



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

# Φυτοχημική μελέτη των καρπών του είδους *Paliurus spina-christi* Miller (οικ. Rhamnaceae)



Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης  
Αμούντζιας Βάιος  
Φαρμακοποιός  
Αθήνα, 2017



# Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα :

- Τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, το Διευθυντή του τομέα Φαρμακογνωσίας Καθηγητή Αλέξιο-Λέανδρο Σκαλτσούνη, την Καθηγήτρια Σοφία Μητάκου και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Νεκτάριο Αληγιάννη
- Τον επιβλέποντα της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας Αναπληρωτή Καθηγητή Νεκτάριο Αληγιάννη για τη συνεχή καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια της προσπάθειας αυτής, τις πολύτιμες συμβουλές του, την ευρεία παροχή γνώσεων, την ηθική υποστήριξη και υπομονή του, που συντέλεσαν στην άριστη συνεργασία μας
- Το μεταδιδάκτορα Διονύση Αμπάτη για τη βοήθειά του, τη συνεχή καθοδήγησή του, την ηθική υποστήριξή του, την υπομονή του και την άριστη συνεργασία μας
- Τη μεταδιδάκτορα Ειρήνη Μπαϊρα για τη λήψη των φασμάτων HRMS
- Τις μεταδιδάκτορες Γεωργία-Κωνσταντίνα Σταθοπούλου και Αντιγόνη Χείλαρη για τη βοήθεια στη λήψη κάποιων από τα φάσματα NMR
- Την Τριάδα Μίγα και την οικογένειά της για τη συλλογή των καρπών
- Τη Χριστίνα, την Εύα, το Γρηγόρη, το Μιχάλη και το Sergio για όλη τη βοήθειά τους μέσα και έξω από το εργαστήριο
- Όλους τους φίλους προπτυχιακούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές, τους υποψήφιους διδάκτορες και τους μεταδιδάκτορες του εργαστηρίου για τη συνεργασία μας και το ευχάριστο κλίμα στο εργαστήριο
- Την οικογένειά μου, τους φίλους μου και τη Γκαβριέλα για τη στήριξη και τη συμπαράστασή τους



## Περιεχόμενα

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>Θεωρητικό μέρος</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1      | Περίληψη – Σκοπός  | 3         |
| 1.2      | Summary – Objective  | 5         |
| 1.3      | Εισαγωγικές πληροφορίες για το είδος <i>Paliurus spina-christi</i> Miller της οικογένειας Rhamnaceae | 7         |
| 1.3.1    | Δρογοβοτανική και γεωγραφική εξάπλωση  | 7         |
| 1.3.2    | Δρογοϊστορία και δρογοετυμολογία   | 13        |
| 1.3.3    | Οικολογική και οικονομική σημασία  | 14        |
| 1.3.4    | Δρογοφαρμακολογία  | 16        |
| 1.3.5    | Δρογοχημεία του γένους <i>Paliurus</i>   | 18        |
| 1.3.6    | Κυκλοπεπτίδια – Κυκλοπεπτιδικά αλκαλοειδή (Cyclopeptide Alkaloids, CPAs)                             | 22        |
| 1.3.6.1  | Ιστορική αναδρομή, κατηγοριοποίηση, δομικά χαρακτηριστικά και εξάπλωση στο φυτικό βασίλειο           | 22        |
| 1.3.6.2  | Φυτικοχημικές ιδιότητες, μεθοδολογίες ταυτοποίησης και συνθετική Παρασκευή                           | 29        |
| 1.3.6.3  | Βιοσύνθεση και βιολογική ιδιότητες   | 31        |
| <b>2</b> | <b>Πειραματικό μέρος</b>   | <b>33</b> |
| 2.1      | Υλικά και Μέθοδοι  | 35        |
| 2.1.1    | Διαλύτες   | 35        |
| 2.1.2    | Προσροφητικές ρητίνες τύπου XAD (Rohm & Haas)  | 35        |
| 2.1.3    | Χρωματογραφικά αντιδραστήρια   | 35        |
| 2.1.4    | Χρωματογραφικές μέθοδοι  | 35        |
| 2.1.4.1  | Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας  | 35        |
| 2.1.4.2  | Υγρή χρωματογραφία στήλης υπό κενό   | 36        |
| 2.1.4.3  | Υγρή-υγρή εκχύλιση   | 36        |
| 2.1.4.4  | Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)  | 36        |
| 2.1.5    | Φασματοσκοπικές μέθοδοι  | 36        |
| 2.1.5.1  | Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)   | 36        |
| 2.1.5.2  | Φασματομετρία μάζας  | 37        |
| 2.2      | Πορεία φυτοχημικής ανάλυσης  | 38        |
| 2.2.1    | Τόπος και χρόνος συλλογής  | 38        |
| 2.2.2    | Φυτοχημική μελέτη  | 38        |
| 2.2.3    | Κατεργασία του μεθανολικού εκχυλίσματος  | 40        |
| 2.2.3.1  | Κατεργασία του κλάσματος EtOAc (L.L.E.)  | 42        |
| 2.2.3.2  | Χρωματογραφικός έλεγχος και επεξεργασία των κλασμάτων από τη VLC1 του κλάσματος EtOAc (L.L.E.)       | 44        |

|              |  |            |
|--------------|--|------------|
| 2.2.3.2.1    | Επεξεργασία του κλάσματος VLC1_4-7 .....                             | 44         |
| 2.2.3.2.2    | Επεξεργασία του κλάσματος VLC-1_8-17 .....                           | 45         |
| 2.2.3.2.3    | Επεξεργασία του κλάσματος VLC-1_45-100 .....                         | 45         |
| 2.2.3.2.4    | Επεξεργασία του κλάσματος VLC-1_EtOAc 100% .....                     | 45         |
| 2.2.3.2.4.1  | Επεξεργασία του δείγματος της ζώνης C .....                          | 46         |
| 2.2.3.2.4.2  | Επεξεργασία του δείγματος της ζώνης D .....                          | 47         |
| 2.2.3.2.5    | Επεξεργασία του κλάσματος VLC-1_EtOAc/MeOH .....                     | 47         |
| 2.2.3.2.5.1  | Επεξεργασία του δείγματος της ζώνης δ .....                          | 48         |
| 2.2.3.3      | Φασματοσκοπική μελέτη απομονωμένων ουσιών .....                      | 50         |
| 2.2.3.3.1    | Μεταβολίτης 1 .....  | 50         |
| 2.2.3.3.2    | Μεταβολίτης 2 .....  | 55         |
| 2.2.3.3.3    | Μεταβολίτης 3 .....  | 60         |
| 2.2.3.3.4    | Μεταβολίτης 4 .....  | 65         |
| 2.2.3.3.5    | Μεταβολίτης 5 .....  | 73         |
| 2.2.3.3.6    | Μεταβολίτης 6 .....  | 80         |
| 2.2.3.3.7    | Μεταβολίτης 7 .....  | 88         |
| 2.2.3.3.8    | Μεταβολίτης 8 .....  | 92         |
| 2.2.3.3.9    | Μεταβολίτης 9 .....  | 99         |
| 2.2.3.3.10   | Μεταβολίτης 10 .....   | 100        |
| 2.2.3.3.11   | Μεταβολίτης 11 .....   | 102        |
| <b>2.2.4</b> | <b>Κατεργασία του υδατικού εκχυλίσματος .....</b>                    | <b>107</b> |
| 2.2.4.1      | Κατεργασία με μακρόπορες ρητίνες ιοντοανταλλαγής XAD .....           | 107        |
| 2.2.4.2      | Κλασμάτωση με RP-SPE .....   | 109        |
| 2.2.4.3      | Έλεγχος των δειγμάτων με χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC)<br>112   |            |
| 2.2.4.3.1    | Επεξεργασία του δείγματος H <sub>2</sub> O-L.L.E. XAD-4-MeOH-5 ..... | 114        |
| 2.2.4.3.2    | Επεξεργασία του δείγματος H <sub>2</sub> O-L.L.E. XAD-4-MeOH-20 ...  | 116        |
| 2.2.4.3.3    | Επεξεργασία του δείγματος H <sub>2</sub> O-L.L.E. XAD-7-MeOH-20 ...  | 120        |
| <b>3</b>     | <b>Συμπεράσματα - Προοπτικές .....</b>                               | <b>122</b> |
| <b>4</b>     | <b>Βιβλιογραφία .....</b>  | <b>126</b> |

# 1 Θεωρητικό μέρος







## 1.1 Περίληψη - Σκοπός

Μεταξύ των κύριων στόχων του Εργαστηρίου Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων είναι η μελέτη χερσαίων φυτικών οργανισμών ως προς τους περιεχόμενους μεταβολίτες και η ανακάλυψη νέων φυσικών προϊόντων με αξιόλογες βιολογικές ιδιότητες. Σκοπός είναι η παραγωγή νέων γνώσεων στο πεδίο των φυσικών προϊόντων, αλλά και η διερεύνηση της δυνατότητας εφαρμογής τους στους τομείς της φαρμακευτικής, της κοσμητολογίας και της αγροδιατροφής.

Στα πλαίσια αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας μελετήθηκε το μεταβολικό φορτίο των καρπών του είδους *Paliurus spina-christi* (οικ. Rhamnaceae), για το οποίο υπάρχουν ελάχιστες αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία, τόσο για το φυτοχημικό του περιεχόμενο όσο και για τις βιολογικές του ιδιότητες. Το *P. spina-christi*, ή αγκάθι του Χριστού όπως αποκαλείται, είναι ένας θάμνος που χρησιμοποιείται εδώ και αιώνες όχι μόνο λόγω της μεγάλης οικονομικής του σημασίας, αλλά και εξαιτίας της χρήσης του στην παραδοσιακή ιατρική. Προγενέστερες φυτοχημικές μελέτες, οι οποίες έχουν πραγματοποιηθεί σε άλλα είδη του ίδιου γένους, έχουν καταλήξει στην απομόνωση και το χαρακτηρισμό πληθώρας ενδιαφερόντων δευτερογενών μεταβολιτών. Σκοπός της παρούσης εργασίας λοιπόν ήταν η φυτοχημική μελέτη των καρπών του προαναφερόμενου είδους για την απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών οι οποίοι να δικαιολογούν τις αναφερόμενες στη βιβλιογραφία βιολογικές ιδιότητες και τις παραδοσιακές θεραπευτικές χρήσεις του.

Πιο συγκεκριμένα, ώριμοι καρποί του φυτού συλλέχθηκαν, κονιοποιήθηκαν και εκχυλίστηκαν εξαντλητικά με μία σειρά διαλυτών αυξανόμενης πολικότητας. Μετά την αξιολόγηση με TLC και <sup>1</sup>H-NMR των παραγόμενων εκχυλισμάτων ως προς το φυτοχημικό τους προφίλ, επιλέχθηκαν το μεθανολικό και το υδατικό εκχύλισμα για περαιτέρω μελέτη. Από το μεθανολικό εκχύλισμα, το οποίο κλασματώθηκε με τη χρήση της τεχνικής της υγρής - υγρής εκχύλισης, προέκυψε το κλάσμα του οξικού αιθυλεστέρα (EtOAc) που επιλέχθηκε για περαιτέρω χρωματογραφική επεξεργασία. Από αυτό απομονώθηκαν έντεκα δευτερογενείς μεταβολίτες, οι οποίοι ανήκουν στις χημικές κατηγορίες των φαινολών, των στερολών, των τριτερπενίων και των κυκλοπεπτιδικών αλκαλοειδών. Μάλιστα, ο ένας εκ των τριών μεταβολιτών που ανήκουν στην τελευταία κατηγορία αποτελεί νέο φυσικό προϊόν. Στη συνέχεια μελετήθηκε το υδατικό εκχύλισμα και εντοπίστηκε η παρουσία φυσικών προϊόντων που ανήκουν στην κατηγορία των φλαβονοειδών. Ένα άλλο υδατικό εκχύλισμα του φυτού, το οποίο παρασκευάστηκε με βάση συνταγή παραδοσιακής θεραπευτικής, υπέστη επεξεργασία με ρητίνες τύπου XAD-4 και XAD-7 και στη συνέχεια μια σειρά από χρωματογραφικούς καθαρισμούς με την τεχνική της εκχύλισης στερεάς φάσεως (Solid Phase Extraction). Τα παραγόμενα κλάσματα μελετήθηκαν (HPLC, <sup>1</sup>H-NMR) και επιβεβαιώθηκε η παρουσία φλαβονοειδών. Μεταξύ των

μελλοντικών στόχων περιλαμβάνεται η επιβεβαίωση της παραδοσιακής χρήσης της δρόγης (η *in vivo* αξιολόγηση είναι υπό εξέλιξη) και η συσχέτισή της με συγκεκριμένες ομάδες των προαναφερόμενων μεταβολιτών.

Λέξεις κλειδιά: *Paliurus spina-christi*, *Rhamnaceae*, Χημεία Φυσικών Προϊόντων, φυτοστερόλες, τριτερπένια, κυκλοπεπτιδικά αλκαλοειδή.

## 1.2 Summary - Objective

One of the main objectives of the Pharmacognosy and Natural Products Laboratory is the study of terrestrial plant organisms in terms of its chemical constituents and the discovery of new natural products with notable biological properties. The aim is to create new knowledge in the field of natural products and to investigate their possible potential as pharmaceuticals, cosmeceuticals and agroceuticals.

In this thesis, the secondary metabolite content of the fruits of *Paliurus spina-christi* (Rhamnaceae) was studied. There are not many references about this plant in the bibliography, not only regarding its phytochemical content, but also about any possible biological activity. *Paliurus spina-christi*, commonly known as Christ's thorn, is a bush that has been used for centuries not only due to its economic importance, but also because of its use in the traditional medicine. Previous phytochemical studies that have been done on other species of the same genus, have resulted in the isolation and characterization of many interesting secondary metabolites. Thus, the aim of this thesis was the phytochemical study of the fruits of the aforementioned plant for the isolation of secondary metabolites which would justify the bibliographical biological properties and the use of the plant in the traditional medicine.

More specifically, mature fruits of the plant were collected, powdered and subjected to exhaustive extractions with a series of solvents of increasing polarity. On the basis of the evaluation of the TLC and <sup>1</sup>H-NMR profile of the produced extracts, the methanolic and aqueous extracts were selected for further study. The processing of the methanolic extract, which was fractionated by a series of liquid - liquid extractions, resulted in the fraction of Ethyl Acetate (EtOAc) which was selected for further chromatographic separations. Eleven secondary metabolites were isolated from this fraction, which belong to the chemical classes of phenolics, sterols, triterpenes and cyclopeptide alkaloids. One of the three metabolites (metabolite 8) of the last class constitutes a new natural product. Subsequently, the aqueous extract was studied and the presence of natural products that belong to the class of flavonoids was identified. Another aqueous extract of the plant, which was prepared based on a traditional medicine recipe was passed through XAD-4 and XAD-7 resins and, after that, to a series of chromatographic purifications by using Solid Phase Extraction techniques. The produced fractions were studied by HPLC and <sup>1</sup>H-NMR and the presence of flavonoids was confirmed. Among the future objectives of this work is the further evaluation of the use of this plant in the traditional medicine (further *in vivo* evaluation is currently in process) and its possible correlation with the isolated and elucidated metabolites.

**Keywords:** *Paliurus spina-christi*, *Rhamnaceae*, *Chemistry of Natural*

*Products, phytosterols, triterpenes, cyclopeptide alkaloids.*

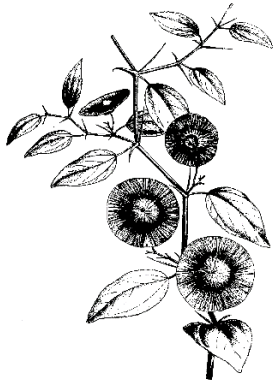
## 1.3 Εισαγωγικές πληροφορίες για το είδος *Paliurus spina-christi* Miller της οικογένειας Rhamnaceae

### 1.3.1 Δρογοβοτανική και γεωγραφική εξάπλωση

Το γένος *Paliurus* ανήκει στην οικογένεια Rhamnaceae (Polunin & Huxley, 1967; Tutin *et al.*, 1968), η οποία περιλαμβάνει ένα μεγάλο αριθμό ανθοφόρων φυτών, με αντιπροσώπους σε όλες σχεδόν τις ηπείρους, αν και τα μέλη της απαντώνται συνήθως σε τροπικές και υποτροπικές περιοχές (Polunin & Huxley, 1967; Tutin *et al.*, 1968). Είναι γνωστή και ως η «ακανθώδης οικογένεια», ενώ το πιο παλιό απολίθωμα φυτού αυτής της οικογένειας προέρχεται από την Κατώτερη Κρητιδική περίοδο (περίπου πριν από 94 εκατομμύρια χρόνια) (Jud *et al.*, 2017). Περιλαμβάνει περίπου 55 γένη, τα οποία κατανέμονται σε 11 φυλές, καθώς και συνολικά 950 είδη. Πρόκειται για κυρίως μικρά ακανθώδη δέντρα και θάμνους, με απλά συνήθως φύλλα χωρίς λοβούς και μικρά φυλλοβόλα παράφυλλα. Τα άνθη είναι μικρά, πρασινωπά σε μασχαλιαίες συστάδες, σε σχήμα κυπέλου. Τα πέταλα είναι συνήθως πέντε και κάποιες φορές απουσιάζουν, με τους στήμονες να βρίσκονται αντίθετα από τα αυτά και να εξέρχονται από την ανθοδόχη. Η ωοθήκη, η οποία βρίσκεται στη βάση της ανθοδόχης, αποτελείται από 2-4 κύτταρα, περιλαμβάνει έναν έως δύο στύλους. και είναι επιφυής. Οι καρποί είναι συνήθως σαρκώδεις και έχουν τη μορφή κάψουλας.

Τα είδη του γένους *Paliurus* είναι θάμνοι με παράφυλλα, τα οποία έχουν μετατραπεί σε άκανθες και συχνά αποσπώνται και πέφτουν γρήγορα. Τα άνθη είναι πενταμελή, ερμαφρόδιτα με δύο έως τρεις στύλους. Οι καρποί είναι ξηροί, ημισφαιρικοί, με μία ευρεία μεβράνη γύρω από την κορυφή τους (Tutin *et al.*, 1968).

Το γένος *Paliurus* περιλαμβάνει το είδος *P. ramosissimus* (Lour.) Poir. που φύεται στην ανατολική Ασία, τα είδη *P. hemsleyanus* Rehder ex Schirarend & Olabi και *P. orientalis* (Franch.) Hemsl τα οποία είναι ενδημικά στην Κίνα και το είδος *P. spina-christi* Miller, το οποίο εξαπλώνεται και στην Ευρώπη. Στη βόρεια Ελλάδα υπάρχει ένα είδος που ονομάζεται *P. microcarpus* Wilmott, του οποίου οι καρποί είναι μικρότεροι από αυτούς του *P. spina-christi* Miller (9-10mm σε διάμετρο), διαθέτει στενότερα πτερύγια και σύμφωνα με τους Tutin *et al.*, είναι μία διαφορετική ποικιλία του *P. spina-christi* Miller. Εντούτοις, θεωρείται από πολλούς συνώνυμο είδος.



Εικόνα 1: *Paliurus spina-christi*

Το *Paliurus spina-christi* Mill. (Εικόνα 1-3) ταυτοποιήθηκε το 1768. Είναι ένας θάμνος αυτοφυής, φυλλοβόλος, πολύκλαδος, πυκνόκλαδος, ακανθώδης, με πλατιά κόμη και ύψος μέχρι 5 μέτρα. Ο φλοιός του είναι σταχτόχρωμος. Ο βλαστός ακολουθεί τη μονοποδιακή διακλάδωση. Οι άκανθες είναι επαναλαμβανόμενες, ευθυτενείς και βρίσκονται σε όλο το μήκος του κορμού και των κλαδιών εξαιτίας του γεγονότος ότι είναι προϊόν μεταμόρφωσης των παράφυλλων. Τα φύλλα του είναι ωσειδή, βραχύμισχα, μήκους 2-4 εκ. και πλάτους 1.5-3 εκ. και είναι δίσειρα. Οι παρυφές τους είναι λειόχειλες ή πριονωτές. Η πάνω

επιφάνεια είναι σκούρα πράσινη, ενώ η κάτω έχει πιο απαλό χρώμα και είναι τριχωτή κοντά στα νεύρα. Τα άνθη του είναι κιτρινοπράσινα, σε βότρυες. Η άνθηση γίνεται από το Μάιο έως τον Ιούνιο. Η μορφολογία της γύρης ακολουθεί το γενικό κανόνα της οικογένειας Rhamnaceae. Είναι ακτινωτά συμμετρική, έχει διευρυμένο και κυκλικό διάφραγμα τριών ζωνών στις γωνίες του περιγράμματός της και οι πόλοι της είναι ομοιόμορφοι (Εικόνα 4) (Schirarend, 1996). Ο καρπός, ο οποίος χαρακτηρίζεται ως 'rome', καθώς αποτελείται από ένα σαρκώδες διευρυμένο δοχείο και έναν σκληρό κεντρικό πυρήνα που περιέχει τα σπέρματα. Είναι ξηρός, κίτρινος, διαμέτρου 1.8-3cm, τρίχωρος, με εξωκάρπιο δερματώδες (Εικόνα 5), περιβάλλεται από κυματοειδές πτερύγιο και μοιάζει με «μινιατούρα ομπρέλας» (Huxley & Taylor, 1977). Μετά την ωρίμασή του το χρώμα του γίνεται καφετί, ενώ η περίοδος της καρποφορίας είναι από τον Οκτώβριο έως το Δεκέμβριο. Μέσα σε κάθε κοιλότητα του καρπού βρίσκεται ένα καστανόχρωμο ωσειδές σπέρμα, ελαφρώς κυρτό, 3 έως 5 mm σε διάμετρο και 1-1.5 mm σε πάχος, πλούσιο σε λιπίδια (Εικόνα 6).



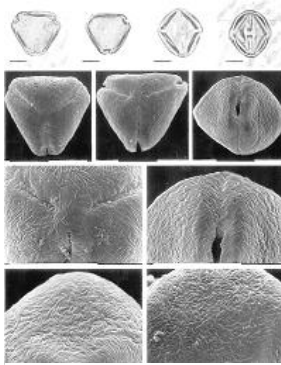
Εικόνα 2: *P. spina-christi*



Εικόνα 3: *P. spina-christi*

(Miller, 1768; Διαπούλης, 1948; Polunin & Huxley, 1967; Tutin *et al.*, 1968; Polunin, 1969; Huxley & Taylor, 1977; Dalakishvili *et al.*, 1984; Αθανασιάδης, 1986; Humphries *et al.*, 1989; Pignatti, 1997; Richardson *et al.*, 2000; Αραμπατζής, 2001, Παπαπορφυρίου, 2014).

Το *P. spina-christi* Mill. ευδοκίμει κυρίως στις βραχώδεις και ξηρές περιοχές της Μεσογείου (πλην νησιών), στη Βαλκανική χερσόνησο, τις ακτές της Μαύρης Θάλασσας και ιδιαίτερα στην περιοχή της Παλαιστίνης (Εικόνα 7 και 8) (Miller, 1768; Tutin *et al.*, 1968; Casavecchia *et al.*, 2015; Global Biodiversity Information Facility Web site,



Εικόνα 4: Φωτογραφία με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο της γύρης του *P. spina-christi*

2016). Αναπτύσσεται κυρίως σε αργιλώδη και ασβεστολιθικά εδάφη, όξινα, ουδέτερα έως και πολύ αλκαλικά, από τις παράκτιες περιοχές έως τις ορεινές χαμηλού υψομέτρου (μέχρι 500 m), ενώ για την ανάπτυξή του δεν απαιτούνται πολλά θρεπτικά συστατικά (Casavecchia *et al.*, 2015). Έχει βρεθεί επίσης στη Βόρεια Αμερική, όπου εισήχθη από την Ευρώπη πριν από εκατό χρόνια περίπου για την κατασκευή φρακτών, ενώ πλέον θεωρείται παράσιτο καθώς λειτουργεί ως κωροκατακτητικό είδος και καταβάλλονται προσπάθειες να μειωθεί η εξάπλωσή του (O'Kennon, 1991). Στην

Ελλάδα, εξαπλώνεται στη θερμότερη περιοχή της παραμεσόγειας ζώνης βλάστησης (Αθανασιάδης, 1986). Στο νομό Χαλκιδικής υπάρχει ένα χωριό με το όνομα Παλιούρι, λόγω των παλιουριών που χρησιμοποιούσαν οι κάτοικοι παιότερα για την περιφραγή των σπιτιών (Παλαιώριον ή Παλιούρι Χαλκιδικής, 2012). Το όνομα Παλιουριά φέρουν και άλλα χωριά σε διάφορους νομούς της Ελλάδας, όπως στη Λάρισα και τα Γραβενά, λόγω των παλιουριών που υπάρχουν σε αυτές τις περιοχές.



Εικόνα 5: Καρποί *P. spina-christi*



Εικόνα 6: Σπέρμα *P. spina-christi*, πλευρική και εγκάρσια τομή του αντίστοιχα



Εικόνα 7: Γεωγραφική κατανομή του *P. spina-christi* στην περιοχή της Μεσογείου (Casavecchia *et al.*, 2015)



Εικόνα 8: Παγκόσμια γεωγραφική κατανομή του *Paliurus spina-christi* (Global Biodiversity Information Facility Web site, OpenStreetMap®)



Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται η βοτανική ταξινόμηση του είδους *P. spina-christi*.

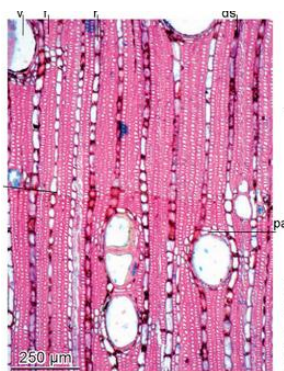
Πίνακας 1: Βοτανική ταξινόμηση του φυτού *p. spina-christi*

| Βοτανική ταξινόμηση του φυτού <i>Paliurus spina-christi</i> |   |                                   |
|---|---|-----------------------------------|
| Βασίλειο  | → | Plantae                           |
| Υπεράθροισμα  | → | Spermatophyta                     |
| Άθροισμα  | → | Angiospermae                      |
| Κλάση   | → | Dicotyledoneae                    |
| Υποκλάση  | → | Rosidae                           |
| Τάξη  | → | Rosales                           |
| Οικογένεια  | → | Rhamnaceae                        |
| Φυλή  | → | Paliureae                         |
| Γένος   | → | <i>Paliurus</i>                   |
| Είδος   | → | <i>P. spina-christi</i><br>Miller |

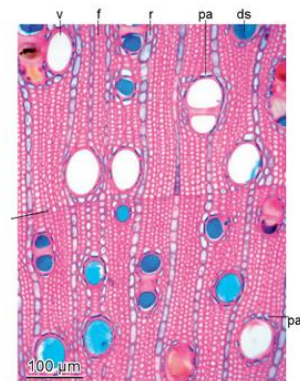
Υπάρχουν διαφωνίες μεταξύ κάποιων βοτανολόγων για τη βοτανική κατάταξη του *P. spina-christi* Mill., καθώς κάποιοι θεωρούν πως είναι συνώνυμο είδος με το φυτό *Zizyphus spina-christi* L.. Τα δύο αυτά είδη έχουν κάποιες ομοιότητες, εντούτοις, είναι διαφορετικά, όπως φαίνεται από τη μακροσκοπική (Εικόνα 9) και μικροσκοπική μελέτη των δύο ειδών (Εικόνα 10) (Fayvush, 2008; Schweingruber *et al.*, 2011).



Εικόνα 9: Μακροσκοπική μελέτη των ειδών *Paliurus spina-christi* και *Zizyphus spina-christi* (Fayvush, 2008)



Left Fig. 5. Diffuse-porous xylem with a few thick-walled vessels (<math>< 50 \mu\text{m}</math>), thick-walled fibers and paratracheal parenchyma. Stem of a 2 m-high shrub, riparian, arid zone, Nizwa, Oman. *Zizyphus spina-christi*, transverse section.



Right Fig. 8. Semi-ring-porous xylem. The thick-walled vessels are arranged solitary and are surrounded by paratracheal parenchyma and filled with a blue-stained substance. Stem of a 1.5 m-high shrub, dry meadow, hill zone, Tbilisi, Georgia. *Paliurus spina-christi*, transverse section.

Εικόνα 10: Μικροσκοπική μελέτη των ειδών *Paliurus spina-christi* και *Zizyphus spina-christi* (Schweingruber *et al.*, 2011).

### 1.3.2 Δρογοϊστορία και δρογοετυμολογία

Το είδος *P. spina-christi* και αναφέρεται για πρώτη φορά στο βιβλίο του Phillip Miller με τίτλο «The gardener's dictionary, ed. 8» το 1768 (Εικόνα 11). Το γένος *Paliurus* είχε αναγνωριστεί αρχικά από το Λινναίο αλλά ταξινομήθηκε αρχικά μαζί με τα γένη *Zizyphus* και *Alaternus* ως *Rhamnus* (Miller, 1768; Mills, 2010). Έχει αναφερθεί από το Νικόλαο Μυρεψό στο έργο του «Δυναμερόν» (13<sup>ος</sup> αιώνας) και συγκεκριμένα στο κεφάλαιο «Περί αντιδότην» όπου αναφέρεται ως *κροκολύκην* ή *παλιούρος* (Valiakos *et al.*, 2015). Ο Lucius Junius Moderatus Columella (4 - 70 μ.Χ.), ο πιο σημαντικός συγγραφέας για τη γεωργία στη Ρωμαϊκή αυτοκρατορία, το αναφέρει ως ένα πολύ καλό φυτό για τη δημιουργία φρακτών. Επίσης, σύμφωνα με το Διοσκουρίδη (40-90 μ.Χ.), όταν τοποθετούνται τα κλαδιά του παλιούρου σε πόρτες ή παράθυρα, εξουδετερώνουν τα ξόρκια των μαγισσών, εκδιώχνονται οι δαίμονες και αντιμετωπίζονται οι επιθέσεις τους (Venot, 1971; Huxley & Taylor, 1977). Έχει αναφερθεί επίσης από το Θεόφραστο, ο οποίος εκθέτει αρκετά είδη *Paliurus*, αλλά και τον Πλίνιο, για τον οποίο τα είδη *P. spina-christi* και *Zizyphus jujube* είναι συνώνυμα (Venot, 1971). Επιπλέον, έχει αναφερθεί στο γνωστό δημοτικό τραγούδι «Γιούργια στα παλιούρια», με τη



Εικόνα 12: *P. spina-christi*. Γκραβούρα από το βιβλίο *L'Histoire des plantes* του J. Dalechamp. Λυόν, 1615

σημασία της φράσης να αλλάζει ανάλογα με τους στίχους του τραγουδιού.

Το είδος *P. spina-christi* (Εικόνα 12) ονομάζεται και αγκάθι του Χριστού (Christ's thorn) ή της Ιερουσαλήμ και θεωρείται ότι ήταν ένα από τα φυτά που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή της στεφάνης που έβαλαν στο κεφάλι του Χριστού οι Ρωμαίοι κατά την πορεία του προς το Γολγοθά. Το άλλο ήταν το *Zizyphus spina-christi* και για το λόγο αυτό έλαβαν και τα δύο το προαναφερόμενο κοινό όνομα. Άλλα κοινά ονόματα είναι παλέουρο, παλιούρι, πάλιουρας, ή τσαλί. Η ονομασία τσαλί θεωρείται ότι είναι τούρκικης προέλευσης και σημαίνει βάτος, ενώ οι υπόλοιπες ονομασίες είναι

PALIURUS. Tourn. Inf. R. H. 616. tab. 387. Rhamnus. Lin. Gen. Plant. 235. Christ's Thorn.

The CHARACTERS are,  
The flower has no empalement. It hath five petals which are ranged circularly, and end in acute points. It hath five stamina, which are inserted in the scales under the petals, terminated by small summits, and a roundish trifid germen, supporting three short styles, crowned by obtuse stigmas. The germen afterward becomes a buckler-shaped nut divided into three cells, each containing one seed.

This genus of plants is by Dr. Linnæus joined to the Rhamnus, which is ranged in the first section of his fifth class, in which are placed those plants whose flowers have five stamina and one style; but as the flowers of this have three styles, so it should be ranged in his third section.

We know but one SPECIES of this genus, viz. PALIURUS (*Spina Christi*) Dod. Pempt. 848. *Christ's Thorn*. Rhamnus aculeis geminatis, inferiore reflexo, floribus trigynis. Hort. Cliff. 69. Prickly Buckthorn with double thorns, the under ones of which are reflexed, and flowers containing three germina.

This plant grows naturally in the hedges in Palestine; it rises with a pliant shrubby stalk to the height of eight or ten feet, sending out many weak slender branches, garnished with oval leaves placed alternately, standing upon foot-stalks near one inch long; these have three longitudinal veins, and are of a pale green. The flowers come out at the wings of the stalk in clusters, almost the length of the young branches; they are of a greenish yellow colour, and appear in June, and are succeeded by broad, roundish, buckler-shaped seed-vessels, which have borders like the brims of a hat, the foot-stalks being fattened to the middle; these have three cells, each containing one seed.

This is by many persons supposed to be the plant, from which the crown of thorns which was put upon the head of our Saviour, was composed; the truth of which is supported by many travellers of credit, who affirm that this is one of the most common shrubs in the country of Judæa; and from the pliability of its branches, which may easily be wrought into any figure, it may afford a probability.

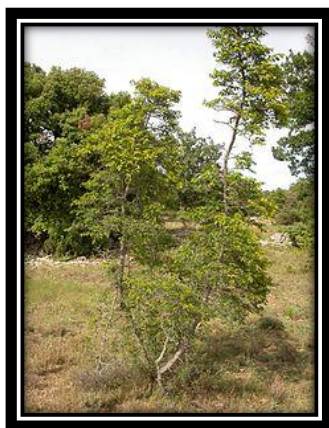
This shrub grows wild in most parts of the Levant, as also in Italy, Spain, Portugal, and the south of France, especially near Montpellier, from whence their seeds may be procured, for they do not ripen in England. These seeds should be sown as soon as possible after they arrive, on a bed of light earth, and the plants will come up the following spring; but when the seeds are kept out of the ground till spring, they will not come up till the next year, and very often fail; therefore it is much the best way to sow them in the autumn. These seedling plants may be transplanted the following season into a nursery to get strength, before they are planted out for good.

Εικόνα 11: Το λήμμα του Miller για το *P. spina-christi*, στο βιβλίο του «The gardener's dictionary», σελ. 809, το 1768

άγνωστης ετυμολογίας, αν και υπάρχει μία θεωρία γύρω από την προέλευσή τους. Σύμφωνα με το μύθο, ένας κακόβουλος και τσιγκούνης έμπορος ενδυμάτων με το όνομα Πάλιουρας δεν έδειχνε αλληλεγγύη προς τους φτωχούς που του ζητούσαν ελεημοσύνη, ενώ παράλληλα εξαπατούσε όποιον είχε την ατυχία να μπει στο κατάστημά του. Τις δεκάρες που κέρδιζε κλέβοντας τους πελάτες του, τις περνούσε σε κλωστές και τις είχε πάντα κρεμασμένες πάνω του. Η τιμωρία του θεού για όλα τα δεινά που προκαλούσε στους συνανθρώπους του ήταν να μεταμορφωθεί σε φυτό μετά το θάνατό του. Το φυτό αυτό ήταν το παλιούρι, που με τα αγκάθια του πιάνει α ρούχα των περαστικών προσπαθώντας να τα κάνει δικά του. Οι περασμένες δεκάρες στις κλωστές φαίνονται καθαρά όταν πέσουν τα φύλλα του φυτού τον Οκτώβρη. Είναι οι χαρακτηριστικοί καφέ ξυλώδεις καρποί του παλιουριού (Μυγδανάλευρος, 2014).

Τα πιο γνωστά επιστημονικά συνώνυμα ονόματα είναι τα *P. aculeatus* Lam., *P. australis* Gaertn. και *Rhamnus paliurus* L. Άλλα συνώνυμα ονόματα είναι τα *P. clypeiformis* Medik., *P. incurvus* Wall. ex Lindl., *P. paliurus* (L.) Karst., *P. petasus* Dum.-Cours., *P. solitarius* Stokes, *P. trinervatus* Moench, *P. virgatus* D. Don, *P. vulgaris* Steud., *Rhamnus horrida* Salisb., *Zizyphus paliurus* (L.) Wild., *Z. paniculata* Buch.-Ham., *Z. spina-christi* (Mill.) Georgi, *Z. virgata* (D. Don) D. Dietr. (Hooker & Jackson, 1893; Global Biodiversity Information Facility Web site, 2016).

### 1.3.3 Οικολογική και οικονομική σημασία



Εικόνα 13: *P. spina-christi*

Το *P. spina-christi* (Εικόνα 13) είναι ένα φυτό με τεράστια οικολογική σημασία. Πολλές προνύμφες λεπιδόπτρων, όπως του γένους *Bucculatrix* και ειδικότερα οι προνύμφες των *B. albella*, *B. paliuricola* και *B. turatii*, τρέφονται αποκλειστικά από αυτό το είδος (Paliurus, 2017). Επίσης, οι θαμνώνες του *P. spina-christi* αποτελούν σημαντική πηγή βόσκησης για αίγες και βοοειδή, καθώς η περιεκτικότητά του σε ολικές πρωτεΐνες είναι ιδιαίτερα υψηλή για ξυλώδες είδος που δεν ανήκει στην οικογένεια των ψυχανθών (Parlak *et al.*, 2011; Kökten *et al.*, 2012), ενώ έδειξε ότι περιέχει το μικρότερο ποσοστό αδιάλυτων ινωδών ουσιών σε ουδέτερο (NDF) και όξινο (ADF) απορρυπαντικό διάλυμα μεταξύ των φυτικών ειδών που μελετήθηκαν από τους Temel & Tan (Temel & Tan, 2011). Επιπροσθέτως, διαθέτει πληθώρα ιχνοστοιχείων, όπως σίδηρο, μαγγάνιο, χαλκό κ. ά., τα οποία είναι απαραίτητα για τα ζώα βοοειδών (Gökkuş *et al.*, 2013). Το φυτό διαθέτει βαθύ, πασσαλώδες ριζικό σύστημα που αποτελεί μηχανισμό ανοχής και κατά συνέπεια αντοχής στη βόσκηση και του επιτρέπει να επανακάμπτει γρήγορα. Επίσης, προστατεύεται από την

υπερβόσκηση λόγω των ακάνθων που φέρει (Παπαναστάσης & Νοϊτσάκης, 1992; Παπαναστάσης & Ισπικούδης, 2012, Παπαπορφυρίου, 2014). Το ριζικό του σύστημα είναι αυτό που το βοηθά να είναι ανθεκτικό στις πυρκαγιές, αν και εύφλεκτο, καθώς ριζοβλαστάνει και πρεμνοβλαστάνει έντονα σε χρονικό διάστημα λίγων εβδομάδων μετά από μία πυρκαγιά (Χασιλίδης *et al.*, 2008). Επιπλέον, το παλιούρι, όπως άλλα ξυλώδη είδη, βοηθά στη μείωση του κινδύνου διάβρωσης του εδάφους, βελτιώνει τον οικότοπο της άγριας ζωής, αναβαθμίζει την αισθητική του τοπίου και εμπλουτίζει το άνω στρώμα του εδάφους με θρεπτικά συστατικά (Le Houerou, 1987; Παπαπορφυρίου, 2014). Όσον αφορά την οικονομική του σημασία, χρησιμοποιείται για τη δημιουργία αποτελεσματικών φυτοφρακτών, καθώς με τα αγκάθια και τα πυκνά κλαδιά του καθίσταται ένα από τα καταλληλότερα είδη για φυσική περίφραξη εκτάσεων. Επιπλέον, καλλιεργείται σε κάποιες χώρες ως διακοσμητικό φυτό και για την κατασκευή μπαστουνιών από τα κλαδιά του. Επίσης, θεωρείται σπουδαίο μελισσοκομικό φυτό με ισχυρή έκκριση νέκταρος και έντονη παραγωγή γύρης (Χασιλίδης *et al.*, 2011). Είναι πολύ ελκυστικό για τις μέλισσες (*Apis mellifera*) λόγω του αριθμού και του



Εικόνα 14: Άνθη *P. spina-christi*



Εικόνα 15: Το *P. spina-christi* είναι ένα πολύ σημαντικό μελισσοκομικό φυτό

μικρού μεγέθους των ανθέων του σε συνδυασμό με τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά (Εικόνα 14 και 15). Σε κάποιες περιπτώσεις έχει παρατηρηθεί ότι πριν την άνθησή του μαζεύει αφίδες οι οποίες καλύπτουν τα φύλλα του και δημιουργούν μελίτωμα το οποίο είναι εκμεταλλεύσιμο από τις μέλισσες (Σαραντινός, 2015). Μελέτες που έγιναν σε διαφορετικά πολυανθικά είδη μελιού κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η γύρη του παλιουριού βρίσκεται σε μεγάλο ποσοστό μέσα στο μέλι (Primorac *et al.*, 2008; Di Marco *et al.*, 2012). Το αυτούσιο μέλι του παλιουριού είναι κίτρινου χρώματος και καλού ιξώδους. Η έκκριση νέκταρος επηρεάζεται έντονα από τις καιρικές συνθήκες και ιδιαίτερα από τη βροχή και τον άνεμο και για το λόγο αυτό είναι δύσκολο να πάρουμε αυτούσιο μέλι παλιουριού (Ricciardelli & Intora, 2000; Lazarova, *et al.*, 2010). Μελέτες που έχουν γίνει για τα συστατικά του αυτούσιου μελιού από παλιούρι έχουν δείξει την παρουσία φαινολικών συστατικών, κατώτερα αλειφατικά οξέα και ανώτερους κορεσμένους υδρογονάνθρακες (Jerkovic *et al.*, 2009; Mattonai *et al.*, 2015).

### 1.3.4 Δρογοφαρμακολογία

Σύμφωνα με τους Brantner *et al.*, τα αιθανολικά εκχυλίσματα των φύλλων, των άνθων, των καρπών, του φλοιού και ειδικά των ριζών έχουν δείξει σημαντική αντιμικροβιακή δράση έναντι Gram θετικών βακτηρίων όπως τα *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* και *Micrococcus luteus*, ενώ έδειξαν δράση και κατά του Gram αρνητικού βακτηρίου *Shigella sonnei* (Brantner *et al.*, 1996).

Το μεθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του φυτού έχει δείξει σημαντική αντιοξειδωτική δράση έναντι της υπεροξειδωσης του λινολεϊκού οξέος (Souri *et al.*, 2004), καθώς και έναντι των ελευθέρων ριζών ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) και DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). Αυτό εξηγείται λόγω του μεγάλου ολικού φαινολικού φορτίου που εμφάνισε το συγκεκριμένο εκχύλισμα (Kirca & Arslan, 2008). Τη σημαντική αντιοξειδωτική δράση του μεθανολικού εκχυλίσματος των ανθέων έναντι του DPPH ανέδειξε και η μελέτη των Jukic *et al.* Το ίδιο εκχύλισμα είχε επίσης μερική ανασταλτική δράση έναντι της ακετυλοχολινεστεράσης (AChE). Επίσης, μέτρια δράση έναντι του DPPH έδειξαν και τα εκχυλίσματα χλωροφορμίου και οξικού αιθυλεστέρα των ανθέων (Jukic *et al.*, 2012).

Το υδατομεθανολικό εκχύλισμα του φυτού δεν έδειξε αντιλεισμμανιακή δράση σύμφωνα με τους El-On *et al.* (El-On *et al.*, 2009), ενώ το υδατικό εκχύλισμα των καρπών, το οποίο παρασκευάστηκε με βρασμό των καρπών σε απεσταγμένο νερό έδειξε σημαντική αντιυπερχοληστερολαιμική δράση. Σύμφωνα με τους Mosaddegh *et al.*, η χορήγηση του εκχυλίσματος αυτού σε πειραματόζωα σε ποσότητα 100mg/kg/μέρα μείωσε τα επίπεδα της ολικής χοληστερόλης κατά 45,5%, σε ποσότητα 50mg/kg/μέρα μείωσε τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων κατά 48,73%, ενώ καμία διαφορά δε σημειώθηκε στην υψηλής πυκνότητας χοληστερόλη (HDL) (Mosaddegh *et al.*, 2004).

Το *P. spina-christi* έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στην παραδοσιακή ιατρική.

Σύμφωνα με το Διοσκουρίδη στο πεντάτομο έργο του «Περί ὕλης ἰατρικῆς», αλλά και με τον Πλίνιο, τα φύλλα και οι ρίζες του φυτού είναι στυπτικά, ενώ το αφέψημα αυτών ρυθμίζει την καλή λειτουργία του εντέρου, είναι διουρητικό και θρυμματίζει τις πέτρες των νεφρών, αντιμετωπίζει τα δήγματα από δηλητηριώδη πλάσματα και βοηθά κατά του ερυσιπέλατος, του έρπητα και του βήχα (Venot, 1971; Huxley & Taylor, 1977).

Στη νότια Γαλλία είναι γνωστή η παραδοσιακή χρήση του ως διουρητικό, υποτασικό, αντικαταρροϊκό, κατά της διάρροιας, των ρευματισμών και ότι προκαλεί αζωτουρία (Ronchèse & Fiquet, 1952; Venot, 1971). Ο Brion, γάλλος γιατρός στη Λυόν του 1806, αναφέρει ότι το αφέψημα του παλιουριού, αν και ελάχιστα γνωστό, λειτουργεί καταλυτικά στην αντιμετώπιση των κωλικών νεφρού. Η παρασκευή του αφεψήματος περιλαμβάνει μία χούφτα ώριμων κονιοποιημένων καρπών παλιουριού, οι οποίοι βράζονται σε νερό έως ότου ο όγκος μειωθεί στο μισό. Κάθε μέρα ο ασθενής θα έπρεπε να πίνει μισό λίτρο

του αφεψήματος, κάνοντας παράλληλα σωστή διατροφή. Σε περιπτώσεις μεγάλου πόνου, ο γιατρός υπαγόρευε τη χρήση *Psyllium* ή ακόμη και οπιοειδών. Πριν το 1960 διεξήχθησαν έρευνες από Γάλλους επιστήμονες για τον έλεγχο της τοξικότητας των υδατικών εκχυλισμάτων των καρπών και των φύλλων του παλιουριού, καθώς και για τη φαρμακοδυναμική ενός εκχυλίσματος το οποίο χορηγήθηκε υποδορίως σε πειραματόζωα. Οι μελέτες έδειξαν χαμηλή τοξικότητα και υψηλή διουρητική δράση, ενώ το βάμμα του παλιουριού είχε διατεθεί εμπορικά στο παρελθόν ως φυτικό διουρητικό (Venot, 1971).

Μετά το 2000 έχει λάβει χώρα μία πληθώρα εθνοφαρμακολογικών μελετών, στις οποίες πάντα υπάρχουν πληροφορίες για χρήση του παλιουριού από τοπικούς πληθυσμούς για την αντιμετώπιση διάφορων ασθενειών. Στον ακόλουθο πίνακα περιλαμβάνονται μερικές χαρακτηριστικές πληροφορίες σχετικές με τις παραδοσιακές θεραπευτικές χρήσεις του παλιουριού (Πίνακας 2).

Πίνακας 2: Εθνοφαρμακολογικές μελέτες που περιέχουν στοιχεία για τη χρήση του *P. spina-christi* στην παραδοσιακή ιατρική

| Περιοχή                     | Μέρος του φυτού που χρησιμοποιείται  | Είδος σκευάσματος | Οδός χορήγησης  | Ασθένεια / Δράση  | Βιβλιογραφία  |
|-----------------------------|--|-------------------|-----------------|---|---|
| Καταλονία                   | Καρποί   | Έγχυμα            | Per os          | Αντιυπερχοληστερολαιμική, ρυθμίζει την κυκλοφορία του αίματος | Bonet <i>et al.</i> , 1999<br>Parada <i>et al.</i> , 2009 |
|                             | Καρποί   | Αφέψημα           | Per os          | Μειώνει τη συγκέντρωση ουρικού οξέος                          | Parada <i>et al.</i> , 2009                               |
| Σίλε, Τουρκία               | Καρποί   | Αφέψημα           | Per os          | Τονωτικό  | Tuzlaci & Tolon, 2000                                     |
|                             | Συνταγή με φύλλα από <i>Cydonia oblonga</i> , καρπούς από <i>Paliurus spina-christi</i> , ολόκληρο το φυτό <i>Thymus longicaulis</i> subsp. <i>longicaulis</i> var. <i>subisophyllus</i> , φύλλα από <i>Tilia argentea</i> και ολόκληρο το φυτό <i>Urtica dioica</i> | Αφέψημα           | Per os          | Για τα εκζέματα   | Tuzlaci & Tolon, 2001                                     |
| Κοζαλί, Τουρκία             | Φύλλα  | Συντεθλιμμένα     | Εξωτερική χρήση | Ακροαστικά  | Tuzlaci & Sadikoglu, 2007                                 |
|                             | Καρποί   | Αφέψημα           | Per os          | Άσθμα   | Tuzlaci & Sadikoglu, 2007                                 |
| Σιρσίε, Τουρκία             | Καρποί   | Αφέψημα           | Per os          | Διουρητική δράση, και δράση κατά της δυσκοιλιότητας           | Cakilcioglu & Turkoglu, 2010                              |
| Ανατολική Ανατολία, Τουρκία | Καρποί   | Αφέψημα           | Per os          | Διουρητική δράση, και δράση κατά της δυσκοιλιότητας           | Altundag & Ozturk, 2011                                   |

| Περιοχή                 | Μέρος του φυτού που χρησιμοποιείται | Είδος σκευάσματος | Οδός χορήγησης | Ασθένεια / Δράση  | Βιβλιογραφία             |
|-------------------------|-------------------------------------|-------------------|----------------|---|--------------------------|
| Maden, Τουρκία          | Καρποί                              | Αφέψημα           | Per os         | Διουρητική δράση, για τις πέτρες των νεφρών   | Cakilcioglu et al., 2011 |
| Κόλπος Edremit, Τουρκία | Καρποί                              | Αφέψημα           | Per os         | Άφυσο. Για τη γρίπη, το στομαχόπονο, το άσθμα, αποτοξινώνει το αίμα                       | Polat & Satil, 2012      |
| Alaşehir, Τουρκία       | Σπέρματα                            | Αφέψημα           | Per os         | Διουρητική δράση, βοηθητική κατά του διαβήτη, της νεφραλγίας και των πετρών στους νεφρούς | Sargin et al., 2013      |
| Turgutlu, Τουρκία       | Καρποί                              | Αφέψημα           | Per os         | Για τις πέτρες των νεφρών   | Bulut & Tuzlaci, 2013    |
| Malatya, Τουρκία        | Καρποί                              | Αφέψημα           | Per os         | Διουρητική δράση  | Tetik et al., 2013       |

Όπως φαίνεται και στον πίνακα 2, η πιο συχνή αναφορά παραδοσιακής χρήσης του φυτού σχετίζεται με τη διουρητική του δράση, γεγονός το οποίο εξηγεί και τη χρήση του για το θρυμματισμό των πετρών στους νεφρούς. Η χρήση κατά της δυσκοιλιότητας και ως αντιυπερχοληστερολαιμικό έχει αναφερθεί λιγότερες φορές, ενώ η χρήση του ως αντιυπερχοληστερολαιμικό συνάδει με τα αποτελέσματα μελετών αξιολόγησης της δράσης διαφόρων εκχυλισμάτων του φυτού (Mosaddegh et al., 2004).

### 1.3.5 Δρογοχημεία του γένους *Paliurus*

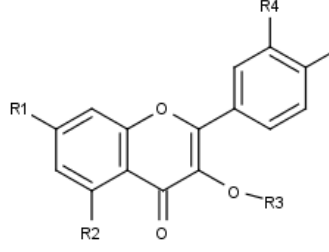
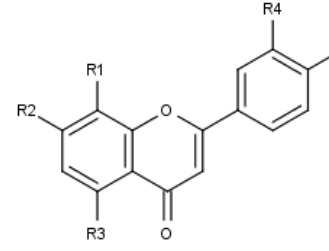
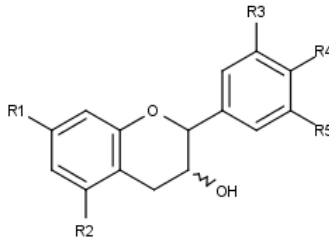
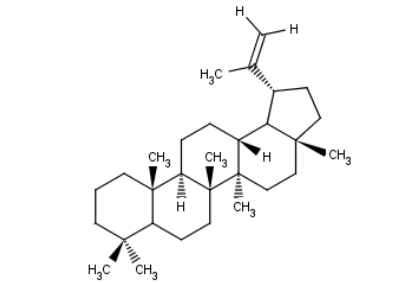
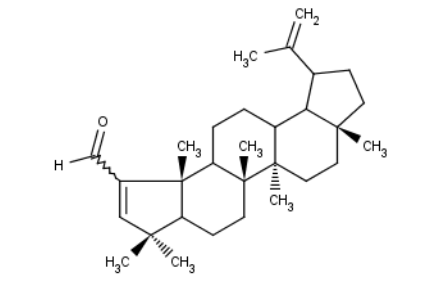
Οι περισσότερες φυτοχημικές μελέτες του γένους αφορούν το είδος *P. ramosissimus*, ενώ ελάχιστες έχουν γίνει για τα είδη *P. hemsleyanus* και *P. spina-christi*.

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες που έχουν απομονωθεί ανήκουν στις κατηγορίες των φλαβονοειδών, των τριτερπενίων, των στεροειδών και των κυκλοπεπτιδικών αλκαλοειδών. Τα φλαβονοειδή που έχουν αναφερθεί είναι συνήθως φλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβαν-3-όλες και γλυκοζίτες τους (Πίνακας 3). Μεταξύ των τριτερπενίων περιλαμβάνονται παράγωγα τύπου λουπανίου ή πιο σπάνια τύπου σεανοθανίου (Εικόνα 16), ενώ τα απομονωμένα στεροειδή ανήκουν στην κατηγορία των φυτοστερολών (Εικόνα 17). Τέλος, έχουν εντοπισθεί κυκλοπεπτιδικά αλκαλοειδή που ανήκουν και στους τρεις γνωστούς τύπους (Ia και Ib και Ic) (βλ. 1.3.6.1). Στη συνέχεια παρατίθενται οι βασικοί σκελετοί των χημικών κατηγοριών στις οποίες ανήκουν οι κυριότεροι μεταβολίτες που έχουν απομονωθεί ή ταυτοποιηθεί μέχρι σήμερα από το γένος *Paliurus*. Οι συγκεκριμένοι μεταβολίτες που αναφέρονται έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί από το είδος *P. spina-*

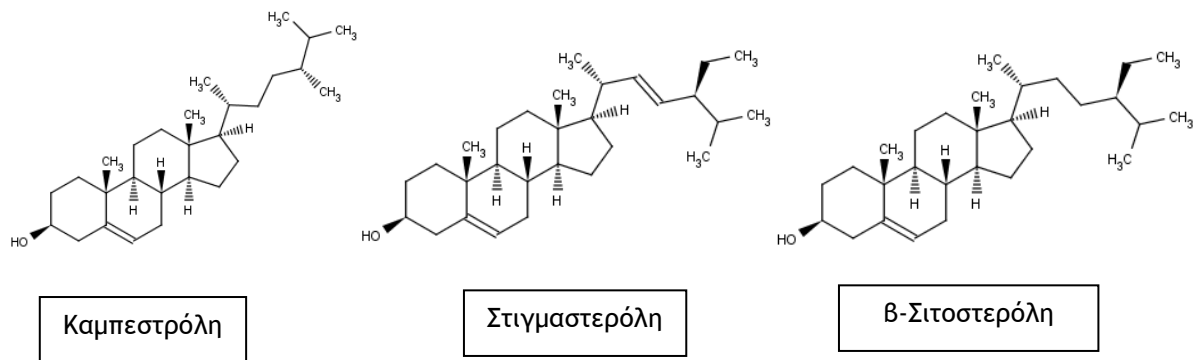


christi.

Πίνακας 3: Γενικοί τύποι φλαβονοειδών που έχουν απομονωθεί από το γένος *Paliurus* (Ronchèse & Fiquet, 1952; Dalakishvili et al., 1986; Kuštrak et al., 1987; Brantner & Males, 1990; Medić-Šarić et al., 1996; Brantner & Males, 1999; Zor et al., 2017)

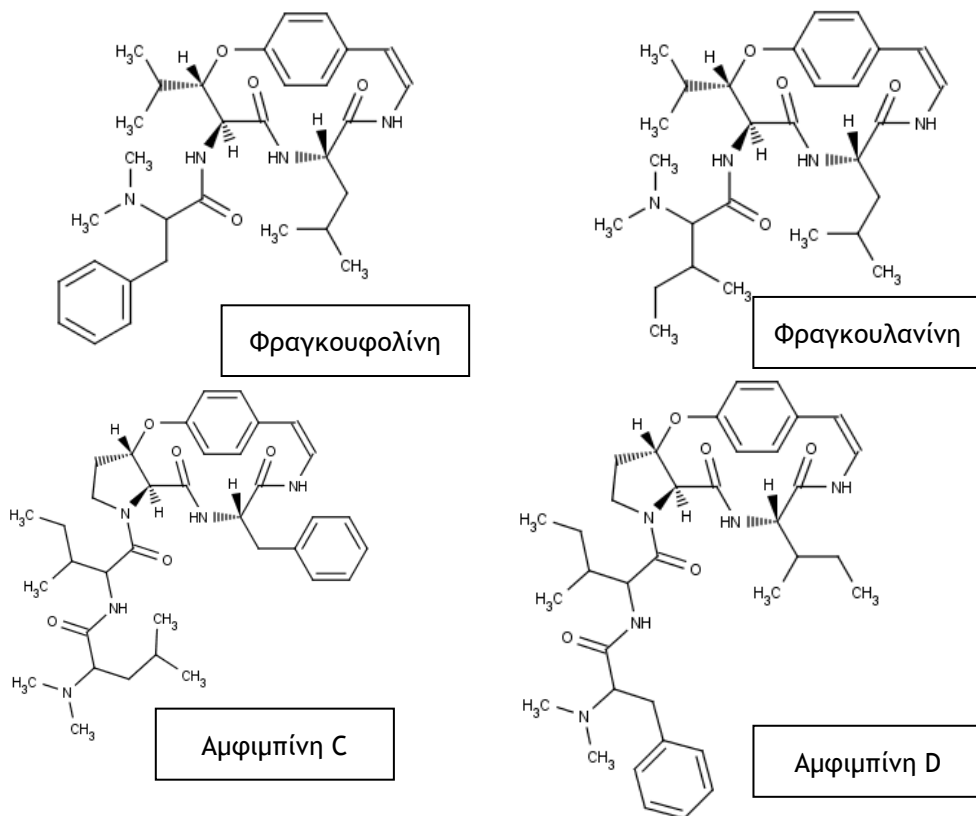
|  |  |  |
|--|--|--|
|  <p>Γενικός τύπος φλαβονολών</p>      | <p>Ρουτίνη<br/>Υπεροσίδης<br/>Ισοκερκιτρίνη<br/>3-Ο-Τριγλυκοσίδης κερκετίνης<br/>3-Ο-Ραμνσυλο-4-Ο-γλυκοσίδης κερκετίνης<br/>3-Ο-Ραμνογλυκοσυλο-7-Ο-ραμνοσίδης κερκετίνης<br/>3-Ο-Τριγλυκοσίδης καιμπερόλης<br/>3-Ο-Ραμνογλυκοσυλο-7-Ο-ραμνοσίδης καιμπερόλης</p> | <p>R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>4</sub> = R<sub>5</sub> = OH, R<sub>3</sub> = LRha-Glu<br/>R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>4</sub> = R<sub>5</sub> = OH, R<sub>3</sub> = Gal<br/>R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>4</sub> = R<sub>5</sub> = OH, R<sub>3</sub> = Glu<br/>R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>4</sub> = R<sub>5</sub> = OH, R<sub>3</sub> = Glu-Glu-Glu<br/>R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>4</sub> = OH, R<sub>3</sub> = Rha-Glu, R<sub>5</sub> = Glu<br/>R<sub>1</sub> = Rha, R<sub>2</sub> = R<sub>4</sub> = R<sub>5</sub> = OH, R<sub>3</sub> = Rha-Glu<br/>R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>5</sub> = OH, R<sub>3</sub> = Glu-Glu-Glu, R<sub>4</sub> = H<br/>R<sub>1</sub> = O-Rha, R<sub>2</sub> = R<sub>5</sub> = OH, R<sub>3</sub> = Rha-Glu, R<sub>4</sub> = H</p> |
|  <p>Γενικός τύπος φλαβονών</p>       | <p>7-Ο-Ραμνογλυκοσίδης σκοπαρίνης</p>  | <p>R<sub>1</sub> = Glu, R<sub>2</sub> = O-Rha-Glu, R<sub>3</sub> = R<sub>4</sub> = R<sub>5</sub> = OH</p>  |
|  <p>Γενικός τύπος φλαβαν-3-ολών</p> | <p>Κατεχίνη<br/>Επικατεχίνη<br/>Γαλλοκατεχίνη</p>  | <p>R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = R<sub>4</sub> = OH, R<sub>5</sub> = H, OH-3B<br/>R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = R<sub>4</sub> = OH, R<sub>5</sub> = H, OH-3α<br/>R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = R<sub>4</sub> = R<sub>5</sub> = OH, OH-3B</p>   |
|  <p>Τριτερπένια τύπου λουπανίου</p> |  <p>Τριτερπένια τύπου σεανθανίου</p>   |  |

Εικόνα 16: Γενικοί σκελετοί τριτερπενοειδών που έχουν βρεθεί στο γένος *Paliurus* (Lee et al., 1992; Lee et al., 1997; Chen et al., 2016)



Εικόνα 17: Φυτοστερόλες που έχουν απομονωθεί από το είδος *P. spina-christi* (Kemertelidze et al., 1999)

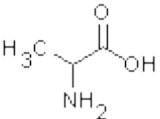
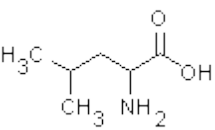
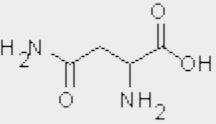
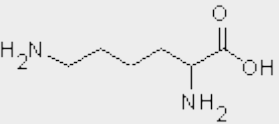
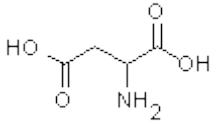
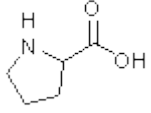
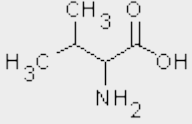
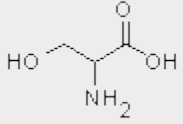
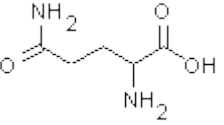
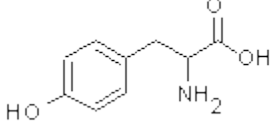
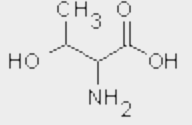
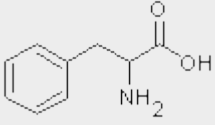
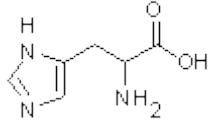
Τα παρακάτω κυκλοπεπτιδικά αλκαλοειδή (Εικόνα 18) έχουν απομονωθεί από το είδος *P. spina-christi*. Η φραγκουφολίνη και η φραγκουλανίνη ανήκουν στον τύπο Ia1, ενώ οι αμφιμίνες C και D αποτελούν κυκλοπεπτιδικά αλκαλοειδή τύπου Ia2 (βλ. 1.3.6.1) (Velcheva, 1993).



Εικόνα 18: Κυκλοπεπτιδικά αλκαλοειδή (CPAs) που έχουν απομονωθεί από το *P. spina-christi*

Οι Males et al. ταυτοποίησαν μία σειρά αμινοξέων στο *P. spina-christi*, τα οποία παίρνουν μέρος στη δημιουργία των κυκλοπεπτιδικών αλκαλοειδών (Πίνακας 4).

Πίνακας 4: Αμινοξέα που έχουν ταυτοποιηθεί στο *P. spina-christi* (Males *et al.*, 2001)

|               |     |   |               |     |  |
|---------------|-----|---|---------------|-----|--|
| Αλανίνη       | Ala |    | Λευκίνη       | Leu |   |
| Ασπαραγίνη    | Asn |    | Λυσίνη        | Lys |   |
| Ασπαρτικό οξύ | Asp |    | Προλίνη       | Pro |   |
| Βαλίνη        | Val |    | Σερίνη        | Ser |   |
| Γλουταμίνη    | Gln |    | Τυροσίνη      | Tyr |   |
| Θρεονίνη      | Thr |   | Φαινυλαλανίνη | Phe |  |
| Ιστιδίνη      | His |  |               |     |  |

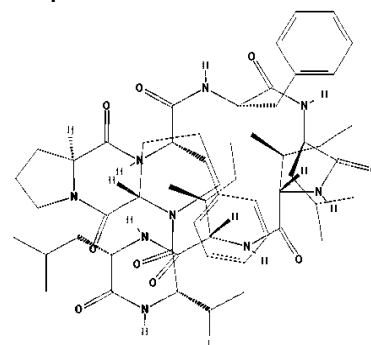
Σύμφωνα με την ερευνητική ομάδα, η ασπαραγίνη, η βαλίνη και η σερίνη ήταν τα κύρια αμινοξέα τα οποία αποτελούν δομικά στοιχεία των προαναφερόμενων αλκαλοειδών (Males *et al.*, 2001).

Επειδή τα κυκλοπεπτιδικά αλκαλοειδή αποτελούν μεταβολίτες που χαρακτηρίζουν το γένος *Paliurus*, στη συνέχεια παρατίθενται περισσότερα στοιχεία σχετικά με την εξάπλωσή τους στο φυτικό βασίλειο, τα δομικά τους χαρακτηριστικά, τη βιοσύνθεση και τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες.

### 1.3.6 Κυκλοπεπτίδια - Κυκλοπεπτιδικά αλκαλοειδή (Cyclopeptide Alkaloids, CPAs)

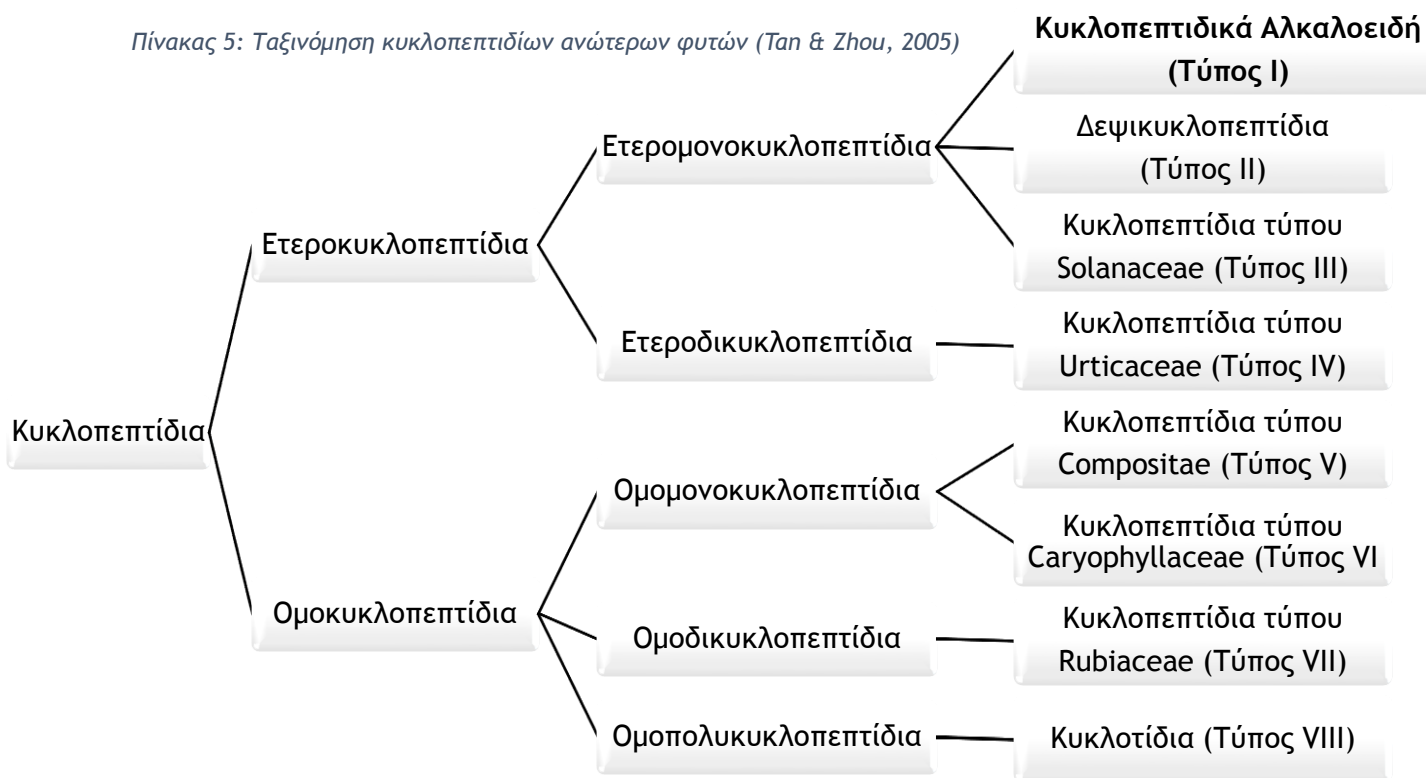
#### 1.3.6.1 Ιστορική αναδρομή, κατηγοριοποίηση, δομικά χαρακτηριστικά και εξάπλωση στο φυτικό βασίλειο

Τα κυκλοπεπτίδια είναι μία οικογένεια δευτερογενών μεταβολιτών που απαντώνται στα ανώτερα φυτά. Δημιουργούνται από πεπτιδικούς δεσμούς δύο έως τριάντα επτά πρωτεϊνικών και μη πρωτεϊνικών αμινοξέων, κυρίως L-στερεοχημείας. Το πρώτο κυκλοπεπτίδιο απομονώθηκε και ταυτοποιήθηκε το 1959 από τους Kaufmann και Tobschirbel και ήταν το Cyclolinoreptide A (CLA, τύπος VI, **Εικόνα 19**). Από τότε έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί πάνω από 450 κυκλοπεπτίδια. Η δομή τους ποικίλλει ανάλογα με τον αριθμό και τον τρόπο



Εικόνα 19: Cyclolinoreptide A

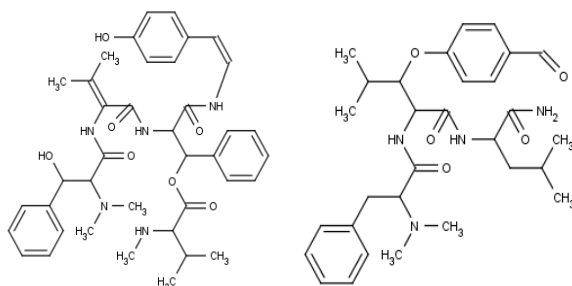
Πίνακας 5: Ταξινόμηση κυκλοπεπτιδίων ανώτερων φυτών (Tan & Zhou, 2005)



σύνδεσης των αμινοξέων και για το λόγο αυτό τα κυκλοπεπτίδια ταξινομήθηκαν σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα κατά τους Tan και Zhou το 2005 (Πίνακας 5) (Tan & Zhou, 2006).

Κυκλοπεπτίδια έχουν βρεθεί σε 26 οικογένειες, 65 γένη και 120 είδη. Κυρίως απαντώνται στις οικογένειες Caryophyllaceae και Rhamnaceae και μάλιστα στην τελευταία έχουν απομονωθεί σχεδόν αποκλειστικά κυκλοπεπτιδικά αλκαλοειδή τύπου I.

Τα κυκλοπεπτιδικά αλκαλοειδή ορίζονται ως πολυαμιδικές ενώσεις και απαντώνται κυρίως στα είδη της οικογένειας Rhamnaceae. Άλλες ονομασίες με τις οποίες έχουν αναφερθεί είναι οι ακόλουθες: πεπτιδικά αλκαλοειδή, κυκλικά πεπτιδικά αλκαλοειδή, βασικά πεπτίδια και φαινυλοκυκλοπεπτίδια. Ο βασικός πυρήνας των ενώσεων αυτών είναι ένα 13-, 14- ή 15-μελές κυκλικό μακρομόριο που ως γενικά δομικά στοιχεία περιλαμβάνει δύο αμινοξέα και μία στυρυλάμινο-υπομονάδα (Morel *et al.*, 2009). Υπάρχουν βέβαια εξαιρέσεις



Εικόνα 20: Lasiodine A και Sanjoinine G2

στο γενικό αυτό κανόνα, όπως είναι τα άκυκλα πεπτιδικά αλκαλοειδή Lasiodine A και Sanjoinine G2 (Εικόνα 20). Ο γενικός τύπος των κυκλοπεπτιδικών αλκαλοειδών φαίνεται στο παρακάτω σχήμα (Εικόνα 21) (Gournelis *et al.*, 1997).

Παρατηρώντας το γενικό αυτό τύπο, συμπεραίνουμε ότι τα κυκλοπεπτιδικά αλκαλοειδή αποτελούνται από ένα παράγωγο τυροσίνης (την 3- ή 4-υδροξυστυρυλάμινο- υπομονάδα, D), ένα κοινό αμινοξύ που είναι προσδεμένο στο δακτύλιο (ring-bound amino acid, C) και ένα β-υδροξυ-αμινοξύ [2-υδροξυλευκίνη (τύπος Ia1), 2-υδροξυ-προλίνη (τύπος Ia2), ή 3-υδροξυ-φαινυλαλανίνη (τύπος Ia3), B) το οποίο είναι συνδεδεμένο με τη στυρυλάμινο-υπομονάδα μέσω μίας αιθερικής γέφυρας. Συνδεδεμένη με πεπτιδικό δεσμό στην αμινο-ομάδα του β-υδροξυ-αμινοξέος είναι συνήθως μία τελική υπομονάδα αμινοξέος (terminal ή side chain amino acid, A). Σε αρκετές περιπτώσεις, μεταξύ των A και B υπομονάδων μεσολαβεί ένα ακόμα αμινοξύ, το οποίο αποτελεί την υπομονάδα E (Tan & Zhou, 2006, Gournelis *et al.*, 1997).

Τα αμινοξέα που έχει βρεθεί ότι παίρνουν μέρος στη δημιουργία των κυκλοπεπτιδικών αλκαλοειδών φαίνονται στον Πίν. 6.

στο γενικό αυτό κανόνα, όπως είναι τα άκυκλα πεπτιδικά αλκαλοειδή Lasiodine A και Sanjoinine G2 (Εικόνα 20). Ο γενικός τύπος των κυκλοπεπτιδικών αλκαλοειδών φαίνεται στο παρακάτω σχήμα (Εικόνα 21) (Gournelis *et al.*, 1997).

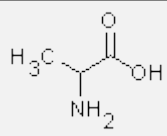
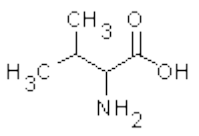
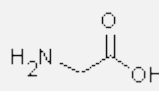
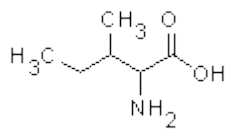
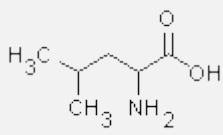
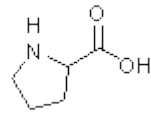
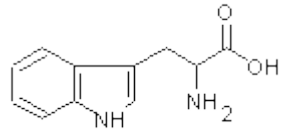
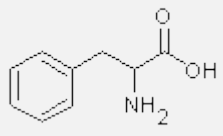
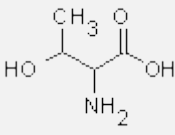


- A= τελικό αμινοξύ (side-chain)
- B= β-υδροξυαμινοξύ
- C=αμινοξύ που είναι προσδεμένο στο δακτύλιο (ring-bound)
- D= υδροξυστυρυλάμινο-υπομονάδα
- E= ενδιάμεσο αμινοξύ, το οποίο κάποιες φορές υπάρχει μεταξύ των υπομονάδων A και B

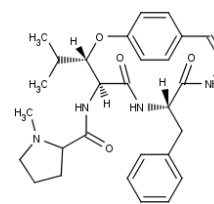
Εικόνα 21: Γενικός τύπος των κυκλοπεπτιδικών αλκαλοειδών του γένους *Paliurus*

Πίνακας 6: Αμινοξέα που παίρνουν μέρος στη δημιουργία των κυκλοπεπτιδικών αλκαλοειδών

**Μη πολικά, αλειφατικά κατάλοιπα**

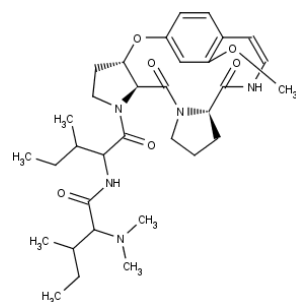
|  |     |   |
|--|-----|---|
| <b>Αλανίνη</b>                         | Ala |    |
| <b>Βαλίνη</b>                          | Val |    |
| <b>Γλυκίνη</b>                         | Gly |    |
| <b>Ισολευκίνη</b>                      | Ile |    |
| <b>Λευκίνη</b>                         | Leu |    |
| <b>Προλίνη</b>                         | Pro |  |
| <b>Αρωματικά κατάλοιπα</b>             |     |   |
| <b>Τρυπτοφάνη</b>                      | Trp |  |
| <b>Φαινυλαλανίνη</b>                   | Phe |  |
| <b>Πολικά, μη φορτισμένα κατάλοιπα</b> |     |   |
| <b>Θρεονίνη</b>                        | Thr |  |

Η παρουσία αλκαλοειδών στο φυτό *Ceanothus americanus* (Rhamnaceae), το οποίο χρησιμοποιούνταν στη λαϊκή θεραπευτική, παρατηρήθηκε ήδη από τον Clinch το 1884. Τις δεκαετίες του 1920 και 1930 οι Clark και Bertho *et al.* άρχισαν να εξερευνούν το πεδίο αυτό και η ερευνητική ομάδα του τελευταίου απομόνωσε την ένωση Σεανοθίνη-B (Εικόνα 22) από μείγματα αλκαλοειδών του *C. Americanus* και



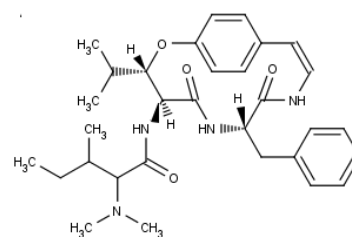
Εικόνα 22: Σεανοθίνη-B

απλά προσδιόρισε το σωστό εμπειρικό τύπο  $C_{29}H_{36}N_4O_4$  το 1933. Το 1965 οι Warnhoff *et al.* απομόνωσαν επίσης το ίδιο μόριο από τον ίδιο οργανισμό και πρότειναν την ολοκληρωμένη δομή, η οποία αναθεωρήθηκε από τους Klein *et al.* και Servis *et al.* το 1968. Η πρώτη ανακάλυψη των κυκλοπεπτιδικών αλκαλοειδών έγινε από τους Pais *et al.* το 1963, οι οποίοι απομόνωσαν τα μόρια Αντουετίνες-Χ, -Υ και -Ζ από το φυτό *Waltheria americana* (Steruliaceae). Το 1963 οι Menard *et al.* απομόνωσαν τη Ζιζιφίνη-Α (Εικόνα 23) από το φυτό *Zizyphus oenoplia* (Rhamnaceae) και αναγνώρισαν τα



Εικόνα 23: Ζιζιφίνη-Α

αμινοξέα ισολευκίνη και προλίνη ως δομικά στοιχεία του μορίου. Το 1965 οι Zbiral *et al.* πρότειναν την ολοκληρωμένη δομή της Ziziphine, η οποία αναθεωρήθηκε από τους Tschesche *et al.* το 1973. Το 1964 οι Pais *et al.* πρώτοι πρότειναν τον όρο πεπτιδικά αλκαλοειδή και πρότειναν τη δομή της πανδαμίνης (Εικόνα 24), την οποία απομόνωσαν από το φυτό *Panda oleosa*

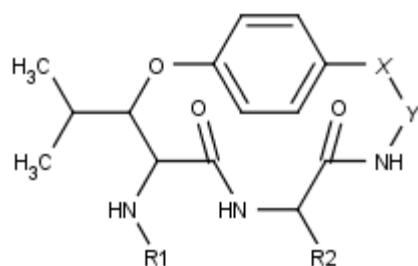


Εικόνα 24: Πανδαμίνη

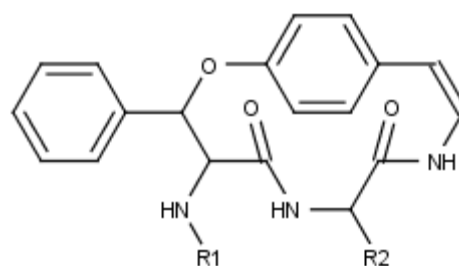
(Pandaceae). Δύο χρόνια αργότερα η ίδια ομάδα επιβεβαίωσε τη δομή αυτή. Από τότε έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί πάνω από διακόσια κυκλοπεπτιδικά αλκαλοειδή (Tan & Zhou, 2006).

Ιστορικά λοιπόν καθιερώθηκαν διάφορα μοντέλα κατηγοριοποίησης των κυκλοπεπτιδικών αλκαλοειδών. Η πρώτη κατηγοριοποίηση προτάθηκε από τους Pais *et al.* το 1971 με βάση τις υποομάδες που απαρτίζουν τα μόρια. Μερικά χρόνια αργότερα, το 1975, οι Tschesche *et al.* ταξινόμησαν τα κυκλοπεπτιδικά αλκαλοειδή σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με το μέγεθος του δακτυλίου. Οι κατηγορίες αυτές είναι οι Ia, Ib και Ic, ενώ η πρώτη περιλαμβάνει τις υποκατηγορίες Ia1, Ia2 και Ia3, ανάλογα με το είδος του β-υδροξυαμινοξέος που περιέχουν. Οι γενικές δομές των κυκλοπεπτιδικών αλκαλοειδών φαίνονται στην Εικόνα 25 (Tan & Zhou, 2006).

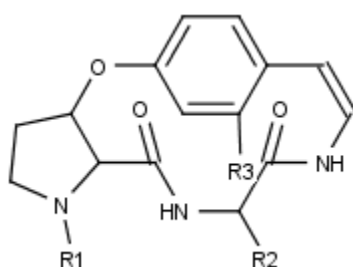
Το 1984 οι Joullié και Nutt πρότειναν έναν άλλο, παρόμοιο τρόπο ταξινόμησης, σύμφωνα με τον οποίο διακρίνονται τρεις κατηγορίες: τα κυκλοπεπτιδικά αλκαλοειδή με την αυστηρή έννοια της λέξης (*sensu stricto*), τα άκυκλα πεπτιδικά αλκαλοειδή και τα ουδέτερα μόρια. Τα κυκλοπεπτιδικά αλκαλοειδή *sensu stricto* χωρίζονται σε υποκατηγορίες ανάλογα με τον αριθμό των αμινοξέων που μετέχουν στη δημιουργία του μορίου, αλλά και με το μέγεθος του μακρομορίου ως 4(13)-, 5(13)-, 4(14)-, 5(14)- και 4(15)-τύπου



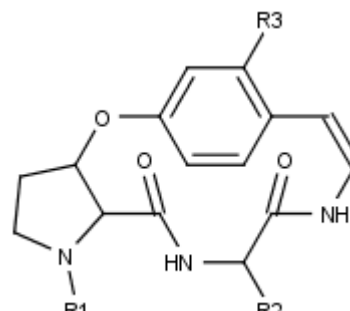
Τύπος Ia1



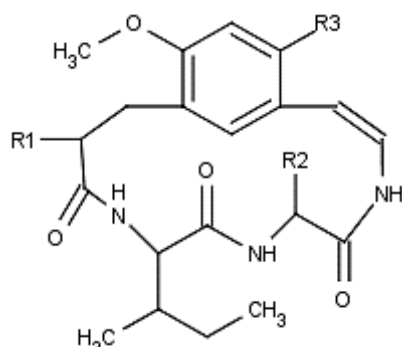
Τύπος Ia2



Τύπος Ia3



Τύπος Ib



Τύπος Ic

X-Y = HC=CH, CH<sub>2</sub>(OH)-CH<sub>2</sub>,  
CH<sub>2</sub>(OCH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>, COCH<sub>2</sub>

R<sub>1</sub> = Κατάλοιπα αμινοξέων

R<sub>2</sub> = Πλευρική αλυσίδα αμινοξέων

R<sub>3</sub> = H, OH, ή OCH<sub>3</sub>

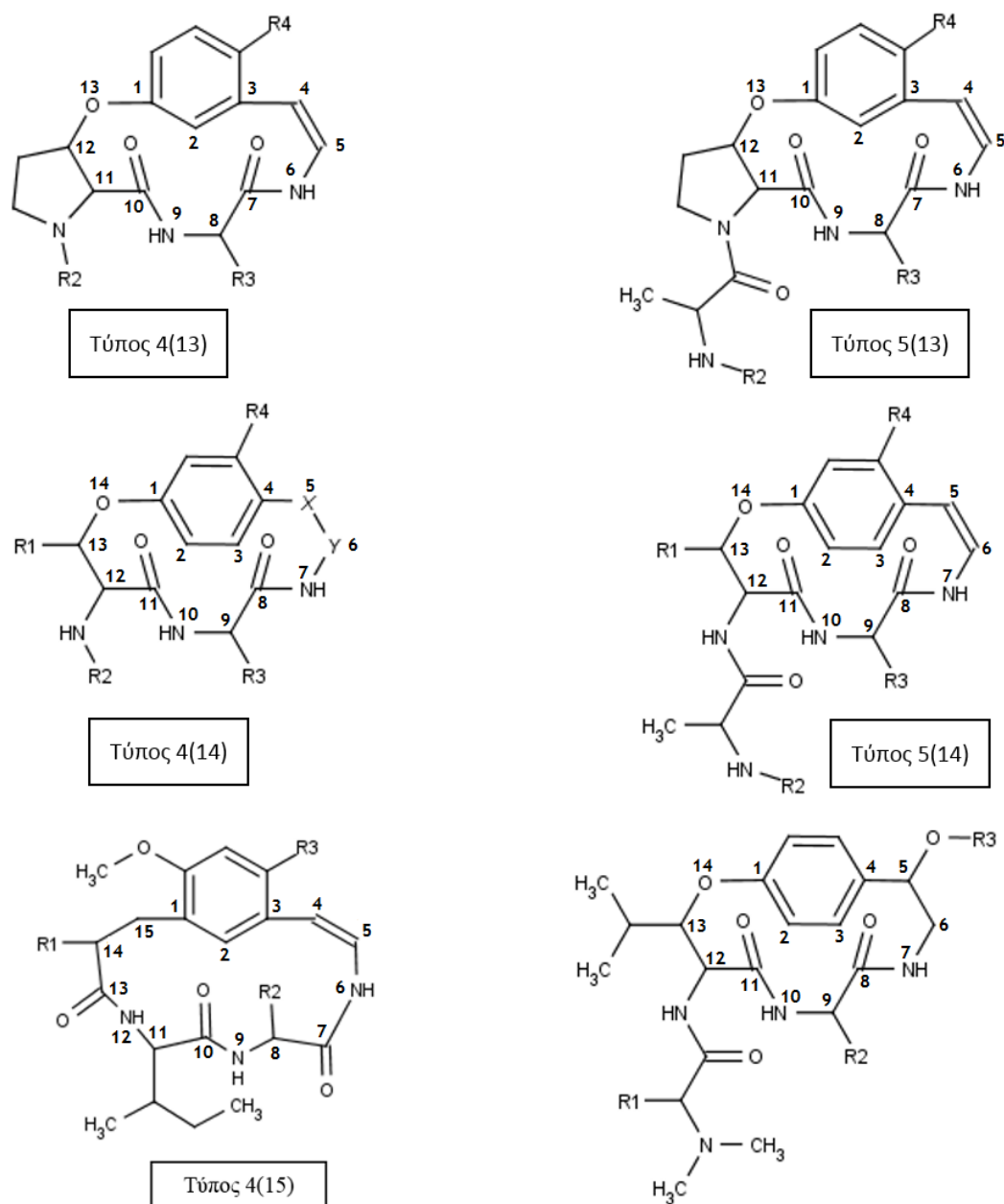
R<sub>4</sub> = NH<sub>2</sub>, NHCH<sub>3</sub>, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>

Εικόνα 25: Κατηγοριοποίηση κυκλοπεπτιδικών αλκαλοειδών σύμφωνα με τον Tschesche et al. (Tan & Zhou, 2006).

αλκαλοειδή. Οι αριθμοί 4 και 5 υποδηλώνουν τον αριθμό των αμινοξικών υπομονάδων που παίρνουν μέρος στη δημιουργία του κυκλοπεπτιδικού αλκαλοειδούς, ενώ οι αριθμοί 13, 14 και 15 υποδηλώνουν τον αριθμό των ατόμων που αποτελούν το κυκλικό τμήμα, την ansa γέφυρα του μορίου. Οι υποκατηγορίες 4(14) και 5(14) χωρίζονται περαιτέρω ανάλογα με το είδος του β-υδροξυαμινοξέος και ονομάζονται σύμφωνα με το πρώτο κυκλοπεπτιδικό αλκαλοειδές της αντίστοιχης κατηγορίας που ταυτοποιήθηκε. Οι υποκατηγορίες 4(13), 5(13) και 4(15) είναι ενιαίες όσον αφορά τα κυκλοπεπτιδικά αλκαλοειδή που περιλαμβάνουν. Στις υπόλοιπες δύο όμως υπάρχουν εξαιρέσεις. Στην υποκατηγορία 4(14) υπάρχει μία ομάδα μορίων



τύπου πανταμίνης, τα οποία περιλαμβάνουν μία 2-αλκοξυ-2-(π-υδροξυφαινυλο) αιθυλαμίνη στη θέση της υδροξυστυρυλαμινο- υπομονάδας D. Οι γενικές δομές των κυκλοπεπτιδικών αλκαλοειδών που ταξινομούνται με αυτό τον τρόπο καθώς και οι εξαιρέσεις τους φαίνονται στην **Εικόνα 26**.

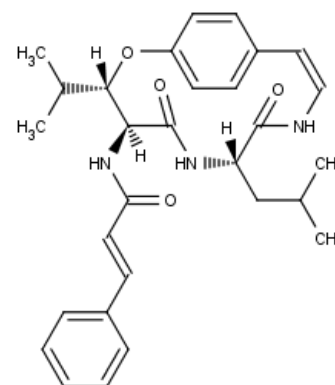


X-Y = HC=CH, CH<sub>2</sub>(OH)-CH<sub>2</sub>,  
 CH<sub>2</sub>(OCH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>, COCH<sub>2</sub>  
 R<sub>1</sub> = Άρυλο- ή άλκυλο- ομάδα  
 R<sub>2</sub> = Τελικό κατάλοιπο (βασικό ή ουδέτερο)  
 R<sub>3</sub> = Πλευρική αλυσίδα αμινοξέος  
 R<sub>4</sub> = H, OH, ή OCH<sub>3</sub>  
 R<sub>5</sub> = Ενδιάμεσο αμινοξύ

Κυκλοπεπτιδικά αλκαλοειδή  
 τύπου πανταμίνης – εξαίρεση  
 στην κατηγορία 4(14)

Εικόνα 26: Κατηγοριοποίηση κυκλοπεπτιδικών αλκαλοειδών σύμφωνα με τους Jullié και Nutt, 1984 (Gournelis et al., 1997; El-Seedi et al., 2007; Morel et al., 2009; Tuenter et al., 2016)

Σύμφωνα με την παραπάνω ταξινόμηση τα κυκλοπεπτιδικά αλκαλοειδή είναι ως επί το πλείστον βασικά μόρια. Η βασικότητά τους αποδίδεται αποκλειστικά στο αμινικό άζωτο του N-τελικού αμινοξέος, καθώς τα υπόλοιπα άτομα αζώτου που υπάρχουν στο μόριο είναι αμιδικά και δεν έχουν ικανότητά τους να πρωτονιωθούν, εξαιτίας της συζυγίας του ασύζευκτου ζεύγους e<sup>-</sup> του αμιδικού αζώτου με το π-νέφος του καρβονυλίου. Παρ' όλα αυτά έχουν ταυτοποιηθεί μόρια που δεν έχουν ένα τελικό αμινοξύ ως πλευρική αλυσίδα (terminal ή side-chain), όπως είναι η σανγοϊνενίνη (Εικόνα 27). Αυτά τα παράγωγα θεωρούνται ουδέτερα εφόσον δεν έχουν ένα N-τελικό άκρο με ελεύθερη ή υποκατεστημένη βασική αμινομάδα.



Εικόνα 27: Σανγοϊνενίνη

Μολονότι σε αρκετά άρθρα επισκόπησης σχετικά με κυκλοπεπτιδικά αλκαλοειδή ακολουθείται η κατηγοριοποίηση που πρότειναν οι Joullié και Nutt το 1984 (Gournelis *et al.*, 1997; El-Seedi *et al.*, 2007; Morel *et al.*, 2009; Tuentner *et al.*, 2016), στην παρούσα διπλωματική εργασία θα χρησιμοποιηθεί η κατηγοριοποίηση που πρότειναν οι Tschesche *et al.* το 1974 (Tan & Zhou, 2006).

Στο γένος *Paliurus* απαντώνται και οι τρεις τύποι κυκλοπεπτιδικών αλκαλοειδών (Ia, Ib και Ic).

Συνολικά πάνω από διακόσια κυκλοπεπτιδικά αλκαλοειδή έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί σε φυτικά είδη που ανήκουν σε εννιά βοτανικές οικογένειες, είκοσι τρία γένη και πενήντα δύο είδη. Ειδικά από είδη του γένους *Zizyphus* έχουν απομονωθεί περισσότερα από τα μισά των ταυτοποιημένων αλκαλοειδών. Πολλά έχουν απομονωθεί και από είδη των οικογενειών Acanthaceae, Asteraceae, Celastraceae, Euphorbiaceae, Malvaceae, Olacaceae, Pandaceae, Phyllanthaceae, Rubiaceae, Sterculiaceae και Urticaceae. Εντοπίζονται σε σχεδόν όλα τα φυτικά μέρη, συμπεριλαμβανομένου του κορμού, των ριζών και όλων των υπέργειων τμημάτων. Η περιεκτικότητά τους κυμαίνεται από (1x10<sup>-6</sup>)% έως (1x10<sup>-2</sup>)% w/w και αυτό εξαρτάται όχι μόνο από την φυτική πρώτη ύλη, αλλά και από τη μέθοδο απομόνωσης. Το γεγονός ότι ανευρίσκονται σε τόσο μικρή συγκέντρωση δικαιολογεί την άποψη ότι πιθανότατα απαντώνται και σε άλλα φυτικά είδη αλλά δεν έχουν εντοπισθεί στα πλαίσια προγενέστερων μελετών (Gournelis *et al.*, 1997; Tan & Zhou, 2006; El-Seedi *et al.*, 2007; Morel *et al.*, 2009; Tuentner *et al.*, 2016).

### 1.3.6.2 Φυσικοχημικές ιδιότητες, μεθοδολογίες ταυτοποίησης και συνθετική Παρασκευή

Τα κυκλοπεπτιδικά αλκαλοειδή δημιουργούν κρυστάλλους σχετικά εύκολα. Το σημείο τήξης συνήθως ξεπερνά τους 200°C και τα περισσότερα είναι αριστερόστροφα. Είναι συνήθως ασθενείς βάσεις με εξαίρεση αυτά που δεν περιέχουν N-τελικό άκρο αμινοξέος και δε διαλύονται εύκολα σε νερό, ενώ διαλύονται πιο εύκολα σε αλκοόλες, το χλωροφόρμιο και άλλους οργανικούς διαλύτες. Τα αμινοξέα που απαρτίζουν τα κυκλοπεπτιδικά αλκαλοειδή (Πίνακας 6) ανήκουν συνήθως στη L-σειρά (Tan & Zhou, 2006).

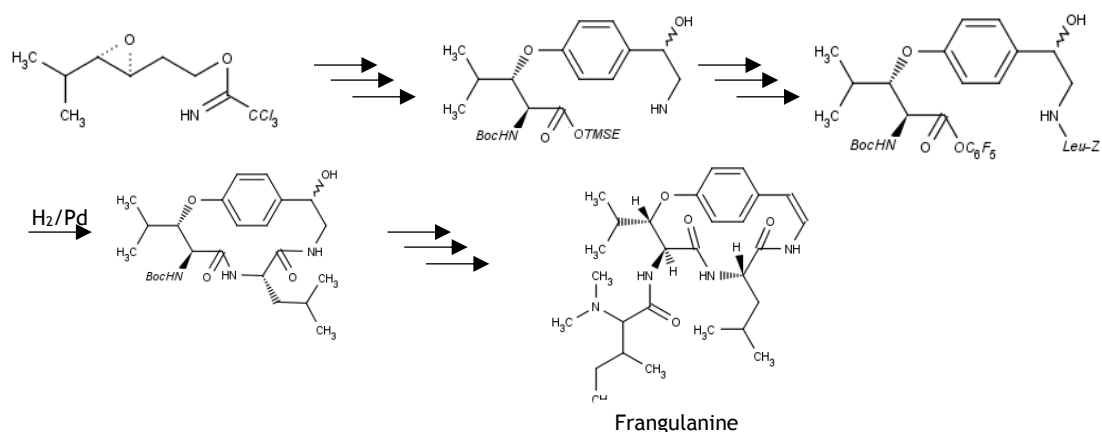
Οι δομές των κυκλοπεπτιδικών αλκαλοειδών καθορίζονται μέχρι σήμερα με χημικές τροποποιήσεις και φασματοσκοπικές μεθόδους. Μεταξύ των αντιδράσεων που εφαρμόζονται περιλαμβάνονται οξειδώσεις, ακετυλιώσεις, μεθυλιώσεις, φορμυλιώσεις και υδρογονώσεις. Μία άλλη μεθοδολογία που εφαρμόζεται για την ταυτοποίηση των κυκλοπεπτιδικών αλκαλοειδών περιλαμβάνει την αναγνώριση των αμινοξέων του κυκλοπεπτιδίου μετά από αλκαλική ή όξινη υδρόλυσή του με τη χρήση διαφόρων τεχνικών, όπως είναι η χρωματογραφία χάρτου (PC), η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC), η αέρια χρωματογραφία (GC) και η υγρή χρωματογραφία (LC) συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (MS). Μεταξύ των φασματοσκοπικών μεθόδων που χρησιμοποιούνται περιλαμβάνονται η φασματοσκοπία υπερύθρου (IR), η φασματοσκοπία υπεριώδους (UV), η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), η φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού (CD) και η περίθλαση ακτίνων Χ. Η φασματομετρία μάζας και η ανάλυση των αμινοξέων μετά από υδρόλυση είναι ιδιαίτερες αποτελεσματικές (Tan & Zhou, 2006).

Ο καθορισμός της στερεοχημείας των κυκλοπεπτιδικών αλκαλοειδών επιτυγχάνεται με χημικές μετατροπές, ενζυμική οξείδωση και φασματοσκοπικές μεθόδους. Η χημική μετατροπή των αμινοξέων σε διαστερεομερή παράγωγα και η επακόλουθη ταυτοποίησή τους με αέρια χρωματογραφία, χρωματογραφία γέλης (GLC) και υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC) έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για να προσδιοριστεί η στερεοχημεία των αμινοξέων. Άλλες τεχνικές που χρησιμοποιούνται είναι η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού και η περίθλαση ακτίνων Χ. Η ταυτοποίηση επιτυγχάνεται με τη χρήση πρότυπων L- και D- αμινοξέων, αν και όπως προαναφέρθηκε τα αμινοξέα που απαρτίζουν τα κυκλοπεπτιδικά αλκαλοειδή βρίσκονται συνήθως στην L-μορφή, εφόσον πρόκειται για φυσικά αμινοξέα. Ωστόσο έχουν αναφερθεί και μερικές εξαιρέσεις, όπως η (i) λασιοδίνη-A, η οποία φέρει ως 'ring-bound' α-αμινοξύ την D-β-υδροξυφαινυλαλανίνη, (ii) η πουμπεσκίνη-A, η οποία έχει ως 'ring-bound' α-αμινοξύ τη D-λευκίνη, (iii) η σκουτιαμίνη-G, η οποία φέρει ως 'ring-bound α-αμινοξύ' την D-β-υδροξυφαινυλαλανίνη, (iv) η σκουτιαμίνη-K, , η οποία φέρει ως 'ring-bound α-αμινοξύ' τη D-θρεονίνη-(3S/4S)-β-υδροξυφαινυλαλανίνη, (v) η κονταλίνη-A με το β-υδροξυαμινοξύ L-θρεονίνη-(3S/4S)-β-υδροξυφαινυλαλανίνη και (vi) τα ντισκαρένια-C και -D με τα β-υδροξυ-

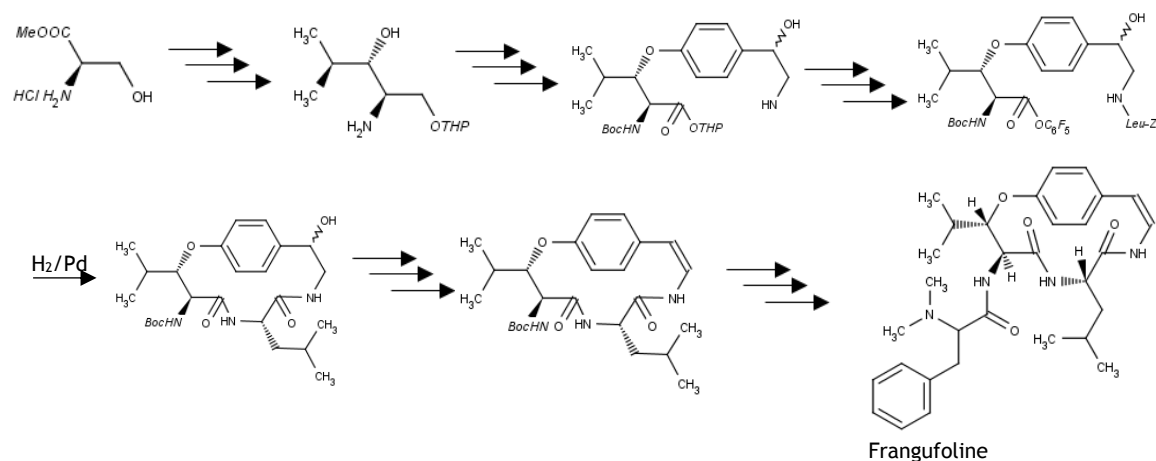
αμινοξέα L-θρεονίνη-(3S/4S)-β-υδροξυφαινυλαλανίνη και D-θρεονίνη-(3S/4S)-β-υδροξυφαινυλαλανίνη, αντίστοιχα (Tan & Zhou, 2006; Tuenter *et al.*, 2016).

Τις τελευταίες δεκαετίες η σύνθεση των κυκλοπεπτιδικών αλκαλοειδών έτυχε ιδιαίτερης προσοχής λόγω της πολυπλοκότητας των δομών τους και των σημαντικών βιολογικών ιδιοτήτων τους. Η σύνθεση των αλκαλοειδών τύπου Ia (Εικόνα 25) είναι πολύ πιο δύσκολη σε σχέση με αυτές των τύπων Ib και Ic λόγω του άκαμπτης δομής του 14-μελούς δακτυλίου με τις δύο *S-trans* αμιδικές υπομονάδες. Οι πρωταρχικές δυσκολίες που πρέπει να ξεπεραστούν είναι η δημιουργία του άλκυλο- ή αρυλο- αιθέρα, η ακορεστότητα και η κυκλοποίηση του μορίου.

Οι ομάδες που είχαν την πιο καινοτόμα συμβολή στη σύνθεση των κυκλοπεπτιδικών αλκαλοειδών είναι του Schmidt (Schmidt *et al.*, 1983; Schmidt *et al.*, 1991) (Εικόνα 28) και της Joullié (Xiao *et al.*, 1998) (Εικόνα 29).



Εικόνα 28: Σύνθεση της φραγκουλανίνης από τον Schmidt

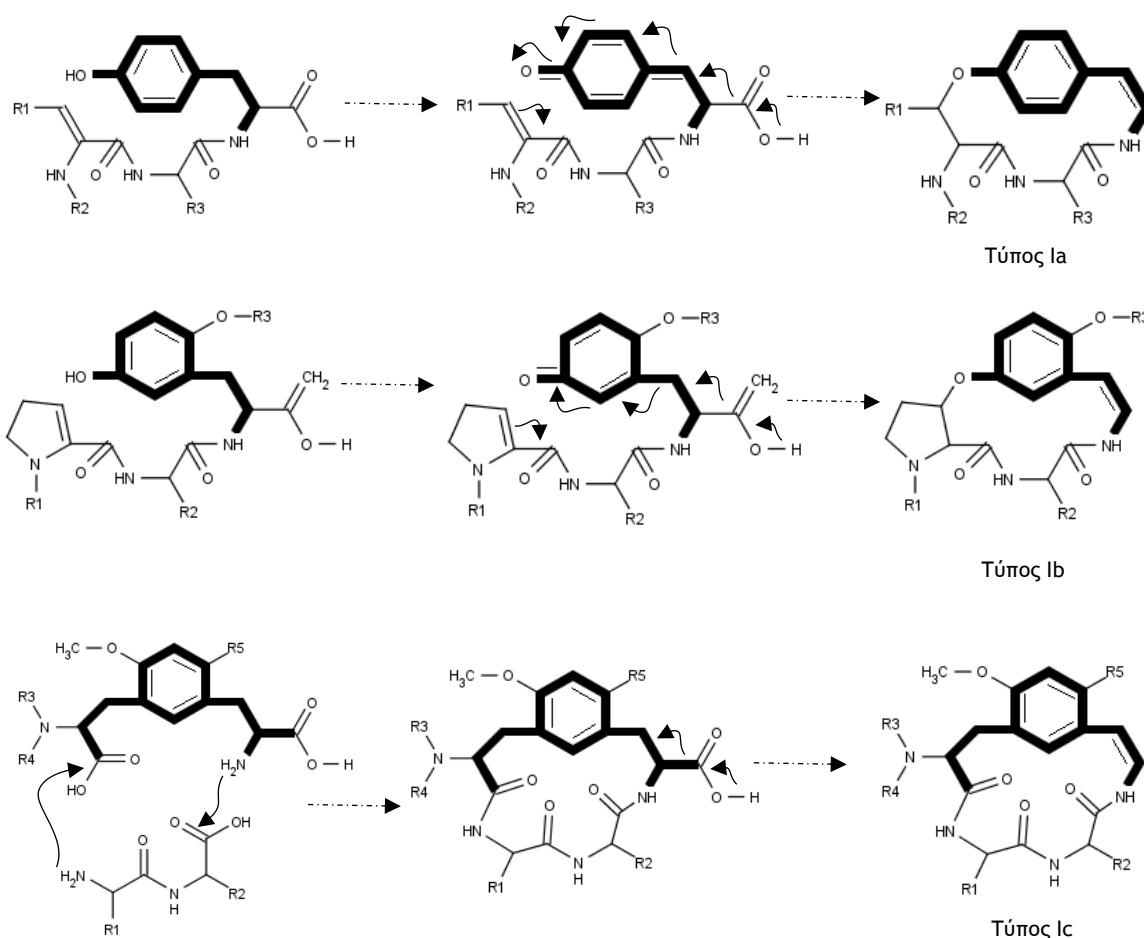


Εικόνα 29: Σύνθεση της frangufoline από την Joullié

### 1.3.6.3 Βιοσύνθεση και Βιολογική ιδιότητες

Οι τύποι Ia και Ib (Εικόνα 25) των κυκλοπεπτιδικών αλκαλοειδών πιθανώς να σχηματίζονται βιογενετικά από ένα τριπεπτίδιο που περιέχει δύο αφυδατωμένα αμινοξέα με την προσθήκη μίας φαινολικής ομάδας στο διπλό δεσμό του ενός. Η βιοσύνθεση των κυκλοπεπτιδικών αλκαλοειδών του τύπου Ic ίσως περιλαμβάνει μία  $\mu$ -φαιnyλο-διαλανίνη ως πρόδρομη ένωση ή το αντίστοιχο αφυδατωμένο μόριο (Εικόνα 30). Η στυρυλάμινο- υπομονάδα φαίνεται ότι προέρχεται από την τυροσίνη (Tan & Zhou, 2006; Morel *et al.*, 2009).

Φυτά από τα οποία έχουν απομονωθεί κυκλοπεπτιδικά αλκαλοειδή έχουν



Εικόνα 30: Η βιοσυνθετική οδός των κυκλοπεπτιδικών αλκαλοειδών (Tan & Zhou, 2006; Morel *et al.*, 2009)

χρησιμοποιηθεί για αιώνες στην παραδοσιακή θεραπευτική σε πολλά μέρη του κόσμου. Το γένος *Zizyphus* για παράδειγμα, από το οποίο έχει απομονωθεί το μεγαλύτερο ποσοστό των κυκλοπεπτιδικών αλκαλοειδών, έχει χρησιμοποιηθεί παραδοσιακά για τις αναλγητικές, αντιδιαβητικές, αντιμικροβιακές, αντιπλασμοδικές, αντισπασμωδικές, ηρεμιστικές, διουρητικές και υπογλυκαιμικές του ιδιότητες (Tan & Zhou, 2006; Morel *et al.*, 2009).

Έρευνες που έχουν γίνει πάνω στη δράση κάποιων από τα κυκλοπεπτιδικά αλκαλοειδή που έχουν απομονωθεί ή και συντεθεί έχουν δείξει ότι εμφανίζουν

αντιμικροβιακή δράση έναντι Gram θετικών και Gram αρνητικών βακτηρίων, όπως τα *Staphylococcus aureus* και *Escherichia coli* και αντιμυκητιασική δράση έναντι των *Saccharomyces cerevisiae* και *Candida albicans*. Η δράση φαίνεται να επηρεάζεται από τη στερεοχημεία και την ύπαρξη 3-υδροξυφαινυλαλανίνης στη δομή του κυκλοπεπτιδικού αλκαλοειδούς. Επίσης, έχει τεράστια σημασία η ύπαρξη N,N-διμέθυλο- ή N-μέθυλο- ομάδας στη δομή του μακρομορίου, καθώς χωρίς αυτή ενδέχεται να μην έχει καμία αντιμικροβιακή ή αντιμυκητιασική δράση αλκαλοειδές (Tan & Zhou, 2006; Morel *et al.*, 2009; Tuenter *et al.*, 2016).

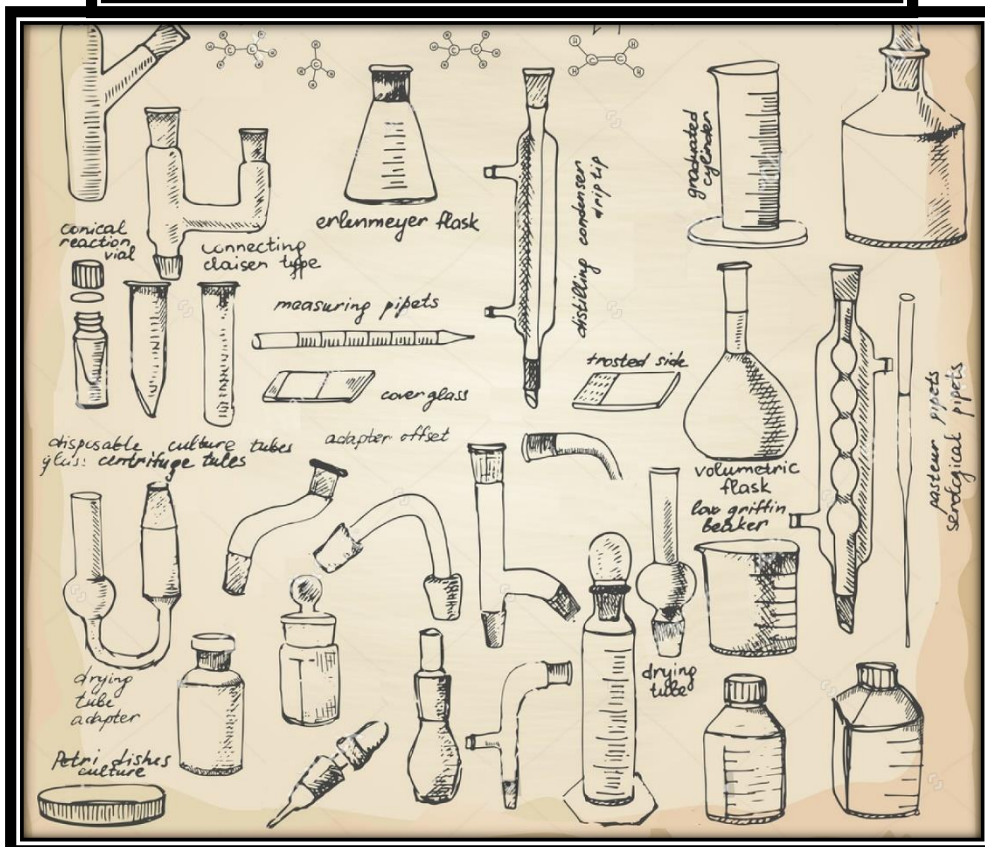
Η δράση των κυκλοπεπτιδικών αλκαλοειδών στο κεντρικό νευρικό σύστημα έχει μελετηθεί εκτενώς. Εμφανίζουν ηρεμιστικές ιδιότητες, καθώς είναι αποτελεσματικοί αναστολείς της μέσω της καλμοδουλίνης ενεργοποίησης της Ca<sup>2+</sup> ATPάσης και της φωσφοδιεστεράσης (Morel *et al.*, 2009). Μία άλλη οδός, μέσω της οποίας ενδέχεται να εμφανίζουν τη δράση τους, είναι η αύξηση εισροής ιόντων χλωρίου, η οποία έχει αποδειχτεί ότι βελτιώνει την ποιότητα του ύπνου που έχει προκληθεί σε πειραματόζωα από τη χρήση πεντοβαρβιτάλης (Ma *et al.*, 2008).

Άλλες δράσεις, οι οποίες έχουν αναφερθεί για ορισμένα κυκλοπεπτιδικά αλκαλοειδή, είναι η αντιδιαβητική μέσω της αναστολής της  $\alpha$ -γλυκοσιδάσης, η αντιπλάσμωνδιακή και η διεγερτική του ανοσοποιητικού συστήματος (Gournelis *et al.*, 1997; Tan & Zhou, 2006; El-Seedi *et al.*, 2007; Tuenter *et al.*, 2016).

## 2 Πειραματικό μέρος

PERIODIC TABLE OF THE ELEMENTS  
TABLE IV. PERIODIQUE DES ELEMENTS

Zn







## 2.1 Υλικά και Μέθοδοι

### 2.1.1 Διαλύτες

Για τις χρωματογραφικές αναλύσεις με την τεχνική της HPLC χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθοι διαλύτες υψηλής καθαρότητας: νερό (H<sub>2</sub>O), μεθανόλη (MeOH), κυκλοεξάνιο (c-Hex), οξικός αιθυλεστέρας (EtOAc) και ισοπροπανόλη (i-PrOH).

Πριν χρησιμοποιηθούν οι διαλύτες στην HPLC διηθήθηκαν υπό κενό από μικρόπορα φίλτρα και απαερώθηκαν σε λουτρό υπερήχων.

Για τις λοιπές χρωματογραφικές διαδικασίες χρησιμοποιήθηκαν οι εξής διαλύτες: κυκλοεξάνιο, δικλωρομεθάνιο (DCM), χλωροφόρμιο (CHCl<sub>3</sub>) οξικός αιθυλεστέρας, διαιθυλαιθέρας, μεθανόλη και απεσταγμένο H<sub>2</sub>O.

### 2.1.2 Προσροφητικές ρητίνες τύπου XAD (Rohm & Haas)

Για την προσρόφηση σε ρητίνες τεχνολογίας XAD χρησιμοποιήθηκαν στήλες με διαστάσεις 60cm ύψος x 1.6cm διάμετρος και πορώδες 0. Οι ρητίνες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν XAD-4 και XAD-7HP. Ο διαλύτης έκπλυσης ήταν το απεσταγμένο H<sub>2</sub>O, ενώ ο διαλύτης αποδέσμευσης η μεθανόλη.

### 2.1.3 Χρωματογραφικά αντιδραστήρια

Τα χρωματογραφήματα TLC παρατηρήθηκαν αρχικά στο υπεριώδες φως (254nm, 366nm). Στη συνέχεια οι TLC ψεκάστηκαν με το ακόλουθο μίγμα αντιδραστηρίων A + B:

Διάλυμα A: Βανιλίνη 5% σε μεθανόλη,

Διάλυμα B: π. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5% σε μεθανόλη

Ίσοι όγκοι των αντιδραστηρίων A και B αναμείχθηκαν λίγο πριν τον ψεκασμό και τα χρωματογραφήματα εμφανίσθηκαν με θέρμανση για 2 λεπτά σε υψηλή θερμοκρασία (> 100 °C).

### 2.1.4 Χρωματογραφικές μέθοδοι

#### 2.1.4.1 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας

Οι πλάκες που χρησιμοποιήθηκαν έφεραν:

- Γέλη οξειδίου του πυριτίου με δείκτη φθορισμού σε φύλλα αλουμινίου 20 x 20cm. Πάχος στιβάδας 0.1mm (silica gel 60 F<sub>254</sub>, E. Merck, Germany) (αναλυτική χρωματογραφία).
- Γέλη οξειδίου του πυριτίου με δείκτη φθορισμού σε γυάλινες πλάκες 20 x 10 cm και 20 x 20cm. Πάχος στιβάδας 0.5mm (silica gel 60 F<sub>254</sub>, E. Merck, Germany) (παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας).

#### 2.1.4.2 Υγρή χρωματογραφία στήλης υπό κενό

- Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε γέλη πυριτίου με κόκκους διαμέτρου 63-200 $\mu\text{m}$ . Το δείγμα τοποθετήθηκε με τη χρήση γέλης πυριτίου 'Silica gel 60' με διάμετρο κόκκων 0.2-0.5mm. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκαν οργανικοί διαλύτες κατάλληλης πολικότητας.
- Όσον αφορά τη διαδικασία SPE, χρησιμοποιήθηκαν ήδη πληρωμένες στήλες C-18 χωρητικότητας 6ml. Πριν τη χρήση τους έγινε εξισορρόπηση με κατάλληλα συστήματα διαλυτών.

#### 2.1.4.3 Υγρή-υγρή εκχύλιση

Οι εκχυλίσεις υγρού-υγρού έγιναν σε διαχωριστικές χοάνες κατάλληλου κατά περίπτωση μεγέθους. Κάθε φορά η κατανομή των ουσιών στις δύο φάσεις έγινε με ανακίνηση της διαχωριστικής χοάνης και αναμονή κάποιων λεπτών ώστε να επιτευχθεί η ισορροπία.

#### 2.1.4.4 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

Η διάταξη που χρησιμοποιήθηκε είναι της Thermo Finnigan και αποτελείται από τα ακόλουθα μέρη:

- Αντλία SpectraSystem P4000, με την ικανότητα ανάμειξης τεσσάρων διαφορετικών διαλυτών, σε οποιαδήποτε αναλογία,
- Απαερωτής (degasser) SpectraSystem 1000,
- Αυτόματος δειγματολήπτης SpectraSystem AS3000
- Ανιχνευτής φωτοδιόδων (PDA) SpectraSystem UV6000LP.

Οι χρωματογραφικές στήλες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής:

- Αναλυτική στήλη αντίστροφης φάσης SUPELCO C-18, 5 $\mu\text{m}$  με διαστάσεις 25cm x 4.6mm για τον ποιοτικό έλεγχο των πολικών κλασμάτων
- Ημιπαρασκευαστική στήλη αντίστροφης φάσης Fortis C-18, 5 $\mu\text{m}$  με διαστάσεις 250 x 10mm για την επεξεργασία των μειγμάτων από τα πολικά κλάσματα
- Ημιπαρασκευαστική στήλη κανονικής φάσης MZ PerfectSil, 5 $\mu\text{m}$  με διαστάσεις 250 x 10mm για την απομόνωση των άπολων μορίων

### 2.1.5 Φασματοσκοπικές μέθοδοι

#### 2.1.5.1 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

Η λήψη των φασμάτων πρωτονίου  $^1\text{H-NMR}$ , όπως και φασμάτων δύο διαστάσεων COSY (Correlation Spectroscopy), HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence), HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence) έγινε σε φασματογράφους Bruker DRX 400 και Bruker Avance III 600 (400MHz και 600MHz, αντίστοιχα για το  $^1\text{H}$ ). Οι χημικές μετατοπίσεις ( $\delta$ ) είναι εκφρασμένες σε ppm, ενώ οι σταθερές σύζευξης ( $J$ ) σε Hz. Η πολλαπλότητα των κορυφών

εκφράζεται ως *s* (απλή), *brs* (ευρεία απλή), *d* (διπλή), *t* (τριπλή), *q* (τετραπλή), *dd* (διπλή-διπλή), *dt* (διπλή-τριπλή), *ddd* (διπλή- διπλή- διπλή-διπλή), *td* (τριπλή διπλή), και *m* (πολλαπλή), ενώ ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε για την λήψη των φασμάτων ήταν το δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl<sub>3</sub>) και η δευτεριωμένη μεθανόλη (MeOD).

#### 2.1.5.2 Φασματομετρία μάζας

Η λήψη των φασμάτων μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας έγινε σε φασματογράφο μάζας ESI-LTQ Orbitrap Discovery XL (Thermo Scientific, Γερμανία). Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν ακετονιτρίλιο (ACN) κατάλληλο για ανάλυση σε φασματογράφο μάζας. Η ανάλυση έγινε με απευθείας έγχυση των απομονωμένων ουσιών στο φασματογράφο. Η μέθοδος παραγωγής των αρνητικών μοριακών ιόντων ήταν ο Ηλεκτροψεκασμός (ESI(-)).

## 2.2 Πορεία φυτοχημικής ανάλυσης

### 2.2.1 Τόπος και χρόνος συλλογής

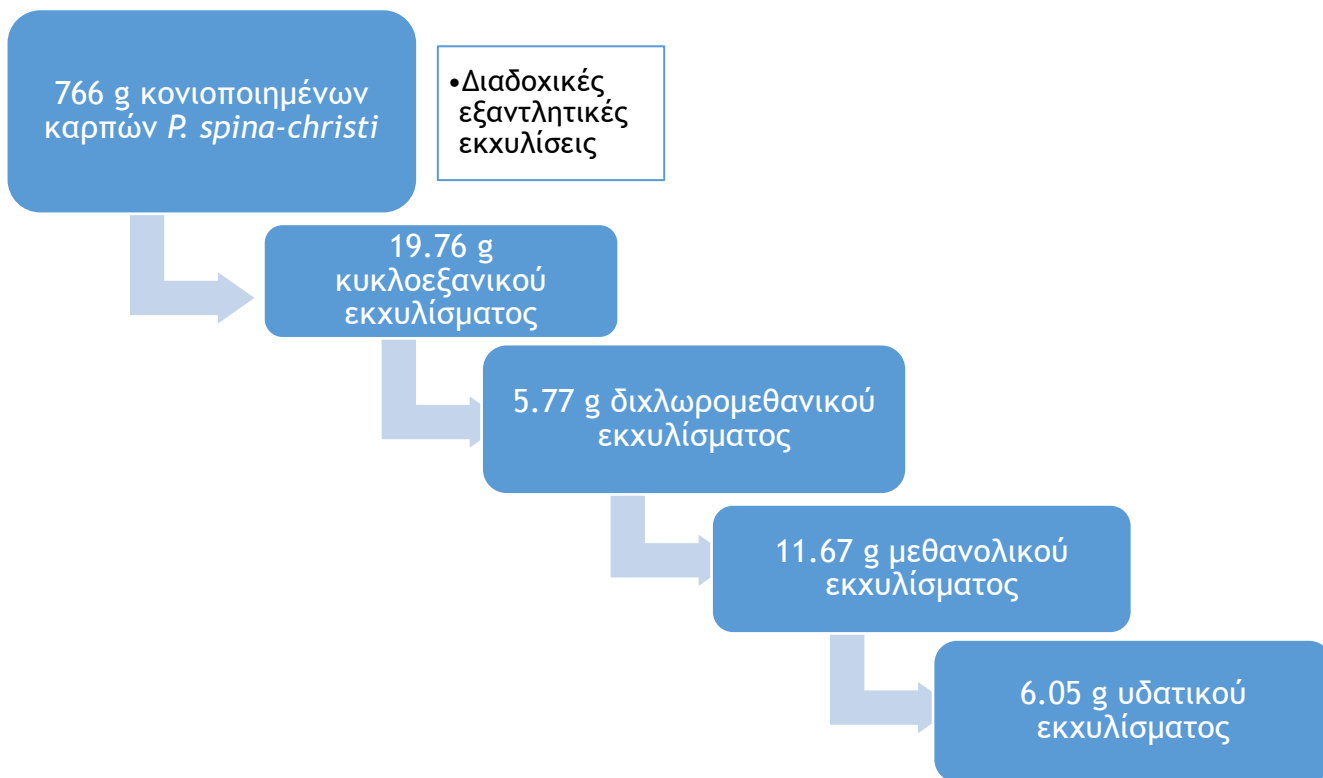
Οι ώριμοι καρποί του φυτού *Paliurus spina-christi* συλλέχθηκαν το Νοέμβριο του 2015 από την Τριάδα Μίγα και την οικογένειά της στην περιοχή της Δαφνοσπηλιάς Καρδίτσας.

### 2.2.2 Φυτοχημική μελέτη

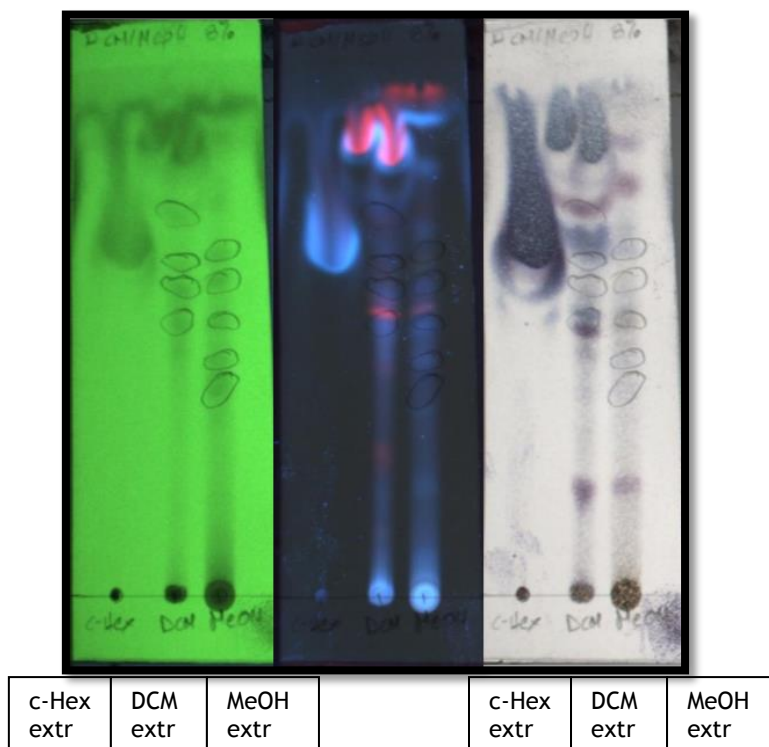
Καρποί βάρους 766 g μετά την κονιοποίηση τους εκκυλίστηκαν διαδοχικά με τους διαλύτες: (i) κυκλοεξάνιο (c-Hex) για την απομάκρυνση των λιπαρών συστατικών, (ii) διχλωρομεθάνιο (DCM) για την παραλαβή των άπολων, (iii) μεθανόλη (MeOH) για την παραλαβή των μέσης και μεγαλύτερης πολικότητας συστατικών και (iv) απεσταγμένο H<sub>2</sub>O για την παραλαβή των πολικών συστατικών (Εικόνα 31). Οι εκκυλίσεις έγιναν με την κλασική μέθοδο της διαβροχής, ενώ κάθε εκκύλιση πραγματοποιήθηκε εις διπλούν χρησιμοποιώντας 3L διαλύτη τη φορά και η διάρκεια της κάθε εκκύλισης ήταν μία μέρα. Όλες οι εκκυλίσεις έλαβαν χώρα υπό συνεχή ανάδευση. Στη συνέχεια, τα υγρά εκκυλίσματα συλλέχθηκαν και οι διαλύτες απομακρύνθηκαν με εξάτμιση υπό ελαττωμένη πίεση σε συσκευή Rotavapor R-114 Buchi, οπότε προέκυψαν οι παρακάτω ποσότητες ξηρών εκκυλισμάτων:

- 19.76 g κίτρινου, ελαιώδους κυκλοεξανικού εκκυλίσματος
- 5.77 g κίτρινου, ελαιώδους διχλωρομεθανικού εκκυλίσματος
- 11.67 g σκούρου καφέ, κολλώδους μεθανολικού εκκυλίσματος
- 6.05 g σκούρου καφέ, κολλώδους υδατικού εκκυλίσματος

Κατά τον χρωματογραφικό έλεγχο των εκκυλισμάτων με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας κανονικής φάσης (NP-TLC), στον οποίο χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ανάπτυξης DCM/MeOH σε αναλογία 92/8 (Εικόνα 32), παρατηρήθηκε πως το κυκλοεξανικό και το διχλωρομεθανικό εκκύλισμα περιείχαν μεγάλη ποσότητα λιπιδίων, ενώ το μεθανολικό και το υδατικό εκκύλισμα επιλέχθηκαν για περαιτέρω επεξεργασία, καθώς διαπιστώθηκε πως είχαν το πιο ενδιαφέρον φυτοχημικό προφίλ.



Εικόνα 31: Σχηματική απεικόνιση της εκκύλισης των καρπών του *P. spina-christi*



Εικόνα 32: Χρωματογραφικός έλεγχος των εκκυλισμάτων των καρπών του *P. spina-christi* μετά από ανάπτυξη σε DCM/MeOH 92/8, παρατήρηση στα 254 nm & 366 nm και εμφάνιση με το αντιδραστήριο θειικής Βανιλίνης

### 2.2.3 Κατεργασία του μεθανολικού εκχυλίσματος

Από το χρωματογραφικό έλεγχο με NP-TLC διαπιστώθηκε ότι, παρά την προηγούμενη εκχύλιση με *c*-Hex και DCM, παρελήφθησαν λιπαρά συστατικά στο μεθανολικό εκχύλισμα. Επίσης, κατά την περαιτέρω κατεργασία του εκχυλίσματος με μεθανόλη διαπιστώθηκε η παρουσία αδιάλυτου ιζήματος. Για το λόγο αυτό κρίθηκε σημαντική η κλασμάτωση 6.92 g του εκχυλίσματος με μία σειρά από διαδοχικές υγρές-υγρές εκχυλίσεις (L.L.E.).

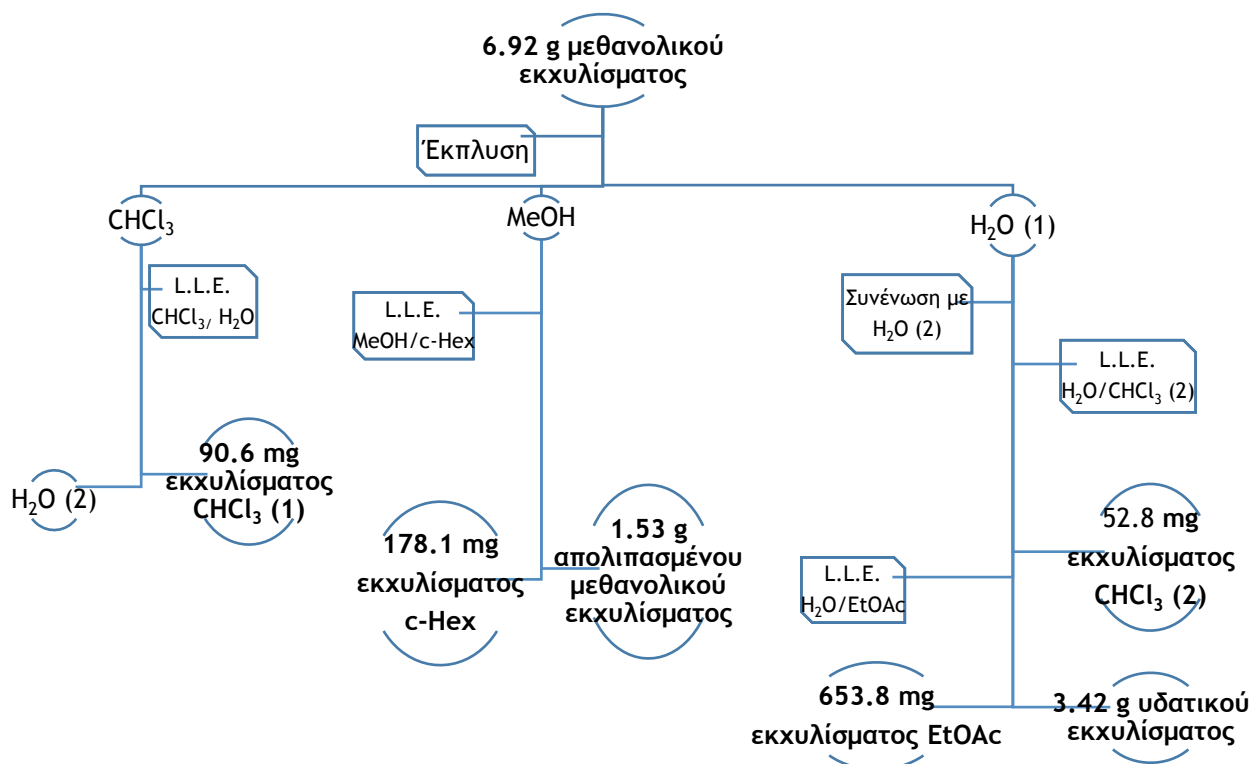
Αρχικά στο συμπυκνωμένο μέχρι ξηρού εκχύλισμα έγινε έκπλυση με χλωροφόρμιο ( $\text{CHCl}_3$ ). Μετά την απομάκρυνση του  $\text{CHCl}_3$  με διήθηση ακολούθησε επεξεργασία του υπολείμματος με μεθανόλη (MeOH), ενώ μετά από διήθηση το ίζημα που παρέμεινε διαλύθηκε (υδατικό-1). Στο  $\text{CHCl}_3$  κλάσμα πραγματοποιήθηκε υγρή-υγρή εκχύλιση με απεσταγμένο  $\text{H}_2\text{O}$  (υδατικό-2) (back-extraction), το οποίο στη συνέχεια συνενώθηκε με το υδατικό-1. Αντίστοιχα, στο μεθανολικό κλάσμα έγινε υγρή-υγρή εκχύλιση με κυκλοεξάνιο (*c*-Hex) (back-extraction), ενώ στο υδατικό κλάσμα έγινε υγρή-υγρή εκχύλιση με  $\text{CHCl}_3$  ( $\text{CHCl}_3$ -2) (back-extraction). Λόγω δημιουργίας γαλακτώματος μεταξύ των δύο στιβάδων προστέθηκε NaCl μέχρι κορεσμού της υδατικής στιβάδας. Στη συνέχεια έγινε εκ νέου υγρή-υγρή εκχύλιση της υδατικής στιβάδας με οξικό αιθυλεστέρα (EtOAc) (back-extraction) (Εικόνα 33).

Με αυτή τη διαδικασία παραλήφθηκαν τα κλάσματα που φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 7).

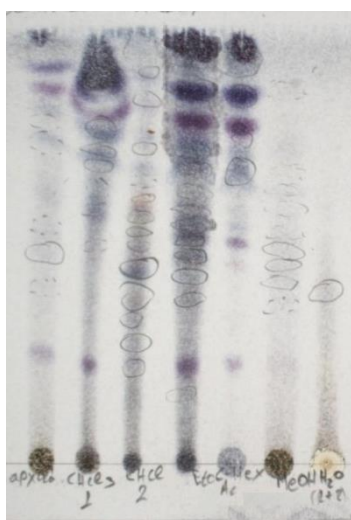
Πίνακας 7: Τα κλάσματα που παραλήφθηκαν από το μεθανολικό εκχύλισμα με υγρές-υγρές εκχυλίσεις και οι ποσότητές τους

| Κλάσμα  | Ποσότητα (g) |
|---|--------------|
| $\text{CHCl}_3$ (1) (L.L.E.)                          | 0.091        |
| $\text{CHCl}_3$ (2) (L.L.E.)                          | 0.053        |
| <i>c</i> -Hex (L.L.E.)                                | 0.178        |
| EtOAc (L.L.E.)  | 0.654        |
| $\text{H}_2\text{O}$ (L.L.E.) (υδατικό-1 + υδατικό-2) | 3.420        |
| MeOH (L.L.E.)   | 1.530        |

Μετά από χρωματογραφικό έλεγχο με TLC (Εικόνα 34), ο οποίος πραγματοποιήθηκε με σύστημα ανάπτυξης DCM/MeOH 92/8, καθώς και την αξιολόγηση των φασμάτων  $^1\text{H-NMR}$  που ελήφθησαν στα προαναφερόμενα εκχυλίσματα, επιλέχθηκαν τα κλάσματα του EtOAc (L.L.E.) και του  $\text{H}_2\text{O}$  (L.L.E.) για περαιτέρω επεξεργασία.



Εικόνα 33: Σχηματική απεικόνιση της επεξεργασίας του μεθανολικού εκχυλίσματος με διαδοχικές υγρές-υγρές εκχυλίσεις



Εικόνα 34: TLC πλάκα με τα κλάσματα από τη διαδικασία υγρής-υγρής εκχύλισης του εκχυλίσματος της μεθανόλης μετά από ψεκασμό με θειική βανιλίνη και θέρμανση. Από αριστερά προς τα δεξιά: Αρχικό εκχύλισμα μεθανόλης, CHCl<sub>3</sub> (1), CHCl<sub>3</sub> (2), EtOAc, c-Hex, MeOH, H<sub>2</sub>O (1+2)

### 2.2.3.1 Κατεργασία του κλάσματος EtOAc (L.L.E.)

Το κλάσμα του EtOAc (L.L.E.), το οποίο προέκυψε από το μεθανολικό εκχύλισμα των καρπών με υγρή - υγρή εκχύλιση, υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης υπό κενό (VLC1). Όλη η ποσότητα (653.8 mg) προστέθηκε σε στήλη πορώδους 4, πληρωμένη με στατική φάση από silica gel 60H (0.04-0.06mm). Ακολούθησε βαθμιδωτή έκλουση με το σύστημα διαλυτών που φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 8).

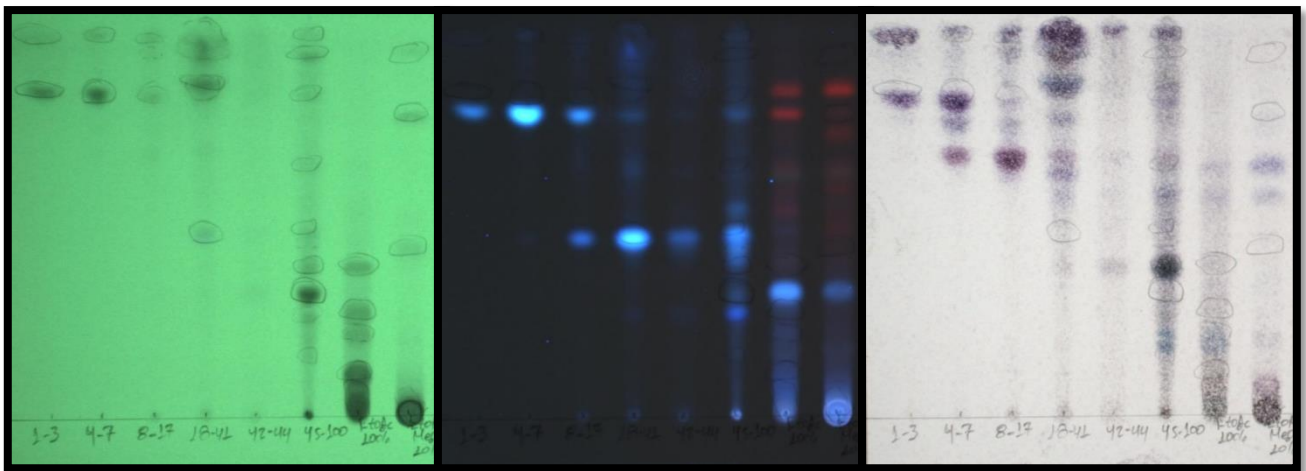
Πίνακας 8: Σύστημα διαλυτών κινητής φάσης που χρησιμοποιήθηκε για τη VLC1

| Σύστημα διαλυτών<br>κινητής φάσης | Αναλογία (%) | Όγκος (ml) |
|-----------------------------------|--------------|------------|
| c-Hex/EtOAc                       | 95/5         | 150        |
| c-Hex/EtOAc                       | 90/10        | 850        |
| EtOAc                             | 100          | 500        |
| EtOAc/MeOH                        | 90/10        | 500        |
| EtOAc/MeOH                        | 85/15        | 500        |

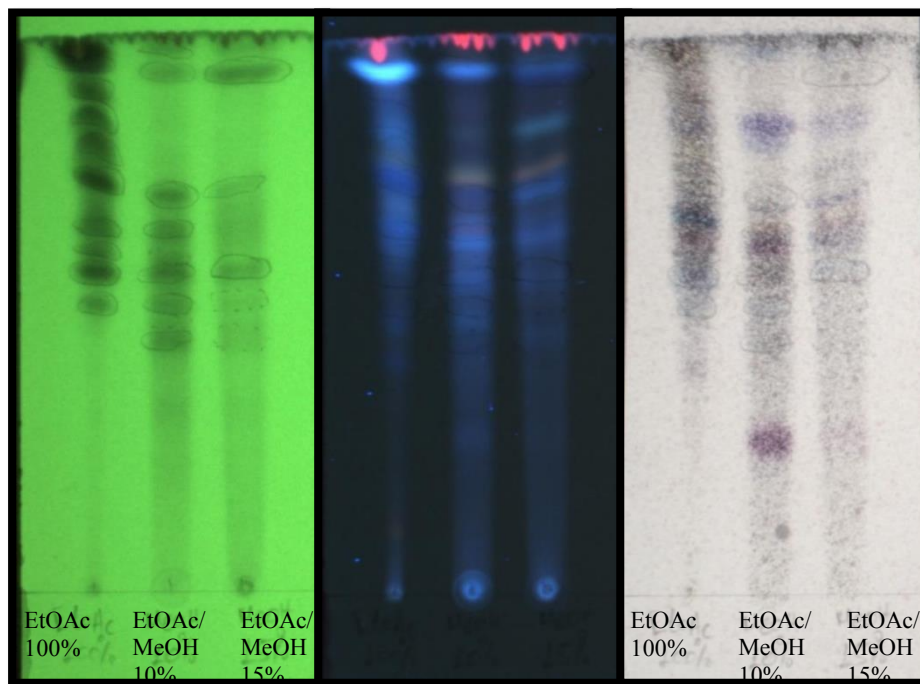
Συνολικά παραλήφθηκαν 102 κλάσματα, τα οποία μετά από χρωματογραφικό έλεγχο με TLC (με συστήματα ανάπτυξης c-Hex/EtOAc 60/40 και DCM/MeOH 92/8) (Εικόνα 35 και 36) συνενώθηκαν όπως φαίνεται παρακάτω:

- Κλάσμα 1-3: 154.2 mg
- Κλάσμα 4-7: 22.3 mg
- Κλάσμα 8-17: 29.9 mg
- Κλάσμα 18-41: 117.5 mg
- Κλάσμα 42-44: 3.4 mg
- Κλάσμα 45-100: 12.8 mg
- Κλάσμα EtOAc 100%: 59.2 mg
- Κλάσμα EtOAc/MeOH: 114.4 mg





Εικόνα 35: Συγκεντρωτική πλάκα TLC με τα συνενωμένα κλάσματα από τη VLC1 μετά από ανάπτυξη σε *c*-Hex.EtOAc 60/40, παρατήρηση στα 254 nm & 366 nm και εμφάνιση με το αντιδραστήριο θειικής βανιλίνης



Εικόνα 36: TLC πλάκα με τα τελευταία κλάσματα από τη VLC1 μετά από ανάπτυξη σε DCM/MeOH 92/8, παρατήρηση στα 254 nm & 366 nm και μετά από εμφάνιση με το αντιδραστήριο θειικής βανιλίνης

### 2.2.3.2 Χρωματογραφικός έλεγχος και επεξεργασία των κλάσμάτων από τη VLC1 του κλάσματος EtOAc (L.L.E.)

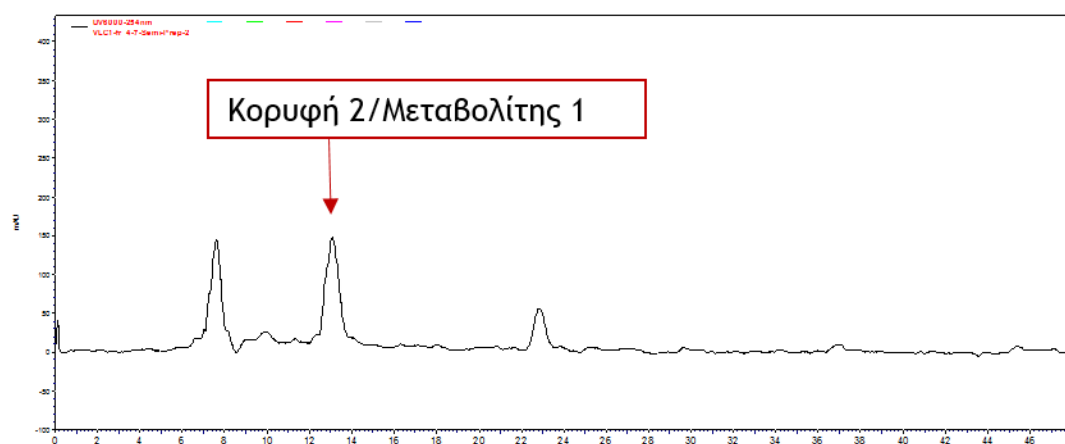
#### 2.2.3.2.1 Επεξεργασία του κλάσματος VLC1\_4-7

Το κλάσμα VLC1\_4-7 (22.3mg) υποβλήθηκε σε ημιπαρασκευαστική (semi-Prep) υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης κανονικής φάσης (NP-HPLC), ενώ η μέθοδος έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε φαίνεται ακολούθως:

| Χρόνος (min) | c-Hex (%) | EtOAc (%) | Ταχύτητα ροής (ml/min) |
|--------------|-----------|-----------|------------------------|
| 0            | 80        | 20        | 2                      |
| 60           | 80        | 20        | 2                      |

Επίσης, χρησιμοποιήθηκε η διάταξη Thermo-Finnigan και ημιπαρασκευαστική στήλη MZ PerfectSil με μέγεθος σωματιδίων 5 μm και διαστάσεις 250 mm x 10 mm i.d. Τα μήκη κύματος UV, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των εκλουόμενων ουσιών, ήταν 230, 254 και 280 nm, αν και η χρήση του ανιχνευτή πολλαπλής διόδου (PDA) επιτρέπει τη λήψη ολόκληρου του φάσματος UV-Vis (200 nm - 700 nm).

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν κατά τις αναλύσεις ήταν καθαρότητας HPLC και διηθούνταν πριν την χρήση από μικρόπορα φίλτρα. Για την απαέρωση των διαλυτών χρησιμοποιήθηκε ειδικός απαερωτής συνδεδεμένος με το LC-σύστημα. Στο χρωματογράφημα από την ανάλυση του δείγματος



Εικόνα 37: Χρωματογράφημα του κλάσματος VLC1\_4-7 στα 254nm

(Εικόνα 37) εμφανίστηκαν τρεις κορυφές και παραλήφθηκαν τα αντίστοιχα κλάσματα, τα οποία ελέγχθηκαν με τη λήψη φασμάτων πρωτονίου  $^1\text{H-NMR}$ . Το φάσμα της κορυφής 2 (1.6 mg) παρουσίασε μεγάλο ενδιαφέρον και μετά από τη λήψη φασμάτων δύο διαστάσεων ταυτοποιήθηκε ο μεταβολίτης 1 (βλ. 2.2.3.3.1). Οι υπόλοιπες κορυφές του χρωματογραφήματος διαπιστώθηκε ότι αντιστοιχούν σε μείγματα δύο ή περισσότερων ουσιών.

#### 2.2.3.2.2 Επεξεργασία του κλάσματος VLC-1\_8-17

Το κλάσμα VLC1\_8-17 χρωματογραφήθηκε με παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Prep-TLC). Πιο συγκεκριμένα, 20 mg του κλάσματος τοποθετήθηκαν με τη χρήση της συσκευής Linomat-5 (Camag) σε γυάλινη πλάκα διαστάσεων 20 x 20 cm με επίστρωση πυριτίου (Silica gel 60 F254-Merck). Ως διαλύτες ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκαν c-Hex/EtOAc 70/30. Στις χρωματογραφικές πλάκες εμφανίστηκαν κατά την παρατήρηση στη λάμπα UV πέντε ζώνες. Επίσης, μετά από ψεκασμό με θειική βανιλίνη και θέρμανση παρατηρήθηκε μία ακόμη ζώνη. Μετά από την απόξεση και την εκχύλιση με σύστημα διαλυτών EtOAc/MeOH 90/10 όλων των παρατηρούμενων ζωνών, παραλήφθηκαν οι αντίστοιχες ουσίες και ακολούθησε η λήψη φασμάτων <sup>1</sup>H-NMR. Τα δείγματα που προήλθαν από τις ζώνες A και C, μελετήθηκαν περαιτέρω με τη λήψη φασμάτων NMR δύο διαστάσεων και ταυτοποιήθηκαν ο μεταβολίτης 2 (1.3 mg) και ο μεταβολίτης 3 (7.3 mg), αντίστοιχα (βλ. 2.2.3.3.2 και 2.2.3.3.3).

#### 2.2.3.2.3 Επεξεργασία του κλάσματος VLC-1\_45-100

Το κλάσμα VLC-1\_45-100 (12.8 mg) χρωματογραφήθηκε με παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Prep-TLC), η οποία πραγματοποιήθηκε σε γυάλινη πλάκα διαστάσεων 20 x 20 cm με επίστρωση πυριτίου (Silica gel 60 F254-Merck). Ως σύστημα ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκε το μίγμα διαλυτών c-Hex/EtOAc 60/40. Κατά την παρατήρηση στο UV παρατηρήθηκε μία ζώνη, ενώ μετά από ψεκασμό με θειική βανιλίνη και θέρμανση παρατηρήθηκαν τέσσερις ακόμη ζώνες. Μετά από την απόξεση και την εκχύλιση όλων των ζωνών με σύστημα διαλυτών EtOAc/MeOH 90/10, παραλήφθηκαν οι αντίστοιχες ουσίες και ελήφθησαν τα φάσματα <sup>1</sup>H-NMR. Από τη μελέτη των φασμάτων διαπιστώθηκε ότι η ουσία της ζώνης A ήταν ταυτόσημη με το μεταβολίτη 2 (βλ. 2.2.3.2.2), ενώ στο δείγμα της ζώνης B φάνηκε να περιέχεται μία ουσία (1.1 mg) που μετά από τη λήψη φασμάτων ταυτοποιήθηκε ως ο μεταβολίτης 4 (βλ. 2.2.3.3.4).

#### 2.2.3.2.4 Επεξεργασία του κλάσματος VLC-1\_EtOAc 100%

Το κλάσμα VLC-1\_EtOAc 100% χρωματογραφήθηκε με παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Prep-TLC). Πιο συγκεκριμένα, ποσότητα 20mg του κλάσματος τοποθετήθηκαν με τη βοήθεια του Linomat-5 (Camag) σε γυάλινη πλάκα διαστάσεων 20 x 10 cm με επίστρωση πυριτίου (Silica gel 60 F254-Merck). Ως σύστημα ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκε μίγμα διαλυτών DCM/MeOH 92/8, ενώ η διαδικασία επαναλήφθηκε ακόμη δύο φορές. Στις χρωματογραφικές πλάκες εμφανίστηκαν κατά την παρατήρηση στο UV τέσσερις ευρείες ζώνες. Μετά την απόξεση και την εκχύλιση όλων των ζωνών με σύστημα διαλυτών EtOAc/MeOH 90/10, παραλήφθηκαν οι αντίστοιχες ουσίες. Από τη μελέτη των φασμάτων <sup>1</sup>H-NMR που ελήφθησαν στα δείγματα όλων των ζωνών, επιλέχθηκαν αυτά που προήλθαν από τις ζώνες C και D για

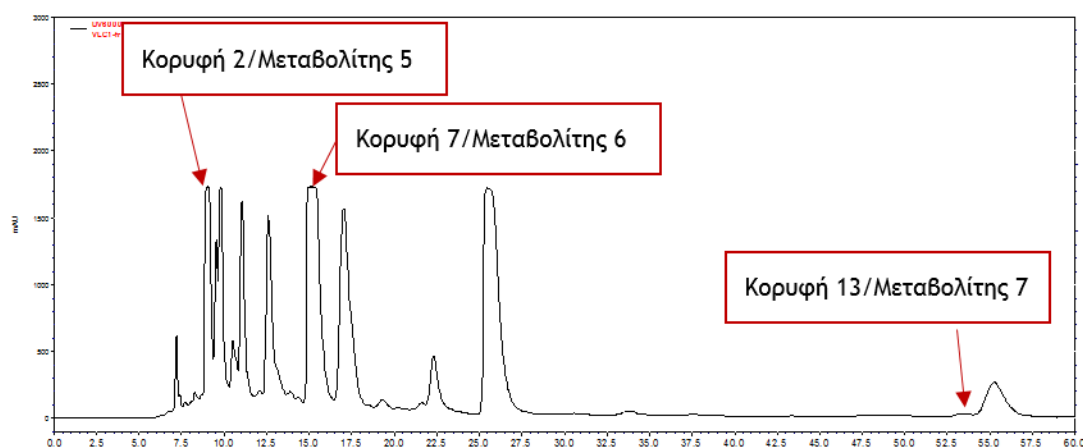
περαιτέρω επεξεργασία.

#### 2.2.3.2.4.1 Επεξεργασία του δείγματος της ζώνης C

Το δείγμα της ζώνης C (9.3 mg) υποβλήθηκε σε semi-Prep υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης κανονικής φάσης (NP-HPLC) με την ισοκρατική μέθοδο που φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

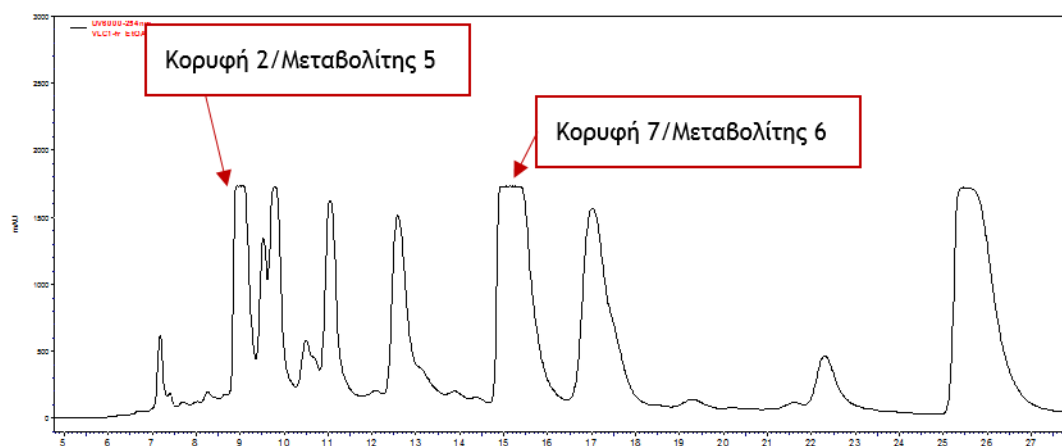
| Χρόνος (min) | c-Hex (%) | i-PrOH (%) | Ταχύτητα ροής (ml/min) |
|--------------|-----------|------------|------------------------|
| 0            | 85        | 15         | 2                      |
| 60           | 85        | 15         | 2                      |

Επίσης, χρησιμοποιήθηκε η διάταξη Thermo-Finnigan και ημιπαρασκευαστική στήλη MZ PerfectSil με μέγεθος σωματιδίων 5  $\mu\text{m}$  και διαστάσεις 250 mm x 10 mm i.d. Η ανίχνευση των εκλουόμενων ουσιών έγινε σε μήκη κύματος 230, 254 και 280 nm, ενώ παράλληλα η χρήση του ανιχνευτή πολλαπλής διόδου (PDA) επέτρεψε τη λήψη ολόκληρου του φάσματος UV-Vis (200 nm - 700 nm).



Εικόνα 38: Χρωματογράφημα HPLC της ζώνης C στα 254nm

Στο χρωματογράφημα από την ανάλυση του δείγματος (Εικόνα 38 και 39) εμφανίστηκαν δεκατέσσερις κορυφές, οι οποίες συλλέχθηκαν και ελήφθησαν φάσματα  $^1\text{H-NMR}$ . Στα δείγματα των κορυφών 5, 7 και 13 πραγματοποιήθηκε λήψη φασμάτων δύο διαστάσεων και τελικά ταυτοποιήθηκαν ο μεταβολίτης 5 (2.1 mg), ο μεταβολίτης 6 (2.4 mg) και ο μεταβολίτης 7 (2.3 mg), αντίστοιχα (βλ. 2.2.3.3.5, 2.2.3.3.6 και 2.2.3.3.7). Τα δείγματα που προήλθαν από τις υπόλοιπες ζώνες διαπιστώθηκε ότι αποτελούσαν μείγματα 2 ή περισσότερων ουσιών.



Εικόνα 39: Μεγέθυνση του χρωματογραφήματος HPLC της ζώνης C στα 254nm

#### 2.2.3.2.4.2 Επεξεργασία του δείγματος της ζώνης D

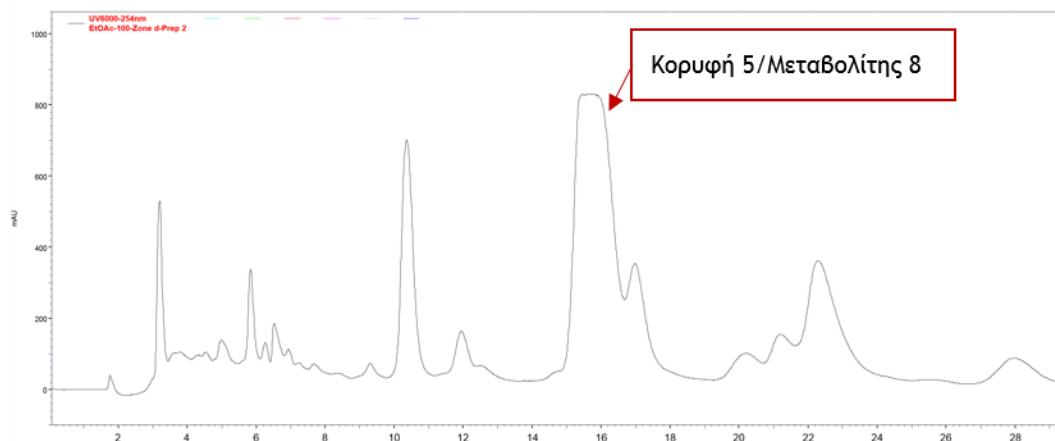
Η ζώνη **D** (3.6 mg) υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης κανονικής φάσης (NP-HPLC) με την μέθοδο που φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

| Χρόνος (min) | c-Hex (%) | EtOAc (%) | Ταχύτητα ροής (ml/min) |
|--------------|-----------|-----------|------------------------|
| 0            | 60        | 40        | 1                      |
| 60           | 60        | 40        | 1                      |

Επίσης, χρησιμοποιήθηκε η διάταξη Thermo-Finnigan και ημιπαρασκευαστική στήλη MZ PerfectSil με μέγεθος σωματιδίων 5  $\mu\text{m}$  και διαστάσεις 250 mm x 10 mm i.d. Η ανίχνευση των εκκλυόμενων ουσιών έγινε σε μήκη κύματος 230, 254 και 280 nm, ενώ παράλληλα η χρήση του ανιχνευτή πολλαπλής διόδου (PDA) επέτρεψε τη λήψη ολόκληρου του φάσματος UV-Vis (200 nm - 700 nm). Από τη διαδικασία παραλήφθηκε η κορυφή 5 (Εικόνα 40), η οποία μετά τη λήψη και μελέτη των φασμάτων δύο διαστάσεων ταυτοποιήθηκε ως ο **μεταβολίτης 8** (0.5 mg) (βλ. 2.2.3.3.8).

#### 2.2.3.2.5 Επεξεργασία του κλάσματος VLC-1\_EtOAc/MeOH

Το κλάσμα VLC-1\_EtOAc/MeOH χρωματογραφήθηκε με παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Prep-TLC) για περαιτέρω κλασμάτωσή του. Πιο συγκεκριμένα, ποσότητα 20 mg του κλάσματος τοποθετήθηκε με τη βοήθεια του Linomat-5 (Camag) σε γυάλινη πλάκα διαστάσεων 20 x 10 cm με επίστρωση πυριτίου (Silica gel 60 F254-Merck). Ως σύστημα ανάπτυξης



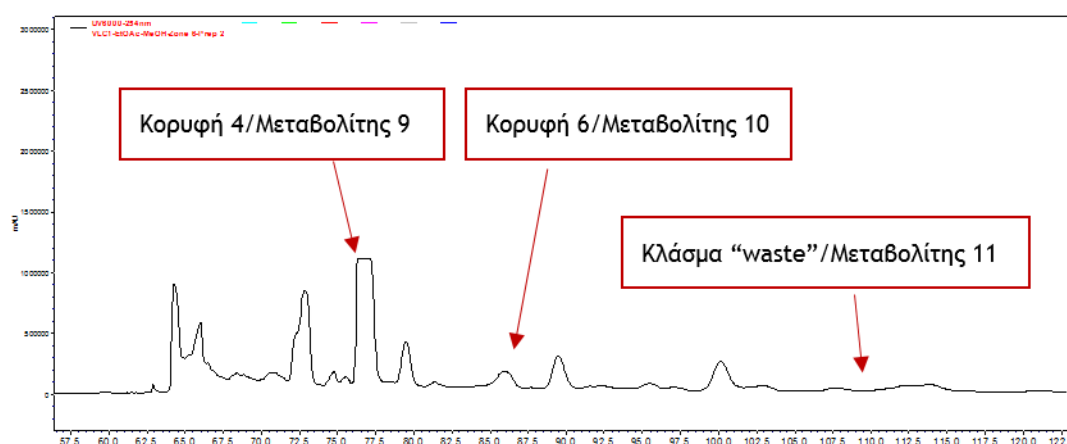
Εικόνα 40: Χρωματογράφημα HPLC της ζώνης D στα 254nm

χρησιμοποιήθηκε το μίγμα διαλυτών DCM/MeOH 92/8. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε ακόμη πέντε φορές. Στις χρωματογραφικές πλάκες εμφανίστηκαν κατά την παρατήρηση στο UV τέσσερις ευρείες ζώνες. Μετά από απόξεση και εκκύλιση όλων των ζωνών με σύστημα διαλυτών EtOAc/MeOH 90/10, παραλήφθηκαν οι αντίστοιχες ουσίες. Από τη μελέτη των φασμάτων <sup>1</sup>H-NMR όλων των δειγμάτων, επιλέχθηκε το δείγμα της ζώνης 6 για περαιτέρω επεξεργασία.

### 2.2.3.2.5.1 Επεξεργασία του δείγματος της ζώνης 6

Το δείγμα της ζώνης 6 (14.2 mg) υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης κανονικής φάσης (NP-HPLC) με την μέθοδο που φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

| Χρόνος (min) | c-Hex (%) | EtOAc (%) | Ταχύτητα ροής (ml/min) |
|--------------|-----------|-----------|------------------------|
| 0            | 75        | 25        | 1                      |
| 60           | 75        | 25        | 1                      |



Εικόνα 41: Χρωματογράφημα HPLC της ζώνης 6 στα 254nm

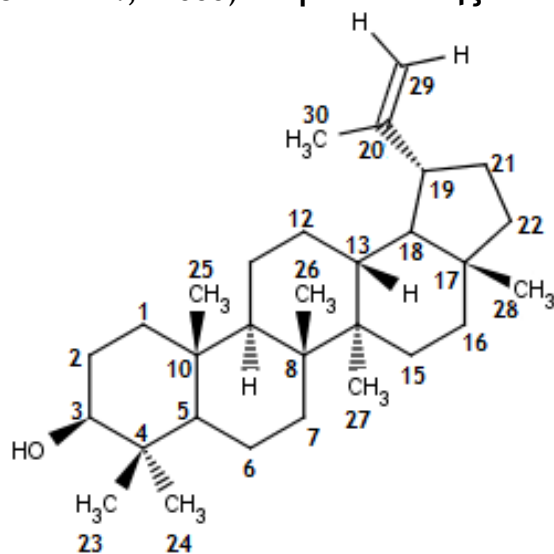
Επίσης, χρησιμοποιήθηκε η διάταξη Thermo-Finnigan και ημιπαρασκευαστική

στήλη MZ PerfectSil με μέγεθος σωματιδίων 5 μm και διαστάσεις 250 mm x 10 mm i.d. Η ανίχνευση των εκλούμενων ουσιών έγινε σε μήκη κύματος 230, 254 και 280 nm, ενώ παράλληλα η χρήση του ανιχνευτή πολλαπλής διόδου (PDA) επέτρεψε τη λήψη ολόκληρου του φάσματος UV-Vis (200 nm - 700 nm). Κατά την προαναφερόμενη διαδικασία συλλέχθηκαν 8 κορυφές, από τις οποίες μετά τη φασματοσκοπική μελέτη με τη λήψη φασμάτων <sup>1</sup>H-NMR επιλέχθηκαν οι ζώνες 4, 6 και “waste” για περαιτέρω μελέτη (Εικόνα 41). Οι ουσίες των προαναφερόμενων δειγμάτων μετά από μελέτη φασμάτων δύο διαστάσεων ταυτοποιήθηκαν ως ο μεταβολίτης 9 (1.5mg), ο μεταβολίτης 10 (1.1 mg) και ο μεταβολίτης 11 (3.9 mg), αντίστοιχα (βλ. 2.2.3.3.9, 2.2.3.3.10 και 2.2.3.3.11).

### 2.2.3.3 Φασματοσκοπική μελέτη απομονωμένων ουσιών

#### 2.2.3.3.1 Μεταβολίτης 1

Ο μεταβολίτης 1 απομονώθηκε από το κλάσμα 4-7 της VLC1 του κλάσματος EtOAc (L.L.E.) του μεθανολικού εκχυλίσματος (βλ. 2.2.3.2.1). Η απομόνωσή του πραγματοποιήθηκε με ημιπαρασκευαστική χρωματογραφία NP-HPLC και η δομή του (Εικόνα 42) προσδιορίστηκε με τη λήψη φασμάτων 1D και 2D NMR (Εικόνα 43 και 44) σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl<sub>3</sub>). Μετά από τη μελέτη των φασμάτων και τη σύγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα (Pereira *et al.*, 1996; Burns *et al.*, 2000) ο μεταβολίτης 1 ταυτοποιήθηκε ως λουπεόλη.



Εικόνα 42: Η δομή του μεταβολίτη 1 (λουπεόλη)

Τα τριτερπένια τύπου λουπανίου παρουσιάζουν χαρακτηριστικά σήματα στο φάσμα <sup>1</sup>H NMR, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται τα ακόλουθα:

- Τα δύο ‘germinal’ πρωτόνια του εξωμεθυλενικού διπλού δεσμού συντονίζονται στα 4-5 ppm και εμφανίζονται το ένα ως μια διπλή κορυφή ( $J = 1-2\text{Hz}$ ) και το άλλο ως πολλαπλή κορυφή (εξαιτίας της σύζευξης με τα μεθυλικά πρωτόνια της θέσης 30), αν δεν υπάρχει κάποια οξειδωση ή άλλη υποκατάσταση στον C-30
- Η μετατόπιση του ολεφινικού μεθυλίου CH<sub>3</sub>-30
- Οι μετατοπίσεις των υπόλοιπων 6 μεθυλίων του μορίου που συντονίζονται στην αλειφατική περιοχή και εμφανίζονται όλες ως απλές κορυφές, καθώς βρίσκονται σε τεταρτοταγείς άνθρακες
- Η διπλή διπλή κορυφή στα 3.20 ppm περίπου, η οποία αντιστοιχεί στο H-3 και δείχνει την παρουσία υδροξυλίου στον C-3, αν δεν έχει οξειδωθεί σε κετόνη ή αν δεν υπάρχει κάποια άλλη υποκατάσταση (π.χ. ακετόξυ- ή μεθόξυ- ομάδα)

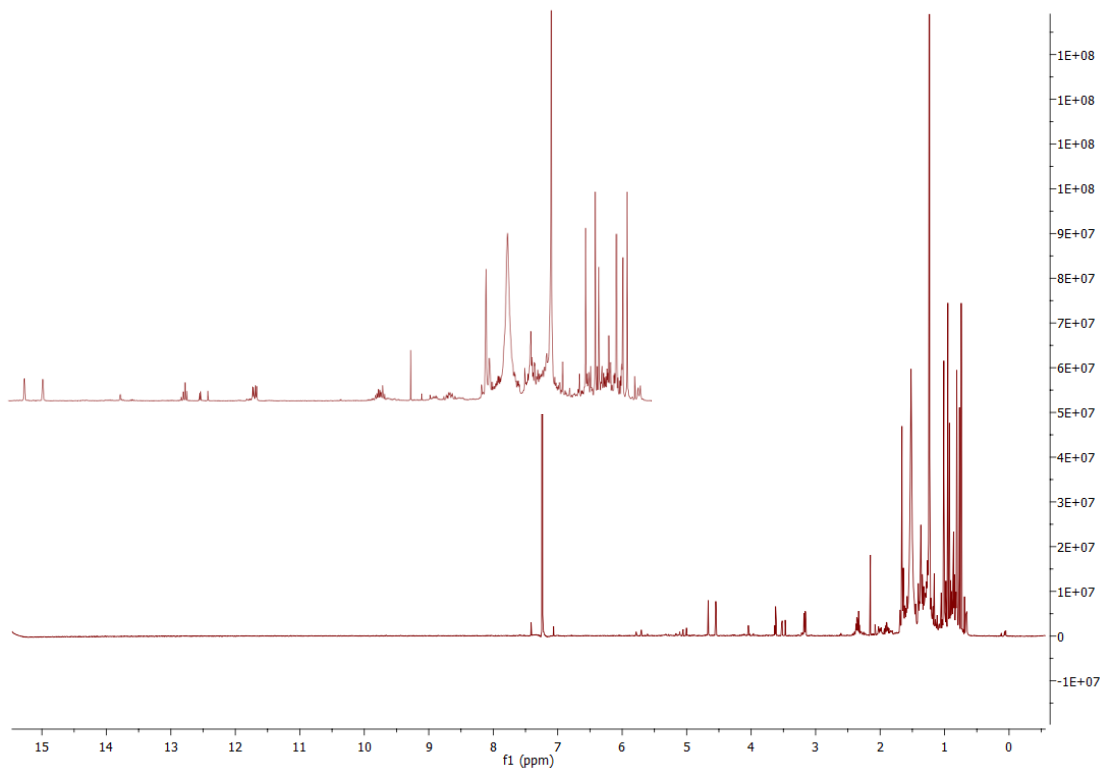


Από την ανάλυση των φασμάτων 1D και 2D του μεταβολίτη-1 παρατηρήθηκαν τα ακόλουθα:

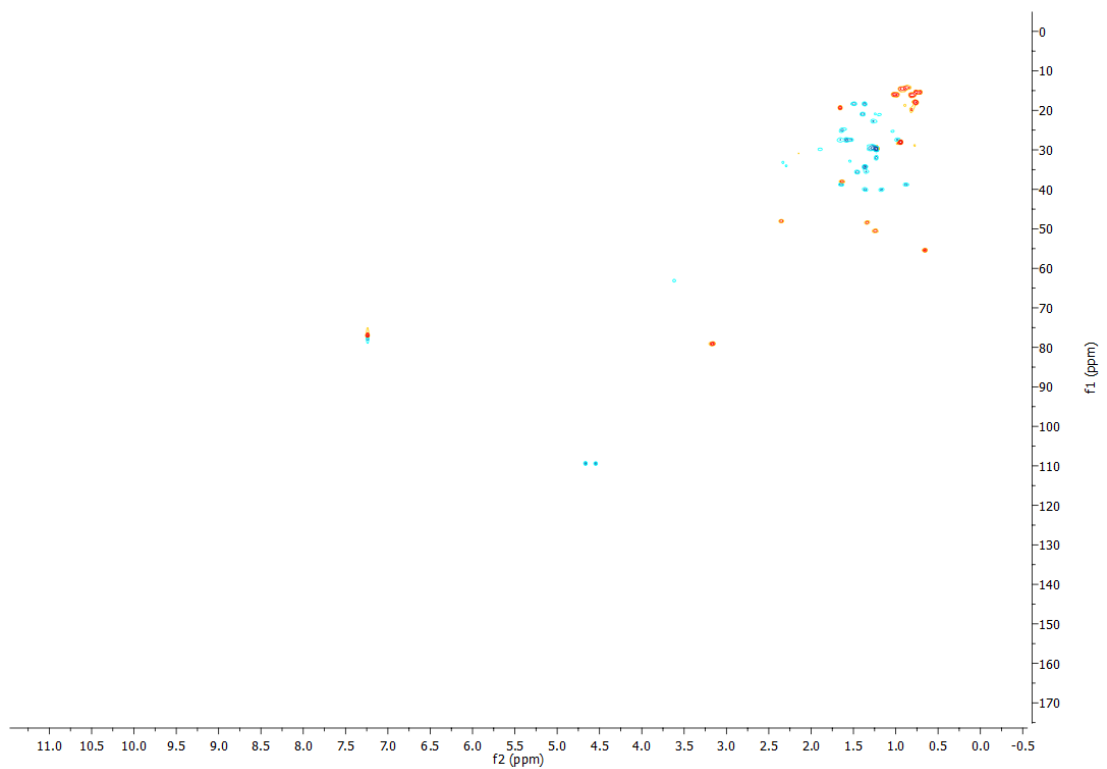
- Στην ολεφινική περιοχή και συγκεκριμένα στα 4.67 και 4.55 ppm παρατηρούμε δύο κορυφές που ολοκληρώνουν για 1H η κάθε μία και αποδίδονται στα H-29a και H-29b του εξωμεθυλενικού διπλού δεσμού. Μαζί με το ολεφινικό μεθύλιο που συντονίζεται στα 1.66ppm (H-30) συμπληρώνουν τις χημικές μετατοπίσεις της ισοπροπενυλικής αλυσίδας που συνδέεται με τον πενταμελή δακτύλιο E, η οποία αποτελεί χαρακτηριστικό δομικό στοιχείο των λουπανικών τριτερπενίων
- Στην οξυγονωμένη περιοχή και συγκεκριμένα στα 3.17 ppm παρατηρούμε μία διπλή διπλών κορυφή με  $J = 11.4/4.9\text{Hz}$ , η οποία ολοκληρώνει για 1H και αντιστοιχεί στο H-3
- Στην αλειφατική περιοχή παρατηρούμε έξι απλές κορυφές που ολοκληρώνουν για τρία πρωτόνια η κάθε και αντιστοιχούν στα πρωτόνια των μεθυλίων που συνδέονται σε τεταρτοταγείς άνθρακες. Οι χημικές μετατοπίσεις αυτών των μεθυλίων συμφωνούν με τις αντίστοιχες τιμές της βιβλιογραφίας

Με τη βοήθεια του φάσματος HSQC-DEPT προσδιορίσαμε όλες τις υπόλοιπες χημικές μετατοπίσεις των μεθυλενικών και μεθινικών πρωτονίων και των ανθράκων τους, τα οποία είναι σε αντιστοίχιση με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας (Pereira *et al.*, 1996; Burns *et al.*, 2000; Prakash & Prakash, 2012), καθώς και με τα σήματα των αντίστοιχων πρωτονίων του μεταβολίτη 11 (βλ. 2.2.3.3.11).

Στον παρακάτω πίνακα περιλαμβάνονται τα δεδομένα των φασμάτων  $^1\text{H-NMR}$  και  $^{13}\text{C-NMR}$  του μεταβολίτη 1.



Εικόνα 43: Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR του μεταβολίτη 1 σε  $\text{CDCl}_3$ . Πάνω αριστερά φαίνεται μία μεγέθυνση του φάσματος



Εικόνα 44: Φάσμα  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC-DEPT του μεταβολίτη 1 σε  $\text{CDCl}_3$

Πίνακας 9: Φασματοσκοπικά δεδομένα της λουπεόλης

| Θέση | <sup>1</sup> H-NMR |                      | <sup>13</sup> C-NMR |
|------|--------------------|----------------------|---------------------|
|      | δ (ppm)            | Multiplicity, J (Hz) | δ (ppm)             |
| 1    | 0.88               | 1H, (ovlp)           | 38.7                |
|      | 1.64               | 1H, (ovlp)           |                     |
| 2    | 1.58               | 1H, (ovlp)           | 27.4                |
|      | 1.54               | 1H, (ovlp)           |                     |
| 3    | 3.17               | 1H, dd, J = 11.4/4.9 | 79.1                |
| 4    | -                  | -                    | n.d.                |
| 5    | 0.66               | 1H, d, J = 9.4       | 55.2                |
| 6    | 1.49               | 1H, (ovlp)           | 18.3                |
|      | 1.37               | 1H, (ovlp)           |                     |
| 7    | 1.37               | 2H, (ovlp)           | 34.3                |
| 8    | -                  | -                    | n.d.                |
| 9    | 1.24               | 1H, (ovlp)           | 50.5                |
| 10   | -                  | -                    | n.d.                |
| 11   | 1.39               | 1H, (ovlp)           | 20.9                |
|      | 1.19               | 1H, (ovlp)           |                     |
| 12   | 1.04               | 1H, (ovlp)           | 25.2                |
|      | 1.64               | 1H, (ovlp)           |                     |
| 13   | 1.64               | 1H, (ovlp)           | 38.0                |
| 14   | -                  | -                    | n.d.                |
| 15   | 0.98               | 1H, (ovlp)           | 27.5                |
|      | 1.66               | 1H, (ovlp)           |                     |
| 16   | 1.35               | 1H, (ovlp)           | 35.6                |
|      | 1.45               | 1H, (ovlp)           |                     |
| 17   | -                  | -                    | n.d.                |
| 18   | 1.34               | 1H, (ovlp)           | 48.4                |
| 19   | 2.35               | 1H, m                | 48.0                |
| 20   | -                  | -                    | n.d.                |
| 21   | 1.30               | 1H, (ovlp)           | 29.8                |

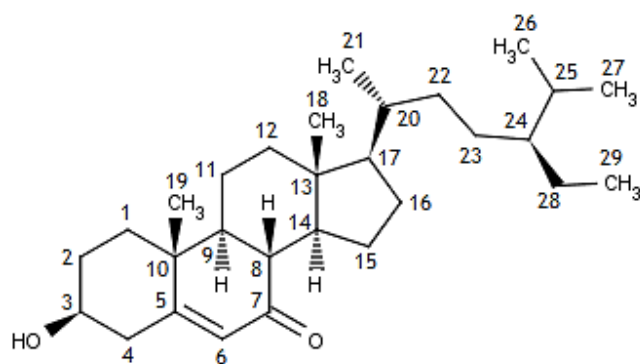
|    |      |                  |       |
|----|------|------------------|-------|
|    | 1.90 | 1H m             |       |
| 22 | 1.17 | 1H, (ονlp)       | 40.0  |
|    | 1.36 | 1H, (ονlp)       | 40.0  |
| 23 | 0.95 | 3H, s            | 28.0  |
| 24 | 0.74 | 3H, s            | 15.4  |
| 25 | 0.81 | 3H, s            | 16.1  |
| 26 | 1.01 | 3H, s            | 16.0  |
| 27 | 0.93 | 3H, s            | 14.6  |
| 28 | 0.77 | 3H, s            | 18.0  |
| 29 | 4.67 | 1H, d, $J = 2.2$ | 109.3 |
|    | 4.55 | 1H, m            |       |
| 30 | 1.66 | 3H, s            | 19.3  |

- (ονlp): Οι πολλαπλότητες και οι συζεύξεις δε διακρίνονται λόγω αλληλο-επικάλυψης των σημάτων που αντιστοιχούν σε αυτά τα πρωτόνια
- Οι χημικές μετατοπίσεις των διαστεροτοπικών μεθυλενικών πρωτονίων προσδιορίστηκαν με τη βοήθεια του φάσματος HSQC-DEPT. Η στερεοχημεία τους δεν περιλαμβάνεται
- n.d.: Οι τεταρτοταγείς άνθρακες δεν εντοπίστηκαν λόγω μη λήψης φάσματος HMBC

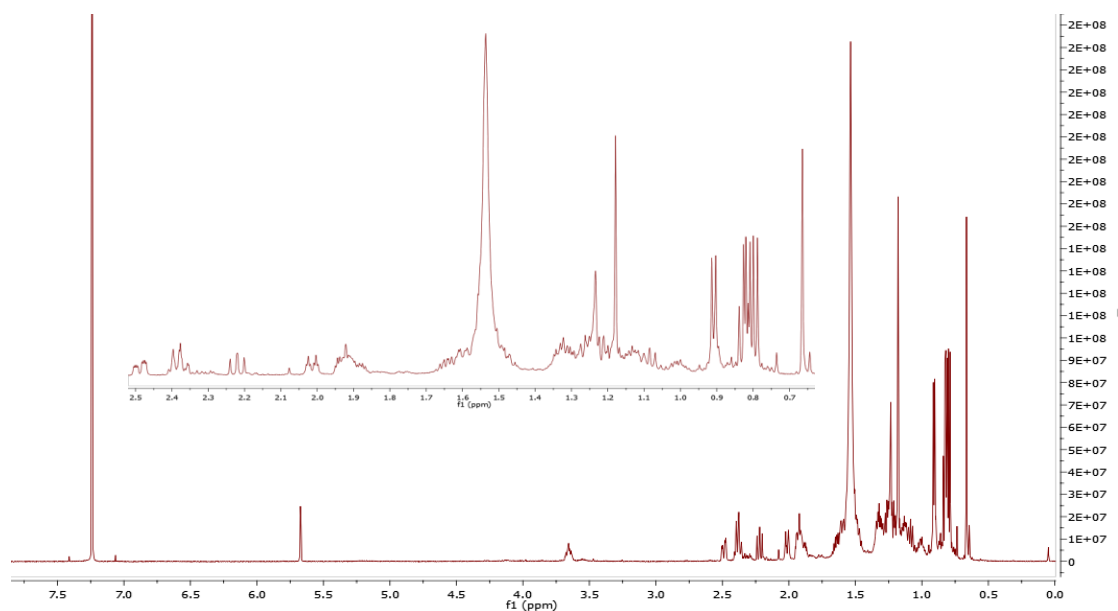
Η Λουπεόλη ( $M.T C_{30}H_{50}O$  και  $M_r = 426$  amu) απομονώνεται για πρώτη φορά από το είδος *Paliurus spina-christi*, ενώ πρόσφατα δημοσιεύτηκε η απομόνωσή της για πρώτη φορά από το γένος (Chen *et al.*, 2016). Έχουν αναφερθεί αρκετές βιολογικές δράσεις που σχετίζονται με τη λουπεόλη, όπως αντικαρκινική, αντιφλεγμονώδης, αντιπρωτοζωική και αντιμικροβιακή (Miles *et al.*, 1974; Miles & Kokpol, 1976; Bani *et al.*, 2006; Gallo & Sarachine, 2009).

### 2.2.3.3.2 Μεταβολίτης 2

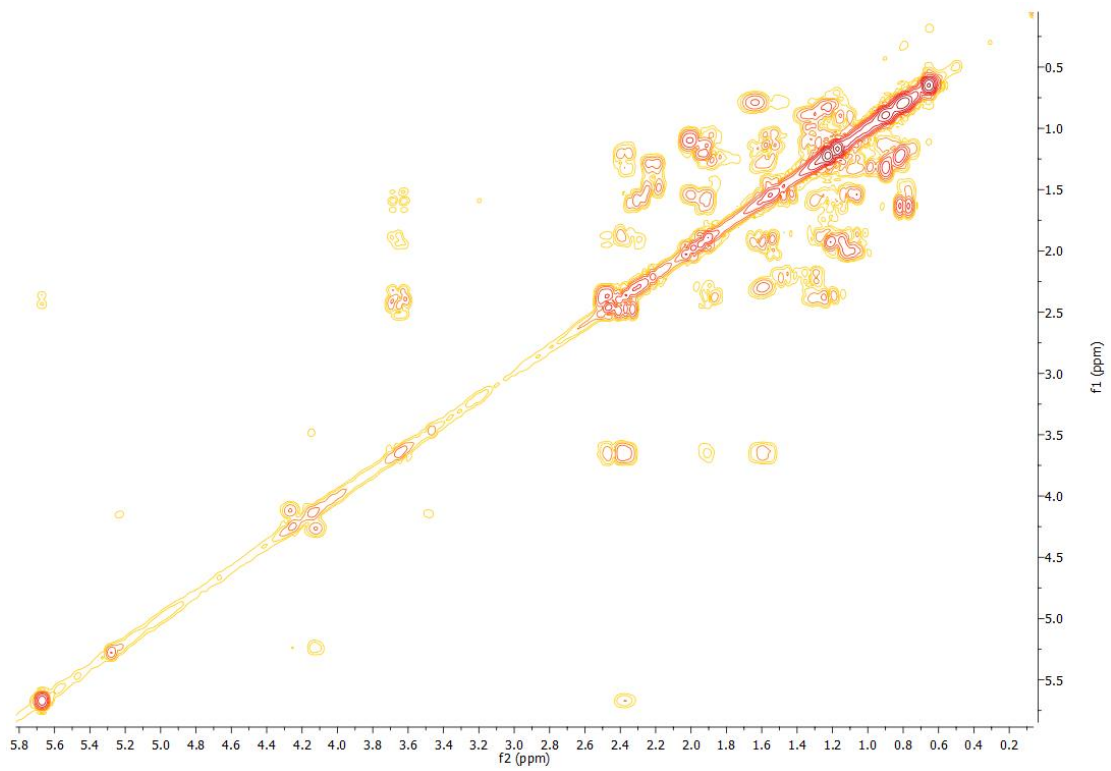
Ο μεταβολίτης 2 απομονώθηκε από τα κλάσματα 8-17 και 45-100 της VLC1 του κλάσματος EtOAc (L.L.E.) του μεθανολικού εκχυλίσματος με παρασκευαστική χρωματογραφία TLC (βλ. 2.2.3.2.2 και 2.2.3.2.3). Η δομή του μορίου (Εικόνα 45) προσδιορίστηκε με βάση τη μελέτη των φασμάτων NMR (Εικόνα 46-49), τα οποία ελήφθησαν σε διαλύτη δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl<sub>3</sub>), αλλά και μετά από σύγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα (Zhang, *et al.*, 2005; Gao *et al.*, 2013). Έτσι, ο μεταβολίτης 2 ταυτοποιήθηκε ως 7-κετοσιτοστερόλη ή 3β-υδροξυσιτοστ-5-εν-7-όνη.



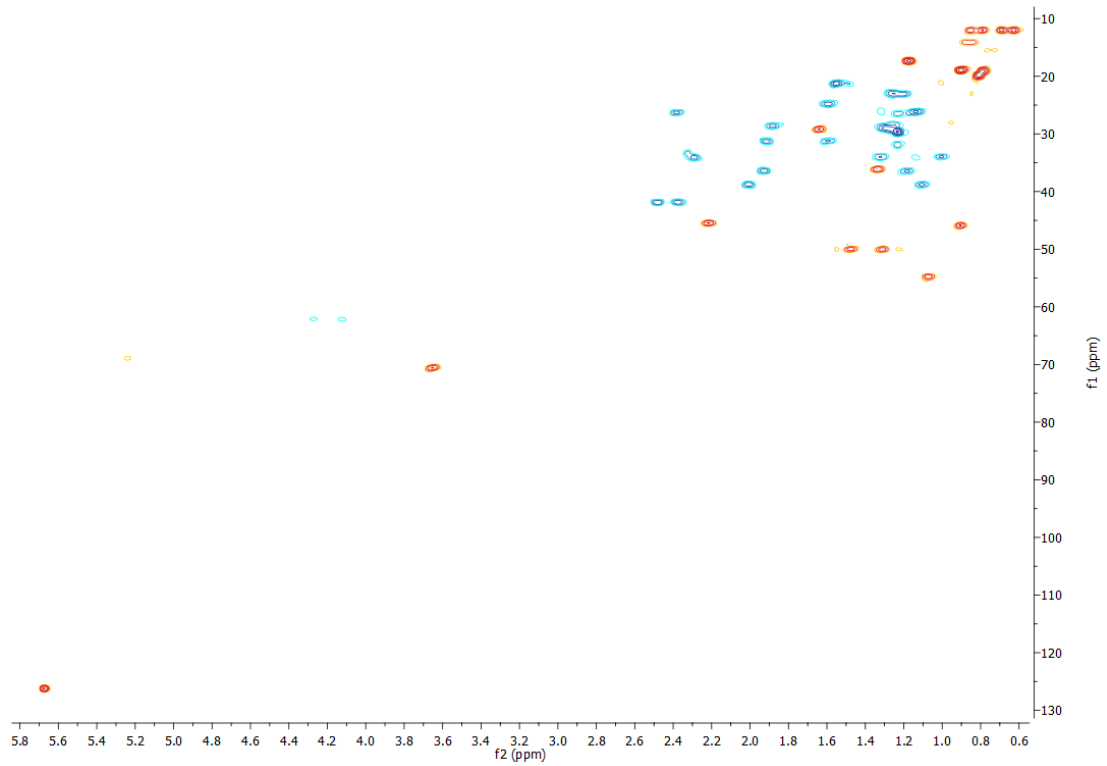
Εικόνα 45: Η δομή του μεταβολίτη 2 (7-κετοσιτοστερόλη)



Εικόνα 46: Φάσμα <sup>1</sup>H NMR του μεταβολίτη 2 σε CDCl<sub>3</sub>. Πάνω αριστερά φαίνεται μία μεγένθυση του φάσματος



Εικόνα 47: Φάσμα  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY του μεταβολίτη 2 σε  $\text{CDCl}_3$



Εικόνα 48: Φάσμα  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC-DEPT του μεταβολίτη 2 σε  $\text{CDCl}_3$



Εικόνα 49: Φάσμα  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC του μεταβολίτη 2 σε  $\text{CDCl}_3$

Πιο συγκεκριμένα κατά τη μελέτη των προαναφερόμενων φασμάτων παρατηρήσαμε τα ακόλουθα χαρακτηριστικά σήματα:

- Η πολλαπλή κορυφή 3.66 ppm, η οποία ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο, αντιστοιχεί στο μεθινικό πρωτόνιο της θέσεως 3 και είναι χαρακτηριστική της υδροξυλίωσης στην θέση C-3 του δακτυλίου A του στεροειδούς σκελετού και της παρουσίας τεσσάρων συνολικά πρωτονίων στις θέσεις 2 και 4. Από τις ομοπυρηνικές συζεύξεις ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY) του H-3, σε συνδυασμό με τις ετεροπυρηνικές συσχετίσεις του φάσματος HSQC, προσδιορίσαμε τις χημικές μετατοπίσεις των μεθυλενικών πρωτονίων και των ανθράκων στις θέσεις C-2 και C-4.
- Στην αλειφατική περιοχή του  $^1\text{H}$ NMR, εντοπίσαμε έξι σήματα μεθυλίων (κορυφές που ολοκλήρωναν για 3H), τα οποία διακρίνονται σε 2 απλές (0.66ppm, H<sub>3</sub>-18 και 1.18ppm, H<sub>3</sub>-19), τρεις διπλές (0.91ppm H<sub>3</sub>-21, 0.81ppm H<sub>3</sub>-26, 0.79ppm H<sub>3</sub>-27) και μία τριπλή (0.83ppm, H<sub>3</sub>-29). Το τελευταίο σήμα αποτέλεσε μια ακόμη ισχυρή ένδειξη για την ύπαρξη στεροειδικού σκελετού αφού τα μεθυλικά σήματα στα τριτερπένια είναι είτε απλές είτε διπλές κορυφές.
- Από τις ετεροπυρηνικές συσχετίσεις στο φάσμα HMBC του H<sub>3</sub>-19, προσδιορίσαμε τις μετατοπίσεις του τεταρτοταγούς  $\text{sp}^2$  C-5 (165.1ppm), του τεταρτοταγούς  $\text{sp}^3$  C-10 (38.2ppm), του μεθυλενικού  $\text{sp}^3$  C-1

(36.3ppm) και του μεθινικού  $sp^3$  C-9 (49.9ppm). Διακρίνοντας το μεθίλιο H-9, με την συνδυαστική μελέτη στη συνέχεια των φασμάτων  $^1H$ - $^1H$ -COSY και HSQC-DEPT, προσδιορίσαμε τις χημικές μετατοπίσεις των μεθινίων CH-8 και CH-14 καθώς και του μεθυλενίου CH<sub>2</sub>-11. Από τις κοινές HMBC συσχετίσεις των μεθυλίων H<sub>3</sub>-18 και H<sub>3</sub>-21 με μεθινικό άνθρακα συντονιζόμενο στα 54.8ppm, αφενός επιβεβαιώσαμε την χημική μετατόπιση του H<sub>3</sub>-21 (0.91ppm, d), αφετέρου προσδιορίσαμε και το τελευταίο μεθίλιο του συμπυκνωμένου τμήματος του μορίου, το CH-17 (1.07ppm / m και 54.8ppm).

Με τη συνδυαστική μελέτη των φασμάτων  $^1H$ - $^1H$ -COSY, HSQC-DEPT και HMBC, και κυρίως από τις ετεροπυρηνικές  $^3J_{CH}$  και  $^4J_{CH}$  συσχετίσεις των μεθυλικών πρωτονίων H-21, H-26, H-27 και H-29 με τους άνθρακες της πλευρικής αλυσίδας, αποδώσαμε όλα τα σήματα των ατόμων της αλυσίδας.

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται τα πρωτόνια και οι άνθρακες του μεταβολίτη 2

Πίνακας 10: Φασματοσκοπικά δεδομένα της 7-κετοσιτοστερόλης

| Θέση | $^1H$ -NMR     |                           | $^{13}C$ -NMR  |
|------|----------------|---------------------------|----------------|
|      | $\delta$ (ppm) | Multiplicity, J (Hz)      | $\delta$ (ppm) |
| 1    | 1.19           | 1H, (ovlp)                | 36.3           |
|      | 1.92           | 1H, (ovlp)                |                |
| 2    | 1.59           | 1H, (ovlp)                | 31.1           |
|      | 1.92           | 1H, (ovlp)                |                |
| 3    | 3.66           | 1H, m                     | 70.6           |
| 4    | 2.38           | 1H, m                     | 41.8           |
|      | 2.48           | 1H, ddd, J = 13.9/4.7/2.2 |                |
| 5    | -              | -                         | 165.1          |
| 6    | 5.67           | 1H, brd, J = 1.5          | 126.3          |
| 7    | -              | -                         | n.d.           |
| 8    | 2.21           | 1H, dd, J = 12.2/11.2     | 45.5           |
| 9    | 1.31           | 1H, m                     | 49.9           |
| 10   | -              | -                         | 38.2           |
| 11   | 1.59-1.49      | 2H, m                     | 21.2           |
| 12   | 1.10           | 1H, (ovlp)                | 38.5           |
|      | 2.00           | 1H, dt, J = 12.8/3.6      |                |



|    |           |                  |      |
|----|-----------|------------------|------|
| 13 | -         | -                | 42.7 |
| 14 | 1.47      | 1H, (ovlp)       | 49.9 |
| 15 | 1.13      | 1H, (ovlp)       | 26.1 |
|    | 2.38      | 1H, (ovlp)       |      |
| 16 | 1.28      | 1H, (ovlp)       | 28.6 |
|    | 1.88      | 1H, (ovlp)       |      |
| 17 | 1.07      | 1H, m            | 54.8 |
| 18 | 0.66      | 3H, s            | 12.0 |
| 19 | 1.18      | 3H, s            | 17.4 |
| 20 | 1.32      | 1H, m            | 36.1 |
| 21 | 0.91      | 3H, d, $J = 6.5$ | 19.0 |
| 22 | 1.00      | 1H, (ovlp)       | 34.0 |
|    | 1.32      | 1H, (ovlp)       |      |
| 23 | 1.13      | 1H, (ovlp)       | 26.3 |
|    | 1.32      | 1H, (ovlp)       |      |
| 24 | 0.90      | 1H, (ovlp)       | 45.9 |
| 25 | 1.63      | 1H, (ovlp)       | 29.2 |
| 26 | 0.81      | 3H, d, $J = 6.9$ | 19.8 |
| 27 | 0.79      | 3H, d, $J = 6.9$ | 19.1 |
| 28 | 1.32-1.20 | 2H, m            | 23.0 |
| 29 | 0.83      | 3H, t, $J = 7.4$ | 12.1 |

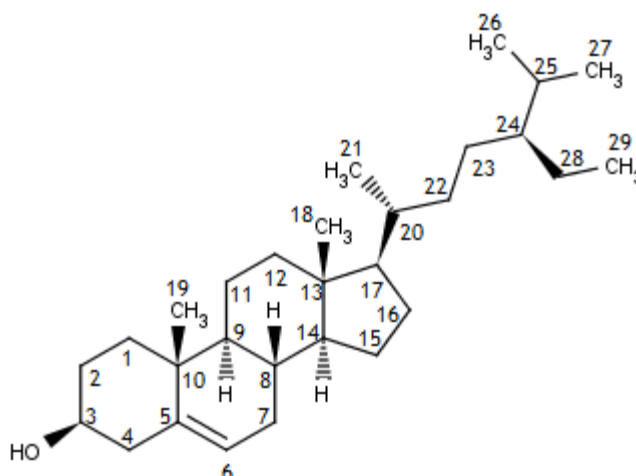
- (ovlp): Οι πολλαπλότητες και οι συζεύξεις δε διακρίνονται λόγω αλληλο-επικάλυψης των σημάτων που αντιστοιχούν σε αυτά τα πρωτόνια
- Οι χημικές μετατοπίσεις των διαστεροτοπικών μεθυλενικών πρωτονίων προσδιορίστηκαν με τη βοήθεια του φάσματος HSQC-DEPT. Η στερεοχημεία τους δεν περιλαμβάνεται
- n.d.: Οι τεταρτοταγείς άνθρακες δεν εντοπίστηκαν λόγω μη λήψης φάσματος HMBC

Η 3β-υδροξυ-β-σιτοστ-5-εν-7-όνη (Μ.Τ  $C_{29}H_{48}O_2$  και σχετική μοριακή μάζα  $M_r = 428$  amu) απομονώνεται για πρώτη φορά από το γένος *Paliurus*.

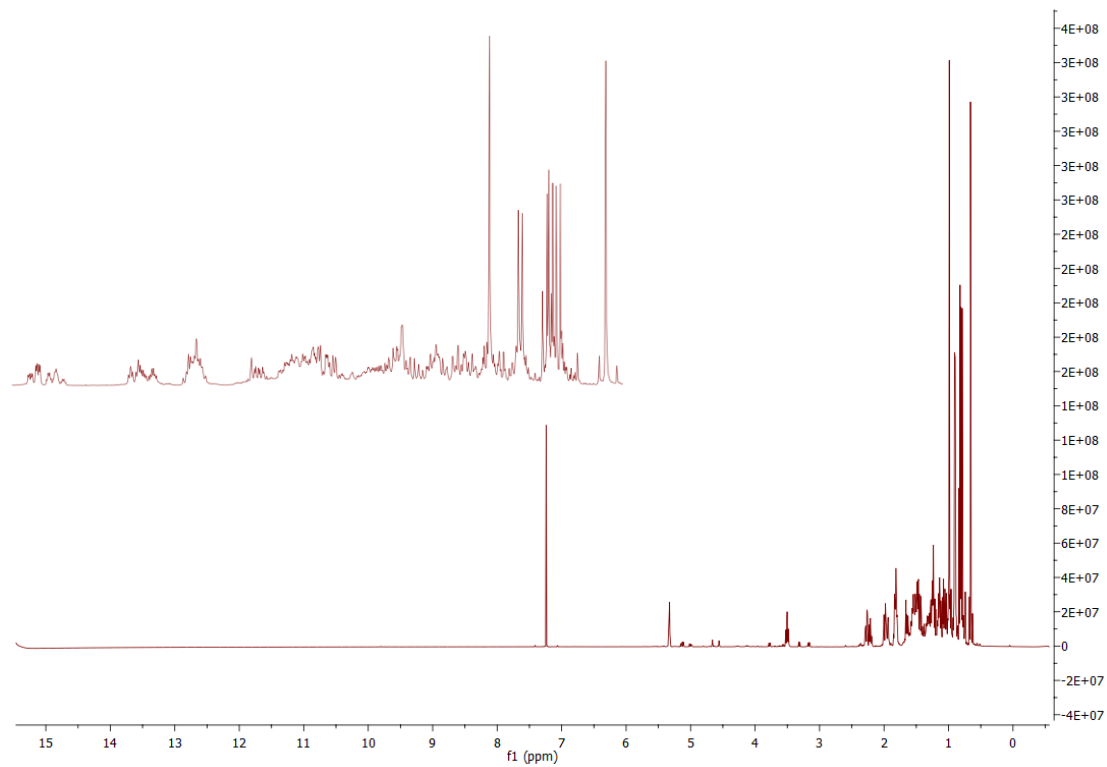
### 2.2.3.3.3 Μεταβολίτης 3

Ο μεταβολίτης 3 απομονώθηκε από το κλάσμα 8-17 της VLC1 του κλάσματος EtOAc (L.L.E.) του μεθανολικού εκχυλίσματος με παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Prep-TLC), η ανάπτυξη της οποίας έγινε με το σύστημα c-Hex/EtOAc 70/30 (βλ. 2.2.3.2.2). Η δομή της ένωσης (Εικόνα 50) προσδιορίστηκε με βάση τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR (Εικόνα 51-54) αλλά και τη σύγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα. Παρατηρώντας το φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του μεταβολίτη-3 και μετά την σύγκρισή του με το φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του μεταβολίτη-2, συμπεράναμε ότι πρόκειται για στεροειδές και μάλιστα με την ίδια πλευρική αλυσίδα, κυρίως συγκρίνοντας τις χημικές μετατοπίσεις και τις συζεύξεις των μεθυλίων, που ήταν σχεδόν ταυτόσημες.

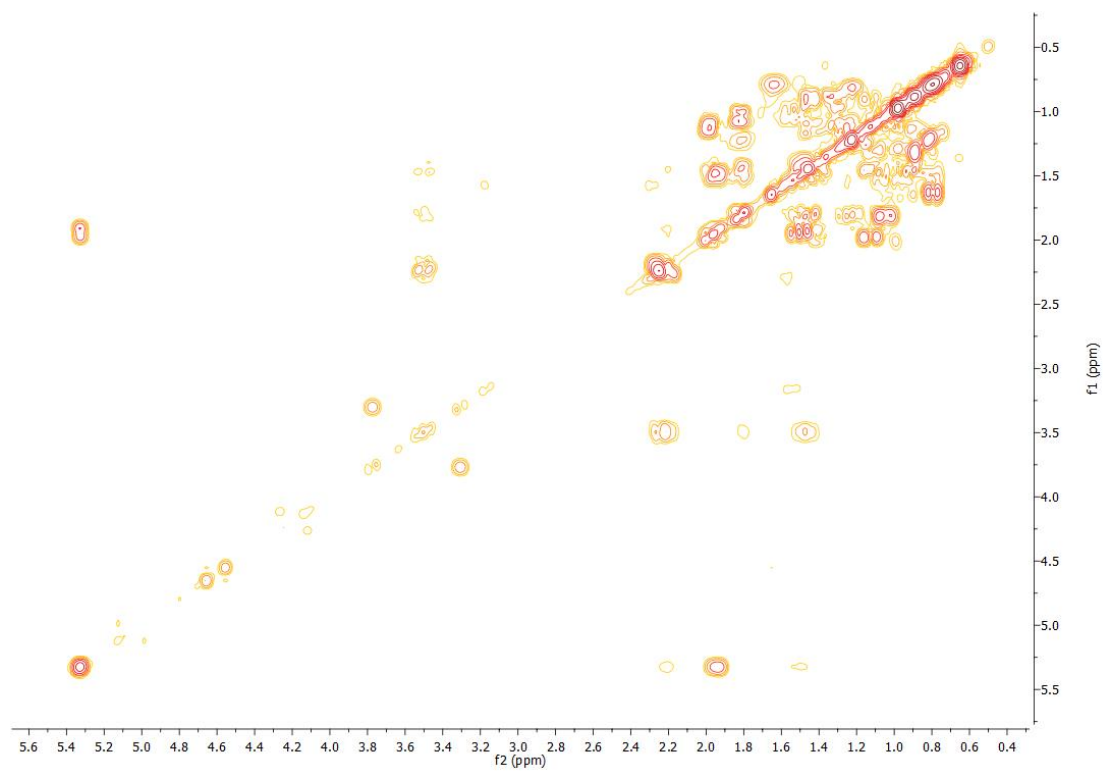
Από την ανάλυση των 1D και 2D NMR φασμάτων του μεταβολίτη-3, προσδιορίσαμε τις διαφορές μεταξύ των δύο μορίων, οι οποίες αφορούσαν το ολεφινικό μεθίλιο H-6 του B-δακτυλίου (προστασία στα 5.35ppm από 5.67ppm στην 7-κετοσιτοστερόλη), τον  $sp^2$  τεταρτοταγή C-5 με διαφορά περίπου -25 ppm (140.2ppm στον μεταβολίτη-3 από 165ppm στην 7-κετοσιτοστερόλη), το μεθίλιο  $sp^3$  της θέσεως 8 (προστασία στα 1.46ppm/31.7ppm από τα 2.21ppm/45.5ppm στην 7-κετοσιτοστερόλη), την προστασία του μεθινικού H-9 (0.90ppm, από 1.31ppm στην 7-κετοσιτοστερόλη) και τα μεθυλικά πρωτόνια H-19 (1.18 ppm, από 0.99ppm στην 7-κετοσιτοστερόλη). Αυτές οι διαφοροποιήσεις, μαζί με το γεγονός ότι υπήρχε ένα παραπάνω μεθυλένιο (7-CH<sub>2</sub>, 1.50ppm/1.90ppm - 31.7ppm) στο μεταβολίτη-3 σε σχέση με το μεταβολίτη-2, συνηγορούσαν ότι δεν υπάρχει καρβονύλιο στη θέση 7. Έτσι ο μεταβολίτης-3 αναγνωρίστηκε ως η β-σιτοστερόλη. Η σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων  $^1\text{H}$  και  $^{13}\text{C}$  του μεταβολίτη-3 (βλέπε Πίνακα 11) με αυτές της βιβλιογραφίας επιβεβαίωσε το συμπέρασμά μας (De Eknamkul & Potduang, 2003; Zhang, *et al.*, 2005; Wang, *et al.*, 2012).



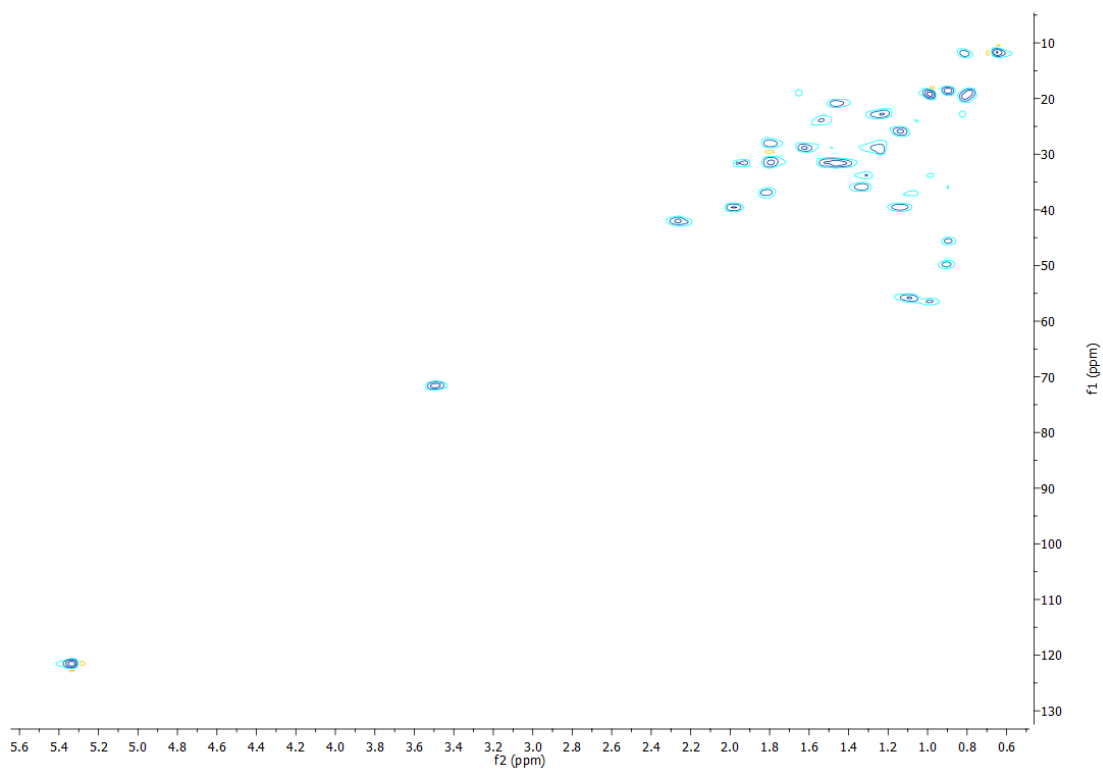
Εικόνα 50: Η δομή του μεταβολίτη 3 (β-Σιτοστερόλη)



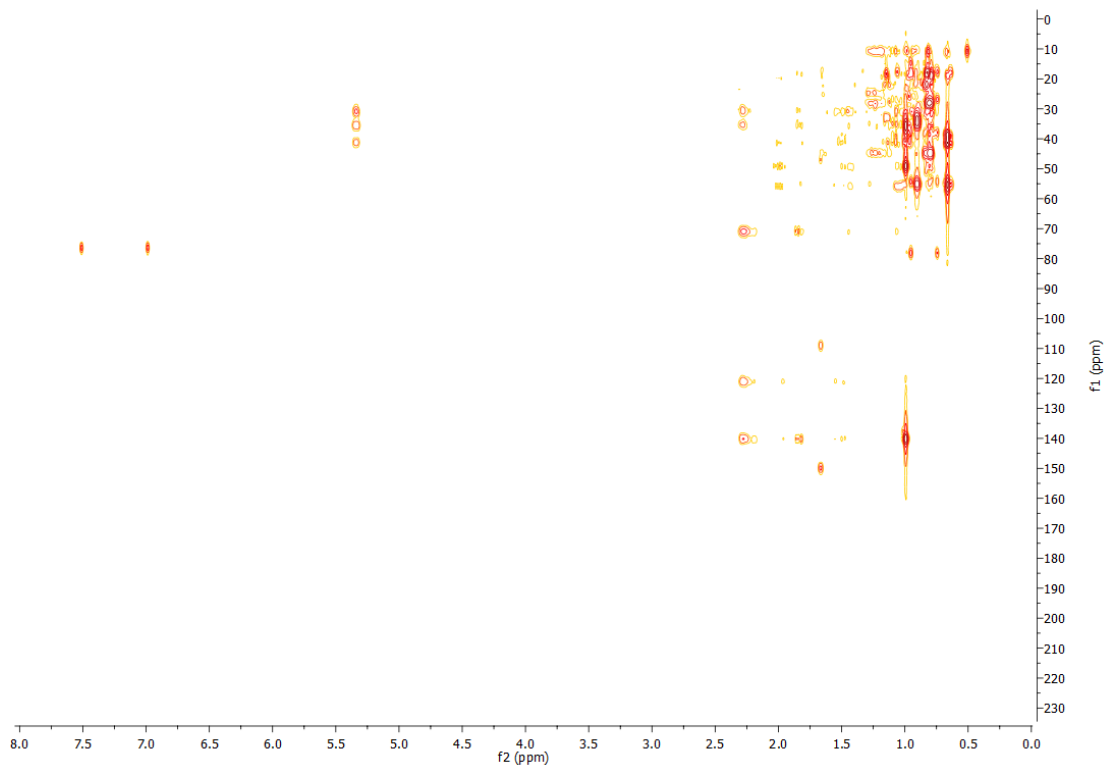
Εικόνα 51: Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR του μεταβολίτη 3 σε  $\text{CDCl}_3$ . Πάνω αριστερά φαίνεται μία μεγέθυνση του φάσματος



Εικόνα 52: Φάσμα  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY του μεταβολίτη 3 σε  $\text{CDCl}_3$



Εικόνα 53: Φάσμα  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC του μεταβολίτη 3 σε  $\text{CDCl}_3$



Εικόνα 54: Φάσμα  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC του μεταβολίτη 3 σε  $\text{CDCl}_3$

Πίνακας 11: Φασματοσκοπικά δεδομένα της β-Σιτοστερόλης

| Θέση | <sup>1</sup> H-NMR |                      | <sup>13</sup> C-NMR |
|------|--------------------|----------------------|---------------------|
|      | δ (ppm)            | Multiplicity, J (Hz) | δ (ppm)             |
| 1    | 1.08               | 1H, m                | 36.9                |
|      | 1.81               | 1H, m                |                     |
| 2    | 1.48               | 1H, m                | 31.7                |
|      | 1.80               | 1H, m                |                     |
| 3    | 3.50               | 1H, m                | 71.6                |
| 4    | 2.31-2.20          | 2H, m                | 42.2                |
| 5    | -                  | -                    | 140.3               |
| 6    | 5.35               | 1H, m                | 121.6               |
| 8    | 1.46               | 1H, m                | 31.7                |
| 9    | 0.90               | 1H, m                | 50.0                |
| 10   | -                  | -                    | 36.2                |
| 11   | 1.52-1.39          | 2H, m                | 21.0                |
| 12   | 1.15               | 1H, m                | 39.6                |
|      | 1.98               | 1H, m                |                     |
| 13   | -                  | -                    | 42.3                |
| 14   | 0.99               | 1H, m                | 56.5                |
| 15   | 1.04               | 1H, m                | 24.2                |
|      | 1.53               | 1H, m                |                     |
| 16   | 1.24               | 1H, m                | 28.2                |
|      | 1.79               | 1H, m                |                     |
| 17   | 1.09               | 1H, m                | 55.9                |
| 18   | 0.66               | 3H, s                | 11.9                |
| 19   | 0.99               | 3H, s                | 19.3                |
| 20   | 1.33               | 1H, m                | 36.01               |
| 21   | 0.90               | 3H, d, J = 6.5       | 18.7                |
| 22   | 0.98               | 1H, m                | 33.9                |
|      | 1.32               | 1H, m                |                     |
| 23   | 1.20-1.09          | 2H, m                | 26.0                |
| 24   | 0.89               | 1H, m                | 45.6                |

|    |           |                  |      |
|----|-----------|------------------|------|
| 25 | 1.63      | 1H, m            | 29.0 |
| 26 | 0.82      | 3H, d, $J = 6.9$ | 19.6 |
| 27 | 0.79      | 3H, d, $J = 6.9$ | 19.1 |
| 28 | 1.32-1.18 | 2H, m            | 22.8 |
| 29 | 0.83      | 3H, t, $J = 7.4$ | 12.0 |

- Οι χημικές μετατοπίσεις των διαστεροτοπικών μεθυλενικών πρωτονίων προσδιορίστηκαν με τη βοήθεια του φάσματος HSQC. Η στεreoχημεία τους δεν περιλαμβάνεται

Η β-σιτοστερόλη είναι από τις πιο συχνά απαντούμενες φυτοστερόλες, έχει χημικό τύπο  $C_{29}H_{50}O$  και μοριακή μάζα  $M_r$  414 amu. Έχει απομονωθεί ξανά από το *P. spina-christi* (Kemertelidze *et al.*, 1999).

#### 2.2.3.3.4 Μεταβολίτης 4

Ο μεταβολίτης 4 απομονώθηκε από το κλάσμα 45-100 της VLC1 του κλάσματος *EtOAc* (*L.L.E.*) του μεθανολικού εκχυλίσματος με παρασκευαστική χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (*Prep-TLC*), η ανάπτυξη της οποίας έγινε με το σύστημα *c-Hex/EtOAc* 60/40 (βλ. 2.2.3.2.3). Η δομή του μορίου (Εικόνα 55) προσδιορίστηκε μετά την μελέτη των φασμάτων NMR (Εικόνα 56-59), τα οποία ελήφθησαν σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο ( $\text{CDCl}_3$ ). Μολονότι, οι βασικές κορυφές του φάσματος  $^1\text{H-NMR}$  παραπέμπουν σε δομή στεροειδούς, παρατηρήθηκαν αρκετές διαφορές σε σύγκριση με τα φάσματα των μεταβολιτών 2 και 3. Πιο συγκεκριμένα:

- Στην αλειφατική περιοχή του φάσματος εντοπίστηκαν τέσσερις διπλές κορυφές που αντιστοιχούν σε μεθυλικά πρωτόνια της πλευρικής αλυσίδας και όχι τρεις διπλές και μία τριπλή όπως στην περίπτωση της  $\beta$ -σιτοστερόλης (μεταβολίτης-3) και της 7-κετο- $\beta$ -σιτοστερόλης (μεταβολίτης-2).
- Στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος, το H-3 συντονίζεται στα 3.95 ppm και είναι σαφέστερα πιο αποθωρακισμένο σε σύγκριση με τα αντίστοιχα πρωτόνια του μεταβολίτη-2 (3.66 ppm) και του μεταβολίτη 3 (3.50 ppm).
- Στην ολεφινική περιοχή του φάσματος εμφανίζονται Εμφανίζονταν τώρα στην ολεφινική-αρωματική περιοχή δύο spin συστήματα από 2 πρωτόνια το κάθε ένα, αντί για ένα ολεφινικό μεθίνιο όπως στους μεταβολίτες 2 και 3. Το πρώτο είναι απομονωμένο και τα δύο ολεφινικά πρωτόνια παρουσιάζουν σύζευξη COSY μόνο μεταξύ τους και η σταθερά σύζευξης δηλώνει *cis* γεωμετρία (6.22ppm, d,  $J=8.6\text{Hz}$  και 6.48ppm, d,  $J=8.6\text{Hz}$ ). Το δεύτερο σύστημα βρίσκεται στην πλευρική αλυσίδα, αποτελείται από δύο ολεφινικά πρωτόνια που εμφανίζονται ως διπλές διπλών κορυφές (5.11ppm, dd,  $J=15.3/8.8\text{Hz}$  και 5.20ppm, dd,  $J=15.3/8.8\text{Hz}$ ) και παρουσιάζει *trans* γεωμετρία, γεγονός που αντικατοπτρίζεται στην σταθερά σύζευξης ( $J=15.3\text{Hz}$ ) της μεταξύ τους αλληλεπίδρασης.

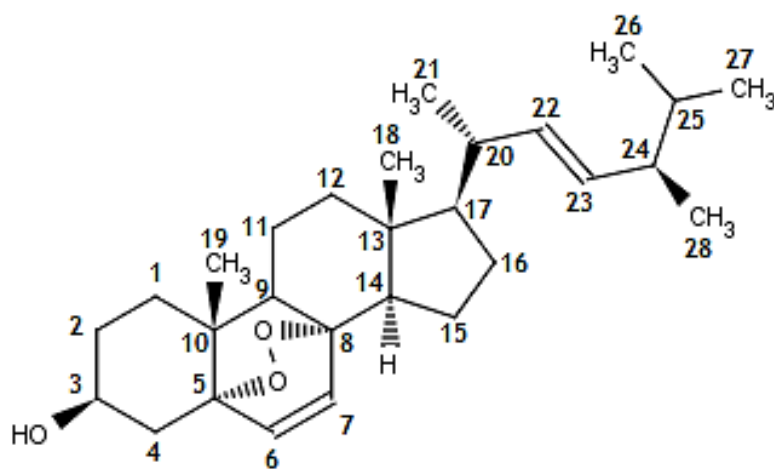
Από την συνδυαστική μελέτη των 2D NMR φασμάτων ( $^1\text{H-HCOSY}$ ,  $^1\text{H-SQC-DEPT}$  και  $^1\text{H-MBC}$ ) του μεταβολίτη-4 καταγράψαμε τα εξής:

- Το H-3 (3.95ppm, m) είχε τέσσερις COSY συζεύξεις με πρωτόνια στις χημικές μετατοπίσεις 1.50 ppm, 1.82 ppm, 1.88 ppm και 2.09 ppm. Τα πρωτόνια αυτά - από το φάσμα  $^1\text{H-SQC-DEPT}$  - παρατηρήθηκε ότι συνδέονται με τους  $\text{sp}^3$  άνθρακες C-1 και C-4 (1.88/2.09 - C-4 και 1.50/1.82 - C-1). Βασίσαμε την διάκριση των C-1 και C-4 στην  $^1\text{H-MBC}$  συσχέτιση ενός από τα παραπάνω μεθυλενικά πρωτόνια (2.09 ppm) με τεταρτοταγή οξυγονωμένο C συντονιζόμενο στα 82.0 ppm.

- Τα δύο ολεφινικά πρωτόνια με *cis* σύζευξη μεταξύ τους (διπλός δεσμός σε δακτύλιο) είχαν HMBC συσχέτιση με δύο τεταρτοταγείς οξυγονωμένους άνθρακες στα 82.0 ppm και 79.2 ppm.
- Με τον ένα από τους δύο τεταρτοταγείς οξυγονωμένους άνθρακες εμφάνισαν επίσης στο φάσμα HMBC συσχέτιση και τα μεθυλικά πρωτόνια H-19 (0.86ppm/18.2ppm), ενώ τα μεθυλικά πρωτόνια H-18 (0.79ppm, s) και H-21 (0.97ppm, d,  $J=6.7$  Hz / 21.0ppm) παρουσιάζουν σύζευξη με τον μεθινικό άνθρακα C-17 (56.3 ppm).

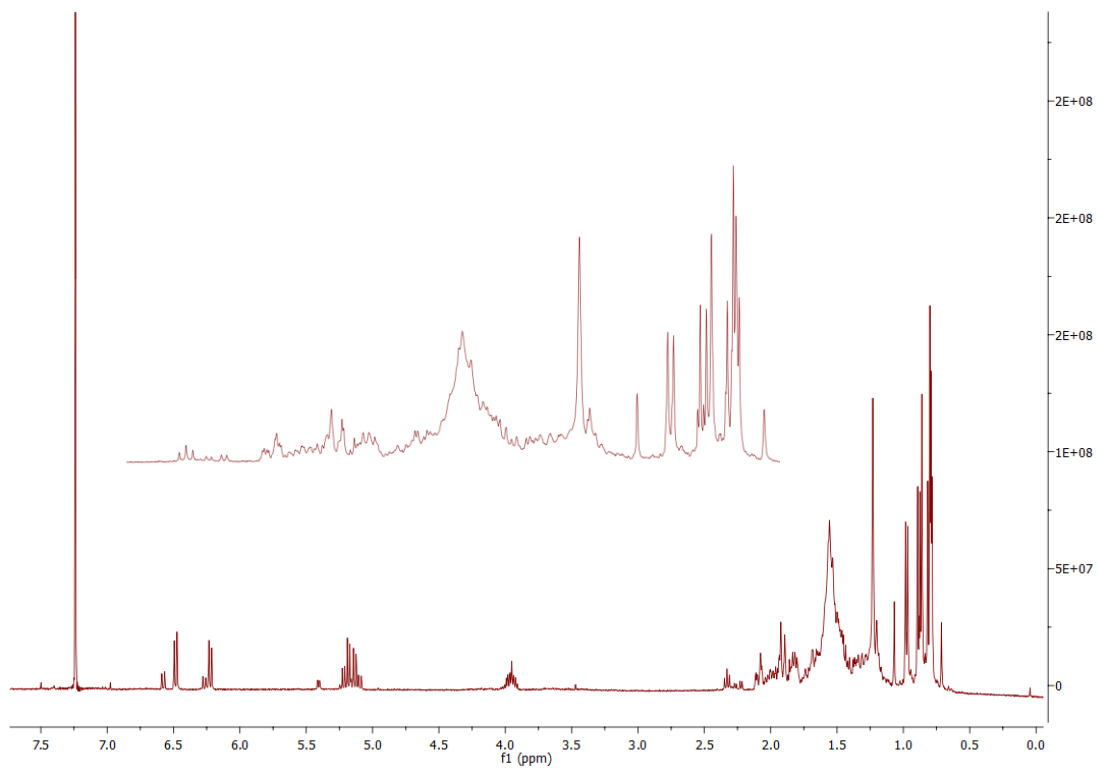
Τα παραπάνω δεδομένα μαζί με τις υπόλοιπες ετεροπυρηνικές συσχετίσεις HMBC και HSQC-DEPT, μας επέτρεψαν να συμπεράνουμε ότι στο μόριο υπάρχει υπεροξειδικός δεσμός μεταξύ των ανθράκων C-5 (82.0 ppm) και C-8 (79.2 ppm) και ότι ο διπλός δεσμός (*cis* γεωμετρίας) σχηματίζεται μεταξύ των C-6 (135.5 ppm) και C-7 (130.8 ppm). Η πλευρική αλυσίδα είναι τύπου εργοστερόλης με 9 άνθρακες και όχι με 8 άνθρακες όπως των μεταβολιτών 2 και 3 (τύπου σιτοστερόλης).

Έτσι ο μεταβολίτης 4 αναγνωρίστηκε ως η 5α,8α-επιδιοξυεργοστα-6,22-διεν-3β-ολ ή υπεροξείδιο της εργοστερόλης. Τα δεδομένα μας (Πίνακας 12) είναι σε πλήρη συμφωνία με τα αντίστοιχα της βιβλιογραφίας (Leliebre-Lara, *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2009).

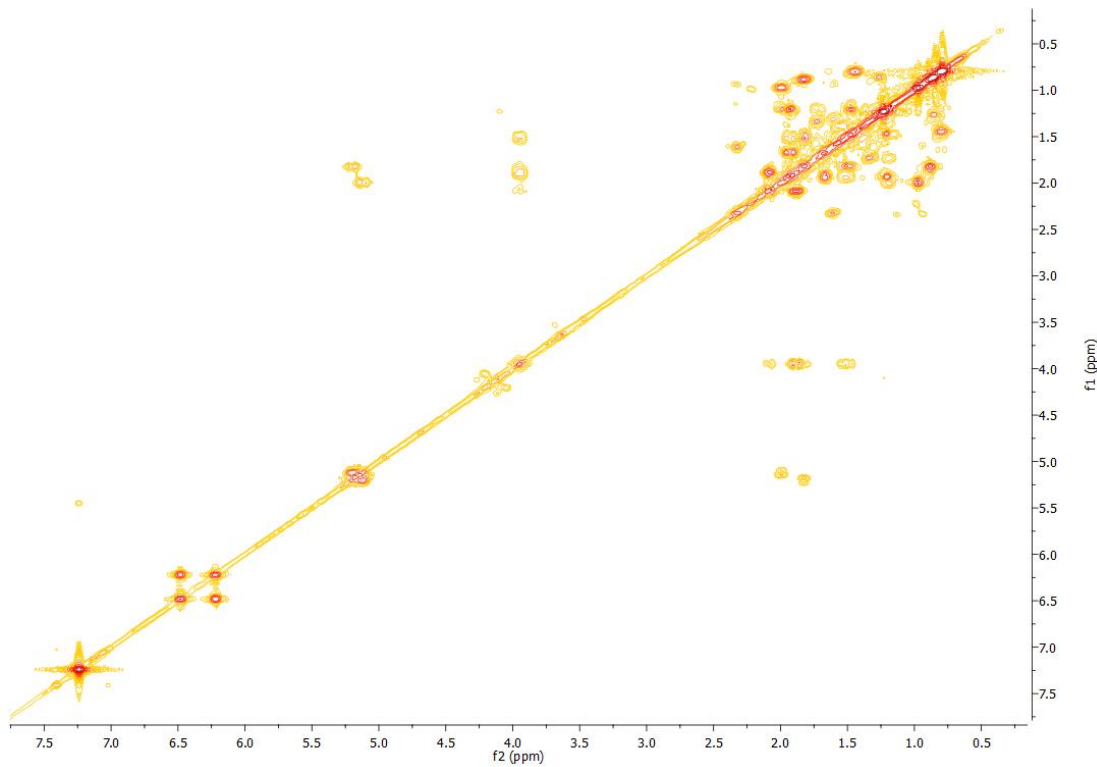


Εικόνα 55: Η δομή του μεταβολίτη 4 (Υπεροξείδιο της εργοστερόλης)

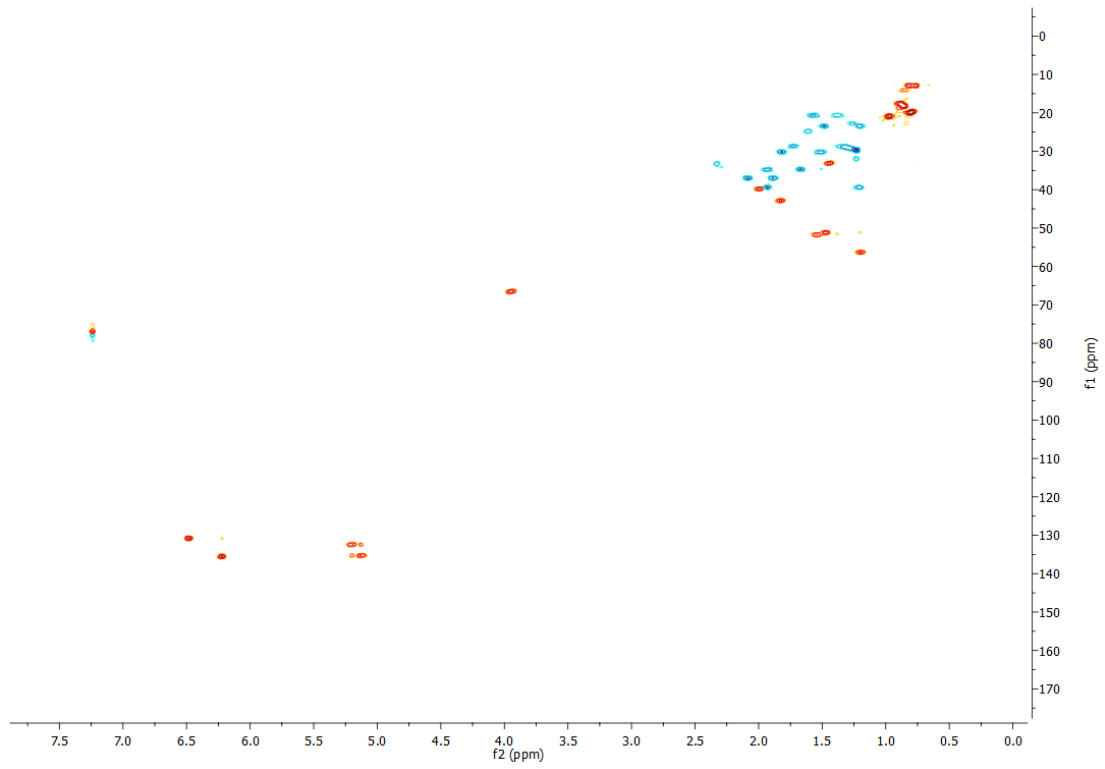




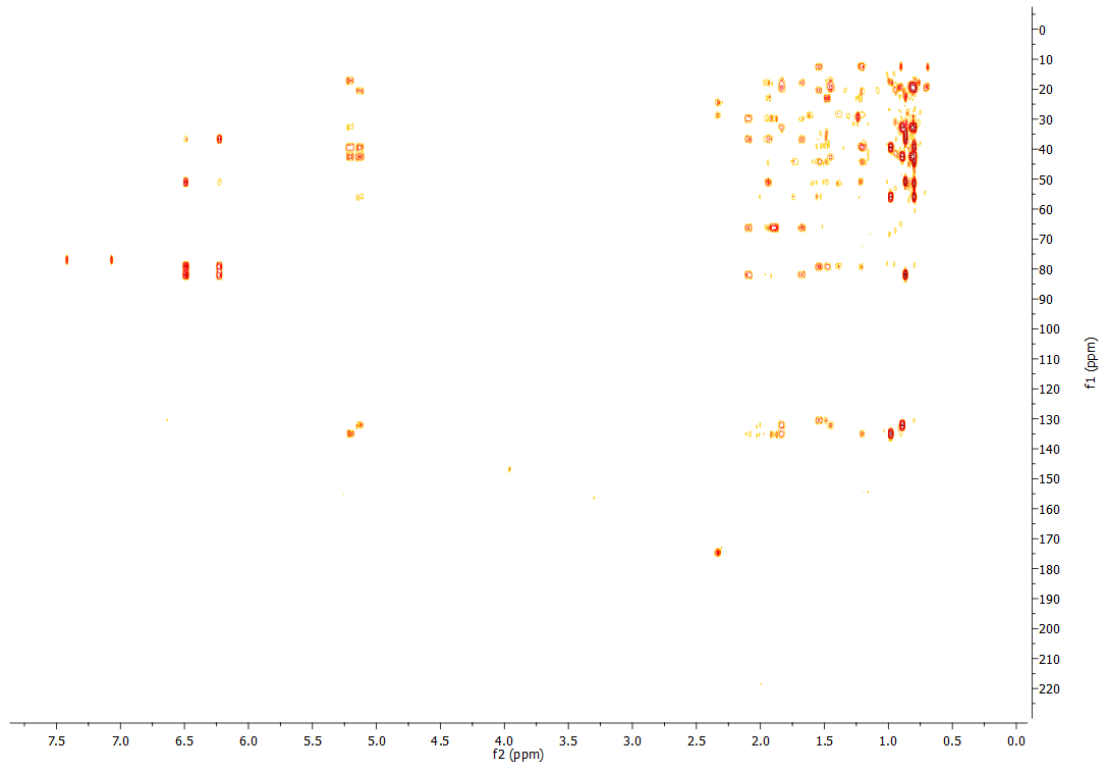
Εικόνα 56: Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR του μεταβολίτη 4 σε  $\text{CDCl}_3$ . Πάνω αριστερά φαίνεται μία μεγέθυνση του φάσματος



Εικόνα 57: Φάσμα  $1\text{H}-1\text{H}$  COSY του μεταβολίτη 4 σε  $\text{CDCl}_3$



Εικόνα 58: Φάσμα  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC-DEPT του μεταβολίτη 4 σε  $\text{CDCl}_3$



Εικόνα 59: Φάσμα  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC του μεταβολίτη 4 σε  $\text{CDCl}_3$

Πίνακας 12: Φασματοσκοπικά δεδομένα του υπεροξειδίου της εργοστερόλης σε CDCl<sub>3</sub>

| Θέση | <sup>1</sup> H-NMR |                      | <sup>13</sup> C-NMR |
|------|--------------------|----------------------|---------------------|
|      | δ (ppm)            | Multiplicity, J (Hz) | δ (ppm)             |
| 1    | 1.67               | 1H, (ovlp)           | 34.8                |
|      | 1.93               | 1H, m                |                     |
| 2    | 1.50               | 1H, (ovlp)           | 30.2                |
|      | 1.82               | 1H, m                |                     |
| 3    | 3.95               | 1H, m                | 66.5                |
| 4    | 1.88               | 1H, m                | 37.0                |
|      | 2.09               | 1H, m                |                     |
| 5    | -                  | -                    | 82.0                |
| 6    | 6.22               | 1H, d, J = 8.6       | 135.5               |
| 7    | 6.48               | 1H, d, J = 8.6       | 130.8               |
| 8    | -                  | -                    | 79.2                |
| 9    | 1.47               | 1H, (ovlp)           | 51.2                |
| 10   | -                  | -                    | 36.7                |
| 11   | 1.20               | 1H, (ovlp)           | 23.4                |
|      | 1.47               | 1H, (ovlp)           |                     |
| 12   | 1.21               | 1H, (ovlp)           | 39.3                |
|      | 1.93               | 1H, (ovlp)           |                     |
| 13   | -                  | -                    | 44.8                |
| 14   | 1.54               | 1H, (ovlp)           | 51.9                |
| 15   | 1.39               | 1H, m                | 20.6                |
|      | 1.57               | 1H, (ovlp)           |                     |
| 16   | 1.33               | 1H, m                | 28.8                |
|      | 1.73               | 1H, m                |                     |
| 17   | 1.20               | 1H, m                | 56.3                |
| 18   | 0.79               | 3H, s                | 13.0                |
| 19   | 0.86               | 3H, s                | 18.2                |
| 20   | 2.00               | 1H, m                | 39.9                |
| 21   | 0.97               | 3H, d, J = 6.7       | 21.0                |
| 22   | 5.11               | 1H, dd, J = 15.3/8.8 | 135.3               |

|    |      |                        |       |
|----|------|------------------------|-------|
| 23 | 5.20 | 1H, dd, $J = 15.3/8.8$ | 132.4 |
| 24 | 1.82 | 1H, m                  | 43.0  |
| 25 | 1.44 | 1H, m                  | 33.9  |
| 26 | 0.81 | 3H, d, $J = 6.6$       | 19.6  |
| 27 | 0.79 | 3H, d, $J = 6.6$       | 19.9  |
| 28 | 0.88 | 2H, d, $J = 6.7$       | 17.6  |

- ο (ονlr): Οι πολλαπλότητες και οι συζεύξεις δε διακρίνονται λόγω αλληλο-επικάλυψης των σημάτων που αντιστοιχούν σε αυτά τα πρωτόνια
- ο Οι χημικές μετατοπίσεις των διαστεροτοπικών μεθυλενικών πρωτονίων προσδιορίστηκαν με τη βοήθεια του φάσματος HSQC-DEPT. Η στερεοχημεία τους δεν περιλαμβάνεται

Το 3β-υδροξυ-5α,8α-επιδιοξυεργόστα-6,22-διένιο έχει Μ.Τ  $C_{28}H_{44}O_3$  και σχετική μοριακή μάζα  $M_r = 429$  αμυ, ενώ είναι η πρώτη φορά που απομονώνεται από το γένος *Paliurus*.

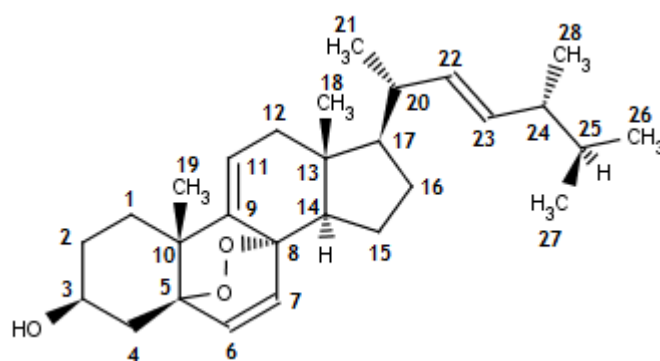
Στο φάσμα  $^1H$ NMR του μεταβολίτη-4, εκτός από τις κορυφές που αντιστοιχούν στην προαναφερόμενη ουσία, παρατηρήσαμε και ένα σύνολο κορυφών που έδειξαν ότι υπάρχει και μία δεύτερη ουσία σε μικρότερη περιεκτικότητα- (Εικόνα 61). Η ανάλυση των κορυφών οδήγησε στα εξής συμπεράσματα:

- Υπάρχουν δύο διπλές κορυφές (6.27 ppm, d,  $J = 8.6$  Hz / 6.58 ppm, d,  $J = 8.6$  Hz) στην ολεφινική περιοχή του φάσματος, ελαφρώς πιο αποπροστατευμένες και με την ίδια σταθερά σύζευξης σε σχέση με τις αντίστοιχες κορυφές του μεταβολίτη-4 που αντιστοιχούν στα ολεφινικά μεθίλια CH-6 (6.22ppm, d,  $J=8.6$ Hz) και CH-7 (6.48ppm, d,  $J=8.6$ Hz) του απομονωμένου spin συστήματος του διπλού δεσμού του Β δακτυλίου.
- Υπάρχει μια διπλή διπλής κορυφή στην ολεφινική περιοχή (5.41ppm, dd,  $J=6.0/1.8$ Hz), που αντιστοιχεί σε ένα πρωτόνιο
- Στην αλειφατική περιοχή του φάσματος και πιο συγκεκριμένα στο τμήμα που συντονίζονται τα μεθύλια, υπάρχουν δύο απλές (0.71ppm και 1.07ppm), που ολοκληρώνουν η κάθε μια για τρία πρωτόνια.

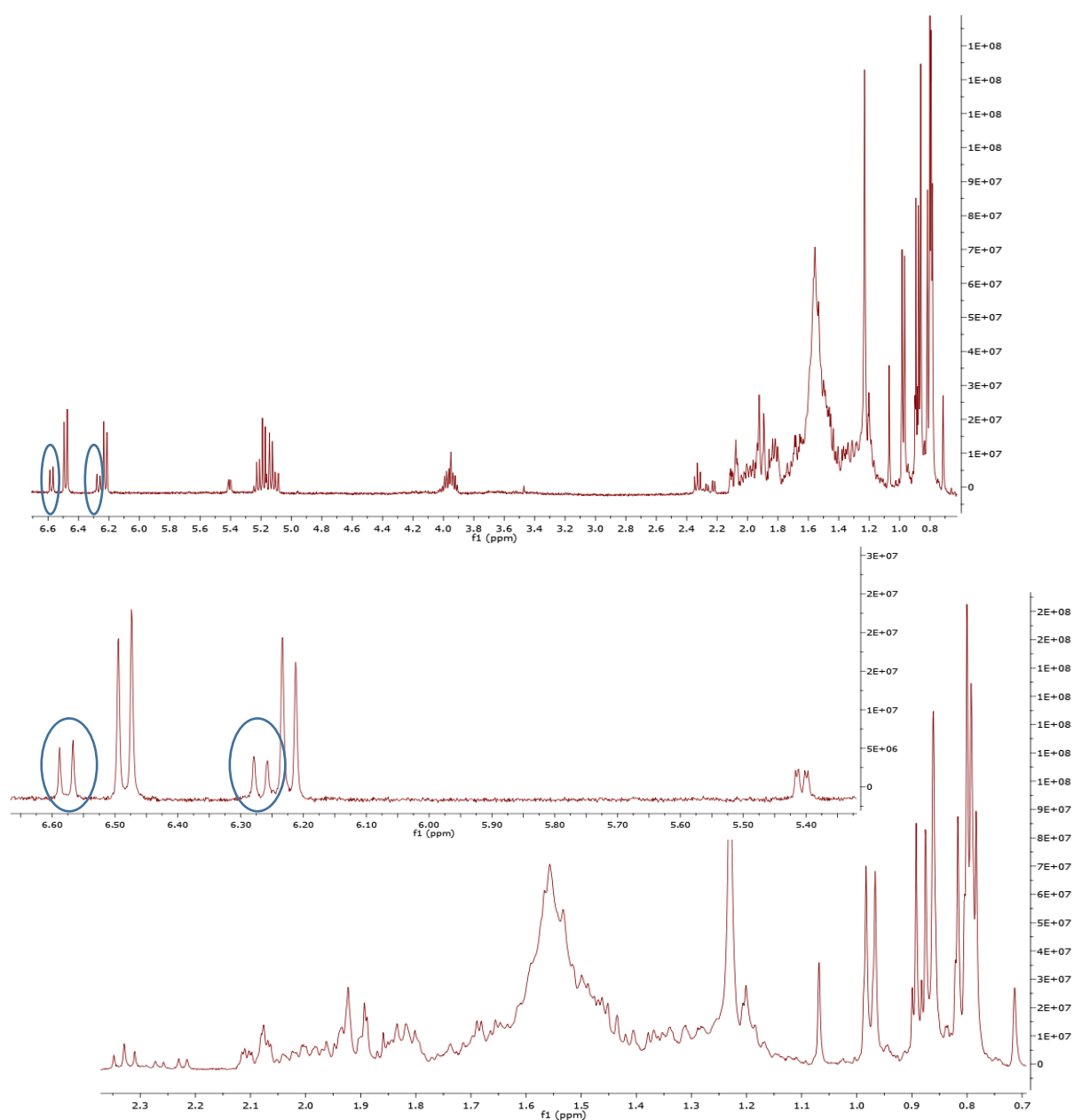
Με βάση τα προαναφερόμενα καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι η ουσία-πρόσμιξη έχει παρόμοια δομή με αυτή του μεταβολίτη-4. Ωστόσο διαφέρει λόγω της παρουσία ενός παραπάνω διπλού δεσμού, ο οποίος είναι τρισυποκατεστημένος και γειτνιάζει τόσο με την υπεροξειδική γέφυρα του Β δακτυλίου. Επίσης, ένα σημαντικό στοιχείο για τον καθορισμό της δομής της πρόσμιξης αποτέλεσε το γεγονός ότι παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφοροποιήσεις στις χημικές μετατοπίσεις των απλών κορυφών που αντιστοιχούν στα μεθυλικά πρωτόνια H-18 και H-19.

Λαμβάνοντας υπόψιν τα προαναφερόμενα δεδομένα και τη σύγκριση με αντίστοιχα δεδομένα της βιβλιογραφίας καταλήξαμε στην εκτίμηση ότι η

ουσία-πρόσμιξη είναι η 5α,8α-επιδιοξεργοστα-6,9(11),22-τριεν-3β-όλη (Εικόνα 60) (Fangkrathok *et al.*, 2013). Είναι η πρώτη φορά που εντοπίζεται στο είδος *Paliurus*.



Εικόνα 60: Η δομή της 5α,8α-επιδιοξεργοστα-6,9(11),22-τριεν-3β-όλης

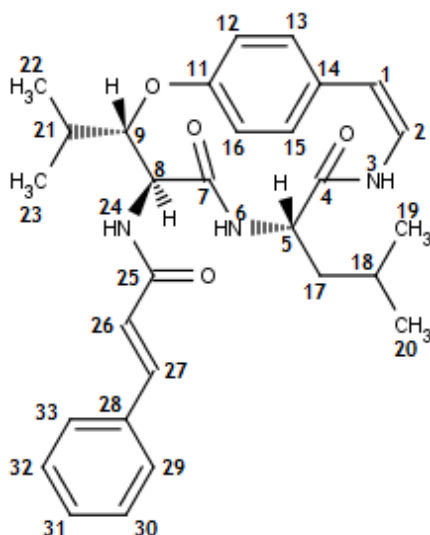


Εικόνα 61: Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της πρόσμιξης του μεταβολίτη 4 σε  $\text{CDCl}_3$ . Κάτω φαίνονται μεγεθύνσεις του φάσματος

Ολοκληρώνοντας την απόδοση της δομής των στεροειδικών μεταβολιτών 2, 3 και 4 θα θέλαμε να προσθέσουμε κάποια στοιχεία για την στερεοχημεία τους. Εκτός από τα χειρικά κέντρα του τετραμελούς πυρήνα των στεροειδών όπου οι στερεοχημείες είναι σταθερές (όπως τις έχουμε επισημάνει στις εικόνες των μεταβολιτών) για την συντριπτική πλειοψηφία των εκατοντάδων απομονωμένων στεροειδικών μορίων από χερσαίους και θαλάσσιους οργανισμούς, πολύ μεγάλη έρευνα είχε διεξαχθεί στο παρελθόν για τις στερεοχημείες των χειρικών κέντρων της πλευρικής αλυσίδας. Αυτή αφορούσε κυρίως τις στερεοχημείες των C-20 και C-24. Η σχετική στερεοχημεία του C-20 στα φυσικά στεροειδή είναι R και το ενδιαφέρον για αυτό το χειρικό κέντρο περιορίζεται στη σύνθεση μη φυσικών στεροειδών με S στερεοχημεία στον C-20 για λόγους μελέτης των σχέσεων δομής-βιολογικής δράσης. Για τον C-24 όμως έχουν αναφερθεί φυσικά στεροειδή (διαφόρων υπο-ομάδων) και με τις δύο στερεοχημείες ή σε πολλές περιπτώσεις έχουν αναφερθεί μίγματα επιμερών. Όπως έχει καταγραφεί στη βιβλιογραφία, στεροειδή που απομονώνονται από φύκη/σπόγγους και μύκητες παρουσιάζουν αλκυλοϋποκατάσταση στον C-24 κυρίως με β-στερεοχημεία (24S για τις υπο-ομάδες των στεροειδών με κορεσμένη πλευρική αλυσίδα, ενώ 24R για πλευρικές αλυσίδες με Δ<sup>22</sup>), ενώ το χερσαίο φυτικό βασίλειο παράγει κυρίως στεροειδή με αλκυλοϋποκατάσταση στον C-24 που είναι α-στερεοχημείας (24R για τις υπο-ομάδες των στεροειδών με κορεσμένη πλευρική αλυσίδα, ενώ 24S για πλευρικές αλυσίδες με Δ<sup>22</sup>). Κυρίως η φασματοσκοπία <sup>13</sup>CNMR έχει χρησιμοποιηθεί για να διακριθούν οι επιμέρειες στον C-24 στα φυσικά στεροειδή (Nes & Parish, 1989; Chiu & Patterson, 1981; Akihisa *et al.*, 1986). Στη δική μας εργασία και οι τρεις στεροειδείς μεταβολίτες είχαν στερεοχημεία R στον C-24, όπως επιβεβαιώσαμε στην βάση της σύγκρισης των χημικών μετατοπίσεων γειτονικών ανθράκων του C-24(R) μας με αυτές της βιβλιογραφίας.

### 2.2.3.3.5 Μεταβολίτης 5

Ο μεταβολίτης 5 απομονώθηκε από τη ζώνη C του κλάσματος EtOAc 100% της VLC1 του κλάσματος EtOAc (L.L.E.) του μεθανολικού εκχυλίσματος με ημιπαρασκευαστική χρωματογραφία NP-HPLC (βλ. 2.2.3.2.4.1). Η δομή του μορίου (Εικόνα 62) προσδιορίστηκε με βάση τα φασματοσκοπικά δεδομένα (Εικόνα 63 - 65) και ο μεταβολίτης 5 ταυτοποιήθηκε ως το 3(14) κυκλοπεπτιδικό αλκαλοειδές (τύπου Ia1) σανγιοϊνενίνη.



Εικόνα 62: Η δομή του μεταβολίτη 5 (Σανγιοϊνενίνη)

Στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί η ύπαρξη φυσικών προϊόντων αυτής της κατηγορίας τόσο στο γένος *Paliurus* όσο και στο συγκεκριμένο είδος (Velcheva, 1993). Στα φάσματα του μεταβολίτη 5, τα οποία παρατίθενται στη συνέχεια, εντοπίσαμε χαρακτηριστικά σήματα των υπομονάδων των κυκλοπεπτιδικών αλκαλοειδών. Πιο συγκεκριμένα παρατηρούμε τα ακόλουθα:

- ο Στην αρωματική περιοχή του φάσματος  $^1\text{H-NMR}$  εμφανίζονται τα χαρακτηριστικά σήματα της στυρυλάμινο- υπομονάδας. Όταν πρόκειται για τους τύπους Ib ή Ic (βλ. 1.3.6.1), επειδή έχουν m-ansa δομή, εμφανίζεται μια ποικιλία κορυφών (σχεδόν απλές, διπλές διπλών, τριπλές) όσον αφορά στα πρωτόνια του συγκεκριμένου δακτυλίου. Όταν όμως πρόκειται για τον τύπο Ia, στον οποίο υπάρχει η p-ansa γεφύρωση στον αρωματικό δακτύλιο της στυρυλάμινο- μονάδας, οι κορυφές των πρωτονίων του δακτυλίου είναι διπλές διπλών (dd) με  $J \sim 8/2\text{Hz}$ . Με άλλα λόγια, δεν παρατηρείται η χαρακτηριστική εικόνα της π-υποκατάστασης αρωματικού πυρήνα, καθώς τα τέσσερα πρωτόνια του συγκεκριμένου δακτυλίου δεν είναι ανά δύο ισοδύναμα, εξαιτίας της μη ελεύθερης περιστροφής του (λόγω της συμμετοχής του στην κυκλική γέφυρα). Επιπλέον, ο cis-διπλός δεσμός της στυρυλάμινο- υπομονάδας είναι συζυγιακός με τον αρωματικό δακτύλιο, με το H-1 να είναι πιο θωρακισμένο από το H-2 και η σύζευξη

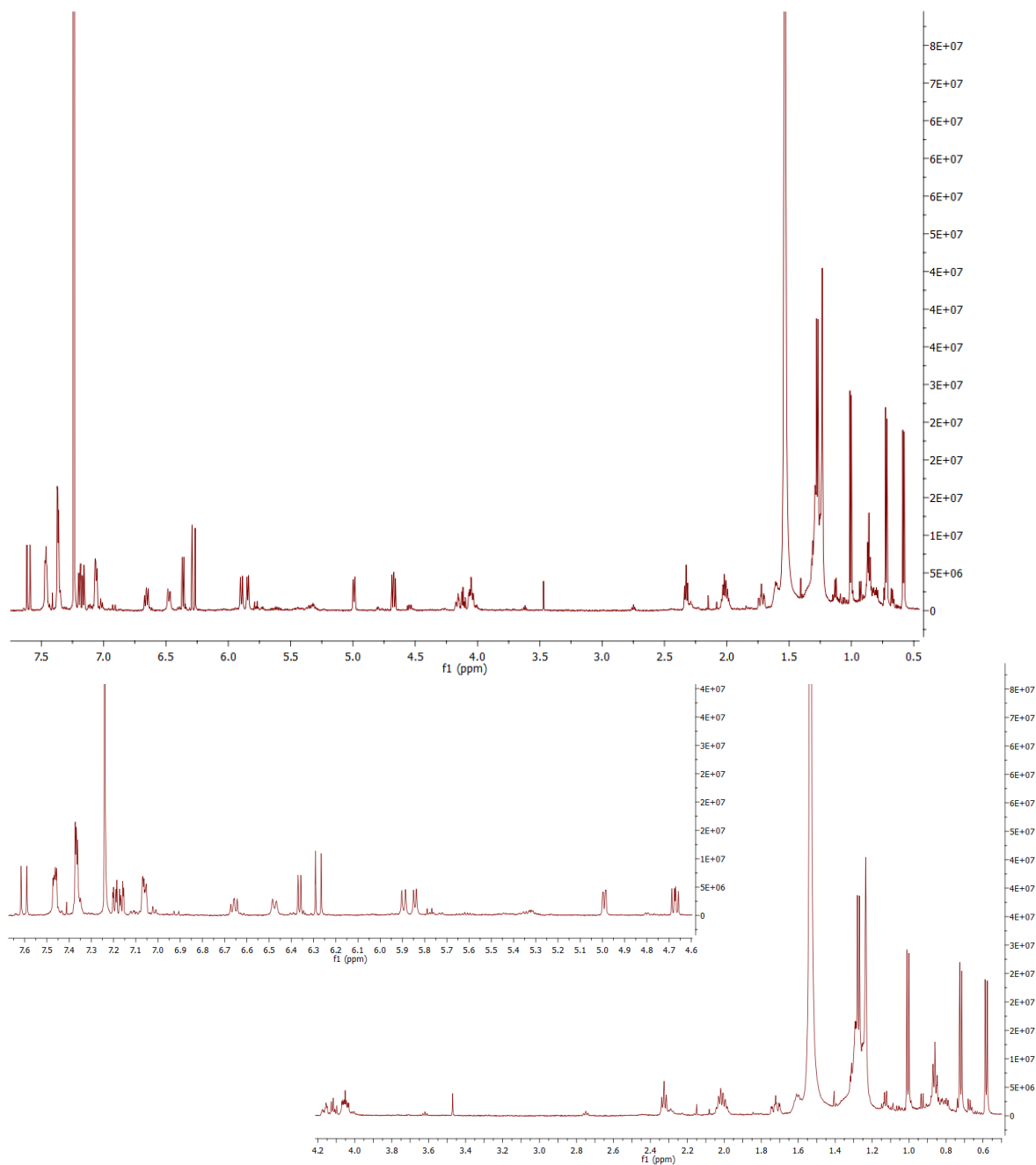
μεταξύ τους να κυμαίνεται από 7-12Hz, λόγω της *cis* γεωμετρίας. Επίσης, η ύπαρξη του δευτεροταγούς αμιδικού αζώτου αλλάζει την πολλαπλότητα της κορυφής του H-2 σε dd αν δεν έχει χρησιμοποιηθεί πρωτικός δευτεριωμένος διαλύτης που έχει την ικανότητα να αντικαθιστά τα αμιδικά πρωτόνια με δευτέρια με αποτέλεσμα αυτά να μην εμφανίζονται στο φάσμα  $^1\text{H NMR}$ .

- Ο C-9 είναι ο μοναδικός οξυγονωμένος μεθινικός άνθρακας του μορίου και άρα τα σήματα του μεθινίου της συγκεκριμένης θέσης διακρίνεται εύκολα σε ένα ετεροπυρηνικό φάσμα HSQC-DEPT, με τον C-9 να συντονίζεται στην περιοχή 78-85 ppm. Αξιοσημείωτο είναι επίσης το γεγονός ότι ο C-9 είναι ο μοναδικός χειρικός C στη γέφυρα των κυκλοπεπτιδικών αλκαλοειδών του οποίου η σχετική στερεοχημεία του πρέπει να ελεγχθεί, καθώς οι υπόλοιποι χειρικοί άνθρακες αποτελούν α-C φυσικών αμινοξέων (L-αμινοξέα, με μηδαμινές και αμφισβητούμενες εξαιρέσεις) και υιοθετούν την S στερεοχημεία.
- Τα αμινοξέα που έχουν εντοπισθεί ότι παίρνουν μέρος στη δημιουργία των κυκλοπεπτιδικών αλκαλοειδών καταγράφονται στον Πίνακα 6. Σύμφωνα με τα προαναφερόμενα, ταυτοποιώντας το H-9 μπορούμε να εκτιμήσουμε το β-υδροξυαμινοξύ του μορίου, ενώ οι  $^2J_{\text{CH}}$  και  $^3J_{\text{CH}}$  συσχετίσεις στο φάσμα HMBC με γειτονικούς άνθρακες είναι ιδιαίτερα βοηθητικές για να αποδώσουμε τις χημικές μετατοπίσεις του στυρυλάμινο- τμήματος και του β-υδροξυαμινοξέος, ιδιαίτερα αν αυτό είναι η φαινυλαλανίνη και στο μόριο υπάρχουν και άλλοι αρωματικοί δακτύλιοι (αν για παράδειγμα υπάρχει δεύτερη φαινυλαλανίνη ή κινναμωμικό οξύ).
- Από το φάσμα HSQC μπορούμε επίσης να διακρίνουμε τα πρωτόνια των α-ανθράκων των αμινοξέων των κυκλοπεπτιδικών αλκαλοειδών, καθώς συντονίζονται στην περιοχή 50-70 ppm.
- Στις λίγες σχετικά περιπτώσεις που τα κυκλοπεπτιδικά αλκαλοειδή δεν έχουν τελική μονάδα (*terminal end*) αμινοξέος με βασικό άζωτο (υποκατεστημένο ή ελεύθερο), τότε υπάρχει μία υπομονάδα κινναμωμικού οξέος (ή άλλου οξέος), συνδεδεμένου με αμιδικό δεσμό με την αμινομάδα της β-υδροξυαμινοξικής μονάδας του μορίου. Οι κορυφές των πρωτονίων της υπομονάδας αυτής είναι χαρακτηριστικές λόγω του *trans*-διπλού δεσμού και της μονοϋποκατάστασης του αρωματικού δακτυλίου. Πιο συγκεκριμένα, εμφανίζονται δύο διπλές κορυφές με  $J = 12-16\text{Hz}$ , με τη μία να είναι πολύ αποθωρακισμένη λόγω της συζυγίας του ενός από τα δύο ολεφινικά μεθίνα με το αμιδικό καρβονύλιο του κινναμωμικού οξέος. Ακόμη, μπορούμε να διακρίνουμε δύο συνήθως πολλαπλές κορυφές, μία που ολοκληρώνει για 2H και μία για 3H του μονοϋποκατεστημένου αρωματικού δακτυλίου. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι τα ο-H ως προς την υποκατάσταση είναι

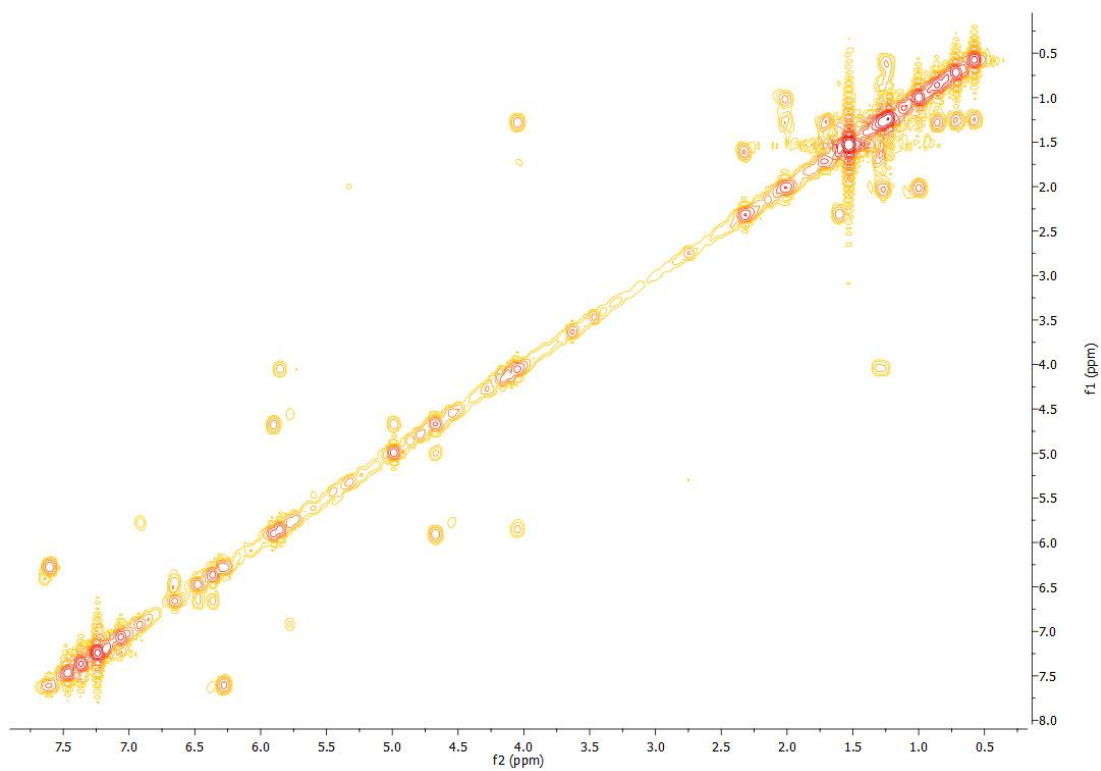


ισοδύναμα μεταξύ τους, ενώ τα υπόλοιπα πρωτόνια έχουν παρόμοιο χημικό περιβάλλον.

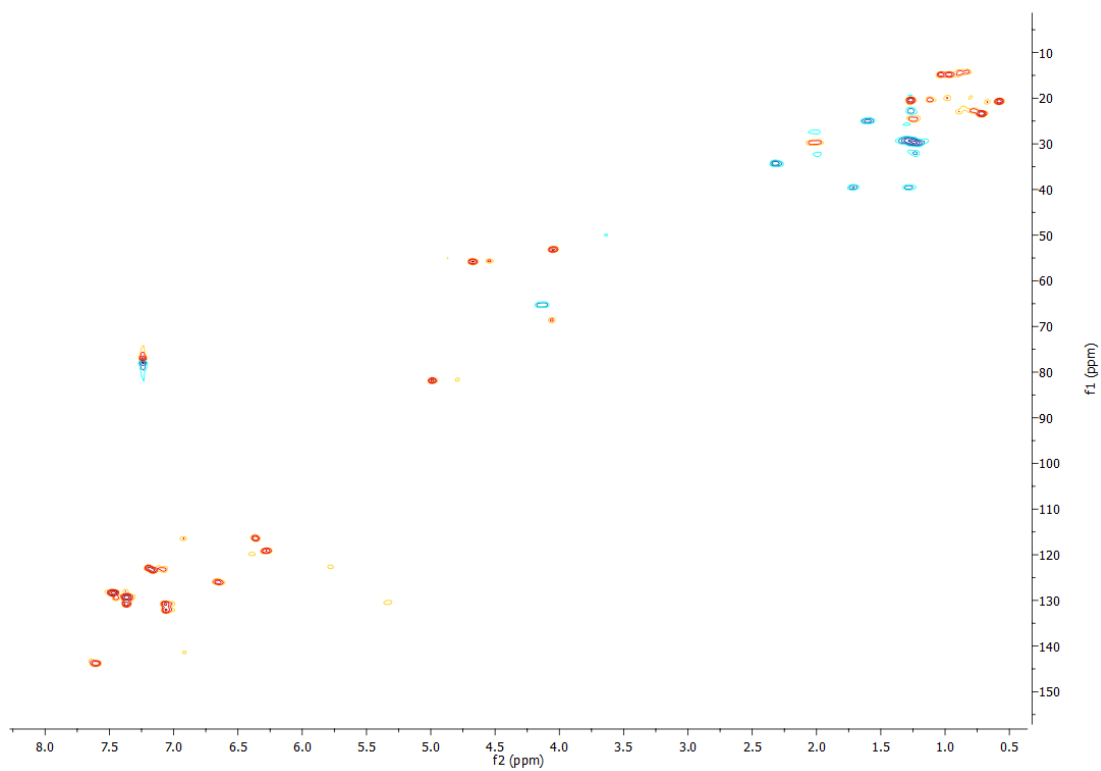
Στη συνέχεια παρατίθενται τα φάσματα NMR του μεταβολίτη **5**, τα οποία έχουν ληφθεί σε δυτεριωμένο χλωροφόρμιο.



Εικόνα 63: Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR του μεταβολίτη **5** σε  $\text{CDCl}_3$ . Κάτω διακρίνονται λεπτομέρειες του φάσματος



Εικόνα 64: Φάσμα  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY του μεταβολίτη 5 σε  $\text{CDCl}_3$



Εικόνα 65: Φάσμα  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC-DEPT του μεταβολίτη 5 σε  $\text{CDCl}_3$

Από την ανάλυση των φασμάτων NMR του μεταβολίτη 5 παρατηρήσαμε τα ακόλουθα:

- Τέσσερις διπλές διπλών κορυφές σε  $\delta$  7.19 - 7.05, οι οποίες αντιστοιχούν στα πρωτόνια των ανθράκων του π-υποκατεστημένου αρωματικού δακτυλίου της στυρυλάμινο- υπομονάδας (p-ansa γεφύρωση, 14μελές κυκλικό τμήμα).
- Μία διπλή και μία διπλή διπλής κορυφή που αντιστοιχούν στα πρωτόνια του *cis*-διπλού δεσμού της στυρυλάμινο-υπομονάδας. Η σταθερά σύζευξης της μεταξύ τους αλληλεπίδρασης είναι 7.8 Hz, ενώ το ένα πρωτόνιο παρουσιάζει και δεύτερη αλληλεπίδραση με το πρωτόνιο αζώτου (3-NH, 6.48ppm, d,  $J = 10\text{Hz}$ ).
- Τα σήματα του οξυγονωμένου μεθινίου της θέσης 9 (H-9) εμφανίζονται στο ετεροπυρηνικό φάσμα δύο διαστάσεων HSQC-DEPT (4.99ppm, dd,  $J = 7.3$  και  $1.6\text{Hz} / 81.9\text{ppm}$ ). Η  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY σύζευξη του πρωτονίου H-9 με το μεθινικό πρωτόνιο H-21-(2.0ppm, m), το οποίο είχε με την σειρά του έχει COSY συζεύξεις με τα μεθυλικά πρωτόνια H-22 (1.27ppm, d,  $J = 6.7\text{Hz}$ ) και H-23 (0.99ppm, d,  $J = 6.7\text{Hz}$ ), επιβεβαιώνουν την ύπαρξη Leu ως το β-υδροξυαμινοξύ και ταυτόχρονα διακρίνουν την ισοπρόπουλο- ομάδα της Leu αυτής από την ισοπρόπουλο- ομάδα της δεύτερης Leu του μορίου που είναι ενσωματωμένη στο δακτύλιο.
- Επιπλέον, η  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY σύζευξη του H-9 με το πρωτόνιο του α-άνθρακα του ίδιου αμινοξέος, δηλαδή το H-8 (4.68 ppm, dd,  $J = 10.2$  και  $7.3\text{Hz}$ ), το οποίο με την σειρά του παρουσιάζει COSY σύζευξη με το αμιδικό πρωτόνιο 8-NH (5.90 ppm, d,  $J = 10.2\text{Hz}$ ), συνετέλεσαν στην απόδοση των σημάτων της μίας Leu (β-υδροξυαμινοξύ) και τη διάκριση των τριών αμιδικών πρωτονίων μεταξύ τους.
- Δύο κορυφές που ολοκληρώνουν για 2H και 3H αντίστοιχα, αλλά και δύο διπλές κορυφές σε  $\delta$  6.28 και  $\delta$  7.60 με  $J = 15.5\text{Hz}$ , ανήκουν στην κινναμόυλο- ομάδα που αποτελεί το τελικό άκρο του κυκλοπεπτιδικού αλκαλοειδούς.

Τα προαναφερόμενα είναι σε πλήρη συμφωνία με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας (Zarga-Abu *et al.*, 1995).

Πίνακας 13: Φασματοσκοπικά δεδομένα της σανγιοϊενίνης σε CDCl<sub>3</sub>

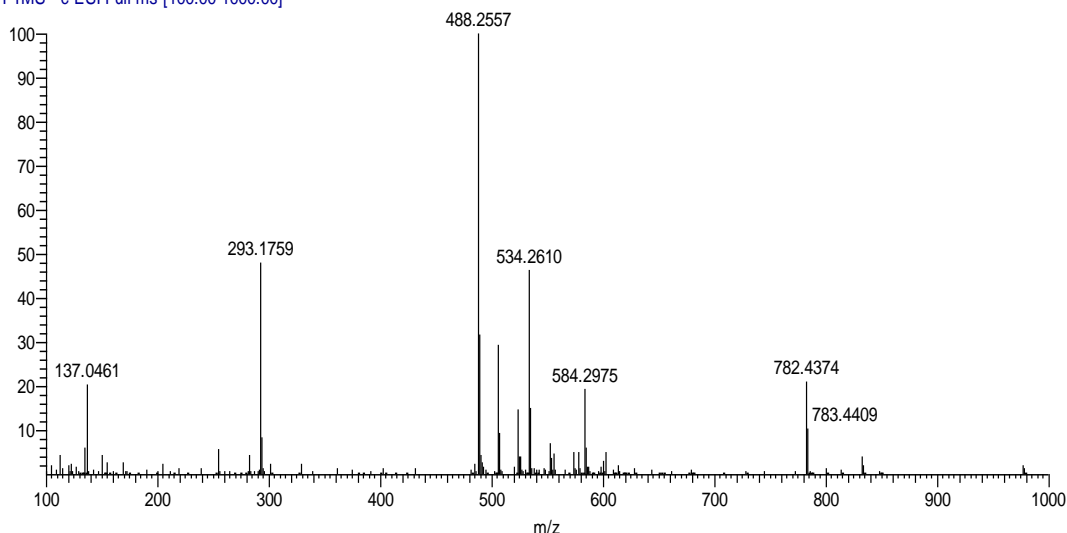
| Θέση  | <sup>1</sup> H-NMR    |                                | <sup>13</sup> C-NMR |
|-------|-----------------------|--------------------------------|---------------------|
|       | δ (ppm)               | Multiplicity, J (Hz)           | δ (ppm)             |
| 1     | 6.36                  | 1H, d, J = 7.8                 | 116.5               |
| 2     | 6.64                  | 1H, dd, J = 10.0 / 7.8         | 126.0               |
| 3-NH  | 6.48                  | 1H, d, J = 10.0                | -                   |
| 4     | -                     | -                              | n.d.                |
| 5     | 4.05                  | 1H, ddd, J = 11.0 / 7.5 / 3.2  | 53.2                |
| 6-NH  | 5.86                  | 1H, d, J = 7.5Hz               | -                   |
| 7     | -                     | -                              | n.d.                |
| 8     | 4.68                  | 1H, dd, J = 10.2 / 7.3         | 55.6                |
| 9     | 4.99                  | 1H, dd, J = 7.3 / 1.6          | 81.9                |
| 11    | -                     | -                              | n.d.                |
| 12    | 7.16 <sup>a,b,c</sup> | 1H, dd, J = 8.5 / 2.8          | 123.4               |
| 13    | 7.07 <sup>a,b,c</sup> | 1H, dd, J = 8.2 / 3.0          | 132.2               |
| 14    | -                     | -                              | n.d.                |
| 15    | 7.06 <sup>a,b,c</sup> | 1H, dd, J = 8.2 / 3.0          | 130.9               |
| 16    | 7.19 <sup>a,b,c</sup> | 1H, dd, J = 8.5 / 2.8          | 122.8               |
| 17    | 1.28                  | 1H, (ovlp)                     | 39,5                |
|       | 1.74                  | 1H, ddd, J = 14.0 / 10.7 / 3.3 |                     |
| 18    | 1.26                  | 1H, m                          | 20.5                |
| 19    | 0.58                  | 3H, d, J = 6.6                 | 20.8                |
| 20    | 0.71                  | 3H, d, J = 6.6                 | 23.5                |
| 21    | 2.00                  | 1H, m                          | 29.8                |
| 22    | 0.99                  | 3H, d, J = 6.7                 | 14.6                |
| 23    | 1.27                  | 3H, d, J = 6.7                 | 20.6                |
| 24-NH | 5.90                  | 1H, d, J = 10.2                | -                   |
| 25    | -                     | -                              | n.d.                |
| 26    | 6.28                  | 1H, d, J = 15.5                | 119.2               |
| 27    | 7.60                  | 1H, d, J = 15.5                | 143.9               |
| 28    | -                     | -                              | n.d.                |
| 29/33 | 7.46 <sup>b,c</sup>   | 2H, (ovlp)                     | 128.4 <sup>c</sup>  |

|       |                      |            |                    |
|-------|----------------------|------------|--------------------|
| 30/32 | 7.37 <sup>b, c</sup> | 2H, (ονlp) | 129.4 <sup>c</sup> |
| 31    | 7.37                 | 1H, (ονlp) | 131.0              |

- ο ονlp: Οι πολλαπλότητες και οι συζεύξεις δεν διακρίνονται λόγω αλληλο-επικάλυψης των σημάτων
- ο n.d.: Οι 4<sup>veic</sup> C δεν ανιχνεύτηκαν
- ο a: Οι χημικές μετατοπίσεις μπορεί να είναι ανταλλαγμένες
- ο b: Η απόδοση κάθε H στον αντίστοιχο C έγινε αξιοποιώντας το φάσμα HSQC-DEPT
- ο c: Τα σήματα από τα αρωματικά πρωτόνια δεν μπορούν να αποδοθούν σε συγκεκριμένες θέσεις λόγω επικάλυψης των κορυφών και έλλειψης φάσματος HMBC

Οι αμινοξικές μονάδες της Σανγιοϊενίνης είναι δύο λευκίνες (η μία ως β-υδροξυαμινοξύ και η δεύτερη ενσωματωμένη στο δακτύλιο). Είναι ουδέτερο μόριο, εφόσον δε διαθέτει N-μέθυλο- ή N,N-διμέθυλο- άκρο. Το τελικό τμήμα αποτελείται από μία κιναμμωμόυλο- ομάδα συνδεδεμένη με αμιδικό δεσμό με τη λευκίνη (β-υδροξυ-αμινοξύ).

PSC\_C\_P2\_12\_4\_17\_ESI(-) #15 RT: 0.14 AV: 1 NL: 3.75E6  
T: FTMS - c ESI Full ms [100.00-1000.00]



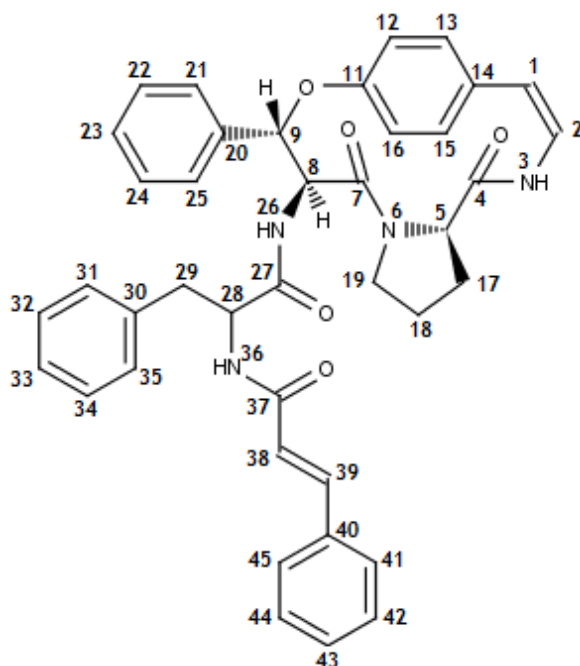
Εικόνα 66. Φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας με αρνητικό ιονισμό της σανγιοϊενίνης. Βλέπουμε ότι το ψευδομοριακό ιόν είναι 488.2557

Στο φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας με αρνητικό ιονισμό (Εικόνα 66) βλέπουμε ότι το ψευδομοριακό ιόν είναι 488.2557. Η διαφορά από τη θεωρητική τιμή του θραύσματος {M-H}<sup>-</sup> είναι 4.153ppm. Ο Χημικός Τύπος που δίνεται μέσω του ψευδομοριακού ιόντος είναι C<sub>29</sub>H<sub>34</sub>O<sub>4</sub>N<sub>3</sub>, άρα ο Χημικός Τύπος της ένωσης είναι C<sub>29</sub>H<sub>35</sub>O<sub>4</sub>N<sub>3</sub> και σε αυτόν αντιστοιχούν 14 βαθμοί ακορεστότητας. Τα δεδομένα που πήραμε από το φάσμα μάζας συμφωνούν με τα φασματοσκοπικά δεδομένα και επιβεβαιώνουν τον ισχυρισμό ότι πρόκειται για την ένωση Σανγιοϊενίνη.

Η σανγιοϊενίνη απομονώνεται για πρώτη φορά από το γένος *Paliurus*, ενώ έχει απομονωθεί ξανά από την οικογένεια Rhamnaceae και συγκεκριμένα από τα είδη *Zizyphus lotus* και *Z. vulgaris* var. *spinousus* (Tan & Zhou, 2006). Δεν έχει αναφερθεί κάποια βιολογική δράση στη βιβλιογραφία μέχρι σήμερα.

### 2.2.3.3.6 Μεταβολίτης 6

Ο μεταβολίτης 6 απομονώθηκε από τη ζώνη C του κλάσματος EtOAc 100% της VLC1 του κλάσματος EtOAc (L.L.E.) του μεθανολικού εκκυλίσματος με ημιπαρασκευαστική χρωματογραφία NP-HPLC (βλ. 2.2.3.2.4.1). Η δομή του μορίου (Εικόνα 67) προσδιορίστηκε με βάση τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR (Εικόνα 68 - 71) και ο μεταβολίτης 6 ταυτοποιήθηκε ως οξυφυλλίνη C, ένα 4(14) (τύπου Ia2) κυκλοπεπτιδικό αλκαλοειδές.



Εικόνα 67: Η δομή του μεταβολίτη 6 (Οξυφυλλίνη C)

Η γενική εικόνα του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR του μεταβολίτη 6 είναι παρόμοια με αυτή του μεταβολίτη 5 (Σανγιοϊενίνη). Για το λόγο αυτό προσπαθήσαμε να βρούμε τις χαρακτηριστικές ομάδες ενός κυκλοπεπτιδικού αλκαλοειδούς. Από τη συνδυαστική μελέτη των φασμάτων NMR μίας και δύο διαστάσεων παρατηρήσαμε τα εξής:

- Απουσία μεθυλικών σημάτων υποδεικνύει ότι το μόριο δεν περιείχε Leu/Ile/Ala/Val, ενώ αντίθετα η ύπαρξη 3 μεθυλενικών αλειφατικών ανθράκων (όπως επιβεβαιώθηκε από το φάσμα HSQC-DEPT) σε απομονωμένο spin-σύστημα υποδεικνύει ότι ένα από τα αμινοξέα του μορίου ήταν η προλίνη (Pro).
- Στην αρωματική περιοχή εμφανίζονται μία διπλή με  $J = 7.8$  Hz (6.38 ppm) και μία περίπου τριπλή με  $J = 8.6$  Hz (6.72 ppm) οι οποίες αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-1 και H-2 του *cis*-διπλού δεσμού της στυρυλάμινο- υπομονάδας. Επίσης, το H-2 εμφανίζει ομοπυρηνική σύζευξη με πρωτόνιο αμιδικού αζώτου και το H-1 ετεροπυρηνική σύζευξη (HMBC) με τον αρωματικό άνθρακα C-14 ( $\delta$  131.7).

- Από τις διακριτές HMBC συσχετίσεις των τεσσάρων αρωματικών πρωτονίων της στυρυλάμινο- υπομονάδας με το μοναδικό οξυγονωμένο αρωματικό C-11 (155.0ppm) και σε συνδυασμό με το φάσμα HSQC-DEPT, επιτεύχθηκε η απόδοση όλων των ατόμων αυτής της υπομονάδας.
- Εκτός από τα αρωματικά πρωτόνια της στυρυλάμινο- υπομονάδας, στην αρωματική περιοχή εμφανίζεται πλήθος κορυφών, γεγονός που υποδεικνύει την ύπαρξη αμινοξικών υπομονάδων φαινυλαλανίνης. Επιπρόσθετα εντοπίσαμε και δύο χαρακτηριστικά σήματα ενός *trans* διπλού δεσμού (CH-38, 6.25ppm, d,  $J=15.5\text{Hz}$  / CH-39 7.48ppm, d,  $J=15.5\text{Hz}$ ), συζυγιακού με αρωματικό δακτύλιο, που φανερώνουν με τη σειρά τους την ύπαρξη κιναμμωμούλο- ομάδας στο μόριο. Από τις HMBC συσχετίσεις του ολεφινικού μεθινίου H-39 με καρβονύλιο στα 165.7 ppm (C-37) και με τους αρωματικούς άνθρακες C-40 (134.6 ppm) και C-45 (128.6 ppm), όπως επίσης λαμβάνοντας υπόψιν τις HMBC συσχετίσεις των αρωματικών H-45 (7.52 ppm) και H-44 (7.42 ppm) με τους άνθρακες του αρωματικού δακτυλίου της κιναμμωμούλο- ομάδας αποδώσαμε όλα τα άτομα αυτής της μονάδας του μορίου. Από τις HMBC συσχετίσεις των βενζυλικών μεθυλενικών πρωτονίων της φαινυλαλανίνης (τελικής-*terminal end*) H-29<sub>a</sub> (3.34 ppm) και H-29<sub>b</sub> (2.77 ppm) με τους αρωματικούς άνθρακες C-30 (136.2) και C-31 (128.1), τον α-άνθρακά της C-28 (54.4ppm) και το καρβονύλιό της στα 166.4ppm (C-27), αφενός αποδώσαμε όλα τα άτομα αυτής αμινοξικής μονάδας, αφετέρου διακρίναμε τις μετατοπίσεις μεταξύ των αρωματικών ατόμων και των καρβονυλίων της φαινυλαλανίνης (τελικής - *terminal end*) και του κιναμμωμικού οξέος.
- Στο ετεροπυρηνικό φάσμα δύο διαστάσεων HSQC-DEPT μπορούμε εύκολα να διακρίνουμε το οξυγονωμένο μεθίνιο CH-9 (5.92 ppm, d,  $J = 7.0\text{Hz}$  / 82.4ppm) του β-υδροξυαμινοξέος. Εκτός από την HMBC συσχέτισή του με τον C-11 (155.0 ppm) της στυρυλάμινο υπομονάδας, εντοπίσαμε HMBC συσχετίσεις του και με αρωματικούς άνθρακες στα 136.8 ppm (C-20) και 128.9 (C-21/25) γεγονός που επιβεβαίωσε ότι το β-υδροξυαμινοξύ είναι η φαινυλαλανίνη. Το οξυγονωμένο μεθινικό πρωτόνιο H-9 παρουσίασε <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>HCOSY σύζευξη με το α-μεθινικό πρωτόνιο της φαινυλαλανίνης, το H-8 (4.74 ppm, dd,  $J = 9.7 / 7.0\text{Hz}$ ). Επίσης, εντοπίστηκαν από το φάσμα HSQC-DEPT άλλοι δύο τριτοταγείς α-άνθρακες αμινοξέων, οι οποίοι ανήκουν στα μεθίνια CH-5 (3.89 ppm d,  $J = 7.4\text{ Hz}$  / 59.6 ppm) και CH-28 (4.54 ppm, m / 54.4 ppm). Το H-28 παρουσίασε COSY συζεύξεις με αμιδικό πρωτόνιο στα 5.88ppm (NH-36) και με τα βενζυλικά μεθυλενικά πρωτόνια H-29 (3.34 ppm / 2.77ppm), ενώ το H-5 μόνο με αλειφατικά μεθυλενικά πρωτόνια (CH<sub>2</sub>-17: 1.40 ppm / 2.21 ppm). Τα δεδομένα αυτά εξασφάλιζαν ότι ο C-28

είναι ο α-άνθρακας της δεύτερης φαινυλαλανίνης του μορίου, ενώ το μεθίλιο CH-5 ανήκει στην προλίνη.

- Οι κοινές HMBC συσχετίσεις του καρβονυλίου C-7 της β-υδροξυφαινυλαλανίνης με τα μεθινικά πρωτόνια H-5 και H-8 και H-9, φανερώνουν ότι η προλίνη ήταν ενσωματωμένη στο δακτύλιο, ενώ η δεύτερη φαινυλαλανίνη βρισκόταν στο τελικό άκρο του μορίου, συνδεδεμένη με την κιναμμωμόλο- ομάδα.
- Η στερεοχημεία των χειρικών κέντρων του μορίου είναι 5S, 8S, 9S, 28S στη βάση των βιβλιογραφικών δεδομένων.

Τα φασματοσκοπικά δεδομένα (βλέπε παρακάτω Πίν. 14) συμφωνούν με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας (Tuenter *et al.*, 2016).

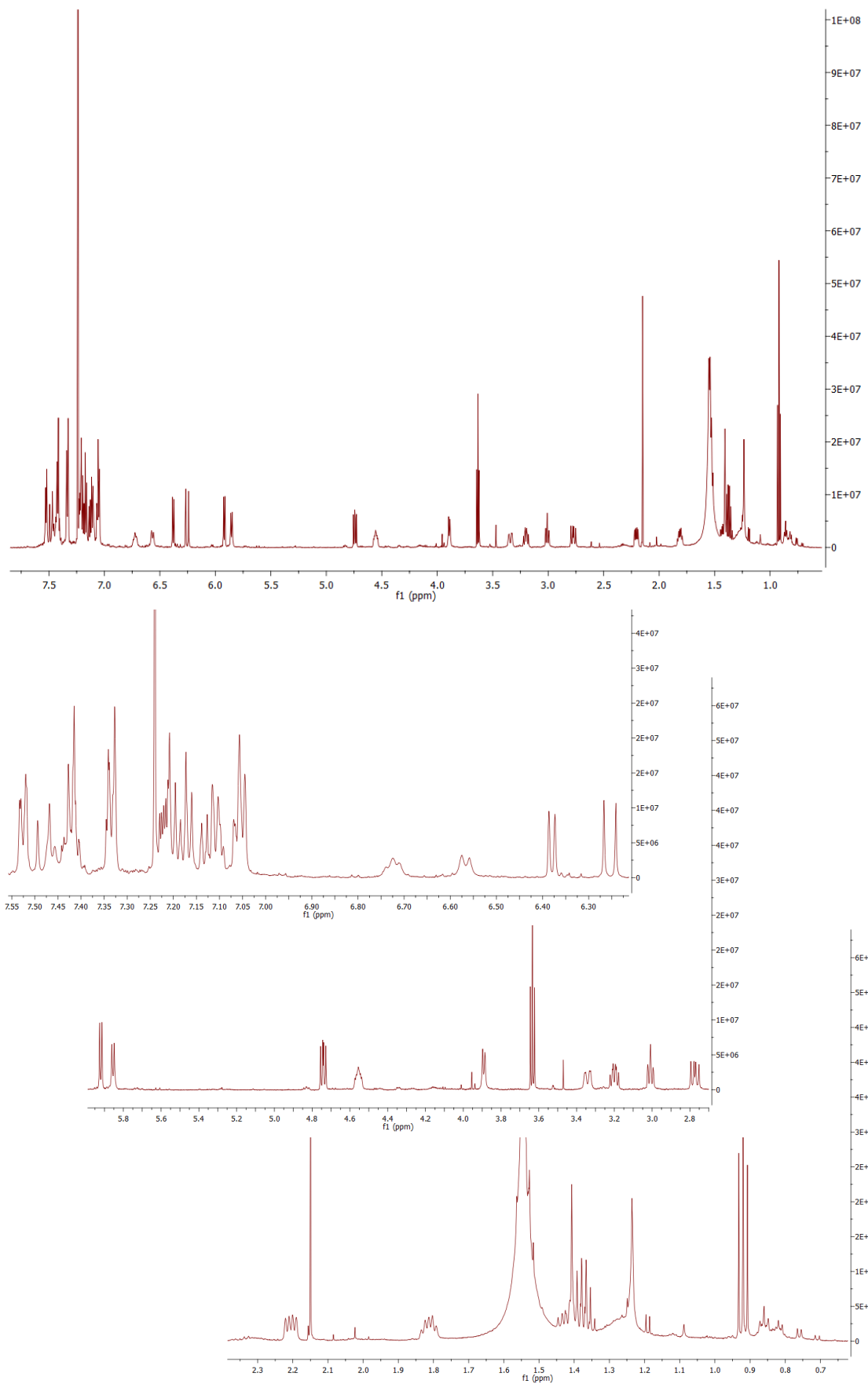
Πίνακας 14: Φασματοσκοπικά δεδομένα της Οξυφυλλίνης C σε CDCl<sub>3</sub>

| Θέση | <sup>1</sup> H-NMR |                        | <sup>13</sup> C-NMR |
|------|--------------------|------------------------|---------------------|
|      | δ (ppm)            | Multiplicity, J (Hz)   | δ (ppm)             |
| 1    | 6.38               | 1H, d, J = 7.7         | 116.5               |
| 2    | 6.72               | 1H, -t, J = 9.8 / 7.7  | 126.2               |
| 3-NH | 6.57               | 1H, d, J = 9.8         | -                   |
| 4    | -                  | -                      | 169.8               |
| 5    | 3.89               | 1H, br d, J = 7.2      | 59.6                |
| 7    | -                  | -                      | 170.4               |
| 8    | 4.74               | 1H, dd, J = 9.7 / 7.0  | 56.3                |
| 9    | 5.92               | 1H, d, J = 7.0         | 82.4                |
| 11   | -                  | -                      | 155.0               |
| 12   | 7.32               | 1H, (ovlp)             | 124.2               |
| 13   | 7.11               | 1H, (ovlp)             | 132.7               |
| 14   | -                  | -                      | 131.7               |
| 15   | 7.06               | 1H, (ovlp)             | 131.0               |
| 16   | 7.21               | 1H, (ovlp)             | 124.0               |
| 17   | 2.21               | 1H, dd, J = 12.1 / 6.3 | 26.1                |
|      | 1.40               | 1H, (ovlp)             |                     |
| 18   | 1.81               | 1H, m                  | 24.8                |
|      | 1.53               | 1H, (ovlp)             |                     |
| 19   | 3.20               | 1H, td, J = 9.6 / 7.0  | 47.3                |
|      | 3.01               | 1H, br t, J = 8.3      |                     |

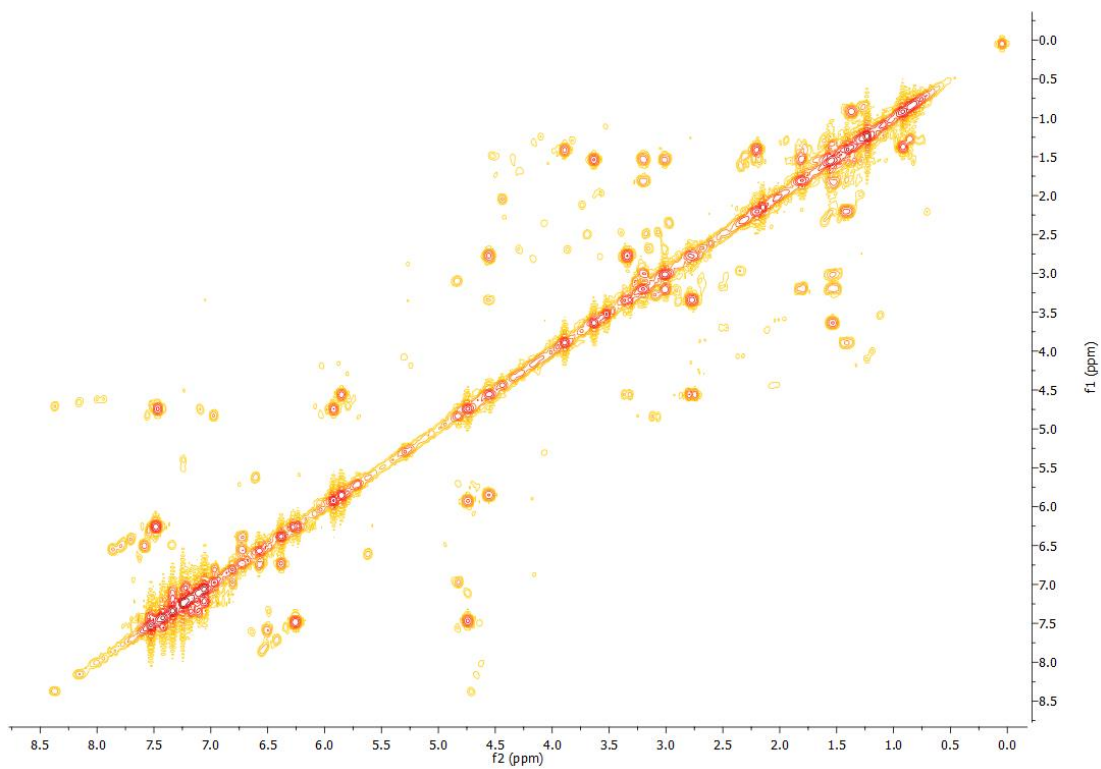


|              |      |                            |       |
|--------------|------|----------------------------|-------|
| <b>20</b>    | -    | -                          | 136.8 |
| <b>21/25</b> | 7.33 | 2H, m                      | 128.9 |
| <b>22/24</b> | 7.19 | 2H, (ovlp)                 | 127.8 |
| <b>23</b>    | 7.22 | 1H, (ovlp)                 | 124.1 |
| <b>26-NH</b> | 7.48 | 1H, (ovlp)                 | -     |
| <b>27</b>    | -    | -                          | 166.4 |
| <b>28</b>    | 4.54 | 1H, m                      | 54.4  |
| <b>29</b>    | 3.34 | 1H, dd, $J = 15.5 / 3.6$   | 36.3  |
|              | 2.77 | 1H, dd, $J = 15.5 / 10.0$  |       |
| <b>30</b>    | -    | -                          | 136.2 |
| <b>31/35</b> | 7.10 | 2H, (ovlp)                 | 128.1 |
| <b>32/34</b> | 7.06 | 2H, (ovlp)                 | 129.3 |
| <b>33</b>    | 7.20 | 1H, (ovlp)                 | 129.0 |
| <b>36-NH</b> | 5.88 | 1H, d, $J = 7.5$           | -     |
| <b>37</b>    | -    | -                          | 165.7 |
| <b>38</b>    | 6.25 | 1H, d, $J = 15.5$          | 118.0 |
| <b>39</b>    | 7.48 | 1H, d, $J = 15.5$          | 144.0 |
| <b>40</b>    | -    | -                          | 134.6 |
| <b>41/45</b> | 7.52 | 2H, dd, $J = 8.0 / 1.9$ Hz | 128.6 |
| <b>42/44</b> | 7.42 | 2H, m                      | 129.7 |
| <b>43</b>    | 7.40 | 1H, m                      | 130.6 |

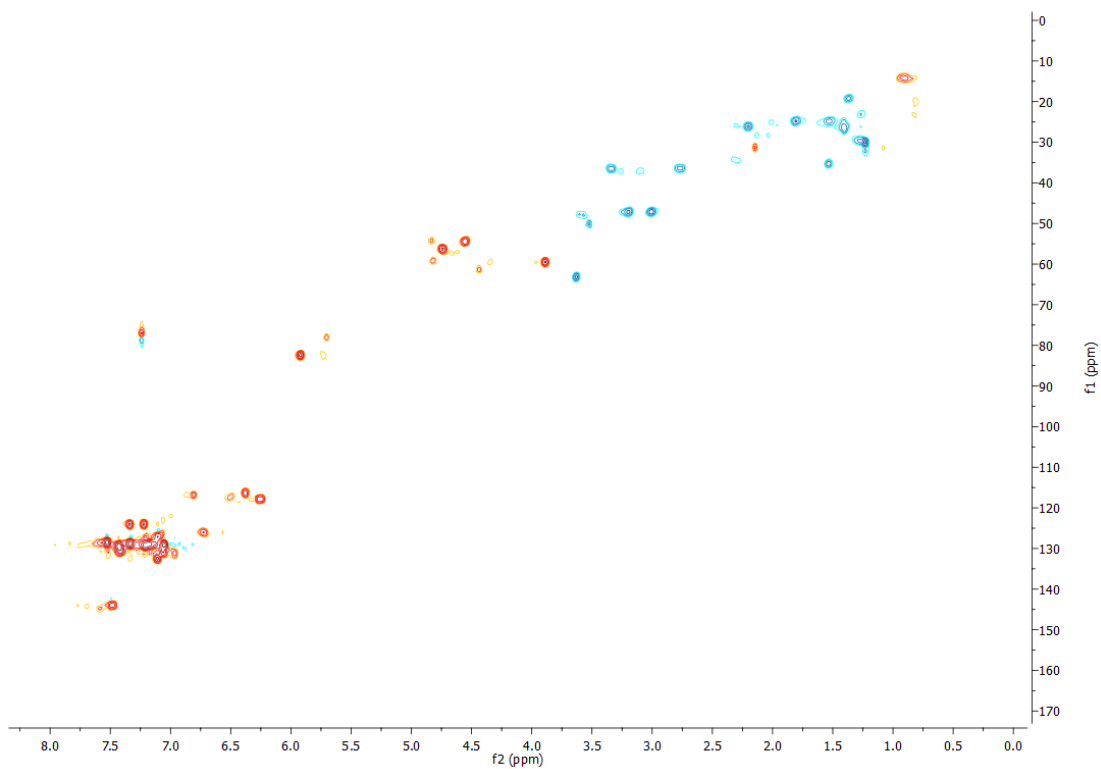
- ο ονίρ: Οι πολλαπλότητες και οι συζεύξεις δεν διακρίνονται λόγω αλληλεπικάλυψης των σημάτων



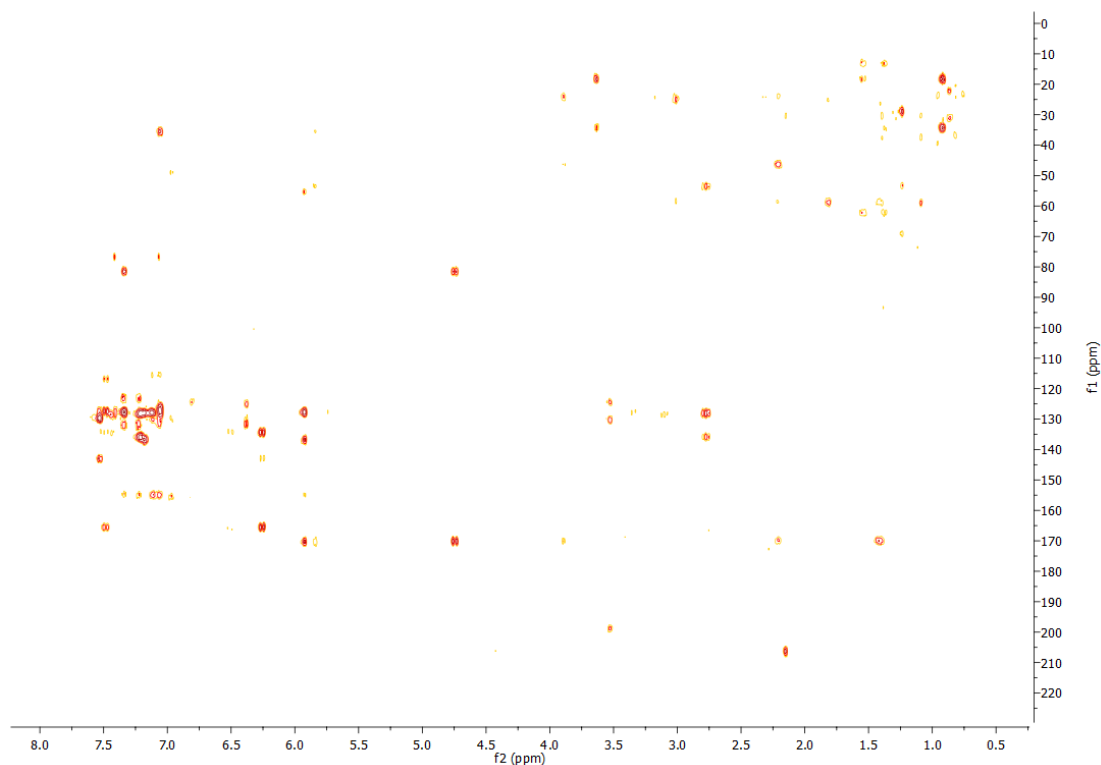
Εικόνα 68: Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR του μεταβολίτη 6 σε  $\text{CDCl}_3$ . Κάτω διακρίνονται μεγεθύνσεις του φάσματος



Εικόνα 69: Φάσμα  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY του μεταβολίτη 6 σε  $\text{CDCl}_3$



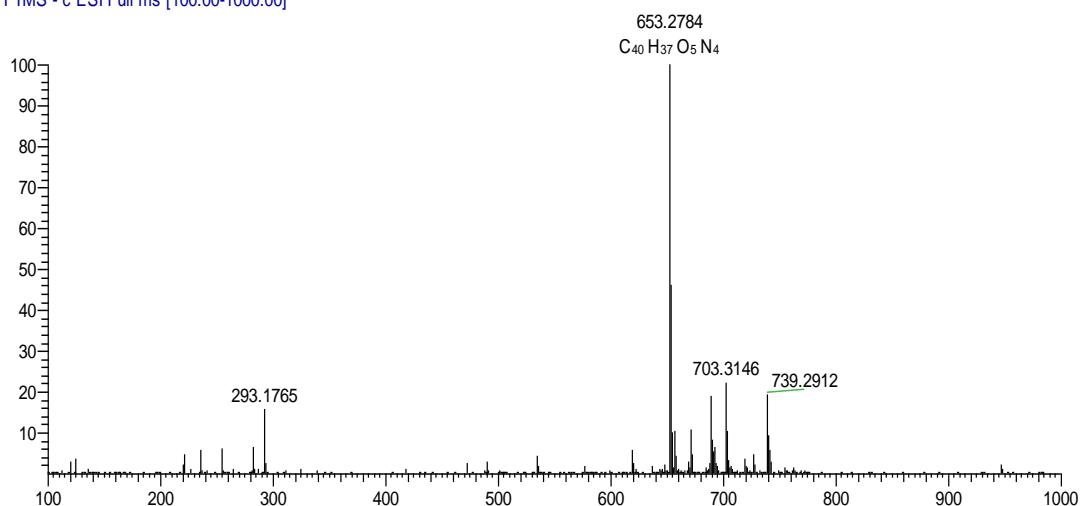
Εικόνα 70: Φάσμα  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC-DEPT του μεταβολίτη 6 σε  $\text{CDCl}_3$



Εικόνα 71: Φάσμα  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  HMBSC του μεταβολίτη 6 σε  $\text{CDCl}_3$

Η Οξυφυλλίνη C έχει το χημικό τύπο  $\text{C}_{40}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_5$ , σχετική μοριακή μάζα 654 amu και ανήκει στον τύπο Ia2. Οι αμινοξικές μονάδες της οξυφυλλίνης C είναι L-φαινυλαλανίνη και L-προλίνη (β-υδροξυαμινοξύ και αμινοξύ ενσωματωμένο στο δακτύλιο, αντίστοιχα) και L-φαινυλαλανίνη ως αμινοξικό άκρο το οποίο είναι συνδεδεμένο με κινναμμωμικό οξύ. Είναι ουδέτερο μόριο, εφόσον δε διαθέτει N-μέθυλο- ή N,N-διμέθυλο-άκρο.

PSC\_C\_P7\_12\_4\_17\_ESI(-) #15 RT: 0.14 AV: 1 NL: 4.94E6  
T: FTMS - c ESI Full ms [100.00-1000.00]



Εικόνα 72. Φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας με αρνητικό ιονισμό της οξυφυλλίνης C. Βλέπουμε ότι το ψευδομοριακό ιόν είναι 653.2784

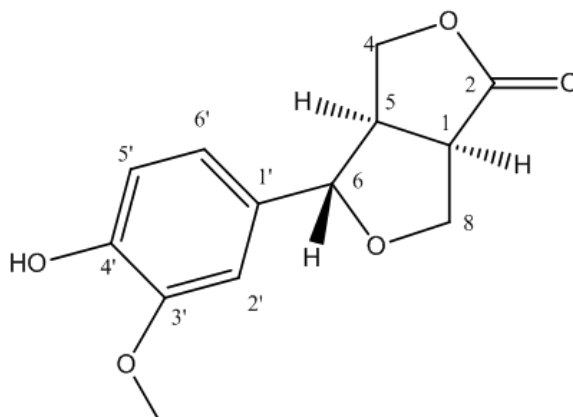
Στο φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας με αρνητικό ιονισμό (Εικόνα 72) βλέπουμε ότι το ψευδομοριακό ιόν είναι 653.2784. Η διαφορά από τη

θεωρητική τιμή του θραύσματος {M-H}<sup>-</sup> είναι 4.751ppm. Ο Χημικός Τύπος που δίνεται μέσω του ψευδομοριακού ιόντος είναι C<sub>40</sub>H<sub>37</sub>O<sub>4</sub>N<sub>5</sub>, άρα ο Χημικός Τύπος της ένωσης είναι C<sub>40</sub>H<sub>38</sub>O<sub>4</sub>N<sub>5</sub> και σε αυτόν αντιστοιχούν 24 βαθμοί ακορεστότητας. Τα δεδομένα που πήραμε από το φάσμα μάζας συμφωνούν με τα φασματοσκοπικά δεδομένα και επιβεβαιώνουν τον ισχυρισμό ότι πρόκειται για την ένωση Οξυφυλλίνη C.

Η Οξυφυλλίνη C απομονώνεται για πρώτη φορά από το γένος *Paliurus*, ενώ έχει απομονωθεί ξανά από την οικογένεια Rhamnaceae και συγκεκριμένα από το είδος *Zizyphus oxyphylla* (Kaleem *et al.*, 2012). Έχει αναφερθεί ασθενής αντιβακτηριακή δράση (Kaleem *et al.*, 2012).

### 2.2.3.3.7 Μεταβολίτης 7

Ο μεταβολίτης 7 απομονώθηκε από τη ζώνη C του κλάσματος EtOAc 100% της VLC1 του κλάσματος EtOAc (L.L.E.) του μεθανολικού εκχυλίσματος με ημιπαρασκευαστική χρωματογραφία NP-HPLC (βλ. 2.2.3.2.4.1). Η δομή του μορίου (Εικόνα 73) προσδιορίστηκε με βάση τη μελέτη των φασμάτων NMR (Εικόνα 74- 76) και ταυτοποιήθηκε ως σαλικιφολιόλη ή (1R,5R,6S)-6-(3-μεθοξυ-4-υδροξυφαινυλο)-3,7-διοξαδίκυκλο[3.3.0]οκταν-2-όνη (Chang *et al.*, 2010).



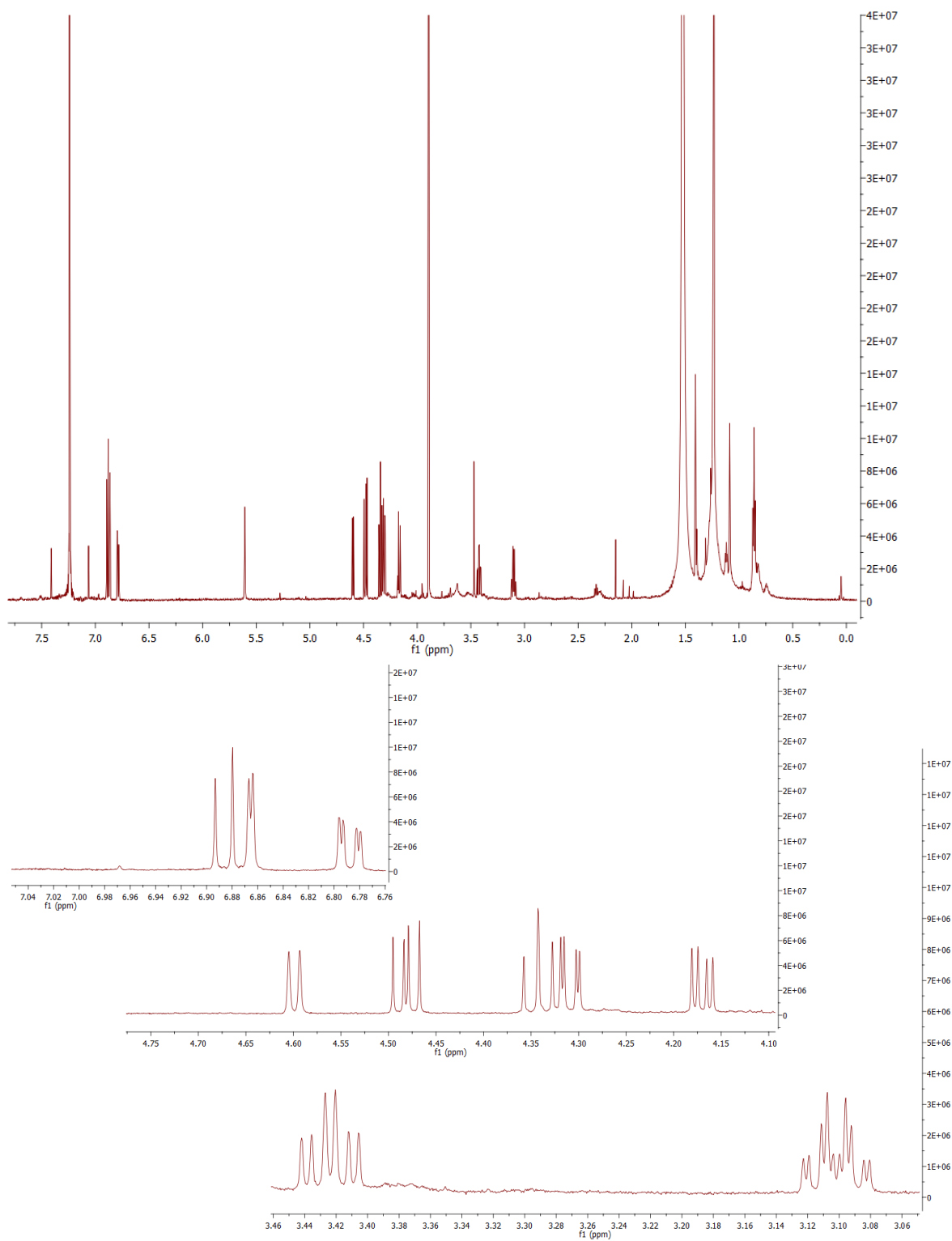
Εικόνα 73: Η δομή του μεταβολίτη 7 (Σαλικιφολιόλη)

Η σαλικιφολιόλη ανήκει στην κατηγορία των λιγνανίων, έχει το χημικό τύπο  $C_{14}H_{16}O_4$  και μάζα 248,2744.

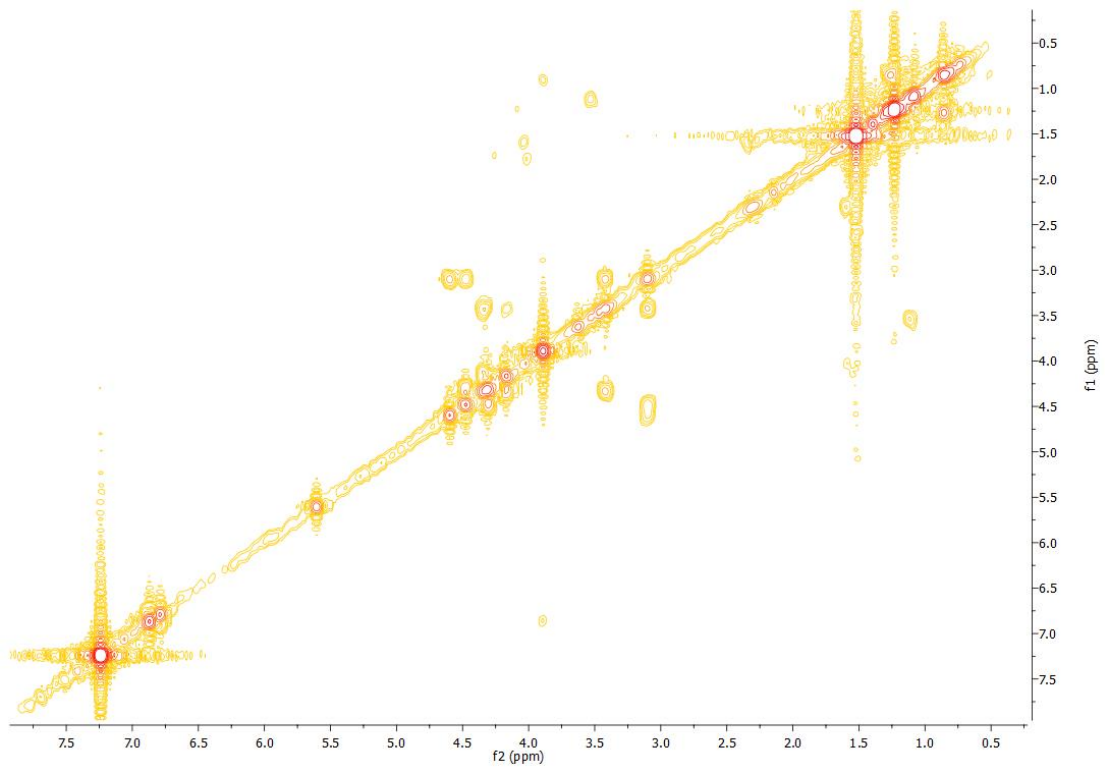
Από την ανάλυση των φασμάτων NMR εξήχθησαν τα ακόλουθα συμπεράσματα:

- Στην αρωματική περιοχή υπάρχουν τρία σήματα, τα οποία είναι χαρακτηριστικά για την παρουσία ABX συστήματος ανήκουν στον αρωματικό δακτύλιο του λιγνανίου.
- Στην περιοχή 3.0-5.0 ppm παρατηρούμε σήματα των οποίων οι άνθρακες συνδέονται με οξυγόνο. Με το ετεροπυρηνικό φάσμα δύο διαστάσεων HSQC-DEPT μπορούμε να τα διακρίνουμε μεταξύ τους και με το ομοπυρηνικό φάσμα δύο διαστάσεων  $^1H$ - $^1H$  COSY μπορούμε να δούμε τις συσχετίσεις. Έτσι, εύκολα μπορούμε να διακρίνουμε τα υδρογόνα των ανθράκων του συστήματος των δύο πενταμελών δακτυλίων. Επίσης, εύκολα διακρίνουμε την παρουσία της μεθόξυ-ομάδας, η οποία εμφανίζεται ως απλή κορυφή στα 3.89 ppm του φάσματος  $^1H$ -NMR, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 56.2 ppm.

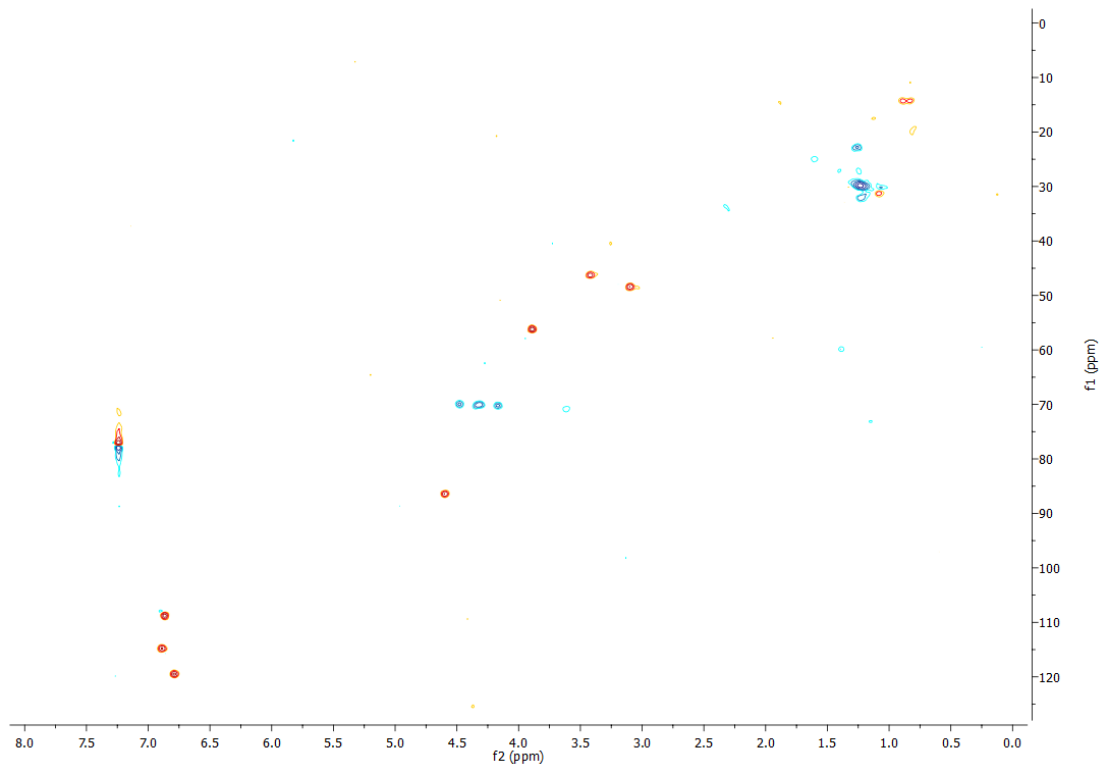
Η σαλικιφολιόλη απομονώνεται για πρώτη φορά από το γένος *Paliurus* και από την οικογένεια Rhamnaceae



Εικόνα 74: Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR του μεταβολίτη 7 σε  $\text{CDCl}_3$ . Κάτω διακρίνονται λεπτομέρειες του φάσματος



Εικόνα 75: Φάσμα  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY του μεταβολίτη 7 σε  $\text{CDCl}_3$



Εικόνα 76: Φάσμα  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC-DEPT του μεταβολίτη 7 σε  $\text{CDCl}_3$



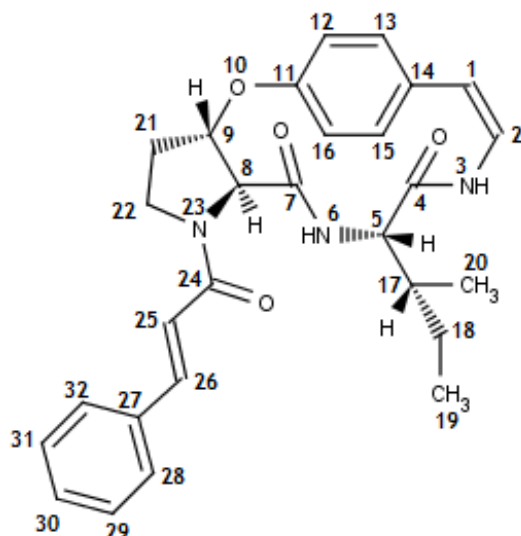
Πίνακας 15: Φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη 7 σε CDCl<sub>3</sub>

| Θέση              | <sup>1</sup> H-NMR |                                     | <sup>13</sup> C-NMR |
|-------------------|--------------------|-------------------------------------|---------------------|
|                   | δ (ppm)            | Multiplicity, J (Hz)                | δ (ppm)             |
| 1                 | 3.42               | 1H, td, J = 9.0 / 3.8               | 46.2                |
| 2                 | -                  | -                                   | 177.8               |
| 4 <sup>#</sup>    | 4.48               | 1H, dd, J = 9.7 / 6.9               | 69.9                |
|                   | 4.31               | 1H, dd, J = 9.7 / 2.2               |                     |
| 5                 | 3.10               | 1H, dddd, J = 9.6 / 6.8 / 6.8 / 2.2 | 48.5                |
| 6                 | 4.60               | 1H, d, J = 6.5                      | 86.5                |
| 8 <sup>#</sup>    | 4.34               | 1H, t, J = 9.2                      | 70.2                |
|                   | 4.17               | 1H, dd, J = 9.2 / 3.8               |                     |
| 1'                | -                  | -                                   | n.d.                |
| 2'                | 6.87               | 1H, d, J = 2.0                      | 108.8               |
| 3'                | -                  | -                                   | n.d.                |
| 4'                | -                  | -                                   | n.d.                |
| 5'                | 6.89               | 1H, d, J = 8.0                      | 114.8               |
| 6'                | 6.79               | 1H, dd, J = 8.0 / 2.0               | 119.5               |
| -OCH <sub>3</sub> | 3.89               | 3H, s                               | 56.2                |
| 4-OH              | 5.61               | 1H, s                               | -                   |

- #: Οι χημικές μετατοπίσεις των διαστερεοτοπικών μεθυλενικών πρωτονίων προσδιορίστηκαν με τη βοήθεια του φάσματος HSQC-DEPT. Η σχετική στερεοχημεία τους καθορίστηκε στην βάση των σταθερών σύζευξης
- n.d. :Οι χημικές μετατοπίσεις των τεταρτοταγών ανθράκων δεν προσδιορίστηκαν ελλείψει φάσματος HMBC

### 2.2.3.3.8 Μεταβολίτης 8

Ο μεταβολίτης 8 απομονώθηκε από τη ζώνη D του κλάσματος EtOAc 100% της VLC1 του κλάσματος EtOAc (L.L.E.) του μεθανολικού εκκυλίσματος με ημιπαρασκευαστική χρωματογραφία NP-HPLC (βλ. 2.2.3.2.4.2). Η δομή του μορίου (Εικόνα 77) προσδιορίστηκε με τη μελέτη φασάτων NMR (Εικόνα 78 - 81) που ελήφθησαν σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl<sub>3</sub>).



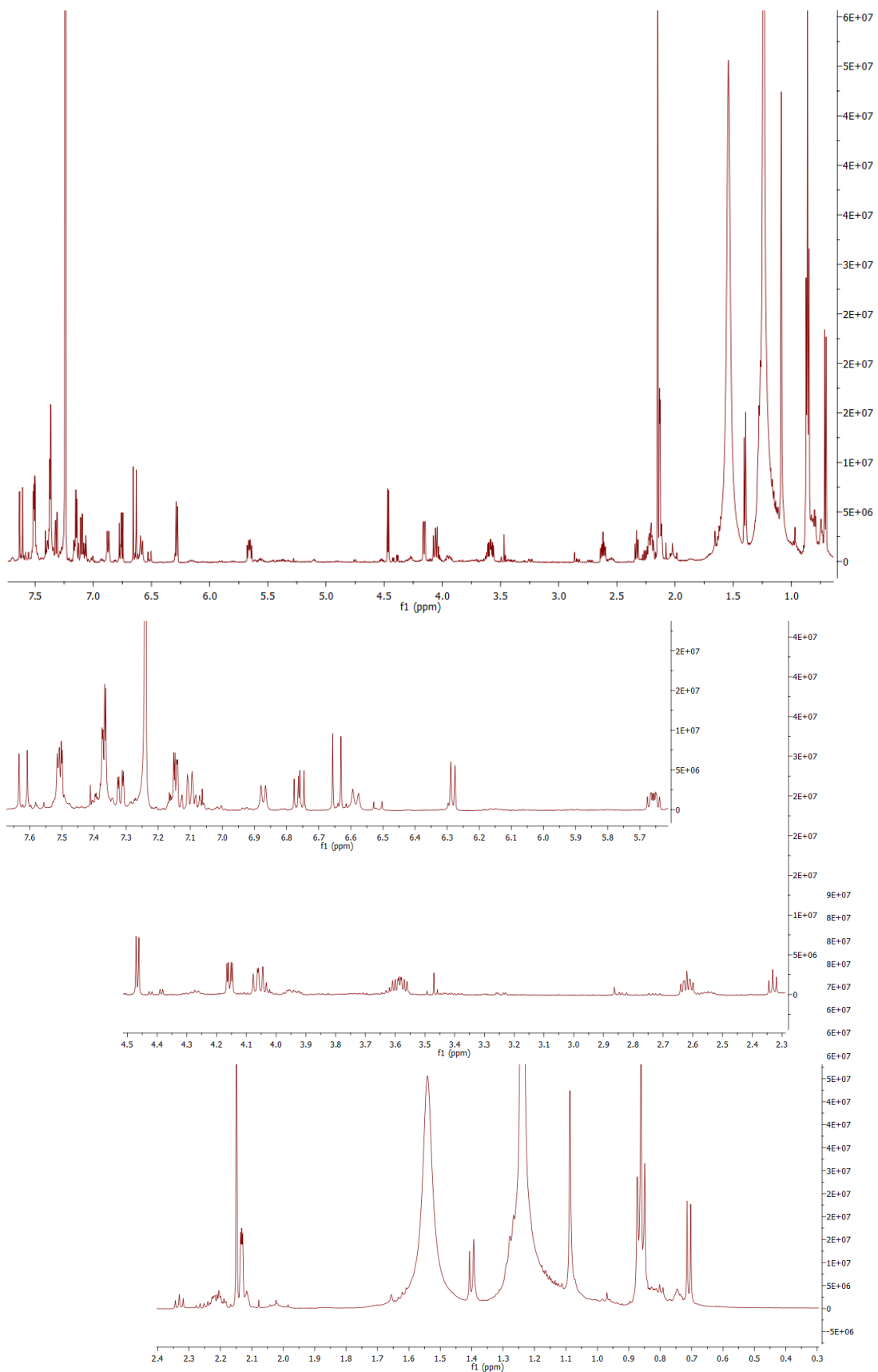
Εικόνα 77: Η δομή του μεταβολίτη 8

Η εικόνα του φάσματος <sup>1</sup>H NMR του μεταβολίτη 8 είναι παρόμοια με αυτή του μεταβολίτη 5 και έτσι δόθηκε έμφαση στον εντοπισμό των χαρακτηριστικών ομάδων του κυκλοπεπτιδικού αλκαλοειδούς. Πιο συγκεκριμένα:

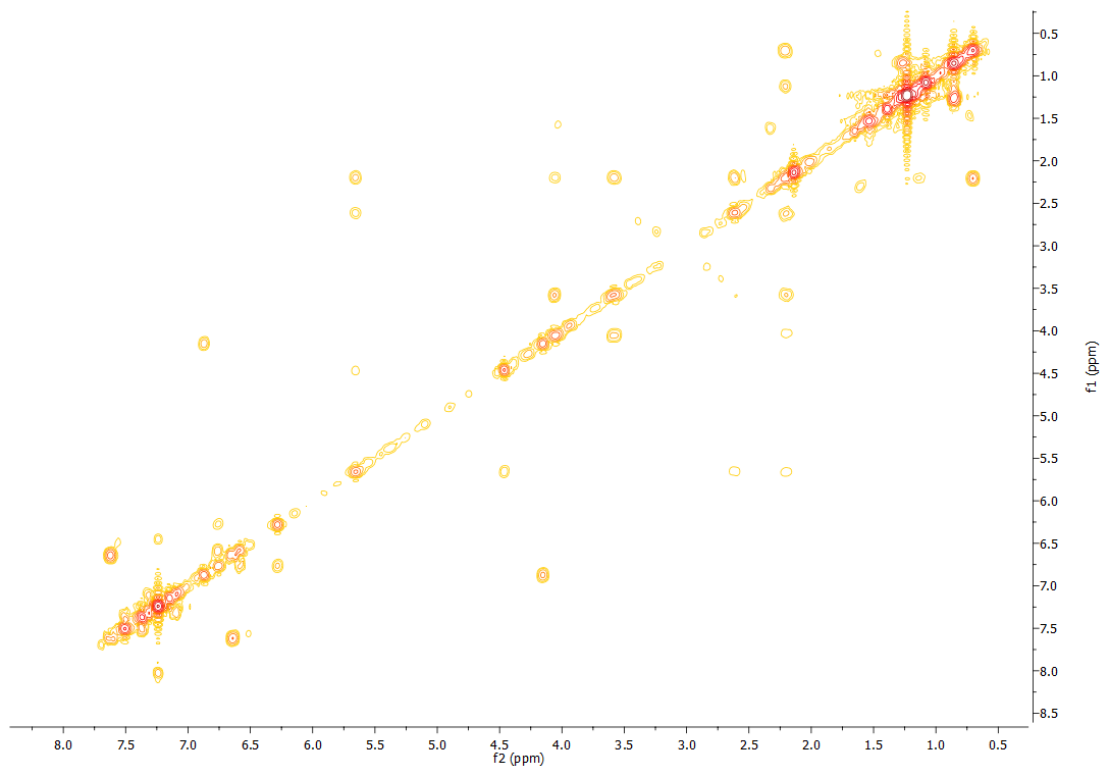
- Στο ετεροπυρηνικό φάσμα HSQC-DEPT διακρίνεται ένα πρωτόνιο του οποίου ο άνθρακας συντονίζεται στα 83.4ppm και αντιστοιχεί στο οξυγονωμένο μεθίλιο της θέσης C-9, το οποίο αποτελεί β-άνθρακα της β-υδροξυαμινοξικής μονάδας του κυκλοπεπτιδίου. Το H-9 (5.66 ppm, ddd,  $J = 10.0 / 7.0 / 5.3$  Hz) παρουσιάζει σύζευξη (COSY) με το πρωτόνιο H-8, το οποίο συντονίζεται στα 4.47 ppm (d,  $J = 5.6$ Hz), ενώ ο αντίστοιχος άνθρακός (α-άνθρακας της β-υδροξυαμινοξικής μονάδας) συντονίζεται στα 64.0 ppm. Έτσι, το H-8 του κυκλοπεπτιδίου δεν παρουσιάζει ομοπυρηνική σύζευξη με αμιδικό πρωτόνιο, όπως συνέβαινε στην περίπτωση των μεταβολιτών 5 και 6. Τα δύο προαναφερόμενα στοιχεία (σύζευξη του H-8 μόνο με το H-9 και σημαντική αποπροστασία του C-8) ήταν ισχυρές ενδείξεις ότι η β-υδροξυαμινοξική μονάδα του κυκλοπεπτιδίου ήταν η προλίνη (Pro), γεγονός που επιβεβαιώθηκε από τις ομοπυρηνικές συζεύξεις του H-9 με τα αλειφατικά μεθυλενικά πρωτόνια 21-H<sub>a</sub> (2.60 ppm) και 21-H<sub>b</sub> (2.20 ppm). Τα τελευταία παρουσίασαν με τη σειρά τους συζεύξεις (COSY) με τα μεθυλενικά πρωτόνια 22-H<sub>a</sub> (3.58 ppm) και 22-H<sub>b</sub> (2.20 ppm). Η HMBC συσχέτιση του H-8 με καρβονυλικό άνθρακα στα 170.0 ppm, επιβεβαίωσε τη θέση του καρβονυλίου της προλίνης (C-7).

- Στην ολεφινική περιοχή του φάσματος  $^1\text{H-NMR}$  και συγκεκριμένα στα 6,28 και 6,76 ppm εμφανίζονται μία διπλή και μία διπλή διπλής κορυφές, οι οποίες παρουσιάζουν σύζευξη με σταθερά  $J = 7.8 \text{ Hz}$ . Επίσης, το πρωτόνιο H-2, το οποίο αντιστοιχεί στη διπλή διπλής κορυφή, παρουσιάζει σύζευξη με το πρωτόνιο αζώτου στα 6.59 ppm (NH-3). Τα προαναφερόμενα σήματα είναι χαρακτηριστικά της ύπαρξης του του *cis*-διπλού δεσμού της στυρυλάμινο- υπομονάδας.
- Η απουσία βενζυλικών μεθυλενικών πρωτονίων που θα είχαν σύζευξη (COSY) με το μεθίνιο του  $\alpha$ -άνθρακα αμινοξέος ή/και HMBC συζεύξεις με αρωματικούς άνθρακες (όπως στην περίπτωση της οξυφυλλίνης C-μεταβολίτης-6) απέκλεισαν την παρουσία φαινυλαλανίνης (Phe).
- Στην αρωματική περιοχή του φάσματος  $^1\text{H NMR}$ , το αμιδικό πρωτόνιο στα 6.59 ppm παρουσίασε σύζευξη (COSY) με το ολεφινικό μεθίνιο H-2 (6.76 ppm) της στυρυλάμινο- υπομονάδας και έτσι αποδόθηκε στο NH-3. Η ισχυρή σύζευξη με σταθερά 15 Hz των δύο ολεφινικών πρωτονίων στα 6.64 ppm και 7.62 ppm επιβεβαίωσε την ύπαρξη κιναμμωμικής ομάδας στο μόριο, ενώ από τη συνδυαστική μελέτη ομοπυρηνικών και ετεροπυρηνικών συσχετίσεων αυτών των πρωτονίων προσδιορίσαμε όλες της χημικές μετατοπίσεις των ατόμων αυτής της υπομονάδας.
- Έχοντας αποδώσει τις κορυφές των τεσσάρων ολεφινικών μεθινίων της στυρυλάμινο υπομονάδας και της κιναμμωμικής υπομονάδας, παρέμειναν εννέα ακόμα αρωματικά πρωτόνια (όπως διαπιστώθηκε από τις ολοκληρώσεις στο φάσμα  $^1\text{H NMR}$ ) που αντιστοιχούν στους αρωματικούς δακτυλίους των δύο προαναφερόμενων υπομονάδων. Η απόδοσή τους στηρίχτηκε στα φάσματα HSQC-DEPT και HMBC. Καθοριστική συμβολή σε αυτό είχαν οι HMBC συσχετίσεις του H-26 με τους C-28/C-32 στα 128.2 ppm, των H-31/H-29 (7.37 ppm) με τον C-28 (134.5 ppm) και των H-2 και H-13 με τους άνθρακες C-14 (132.5 ppm) και C-11 (157.2 ppm), αντίστοιχα.
- Στην αλειφατική περιοχή του φάσματος  $^1\text{H NMR}$  υπάρχει μία διπλή και μία τριπλή κορυφή, που αντιστοιχούν σε πρωτόνια μεθυλίων και συνηγορούν στη ύπαρξη Ισολευκίνης (Ile) στο μόριο. Τα μεθυλικά πρωτόνια H-20 (0.70 ppm) συζεύγνυνται με το μεθινικό πρωτόνιο H-21 (2.21 ppm, m), ενώ τα H-19 (0.86 ppm) συζεύγνυνται με τα μεθυλενικά πρωτόνια H-18 (1.26ppm, 2H, (ονlr)). Η HMBC συσχέτιση του H-20 με τον  $\alpha$ -άνθρακα του αμινοξέος C-5 (59.0 ppm) και του H-19 με τον C-18 συνετέλεσαν στην ολοκλήρωση της απόδοσης όλων των ατόμων του αμινοξέος Ile που είναι συνδεδεμένο στο δακτύλιο. Οι ασθενείς HMBC συσχετίσεις του H-5 με τα δύο καρβονύλια C-4 (167 ppm) και C-7 (170.0 ppm) επιβεβαίωσαν την πεπτιδική σύνδεση της ισολευκίνης (*ring-bound* αμινοξύ) με την προλίνη ( $\beta$ -υδροξυαμινοξύ).

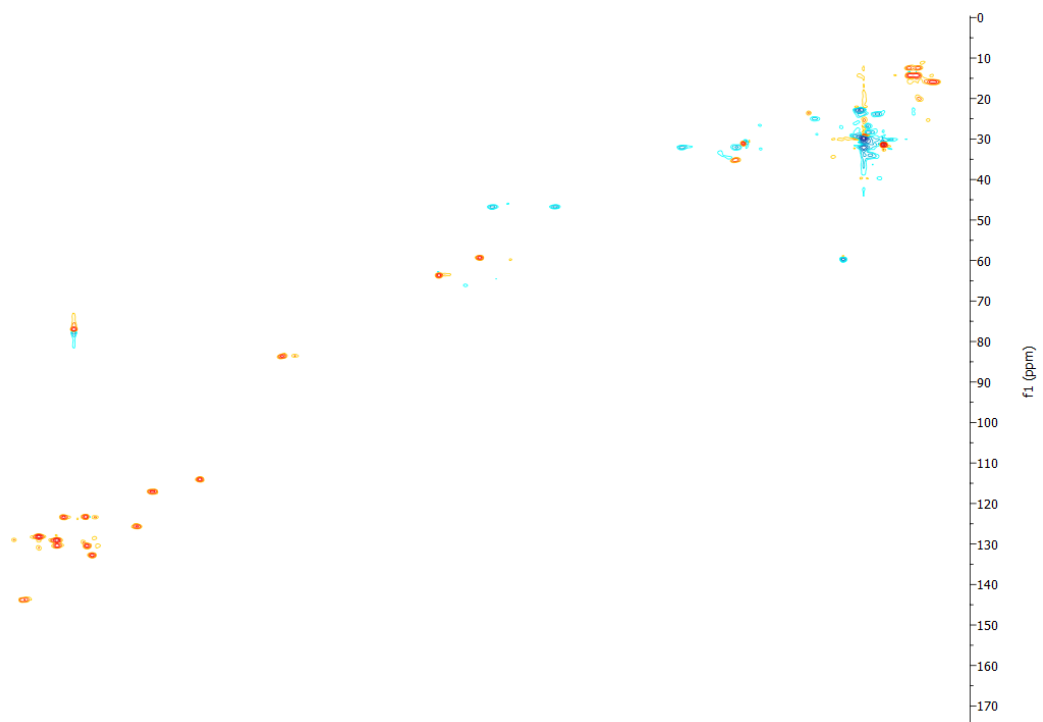
Η στερεοχημείες των χειρικών κέντρων του μορίου είναι 5S, 17S, 8S, 9S, στη βάση των βιβλιογραφικών δεδομένων που εξηγήουμε στη συνέχεια.



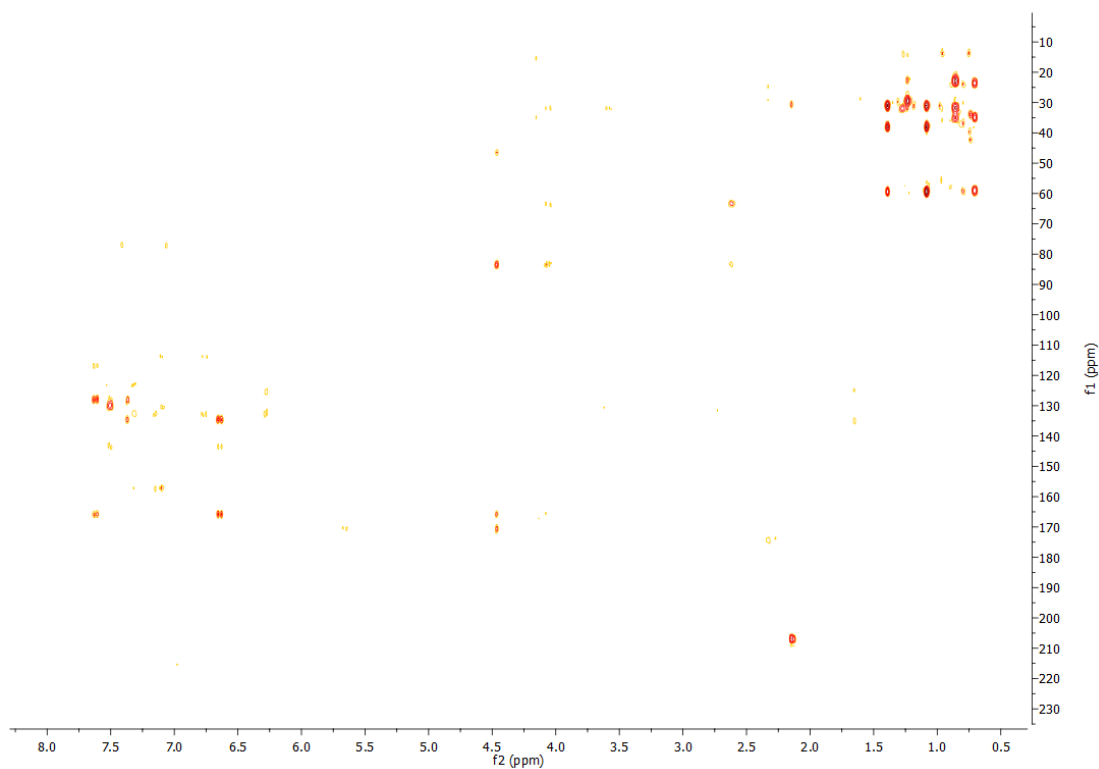
Εικόνα 78: Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR του μεταβολίτη 8 σε  $\text{CDCl}_3$ . Κάτω διακρίνονται μεγεθύνσεις του φάσματος



Εικόνα 79: Φάσμα  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY του μεταβολίτη 8 σε  $\text{CDCl}_3$



Εικόνα 80: Φάσμα  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC-DEPT του μεταβολίτη 8 σε  $\text{CDCl}_3$



Εικόνα 81: Φάσμα  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBSC του μεταβολίτη 8 σε  $\text{CDCl}_3$

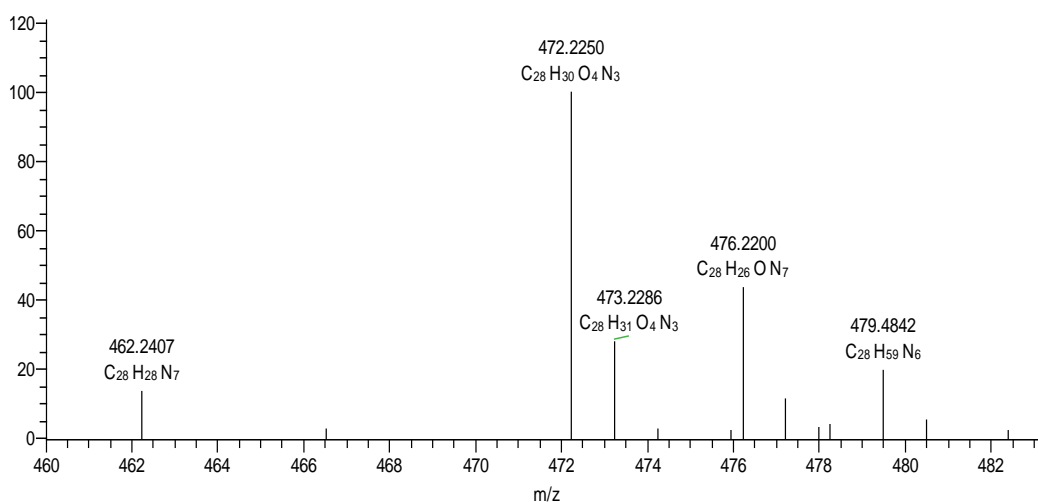
Πίνακας 16: Φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη 8 σε  $\text{CDCl}_3$

| Θέση | $^1\text{H-NMR}$ |                                 | $^{13}\text{C-NMR}$ |
|------|------------------|---------------------------------|---------------------|
|      | $\delta$ (ppm)   | Multiplicity, $J$ (Hz)          | $\delta$ (ppm)      |
| 1    | 6.28             | 1H, d, $J = 7.9$                | 114.0               |
| 2    | 6.76             | 1H, dd, $J = 10.6 / 7.9$        | 125.7               |
| 3-NH | 6.59             | 1H, d, $J = 10.6$               | -                   |
| 4    | -                | -                               | 167.0               |
| 5    | 4.15             | 1H, dd, $J = 8.6 / 3.0$ Hz      | 59.0                |
| 6-NH | 6.87             | 1H, d, $J = 8.6$                | -                   |
| 7    | -                | -                               | 170.0               |
| 8    | 4.47             | 1H, d, $J = 5.6$                | 64.0                |
| 9    | 5.66             | 1H, ddd, $J = 10.0 / 7.0 / 5.6$ | 83.4                |
| 11   | -                | -                               | 157.0               |
| 12   | 7.32             | 1H, dd, $J = 8.3 / 2.0$         | 123.4               |
| 13   | 7.10             | 1H, dd, $J = 8.3 / 1.8$         | 132.8               |

|       |      |                                  |       |
|-------|------|----------------------------------|-------|
| 14    | -    | -                                | 132.5 |
| 15    | 7.14 | 1H, dd, $J = 8.0 / 1.8$          | 130.4 |
| 16    | 7.15 | 1H, dd, $J = 8.0 / 2.0$          | 123.3 |
| 17    | 2.21 | 1H, (ovlp)                       | 35.0  |
| 18    | 1.26 | 1H, (ovlp)                       | 23.0  |
|       | 1.26 | 1H, (ovlp)                       |       |
| 19    | 0.86 | 3H, t, $J = 7.0\text{Hz}$        | 12.5  |
| 20    | 0.70 | 3H, d, $J = 7.0$                 | 15.9  |
| 21    | 2.60 | 1H, ddd, $J = 12.3 / 7.0 / 5.3$  | 32.0  |
|       | 2.20 | 1H, (ovlp)                       |       |
| 22    | 3.58 | 1H, ddd, $J = 12.8 / 11.0 / 5.3$ | 47.0  |
|       | 4.05 | 1H, dd, $J = 11.0 / 8.4$         |       |
| 24    | -    | -                                | 166.0 |
| 25    | 6.64 | 1H, d, $J = 15.5$                | 117.0 |
| 26    | 7.62 | 1H, d, $J = 15.5$                | 144.0 |
| 27    | -    | -                                | 134.5 |
| 28/32 | 7.51 | 2H, (ovlp)                       | 128.2 |
| 29/31 | 7.37 | 2H, (ovlp)                       | 129.0 |
| 30    | 7.37 | 1H, (ovlp)                       | 130.3 |

- ο ovlp: Οι πολλαπλότητες και οι συζεύξεις δε διακρίνονται λόγω αλληλο-επικάλυψης των σημάτων.

PSC\_D\_P5\_12\_4\_17\_ESI(-) #15 RT: 0.15 AV: 1 NL: 3.20E5  
T: FTMS - c ESI Full ms [100.00-1000.00]



Εικόνα 82. Φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας με αρνητικό ιονισμό του μεταβολίτη 8. Βλέπουμε ότι το ψευδομοριακό ιόν είναι 472.2250.

Στο φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας με αρνητικό ιονισμό (Εικόνα 82) βλέπουμε ότι το ψευδομοριακό ιόν είναι 472.2250. Η διαφορά από τη θεωρητική τιμή του θραύσματος {M-H}<sup>-</sup> είναι 3.170ppm. Ο Χημικός Τύπος που δίνεται μέσω του ψευδομοριακού ιόντος είναι C<sub>28</sub>H<sub>30</sub>O<sub>4</sub>N<sub>3</sub>, άρα ο Χημικός Τύπος της ένωσης είναι C<sub>28</sub>H<sub>31</sub>O<sub>4</sub>N<sub>3</sub> και σε αυτόν αντιστοιχούν 14 βαθμοί ακορεστότητας. Τα δεδομένα που πήραμε από το φάσμα μάζας συμφωνούν με τα φασματοσκοπικά δεδομένα και επιβεβαιώνουν τον ισχυρισμό ότι πρόκειται για το Μεταβολίτη 8.

Ο μεταβολίτης 8 είναι ένα 3(14) κυκλοπεπτιδικό αλκαλοειδές (τύπου Ia3).

Ολοκληρώνοντας την απόδοση της συντακτικής δομής των τριών κυκλοπεπτιδικών αλκαλοειδών (μεταβολιτών 5, 6 και 8) θα θέλαμε να προσθέσουμε εδώ κάποιες παρατηρήσεις που αφορούν στα χειρικά κέντρα των μορίων αυτών και να αιτιολογήσουμε τις στερεοχημείες που έχουμε αποδώσει στις δομές τους.

Τα αμινοξέα που απαντούν στην φύση παρουσιάζουν συνήθως L-στερεοχημεία στους α-άνθρακες. Στα κυκλοπεπτιδικά αλκαλοειδή αυτό επιβεβαιώνεται στη συντριπτική πλειοψηφία των απομονωμένων μεταβολιτών, εκτός από μια μοναδική καταγεγραμμένη περίπτωση (και για αυτό τον λόγο αμφισβητήσιμη), αυτή της σκουτιανίνης-E (όπου το β-υδροξυαμινοξύ, Λευκίνη παρουσιάζει D-στερεοχημεία στον α-άνθρακα) από τη *Scutia buxifolia* (Morel *et al.*, 1979). Σε αυτό το πλαίσιο αποδώσαμε σε όλες τις αμινοξικές υπομονάδες και των τριών μεταβολιτών την L-στερεοχημεία στους α-άνθρακες τους και σύμφωνα με την ορολογία C-I-P (Cahn-Ingold-Prelog) τους χαρακτηρίσαμε ως S\*. Στην περίπτωση της ισολευκίνης (Ile), της συνδεδεμένης στο δακτύλιο αμινοξικής υπομονάδας του μεταβολίτη-8, και το δεύτερο χειρικό κέντρο της (εκτός από τον α-άνθρακα), δηλ. τον C-17 του μορίου, χαρακτηρίστηκε ως S\*, γιατί αυτές είναι οι στερεοχημείες της φυσικής L-Ισολευκίνης (2S, 3S).

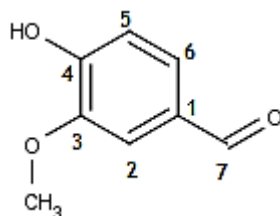
Στα χειρικά κέντρα των β-οξυγονωμένων ανθράκων στις β-υδροξυαμινοξικές υπομονάδες των απομονωμένων μεταβολιτών, δηλαδή στο β-άνθρακα της β-υδροξυλευκίνης (C-9, μεταβολίτης-5), στο β-άνθρακα της β-υδροξυφαινουλαανίνης (C-9, μεταβολίτης-6) και στο β-άνθρακα της β-υδροξυισολευκίνης (C-9, μεταβολίτης-8), αποδώσαμε την S\* στερεοχημεία, στη βάση των χημικών μετατοπίσεων του άνθρακα C-9 (81-83 ppm για την L-erythro μορφή / 87ppm για την D-erythro μορφή) και των σταθερών σύζευξης μεταξύ των H-9 και H-8 (7-8 Hz στην *anti*-γεωμετρία / 2Hz στην *syn*-γεωμετρία) (Gournelis, & Verpoorte, 1997; Mostardeiro *et al.*, 2013; Tuenter *et al.*, 2016; Tuenter, *et al.*, 2017; Tuenter *et al.*, 2017).

Ο μεταβολίτης 8 αποτελεί πιθανότατα ένα νέο φυσικό προϊόν.



### 2.2.3.3.9 Μεταβολίτης 9

Ο μεταβολίτης 9 απομονώθηκε από τη ζώνη 6 του κλάσματος EtOAc/MeOH της VLC1 του κλάσματος EtOAc (L.L.E.) του μεθανολικού εκχυλίσματος με ημιπαρασκευαστική χρωματογραφία NP-HPLC (βλ. 2.2.3.2.5.1). Η δομή του μορίου (Εικόνα 83) προσδιορίστηκε με βάση τη φασματοσκοπία NMR (Εικόνα 84) και αναγνωρίστηκε ως η Βανιλίνη.



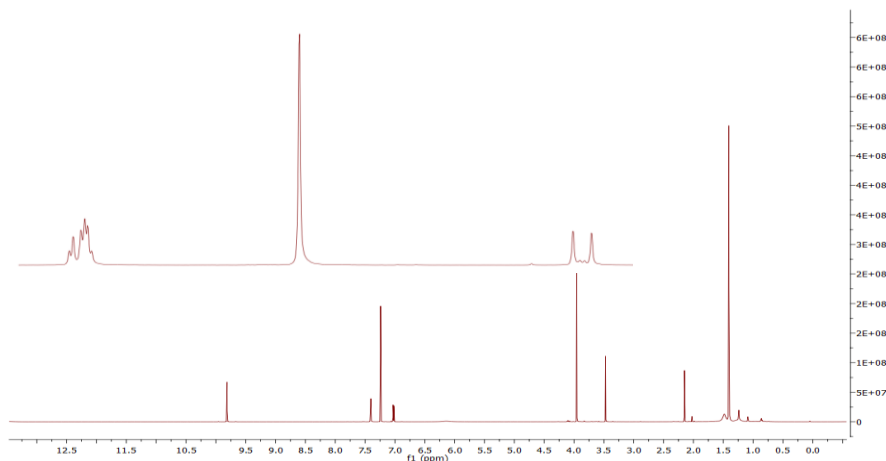
Εικόνα 83: Η δομή του μεταβολίτη 9 (Βανιλίνη)

Πίνακας 17: Φασματοσκοπικά δεδομένα  $^1\text{H-NMR}$  της βανιλίνης σε  $\text{CDCl}_3$

| Θέση              | $^1\text{H}$ ( $\delta$ ) (ppm) | Σταθερά σύζευξης $J$ (Hz) |
|-------------------|---------------------------------|---------------------------|
| 2                 | 7.40                            | 1H, (ονlr)                |
| 5                 | 7.02                            | 1H, d, $J = 8.4$          |
| 6                 | 7.41                            | 1H, (ονlr)                |
| 7                 | 9.81                            | 1H, s                     |
| -OCH <sub>3</sub> | 3.96                            | 3H, s                     |

- ονlr: Οι πολλαπλότητες και οι συζεύξεις δεν διακρίνονται λόγω αλληλοεπικάλυψης των σημάτων.

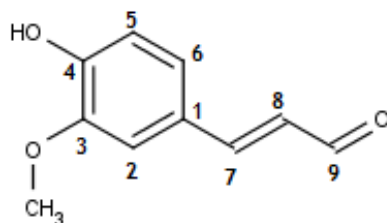
Η βανιλίνη έχει χημικό τύπο  $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$  και σχετική μοριακή μάζα.  $M_r=152$  amu Απομονώνεται για πρώτη φορά από το γένος *Paliurus*.



Εικόνα 84: Φάσμα  $^1\text{H NMR}$  του μεταβολίτη 9 σε  $\text{CDCl}_3$ . Πάνω αριστερά φαίνεται μία μενέθυσση του φάσματος

### 2.2.3.3.10 Μεταβολίτης 10

Ο μεταβολίτης 10 απομονώθηκε από τη ζώνη 6 του κλάσματος EtOAc/MeOH της VLC1 του κλάσματος EtOAc (L.L.E.) του μεθανολικού εκχυλίσματος με ημιπαρασκευαστική χρωματογραφία NP-HPLC (βλ. 2.2.3.2.5.1). Η δομή του μορίου (Εικόνα 85) προσδιορίστηκε με βάση τη φασματοσκοπία NMR (Εικόνα 86) και αναγνωρίστηκε ως η 3-μεθοξυ-4-υδροξυκινναμαλδεΐδη.

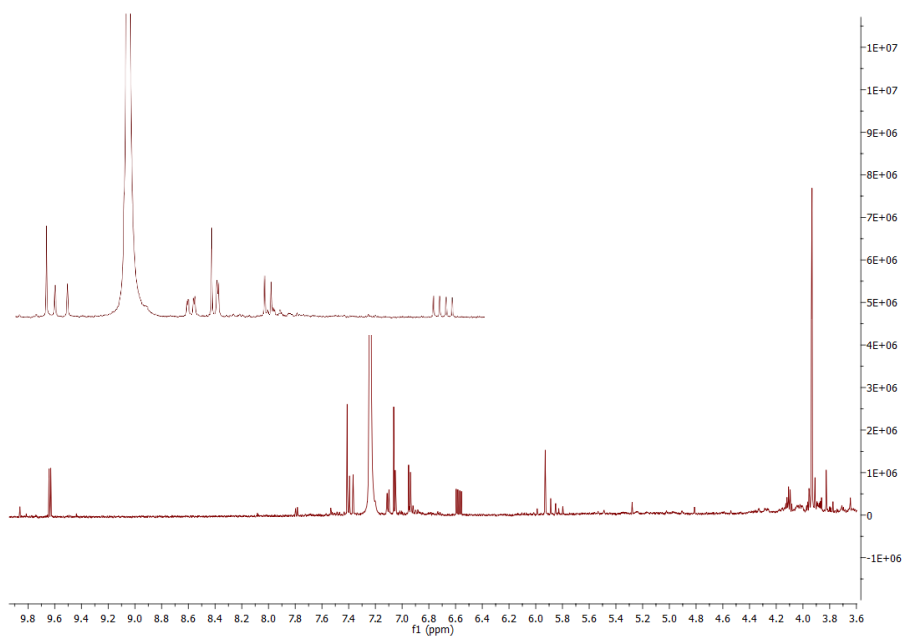


Εικόνα 85: Η δομή του μεταβολίτη 10 (3-μεθοξυ-4-υδροξυκινναμαλδεΐδη)

Πίνακας 18: Χημικές μετατοπίσεις και σταθερών σύζευξης της 4-hydroxy-3-methoxy-cinnamaldehyde σε CDCl<sub>3</sub>

| Θέση              | <sup>1</sup> H (δ) (ppm) | Σταθερά σύζευξης J (Hz) |
|-------------------|--------------------------|-------------------------|
| 2                 | 7.05                     | 1H, d, J = 2.0          |
| 5                 | 6.94                     | 1H, d, J = 8.0          |
| 6                 | 7.11                     | 1H, d, J = 8.0/2.0      |
| 7                 | 7.38                     | 1H, d, J = 15.8         |
| 8                 | 6.57                     | 1H, dd, J = 15.8 /7.7   |
| 9                 | 9.64                     | 1H, d, J = 7.7          |
| -OCH <sub>3</sub> | 3.96                     | 3H, s                   |
| 4-OH              | 5.93                     | 1H, s                   |

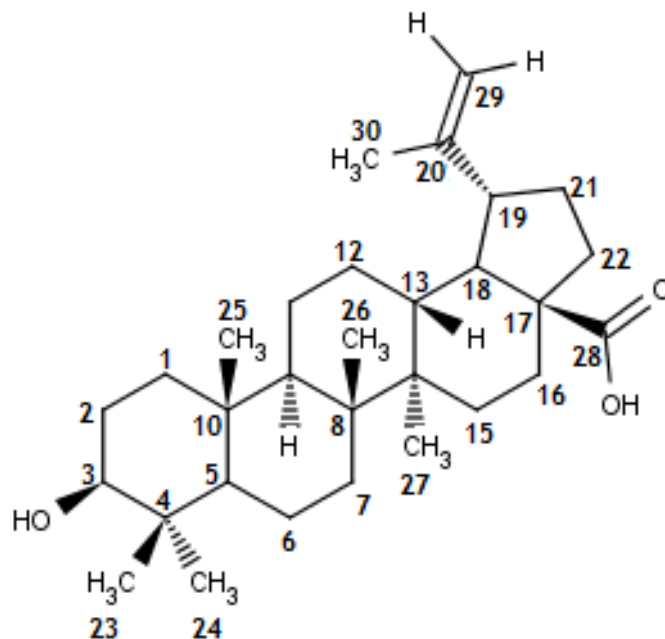
Η 3-μεθοξυ-4-υδροξυκινναμαλδεΐδη έχει χημικό τύπο C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub> και σχετική μοριακή μάζα M<sub>r</sub>=178 amu. Απομονώνεται για πρώτη φορά από το γένος *Paliurus*.



Εικόνα 86: Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR του μεταβολίτη 10 σε  $\text{CDCl}_3$ . Πάνω αριστερά φαίνεται μία μεγέθυνση του φάσματος

#### 2.2.3.3.11 Μεταβολίτης 11

Ο μεταβολίτης 11 απομονώθηκε από τη ζώνη 6 του κλάσματος EtOAc/MeOH της VLC1 του κλάσματος EtOAc (L.L.E.) του μεθανολικού εκχυλίσματος με ημιπαρασκευαστική χρωματογραφία NP-HPLC (βλ. 2.2.3.2.5.1). Η δομή του μορίου (Εικόνα 87) προσδιορίστηκε με βάση τη φασματοσκοπία NMR (Εικόνα 88 - 91) και ταυτοποιήθηκε ως μπετουλινικό οξύ (Khaliq *et al.*, 2007; Mutai *et al.*, 2004).



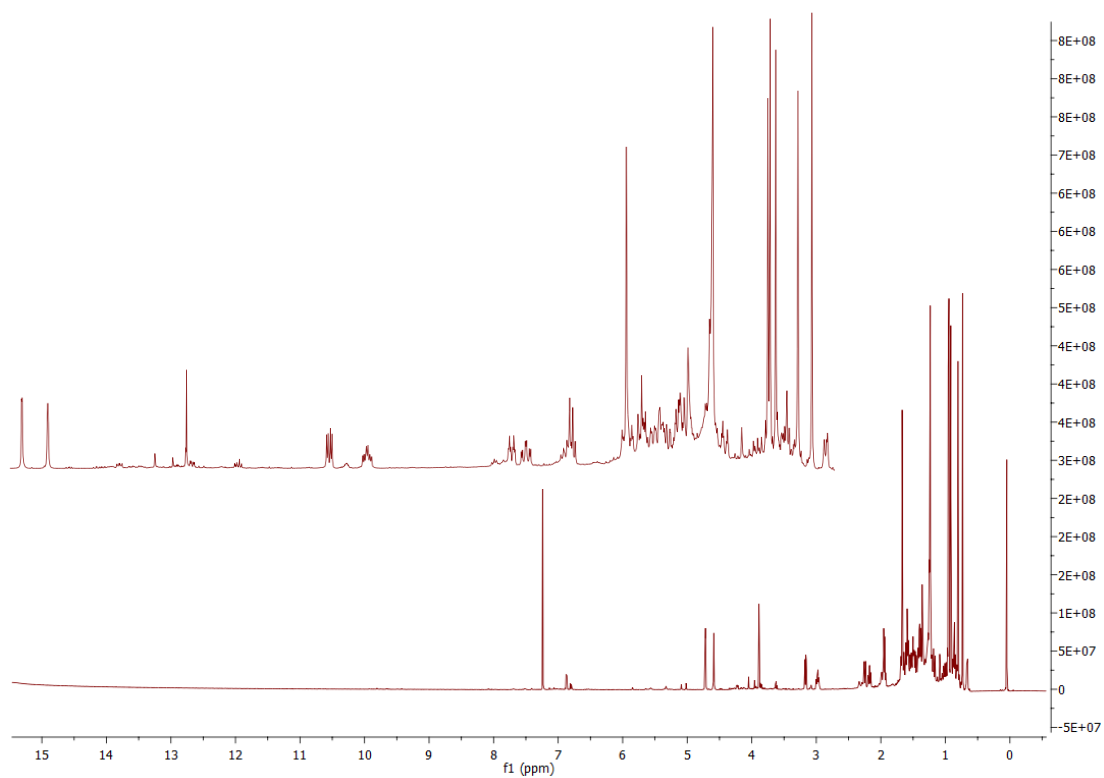
Εικόνα 87: Η δομή του μεταβολίτη 11 (Μπετουλινικό οξύ)

Το φάσμα <sup>1</sup>H NMR του μπετουλινικού οξέος είναι παρόμοιο με αυτό του μεταβολίτη 1 (Λουπεόλη) με την εξαίρεση ότι λείπει μία κορυφή μεθυλίου στην αλειφατική περιοχή.

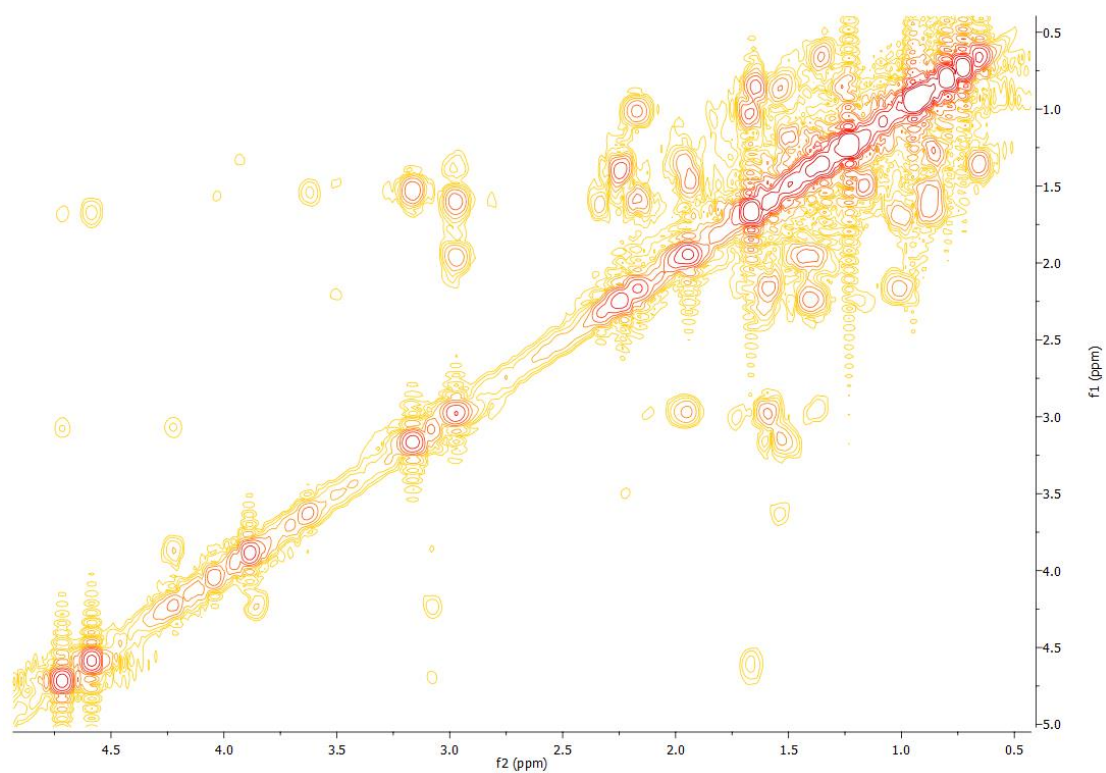
Πιο συγκεκριμένα, από την ανάλυση των σημάτων παρατηρήσαμε τα εξής:

- Στην ολεφινική περιοχή (4.67 και 4.55 ppm) παρατηρούμε δύο κορυφές που ολοκληρώνουν για 1H η καθεμία και αντιστοιχούν στα H-29a και H-29b. Οι κορυφές αυτές συμφωνούν με την παρουσία εξωμεθυλενικού διπλού δεσμού και είναι χαρακτηριστικές για τα τριτερπένια τύπου λουπανίου.
- Στην οξυγονωμένη περιοχή (3.17 ppm) παρατηρούμε μία πολλαπλή κορυφή που ολοκληρώνει για 1H και αντιστοιχεί στο H-3.

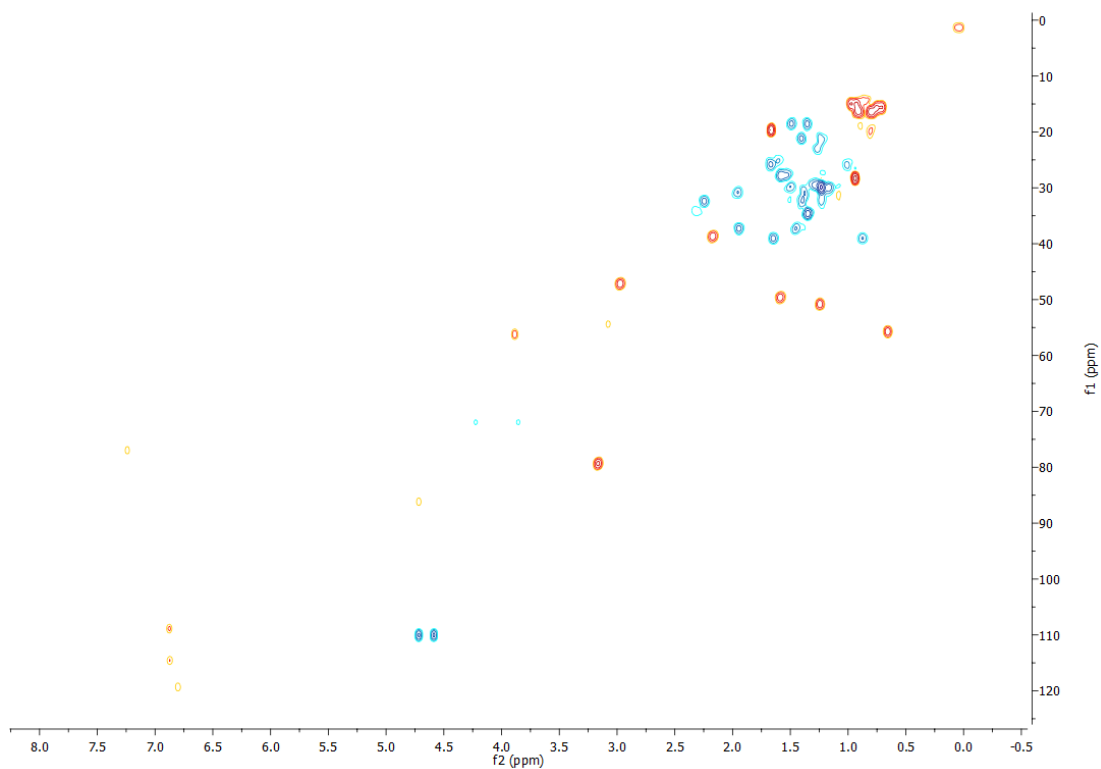
Στην αλειφατική περιοχή παρατηρούμε έξι κορυφές που ολοκληρώνουν για 3H η καθεμία και αντιστοιχούν σε μεθυλικά πρωτόνια. Η κορυφή στα 1.66 ppm είναι χαρακτηριστική για μεθύλιο που συνδέεται σε διπλό δεσμό και συγκεκριμένα για τα μεθυλικά πρωτόνια H-30 στα τριτερπένια τύπου λουπανίου. Η κορυφή του μεθυλίου που λείπει από το φάσμα (σε σχέση με αυτό της λουπεόλης) αντιστοιχεί στη θέση που υπάρχει η καρβοξυλομάδα στην περίπτωση του μπετουλινικού οξέος.



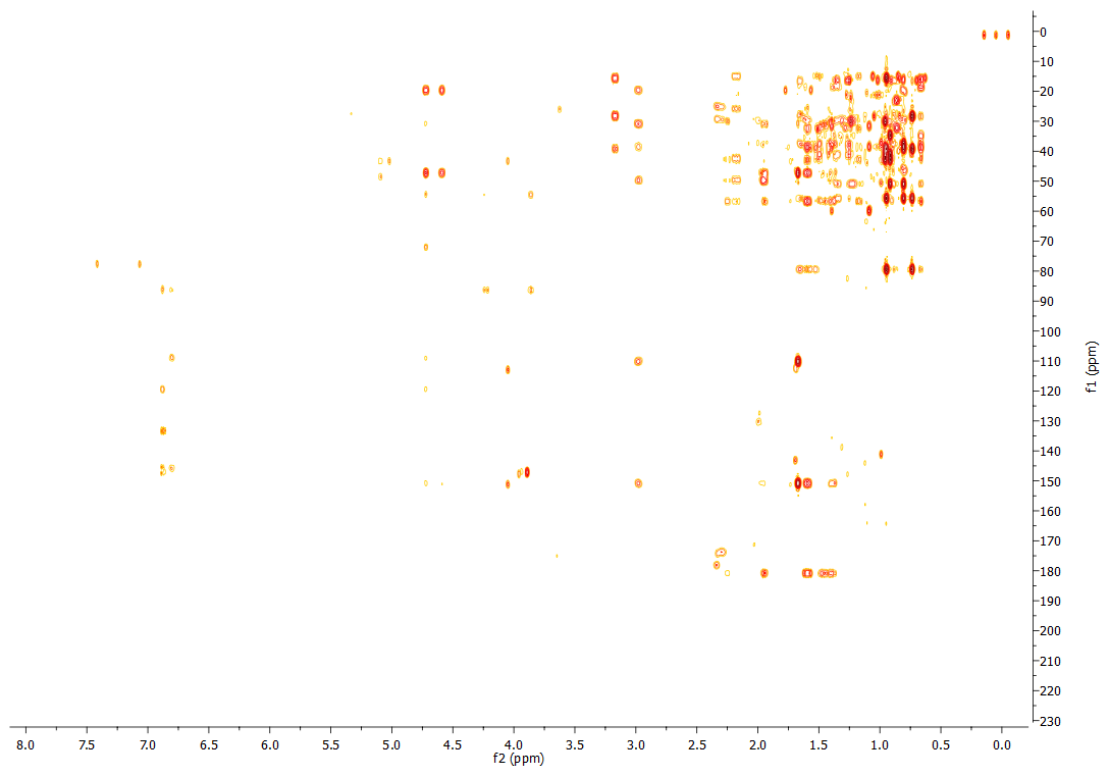
Εικόνα 88: Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR του μεταβολίτη 11 σε  $\text{CDCl}_3$ . Πάνω αριστερά φαίνεται μία μεγέθυνση του φάσματος



Εικόνα 89: Φάσμα  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY του μεταβολίτη 11 σε  $\text{CDCl}_3$



Εικόνα 90: Φάσμα  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC-DEPT του μεταβολίτη 11 σε  $\text{CDCl}_3$



Εικόνα 91: Φάσμα  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC του μεταβολίτη 11 σε  $\text{CDCl}_3$

Πίνακας 19: Φασματοσκοπικά δεδομένα του μπετουλινικού οξέος σε CDCl<sub>3</sub>

| Θέση | <sup>1</sup> H-NMR |                        | <sup>13</sup> C-NMR |
|------|--------------------|------------------------|---------------------|
|      | δ (ppm)            | Multiplicity, J (Hz)   | δ (ppm)             |
| 1    | 0.88               | 1H, (ovlp)             | 39.1                |
|      | 1.65               | 1H, (ovlp)             |                     |
| 2    | 1.60               | 1H, (ovlp)             | 27.8                |
|      | 1.55               | 1H, (ovlp)             |                     |
| 3    | 3.17               | 1H, dd, J = 11.6 / 4.7 | 79.3                |
| 4    | -                  | -                      | 39.0                |
| 5    | 0.65               | 1H, dd, J = 9.1 / 3.0  | 55.9                |
| 6    | 1.49               | 1H, (ovlp)             | 18.6                |
|      | 1.36               | 1H, (ovlp)             |                     |
| 7    | 1.34               | 2H, (ovlp)             | 34.8                |
| 8    | -                  | -                      | 40.8                |
| 9    | 1.24               | 1H, (ovlp)             | 50.5                |
| 10   | -                  | -                      | 38.5                |
| 11   | 1.41               | 1H, (ovlp)             | 21.1                |
|      | 1.23               | 1H, (ovlp)             |                     |
| 12   | 1.01               | 1H, m                  | 25.9                |
|      | 1.67               | 1H, (ovlp)             |                     |
| 13   | 2.16               | 1H, td, J = 13.6 / 3.6 | 38.4                |
| 14   | -                  | -                      | 42.7                |
| 15   | 1.50               | 1H, (ovlp)             | 30.0                |
|      | 1.17               | 1H, (ovlp)             |                     |
| 16   | 2.25               | 1H, t, J = 12.8 / 3.0  | 32.4                |
|      | 1.40               | 1H, (ovlp)             |                     |
| 17   | -                  | -                      | 56.9                |
| 18   | 1.59               | 1H, (ovlp)             | 49.7                |
| 19   | 2.98               | 1H, td, J = 10.7 / 4.7 | 47.3                |
| 20   | -                  | -                      | 150.8               |
| 21   | 1.95               | 1H, m                  | 30.9                |
|      | 1.38               | 1H, (ovlp)             |                     |

|    |      |                  |       |
|----|------|------------------|-------|
| 22 | 1.50 | 1H, (ovlp)       | 37.4  |
|    | 1.99 | 1H, m            |       |
| 23 | 0.94 | 3H, s            | 28.4  |
| 24 | 0.73 | 3H, s            | 15.6  |
| 25 | 0.81 | 3H, s            | 16.4  |
| 26 | 0,92 | 3H, s            | 16.3  |
| 27 | 0,96 | 3H, s            | 14.9  |
| 28 | -    | -                | 181.0 |
| 29 | 4.72 | 1H, d, $J = 2.2$ | 110.2 |
|    | 4.59 | 1H, m            |       |
| 30 | 1.67 | 3H, s            | 19.7  |

- ονlp: Οι πολλαπλότητες και οι συζεύξεις δεν διακρίνονται λόγω αλληλοεπικάλυψης των σημάτων

Το μπετουλινικό οξύ, το οποίο έχει μορικό τύπο  $C_{30}H_{48}O_3$  και σχετική μοριακή μάζα  $M_r=456$  amu, απομονώνεται για πρώτη φορά από το είδος *Paliurus spinachristi*, ενώ έχει απομονωθεί ξανά από το γένος *Paliurus* (Chen *et al.*, 2016).



## 2.2.4 Κατεργασία του υδατικού εκχυλίσματος

### 2.2.4.1 Κατεργασία με μακρόπορες ρητίνες ιοντοανταλλαγής XAD

Στο υδατικό εκχύλισμα (Psc-H<sub>2</sub>O) καθώς και στο υδατικό κλάσμα από την υγρή-υγρή εκχύλιση του μεθανολικού εκχυλίσματος (H<sub>2</sub>O-L.L.E.) έγινε δέσμευση του οργανικού φορτίου με χρήση μακρόπορων ρητινών ιοντοανταλλαγής XAD.

Οι ρητίνες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η XAD-4, στην επιφάνεια της οποίας προσροφούνται φαινολικά συστατικά σχετικά μικρού μοριακού βάρους και η XAD-7HP, η οποία έχει την ικανότητα δέσμευσης συστατικών μεγαλύτερου μοριακού βάρους καθώς και πολικότερων συστατικών.

Η προετοιμασία των διαλυμάτων που διαβιβάστηκαν από τις στήλες με τη ρητίνη είχε ως εξής:

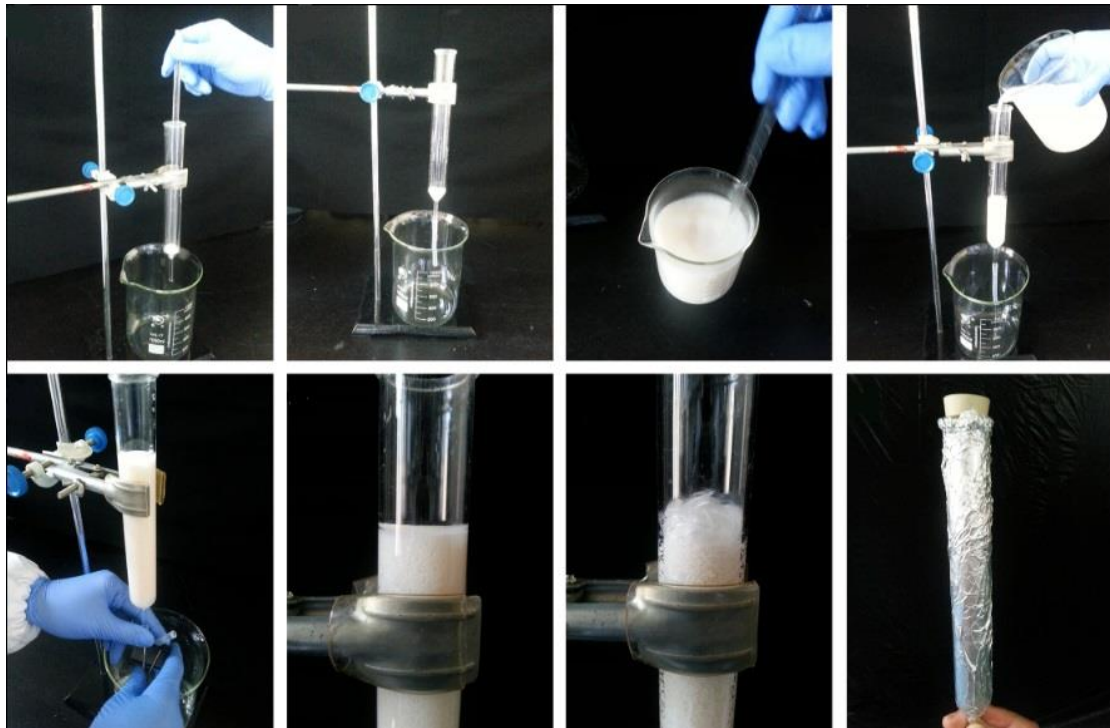
- 1g από το Psc-H<sub>2</sub>O διαλύθηκε σε 400ml νερό για τη διαβίβαση από στήλη πληρωμένη με XAD-4. Η διαδικασία επαναλήφθηκε για το δείγμα που θα διαβιβαζόταν από την πληρωμένη με XAD-7HP στήλη.
- Όλη η ποσότητα του H<sub>2</sub>O-L.L.E. (3.42 g μαζί με άλας NaCl) διαλύθηκε σε 1000ml νερό και χωρίστηκε σε δύο ίσα μέρη των 500ml.

Η πορεία που ακολουθήθηκε περιλαμβάνει τρία στάδια:

Στο **1<sup>ο</sup> στάδιο** - στάδιο έκλουσης του δείγματος - το κάθε δείγμα (400 ml υδατικού διαλύματος Psc-H<sub>2</sub>O και 500 ml υδατικού διαλύματος H<sub>2</sub>O-L.L.E.) διέρχεται μέσα από την στήλη στην οποία έχουμε από πριν πακετάρει 40ml ρητίνης (**Εικόνα 92**), ώστε να μην υπάρχουν κενοί χώροι ή φυσαλίδες αέρα. Ο χρόνος έκλουσης καθορίστηκε στα 45' - 60', ρυθμίζοντας κατάλληλα την ροή, ώστε να είναι σίγουρο ότι θα δοθεί ικανοποιητικός χρόνος για την πλήρη αποκατάσταση ισορροπίας μεταξύ φαινολών και ρητίνης και να επιτευχθεί η δέσμευση των ουσιών στόχων στις ενεργές θέσεις στην ρητίνη.

Στο **2<sup>ο</sup> στάδιο** - στάδιο έκπλυσης - ικανός όγκος απεσταγμένου H<sub>2</sub>O (300 ml) διέρχεται από την στήλη ώστε να απομακρυνθούν κυρίως το NaCl του H<sub>2</sub>O-L.L.E. αλλά και άλλες ουσίες (ελεύθερα σάκχαρα, κάποιες ομάδες λιπαρών οξέων, οργανικά και ανόργανα άλατα, κυτταρινικά κατάλοιπα κ.ά) που δεν είχαν δεσμευτεί χημικά στην ρητίνη. Το διάλυμα που προέκυψε από αυτό το στάδιο συνενώθηκε με το συλλεχθέν διάλυμα του πρώτου σταδίου και ονομάστηκε «Απόβλητο».

Στο **3<sup>ο</sup> και τελικό στάδιο** - στάδιο αποδέσμευσης - 350 ml MeOH διήλθαν από την ρητίνη. Ο χρόνος διέλευσης της MeOH τηρήθηκε ξανά αυστηρά στα 45' - 60', ώστε να προλάβει να επιτευχθεί η αποδέσμευση των φαινολικών συστατικών από την ρητίνη.



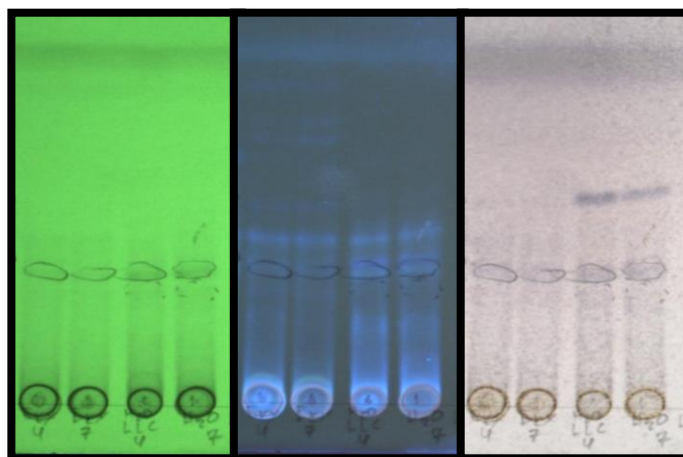
Εικόνα 92: Πακετάρισμα στήλης με ιοντοανταλλακτική ρητίνη XAD (Lu et al., 2015)

Μετά από αυτή τη διαδικασία οι διαλύτες του αποβλήτου και του διαλύματος αποδέσμευσης απομακρύνθηκαν με εξάτμιση υπό ελαττωμένη πίεση σε συσκευή Rotavapor R-114 Buchi μέχρις ξηρού. Για το νερό η πίεση έφτασε τα 50 mbar, ενώ για τη μεθανόλη τα 150 mbar στους 50°C.

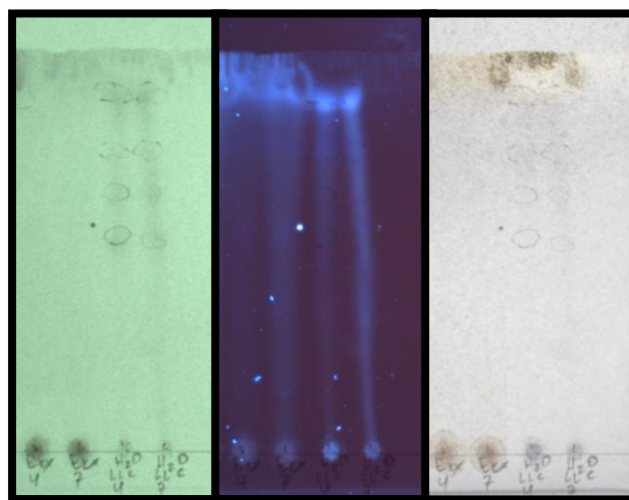
Πρόεκυψαν έτσι τα εξής εκχυλίσματα:

| Όνομασία  | Ποσότητα (mg) |
|---|---------------|
| <i>Psc-H<sub>2</sub>O</i> απόβλητο XAD-4  | 470           |
| <i>Psc-H<sub>2</sub>O</i> απόβλητο XAD-7HP                                      | 540           |
| <i>H<sub>2</sub>O-L.L.E.</i> απόβλητο XAD-4<br>(συμπεριλαμβανομένου του NaCl)   | 3060          |
| <i>H<sub>2</sub>O-L.L.E.</i> απόβλητο XAD-7HP<br>(συμπεριλαμβανομένου του NaCl) | 3650          |
| <i>Psc-H<sub>2</sub>O</i> αποδέσμευση XAD-4                                     | 194.8         |
| <i>Psc-H<sub>2</sub>O</i> αποδέσμευση XAD-7HP                                   | 93.0          |
| <i>H<sub>2</sub>O-L.L.E.</i> αποδέσμευση XAD-4                                  | 257.3         |
| <i>H<sub>2</sub>O-L.L.E.</i> αποδέσμευση XAD-7HP                                | 143.1         |

τη συνέχεια έγινε χρωματογραφικός έλεγχος με TLC για όλα τα δείγματα. Το σύστημα ανάπτυξης ήταν DCM/MeOH 92/8 για τα προσροφημένα στη μεθανόλη κλάσματα και H<sub>2</sub>O/MeOH για τα δείγματα αποβλήτων (Εικόνα 93 και 94).



Εικόνα 93: TLC πλάκα με τις αποδεσμεύσεις από τις ρητίνες XAD στα 254nm, 366nm και μετά από ψεκάσμο με θειική βανιλίνη και θέρμανση. Από αριστερά προς τα δεξιά, Psc-H<sub>2</sub>O XAD-4, Psc-H<sub>2</sub>O XAD-7HP, H<sub>2</sub>O-L.L.E. XAD-4, H<sub>2</sub>O-L.L.E. XAD-7HP



Εικόνα 94: TLC πλάκα με τα υπόβλητα από τις ρητίνες XAD στα 254nm, 366nm και μετά από ψεκάσμο με θειική βανιλίνη και θέρμανση. Από αριστερά προς τα δεξιά, Psc-H<sub>2</sub>O XAD-4, Psc-H<sub>2</sub>O XAD-7HP, H<sub>2</sub>O-L.L.E. XAD-4, H<sub>2</sub>O-L.L.E. XAD-7HP

Λόγω της μικρής ποσότητας των δειγμάτων, αλλά και του φυτοχημικού τους προφίλ αποφασίστηκε η κλασμάτωσή τους με τη βοήθεια εκκύλισης στερεής φάσης υπό κενό (SPE).

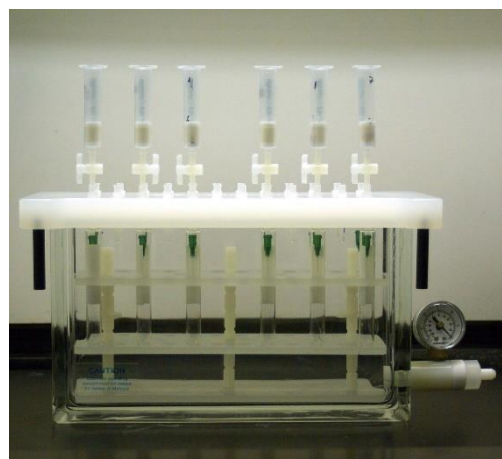
#### 2.2.4.2 Κλασμάτωση με RP-SPE

Οι στήλες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν C-18 όγκου 6ml. Πριν τη χρήση τους, πραγματοποιήθηκε εξισορρόπηση με το πέρασμα των διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια, σε συγκεκριμένους όγκους.

Όλα τα δείγματα διαλύθηκαν σε συγκέντρωση 10mg/ml και μέσα στη στήλη τοποθετήθηκαν 2ml διαλύματος (Εικόνα 95). Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την εξισορρόπηση της στήλης (Conditioning) αλλά και για την κλασμάτωση φαίνεται στον Πίνακας 20.

Πίνακας 20: Συστήματα διαλυτών για την εξισορρόπηση της στήλης και για την κλασμάτωση των δειγμάτων

| Συστήματα διαλυτών του Conditioning       | Αναλογία διαλυτών (%) | Όγκος (ml) |
|---|-----------------------|------------|
| MeOH                                      | 100                   | 6          |
| H <sub>2</sub> O                          | 100                   | 3          |
| H <sub>2</sub> O/MeOH                     | 99/1                  | 3          |
| <b>Συστήματα διαλυτών της κλασμάτωσης</b> |                       |            |
| H <sub>2</sub> O/MeOH                     | 99/1                  | 20         |
| H <sub>2</sub> O/MeOH                     | 95/5                  | 12         |
| H <sub>2</sub> O/MeOH                     | 90/10                 | 12         |
| H <sub>2</sub> O/MeOH                     | 80/20                 | 20         |
| H <sub>2</sub> O/MeOH                     | 50/50                 | 20         |
| H <sub>2</sub> O/MeOH                     | 5/95                  | 16         |



Εικόνα 95: Συσκευή SPE

Μετά από αυτή τη διαδικασία οι διαλύτες προσρόφησης και αποδέσμευσης απομακρύνθηκαν με εξάτμιση υπό ελαττωμένη πίεση σε συσκευή Rotavapor

R-114 Buchi μέχρις ξηρού. Τα δείγματα που παραλήφθηκαν, τα βάρη τους, τα ποσοστά τους επί του ολικού δείγματος και η %ανάκτηση παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 21).

Πίνακας 21: Δείγματα που παραλήφθηκαν μετά από το SPE, τα βάρη τους, τα ποσοστά τους επί του ολικού δείγματος και η %ανάκτηση

**Βάρος δείγματος (mg) και ποσοστό επί του δείγματος (%)**

| <b>Δείγμα</b><br><b>H<sub>2</sub>O/MeOH</b>                                      | <b>Psc-H<sub>2</sub>O XAD-4</b> |        | <b>Psc-H<sub>2</sub>O</b><br><b>XAD-7HP</b> |        | <b>H<sub>2</sub>O-L.L.E.</b><br><b>XAD-4</b> |        | <b>H<sub>2</sub>O-L.L.E.</b><br><b>XAD-7HP</b> |        |
|--|---------------------------------|--------|---|--------|--|--------|--|--------|
|  | <b>99/1</b>                     | 34.3   | 18.50%                                      | 41.1   | 51.40%                                       | 29.2   | 13.60%   | 39.0   |
| <b>95/5</b>  | 6.4                             | 3.50%  | 2.8   | 3.50%  | 8.9  | 4.10%  | 8.3  | 6.60%  |
| <b>90/10</b>   | 6.8                             | 3.70%  | 4.4   | 5.50%  | 9.3  | 4.30%  | 10.6   | 8.50%  |
| <b>80/20</b>   | 14.7                            | 7.90%  | 7.9   | 9.90%  | 25.6   | 11.9%  | 21.5   | 17.2%  |
| <b>50/50</b>   | 42.9                            | 23.20% | 19.1  | 23.90% | 56.9   | 26.50% | 46.1   | 36.90% |
| <b>5/95</b>  | 57.8                            | 31.20% | 6.8   | 8.50%  | 52.8   | 24.55% | 11.3   | 9.00%  |
| <b>Σύνολο</b>  | 162.9                           |        | 82.1  |        | 182.7  |        | 97.8   |        |
| <b>Ποσότητα</b><br><b>δείγματος που</b><br><b>χρησιμοποιήθηκε</b><br><b>(mg)</b> | 185                             |        | 80  |        | 215  |        | 125  |        |
| <b>Recovery (%)</b>  | 88.1%                           |        | 102.6%                                      |        | 85.0%  |        | 78.2%  |        |

Στη συνέχεια, έγινε ποιοτικός έλεγχος όλων των δειγμάτων με χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC). Στον παρακάτω πίνακα καταγράφονται οι κωδικοί των δειγμάτων της HPLC.

Πίνακας 22: Ονομασίες των δειγμάτων που επεξεργάστηκαν με HPLC

| H <sub>2</sub> O/MeOH | Κωδικοί δειγμάτων                  |                                    |                                       |                                       |
|-----------------------|------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| 99/1                  | Psc-H <sub>2</sub> O XAD-4-MeOH-1  | Psc-H <sub>2</sub> O XAD-7-MeOH-1  | H <sub>2</sub> O-L.L.E. XAD-4-MeOH-1  | H <sub>2</sub> O-L.L.E. XAD-7-MeOH-1  |
| 95/5                  | Psc-H <sub>2</sub> O XAD-4-MeOH-5  | Psc-H <sub>2</sub> O XAD-7-MeOH-5  | H <sub>2</sub> O-L.L.E. XAD-4-MeOH-5  | H <sub>2</sub> O-L.L.E. XAD-7-MeOH-5  |
| 90/10                 | Psc-H <sub>2</sub> O XAD-4-MeOH-10 | Psc-H <sub>2</sub> O XAD-7-MeOH-10 | H <sub>2</sub> O-L.L.E. XAD-4-MeOH-10 | H <sub>2</sub> O-L.L.E. XAD-7-MeOH-10 |
| 80/20                 | Psc-H <sub>2</sub> O XAD-4-MeOH-20 | Psc-H <sub>2</sub> O XAD-7-MeOH-20 | H <sub>2</sub> O-L.L.E. XAD-4-MeOH-20 | H <sub>2</sub> O-L.L.E. XAD-7-MeOH-20 |
| 50/50                 | Psc-H <sub>2</sub> O XAD-4-MeOH-50 | Psc-H <sub>2</sub> O XAD-7-MeOH-50 | H <sub>2</sub> O-L.L.E. XAD-4-MeOH-50 | H <sub>2</sub> O-L.L.E. XAD-7-MeOH-50 |
| 5/95                  | Psc-H <sub>2</sub> O XAD-4-MeOH-95 | Psc-H <sub>2</sub> O XAD-7-MeOH-95 | H <sub>2</sub> O-L.L.E. XAD-4-MeOH-95 | H <sub>2</sub> O-L.L.E. XAD-7-MeOH-95 |

#### 2.2.4.3 Έλεγχος των δειγμάτων με χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC)

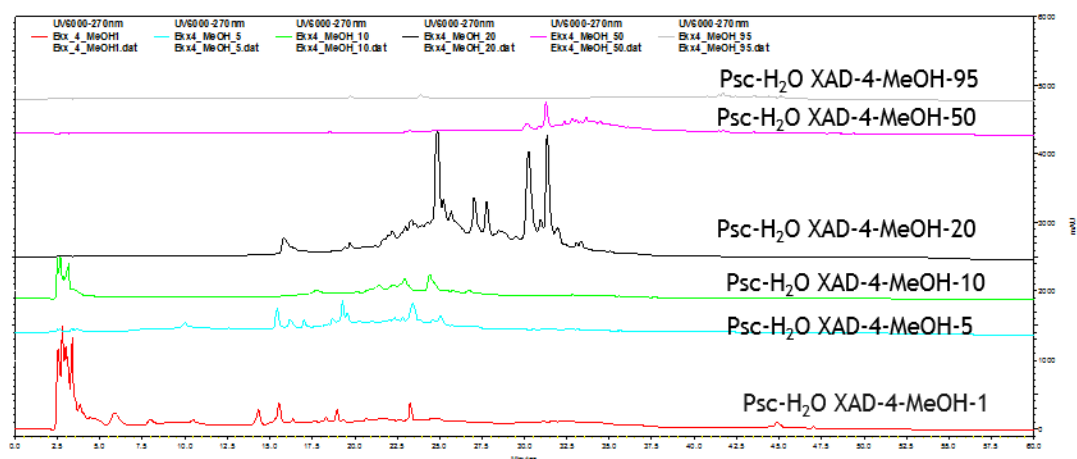
Για τον ποιοτικό έλεγχο των κλασμάτων του SPE χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία υψηλής πίεσης αντίστροφης φάσης (RP-HPLC). Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

| Χρόνος (min) | H <sub>2</sub> O (%) | MeOH(%) | Ταχύτητα ροής (ml/min) |
|--------------|----------------------|---------|------------------------|
| 0            | 95                   | 5       | 0.8                    |
| 3            | 88                   | 12      | 0.8                    |
| 8            | 85                   | 15      | 0.8                    |
| 20           | 60                   | 40      | 0.8                    |
| 24           | 60                   | 40      | 0.8                    |
| 40           | 10                   | 90      | 0.8                    |
| 45           | 10                   | 90      | 0.8                    |
| 50           |                      | 100     | 0.8                    |
| 55           |                      | 100     | 0.8                    |
| 65           | 95                   | 5       | 0.8                    |

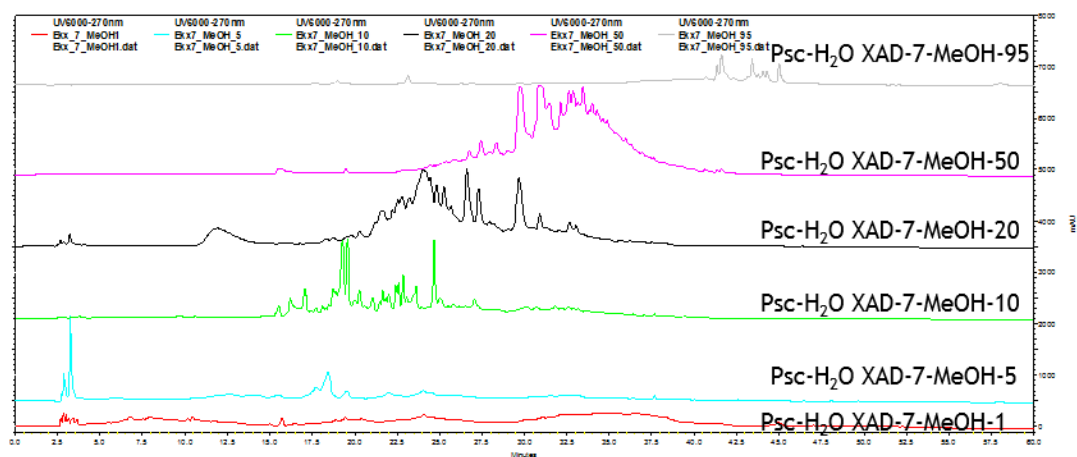
Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει ως κινητή φάση νερό (H<sub>2</sub>O - Διαλύτης Α) και μεθανόλη (MeOH - Διαλύτης Β) με ροή 0.8 ml/min και η έκλυση ήταν βαθμιδωτή με κάποια διαστήματα ισοκρατικής έκλυσης.

Τα μήκη κύματος που επιλέχθηκαν για την ανίχνευση των εκλουόμενων ουσιών ήταν 254, 270 και 300 nm, ενώ η χρήση του ανιχνευτή πολλαπλής διόδου (PDA) επέτρεψε τη λήψη ολόκληρου του φάσματος UV-Vis (200nm - 700nm). Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν κατά τις αναλύσεις ήταν καθαρότητας HPLC. Για την απαέρωση των διαλυτών χρησιμοποιήθηκε ειδικός απαερωτής συνδεδεμένος με το LC-σύστημα. Για τους διαχωρισμούς χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφική διάταξη Thermo-Finnigan και χρωματογραφική στήλη C18 με μέγεθος σωματιδίων 5 μm και διαστάσεων 25 cm x 10 mm i.d..

Στις παρακάτω εικόνες παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα που λήφθηκαν στα 270nm.



Εικόνα 96: Χρωματογραφήματα κλασμάτων του SPE από το δείγμα Psc-H<sub>2</sub>O XAD-4 στα 270nm



Εικόνα 97: Χρωματογραφήματα κλασμάτων του SPE από το δείγμα Psc-H<sub>2</sub>O XAD-7 στα 270nm

Μετά τον ποιοτικό έλεγχο, τα δείγματα H<sub>2</sub>O-L.L.E. XAD-4-MeOH-5, H<sub>2</sub>O-L.L.E. XAD-4-MeOH-20 και H<sub>2</sub>O-L.L.E. XAD-7-MeOH-20 επιλέχθηκαν για περαιτέρω χρωματογραφική μελέτη με τη χρήση παρασκευαστικής RP-HPLC.

#### 2.2.4.3.1 Επεξεργασία του δείγματος H<sub>2</sub>O-L.L.E. XAD-4-MeOH-5

Για την επιτυχή απομόνωση των περιεχόμενων ουσιών πραγματοποιήθηκε ημιπαρασκευαστική υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης αντίστροφης φάσης (RP-HPLC).

Τα 8.9mg του κλάσματος H<sub>2</sub>O-L.L.E. XAD-4-MeOH-5 χρωματογραφήθηκαν με την μέθοδο που φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

| Χρόνος (min) | H <sub>2</sub> O (%) | MeOH (%) | Ταχύτητα ροής (ml/min) |
|--------------|----------------------|----------|------------------------|
| 0            | 95                   | 5        | 2                      |
| 3            | 88                   | 12       | 2                      |
| 8            | 85                   | 15       | 2                      |
| 15           | 73                   | 27       | 2                      |
| 20           | 73                   | 27       | 2                      |
| 25           | 60                   | 40       | 2                      |
| 30           | 60                   | 40       | 2                      |
| 40           | 10                   | 90       | 2                      |
| 45           | 10                   | 90       | 2                      |
| 50           | 95                   | 5        | 2                      |
| 55           | 95                   | 5        | 2                      |

Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει ως κινητή φάση νερό (H<sub>2</sub>O - Διαλύτης Α) και μεθανόλη (MeOH - Διαλύτης Β) με ροή 2 ml/min και η έκλουση ήταν βαθμιδωτή με κάποια plateau.

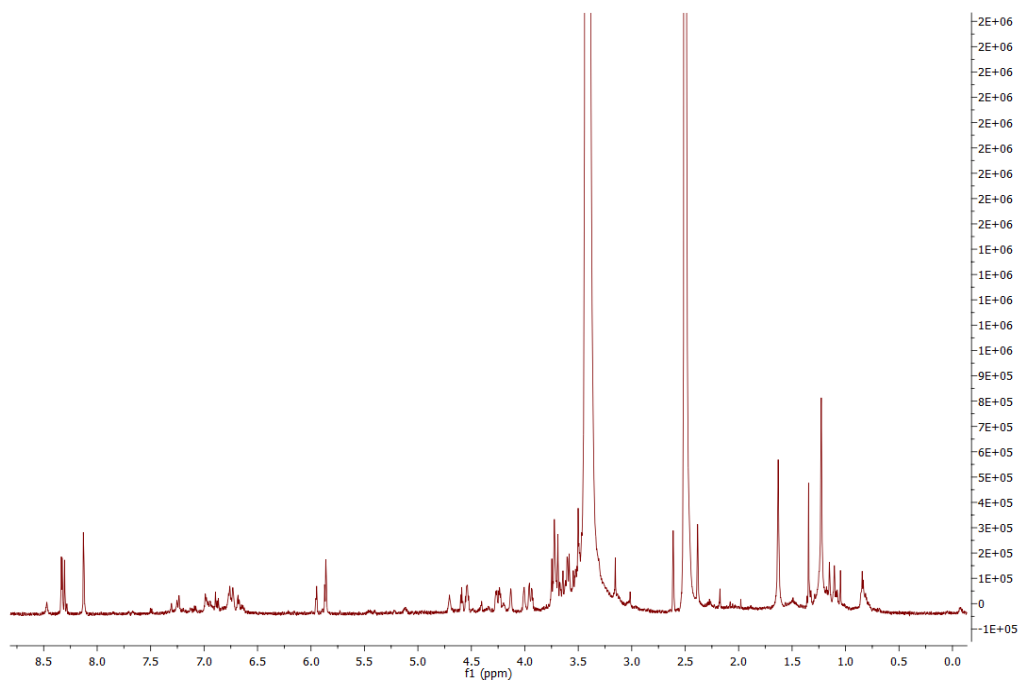
Τα μήκη κύματος που επιλέχθηκαν για την ανίχνευση των εκλουόμενων ουσιών ήταν 254, 270 και 300 nm, ενώ η χρήση του ανιχνευτή πολλαπλής διόδου (PDA) επέτρεψε τη λήψη ολόκληρου του φάσματος UV-Vis (200nm - 700nm). Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν κατά τις αναλύσεις ήταν καθαρότητας HPLC. Για την απαέρωση των διαλυτών χρησιμοποιήθηκε ειδικός απαερωτής συνδεδεμένος με το LC-σύστημα. Για τους διαχωρισμούς χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφική διάταξη Thermo-Finnigan και χρωματογραφική στήλη C18 με μέγεθος σωματιδίων 5 μm και διαστάσεων 25cm x 10 mm i.d. Στο χρωματογράφημα από την ανάλυση του δείγματος (**Εικόνα 98**) εμφανίστηκαν αρκετές κορυφές. Το κλάσμα που αντιστοιχεί στην κορυφή 2 παραλήφθηκε μόνο του, ενώ το υπόλοιπο χρωματογράφημα χωρίστηκε σε ζώνες.

Για τα κλάσματα που συλλέχθηκαν ελήφθησαν φάσματα πρωτονίου (<sup>1</sup>H-NMR) σε δευτεριωμένη μεθανόλη (MeOD) και από αυτά το κλάσμα που αντιστοιχεί στην κορυφή 2 αναγνωρίστηκε η παρουσία φλαβονοειδών και νουκλεοτιδίων (**Εικόνα 99**).





Εικόνα 98: Χρωματογράφημα του δείγματος H<sub>2</sub>O-L.L.E. XAD-4-MeOH-5 στα 254nm



Εικόνα 99: Φάσμα <sup>1</sup>H NMR της κορυφής 2 σε MeOD

#### 2.2.4.3.2 Επεξεργασία του δείγματος H<sub>2</sub>O-L.L.E. XAD-4-MeOH-20

Για την απομόνωση των περιεχόμενων ουσιών πραγματοποιήθηκε ημιπαρασκευαστική υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης αντίστροφης φάσης (RP-HPLC).

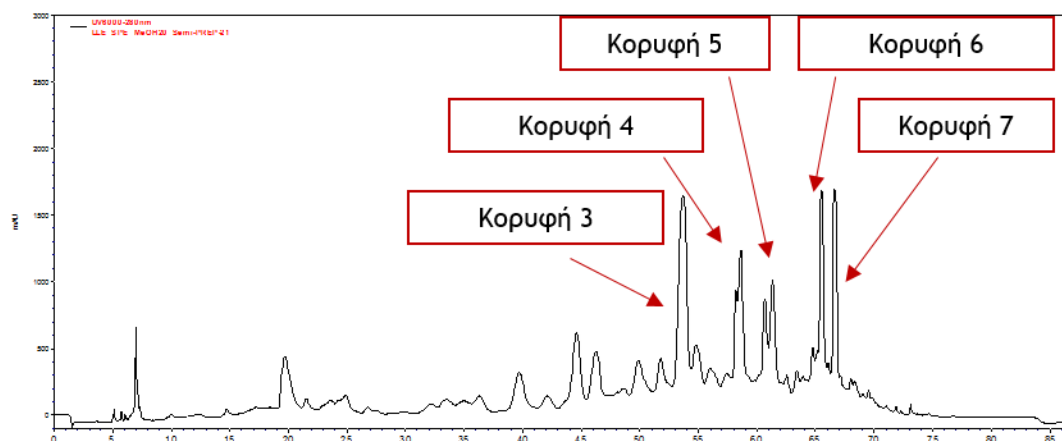
Τα 25.6 mg του κλάσματος H<sub>2</sub>O-L.L.E. XAD-4-MeOH-20 χρωματογραφήθηκαν με την μέθοδο που φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

| Χρόνος (min) | H <sub>2</sub> O (%) | MeOH (%) | Ταχύτητα ροής (ml/min) |
|--------------|----------------------|----------|------------------------|
| 0            | 90                   | 10       | 2                      |
| 10           | 70                   | 30       | 2                      |
| 35           | 70                   | 30       | 2                      |
| 40           | 65                   | 35       | 2                      |
| 42           | 65                   | 35       | 2                      |
| 47           | 60                   | 40       | 2                      |
| 49           | 60                   | 40       | 2                      |
| 54           | 55                   | 45       | 2                      |
| 56           | 55                   | 45       | 2                      |
| 61           | 40                   | 60       | 2                      |
| 67           | 10                   | 90       | 2                      |
| 77           | 10                   | 90       | 2                      |
| 82           | 90                   | 10       | 2                      |
| 87           | 90                   | 10       | 2                      |

Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει ως κινητή φάση μίγμα νερού (H<sub>2</sub>O - Διαλύτης Α) και μεθανόλης (MeOH - Διαλύτης Β), η οποία διοχετεύθηκε με ροή 2 ml/min και η έκλουση ήταν βαθμιδωτή με κάποια τμήματα ισοκρατικής έκλουσης.

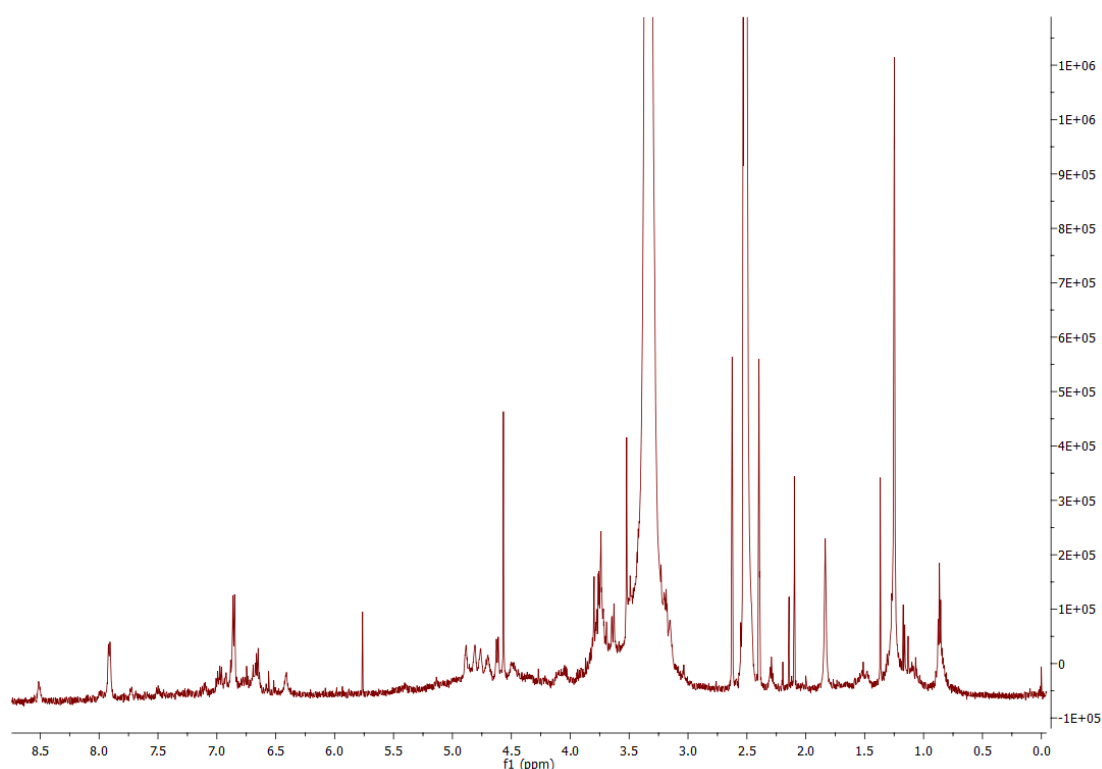
Τα μήκη κύματος που επιλέχθηκαν για την ανίχνευση των εκλουόμενων ουσιών ήταν 254, 270 και 300 nm, ενώ η χρήση του ανιχνευτή πολλαπλής διόδου (PDA) επέτρεψε τη λήψη ολόκληρου του φάσματος UV-Vis (200nm - 700nm). Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν κατά τις αναλύσεις ήταν καθαρότητας HPLC. Για την απαέρωση των διαλυτών χρησιμοποιήθηκε ειδικός απαερωτής συνδεδεμένος με το LC-σύστημα. Για τους διαχωρισμούς χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφική συσκευή Thermo-Finnigan και χρωματογραφική στήλη C18 με μέγεθος σωματιδίων 5 μm και διαστάσεων 25 cm x 10 mm i.d.

Στο χρωματογράφημα από την ανάλυση του δείγματος (Εικόνα 100) εμφανίστηκαν αρκετές κορυφές. Παραλήφθηκαν τα κλάσματα που αντιστοιχούν στις κορυφές 3, 4, 5, 6 και 7, ενώ το υπόλοιπο χρωματογράφημα χωρίστηκε σε ζώνες.

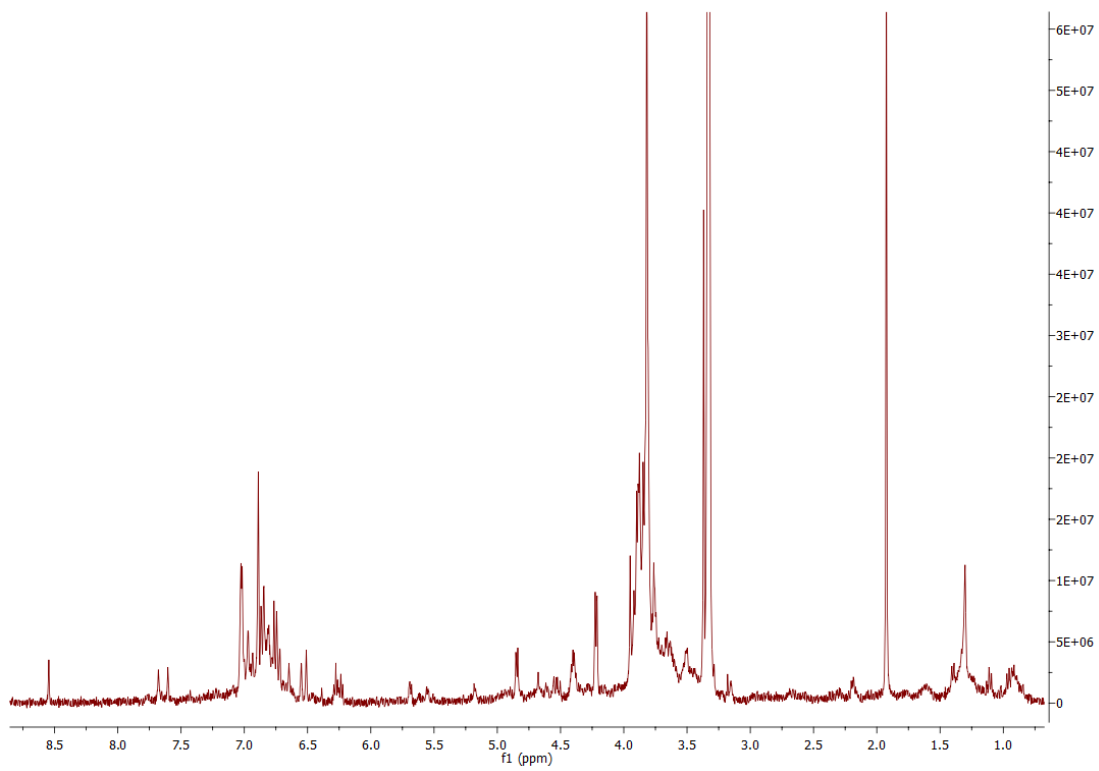


Εικόνα 100: Χρωματογράφημα του δείγματος H<sub>2</sub>O-L.L.E. XAD-4-MeOH-20 στα 280nm

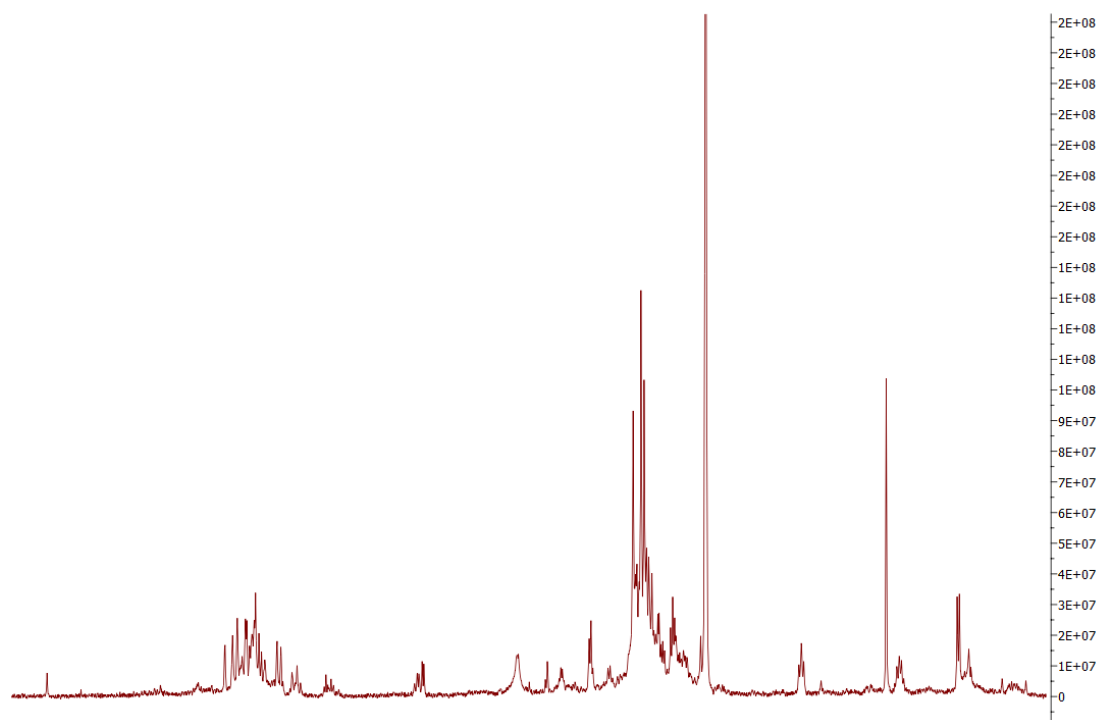
Για τα κλάσματα που συλλέχθηκαν ελήφθησαν φάσματα πρωτονίου (<sup>1</sup>H-NMR) με δευτεριωμένη μεθανόλη (MeOD) και παρατηρήθηκε ότι: (i) το δείγμα της κορυφής 3 περιέχει π-υποκατεστημένα φαινολικά παράγωγα, (ii) το δείγμα της κορυφής 4 περιέχει παράγωγο κινναμωμικής αλκοόλης και άλλες απλές φαινόλες, (iii) το δείγμα της κορυφής 5 περιέχει γλυκοσίδες φλαβονοειδών και άλλων απλών φαινολικών ενώσεων, (iv) το δείγμα της κορυφής 6 περιέχει 7-O-γλυκοσίδα της καιμπφερόλης και (v) το δείγμα της κορυφής 7 περιέχει κάποιο παράγωγο καιμπφερόλης (Εικόνα 101-105).



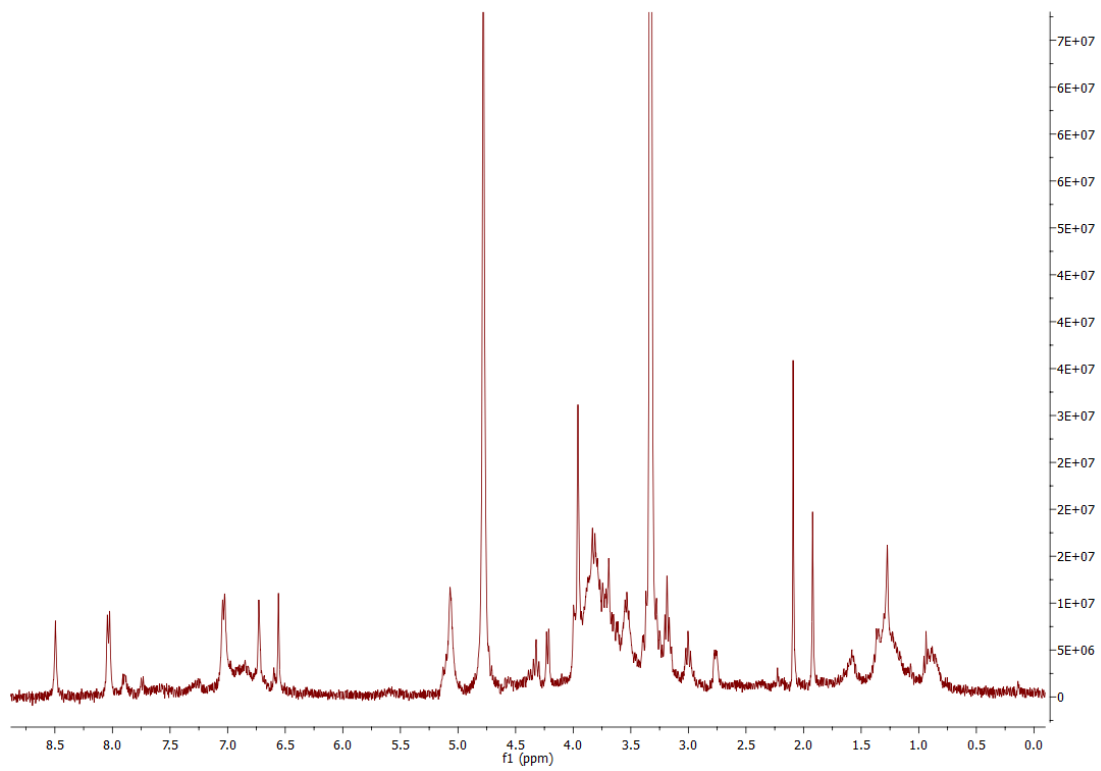
Εικόνα 101: Φάσμα <sup>1</sup>H NMR της κορυφής 3 σε MeOD



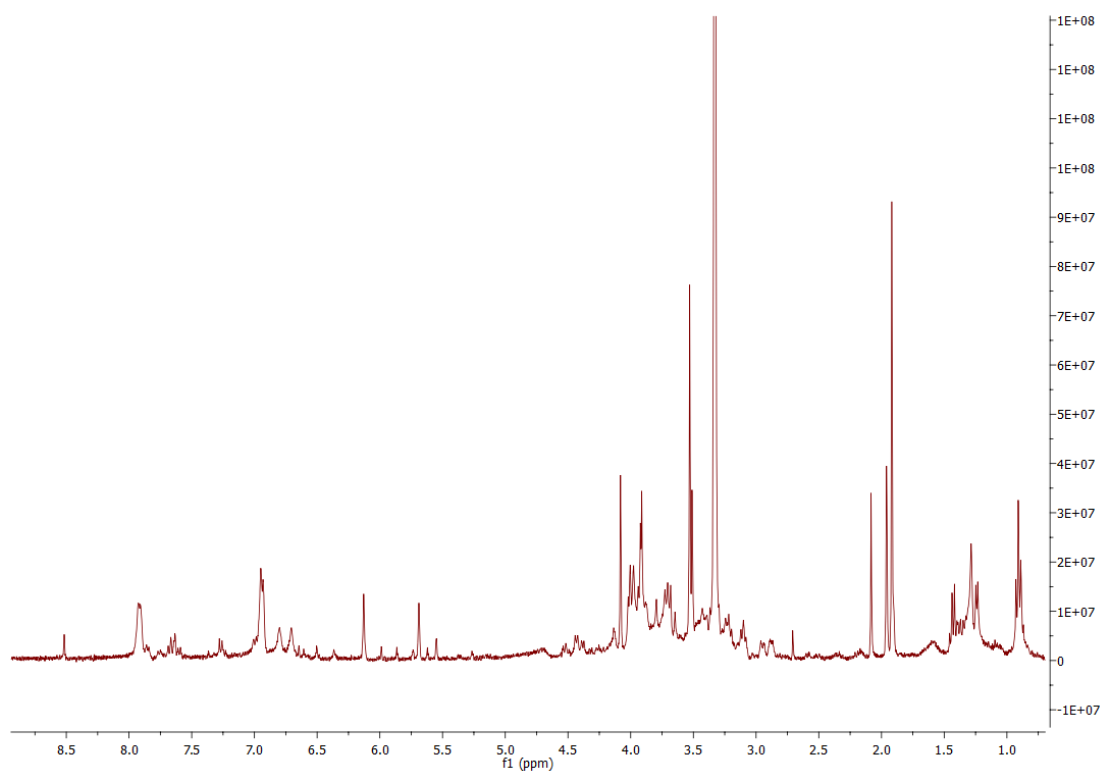
Εικόνα 102: Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της κορυφής 4 σε MeOD



Εικόνα 103: Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της κορυφής 5



Εικόνα 104: Φάσμα <sup>1</sup>H NMR της κορυφής 6



Εικόνα 105: Φάσμα <sup>1</sup>H NMR της κορυφής 7 σε MeOD

### 2.2.4.3.3 Επεξεργασία του δείγματος H<sub>2</sub>O-L.L.E. ΧΑD-7-MeOH-20

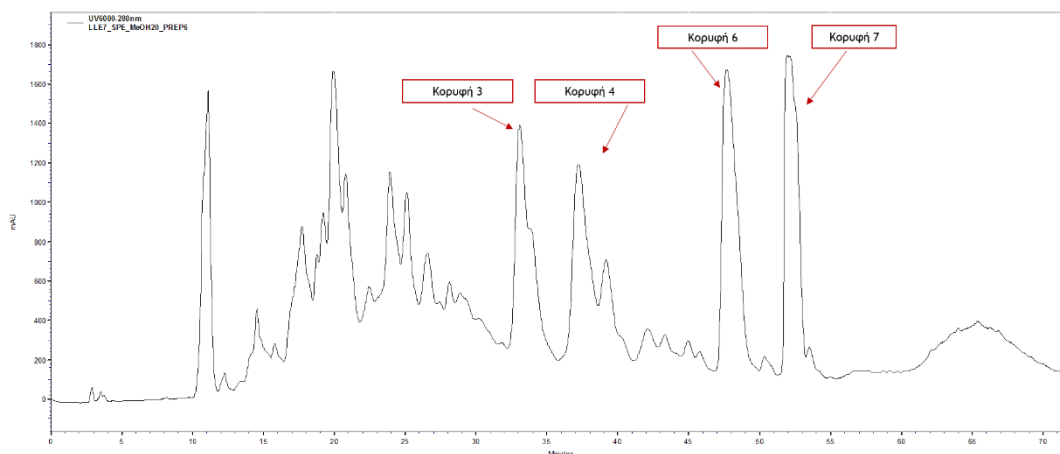
Με σκοπό την απομόνωση των περιεχόμενων μεταβολιτών πραγματοποιήθηκε παρασκευαστική υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης αντίστροφης φάσης (RP-HPLC). Πιο συγκεκριμένα, τα 21.5mg του κλάσματος H<sub>2</sub>O-L.L.E. ΧΑD-7-MeOH-20 χρωματογραφήθηκαν με την μέθοδο που φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

| Χρόνος (min) | H <sub>2</sub> O (%) | MeOH (%) | Ταχύτητα ροής (ml/min) |
|--------------|----------------------|----------|------------------------|
| 0            | 90                   | 10       | 1                      |
| 10           | 70                   | 30       | 1                      |
| 35           | 70                   | 30       | 1                      |
| 40           | 65                   | 35       | 1                      |
| 42           | 65                   | 35       | 1                      |
| 47           | 60                   | 40       | 1                      |
| 49           | 60                   | 40       | 1                      |
| 54           | 55                   | 45       | 1                      |
| 56           | 55                   | 45       | 1                      |
| 60           | 40                   | 60       | 1                      |
| 65           | 10                   | 90       | 1                      |
| 67           | 10                   | 90       | 1                      |
| 72           | 90                   | 10       | 1                      |

Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει ως κινητή φάση μίγμα νερού (H<sub>2</sub>O - Διαλύτης Α) και μεθανόλης (MeOH - Διαλύτης Β), η οποία διοχετεύθηκε με ροή 1 ml/min και η έκλουση ήταν βαθμιδωτή με κάποια τμήματα ισοκρατικής έκλουσης.

Τα μήκη κύματος που επιλέχθηκαν για την ανίχνευση των εκλουόμενων ουσιών ήταν 254, 270 και 300 nm, ενώ η χρήση του ανιχνευτή πολλαπλής διόδου (PDA) επέτρεψε τη λήψη ολόκληρου του φάσματος UV-Vis (200nm - 700nm). Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν κατά τις αναλύσεις ήταν καθαρότητας HPLC. Για την απαέρωση των διαλυτών χρησιμοποιήθηκε ειδικός απαερωτής συνδεδεμένος με το LC-σύστημα. Για τους διαχωρισμούς χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφική συσκευή Thermo-Finnigan και χρωματογραφική στήλη C18 με μέγεθος σωματιδίων 5 μm και διαστάσεων 25 cm x 10 mm i.d.

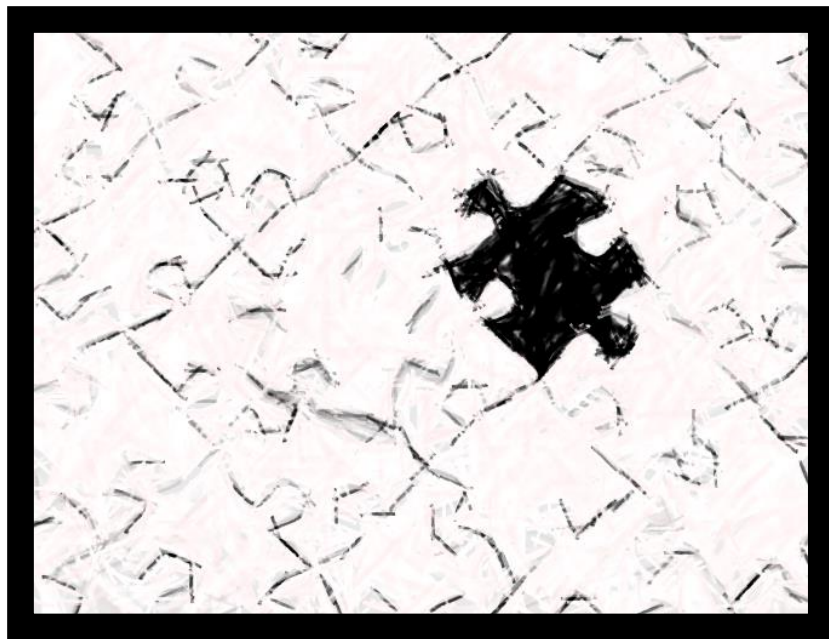
Στο χρωματογράφημα από την ανάλυση του δείγματος εμφανίστηκαν αρκετές κορυφές (Εικόνα 106). Παραλήφθηκαν τα κλάσματα που αντιστοιχούν στις κορυφές 3, 4, 6 και 7, ενώ το υπόλοιπο χρωματογράφημα χωρίστηκε σε ζώνες.



Εικόνα 106. Χρωματογράφημα του δείγματος H<sub>2</sub>O-L.L.E. XAD-7-MeOH-20 στα 280nm

Για τα κλάσματα που συλλέχθηκαν ελήφθησαν φάσματα πρωτονίου (<sup>1</sup>H-NMR) και από αυτά οι κορυφές 3, 4, 6 και 7 αναγνωρίστηκαν ως μείγματα φλαβονοειδών, τα οποία ήταν παρόμοια με αυτά που παραλήφθηκαν από την HPLC του δείγματος H<sub>2</sub>O-L.L.E. XAD-4-MeOH-20 (βλ. 2.2.4.3.2) και για το λόγο αυτό συνενώθηκαν μαζί τους.

## 3 Συμπεράσματα - Προοπτικές







Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκαν φυτοχημικά οι καρποί του *Paliurus spina-christi* της οικογένειας Rhamnaceae, ένα είδος για το οποίο υπάρχουν ελάχιστες αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία. Μετά από την εξαντλητική εκχύλιση ξηρών καρπών του φυτού και μια σειρά υγρών εκχυλιστικών και χρωματογραφικών διαχωρισμών του μεθανολικού εκχυλίσματος, απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 11 δευτερογενείς μεταβολίτες, οι οποίοι ανήκουν στις κατηγορίες των φαινολών, των στερολών, των τριτερπενίων και των κυκλοπεπτιδικών αλκαλοειδών. Πιο συγκεκριμένα απομονώθηκαν οι εξής μεταβολίτες: Βανιλίνη (Μεταβολίτης 9), 3-μεθοξυ-4-υδροξυκινναμαλδεΰδη (Μεταβολίτης 10), σαλικιφολιόλη (Μεταβολίτης 7), β-σιτοστερόλη (Μεταβολίτης 3), η 7-κετοσιτοστερόλη (Μεταβολίτης 2), υπερόξυεργοστερόλη (Μεταβολίτης 4), λουπεόλη (Μεταβολίτης 1), μπετουλινικό οξύ (Μεταβολίτης 11), σανγιοϊνενίνη (Μεταβολίτης 5), οξυφυλλίνη C (Μεταβολίτης 6), καθώς και ένα νέο φυσικό προϊόν (Μεταβολίτης 8) που ανήκει στην κατηγορία των κυκλοπεπτιδικών αλκαλοειδών.

Από το υδατικό εκχύλισμα, μετά από επεξεργασία με ρητίνες τεχνολογίας XAD (τύπων 4 και 7) και χρωματογραφία SPE παραλάβαμε ένα γλυκοσίδη της καιμπφερόλης και μίγματα (όπως διαπιστώσαμε μέσω της ανάλυσής τους με HPLC) φλαβονοειδών και απλών φαινολικών ενώσεων.

Σε κλάσματα του μεθανολικού εκχυλίσματος, τα οποία χαρακτηρίζονται από μικρή και μέση πολικότητα (η ανάλυση των οποίων δεν παρουσιάζεται σε αυτήν την εργασία), έχουν εντοπισθεί μίγματα κυκλοπεπτιδικών αλκαλοειδών τα οποία θα απομονωθούν και θα χαρακτηριστούν στο άμεσο μέλλον. Επίσης, μεταξύ των μελλοντικών στόχων περιλαμβάνεται η απομόνωση των αλκαλοειδών σε μεγαλύτερη ποσότητα, γεγονός που θα επιτρέψει τόσο τον πλήρη χημικό χαρακτηρισμό τους αλλά και την αξιολόγηση των βιολογικών τους ιδιοτήτων, καθώς αυτή η κατηγορία φυσικών προϊόντων έχει ελεγχθεί μόνο σε ένα περιορισμένο αριθμό βιολογικών στόχων μέχρι σήμερα (κυρίως αντιμικροβιακή και αντιπλάσμωνδιακή δράση). Επίσης θα πραγματοποιηθεί λήψη φασμάτων NOESY και ROESY των μεταβολιτών αυτών (και για τους ήδη απομονωμένους) ώστε να προκύψουν ισχυρά φασματοσκοπικά δεδομένα για την απόδοση της απόλυτης στερεοχημείας των χειρικών τους κέντρων.

Επίσης, στα επόμενα βήματα της μελέτης του είδους περιλαμβάνεται και η απομόνωση και ταυτοποίηση των πολικών συστατικών (φλαβονοειδών και γλυκοζιτών αυτών) από τα μείγματα που παραλήφθηκαν από την επεξεργασία των υδατικών εκχυλισμάτων.

Τέλος, σε εξέλιξη βρίσκεται η *in vivo* βιολογική αξιολόγηση τόσο των υδατοαλκοολικών εκχυλισμάτων των καρπών όσο και του παρασκευάσματος της παραδοσιακής συνταγής.



# 4 Βιβλιογραφία

- Akihisa, T. (., Thakur, S., Rosenstein, F. U., & Matsumoto, T. (1986). Sterols of Cucurbitaceae: The Configurations at C-24 of 24-Aikyl- $\Delta^5$ -,  $\Delta^7$ - and  $\Delta^8$ -Sterols. *Lipids*, 21(1), 39-46.
- Altundag, E., & Ozturk, M. (2011). Ethnomedicinal studies on the plant resources of east Anatolia, Turkey. *Procedia Social and Behavioral Sciences*, 19, 756-777.
- Bani, S., Kaul, A., Khan, B., Ahmad, S., Suri, K., Gupta, B., . . . Qazi, G. (2006). Suppression of T lymphocyte activity by lupeol isolated from *Crataeva religiosa*. *Phytotherapy Research*, 20, 279-287.
- Bonet, M. A., Parada, M., Selga, A., & Valles, J. (1999). Studies on pharmaceutical ethnobotany in the regions of L'Alt Emporda` and Les Guilleries (Catalonia, Iberian Peninsula). *Journal of Ethnopharmacology*, 68, 145-168.
- Brantner, A. H., & Males, Z. (1999). Quality assessment of *Paliurus spina-christi* extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 66, 175-179.
- Brantner, A., & Males, Z. (1990). Investigations on the Flavonoid Glycosides. *Planta Medica*, 56, 582-583.
- Brantner, A., Males, Z., Pepeljnjak, S., & Antolic, A. (1996). Antimicrobial activity of *Paliurus spina-christi* Mill. (Christ's thorn). *Journal of Ethnopharmacology*, 52, 119-122.
- Bulut, G., & Tuzlaci, E. (2013). An ethnobotanical study of medicinal plants in Turgutlu (Manisa — Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, 149, 633-647.
- Burns, D., Reynolds, W. F., Buchanan, G., Reese, P. B., & Enriquez, R. G. (2000). Assignment of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C spectra and investigation of hindered side-chain rotation in lupeol derivatives. *MAGNETIC RESONANCE IN CHEMISTRY*, 38, 488-493.
- Cakilcioglu, U., & Turkoglu, I. (2010). An ethnobotanical survey of medicinal plants in Sivrice (Elazig-Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, 132, 165-175.
- Cakilcioglu, U., Khatun, S., Turkoglu, I., & Hayta, S. (2011). Ethnopharmacological survey of medicinal plants in Maden (Elazig-Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, 137, 469-486.
- Casavecchia, S., Biscotti, N., Pesaresi, S., & Edoardo, B. (2015). The *Paliurus spina-christi* dominated vegetation in Europe. *Biologia*, 70(7), 879-892.
- Chang, H.-S., Lee, S.-J., Yang, C.-W., & Cheng, I.-S. (2010). Cytotoxic Sesquiterpenes from *Magnolia kachirachirai*. *Chemistry and Bioactivity*, 7, 2737-2747.
- Chen, C., Guandi, L., Rong, H., & Hongzheng, F. (2016). Chemical constituents from *Paliurus ramosissimus*. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*, 25(2), 1-8.
- Chen, Y.-K., Kuo, Y.-H., Chiang, B.-H., Lo, J.-M., & Sheen, L.-Y. (2009). Cytotoxic activities of 9,11-Dehydroergosterol peroxide and ergosterol peroxide from the fermentation mycelia of *Ganoderma lucidum* cultivated in the medium containing Leguminous plants on Hep 3B cells. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 57, 5713-5719.
- Chiu, P.-L., & Patterson, G. (1981). Quantitative Estimation of C-24 Epimeric Sterol Mixtures by 220 MHz Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Lipids*, 16(3), 203-206.
- Dalakishvili, T. M., Gusakova, S. D., Chachanidze, N. I., Kuparadze, K. G., & Kemertelidze, E. P. (1984). Lipids of the seeds of *Paliurus spina-christi*.

- Khimiya Prirodnikh Soedinenii*(3), 322-326.
- Dalakishvili, T. M., Zurabishvili, T. S., & Kemertelidze, E. P. (1986). Phytochemical investigation of *Paliurus spina-christi*. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*(5), 639.
- De Eknankul, W., & Potduang, B. (2003). Biosynthesis of  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol in *Croton syblyratrus* proceeds via a mixed origin of isoprene units. *Phytochemistry*, 62, 389-398.
- Di Marco, G., Canuti, L., Impei, S., Leonardi, D., & Canini, A. (2012). Nutraceutical properties of honey and pollen produced in a natural park. *Agricultural Sciences*, 3(2), 187-200.
- El-On, J., Ozer, L., Gopas, J., Sneir, R., Enav, H., Luft, N., . . . Golan-Goldhirsh, A. (2009). Antileishmanial activity in Israeli plants. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 103(4), 297-306.
- El-Seedi, H. R., Zahra, M. H., Göransson, U., & Verpoorte, R. (2007). Cyclopeptide alkaloids. *Phytochemistry Reviews*, 6(1), 143-165.
- Fangkrathok, N., Sripanidkulchai, B., Umehara, K., & Noguchi, H. (2013). Bioactive ergostanoids and a new polyhydroxyoctane from *Lentinus polychrous* mycelia and their inhibitory effects on E2-enhanced cell proliferation of T47D cells. *Natural Product Research*, 27(18), 1611-1619.
- Fayvush, G. (2008, June 26). *Specimen Details: Paliurus spina-christi Mill.* Ανάκτηση 2017, από New York Botanical Garden Web site: [www.nybg.org/](http://www.nybg.org/)
- Gallo, M. B., & Sarachine, M. J. (2009). Biological Activities of Lupeol. *International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 3(1), 46-66.
- Gao, J., Yue, Q., Ji, C. B., & Zhang, X. (2013). Novel Synthetic strategies for the preparation of Individual Phytosterol oxides. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 61, 982-988.
- Gökkuş, A., Parlak, A. Ö., & Parlak, M. (2013). Change of Mineral Element Content in the Common Shrubs of Mediterranean Zone. II. Micronutrients. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 50(1), 409-418.
- Gournelis, D. C., G., L. G., & Verpoorte, R. (1997). Cyclopeptide alkaloids. *Natural Product Reports*, 14, 75-82.
- Hooker, J., & Jackson, D. (1893). *Index Kewensis, Plantarum phanerogamarum* (Τόμ. 2). Oxford: Clarendon Press.
- Humphries, C., Press, J., Sutton, D., & Garrard, I. (1989). *The Hamlyn Guide to Trees of Britain and Europe*. London: Hamlyn Publishing Group.
- Huxley, A., & Taylor, A. (1977). *Flowers of Greece and the Aegean*. United Kingdom: Chatto & Windus.
- Jerkovic', I., Tuberoso, C. I., Marijanovic', Z., Jelic', M., & Kasum, A. (2009). Headspace, volatile and semi-volatile patterns of *Paliurus spina-christi* unifloral honey as markers of botanical origin. *Food Chemistry*, 112, 239-245.
- Jud, N. A., Gandolfo, M. A., Iglesias, A., & Wilf, P. (2017). Flowering after disaster: Early Danian buckthorn (Rhamnaceae) flowers and leaves from Patagonia. *PLOS ONE*, 12(5), 1-24.
- Jukic, M., Burcul, F., Carev, I., Politeo, O., & Milos, M. (2012). Screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of selected plants from Croatia. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*, 26(18), 1703-1707.
- Kaleem, W. A., Nisar, M., Qayum, M., Zia-Ul-Haq, M., Adhikari, A., & De Feo, V. (2012). New 14-Membered Cyclopeptide Alkaloids from *Zizyphus oxyphylla* Edgew. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 11520-11529.
- Kemertelidze, E. P., Dalakishvili, T. M., Gusakova, S. D., Shalashvili, K. G.,

- Khatiashvili, N. S., Bitadze, M. A., . . . Bereznyakova, A. I. (1999). Chemical composition and pharmacological activity of the fruits of *Paliurus spina-christi* Mill. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 33(11), 591-594.
- Khaliq, S., Volk, S. J., & Fram, A. W. (2007). Phytochemical investigation of *Perovskia abrotanoides*. *Planta Medica*, 73, 77-83.
- Kırca, A., & Arslan, E. (2008). Antioxidant capacity and total phenolic content of selected plants from Turkey. *International Journal of Food Science & Technology*, 43(11), 2038-2046.
- Kökten, K., Kaplan, M., Hatipoğlu, R., Saruhan, V., & Çınar, S. (2012). Nutritive value of Mediterranean shrubs. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 22(1), 188-194.
- Kuštrak, D., Pitarević, I., & Maleš, Ž. (1987). Flavonoids of the leaves of Christ's thorn (*Paliurus spina-christi* Mill.). *Glas farmaceuta*, 4(1), 68-74.
- Lazarova, M. A., Atanassova, J. R., & Yurukova, L. D. (2010). Botanical origin and inorganic content of bee honey in Northeast Bulgaria (Shumen region). *Phytologia Balcanica*, 16, 131-135.
- Le Houerou, H. N. (1987). Indigenous shrubs and trees in the silvopastoral systems of Africa. Στο *Agroforestry, a Decade of Development* (σσ. 139-156). Nairobi: ICRAF.
- Lee, S.-S., Lin, C.-J., & Liu, K. C. (1992). Two New Triterpene Glucosides from *Paliurus ramosissimus*. *Journal of Natural Products*, 55(5), 602-606.
- Lee, S.-S., Shy, S.-N., & Liu, K. C. (1997). Triterpenes from *Paliurus hemsleyanus*. *Phytochemistry*, 46(3), 549-554.
- Leliebre-Lara, V., Fidalgo, L., Wenzig, E.-M., Kunert, O., Nogueiral-Lima, C., & Bauer, R. (2017). In vitro antileishmanial activity of sterols from *Trametes versicolor* (Bres. Rivarden). *Molecules*, 21, 1045-1054.
- Lu, Y., Sun, L., & Shi, W. (2015). Collection of Root Exudate from Duckweed. *Bio-protocol*, 5(1), 1-6.
- Ma, Y., Han, H., Nam, S.-Y., Kim, Y.-B., Hong, J.-T., Yun, Y.-P., & Ki-Wan, O. (2008). Cyclopeptide alkaloid fraction from *Zizyphi Spinosi Semen* enhances pentobarbital-induced sleeping behaviors. *Journal of Ethnopharmacology*, 117(2), 318-324.
- Males, Z., Plazibat, M., Pilepic, K. H., & Cetina-Čizmek, B. (2001). Investigation of the composition of amino acids in Christ's thorn (*Paliurus spina-christi* Mill.). *Farmaceutski glasnik*, 57(7), 257-265.
- Mattonai, M., Parri, E., Querci, D., Degano, I., & Ribechini, E. (2015). Development and validation of an HPLC-DAD and HPLC/ESI-MS2 method for the determination of polyphenols in monofloral honeys from Tuscany (Italy). *Microchemical Journal*, 1-35.
- Medić-Šarić, M., Males, Z., Šarić, S., & Brantner, A. (1996). Quantitative Modeling of Flavonoid Glycosides Isolated from *Paliurus spina-christi* Mill. *Croatica Chemica Acta*, 69(4), 1603-1616.
- Miles, D., & Kokpol, U. (1976). Tumor inhibitors II: constituents and antitumor activity of *Sarracenia flava*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 65, 284-285.
- Miles, D., Kokpol, U., Zalkow, L., Steindel, S., & Nabors, J. (1974). Tumor inhibitors I: preliminary investigation of antitumor activity of *Sarracenia flava*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 63, 613-615.
- Miller, P. (1768). *The gardener's dictionary*.
- Mills, C. (2010, Φεβρουάριος 28). *Paliurus spina-christi* Mill. Ανάκτηση 2017, από Hortus Camdenensis Web site: <http://hortuscamden.com>
- Morel, A. F., Maldaner, G., & Ilha, V. (2009). Cyclopeptide Alkaloids from Higher

- Plants. Στο G. A. Cordell, *The Alkaloids* (Τόμ. 67, σσ. 79-141). Elsevier.
- Morel, A. F., Van Fosen Bravo, R., Reis, F. D., & Ruveda, E. A. (1979). Peptide alkaloids of *Scutia buxifolia*. *Phytochemistry*, *18*, 473-477.
- Mosaddegh, M., Khoshnood, M. J., Kamalinejad, M., & Alizadehb, E. (2004). Study on the Effect of *Paliurus spina-christi* on Cholesterol, Triglyceride and HDL Levels in Diabetic Male Rats Fed a High Cholesterol Diet. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, *3*, 51-54.
- Mostardeiro, M. A., Ilha, V., Dahmer, J., Caro, M. S., Dalcol, I. I., da Silva, U. F., & Morel, A. F. (2013). Cyclopeptide Alkaloids: Stereochemistry and Synthesis of the Precursors of Discarines C and D and Myrianthine A. *JNP*, *76*(7), 1343-1350.
- Mutai, C., Abatis, D., Vagias, C., Moreau, D., Roussakis, C., & Roussis, V. (2004). Cytotoxic lupane-type triterpenoids from *Acacia mellifera*. *Phytochemistry*, *65*, 1159-1164.
- Nes, W., & Parish, E. (1989). Analysis of sterols and other Biologically significant steroids. *Academic Press Inc*, 251.
- O'Kennon, R. J. (1991). *Paliurus spina-christi* (Rhamnaceae) new for North America in Texas. *SIDA, Contributions to Botany*, *14*(4), σσ. 606-609.
- Paliurus*. (2017, Απρίλιος 12). Ανάκτηση 2017, από Wikipedia Web site: <https://en.wikipedia.org>
- Paliurus spina-christi* Miller. (2016). Ανάκτηση 2017, από Global Biodiversity Information Facility Web site: <http://www.gbif.org>
- Parada, M., Carrió, E., Bonet, M. À., & Vallès, J. (2009). Ethnobotany of the Alt Empordà region (Catalonia, Iberian Peninsula) - Plants used in human traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, *124*, 609-618.
- Parlak, A. O., Gokkus, A., Hakyemez, B. H., & Baytekin, H. (2011). Forage quality of deciduous woody and herbaceous species throughout a year in Mediterranean Shrublands of Western Turkey. *Journal of Animal and Plant Sciences*, *21*(3), 513-518.
- Pereira, F. B., Domingues, F. M., & Silva, A. M. (1996). Triterpenes from *Acacia Dealbata*. *Natural Product Letters*, *8*(2), 97-103.
- Pignatti, S. (1997). *Flora d'Italia* (Edizioni Agricole della Calderini s.r.l. εκδ., Τόμ. 1-3). Bologna, Italia: Edagricole.
- Polat, R., & Satil, F. (2012). An ethnobotanical survey of medicinal plants in Edremit Gulf (Balıkesir – Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, *139*, 626-641.
- Polunin, O. (1969). *Flowers of Europe*. United Kingdom: Oxford U.P.
- Polunin, O., & Huxley, A. (1967). *The flowers of Mediterranean*. United Kingdom: Chatto and Windus.
- Prakash, C. V., & Prakash, I. (2012). Isolation and Structural Characterization of Lupane Triterpenes from *Polypodium Vulgare*. *Research Journal of Pharmaceutical Sciences*, *1*(1), 23-27.
- Primorac, L., Bubalo, D., Kenjerić, D., Flanjak, I., Piricki, A. P., & Mandić, M. L. (2008). Pollen Spectrum and Physicochemical Characteristics of Croatian Mediterranean Multifloral Honeys. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, *104*(2), 170-174.
- Ricciardelli, G., & Intopa, F. (2000). *Flowers and bees in Europe*. Apimondia Publishing House.
- Richardson, J. E., Fay, M. F., Cronk, Q. C., Bowman, D., & Chase, M. W. (2000). A Phylogenetic Analysis of Rhamnaceae using rbcL and trnL-F Plastid DNA Sequences. *American Journal of Botany*, *87*(9), 1309-1324.

- Ronchèse, A. D., & Fiquet, C. (1952). The constituents of *Paliurus aculeatus* Lamk (Rhamnaceae) with particular emphasis on a heteroside. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, *10*, 676.
- Sargin, S. A., Akçicek, E., & Selvi, S. (2013). An ethnobotanical study of medicinal plants used by the local people of Alaşehir (Manisa) in Turkey. *Journal of Ethnopharmacology*, *150*, 860-874.
- Schirarend, C. (1996). Pollen morphology of the genus *Paliurus* (Rhamnaceae). *Grana*, *35*(6), 347-356.
- Schmidt, U., Lieberknecht, A., Bokens, H., & Griesser, H. (1983). Total synthesis of zizyphine A. Synthesis of peptide alkaloids. 8. Amino acids and peptides. 40. *The Journal of Organic Chemistry*, *48*(16), 2680-2685.
- Schmidt, U., Zah, M., & Lieberknecht, A. (1991). The total synthesis of frangulanine. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*(16), 1002.
- Schweingruber, F. H., Börner, A., & Schulze, E.-D. (2011). *Atlas of Stem Anatomy in Herbs, Shrubs and Trees* (Tóm. 1). Berlin: Springer.
- Souri, E., Amin, G., Dehmobed-Sharifabadi, A., Nazifia, A., & Farsam, H. (2004). Antioxidative Activity of Sixty Plants from Iran. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, *3*, 55-59.
- Tan, N.-H., & Zhou, J. (2006). Plant Cyclopeptides. *Chemical Reviews*, *106*, 840-895.
- Temel, S., & Tan, M. (2011). Fodder values of shrub species in maquis in different altitudes. *The Journal of Animal and Plant Sciences*, *21*, 508-512.
- Tetik, F., Civelek, S., & Cakilcioglu, U. (2013). Traditional uses of some medicinal plants in Malatya (Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, *146*, 331-346.
- Tuenter, E., Ahmad, R., Foubert, K., Amin, A., Orfanoudaki, M., Cos, P., . . . Exarchou, V. (2016). Isolation and Structure Elucidation by LC-DAD-MS and LC-DAD-SPE-NMR of Cyclopeptide Alkaloids from the Roots of *Ziziphus oxyphylla* and Evaluation of Their Antiplasmodial Activity. *Journal Of Natural Products*, *79*, 2865-2872.
- Tuenter, E., Exarchou, V., Apers, S., & Pieters, L. (2017). Cyclopeptide alkaloids. *Phytochemistry Reviews*, *16*(4), 623-637.
- Tuenter, E., Foubert, K., Staerk, D., Apers, S., & Pieters, L. (2017). Isolation and structure elucidation of cyclopeptide alkaloids from *Ziziphus nummularia* and *Ziziphus spina-christi* by HPLC-DAD-MS and HPLC-PDA-(HRMS)-SPE-NMR. *Phytochemistry*, *138*, 163-169.
- Tutin, T. G., Heywood, V. H., Burges, N. A., Moore, D. M., Valentine, D. H., Walters, S. M., & Webb, D. A. (1968). *Flora Europea* (Tóm. 2). United Kingdom: Cambridge University Press.
- Tuzlaci, E., & Sadikoglu, E. (2007). Turkish folk medicinal plants, Part VI: Koçarlı (Aydin). *J. Fac. Pharm. Istanbul*, *39*, 25-37.
- Tuzlaci, E., & Tolon, E. (2000). Turkish folk medicinal plants, part III: Şile (Istanbul). *Fitoterapia*, *71*, 673-685.
- Valiakos, E., Marselos, M., Sakellaridis, N., Constantinidis, T., & Skaltsa, H. (2015). Ethnopharmacological approach to the herbal medicines of the “Antidotes” in Nikolaos Myrepsos' *Dynameron*. *Journal of Ethnopharmacology*, *163*, 68-82.
- Velcheva, M. P. (1993). Constituents of *Paliurus spina christi*. *Fitoterapia*, *64*(3), 284-285.
- Venot, C. (1971). Un vieux remède de la médecine populaire qui n'a jamais sombré dans l'oubli : le *Paliurus Australis*. *Revue d'histoire de la pharmacie*, *59*(211), 537-541.
- Wang, L., Wu, M., Huang, J., Wang, J., Chen, Y., & Yin, B. (2012). Chemical



- constituents of *Eria spicata*. *Chemistry of Natural Compounds*, 48(1), 168-169.
- Xiao, D., East, S. P., & Joullie, M. M. (1998). Total synthesis of sanjoinine A (franguloline). *Tetrahedron Letters*, 39(52), 9631-9632.
- Zarga-Abu, M., Sabri, S., & AL-Aboudi, A. (1995). New cyclopeptide alkaloids from *Zizyphus lotus*. *Journal of Natural Products*, 58(4), 504-511.
- Zhang, X., Geoffroy, P., Miesch, M., Julien-David, D., Raul, F., Aoude-Werner, D., & Marchioni, E. (2005). Gram-scale chromatographic purification of  $\beta$ -sitosterol. Synthesis and characterization of  $\beta$ -sitosterol oxides. *Steroids*, 70, 885-895.
- Zor, M., Aydin, S., Güner, N. D., Başaran, N., & Başaran, A. A. (2017). Antigenotoxic properties of *Paliurus spina-christi* Mill fruits and their active compounds. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(229).
- Αθανασιάδης, Ν. Η. (1986). *Δασική Βοτανική – Μέρος ΙΙ, Δέντρα και Θάμνοι των Δασών της Ελλάδος*. Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις Γιαχούδη – Γιαπούλη.
- Αραμπατζής, Θ. (2001). *Θάμνοι και Δέντρα στην Ελλάδα* (Τόμ. 2). Δράμα: Εκδόσεις Οικολογική Κίνηση Δράμας.
- Διαπούλης, Χ. (1948). *Ελληνική Χλωρίς: κλείδες προσδιορισμού των ελληνικών φυτών αυτοφυών και καλλιεργημένων: αγχειόσπερμα δικοτυλήδονα* (Τόμ. Β1). Αθήνα: Υπουργείο Γεωργίας.
- Μακρυγιαννάκης, Μ. (2017). *Αξιοποίηση υποπροϊόντων εκπίκρασης ελαιοκάρπων για την παραλαβή Βιοδραστικών Προϊόντων*. Αθήνα: Αληγιάννης Νεκτάριος.
- Μυγδανάλευρος, Κ. (2014). *Παλιούρι*. Ανάκτηση 2016, από Melissomania Web site: melissomania.gr
- Παλιούρι Χαλκιδικής*. (2012, 06 16). Ανάκτηση 2017, από Wikipedia Web site: www.el.wikipedia.org
- Παπαναστάσης, Β. Π., & Ισπικούδης, Ι. (2012). *Οικολογία Λιβαδιών*. Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις Γιαχούδη.
- Παπαναστάσης, Β. Π., & Νοϊτσάκης, Β. Ι. (1992). *Λιβαδική Οικολογία*. Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις Γιαχούδη.
- Παπαπορφυρίου, Π. (2014, 2 1). *researchgate*. Ανάκτηση 5 8, 2017, από researchgate.net: [https://www.researchgate.net/publication/281649881\\_Biopoikiloteta\\_kai\\_threptike\\_axia\\_tes\\_blasteses\\_se\\_thamnones\\_Paliurus\\_spina-christi\\_sten\\_kentrike\\_boreia\\_Ellada](https://www.researchgate.net/publication/281649881_Biopoikiloteta_kai_threptike_axia_tes_blasteses_se_thamnones_Paliurus_spina-christi_sten_kentrike_boreia_Ellada)
- Σαραντινός, Σ. (2015, Μάιος 29). *Παλιούρι το αγκάθι του Χριστού*. Ανάκτηση 2017, από Ορεινό Μέλι Web site: oreinomeli.wordpress.com
- Χασιλίδης, Π., Γρηγοριάδης, Ν., Τσαγκουρίδου, Δ., & Γρηγοριάδης, Σ. (2008). Οι μελισσοβοσκές Παλιουριού (*Paliurus spina - christi*) του Όρους Πάϊκου. Η σημασία και οι δυνατότητες διαχείρισής τους με βάση τις αρχές της πολλαπλής χρήσης δασών και δασικών εκτάσεων. *15ο Πανελλήνιο Δασολογικό Συνέδριο*, (σσ. 25-30). Καρδίτσα.