



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑΣ & ΧΗΜΕΙΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

**ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ
ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΑΠΟ
ΜΑΛΑΚΟ ΚΟΡΑΛΛΙ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ *SINULARIA***

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΓΙΑ ΤΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ, ΑΝΑΠΤΥΞΗ, ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ
ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

ΔΩΡΟΘΕΑ-ΘΕΟΔΩΡΑ ΛΑΪΝΑ

ΑΘΗΝΑ
ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ 2019

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ

Βασίλειος Ρούσσης

Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Βασίλειος Ρούσσης

Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Όλγα Τζάκου

Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ευσταθία Ιωάννου

Επίκ. Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μελέτη των θαλάσσιων οργανισμών ως πηγή βιοδραστικών δευτερογενών μεταβολιτών αποτελεί μία σύγχρονη προέκταση της χημείας φυσικών προϊόντων. Στόχοι του ερευνητικού αυτού κλάδου είναι η ανακάλυψη, η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός νέων χημικών ενώσεων που προέρχονται από θαλάσσιους οργανισμούς, η αξιολόγηση των πιθανών βιολογικών ιδιοτήτων τους και η αξιοποίησή τους σε σύγχρονους χώρους εφαρμογής.

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας μελετήθηκε η χημική σύσταση του οργανικού εκχυλίσματος ενός μαλακού κοραλλιού του γένους *Sinularia*, δείγμα του οποίου συλλέχθηκε από την Ερυθρά Θάλασσα στην περιοχή Al Fahal στο Thuwal της Σαουδικής Αραβίας, σε βάθος 10-12 m, τον Ιανουάριο του 2018.

Κατόπιν εξαντλητικής εκχύλισης του οργανισμού με οργανικούς διαλύτες, το εκχύλισμα υποβλήθηκε σε σειρά χρωματογραφικών διαχωρισμών με αποτέλεσμα την απομόνωση έντεκα μεταβολιτών (**1-11**), οι οποίοι ταυτοποιήθηκαν μέσω φασματοσκοπικών μεθόδων NMR και MS.

Συγκεκριμένα, απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν:

- έξι σεσκιτερπένια, εκ των οποίων δύο με σκελετό γουαϊανίου (**1** και **2**), ένα με σκελετό κυκλο-αρωμαδενδρανίου (**3**), ένα με σκελετό καδινανίου (**4**), ένα με σκελετό σινουλαρανίου (**5**) και ένα άκυκλο με σκελετό *seco*-γερμακρανίου (**6**),
- δύο διτερπένια (**7** και **8**), καθώς και δύο *nor*-διτερπένια (**9** και **10**) με σκελετό κεμβρανίου και
- ένα στεροειδές (**11**).

ABSTRACT

The investigation of marine organisms as a source of bioactive secondary metabolites is a modern extension of natural products chemistry. The targets of this field include the discovery, the isolation and structure elucidation of new compounds that are biosynthesized by marine organisms, the evaluation of their potential biological properties and their exploitation in industrial applications.

In the framework of the present thesis, the chemical composition of the organic extract of a soft coral of the genus *Sinularia* was investigated. The specimens were collected from the Red Sea in the region Al Fahal of Thuwal (Saudi Arabia), at a depth of 10-12 m, in January of 2018.

Exhaustive extraction of the soft coral specimens, followed by a series of chromatographic separations led to the isolation of eleven metabolites (**1-11**) that were identified on the basis of their spectroscopic data (NMR and MS).

Specifically, the isolated metabolites include:

- six sesquiterpenes, including two guaianes (**1** and **2**), one cyclo-aromendendrane (**3**), one cadinane (**4**), one sinularane (**5**) and a *seco*-germacrane (**6**),
- two diterpenes (**7** and **8**), as well as two *nor*-diterpenes (**9** and **10**) featuring the cembrane framework and
- one steroid (**11**).

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω όλους όσοι με βοήθησαν με κάθε τρόπο για να ολοκληρώσω αυτή τη μεταπτυχιακή εργασία.

Ένα πολύ θερμό ευχαριστώ θα ήθελα να απευθύνω στον Καθηγητή Βασίλειο Ρούσση και στην Επικ. Καθηγήτρια Ευσταθία Ιωάννου για την επιλογή και ανάθεση του θέματος, αλλά και την μετάδοση των γνώσεών τους, την καθοδήγησή τους καθ' όλη την διάρκεια της εργασίας και την υπομονή τους. Η συμβολή τους στη μελλοντική μου πορεία και τον προσανατολισμό μου είναι καθοριστική και ανεκτίμητη.

Ένα ιδιαίτερα μεγάλο ευχαριστώ στην μεταδιδακτορική ερευνήτρια Δρ. Νατάσα Πετράκη για την πολύτιμη βοήθειά της, για την στήριξή της και την προθυμία της, τις γνώσεις που μου μετέδωσε, καθώς και την διάθεσή της να με βοηθήσει οποιαδήποτε στιγμή χρειάστηκα.

Ευχαριστώ, ακόμη, την Καθηγήτρια Όλγα Τζάκου και την Καθηγήτρια Μαρία Κουλάδη για την βοήθειά τους κατά την διάρκεια της εργασίας μου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους μεταπτυχιακούς φοιτητές, υποψήφιους διδάκτορες, μεταδιδακτορικούς ερευνητές και τεχνικούς του εργαστηρίου για τη φιλία τους και τη βοήθειά τους καθ' όλη τη διάρκεια παραμονής μου στο εργαστήριο.

Τέλος, πέρα και πάνω από όλα ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στους ανθρώπους που ολοκληρώνουν αυτό που είμαι και όλα όσα αγαπώ, την οικογένειά μου και τους φίλους μου.

Δώρα Λαϊνά

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ..... | i |
| ABSTRACT | iii |
| ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ..... | v |
| ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ..... | vii |
| ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ | ix |
| 1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ | 1 |
| 1.1. Φυσικά προϊόντα και η χρησιμότητά τους..... | 1 |
| 1.2. Θαλάσσια Φαρμακογνωσία | 2 |
| 1.3. Κνιδόζωα (Κνιδάρια)..... | 7 |
| 1.3.1. Γενικά..... | 7 |
| 1.3.2. Χαρακτηριστικά των Κνιδόζωων..... | 9 |
| 1.4. Κοράλλια..... | 10 |
| 1.4.1. Γενικά..... | 10 |
| 1.4.2. Κοραλλιογενείς ύφαλοι..... | 10 |
| 1.4.3. Παραδείγματα βιοδραστικών συστατικών που έχουν απομονωθεί από κοράλλια | 11 |
| 1.5. Γένος <i>Sinularia</i> | 12 |
| 1.5.1. Γενικά..... | 12 |
| 1.5.2. Βιοδραστικοί δευτερογενείς μεταβολίτες του γένους <i>Sinularia</i> | 12 |
| 1.6. Σκοπός της μελέτης | 18 |
| 2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ | 19 |
| 2.1. Οργανολογία | 19 |
| 2.2. Διαλύτες και χημικά αντιδραστήρια..... | 19 |
| 2.3. Συλλογή του οργανισμού..... | 20 |
| 2.4. Χρωματογραφικός διαχωρισμός και απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών ... | 20 |
| 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ..... | 47 |
| 3.1. Μεταβολίτης 1 | 48 |
| 3.2. Μεταβολίτης 2 | 51 |
| 3.3. Μεταβολίτης 3 | 54 |
| 3.4. Μεταβολίτης 4 | 57 |
| 3.5. Μεταβολίτης 5 | 59 |

| | |
|-----------------------------------|----|
| 3.6. Μεταβολίτης 6 | 61 |
| 3.7. Μεταβολίτης 7 | 64 |
| 3.8. Μεταβολίτης 8 | 67 |
| 3.9. Μεταβολίτης 9 | 70 |
| 3.10. Μεταβολίτης 10 | 73 |
| 3.11. Μεταβολίτης 11 | 76 |
| ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ | 79 |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | 81 |

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

| | |
|--------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1D NMR | πείραμα NMR μίας διάστασης |
| ¹H NMR | 1D-NMR πείραμα πυρήνων υδρογόνου (πρωτονίου) |
| br | ευρεία (NMR) |
| CDCl₃ | δευτεριωμένο χλωροφόρμιο |
| CH₂Cl₂ | διχλωρομεθάνιο |
| CHCl₃ | χλωροφόρμιο |
| cHex | κυκλοεξάνιο |
| d | διπλή (NMR) |
| EIMS | φασματομετρία μάζας με μέθοδο ιονισμού τον βομβαρδισμό με δέσμη ηλεκτρονίων (E lectron I mpact M ass S pectrometry) |
| EtOAc | οξικός αιθυλεστέρας |
| HPLC | υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (H igh P erformance L iquid C hromatography) |
| J | σταθερά σύζευξης (σε Hz) (NMR) |
| m | πολλαπλή (NMR) |
| Me₂CO | ακετόνη |
| MeOH | μεθανόλη |
| MS | φασματομετρία μάζας (M ass S pectrometry) |
| m/z | λόγος μάζας προς φορτίο |
| n-C₅H₁₂ | κανονικό πεντάνιο |
| n-Hex | κανονικό εξάνιο |
| NMR | φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (N uclear M agnetic R esonance) |
| RI | δείκτης διάθλασης (R efractive I ndex) |
| q | τετραπλή (NMR) |
| s | απλή (NMR) |
| t | τριπλή (NMR) |
| TLC | χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (T hin L ayer C hromatography) |
| δ | χημική μετατόπιση της απορρόφησης ενός πυρήνα σε σχέση με το τετραμεθυλοσιλάνιο (σε ppm) (NMR) |

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1. Φυσικά προϊόντα και η χρησιμότητά τους

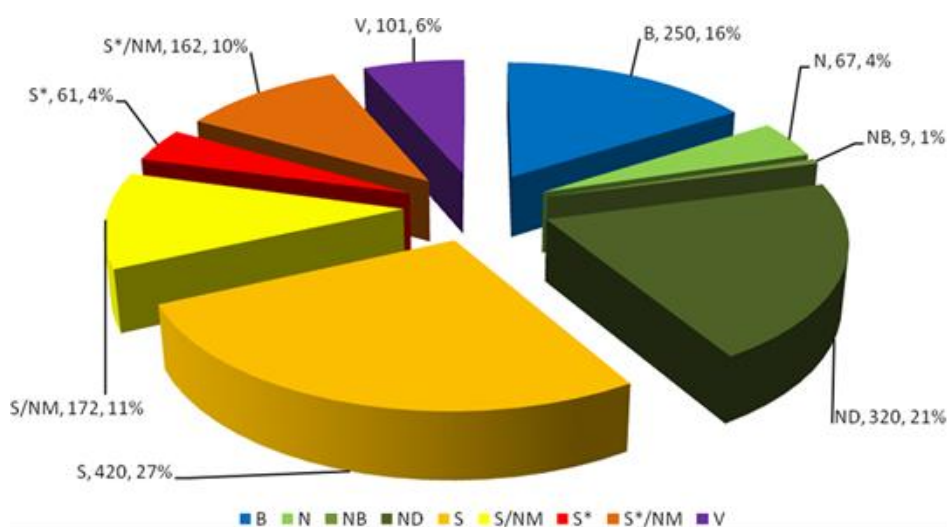
Ο όρος «φυσικά προϊόντα» καλύπτει μια μεγάλη ομάδα χημικών ενώσεων που προέρχεται και έχει απομονωθεί από βιολογικές πηγές. Ως φυσικό προϊόν ορίζεται οποιαδήποτε χημική ουσία παράγεται από ζωντανούς οργανισμούς, όπως φυτά, ζώα και μικροοργανισμούς χερσαίας και θαλάσσιας προέλευσης (Orhan, 2014). Σύμφωνα με άλλους ορισμούς, ο όρος «φυσικό προϊόν» αναφέρεται σε οποιαδήποτε ουσία του δευτερογενούς μεταβολισμού, η οποία παράγεται από ζωντανούς φυτικούς ή ζωικούς οργανισμούς για συγκεκριμένο λόγο, ανεξάρτητα από τις βασικές λειτουργικές ανάγκες τους (Γεωργιάδης, 1994). Η επιστήμη που ασχολείται με τα φάρμακα φυσικής προέλευσης, γνωστή και με τον όρο «φαρμακογνωσία», αποτελεί έναν από τους κύριους κλάδους των φαρμακευτικών επιστημών. Αναλυτικότερα, η φαρμακογνωσία περιγράφεται ως η συστηματική επιστήμη των μορφολογικών, χημικών και βιολογικών ιδιοτήτων σε συνδυασμό με την ιστορία, την καλλιέργεια, τη συλλογή, την εκχύλιση, την απομόνωση, τις βιολογικές δοκιμασίες, τον ποιοτικό έλεγχο και την παρασκευή ακατέργαστων φαρμάκων φυσικής προέλευσης (Orhan, 2014).

Η ιατρική μέχρι τη δεκαετία του '50 ήταν συνηφασμένη με τα φυσικά προϊόντα. Από τότε και μέχρι τη δεκαετία του '70 επικράτησε στη παρασκευή των φαρμάκων η συνθετική χημεία. Ωστόσο, σήμερα τα φυσικά προϊόντα επανακτούν την σημασία τους ως μια βασική πηγή αποτελεσματικών φαρμάκων.

Τα φυσικά προϊόντα αποτελούν εδώ και πολλά χρόνια πηγή έμπνευσης νέων ανακαλύψεων στη χημεία, τη βιολογία, την ιατρική και φυσικά τη φαρμακευτική λόγω της δομικής και χημικής ποικιλομορφίας τους. Όσον αφορά στην ανάπτυξη και παραγωγή φαρμάκων, φυσικά προϊόντα και μόρια εμπνευσμένα από αυτά καλύπτουν ένα σημαντικό μερίδιο της αγοράς, το οποίο περιλαμβάνει το 61% των αντικαρκινικών και το 49% των αντιμικροβιακών ενώσεων, οι οποίες εγκρίθηκαν τα τελευταία 30 χρόνια (Luo *et al.*, 2014). Πολλά από τα κλινικώς χρησιμοποιούμενα φάρμακα που προέρχονται από φυσικά προϊόντα απομονώθηκαν αρχικά από μικροοργανισμούς, αλλά και από φυτά. Ορισμένα παραδείγματα παραγώγων φαρμάκων φυτικής προέλευσης είναι η μορφίνη (morphine), η βινμπλαστίνη (vinblastine), η βινκριστίνη (vincristine), η κινίνη (quinine), η αρτεμισινίνη (artemisinin), ο ετοποσίδης (etoposide), ο τενιποσίδης (teniposide), η πακλιταξέλη (paclitaxel) και τα παράγωγα καμποθεκίνης

(camptothecin), τοποτεκάνης (topotecan) και ιρινοτεκάνης (irinotecan). Τα τελευταία χρόνια, τα φάρμακα θαλάσσιας προέλευσης συνεισφέρουν σημαντικά στη θεραπευτική, όπως για παράδειγμα η τραβεκτιδίνη (trabectedin) η οποία είναι η δραστική ουσία του αντικαρκινικού φαρμάκου Yondelis® (Kingston, 2010).

Τα φυσικά προϊόντα αποτελούν μόρια-οδηγούς για τη σύνθεση πολυπλοκότερων, δραστικότερων ή λιγότερο τοξικών μορίων. Στην Εικόνα 1 παρουσιάζεται η συμβολή των φυσικών προϊόντων στον τομέα των εγκεκριμένων φαρμάκων της περιόδου 1981 έως 2014 (Newman & Cragg, 2016).



Εικόνα 1. Σύνολο εγκεκριμένων φαρμάκων περιόδου 1981-2014, n = 1562.

(N:φυσικό προϊόν, NB: «βοτανικό» φυσικό προϊόν, ND: παράγωγο φυσικού προϊόντος, NM: «μιμητικό» φυσικού προϊόντος, S: συνθετικό φάρμακο, S*: συνθετικό φάρμακο με φυσικό φαρμακοφόρο τμήμα, V: εμβόλια, B: Βιολογικά μακρομόρια).

1.2. Θαλάσσια Φαρμακογνωσία

Το υδάτινο περιβάλλον καλύπτει περισσότερο από το 70% της συνολικής επιφάνειας του πλανήτη Γη και αντιπροσωπεύει περισσότερο από το 95% της βιόσφαιρας και συντηρεί τουλάχιστον 200.000 μορφές ζωής. Στο ζωικό βασίλειο από τα 28 κύρια φύλα, τα 26 βρίσκονται στον υδάτινο χώρο, ενώ τα 8 είναι αποκλειστικά υδρόβια, κάτι το οποίο είναι λογικό εφόσον η ζωή ξεκίνησε από τους προϊστορικούς ωκεανούς πριν από 3 δισεκατομμύρια χρόνια. Συνεπώς, οι θαλάσσιοι οργανισμοί που δεν εγκατέλειψαν ποτέ το αρχικό τους οικοσύστημα είχαν στη διάθεσή τους περισσότερο χρόνο προσαρμογής και εξέλιξης και μάλιστα σε ένα πολύ πιο ομοιογενές

και σταθερό περιβάλλον από αυτό των αντίστοιχων χερσαίων (Ρούσσης, 2017).

Τις τελευταίες δεκαετίες, χιλιάδες συστατικά έχουν απομονωθεί από θαλάσσιους οργανισμούς. Εκατοντάδες έχουν χρησιμοποιηθεί ως μόρια-οδηγοί για τη σύνθεση χημικών ενώσεων με θεραπευτικές ιδιότητες, και άλλα αποτελούν τα ίδια συστατικά σκευασμάτων ή είναι υποψήφια φάρμακα αφού βρίσκονται σε στάδια κλινικών δοκιμών. Ενδεικτικά, κάποια παραδείγματα είναι:

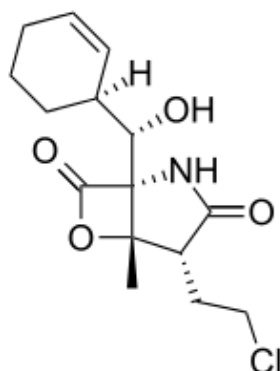
1. Αντικαρκινική δράση

▪ **Aplidine (Plitidepsin Φάση II/III)**

Η πλιτιδεψίνη ή δεϋδροδιδεμνίνη Β είναι ένα δεσιπεπτίδιο που απομονώθηκε από το ασκίδιο *Aplidium ablicans*. Εμφανίζει αντιμιτωτική δράση, μπλοκάροντας τον κυτταρικό κύκλο και έτσι προκαλείται απόπτωση των καρκινικών κυττάρων. Βρίσκεται στην Φάση III κλινικών δοκιμών για την θεραπεία του πολλαπλού μυελώματος και στη Φάση II για συμπαγείς όγκους και αιματολογικές κακοήθειες νεοπλασίες, όπως το T-κυτταρικό λέμφωμα (Jaspars *et al.*, 2016).

▪ **Marizomib (Salinosporamide A, CHI-0052, Φάση II/I)**

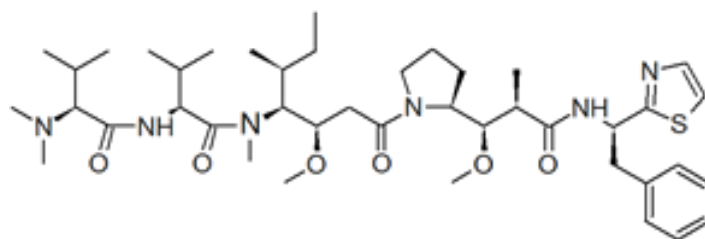
Το σαλινοσποραμίδιο Α είναι ένας ισχυρός και εκλεκτικός αναστολέας του 20S πρωτεασώματος και παρουσιάζει δράση έναντι πολλών αιματολογικών κακοηθειών και όγκων, όπως του πολλαπλού μυελώματος (Fenical *et al.*, 2009). Απομονώθηκε από το βακτήριο *Salinispora tropica* και βρίσκεται στη Φάση II/I κλινικών δοκιμών για τη θεραπεία του πολλαπλού μυελώματος, ενώ ήδη χρησιμοποιείται ως ορφανό φάρμακο. Την ανάπτυξή του έχει αναλάβει η Triplate Research and Development Corporation (Newman & Cragg, 2016).



▪ **Συζεύγματα φαρμάκου (MMAE/MMAF)-αντισώματος (διάφορες φάσεις)**

Ένας αριθμός συζευγμάτων φαρμάκου-αντισώματος (ADCs: antibody-drug conjugates) βρίσκεται σε κλινικές δοκιμές για τη θεραπεία διάφορων τύπων καρκίνου, στα οποία τα

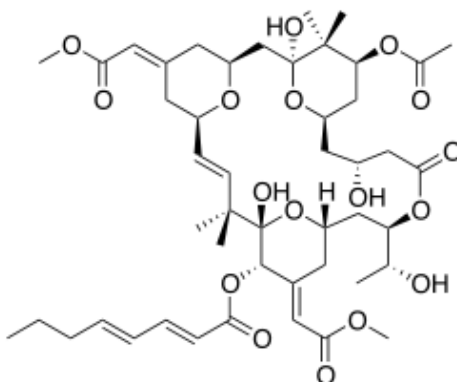
φάρμακα είναι συνθετικά ανάλογα φυσικών προϊόνων που ανήκουν στην οικογένεια των δολαστατινών, όπως το Glematumumab Vedotin (Φάση II) και το Pinatuzumab Vedotin (RG-7593) (Φάσεις I/II), ενώ ήδη κυκλοφορεί το Brentuximab Vedotin για τη θεραπεία λεμφώματος Hodgkin και αναπλαστικού μεγαλοκυτταρικού λεμφώματος (Newman & Cragg, 2017).



2. Δράση κατά της νόσου Alzheimer:

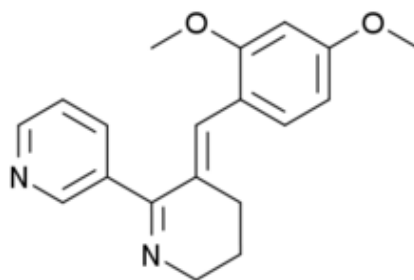
▪ Bryostatin 1 (Φάση II)

Η βρυοστατίνη 1 είναι ένα μακρολίδιο που απομονώθηκε από το βρυόζωο *Bugula neritina*, και βρίσκεται στη Φάση II των κλινικών δοκιμών για τη θεραπεία της νόσου Alzheimer από τη Neurotrophe Bioscience (Newman & Cragg, 2016).



▪ DMXBBA (GTS-21, Φάση II)

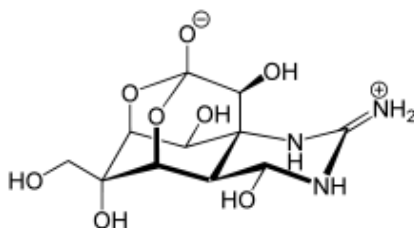
Είναι συνθετικό ανάλογο του αλκαλοειδούς αναβασεΐνη που έχει απομονωθεί από πολλά είδη νημερτίων σκωλήκων, ενεργοποιεί εκλεκτικά τους α7 νικοτινικούς υποδοχείς ακετυλοχολίνης (Kem *et al.*, 2004). Τα αποτελέσματα μέχρι τώρα δείχνουν σημαντική βελτίωση σε ασθενείς με σχιζοφρένεια (Rangel & Falkenberg, 2015).



3. Αναλγητική δράση:

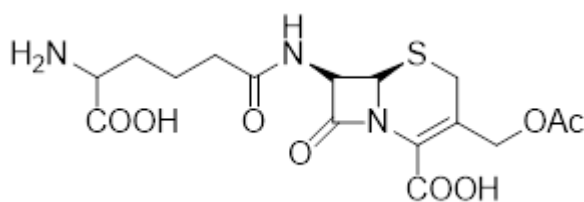
▪ Tetrodotoxin (Φάση II/III)

Η τετροδοτοξίνη είναι ένα αλκαλοειδές που έχει απομονωθεί από ψάρια της οικογένειας Tetraodontidae και προκαλεί αναστολή των τασοεξαρτώμενων διαύλων νατρίου. Η WEX Pharmaceuticals Inc. εξετάζει σε επίπεδο κλινικών δοκιμών τη δράση έναντι στο νευροπαθητικό άλγος που σχετίζεται με το καρκίνο (Φάση II) και έναντι της προκαλούμενης από χημειοθεραπεία περιφερικής νευροπάθειας (Φάση II) (Jaspars *et al.*, 2016, Newman & Cragg, 2016).



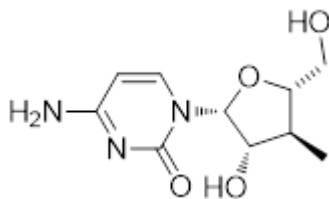
Επίσης, κάποια ακόμα χαρακτηριστικά παραδείγματα φυσικών προϊόντων θαλάσσιας προέλευσης που κυκλοφορούν ως εμπορικά σκευάσματα, είτε ως αυτούσια συστατικά φαρμακευτικών σκευασμάτων είτε ως μεταβολίτες που έχουν χρησιμοποιηθεί ως μόρια-οδηγοί για τη σύνθεση χημικών ενώσεων με θεραπευτικές ιδιότητες, είναι τα εξής:

- **Κεφαλοσπορίνη C:** απομονώθηκε από τον θαλάσσιο μύκητα *Cephalosporium acremonium*, χρησιμοποιείται ως φυσικό ανάλογο, ανήκει στην κατηγορία των αντιβιοτικών β-λακτάμης και εμφανίζει δραστικότητα κυρίως έναντι θετικών αλλά και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων (Lee *et al.*, 2013).

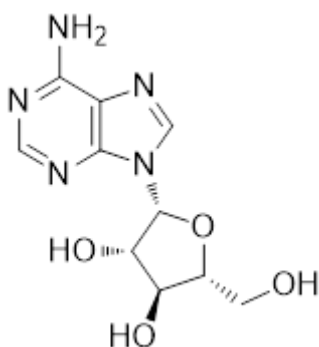


- **Ara-C (Cytarabine®):** αποτελεί συνθετικό παράγωγο του νουκλεοσιδικού

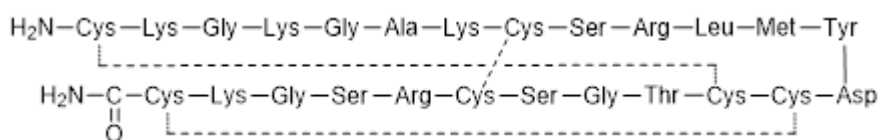
αναλόγου της σπογγοουριδίνης που απομονώθηκε από τον σπόγγο *Tethya crypta* και εμφανίζει αντιλευχαιμική δράση (Jimenez *et al.*, 2018).



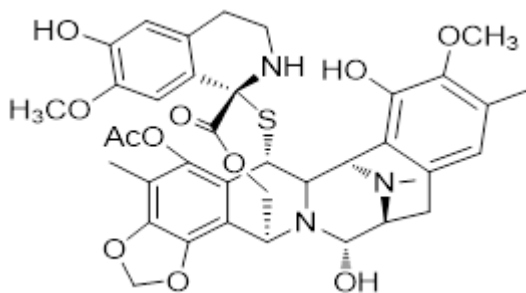
- **Ara-A (Vidarabine®)**: αποτελεί συνθετικό παράγωγο του νουκλεοσιδικού αναλόγου της σπογγοθυμιδίνης που απομονώθηκε από τον σπόγγο *Tethya crypta* και εμφανίζει αντική δράση (Monaster & Luesch, 2011).



- **Ζικονοτίδιο (Prialt®)**: αποτελεί ολιγοπεπτίδιο που απομονώθηκε από το γαστερόποδο *Conus magus* και εμφανίζει έντονη αναλγητική δράση (Layer & McIntosh, 2006).

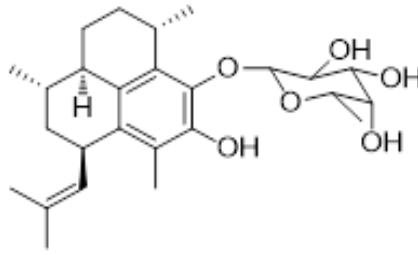


- **Τραμπεκτιδίνη (Εκτεϊνασιδίνη 743)**: αποτελεί αλκαλοειδές που απομονώθηκε από το ασκίδιο *Ecteinascidia turbinata* και χορηγείται για τη θεραπεία σαρκώματος μαλακών ιστών (Incalci & Galmarini, 2010).

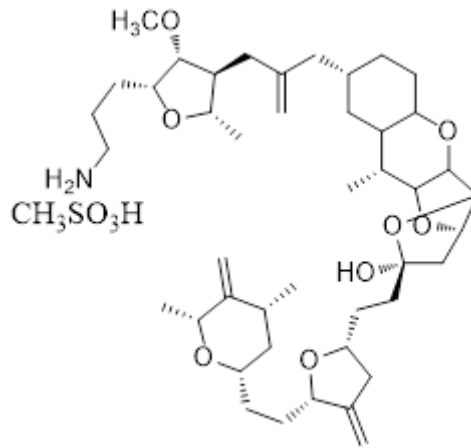


- **Ψευδοπτεροσίνη E**: αποτελεί διτερπενικό γλυκοσίδη που απομονώθηκε από το μαλακό κοράλλι *Pseudopterogorgia elisabethae* και εμφανίζει ισχυρή

αντιφλεγμονώδη δράση μέσω πρωτότυπου μηχανισμού (Rodriguez *et al.*, 2004).



- **Χαλιγονδρίνη Β (Halaven[®])**: είναι πολυαιθερικό μακρολίδιο που απομονώθηκε από το σπόγγο *Halichondria okadai* και αποτελεί μόριο-οδηγό για τη σύνθεση του αναλόγου E7389 (Halaven[®]), το οποίο χρησιμοποιείται για τη θεραπεία υποτροπιάζοντα μεταστατικού καρκίνου του μαστού (Montaser & Luesch, 2011).

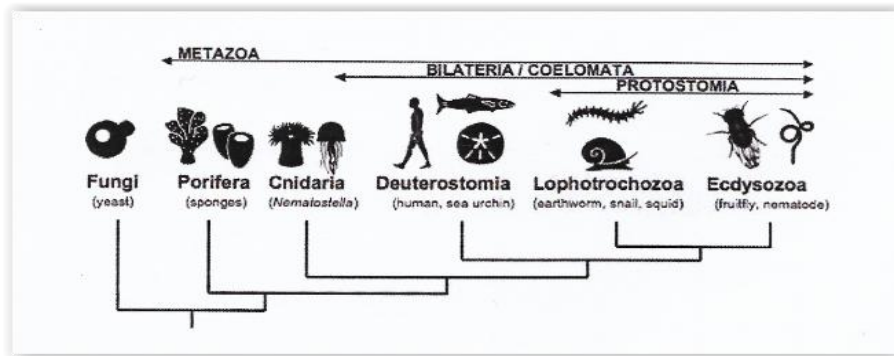


1.3. Κνιδόζωα (Κνιδάρια)

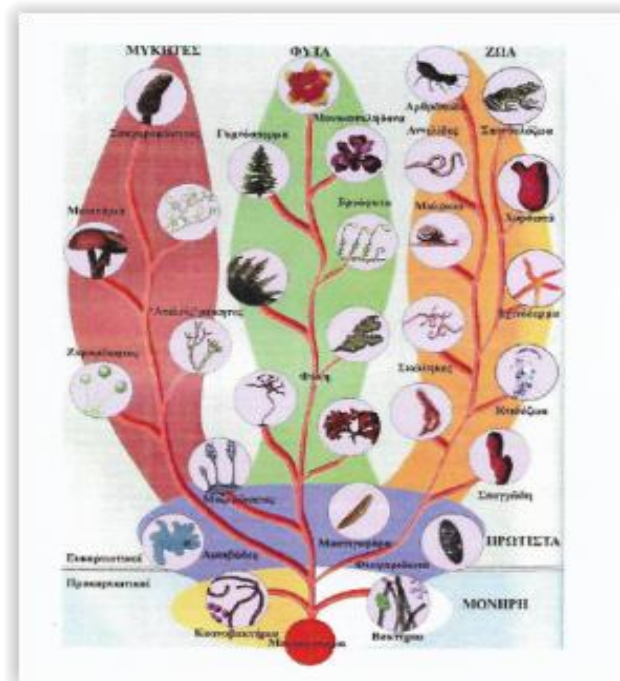
1.3.1. Γενικά

Τα **Κνιδόζωα** (λατ. Cnidaria, από το αρχαιοελληνικό κνίδη, που σημαίνει «τσουκνίδα», εξαιτίας της ικανότητάς τους να κεντρίζουν) είναι μία συνομοταξία που περιλαμβάνει άνω των 10.000 ειδών ζώων που απαντώνται αποκλειστικά σε υδάτινα, και κυρίως θαλάσσια, οικοσυστήματα.

Τα Κνιδόζωα θεωρούνται τα πρώτα πραγματικά μετάζωα (Εικ. 2). Για πρώτη φορά, σε αυτό το φύλο παρατηρείται η σαφής διαφοροποίηση των κυττάρων σε ιστούς. Τα Κνιδόζωα φυλογενετικά θεωρούνται πρόγονοι πολλών άλλων ζωικών ομάδων και έτσι κατέχουν σημαντική θέση στο ζωικό βασίλειο (Εικ. 3).



Εικόνα 2. Φυλογενετικές σχέσεις Μεταζώων.



Εικόνα 3. Απεικόνιση της σημαντικής θέσης των Κνιδόζωων στο ζωικό βασίλειο.

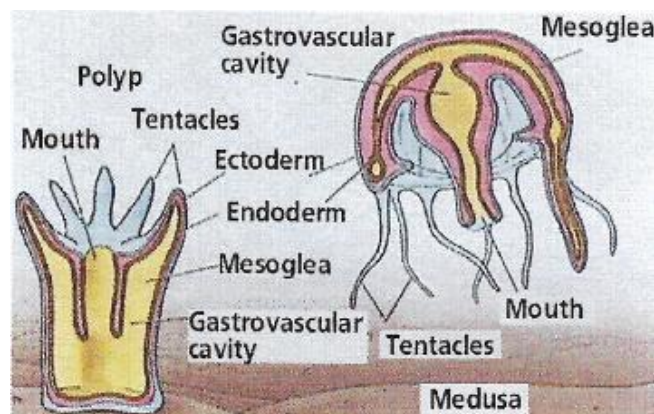
Τα Κνιδόζωα έκαναν νωρίς την εμφάνισή τους στο υγρό στοιχείο, γεγονός το οποίο δείχνει ότι, αν και κατώτερες μορφές ζωής, ανέπτυξαν τέτοια χημεία που τους επέτρεψε να επιβιώσουν στο πέρασμα των αιώνων, αντιμετωπίζοντας επιτυχώς τους θηρευτές τους, αλλά και τις όποιες άλλες αντίξοες συνθήκες.

Τα Κνιδόζωα, τα οποία εμφανίστηκαν στη Προκάμβριο, ταξινομούνται σε τέσσερις κύριες ομάδες: τα σχεδόν εξ ολοκλήρου εδραία ανθόζωα (θαλάσσιες ανεμώνες, κοράλλια, φτερά της θάλασσας), τα ελεύθερα σκυφόζωα (μέδουσα), τα κυβόζωα (κυβοειδείς μέδουσες) και τα υδρόζωα, μια διαφορετική ομάδα που περιλαμβάνει όλα τα κνιδόζωα του γλυκού νερού, πολλές θαλάσσιες μορφές, αλλά έχει και μέλη με εδραία μορφή, όπως η ύδρα, και ελεύθερα αποικιακά, όπως η γαλέρα.

Τέλος, τα σταυρόζωα έχουν πρόσφατα αναγνωρισθεί ως ομοταξία αυτόνομη και όχι μία υποομάδα των σκυφοζώων και υπάρχει συζήτηση σχετικά με το αν τα μυξόζωα και τα πολυποδιόζωα είναι κνιδόζωα ή πιο κοντά στα αμφίπλευρα (πολυπλοκότερα ζώα).

1.3.2. Χαρακτηριστικά των Κνιδόζωων

Τα **Κνιδόζωα** είναι απλοί, πολυκύτταροι, θαλάσσιοι οργανισμοί. Τα κύτταρά τους είναι οργανωμένα σε ιστούς, οι οποίοι διευθετούνται ακτινωτά. Το σώμα τους είναι σακοειδές και αποτελείται από δύο στιβάδες κυττάρων: την εξωτερική στιβάδα ή εξώδερμα (ectoderm) και την εσωτερική στιβάδα ή ενδόδερμα (endoderm). Μεταξύ τους παρεμβάλλεται ένα άμορφο ζελατινώδες στρώμα, η μεσόγλοια (mesoglea), με ένα υποτυπώδες νευρικό δίκτυο. Στο εσωτερικό σχηματίζεται μια κοιλότητα, η γαστρική κοιλότητα με πτυχώμενο εσωτερικό τοίχωμα, έτσι ώστε να σχηματίζονται κατακόρυφες μεσεντέριες πτυχές. Η γαστρική κοιλότητα έχει ένα μόνο άνοιγμα, το στόμα, το οποίο χρησιμεύει και ως έδρα και περιβάλλεται από ακτινωτά διατεταγμένες κεραίες για τη σύλληψη της τροφής (Εικ. 4).



Εικόνα 4. Σώμα Κνιδοζώων.

Ένα χαρακτηριστικό των κνιδοζώων, από το οποίο πήραν και το όνομά τους, είναι ότι στο εξώδερμά τους και ιδίως στις κεραίες, φέρουν ειδικά κύτταρα, τα κνιδοκύτταρα. Έχουν περιγραφεί 30 διαφορετικοί τύποι κνιδοκυττάρων (Tardent, 1995). Τα κύτταρα αυτά διαθέτουν, μέσα σε ειδικές κύστες που ονομάζονται νηματοκύστες, ένα τοξικό υγρό που σκοτώνει όλους τους μικρούς οργανισμούς, όπως μικρά ψάρια και προκαλεί κνησμό σε μεγαλύτερους.

Ο κύκλος ζωής στα κνιδόζωα παρουσιάζει ένα παροδικό πολυμορφισμό και οι οργανισμοί εμφανίζονται με δύο μορφές: τη μορφή του εδραίου πολύποδα και τη

μορφή της ελεύθερης μέδουσας.

Ο πολύποδας έχει μικροσκοπικό μέγεθος, με κυνδρική ή ασκοειδή μορφή που είναι προσκολλημένη στο βυθό ή σε άλλα υποστρώματα. Με διαδοχικές εκβλαστήσεις, σχηματίζεται αποικία, με μορφή αλυσίδας με μήκος έως 2 cm. Οι πολύποδες μπορούν να είναι αποικιακοί, με πολυμορφισμό μέσα στις αποικίες (Peckenik, 1996).

1.4. Κοράλλια

1.4.1. Γενικά

Τα **κοράλλια** είναι θαλάσσια ασπόνδυλα της ομοταξίας των Ανθοζώων, της συνομοταξίας των Κνιδοζώων. Τα κοράλλια διαφέρουν από τα υπόλοιπα κνιδόζωα διότι δεν έχουν το στάδιο της μέδουσας στο κύκλο ζωής τους. Αν και δεν είναι σπάνια τα μονήρη είδη, τα κοράλλια ζουν κυρίως σε αποικίες. Η βάση των αποικιών είναι ο πολύποδας, μία μικροσκοπική ανεμώνη είτε εξακτινωτής (Εξακοράλλια) ή οκτακτινωτής (Οκτακοράλλια) συμμετρίας. Ο κάθε πολύποδας καταλαμβάνει ένα από τους δεκάδες ή εκατοντάδες πόρους (οπές) του σκελετού της αποικίας από τον οποίο αναδύεται όταν θέλει να τραφεί και στον οποίο καταφεύγει όταν θέλει να προστατευτεί. Η γέννηση ενός νέου πολύποδα συνεπάγεται την ανάπτυξη του σκελετού, άρα και την επέκταση της αποικίας.

Συνήθως η λέξη κοράλλι παραπέμπει αυτόματα τους τροπικούς υφάλους. Όχι άδικα, αφού οι ύφαλοι είναι βιογενείς σχηματισμοί που δημιουργήθηκαν στη διάρκεια χιλιετιών από τις αλληπάλληλες αποθέσεις των ασβεστολιθικών σκελετών των κοραλλιών (Squires, 1965).

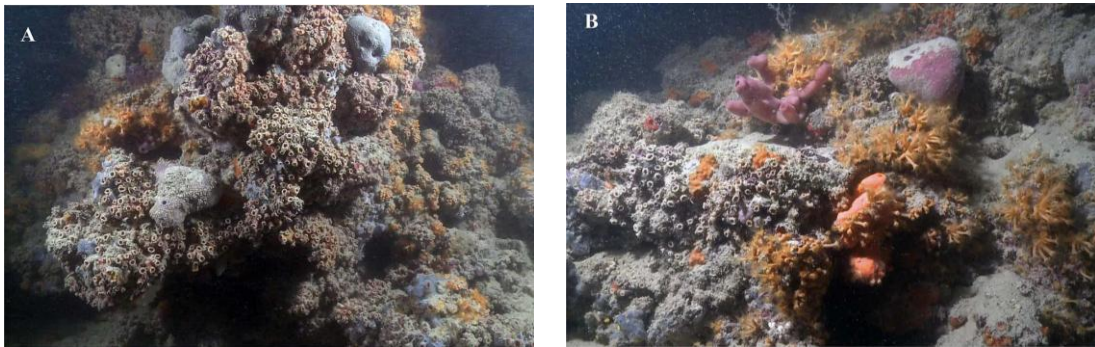
1.4.2. Κοραλλιογενείς ύφαλοι

Οι **κοραλλιογενείς ύφαλοι** (corals reefs) είναι μάζες βιογενούς ασβεστόλιθου που σχηματίζονται από αποικίες κοραλλιών μαζί με άλλους οργανισμούς, όπως ασβεστοφύκη. Σχηματίζονται κοντά σε ακτές σε ρηχούς πυθμένες όπου υπάρχουν οι κατάλληλες συνθήκες ανάπτυξης κοραλλιών. Δημιουργούνται διαχρονικά αφού οι νεώτερες γενιές αναπτύσσονται πάνω στα σκελετικά στοιχεία των παλαιότερων. Ο ρυθμός ανάπτυξής τους είναι πολύ αργός, προσθέτοντας περίπου ένα cm σε ύψος κάθε χρόνο.

Τυπικές μορφές κοραλλιογενών υφάλων παρατηρούνται στα ηφαιστειακά νησιά του Ειρηνικού, τα οποία περιβάλλονται αρχικά από έναν κροσσωτό ύφαλο (fringe reef).

Όταν τα ηφαιστειακά αυτά νησιά, βυθίζονται σιγά σιγά, ο ύφαλος αναπτύσσεται προς τα έξω και έτσι δημιουργείται ένα κοραλλιογενές φράγμα (barrier reef). Όταν τα νησιά βυθιστούν τελείως, τότε παραμένει η ατόλλη (atoll).

Οι κοραλλιογενείς ύφαλοι είναι εξαιρετικά ποικίλα θαλάσσια οικοσυστήματα που φιλοξενούν πάνω από 4.000 είδη ψαριών, μεγάλο αριθμό κνιδαρίων, μαλάκιων, καρκινοειδών και άλλων ζώων. Ο πρώτος κοραλλιογενής ύφαλος στη Μεσόγειο εντοπίστηκε στην Ιταλία, με το υποθαλάσσιο οικοσύστημα να εκτείνεται σε μήκος τουλάχιστον δύομισι χιλιομέτρων στις ακτές της Αδριατικής, στην Απουλία. Αυτοί οι τύποι υφάλων βρίσκονται σε βάθη που κυμαίνονται από 30 έως και 200 m (Corriero *et al.*, 2019) (Εικ. 5).



Εικόνα 5. Κοραλλιογενής ύφαλος Μεσογείου.

1.4.3. Παραδείγματα βιοδραστικών συστατικών που έχουν απομονωθεί από κοράλλια

Η ελευθεροβίνη απομονώθηκε από μαλακά κοράλλια του γένους *Eleutherobia*. Η αντικαρκινική της δράση και ο σπάνιος μηχανισμός δράσης που είναι όμοιος με αυτόν της ταξόλης (διακόπτει την αποδιοργάνωση των κυτταρικών μικροσωληνίσκων, καθιστώντας αδύνατη την κυτταρική διαίρεση), αλλά και η ευκολία παρασκευής της ελευθεροβίνης την ανέδειξαν ως το πλέον ενδιαφέρον μόριο και το πιο ελπιδοφόρο στη θεραπεία του καρκίνου του μαστού, των ωοθηκών, των νεφρών και του λάρυγγα στα τέλη του προηγούμενου αιώνα (Lindel *et al.*, 1997, Long *et al.*, 1998).

Ακόμη, το μαλακό κοράλλι της Καραϊβικής *Pseudopterogorgia elizabethae* έχει παρουσιάσει φαρμακολογικό ενδιαφέρον. Από αυτό το είδος έχουν απομονωθεί διτερπενικοί γλυκοζίτες, οι ψευδοπεροσίνες A-Z (Look *et al.*, 1986, Roussis *et al.*, 1990, Ata Athar *et al.*, 2003, Duque *et al.*, 2004, Rodriguez *et al.*, 2004). Αυτοί

βιοσυντίθενται από συμβιωτικά δινωμαστιγωτά του γένους *Symbiodinium*, σταματούν τη σύνθεση των λευκοτριενίων, επιδρώντας ανταγωνιστικά στις λιποξυγενάσες ή σε άλλα ένζυμα πολύ νωρίς στην πορεία της βιοσύνθεσης του αραχιδονικού οξέος (Roussis *et al.*, 1990).

Εκτός από το πλήθος των βιοδραστικών μεταβολιτών που βιοσυνθέτουν τα κοράλλια, ακόμη και ο σκληρός σκελετός τους έχει ιδιαίτερη αξία για την ανθρώπινη υγεία. Ο σκληρός σκελετός των κοραλλιών αποτελείται, κατά κύριο λόγο, από υδροξυαπατίτη (άλας του ασβεστίου) και η πορώδης δομή του μοιάζει πολύ με τη δομή των ανθρώπινων οστών. Έτσι, τα αιμοφόρα αγγεία και οι μυικές ίνες αναπτύσσονται ανεμπόδιστα, με αποτέλεσμα ο υδροξυαπατίτης των κοραλλιών να αποτελεί ιδανικό υλικό σε περιπτώσεις μεταμόσχευσης οστών (Henkel, 1998).

1.5. Γένος *Sinularia*

1.5.1. Γενικά

Το γένος *Sinularia* ανήκει στην συνομοταξία Cnidaria, στην τάξη Alcyonaria και στην οικογένεια Alcyoniidae. Το γένος *Sinularia* περιλαμβάνει τουλάχιστον 160 είδη, πολλά εκ των οποίων έχουν μελετηθεί ως προς τη χημική τους σύσταση.

Τα είδη ποικίλλουν σημαντικά σε μορφές ανάπτυξης, από επιταγείς οργανισμούς με μικρά εξογκώματα έως ανορθούμενους οργανισμούς με ψηλούς και άφθονους λοβούς. Εμφανίζονται σε ρηχά νερά, λιγότερο από 1 m έως λίγο κάτω από 35 m και εμφανίζονται σε διάφορους υφάλους.

Το γένος *Sinularia* εκτείνεται στις τροπικές ζώνες του πλανήτη από την Ερυθρά Θάλασσα και τον Ινδικό μέχρι τον Ειρηνικό Ωκεανό.

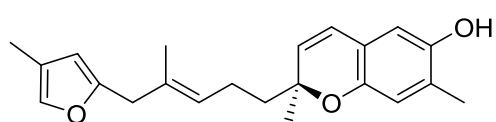
1.5.2. Βιοδραστικοί δευτερογενείς μεταβολίτες του γένους *Sinularia*

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες που έχουν απομονωθεί από το γένος *Sinularia* συχνά εμφανίζουν αντιμικροβιακή, αντιφλεγμονώδη ή κυτταροτοξική δράση και ανήκουν στις κατηγορίες των σεσκιτερπενίων, διτερπενίων, στερολών και γλυκοζιτών, γλυκολιπιδίων, παραγώγων σπερμιδίνης, κα.

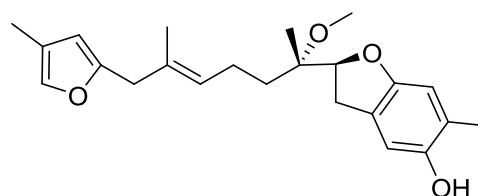
➤ Σεσκιτερπένια

Από το γένος *Sinularia* έχουν απομονωθεί πολλά σεσκιτερπένια. Από το *Sinularia capillosa* απομονώθηκαν δύο φουρανο-βενζο-σεσκιτερπένια (**1** και **2**) και ένα

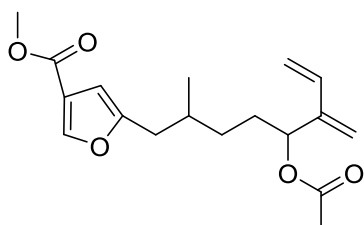
φουρανο-σεσκιτερπένιο (**3**), εκ των οποίων το **2** παρουσίασε αντική δράση (Coll *et al.*, 1977). Το 2009, το φουρανο-σκεσκιτερπένιο **4** βρέθηκε ότι μπορεί να έχει θεραπευτική δράση έναντι λευχαιμικών κυττάρων διότι μπλοκάρει τον κυτταρικό κύκλο και οδηγεί σε απόπτωση (Arepalli *et al.*, 2009). Από το *Sinularia gibberosa* απομονώθηκε ο μεταβολίτης υπεροξυγκιμπερόλη (**5**), ο οποίος έχει κυτταροτοξική δράση έναντι καρκινικών κυττάρων του ήπατος, καθώς και η σινουγκιμπεροδιόλη (**6**) (Zhang *et al.*, 2006). Από το *Sinularia polydactyla* απομονώθηκαν σεσκιτερπένια με σκελετό γουαϊανίου, όπως ο μεταβολίτης **7** με κυτταροτοξική δράση έναντι καρκινικών επιδερμικών κυττάρων του στόματος (KB) και του μαστού (MCF) (Zhang *et al.*, 2008). Από το *Sinularia leptoclados* απομονώθηκαν τα σεσκιτερπένια **8-11** (Su *et al.*, 2010), ενώ από τα είδη *Sinularia nanolobata* και *S. gibberosa* απομονώθηκαν τα σεσκιτερπένια **12-14** με σκελετό καρνοφυλλενίου (Li *et al.*, 2008).



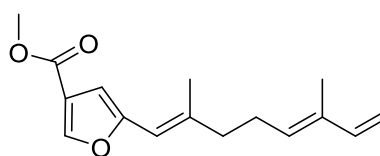
1



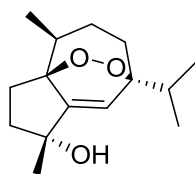
2



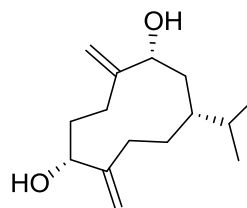
3



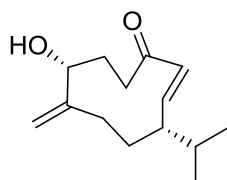
4



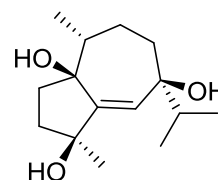
5



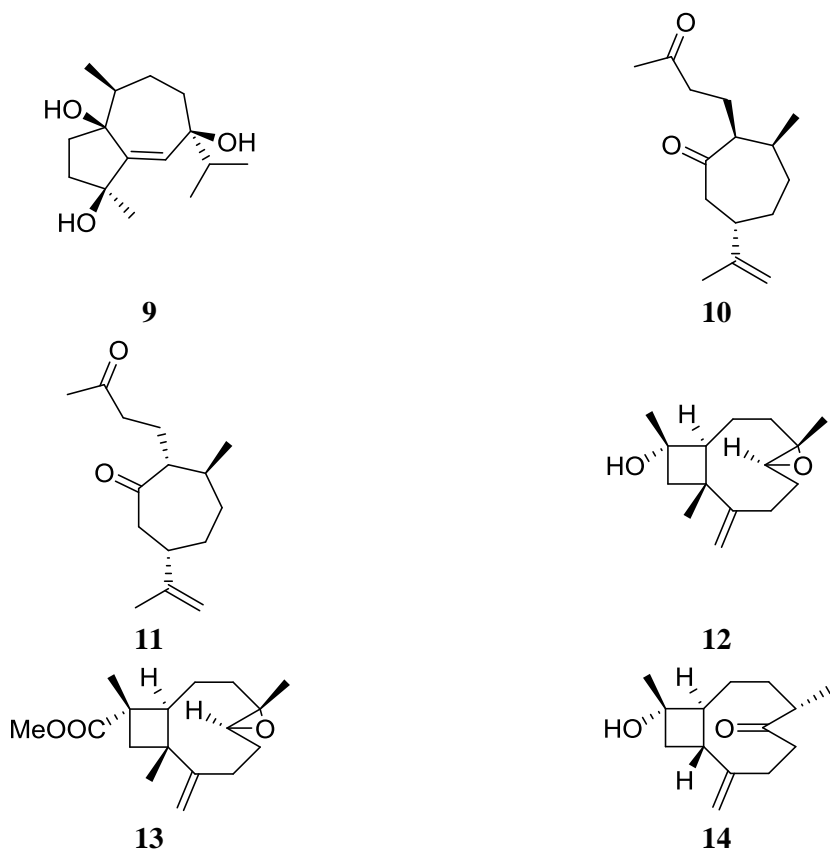
6



7

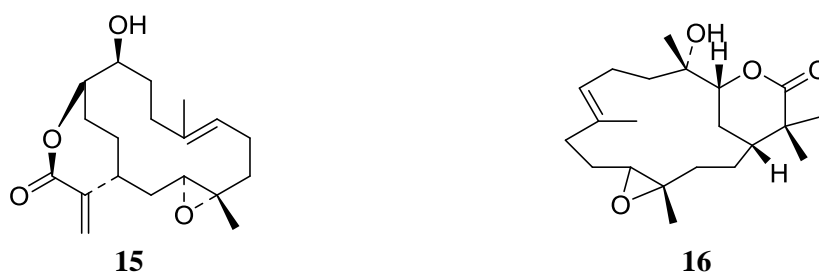


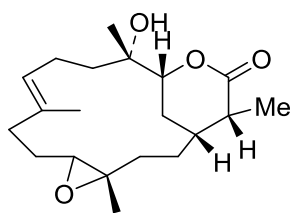
8



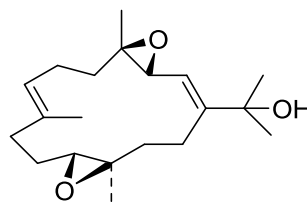
➤ Διτερπένια

Τα διτερπένια με σκελετό κεμβραίου είναι οι πιο συχνά απαντώμενοι δευτερογενείς μεταβολίτες στο γένος *Sinularia*. Το σινουλαριολίδιο (**15**) και τα δύο κυτταροτοξικά κεμβράνια, σινουλαρίνη (**16**) και διυδροσινουλαρίνη (**17**) απομονώθηκαν για πρώτη φορά από τον *Sinularia flexibilis* (Weinheimer *et al.*, 1977). Η σινουγκιμπερόλη (**18**) (Hou *et al.*, 1995) έδειξε σημαντική κυτταροτοξική δράση έναντι των καρκινικών κυττάρων HT-29 και P-388, με τιμές ED₅₀ 0.50 και 11.7 mg/mL, αντίστοιχα. Το σινουφλεξολίδιο (**19**), το διυδροσινουφλεξολίδιο (**20**) και η σινουφλεξιμπιλίνη (**21**) απομονώθηκαν από το είδος *S. flexibilis* (Duh *et al.*, 1998). Οι μεταβολίτες **19** και **21** επέδειξαν σημαντική κυτταροτοξική δράση έναντι των σειρών A549, HT-29, KB και P-388, ενώ ο **20** ήταν δραστικός μόνο έναντι της σειράς P-388.

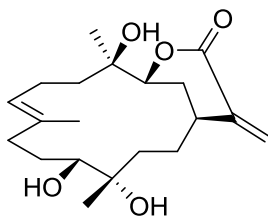




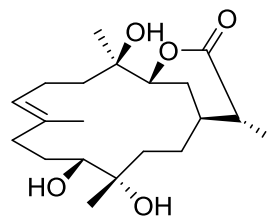
17



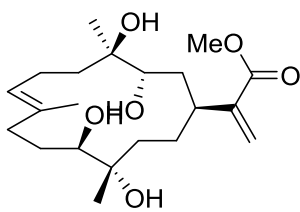
18



19



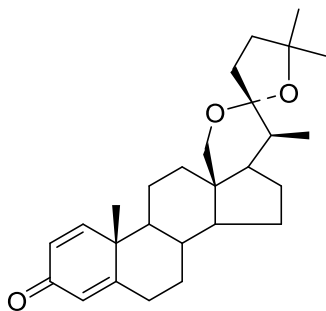
20



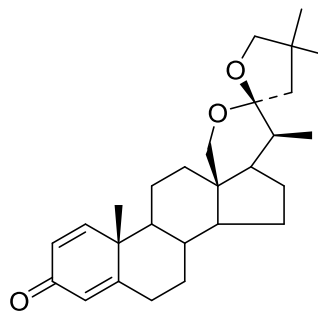
21

➤ Στερόλες / Στεροειδικοί γλυκοζίτες

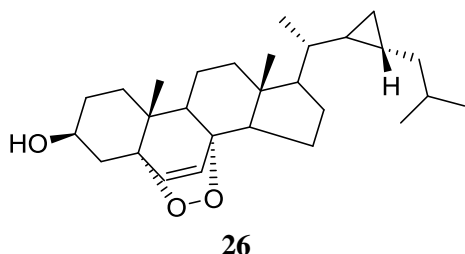
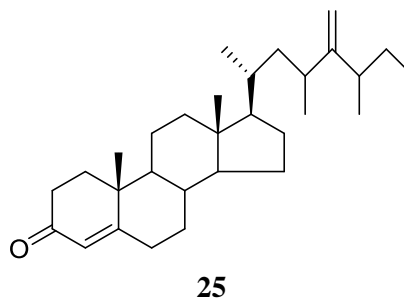
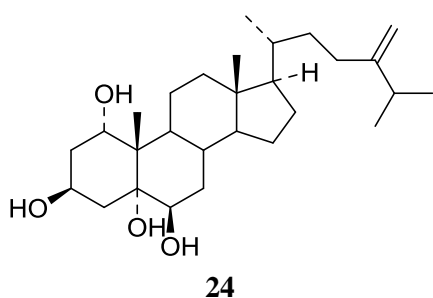
Οι C-18 οξυγονωμένες στερόλες **22** και **23** που απομονώθηκαν από είδος του γένους *Sinularia* που συλλέχθηκε στον Ειρηνικό Ωκεανό εμπεριείχαν μία σπειροκετάλη στη δομή τους (Ciminiello *et al.*, 1990). Η νουμερστερόλη-A (**24**) που απομονώθηκε από το *Sinularia numerosa* επέδειξε εκλεκτική κυτταροτοξικότητα (Tillekeratne *et al.*, 1988) έναντι των καρκινικών κυττάρων KB και HT-29, με τιμές ED₅₀ 1.9 και 1.5 mg/mL, αντίστοιχα. Η ρεμείστερόλη (**25**), που αναφέρθηκε από το είδος *S. leptoclados* που συλλέχθηκε από τη θάλασσα της Νότιας Κίνας, εμφάνισε δράση κατά της υπότασης και της αρρυθμίας (Long *et al.*, 1982). Ακόμη, από το μαλακό κοράλλι *Sinularia crispa* απομονώθηκε ο στεροειδικός γλυκοζίτης **26** (Sheu *et al.*, 2000).



22

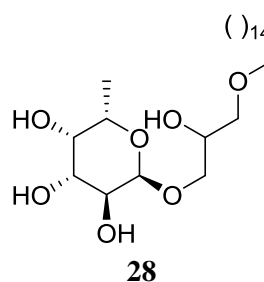
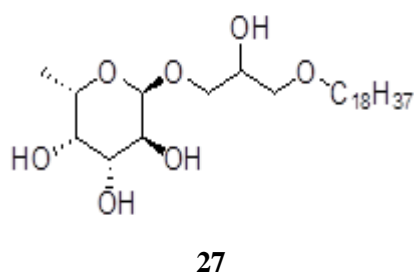


23



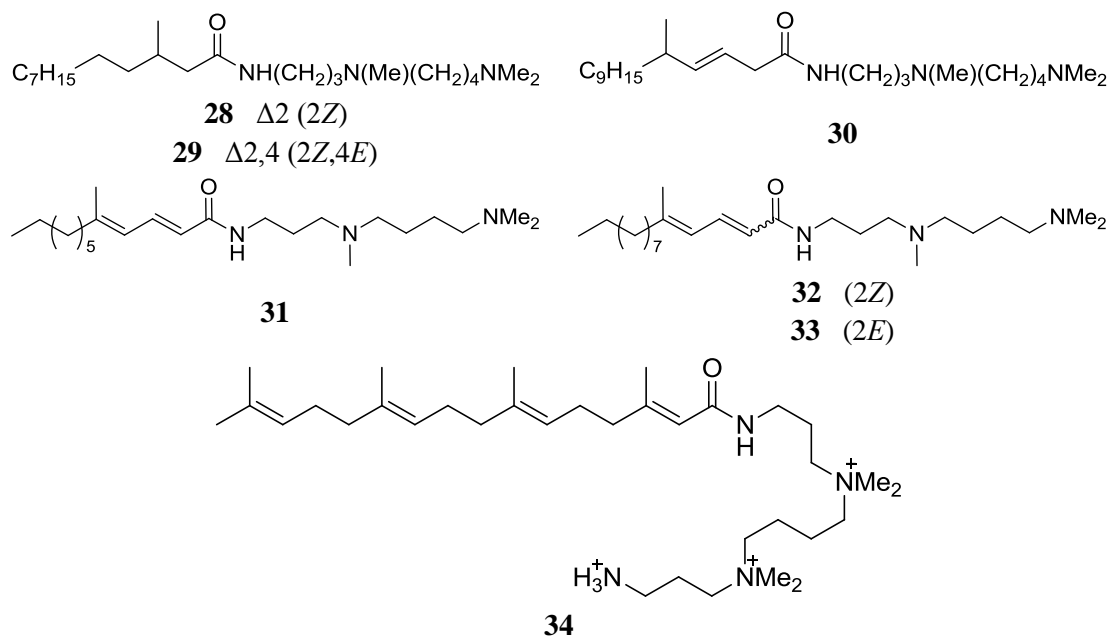
➤ Άλλες ουσίες

Το γλυκολιπίδιο **27**, το οποίο απομονώθηκε από το *Sinularia grandilobata* που συλλέχθηκε στο νησί Andaman (Ινδικός Ωκεανός), παρουσίασε αντιβακτηριακή δράση έναντι των *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Escherichia coli* και *Pseudomonas aeruginosa* και αντιμυκητιακή δράση έναντι των *Rhizopus oryzae* και *Candida albicans* (Dmitrenok *et al.*, 2003). Το γλυκολιπίδιο **28** απομονώθηκε από ένα είδος *Sinularia* sp. που συλλέχθηκε στο νησί Rangat στο Αρχιπέλαγος Andaman και έδειξε δράση έναντι του *B. pumilus* (Sibramanyam & Kulatheeswaran, 1999).

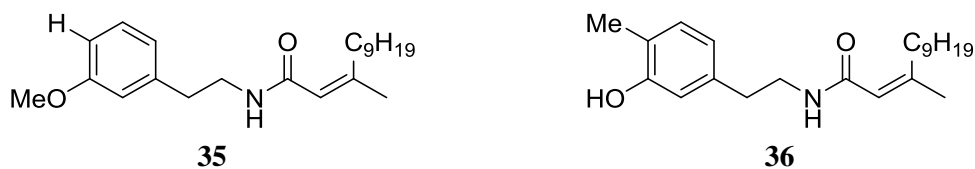


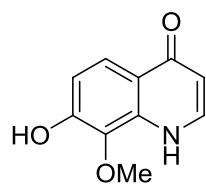
Οι μεταβολίτες **28-30**, οι οποίοι είναι ακυλιωμένα παράγωγα σπερμιδίνης, απομονώθηκαν ως κυτταροτοξικά συστατικά είδους *Sinularia* sp. που συλλέχθηκε από το νησί Nauru στη Μικρονησία (Choi & Schmitz, 1997). Οι ακυλο-σπερμιδίνες **31-33**, οι οποίες απομονώθηκαν από είδος του γένους *Sinularia* που συλλέχθηκε στη θάλασσα της Okinawa, επέδειξαν κυτταροτοξικότητα στη καρκινική σειρά A431 (Ojika *et al.*, 2003). Η σινουλαμίνη (**34**), ένα παράγωγο σπερμιδίνης που απομονώθηκε από ένα είδος *Sinularia* sp. εμφάνισε δράση ως αναστολέας της H,K-ATPάσης (Sata *et al.*,

1999).

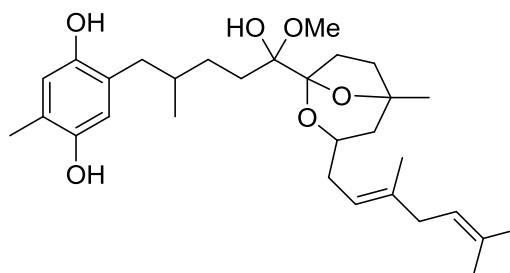


Η 4-(2-αμινο-αιθυλ)2-μεθοξυφαινόλη (**35**) και η 5-(2-αμινο-αιθυλ)-2-μεθοξυφαινόλη (**36**) με καρδιοτονωτική δράση απομονώθηκαν από το *S. flexibilis* (Kazlauskas *et al.*, 1980). Το παράγωγο κινολίνης **37** που αναφέρθηκε από το *S. polydactyla* (Long *et al.*, 1984) της θάλασσας της Νότιας Κίνας αυξάνει τη ροή αίματος στον εγκέφαλο και στην καρδιά των ποντικών μετά από χορήγηση δόσης 150 mg/kg. Ένα παράγωγο τετραπρενυλοτολουκινόλης, η σινδουρόλη (**38**) βρέθηκε κυτταροτοξική στα κύτταρα λευχαιμίας ποντικού P388 (Koren *et al.*, 1996). Η σινγκαρδίνη (**39**) που απομονώθηκε από το *Sinularia grandineri* εμφάνισε κυτταροτοξικότητα έναντι των καρκινικών σειρών P388, A-549, HT-29 και MEL-28, καθώς και ήπια αντιμυκητιακή δράση εναντίον των *Candida albicans* B311 και *Cryptococcus neoforman* (Elsayed *et al.*, 1996).

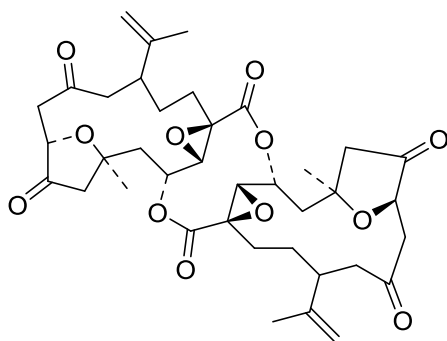




37



38



39

1.6. Σκοπός της μελέτης

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η απομόνωση νέων φυσικών προϊόντων με πιθανή βιολογική δράση ή άλλη αξιόλογη εφαρμογή. Γι' αυτό το λόγο, μελετήθηκε ένα μαλακό κοράλλι του γένους *Sinularia*, το οποίο επιλέχθηκε με βάση το ενδιαφέρον χημικό προφίλ που εμφάνισε το οργανικό του εκχύλισμα στον προκαταρκτικό έλεγχο με φασματοσκοπία ^1H NMR και χρωματογραφία TLC και δεδομένου ότι μέχρι στιγμής έχει απομονωθεί σημαντικός αριθμός μεταβολιτών με βιολογικές δράσεις από είδη του συγκεκριμένου γένους.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1. Οργανολογία

Τα φάσματα NMR ελήφθησαν σε φασματογράφους Bruker AC 200 και Bruker DRX 400. Για τη λήψη όλων των φασμάτων NMR χρησιμοποιήθηκε CDCl_3 . Οι ^1H NMR χημικές μετατοπίσεις δίνονται στη κλίμακα δ (ppm) λαμβάνοντας ως αναφορά την κορυφή του CHCl_3 στα 7.24 ppm, ενώ οι σταθερές σύζευξης J (Hz) δίνονται σε παρενθέσεις.

Τα φάσματα μάζας χαμηλής ευκρίνειας καταγράφηκαν σε φασματογράφο μάζας Hewlett-Packard 5973 ή σε φασματογράφο μάζας Thermo Electron Corporation DSQ με μέθοδο ιονισμού τον βομβαρδισμό με δέσμη ηλεκτρονίων (EIMS).

Οι χρωματογραφικοί διαχωρισμοί HPLC πραγματοποιήθηκαν σε χρωματογράφο CECIL 1100 Series Liquid Chromatography Pump με μονή αντλία εισαγωγής του συστήματος διαλυτών και ανιχνευτή RI GBC LC-1240 ή σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας AGILENT 1100 με ανιχνευτή RI.

Οι στήλες που χρησιμοποιήθηκαν στους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς HPLC ήταν οι ακόλουθες: (i) στήλη κανονικής φάσης διαστάσεων 25 cm x 10 mm (Supelco, Supelcosil LC-Si 5 μm) και (ii) στήλη κανονικής φάσης διαστάσεων 25 cm x 10 mm (Alltech, Econoshpere Silica 10u).

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

2.2. Διαλύτες και χημικά αντιδραστήρια

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

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

Οι χρωματογραφικοί προσδιορισμοί TLC πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας πλάκες αλουμινίου με επίστρωση Kieselgel 60 G/UV₂₅₄ (20 x 20 cm, πάχους 0.2 mm)

της εταιρείας Macherey-Nagel. Μετά την ανάπτυξη τους σε κατάλληλο σύστημα διαλυτών, οι πλάκες ελέγχονταν σε λάμπα υπεριώδους φωτός (UV) στα 254 nm και 365 nm και οι κηλίδες ανιχνεύονταν ύστερα από ψεκασμό με διάλυμα 5% H₂SO₄ σε MeOH και θέρμανση της πλάκας στους 100°C για περίπου 2 min.

Οι διαλύτες cHex, EtOAc, CH₂Cl₂ και MeOH ήταν καθαρότητας A.R. της εταιρείας LAB-SCAN Analytical Sciences, οι οποίοι πριν από τη χρήση τους αποστάχθηκαν. Ο διαλύτης n-C₅H₁₂ ήταν καθαρότητας A.R. της εταιρείας LAB-SCAN Analytical Sciences. Οι διαλύτες Me₂CO και n-Hex ήταν καθαρότητας HPLC της εταιρείας LAB-SCAN Analytical Sciences. Όλοι οι διαλύτες πριν από τη χρήση τους σε χρωματογραφικούς διαχωρισμούς HPLC διηθήθηκαν υπό κενό και απαερώθηκαν.

Για την λήψη των φασμάτων NMR χρησιμοποιήθηκε CDCl₃ χωρίς εσωτερικό πρότυπο των εταιρειών Deutero GmbH ή Aldrich-Sigma Chemical Company.

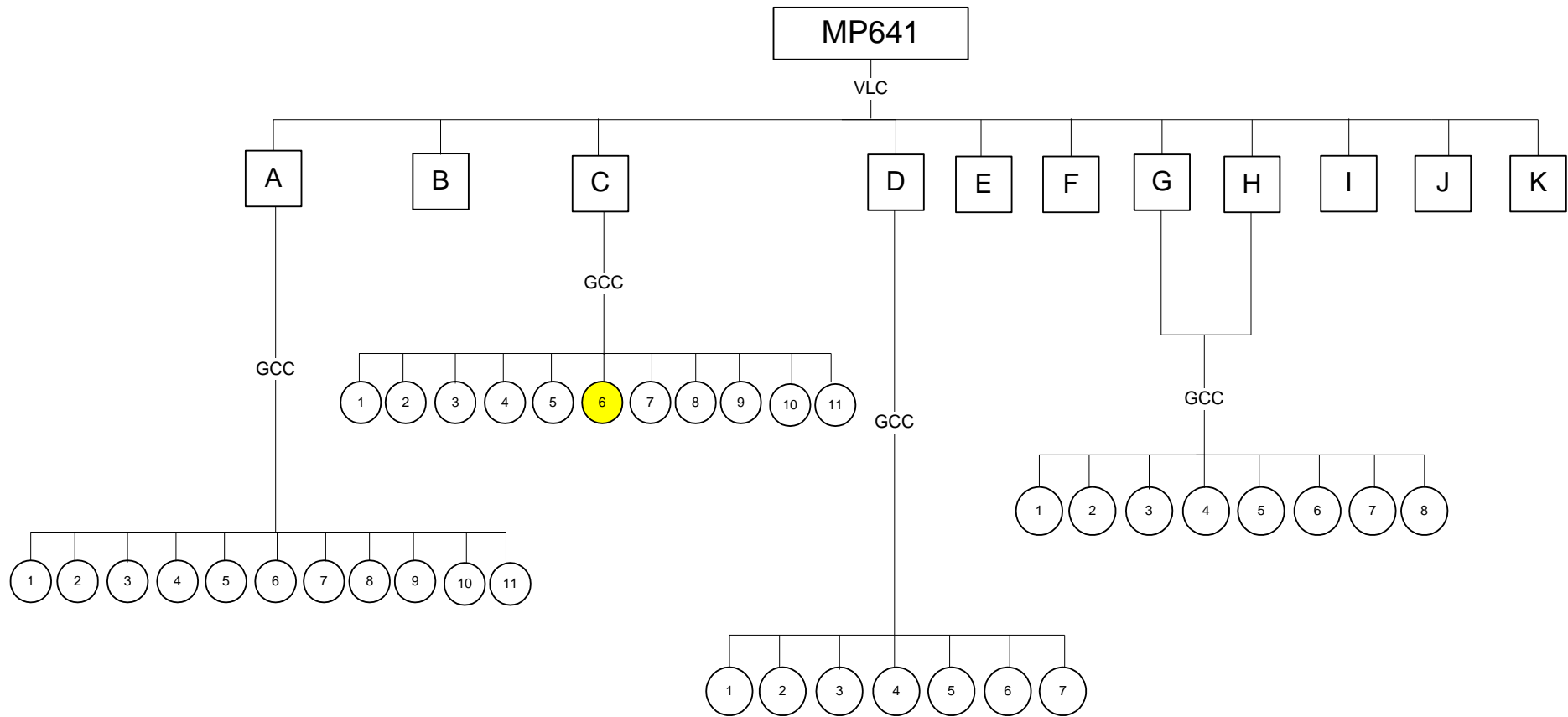
2.3. Συλλογή του οργανισμού

Δείγμα του μαλακού κοραλλιού του γένους *Sinularia* (MP641-KR641) συλλέχθηκε από την Ερυθρά Θάλασσα στη περιοχή Al Fahal, στο Thuwal, της Σαουδικής Αραβίας, σε βάθος 10-12m, τον Ιανουάριο του 2018. Ο οργανισμός μεταφέρθηκε υπό ψύξη στο Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων του Πανεπιστημίου Αθηνών, όπου και διατηρήθηκε στους -20°C μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία του.

2.4. Χρωματογραφικός διαχωρισμός και απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών

Αρχικά, δείγμα του οργανισμού υποβλήθηκε σε μικρή κλίμακα σε εξαντλητική εκχύλιση με μίγματα MeOH/CH₂Cl₂. Μετά τη συνένωση των εκχυλισμάτων και τη συμπύκνωσή τους υπό κενό προέκυψε υπόλειμμα σκούρου καφέ χρώματος και ελαιώδους υφής (MP641), το οποίο υποβλήθηκε σε σειρά χρωματογραφικών διαχωρισμών (Εικ. 6).

Συγκεκριμένα, το υπόλειμμα MP641 (1.8 g) υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία βαρύτητας, χρησιμοποιώντας ως στατική φάση γέλη πυριτίου κανονικής φάσης και ως κινητή φάση συστήματα διαλυτών βαθμιαία αυξανόμενης πολικότητας. Συνολικά παρελήφθησαν 11 κλάσματα, τα οποία ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με TLC και φασματοσκοπικά με ¹H NMR (Πίν. 1).



Εικόνα 6. Πορεία χρωματογραφικών διαχωρισμών του αρχικού εκχυλίσματος (σε μικρή κλίμακα), όπου με κίτρινο παρουσιάζονται οι απομονωμένοι δευτερογενείς μεταβολίτες.

Πίνακας 1. Κλάσματα που παρελήφθησαν με τα αντίστοιχα συστήματα διαλυτών έκλουσης.

| Κλάσματα | Σύστημα διαλυτών | Υπόλειμμα |
|-----------------|-------------------------|------------------|
| A | cHex (100%) | MP641A |
| B | cHex/EtOAc (90:10) | MP641B |
| C | cHex/EtOAc (80:20) | MP641C |
| D | cHex/EtOAc (70:30) | MP641D |
| E | cHex/EtOAc (60:40) | MP641E |
| F | cHex/EtOAc (50:50) | MP641F |
| G | cHex/EtOAc (30:70) | MP641G |
| H | cHex/EtOAc (10:90) | MP641H |
| I | EtOAc (100%) | MP641I |
| J | EtOAc/MeOH (90:10) | MP641J |
| K | EtOAc/MeOH (50:50) | MP641K |

Το υπόλειμμα MP641A (162.3 mg) υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία βαρύτητας σε στήλη γέλης πυριτίου κανονικής φάσης. Το σύστημα των διαλυτών έκλουσης αποτελούταν από μίγματα cHex/EtOAc βαθμιαίας αυξανόμενης πολικότητας. Παρελήφθησαν 45 κλάσματα (Πίν. 2), τα οποία ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με TLC και στη συνέχεια συνενώθηκαν ώστε να προκύψουν 11 υπολείμματα, τα οποία ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR (Πίν. 3).

Πίνακας 2. Κλάσματα που παρελήφθησαν με τα αντίστοιχα συστήματα διαλυτών έκλουσης.

| Κλάσματα | Σύστημα διαλυτών |
|-----------------|-------------------------|
| 1-17 | cHex (100%) |
| 18-24 | cHex/EtOAc (95:5) |
| 25-31 | cHex/EtOAc (90:10) |
| 32-37 | cHex/EtOAc (80:20) |
| 38-44 | cHex/EtOAc (70:30) |
| 45 | cHex/EtOAc (50:50) |

Πίνακας 3. Υπολείμματα που προέκυψαν μετά από συνένωση.

| Συνενωμένα κλάσματα | Υπόλειμμα |
|----------------------------|------------------|
| 1-4 | MP641A1 |
| 5 | MP641A2 |
| 6-7 | MP641A3 |
| 8-11 | MP641A4 |
| 12-24 | MP641A5 |
| 25-28 | MP641A6 |
| 29-31 | MP641A7 |
| 32-36 | MP641A8 |
| 37-40 | MP641A9 |
| 41-44 | MP641A10 |
| 45 | MP641A11 |

Το υπόλειμμα MP641C (160.8 mg) υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία βαρύτητας σε στήλη γέλης πυριτίου κανονικής φάσης. Το σύστημα των διαλυτών έκλουσης αποτελούταν από μίγματα cHex/EtOAc βαθμιαίας αυξανόμενης πολικότητας. Παρελήφθησαν 65 κλάσματα (Πίν. 4), τα οποία ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με TLC και στη συνέχεια συνενώθηκαν ώστε να προκύψουν 11 υπολείμματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το κλάσμα MP641C6 ήταν καθαρή ουσία (μεταβολίτης **K641-01**) (Πίν. 5).

Πίνακας 4. Κλάσματα που παρελήφθησαν με τα αντίστοιχα συστήματα διαλυτών έκλουσης.

| Κλάσματα | Σύστημα διαλυτών |
|-----------------|-------------------------|
| 1-7 | cHex (100%) |
| 8-15 | cHex/EtOAc (98:2) |
| 16-23 | cHex/EtOAc (96:4) |
| 24-31 | cHex/EtOAc (94:6) |
| 32-39 | cHex/EtOAc (92:8) |
| 40-47 | cHex/EtOAc (90:10) |
| 48-55 | cHex/EtOAc (85:15) |
| 56-60 | cHex/EtOAc (80:20) |
| 61-65 | cHex/EtOAc (70:30) |
| 66 | EtOAc (100%) |

Πίνακας 5. Υπολείμματα που προέκυψαν μετά από συνένωση.

| Συνενωμένα κλάσματα | Υπόλειμμα |
|----------------------------|------------------|
| 1-19 | MP641C1 |
| 20-24 | MP641C2 |
| 25-28 | MP641C3 |
| 29-31 | MP641C4 |
| 32-34 | MP641C5 |
| 35-37 | MP641C6 |
| 38-40 | MP641C7 |
| 41-44 | MP641C8 |
| 45-60 | MP641C9 |
| 61-65 | MP641C10 |
| 66 | MP641C11 |

Το υπόλειμμα MP641D (78.6 mg) υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία βαρύτητας σε στήλη γέλης πυριτίου κανονικής φάσης. Το σύστημα των διαλυτών έκλουσης αποτελούταν από μίγματα cHex/Me₂CO βαθμιαίας αυξανόμενης πολικότητας. Παρελήφθησαν 17 κλάσματα (Πίν. 6), τα οποία ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με TLC και στη συνέχεια συνενώθηκαν ώστε να προκύψουν 7

υπολείμματα, τα οποία ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR (Πίν. 7).

Πίνακας 6. Κλάσματα που παρελήφθησαν με τα αντίστοιχα συστήματα διαλυτών έκλουσης.

| Κλάσματα | Σύστημα διαλυτών |
|----------|---------------------------------|
| 1-16 | cHex/Me ₂ CO (93:7) |
| 17 | cHex/Me ₂ CO (70:30) |

Πίνακας 7. Υπολείμματα που προέκυψαν μετά από συνένωση.

| Συνενωμένα κλάσματα | Υπόλειμμα |
|---------------------|-----------|
| 1-4 | MP641D1 |
| 5-6 | MP641D2 |
| 7-8 | MP641D3 |
| 9-10 | MP641D4 |
| 11-12 | MP641D5 |
| 13-16 | MP641D6 |
| 17 | MP641D7 |

Τα υπόλειμματα MP641G (40.5 mg) και MP641H (16.9 mg) συνενώθηκαν και υποβλήθηκαν σε υγρή χρωματογραφία βαρύτητας σε στήλη γέλης πυριτίου κανονικής φάσης. Το σύστημα των διαλυτών έκλουσης αποτελούταν από μίγματα cHex/Me₂CO βαθμιαίας αυξανόμενης πολικότητας. Παρελήφθησαν 43 κλάσματα (Πίν. 8), τα οποία ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με TLC και στη συνέχεια συνενώθηκαν ώστε να προκύψουν 8 υπολείμματα, τα οποία ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR (Πίν. 9).

Πίνακας 8. Κλάσματα που παρελήφθησαν με τα αντίστοιχα συστήματα διαλυτών έκλουσης.

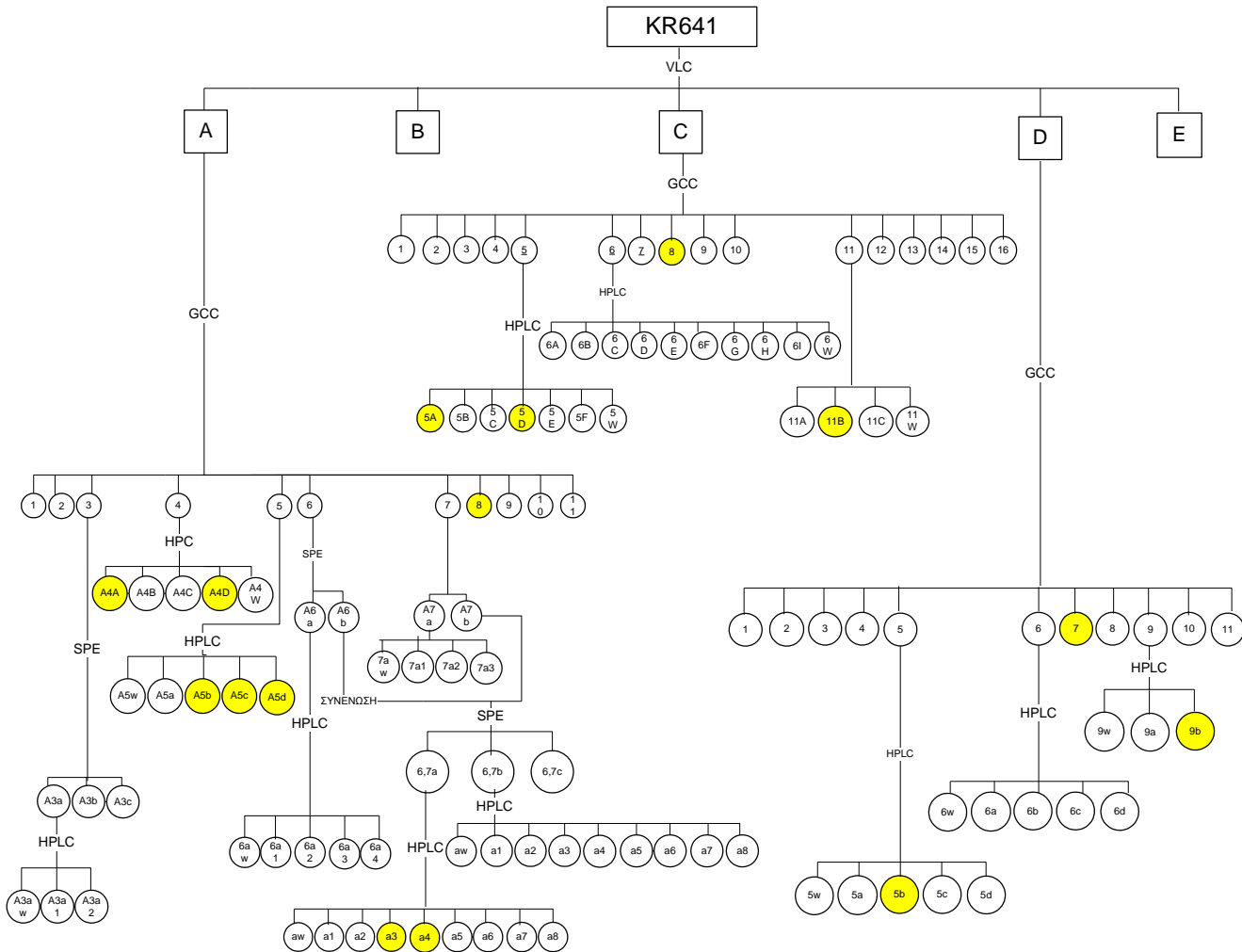
| Κλάσματα | Σύστημα διαλυτών |
|----------|---------------------------------|
| 1-42 | cHex/Me ₂ CO (82:18) |
| 43 | cHex/Me ₂ CO (50:50) |

Πίνακας 9. Υπολείμματα που προέκυψαν μετά από συνένωση.

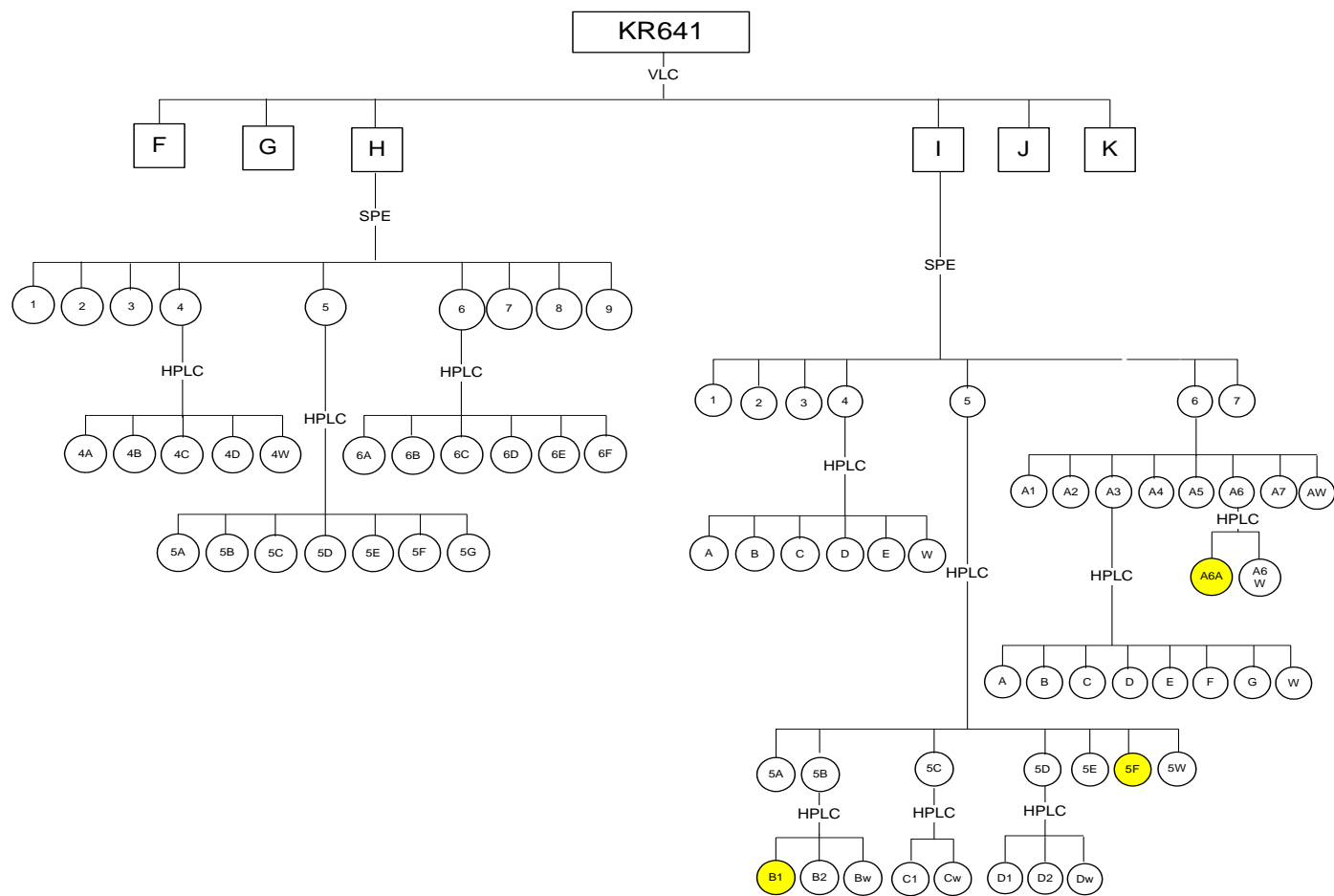
| Συνενωμένα κλάσματα | Υπόλειμμα |
|---------------------|-----------|
| 1-5 | MP641G1 |
| 6-8 | MP641G2 |
| 9-11 | MP641G3 |
| 12-13 | MP641G4 |
| 14-18 | MP641G5 |
| 19-28 | MP641G6 |
| 29-42 | MP641G7 |
| 43 | MP641G8 |

Στη συνέχεια, ποσότητα του οργανισμού υποβλήθηκε σε μεγάλη κλίμακα σε εξαντλητική εκχύλιση με 100% MeOH (2 φορές), με μίγμα MeOH/CH₂Cl₂ 1:1 και με 100% CH₂Cl₂ ανά 24 h. Μετά τη συνένωση των εκχυλισμάτων και τη συμπύκνωσή τους υπό κενό προέκυψε υπόλειμμα σκούρου καφέ χρώματος και ελαιώδους υφής (KR641).

Η συνολική πορεία απομόνωσης των δευτερογενών μεταβολιτών από το αρχικό εκχύλισμα του οργανισμού παρουσιάζεται διαγραμματικά στην Εικόνα 7 και στην Εικόνα 8, ενώ στη συνέχεια περιγράφονται λεπτομερώς όλα τα στάδια της.



Εικόνα 7. Πορεία χρωματογραφικών διαχωρισμών του αρχικού εκχυλίσματος (σε μεγάλη κλίμακα), όπου με κίτρινο παρουσιάζονται οι απομονωμένοι δευτερογενείς μεταβολίτες (μέρος Α).



Εικόνα 8. Πορεία χρωματογραφικών διαχωρισμών του αρχικού εκχυλίσματος (σε μεγάλη κλίμακα), όπου με κίτρινο παρουσιάζονται οι απομονωμένοι δευτερογενείς μεταβολίτες (μέρος B).

Το αρχικό υπόλειμμα μεγάλης κλίμακας KR641 (9.315 g) υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία με υποβοήθηση κενού, χρησιμοποιώντας ως στατική φάση γέλη πυριτίου κανονικής φάσης και ως κινητή φάση σύστημα διαλυτών βαθμιαία αυξανόμενης πολικότητας. Συνολικά παρελήφθησαν 19 κλάσματα όγκου 250 ml το καθένα (Πίν. 10), τα οποία αρχικά ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με TLC. Τα κλάσματα που εμφάνισαν παρόμοια χρωματογραφικά χαρακτηριστικά συνενώθηκαν ώστε να προκύψουν 11 υπολείμματα, τα οποία ελέγχθηκαν στη συνέχεια φασματοσκοπικά με ¹H NMR (Πίν. 11).

Πίνακας 10. Κλάσματα που παρελήφθησαν με τα αντίστοιχα συστήματα διαλυτών έκλουσης.

| Κλάσματα | Σύστημα διαλυτών |
|-----------------|-------------------------|
| A | cHex (100%) |
| B | cHex/EtOAc (95:5) |
| C | cHex/EtOAc (90:10) |
| D | cHex/EtOAc (85:15) |
| E | cHex/EtOAc (80:20) |
| F | cHex/EtOAc (75:25) |
| G | cHex/EtOAc (70:30) |
| H | cHex/EtOAc (60:40) |
| I | cHex/EtOAc (50:50) |
| J1 | cHex/EtOAc (30:70) |
| J2, J3 | cHex/EtOAc (30:70) |
| K | cHex/EtOAc (10:90) |
| L1 | EtOAc (100%) |
| L2 | EtOAc (100%) |
| M | EtOAc/MeOH (90:10) |
| N | EtOAc/MeOH (85:15) |
| O | EtOAc/MeOH (50:50) |
| P | MeOH (100%) |

Πίνακας 11. Υπολείμματα που προέκυψαν μετά από συνένωση.

| Συνενωμένα κλάσματα | Υπόλειμμα |
|----------------------------|------------------|
| A,B | KR641A |
| D | KR641B |
| C,E,F | KR641C |
| G | KR641D |
| H | KR641E |
| I | KR641F |
| J1,J2 | KR641G |
| J3,K,L1 | KR641H |
| L2,M,N | KR641I |
| O | KR641J |
| P | KR641K |

Το υπόλειμμα KR641A (1.153 g) υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία βαρύτητας σε στήλη γέλης πυριτίου κανονικής φάσης. Το σύστημα των διαλυτών έκλουσης αποτελούταν από μίγματα *n*-C₅H₁₂/EtOAc βαθμιαίας αυξανόμενης πολικότητας. Παρελήφθησαν 133 κλάσματα (Πίν. 12), τα οποία ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με TLC και στη συνέχεια συνενώθηκαν ώστε να προκύψουν 11 υπολείμματα, τα οποία ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το κλάσμα KR641A8 ήταν καθαρή ουσία (μεταβολίτης **K641-01**) (Πίν. 13).

Πίνακας 12. Κλάσματα που παρελήφθησαν με τα αντίστοιχα συστήματα διαλυτών έκλουσης.

| Κλάσματα | Σύστημα διαλυτών |
|-----------------|---------------------------------------------------------|
| 1-49 | <i>n</i> -C ₅ H ₁₂ (100%) |
| 50-60 | <i>n</i> -C ₅ H ₁₂ /EtOAc (99:1) |
| 61-80 | <i>n</i> -C ₅ H ₁₂ /EtOAc (98:2) |
| 81-102 | <i>n</i> -C ₅ H ₁₂ /EtOAc (97:3) |
| 103-110 | <i>n</i> -C ₅ H ₁₂ /EtOAc (95:5) |
| 111-122 | <i>n</i> -C ₅ H ₁₂ /EtOAc (90:10) |
| 123-132 | <i>n</i> -C ₅ H ₁₂ /EtOAc (85:15) |
| 133 | EtOAc (100%) |

Πίνακας 13. Υπολείμματα που προέκυψαν μετά από συνένωση.

| Συνενωμένα κλάσματα | Υπόλειμμα |
|----------------------------|------------------|
| 1-3 | KR641A1 |
| 4-16 | KR641A2 |
| 17-18 | KR641A3 |
| 19-20 | KR641A4 |
| 21-23 | KR641A5 |
| 24-25 | KR641A6 |
| 26-41 | KR641A7 |
| 42-55 | KR641A8 |
| 56-122 | KR641A9 |
| 123-132 | KR641A10 |
| 133 | KR641A11 |

Το υπόλειμμα KR641A3 (59.4 mg) διαβιβάστηκε από μικρή στήλη γέλης πυριτίου με διαλύτες έκλουσης μίγματα *n*-Hex/EtOAc προοδευτικά αυξανόμενης πολικότητας. Παρελήφθησαν 3 κλάσματα (Πίν. 14).

Πίνακας 14. Κλάσματα που παρελήφθησαν με τα αντίστοιχα συστήματα διαλυτών έκλουσης.

| Κλάσματα | Σύστημα διαλυτών |
|----------|-----------------------------|
| KR641A3A | <i>n</i> -Hex (100%) |
| KR641A3B | <i>n</i> -Hex/EtOAc (90:10) |
| KR641A3C | EtOAc (100%) |

Το υπόλειμμα KR641A3A υποβλήθηκε σε HPLC. Συνολικά, παραλήφθηκαν 3 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR (Πίν. 15).

Πίνακας 15. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

| Συνθήκες χρωματογραφίας | |
|-------------------------|-----------------------|
| Στήλη | Supelcosil LC-Si 5 μm |
| Διαλύτης έκλουσης | <i>n</i> -Hex (100%) |
| Ροή διαλύτη | 1.5 mL/min |
| Ανιχνευτής | R.I. |

| Κωδικός κλάσματος | Μάζα (mg) | Χρόνος έκλουσης (min) |
|-------------------|-----------|-----------------------|
| KR641A3A1 | 43.7 | 13.1 |
| KR641A3A2 | 0.7 | 15.2 |
| KR641A3A3 | 4.4 | 15.9 |

Το υπόλειμμα KR641A4 (250 mg) υποβλήθηκε σε HPLC. Συνολικά, παραλήφθηκαν 4 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα KR641A4A και KR641A4D ήταν καθαρές ουσίες (μεταβολίτες **K641-03** και **K641-02**, αντίστοιχα) (Πίν. 16).

Πίνακας 16. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

| Συνθήκες χρωματογραφίας | |
|-------------------------|-----------------------|
| Στήλη | Supelcosil LC-Si 5 μm |
| Διαλύτης έκλουσης | <i>n</i> -Hex (100%) |
| Ροή διαλύτη | 1.5 mL/min |
| Ανιχνευτής | R.I. |

| Κωδικός κλάσματος | Μάζα (mg) | Χρόνος έκλουσης (min) |
|-------------------|-----------|-----------------------|
| KR641A4A | 6.7 | 15.6 |
| KR641A4B | 21.1 | 16.2 |
| KR641A4C | 43.7 | 17.0 |
| KR641A4D | 75.7 | 17.9 |

Το υπόλειμμα KR641A5 (174 mg) υποβλήθηκε σε HPLC. Συνολικά, παραλήφθηκαν 4 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα KR641A5C και KR641A5D ήταν καθαρή ουσία (μεταβολίτης **K641-02**) (Πίν. 17).

Πίνακας 17. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

| Συνθήκες χρωματογραφίας | |
|--------------------------------|----------------------------------|
| Στήλη | Supelcosil LC-Si 5 μm |
| Διαλύτης έκλουσης | <i>n</i> -Hex (100%) |
| Ροή διαλύτη | 1.5 mL/min |
| Ανιχνευτής | R.I. |

| Κωδικός κλάσματος | Μάζα (mg) | Χρόνος έκλουσης (min) |
|--------------------------|------------------|------------------------------|
| KR641A5A | 2.3 | 15.1 |
| KR641A5B | 6.9 | 16.9 |
| KR641A5C | 49.6 | 17.6 |
| KR641A5D | 16.6 | 18.8 |

Τα υπολείμματα KR641A6 (155.4 mg) και KR541A7 (410.7 mg) υποβλήθηκαν ξεχωριστά σε υγρή χρωματογραφία με υποβοήθηση κενού, χρησιμοποιώντας ως στατική φάση γέλη πυριτίου κανονικής φάσης και ως κινητή φάση 100% *n*-Hex και 100% EtOAc, ώστε να παραληφθούν 2 κλάσματα για το καθένα, τα οποία ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με TLC (Πίν. 18).

Πίνακας 18. Κλάσματα που παρελήφθησαν με τα αντίστοιχα συστήματα διαλυτών έκλουσης.

| Κλάσματα | Σύστημα διαλυτών |
|-----------------|-------------------------|
| KR641A6A | <i>n</i> -Hex (100%) |
| KR641A6B | EtOAc (100%) |
| KR641A7A | <i>n</i> -Hex (100%) |
| KR641A7B | EtOAc (100%) |

Το υπόλειμμα KR641A6A (9.4 mg) υποβλήθηκε σε HPLC. Συνολικά, παραλήφθηκαν 4 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR (Πίν. 19).

Πίνακας 19. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

| Συνθήκες χρωματογραφίας | |
|-------------------------|-----------------------|
| Στήλη | Supelcosil LC-Si 5 μm |
| Διαλύτης έκλουσης | <i>n</i> -Hex (100%) |
| Ροή διαλύτη | 1.5 mL/min |
| Ανιχνευτής | R.I. |

| Κωδικός κλάσματος | Μάζα (mg) | Χρόνος έκλουσης (min) |
|-------------------|-----------|-----------------------|
| KR641A6A1 | 0.7 | 19.3 |
| KR641A6A2 | 2.3 | 20.1 |
| KR641A6A3 | 3.7 | 21.1 |
| KR641A6A4 | 0.6 | 22.0 |

Το υπόλειμμα KR641A7A (7.4 mg) υποβλήθηκε σε HPLC. Συνολικά, παραλήφθηκαν 3 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR (Πίν. 20).

Πίνακας 20. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

| Συνθήκες χρωματογραφίας | |
|-------------------------|-----------------------|
| Στήλη | Supelcosil LC-Si 5 μm |
| Διαλύτης έκλουσης | <i>n</i> -Hex (100%) |
| Ροή διαλύτη | 1.5 mL/min |
| Ανιχνευτής | R.I. |

| Κωδικός κλάσματος | Μάζα (mg) | Χρόνος έκλουσης (min) |
|-------------------|-----------|-----------------------|
| KR641A7A1 | 0.2 | 19.8 |
| KR641A7A2 | 2.1 | 20.5 |
| KR641A7A3 | 1.7 | 22.0 |

Τα υπολείμματα KR641A6B και KR641A7B συνενώθηκαν στο υπόλειμμα KR641A6,7, το οποίο υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία με υποβοήθηση κενού, χρησιμοποιώντας ως στατική φάση γέλη πυριτίου κανονικής φάσης και ως κινητή φάση σύστημα διαλυτών *c*Hex/EtOAc βαθμιαία αυξανόμενης πολικότητας. Παρελήφθησαν 3 κλάσματα, τα οποία ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με TLC (Πίν. 21).

Πίνακας 21. Κλάσματα που παρελήφθησαν με τα αντίστοιχα συστήματα διαλυτών έκλουσης.

| Κλάσματα | Σύστημα διαλυτών | Μάζα (mg) |
|------------|---------------------|-----------|
| KR641A6,7A | cHex/EtOAc (85:15) | 106.9 |
| KR641A6,7B | cHex/ EtOAc (85:15) | 41.8 |
| KR641A6,7C | EtOAc (100%) | 85.5 |

Το υπόλειμμα KR641A6,7A (106.9 mg) υποβλήθηκε σε HPLC. Συνολικά, παραλήφθηκαν 9 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα KR641A6,7A3, KR641A6,7A4 και KR641A6,7A6 ήταν καθαρές ουσίες (μεταβολίτες **K641-10**, **K641-11** και **K641-01**, αντίστοιχα) (Πίν. 22).

Πίνακας 22. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

| Συνθήκες χρωματογραφίας | |
|-------------------------|-----------------------|
| Στήλη | Supelcosil LC-Si 5 μm |
| Διαλύτης έκλουσης | cHex/EtOAc (80:20) |
| Ροή διαλύτη | 1.5 mL/min |
| Ανιχνευτής | R.I. |

| Κλάσματα | Μάζα (mg) | Χρόνος έκλουσης (min) |
|-------------|-----------|-----------------------|
| KR641A6,7A1 | 16.6 | 16.8 |
| KR641A6,7A2 | 5.6 | 17.3 |
| KR641A6,7A3 | 5.1 | 17.9 |
| KR641A6,7A4 | 3.6 | 18.6 |
| KR641A6,7A5 | 4.7 | 19.0 |
| KR641A6,7A6 | 17.0 | 19.3 |
| KR641A6,7A7 | 16.8 | 22.1 |
| KR641A6,7A8 | 3.0 | 25.7 |
| KR641A6,7A9 | 7.0 | 27.3 |

Το υπόλειμμα KR641A6,7B (40.8 mg) υποβλήθηκε σε HPLC. Συνολικά, παραλήφθηκαν 10 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το κλάσμα KR641A6,7B2 ήταν καθαρή ουσία (μεταβολίτης **K641-01**) (Πίν. 23).

Πίνακας 23. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

| Συνθήκες χρωματογραφίας | |
|-------------------------|----------------------------|
| Στήλη | Supelcosil LC-Si 5 μ m |
| Διαλύτης έκλουσης | cHex/EtOAc (70:30) |
| Ροή διαλύτη | 1.5 mL/min |
| Ανιχνευτής | R.I. |

| Κλάσματα | Μάζα (mg) | Χρόνος έκλουσης (min) |
|-------------|-----------|-----------------------|
| KR641A6,7B1 | 1.5 | 15.9 |
| KR641A6,7B2 | 2.4 | 16.3 |
| KR641A6,7B3 | 6.4 | 17.0 |
| KR641A6,7B4 | 4.9 | 17.6 |
| KR641A6,7B5 | 2.0 | 17.9 |
| KR641A6,7B6 | 7.9 | 18.7 |
| KR641A6,7B7 | 1.7 | 19.2 |
| KR641A6,7B8 | 2.3 | 21.3 |
| KR641A6,7B9 | 5.4 | 24.5 |

Το υπόλειμμα KR641C (1.039 g) υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία βαρύτητας σε στήλη γέλης πυριτίου κανονικής φάσης. Το σύστημα των διαλυτών έκλουσης αποτελούταν από μίγματα cHex/EtOAc βαθμιαία αυξανόμενης πολικότητας. Παρελήφθησαν 185 κλάσματα (Πίν. 24), τα οποία ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με TLC και στη συνέχεια συνενώθηκαν ώστε να προκύψουν 16 υπολείμματα, τα οποία ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το κλάσμα KR641C8 ήταν καθαρή ουσία (μεταβολίτης **K641-01**) (Πίν. 25).

Πίνακας 24. Κλάσματα που παρελήφθησαν με τα αντίστοιχα συστήματα διαλυτών έκλουσης.

| Κλάσματα | Σύστημα διαλυτών |
|----------|--------------------|
| 1-19 | cHex (100%) |
| 20-27 | cHex/EtOAc (99:1) |
| 28-37 | cHex/EtOAc (98:2) |
| 38-75 | cHex/EtOAc (97:3) |
| 76-89 | cHex/EtOAc (96:4) |
| 90-100 | cHex/EtOAc (95:5) |
| 101-124 | cHex/EtOAc (94:6) |
| 125-133 | cHex/EtOAc (93:7) |
| 134-160 | cHex/EtOAc (92:8) |
| 161-178 | cHex/EtOAc (88:12) |
| 179-184 | cHex/EtOAc (80:20) |
| 185 | cHex/EtOAc (50:50) |

Πίνακας 25. Υπολείματα που προέκυψαν μετά από συνένωση.

| Συνενωμένα κλάσματα | Υπόλειμμα |
|----------------------------|------------------|
| 1-57 | KR641C1 |
| 58-69 | KR641C2 |
| 70-87 | KR641C3 |
| 88-92 | KR641C4 |
| 93-105 | KR641C5 |
| 106-113 | KR641C6 |
| 114-119 | KR641C7 |
| 120-129 | KR641C8 |
| 130-138 | KR641C9 |
| 139-144 | KR641C10 |
| 145-153 | KR641C11 |
| 154-162 | KR641C12 |
| 163-166 | KR641C13 |
| 167-174 | KR641C14 |
| 175-184 | KR641C15 |
| 185 | KR641C16 |

Το υπόλειμμα KR641C5 (32.6 mg) υποβλήθηκε σε HPLC. Συνολικά, παραλήφθηκαν 6 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα KR641C5A και KR641C5D ήταν καθαρές ουσίες (μεταβολίτες **K641-09** και **K641-06**, αντίστοιχα) (Πίν. 26).

Πίνακας 26. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

| Συνθήκες χρωματογραφίας | |
|--------------------------------|-----------------------|
| Στήλη | Supelcosil LC-Si 5 μm |
| Διαλύτης έκλουσης | cHex/EtOAc (95:5) |
| Ροή διαλύτη | 1.5 mL/min |
| Ανιχνευτής | R.I. |

| Κλάσματα | Μάζα (mg) | Χρόνος έκλουσης (min) |
|-----------------|------------------|------------------------------|
| KR641C5A | 3.4 | 11.5 |
| KR641C5B | 0.2 | 20.9 |
| KR641C5C | 1.2 | 21.4 |
| KR641C5D | 4.3 | 22.8 |
| KR641C5E | 1.9 | 23.5 |
| KR641C5F | 1.9 | 25.2 |

Το υπόλειμμα KR641C6 (14.4 mg) υποβλήθηκε σε HPLC. Συνολικά, παραλήφθηκαν 9 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR (Πίν. 27).

Πίνακας 27. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

| Συνθήκες χρωματογραφίας | |
|--------------------------------|-----------------------|
| Στήλη | Supelcosil LC-Si 5 μm |
| Διαλύτης έκλουσης | cHex/EtOAc (95:5) |
| Ροή διαλύτη | 1.5 mL/min |
| Ανιχνευτής | R.I. |

| Κλάσματα | Μάζα (mg) | Χρόνος έκλουσης (min) |
|-----------------|------------------|------------------------------|
| KR641C6A | 2.6 | 11.2 |
| KR641C6B | 0.1 | 26.3 |
| KR641C6C | 3.0 | 27.3 |
| KR641C6D | 0.7 | 28.2 |
| KR641C6E | 0.4 | 29.0 |
| KR641C6F | 0.5 | 30.1 |
| KR641C6G | 0.1 | 31.1 |
| KR641C6H | 1.3 | 33.2 |
| KR641C6I | 2.4 | 33.9 |

Το υπόλειμμα KR641C11 (27.0 mg) υποβλήθηκε σε HPLC. Συνολικά, παραλήφθηκαν 3 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR (Πίν. 28).

Πίνακας 28. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

| Συνθήκες χρωματογραφίας | |
|--------------------------------|-----------------------|
| Στήλη | Supelcosil LC-Si 5 μm |
| Διαλύτης έκλουσης | cHex/EtOAc (85:15) |
| Ροή διαλύτη | 1.5 mL/min |
| Ανιχνευτής | R.I. |

| Κλάσματα | Μάζα (mg) | Χρόνος έκλουσης (min) |
|-----------------|------------------|------------------------------|
| KR641C11A | 0.8 | 10.9 |
| KR641C11B | 5.6 | 26.2 |
| KR641C11C | 3.0 | 26.6 |

Το υπόλειμμα KR641D (2.039 g) υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία βαρύτητας σε στήλη γέλης πυριτίου κανονικής φάσης. Το σύστημα των διαλυτών έκλουσης αποτελούταν από μίγματα cHex/EtOAc βαθμιαία αυξανόμενης πολικότητας. Παρελήφθησαν 79 κλάσματα (Πίν. 29), τα οποία ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με TLC και στη συνέχεια συνενώθηκαν ώστε να προκύψουν 11 υπόλειμματα, τα οποία

ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το κλάσμα KR641D7 ήταν καθαρή ουσία (μεταβολίτης **K641-05**) (Πίν. 30).

Πίνακας 29. Κλάσματα που παρελήφθησαν με τα αντίστοιχα συστήματα διαλυτών έκλουσης.

| Κλάσματα | Σύστημα διαλυτών |
|----------|--------------------|
| 1-14 | cHex/EtOAc (88:12) |
| 15-23 | cHex/EtOAc (87:13) |
| 24-37 | cHex/EtOAc (86:14) |
| 38-47 | cHex/EtOAc (85:15) |
| 48-61 | cHex/EtOAc (84:16) |
| 62-71 | cHex/EtOAc (82:18) |
| 72-78 | cHex/EtOAc (80:20) |
| 79 | cHex/EtOAc (50:50) |

Πίνακας 30. Υπολείμματα που προέκυψαν μετά από συνένωση.

| Συνενωμένα κλάσματα | Υπόλειμμα |
|---------------------|-----------|
| 1-10 | KR641D1 |
| 11-14 | KR641D2 |
| 15-19 | KR641D3 |
| 20-23 | KR641D4 |
| 24-30 | KR641D5 |
| 31-33 | KR641D6 |
| 34-45 | KR641D7 |
| 46-50 | KR641D8 |
| 51-64 | KR641D9 |
| 65-78 | KR641D10 |
| 79 | KR641D11 |

Το υπόλειμμα KR641D5 (12.5 mg) υποβλήθηκε σε HPLC. Συνολικά, παραλήφθηκαν 4 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το κλάσμα KR641D5B ήταν καθαρή ουσία (μεταβολίτης **K641-01**) (Πίν. 31).

Πίνακας 31. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

| Συνθήκες χρωματογραφίας | |
|-------------------------|------------------------|
| Στήλη | Econoshpere Silica 10u |
| Διαλύτης έκλουσης | cHex/EtOAc (85:15) |
| Ροή διαλύτη | 1.2 mL/min |
| Ανιχνευτής | R.I. |

| Κλάσματα | Μάζα (mg) | Χρόνος έκλουσης (min) |
|----------|-----------|-----------------------|
| KR641D5A | 0.8 | 9.4 |
| KR641D5B | 2.4 | 15.2 |
| KR641D5C | 3.0 | 16.5 |
| KR641D5D | 2.4 | 17.6 |

Το υπόλειμμα KR641D6 (11.2 mg) υποβλήθηκε σε HPLC. Συνολικά, παραλήφθηκαν 2 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR (Πίν. 32).

Πίνακας 32. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

| Συνθήκες χρωματογραφίας | |
|-------------------------|------------------------|
| Στήλη | Econoshpere Silica 10u |
| Διαλύτης έκλουσης | cHex/EtOAc (85:15) |
| Ροή διαλύτη | 1.5 mL/min |
| Ανιχνευτής | R.I. |

| Κλάσματα | Μάζα (mg) | Χρόνος έκλουσης (min) |
|----------|-----------|-----------------------|
| KR641D6A | 0.5 | 9.7 |
| KR641D6B | 6.0 | 22.2 |

Το υπόλειμμα KR641D9 (6.7 mg) υποβλήθηκε σε HPLC. Συνολικά, παραλήφθηκαν 2 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το κλάσμα KR641D9B ήταν καθαρή ουσία (μεταβολίτης **K641-04**) (Πίν. 33).

Πίνακας 33. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

| Συνθήκες χρωματογραφίας | |
|-------------------------|------------------------|
| Στήλη | Econoshpere Silica 10u |
| Διαλύτης έκλουσης | cHex/EtOAc (77:23) |
| Ροή διαλύτη | 1.5 mL/min |
| Ανιχνευτής | R.I. |

| Κλάσματα | Μάζα (mg) | Χρόνος έκλουσης (min) |
|----------|-----------|-----------------------|
| KR641D9A | 1.3 | 15.8 |
| KR641D9B | 1.7 | 21.3 |

Το υπόλειμμα KR641H (173.0 mg) υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία με υποβοήθηση κενού, χρησιμοποιώντας ως στατική φάση γέλη πυριτίου κανονικής φάσης και ως κινητή φάση σύστημα διαλυτών cHex/EtOAc βαθμιαία αυξανόμενης πολικότητας. Παρελήφθησαν 9 κλάσματα, τα οποία ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με TLC (Πίν. 34).

Πίνακας 34. Κλάσματα που παρελήφθησαν με τα αντίστοιχα συστήματα διαλυτών έκλουσης.

| Όνομα κλάσματος | Σύστημα διαλυτών |
|-----------------|---------------------|
| KR641H1 | cHex/EtOAc (85:15) |
| KR641H2 | cHex/ EtOAc (80:20) |
| KR641H3 | cHex/EtOAc (75:25) |
| KR641H4 | cHex/EtOAc (70:30) |
| KR641H5 | cHex/EtOAc (65:35) |
| KR641H6 | cHex/ EtOAc (60:40) |
| KR641H7 | cHex/EtOAc (55:45) |
| KR641H8 | cHex/EtOAc (50:50) |
| KR641H9 | cHex/EtOAc (45:55) |

Το υπόλειμμα KR641H4 (38 mg) υποβλήθηκε σε HPLC. Συνολικά, παραλήφθηκαν 4 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR (Πίν. 35).

Πίνακας 35. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

| Συνθήκες χρωματογραφίας | |
|-------------------------|------------------------|
| Στήλη | Econoshpere Silica 10u |
| Διαλύτης έκλουσης | cHex/EtOAc (60:40) |
| Ροή διαλύτη | 1.5 mL/min |
| Ανιχνευτής | R.I. |

| Κλάσματα | Μάζα (mg) | Χρόνος έκλουσης (min) |
|----------|-----------|-----------------------|
| KR641H4A | 3.0 | 17.7 |
| KR641H4B | 4.8 | 25.1 |
| KR641H4C | 6.6 | 26.5 |
| KR641H4D | 7.8 | 30.0 |

Το υπόλειμμα KR641H5 (51 mg) υποβλήθηκε σε HPLC. Συνολικά, παραλήφθηκαν 7 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR (Πίν. 36).

Πίνακας 36. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

| Συνθήκες χρωματογραφίας | |
|--------------------------------|------------------------|
| Στήλη | Econoshpere Silica 10u |
| Διαλύτης έκλουσης | cHex/EtOAc (60:40) |
| Ροή διαλύτη | 1.5 mL/min |
| Ανιχνευτής | R.I. |

| Κλάσματα | Μάζα (mg) | Χρόνος έκλουσης (min) |
|-----------------|------------------|------------------------------|
| KR641H5A | 5.1 | 13.2 |
| KR641H5B | 4.3 | 21.0 |
| KR641H5C | 4.5 | 21.8 |
| KR641H5D | 8.2 | 24.1 |
| KR641H5E | 11.3 | 27.2 |
| KR641H5F | 8.6 | 28.0 |
| KR641H5G | 6.4 | 29.3 |

Το υπόλειμμα KR641H6 (33.0 mg) υποβλήθηκε σε HPLC. Συνολικά, παραλήφθηκαν 6 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR (Πίν. 37).

Πίνακας 37. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

| Συνθήκες χρωματογραφίας | |
|--------------------------------|------------------------|
| Στήλη | Econoshpere Silica 10u |
| Διαλύτης έκλουσης | cHex/EtOAc (60:40) |
| Ροή διαλύτη | 1.5 mL/min |
| Ανιχνευτής | R.I. |

| Κλάσματα | Μάζα (mg) | Χρόνος έκλουσης (min) |
|-----------------|------------------|------------------------------|
| KR641H6A | 2.5 | 20.4 |
| KR641H6B | 3.2 | 25.3 |
| KR641H6C | 2.2 | 27.4 |
| KR641H6D | 4.2 | 32.3 |
| KR641H6E | 2.8 | 33.8 |
| KR641H6F | 4.2 | 38.4 |

Το υπόλειμμα KR641I (87.0 mg) υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία με υποβοήθηση κενού, χρησιμοποιώντας ως στατική φάση γέλη πυριτίου κανονικής φάσης και ως κινητή φάση σύστημα διαλυτών cHex/EtOAc βαθμιαία αυξανόμενης πολικότητας. Παρελήφθησαν 7 κλάσματα, τα οποία ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με

TLC (Πίν. 38).

Πίνακας 38. Κλάσματα που παρελήφθησαν με τα αντίστοιχα συστήματα διαλυτών έκλουσης.

| Όνομα κλάσματος | Σύστημα διαλυτών |
|-----------------|--------------------|
| KR641I1 | cHex/EtOAc (70:30) |
| KR641I2 | cHex/EtOAc (65:35) |
| KR641I3 | cHex/EtOAc (60:40) |
| KR641I4 | cHex/EtOAc (55:45) |
| KR641I5 | cHex/EtOAc (50:50) |
| KR641I6 | cHex/EtOAc (45:55) |
| KR641I7 | cHex/EtOAc (40:60) |

Το υπόλειμμα KR641I4 (15.0 mg) υποβλήθηκε σε HPLC. Συνολικά, παραλήφθηκαν 5 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR (Πίν. 39).

Πίνακας 39. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

| Συνθήκες χρωματογραφίας | |
|-------------------------|------------------------|
| Στήλη | Econoshpere Silica 10u |
| Διαλύτης έκλουσης | cHex/EtOAc (45:55) |
| Ροή διαλύτη | 2 mL/min |
| Ανιχνευτής | R.I. |

| Κλάσματα | Μάζα (mg) | Χρόνος έκλουσης (min) |
|----------|-----------|-----------------------|
| KR641I4A | 1.0 | 15.5 |
| KR641I4B | 1.6 | 18.9 |
| KR641I4C | 1.3 | 20.3 |
| KR641I4D | 2.6 | 21.9 |
| KR641I4E | 0.2 | 22.5 |

Το υπόλειμμα KR641I5 (16.0 mg) υποβλήθηκε σε HPLC. Συνολικά, παραλήφθηκαν 6 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το κλάσμα KR641I5F ήταν καθαρή ουσία (μεταβολίτης **K641-07**) (Πίν. 40).

Πίνακας 40. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

| Συνθήκες χρωματογραφίας | |
|-------------------------|------------------------|
| Στήλη | Econoshpere Silica 10u |
| Διαλύτης έκλουσης | cHex/EtOAc (45:55) |
| Ροή διαλύτη | 2 mL/min |
| Ανιχνευτής | R.I. |

| Κλάσματα | Μάζα (mg) | Χρόνος έκλουσης (min) |
|----------|-----------|-----------------------|
| KR641I5A | 1.0 | 18.5 |
| KR641I5B | 1.8 | 20.7 |
| KR641I5C | 1.2 | 22.3 |
| KR641I5D | 2.1 | 23.7 |
| KR641I5E | 1.2 | 25.4 |
| KR641I5F | 3.2 | 27.4 |

Το υπόλειμμα KR641I5B (3.0 mg) υποβλήθηκε σε HPLC. Συνολικά, παραλήφθηκαν 6 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το κλάσμα KR641I5B1 ήταν καθαρή ουσία (μεταβολίτης **K641-08**) (Πίν. 41).

Πίνακας 41. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

| Συνθήκες χρωματογραφίας | |
|-------------------------|------------------------|
| Στήλη | Econoshpere Silica 10u |
| Διαλύτης έκλουσης | cHex/EtOAc (70:30) |
| Ροή διαλύτη | 2 mL/min |
| Ανιχνευτής | R.I. |

| Κλάσματα | Μάζα (mg) | Χρόνος έκλουσης (min) |
|-----------|-----------|-----------------------|
| KR641I5B1 | 1.0 | 18.9 |
| KR641I5B2 | 0.8 | 20.3 |

Το υπόλειμμα KR641I5C (1.0 mg) υποβλήθηκε σε HPLC. Συνολικά, παραλήφθηκε 1 κλάσμα, το οποίο ζυγίστηκε και ελέγχθηκε φασματοσκοπικά με ¹H NMR (Πίν. 42).

Πίνακας 42. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

| Συνθήκες χρωματογραφίας | |
|-------------------------|------------------------|
| Στήλη | Econoshpere Silica 10u |
| Διαλύτης έκλουσης | cHex/EtOAc (70:30) |
| Ροή διαλύτη | 2 mL/min |
| Ανιχνευτής | R.I. |

| Κλάσμα | Μάζα (mg) | Χρόνος έκλουσης (min) |
|-----------|-----------|-----------------------|
| KR641I5C1 | 0.7 | 17.9 |

Το υπόλειμμα KR641I5D (2.0 mg) υποβλήθηκε σε HPLC. Συνολικά, παραλήφθηκαν 2 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR (Πίν. 43).

Πίνακας 43. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

| Συνθήκες χρωματογραφίας | |
|-------------------------|------------------------|
| Στήλη | Econoshpere Silica 10u |
| Διαλύτης έκλουσης | cHex/EtOAc (70:30) |
| Ροή διαλύτη | 2 mL/min |
| Ανιχνευτής | R.I. |

| Κλάσματα | Μάζα (mg) | Χρόνος έκλουσης (min) |
|-----------|-----------|-----------------------|
| KR641I5D1 | 0.4 | 6.6 |
| KR641I5D2 | 0.5 | 20.6 |

Το υπόλειμμα KR641I6 (34.1 mg) διαλύθηκε σε μίγμα cHex/EtOAc (45:55) και διηθήθηκε σε ηθμό, οπότε παραλήφθησαν το διήθημα (KR641I6A, 33.8 mg) και το ίζημα (KR641I6B, 0.3 mg) που εκπλύθηκε με EtOAc. Το κλάσμα KR641I6A (33.8 mg) υποβλήθηκε σε HPLC. Συνολικά, παραλήφθηκαν 7 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR (Πίν. 44).

Πίνακας 44. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

| Συνθήκες χρωματογραφίας | |
|-------------------------|------------------------|
| Στήλη | Econoshpere Silica 10u |
| Διαλύτης έκλουσης | cHex/EtOAc (45:55) |
| Ροή διαλύτη | 2 mL/min |
| Ανιχνευτής | R.I. |

| Κλάσματα | Μάζα (mg) | Χρόνος έκλουσης (min) |
|-----------|-----------|-----------------------|
| KR641I6A1 | 0.2 | 9.5 |
| KR641I6A2 | 0.1 | 20.4 |
| KR641I6A3 | 5.0 | 22.9 |
| KR641I6A4 | 1.6 | 25.1 |
| KR641I6A5 | 1.5 | 27.3 |
| KR641I6A6 | 2.5 | 28.5 |
| KR641I6A7 | 2.0 | 31.8 |

Το υπόλειμμα KR641I6A6 (2.4 mg) υποβλήθηκε σε HPLC. Συνολικά, παραλήφθηκε 1 κλάσμα, το οποίο ζυγίστηκε και ελέγχθηκε φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι ήταν καθαρή ουσία (μεταβολίτης **K641-07**) (Πίν. 45).

Πίνακας 45. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

| Συνθήκες χρωματογραφίας | |
|-------------------------|------------------------|
| Στήλη | Econoshpere Silica 10u |
| Διαλύτης έκλουσης | cHex/EtOAc (70:30) |
| Ροή διαλύτη | 2 mL/min |
| Ανιχνευτής | R.I. |

| Κλάσμα | Μάζα (mg) | Χρόνος έκλουσης (min) |
|------------|-----------|-----------------------|
| KR641I6A6A | 1.3 | 20.2 |

Συνολικά από τα οργανικά εκχυλίσματα του μαλακού κοραλλιού του γένους *Sinularia* που μελετήθηκε απομονώθηκαν 11 μεταβολίτες, οι οποίοι παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα 46.

Πίνακας 46. Απομονωμένοι μεταβολίτες και μάζες αυτών.

| Μεταβολίτης | Κωδικός | Κλάσματα | Μάζα (mg) |
|--------------------|----------------|-------------------------------------------------------------------------|------------------|
| 1 | K641-01 | MP641C6 KR641A6,7A6 KR641A6,7B2 KR641A8 KR641C8 KR641D5B | 43.1 |
| 2 | K641-04 | KR641D9B | 1.7 |
| 3 | K641-11 | KR641A6,7A4 | 3.6 |
| 4 | K641-02 | KR641A4D KR641A5C KR641A5D | 141.9 |
| 5 | K641-03 | KR641A4A | 6.7 |
| 6 | K641-10 | KR641A6,7A3 | 5.3 |
| 7 | K641-09 | KR641C5A | 3.4 |
| 8 | K641-06 | KR641C5D | 4.3 |
| 9 | K641-07 | KR641I5F KR641I6A6A | 4.5 |
| 10 | K641-08 | KR641I5B1 | 1.0 |
| 11 | K641-05 | KR641D7 | 92.5 |

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

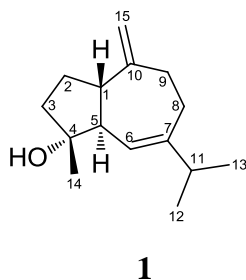
Δείγμα ενός μαλακού κοραλλιού του γένους *Sinularia* συλλέχθηκε από την Ερυθρά Θάλασσα στη περιοχή Al Fahal, στο Thuwal, της Σαουδικής Αραβίας σε βάθος 10-12 m, τον Ιανουάριο του 2018. Ο οργανισμός εκχυλίστηκε εξαντλητικά με μίγματα CH_2Cl_2 και MeOH και το οργανικό εκχύλισμα που προέκυψε υποβλήθηκε σε χρωματογραφικούς διαχωρισμούς με αποτέλεσμα την απομόνωση **11** δευτερογενών μεταβολιτών.

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

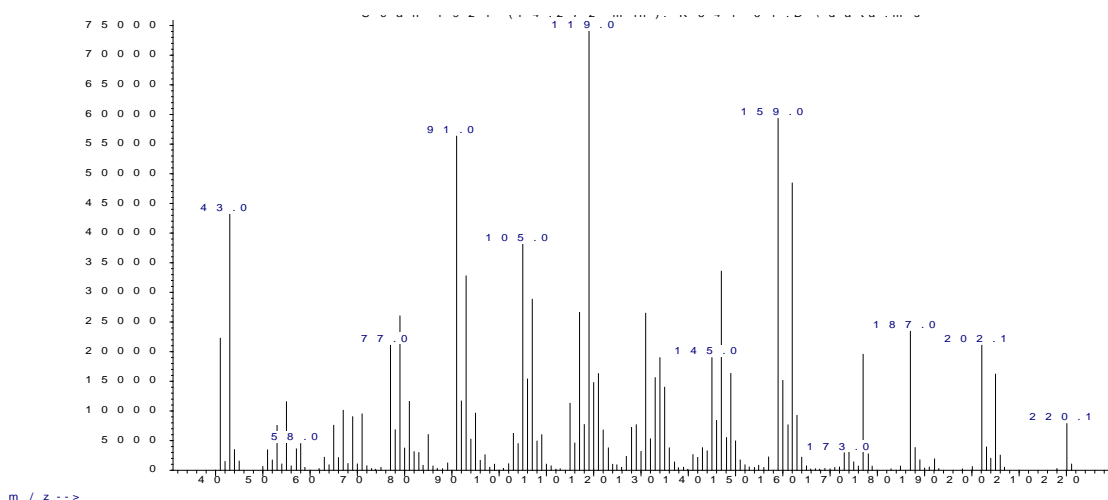
Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα φασματοσκοπικά δεδομένα των δευτερογενών μεταβολιτών **1–11** και περιγράφεται ο καθορισμός της χημικής τους δομής.

3.1. Μεταβολίτης 1

Ο μεταβολίτης **1** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως υποκίτρινο ελαιώδες υπόλειμμα συνολικής μάζας 43.1 mg.



Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **1** (Εικ. 9) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 220.

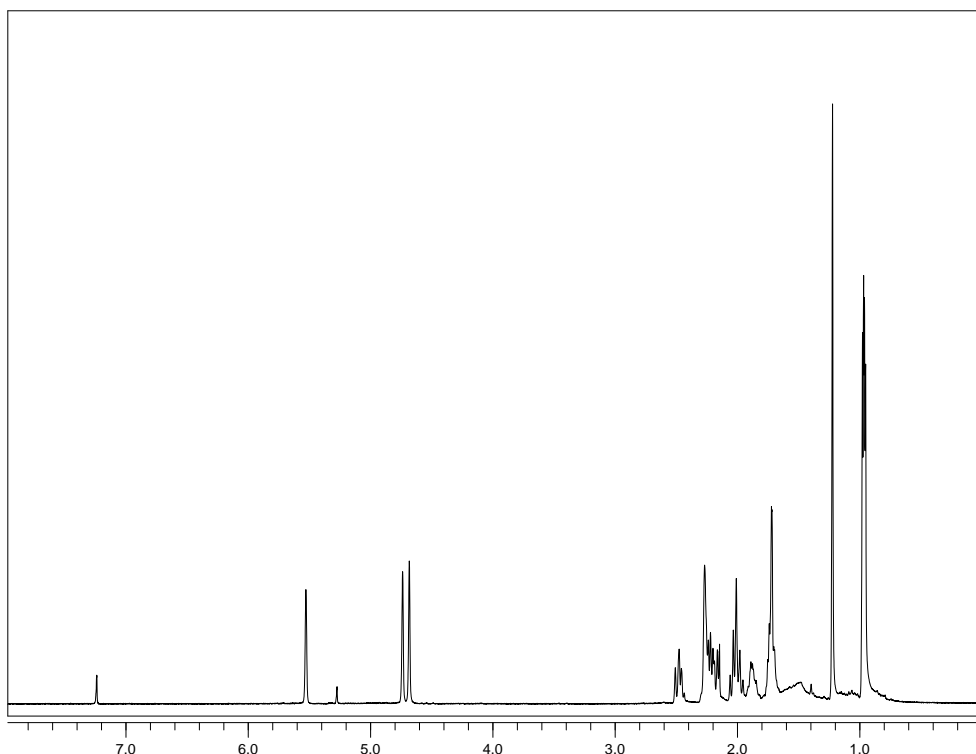


Εικόνα 9. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **1**.

Στο φάσμα $^1\text{H NMR}$ του μεταβολίτη **1** (Εικ. 10) παρατηρήθηκαν:

- Δύο διπλές κορυφές σε δ 0.97 και 0.98, οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν σε πρωτόνια δύο αλειφατικών μεθυλίων σε τριτοταγή άτομα άνθρακα.
- Μια απλή κορυφή σε δ 1.23, η οποία ολοκλήρωνε για τρία πρωτόνια και αντιστοιχούσε σε πρωτόνια αλειφατικού μεθυλίου σε τεταρτοταγές άτομο άνθρακα.

- Δύο απλές κορυφές στην περιοχή των ολεφινικών πρωτονίων, σε δ 4.74 και 4.69, οι οποίες ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και ήταν χαρακτηριστικές για τη παρουσία ενός εξωμεθυλενίου.
- Μία απλή κορυφή στην περιοχή των ολεφινικών πρωτονίων, σε δ 5.53, η οποία ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο.



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

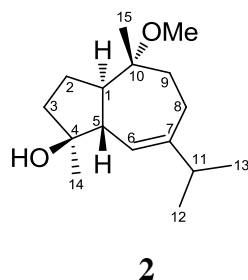
Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **1** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$ που αντιστοιχούσε σε βαθμό ακορεστότητας τέσσερα. Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **1** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν αλισμόλη (Guo-Ping *et al.*, 2003, Nakajima *et al.*, 1994). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **1** παρατίθενται στον Πίνακα 47.

Πίνακας 47. Φασματοσκοπικά δεδομένα ^1H NMR του μεταβολίτη **1** σε CDCl_3 (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

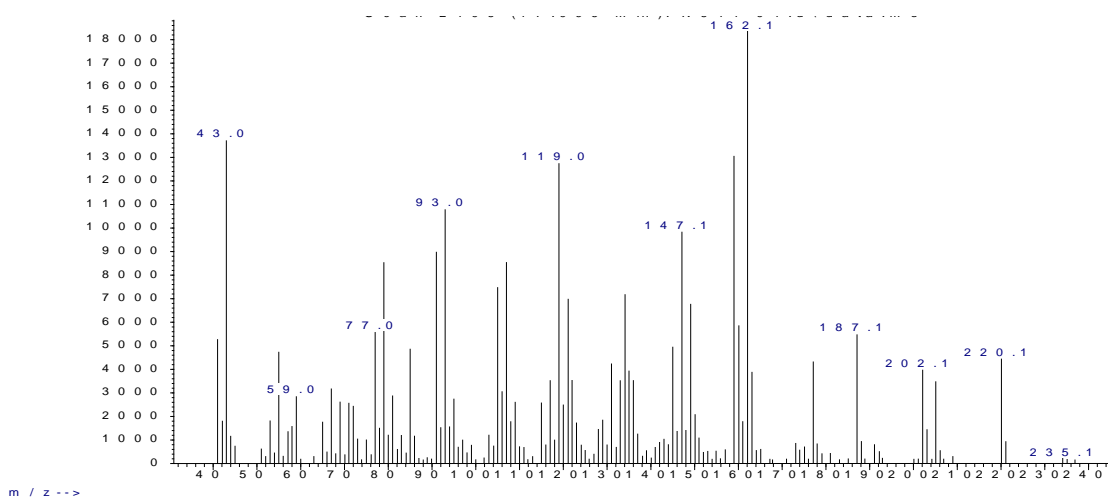
| Θέση | Πειραματικά δεδομένα | Βιβλιογραφικά δεδομένα |
|-------------|-----------------------------|-------------------------------|
| 6 | 5.53 s | 5.56 s |
| 12 | 0.97 d (7.0) | 0.99 d (7.0) |
| 13 | 0.98 d (7.0) | 1.00 d (7.0) |
| 14 | 1.23 s | 1.25 s |
| 15a | 4.74 s | 4.76 s |
| 15b | 4.69 s | 4.71 s |

3.2. Μεταβολίτης 2

Ο μεταβολίτης **2** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως υπόλειμμα συνολικής μάζας 1.7 mg.



Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **2** (Εικ. 11) δεν εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$. Αντ' αυτού εμφάνισε θραύσματα $[M-H_2O]^+$ και $[M-MeOH]^+$ σε m/z 234 και 220, αντίστοιχα.

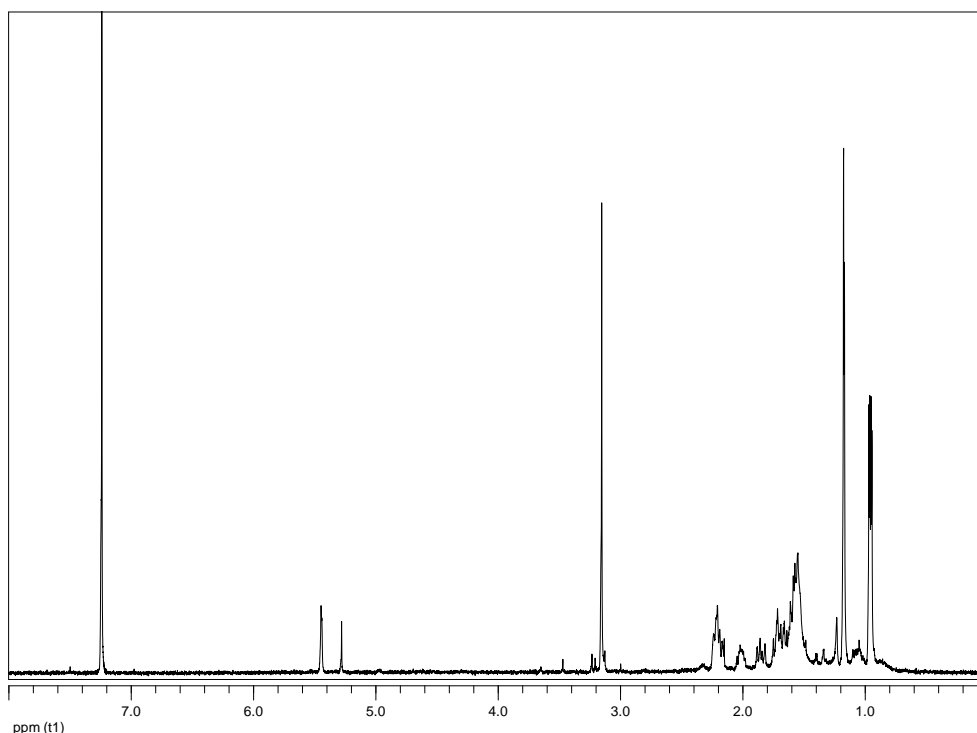


Εικόνα 11. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **2**.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **2** (Εικ. 12) παρατηρήθηκαν:

- Δύο διπλές κορυφές σε δ 0.96 και 0.97, οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν σε πρωτόνια δύο αλειφατικών μεθυλίων σε τριτοταγή άτομα άνθρακα.
- Δύο απλές κορυφές σε δ 1.17 και 1.18, οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν σε πρωτόνια δύο μεθυλίων σε τεταρτοταγή άτομα άνθρακα.

- Μία απλή κορυφή σε δ 3.15, η οποία ολοκλήρωνε για τρία πρωτόνια και αντιστοιχούσε σε πρωτόνια του μεθυλίου μίας μεθοξυ-ομάδας.
- Μία απλή κορυφή σε δ 5.45, η οποία ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχούσε σε ένα ολεφινικό μεθίνιο.



Εικόνα 12. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **2**.

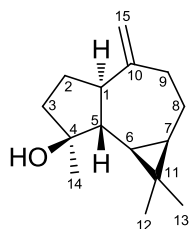
Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **2** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{O}_2$ που αντιστοιχούσε σε βαθμό ακορεστότητας τρία. Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **2** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν 10α-μεθοξυ-4β-υδροξυ-γουαϊαν-6-ένιο (Rama Rao *et al.*, 2000). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **2** παρατίθενται στον Πίνακα 48.

Πίνακας 48. Φασματοσκοπικά δεδομένα ^1H NMR του μεταβολίτη **2** σε CDCl_3 (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

| Θέση | Πειραματικά δεδομένα | Βιβλιογραφικά δεδομένα |
|-------------|-----------------------------|-------------------------------|
| 6 | 5.45 s | 5.46 s |
| 14 | 1.17 s | 1.17 s |
| 12 | 0.96 d (6.8) | 0.96 d (6.0) |
| 13 | 0.97 d (6.8) | 0.97 d (6.0) |
| 15 | 1.18 s | 1.19 s |
| -OMe | 3.15 s | 3.16 s |

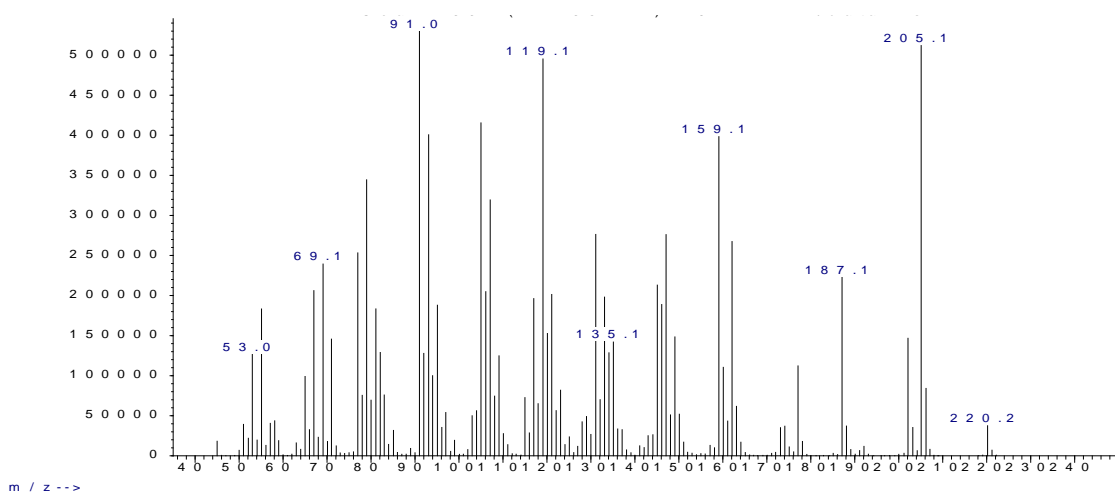
3.3. Μεταβολίτης 3

Ο μεταβολίτης **3** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως ελαιώδες υπόλειμμα συνολικής μάζας 3.6 mg.



3

Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **3** (Εικ. 13) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 220.

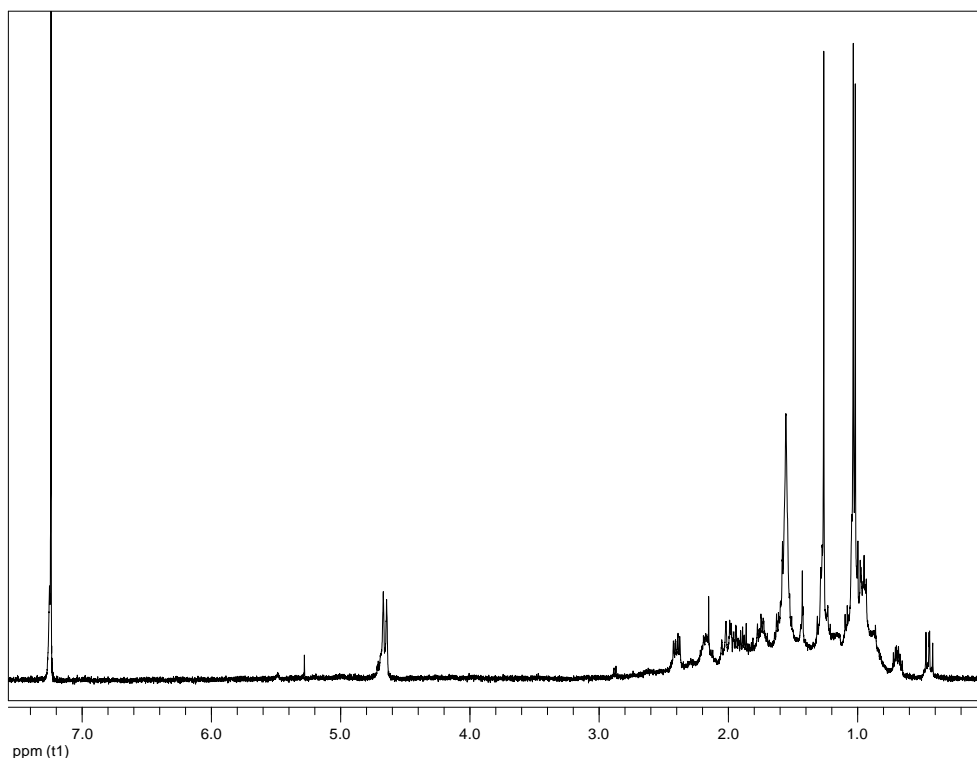


Εικόνα 13. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **3**.

Στο φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **3** (Εικ. 14) παρατηρήθηκαν:

- Δύο πολλαπλές κορυφές σε δ 0.44 και 0.69, οι οποίες ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αποδόθηκαν στα πρωτόνια ενός κυκλοπροπανικού δακτυλίου.
- Δύο απλές κορυφές σε δ 1.02 και 1.03, οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν σε πρωτόνια δύο μεθυλίων σε τεταρτοταγή άτομο άνθρακα.

- Μία απλή κορυφή σε δ 1.26, η οποία ολοκλήρωνε για τρία πρωτόνια και αντιστοιχούσε σε πρωτόνια δίπλα σε οξυγονομένο άνθρακα.
- Μια απλή κορυφή σε δ 4.66, η οποία ολοκλήρωνε για δύο πρωτονια και αντιστοιχούσε σε πρωτόνια διπλού δεσμού.



Εικόνα 14. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **3**.

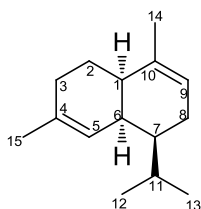
Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **3** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$ που αντιστοιχούσε σε βαθμό ακορεστότητας τέσσερα. Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **3** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν σπαθουλενόλη (Bowden *et al.*, 1975). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **3** παρατίθενται στον Πίνακα 49.

Πίνακας 49. Φασματοσκοπικά δεδομένα ^1H NMR του μεταβολίτη **3** σε CDCl_3 (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

| Θέση | Πειραματικά δεδομένα | Βιβλιογραφικά δεδομένα |
|-------------|-----------------------------|-------------------------------|
| 6 | 0.44 m | 0.48 m |
| 7 | 0.69 m | 0.73 m |
| 12 | 1.03 s | 1.07 s |
| 13 | 1.02 s | 1.07 s |
| 14 | 1.26 s | 1.30 s |
| 15 | 4.66 s | 4.70 s |

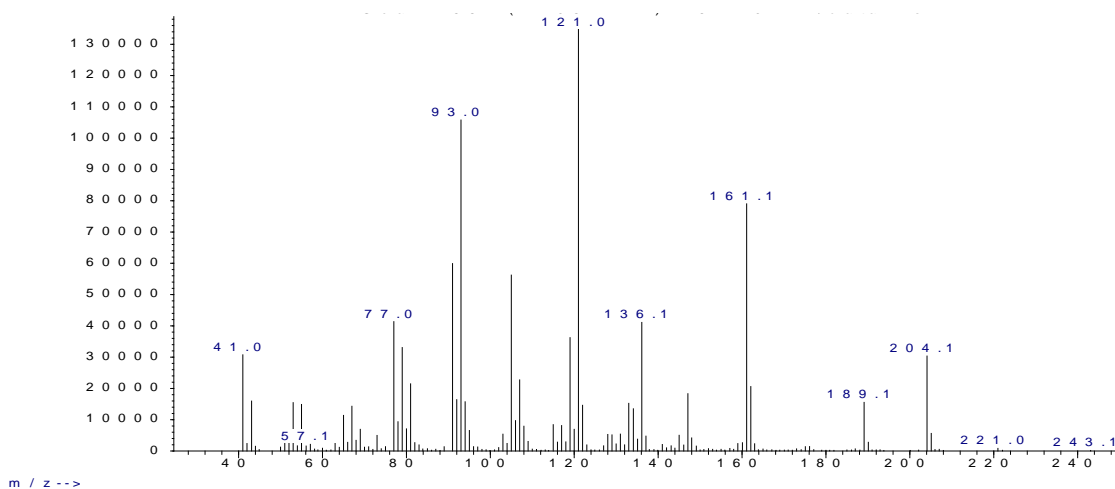
3.4. Μεταβολίτης 4

Ο μεταβολίτης **4** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως υπόλειμμα συνολικής μάζας 141.9 mg.



4

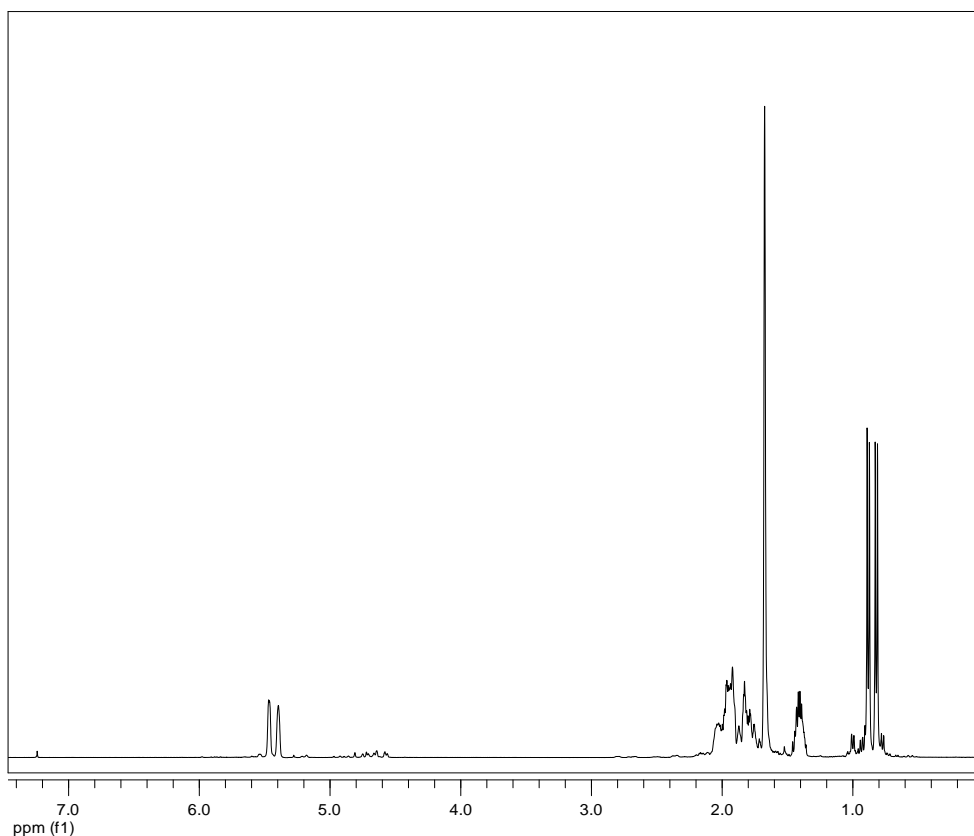
Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **4** (Εικ. 15) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 204.



Εικόνα 15. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **4**.

Στο φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **4** (Εικ. 16) παρατηρήθηκαν:

- Δύο διπλές κορυφές σε δ 0.83 και 0.89, οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν σε πρωτόνια δύο μεθυλίων σε τριτοταγή άτομα άνθρακα.
- Μία απλή κορυφή σε δ 1.68, η οποία ολοκλήρωνε για έξι πρωτόνια και αντιστοιχούσε στα πρωτόνια δύο βινυλικών μεθυλίων.
- Δύο απλές κορυφές σε δ 5.38 και 5.46, οι οποίες ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αποδόθηκαν σε δύο ολεφινικά πρωτόνια.



Εικόνα 16. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **4**.

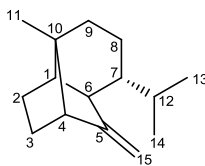
Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **4** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_{15}\text{H}_{24}$ που αντιστοιχούσε σε βαθμό ακορεστότητας τέσσερα. Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **4** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν α -αμορφένιο (Rabe *et al.*, 2016). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **4** παρατίθενται στον Πίνακα 50.

Πίνακας 50. Φασματοσκοπικά δεδομένα ^1H NMR του μεταβολίτη **4** σε CDCl_3 (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

| Θέση | Πειραματικά δεδομένα | Βιβλιογραφικά δεδομένα |
|------|----------------------|------------------------|
| 5 | 5.46 d (2.5) | 5.48 d (3.7) |
| 9 | 5.38 s | 5.29 s |
| 12 | 0.89 d (7.0) | 0.94 d (6.7) |
| 13 | 0.83 d (7.0) | 0.89 d (6.7) |
| 14 | 1.68 s | 1.64 s |
| 15 | 1.68 s | 1.64 s |

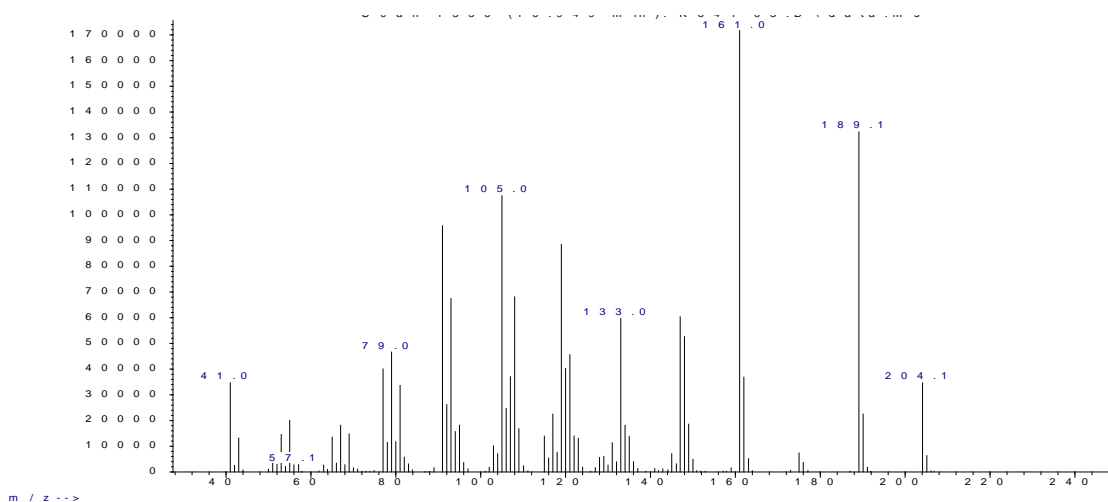
3.5. Μεταβολίτης 5

Ο μεταβολίτης **5** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως υπόλειμμα συνολικής μάζας 6.7 mg.



5

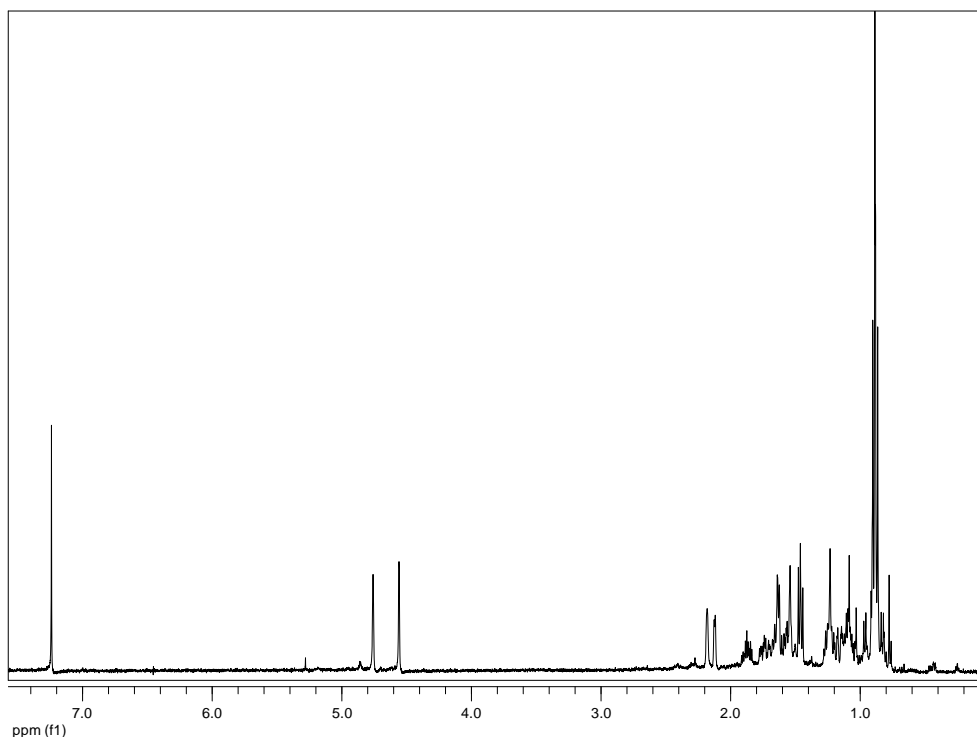
Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **5** (Εικ. 17) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 204.



Εικόνα 17. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **5**.

Στο φάσμα $^1\text{H NMR}$ του μεταβολίτη **5** (Εικ. 18) παρατηρήθηκαν:

- Δύο διπλές κορυφές σε δ 0.90 και 0.89, οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν σε πρωτόνια δύο αλειφατικών μεθυλίων σε τριτοταγή άτομα άνθρακα.
- Μία απλή κορυφή σε δ 0.86, η οποία ολοκλήρωνε για τρία πρωτόνια και αντιστοιχούσε σε πρωτόνια ενός αλειφατικού μεθυλίου σε τεταρτοταγές άτομο άνθρακα.
- Δύο ευρείες απλές κορυφές σε δ 4.55 και 4.75, οι οποίες ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αντιστοιχούσαν στα πρωτόνια ενός εξωμεθυλενίου.



Εικόνα 18. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **5**.

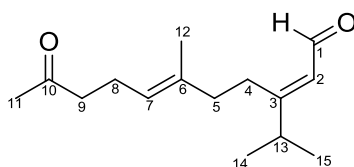
Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **5** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_{15}\text{H}_{24}$ που αντιστοιχούσε σε βαθμό ακορεστότητας τέσσερα. Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **5** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν σινουλαρένιο (Beechan *et al.*, 1977). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **5** παρατίθενται στον Πίνακα 51.

Πίνακας 51. Φασματοσκοπικά δεδομένα ^1H NMR του μεταβολίτη **5** σε CDCl_3 (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

| Θέση | Πειραματικά δεδομένα | Βιβλιογραφικά δεδομένα |
|-------------|----------------------|------------------------|
| 11 | 0.86 s | 0.91 s |
| 13 | 0.89 d (6.5) | 0.90 d (6.4) |
| 14 | 0.90 d (6.5) | 0.92 d (6.4) |
| 15 α | 4.75 brs | 4.79 brs |
| 15 β | 4.55 brs | 4.59 brs |

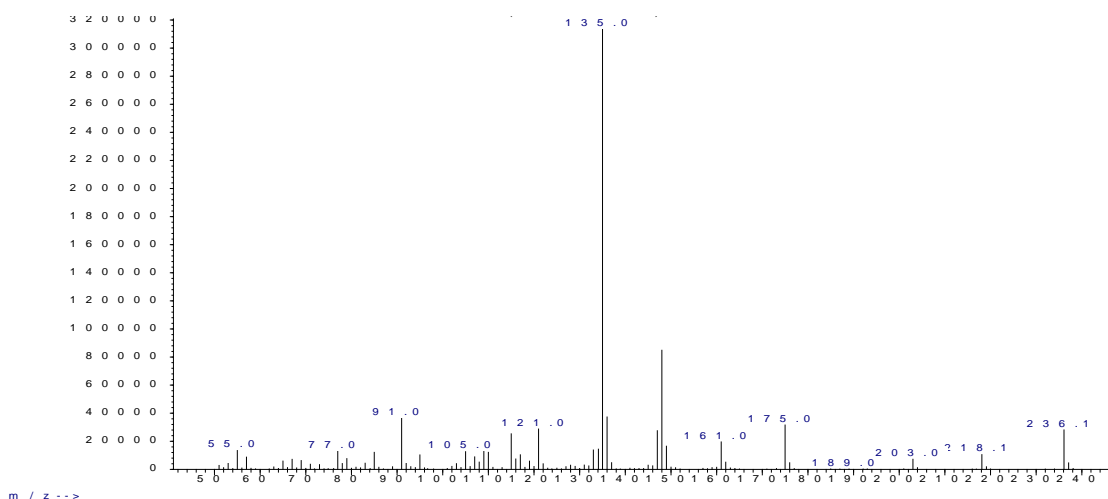
3.6. Μεταβολίτης 6

Ο μεταβολίτης **6** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως υπόλειμμα συνολικής μάζας 5.3 mg.



6

Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **6** (Εικ. 19) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 236.

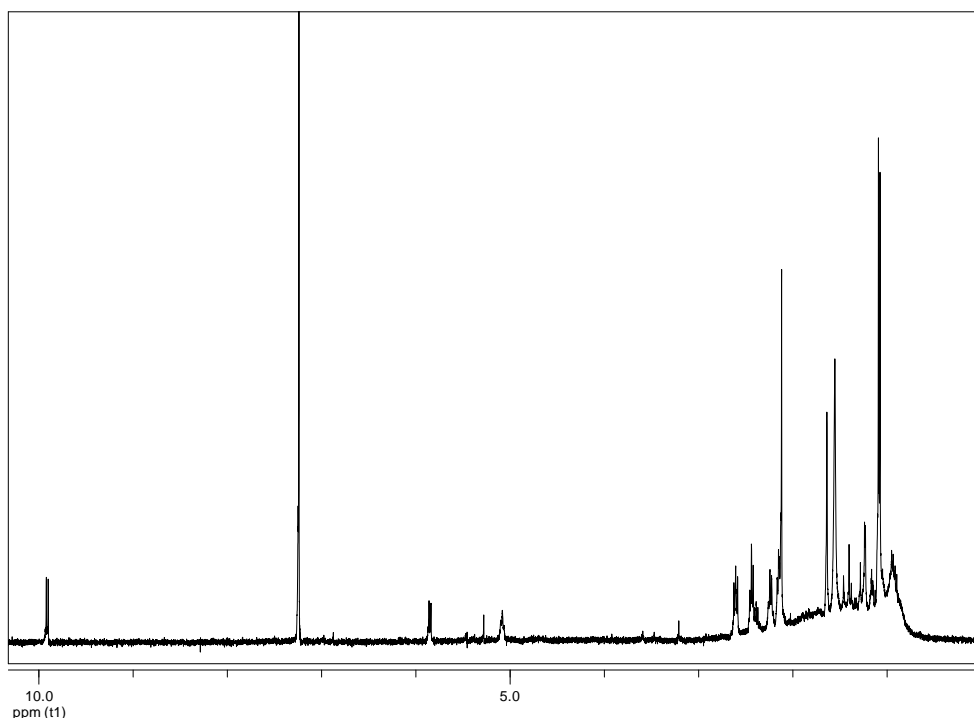


Εικόνα 19. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **6**.

Στο φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **6** (Εικ. 20) παρατηρήθηκαν:

- Μία διπλή κορυφή σε δ 1.08, η οποία ολοκλήρωνε για έξι πρωτόνια και αποδόθηκε στα πρωτόνια δύο αλειφατικών μεθυλίων σε τριτοταγή άτομα άνθρακα.
- Μία απλή κορυφή σε δ 1.64, η οποία ολοκλήρωνε για τρία πρωτόνια και αποδόθηκε στα πρωτόνια ενός βινυλικού μεθυλίου.
- Μία απλή κορυφή σε δ 2.12, η οποία ολοκλήρωνε για τρία πρωτόνια και αποδόθηκε στα πρωτόνια μίας μεθυλο-κετόνης.

- Μία τριπλή κορυφή σε δ 5.08 και μία διπλή σε δ 5.85, οι οποίες ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αποδόθηκαν σε δύο ολεφινικά πρωτόνια.
- Μία διπλή κορυφή σε δ 9.91, η οποία ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο και ήταν χαρακτηριστική για το πρωτόνιο μίας αλδεΐδης.



Εικόνα 20. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **6**.

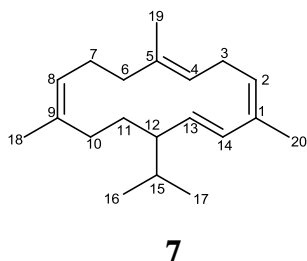
Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **6** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_2$ που αντιστοιχούσε σε βαθμό ακορεστότητας τέσσερα. Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **6** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν (2*E*,6*E*)-3-ισοπροπυλο-6-μέθυλο-10-οξο-ενδεκα-2,6-διενάλη (Shi-Yie *et al.*, 2009). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **6** παρατίθενται στον Πίνακα 52.

Πίνακας 52. Φασματοσκοπικά δεδομένα ^1H NMR του μεταβολίτη **6** σε CDCl_3 (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

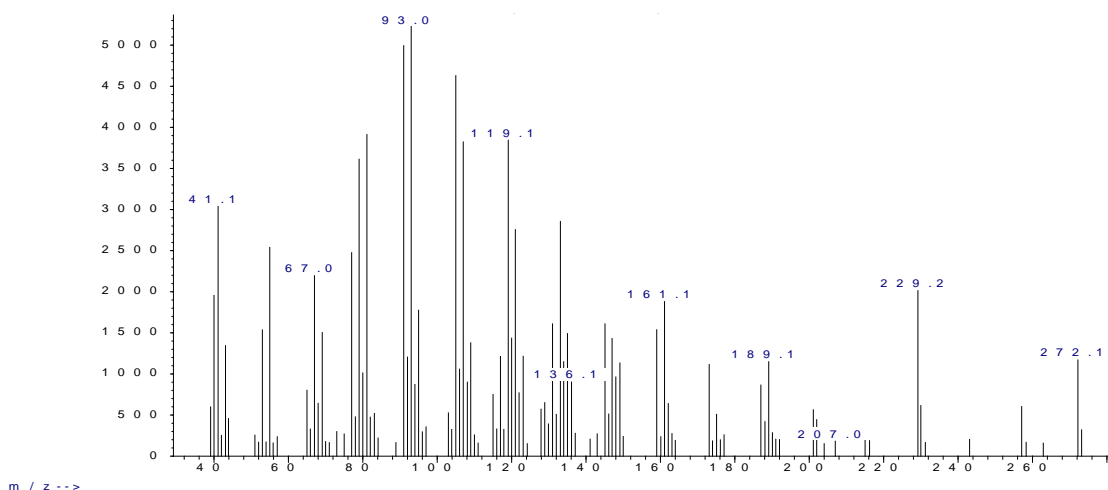
| Θέση | Πειραματικά δεδομένα | Βιβλιογραφικά δεδομένα |
|-------------|-----------------------------|-------------------------------|
| 1 | 9.91 d (8.0) | 9.93 d (8.0) |
| 2 | 5.85 d (8.0) | 5.78 d (8.0) |
| 4 | 2.61 t (7.6) | 2.63 t (8.0) |
| 5 | 2.15 m | 2.17 t (8.0) |
| 7 | 5.08 t (6.7) | 5.11 t (6.4) |
| 8 | 2.24 dd (7.6, 6.7) | 2.26 dd (7.6, 6.4) |
| 9 | 2.44 t (7.6) | 2.46 t (7.6) |
| 11 | 2.12 s | 2.14 s |
| 12 | 1.64 brs | 1.66 brs |
| 13 | 2.39 m | 2.41 septet (6.8) |
| 14 | 1.08 d (6.8) | 1.11 d (6.8) |
| 15 | 1.08 d (6.8) | 1.11 d (6.8) |

3.7. Μεταβολίτης 7

Ο μεταβολίτης **7** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως υπόλειμμα συνολικής μάζας 3.4 mg.



Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **7** (Εικ. 21) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 272.

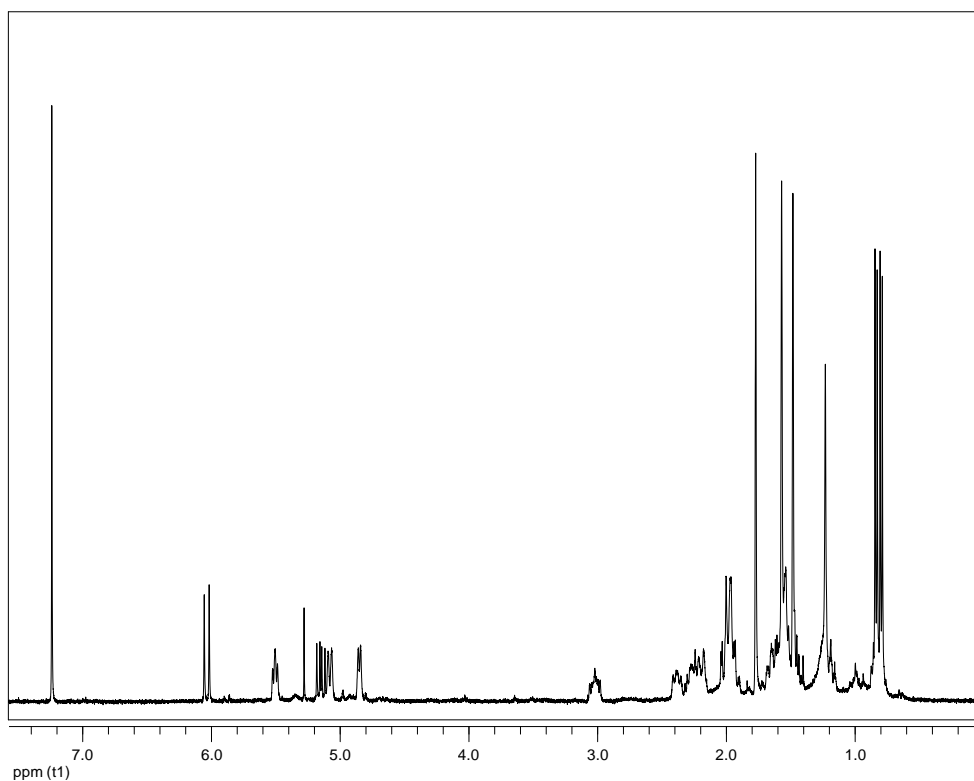


Εικόνα 21. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **7**.

Στο φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **7** (Εικ. 22) παρατηρήθηκαν:

- Δύο διπλές κορυφές σε δ 0.80 και 0.84, οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν σε πρωτόνια δύο αλειφατικών μεθυλίων σε τριτοταγή άτομα άνθρακα.
- Τρεις απλές κορυφές σε δ 1.48, 1.57 και 1.77, οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν σε πρωτόνια τριών βινυλικών μεθυλίων.

- Δύο διπλές κορυφές σε δ 4.85 και 6.04, μία ευρεία διπλή κορυφή σε δ 5.08, μία διπλή διπλών κορυφή σε δ 5.15 και μία τριπλή κορυφή σε δ 5.51, οι οποίες ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αποδόθηκαν σε πέντε ολεφινικά πρωτόνια.



Εικόνα 22. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη 7.

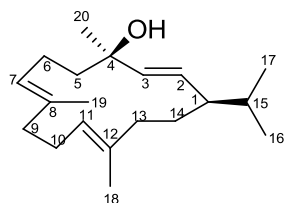
Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **7** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_{20}\text{H}_{32}$ που αντιστοιχούσε σε βαθμό ακορεστότητας πέντε. Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **7** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν κεμβράνιο (Takagi *et al.*, 1980). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **7** παρατίθενται στον Πίνακα 53.

Πίνακας 53. Φασματοσκοπικά δεδομένα ^1H NMR του μεταβολίτη **7** σε CDCl_3 (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

| Θέση | Πειραματικά δεδομένα | Βιβλιογραφικά δεδομένα |
|-------------|-----------------------------|-------------------------------|
| 2 | 5.51 t (7.2) | 4.80-5.70 m |
| 4 | 5.08 brd (11.1) | 4.80-5.70 m |
| 8 | 4.85 d (6.6) | 4.80-5.70 m |
| 13 | 5.15 dd (15.4, 9.8) | 4.80-5.70 m |
| 14 | 6.04 d (15.4) | 6.06 d (15.0) |
| 16 | 0.80 d (6.8) | 0.81 d (7.0) |
| 17 | 0.84 d (6.8) | 0.87 d (7.0) |
| 18 | 1.48 s | 1.51 s |
| 19 | 1.57 s | 1.59 s |
| 20 | 1.77 s | 1.79 s |

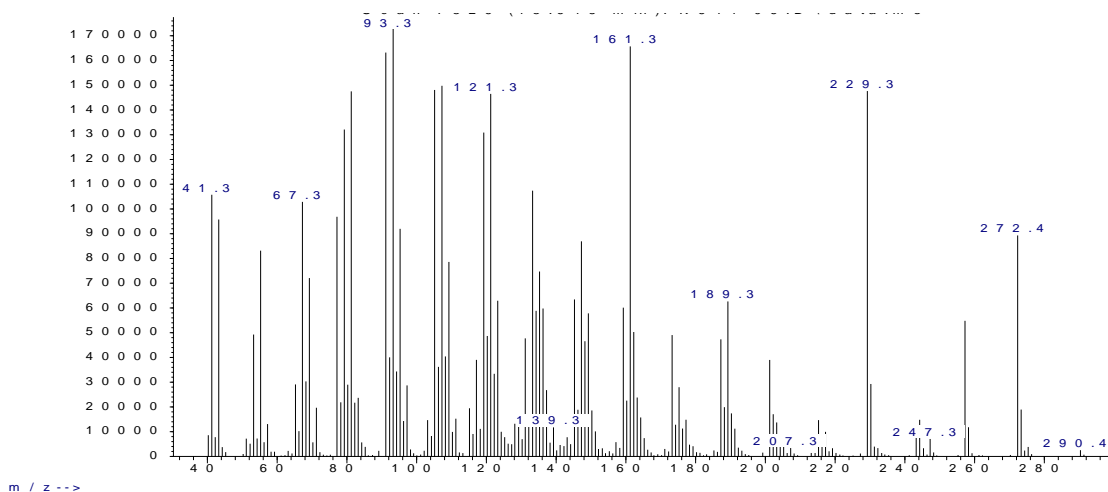
3.8. Μεταβολίτης 8

Ο μεταβολίτης **8** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως υπόλειμμα συνολικής μάζας 4.3 mg.



8

Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **8** (Εικ. 23) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 290.

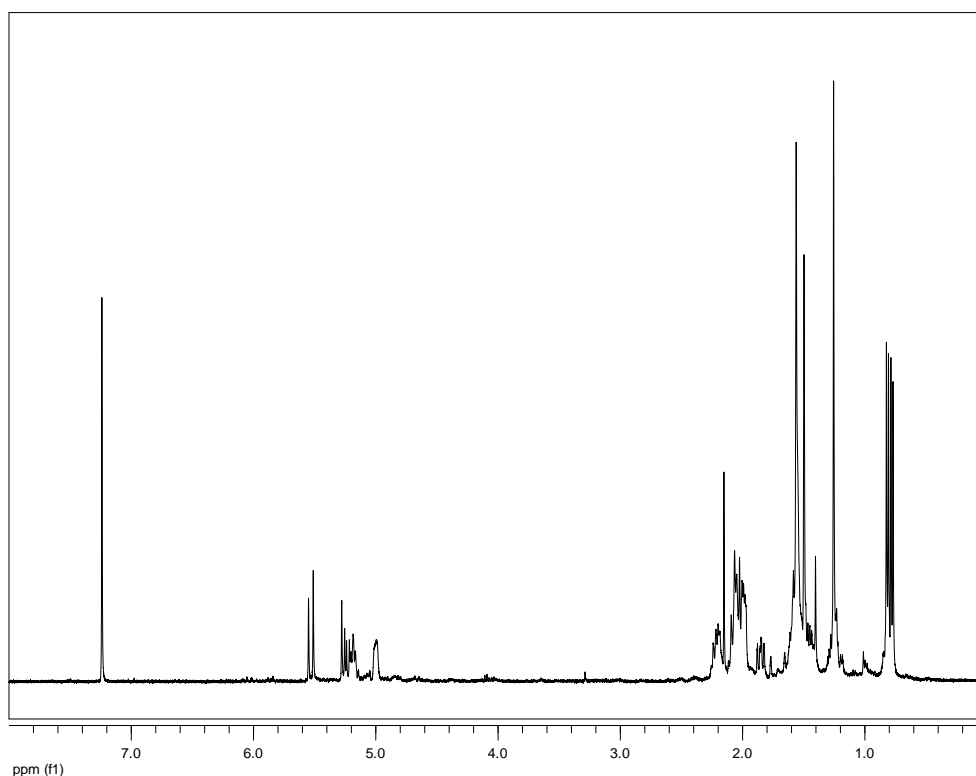


Εικόνα 23. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **8**.

Στο φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **8** (Εικ. 24) παρατηρήθηκαν:

- Δύο διπλές κορυφές σε δ 0.79 και 0.80, οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν σε πρωτόνια δύο αλειφατικών μεθυλίων σε τριτοταγή άτομα άνθρακα.
- Μία απλή κορυφή σε δ 1.26, η οποία ολοκλήρωνε για τρία πρωτόνια και αντιστοιχούσε σε πρωτόνια ενός αλειφατικού μεθυλίου σε τριτοταγές άτομο άνθρακα.

- Δύο απλές κορυφές σε δ 1.50 και 1.56, οι οποίες ολοκληρώναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν σε πρωτόνια δύο βινυλικών μεθυλίων.
- Μία πολλαπλή κορυφή σε δ 5.00, μία τριπλή κορυφή σε δ 5.19, μία διπλή διπλών κορυφή σε δ 5.25 και μία διπλή κορυφή σε δ 5.53, οι οποίες ολοκληρώναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αποδόθηκαν σε τέσσερα ολεφινικά πρωτόνια.



Εικόνα 24. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **8**.

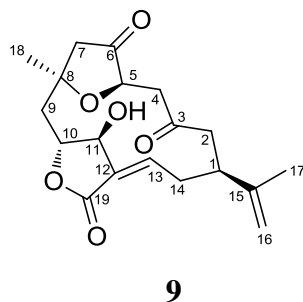
Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **8** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}$ που αντιστοιχούσε σε βαθμό ακορεστότητας τέσσερα. Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **8** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν 4-επι-ισοκεμβρόλη (Bruce *et al.*, 1981). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **8** παρατίθενται στον Πίνακα 54.

Πίνακας 54. Φασματοσκοπικά δεδομένα ^1H NMR του μεταβολίτη **8** σε CDCl_3 (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

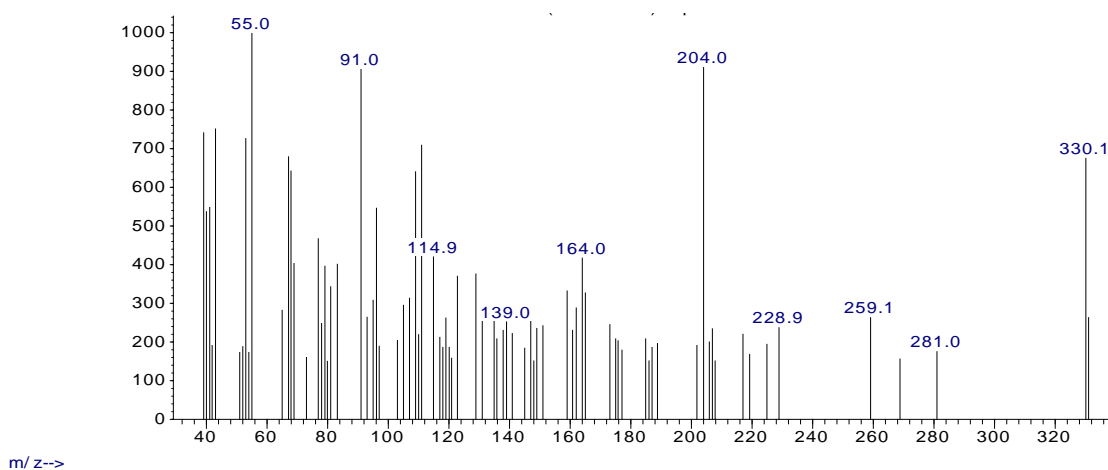
| Θέση | Πειραματικά δεδομένα | Βιβλιογραφικά δεδομένα |
|-------------|-----------------------------|-------------------------------|
| 2 | 5.25 dd (15.5, 9.3) | 5.35 dd (16.0, 9.0) |
| 3 | 5.53 d (15.5) | 5.66 d (16.0) |
| 7 | 5.19 t (7.6) | 5.25 t (7.5) |
| 11 | 5.00 m | 5.05 m |
| 16 | 0.79 d (7.0) | 0.80 d (7.0) |
| 17 | 0.82 d (7.0) | 0.87 d (7.0) |
| 18 | 1.50 d (15.0) | 1.55 d (15.2) |
| 19 | 1.56 d (15.0) | 1.61 d (14.9) |
| 20 | 1.26 s | 1.30 s |

3.9. Μεταβολίτης 9

Ο μεταβολίτης **9** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως υπόλειμμα λευκής σκόνης συνολικής μάζας 4.5 mg.



Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **9** (Εικ. 25) εμφάνισε θραύσμα προϊόν απόσπασης ενός μορίου νερού $[M-H_2O]^+$ σε m/z 330.

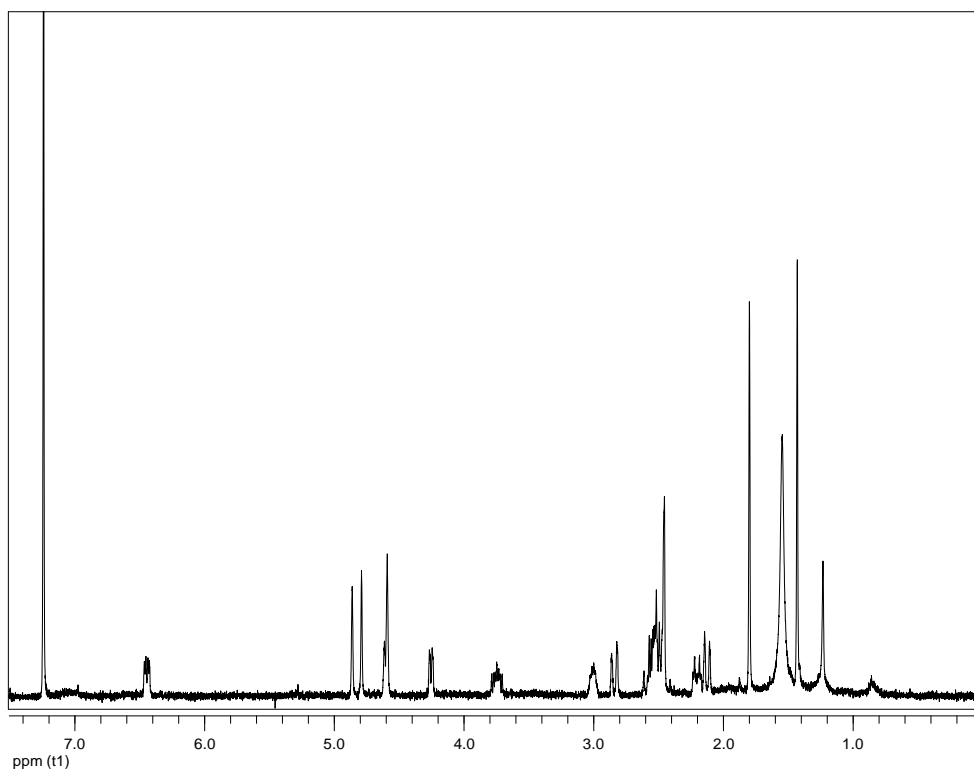


Εικόνα 25. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **9**.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **9** (Εικ. 26) παρατηρήθηκαν:

- Μία απλή κορυφή σε δ 1.43, η οποία ολοκλήρωνε για τρία πρωτόνια και αντιστοιχούσε σε πρωτόνια ενός μεθυλίου σε τεταρτοταγές άτομο άνθρακα.
- Μία απλή κορυφή σε δ 1.79, η οποία ολοκλήρωνε για τρία πρωτόνια και αντιστοιχούσε σε πρωτόνια ενός βινυλικού μεθυλίου.
- Μία διπλή διπλών κορυφή σε δ 4.26, μία ευρεία απλή κορυφή σε δ 4.58 και μία πολλαπλή κορυφή σε δ 4.59, οι οποίες ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αντιστοιχούσαν σε πρωτόνια τριών οξυγονωμένων μεθινίων.

- Δύο απλές κορυφές σε δ 4.79 και 4.86, οι οποίες ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αντιστοιχούσαν στα πρωτόνια ενός εξωμεθυλενίου.
- Μία διπλή διπλών κορυφή σε δ 6.46, η οποία ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο και αποδόθηκε σε ένα αποθωρακισμένο ολεφινικό πρωτόνιο.



Εικόνα 26. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **9**.

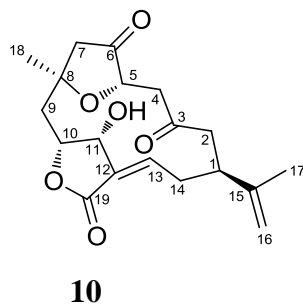
Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **9** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{O}_6$ που αντιστοιχούσε σε βαθμό ακορεστότητας οκτώ. Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **9** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν 5-επι-σινουλεπτολίδιο (Atallah *et al.*, 2004, Sato *et al.*, 1985). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **9** παρατίθενται στον Πίνακα 55.

Πίνακας 55. Φασματοσκοπικά δεδομένα ^1H NMR του μεταβολίτη **9** σε CDCl_3 (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

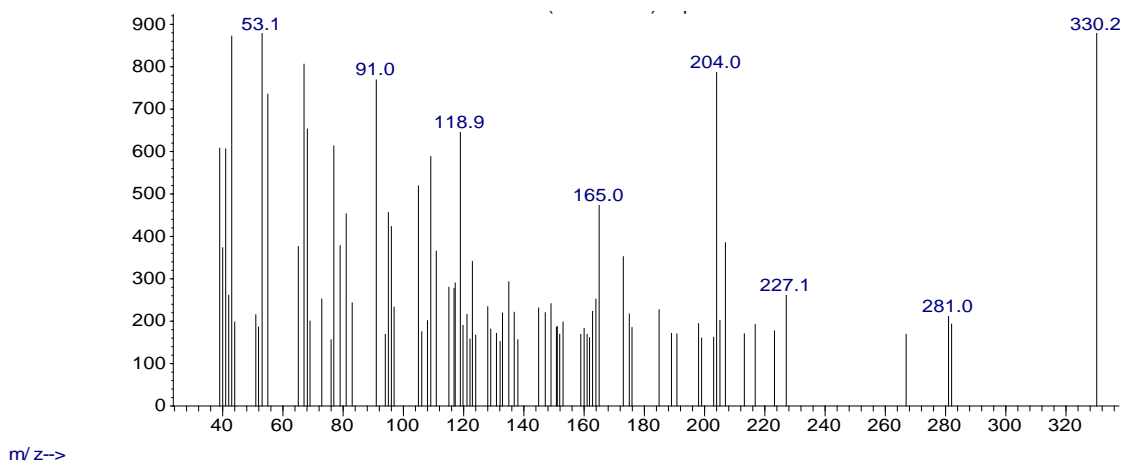
| Θέση | Πειραματικά δεδομένα | Βιβλιογραφικά δεδομένα |
|-------------|-----------------------------|-------------------------------|
| 5 | 4.26 dd (8.8, 2.9) | 4.28 dd (8.3, 3.0) |
| 10 | 4.59 m | 4.63 ddd (7.0, 2.0, 2.0) |
| 11 | 4.58 brs | 4.61 d (2.0) |
| 13 | 6.46 dd (11.0, 5.0) | 6.47 dd (11.0, 5.0) |
| 16a | 4.79 s | 4.81 s |
| 16b | 4.86 s | 4.89 s |
| 17 | 1.79 s | 1.82 s |
| 18 | 1.43 s | 1.53 s |

3.10. Μεταβολίτης 10

Ο μεταβολίτης **10** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως λευκό υπόλειμμα συνολικής μάζας 1.0 mg.



Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **10** (Εικ. 27) εμφάνισε θραύσμα προϊόν απόσπασης ενός μορίου νερού $[M-H_2O]^+$ σε m/z 330.

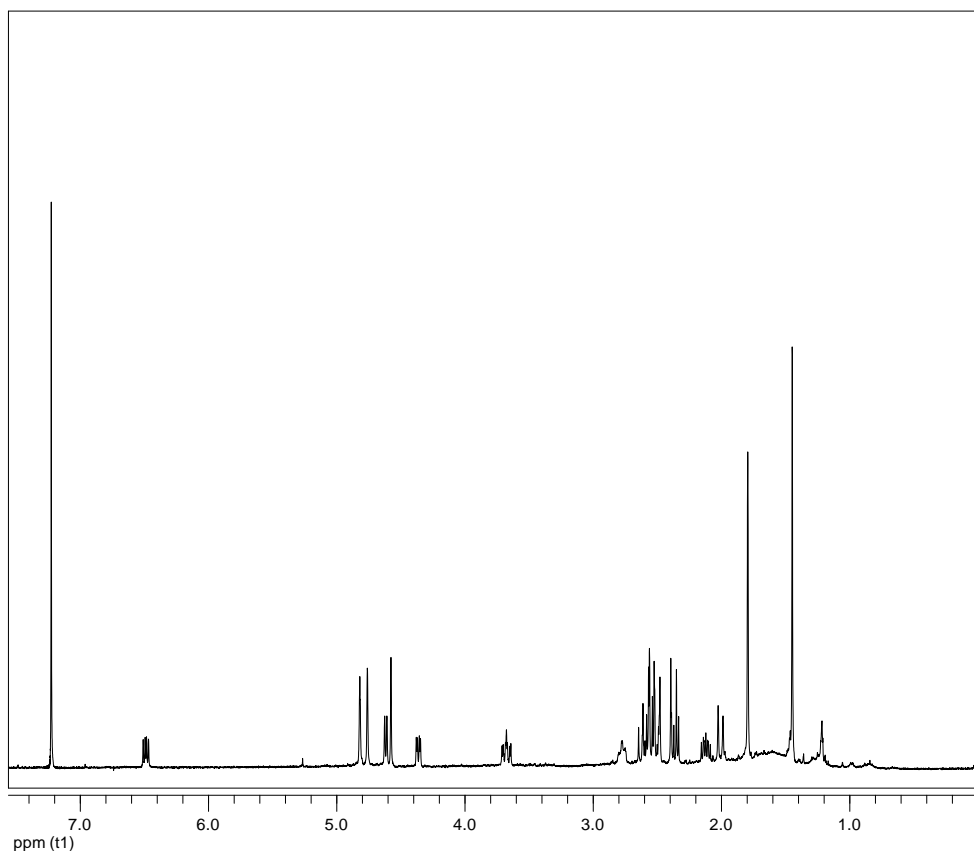


Εικόνα 27. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **10**.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **10** (Εικ. 28) παρατηρήθηκαν:

- Μία απλή κορυφή σε δ 1.45, η οποία ολοκλήρωνε για τρία πρωτόνια και αντιστοιχούσε σε πρωτόνια ενός μεθυλίου σε τεταρτοταγές άτομο άνθρακα.
- Μία απλή κορυφή σε δ 1.81, η οποία ολοκλήρωνε για τρία πρωτόνια και αντιστοιχούσε σε πρωτόνια ενός βινυλικού μεθυλίου.
- Δύο διπλές κορυφές σε δ 4.38 και 4.62 και μία απλή κορυφή σε δ 4.59, οι οποίες ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αντιστοιχούσαν σε πρωτόνια τριών οξυγονωμένων μεθινίων.

- Δύο απλές κορυφές σε δ 4.77 και 4.83, οι οποίες ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αντιστοιχούσαν στα πρωτόνια ενός εξωμεθυλενίου.
- Μία διπλή διπλών κορυφή σε δ 6.50, η οποία ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο και αποδόθηκε σε ένα αποθωρακισμένο ολεφινικό πρωτόνιο.



Εικόνα 28. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **10**.

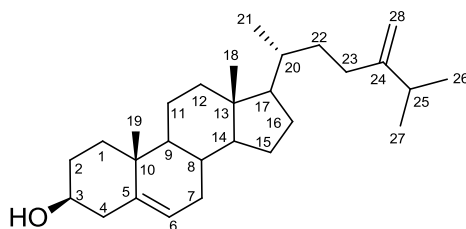
Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **10** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{O}_6$ που αντιστοιχούσε σε βαθμό ακορεστότητας οκτώ. Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **10** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν 11-επι-σινουλεπτολίδιο (Ramesh & Venkateswarlu, 2000). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **10** παρατίθενται στον Πίνακα 56.

Πίνακας 56. Φασματοσκοπικά δεδομένα ^1H NMR του μεταβολίτη **10** σε CDCl_3 (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

| Θέση | Πειραματικά δεδομένα | Βιβλιογραφικά δεδομένα |
|-------------|-----------------------------|-------------------------------|
| 5 | 4.38 d (10.0) | 4.40 d (10.0) |
| 10 | 4.62 d (7.0) | 4.65 d (6.8) |
| 11 | 4.59 s | 4.61 s |
| 13 | 6.50 dd (11.0, 6.0) | 6.53 dd (11.0, 6.0) |
| 16a | 4.77 s | 4.80 s |
| 16b | 4.83 s | 4.86 s |
| 17 | 1.81 s | 1.83 s |
| 18 | 1.45 s | 1.49 s |

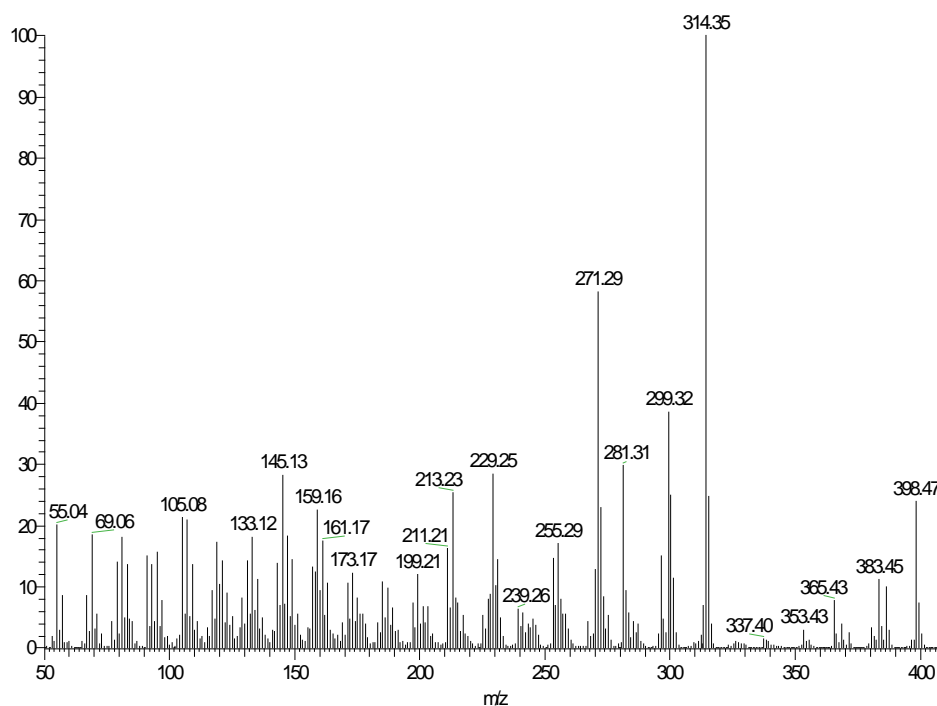
3.11. Μεταβολίτης 11

Ο μεταβολίτης **11** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως υπόλειμμα συνολικής μάζας 92.5 mg.



11

Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **11** (Εικ. 29) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 398.

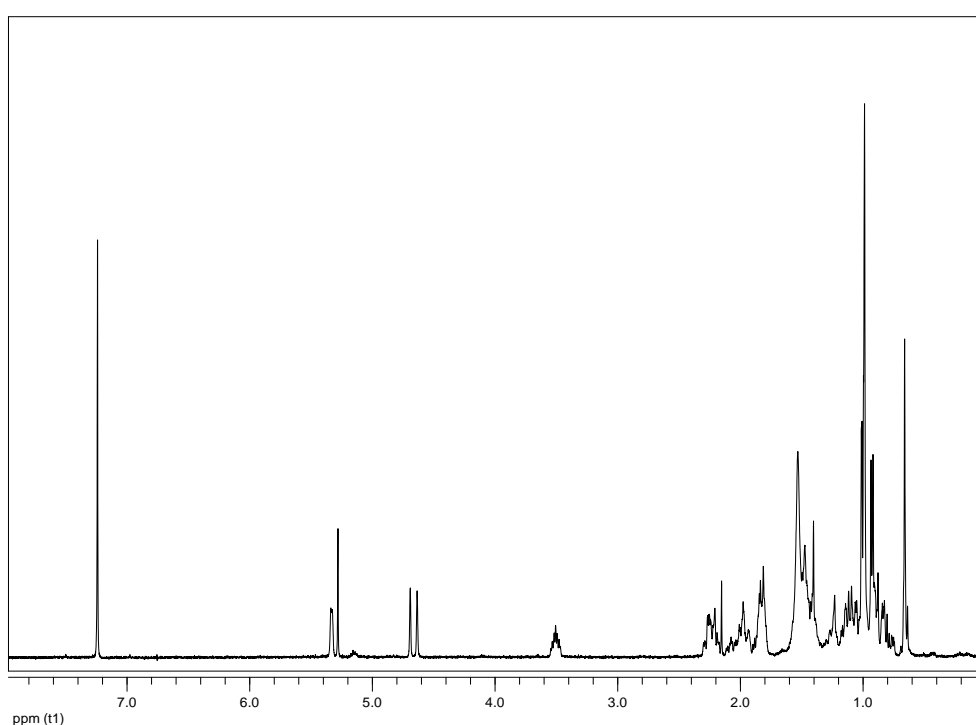


Εικόνα 29. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **11**.

Στο φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **11** (Εικ. 30) παρατηρήθηκαν:

- Δύο απλές κορυφές σε δ 0.66 και 0.98, οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν στα πρωτόνια δύο αλειφατικών μεθυλίων σε τεταρτοταγή άτομα άνθρακα.

- Τρεις διπλές κορυφές σε δ 0.93, 0.99 και 1.01, οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν στα πρωτόνια τριών αλειφατικών μεθυλίων σε τριτοταγή άτομα άνθρακα.
- Μια πολλαπλή κορυφή σε δ 3.49, η οποία ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχούσε στο πρωτόνιο ενός οξυγονωμένου μεθινίου
- Δύο απλές κορυφές σε δ 4.63 και 4.68, οι οποίες ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αντιστοιχούσαν στα πρωτόνια ενός εξωμεθυλενίου.
- Μια πολλαπλή κορυφή σε δ 5.32, η οποία ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο και αποδόθηκε σε ένα ολεφινικό μεθίνιο.



Εικόνα 30. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **11**.

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **11** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_{28}\text{H}_{46}\text{O}$ που αντιστοιχούσε σε βαθμό ακορεστότητας έξι. Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **11** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν 24-μεθυλενο-χοληστερόλη (Riccardis *et al.*, 1993). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **11** παρατίθενται στον Πίνακα 57.

Πίνακας 57. Φασματοσκοπικά δεδομένα ^1H NMR του μεταβολίτη **11** σε CDCl_3 (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

| Θέση | Πειραματικά δεδομένα | Βιβλιογραφικά δεδομένα |
|-------------|-----------------------------|-------------------------------|
| 3 | 3.49 m | 3.54 m |
| 6 | 5.32 m | 5.35 brs |
| 18 | 0.66 s | 0.68 s |
| 19 | 0.98 s | 1.01 s |
| 21 | 0.93 d (6.6) | 0.95 d (6.5) |
| 26 | 0.99 d (6.9) | 1.01 d (7.0) |
| 27 | 1.01 d (6.9) | 1.01 d (7.0) |
| 28 | 4.63 s, 4.68 s | 4.71 d (1.5), 4.66 d (1.5) |

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας μελετήθηκε η χημική σύσταση του οργανικού εκχυλίσματος ενός μαλακού κοραλλιού του γένους *Sinularia*, δείγμα του οποίου συλλέχθηκε από την Ερυθρά Θάλασσα στη περιοχή Al Fahal στο Thuwal της Σαουδικής Αραβίας σε βάθος 10-12 m τον Ιανουάριο του 2018.

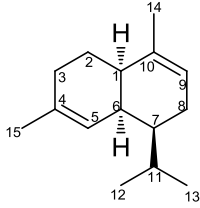
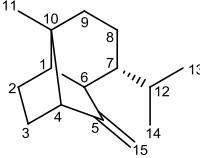
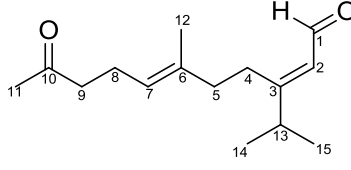
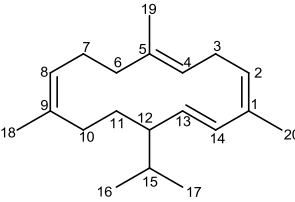
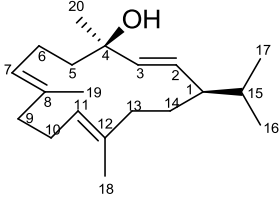
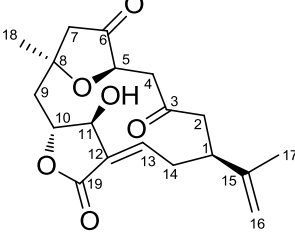
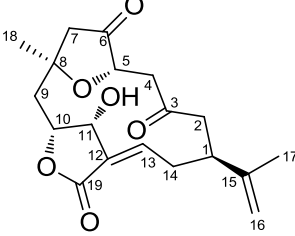
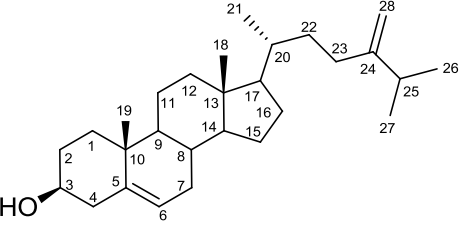
Από το οργανικό του εκχύλισμα απομονώθηκαν με χρωματογραφικούς διαχωρισμούς 11 (**1-11**) δευτερογενείς μεταβολίτες, οι οποίοι ταυτοποιήθηκαν μέσω φασματοσκοπικών μεθόδων NMR και MS.

Συνολικά απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν:

- έξι σесκιτερπένια, εκ των οποίων δύο με σκελετό γουαϊανίου (**1** και **2**), ένα με σκελετό κυκλο-αρωμαδενδρανίου (**3**), ένα με σκελετό καδινανίου (**4**), ένα με σκελετό σινουλαρανίου (**5**) και ένα άκυκλο με σκελετό *seco*-γερμακρανίου (**6**),
- Δύο διτερπένια (**7** και **8**), καθώς και δύο *nor*-διτερπένια (**9** και **10**) με σκελετό κεμβρανίου και
- Ένα στεροειδές (**11**).

Στη συνέχεια παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι απομονωθέντες μεταβολίτες.

| Μεταβολίτης | Δομή |
|-------------|------|
| 1 | |
| 2 | |
| 3 | |

| | |
|----|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 4 |  |
| 5 |  |
| 6 |  |
| 7 |  |
| 8 |  |
| 9 |  |
| 10 |  |
| 11 |  |

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ahmed A.F., Dai C.F., Kuo Y.H., Sheu J.H. 1,3 β ,5 β trihydroxy, 24-methylene cholestan-6-one: A novel steroid from a soft coral *Sinularia gibberosa*. *Steroids*, **2003**, 68, 377–381.
- Ahmed A.F., Su J.H., Kuo Y.H., Sheu J.H. Scabrolides E-G, three new norditerpenoids from the soft coral *Sinularia scabra*. *J. Nat. Prod.*, **2004**, 67, 12, 2079-2082.
- Arepalli S.K., Sridhar V., Rao J.V., Kennady P.K., Venkateswarlu Y. Furano-sesquiterpene from soft coral, *Sinularia kavarrittiensis*: induces apoptosis via the mitochondrial-mediated caspase-dependent pathway in THP-1, leukemia cell line. *Apoptosis*, **2009**, 14, 729–40.
- Ata A., Kerr R.G., Moya C.E., Jacobs R. Identification of anti-inflammatory diterpenes from the marine gorgonian *Pseudopterogorgia elisabethae*. *Tetrahedron Lett.*, **2003**, 59, 23, 4215-4222.
- Atallah F.A., Jui-Hsin Su, Yao-Haur Kuo, Jyh-Horng Sheu. Scabrolides E-G, three new norditerpenoids from the soft coral *Sinularia scabra*. *J. Nat. Prod.*, **2004**, 67, 2079-2082.
- Beutler J. A. Natural products as a foundation for drug discovery. *Curr. Protoc. Pharmacol.*, **2009**.
- Bowden B.F., Cambie R.C., Parnell I.C. Constituents of the fruit of *Pseudopanax arboretum* (Araliaceae). *Aust. J. Chem.*, **1975**, 28, 91-107.
- Bowden F.B., Coll C.J., Mitchell S.J. and Kazlauskas R. Studies of Australian soft corals. Two cembranoid diterpenes from the soft coral *Sinularia facile*. *Aust. J. Chem.*, **1981**, 34, 1551-1556.
- Cheng S.Y., Huang C.Y., Wen Z.H., Chiou S.F., Wang S.K., Hsu C.H., Dai C.F., Duh C.V. Novel sesquiterpenes and noregosterol from the soft corals *Nephthea erecta* and *Nephthea chabroli*. *Tetrahedron Lett.*, **2009**, 50, 802-806.
- Choi, Y.-H., Schmitz, F.J. Cytotoxic acylated spermidine from a soft coral *Sinularia* species. *J. Nat. Prod.*, **1997**, 60, 495–496.
- Ciminiello, P., Fenical, W., Paul, V.J. Structure assignments of two new C-18-oxygenated steroidal ketals isolated from a Pacific soft coral of the genus *Sinularia*. *Experientia*, **1990**, 46, 9, 980–982.

- Coll J.C., Stokie G.J. Studies of Australian soft corals. Novel furano-sesquiterpene acid from soft coral *Sinularia-Gonatodes* (Kolonko). *Tetrahedron Lett.*, **1977**, 18, 1539–42.
- Cragg G., Newman D., Snader K. Natural products in drug discovery and development. *J. Nat. Prod.*, **1997**, 60, 52-60.
- Curtis M.B. and Carl D. Sinularene, a sesquiterpene hydrocarbon based on a novel skeleton from the soft coral *Sinularia mayi*. *Tetrahedron Lett.*, **1997**, 28, 2395-2398.
- De Riccardis F., Minale L., Iorizzi M., Debitus C. and Levi C. Marine sterols. Side-chain-oxygenated sterols, possibly of abiotic origin, from the new caledonian sponge *Stelodoryx chlorophylla*. *J. Nat. Prod.*, **1993**, 56, 2, 282-287.
- Dmitrenok, A.S., Radhika, P., Anjaneyulu, V., Subrahmanyam, S., Subba Rao, P.V., Dmitrenok, P.S. New lipids from the soft coral of Andaman islands. *Russ. Chem. Bull.*, **2003**, 52, 1868–1872.
- Duh C.Y., Wang S.W., Tseng H.K., Sheu J.H. A novel cytotoxic biscebranoid from the Formosan soft coral *Sinularia flexibilis*. *Tetrahedron Lett.*, **1998**, 39, 7121–7122.
- Duh C.Y., Hou R.S. Cytotoxic cebranoids from the soft coral *Sinularia gibberosa* and Sarcophyton *trocheliophorum*. *J. Nat. Prod.*, **1996**, 59, 6, 595–598.
- Duh C.Y., Hou R.S., Liu C.H., Soong K. Potential anticancer cebranoid diterpenes from a Formosan soft coral. *Acta Oceanogr. Taiwan*, **1995**, 34, 3, 71–78.
- Duque C., Puyana M., Narvaez G., Osorno O., Hara N., Fujimoto Y. Pseudopteriosins P-V, new compounds from the gorgonian octocoral *Pseudopterogorgia elisabethea* from Providencia island, Colombian Caribbean. *Tetrahedron Lett.*, **2004**, 60, 47, 10627-10635.
- Elsayed K.A., Hamann M.T. A new norcebranoid dimer from the Red Sea soft coral *Sinularia gradineri*. *J. Nat. Prod.*, **1996**, 59, 687–689.
- Fenical W. Marine soft corals of the genus *Pseudopterogorgia*: a resource for novel anti-inflammatory diterpenoids. *J. Nat. Prod.*, **1987**, 50, 6, 1001-1008.
- Fenical W., Jensen P.R., Palladino M.A., Lam K.S., Lloyd G.K., Potts B.C. Discovery and development of the anticancer agent salinosporamide A (NPI-0052). *Bioorg. Med. Chem.*, **2009**, 17, 2175-2180.

- Findlay A.J. and Patil D.A. Novel sterols from the finger sponge *Haliclona oculata*. *Can. J. Chem.*, **1985**, 63, 2406.
- Gebreyesus T., Stoilov I., Luo F., Djerassi C. Minor and trace sterols in marine invertebrates - The isolation structure elucidation and synthesis of ergo-5,24(28),25 triene-3 β -ol. *Steroids*, **1985**, 45, 5, 447–452.
- Guo-Ping P., Gang T., Xian-Feng H., Feng-Chang Lou Guaiane-type sesquiterpenoids from *Alisma orientalis*. *Phytochemistry*, **2003**, 63, 887-881.
- Harper M. Introduction to the chemical ecology of marine natural products. McClintock J., Baker B. (Eds) *Marine Chemical Ecology*, CRC Press New York, **2001**.
- Henkel J. Drugs of the Deep. *FDA Consumer*, **1998**, 32, 1.
- Hou R.S., Duh C.Y., Chiang M.Y., Lin C.N. Sinnugibberal, a new cytotoxic cembranoid diterpene from the soft coral *Sinularia gibberosa*. *J. Nat. Prod.*, **1995**, 58, 1126–1130.
- Incalci M.D., Galmarini C.M. A Review of Trabectedin (ET-743): A unique mechanism of action. *Am. Assoc. Cancer Res.*, **2010**, 2157-2164.
- Jaspars M., De Pascale D., Andersen J.H., Reyes F., Crawford A.D., Ianora A. The marine biodiscovery pipeline and ocean medicines of tomorrow. *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, **2016**, 96, 151-158.
- Jimenez P.C., Wilke D.V., Leticia V.C. Marine drugs for cancer : surfacing biotechnological innovations from the oceans. *Clinics*, **2018**, 73, 1-7.
- Kamel N.H., Fronczek R.F., Fischer H.N., Slattery M. A novel metabolite from the hybrid soft coral *Sinularia maxima* x *Sinularia polydactyla*: A biosynthetically mixed skeleton linkers cembrane and africanane terpenoids. *Tetrahedron Lett.*, **2004**, 45, 9, 1995–1997.
- Kazlauskas R., Marwood J.F., Wells R.J. 2-Phenylethylamides of a novel lipid acid: A trial stimulants from the soft coral *Sinularia flexibilis*. *Aust. J. Chem.*, **1980**, 33, 8, 1799–1803.
- Kem W.R., Mahnir V.M., Prokai L., Papke R.L., Cao X., LeFrancois S., Wildeboer K., Prokai-Tatrai K., Porter-Papke J., Soti F. Hydroxy metabolites of the Alzheimer's drug candidate 3-[(2, 4-dimethoxy) benzylidene]-anabaseine dihydrochloride (GTS-21): their molecular properties, interactions with brain nicotinic receptors, and brain penetration. *Mol. Pharmacol.*, **2004**, 65, 56-67.
- Kingston D.G. Modern natural products drug discovery and its relevance to

- biodiversity conservation. *J. Nat. Prod.*, **2010**, 74, 3, 496-511.
- Kobayashi M., Appa Rao K.M.C., Anjaneyulu V. Marine sterols. Part 29. Isolation of new polyhydroxy sterol and steroidal glycosides from the soft coral *Sinularia gibberosa*. *Journal of Chemical Research. Synopses*, **1994**, 4, 140–141.
 - Koren G.G., Klein P., Amira R., Benayahu Y., Schleyer M., Kashman Y. Sindurol and nephthoside: New tetraprenyltoluquinols from the soft coral *Sinularia durce* and *Nephthea species*. *J. Nat. Prod.*, **1996**, 59, 3, 262–266.
 - Layer R.T., McIntosh J.M. Conotoxins : Therapeutic Potential and Application. *Mar. Drugs*, **2006**, 4, 119-142.
 - Lee Y.M., Kim M.J., Li H., Zhang P., Bao B., Lee K.J., Jung J.H. Marine-Derived *Aspergillus* Species as a Source of Bioactive Secondary Metabolites. *Mar. Biotechnol.*, **2013**, 15, 499-519.
 - Lindel T., Jensen P.R., Fenical W., Long B.H., Casazza A.M., Carboni J., Fairchild C. R. Eleutherobin, a new cytotoxin that mimics paclitaxel (taxol) by stabilizing microtubules. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 8744-8745.
 - Long B.H., Carboni J.M., Wasserman A.J., Cornell L.A., Casazza A.M., Jensen P.R., Lindel T., Fenical W., Fairchild C.R. Eleutherobin, a novel cytotoxic agent that induces tubulin polymerization, is similar to paclitaxel (taxol). *Cancer Res.*, **1998**, 58, 1111-1115.
 - Long K., Yankang L., Zeng F. Studies on chemical constituents of the Chinese gorgonians and soft coral IV. *Zhongshan Daxue Xuebao, Ziran, Kexueben*, **1982**, 1, 71.
 - Look S.A., Fenical W., Jacobs R.S., Clardy J. The pseudopterosins: anti-inflammatory and analgesic natural products from the sea whip *Pseudopteroorgia elisabethae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1986**, 83, 6238-6240.
 - Luo Y., Cobb R.E., Zhao H. Recent advances in natural product discovery. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2014**, 30, 230-237.
 - Mayer A.M., Glaser K.B., Cuevas C., Jacobs R.S., Kem W., Little R.D., McIntosh J.M., Newman D.J., Potts B.C., Shuster D.E. The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. *Trends Pharmacol. Sci.*, **2010**, 31, 255-265.
 - Mayer A.M.S., Jacobson P.B., Fenical W., Jacobs R.S., Glaser K.B. Pharmacological characterization of the pseudopterosins: Novel anti-inflammatory natural products isolated from the Caribbean soft coral,

Pseudopterogorgia elisabethae. *Life Sci.*, **1998**, 62, 26, 401-407.

- Montaser R., Luesch H. Marine natural products : a new wave of drugs? *Future Med. Chem.*, **2011**, 3, 12, 1475-1489.
- Mullen K., Harvell C.D., Peters E., Coral resistance to disease. *Edit. Rosenberg E.*, **2004**, 378-399.
- Ojika M., Islam M.K., Shintani T., Zhang Y., Okamoto T., Sakagami Y. Three new cytotoxic acyl spermidines from the soft coral *Sinularia species*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2003**, 67, 1410–1412.
- Orhan I.K. Pharmacognosy: Science of natural products in drug discovery. *Bioimpacts*, **2014**, 4, 3, 109-110.
- Newman D.J., Cragg G.M. Drugs and drug candidates from marine sources: an assessment of the current “state of play”. *Planta Med.*, **2016a**, 82, 775-789.
- Newman D.J., Cragg G.M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.*, **2016b**, 79, 629-661.
- Newman J.D., Cragg M.G. Current status of marine-derived compounds as warheads in anti-tumor drug candidates. *Mar. Drugs*, **2017**, 15, 99.
- Nils B., Wilfried A.K. The role of germacrene D as a precursor in sesquiterpene biosynthesis: investigations of acid catalyzed, photochemically and thermally induced rearrangements. *Phytochemistry*, **2000**, 55, 141-168.
- Patrick R., Thomas S. and Jeroen S.D. Mechanistic investigations on six bacterial terpene cyclases. *Beilstein J. Org. Chem.*, **2016**, 12, 1839–1850.
- Peckenik J. A. Biology of the invertebrates. *Ed. Kemp M.J.*, WCB, USA, **1996**.
- Rama Rao M, Sridevi K.V., Venkatesham U., Prabhaker Rao T., Lee S.S. and Venkateswarlu Y. Four new sesquiterpenoids from the soft coral *Nephthea chabrollii*. *J. Chem. Res.*, **2000**, 245-247.
- Ramesh P., Venkateswarlu Y. Unusual terpenoid constituents of the soft coral *Sinularia dissecta*. *J. Chem. Res.*, **2000**, 48-50.
- Rangel M., Falkenberg M. An overview of the marine natural products in clinical trials and on the market. *J. Coast. Life Med.*, **2015**, 3, 421-428.
- Reddy M.V.R., Lakshman, S., Rao A.V.R., Venkateswarlu, Y., Rao, J.V. A new diterpene from the soft coral *Sinularia dissecta*. *J.Nat. Prod.*, **1993**, 56, 6, 970–972.
- Rezzi S., Bighelli A., Castola V., Casanova J. Direct identification and quantitative determination of acidic and neutral diterpenes using ¹³C-NMR

- spectroscopy. Application to the analysis of oleoresin of *Pinus nigra*. *Appl. Spectroscopy*, **2002**, 56, 3.
- Rodriguez I.I., Shi Y., Garcia O.J., Rodriguez A.D., Mayer A.M.S., Sanchez J.A., Ortega-Barria E., Gonzalez J. New pseudo-pterisins and seco-pseudo-pterisins diterpene glycosides from two Colombian isolates of *Pseudo-pterisorgia elisabethae* and their biological activities. *J. Nat. Prod.*, **2004**, 67, 1672-1680.
 - Roussis V., Zhongde W., Fenical W. New anti-inflammatory pseudo-pterisins from the marine octocoral *Pseudo-pterisorgia elisabethae*. *J. Org. Chem.*, **1990**, 55, 16, 4916-4922.
 - Ruppert E.E., Fox R.S., Barnes R.D. Invertebrate Zoology, 7th edition. *Cengage Learning.*, **2004**, 132-148.
 - Sata N.U., Sugano M., Matsunaga S., Fusetani N. Sinularamide: An H,K –ATPase inhibitor from a soft coral *Sinularia* sp.. *Tetrahedron Lett.*, **1999**, 40, 4, 719–722.
 - Sato A., Fenical W., Qi-tai Z., Clardy J. Norcembrene diterpenoids from Pacific soft corals of the genus *Sinularia* (Alcyonacea; Octocorallia). *Tetrahedron*, **1985**, 41, 4304-4308.
 - Sheu, J.H., Chang, K.C., Duh, C.Y. Cytotoxic 5-,8- epi dioxy sterol from a soft coral *Sinularia* species. *J. Nat. Prod.*, **2000**, 63, 1, 149–151.
 - Sheu J.H., Chang K.C., Sung P.J., Duh C.Y., Shen Y.C. Chemical constituents from a Formosan soft coral *Sinularia* species. *J. Chin. Chem. Soc.*, **1999**, 46, 2, 253–257.
 - Squires D.F. Deep sea corals collected by the Lamont Geological Observatory 1. Atlantic corals. *Am. Museum Novit.*, **1965**, 1–42.
 - Subrahmanyam, C., Kulatheeswaran, R. Bioactive compound from a new species of *Sinularia* soft coral (showing antibacterial activities) have been isolated from *Sinularia* species. *Ind. J. Chem. B*, **1999**, 38, 12, 1388–1390.
 - Tardent P. The Cnidarian cnidocyte, a high-tech cellular weaponry. *BioEssays*, **1995**, 17, 4, 351-362.
 - Su J.H., Chiang M.Y., Wen Z.H., Dai C.F., Hsu C.H., Sheu J.H. Sesquiterpenoids from the Formosan soft coral *Sinularia leptoclados*. *Chem. Pharm. Bull.*, **2010**, 58, 250–253.
 - Su, J., Yu X., Zeng, L., Mak T.C.W. Novel polyhydroxylated sterols from the

- soft coral *Sinularia numerosa*. *J. Nat. Prod.*, **1989**, 52, 5, 934–940.
- Tillekeratne L.M.V., Liyanage G.K., Ratnasooriya W.D., Ksebati M.B., Schmitz F.J. A new spermatostatic glycoside from the soft coral *Sinularia crispera*. *J. Nat. Prod.*, **1989**, 52, 5, 1143–1145.
 - Tursch B., Braekman J.C., Daloz D., Herin M., Karlsson R., Losman D. Chemical studies of marine invertebrates XI. Sinulariolide, a new cembranolide diterpene from the soft coral *Sinularia flexibilis*. *Tetrahedron Lett.*, **1975**, 31, 2, 129–133.
 - Weinheimer A.J., Matson A.J., Hossain M.B., Van der Helm, D. Marine anticancer agent: Sinularin and dihydrosinularin, new cembranolides from the soft coral *Sinularia flexibilis*. *Tetrahedron Lett.*, **1977**, 34, 2923–2926.
 - Yoshikazu T., Takane F., Hajime K. and Kunio K. Cembrene, from Japanese domestic tobacco *Nicotiana Tabacum* cv. Suifu. *Agr. Biol. Chem.*, **1980**, 44, 2, 467-468.
 - Yoshijiro N., Yohko S., Masumi K. (nee Ohtsuka), Kikuko T. (nee Mikoshiba), Yoshiteru I. and Juno S. Terpenoids of *Alisma Orientale* rhizome and the crude drug *alismaticum*. *Phytochemistry*, **1994**, 36, 119-12.
 - Αποστολοπούλου Μ., Θεσσαλού Μ., Κουσουλάκος Α., Λεγάκις Α., Νικολαΐδου Α., Γενικές Έννοιες Ζωολογίας-Ζωολογία Ασπόνδυλων. Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα **1996**.
 - Γεωργιάδης Θ. Συστηματική Βοτανική. Εκδόσεις Πανεπιστημίου Πατρών, **1994**.
 - Ιωάννου Ε. Σημειώσεις για το μάθημα: Θαλάσσια Φαρμακογνωσία, ΜΔΕ Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων. ΕΚΠΑ Αθήνα, **2018**.
 - Ρούσσης Β. Φαρμακογνωσία Ι, Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων. ΕΚΠΑ Αθήνα, **2017**.