



Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης:

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

**Απομόνωση, ταυτοποίηση και ποσοτικός προσδιορισμός
της γ-ορυζανόλης και της πολικής γ-ορυζανόλης από
παραπροϊόντα μύλευσης του ρυζιού (*Oryza sativa L.*)**



Σπηλιοπούλου Μαρία

Φαρμακοποιός

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Σοφία Μητάκου

Αθήνα

2017

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Φαρμακευτική Σχολή

Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων

Μεταπτυχιακό πρόγραμμα:

Απομόνωση-Ανάπτυξη-Παραγωγή και έλεγχος Βιοδραστικών Φυσικών Προϊόντων

Τίτλος Εργασίας:

Απομόνωση, ταυτοποίηση και ποσοτικός προσδιορισμός γ-ορυζανόλης και της πολικής γ-ορυζανόλης από παραπροϊόντα μύλευσης του ρυζιού (*Oryza sativa* L.)

Φοιτήτρια: Σπηλιοπούλου Μαρία

A. M: 131512

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: κα. Σοφία Μητάκου

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Καθηγητής Κος. Αλέξιος-Λέανδρος Σκαλτούνης

Καθηγήτρια Κα. Σοφία Μητάκου

Αναπληρωτής Καθηγητής Κος Νεκτάριος Αληγιάννης

Ευχαριστίες

Ευχαριστώ τα μέλη της Τριμελούς Επιτροπής της διπλωματικής εργασίας για το μεταπτυχιακό δίπλωμα ειδίκευσης, τον Καθηγητή κ. Αλέξιο-Λέανδρο Σκαλτσούνη, τη Καθηγήτρια κα Σοφία Μητάκου και τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Νεκτάριο Αληγιάννη για την κριτική ανάγνωση του κειμένου, τον πολύτιμο χρόνο που διέθεσαν και την τιμή που μου έκαναν να συμμετάσχουν στην τριμελή εξεταστική επιτροπή της διπλωματικής μου εργασίας.

Ευχαριστώ τον Καθηγητή κ. Αλέξιο-Λέανδρο Σκαλτσούνη που με δέχτηκε στο Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, για τις συμβουλές του και τις ευκαιρίες επιστημονικής κατάρτισης που μου παρείχε.

Ευχαριστώ την καθηγήτρια κα Σοφία Μητάκου υπεύθυνη της παρούσας εργασίας, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε στην εκπόνηση του θέματος, για τις συμβουλές της και τις επισημάνσεις της κατά την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής εργασίας και τη βοήθεια της στη συγγραφή της εργασίας.

Ευχαριστώ θερμά την ΕΔΙΠ κα. Μαρία Χαλαμπαλάκη για την πολύτιμη καθοδήγηση για την ολοκλήρωση της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας και την ηθική υποστήριξη της καθ' όλη την διάρκεια της προσπάθειας αυτής, καθώς και την πολύτιμη βοήθεια στη συγγραφή και τη διόρθωση της εργασίας.

Ευχαριστώ τον διδάκτορα Vincent Briudes για τη συνεχή καθοδήγηση, την απλόχερη μετάδοση γνώσεων και την πολύτιμη βοήθειά του στην πραγματοποίηση των αναλυτικών πειραμάτων, στο στάδιο της απομόνωσης και για τη λήψη και την ερμηνεία των φασμάτων μάζας.

Ευχαριστώ το διδάκτορα Αποστόλη Αγγελή για την πολύτιμη βοήθεια στην πραγματοποίηση των πειραμάτων CPC και την βοήθεια του στο στάδιο της απομόνωσης και της ερμηνείας των φασμάτων NMR.

Ευχαριστώ την εταιρεία Agrino (EV. GE. PISTIOLAS S.A.) για την παραχώρηση των δειγμάτων της παρούσας εργασίας.

Ευχαριστώ τους διδάκτορες Παναγιώτη Σταθόπουλο, Νικιτία Μέξια, Nicola Gaboriaud, Νάντια Βουγογιαννοπούλου, Job Tchoumtchoua για την απλόχερη μετάδοση γνώσεων.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Θεοδώρα, το Δημήτρη, τη Μαριλένα, τη Ροζαλία, τη Νέλλη, την Έλενα, τη Βασούλα και το Μιχάλη για τη βοήθεια και το ευχάριστο κλίμα στο εργαστήριο.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένεια μου για την αδιάκοπη υποστήριξή τους αυτά τα τρία χρόνια, τους φίλους μου και δικούς μου ανθρώπους για τη συμπαράσταση και την υπομονή τους.

Σπηλιοπούλου Μαρία

Αθήνα, 2017

Περιεχόμενα

Περίληψη	8
Abstract	9
Γενικό μέρος	10
1 Εισαγωγή.....	11
1.1 Βοτανική περιγραφή.....	16
1.2 Ποικιλίες του <i>O.sativa</i>	20
2 Επεξεργασία του ρυζιού.....	24
2.1 Διαδικασία παραγωγής ρυζιού.....	24
2.2 Προϊόντα ρυζιού	28
2.3 Οικονομικό ενδιαφέρον παραγωγής ρυζελαίου (RBO)	32
3 Φυτοχημική μελέτη του ρυζιού.....	33
3.1 Βιοδραστικά συστατικά των εξωτερικών στρωμάτων του ρυζιού	35
3.1.1 Φλαβονοειδή.....	37
3.1.2 Ανθοκυάνες και Προανθοκυανιδίνες	37
3.1.3 Φυτικό οξύ.....	38
3.1.4 Φαινολικά οξέα	39
3.1.5 Τοκοτριενόλες & Τοκοφερόλες	40
3.1.6 Φυτοστερόλες	41
3.1.7 γ-Ορυζανόλη.....	42
3.2 Χημική Σύσταση ρυζελαίου (RICE BRAN OIL).....	46
4 Φαρμακολογικές ιδιότητες γ-ορυζανόλης.....	50
4.1 Δράση έναντι του οξειδωτικού στρες.....	50
4.2 Αντιελκωτική δράση	51
4.3 Αντιφλεγμονώδης δράση.....	51
4.4 Αντιαλλεργική δράση.....	52
4.5 Αντιμικροβιακές ιδιότητες	53
4.6 Αντικαρκινικές ιδιότητες.....	53
4.7 Δράση στο μετεμμηνοπαυσιακό σύνδρομο.....	54
4.8 Δράση έναντι της οστεοπόρωσης.....	54
4.9 Δράση έναντι του υποθυρεοειδισμού.....	55
4.10 Προστατευτική δράση έναντι του μεταβολικού συνδρόμου.....	55
4.10.1 Αντιδιαβητική δράση	56
4.10.2 Αντιυπερλιπιδαιμική δράση	56
4.10.3 Καρδιοπροστατευτική δράση	58

4.11	Άλλες δράσεις της γ-ορυζανόλης.....	58
Προσωπικά αποτελέσματα		59
5	Ειδικό μέρος Α.....	60
5.1	Οργανολογία-Υλικά-Τεχνικές	60
5.1.1	Αναλυτικές Χρωματογραφικές μέθοδοι.....	60
5.1.2	Παρασκευαστικές χρωματογραφικές μέθοδοι	60
5.1.3	Φασματοσκοπικές και Φασματομετρικές Μέθοδοι	61
5.2	Δειγματοληψία και εκχύλιση του πίτουρου	63
5.3	Ανάπτυξη μεθόδου HPLC-DAD για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των RBO δειγμάτων 67	
5.3.1	Ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου έκλουσης	68
5.3.2	Επικύρωση της μεθόδου	75
5.3.3	Ποιοτικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων	77
5.3.4	Υπολογισμός της συγκέντρωσης της ΡγOR και της γOR στο πίτουρο και τον φλοιό	79
6	Ειδικό μέρος Β	86
6.1	Εκχύλιση πίτουρου σε μεγάλη κλίμακα και παραλαβή RBO	87
6.2	Υγρή-υγρή εκχύλιση του RBO και παραλαβή του TOC	89
6.3	Κλασματοποίηση του εμπλουτισμένου κλάσματος TOC με χρωματογραφία κατ' αντιρροή (CPC) 90	
6.3.1	Επιλογή της κατάλληλης σειράς διαφασικών συστημάτων:	90
6.3.2	Εφαρμογή της μεθόδου CPC	96
6.3.3	CPC ανάλυση του εμπλουτισμένου κλάσματος ΡγOR και γOR (TOC) σε παρασκευαστική κλίμακα (prep CPC).....	100
6.4	Απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών από τα κλάσματα του CPC.	104
6.4.1	Απομόνωση ενώσεων της γ-ορυζανόλης (γOR) με τη χρήση semi prep-HPLC	104
6.4.2	Απομόνωση ενώσεων της πολικής γ-ορυζανόλης (ΡγOR).....	107
6.5	Φασματομετρικά & φασματοσκοπικά δεδομένα της γOR και της ΡγOR.....	122
6.5.1	LC-MS , HRMS & HRMS/MS ανάλυση του RBO και των κλασμάτων	122
6.5.2	Ταυτοποίηση των ενώσεων της γ-ορυζανόλης (γOR) και της πολικής γ-ορυζανόλης (ΡγOR) 130	
6.5.3	Ταυτοποίηση 6 ενώσεων της γ-ορυζανόλης (γOR)	132
6.5.4	Ταυτοποίηση 6 ενώσεων της πολικής γ-ορυζανόλης (ΡγOR).....	164
6.6	Συμπεράσματα-προοπτικές	191
Παράρτημα.....		194
Βιβλιογραφία		226

Συντομεύσεις

ACN	ακετονιτρίλιο
APCI	Χημικός Ιονισμός υπό Ατμοσφαιρική Πίεση
Aratio	Λόγος εμβαδού κορυφής αναλύτη προς εσωτερικό πρότυπο (A/Ais)
br	Ευρεία κορυφή
¹³ C NMR	Πείραμα πυρήνων άνθρακα 13 πυρηνικού και μαγνητικού συντονισμού
CD ₃ OD	Δευτεριωμένη μεθανόλη
CDCI ₃	Δευτεριωμένο χλωροφόρμιο
CHCl ₃	Χλωροφόρμιο
CPC	Χρωματογραφία Φυγόκεντρου Κατανομής κατ' Αντιρροή
d	Διπλή κορυφή
DAD	Ανιχνευτής Συστοιχίας Φωτοδιοδίων
dd	διπλή διπλή κορυφή
ddd	διπλή διπλή διπλή κορυφή
ESI	Ηλεκτροψεκασμός
EtOAc	Οξικός αιθυλεστέρας
EtOH	Αιθανόλη
FFAs	ελεύθερα λιπαρά οξέα
¹ H NMR	Πείραμα NMR πρωτονίου πυρηνικού και μαγνητικού συντονισμού
HPLC	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης
HRMS	Φασματομετρία Μάζας Υψηλής Ακρίβειας
Hz	Hertz
iPrOH	ισοπροπανόλη
IS	εσωτερικό πρότυπο
<i>J</i>	σταθερά σύζευξης
Kvalues	συντελεστής κατανομής
LOD	όριο ανίχνευσης
LOQ	όριο ποσοτικοποίησης
m-	μετα-
m	Πολλαπλή κορυφή
m/z	αναλογία μάζας προς φορτίο
MeOH	Μεθανόλη
MS	Φασματομετρία Μάζας
n-Hex	Κανονικό εξάνιο
NMR	Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός
o-	ορθο-
p-	παρα-
prep TLC	Παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας
PyOR	πολική γ-ορυζανόλη
q	Τετραπλή κορυφή
R	εύρος
r ²	συντελεστής συσχέτισης
RP	Αντίστροφης φάσης
rpm	μονάδα μέτρησης στροφορμής

RSD	Σχετική τυπική απόκλιση
Rt	χρόνος συγκράτησης
s	Απλή κορυφή σε φάσματα πρωτονίου NMR
semi-prep-HPLC	Ημι-παρασκευαστική HPLC
S _F	όγκος στήλης CPC
SFC-DAD-MS	Χρωματογραφία Υπερκρίσιμων υγρών συνδεδεμένη σε σειρά με ανιχνευτή συστοιχίας διόδων και φασματογράφο μάζας
t	τριπλή κορυφή
TLC	Χρωματογραφία Λεπτής στιβάδας
U/L	πάνω/κάτω φάση ενός διφασικού συστήματος
UHPLC	Υγρή Χρωματογραφία Υπερύψηλης Απόδοσης
UHPLC-HRMS	Υγρή Χρωματογραφία Υπερύψηλης Απόδοσης συνδεδεμένη με υβριδικό φασματογράφο μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας
UV	Υπεριώδες
Vis	ορατό
XIC	Χρωματογράφημα εξαγόμενων ιόντων
γOR	γ-ορυζανόλη
δ	χημική μετατόπιση

Περίληψη

Το πίτουρο είναι το σημαντικότερο υποπροϊόν της επεξεργασίας του ρυζιού από την εκχύλιση του οποίου προκύπτει το ρυζέλαιο (Rice Bran Oil - RBO). Το RBO είναι πλούσιο σε βιοδραστικές ενώσεις και ω-6 λιπαρά οξέα αλλά ξεχωρίζει από τα υπόλοιπα φυτικά έλαια χάρη στην υψηλά ποσοστά γ-ορυζανόλης, η οποία εμφανίζει πληθώρα φαρμακολογικών ιδιοτήτων. Αν και θεωρείται ως ένα από τα έλαια με τις περισσότερες ευεργετικές ιδιότητες στον κόσμο, δεν είναι ευρέως γνωστό. Η πολύπλοκη διαδικασία εξευγενισμού που το καθιστά ίσως πιο ακριβό σε σχέση με άλλα φυτικά έλαια μπορεί να αντισταθμιστεί από την σωστή εκμετάλλευση και την ανακύκλωση των υποπροϊόντων και των αποβλήτων που προκύπτουν από την επεξεργασία του ρυζιού με ευεργετικά οφέλη για το περιβάλλον και την υγεία. Από το 2009 και μετά παρατηρείται μία συνεχώς αυξανόμενη ζήτηση του RBO από το αγοραστικό κοινό κυρίως της Ασίας, γεγονός που καθιστά το RBO και τα υποπροϊόντα του ρυζιού, μία προσοδοφόρα επιχειρηματική ευκαιρία. Αυξημένο είναι και το ενδιαφέρον της επιστημονική κοινότητας παγκοσμίως για τις ευεργετικές για την υγεία ιδιότητες των συστατικών του.

Στα πλαίσια αυτής της εργασίας αναπτύχθηκε μέθοδος ποσοτικοποίησης της γ-ορυζανόλης (**γOR**) και της πολικής γ-ορυζανόλης (**ΡγOR**) στα παραπροϊόντα μύλευσης του ρυζιού που θα επιτρέπει την επιλογή της πιο πλούσιας πρώτης ύλης για τη μετέπειτα απομόνωση των επιμέρους ενώσεων τους με τη χρήση διαφόρων χρωματογραφικών τεχνικών.

Μελετήθηκαν συνολικά 12 δείγματα -δέκα δείγματα πίτουρου και δύο δείγματα φλοιού- τα οποία είναι υποπροϊόντα της επεξεργασίας του ρυζιού. Προήλθαν από την αποφλοιώση και τα διάφορα στάδια της μύλευσης του λευκού και κίτρινου (parboiled) ρυζιού της ποικιλίας Gladio και του λευκού ρυζιού της ποικιλίας Ronaldo. Από τα δείγματα παρασκευάστηκαν τα εκχυλίσματα ρυζελαίου και φλοιού, τα οποία αναλύθηκαν με την τεχνική HPLC. Με την ανάπτυξη κατάλληλης μεθόδου και την κατασκευή καμπύλης αναφοράς για την γOR και την ΡγOR πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός των ομάδων αυτών στο πίτουρο και στο φλοιό.

Με βάση τα αποτελέσματα του ποσοτικού προσδιορισμού επιλέχθηκε το πιο πλούσιο δείγμα σε γOR & ΡγOR. Το δείγμα αυτό εκχυλίστηκε και με την ανάπτυξη κατάλληλης μεθόδου στην Χρωματογραφία Κατανομής με Φυγοκέντριση (CPC) η ΡγOR κλασματώθηκε και διαχωρίστηκε από τη γOR. Με την εφαρμογή επιπλέον χρωματογραφικών τεχνικών στα κλάσματα του CPC απομονώθηκαν μέσω semi prep-HPLC έξι ενώσεις της γOR και μέσω SFC-MS απομονώθηκαν έξι ενώσεις της

PyOR. Η ταυτοποίηση των απομονωμένων ενώσεων έγινε με εφαρμογή φασματοσκοπικών (1D & 2D NMR), φασματομετρικών (HRMS) μεθόδων και μελέτη των βιβλιογραφικών δεδομένων.

Abstract

The oil deriving from rice bran, namely rice bran oil (RBO), is one of the major by-product of the rice milling industry. RBO represents a rich source of ω -6 FFA and bioactive phytochemicals with pharmaceutical and cosmetic interest such as γ -oryzanol (γ OR). γ -Oryzanol is of particular significance because it is abundant in RBO compared to other vegetable oils. Although RBO is considered to be one the healthiest oils in the world, it does not reach its full production potential. RBO is more expensive than other vegetable oils due to its complex refining process. However, the correct management of the wastes in the rice industry can reduce that cost. The exploitation and recycling of the main rice byproducts and residues is an economical opportunity that has benefits for the environment as well. Apart from the commercial part of the matter, the scientific community is interested more and more about the beneficial for the human health activities of RBO's constituents, and especially γ OR.

The aim of the present study is, on the one hand, the determination and quantification of both γ OR and PyOR components in rice bran and rice husk and on the other hand, the isolation and structural elucidation of their individual constituents.

Initially, 12 different samples of rice bran and rice husk, of different varieties (Gladio and Ronaldo) obtained throughout the various steps of the milling process, with or without the parboiling technique (PB), were extracted independently twice via ultrasonic extraction using EtOAc. EtOAc was the optimum solvent for the extraction of both γ OR and PyOR. The obtained RBO extracts yielded up to 25% (w/w). Additionally, a targeted HPLC-UV method was developed for the separation and quantification of γ OR & PyOR in bran/husk (w/w). Taking into accounts the results of the quantification, Gladio parboiled 1st step bran (Gpb1) was chosen for the isolation of γ OR's & PyOR's individual constituents, which is the second goal of the present study. The fractionation of PyOR and its separation from γ OR was succeeded via CPC. The isolation of γ OR's & PyOR's constituents demands the implementation of more than one chromatographic techniques. γ OR's individual constituents were isolated via semi prep-HPLC whereas PyOR's individual constituents were isolated via prep- SFC-MS. Their structural elucidation was accomplished by combining LC-HRMSⁿ and NMR (1D& 2D) data.

Γενικό μέρος

1 Εισαγωγή

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν αρχικά, ο ποιοτικός και ποσοτικός έλεγχος του πίτουρου από διαφορετικά στάδια της μύλευσης του ρυζιού με σκοπό την ανάπτυξη μεθόδου που θα επιτρέπει την εύρεση της πιο πλούσιας πρώτης ύλης σε ΡγΟΡ και γΟΡ. Δευτερευόντως, στόχος αυτής της εργασίας ήταν η εκμετάλλευση του πιο πλούσιου δείγματος σε ΡγΟΡ και γΟΡ για την κλασμάτωση της ΡγΟΡ και τον διαχωρισμό της από τη γΟΡ μέσω εκχύλισης κατ' αντιρροή, με σκοπό τελικά, την απομόνωση και την ταυτοποίηση των ενώσεων της ΡγΟΡ και γΟΡ.

Το ρύζι θεωρείται ότι κατάγεται από την Ινδία ή τη Νοτιοανατολική Ασία. Καλλιεργείται στην Κίνα ήδη από το 2.800 π.Χ. Από την Ασία διαδόθηκε στην Αφρική, το 700 μ.Χ. η καλλιέργειά του επεκτάθηκε στην Ευρώπη και το 16ο αι. στις Η.Π.Α. Σήμερα καλλιεργείται σ' όλες σχεδόν τις τροπικές και υποτροπικές χώρες και σε πολλές χώρες της εύκρατης ζώνης. Η καλλιέργειά του εκτείνεται μέχρι τον 48° παράλληλο στο βόρειο ημισφαίριο και μέχρι τον 35° παράλληλο στο νότιο ημισφαίριο. Εκτιμάται ότι υπάρχουν πάνω από 40.000 καλλιεργήσιμων ποικιλιών παγκοσμίως [1].

Αν και ο αρχαίος βοτανολόγος Θεόφραστος (370-285 π.Χ.), ο φυσιολόγος Διοσκουρίδης (1ος αιώνας μ.Χ.) και ο γιατρός Γαληνός (130-200 μ.Χ.) είχαν μελετήσει αρκετά το ρύζι ως φυτό, προϊόν διατροφής και μέσο θεραπείας ασθενειών του πεπτικού συστήματος, οι πρόγονοί μας είχαν δείξει γενικά λίγο ενδιαφέρον και προσοχή για την καλλιέργεια αυτή, ίσως επειδή η διατροφή τους στηριζόταν σε προϊόντα παραγόμενα από άλλα σιτηρά.

Στην Ελλάδα άρχισε να καλλιεργείται από τα χρόνια του μεσαίωνα. Από τη 10ετία του 1950, που άρχισε να αυξάνεται σιγά-σιγά η κατανάλωση του ρυζιού στη χώρα μας ξεκίνησε το ενδιαφέρον της πολιτείας για την καλλιέργεια αυτή, η οποία οδήγησε το 1958 στη δημιουργία τμήματος για την έρευνα του ρυζιού στο Ινστιτούτο Σιτηρών. Σημαντικότερες Περιφερειακές Ενότητες όπου παράγεται ρύζι είναι οι Σερρών, Θεσσαλονίκης, Αιτωλοακαρνανίας, Φθιώτιδας, Καβάλας, Λακωνίας και Ιωαννίνων [2],[3].

Το ρύζι παίζει καθοριστικό ρόλο στην υγεία του ανθρώπου με πολλούς τρόπους. Καλλιεργείται σε περισσότερες από 100 χώρες και η ευημερία για περισσότερους από 1 δισεκατομμύριο ανθρώπους εξαρτάται από αυτό. Από τα 475 εκατομμύρια τόνους μυλεμένου ρυζιού που παράγονται παγκοσμίως το 85% καταναλώνεται από

τους ανθρώπους και το υπόλοιπο 15% χρησιμοποιείται ως ζωοτροφή ή απορρίπτεται ως απόβλητο.

Το ρύζι καταναλώνεται κυρίως ως λευκό ρύζι με αποτέλεσμα να έχει χάσει τα θρεπτικά συστατικά που βρίσκονται στο πίτουρο. Το πίτουρο του ρυζιού είναι μια πλούσια πηγή λιπιδίων, πρωτεϊνών, διαλυτών και αδιάλυτων διαιτητικών ίνων, σιδήρου, βιταμινών Β, και μια σειρά μικρών μορίων (π.χ., φυτοστερόλες, φαινολικά οξέα, και αντιοξειδωτικά) και μπορεί να βοηθήσει στην πρόληψη, τον έλεγχο και την αντιμετώπιση ασθενειών [4]. Λόγω της ευρείας κατανάλωσης του ρυζιού, η κατανόηση της σημασίας των θρεπτικών συστατικών που υπάρχουν στο πίτουρο του ρυζιού θα παίξει καθοριστικό ρόλο στην αντιμετώπιση παγκόσμιων προβλημάτων που αφορούν τον υποσιτισμό 870 εκατομμυρίων ανθρώπων (1 στους 8) και την παχυσαρκία σε μισό δις ανθρώπους (1 στους 10) με κοινό παρονομαστή και στις 2 περιπτώσεις τη μη λήψη απαραίτητων θρεπτικών συστατικών [4].

Το πίτουρο αποτελεί αντικείμενο έρευνας για την αντιμετώπιση τόσο χρόνιων όσο και μολυσματικών ασθενειών. Η συντριπτική πλειοψηφία της έρευνας έχει επικεντρωθεί στην πρόληψη και τον έλεγχο των χρόνιων ασθενειών, σύμφωνα με την οποία το καστανό ρύζι και το πίτουρο ρυζιού μειώνουν τον κίνδυνο διαβήτη τύπου 2, ρυθμίζουν το μεταβολισμό των λιπιδίων, το μεταβολικό σύνδρομο, τις καρδιαγγειακές παθήσεις, και επιδεικνύουν κυτταροτοξική δράση. Η επίδραση των συστατικών του πίτουρου, στην ανοσολογική απάντηση για την προστασία εναντίον εντερικών παθογόνων όπως η σαλμονέλα, διευρύνουν τους πιθανούς τρόπους αντιμετώπισης λοιμωδών ασθενειών [4].

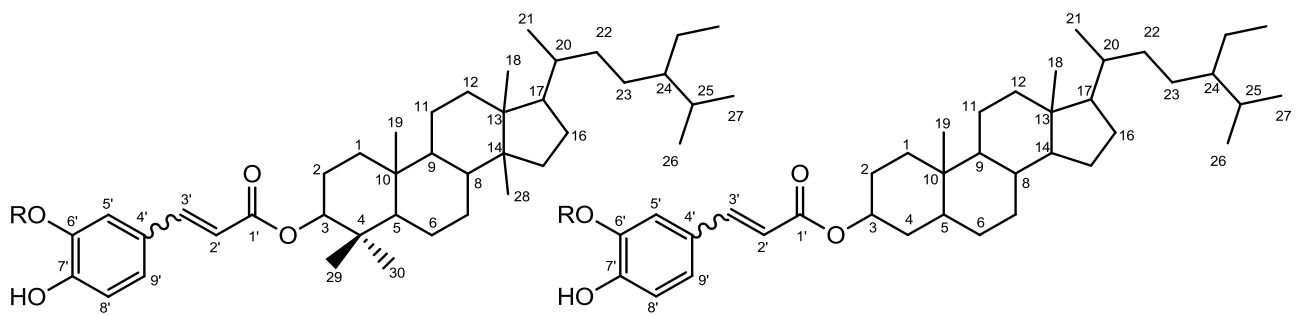
Σύμφωνα με το Υπουργείο Γεωργίας των Ηνωμένων Πολιτειών (USDA), η παγκόσμια αύξηση της εγχώριας κατανάλωσης βρώσιμων φυτικών ελαίων αυξήθηκε κατά περίπου 19% μεταξύ 2008 και 2011, με το φοινικέλαιο, το έλαιο σόγιας, και το έλαιο κράμβης να καταναλώνονται περισσότερο από άλλα φυτικά έλαια.

Τα φυτικά έλαια είναι φυσικά προϊόντα που αποτελούνται ουσιαστικά από λιπίδια και συνήθως λαμβάνονται από σπόρους, ξηρούς καρπούς, ή φρούτα διαφόρων φυτών, χρησιμοποιώντας διαφορετικές μεθόδους εκχύλισης. Τα βρώσιμα φυτικά έλαια αποτελούν τη βασική πηγή λιπαρών οξέων, συστατικά απαραίτητα στον ανθρώπινο οργανισμό για την αποτελεσματική λειτουργία και συντήρηση του σώματος (π.χ διατήρηση της δομής των κυτταρικών μεμβρανών, συμμετοχή σε διαδικασίες παραγωγής ορμονών και παροχή ενέργειας, συμπεριλαμβανομένης της αντιοξειδωτικής και αντιφλεγμονώδους δράσης).

Αντίθετα με τα περισσότερα φυτικά έλαια, το έλαιο από το πίτουρο του ρυζιού ή ρυζέλαιο (**RBO - Rice Bran Oil**) δεν εξάγεται από τους σπόρους ή ξηρούς καρπούς όπως το σογιέλαιο ή το αραχιδέλαιο αντίστοιχα. Το RBO λαμβάνεται από το πίτουρο, ένα παραπροϊόν της διαδικασίας μύλευσης των κόκκων ρυζιού. Από το πίτουρο παράγεται κατά μέσο όρο 20-25% RBO, ανάλογα με τη μέθοδο μύλευσης, τη γεωγραφική προέλευση και την ποικιλία ρυζιού, παράμετροι που μπορεί να επηρεάσουν την ποιότητα και την θρεπτική αξία του πίτουρου. Λόγω του χαμηλού κόστους και της υψηλής θρεπτικής του αξίας, το πίτουρο χρησιμοποιείται συχνά ως ζωοτροφή.

Το αυξανόμενο ενδιαφέρον για την κατανάλωση τροφών με αντιοξειδωτικές ιδιότητες έχει οδηγήσει την επιστημονική έρευνα στην αναζήτηση νέων φυτικών πηγών βιοδραστικών ενώσεων. Σε αυτό το πλαίσιο, το RBO αναδύεται ως φυσική εναλλακτική λύση λόγω της αισθητής περιεκτικότητάς του σε φυτοχημικές ενώσεις, όπως η βιταμίνη E (α-, β-, γ-, δ- τοκοφερόλες και α-, β-, γ-, δ- τοκοτριενόλες) και η γ-ορυζανόλη, που παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση και πιθανά οφέλη για την υγεία [5].

Το RBO είναι ένα από τα συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα μαγειρικά έλαια στην Ασία, και το κύριο παραπροϊόν της μύλευσης στη βιομηχανία του ρυζιού. Αποτελεί προϊόν με μεγάλο οικονομικό ενδιαφέρον, καθ' ότι το RBO αλλά και υποπροϊόντα αυτού βρίσκουν εφαρμογή στη διατροφή, τη φαρμακευτική βιομηχανία και τη βιομηχανία καλλυντικών. Ειδικά, η γ-ορυζανόλη έχει ιδιαίτερη σημασία επειδή είναι άφθονη στο RBO σε σύγκριση με άλλα φυτικά έλαια. Η γ-ορυζανόλη απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1954 από τους Kaneko και Tsuchiya [6] από το ασαπνωποίητο κλάσμα του πίτουρου ως κρυσταλλική ουσία. Αρχικά, θεωρήθηκε ότι επρόκειτο για μία ένωση που ονομάστηκε ορυζανόλη (oryzanol), από τη βοτανική ονομασία του είδους του ρυζιού *Oryza sativa*. Τρία χρόνια μετά, οι Shimizu et al. [7], χρησιμοποιώντας μια διαφορετική μέθοδο εκχύλισης, ανακάλυψε ότι η γ-ορυζανόλη δεν ήταν μια ενιαία οντότητα και πρότεινε ότι αποτελείται από τρεις εστέρες φερουλικού οξέος με τριτερπενικές αλκοόλες, οι οποίες ορίστηκαν ως oryzanol A, B, και C. Στη συνέχεια, η ίδια επιστημονική ομάδα προσδιόρισε την oryzanol A ως Cycloartenyl ferulate, και το 1958 η oryzanol C προσδιορίστηκε ως 24-methylene cycloartanyl ferulate. Τέλος, η oryzanol B βρέθηκε να είναι ένα μίγμα oryzanol A και C. Από τότε, διάφορες μελέτες σχετικά με τη σύνθεση της γ-ορυζανόλης, επέτρεψαν την αναγνώριση περισσότερων από 23 εστέρες [8] φερουλικού οξέος με αλκοόλες τριτερπενίου και με στερόλες, οι βασικές δομές των οποίων φαίνονται στην παρακάτω εικόνα (**Σφάλμα! Το αρχείο ροέλευσης της αναφοράς δεν βρέθηκε.**) [9].



Εικόνα 1-1 φερουλικοί εστέρες τριτερπενικών αλκοολών και φερουλικοί εστέρες φυτοστερολών

Δεδομένου ότι το RBO είναι ένα σημαντικό παραπροϊόν στην βιομηχανία ρυζιού, έχει δοθεί μεγάλη προσοχή στη βελτιστοποίηση της παραγωγής του και την επιλογή του καταλληλότερου τρόπου εξευγενισμού. Ο εξευγενισμός μέσω της αποκομμίωσης και της αποκήρωσης του ακατέργαστου RBO απομακρύνει μικρό ποσοστό γ-ορυζανόλης (1-6%), ενώ ο χημικός εξευγενισμός με αποτέλεσμα τη σαπωνοποίηση απομακρύνει τη γ-ορυζανόλη σε ποσοτό 93-95 %, η οποία συγκεντρώνεται στο υπόλειμμα αυτής της διαδικασίας που ονομάζεται **soapstock**. Αυτό το υπόλειμμα (**soapstock**) είναι αρκετά πολύτιμο, δεδομένου ότι είναι η πλουσιότερη πηγή γ-ορυζανόλης και ίσως το πιο σημαντικό παραπροϊόν της επεξεργασίας ρυζιού [10], [9].

Η γ-ορυζανόλη παρουσιάζει γενικά ένα ευρύ φάσμα ευεργετικών δράσεων στην υγεία, συμπεριλαμβανομένων της αντικαρκινικής, αντιφλεγμονώδους, αντι-υπερλιπιδαιμικής, αντιδιαβητικής, και νευροπροστατευτικής, οι οποίες αποδίδονται κυρίως στην αντιοξειδωτική της δράση. Αυτό το πλειοτροπικό βιολογικό προφίλ της γ-ορυζανόλης μαζί με την υψηλή διαθεσιμότητα της στα βιομηχανικά παραπροϊόντα, έχει συμβάλει σημαντικά στην αύξηση του ενδιαφέροντος από τον ακαδημαϊκό χώρο και τη βιομηχανία, ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια.[9]

Εκτός από τη γ-ορυζανόλη, υπάρχει στο ρυζέλαιο ακόμα μία χημική ομάδα, η πολική γ-ορυζανόλη, που αποτελείται από υδροξυλιωμένους φερουλικούς εστέρες, και έχει μελετηθεί ελάχιστα. Αναφέρεται η ύπαρξή της για πρώτη φορά το 2003 από τους Fang et al. [8] ενώ απομονώνονται για πρώτη φορά το 2005 από τους Luo et al. [11] τρεις ενώσεις της πολικής γ-ορυζανόλης με τη μέθοδο της παρασκευαστικής HPLC κανονικής φάσης και μελετάται η κυτταροτοξική της δράση. Το 2011, απομονώνεται η πολική γ-ορυζανόλη για πρώτη φορά με τη μέθοδο της χρωματογραφίας κατ'

αντιρροή και ταυτοποιούνται οι κύριες ενώσεις με τη μέθοδο LC-MS από τους Angelis et al. [12].

Η απουσία έως σήμερα δεδομένων για την ακριβή σύσταση της πολικής γ-ορυζανόλης, και τη δράση αυτής της ομάδας ενώσεων, έχει αυξήσει σημαντικά και το επιστημονικό ενδιαφέρον σε σύγκριση με άλλα βρώσιμα φυτικά έλαια, όπως αποδεικνύεται από την αύξηση του αριθμού των αναφορών που δημοσιεύθηκαν μετά το 2000 [5].

1.1 Βοτανική περιγραφή



Εικόνα 1-2 Μορφολογικά χαρακτηριστικά ρυζιού (Πηγή: el.wikipedia.org)

Το ρύζι ανήκει στο γένος *Oryza* της οικογένειας *Poaceae*. Ανήκει στα σιτηρά των θερμών κλιμάτων και είναι φυτό μεγάλης οικονομικής σημασίας παγκοσμίως. Το γένος *Oryza* περιλαμβάνει 20 είδη, ιθαγενή των υγρών περιοχών της Αφρικής, Ν. και ΝΑ. Ασίας, Ν. και Κ. Αμερικής και Αυστραλίας. Από τα είδη αυτά καλλιεργούνται κυρίως το *Oryza sativa* L. και σε μικρές εκτάσεις στη Δ. Αφρική το

Oryza glaberrima Steud. (African rice). Είναι γνωστό ως rice (Αγγλία και ΗΠΑ), riz (Γαλλία), reis (Γερμανία), riso (Ιταλία) και arroz (Ισπανία) [13].

Πίνακας 1-1 Συστηματική κατάταξη του *Oryza sativa* L. [14]

APG III Classification	
Regnum	Plantae
Cladus	Angiospermae
Cladus	monocotyledons
Cladus	commelinids
Ordo	Poales
Familia	Poaceae
Subfamilia	Ehrhartoideae
Tribus	Oryzeae
Genus	<i>Oryza</i> L. – rice
Species	<i>Oryza sativa</i> L. – rice

Το ρύζι είναι μονοκότυλο, ποώδες, ετήσιο φυτό, κυρίως αυτογονιμοποιούμενο με μικρό ποσοστό σταυρογονιμοποίησης από 1-4%.

Οι ρίζες του είναι θυσανώδεις, λεπτές, πολλές και επιπόλαιες. Φθάνουν μέχρι βάθος 10 εκατοστών και μόνο ένα μικρό ποσοστό (περίπου 20% των ριζών) φθάνουν σε βάθος 25-30 εκατοστών όταν καλλιεργείται υπό κατάκλυση. Αντίθετα, φυτά που καλλιεργούνται χωρίς κατάκλυση αναπτύσσουν ριζικό σύστημα μέχρι βάθος 100 εκατοστών. Μπορεί να σχηματίσει και εναέριες ρίζες. Το ριζικό σύστημα του ρυζιού αποκτά τη μέγιστη ανάπτυξη του κατά την εποχή της άνθησης των φυτών (Δαλιάνης, 1983:235-309) [15].

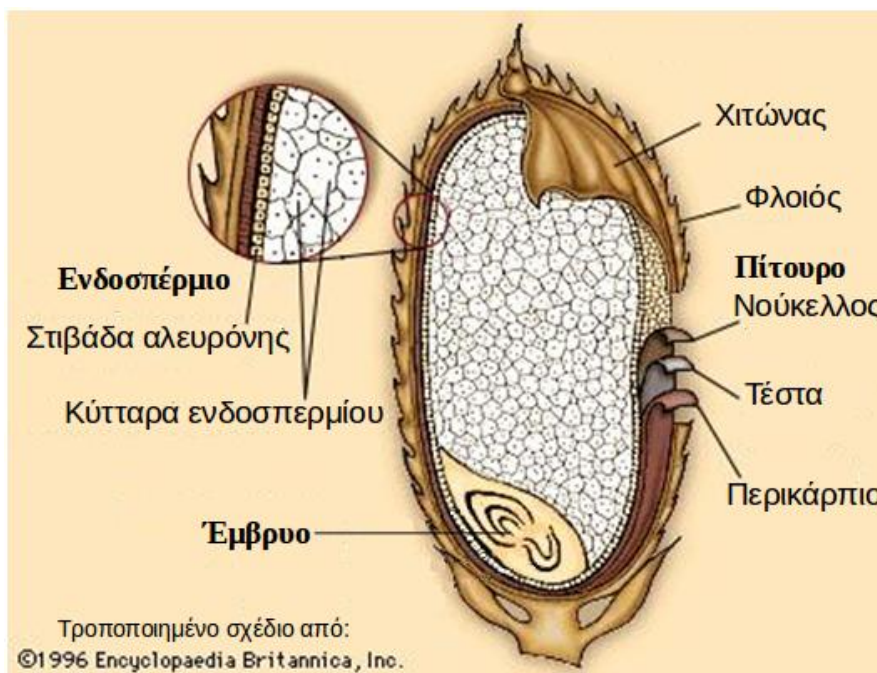
Το στέλεχος του ρυζιού είναι κάλαμος όπως όλων των σιτηρών. Είναι κενό εσωτερικά και αποτελείται από συμπαγείς κόμβους και κοντά μεσογονάτια διαστήματα. Κάθε στέλεχος φέρει 10 έως 23 κόμβους και ισάριθμα μεσογονάτια. Οι πρώιμες ποικιλίες έχουν λιγότερα μεσογονάτια συγκριτικά με τις όψιμες. Το ύψος των φυτών κυμαίνεται συνήθως από 60 έως 180 cm, ανάλογα με την ποικιλία και τις

συνθήκες ανάπτυξης. Υπάρχουν όμως και ποικιλίες ρυζιού στις ασιατικές χώρες που ανάλογα με το σύστημα καλλιέργειας μπορούν να φθάσουν μέχρι και 7 m. Το ρύζι παρουσιάζει ισχυρό αδελφωμα, που κατά κανόνα αρχίζει 40 περίπου μέρες μετά τη σπορά. Τα αδέρφια (δευτερεύοντα και τριτεύοντα στελέχη) εκφύονται από τους κόμβους που βρίσκονται κοντά στην επιφάνεια του εδάφους. Παρά το γεγονός ότι τα αδέρφια εμφανίζονται 40 περίπου μέρες μετά την εμφάνιση του κεντρικού στελέχους η ωρίμανση όλων των ταξιανθιών είναι σχεδόν ταυτόχρονη, σε αντίθεση με τα χειμερινά σιτηρά. Κάθε φυτό ρυζιού έχει συνήθως 4 έως 5 αδέρφια (Παπακώστα-Τασοπούλου, 2008:275- 332) [16].

Από κάθε κόμβο του στελέχους εκφύεται **ένα φύλλο** που αποτελείται από τον κολεό και το έλασμα. Το έλασμα είναι στενό, επίμηκες, τραχύ στην υφή, δύσκαμπτο και ανορθωμένο. Ο κολεός είναι αρκετά επιμήκης και χαρακτηρίζεται από το γεγονός ότι δεν περιβάλλει πλήρως σε όλο του το μήκος το αντίστοιχο τμήμα του στελέχους. Στο σημείο ένωσης του κολεού με το έλασμα σχηματίζεται η «γλωσσίδα» που είναι αιχμηρή και συνήθως δίλοβη και τα «ωτία» (στη βάση του ελάσματος) που είναι συνήθως τριχωτά και έχουν δρεπανοειδές σχήμα. Η γωνία που σχηματίζει το έλασμα των φύλλων με το στέλεχος εξαρτάται από την ποικιλία. Γενικά, το φύλλωμα του ρυζιού είναι περισσότερο ορθότονο συγκριτικά με τα άλλα σιτηρά. Το μέγεθος των φύλλων αυξάνεται προοδευτικά από τη βάση προς την κορυφή. Τα μεγαλύτερα φύλλα είναι τα 3 έως 5 κορυφαία. Οι πρώιμες ποικιλίες συνήθως σχηματίζουν 12 έως 18 φύλλα και οι όψιμες 23 (Δαλιάνης, 1983:235-309) [15].

Η **ταξιανθία του ρυζιού** είναι επάκρια φόβη, μήκους 10 έως 25 cm και τις περισσότερες φορές κάμπτεται κατά το γέμισμα των καρπών (φόβη κύπτουσα). Ο κεντρικός άξονας της φόβης αποτελεί προέκταση του στελέχους. Από τους κόμβους του κεντρικού άξονα της φόβης εκφύονται δευτερεύοντες και από αυτούς τριτεύοντες άξονες, στα άκρα των οποίων αναπτύσσονται μονανθή σταχύδια, πάνω σε μικρούς μίσχους. Από κάθε πλευρά του σταχυδίου υπάρχουν δύο ατελώς αναπτυγμένα λέπυρα. Κάθε φόβη έχει συνήθως 75 έως 150 σταχύδια. Το άνθος του ρυζιού περιβάλλεται από δύο περιβλήματα, τον χιτώνα και τη λεπίδα και αποτελείται από 6 στήμονες (σε αντίθεση με τα άλλα καλλιεργούμενα σιτηρά που έχουν 3), τον ύπερο, που αποτελείται από τη μονόχωρη ωοθήκη, τον βραχύ στύλο και το δισχιδές στίγμα και δύο γλωχίνες στη βάση του υπέρου οι οποίες βοηθούν στο άνοιγμα των περιβλημάτων του άνθους. Το χρώμα του χιτώνα και της λεπίδας είναι αχυρώδες, κίτρινο ή καστανό. Ο ρυθμός ανοίγματος των ανθέων του ρυζιού είναι ταχύς και τα άνθη μπορεί να μείνουν ανοικτά από 20 λεπτά μέχρι και 3 ώρες. Η άνθηση αρχίζει

νωρίς το πρωί, όταν η θερμοκρασία είναι υψηλή και καθυστερεί σημαντικά όταν ο ουρανός συννεφιάζει και πέφτει η θερμοκρασία (Καραμάνος, 1999:248-352) [17].



Ο **κόκκος του ρυζιού** είναι καρύοψη και περιβάλλεται από τον **φλοιό** που αποτελείται από 2 μέρη, τον χιτώνα και τη λεπίδα τα οποία ταυτόχρονα καλύπτουν και προστατεύουν τον κόκκο. Ο φλοιός αντιστοιχεί στο 20% περίπου του βάρους του κόκκου, αν και αναφέρονται τιμές από 16 έως 28%. Το ρύζι υπό τη μορφή αυτή είναι γνωστό με τη διεθνή ονομασία paddy. Ο αποφλοιωμένος σπόρος του ρυζιού είναι γνωστός με το όνομα καστανό ρύζι (διεθνώς cargo) και αποτελείται από το **πίτουρο**, το αμυλώδες ενδοσπέρμιο και το **έμβρυο**. Στο εσωτερικό του φλοιού και γύρω από το ενδοσπέρμιο διακρίνονται τρεις στιβάδες, το περικάρπιο (pericarp) (10μm), η **τέστα** (testa) ή σπερμόδερμα (0,5μm) και ο **νούκελλος** (nucellar tissue) (2,5μm) που συγκροτούν το **πίτουρο**. Μετά τις τρεις στιβάδες εμφανίζεται το **έμβρυο** (ή φυτό), το οποίο είναι πολύ μικρό και εντοπίζεται σε μία κοιλιακή περιοχή στη βάση του καρπού. Το **έμβρυο** είναι το πιο σημαντικό μέρος, διότι είναι απαραίτητο για την αναπαραγωγή. Αποτελείται από το πτερίδιο με το κολεόπτιλο που το περιβάλλει, από το ριζίδιο με την κολεόρριζα που το περιβάλλει, από το υποτυπώδες υποκοτύλιο ή μεσοκοτύλιο στο οποίο βρίσκονται οι καταβολές των δευτερογενών εμβρυακών ριζών και το ασπίδιο. Το **ενδοσπέρμιο** αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος του σπόρου, είναι σχετικά σκληρό και το χρώμα του στις καλλιεργούμενες ποικιλίες είναι συνήθως λευκό ή ελαφρώς κιτρινοκαστανό (Δαλιάνης,1983:235-309) [15]. Το ενδοσπέρμιο αποτελείται από την στοιβάδα της αλευρόνης και το κυρίως ενδοσπέρμιο. Η στοιβάδα της αλευρόνης περικλείει το κυρίως ενδοσπέρμιο, έχει πάχος από μία έως

πέντε κυτταρικές στοιβάδες και διαφέρει σε μορφολογία και λειτουργία από το ενδοσπέρμιο. Είναι πιο λεπτή στη ράχη του κόκκου από ότι στην «κοιλιά» του, και πιο λεπτή στα κοντόσπερμα ρύζια σε σχέση με τα μακρύσπερμα. Τα κύτταρα του ενδοσπερμίου έχουν λεπτά τοιχώματα και στοιβάζονται με αμυλοπλάστες που περιέχουν σύνθετους κόκκους αμύλου, οι οποίοι είναι πολυεδρικοί με διάμετρο 3-9 μμ. Τα κρυσταλλικά και μικρά σφαιρικά πρωτεϊνικά συστατικά, διαμέτρου 0,5-4 μμ, εντοπίζονται στη στοιβάδα της υποαλευρόνης και σε όλο το ενδοσπέρμιο. Το ενδοσπέρμιο έχει χρώμα λευκό και μπορεί να έχει υαλώδη ή θαμπή όψη. Η τυπική κατά βάρος κατανομή είναι: περικάρπιο 1-2%, αλευρόνη- νούκελλος και τέστα 4-6%, έμβρυο 1%, σκούτελος 1.5-2% και ενδοσπέρμιο 90-91%. Το ρύζι από τα δημητριακά είναι το μοναδικό που περιέχει μεγάλη περιεκτικότητα κυτταρίνης [18], [19], [20].

1.2 Ποικιλίες του *O.sativa*

Στο είδος *Oryza sativa* διακρίνονται δύο κύρια υποείδη (subspecies, "**subsp.**" ή "**ssp**"), τα οποία ονομάζονται ***indica & japonica***. Το ρύζι χάρη στην προσαρμοστικότητα του, μπορεί και αναπτύσσεται σε περιβάλλοντα με μεγάλη παραλλακτικότητα μεταξύ τους. Το υποείδος *indica* είναι ιθαγενές των υγρών τροπικών και υποτροπικών περιοχών της Ασίας, ενώ το υποείδος *japonica* των ευκράτων και υποτροπικών περιοχών. Το υποείδος *indica* είναι μακρόκαρπο και γενικά υψηλόσωμο, με λεπτά αδύναμα στελέχη, τα οποία έχουν την τάση να πλαγιάζουν. Το υποείδος *japonica* αντίθετα έχει μικρούς καρπούς, μεγάλο αριθμό αδελφιών, τα στελέχη είναι κοντά, ισχυρά και αντέχουν στο πλάγιασμα [21], [22].

Οι σπόροι *japonica* είναι κοντοί και στρογγυλοί, δεν θρυμματίζονται εύκολα και έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε αμυλόζη, που τους δίνει κολλώδη υφή όταν μαγειρεύονται. Οι σπόροι *indica* είναι μακριοί έως μέτρια μακριοί, λεπτοί, σχεδόν επίπεδοι, θρυμματίζονται εύκολα και έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε αμυλόζη, καθιστώντας τους ξηρότερους και σπυρωτούς όταν μαγειρεύονται [22], [23]. Οι σπόροι *japonica* και *indica* διαφέρουν και ως προς τη περιεκτικότητα σε λιπόφιλες φυτοχημικές ενώσεις, όπως τοκοφερόλες, τοκοτριενόλες και γ-ορυζανόλη. Οι σπόροι τύπου *japonica* είναι πιο πλούσιοι σε γ-ορυζανόλη και βιταμίνη E, σύμφωνα με τις δημοσιεύσεις των ερευνητών Heinemann et al. [24] και Shao-Hua Huang and Lean-Teik Ng [25].

Από τα 250.000 στρ. που καλλιεργούνται με ρύζι το 70% περιλαμβάνει τον υποείδος ρυζιού *indica*. Η Ελλάδα παράγει ένα από τα καλύτερα ρύζια αυτού του υποείδους επειδή τα ελληνικά εδάφη είναι αλατούχα και αυτό βοηθάει στην υψηλή ποιότητα. Το υπόλοιπο 30% των καλλιεργούμενων εκτάσεων είναι υποείδους *japonica*. Το

ΕΘΙΑΓΕ διαθέτει μια σειρά ποικιλιών και από τα δύο υποείδη, απόλυτα προσαρμοσμένα στις τοπικές συνθήκες (Πίνακας 1-2). Οι ελληνικές ποικιλίες ρυζιού είναι υψηλών και σταθερών αποδόσεων. Η χώρα μας κατατάσσεται στις τέσσερις χώρες με την υψηλότερη απόδοση στον κόσμο μετά την Αυστραλία, τις ΗΠΑ και την Αίγυπτο. Καλλιεργείται κυρίως στις Περιφερειακές Ενότητες Θεσσαλονίκης, Σερρών και λιγότερο στις Περιφερειακές Ενότητες Καβάλας, Ημαθίας, Φθιώτιδας, Αιτωλοακαρνανίας, Πιερίας και σε άλλες περιοχές [26], [27].

Πίνακας 1-2 Ελληνικές ποικιλίες ρυζιού του υποείδους *indica* και του υποείδους *japonica* [27]

Ελληνικές Ποικιλίες Ρυζιού	Υποείδος
Ποικιλία Αλέξανδρος	<i>indica</i>
Ποικιλία Αξιός	<i>japonica</i>
Ποικιλία Δήμητρα	<i>japonica</i>
Ποικιλία Δίον	<i>japonica</i>
Ποικιλία Ευρώπη	<i>japonica</i>
Ποικιλία Ισπανική Α'	<i>japonica</i>
Ποικιλία Μακεδονία	<i>japonica</i>
Ποικιλία Ολυμπιάδα	<i>japonica</i>
Ποικιλία Ρωξάνη	<i>japonica</i>
Ποικιλίες Στρυμώνας	<i>japonica</i>

Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκε πύτουρο των ποικιλιών **Gladio** και **Ronaldo** που παραχωρήθηκαν από την εταιρεία AGRINO (ΕΥ.ΓΕ ΠΙΣΤΙΟΛΑΣ ΑΒΕΕ). Το ρύζι **Ronaldo** είναι ποικιλία του υποείδους *japonica* ενώ το ρύζι **Gladio** είναι ποικιλία του υποείδους *indica*.

Οι **καλλιεργούμενες ποικιλίες ρυζιού** ταξινομούνται λαμβάνοντας υπόψη διάφορα κριτήρια [21].

Οι ποικιλίες διακρίνονται **ανάλογα με τις συνθήκες στις οποίες αναπτύσσονται και το σύστημα καλλιέργειας**, σε ποικιλίες πεδινών περιοχών ή κατακλυζόμενες, σε ποικιλίες ορεινών περιοχών ή μη κατακλυζόμενες και σε επιπλέουσες και βαθέων υδάτων. Στην πρώτη κατηγορία κατατάσσονται ποικιλίες που αναπτύσσονται **σε** αγρούς που κατακλύζονται με νερό με φυσικά ή τεχνητά μέσα, σε ύψος έως 50 cm, κατά το μεγαλύτερο μέρος της καλλιεργητικής περιόδου και αντιπροσωπεύουν το 75% των καλλιεργούμενων εκτάσεων. Χαρακτηρίζονται διεθνώς ως lowland ή paddy rice. Στη δεύτερη κατηγορία υπάγονται οι ποικιλίες που καλλιεργούνται χωρίς κατάκλυση και αναπτύσσονται σε περιοχές με υψηλές βροχοπτώσεις. Αποτελούν το 10% περίπου των καλλιεργούμενων εκτάσεων και διεθνώς ονομάζονται upland rice. Οι ποικιλίες της τρίτης κατηγορίας καλλιεργούνται σε εδάφη κατακλυσμένα με νερό σε ύψος μεγαλύτερο των 51 cm, που μπορεί να φθάσει και τα 5-6 m. Χαρακτηριστικό των ποικιλιών αυτών είναι η ταχεία επιμήκυνση των στελεχών έτσι ώστε το φύλλωμά τους να διατηρείται πάνω από την επιφάνεια του νερού. Αποτελούν το 15% των καλλιεργούμενων εκτάσεων και απαντώνται σε περιοχές που δέχονται πολλές βροχοπτώσεις κατά την περίοδο των μουσώνων.

Η **διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου** αποτελεί ένα σημαντικό κριτήριο διαχωρισμού των ποικιλιών. Γενικά, η διάρκεια του βιολογικού κύκλου κυμαίνεται από 80 έως 280 ημέρες. Οι ποικιλίες διακρίνονται σε πρώιμες (80-130 ημέρες), μέσης πρωιμότητας (130-160 ημέρες) και όψιμες (άνω των 160 ημερών). Οι ποικιλίες μικρού βιολογικού κύκλου είναι κατάλληλες για τις εύκρατες περιοχές και οι όψιμες για τις τροπικές και υποτροπικές περιοχές. Η αντίδραση στη φωτοπερίοδο επίσης, διακρίνει τις ποικιλίες σε ευαίσθητες και αδιάφορες.

Η ταξινόμηση του ρυζιού μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους, ανάλογα με τα χρησιμοποιούμενα κριτήρια, όπως βάσει των **μορφολογικών χαρακτηριστικών, της αναλογίας αμυλόζης/αμυλοπηκτίνης, ή της επεξεργασίας**. Έτσι, το ρύζι μπορεί να καταταχθεί ως εξής. [18] Ανάλογα με το **σχήμα και το χρώμα** των καρπών οι ποικιλίες κατατάσσονται σε διάφορες κατηγορίες όπως μακρόσπερμες, μεσόσπερμες, μικρόσπερμες, επιμήκεις, ενδιάμεσες ή στρογγυλόσπερμες. Στον χαρακτηρισμό των διαφόρων κλάσεων λαμβάνεται υπόψη, για τον καθορισμό του σχήματος, η σχέση μήκους προς πλάτος του κόκκου και για το μέγεθος, το μήκος του καρπού. Στις ποικιλίες του υποείδους *indica* το μήκος του κόκκου είναι τέσσερις μέχρι πέντε φορές μεγαλύτερο από το πλάτος ενώ αυτές του υποείδους *japonica* έχουν μήκος σπόρου δύο μέχρι τρεις φορές μεγαλύτερο από το πλάτος του [28], [29], [30].

Ανάλογα με την **περιεκτικότητα του αμύλου του ενδοσπερμίου, σε αμυλόζη και αμυλοπηκτίνη**. Το χαρακτηριστικό αυτό συνδέεται με την εμφάνιση του ρυζιού μετά από το μαγείρεμα. Η απορρόφηση νερού και η διόγκωση του κόκκου σχετίζονται θετικά με την περιεκτικότητα σε αμυλόζη, ενώ υψηλή περιεκτικότητα σε αμυλοπηκτίνη κάνει το ρύζι μαλακό με κόκκους που κολλούν μεταξύ τους σχηματίζοντας συσσωματώματα. Το ρύζι μπορεί να είναι κηρώδες ή μη-κηρώδες και έχει πολλά διαφορετικά χρώματα (καφέ κόκκινο, μαύρο κ.ά.). Στις κηρώδεις ποικιλίες το ενδοσπέρμιο έχει γαλακτώδη εμφάνιση και κηρώδη υφή και αποτελείται σχεδόν αποκλειστικά από αμυλοπηκτίνη [18], [17], [19].

Ανάλογα με την **επεξεργασία των κόκκων**, το ρύζι κατηγοριοποιείται ως εξής:

Έμφλοιο ή αναποφλοιώτο ρύζι, το οποίο είναι το ρύζι με το φλοιό του μετά τη συγκομιδή.

Καστανό ρύζι (ή κάργκο ή καφέ ή ημικατέργαστο), το οποίο προκύπτει μετά την απομάκρυνση του φλοιού, αλλά διατηρεί τη στοιβάδα του περικάρπιου που του προσδίνει το χαρακτηριστικό καφέ χρώμα, το άρωμα ξηρών καρπών και την τραχεία υφή. Το στρώμα πίτουρου παραμένει, διατηρώντας όλα τα θρεπτικά συστατικά (θειαμίνη, ριβοφλαβίνη, νιασίνη, βιταμίνη E, ασβέστιο, φωσφόρο, κάλιο, πρωτεΐνες, ίνες και λίπη). Ο κόκκος έχει βάρος περίπου 25 mg. Διατηρείται καλύτερα και περισσότερο όταν καταψύχεται, αφού έτσι αποφεύγεται η οξειδωση των λιπαρών του και απαιτεί αρκετά μεγαλύτερο χρόνο μαγειρέματος σε σχέση με το μυλευμένο (40 min).

Λευκό ρύζι ή μυλευμένο ή επεξεργασμένο, το οποίο προκύπτει μετά την διαδικασία της μύλευσης και την απομάκρυνση των εξωτερικών στοιβάδων του περικάρπιου, της τέστας και του νούκελλου. Η διαδικασία απομακρύνει πολλά από τα θρεπτικά συστατικά και το ρύζι αποκτά λευκό χρώμα. Ανάλογα με την επεξεργασία, μπορεί να επικαλυφθεί με πυριτικό μαγνήσιο ή οξείδιο του τιτανίου ή μίγμα γλυκόζης και πυριτικού μαγνησίου, με σκοπό τη βελτίωση της υφής και του χρώματός του. Το λευκό ρύζι χρειάζεται 15 min μαγείρεμα.

Parboiled ή κίτρινο ρύζι, το οποίο προκύπτει από τη μύλευση του έμφλοιου ρυζιού που έχει προηγουμένως εμβαπτιστεί σε ατμό/θερμό νερό, υπό πίεση. Η υγροθερμική αυτή επεξεργασία του ρυζιού προκαλεί διάχυση των θρεπτικών συστατικών προς το ενδοσπέρμιο, και έτσι το κίτρινο ρύζι είναι πιο θρεπτικό από το λευκό. Οι κόκκοι του είναι πιο σφιχτοί και σπυρωτοί από κάθε άλλο τύπο ρυζιού, λόγω ζελατινοποίησης του περιεχόμενου αμύλου. Έχει χρόνο μαγειρέματος 16-25 min.

Κόκκινο ρύζι, το οποίο έχει κόκκινο περικάρπιο λόγω ποικιλίας ή εσοδείας. Είναι πέντε φορές πιο πλούσιο σε αντιοξειδωτικά (τοκόλες, ορυζανόλη, φαινολικό οξύ με προανθοκυανιδίνες και πολυμερικές πολυφαινόλες) από ότι το λευκό μυλευμένο ρύζι.

Μαύρο ρύζι το οποίο περικλείεται από λεπτή στοιβάδα μαύρου πίτουρου.

Αρωματικό ρύζι, είναι το φυσικά αρωματισμένο από τα συστατικά του εδάφους στο οποίο καλλιεργείται.

Προμαγειρεμένο είναι το μυλευμένο, μαγειρεμένο και ξηραμένο ρύζι. Το προμαγειρεμένο είναι περισσότερο πορώδες και βράζει σε λιγότερο χρόνο από το λευκό, λόγω της μεγαλύτερης ικανότητας απορρόφησης του νερού [18]. (<http://www.sagevfoods.com/MainPages/Rice101/Types.htm>, <http://www.foodreference.com/html/art-rice-varieties.html>, <http://www.berkeleywellness.com/healthy-eating/food/article/types-rice>)

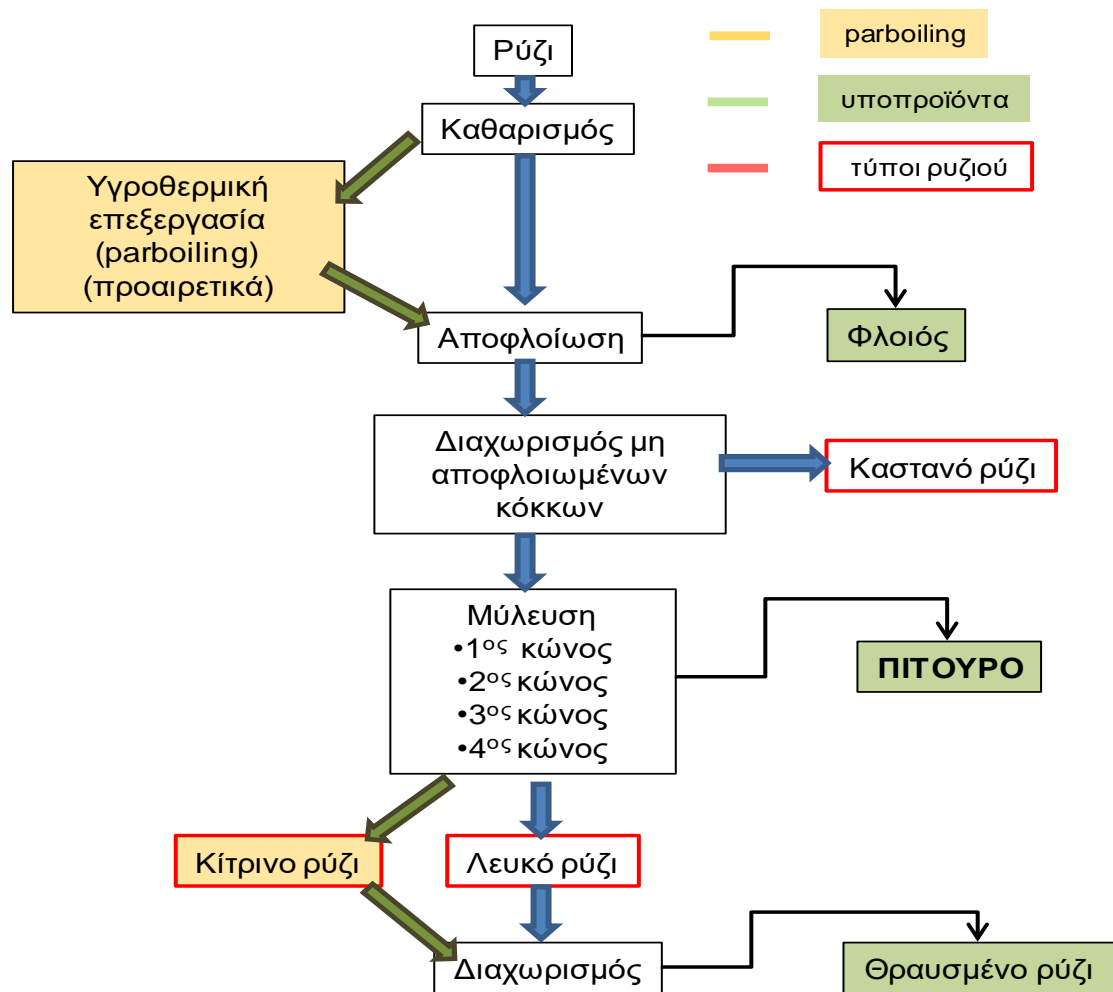
2 Επεξεργασία του ρυζιού

2.1 Διαδικασία παραγωγής ρυζιού

Γενικά με τον όρο, επεξεργασία των τροφίμων περιλαμβάνεται οποιαδήποτε διεργασία αλλάζει ή μετατρέπει τις ακατέργαστες ζωικές ή φυτικές πρώτες ύλες σε ασφαλή, εδώδιμα και πιο εύγευστα τρόφιμα. Για τη βέλτιστη και οικονομικά αποδοτική επεξεργασία του ρυζιού είναι πολύ σημαντική η ομοιόμορφη μορφολογία των κόκκων [20]. Από το κοινό ρύζι με διαφορετική επεξεργασία προκύπτουν πολλά συγγενή προϊόντα τα οποία θα αναλυθούν στη συνέχεια.

Μύλευση (milling process)

Η επεξεργασία του ρυζιού περιλαμβάνει τη μύλευση ή επιφανειακή κατεργασία, που είναι το βασικό στάδιο διεργασίας και την **υγροθερμική κατεργασία (parboiling)**. Το ρύζι υφίσταται μύλευση, ώστε να αποκτήσει ανοιχτόχρωμη εμφάνιση, επιθυμητή για τους καταναλωτές και να μειωθεί ο χρόνος βρασμού (15 min για το μυλευμένο, έναντι 40 min το καστανό ρύζι). Όλα οι τύποι ρυζιού μυλεύονται ομοίως. Το κίτρινο ρύζι μυλεύεται, αφού υποστεί την υγροθερμική κατεργασία. Η υγροθερμική επεξεργασία είναι μία τεχνική λίγων εκατονταετιών, αλλά αρκετά περίπλοκη. Το ρύζι μπορεί να καταναλωθεί και χωρίς μύλευση, αλλά στους περισσότερους καταναλωτές αρέσει χωρίς το πίτουρό του, δηλαδή ως λευκό ή κίτρινο [18], [31], [32, 33], [34], [35].



Εικόνα 2-1 Τυπική διαδικασία επεξεργασίας του ρυζιού.

Στάδια τυπικής επεξεργασίας ρυζιού:

Καθαρισμός (cleaning): Από το έμφλοιο ρύζι απομακρύνονται όλες οι ξένες ύλες, με χρήση καθαριστή κοσκίνων και αερισμού. Έτσι αφαιρούνται σανό, άχυρα, μεγάλες πέτρες, μέρη φυτών, μεταλλικά τεμάχια, μέρη εντόμων, κτλ.

Αποφλοιώση (husk removal): Το καθαρό πλέον έμφλοιο ρύζι περνά από αποφλοιωτική μηχανή δύο πέτρινων ή πλαστικών κυλίνδρων, ή ζεύγη οριζοντίων δίσκων, οι οποίοι κινούνται αντίρροπα με διαφορετική ταχύτητα. Ο φλοιός απομακρύνεται από το αλεσμένο προϊόν με χρήση αέρα, ενώ εκείνο που παραμένει είναι το καφετί ρύζι, με τα στρώματα πίτουρου να περιβάλλουν ακόμη τον κόκκο. Η ευκολία του σταδίου αυτού εξαρτάται από την ποικιλία του ρυζιού. Ο φλοιός αποτελεί περίπου το 20% του βάρους της πρώτης ύλης ρυζιού.

Διαχωριστής μη αποφλοιωμένων κόκκων (paddy separator): Καθώς η αποφλοιωτική μηχανή πιέζει ελαφρά το ρύζι, γίνεται μεταφορά μερικών μη αποφλοιωμένων κόκκων στο καστανό ρύζι. Προκειμένου να μειωθεί το ποσοστό

θραυσμένων κόκκων χρησιμοποιείται διαλογέας ο οποίος λειτουργεί με βάση τη διαφορά του ειδικού βάρους των κόκκων και επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την ταχύτητα παραγωγής ενός ορυζόμυλου. Έτσι, διαχωρίζεται ο μη αποφλοιωμένος κόκκος από το καστανό ρύζι, ενώ οι μη αποφλοιωμένοι κόκκοι επιστρέφουν στην αποφλοιωτική μηχανή.

Μύλευση ή επιφανειακή επεξεργασία (milling process): Η μύλευση είναι μία μηχανική διεργασία, κατά την οποία, αφαιρώντας τα εξωτερικά στρώματα των κόκκων ρυζιού (περικάρπιο, μέρος του ενδοσπερμίου και το έμβρυο), παράγεται το λευκό μυλευμένο ρύζι, ενώ παράλληλα προκύπτουν ως υποπροϊόντα αλεσμένο πίτουρο και θραυσμένο ρύζι. Στο στάδιο λαμβάνει χώρα τριβή των κόκκων ρυζιού μεταξύ τους με χρήση κυλίνδρου και απλής πίεσης αέρα. Η μύλευση επιτυγχάνεται μέσω 2-3 επαναλήψεων σε διαφορετικούς κυλίνδρους και με διαφορετικές ρυθμίσεις, ανάλογα με τον απαιτούμενο βαθμό μύλευσης. Η προσθήκη ελαίου προστατεύει το άρωμα του ρυζιού, καθώς το έλαιο δρώντας ως διαλύτης πτητικών καρβονυλίων βοηθά στη διατήρησή τους στο προϊόν [36].

Διαχωρισμός: Το μυλευμένο ρύζι διαλέγεται κατά μέγεθος και διαχωρίζεται από διαφορετικούς σπόρους αλλά ακόμη και από ίδιου μεγέθους ή θραυσμένους κόκκους ρυζιού, με τη βοήθεια σειράς οριζόντιων ή περιστροφικών αυτοκαθαριζόμενων δονούμενων κοσκίνων. Τα προϊόντα διαφορετικού μεγέθους αποθηκεύονται χωριστά.

Στίλβωση: Τα υπολείμματα της μύλευσης απομακρύνονται με τη βοήθεια κυλίνδρου, ο οποίος περιστρέφεται με υψηλή ταχύτητα. Το μεν πίτουρο περιέχει περικάρπιο, νούκελλο, αλευρόνη και τέστας και έχει ένα ανοικτό καφέ χρώμα, το δε μυλευμένο ρύζι περιέχει ως επί το πλείστον το αμυλούχο ενδοσπέρμιο. Κατά τη μύλευση αφαιρείται περίπου το 9-13% του βάρους του καστανού ρυζιού. Το ποσοστό αυτό εξαρτάται από την ποικιλία του ρυζιού, την περιοχή της καλλιέργειας και την υγρασία του κόκκου. Το μυλευμένο ρύζι είναι μικρότερο σε μέγεθος από το καστανό ρύζι.

Υγροθερμική επεξεργασία (parboiling): Η υγροθερμική επεξεργασία είναι ένα **προαιρετικό στάδιο**, το οποίο τοποθετείται μετά τον καθαρισμό και πριν την αποφλοίωση. Η υγροθερμική επεξεργασία έχει σκοπό τη βελτίωση της απόδοσης της μύλευσης και τη βελτίωση των θρεπτικών και οργανοληπτικών ιδιοτήτων του ρυζιού μετά το μαγείρεμα. Εφαρμόζεται στο 1/4 περίπου της παγκόσμιας παραγωγής ρυζιού. Το ρύζι που προκύπτει είναι γνωστό ως **parboiled** και η αυτή η κατεργασία περιλαμβάνει τα εξής στάδια: [37], [38], [31], [39], [40], [41], [42], [43]

1. Εμβάπτιση του ρυζιού σε νερό έως ότου αυξηθεί η υγρασία σε 25-30%, για περίπου 3-3,5 h στους 70 °C.
2. Βρασμό του ενυδατωμένου ρυζιού σε ατμό υπό πίεση ή μη για 20 min περίπου.
3. Προξήρανση και ξήρανση του έμφλοιου ρυζιού σε ασφαλή επίπεδα υγρασίας (14%).

Χάρη στην υγροθερμική επεξεργασία παρατηρούνται μικρότερες απώλειες θρεπτικών συστατικών, τα οποία διαχέονται από το πίτουρο προς το ενδοσπέρμιο. Η εμβάπτιση του έμφλοιου ή του καστανού ρυζιού επηρεάζει την απορροφητικότητα νερού του κόκκου [44-46]. Το άμυλο ζελατινοποιείται, διογκώνεται και ανακατανέμεται ομοιογενώς στον κόκκο. Η ολική περιεκτικότητα αμυλόζης όμως, παραμένει ουσιαστικά αμετάβλητη. Τα μόρια του αμύλου ζελατινοποιούνται πλήρως κατά την υγροθερμική επεξεργασία, μέρος αυτών όμως μπορεί να επανασυνδεθεί αργότερα [47-49]. Από την υγροθερμική επεξεργασία δεν επηρεάζονται οι πρωτεΐνες του ενδοσπερμίου [50] και τα δε αμινοξέα παραμένουν αμετάβλητα. Παρατηρείται μεταφορά βιταμινών και ανόργανων αλάτων από το στρώμα αλευρόνης και τέστα στο αμυλούχο ενδοσπέρμιο, όπως και αδρανοποίηση ενζύμων, καταστροφή ζυμών, μυκήτων, εντόμων και των αυγών τους.

Σε αντίθεση με τις υδατοδιαλυτές βιταμίνες, τα λιπαρά διαχέονται προς τα έξω κατά την υγροθερμική επεξεργασία. Π.χ. το πίτουρο του κίτρινου ρυζιού περιέχει 20-28% λιπαρά σε σχέση με 16-18% που περιέχει το λευκό ρύζι. Η εμβάπτιση οδηγεί σε μείωση των φυτικών στο ρύζι, αλλά δεν επηρεάζει πολύ την αναλογία φυτικών/σίδηρο και φυτικών/ψευδάργυρο, διότι μέρος των ανόργανων στοιχείων μεταφέρεται στο διάλυμα εμβάπτισης [51]. Οι ανωτέρω αλλαγές συνοδεύονται από μείωση του αλευρότητας, αλλά από αύξηση της διαφάνειας, της σκληρότητας, της λαμπρότητας και της αντοχής στη θραύση του μυλεμένου ρυζιού. Κατά την κατεργασία αδρανοποιείται η λιπάση και συνεπώς διατηρούνται οι ιδιότητες του αλεσμένου πίτουρου κατά την αποθήκευση. Οι λιπάσες είναι ένζυμα που είναι κυρίως υπεύθυνα για την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων σε γλυκερόλη και λιπαρά οξέα. Το πίτουρο περιέχει διάφορους τύπους λιπάσης, οι οποίες συντελούν στην σημαντική αύξηση της ελεύθερων λιπαρών οξέων (FFAs) με υδρόλυση του ελαίου. Η ταχεία αύξηση των FFA συμβαίνει μέσα σε λίγες ώρες και φθάνει στο 7-8% μέσα σε 24 ώρες, που ακολουθείται κατά περίπου 5% αύξηση ανά ημέρα. Η δραστηριότητα της λιπάσης επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από την υγρασία, τη θερμοκρασία, pH, το χρόνο. Η δραστηριότητα του ενζύμου μειώνεται απότομα και στη συνέχεια σταδιακά συνεχίζει να μειώνεται στους 60°C [52].

Οι υδατοδιαλυτές βιταμίνες και τα ανόργανα άλατα διαλυτοποιούνται στο περιβλήμα και το έμβρυο, και διαχέονται ομογενώς στο υποαλευρώδες αμυλούχο ενδοσπέρμιο κατά το βράσιμο σε ατμό. Το κίτρινο ρύζι, λόγω μεγαλύτερης σκληρότητας απαιτεί λιγότερη μύλευση. Κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας συμβαίνει απώλεια θειαμίνης και νικοτινικού οξέος. Οι απώλειες αυτές εμφανίζονται κατά την εμβάπτιση, ειδικά όταν ο φλοιός «χωρίζει», και κατά το βράσιμο καθώς η πίεση αυξάνεται [31]. Οι απώλειες σε θειαμίνη, νιασίνη, βιοτίνη και παντοθενικό οξύ 70%, 28%, 49% και 25%, αντίστοιχα [53]. Οι συγκεντρώσεις τέφρας, φωσφόρου, ασβεστίου, σιδήρου, μαγγανίου, μολύβδου και χρωμίου είναι σίγουρα μεγαλύτερες στο κίτρινο μυλευμένο ρύζι από ότι στο λευκό ρύζι. Το μαγνήσιο, ο ψευδάργυρος και ο χαλκός παραμένουν αμετάβλητα. Στο καστανό ρύζι δεν υπάρχει επίδραση στα θρεπτικά του στοιχεία μετά την υγροθερμική επεξεργασία.

2.2 Προϊόντα ρυζιού

Το ρύζι είναι το δεύτερο σε σπουδαιότητα σιτηρό στον κόσμο μετά από το σιτάρι και θεωρείται το κυριότερο φυτό παραγωγής τροφής για τον άνθρωπο. Αποτελεί επίσης τη βάση της διατροφής του μισού περίπου πληθυσμού της γης [13]. Μία από τις συνέπειες των βιομηχανικών δραστηριοτήτων παραγωγής τροφίμων είναι η δημιουργία μεγάλου όγκου των αποβλήτων, η απόρριψη των οποίων μπορεί να προβληματική, δεδομένου ότι καταλαμβάνει μεγάλο χώρο, και η κακή διαχείριση που μπορεί να δημιουργήσει κινδύνους για το περιβάλλον και για την υγεία του πληθυσμού. Η βιομηχανία ρυζιού αποτελεί σημαντική δραστηριότητα και παράγει μεγάλες ποσότητες αποβλήτων. Τα κύρια στερεά απόβλητα που παράγονται κατά την παραγωγή ρυζιού κύκλου περιλαμβάνουν το άχυρο, τον φλοιό, την τέφρα, το πύουρο και το θραυσμένο ρύζι. Η επεξεργασία και η ανακύκλωση αυτών των αποβλήτων, εκτός από αναγκαία, αποτελεί μία προσοδοφόρα επιχειρηματική ευκαιρία. Θεωρητική έρευνα για τον κύκλο παραγωγής ρυζιού και των αποβλήτων της απέδειξαν την ύπαρξη περιβαλλοντικά κατάλληλων εφαρμογών για όλα τα απόβλητα από τον κύκλο παραγωγής ρυζιού. Συνοπτικά αναφέρονται οι κυριότερες χρήσεις των αποβλήτων του ρυζιού:

Το ρύζι, το πύουρο και το θραυσμένο ρύζι έχουν την κύρια χρήση τους στη βιομηχανία τροφίμων. Το άχυρο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την καύση ή την διατροφή των ζώων. Ο φλοιός μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτροφή πουλερικών, ως λίπασμα ή ως καύσιμο. Στην περίπτωση της καύσης, χρησιμοποιείται ως βιομάζα για να τροφοδοτήσει τους αντιδραστήρες για την παραγωγή θερμικής ή ηλεκτρικής ενέργειας. Αυτή η διαδικασία παράγει τέφρα, η

οποία δείχνει δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί ως ένα παραπροϊόν σε πολλές διαφορετικές εφαρμογές, που δεν έχουν ακόμη παγιωθεί [54], [55].

Φλοιός: Ο φλοιός, αντιπροσωπεύει το 20 % του κόκκου και έχει μεγάλη συγκέντρωση σε πυρίτιο και έτσι η τέφρα του χρησιμοποιείται ως **οικοδομικό υλικό** (τσιμέντο υψηλής αντοχής), στη μεταλλουργία, στη φαρμακευτική βιομηχανία. Ακόμα χρησιμοποιείται ως τροφή μηρυκαστικών, πρώτη ύλη στη **χαρτοβιομηχανία**, υλικό κλινοστρωμνής για πουλερικά και άλογα, καύσιμο, μονωτικό, λίπασμα, αλλά και για την **παραγωγή φουρφουράλης, α-κυτταρίνης, λινελαίου, σιλικόνης, ζεόλιθων, υδράλου και συνθετικών ινών** [18]. Επίσης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως **απορροφητικό βαφών και βαρέων μετάλλων** σε υδατικά συστήματα για την προστασία του περιβάλλοντος [55], [54].

Πίτουρο: Προκύπτει από το ρύζι και περιέχει 16-18% λιπαρά, ενώ από το κίτρινο ρύζι 20-28% λιπαρά. Ωστόσο, η παρουσία του ενζύμου λιπάση, η οποία προκαλεί ταχεία αποδόμηση των λιπιδίων, υποχρεώνει την απενεργοποίηση του ενζύμου με σκοπό την σταθεροποίηση του πίτουρου. Η θερμική επεξεργασία, η αποθήκευση σε χαμηλή θερμοκρασία, η χημική επεξεργασία, ο έλεγχος της σχετικής υγρασίας, και η σύγχρονη μύλευση και εκχύλιση είναι διαφορετικές οικονομικά αμφίβολες εναλλακτικές λύσεις που χρησιμοποιούνται για τη σταθεροποίηση του πίτουρου.

Τα πίτουρα χρησιμοποιούνται ευρέως ως **ζωοτροφές**. Ωστόσο, η μείωση της κατανάλωσης προϊόντων με βάση το ρύζι κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών έχει διεγείρει την ανάπτυξη ενός αριθμού διαφορετικών προϊόντων ρυζιού προστιθέμενης αξίας. Η αυξανόμενη ζήτηση των καταναλωτών για πιο υγιεινά προϊόντα καθώς επίσης και το αυξανόμενο ενδιαφέρον για ethnic παραδοσιακά προϊόντα οδήγησε στην αυξημένη παραγωγή **ρυζελαίου (RBO)** μέσω της εκχύλισης του πίτουρου και τη χρήση του πίτουρου και των συστατικών του **σε δημητριακά και συμπυκνώματα βιταμινών**. Η **συμπυκνωμένη πρωτεΐνη** του πίτουρου μπορεί να έχει περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες από 19,4 έως 76,1 ανάλογα με τη μέθοδο εκχύλισης, και έχει ενσωματωθεί στο ψωμί, σε αναψυκτικά, γλυκίσματα, και βρεφικές τροφές. Το πίτουρο έχει χρησιμοποιηθεί ως μέσο ανάπτυξης του *Saccharomyces sp.* ή για την παραγωγή πρωτεάσης και ενζύμων που σχετίζονται με την πήξη του γάλακτος. Επιπλέον, ο φλοιός και το πίτουρο χρησιμοποιούνται ως **πηγές ενέργειας**, ως φίλτρα από πολυμερή και ως πρώτες ύλες για την παραγωγή προϊόντων διατροφής και συμπυκνωμένης πρωτεΐνης [55].

Ρυζέλαιο (RICE BRAN OIL): Χρησιμοποιείται κυρίως σε ασιατικές χώρες και προκύπτει με εκχύλιση από το πίτουρο του ρυζιού. Το ακατέργαστο RBO είναι

σκούρο πρασινωπό, και έχει έντονη μυρωδιά. Επιπλέον, έχει όξινο pH και υψηλή συγκέντρωση ελεύθερων λιπαρών οξέων, που το καθιστούν μη βρώσιμο. Για να καταστεί εδώδιμο έλαιο υποβάλλεται σε φυσικές ή χημικές διαδικασίες εξευγενισμού (αποκλήρωση, αποκομμίωση, εξουδετέρωση ελεύθερων λιπαρών, αποχρωματισμό και απόσμηση ατμού), και θεωρείται προϊόν «γκουρμέ». Διαθέτει μοναδικές ιδιότητες, όπως ιδιαίτερο άρωμα ρυζιού και είναι ιδανικό για τηγάνισμα. Το εξευγενισμένο RBO είναι ελαφρώς κίτρινο, με ήπια οσμή και γεύση που θυμίζει ρύζι [5]. Έχει θεραπευτικές ιδιότητες, διότι περιέχει υψηλά επίπεδα γ-ορυζανόλης και τοκοτριενολών [56], [19]. Το πίτουρο περιέχει 15-25% λιπίδια, και το έλαιο που εξάγεται από πίτουρο ρυζιού είναι μοναδικό μεταξύ των βρώσιμων ελαίων, λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς του σε γ-ορυζανόλη, λεκιθίνη, τοκοφερόλες, τοκοτριενόλες και στερόλες. Ο τύπος της διαδικασίας εξευγενισμού που χρησιμοποιείται επηρεάζει την ποιότητα του RBO. Μεγάλες ποσότητες των φυτοχημικών ενώσεων, ειδικά της γ-ορυζανόλης, χάνονται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας εξευγενισμού, ανεξάρτητα από τη μέθοδο που χρησιμοποιείται. Η απώλεια αυτή οφείλεται στην υψηλή λιποφιλικότητα αυτών των φυτοχημικών ενώσεων. Έχουν προταθεί αρκετές μέθοδοι εκχύλισης προκειμένου να γίνει ανάκτηση όλων αυτών των ενώσεων, με στόχο τη χρήση τους σε διατροφικά, φαρμακευτικά και καλλυντικά σκευάσματα [36]. Επιπρόσθετα, έχει δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στο ρυζέλαιο ως πιθανή πηγή ανανεώσιμων καυσίμων όπως ντίζελ ή βιοντίζελ [57], [58].

Το RBO, ως πλούσια πηγή των προαναφερθέντων βιοδραστικών ενώσεων (γ-ορυζανόλη, τοκοφερόλες, τοκοτριενόλες, πολεικοσανόλες, φυτοστερόλες και σε μικρότερη ποσότητα λεκιθίνη και καροτενοειδή) χρησιμοποιείται για την απομόνωση αυτών με διάφορες τεχνικές, οι οποίες με τη σειρά τους βρίσκουν σειρά εφαρμογών στη **βιομηχανία φαρμάκων και καλλυντικών**. Άλλες εφαρμογές του RBO περιλαμβάνουν σκευάσματα **ζωοτροφών, σαπούνια, και γλυκερίνη**. Οι κηροί μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υποκατάστατο κηρού carnauba στη ζαχαροπλαστική, σε καλλυντικά και στη στίλβωση προϊόντων. Η χρήση του RBO ως φυσικό συστατικό σε καλλυντικά προϊόντα συνεχώς αυξάνεται. Η παρουσία της γ-ορυζανόλης στο RBO μπορεί να λειτουργήσει ως προστατευτικός παράγοντας έναντι υπεριώδους ακτινοβολίας UV και ως εκ τούτου μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένα ισχυρό αντηλιακό μέσο. Το φερουλικό οξύ και οι εστέρες του που υπάρχουν στη γ-ορυζανόλη βοηθούν στην τόνωση της ανάπτυξης των μαλλιών και την πρόληψη της γήρανσης του δέρματος. Οι τοκοτριενόλες του RBO όταν εφαρμόζονται στο δέρμα, το διαπερνούν και απορροφούνται γρήγορα. Συμβάλλουν στη προστασία του χάρη στις αντιοξειδωτικές ιδιότητές τους. Σταθεροποιούν τις ελεύθερες ρίζες που

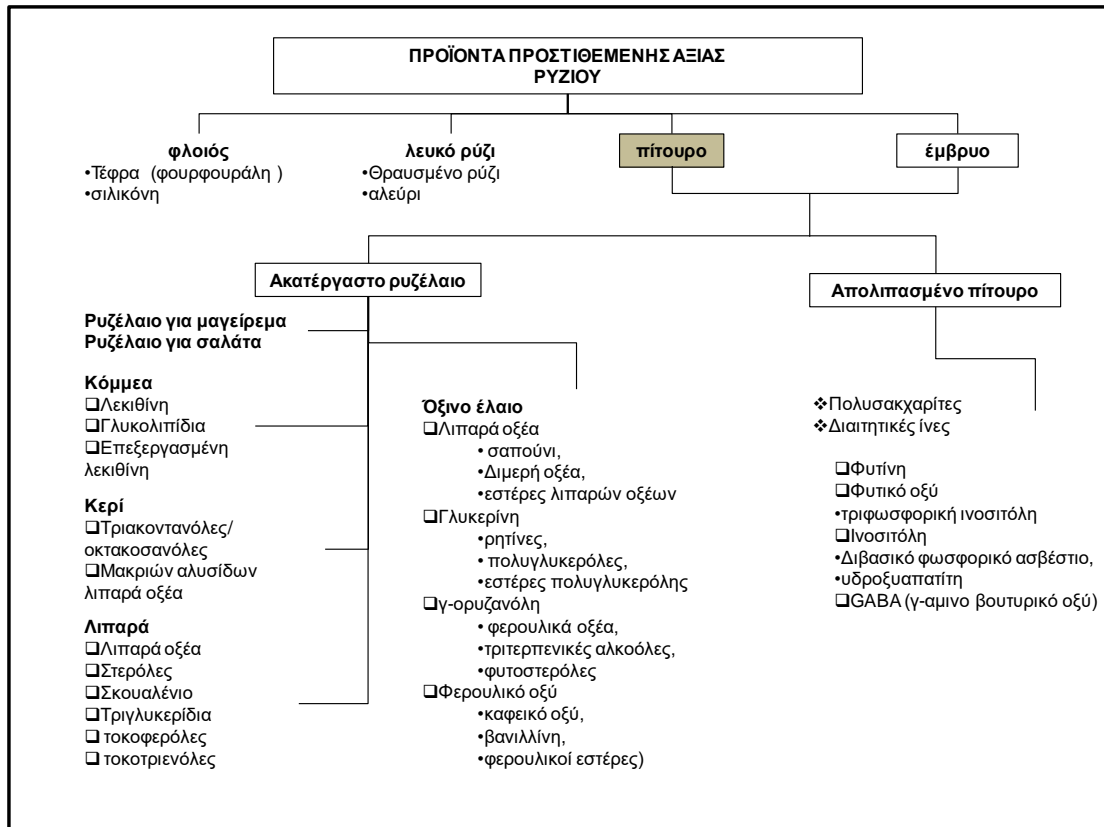
δημιουργούνται στο δέρμα όταν εκτίθεται σε υπεριώδεις ακτίνες και το προστατεύουν από αυτές [59].

Θραυσμένο ρύζι: Θεωρείται ο κόκκος με μήκος λιγότερο από τα τρία τέταρτα του μήκους του ολόκληρου κόκκου. Σε μερικές χώρες είναι δημοφιλέστερο από το ακέραιο ρύζι. Χρησιμοποιείται για την παραγωγή ρυζάλευρου, μπύρας, σιροπιού με υψηλής περιεκτικότητα φρουκτόζης, αμύλου ρυζιού, μαλτοδεξτρίνης, σιροπιού γλυκόζης, πρωτεϊνικών συμπυκνωμάτων και τροφών [55].

Ρυζάλευρο: αποτελεί πηγή αμύλου και χρησιμοποιείται ευρέως στη ζαχαροπλαστική και γενικότερα στη βιομηχανία τροφίμων. Από αυτό μπορεί με εκβολή να παραχθούν ζυμαρικά ρυζιού τσιπς, κέικ, δημητριακά πρωινού, ψωμιά και πρόχειρα φαγητά (donuts, μπισκότα). Επίσης, χρησιμοποιείται στις βρεφικές τροφές γιατί είναι εύπεπτο και έχει υποαλλεργικές ιδιότητες, για την παραγωγή μπύρας και πηκτικών ουσιών για σάλτσες, πουτίγκες, ακόμη και ρυζόχαρτου [55]. Χρησιμοποιείται ευρέως για την παραγωγή διαιτητικών προϊόντων και προϊόντων για ασθενείς με δυσανεξία στη γλουτένη που υπάρχει στο σιτάρι, το κριθάρι, τη βρώμη και τη σίκαλη. Τα μόνα δημητριακά που θεωρούνται ασφαλή για ασθενείς με κοιλιοκάκη είναι από ρύζι και καλαμπόκι [55],[18].

Άμυλο ρυζιού: Είναι το σημαντικότερο συστατικό του μυλευμένου ρυζιού, βρίσκεται μόνο στο ενδοσπέρμιο του κόκκου και ανέρχεται στο 90-93% του ξηρού βάρους μυλευμένου ρυζιού [60]. Χρησιμοποιείται ως πηκτική ουσία στην παρασκευή σαλτσών και επιδορπίων. Με την υδρόλυσή του μπορεί επίσης να παραχθεί γλυκό σιρόπι.

Από κάθε ένα από τα παραπάνω κύρια προϊόντα της επεξεργασίας του ρυζιού, προκύπτουν νέα υποπροϊόντα, τα προϊόντα προστιθέμενης αξίας, τα οποία και παρουσιάζονται συνοπτικά στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 2-2), [57].



Εικόνα 2-2 Προϊόντα προστιθέμενης αξίας από το ρύζι.

2.3 Οικονομικό ενδιαφέρον παραγωγής ρυζελαίου (RBO)

Σύμφωνα με δεδομένα από το FAO, 2015 η παγκόσμια παραγωγή ρυζιού αυξήθηκε από το 2001 έως το 2013 , από 600 εκ. τόνους σε 750 εκ.τόνους, με την Κίνα, την Ινδία, την Ινδονησία, και το Μπαγκλαντές να βρίσκονται στις πρώτες θέσεις. Το πλήθος των RBO προϊόντων, στην Ασία είναι σαφώς μεγαλύτερο σε σχέση με την Ευρώπη, όπου μετά το 2009 σημειώνεται σημαντική αύξηση, με αποκορύφωμα το 2014.

Σύμφωνα με το International Association of Rice Bran Oil (IARBO), το οποίο δημιουργήθηκε από τις μεγαλύτερες χώρες παραγωγής ρυζελαίου (Ινδία, Ιαπωνία, Κίνα, Ταϊλάνδη και Βιετνάμ), το ρυζέλαιο αν και θεωρείται ως ένα από τα έλαια με τις περισσότερες ευεργετικές ιδιότητες στον κόσμο, δεν αξιοποιείται πλήρως η παραγωγή του σε παγκόσμιο επίπεδο. Από τους 476 εκατομμύρια τόνους ρυζιού που παράχθηκαν την περίοδο 2014-15, υπήρχε δυνατότητα παραλαβής πίτουρου 23,8 εκατομμύριων τόνων (5% της παραγωγής ρυζιού). Με ανάκτηση 17,5% η δυνατότητα παραγωγής RBO για την περίοδο αυτή ήταν 3,6 εκατομμύρια τόνοι. Παρήχθησαν μόνο 1,5 εκατομμύρια τόνοι, αφήνοντας αναξιοποίητους 2,1 εκατομμύρια τόνους RBO σύμφωνα με B.V. Mehta, executive director, The Solvent

Extractors' Association of India. Ως κορυφαίος παραγωγός RBO θεωρείται η Ινδία με 950.000 τόνους, ακολουθεί η Κίνα με 200.000 τόνους, η Ιαπωνία με 80.000 τόνους και η Ταϊλάνδη με 50.000 τόνους. Οι υπόλοιποι 220.000 τόνοι προέρχονται από άλλες χώρες.

Ωστόσο, οι πωλήσεις του RBO στην Ινδία την περίοδο 2013-2014 σημείωσαν αύξηση περίπου 60%. Το γεγονός αυτό έχει άμεση σχέση με το αγοραστικό κοινό, το οποίο δείχνει προτίμηση όλο και περισσότερο σε υψηλής ποιότητας προϊόντα με ευεργετικές για την υγεία ιδιότητες παρά το πιθανό υψηλότερο αντίτιμο.

Λόγω της πολύπλοκης διαδικασίας εξευγενισμού, το ρυζέλαιο είναι πιο ακριβό από ότι το σογιέλαιο ή το κραμβέλαιο, αλλά θεωρείται ανώτερης ποιότητας έλαιο, όπως το σησαμέλαιο και το ελαιόλαδο. Αυτό αποτέλεσε κίνητρο για την βιομηχανία, για την δημιουργία προϊόντων προστιθέμενης αξίας.

Η Ελλάδα βρίσκεται στις πρώτες θέσεις παραγωγής και στην πρώτη θέση κατανάλωσης ελαιολάδου. Είναι λογικό λοιπόν, το ρυζέλαιο ως εδώδιμο έλαιο να είναι σχεδόν άγνωστο. Ωστόσο, με δεδομένη την πληθώρα εφαρμογών του RBO και των συστατικών του στην διατροφή, την κοσμητολογία και την φαρμακευτική βιομηχανία αλλά και το παγκόσμιο ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας για τις ευεργετικές ιδιότητες του, σε συνδυασμό με την αύξηση του καταναλωτικού ενδιαφέροντος δεν πρέπει να μείνει αναξιοποίητο [61], [62], [63].

3 Φυτοχημική μελέτη του ρυζιού

Το μη επεξεργασμένο ρύζι, είναι πολύ σημαντική πηγή θρεπτικών συστατικών στην ανθρώπινη διατροφή, παρέχοντας υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, μαγνήσιο, ψευδάργυρο, χαλκό, βιταμίνη Β6, και διαιτητικές φυτικές ίνες. Έχει υψηλή περιεκτικότητα σε κάλιο και χαμηλή περιεκτικότητα σε νάτριο. Η κατανάλωση ρυζιού κατά μέσο όρο 280 g ημερησίως στην κινεζική διατροφή παρέχει 20,7 g πρωτεΐνης, 216,2 g υδατάνθρακες, 2 g διαιτητικές φυτικές ίνες, και 2,2 g λίπους [1]. Γενικά, τα περισσότερα θρεπτικά συστατικά είναι συγκεντρωμένα στα εξωτερικά στρώματα του κόκκου [18], [64], δηλαδή στον φλοιό και στο πίτουρο ενώ οι φυτοχημικές και οι οργανοληπτικές ιδιότητες αλλάζουν και μεταξύ κόκκων της ίδιας ποικιλίας ρυζιού. Η σύσταση και θρεπτικότητα του ρυζιού δεν εξαρτάται από γενετικούς παράγοντες αλλά σχετίζεται με την ποικιλία, τις περιβαλλοντικές συνθήκες και τον τρόπο καλλιέργειας, γενικά την κατεργασία του κόκκου πριν από την μύλευση, ενώ στο

μυλεμένο ρύζι εξαρτάται από το είδος της μύλευσης, τον βαθμό μύλευσης, και τις διαδικασίες κλασματοποίησης κατά την μύλευση [18], [64], [65].

Περιέχει πρωτογενείς και δευτερογενείς μεταβολίτες που δεν κατανέμονται ισόποσα στα κλάσματα που προκύπτουν από την επεξεργασία (μύλευση) του ρυζιού (καστανό ρύζι, λευκό ρύζι, φλοιός, πίτουρο) και στα παραπροϊόντα αυτής της διαδικασίας όπως είναι το ρυζέλαιο.

Πρωτεΐνες: Οι πρωτεΐνες, το δεύτερο σε ποσότητα συστατικό του ρυζιού, είναι καλά ισορροπημένες επειδή και τα οκτώ απαραίτητα αμινοξέα υπάρχουν σε κατάλληλες αναλογίες. Έχει καλής ποιότητας πρωτεΐνες (globulin, glutelin, prolamin) σε σύγκριση με άλλα δημητριακά και είναι πλούσιο σε αμινοξέα όπως λευκίνη, ισολευκίνη, βαλίνη, λυσίνη [66], [67]. Η λυσίνη είναι ένα βασικό αμινοξύ το οποίο είναι ιδιαίτερα σημαντικό για την ανάπτυξη των παιδιών και είναι συχνά ελλιπής σε φυτικές τροφές. Αυτό κάνει το ρύζι μια αρκετά καλή πηγή πρωτεΐνης σε δίαιτες με περιορισμένη διαθεσιμότητα ζωικών πρωτεϊνών [49]. Μεταξύ των κλασμάτων της μύλευσης, το πίτουρο έχει την υψηλότερη περιεκτικότητα σε ενέργεια και πρωτεΐνη και ο φλοιός έχει το χαμηλότερο [68].

Υδατάνθρακες: Η μύλευση κατά τη διάρκεια της οποίας αφαιρείται το πίτουρο, τμήμα της αλευρόνης και μέρος του εμβρύου, μειώνει το περιεχόμενο πρωτεΐνης, λιπαρών, και διαιτητικών ινών και αυξάνει τους διαθέσιμους υδατάνθρακες [63], [68], [67]. Το ρύζι αποτελείται κυρίως από άμυλο. Το καστανό ρύζι περιέχει περίπου 75-85% υδατάνθρακες, και το λευκό ρύζι περίπου 90 %. Επομένως οι ιδιότητες του αμύλου αποτελούν έναν σημαντικό παράγοντα της ποιότητας των σιτηρών. Η σύνθεση του αμύλου μπορεί να διαφέρει ως προς την αναλογία αμυλόζης/αμυλοπηκτίνης. Η αμυλόζη αποτελείται από γραμμικά συνδεδεμένα μόρια γλυκόζης και η αμυλοπηκτίνη αποτελείται από μόρια γλυκόζης με διακλαδισμένη σύνδεση. Στις ποικιλίες των οποίων το ενδοσπέρμιο αποτελείται κυρίως από αμυλοπηκτίνη, το ρύζι είναι κηρώδες. Οι ποικιλίες αυτές απορροφούν λιγότερο νερό κατά το μαγείρεμα και έχουν κολλώδη υφή, ενώ οι ποικιλίες ρυζιού με περιεκτικότητα σε αμυλόζη μεγαλύτερη από 25 % απορροφούν περισσότερο νερό και έχουν σπυρωτή αίσθηση μετά το μαγείρεμα [19], [49].

Σάκχαρα: Η σακχαρόζη είναι το κύριο σάκχαρο του εμβρύου και του ενδοσπερμίου, ενώ υπάρχουν ακόμα μικρές ποσότητες ραφινόζης, γλυκόζης και φρουκτόζης. Το είδος και η συγκέντρωση των σακχάρων επηρεάζεται από την ποικιλία, το βαθμό μύλευσης και τον τρόπο επεξεργασίας. Στο πίτουρο περιέχονται σάκχαρα σε

δεκαπλάσια ποσότητα, τα οποία κατά την υγροθερμική επεξεργασία διαχέονται (περίπου κατά 50%) στο ενδοσπέρμιο.

Λιπαρά: Τα λιπαρά του ρυζιού είναι ιδιαίτερα χαμηλά (περίπου 3%), όπως άλλωστε και όλων των δημητριακών. Η συγκέντρωσή τους μειώνεται από το εξωτερικό προς το εσωτερικό μέρος του κόκκου και χρησιμοποιείται συχνά ως μέτρο σύγκρισης του βαθμού μύλευσης. Τα λιπαρά του ρυζιού είναι πλούσια σε απαραίτητα ω-6 λιπαρά οξέα. Το μυλευμένο ρύζι μπορεί να περιέχει 0.3-0.5%. Το καστανό ρύζι περιέχει περισσότερα μη πολικά λιπαρά και λιγότερα γλυκολιπίδια και φωσφολιπίδια από άλλα δημητριακά. Τα λιπαρά του ρυζιού είναι συγκεντρωμένα στη στιβάδα του πίτουρου και η σύστασή τους αναλύεται παρακάτω [68].

3.1 Βιοδραστικά συστατικά των εξωτερικών στρωμάτων του ρυζιού

Το πίτουρο, από την εκχύλιση του οποίου παράγεται το ρυζέλαιο, αλλά και ο φλοιός αποτελούν τη πλουσιότερη πηγή για την παραλαβή βιοδραστικών συστατικών [18], [64]. Το πίτουρο αποτελεί περίπου το 10% του βάρους του αναποφλοιώτου ρυζιού [52]. Περιέχει 12-22% έλαιο (υψηλό ποσοστό σε σχέση με άλλες πηγές πίτουρου), 11-17% πρωτεΐνη, 6-14% ίνες, 10-15% υγρασία, και 8-17% τέφρα. Είναι πλούσιο σε βιταμίνες, συμπεριλαμβανομένης της βιταμίνης E, θειαμίνη, νιασίνη, και μέταλλα όπως αργίλιο, ασβέστιο, χλώριο, σίδηρο, μαγνήσιο, μαγγάνιο, φώσφορο, κάλιο, νάτριο, και ψευδάργυρο. Περιέχει περίπου 4% ασαπνωτοποιήτων ενώσεων, που αποτελούνται κυρίως από φυσικά αντιοξειδωτικά όπως τοκοφερόλες, τοκοτριενόλες, και γ-ορυζανόλη, τα οποία εντοπίζονται στο έλαιο [52].

Οι **πρωτεΐνες** του πίτουρου είναι υψηλής θρεπτικής αξίας και είναι πλούσιες σε απαραίτητα αμινοξέα, ιδιαίτερα λυσίνη [52]. Οι **διαιτητικές ίνες** του πίτουρου περιλαμβάνουν την κυτταρίνη, την ημικυτταρίνη, τις πηκτίνες, τα υδροκολλοειδή, και τη λιγνίνη. Αυτά μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες, ανάλογα με τη διαλυτότητά τους στο νερό. Οι δομικές ίνες (λιγνίνες, κυτταρίνη και μερικές ημικυτταρίνες) είναι αδιάλυτες, ενώ οι πηκτίνες, τα κόμμεα, βλέννες, και οι υπόλοιπες ημικυτταρίνες είναι διαλυτές. Η συνολική ποσότητα διαιτητικών ινών στο πίτουρο κυμαίνεται από 25 έως 40%. Οι ίνες του πίτουρου αποτελούνται από ένα σχετικά χαμηλό ποσοστό διαλυτών ινών (7-13%), και το υπόλοιπο είναι αδιάλυτες ίνες. Η αξιοποίηση του πίτουρου είναι εφικτή μόνο με την **απενεργοποίηση του ενζύμου λιπάση**, υπεύθυνου για την υδρολυτική αποδόμηση των συστατικών του. Η

σταθεροποίηση του πίτουρου με διάφορες τεχνικές μετατρέπει το πίτουρο σε ένα σημαντικό υποπροϊόν του ρυζιού [66].

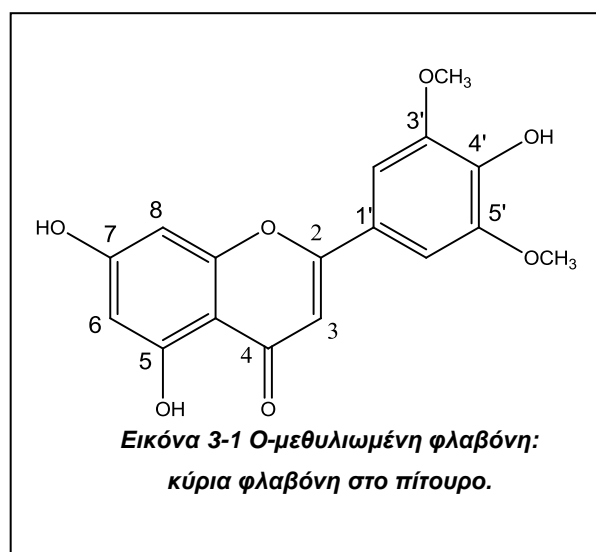
Οι Goufo et al. [22], συγκέντρωσε στοιχεία από 316 δημοσιεύσεις για τις αντιοξειδωτικές ενώσεις του ρυζιού, τα φλαβονοειδή, τις ανθοκυάνες (ανθοκυανίνες/ ανθοκυανιδίνες), το φυτικό οξύ, τα φαινολικά οξέα, τις τοκοφερόλες/ τοκοτριενόλες (vitamin E) και τη γ-ορυζανόλη. Σε πλήθος δημοσιεύσεων αναφέρεται ξεχωριστά από τη γ-ορυζανόλη, μία ακόμα ομάδα, οι φυτοστερόλες [69], [70], [71], [72].

Πίνακας 3-1 Κύριες βιοδραστικές ενώσεις του πίτουρου [73] , [58, 72]

Κύριες βιοδραστικές ενώσεις του πίτουρου			
Φλαβονοειδή	Ανθοκυανες- προανθοκυανιδίνες	Φαινολικά οξέα	Στεροϊδικού τύπου ενώσεις
Λουτεολίνη		Πρωτοκατεχουϊκό οξύ	γ-ορυζανόλη (>20 φερουλικοί εστέρες τριτερπενικών αλκοολών και στερολών)
Απιγενίνη	κυανιδίνη-3-O- γλυκοσίδης	Υδροξυ-βενζοϊκό οξύ	
Κερκετίνη	παιωνιδίνης-3-O- γλυκοσίδης	Βανιλλικό οξύ	
Ισοραμνετίνη	κυανιδίνη-3-O- ρουτινοσίδης	Συριγγικό οξύ	
Καιπφερόλη		Καφεϊκό οξύ	
μυρικετίνη	Κατεχίνη	π-κουμαρικό οξύ	τοκοφερόλες
	επικατεχίνη	Φερουλικό οξύ	τοκοτριενόλες
		Σιναπικό οξύ	Ακετυλιωμένοι στερουλικοί γλυκοσίδες
		Χλωρογενικό οξύ	φυτοστερόλες

3.1.1 Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι παράγωγα του φαιτυλοπροπανίου (C6-C3) και προέρχονται από τον συνδυασμό των βιοσυνθετικών οδών του σικιμικού και του οξικού οξέος. Τα περισσότερα φλαβονοειδή έχουν μέγιστο απορρόφησης στα 370 nm. Τα φλαβονοειδή αποτελούνται από έναν σκελετό 15 ανθράκων που οργανώνεται σε δύο αρωματικούς δακτυλίους (A και B δακτυλίους) που συνδέονται μεταξύ τους με μια αλυσίδα τριών ανθράκων (Δομή C6-C3-C6). Η δράση των φλαβονοειδών οφείλεται στα φαινολικά υδροξύλια, ιδιαίτερα στο 3'OH και 4'OH. Τα φλαβονοειδή μπορούν να ταξινομηθούν σε φλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβανόνες, διυδρο-φλαβονόλες, και



ισοφλαβονοειδή, τα οποία εμφανίζονται γενικά ως O- ή C-γλυκοσίδες.

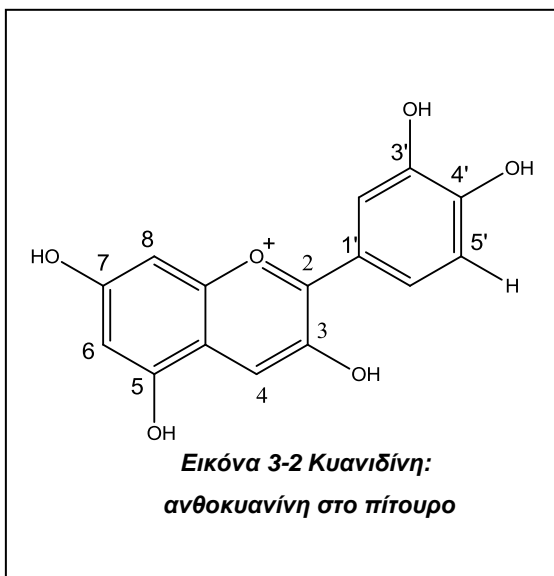
Από τα επτά φλαβονοειδή που συνήθως περιέχονται στο ρύζι, η τρισίνη (O-μεθυλιωμένη φλαβόνη) φαίνεται να είναι το κύριο φλαβονοειδές στο πίτουρο, αντιπροσωπεύοντας το 77% του συνόλου των επτά φλαβονοειδών. Τα άλλα φλαβονοειδή βρίσκονται στο

ρύζι με την ακόλουθη σειρά: λουτεολίνη (14%)> απιγενίνη (6%)> κερκετίνη (3%)> ισοραμεντίνη (1%)> καιπφερόλη (<1%)> μυρικετίνη (<1%).

Το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών (TFC) του πίτουρου είναι υψηλότερο από εκείνο του φλοιού (1,8 φορές), του καστανού ρυζιού (3,1 έως 4,2 φορές), και του λευκού ρυζιού (5,4 έως 15,6 φορές) [22].

3.1.2 Ανθοκυάνες και Προανθοκυανιδίνες

Οι ανθοκυάνες, μια άλλη κατηγορία των φλαβονοειδών, είναι υπεύθυνες για τον χρωματισμό των ανθέων και των καρπών. Εμφανίζουν μέγιστη απορρόφηση στα 510 nm, είναι υδατοδιαλυτοί γλυκοσίδες και τα άγλυκά τους είναι παράγωγα του κατιόντος 2-φαιτυλο-βενζυλοπυρυλίου ή κατιόντος φλαβυλίου.



Μοιράζονται μία κοινή υδροξυλίωση στο C3, C5, και τις θέσεις C7 επί του Β-δακτυλίου. Ανθοκυανίνες υπάρχουν και ως Ο-γλυκοσίδες (μονο, δι, ή τρι) και ακυλογλυκοσίδες των ανθοκυανιδινών στα φυτά. Τα σάκχαρα μπορούν να αντικατασταθούν από αλειφατικά, υδροξυβενζοϊκά, ή υδροξυκινναμωμικά οξέα.

Από τις 18 ανθοκυανίνες που έχουν ταυτοποιηθεί στο ρύζι, οι 4 κύριες είναι οι εξής: κουανιδίνο-3-Ο-γλυκοσίδης,

παιωνιδίνο-3-Ο-γλυκοσίδης, κουανιδίνο-3-Ο-ρουτινοσίδης, κουανιδίνο-3-Ο-γαλακτοσίδης και η μέση τιμή του αθροίσματος των τεσσάρων ανθοκυανινών είναι 3,6 φορές μεγαλύτερη για το πίτουρο σε σχέση με το καστανό ρύζι.

Οι προανθοκυανιδίνες, ή συμπυκνωμένες τανίνες, που προκύπτουν από τη συμπύκνωση φλαβαν-3-ολών ή φλαβα-3-4-διολών με φλαβαν-3-όλες (κατεχίνη, επικατεχίνη). Η κατεχίνη και επικατεχίνη είναι άφθονη στο πίτουρο και ακολουθεί με μεγάλη διαφορά (10 και 20 φορές μικρότερη ποσότητα) ο φλοιός.

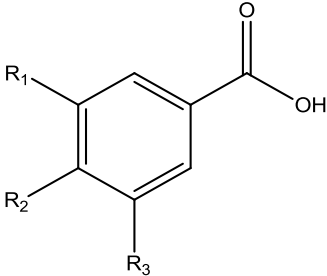
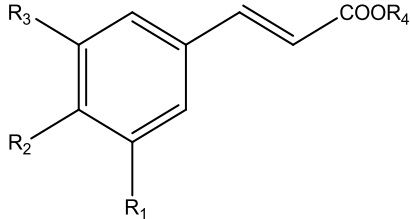
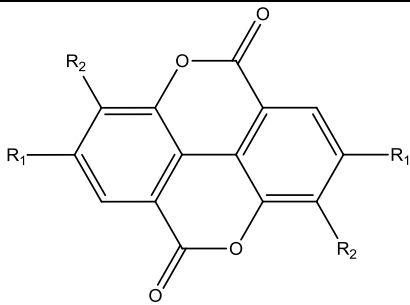
Οι ανθοκυανίνες και οι προανθοκυανιδίνες είναι ενώσεις οι οποίες φαίνεται να σχετίζονται κυρίως με το στρώμα του πίτουρου. Η ποσότητα στο πίτουρο των παρακάτω γλυκοσιδών, κουανιδίνο-3-Ο-γλυκοσίδη, παιωνιδίνο-3-Ο-γλυκοσίδη και κουανιδίνο-3-Ο-ρουτινοσίδη είναι, αντίστοιχα, 7,5, 2,3 και 3,3 φορές υψηλότερη σε σχέση με το καστανό ρύζι. Το λευκό ρύζι δεν περιέχει σχεδόν καθόλου ανθοκυανίνες ή προανθοκυανιδίνες [22].

3.1.3 Φυτικό οξύ

Το φυτικό οξύ, επίσης γνωστό ως ινοσιτολικό εξαφωσφατίδιο (IP 6) είναι η βασική μορφή αποθήκευσης του φωσφόρου σε πολλούς φυτικούς ιστούς και ειδικά σε ποικιλίες σιτηρών (σιτάρι, ρύζι, σίκαλη, κριθάρι κλπ) και φασολιών και αντιπροσωπεύει το 65-73% της συνολικής περιεκτικότητας σε φωσφόρο. Το φυτικό οξύ βρίσκεται κατά 90% στο πίτουρο και το υπόλοιπο 10% μοιράζεται στο ενδοσπέρμιο και στον φλοιό [22], [74], [57].

3.1.4 Φαινολικά οξέα

Τα Φαινολικά οξέα με μέγιστη απορρόφηση στα 280 nm είναι παράγωγα του υδροξυβενζοϊκού οξέος με βασικό σκελετό C6-C1 (γαλλικό, πρωτοκατεχουϊκό, π-υδροξυβενζοϊκό, βανιλικό, και συριγγικό οξύ ενώ αυτά που απορροφούν μέγιστα στα 320 nm είναι παράγωγα του υδροξυκινναμωμικού οξέος με βασικό σκελετό C6-C3 (π-κουμαρικό, φερουλικό, καφεϊκό, σιναπτικό, χλωρογενικό, και κινναμωμικό οξύ).

ΔΟΜΗ	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	ΟΝΟΜΑΣΙΑ
	H	H	H		Γαλλικό οξύ
	H	OH	OH	-	Πρωτοκατεχουϊκό οξύ
	H	OH	H	-	ρ-υδροξυ-βενζοϊκό οξύ
	H	OH	OCH ₃	-	Βανιλικό οξύ
	OCH ₃	OH	OCH ₃	-	Συριγγικό οξύ
	H	H	H	H	Κινναμωμικό οξύ
	OH	OH	OH	H	Καφεϊκό οξύ
	H	OH	H	H	ρ-κουμαρικό οξύ
	OCH ₃	OH	H	H	Φερουλικό οξύ
	OCH ₃	OH	OCH ₃	H	Σιναπτικό οξύ
	OH	OH	H	quinate	Χλωρογενικό οξύ
	OH	OH			Ελλαγικό οξύ

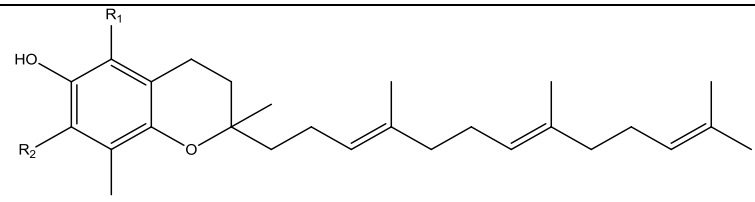
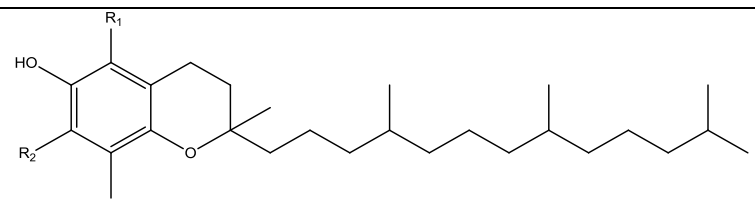
Εικόνα 3-3 Τα κύρια Φαινολικά οξέα στο πύτουρο

Το πύτουρο ρυζιού είναι η πλουσιότερη πηγή φαινολικών οξέων στο ρύζι [42], [75], [76]. Δώδεκα φαινολικά οξέα συνήθως προσδιορίζονται στο καστανό ρύζι, το λευκό ρύζι και το πύτουρο, με κυριότερο το φερουλικό οξύ (56-77% του συνόλου των

φαινολικών οξέων), το οποίο ακολουθείται από το p-κουμαρικό οξύ (8-24%), το σιναπτικό οξύ (2-12%), το γαλλικό οξύ (1-6%), το πρωτοκατεχουϊκό οξύ (1-4%), το p-υδροξυβενζοϊκό οξύ (1-2%), το βανιλλικό οξύ (1%), και το συριγγικό οξύ (1%). Υπάρχουν και άλλες φαινολικές ενώσεις που καθεμία αποτελεί λιγότερο του 1% του ολικού φαινολικού περιεχομένου (καφεϊκό οξύ, χλωρογενικό οξύ, κινναμμωμικό οξύ, ελλαγικό οξύ). Στον φλοιό, παρατηρείται μια διαφορετική κατανομή, με το p-κουμαρικό οξύ να είναι το κυρίαρχο φαινολικό οξύ (71%), ακολουθούμενο από το φερουλικό οξύ (23%), το βανιλλικό οξύ (3%), και το συριγγικό οξύ (1%). Συνοπτικά, το ολικό φαινολικό περιεχόμενο του πίτουρου σύμφωνα με τους Goufo et al. [22] είναι σχεδόν ίδιο με αυτό του φλοιού, ακολουθείται από το καστανό ρύζι και τελευταίο είναι το λευκό ρύζι. Οι μόνες εξαιρέσεις είναι βανιλλικό, συριγγικό, και p-κουμαρικό οξύ, των οποίων το περιεχόμενο είναι, αντίστοιχα, 8,0, 37,0, και 7,9 φορές υψηλότερο στον φλοιό σε σύγκριση με το πίτουρο [22].

3.1.5 Τοκοτριενόλες & Τοκοφερόλες

Οι τοκοτριενόλες και τοκοφερόλες, γνωστές ως βιταμίνη E, είναι πρενυλιωμένα παράγωγα του βενζοδιυδροπυρανίου (χρωμανόλης) που διακρίνονται από την πλευρική αλυσίδα τους, η οποία μπορεί να είναι είτε κορεσμένη είτε ακόρεστη. Η σειρά, η θέση και η φύση των υποκαταστατών καθορίζουν τέσσερις διαφορετικές ενώσεις (α, β, γ, δ). Η ελεύθερη ομάδα υδροξυλίου στον δακτύλιο χρωμανόλης είναι υπεύθυνη για τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες [22].

ΔΟΜΗ	R ₁	R ₂	ΟΝΟΜΑΣΙΑ
	CH ₃	CH ₃	α-τοκοτριενόλη
	CH ₃	H	β-τοκοτριενόλη
	H	CH ₃	γ-τοκοτριενόλη
	H	H	δ-τοκοτριενόλη
	CH ₃	CH ₃	α-τοκοφερόλη
	CH ₃	H	β-τοκοφερόλη
	H	CH ₃	γ-τοκοφερόλη
	H	H	δ-τοκοφερόλη

Εικόνα 3-4 Τοκοφερόλες & Τοκοτριενόλες στο πίτουρο

Η περιεκτικότητα σε βιταμίνη Ε ακολουθεί φθίνουσα πορεία ως εξής: πίτουρο > καστανό ρύζι > λευκό ρύζι > φλοιός.

Η γ-τοκοτριενόλη συμβάλλει το περισσότερο στο ολικό περιεχόμενο τοκοφερολών/τριενολών με ποσοστό 27-63%, ακολουθούμενη από την α-τοκοφερόλη (10-30%), την α-τοκοτριενόλη (9-19%), την γ-τοκοφερόλη (9-14%), την δ-τοκοτριενόλη (2-6%), την β-τοκοτριενόλη (1- 4%), την β-τοκοφερόλη (1-2%) και την δ-τοκοφερόλη (1-2%). Συνολικά, οι τοκοτριενόλες αντιπροσωπεύουν το 47-80% της συνολικής περιεκτικότητας σε βιταμίνη Ε και οι τοκοφερόλες το 20-53% [22].

3.1.6 Φυτοστερόλες

Οι φυτοστερόλες και οι φυτοστανόλες είναι μία μεγάλη ομάδα ενώσεων που υπάρχουν αποκλειστικά στα φυτά. Δομικά σχετίζονται με την χοληστερόλη αλλά διαφέρουν από αυτήν στο τμήμα της πλευρικής αλυσίδας. Αποτελούνται από έναν στεροειδικό σκελετό με μια υδροξυλομάδα στην θέση 3 του Α δακτυλίου και μία πλευρική αλυσίδα στην θέση 17 του D δακτυλίου. Οι στερόλες έχουν έναν διπλό δεσμό μεταξύ C-5 και C-6 του στεροειδικού τμήματος, ενώ στις φυτοστανόλες το στεροειδικό τμήμα είναι κορεσμένο [77]. Έχουν χρησιμοποιηθεί ως συμπληρώματα διατροφής επειδή μπορούν να μειώσουν το επίπεδο της χοληστερόλης και εμφανίζουν αντι-αθηρωματική δράση [72], [78]. Οι κυριότερες φυτοστερόλες στο πίτουρο είναι η β-σιτοστερόλη, η καμπεστερόλη, η στιγμαστερόλη [52].

ΔΟΜΗ	R	ΟΝΟΜΑΣΙΑ
		β-σιτοστερόλη
		καμπεστερόλη
		στιγμαστερόλη

Εικόνα 3-5 Κύριες φυτοστερόλες στο πύτουρο.

3.1.7 γ-Ορυζανόλη

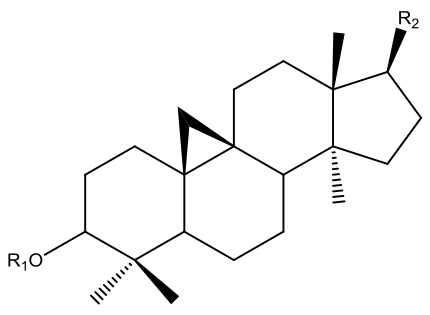
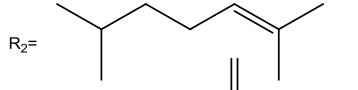
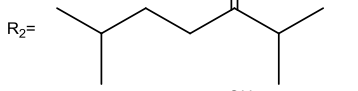
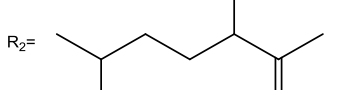
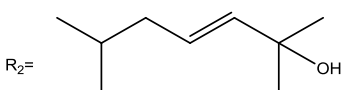
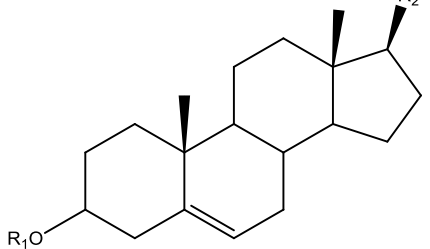
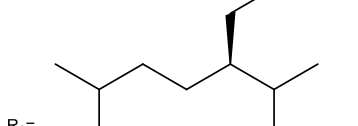
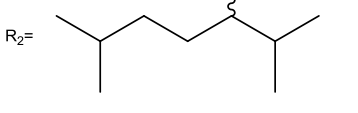
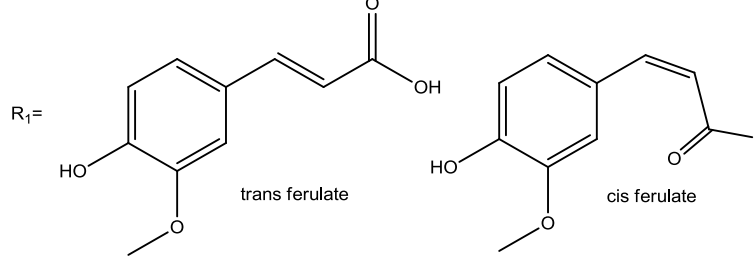
Η **γ-ορυζανόλη** είναι ένα μίγμα φερουλικών εστέρων, οι οποίοι σχηματίζονται με εστεροποίηση της υδροξυλομάδας μιας στερόλης (καμπεστερόλη, στιγμαστερόλη, β-σιτοστερόλη) ή με την εστεροποίηση της καρβοξυλομάδας του φερουλικού οξέως με τις τριτερπενικές αλκοόλες (κυκλοαρτανόλη, κυκλοαρτενόλη ή 24-μεθυλενοκυκλοαρτανόλη). Στερόλες με ένα κεκορεσμένο στεροειδικό σκελετό είναι γνωστές ως στανόλες, ενώ οι ενώσεις που περιέχουν ένα διπλό δεσμό μεταξύ C5 και C6 ή μεταξύ C7 και C8 αναφέρονται ως στερόλες. Οι μεθυλομάδες στον C4 επηρεάζουν την αντιοξειδωτική ιδιότητα των φερουλικών εστέρων. Το λευκό ρύζι είναι το πιο φτωχό σε γ-ορυζανόλη, το πύτουρο είναι 50 φορές πιο πλούσιο σε γ-ορυζανόλη (άθροισμα πέντε κύριων συστατικών της γ-ορυζανόλης), και ακολουθεί το καστανό ρύζι [22]. Η κατανομή των πέντε συστατικών της γ-ορυζανόλης στο συνολικό περιεχόμενο ακολουθεί την εξής φθίνουσα σειρά: trans φερουλικός εστέρας 24-μεθυλενοκυκλοαρτανόλης (34-44% του συνόλου), κυκλοαρτενόλης, (19-26%), καμπεστερόλης (15-23%), β-σιτοστερόλης (7- 17%), και στιγμαστερόλης (1-7%) [22].

Οι φερουλικοί στερυλεστέρες που συνθέτουν την γ-ορυζανόλη βρίσκονται κυρίως στο πύτουρο [25], [79], [80]. **Ανεξάρτητα από το χρώμα του ρυζιού, η κατανομή της γ-ορυζανόλης στο ρύζι έχει την ακόλουθη φθίνουσα σειρά: πύτουρο (317,4**

έως 317,6 g / kg)> καστανό ρύζι (41,3 – 47,3 g / kg)> φλοιό (10,2 – 32,3 g / kg)> λευκό ρύζι (4,9 έως 23,2 g / kg) [22].

Η γ-ορυζανόλη απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1954 από τους Kaneko και Tsuchiya [6] από το ασαπωνοποίητο κλάσμα του πίτουρου ως κρυσταλλική ουσία. Θεώρησαν ότι επρόκειτο για μία ένωση, η οποία ονομάστηκε ορυζανόλη από την βοτανική ονομασία των ειδών του ρυζιού, *Oryza sativa*. Τρία χρόνια μετά, οι Shimizu et al. [7] χρησιμοποιώντας διαφορετική μέθοδο εκχύλισης, διαπίστωσαν ότι η γ-ορυζανόλη δεν είναι μια ένωση αλλά αποτελείται από τρεις εστέρες φερουλικού οξέος με τριτερπενικές αλκοόλες, οι οποίες ορίστηκαν αρχικά ως ορυζανόλη Α, Β, και Γ και το 1958 ονομάστηκαν ως φερουλικοί εστέρες του κυκλοαρτενίου (Α) και του 24 μεθύλενο κυκλοαρτενίου (Γ) ενώ η ορυζανόλη Β βρέθηκε να είναι μίγμα του Α και του Γ [9]. Στην ομάδα της γ-ορυζανόλης ανήκουν και οι καφεϊκοί εστέρες τριτερπενικών αλκοολών (φυτοστερολών, κυκλοαρτενίων). Ωστόσο, στο ρύζι ένας καφεϊκός εστέρας έχει αναφερθεί μέχρι στιγμής, ο καφεϊκός εστέρας του κυκλοαρτενίου [8]. Με βάση το μέγιστο απορρόφησης στα 325 nm, **τουλάχιστον 25** συστατικά της γ-ορυζανόλης έχουν εντοπιστεί μέχρι σήμερα, με πέντε από αυτά να αποτελούν περίπου το 95% της γ-ορυζανόλης [8], [22], [81], [82], [83].

Εκτός από τη γ-ορυζανόλη, υπάρχει στο ρυζέλαιο ακόμα μία ομάδα, **η πολική γ-ορυζανόλη** που αποτελείται από υδροξυλιωμένους φερουλικούς εστέρες, και έχει μελετηθεί ελάχιστα. Αναφέρεται η ύπαρξή της για πρώτη φορά το 2003 από τους Fang et al. [8], απομονώνονται για πρώτη φορά το 2005 από τους Luo et al. [11] ξεχωριστά τρεις ενώσεις της πολικής γ-ορυζανόλης με τη μέθοδο της παρασκευαστικής HPLC κανονικής φάσης και μελετάται η κυτταροτοξική της δράση. Το 2011, απομονώνεται η πολική γ-ορυζανόλη με τη μέθοδο της χρωματογραφίας κατ' αντιρροή για πρώτη φορά και ταυτοποιούνται οι κύριες ενώσεις με τη μέθοδο LC-MS από τους Angelis et al. [12].

ΔΟΜΗ	R ₂	ΟΝΟΜΑΣΙΑ (Φερουλικός εστέρας)
		κυκλοαρτενόλης
		24-μεθυλενο-κυκλοαρτανόλης
		(24S) ή (24R)-κυκλοαρτ-25-εν-3β,24-διολης
		κυκλοαρτ-23Z-εν-3β,25-διόλης
		β-σιτοστερόλης
		καμπεστερόλης
		

Εικόνα 3-6 Βασικές ενώσεις της γ-ορυζανόλης και της πολικής γ-ορυζανόλης [10]

Συστατικά της γ-ορυζανόλης που έχουν αναφερθεί:

γ-ορυζανόλη	Αναφορές
24 μεθυλενο-κυκλοαρτανόλης, ¹	[72],[9],[8], [83], [84], [85]
κυκλοαρτενόλης, ¹	[72],[9],[8], [83], [84], [85]
Καφεϊκός εστέρας της κυκλοαρτενόλης, ²	[8]
κυκλοαρτανόλης, ¹	[8]
κυκλομπρανόλης, ¹	[85]
κυκλοευκαλενόλης, ¹	[72], [8], [83]
καμπεστερόλης, ¹	[8], [84], [85]
Καφεϊκός εστέρας της καμπεστερόλης, ²	[8]
σιτοστερόλης, ¹	[8], [83], [84], [85]
σιτοστανόλης, ¹	[72]
στιγμαστερόλης, ¹	[72], [8], [83], [84], [85]
στιγμαστανόλης, ¹	[72]
D ⁷ -στιγμαστενόλης, ¹	[84],
D ⁷ -σιτοστενόλης, ¹	[8], [84]
D ⁷ -καμπεστενόλης, ¹	[8], [84]
καμπεστανόλης, ¹	[72]
γκραμιστερόλης, ¹	[83]
Σιτροσταδιενόλης, ¹	[83]
24-μεθυλεν-χολεστερόλης, ¹	[72]
24-μεθυλοχολεστερόληςferulate, ¹	[72]
Πολική γ-ορυζανόλη	
24-υδροξυ-24-μεθυλοκυκλοαρτανόλης, ¹	[72]
25-υδροξυ-24-μεθυλοκυκλοαρτανόλης, ¹	[72]
(24S)-κυκλοαρτ-25-εν-3β, 24-διολης, ¹	[72], [12]
(24R)- κυκλοαρτ-25-εν-3β,24-διολης, ¹	[72], [12]
κυκλοαρτ-23Z-εν-3β,25-διολης, ¹	[72], [12]

3.2 Χημική Σύσταση ρυζελαίου (RICE BRAN OIL)

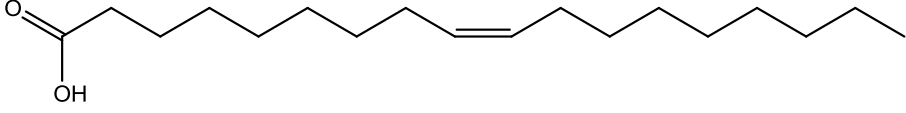
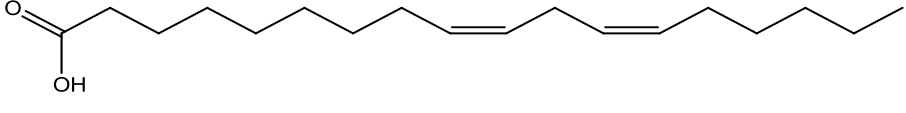
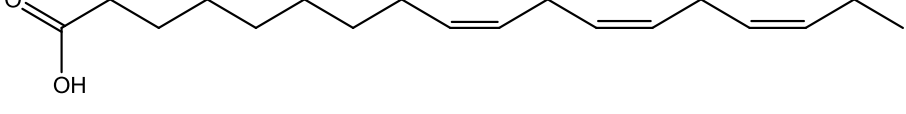
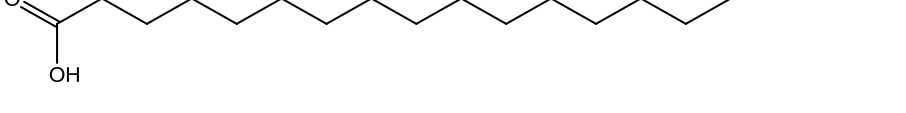
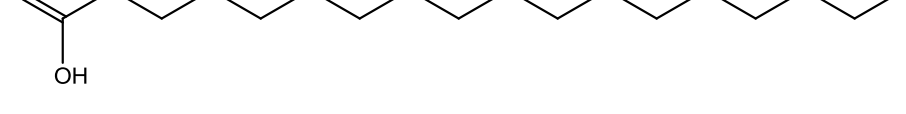
Το ρυζέλαιο, είναι πλούσιο σε ακόρεστα λιπαρά οξέα και βιοδραστικές ομάδες ενώσεων όπως είναι οι τοκοφερόλες/τοκοτριενόλες, οι φυτο-στερόλες/στανόλες και η γ-ορυζανόλη που περιγράφησαν προηγουμένως. Γενικά τα φυτικά έλαια αποτελούνται κυρίως από λιπίδια που μπορούν να διακριθούν σε δύο κύριες κατηγορίες: σαπωνοποιήσιμα και ασαπωνοποιήτα. Η πρώτη κατηγορία απαντά στο 93–96% ενώ η δεύτερη στο 4–7% [86].

Πίνακας 3-2 Σύσταση του ακατέργαστου RBO [87], [65], [57].

ΛΙΠΙΔΙΑ		ΠΟΣΟΣΤΟ
ΣΑΠΩΝΟΠΟΙΗΣΙΜΑ		90-96
Ουδέτερα λιπίδια		88-89
1.	Τριαγλυκερόλες	66-67
2.	Διαγλυκερόλες	2.4-3.6
3.	Μονογλυκερόλες	4.7-6.2
4.	Ελευθέρα λιπαρά οξέα	2-4
5.	Κερί	3-4
Πολικά λιπίδια		
6.	Γλυκολιπίδια	5.4-6.7
7.	Φωσφολιπίδια	3.6-4.8
ΑΣΑΠΩΝΟΠΟΙΗΤΑ		3.6-4.8
1.	4-δεσμεθυλο στερόλες και εστέρες (εστέρες με λιπαρά οξέα μακριάς αλύσου και εστέρες φερουλικών οξέων)	1.8
2.	4-μονομεθυλο στερόλες	0.4
3.	4,4'-διμεθυλο στερόλες και εστέρες (εστέρες φερουλικών οξέων)	1.2
4.	Υδατάνθρακες	0.8
5.	Τοκοφερόλες	0.04
6.	Τοκοτριενόλες	0.07

Τα **σαπωνοποιήσιμα λιπίδια** συγκροτούνται από ένα λιπίδιο και μία λειτουργική ομάδα εστέρα που μπορεί να υδρολύεται υπό συγκεκριμένες συνθήκες. Τα λιπίδια που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία είναι τα τριγλυκερίδια, τα διγλυκερίδια, τα

ελεύθερα λιπαρά οξέα και οι κηροί. Η κύρια σύνθεση ακατέργαστου ρυζέλαιου είναι τα ουδέτερα λιπίδια και σε σύγκριση με άλλα φυτικά έλαια, το ρυζέλαιο περιέχει υψηλότερα επίπεδα μη τριγλυκεριδικών συστατικών, τα περισσότερα από τα οποία απομακρύνονται κατά τις διεργασίες εξευγενισμού. Το 90% με 96% του ρυζέλαιου αποτελείται από σαπωνοποιήσιμα λιπίδια, όπως είναι τα ελεύθερα λιπαρά οξέα ελαϊκό (C18:1) (38,4%), λινελαϊκό (C18:2) (34,4%) και α-λινολενικό (C18:3) (2,2%) από τα ακόρεστα λιπαρά οξέα, καθώς και παλμιτικό (C16:0) (21,5%) και στεατικό (C18:0) (2,9%) οξύ από τα κορεσμένα λιπαρά οξέα [65], [88]. Η περιεκτικότητα ενός ελαίου σε λιπαρά οξέα είναι δείκτης της σταθερότητάς του, των φυσικών ιδιοτήτων και της θρεπτικής του αξίας [89]. Τα κύρια φωσφολιπίδια στο ρύζι είναι η φωσφατιδυλοχολίνη (PC), η φωσφατιδυλαιθανολαμίνη (PE) και η φωσφατιδυλο-ϊνοσιτόλη (PI).

ΔΟΜΗ	ΕΝΩΣΗ
	Ελαϊκό οξύ
	Λινελαϊκό οξύ
	α-λινολενικό οξύ
	Παλμιτικό οξύ
	Στεατικό οξύ

Εικόνα 3-7 Τα κύρια λιπαρά οξέα του ρυζέλαιου

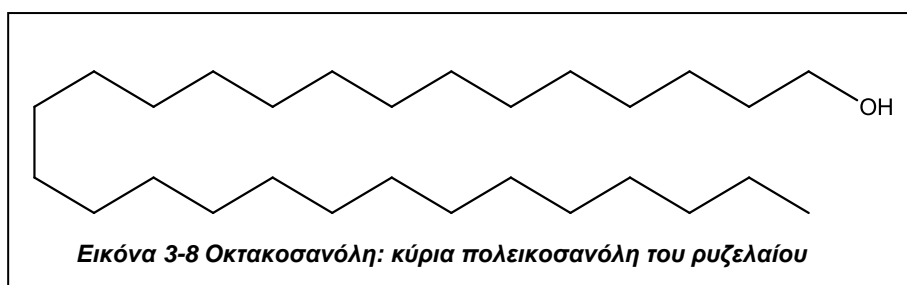
Το **ασαπυνοποίητο** κλάσμα του RBO κυμαίνεται από 2% έως 4%, ανάλογα με την διαδικασία εξευγενισμού του ελαίου. Αυτή η τιμή είναι υψηλότερη από εκείνη των άλλων φυτικών ελαίων, όπως είναι το ηλιέλαιο (1,4%), το έλαιο αραχίδας (0,2%), το έλαιο από σπόρους κάρδαμου (1,3%). Η σύνθεση αυτή υπογραμμίζει την υψηλή θρεπτική αξία του RBO, και περιέχει τον μεγαλύτερο αριθμό φυτοχημικών ενώσεων παρουσιάζοντας σημαντική βιολογική δράση. Στα ασαπυνοποίητα λιπίδια περιλαμβάνονται "λιποδιαλυτές" βιταμίνες (κυρίως A και E) και χοληστερόλη. Το

ασαπυνοποίητο κλάσμα περιέχει κυρίως **φυτοστερόλες** (καμπεστερόλη, σιγμαστερόλη, β-σιτοστερόλη), **τριτερπενικές αλκοολές** (24-μεθυλενο-κυκλοαρτανόλη, κυκλοαρτενόλη, κυκλοαρτανόλη), **τοκοφερόλες**, **τοκοτριενόλες** και **γ-ορυζανόλη**, καθώς και άλλες ενώσεις που βρίσκονται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις, όπως **λεκιθίνη** και **καροτενοειδή**, **σκουαλένιο** και **κεραμίδια** [72], [5], [65]. Τα τελευταία χρόνια, ωστόσο έχουν προστεθεί κάποιες κατηγορίες ουσιών στο ασαπυνοποίητο κλάσμα, όπως είναι οι **πολεικοσανόλες** και λιπαρές αλδεΐδες [88]. Η γ-ορυζανόλη φαίνεται να είναι η κυρίαρχη ομάδα ενώσεων του ασαπυνοποίητου κλάσματος σε σχέση με τις υπόλοιπες. Ωστόσο, οι περισσότερες ομάδες έχουν ήδη περιγραφεί ως βιοδραστικά συστατικά του πύτουρου.

Από τις δευτερεύουσες ομάδες ενώσεων του ρυζελαίου αξίζει να σημειωθούν οι εξής:

Πολεικοσανόλες

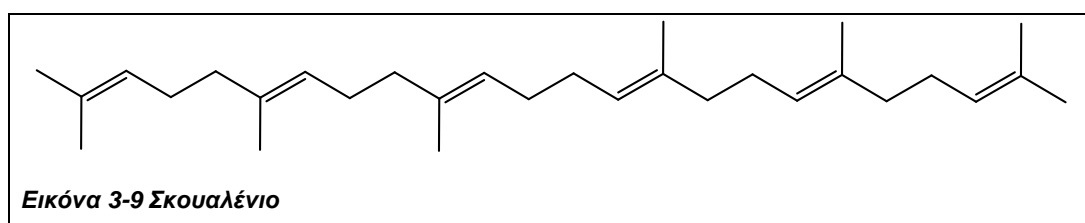
Πολεικοσανόλες είναι μια κοινή ονομασία αλειφατικών πρωτοταγών αλκοολών μακριάς αλυσίδας που αποτελούνται από 20-34 άτομα άνθρακα και κατανέμονται στο ασαπυνοποίητο κλάσμα του ορυζελαίου. Περιλαμβάνουν 1-τετρακοζανόλη, 1-εξακοζανόλη, 1-επτακοζανόλη, 1-οκτακοζανόλη, 1-νονακοζανόλη, 1-τριακοντανόλη, 1-δοτριακοντανόλη και 1-τετρατριακοντανόλη εκ των οποίων τα κυρίαρχα είναι η 1-οκτακοζανόλη και η 1-τριακοντανόλη. Βρίσκονται σε μια ποικιλία φυτικών οργάνων, όπως φύλλα, φρούτα, ξηροί καρποί και σπόροι όπως ο κόκκος του ρυζιού, και απομονώνονται από διάφορες πηγές, όπως κεριά μέλισσας, ζαχαροκάλαμο, σιτάρι, καστανό ρύζι και καλαμπόκι. [72]



Η οκτακοζανόλη, η οποία είναι η κύρια αλειφατική αλκοόλη στο μείγμα των πολεικοσανολών, μειώνει τη δράση της χοληστερόλης. Η τριακοντανόλη, μια αλειφατική πρωτοταγής αλκοόλη μακριάς αλυσίδας (C30) αναστέλλει ισχυρά την σύνθεση της χοληστερόλης σε κύτταρα ηπατώματος, ενώ η οκτακοζανόλη δεν μπορεί να επηρεάσει τη σύνθεσή της [87], [90].

Σκουαλένιο

Το σκουαλένιο ένα άλλο δευτερεύον συστατικό του RBO, ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά από τον Tsumimoto το 1931 σε εκχυλισμα ήπατος καρχαρία. Αργότερα, βρέθηκε σε διαφορετικούς ιστούς ζώων και φυτών. Το σκουαλένιο είναι ένα πολυακόρεστο τριτερπένιο με 6 μονάδες ισοπρενίου, και βιοσυνθετικά αποτελεί την πρόδρομο ένωση για τη βιοσύνθεση της χοληστερόλης και άλλων στεροειδών. Έχει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και ενισχύει την αντικαρκινική δράση όταν χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με άλλα αντικαρκινικά φάρμακα [91]. Οι διάφορες βιο-λειτουργίες του σκουαλενίου επιτρέπουν την εφαρμογή του σε τρόφιμα, καλλυντικά, ακόμη και φάρμακα [72].



Κεραμίδια

Τα κεραμίδια είναι ενώσεις που αποτελούνται από ένα λιπαρό οξύ συνδεδεμένο με την αμινομάδα της σφιγγοσίνης (αμινο-αλκοόλη αλκοόλη που φέρει ήδη μια επιμήκη αλειφατική αλυσίδα) ή άλλης μεγάλης αλυσίδας. Ανακαλύφθηκαν αρχικά σε ανθρώπινους ιστούς του εγκεφάλου. Συντίθενται ή λαμβάνονται μέσω εκχύλισης από φυτά, όπως το ρύζι και το σιτάρι. Τα κεραμίδια ρυζιού έχουν χρησιμοποιηθεί ως λειτουργικό συστατικό στα καλλυντικά, λόγω των θετικών επιπτώσεών τους στην υγεία του δέρματος, όπως είναι η ενυδάτωση και η αντι-μελάγχρωση.[72], [92]

4 Φαρμακολογικές ιδιότητες γ-ορυζανόλης

Το RBO είναι ένα φυτικό έλαιο πλούσιο σε βιοδραστικές φυτοχημικές ενώσεις, οι οποίες παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση και οφέλη για την υγεία. Η ταυτοποίηση των βιοδραστικών ενώσεων, που αναφέρθηκαν στη φυτοχημική ανάλυση του RBO έχει δώσει ώθηση στην ανάπτυξη νέων εμπλουτισμένων διατροφικών σκευασμάτων με ρυζέλαιο ή τις ενώσεις του. Το RBO και οι ενώσεις του έχουν μελετηθεί για την πιθανή δράση τους εναντίον των ελευθέρων ριζών, στην αντιμετώπιση της υπερλιπιδαιμίας και του διαβήτη τύπου 1 και 2, για την αντιφλεγμονώδη δράση και την ενίσχυση του ανοσοποιητικού [5]. Σύμφωνα με έρευνες που αναφέρονται στο βιβλίο "MEDICINAL PLANTS OF THE WOLRD", μετά από απλή αντικατάσταση του φοινικέλαιου με ρυζέλαιο (RBO) ως μαγειρικό λάδι διαπιστώθηκε μείωση της χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων στο αίμα σε διάστημα μόλις 15 ημερών. Η μείωση της χοληστερόλης στο αίμα και της LDL χοληστερόλης είναι αντίστοιχη με τη μείωση που οφείλεται στην κατανάλωση ελαιολάδου [28]. Τα θετικά λοιπόν αποτελέσματα σχετικά με την δραστηριότητα του RBO, που είναι το μοναδικό φυτικό έλαιο πλούσιο σε γ-ορυζανόλη, αποτέλεσε το κίνητρο για την μελέτη της δραστηριότητας της γ-ορυζανόλης.

Από τη στιγμή που ανακαλύφθηκε η γ-ορυζανόλη τη δεκαετία του 1950 έχει διεξαχθεί πληθώρα ερευνών σχετικά με την πιθανή φαρμακολογική της δράση [69], [93]. Η πλειοψηφία των βιολογικών ερευνών αφορά την αντιοξειδωτική δράση της γ-ορυζανόλης, χάρη στο φαινολικό τμήμα της δομής της. Εξ ορισμού οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) είναι ελεύθερες ρίζες, οι οποίες, όταν υπερπαράγονται από τον οργανισμό, μπορεί να προκαλέσουν οξειδωτικό στρες με οξείδωση βιολογικών μακρομορίων όπως οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊνικά οξέα, καθώς και των κυτταρικών μεμβρανών. Αυτή η οξειδωτική βλάβη είναι η αιτία πολλών χρόνιων ασθενειών, και της γήρανσης των κυττάρων. Έτσι, κατά τις τελευταίες δεκαετίες η έρευνα για νέα αντιοξειδωτικά έχει αυξηθεί σημαντικά. Οι οργανικές ενώσεις που συγκροτούν τη γ-ορυζανόλη, φέρουν ένα φερουλικό / καφεϊκό οξύ, το οποίο σαν δότης ηλεκτρονίων εμποδίζει τη δράση των ελευθέρων ριζών και καθιστά την γ-ορυζανόλη κατάλληλο πεδίο για μελέτη πιθανής αντιοξειδωτικής δράσης [9], [94, 95], [96].

4.1 Δράση έναντι του οξειδωτικού στρες

Το «οξειδωτικό στρες» αντιπροσωπεύει μια διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου (**Reactive Oxygen Species, ROS**) και της ικανότητας ενός βιολογικού συστήματος να αδρανοποιεί τα τοξικά αυτά μόρια και να

επισκευάζει τις βλάβες που προκαλούν. Χημικά, το οξειδωτικό στρες σχετίζεται είτε με την αυξημένη παραγωγή ROS είτε με τη μείωση των αντιοξειδωτικών εφεδρειών του οργανισμού, όπως του μηχανισμού ανηγμένης και οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSH/GSSG). Οι ROS προκαλούν υπεροξειδωτική βλάβη των λιπιδίων, των πρωτεϊνών και του DNA, οδηγώντας στην εμφάνιση πρόωρης γήρανσης, αθηρωμάτωσης, διαβήτη και διαφόρων εκφυλιστικών νοσημάτων ή και καρκίνου. Η κυριότερη πηγή ROS στον άνθρωπο είναι τα μιτοχόνδρια, όπου παράγονται φυσιολογικά ως ενδιάμεσο κατά τη διάρκεια της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Σύμφωνα με τους MS Islam et al. οι ενώσεις της γ-ορυζανόλης (φερουλικό εστέρες της κυκλοαρτενόλης, της 24-μεθυλενοκυκλοαρτανόλης, της β-σιτοστερόλης και της καμπεστερόλης) αναστέλλουν την υπεροξειδωση των λιπιδίων, την παραγωγή ελεύθερων ριζών και απομακρύνουν τις ελεύθερες ρίζες από το σώμα [97]. Σε κυτταρικό επίπεδο, η χοληστερόλη μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία της λιπιδικής διπλοστοιβάδας. Έτσι, οι ενώσεις της γ-ορυζανόλης που έχουν παρόμοια δομή με εκείνη της χοληστερόλης, φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη μείωση του οξειδωτικού στρες και τη διατήρηση της λειτουργικότητας των κυττάρων. Σύμφωνα με *in vitro* πειράματα, η γ-ορυζανόλη, το φερουλικό οξύ και το στεροειδικό τμήμα (κυκλοαρτενόλη) μέσω διαφόρων μηχανισμών, μειώνουν τελικά το οξειδωτικό στρες [98].

4.2 Αντιελκωτική δράση

Στη δεκαετία του 1970-1980, η γ-ορυζανόλη ερευνήθηκε εκτενώς στην Ιαπωνία για τις ιδιότητες έναντι στη δημιουργία ελκών, χρησιμοποιώντας μοντέλα αρουραίων. Παρ' όλα αυτά, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για την καθιέρωση της κλινικής αποτελεσματικότητάς της [9].

4.3 Αντιφλεγμονώδης δράση

Πρόσφατα, πολλοί ερευνητές διερεύνησαν την ικανότητα της γ-ορυζανόλης στην θεραπεία της φλεγμονής. Σε κολίτιδα που προκαλείται σε ποντίκια, με την χορήγηση γ-ορυζανόλης η φλεγμονώδης αντίδραση αναστέλλεται. Συμπεραίνεται λοιπόν, ότι η γ-ορυζανόλη θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως θεραπευτικό ή προληπτικό μέσο σε φλεγμονώδεις παθήσεις του γαστρεντερικού συστήματος [9, 99]. Ο ορθοκολικός καρκίνος είναι μια από τις συχνότερες μορφές καρκίνου ενώ και οι φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου (IBDs) – κυρίως η ελκώδης κολίτιδα (UC) και η νόσος του Crohn αποτελούν σημαντικά προβλήματα υγείας [100], [98]. Η γ-ορυζανόλη (φερουλικός εστέρας της κυκλοαρτενόλης) και το φερουλικό οξύ βελτίωσαν τη φλεγμονή στο

κόλον σε κολίτιδα ποντικών επαγόμενη από DSS (dextran sulfate sodium). Παρόλα αυτά, η θεραπευτική αντιμετώπιση των IBDs στηρίζεται στη χρήση κυρίως αμινοσαλικυλικών, κορτικοστεροειδών αλλά και ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων, ανάλογα με την εξέλιξη της νόσου. Τα παράγωγα του 5-αμινο σαλικυλικού οξέος, είναι συνήθως καλά ανεκτά, αλλά μπορεί να εμφανίσουν παρενέργειες, όπως οξεία παγκρεατίτιδα, κοιλιακό άλγος, διάρροια, ναυτία, κεφαλαλγία, αναιμία, νεφρική ανεπάρκεια. Η γ-ορυζανόλη, παρ' ότι απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για την κλινική αποτελεσματικότητά της, αποτελεί πιθανώς μία σημαντική εναλλακτική λύση για την αντιμετώπιση των γαστρεντερικών ενοχλήσεων [98]. Μια δευτερεύουσα επίδραση της παραγωγής ελευθέρων ριζών (ROS) είναι η επαγωγή της ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ, ο οποίος μεσολαβεί στη φλεγμονή. Τόσο σε *in vivo* όσο και σε *in vitro* πειράματα, η γ-ορυζανόλη αναστέλλει την ενεργοποίηση του NF-κΒ και την διαδικασία της φλεγμονής. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι το ρυζέλαιο εμποδίζει την ανάπτυξη φλεγμονής στο αυτί ποντικού που προκλήθηκε από 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) [83]. Τέλος υπάρχουν αναφορές για την αντιφλεγμονώδη δράση της τριτερπενικής αλκοόλης, κυκλοαρτενόλη και του trans φερουλικού οξέος [98]. Δεν έχει αποδειχθεί εάν η γ-ορυζανόλη αναστέλλει τον NF-κΒ άμεσα ή έμμεσα μέσω της αντιοξειδωτικής της ικανότητας. Η αναστολή των ανεπιθύμητων κυτταρικών λειτουργιών που προκαλούνται από μη φυσιολογικά προφλεγμονώδη σήματα με τη μεσολάβηση του NF-κΒ είναι μία σημαντική ικανότητα των λεγόμενων «χημειοπροστατευτικών» φυτοχημικών ενώσεων.

4.4 Αντιαλλεργική δράση

Στην έρευνα των Oka et al. [101], χρησιμοποιώντας την παθητική δερματική αναφυλαξία (PCA) σαν μοντέλο αντίδρασης σε αρουραίους, παρατήρησαν μια σημαντική αντι-αλλεργική δράση που προσδιορίζεται από την αναστολή της αποκοκκίωσης των μαστοκυττάρων (mast cell degranulation). Επιπλέον, χρησιμοποιώντας την ίδια μεθοδολογία, προσδιορίστηκε η επίδραση των κύριων συστατικών του κλάσματος, τα οποία είναι οι φερουλικοί εστέρες κυκλοαρτενόλης (28,2%), 24-μεθυλενο-κυκλοαρτανόλης (22,4%), β-σιτοστερόλης (12,3%) και κυκλομπρανόλης (<10%) και αποδείχθηκε παρόμοια αναστολή της αποκοκκίωσης των μαστοκυττάρων. Τέλος, διερευνήθηκε ο πιθανός μηχανισμός δράσης, σύμφωνα με τον οποίο η γ-ορυζανόλη συνδέεται με την ανοσοσφαιρίνη E (IgE), αποτρέποντας τη σύνδεση με τον υποδοχέα της IgE και τον υψηλής συγγένειας υποδοχέα IgE (FcεRI), ο οποίος εμπλέκεται στην αλλεργική διαταραχή [16].

4.5 Αντιμικροβιακές ιδιότητες

Εκχυλίσματα από το πύουρο του ρυζιού αναστέλλουν την ανάπτυξη των ακόλουθων βακτηρίων που απομονώθηκαν από ασθενείς που πάσχουν διαρροϊκές ασθένειες: *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Escherichia coli* και *Staphylococcus aureus*. Τα εκχυλίσματα ήταν πιο αποτελεσματικά έναντι του *V. cholerae* (στέλεχος O139) με ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) 0,976 mg/ml, υποδεικνύοντας ότι το πύουρο ρυζιού συνεισφέρει στην αντιμετώπιση διαρροϊκών καταστάσεων [58].

4.6 Αντικαρκινικές ιδιότητες

Η γ-ορυζανόλη και τα συστατικά της έχουν αξιολογηθεί για τις αντικαρκινικές τους ιδιότητες. Οι Yasukawa et al. έχουν αναφερθεί στην ανασταλτική δράση των τεσσάρων κύριων συστατικών της γ-ορυζανόλης (φερουλικοί εστέρες της κυκλοαρτενόλης, της 24-μεθυλενοκυκλοαρτανόλης, της β-σιτοστερόλης, της καμπεστερόλης) στην πειραματικά επαγόμενη καρκινογένεση σε δέρμα ποντικού [102]. Επιπλέον μια πρόσφατη εργασία έδειξε ότι γ-ορυζανόλη μειώνει σημαντικά τη μάζα του όγκου σε ποντίκια στα οποία εμφυτεύτηκαν καρκινικά κύτταρα CT-26 παχέως εντέρου. Η από του στόματος χορήγηση 1% γ-ορυζανόλης οδήγησε σε μια δόσο-εξαρτώμενη μείωση της ανάπτυξης του όγκου κατά 44% χωρίς να επηρεάζει το βάρος των άλλων οργάνων [103]. Στην Ασία, όπου το ρύζι είναι βασικό στοιχείο της διατροφής, τα περιστατικά καρκίνου στον μαστό και το παχύ έντερο είναι αισθητά λιγότερα σε σχέση με τον Δυτικό κόσμο. Οι φερουλικοί εστέρες του ρυζιού με στερόλες και τριτερπενικές αλκοόλες εμφανίζουν προστατευτική δράση στον καρκίνο του παχέως εντέρου *in vitro* και *in vivo* [104], [105]. Έχει αναφερθεί ότι οι φερουλικές φυτοστερόλες μετριάζουν την ανάπτυξη και την εξάπλωση του καρκίνου του μαστού, σε πειράματα που έχουν γίνει σε ποντίκια [106]. Οι ενώσεις trans φερουλικός εστέρας κυκλοαρτενόλης και 24-μεθυλενο-κυκλοαράτανόλης δείχνουν επίσης μέτρια κυτταροτοξικότητα κατά του ανθρώπινου αδενοκαρκινώματος σε MCF-7 κύτταρα μαστού [11]. Σε πειράματα που έγιναν σε Arc^{Min} ποντίκια, (ποντίκια που εμφανίζουν προδιάθεση για πολλαπλή εντερική νεοπλασία λόγω μετάλλαξης στο APC ογκοκατασταλτικό γονίδιο) με καρκίνο του μαστού, του προστάτη, και του εντέρου παρατήρησαν ότι η εφαρμογή δίαιτας με 30% πύουρο ρυζιού είχε σαν αποτέλεσμα την μείωση των αδενωμάτων [107]. Σε άλλη έρευνα, παρατηρήθηκε η αντικαρκινική δράση των ενώσεων του πύουρου, της β-σιτοστερόλης, της καμπεστερόλης και της στιγμαστερόλης στο παχύ έντερο, στο μαστό, και στον προστάτη [108]. Ωστόσο, εξακολουθεί να είναι ασαφές εάν αυτές οι αντικαρκινικές δράσεις των φυτοστερολών

σχετίζονται με την αντιοξειδωτική δράση ή και με την αναστολή του παράγοντα μεταγραφής NF-κΒ [98].

4.7 Δράση στο μετεμμηνοπαυσιακό σύνδρομο

Στην Ιαπωνία δύο μελέτες έχουν ερευνήσει την επίδραση της γ-ορυζανόλης επί των διαταραχών της εμμηνόπαυσης. Στην πρώτη, το 1960, χορηγήθηκαν σε 13 γυναίκες που είχαν υποβληθεί σε υστερεκτομή 100 mg γ-ορυζανόλης τρεις φορές την ημέρα επί 38 ημέρες. Σύμφωνα με τα ευρήματα, το 67% των γυναικών ανέφεραν σημαντική μείωση των συμπτωμάτων της εμμηνόπαυσης, όπως οι εξάψεις. Το 1982, σε μια άλλη μελέτη, σε 40 γυναίκες με διαταραχές εξαιτίας της κλιμακτήριου χορηγήθηκαν 300 mg της γ-ορυζανόλης, καθημερινά για 4-8 εβδομάδες. Στο 90% των περιπτώσεων παρατηρήθηκε μια γενική βελτίωση όσον αφορά τις εμμηνόπαυσιακες διαταραχές. Από τότε κι άλλες μελέτες που ερευνούν την επίδραση της γ-ορυζανόλης έχουν διεξαχθεί επί των διαταραχών της εμμηνόπαυσης σε σύγκριση με άλλες προσεγγίσεις όπως ο βελονισμός. Ακόμα κι αν ο βελονισμός παρουσιάζει ένα καλύτερο αποτέλεσμα, έρευνα έδειξε ότι η συνδυασμένη χρήση του βελονισμού και κινεζικής ιατρικής είναι πιο αποτελεσματική για την αντιμετώπιση των συμπτωμάτων της εμμηνόπαυσης [109], [110], [111], [112].

4.8 Δράση έναντι της οστεοπόρωσης

Οι οστεοκλάστες είναι υπεύθυνοι για τα μεταβολικά νοσήματα των οστών συμπεριλαμβανομένης της οστεοπόρωσης, της ρευματοειδούς αρθρίτιδας και του πολλαπλού μυελώματος. Οι επιδράσεις του εκχυλίσματος του πίτουρου του ρυζιού (RB-BuOH) και τα κλάσματά του ερευνήθηκαν επί του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ (receptor activator of nuclear factor κB ligand, RANKL), μέλος της υπερικογένειας των παραγόντων νέκρωσης όγκων (tumor necrosis factor, TNF), που αποτελεί καταλυτικό παράγοντα για τη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών [113]. Στη μελέτη των Moon et al., βρέθηκε ότι το RB-BuOH ανέστειλε σημαντικά την λόγω RANKL επαγόμενη διαφοροποίηση των μακροφάγων που προέρχονται από τον μυελό των οστών (BMMs, **Bone marrow-derived macrophages**) σε οστεοκλάστες χωρίς καμία κυτταροτοξικότητα, σε συγκέντρωση 5-40μg/ml του RB-BuOH. Αποτελεί μία από τις πρώτες μελέτες όπου αναφέρουν την πιθανή δράση του πίτουρου στην αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης. Ωστόσο απαιτείται περαιτέρω μελέτη για να προσδιοριστούν οι ενώσεις που ευθύνονται για την αναστολή του RANKL [114]. Από την στιγμή που οι οστεοκλάστες παίζουν ένα ουσιαστικό ρόλο στην διάσπαση της οστικής μάζας, η επίδραση στην διαφοροποίησή τους και στην

λειτουργική τους ωρίμανση θεωρείται μια σημαντική στρατηγική για την αντιμετώπιση μεταβολικών νοσημάτων όπως η οστεοπόρωση [115], [114]. Στη μελέτη των Muhammad et al, ερευνήθηκε *in vivo* η επίδραση της γ-ορυζανόλης (γOR) αλλά και άλλων βιοδραστικών ενώσεων, όπως το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA), οι ακετυλιωμένοι στερολικοί γλυκοσίδες (ASG), και φαινολικά κλάσματα από καστανό ρύζι που έχει βλαστήσει (GBR) στην έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με το μεταβολισμό των οστών. Αρouraίοι υποβλήθηκαν σε αγωγή με γOR και GABA, (100 και 200 mg / kg). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της έρευνας, το GABA και η γ-ορυζανόλη διεγείρουν την οστεοβλαστογένεση πιθανώς μέσω της ενεργοποίησης των υποδοχέων GABA_B και με αναστολή της δραστηριότητας των φλεγμονωδών κυτοκινών και των ελευθέρων ριζών. Ως εκ τούτου, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά στην αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης [116].

4.9 Δράση έναντι του υποθυρεοειδισμού

Μία εφάπαξ από του στόματος δόση (300 mg) γ-ορυζανόλη παρήγαγε μια σημαντική μείωση στα αυξημένα επίπεδα θυρεοτροπίνης (TSH) του ορού σε υποθυρεοειδικούς ασθενείς, ενώ η χρόνια θεραπεία με γ-ορυζανόλη οδήγησε σε μειωμένα επίπεδα TSH στον ορό σε έξι από οκτώ ασθενείς. Επιπλέον, δεν υπήρξε μεταβολή στα επίπεδα της (T4) θυροξίνης στον ορό και της (T3) τριιωδοθυρονίνης, και καμία διαφορά στην TSH του ορού και στην θυροειδοτρόπο ορμόνη (TRH) σε υποθυρεοειδικούς ασθενείς σε σχέση με φυσιολογικά άτομα. Ως εκ τούτου, η γ-ορυζανόλη αναστέλλει τα επίπεδα της TSH στον ορό σε ασθενείς με πρωτοπαθή υποθυρεοειδισμό, πιθανώς με άμεση δράση στον υποθάλαμο και όχι την υπόφυση [117], [98].

4.10 Προστατευτική δράση έναντι του μεταβολικού συνδρόμου

Βασικές διαταραχές του μεταβολικού συνδρόμου είναι η παχυσαρκία (κυρίως η κεντρικού τύπου), η δυσλιπιδαιμία, η υπέρταση και ο σακχαρώδης διαβήτης. Κοινός παρανομαστής των διαταραχών αυτών είναι η παρουσία αντοχής των περιφερικών ιστών και κυρίως του μυϊκού ιστού, στην δράση της ινσουλίνης. Αυτή η ινσουλινοαντίσταση δεν είναι νόσος, είναι όμως κεντρική μεταβολική διαταραχή. Υπάρχει μια σειρά διαταραχών που σχετίζονται με το μεταβολικό σύνδρομο όπως η υπερούριχαιμία, το λιπώδες ήπαρ, η υπνική άπνοια, το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών, η αυξημένη πηκτικότητα του αίματος κ.λ.π. Το μεταβολικό σύνδρομο είναι ένα σύνολο μεταβολικών διαταραχών που οδηγούν αναπόφευκτα στην

αθηρωμάτωση και σε καρδιαγγειακή νόσο. Βασικές ψηφίδες αυτού του συνόλου είναι η παχυσαρκία (κυρίως η κεντρικού τύπου), η δυσλιπιδαιμία, η υπέρταση και ο σακχαρώδης διαβήτης [118]. Μελέτες σχετικές με τη δράση της γ-ορυζανόλης (αντιδιαβητική, αντιυπερλιπιδαιμική, καρδιοπροστατευτική δράση) δείχνουν ότι είναι αποτελεσματική στη βελτίωση αρκετών επιμέρους παραμέτρων που είναι υπεύθυνες για την δημιουργία του μεταβολικού συνδρόμου.

4.10.1 Αντιδιαβητική δράση

Διάφορα πειράματα έχουν διεξαχθεί προκειμένου να αναλυθούν οι δυνατότητες της γ-ορυζανόλης στην αντιμετώπιση του σακχαρώδη διαβήτη. Σε διάφορες μελέτες, που διεξήχθησαν κυρίως σε διαβητικούς αρουραίους, η γ-ορυζανόλη βρέθηκε να έχει αντιδιαβητική δράση, βελτιώνοντας την ευαισθησία στην ινσουλίνη και τη μείωση της γλυκόζης του αίματος [9], [119], [120], [121]. Το οξειδωτικό στρες θεωρείται ότι είναι ένας βασικός παράγοντας στην ανάπτυξη του διαβήτη και των σχετικών επιπλοκών του. Παρά το γεγονός ότι υπάρχουν λίγες μελέτες σχετικά με τη δράση φυτοχημικών ενώσεων κατά του σακχαρώδη διαβήτη, έχει αναφερθεί ότι το εκχύλισμα του πίτουρου που περιέχει φυτοστερόλες, τοκοτριενόλες, τοκοφερόλες, σκουαλένιο, και άλλες ενώσεις, αποτρέπει σε μεγάλο βαθμό την οξειδωτική βλάβη. Ωστόσο, ο μηχανισμός δράσης αυτών των ενώσεων ως προς την αντιμετώπιση του διαβήτη δεν έχει ακόμα διασαφηνιστεί. Η γ-ορυζανόλη αυξάνει την έκκριση αδιπνονεκτίνης (ορμόνη που εμπλέκεται στη ρύθμιση των επιπέδων της γλυκόζης, όπως επίσης και στον καταβολισμό των λιπαρών οξέων και εκκρίνεται αποκλειστικά από τον λιπώδη ιστό), στα λιποκύτταρα σε ποντίκια, αλλά μόνο υπό την προϋπόθεση ότι είναι ενεργοποιημένος ο NF-κΒ. Έχει τεκμηριωθεί επίσης ότι το φερουλικό οξύ μπορεί να μειώσει τα επίπεδα του σακχάρου στο αίμα σε διαβητικούς ποντικούς τύπου 1 και τύπου 2 ενισχύοντας την έκκριση ινσουλίνης [98], [122].

4.10.2 Αντιυπερλιπιδαιμική δράση

Λόγω της δομικής αναλογίας των ενώσεων της γ-ορυζανόλης με την χοληστερόλη, ερευνάται η ικανότητά της να μειώνει τα επίπεδα χοληστερόλης. Η πρώτη επιστημονική μελέτη για το θέμα αυτό διεξήχθη σε ανθρώπους το 1970. Οι Suzuki και Oshima [123] παρατήρησαν μείωση της ολικής χοληστερόλης (TC), εντός 7 ημερών, στο πλάσμα 50 υγιών νεαρών γυναικών που κατανάλωναν 60 g ενός συνδυασμού από 70% RBO και 30% έλαιο καρθάμου ή Safflower (*Carthamus tinctorius*). Αργότερα, το 1984, Ishihara et al. [124] επικεντρώθηκαν ιδιαίτερα στην γ-ορυζανόλη, δείχνοντας ότι μετά από καθημερινή χορήγηση 300 mg γ-ορυζανόλης για

4 εως 8 εβδομάδες σε υπερλιπιδαιμικά άτομα με κλιμακτηριακές διαταραχές υπήρξε μια μείωση στην ολική χοληστερόλη (TC), στην χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (LDL-C) και στα τριγλυκερίδια (TG) στο πλάσμα, μαζί με αύξηση της συγκέντρωσης της υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (HDL-C), χωρίς παρενέργειες. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν δημοσιευθεί από άλλες κλινικές και *in vivo* μελέτες, σε αρουραίους, σε κουνέλια και χάμστερ.[125], [126], [85], [127], [128, 129], [130], [131], [132], [133]. Οι Cicero και Gaddi υπέδειξαν ότι η γ-ορυζανόλη θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως θεραπευτικός παράγοντας για την υπερλιπιδαιμία και την αθηρωμάτωση [9], [134], [135]. Η αθηρωμάτωση είναι εκφυλιστική πάθηση των μεγάλου και μεσαίου μεγέθους αρτηριών, η οποία προσβάλλει μεγάλες αλλά και μικρές ηλικίες. Προκαλείται λόγω δημιουργίας μιας πλάκας, του λεγόμενου αθηρώματος, στο εσωτερικό τοίχωμα των αγγείων. Τα αθηρώματα δημιουργούνται από εναποθέσεις λιπιδικών στοιχείων. Η δυσλιπιδαιμία είναι ένας από τους κύριους παράγοντες κινδύνου για την αθηρωμάτωση και συμβάλλει σημαντικά στην πρόκληση καρδιαγγειακής νόσου. Μια από τις πιο σημαντικές λειτουργίες του ρυζελαίου είναι η δυνατότητα μείωσης της χοληστερόλης. Αρκετές αναφορές δείχνουν ότι το ρυζέλαιο και τα κύρια συστατικά του (ακόρεστα λιπαρά οξέα, τριτερπενικές αλκοόλες, φυτοστερόλες, τοκοτριενόλες, και α-τοκοφερόλη) βελτιώνουν το λιπιδικό προφίλ στο πλάσμα τρωκτικών, κουνελιών, των μη ανθρώπινων πρωτευνόντων, και ανθρώπων μειώνοντας την ολική χοληστερόλη και τα τριγλυκερίδια και αυξάνοντας παράλληλα την λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας (HDL-C). [129, 136]. Μελέτες σε δυσλιπιδαιμικά ποντίκια που τρέφονταν με εξευγενισμένο ρυζέλαιο, έδειξαν σημαντική μείωση της ολικής χοληστερόλης, της LDL και της VLDL.[137] Μελέτες σε εθελοντές με δυσλιπιδαιμία έδειξαν επίσης ότι η γ-ορυζανόλη βελτίωσε σημαντικά το προφίλ των λιπιδίων τους [126]. Ο συνδυασμός γ-ορυζανόλης, βιταμίνης και νιασίνης σε δυσλιπιδαιμικούς εθελοντές βελτιώνει σημαντικά το προφίλ των λιπιδίων, ROS και την συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα [129]. Εκτός από τη γ-ορυζανόλη, οι τριτερπενικές αλκοόλες, κυκλοαρτενόλη και 24-μεθυλενο-κυκλοαρτανόλη, μειώνουν τα επίπεδα χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων σε υπερχοληστερολαιμικούς αρουραίους. Τα παραπάνω ευρήματα σε συνδυασμό με την αποδεδειγμένη ικανότητα των τοκοτριενολών να αναστέλλουν την αναγωγή της HMG-CoA (περιοριστικός παράγοντας στη σύνθεση της χοληστερόλης) καθιστούν το ρυζέλαιο, κατάλληλο για υπερλιπιδαιμικούς ασθενείς. Το ρυζέλαιο, μπορεί να χρησιμοποιηθεί προληπτικά για την αθηρωμάτωση και τις χρόνιες αγγειακές παθήσεις [98]. Αν και ο μηχανισμός πίσω από την ικανότητα της γ-ορυζανόλης να μειώνει την χοληστερόλη δεν είναι πλήρως κατανοητός, η τακτική κατανάλωση της γ-

ορουζανόλης αποτελεί εναλλακτική θεραπευτική αντιμετώπιση της υπερλιπιδαιμίας [138].

4.10.3 Καρδιοπροστατευτική δράση

Διατροφικές προσεγγίσεις με στόχο να αποτραπεί η μικροαγγειακή δυσλειτουργία που σχετίζεται με την παχυσαρκία παρουσιάζουν πιθανά πλεονεκτήματα έναντι φαρμακολογικών στρατηγικών. Σύμφωνα με τον M.L. Justo et al. [139] αποδεικνύεται για πρώτη φορά ότι η ενσωμάτωση του πίτουρου, (πλούσιου σε γ-ορουζανόλη και τοκοφερόλες/ τοκοτριενόλες) στη διατροφή μειώνει τις μικροαγγειακές αλλοιώσεις στις μικρές μεσεντέριες αρτηρίες σε παχύσαρκους αρουραίους, αποκαθιστώντας την αρτηριακή λειτουργία, μειώνοντας τη φλεγμονή και το οξειδωτικό στρες. Παρατηρείται ακόμα, βελτίωση στις διαταραχές του μεταβολικού συνδρόμου, δυλιπιδαιμία, αντίσταση στην ινσουλίνη και υπέρταση. Αν και αρκετές μελέτες σε ανθρώπους και ζωικά μοντέλα έχουν αποδείξει την ευεργετική ημερήσια πρόσληψη πίτουρου ρυζιού και άλλων παραγώγων ολικής αλέσεως στις μεταβολικές διαταραχές που σχετίζονται με την παχυσαρκία και τον διαβήτη, οι επιπτώσεις των μικροαγγειακών επιπλοκών που συνδέονται με αυτές τις διαταραχές παραμένουν άγνωστες [85, 129, 140, 141]. Αποδεικνύεται από τους M.L. Justo et al. για πρώτη φορά η ευεργετική επίδραση του πίτουρου στην μικροαγγειακή δυσλειτουργία που σχετίζονται με την παχυσαρκία [139]. Η διατροφική προσέγγιση είναι πολλά υποσχόμενη για την πρόληψη μικροαγγειακών αλλοιώσεων δεδομένου ότι η πρόληψη είναι ζωτικής σημασίας για τα καρδιαγγειακά επεισόδια σε παχύσαρκα άτομα [139].

4.11 Άλλες δράσεις της γ-ορουζανόλης

Το φερουλικό οξύ και η γ-ορουζανόλη καθυστερούν την φωτο-οξείδωση απορροφώντας την UV ακτινοβολία, γεγονός που τα καθιστά κατάλληλα για τη χρήση τους στα καλλυντικά, ως αντηλιακό ή ως παράγοντες λεύκανσης. Η γ-ορουζανόλη χρησιμοποιείται ως συμπλήρωμα διατροφής από body-builders και αθλητές, καθώς πιστεύεται ότι αυξάνει τα επίπεδα της τεστοστερόνης, επάγει τις ενδορφίνες, και αυξάνει τη μυϊκή μάζα. Επίσης, κλινικές μελέτες αποκάλυψαν ότι η γ-ορουζανόλη αυξάνει την χημική ουσία του εγκεφάλου νορεπινεφρίνη, και έχει χορηγηθεί σε άτομα που πάσχουν από ήπιο άγχος [142], [98].

Προσωπικά αποτελέσματα

5 Ειδικό μέρος Α

5.1 Οργανολογία-Υλικά-Τεχνικές

5.1.1 Αναλυτικές Χρωματογραφικές μέθοδοι

- **Χρωματογραφία λεπτής στιβάδος (TLC).** Πλάκες αλουμινίου κανονικής φάσης με επίστρωση γέλης πυριτίου με πάχος στιβάδας 0,1 mm (Silica gel 60 F254-Merck). Τα χρωματογραφήματα ελέγχθηκαν με λαμπτήρες υπεριώδους ακτινοβολίας, σε μήκη κύματος 254 nm και 366 nm και ακολούθησε ψεκασμός με μεθανολικό διάλυμα θειικής βανιλίνης και θέρμανση.
- **Υγρή χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC).** Για την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης χρησιμοποιήθηκε σύστημα Thermo Scientific που αποτελείται από: Αντλία SpectraSystem P4000, με την ικανότητα ανάμειξης τεσσάρων διαφορετικών διαλυτών, σε οποιαδήποτε αναλογία, αυτόματος δειγματολήπτης SpectraSystem AS3000, ανιχνευτής πολλαπλής διόδου (PDA) SpectraSystem UV6000LP, Στήλη Supelco Analytical Discovery HS-C18 (25 cm x 4.6 mm, 5 μm). Λογισμικό ChromQuest™ 4.1.
- **Υγρή Χρωματογραφία Υπερυψηλής Απόδοσης συνδεδεμένη με Υβριδικό Φασματογράφο Μάζας Υψηλής Διακριτικής Ικανότητας.** UHPLC: Thermo Finnigan Accela High Speed: αντλία Accela, αυτόματος δειγματολήπτης Accela και ανιχνευτής συστοιχίας φωτοδίοδων (PDA) Accela. MS: Υβριδικός φασματογράφος μάζας που περιλαμβάνει συνδυασμό γραμμικής παγίδας ιόντων (Ion trap - LTQ XL) και τροχιακή παγίδα ιόντων (Orbital trap – Orbitrap) LTQ-Orbitrap Discovery (Thermo Scientific - Bremen, Germany) εφοδιασμένο με πηγή ιοντισμού τύπου ηλεκροψεκασμού (Electrospray - ESI) και με χημικό ιονισμό υπό ατμοσφαιρική πίεση (Atmospheric-pressure chemical ionization-APCI). Στήλη Fortis C18 (100 mm x 2.1 mm, 1.7 μm).

5.1.2 Παρασκευαστικές χρωματογραφικές μέθοδοι

- **Παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδος (Prep-TLC).** Χρησιμοποιήθηκαν γυάλινες πλάκες κανονικής φάσης επιστρωμένες με γέλη πυριτίου με πάχος στιβάδας 1mm (Silica gel 60 F254-Merck).
- **Ημιπαρασκευαστική Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (semi prep-HPLC)** semi-Prep-HPLC Thermo Finnigan: χρησιμοποιήθηκε αντλία

SpectraSystem P4000, με απαερωτή SpectraSystem 1000, αυτόματο δειγματολήπτη SpectraSystem AS3000, ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιοδίων (PDA) SpectraSystem UV6000LP, λογισμικό Clarity TM. και στήλη: Discovery HS-C18 (250 x10mm , 10 μm) (Supelco).

➤ **Χρωματογραφία Κατανομής με Φυγοκέντριση (Centrifugal Partition Chromatography, CPC):** Χρησιμοποιήθηκε το σύστημα CPC KROMATON που περιλαμβάνει: Αντλία Lab Alliance. Σύστημα εισαγωγής. Σύστημα περιστροφής. Στήλη χωρητικότητας: 200 ml ή 1000ml. Συλλέκτη Buchi fraction collector B-684 και συνδεδεμένο ανιχνευτή UV-DAD (flash 14 DAD detector ,ECOM). Λογισμικό Clarity TM

➤ **Χρωματογραφία Υπερκρίσιμων υγρών συνδεδεμένη σε σειρά με ανιχνευτή συστοιχίας διόδων και φασματογράφο μάζας (SFC-DAD-MS)** Η ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε σύστημα της εταιρίας Waters. Το οποίο αποτελείται από την αντλία (Waters 2767 Sample Manager Injector and Collector), μονάδα παροχής των διαλυτών (Thar SFC Fluid Delivery Module), στήλη (Anal_Sil-Ethylpyridin_250mm, S-Prep_Sil-Ethylpyridin_150mm) μέσα σε θερμοστατούμενο φούρνο (Waters Column Oven), περιστολέα πίεσης (Waters Back Pressure Regulator), αντλία του συνδιαλύτη (Waters 515 HPLC Pump), αντλία ελέγχου των διαλυτών (Waters Pump Control Module II), προθερμαντήρα (Thar SFC Heat Exchanger) και ανιχνευτή (Waters 2998 Photodiode Array Detector). Το σύστημα είναι συνδεδεμένο με το φασματογράφο μάζας Waters SQD (ανιχνευτής απλού τετράπολου και πηγή ESI). Η προμήθεια της φιάλης CO₂ έγινε από την εταιρία REVIVAL και η επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε στο λογισμικό MassLynx v.4.1

5.1.3 Φασματοσκοπικές και Φασματομετρικές Μέθοδοι

➤ **Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR).** Για τη λήψη των φασμάτων Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού χρησιμοποιήθηκε σύστημα NMR Bruker Ultrashield™ PLUS 600 (600 MHz). Για τη λήψη των φασμάτων χρησιμοποιήθηκε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο CDCl₃ (7.26 ppm/¹H-NMR, 77.0 ppm/¹³C-NMR). Οι χημικές μετατοπίσεις εκφράζονται σε δ ή ppm και οι σταθερές σύζευξης *J* σε Hertz (Hz). Η πολλαπλότητα των κορυφών των φασμάτων εκφράζεται ως s (single): απλή, brs (broad singlet): ευρεία απλή, d (double): διπλή, t (triple):τριπλή, q (quintuplet): τετραπλή, dd (double of doublets): διπλή διπλής, m (multiple): πολλαπλή. Ελήφθησαν φάσματα μίας διάστασης (1D) ¹H-NMR και ¹³C-NMR καθώς και φάσματα δύο διαστάσεων (2D), COSY (Correlation spectroscopy),

HSQC-DEPT (Heteronuclear single Quantum Coherence- Distortionless enhancement by polarization transfer), HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence), DEPT.

➤ **Φασματομετρία Μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας.** Για την λήψη φασμάτων μάζας χρησιμοποιήθηκε φασματογράφος LTQ-Orbitrap της εταιρίας Thermo Fisher Scientific, ο οποίος συνδυάζει αναλυτή μάζας γραμμικής παγίδας (linear trap) με αναλυτή μάζας τροχιακής παγίδας (orbitrap). Το μηχάνημα LTQ-Orbitrap platform, είναι εφοδιασμένο με πηγή ιοντισμού τύπου ηλεκροψεκασμού (Electrospray - ESI) και με χημικό ιονισμό υπό ατμοσφαιρική πίεση (APCI). Τα πειράματα πλήρους σάρωσης (Full Scan) ελήφθησαν με τη χρήση του αναλυτή μαζών Orbitrap ενώ τα πειράματα διδύμης φασματομετρίας MS/MS ελήφθησαν με τον αναλυτή IT. Για την καταγραφή των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Xcalibur 2,2.

5.2 Δειγματοληψία και εκχύλιση του πίτουρου

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη ύλη το πίτουρο και ο φλοιός του ρυζιού από δύο ποικιλίες του *Oryza sativa* και συγκεκριμένα το Gladio και το Ronaldo. Στην ποικιλία Gladio, εκτός από το πίτουρο της συμβατικής ποικιλίας έγινε επεξεργασία του πίτουρου Gladio parboiled, δηλαδή πίτουρου που προέκυψε από την υποβολή του ρυζιού στην υγροθερμική επεξεργασία, ένα προαιρετικό στάδιο, με σκοπό τη βελτίωση της απόδοσης της μύλευσης και τη βελτίωση των θρεπτικών και οργανοληπτικών ιδιοτήτων του ρυζιού. Από τα στάδια της μύλευσης του ρυζιού, όπως έχει αναλυθεί στο εισαγωγικό μέρος, προκύπτουν ως υποπροϊόντα το πίτουρο του 1^{ου} κώνου, 2^{ου} κώνου και 3^{ου} κώνου. Στην περίπτωση του Gladio parboiled προκύπτει πίτουρο από τέσσερις κώνους.

Η εκχύλιση του πίτουρου του ρυζιού δίνει ως προϊόν, το ρυζέλαιο ή rice bran oil (RBO). Το εκχυλιζόμενο έλαιο απαιτεί εξευγενισμό προκειμένου να καταστεί εδωδιμο. Ωστόσο, στην παρούσα εργασία ως **ρυζέλαιο ή rice bran oil (RBO)** θα χαρακτηρίζεται το μη εξευγενισμένο πίτουρο εκχυλισμένο με οξικό αιθυλεστέρα. Το ρυζέλαιο είναι ένα προϊόν του ρυζιού που είναι πλούσιο σε **γ-ορυζανόλη (γOR)** και **πολική γ-ορυζανόλη (PγOR)**. Η γ-ορυζανόλη είναι ένα μίγμα παρόμοιων δομικά ενώσεων, που αποτελείται από εστέρες φερουλικού οξέος με φυτοστερόλες και τριτερπενικές αλκοόλες [143], [12], [8]. Η ομάδα της πολικής γ-ορυζανόλης (PγOR), είναι μια νέα ομάδα υδροξυλιωμένων φερουλικών τριτερπενικών αλκοολών που δίνει νέες προοπτικές στη χρήση του RBO και ως θεραπευτικό μέσο [12].

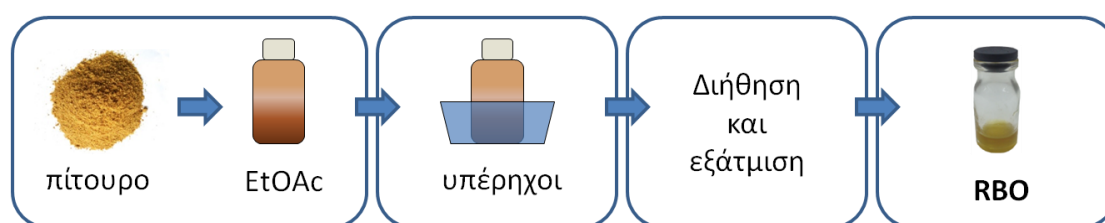
Στη παρούσα εργασία μελετήθηκαν συνολικά 12 δείγματα και συγκεκριμένα 10 δείγματα πίτουρου και 2 δείγματα φλοιού των ποικιλιών Gladio και Ronaldo από διαφορετικά στάδια της μύλευσης, που παραχωρήθηκαν από την εταιρεία EV. GE. PISTIOLAS S.A. (Agrinio, Greece). Παρακάτω παρατίθενται τα δείγματα:

- **Ronaldo πίτουρο (Ronlado bran ή Rb):**
 - Φλοιός (v=2) ή Rh
 - 1^{ος} κώνος (v=2) ή Rb1
 - 2^{ος} κώνος(v=2) ή Rb2
 - 3^{ος} κώνος (v=2) ή Rb3
- **Gladio πίτουρο (Gladio bran ή Gb):**
 - Φλοιός (v=2) ή Gh
 - 1^{ος} κώνος (v=2) ή Gb1
 - 2^{ος} κώνος (v=2) ή Gb2
 - 3^{ος} κώνος (v=2) ή Gb3

➤ **Gladio parboiled πίτουρο (Gladio parboiled bran ή Gpb):**

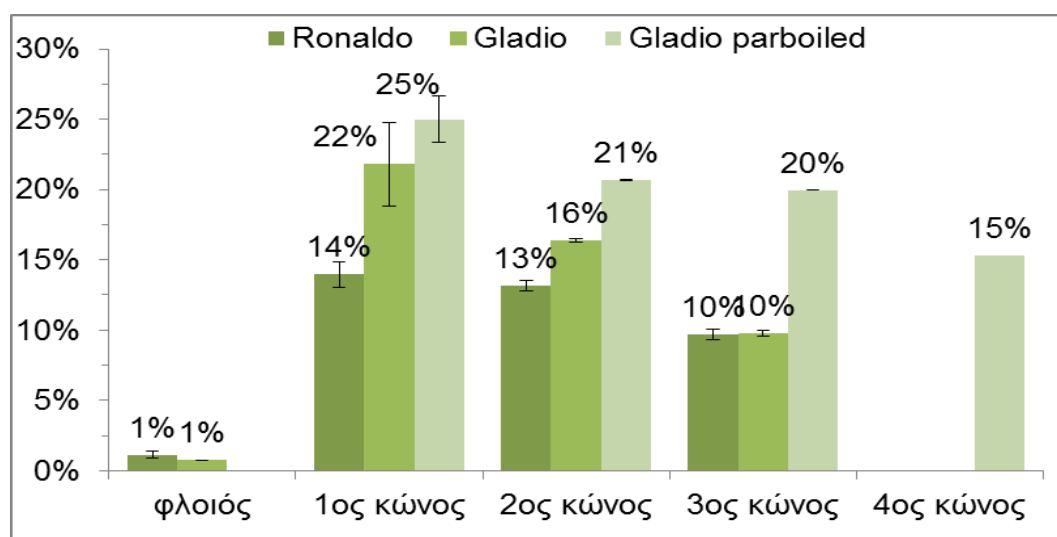
- 1^{ος} κώνος (n=2) ή Gpb1
- 2^{ος} κώνος (n=2) ή Gpb2
- 3^{ος} κώνος (n=2) ή Gpb3
- 4^{ος} κώνος (n=2) ή Gpb4

Το πρώτο βήμα για τη μελέτη των ρυζέλαιων ήταν η εκχύλιση του φυτικού υλικού με EtOAc. Προστέθηκαν 5 g δείγματος μαζί 50 ml EtOAc σε γυάλινο σκουρόχρωμο φιαλίδιο των 125 ml καλά σφραγισμένο. Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε σε λουτρό υπερήχων (4 ώρες), σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (Εικόνα 5-1). Μόνο για το φλοιό, προηγήθηκε της εκχύλισης, η κονιοποίησης του.



Εικόνα 5-1 Συνοπτική απεικόνιση της διαδικασίας εκχύλισης του πίτουρου

Το κάθε δείγμα εκχυλίστηκε 2 φορές (n=2) ως ανεξάρτητο δείγμα. Ο μέσος όρος των αποδόσεων του RBO που προέκυψε από τις εκχυλίσεις των Ronaldo (*japonica*) και Gladio (*indica*) παρουσιάζονται στην Εικόνα 5-2



Εικόνα 5-2 Συγκριτική μελέτη της απόδοσης (n=2) σε RBO (g RBO/100 g πίτουρου) από την εκχύλιση του φλοιού και του πίτουρου Ronaldo, Gladio και Gladio parboiled σε όλα τα στάδια της μύλευσης.

Όπως παρατηρείται στο ραβδόγραμμα, οι αποδόσεις σε RBO για τα Ronaldo και Gladio μειώνονται σταδιακά όσο προχωρά η διαδικασία της μύλευσης από το 1^ο βήμα, στο 2^ο βήμα και στο 3^ο βήμα της μύλευσης. Σημαντική είναι η διαφορά που παρατηρείται στην απόδοση μεταξύ 1^{ου} και 2^{ου} βήματος στα δείγματα Gladio, η οποία δεν παρατηρείται στα δείγματα Ronaldo. Το Gladio parboiled εμφάνισε μεγαλύτερη απόδοση σε RBO από τα non-parboiled (Gladio & Ronaldo). Παρόμοια, τα επίπεδα RBO μειώνονται καθώς προχωρά η διαδικασία της μύλευσης από 25% σε 15%, χωρίς όμως να παρατηρείται ιδιαίτερα μεγάλη διαφορά μεταξύ 2^{ου} & 3^{ου} κώνου, στους οποίους οι αποδόσεις είναι 21% & 20%, αντίστοιχα. Συμφώνα με τους Amarasinghe, B. M. W. P. K., et al. [144], οι οποίοι ασχολήθηκαν με την υδατική εκχύλιση και την παραλαβή RBO, η διαδικασία της υγροθερμικής επεξεργασίας στο ρύζι αυξάνει την απόδοση σε RBO. Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν και οι Khoei, M. & Chekin, F., [145], οι οποίοι συνέκριναν τις αποδόσεις σε RBO ύστερα από υδατική εκχύλιση και εκχύλιση με εξάνιο. Και στις δυο περιπτώσεις, το parboiled πύτουρο έδωσε μεγαλύτερα ποσοστά RBO.

Οι καλλιεργούμενες ποικιλίες ρυζιού Gladio και Ronaldo, ανήκουν σε δυο από τα κύρια υποείδη ρυζιού στον κόσμο, το υποείδος [24] *indica* (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*) και το *japonica* (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*), αντίστοιχα τα οποία διαφέρουν ως προς τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους αλλά και ως προς τη περιεκτικότητά τους σε βιοδραστικές ουσίες (τοκοφερόλες, τοκοτριενόλες, γ-ορυζανόλη). Σε αρκετές δημοσιεύσεις που αφορούν ποικιλίες ρυζιού σε περιοχές όπως η Ταϊβάν [25] και η Βραζιλία [24], τα υποείδη *japonica* εμφανίζουν υψηλότερα ποσοστά σε βιοδραστικά συστατικά σε σχέση με τις τα υποείδη *indica*. Ωστόσο σύμφωνα με τον Sung Won Yoon [146] και τον Miller [82] δεν έχουν σχέση οι μορφολογικές διαφορές με τα επίπεδα γOR στο ρύζι. Το υποείδος *indica* έχει μακριούς, λεπτούς ελαφρώς πεπλατυσμένους καρπούς ενώ το υποείδος *japonica* έχει φαρδείς, παχείς και κοντούς καρπούς.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, για την εκχύλιση του πύτουρου χρησιμοποιείται κυρίως το εξάνιο [147], [148]. Ωστόσο, η περιβαλλοντική μόλυνση που προκαλεί σε συνδυασμό με το ότι θεωρείται νευροτοξίνη, τοξική σε υψηλές συγκεντρώσεις κατέστησε αναγκαία την εύρεση εναλλακτικών διαλυτών για την εκχύλιση τόσο του πύτουρου όσο και άλλων φυτικών ελαίων.

Σύμφωνα με τους Lohani, Fallani et al. 2015 [149], εάν ληφθεί υπόψη η ασφάλεια κατά την κατανάλωση, οι περιβαλλοντικές επιπτώσεις, τα συγκρίσιμα αποτελέσματα σε σχέση με την απόδοση της εκχύλισης και την ποιότητα του ελαίου (θερμιδική αξία, πυκνότητα, ιξώδες, προφίλ των ελεύθερων λιπαρών οξέων, και το ασαπνωποίητο

κλάσμα) που προκύπτει, ο οξικός αιθυλεστέρας ως διαλύτης εκχύλισης μπορεί να είναι μία πολλά υποσχόμενη και πιο φθηνή εναλλακτική από το εξάνιο. Διαλύτες που έχουν χρησιμοποιηθεί προς αντικατάσταση του εξανίου ως διαλύτη εκχύλισης, τόσο του πίτουρου όσο και άλλων ελαίων από καρπούς φυτών, είναι από τις αλκοόλες, η ισοπροπανόλη και η αιθανόλη και από τους «πράσινους» διαλύτες το λιμονένιο και το πινένιο. [147], [150]. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της εκχύλισης του πίτουρου *tao-scented jaronica* (TaiNung 71;TN71) με τρεις διαφορετικούς διαλύτες, μεθανόλη, οξικό αιθυλεστέρα και εξάνιο προέκυψαν τα εξής συμπεράσματα. Η μεθανόλη δίνει τις υψηλότερες αποδόσεις σε ολικό φαινολικό φορτίο, ακολουθεί ο οξικός αιθυλεστέρας και τη χαμηλότερη απόδοση την εμφανίζει το εξάνιο. Ωστόσο, ο οξικός αιθυλεστέρας είναι πιο αποτελεσματικός στην εκχύλιση γOR σε σχέση με τη μεθανόλη και το εξάνιο [151],[152].

Έτσι, στην παρούσα εργασία, της οποίας αρχικός στόχος είναι η παραλαβή ρυζελαίου πλούσιο σε γ-ορυζανόλη (γOR) και πολική γ-ορυζανόλη (PγOR) για την περαιτέρω επεξεργασία, απομόνωση και ταυτοποίηση των ουσιών που ανήκουν στις δύο προαναφερθείσες ομάδες (γOR, PγOR) χρησιμοποιήθηκε σαν διαλύτης εκχύλισης ο οξικός αιθυλεστέρας (EtOAc).

Υπάρχει πληθώρα δημοσιεύσεων σχετικά με την παραλαβή του RBO από το πίτουρο εξαιτίας της προοπτικής που παρουσιάζει σε βιομηχανική κλίμακα και της μετέπειτα εκμετάλλευσής του. Ωστόσο, δεν μπορεί να γίνει απόλυτη σύγκριση της μεθόδου εκχύλισης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία σε σχέση με αυτές που έχουν δημοσιευθεί. Τα δεδομένα που αφορούν την απόδοση της εκχύλισης συνήθως παραλείπονται και εξετάζεται μόνο η απόδοση σε γOR γεγονός που δυσκολεύει την μεμονωμένη σύγκριση των αποτελεσμάτων της εκχύλισης.

Εκτός, όμως από τον συμβατικό τρόπο εκχύλισης, έχει μελετηθεί πληθώρα τεχνικών για την εκχύλιση του πίτουρου, όπως ωμική θέρμανση (ohmic heating), εκχύλιση με νερό σε υποκρίσιμες συνθήκες (Subcritical Water Extraction, SBWE) και εκχύλιση με υπερκρίσιμα υγρά (Supercritical Fluid Extraction, SFE), [153] [154]. Η εκχύλιση πίτουρου με υπερκρίσιμα υγρά, στη δημοσίευση του Zhimin Xu (2000), είχε σαν αποτέλεσμα την παραλαβή RBO που κυμαίνεται μεταξύ 9-13% ανάλογα με τις συνθήκες που εφαρμόστηκαν [155]. Οι Ruen-Ngam et al. (2016) χρησιμοποίησαν εξάνιο ως διαλύτη εκχύλισης του πίτουρου. Μετά από μελέτη τεχνικών προετοιμασίας του πίτουρου για αύξηση της απόδοσης σε RBO παρέλαβαν 27 g RBO/100 g πίτουρου μετά από εφαρμογή ζεστού αέρα (70 °C) στο πίτουρο και 14 g/100 g πίτουρου μετά από βρασμό του πίτουρου [154].

Εκτός από την επιλογή κατάλληλου διαλύτη εκχύλισης, η διαδικασία της μύλευσης έχει αξιοσημείωτο ρόλο στα επίπεδα βιοδραστικών ουσιών στο πύουρο του ρυζιού. Καθότι τα εξωτερικά στρώματα του πυρήνα του ρυζιού περιέχουν σχεδόν την συνολική ποσότητα της γ-ορυζανόλης (γOR), ανάλογα με τον βαθμό μύλευσης προκύπτουν υποπροϊόντα με διαφορετική περιεκτικότητα βιοδραστικών ουσιών. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα διάφορων ερευνών και αυτής της εργασίας, όσο αυξάνεται ο βαθμός μύλευσης του ακατέργαστου ρυζιού, μειώνεται η συγκέντρωση της γOR όσο και των άλλων βιοδραστικών ουσιών [143], [89]. Η ποσότητα της γOR σύμφωνα με τους Tuncel και Yilmaz [79] κυμαίνεται από 12.19–3296.5 mg/kg στα διάφορα στάδια της μύλευσης, με το πύουρο να αποτελεί την πιο πλούσια πηγή γOR.

5.3 Ανάπτυξη μεθόδου HPLC-DAD για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των RBO δειγμάτων

Ένας από τους στόχους της παρούσας εργασίας είναι να μελετηθούν ποιοτικά όσο και ποσοτικά ως προς τα περιεχόμενα συστατικά τα υπό μελέτη δειγμάτων RBO (Ronaldo, Gladio και Gladio parboiled). Για την επίτευξη αυτού του στόχου επιλέχθηκε η τεχνική HPLC-DAD. Σημαντικά στάδια εκτός από την ανάπτυξη κατάλληλης μεθοδολογίας ανάλυσης ήταν και η εύρεση κατάλληλης κατεργασίας του δείγματος εξαιτίας της ιδιαίτερης φύσης του.

Διαλυτότητα, προκατεργασία δείγματος: Το RBO εξαιτίας της ελαιώδους φύσης και συνεπώς του σχετικά άπολου χαρακτήρα των συστατικών του παρουσιάζει μειωμένη διαλυτότητα στους συνήθεις διαλύτες που χρησιμοποιούνται σε αναλύσεις HPLC-DAD ακόμα και σε μικρές συγκεντρώσεις (0.1 και 0.2 mg/ml). Έπειτα από διάφορες δοκιμές διαπιστώθηκε ότι ικανοποιητική διάλυση επιτεύχθηκε με τη χρήση λουτρού υπερήχων για 10 min, στους 45 °C, σε ACN. Επίσης, πριν από κάθε ανάλυση προηγήθηκε διήθηση των δειγμάτων από φίλτρα σύριγγας (NYL 0.45 μm). Για να ερευνηθεί εάν η διήθηση επηρεάζει την διαδικασία της ανάλυσης δοκιμάστηκαν διάφορες συγκεντρώσεις και συγκρίθηκαν τα αποτελέσματα ως προς τα επίπεδα της γOR, σε δείγματα στα οποία είχε προηγηθεί διήθηση και σε δείγματα που αναλύθηκαν απευθείας. Βρέθηκε ότι ακόμα και σε υψηλές συγκεντρώσεις (5 mg/ml) τα αποτελέσματα ήταν απολύτως συγκρίσιμα αφού η σχετική τυπική απόκλιση ήταν μικρότερη της μονάδας (RSD% < 1%) ενώ πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις (n=3).

Επιλογή τεχνικής: Προσπάθειες ποσοτικοποίησης της γOR έχουν πραγματοποιηθεί τόσο με τη χρήση χρωματογραφίας κανονικής φάσης (NP) όσο και με

χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (RP). Επιλέχθηκε τελικά η χρωματογραφία RP λόγω της μικρότερης τοξικότητας των διαλυτών που χρησιμοποιούνται αλλά και της καλύτερης διαχωριστικής ικανότητας που παρατηρείται. Η διαχωριστική ικανότητα είναι ένας ιδιαίτερα σημαντικός παράγοντας για την αξιόπιστη ποσοτικοποίηση τόσο πολύπλοκων δειγμάτων όπως η γOR [156], [84], [24].

Επιλογή χρωματογραφικής στήλης και μεθόδου: Ελέχθησαν 2 στήλες HPLC RP, μια C8 και μια C18. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, όσο πιο άπολη (C18, C30) είναι η στατική φάση της χρωματογραφικής στήλης επιτυγχάνεται καλύτερη διαχωριστική ικανότητα τοκοφερολών και γ-ορυζανόλης (γOR) [143], [12], [156], [157] όπως διαπιστώθηκε και στην παρούσα μελέτη. Στη στήλη C18 (Supelco Analytical Discovery HS C18 (25 cm x 4.6 mm, 5 μm) , με μία απλή ισοκρατική μέθοδο με ACN 100% για 45 min, με ροή 2 ml/min έγιναν μια σειρά από δοκιμές, που αφορούν τη διαλυτότητα και τη διήθηση των δειγμάτων.

Για την τελική επιλογή της καταλληλότερης μεθόδου για τον διαχωρισμό των ουσιών της ΡγOR και της γOR δοκιμάστηκαν διάφορες μέθοδοι. Ενδεικτικά αναφέρονται οι τέσσερις παρακάτω (1) ισοκρατική έκλουση με MeOH/ ACN σε αναλογία 5/95 v/v για 150 min με ροή 1 ml/min, (2) βαθμιδωτή έκλουση με ACN/ H₂O από 95/5 σε 100%ACN σε 150 min με ροή 1 ml/min, (3) ισοκρατική έκλουση με iPrOH/ ACN σε αναλογία 5/95 v/v για 150 min με ροή 1 ml/min και (4) ισοκρατική έκλουση με MeOH/ ACN σε αναλογία 50/50 v/v για 150 min, με ροή 1 ml/min. Η μελέτη των χρωματογραφημάτων του RBO δείγματος που αναλύθηκε, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η καλύτερη διαχωριστική ικανότητα μπορούσε να επιτευχθεί με τη μέθοδο (2).

5.3.1 Ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου έκλουσης

Για τον διαχωρισμό των ουσιών της ΡγOR και της γOR αναπτύχθηκε μια αναλυτική μέθοδος χρησιμοποιώντας την τεχνική HPLC-DAD σε χρωματογραφική στήλη αντιστρόφου φάσης Supelco Analytical Discovery, HS C18 (25 cm x 4.6 mm, 5μm) όπως ήδη αναφέρθηκε. Για την ανάπτυξη της μεθόδου χρησιμοποιήθηκε το δείγμα του πρότυπου της γOR με συγκέντρωση 0,1 mg/ ml ACN και δείγμα RBO (Rb1A) με συγκέντρωση 5 mg/ml σε ACN. Η παρατήρηση της γOR έγινε στα 325 nm [12] με τη βοήθεια UV-DAD ανιχνευτή. Ο βρόγχος δείγματος (loop) που χρησιμοποιήθηκε ήταν 100 ul.

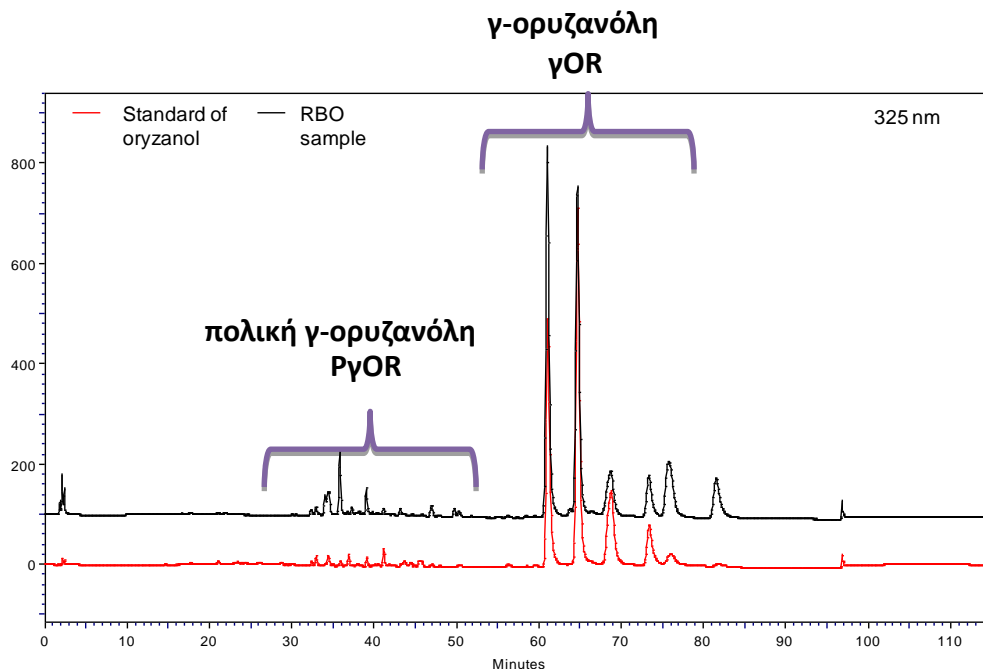
Η παρακάτω μέθοδος προτού πάρει την τελική μορφή χρειάστηκε να βελτιστοποιηθεί. Σε αυτό το σημείο αξίζει να σημειωθεί ότι τόσο η γOR όσο και η

ΡγOR αποτελείται από πολλά επιμέρους συστατικά με πολύ μικρές δομικές διαφοροποιήσεις, ισομερείς ενώσεις αρκετές φορές, γεγονός που καθιστά πολύ δύσκολο το διαχωρισμό τους. Επιπρόσθετα, η μη εφαρμογή θερμοκρασίας στη στήλη είχε σαν αποτέλεσμα την ύπαρξη υψηλής σχετικής τυπικής απόκλισης στον χρόνο έκλουσης (Rt) των τεσσάρων κύριων κορυφών της τάξεως του RSD% 7-10%. Με την εφαρμογή θερμοκρασίας 40 °C στη στήλη ο χρόνος έκλουσης (Rt) σταθεροποιήθηκε για την καθεμία από τις κύριες κορυφές (RSD%(Rt)<1%)

Η αρχική μέθοδος διαρκούσε 150 min εξαιτίας της μεγάλης διάρκειας του 3ου βήματος της μεθόδου (ACN 100% έως το 128^ο λεπτό). Οι ενώσεις του πρότυπου της γOR μετά τη σταθεροποίηση του Rt εκλούονταν μέχρι το 90^ο λεπτό, οπότε η διάρκεια της μεθόδου ήταν εφικτό να ελαττωθεί κατά 35 min χωρίς να επηρεαστεί ο διαχωρισμός των ουσιών. Τελικά οι αναλύσεις των δειγμάτων έγιναν με τη μέθοδο του Πίνακα 5-1, με τη θερμοκρασία της χρωματογραφικής στήλης να είναι στους 40 °C, ροή 1.2 ml/min και πίεση 20-100 bar.

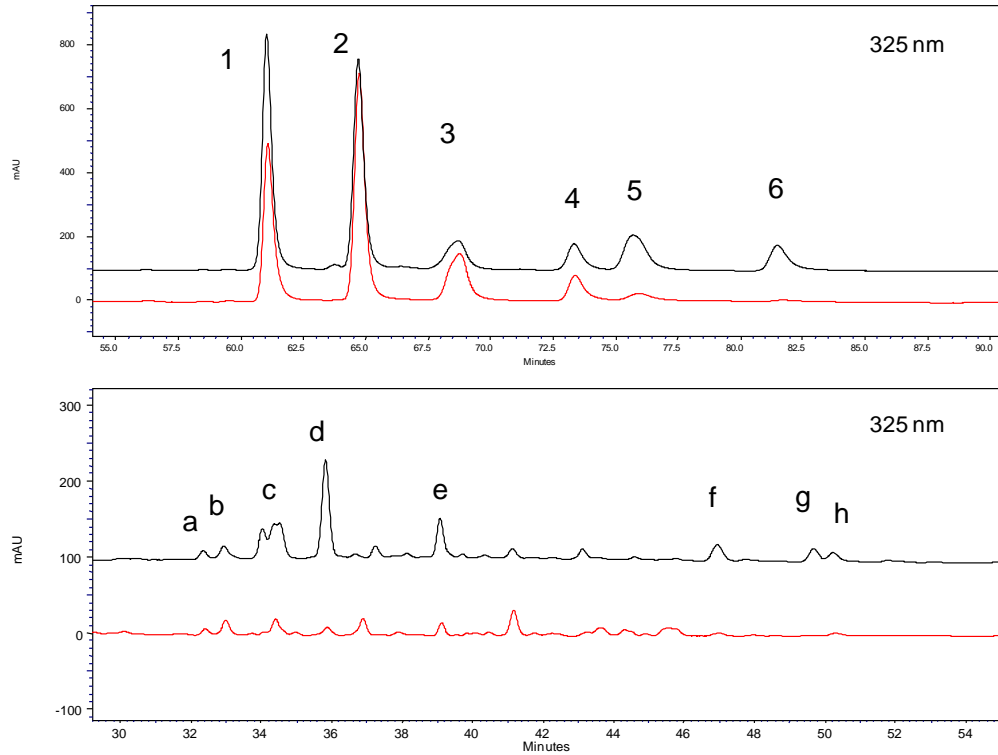
Πίνακας 5-1 Μέθοδος χρωματογραφίας HPLC για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς γOR & ΡγOR

Βήματα	Χρόνος (min)	Ροή (mL/min)	%H₂O + 0.1% formic acid	% ACN
1	0	1.2	30	70
2	40	1.2	0	100
3	93	1.2	0	100
4	95	1.2	30	70
5	115	1.2	30	70

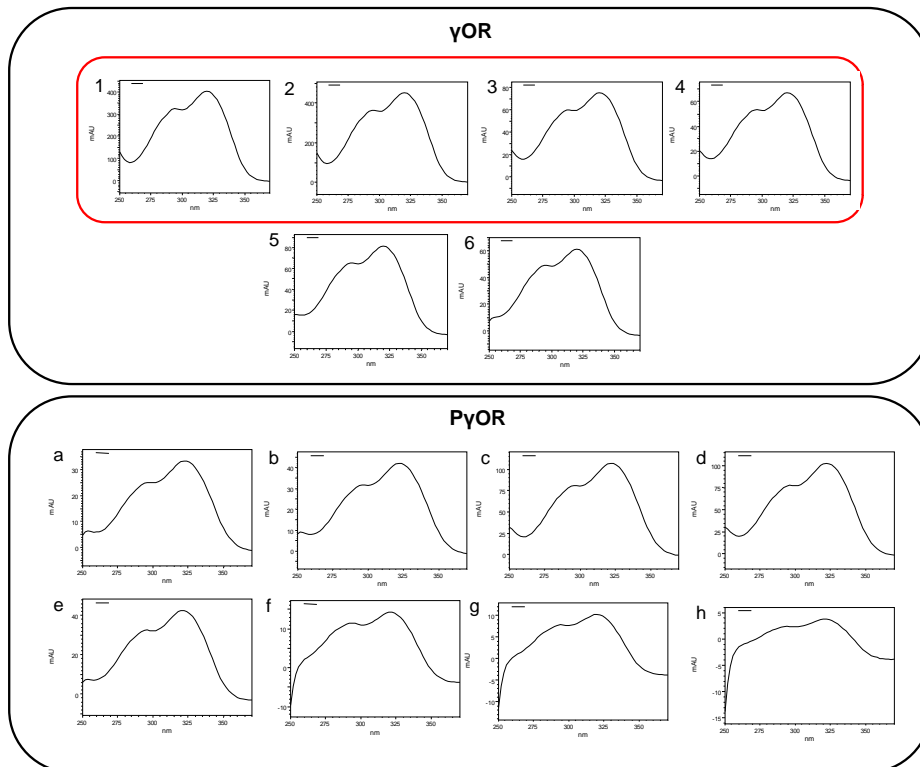


Εικόνα 5-3 UV-Χρωματογράφημα του RBO (μαύρο) σε συγκέντρωση 5 mg/ml ACN και της πρότυπης ορυζανόλης (κόκκινο) 0.1mg/ ml ACN, στα 325 nm.

Όπως φαίνεται στο χρωματογράφημα της Εικόνα 5-3, παρατηρούνται δύο κύριες ομάδες ουσιών: η ομάδα της πολικής γ-ορυζανόλης (**PγOR**) της οποίας οι ενώσεις εκλύονται μεταξύ 30 και 55 min και η ομάδα της γ-ορυζανόλης (**γOR**) της οποίας οι ενώσεις εκλύονται μεταξύ 60 και 90 min, ενώ παρατηρείται ικανοποιητικός διαχωρισμός των επιμέρους ουσιών. Η ταυτοποίηση της γOR στην Εικόνα 5-3 με βάση τα UV-φάσματα πραγματοποιήθηκε μέσω της ανάλυσης ενός πρότυπου δείγματος της γOR (κόκκινο). Στην ίδια εικόνα, στο χρωματογράφημα του δείγματος RBO (μαύρο), τα UV-φάσματα των κύριων κορυφών της PγOR αλλά και όλων των κορυφών στην ομάδα της γOR στην Εικόνα 5-5 εμφάνισαν χαρακτηριστικό προφίλ με μέγιστη απορρόφηση στα 325 nm, ελάχιστη στα 260 nm και έναν ώμο στα 295 nm, αντίστοιχα με αυτά της πρότυπης γOR [158]. Για τις κύριες ενώσεις της PγOR και της γOR χρησιμοποιούνται τα γράμματα a-h και οι αριθμοί 1-6 αντίστοιχα, όπως μπορούμε να δούμε στην Εικόνα 5-4.



Εικόνα 5-4 UV-Χρωματογράφημα της γ OR (από το 60^ο λεπτό έως το 90^ο λεπτό) & της $P\gamma$ OR (από το 30^ο λεπτό έως το 55^ο λεπτό) ενός RBO δείγματος και του πρότυπου της γ OR.

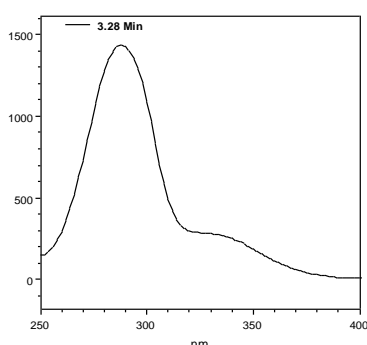


Εικόνα 5-5 UV-φάσμα των κυριότερων ενώσεων της γ OR & $P\gamma$ OR ενός RBO δείγματος και του πρότυπου της γ OR.

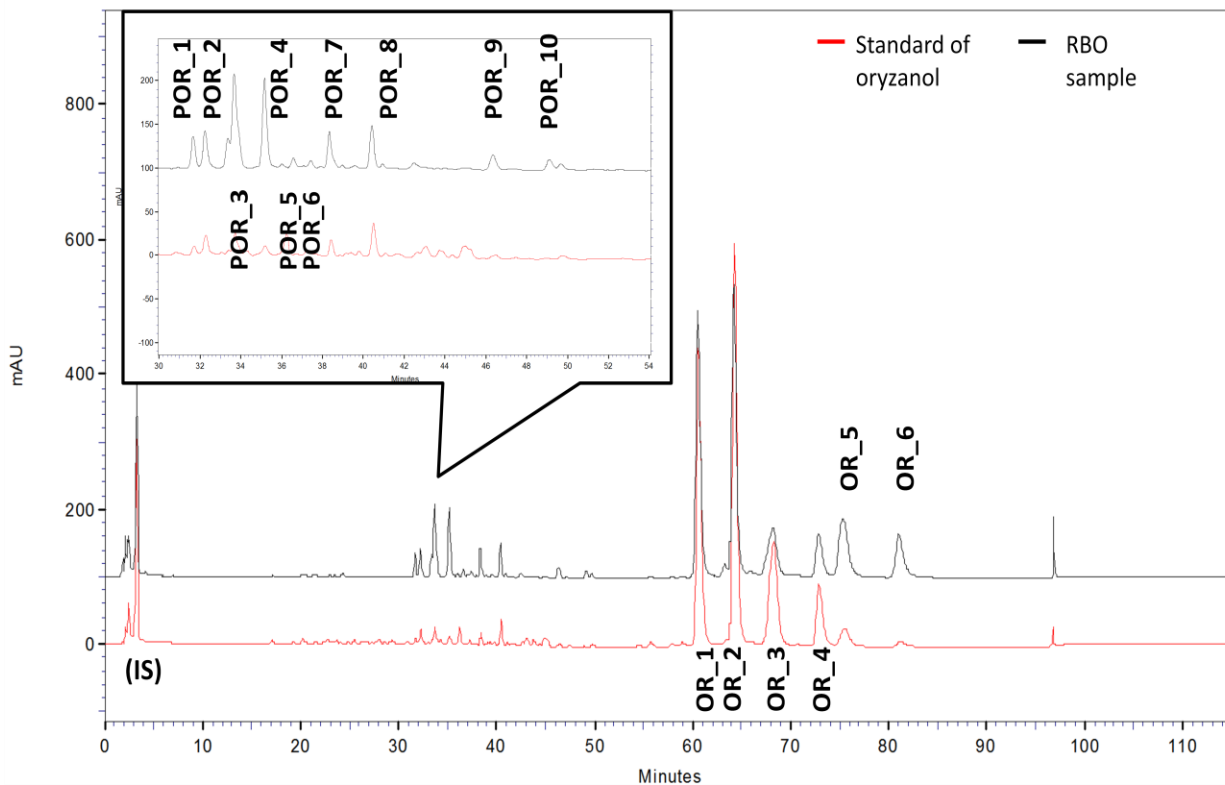
Με βάση βιβλιογραφικά δεδομένα, η κύρια διαφορά των δύο ομάδων είναι η ύπαρξη τουλάχιστον μίας επιπλέον υδροξυλομάδας στις ενώσεις της ΡγΟΡ [12], [9]. Η διαφορά αυτή αυξάνει την πολικότητα της ΡγΟΡ, γεγονός που επιτρέπει τον διαχωρισμό αυτών των δυο ομάδων. Ωστόσο, ο διαχωρισμός των ενώσεων της ίδιας ομάδας είναι ακόμη πιο δύσκολος. Οι μικρές δομικές διαφορές που αφορούν τον βασικό σκελετό των ενώσεων και οι διαφορές στην πλευρική αλυσίδα καθιστούν εξαιρετικά δύσκολο τον διαχωρισμό τους. Η μέχρι τώρα βιβλιογραφία [84, 156, 158-161] επιτρέπει παρ' όλα αυτά την αντιστοίχιση των κύριων ενώσεων της γΟΡ με τις κορυφές του χρωματογραφήματος σε RP στήλη όπως μπορούμε να δούμε στην Εικόνα 5-8.

Προκειμένου να προχωρήσουμε σε ποσοτικοποίηση των υπό ανάλυση ενώσεων ήταν απαραίτητη η εύρεση εσωτερικού πρότυπου (IS). Η χρήση εσωτερικού πρότυπου στον ποσοτικό προσδιορισμό βελτιώνει κατά πολύ την επαναληψιμότητα και την ακρίβεια της μεθόδου. Γενικότερα, η ένωση η οποία χρησιμοποιείται ως IS προστίθεται σε σταθερή συγκέντρωση και πρέπει να πληρεί ορισμένες προϋποθέσεις: • θα πρέπει να είναι σταθερή, • δεν θα πρέπει να αντιδρά με κανένα από τα συστατικά του δείγματος, • θα πρέπει να δίνει μία και μοναδική κορυφή, • ο χρόνος συγκράτησης της ένωσης θα πρέπει να διαφέρει από τους αντίστοιχους χρόνους των ενώσεων που εξετάζονται, αλλά να είναι κοντά σε αυτούς, και • θα πρέπει να μην υπάρχει στα προς ανάλυση δείγματα.

Έπειτα από πολλές δοκιμές βασιζόμενοι στο logP πλήθους οργανικών μορίων ως εσωτερικό πρότυπο (IS) χρησιμοποιήθηκε τελικά το συνθετικό παράγωγο 2,4,6-τριυδροξυ-3-φαίνυλ-ακετοφαινόνη (trihydroxy-3-prenyl-acetophenone) το οποίο εκκλύεται στα 3.28 min, απορροφά στα 325 nm (Εικόνα 5-6) και διαλύεται στο ACN. Εξαιτίας των χαρακτηριστικών αυτών αποτελεί μία ικανοποιητική επιλογή.

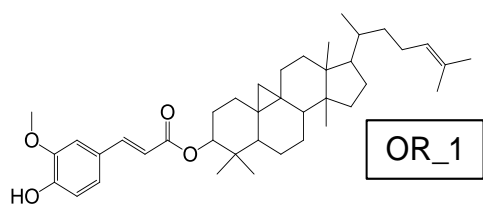


Εικόνα 5-6 UV-φάσμα του εσωτερικού πρότυπου, 2,4,6-trihydroxy 3-prenyl-acetophenone, με μεγίστη απορρόφηση στα 288nm και 331 nm και ελάχιστο στα 320 nm.



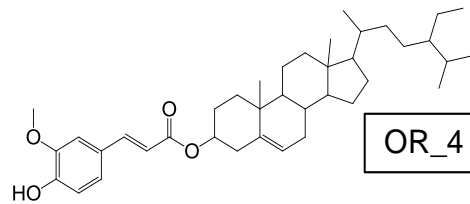
Εικόνα 5-7 Χρωματογράφημα-UV στα 325 nm ενός RBO δείγματος (4 mg/ml ACN) και του πρότυπου της γOR (0.1 mg/ml ACN) στα οποία έχει προστεθεί 0.03 mg/ml (IS).

Λόγω της πολυπλοκότητας του δείγματος (τουλάχιστον 23 ενώσεις με παρόμοια δομή), οι κορυφές POR_1, POR_2, POR_4, POR_7, POR_8, POR_9 & POR_10 για την ΡγOR και οι κορυφές OR_1, OR_2, OR_3, OR_4 για τη γOR όπως έχουν σημειωθεί στην Εικόνα 5-7, συμμετέχουν ως άθροισμα και όχι ως μεμονωμένες ενώσεις στον υπολογισμό της συγκέντρωσης της ΡγOR & γOR στο πύουρο και στο φλοιό. Για ορισμένες από τις κορυφές είναι εφικτό όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα η αντιστοίχησή τους με τις ήδη γνωστές ενώσεις της ΡγOR & γOR με βάση την έως τώρα βιβλιογραφία [162], [12].



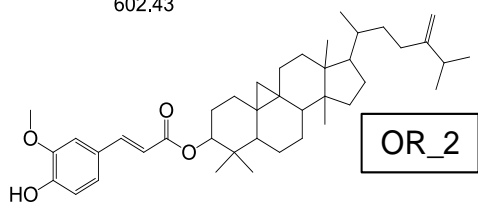
cycloartenyl ferulate

$C_{40}H_{58}O_4$
602.43



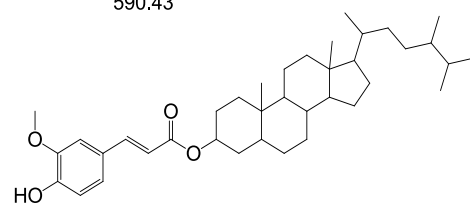
b-sitosteryl ferulate

$C_{39}H_{58}O_4$
590.43



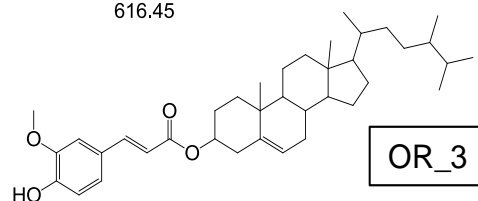
24-methylene
cycloartenyl ferulate

$C_{41}H_{60}O_4$
616.45



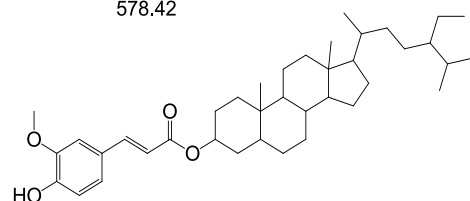
Campestanyl ferulate

$C_{38}H_{58}O_4$
578.42



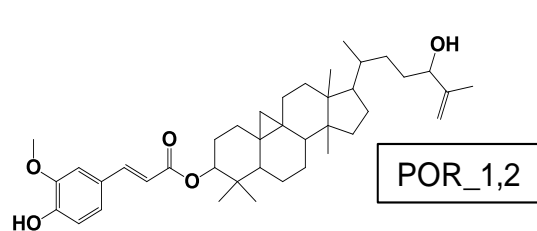
Campesteryl ferulate

$C_{38}H_{56}O_4$
576.42



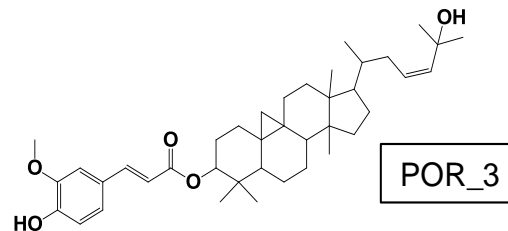
Sitostanyl or
stigmasterol ferulate

$C_{39}H_{60}O_4$
592.45



(24R)-cycloart-25-ene-3β,24-diol-3β-trans-ferulate
(24S)-cycloart-25-ene-3β,24-diol-3β-trans-ferulate

$C_{40}H_{58}O_5$
618.43



cycloart-23Z-ene-3β,25-diol-3β-trans-ferulate

$C_{40}H_{58}O_5$
618.43

Εικόνα 5-8 Αντιστοίχιση των κύριων ενώσεων της ΡγOR & γOR όπως αυτές αναφέρονται στη βιβλιογραφία (Stöggli et al., 2005 [162] και Angelis et al., 2011, [12]) με τις κορυφές του Χρωματογραφήματος-UV της Εικόνα 5-7.

5.3.2 Επικύρωση της μεθόδου

5.3.2.1 Καμπύλες αναφοράς πρότυπων διαλυμάτων

Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς της ΡγOR και της γOR παρασκευάστηκαν μητρικά διαλύματα του πρότυπου της γOR με συγκέντρωση 1 mg/ml ACN και του εσωτερικού πρότυπου (2,4,6-trihydroxy-3-prenyl-acetophenone (**IS**)) με συγκέντρωση 0.3 mg/ml ACN. Από τα μητρικά δείγματα με τις κατάλληλες αραιώσεις παρασκευάστηκαν τα δείγματα του πρότυπου της γOR σε 9 συγκεντρώσεις 5 ug/ml, 10 ug/ml, 15 μg/ml, 20μg/ml, 50 μg/ml, 75μg/ml, 100 μg/ml, 125 μg/ml, 150 μg/ml. Σε όλα τα δείγματα της καμπύλης αναφοράς αλλά και σε αυτά που αναλύονται στη συνέχεια προστέθηκαν 100 ul εσωτερικού πρότυπου από το μητρικό δείγμα του εσωτερικού πρότυπου.

Ο έλεγχος ποιότητας εξασφαλίστηκε μέσω του δείγματος ελέγχου (QC) το οποίο παρασκευάστηκε εκ νέου με το πρότυπο της γOR σε συγκέντρωση 100 μg/ml στο οποίο προστέθηκαν 100 ul εσωτερικού πρότυπου.

Από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων και με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων προέκυψε η γραφική παράσταση της Εικόνα 5-9 με την εξίσωση που ακολουθεί και τον **συντελεστή συσχέτισης** να είναι στα αποδεκτά όρια ($R^2=0.999028106$, όπου $R^2 > 0.998$):

- $(Q/Q_{IS}) = 0.3072 * (A/A_{IS}) + 0.0411$ ή $y = 0.3072x + 0.0411$ και $R^2 = 0.999$

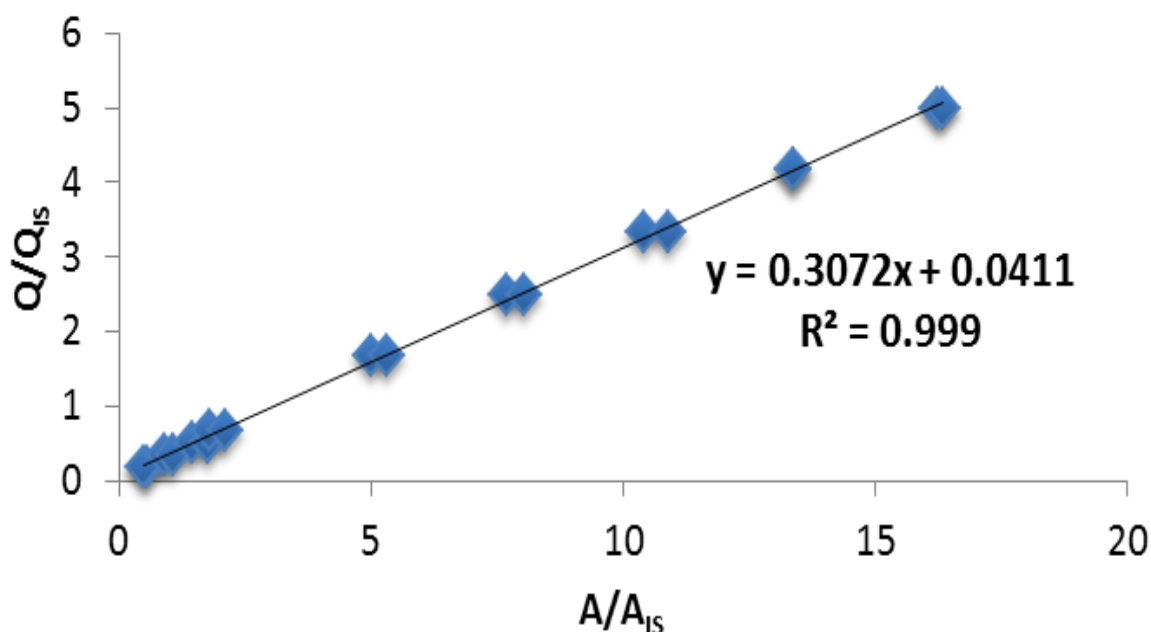
Ο υψηλός συντελεστής συσχέτισης αποδεικνύει την πολύ καλή **γραμμικότητα**. Με κατάλληλη επεξεργασία των δεδομένων, κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς για κάθε μία από τις 4 κύριες κορυφές της γOR με σκοπό την εξασφάλιση της αξιοπιστίας και της γραμμικότητας της μεθόδου. Και οι τέσσερις καμπύλες αναφοράς είχαν $R^2=0.998$. Με βάση τα αποτελέσματα από την καμπύλη αναφοράς, **το εύρος (R)** στο οποίο θα πρέπει να κυμαίνεται το Aratio για ένα δείγμα RBO με άγνωστη ποσότητα γOR και ΡγOR είναι από 0.55 έως 16.36, προκειμένου να είναι υπολογίσιμη η συγκέντρωσή τους.

Γραμμικότητα είναι η ικανότητα μιας μεθόδου να εκμαιεύει αποτελέσματα των δοκίμων που να είναι ευθέως ανάλογα προς τη συγκέντρωση του αναλύτη μέσα σε ένα δεδομένο εύρος.

Εύρος (R) είναι το διάστημα μεταξύ της μέγιστης και της ελάχιστης συγκέντρωσης του αναλύτη που μπορούν να προσδιοριστούν με ακρίβεια. Το εύρος εκφράζεται

κανονικά στις ίδιες μονάδες με τα αποτελέσματα των δοκιμών που λαμβάνονται με τη μέθοδο.

Η αποδοχή της γραμμικότητας μιας μεθόδου ελέγχεται από την εξέταση του **συντελεστή συσχέτισης** και της τομής της ευθείας παλινδρόμησης στον άξονα y'y. Συντελεστής συσχέτισης (R^2) > 0.998 θεωρείται γενικά ως απόδειξη της αποδέκτης προσαρμογής των δεδομένων στη γραμμή παλινδρόμησης.



Εικόνα 5-9 Καμπύλη αναφοράς της PγOR και της γOR.

5.3.2.2 Όρια ανίχνευσης και ποσοτικής αποτίμησης

Το όριο ανίχνευσης (LOD) και το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) ορίζονται ως η ελάχιστη συγκέντρωση της προσδιοριζόμενης ένωσης που μπορεί να ανιχνευθεί ή να προσδιορισθεί ποσοτικά αντίστοιχα, με βεβαιότητα 99%. Προκειμένου να καθορισθεί η ευαισθησία της μεθόδου, ως όριο ποσοτικοποίησης (limit of quantification, LOQ) ορίστηκε η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στο 1^ο σημείο της καμπύλης αναφοράς, δηλαδή 5μg/ ml και το όριο ανίχνευσης (limit of detection, LOD) ορίστηκε θεωρητικά σύμφωνα με τον τύπο $LOD=LOQ/3$, δηλαδή 1.67 μg/ml.

Συνεπώς, η παραπάνω εξίσωση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό της περιεκτικότητας του πύτουρου και του φλοιού σε PγOR και γOR.

5.3.2.3 Σταθερότητα διαλυμάτων

Μετά την δημιουργία καμπυλών αναφοράς ελέγχθηκε η σταθερότητα του μητρικού διαλύματος του δείγματος και του IS (*stock solution stability*) σε διάφορες συγκεντρώσεις και σε διάφορα συστήματα διαλυτών ACN/H₂O, v/v: 100/0, 90/10, 80/20 & 60/40. Επίσης, ελέγχθηκε η σταθερότητα του μητρικού διαλύματος του δείγματος και του IS σε διάστημα 4 ημερών (96 h) (*post-preparative stability*). Η κάθε αναλογία ελέγχθηκε 3 φορές σε διάστημα 96 ωρών (n=3). Η 2η δοκιμή έγινε μετά από 24 ωρών και η 3η δοκιμή έγινε μετά από 96 ώρες. Το RSD% που αφορά το εμβαδόν της κορυφής του εσωτερικού πρότυπου διαλυμένο στο ίδιο σύστημα διαλυτών ήταν μικρότερο του 2% μετά από 96 h. Το RSD% που αφορά το άθροισμα του εμβαδού των 5 κορυφών της ΡγOR διαλυμένο στο ίδιο σύστημα διαλυτών βρέθηκε μικρότερο του 3% μετά από 96 h. Το RSD% που αφορά το σύνολο των δοκιμών στο διάστημα των 5 ημερών ανεξάρτητα από το σύστημα διαλυτών των δειγμάτων είναι μικρότερο του 3%. Συμπεραίνεται λοιπόν ότι, ο χρόνος έκλουσης (Rt), το εμβαδόν της ΡγOR και του εσωτερικού πρότυπου παραμένουν σταθερά μετά από 96 ώρες (RSD< 3%) και δεν αλλοιώνεται από την προσθήκη H₂O έως 40% στον διαλύτη του δείγματος (RSD< 3%). Τα παραπάνω αποδεικνύουν τη σταθερότητα των δειγμάτων με το χρόνο και άρα την αξιοπιστία της μεθόδου.

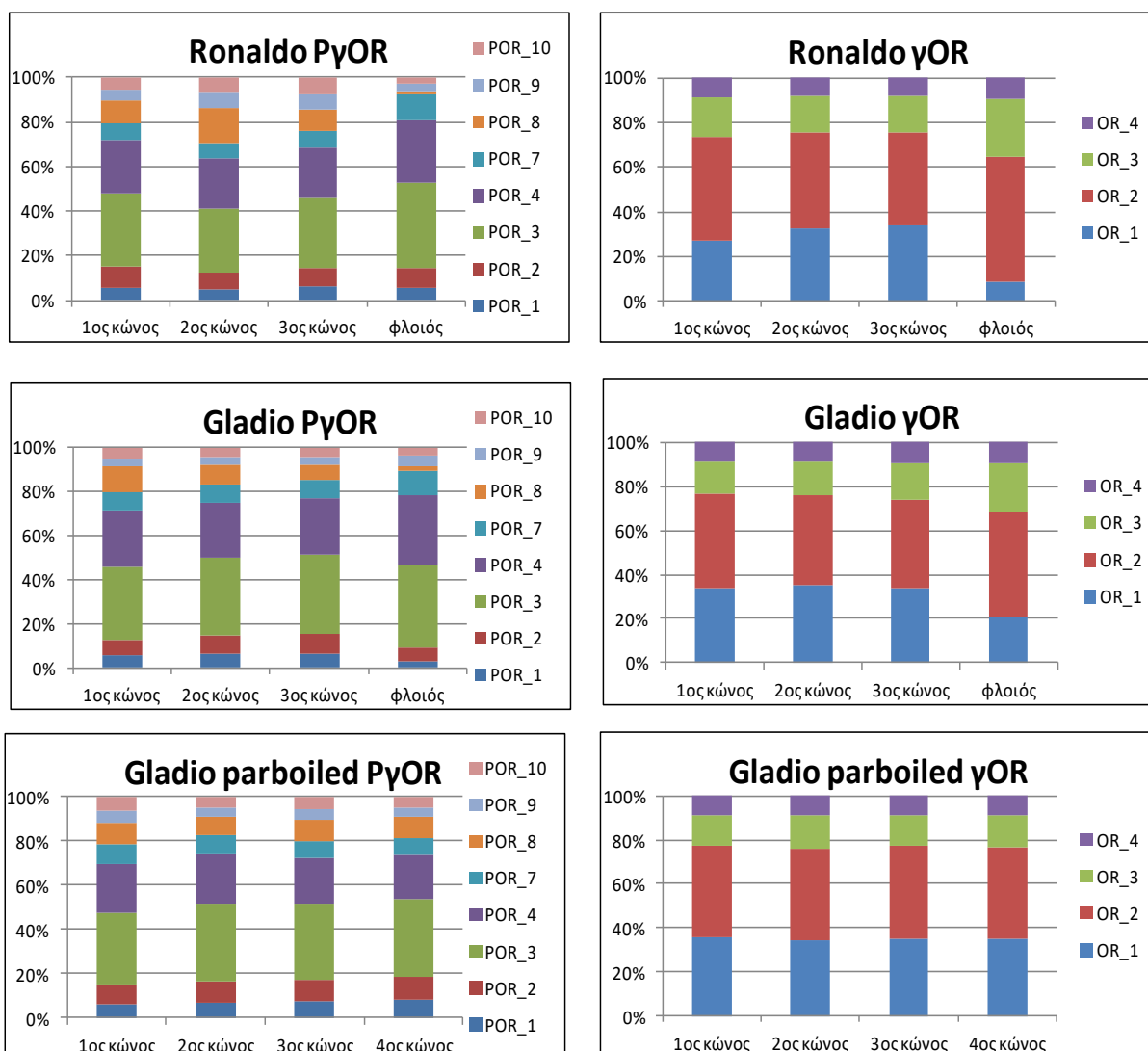
5.3.3 Ποιοτικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων

Μετά από την επιτυχή ανάπτυξη της χρωματογραφικής μεθόδου ακολούθησε ο ποσοτικός προσδιορισμός της ΡγOR και της γOR. Συγκεκριμένα, παρασκευάστηκαν τα 24 προς μελέτη δείγματα RBO με τον εξής τρόπο: 25 mg RBO διαλύθηκαν σε 5 ml ACN με την εφαρμογή λουτρού υπερήχων για 15 min, στους 40 °C. Τα δείγματα αφέθηκαν σε ηρεμία. Στη συνέχεια, 0.9 ml (=4.5 mg RBO) από το κάθε δείγμα διηθήθηκε με φίλτρο NYL 0.45 μm και τοποθετήθηκε σε φιαλίδιο HPLC μαζί με 100 μl εσωτερικού πρότυπου. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς προαναφέρθηκε στον Πίνακα 5-1.

Τα χρωματογραφήματα που προέκυψαν επεξεργάστηκαν και υπολογίστηκε ο λόγος $x=(A/A_{IS})$ όπου A είναι το άθροισμα του εμβαδού των κύριων κορυφών (OR_1 έως OR_4) του πρότυπου της γOR, και A_{IS} είναι το εμβαδόν της κορυφής του εσωτερικού πρότυπου όπως εμφανίζονται στην Εικόνα 5-7. Υπολογίστηκε ακόμα ο λόγος των συγκεντρώσεων $y=(Q/Q_{IS})$ όπου Q είναι η συγκέντρωση του πρότυπου της γOR (5, 10, 15, 20, 50, 75, 100, 125, 150 μg/ml) και Q_{IS} είναι η συγκέντρωση του εσωτερικού πρότυπου (30 μg/ml).

Για την ποσοτικοποίηση της ΡγΟΡ & της γΟΡ στα RBO δείγματα (mg ΡγΟΡ ή mg γΟΡ /g RBO) αλλά και στο πίτουρο (mg ΡγΟΡ ή mg γΟΡ/g πίτουρου), συμμετέχουν οι κύριες κορυφές της ΡγΟΡ, POR_1, POR_2, POR_4, POR_7, POR_8, POR_9 & POR_10 και της γΟΡ, OR_1, OR_2, OR_3, OR_4 όπως έχουν σημειωθεί στην Εικόνα 5-7. Λόγω της πολυπλοκότητας του δείγματος οι προαναφερθείσες κορυφές συμμετέχουν στην ποσοτικοποίηση ως άθροισμα και όχι ως μεμονωμένες ενώσεις.

Προτού όμως παρουσιαστούν και αναλυθούν τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης είναι σημαντικό να γίνει σχολιασμός των **ποιοτικών χαρακτηριστικών** των RBO δειγμάτων. Η συνεισφορά των κύριων κορυφών στη συνολική συγκέντρωση της πολικής γ-ορυζανόλης (ΡγΟΡ) και της γ-ορυζανόλης (γΟΡ) φαίνονται στην Εικόνα 5-10.



Εικόνα 5-10. Συνεισφορά των κύριων ενώσεων της ΡγΟΡ & της γΟΡ στο συνολικό προς μέτρηση εμβαδό της κάθε ομάδας.

Σε όλα τα δείγματα που αναλύθηκαν, οι κορυφές OR_1, OR_2 αντιπροσωπεύουν τις κύριες ενώσεις της γOR, ενώ οι κορυφές POR_3, POR_4 αντιπροσωπεύουν τις κύριες ενώσεις της ΡγOR. Ειδικότερα, OR_1 & OR_2 αποτελούν το $\approx 26-35\%$ και $\approx 42-47\%$ της συνολικής ποσότητας γOR ενώ POR_3 & POR_4 αποτελούν το $\approx 33-35\%$ και $\approx 21-27\%$ της συνολικής ποσότητας γ-ορυζανόλης (ΡγOR).

Όσον αφορά τις δευτερεύουσες κορυφές, τα ποσοστά διαμορφώνονται ως εξής: OR_4 $\approx 9\%$, OR_3 $\approx 14-19\%$ ως προς τη συνολική γ-ορυζανόλη (γOR). POR_1 $\approx 6\%$, POR_2 $\approx 8\%$, POR_7,8 $\approx 7-9\%$, POR_9,10 $\approx 4-6\%$. ως προς το τη συνολική ποσότητα γ-ορυζανόλη (ΡγOR).

Η σύσταση των RBO δειγμάτων και των εκχυλισμάτων του φλοιού είναι σταθερή και η κάθε ουσία βρίσκεται στην ίδια αναλογία ως προς τη συνολική ποσότητα της γOR ή της ΡγOR στα δείγματα, ανεξαρτήτως ποικιλίας (Ronaldo, Gladio), τρόπου επεξεργασίας (parboiled, non-parboiled) και σταδίου μύλευσης (1^{ος}, 2^{ος}, 3^{ος}, 4^{ος} κώνος). Επίσης, σε όλα τα δείγματα οι τιμές της γOR ήταν τετραπλάσιες σε σχέση με αυτές της ΡγOR.

5.3.4 Υπολογισμός της συγκέντρωσης της ΡγOR και της γOR στο πίτουρο και τον φλοιό

Για τα δείγματα της καμπύλης αναφοράς πραγματοποιήθηκαν δυο επαναλήψεις και για το QC πέντε επαναλήψεις ενώ τα 24 δείγματα RBO που προέκυψαν από τις 2 ανεξάρτητες εκχυλίσεις που έγιναν για το κάθε ένα από τα 12 αρχικά δείγματα (10 δείγματα πίτουρου και 2 δείγματα φλοιού), ενέθηκαν από μία φορά. Το QC όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, παρασκευάστηκε εκ νέου με το πρότυπο της γOR σε συγκέντρωση 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ στο οποίο προστέθηκαν 100 μl από το μητρικό δείγμα του εσωτερικού πρότυπου (0.3 mg/ml ACN).

Δύο ενέσεις τυφλού διαλύματος (blank) με ACN ενέθηκαν στην αρχή του πειράματος με σκοπό την εξασφάλιση της σταθερότητας των συνθηκών έκλουσης στην χρωματογραφική στήλη HPLC. Με σκοπό τον έλεγχο αλλά και την αποφυγή τυχόν επιμολύνσεων από τα RBO δείγματα, το QC ενιόταν ανάμεσα σε δύο ενέσεις λευκού δείγματος κάθε 8-9 ενέσεις RBO δείγματος ή δείγματος της καμπύλης αναφοράς. Η συνολική διάρκεια του πειράματος με δεδομένη τη διάρκεια της μεθόδου να είναι 115 min, ήταν περίπου 5 ημέρες. Με αυτή την ακολουθία ήταν εφικτό να ελεγχθεί η σταθερότητα του συστήματος HPLC-DAD πριν, κατά τη διάρκεια και μετά από μία σειρά αναλύσεων. Το RSD% που αφορά το εμβαδόν της κορυφής του εσωτερικού

πρότυπου είναι 0% και το RSD% που αφορά το εμβαδόν των κορυφών της γOR σαν άθροισμα είναι 2% για τις 5 επαναλήψεις, δηλαδή εντός αποδεκτών ορίων (RSD<2%).

Χρησιμοποιώντας την εξίσωση της καμπύλης αναφοράς καθίσταται εφικτός ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της πολικής ΡγOR και της γOR τόσο στα RBO εκχυλίσματα όσο και στην αρχική πρώτη ύλη, το πίτουρο ή τον φλοιό.

$$\left(\frac{Q}{Q_{is}}\right) = 0.3072058 \times \left(\frac{A}{A_{is}}\right) + 0.0410591$$

$$(Cx) = (Q) / (Crbo)$$

Q: συγκέντρωση της ΡγOR ή της γOR σε μg/ml ή Q_{OR} ή P_{OR}

Q_{is}: συγκέντρωση του εσωτερικού πρότυπου σε μg/ml, η οποία είναι $Q=30$ μg/ml

A: άθροισμα του εμβαδού των κορυφών της γOR ή της ΡγOR

A_{is}: εμβαδόν της κορυφής του εσωτερικού πρότυπου

Crbo: συγκέντρωση του RBO δείγματος σε mg/ml, η οποία είναι ≈ 4.5 mg/ml

Cx: συγκέντρωση της ΡγOR ή της γOR σε mg/g σε RBO

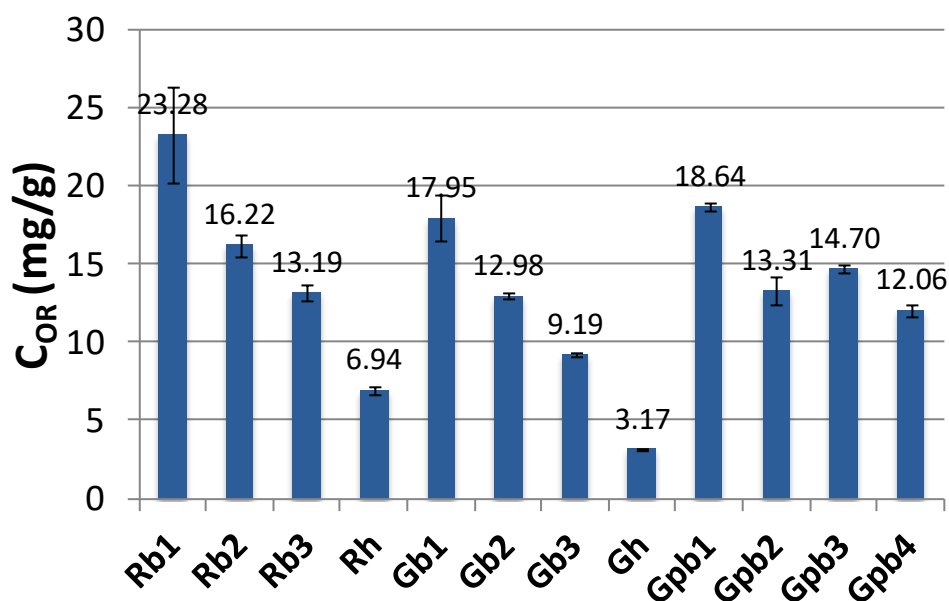
$$(Cy) = (Cx) \times yield$$

Yield: απόδοση της εκχύλισης του πίτουρου σε RBO, εκφρασμένο σε %

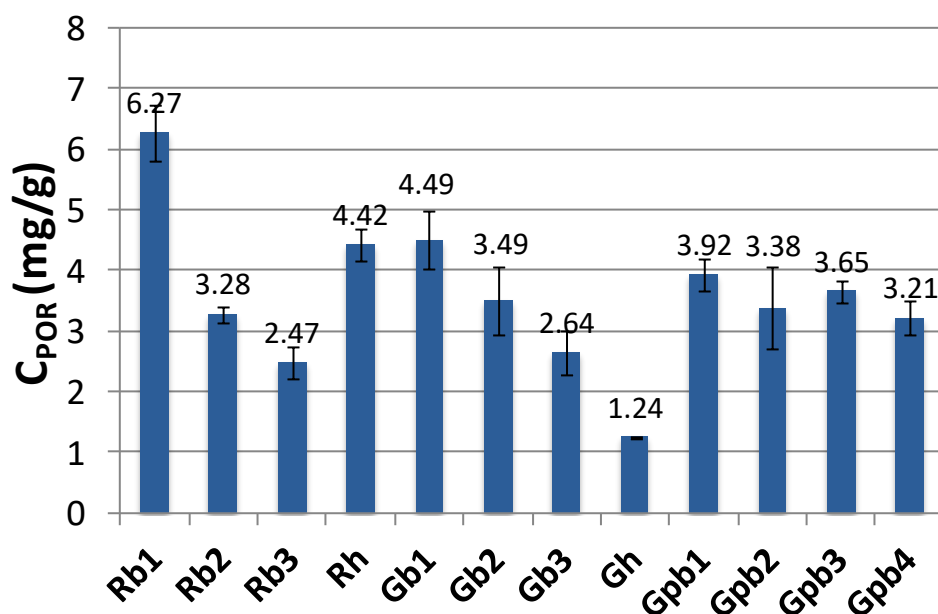
Cy: συγκέντρωση ΡγOR ή της γOR σε mg/g πίτουρου

Μετά από επεξεργασία των χρωματογραφημάτων των RBO δειγμάτων, προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα. (Εικόνα 5-11, Εικόνα 5-12). Από τις εικόνες που ακολουθούν, μπορούν να εξαχθούν ποσοτικά δεδομένα που αφορούν τη συγκέντρωση των δειγμάτων σε ΡγOR και γOR και την απώλεια ή τη διατήρηση της ΡγOR & της γOR στην πρώτη ύλη ανάλογα με το στάδιο της μύλευσης και την εφαρμογή ή μη της υγροθερμικής επεξεργασίας. Τα δεδομένα της ανάλυσης βρίσκονται πιο αναλυτικά στο Παράρτημα.

C_{OR} στο RBO (mg/g)



C_{POR} στο RBO (mg/g)



Εικόνα 5-11 Συγκέντρωση της ΡγOR ή γOR σε mg/g σε RBO.

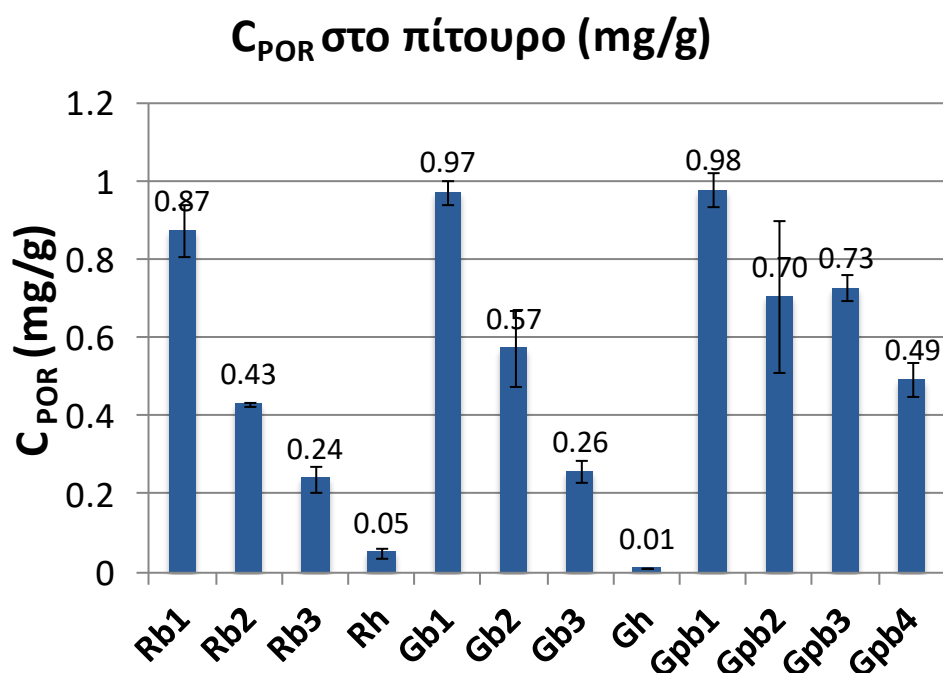
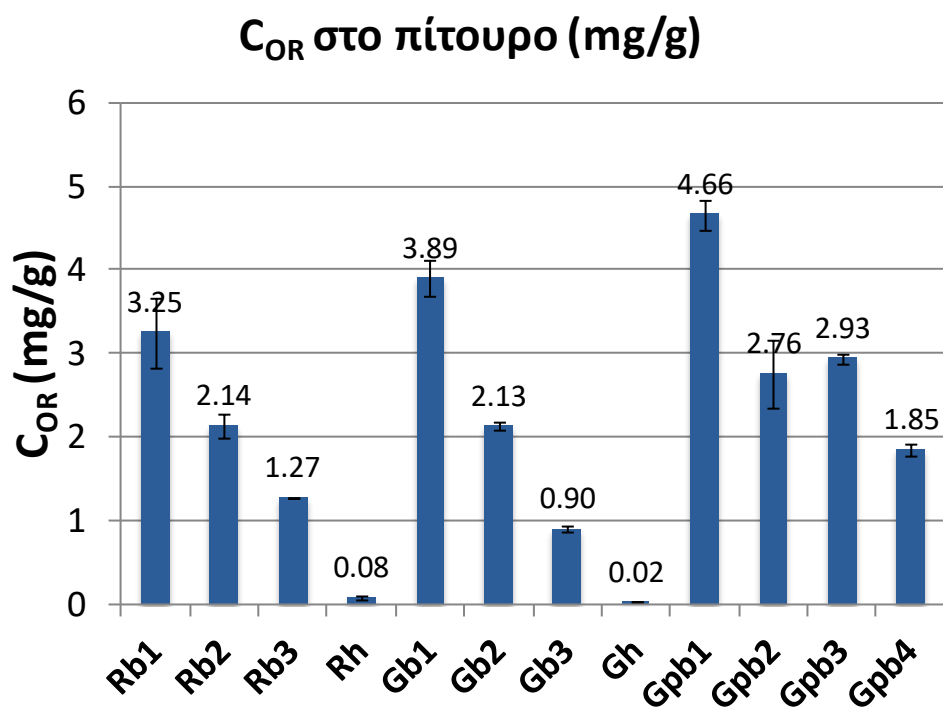
Σύμφωνα με την Εικόνα 5-11, το RBO εκχύλισμα του 1^{ου} κώνου αποτελεί την πιο πλούσια πηγή τόσο ΡγOR όσο και γOR ανεξάρτητα από την ποικιλία και την επεξεργασία που έχει προηγηθεί της παραλαβής του πίτουρου. Μεταξύ των ποικιλιών πίτουρου Ronaldo, Gladio και Gladio parboiled, το πίτουρο Ronaldo είναι το πλουσιότερο σε ΡγOR όσο και γOR εκχύλισμα RBO. Η συγκέντρωση σε ΡγOR και

γOR του RBO ακολουθεί φθίνουσα πορεία από τον 1^ο κώνο στον 3^ο για το πίτουρο Ronaldo και Gladio ενώ για το Gl.parboiled ισχύει το εξής 1^{ος} κώνος > 2^{ου} κώνου \approx 3^{ου} κώνου \approx 4^{ου} κώνου. Η συγκέντρωση της γOR στον φλοιό ακολουθεί τη φθίνουσα πορεία που περιγράφηκε για το εκχύλισμα RBO από το πίτουρο Ronaldo και Gladio ενώ η συγκέντρωση της ΡγOR στον φλοιό Ronaldo ακολουθεί διαφορετική σειρά: 1^{ος} κώνος> φλοιός> 2^{ος} κώνος> 3^{ος} κώνος ενώ στον φλοιό Gladio συγκέντρωση της ΡγOR είναι μικρότερη από του 3^{ου} κώνου.

Πιο συγκεκριμένα,

- Ο 1^{ος} κώνος, ο 2^{ος} κώνος, ο 3^{ος} κώνος και ο φλοιός της ποικιλίας Ronaldo περιέχουν αντίστοιχα, 23.28 >16.22 >13.19 >6.94 γOR σε mg/g RBO και 6.26 >3.27 >2.47 >4.42 ΡγOR σε mg/g RBO.
- Ο 1^{ος} κώνος, ο 2^{ος} κώνος, ο 3^{ος} κώνος και ο φλοιός της ποικιλίας Gladio περιέχουν αντίστοιχα, 17.95 >12.95 >9.19 >3.16 γOR σε mg/g RBO και 4.49 >3.49 >2.64 >1.24 ΡγOR σε mg/g RBO.
- Ο 1^{ος} κώνος, ο 2^{ος} κώνος, ο 3^{ος} κώνος και 4^{ος} κώνος της ποικιλίας Gladio parboiled περιέχουν αντίστοιχα, 18.64 >13.31 >14.70 >12.05 γOR σε mg/g RBO και 3.91 >3.37 >3.65 >3.21 ΡγOR σε mg/g RBO.

Παρατηρείται λοιπόν ότι το εκχύλισμα του πίτουρου Ronaldo 1^{ος} κώνος είναι το RBO με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση σε ΡγOR και γOR. Ωστόσο, δεν γίνεται να μη συμπεριληφθεί ο παράγοντας *απόδοση εκχύλισης*, στο τελικό συμπέρασμα που αφορά την εύρεση της πιο πλούσιας πηγής σε ΡγOR και γOR μεταξύ των αρχικών δειγμάτων πίτουρου και φλοιού.



Εικόνα 5-12 Συγκέντρωση της ΡγOR ή γOR σε mg/g στο πίτουρο

Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν συμπεριλαμβάνοντας την απόδοση (Εικόνα 5-2) της εκχύλισης του πίτουρου σε RBO είναι τα εξής:

- Ο 1^{ος} κώνος, ο 2^{ος} κώνος, ο 3^{ος} κώνος και ο φλοιός της ποικιλίας Ronaldo περιέχουν αντίστοιχα, 3.25 > 2.14 > 1.27 > 0.08 γOR σε mg/g πίτουρου και 0.87 > 0.43 > 0.24 > 0.05 ΡγOR σε mg/g πίτουρου

- Ο 1^{ος} κώνος, ο 2^{ος} κώνος, ο 3^{ος} κώνος και ο φλοιός της ποικιλίας Gladio περιέχουν αντίστοιχα, 3.89 >2.13 >0.90 >0.02 γOR σε mg/g πίτουρου και 0.97 >0.57 >0.26 >0.01 ΡγOR σε mg/g πίτουρου.
- Ο 1^{ος} κώνος, ο 2^{ος} κώνος, ο 3^{ος} κώνος και 4^{ος} κώνος της ποικιλίας Gladio parboiled περιέχουν αντίστοιχα, 4.66 >2.76 >2.93 >1.85 γOR σε mg/g πίτουρου και 0.98 >0.70 >0.73 >0.49 ΡγOR σε mg/g πίτουρου.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτουν ορισμένα τελικά συμπεράσματα σχετικά με τον υπολογισμό της γOR ή της ΡγOR σε mg/g πίτουρου.

- Ανεξαρτήτως ποικιλίας, στον 1^ο κώνο πίτουρου βρέθηκε η υψηλότερη συγκέντρωση ΡγOR & γOR.
- Για τις ποικιλίες Ronaldo & Gladio, η συγκέντρωση σε ΡγOR & γOR ακολουθεί την εξής φθίνουσα πορεία: 1^{ος} κώνος > 2^{ος} κώνος > 3^{ος} κώνος > φλοιός.
- Για την ποικιλία Gladio parboiled, η συγκέντρωση σε ΡγOR & γOR ακολουθεί μια διαφορετική πορεία: 1^{ος} κώνος > 3^{ος} κώνος ≥ 2^{ος} κώνος > 4^{ος} κώνος.
- Η συγκέντρωση της ΡγOR στον φλοιό Gladio δε μπορεί να συμπεριληφθεί στα τελικά αποτελέσματα, αφού οι τιμές είναι μικρότερες του ορίου ποσοτικοποίησης (<LOQ).
- Συγκρίνοντας τον 1^ο κώνο της κάθε ποικιλίας για την ΡγOR και την γOR ακολουθείται η εξής πορεία: Gladio parboiled > Gladio > Ronaldo.

Αξίζει να σημειωθεί ότι αν και τα RBO από τους 1^{ους} κώνους των Ronaldo και Gladio χαρακτηρίζονται από υψηλότερα επίπεδα ορυζανολών, οι εμφανώς υψηλότερες τιμές στην απόδοση εκχύλισης του πίτουρου Gladio parboiled και ειδικότερα του 1^{ου} κώνου καθιστά **τον 1^ο κώνο πίτουρου Gladio parboiled ως την πλουσιότερη πηγή ΡγOR και γOR.**

Υπάρχουν αρκετές αναφορές ποσοτικοποίησης της γOR στο RBO όσο και στο πίτουρο διάφορων ποικιλιών ρυζιού ενώ δεν υπάρχει καμία για την ΡγOR. Οι Mohanlal et al. χρησιμοποιώντας το 24-methylene-cycloartanyl ferulate σε διάφορες συγκεντρώσεις κατασκεύασαν καμπύλη αναφοράς σύμφωνα με την οποία το πίτουρο Njavara Black, το πίτουρο Sujatha, και το πίτουρο Palakkadan Matta περιέχουν 1.84± 0.07, 0.67±0.03, 0.25±0.01 γ-ορυζανόλη (γOR) αντίστοιχα [159]. Σύμφωνα με τους Iqbal et al. [163] το πίτουρο "Super kernel" περιέχει 0.802 mg/g πίτουρου [159]. Οι W. Lu et al. χρησιμοποιώντας το Cycloartenyl ferulate, ως εσωτερικό πρότυπο υπολόγισαν την ποσότητα της γOR σε 17 δείγματα RBO

επεξεργασμένα ή εξευγενισμένα, προερχόμενα από Κίνα, Ταϊλάνδη, Ιαπωνία, Ινδία, Βιετνάμ, η οποία είναι περίπου 2.14-13.74 mg/g RBO ή 2.29-14.70 mg/g RBO (ποσότητα που υπολογίστηκε με βάση το μοριακό βάρος του campesteryl ferulate ή του 24-methylene cycloartanyl ferulate αντίστοιχα). Επίσης, είναι σημαντικό να τονιστεί ότι το ακατέργαστο RBO είναι πιο πλούσιο σε γOR σε σχέση με το εξευγενισμένο.

Επίσης, στις περισσότερες δημοσιεύσεις που προαναφέρθηκαν, δεν αναφέρεται από ποιο στάδιο της μύλευσης προέρχεται το πύουρο με αποτέλεσμα να υπάρχει μεγάλη διαφοροποίηση ως προς τα αποτελέσματα που δημοσιεύονται. Η διαφορά αυτή μπορεί να οφείλεται και σε άλλες παραμέτρους, όπως η προέλευση, η εποχή της συγκομιδής, η διαφορετική επεξεργασία των δειγμάτων και συνθήκες αποθήκευσης.

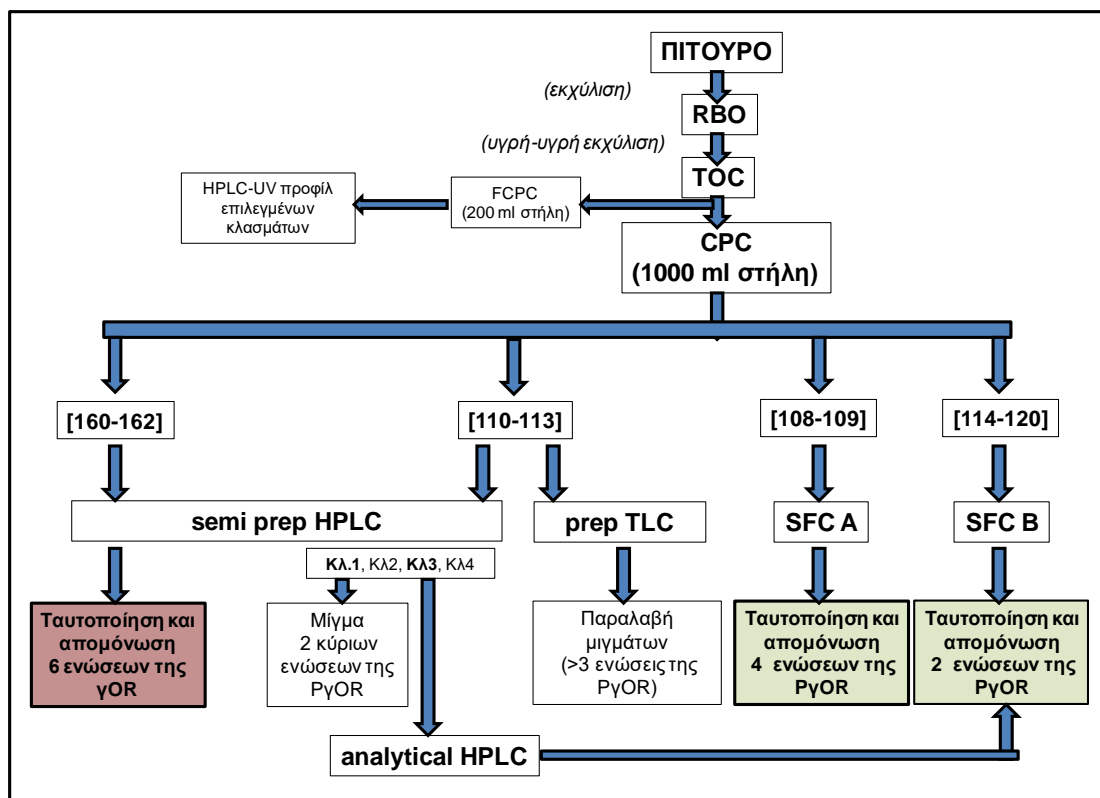
Ωστόσο, είναι η **πρώτη φορά που δίνεται η δυνατότητα υπολογισμού της συγκέντρωσης ταυτόχρονα της ΡγOR και της γOR χρησιμοποιώντας την ίδια καμπύλη αναφοράς**. Επίσης, **ποσοτικοποίηση ΡγOR δεν έχει αναφερθεί στο παρελθόν**. Ένα ακόμα σημαντικό συμπέρασμα που μπορεί να εξαχθεί από την ποιοτική μελέτη των δειγμάτων στη παρούσα εργασία, είναι ότι η **ποιότητα των δειγμάτων δεν αλλοιώνεται** από τη μύλευση ούτε από την υγροθερμική επεξεργασία και δε διαφοροποιείται, τουλάχιστον στις ποικιλίες της παρούσας εργασίας.

Τέλος, εξαιτίας της ολοκληρωμένης προσέγγισης που πραγματοποιήθηκε στην παρούσα εργασία όπου λαμβάνονται υπόψη **διαφορετικά υποείδη ρυζιού, διαφορετικοί τύποι παραπροϊόντων και στάδια μύλευσης**, δίνεται η δυνατότητα εύρεσης της **βέλτιστης πρώτης ύλης** για την αποδοτικότερη απομόνωση της ΡγOR ή της γOR ανάμεσα στα παραπροϊόντα που προκύπτουν από την επεξεργασία του ρυζιού και **δεν έχει περιγραφεί στο παρελθόν**.

6 Ειδικό μέρος Β

Το δεύτερο σκέλος της παρούσας εργασίας αφορά την απομόνωση και την ταυτοποίηση των ουσιών της πολικής γ-ορυζανόλης (**PγOR**), πολλές εκ των οποίων δεν έχουν ταυτοποιηθεί ή απομονωθεί ακόμα αλλά και των ουσιών της γ-ορυζανόλης (**γOR**) οι περισσότερες εκ των οποίων έχουν περιγραφεί ξανά αλλά τα στοιχεία για την ταυτοποίησή τους είναι ελλιπή ή αποσπασματικά. Για την επίτευξη αυτού του στόχου είναι απαραίτητη η επανάληψη της εκχύλισης του πύτου σε μεγαλύτερη κλίμακα και η παραλαβή όσο το δυνατόν πλουσιότερων σε γOR και PγOR ρυζελαίων.

Για την στοχευμένη απομόνωση των δευτερογενών μεταβολιτών, το επιλεγμένο δείγμα υποβλήθηκε αρχικά σε υγρή-υγρή εκχύλιση απ' όπου έγινε η παραλαβή του ολικού κλάσματος γ-ορυζανόλης (**Total γ-Oryzanol Content, TOC**), δηλαδή εμπλουτισμένου κλάσματος PγOR και γOR (TOC). Στη συνέχεια, το TOC κλασματώθηκε με την τεχνική της **Χρωματογραφίας Κατανομής με Φυγοκέντριση (Centrifugal Partition Chromatography, CPC)** και τη μέθοδο βαθμιδωτής έκλουσης ενώ τα κλάσματα επεξεργάστηκαν περαιτέρω με τη χρήση διαφόρων χρωματογραφικών τεχνικών όπως Ημι-Παρασκευαστική Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (**semi prep-HPLC**), Αναλυτική Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (**analytical HPLC**), Παρασκευαστική Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (**prep TLC**), Χρωματογραφία Υπερκρίσιμων Υγρών (**SFC**).



Εικόνα 6-1 Συνοπτικό σχεδιάγραμμα του ειδικού μέρους Β.

6.1 Εκχύλιση πίτουρου σε μεγάλη κλίμακα και παραλαβή RBO

Τα αποτελέσματα του 1^{ου} σκέλους της εργασίας έδειξαν ότι το πίτουρο από τον 1^ο κώνο της μύλευσης της ποικιλίας Gladjo parboiled περιείχε το μεγαλύτερο ποσοστό γOR και PγOR. Έτσι αποφασίστηκε να εκχυλιστεί το σύνολο της ποσότητας του συγκεκριμένου πίτουρου προκειμένου να παραλάβουμε μεγάλη ποσότητα RBO πλούσιο στις ουσίες στόχους.

Για την εκχύλιση του πίτουρου σε μεγαλύτερη κλίμακα χρησιμοποιήθηκε η συσκευή εκχύλισης με υπερήχους R.E.U.S PEX 3N, η οποία φαίνεται στην Εικόνα 6-2.

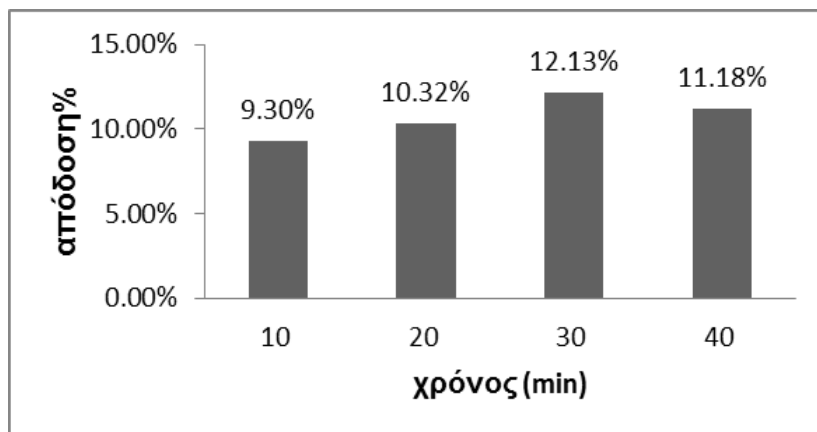
Προκειμένου να βρεθεί ο ελάχιστος χρόνος που απαιτείται για τη μέγιστη απόδοση σε RBO πραγματοποιήθηκε μια δοκιμαστική εκχύλιση, στην οποία η θερμοκρασία διατηρήθηκε σταθερή στους 33 °C καθ' όλη τη διάρκεια της εκχύλισης.



Εικόνα 6-2 Συσκευή εκχύλισης R.E.U.S PEX 3N.

Εύρεση βέλτιστου χρόνου εκχύλισης με υπερήχους

Προστέθηκαν στον κάδο της συσκευής 250 g πίτουρου και 2.5 L EtOAc. Στα 10 min, στα 20 min, στα 30 min και στα 40 min έγινε συλλογή 20 ml εκχυλίσματος, το οποίο ισοδυναμεί με 2 g πίτουρου.



Εικόνα 6-3 Απεικόνισή της απόδοσης (g RBO/100 g πίτουρου) της εκχύλισης με EtOAc με εφαρμογή υπερήχων μετά από 10 min, 20 min, 30 min & 40 min.

Μετά από εξάτμιση μέχρι ξηρού των εκχυλισμάτων, παρατηρήθηκε ότι η βέλτιστη απόδοση μπορούσε να επιτευχθεί μετά από 30 min εφαρμογής υπερήχων. Επομένως το πρωτόκολλο εκχύλισης διαμορφώνεται ως εξής:

Πρωτόκολλο εκχύλισης πίτουρου με οξικό αιθυλεστέρα

- Προσθήκη στο κάδο των υπερήχων 250 g πίτουρου και 2.5 L EtOAc (αναλογία 1/10 w/v)
- Χρήση του υδατόλουτρου για την διατήρηση σταθερής θερμοκρασίας στους 33 °C
- Εφαρμογή υπερήχων για 30 min
- Συλλογή του εκχυλίσματος
- Εξάτμιση υπό κενό και παραλαβή του ελαίου
- Ζύγιση

Από την εκχύλιση συνολικά 1500 g πίτουρου, έγινε παραλαβή 322.5 g RBO (Gpb1) το οποίο αντιστοιχεί σε απόδοση **22% (g RBO/ 100 g πίτουρου)**. Το RBO επεξεργαστηκε περαιτέρω μέσω υγρής-υγρής εκχύλισης με σκοπό την παραλαβή εμπλουτισμένου κλάσματος ΡγOR και γOR (TOC).

6.2 Υγρή-υγρή εκχύλιση του RBO και παραλαβή του TOC

Με την υγρή-υγρή εκχύλιση του RBO επιτυγχάνεται η παραλαβή εμπλουτισμένου εμπλουτισμένου κλάσματος ΡγOR και γOR (TOC) με στόχο την διευκόλυνση των επόμενων βημάτων για την απομόνωση των συστατικών της γOR και ΡγOR. Αρχικά πραγματοποιήθηκαν ορισμένες δοκιμές για την εύρεση κατάλληλου διφασικού συστήματος λαμβάνοντας υπόψη τη λιπαρή φύση του ελαίου, την πιο πολική φύση της ΡγOR και τη βιβλιογραφία [12]. Τα συστήματα παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

ΣΥΣΤΗΜΑ	RBO-ΔΙΑΛΥΤΕΣ	ΑΝΑΛΟΓΙΑ
1	RBO/EtOH	1/1
2	n-Hex/RBO/EtOH	4/1/5
3	n-Hex/RBO/EtOH/H ₂ O	4/1/4/1

Το σύστημα 1 απορρίφθηκε λόγω δημιουργίας σταθερού γαλακτώματος. Με το σύστημα 2 δημιουργήθηκε διφασικό σύστημα αλλά ο μεγάλος χρόνος διαχωρισμού των φάσεων οδήγησε στην απόρριψη του. Στο σύστημα 3, με την προσθήκη H₂O σε μικρή αναλογία παρατηρήθηκε ταχύς διαχωρισμός των 2 φάσεων και παρά την αυξημένη πολικότητά του, επηρέασε σε πολύ μικρό βαθμό την ανάκτηση της γOR από το RBO. Το σύστημα 3, ελέγχθηκε στη συνέχεια και με Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (TLC), με στόχο την επιβεβαίωση της παραλαβής του TOC και της απομάκρυνσης των λιπαρών ουσιών.

Μετά από την επιλογή του συστήματος 3 για την υγρή-υγρή εκχύλιση, προστέθηκαν σε διαχωριστική χοάνη 400ml εξάνιο (**n-Hex**), 100 ml **RBO**, 400 ml αιθανόλη (**EtOH**) και 100 ml νερό (**H₂O**). Μετά από τη δημιουργία διφασικού συστήματος συλλέχτηκε η κάτω φάση και εξατμίστηκε μέχρι ξηρού. Η διαχωριστική χοάνη πληρώθηκε 3 φορές ακόμα με 400 ml EtOH και 100 ml H₂O (κάτω φάση) και επεξεργάστηκε όπως προηγουμένως.

Από τη συνολική επεξεργασία 300 ml RBO (≈ 257 g), έγινε παραλαβή **12.8 g TOC** (4.26% w/v), το οποίο **χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια για το διαχωρισμό των επιμέρους** συστατικών της γOR και ΡγOR **μέσω της τεχνικής CPC.**

6.3 Κλασματοποίηση του εμπλουτισμένου κλάσματος ΤΟC με χρωματογραφία κατ' αντιστροφή (CPC)

Ένας επιτυχημένος διαχωρισμός με την τεχνική CPC προϋποθέτει τη χρήση της κατάλληλης μεθόδου και την εύρεση κατάλληλου διφασικού συστήματος. Στο παρελθόν έχουν γίνει προσπάθειες απομόνωσης της γΟR [12] αλλά και μεμονωμένων ενώσεων αυτής της ομάδας [164] με τη τεχνική CPC. Δεν έχει πραγματοποιηθεί όμως άμεση απομόνωση των ενώσεων της ΡγΟR. Στη παρούσα εργασία το εμπλουτισμένο κλάσμα ΤΟC επεξεργάστηκε με τη βοήθεια της CPC, στοχεύοντας κυρίως στην καλή κλασμάτωση των ενώσεων της ΡγΟR ώστε να διευκολυνθεί στη συνέχεια η απομόνωση τους με τη χρήση άλλων χρωματογραφικών τεχνικών.

6.3.1 Επιλογή της κατάλληλης σειράς διφασικών συστημάτων:

Η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου και εν συνεχεία των κατάλληλων διφασικών συστημάτων αποτελεί κρίσιμο στάδιο στην διαδικασία της ανάλυσης του εκχυλίσματος. Λόγω της πολυπλοκότητας του υπό ανάλυση μείγματος επιλέχθηκε η μέθοδος της βαθμιδωτής έκλουσης ως η καταλληλότερη για την επίτευξη του βέλτιστου διαχωρισμού και κυρίως των ενώσεων της ΡγΟR που παρουσιάζουν μεγάλη δομική ομοιότητα τόσο μεταξύ τους όσο και με αυτές των γΟR. Με την μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται σταδιακή μεταβολή της πολικότητας της κινητής φάσης με αποτέλεσμα την καλύτερη κλασμάτωση του μείγματος και την διευκόλυνση των επόμενων σταδίων για την παραλαβή καθαρών μεταβολιτών.

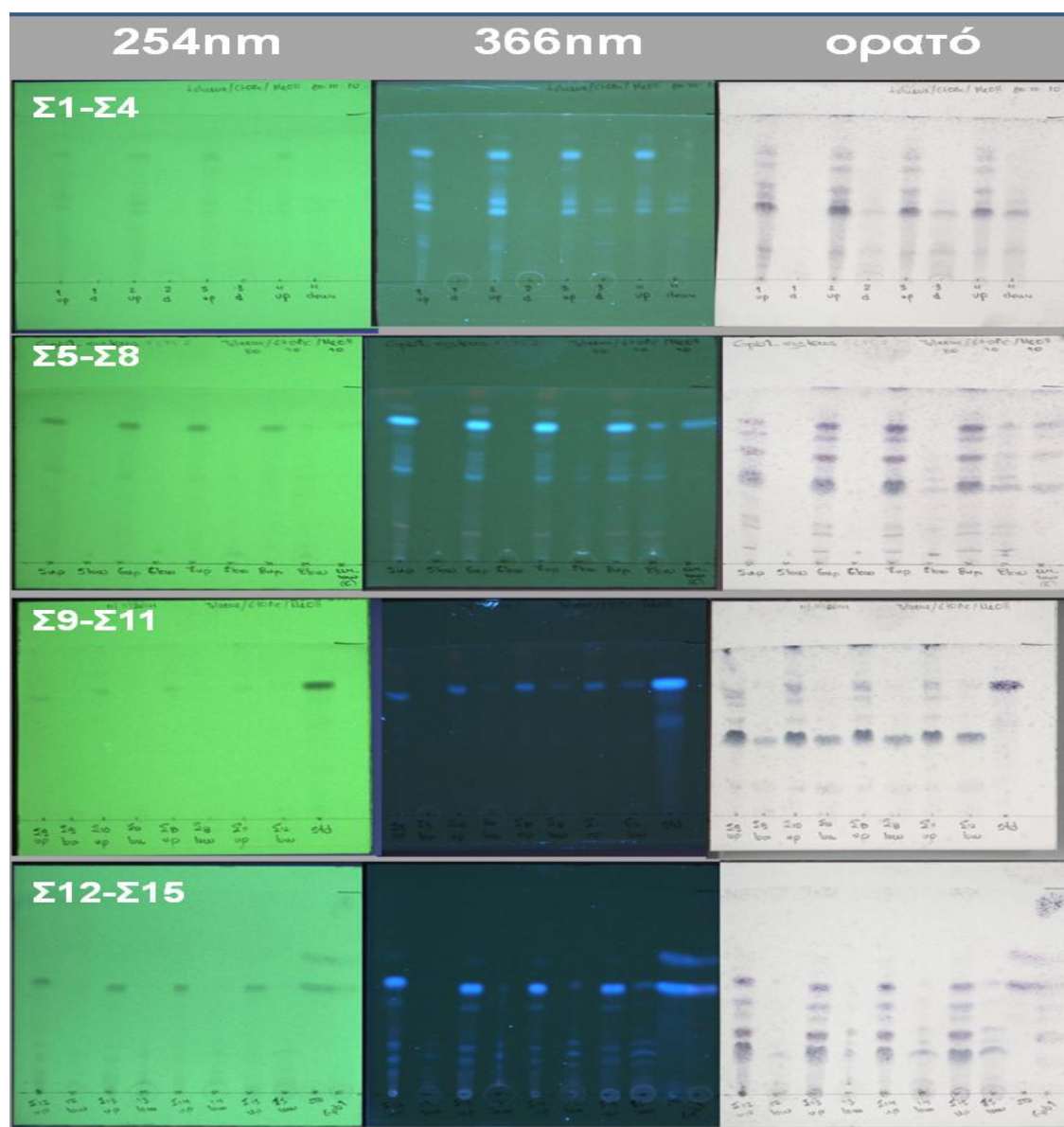
Βασιζόμενοι σε βιβλιογραφικά δεδομένα [165], [164], [12] και λαμβάνοντας υπόψη τη λιπαρή φύση του ελαίου, δημιουργήθηκαν προς έλεγχο τέσσερις σειρές διφασικών συστημάτων οι οποίες απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 6-1). Η άπολη φύση του εκχυλίσματος οδήγησε στο να επιλεγεί ως στατική φάση η άπολη φάση του πρώτου συστήματος διαλυτών ενώ ως κινητή οι πολικές φάσεις των διφασικών συστημάτων ξεκινώντας από την πιο πολική και μειώνοντας σταδιακά την πολικότητα της κινητής φάσης (Reversed Phase CPC). Έτσι, στις προς έλεγχο σειρές διφασικών συστημάτων, διατηρήθηκε σταθερή η αναλογία των διαλυτών της πάνω φάσης και μεταβλήθηκε η αναλογία των διαλυτών της κάτω φάσης (κινητής φάσης) ώστε να καλυφθεί μια μεγάλη γκάμα πολικοτήτων.

Πίνακας 6-1 Προς έλεγχο σειρές διφασικών συστημάτων

	n-Hex	EtOAc	EtOH	H ₂ O
Σ1	10	5	5	10
Σ2	10	5	7.5	7.5
Σ3	10	5	10	5
Σ4	10	5	12	3
Σ5	12	3	5	10
Σ6	12	3	7.5	7.5
Σ7	12	3	10	5
Σ8	12	3	12	3
Σ9	12	3	11	4
Σ8	12	3	12	3
Σ10	12	3	13	2
Σ11	12	3	14	1
Σ12	14	1	5	10
Σ13	14	1	7.5	7.5
Σ14	14	1	10	10
Σ15	14	1	13	2

Τα παραπάνω συστήματα ελέγχθησαν τόσο ως προς την διαλυτότητα του δείγματος και την ικανότητα διαχωρισμού των φάσεων (1ος έλεγχος), όσο και ως προς την κατανομή των ουσιών στις δύο φάσεις (2ος έλεγχος). Για τον **1ο έλεγχο**, ποσότητα 10 mg εκχυλίσματος τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες και προστέθηκαν οι διαλύτες του εκάστοτε συστήματος στις προκαθορισμένες αναλογίες μέχρι τελικού όγκου 6 ml. Το κάθε μίγμα ανακινήθηκε έντονα και στη συνέχεια αφέθηκε σε ηρεμία, ενώ τελικά ελέγχθηκε τόσο η ικανότητα διάλυσης του μίγματος όσο και ο χρόνος διαχωρισμού των δύο φάσεων. Ο έλεγχος αυτός έδειξε ότι όλα τα συστήματα είναι ικανά να διαλύσουν γρήγορα το μίγμα των ουσιών ενώ ο διαχωρισμός των φάσεων πραγματοποιήθηκε εντός του καθορισμένου χρονικού διαστήματος (< 30 sec). Στη συνέχεια η κάθε φάση διαχωρίστηκε και ελέγχθηκε με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (**2ος έλεγχος**). Τα χρωματογραφήματα αναπτύχθηκαν με μίγμα των

διαλυτών Toluene/ EtOAc/ MeOH 80/10/10 (v/v/v) και μελετήθηκαν τόσο στο υπεριώδες- ορατό (254 και 366 nm) όσο και μετά την εμφάνιση με διάλυμα θειικής βανιλίνης και θέρμανση.



Εικόνα 6-4 Εύρεση κατάλληλης σειράς διφασικού συστήματος για τη διενέργεια κλασματοποίησης μέσω CPC. Σύστημα διαλυτών ανάπτυξης: Toluene/ EtOAc/ MeOH, 80/10/10 (v/v/v).

Η μελέτη των παραπάνω χρωματογραφημάτων έδειξε ότι η σειρά **Σ12-Σ15** διφασικών συστημάτων (Hept/EtOAc/EtOH/H₂O σε αναλογίες 14/1/x/y) παρουσίασε την καλύτερη κατανομή των ουσιών στις δύο φάσεις κατά την μετάβαση από την πιο πολική στην πιο άπολη κάτω (κινητή) φάση του συστήματος.

Αυτή η ομάδα συστημάτων μελετήθηκε περαιτέρω (3^{ος} έλεγχος) προκειμένου να υπολογιστούν οι συντελεστές κατανομής (**Kvalues** ή partition coefficients) των ουσιών και να επιβεβαιωθεί η ορθή επιλογή της.

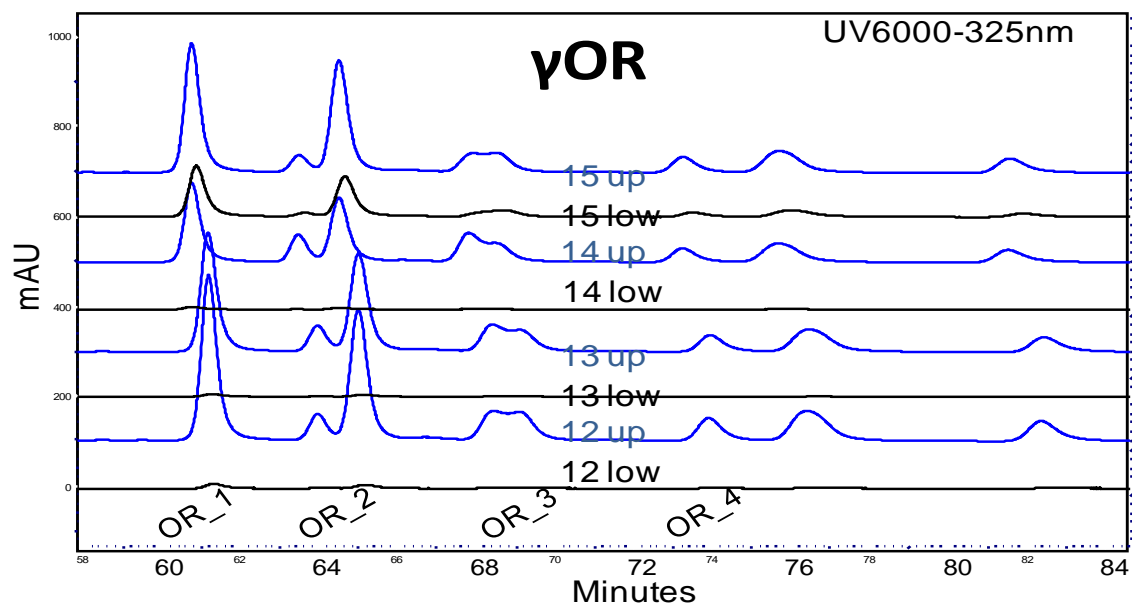
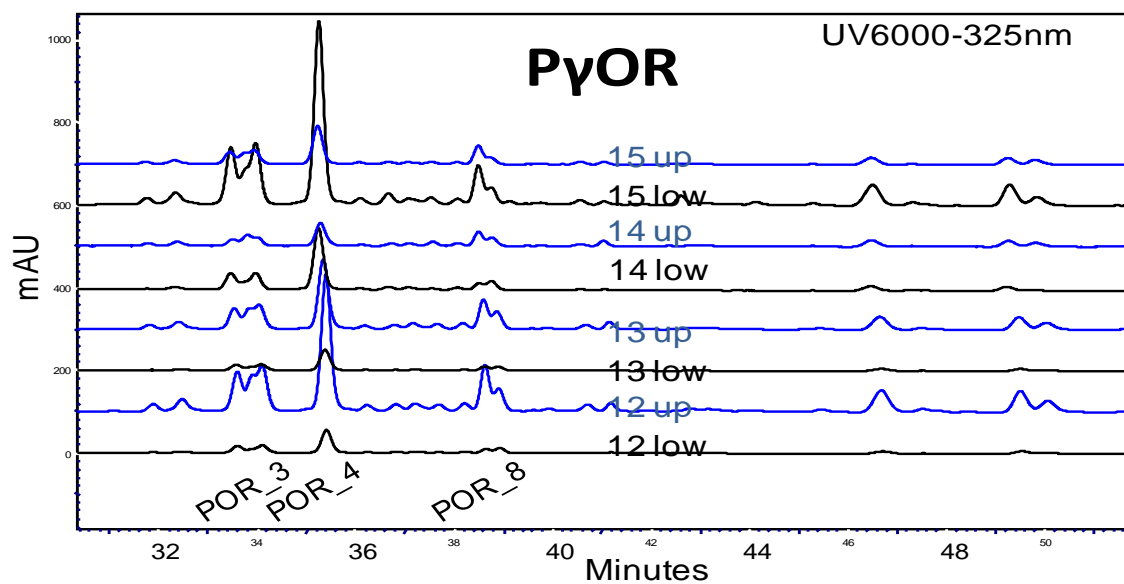
Ο συντελεστής κατανομής υπολογίζεται ως εξής:

$$Kvalue(x) = (CxU) / (CxL) = \frac{(ExU)}{(ExL)}$$

Όπου,

- *Kvalue(x)*: Συντελεστής κατανομής ουσίας x
- *Cx(U)*, *Cx(L)*: Συγκέντρωση της ουσίας x στην στατική (Upper phase) και την κινητή φάση (Lower phase) αντίστοιχα
- *Ex(U)*, *Ex(L)*: Εμβαδόν επιφάνειας κορυφής της ουσίας x στις αντίστοιχες φάσεις

Για το σκοπό αυτό, μεταφέρονται με ακρίβεια 1000 μL από την κάθε φάση σε HPLC φιαλίδιο και κάθε ένα από τα οχτώ δείγματα που προκύπτουν, αναλύεται σε HPLC-DAD. Ο συντελεστής κατανομής υπολογίζεται από το λόγο του εμβαδού της εκάστοτε κορυφής στην επάνω φάση (up, μπλε χρωματογράφηματα) προς το εμβαδό της ίδιας κορυφής στην κάτω φάση (low, μαύρα χρωματογράφηματα) του κάθε διφασικού συστήματος [165].



Εικόνα 6-5 Απεικόνιση των χρωματογραφήματων στα 325 nm των 2 φάσεων των συστημάτων Σ12 έως Σ15 και σημείωση των κύριων κορυφών της PγOR (POR_3,4,8) των οποίων ο συντελεστής κατανομής πλησιάζει τις ιδανικές τιμές ($0.5 \leq K \leq 1.0$) και τις κύριες κορυφές της γOR (OR_1-4).

Πίνακας 6-2 Υπολογισμός των συντελεστών κατανομής *Kvalue* για 18 επιλεγμένες κορυφές στην ομάδα διφασικών συστημάτων Σ12-Σ15 σε βαθμιδωτές αναλογίες διαλυτών

		<i>Kvalue=ExU/ ExL</i>			
Κορυφή_(x)	Rt (min)	<i>Kvalue12</i>	<i>Kvalue13</i>	<i>Kvalue14</i>	<i>Kvalue15</i>
POR_1	32.495	3.638614	8.81667	4.213251	0.397147
POR_2	33.167	1174.966	4.79776	1.85017	0.329385
POR_3	33.62	6.372861	3.82486	0.630695	0.271509
POR_4	35.44	5.715054	3.08029	0.396706	0.231651
POR_5	36.273	7.627606	3.71722	0.773761	0.387467
POR_6	37.243	5.054607	4.33698	1.90113	0.400541
POR_7	38.257	4.854849	4.88761	1.18876	
POR_8	38.948	7.311133	5.20705	1.429756	0.482513
POR_9	39.63	6.584016	3.24887	0.991928	
POR_10	41.21	8.429716	8.22616	4.461817	
POR_11	46.733	8.55875	4.94645	1.396759	0.243213
POR_12	49.54	7.647631	4.85735	1.050114	0.578048
OR_1	61.358	29.89147	21.1932	18.39636	2.340569
OR_2	65.212	29.67325	20.7647	19.73752	2.541828
OR_3	68.565	26.48217	10.4894	34.89923	3.370087
OR_4	74.055	71.59466	52.0743	26.03505	3.294361
OR_5	75.558	10492.6	1200.03	24.82981	2.930863
OR_6	81.647	6843.948	2558.91	235.9741	3.668414

Ο κατάλληλος συντελεστής κατανομής σε θεωρητικό επίπεδο θα πρέπει να έχει τις εξής τιμές $0.5 \leq K \leq 1.0$ [165] (για HSCCC). Στο Σ14, Σ15 οι τιμές των συντελεστών κατανομής πλησιάζουν ιδανικές τιμές για τις κύριες ουσίες της ΡγOR (POR_3, POR_4, POR_8). Πρόκειται για πολύπλοκα μίγματα που απαρτίζονται από τουλάχιστον 18 ουσίες που ανήκουν στην ευρύτερη ομάδα της ΡγOR & γOR, γεγονός που πρακτικά δεν επιτρέπει την επίτευξη ιδανικής τιμής του συντελεστή κατανομής για την κάθε μία ουσία. Παρόλα αυτά, από τον έλεγχο TLC (Εικόνα 6-4) των διφασικών συστημάτων, τα χρωματογραφήματα της Εικόνα 6-5 και τους συντελεστές κατανομής των κύριων ουσιών της ΡγOR (Εικόνα 6-6), συμπεράναμε ότι η ανάλυση με την μέθοδο της βαθμιδωτής έκλουσης με τη σειρά διφασικών συστημάτων Σ12-Σ15 είναι ικανή να κλασματώσει ικανοποιητικά το προς ανάλυση πολύπλοκο μείγμα TOC.

6.3.2 Εφαρμογή της μεθόδου CPC

Για την CPC κλασμάτωση του εμπλουτισμένου κλάσματος ΡγOR και γOR (TOC) εφαρμόστηκε η μέθοδος της βαθμιδωτής έκλουσης με τη χρήση σειράς 4 διφασικών συστημάτων (Σ12 έως Σ15) αποτελούμενα από τους διαλύτες n-Hex-EtOAc-EtOH-H₂O σε αναλογίες:

- A. 14/1/5/10 (Σ12)
- B. 14/1/7.5/7.5 (Σ13)
- C. 14/1/10/5 (Σ14)
- D. 14/1/13/2 (Σ15)

Κάθε σύστημα προετοιμάστηκε ξεχωριστά σε διαχωριστική χοάνη, ανακινήθηκε και αφέθηκε σε ηρεμία έως ότου διαχωριστούν οι δύο φάσεις οι οποίες τοποθετήθηκαν σε ξεχωριστές κωνικές φιάλες.

Για την ανάλυση δείγματος TOC, βάρους 501.8 mg χρησιμοποιήθηκε η στήλη των 200 ml. Αρχικά, η στήλη πληρώθηκε με την πάνω φάση του πρώτου συστήματος (στατική φάση) με ροή 8 ml/min και την περιστροφή της στήλης να έχει ρυθμιστεί στα 200 rpm. Στη συνέχεια το όργανο ρυθμίστηκε σε descending mode και διοχετεύτηκε η κάτω φάση του πρώτου συστήματος με ροή 8 ml/min και περιστροφή της στήλης στα 750 rpm. Αφού ισορρόπησαν οι φάσεις μέσα στη στήλη ($S_F=0.7$) έγινε εισαγωγή του δείγματος, (βάρους 501.8 mg) διαλυμένου σε 30 ml συστήματος διαλυτών με αναλογία κινητής προς στατική φάση ίση με 1. Με κινητή την κάτω φάση του πρώτου συστήματος συλλέχθηκαν συνολικά 12 κλάσματα των 10 ml και στη συνέχεια διοχετεύτηκε η κάτω φάση του δεύτερου συστήματος. Μετά την συλλογή του 24^{ου} κλάσματος, η κινητή φάση άλλαξε εκ νέου και διοχετεύτηκε η κάτω φάση του τρίτου συστήματος για να συλλεχθούν 12 επιπλέον κλάσματα. Το στάδιο της έκλουσης ολοκληρώθηκε με την διοχέτευση της κάτω φάσης του τέταρτου συστήματος και τη συλλογή 12 επιπλέον κλασμάτων. Ακολουθεί το τελευταίο στάδιο της διαδικασίας, το στάδιο της εξώθησης, στο οποίο χρησιμοποιήθηκε ως κινητή φάση η άνω φάση του πρώτου συστήματος με αποτέλεσμα τη συλλογή 20 κλασμάτων των 10 ml. Τόσο η ροή των διαλυτών όσο και η περιστροφή της στήλης παρέμειναν σταθερά καθ' όλη τη διάρκεια της ανάλυσης στα 8 ml/min και 750 rpm, αντίστοιχα. Ακόμα, όλη η ανάλυση έγινε σε descending mode και παρουσιάζεται συνοπτικά στον Πίνακα 6-3.

Πίνακας 6-3 Διαδικασία κλασμάτωσης του εμπλουτισμένου κλάσματος ΡγOR και γOR (TOC) του ρυζελαίου από το πίτουρο *Gladia parboiled* 1ος κώνος με χρήση της τεχνικής CPC (στήλη 200ml) και τη μέθοδο της βαθμιδωτής έκλουσης.

Στατική φάση	Κινητή φάση	Κλάσματα (10 ml)
Στάδιο έκλουσης		
Σ12up	Σ12down	12
Σ12up	Σ13down	12
Σ12up	Σ14down	12
Σ12up	Σ15down	12
Στάδιο εξώθησης		
Σ12up	Σ12up	20

Ροή: 8ml/min

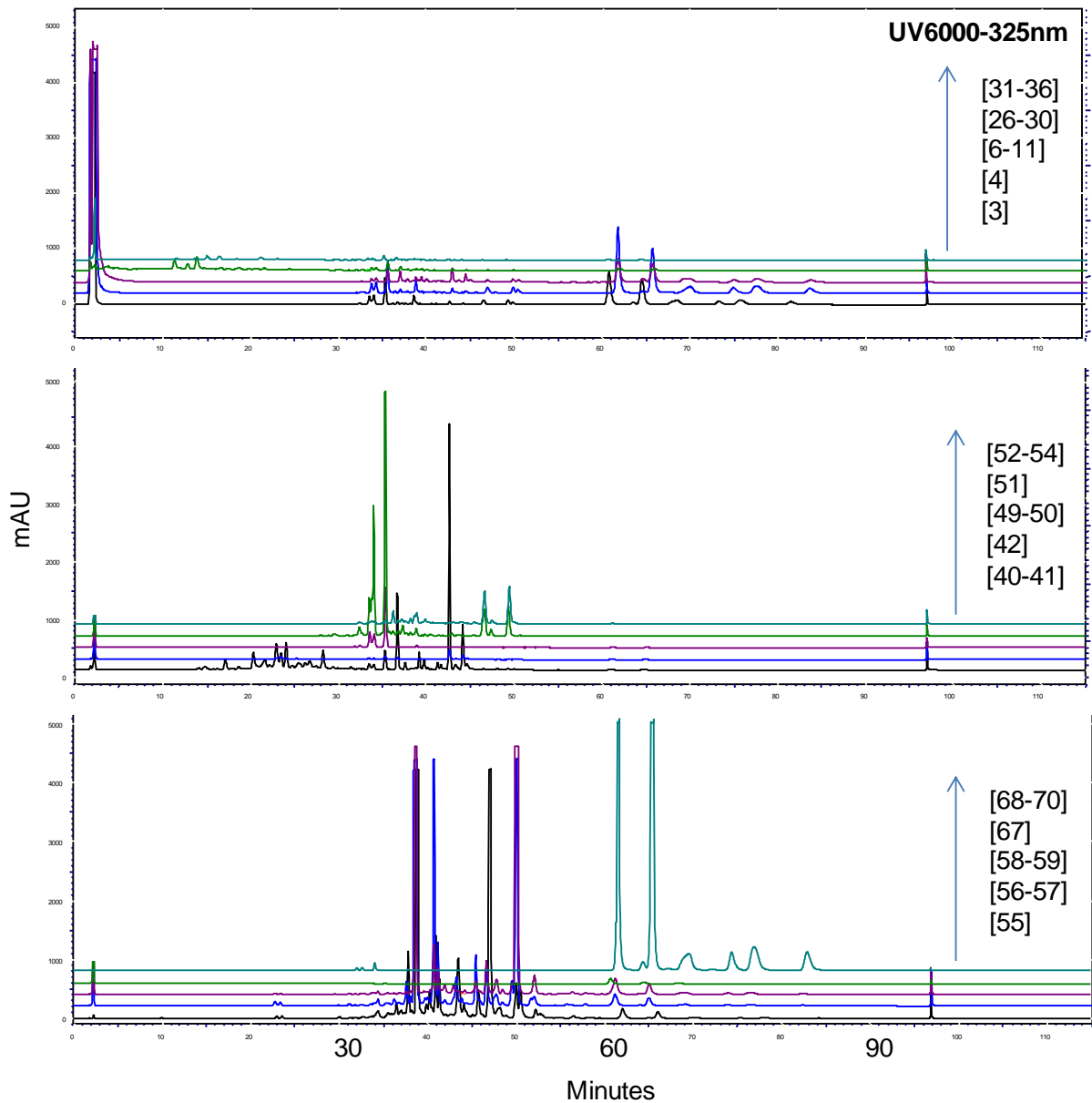
Περιστροφή: 750rpm

Τα κλάσματα που προέκυψαν (68 κλ. των 10 mL) ελέχθησαν αρχικά με TLC προκειμένου να γίνουν οι απαραίτητες συνενώσεις. Προέκυψαν έτσι 27 συνενωμένα κλάσματα τα βάρη των οποίων παρουσιάζονται στον παρακάτω Πίνακας 6-4.

Πίνακας 6-4 Συνενωμένα κλάσματα που προέκυψαν από την κλασμάτωση του TOC με CPC και τη χρήση ημι-παρασκευαστικής στήλης (200 ml).

CPC (στήλη 200 ml)						
Κλάσματα	Συνενώσεις	Βάρος (mg)		Κλάσματα	Συνενώσεις	Βάρος (mg)
1	[1,2]			15	[49,50]	10.7
2	[3]	16.1		16	[51]	8.7
3	[4]	7.5		17	[52,54]	13.1
4	[5]	2.2		18	[55]	2.8
5	[6,11]	4.6		19	[56,57]	5.5
6	[12-15]	4.2		20	[58,59]	4.5
7	[16,19]	3.7		21	[60,62]	17.0
8	[20,25]	8.0		22	[63]	17.5
9	[26,30]	7.2		23	[64,66]	106.6
10	[31,36]	7.5		24	[67]	33.6
11	[37,39]	15.0		25	[68,70]	84.3
12	[40,41]	14.3		26	[71,75]	3.5
13	[42]	9.9		27	[29]	4.4
14	[43,48]	24.2		sum	[1,75]	436.6

Τα συνενωμένα κλάσματα επεξεργάστηκαν εκ νέου με χρωματογραφία λεπτής σιβάδας ενώ 15 από αυτά ελέγχθηκαν και με την τεχνική HPLC-DAD (κελιά επισημασμένα με μωβ χρώμα) χρησιμοποιώντας για την ανάλυση την μέθοδο που εμφανίζεται στον Πίνακα 5-1. Επίσης σε 7 συνενωμένα κλάσματα (**BOLD**) έγινε και λήψη φασμάτων ^1H NMR με σκοπό την επιβεβαίωση της ύπαρξης ΡγOR και γOR. Τα χρωματογραφήματα HPLC-DAD (325 nm) των 15 επιλεγμένων κλασμάτων παρουσιάζονται στην Εικόνα 6-6.



Εικόνα 6-6 Χρωματογραφήματα HPLC-DAD (325 nm) 15 επιλεγμένων κλασμάτων την επεξεργασία του TOC με ημι-παρασκευαστικό CPC.

Από την παραπάνω μελέτη των συνενωμένων κλασμάτων (TLC, HPLC-DAD και ^1H NMR) έγινε εμφανές ότι έχει επιτευχθεί μια καλή κλασματοποίηση των ενώσεων της ΡγOR και ότι το σύνολο της γOR είναι συγκεντρωμένο στα κλάσματα [67], [68-70].

6.3.3 CPC ανάλυση του εμπλουτισμένου κλάσματος ΡγOR και γOR (TOC) σε παρασκευαστική κλίμακα (prep CPC)

Η παραπάνω μέθοδος, μεταφέρθηκε σε παρασκευαστική στήλη CPC (1000ml) προκειμένου να παραληφτούν εμπλουτισμένα κλάσματα ΡγOR σε μεγάλη ποσότητα με στόχο τη διευκόλυνση των περαιτέρω σταδίων καθαρισμού και απομόνωσης των επιμέρους συστατικών.

Αρχικά, η στήλη πληρώθηκε με την πάνω φάση του πρώτου συστήματος (στατική φάση) με ροή 20ml/min και περιστροφή της στήλης στα 200 rpm. Στη συνέχεια, το όργανο ρυθμίστηκε σε descending mode και διοχετεύτηκε η κάτω φάση του πρώτου συστήματος με ροή 10 ml/min ενώ η περιστροφή της στήλης είχε ρυθμιστεί στα 650 rpm.

Αφού ισορρόπησαν οι δύο φάσεις μέσα στη στήλη ($S_F=0.84$) έγινε εισαγωγή 4.66 g δείγματος, διαλυμένου σε 15 ml κινητής και 15 ml στατικής φάσης του πρώτου συστήματος. Με κινητή την κάτω φάση του πρώτου συστήματος συλλέχθηκαν συνολικά 30 κλάσματα των 20 ml και στη συνέχεια διοχετεύτηκε η κάτω φάση του δεύτερου συστήματος.

Μετά τη συλλογή του 60^{ου} κλάσματος, η κινητή φάση άλλαξε εκ νέου και διοχετεύτηκε η κινητή φάση του τρίτου συστήματος για να συλλεχθούν 30 ακόμη κλάσματα. Ομοίως διοχετεύεται η κινητή φάση του τέταρτου συστήματος και μετά τη συλλογή του 120^{ου} κλάσματος ακολουθεί το στάδιο της εξώθησης στο οποίο χρησιμοποιήθηκε ως κινητή φάση η άνω φάση του πρώτου συστήματος, με αποτέλεσμα τη συλλογή 50 κλασμάτων των 20 ml.

Τόσο η ροή των διαλυτών όσο και η περιστροφή της στήλης παρέμειναν σταθερές καθ' όλη τη διάρκεια της ανάλυσης στα 10 ml/min και 650 rpm, αντίστοιχα. Όπως και προηγουμένως, όλη η ανάλυση έγινε σε descending mode. Συνοπτικά τα στάδια της ανάλυσης παρουσιάζονται στον Πίνακα 6-5.

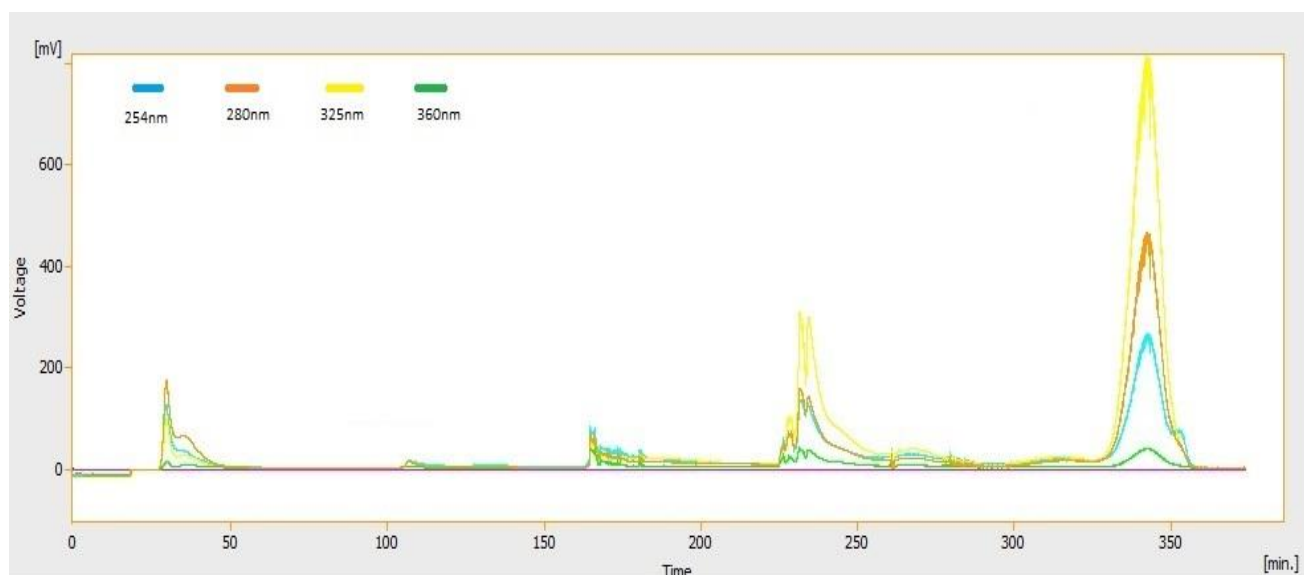
*Πίνακας 6-5 Διαδικασία κλασμάτωσης του εμπλουτισμένου κλάσματος ΡγOR και γOR (TOC) του ρυζελαίου από το πίτουρο *Gladio parboiled* 1ος κώνος με χρήση της τεχνικής CPC (στήλη 1000ml) και τη μέθοδο της βαθμιδωτής έκλουσης.*

Στατική φάση	Κινητή φάση	Κλάσματα (20 ml)
Στάδιο έκλουσης		
Σ12up	Σ12down	30
Σ12up	Σ13down	30
Σ12up	Σ14down	30
Σ12up	Σ15down	30
Στάδιο εξώθησης		
Σ12up	Σ12up	50

Ροή: 10ml/min

Περιστροφή: 650rpm

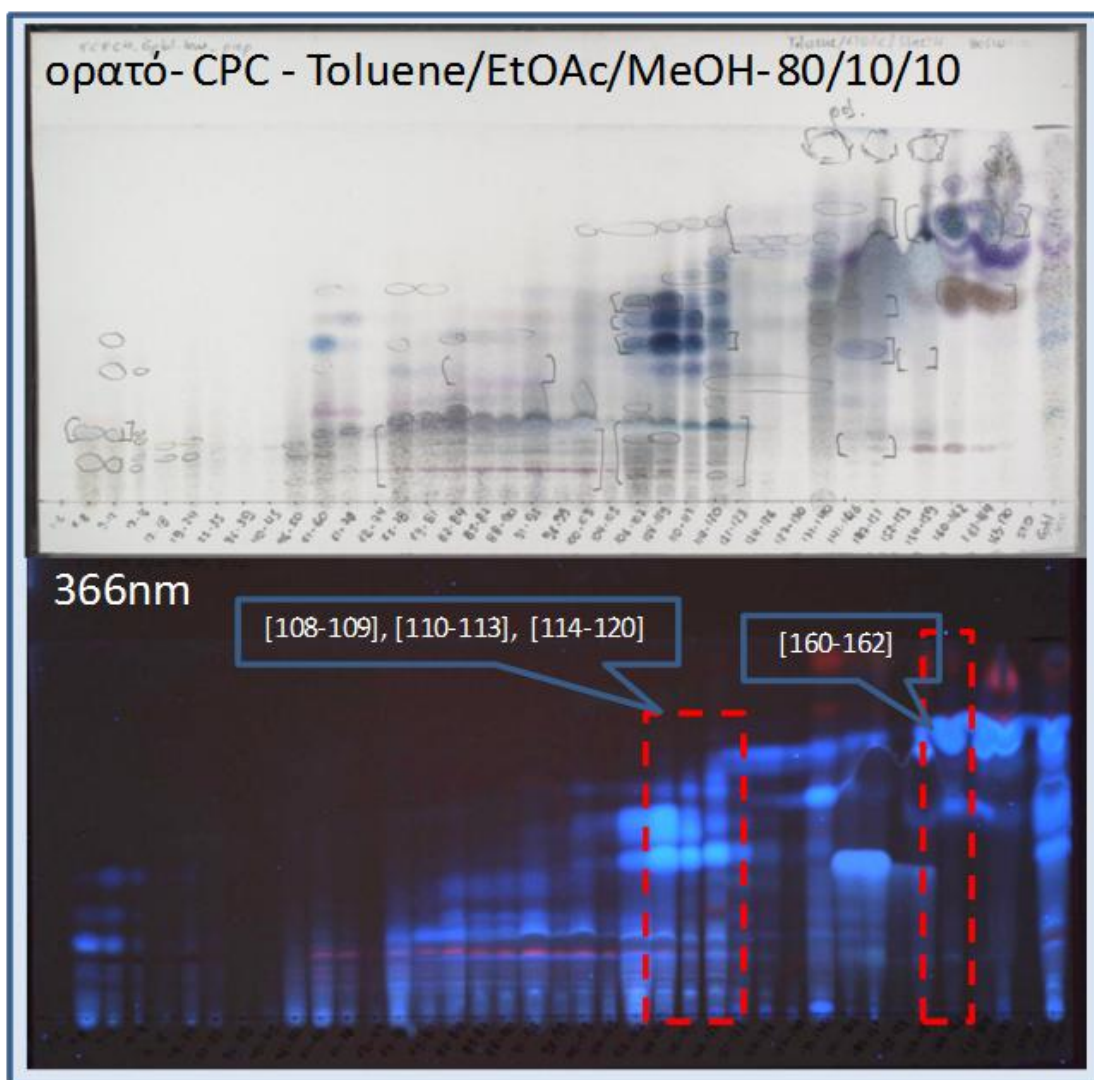
Τα κλάσματα που προέκυψαν (170 κλ. των 20 ml) ελέχθησαν αρχικά με με TLC. Με τη βοήθεια του χρωματογραφήματος UV (Εικόνα 6-7) του CPC και της TLC έγιναν οι απαραίτητες συνενώσεις. Προέκυψαν έτσι 38 συνενωμένα κλάσματα, τα βάρη των οποίων παρουσιάζονται στον παρακάτω Πίνακας 6-6.



Εικόνα 6-7 Χρωματογράφημα UV του CPC σε 4 μήκη κύματος (254nm (μπλε) 280nm (πορτοκαλι), 325nm (κίτρινο), 366nm (πρασινό)).

Πίνακας 6-6 Συνενωμένα κλάσματα που προέκυψαν από την κλασμάτωση του TOC με CPC και τη χρήση παρασκευαστικής στήλης (1000 ml).

CPC					
(στήλη 1000 ml)					
Κλάσματα	Συνενώσεις	Βάρος (mg)	Κλάσματα	Συνενώσεις	Βάρος (mg)
1	[1,6]	0.0009	20	[96,99]	0.0408
2	[7,8]	0.0287	21	[100,103]	0.037
3	[9,12]	0.0194	22	[104,105]	0.018
4	[13,16]	0.0071	23	[106,107]	0.069
5	[17,18]	0.0019	24	[108,109]	0.1228
6	[19,24]	0.0046	25	[110,113]	0.1433
7	[25,35]	0.0052	26	[114,120]	0.1088
8	[36,39]	0.0017	27	[121,123]	0.0272
9	[40,45]	0.0035	28	[124,126]	0.0299
10	[46,50]	0.0167	29	[127,130]	0.0335
11	[51,60]	0.0202	30	[131,140]	0.059
12	[61,71]	0.0173	31	[141,146]	0.0659
13	[72,74]	0.0045	32	[147,151]	0.2003
14	[75,78]	0.0381	33	[152,153]	0.1497
15	[79,81]	0.0003	34	[154,159]	0.5006
16	[82,84]	0.0411	35	[160,162]	0.2777
17	[85,87]	0.0394	36	[163,164]	0.3101
18	[88,90]	0.0365	37	[165,170]	1.0407
19	[91,95]	0.0579	38	[171,178]	0.0268



Εικόνα 6-8 Συγκεντρωτική TLC του CPC στο ορατό και στα 360 nm

Τα συνενωμένα κλάσματα επεξεργάστηκαν εκ νέου με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Εικόνα 6-8). Οι όμοια χρωματισμένες ομάδες στον Πίνακα 6-5 αφορούν κλάσματα πλούσια σε ΡγOR με παρόμοιο προφίλ στην TLC και η έντονη γραφή (**bold**) υποδηλώνει τα κλάσματα πλούσια γOR. Η επιλογή των κλασμάτων για την περαιτέρω ανάλυση έγινε βάσει δεδομένων HPLC-DAD, HRMS, και πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).

Έτσι, για την απομόνωση των ενώσεων της γOR χρησιμοποιήθηκε το συνενωμένο κλάσμα **[160-162]** ενώ για την απομόνωση των ενώσεων της ΡγOR χρησιμοποιήθηκαν τα συνενωμένα κλάσματα **[108-109], [110-113], [114-120]**.

6.4 Απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών από τα κλάσματα του CPC.

Κατά τον έλεγχο με TLC διαπιστώθηκε ότι από την αρχική κλασμάτωση προέκυψαν αρκετά κλάσματα τα οποία αποτελούσαν μίγματα 2 έως 3 κύριων ουσιών με 4 έως 5 ακόμα δευτερεύουσες ουσίες. Στην παραπάνω εικόνα (Εικόνα 6-8) επισημαίνονται τα κλάσματα που μελετήθηκαν.

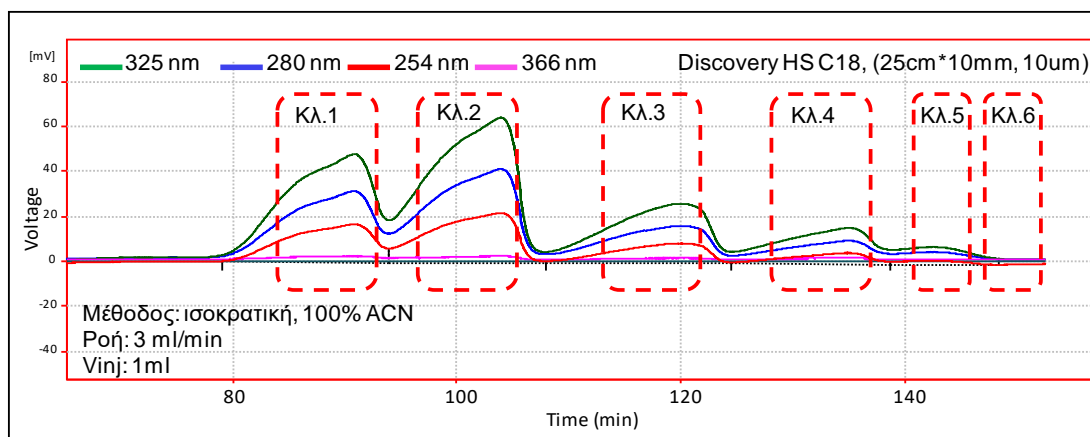
Για την περαιτέρω επεξεργασία των επιλεγμένων κλασμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι εξής τεχνικές:

- a) Ημιπαρασκευαστική Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (semi prep-HPLC)
- b) Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)
- c) Παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (prep TLC)
- d) Χρωματογραφία Υπερκρίσιμων Υγρών (SFC)

6.4.1 Απομόνωση ενώσεων της γ-ορυζανόλης (γOR) με τη χρήση semi prep-HPLC

Για την απομόνωση των ενώσεων της γOR επιλέχθηκε το κλάσμα του **CPC**, [160-162] το οποίο σύμφωνα με την συγκεντρωτική TLC της Εικόνα 6-8 είχε μία βασική κηλίδα στα 325 nm με Rf ίδιο με το πρότυπο της γOR που αναπτύχθηκε στην ίδια TLC. Η επεξεργασία του κλάσματος έγινε σε στήλη DISCOVERY HS C18 (25 cm x 10 mm, 10 μm) και με loop 1500 μl. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε τελικά, ελέγχθηκε πρώτα με το πρότυπο της γOR (≈ 30 mg/ml iPrOH).

Αρχικά, 29 mg του κλάσματος διαλύθηκαν σε 1ml ισοπροπανόλη (iPrOH), διηθήθηκαν με φίλτρο (0.45 μm NYL) και ενιέθηκαν (V_{inj}= 1 ml) σε loop 1500 μl. Η μέθοδος που αναπτύχθηκε για τον διαχωρισμό της γOR στις ενώσεις της μία προς μία είναι μία ισοκρατική μέθοδος με ροή 3 ml/min και κινητή φάση 100% ACN για 180 min. Στη μέθοδο αυτή, οι 6 κύριες ενώσεις της γOR εκκλούνται μία προς μία από το 90° λεπτό μέχρι το 160° λεπτό. Τελικά, προέκυψαν 6 κλάσματα με τα αντίστοιχα βάρη να φαίνονται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 6-7).

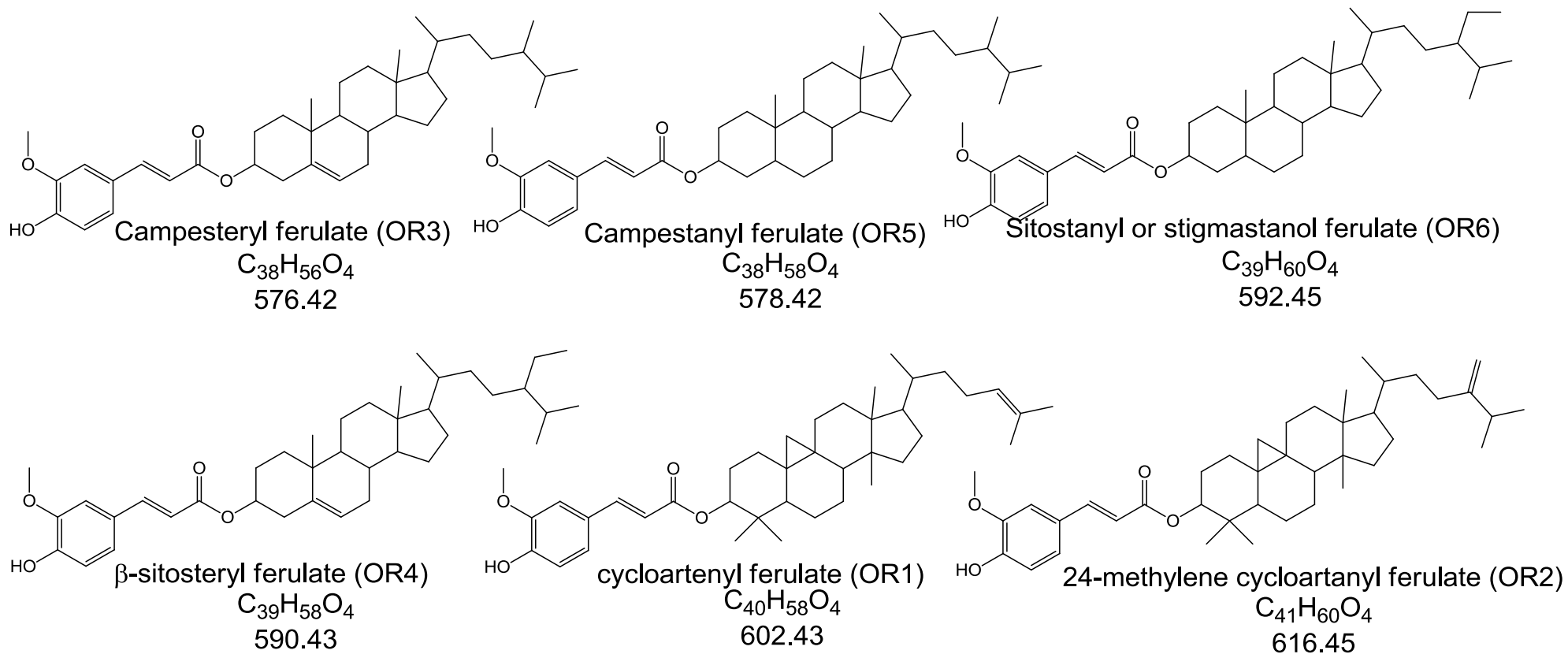


Εικόνα 6-9 Χρωματογράφημα semi prep-HPLC του κλάσματος [160-162] από το CPC.

Τα κλάσματα της semi prep-HPLC, ελέχθησαν χρωματογραφικά με TLC κανονικής φάσης, με σύστημα ανάπτυξης της TLC, toluene/EtOAc/MeOH, 96/6/4, v/v/v, όπου παρατηρήθηκε διαχωρισμός των ενώσεων που απορροφούν στα 325 nm και 254 nm και έχουν ίδιο R_f με την πρότυπη γΟΡ. Στη συνέχεια ακολούθησε φασματοσκοπική μελέτη πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού 1D & 2D αλλά και φασματομετρία μάζας (HRMS) για τα παραπάνω κλάσματα με τη βοήθεια των οποίων ταυτοποιήθηκαν τα παρακάτω φυσικά προϊόντα που ανήκουν στην ομάδα της γΟΡ.

Πίνακας 6-7 Τα βάρη των κλασμάτων της semi prep-HPLC και τα ονόματα των απομονωμένων ενώσεων της γ-ορυζανόλης (γΟΡ).

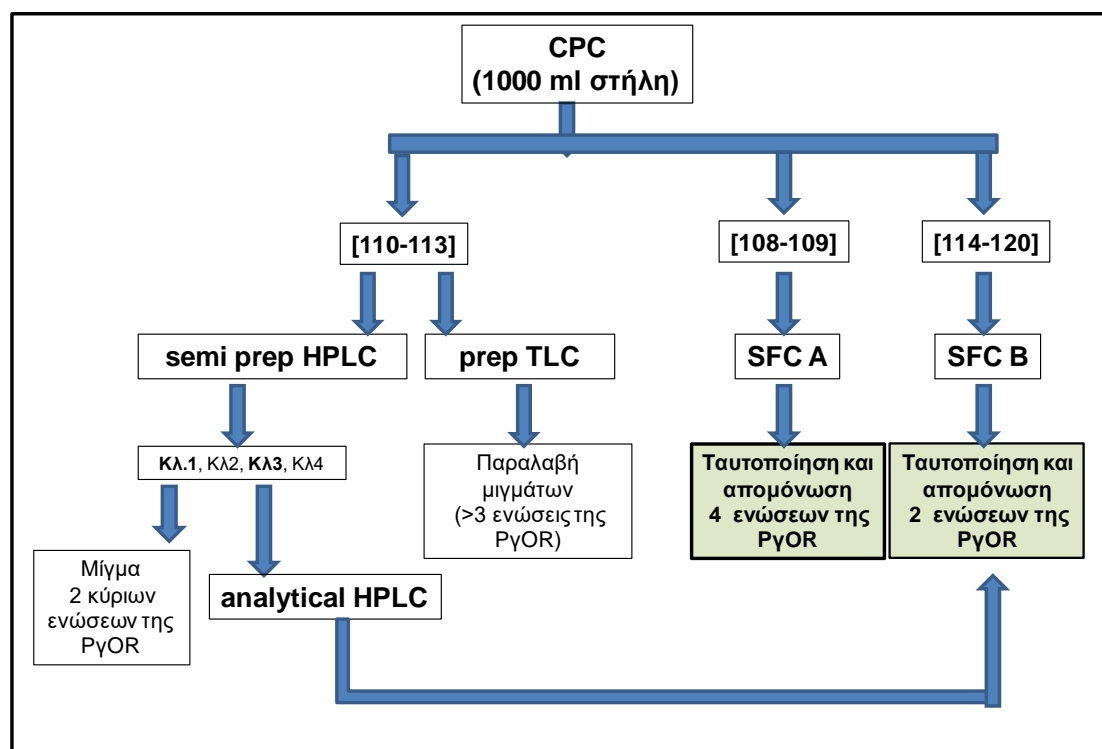
semi prep-HPLC		
κλάσματα	βάρος (g)	
1	0.0048	cycloartenyl ferulate (OR1)
2	0.0026	24-methylene cycloartanyl ferulate (OR2)
3	0.0011	campesteryl ferulate (OR3)
4	0.0011	β-sitosteryl ferulate (OR4)
5	0.0005	campestanol ferulate (OR5)
6	0.0008	sitostanyl ferulate (OR6)



Εικόνα 6-10 Απεικόνιση των απομονωμένων ενώσεων που συγκροτούν την γ -ορυζανόλη (γ OR) σύμφωνα με HR-MS και NMR δεδομένα.

6.4.2 Απομόνωση ενώσεων της πολικής γ-ορυζανόλης (PγOR)

Έγινε μια σειρά από δοκιμές με διάφορες τεχνικές, προτού χρησιμοποιηθεί τελικά η τεχνική των υπερκρίσιμων υγρών (SFC) για την απομόνωση των ενώσεων της PγOR. Στο σχεδιάγραμμα παρουσιάζονται συνοπτικά οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν με αυτόν το σκοπό και τα αποτελέσματά τους.



Εικόνα 6-11 Διάγραμμα της πορείας και των τεχνικών που εφαρμόστηκαν για την απομόνωση των ενώσεων της πολικής γ-ορυζανόλης (PγOR).

6.4.2.1 Κλασματοποίηση μέσω semi prep-HPLC

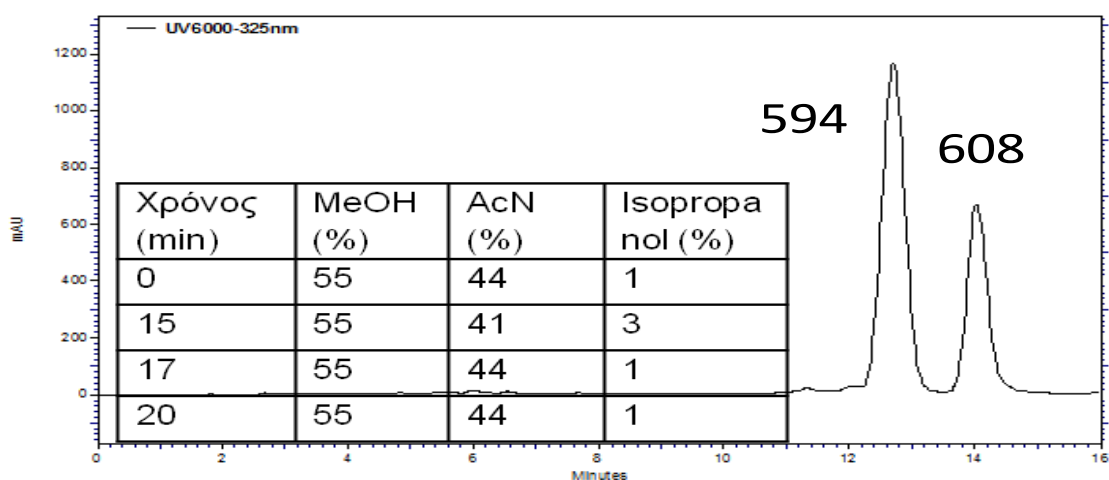
Αρχικά, επιλέχθηκε το κλάσμα [110-113] από το CPC, το οποίο σύμφωνα με τον χρωματογραφικό έλεγχο μέσω TLC κανονικής φάσης (Εικόνα 6-8) και το HPLC προφίλ ήταν πλούσιο σε PγOR. Πρώτα, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της semi prep-HPLC. Εφαρμόστηκε όπως και προηγουμένως 100% ACN ισοκρατικά, με ροή 3 ml/min για 80 λεπτά. Σε 1 ml iPrOH, διαλύονταν 30-40 mg από το κλάσμα του CPC και μετά από διήθηση με φίλτρο (0.45μm NYL), το δείγμα ενιόταν. Η διαδικασία επαναλήφθηκε τρεις φορές και παρά την τήρηση των χρόνων συλλογής η διαδικασία δεν είχε καλή επαναληψιμότητα.

Από αυτήν τη διαδικασία, προέκυψαν συνολικά τέσσερα κλάσματα τα οποία ύστερα από έλεγχο με TLC κανονικής φάσης, υποβλήθηκαν σε φασματοσκοπικό (NMR) και

φασματομετρικό έλεγχο (HRMS) με τη βοήθεια των οποίων ταυτοποιήθηκαν 4 ενώσεις της ΡγΟΡ.

Αν και σε μίγμα, από το **κλάσμα 1** της semi prep-HPLC ταυτοποιήθηκε το *cis* & *trans* ισομερές των ενώσεων (24R)-cycloart-25-ene-3β,24-diol-3β ferulate & (24S)-cycloart-25-ene-3β,24-diol-3β ferulate (**POR2**) καθώς και το *cis* & *trans* ισομερές της ένωσης Cycloart-23Z-ene3β,25-diol-3β ferulate (**POR3**) που απεικονίζονται στην Εικόνα 6-13.

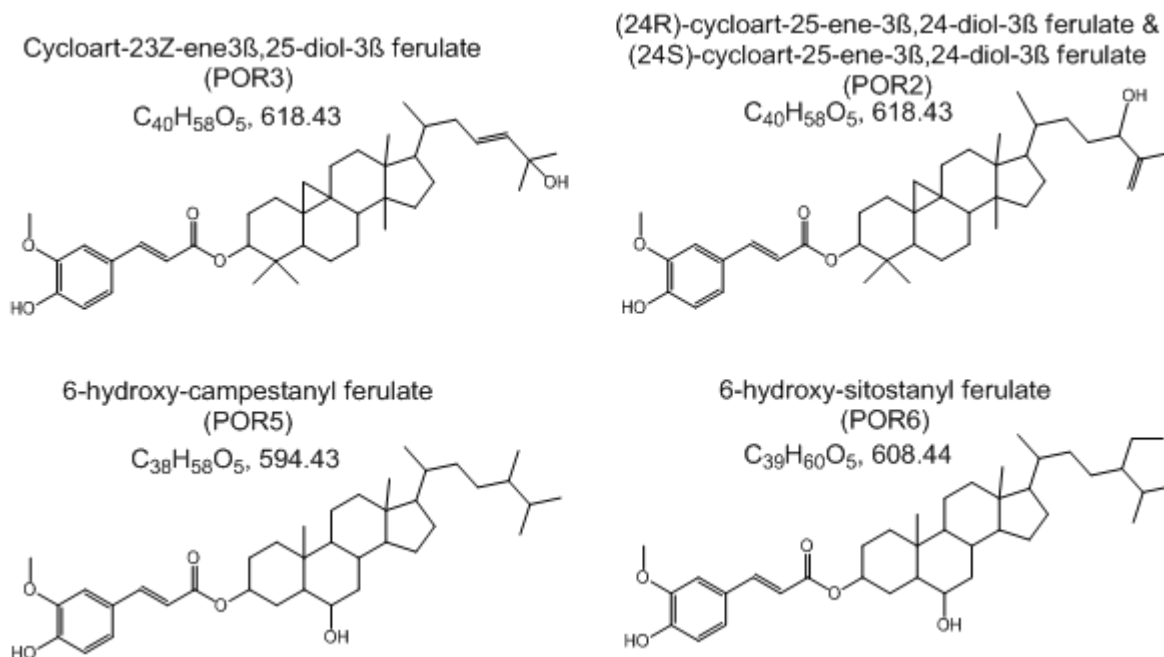
Το **κλάσμα 3**, ύστερα από HRMS ανάλυση παρουσίασε κοινή σύσταση και στις 3 επαναλήψεις. Περιείχε δύο νέες ενώσεις που ανήκουν στην ομάδα της ΡγΟΡ σε αναλογία περίπου 3:1 (Εικόνα 6-12). Μετά από τις απαραίτητες συνενώσεις, συλλέχθηκαν 3.8 mg του κλάσματος 3 τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση των 2 ουσιών μέσω **analytical HPLC**. Αναπτύχθηκε κατάλληλη μέθοδος στην προαναφερθείσα αναλυτική στήλη της HPLC (Discovery, HS C18 , 25 cm x 4.6 mm, 5μm). Η παρατήρηση των ενώσεων της ΡγΟΡ έγινε στα 325 nm, η θερμοκρασία της χρωματογραφικής στήλης ρυθμίστηκε στους 40 °C και η ροή στο 1 ml/min. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό τους παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 6-12 UV-Χρωματογράφημα στα 325 nm του κλάσματος 3 της semi prep-HPLC στην αναλυτική HPLC στήλη.

Μετά τον επιτυχή διαχωρισμό των 2 ουσιών ακολούθησε φασματοσκοπική μελέτη πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (1D & 2D) που οδήγησε στην ταυτοποίηση των παρακάτω *cis* & *trans* φερουλικών εστέρων, 6-hydroxy-campestanyl ferulate (**POR5**) & 6-hydroxy-sitostanyl ferulate (**POR6**) με $RDB_{eq} = 10.5$, όπως αυτά απεικονίζονται στην Εικόνα 6-13. Η τεχνική της semi prep-HPLC οδήγησε στην παραλαβή μίγματος των κύριων ενώσεων του κλάσματος. Η προσθήκη ενός επιπλέον σταδίου για την

τελική απομόνωση μέσω analytical HPLC, καθιστά την διαδικασία εξαιρετικά χρονοβόρα και μη αποδοτική ως προς το τελικό αποτέλεσμα.



Εικόνα 6-13 Απεικόνιση της δομής των κύριων ουσιών της πολικής γ-ορυζανόλης (PγOR) του κλάσματος 1 και 3 της *semi prep-HPLC*.

Οι ενώσεις (POR2) & (POR3) έχουν απομονωθεί ξανά από το πίτουρο του ρυζιού από τους Luo et al. [11] και τους Lemus et al.[9], οι οποίοι έχουν δημοσιεύσει δεδομένα 1H NMR, ^{13}C NMR και HRMS, ενώ οι ενώσεις (POR5) & (POR6) είναι νέα φυσικά προϊόντα. Οι ενώσεις (POR2) & (POR3) απομονώθηκαν μαζί ως μίγμα *cis* & *trans* ισομερών μέσω *semi prep-HPLC*, ενώ οι ενώσεις (POR5) & (POR6) με την προσθήκη ενός επιπλέον σταδίου (*analytical HPLC*) απομονώθηκαν μία προς μία αλλά και πάλι ως μίγμα *cis* & *trans* ισομερών. Ωστόσο, η παραλαβή μιγμάτων και η πολύ μικρή απόδοση πιθανότατα λόγω των πολλών βημάτων έως την απομόνωση, καθιστούν αυτή την ακολουθία διαδικασιών μη κατάλληλη για την επεξεργασία των επιλεγμένων κλασμάτων CPC.

6.4.2.2 Κλασματοποίηση μέσω *prep TLC*

Ποσότητα από το ίδιο κλάσμα ([110-113], **CPC**) δοκιμάστηκε στην παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (*prep TLC*) με σκοπό τη λήψη απομονωμένων ουσιών της PγOR. Η τοποθέτηση του δείγματος βάρους 12 mg στην πλάκα (PLC Silica gel 60 F254, 1 mm, Analytical Chromatography, glass plate 20 cm x 20 cm) έγινε με τη βοήθεια γυάλινης πιπέτας Παστέρ. Η ανάπτυξη της πλάκας έγινε σε γυάλινο κλειστό θάλαμο με σύστημα ανάπτυξης αποτελούμενο από μίγμα διαλυτών Toluene/EtOAc/MeOH σε αναλογία 80/10/10, v/v/v. Η ανάπτυξη επαναλήφθηκε με

σκοπό την έκλουση της μεγίστης δυνατής ποσότητας από τη βάση (baseline). Αφού διαχωρίστηκαν οι ζώνες, οι ουσίες αποδεσμεύτηκαν από τη γέλη πυριτίου με EtOAc (διαλύτης εκχύλισης) με τη βοήθεια φίλτρου με πορώδες (Shott Duran por4).

Πίνακας 6-8 Κλάσματα prepTLC και τα αντίστοιχα βάρη τους

Κλάσματα prep TLC	Βάρος (mg)
A	1.45
B	1.83
C	2.5
D	3.02
E	1.76
F	1.28

Από την παραπάνω διαδικασία προέκυψαν 6 κλάσματα τα οποία ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με TLC κανονικής φάσεως. Τα κλάσματα B,C,D υποβλήθηκαν σε φασματοσκοπική μελέτη πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (1D & 2D) και φασματομετρίας μάζας (HR-MS). Σύμφωνα με τα δεδομένα που προέκυψαν από την ανάλυση με φασματομετρία μάζας προέκυψαν και πάλι μίγματα με προφίλ παρόμοιο με αυτό των κλασμάτων από την semi prep-HPLC. Όπως και με την semi prep-HPLC, έτσι και με την prep TLC, πέραν της μερικής κλασματοποίησης δεν ήταν εφικτή η απομόνωση μια προς μία των ουσιών της PγOR.

Ενδεικτικά οι κύριες ουσίες που ταυτοποιήθηκαν και πάλι είναι τα ζεύγη *cis* & *trans* ισομερών ενώσεων (POR2), (POR3), (POR5), (POR6) όπως αυτές παρουσιάζονται στην Εικόνα 6-13.

6.4.2.3 Κλασματοποίηση και απομόνωση μέσω Χρωματογραφίας Υπερκρίσιμων Υγρών (SFC)

Η χρωματογραφία υπερκρίσιμων υγρών (Supercritical Fluid Chromatography or SFC) είναι μια χρωματογραφική τεχνική για την οποία έγινε αναφορά για πρώτη φορά το 1962 από τους Klesper et al. [166] με την ονομασία υψηλής πίεσης αέρια χρωματογραφία (high-pressure gas chromatography, HPGC). Ωστόσο το SFC, άρχισε να αναγνωρίζεται ως μία πραγματικά αποτελεσματική τεχνική διαχωρισμού στα τέλη της δεκαετίας του 1990.

Πρόκειται για μία καινούρια τεχνική, μια «πράσινη» τεχνική που χρησιμοποιεί φιλικούς προς το περιβάλλον διαλύτες. Χρησιμοποιεί το αέριο CO₂ σε υπερκρίσιμη κατάσταση ($\theta=31^{\circ}\text{C}$ & $p>72\text{ atm}$) ως κινητή φάση και μία πολική στατική φάση, όπως SiO₂ ή Al₂O₃. Ο εξοπλισμός που χρησιμοποιείται έχει πολλές ομοιότητες με αυτόν της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Δίνεται η δυνατότητα διαχωρισμού πολύπλοκων μιγμάτων και συγχρόνως ο προσδιορισμός της ποσότητας και της ταυτότητας του κάθε συστατικού.

Η πιο σημαντική διαφορά από την HPLC έγκειται στη χρήση του πυκνού συμπιεσμένου αέριου CO₂, το οποίο σε υψηλές πιέσεις δρα ως διαλύτης. Τα βασικά πλεονεκτήματα της SFC έναντι της HPLC όταν χρησιμοποιείται παρασκευαστικά παρατίθενται παρακάτω [167]:

1. Πολλές ενώσεις έχουν μεγαλύτερη διαλυτότητα σε μίγματα υπερκρίσιμων ρευστών από ότι σε οργανικούς διαλύτες.
2. Κατάλληλη για άπολες ενώσεις
3. Το μέγιστο επιτρεπόμενο ποσό φορτίου της στήλης της παρασκευαστικής SFC είναι μεγαλύτερο από αυτό της HPLC με αποτέλεσμα να αυξάνεται η παραγωγικότητα και η απόδοση του διαχωρισμού.
4. Υψηλότερη απόδοση ανάκτησης και ευκολότερη ανάκτηση προϊόντων.
5. Είναι κατάλληλη για το διαχωρισμό θερμοευαίσθητων ουσιών, καθώς η χρωματογραφία πραγματοποιείται στους $\approx 31^{\circ}\text{C}$.
6. Το υπερκρίσιμο CO₂ είναι φθηνότερο και ασφαλέστερο από οργανικούς διαλύτες. Είναι ένας «πράσινος» διαλύτης, μη τοξικός, πτητικός και μη εύφλεκτος.

Το SFC είναι μία κανονικής φάσης χρωματογραφική τεχνική, εξαιρετικά γρήγορη και αποτελεσματική στον διαχωρισμό και στην απομόνωση άπολων ουσιών χάρη στο μικρό ιξώδες, το μεγάλο συντελεστή διάχυσης, και τη μικρή επιφανειακή τάση του CO₂ αλλά και δυνατότητα προσαρμογής της διαλυτικής ικανότητάς του στα

επιθυμητά επίπεδα αλλάζοντας την πίεση ή/και την θερμοκρασία. Χρησιμοποιεί κυρίως το CO₂, έναν εξαιρετικά άπολο διαλύτη ως κινητή φάση και για πιο πολικές ουσίες χρησιμοποιεί ως συνδιαλύτη αιθανόλη, μεθανόλη, ισοπροπανόλη και ακετονιτρίλιο.

Υπάρχουν ήδη αναφορές σχετικά με την εκχύλιση γOR με τη μέθοδο των υπερκρίσιμων υγρών [99], [153], [168], [71] αλλά δεν υπάρχουν αναφορές ως προς τη χρήση της τεχνικής αυτής ως μέσο απομόνωσης τόσο των ουσιών της γOR όσο και των ουσιών της ΡγOR [169].



SFC-MS

❖ Επιλογή κατάλληλης στατικής και κινητής φάσης: Το CO₂ όπως προαναφέρθηκε, είναι ένας άπολος διαλύτης ο οποίος παρασύρει τα άπολα συστατικά. Ο συνδιαλύτης χρησιμοποιείται για να αυξήσει την πολικότητα της κινητής φάσης και το εύρος των συστατικών που θα εκλουστούν. Ως συνδιαλύτης χρησιμοποιήθηκε μεθανόλη (MeOH). Λόγω της απουσίας βιβλιογραφικών δεδομένων, έγινε σειρά δοκιμών αρχικά με το πρότυπο της γOR και στη συνέχεια με το κλάσμα [108-109] του **CPC** σε διάφορες χειρόμορφες (Chiral Pack) και μη αναλυτικές στήλες (2-Ethylpyridine, Silica).

- Anal_Silica_250mm
- Anal_Sil_Ethylpyridin_250mm
- Anal_Chiral_Pack_IA_250mm
- Anal_Chiral_Pack_IB_250mm
- Anal_Chiral_Pack_IC_250mm
- Anal_Chiral_Pack_ID_250mm

Καταλληλότερη για τον διαχωρισμό των ενώσεων της ΡγOR κρίθηκε ως **στατική φάση**, η αναλυτική στήλη του SFC Anal_Sil_Ethylpyridine_250mm κι έτσι χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια η αντίστοιχη παρασκευαστική στήλη S-Prep_Sil-Ethylpyridin_150mm για τη συλλογή των κλασμάτων.

Χρωματογραφική ανάλυση μέσω SFC-MS του κλάσματος [108-109] του CPC

Προετοιμασία δείγματος και μηχανήματος SFC για χρωματογραφική ανάλυση: Ποσότητα του κλάσματος [108-109] του CPC διαλύθηκε σε MeOH (HPLC grade) έως τελικής συγκέντρωσης 1 mg/ml MeOH. Συνολικά έγιναν 20 δοκιμές. Αρχικά, δοκιμάστηκε ισοκρατική έκλυση με αλληπάλληλες εγχύσεις αλλάζοντας το ποσοστό συνδιαλύτη (30%, 20%, 10%, 5% MeOH) χωρίς να έχει τα επιθυμητά αποτελέσματα διαχωρισμού. Η ακριβής μέθοδος της κινητής φάσης βασίστηκε στα αποτελέσματα των δοκιμών που ακολούθησαν με τη μέθοδο της βαθμιδωτής έκλυσης. Οι δοκιμές φαίνονται αναλυτικά στον Πίνακα 6-10.

Πίνακας 6-9 Πειραματικές συνθήκες SFC-MS

	Αναλυτική χρωματογραφία	Παρασκευαστική Χρωματογραφία
Στατική φάση	Anal_Sil-Ethylpyridin_250mm	S-Prep_Sil-Ethylpyridin_150mm
Όγκος εισαγωγής δείγματος	50ul (C= 1 mg/ml)	500ul (C= 5 mg/ml)
Μήκος κύματος απορρόφησης	210-450 nm	210-450nm
Ροή (ml/min)	5	15

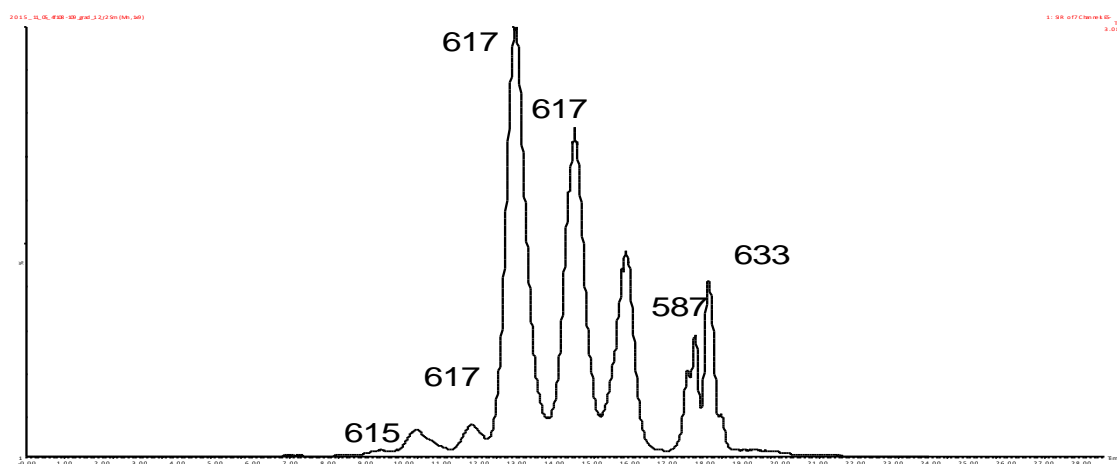
Split Ratio:	MS 0.4 ml/min	MS 0.4 ml/min
Solvent: (συν-διαλύτης)	MeOH	MeOH
Makeup Flow Rate:	1.0 ml/min	5.0 ml/min
System Back Pressure:	150 bar	150 bar
System Back Pressure Alarm	250 bar	250 bar
External Heater Temp:	30 °C	30 °C
External Heater Temp Alarm:	60 °C	60 °C
Column Oven Temperature:	40 °C	40 °C
Post-BPR Temperature:	40 °C	40 °C

Πίνακας 6-10 Ανάπτυξη μεθόδου για τον διαχωρισμό των ενώσεων της ΡγOR από το κλάσμα [108-109] του CPC με την τεχνική SFC.

ΜΕΘΟΔΟΣ	ΒΑΘΜΙΔΩΤΗ ΕΚΛΟΥΣΗ (min, %MeOH in CO ₂)
1	0-4 min,5%; 4-8 min, 5-30%; 8-10 min, 30-50%; 10-12 min, 50%; 12-12.5 min, 50-5%; 12.5-15min, 5%
2	0-3 min,5%; 3-5 min, 5-15%; 5-10 min, 15%; 10-13 min, 15-50%; 13-13.5 min, 50-5%; 13.5-16min, 5%
3	0-2 min,5%; 2-5 min, 5-10%; 5-11 min, 10%; 11-14 min, 10-50%; 14-14.5 min, 50-5%; 14.5-17min, 5%
4	0-2 min,5%; 2-5 min, 5-13%; 5-11 min, 13%; 11-14 min, 13-50%; 14-14.5 min, 50-5%; 14.5-17min, 5%
5	0-3 min,5%; 3-9 min, 5-15%; 9-13 min, 15%; 13-15 min, 15-50%; 15-15.5 min, 50-5%; 15.5-18min, 5%
6	0-2 min,5%; 2-5 min, 5-12%; 5-8 min, 12-15%; 8-10 min, 15%; 10-13 min, 15-50%; 13-13.5min, 50-5%; 13.5-16min, 5%
7	0-3 min,5%; 3-9 min, 5-10%; 9-13 min, 10%; 13-15 min, 10-50%; 15-15.5 min, 50-5%; 15.5-18min, 5%
8	0-2 min,5%; 2-9 min, 5-15%; 9-13 min, 15%; 13-15 min, 15-50%; 15-15.5 min, 50-5%; 15.5-18min, 5%
9	0-3 min,5%; 3-9 min, 5-10%; 9-15 min, 10%; 15-19 min, 10-50%; 19-19.5 min, 50-5%; 19.5-22min, 5%
10	0-3 min,5%; 3-9 min, 5-10%; 9-17 min, 10%; 17-21 min, 10-50%; 21-21.5 min, 50-5%; 21.5-24min, 5%
11	0-2 min,5%; 2-5 min, 5-10%; 5-15 min, 10%; 15-17 min, 10-20%; 17-19 min, 10-50%; 19-19.5min, 50-5%; 19.5-22min, 5%
12	0-3 min,5%; 3-9 min, 5-10%; 9-16 min, 10%; 16-21 min, 10-50%; 21-21.5 min, 50-5%; 21.5-24min, 5%
13	0-3 min,5%; 3-9 min, 5-10%; 9-16 min, 10%; 16-26 min, 10-50%; 26-26.5min, 50-5%; 26.5-29min, 5%
14	0-3 min,5%; 3-9 min, 5-10%; 9-16 min, 10%; 16-19 min, 10-30%; 19-21 min, 30-50%, 21-21.5min, 50-5%; 21.5-24min, 5%
15	0-3 min,5%; 3-9 min, 5-10%; 9-16 min, 10%; 16-17 min, 12-20%; 17-18 min, 20%; 18-19 min, 20-25%; 19-20 min, 25%; 20-21 min, 25-50%; 21-21.5min, 50-5%; 21.5-24 min, 5%

Ικανοποιητικός διαχωρισμός επετεύχθη στις μεθόδους 5, 7, 9. Μικρές αλλαγές στο ποσοστό του συνδιαλύτη και στη χρονική διάρκεια του κάθε βήματος, οδήγησαν στη μέθοδο βαθμιδωτής έκλουσης 12 (**grad 12**) με την οποία πραγματοποιήθηκε ο βέλτιστος διαχωρισμός που απεικονίζεται στην Εικόνα 6-14. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την αναλυτική χρωματογραφία μέσω SFC-MS είναι η εξής:

SFC	Αναλυτική μέθοδος (ροή 5ml/min)
Στήλη (στατική φάση)	Analytical_Meth_Sil_EthPyr (250 mm)
Μέθοδος grad 12 (κινητή φάση, %MeOH)	0-3 min,5%; 3-9 min, 5-10%; 9-16 min, 10%; 16-21 min, 10-50%; 21-21.5 min, 50-5%; 21.5-24min, 5%



Εικόνα 6-14 TIC χρωματογράφημα (μέθοδος grad 12) του κλάσματος CPC, [108-109] στην αναλυτική στήλη του SFC-MS.

Για την απομόνωση των ουσιών της ΡγOR χρησιμοποιήθηκε το κλάσμα [108-109] του CPC το οποίο συμφώνα με δεδομένα από LC-MS αλλά και το TIC χρωματογράφημα του SFC-MS (Εικόνα 6-14) περιείχε τουλάχιστον 6 ουσίες που ανήκουν στην κατηγορία της ΡγOR.

Απομόνωση μέσω SFC-MS από το κλάσμα [108-109] του CPC (SFC A)

Για το καλύτερο διαχωρισμό και την απομόνωση καθαρών ουσιών συνοπτικά εφαρμόστηκαν τα εξής:

Προετοιμασία συστήματος διαλυτών για παρασκευαστική χρωματογραφία: Με σκοπό την απομόνωση όσο το δυνατόν μεγαλύτερης ποσότητας καθαρών ενώσεων της ΡγOR, αναπτύχθηκε με οδηγό την παραπάνω αναλυτική μέθοδο (grad 12), η μέθοδος για την παρασκευαστική στήλη του SFC, S-Prep_Sil-Ethylpyridin_150mm.

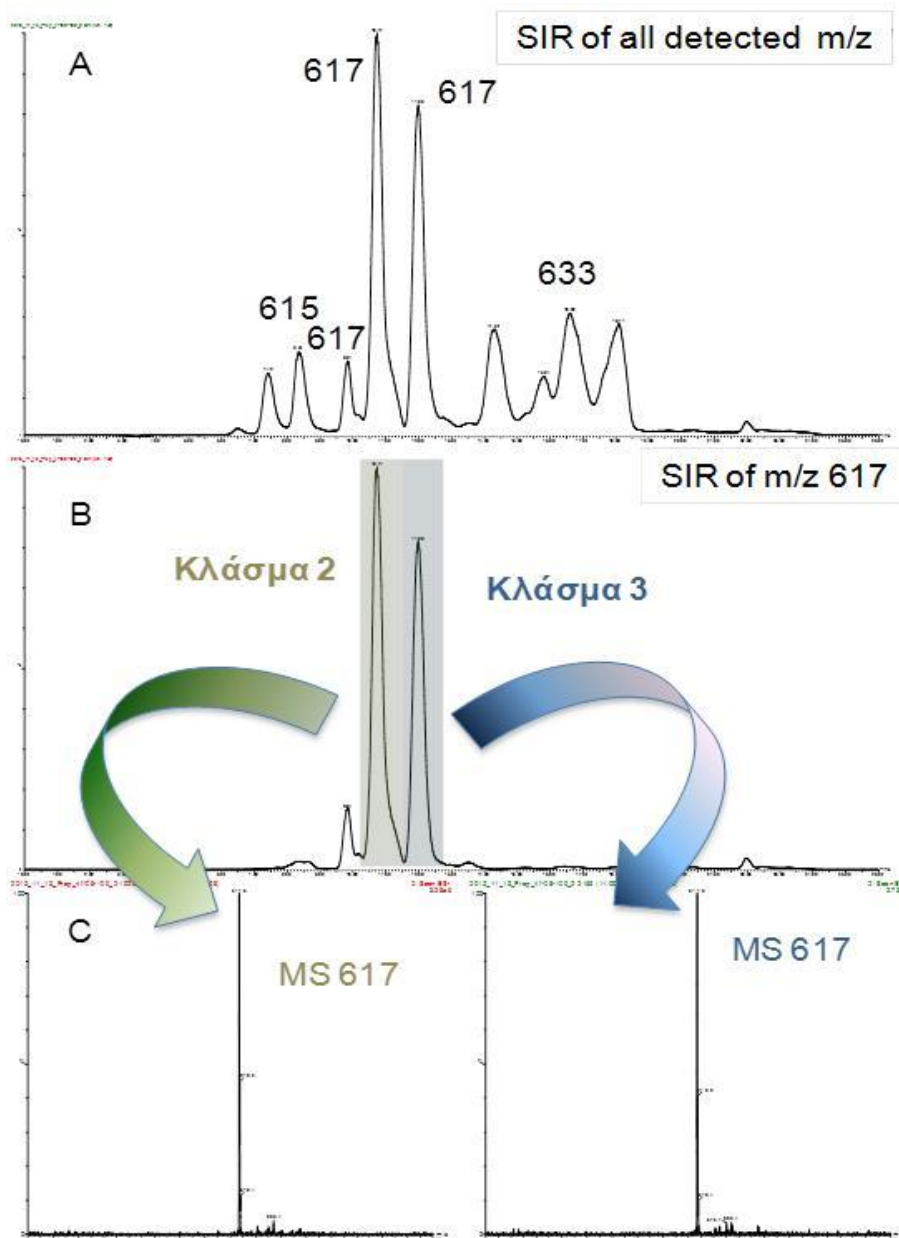
SFC	Παρασκευαστική μέθοδος 1 (ροή 15ml/min)
Στήλη (στατική φάση)	S-Prep_Sil-Ethylpyridin (150mm)
Μέθοδος SFC PREP A (κινητή φάση, %MeOH)	0-3 min, 5%; 3-9 min, 5-10%; 9-16 min, 10%; 16-21 min, 10-20%; 21-22 min, 20-30%; 22-23 min, 30%, 23-23.5 min, 30-5%; 23.5-26min, 5%

Προετοιμασία δείγματος και μηχανήματος SFC για απομόνωση: Για την προετοιμασία του δείγματος, ποσότητα του κλάσματος [108-109] του CPC διαλύθηκε σε MeOH (HPLC grade) έως τελικής συγκέντρωσης 5mg/ml. Το δείγμα σε συγκέντρωση μικρότερη ή ίση με 5 mg/ ml MeOH είναι διαυγές και ως εκ τούτου μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση μέσω SFC-MS. Οι συνθήκες του μηχανήματος για την συλλογή των κλασμάτων αναφέρονται στον Πίνακα 6-9.

Συλλογή και συμπύκνωση κλασμάτων: Για την παραλαβή ικανής ποσότητας απομονωμένων ουσιών, έγιναν 18 κύκλοι συλλογής με μικρομετατροπές στις ρυθμίσεις που αφορούν τους χρόνους συλλογής του κάθε κλάσματος. Το αποτέλεσμα ήταν η παραλαβή 4 κλασμάτων που περιέχουν απομονωμένες ενώσεις της ΡγOR ή μίγματα αυτών. Το ακριβές μοριακό βάρος των ενώσεων καταγράφηκε από τον φασματογράφο μάζας (MS) που είναι συζευγμένος με το SFC. Τα κλάσματα συλλέγονται σε περιέκτες και στη συνέχεια συμπυκνώνονται και φυλάσσονται.

Πίνακας 6-11 Τα κλάσματα του SFC PREP A και τα αντίστοιχα βάρη τους

SFC PREP A				
κλάσμα	Ψευδομοριακό ιόν [M-H]⁻	Μοριακός τύπος [M-H]⁻	RDB_{eq}	Βάρος (*10⁻³ g)
1	615	C ₄₀ H ₅₅ O ₅	13.5	0.23
2	617	C ₄₀ H ₅₇ O ₅	12.5	6.11
3	617	C ₄₀ H ₅₇ O ₅	12.5	2.06
4	633	C ₄₀ H ₅₇ O ₆	12.5	0.69



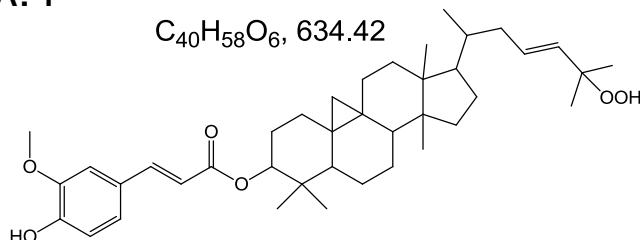
Εικόνα 6-15 A) TIC Χρωματογράφημα κατά την συλλογή των κλασμάτων στο SFC-MS με την μέθοδο SFC PREP A. B) XIC των ενώσεων με ψευδομοριακό ιόν 617 και απεικόνιση συλλογής των κλασμάτων 2 & 3. C) φάσμα μάζας σε (ES) αρνητικό ιονισμό των κλασμάτων 2 & 3.

Όλα τα κλάσματα υποβλήθηκαν σε φασματοσκοπική μελέτη πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (1D & 2D) και φασματομετρίας μάζας (HRMS) και απομονώθηκαν 4 φυσικά προϊόντα της ΡγΟΡ από τα κλάσματα 1, 2, 3 & 4 του SFC PREP A. Από τα κλάσματα 2 & 3 απομονώθηκαν αντίστοιχα τα ήδη γνωστά ζεύγη *trans* & *cis* φερουλικών εστέρων, Cycloart-23Z-ene-3β,25-diol-3β ferulate (POR3) και ((24R)-cycloart-25-ene-3β,24-diol-3β-ferulate & (24S)-cycloart-25-ene-3β,24-diol-3β-ferulate (POR2). Ενώ από τα κλάσματα 1 & 4 απομονώθηκαν **αντίστοιχα δύο νέα φυσικά προϊόντα**, το Cycloart-26-methylen-24-oxo-3β-ol *trans* & *cis* ferulate (POR4), 25-

hydroperoxy-cycloart-23E-en-3β-ol *trans* & *cis* ferulate (POR1). Για την ταυτοποίηση τους αξιοποιήθηκαν δεδομένα φασματοσκοπίας NMR, φασματομετρίας μάζας και βιβλιογραφικά δεδομένα [170], [171].

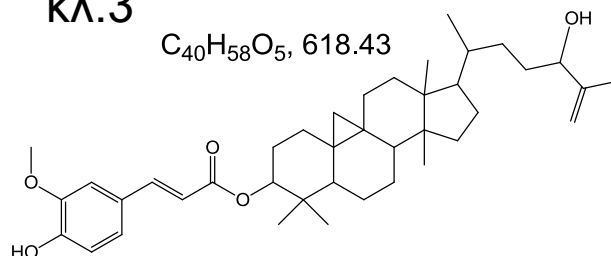
25-hydroperoxy-cycloart-23E-en-3β-ol ferulate (POR1)

κλ.4



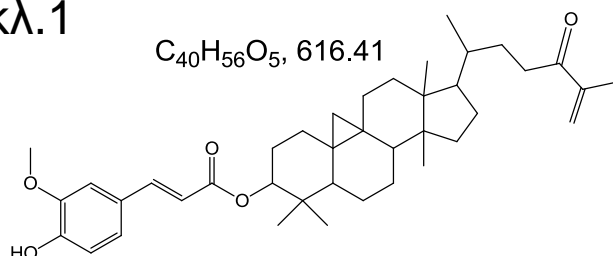
(24R)-cycloart-25-ene-3β,24-diol-3β ferulate & (24S)-cycloart-25-ene-3β,24-diol-3β ferulate (POR2)

κλ.3



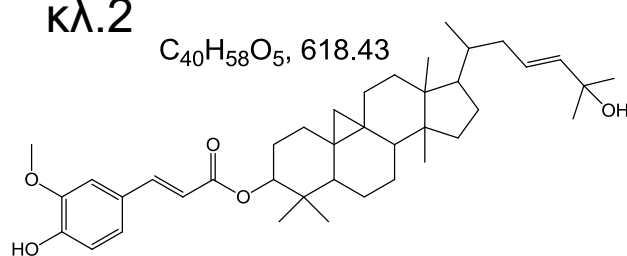
Cycloart-26-methylen-24-oxo-3β-ol ferulate (POR4)

κλ.1



Cycloart-23Z-ene3β,25-diol-3β ferulate (POR3)

κλ.2

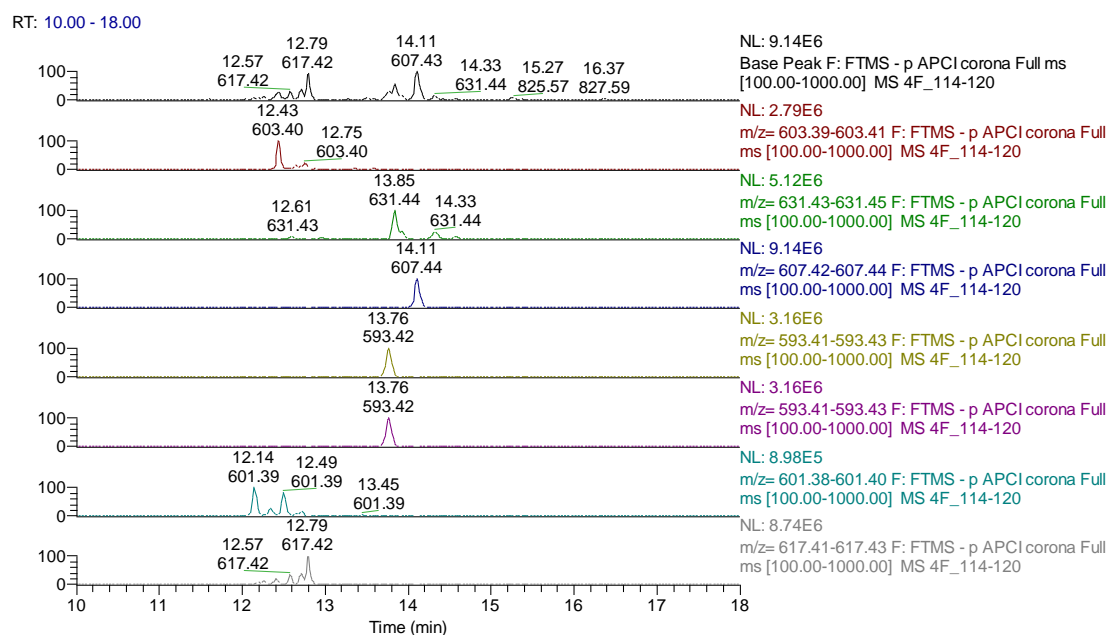


Εικόνα 6-16 Απεικόνιση της δομής των κύριων ουσιών της ΡγΟΡ του κλάσματος 1, 2, 3, 4 του SFC PREP A.

Ο επιτυχής διαχωρισμός μέσω SFC-MS για πρώτη φορά των ενώσεων **(24R)-cycloart-25-ene-3β,24-diol-3β *trans* & *cis* ferulate & (24S)-cycloart-25-ene-3β,24-diol-3β *trans* & *cis* ferulate (POR2), Cycloart-23Z-ene3β,25-diol-3β *trans* & *cis* ferulate (POR3)** αλλά και η απομόνωση δύο ακόμα νέων φυσικών προϊόντων της ΡγΟΡ (**Cycloart-26-methylen-24-oxo-3β-ol *trans* & *cis* ferulate (POR4), 25-hydroperoxy-cycloart-23E-en-3β-ol *trans* & *cis* ferulate (POR1)**), καθιστά την τεχνική αυτή τη βέλτιστη επιλογή για την επεξεργασία των υπόλοιπων κλασμάτων του CPC.

Απομόνωση μέσω SFC-MS από το κλάσμα [114-120] του CPC (SFC B)

Λαμβάνοντας υπόψη τη διαθέσιμη ποσότητα (Πίνακας 6-6), σε συνδυασμό με τις πληροφορίες σχετικά με το προφίλ των κλασμάτων του CPC μετά από HRMS ανάλυση, επιλέχθηκε το κλάσμα [114-120] του CPC για την ανάπτυξη μεθόδου στο SFC με σκοπό την απομόνωση και την ταυτοποίηση νέων ουσιών που ανήκουν στην ομάδα της ΡγOR.



Εικόνα 6-17 Χρωματογράφημα εξαγόμενων ιόντων των ενώσεων της ΡγOR που ανιχνεύτηκαν στο κλάσμα [114-120] του CPC (Extracted Ion Chromatograms -XICs)

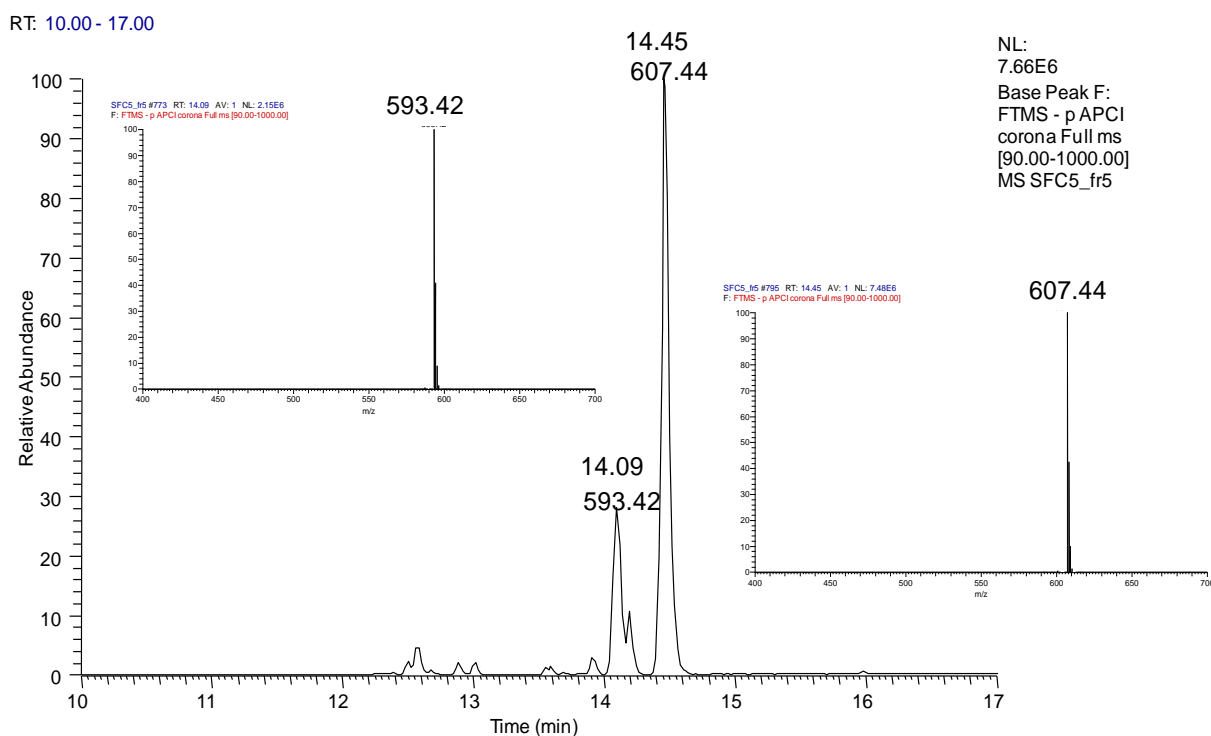
Για το καλύτερο διαχωρισμό και την απομόνωση καθαρών ουσιών συνοπτικά εφαρμόστηκαν τα εξής:

Προετοιμασία συστήματος διαλυτών: Με οδηγό το προηγούμενο SFC PREP A και δοκιμή των μεθόδων που ήδη υπάρχουν για την αναλυτική (Anal_Sil-Ethylpyridin_250mm) και την παρασκευαστική στήλη (S-Prep_Sil-Ethylpyridin_150mm) αναπτύχθηκε η παρασκευαστική μέθοδος SFC PREP B:

SFC	Παρασκευαστική μέθοδος 2 (ροή 15ml/min)
Στήλη (στατική φάση)	S-Prep_Sil-Ethylpyridin (150mm)
Μέθοδος SFC PREP B (κινητή φάση, %MeOH)	0-4 min, 5%; 4-11 min, 5-10%; 11-20 min, 10%; 20-24 min, 10-20%; 24-25 min, 20-30%; 25-26 min, 30%, 26-26.5 min, 30-5%; 26.5-29min, 5%

Προετοιμασία δείγματος και μηχανήματος SFC για απομόνωση: Για την προετοιμασία του δείγματος, ποσότητα του κλάσματος [114-120] του CPC διαλύθηκε σε MeOH (HPLC grade) έως τελικής συγκέντρωσης 5 mg/ml. Το δείγμα σε συγκέντρωση μικρότερη ή ίση με 5 mg/ml MeOH είναι διαυγές και ως εκ τούτου μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση μέσω SFC-MS. Οι συνθήκες του μηχανήματος για την συλλογή των κλασμάτων αναφέρονται στον Πίνακα 6-9.

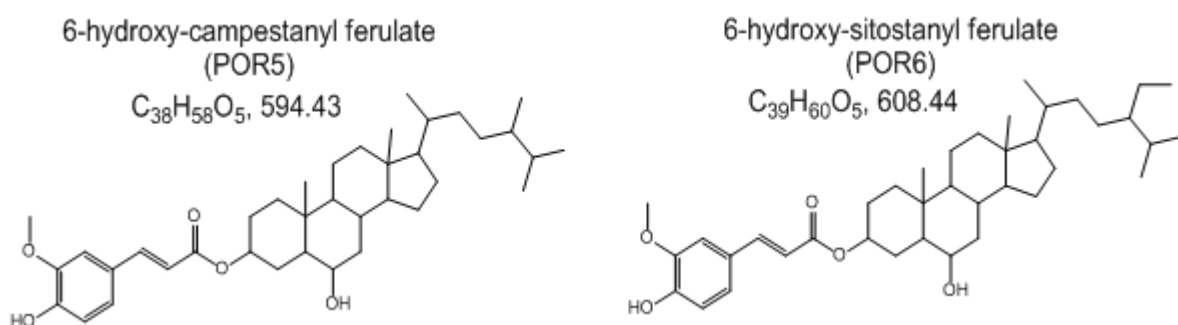
Συλλογή και συμπύκνωση κλασμάτων: Σύμφωνα με την HRMS ανάλυση του αρχικού CPC κλάσματος και τις πληροφορίες από το SFC-MS όλων των κλασμάτων που προέκυψαν, περιέχουν ουσίες της ΡγΟΡ. Για την παραλαβή ικανής ποσότητας απομονωμένων ουσιών, έγιναν 15 κύκλοι συλλογής με μικρομετατροπές στις ρυθμίσεις που αφορούν τους χρόνους συλλογής. Όλα τα αρχικά κλάσματα που συλλέχθηκαν με τη μέθοδο SFC PREP B ήταν μίγμα τουλάχιστον 4 ενώσεων, οπότε έγινε στοχευμένη συλλογή με σκοπό την παραλαβή μόνο του κλάσματος που περιείχε τις ενώσεις με μοριακό βάρος m/z 608 & 594. Το κλάσμα συλλέχθηκε σε περιέκτη, συμπυκνώθηκε και φυλάχθηκε.



Εικόνα 6-18 LC-MS χρωματογράφημα του κλάσματος 1 του SFC PREP B και φάσμα μάζας (HRMS, APCI) των κύριων κορυφών του κλάσματος.

SFC PREP B				
κλάσμα	Ψευδομοριακό ιόν [M-H] ⁻	Μοριακός τύπος [M-H] ⁻	RDB _{eq}	Βάρος (*10 ⁻³ g)
1	607	C39 H59 O5	10.5	3.56
	593	C38 H57 O5	10.5	

Στο κλάσμα 1 του SFC PREP B πραγματοποιήθηκε HRMS και φασματοσκοπική ανάλυση NMR (1D & 2D). Έτσι, ήταν εφικτή η ταυτοποίηση **2 νέων φυσικών προϊόντων**, της 6-hydroxy-campestanyl trans ferulate (POR5) & της 6-hydroxy-sitostanyl transferulate (POR6).



Εικόνα 6-19 Απεικόνιση της δομής των κύριων ουσιών της ΡγOR του κλάσματος 1 του SFC PREP B.

Η επιτυχής απομόνωση για πρώτη φορά **2 ακόμα νέων φυσικών προϊόντων**, της **6-hydroxy-campestanyl trans ferulate (POR5)** & της **6-hydroxy-sitostanyl trans ferulate (POR6)** από κλάσμα CPC με την τεχνική SFC-MS, επιβεβαιώνει και πάλι την καταλληλότητα της τεχνικής αυτής για την απομόνωση ενώσεων της ΡγOR.

6.5 Φασματομετρικά & φασματοσκοπικά δεδομένα της γOR και της ΡγOR.

6.5.1 LC-MS , HRMS & HRMS/MS ανάλυση του RBO και των κλασμάτων

Η γOR αποτελεί πολύπλοκο μίγμα εστέρων του φερουλικού οξέος με διάφορες φυτοστερόλες και τριτερπενικές αλκοόλες. Το ίδιο ισχύει και για την ομάδα της ΡγOR που αποτελείται επίσης από εστέρες φερουλικού οξέος με τριτερπενικές αλκοόλες με μόνη δομική διαφορά την ύπαρξη τουλάχιστον ενός επιπλέον υδροξυλίου στο τριτερπενικό τμήμα. Πρόκειται, όπως έχει προαναφερθεί, για πιο πολικές ενώσεις από εκείνες της γOR, οι οποίες παρουσιάζουν όμως παρόμοια χαρακτηριστικά, ίδια μέγιστη απορρόφηση στο UV (325 nm) και βαθύ μπλε χρωματισμό μετά τον ψεκασμό με το αντιδραστήριο εμφάνισης και θέρμανση.

Για την ταυτοποίηση των δομών της γOR και της ΡγOR πραγματοποιήθηκε μελέτη, αρχικά του αρχικού εκχυλίσματος *Gladio parboiled* 1^{ος} κώνος (Gpb1), των παραληφθέντων κλασμάτων από το CPC και στη συνέχεια των κλασμάτων από τις χρωματογραφικές τεχνικές απομόνωσης που ακολούθησαν (semi prep-HPLC, Prep TLC, SFC-MS) η οποία και επέτρεψε την αντιστοίχιση των κύριων κορυφών με συγκεκριμένες ενώσεις, όπως αυτές παρουσιάζονται στον Πίνακα 6-13. Η μελέτη έγινε με τη χρήση της τεχνικής της Υγρής Χρωματογραφίας Υπερυψηλής Απόδοσης συνδεδεμένης με Υβριδικό Φασματογράφο Μάζας Υψηλής Διακριτικής Ικανότητας (UHPLC-HRMS) ενώ ως μέθοδος ιονισμού χρησιμοποιήθηκε η τεχνική Χημικού Ιονισμού υπό Ατμοσφαιρική Πίεση (APCI) και η μέθοδο του ηλεκτροψεκασμού (ESI).

Τα δείγματα προετοιμάστηκαν με μεθανόλη αναλυτικής καθαρότητας σε τελική συγκέντρωση 1 mg/ml για ολικά εκχυλίσματα, σε συγκέντρωση 100 μg/ml για αρχικά κλάσματα και 20 μg/ml για καθαρά μόρια.

Η ανάλυση των δειγμάτων έγινε στην στήλη RP, Fortis C18 (100 mm x 2.1 mm, 1.7 μm), ο όγκος έγχυσης του αρχικού εκχυλίσματος ήταν 5 μL ενώ η έκλουση έγινε σε αυξημένη θερμοκρασία 50 °C και ροή 400 μL/min. Ως διαλύτες έκλουσης χρησιμοποιήθηκαν Α) H₂O+0.1F.A και Β) MeOH+ACN (1:1) ενώ η μέθοδος έκλουσης καταστρώθηκε σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

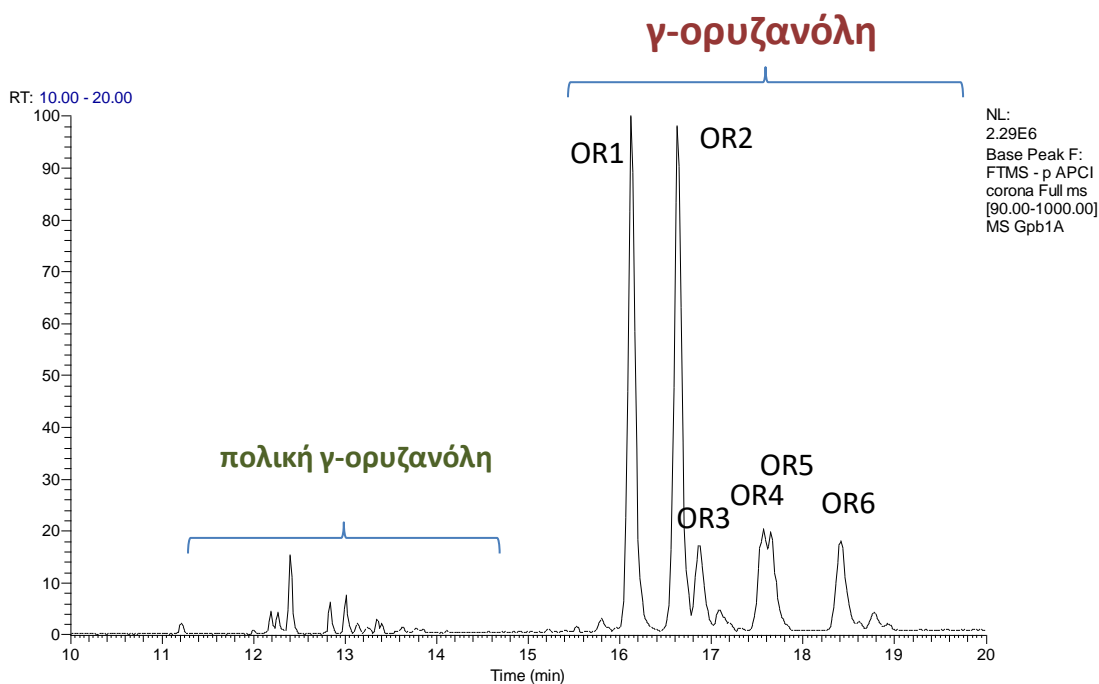
Πίνακας 6-12 Μέθοδος έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των δειγμάτων.

Χρόνος (min)	H ₂ O+0.1F.A	MeOH+ACN 1:1	Ροή (μl/min)
0	30	70	400
7	30	70	400
12	0	100	400
28	0	100	400
28.5	30	70	400
33	30	70	400

Τα δεδομένα MS αποκτήθηκαν με πλήρη σάρωση (full scan), σε εύρος μαζών m/z 90.00-1000.00 mmu. Για τον ιονισμό (APCI) οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής: θερμοκρασία εξάτμισης (vapourizer temperature) 325 °C, θερμοκρασία τριχοειδούς 250 °C και τάση τριχοειδούς 9 V. Χρησιμοποιήθηκε άζωτο ως βοηθητικό αέριο εξάτμισης (sheath gas) 40 μονάδες (arbitrary units) και ως βοηθητικό αέριο (auxiliary gas) 20 μονάδες (arbitrary units).

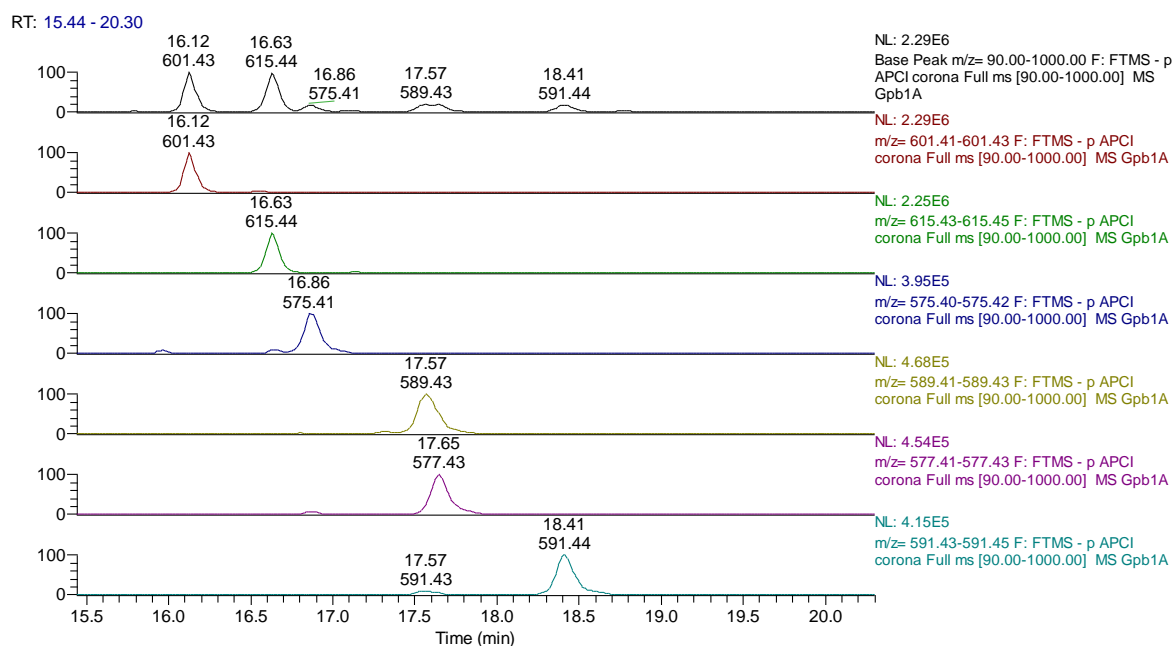
Για την στοχευμένη μελέτη, ήταν απαραίτητο να τεθούν ορισμένα κριτήρια αποκλεισμού, δεδομένου ότι με αρνητικό ιονισμό, οι ενώσεις στόχος εμφανίζουν βαθμό ακορεστότητας (RDB_{eq}) 10.5-13.5 [12] και έχουν τουλάχιστον τέσσερα άτομα οξυγόνου είτε πρόκειται για φερουλικούς είτε για καφεϊκούς εστέρες τριτερπενίων.

Η πρώτη ομάδα κορυφών αντιστοιχεί στην ΡγOR και εκλύεται μεταξύ 10 και 15 min, ενώ η γOR μεταξύ 15.5 και 20.5 min.



Εικόνα 6-20 Χρωματογράφημα HRMS –p APCI του αρχικού εκχυλίσματος Grb1 σε MeOH. Στην περιοχή έκλουσης της γOR (15.5 έως 20 min παρατηρείται η αντιστοίχιση των κύριων

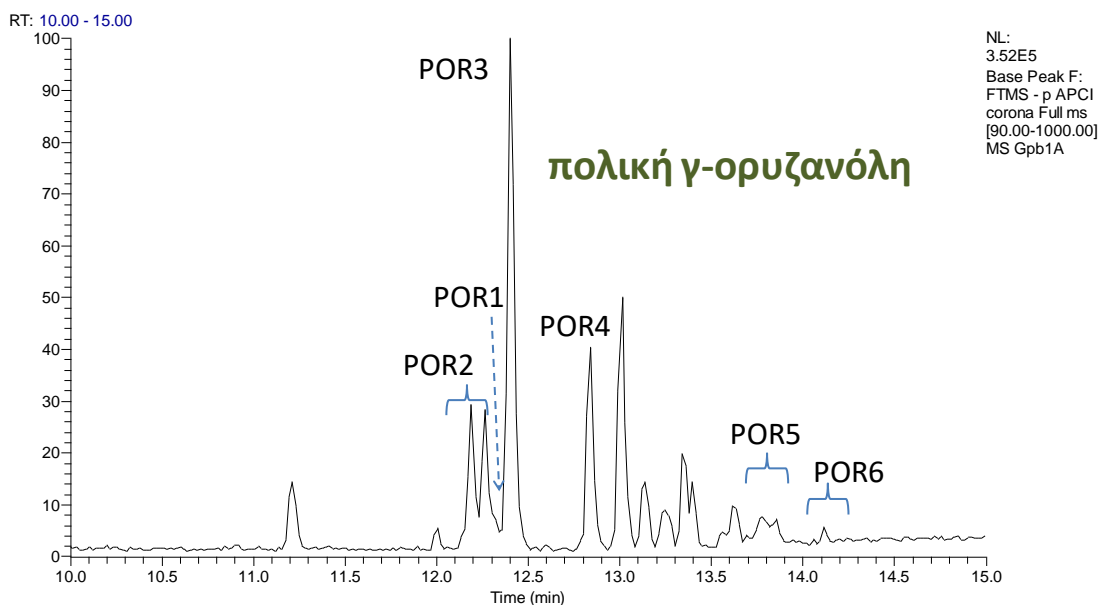
συστατικών της γOR με τις απομονωμένες ενώσεις της παρούσας εργασίας (Σφάλμα! Το ρχείο προέλευσης της αναφοράς δεν βρέθηκε.).



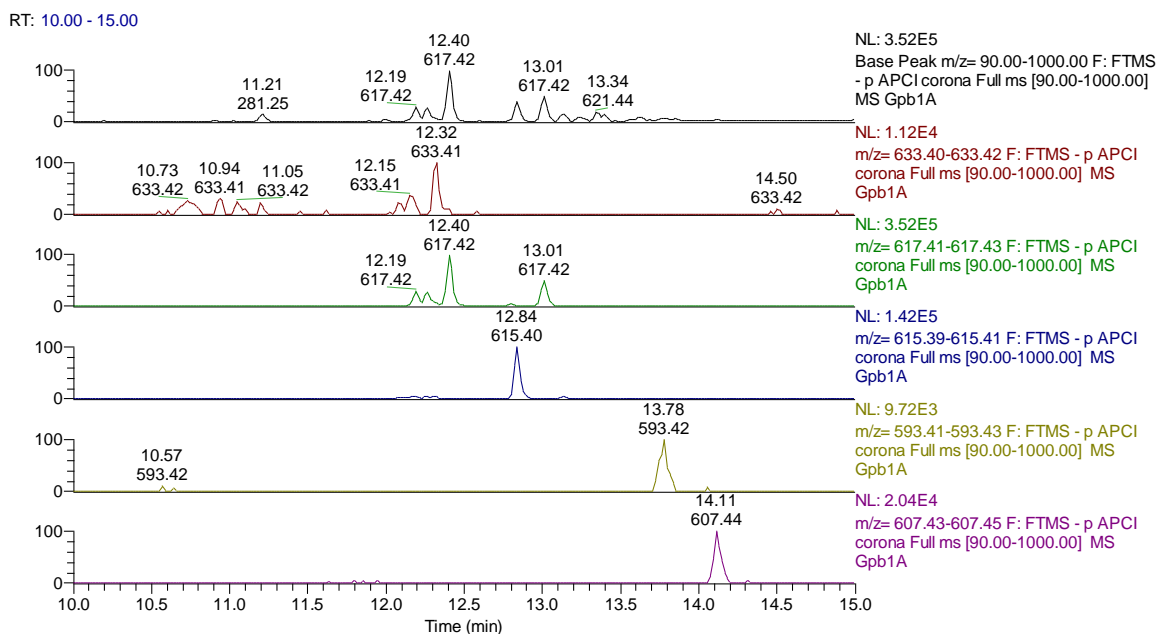
Εικόνα 6-21 Χρωματογράφημα εξαγόμενων ιόντων των κύριων ενώσεων της γOR που ανιχνευτήκαν (Extracted Ion Chromatograms –XICs) στο αρχικό εκχύλισμα Gpb1.

Για την ανάλυση LC-HRMS του δείγματος χρησιμοποιήθηκε η τεχνική APCI σε αρνητικό ιονισμό. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η βασική κορυφή στα φάσματα αρνητικού ιονισμού (APCI-) των συστατικών της γOR αντιστοιχούν στο ψευδομοριακό ιόν $[M-H]^-$. Από την μελέτη αυτή συμπεράναμε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό της γOR αποτελείται από τους εξής τέσσερις φερουλικούς εστέρες: (OR1) cycloartenyl ferulate, (OR2) 24-methylene-cycloartanyl ferulate, (OR3) campesteryl ferulate και (OR4) β-sitosteryl ferulate. Εκτός από τα παραπάνω μόρια, στην περιοχή της γOR ταυτοποιήθηκαν επίσης κάποια δευτερεύοντα μόρια τα οποία στη βιβλιογραφία [9], [8], αναφέρονται ως cycloartenyl caffeate με m/z 588.41, με μοριακό τύπο $C_{38}H_{58}O_4$ & RDB_{eq} 12.5 και cycloartanyl ferulate με m/z 604.44, μοριακό τύπο $C_{40}H_{60}O_4$ & RDB_{eq} 11.5.

Από την ομάδα της ΡγOR, τρεις είναι οι κύριοι εστέρες. Πρόκειται για τους εστέρες του φερουλικού οξέος με την (24S)-κυκλοαρτ-25-ενο-3β,24-διόλη, την (24S)-κυκλοαρτ-25-ενο-3β,24-διόλη (POR2) και την κυκλοαρτ-23Z-ενο-3β,25-διόλη (POR3). Τα παραπάνω στοιχεία συμφωνούν με τα δεδομένα των Angelis et al. [12].



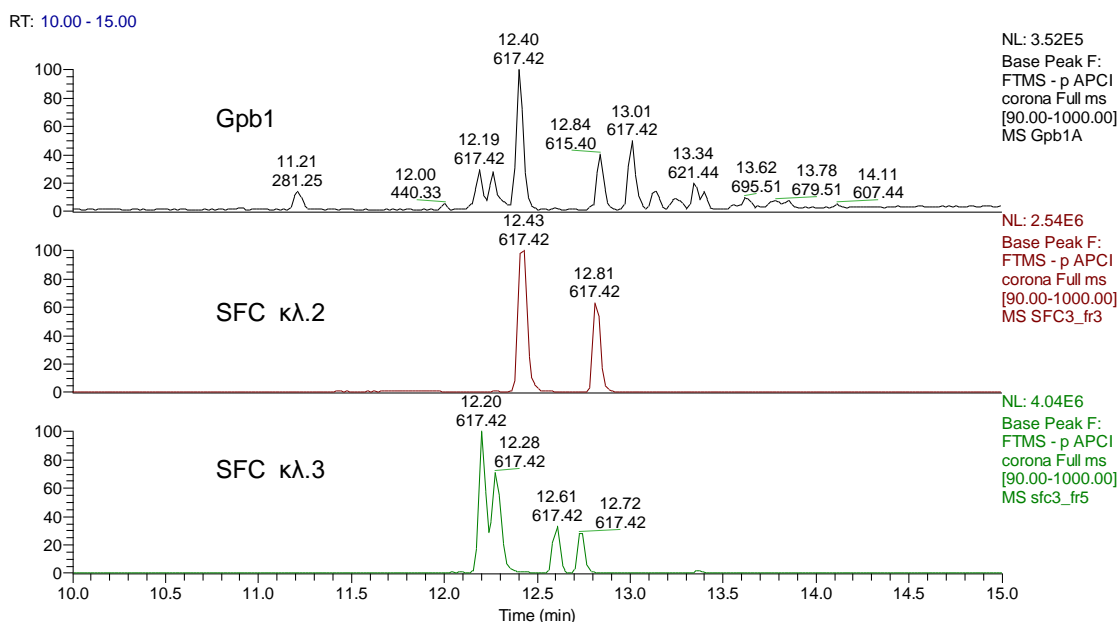
Εικόνα 6-22 Μεγέθυνση του χρωματογραφήματος HRMS –p APCI του αρχικού εκχυλίσματος Gpb1 (RBO) στην περιοχή έκλουσης της ΡγOR (10 έως 15 min) και αντιστοίχιση των κύριων συστατικών της ΡγOR με τις απομονωμένες ενώσεις της παρούσας εργασίας (Πίνακας 6-13)



Εικόνα 6-23 Χρωματογράφημα εξαγόμενων ιόντων (Extracted Ion Chromatograms-XICs) των κύριων ενώσεων της ΡγOR που ανιχνεύτηκαν στο αρχικό εκχύλισμα Gpb1 .

Οι ενώσεις με διαφορετικό χρόνο έκλουσης αλλά ίδιο ψευδομοριακό ιόν, ίδιο προτεινόμενο μοριακό τύπο και ίδιο βαθμό ακορεστότητας είναι ισομερείς ενώσεις. Σε όλα τα χρωματογραφήματα μάζας των κλασμάτων που παρελήφθησαν από τις διάφορες τεχνικές απομόνωσης των ενώσεων της ΡγOR, παρατηρούνται τουλάχιστον 2 κορυφές που αντιστοιχούν στο ισομερές ζεύγος *cis* & *trans* του

εκάστοτε φερουλικού εστέρα. Το NMR επιβεβαιώνει την ύπαρξη αυτών των ισομερών με το *trans* ισομερές να βρίσκεται πάντα σε αναλογία τουλάχιστον 2:1 σε σχέση με το *cis* και να εκλούεται πρώτο στην RP στήλη (Εικόνα 6-24). Ενδεικτικά, μπορεί να ειπωθεί ότι στα κλάσματα 2 & 3 του SFC PREP A, υπάρχουν τουλάχιστον έξι ισομερείς ενώσεις με ψευδομοριακό ιόν 617.42. Οι τόσο μικρές διαφορές μεταξύ των ενώσεων της ΡγOR καθιστούν κατανοητή τη δυσκολία απομόνωσης αυτών των ουσιών και τη χρησιμότητα της φασματομετρίας μάζας για την ταυτοποίηση όλων των ενώσεων αυτής της ομάδας.

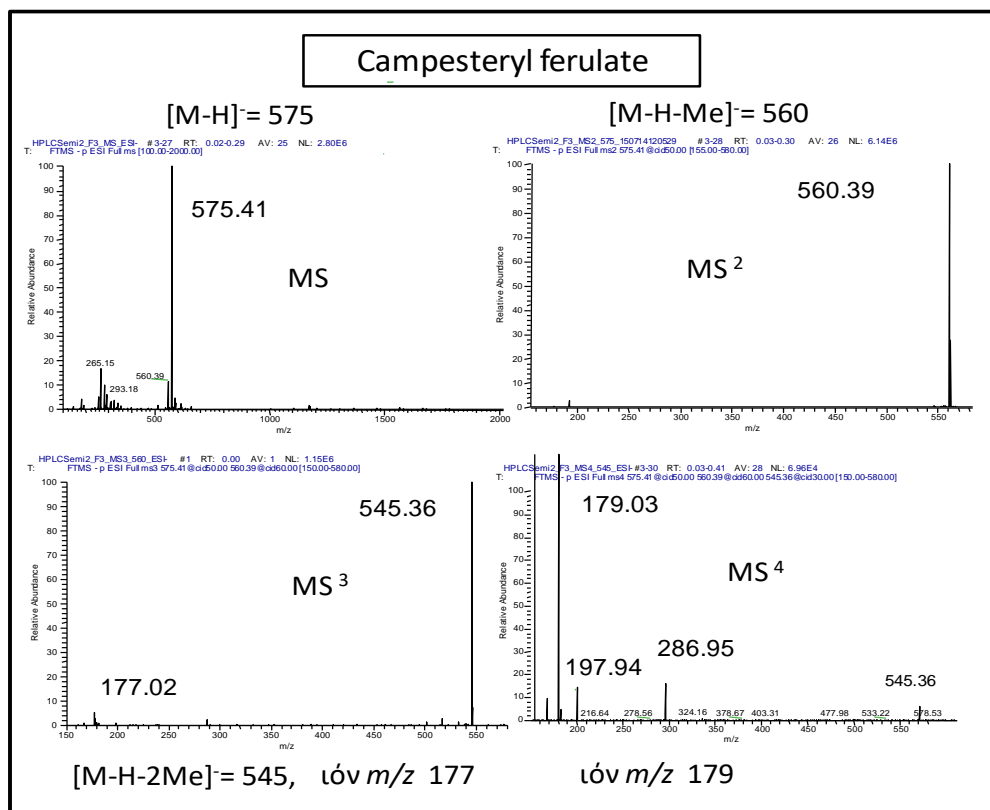
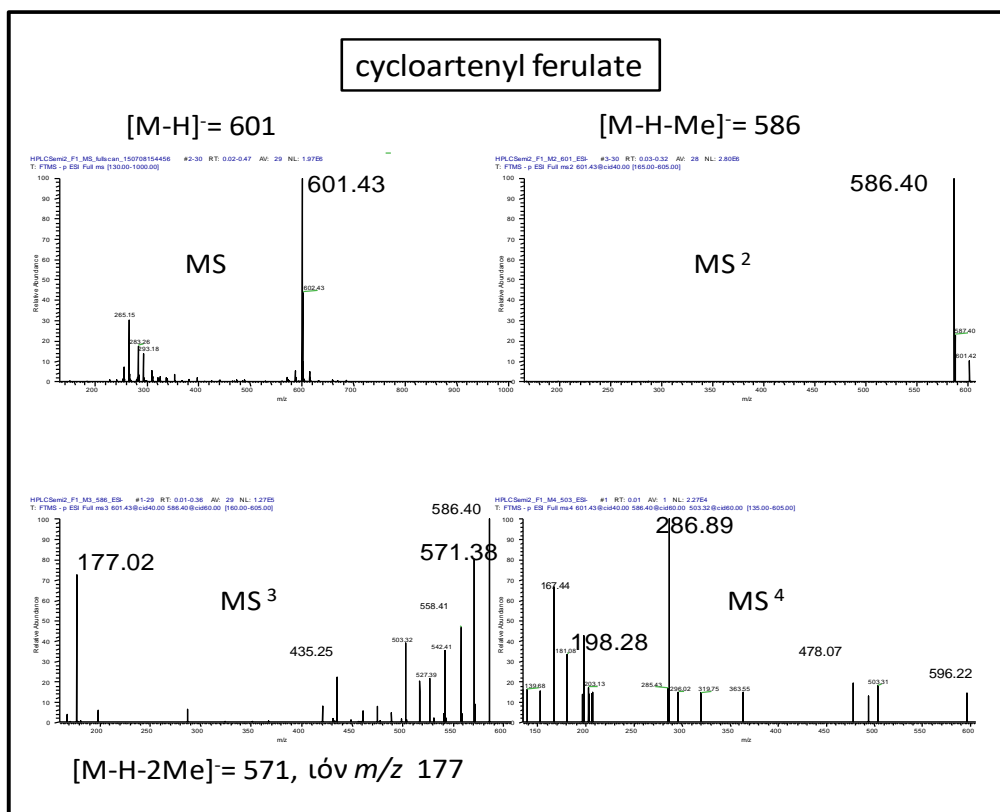


Εικόνα 6-24 Σύγκριση των LC-MS χρωματογραφημάτων του αρχικού εκχυλίσματος (Gpb1) και των κλασμάτων 2 & 3 του SFC PREP A.

Σε δεύτερο επίπεδο, έγινε λήψη φασμάτων μάζας και θραυσματοποίηση επιπέδου MS^2 , MS^3 και MS^4 στα κλάσματα που προέκυψαν από τις χρωματογραφικές τεχνικές απομόνωσης. Η παραγωγή ιόντων έγινε με την μέθοδο του ESI και APCI, σε αρνητικό ιονισμό.

Σε όλες τις ενώσεις, στο MS^2 παρατηρείται απώλεια της μεθυλο-ομάδας του φερουλικού οξέος $[M-H-Me]^-$, στο MS^3 παρατηρείται απώλεια κι ενός ακόμα μεθυλίου $[M-H-2Me]^-$ και το θραύσμα του φερουλικού οξέος ($[feruloyl]^- = 193$) στα m/z 177 ή 179. Στο παρελθόν έχει προταθεί απώλεια του 2^{ou} μεθυλίου της θέσης 10 για τα παράγωγα καμπεστερόλης με τον χαρακτηριστικό διπλό δεσμό μεταξύ θέσης 5 & 6 [8]. Ωστόσο στην παρούσα εργασία παρατηρήθηκε απώλεια 2^{ou} μεθυλίου σχεδόν σε όλα τα απομονωμένα μόρια (Πίνακας 6-12). Ο βαθμός καθαρότητας και η διαθέσιμη ποσότητα δεν επέτρεψε την λήψη κάποιου χαρακτηριστικού μοτίβου από την θραυσματοποίηση επιπέδου MS^3 και από την θραυσματοποίηση επιπέδου MS^4 δεν ήταν εφικτό να εξαχθεί κάποιο επιπλέον συμπέρασμα [8].

Παρ' όλα αυτά, τα χρωματογραφικά και φασματοσκοπικά δεδομένα που προέκυψαν από μια τέτοια ανάλυση, όπως ο χρόνος κατακράτησης (R_t), το φάσμα UV-Vis, ο βαθμός ακορεστότητας (RDB_{eq}) αλλά και οι εξαιρετικά ακριβείς μετρήσεις μάζας, παρέχουν εξαιρετικά σημαντική βοήθεια και έχουν ενσωματωθεί πλέον στην διαδικασία ταυτοποίησης των δευτερογενών μεταβολιτών.



Εικόνα 6-25 Ενδεικτική απεικόνιση της πορείας θραυσματοποίησης του *cycloartenyl ferulate* και του *campesteryl ferulate* μέσω φασμάτων HRMS/MS σε αρνητικό ιονισμό με τη μέθοδο του ηλεκτροψεκασμού (ESI).

Πίνακας 6-13 Χρωματογραφικά και φασματομετρικά δεδομένα των δευτερογενών μεταβολιτών που ανιχνεύθηκαν στο εκχύλισμα *Grb1* και τα κλάσματα των χρωματογραφικών τεχνικών.

	Rt (min)	m/z Ψευδομοριακό ιόν [M-H] ⁻	Μοριακός τύπος [M-H] ⁻	RDB _{eq}	MS ² [M-H-Me] ⁻	MS ³ [M-H-2Me] ⁻	Θραύσματα
γ-ορυζανόλη							
OR1	16.12	601.43	C ₄₀ H ₅₇ O ₄	12.5	586	571	177
OR2	16.63	615.44	C ₄₁ H ₅₉ O ₄	12.5	600	585	177
OR3	16.86	575.41	C ₃₈ H ₅₅ O ₄	11.5	560	545	179
OR4	17.57	589.43	C ₃₉ H ₅₇ O ₄	11.5	574	559	179
OR5	17.65	577.43	C ₃₈ H ₅₇ O ₄	10.5	562	547	177
OR6	18.41	591.44	C ₃₉ H ₅₉ O ₄	10.5	576		177
πολική γ-ορυζανόλη							
POR2	12.19, 12.28	617.42	C ₄₀ H ₅₇ O ₅	12.5	602	587	177
POR1	12.34, 12.74	633.41	C ₄₀ H ₅₇ O ₆	12.5			
POR3	12.40, 12.81	617.42	C ₄₀ H ₅₇ O ₅	12.5	602	587	177
POR2	12.61, 12.72	617.42	C ₄₀ H ₅₇ O ₅	12.5	602	587	177
POR4	12.87, 13.17	615.40	C ₄₀ H ₅₅ O ₅	13.5			
POR5	13.78	593.42	C ₃₈ H ₅₇ O ₅	10.5	578	563	177
POR6	14.11	607.44	C ₃₉ H ₅₉ O ₅	10.5	592	577	177

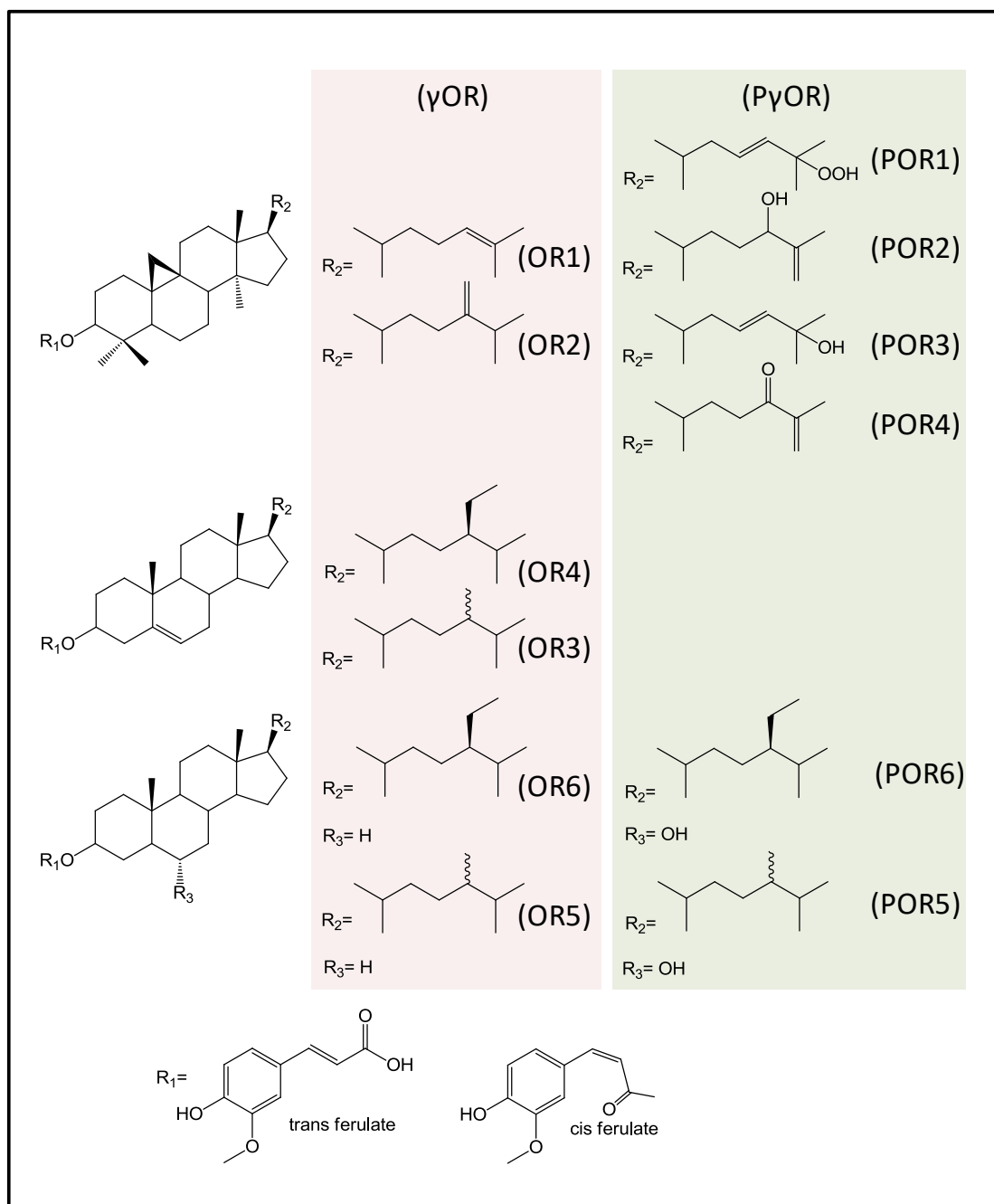
6.5.2 Ταυτοποίηση των ενώσεων της γ-ορυζανόλης (γOR) και της πολικής γ-ορυζανόλης (PγOR)

Από τη μελέτη του ρυζελαίου προερχόμενο από την εκχύλιση του πίτουρου *Gladio parboiled* ¹⁰⁵ κώνος με EtOAc, απομονώθηκαν συνολικά **12 τριτερπενικοί φερουλικοί εστέρες**. Αν διαχωρίσουμε τις απομονωμένες ουσίες με βάση το πλήθος των οξυγόνων που υπάρχουν στις ουσίες, έξι ανήκουν στην ομάδα της γOR και έξι στην ομάδα της PγOR. Από αυτές 2 ανήκουν στην ομάδα των κυκλοαρτανίων **cycloartenyl ferulate (OR1)**, **24-methylene-cycloartenyl ferulate (OR2)** και 4 στην ομάδα των φυτοστερολών, **campesteryl ferulate (OR3)**, **β-sitosteryl ferulate (OR4)**, **campestanyl ferulate (OR5)**, **sitostanyl ferulate (OR6)**). Οι έξι ενώσεις που ανήκουν στην ομάδα της PγOR έχουν τουλάχιστον μία επιπλέον υδροξυλομάδα, οπότε και παρατηρείται τουλάχιστον ένα επιπλέον οξυγόνο στον μοριακό τύπο. Στην ομάδα της PγOR η *cis* & *trans* μορφή του κάθε εστέρα δεν ήταν εφικτό να διαχωριστούν. Οπότε για κάθε μία από τις ακόλουθες ουσίες που απομονώθηκαν συνυπάρχει με τον *trans* και ο *cis* φερουλικός εστέρας. Από την ομάδα της PγOR, τέσσερις ανήκουν στους εστέρες κυκλοαρτανίων, **25-hydroperoxy-cycloart-23E-en-3β-ol ferulate (POR1)**, **(24R)-cycloart-25-ene-3β,24-diol-3β ferulate & (24S)-cycloart-25-ene-3β,24-diol-3β ferulate (POR2)**, **Cycloart-23Z-ene3β,25-diol-3β ferulate (POR3)**, **Cycloart-26-methylen-24-oxo-3β-ol ferulate (POR4)**, και δύο στους εστέρες στανόλης, **6-hydroxy-campestanyl ferulate (POR5)** και **6-hydroxy-sitostanyl ferulate (POR6)**.

Για την ταυτοποίηση τους χρησιμοποιήθηκαν οι εξής δυο τεχνικές:

- Φασματομετρία μάζας υψηλής διαχωριστικής ικανότητας (High Resolution MS, High Resolution MS/MS)
- Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)

Συνδυάζοντας τα δεδομένα από τη φασματομετρία μάζας, με τη φασματοσκοπία NMR 1D (¹H, ¹³C) & 2D (HSQC-DEPT, HMBC, COSY) και βιβλιογραφικά δεδομένα έγινε δυνατή η ταυτοποίηση και η απόδοση της δομής των ενώσεων της γOR και της PγOR.

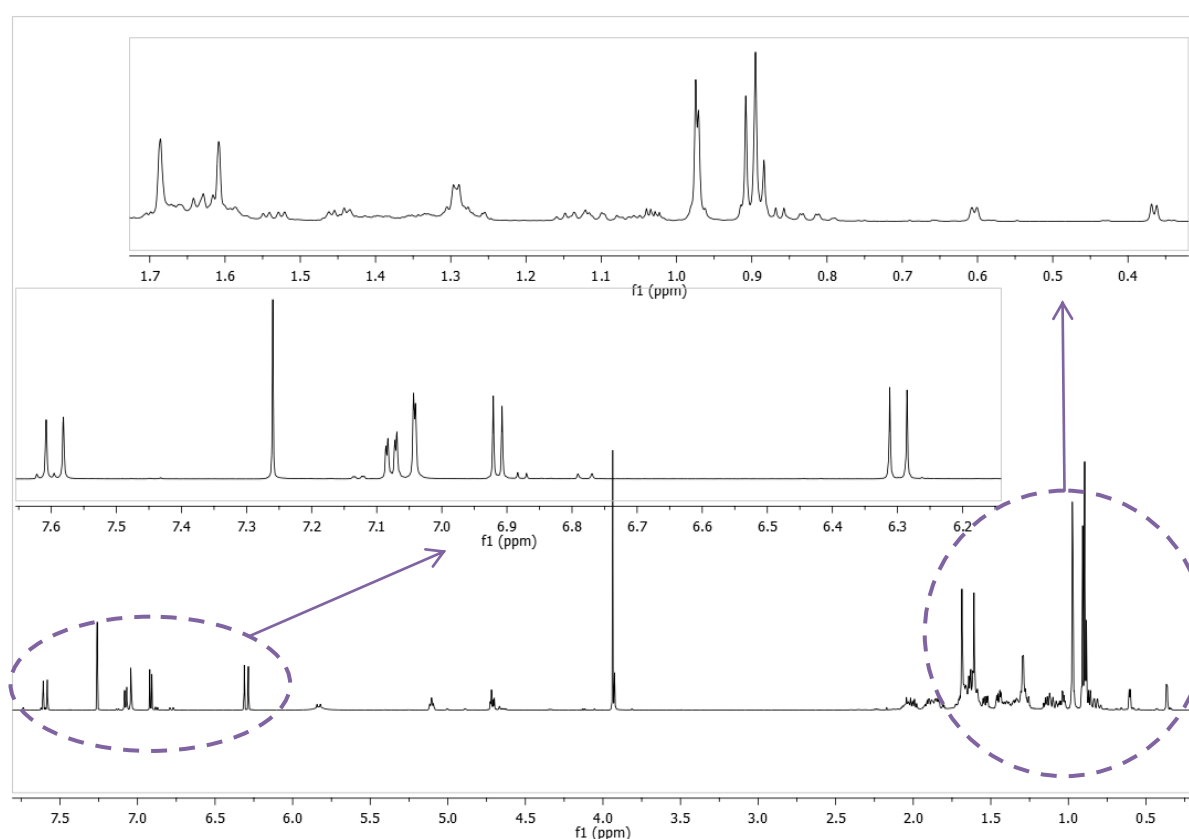


Εικόνα 6-26 Συγκεντρωτικός πίνακας των απομονωμένων ενώσεων της γOR & της $P\gamma OR$.

Από την ομάδα της γOR , οι (OR5) & (OR6) παρ' ότι έχουν αναφερθεί στο παρελθόν υπάρχουν ελλιπή φασματοσκοπικά δεδομένα. Οι υπόλοιπες γOR έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί μέσω NMR και HRMS και στο παρελθόν. Από την ομάδα της $P\gamma OR$, οι (POR1), (POR4), (POR5), (POR6) είναι καινούρια φυσικά προϊόντα, ενώ οι άλλες δύο έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί ξανά.

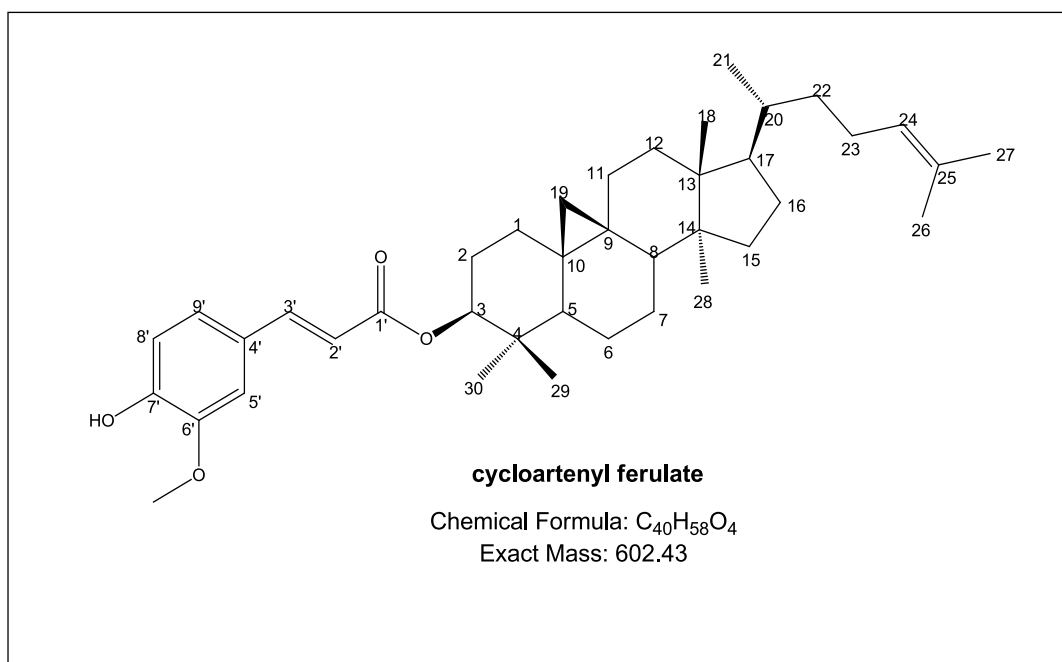
6.5.3 Ταυτοποίηση 6 ενώσεων της γ -ορυζανόλης (γ OR)

Οι έξι ουσίες της γ OR απομονώθηκαν από το κλάσμα [160-162] του CPC ύστερα από επεξεργασία με semi prep-HPLC (Εικόνα 6-9). Εμφανίζονται ως μωβ-κηλίδα ύστερα από ανάπτυξη με διάλυμα θειικής βανιλίνης και με το ίδιο Rf. Η λήψη των φασμάτων μάζας των μορίων έγινε με φασματογράφο μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας HRMS με την μέθοδο του ηλεκροψεκασμού (ESI), σε αρνητικό ιονισμό. Για την καθεμία από τις παρακάτω ουσίες καθορίστηκε το μοριακό βάρος που αντιστοιχεί σε συγκεκριμένο μοριακό τύπο. Το RDB των μορίων κυμαίνεται από 10,5-13,5 το οποίο συμφωνεί με τα βιβλιογραφικά δεδομένα που αφορούν την γ OR [12].

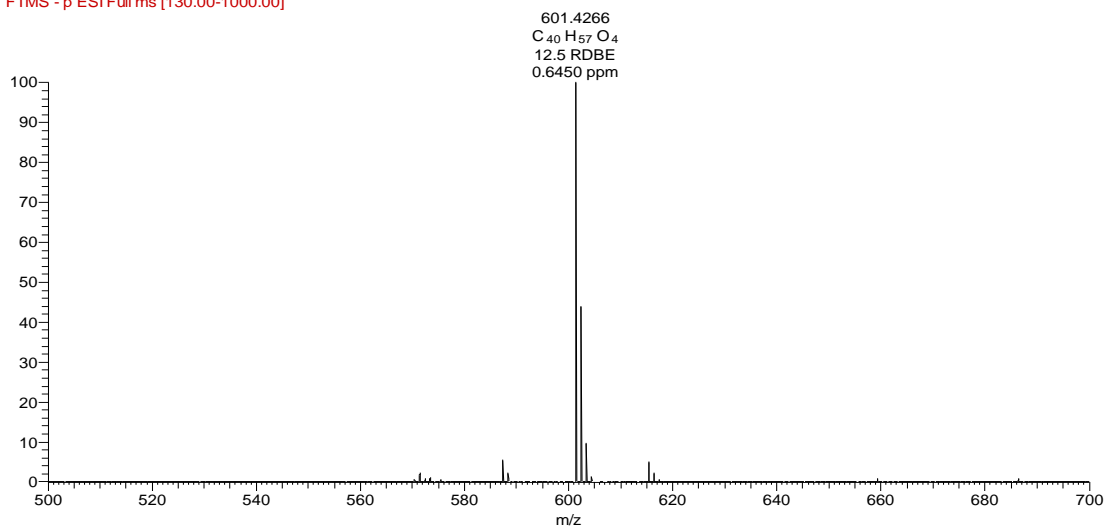


Εικόνα 6-27 Χαρακτηριστικό φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της *cycloartenyl ferulate* (OR1) σε CDCl_3 .

Cycloartenyl ferulate (OR1)

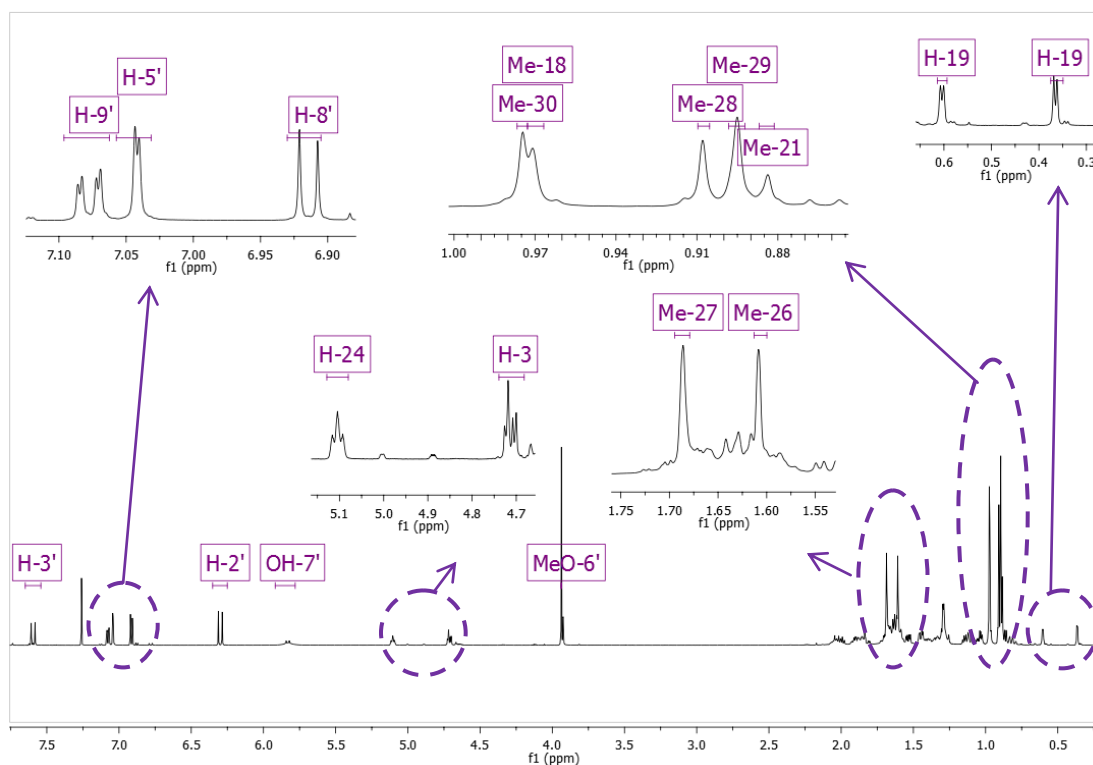


HPLCSemi2_F1_MS_fullscan_150708154456 #5-26 RT: 0.07-0.41 AV: 22 NL: 1.84E6
F: FTMS - p ESI Full ms [130.00-1000.00]



Εικόνα 6-28 Φάσμα HRMS πλήρους σάρωσης (Full Scan) της cycloartenyl ferulate (OR1)

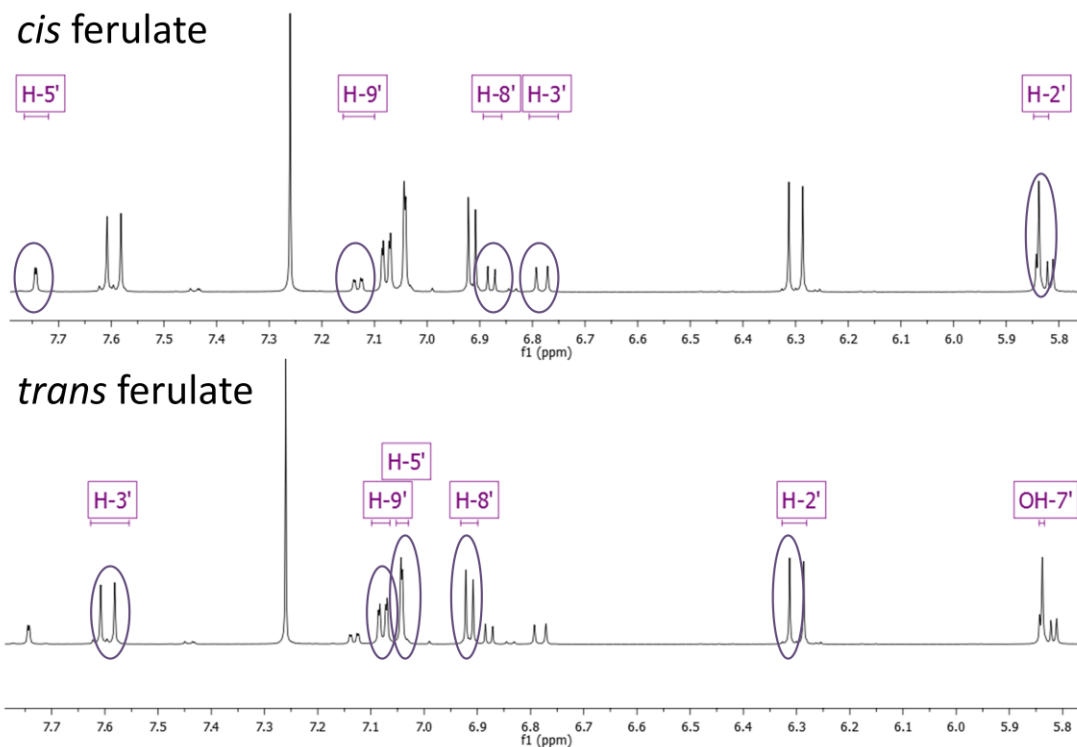
Το φάσμα μάζας του μορίου ελήφθη με φασματογράφο μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας HRMS με την μέθοδο του ηλεκροψεκασμού (ESI), σε αρνητικό ιονισμό. Έτσι καθορίστηκε το μοριακό βάρος της ουσίας MB: 602.4266 που αντιστοιχεί σε μοριακό τύπο $C_{40}H_{58}O_4$ ($RDB_{eq}= 12.5$). Η δομή των μορίων Cycloartenyl trans & cis ferulate (OR1) προσδιορίστηκε με βάση τη φασματοσκοπία NMR (^{13}C , DEPT, COSY, HSQC-DEPT, HMBC).



Εικόνα 6-29 Χαρακτηριστικά σήματα στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της *cycloartenyl ferulate* (OR1) σε CDCl_3 .

Η λήψη φασμάτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR αποτέλεσε τη βάση για την απόδοση της δομής του συγκεκριμένου φυσικού προϊόντος. Ειδικότερα:

Η ανάλυση του φάσματος $^1\text{H NMR}$ παρουσιάζει ένα ζεύγος διπλών κορυφών (d) ($J=3.92$ Hz) στη περιοχή των υψηλών πεδίων στα 0.60 και 0.36 ppm, το οποίο είναι χαρακτηριστικό των πρωτονίων στη θέση 19 της κυκλοπρότυλο ομάδας των κυκλοαρτανίων. Μεταξύ 0.88 και 1.80 ppm του φάσματος εμφανίζονται 6 απλές κορυφές, και μία διπλή κορυφή κάθε μια εκ των οποίων ολοκληρώνει για 3 πρωτόνια. Στα 0.97 ppm, οι δυο απλές κορυφές που ολοκληρώνουν για τρία πρωτόνια αντιστοιχούν στα Me-30 και Me-18. Στα 0.89 ppm συναντώνται μια διπλή κορυφή και μια απλή, που ολοκληρώνουν συνολικά για 6 πρωτόνια και αντιστοιχούν στα μεθύλια 21 (3H, d, $J= 6.53$ Hz) και 29 (3H, s) αντίστοιχα. Η απλή κορυφή στα 0.90 ppm, ολοκληρώνει για 3 πρωτόνια και αντιστοιχεί στο μεθύλιο 28 (3H, s). Οι δυο πιο αποθωρακισμένες απλές κορυφές στα 1.61 και 1.68 ppm αντιστοιχούν σε μεθύλια ενός διπλού δεσμού (CH₃-26, CH₃-27 αντίστοιχα), ενώ οι υπόλοιπες κορυφές αφορούν τα αλειφατικά μεθυλένια και μεθίνια του βασικού στεροειδικού σκελετού, οι χημικές μετατοπίσεις των οποίων φαίνονται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα. Στα 4.73 ppm μια διπλή διπλών (dd, $J= 4.70, 10.21$ Hz) αντιστοιχεί στο μεθίλιο της θέσης 3 ενωμένο με καρβονύλιο του εστέρα (CH-OC=OR) όπως επεξηγείται παρακάτω.



Εικόνα 6-30 Χαρακτηριστικά σήματα στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του *trans* & *cis* φερουλικού τμήματος των ενώσεων της γOR σε CDCl_3 .

Η παρουσία κορυφών στην αρωματική περιοχή (7.6 έως 6.0 ppm) υποδεικνύει την παρουσία ενός αρωματικού συστήματος. Το αρωματικό σύστημα χαρακτηρίζεται από ένα σύστημα 3 σημάτων, το οποίο αποτελείται από μια διπλή διπλών στα 7.08 ppm (H-9', dd, $J = 1.90, 8.11$ Hz) που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο, μια διπλή στα 7.04 ppm (H-5', d, $J = 1.90\text{Hz}$) και μια διπλή στα 6.92 ppm με σταθερά σύζευξης 8.11 Hz (H-8', d, $J = 8.11$ Hz). Το αρωματικό αυτό σύστημα είναι γνωστό με την ονομασία ABX.

Επίσης, στην αρωματική περιοχή εμφανίζονται κορυφές που αφορούν έναν *trans* διπλό δεσμό όπως αποδεικνύεται από την παρουσία ενός ζεύγους διπλών κορυφών με σταθερά σύζευξης 15.87 Hz, οι οποίες αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-3' και H-2', ο οποίος βρίσκεται σε συζυγία με τον βενζολικό πυρήνα και με το καρβονύλιο όπως αποδεικνύεται από $^2J, ^3J$ συζεύξεις με τους άνθρακες του βενζολικού πυρήνα αλλά και του καρβονυλίου, όπως αυτές αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα.

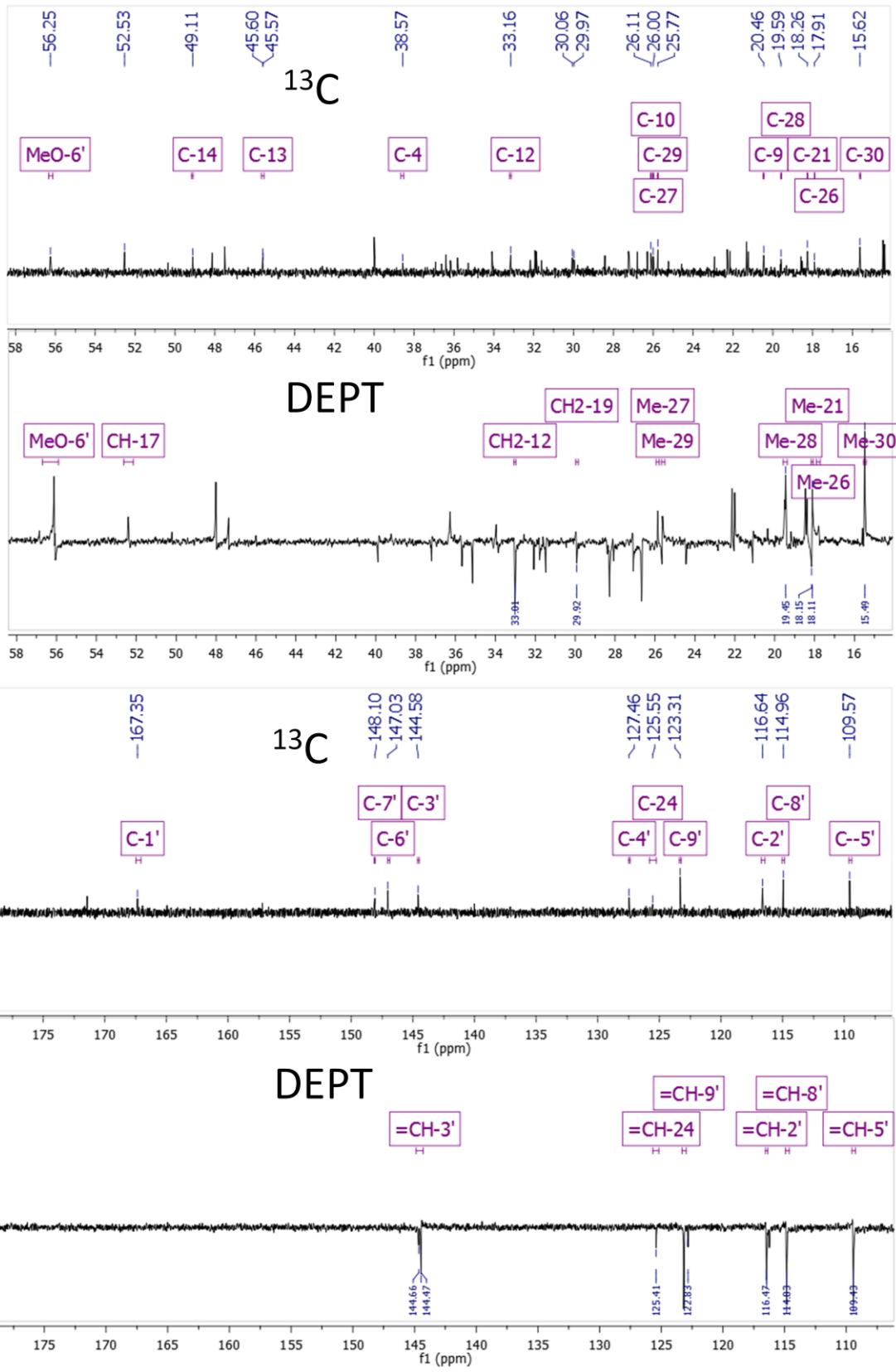
Η απλή κορυφή στα 5.83 ppm που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο αντιστοιχεί στο πρωτονίου του υδροξυλίου όπως φαίνεται από την απουσία σήματος στο HSQC-DEPT από την 2J σύζευξη του πρωτονίου με τον C-7' (147.76 ppm) και την 3J σύζευξη με τον C-8' (114.87 ppm).

Στα 3.93 ppm του φάσματος ^1H NMR διακρίνεται ένα σήμα χαρακτηριστικό της παρουσίας μεθοξυ-ομάδας στην ένωση. Η θέση της μεθοξυ-ομάδας καθορίστηκε με βάση το HSQC-DEPT και το HMBC, όπου διακρίνεται 3J σύζευξη των πρωτονίων της μεθοξυ-ομάδας με τον C-6' ο οποίος συντονίζεται στα 146.76 ppm.

Εκτός από το *trans*, υπάρχει και το *cis* ισομερές του εστέρα της κυκλοαρτενόλης σε αναλογία *trans/cis*, 3:1. Τα σήματα του *cis* ισομερούς αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα. Παρατηρείται και πάλι ένα ABX σύστημα, και ένας *cis* διπλός δεσμός μεταξύ H-2', H-3' με σταθερά σύζευξης 12.9 Hz. Με βάση το φάσμα HMBC, καθορίζεται και πάλι η σύνδεση του φερουλικού τμήματος στον C-3 της κυκλοαρτενόλης.

Πίνακας 6-14 Φασματοσκοπικά δεδομένα (600 MHz, CDCl_3) του μίγματος *cis* & *trans* φερουλικού τμήματος των ενώσεων της γOR .

Atom	^{13}C (ppm)	^1H (ppm)	Integration, Mult/ty, (J (Hz))	HMBC
<i>trans</i>				
1'	167.02	-	-	
2'	116.52	6.29	1H, d, (15.84Hz)	1', 4', 3'
3'	144.62	7.59	1H, d, (15.84Hz)	5', 9', 1', 2', 4'
4'	127.20	-	-	
5'	109.48	7.04	1H, d, (1.90Hz)	3', 7', 9'
6'	146.88	-	-	
7'	147.76	-	-	
8'	114.87	6.92	1H, d, (8.11Hz)	7', 4'
9'	123.23	7.08	1H, dd, (8.11, 1.90 Hz)	5', 3'
6' CH_3O	56.06	3.93	3H, s	6'
7' OH		5.83	1H, brs	7'
<i>cis</i>				
1'	166.16	-	-	
2'	116.52	6.29	1H, d, (12.90)	1', 4', 3'
3'	143.56	6.78	1H, d, (12.90)	5', 9', 1'
4'	127.35	-	-	
5'	112.98	7.74	1H, d, (1.90)	9', 3', 6'
6'	146.77	-	-	
7'	147.06	-	-	
8'	114.00	6.89	1H, d, (8.28)	4', 7'
9'	125.71	7.13	1H, dd, (8.28, 1.90)	5', 3', 7'
6' CH_3O	56.06	3.93	3H, s	6'
7' OH		5.83	1H, brs	7'



Εικόνα 6-31 Χαρακτηριστικά σήματα στο φάσμα ^{13}C -NMR των ενώσεων της γOR σε CDCl_3 .

Τα φάσματα του ^{13}C NMR και DEPT παρουσιάζουν:

- Οχτώ μεθύλια εκ των οποίων τα επτά τοποθετούνται στη περιοχή των υψηλών πεδίων και το ένα, αρκετά αποθωρακισμένο, αντιστοιχεί στη μεθόξυ ομάδα.
- Έντεκα μεθυλένια με χαρακτηριστικό για την ομάδα των κυκλοαρτανίων το μεθυλένιο της θέσης 19.
- Έντεκα μεθίνια με χαρακτηριστικά τα πιο αποθωρακισμένα μεθίνια, όπως το μεθίνιο της θέσης 24 (δ 125.47) που ανήκει στον αιθυλενικό διπλό δεσμό της πλευρικής αλυσίδας, το μεθίνιο της θέσης 3 (δ 80.63) που συνδέεται με το φερουλικό τμήμα της ένωσης και τα πέντε μεθίνια του αρωματικού συστήματος.
- Δέκα τεταρτοταγείς άνθρακες εκ των οποίων οι τέσσερις βρίσκονται στην αρωματική περιοχή, ο ένας αντιστοιχεί σε καρβονύλιο άνθρακα στα 167.02 ppm και ο άλλος ανήκει σε αιθυλενικό διπλό δεσμό με sp^2 υβριδισμό στα 131.00 ppm στη θέση 25.

Η εξέταση του φάσματος HMBC αποκαλύπτει συσχετίσεις, με 3J σύζευξη μεταξύ του H-3 και του καρβονυλίου στα 167.02 ppm (C-1') πράγμα που αποδεικνύει την εστεροποίηση στον C-3, αλλά και με τον άνθρακα μεθυλενίου της θέσης 1 που συντονίζεται στα 31.54 ppm. Διακρίνεται 2J σύζευξη για τον τεταρτοταγή άνθρακα της θέσης 4 στα 39.82 ppm, ο οποίος βρίσκεται σε 3J σύζευξη με τα μεθυλικά πρωτόνια των θέσεων 29 και 30.

Για τα μεθυλενικά πρωτόνια της θέσης 19 φαίνεται να υπάρχει 2J σύζευξη με τους τεταρτοταγείς άνθρακες των θέσεων 9 και 10 αλλά και 3J σύζευξη με τον μεθυλενικό άνθρακα της θέσης 1 και τους μεθινικούς άνθρακες των θέσεων 5 και 8.

Τα αποθωρακισμένα μεθυλικά πρωτόνια της θέσης 26 & 27 εμφανίζουν 2J και 3J σύζευξη με τον τεταρτοταγή άνθρακα στη θέση 25 (131.00 ppm) και με τον μεθινικό άνθρακα στη θέση 24 (125.47 ppm) του διπλού δεσμού αντίστοιχα. Παρατηρείται επίσης 3J σύζευξη μεταξύ των μεθυλίων 26 και 27. Το H-24 συζευγνύεται με 3J σύζευξη με τα μεθύλια 26 & 27 αλλά και με τον C-22 (δ 36.44). Η χημική μετατόπιση του C-22 επιβεβαιώνεται από τη 3J σύζευξη των μεθυλικών πρωτονίων της θέσης 21 με τον C-22.

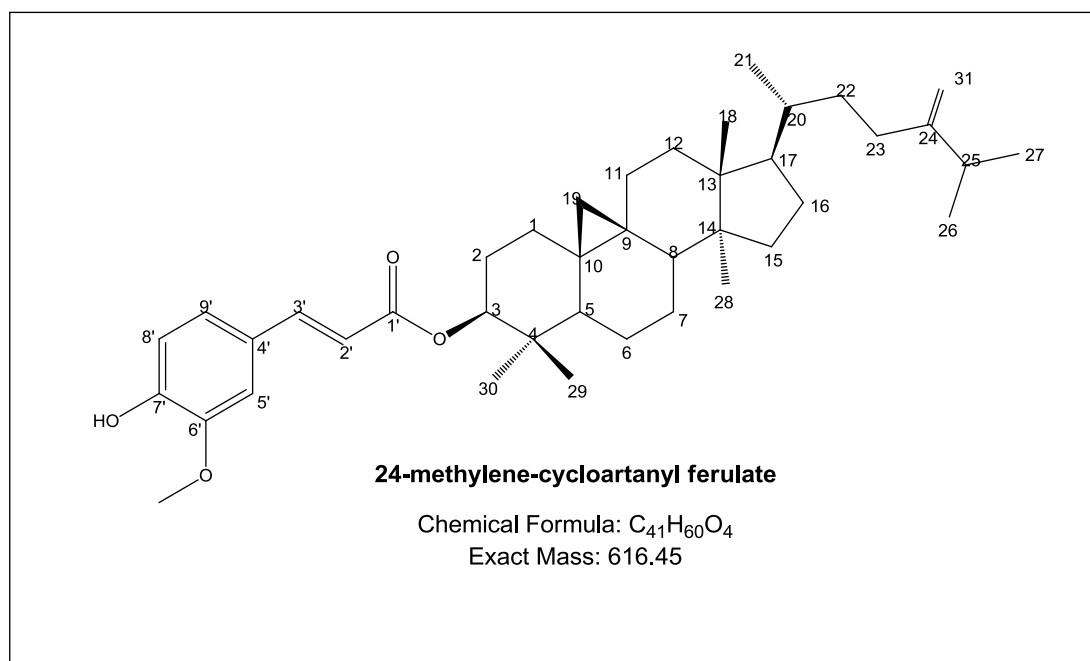
Μετά από παρατήρηση του φάσματος COSY προκύπτουν συσχετίσεις μεταξύ του H-3 με τα πρωτόνια της θέσης 2 στα 1.68 ppm και 1.85 ppm και μεταξύ του H-24 με τα βινυλικά πρωτόνια της θέσης 23 (2.01 και 1.83 ppm).

Πίνακας 6-15 Φασματοσκοπικά δεδομένα (600 MHz, CDCl₃) του cycloartenyl ferulate (OR1).

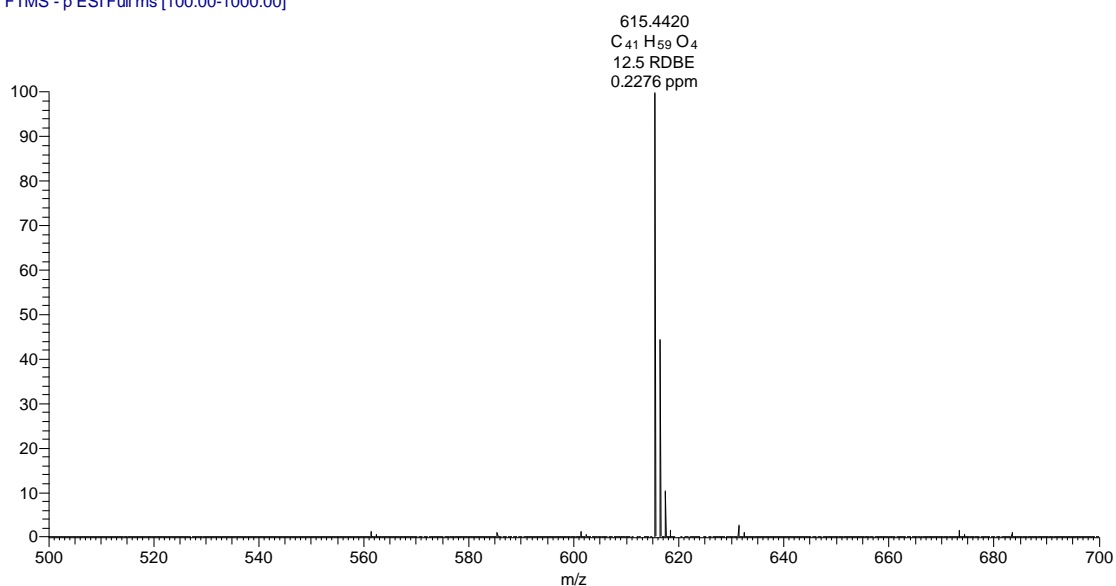
OR1	cycloartenyl ferulate			
Atom	¹³ C	¹ H (ppm)	Integration, Mult/ty, (J (Hz))	HMBC Correlations
1	31.61	1.66, 1.28	1H, m/ 1H, m	
2	26.80	1.85, 1.68	1H, m/ 1H, m	3, 4
3	80.63	4.71	1H, dd, (4.5, 10.21)	1', 30, 4, 1, 2
4	39.82	-	-	
5	47.42	1.44	1H, m	4, 30, 3, 29
6	21.00	1.6, 0.8	1H, m/ 1H, m	
7	28.27	1.9, 1.28	1H, m/ 1H, m	
8	47.92	1.52	1H, m	11
9	20.22	-	-	
10	26.22	-	-	
11	25.85	1.33, 1.11	1H, m/ 1H, m	9, 8
12	32.89	1.62	2H, m	18, 11, 13, 14,
13	45.77	-	-	
14	48.53	-	-	
15	35.90	1.30	2H, m	28, 13, 14,
16	26.33	2.00, 1.14	2H, m	13, 17, 14
17	52.37	1.58	1H, m	13, 14, 28,
18	17.99	0.97	3H, s	13, 17, 12, 14
19	29.78	0.60, 0.36	1H, d, (3.92)/ 1H, d, (3.92)	1, 10, 9, 5, 8
20	35.95	1.38	1H, m	
21	18.20	0.89	3H, d, (6.53)	20, 17
22	36.44	1.44, 1.04	2H, m	
23	25.00	1.83, 2.01	2H, m	27, 25, 24
24	125.47	5.11	1H, t, (6.01)	26, 27, 22
25	131.00	-	-	
26	17.65	1.61	3H, s	25, 24, 27
27	25.78	1.68	3H, s	25, 24, 26
28	19.30	0.90	3H, s	13, 14
29	25.54	0.89	3H, s	30, 4, 5, 3
30	15.36	0.97	3H, s	3, 4, 29
<i>Trans</i>				
1'	167.02	-	-	
2'	116.52	6.29	1H, d, (15.84Hz)	1', 4', 3'
3'	144.62	7.59	1H, d, (15.84Hz)	5', 9', 1', 2', 4'
4'	127.2	-	-	
5'	109.48	7.04	1H, d, (1.90Hz)	3', 7', 9'
6'	146.88	-	-	
7'	147.76	-	-	
8'	114.87	6.92	1H, d, (8.11Hz)	7', 4',
9'	123.23	7.08	1H, dd, (8.11, 1.90 Hz)	5', 3'
6' CH ₃ O	56.06	3.93	3H, s	6'
7' OH		5.83	1H, brs	7'
<i>Cis</i>				
1'	166.16	-	-	
2'	117.81	5.83	1H, d, (12.90Hz)	4', 1

3'	143.56	6.78	1H, d, (12.90Hz)	5', 9', 1'
4'	127.35	-	-	
5'	112.98	7.74	1H, d, (1.90)	9', 3', 6'
6'	146.77	-	-	
7'	147.06	-		
8'	114.00	6.89	1H, d, (8.28)	4', 7'
9'	125.71	7.13	1H, dd, (8.28, 1.90)	5', 3', 7'
6' CH ₃ O	56.06	3.93	3H, s	6'
7' OH		5.83	1H, brs	7'

24-methylene-cycloartanyl ferulate (OR2)

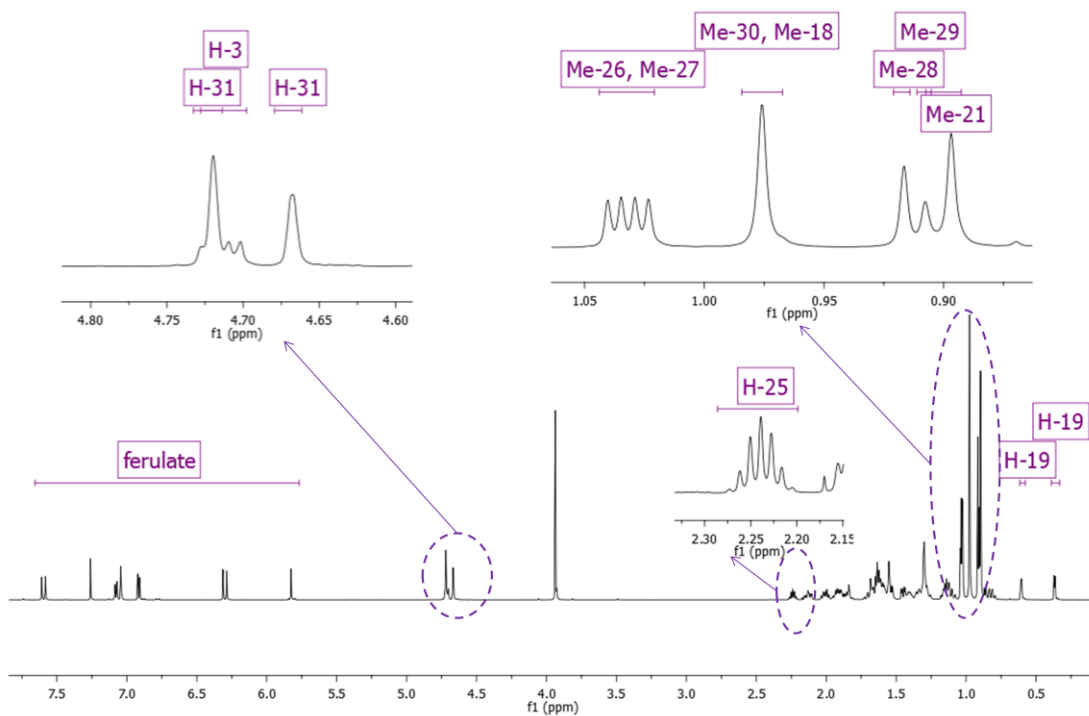


hplcsemi2_f2_ms_150708164255 #2-26 RT: 0.02-0.34 AV: 25 NL: 3.66E6
T: FTMS - p ESI Full ms [100.00-1000.00]



Εικόνα 6-32 Φάσμα HRMS πλήρους σάρωσης (Full Scan) της 24-methylene-cycloartanyl ferulate (OR2).

Το φάσμα μάζας του μορίου ελήφθη με φασματογράφο μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας HRMS με την μέθοδο του ηλεκροψεκασμού (ESI) σε αρνητικό ιονισμό. Έτσι καθορίστηκε το μοριακό βάρος της ουσίας MB: 616.4420 που αντιστοιχεί σε μοριακό τύπο $C_{41}H_{60}O_4$ ($RDB_{eq} = 12.5$). Η δομή των μορίων 24-methylene-cycloartanyl *trans* και *cis* ferulate (OR2) προσδιορίστηκε με βάση τη φασματοσκοπία NMR (1H , ^{13}C , DEPT, COSY, HSQC-DEPT, HMBC).



Εικόνα 6-33 Χαρακτηριστικά σήματα στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της *24-methylene-cycloartanyl ferulate* (OR2) σε CDCl_3 .

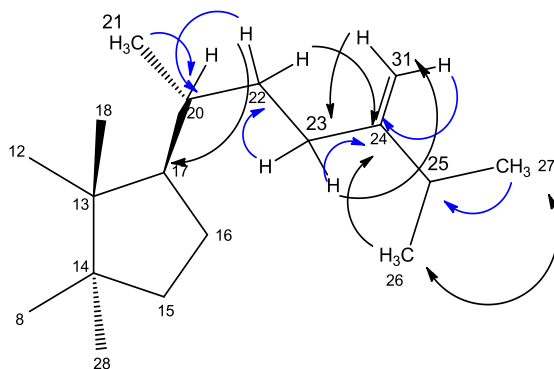
Η λήψη φασμάτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR αποτέλεσε τη βάση για την απόδοση της δομής του συγκεκριμένου φυσικού προϊόντος. Ειδικότερα:

Τα χαρακτηριστικά σήματα της κυκλοπρότυλο ομάδας της θέσης 19 και των μεθυλίων 18, 28, 29, 30, 21 στην αλειφατική περιοχή (τέσσερις απλές κορυφές και μία διπλή που ολοκληρώνουν για 3 πρωτόνια), το απόθωρακισμένο σήμα του C-3 στα ≈ 80 ppm και το ABX σύστημα στην αρωματική περιοχή συζευγμένο με *cis* ή *trans* διπλό δεσμό οδηγούν στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για τριτερπενικό φερουλικό εστέρα, παράγωγο της κυκλοαρτενόλης που διαφέρει από την ένωση (OR1) μόνο στην πλευρική αλυσίδα.

Το φάσμα $^1\text{H NMR}$ παρουσιάζει ορισμένες διαφορές. Στα 4.71 & 4.66 ppm εμφανίζονται 2 ευρείες απλές κορυφές, που ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η καθεμία και αντιστοιχούν σε πρωτόνια εξωμεθυλενίου της θέσης 31 όπως αποδεικνύεται παρακάτω με τη βοήθεια φάσματος HSQC-DEPT. Στα 1.03 ppm εμφανίζονται 2 διπλές κορυφές με σταθερά σύζευξης 7.6 Hz που ολοκληρώνουν για τρία πρωτόνια η καθεμία και αντιστοιχούν στα αποθωρακισμένα λόγω του διπλού δεσμού μεθύλια των θέσεων 26 & 27. Τέλος στα 2.23 ppm παρατηρείται μία επταπλή κορυφή που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στη θέση 25.

Τα φάσματα του $^{13}\text{C NMR}$ και DEPT παρουσιάζουν:

- Οχτώ μεθύλια εκ των οποίων τα επτά τοποθετούνται στη περιοχή των υψηλών πεδίων και το ένα, αρκετά αποθωρακισμένο, αντιστοιχεί στη μεθοξυ-ομάδα.
- Δώδεκα μεθυλένια εκ των οποίων 2 είναι χαρακτηριστικά. Το ένα αφορά το μεθυλένιο της θέσης 19, και το άλλο αφορά ένα αποθωρακισμένο εξωμεθυλένιο στα 105.91 ppm
- Δέκα μεθίνια εκ των οποίων τα πέντε ανήκουν στο αρωματικό σύστημα, το μεθίνιο της θέσης 3 (δ 80.63) τοποθετείται δίπλα σε καρβονύλιο εστέρα και ένα τοποθετείται δίπλα σε διπλό δεσμό (C-25) στα 33.69 ppm.
- Δέκα τεταρτοταγείς άνθρακες εκ των οποίων οι τέσσερις βρίσκονται στην αρωματική περιοχή, ο ένας αντιστοιχεί σε καρβονύλιο άνθρακα (C-1') στα 167.02 ppm και ο άλλος ανήκει σε διπλό δεσμό στα 156.37 ppm στη θέση 24.



Εικόνα 6-34 Τα μπλε βέλη απεικονίζουν τις 2J συζεύξεις και τα μαύρα τόξα απεικονίζουν τις 3J συζεύξεις του φάσματος HMBC της ένωσης (OR2).

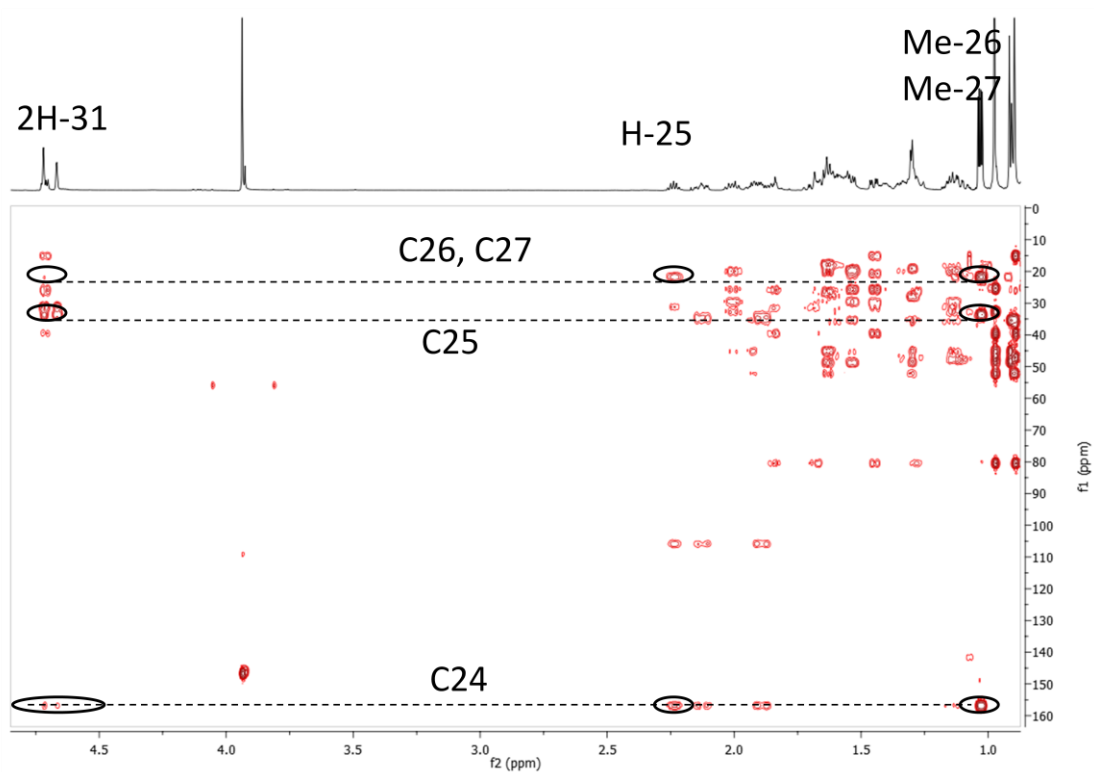
Με βάση τον μοριακό τύπο η ένωση έχει έναν επιπλέον άνθρακα, η θέση του οποίου επιβεβαιώνεται με τη βοήθεια των φασμάτων HSQC-DEPT, HMBC, COSY. Η δύο απλές κορυφές στα 4.66 και 4.71 ppm αντιστοιχούν σύμφωνα με το HSQC-DEPT στον ίδιο άνθρακα (δ 105.91), υποδηλώνοντας την ύπαρξη εξωμεθυλενίου. Η επταπλή κορυφή του H-25 και το γεγονός ότι τα μεθύλια 26 & 27 (δ 1.03) αντιστοιχούν στον ίδιο άνθρακα (δ 21.73), οδηγεί στο συμπέρασμα ότι σχηματίζεται μια ισοπρότυλο ομάδα ((CH₃)₂CH-). Σύμφωνα με το φάσμα HMBC, τα αποθωρακισμένα μεθύλια και τα εξωμεθυλενικά πρωτόνια συνδέονται με 3J & 2J σύζευξη αντίστοιχα με τον τεταρτοταγή άνθρακα του διπλού δεσμού γεγονός που τοποθετεί τον επιπλέον άνθρακα στη θέση 24 της ένωσης τύπου κυκλοαρτανίου. Το H-25 συνδέεται με σύζευξη 2J με τον C-25 και τα μεθύλια 26 & 27 και με σύζευξη 3J με τον C-31.

Μετά από παρατήρηση του φάσματος COSY προκύπτουν συσχετίσεις μεταξύ του H-3 με τα πρωτόνια της θέσης 2 στα 1.68 ppm και 1.85 ppm και μεταξύ του H-25 με τα μεθύλια 26 & 27.

Πίνακας 6-16 Φασματοσκοπικά δεδομένα (600 MHz, CDCl₃) του 24-methylene-cycloartanyl ferulate (OR2).

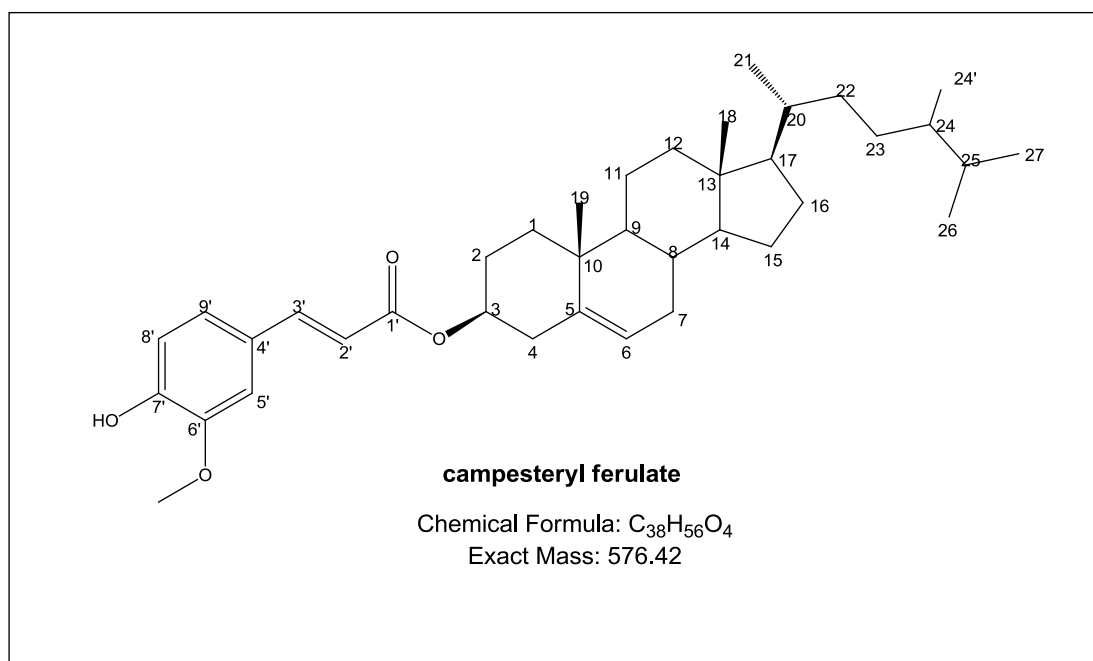
OR2	24-methylene-cycloartanyl ferulate			
Atom	¹³ C (ppm)	¹ H (ppm)	Integration, Mult/ty, (J (Hz))	HMBC Correlations
1	31.61	1.66, 1.28	1H, m/ 1H, m	
2	26.80	1.85,1.68	1H, m/ 1H, m	3, 4
3	80.63	4.71	1H, dd, (4.5, 10.21)	1', 30, 4, 1, 2
4	39.82	-	-	
5	47.42	1.44	1H, m	4, 30, 3, 29
6	21.00	1.6, 0.8	1H, m/ 1H, m	
7	28.27	1.9, 1.28	1H, m/ 1H, m	
8	47.92	1.52	1H, m	11
9	20.22	-	-	
10	26.22	-	-	
11	25.74	1.33, 1.11	1H, m/ 1H, m	
12	33.13	1.62	2H, m	17, 13, 18, 17
13	45.77	-	-	
14	48.53	-	-	
15	35.90	1.30	2H, m	28, 13,14, 17
16	26.46	2.01, 1.14	2H, m	14, 13, 28
17	52.02	1.62	1H, m	
18	18.20	0.97	3H, s	
19	29.80	0.60, 0.37	1H, d, (3.92)/ 1H, d, (3.92)	
20	35.90	1.41	1H, m	
21	18.56	0.89	3H, d, (6.4)	20
22	34.91	1.58, 1.14	2H, m	17, 24, 23, 20
23	31.64	2.12, 1.89	2H, m	22, 31, 24,
24	156.37	-	-	
25	33.69	2.23	1H, sept, (6.79)	24,26,27, 31
26	21.73	1.03	3H, d, (6.7)	27, 25, 24
27	21.73	1.03	3H, d, (6.7)	26, 25, 24
28	19.08	0.91	3H,s	
29	25.29	0.89	3H,s	
30	15.01	0.97	3H,s	
31	105.91	4.71, 4.66	2H, brs	24, 23, 25
<i>trans</i>				
1'	167.02	-	-	
2'	116.52	6.29	1H, d, (15.84Hz)	1', 4', 3'
3'	144.62	7.59	1H, d, (15.84Hz)	5', 9', 1', 2', 4'
4'	127.20	-	-	
5'	109.48	7.04	1H, d, (1.90Hz)	3', 7', 9'
6'	146.88	-	-	
7'	147.76	-	-	

8'	114.87	6.92	1H, d, (8.11Hz)	7', 4',
9'	123.23	7.08	1H, dd, (8.11, 1.90 Hz)	5', 3'
6' CH ₃ O	56.06	3.93	3H, s	6'
7' OH		5.83	1H, brs	7'
<i>cis</i>				
1'	166.16	-	-	
2'	117.81	5.83	1H, d, (12.90Hz)	4', 1
3'	143.56	6.78	1H, d, (12.90Hz)	5', 9', 1'
4'	127.35	-	-	
5'	112.98	7.74	1H, d, (1.90)	9', 3', 6'
6'	146.77	-	-	
7'	147.06	-		
8'	114.00	6.89	1H, d, (8.28)	4', 7'
9'	125.71	7.13	1H, dd, (8.28, 1.90)	5', 3', 7'
6' CH ₃ O	56.06	3.93	3H, s	6'
7' OH		5.83	1H, brs	7'

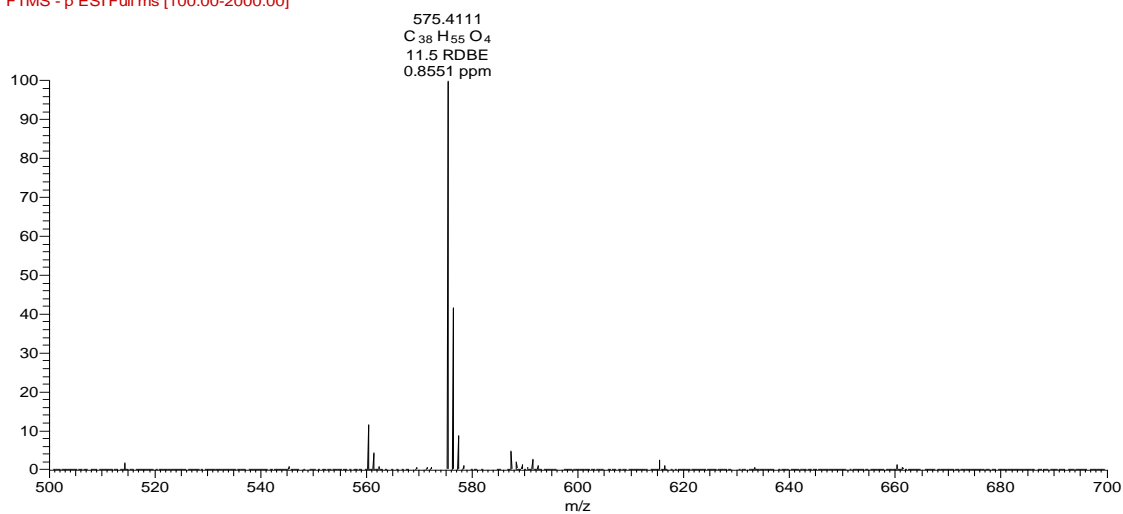


Εικόνα 6-35 Χαρακτηριστικές συζεύξεις στο HMBC φάσμα (CDCl₃) της πλευρικής αλυσίδας της ένωσης (OR2).

Campesteryl ferulate (OR3)



hplcsemi2_f3_ms_esi- #6-29 RT: 0.06-0.32 AV: 24 NL: 2.72E6
F: FTMS - p ESI Full ms [100.00-2000.00]

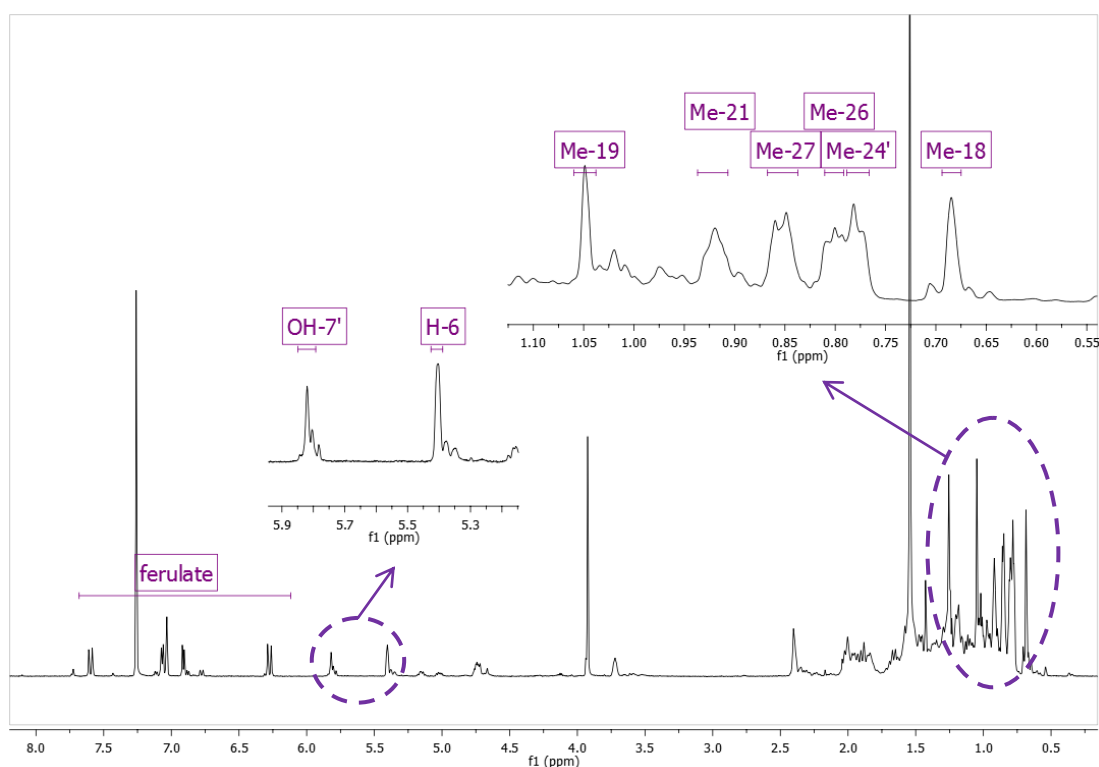


Εικόνα 6-36 Φάσμα HRMS πλήρους σάρωσης (Full Scan) της Campesteryl ferulate (OR3).

Το φάσμα μάζας του μορίου ελήφθη με φασματογράφο μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας HRMS με την μέθοδο του ηλεκροψεκασμού (ESI) σε αρνητικό ιονισμό. Έτσι καθορίστηκε το μοριακό βάρος της ουσίας MB: 576.4111 που αντιστοιχεί σε μοριακό τύπο $C_{38}H_{56}O_4$ ($RDB_{eq}=11.5$). Η δομή των μορίων campesteryl *trans* & *cis* ferulate (OR3) προσδιορίστηκε με βάση τη φασματοσκοπία NMR (1H , HSQC-DEPT, HMBC).

Η λήψη φασμάτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR αποτέλεσε τη βάση για την απόδοση της δομής του συγκεκριμένου φυσικού προϊόντος. Ειδικότερα:

Η ανάλυση του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ σε σύγκριση με την ένωση (OR1) και (OR2) υποδεικνύει την χαρακτηριστική απουσία των H-19, δηλαδή της κυκλοπρότυλο ομάδας καθώς και ενός μεθυλίου. Παράλληλα παρατηρούνται όλα τα σήματα φερουλικού οξέος και μάλιστα εστεροποιημένου όπως αποδεικνύεται από τον C-3. Τα παραπάνω υποδηλώνουν την απουσία κυκλοαρτανίου ως βασικό σκελετό. Ωστόσο, υπάρχουν και πάλι αρκετές ομοιότητες που οδηγούν στην ύπαρξη στερόλης, όπως το θωρακισμένο σήμα του C-3 στα ≈ 74 ppm σε σχέση με το αποθωρακισμένο σήμα στα ≈ 80 ppm που συναντάται στους εστέρες κυκλοαρτανίου.



Εικόνα 6-37 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) του *campesteryl ferulate* (OR3).

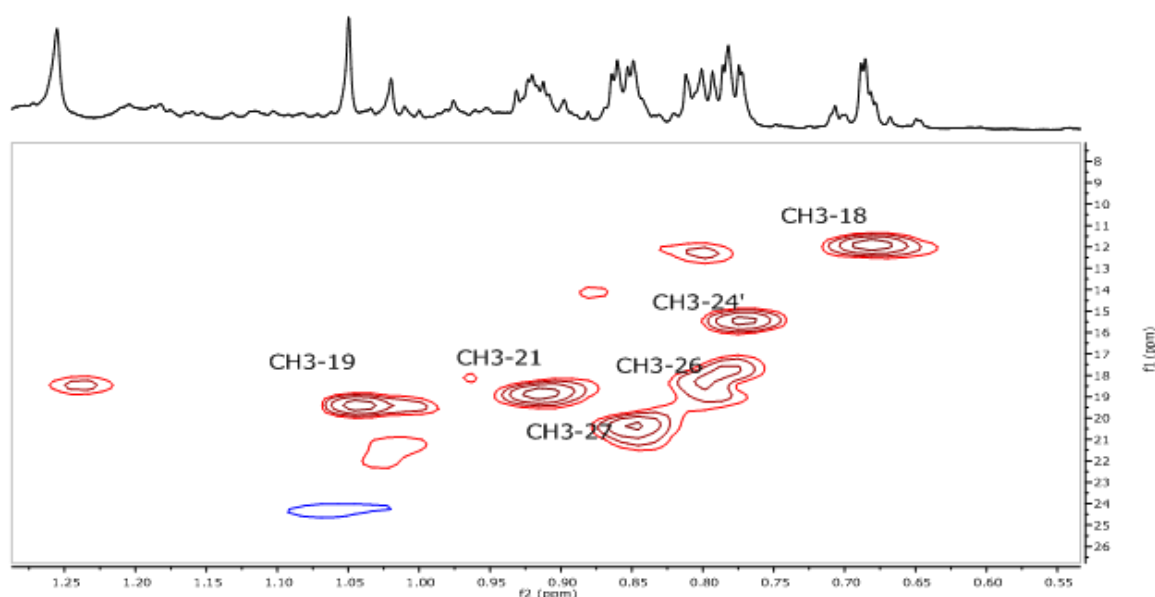
Συγκεκριμένα, στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης (OR3) μεταξύ 0.6 και 1.80 ppm παρατηρούνται έξι μεθύλια. Δύο απλές κορυφές στα 0.68 & 1.04 ppm αντιστοιχούν στα μεθύλια των θέσεων 18 και 19. Τέσσερις διπλές κορυφές στα 0.80, 0.85, 0.78 και 0.92 ppm αντιστοιχούν στα μεθύλια των θέσεων 27, 26, 24', 21. Στα 5.41 ppm παρατηρείται ένα ολεφινικό υδρογόνο που αντιστοιχεί στον διπλό δεσμό μεταξύ θέσης 5 και 6.

Σύμφωνα με το φάσμα COSY, το H-3 συνδέεται με το H-2 (δ 1.66) και το H-4 (δ 2.40). Με τη βοήθεια του HSQC-DEPT, βρέθηκαν οι χημικές μετατοπίσεις των ανθράκων αυτών. Σύμφωνα με το φάσμα HMBC, στο στεροειδικό σκελετό το H-4 συνδέεται με 2J & με 3J με τους άνθρακες του διπλού δεσμού C-5 (δ 139.53) και C-6 (δ 122.93). Τα H-4 συνδέονται ακόμα με τον C-3, τον C-10 και τον C-2. Τα πρωτόνια

του Me-19 συνδέονται με 3J σύζευξη με τον τεταρτοταγή αποθωρακισμένο άνθρακα της θέσης 5 και με 2J , τους C-10 και C-9. Αντίστοιχα, το ολεφινικό πρωτόνιο H-6 (δ 5.40) συνδέεται με 3J σύζευξη με τον τεταρτοταγή C-10 αλλά και με τους αιθυλενικούς άνθρακες των θέσεων 4 & 7. Με οδηγό τις συζεύξεις κυρίως των H-3 & H-4 αντιστοιχούνται τα σήματα των φασμάτων στον Α και Β δακτύλιο του στεροειδικού σκελετού.

Η πλευρική αλυσίδα διαμορφώνεται επίσης με τη βοήθεια του φάσματος HMBC. Τα πρωτόνια των μεθυλίων 26 & 27 συνδέονται με σύζευξη 2J με τον C-25 και με 3J μεταξύ τους. Το Me-24' συνδέεται με σύζευξη 2J με τον C-24 και με σύζευξη 3J με τον C-25.

Τα σήματα αυτά είναι χαρακτηριστικά της ένωσης της καμπεστερόλης. Η campesteryl ferulate (OR3) έχει απομονωθεί ξανά από το πίσυρο από τους Bao et al. [172] στην έρευνα των οποίων έχουν δημοσιευτεί φασματοσκοπικά δεδομένα ^{13}C NMR & 1H NMR. Η ανάλυση των φασμάτων HMBC, HSQC-DEPT σε συνδυασμό με βιβλιογραφικά δεδομένα βοήθησε στην συμπλήρωση του παρακάτω πίνακα, όπου παρουσιάζονται αναλυτικά τα σήματα ^{13}C , 1H και οι συσχετίσεις με 3J & 2J με γειτονικούς άνθρακες με αποτέλεσμα την απόδοση δομής της ένωσης (OR3) [172], [83], [102].



Εικόνα 6-38 Χαρακτηριστικά μεθύλια στο φάσμα HSQC-DEPT ($CDCl_3$) του campesteryl ferulate (OR3).

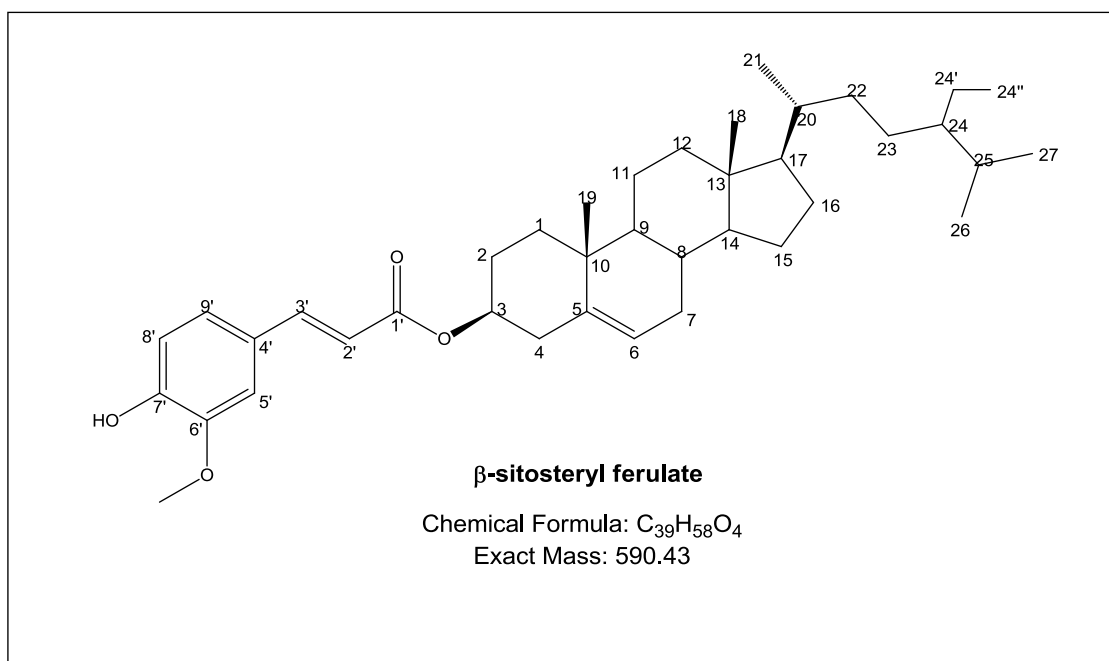
Πίνακας 6-17 Φασματοσκοπικά δεδομένα (600 MHz, CDCl₃) του campesteryl ferulate (OR3).

OR3	campesteryl ferulate			
Atom	¹³ C (ppm)	¹ H (ppm)	Integration, Mult/ty, (J (Hz))	HMBC Correlations
1	36.49	1.88, 1.17	1H, m/ 1H, m	
2	27.98	1.92, 1.66	1H, m/ 1H, m	3
3	74.04	4.74	1H, m	
4	38.34	2.39	2H, m	10, 2, 3, 5, 6
5	139.53	-	-	
6	122.93	5.41	1H, m	7, 4, 10
7	31.98	1.99, 1.57	1H, m/ 1H, m	
8	31.97	1.46	1H, m	7, 9
9	50.18	0.98	1H, m	12
10	36.67	-	-	
11	21.00	1.52	2H, m	9
12	39.54	2.00, 1.16	1H, m/ 1H, m	
13	42.46	-	-	
14	56.82	1.00	1H, m	9
15	24.37	1.58, 1.07	1H, m/ 1H, m	
16	28.20	1.85, 1.26	1H, m/ 1H, m	
17	56.17	1.11	1H, m	
18	11.92	0.68	3H, s	12, 17
19	19.42	1.04	3H, s	10, 5, 9
20	35.70	1.35	1H, m	22
21	18.86	0.92	3H, d, (6.3)	17, 22
22	33.94	1.3, 1.06	1H, m/ 1H, m	
23	30.36	1.20, 1.10	1H, m/ 1H, m	
24	39.06	1.20	1H, m	
25	32.54	1.51	1H, m	26, 27
26	20.37	0.85	3H, d, (6.8)	27, 25
27	18.37	0.80	3H, d, (6.8)	26, 25
24'	15.45	0.77	3H, d, (6.7)	24, 25
<i>Trans</i>				
1'	167.02	-	-	
2'	116.52	6.29	1H, d, (15.84Hz)	1', 4', 3'
3'	144.62	7.59	1H, d, (15.84Hz)	5', 9', 1', 2', 4'
4'	127.20	-	-	
5'	109.48	7.04	1H, d, (1.90Hz)	3', 7', 9'
6'	146.88	-	-	
7'	147.76	-	-	
8'	114.87	6.92	1H, d, (8.11Hz)	7', 4',
9'	123.23	7.08	1H, dd, (8.11, 1.90 Hz)	5', 3'
6' CH ₃ O	56.06	3.93	3H, s	6'
7' OH		5.83	1H, brs	7'
<i>Cis</i>				
1'	166.16	-	-	
2'	117.81	5.83	1H, d, (12.90Hz)	4', 1
3'	143.56	6.78	1H, d, (12.90Hz)	5', 9', 1'
4'	127.35	-	-	

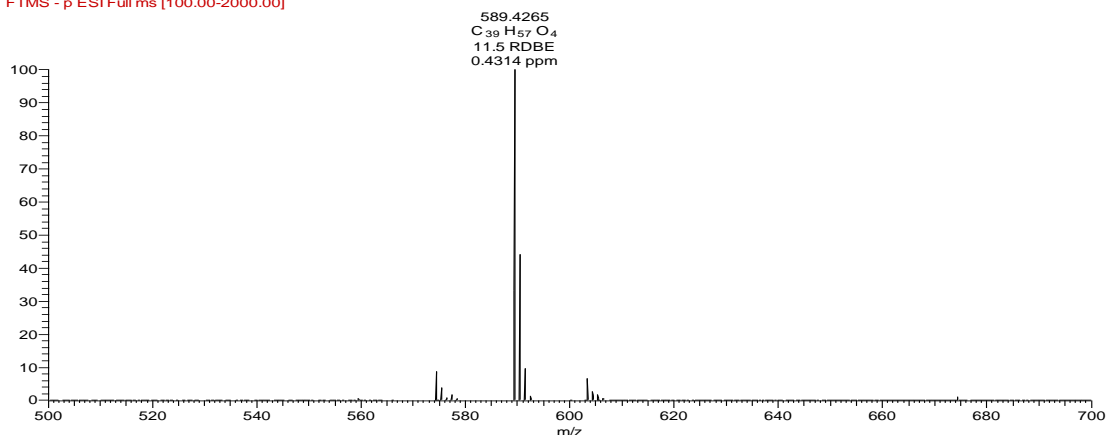
5'	112.98	7.74	1H, d, (1.90)	9', 3', 6'
6'	146.77	-	-	
7'	147.06	-		
8'	114.00	6.89	1H, d, (8.28)	4', 7'
9'	125.71	7.13	1H, dd, (8.28, 1.90)	5', 3', 7'
6' CH ₃ O	56.06	3.93	3H, s	6'
7' OH		5.83	1H, brs	7'

Συνοπτικά λοιπόν, η ένωση (OR3) αποτελείται από 7 μεθύλια εκ των οποίων το ένα αντιστοιχεί στην μεθοξυ-ομάδα του φερουλικού τμήματος, 10 μεθυλένια, 14 μεθίλια με πιο χαρακτηριστικά το μεθίνιο της θέσης 3 και το μεθίνιο του διπλού δεσμού στη θέση 6 και τα πέντε μεθίλια του φερουλικού τμήματος. Τέλος, έχει 7 τεταρτοταγείς άνθρακες, με πιο χαρακτηριστικούς, τον C-5 του διπλού δεσμού και τους άνθρακες του φερουλικού τμήματος.

β -sitosteryl ferulate (OR4)

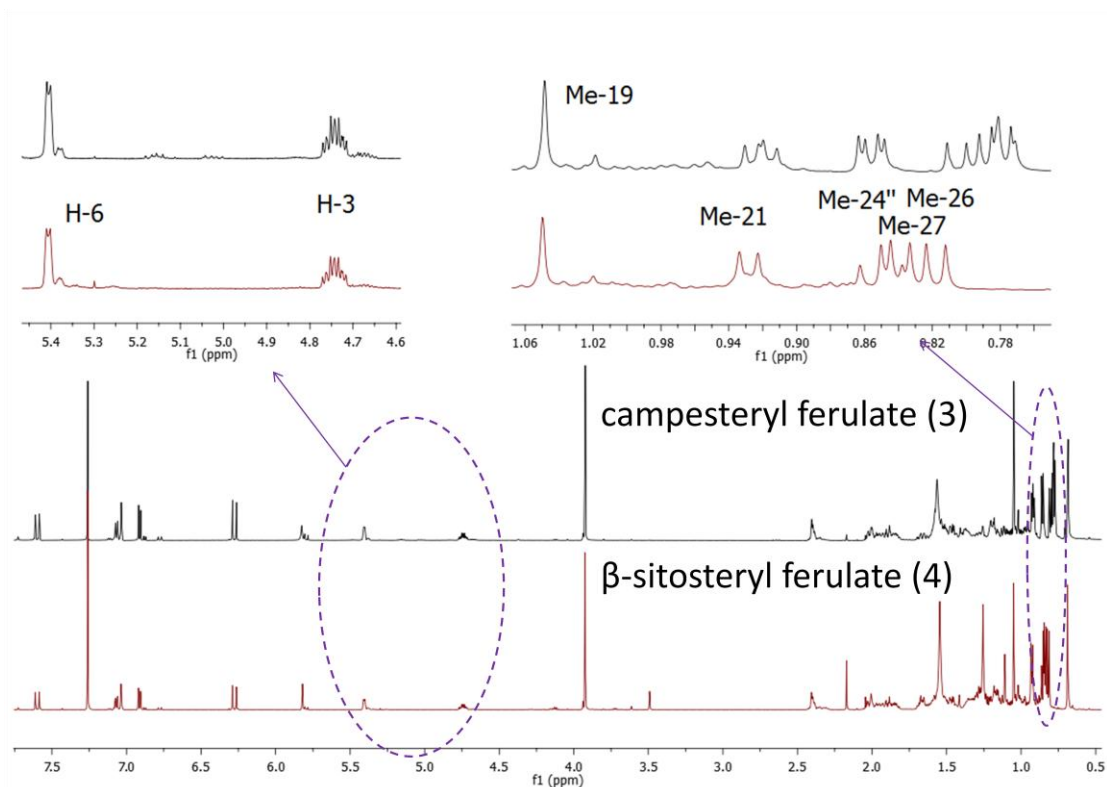


hplcsemi2_f4_ms_esi- #2-28 RT: 0.02-0.33 AV: 27 NL: 4.28E6
F: FTMS - p ESI Full ms [100.00-2000.00]



***Εικόνα 6-39* Φάσμα HRMS πλήρους σάρωσης (Full Scan) της β -sitosteryl ferulate (OR4).**

Το φάσμα μάζας του μορίου ελήφθη με φασματογράφο μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας HRMS με την μέθοδο του ηλεκροψεκασμού (ESI) σε αρνητικό ιονισμό. Έτσι καθορίστηκε το μοριακό βάρος της ουσίας MB: 590.4265 που αντιστοιχεί σε μοριακό τύπο $C_{39}H_{58}O_4$ ($RDB_{eq}=11.5$). Η δομή των μορίων β -sitosteryl *trans* & *cis* ferulate (OR4) προσδιορίστηκε με βάση τη φασματοσκοπία NMR (1H , HSQC-DEPT, HMBC, COSY).



Εικόνα 6-40 Σύγκριση των χαρακτηριστικών σημάτων του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) των ενώσεων (OR3) & (OR4).

Η λήψη φασμάτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR αποτέλεσε τη βάση για την απόδοση της δομής του συγκεκριμένου φυσικού προϊόντος. Ειδικότερα:

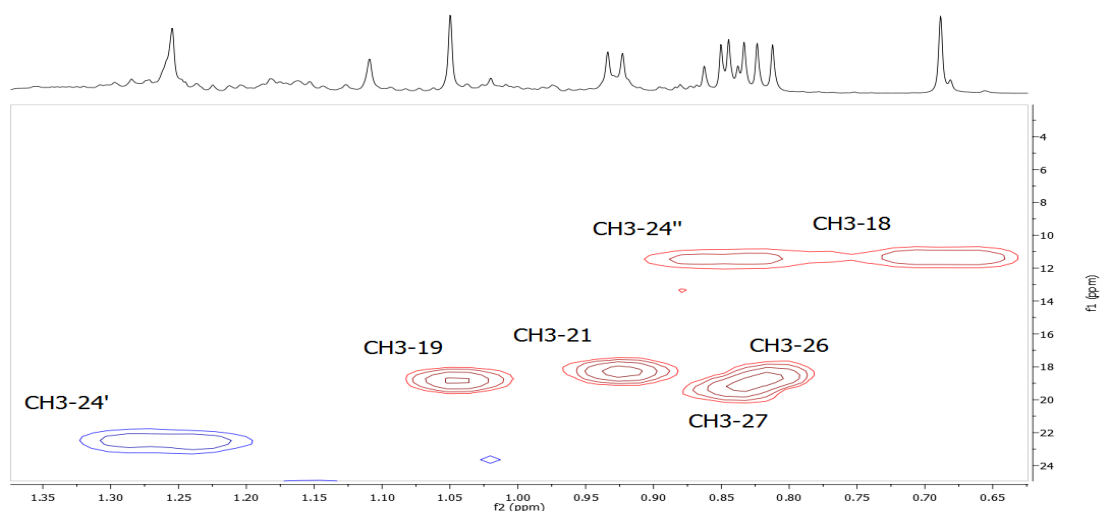
Η ανάλυση του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ σε σύγκριση με την ένωση (OR1) και (OR2) υποδεικνύει την χαρακτηριστική απουσία των H-19, δηλαδή της κυκλοπρότυλο ομάδας καθώς και ενός μεθυλίου. Παράλληλα παρατηρούνται όλα τα σήματα φερουλικού οξέος και μάλιστα εστεροποιημένου όπως αποδεικνύεται από τον C-3. Τα παραπάνω υποδηλώνουν την απουσία κυκλοαρτανίου ως βασικό σκελετό. Ωστόσο, όπως και προηγουμένως στην ένωση (OR3), υπάρχουν και πάλι αρκετές ομοιότητες που οδηγούν στην ύπαρξη στερόλης, όπως το θωρακισμένο σήμα του C-3 στα ≈ 74 ppm σε σχέση με το αποθωρακισμένο σήμα στα ≈ 80 ppm που συναντάται στους εστέρες κυκλοαρτανίου. Ακόμα, η ένωση (OR4) παρουσιάζει πολλές ομοιότητες με την ένωση (OR3). Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ εντοπίζονται διαφορές μόνο στην αλειφατική περιοχή των υψηλών πεδίων .

Συγκεκριμένα, στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης (OR4) μεταξύ 0.60 και 1.80 ppm παρατηρούνται έξι μεθύλια. Όπως και στην ένωση (OR3), δύο απλές κορυφές στα 0.68 και 1.04 ppm αντιστοιχούν στα μεθύλια των θέσεων 18 και 19 και στα 5.41 ppm παρατηρείται ένα ολεφινικό υδρογόνο που αντιστοιχεί στον διπλό δεσμό μεταξύ θέσης 5 και 6. Σε αντίθεση με το φάσμα της ένωσης (OR3), παρατηρούνται τρεις

διπλές κορυφές στα 0.82, 0.84 και 0.92 ppm που αντιστοιχούν στα μεθύλια των θέσεων 26, 27 και 21 και μία τριπλή κορυφή στα 0.85 ppm που αντιστοιχεί στο μεθύλιο της θέσης 24".

Η πλευρική αλυσίδα διαμορφώνεται με τη βοήθεια κυρίως του φάσματος HMBC. Τα πρωτόνια των μεθυλίων 26 & 27 συνδέονται με σύζευξη 2J με τον C-25 και με 3J μεταξύ τους αλλά και με τον C-24 (δ 45.46). Με τη βοήθεια του φάσματος COSY επιβεβαιώνεται η θέση του H-25 λόγω 2J μεταξύ των πρωτονίων 27, 25. Το H-25 (δ 1.66) συνδέεται με σύζευξη 2J με τα μεθύλια 26 & 27 και με 3J με τον C-24 και τον C-24'. Με τον C-24' συνδέεται επίσης με σύζευξη 2J τα πρωτόνια του Me-24". Τέλος, το H-24 συνδέεται και με τους δυο άνθρακες της αιθυλο ομάδας (C-24' & C-24") αλλά και με τον C-25, ενώ η θέση του διπλού δεσμού μεταξύ C-5, C-6 επιβεβαιώνεται όπως προηγουμένως στην ένωση (OR3). Διαφέρει λοιπόν από την ένωση (OR3), μόνο κατά την ύπαρξη ενός επιπλέον μεθυλενίου, το οποίο τοποθετείται ως αίθυλο ομάδα στη θέση 24 της πλευρικής αλυσίδας.

Τα σήματα αυτά είναι χαρακτηριστικά της ένωσης της β -σιτοστερόλης. Η β -sitosteryl ferulate (OR4) έχει απομονωθεί ξανά από το πítουρο από τους Akihisa et al. [83] και τους Yakusawa et al. [102] στις έρευνες των οποίων έχουν δημοσιευτεί φασματοσκοπικά δεδομένα 1H NMR. Η ανάλυση των φασμάτων HMBC, HMQC & COSY σε συνδυασμό με βιβλιογραφικά δεδομένα βοήθησε στην συμπλήρωση του παρακάτω πίνακα, όπου παρουσιάζονται αναλυτικά τα σήματα ^{13}C , 1H και οι συσχετίσεις με 3J & 2J με γειτονικούς άνθρακες με αποτέλεσμα την απόδοση δομής των ενώσεων (OR4) [173], [174], [172], [175], [83], [102].



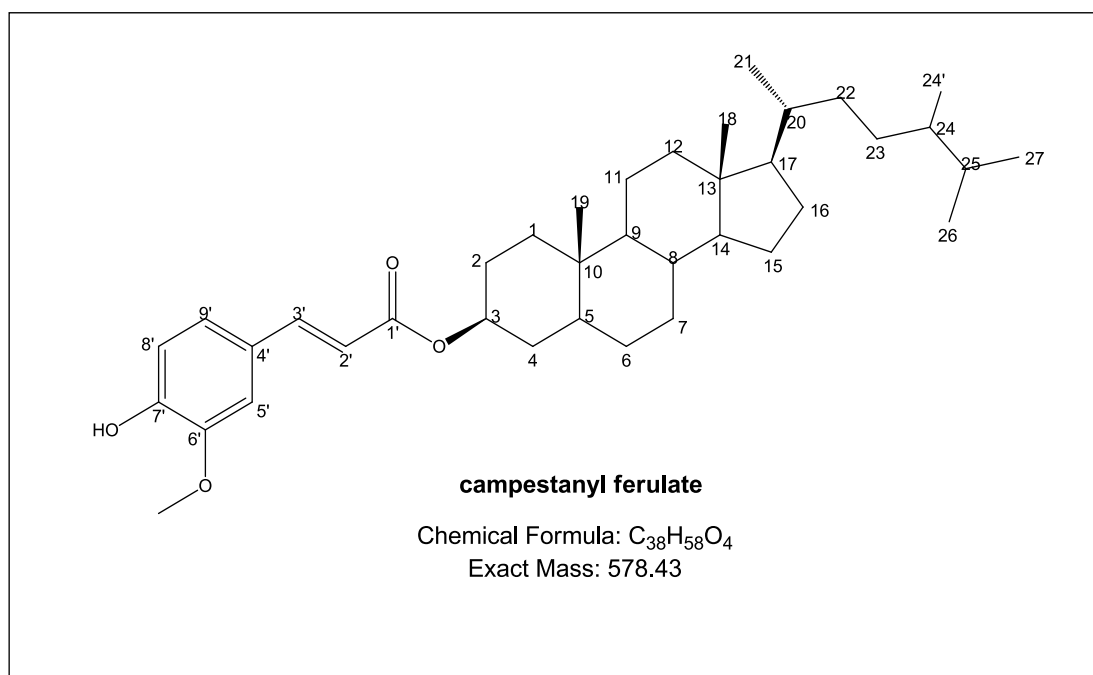
Εικόνα 6-41 Χαρακτηριστικά μεθύλια στο φάσμα HSQC-DEPT ($CDCl_3$) του β -sitosteryl ferulate (OR4).

Πίνακας 6-18 Φασματοσκοπικά δεδομένα (600 MHz, $CDCl_3$) του β -sitosteryl ferulate (OR4).

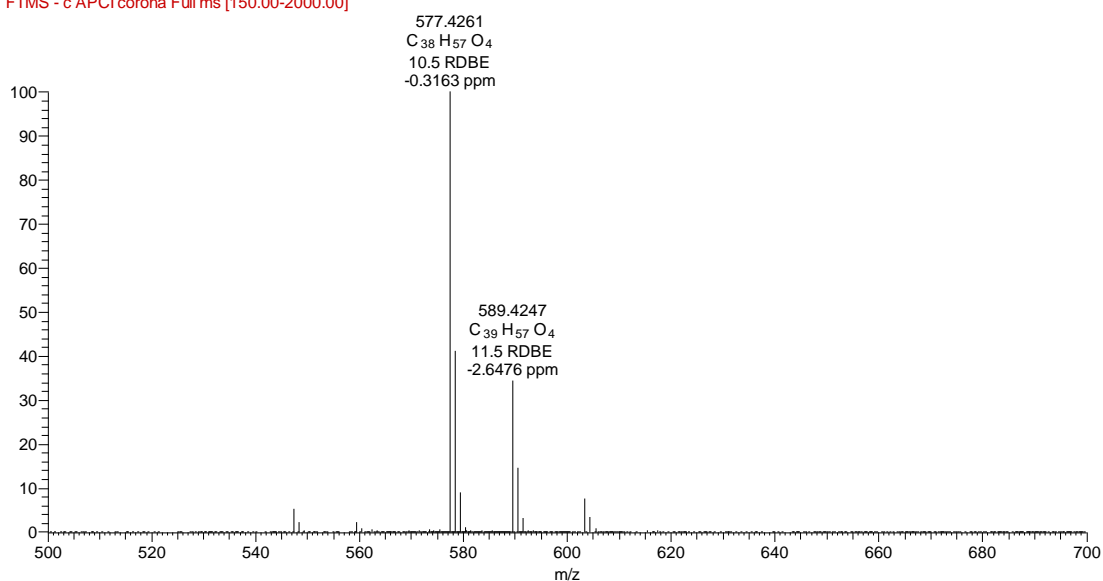
OR4	β -sitosteryl ferulate			
Atom	^{13}C (ppm)	1H (ppm)	Integration, Mult/ty, (J (Hz))	HMBC Correlations
1	36.49	1.88, 1.17	1H, m/ 1H, m	
2	27.98	1.92, 1.66	1H, m/ 1H, m	3
3	74.04	4.74	1H, m	
4	38.34	2.39	2H, m	10, 2, 3, 5, 6
5	139.53	-	-	
6	122.93	5.41	1H, m	7, 4, 10
7	31.98	1.99, 1.57	1H, m/ 1H, m	
8	31.97	1.46	1H, m	7, 9
9	50.18	0.98	1H, m	12
10	36.67	-	-	
11	21.00	1.52	2H, m	9
12	39.54	2.00, 1.16	1H, m/ 1H, m	
13	42.46	-	-	
14	56.82	1.00	1H, m	9
15	24.37	1.58, 1.07	1H, m/ 1H, m	
16	27.50	1.65, 1.26	1H, m/ 1H, m	
17	55.85	1.10	1H, m	
18	11.58	0.68	3H, s	12, 17
19	18.84	1.05	3H, s	10, 5, 9
20	35.71	1.35	1H, m	
21	18.29	0.93	3H, d, (6.53)	20, 17
22	33.80	2.3, 1.16	1H, m/ 1H, m	
23	25.98	1.32, 1.01	2H, m	
24	45.46	0.92	1H, m	24', 25, 24'
25	28.62	1.66	1H, m	24', 27, 24
26	18.86	0.82	3H, d, (6.8)	27, 25, 24

27	19.53	0.83	3H, d, (6.8)	26, 25, 24
24'	22.61	1.26	2H, m	
24''	11.60	0.85	3H, t	24'
<i>Trans</i>				
1'	167.02	-	-	
2'	116.52	6.29	1H, d, (15.84Hz)	1', 4', 3'
3'	144.62	7.59	1H, d, (15.84Hz)	5', 9', 1', 2', 4'
4'	127.20	-	-	
5'	109.48	7.04	1H, d, (1.90Hz)	3', 7', 9'
6'	146.88	-	-	
7'	147.76	-	-	
8'	114.87	6.92	1H, d, (8.11Hz)	7', 4',
9'	123.23	7.08	1H, dd, (8.11, 1.90 Hz)	5', 3'
6' CH ₃ O	56.06	3.93	3H, s	6'
7' OH		5.83	1H, brs	7'
<i>Cis</i>				
1'	166.16	-	-	
2'	117.81	5.83	1H, d, (12.90Hz)	4', 1
3'	143.56	6.78	1H, d, (12.90Hz)	5', 9', 1'
4'	127.35	-	-	
5'	112.98	7.74	1H, d, (1.90)	9', 3', 6'
6'	146.77	-	-	
7'	147.06	-	-	
8'	114.00	6.89	1H, d, (8.28)	4', 7'
9'	125.71	7.13	1H, dd, (8.28, 1.90)	5', 3', 7'
6' CH ₃ O	56.06	3.93	3H, s	6'
7' OH		5.83	1H, brs	7'

campestanyl ferulate (OR5)

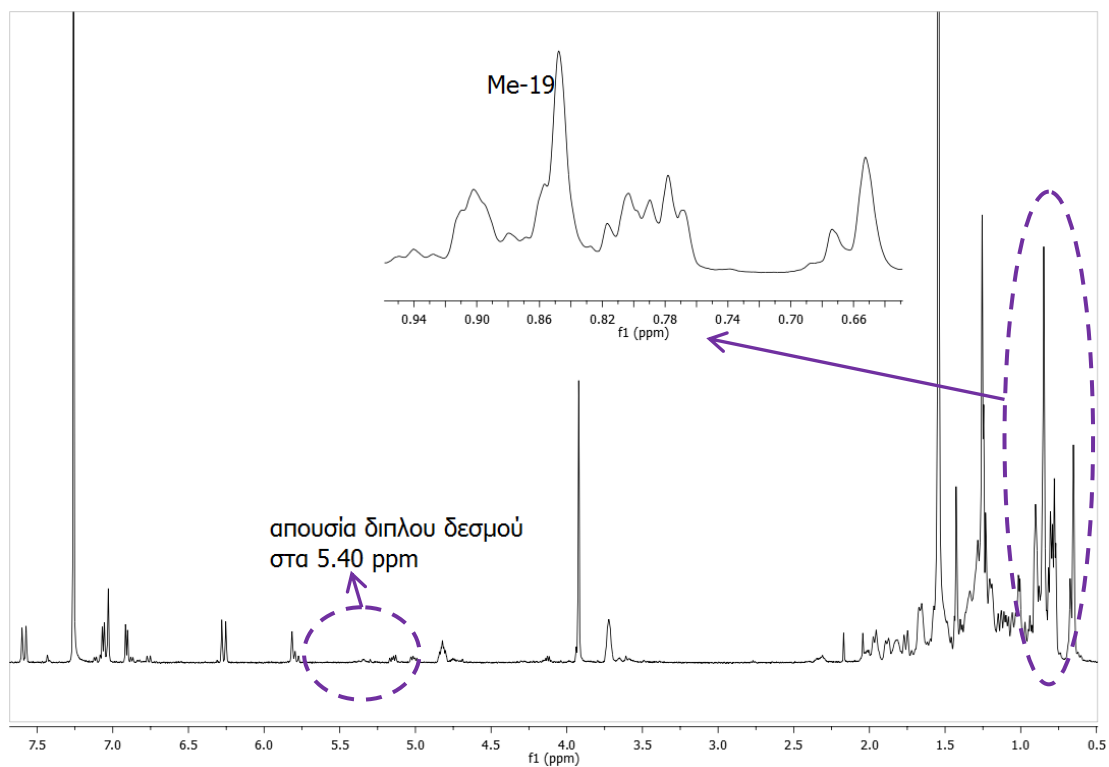


hs5_7_fims_apci-#3-28 RT: 0.03-0.37 AV: 26 NL: 3.81E6
F: FTMS - c.APCI corona Full ms [150.00-2000.00]



Εικόνα 6-42 Φάσμα HRMS πλήρους σάρωσης (Full Scan) της campestanyl ferulate (OR5).

Το φάσμα μάζας του μορίου ελήφθη με φασματογράφο μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας HRMS με την μέθοδο APCI σε αρνητικό ιονισμό. Έτσι καθορίστηκε το μοριακό βάρος της ουσίας MB: 578.4261 που αντιστοιχεί σε μοριακό τύπο $C_{38}H_{58}O_4$ ($RDB_{eq}=10.5$). Η δομή των μορίων campestanyl *trans* & *cis* ferulate (OR5) προσδιορίστηκε με βάση τη φασματοσκοπία NMR (1H , HSQC-DEPT, HMBC).

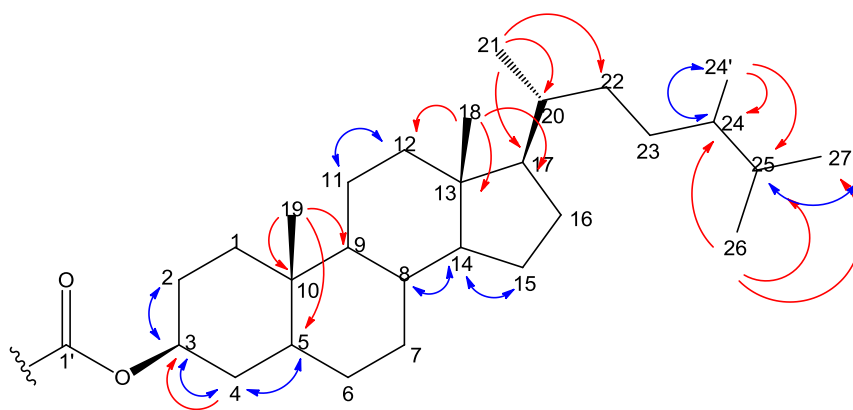


Εικόνα 6-43 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης *campestanyl ferulate* (OR5) σε CDCl_3 .

Η λήψη φασμάτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR αποτέλεσε τη βάση για την απόδοση της δομής του συγκεκριμένου φυσικού προϊόντος. Ειδικότερα:

Η ανάλυση του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ σε σύγκριση με την ένωση (OR3) και (OR4) υποδεικνύει ύπαρξη στερόλης αντί κυκλοαρτανίου στο βασικό σκελετό. Παράλληλα παρατηρούνται όλα τα σήματα φερούλικου οξέος και μάλιστα εστεροποιημένου όπως αποδεικνύεται από τον C-3. Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης (OR5) μεταξύ 0.60 και 1.80 ppm παρατηρούνται έξι μεθύλια. Δύο απλές κορυφές στα 0.65 & 0.85 ppm αντιστοιχούν στα μεθύλια των θέσεων 18 και 19. Τέσσερις διπλές κορυφές στα 0.78, 0.84, 0.77 και 0.90 ppm αντιστοιχούν στα μεθύλια των θέσεων 27, 26, 24', 21. Η πολλαπλότητα παραμένει ακριβώς ίδια με την ένωση (OR3). Η ένωση (OR5) διαφέρει από την ένωση (OR3) κυρίως ως προς την απουσία του διπλού δεσμού (δ 5.40) μεταξύ θέσης 5 και 6 και τη θωράκιση του Me-19 στα 0.85 ppm. Η απουσία του διπλού δεσμού επιβεβαιώνεται από το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ και από το βαθμό ακορεστότητας της ένωσης ($\text{RDB}_{\text{eq}}=10.5$).

Η ανάλυση των φασμάτων HMBC, HSQC-DEPT, η σύγκριση με τα σήματα της ένωσης (OR3) σε συνδυασμό με βιβλιογραφικά δεδομένα [174], βοήθησε στην συμπλήρωση του παρακάτω πίνακα, όπου παρουσιάζονται αναλυτικά τα σήματα ^{13}C , ^1H και οι συσχετίσεις με 3J & 2J με γειτονικούς άνθρακες με αποτέλεσμα την απόδοση δομής των ενώσεων (OR5).



Εικόνα 6-44 Τα μπλε βέλη απεικονίζουν τις COSY συζεύξεις και τα κόκκινα τόξα απεικονίζουν τις HMBC (2J , 3J) συζεύξεις (κόκκινα τόξα) της ένωσης (OR5).

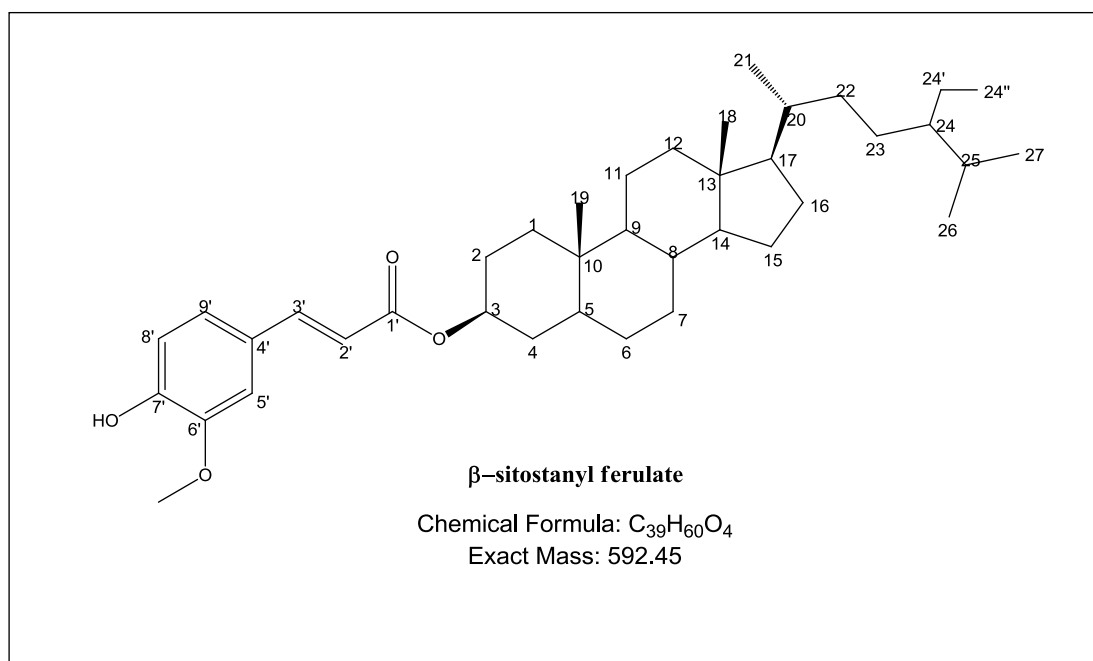
Πίνακας 6-19 Φασματοσκοπικά δεδομένα (600 MHz, $CDCl_3$) του campestanol ferulate (OR5).

OR5	campestanol ferulate				
Atom	^{13}C (ppm)	1H (ppm)	Integration, Mult/ty, (J (Hz))	HMBC Correlations	COSY
1	36.9	1.76, 1.06	1H, m/ 1H, m		1
2	27.66	1.87, 1.57	1H, m/ 1H, m		2
3	73.77	4.81	1H, m		2, 4
4	27.16	1.40	2H, m	3	3, 5
5	44.81	1.21	1H, m		4, 6
6	26.50	1.83, 1.40	2H, m		
7	26.90	2.01, 1.30	2H, m		
8	31.50	1.57	1H, m		
9	54.42	0.66	1H, m		11
10	36.40	-	-		
11	21.26	1.48, 1.28	1H, m/ 1H, m		12
12	39.84	1.96, 1.13	1H, m/ 1H, m		11
13	42.53	-	-		
14	55.98	1.00	1H, m		8, 15
15	24.23	1.55, 1.02	1H, m/ 1H, m		
16	27.73	1.65, 1.26	1H, m/ 1H, m		
17	56.27	1.09	1H, m		
18	12.21	0.65	3H, s	12, 17, 13	
19	12.26	0.85	3H, s	5, 10, 9	
20	36.35	1.35	1H, m		
21	18.82	0.90	3H, d, (6.5)	17,22, 20	
22	33.52	1.30, 1.16	1H, m/ 1H, m		23
23	30.36	1.20, 1.10	2H, m		
24	39.10	1.20	1H, m		
25	32.21	1.52	1H, m		
26	20.43	0.84	3H, d, (6.8)	24, 25, 27,	
27	17.71	0.78	3H, d, (6.8)	26	
24'	15.45	0.77	3H, d, (6.8)	25, 24	24

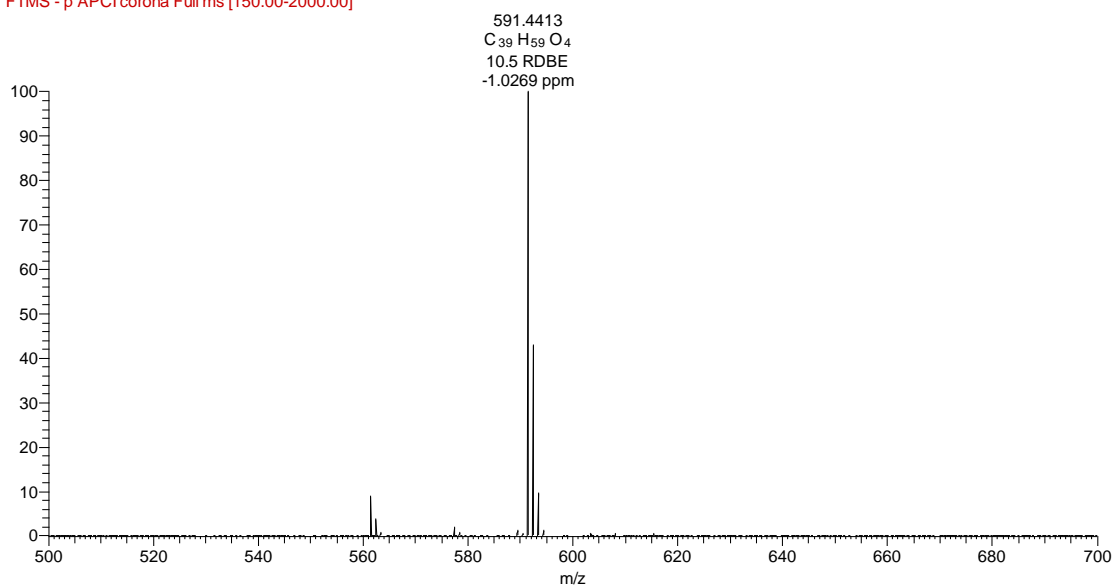
Trans

1'	167.02	-	-		
2'	116.52	6.29	1H, d, (15.84Hz)	1', 4', 3'	
3'	144.62	7.59	1H, d, (15.84Hz)	5', 9', 1', 2', 4'	
4'	127.20	-	-		
5'	109.48	7.04	1H, d, (1.90Hz)	3', 7', 9'	
6'	146.88	-	-		
7'	147.76	-	-		
8'	114.87	6.92	1H, d, (8.11Hz)	7', 4',	
9'	123.23	7.08	1H, dd, (8.11, 1.90 Hz)	5', 3'	
6' CH ₃ O	56.06	3.93	3H, s	6'	
7' OH		5.83	1H, brs	7'	
<i>Cis</i>					
1'	166.16	-	-		
2'	117.81	5.83	1H, d, (12.90Hz)	4', 1	
3'	143.56	6.78	1H, d, (12.90Hz)	5', 9', 1'	
4'	127.35	-	-		
5'	112.98	7.74	1H, d, (1.90)	9', 3', 6'	
6'	146.77	-	-		
7'	147.06	-	-		
8'	114.00	6.89	1H, d, (8.28)	4', 7'	
9'	125.71	7.13	1H, dd, (8.28, 1.90)	5', 3', 7'	
6' CH ₃ O	56.06	3.93	3H, s	6'	
7' OH		5.83	1H, brs	7'	

β -sitostanyl ferulate (OR6)

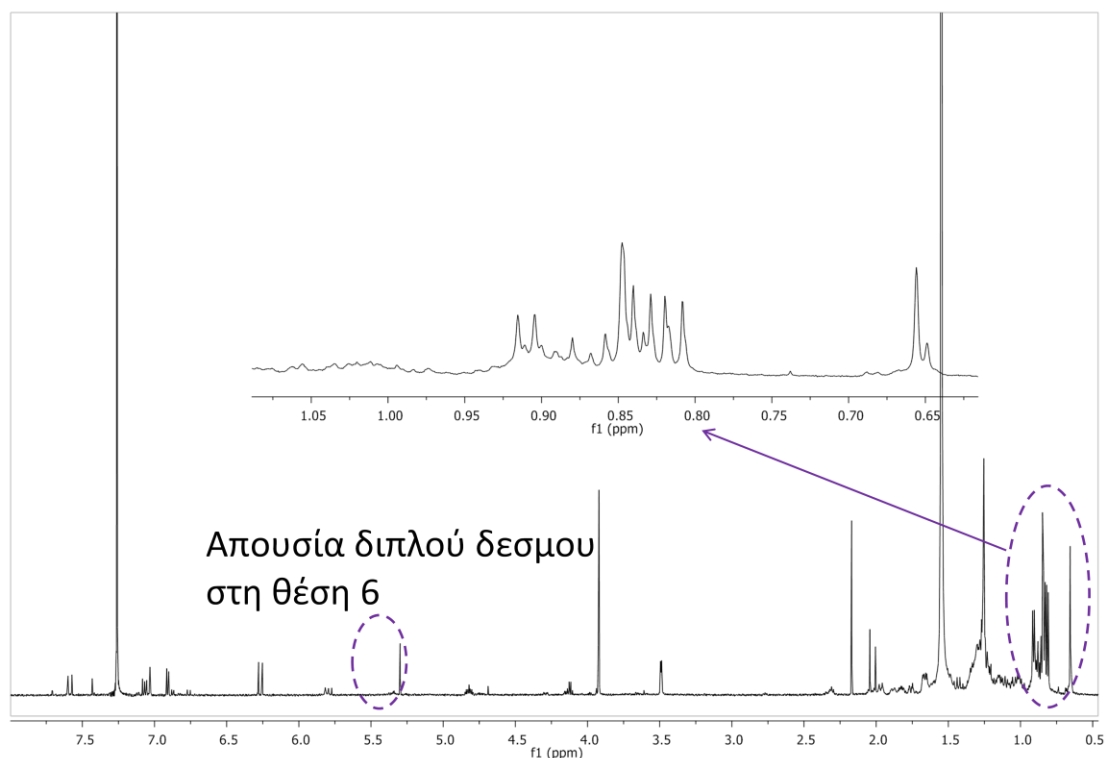


hs5_8_fms_apci-#3-27 RT: 0.04-0.42 AV: 25 NL: 1.40E6
F: FTMS -p APCI corona Full ms [150.00-2000.00]



Εικόνα 6-45 Φάσμα HRMS πλήρους σάρωσης (Full Scan) της β -sitostanyl ferulate (OR6).

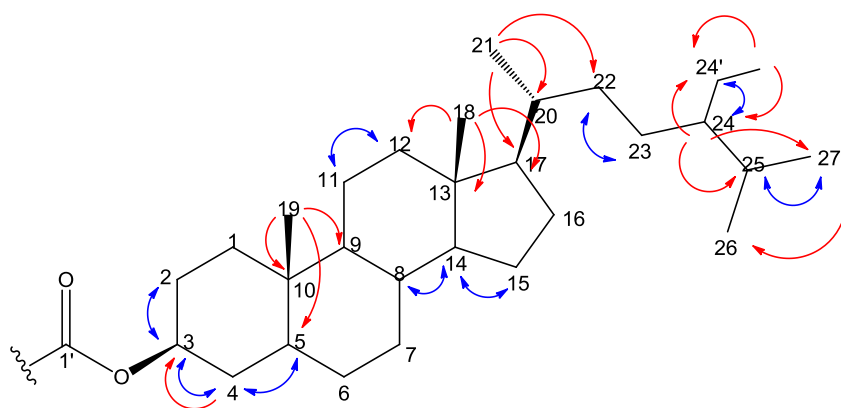
Το φάσμα μάζας του μορίου ελήφθη με φασματογράφο μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας HRMS με την μέθοδο APCI σε αρνητικό ιονισμό. Έτσι καθορίστηκε το μοριακό βάρος της ουσίας MB: 592.4413 που αντιστοιχεί σε μοριακό τύπο $C_{39}H_{60}O_4$ ($RDB_{eq}=10.5$). Η δομή των μορίων β -sitostanyl *trans* & *cis* ferulate (OR6) προσδιορίστηκε με βάση τη φασματοσκοπία NMR (1H , HSQC-DEPT, HMBC, COSY).



Εικόνα 6-46 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης β -sitostanyl ferulate (OR6) σε CDCl_3 .

Η λήψη φασμάτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR αποτέλεσε τη βάση για την απόδοση της δομής του συγκεκριμένου φυσικού προϊόντος. Ειδικότερα:

Η ανάλυση του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ σε σύγκριση με την ένωση (OR3) και (OR4) υποδεικνύει ύπαρξη στερόλης αντί κυκλοαρτανίου στον βασικό σκελετό, όπως ακριβώς και στην ένωση (OR5). Παράλληλα παρατηρούνται όλα τα σήματα φερουλικού οξέος και μάλιστα εστεροποιημένου όπως αποδεικνύεται από τον C-3. Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης (OR6) μεταξύ 0.60 και 1.80 ppm παρατηρούνται έξι μεθύλια. Όπως και στην ένωση (OR5), δύο απλές κορυφές στα 0.68 και 0.84 ppm αντιστοιχούν στα μεθύλια των θέσεων 18 και 19. Σε αντίθεση με το φάσμα της ένωσης (OR5), παρατηρούνται τρεις διπλές κορυφές στα 0.81, 0.83 και 0.91 ppm που αντιστοιχούν στα μεθύλια των θέσεων 26, 27 και 21 και μία τριπλή κορυφή στα 0.85 ppm που αντιστοιχεί στο μεθύλιο της θέσης 24". Η πολλαπλότητα παραμένει ακριβώς ίδια με την ένωση (OR4). Η ένωση (OR6) διαφέρει από την ένωση (OR4) κυρίως ως προς την απουσία του διπλού δεσμού (δ 5.40) μεταξύ θέσης 5 και 6 και τη θωράκιση του Me-19 στα 0.85 ppm. Η απουσία του διπλού δεσμού επιβεβαιώνεται από το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ και από το βαθμό ακορεστότητας της ένωσης ($\text{RDB}_{\text{eq}}=10.5$).



Εικόνα 6-47 Τα μπλε βέλη απεικονίζουν τις COSY συζεύξεις και τα κόκκινα τόξα απεικονίζουν τις HMBC (2J , 3J) συζεύξεις (κόκκινα τόξα) της ένωσης (OR6).

Πίνακας 6-20 Φασματοσκοπικά δεδομένα (600 MHz, $CDCl_3$) του sitostanyl ferulate (OR6).

OR6	sitostanyl ferulate				
Atom	^{13}C (ppm)	1H (ppm)	Integration, Mult/ty, (J (Hz))	HMBC Correlations	COSY
1	36.90	1.76, 1.06	1H, m/ 1H, m		1
2	27.66	1.87, 1.57	1H, m/ 1H, m		2
3	73.77	4.81	1H, m		2, 4
4	27.16	1.40	2H, m	3	3, 5
5	44.81	1.21	1H, m		4, 6
6	26.50	1.83, 1.40	2H, m		
7	26.90	2.01, 1.3	2H, m		
8	31.50	1.57	1H, m		
9	54.42	0.66	1H, m		
10	36.40	-	-		
11	21.26	1.48, 1.28	1H, m/ 1H, m		12
12	39.84	1.96, 1.13	1H, m/ 1H, m		11
13	42.53	-	-		
14	55.98	1.01	1H, m		8, 15
15	24.23	1.55, 1.02	1H, m/ 1H, m		
16	28.43	1.82, 1.26	1H, m/ 1H, m		
17	56.28	1.10	1H, m		
18	12.11	0.65	3H, s	12, 17, 13	
19	12.10	0.84	3H, s	10, 9, 5	
20	35.72	1.34	1H, m		
21	18.83	0.91	3H, d, (6.5)	20, 22, 17	
22	33.81	2.30, 1.16	1H, m/ 1H, m		23
23	31.13	1.66	2H, m		
24	45.72	0.92	1H, m	26, 27, 22	
25	29.28	1.67	1H, m		
26	19.13	0.81	3H, d, (6.8)		
27	19.87	0.83	3H, d, (6.8)		25
24'	22.53	1.28	2H, m	25	24
24''	12.18	0.85	3H, t, (7.08)	24', 24	

<i>Trans</i>					
1'	167.02	-	-		
2'	116.52	6.29	1H, d, (15.84Hz)	1', 4', 3'	
3'	144.62	7.59	1H, d, (15.84Hz)	5', 9', 1', 2', 4'	
4'	127.20	-	-		
5'	109.48	7.04	1H, d, (1.90Hz)	3', 7', 9'	
6'	146.88	-	-		
7'	147.76	-	-		
8'	114.87	6.92	1H, d, (8.11Hz)	7', 4',	
9'	123.23	7.08	1H, dd, (8.11, 1.90 Hz)	5', 3'	
6' CH ₃ O	56.06	3.93	3H, s	6'	
7' OH		5.83	1H, brs	7'	
<i>Cis</i>					
1'	166.16	-	-		
2'	117.81	5.83	1H, d, (12.90Hz)	4', 1	
3'	143.56	6.78	1H, d, (12.90Hz)	5', 9', 1'	
4'	127.35	-	-		
5'	112.98	7.74	1H, d, (1.90)	9', 3', 6'	
6'	146.77	-	-		
7'	147.06	-	-		
8'	114.00	6.89	1H, d, (8.28)	4', 7'	
9'	125.71	7.13	1H, dd, (8.28, 1.90)	5', 3', 7'	
6' CH ₃ O	56.06	3.93	3H, s	6'	
7' OH		5.83	1H, brs	7'	

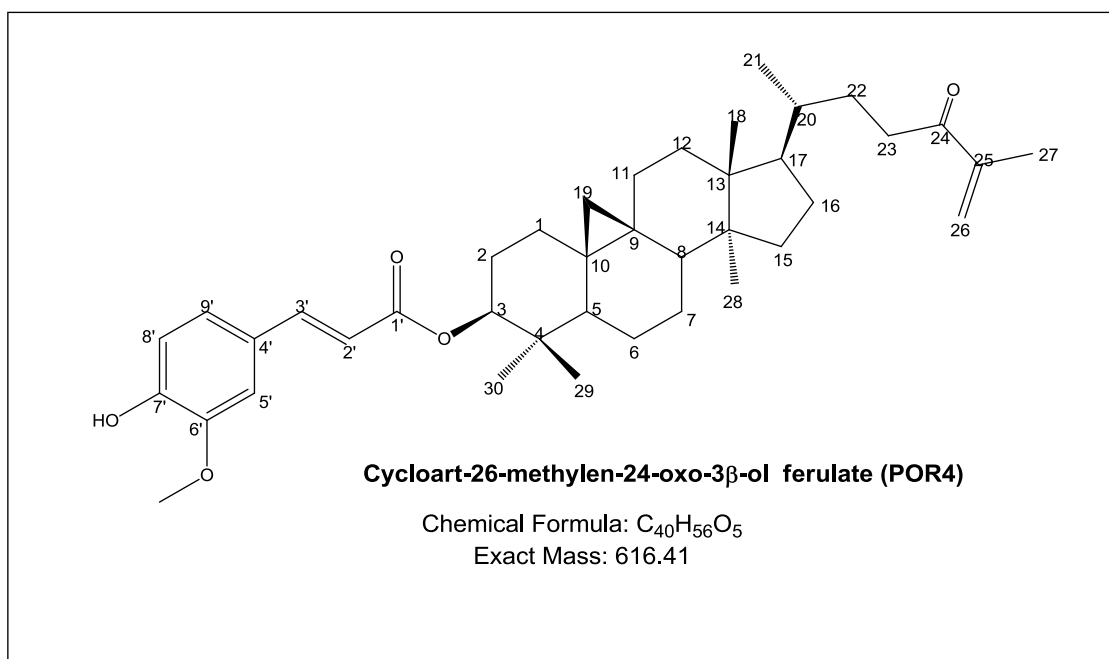
Και οι 6 ενώσεις της γOR έχουν ταυτοποιηθεί στο παρελθόν μέσω LC-MS/MS από τους Fang et al. [8]. Το 1998, απομονώθηκαν από τους Yakusawa et al. [102] από το πίτουρο του ρυζιού οι ενώσεις OR1, OR2, OR3, OR4 για τις οποίες δημοσιεύτηκαν δεδομένα ¹H NMR και HR-MS (M⁺). Παρομοίως, το 2000 απομονώθηκαν από τους Akihisa et al. [83] οι ενώσεις OR1, OR2, OR3, OR4, OR6 για τις οποίες δημοσιεύτηκαν δεδομένα ¹H NMR και HR-MS. Οι Liu et al. προσέθεσαν δεδομένα ¹³C NMR για τις ενώσεις OR1, OR2 και HR-MS δεδομένα ([M-H]⁻) ενώ οι Bao et al. [172], προσέθεσαν δεδομένα ¹³C NMR για την ένωση (OR3). Γενικές πληροφορίες για το φάσμα ¹H NMR και ¹³C NMR των στερολών/ στανολών βρέθηκαν στο *Journal of Lipid Research* [174] ενώ πληροφορίες ¹H NMR και HRMS των ενώσεων OR5, OR6 έχουν δημοσιευθεί από τους Iwatsuki et al. [176]. Στην εργασία αυτή προστέθηκαν φασματοσκοπικά δεδομένα τόσο στο φάσμα ¹H NMR και στο ¹³C NMR των ενώσεων (OR5) & (OR6). Τέλος, με τα δεδομένα από τα φάσματα 2 διαστάσεων (HSQC-DEPT, HMBC, COSY) για όλες τις απομονωμένες ενώσεις της γOR και τα HR-MS επιβεβαιώθηκε η δομή των παραπάνω ενώσεων.

6.5.4 Ταυτοποίηση 6 ενώσεων της πολικής γ-ορυζανόλης (PγOR)

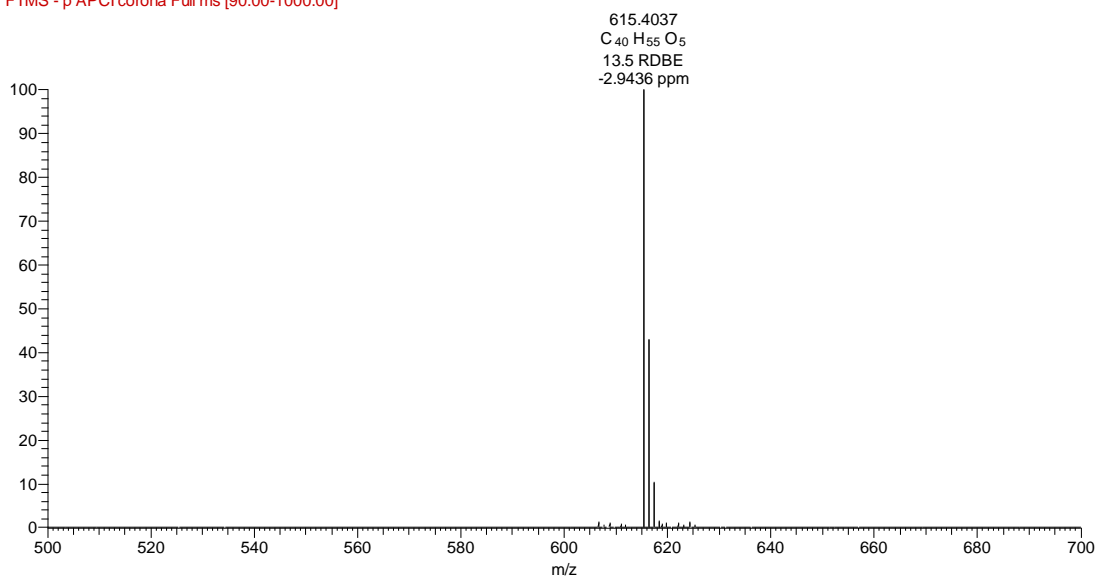
Οι 6 ουσίες της PγOR απομονώθηκαν από το κλάσμα [108-109] και το κλάσμα [114-120] του CPC ύστερα από επεξεργασία με SFC (Εικόνα 6-15 & Εικόνα 6-18 αντίστοιχα). Εμφανίζονται ως μωβ-κηλίδα ύστερα από ανάπτυξη με διάλυμα θειικής βανιλίνης. Η λήψη των φασμάτων μάζας των μορίων έγινε με φασματογράφο μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας HRMS με την μέθοδο του APCI σε αρνητικό ιονισμό. Το RDB_{eq} των μορίων κυμαίνεται από 10,5-13,5 το οποίο συμφωνεί με τα βιβλιογραφικά δεδομένα που αφορούν την γOR [12].

Από την ομάδα της PγOR τέσσερις ανήκουν στα κυκλοαρτάνια και απομονώθηκαν από το κλάσμα [108-109] του CPC: **(24R)-cycloart-25-ene-3β,24-diol-3β *trans* & *cis* ferulate & (24S)-cycloart-25-ene-3β,24-diol-3β *trans* & *cis* ferulate (POR2), Cycloart-23Z-ene3β,25-diol-3β *trans* & *cis* ferulate (POR3), Cycloart-26-methylen-24-oxo-3β-ol *trans* & *cis* ferulate (POR4), 25-hydroperoxy-cycloart-23E-en-3β-ol *trans* & *cis* ferulate (POR1)**. Από το κλάσμα [114-120] του CPC απομονώθηκαν ακόμα δυο ουσίες, η **6-hydroxy-campestanyl *trans* ferulate (POR5)** και η **6-hydroxy-sitostanyl *trans* ferulate (POR6)**. Χαρακτηριστική διαφορά με την ομάδα της γOR είναι η ύπαρξη ενός τουλάχιστον επιπλέον υδροξυλίου σε όλες τις ενώσεις της PγOR.

cycloart-26-methylen-24-oxo-3β-ol ferulate (POR4)



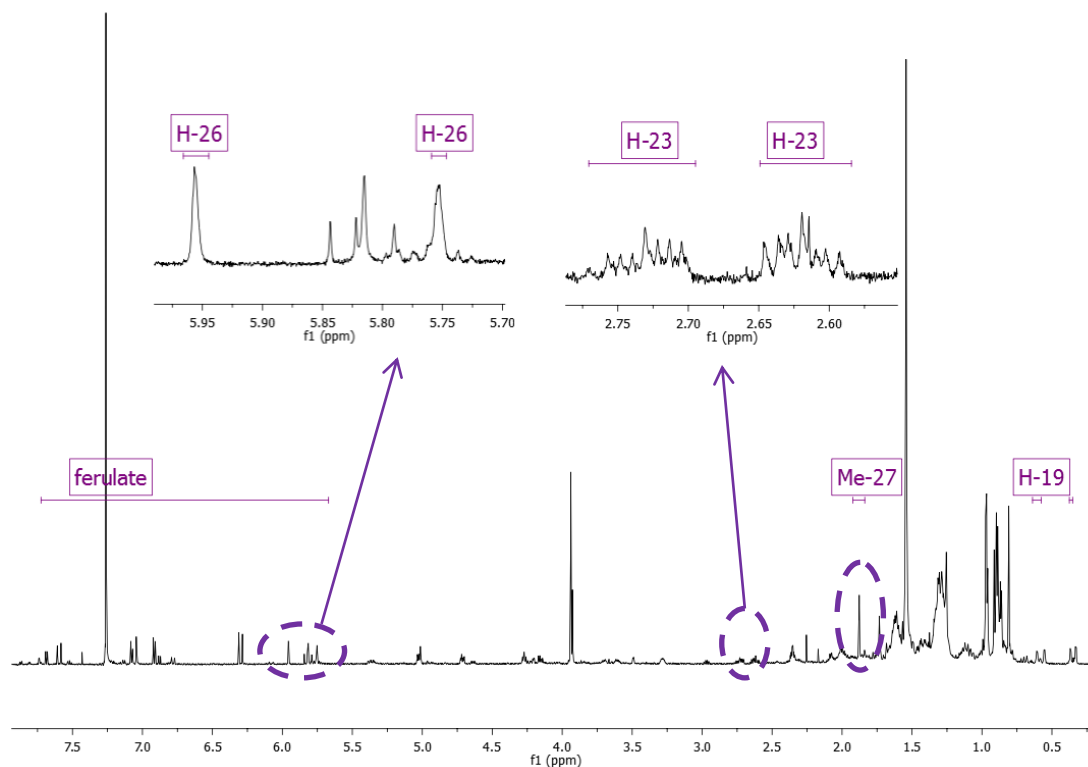
sfc3_fr2 #702 RT: 12.86 AV: 1 NL: 2.70E5
F: FTMS - p APCI corona Full ms [90.00-1000.00]



Εικόνα 6-48 Φάσμα HRMS πλήρους σάρωσης (Full Scan) της *Cycloart-26-methylen-24-oxo-3β-ol ferulate (POR4)*.

Η ένωση (POR4) απομονώθηκε από το κλάσμα 1 του SFC-A. Το φάσμα μάζας του μορίου ελήφθη με φασματογράφο μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας HRMS με τη μέθοδο χημικού ιονισμού υπό ατμοσφαιρική πίεση (APCI) σε αρνητικό ιονισμό. Έτσι καθορίστηκε το μοριακό βάρος της ουσίας MB: 616.4037 που αντιστοιχεί σε μοριακό τύπο $C_{40}H_{56}O_5$ ($RDB_{eq}=13.5$). Η δομή των μορίων **cycloart-26-methylen-24-oxo-3β-**

οι *trans* & *cis* ferulate (POR4) προσδιορίστηκε με βάση τη φασματοσκοπία NMR (^1H , HSQC-DEPT, HMBC, COSY).



Εικόνα 6-49 Φάσμα ^1H -NMR της ένωσης *cycloart-26-methylen-24-oxo-3β-ol trans & cis ferulate* (POR4) σε CDCl_3 .

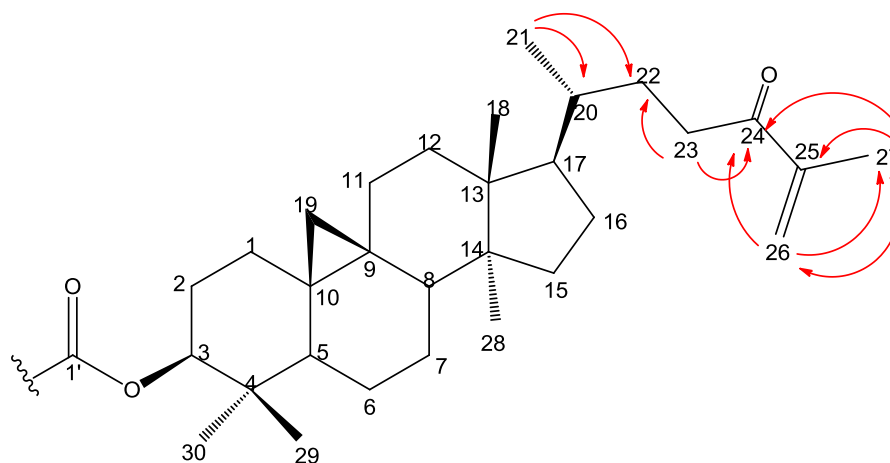
Η ανάλυση του φάσματος ^1H -NMR σε σύγκριση με την ένωση (OR1) και (OR2) υποδεικνύει την χαρακτηριστική παρουσία των H-19, δηλαδή της κυκλοπρότυλο ομάδας. Παράλληλα παρατηρούνται όλα τα σήματα φερουλικού οξέος και μάλιστα εστεροποιημένου όπως αποδεικνύεται από τον C-3 (4.71 ppm, 1H, dd, $J= 4.37, 11.18$ Hz). Τα παραπάνω υποδηλώνουν την παρουσία κυκλοαρτανίου ως βασικό σκελετό με μία επιπλέον OH-ομάδα όπως υποδεικνύει το σήμα στα 202.98 ppm και ο μοριακός τύπος. Η ένωση (POR4), παρουσιάζει αρκετές ομοιότητες με τις ενώσεις (OR1) & (OR2).

Η ανάλυση του φάσματος ^1H NMR παρουσιάζει ένα ζεύγος διπλών κορυφών (d) ($J=3.92$ Hz) στη περιοχή των υψηλών πεδίων στα 0.60 και 0.36 ppm, το οποίο είναι χαρακτηριστικό των πρωτονίων στη θέση 19 της κυκλοπρότυλο ομάδας των κυκλοαρτανίων. Μεταξύ 0.88 και 1.90 ppm του φάσματος εμφανίζονται οι κορυφές των μεθυλιών 30, 18, 28, 29, 21 και 27. Στα 0.97 ppm, οι δυο απλές κορυφές που ολοκληρώνουν για τρία πρωτόνια αντιστοιχούν στα Me-30 και Me-18. Στα 0.89 ppm συναντώνται μια διπλή κορυφή και μια απλή, που ολοκληρώνουν συνολικά για 6 πρωτόνια και αντιστοιχούν στα μεθύλια 21 (3H, d, $J= 5.65$ Hz) και 29 (3H, s)

αντίστοιχα. Η απλή κορυφή στα 0.90 ppm, ολοκληρώνει για 3 πρωτόνια και αντιστοιχεί στο μεθύλιο 28 (3H, s), ενώ οι υπόλοιπες κορυφές αφορούν τα αλειφατικά μεθυλένια και μεθίλια του βασικού στεροειδικού σκελετού οι χημικές μετατοπίσεις των οποίων φαίνονται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα. Τέλος, η αποθωρακισμένη απλή κορυφή στα 1.87 ppm αντιστοιχεί στο βινυλικό Me-27 και το OH-7' παρατηρείται στα 5.83 ppm σαν ευρεία απλή κορυφή. Όπως και στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης (OR2), παρατηρείται εξωμεθυλένιο (δ 5.75, 5.95) το οποίο όμως είναι πιο αποθωρακισμένο λόγω της ύπαρξης συζυγίας με άνθρακα κετόνης.

Η μελέτη των φασμάτων HSQC-DEPT & HMBC οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η ένωση (POR4) αποτελείται από:

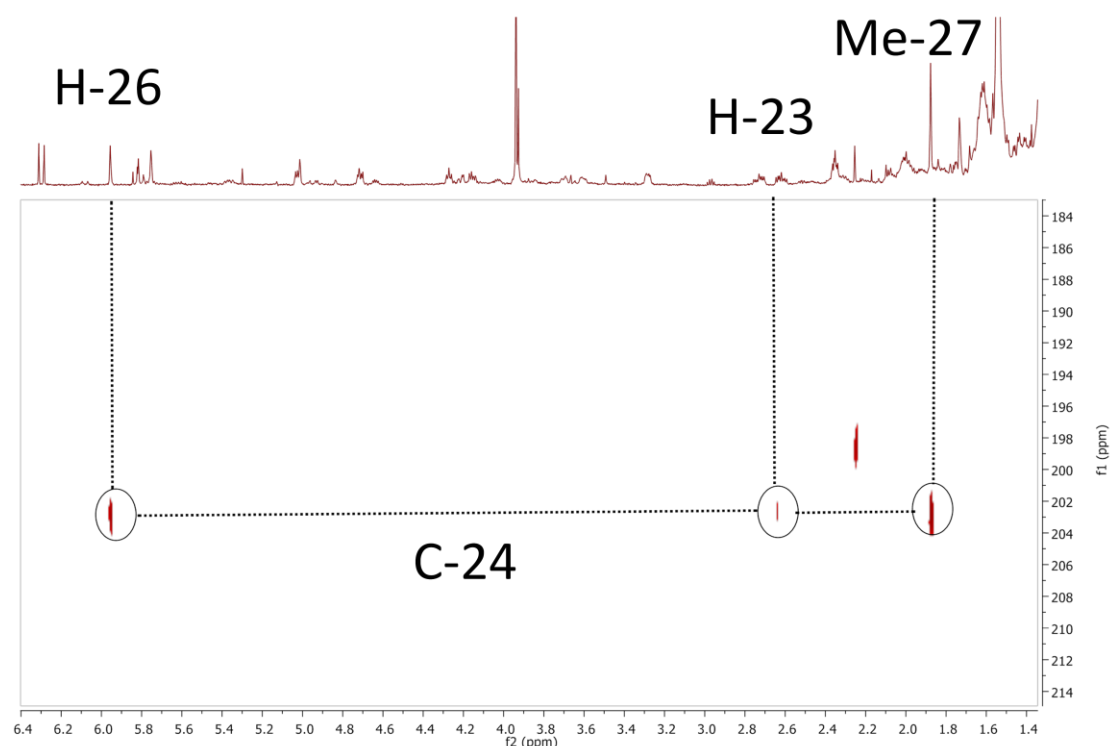
- Επτά μεθύλια εκ των οποίων τα έξι τοποθετούνται στη περιοχή των υψηλών πεδίων και το ένα, αρκετά αποθωρακισμένο, αντιστοιχεί στη μεθοξυ ομάδα.
- Έντεκα μεθυλένια με χαρακτηριστικό το μεθυλένιο της θέσης 19 των κυκλοαρτανίων και ένα εξωμεθυλένιο.
- Δέκα μεθίλια εκ των οποίων τα πέντε πιο αποθωρακισμένα ανήκουν στο αρωματικό σύστημα.
- Δώδεκα τεταρτοταγείς άνθρακες εκ των οποίων οι πέντε βρίσκονται στην αρωματική περιοχή, ένας ανήκει στο καρβονύλιο της πλευρικής αλυσίδας (δ 202.98) κι άλλος ένας βρίσκεται στην περιοχή των διπλών δεσμών (δ 144.73) αρκετά αποθωρακισμένος λόγω της σύζευξης του με το καρβονύλιο.



Εικόνα 6-50 Τα κόκκινα τόξα απεικονίζουν τις HMBC (2J , 3J) συζεύξεις της ένωσης (POR4)

Διαφέρει σε σχέση με την ένωση (OR1) μόνο στα σήματα της πλευρικής αλυσίδας, η δομή της οποίας αποδόθηκε χάρη στα φάσματα HSQC-DEPT & HMBC. Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ εμφανίζονται δύο απλές κορυφές στα 5.75 & 5.95 ppm, οι οποίες σύμφωνα με HSQC-DEPT αντιστοιχούν στον C-26. Στο φάσμα HMBC, τα υδρογόνα (H-26) του εξωμεθυλενίου εμφανίζουν 3J σύζευξη με τον άνθρακα καρβονυλίου (C-25) στα

202.98 ppm και με μια αποθωρακισμένη απλή κορυφή μεθυλίου στα 1.87 ppm (CH₃-27). Το Me-27, εμφανίζει ³J σύζευξη με τα H₂-26 και με το C-24 και ²J σύζευξη με τον C-25 (δ 144.73). Δίπλα στην κετόνη τοποθετείται ένα μεθυλένιο (>C₂₅=CH₂) και ένα μεθύλιο (>C₂₅-CH₃). Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, στην πλευρική αλυσίδα τοποθετείται ένας πολύ αποθωρακισμένος οξυγονωμένος άνθρακας στη θέση 24 (δ 202.98) ppm που αντιστοιχεί σε μία συζευγμένη κετόνη δίπλα σε διπλό δεσμό. **Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι η ένωση (POR4) είναι ένα νέο φυσικό προϊόν που απομονώνεται για πρώτη φορά από το πύτουρο του ρυζιού [170].**



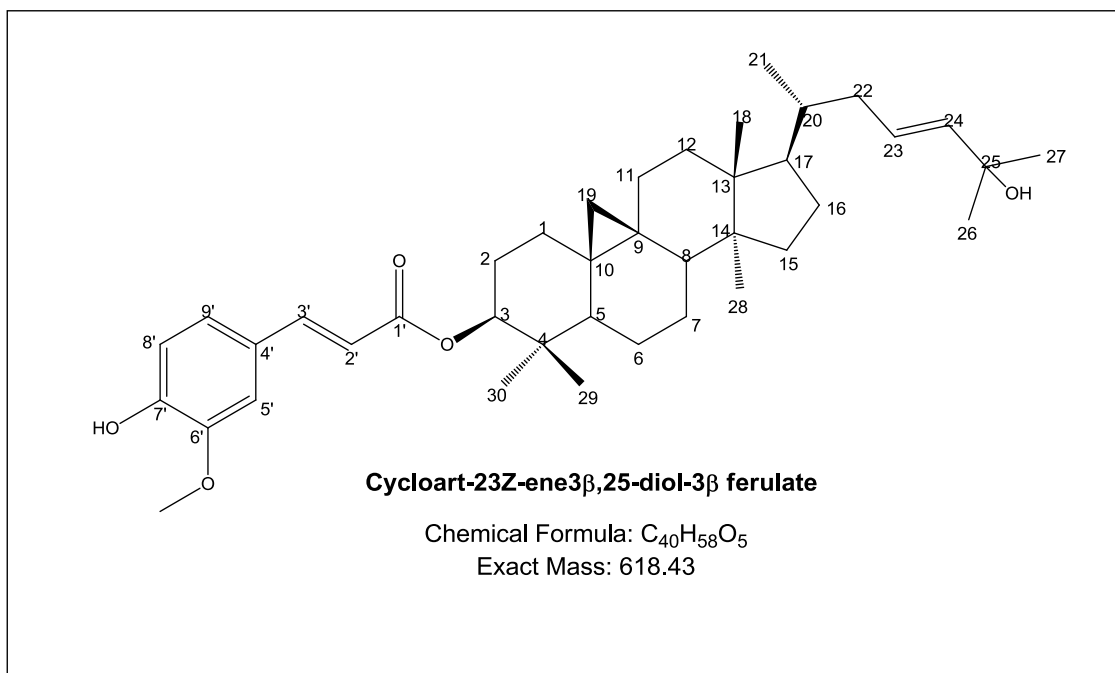
Εικόνα 6-51 Φάσμα HMBC της *cycloart-26-methylen-24-oxo-3β-ol trans & cis ferulate (POR4)* σε CDCl₃.

Πίνακας 6-21 Φασματοσκοπικά δεδομένα (600 MHz, CDCl₃) του *cycloart-26-methylen-24-oxo-3β-ol trans & cis ferulate (POR4)*.

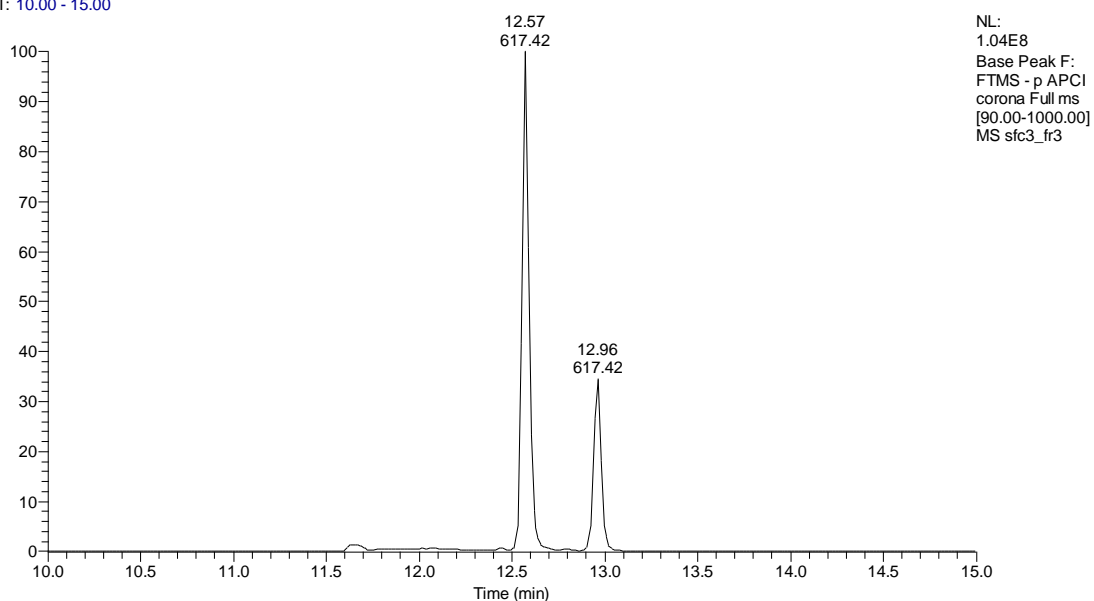
POR4	cycloart-26-methylen-24-oxo-3β-ol ferulate			
Atom	¹³ C (ppm)	¹ H (ppm)	Integration, Mult/ty, (J (Hz))	HMBC Correlations
1	31.61	1.66, 1.25	1H, m/ 1H, m	
2	26.80	1.83, 1.67	1H, m/ 1H, m	3, 4
3	80.63	4.71	1H, dd, (4.37, 11.18)	1', 30, 4, 1, 2
4	39.71	-	-	
5	47.33	1.44	1H, m	30, 29, 6, 4
6	21.06	1.59, 0.79	1H, m/ 1H, m	
7	26.54	1.99, 1.30	1H, m/ 1H, m	
8	47.94	1.52	1H, m	11
9	20.28	-	-	

10	26.41	-	-	
11	26.18	1.33, 1.11	1H, m/ 1H, m	
12	33.13	1.62	2H, m	17, 13, 18, 17
13	45.77	-	-	
14	48.53	-	-	
15	35.90	1.30	2H, m	28, 13,14, 17
16	26.46	2.01, 1.14	1H, m/ 1H, m	14, 13, 28
17	52.02	1.62	1H, m	
18	18.20	0.97	3H, s	
19	29.80	0.60, 0.37	1H, d, (3.92)/ 1H, d, (3.92)	
20	35.99	1.40	1H, m	
21	19.32	0.89	3H, d, (5.65)	17, 22, 20
22	31.12	1.8	1H, m/ 1H, m	
23	34.73	2.61, 2.71	1H, ddd, (5.24,10.08,16.03) / 1H, ddd (5.24, 10.08, 16.03)	24
24	202.98	-	-	
25	144.73	-	-	
26	124.42	5.75, 5.95	1H, brs / 1H, brs	27, 24
27	17.77	1.87	3H, s	24, 25, 26
28	18.22	0.90	3H, s	13, 14
29	25.58	0.89	3H, s	30, 4, 3
30	15.37	0.97	3H, s	5
<i>trans</i>				
1'	167.02	-	-	
2'	116.52	6.29	1H, d, (15.84Hz)	1', 4', 3'
3'	144.62	7.59	1H, d, (15.84Hz)	5', 9', 1', 2', 4'
4'	127.2	-	-	
5'	109.48	7.04	1H, d, (1.90Hz)	3', 7', 9'
6'	146.88	-	-	
7'	147.76	-	-	
8'	114.87	6.92	1H, d, (8.11Hz)	7', 4',
9'	123.23	7.08	1H, dd, (8.11, 1.90 Hz)	5', 3'
6' CH ₃ O	56.06	3.93	3H, s	6'
7' OH		5.83	1H, brs	7'
<i>cis</i>				
1'	166.16	-	-	
2'	117.81	5.83	1H, d, (12.90Hz)	4', 1
3'	143.56	6.78	1H, d, (12.90Hz)	5', 9', 1'
4'	127.35	-	-	
5'	112.98	7.74	1H, d, (1.90)	9', 3', 6'
6'	146.77	-	-	
7'	147.06	-	-	
8'	114.00	6.89	1H, d, (8.28)	4', 7'
9'	125.71	7.13	1H, dd, (8.28, 1.90)	5', 3', 7'
6' CH ₃ O	56.06	3.93	3H, s	6'
7' OH		5.83	1H, brs	7'

cycloart-23Z-ene3 β ,25-diol-3 β -*trans*- ferulate (POR3)



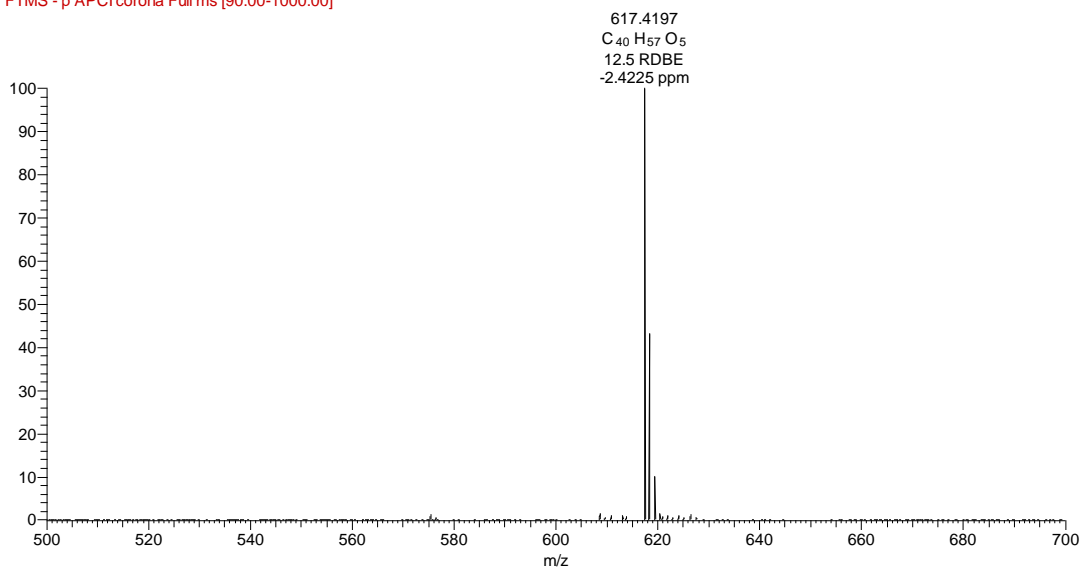
RT: 10.00 - 15.00



Εικόνα 6-52 LC-MS του κλάσματος 2ου SFC-A, όπου παρατηρούνται τα *cis* (12.96 min) & *trans* (12.57 min) ισομερή της cycloart-23Z-ene3 β ,25-diol-3 β -ferulate (POR3).

Όλες οι ενώσεις της γ OR και της β OR έχουν απομονωθεί σαν ζεύγος ισομερών τριτερπενικών εστέρων *trans* & *cis* φερουλικού οξέος, όπως φαίνεται χαρακτηριστικά στο φάσμα HR-MS της παραπάνω εικόνας. Η αναλογία μεταξύ *trans* & *cis* είναι τουλάχιστον 2:1 και το *trans* ισομερές στην χρωματογραφία RP εκλύεται πάντα πρώτο.

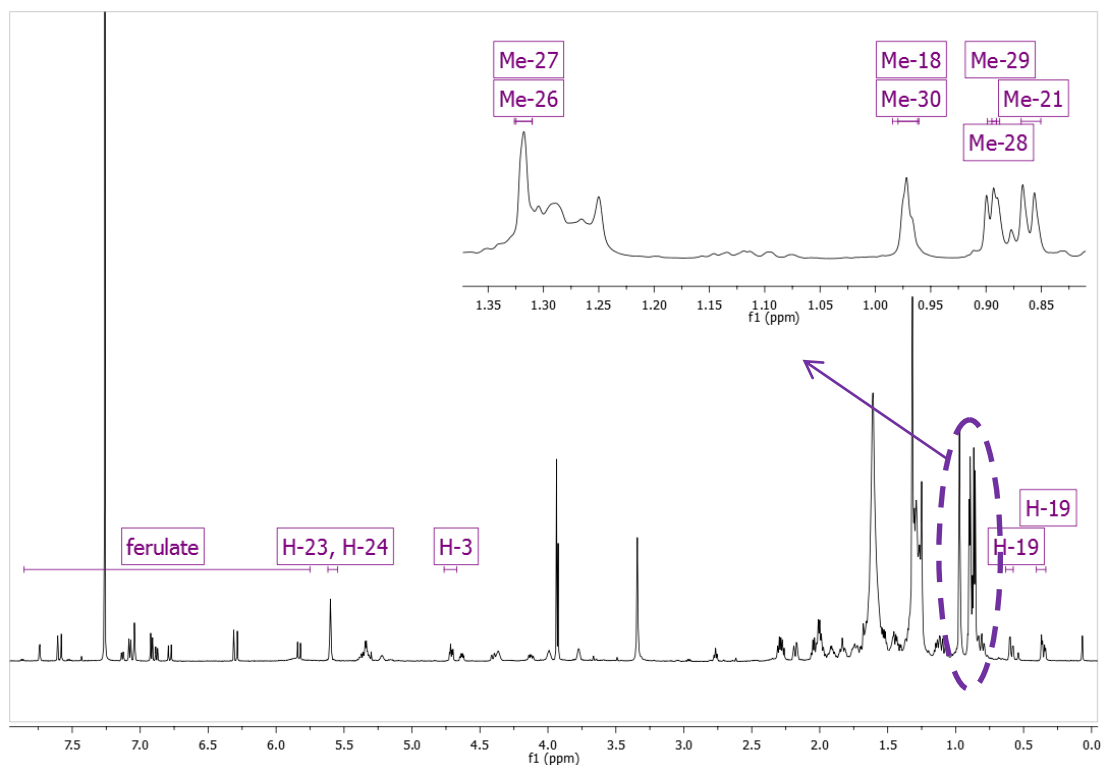
sfc3_fr3 #679-740 RT: 12.31-13.20 AV: 48 NL: 7.49E6
F: FTMS - p APCI corona Full ms [90.00-1000.00]



Εικόνα 6-53 Φάσμα HRMS πλήρους σάρωσης (Full Scan) της cycloart-23Z-ene3β,25-diol-3β-ferulate (POR3)

Η ένωση (POR3) απομονώθηκε από το κλάσμα 2 του SFC-A. Το φάσμα μάζας του μορίου ελήφθη με φασματογράφο μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας HRMS με την μέθοδο χημικού ιονισμού υπό ατμοσφαιρική πίεση (APCI) σε αρνητικό ιονισμό. Έτσι καθορίστηκε το μοριακό βάρος της ουσίας MB: 618.4197 που αντιστοιχεί σε μοριακό τύπο C₄₀H₅₈O₅ (RDB_{eq} =12.5). Η δομή του cycloart-23Z-ene3β,25-diol-3β-*trans*-ferulate (POR3) προσδιορίστηκε με βάση τη φασματοσκοπία NMR (¹H, ¹³C, DEPT HSQC-DEPT, HMBC, COSY) και βιβλιογραφικά δεδομένα [177-179].

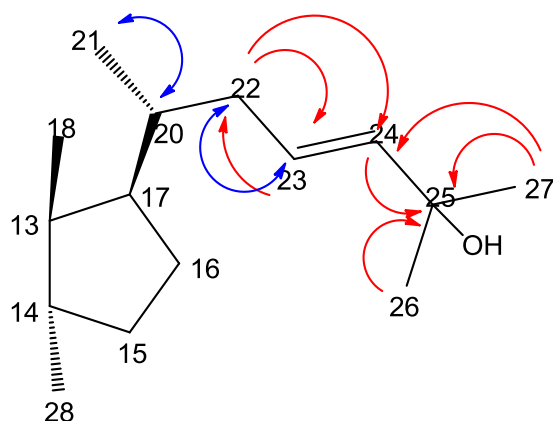
Πρόκειται όπως και προηγουμένως για παράγωγο φερουλικό εστέρα κυκλοαρτανίου, με μία επιπλέον OH-ομάδα όπως υποδεικνύει το σήμα στα δ 70.58 και ο μοριακός τύπος. Τα σήματα ¹H και ¹³C είναι ίδια με αυτά που περιγράφηκαν στα κυκλοαρτανικού τύπου ενώσεις της γOR με εξαίρεση τα σήματα που αφορούν την πλευρική αλυσίδα.



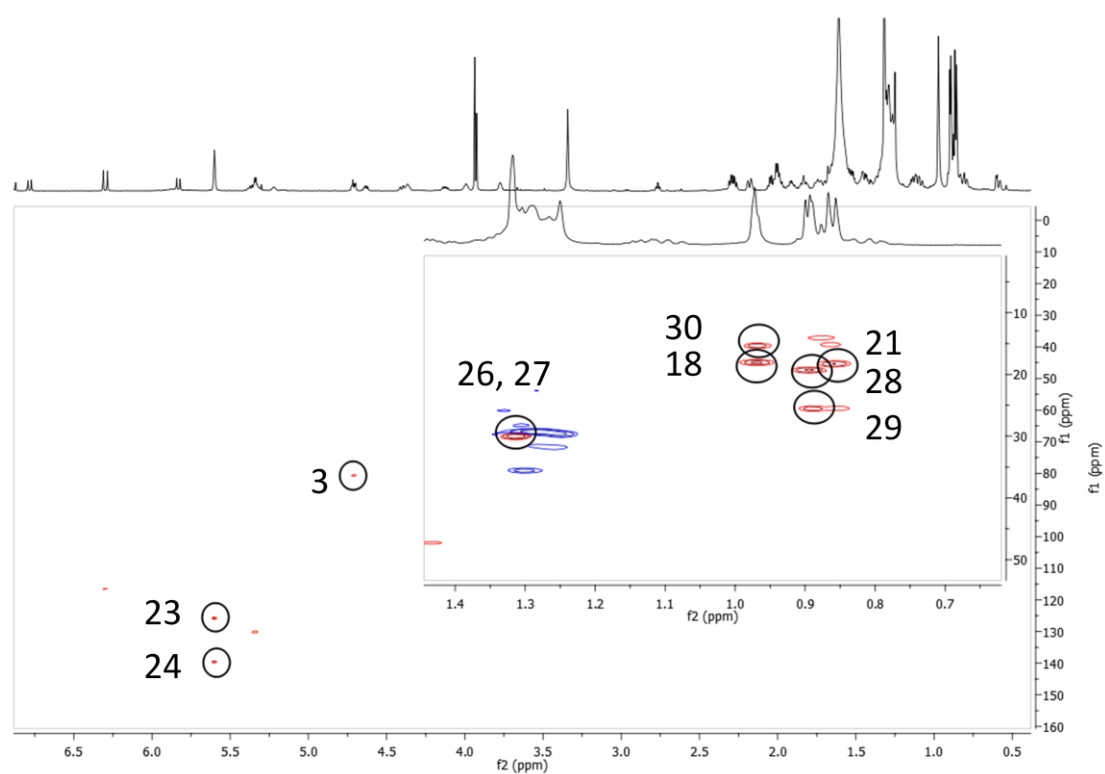
Εικόνα 6-54 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης *cycloart-23Z-ene3 β ,25-diol-3 β - ferulate* (POR3) σε CDCl_3 .

Στο φάσμα $^1\text{H NMR}$ εμφανίζεται μία απλή κορυφή στα 5.60 ppm που ολοκληρώνει για δυο πρωτόνια. Πρόκειται λοιπόν για ολεφινικά πρωτόνια καθένα από τα οποία αντιστοιχεί σε διαφορετικό άνθρακα (125.15 ppm και 139.58 ppm) του διπλού δεσμού, όπως παρατηρείται παρακάτω στο φάσμα HSQC-DEPT. Στην αλειφατική περιοχή, εκτός από τα χαρακτηριστικές κορυφές των μεθυλίων 18, 30, 28, 29 & 21, παρατηρείται μία απλή κορυφή στα 1.32 ppm (6H, s) που αντιστοιχεί στα Me-26 και Me-27.

Η θέση του διπλού δεσμού μεταξύ C-23 και C-24 επιβεβαιώθηκε από τη 3J σύζευξη στο HMBC μεταξύ των μεθυλικών πρωτονίων στα 1.32 ppm (CH_3 -26, CH_3 -27) με τον C-24. Επιπλέον, το μεθυλενικό πρωτόνιο στα 1.73 ppm της θέσης 22 σχετίζεται με 2J και 3J σύζευξη με τους άνθρακες του διπλού δεσμού στα 125.15 ppm (C-23) και 139.58 ppm. Η θέση της ομάδας OH στον C-25 ήταν προφανής, εν μέρει από το φάσμα πρωτονίου, με την αποθωρακισμένη απλή κορυφή στα 1.32 ppm που ολοκληρώνει για 6 πρωτόνια. Η θέση αυτή επιβεβαιώνεται στο φάσμα HMBC με τη 2J σύζευξη των μεθυλικών υδρογόνων με άνθρακα στα 70.58 ppm (οξυγονωμένη περιοχή). Μετά από παρατήρηση του φάσματος COSY προκύπτουν συσχετίσεις μεταξύ των πρωτονίων στα 1.46 ppm (H-20) και 0.86 ppm (H-21) αλλά και μεταξύ του H-23 στα 5.60 ppm με τα 2H της θέσης 22 στα 1.72 και 2.18 ppm.



Εικόνα 6-55 Τα μπλε βέλη απεικονίζουν τις COSY συζεύξεις και τα κόκκινα τόξα απεικονίζουν τις HMBC (2J , 3J) συζεύξεις της ένωσης (POR3).



Εικόνα 6-56 Φάσμα HSQC-DEPT της *cycloart-23Z-ene3β,25-diol-3β ferulate trans & cis ferulate* (POR3) σε $CDCl_3$.

Οι Luo et al. [11] και οι Lemus et al. [143] έχουν απομονώσει ξανά από το πύτουρο του ρυζιού την ένωση (POR3) και έχουν δημοσιευθεί δεδομένα 1H , ^{13}C και HRMSx.

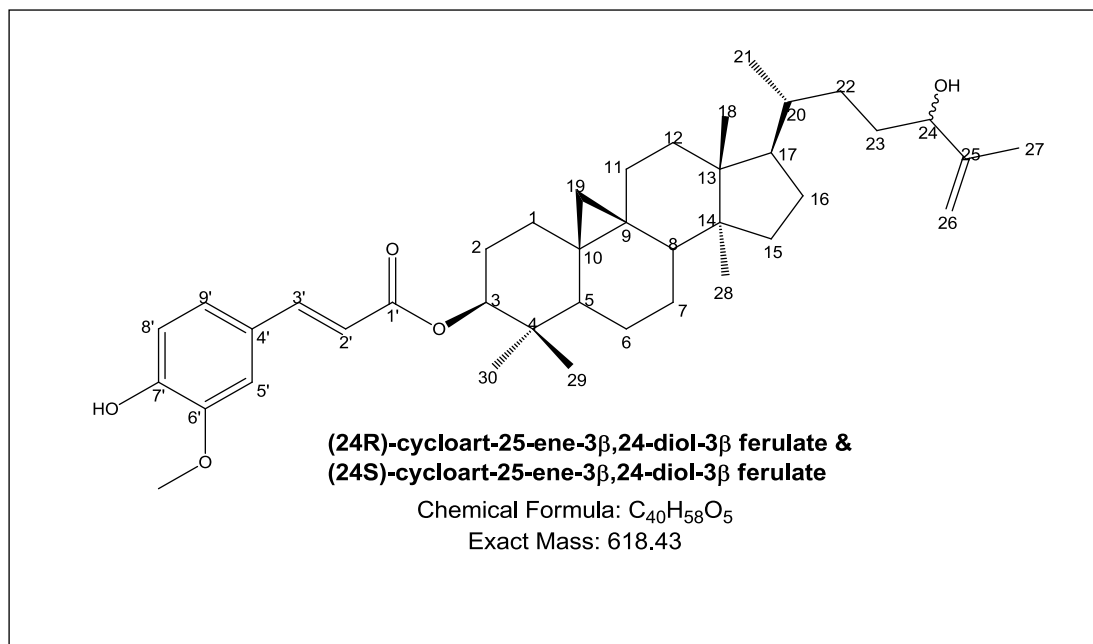
Πίνακας 6-22 Φασματοσκοπικά δεδομένα (600 MHz, CDCl₃) του cycloart-23Z-ene3β,25-diol-3β-ferulate (POR3).

POR3	cycloart-23Z-ene3β,25-diol-3β- <i>trans</i> -ferulate & cis ferulate				
Atom	¹³ C (ppm)	¹ H (ppm)	Integration, Mult/ty, (J (Hz))	HMBC Correlations	COSY
1	31.61	1.66, 1.25	1H, m/ 1H, m		
2	26.80	1.83,1.67	1H, m/ 1H, m	3, 4	
3	80.63	4.71	1H, dd, (4.37, 11.18)	1', 30, 4, 1, 2	
4	39.71	-	-		
5	47.33	1.44	1H, m	30, 29, 6, 4	
6	21.06	1.59, 0.79	1H, m/ 1H, m		
7	26.54	1.99, 1.30	1H, m/ 1H, m		
8	47.941	1.52	1H, m	11	
9	20.28	-	-		
10	26.41	-	-		
11	26.18	1.33, 1.11	1H, m/ 1H, m		
12	33.13	1.62	2H, m	17, 13, 18, 17	
13	45.77	-	-		
14	48.53	-	-		
15	35.90	1.30	2H, m	28, 13,14, 17	
16	26.46	2.01, 1.14	1H, m/ 1H, m	14, 13, 28	
17	52.02	1.62	1H, m		
18	18.20	0.97	3H, s		
19	29.8	0.60, 0.37	1H, d, (3.92)/ 1H, d, (3.92)		
20	36.49	1.46	1H, m		21
21	18.22	0.86	3H, d, (5.65)	20,17	20
22	38.97	1.72, 2.18	1H, m/ 1H, m	23, 24	2.19
23	125.15	5.60	1H, brs	22, 25,	22
24	139.58	5.60	1H, brs		
25	70.58	-	-		
26	29.75	1.32	3H, s	27, 25, 24, 23	
27	29.75	1.32	3H, s		
28	19.29	0.89	3H, s	14	
29	25.56	0.88	3H, s	30, 4 , 3	1.27
30	15.35	0.97	3H, s	29, 5, 3	
<i>trans</i>					
1'	167.02	-	-		
2'	116.52	6.29	1H, d, (15.84Hz)	1', 4', 3'	
3'	144.62	7.59	1H, d, (15.84Hz)	5', 9', 1', 2', 4'	
4'	127.20	-	-		
5'	109.48	7.04	1H, d, (1.90Hz)	3', 7', 9'	
6'	146.88	-	-		
7'	147.76	-	-		
8'	114.87	6.92	1H, d, (8.11Hz)	7', 4',	
9'	123.23	7.08	1H, dd, (8.11, 1.90 Hz)	5', 3'	
6' CH ₃ O	56.06	3.93	3H, s	6'	
7' OH		5.83	1H, brs	7'	
<i>cis</i>					
1'	166.16	-	-		

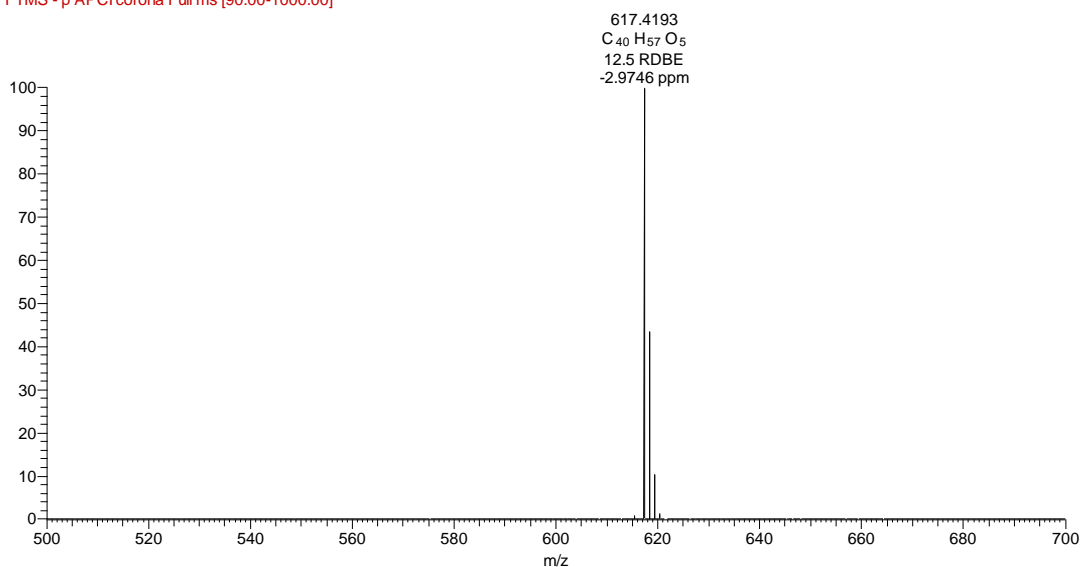
2'	117.81	5.83	1H, d, (12.90Hz)	4', 1	
3'	143.56	6.78	1H, d, (12.90Hz)	5', 9', 1'	
4'	127.35	-	-		
5'	112.98	7.74	1H, d, (1.90)	9', 3', 6'	
6'	146.77	-	-		
7'	147.06	-			
8'	114.00	6.89	1H, d, (8.28)	4', 7'	
9'	125.71	7.13	1H, dd, (8.28, 1.90)	5', 3', 7'	
6' CH ₃ O	56.06	3.93	3H, s	6'	
7' OH		5.83	1H, brs	7'	

(24R)-cycloart-25-ene-3 β ,24-diol-3 β -ferulate &

(24S)-cycloart-25-ene-3 β ,24-diol-3 β -ferulate (POR2)



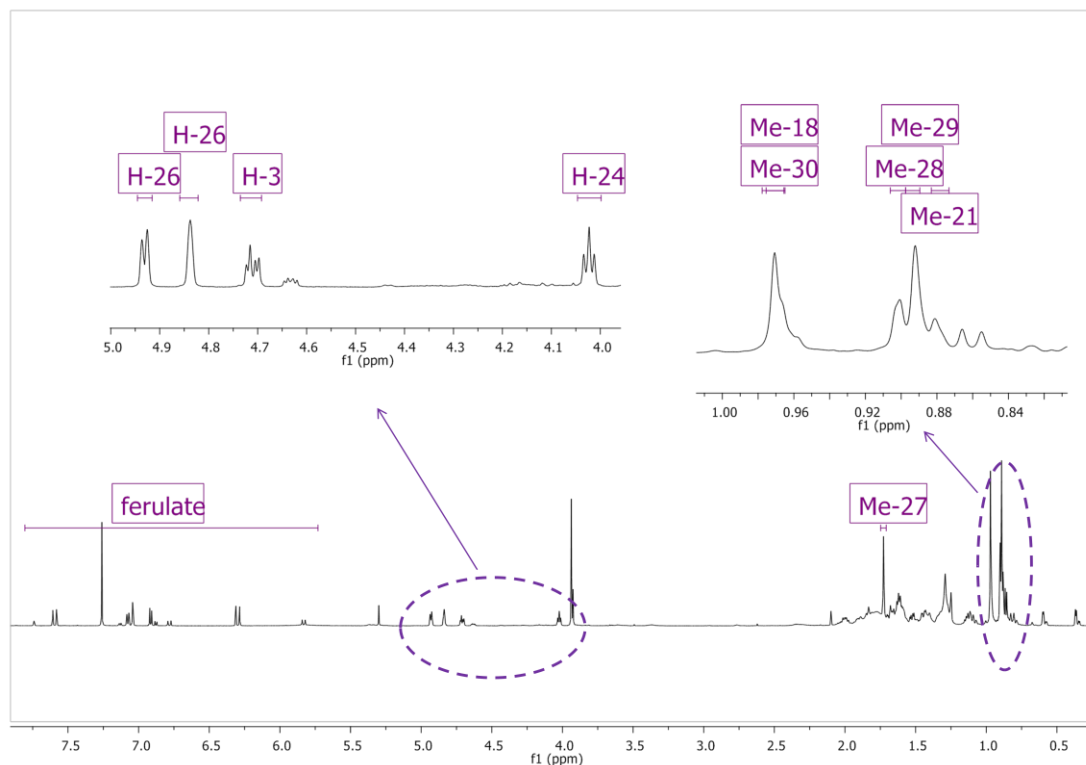
sfc3_fr5 #664 RT: 12.19 AV: 1 NL: 8.49E5
F: FTMS - p APCI corona Full ms [90.00-1000.00]



Εικόνα 6-57 Φάσμα HRMS πλήρους σάρωσης (Full Scan) της (24R)-cycloart-25-ene-3 β ,24-diol-3 β -ferulate & (24S)-cycloart-25-ene-3 β ,24-diol-3 β -ferulate.

Η ένωση (POR2) απομονώθηκε από το κλάσμα 3 του SFC-A. Το φάσμα μάζας του μορίου ελήφθη με φασματογράφο μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας HRMS με την μέθοδο χημικού ιονισμού υπό ατμοσφαιρική πίεση (APCI) σε αρνητικό ιονισμό. Έτσι καθορίστηκε το μοριακό βάρος της ουσίας MB: 618.4193 που αντιστοιχεί σε μοριακό τύπο C₄₀H₅₈O₅ (RDB_{eq} =12.5) γεγονός που υποδεικνύει ότι πρόκειται για ένα

ισομερές του μορίου (POR3). Η δομή των μορίων (24R)-cycloart-25-ene-3β,24-diol-3β *cis* & *trans* ferulate και των (24S)-cycloart-25-ene-3β,24-diol-3β *cis* & *trans* ferulate (POR2) προσδιορίστηκε με βάση τη φασματοσκοπία NMR (¹H, HSQC-DEPT, HMBC, COSY).

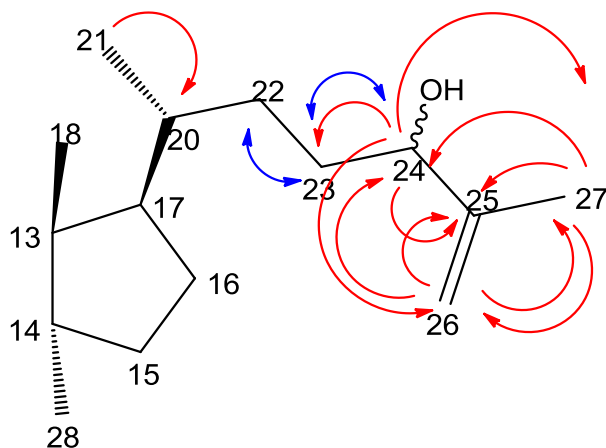


Εικόνα 6-58 Φάσμα ¹H-NMR της ένωσης (24S) & (24R)-cycloart-25-ene-3β,24-diol-3β *cis* & *trans* ferulate (POR2) σε CDCl₃.

Πρόκειται για έναν κυκλοαρτανικού τύπου φερουλικό εστέρα, τα χαρακτηριστικά σήματα του οποίου έχουν περιγραφεί. Η διαφορά έγκειται κάθε φορά στην πλευρική αλυσίδα. Η πλευρική αλυσίδα του μορίου καταλήγει στο εξωμεθυλένιο της θέσης 26, όπως φαίνεται στο φάσμα ¹H-NMR με σήματα στα 4.93 ppm & 4.83 ppm (1H, d, $J=6.44$ Hz/ 1H, brs). Το αποθωρακισμένο βινυλικό Me-27 εμφανίζεται με μια απλή κορυφή στα 1.72 ppm. Το H-24 εμφανίζεται στα 4.02 ppm με μία τριπλή κορυφή (t, $J=6.41$ Hz).

Στο HSQC-DEPT, επιβεβαιώνεται η ύπαρξη του εξωμεθυλενίου με τα υδρογόνα στα 4.93 ppm & 4.83 ppm να συνδέονται στον ίδιο άνθρακα στα 111.19 ppm (C-26) και η ύπαρξη του ενός επιπλέον οξυγονωμένου άνθρακα με το H-24 να συζεύγνυται με άνθρακα στα 76.73 ppm (C₂₄-OH). Στο φάσμα HMBC, τα H₂-26 εμφανίζουν ³J σύζευξη με τον μεθυλικό C-27 (δ 17.37) της θέσης 27 και τον οξυγονωμένο C-24 αλλά και ²J σύζευξη με τον τεταρτοταγή άνθρακα της C-25 (δ 147.65). Επιβεβαιώνεται έτσι η θέση της OH-ομάδας στον C-24. Η ταυτοποίηση του μορίων

(24R)-cycloart-25-ene-3 β ,24-diol-3 β -*trans*-ferulate & (24S)-cycloart-25-ene-3 β ,24-diol-3 β -*trans*-ferulate έγινε με βάση τα φάσματα ^1H , COSY, HSQC-DEPT και HMBC σε συνδυασμό με βιβλιογραφικά δεδομένα [177, 179, 180]. Η ένωση (POR2) όπως και η (POR3) έχει απομονωθεί ξανά από το πύτουρο του ρυζιού και από τους ίδιους ερευνητές έχουν δημοσιευθεί δεδομένα ^1H , ^{13}C και HRMS [11], [143].



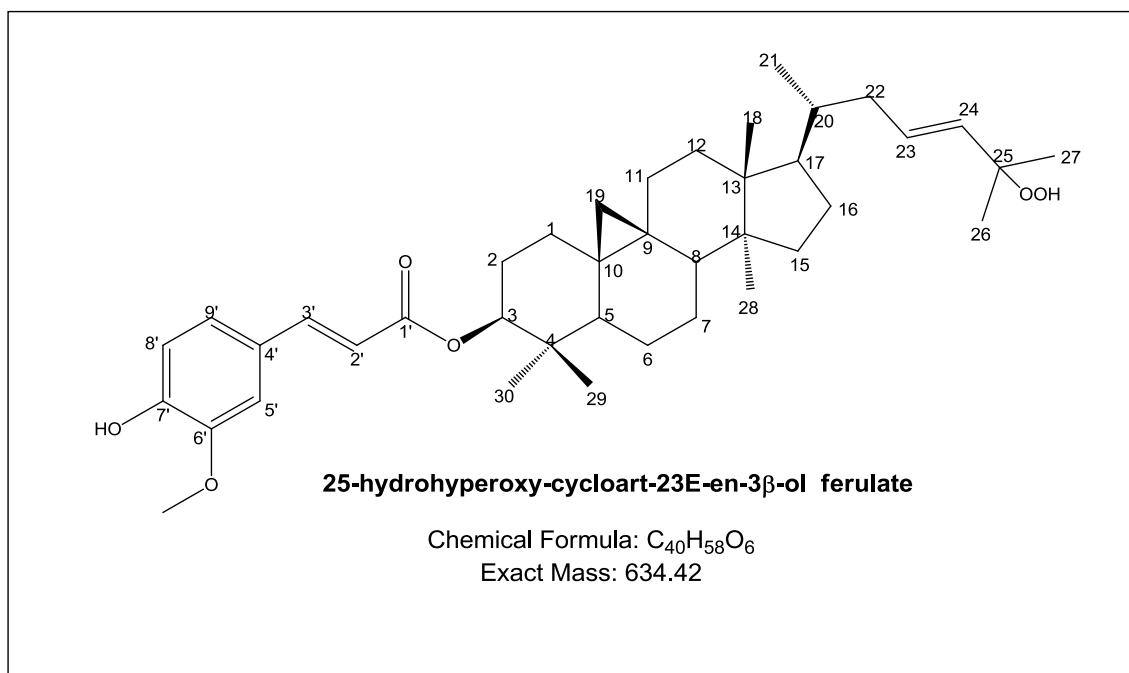
Εικόνα 6-59 Τα μπλε βέλη απεικονίζουν τις COSY συζεύξεις και τα κόκκινα τόξα απεικονίζουν τις HMBC (2J , 3J) συζεύξεις της ένωσης (POR2).

Πίνακας 6-23 Φασματοσκοπικά δεδομένα (600 MHz, CDCl_3) του (24S)-cycloart-25-ene-3 β ,24-diol-3 β -ferulate (POR2)

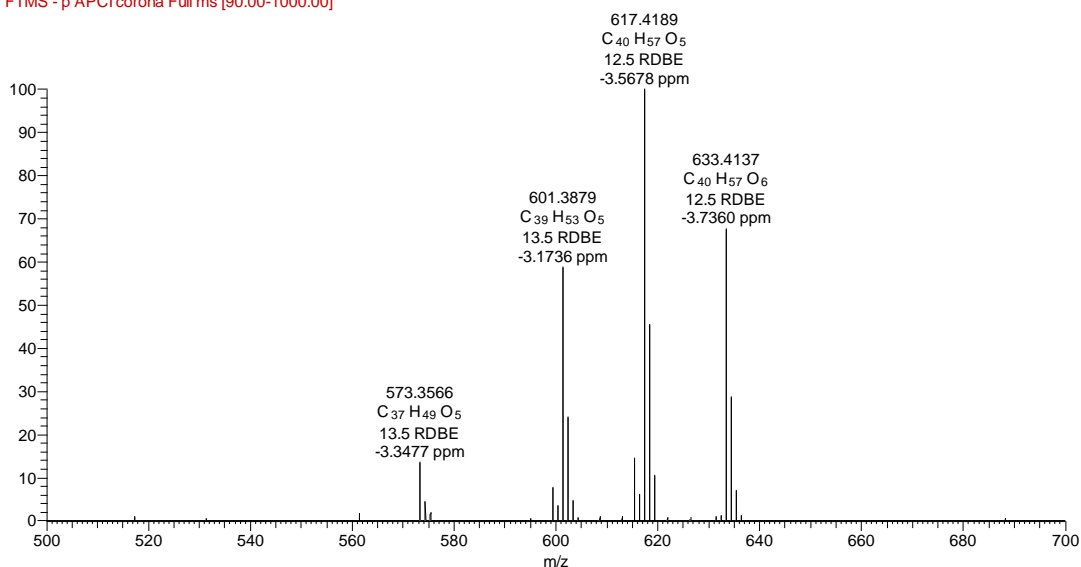
POR2	(24S)-cycloart-25-ene-3 β ,24-diol-3 β ferulate				
Atom	^{13}C (ppm)	^1H (ppm)	Integration, Mult/ty, (J (Hz))	HMBC Correlations	COSY
1	31.61	1.66, 1.25	1H, m/ 1H, m		
2	26.80	1.83, 1.67	1H, m/ 1H, m	3, 4	
3	80.63	4.71	1H, dd, (4.37, 11.18)	1', 30, 4, 1, 2	
4	39.71	-	-		
5	47.33	1.44	1H, m	30, 29, 6, 4	
6	21.06	1.59, 0.79	1H, m/ 1H, m		
7	26.54	1.99, 1.30	1H, m/ 1H, m		
8	47.941	1.52	1H, m	11	
9	20.28	-	-		
10	26.41	-	-		
11	26.18	1.33, 1.11	1H, m/ 1H, m		
12	33.13	1.62	2H, m	17, 13, 18, 17	
13	45.77	-	-		
14	48.53	-	-		
15	35.90	1.30	2H, m	28, 13, 14, 17	
16	26.46	2.01, 1.14	2H, m	14, 13, 28	
17	52.02	1.62	1H, m		

18	18.20	0.97	3H, s		
19	29.80	0.60, 0.37	1H, d, (3.92)/ 1H, d, (3.92)		
20	35.99	1.40	1H, m		
21	18.31	0.89	3H, d, (5.18)	17, 22, 20	20
22	31.97	1.12, 0.95	1H, m / 1H, m		
23	31.68	1.65, 1.45	1H, m / 1H, m	25, 24	23,22
24	76.73	4.02	1H, t, (6.41)	22, 26, 27, 25	23
25	147.65				
26	111.19	4.93, 4.83	1H, d, (6.44)/ 1H, brs	25, 24, 27	27
27	17.37	1.72	3H, s	24, 25, 26	
28	19.29	0.91	3H, s	13, 14	
29	25.50	0.89	3H, s	3, 4, 5, 30	
30	15.36	0.97	3H, s	5, 3, 29, 4	
<i>trans</i>					
1'	167.02	-	-		
2'	116.52	6.29	1H, d, (15.84Hz)	1', 4', 3'	
3'	144.62	7.59	1H, d, (15.84Hz)	5', 9', 1', 2', 4'	
4'	127.20	-	-		
5'	109.48	7.04	1H, d, (1.90Hz)	3', 7', 9'	
6'	146.88	-	-		
7'	147.76	-	-		
8'	114.87	6.92	1H, d, (8.11Hz)	7', 4',	
9'	123.23	7.08	1H, dd, (8.11, 1.90 Hz)	5', 3'	
6' CH ₃ O	56.06	3.93	3H, s	6'	
7' OH		5.83	1H, brs	7'	
<i>cis</i>					
1'	166.16	-	-		
2'	117.81	5.83	1H, d, (12.90Hz)	4', 1	
3'	143.56	6.78	1H, d, (12.90Hz)	5', 9', 1'	
4'	127.35	-	-		
5'	112.98	7.74	1H, d, (1.90)	9', 3', 6'	
6'	146.77	-	-		
7'	147.06	-	-		
8'	114.00	6.89	1H, d, (8.28)	4', 7'	
9'	125.71	7.13	1H, dd, (8.28, 1.90)	5', 3', 7'	
6' CH ₃ O	56.06	3.93	3H, s	6'	
7' OH		5.83	1H, brs	7'	

25-hydroperoxy-cycloart-23E-en-3β-ol ferulate (POR1)



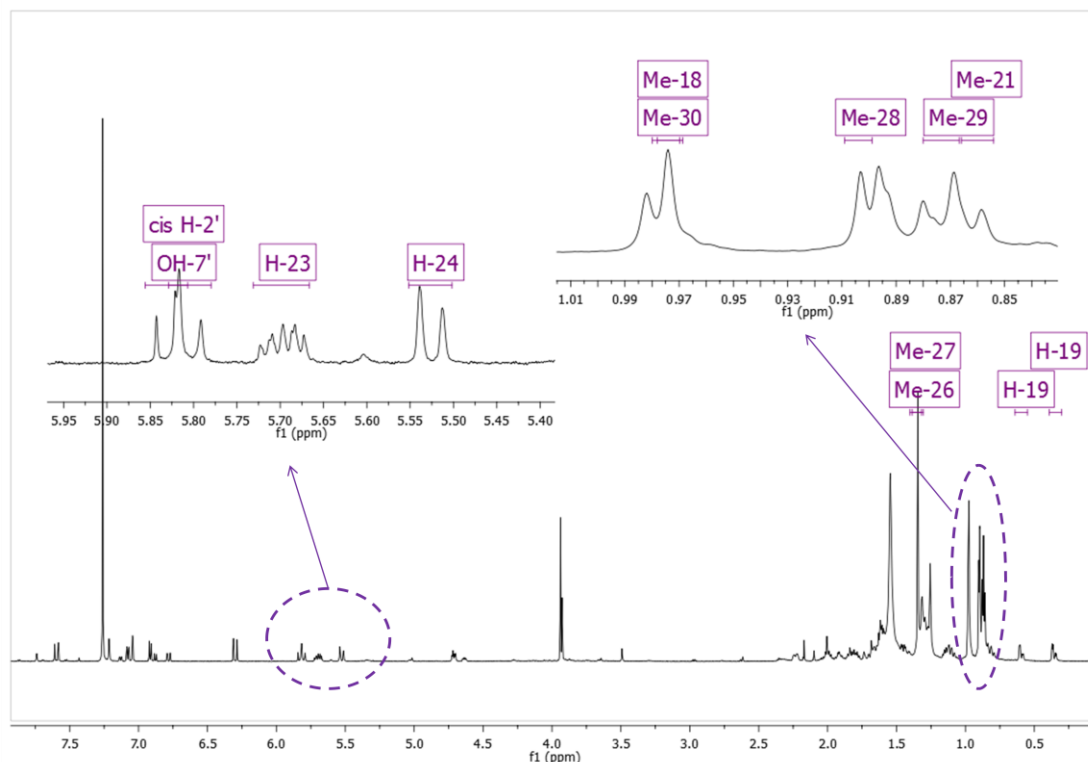
sfc3_fr8 #672 RT: 12.31 AV: 1 NL: 1.98E5
F: FTMS - p APCI corona Full ms [90.00-1000.00]



Εικόνα 6-60 Φάσμα HRMS πλήρους σάρωσης (Full Scan) της 25-hydroperoxy-cycloart-23E-en-3β-ol ferulate (POR1).

Η ένωση (POR1) απομονώθηκε από το κλάσμα 4 του SFC-A. Το φάσμα μάζας του μορίου ελήφθη με φασματογράφο μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας HRMS με την μέθοδο χημικού ιονισμού υπό ατμοσφαιρική πίεση (APCI) σε αρνητικό ιονισμό. Έτσι καθορίστηκε το μοριακό βάρος της ουσίας MB: 634.4137 που αντιστοιχεί σε μοριακό τύπο $C_{40}H_{58}O_6$ (RDB_{eq} 12.5). Η δομή των μορίων 25-hydroperoxy-cycloart-

23E-en-3β-ol *trans* & *cis* ferulate (POR1) προσδιορίστηκε με βάση τη φασματοσκοπία NMR (^1H , HSQC-DEPT, HMBC, COSY).

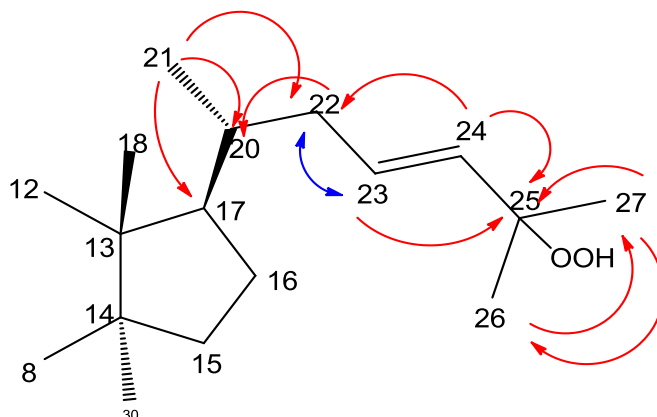


Εικόνα 6-61 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης 25-hydroperoxy-cycloart-23E-en-3β-ol *trans* & *cis* ferulate (POR1) σε CDCl_3 .

Πρόκειται πάλι για κυκλοαρτανικού τύπου φερουλικό εστέρα, τα χαρακτηριστικά σήματα του οποίου έχουν περιγραφεί παραπάνω. Διαφέρει μόνο στα σήματα της πλευρικής αλυσίδας. Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ παρατηρείται ένας διπλός δεσμός στα 5.69 και 5.52 ppm και μία αποθωρακισμένη απλή κορυφή στα 1.34 ppm που ολοκληρώνει για έξι υδρογόνα.

Στο HMBC διακρίνεται μια 3J σύζευξη του οξυγονωμένου C-25 (δ 82.18) με το ολεφινικό πρωτόνιο H-23 (δ 5.69) αλλά και μια 3J σύζευξη του ολεφινικού πρωτονίου H-24 (δ 5.52) με τα μεθύλια 26 & 27. Η απλή κορυφή των αποθωρακισμένων Me-26, Me-27 (δ 1.34) στο φάσμα ^1H και οι συζεύξεις που περιγράφησαν στο HMBC οδηγούν στην τοποθέτηση της οξυγονωμένης ομάδας στη θέση 25 και το διπλό δεσμό στη θέση 23 (δ 5.69) και 24 (δ 5.52). Η ύπαρξη 6 οξυγόνων στον μοριακό τύπο, η απουσία άλλων οξυγονομένων ανθράκων στο HSQC-DEPT, η αποθωράκιση του C-25 σε σχέση με τη συνήθη χημική μετατόπιση των τριτοταγών αλκοολών στα 70 ppm αλλά και βιβλιογραφικά δεδομένα [170] οδηγεί στην τοποθέτηση του επιπλέον οξυγόνου και πάλι στην θέση 25 με τη μορφή υπεροξειδίου C₂₅-O-OH. Τέλος στο φάσμα COSY είναι εμφανής η σύζευξη μεταξύ H-23 και H₂-22 (δ 2.23 &

1.79), γεγονός που επιτρέπει την καθολική απόδοση των σημάτων της ένωσης (POR1) όπως αυτά παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα [170], [181], [171].



Εικόνα 6-62 Τα μπλε βέλη απεικονίζουν τις COSY συζεύξεις και τα κόκκινα τόξα απεικονίζουν τις HMBC (2J , 3J) συζεύξεις της ένωσης (POR1).

Η μελέτη των φασμάτων HSQC-DEPT & HMBC οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η ένωση (POR1) αποτελείται από:

- Οχτώ μεθύλια εκ των οποίων τα επτά τοποθετούνται στη περιοχή των υψηλών πεδίων και το ένα αρκετά αποθωρακισμένο αντιστοιχεί στη μεθόξυ ομάδα.
- Εννέα μεθυλένια με χαρακτηριστικό το μεθυλένιο της θέσης 19 των κυκλοαρτανίων.
- Δώδεκα μεθίλια εκ των οποίων τα πέντε πιο αποθωρακισμένα ανήκουν στο αρωματικό σύστημα και δύο ανήκουν στο διπλό δεσμό της πλευρικής αλυσίδας.
- Έντεκα τεταρτοταγείς άνθρακες εκ των οποίων οι τέσσερις βρίσκονται στην αρωματική περιοχή και ένας ανήκει σε αποθωρακισμένο οξυγονωμένο άνθρακα της πλευρικής αλυσίδας (δ 82.18).

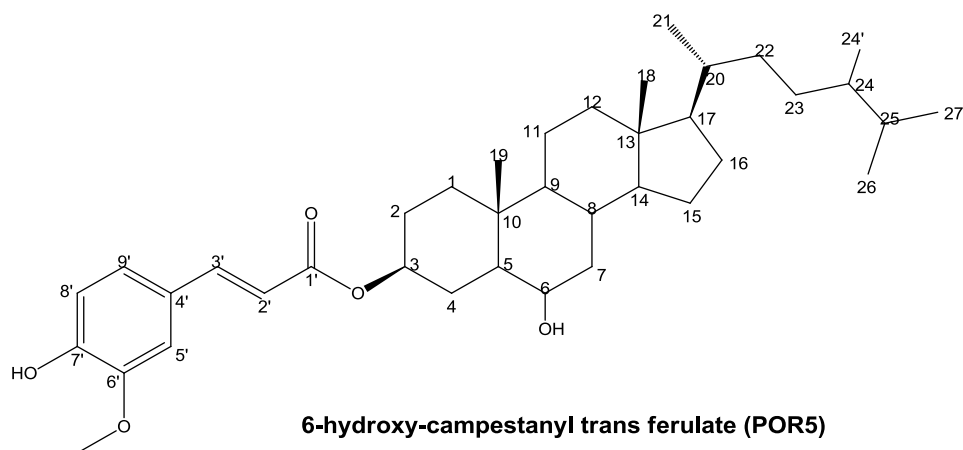
Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι η ένωση (POR1) είναι ένα νέο φυσικό προϊόν που απομονώνεται για πρώτη φορά από το πύτουρο του ρυζιού [170].

Πίνακας 6-24 Φασματοσκοπικά δεδομένα (600 MHz, $CDCl_3$) του 25-hydroperoxy-cycloart-23E-en-3β-ol ferulate (POR1).

POR1	25-hydroperoxy-cycloart-23E-en-3β-ol ferulate			
Atom	^{13}C (ppm)	1H (ppm)	Integration, Mult/ty, (J (Hz))	HMBC Correlations
1	31.61	1.66, 1.25	1H, m/ 1H, m	
2	26.80	1.83,1.67	1H, m/ 1H, m	3, 4
3	80.63	4.71	1H, dd, (4.37, 11.18)	1', 30, 4, 1, 2
4	39.71	-	-	
5	47.33	1.44	1H, m	30, 29, 6, 4
6	21.06	1.59, 0.79	1H, m/ 1H, m	
7	26.54	1.99, 1.30	1H, m/ 1H, m	
8	47.94	1.52	1H, m	11

9	20.28	-	-	
10	26.41	-	-	
11	26.18	1.33, 1.11	1H, m/ 1H, m	
12	33.13	1.62	2H, m	17, 13, 18, 17
13	45.77	-	-	
14	48.53	-	-	
15	35.9	1.30	2H, m	28, 13,14, 17
16	26.46	2.01, 1.14	2H, m	14, 13, 28
17	52.02	1.62	1H, m	
18	18.20	0.97	3H, s	
19	29.80	0.60, 0.37	1H, d, (3.92)/ 1H, d, (3.92)	
20	36.37	1.48		
21	18.37	0.87	3H, d, (6.80)	17, 20
22	39.42	2.23, 1.79	2H, <i>m</i>	23, 24, 21, 20
23	131.00	5.69	1H, td, (8,00,15.73)	25
24	134.5	5.52	1H, d, (15.73)	25, 22, 26,27
25-OOH	82.18			
26	24.41	1.34	(3H, s)	25, 27, 24
27	24.41	1.34	(3H, s)	25, 26, 24
28	19.29	0.90	(3H, s)	
29	25.54	0.89	(3H, s)	4, 3, 30, 5,
30	15.35	0.97	(3H, s)	4, 3, 29,
<i>trans</i>				
1'	167.02	-	-	
2'	116.52	6.29	1H, d, (15.84Hz)	1', 4', 3'
3'	144.62	7.59	1H, d, (15.84Hz)	5', 9', 1', 2', 4'
4'	127.20	-	-	
5'	109.48	7.04	1H, d, (1.90Hz)	3', 7', 9'
6'	146.88	-	-	
7'	147.76	-	-	
8'	114.87	6.92	1H, d, (8.11Hz)	7', 4',
9'	123.23	7.08	1H, dd, (8.11, 1.90 Hz)	5', 3'
6' CH ₃ O	56.06	3.93	3H, s	6'
7' OH		5.83	1H, brs	7'
<i>cis</i>				
1'	166.16	-	-	
2'	117.81	5.83	1H, d, (12.90Hz)	4', 1
3'	143.56	6.78	1H, d, (12.90Hz)	5', 9', 1'
4'	127.35	-	-	
5'	112.98	7.74	1H, d, (1.90)	9', 3', 6'
6'	146.77	-	-	
7'	147.06	-	-	
8'	114.00	6.89	1H, d, (8.28)	4', 7'
9'	125.71	7.13	1H, dd, (8.28, 1.90)	5', 3', 7'
6' CH ₃ O	56.06	3.93	3H, s	6'
7' OH		5.83	1H, brs	7'

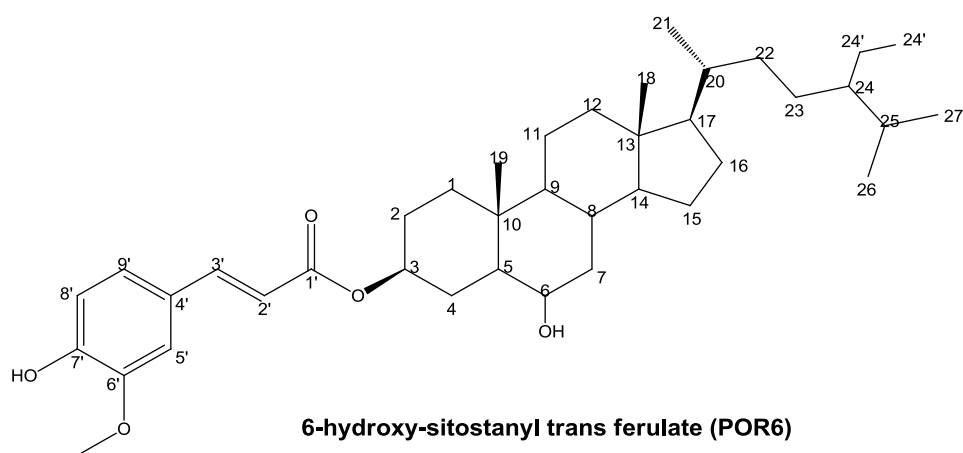
6-hydroxy-campestanyl *trans* ferulate (POR5)



Chemical Formula: $C_{38}H_{58}O_5$

Exact Mass: 594.43

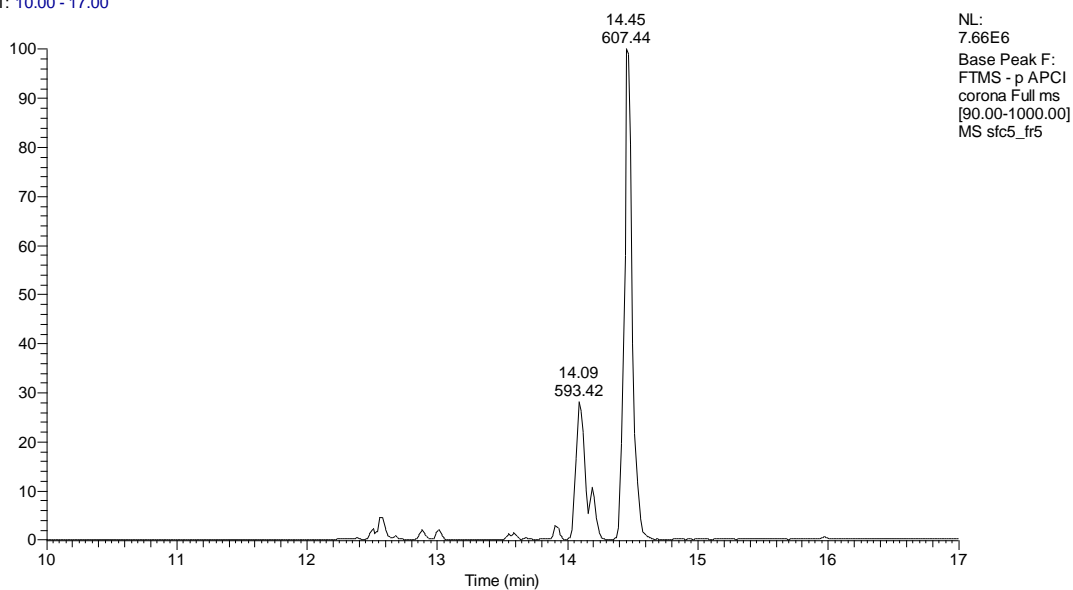
6-hydroxy-sitostanyl *trans* ferulate (POR6)



Chemical Formula: $C_{39}H_{60}O_5$

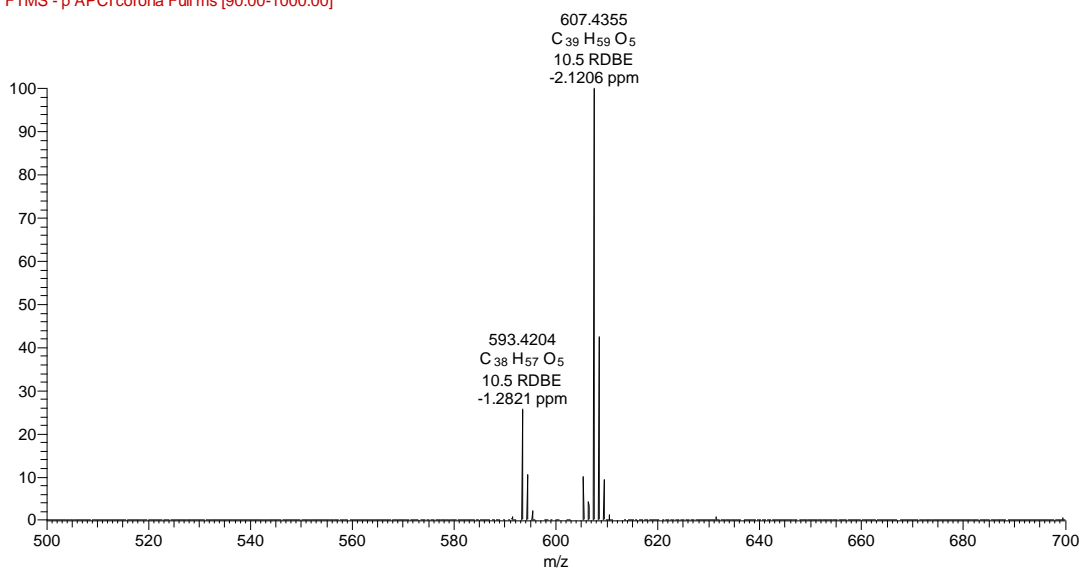
Exact Mass: 608.44

RT: 10.00 - 17.00



Εικόνα 6-63 LC-MS του κλάσματος 1 του SFC-B, όπου παρατηρούνται τα 6-hydroxy-campestanyl trans ferulate (POR5) & 6-hydroxy-sitostanyl trans ferulate (POR6).

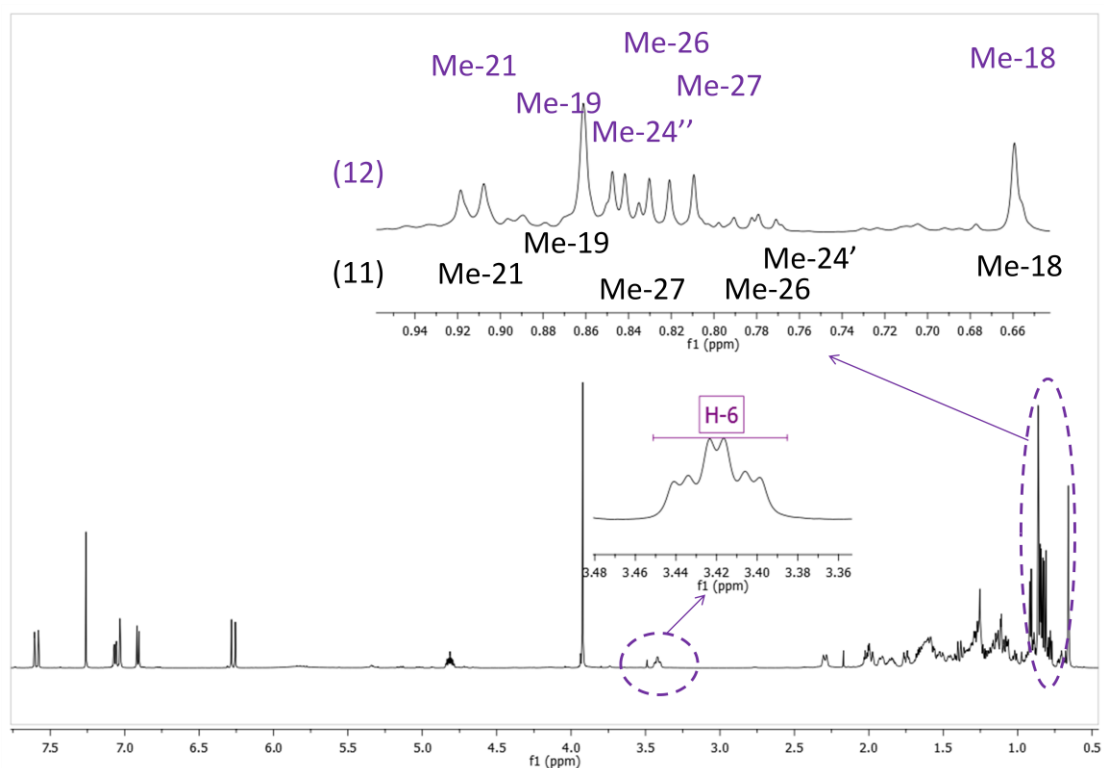
sfc5_fr5 #745-820 RT: 13.62-14.89 AV: 69 NL: 4.75E5
F: FTMS - p APCI corona Full ms [90.00-1000.00]



Εικόνα 6-64 Φάσμα HRMS πλήρους σάρωσης (Full Scan) των 6-hydroxy-campestanyl trans ferulate (POR5) & 6-hydroxy-sitostanyl trans ferulate (POR6).

Οι ενώσεις (POR5) & (POR6) απομονώθηκαν από το κλάσμα 1 του SFC-B ως μίγμα, αλλά και μία προς μία μετά από επεξεργασία του κλ.3 της semi prep HPLC με analytical HPLC. Το φάσμα μάζας των μορίων ελήφθη με φασματογράφο μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας HRMS με την μέθοδο χημικού ιονισμού υπό ατμοσφαιρική πίεση (APCI) σε αρνητικό ιονισμό. Έτσι καθορίστηκε το μοριακό βάρος των ουσιών MB: 608.4355 και 594.4204 που αντιστοιχεί σε μοριακό τύπο C₃₉H₆₀O₅ (RDB_{eq}=10.5) και C₃₈H₅₈O₅ (RDB_{eq} =10.5) αντίστοιχα. Η δομή των μορίων 6-hydroxy-sitostanyl trans ferulate (POR6) και 6-hydroxy-campestanyl trans ferulate (POR5)

προσδιορίστηκε με βάση τη φασματοσκοπία NMR (^1H , HSQC-DEPT, HMBC, COSY).



Εικόνα 6-65 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης *6-hydroxy-campestanyl trans ferulate (POR5)* & *6-hydroxy-sitostanyl trans ferulate (POR6)* σε CDCl_3 .

Πρόκειται για φερουλικούς εστέρες φυτοστερολών, παράγωγα της β-χολεστανόλης [182] που επιβεβαιώνεται από την απουσία της κυκλοπρόπυλο ομάδας, των Me-29, Me-30 και την παρουσία ορισμένων χαρακτηριστικών κορυφών του βασικού σκελετού των στερολών και της πλευρικής αλυσίδας [173], [174], [172], [183], [184], [175], [176]. Η απουσία του διπλού δεσμού που επιβεβαιώνεται από το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ και από το βαθμό ακορεστότητας της ένωσης ($\text{RDB}_{\text{eq}}=10.5$) σε συνδυασμό με τη ύπαρξη μιας οξυγονωμένης ομάδας με βάση το μοριακό τύπο αλλά και το φάσμα HSQC-DEPT (θέση 6, δ_{H} 3.42, δ_{C} 69.18) που το επιβεβαιώνει, έγινε δυνατή η ταυτοποίηση των ενώσεων αυτών. Παρά το γεγονός ότι στα φάσματα 2D παρατηρούνται σήματα και από τις 2 ενώσεις (POR5) & (POR6).

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης (POR6) μεταξύ 0.60 και 1.80 ppm παρατηρούνται έξι μεθύλια. Όπως και στην ένωση (OR5), δύο απλές κορυφές στα 0.68 και 0.86 ppm αντιστοιχούν στα μεθύλια των θέσεων 18 και 19. Για την (OR6) παρατηρούνται τρεις διπλές κορυφές στα 0.81, 0.83 και 0.91 ppm που αντιστοιχούν στα μεθύλια των θέσεων 26, 27 και 21 και μία τριπλή κορυφή στα 0.85 ppm που αντιστοιχεί στο

μεθύλιο της θέσης 24". Τα σήματα της πλευρικής αλυσίδας, είναι ίδια ως προς την πολλαπλότητα για τις ενώσεις (OR4), (OR6) και (POR6). Αντίστοιχα, για την (POR5), παρατηρούνται τέσσερις διπλές κορυφές στα 0.78, 0.84, 0.77 και 0.91 ppm αντιστοιχούν στα μεθύλια των θέσεων 27, 26, 24', 21. Τα ίδια σήματα συναντώνται και για την πλευρική αλυσίδα των (OR3), (OR5).

Οι εστέρες στανολών (ενώσεις OR5 & OR6) που περιγράφησαν στην ομάδα της γOR διαφέρουν από τις ενώσεις POR5 & POR6, λόγω του αποθωρακισμένου H-6 στα 3.42 ppm. Σε αντίθεση με τα προηγούμενα παράγωγα τύπου κυκλοαρτενόλης, τα υδροξυλιωμένα παράγωγα φυτοστερόλης απομονώθηκαν κυρίως σε *trans* μορφή. Το επιπλέον OH των ενώσεων (POR5) & (POR6) σε σχέση με τις ενώσεις (OR5) & (OR6), όπως είναι φανερό με βάση τους μοριακούς τους τύπους, κατατάσσει τις παραπάνω ενώσεις στην ομάδα της ΡγOR.

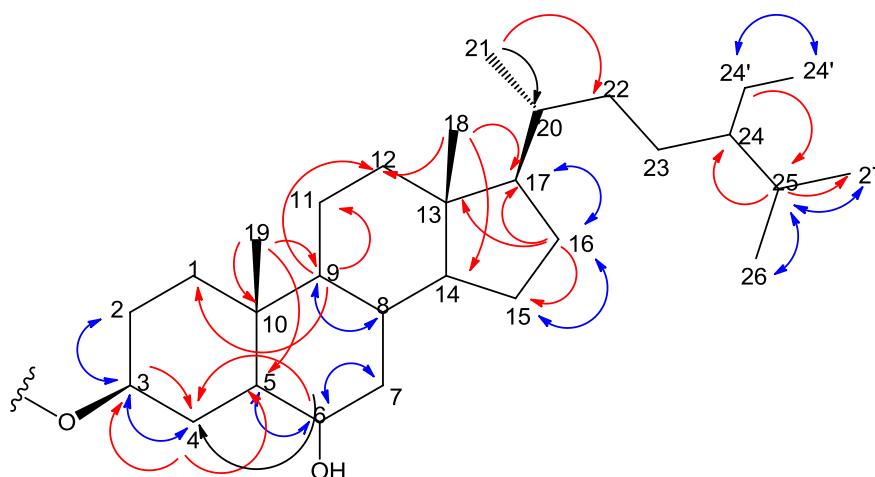
Η ανάλυση του φάσματος COSY έδειξε σύζευξη μεταξύ H-6 και H-5, H-6 και H₂-7 (Εικόνα 6-66). Η ανάλυση του φάσματος HMBC εμφάνισε ³J συσχέτιση του H-6 με τον C-4 (δ 28.16) και ²J συσχέτιση με τον C-5 (δ 51.35). Τα παραπάνω και οι χαρακτηριστικές απλές κορυφές μεθυλίων στα δ 0.68 (H-18) και 0.86 (H-19) οδηγούν στην απόδοση της δομής (POR6), η οποία θεωρείται ότι είναι η 6-hydroxyl-sitostanyl ferulate (POR6) [185], [186], [187].

Η μελέτη των φασμάτων HSQC-DEPT & HMBC οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η ένωση (POR6) αποτελείται από:

- Επτά μεθύλια εκ των οποίων τα έξι τοποθετούνται στη περιοχή των υψηλών πεδίων και το ένα αρκετά αποθωρακισμένο αντιστοιχεί στη μεθοξυ ομάδα.
- Έντεκα μεθυλένια στα υψηλά πεδία.
- Δεκαπέντε μεθίλια εκ των οποίων τα πέντε πιο αποθωρακισμένα ανήκουν στο αρωματικό σύστημα και ένα είναι οξυγονωμένο (δ 69.18).
- Έξι τεταρτοταγείς άνθρακες εκ των οποίων οι τέσσερις βρίσκονται στην αρωματική περιοχή και οι άλλοι δύο στην αλειφατική περιοχή.

Τα ίδια ισχύουν και για την (POR5) με μοναδική διαφορά τα δέκα μεθυλένια αντί για έντεκα. Η ένωση (POR5), υπάρχει σε αναλογία 1:3 στο κλάσμα του SFC-B σε σχέση με την ένωση (POR6) και παρουσιάζει τις ίδιες συζεύξεις στο COSY, HMBC με εξαίρεση τα σήματα της πλευρικής αλυσίδας. Οπότε το επιπλέον -OH τοποθετείται και πάλι στη θέση 6. Η (POR5) έχει ένα λιγότερο μεθύλιο.

Πιο αναλυτικά, τα σήματα ¹³C & ¹H NMR παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.



Εικόνα 6-66 Τα μπλε βέλη απεικονίζουν τις COSY συζεύξεις και τα κόκκινα τόξα απεικονίζουν τις HMBC (2J , 3J) συζεύξεις (κόκκινα τόξα) του 6-hydroxy-sitostanyl ferulate (POR6) σε $CDCl_3$ που δηλώνουν τη συγκεκριμένη υποκατάσταση.

Πίνακας 6-25 Φασματοσκοπικά δεδομένα (600 MHz, $CDCl_3$) του 6-hydroxy-sitostanyl trans ferulate (POR6) και του 6-hydroxy-campestanyl trans ferulate (POR5).

POR6	6-hydroxy-sitostanyl trans ferulate				
Atom	^{13}C (ppm)	1H (ppm)	Integration, Mult/ty, (J (Hz))	HMBC Correlations	COSY
1	23.81	1.73, 1.03	1H, m/1H, m		
2	26.83	1.9, 1.56	1H, m/1H, m		
3	73.11	4.80	1H, tt, (4.95, 9.58)	1', 2, 4, 5	2, 4
4	28.16	2.29, 1.38	1H, m/1H, m	5, 10, 3	
5	51.35	1.11	1H, m		
6	69.18	3.42	1H, td, (4.24, 10.60)	5, 4	7, 5
7	42.75	2.00, 0.86	1H, m/1H, m		
8	33.99	1.45	1H, m		
9	53.33	0.70	1H, m	1, 11, 12	8
10	36.14	-	-		
11	20.68	1.48, 1.25	1H, m/1H, m		
12	39.26	1.14, 1.97	1H, m/1H, m		
13	42.7	-	-		
14	55.74	1.07	1H, m		
15	23.88	1.58, 1.06	1H, m/1H, m		
16	27.69	1.85, 1.26	1H, m/1H, m	17, 13, 15	17, 15, 16
17	55.68	1.12	1H, m		
18	11.58	0.68	3H, s	17, 12, 13, 14	
19	13.03	0.86	3H, s	9, 1,	
20	35.71	1.35	1H, m		
21	18.37	0.91	3H, d, (6.5)	20, 17, 22	20
22	33.52	2.30, 1.16	1H, m/1H, m	20,	22
23	25.98	1.32, 1.01	1H, m/1H, m		
24	45.42	0.93	1H, m		
25	28.82	1.66	1H, m	27, 24,	

26	18.86	0.81	3H, d, (6.8)	27, 25, 24	25
27	19.53	0.83	3H, d, (6.8)	26, 25	25
24'	22.61	1.26	2H, m	25	
24''	11.6	0.85	3H, t, (7.00)		24'
<i>trans</i>					
1'	167.02	-	-		
2'	116.52	6.29	1H, d, (15.84Hz)	1', 4', 3'	
3'	144.62	7.59	1H, d, (15.84Hz)	5', 9', 1', 2', 4'	
4'	127.20	-	-		
5'	109.48	7.04	1H, d, (1.90Hz)	3', 7', 9'	
6'	146.88	-	-		
7'	147.76	-	-		
8'	114.87	6.92	1H, d, (8.11Hz)	7', 4',	
9'	123.23	7.08	1H, dd, (8.11, 1.90 Hz)	5', 3'	
6' CH ₃ O	56.06	3.93	3H, s	6'	
7' OH		5.83	1H, brs	7'	

POR5	6-hydroxy-campestanyl <i>trans</i> ferulate				
Atom	¹³ C (ppm)	¹ H (ppm)	Integration, Mult/ty, (J (Hz))	HMBC Correlations	COSY
1	23.81	1.73, 1.03	1H, m/1H, m		
2	26.83	1.9, 1.56	1H, m/1H, m		
3	73.11	4.80	1H, tt, (4.95, 9.58)	1', 2, 4, 5	2, 4
4	28.16	2.29, 1.38	1H, m/1H, m	5, 10, 3	
5	51.35	1.11	1H, m		
6	69.18	3.42	1H, td, (4.24, 10.60)	5, 4	7, 5
7	42.75	2.00, 0.86	1H, m/1H, m		
8	33.99	1.45	1H, m		
9	53.33	0.70	1H, m	1, 11, 12	8
10	36.14	-	-		
11	20.68	1.48, 1.25	1H, m/1H, m		
12	39.26	1.14, 1.97	1H, m/1H, m		
13	42.70	-	-		
14	55.74	1.07	1H, m		
15	23.88	1.58, 1.06	1H, m/1H, m		
16	27.69	1.85, 1.26	1H, m/1H, m	17, 13, 15	17, 15, 16
17	55.68	1.12	1H, m		
18	11.58	0.68	3H, s	17, 12, 13, 14	
19	13.03	0.86	3H, s	9, 1,	
20	35.71	1.35	1H, m		
21	18.37	0.91	3H, d,(6.5)	20, 17, 22	20
22	33.52	1.30, 1.16	1H, m/1H, m	20,	22
23	30.36	1.20, 1.10	2H, m		
24	38.3	1.19	1H, m		
25	31.52	1.52	1H, m		
26	17.47	0.78	3H, d, (6.6)		
27	20.00	0.84	3H, d, (6.6)		
24'	14.99	0.77	3H, d, (6.6)	21, 24, 26, 27	24

<i>trans</i>					
1'	167.02	-	-		
2'	116.52	6.29	1H, d, (15.84Hz)	1', 4', 3'	
3'	144.62	7.59	1H, d, (15.84Hz)	5', 9', 1', 2', 4'	
4'	127.20	-	-		
5'	109.48	7.04	1H, d, (1.90Hz)	3', 7', 9'	
6'	146.88	-	-		
7'	147.76	-	-		
8'	114.87	6.92	1H, d, (8.11Hz)	7', 4',	
9'	123.23	7.08	1H, dd, (8.11, 1.90 Hz)	5', 3'	
6' CH ₃ O	56.06	3.93	3H, s	6'	
7' OH		5.83	1H, brs	7'	

Η απόδοση των ενώσεων της ΡγOR έγινε συνδυάζοντας φασμάτα NMR 1D & 2D, δεδομένων HRMS και βιβλιογραφικών δεδομένων ¹H NMR, ¹³C NMR για τις αντίστοιχες τριτερπενικές ή στερουλικές αλκοόλες [178], [179], [183], [170], [186], [187]. Η ένωση (POR2) όπως και η (POR3) έχουν απομονωθεί ξανά από το πύτουρο του ρυζιού και από τους ίδιους ερευνητές έχουν δημοσιευθεί δεδομένα ¹H NMR, ¹³C NMR και HRMS [11], [143] ενώ οι ενώσεις (POR1) (POR4) (POR5) (POR6) είναι νέα φυσικά προϊόντα και **απομονώνονται για πρώτη φορά από το πύτουρο του ρυζιού.**

6.6 Συμπεράσματα-προοπτικές

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε αρχικά, ποιοτικός και ποσοτικός έλεγχος του πίτουρου από διαφορετικά στάδια της μύλευσης με σκοπό την ανάπτυξη μεθόδου που θα επιτρέπει την εύρεση της πιο πλούσιας πρώτης ύλης σε ΡγΟΡ και γΟΡ. Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια των αναλυτικών τεχνικών HPLC-DAD και LC-HRMS. Στη συνέχεια οι ενώσεις της ΡγΟΡ κλασματώθηκαν και διαχωρίστηκαν από τη γΟΡ μέσω εκχύλισης κατ' αντιρροή, ενώ η απομόνωση των ενώσεων της ΡγΟΡ & γΟΡ πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια άλλων χρωματογραφικών τεχνικών. Η ταυτοποίηση των απομονωμένων μεταβολιτών έγινε με το συνδυασμό δεδομένων NMR (1D & 2D) και HRMS.

Τα δείγματα πίτουρου και φλοιού εκχυλίστηκαν σε οξικό αιθυλεστέρα με τη βοήθεια υπερήχων, το οποίο οδήγησε σε ορισμένα γενικά συμπεράσματα. Όσο αυξάνεται ο βαθμός μύλευσης, τόσο μειώνεται η απόδοση σε RBO και η υγροθερμική επεξεργασία βελτιώνει σημαντικά την απόδοση σε RBO. Η βέλτιστη απόδοση σε RBO (g RBO/100 g πίτουρου) επετεύχθη με πίτουρο από τον 1^ο κώνο Gladio parboiled (25%) και η ελάχιστη με τον φλοιό (1% Ronaldo, 1% Gladio).

Τα RBO δείγματα από πίτουρο αναλύθηκαν με HPLC-DAD και έγινε αντιληπτό ότι τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων είναι σταθερά και ανεξάρτητα της ποικιλίας, του σταδίου μύλευσης αλλά και της εφαρμογής ή μη της υγροθερμικής επεξεργασίας. Με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς με τη βοήθεια πρότυπης γΟΡ και ενός εσωτερικού πρότυπου (IS) που επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό της γΟΡ και της ΡγΟΡ σε ένα δείγμα RBO ($R^2 > 0.998$). Η επεξεργασία όλων των δειγμάτων με την παραπάνω μέθοδο οδήγησε στο συμπέρασμα ότι **η πλουσιότερη πηγή γΟΡ και ΡγΟΡ είναι το πίτουρο του 1^{ου} κώνου Gladio parboiled (Gpb1).**

Με δεδομένο πλέον την επιλογή του πίτουρου Gpb1, ως την καταλληλότερη πρώτη ύλη πραγματοποιήθηκαν σειρά δοκιμών και τεχνικών έως την επίτευξη του τελικού στόχου δηλαδή της απομόνωσης των ενώσεων της ΡγΟΡ.

Την εκχύλιση του πίτουρου Gpb1 και την παραλαβή RBO ακολούθησε η υγρή-υγρή εκχύλιση και η παραλαβή του εμπλουτισμένου κλάσματος ΡγΟΡ & γΟΡ (**total γ-oryzanol content, TOC**). Το εμπλουτισμένο κλάσμα TOC επεξεργάστηκε με τη βοήθεια της Χρωματογραφίας Φυγόκεντρου Κατανομής κατ' Αντιρροή (CPC), στοχεύοντας κυρίως στην καλή κλασμάτωση της πολικής γ-ορυζανόλης ώστε να διευκολυνθεί στη συνέχεια η απομόνωσή τους με τη χρήση άλλων χρωματογραφικών τεχνικών. Η τεχνική αυτή έχει εφαρμοστεί με επιτυχία για την απομόνωση μεγάλων

ποσοτήτων γOR σε ένα μονό στάδιο [12]. Ένα από τα κύρια πλεονέκτημα του CPC είναι η αποτελεσματική ανάλυση μεγάλων ποσοτήτων δείγματος, αντίθετα με ότι συμβαίνει στην στερεή – υγρή χρωματογραφία όπου απαιτείται μικρός όγκος ένεσης για να εξασφαλιστεί καλή ποιότητα ανάλυσης. Με δεδομένη την αναλογία 1:4 της ΡγOR σε σχέση με την γOR, είναι σαφώς κατανοητό ότι η ανάκτηση ολόκληρης της ποσότητας του προς ανάλυση δείγματος που εξασφαλίζει η CPC χάρη στην απουσία στερεής φάσης, παρακάμπτοντας προβλήματα μη αναστρέψιμης προσρόφησης ουσιών, την καθιστά τεχνική επιλογής για την αύξηση της απόδοσης κλασμάτων πλούσιων σε ΡγOR. Στην παρούσα εργασία αναπτύχθηκε μέθοδος κλασμάτωσης της ΡγOR και διαχωρισμού της από την γOR.

Από τα κλάσματα που προέκυψαν, έγινε στοχευμένη επιλογή με τη βοήθεια αναλυτικών τεχνικών όπως Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (**TLC**), Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (**HPLC-DAD**) και Υγρή Χρωματογραφία Υπερυψηλής Πίεσης συνδεδεμένης με Φασματογράφο Μάζας Υψηλής Διακριτικής Ικανότητας (**UHPLC-HRMS**) για την περαιτέρω απομόνωση των ενώσεων της ΡγOR με την χρήση άλλων χρωματογραφικών τεχνικών, όπως semi prep-HPLC, HPLC-DAD, prep TLC, SFC-MS.

Η επιτυχής απομόνωση των ενώσεων της γOR πραγματοποιήθηκε με **semi prep-HPLC**, ενώ των ενώσεων της ΡγOR με **prep SFC-MS**. Αξίζει να σημειωθεί ότι το SFC-MS είναι μια πολλά υποσχόμενη χρωματογραφική τεχνική για πολύπλοκα μίγματα άπολων ενώσεων, όπως αυτά της ΡγOR, που δίνει την δυνατότητα στοχευμένης απομόνωσης χάρη στη σύνδεση του με τη φασματομετρία μαζών. **Συνολικά ταυτοποιήθηκαν 12 ενώσεις. Έξι ανήκουν στην ομάδα της γOR. Από αυτές, οι 4 είναι γνωστές ενώσεις ενώ για τις άλλες δύο υπήρχαν ελλιπή βιβλιογραφικά δεδομένα για το φάσμα ^1H NMR και ^{13}C NMR. Από τις υπόλοιπες έξι, οι οποίες ανήκουν στην ομάδα της ΡγOR, οι δύο είναι γνωστές και οι υπόλοιπες τέσσερις είναι νέα φυσικά προϊόντα.**

Η απόδοση της δομής των απομονωμένων μεταβολιτών πραγματοποιήθηκε με διάφορες φασματοσκοπικές μεθόδους και κυρίως με φασματοσκοπία **NMR** και φασματομετρία **HRMS**. Η ανάλυση των φασμάτων **LC-MS** έγινε με στόχο την **γρήγορη αξιολόγηση** των μεταβολιτών σε επίπεδο κλασμάτων CPC και άλλων χρωματογραφικών τεχνικών και κατ' επέκταση την **στοχευμένη απομόνωσή τους**.

Έχοντας ως βάση αυτά τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα προσφέρονται πολλές προοπτικές για το μέλλον, όπως είναι η επιβεβαίωση της μεθόδου ποσοτικοποίησης που περιγράφηκε στη παρούσα εργασία. Η μέθοδος ποσοτικοποίησης δύναται να εφαρμοστεί στα παραπροϊόντα της μύλευσης του ρυζιού των ποικιλιών Gladio και Ronaldo της επόμενης καλλιεργητικής περιόδου και να γίνει σύγκριση των αποτελεσμάτων με αυτά της προηγούμενης καλλιεργητικής περιόδου. Τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα και στο κομμάτι της απομόνωσης θέτουν ως επόμενο βήμα την απομόνωση και ταυτοποίηση του συνόλου των ενώσεων της PγOR καθώς και την απομόνωση της γOR και της PγOR σε μεγάλη κλίμακα. Η απουσία απομονωμένων και πλήρως χημικά χαρακτηρισμένων συστατικών, τόσο της γ-ορουζανόλης όσο και της πολικής γ-ορουζανόλης έχει αποτρέψει την αξιολόγηση των βιολογικών τους ιδιοτήτων, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Ωστόσο, έχουν ξεκινήσει ήδη κάποια πειράματα αξιολόγησης πιθανής δράσης του εμπλουτισμένου εκχυλίσματος σε γOR και PγOR έναντι του μεταβολικού συνδρόμου. Η επίτευξη των στόχων που αφορούν την απομόνωση θα επιτρέψουν στη συνέχεια την διερεύνηση της βιολογικής δράσης της PγOR & της γOR στο μεταβολικό σύνδρομο *in vivo*.

Παράρτημα

Δεδομένα ανάλυσης HPLC-DAD

Πίνακας Π 1 Δεδομένα κατασκευής καμπύλης αναφοράς με τη μέθοδο εσωτερικού.

	Conc OR (ug/mL)	Conc IS (ug/mL)	A1	AIS1	A ratio	Q ratio
CC1_1	5	30	2483801	4493653	0.55273538	0.166666667
CC1_2	5	30	2283717	4545050	0.502462459	0.166666667
CC2_1	10	30	4103364	4548800	0.902076152	0.333333333
CC2_2	10	30	4792754	4484378	1.068766728	0.333333333
CC3_1	15	30	6659678	4524575	1.471890288	0.5
CC3_2	15	30	7923947	4459566	1.776842634	0.5
CC4_1	20	30	8039085	4492713	1.789360905	0.666666667
CC4_2	20	30	9509868	4468268	2.12831191	0.666666667
CC5_1	50	30	21917032	4364647	5.021490169	1.666666667
CC5_2	50	30	23048592	4339207	5.311706033	1.666666667
CC6_1	75	30	33713096	4380775	7.695692201	2.5
CC6_2	75	30	34938886	4352861	8.02664868	2.5
CC7_1	100	30	47248200	4527577	10.43564803	3.333333333
CC7_2	100	30	48731735	4475452	10.88867337	3.333333333
CC8_1	125	30	60797706	4547015	13.37090509	4.166666667
CC8_2	125	30	60884490	4542866	13.4022201	4.166666667
CC9_1	150	30	74053749	4558580	16.24491596	5
CC9_2	150	30	74996042	4584311	16.35928322	5

- Aratio= [0.55, 16.36]
- Qratio= [0.17, 5]

Πίνακας Π 2 Υπολογισμός της συγκέντρωσης της πολικής γ-ορυζανόλης και της γ-ορυζανόλης στο πίτουρο και το φλοιό.

	Area (OR1-4)	Area (POR1-4/7-10)	Area (IS)	Area ratio (OR)	Area ratio (POR)	Q_{IS} (ug/mL)
Rb1a	43684024	13242217	4225746	10.34	3.13	30
Rb1b	51568835	11609864	4136582	12.47	2.81	30
Rb2a	31945407	5656732	3916232	8.16	1.44	30
Rb2b	30688028	6144981	4070573	7.54	1.51	30
Rb3a	26594555	4030112	4105437	6.48	0.98	30
Rb3b	25004188	4726249	4074424	6.14	1.16	30
Rha*	14853009	9276620				
Rhb*	14166496	8493826				
Gb1a	35921039	8398512	4357912	8.24	1.93	30
Gb1b	37882604	9226689	4061164	9.33	2.27	30
Gb2a	27407964	6147081	4393713	6.24	1.40	30
Gb2b	26098077	7360228	4165073	6.27	1.77	30
Gb3a	18845400	4428061	4201629	4.49	1.05	30
Gb3b	18345724	5466028	4166127	4.40	1.31	30
Gha*	6714379	2061874				
Ghb*	6149323	1839790				
Gpb1a	36604048	7711970	4122267	8.88	1.87	30
Gpb1b	36570562	6808804	4037455	9.06	1.69	30
Gpb2a	27098106	7099762	4061154	6.67	1.75	30
Gpb2b	26150766	5548529	4227290	6.19	1.31	30
Gpb3a	29693987	6598105	4095929	7.25	1.61	30
Gpb3b	29408916	7254079	4148506	7.09	1.75	30
Gpb4a	24569433	5578142	4105099	5.99	1.36	30
Gpb4b	23028274	6290872	4105100	5.61	1.53	30

Πίνακας Π 3 Υπολογισμός της συγκέντρωσης της ΡγOR & της γOR σε ug/ml με βάση τη μέθοδο εσωτερικού προτύπου.

	Q/Q _{IS} (OR)	Q/Q _{IS} (POR)	Q _{OR} (ug/mL)	Q _{POR} (ug/mL)	C _{RBO} (mg/mL)
Rb1a	3.22	1.00	96.50	30.11	4.57
Rb1b	3.87	0.90	116.13	27.10	4.57
Rb2a	2.55	0.48	76.41	14.54	4.57
Rb2b	2.36	0.50	70.71	15.14	4.50
Rb3a	2.03	0.34	60.93	10.28	4.50
Rb3b	1.93	0.40	57.79	11.92	4.50
Rha*			31.99	20.70	4.50
Rhb*			30.60	19.11	4.51
Gb1a	2.57	0.63	77.20	18.99	4.57
Gb1b	2.91	0.74	87.20	22.17	4.59
Gb2a	1.96	0.47	58.72	14.13	4.57
Gb2b	1.97	0.58	58.98	17.52	4.50
Gb3a	1.42	0.36	42.57	10.94	4.59
Gb3b	1.39	0.44	41.82	13.32	4.59
Gha*			15.51	6.08	4.94
Ghb*			14.36	5.63	4.50
Gpb1a	2.77	0.62	83.07	18.47	4.50
Gpb1b	2.82	0.56	84.71	16.77	4.50
Gpb2a	2.09	0.58	62.73	17.34	4.50
Gpb2b	1.94	0.44	58.24	13.33	4.59
Gpb3a	2.27	0.54	68.05	16.08	4.57
Gpb3b	2.22	0.58	66.57	17.35	4.59
Gpb4a	1.88	0.46	56.39	13.76	4.57
Gpb4b	1.76	0.51	52.93	15.36	4.50

Πίνακας Π 4 Υπολογισμός της συγκέντρωσης της ΡγOR & γOR σε mg/g RBO.

$Cx = Q \times Cr_{bo}$	C_{OR} (mg/g)	C_{POR} (mg/g)	Average C_{OR} (mg/g)	RSD	Average C_{POR} (mg/g)	RSD
Rb1a	21.1	6.6	23.3	13%	6.3	7%
Rb1b	25.4	5.9				
Rb2a	16.7	3.2	16.2	4%	3.3	4%
Rb2b	15.7	3.4				
Rb3a	13.5	2.3	13.2	4%	2.5	10%
Rb3b	12.8	2.6				
Rha*	7.1	4.6	6.9	3%	4.4	6%
Rhb*	6.8	4.2				
Gb1a	16.9	4.2	18.0	8%	4.5	11%
Gb1b	19.0	4.8				
Gb2a	12.9	3.1	13.0	1%	3.5	16%
Gb2b	13.1	3.9				
Gb3a	9.3	2.4	9.2	1%	2.6	14%
Gb3b	9.1	2.9				
Gha*	3.1	1.2	3.2	1%	1.2	1%
Ghb*	3.2	1.3				
Gpb1a	18.5	4.1	18.6	1%	3.9	7%
Gpb1b	18.8	3.7				
Gpb2a	13.9	3.9	13.3	7%	3.4	20%
Gpb2b	12.7	2.9				
Gpb3a	14.9	3.5	14.7	2%	3.7	5%
Gpb3b	14.5	3.8				
Gpb4a	12.4	3.0	12.1	3%	3.2	9%
Gpb4b	11.8	3.4				

Πίνακας Π 5 Συγκέντρωση της ΡγOR και της γOR σε mg/g RBO.

$Cx = Q \times Cr_{bo}$	Average C_{OR} (mg/g)	Error bar	Average C_{POR} (mg/g)	Error bar
Rb1	23.28483397	3.038630686	6.265057409	0.466821139
Rb2	16.2244608	0.722071427	3.275416812	0.127352194
Rb3	13.1914757	0.493861945	2.466799756	0.258250366
Rh	6.94369132	0.233849206	4.415978379	0.258735297
Gb1	17.95280411	1.477997978	4.494967496	0.473990405
Gb2	12.98388778	0.173547073	3.493333035	0.565043192
Gb3	9.192190708	0.116019612	2.643590974	0.366482574
Gh	3.1657555	0.036030318	1.24148471	0.013980552
Gpb1	18.64198841	0.258114614	3.916386946	0.267042007
Gpb2	13.31438048	0.883759702	3.378969376	0.671985385
Gpb3	14.70351707	0.274744847	3.650623636	0.18459168
Gpb4	12.0566301	0.415882582	3.212415888	0.282607682

Πίνακας Π 6 Συγκέντρωση της ΡγOR και της γOR σε mg/g πίτουρου.

$(Cy) = (Cx) \times yield$	Average C_{OR} (mg/g)	Error bar	Average C_{POR} (mg/g)	Error bar
Rb1	3.246841125	0.418576981	0.873743355	0.066492577
Rb2	2.135953258	0.151448323	0.430734139	0.005361211
Rb3	1.273771594	0.000466489	0.238835054	0.033965439
Rh	0.078585153	0.018953866	0.050107046	0.01329482
Gb1	3.893423599	0.214338625	0.973269817	0.030997417
Gb2	2.127217495	0.049195876	0.572745309	0.098154659
Gb3	0.898240721	0.032438995	0.257866926	0.02973739
Gh	0.023788076	0.000463313	0.009328743	0.000180573
Gpb1	4.657903053	0.172756036	0.977618797	0.043966018
Gpb2	2.759787783	0.402754674	0.704088177	0.194765953
Gpb3	2.934200398	0.065605571	0.728417469	0.034158948
Gpb4	1.847951681	0.065358427	0.492349141	0.042884813

Πίνακας Π 7 Συγκεντρωτικός πίνακας με τα αποτελέσματα της απόδοσης της εκχύλισης των δειγμάτων και του υπολογισμού της συγκέντρωσης γOR & ΡγOR στα εκχυλίσματα και στα αρχικά δείγματα (πίτουρο, φλοιός).

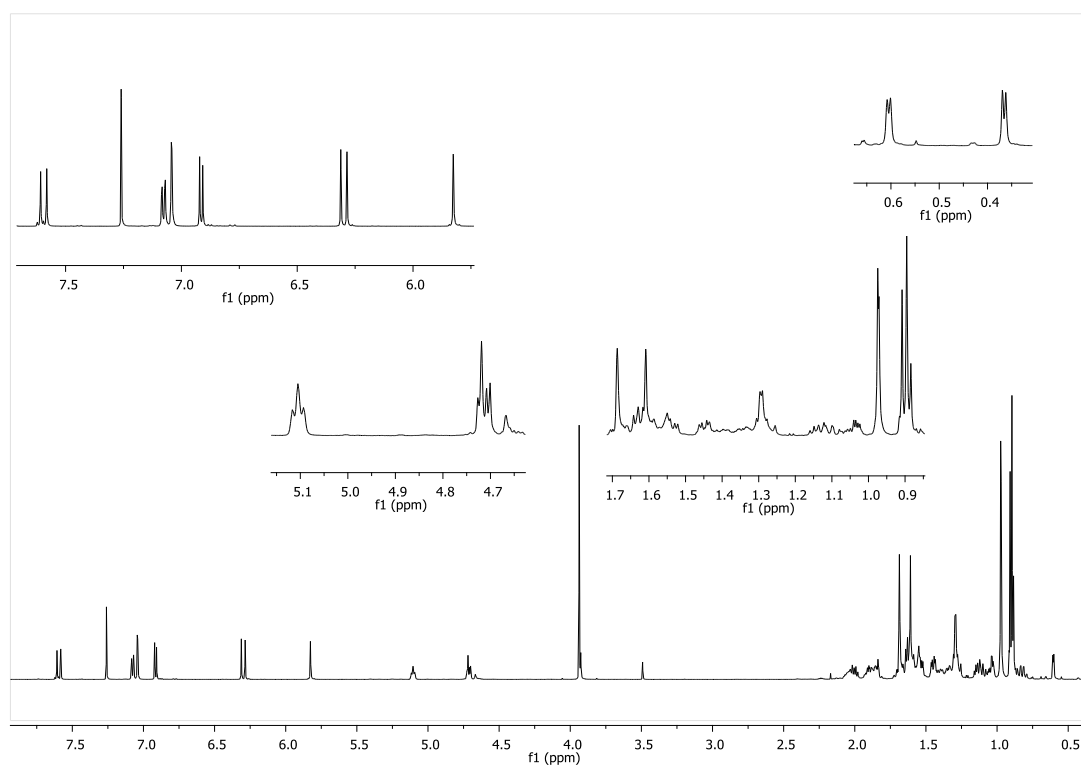
		RBO		extraction	Bran					
		C _{OR} (mg/g)	C _{POR} (mg/g)	yield	C _{OR} (mg/g)	C _{POR} (mg/g)	C _{OR} (mg/g)	RSD.	C _{POR} (mg/g)	RSD.
Ronaldo Ellada	Rb1a	21.14	6.60	14%	2.95	0.92	3.25	13%	0.87	8%
	Rb1b	25.43	5.93	14%	3.54	0.83				
	Rb2a	16.74	3.19	13%	2.24	0.43	2.14	7%	0.43	1%
	Rb2b	15.71	3.37	13%	2.03	0.43				
	Rb3a	13.54	2.28	9%	1.27	0.21	1.27	0%	0.24	14%
	Rb3b	12.84	2.65	10%	1.27	0.26				
	Rha	7.11	4.60	1%	0.09	0.06	0.08	24%	0.05	27%
	Rhb	6.78	4.23	1%	0.07	0.04				
Gladio Ellada	Gb1a	16.91	4.16	24%	4.04	1.00	3.89	6%	0.97	3%
	Gb1b	19.00	4.83	20%	3.74	0.95				
	Gb2a	12.86	3.09	16%	2.09	0.50	2.13	2%	0.57	17%
	Gb2b	13.11	3.89	16%	2.16	0.64				
	Gb3a	9.27	2.38	10%	0.92	0.24	0.90	4%	0.26	12%
	Gb3b	9.11	2.90	10%	0.88	0.28				
	Gha	3.14	1.23	1%	0.02	0.01	0.02	2%	0.01	2%
	Ghb	3.19	1.25	1%	0.02	0.01				
Gladio Ellada parboiled	Gpb1a	18.46	4.11	25%	4.54	1.01	4.66	4%	0.98	4%
	Gpb1b	18.82	3.73	25%	4.78	0.95				
	Gpb2a	13.94	3.85	22%	3.04	0.84	2.76	15%	0.70	28%
	Gpb2b	12.69	2.90	20%	2.47	0.57				
	Gpb3a	14.90	3.52	20%	2.98	0.70	2.93	2%	0.73	5%
	Gpb3b	14.51	3.78	20%	2.89	0.75				
	Gpb4a	12.35	3.01	15%	1.89	0.46	1.85	4%	0.49	9%
	Gpb4b	11.76	3.41	15%	1.80	0.52				

Φασματοσκοπικά δεδομένα των απομονωμένων ενώσεων της γ-ορυζανόλης (γOR) και της πολικής γ-ορυζανόλης (PγOR).

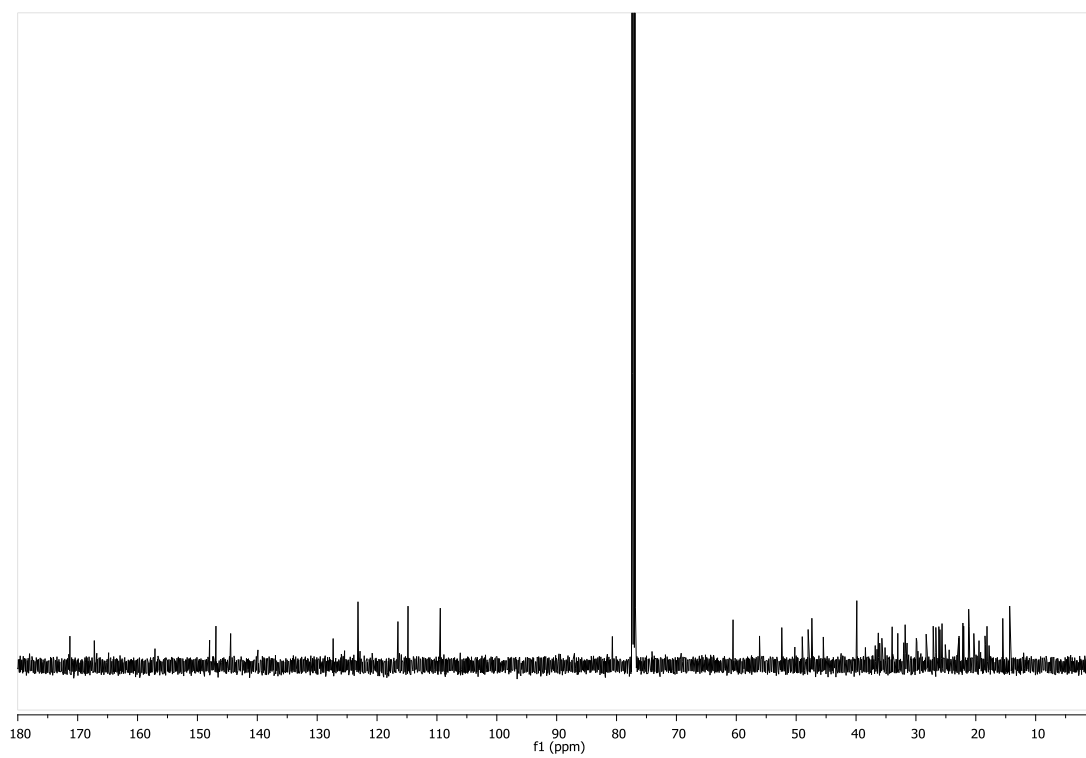
γOR

(OR1): cycloartenyl ferulate

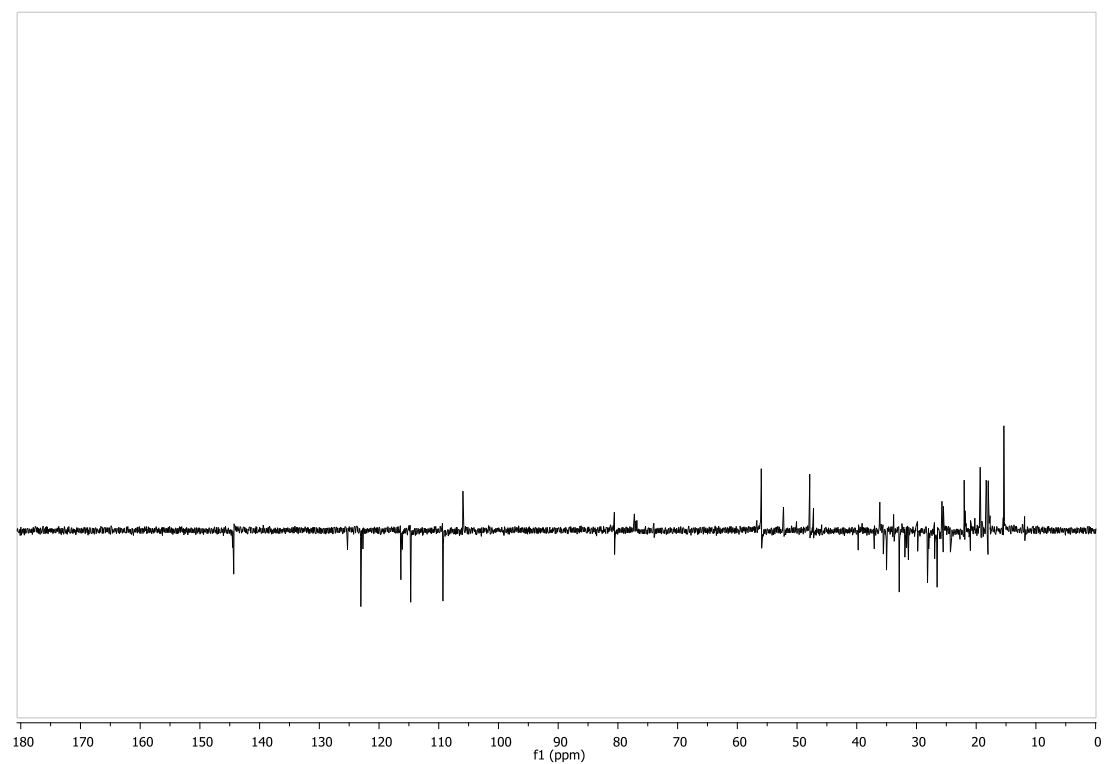
^1H NMR (CDCl_3)



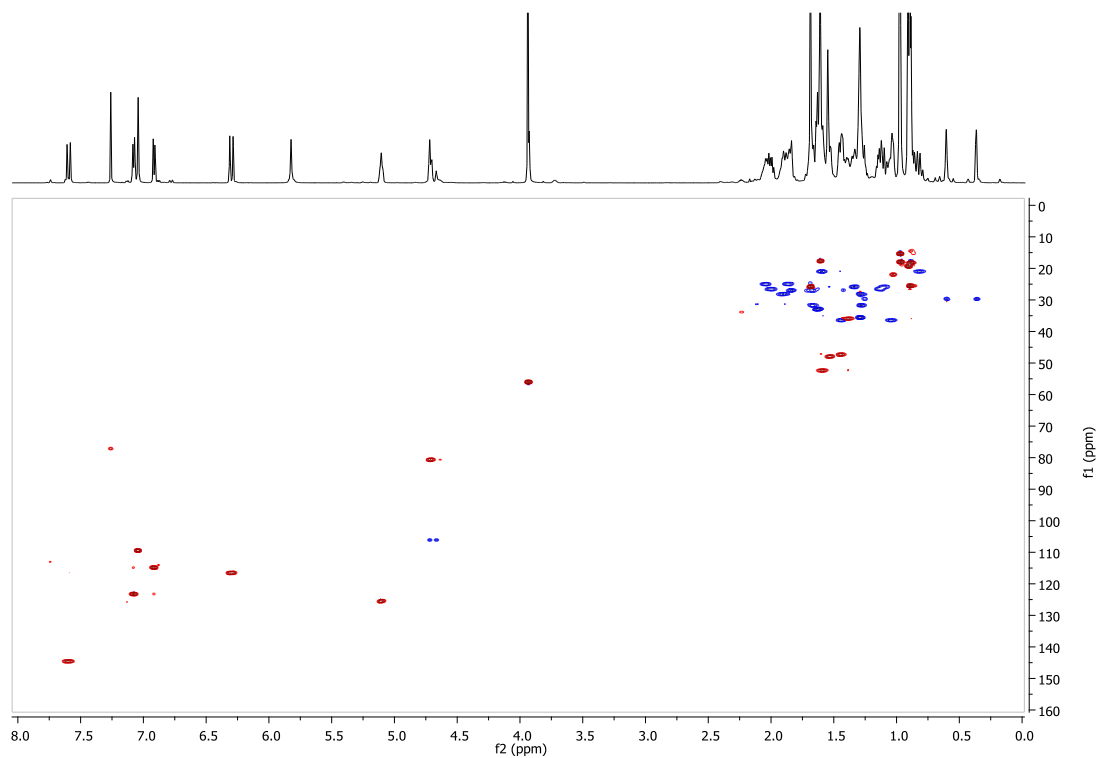
^{13}C NMR (CDCl_3)



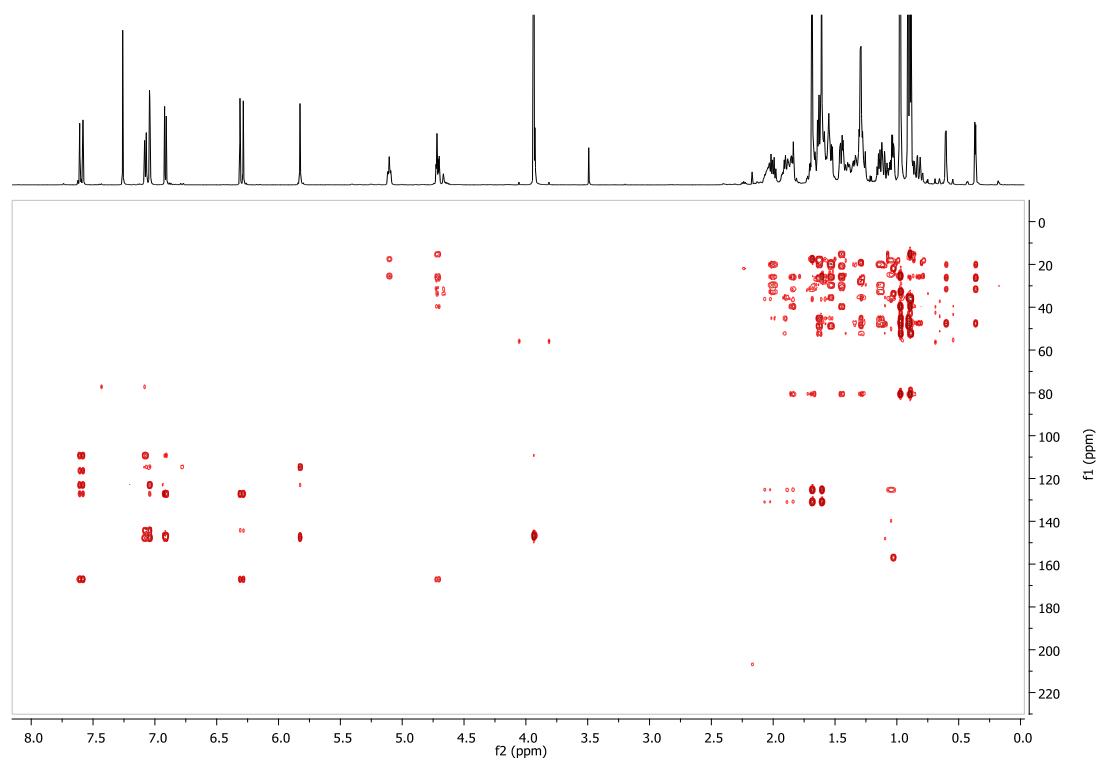
DEPT (CDCl_3)



HSQC-DEPT (CDCl₃)

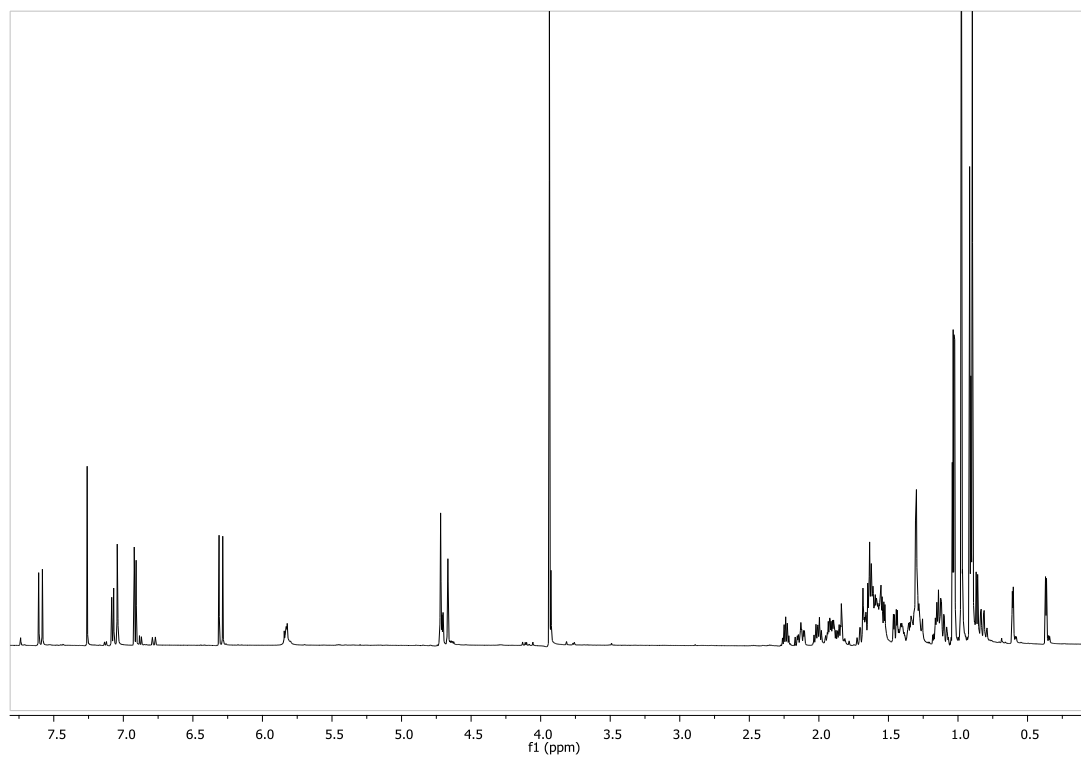


HMBC (CDCl₃)

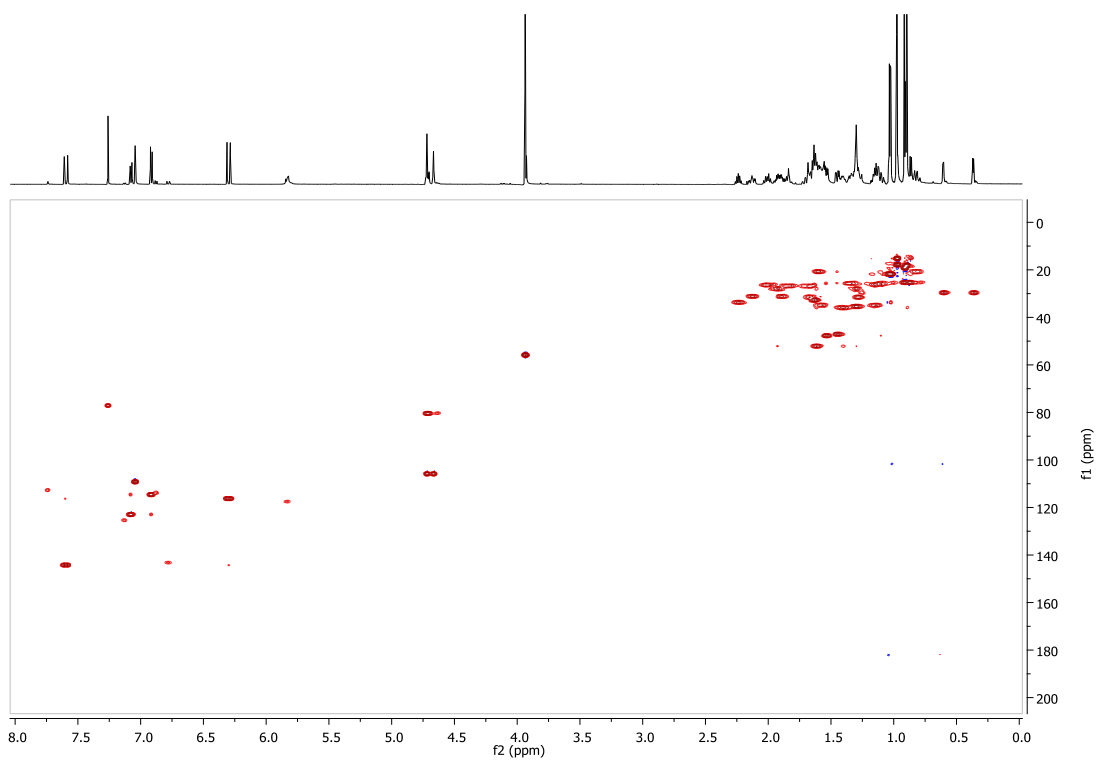


(OR2): 24-methylene-cycloartanyl ferulate

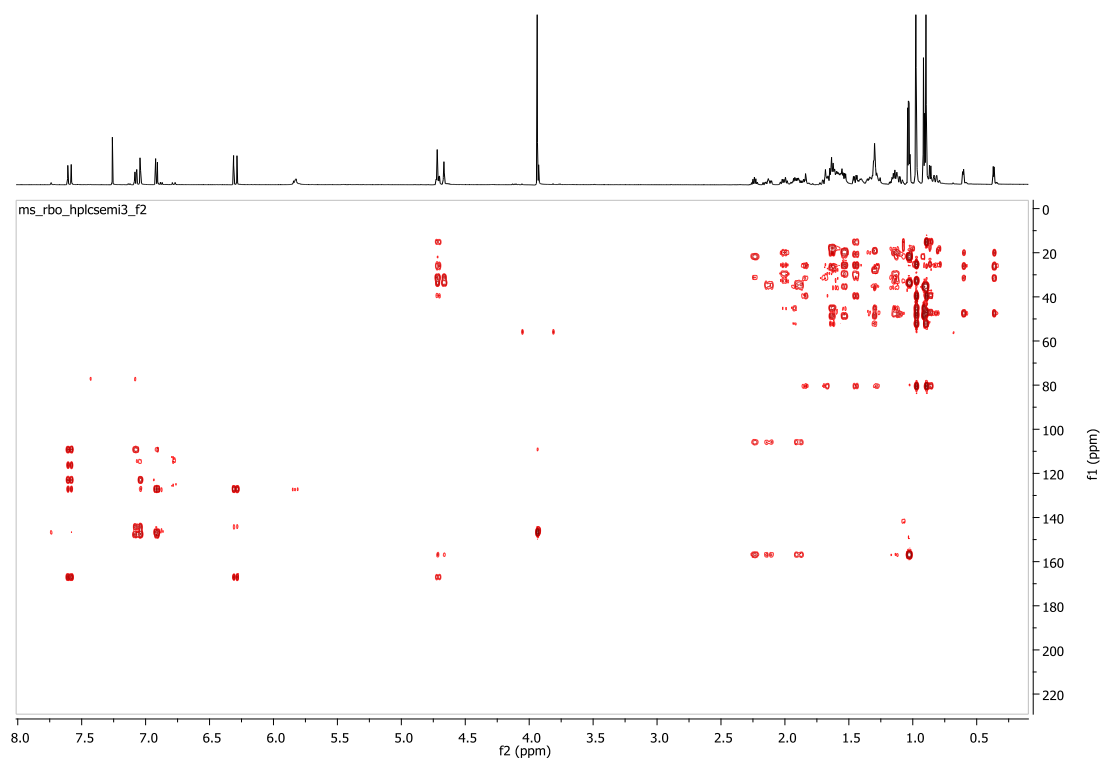
^1H NMR (CDCl_3)



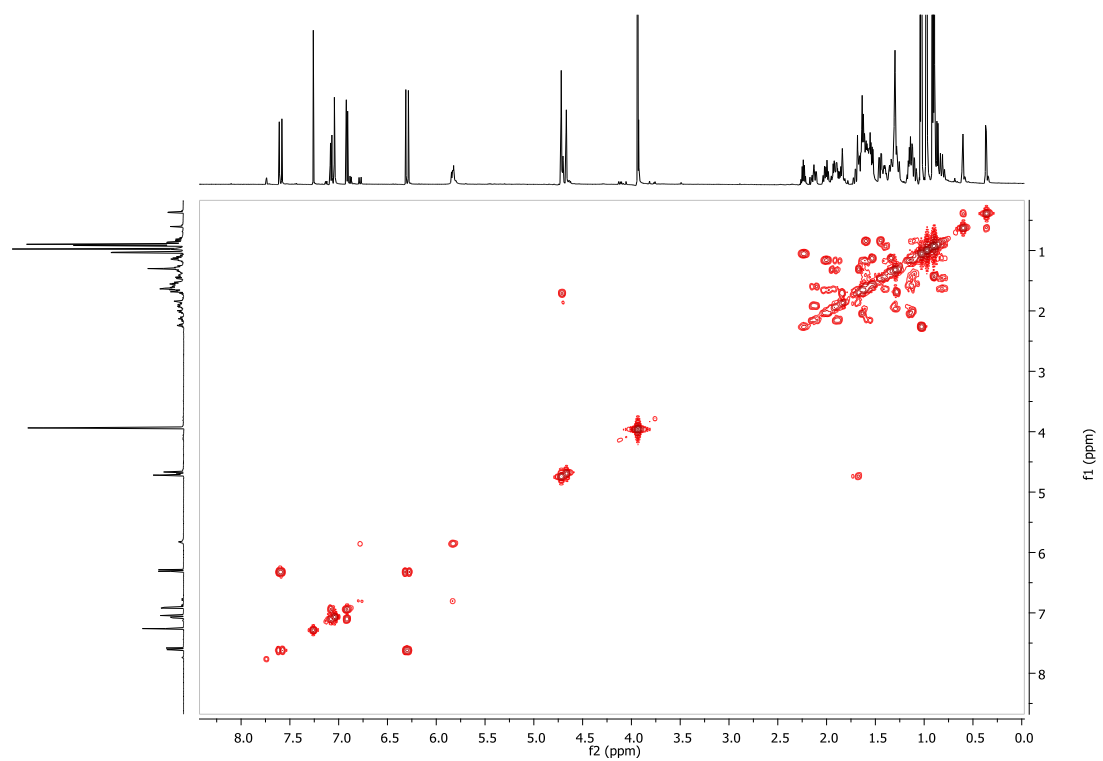
HSQC-DEPT (CDCl_3)



HMBC (CDCl₃)

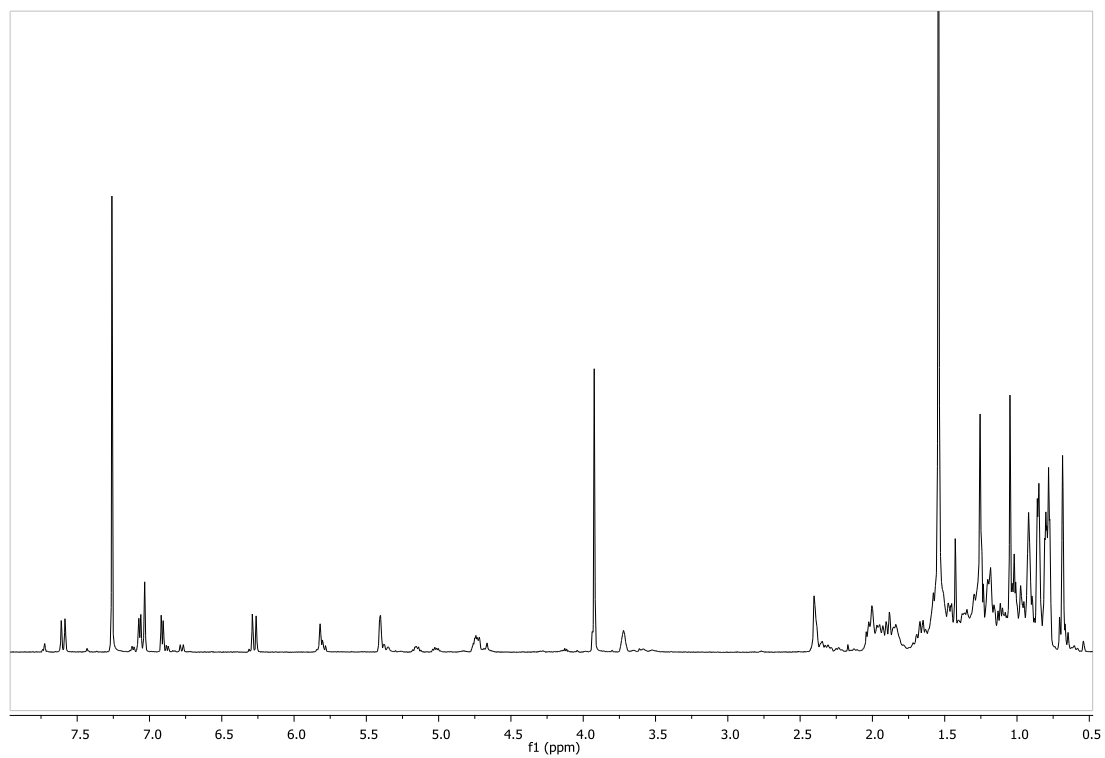


COSY (CDCl₃)

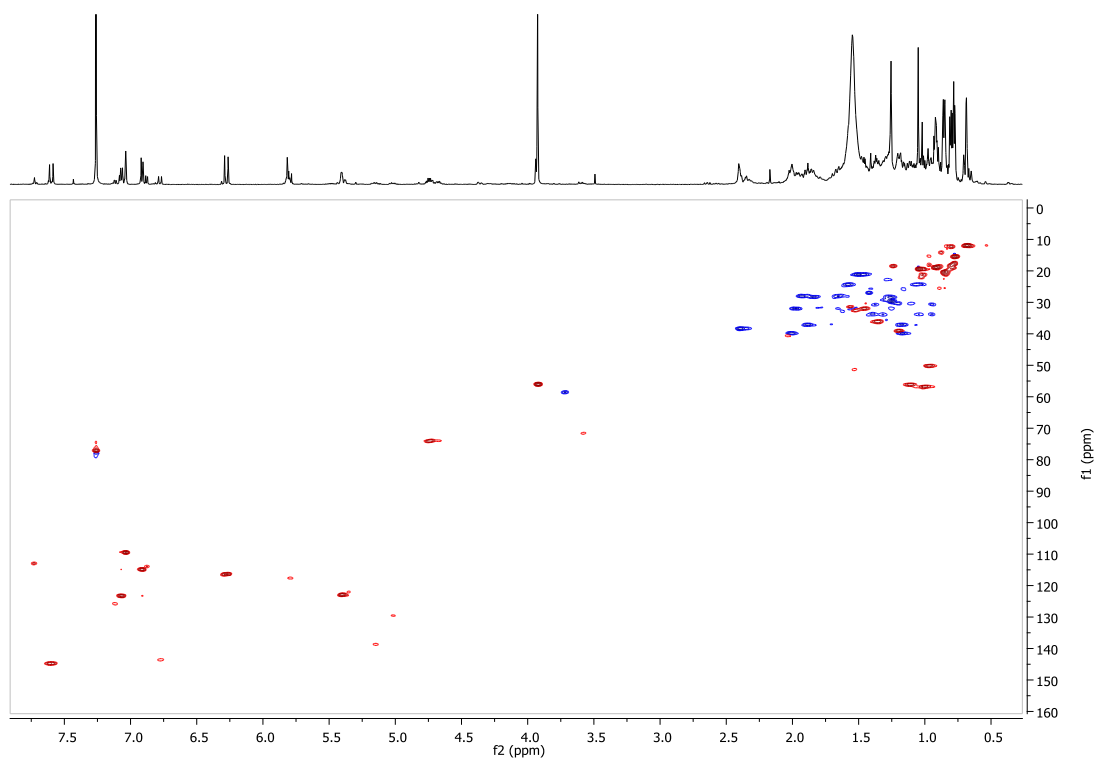


(OR3): campesteryl ferulate

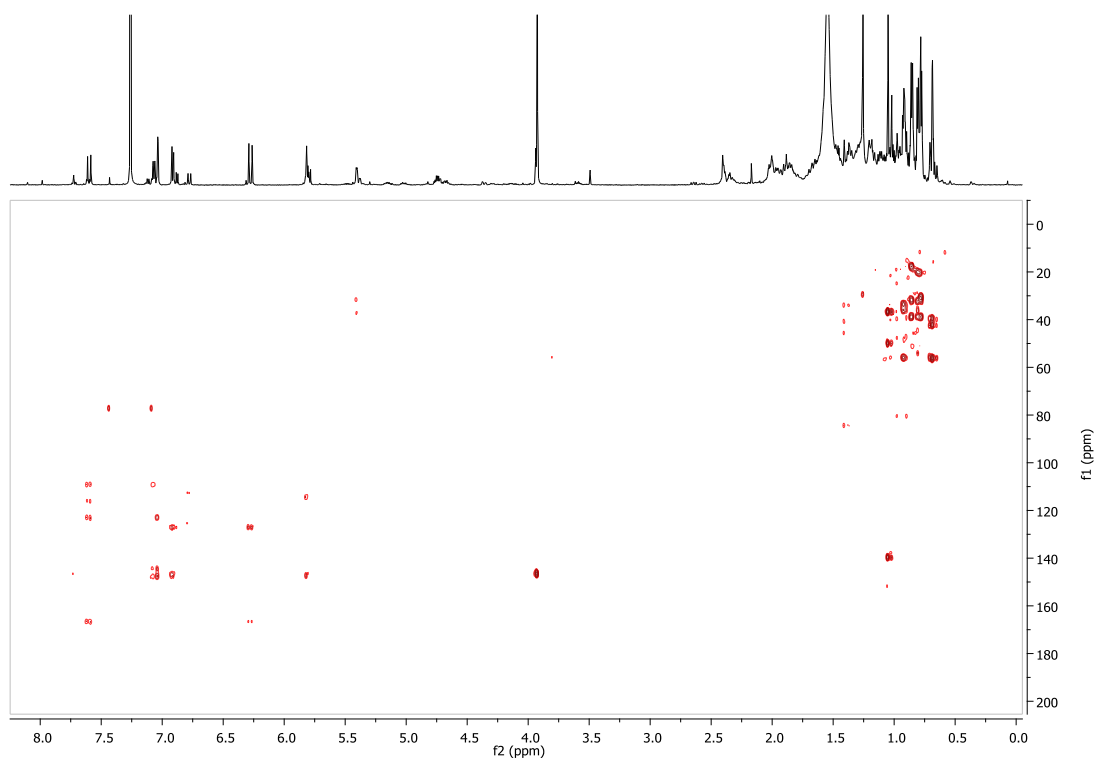
^1H NMR (CDCl_3)



HSQC-DEPT (CDCl_3)

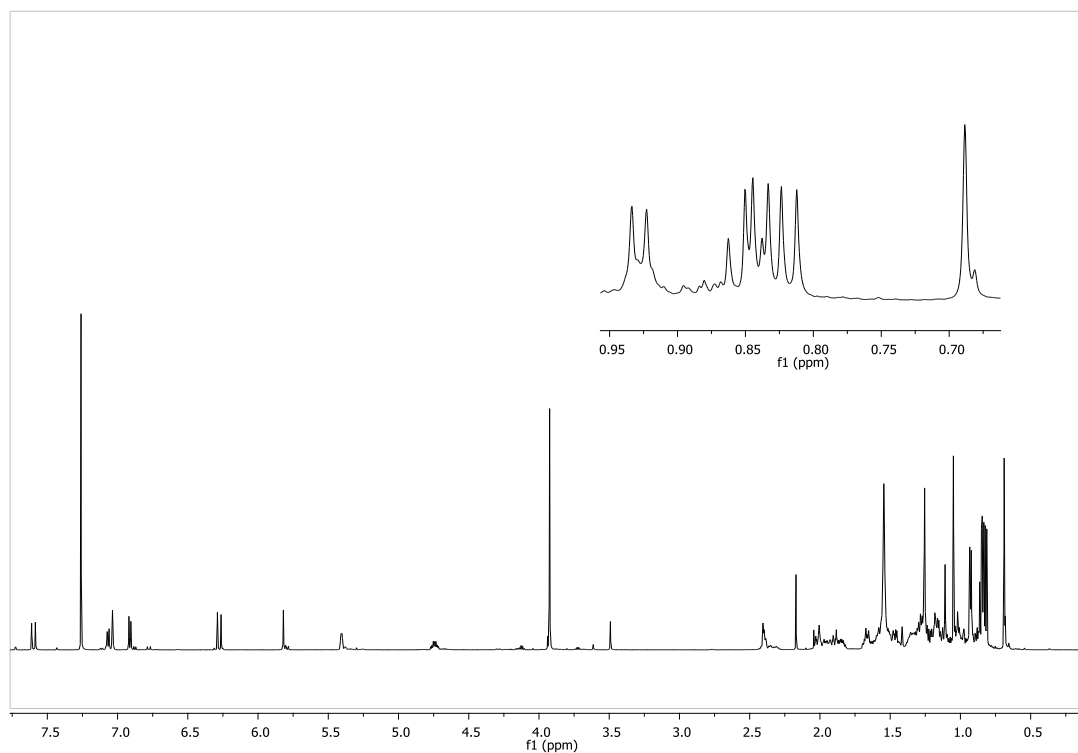


HMBC (CDCl₃)

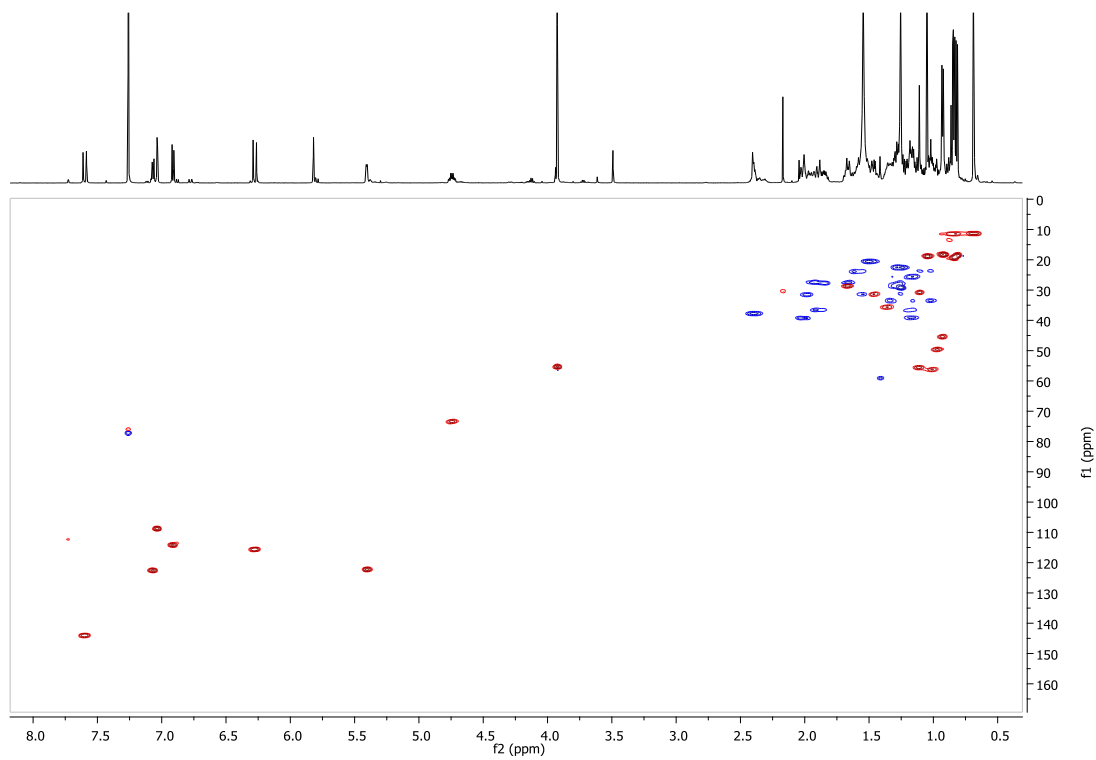


(OR4): β -sitosteryl ferulate,

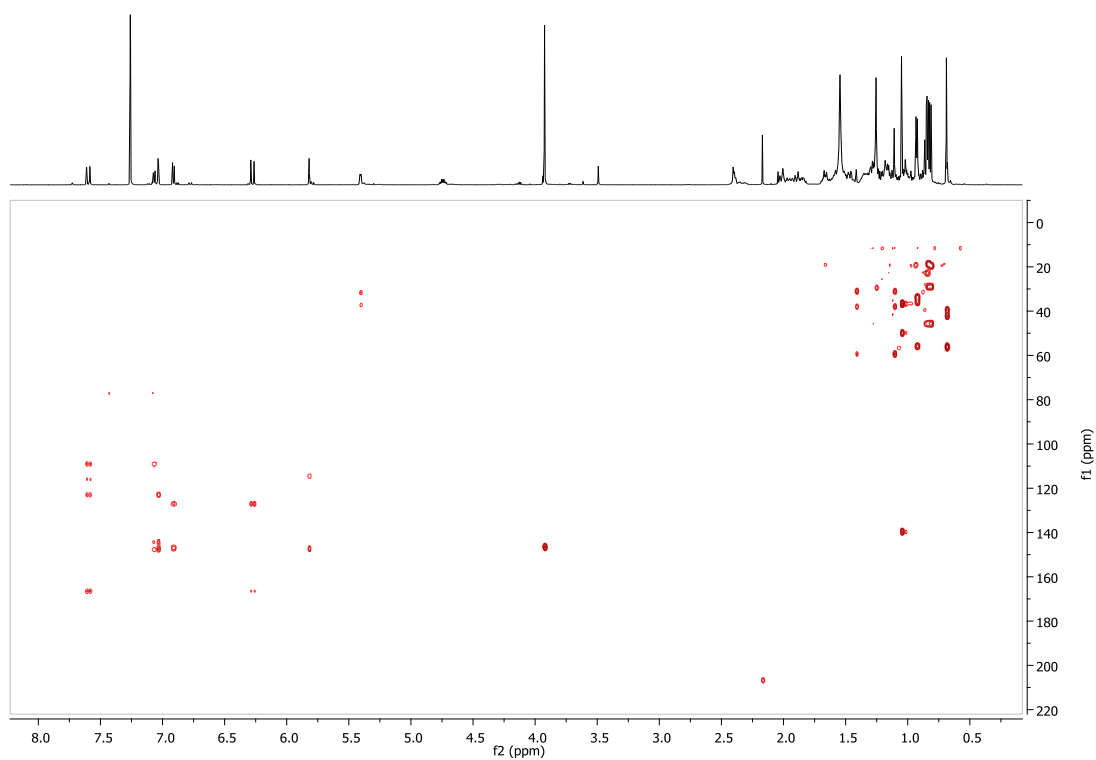
^1H NMR (CDCl_3)



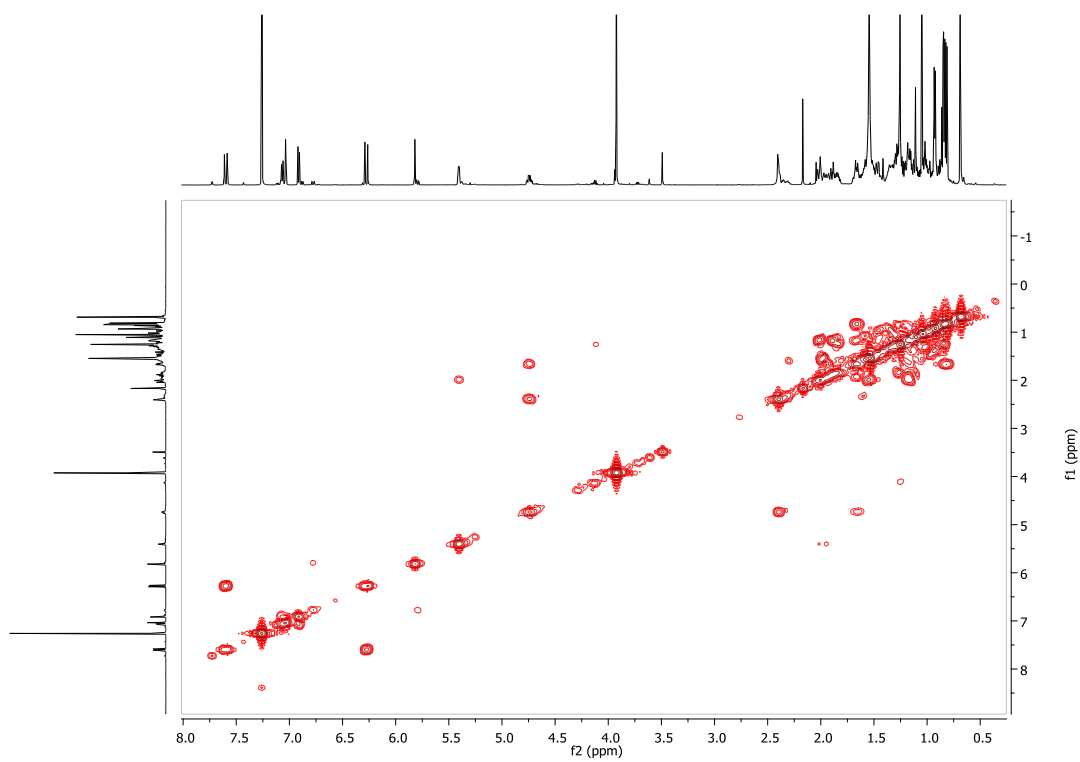
HSQC-DEPT (CDCl_3)



HMBC (CDCl₃)

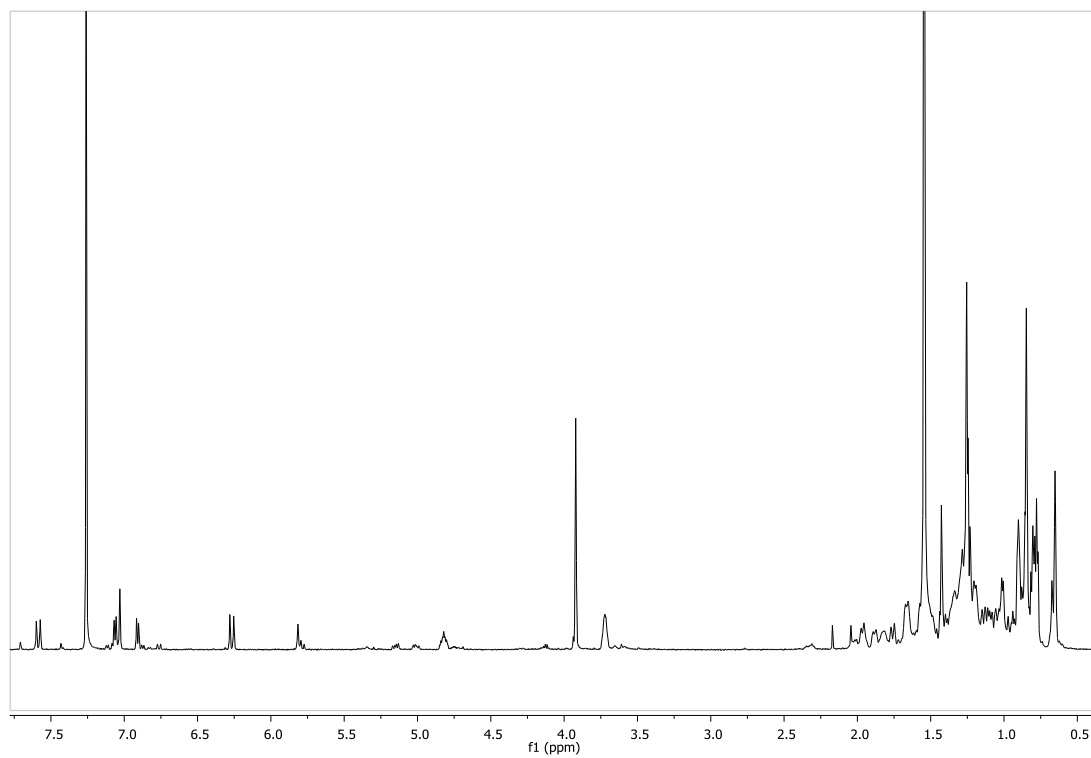


COSY (CDCl₃)

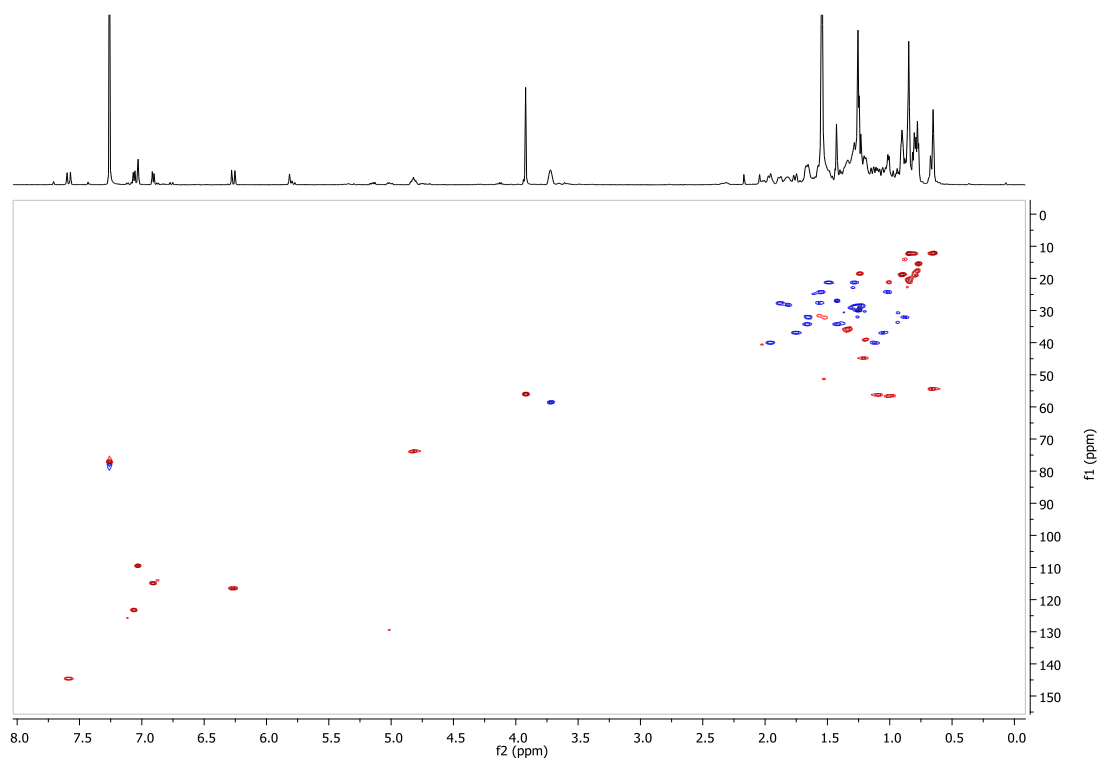


(OR5): campestanyl ferulate

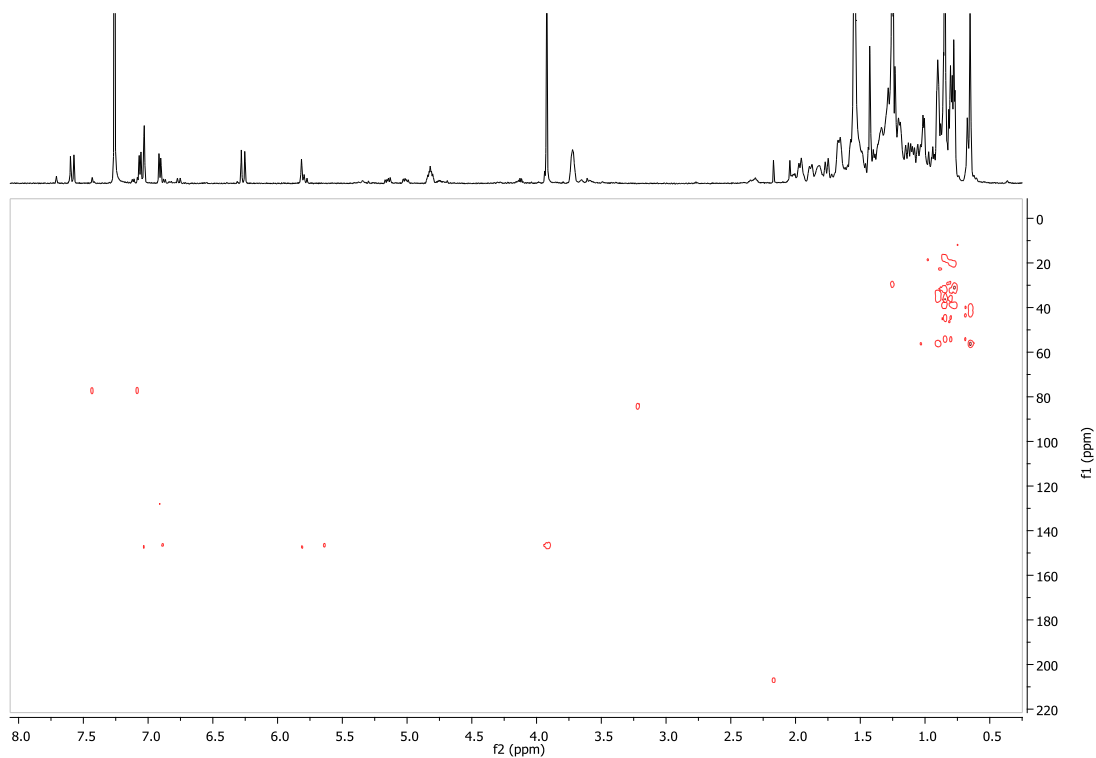
^1H NMR (CDCl_3)



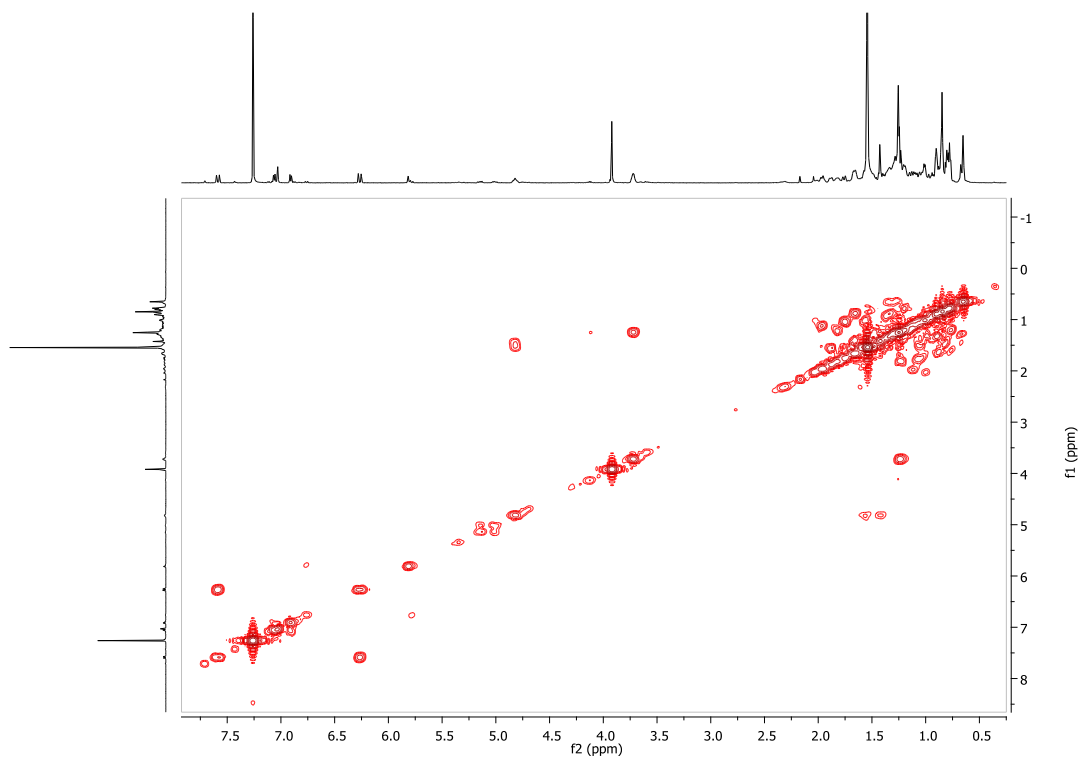
HSQC-DEPT (CDCl_3)



HMBC (CDCl₃)

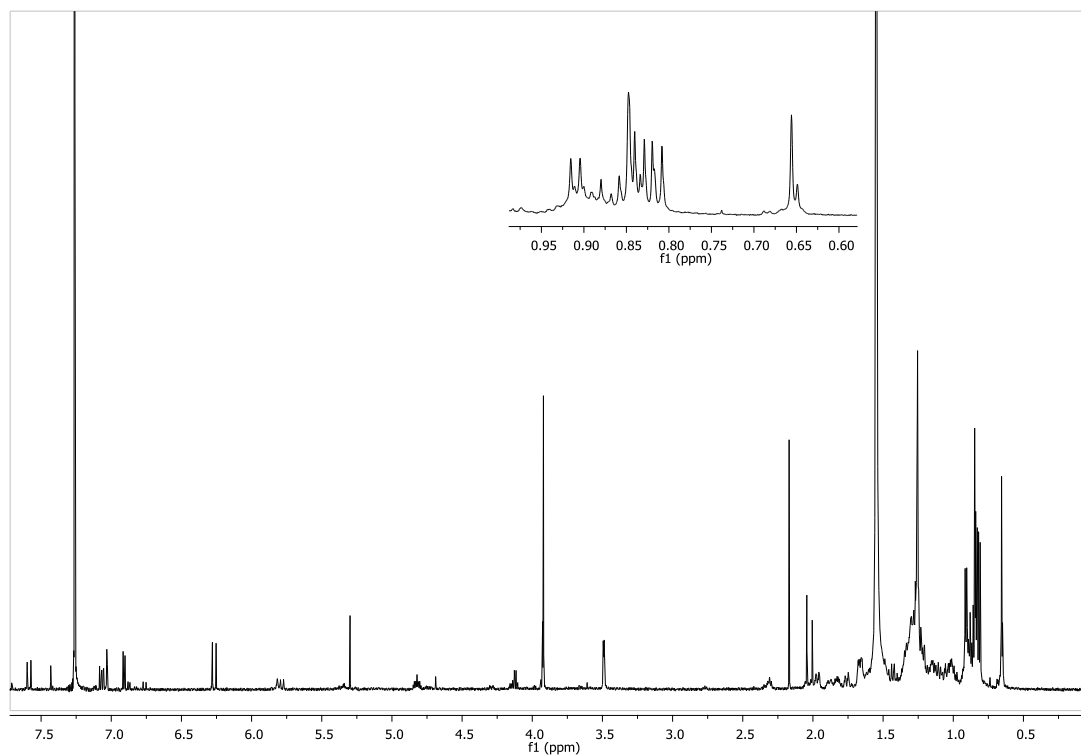


COSY (CDCl₃)

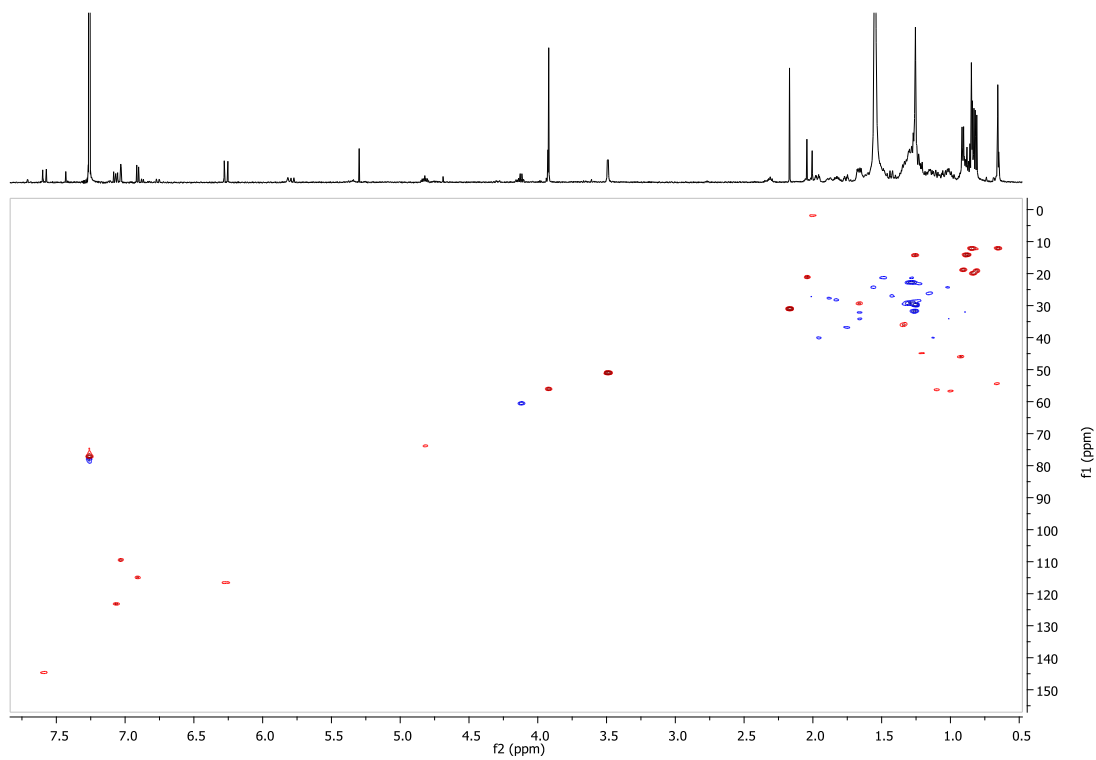


(OR6): sitostanyl ferulate

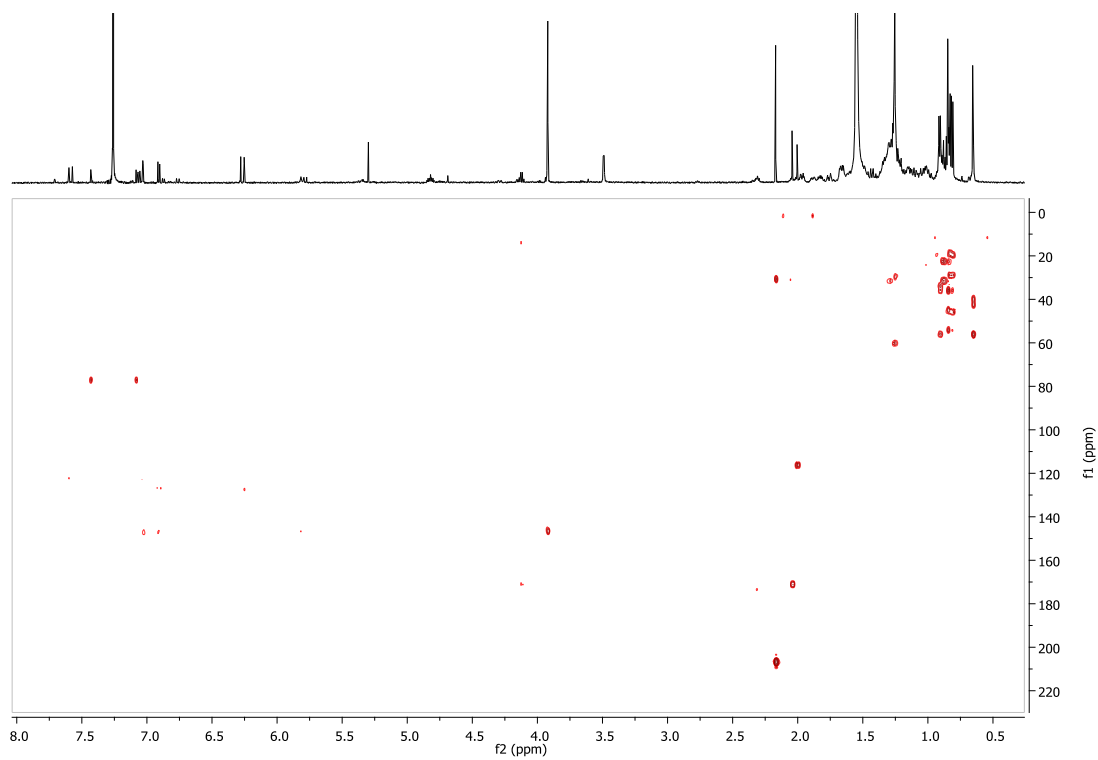
^1H NMR (CDCl_3)



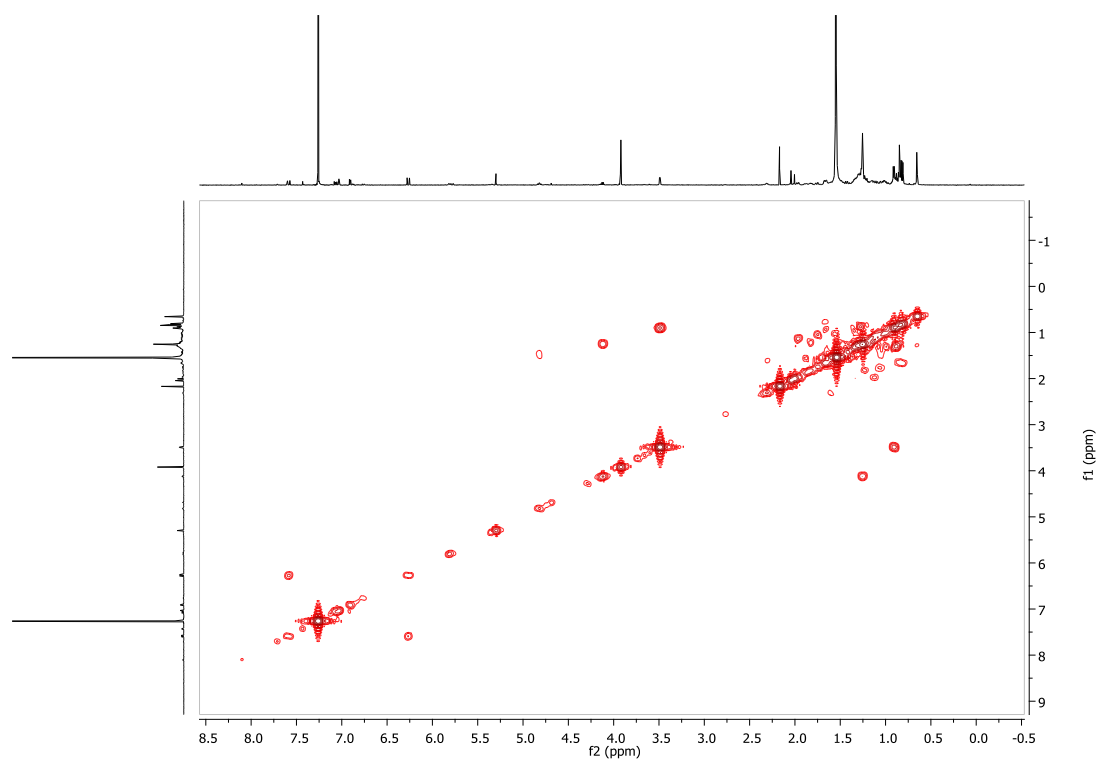
HSQC-DEPT (CDCl_3)



HMBC (CDCl₃)

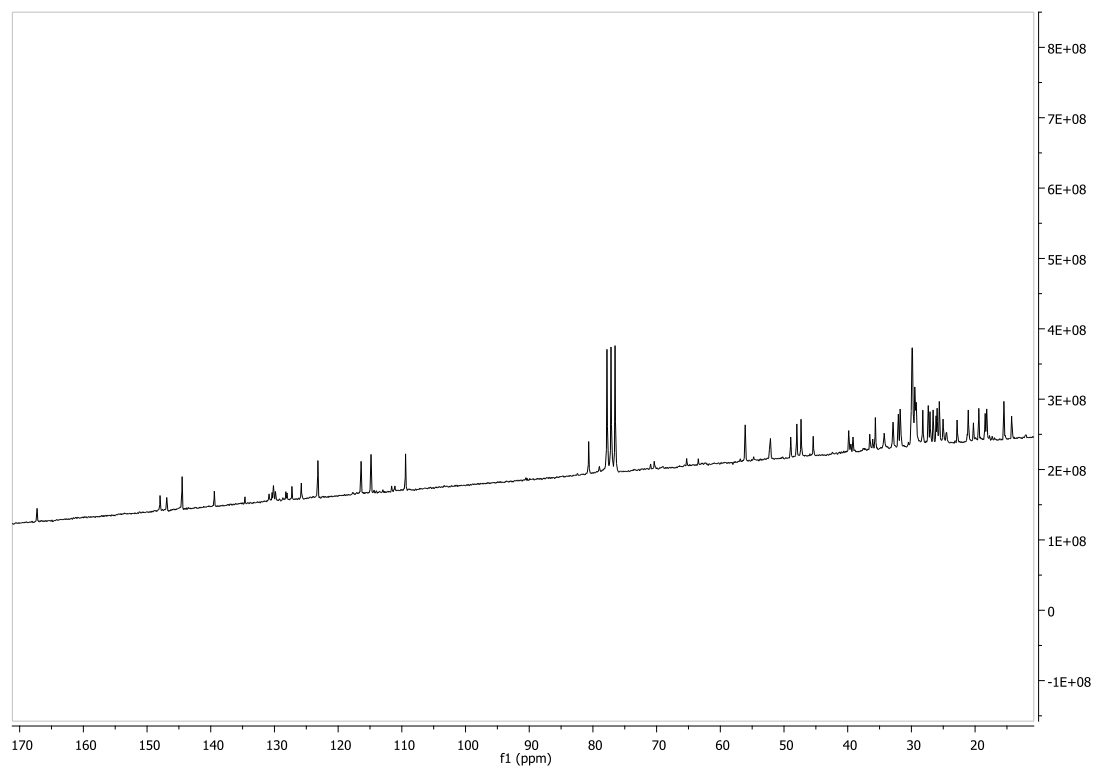


COSY (CDCl₃)

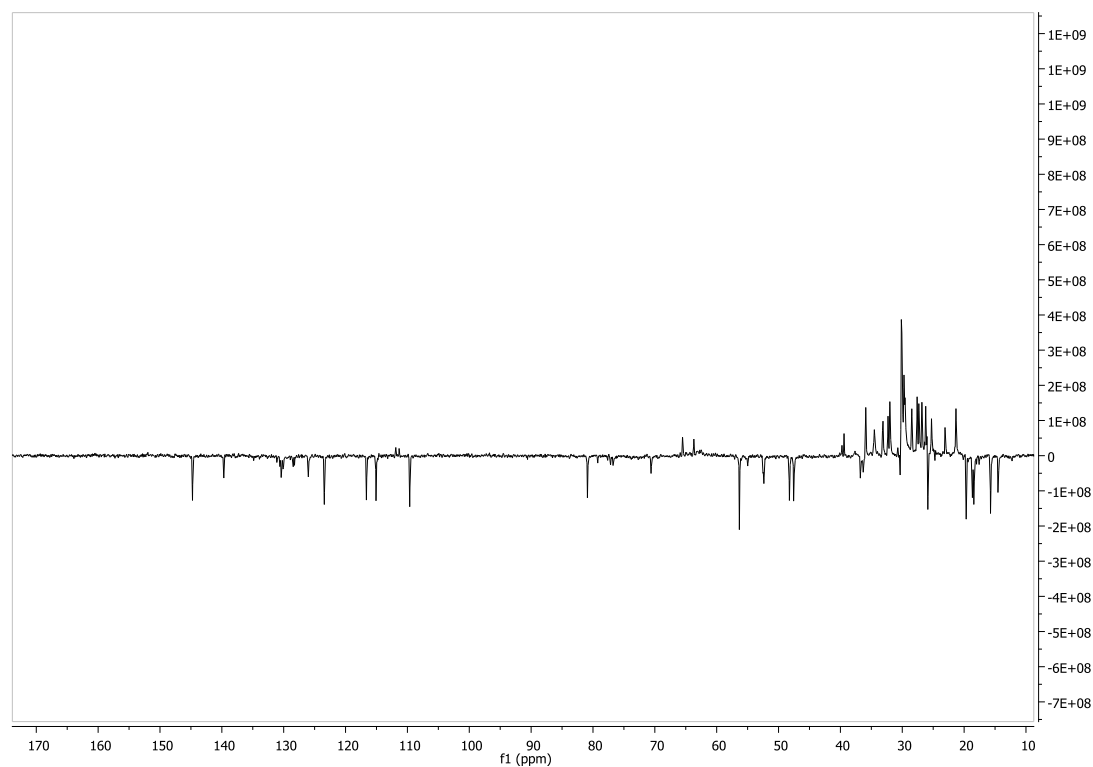


PyOR

^{13}C NMR (CDCl_3) (4f108-109)

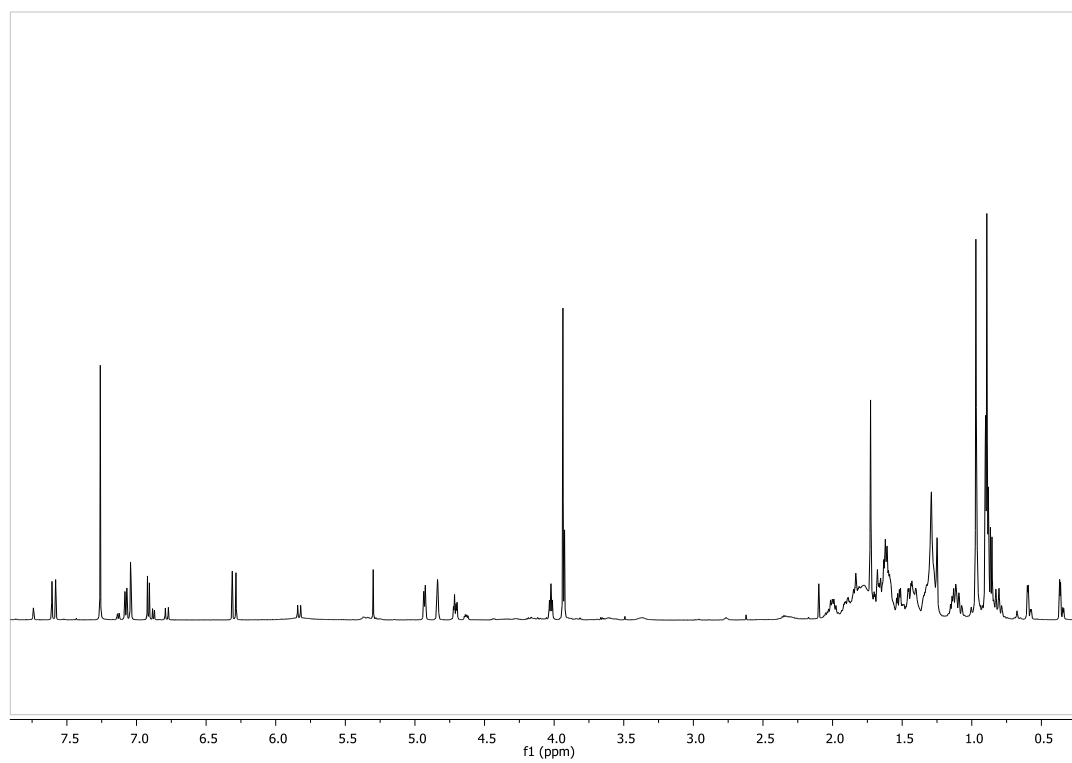


DEPT (CDCl_3) (4f108-109)

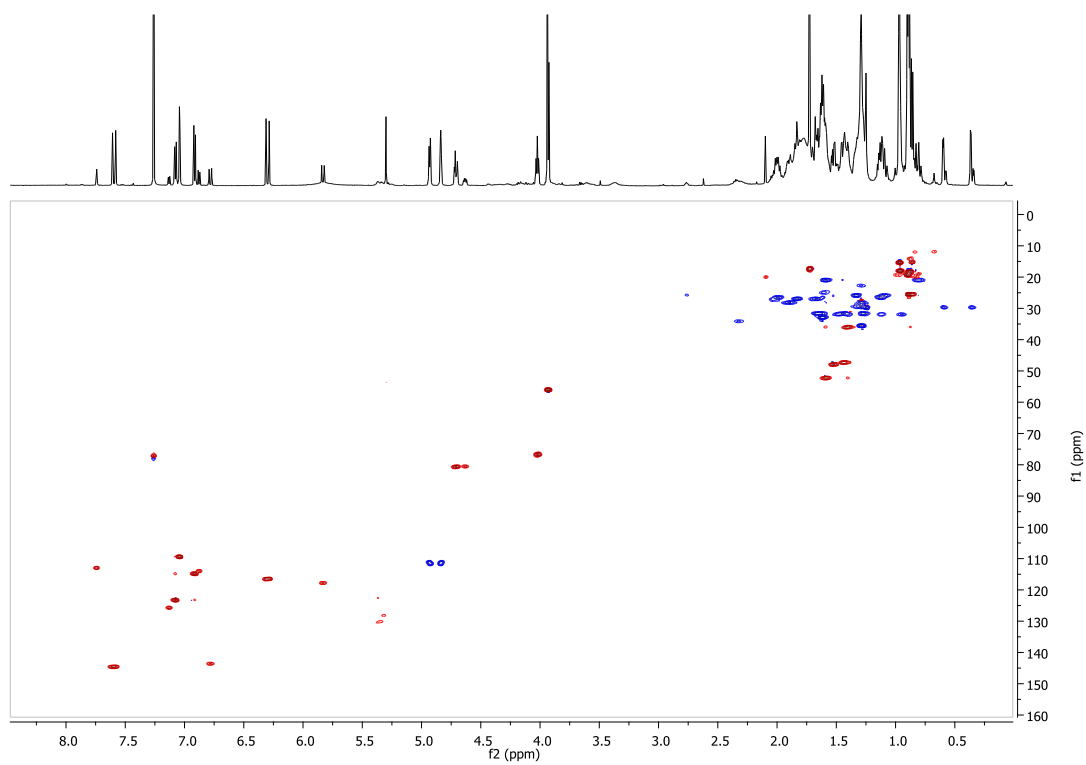


(POR2): (24R)-cycloart-25-ene-3 β ,24-diol-3 β ferulate & (24S)-cycloart-25-ene-3 β ,24-diol-3 β -ferulate

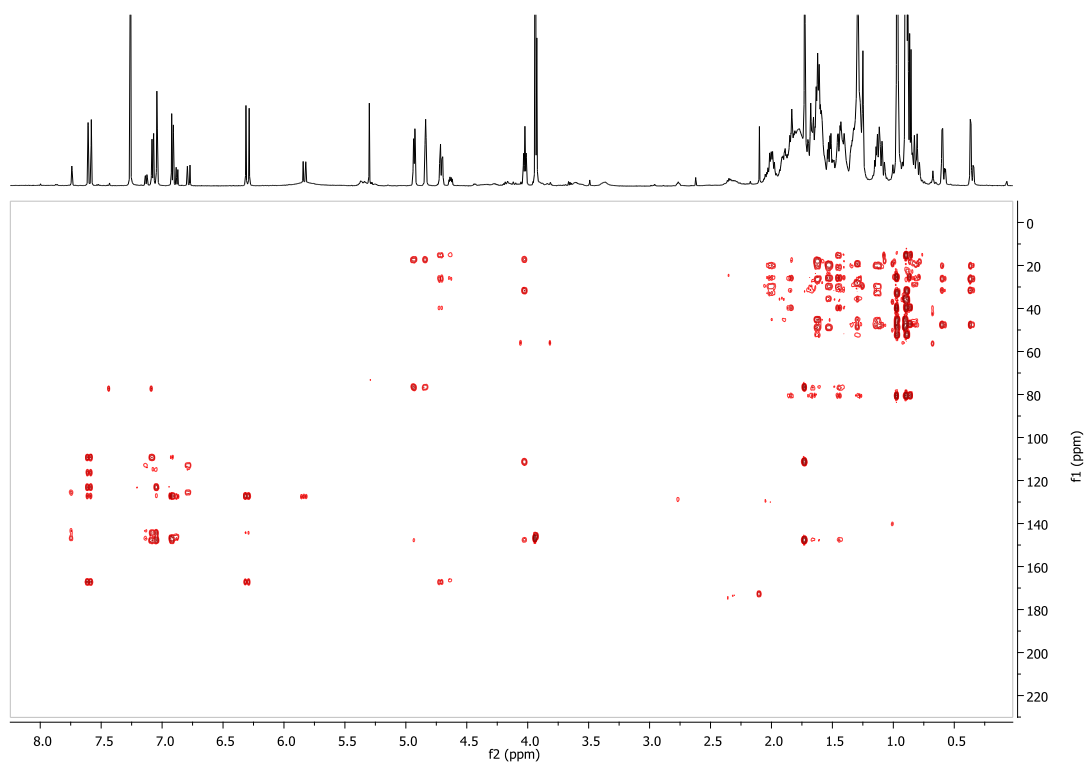
^1H NMR (CDCl_3)



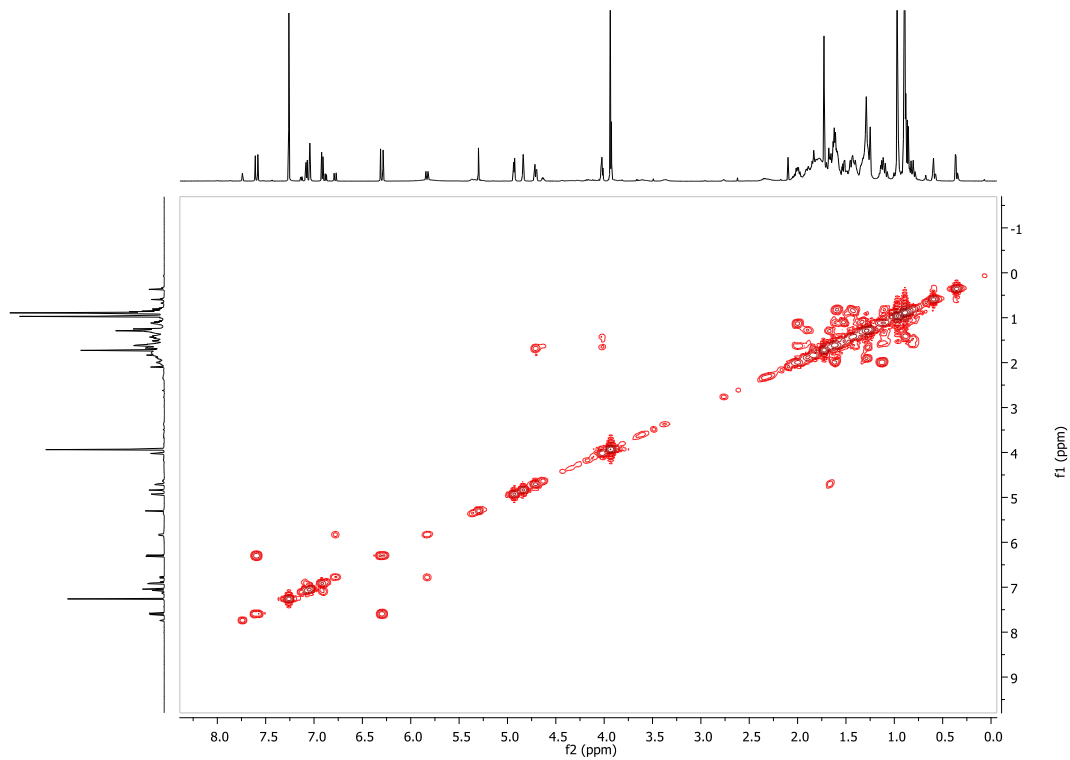
HSQC-DEPT (CDCl_3)



HMBC (CDCl₃)

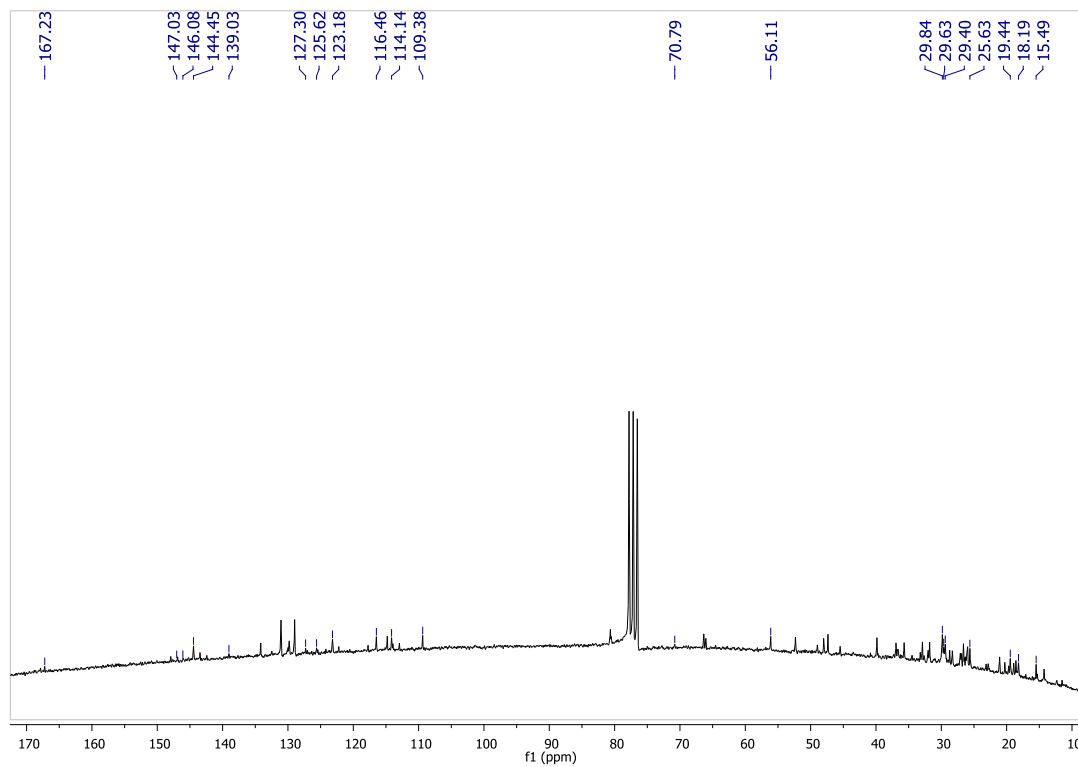


COSY (CDCl₃)

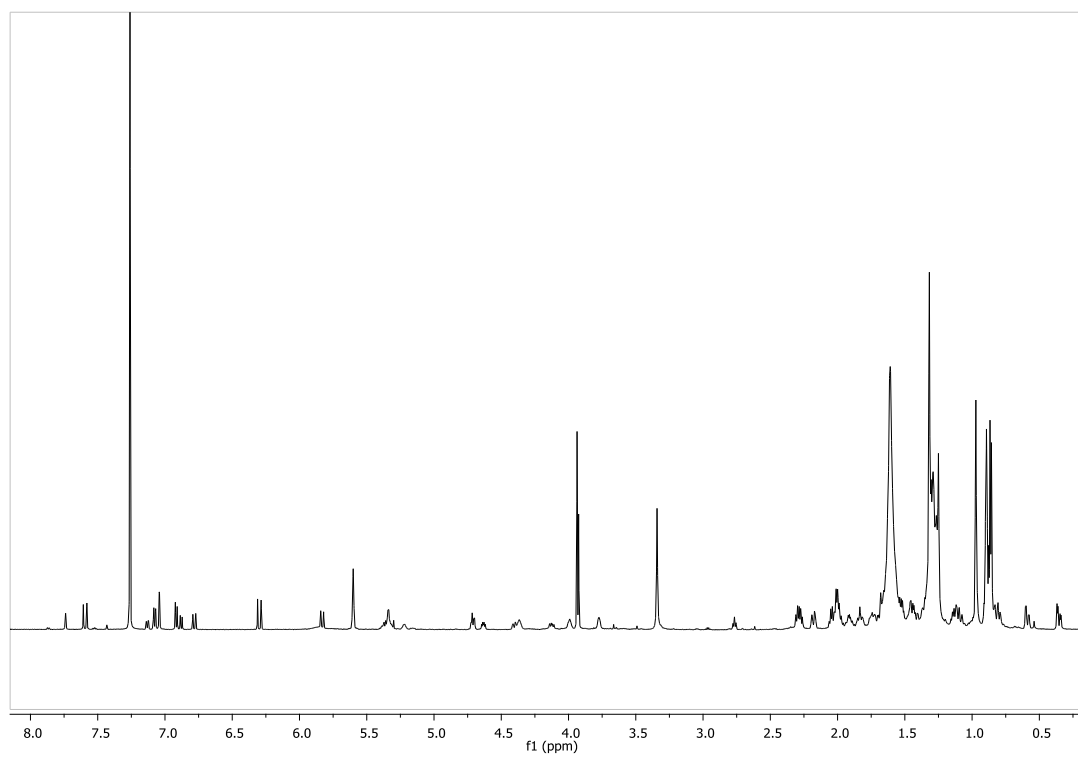


(POR3): Cycloart-23Z-ene3 β ,25-diol-3 β -trans-ferulate

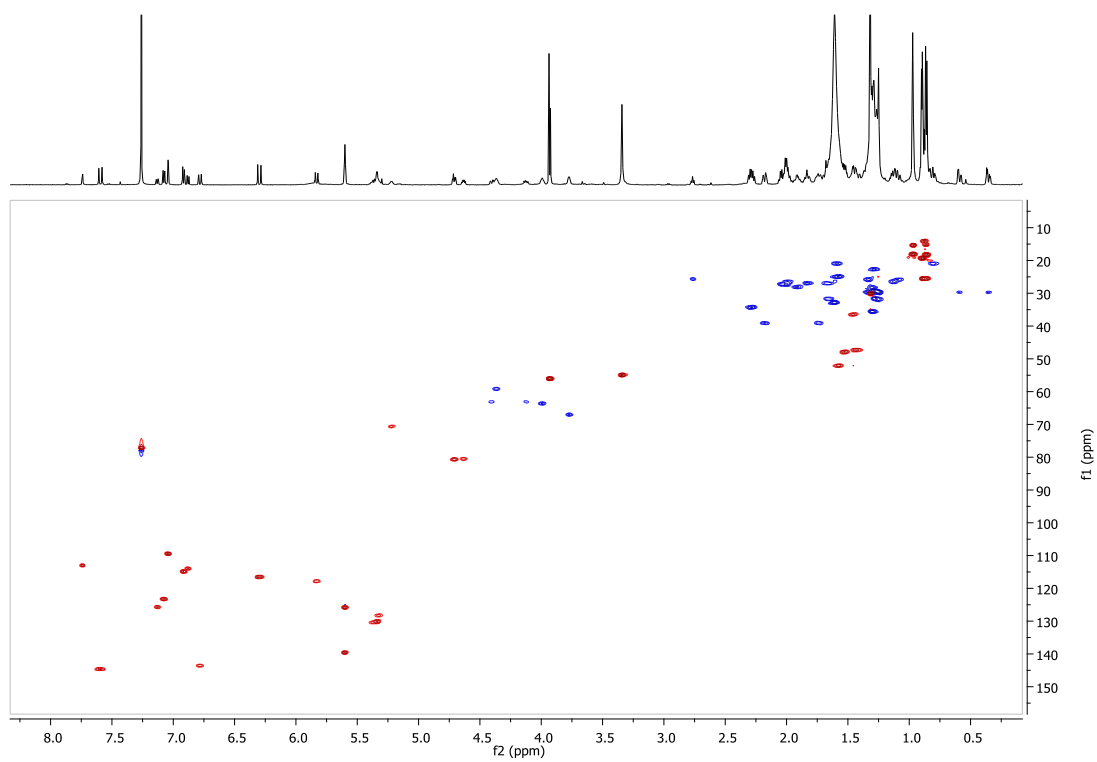
^{13}C NMR (CDCl_3)



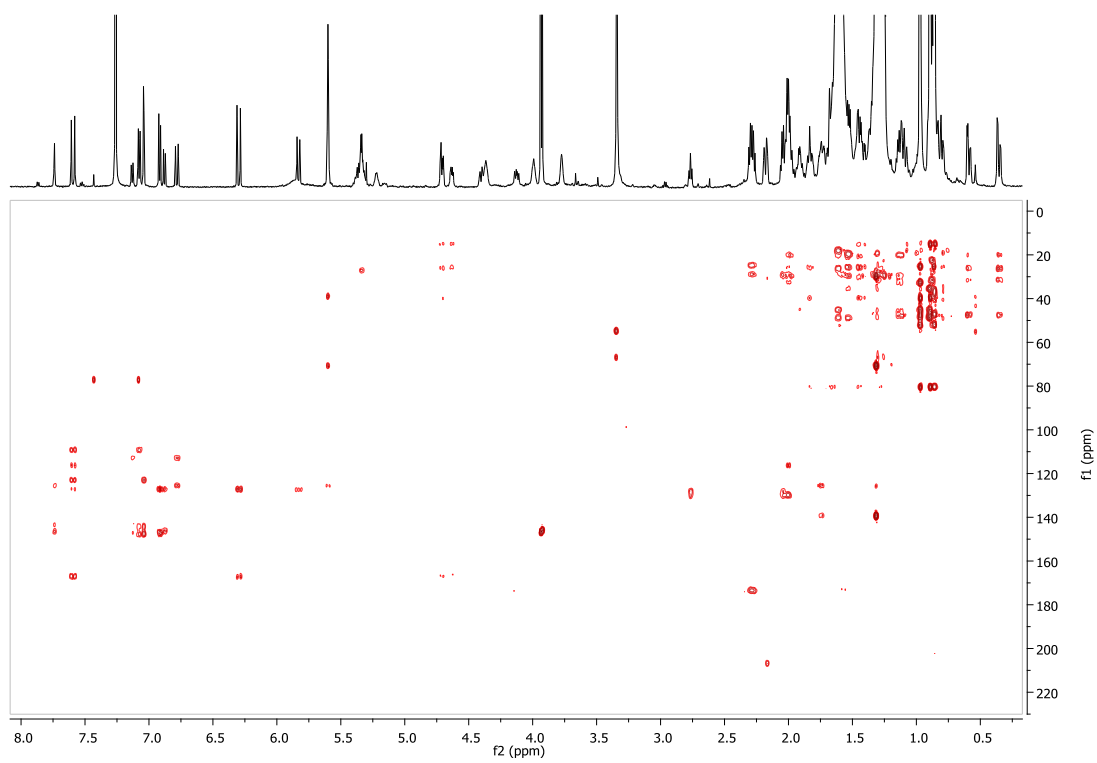
^1H NMR (CDCl_3)



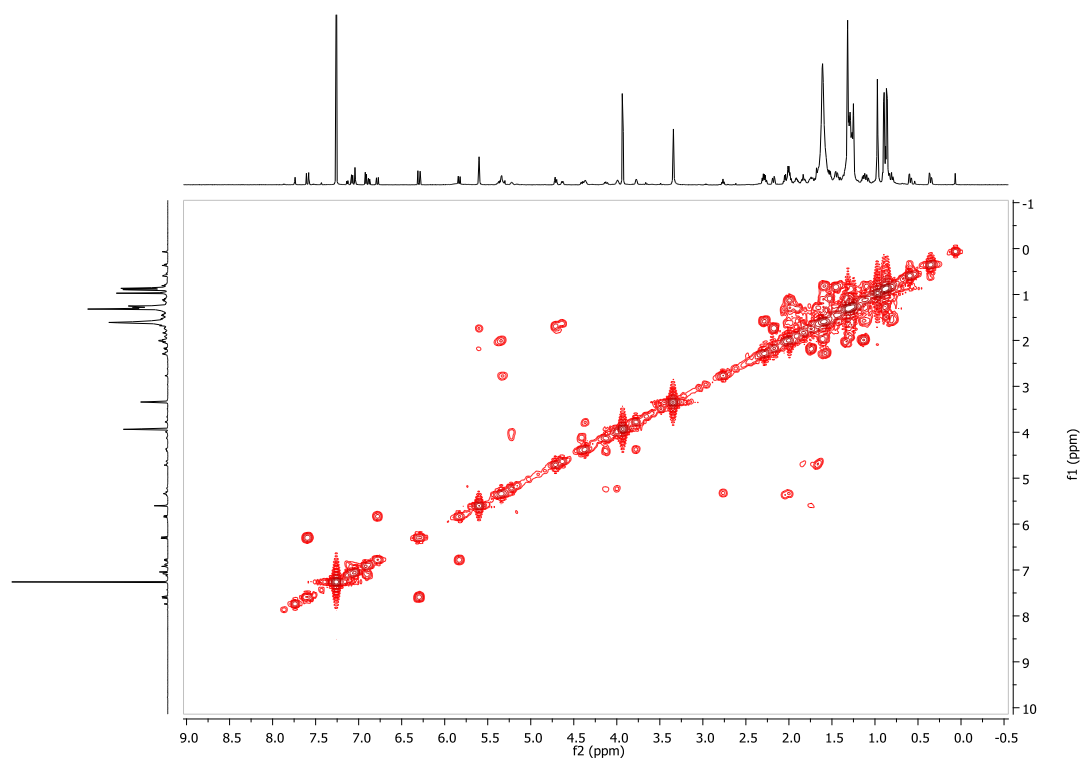
HSQC-DEPT (CDCl₃)



HMBC (CDCl₃)

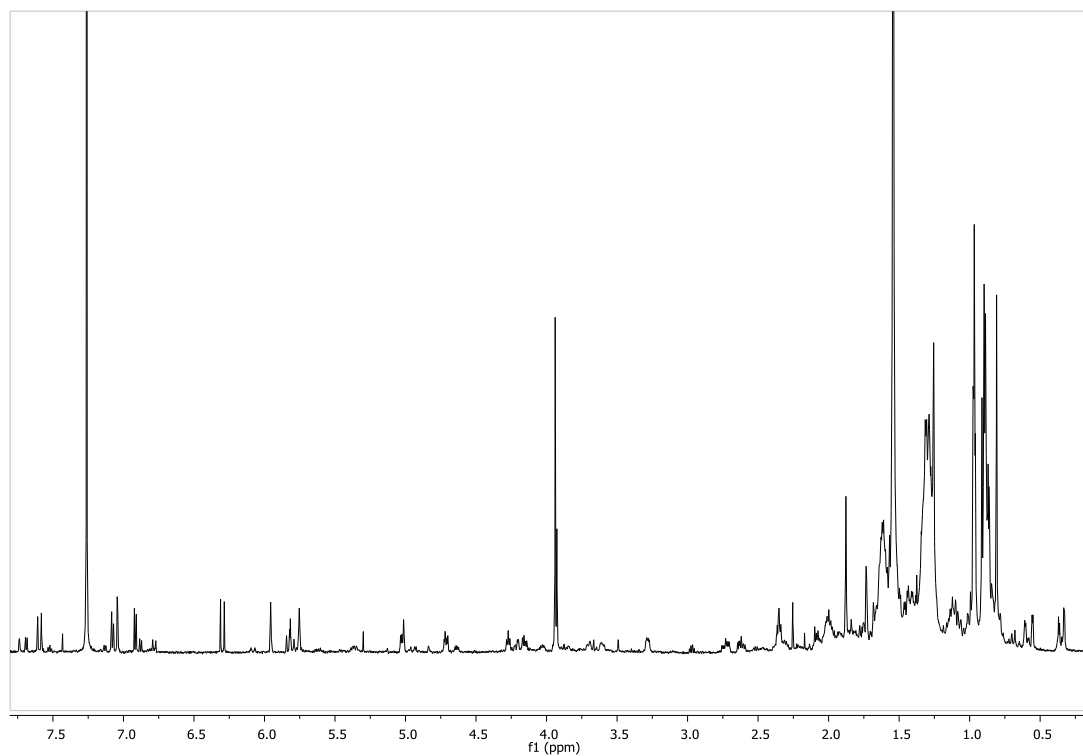


COSY (CDCl₃)

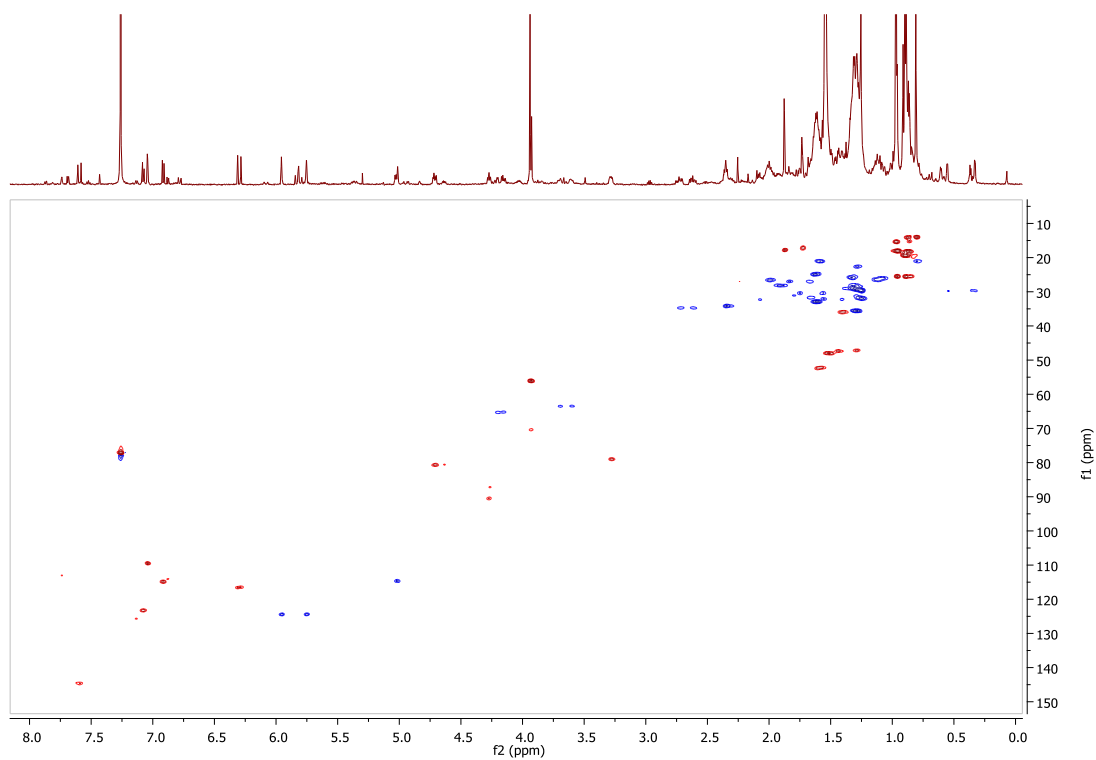


(POR4): Cycloart-26-methylen-24-oxo-3 β -ol ferulate

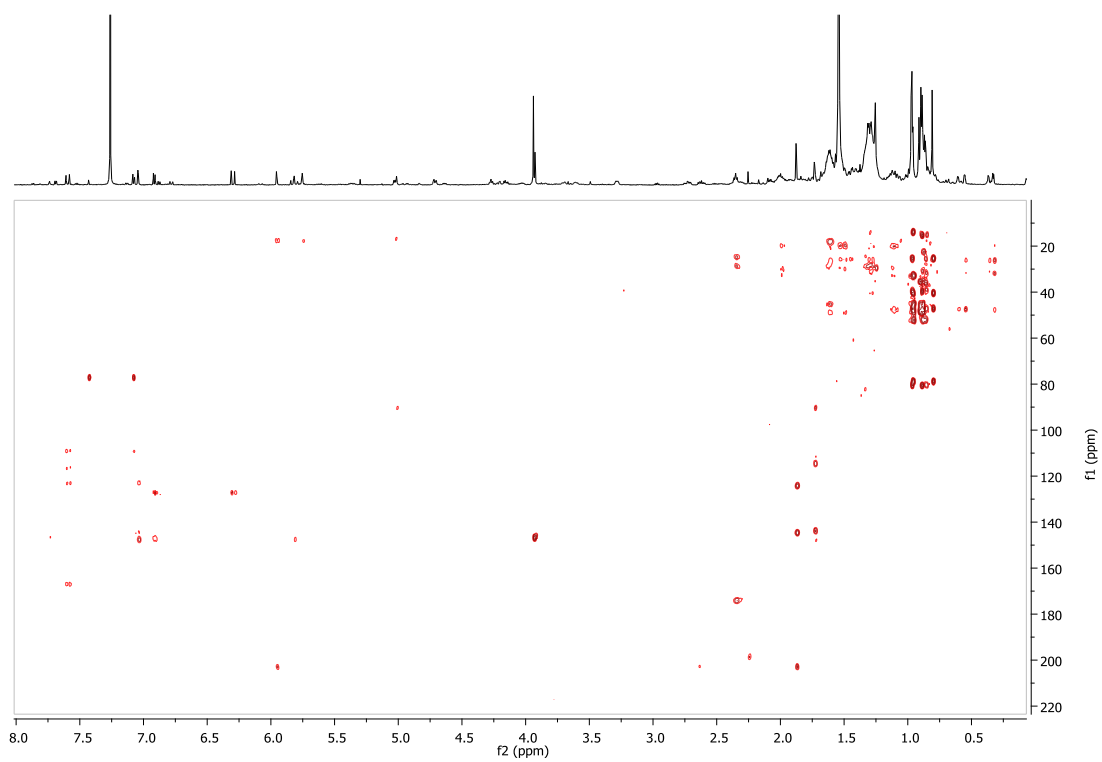
^1H NMR (CDCl_3)



HSQC-DEPT (CDCl_3)

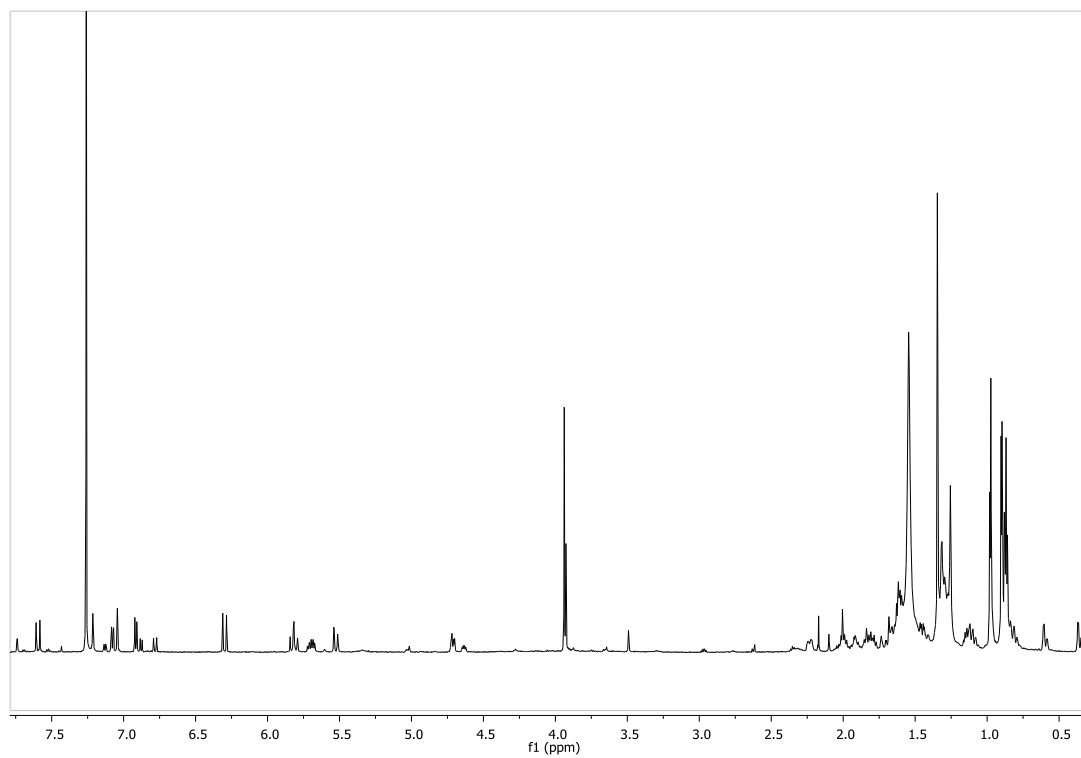


HMBC (CDCl₃)

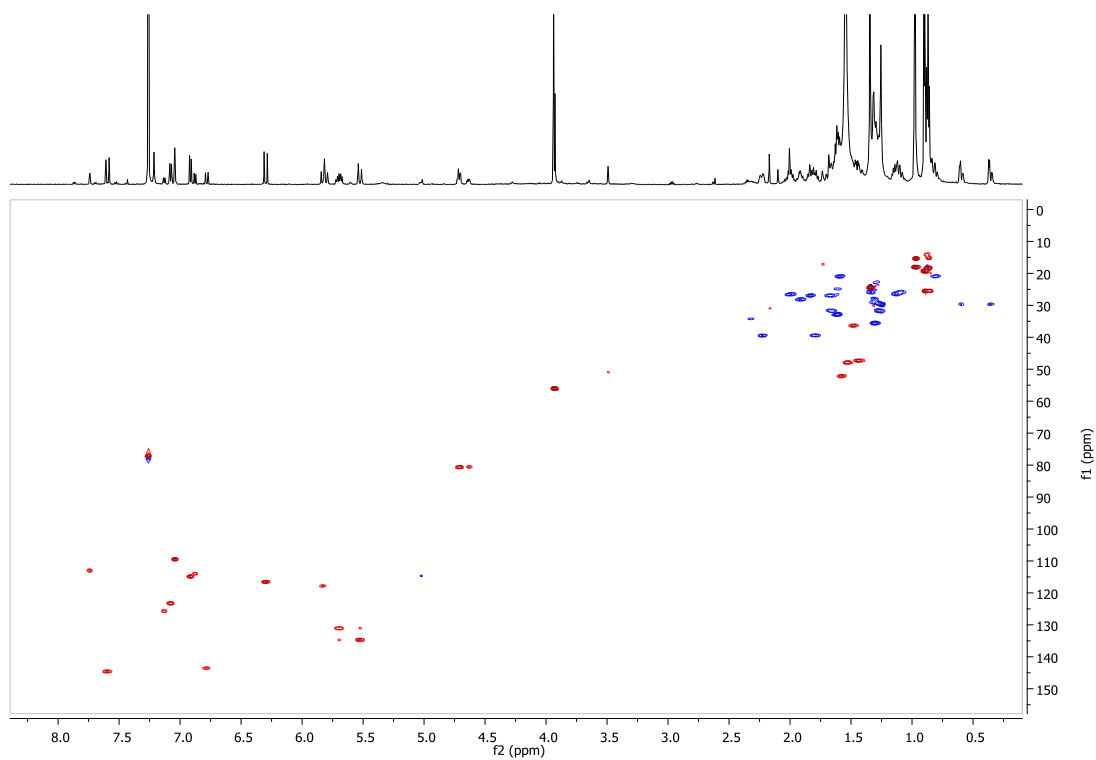


(POR1): 25-hydroperoxy-cycloart-23E-en-3 β -ol ferulate

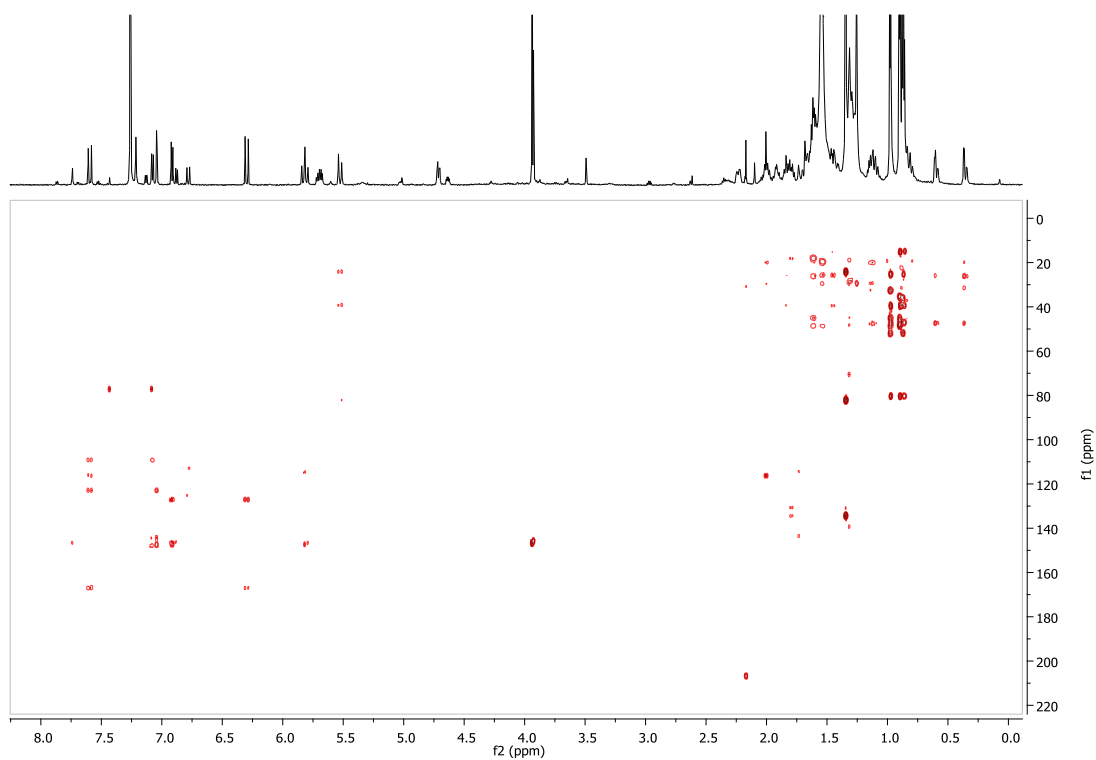
^1H NMR (CDCl_3)



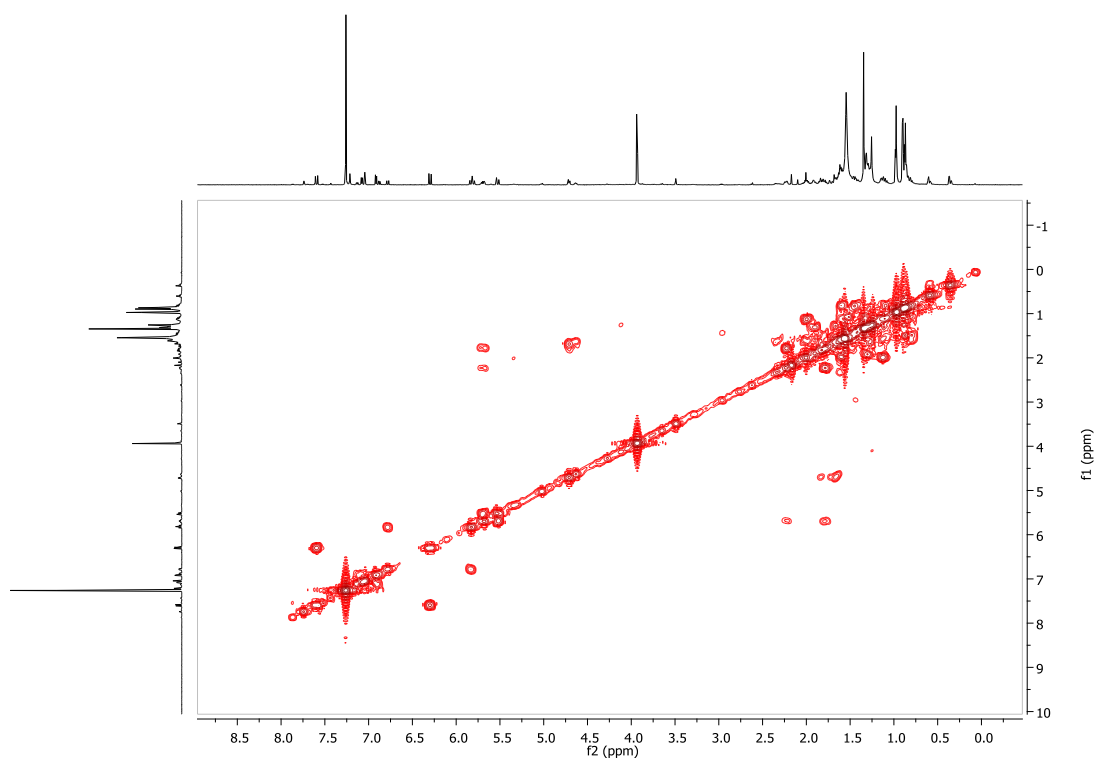
HSQC-DEPT (CDCl_3)



HMBC (CDCl₃)

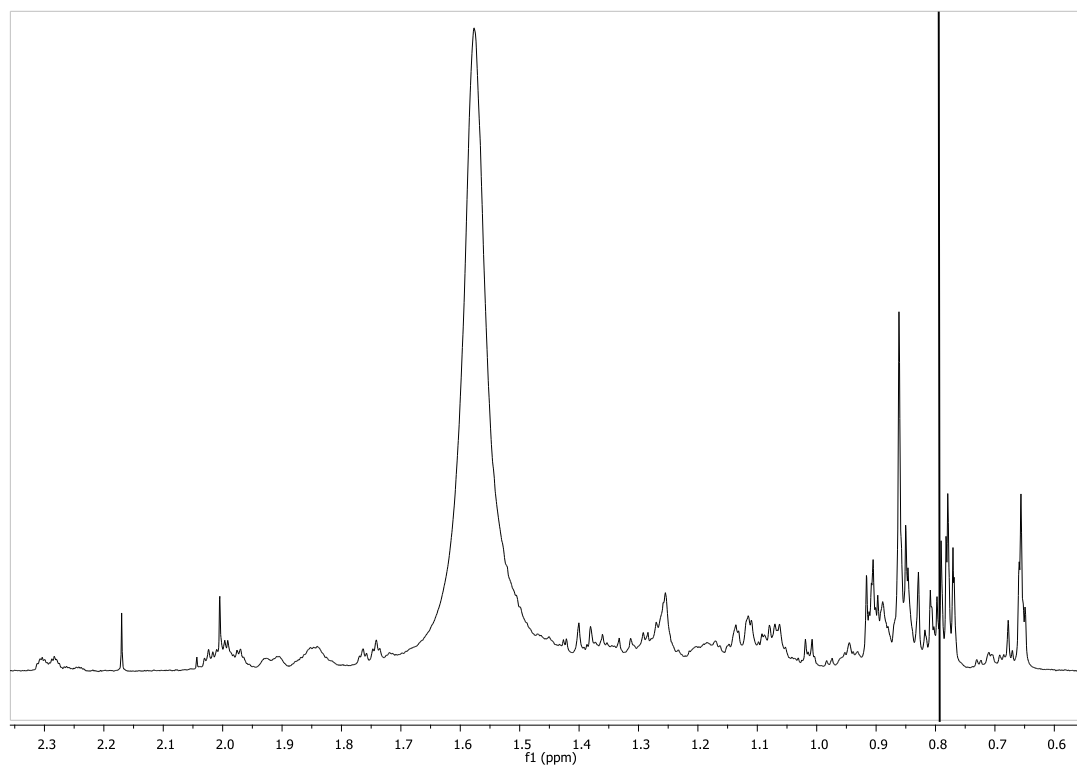


COSY (CDCl₃)



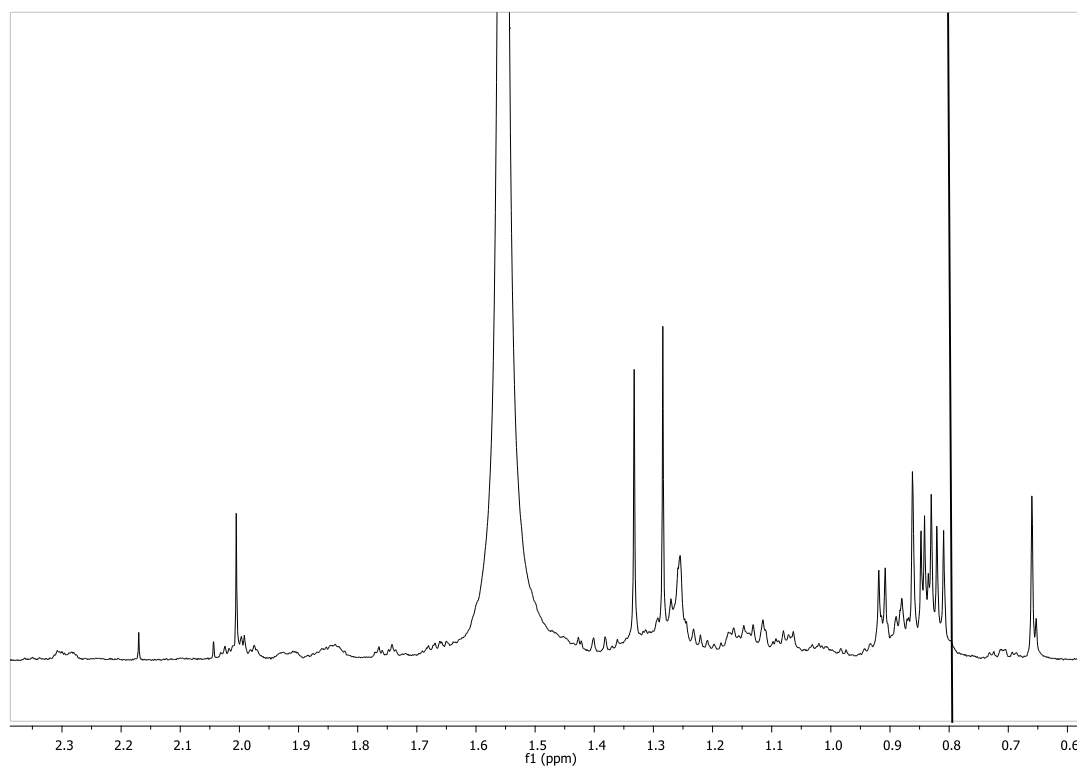
(POR5): 6-hydroxy-campestanyl ferulate

^1H NMR (CDCl_3)

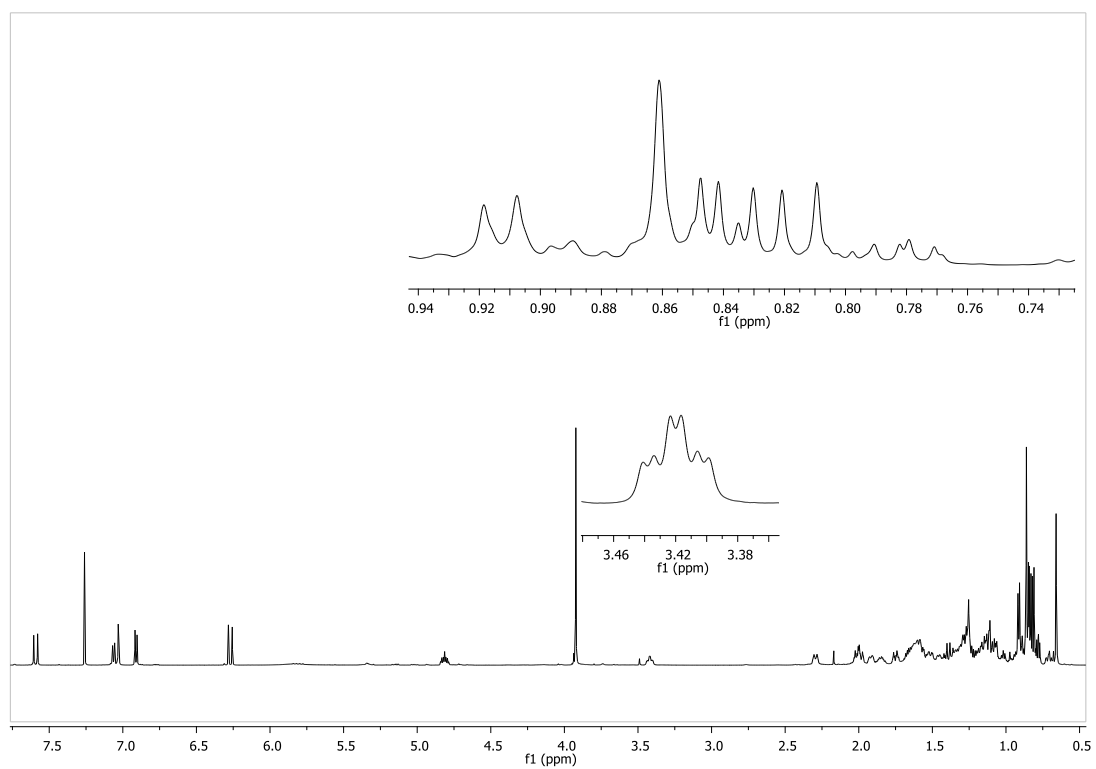


(POR6): 6-hydroxy-sitostanyl ferulate

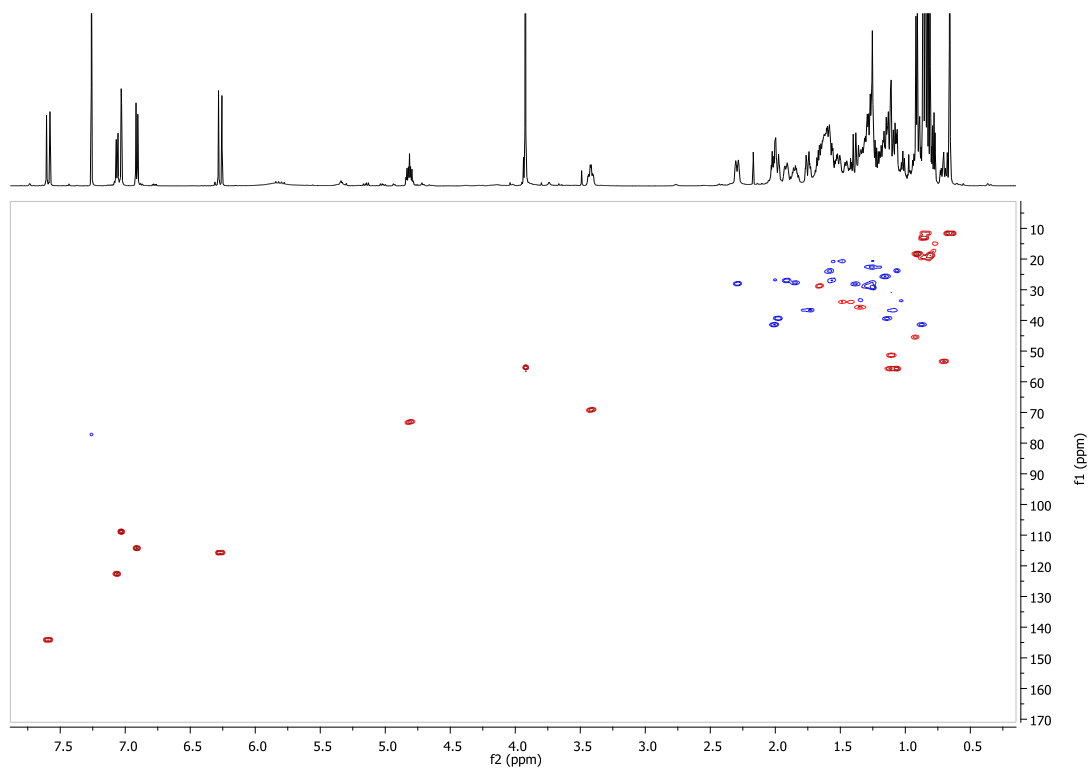
^1H NMR (CDCl_3)



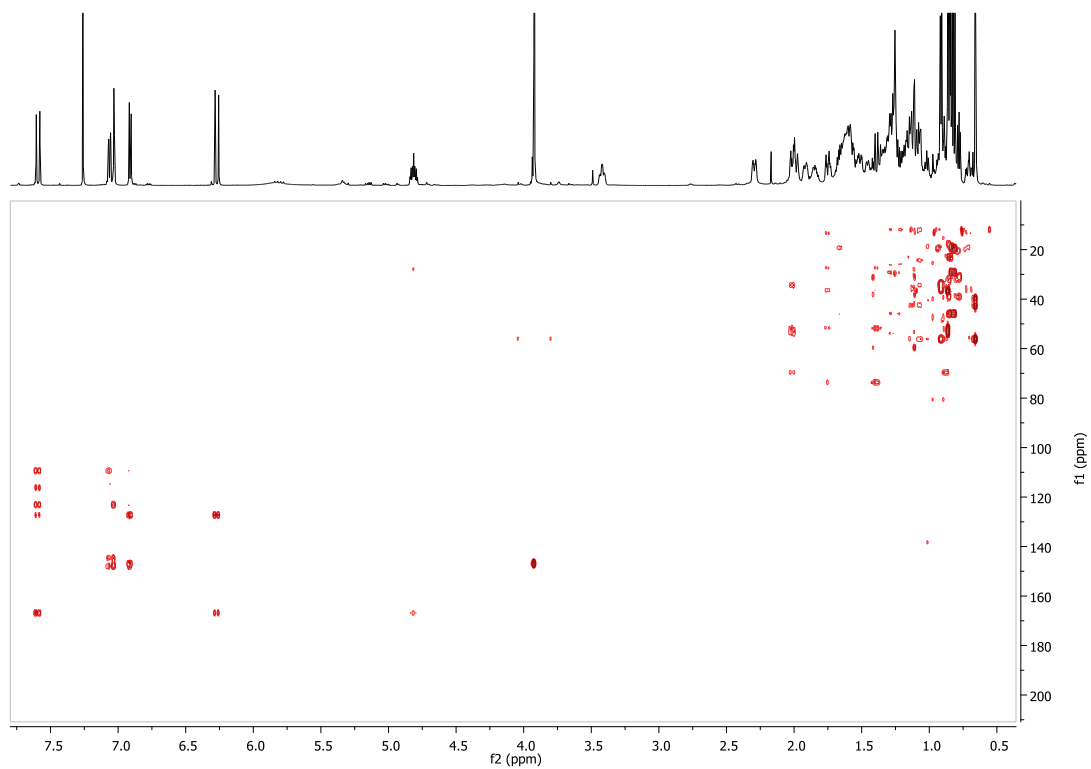
^1H NMR (CDCl_3) (SFCB- POR5 & POR6)



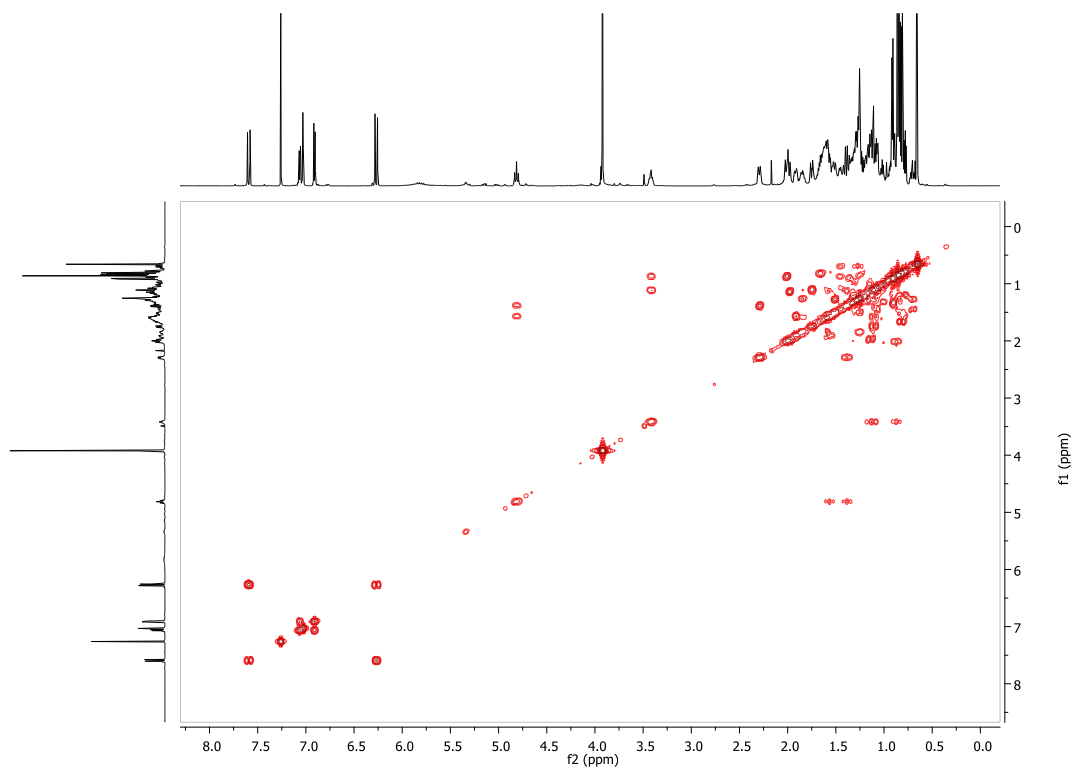
HSQC-DEPT (CDCl_3)



HMBC (CDCl₃)



COSY (CDCl₃)



Βιβλιογραφία

1. Shi, Z., A.W. Taylor, and G.A. Wittert, *Chapter 24 - Rice Intake, Weight Change and Metabolic Syndrome A2 - Watson, Ronald Ross*, in *Wheat and Rice in Disease Prevention and Health*, V.R. Preedy and S. Zibadi, Editors. 2014, Academic Press: San Diego. p. 323-331.
2. <http://www.agrocapital.gr/Category/Afieromata/Article/5063/i-kalliergeia-ryziou-kai-i-istoria-toy>.
3. ΓΕΝΙΚΗ ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ-ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΣΙΤΗΡΩΝ. Available from: <http://www.katsantonis.info/index.php/el/antikeimena/ryzi/14-eksiliksi-ryzi>.
4. Borresen, E.C. and E.P. Ryan, *Chapter 22 - Rice Bran: A Food Ingredient with Global Public Health Opportunities A2 - Watson, Ronald Ross*, in *Wheat and Rice in Disease Prevention and Health*, V.R. Preedy and S. Zibadi, Editors. 2014, Academic Press: San Diego. p. 301-310.
5. Rigo, L.A., et al., *Chapter 23 - Rice Bran Oil: Benefits to Health and Applications in Pharmaceutical Formulations*, in *Wheat and Rice in Disease Prevention and Health*, R.R.W.R.P. Zibadi, Editor. 2014, Academic Press: San Diego. p. 311-322.
6. Kaneko R, T.T., *New compound from rice bran oil*. J Soc Chem Ind Japan 1954. **57**: p. 526-9.
7. Shimizu, M., et al., *Studies on the Constituents of Rice Bran Oil. I. Isolation of Phenolic Substances*. Pharmaceutical Bulletin, 1957. **5**(1): p. 36-39.
8. Fang, N., S. Yu, and T.M. Badger, *Characterization of triterpene alcohol and sterol ferulates in rice bran using LC-MS/MS*. J Agric Food Chem, 2003. **51**(11): p. 3260-7.
9. Lemus, C., et al., *Chapter 32 - γ -Oryzanol: An Attractive Bioactive Component from Rice Bran A2 - Watson, Ronald Ross*, in *Wheat and Rice in Disease Prevention and Health*, V.R. Preedy and S. Zibadi, Editors. 2014, Academic Press: San Diego. p. 409-430.
10. Krishna, A.G.G., et al., *Effect of refining of crude rice bran oil on the retention of oryzanol in the refined oil*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2001. **78**(2): p. 127-131.
11. Luo, H.-F., et al., *Cytotoxic hydroxylated triterpene alcohol ferulates from rice bran*. Journal of natural products, 2005. **68**(1): p. 94-97.
12. Angelis, A., et al., *One-step isolation of gamma-oryzanol from rice bran oil by non-aqueous hydrostatic countercurrent chromatography*. J Sep Sci, 2011. **34**(18): p. 2528-37.
13. Vaughan, J.G.G., *The New Oxford Book of Food Plants. Illustrated by B. E. Nicholson*. Oxford University Press, 1997: p. 8-9.
14. *An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III*. Botanical Journal of the Linnean Society, 2009. **161**: p. 105-121.
15. Δαλιάνης, Κ., *Ανοιξιάτικα Σιτηρά*. Αθήνα: Εκδόσεις Σταμούλη, 1983: p. 235-309.
16. Παπακώστα-Τασοπούλου, Δ., Παπακώστα-Τασοπούλου, Δ. (2008). *Ειδική Γεωργία Ι - Τεύχος Α Σιτηρά Χειμερινά-Εαρινά*. Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία, σελ. 275-332. *Ειδική Γεωργία Ι - Τεύχος Α* . . 2008, Θεσσαλονίκη Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία.

17. Καραμάνος, Α., *Τα σιτηρά των θερμών κλιμάτων: Αραβόσιτος, σόργο, ρύζι, κεχρί*. Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις Παπαζήση, 1999: p. 248-352.
18. Κυριτση, Α., *ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΥ ΡΥΖΙΟΥ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ*, 2009.
19. Honeseey, R.C., *Principles of Cereal Science and Technology (1st ed., pp. 19-22, 47, 85-86, 101, 109, 159-162, 167-178, 133-142)*. The American Association of Cereal Chemists Inc, USA. 1986.
20. Evers, T. and S. Millar, *Cereal Grain Structure and Development: Some Implications for Quality*. Journal of Cereal Science, 2002. **36**(3): p. 261-284.
21. Παπακώστα-Τασσοπούλου, Δ., *Σιτηρά Χειμερινά-Εαρινά*. Ειδική Γεωργία Ι-Τεύχος Α-Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία, 2008: p. 275-332.
22. Goufo, P. and H. Trindade, *Rice antioxidants: phenolic acids, flavonoids, anthocyanins, proanthocyanidins, tocopherols, tocotrienols, gamma-oryzanol, and phytic acid*. Food Sci Nutr, 2014. **2**(2): p. 75-104.
23. Heuberger, A.L., et al., *Metabolomic and functional genomic analyses reveal varietal differences in bioactive compounds of cooked rice*. PLoS One, 2010. **5**(9): p. e12915.
24. Heinemann, R.J.B., et al., *Tocopherols, Tocotrienols, and γ-Oryzanol Contents in Japonica and Indica Subspecies of Rice (Oryza sativa L.) Cultivated in Brazil*. Cereal Chemistry, 2008. **85**(2): p. 243-247.
25. Huang, S.H. and L.T. Ng, *Quantification of tocopherols, tocotrienols, and gamma-oryzanol contents and their distribution in some commercial rice varieties in Taiwan*. J Agric Food Chem, 2011. **59**(20): p. 11150-9.
26. <http://www.gaiapedia.gr/gaiapedia/index.php/%CE%A1%CF%8D%CE%B6%CE%B9>.
27. <http://ricepedia.org/rice-as-a-plant/rice-species/cultivated-rice-species>.
28. Ross, I.A., *Medicinal plants of the world, Volume 3: chemical constituents, traditional and modern medicinal uses*. 2005, Totowa: Humana Press. xvii + 623 pp.
29. Linnaeus, C., *Species Plantarum* 1:333, 1753.
30. Londo, J.P., et al., *Phylogeography of Asian Wild Rice, Oryza rufipogon, Reveals Multiple Independent Domestications of Cultivated Rice, Oryza sativa*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. **103**(25): p. 9578-9583.
31. Dexter, P.B., *Rice Fortification For Developing Countries*. OMNI/USAID, 1998.
32. Luh, B.S., *5 - Rice production A2 - Owens, Gavin*, in *Cereals Processing Technology*. 2001, Woodhead Publishing. p. 79-108.
33. Slavin, J.J., D; Marquart, L *Grain processing and nutrition* CRITICAL REVIEWS IN FOOD SCIENCE AND NUTRITION CR R F SCI, 2000. **40**(4): p. 309-326.
34. Walter, P., *Vitamin requirements and vitamin enrichment of foods*. Food Chemistry, 1994. **49**(2): p. 113-117.
35. Villareal, C.P., Maranville, J.W., & Juliano, B.O. , *Nutrient content and retention during milling of brown rices from the International Rice Research Institute*. Cereal Chemistry, 1991. **68**(4): p. 437-439.
36. Semwal, A.D., G.K. Sharma, and S.S. Arya, *Flavour degradation in dehydrated convenience foods: changes in carbonyls in quick-cooking rice and Bengalgram dhal*. Food Chemistry, 1996. **57**(2): p. 233-239.
37. Bello, M., R. Baeza, and M.P. Tolaba, *Quality characteristics of milled and cooked rice affected by hydrothermal treatment*. Journal of Food Engineering, 2006. **72**(2): p. 124-133.
38. Bhattacharya, K.R., *Parboiling of rice*. Rice Chemistry and Technology. 2nd Ed. B. O. Juliano, ed. AACCC International: St. Paul, MN., 1985: p. 289-348.

39. Roy, P., et al., *Processing conditions, rice properties, health and environment*. Int J Environ Res Public Health, 2011. **8**(6): p. 1957-76.
40. Iguaz, A., et al., *Modelling effective moisture diffusivity of rough rice (Lido cultivar) at low drying temperatures*. Journal of Food Engineering, 2003. **59**(2-3): p. 253-258.
41. Iguaz, A. and P. Virseda, *Moisture desorption isotherms of rough rice at high temperatures*. Journal of Food Engineering, 2007. **79**(3): p. 794-802.
42. Takeuchi, S., et al., *The change of moisture distribution in a rice grain during boiling as observed by NMR imaging*. Journal of Food Engineering, 1997. **33**(3-4): p. 281-297.
43. Wiset, L., et al., *Effects of high temperature drying on rice quality*. Agricultural Engineering International: CIGR Journal, 2001.
44. Bello, M., M.P. Tolaba, and C. Suarez, *Factors affecting water uptake of rice grain during soaking*. LWT - Food Science and Technology, 2004. **37**(8): p. 811-816.
45. Bello, M.O., M.P. Tolaba, and C. Suarez, *Water absorption and starch gelatinization in whole rice grain during soaking*. LWT - Food Science and Technology, 2007. **40**(2): p. 313-318.
46. Thakur, A.K. and A.K. Gupta, *Water absorption characteristics of paddy, brown rice and husk during soaking*. Journal of Food Engineering, 2006. **75**(2): p. 252-257.
47. Ahromrit, A., D.A. Ledward, and K. Niranjana, *Kinetics of high pressure facilitated starch gelatinisation in Thai glutinous rice*. Journal of Food Engineering, 2007. **79**(3): p. 834-841.
48. Casiraghi, M., et al., *Effect of processing on rice starch digestibility evaluated by in vivo and in vitro methods*. Journal of Cereal Science, 1993. **17**(2): p. 147-156.
49. Frei, M., & Becker, K., *On Rice, Biodiversity & Nutrients*, . Institute of Animal Production in the Tropics and Subtropics (480B), Department of Aquaculture Systems and Animal Nutrition, University of Hohenheim, Stuttgart, Germany, 17 March., 2005.
50. Mujoo, R., A. Chandrashekar, and S. Zakiuddin Ali, *Rice Protein Aggregation During the Flaking Process*. Journal of Cereal Science, 1998. **28**(2): p. 187-195.
51. Lestienne, I., et al., *Effects of soaking whole cereal and legume seeds on iron, zinc and phytate contents*. Food Chemistry, 2005. **89**(3): p. 421-425.
52. Sharif, M.K., et al., *Rice bran: a novel functional ingredient*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2014. **54**(6): p. 807-16.
53. Kyritsi, A., C. Tzia, and V.T. Karathanos, *Vitamin fortified rice grain using spraying and soaking methods*. LWT - Food Science and Technology, 2011. **44**(1): p. 312-320.
54. Moraes, C.A., et al., *Review of the rice production cycle: by-products and the main applications focusing on rice husk combustion and ash recycling*. Waste Manag Res, 2014. **32**(11): p. 1034-48.
55. Rosell, C.M. and C. Collar, *Rice-Based Products*, in *Handbook of Food Products Manufacturing*. 2006, John Wiley & Sons, Inc. p. 521-538.
56. McCaskill DR, Z.F., *Use of rice bran oil in foods*. Food Technol 1999. **53**: p. 50-54.
57. Ju, Y.-I. and S.R. Vali, *Rice bran oil as a potential resource for biodiesel: a review*. Journal of scientific and Industrial Research, 2005. **64**(11): p. 866.
58. Friedman, M., *Rice brans, rice bran oils, and rice hulls: composition, food and industrial uses, and bioactivities in humans, animals, and cells*. J Agric Food Chem, 2013. **61**(45): p. 10626-41.

59. Rohman, A., *Chapter 37 - Rice Bran Oil's Role in Health and Cooking*, in *Wheat and Rice in Disease Prevention and Health*, R.R.W.R.P. Zibadi, Editor. 2014, Academic Press: San Diego. p. 481-490.
60. Ong, M.H. and J.M.V. Blanshard, *Texture determinants in cooked, parboiled rice. I: Rice starch amylose and the fine structure of amylopectin*. *Journal of Cereal Science*, 1995. **21**(3): p. 251-260.
61. *International Association of Rice Bran Oil: Conference 2015, India*. 2015; Available from: www.iarbo.com.
62. Chaturvedi, A. *The Economic Times*. April 5, 2013; Available from: <http://blogs.economicstimes.indiatimes.com/AgroCommodities/rice-bran-the-wonder-oil/>.
63. Reidy, S. *THE GRAIN AND GRAIN PROCESSING INFORMATION SITE*. February 5, 2016; Available from: http://www.world-grain.com/articles/news_home/Features/2016/02/Healthiest_oil_has_growth_pote.aspx?ID=%7B9C6074B5-8FA4-4BD5-8E21-A7FBE44E5D49%7D&cck=1.
64. Lamberts, L., et al., *Effect of milling on colour and nutritional properties of rice*. *Food Chemistry*, 2007. **100**(4): p. 1496-1503.
65. Saunders, R.M., *Rice bran: Composition and potential food uses*. *Food Reviews International*, 2009. **1**(3): p. 465-495.
66. Vaidya, R., et al., *Chapter 25 - Glycemic Index of Indian Cereal Staple Foods and their Relationship to Diabetes and Metabolic Syndrome A2 - Watson, Ronald Ross*, in *Wheat and Rice in Disease Prevention and Health*, V.R. Preedy and S. Zibadi, Editors. 2014, Academic Press: San Diego. p. 333-346.
67. Gopalan, C., et al., *Nutritive Value of Indian Foods*. 1989: National Institute of Nutrition, Indian Council of Medical Research.
68. Juliano, B.O., *FAO: Gross nutrient composition*. 1993.
69. Nagendra Prasad Mn, N.P., S. Kr, and S. Khatokar M, *Health Benefits of Rice Bran - A Review*. *Journal of Nutrition & Food Sciences*, 2011. **01**(03).
70. Most, M.M., et al., *Rice bran oil, not fiber, lowers cholesterol in humans*. *Am J Clin Nutr*, 2005. **81**(1): p. 64-8.
71. KING, N.T.D.A.J.W., *Phytosterol Enrichment of Rice Bran Oil by a Supercritical Carbon Dioxide Fractionation Technique*. *JOURNAL OF FOOD SCIENCE*, 2000. **65**(8).
72. Cho, D.H. and S.T. Lim, *Germinated brown rice and its bio-functional compounds*. *Food Chem*, 2016. **196**: p. 259-71.
73. Pereira-Caro, G., et al., *Phytochemical profiles of black, red, brown, and white rice from the Camargue region of France*. *J Agric Food Chem*, 2013. **61**(33): p. 7976-86.
74. Lu, T.-J., H.-N. Chen, and H.-J. Wang, *Chemical Constituents, Dietary Fiber, and γ -Oryzanol in Six Commercial Varieties of Brown Rice from Taiwan*. *Cereal Chemistry Journal*, 2011. **88**(5): p. 463-466.
75. Gunaratne, A., et al., *Antioxidant activity and nutritional quality of traditional red-grained rice varieties containing proanthocyanidins*. *Food Chem*, 2013. **138**(2-3): p. 1153-61.
76. Walter, M., et al., *Antioxidant properties of rice grains with light brown, red and black pericarp colors and the effect of processing*. *Food Research International*, 2013. **50**(2): p. 698-703.
77. Richard Cantrill, Y.K., *Phytosterols, phytostanols and their esters* 69 JECFA1, 2008: p. 1-13.
78. Brufau, G., M.A. Canela, and M. Rafecas, *Phytosterols: physiologic and metabolic aspects related to cholesterol-lowering properties*. *Nutr Res*, 2008. **28**(4): p. 217-25.

79. Tuncel, N.B. and N. Yılmaz, *Gamma-oryzanol content, phenolic acid profiles and antioxidant activity of rice milling fractions*. European Food Research and Technology, 2011. **233**(4): p. 577-585.
80. Jeng, T.L., et al., *gamma-Oryzanol, tocol and mineral compositions in different grain fractions of giant embryo rice mutants*. J Sci Food Agric, 2012. **92**(7): p. 1468-74.
81. Xu, Z., N. Hua, and J.S. Godber, *Antioxidant activity of tocopherols, tocotrienols, and gamma-oryzanol components from rice bran against cholesterol oxidation accelerated by 2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride*. J Agric Food Chem, 2001. **49**(4): p. 2077-81.
82. Miller, A. and K.H. Engel, *Content of gamma-oryzanol and composition of steryl ferulates in brown rice (Oryza sativa L.) of European origin*. J Agric Food Chem, 2006.
83. Akihisa, T., et al., *Triterpene alcohol and sterol ferulates from rice bran and their anti-inflammatory effects*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000. **48**(6): p. 2313-2319.
84. Xu, Z. and J.S. Godber, *Purification and identification of components of gamma-oryzanol in rice bran Oil*. J Agric Food Chem, 1999. **47**(7): p. 2724-8.
85. Berger, A., et al., *Similar cholesterol-lowering properties of rice bran oil, with varied gamma-oryzanol, in mildly hypercholesterolemic men*. Eur J Nutr, 2005. **44**(3): p. 163-73.
86. Afinisha Deepam, L.S., et al., *A new method for simultaneous estimation of unsaponifiable constituents of rice bran oil using HPTLC*. J Sep Sci, 2007. **30**(16): p. 2786-93.
87. Rohman, A., *Chapter 37 - Rice Bran Oil's Role in Health and Cooking A2 - Watson, Ronald Ross*, in *Wheat and Rice in Disease Prevention and Health*, V.R. Preedy and S. Zibadi, Editors. 2014, Academic Press: San Diego. p. 481-490.
88. Afinisha Deepam, L.S. and C. Arumughan, *Effect of saponification on composition of unsaponifiable matter in rice bran oil*. J Oleo Sci, 2012. **61**(5): p. 241-7.
89. Ha, T.-Y., et al., *Changes in nutraceutical lipid components of rice at different degrees of milling*. European Journal of Lipid Science and Technology, 2006. **108**(3): p. 175-181.
90. Jung, D.M., et al., *A Gas Chromatography-Tandem Quadrupole Mass Spectrometric Analysis of Policosanols in Commercial Vegetable Oils*. Journal of food science, 2011. **76**(6): p. C891-C899.
91. Nakagawa, M., et al., *POTENTIATION BY SQUALENE OF THE CYTOTOXICITY OF ANTICANCER AGENTS AGAINST CULTURED MAMMALIAN CELLS AND MURINE TUMOR*. Japanese Journal of Cancer Research GANN, 1985. **76**(4): p. 315-320.
92. Shimoda, H., *Natural products supporting the extracellular matrix: Rice ceramide and other plant extracts for skin health (pp. 319–334)*. Boston: William Andrew Publishing. Nutritional cosmetics. In A. Tabor & R. M. Blair (Eds.),, 2009: p. 319-334.
93. Sugano, M., K. Koba, and E. Tsuji, *Health benefits of rice bran oil*. Anticancer Res, 1999. **19**(5A): p. 3651-7.
94. Suwanna Vorarat¹, Chittima Managit¹, , *Examination of Antioxidant Activity and Development of Rice Bran Oil and Gamma-Oryzanol Microemulsion*. J Health Res, 2010. **24**(2): p. 67-72.
95. Juliano, C., et al., *Antioxidant activity of gamma-oryzanol: mechanism of action and its effect on oxidative stability of pharmaceutical oils*. Int J Pharm, 2005. **299**(1-2): p. 146-54.

96. Wang, T., K.B. Hicks, and R. Moreau, *Antioxidant activity of phytosterols, oryzanol, and other phytosterol conjugates*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2002. **79**(12): p. 1201-1206.
97. Islam, M.S., et al., *Antioxidant, Free Radical-Scavenging, and NF- κ B-Inhibitory Activities of Phytosteryl Ferulates: Structure-Activity Studies*. Journal of Pharmacological Sciences, 2009. **111**(4): p. 328-337.
98. Islam, M.S., et al., *Chapter 34 - Rice Bran Antioxidants in Health and Wellness A2 - Watson, Ronald Ross*, in *Wheat and Rice in Disease Prevention and Health*, V.R. Preedy and S. Zibadi, Editors. 2014, Academic Press: San Diego. p. 443-451.
99. Lerma-García, M.J., et al., *Composition, industrial processing and applications of rice bran γ -oryzanol*. Food Chemistry, 2009. **115**(2): p. 389-404.
100. Mizuta, K., H. Kaneta, and K. Itaya, *Effects of gamma-oryzanol on gastric secretions in rats (author's transl)*. Nihon Yakurigaku Zasshi, 1978. **74**(2): p. 285-95.
101. Oka, T., et al., *Cycloartenyl ferulate, a component of rice bran oil-derived gamma-oryzanol, attenuates mast cell degranulation*. Phytomedicine, 2010. **17**(2): p. 152-6.
102. Yasukawa, K., et al., *Inhibitory effect of cycloartenol ferulate, a component of rice bran, on tumor promotion in two-stage carcinogenesis in mouse skin*. Biol Pharm Bull, 1998. **21**(10): p. 1072-6.
103. Kim, S.P., et al., *Dietary rice bran component gamma-oryzanol inhibits tumor growth in tumor-bearing mice*. Mol Nutr Food Res, 2012. **56**(6): p. 935-44.
104. Raicht, R.F., et al., *Protective Effect of Plant Sterols against Chemically Induced Colon Tumors in Rats*. Cancer Research, 1980. **40**(2): p. 403-405.
105. Kong, C.K.L., et al., *A rice bran polyphenol, cycloartenyl ferulate, elicits apoptosis in human colorectal adenocarcinoma SW480 and sensitizes metastatic SW620 cells to TRAIL-induced apoptosis*. Biochemical Pharmacology, 2009. **77**(9): p. 1487-1496.
106. Awad, A.B. and C.S. Fink, *Phytosterols as anticancer dietary components: Evidence and mechanism of action*. Journal of Nutrition, 2000. **130**(9): p. 2127-2130.
107. Verschoyle, R.D., et al., *Evaluation of the cancer chemopreventive efficacy of rice bran in genetic mouse models of breast, prostate and intestinal carcinogenesis*. British Journal of Cancer, 2007. **96**(2): p. 248-254.
108. Hudson, E.A., et al., *Characterization of potentially chemopreventive phenols in extracts of brown rice that inhibit the growth of human breast and colon cancer cells*. Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention, 2000. **9**(11): p. 1163-1170.
109. Borud, E., S. Grimsgaard, and A. White, *Menopausal problems and acupuncture*. Auton Neurosci, 2010. **157**(1-2): p. 57-62.
110. Cho, S.H. and W.W. Whang, *Acupuncture for vasomotor menopausal symptoms: a systematic review*. Menopause, 2009. **16**(5): p. 1065-73.
111. Ma, X.-p., F.-d. Wu, and Q.-h. Shan, *Clinical observation on treating menopause syndrome with acupuncture therapy*. Journal of Acupuncture and Tuina Science, 2009. **7**(1): p. 51-54.
112. Tian, H. and C. Zhang, *The combined use of acupuncture and Chinese medicines for treatment of menopausal syndrome--a clinical report of 63 cases*. J Tradit Chin Med, 2008. **28**(1): p. 3-4.
113. E. Terpos, D.C., J. Meletis, *Interactions between immune system and bone cells: Clinical implications*. Archives of Hellenic Medicine 2008. **25**(4): p. 442-455.
114. Jungsun Moon, S.-H.M., Sik-Won Choi, Sookyeon Lee, Seong Hwan Kim and D. Yim, *Anti-osteoclastogenic activity of butanol fraction of rice bran*

- extract via downregulation of MAP kinase activity and c-Fos/NFATc1 expression. 2013.
115. Raisz, L.G., *Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects*. J Clin Invest, 2005. **115**(12): p. 3318-25.
 116. Muhammad, S.I., et al., *Upregulation of genes related to bone formation by gamma-amino butyric acid and gamma-oryzanol in germinated brown rice is via the activation of GABAB-receptors and reduction of serum IL-6 in rats*. Clin Interv Aging, 2013. **8**: p. 1259-71.
 117. Shimomura, Y., et al., *Effect of gamma-oryzanol on serum TSH concentrations in primary hypothyroidism*. Endocrinol Jpn, 1980. **27**(1): p. 83-6.
 118. http://www.incardiology.gr/pathiseis_alles/metaboliko_sindromo.html.
 119. Cheng, H.H., et al., *Gamma-oryzanol ameliorates insulin resistance and hyperlipidemia in rats with streptozotocin/nicotinamide-induced type 2 diabetes*. Int J Vitam Nutr Res, 2010. **80**(1): p. 45-53.
 120. Ghatak, S.B. and S.S. Panchal, *Anti-diabetic activity of oryzanol and its relationship with the anti-oxidant property*. International Journal of Diabetes in Developing Countries, 2012. **32**(4): p. 185-192.
 121. Ghatak, S.B. and S.S. Panchal, *Protective effect of oryzanol isolated from crude rice bran oil in experimental model of diabetic neuropathy*. Revista Brasileira de Farmacognosia, 2012. **22**: p. 1092-1103.
 122. Ohara, K., et al., *The effects of hydroxycinnamic acid derivatives on adiponectin secretion*. Phytomedicine, 2009. **16**(2-3): p. 130-7.
 123. Suzuki, S. and S. Oshima, *Influence of Blending of Edible Fats and Oils on Human Serum Cholesterol Level (Part 1) Blending of Rice Bran Oil and Safflower Oil*. The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics, 1970. **28**(1): p. 3-6.
 124. Ishihara, M., *Effect of gamma-oryzanol on serum lipid peroxide level and clinical symptoms of patients with climacteric disturbances*. Asia Oceania J Obstet Gynaecol, 1984. **10**(3): p. 317-23.
 125. Yoshino G., K.T., *Effects of gamma oryzanol and probucol on hyperlipidemia*. Current Therapeutic Research. . 1989. **45**(6): p. 975-982.
 126. Sasaki, J., et al., *Effects of gamma-oryzanol on serum lipids and apolipoproteins in dyslipidemic schizophrenics receiving major tranquilizers*. Clin Ther, 1990. **12**(3): p. 263-8.
 127. Somsuvra B. Ghatak, S.J.P., *Anti-hyperlipidemic activity of oryzanol, isolated from crude rice bran oil, on Triton WR-1339-induced acute hyperlipidemia in rats*. Rev. Bras. Farmacogn. Braz. J. Pharmacogn., 2012. **22**(3): p. 642-648.
 128. Rong, N., L.M. Ausman, and R.J. Nicolosi, *Oryzanol decreases cholesterol absorption and aortic fatty streaks in hamsters*. Lipids, 1997. **32**(3): p. 303-9.
 129. Wilson, T.A., et al., *Rice bran oil and oryzanol reduce plasma lipid and lipoprotein cholesterol concentrations and aortic cholesterol ester accumulation to a greater extent than ferulic acid in hypercholesterolemic hamsters*. J Nutr Biochem, 2007. **18**(2): p. 105-12.
 130. Lichtenstein, A.H., et al., *Rice bran oil consumption and plasma lipid levels in moderately hypercholesterolemic humans*. Arterioscler Thromb, 1994. **14**(4): p. 549-56.
 131. Sakamoto, K., et al., *Effects of gamma-oryzanol and cycloartenol ferulic acid ester on cholesterol diet induced hyperlipidemia in rats*. Jpn J Pharmacol, 1987. **45**(4): p. 559-65.
 132. Hiramatsu, K., et al., *Effect of gamma-oryzanol on atheroma formation in hypercholesterolemic rabbits*. Tokai J Exp Clin Med, 1990. **15**(4): p. 299-305.
 133. Negm, C.S. and K. Silliman, *The Effects of Rice Bran Oil and oryzanol on Plasma Levels of Total Cholesterol and hdl-Cholesterol in Male Golden*

- Hamsters*. Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics, 1995. **95**(9): p. A29.
134. Inoue, Y., R. Horinuki, and Y. Kimura, *Suppression of Experimental Atherosclerosis in Rats by γ -Oryzanol (Hi-Z γ)*. The Journal of Japan Atherosclerosis Society, 1989. **17**(3): p. 499-507.
 135. Zhang, Q.H., *Effects of gamma-oryzanol on experimental coronary atherosclerosis in rats*. Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi, 1986. **14**(5): p. 287-90, 319.
 136. Cicero, A.F.G. and A. Gaddi, *Rice Bran Oil and γ -Oryzanol in the Treatment of Hyperlipoproteinaemias and Other Conditions*. Phytotherapy Research, 2001. **15**(4): p. 277-289.
 137. Seetharamaiah, G.S. and a.N. Chandrasekhara, *Studies on hypocholesterolemic activity of rice bran oil*. Atherosclerosis, 1989. **78**: p. 219-223.
 138. Rong, N., L.M. Ausman, and R.J. Nicolosi, *Oryzanol decreases cholesterol absorption and aortic fatty streaks in hamsters*. Lipids, 1997. **32**(3): p. 303-309.
 139. Justo, M.L., et al., *Microvascular disorders in obese Zucker rats are restored by a rice bran diet*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2014. **24**(5): p. 524-31.
 140. Justo, M.L., et al., *Water-soluble rice bran enzymatic extract attenuates dyslipidemia, hypertension and insulin resistance in obese Zucker rats*. Eur J Nutr, 2013. **52**(2): p. 789-97.
 141. Kozuka, C., et al., *Natural food science based novel approach toward prevention and treatment of obesity and type 2 diabetes: recent studies on brown rice and gamma-oryzanol*. Obes Res Clin Pract, 2013. **7**(3): p. e165-72.
 142. Grunewald, K.K. and R.S. Bailey, *Commercially Marketed Supplements for Bodybuilding Athletes*. Sports Medicine: Evaluations of Research in Exercise Science and Sports Medicine, 1993. **15**(2): p. 90-103.
 143. Lemus, C., et al., *γ -Oryzanol. An Attractive Bioactive Component from Rice Bran*, in *Wheat and Rice in Disease Prevention and Health*. 2014. p. 409-430.
 144. Amarasinghe, B.M.W.P.K., M.P.M. Kumarasiri, and N.C. Gangodavilage, *Effect of method of stabilization on aqueous extraction of rice bran oil*. Food and Bioproducts Processing. **87**(2): p. 108-114.
 145. Khoei, M. and F. Chekin, *The ultrasound-assisted aqueous extraction of rice bran oil*. Food Chem, 2016. **194**: p. 503-7.
 146. Sung Won Yoon¹, Junsoo Lee², Young-Gil Pyo^{1,4}, Sea-Kwan Oh³, Jeom-Sig Lee³, In-Hwan Kim^{1,4,*}, *Nutraceutical Lipid Substances in Korean Rice Cultivars*. Journal of Food and Nutrition Research, 2014. **2**(1): p. 40-46.
 147. Oliveira, R., et al., *Effects of the extraction conditions on the yield and composition of rice bran oil extracted with ethanol—A response surface approach*. Food and Bioproducts Processing, 2012. **90**(1): p. 22-31.
 148. Da Costa Rodrigues, C.E. and R. Oliveira, *Response surface methodology applied to the analysis of rice bran oil extraction process with ethanol*. International Journal of Food Science & Technology, 2010. **45**(4): p. 813-820.
 149. Lohani, U.C., P. Fallahi, and K. Muthukumarappan, *Comparison of Ethyl Acetate with Hexane for Oil Extraction from Various Oilseeds*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2015. **92**(5): p. 743-754.
 150. Liu, S.X. and P.K. Mamidipally, *Quality Comparison of Rice Bran Oil Extracted with d-Limonene and Hexane*. Cereal Chemistry, 2005. **82**(2): p. 209-215.
 151. Chen, H.H. and T.H. Chiu, *Phytochemicals characterization of solvent extracts from taro-scented japonica rice bran*. J Food Sci, 2011. **76**(4): p. C656-62.

152. Lai, P., et al., *Phytochemicals and antioxidant properties of solvent extracts from Japonica rice bran*. Food Chemistry, 2009. **117**(3): p. 538-544.
153. Jesus, S.P., R. Grimaldi, and H. Hense, *Recovery of γ -oryzanol from rice bran oil byproduct using supercritical fluid extraction*. The Journal of Supercritical Fluids, 2010. **55**(1): p. 149-155.
154. Ruen-Ngam, D., C. Thawai, and S. Sukonthamut, *Pretreatment to increase yield and antioxidant activity of γ -oryzanol in rice bran oil*. ScienceAsia, 2016. **42**(2): p. 75.
155. Godber, Z.X.a.J.S., *Comparison of Supercritical Fluid and Solvent Extraction Methods in Extracting γ -Oryzanol from Rice Bran*. JAOCS, 2000. **77**(5).
156. Shammugasamy, B., et al., *Rapid Reversed-Phase Chromatographic Method for Determination of Eight Vitamin E Isomers and γ -Oryzanols in Rice Bran and Rice Bran Oil*. Food Analytical Methods, 2014. **8**(3): p. 649-655.
157. Godber*, Z.X.a.J.S., *Antioxidant Activities of Major Components of γ -Oryzanol from Rice Bran Using a Linoleic Acid Model*. JAOCS, 2001. **78**(6).
158. E.J. Rogers a, S.M.R.a., ; R.J. Nicolosi a,;, D.R. Carpenter b,; C.A. McClelland b,; L.J. Romanczyk, Jr. b, *Identification and Quantitation of 7-Oryzanol Components and Simultaneous Assessment of Tocols in Rice Bran Oil*. JAOCS, 1993. **70**(3).
159. Mohanlal, S., et al., *Chemical Indices, Antioxidant Activity and Anti-Inflammatory Effect of Extracts of the Medicinal Rice "Njavara" and Staple Varieties: A Comparative Study*. Journal of Food Biochemistry, 2013. **37**(3): p. 369-380.
160. Lu, W., et al., *Simultaneous HPLC quantification of five major triterpene alcohol and sterol ferulates in rice bran oil using a single reference standard*. Food Chem, 2014. **148**: p. 329-34.
161. Cho, J.-Y., et al., *Quantitative analyses of individual γ -Oryzanol (Steryl Ferulates) in conventional and organic brown rice (*Oryza sativa* L.)*. Journal of Cereal Science, 2012. **55**(3): p. 337-343.
162. Stöggel, W., et al., *Simultaneous determination of carotenoids, tocopherols, and γ -oryzanol in crude rice bran oil by liquid chromatography coupled to diode array and mass spectrometric detection employing silica C30 stationary phases*. Journal of Separation Science, 2005. **28**(14): p. 1712-1718.
163. Iqbal, S., M.I. Bhangar, and F. Anwar, *Antioxidant properties and components of some commercially available varieties of rice bran in Pakistan*. Food Chemistry, 2005. **93**(2): p. 265-272.
164. Liu, M., et al., *Preparative separation of triterpene alcohol ferulates from rice bran oil using a high performance counter-current chromatography*. Food Chem, 2013. **139**(1-4): p. 919-24.
165. Ito, Y., *Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography*. Journal of Chromatography A, 2005. **1065**(2): p. 145-168.
166. Saito, M., *History of supercritical fluid chromatography: instrumental development*. J Biosci Bioeng, 2013. **115**(6): p. 590-9.
167. Guiochon, G. and A. Tarafder, *Fundamental challenges and opportunities for preparative supercritical fluid chromatography*. J Chromatogr A, 2011. **1218**(8): p. 1037-114.
168. Chen, C.-R., et al., *Supercritical carbon dioxide extraction and deacidification of rice bran oil*. The Journal of Supercritical Fluids, 2008. **45**(3): p. 322-331.
169. http://www.waters.com/waters/en_GR/Supercritical-Fluid-Chromatography/nav.htm?cid=10145739&locale=en_GR.
170. Lacroix, D., et al., *Hydroperoxy-cycloartane triterpenoids from the leaves of *Markhamia lutea*, a plant ingested by wild chimpanzees*. Phytochemistry, 2009. **70**(10): p. 1239-45.

171. al., W.e., *Triterpenoids and Steroids from the Fruits of Melia toosendan and Their Cytotoxic Effects on*. Journal of Natural Products, 2010. **73**: p. 1898–1906.
172. Bao, Y., E. Yanase, and S. Nakatsuka, *Isolation of campesteryl ferulate and epi-campesteryl ferulate, two components of gamma-oryzanol from rice bran*. Biosci Biotechnol Biochem, 2013. **77**(4): p. 877-9.
173. al., C.e., *Isolation of Stigmasterol and β -Sitosterol from the dichloromethane extract of Rubus suavissimus*. International Current Pharmaceutical Journal, 2012. **1**(9): p. 239-242.
174. William K. Wilson, R.M.S., Joshua J. Warren, Peter S. Rogers, Benfang Ruan, and J. and George J. Schroeffer, *Analysis of unsaturated c27 sterols by nuclear*. Journal of Lipid Research 1996. **37**.
175. Krishna, V., C.I. Chang, and C.H. Chou, *Two isomeric epoxysitosterols from Rhododendron formosanum: 1H and 13C NMR chemical shift assignments*. Magn Reson Chem, 2006. **44**(8): p. 817-9.
176. Iwatsuki, K., et al., *Sterol ferulates, sterols, and 5-alk(en)ylresorcinols from wheat, rye, and corn bran oils and their inhibitory effects on Epstein-Barr virus activation*. Journal of agricultural and food chemistry, 2003. **51**(23): p. 6683-6688.
177. al, P.e., *Chemical Constituents from Bombacopsis glabra (Pasq.) A.Robyns*. J. Braz. Chem. Soc., 2002. **13**(2): p. 276-280.
178. Shen, T., et al., *Cycloartane-type triterpenoids from the resinous exudates of Commiphora opobalsamum*. Journal of natural products, 2008. **71**(1): p. 81-86.
179. al., A.-M.e., *Chemical Investigation of Euphorbia schimperi C. Presl*. Rec. Nat. Prod. , 2008. **2**(2): p. 39-45.
180. Sevil OKSUZ, A.U., Asli BARLA, *Terpenoids and Aromatic Compounds from Euphorbia heteradena*. Turk J Chem, 2002. **26**: p. 457 – 463.
181. Asai, T., N. Hara, and Y. Fujimoto, *Fatty acid derivatives and dammarane triterpenes from the glandular trichome exudates of Ibicella lutea and Proboscidea louisiana*. Phytochemistry, 2010. **71**(8-9): p. 877-94.
182. Winkler-Moser, J.K., et al., *Synthesis of steryl ferulates with various sterol structures and comparison of their antioxidant activity*. Food Chem, 2015. **169**: p. 92-101.
183. S. Weber, J.P., V. Brecht, and A. W. Frahm*, *Phytochemical Investigation of Aglaia rubiginosa*. J. Nat. Prod., 2000. **63**: p. 636-642.
184. Singh, O.M., et al., *Isolation of steroidal glycosides from Solanum xanthocarpum and studies on their antifungal activities*. Nat Prod Res, 2007. **21**(7): p. 585-90.
185. Garcez, F.R., et al., *Chemical constituents from Terminalia glabrescens*. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2003. **14**(3): p. 461-465.
186. Kimura, Y., et al., *Structures of Five Hydroxylated Sterols from the Seeds of Trichosanthes kirilowii MAXIM*. CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN, 1995. **43**(10): p. 1813-1817.
187. Fukuyama, Y., et al., *In vitro fibrinolytic phytosterols isolated from the roots of Spatholobus suberetus*. Planta Med, 1988. **54**(1): p. 34-6.