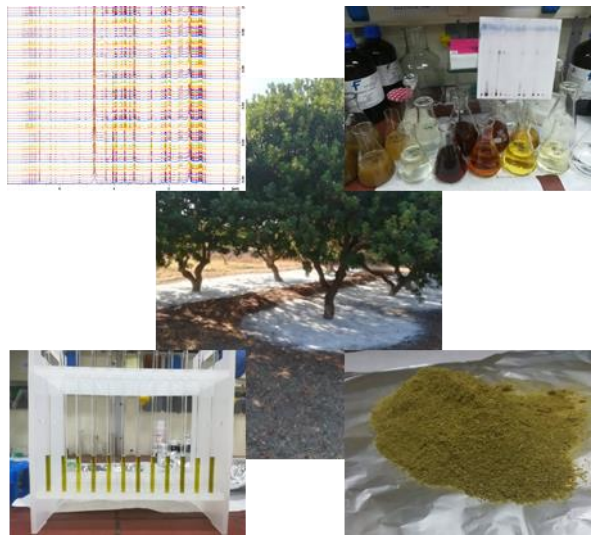
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν Πανεπιστήμιον Αθηνών

Τμήμα Φαρμακευτικής
Τομέας Φαρμακογνωσίας και
Χημείας Φυσικών Προϊόντων

«Φυτοχημική μελέτη των φύλλων της μαστίχας Χίου (*Pistacia lentiscus* L.-Anacardiaceae)- Μεταβολομική μελέτη»



Χριστόδουλος Αναγνώστου

Χημικός

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης

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

ΑΘΗΝΑ 2020

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν Πανεπιστήμιον Αθηνών

Τμήμα Φαρμακευτικής
Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων

«Φυτοχημική μελέτη των φύλλων της μαστίχας Χίου (*Pistacia lentiscus* L.-Anacardiaceae)- Μεταβολομική μελέτη»

Χριστόδουλος Αναγνώστου

Χημικός

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- Αλέξιος-Λέανδρος Σκαλτσούνης
  Καθηγητής Φαρμακευτικής
- Σοφία Μητάκου
  Καθηγήτρια Φαρμακευτικής
- Μαρία Χαλαμπαλάκη
  Επίκουρη Καθηγήτρια Φαρμακευτικής

ΑΘΗΝΑ 2020

Ευχαριστίες

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά:

- Τα μέλη της τριμελούς επιτροπής της μεταπτυχιακής εργασίας, τον Καθηγητή και Πρόεδρο του Τμήματος Φαρμακευτικής καθηγητή κ. Αλέξιο-Λέανδρο Σκαλτσούνη, την Καθηγήτρια και Διευθύντρια του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων κα. Σοφία Μητάκου και την Επίκουρη Καθηγήτρια κα. Μαρία Χαλαμπαλάκη για τον πολύτιμο χρόνο που διέθεσαν και την τιμή που μου έκαναν να συμμετάσχουν στην εξεταστική επιτροπή της διπλωματικής μου εργασίας.
- Τον Πρόεδρο του Τμήματος Φαρμακευτικής καθηγητή κ. Αλέξιο-Λέανδρο Σκαλτσούνη που με δέχτηκε στο εργαστήριο
- Την Επίκουρη Καθηγήτρια της Φαρμακευτικής κα. Μαρία Χαλαμπαλάκη και επιβλέπουσα της εργασίας για την ανάθεση του θέματος, για την συνεχή και αποτελεσματική βοήθεια της καθ' όλη τη διάρκεια της προσπάθειας αυτής, τις πολύτιμες συμβουλές της, τις γνώσεις που μου μετέδωσε σε θέματα ανάλυσης φυσικών προϊόντων και μεταβολομικής ανάλυσης, την υπομονή της και το χιούμορ της που δημιουργούν ένα θετικό κλίμα όπου και να βρίσκεται.
- Την μετα-Διδάκτορα κα. Αναστασία Παπαχρήστου για το αμέριστο ενδιαφέρον της για την ολοκλήρωση της εργασίας, την μετάδοση πολύτιμων γνώσεων σχετικά με ζητήματα μεταβολομικής ανάλυσης, την συμβολή της στην συγγραφή του τελικού κειμένου και στην παρουσίαση της εργασίας, για την ατελείωτη υπομονή και ενδιαφέρον της κατά τη διάρκεια των πειραματικών διεργασιών κυρίως όμως για την υπεροχή συνεργασία που με έκανε κάθε στιγμή να νιώθω άνετα.
- Την υποψήφια Διδάκτορα κα. Βασιλίνα Πάχη για την αρχική μας συνεργασία, τις επιστημονικές γνώσεις που μου μετέδωσε σχετικά με τις αναλυτικές τεχνικές, για το συνεχές ενδιαφέρον που έδειξε για την πορεία

της εργασίας μου αλλά και για το ασταμάτητο της ενδιαφέρον για την απόκτηση νέων γνώσεων που μου κόλλησε και την ευχαριστώ θερμά για αυτό.

- Τον υποψήφιο Διδάκτορα κ. Σταυρο Μπετεινάκη για την πολύτιμη βοήθειά του κατά την πραγματοποίηση πειραμάτων φασματοσκοπίας NMR μέσα στα πλαίσια της μεταβολομικής μελέτης που πραγματοποιήθηκε, και τις αξιόλογες παρατηρήσεις του σχετικά με τις μεθόδους πολυπαραμετρικής ανάλυσης δεδομένων.
- Την Διδάκτορα κα. Θεοδώρα Νίκου για την πολύτιμη βοήθειά της κατά την επεξεργασία των φασμάτων LC-MS στα πλαίσια της μεταβολομικής μελέτης.
- Τον καθηγητή του τομέα της Βιολογίας Γεώργιο Δαλιανά καθώς και τις υποψήφιες Διδάκτορες Μαριάντζελα Διονυσοπούλου και Σοφία Δήμου για την διεξαγωγή των βιολογικών πειραμάτων.
- Τον καθηγητή του Τομέα Χημείας Θωμά Μαυρομούστακο που με κατεύθυνε προς τον Τομέα της Φαρμακογνωσίας και σε αυτό το εργαστήριο.
- Την μητέρα μου κα. Ιουλία Γαΐλα για την πρώτη ύλη που μου παρείχε.
- Όλη την ερευνητική ομάδα του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων του Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, για τη όμορφη συνεργασία και το φιλικό κλίμα.
- Τους υποψήφιους Διδάκτορες Πέτρο, Δημήτρη, Μαριλένα, Σταύρο, Έλενα, Μόνικα και Αναστασία που ήταν πάντα πρόθυμοι να απαντήσουν κάθε ερώτηση που είχα και να με βοηθήσουν όταν τους χρειαζόμουν
- Τα μέλη του εργαστηρίου και φίλους μου Σπύρο, Βαρβάρα, Ειρήνη, Παναγιώτη, Πέτρο, Πέννυ, Ανδριάννα, Γκάμπι και Εβίνα για την συμπαράστασή τους, το ενδιαφέρον τους και τις ωραίες στιγμές εντός και εκτός εργαστηρίου.
- Τέλος, ευχαριστώ τους φίλους μου, τους γονείς μου και τα αδέρφια μου για την συμπαράσταση και για την στήριξη σε κάθε βήμα που αποφασίζω να κάνω.

Περιεχόμενα

ΣΤΟΧΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ 1

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 *PISTACIA LENTISCUS* L. CV. CHIA 5

1.1 ΤΟ ΔΕΝΤΡΟ ΤΗΣ ΜΑΣΤΙΧΑΣ 5

1.1.1 ΒΟΤΑΝΙΚΗ ΚΑΙ ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΙΣΗ 5

1.1.2 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ 10

1.1.3 ΦΥΤΟΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΑΣ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ *PISTACIA* 12

1.1.4 ΦΥΛΛΑ ΤΟΥ *PISTACIA LENTISCUS* L. 13

1.1.4.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΣΤΟ *PISTACIA LENTISCUS* L. . 14

1.1.4.2 ΠΑΡΑΔΟΣΙΑΚΕΣ ΧΡΗΣΕΙΣ 46

1.1.4.3 ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ 46

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ 47

2.1 ΧΡΗΣΙΜΟΙ ΟΡΟΙ 47

2.2 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ 48

2.3 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΦΟΡΑ 50

2.4 ΦΥΤΟΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ (PLANT METABOLOMICS) 52

2.5 ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΣΤΟ ΓΕΝΟΣ *PISTACIA* 53

2.6 ΑΛΓΟΡΙΘΜΟΙ ΚΑΙ ΕΡΓΑΛΕΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΡΟΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ 53

2.7 ΠΟΛΥΠΑΡΑΜΕΤΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ 56

2.7.1 ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΥΡΙΩΝ ΣΥΝΙΣΤΩΣΩΝ (PRISCIPAL COMPONENT ANALYSIS - PCA) 57

2.7.2 ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕΡΙΚΩΝ ΕΛΑΧΙΣΤΩΝ ΤΕΤΡΑΓΩΝΩΝ (PARTIAL LEAST SQUARES DISCRIMINANT ANALYSIS- PLS-DA) ΚΑΙ ΟΡΘΟΓΩΝΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΡΙΤΩΝ ΜΕΤΑΒΛΗΤΩΝ ΜΕΡΙΚΩΝ ΕΛΑΧΙΣΤΩΝ ΤΕΤΡΑΓΩΝΩΝ (ORTHOGONAL PARTIAL LEAST SQUARES DISCRIMINANT ANALYSIS - OPLSDA) 59

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ 63

3.1 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ 63

3.2 ΥΛΙΚΑ 64

3.3 ΛΟΓΙΣΜΙΚΑ 64

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ.....65

4.1 ΣΥΛΛΟΓΗ ΤΗΣ ΔΡΟΓΗΣ.....65

4.2 ΑΡΧΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΗΣ ΔΡΟΓΗΣ.....65

4.2.1 ΞΗΡΑΝΣΗ ΤΗΣ ΔΡΟΓΗΣ.....65

4.2.2 ΚΟΝΙΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΤΗΣ ΔΡΟΓΗΣ.....65

4.2.3 ΑΡΧΙΚΟΙ ΕΛΕΓΧΟΙ ΓΙΑ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ 66

4.2.3.1 ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΜΕ TLC, HPLC-DAD και NMR.....67

4.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ.....72

4.3.1 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΚΟΝΙΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΦΥΛΛΩΝ 73

4.3.2 ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΤΩΝ ΣΑΚΧΑΡΩΝ.....74

4.3.3 ΚΛΑΣΜΑΤΩΣΗ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΑΝΟΙΧΤΗΣ ΣΤΗΛΗΣ ΥΠΟ ΚΕΝΟ.....76

4.3.4 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ 77

4.3.4 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ 80

4.4 ΕΛΕΓΧΟΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ 124

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ 126

5.1 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ (NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE - NMR) 126

5.2 ΕΠΙΛΟΓΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΒΑΣΙΣΜΕΝΗ ΣΤΟ NMR.....132

5.3 ΧΗΜΕΙΟΜΕΤΡΙΑ - ΠΟΛΥΠΑΡΑΜΕΤΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ .140

5.3.1 ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΕΚΥΨΑΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ NMR.....140

5.3.2 ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΥΡΙΩΝ ΣΥΝΙΣΤΩΣΩΝ (PRINCIPAL COMPONENTS ANALYSIS-PCA).....141

5.3.3 ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕΡΙΚΩΝ ΕΛΑΧΙΣΤΩΝ ΤΕΤΡΑΓΩΝΩΝ (PARTIAL LEAST SQUARES DISCRIMINANT ANALYSIS- PLS-DA).....144

5.3.4 ΟΡΘΟΓΩΝΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΡΙΤΩΝ ΜΕΤΑΒΛΗΤΩΝ ΜΕΡΙΚΩΝ ΕΛΑΧΙΣΤΩΝ ΤΕΤΡΑΓΩΝΩΝ (ORTHOGONAL PARTIAL LEAST SQUARES DISCRIMINANT ANALYSIS- OPLS-DA) 151

5.4 ΑΠΟΔΟΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΣΕ ΣΥΝΘΕΤΑ ΜΙΓΜΑΤΑ (DEREPLICATION) ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ NMR 154

5.5 ΑΠΟΔΟΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΣΕ ΣΥΝΘΕΤΑ ΜΙΓΜΑΤΑ (DEREPLICATION) ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ LC-MS 156

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ/ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ 159

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 163

Περιεχόμενα

ΣΤΟΧΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο στόχος της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας κινήθηκε πάνω σε δύο παράλληλους άξονες.

Ως πρώτο στόχο τέθηκε η απομόνωση και η ταυτοποίηση των δευτερογενών μεταβολιτών των φύλλων του δέντρου της μαστίχας, *Pistacia lentiscus* L. της οικογένειας Anacardiaceae, το οποίο φύεται στο νότιο τμήμα του νησιού της Χίου, στα γνωστά σε όλους μας "Μαστιχοχώρια". Παρά τη μακρά ιστορία και την εθνοφαρμακολογική σημασία του, τα φύλλα του μαστιχόδενδρου, έχουν ελάχιστα μελετηθεί φυτοχημικά ενώ ακόμα πιο περιορισμένες είναι οι μελέτες για τις βιολογικές ιδιότητες των δευτερογενών μεταβολιτών τους. Η αξιολόγηση την αντιμυκητιασικής δράσης τόσο των ολικών εκχυλισμάτων αλλά και συγκεκριμένων απομονωμένων καθαρών ουσιών συμπεριλήφθηκε στους στόχους της εργασίας.

Δεύτερο στόχο αποτέλεσε η ανάπτυξη και εφαρμογή σύγχρονων προσεγγίσεων με τη χρήση αναλυτικών τεχνικών Πυρηνικού και Μαγνητικού Συντονισμού-NMR και Υγρής Χρωματογραφίας συνδεδεμένης με Φασματόμετρο Μάζας Υψηλής Διακριτικής Ικανότητας-LC-HRMS για την καταγραφή του μεταβολικού αποτυπώματος των εκχυλισμάτων των φύλλων της μαστίχας. Αναλυτικότερα, επιχειρήθηκε μη στοχευμένη μεταβολομική μελέτη (NMR-based metabolic profiling) για την ανάδειξη διαφοροποιήσεων και μορίων-δεικτών μεταξύ διαφορετικών συλλογών με άλλη γεωγραφική προέλευση, περίοδο συλλογής και ηλικίας του φύλλου και του μαστιχόδενδρου. Επιπρόσθετα, έγινε προσπάθεια χαρακτηρισμού του μεταβολώματος των φύλλων με τη μεθοδολογία dereplication (ταυτοποίηση γνωστών μορίων σε πολύπλοκα μίγματα) με τη τεχνική LC-HRMS. Συνδυαστική μελέτη τέτοιου τύπου δεν έχει αναφερθεί στο παρελθόν σε κανένα είδος του γένους *Pistacia.* Τέλος, συμπληρωματικό στόχο αποτέλεσε η χρήση στατιστικών εργαλείων στα δεδομένα NMR προκειμένου να διευκολυνθεί η ταυτοποίηση των μορίων-δεικτών και συγκεκριμένα της μεθόδου STOCSY (Statistical Total Correlation Spectroscopy).

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1
PISTACIA LENTISCUS L. CV. CHIA

1.1 ΤΟ ΔΕΝΤΡΟ ΤΗΣ ΜΑΣΤΙΧΑΣ

1.1.1 ΒΟΤΑΝΙΚΗ ΚΑΙ ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΙΣΗ

Το δέντρο της μαστίχας ή αλλιώς μαστιχόδεντρο ή σχίνος με επιστημονική ονομασία *Pistacia lentiscus* L. cv. Chia ανήκει στο γένος *Pistacia* της οικογένειας Anacardiaceae και συμπεριλαμβάνει κυρίως φυτά με διατροφική, ιατρική και καλλωπιστική αξία[1]. Ο Λιναίος ήταν ο πρώτος που το κατέταξε συστηματικά με την ονομασία *Pistacia lentiscus* L. Συγκεκριμένα η ονομασία *Pistacia* προέρχεται από το ουσιαστικό πίσσα (του δέντρου, δηλαδή κολλώδης) και το ρήμα ακέομαι (θεραπεύω) ενώ η ονομασία του είδους *lentiscus* από το λατινικό lentus (κολλώδης)

Εικόνα 1: *Pistacia lentiscus cv. Chia (22/08/2019)*

Το γένος *Pistacia* χαρακτηρίζεται από διοϊκό αναπαραγωγικό σύστημα (έχει αρσενικά και θηλυκά άνθη) και από τον ομοιοχλαμιδικό περίανθο των ανθεών του. Ο περίανθος μέσα και έξω δεν διαφοροποιείται σε κάλυκα και στεφάνη άνθους[2]. Συμφώνα με τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους, ο Zohary (1952) χώρισε το γένος *Pistacia* σε τέσσερα τμήματα (sections): το *lentiscella* (New World species - είδη που εκφύονται στην Αμερική), το *lentiscus* (τα αειθαλή φυτά), το *butmela* (*P. atlantica Desf.)* και το *terebinthus* (*P. chinensis* Bunge*, P. khinjuk* Stocks*, P. Palaestina* Boiss*.* και *P. vera L.).*

Μία ακόμα διαίρεση του γένους έχει γίνει από τους Kafkas και Perl-Treves (2002)[3] που χώρισαν το γένος σε δέντρα με κορμό (*P. atlantica, P. eurycarpa, P. integerrima, P. khinjuk* και *P. vera*) και θάμνους/μικρά δέντρα (*P. lentiscus, P. mexicana, P. palaestina, P. texana* και *P. terebinthus*) ισχυριζόμενοι ότι αυτή η μορφολογική ταξινόμηση υποστηρίζεται από την DNA-ανάλυση. Μέχρι σήμερα έχουν πραγματοποιηθεί κι άλλες προσπάθειες για την ταξινόμηση του είδους *Pistacia* που βασίζονται σε μελέτες κυρίως ριβωσομικού DNA[4], καθώς και μελέτες που σχετίζονται με τα αφιδοειδή (Ημίπτερα - Fordinae), παράσιτα του φυτού[5].

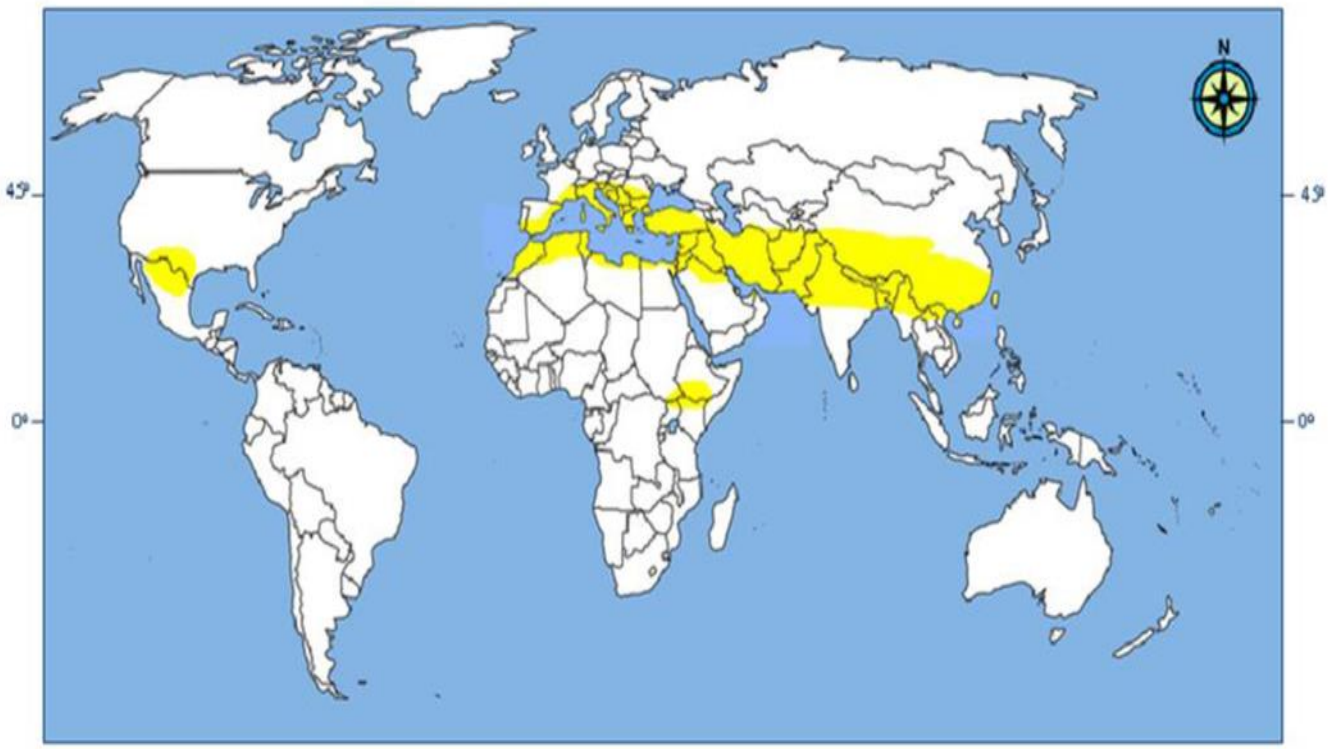
Σήμερα, το γένος *Pistacia* έχει γύρω στα 20 είδη και υποείδη με πιο διαδεδομένα να είναι τα εξής:

1| *Pistacia aethiopica* Kokwaro
2| *Pistacia atlantica* Desf.
Pistacia atlantica subsp. Atlantica
Pistacia atlantica subsp. cabulica (Stocks) Rech. f.
Pistacia atlantica subsp. mutica (Fisch. & C. A. Mey.) Rech. f.
3| *Pistacia chinensis* Bunge
Άλλες ονομασίες: *Pistacia chinensis* subsp. Chinensis ή *Pistacia philippinensis* Merr. & Rolfe
4| *Pistacia eurycarpa* Yalt
Άλλες ονομασίες: *Pistacia atlantica* subsp. kurdica (Zohary) Rech. F. ή *Pistacia atlantica* var. kurdica Zohary
5| *Pistacia integerrima* J. Stewart
Άλλες ονομασίες: *Pistacia chinensis* subsp. integerrima (J. Stewart) Rech.f.
6| *Pistacia khinjuk* Stocks
7| *Pistacia lentiscus* L.
8| *Pistacia mexicana* Kunth
9| *Pistacia x saportae* Burnat
10| *Pistacia terebinthus* L.

Pistacia terebinthus subsp. palaestina (Boiss.) Engl.
Άλλες ονομασίες: *Pistacia palaestina* Boiss. ή *Pistacia terebinthus* subsp. terebinthus

11| *Pistacia texana* Swingle
12| *Pistacia vera* L.
13| *Pistacia weinmannifolia* J. Poiss. ex Franch.
Άλλες ονομασίες: *Pistacia coccinea* Collett & Hemsl[3,6].

Τα είδη *Pistacia* συναντώνται σε μία ζώνη πάνω από τον τροπικό του καρκίνου σε γεωγραφικό πλάτος ανάμεσα στον 20°-45°Β (Βόρεια), όπως αποτυπώνεται στην **Εικόνα 2**, καθώς και σε μία περιοχή της Ανατολικής Αφρικής (είδος *P. αethiopica*).



Εικόνα 2: *Γεωγραφική εξάπλωση του γένους Pistacia[7] με κίτρινο*

Πιο συγκεκριμένα η γεωγραφική κατανομή των ειδών-υποειδών που έχουν χαρτογραφηθεί του γένους *Pistachia* φαίνονται στον ακόλουθο **Πίνακα 1**.

Πίνακας 1: *Γεωγραφική κατανομή του γένους Pistacia*

	Είδος-υποείδος	Γεωγραφική κατανομή
1	Pistacia aethiopica Kokwaro	Ανατολική Αφρική, Υεμένη
2	*Pistacia atlantica* Desf.	Βόρεια Αφρική, Κανάρια Νησιά, Δυτική Ασία, Καύκασος, Κριμαία, Βορειοανατολική Ελλάδα
	Pistacia atlantica subsp. atlantica	Βορειοδυτική Αφρική , Κανάρια Νησιά
	Pistacia atlantica subsp. cabulica	Αφγανιστάν ,Ινδική Χερσόνησο
	Pistacia atlantica subsp. mutica	Δυτική Ασία, Καύκασος, Ουκρανία, Ελλάδα
3	*Pistacia chinensis* Bunge	Κεντρική Κίνα
4	*Pistacia eurycarpa* Yalt.	Δυτική Ασία, Καύκασος
5	*Pistacia integerrima* J. Stewart	Αφγανιστάν, Ινδική Χερσόνησο;, Μιανμάρ
6	*Pistacia khinjuk* Stocks	Αίγυπτος, Μέση Ανατολή μέχρι Ινδική Χερσόνησο
7	*Pistacia lentiscus* L.	Μεσόγειος, Πορτογαλία και Κανάρια Νησιά
8	*Pistacia mexicana* Kunth	Μεξικό, Γουατεμάλα
9	*Pistacia x saportae* Burnat	Αλγερία, Μαρόκο, Κύπρος, Ισραήλ, Νοτιοανατολική Ευρώπη
10	*Pistacia terebinthus* L.	Μεσόγειο
	Pistacia terebinthus subsp. palaestina (Boiss.)Engl.	Ισραήλ, Συρία, Παλαιστίνη
11	*Pistacia texana* Swingle	ΗΠΑ (Τέξας) , Μεξικό
12	*Pistacia vera* L.	Ευρώπη, Μέση Ανατολή, Κεντρική Ασία
13	*Pistacia weinmannifolia* J. Poiss. ex Franch.	Κίνα ,Μιανμάρ

Στην Ελλάδα φύονται τα είδη *Pistacia lentiscus* L., *Pistacia atlantica* Desf. και *Pistacia terebinthus* L. Το *Pistacia lentiscus* cv. Chia Duham καλλιεργείται στη Νότια πλευρά του νησιού της Χίου και διαφέρει από το υπόλοιπο είδος *Pistacia lentiscus* L. στο γεγονός ότι με τη χάραξη του κορμού ή των κλαδιών παράγεται ρητίνη, η οποία πήζει, η γνωστή μαστίχα της Χίου[8].

Εικόνα 3: *Μαστιχοχώρια Χίου με πράσινο*

Από μελέτες του συλλόγου μαστιχοπαραγωγών Χίου δεν έχει βρεθεί καμία διαφορά του *Pistacia lentiscus* cv. Chia με το είδος *Pistacia lentiscus* L. γι' αυτό και αποδίδεται ο όρος cv. (cultivar, cultivated clone) δηλαδή καλλιεργούμενη ποικιλία[9]. Με βάση τα στοιχεία της βιβλιογραφίας στην πλειονότητα των δημοσιεύσεων χρησιμοποιείται η ονομασία *Pistacia lentiscus* var. Chia (Desf. Ex Poiret) DC (var.- variety), αλλά λόγω της έλλειψης ταξινομικής κατοχύρωσης σύμφωνα με τη μονογραφία της Ευρωπαϊκής Φαρμακογνωσίας η επιστημονικά αποδεκτή ονομασία είναι όπως και του είδους, *Pistacia lentiscus* L., χωρίς την επισήμανση variety ή cultivar.

1.1.2 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Γενικά το γένος *Pistacia* απαρτίζεται από είδη που είναι είτε μικρά δέντρα είτε θάμνοι. Σύμφωνα με τη Flora Europaea το γένος έχει τα εξής χαρακτηριστικά[10]:

- Θάμνοι ή δέντρα δικοτυλήδονα και δίοικα (αρσενικά και θηλυκά άνθη απαντώνται σε διαφορετικά δέντρα πολύ σπάνια μονόοικα από το είδος *Pistacia atlantica*[1])
- Φλοιός ρητινώδης,
- Οφθαλμοί με λέπια,
- Φύλλα πτεροειδή, σε μερικές περιπτώσεις με μόνο ένα φυλλάριο,
- Άνθη σε πλάγιες ταξιανθίες,
- Χωρίς πέταλα,
- 3-5 στήμονες

Η Χιώτικη *P. lentiscus* μορφολογικά δεν έχει χαρακτηριστικά που να τη διαφοροποιούν από τα υπόλοιπα είδη. Έτσι, η Χιώτικη *Pistacia lentiscus* έχει τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

- Θάμνος ή μικρό δένδρο με ύψος 2-3 m (μέχρι 5)
- Μη ευθύς κορμός με χρώμα ανοιχτό σταχτί όταν το φυτό είναι μικρό και σταχτόμαυρο όταν το φυτό είναι σε μεγαλύτερη ηλικία
- Φύλλα αειθαλή, πτεροειδή, με 8-12 φυλλάρια (σπανίως λιγότερα από 8), διαστάσεων 1-5 επί 0.5-1.5 cm
- Το σχήμα των φυλλαρίων είναι λογχοειδές προς ωοειδές-λογχοειδές με πρασινοκίτρινο χρώμα
- Μίσχοι άτριχοι με στενό πράσινο πτερύγιο
- Ρίζες που μεγαλώνουν μέχρι και 20 m
- Ανάπτυξη που ολοκληρώνεται στα 40 με 50 χρόνια, το προσδόκιμο ζωής είναι πάνω από 100 χρόνια
- Άνθη πολύ μικρά με κιτρινωπό ή πορφυρό χρώμα
- Καρποί ωοειδείς-σφαιροειδείς με μυτερή απόληξη γύρω στα 4 mm με κόκκινο χρώμα που μαυρίζει κατά την ωρίμανση[8,10].

Το βασικό χαρακτηριστικό της Χιώτικης *Pistacia lentiscus* όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, είναι η παραγωγή της χαρακτηριστικής ρητίνης που πήζει, της μαστίχας.

Εικόνα 4: *Εικόνα με μαστίχα που δεν έχει πήξει και που έχει πήξει*

Έχουν γίνει πολλές προσπάθειες να καλλιεργηθεί το μαστιχόδεντρο σε περιοχές διαφορετικές από τη Νότια Χίο, από τα Μαστιχοχώρια, αλλά χωρίς αποτέλεσμα. Οι προσπάθειες καλλιέργειας του δέντρου έγιναν είτε στη βόρεια Χίο, είτε σε περιοχές με παρόμοιο κλίμα και έδαφος με την Χίο, ή ακόμα έγιναν και προσπάθειες μεταφοράς του εδάφους της Χίου σε άλλες περιοχές για καλλιέργεια του δέντρου εκεί. Το αποτέλεσμα ήταν το φυτό να αναπτύσσεται κανονικά αλλά με τη χαραγή του κορμού δεν υπήρχε η εμφάνιση της χαρακτηριστικής αυτής ρητίνης.

1.1.3 ΦΥΤΟΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΑΣ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ *PISTACIA*

Διάφορα συστατικά έχουν ταυτοποιηθεί στα είδη *Pistacia* που ανήκουν στις φυτοχημικές ομάδες των μονοτερπενοειδών, σεσκιτερπενοειδών, αιθερίων ελαίων, διτερπενοειδών, τριτερπενοειδών, φαινολικών συστατικών, λιπαρών οξέων, στερολών καθώς και άλλων κατηγορών[11].

Τα μονοτερπένια αποτελούν το κύριο συστατικό του αιθερίου ελαίου του γένους *Pistacia* και συγκεκριμένα το α-πινένιο (α-pinene). Επιπλέον σύμφωνα με το είδος και το μέρος του φυτού απαντώνται διαφορετικά μονοτετρπένια με χαρακτηριστικά το λιμονένιο (limonene), το α-τερπινολενιο (α-terpinolene) και το οκιμένιο (ocimene) στα φρούτα και φύλλα του *P. vera*[12] και το (E)-*β*-οκιμένιο ((E)-*β*-Ocimene) και την τερπινεν-4-όλη (terpinen-4-ol) στα φρούτα και το *p*-κυμενιο (*p*-cymen) στους βλαστούς του *P. terebinthus*[12,13].

Σε μικρότερα ποσοστά έχουν απομονωθεί σεσκιτερπένια με χαρακτηριστικά το γερμακρένιο-D (germacrene-D) και το β-καριοφυλλένιο (β-caryophyllene) στα φύλλα των *P. lentiscus* και *P. terebinthus*[12].

Διτερπενοειδή και τριτερπενοειδή έχουν απομονωθεί από τη ρητίνη διαφόρων ειδών του γένους *Pistacia.* Εντοπίστηκαν αμπιεταδιένιο (Abietadiene) και αμπιετατριένιο (abietatriene) στο *P. vera*[14], καθώς και τετρακυκλικά τριτερπενοειδή, όπως το μαστιχαδιενονικό οξύ (masticadienonic acid), το μαστιχαδιενολικό οξύ (masticadienolic acid) και το ολεανολικό οξύ (oleanolic acid) στα *P. lentiscus*, *P. terebinthus* και *P. atlantica*[15].

Το γαλλικό οξύ (gallic acid), η κατεχίνη (catechin), η επικατεχίνη (epicatechin) και ο μεθυλεστέρας του γαλλικού οξέος (gallic acid methyl ester) έχουν βρεθεί στα *P. vera*, *P. lentiscus* και *P. atlantica*[16–18]. Παράγωγα της μυρικετίνης (myricetin) εμφανίζονται κυρίως στα φύλλα του *P. lentiscus*[17] Ανθοκυανίνες, όπως ο γλυκοσίδης της κυανιδίνης (cyanidin-3-O-glucoside) έχουν απομονωθεί από τον καρπό του *P. vera*[18].

Οι καρποί των ειδών του γένους *Pistacia* παρουσιάζουν κυρίως ελαιώδη χαρακτήρα με κύριο λιπαρό οξύ το ολεϊκό οξυ (Oleic acid) και κύρια στερόλη τη *β*-σιτοστερόλη (*β*-sitosterol) στα είδη *P. vera*, *P. atlantica*, *P. lentiscus*, και *P. terebinthus*[11].

Έχουν βρεθεί επιπλέον συστατικά, όπως τοκοφερόλες, τοκοτριενόλες ξανθίνες, χλωροφύλλες και *β*-καροτένιο (*β*-carotene) σε διάφορα είδη[11].

1.1.4 ΦΥΛΛΑ ΤΟΥ *PISTACIA LENTISCUS* L.

Στην **Εικόνα 5** ακολουθεί μία χαρακτηριστική φωτογραφία του φύλλου της *Pistacia lentiscus* L.

Εικόνα 5: *Μορφολογία του φύλλου του Pistacia lentiscus L.*

Παρατηρώντας τα φύλλα του *Pistacia lentiscus* της Χίου εμφανίζονται διαφορές και αναλόγως την περιοχή που καλλιεργείται το φυτό οι ντόπιοι έχουν χωρίσει το φυτό σε διαφορετικές ποικιλίες. Στο μουσείο της μαστίχας στη Χίο

έχει γίνει μια προσπάθεια ανασυγκρότησης αυτής της πληροφορίας.

Εικόνα 6: *Ποικιλίες και τα φύλλα της Χιώτικης Pistacia lentiscus σύμφωνα με το μουσείο της μαστίχας στη Χίο*

1.1.4.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΣΤΟ *PISTACIA LENTISCUS* L.

Έχουν γίνει διάφορες μελέτες στα φύλλα του *Pistacia lentiscus* L. για την εύρεση των δευτερογενών μεταβολιτών τους και την αξιολόγηση της βιολογικής τους δράσης με κύρια τα συστατικά του αιθερίου ελάιου. Έχουν απομονωθεί διάφορα τερπένια (μονοτερπένια, σεσκιτερπένια, διτερπένια, τριτερπένια και παράγωγά τους)[19–24] με κυρίαρχα το α-πινένιο (α-pinene), το γ-τερπινένιο (γ-terpinene), την τερπινεν-4-όλη (terpinen-4-ol), το β-καριοφυλένιο (β-caryophyllene), το γερμακρένιο D (germacrene D) και το δ-καδινένιο (δ-cadinene), καθώς και φαινολικές ουσίες (φαινόλες, παράγωγά τους, φλαβονοειδή και γλυκοσίδες τους)[11,20,25–27] με χαρακτηριστικές ουσίες το γαλλικό οξύ (gallic acid), το 5-O- γαλλοϋλο κινικό οξύ (5-O-galloyl quinic acid), την χρυσανθεμίνη (chrysanthemin), τη μυρτιλλίνη (myrtillin), τη μυρικιτρίνη (myricitrin), το γλυκουρονίδιο της μυρικετίνης (myricetin glucuronide), τον 3-O-ρουτινοσίδη της μυρικετίνης (myricetin 3-O-rutinoside) και την κερκετίνη (quercetin).

Στο αιθέριο έλαιο έχουν απομονωθεί:

Α) Μονοτερπένια και παράγωγα τους

Β) Σεσκιτερπένια και παράγωγα τους

Γ) Διτερπενια και Τριτερπένια

Δ) Άλλα συστατικά του αιθέριου ελαίου

Στα εκχυλίσματα έχουν απομονωθεί:

Ε) Απλές φαινόλες και παράγωγα τους

Ζ) Φλαβονοειδή και γλυκοσίδες τους

Η) Άλλα συστατικά των εκχυλισμάτων

Το αιθέριο έλαιο είναι ένα από τα κύρια συστατικά που απαντάτε σε διάφορα μέρη του φυτού όπως στα φύλλα, στον καρπό και στο άνθος του. Η ανάλυση των αιθέριων ελαίων βασίζεται σε τεχνικές αέριας χρωματογραφίας

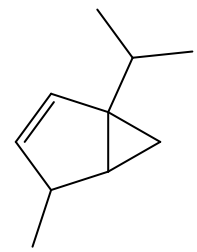
(GC) και υπάρχουν ποιοτικές και ποσοτικές διακυμάνσεις στο περιεχόμενό τους σε συστατικά που οφείλονται στον τρόπο καλλιέργειας, στα γεωγραφικά χαρακτηριστικά ,στις κλιματικές συνθήκες κ.α.

Α) Μονοτερπένια και παράγωγα τους

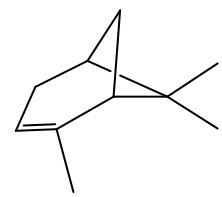
Τα τερπένια είναι η μεγαλύτερη ομάδα φυτικών φυσικών προϊόντων με παραπάνω από 30.000 μεταβολίτες[28]. Τα μονοτερπένια αποτελούνται από δύο ομάδες ισοπρενίου και έχουν μοριακό τύπο $C_{10}H_{16}$. Βρίσκονται σε διάφορα μέρη των φυτών (φλοιό, καρπό, φύλλα, άνθος) και συνήθως έχουν μοναδική οσμή. Χαρακτηρίζονται για τη δράση τους ως αλλοχημικά[29].

Μονοτερπένια

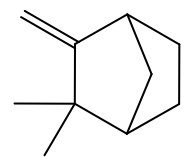
α-thujene



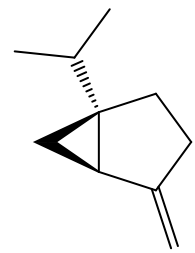
α-pinene



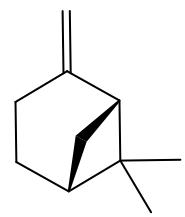
camphene



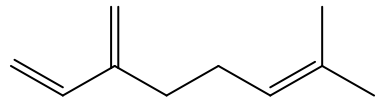
sabinene



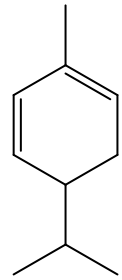
β-pinene



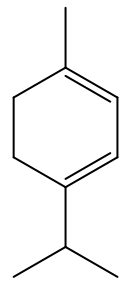
β-myrcene



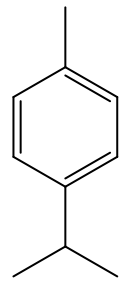
α-phellandrene



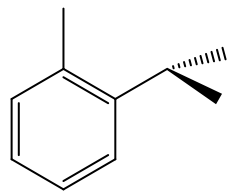
α-terpinene



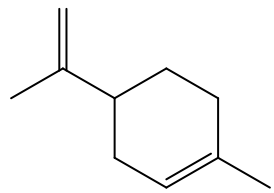
p-Cymene



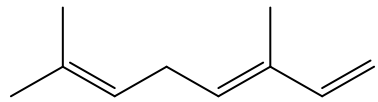
o-cymene



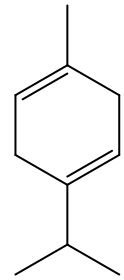
α-limonene



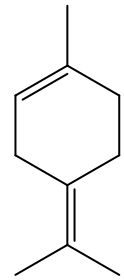
β-ocimene(trans-β-Ocimene)



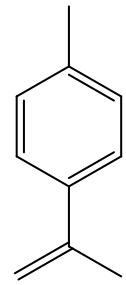
γ-terpinene



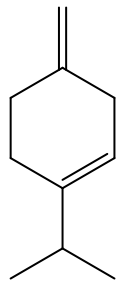
α-terpinolene



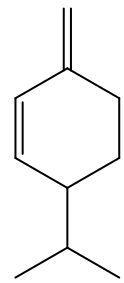
p-Cymenene



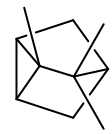
β-Terpinene



β-Phellandrene

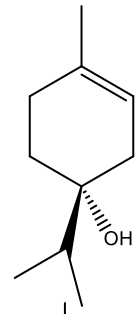


Tricyclene

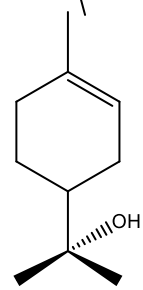


Αλκοόλες μονοτερπενίων

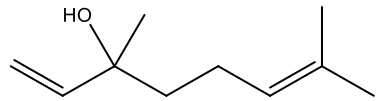
α-terpinen-4-ol



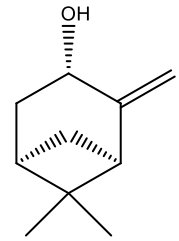
α-terpineol



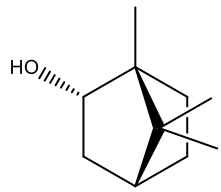
Linalool



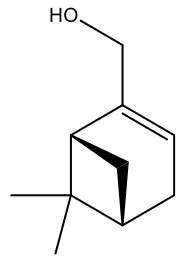
Pinocarveol



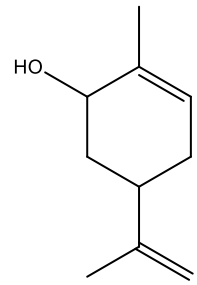
Borneol



Myrtenol

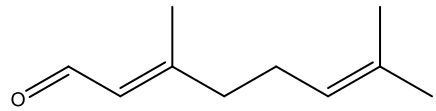


(Z)-Carveol



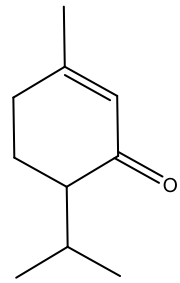
Αλδεΰδες μονοτερπενίων

Geranial or Citral

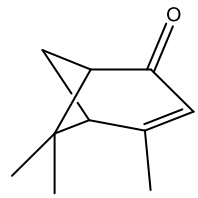


Κετόνες μονοτερπενίων

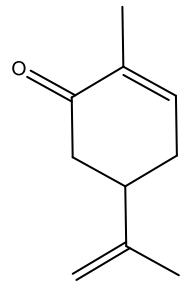
1-p-Menthen-3-one



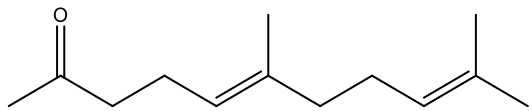
Verbenone



Carvone

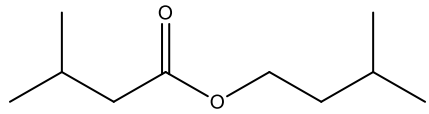


Geranyl acetone



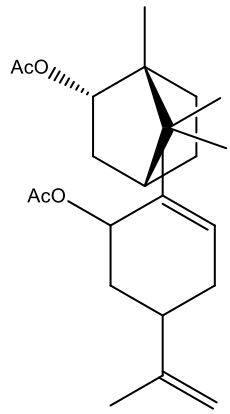
Εστέρες <u>μονοτερπενίων</u>

<u>Isoamyl isovalerate</u>



<u>Bornyl acetate</u>

<u>(Z)-Carvyl acetate</u>

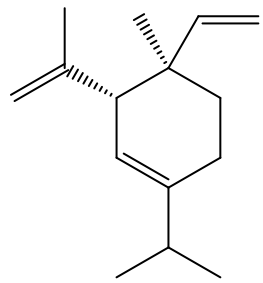


Β) Σεσκιτερπένια και παράγωγα τους

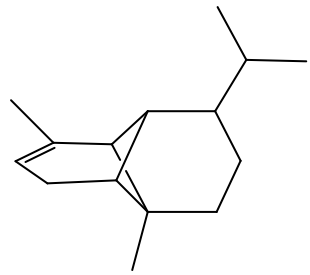
Τα σεσκιτερπένια αποτελούνται από τρεις ομάδες ισοπρενίου και έχουν συνήθως μοριακό τύπο $C_{15}H_{24}$. Βρίσκονται σε φυτά, αλλά και σε έντομα και χαρακτηρίζονται από τη σημειοχημική τους δράση (προστατευτική ή ως φερορμόνη) όμως συνήθως βρίσκονται σε μικρές ποσότητες και απομονώνονται σε ίχνη[30]. Έχουν διάφορες εφαρμογές στην ιατρική, σε σαπούνια και σε αρώματα.

Σεσκιτερπένια

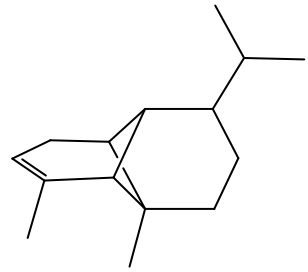
<u>δ-Elemene</u>



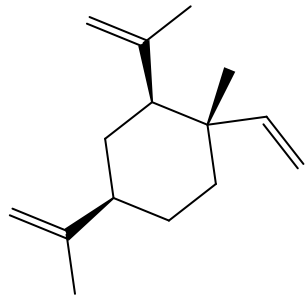
<u>α-Ylangene</u>



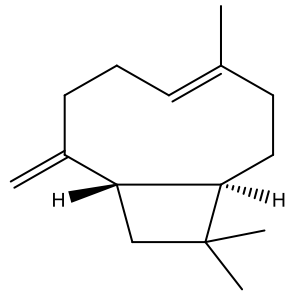
α-copaene



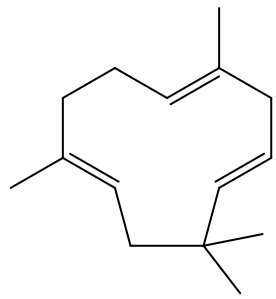
β-elemene



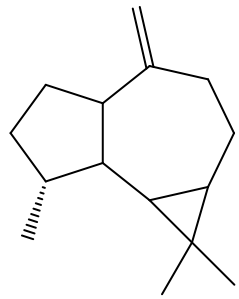
β-caryophyllene



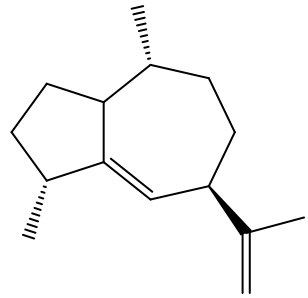
α-caryophyllene



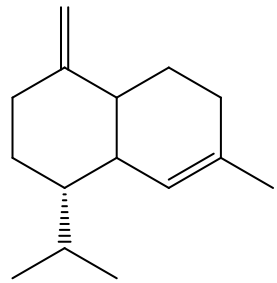
Allo-Aromadendrene



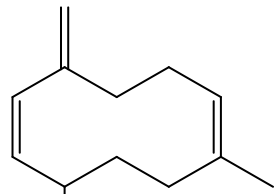
γ-Gurjunene



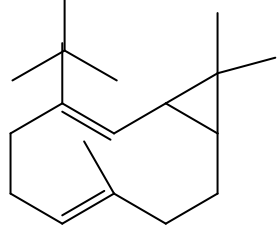
γ-muurolene



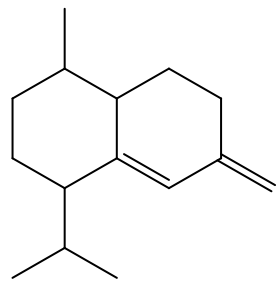
germcrene-D



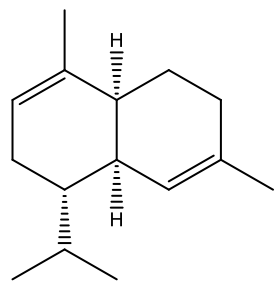
bicyclogermcrene



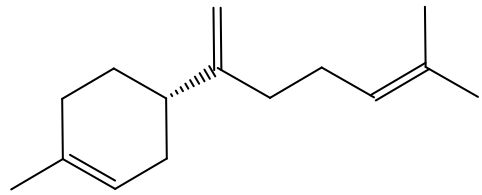
5-Muuroladiene



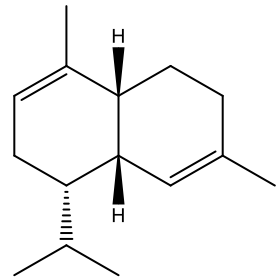
α-muurolene



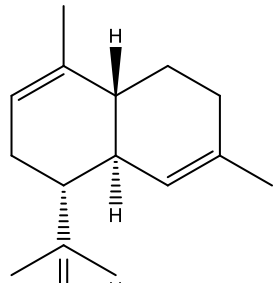
β-bisabolene



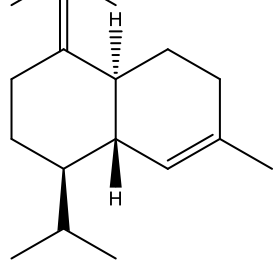
α-amorphene



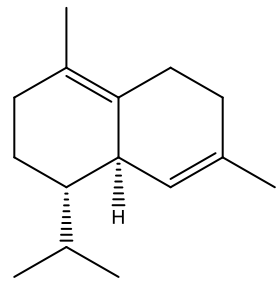
α-Cadinene



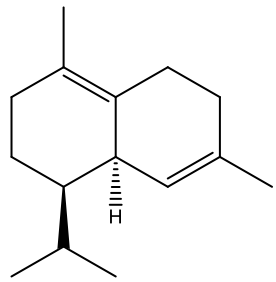
γ-Cadinene



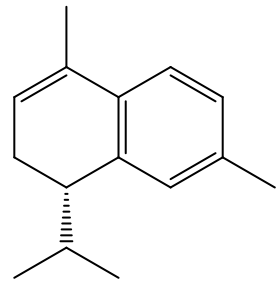
δ-cadinene



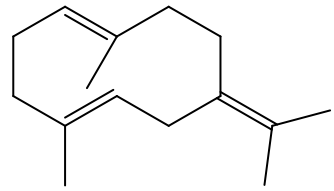
δ-Amorphene



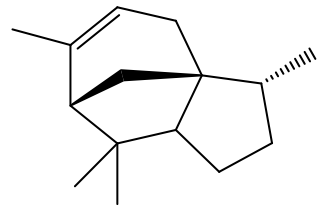
α-calacorene



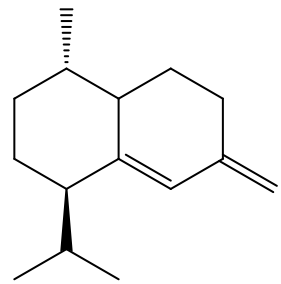
germcrene-B



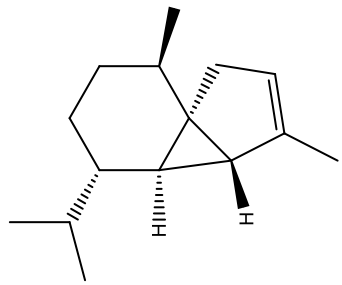
α-cedrene



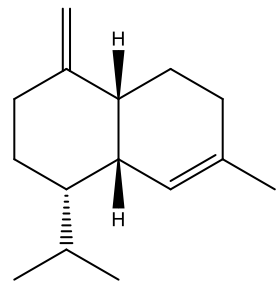
trans-muurola-4(14),5- diene



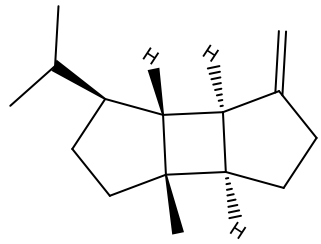
α-Cubebene



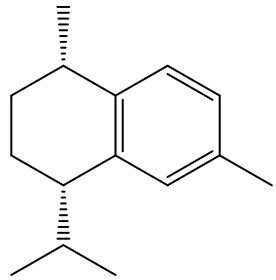
γ-Amorphene



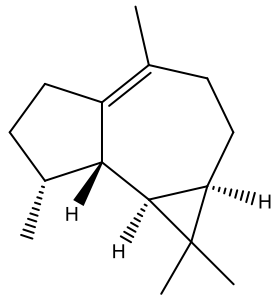
β-Bourbonene



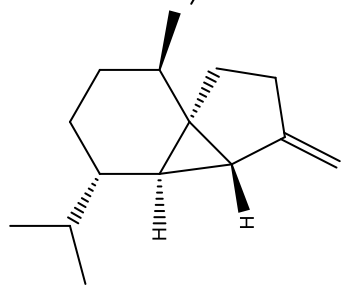
cis-Calamenene



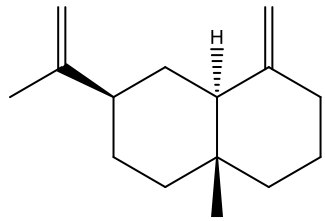
Viridiflorene or Ledene



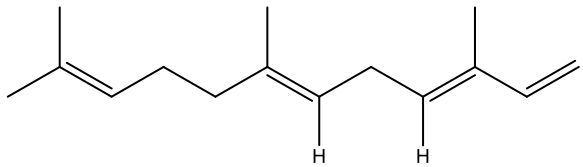
b-Cubebene



b-Selinene

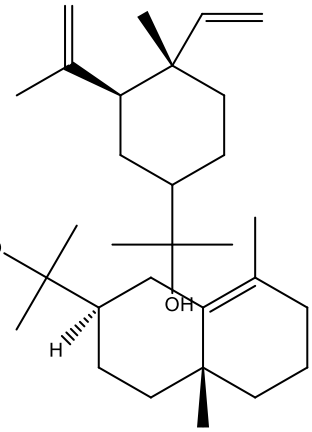


E, E-Farnesene



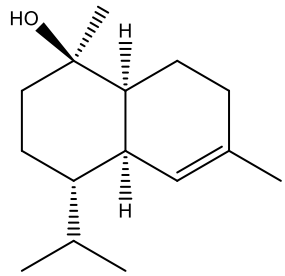
Αλκοόλες Σεσκιτερπενίων

elemol

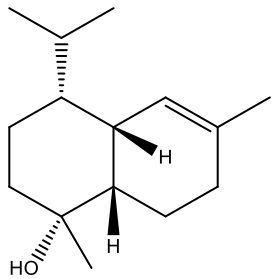


γ-eudesmol

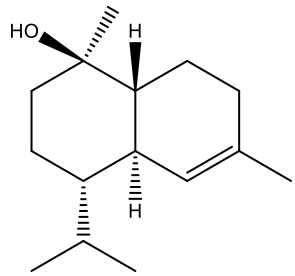
δ-cadinol



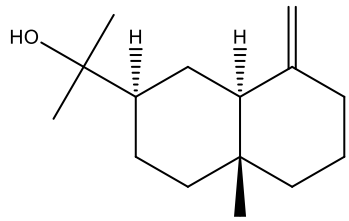
α-Muurolol



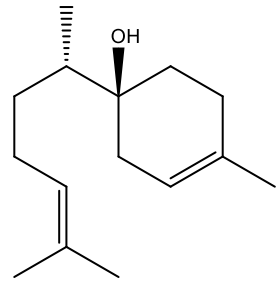
α-cadinol



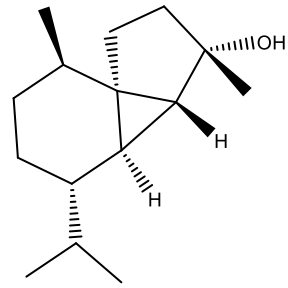
β-eudesmol



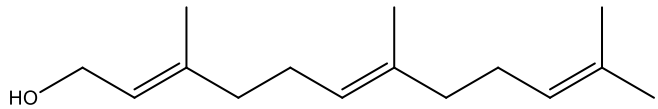
α-bisabolol



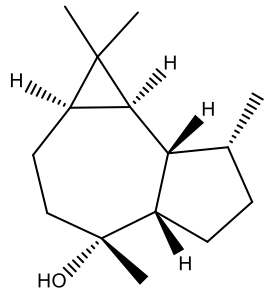
Cubebol



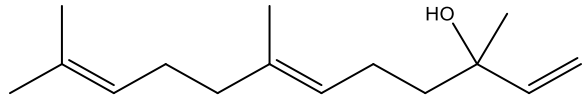
Farnesol



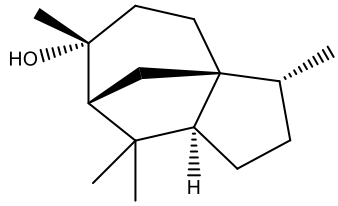
Ledol



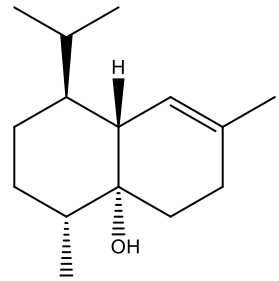
Nerolidol



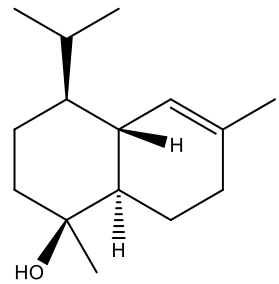
Cedrol



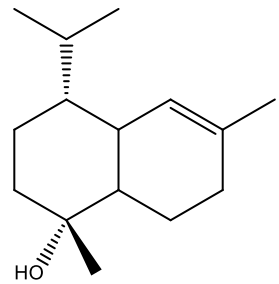
Cubenol



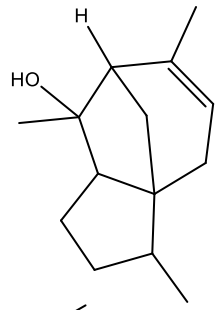
Cedrelanol



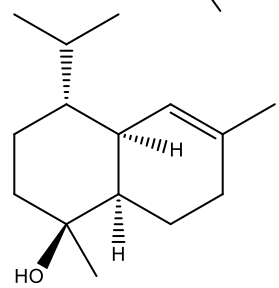
epi-α-Cadinol



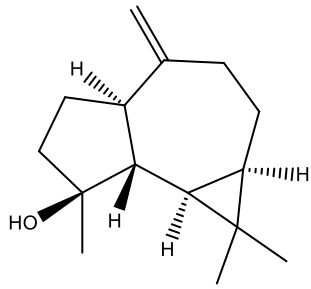
8-Cedren-13-ol



Torreyol

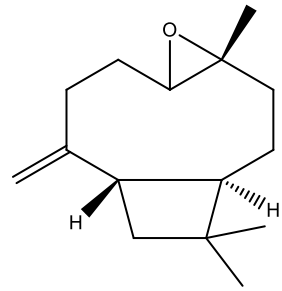


Spathulenol

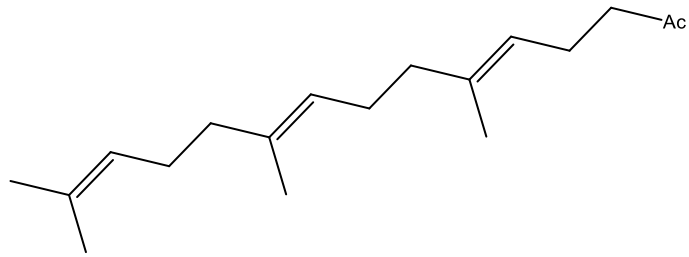


Άλλα παράγωγα σεσκιτερπενίων

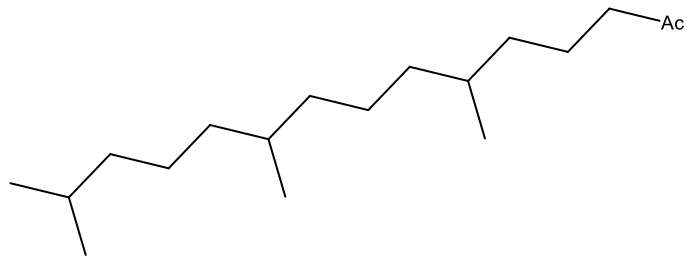
Caryophyllene oxide



Farnesyl acetone



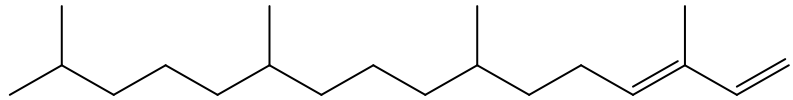
Hexahydro farnesyl acetone



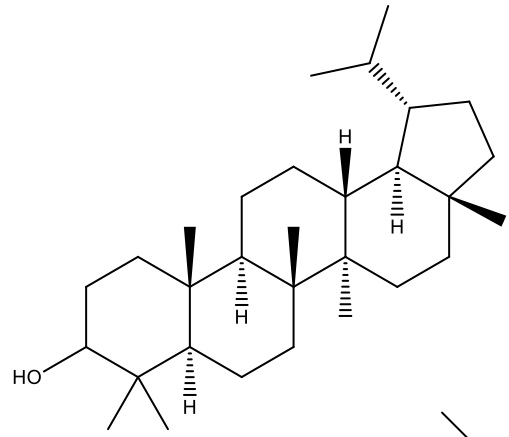
Γ) Διτερπένια και Τριτερπένια

Τα διτερπένια αποτελούνται από τέσσερις ομάδες ισοπρενίου και έχουν συνήθως μοριακό τύπο $C_{20}H_{32}$. Αποτελούν τη βάση σε διάφορα συστατικά, όπως οι βιταμίνες Α,Ε και K_1[31]. Τα τριτερπένια αποτελούνται από έξι ομάδες ισοπρενίου και έχουν συνήθως μοριακό τύπο $C_{30}H_{48}$. Είναι γνωστά από το σκουαλένιο που αποτελεί την πρόδρομη ουσία των στεροειδών[32].

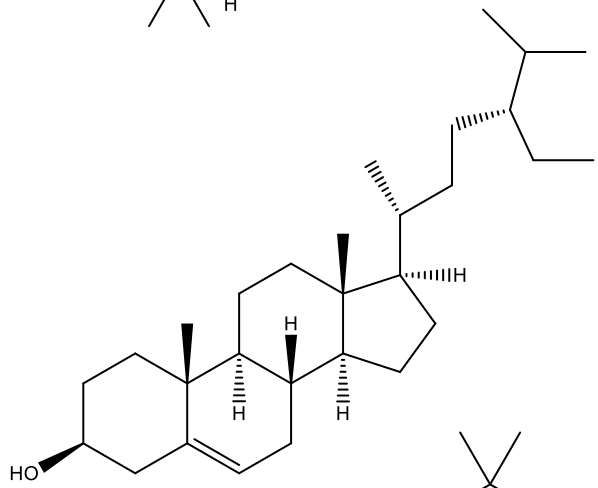
Neophytadiene



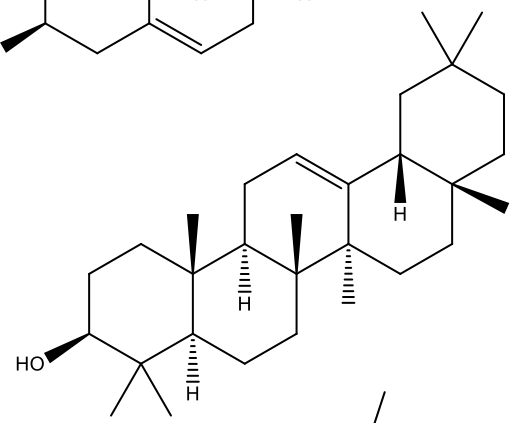
Lupanol



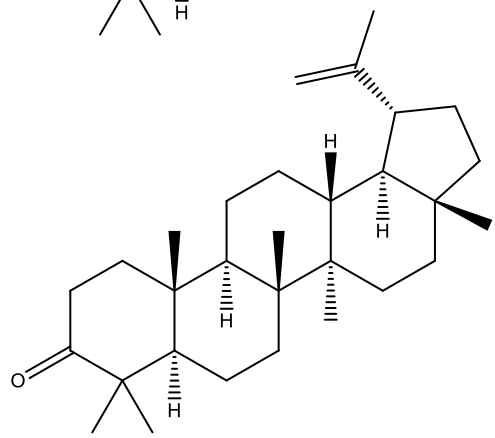
b-Sitosterol



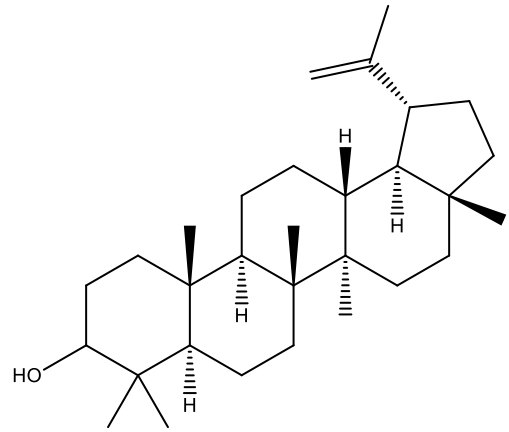
b-Amyrin



Lupenone



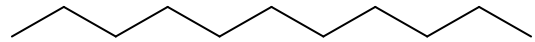
Lupeol



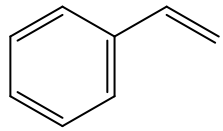
Δ) Άλλα συστατικά του αιθέριου ελαίου

Υδρογονάνθρακες

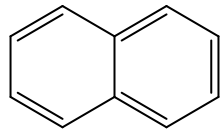
n-Undecane



Styrene

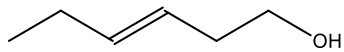


Naphthalene



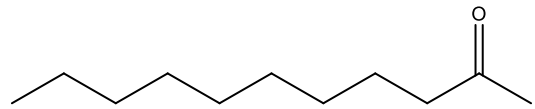
Αλκοόλες

3-Hexen-1 -ol



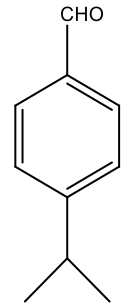
Κετόνες

2-undecanone



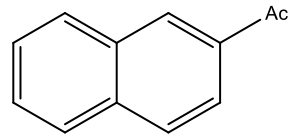
Αλδεΰδες

Cuminaldehyde

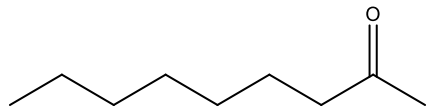


Κετόνες

2-Acetylnaphthalene

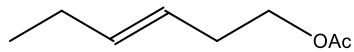


2-Nonanone

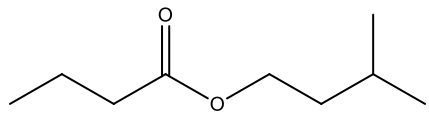


Εστέρες

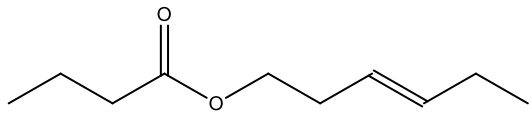
3-Hexen-1 -ol acetate



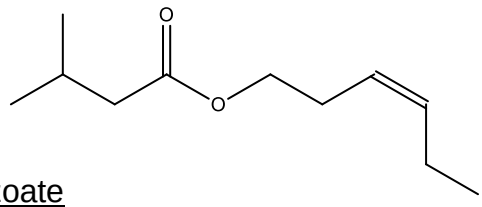
Butanoic acid 3-methylbutyl ester



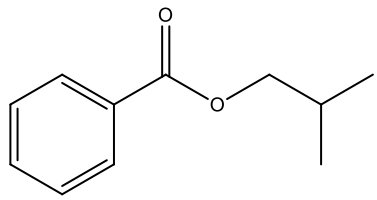
Butanoic acid 3-hexenyl ester



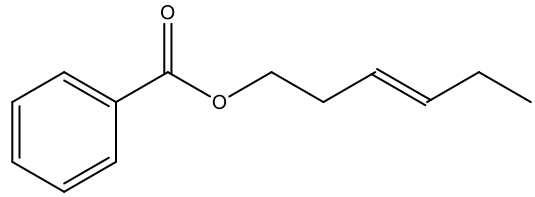
cis-3-Hexenyl-2-methyl butanoate



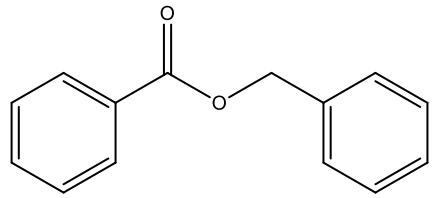
2-Methylbutyl benzoate



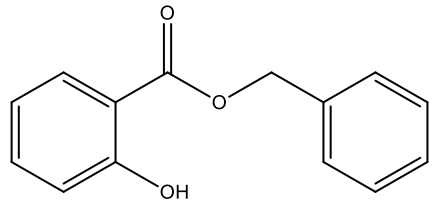
3-Hexen-1-ol benzoate



Benzyl benzoate OR phenylmethyl benzoate



Benzyl salicylate

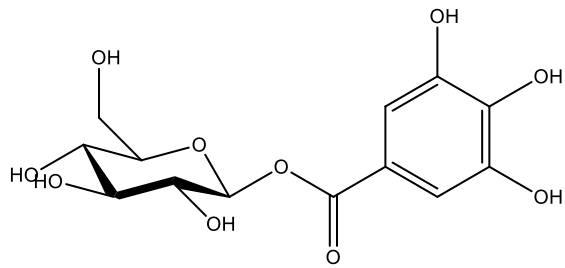


Ε) Απλές φαινόλες και παράγωγά τους

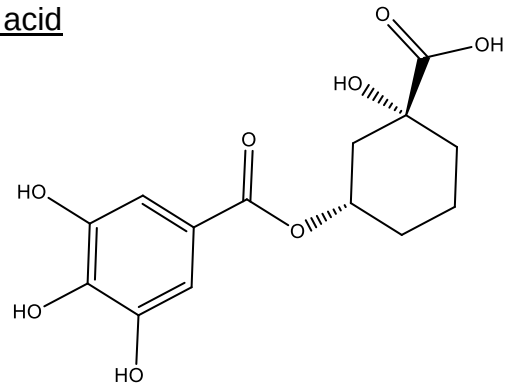
Οι φαινόλες είναι ουσίες που έχουν τουλάχιστον μια ομάδα υδροξυλίου άμεσα συνδεδεμένη με μία αρωματική υδρογονανθρακική ομάδα. Χωρίζονται στις απλές φαινόλες και στις πολυφαινόλες βάσει του αριθμού των φαινολικών τους ομάδων. Οι απλές φαινόλες συναντώνται σε όλο το φυτικό βασίλειο και έχουν κυρίως προστατευτική δράση (έναντι της ακτινοβολίας ή των παθογόνων μικροοργανισμών)[33].

Φαινολικά οξέα και παράγωγα

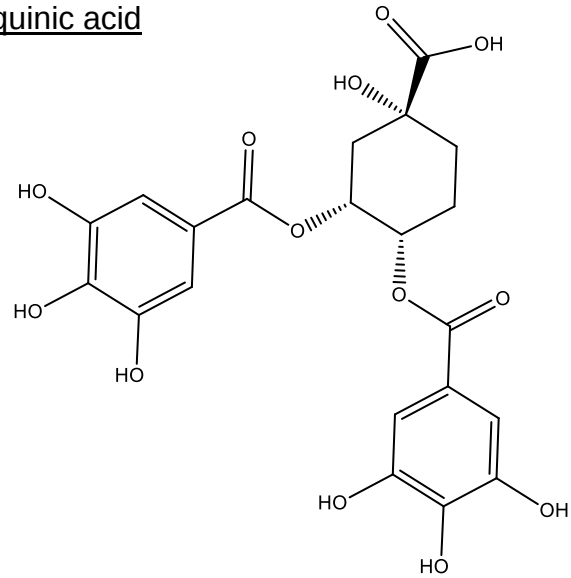
monogalloyl glucose



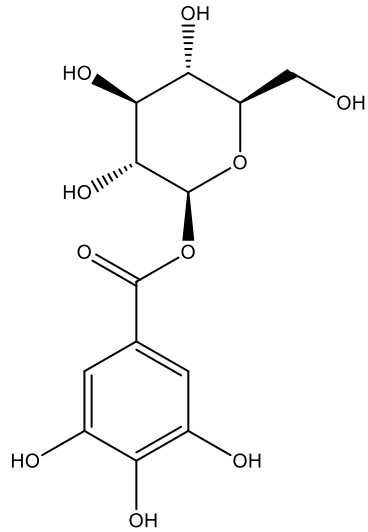
5-O-galloyl quinic acid



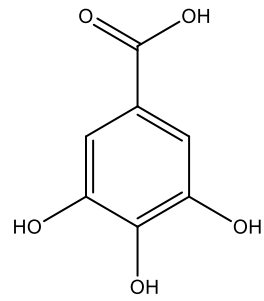
3,5-O-digalloyl quinic acid



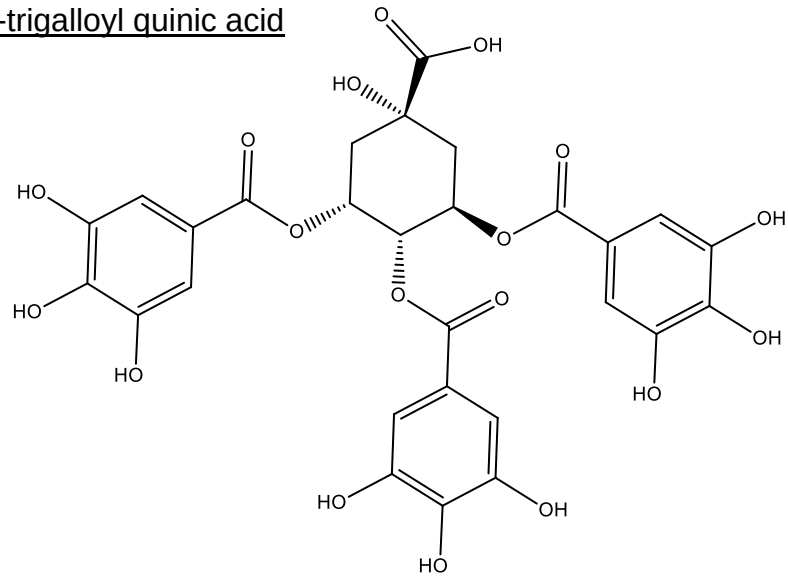
b-Glucogallin



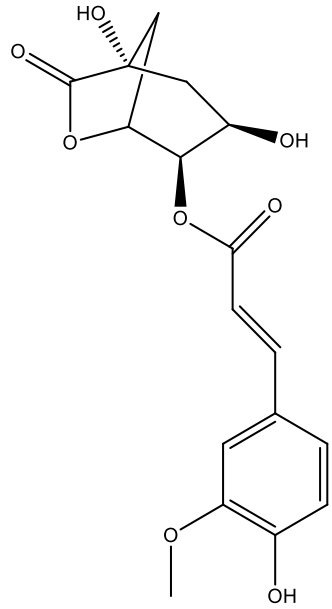
Gallic acid



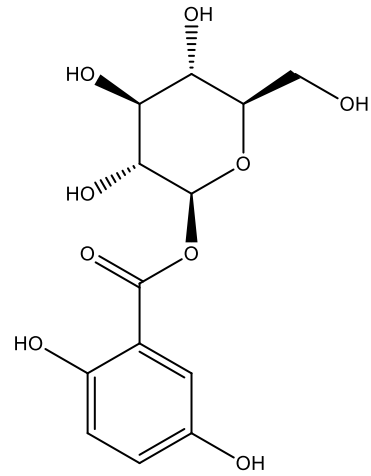
3,4,5-O-trigalloyl quinic acid



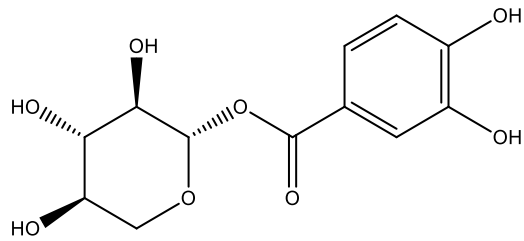
Feruloyl-g-quinide



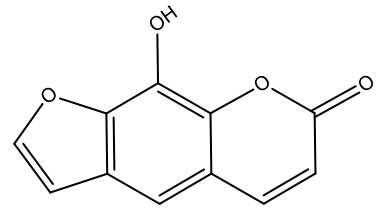
Gentisic acid glycoside



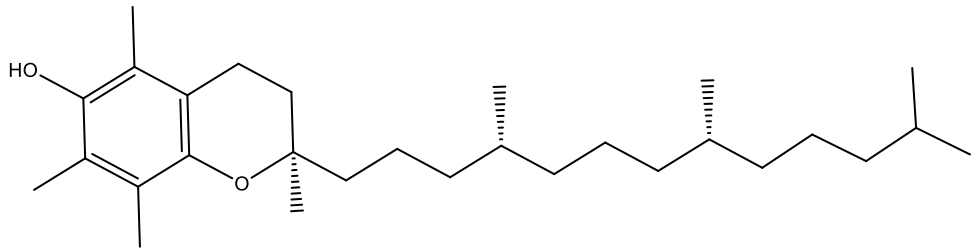
Uralenneoside



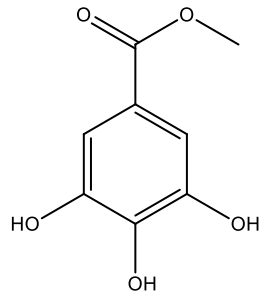
Xanthotoxol



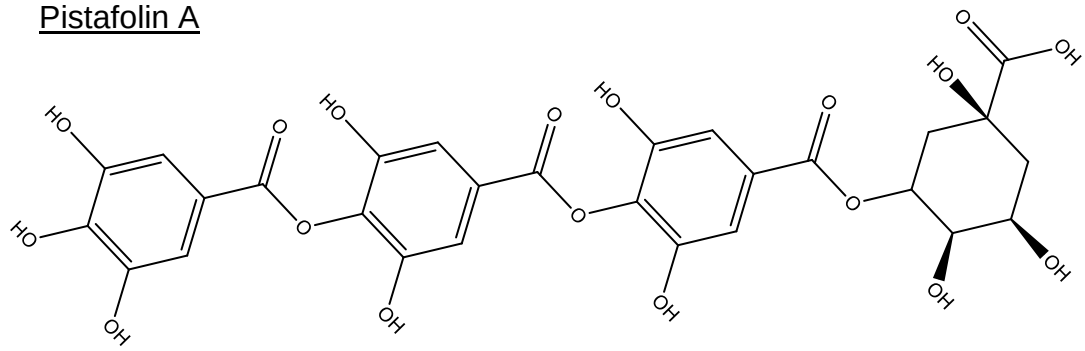
α-tocopherol



Gallic acid methyl ester



Pistafolin A

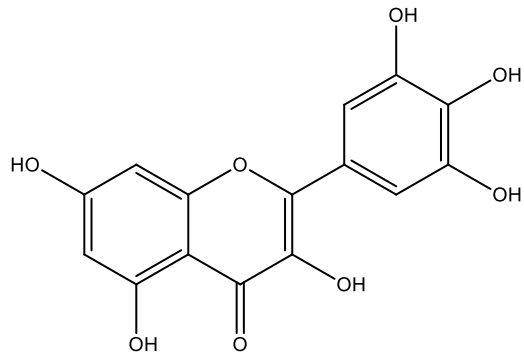


Ζ) Φλαβονοειδή και γλυκοσίδες τους

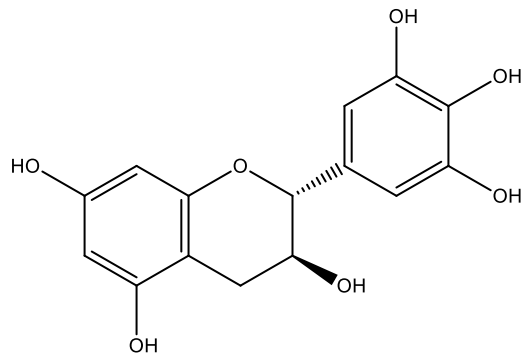
Τα φλαβονοειδή είναι μια από τις κατηγορίες πολυφαινολών που απαντώνται ευρέως στη φύση. Χαρακτηριστικό είναι το κίτρινο χρώμα τους που από εκεί προήλθε και το όνομά τους. Έχουν μελετηθεί εκτενώς για την αντιφλεγμονώδη, αντικαρκινική και καρδιοπροστατευτική δράση που παρουσιάζουν[34].

Φλαβονοειδή

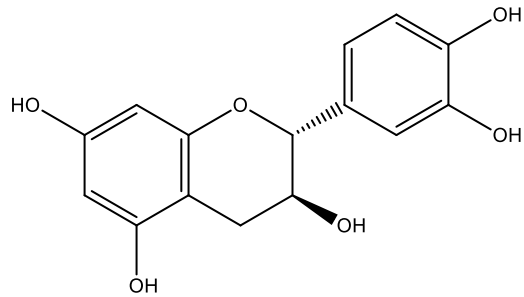
Myricetin



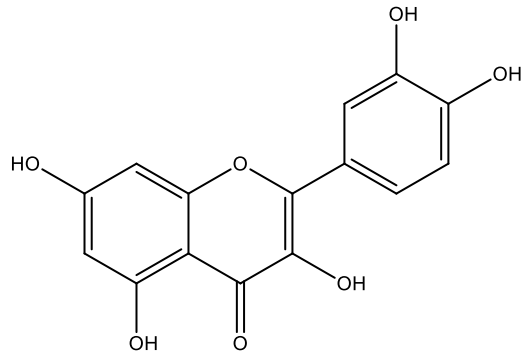
d-Gallocatechin



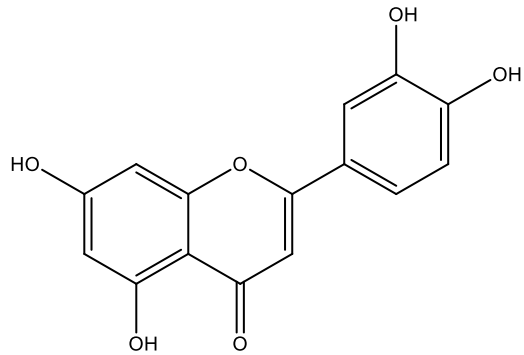
Catechin



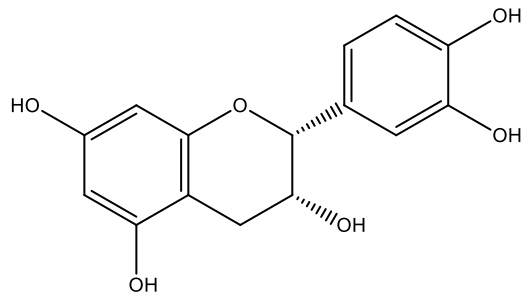
Quercetin



Luteolin

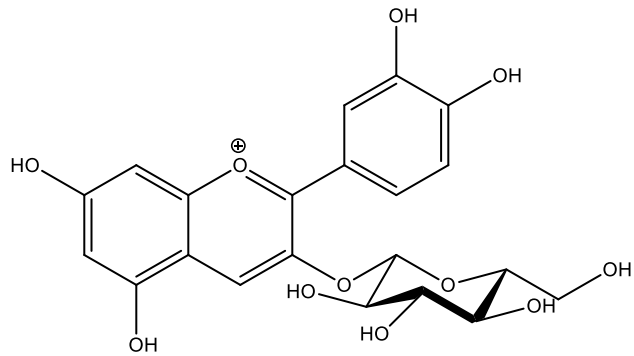


epicatechin

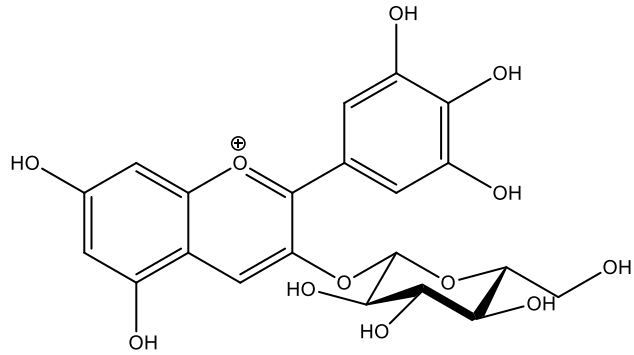


Γλυκοσίδες φλαβονοειδών

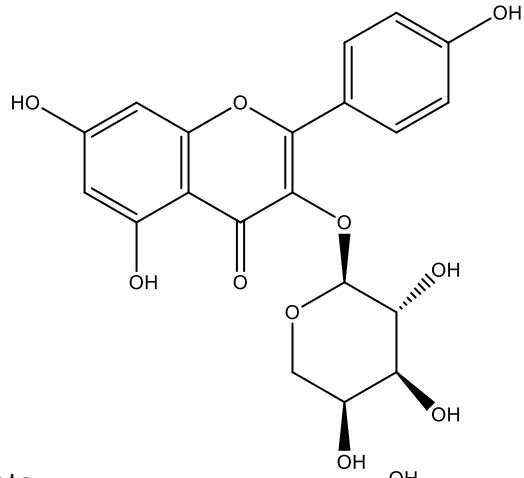
Chrysanthemin



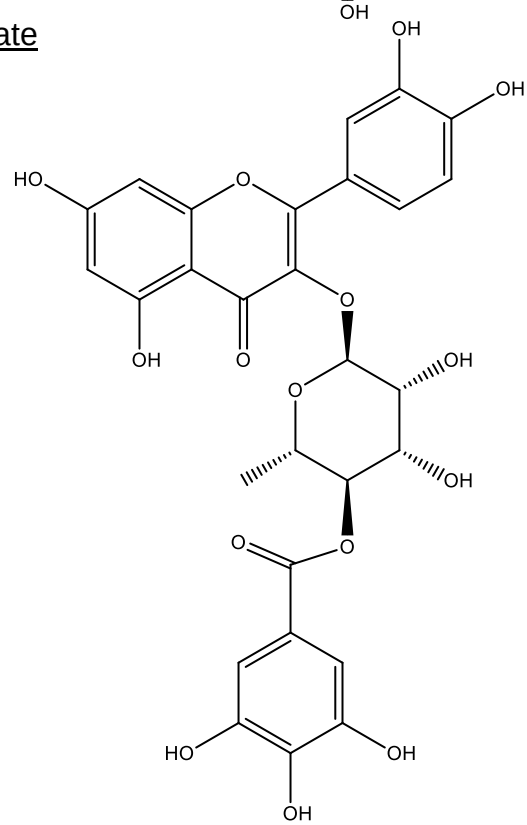
Myrtillin



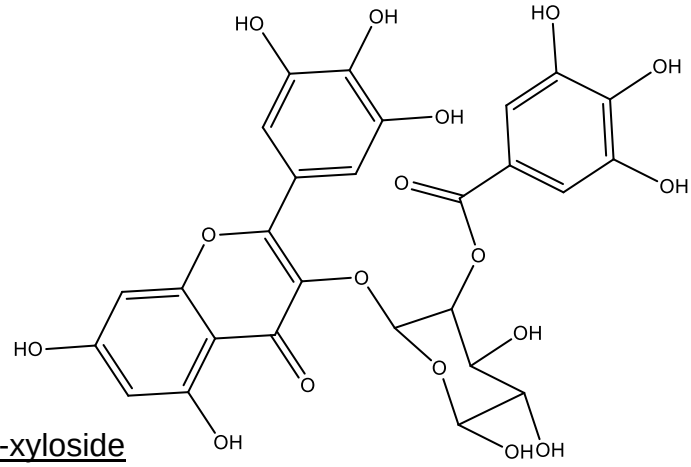
Kaempferol arabinoside



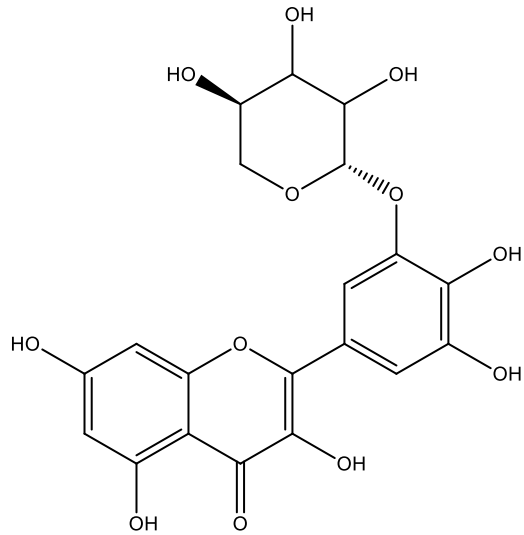
Quercitrin-O-gallate



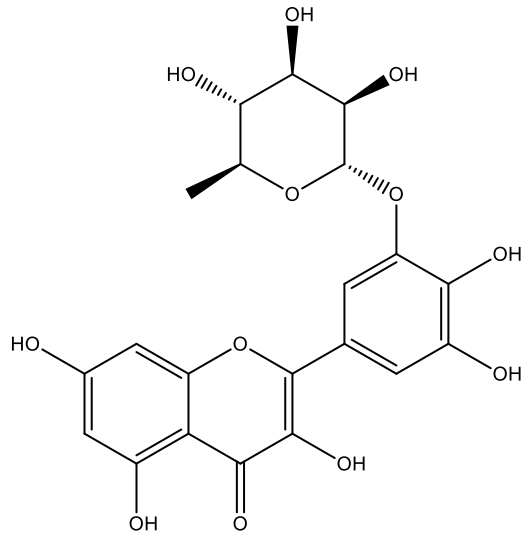
Myricetin galloyl rhamnopyranoside



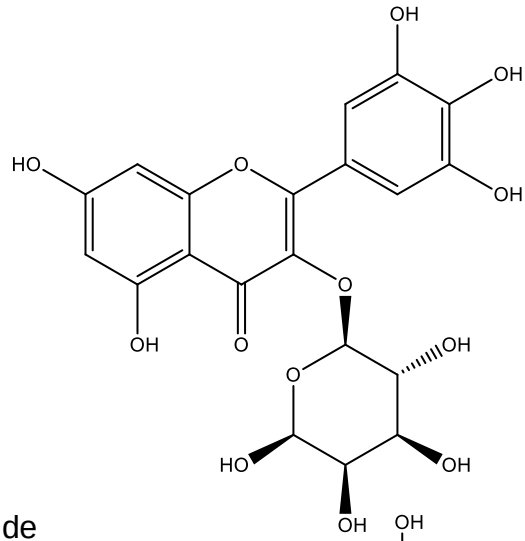
Myricetin-O-xyloside



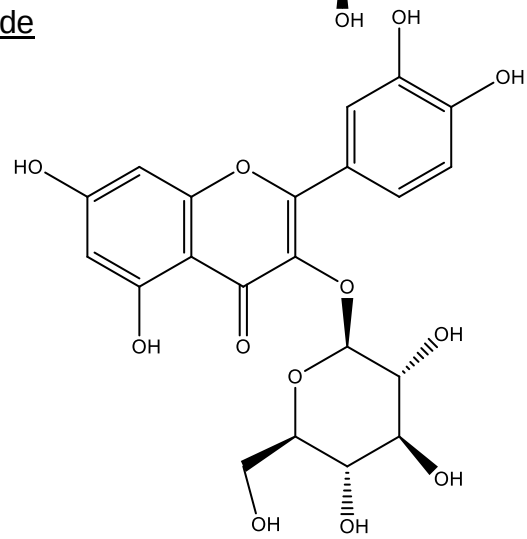
Myricetin-3-O-rhamnoside



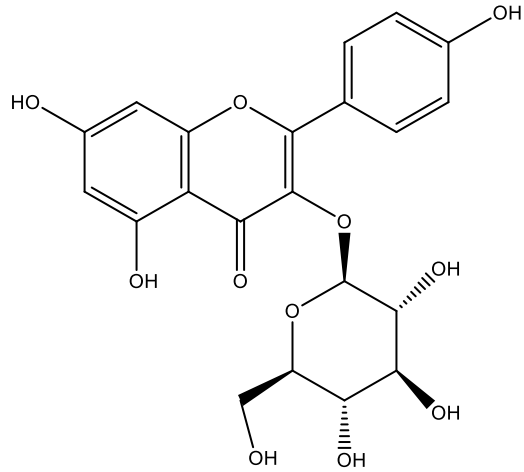
Myricetin galactoside



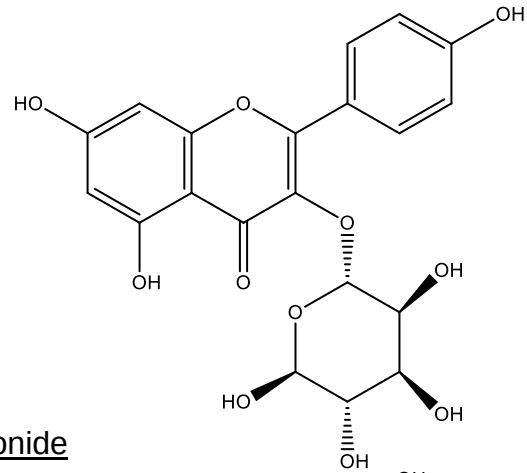
Quercetin glycoside



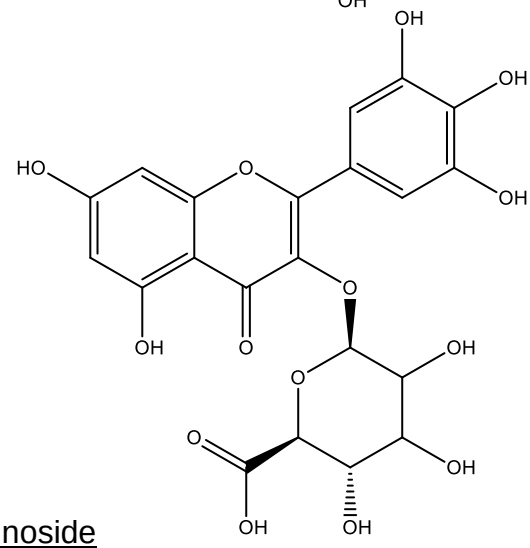
Kaempferol-3-glucoside



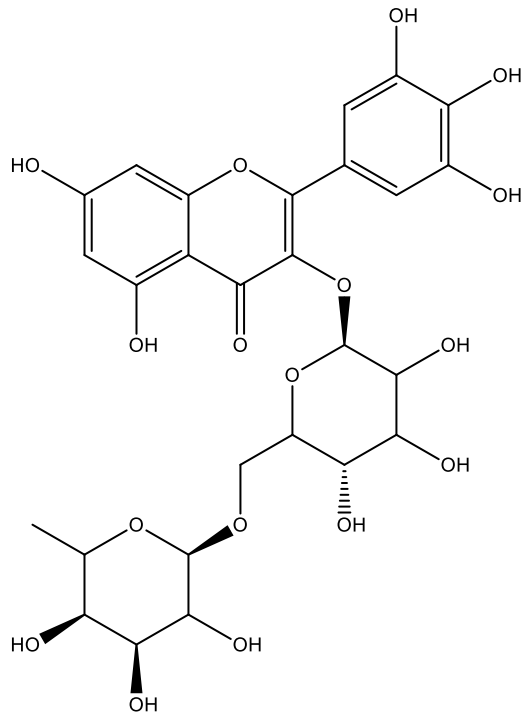
Kaempferol rhamnoside



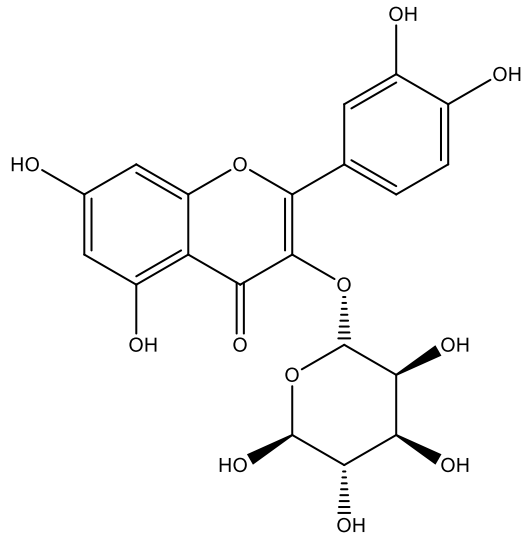
Myricetin gullcuronide



Myricetin 3-O-rutinoside

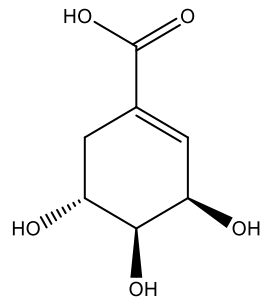


Quercetin 3-O-rhamnoside

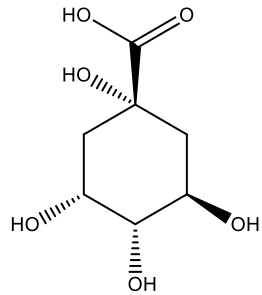


H) Άλλα συστατικά των εκχυλισμάτων

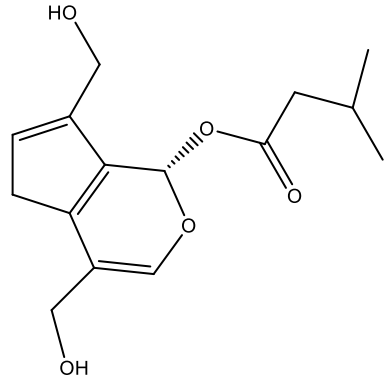
Shikimic acid



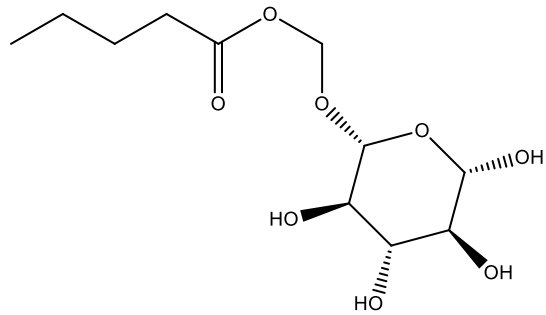
Quinic acid



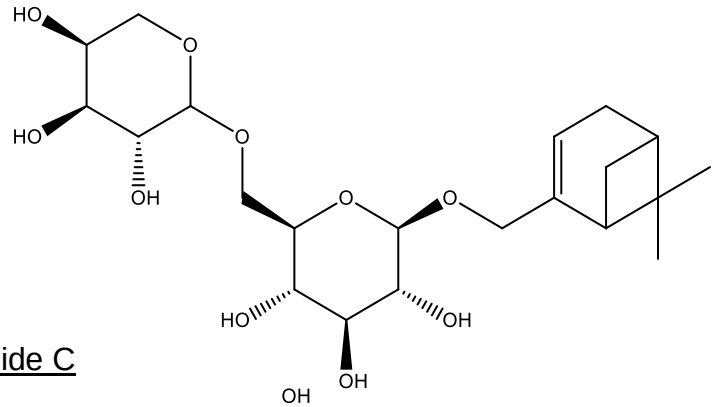
Penstemide



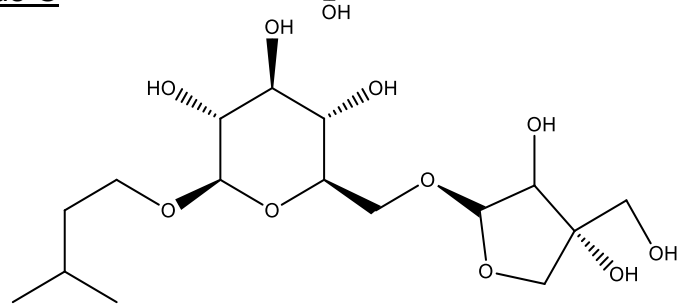
Methyl glucopyranosyloxy pentanoic acid



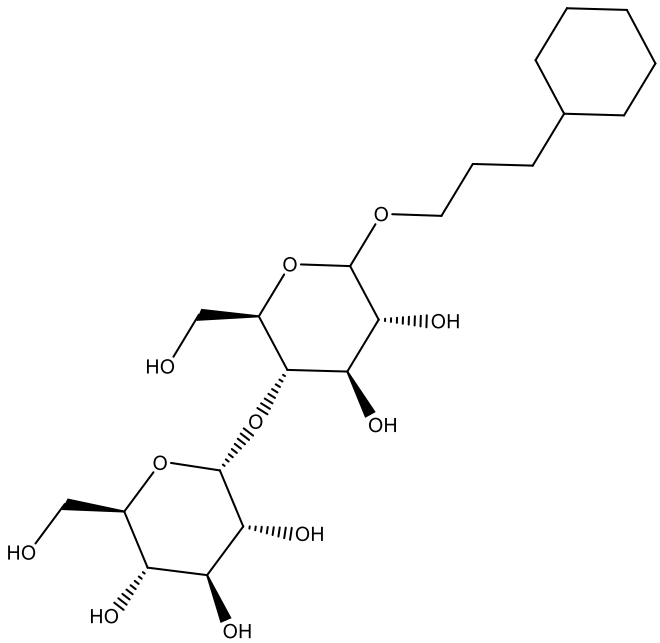
Sacranoside A



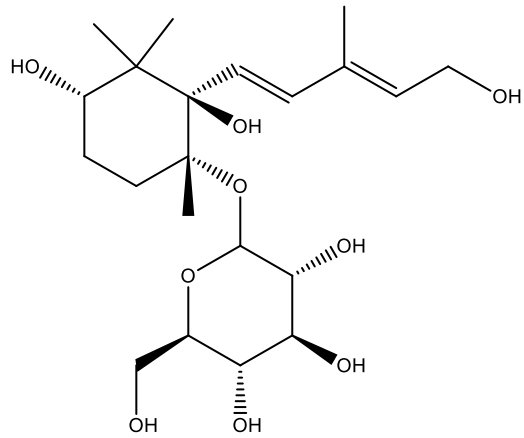
Everlastoside C



Cymal 3



Neorehmannioside



1.1.4.2 ΠΑΡΑΔΟΣΙΑΚΕΣ ΧΡΗΣΕΙΣ

Ο Διοσκουρίδης, στο περίφημο έργο του «Περί ύλης ιατρικής» (De Materia Medica) ήταν ο πρώτος που έγραψε για τις φαρμακευτικές ιδιότητες του μαστιχόδενδρου. Από τα παλιά χρόνια χρησιμοποιούσαν παραδοσιακά[35] τα εκχυλίσματα φύλλων για προβλήματα του πεπτικού συστήματος, στην υγιεινή των δοντιών[36], ενώ θεωρούνταν χρήσιμο κατά της βρογχίτιδας, του ίκτερου[37], των πονοκεφάλων λόγω κρυολογήματος καθώς και των μυκητιάσεων του τριχωτού της κεφαλής[38]. Είχε χρήσεις και στην κτηνιατρική, όπου μαζί με την τροφή στις κατσίκες προσέθεταν ολόκληρα φύλλα για τον πονόκοιλο και τη διάρροια[35].

1.1.4.3 ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Οι μελέτες σχετικά με τις βιολογικές ιδιότητες των φύλλων του μαστιχόδενδρου είναι αρκετά περιορισμένες. Μέχρι σήμερα έχει μελετηθεί το μεθανολικό και το υδατικό εκχύλισμα των φύλλων του *Pistacia lentiscus* L. καθώς και ολόκληρα φύλλα σε μελέτες κυρίως in vivo. Έχει αναφερθεί ότι το υδατικό εκχύλισμα παρουσιάζει αντιμικροβιακή δράση που σύμφωνα με *in vitro* μελέτες προκαλεί μέχρι και πλήρη αναστολή των μικροβιακών μυκηλίων[38]. Επίσης, αντιοξειδωτική δράση *in vitro* και *in vivo* αναστέλλοντας την οξείδωση που προκαλείται από τον σίδηρο (Fe^{2+})[39].

Σύμφωνα με άλλες μελέτες το μεθανολικό εκχύλισμα εμφανίζει αντιοξειδωτική δράση καθώς έδειξε ενθαρρυντικά αποτελέσματα στον έλεγχο με 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) και στη δοκιμή FRAP (ferric reducing-antioxidant power). Την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση παρουσίασαν τα φύλλα που συλλέχθηκαν την περίοδο της άνοιξης[40].

Επιπλέον σε έρευνα που έγινε σε κατσίκες παρουσίασε αντιπαρασιτική δράση, που με την χορήγηση ολόκληρων φύλλων βοηθούσε στην αποβολή παρασίτων που αναπτύσσονται στο εσωτερικό τους[41].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2
ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ

2.1 ΧΡΗΣΙΜΟΙ ΟΡΟΙ

Πολυπαραμετρική ανάλυση δεδομένων (MVDA, multivariate data analysis): Παρατήρηση και ανάλυση περισσότερων από μία μεταβλητές παράλληλα, με στόχο την επίλυση προβλημάτων σε περιπτώσεις που πραγματοποιούνται μετρήσεις που εξαρτώνται από πολλαπλές μεταβλητές και οι σχέσεις μεταξύ των μετρήσεων και των δομών τους είναι σημαντικές.

Χημειομετρία (chemometrics): Επιστήμη που έχει ως αντικείμενο την εξαγωγή πληροφοριών από χημικά συστήματα μέσω εφαρμογών στατιστικών ή/και μαθηματικών μοντέλων.

Μεταβολομική (metabolomics): Η μη επιβλεπόμενη ολιστική, ποσοτική και ποιοτική ανάλυση όλων των μεταβολιτών που βρίσκονται σε ένα βιολογικό σύστημα υπό αυστηρά καθορισμένες συνθήκες.

Μεταβόλωμα (metabolome): Το σύνολο των μεταβολιτών που βρίσκονται σε ένα βιολογικό σύστημα. Ο βιοχημικός φαινότυπος ενός οργανισμού.

Μεταβολικό ή μεταβολομικό προφίλ (metabolic profiling): Ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών που υπάρχουν σε ένα καθορισμένο βιολογικό σύστημα με τη χρήση σύγχρονων αναλυτικών τεχνικών συνήθως υψηλής διακριτικής ικανότητας σε συνδυασμό με χημειομετρικές μεθόδους.

Μεταβολικό ή μεταβολομικό αποτύπωμα (metabolic fingerprinting): Η κατά το δυνατόν πιο ολοκληρωμένη απεικόνιση των μεταβολιτών ενός βιολογικού συστήματος με τη χρήση αναλυτικών τεχνικών (NMR, MS, HPLC-DAD κ.ά.), συνήθως υψηλής διακριτικής ικανότητας.

Στοχευμένη μεταβολομική μελέτη (targeted metabolomics): Ανάλυση, η οποία περιορίζεται στην ανίχνευση και στον ποσοτικό προσδιορισμό συγκεκριμένων μεταβολιτών ενός βιολογικού συστήματος με τη χρήση μεταβολομικών προσεγγίσεων.

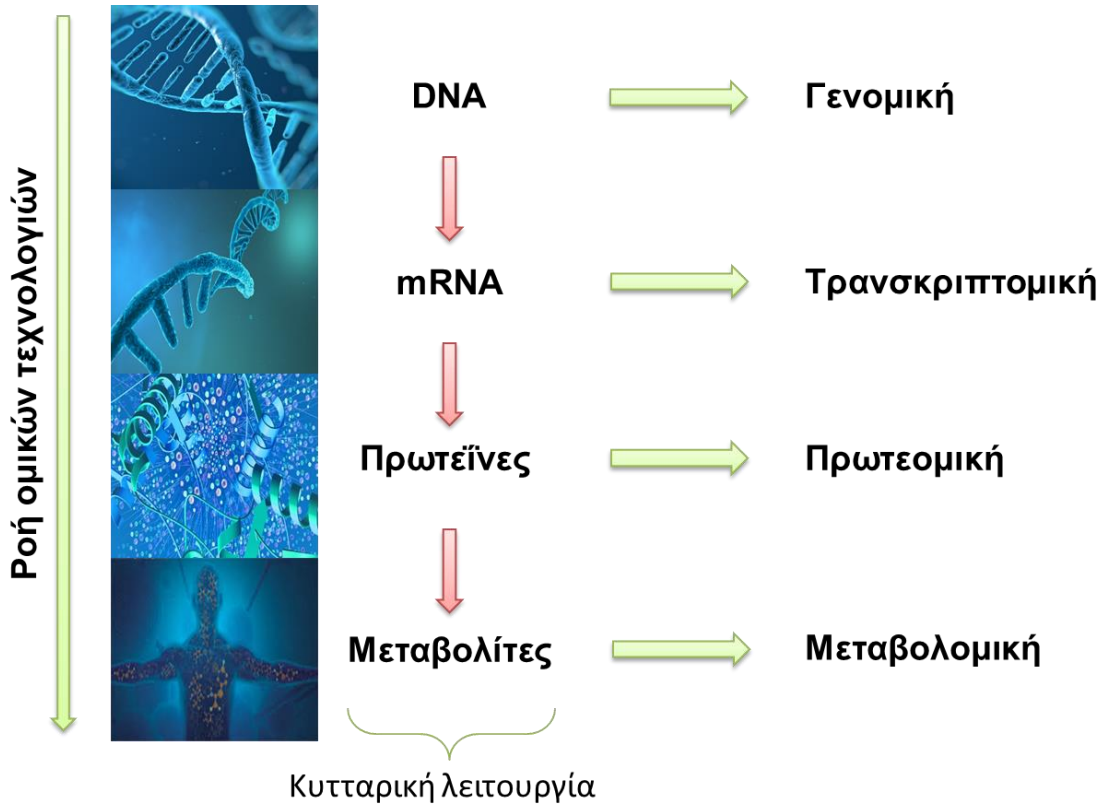
Βιοδείκτης ή βιολογικός δείκτης (biomarker): Μεταβολίτης η παρουσία ή η ποσοτική αυξομείωση του οποίου σε ένα συγκεκριμένο βιολογικό σύστημα αποτελεί ένδειξη μίας βιολογικής κατάστασης ή ενός ενδογενούς/εξωγενούς ερεθίσματος.

2.2 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ

Με την πρόοδο και την εξέλιξη του ανθρώπινου είδους ανά τους αιώνες, ο άνθρωπος βρίσκεται καθημερινά αντιμέτωπος με πληθώρα παραγόντων, οι οποίοι επηρεάζουν την υγεία του. Παράγοντες, όπως η ανάπτυξη ανθεκτικότητας νέων μεταλλαγμένων στελεχών ιών στην εξωγενή χρήση αντιβιοτικών, η εμφάνιση όλο και περισσότερων περιστατικών διαφόρων τύπων καρκίνου, οι νευροεκφυλιστικές νόσοι ή τα αυτοάνοσα νοσήματα, έχουν οδηγήσει την επιστημονική κοινότητα στην ανάγκη διερεύνησης των μηχανισμών ανάπτυξής τους, καθώς και στην τεκμηρίωση της αλληλεπίδρασης μεταξύ γενετικών διαδικασιών και περιβαλλοντικών χαρακτηριστικών[42].

Η βιολογία συστημάτων (systems biology) αποτελεί ένα διεπιστημονικό πεδίο έρευνας βασιζόμενο στη βιολογία που διερευνά τις πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις των βιολογικών συστημάτων. Τα τελευταία χρόνια το συγκεκριμένο πεδίο έρευνας έχει υιοθετήσει τις λεγόμενες τεχνολογίες «ομικής» (omics), που σήμερα υπερβαίνουν τις 200 συνολικά[42]. Σκοπός των τεχνολογιών αυτών είναι η μη στοχευμένη ταυτοποίηση των γονιδιακών προϊόντων (γονιδίων, πρωτεϊνών, μεταβολιτών), τα οποία βρίσκονται σε κάποιο βιολογικό σύστημα χρησιμοποιώντας ταυτόχρονα αναλυτικές τεχνικές και στατιστικές μεθόδους ανάλυσης[43].

Η πρώτη ομική προσέγγιση που αναπτύχτηκε ήταν η γενομική (genomics). Η γενομική αφορά στην ολοκληρωμένη απεικόνιση του γονιδιώματος (genetic maping), του συνόλου δηλαδή των γονιδίων ενός βιολογικού συστήματος, σε επίπεδο δομικό αλλά και λειτουργικό. Η αμέσως επόμενη προσέγγιση είναι εκείνη που μελετάει τον οργανισμό σε επίπεδο μεταγραφικό, η λεγόμενη τρανσκριπτομική (transcriptomics), η οποία μελετά στην ουσία το σύνολο των μορίων RNA που παράγονται από ένα σύνολο κυττάρων ή ιστών. Ακολούθως, εφαρμόστηκε ως προσέγγιση -ομικής η πρωτεομική (proteomics). Η πρωτεομική αντίστοιχα αφορά στη διερεύνηση και αποτύπωση του πρωτεώματος, του συνόλου δηλαδή των πρωτεϊνών που βρίσκονται σε ένα βιολογικό σύστημα εστιάζοντας στη δομή και στην λειτουργία τους. Τελευταία προσέγγιση είναι αυτή που διερευνά το μεταβόλωμα. Η μεταβολομική (metabolomics) έχει ως αντικείμενο την αποτύπωση του συνόλου των μεταβολιτών που παράγονται από έναν οργανισμό[44]. Το μεταβόλωμα μπορεί επίσης να θεωρηθεί ως το σύνολο των τελικών προϊόντων της γονιδιακής έκφρασης.[45]



Εικόνα 7: *Ροή -ομικών προσεγγίσεων*

Η μεταβολομική αρχικά, δεν συμπεριλήφθηκε στο φάσμα της λειτουργικής γενομικής, παρόλο που θεωρείται απαραίτητο τμήμα της μελέτης ενός βιολογικού συστήματος. Λόγω όμως της προόδου στον τομέα της μεταβολομικής, πλέον θεωρείται αναπόσπαστο κομμάτι της και πιθανότατα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη σύνδεση του φαινοτύπου με τον γονότυπο[43,46].

Η μεταβολομική επιπλέον δεν στερείται περιορισμών σε σύγκριση με τις υπόλοιπες προσεγγίσεις. Σε μια τρανσκριπτομική μελέτη που αποδίδει το σύνολο του mRNA, άρα και το μηχανισμό μεταφοράς του μεταφραστικού κώδικα με στόχο την πρωτεϊνοσύνθεση, αλλαγές στα επίπεδα του mRNA δεν σχετίζονται πάντα με αλλαγές στα επίπεδα των παραγόμενων πρωτεϊνών. Παρόμοια σε μία πρωτεομική μελέτη οι πρωτεΐνες μπορεί να είναι ενζυμικά ενεργές ή ανενεργές. Έτσι, αλλαγές στο τρανσκρίπτωμα ή στο πρωτέωμα δεν αντιστοιχούν πάντα σε αλλαγές στο βιοχημικό φαινότυπο. Έχει, λοιπόν διατυπωθεί ότι το μεταβόλωμα μπορεί να προσφέρει ίσως την πιο ολοκληρωμένη πληροφορία και οπτικοποίηση σε σύγκριση με τις υπόλοιπες τεχνολογίες «ομικής»[45].

Ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης που βρίσκεται ο οργανισμός και των διαφορετικών ερεθισμάτων που δέχεται από εξωγενείς παράγοντες το μεταβόλωμα αλλάζει. Η πολυπλοκότητα αυτή του μεταβολώματος καθιστά τη δημιουργία ενός ολιστικού προφίλ μια πολύ δύσκολη διαδικασία, η οποία δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη χρήση μίας και μόνης αναλυτικής μεθόδου. Με το συνδυασμό τεχνολογιών και διαφορετικών αναλυτικών τεχνικών μπορεί να γίνει μια προσέγγιση του στόχου της μεταβολομικής[45].

2.3 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΦΟΡΑ

Η ιδέα ότι τα βιολογικά υγρά (ούρα, αίμα, σάλιο) αντανακλούν την κατάσταση της υγείας ενός ανθρώπου υφίσταται εδώ και πάρα πολλούς αιώνες. Πρώτοι οι Αρχαίοι Κινέζοι γιατροί το 2000-1500 π.Χ. χρησιμοποίησαν τα μυρμήγκια, ώστε να αξιολογήσουν τα ούρα των ασθενών και να ανιχνεύσουν εάν αυτά περιέχουν υψηλά επίπεδα γλυκόζης και κατά συνέπεια εάν οι ασθενείς πάσχουν από διαβήτη. Στην εποχή του Μεσαίωνα, χρησιμοποιήθηκαν "διαγράμματα ούρων" βάσει στατιστικών στοιχείων, με σκοπό να συσχετιστούν το χρώμα και η μυρωδιά των ούρων με διάφορες παθολογικές ιατρικές καταστάσεις, οι οποίες είχαν μεταβολική προέλευση.

Ο ισχυρισμός ότι το κάθε άτομο έχει ένα συγκεκριμένο μεταβολικό προφίλ, το οποίο επηρεάζει και την εικόνα των βιολογικών υγρών του οργανισμού εισήχθη από τον Roger Williams τη δεκαετία του 1940. Ο Williams χρησιμοποίησε τη "χρωματογραφία χαρτιού" (paper chromatography) για να προτείνει χαρακτηριστικά μεταβολικά μοτίβα στα ούρα και το σάλιο, τα οποία συνδέονται με ασθένειες, όπως η σχιζοφρένεια[47].

Οι πρώτες δημοσιεύσεις που ασχολούνται με το συγκεκριμένο αντικείμενο προήλθαν από το Baylor College of Medicine του Τέξας στις αρχές της δεκαετίας του ’70 από τον Horning και τους συνεργάτες του. Αφορούσαν στην πολυσύνθετη ανάλυση στεροειδικών και τοξικών μεταβολιτών φαρμάκων που βρίσκονταν στα ούρα χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της αερίου χρωματογραφίας συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (Gas Chromatography-Mass Spectrometry - GC-MS)[48]. Οι πρώτες αυτές δημοσιεύσεις θεωρούνται η αιτία για την οποία ο όρος «μεταβολικό προφίλ» κατευθύνθηκε στις ποιοτικές και ποσοτικές αναλύσεις περίπλοκων μειγμάτων φυσικής προέλευσης.

Ταυτόχρονα, το 1974 ο Seeley και οι συνεργάτες του εισήγαγαν και τη φασματοσκοπία NMR στη φαρέτρα της μελέτης του μεταβολικού προφίλ των οργανισμών χρησιμοποιώντας την στην ανίχνευση μεταβολιτών σε μη

επεξεργασμένα βιολογικά δείγματα[49]. Από τότε μέχρι και σήμερα η χρήση της φασματοσκοπίας NMR στις μεταβολομικές προσεγγίσεις είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη με χαρακτηριστική τη συμβολή του Jeremy Nicholson, ο οποίος το 1984 στο Πανεπιστήμιο του Λονδίνου και αργότερα στο Imperial College έδειξε ότι μέσω της μελέτης του μεταβολικού προφίλ μπορεί να διαγνωστεί ο σακχαρώδης διαβήτης[50].

Στις αρχές της δεκαετίας του ‘80 άρχισαν να εμφανίζονται στην βιβλιογραφία οι πρώτες εργασίες σχετικά με τη χρήση της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography - HPLC) και της φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance - NMR) σε μελέτες δημιουργίας μεταβολικών προφίλ[50–52]. Εξίσου διαδεδομένη είναι και η υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με τη φασματομετρία μάζας (LC-MS), η οποία βρίσκει μεγάλη εφαρμογή στις σύγχρονες μεταβολομικές προσεγγίσεις[53].

Η μεταβολομική προσέγγιση ως πεδίο έρευνας εδραιώθηκε κατά τα τέλη της δεκαετίας του ‘80 και τις αρχές της δεκαετίας του ‘90, γι’αυτό το λόγο οι διεξαχθείσες έρευνες έγιναν πιο στοχευμένες και άρχισαν να διαφοροποιούνται από την αρχική ευρεία προσέγγιση.

Το 2005 λόγω της πληθώρας εργασιών με βάση την τεχνική MS δημιουργήθηκε η πρώτη ηλεκτρονική βάση δεδομένων μεταβολομικής για το χαρακτηρισμό του ανθρώπινου μεταβολώματος, η METLIN[54]. Μέχρι το 2011 η METLIN περιείχε πάνω από 40.000 μεταβολίτες. Στις τελευταίες μετρήσεις που έγιναν τον Ιούλιο του 2019, η METLIN ξεπέρασε τους 450.000 μεταβολίτες μαζί με άλλες χημικές ενώσεις που κάθε καταχώριση ακολουθείται από αντίστοιχα πειραματικά δεδομένα φασματομετρίας μάζας με διάφορες ενέργειες σύγκρουσης, σε θετικό και αρνητικό ιονισμό.

Το 2007, το «the Human Metabolome Project» με επικεφαλής τον Dr. D. Wishart του Πανεπιστημίου της Αλμπέρτα στον Καναδά συμπλήρωσε τον πρώτο χάρτη του ανθρώπινου μεταβολώματος, ο οποίος αποτελούνταν από μία βάση δεδομένων με 2.500 μεταβολίτες, 1200 φάρμακα και 3500 συστατικά τροφίμων[55].

2.4 ΦΥΤΟΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ (PLANT METABOLOMICS)

Η εφαρμογή των μεταβολομικών προσεγγίσεων στα φυτικά βιολογικά συστήματα άρχισε να αποτελεί αντικείμενο έρευνας μόλις στα τέλη του εικοστού αιώνα. Λόγω της επιτυχίας των πρώτων ερευνητικών αποτελεσμάτων της μεταβολομικής πάνω σε φυτικά υλικά[56], ο αριθμός των ερευνητικών ομάδων που χρησιμοποιούν και που εισέρχονται στο συγκεκριμένο πεδίο αυξάνεται εκθετικά[45].

Η φυτομεταβολομική αποτελεί ένα πεδίο ιδιαίτερα δύσκολο και απαιτητικό στην αντιμετώπιση εξαιτίας τόσο της ποικιλίας των ειδών των φυτών όσο και της χημικής περιπλοκότητας που τα χαρακτηρίζει. Τα φυτά, ως αυτότροφοι οργανισμοί, έχουν αναπτύξει περίπλοκες πολυκύτταρες δομές, με διαφορετική λειτουργία, ώστε να εξασφαλίζουν την επιβίωσή τους σε ένα περιβάλλον το οποίο συνεχώς αλλάζει και είναι πολλές φορές εχθρικό. Έχουν διαφορετικούς τύπους κυττάρων (επιδερμίδα, παρεγχυματικά κύτταρα, τρίχες, αδένες κ.ά.) σε κάθε μέρος του οργανισμού (φύλλα, ρίζες, βλαστοί, αγγειώδες σύστημα κ.ο.κ) που καθένα από αυτά διακρίνεται από διαφορετικό μεταβολισμό.

Οι περιβαλλοντικές συνθήκες, το κλίμα, οι εποχές και το έδαφος είναι παράγοντες, οι οποίοι επηρεάζουν τον κυτταρικό μεταβολισμό και κατά συνέπεια τη λειτουργία του φυτικού οργανισμού στους παραγόμενους μεταβολίτες. Επιπλέον επίδραση στο μεταβολισμό έχουν οι αβιωτικοί παράγοντες, όπως είναι το φως, η ακτινοβολία, το νερό αλλά και βιωτικοί, όπως είναι τα φυτοφάγα ζώα, τα παράσιτα και οι παθογόνοι μικροοργανισμοί. Πρόκειται για παράγοντες πίεσης και στρες για την προστασία από τους οποίους τα φυτά έχουν αναπτύξει ένα πολύπλοκο σύστημα άμυνας με την παραγωγή εξειδικευμένων μεταβολιτών. Οι μεταβολίτες αυτοί, ονομάζονται φυτοαλεξίνες και θεωρούνται τα αντισώματα των φυτικών οργανισμών. Πολλές φορές είναι κοινοί σε όλους τους οργανισμούς, άλλες όμως είναι ειδικοί σε επίπεδο γένους ή ακόμα και είδους.

Από τα παραπάνω γίνεται κατανοητό ότι ο συνολικός αριθμός των μεταβολιτών που παράγονται στο φυτικό βασίλειο συμπεριλαμβανομένων των δευτερογενών μεταβολιτών είναι εξαιρετικά πολυπληθής. Υπολογίζεται ότι ο αριθμός αυτός κυμαίνεται μεταξύ των 100.000 και των 200.000[57]. Η πολυπλοκότητα αυτή αποτελεί πρόκληση για τη μεταβολομική και καθιστά τη φυτομεταβολομική ένα από τα ζητήματα που απασχολούν την έρευνα του σήμερα.

2.5 ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΣΤΟ ΓΕΝΟΣ *PISTACIA*

Λίγες είναι οι μεταβολομικές μελέτες στο γένος Pistacia καθώς η φυτομεταβολομική είναι ένας νέος τομέας έρευνας που συνεχώς αναπτύσσεται.

Η πρώτη καταγραφή στη βιβλιογραφία εμφανίζεται το 2011 που ο Delfini M. και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν την τεχνική της φασματοσκοπίας NMR για να μελετήσουν το μεταβολικό προφίλ δύο διαφορετικών καλλιεργητικών ποικιλιών του είδους *Pistacia vera*[58] Έχουν πραγματοποιηθεί και άλλες έρευνες μεταβολομικού προφίλ στο είδος *Pistacia vera*, όπως το 2014 που έγινε συσχέτιση των υδατοδιαλυτών μεταβολιτών του είδους με τη γεωγραφική κατανομή του με τη χρήση της τεχνικής NMR[59]. Ακόμη σε *in vitro* μελέτες των καρπών του είδους δημιουργήθηκαν μεταβολικά προφίλ των φαινολικών συστατικών που περιέχουν[60].

Το *Pistacia lentiscus L.* είναι το επόμενο είδος που εμφανίζεται σε μελέτες μετααβολομικής που το 2013 ο C.Rodríguez-Pérez και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν το μεταβολικό προφίλ για την ταυτοποίηση νέων συστατικών στα φύλλα του είδους[26]. Έχει χρησιμοποιηθεί και η τεχνική GC-MS για τη δημιουργία του μεταβολικού προφίλ στα άπολα συστατικά του είδους[61].

Επιπλέον, έχει πραγματοποιηθεί μεταβολομική ανάλυση των αρσενικών και θυληκών φυτών του είδους *Pistacia chinensis*[62].

Τέλος, έχουν αρχίσει να γίνονται έρευνες διαφορετικών ειδών σε μελέτες μεταβολομικής που το 2020 χρησιμοποίησαν το μεταβολικό προφίλ των *Pistacia chinensis*, *Pistacia khinjuk* και *Pistacia lentiscus* για να κάνουν χημειομετρικές διαφοροποιήσεις των ειδών[63].

2.6 ΑΛΓΟΡΙΘΜΟΙ ΚΑΙ ΕΡΓΑΛΕΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΡΟΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Οι μεταβολομικές μελέτες καταλήγουν σε ένα συνονθύλευμα πολυπαραμετρικών δεδομένων τα οποία χρειάζονται επεξεργασία μέσω λογισμικών οπτικοποίησης, χημειομετρίας και βιοπληροφορικής με στόχο σε πρώτο στάδιο την ερμηνεία τους και τη δημιουργία μεταβολομικών αποτυπωμάτων διαγνωστικής ή ταξινομικής αξίας και σε δεύτερο στάδιο την

ταυτοποίηση των ουσιών που αποτελούν αίτια της διάγνωσης ή της ταξινόμησης, αντίστοιχα. Οι ουσίες αυτές αποτελούν τους βιοδείκτες (biomarkers), οι οποίοι καθορίζουν τη βιολογική κατάσταση που εξετάζεται[64]. Σε αυτήν τη διαχείριση πληροφοριών, κρίσιμο στάδιο αποτελεί η προ-επεξεργασία των δεδομένων που προκύπτουν από τις αναλύσεις, ώστε τα πολύπλοκα φασματικά δεδομένα να μετατραπούν σε αρχεία δεδομένων με μορφή αριθμών (που είναι πιο διαχειρίσιμα). Πρόκειται για μία προσπάθεια ελάττωσης της περιπλοκότητας των δεδομένων, ώστε να διευκολυνθεί η ανάλυση, η ερμηνεία τους και η εξαγωγή της πληροφορίας.

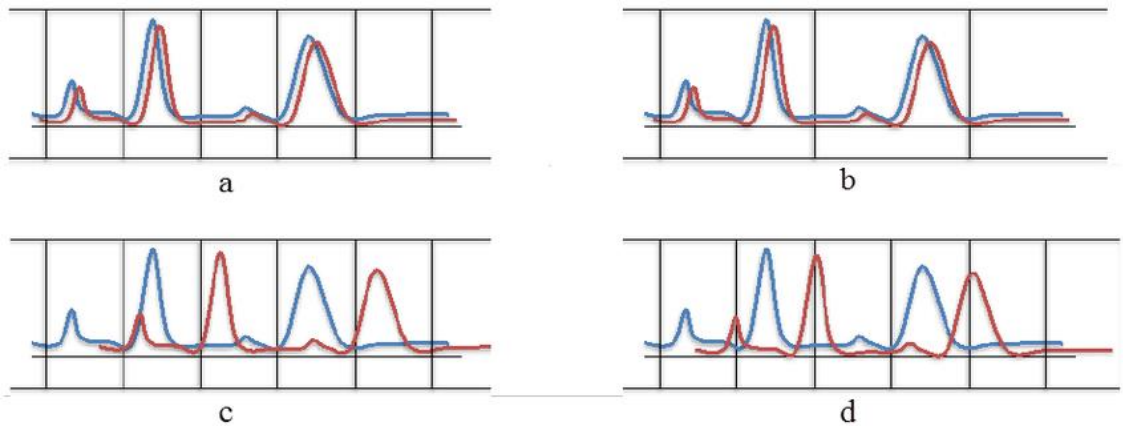
Στο NMR αναγνωρίζονται δύο στάδια προ-επεξεργασίας. Αρχικά, στα φασματικά δεδομένα γίνεται η μετατροπή Fourier, η διόρθωση φάσης και ο αποκλεισμός περιοχών άνευ ενδιαφέροντος (εναπομείναντες διαλύτες, κορυφή του εσωτερικού προτύπου κ.ά.). Στη συνέχεια εφαρμόζονται διαδικασίες, όπως είναι η κανονικοποίηση (normalization), η ευθυγράμμιση (alignment), η διόρθωση της γραμμής βάσης (baseline correction).

Επιπλέον, βασικό στάδιο της προεργασίας των δεδομένων NMR αποτελεί η διαδικασία του "πακεταρίσματος" (bucketing ή binning, όπως λέγεται) των φασματικών δεδομένων. Πρόκειται για τη διαίρεση/τον τεμαχισμό-κατάτμηση του φάσματος σε συγκεκριμένο αριθμό τμημάτων, τα λεγόμενα "bins". Με τη συγκεκριμένη διαδικασία γίνεται εύκολος ο χειρισμός ενός μεγάλου αριθμού μεταβλητών, ο οποίος υπό άλλες συνθήκες θα ήταν αδύνατος. Καθένα από αυτά τα τμήματα (bins) αποτελεί μία από τις μεταβλητές (variables) που χαρακτηρίζουν το κάθε δείγμα. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι με τη διαδικασία του binning επιτυγχάνεται ένα είδος "εξομάλυνσης" του φάσματος και δίνεται η δυνατότητα διόρθωσης μικρών μετατοπίσεων των κορυφών[65].

Η δημιουργία των bins πρέπει να γίνεται ιδιαίτερα προσεκτικά, καθώς στόχος είναι η εξαγωγή όσο το δυνατόν περισσότερων πληροφοριών. Αν τα bins έχουν μεγάλο εύρος μπορεί να περιέχουν περισσότερες από μία κορυφές, οι οποίες αντιστοιχούν σε διαφορετικούς μεταβολίτες και επομένως η περιεχόμενη πληροφορία να μην είναι αντιπροσωπευτική. Αν μία κορυφή είναι ελάχιστα μετατοπισμένη (λόγω παραγόντων, όπως το pH κ.ά.) μπορεί να περιληφθεί σε γειτονικό bin ή να χωριστεί ανάμεσα σε δύο bins κάνοντας την ακόλουθη στατιστική ανάλυση λιγότερο αξιόπιστη.

Τόσο στο στάδιο του διαχωρισμού κατά την ανάλυση ενός δείγματος (LC, LC-UV/DAD) όσο και κατά τη χρήση NMR, οι κορυφές που προκύπτουν μπορεί να είναι ελαφρώς μετατοπισμένες (shifting). Η μετατόπιση αυτή μπορεί να οφείλεται σε παρεκκλίσεις του οργάνου ή σε ποικίλους παράγοντες μεταβολής κατά τη διάρκεια παρασκευής ή ανάλυσης των δειγμάτων. Αυτό σημαίνει πως ο

χρόνος κατακράτησης, η χημική μετατόπιση ή άλλες μεταβλητές δεν είναι χαρακτηριστικές για κάθε μεταβολίτη με τη χρήση διαφορετικών οργάνων, κατά την διεξαγωγή διαφορετικών πειραμάτων ή ακόμα, κατά την ανάλυση διαφορετικών δειγμάτων στο ίδιο πείραμα. Τέτοιες μετατοπίσεις πρέπει να διορθώνονται πριν από τη διεξαγωγή της στατιστικής επεξεργασίας για λόγους επαναληψιμότητας, ακρίβειας και αξιοπιστίας της ανάλυσης και κατ' επέκταση του μεταβολομικού μοντέλου. Παρά την ευκολία και την ταχύτητα της συγκεκριμένης μεθόδου απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή, όπως και στο binning, όταν κορυφές βρίσκονται σε εσφαλμένο τμήμα ή χωρίζονται από δύο τμήματα[65].



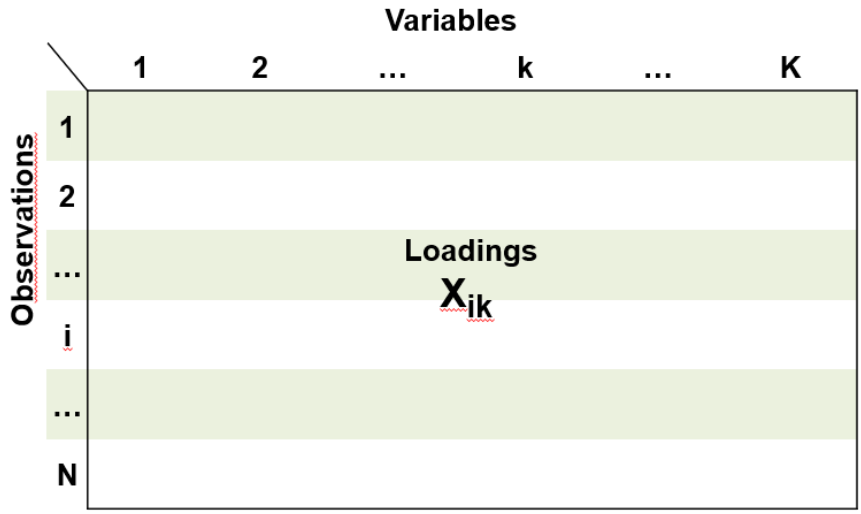
Εικόνα 8: *Παραδείγματα του τρόπου με τον οποίο το binning επηρεάζει τις μετατοπίσεις των κορυφών.(a) Η επιτυχημένη μορφή του binning, κάθε κορυφή σε διαφορετικό bin, (b) πολλές κορυφές στο ίδιο bin, (c) δεν έχει γίνει σωστή προ-επεξεργασία και οι κορυφές δεν είναι ευθυγραμισμένες μεταξύ τους (aligned) για να βρίσκονται στο ίδιο bin, (d) στα όρια του bin βρίσκονται κορυφές*[66]*.*

Εξαιτίας του γεγονότος ότι η πολυπαραμετρική ανάλυση αφορά στην επεξεργασία και στη σύγκριση μεγάλου όγκου φαματοσκοπικών και φασματομετρικών δεδομένων είναι αναγκαίο τα δεδομένα αυτά να είναι συγκρίσιμα μεταξύ τους. Η ανθρώπινη όμως παρέμβαση κατά την πειραματική διαδικασία οδηγεί συνήθως σε σφάλματα κατά την παρασκευή των δειγμάτων, άρα και σε αλλοίωση της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων. Η διαδικασία της κανονικοποίησης επιδιώκει να καταστήσει τα αποκτηθέντα δεδομένα συγκρίσιμα. Η κανονικοποίηση συνήθως περιλαμβάνει κλιμάκωση των δεδομένων με βάση έναν κοινό παρονομαστή όπως είναι ένα εσωτερικό πρότυπο. Η χρήση εσωτερικού προτύπου επιτρέπει την κανονικοποίηση με βάση μία μέτρηση η οποία δεν επηρεάζεται από τον αριθμό των κορυφών και βρίσκεται σε περιοχή που δεν επηρεάζει τις υπολοιπες κορυφές. Κατά

συνέπεια επιτρέπει την πραγματοποίηση στατιστικής επεξεργασίας μεγάλης ακρίβειας[65,67].

2.7 ΠΟΛΥΠΑΡΑΜΕΤΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Όταν ολοκληρωθεί η προ-επεξεργασία των αναλυτικών δεδομένων τα αποτελέσματα τοποθετούνται σε έναν πίνακα. Ο πίνακας αυτός έχει τις στήλες που αντιπροσωπεύουν τις μεταβλητές (variables) και τις σειρές που αντιπροσωπεύουν τις παρατηρήσεις (observations). Στην περιοχή ανάμεσα στις μεταβλητές και στις παρατηρήσεις βρίσκονται τα φορτία (loadings), τα οποία αποτελούν την πληροφορία της κάθε παρατήρησης για την κάθε



μεταβλητή (**Εικόνα 9)**.

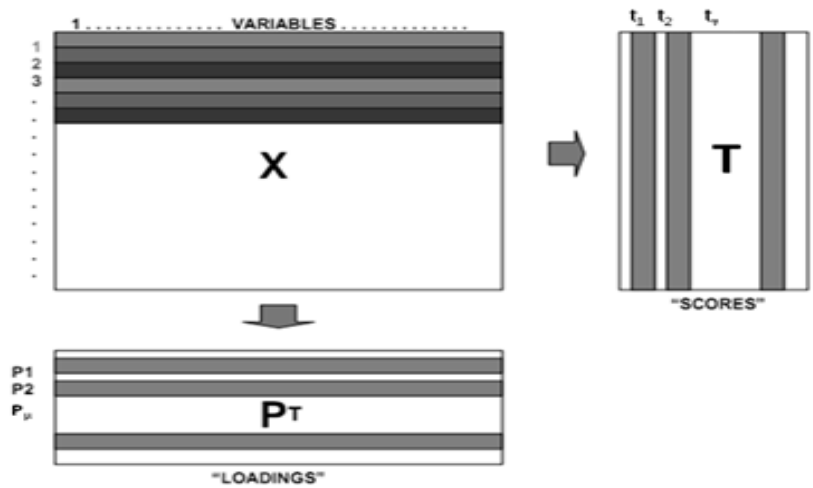
Εικόνα 9: Παράδειγμα μητρικού πίνακα, αποτελέσματος της προεργασίας των δεδομένων

Χρησιμοποιώντας διάφορα στατιστικά προγράμματα είναι δυνατόν να αναπαρασταθεί αυτή η πληροφορία. Οι κυριότερες μέθοδοι προβολής που χρησιμοποιούνται κατά τις προσεγγίσεις πολυπαραμετρικής ανάλυσης περιλαμβάνουν την ανάλυση κυρίων συνιστωσών (Principal Components Analysis - PCA), την ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Discriminant Analysis - PLS-DA) και την Ορθογώνια Ανάλυση

Διακριτών Μεταβλητών Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis - OPLS-DA).

2.7.1 ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΥΡΙΩΝ ΣΥΝΙΣΤΩΣΩΝ (PRISCIPAL COMPONENT ANALYSIS - PCA)

Η ανάλυση κυρίων συνιστωσών (PCA) είναι μία από τις μη επιβλεπόμενες μεθόδους και χρησιμοποιείται πολύ συχνά. Μία μη επιβλεπόμενη μέθοδος επιτρέπει τη δημιουργία ενός στατιστικού μοντέλου χωρίς την παρέμβαση του ερευνητή. Στόχος της PCA είναι να μειώσει τον αριθμό των διαστάσεων ενός συνόλου δεδομένων επιτρέποντας διανύσματα πολλών διαστάσεων να προβληθούν. Το επίπεδο αυτό στο οποίο τελικά οι παρατηρήσεις προβάλλονται ονομάζεται διάγραμμα συντεταγμένων (scores plot) και μέσω αυτού οπτικοποιείται η σχέση μεταξύ των παρατηρήσεων βάσει των μεταβλητών. Γίνονται φανερές, δηλαδή, ομαδοποιήσεις ή τάσεις ομαδοποίησης και εμφανίζονται ακραίες τιμές, εφόσον υπάρχουν. Συμπληρωματικό του scores plot στην ερμηνεία των δεδομένων είναι το διάγραμμα φορτίων (loadings plot), το οποίο περιγράφει την επίδραση των μεταβλητών στις παρατηρήσεις καθώς και την μεταξύ τους σχέση. Στα loadings plots, κάθε σημείο στο διάγραμμα απεικόνισης αντιστοιχεί σε μια πληροφορία (πχ ppm) που χαρακτηρίζει την παρατήρηση (δείγμα), ενώ η θέση του χαρακτηρίζει τη σημαντικότητα και τη βαρύτητα που έχει ως προς την τάση διαχωρισμού. Οι κατευθύνσεις των παρατηρήσεων σε ένα scores plot, συνάδουν με τις κατευθύνσεις των φορτίων στο αντίστοιχο loadings plot.

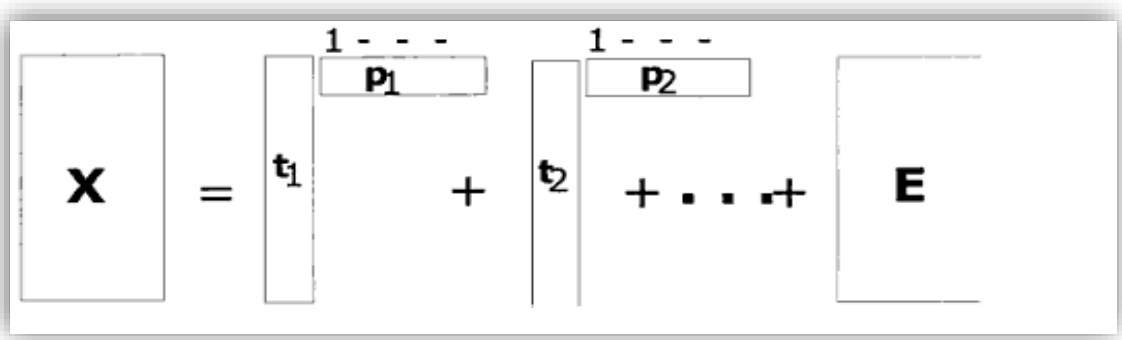


Εικόνα 10: *Δημιουργία Πινάκων των scores και των loadings*

Η PCA ανάλυση σχετίζεται με την ανάλυση του μητρικού πίνακα X, όπως εμφανίζεται στην **Εικόνα 10**, σε ένα δομικό κομμάτι και σε ένα κομμάτι θορύβου. Ο μητρικός πίνακας X συνίσταται από σειρές, πλήθους N, που αποτελούνται από τις παρατηρήσεις- και στήλες, πλήθους K, που αποτελούν τις τιμές των παραμέτρων οι οποίες χαρακτηρίζουν κάθε δείγμα (NxK). Η ανάλυση του πίνακα συνοψίζεται από την εξίσωση:

$$X = TP^T + E$$

Στην εξίσωση αυτή με T συμβολίζεται ο πίνακας των scores. Πρόκειται για έναν πίνακα (Nxμ) που εκφράζει τις προβολές των παρατηρήσεων. Ενώ, P είναι ένας πίνακας (Kxμ) ο οποίος εκφράζει τις προβολές των loadings. Ο συγκεκριμένος πίνακας είναι αντιμετατιθέμενος (P^T). Έτσι η εξίσωση μπορεί να γραφεί πιο αναλυτικά με την μορφή $X = t_1p_1^T + t_2p_2^T + \ldots + t_\mu p_\mu^T + E$. Τέλος, το E αντιπροσωπεύει τα στοιχεία του μοντέλου τα οποία δεν μπορούν να εξηγηθούν με τα T και P[68].



Εικόνα 11: *Αναπαράσταση αναλυτικής έκφρασης της εξίσωσης* $X=TP^T+E$

Το t^1 αντιπροσωπεύει την πρώτη στήλη του πίνακα T και αντίστοιχα το p^1 την πρώτη σειρά του πίνακα P. Για ένα σύνολο μ περιγραφικών μεταβλητών υπάρχουν και μ κύριες συνιστώσες. Κάθε κύρια συνιστώσα είναι κάθετη στην προηγούμενη. Η πρώτη κύρια συνιστώσα (t^1p^1T) περιγράφει τη μεγαλύτερη διαφοροποίηση των σημείων, η δεύτερη κύρια συνιστώσα (t^2p^2T) την αμέσως

επόμενη μεγαλύτερη διαφοροποίηση. Η τελευταία κύρια συνιστώσα περιγράφει μόνο το θόρυβο. Η θέση της κάθε παρατήρησης στο επίπεδο είναι ο καθοριστικός παράγοντας της σχέσης της με τις υπόλοιπες παρατηρήσεις. Επομένως δείγματα που έχουν κοντινές θέσεις στο επίπεδο, έχουν και παρεμφερή πολυπαραμετρικά προφίλ[68].

2.7.2 ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕΡΙΚΩΝ ΕΛΑΧΙΣΤΩΝ ΤΕΤΡΑΓΩΝΩΝ (PARTIAL LEAST SQUARES DISCRIMINANT ANALYSIS- PLS-DA) ΚΑΙ ΟΡΘΟΓΩΝΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΡΙΤΩΝ ΜΕΤΑΒΛΗΤΩΝ ΜΕΡΙΚΩΝ ΕΛΑΧΙΣΤΩΝ ΤΕΤΡΑΓΩΝΩΝ (ORTHOGONAL PARTIAL LEAST SQUARES DISCRIMINANT ANALYSIS - OPLSDA)

Η μέθοδος προβολής PLS-DA ανήκει στις επιβλεπόμενες στατιστικές μεθόδους, είναι δηλαδή απαραίτητος ο καθορισμός των ομάδων στις οποίες ανήκουν οι παρατηρήσεις-δείγματα από τον χρήστη και βρίσκεται σε στενή σχέση με τη μέθοδο PCA. Ωστόσο, δεν έχει ως στόχο την ανεύρεση μέγιστης διακύμανσης μεταξύ ανεξάρτητων μεταβλητών, αλλά προσπαθεί να απεικονίσει προβλεπόμενες και παρατηρούμενες μεταβλητές (predicted and observed variables) σε ένα νέο χώρο.

Χρησιμοποιείται όταν αναζητάται γραμμικός συσχετισμός μεταξύ δύο πινάκων δεδομένων, X (πχ. τα φασματοσκοπικά δεδομένα) και Y (πχ. οι συγκεντρώσεις των μεταβολιτών των δειγμάτων). Στην περίπτωση της PLS-DA, ο πίνακας Y περιέχει ποιοτικές πληροφορίες, όπως για παράδειγμα περιοχή, ηλικία, που χρησιμοποιούνται για την κατηγοριοποίηση ενός δείγματος.

Η μέθοδος PLS-DA είναι κατάλληλη σε περιπτώσεις, όπου ο αριθμός των μεταβλητών υπερβαίνει κατά πολύ αυτόν των παρατηρήσεων και όταν υπάρχει γραμμική σχέση μεταξύ των δεδομένων X. Έτσι, γίνεται δυνατή η διαχείριση πολύπλοκων μητρικών πινάκων που χαρακτηρίζονται από μεγάλο αριθμό παρατηρήσεων και μεταβλητών με στενή σχέση μεταξύ τους[68].

Η OPLS μέθοδος είναι μία τροποποίηση της PLS, η οποία περιλαμβάνει την εφαρμογή ενός φίλτρου "Orthogonal Signal Correction" (OSC). Πρόκειται για μία μεθοδολογία η οποία επιδρά στον πίνακα αποκρίσεων Y κατά τρόπο που επιτρέπει τη συστηματική και έντονη διαφοροποίηση του περιγραφικού πίνακα X που είναι ορθογώνια (μη συσχετιζόμενη) στον Y. Κατ’ αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η βελτιστοποίηση της απόδοσης ενός μοντέλου PLS.

Αρχή της μεθόδου είναι ο διαχωρισμός της συστηματικής ποικιλομορφίας στο X σε δύο μέρη, ένα γραμμικά συσχετιζόμενο με το Y και ένα μη συσχετιζόμενο, δηλαδή ορθογώνιο, στο Y. Αυτός ο διαχωρισμός των

δεδομένων του X πίνακα διευκολύνει την αποκωδικοποίηση και την εφαρμογή του μοντέλου σε νέα δείγματα αποκλείοντας από τη στατιστική τα δεδομένα του πίνακα X που είναι ορθογώνια στην απόκριση του πίνακα Y. Η μέθοδος OPLS-DA είναι κατάλληλη για την ταξινόμηση δεδομένων, τα οποία χαρακτηρίζονται από υψηλά συσχετιζόμενες μεταβλητές, οι οποίες προσδίδουν «θόρυβο» στη στατιστική διαδικασία[68].

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

3.1 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

- Σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography-HPLC), Αντλία SpectraSystem P4000, Αυτόματος δειγματολήπτης SpectraSystem AS3000, Ανιχνευτή UV SpectraSystem UV2000 και Ανιχνευτής πολλαπλής διόδου (PDA) SpectraSystem UV6000LP
- Σύστημα ημιπαρασκευαστικής υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (Preparative High Performance Liquid Chromatography-HPLC) με ενσωματωμένη αντλία, απαερωτή, αυτόματο δειγματολήπτη, ανιχνευτή UV και λογισμικό καταγραφής
- Σύστημα υγρής χρωματογραφίας υπερυψηλής απόδοσης συζευγμένης με υβριδικό φασματόμετρο μαζών (Ultra High Performance Liquid Chromatography- Mass Spectrometry)
- Αναλυτή γραμμικής παγίδας ιόντων (linear ion trap - LTQ) σε σειρά με τροχιακή παγίδα ιόντων (orbital trap - Orbitrap / Fourier Transform Mass Spectrometer) Discovery, Thermo Scientific.
- Φασματοσκόπιο πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance-NMR) Bruker AVANCE III 600 MHz.
- Συσκευή διήθησης υπό κενό με ηθμό (Buchner).
- Συμπυκνωτής με χρήση φυγοκέντρου και κενού SpeedVac
- Λυοφιλοποιητής
- Αναλυτικός ζυγός
- Λουτρό υπερήχων Elmasonic S100H

3.2 ΥΛΙΚΑ

- Μύλος άλεσης
- Περιστροφικός εξατμιστήρας (Rotary evaporator)
- Διαλύτες για τα αναλυτικά πειράματα καθαρότητας αναλυτικού βαθμού (Merck).
- Χρωματογραφικές πλάκες λεπτής στοιβάδας (Thin Layer Chromatography - TLC), αντίστροφης φάσης με επίστρωση γέλης πυριτίου και με πάχος στιβάδας 0.1 mm
- Ethyl acetate dist. (Απεσταγμένος Οξικός αιθυλεστέρας - EtOAc)
- Dichloromethane dist. (Απεσταγμένο Διχλωρομεθάνιο - DCM)
- Acetonitrile, βαθμού καθαρότητας HPLC (Ακετονιτρίλιο - C_2H_2N)
- Methanol, βαθμού καθαρότητας HPLC (Μεθανόλη - MeOH)
- Methanol-d4 (δευτεριωμένη Μεθανόλη - CD_3OD)
- Φυγόκεντρος Eppendorf™ Concentrator Plus με ενσωματωμένο κενό και επιλογή θερμοκρασίας θαλάμου
- Συσκευή τεμαχισμού Philips problend 6
- Σκουρόχρωμοι περιέκτες όγκου 100 mL
- Αυτόματες πιπέτες Gilson
- Ειδικό σωληνάκι NMR διαμέτρου 5 mm
- Φίλτρα σύριγγας
- Ημι-παρασκευαστική στήλη αντίστροφης φάσης fortis C18, (10x250 mm; 5 μm).

3.3 ΛΟΓΙΣΜΙΚΑ

- Simca
- Xcalibur (ThermoScientific)
- Mzmine
- Topspin 4.0.7(Bruker BioSpin srl).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ

4.1 ΣΥΛΛΟΓΗ ΤΗΣ ΔΡΟΓΗΣ

Η συλλογή φύλλων του μαστιχόδενδρου, Pistacia lentiscus πραγματοποιήθηκε για δύο διαφορετικούς σκοπούς σύμφωνα με τους στόχους της παρούσας μελέτης α) για την απομόνωση και ταυτοποίηση των δευτερογενών μεταβολιτών και β) για τη μεταβολομική μελέτη (Κεφάλαιο 6). Έτσι, η πρώτη συλλογή για τη φυτοχημική μελέτη πραγματοποιήθηκε τον Οκτώβριο του 2018 στην περιοχή Ολύμποι της Νότιας Χίου όπου και συλλέχθηκαν 5 kg φύλλων.

4.2 ΑΡΧΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΗΣ ΔΡΟΓΗΣ

4.2.1 ΞΗΡΑΝΣΗ ΤΗΣ ΔΡΟΓΗΣ

Τα φύλλα που παρελήφθησαν αφέθηκαν σε ξηρό περιβάλλον και σε συνεχή επαφή με τον αέρα μέχρι να επιτευχθεί η απόλυτη ξήρανσή τους και διήρκησε περίπου δύο εβδομάδες

4.2.2 ΚΟΝΙΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΤΗΣ ΔΡΟΓΗΣ

Τα φύλλα Μετά την ξήρανση της δρόγης ακολούθησε το στάδιο της κονιοποίησης αφού απομακρύνθηκαν τα ξυλώδη τμήματα που συλλέχθηκαν μαζί με τα φύλλα. Για την κονιοποίηση χρησιμοποιήθηκε μύλος άλεσης και η κονιοποιημένη δρόγη αποθηκεύτηκε σε γυάλινους περιέκτες. Η τελική ποσότητα της κόνις που προέκυψε ήταν 3 kg (Εικόνα 14).

Εικόνα 12: *Μύλος άλεσης και αποθήκευση λεπτής σκόνης σε γυάλινους περιέκτες*

4.2.3 ΑΡΧΙΚΟΙ ΕΛΕΓΧΟΙ ΓΙΑ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ

Προκειμένου να μελετηθεί η χημική σύσταση των φύλλων της Χιώτικης *Pistacia lentiscus*, διενεργήθηκαν δοκιμές εκχύλισης με σκοπό την εύρεση της βέλτιστης απόδοσης και πραγματοποιήθηκε έλεγχος με τη χρήση των αναλυτικών τεχνικών TLC, HPLC-DAD και NMR. Η βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου εκχύλισης της δρόγης κρίθηκε αναγκαία τόσο στην απομόνωση και ταυτοποίηση των ουσιών, όσο και στη μεταβολομική μελέτη. Μέσω της εφαρμογής των αναλυτικών μεθόδων παραλαμβάνεται μια πρώτη εικόνα της σύστασης της δρόγης που έχει συλλεχθεί, ενώ στη συνέχεια ανάλογα με το σκοπό της μελέτης επιλέγεται ο κατάλληλος τρόπος εκχύλισης.

3 gr κονιοποιημένων φύλλων χρησιμοποιήθηκαν για να γίνουν οι αρχικοί έλεγχοι. Το 1 gr χρησιμοποιήθηκε για τη δοκιμασία της διαδοχικής εκχύλισης με τη χρήση αυξανόμενης πολικότητας διαλυτών, όπου σε 30 mL διχλωρομεθάνιο (DCM) διαλύεται 1 gr φυτικού υλικού και αφήνεται να εκχυλιστεί στους υπερήχους για 2 h. Το υπερκείμενο (**Εκχύλισμα Α-s**) παραλαμβάνεται με τη χρήση ηθμού buchner υπό κενό. Το στερεό αφήνεται υπό κενό μέχρι ξηρού, έτσι ώστε να απομακρυνθεί ο διαλύτης και επανεκχυλίζεται με τον ίδιο τρόπο με μεθανόλη (MeOH) (**Εκχύλισμα Β-s**). Τέλος, ακολούθησε εκχύλιση με νερό (H_2O) από την οποία παραλαμβάνεται το **Εκχύλισμα Γ-s**. Τα άλλα 2 gr

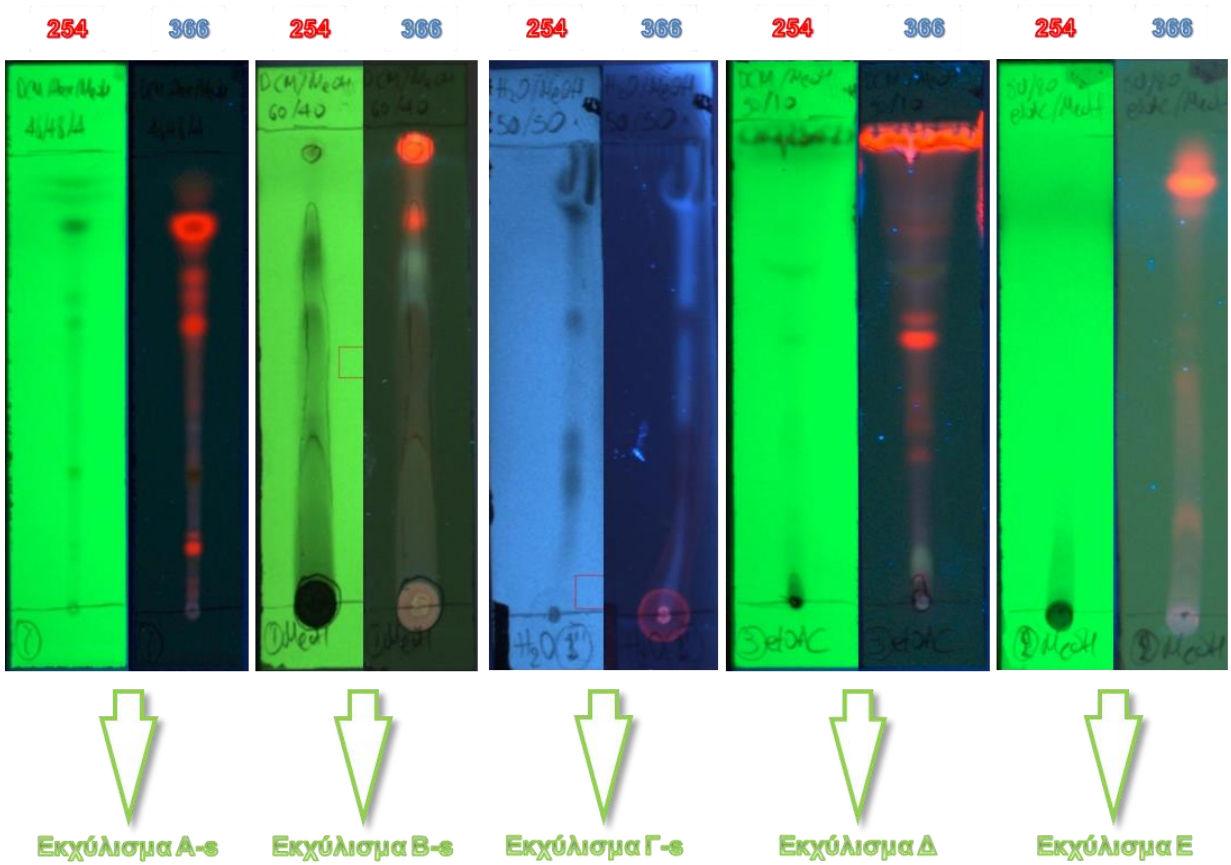
εκχυλίζονται χρησιμοποιώντας το ίδιο πρωτόκολλο με υπερήχους και τα εκχυλίσματα παραλαμβάνονται με διήθηση υπό κενό. Το 1 gr εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα (EtOAc) (**Εκχύλισμα Δ**), ενώ το άλλο 1 gr, αντίστοιχα, με μεθανόλη (**Εκχύλισμα Ε**). Τα 5 εκχυλίσματα εξατμίζονται σε περιστροφικό εξατμιστήρα (Rotary evaporator - rotavapor) μέχρι ξηρού για τον υπολογισμό των αποδόσεων της εκχύλισης και για τη διενέργεια ποιοτικού ελέγχου μέσω TLC, HPLC-DAD και NMR (**Πίνακας 3**).

Πίνακας 3: *Αποδόσεις δοκιμαστικών εκχυλίσεων*

Εκχυλίσματα	Ποσότητα εκχυλίσματος(g)	Απόδοση(%)
Α- s (*DCM*)	29.3	2.93
Β- s (*MeOH*)	322.3	32.23
Γ- s (*H_2O*)	86.3	8.63
Δ (*EtOAc*)	46.6	4.66
Ε (*MeOH*)	430.0	43.00

4.2.3.1 ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΜΕ TLC, HPLC-DAD και NMR

Όπως φαίνεται από τις αποδόσεις των εκχυλίσεων (**Πίνακας 3**), τόσο η διαδοχική όσο και η απευθείας εκχύλιση με MeOH οδηγεί στη μεγαλύτερη απόδοση σε σύγκριση με την εκχύλιση με EtOAc, DCM και H_2O. Επιπλέον, τα μεθανολικά εκχυλίσματα φαίνονται πιο πλούσια σε δευτερογενείς μεταβολίτες σύμφωνα με τις TLC (**Εικόνα 13**) αν και εξαιτίας της πολυπλοκότητας των εκχυλισμάτων δεν είναι δυνατόν να εξαχθούν παραπάνω συμπεράσματα.



Εικόνα 13: *Χρωματογραφήματα TLC δοκιμαστικών εκχυλίσεων*

Περισσότερες πληροφορίες εξήχθησαν με τη χρήση HPLC-DAD στα εκχυλίσματα. Κάθε εκχύλισμα διαλύθηκε σε MeOH/H_2O προς σχηματισμό διαλύματος τελικής συγκέντρωσης 5 mg/mL. Η χρωματογραφική στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν αντιστρόφου φάσης HS C18 25 cm x 4.6 mm, 5 μm. Η κινητή φάση ήταν MeOH και 0.2% οξικό οξύ (CH_3COOH) ακολουθώντας βαθμιδωτή μέθοδο έκλουσης για τον διαχωρισμό των συστατικών.

Συγκεκριμένα, δημιουργήθηκαν δύο μέθοδοι συνολικής διάρκειας 60 min, μία για τα πιο πολικά εκχυλίσματα **Β-s, Γ-s, Δ, Ε** και μία για το εκχύλισμα **Α-s** εξαιτίας της περιεκτικότητάς του σε άπολα συστατικά. Η μέθοδος για το εκχύλισμα Α αρχίζει (t=0) από 50/50 H_2O/MeOH μειώνοντας την πολικότητα σταδιακά μέχρι το χρονικό σημείο (t=55 min), που οι αναλογίες των διαλυτών φθάνουν στο 0/100 H_2O/MeOH και στη συνέχεια η αναλογία επανέρχεται στα αρχικά της επίπεδα, δηλαδή στο 50/50 H_2O/MeOH (t=56 min), όπου παραμένει σταθερή έως ότου ολοκληρωθεί η μέθοδος (t=60 min). Η μέθοδος για τα υπόλοιπα τέσσερα εκχυλίσματα ακολουθεί την ίδια πορεία με εκείνη του εκχυλίσματος Α με μόνη διαφορά την αλλαγή της αρχικής πολικότητας, που

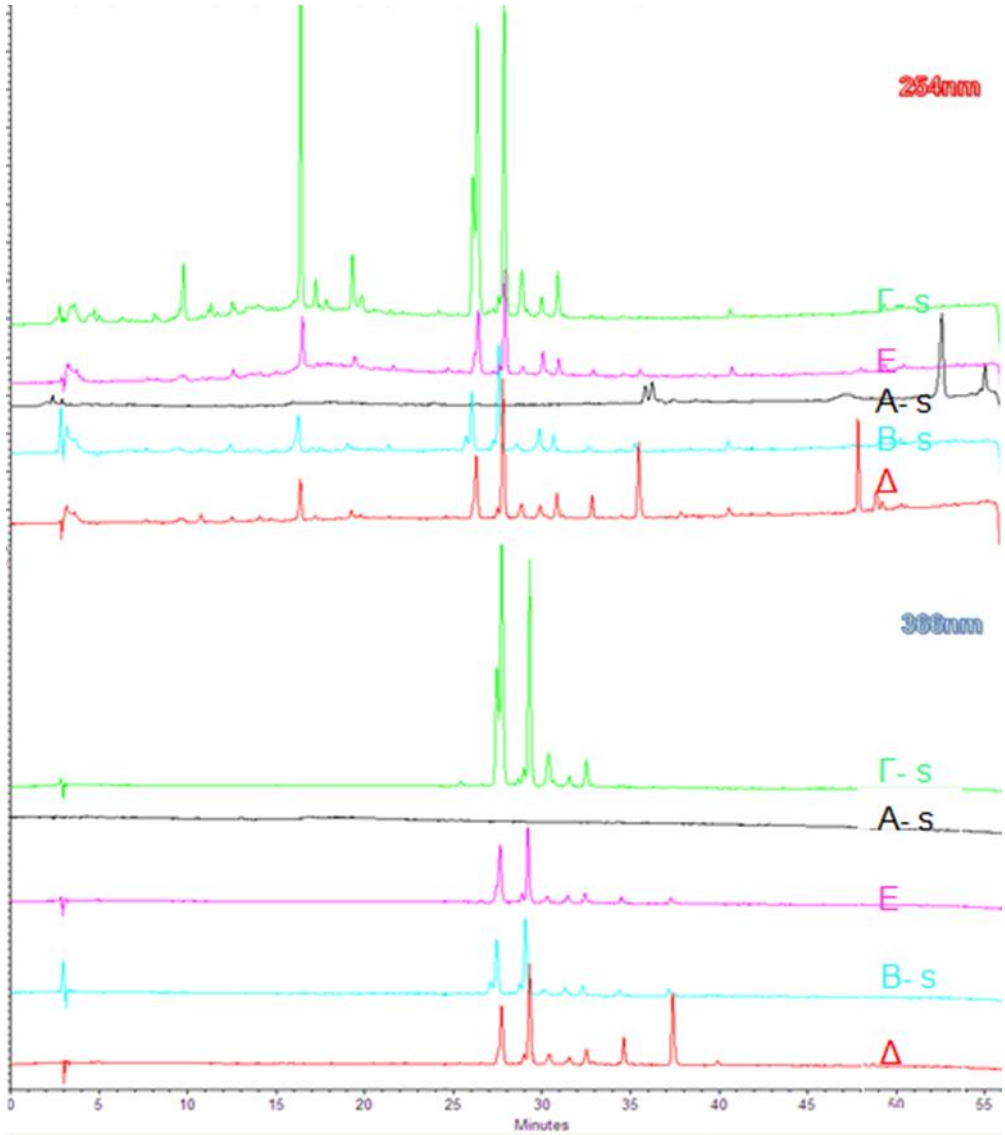
διαμορφώνεται στο 98/2 H_2O/MeOH (**Πίνακας 4**). Ο έλεγχος έγινε στα 254 nm και 366 nm (**Εικόνα 14**).

Πίνακας 4 : *Μέθοδοι HPLC-DAD ποιοτικού ελέγχου των εκχυλισμάτων*

Χρόνος	H_2O+0.2% AA %	MeOH%
0	50	50
55	0	100
56	50	50
60	50	50

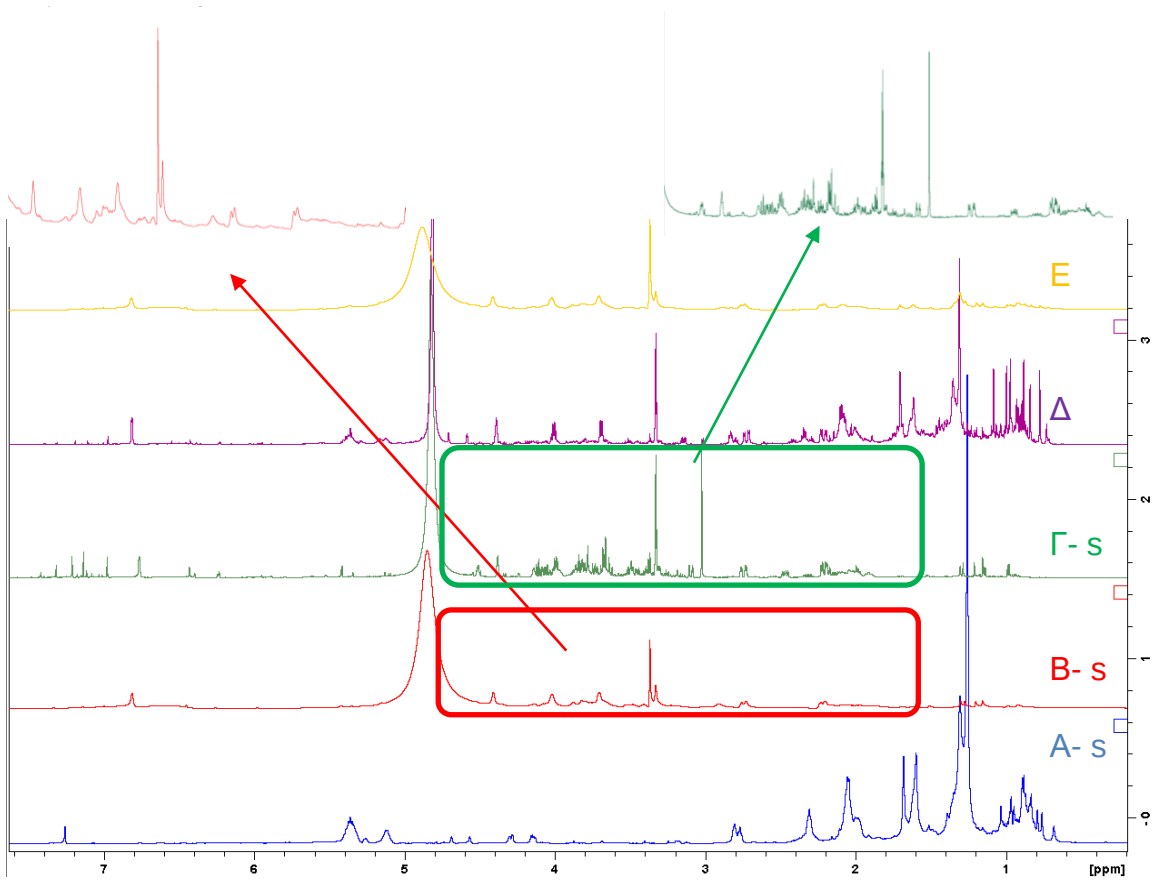
Χρόνος	H_2O+0.2% AA %	MeOH%
0	98	2
55	0	100
56	98	2
60	98	2

Από τα χρωματογραφήματα της **Εικόνας 14** παρατηρούμε ότι εμφανίζονται ελάχιστες κορυφές στο εκχύλισμα Α όπως άλλωστε αναμενόταν αφού περιέχει άπολα συστατικά που συνήθως δεν παρουσιάζουν απορρόφηση στα υπεριώδες. Το εκχύλισμα Β-s και Ε παρουσιάζουν πλούσιο προφίλ και μεγάλη ομοιότητα κάτι που επίσης αναμενόταν αφού πρόκειται για μεθανολικά εκχυλίσματα. Αξίζει να σημειωθεί ότι και το Γ-s παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα που υποδηλώνει την ύπαρξη αρκετά πολικών συστατικών στη δρόγη. Τέλος, το εκχύλισμα Δ εμφανίζονται επίσης αρκετές κορυφές, Αξίζει να σημειωθεί ότι οι βασικές κορυφές εντοπίζονται και στα τέσσερα εκχυλίσματα (εκτός του Α-s) ενώ διαφέρουν μόνο ως προς τα επίπεδα συγκέντρωσης.



Εικόνα 14: *Χρωματογραφήματα εκχυλισμάτων* A-s (DCM), B-s (MeOH), Γ-s, (H2O), Δ (EtOAc) και E (MeOH) *στα α)254 nm και β)366 nm*

Τέλος, πραγματοποιήθηκε ποιοτικός έλεγχος των εκχυλισμάτων με NMR. Τα πέντε διαφορετικά εκχυλίσματα διαλύθηκαν σε δευτεριωμένο διαλύτη για τη λήψη φασμάτων ^{1}H NMR. Το εκχύλισμα A-s διαλύθηκε σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο ($CDCl_3$), ενώ τα υπόλοιπα τέσσερα σε δευτεριωμένη μεθανόλη (CD_3OD). Στην **Εικόνα 15** απεικονίζονται τα φάσματα που προέκυψαν από τα πέντε διαφορετικά εκχυλίσματα.



Εικόνα 15: *Φάσματα ^{1}H NMR των εκχυλισμάτων* A-s (DCM), B-s (MeOH), Γ-s, (H2O), Δ (EtOAc) και E (MeOH)

Από την εξέταση των φασμάτων *^{1}H NMR* εξήχθησαν αντίστοιχα συμπεράσματα με αυτά της ανάλυσης με HPLC-DAD. Το εκχύλισμα A-s χαρακτηρίζεται από άπολα συστατικά όπως καταδεικνύεται από την παρουσία πολλών σημάτων στην περιοχή από 0 μέχρι 3ppm περίπου. Παρόμοια εικόνα εμφανίζεται και στο εκχύλισμα Δ. Αντίθετα τα εκχυλίσματα που προέκυψαν με πολικούς διαλύτες (B-s, Γ-s και E) εμφανίζουν περισσότερα σήματα και κυρίως στην περιοχή των αρωματικών από 6 έως 8 ppm περίπου.

Βάσει του παραπάνω ελέγχου με TLC, HPLC-DAD, NMR αλλά και βάσει των αποδόσεων της εκχύλισης αποφασίστηκε να μελετηθεί φυτοχημικά το εκχύλισμα B-s.

4.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ

Συνοπτικά, η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε για την απομόνωση και την ταυτοποίηση ουσιών από τα κονιοποιημένα φύλλα είναι η εξής:

Εκχύλιση κονιοποιημένων φύλλων

1| 2 kg κονιοποιημένων φύλλων εκχυλίστηκαν τέσσερις φορές με 1.5 L DCM στους υπερήχους για 4 h και έγινε παραλαβή του υπερκείμενου.
2| Στη συνέχεια εκχυλίστηκαν τέσσερις φορές με 1.5 L MeOH στους υπερήχους για 4 h και έγινε παραλαβή του υπερκείμενου.
3| Το μεθανολικό εκχύλισμα συμπυκνώθηκε, ζυγίστηκε και αποθηκεύτηκε.

Δέσμευση πολυφαινολών με XAD-7

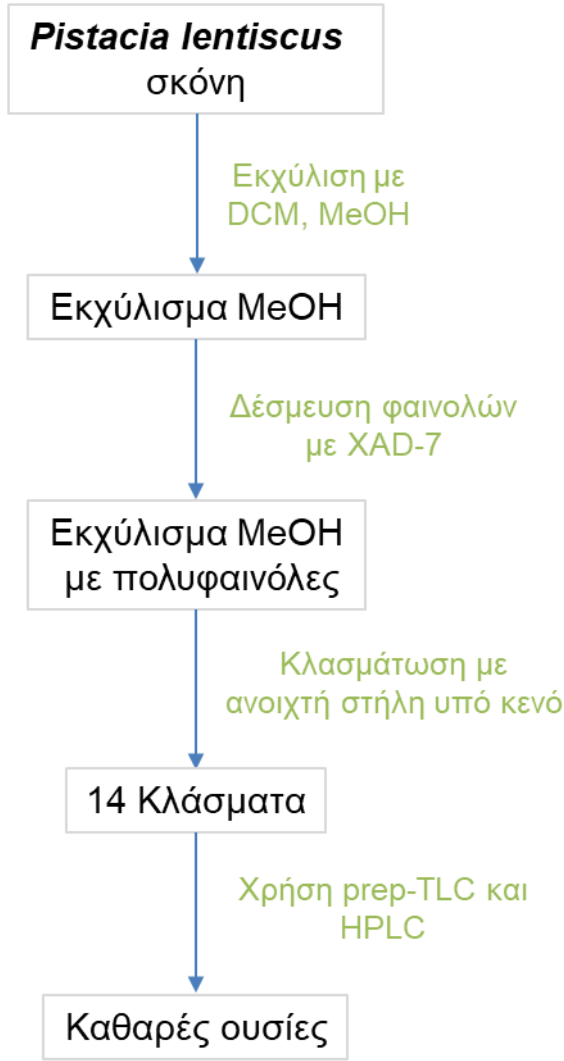
4| Χρησιμοποιήθηκε η ρητίνη XAD-7 για την απομάκρυνση των σακχάρων σε 50 g μεθανολικού εκχυλίσματος.
5| Παραλαμβάνονται οι πολυφαινόλες στο μεθανολικό κλάσμα.

Κλασμάτωση με χρήση χρωματογραφίας ανοιχτής στήλης υπό κενό

6| 10 g μεθανολικού εκχυλίσματος υποβοήθησαν σε χρωματογραφικό διαχωρισμό με τη χρήση ανοικτής στήλης υπό κενό με στατική φάση γέλης πυριτίου και κινητή φάση DCM/ EtOAc/ MeOH σε αναλογίες αυξανόμενης πολικότητας
7| Συλλέχθηκαν 14 κλάσματα.
8| Έπειτα από εξάτμιση του διαλύτη μέχρι ξηρού ζυγίστηκαν
9| Πραγματοποιήθηκε έλεγχος των κλασμάτων με TLC

Απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών

10| Στα κλάσματα 6 και 7 χρησιμοποιείται παρασκευαστική TLC και
11| Στα κλάσματα 9 και 10 χρησιμοποιείται ημι-παρασκευαστική HPLC-UV



Εικόνα 16: *Διαδικασία απομόνωσης δευτερογενών μεταβολιτών*

4.3.1 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΚΟΝΙΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΦΥΛΛΩΝ

Η εκχύλιση του φυτικού υλικού πραγματοποιήθηκε με τη χρήση υπερήχων χρησιμοποιώντας διαλύτες αυξανόμενης πολικότητας. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε DCM σε αναλογία 3/1 v/v (συνολική ποσότητα διαλύτη DCM 6 L). Το υπερκείμενο διάλυμα συμπυκνώθηκε, ζυγίστηκε και αποθηκεύτηκε. Στη συνέχεια ακολουθήθηκε η ίδια πορεία για την εκχύλιση του φυτικού με τη χρήση MeOH. Τελικά παραλήφθηκε μεθανολικό εκχύλισμα συνολικής ποσότητας 398.44 gr.

4.3.2 ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΤΩΝ ΣΑΚΧΑΡΩΝ

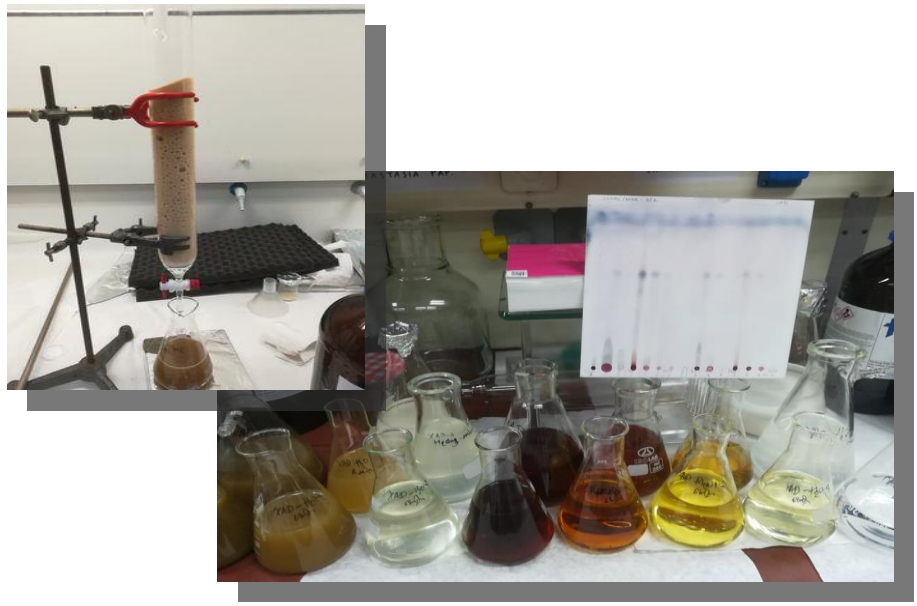
Για την απομάκρυνση των σακχάρων από το μεθανολικό εκχύλισμα και την παραλαβή εμπλουτισμένου εκχυλίσματος σε φαινολικές ενώσεις χρησιμοποιήθηκε η ρητίνη XAD. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν 50 g μεθανολικού εκχυλίσματος και 250 g ρητίνης XAD-7. Αρχικά έγινε ενεργοποίηση της ρητίνης εκπλένοντάς την τρεις φορές με H_2O σε αναλογία 1/1 v/v, παραμένοντας για 20 min στους υπερήχους, ώστε να διογκωθεί και μετά εκπλένοντάς την με MeOH με τον ίδιο ακριβώς τρόπο. Επίσης, ελέγχθηκαν δύο τρόποι για την απομάκρυνση των σακχάρων από το μεθανολικό εκχύλισμα, με σκοπό να βρεθεί ο καλύτερος εξ αυτών: η μέθοδος της ανάδευσης και η μέθοδος της στήλης.

<u>Πρωτόκολλο μεθόδου ανάδευσης:</u>

1| 25 g εκχυλίσματος MeOH τοποθετήθηκαν σε κωνική φιάλη μαζί με 125 g ρητίνης XAD-7 και 250 mL νερού και ανάδευση σε αυτόματο αναδευτήρα για 24 h
2| Ακολούθησε απομάκρυνση της ρητίνης με διήθηση σε συσκευή Buchner και παραλαβή του υπερκείμενου που περιέχει τα σάκχαρα.
3| Ακολούθησε προσθήκη H_2O σε αναλογία 1/1 v/v με τη ρητίνη και αφήνεται στους υπερήχους για 20 min για να αποδεσμευτούν τα σάκχαρα και επαναλήφθηκε το στάδιο της διήθησης τρεις φορές.
4| Στη συνέχεια ακολουθήθηκε παρόμοια πορεία αλλά με διαλύτη MeOH για την παραλαβή των πολυφαινολών.
5| Τέλος, η ρητίνη εκπλύθηκε τρείς φορές με H_2O και αποθηκεύτηκε σε MeOH

<u>Πρωτόκολλο μεθόδου στήλης:</u>

1| Τοποθετήθηκαν 125 g XAD-7 στη στήλη
2| Έγινε έκπλυση της ρητίνης με H_2O (πέντε όγκοι στήλης)
3| Προστέθηκαν 25 g μεθανολικού εκχυλίσματος διαλυμένου σε H_2O
4| Έγινε έκπλυση με H_2O (πέντε όγκοι στήλης) για την απομάκρυνση των σακχάρων
5| Ακολούθησε έκπλυση με MeOH (5 όγκοι στήλης) και παραλαβή του συμπυκνωμένου εκχυλίσματος
6| Έγινε έκπλυση με H_2O (πέντε όγκοι στήλης)
7| Έλεγχος εμπλουτισμένου εκχυλίσματος με TLC



Εικόνα 17: *Μέθοδος στήλης με ρητίνη*

Οι δύο παραπάνω μέθοδοι είχαν παρόμοια απόδοση ως προς το εμπλουτισμένο εκχύλισμα που παραλήφθηκε (**Πίνακας 5**). Ωστόσο, η διαφορά μεταξύ τους βρίσκεται στο χρόνο ολοκλήρωσής τους. Η μέθοδος με τη στήλη είχε συνολική διάρκεια 2 h, ενώ η μέθοδος με την ανάδευση χρειαζόταν τουλάχιστον 4 h μη συμπεριλαμβάνοντας τις 24 h ανάδευσης που προηγούνται και την απώλεια ποσότητας ρητίνης κατά τις μεταφορές. Η μέθοδος της στήλης είχε μόλις 5% απώλεια, ενώ στο τέλος της διαδικασίας ανάδευσης - λόγω των πολλαπλών μεταφορών - είχε παραμείνει το 73% της αρχικής ποσότητας ρητίνης (απώλεια σε ποσοστό περίπου 27%). Το γεγονός αυτό λαμβάνοντας υπ' όψιν και το υψηλό κόστος της ρητίνης είναι σημαντικός ανασταλτικός παράγοντας για την εκτεταμένη χρήση της πρώτης μεθόδου (μέθοδος ανάδευσης).

Πίνακας 5: *Αποδόσεις εκχυλίσεων με τις μεθόδους ανάδευσης και στήλης, αντίστοιχα*

Εκχυλίσματα	Ποσότητα εκχυλίσματος πολυφαινολών (g)	Απόδοση(%)
Μέθοδος ανάδευσης	6.82	27.28
Μέθοδος στήλης	7.49	29.96

4.3.3 ΚΛΑΣΜΑΤΩΣΗ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΑΝΟΙΧΤΗΣ ΣΤΗΛΗΣ ΥΠΟ ΚΕΝΟ

Το μεθανολικό εκχύλισμα (και από τις δυο μεθόδους) από το οποίο έχουν απομακρυνθεί τα σάκχαρα υποβλήθηκε σε κλασμάτωση με χρωματογραφία ανοικτής στήλης υπό κενό. Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε γέλη πυριτίου και ως κινητή φάση DCM, EtOAc, MeOH σε αναλογίες αυξανόμενης πολικότητας. Όπως φαίνεται στον ακόλουθο πίνακα (**Πίνακας 6**),συλλέχθηκαν συνολικά 13 κλάσματα του 1 L το καθένα

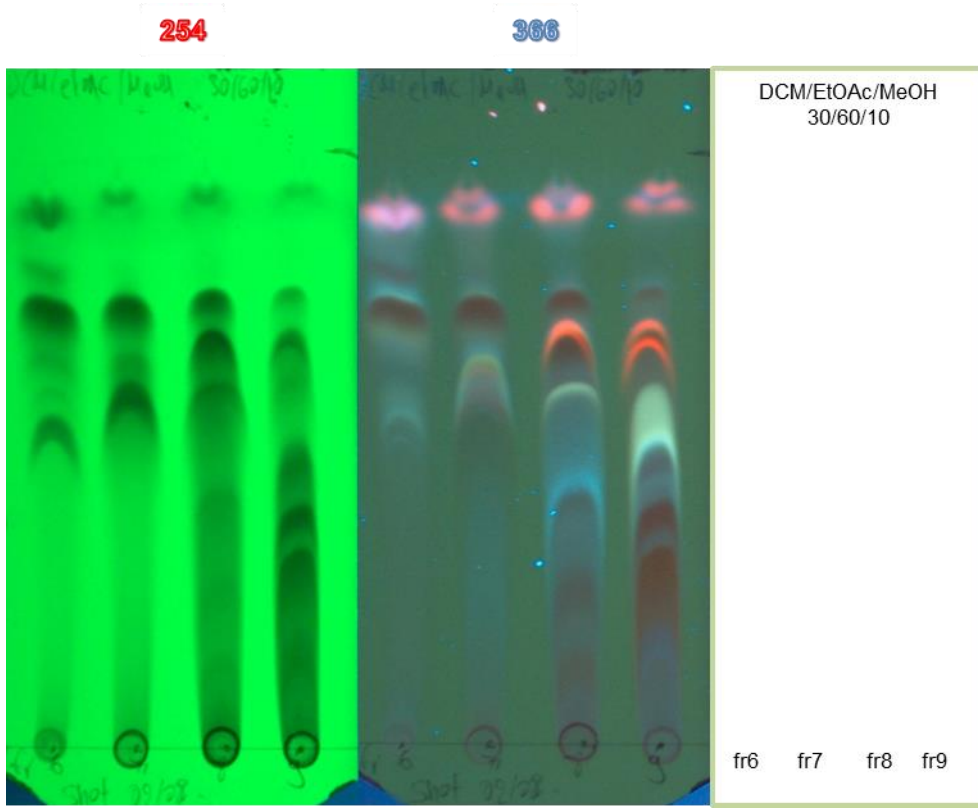
Πίνακας 6: *Σύστημα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν στην ανοιχτή στήλη, τα κλάσματα*

Μεθανολικό εκχύλισμα 10 g

Διαλύτης	Αναλογία	Κλάσμα	Βάρος
DCM	100	1	-
DCM/EtOAc	95/5	2	51.95 mg
DCM/EtOAc	90/10	3	81.5 mg
DCM/EtOAc	80/20	4	57.94 mg
DCM/EtOAc	70/30	5	44.77 mg
DCM/EtOAc	50/50	**6**	60.65 mg
DCM/EtOAc	30/70	**7**	79.57 mg
DCM/EtOAc	10/90	8	89.09 mg
EtOAc	100	**9**	212.57 mg
EtOAc/MeOH	95/5	**10**	1.22 g
EtOAc/MeOH	90/10	11	1.23 g
EtOAc/MeOH	80/20	12	1.87 g
EtOAc/MeOH	50/50	13	2.49 g
MeOH	100	14	1.14 g

4.3.4 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ

Αρχικά πραγματοποιήθηκε ποιοτικός έλεγχος των κλασμάτων με TLC (**Εικόνα 18**) ώστε να επιλεχθούν τα κλάσματα που θα υποβληθούν σε περαιτέρω μελέτη.



Εικόνα 18: *Δοκιμές με την αναλυτική τεχνική της TLC με στόχο την εύρεση κλασμάτων για απομόνωση ουσιών*

Βάσει του ποιοτικού ελέγχου, το κλάσμα **6** εμφάνισε πλούσιο προφίλ σε δευτερογενείς μεταβολίτες και αρκετά παρόμοιο με το κλάσμα **7** οπότε και υποβλήθηκαν σε παρασκευαστική TLC. Ελέγχθηκαν διάφορα συστήματα διαλυτών ανάπτυξης προκειμένου να επιλεγεί το βέλτιστο όπως DCM / EtOAc: 80 / 20 και DCM / EtOAc / MeOH: 30 / 60 / 10, 70 / 20 / 10, 70 / 25 / 5, 80 / 18 / 2). Την καλύτερη διαχωριστική ικανότητα παρουσίασε το σύστημα DCM / EtOAc / MeOH: 80 / 18 / 2 που χρησιμοποιήθηκε στην παραλαβή καθαρών μορίων στο

κλάσμα **6**. Αντίστοιχα, διάφορα συστήματα όπως DCM / EtOAc / MeOH: 30 / 60 / 10, 70 / 20 / 10, 70 / 25 / 5 ελέγχθηκαν στο κλάσμα **7** και βέλτιστο κρίθηκε το DCM / EtOAc / MeOH: 70 / 25 / 5 οπότε και επιλέχθηκε για τον διαχωρισμό και την απομόνωση των μορίων. Μετά την παραλαβή των μορίων χρησιμοποιήθηκε NMR και η φασματομετρία LC-MS για την ταυτοποίησή τους.

Από τη μελέτη των φασμάτων ^{1}H NMR, COSY, HMQC, HMBC, HRMS, HRMS/MS και με τη βοήθεια της βιβλιογραφίας ταυτοποιήθηκαν το Πρωτοκατεχικό οξύ (Protocatechuic acid - $C_7H_6O_4$), ο Μεθυλεστέρας του γαλλικού οξέος (Methyl gallate - $C_8H_8O_5$), η Κατεχίνη (Catechin - $C_{15}H_{14}O_6$), η Γαλλοκατεχίνη (Gallocatechin - $C_{15}H_{14}O_7$), η Απιγενίνη (Apigenin - $C_{15}H_{10}O_5$) και η Λουτεολίνη (Luteolin - $C_{15}H_{10}O_6$).

Πίνακας 7: *Ποιοτικός προσδιορισμός στα κλάσματα 6, 7*

Ουσίες	Κλάσμα 6	Κλάσμα 7
Πρωτοκατεχικό οξύ	+	+
Μεθυλεστέρας του γαλλικού οξέος	+	+
Κατεχίνη	+	-
Γαλλοκατεχίνη	+	-
Απιγενίνη	-	+
Λουτεολίνη	+	+

Παρόμοια πορεία ακολουθήθηκε στα κλάσματα **9** και **10**, Για την απομόνωση των συστατικών χρησιμοποιήθηκε ημι-παρασκευαστική υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (prep-HPLC-UV). Χρησιμοποιήθηκε ημι-παρασκευαστική στήλη αντίστροφης φάσης Fortis C18 (10x250 mm; 5 μm) ενώ έγιναν πολλές δοκιμές για την εύρεση του κατάλληλου συστήματος διαχωρισμού.

Στο κλάσμα **9** η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν συνολικής διάρκειας 30 min με κινητή φάση H_2O και MeOH. Η μέθοδος που ακολουθήθηκε τελικά φαίνεται στον πίνακα:

Πίνακας 8: *Μέθοδος διαχωρισμού κλάσματος 9*

Χρόνος (min)	H_2O	MeOH
0	99	1
10	20	80
25	80	20

29	99	1
30	99	1

Στο κλάσμα **10** η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν συνολικής διάρκειας 30 min με κινητή φάση: H_2O, ACN και MeOH. Η μέθοδος που ακολουθήθηκε τελικά φαίνεται στον πίνακα:

Πίνακας 9: *Μέθοδος διαχωρισμού κλάσματος 10*

Χρόνος (min)	**H_2O**	**ACN /MeOH 1/1**
0	99	1
20	50	50
25	50	50
29	99	1
30	99	1

Παρομοίως, μετά την απομόνωση των μορίων, χρησιμοποιήθηκε NMR και LC-HRMS για την ταυτοποίησή τους. Από τη μελέτη των φασμάτων ^{1}H NMR, COSY, COSY-LR, HMQC, HMBC, MS, MS/MS και με τη βοήθεια της βιβλιογραφίας ταυτοποιήθηκαν το Σικιμικό οξύ (Shikimic acid - $C_7H_{10}O_5$), η Τρικετίνη (Tricetin - $C_{15}H_{10}O_7$), η Μυρικιτρίνη (Myricitrin - $C_{21}H_{20}O_{12}$), η Κερκιτρίνη (Quercitrin - $C_{21}H_{20}O_{11}$) και ο Γλυκοπυρανοσίδης της 2-υδροξυ-1,8-κινεόλης (Hydroxy-1,8-cineole glucoside - $C_{16}H_{28}O_7$). Η Τρικετίνη ταυτοποιήθηκε μόνο στο κλάσμα **9**, οι υπόλοιπες ουσίες απομονώθηκαν και στα δύο κλάσματα.

Στην **Εικόνα 19** φαίνεται η οργανολογία της Prep-HPLC που χρησιμοποιήθηκε για την παραλαβή των δευτερογενών μεταβολιτών των κλασμάτων **9** και **10.**

Εικόνα 19: *Prep-HPLC οργανολογία και κλάσματα που παρελήφθησαν*

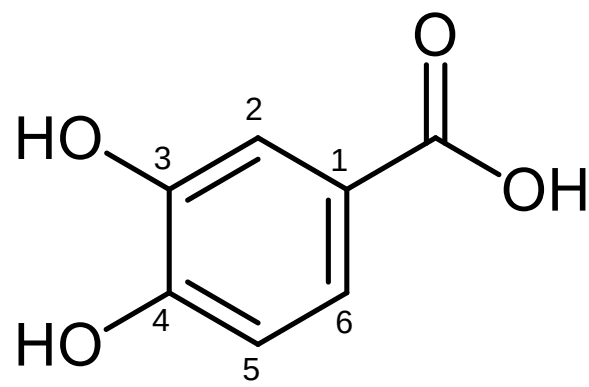
4.3.4 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ

1. Πρωτοκατεχικό οξύ

Το Πρωτοκατεχικό οξύ (ή 3,4-διυδροβενζοϊκό οξύ) είναι ένα φαινολικό οξύ που έχει αναφερθεί σε περισσότερούς από 500 φυτικούς οργανισμούς . Έχει παρόμοια δομή με το γαλλικό, το καφεϊκό και το βανιλικό οξύ που είναι γνωστές αντιοξειδωτικές ουσίες. Είναι ένας από τους κύριους μεταβολίτες των ανθοκυανών[69]. Τα τελευταία χρόνια διεξάγονται εντατικά διάφορες μελέτες στα φλαβονοειδή και τις πολυφαινόλες για τις ευεργετικές τους ιδιότητες στην ανθρώπινη υγεία όπως για τη μείωση του κινδύνου σε διάφορες ασθένειες όπως ο καρκίνος,ο διαβήτης και οι καρδιαγγειακές παθήσεις.

M.T.= $C_7H_6O_4$

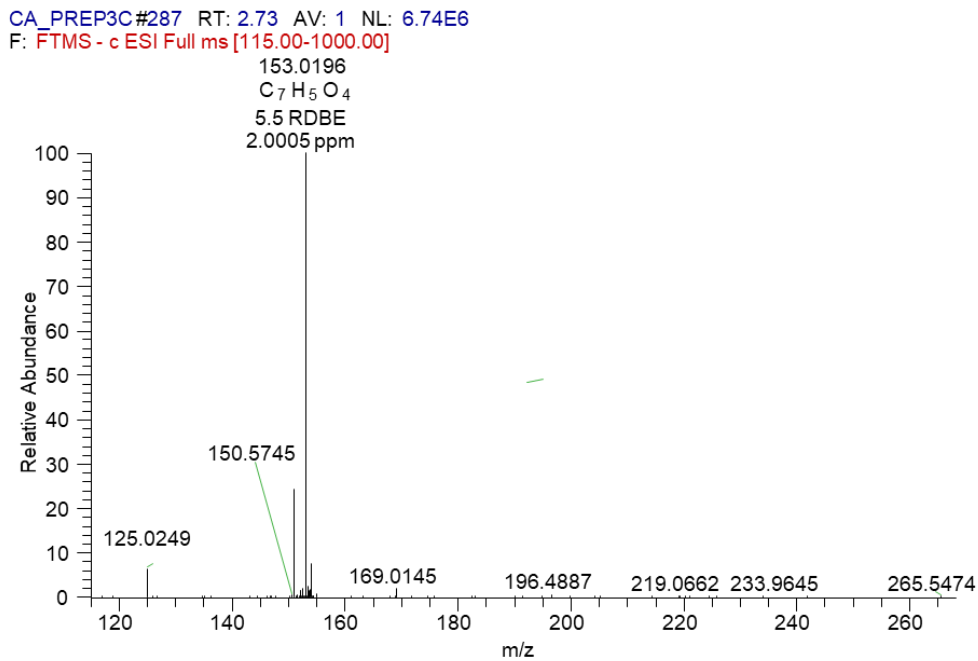
M.B=154.12



Πρωτοκατεχικό οξύ

Έχει αναφερθεί η απομόνωση του μορίου σε τρόφιμα, όπως η ελιά (*Olea europaea*) και το σταφύλι (*Vitis vinifera*)[70] καθώς και σε φλοιούς δέντρων στο γένος *Boswellia*[71], σε φύλλα του είδους *Diospyros melanoxylon*[72] και σε καρπούς του είδους *Hibiscus sabdariffa*[73].

Η λήψη του φάσματος μάζας έγινε σε φασματογράφο μάζας LTQ-Orbitrap με τη μέθοδο του ηλεκτροψεκασμού (ESI), σε αρνητικό ιονισμό. Το ψευδομοριακό ιόν $[M-H]^-$ ήταν εμφανές σε *m/z* 153.0196 που αντιστοιχεί στον μοριακό τύπο $C_7H_5O_4$ με RDB (Ring Double Bond) 5.5.

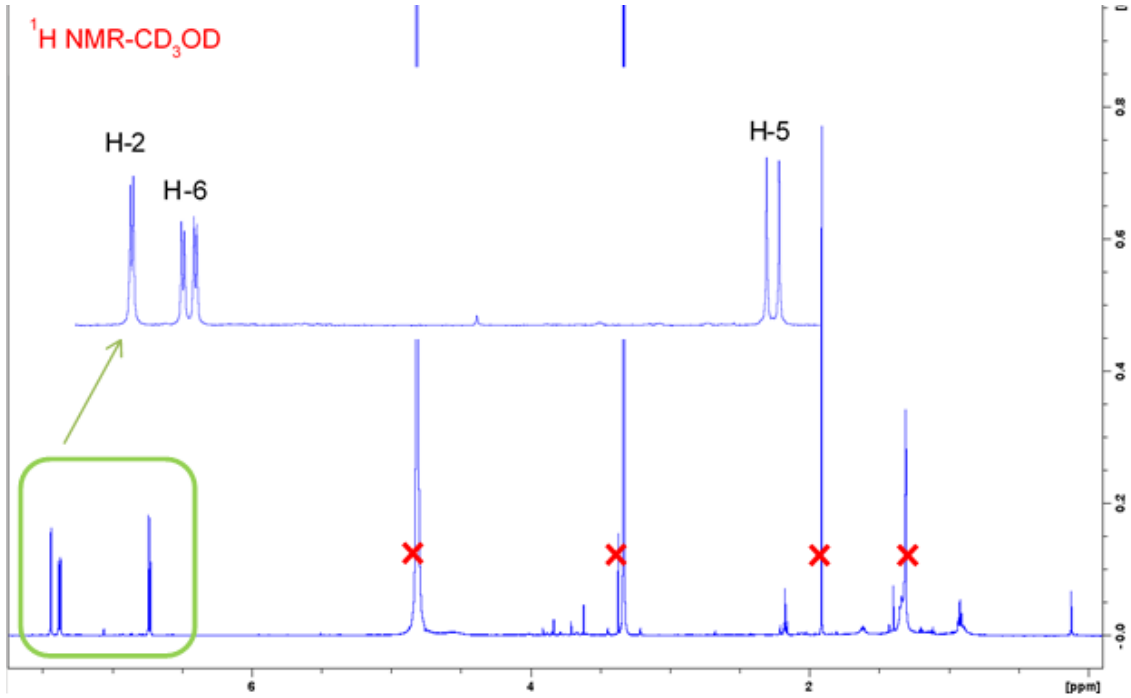


Εικόνα 20: *Φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας του Πρωτοκατεχικού οξέος*

Πίνακας 10: *Φασματοσκοπικά δεδομένα του Πρωτοκατεχικού οξέος*[74]

C/H	δ(ppm)	Πολ/τητα	*J* (Hz)	Τύπος C	Ολοκλήρωση	^{13}C (ppm)
1	-	-	-	-	-	122.4
2	7.43	d	2.05	CH	1	117.4
3	-	-	-	-	-	145.6
4	-	-	-	-	-	149.8
5	6.73	d	8.21	CH	1	116.2
6	7.37	dd	8.21/2.05	CH	1	122.6
C=O	-	-	-	-	-	170.4

Στο φάσμα ^{1}H NMR παρατηρούνται 3 σήματα στην αρωματική περιοχή (6.5-8.5 ppm) με ολοκλήρωση 1/1/1. Μία διπλή (d) κορυφή εμφανίζεται στα 7.43 ppm με σταθερά σύζευξης 2.05 Hz η οποία αντιστοιχεί στο H-2, μία διπλή-διπλών (doublet of doublets - dd) κορυφή στα 7.37 ppm με σταθερά σύζευξης 2.05 Hz και 8.21 Hz (H-5) και μία διπλή (d) κορυφή που εμφανίζεται στα 7.37 ppm με σταθερά σύζευξης 8.21 Hz (αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-6). Πρόκειται για μία υποκατάσταση αρωματικού δακτυλίου στις θέσεις 1, 2 και 4. Με τη μελέτη των φασμάτων και την βοήθεια της βιβλιογραφίας[75,76] επιβεβαιώθηκε ότι η ουσία είναι το Πρωτοκατεχικό οξύ.



Εικόνα 21: *Φάσμα ^{1}H NMR Πρωτοκατεχικού οξέος*

Το Πρωτοκατεχικό οξύ έχει διάφορες βιολογικές δράσεις. Οι πιο βασικές είναι η αντιοξειδωτική, η αντιμικροβιακή, η αντιδιαβητική και η αντικαρκινική δράση του. Επίσης, έχουν γίνει διάφορες δοκιμές *in vitro* για την εύρεση της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητάς του, όπως ο έλεγχος με 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH), με 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) ($ABTS^{+}$), με τη ρίζα του ανιόντος του υπεροξειδίου (O_2^{-}) και με τη ρίζα του υδροξυλίου (OH) και άλλες γνωστές δοκιμές παρουσιάζοντας σημαντικότερα υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σύγκριση με γνωστά αντιοξειδωτικά,

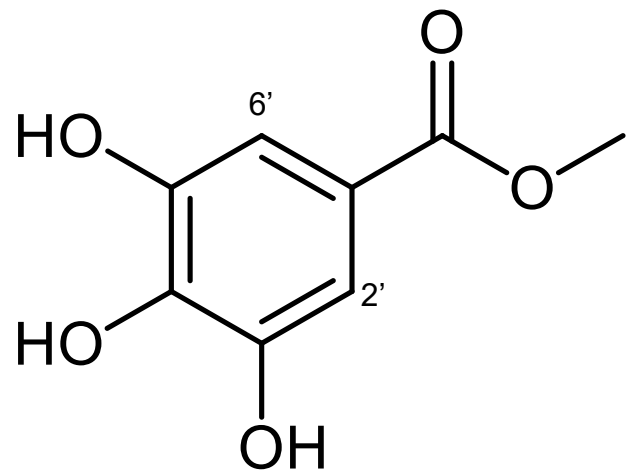
όπως το αντιδραστήριο Trolox[77]. Επιπλέον έχουν πραγματοποιηθεί έρευνες *in vivo* σε ποντίκια και παρατηρήθηκε αντικαρκινική δράση επηρεάζοντας τις φάσεις 1 και 2 του μεταβολισμού καρκινογόνων κυττάρων διαφόρων καρκινικών ιστών όπως του πνεύμονα, του παγκρέατος, του ήπατος, του δέρματος και του μαστού[78]. Επίσης, έχει αναφερθεί αντιμικροβιακή δράση σε Gram θετικά, Gram αρνητικά βακτήρια[79], και μύκητες μειώνοντας τα επίπεδα οξείδωσης των λιπιδίων εμποδίζοντας την επιμόλυνση του οργανισμού από αερόβιους μικροοργανισμούς[80]. Παρουσιάζει αντιδιαβητική ή αντιυπεργλυκαιμική δράση σε *in vitro* ελέγχους έχοντας παρόμοια δράση με εκείνη της ινσουλίνης ενεργοποιώντας τον υποδοχέα PPARγ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) που ρυθμίζει την έκφραση και δράση παραγόντων που συμβάλουν στην αποτελεσματικότητα των μηχανισμών μεταφοράς της γλυκόζης, όπως ο μεταφορέας γλυκόζης (GLUT) 4 και η αδιποκετίνη[81]. Τέλος, έχουν γίνει και άλλες μελέτες και παρατηρήθηκαν δράσεις όπως η αντιφλεγμονώδης, αναλγητική, αντισηπτική, αντιγηραντική και αντιαθηροσκληρωματική[69].

2. Μεθυλεστέρας του γαλλικού οξέος

Το Μεθυλο-γαλλικό οξύ (μέθυλο-3,4,5-τριυδροβενζοϊκός εστέρας) ή αλλιώς μεθυλεστέρας του γαλλικού οξέος είναι μια φαινολική ένωση που κατατάσσεται στην γενικότερη κατηγορία των γαλλικών εστέρων (galloyl esters), δηλαδή ενώσεις που περιέχουν στο βασικό σκελετό τους ένα εστερικό παράγωγο του γαλλικού οξέος (3,4,5-τριυδροβενζοϊκό οξύ). Το γαλλικό οξύ και οι εστέρες του χρησιμοποιούνται ευρέως στην κοσμετολογία, στη φαρμακοβιομηχανία και στην βιομηχανία τροφίμων[82].

M.T.= $C_8H_8O_5$

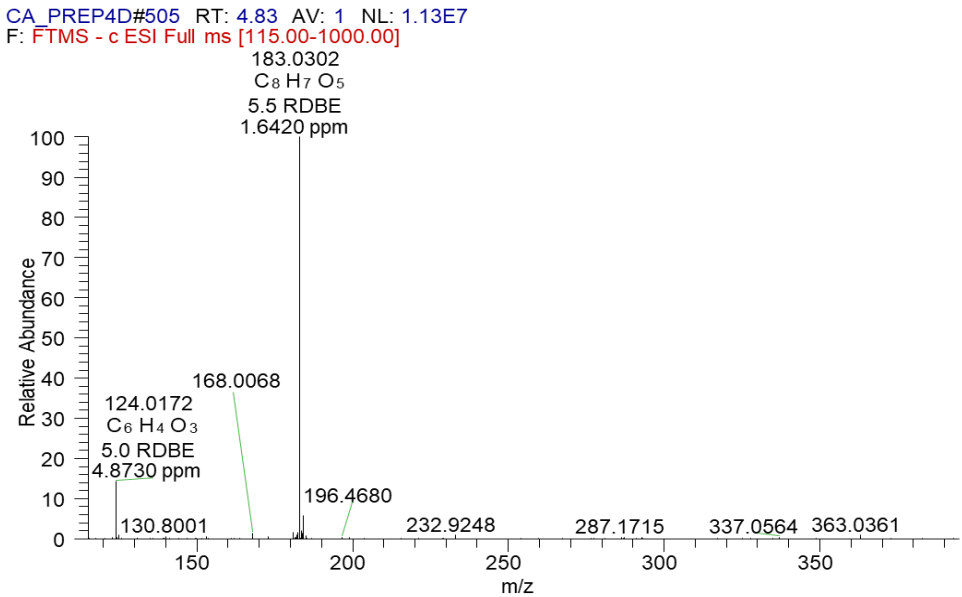
M.B=184.15



Μεθυλεστέρας του γαλλικού οξέος

Ο μεθυλεστέρας του γαλλικού οξέος έχει απομονωθεί από διάφορα γένη φυτών, όπως διάφορα γένη της οικογένειας Meliaceae, από το Galla Rhois[83] μια φυσική παραμόρφωση του φυτού *Rhus chinensis*, στα φυτά *Terminalia myriocarpa*[84], *Bergenia ciliata* και *Geranium niveum*[85] στον καρπό του *Paeonia anomala*[86], στα σπέρματα *Givotia rottleriformis* Griff[87] και στα σπέρματα του *Schinus terebinthifolius*[88].

Η λήψη του φάσματος μάζας έγινε σε φασματογράφο μάζας LTQ-Orbitrap με τη μέθοδο του ηλεκτροψεκασμού (ESI), σε αρνητικό ιονισμό. Το ψευδομοριακό ιόν $[M-H]^-$ ήταν εμφανές σε *m/z* 183.0302 που αντιστοιχεί σε μοριακό τύπο $C_8H_7O_5$ με RDB (Ring Double Bond) 5.5.

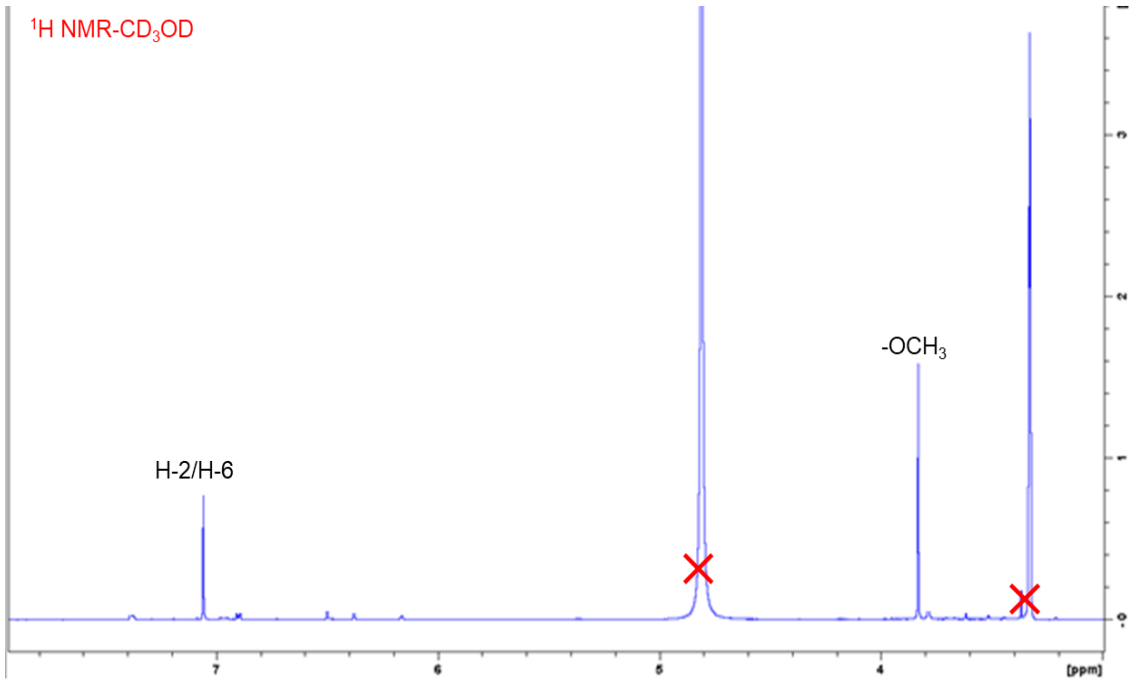


Εικόνα 22: *Φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας του Μεθυλεστέρα του γαλλικού οξέος*

Πίνακας 11: *Φασματοσκοπικά δεδομένα του Μεθυλεστέρα του γαλλικού οξέος*[89]

C/H	^{1}H (ppm)	Πολ/τητα	*J* (Hz)	Τύπος C	Ολοκλήρωση	^{13}C (ppm)
1	-	-	-	-	-	121.3
2	7.05	s	-	CH	2	109.6
3	-	-	-	-	-	146.1
4	-	-	-	-	-	140.3
5	-	-	-	-	-	146.1
6	7.05	s	-	CH	2	109.6
C=O	-	-	-	-	-	165.9
OCH_3	3.83	s	-	CH3	3	51.5

Στο φάσμα ^{1}H NMR παρατηρούνται 2 σήματα. Μία απλή (s) κορυφή στα 7.05 ppm που αντιστοιχεί στα πρωτόνια H-2' και H-6' λόγω της συμμετρίας του δακτυλίου, με ολοκλήρωση 2 και μία απλή (s) κορυφή στα 3.83 ppm που αντιστοιχεί σε πρωτόνιο μεθόξυ-ομάδας με ολοκλήρωση 3. Με τη μελέτη των φασμάτων και τη βοήθεια της βιβλιογραφίας[90,91] διαπιστώθηκε ότι η ουσία είναι ο μεθελεστέρας του γαλλικού οξέος.



Εικόνα 23: *Φάσμα ^{1}H NMR Μεθυλεστέρα του γαλλικού οξέος*

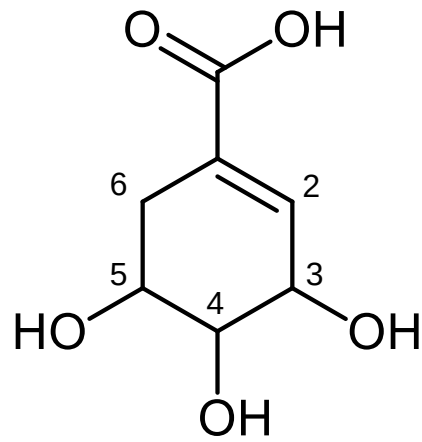
Ο Μεθυλεστέρας του γαλλικού οξέος έχει μελετηθεί εκτενώς και είναι μία από τις πιο δημοφιλείς φαινολικές ουσίες του φυτικού βασιλείου λόγω της πολλαπλής βιολογικής δράσης του ως αντιοξειδωτική, αντικαρκινική, αντιμικροβιακή και αντιφλεγμονώδης ουσία. Έχει αναφερθεί σημαντική αντιοξειδωτική δράση στην πρόληψη του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2)[92]. Επιδρά ως παράγοντας αναστολής του πολλαπλασιασμού καρκινικών κυττάρων σε καρκίνους του δέρματος και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αποφυγή του κινδύνου εμφάνισής τους[87]. Σε πειράματα που διεξήχθησαν σε ζώα επιμολυσμένα με σαλμονέλα εμφάνισε αντιμικροβιακή δράση, ειδικότερα όταν η χορήγησή του έγινε σε συνδυασμό με αναστολείς της ATPασης[89]. Παρουσιάζει αντιφλεγμονώδη δράση με τη συμμετοχή του σε διάφορες διεργασίες του κυττάρου, όπως η παραγωγή φλεγμονωδών μεσολαβητών και η ενεργοποίηση και μεταφορά των λευκοκυττάρων[93].

3. Σικιμικό οξύ

Το σικιμικό οξύ (3,4,5-τριυδρόξυ-1-κυκλοεξέν-1-καρβοξυλικό οξύ) είναι μια φυσική οργανική ένωση που απαντά σε φυτά, βακτήρια, μύκητες, άλγη και παράσιτα και χρησιμοποιείται για τη βιοσύνθεση αρωματικών αμινοξέων μέσω του βιοχημικού μονοπατιού του σικιμικού οξέος[94].

M.T.= $C_7H_{10}O_5$

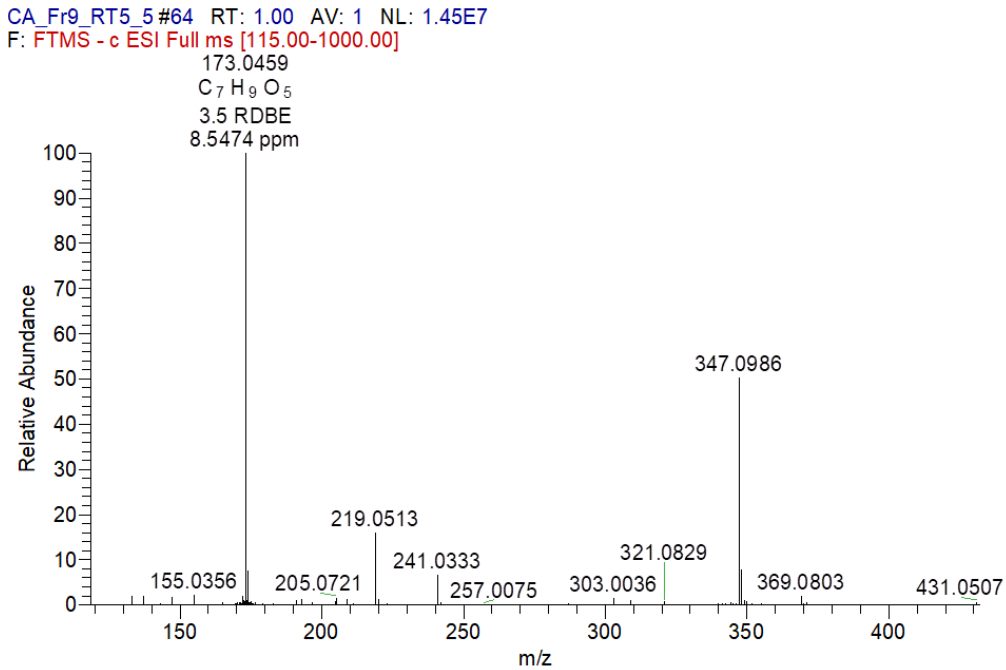
M.B=174.15



Σικιμικό οξύ

Το σικιμικό οξύ απομονώθηκε πρώτη φορά στην Ιαπωνία το 1885 από το *Illicium religiosum* και πήρε το όνομά του από το Ιαπωνικό όνομα του φυτού, *shikimi-no-ki*[96,97]*.* Η απόδοση της δομής του έγινε μετά από 50 χρόνια. Έχει απομονωθεί από πολλά φυτά και κυρίως βρίσκεται στα φύλλα τους. Χαρακτηριστικά μεγάλα ποσοστά σε σικιμικό οξύ παρουσιάζουν τα φυτά του γένους *Illicium*[98] και κυρίως φυτά τροπικών περιοχών, όπως είναι τα *E. citriodora, L. styraciflua*[97]*.*

Η λήψη του φάσματος μάζας έγινε σε φασματογράφο μάζας LTQ-Orbitrap με τη μέθοδο του ηλεκτροψεκασμού (ESI), σε αρνητικό ιονισμό. Το ψευδομοριακό ιόν $[M-H]^-$ ήταν εμφανές σε *m/z* 173.0459 που αντιστοιχεί σε μοριακό τύπο $C_7H_9O_5$ με RDB 3.5. Εμφανίζεται επιπλέον το διμερές του μορίου $[2M-H]^-$ σε *m/z* 347.0986.



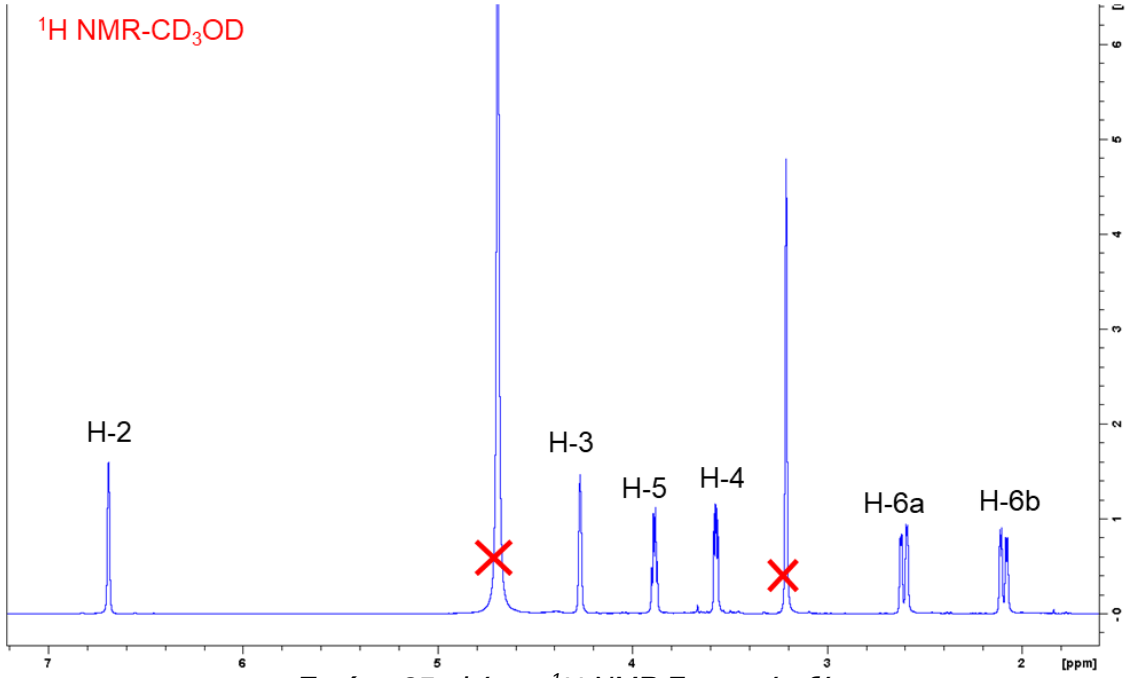
Εικόνα 24: *Φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας του Σικιμικού οξέος*

Πίνακας 12: *Φασματοσκοπικά δεδομένα του Σικιμικού οξέος*

C/H	^{1}H (ppm)	Mult/ty	*J* (Hz)	Type	Ολοκλήρωση	^{13}C (ppm)	HMBC Correlations
1	-	-	-	-	-	129.4	H-3 / H-5
2	6.73	m	-	CH	1	137,3	H-3 / H-4 / H-6
3	4.28	m	-	CH	1	65,9	H-5
4	3.61	dd	7.35/4.18	CH	1	71.4	H-2 / H-6
5	3.92	m	-	CH	1	67.1	H-4 / H-6
6	2.11/2.64	m	-	CH_2	2	30.3	H-2 / H-4
C=O	-	-	-	-	-	168.3	H-2

Στο φάσμα ^{1}H NMR παρατηρείται μια πολλαπλή (m) κορυφή στην περιοχή στα 6.73 ppm που αντιστοιχεί στο H-2. Επίσης, εμφανίζονται τρεις κορυφές στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος και συγκεκριμένα, δύο πολλαπλές (m) κορυφές (H-3, H-5) που συντονίζονται στα 4.28 ppm και 3.92 ppm, αντίστοιχα και μία διπλή-διπλών (dd) κορυφή στα 3.61 ppm (H-4, *J*=7.35/4.18 Hz). Επιπλέον εμφανίζονται άλλες δύο πολλαπλές (m) κορυφές στα 2.64 ppm και 2.11 ppm που αντιστοιχούν σε πρωτόνια αλλυλικής ομάδας και γι' αυτό βρίσκονται αποθωρακισμένα σε σχέση με τα υπόλοιπα πρωτόνια.

Στο φάσμα COSY εμφανίζονται οι συζεύξεις μεταξύ των πρωτονίων του δακτυλίου (H-2 σύζευξη ^{3}J με H-3, H-3 σύζευξη ^{3}J με H-4, H-4 σύζευξη ^{3}J με H-5, H-5 σύζευξη ^{3}J με H-6). Στο φάσμα HMBC εμφανίζεται η σύζευξη ανάμεσα στον άνθρακα του καρβονυλίου και στο H-2. Με βάση τα παραπάνω δεδομένα και τη βοήθεια της βιβλιογραφίας[99,100] έγινε η απόδοση της χημικής δομής του Σικιμικού οξέος.



Εικόνα 25: *Φάσμα ^{1}H NMR Σικιμικού οξέος*

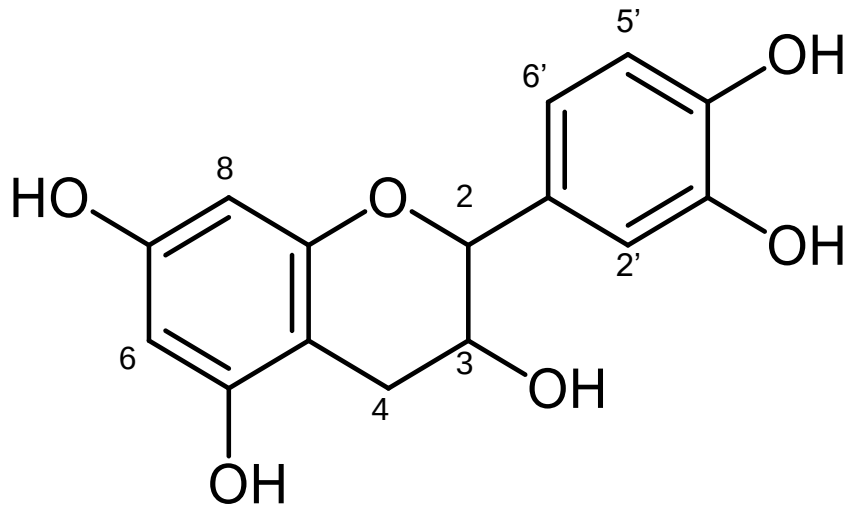
Το Σικιμικό οξύ χρησιμοποιείται ως αρχικό συστατικό (πρώτη ύλη) στη βιομηχανική παραγωγή της δραστικής ένωσης του Tamiflu® , την Οσελταμιβίρη, για την καταπολέμηση του ιού της γρίπης[101]. Επιπλέον χρησιμοποιείται γενικά ως πρόδρομη ουσία στην οργανική σύνθεση λόγω της χαρακτηριστικής χειρομορφίας που παρουσιάζει και της διαθεσιμότητάς του. Είναι πρόδρομο μόριο στη σύνθεση της ζεϋλενόνης (Zeylenone)[102], μίας ουσίας που εφαρμόζεται στη χημειοθεραπεία νεοπλασιών. Επιπλέον χρησιμοποιείται στη σύνθεση διαφόρων άλλων φυσικών βιοδραστικών ουσιών όπως του χορισμικού οξέος (chorismic acid), της περικοσίνης Α (pericosin A) και της βαλιοαμίνης (valioamine)[103].

4. Κατεχίνη

Η Κατεχίνη (2-(3,4-διυδροξυφαινυλ)-3,4-διυδρο-2Η-χρομεν-3,5,7-τριόλη) είναι μια φυσική φαινόλη η οποία κατατάσσεται στην οικογένεια των φλαβονοειδών και συγκεκριμένα στις φλαβαν-3-όλες (που αλλιώς λέγονται κατεχίνες). Είναι ένα από τα γνωστά αντιοξειδωτικά που βρίσκονται στα τρόφιμα.

M.T.= $C_{15}H_{14}O_6$

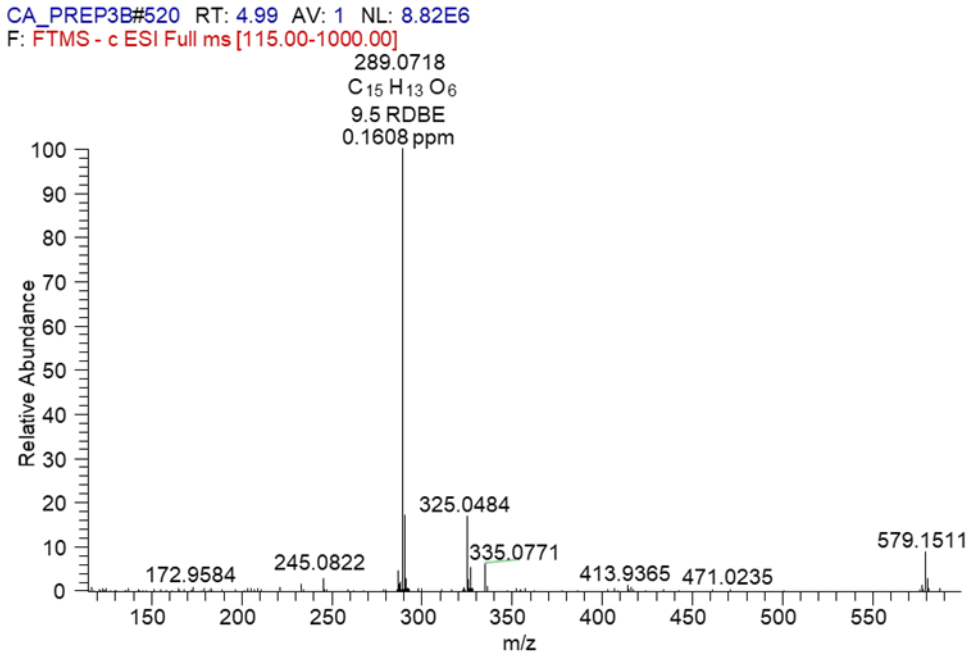
M.B=290.27



Κατεχίνη

Σημαντικές πηγές της είναι τα φρούτα όπως το μήλο, το σταφύλι και τα κεράσια. Σε μεγάλα ποσοστά βρίσκεται επίσης στο τσάι. Ακόμη βρίσκεται σε λαχανικά και όσπρια[104]. Κατεχίνες βρίσκονται σε διάφορα φαρμακευτικά φυτά όπως το *Acacia catechu* L.f από όπου έχει πάρει και το όνομά της από το αφέψημα του φυτού (catechu)[105], το *Ficus cordata*[106], το *Khaya grandifoliola* C.D.C[107] και το *Psidium guajava* [108].

Η λήψη του φάσματος μάζας έγινε σε φασματογράφο μάζας LTQ-Orbitrap με τη μέθοδο του ηλεκτροψεκασμού (ESI), σε αρνητικό ιονισμό. Το ψευδομοριακό ιόν $[M-H]^-$ ήταν εμφανές σε *m/z* 289.0718 που αντιστοιχεί σε μοριακό τύπο $C_{15}H_{13}O_6$ με RDB 9.5.



Εικόνα 26: *Φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας της Κατεχίνης*

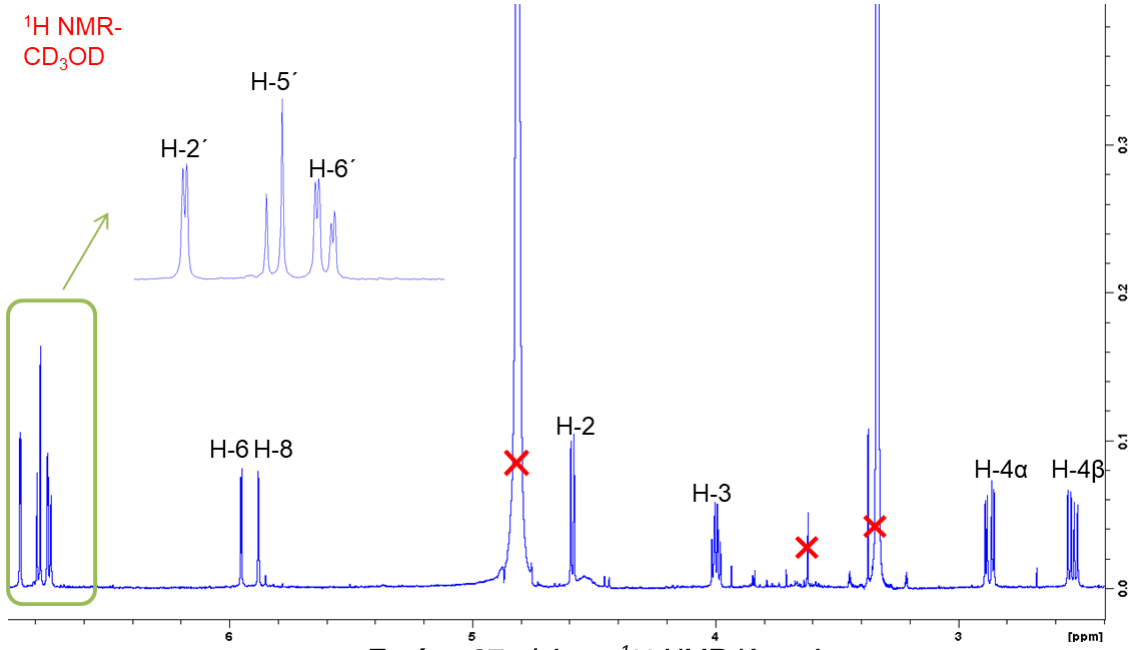
Πίνακας 13: *Φασματοσκοπικά δεδομένα της Κατεχίνης*[109]

C/H	^{1}H (ppm)	Πολ/τητα	*J* (Hz)	Τύπος C	Ολοκλήρωση	^{13}C (ppm)
2	4.58	d	7.71	CH	1	82.8
3	3.99	m	-	CH	1	68.4
4a	2.87	dd	16.11/5.31	CH2	1	28.8
4b	2.52	dd	16.11/8.21	CH2	1	28.8
5	-	-	-	-	-	157.1
6	5.94	d	2.35	CH	1	96.2
7	-	-	-	-	-	157.6
8	5.87	d	2.35	CH	1	95.5

4α	-	-	-	-	-	100.7
8β	-	-	-	-	-	156.7
1’	-	-	-	-	-	132.3
2’	6.85	d	2.04	CH	1	115.3
3’	-	-	-	-	-	145.6
4’	-	-	-	-	-	145.7
5’	6.78	d	8.13	CH	1	115.7
6’	6.74	dd	8.13/2.04	CH	1	120.1

Στο φάσμα ^{1}H NMR παρατηρούνται αρχικά 3 κορυφές στην αρωματική περιοχή (6.5-8.5 ppm χαρακτηριστικές της ύπαρξης αρωματικού δακτυλίου με υποκατάσταση στις θέσεις 1,2,4. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται μία διπλή (d) κορυφή στα 6.85 ppm (H-2’, *J*=2.04 Hz), μία διπλή-διπλών (dd) κορυφή στα 6.74 ppm (H-5’, *J*=8.13 Hz και 2.04 Hz) και μία διπλή (d) κορυφή στα 6.74 ppm (H-6’, *J*=8.13 Hz). Στα 5.94 και 5.87 ppm εμφανίζονται δύο διπλές (d) κορυφές που αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-6 και H-8 και είναι χαρακτηριστικές του A A αρωματικού δακτυλίου των φλαβονοειδών με υποκατάσταση στις θέσεις 5, 7.

Τα υπόλοιπα σήματα αντιστοιχούν σε πρωτόνια του πυρανικού δακτυλίου (C δακτυλίου) των φλαβανολών. Συγκεκριμένα εμφανίζονται δύο κορυφές στην οξυγονωμένη περιοχή, μια διπλή (d) κορυφή στα 4.58 ppm (H-2, *J*=7.71Hz) και μια πολλαπλή (m) κορυφή στα 3.99 ppm (H-3) και δύο dd κορυφές στα 2.87 ppm (H-4α, *J*=16.11 και 8.21 Hz) και στα 2.52 ppm (H-4β, *J*=16.11 και 8.21 Hz). Λόγω των δύο ασύμμετρων κέντρων στον πυρανικό δακτύλιο στις θέσεις 2, 3 υπάρχουν 4 ϊσομερή. Δύο από τα ισομερή αυτά, τα διαστεροισομερή έχουν τους υποκατάστατες στις θέσεις 2, 3 σε *trans* διαμόρφωση και ανήκουν στην κατηγορία των κατεχινών ενώ τα άλλα δύο σε *cis* διαμόρφωση και ανήκουν στην κατηγορία των επικατεχινών. Με τη βοήθεια της βιβλιογραφίας[110,111] διαπιστώθηκε ότι η ουσία είναι η κατεχίνη λόγω της σταθεράς σύζευξης του H-2 που βρίσκεται στα 7.71 Hz, ενώ στην επικατεχίνη θα βρισκόταν κοντά στα 2 Hz.



Εικόνα 27: *Φάσμα ^{1}H NMR Κατεχίνης*

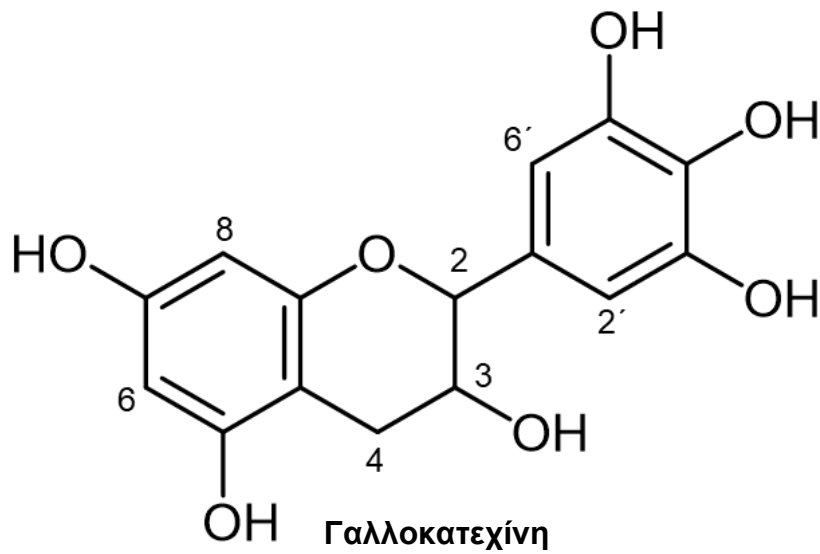
Από τα παλιά χρόνια τα εκχυλίσματα που περιείχαν κατεχίνη βοηθούσαν στην καταπολέμηση των παθήσεων της καρδιάς. Όμως μέχρι σήμερα δεν έχουν βρεθεί στοιχεία που να αποδεικνύουν ότι η κατεχίνη, ως ουσία - και όχι τα εκχυλίσματα που περιέχουν κατεχίνη - βοηθάει στα καρδιαγγειακά προβλήματα[112]. Διάφορες *in vitro* έρευνες αναφέρουν ότι η κατεχίνη βοηθάει στην προστασία κατά των εκφυλιστικών παθήσεων[104]. Τα φλαβονοειδή γενικά έχουν αντιοξειδωτική δράση προστατεύοντας τον οργανισμό από το οξειδωτικό στρες που συχνά ενοχοποιείται για διάφορες παθήσεις όπως καρκινογένεση, αθηροσκλήρωση, υπέρταση και νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπως το Alzheimer και το Parkinson[113,114]. Αντιμικροβιακή δράση εμφανίζεται περισσότερο σε Gram θετικά βακτήρια και λιγότερο σε Gram αρνητικά[115]. Επιπλέον έχει βρεθεί σε μελέτες που έχουν γίνει σε ζώα ότι οι κατεχίνες αναστέλλουν την καρκινογένεση στο δέρμα, στους πνεύμονες, στο ήπαρ, στον προστάτη, στον οισοφάγο και στο στομάχι[116]. Επιπρόσθετα έχει αναφερθεί ότι αποτρέπει την οξείδωση του ανθρώπινου πλάσματος[117].

5. Γαλλοκατεχίνη

Η Γαλλοκατεχίνη (2-(3,4,5-τριυδροξυφενυλ)-3,4-διυδρο-2Η-χρομεν-3,5,7-τριόλη) είναι κι αυτή μια φλαβανόλη και έχει παρόμοια δομή με αυτή της κατεχίνης. Επίσης, έχει παρόμοιες πηγές με κύριες το πράσινο τσάι[118], τις μπανάνες[119] και το ρόδι.

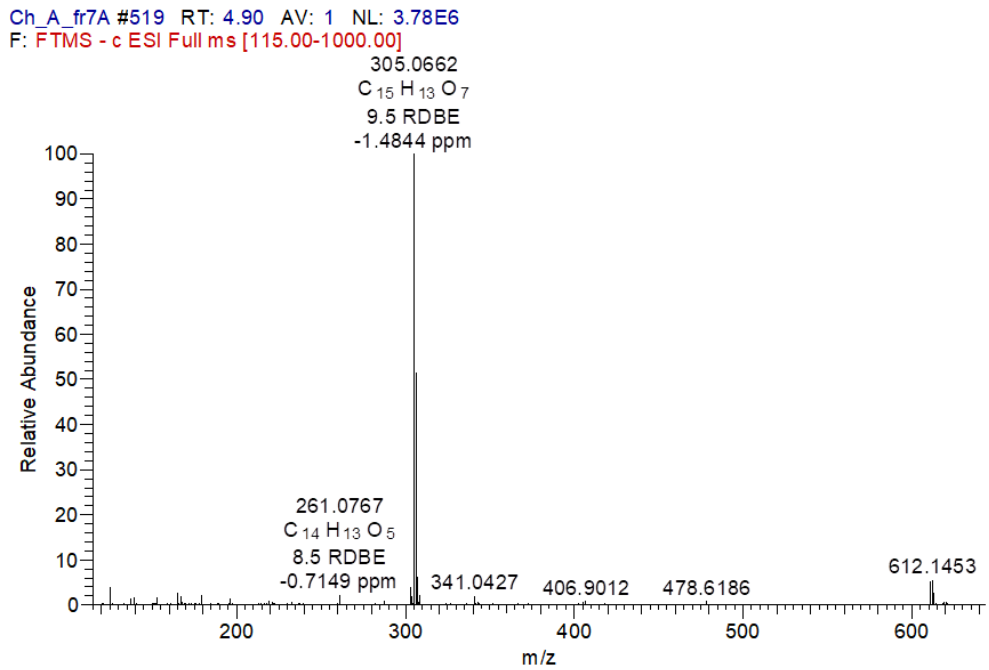
M.T.= $C_{15}H_{14}O_7$

M.B=306,26



Γαλλοκατεχίνη

Η λήψη του φάσματος μάζας έγινε σε φασματογράφο μάζας LTQ-Orbitrap με τη μέθοδο του ηλεκτροψεκασμού (ESI), σε αρνητικό ιονισμό. Το ψευδομοριακό ιόν $[M-H]^-$ ήταν εμφανές σε *m/z* 305.0662 που αντιστοιχεί σε μοριακό τύπο $C_{15}H_{13}O_7$ με RDB (Ring Double Bond) 9.5.



Εικόνα 28: *Φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας Γαλλοκατεχίνης*

Πίνακας 14: *Φασματοσκοπικά δεδομένα τηςΓαλλοκατεχίνης*

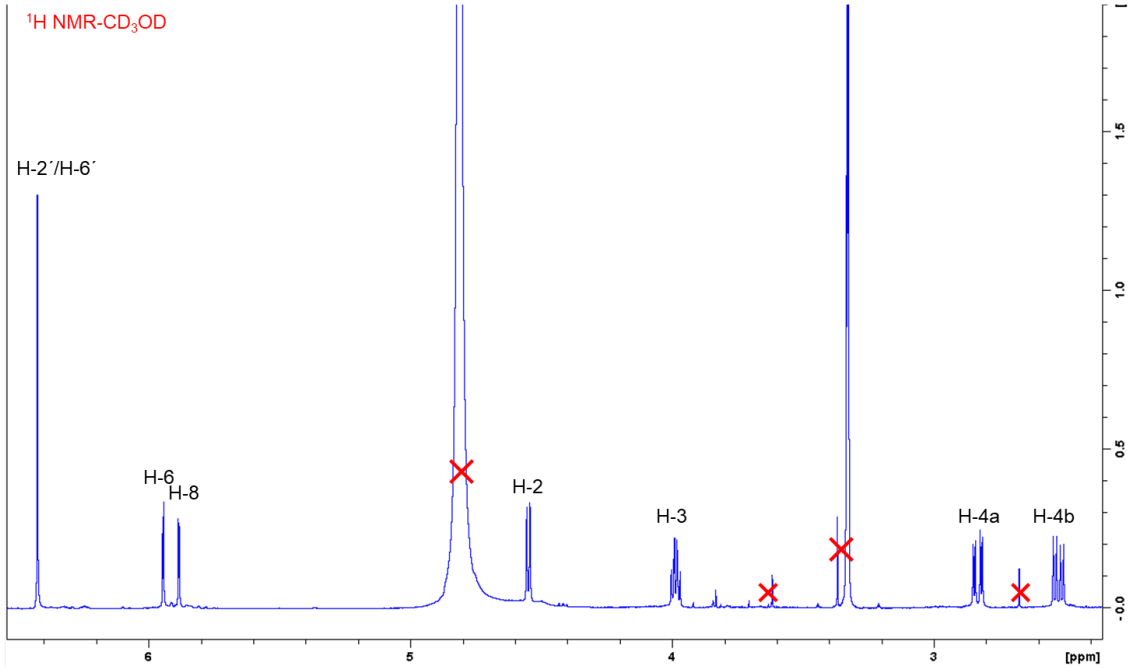
C/H	^{1}H (ppm)	Πολ/τητα	*J* (Hz)	Τύπος C	Ολοκλήρωση	^{13}C (ppm)	HMBC Correlations
2	4.55	d	7.26	CH	1	83.1	H-2’ / H-6’ / H-4a / H-4b
3	3.99	m	-	CH	1	68.9	H-2 / H-4a / H-4b
4a	2.86	dd	16.22/5.05	CH2	1	28.3	H-2
4b	2.48	dd	16.22/7.77	CH2	1	28.3	H-2
5	-	-	-	-	-	157.4	H-8 / H-4a / H-4b
6	5.94	d	2.17	CH	1	96.5	H-8
7	-	-	-	-	-	157.9	H-6
8	5.88	d	2.17	CH	1	95.6	H-6
4α	-	-	-	-	-	101.0	H-8 / H-6 / H-4a / H-4b
8β	-	-	-	-	-	156.8	H-2
1’	-	-	-	-	-	132.1	H-2

2’	6.42	s	-	CH	2	107.4	H-2’ / H-6’ / H-2
3’	-	-	-	-	-	134.2	H-2’ / H-6’
4’	-	-	-	-	-	147.0	H-2’ / H-6’
5’	-	-	-	-	-	134.2	H-2’ / H-6’
6’	6.42	s	-	CH	2	107.4	H-2’ / H-6’ / H-2

Στο ^{1}H NMR εμφανίζονται στην αρωματική περιοχή οι δυο χαρακτηριστικές διπλές (d) κορυφές του A δακτυλίου στα 5.94 ppm (H-6, *J*=2.17 Hz) και 5.88 ppm (H-8, *J*=2.17 Hz). Επιπλέον στο C δακτύλιο (πυρανικό) υπάρχουν τέσσερα σήματα των πρωτονίων H-2, H-3, H-4a, H-4b στα 4.55 ppm (d, *J*=2.17 Hz), 3.99 ppm (m), 2.86ppm (dd, *J*=16.22 και 5.05 Hz), 2.48 ppm (dd, *J*=16.22 και 7.77 Hz), αντίστοιχα. Η διαφορά εμφανίζεται στον B αρωματικό δακτύλιο που εμφανίζεται μία απλή (s) κορυφή στα 6.42 ppm με ολοκλήρωση 2 που αντιστοιχεί στα πρωτόνια H-2’ και H-6’ λόγω της συμμετρίας του δακτυλίου.

Με τη βοήθεια των φασμάτων HMQC και HMBC προσδιορίστηκε εύκολα η δομή της φλαβανόλης άρα η υποκατάσταση του C-2 από τον αρωματικό δακτύλιο (B). Ο άνθρακας C-2 συντονίζεται στα 83.1 ppm και οι C-2’, C-6’ στα 107.4 ppm ενώ διακρίνεται ^{3}J σύζευξη του πρωτονίου H-2 με τους άνθρακες C-2’, C-6’ στο φάσμα HMBC.

Παρόμοια με την κατεχίνη υπάρχουν δύο ασύμμετρα κέντρα στον πυρανικό δακτύλιο στις θέσεις 2 και3 και αρά 4 ισομερή. Με τη βοήθεια της βιβλιογραφίας[120] διαπιστώθηκε ότι η ουσία είναι η Γαλλοκατεχίνη λόγω της σταθεράς σύζευξης του H-2 που βρίσκεται στα 7.26 Hz, ενώ στην περίπτωση της επιγαλλοκατεχίνης θα βρισκόταν κοντά στα 2Hz.



Εικόνα 29: *Φάσμα ^{1}H NMR της γαλλοκατεχίνης*

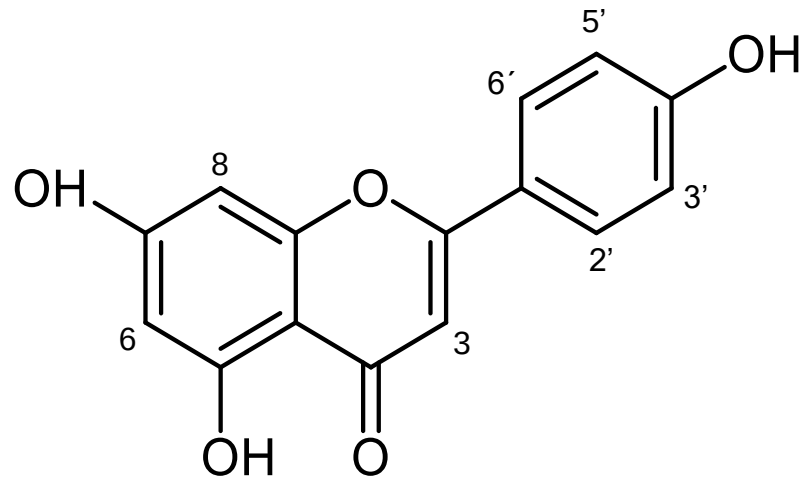
Η Γαλλοκατεχίνη έχει παρόμοιες δράσεις με εκείνες της κατεχίνης. Είναι ένα από τα πιο γνωστά αντιοξειδωτικά των φυτών[113,114]. Αναστέλλει την καρκινογένεση σε ποικίλους ιστούς του ανθρώπινου σώματος[116] και έχει διάφορους άλλους μηχανισμούς δράσης, λειτουργώντας συνεργιστικά με άλλες κατεχίνες, όπως είναι η προ-οξειδωτική, η αντιφλεγμονώδης και η δράση της ως αναστολέα της κινάσης της τυροσινάσης που εξηγούν την αντικαρκινική της δράση.

6. Απιγενίνη

Η Απιγενίνη (2-(4-υδροξυφαινυλ)- 5,7-διυδροξυ-4-χρομενόνη) είναι μια φλαβόνη και συγκεκριμένα μια τριυδροξυφλαβόνη με υδροξυλομάδες στις θέσεις 4’,5 και 7. Σε σύγκριση με τα υπόλοιπα φλαβονοειδή η απιγενίνη είναι ένα από τα πιο διαδεδομένα στο φυτικό βασίλειο και μία από τις πιο μελετημένες φαινόλες[121] λόγω της μικρής τοξικότητας που έχει και των βιολογικών της δράσεων.

M.T.= $C_{15}H_{10}O_5$

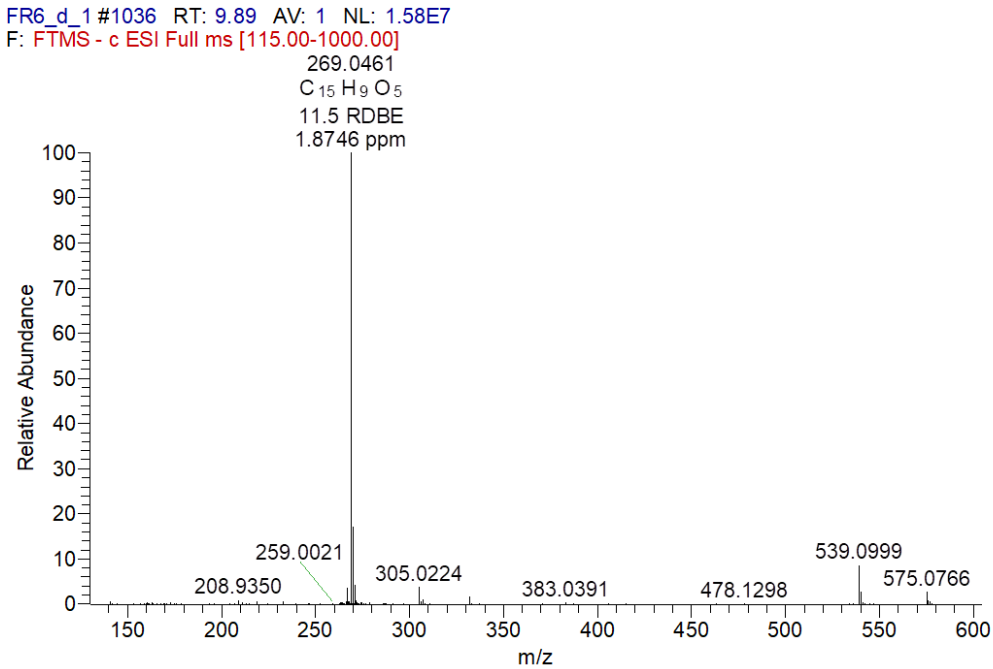
M.B=270,05



Απιγενίνη

Η απιγενίνη απαντά συνηθέστερα με τη γλυκοζυλιωμένη της μορφή σε φρούτα, λαχανικά και βότανα καθώς και στα αφεψήματά τους. Η κυριότερη πηγή της είναι το χαμομήλι[122]. Είναι ένα από τα πιο συχνά απαντώμενα φλαβονοειδή μαζί με την κερκετίνη (quercetin), την καιμφερόλη (kaempferol), τη μυρικετίνη (myricetin) και τη λουτεολίνη (luteolin)[123].

Η λήψη του φάσματος μάζας έγινε σε φασματογράφο μάζας LTQ-Orbitrap με τη μέθοδο του ηλεκτροψεκασμού (ESI),σε αρνητικό ιονισμό. Το ψευδομοριακό ιόν $[M-H]^-$ ήταν εμφανές σε *m/z* 269.0461 που αντιστοιχεί σε μοριακό τύπο $C_{15}H_9O_5$ με RDB (Ring Double Bond) 11.5. Εμφανίζεται επιπλέον το διμερές του μορίου $[2M-H]^-$ σε *m/z* 539.0999.

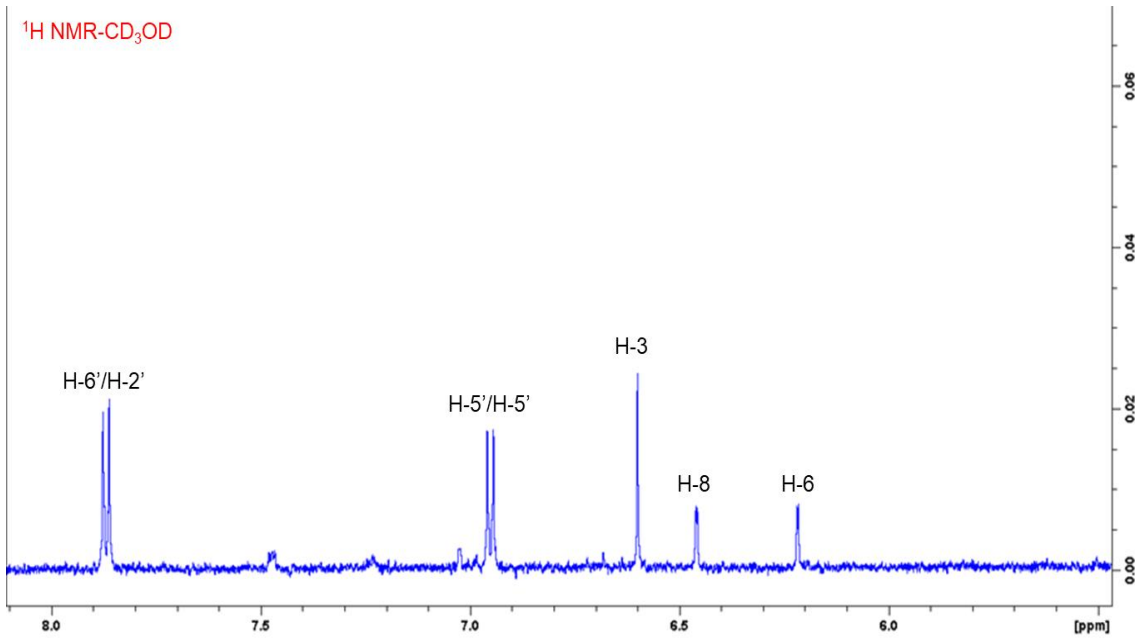


Εικόνα 30: *Φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας της Απιγενίνης*

Πίνακας 15: *Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H NMR Απιγενίνης*[124]

C/H	^{1}H (ppm)	Πολ/τητα	*J* (Hz)	Τύπος C	Ολοκλήρωση	^{13}C (ppm)
2	-	-	-	-	-	163.7
3	6.60	s	-	CH	1	102.1
4	-	-	-	-	-	181. 7
5	-	-	-	-	-	161.2
6	6.21	d	2.01	CH	1	98.9
7	-	-	-	-	-	164.5
8	6.45	d	2,01	CH	1	94.1
4a	-	-	-	-	-	157.4
8a	-	-	-	-	-	103.6
1’	-	-	-	-	-	121.2
2’	7.87	d	8.83	CH	2	128.5
3’	6.95	d	8.72	CH	2	116.0
4’	-	-	-	-	-	161.4
5’	6.95	d	8.72	CH	2	116.0
6’	7.87	d	8.83	CH	2	128.5

Στο φάσμα ^{1}H NMR εμφανίζονται πέντε κορυφές στην αρωματική περιοχή. Δύο διπλές (d) κορυφές στην αρωματική περιοχή με ολοκλήρωση 2 στα 7.87 ppm (H-2’/H-6’, *J*=8.83 Hz) και στα 6.95 ppm (H-3’/H-5’, *J*=8.72 Hz), δύο διπλές (d) κορυφές χαρακτηριστικές των φλαβονοειδών στα 6.21 ppm (H-6, *J*=2.01 Hz) και στα 6.45 ppm (H-8,*J*=2,01 Hz) και μία απλή (s) κορυφή στα 6.60 ppm που αντιστοιχεί στο βινυλικό πρωτόνιο H-3. Με τη μελέτη των φασμάτων και τη βοήθεια της βιβλιογραφίας[125] διαπιστώθηκε ότι η ουσία είναι η απιγενίνη.



Εικόνα 31: *Φάσμα ^{1}H NMR Απιγενίνης*

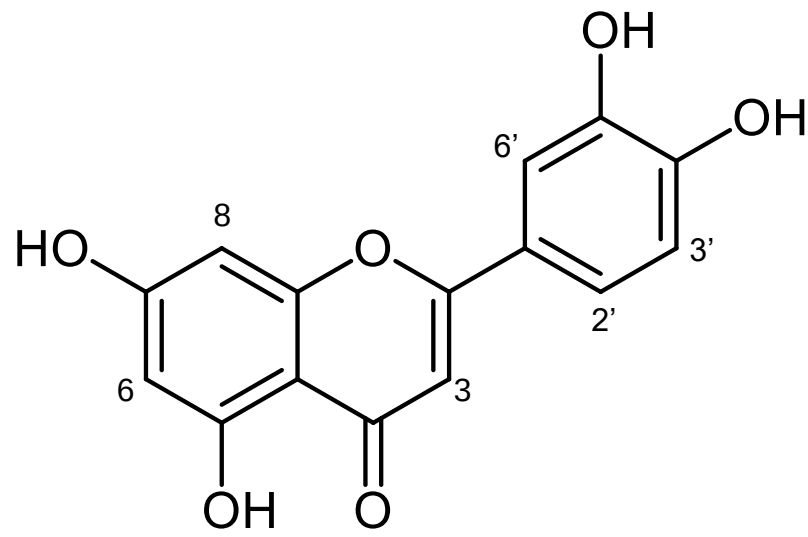
Οι περισσότερες δημοσιεύσεις σχετίζονται με την αντικαρκινική δράση της απιγενίνης[126]. Σε *in vitro* μελέτες έχει βρεθεί ότι λειτουργεί χημειοπροστατευτικά[127], στην πρόληψη του καρκίνου του μαστού[128], δερματολογικών και γαστρεντερικών καρκίνων[129]. Σε μικρότερο αριθμό *in vivo* μελετών σε ποντίκια έχει βρεθεί η δράση της κατά του Alzheimer βελτιώνοντας τη μνήμη και μειώνοντας την εναπόθεση αμυλοειδούς[130], κατά της αμνησίας με τη βελτίωση της μακροπρόθεσμης μνήμης και λειτουργώντας επιδιορθωτικά στην απώλεια μνήμης[131]. Ακόμη έχει βρεθεί η αντιδιαβητική της δράση μειώνοντας τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα[132]. Σε εξέλιξη είναι επιπλέον κλινικές δοκιμές που σχετίζονται με το Alzheimer, την αϋπνία, την οστεοαρθρίτιδα και τις αγχώδεις διαταραχές[133].

7. Λουτεολίνη

Η Λουτεολίνη (2-(3,4-διυδροξυφαινυλ)-5,7-διυδροξυ-4-χρομενόνη) είναι μια φλαβόνη και συγκεκριμένα μια τετραϋδροξυφλαβόνη με υδροξυλομάδες στις θέσεις 4’, 5’, 5 και 7. Στο παρελθόν, κατά την πρώτη χιλιετία π.Χ., χρησιμοποιείτο λόγω του έντονου κίτρινου χρώματός της ως βαφή.

M.T.= $C_{15}H_{10}O_6$

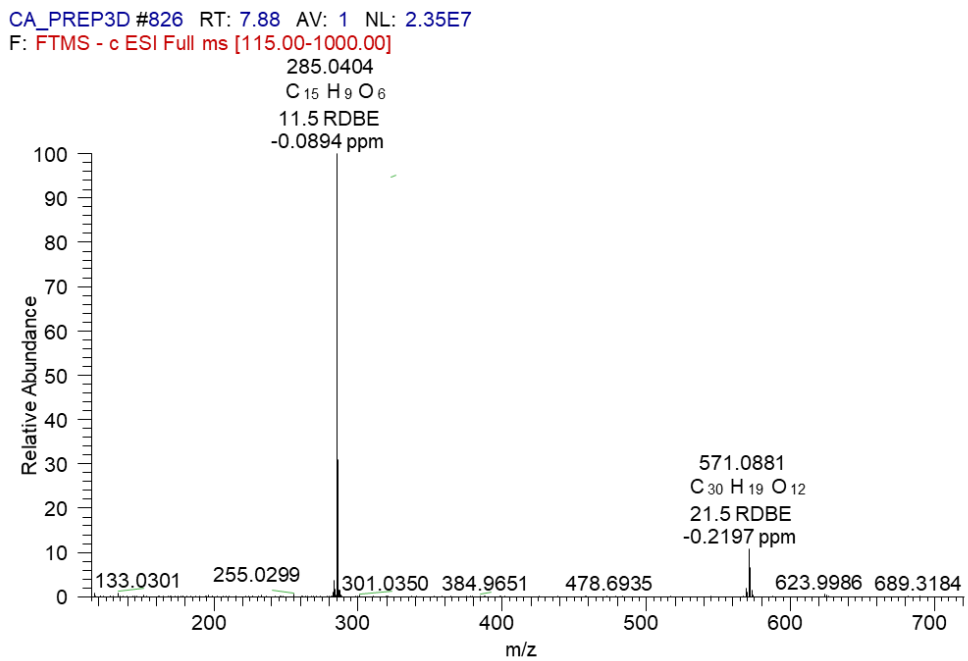
M.B=286,24



Λουτεολίνη

Η Λουτεολίνη είναι ένα από τα πιο διαδεδομένα φλαβονοειδή στο φυτικό βασίλειο[123]. Απομονώνεται κυρίως από φύλλα φυτών, από φρούτα, λαχανικά και φαρμακευτικά βότανα[134]. Σε υψηλά ποσοστά έχει βρεθεί στο μπρόκολο, τα καρότα, τις πιπεριές, στα φύλλα του *Chrysanthemum indicum*[135] και στο *Artemisia asiatica* Nakai[136].

Η λήψη του φάσματος μάζας έγινε σε φασματογράφο μάζας LTQ-Orbitrap με τη μέθοδο του ηλεκτροψεκασμού (ESI),σε αρνητικό ιονισμό. Το ψευδομοριακό ιόν $[M-H]^-$ ήταν εμφανές σε *m/z* 285.0404 που αντιστοιχεί σε μοριακό τύπο $C_{15}H_9O_6$ με RDB (Ring Double Bond) 11.5. Εμφανίζεται επιπλέον το διμερές του μορίου [2M-H] σε *m/z* 571.09.



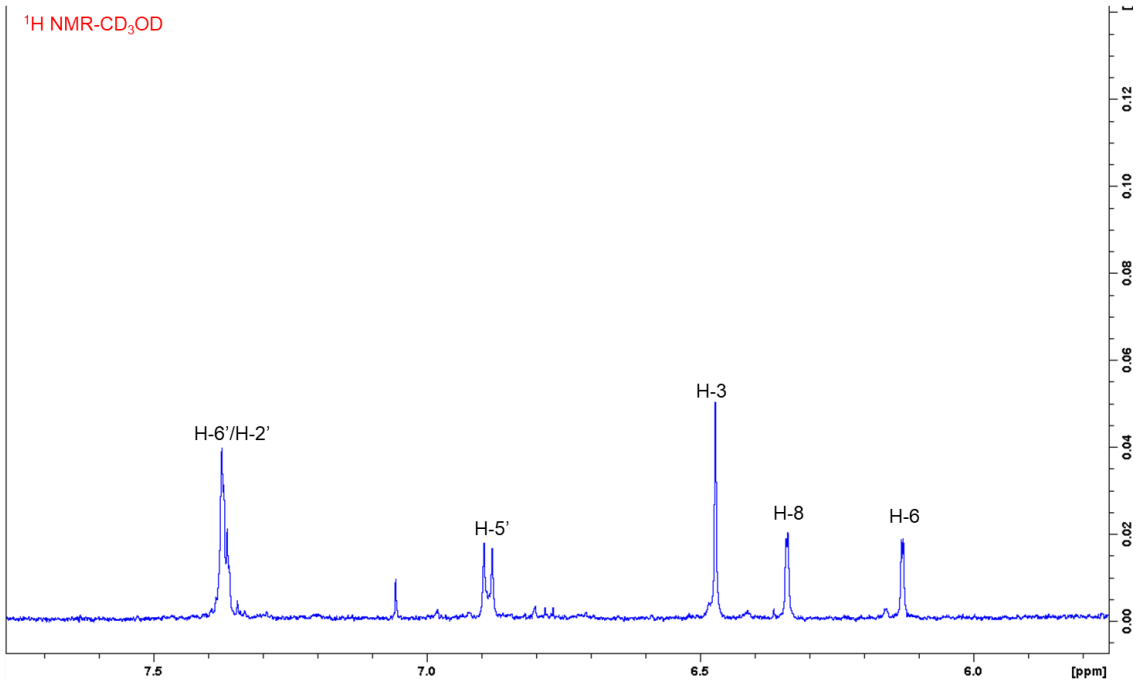
Εικόνα 32: *Φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας της Λουτεολίνης*

Πίνακας 16: *Φασματοσκοπικά δεδομένα Λουτεολίνης*[124]*(*επικάλυψη κορυφών)*

C/H	^{1}H (ppm)	Πολ/τητα	*J* (Hz)	Τύπος C	Ολοκλήρωση	^{13}C (ppm)
2	-	-	-	-	-	163.8
3	6.47	s	-	CH	1	102.8
4	-	-	-	-	-	181.6
5	-	-	-	-	-	161.4
6	6.13	d	2.10	CH	1	98.7
7	-	-	-	-	-	164.1
8	6.34	d	2,10	CH	1	93.6
4a	-	-	-	-	-	157.2

8a	-	-	-	-	-	103.6
1’	-	-	-	-	-	121.4
2’	7.37	m*	-	CH	1	113.1
3’	-	-	-	-	-	145.6
4’	-	-	-	-	-	149.6
5’	6.88	d	8.88	CH	1	115.8
6’	7.37	m*	-	CH	1	118.8

Στο φάσμα ^{1}H-NMR εμφανίζονται πέντε κορυφές στην αρωματική περιοχή. Δύο διπλές (d) κορυφές χαρακτηριστικές των φλαβονοειδών στα 6.13 ppm (H-6, *J*=2.10 Hz) και στα 6.34 ppm (H-8,*J*=2,10Hz), μία απλή (s) κορυφή στα 6.47 ppm που αντιστοιχεί στο βινυλικό πρωτόνιο H-3 και οι κορυφές του B αρωματικού δακτυλίου που απαρτίζεται από μία διπλή (d) κορυφή στα 6.88 ppm (H-5’, *J*=8.88 Hz) και μία πολαπλή (m) κορυφή στα 7.37 ppm που αντιστοιχεί στα πρωτόνια H-2’ και H-6’. Με τη μελέτη των φασμάτων και τη βοήθεια της βιβλιογραφίας[137,138] διαπιστώθηκε ότι η ουσία είναι η λουτεολίνη.



Εικόνα 33: *Φάσμα ^{1}H NMR Λουτεολίνης*

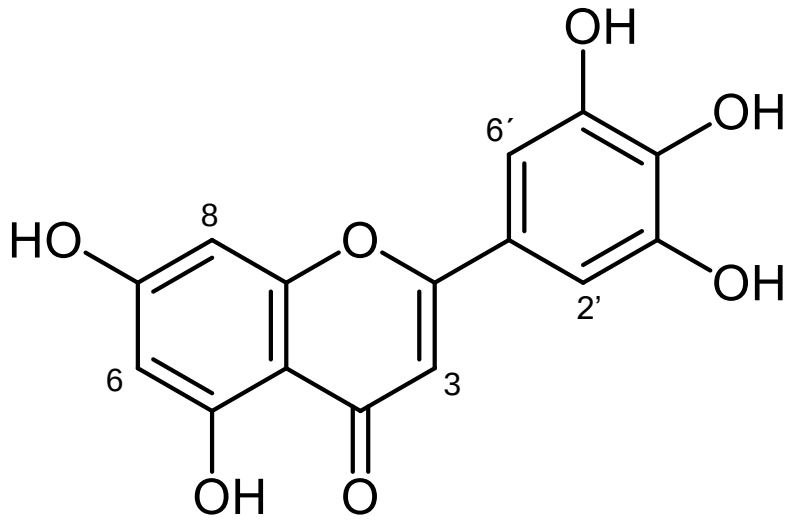
Ως φλαβονοειδές η Λουτεολίνη είναι γνωστή για την αντιοξειδωτική της δράση μειώνοντας τις βλάβες του DNA που προκαλούνται από το οξειδωτικό στρες και την υπεροξείδωση των λιπιδίων[139] σε *in vitro* και *in vivo* μελέτες. Επίσης, έχει αναφερθεί αντιφλεγμονώδης δράση με το να αναστέλλει τη λειτουργία του πυρηνικού παράγοντα NF-kB[140], ο οποίος αυξάνει την έκφραση προ-φλεγμονωδών μεσολαβητών όπως κυτοκινών και ενζύμων. Έχει αναφερθεί ότι διαθέτει αντιμικροβιακή δράση *in vivo* σε μελέτες κατά του βακτηρίου *Chlamydia pneumoniae*[141] και κατά του κοινού ιού της γρίπης[142]. Λόγω της χημειοπροστατευτικής της δράσης έχει αντικαρκινικές ιδιότητες μειώνοντας τις αλλαγές στο DNA όπως μεταλλάξεις σε ογκοκατασταλτικά γονίδια[143] και προστατεύοντας κατά της υπεριώδους ακτινοβολίας[144]. Έχει και άλλους τρόπους δράσης μειώνοντας τα επίπεδα της χοληστερόλης στο αίμα και την πίεση (καρδιοπροστατευτικό)[145], μειώνοντας τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα (αντιδιαβητικό)[146] και μειώνοντας τα επίπεδα απελευθέρωσης της ισταμίνης (αντιαλλεργικό)[147].

8. Τρικετίνη

Η Τρικετίνη (2-(3,4,5-τριϋδροξυφαινυλ)-5,7- διϋδροξυ-4-χρομενόνη) είναι μια φλαβόνη και συγκεκριμένα μια πενταϋδροξυφλαβόνη με υδροξύλια στις θέσεις 3’, 4’, 5’, 5 και 7. Με τη μορφή του άγλυκού της δεν είχε βρεθεί μέχρι το τέλος του εικοστού αιώνα[148].

M.T.= $C_{15}H_{10}O_7$

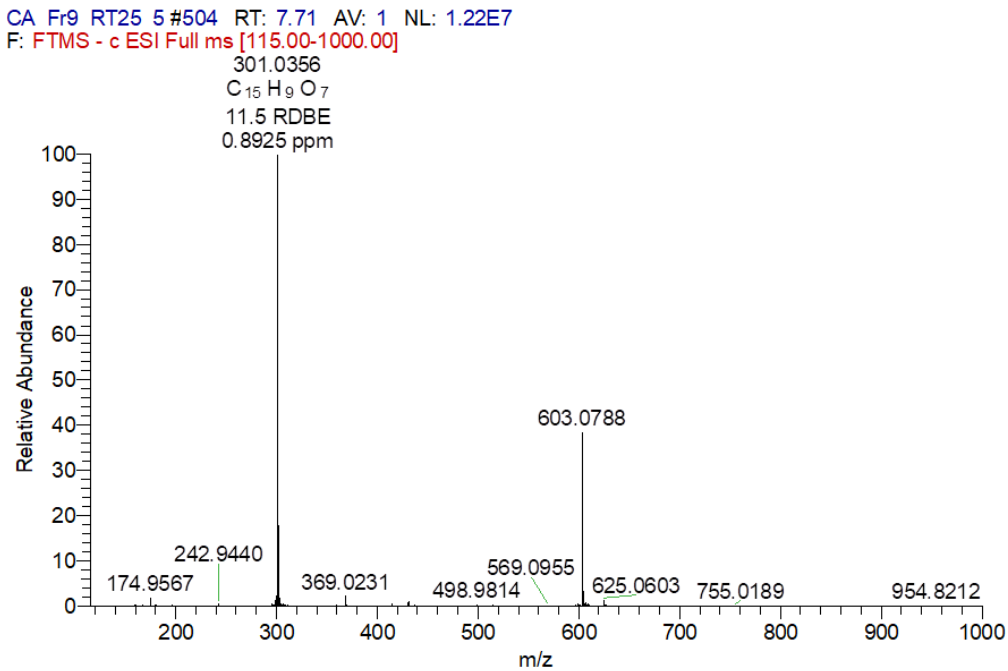
M.B=302.23



Τρικετίνη

Η Τρικετίνη εντοπίζεται στα δημητριακά ενώ έχει απομονωθεί κυρίως από τη γύρη φυτών της οικογένειας Myrtaceae όπως το *Eucalyptus globulus*, το *Kunzea ericoides* και το *Leptospermum scoparium*[149]. Έχει απομονωθεί επιπλέον από γένη των οικογενειών Fabaceae (π.χ. από τη φακή - *Lens culinaris*) και Poaceae[150].

Η λήψη του φάσματος μάζας έγινε σε φασματογράφο μάζας LTQ-Orbitrap με τη μέθοδο του ηλεκτροψεκασμού (ESI), σε αρνητικό ιονισμό. Το ψευδομοριακό ιόν $[M-H]^-$ ήταν εμφανές σε *m/z* 301.0356 που αντιστοιχεί σε μοριακό τύπο $C_{15}H_9O_7$ με RDB (Ring Double Bond) 11.5. Εμφανίζεται επιπλέον το διμερές του μορίου $[2M-H]^-$ σε *m/z* 603.0788.



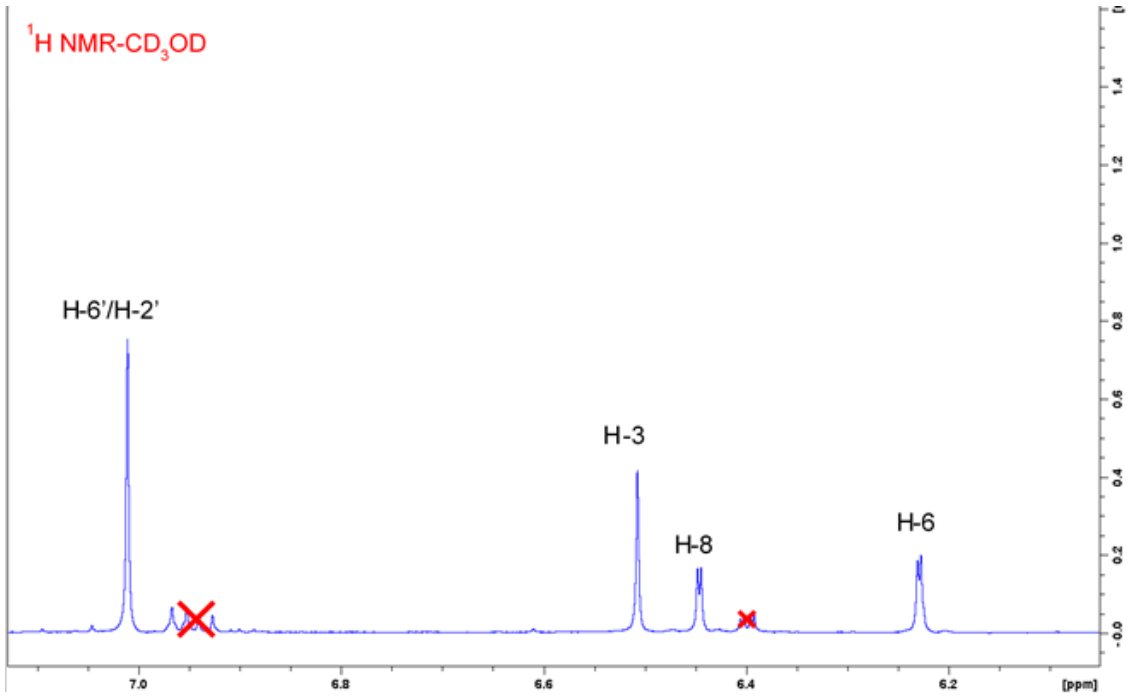
Εικόνα 34: *Φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας της Τρικετίνης*

Πίνακας 17: *Φασματοσκοπικά δεδομένα της Τρικετίνης*

C/H	^{1}H (ppm)	Πολ/τητα	*J* (Hz)	Τύπος C	Ολοκλήρωση	^{13}C (ppm)
2	-	-	-	-	-	163.6
3	6.50	s	-	CH	1	104.5
4	-	-	-	-	-	182.1
5	-	-	-	-	-	161.8
6	6.22	d	2.11	CH	1	98.3
7	-	-	-	-	-	166.4

8	6.44	d	2.11	CH	1	104.4
4a	-	-	-	-	-	104.4
8a	-	-	-	-	-	158.8
1’	-	-	-	-	-	123.5
2’	7.01	s	-	CH	2	107.9
3’	-	-	-	-	-	146.1
4’	-	-	-	-	-	135.2
5’	-	-	-	-	-	146.1
6’	7.01	s	-	CH	2	107.9

Στο φάσμα ^{1}H NMR εμφανίζονται 4 κορυφές στην αρωματική περιοχή. Μία απλή (s) κορυφή με ολοκλήρωση 2 στα 7.01 ppm (H-2’/H-6’), δύο διπλές (d) κορυφές χαρακτηριστικές των φλαβονοειδών στα 6.22 ppm (H-6, *J*=2,11 Hz) και στα 6.44 ppm (H-8, *J*=2.11 Hz) και μία απλή (s) κορυφή στα 6.50 ppm που αντιστοιχεί στο βινυλικό πρωτόνιο H-3. Με τη μελέτη των φασμάτων και τη βοήθεια της βιβλιογραφίας[151] διαπιστώθηκε ότι η ουσία είναι η Τρικετίνη.



Εικόνα 35: *Φάσμα ^{1}H NMR Τρικετίνης*

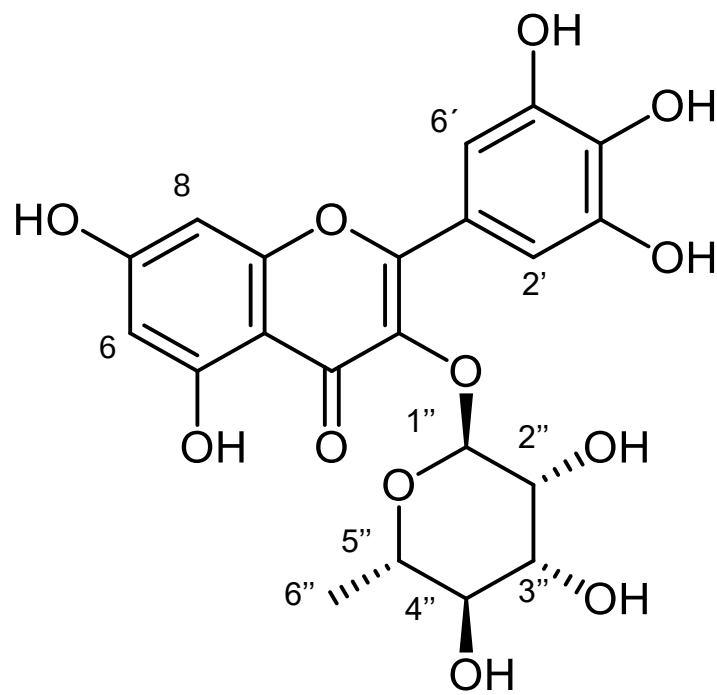
Σε *in vivo* και *in vitro* μελέτες έχει βρεθεί η αναστολή της ανάπτυξης όγκων μέσω διαδικασιών απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων με τη χρήση Τρικετίνης[152]. Συγκεκριμένα, η Τρικετίνη αναστέλλει τη μετάσταση όγκων σε καρκίνο του στόματος[153], του ήπατος[152] και του πνεύμονα[154].

9. Μυρικιτρίνη

Η Μυρικιτρίνη (Myricetin-3-O-α-rhamnoside) είναι μια φυσική πολυφαινόλη και συγκεκριμένα μια γλυκοζυλιωμένη φλαβανόλη με το άγλυκό της να είναι η μυρικετίνη (myricetin) που έχει γλυκοζυλιωθεί στη θέση 3 με ένα μόριο ραμνόζης. Σήμερα χρησιμοποιείται ως τροποποιητής γεύσης στη βιομηχανία τροφίμων[155] όπως σε snacks, γαλακτοκομικά προϊόντα και αφεψήματα λόγω της χαμηλής τοξικότητάς της.

M.T.= $C_{21}H_{20}O_{12}$

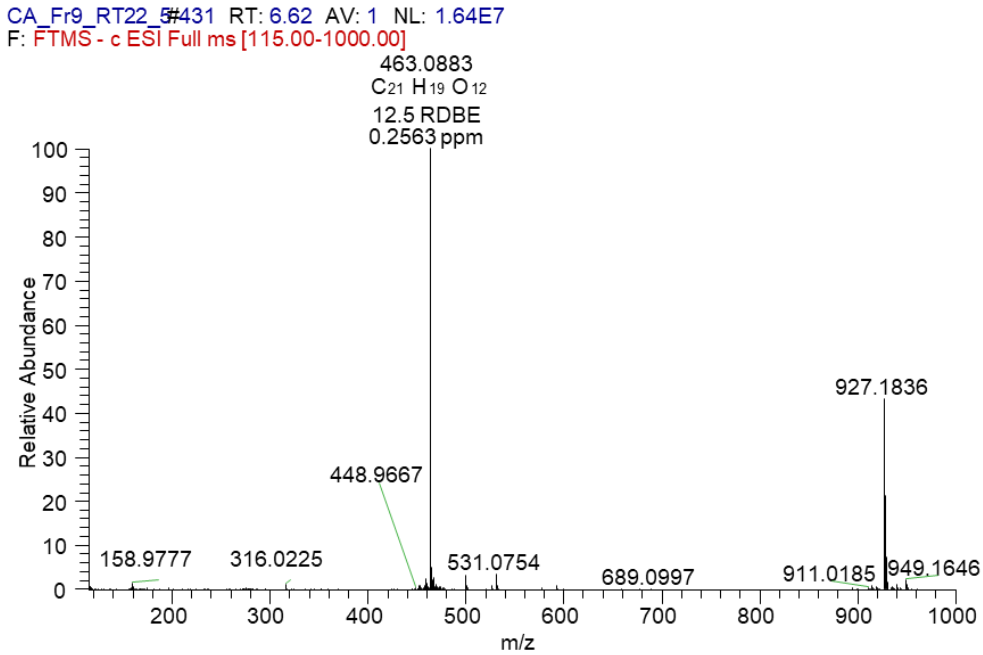
M.B= 464.37



Μυρικιτρίνη

Η Μυρικιτρίνη βρίσκεται σε διάφορα είδη φυτών, σε φρούτα και σε λαχανικά. Έχει απομονωθεί από το φλοιό του *Myrica rubra* SIEBOLD[155], το *Nymphaea lotus*[156], το *Eugenia uniflora*[157] και το *Chrysobalanus icaco*[158].

Η λήψη του φάσματος μάζας έγινε σε φασματογράφο μάζας LTQ-Orbitrap με τη μέθοδο του ηλεκτροψεκασμού (ESI), σε αρνητικό ιονισμό. Το ψευδομοριακό ιόν $[M-H]^-$ ήταν εμφανές σε *m/z* 463.0883 που αντιστοιχεί σε μοριακό τύπο $C_{21}H_{19}O_{12}$ με RDB (Ring Double Bond) 12.5. Εμφανίζεται επιπλέον το διμερές του μορίου $[2M-H]^-$ σε *m/z* 921.1836. Θραυσματοποιώντας περαιτέρω το ψευδομοριακό ιόν με την τεχνική MS/MS εμφανίζεται κορυφή σε *m/z* 317.0292 που αντιστοιχεί στο ιόν του μορίου μετά την απομάκρυνση του σακχάρου [M-rhamnose].

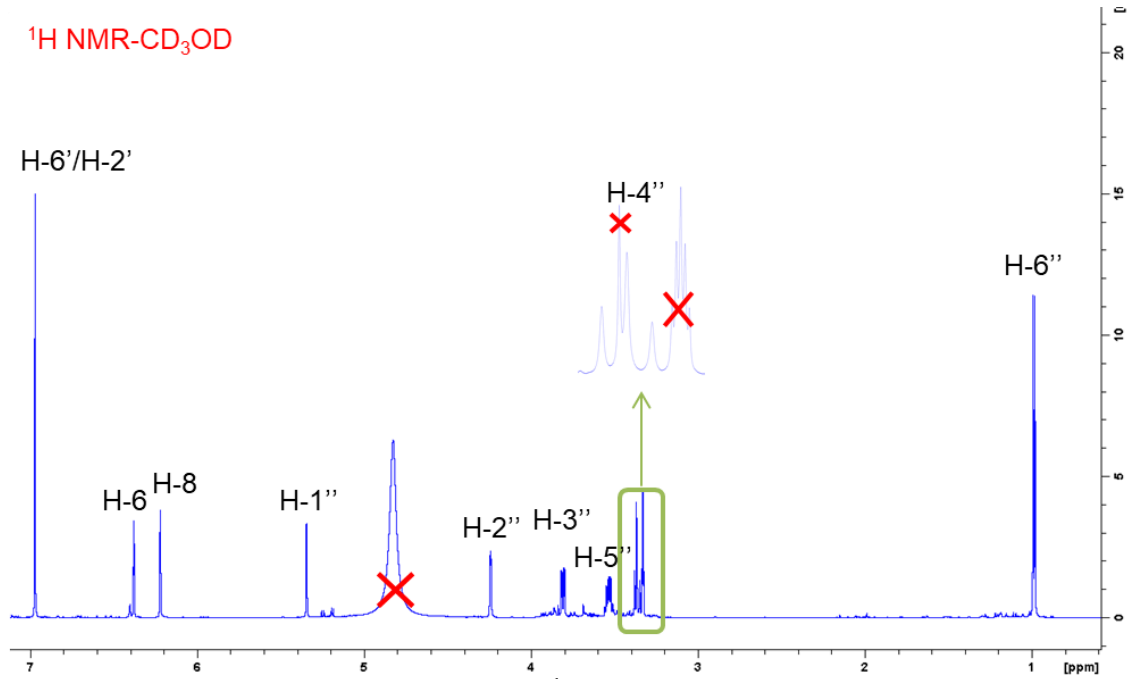


Εικόνα 36: *Φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας της Μυρικιτρίνης*

Πίνακας 18: *Φασματοσκοπικά δεδομένα της Μυρικιτρίνης*[159]

C/H	^{1}H (ppm)	Πολ/τητα	*J* (Hz)	Τύπος C	Ολοκλήρωση	^{13}C (ppm)
2	-	-	-	-	-	159.2
3	-	-	-	-	-	136.1
4	-	-	-	-	-	179.5
5	-	-	-	-	-	163.1
6	6.38	d	2,11	CH	1	99.7
7	-	-	-	-	-	164.0
8	6.22	d	2.11	CH	1	94.6
4a	-	-	-	-	-	158.4
8a	-	-	-	-	-	105.6
1’	-	-	-	-	-	121.7
2’	6.97	s	-	CH	2	109.6
3’	-	-	-	-	-	146.7
4’	-	-	-	-	-	137.7
5’	-	-	-	-	-	146.7
6’	6.97	s	-	CH	2	109.6
Rhamnose						
1’’	5.34	d	1.61	CH	1	103.5
2’’	4.24	dd	1.61/3.33	CH	1	71.7
3’’	3.76	dd	3.33/9.62	CH	1	72.0
4’’	3.36	t	9.62	CH	1	73.2
5’’	3.53	m	-	CH	1	71.9
6’’	0.98	d	6.19	CH_3	3	17.5

Στο φάσμα ^{1}H NMR εμφανίζονται 3 κορυφές στην αρωματική περιοχή. Μία απλή (s) κορυφή στην αρωματική περιοχή με ολοκλήρωση 2 στα 6.97 ppm (H-2'/H-6') και δύο διπλές (d) κορυφές χαρακτηριστικές των φλαβονοειδών στα 6.22 ppm (H-8, *J*=2.11 Hz) και στα 6.38 ppm (H-6, *J*=2.11 Hz). Στη συνέχεια παρατηρούνται οι κορυφές του σακχάρου της ραμνόζης με δύο χαρακτηριστικές διπλές (d) κορυφές, μία του ανωμερικού πρωτονίου στα 5.34 ppm (H-1'', *J*=1.61 Hz) και μία του μεθυλίου στα 0.98 ppm (H-1'', *J*=6.19 Hz) και τέσσερις ακόμα κορυφές, μία διπλή-διπλών (dd) στα 4.24 ppm (H-2'', *J*=1.61 και 3.33 Hz), μία διπλή-διπλή (dd) στα 3.76 ppm (H-3'', *J*=3.33 και 9.62 Hz), μία πολλαπλή (m) στα 3.53 ppm (H-5'') και μία τριπλή (t) στα 3.36 ppm (H-4'', *J*=9.62 Hz). Με τη μελέτη των φασμάτων και τη βοήθεια της βιβλιογραφίας[160] διαπιστώθηκε ότι η ουσία είναι η Μυρικιτρίνη.



Εικόνα 37: *Φάσμα ^{1}H NMR Μυρικιτρίνης*

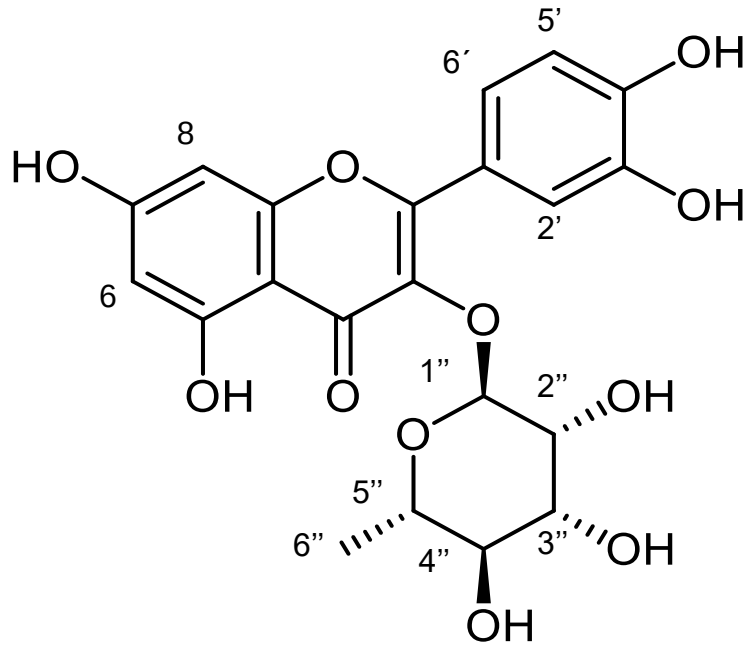
Η Μυρικιτρίνη παρουσιάζει αντιοξειδωτική δράση σε διάφορα μοντέλα για τον έλεγχο της αντιοξειδωτικής ικανότητας (ρίζα DPPH, ρίζα ABTS και ρίζα υδροξυλίου) αναστέλλοντας το οξειδωτικό στρες στα κύτταρα[161]. Σε *in vivo* μελέτη σε ποντίκια έχει ενδείξεις αντιφλεγμονώδους δράσης[162] βελτιώνοντας την αναγέννηση του ηπατικού ιστού και αναστέλλοντας την υπερέκφραση παραγόντων της φλεγμονής (COX-2 και TNF-a). Επιπλέον, σταματάει την απόπτωση κύτταρων του μυοκαρδίου σε ασθενείς που χορηγείται δοξορουμπικίνη (Doxorubicin) αναστέλλοντας τη μιτοχονδριακή απόπτωση[163].

10. Κερκιτρίνη

Η Κερκιτρίνη (Quercetin-3-*O*-α-rhamnoside) είναι μια φυσική πολυφαινόλη και συγκεκριμένα μια γλυκοζυλιωμένη φλαβανόλη με το άγλυκό της να είναι η κερκετίνη (quercetin) που έχει γλυκοζυλιωθεί στη θέση 3 με ένα μόριο ραμνόζης. Είναι το κύριο συστατικό του κερκιτρόν (Quercitron) ενός φυσικού χρώματος που παράγεται από το φλοιό του δέντρου *Quercus velutina*[164].

M.T.= $C_{21}H_{20}O_{11}$

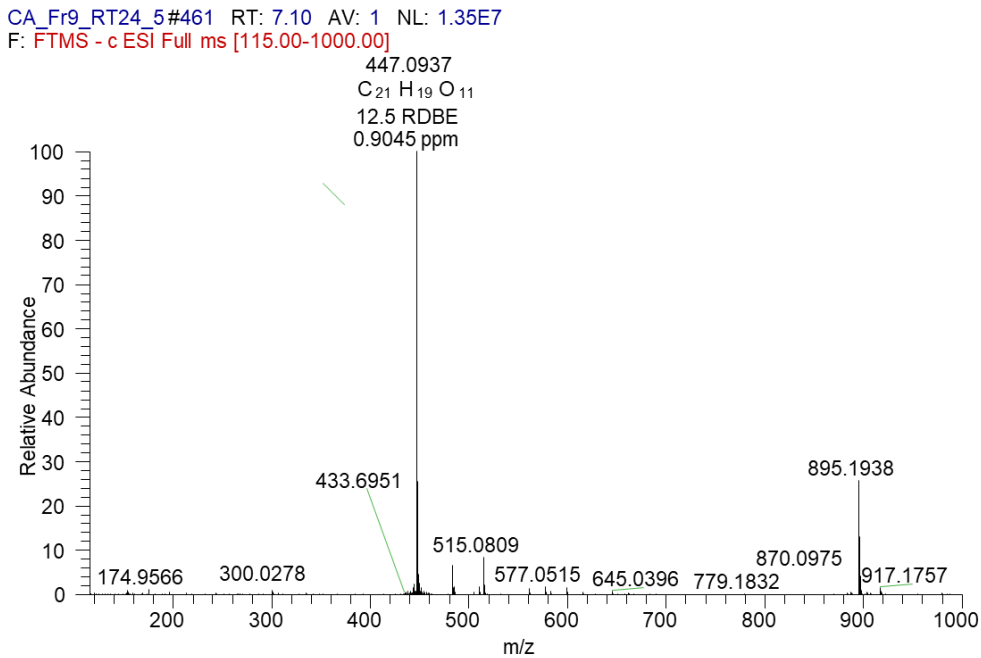
M.B= 448.38



Κερκιτρίνη

Η Κερκιτρίνη βρίσκεται σε μεγάλα ποσοστά σε βελανιδιές (*Quercus alba* και *Quercus robur*)[165] και στο *Fagopyrum tataricum*[166]. Επιπλέον, έχει απομονωθεί από το φυτό *Taxillus kaempferi*[167] και τα φύλλα του *Bauhinia microstachya*[168]

Η λήψη του φάσματος μάζας έγινε σε φασματογράφο μάζας LTQ-Orbitrap με τη μέθοδο του ηλεκτροψεκασμού (ESI), σε αρνητικό ιονισμό. Το ψευδομοριακό ιόν $[M-H]^-$ ήταν εμφανές σε *m/z* 447.0937 που αντιστοιχεί σε μοριακό τύπο $C_{21}H_{19}O_{11}$ με RDB (Ring Double Bond) 12.5. Εμφανίζεται επιπλέον το διμερές του μορίου $[2M-H]^-$ σε *m/z* 895.1938. Θραυσματοποιώντας περαιτέρω το ψευδομοριακό ιόν με την τεχνική MS/MS εμφανίζεται κορυφή σε *m/z* 301.0349 που αντιστοιχεί στο ιόν του μορίου μετά την απομάκρυνση του σακχάρου [M-rhamnose].



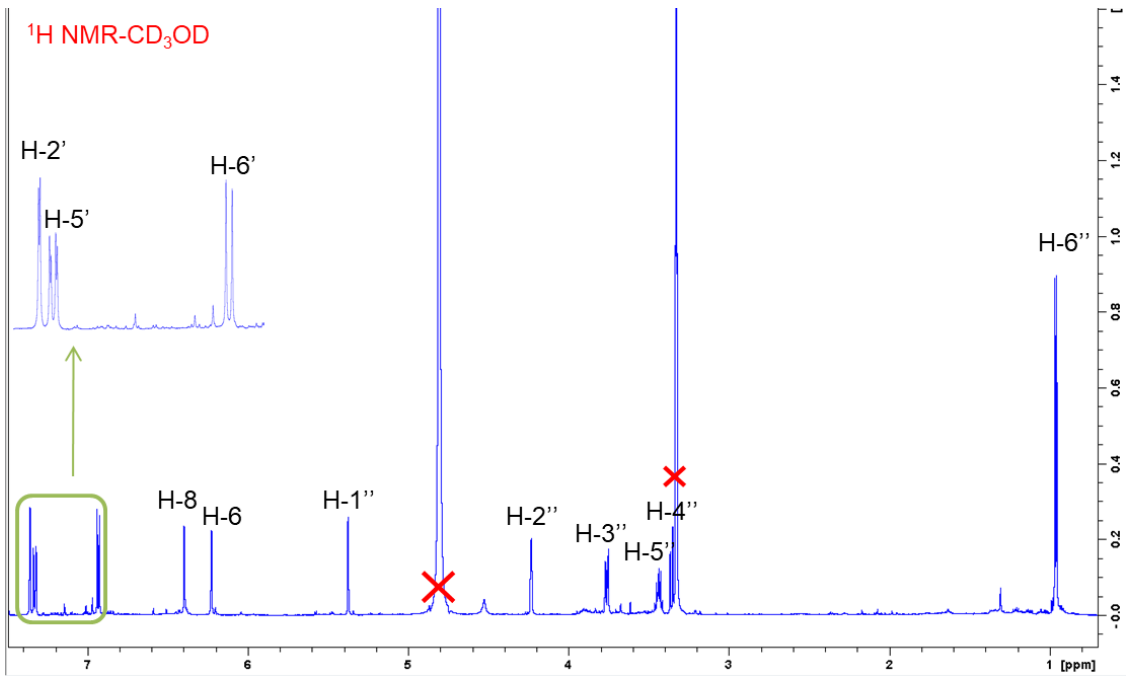
Εικόνα 38: *Φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας της Κερκιτρίνης*

Πίνακας 19: *Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H NMR Κερκιτρίνης*[169]

C/H	^{1}H (ppm)	Πολ/τητα	*J* (Hz)	Τύπος C	Ολοκλήρωση	^{13}C (ppm)
2	-	-	-	-	-	156.4
3	-	-	-	-	-	133.7
4	-	-	-	-	-	177.7
5	-	-	-	-	-	161.4
6	6.22	d	2.05	CH	1	98.7
7	-	-	-	-	-	164.3
8	6.39	d	2.05	CH	1	93.6
4a	-	-	-	-	-	156.5
8a	-	-	-	-	-	104.1
1’	-	-	-	-	-	121.3
2’	7.36	d	2.11	CH	1	116.1
3’	-	-	-	-	-	145.0
4’	-	-	-	-	-	148.6
5’	6.93	d	8.29	CH	1	115.3
6’	7.32	dd	2.11/8.29	CH	1	122.1
rhamnose						
1’’	5.37	d	1.31	CH	1	102.8
2’’	4.23	dd	1.31/3.45	CH	1	71.4
3’’	3.76	dd	3.45/9.43	CH	1	73.3
4’’	3.36	t	9.43	CH	1	68.9
5’’	3.53	m	-	CH	1	76.0
6’’	0.98	d	6.18	CH_3	3	60.3

Στο φάσμα ^{1}H NMR εμφανίζονται 5 κορυφές στην αρωματική περιοχή. Οι τρεις κορυφές του B αρωματικού δακτυλίου, με μία διπλή (d) κορυφή στα 6.93 ppm (H-5’,*J*=8.29 Hz), μία διπλή-διπλών (dd) κορυφή στα 7.32 ppm (H-6’,*J*=8.29 και 2.11 Hz) και μία διπλή (d) κορυφή στα 7.36 ppm (H-5’,*J*=2.11 Hz). Υπάρχουν ακόμα δύο διπλές (d) κορυφές στα 6.22 ppm (H-6, *J*=2.05 Hz) και

στα 6.39 ppm (H-8, *J*=2.05 Hz) που αντιστοιχούν στα πρωτόνια του Α δακτυλίου. Στη συνέχεια παρατηρούνται οι κορυφές του σακχάρου (ραμνόζης) με δύο χαρακτηριστικές διπλές (d) κορυφές, μία του ανωμερικού πρωτονίου στα 5.37 ppm (H-1'', *J*=1.31 Hz) και μία του μεθυλίου στα 0.98 ppm (H-1'', *J*=6.18 Hz) και τέσσερεις ακόμα κορυφές, μία διπλή-διπλών (dd) στα 4.23 ppm (H-2'', *J*=1.31 και 3.45 Hz), μία διπλή-διπλών (dd) στα 3.76 ppm (H-3'', *J*=3.45 και 9.43 Hz), μία πολλαπλή (m) στα 3.53 ppm (H-5'') και μία τριπλή (t) στα 3.36 ppm (H-4'', *J*=9.43 Hz). Με τη μελέτη των φασμάτων και τη βοήθεια της βιβλιογραφίας[160] διαπιστώθηκε ότι η ουσία είναι η Κερκιτρίνη.



Εικόνα 39: *Φάσμα ¹H NMR Κερκιτρίνης*

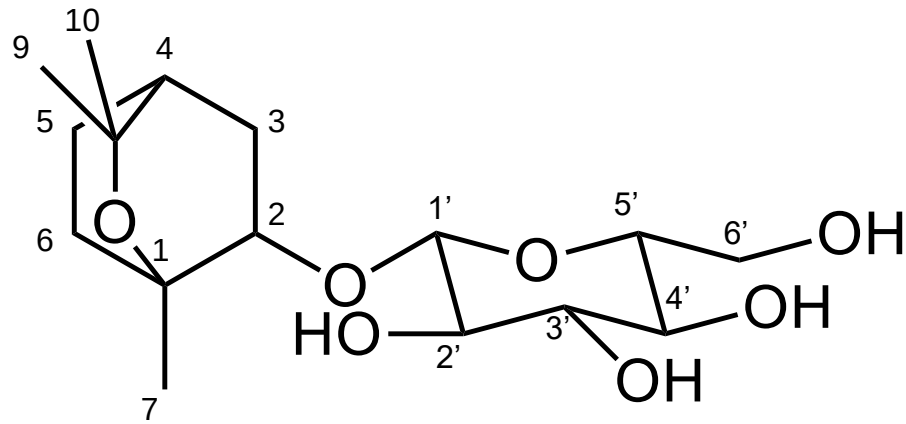
Σε *in vivo* μελέτες σε ποντίκια η Κερκιτρίνη παρουσίασε αντιοξειδωτική δράση καταστέλλοντας την αύξηση των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) και της μαλονδιαλδεΰδης έχοντας ως συνέπεια τη μείωση του οξειδωτικού στρες[170]. Επιπλέον, παρουσιάζει αντιφλεγμονώδη δράση γιατί εμποδίζει την απελευθέρωση προφλεγμονωδών κιτοκινών (TNF-α και IL-6)[170]. Εμφανίζει και ανασταλτική δράση του πολλαπλασιασμού καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου σε *in vitro* μελέτες.

11. Γλυκοπυρανοσίδης της 2-υδροξυ-1,8-κινεόλης

Πρόκειται για τον γλυκοπυρανοσίδη της 2-υδροξυ-1,8-κινεόλης στη θέση 2 του μορίου.

M.T.= $C_{16}H_{28}O_7$

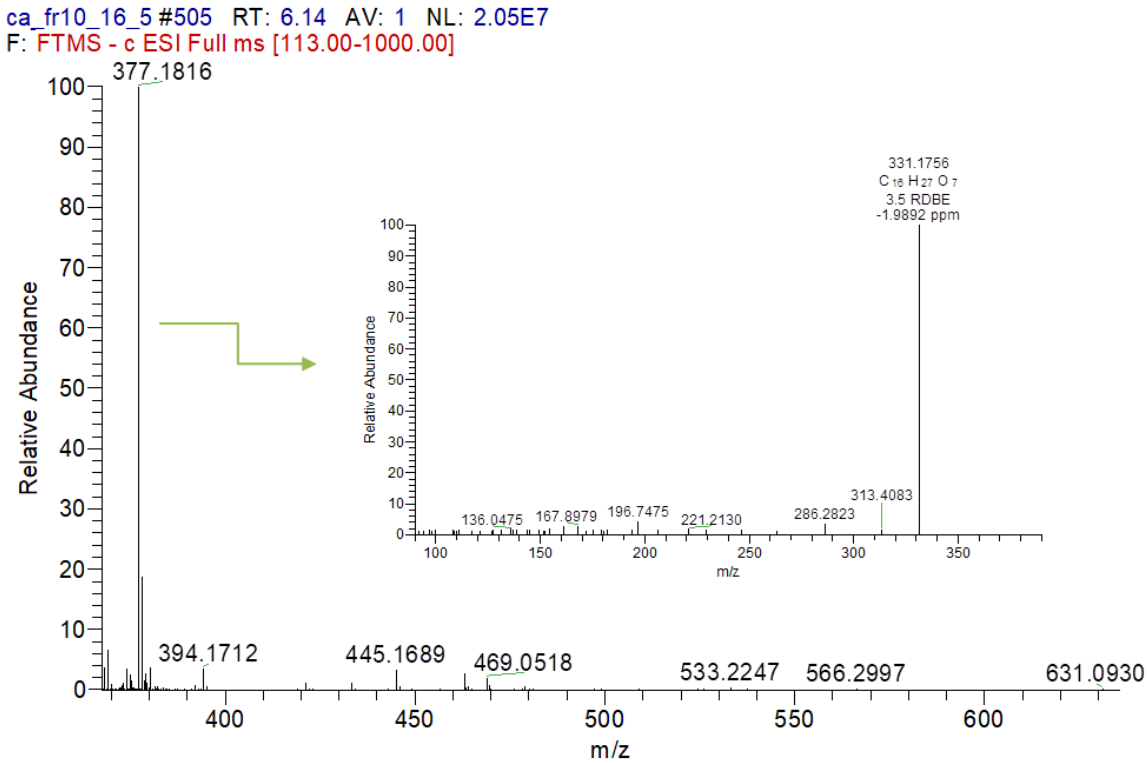
M.B= 332.39



Γλυκοπυρανοσίδης της 2-υδροξυ-1,8-κινεόλης

Έχει απομονωθεί στο παρελθόν από τα φύλλα του ευκάλυπτου (*Eucalyptus globulus*)[171], που από αυτόν έχει δοθεί και το όνομά της 1,8-κινεόλης ως ευκαλιπτόλη. Επιπλέον έχει απομονωθεί από τις ρίζες της μικρής γκαλάνγκα (*Alpinia officinarum*)[172] και της μεγάλης γκαλάνγκα (*Alpinia galanga*)[173].

Η λήψη του φάσματος μάζας έγινε σε φασματογράφο μάζας LTQ-Orbitrap με τη μέθοδο του ηλεκτροψεκασμού (ESI), σε αρνητικό ιονισμό. Το ψευδομοριακό ιόν $[M-H]^-$ δεν ήταν ορατό στο φάσμα μάζας αλλά ανιχνεύτηκε μέσω του ιόντος προσθήκης με φορμικό οξύ $[M+FA-H]^-$ σε *m/z* 377.1818 το οποίο υπήρχε στην κινητή φάση κατά την ανάλυση LC-MS. Με επιπλέον θραυσματοποίηση, χρησιμοποιώντας την τεχνική MS/MS εμφανίζεται το ψευδομοριακό ιόν [M-H] που αντιστοιχεί σε μοριακό τύπο $C_{16}H_{28}O_7$ με RDB (Ring Double Bond) 3.5.



Εικόνα 40: *Φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας του Γλυκοπυρανοσίδη της 2-υδροξυ-1,8-κινεόλης*

Πίνακας 20: *Φασματοσκοπικά δεδομένα του Γλυκοπυρανοσίδη της 2-υδροξυ-1,8-κινεόλης*

C/H	^{1}H (ppm)	Πολ/τητα	*J* (Hz)	Τυπος	Ολοκλήρωση	^{13}C (ppm)	HMBC Correlations
1	-	-	-	-	-	72.5	H-2 / H-6a / H-7
2	3.66	dq	1.84/3.68/9.68	CH	1	79.5	H-4 / H-7 / H-1’
3a	1.69	dt	2.73/14.46	CH_2	1	33.2	H-5a
3b	2.54	m	-	CH_2	1	33.2	H-5a
4	1.51	m*	-	CH	2	34.0	H-9 / H-10
5a	1.58	m	-	CH_2	2	21.5	H-3a / H-3b / H-6a / H-5b
5b	2.02	m*	-	CH_2	2	21.5	H-3a / H-3b / H-6a / H-5b
6a	1.51	m*	-	CH_2	1	25.3	H-2 / H-4 / H-7
6b	2.02	m*	-	CH_2	2	25.3	H-2 / H-4 / H-7
7	1.11	s	-	CH_3	3	23.1	-
8	-	-	-	-	-	73.8	H-3a / H-5a / H-9 / H-10
9	1.21	s	-	CH_3	3	27.7	H-10
10	1.28	s	-	CH_3	3	27.4	H-9
Glucopyranoside							
1’	4.33	d	7.76	CH	1	104.9	H-2 / H-3’
2’	3.19	t	8.12	CH	1	74.0	H-3’
3’	3.35	m	-	CH	-	76.7	H-1’ / H-2’ / H-4’
4’	3.31	m	-	CH	-	70.2	H-3’ / H-6’a / H-6’b
5’	3.27	m	-	CH	-	76.5	H-6’a / H-6’b
6’a	3.71	dd	5.32/11.91	CH_2	2	61.3	H-4’
6’b	3.88	dd	2.36/11.91	CH_2	2	61.3	H-4’

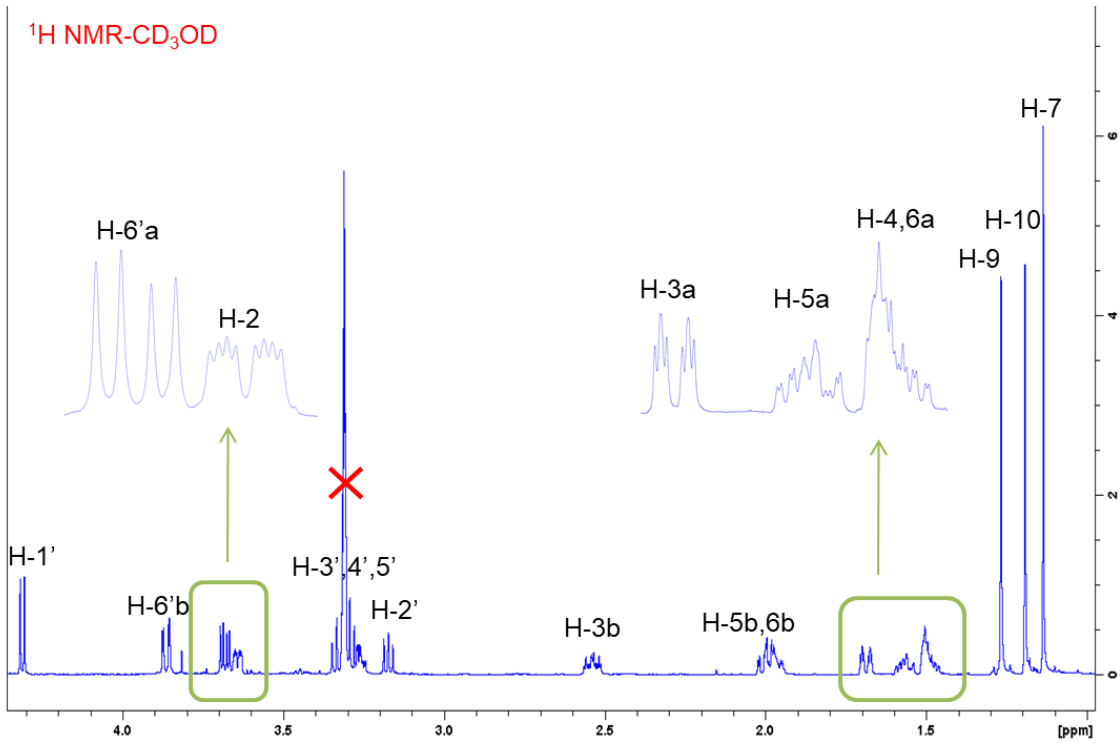
Στο φάσμα ^{1}H NMR πιο αποθωρακισμένο εμφανίζεται το πρωτόνιο που αντιστοιχεί στο ανωμερικό πρωτόνιο της γλυκόζης ως μία διπλή (d) κορυφή στα 4.33 ppm (H-1’, *J*=7.76 Hz). Επιπλέον εμφανίζονται δύο dd (διπλή-διπλή) κορυφές στα 3.71 ppm (H-6’a, *J*=11.91 και 5.32 Hz) και στα 3.88 ppm (H-6’b,

J=11.92 και 2.36 Hz) και μία τριπλή (t) κορυφή στα 3.19 ppm (H-2' , *J*=8.16 Hz).Τα υπόλοιπα πρωτόνια του γλυκοπυρανικού δακτυλίου συντονίζονται στα 3.25-3.40 ppm, εκεί που εμφανίζεται η κορυφή του διαλύτη (στα 3.31 ppm), γι'αυτό εμφανίζονται ως μία πολλαπλή (m) κορυφή στο φάσμα ^{1}H -NMR.

Με τη χρήση του φάσματος COSY παρατηρείται σύζευξη ^{3}J μεταξύ του πρωτονίου H-2' με H-1' και H-3' (3.35 ppm) .Επιπλέον εμφανίζεται σύζευξη ^{3}J μεταξύ του πρωτονίου H-5' με H-6'a (3.71 ppm) και H-6'b (3.88 ppm). Ο άνθρακας στη θέση 4' του γλυκοπυρανικού δακτυλίου εμφανίζεται στα 70.2 ppm (HMQC) και εμφανίζει συζεύξεις ^{2}J με τα πρωτόνια H-3' και H-5' και σύζευξη ^{3}J με τα πρωτόνια H-6'a και H-6'b (HMBC).Στη συνέχεια παρατηρείται σύζευξη ^{3}J μεταξύ του πρωτονίου H-1' και του C-2 (79.5 ppm) του βασικού σκελετού του μορίου.

Εμφανή, σε υψηλά επίπεδα, στο φάσμα ^{1}H -NMR είναι τα σήματα που αντιστοιχούν στις τρεις μεθυλομάδες του μορίου. Τρεις απλές (s) κορυφές με ολοκλήρωση τρία που συντονίζονται στα 1.11 ppm (H-7), 1.21 ppm (H-9) και 1.28 ppm (H-10). Οι άνθρακες των πρωτονίων αυτών συντονίζονται στα 23.16, 27.7 και 27.4 αντίστοιχα. Στο φάσμα HMBC τα H-9 και H-10 συμπεριφέρονται με τον ίδιο τρόπο και εμφανίζουν σύζευξη με τους ίδιους άνθρακες (σύζευξη ^{3}J με C-4 και σύζευξη ^{2}J με C-8) αλλά και μεταξύ τους (^{3}J).

Με τη χρήση του φάσματος HMQC έγινε δυνατή η ταυτοποίηση των πρωτονίων των μεθυλενίων στις θέσεις 3,5,6 και του πρωτονίου H-4. Επιπλέον με τη χρήση του φάσματος COSY παρατηρείται σύζευξη ^{3}J μεταξύ των H-2, H-3a και H-3b και μεταξύ των πρωτονίων H-5a και H-5b με τα H-6a και H-6b, καθώς και σύζευξη ^{2}J μεταξύ των πρωτονίων των μεθυλενίων, H-3a με H-3b,H-5a με H-5b και H-6a με H-6b. Με τη μελέτη των φασμάτων και τη βοήθεια της βιβλιογραφίας[173] διαπιστώθηκε ότι η ουσία είναι ο Γλυκοπυρανοσίδης της 2-υδροξυ-1,8-κινεόλης.



Εικόνα 41: *Φάσμα ^{1}H -NMR του Γλυκοπυρανοσίδη της 2-υδροξυ-1,8-κινεόλης*

Δεν εμφανίζει ενδείξεις για αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις σε σύγκριση με άλλους γλυκοσίδες μονοτερπενίων που απομονώθηκαν από τα ίδια φυτά[171].

4.4 ΕΛΕΓΧΟΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ

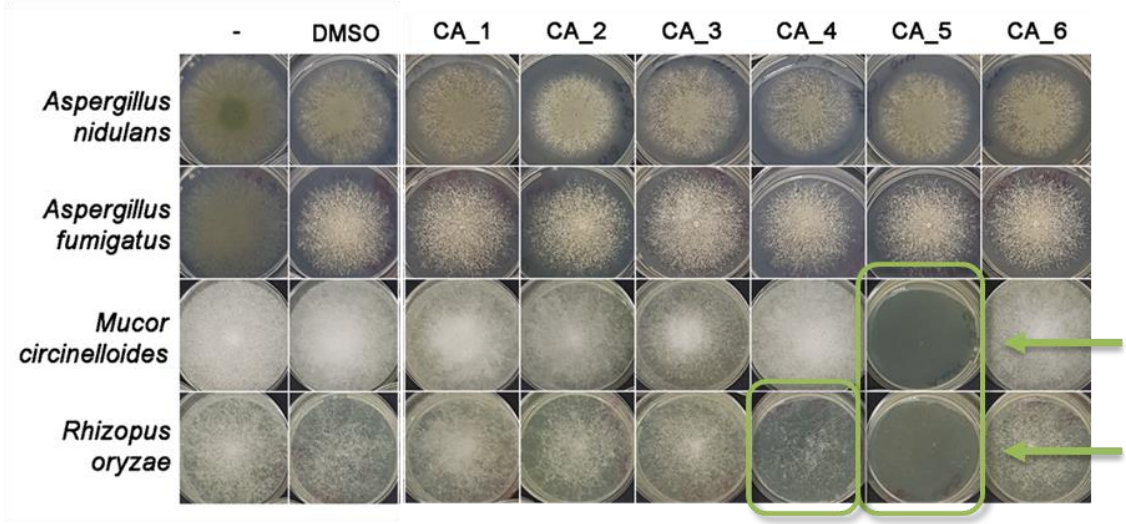
Ύστερα από την ολοκλήρωση των απομονώσεων και των ταυτοποιήσεων των καθαρών ουσιών ακολούθησαν βιολογικές δοκιμές στα παρακάτω μικροβιακά στελέχη, βακτήρια και μύκητες:

1| *Echerichia coli – εντεροβακτήριο Gram(-)*
2| *Pseudomonas aeruginosa –ψευδομονάδα Gram(-)*
3| *Bacillus subtilis – εντερόκοκκος Gram(+)*
4| *Aspergillus nidulans – νηματοειδής μύκητας*
5| *Aspergillus fumigatus – σαπροφυτικός μύκητας*
6| Κλινικό δείγμα *Mucor – ζυγομύκητας*
7| Κλινικό δείγμα *Rhizopus - σαπροφυτικός μύκητας*

Σκοπός των παραπάνω δοκιμών ήταν να μελετηθεί η δραστικότητα, τόσο ολικών εκχυλισμάτων από τα φύλλα της μαστίχας, όσο και καθαρών ουσιών που είχαν προκύψει από τα εκχυλίσματά της και βάσει της βιβλιογραφίας εμφανίζουν ενδιαφέρουσες δράσεις.

Οι έλεγχοι για την αντιμικροβιακή δράση πραγματοποιήθηκαν σε έξι δείγματα που αποτελούνταν από τρία εκχυλίσματα, τα υδατικό (CA_1), μεθανολικό (CA_2) και του οξικού οξέος (CA_3) και τρείς καθαρές ουσίες, το σικιμικό οξύ (CA_4), το γλυκοπυρανοσίδη της 2-υδροξυ-1,8-κινεόλης (CA_5) και τη μυρικιτρίνη (CA_6).

Από τις βιολογικές δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν προέκυψε η ακόλουθη Εικόνα (**Εικόνα 42**) στην οποία απεικονίζεται η αναστολή της ανάπτυξης των πληθυσμών των μικροβιακών στελεχών που εμβολιάστηκαν με τις παραπάνω ουσίες. Υπήρχαν επίσης σειρές τρυβλίων, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα ελέγχου, απουσία και παρουσία του διαλύτη DMSO στον οποίο διαλύθηκαν οι ουσίες.



Εικόνα 42: *Τρυβλία ανάπτυξης πληθυσμών βακτηριακών στελεχών υπό την παρουσία ή απουσία των χορηγήσεων CA_1-CA_6. Τα τρυβλία που επωάστηκαν παρουσία ή/και απουσία του διαλύτη DMSO χρησιμοποιούνται ως δείγματα ελέγχου (control).*

Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 42**, στις δοκιμές χρησιμοποιούνται δύο σειρές τρυβλίων ως δείγματα ελέγχου, εκείνη που περιλαμβάνει μόνο το θρεπτικό υπόστρωμα και εκείνη που έχει εμβολιαστεί συμπληρωματικά με το διαλύτη DMSO στον οποίο έχουν διαλυθεί τα δείγματα. Αυτό συμβαίνει διότι γενικά ο διαλύτης DMSO σε ποσοστά προσθήκης μεγαλύτερα του 1% προκαλεί από μόνος του τοξικότητα στις καλλιέργειες.

Ο γλυκοπυρανοσίδης της 2-υδροξυ-1,8-κινεόλης παρουσίασε σχεδόν ολική αναστολή στον πολλαπλασιασμό του μύκητα *Rhizopus* και του ζυγομύκητα *Mucor* ενώ σε μικρότερα επίπεδα παρουσίασε δράση το σικιμικό οξύ έναντι του μύκητα *Rhizopus*. Στις υπόλοιπες δοκιμές δεν εμφανίστηκαν σημαντικά αποτελέσματα/δραστικότητες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5
ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ

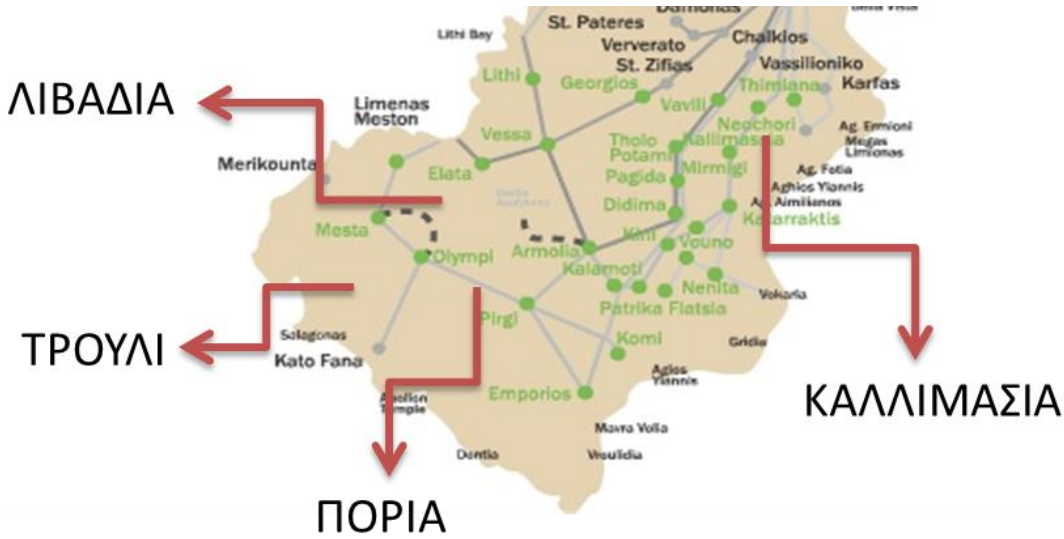
Ο τομέας της μεταβολομικής παρουσιάζει τα τελευταία χρόνια ταχεία ανάπτυξη που οφείλεται κυρίως σε μελέτες, στην ανάπτυξη πρωτοκόλλων και μεθόδων και στην πληθώρα εφαρμογών της σε διάφορους κλάδους όπως η ανάπτυξη φαρμάκων, η βιοϊατρική επιστήμη, οι φυσικές επιστήμες, η τοξικολογία, οι ενεργειακές και οι περιβαλλοντικές επιστήμες και άλλες. Δύο είναι οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες αναλυτικές τεχνικές στον τομέα της μεταβολομικής, η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear magnetic resonance - NMR) και η φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry - MS)[174].

5.1 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ (NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE - NMR)

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκαν δύο συλλογές φύλλων μαστιχόδενδρου. Η πρώτη, σε μεγάλη ποσότητα για τη φυτοχημική μελέτη (Κεφάλαιο 4). και η δεύτερη για τη μεταβολική Συγκεκριμένα, η δεύτερη πραγματοποιήθηκε σε τρεις διαφορετικές χρονικές περιόδους, τον Οκτώβριο του 2018, το Μάιο του 2019 και τον Ιανουάριο του 2020. Εκτός από τις διαφορετικές χρονικές περιόδους, δείγματα συλλέχθηκαν και από τέσσερις διαφορετικές περιοχές (χωράφια) και με συγκεκριμένη μεθοδολογία (Εικόνα 12). Συγκεκριμένα δείγματα φύλλων συλλέχθηκαν από τις περιοχές Λιβάδια, Ποριά, Τρουλί και Καλλιμασιά. Σε κάθε δειγματοληψία γινόταν επιλογή μαστιχόδενδρων μορφολογικά διαφορετικών μεταξύ τους και απομακρυσμένα το ένα από το άλλο. Σε κάθε δέντρο συλλέγονται τρεις επαναλήψεις νέων φύλλων και τρεις παλιών φύλλων. Κάθε φορά συλλέγονται έξι επαναλήψεις με δέκα φύλλα ανά επανάληψη.

Πίνακας 21: *Συντεταγμένες περιοχών σύμφωνα με τον δορυφόρο ΕΓΣΑ 87'*

	ΕΓΣΑ Χ	**ΕΓΣΑ Υ**
Λιβάδια	671683.04	4236995.22
Ποριά	671440.66	4233528.37
Τρουλί	668200.3	4234252.25
Καλλιμασιά	682651.09	4240838.39



Εικόνα 43: *Περιοχές που πραγματοποιήθηκαν οι συλλογές των δειγμάτων*

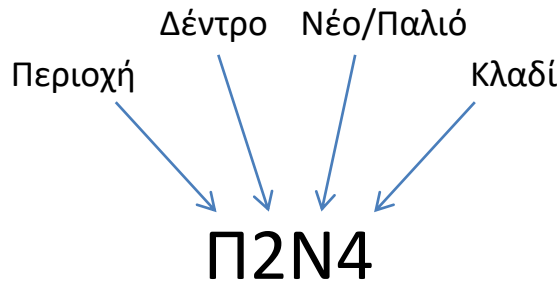
Πίνακας 22: *Πληροφορίες δειγμάτων- μεταδεδομένα (metadata) αναφορικά με τη γεωγραφική περιοχή (χωράφι), την ηλικία του δέντρου και του κλαδιού και την ημερομηνία συλλογής*

Δείγμα	**Χωράφι**	**Ηλικία δέντρου (χρόνια)**	**Δέντρο**	**Κλαδί**	**Ηλικία κλαδιού**	**Ημ/νια συλλογής(DD/MM/YY)**	***Κωδικός***
1	Λιβάδια	100	1	2	νέο	10/12/2018	*Λ1Ν2*
2	Λιβάδια	100	1	3	νέο	10/12/2018	*Λ1Ν3*
3	Λιβάδια	100	1	4	νέο	10/12/2018	*Λ1Ν4*
4	Λιβάδια	100	1	5	νέο	10/12/2018	*Λ1Ν5*
5	Λιβάδια	100	1	6	νέο	10/12/2018	*Λ1Ν6*
6	Λιβάδια	100	1	2	παλιό	10/12/2018	*Λ1Π2*
7	Λιβάδια	100	1	3	παλιό	10/12/2018	*Λ1Π3*
8	Λιβάδια	100	1	4	παλιό	10/12/2018	*Λ1Π4*

9	Λιβάδια	100	1	5	παλιό	10/12/2018	*Λ1Π5*
10	Λιβάδια	100	1	6	παλιό	10/12/2018	*Λ1Π6*
11	Λιβάδια	50	2	2	νέο	10/12/2018	*Λ2Ν2*
12	Λιβάδια	50	2	3	νέο	10/12/2018	*Λ2Ν3*
13	Λιβάδια	50	2	4	νέο	10/12/2018	*Λ2Ν4*
14	Λιβάδια	50	2	5	νέο	10/12/2018	*Λ2Ν5*
15	Λιβάδια	50	2	6	νέο	10/12/2018	*Λ2Ν6*
16	Λιβάδια	50	2	2	παλιό	10/12/2018	*Λ2Π2*
17	Λιβάδια	50	2	3	παλιό	10/12/2018	*Λ2Π3*
18	Λιβάδια	50	2	4	παλιό	10/12/2018	*Λ2Π4*
19	Λιβάδια	50	2	5	παλιό	10/12/2018	*Λ2Π5*
20	Λιβάδια	50	2	6	παλιό	10/12/2018	*Λ2Π6*
21	Ποριά	40	1	1	νέο	1/5/2019	*Π1Ν1*
22	Ποριά	40	1	2	νέο	1/5/2019	*Π1Ν2*
23	Ποριά	40	1	3	νέο	1/5/2019	*Π1Ν3*
24	Ποριά	40	1	4	παλιό	1/5/2019	*Π1Π4*
25	Ποριά	40	1	5	παλιό	1/5/2019	*Π1Π5*
26	Ποριά	40	1	6	παλιό	1/5/2019	*Π1Π6*
27	Ποριά	40	2	1	νέο	1/5/2019	*Π2Ν1*
28	Ποριά	40	2	2	νέο	1/5/2019	*Π2Ν2*
29	Ποριά	40	2	3	νέο	1/5/2019	*Π2Ν3*
30	Ποριά	40	2	4	παλιό	1/5/2019	*Π2Π4*
31	Ποριά	40	2	5	παλιό	1/5/2019	*Π2Π5*
32	Ποριά	40	2	6	παλιό	1/5/2019	*Π2Π6*
33	Ποριά	40	3	1	νέο	1/5/2019	*Π3Ν1*
34	Ποριά	40	3	2	νέο	1/5/2019	*Π3Ν2*
35	Ποριά	40	3	3	νέο	1/5/2019	*Π3Ν3*
36	Ποριά	40	3	4	παλιό	1/5/2019	*Π3Π4*
37	Ποριά	40	3	5	παλιό	1/5/2019	*Π3Π5*
38	Ποριά	40	3	6	παλιό	1/5/2019	*Π3Π6*
39	Ποριά	40	4	1	νέο	1/5/2019	*Π4Ν1*
40	Ποριά	40	4	2	νέο	1/5/2019	*Π4Ν2*
41	Ποριά	40	4	3	νέο	1/5/2019	*Π4Ν3*
42	Ποριά	40	4	4	παλιό	1/5/2019	*Π4Π4*
43	Ποριά	40	4	5	παλιό	1/5/2019	*Π4Π5*
44	Ποριά	40	4	6	παλιό	1/5/2019	*Π4Π6*
45	Τρουλί	35	1	1	νέο	1/5/2019	*Τ1Ν1*
46	Τρουλί	35	1	2	νέο	1/5/2019	*Τ1Ν2*
47	Τρουλί	35	1	3	νέο	1/5/2019	*Τ1Ν3*
48	Τρουλί	35	1	4	παλιό	1/5/2019	*Τ1Π4*
49	Τρουλί	35	1	5	παλιό	1/5/2019	*Τ1Π5*
50	Τρουλί	35	1	6	παλιό	1/5/2019	*Τ1Π6*
51	Τρουλί	35	2	1	νέο	1/5/2019	*Τ2Ν1*

52	Τρουλί	35	2	2	νέο	1/5/2019	*Τ2Ν2*
53	Τρουλί	35	2	3	νέο	1/5/2019	*Τ2Ν3*
54	Τρουλί	35	2	4	παλιό	1/5/2019	*Τ2Π4*
55	Τρουλί	35	2	5	παλιό	1/5/2019	*Τ2Π5*
56	Τρουλί	35	2	6	παλιό	1/5/2019	*Τ2Π6*
57	Τρουλί	35	3	1	νέο	1/5/2019	*Τ3Ν1*
58	Τρουλί	35	3	2	νέο	1/5/2019	*Τ3Ν2*
59	Τρουλί	35	3	3	νέο	1/5/2019	*Τ3Ν3*
60	Τρουλί	35	3	4	παλιό	1/5/2019	*Τ3Π4*
61	Τρουλί	35	3	5	παλιό	1/5/2019	*Τ3Π5*
62	Τρουλί	35	3	6	παλιό	1/5/2019	*Τ3Π6*
63	Τρουλί	35	4	1	νέο	1/5/2019	*Τ4Ν1*
64	Τρουλί	35	4	2	νέο	1/5/2019	*Τ4Ν2*
65	Τρουλί	35	4	3	νέο	1/5/2019	*Τ4Ν3*
66	Τρουλί	35	4	4	παλιό	1/5/2019	*Τ4Π4*
67	Τρουλί	35	4	5	παλιό	1/5/2019	*Τ4Π5*
68	Τρουλί	35	4	6	παλιό	1/5/2019	*Τ4Π6*
69	Καλλιμασιά	50	1	1	νέο	6/1/2020	*Κ1Ν1*
70	Καλλιμασιά	50	1	2	νέο	6/1/2020	*Κ1Ν2*
71	Καλλιμασιά	50	1	3	νέο	6/1/2020	*Κ1Ν3*
72	Καλλιμασιά	50	1	4	παλιό	6/1/2020	*Κ1Π4*
73	Καλλιμασιά	50	1	5	παλιό	6/1/2020	*Κ1Π5*
74	Καλλιμασιά	50	1	6	παλιό	6/1/2020	*Κ1Π6*
75	Καλλιμασιά	50	2	1	νέο	6/1/2020	*Κ2Ν1*
76	Καλλιμασιά	50	2	2	νέο	6/1/2020	*Κ2Ν2*
77	Καλλιμασιά	50	2	3	νέο	6/1/2020	*Κ2Ν3*
78	Καλλιμασιά	50	2	4	παλιό	6/1/2020	*Κ2Π4*
79	Καλλιμασιά	50	2	5	παλιό	6/1/2020	*Κ2Π5*
80	Καλλιμασιά	50	2	6	παλιό	6/1/2020	*Κ2Π6*
81	Καλλιμασιά	50	3	1	νέο	6/1/2020	*Κ3Ν1*
82	Καλλιμασιά	50	3	2	νέο	6/1/2020	*Κ3Ν2*
83	Καλλιμασιά	50	3	3	νέο	6/1/2020	*Κ3Ν3*
84	Καλλιμασιά	50	3	4	παλιό	6/1/2020	*Κ3Π4*
85	Καλλιμασιά	50	3	5	παλιό	6/1/2020	*Κ3Π5*
86	Καλλιμασιά	50	3	6	παλιό	6/1/2020	*Κ3Π6*
87	Καλλιμασιά	50	4	1	νέο	6/1/2020	*Κ4Ν1*
88	Καλλιμασιά	50	4	2	νέο	6/1/2020	*Κ4Ν2*
89	Καλλιμασιά	50	4	3	νέο	6/1/2020	*Κ4Ν3*
90	Καλλιμασιά	50	4	4	παλιό	6/1/2020	*Κ4Π4*
91	Καλλιμασιά	50	4	5	παλιό	6/1/2020	*Κ4Π5*
92	Καλλιμασιά	50	4	6	παλιό	6/1/2020	*Κ4Π6*

Για κάθε δείγμα έχει οριστεί μία κωδική ονομασία σύμφωνα με τα εξής χαρακτηριστικά:



Τέλος, το κάθε δείγμα αποθηκεύεται ξεχωριστά, όπως φαίνεται παρακάτω.

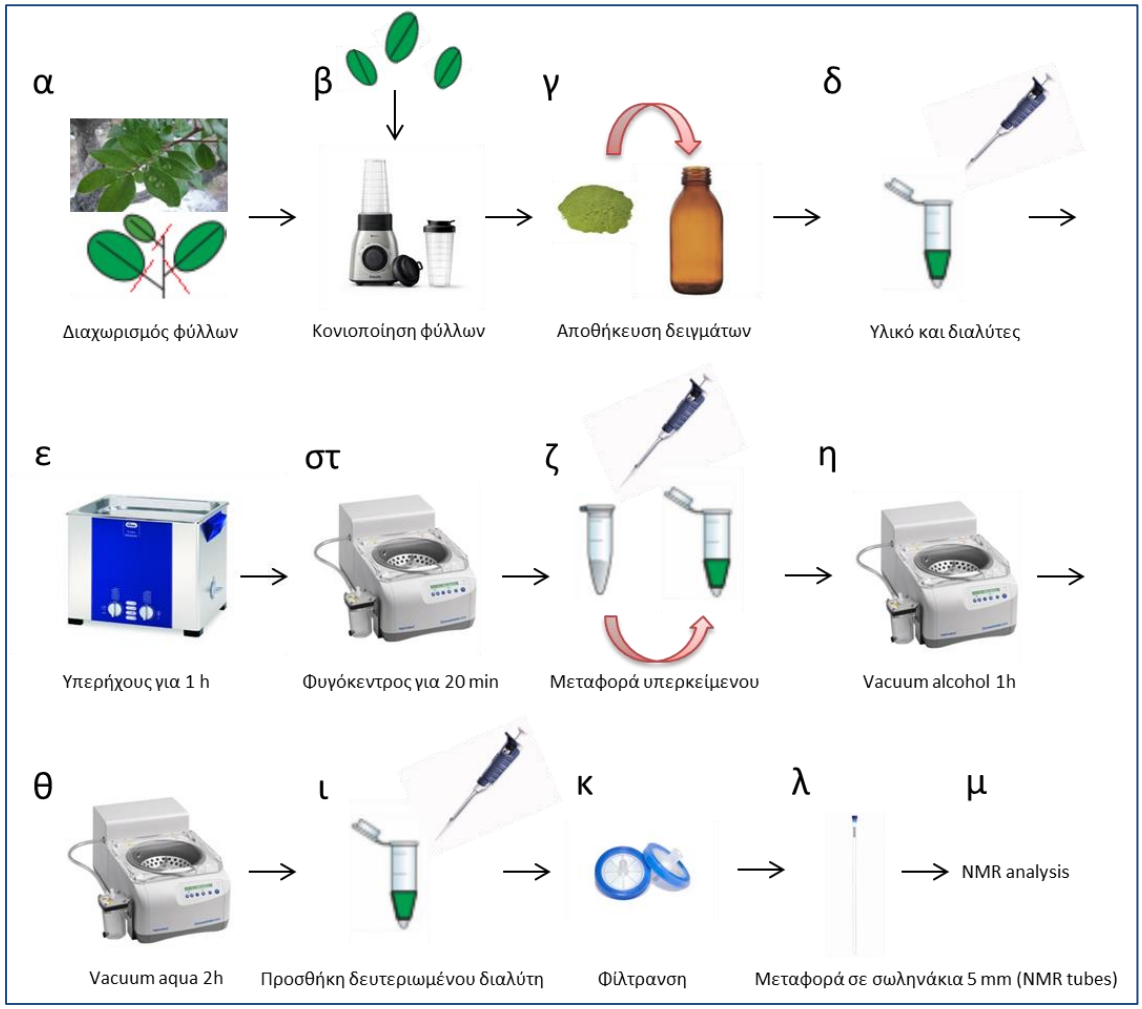
***Εικόνα 44**: Ενδεικτικά δείγματα προοριζόμενα για μεταβολομική μελέτη*

Μετά τη συλλογή – δειγματοληψία, τα φύλλα τοποθετήθηκαν σε σκιερό περιβάλλον με επαρκή αερισμό, ώστε τα φύλλα να αποξηραίνονται φυσικά. Να σημειωθεί ότι πολλά φύλλα μπορεί να είναι χλωρά και να αναπτυχθούν μύκητες, γι' αυτό τα φύλλα απλώνονται ώστε να έρχονται όλα σε επαφή με τον αέρα και να μπορούν να ξηραίνονται ομοιόμορφα. Στη συνέχεια ακολουθήσε διαχωρισμός φύλλων από τα ξυλώδη μέρη, τα άνθη και τις ταξιανθίες και τα φύλλα τοποθετήθηκαν σε ειδική συσκευή για κονιοποίηση (blender) για να πάρουν μορφή σκόνης. Τέλος, αποθηκεύτηκαν σε μορφή σκόνης σε περιέκτες συνολικού όγκου 250 mL. Το επόμενο βήμα ήταν η ανάπτυξη μεθοδολογία για την ανάλυση των δειγμάτων με NMR. Στη συνέχεια παρουσιάζεται συνοπτικά και σχηματικά το τελικό πρωτόκολλο.

Προετοιμασία δειγμάτων για ανάλυση NMR

1| Τοποθέτηση100 mg δείγματος (σκόνης) σε περιέκτες τύπου Eppendorf όγκου 2 mL.
2| Προσθήκη 1 mL διαλύματος EtOAc/MeOH 80/20.
3| Ανάδευση στο vortex για 1 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (RT, 20-25 ^{o}C).
4| Ομογενοποίηση στους υπερήχους για 1 h σε θερμοκρασία περιβάλλοντος(RT=25 ^{o}C).
5| Φυγοκέντριση για 15 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος χρησιμοποιώντας το Eppendorf™ Concentrator Plus σε 217 x g.
6| Μεταφορά του υπερκείμενου (λιγότερο από 1 mL) σε 2 mL Eppendorf (αν το υπερκείμενο δεν είναι καθαρό επανατοποθετείται στη φυγόκεντρο για άλλα 10 min).
7| Τοποθέτηση δειγμάτων στο Eppendorf™ Concentrator Plus σε πρόγραμμα εξάτμισης αλκοόλης (V-AL, vacuum alcohol) για 1 h στους 30 °C και μετά σε πρόγραμμα εξάτμισης νερού (V-AQ, vacuum aqua) για 4 h στους 30 ^{o}C.
8| Προσθήκη 750 μL MeOH-*d*4, με χρήση εσωτερικού προτύπου (hexamethyldisiloxane, HDMSO) 0.02% v/v.
9| Φίλτρανση των παραγόμενων εκχυλισμάτων.
10| Μεταφορά 600 μL σε 5 mm ειδικό σωληνάκι NMR.
11| Ανάλυση NMR.

Στην παρακάτω Εικόνα (**Εικόνα 45**) παρουσιάζεται συνοπτικά το πειραματικό πρωτόκολλο



Εικόνα 45: *Πειραματική πορεία για την προετοιμασία των δειγμάτων.*

5.2 ΕΠΙΛΟΓΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΒΑΣΙΣΜΕΝΗ ΣΤΟ NMR

Όπως φαίνεται στο παραπάνω διάγραμμα ροής (**Εικόνα 44**), δημιουργήθηκε ένα πειραματικό πρωτόκολλο ώστε τα δείγματα να μπορούν να χρησιμοποιηθούν στις μεταβολομικές αναλύσεις που είναι βασισμένες στο NMR. Η δημιουργία ενός πειραματικού πρωτοκόλλου είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς χρειάζεται σε κάθε βήμα της μελέτης να υπάρχει έλεγχος και επαναληψιμότητα και να αποφεύγονται οι διακυμάνσεις λόγω άλλων εξωγενών παραγόντων, εξωτερικών συνθηκών κ.ά. καθώς επίσης και να προσαρμόζεται ανάλογα με τις ιδιαιτερότητες του εκάστοτε δείγματος. Ένας άλλος λόγος για τον οποίο είναι απαραίτητη η ύπαρξη ενός καθολικού πειραματικού πρωτοκόλλου είναι η ανάκτηση όσο το δυνατόν περισσότερων δευτερογενών

μεταβολιτών αλλά και η εύκολη αναγνώριση και επεξεργασία τους στη συνέχεια.

Έτσι πραγματοποιήθηκε μια σειρά δοκιμών προκειμένου να ελεγχθούν οι παρακάτω παράμετροι:

Α) Διαλύτης και διάρκεια εκχύλισης

Β) Απόδοση εκχύλισης

Γ) Τρόπος και διάρκεια ξήρανσης

Δ) Επιλογή δευτεριωμένου διαλύτη και διαλυτότητα

Ε) Συγκέντρωση δείγματος

Σε κάθε περίπτωση το αποτέλεσμα ελεγχόταν με ^{1}H NMR και γινόταν έλεγχος της ποιότητας του φάσματος σχετικά με το πλήθος των κορυφών, τη μορφή τους και το μέγεθος της παρατηρούμενης επικάλυψης κορυφών.

Α) Διαλύτης και διάρκεια εκχύλισης: Οι δοκιμές που έγιναν είχαν ως στόχο την εύρεση των καταλληλότερων διαλυτών και της βέλτιστης διάρκειας εκχύλισης των δειγμάτων. Για το σκοπό αυτό δημιουργήθηκε ένα μίγμα από κονιοποιημένα ξηρά φύλλα που είχε την ίδια ποσότητα φύλλων από κάθε περιοχή, τόσο από παλιά, όσο και από νέα φύλλα. Στη συνέχεια το δείγμα χωρίστηκε σε δύο μέρη. Το πρώτο μέρος διαλύθηκε σε 100% EtOAc και το δεύτερο σε 80/20 EtOAc/MeOH και ύστερα και τα δύο τοποθετήθηκαν στους υπερήχους. Στις χρονικές στιγμές 45 min, 1 h, 2 h ελήφθη από το υπερκείμενο ο ίδιος όγκος δείγματος. Υπολογίστηκαν οι αποδόσεις και πραγματοποιήθηκε σύγκριση στα φάσματα ^{1}H NMR.

Β) Απόδοση εκχύλισης: Η επιλογή των διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν έγινε βάσει των χρωματογραφημάτων HPLC, που παρατίθενται στις **Εικόνες 14,15**. Η εκχύλιση με EtOAc είχε μικρότερες αποδόσεις σε σχέση με εκείνη της MeOH, τα φάσματα όμως ^{1}H -NMR ήταν πιο καθαρά, με εμφανείς κορυφές που διευκολύνουν την επεξεργασία τους. Από την άλλη πλευρά στην εικόνα των φασμάτων ^{1}H -NMR που έχουν εκχυλιστεί με MeOH, λόγω της πληθώρας των κορυφών, δεν εμφανίζεται σαφής διαχωρισμός μεταξύ τους.

Στο πρώτο πρωτόκολλο διαλύθηκαν 4.91 gr σε 100 mL EtOAc, ενώ στο δεύτερο διαλύθηκαν 4.54 gr σε 80 mL EtOAc και 20 mL MeOH. Κάθε χρονική περίοδο που αναφέρθηκε παρελήφθησαν 25 mL υπερκείμενου όπου εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού υπό κενό. Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται

αναλυτικά οι ποσότητες, τα βάρη των εκχυλισμάτων και οι αποδόσεις που προέκυψαν στα 45 min, στη 1 h και στις 2 h.

Πίνακας 23: *Δοκιμαστική εκχύλιση 45 min*

45 min	Δ/τες	Βάρος δρόγης (gr)	Όγκος δ/τη (mL)	Βάρος εκχυλίσματος (gr)	Απόδοση (%)
1ο	100% EtOAc	4.91	25	0.03	1.22
2ο	80/20 EtOAc/MeOH	4.54	25	0.06	1.76

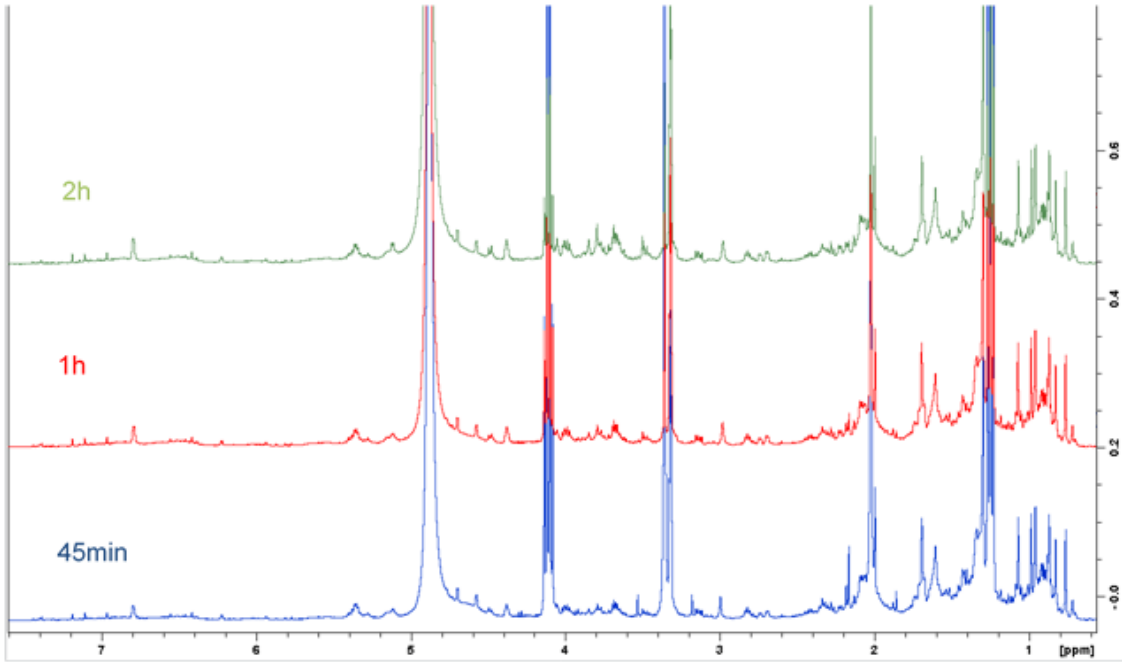
Πίνακας 24: *Δοκιμαστική εκχύλιση 1 h*

1 h	Δ/τες	Βάρος δρόγης (gr)	Όγκος δ/τη (mL)	Βάρος εκχυλίσματος (gr)	Απόδοση (%)
1ο	100% EtOAc	4.91	25	0.13	2.64
2ο	80/20 EtOAc/MeOH	4.54	25	0.18	3.96

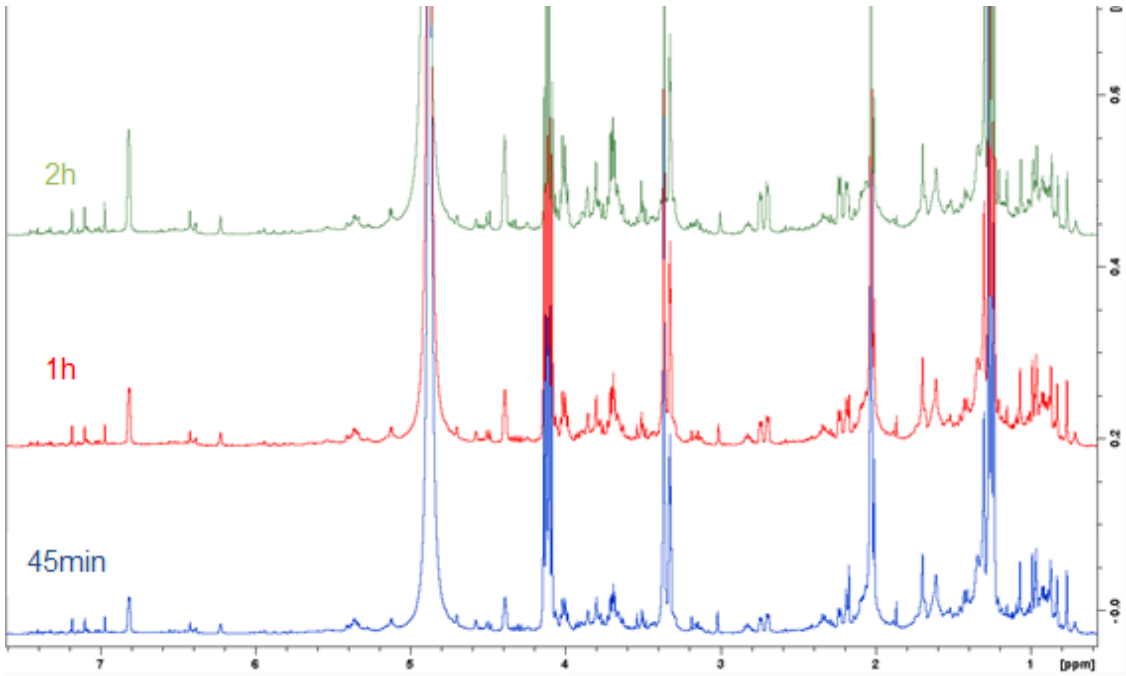
Πίνακας 25: *Δοκιμαστική εκχύλιση 2 h*

2 h	Δ/τες	Βάρος δρόγης (gr)	Όγκος δ/τη (mL)	Βάρος εκχυλίσματος (gr)	Απόδοση (%)
1ο	100% EtOAc	4.91	25	0.13	2.64
2ο	80/20 EtOAc/MeOH	4.54	25	0.2	4.4

Στη συνέχεια τα έξι διαφορετικά εκχυλίσματα διαλύθηκαν σε δευτεριωμένο διαλύτη για την παραλαβή του φάσματος ^{1}H NMR.



Εικόνα 46: *^{1}H NMR στα εκχυλίσματα με 100% EtOAc*



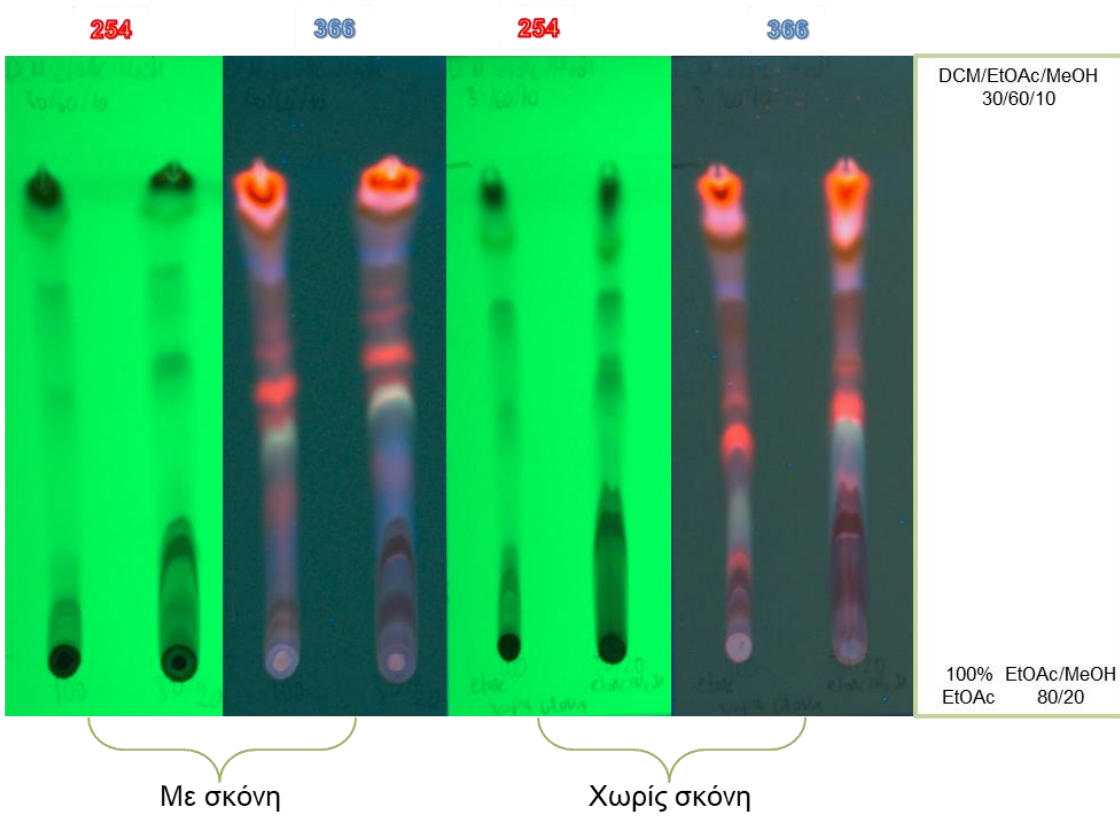
Εικόνα 47: *^{1}H NMR στα εκχυλίσματα με 80/20 EtOAc/MeOH*

Από τα αποτελέσματα των διεργασιών βελτιστοποίησης προέκυψε ότι η βέλτιστη διάρκεια εκχύλισης είναι η 1 h. Η εκχύλιση με διάρκεια 45 min παρουσίασε χαμηλότερες εντάσεις σημάτων στα φάσματα που ελήφθησαν και η τελική απόδοση ήταν χαμηλότερη, ενώ η εκχύλιση των 2 h παρουσίαζε παρόμοιες (λίγο μεγαλύτερες) αποδόσεις και εντάσεις στα φάσματα ^{1}H NMR, σε σχέση με εκείνη της 1 h. Ωστόσο, η εκχύλιση των 2 h απορρίφθηκε διότι δεν εμφανίζονται σημαντικές διαφορές μετά την πρώτη ώρα της εκχύλισης. Έτσι, η 1 h κρίθηκε ως η καταλληλότερη χρονική διάρκεια.

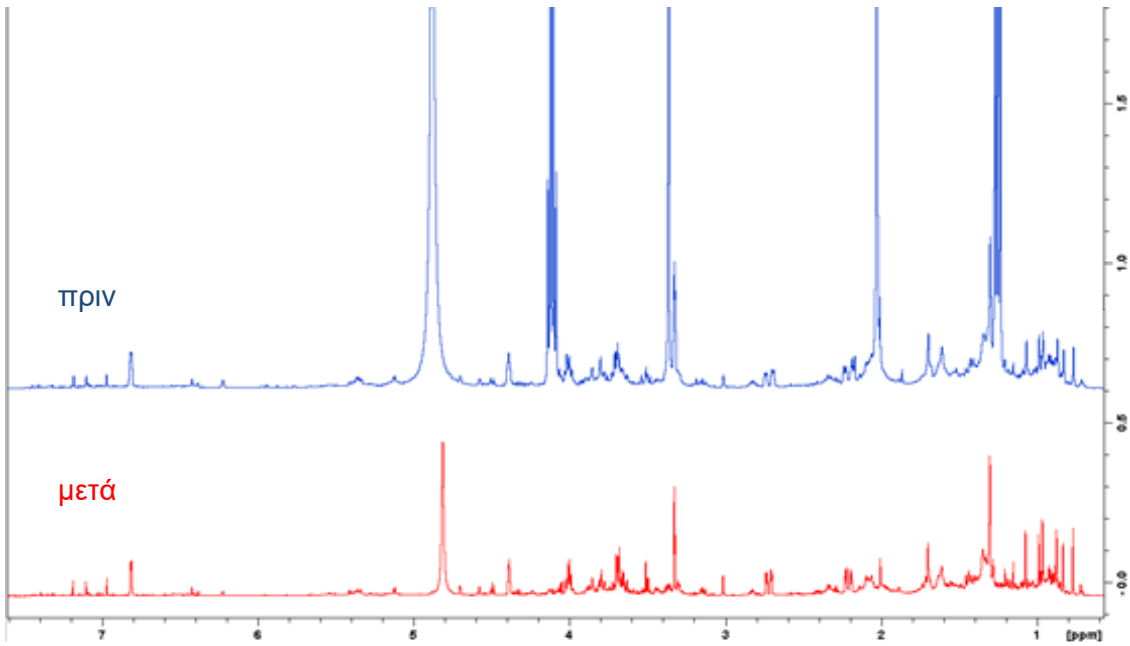
Γ) Τρόπος και διάρκεια ξήρανσης: Βάσει του Nature Protocol που ακολουθήθηκε[175] και λαμβάνοντας υπόψη τον μεγάλο αριθμό δειγμάτων που υπήρχαν αποφασίστηκε η χρήση 2 mL eppendorfs για την εκχύλιση των δειγμάτων. Στη συνέχεια ελέγχθηκε η διάρκεια της εξάτμισης των διαλυτών και η ποσότητα του αρχικού φυτικού υλικού που θα χρησιμοποιηθεί για κάθε δείγμα. Στη συνέχεια έγιναν δοκιμές για τη διάρκεια της εξάτμισης . Χρησιμοποιώντας τον συμπυκνωτή κενού SpeedVac αρχικά γίνεται η απομάκρυνση της αλκοόλης που επιτυγχάνεται στην πρώτη ώρα και μετά τα δείγματα αφήνονται υπό ισχυρό κενό μέχρι την πλήρη ξήρανσή τους για 4 h ακόμη.

Δ) Επιλογή δευτεριωμένου διαλύτη και διαλυτότητα: Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων για την επιλογή του τρόπου εκχύλισης παρατηρήθηκε ότι παρόλο που παραλαμβάνεται το υπερκείμενο μετά την εκχύλιση του φυτικού υλικού, στο στάδιο της διάλυσης με το δευτεριωμένο διαλύτη παρουσιάζεται εναιώρημα. Έτσι, λόγω της ανομοιογένειας του διαλύματος στο σωληνάκι NMR η ποιότητα του φάσματος δεν είναι καλή.

Στη συνέχεια, έγιναν δοκιμές διαλυτότητας του εναιωρήματος που μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού λαμβάνει τη μορφή ιζήματος. Δοκιμάστηκε η διάλυσή του σε κυκλοεξάνιο (C-hexane), DCM, H_2O και DMSO στα εναιωρήματα που ελήφθησαν από τις εκχυλίσεις με τη χρήση 100% EtOAc και 80/20 EtOAc/MeOH.

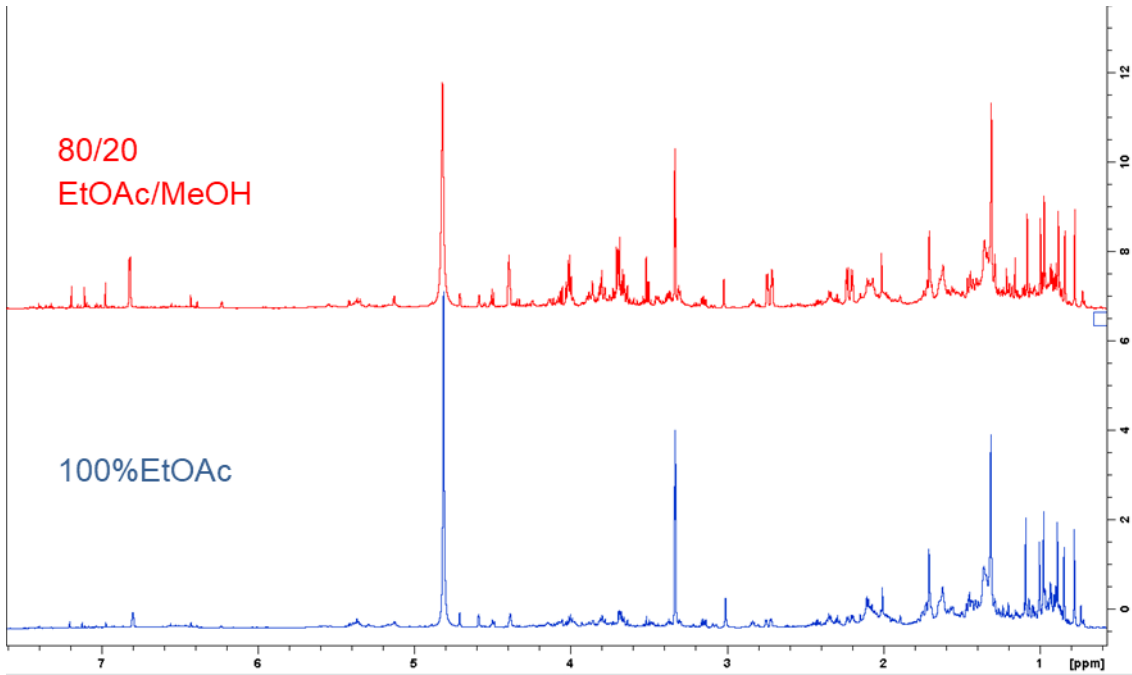


Εικόνα 48: *Δοκιμές με την αναλυτική τεχνική της TLC με στόχο την απομάκρυνση του εναιωρήματος*



Εικόνα 49: *Πριν και μετά την απομάκρυνση του εναιωρήματος και των διαλυτών*

Όπως παρατηρήθηκε (**Εικόνα 48,49**) δεν υπήρχαν εμφανείς διαφορές μεταξύ των υπερκείμενων των διαλυμάτων με και χωρίς σκόνη στον έλεγχο με την αναλυτική τεχνική TLC και τα φάσματα NMR που προέκυψαν απουσία και παρουσία εναιωρήματος δεν είχαν μεγάλες διαφορές γι' αυτό αποφασίστηκε η απομάκρυνσή του.



Εικόνα 50: *Μετά την απομάκρυνση του εναιωρήματος και την προσθήκη των διαλυτών σε αναλογίες σε 80/20 EtOAc/MeOH και 100% EtOAc*

Βάσει όλων των παραπάνω και με κυριώτερο κριτήριο τις εντάσεις των κορυφών και τη μικρότερη δυνατή αλληλεπικάλυψη κορυφών αλλά και των αποδόσεων της εκχύλισης, επιλέχθηκε ως βέλτιστο σύστημα διαλυτών το 80/20 EtOAc/MeOH.

Ε) Συγκέντρωση δείγματος: Στη συνέχεια θα έπρεπε να καθοριστεί η βέλτιστη συγκέντρωση δείγματος η οποία θα εξασφαλίζει ικανοποιητική ευαισθησία αλλά και ευκρίνεια στην ερμηνεία των φασμάτων. Έτσι δοκιμάστηκε η διαδικασία που περιγράφεται στην **Εικόνας 45** με προσθήκη 100 mg και 200 mg φυτικού υλικού αρχικά μέχρι το στάδιο της εξάτμισης. Στα εκχυλίσματα με τις δύο

ποσότητες φυτικού υλικού που δοκιμάστηκαν οι αποδόσεις ήταν ίδιες γι' αυτό επιλέχθηκαν τα 100 mg αρχικού φυτικού υλικού.

Πίνακας 26: *Αποδόσεις με 100 mg και με 200 mg φυτικού υλικού*

	Βάρος δρόγης (mg)	**Καθαρό βάρος Eppendorf (mg)**	**Μικτό Βάρος Ependorf με εκχύλισμα (mg)**	**Βάρος εκχυλίσματος (mg)**	**Απόδοση (%)**
1ο	197.4	109.75	112.94	3.19	1.62
2ο	101.3	109.12	110.75	1.63	1.61

Μετά το τέλος της παραπάνω διαδικασίας και τον καθορισμό των παραμέτρων (A ως E) έγινε η ανάλυση των δειγμάτων. Οι παράμετροι ανάλυσης με NMR φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 27: *Παράμετροι ανάλυσης NMR*

Πυρήνας διέγερσης και ανίχνευσης	**1H**
Διάσταση φάσματος	1D
Αριθμός σαρώσεων	64
Αριθμός εικονικών σάρωσης	4
Αριθμός σημείων πίνακα	65536
Χρονοκαθυστέρηση αποδιέγερσης	2 s
Φασματικό εύρος	14 ppm
Χρόνος συλλογής δεδομένων	3.9 s
Ενίσχυση σήματος	59
Μετατόπιση φέρουσας συχνότητας	6.5 ppm
Φέρουσα συχνότητα	600.1139007 MHz

Τα δείγματα εισήχθησαν στο Φασματοσκόπιο NMR μέσω του αυτόματου δειγματολήπτη, με τη βοήθεια του προγράμματος αυτοματοποίησης ICON-

NMR. Οι παράμετροι της αυτοματοποίησης περιλάμβαναν αυτόματο συντονισμό και προσαρμογή της συνολικής εμπέδησης του συστήματος στα 50 Ω (automated tuning and matching), αυτόματη εύρεση της βέλτιστης ενίσχυσης σήματος (Receiver Gain Automated - rga) και νεκρό χρόνο 5 min πριν την έναρξη της ανάλυσης με σκοπό την εξισορρόπηση της θερμοκρασίας του δείγματος στους 305 K. Τέλος, το σύστημα αυτοματοποίησης, με την εισαγωγή του εκάστοτε δείγματος παρακολουθεί τη διακύμανση/ολίσθηση της συχνότητας του δευτερίου, ώστε να προσαρμόζεται αντιστοίχως και η συχνότητα συντονισμού του πρωτονίου μέσω του «κλειδώματος» στη συχνότητα του δευτερίου (deuterium lock).

5.3 ΧΗΜΕΙΟΜΕΤΡΙΑ - ΠΟΛΥΠΑΡΑΜΕΤΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

5.3.1 ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΕΚΥΨΑΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ NMR

Το πρώτο στάδιο στη μεταβολομική ανάλυση των φασματοσκοπικών δεδομένων αποτελεί η προ-επεξεργασία των δεδομένων. Στόχος είναι η ελάττωση της πολυπλοκότητας των δεδομένων, ώστε να διευκολυνθεί η μετέπειτα ανάλυση και η ερμηνεία τους[65].

Τα δεδομένα που αποκτήθηκαν με τη χρήση της φασματοσκοπίας NMR αρχικά επεξεργάστηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό Topspin 4.0.7 (Bruker BioSpin srl). Σε πρώτο στάδιο πραγματοποιήθηκε η επεξεργασία των φασμάτων, ώστε να εξαλειφθούν τυχόν προβλήματα της φάσης και της γραμμής βάσης. Επιπλέον όλα τα φάσματα βαθμονομήθηκαν με βάση την κορυφή του εσωτερικού προτύπου στα 0.00 ppm.

Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό της MATLAB, ώστε να χωριστούν τα φάσματα σε μικρότερα τμήματα (bins ή buckets) εύρους 0.01 ppm. Για να αναγνωρίσει η MATLAB τα φασματικά δεδομένα τροποποιείται κατάλληλα η κωδικοποίησή τους, ώστε να είναι συμβατά με το λογισμικό. Για το καθένα από αυτά τα διαστήματα υπολογίστηκε το εμβαδόν των περιεχόμενων κορυφών μετατρέποντας κατά αυτόν τον τρόπο τη φασματική πληροφορία σε αρχείο δεδομένων. Το σύνολο των τελευταίων

συνέθεσε το μητρικό πίνακα δεδομένων, ο οποίος χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια για τις ανάγκες της στατιστικής ανάλυσης.

Η πρώτη στήλη του πίνακα περιείχε τις παρατηρήσεις (observations), οι οποίες στην προκειμένη περίπτωση ήταν τα δείγματα, ενώ η πρώτη σειρά περιείχε τις μεταβλητές (variables), οι οποίες ήταν τα τμήματα των χημικών μετατοπίσεων στα οποία είχε κατατμηθεί το φάσμα κατά τη διαδικασία του binning. Συνολικά, το εύρος του φάσματος ορίστηκε από 0 έως 12,5 ppm και τα συνολικά τμήματα που προέκυψαν ήταν 865.

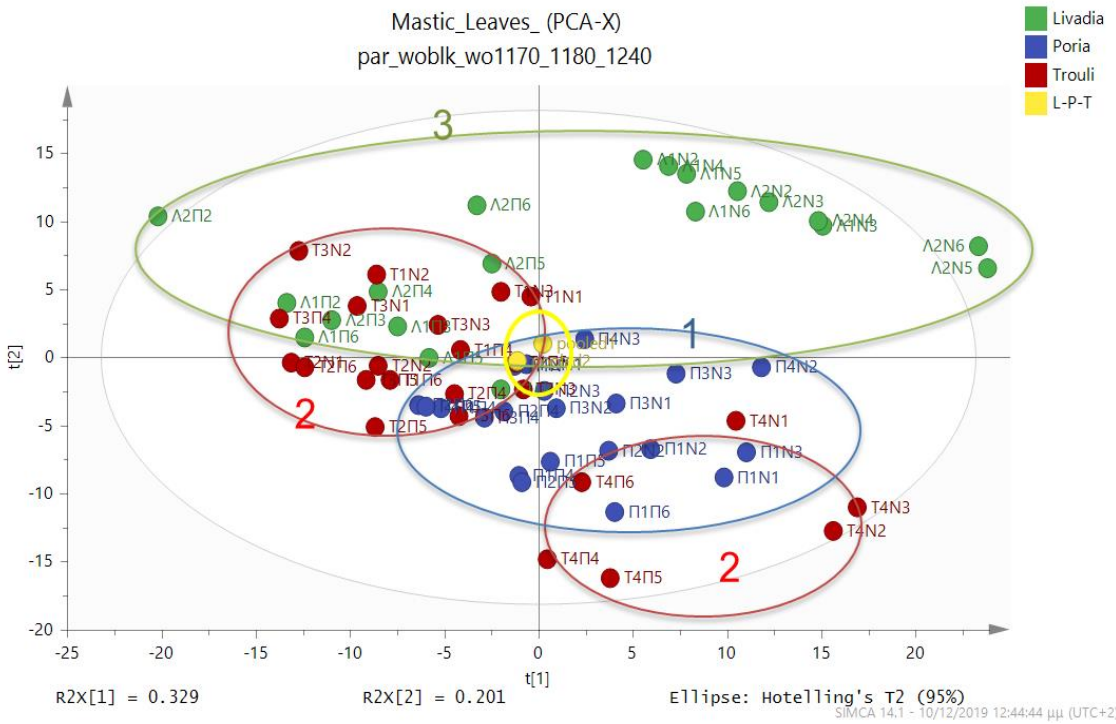
Λόγω της εμπλοκής του ανθρώπινου παράγοντα κατά τη διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας και κατά την προετοιμασία των δειγμάτων πραγματοποιείται κανονικοποίηση (normalization) των αριθμητικών δεδομένων. Η διαδικασία της κανονικοποίησης γίνεται επιπλέον για την αναγωγή των δεδομένων σε συγκρίσιμα μεγέθη, με στόχο την ευκολότερη επεξεργασία τους. Για την κανονικοποίηση τέθηκε το άθροισμα της κάθε φασματικής γραμμής (total intensity) ως παρονομαστής.

Από τον μητρικό πίνακα αποκλείστηκαν οι φασματικές περιοχές οι οποίες δεν περιείχαν χρήσιμη πληροφορία. Τέτοιες αφαιρέθηκαν οι περιοχές των κορυφών των διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν κατά την προετοιμασία των δειγμάτων (μεθανόλη-MeOH: 3.38-3.39 ppm και δευτεριωμένη μεθανόλη-MeOD: 3.24-3.26 ppm, υγρασία μεθανόλης (Residual D_2O) και περιοχές επηρεασμένες από την ευρεία κορυφή του: 4.33-4.92 ppm, οξικός αιθυλεστέρας-EtOAc: 1.16-1.19 ppm, 1.94-1.95 ppm, 4.02-4.06 ppm), η κορυφή του εσωτερικού προτύπου (-0.25-0,25 ppm) καθώς και περιοχές του φάσματος που δεν υπήρχαν κορυφές ή ήταν πολύ χαμηλής έντασης και δεν ανιχνεύονταν (0.25-0.29 ppm, 3.23 ppm, 3.27 ppm, 3.3-3.31 ppm,8.22-8.44 ppm,8.49-8.63 ppm, 8.78-9.2 ppm, 10.28-10.8 ppm, 11.12-12.47 ppm).

5.3.2 ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΥΡΙΩΝ ΣΥΝΙΣΤΩΣΩΝ (PRINCIPAL COMPONENTS ANALYSIS-PCA)

Μετά το στάδιο της προκατεργασίας χρησιμοποιήθηκαν διάφορες μέθοδοι πολυπαραμετρικής ανάλυσης (MVA). Χρησιμοποιήθηκαν μη επιβλεπόμενες και επιβλεπόμενες μέθοδοι με τη χρήση του λογισμικού SIMCA. Ορίστηκαν ως κύριες μεταβλητές οι τιμές των χημικών μετατοπίσεων και ως κύριες παρατηρήσεις τα ονόματα των δειγμάτων. Για την ανάλυση δοκιμάστηκαν διάφορες μέθοδοι κλιμάκωσης (scaling) όπως UnitVariance και Pareto. Ως

πρώτη μέθοδο χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ανάλυσης κύριων συνιστωσών PCA. Με βάση τη στατιστική αποτίμηση (Cross Validation) βρέθηκε ως βέλτιστη μέθοδος κλιμάκωσης η Pareto αλλά χρησιμοποιήθηκε και η μέθοδος κλιμάκωσης UV.

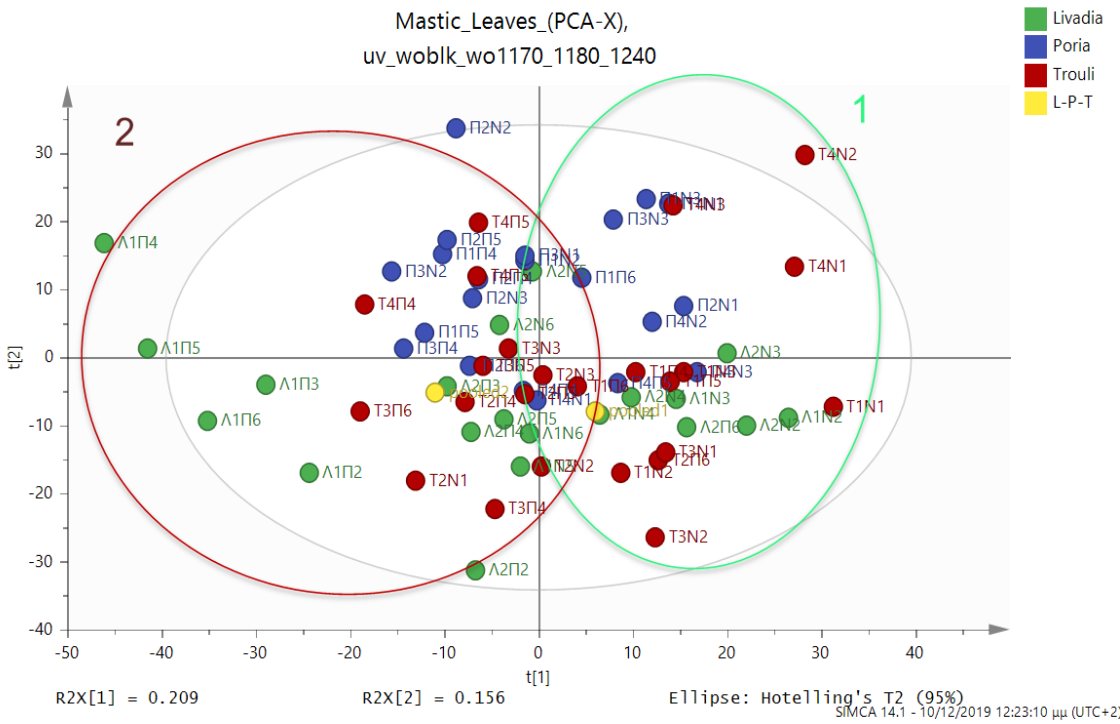


Εικόνα 51: *Διάγραμμα διασποράς (scores plot) των δύο πρώτων κύριων συνιστωσών (PC1, PC2) από την ανάλυση PCA με την χρήση της κλιμάκωσης Pareto των περιοχών Λιβάδια, Ποριά και Τρουλί. Για λόγους αξιοπιστίας της ανάλυσης έχουν παρασκευαστεί και δύο δείγματα "pooled", που φαίνονται με κίτρινο χρώμα.*

Αρχικά, δημιουργήθηκαν διαγράμματα διασποράς για τη σύγκριση των διαφορετικών περιοχών (Λιβάδια, Ποριά και Τρουλί). Τα πρώτα διαγράμματα αφορούσαν στις 3 περιοχές που η πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε στις 28/11/2019 και στη συνέχεια προστέθηκε και η τέταρτη περιοχή στα αποτελέσματα (ομάδα δειγμάτων από την περιοχή Καλλιμασιά).

Από το παραπάνω διάγραμμα διασποράς (scores plot) φαίνεται ότι οι τρεις περιοχές ομαδοποιούνται ικανοποιητικά με εξαίρεση τα δείγματα από το δέντρο 4 της περιοχής Τρουλί. Τα δείγματα που προέκυψαν από τη συνένωση πολλών διαφορετικών δειγμάτων («pooled») βρίσκονται στο κέντρο του scores plot, μια θετική ένδειξη, αφού αποτελούνται από το συνδυασμό διαφορετικών δειγμάτων.

Ως προς την πρώτη συνιστώσα παρατηρείται τάση διαχωρισμού βάσει της ηλικίας, μεταξύ των παλιών και των νεαρών φύλλων (που στην παρακάτω Εικόνα φαίνεται καλύτερα με τη χρήση της κλιμάκωσης UV) των περιοχών Λιβάδια και Ποριά και των μεταβλητών που αντιστοιχούν στο δέντρο 4 της περιοχής Τρουλί με τις υπόλοιπες μεταβλητές της περιοχής αυτής. Ως προς τη δεύτερη συνιστώσα διαχωρίζονται με σαφήνεια οι ομάδες που δημιουργούνται από τις περιοχές Λιβάδια και Ποριά

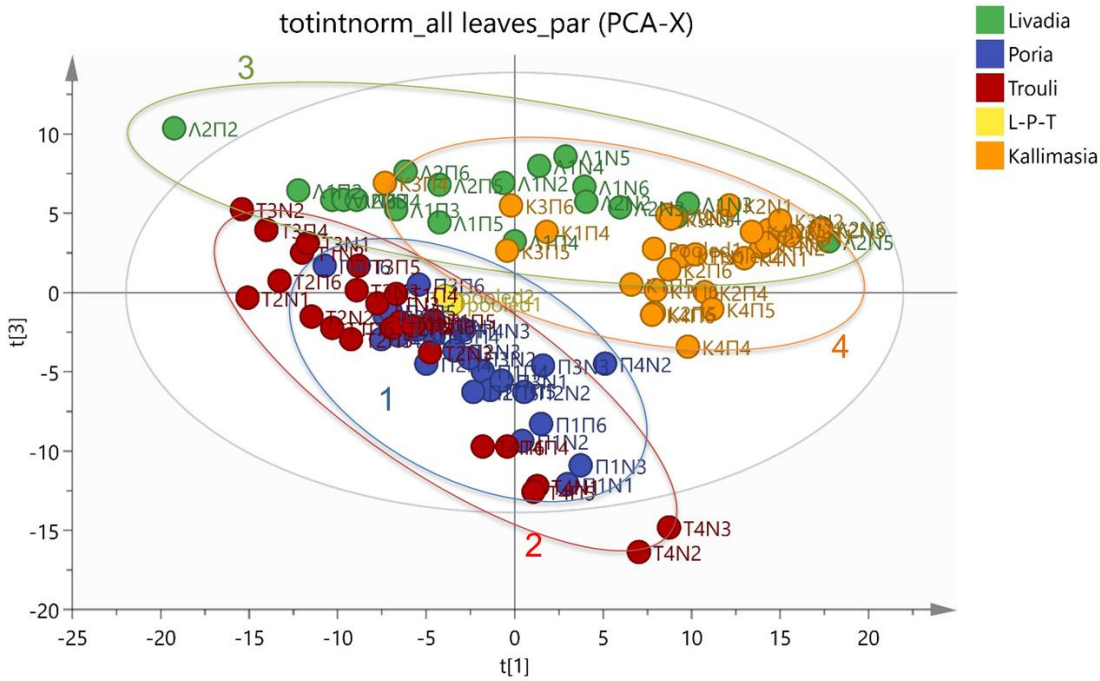


Εικόνα 52: *Διάγραμμα διασποράς (scores plot) των δύο πρώτων κύριων συνιστωσών (PC1, PC2) από την ανάλυση PCA με τη χρήση της κλιμάκωσης UV των περιοχών Λιβάδια, Ποριά και Τρουλί*

Χρησιμοποιώντας την κλιμάκωση UV φαίνεται καλύτερα ο διαχωρισμός σε δύο συστάδες στην πρώτη κύρια συνιστώσα σε σχέση με την κλιμάκωση Pareto. Η συστάδα 1 είναι τα νεαρά φύλλα και η συστάδα 2 τα παλιά.

Τοποθετώντας και τα αποτελέσματα από την περιοχή της Καλλιμασιάς παρατηρείται πως ως προς την πρώτη συνιστώσα διαχωρίζεται η ομάδα 4 (περιοχή Καλλιμασιάς) μαζί με το δέντρο 4 της περιοχής Τρουλί από την ομάδα 2. Ως προς την τρίτη κύρια συνιστώσα παρατηρείται διαχωρισμός των ομάδων 3 και 4 (Λιβάδια και Καλλιμασιά) με εκείνες των 1 και 2 (Τρουλί και Ποριά) γεγονός που ενδεχομένως οφείλεται στην περίοδο συλλογής των δειγμάτων. Τα δείγματα από τις περιοχές Καλλιμασιά και Λιβάδια συλλέχθηκαν τη

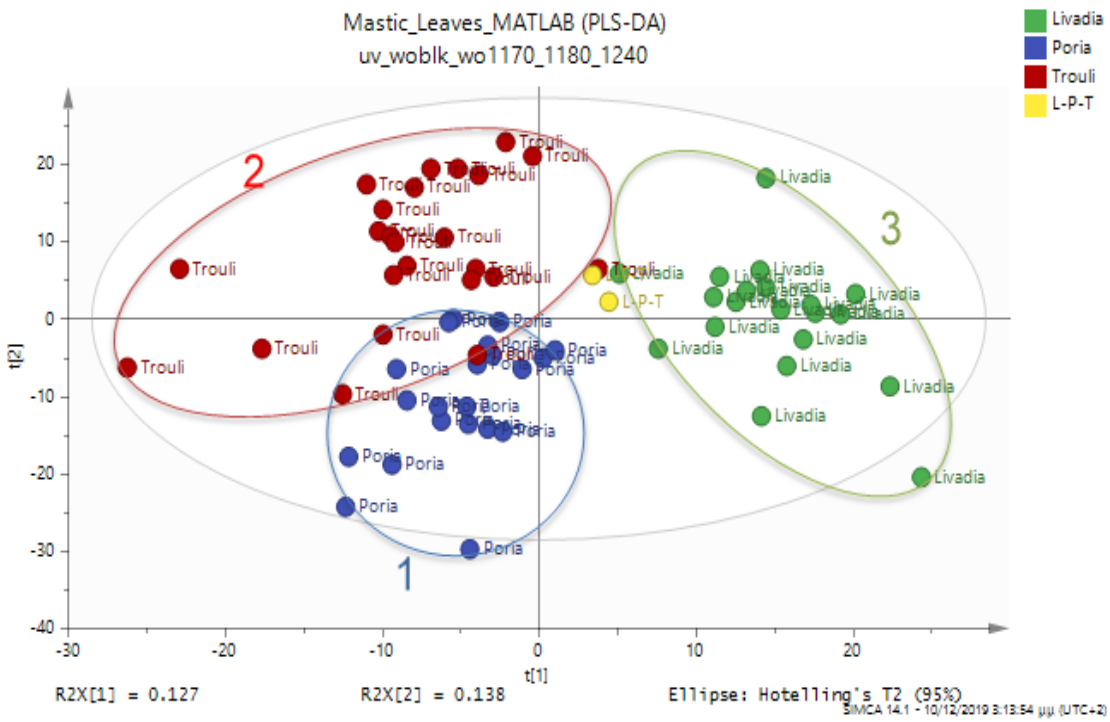
χειμερινή περίοδο ενώ τα δείγματα από τις περιοχές Ποριά και Τρουλί την άνοιξη[176].



Εικόνα 53: *Διάγραμμα διασποράς (scores plot) της πρώτης και τρίτης κύριας συνιστώσας (PC1, PC3) από την ανάλυση PCA με τη χρήση της κλιμάκωσης Pareto με όλες τις περιοχές*

5.3.3 ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕΡΙΚΩΝ ΕΛΑΧΙΣΤΩΝ ΤΕΤΡΑΓΩΝΩΝ (PARTIAL LEAST SQUARES DISCRIMINANT ANALYSIS- PLS-DA)

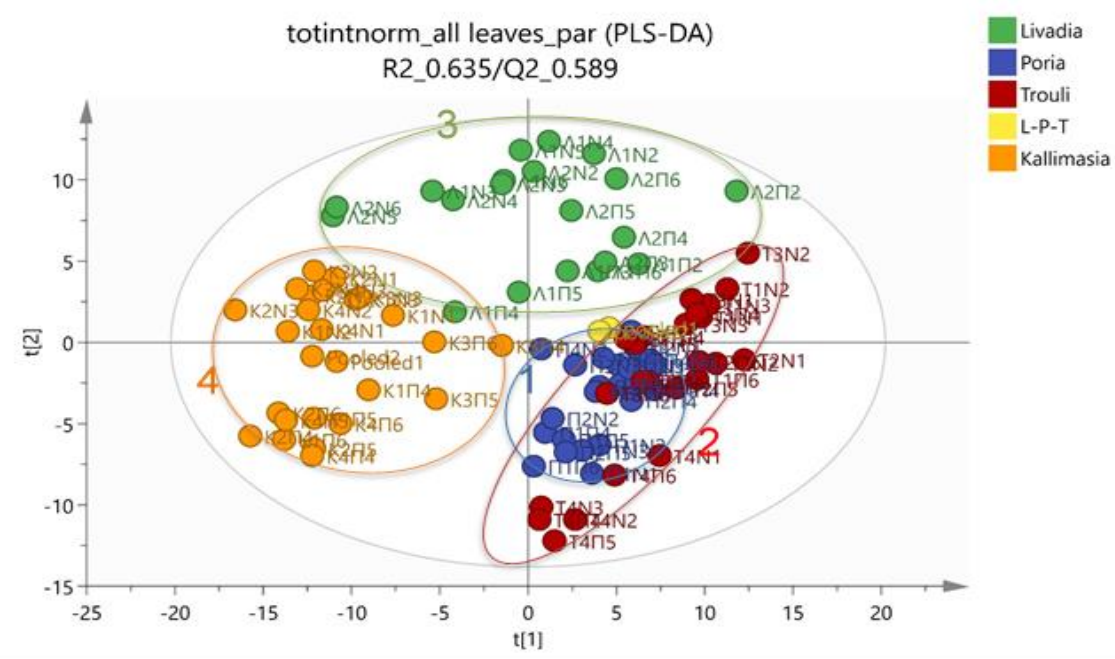
Στη συνέχεια, μετά τη μη επιβλεπόμενη μέθοδο ανάλυσης PCA εφαρμόστηκε η επιβλεπόμενη μέθοδος ανάλυσης PLS-DA. Στη συγκεκριμένη περίπτωση ορίζονται εκ των προτέρων οι περιοχές από τις οποίες προέρχονται τα δείγματα, η ηλικία των φύλλων τους (νέα ή παλιά) και η περίοδος συλλογής τους. Χρησιμοποιώντας την επιβλεπόμενη μέθοδο ανάλυσης PLS-DA εμφανίζονται οι στατιστικά σημαντικές μεταβλητές στις οποίες οφείλεται η ήδη ορισθείσα διαφοροποίηση ανάμεσα στα δείγματα. Στην προκειμένη περίπτωση, η κύρια διαφορά που εμφανίζεται είναι αυτή ανάμεσα στα παλιά και στα νέα φύλλα. Δημιουργήθηκαν διαγράμματα διασποράς, τόσο για την σύγκριση και των τεσσάρων περιοχών προέλευσης των δειγμάτων, όσο και για τη σύγκριση των δειγμάτων ανά ζεύγη.



Εικόνα 54: *Διάγραμμα διασποράς (scores plot) των δύο πρώτων κύριων συνιστωσών (PC1, PC2) από την ανάλυση PLS-DA με τη χρήση της κλιμάκωσης UV των περιοχών Λιβάδια, Πορια και Τρουλί*

Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο κλιμάκωσης UV, στο διάγραμμα διασποράς (scores plot) της **Εικόνας 54** φαίνεται ότι οι τρεις περιοχές ομαδοποιούνται ξεκάθαρα και η πρώτη κύρια συνιστώσα διαχωρίζει την περιοχή Λιβάδια από τις άλλες δύο. Η δεύτερη συνιστώσα διαχωρίζει τις ομάδες 1 και 2 στη συνέχεια, άρα παρατηρείται διαχωρισμός μόνο μεταξύ των περιοχών μέσω των πρώτων κυρίων συνιστωσών.

Προσθέτοντας τα αποτελέσματα και από την περιοχή Καλλιμασιά παρατηρείται πως ως προς την πρώτη συνιστώσα διαχωρίζεται η ομάδα 4, ενώ ως προς τη δεύτερη συνιστώσα διαχωρίζεται η ομάδα 3. Οι ομάδες 1 και 2 εμφανίζονται κυρίως στο τρίτο τεταρτημόριο του διαγράμματος διασποράς. Παρατηρείται επιπλέον διαχωρισμός μεταξύ των ομάδων 1,2 με τις 3,4 που μπορεί να οφείλεται στο ότι έχει οριστεί και η ημερομηνία συλλογής Καθώς τα δείγματα των ομάδων 1,2 έχουν συλλεχθεί την άνοιξη, ενώ τα 3,4 το χειμώνα.



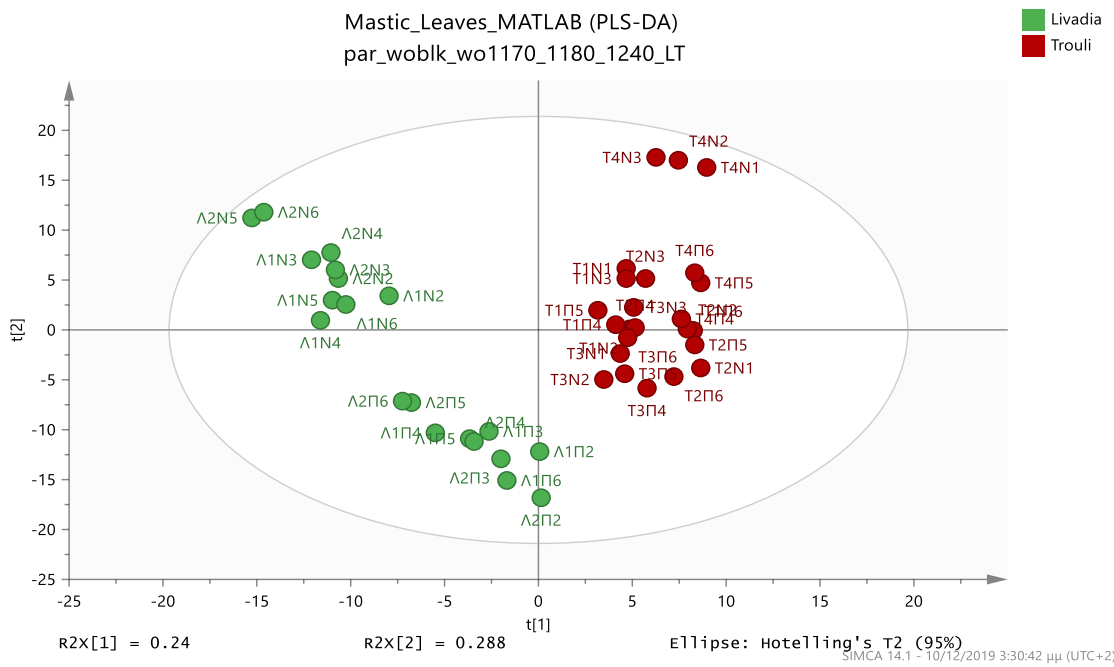
Εικόνα 55: *Διάγραμμα διασποράς (scores plot)των δύο πρώτων κύριων συνιστωσών (PC1, PC2) από την ανάλυση PLS-DA με τη χρήση της κλιμάκωσης Pareto με όλες τις περιοχές*

Επιπλέον δημιουργήθηκαν διαγράμματα ανά ζεύγη. Όπως φαίνεται στις **Εικόνες 56,57** τα δείγματα Τ4 (**Τ**ρουλί, **Δ**έντρο 4, **Ν**έο, Κλαδί **1**-**6**) επηρεάζουν την ομαδοποίηση των μεταβλητών της περιοχής Τρουλί. Σχεδόν τα μισά δείγματα από το συγκεκριμένο δέντρο εμφανίζονται ως ακραίες τιμές. Στην **Εικόνα 56** η δεύτερη κύρια συνιστώσα διαχωρίζει τα παλιά από τα νέα φύλλα με εξαίρεση τα παλιά φύλλα και πάλι του Τ4. Στην **Εικόνα 56** η δεύτερη κύρια συνιστώσα διαχωρίζει τις μεταβλητές του δείγματος Τ4 από τις υπόλοιπες της περιοχής Τρουλί. Η παρατήρηση αυτή συνεχίζει να υπάρχει και στην επιβλεπόμενη μέθοδο ανάλυσης PLS-DA γεγονός που μπορεί να οφείλεται σε παράμετρο που δεν έχει οριστεί όπως είναι η ποικιλία του δέντρου, ή το μέρος που βρισκόταν το συγκεκριμένο δέντρο στο χωράφι όπως για παράδειγμα να βρίσκεται στην περιοχή που εκτίθεται περισσότερο στον ήλιο.

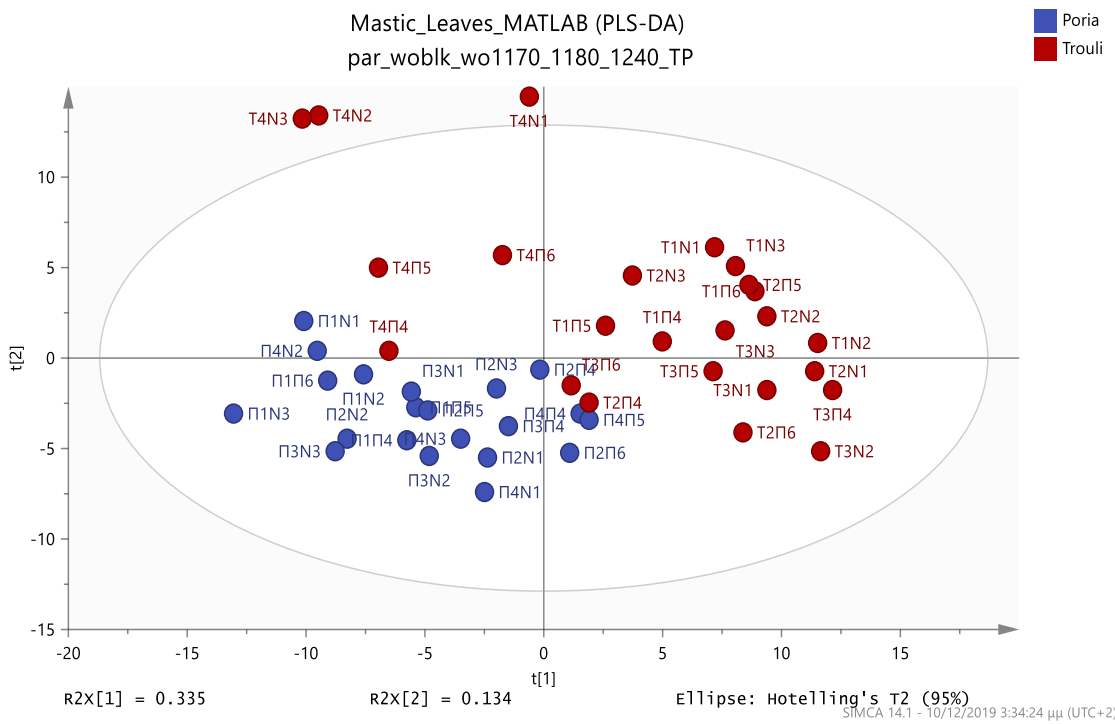
Από την άλλη πλευρά στις **Εικόνες 56-59** υπάρχει εμφανής ομαδοποίηση μεταξύ των ομάδων. Στις **Εικόνες 56-58** η πρώτη κύρια συνιστώσα διαχωρίζει τις δύο περιοχές ενώ η δεύτερη τις διαχωρίζει σε άλλες δύο συστάδες συμφώνα με την ηλικία των φύλλων.

Το ίδιο παρατηρείται και στην **Εικόνα 59** που ορίζοντας ως παράγοντα διαφοροποίησης σε αυτήν την περίπτωση την ηλικία των φύλλων

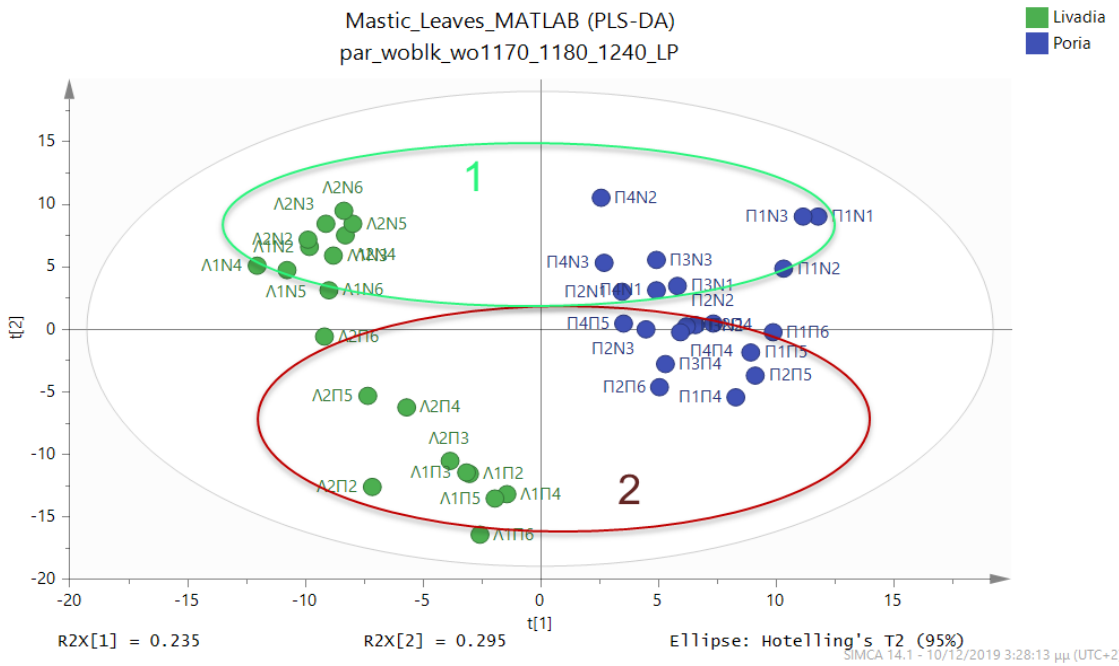
πραγματοποιείται διαχωρισμός παλιών και νεαρών φύλλων από την πρώτη κύρια συνιστώσα.



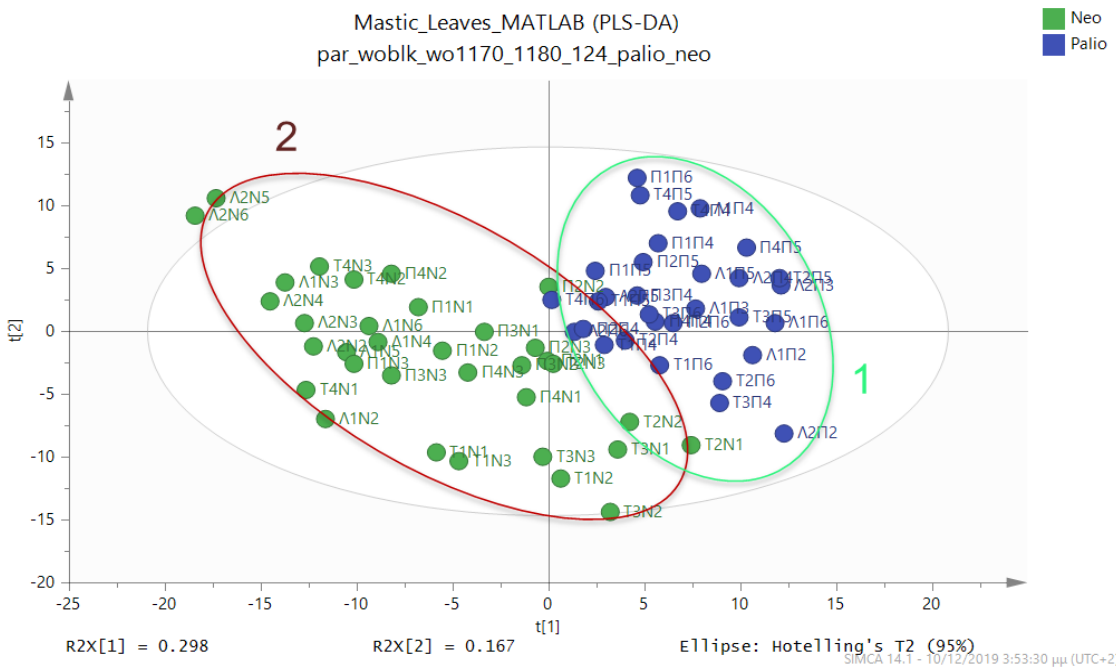
Εικόνα 56: *Διάγραμμα διασποράς (scores plot)των δύο πρώτων κύριων συνιστωσών (PC1, PC2) από την ανάλυση PLS-DA με τη χρήση της κλιμάκωσης Pareto των περιοχών Τρουλί και Λιβάδια*



Εικόνα 57: *Διάγραμμα διασποράς (scores plot)των δύο πρώτων κύριων συνιστωσών (PC1, PC2) από την ανάλυση PLS-DA με τη χρήση της κλιμάκωσης Pareto των περιοχών Τρουλί και Ποριά*

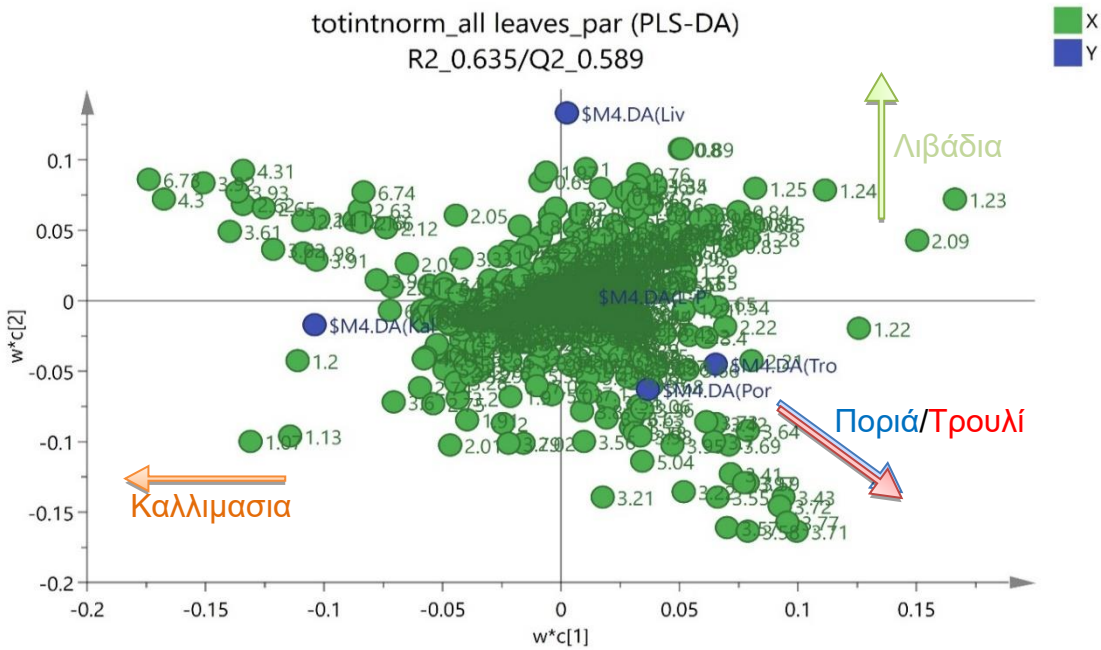


Εικόνα 58: *Διάγραμμα διασποράς (scores plot)των δύο πρώτων κύριων συνιστωσών (PC1, PC2) από την ανάλυση PLS-DA με τη χρήση της κλιμάκωσης Pareto των περιοχών Λιβάδια και Ποριά*



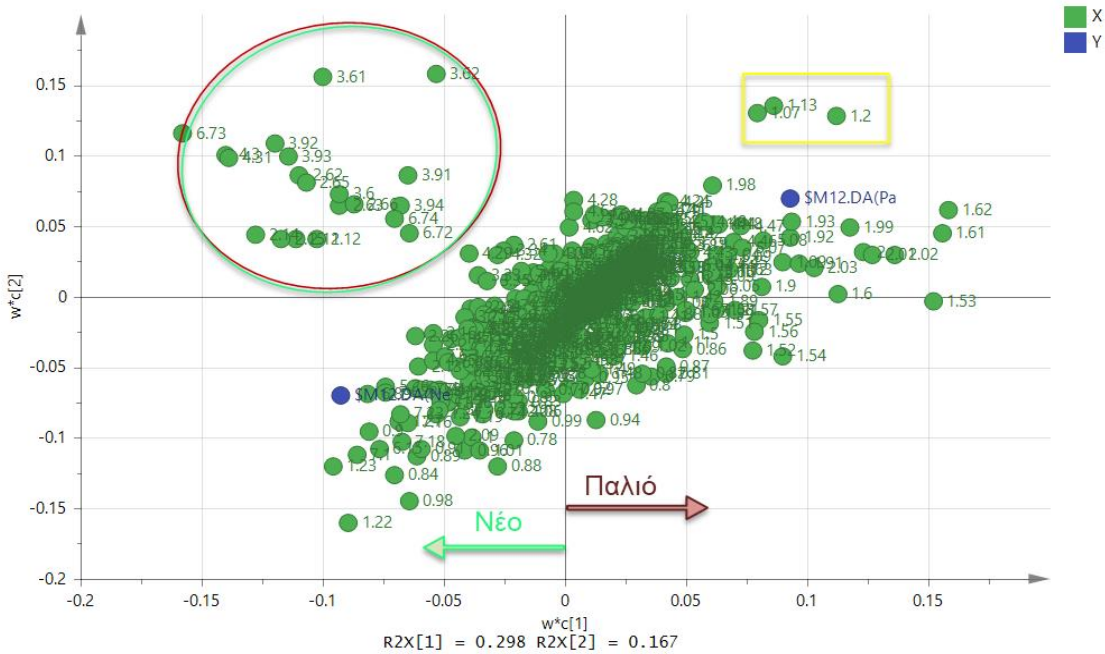
Εικόνα 59: *Διάγραμμα διασποράς (scores plot) των δύο πρώτων κύριων συνιστωσών (PC1, PC2) από την ανάλυση PLS-DA με τη χρήση της κλιμάκωσης Pareto των περιοχών Λιβάδια, Ποριά και Τρουλί με πρώτη μεταβλητή την ηλικία των φύλλων*

Το διάγραμμα φορτίων (loadings plot) της ανάλυσης PLS-DA με τη χρήση της κλίμακωσης Pareto κατέστησε δυνατή την επισήμανση των κυριότερων φορτίων στα οποία αποδίδεται η διαφοροποίηση των δειγμάτων. Οι κατευθύνσεις των φορτίων σε κάθε loadings plot ανταποκρίνονται στις κατευθύνσεις των μεταβλητών στο αντίστοιχο scores plot. Τα φορτία σε ένα loadings plot τα οποία έχουν συντεταγμένες με τάση προς τις συντεταγμένες στο αντίστοιχο scores plot αντιπροσωπεύουν μεταβλητές, οι οποίες εμφανίζουν μεγαλύτερη σημαντικότητα και έχουν μεγάλη συμβολή στη διαμόρφωση του στατιστικού μοντέλου. Στις κρίσιμες περιοχές εντοπίζονται φορτία, τα οποία αντιστοιχούν στους πιθανούς βιοδείκτες (biomarkers) της παρούσας μεταβολομικής μελέτης. Αντιστοιχούν δηλαδή στους μεταβολίτες, οι οποίοι πιθανώς είναι υπεύθυνοι για τη διαφοροποίηση με βάση την ηλικία ή την περιοχή συλλογής στα υπό εξέταση φύλλα.



Εικόνα 60: *Διάγραμμα φορτίων (loadings plot) των τεσσάρων περιοχών*

Ενδιαφέρον προκαλούν τα τρία φορτία που βρίσκονται στο τρίτο τεταρτημόριο παρόλο που δεν βρίσκονται σε κρίσιμες περιοχές (εκεί διαφοροποιείται η περιοχή της Καλλιμασιάς από τις υπόλοιπες) καθώς και τα φορτία στις κρίσιμες περιοχές στο τέταρτο τεταρτημόριο που εμφανίζονται καλύτερα στο διάγραμμα φορτίων του ζεύγους παλιών και νεαρών φύλλων.

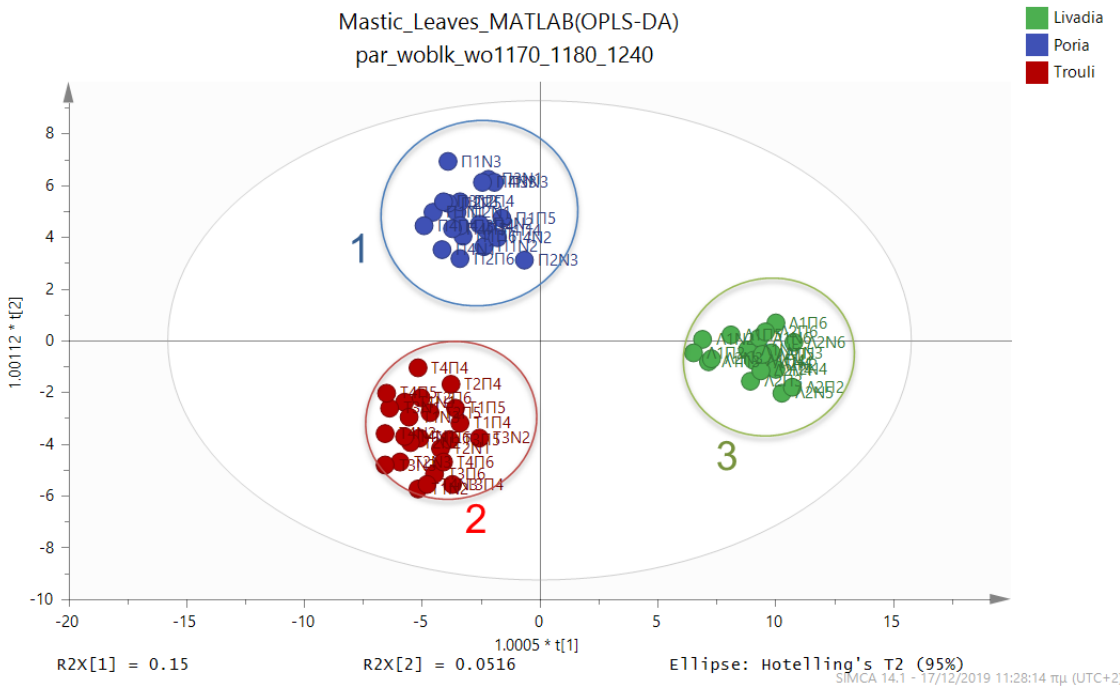


Εικόνα 61: *Διάγραμμα φορτίων (loadings plot) των περιοχών Λιβάδια, Ποριά και Τρουλί με παράγοντα διαφοροποίησης την ηλικία των φύλλων*

Είναι εμφανή τα φορτία του τέταρτου τεταρτημόριου που συνεισφέρουν στη διαφοροποίηση των φύλλων βάση της ηλικία τους. Είναι επιπλέον εμφανή τα τρία φορτία που στην **Εικόνα 59** βρίσκονταν στο τρίτο τεταρτημόριο, και στη συγκεκριμένη διαμόρφωση χωρίς τα φορτία της περιοχής Καλλιμασιά, εμφανίζονται πάλι σε κρίσιμες περιοχές αλλά τώρα στο πρώτο τεταρτημόριο.

5.3.4 ΟΡΘΟΓΩΝΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΡΙΤΩΝ ΜΕΤΑΒΛΗΤΩΝ ΜΕΡΙΚΩΝ ΕΛΑΧΙΣΤΩΝ ΤΕΤΡΑΓΩΝΩΝ (ORTHOGONAL PARTIAL LEAST SQUARES DISCRIMINANT ANALYSIS- OPLS-DA)

Τέλος πραγματοποιήθηκε και έλεγχος με την επιβλεπόμενη ανάλυση OPLS-DA με τη χρήση της κλιμάκωσης Pareto. Στη συγκεκριμένη περίπτωση ορίζονται εκ των προτέρων οι περιοχές που βρίσκονται τα δείγματα ως κύριος παράγοντας διαφοροποίησης και η ηλικία τους (νέα ή παλιά), καθώς και η χρονολογία συλλογής τους ως δευτερεύουσες.

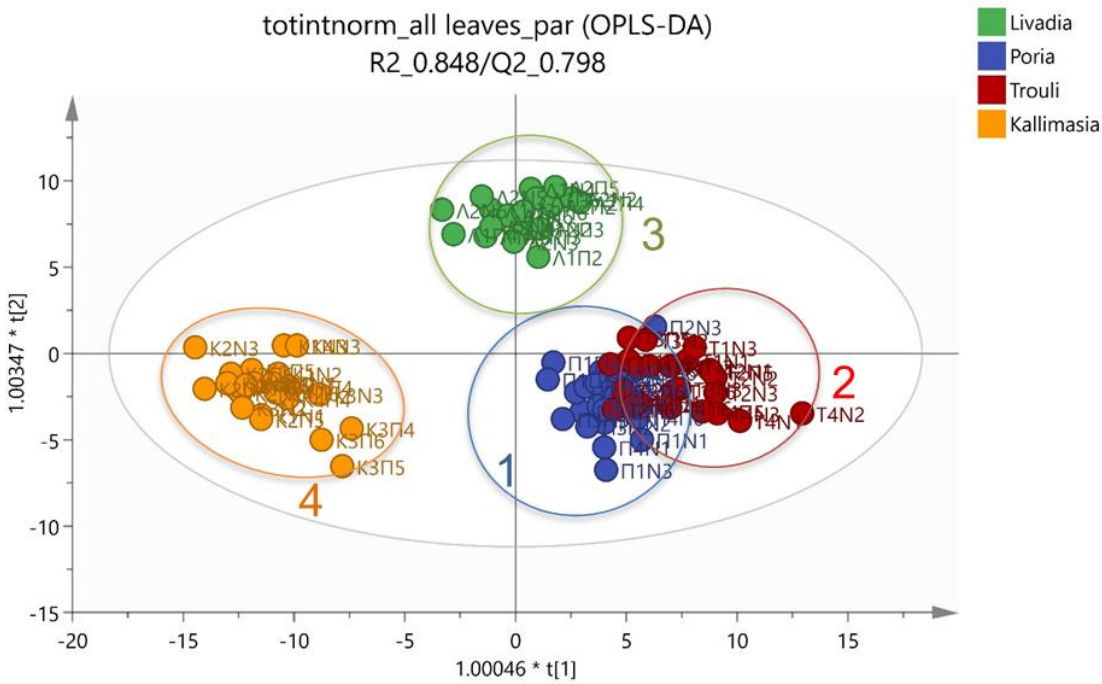


Εικόνα 62: *Διάγραμμα διασποράς (scores plot) των δύο πρώτων κυρίων συνιστωσών (PC1, PC2) από την ανάλυση OPLS-DA με τη χρήση της κλιμάκωσης Pareto των περιοχών Λιβάδια, Ποριά και Τρουλί*

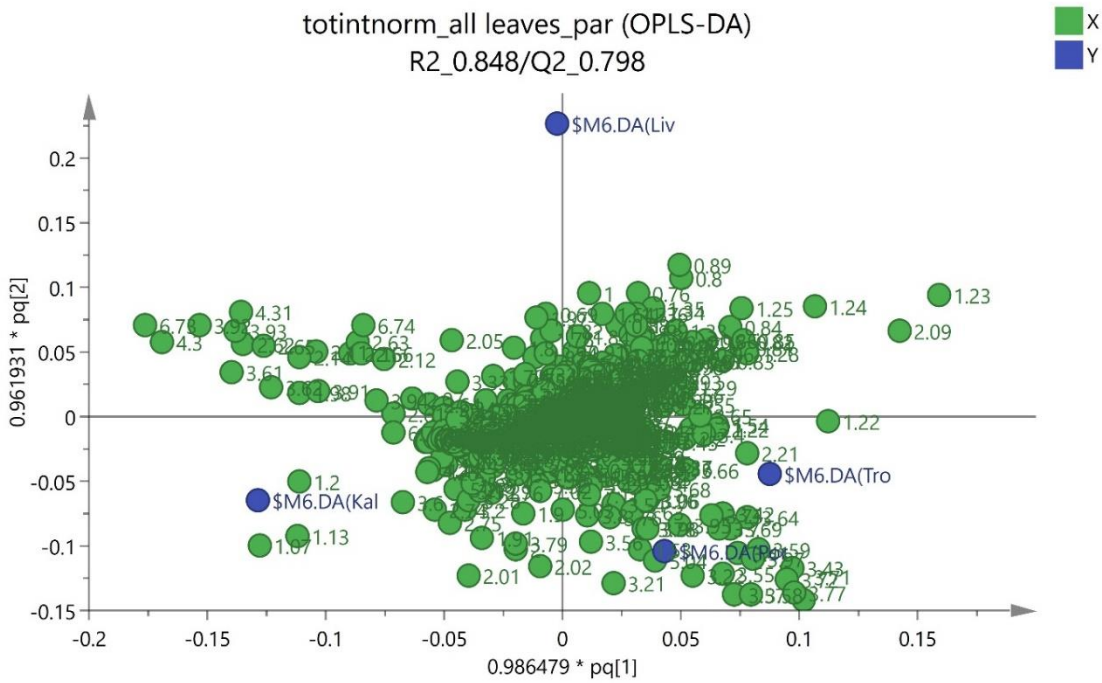
Στο scores plot παρατηρείται η ίδια διαφοροποίηση με την PLS-DA (βλ. **Εικονα 55**) με τη διαφορά ότι υπάρχει μικρότερη διασπορά μεταξύ των μεταβλητών της ίδιας περιοχής άρα και καλύτερη ομαδοποίηση, πράγμα ωστόσο αναμενόμενο στη συγκεκριμένη μέθοδο. Η πρώτη κύρια συνιστώσα διαχωρίζει την περιοχή Λιβάδια από τις άλλες δύο. Η δεύτερη συνιστώσα διαχωρίζει τις περιοχές Ποριά και Τρουλί.

Ακόμη και στην ανάλυση με OPLS-DA όταν προστεθούν τα δεδομένα της περιοχής Καλλιμασιά λόγω της ομοιότητας των δεδομένων των περιοχών Ποριά και Τρουλί αυτά ομαδοποιούνται σε πολύ κοντινή απόσταση μεταξύ τους (**Εικόνα 63**).

Ταυτόχρονα τα φορτία που έχουν μεγάλη συμβολή στη δημιουργία του μοντέλου εμφανίζονται με μεγαλύτερη ολοκλήρωση (απέχουν από την αρχή των αξόνων μεγαλύτερη απόσταση) και είναι εύκολο να εντοπιστούν οι κρίσιμες περιοχές του loadings plot (**Εικόνα 64**).



Εικόνα 63: *Διάγραμμα διασποράς (scores plot) των δύο πρώτων κύριων συνιστωσών (PC1, PC2) από την ανάλυση OPLS-DA με την χρήση της κλιμάκωσης Pareto των τεσσάρων περιοχών*



Εικόνα 64: *Διάγραμμα φορτίων (loadings plot) των τεσσάρων περιοχών*

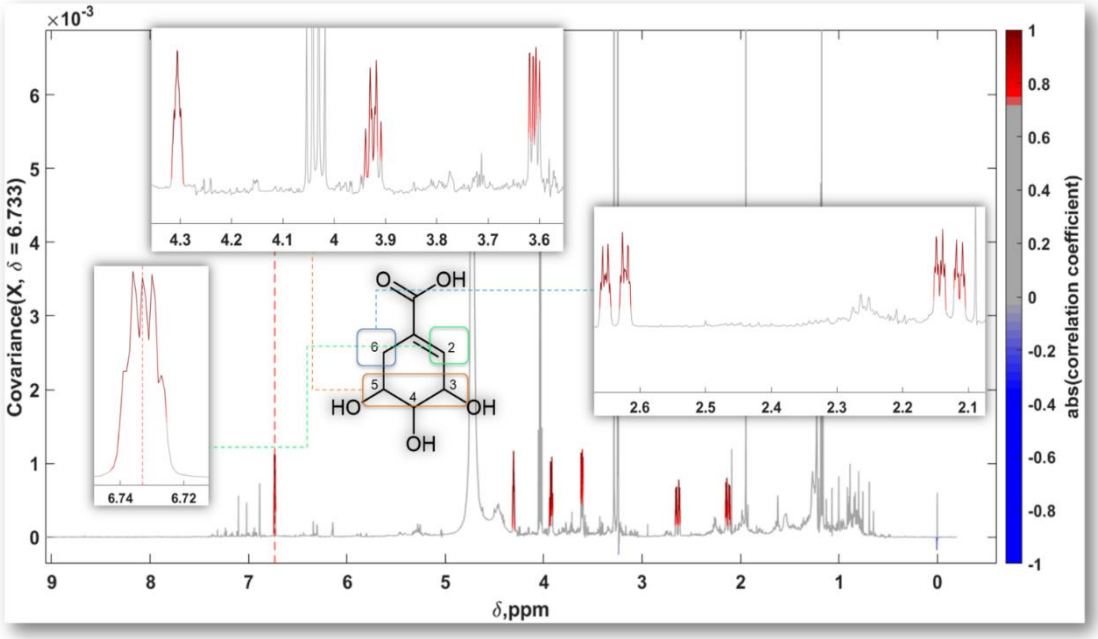
Παρατηρείται ένα παρόμοιο διάγραμμα φορτίων με αυτό της **Εικόνας 60**. Η προβλεπτική (R2) και η διαχωριστική ικανότητα (Q2) βρίσκονται σε τιμές πάνω από το 0.6 συγκεκριμένα σε τιμές κοντά στο 0.8. Έτσι το μοντέλο μπορεί να θεωρηθεί αξιόπιστο.

5.4 ΑΠΟΔΟΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΣΕ ΣΥΝΘΕΤΑ ΜΙΓΜΑΤΑ (DEREPLICATION) ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ NMR

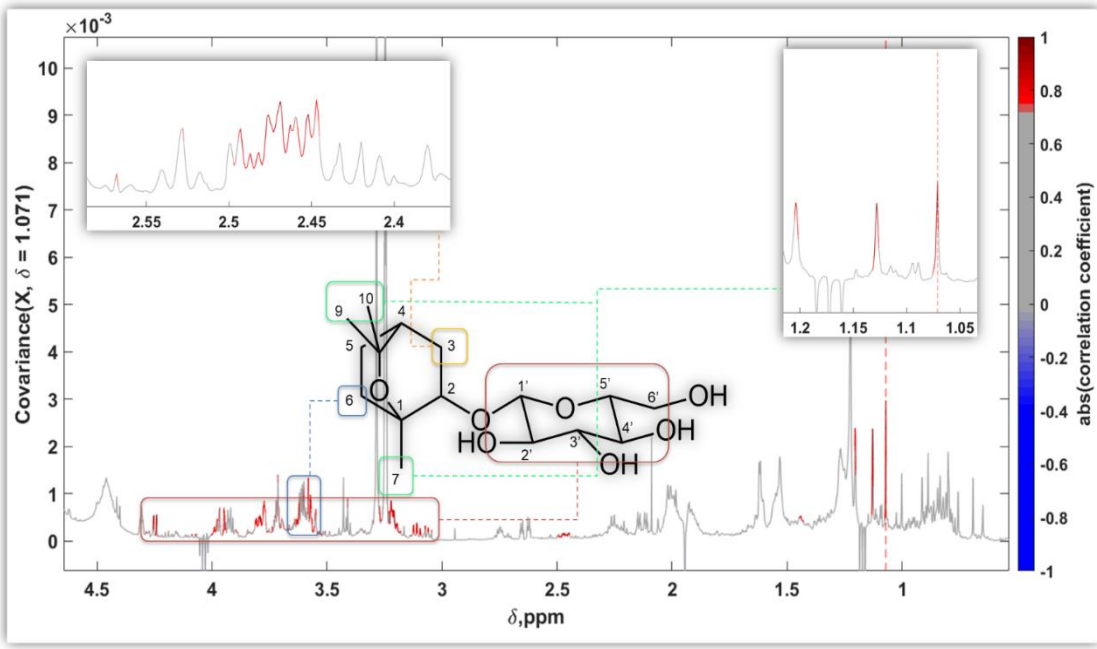
Έχοντας τα αποτελέσματα από τις πολυπαραμετρικές αναλύσεις είναι δυνατόν να βρεθούν οι πιθανοί βιοδείκτες ή ουσίες που έχουν σημαντική συνεισφορά στη δημιουργία των μοντέλων. Αυτό συμβαίνει με τη βοήθεια της βιβλιογραφίας, με τα αποτελέσματα της απομονωτικής μελέτης που έχει προηγηθεί και χρησιμοποιώντας το εργαλείο STOCSY μέσα από το στατιστικό πρόγραμμα της MATLAB. Πρόκειται για ένα εργαλείο, το οποίο παρέχει τη δυνατότητα στο χρήστη να κάνει συσχετισμούς μεταξύ των κορυφών ενός φάσματος, όταν έχει μεγάλο αριθμό δειγμάτων και θέλει να εξετάσει πώς αυξομειώνονται τα επίπεδα των μεταβολιτών μεταξύ των διαφορετικών ομάδων/δειγμάτων.

Το STOCSY χρησιμοποιεί τα στατιστικά δεδομένα του μοντέλου που έχει χρησιμοποιηθεί για να εντοπίσει τις περιοχές του φάσματος που έχουν άμεση συσχέτιση μεταξύ τους, δηλαδή εντοπίζει κορυφές που σε όλα τα φάσματα ^{1}H NMR έχουν παρόμοιες μεταβολές. Όταν οι αναλογίες των κορυφών ή αλλιώς οι εντάσεις στα bins που θα «διαβάσει» το στατιστικό πρόγραμμα είναι σταθερές ο συντελεστής συσχέτισης των κορυφών τείνει στο 1. Έτσι, με τη χρήση της στατιστικής μελέτης είναι εφικτή η εύρεση του φάσματος της ουσίας χωρίς να γίνει απομόνωση της καθαρής της μορφής. Το STOCSY στην ουσία κατασκευάζει ένα "ψευδοφάσμα", το οποίο αποτελεί σύνθεση όλων των διαθέσιμων φασμάτων, τα οποία εισάγονται στο λογισμικό της MATLAB.

Τα φορτία που χρησιμοποιήθηκαν εδώ είναι τα 6.73, 4.31, 3.92, 3,61 και αντιστοιχούν στο σικιμικό οξύ και τα 1.07, 1.13 και 1.2 που αντιστοιχούν στον Γλυκοπυρανοσίδη της 2-υδροξυ-1,8-κινεόλης. Στις **Εικόνες 65,66** φαίνονται τα δύο STOCSY φάσματα που προέκυψαν για τις δύο ουσίες σε συνδυασμό με τα πρωτόνια στα οποία αντιστοιχούν οι κορυφές τους.



Εικόνα 65: *STOCSY του Σικιμικού οξέος*



Εικόνα 66: *STOCSY του Γλυκοπυρανοσίδη της 2-υδροξυ-1,8-κινεόλης*

5.5 ΑΠΟΔΟΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΣΕ ΣΥΝΘΕΤΑ ΜΙΓΜΑΤΑ (DEREPLICATION) ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ LC-MS

Μερικά από τα δείγματα της μεταβολομικής μελέτης ελέγχθηκαν ποιοτικά και με τη τεχνική LC-MS (LTQ-Orbitrap) με τη μέθοδο του ηλεκτροψεκασμού (ESI), σε αρνητικό ιονισμό προκειμένου να εντοπιστούν οι γνωστές ουσίες που αποτελλούν συστατικά των φύλλων (dereplication).

Πίνακας 28: *Προφίλ των φύλλων του Pistacia lentiscus L. με τη χρήση UPLC-ESI(negative)-HRMS*

#	RT	Πειραματικό *m/z*	Θεωρητικό *m/z*	Δ (ppm)	RDB	Χημικός τύπος	MS/MS	Όνομα
1	0.91	191.0562	191.0550	-0.007	2.5	$C_7H_{11}O_6$	173.0454 ($C_7H_9O_5$, 3.5)	Quinic acid
2	1.01	173.0458	173.0444	1.059	3.5	$C_7H_9O_5$	155.0352 ($C_7H_7O_4$, 4.5) 111.0456 ($C_6H_7O_2$)	Shikimic acid
3	2.69	331.0666	331.0660	-1.540	6.5	$C_{13}H_{15}O_{10}$	271.0451 ($C_{11}H_{11}O_8$, 6.5)	B-glucogallin
4	3.79	343.0663	343.0660	-2.740	7.5	$C_{14}H_{15}O_{10}$	191.0560 ($C_7H_{11}O_6$, 2.5)	Galloyl quinic acid
5	4.58	305.0662	305.0656	-1.200	9.5	$C_{15}H_{13}O_7$	196.0666	Gallocatechin
6	5.07	495.0771	495.0769	-1.835	12.5	$C_{21}H_{19}O_{14}$	343.0659 ($C_{14}H_{15}O_{10}$, 7.5) 196.0693	Digalloyl quinic acid
7	5.52	289.0713	289.0707	-1.838	9.5	$C_{15}H_{13}O_6$	245.0815 ($C_{14}H_{13}O_4$, 8.5)	Catechin
8	5.66	183.0299	183.0288	0.620	5.5	$C_8H_7O_5$	168.0063 ($C_7H_4O_5$, 6.0)	Gallic acid methyl ester
9	5.86	647.0879	647.0879	-1.881	17.5	$C_{28}H_{23}O_{18}$	495.0767 ($C_{21}H_{19}O_{14}$, 12.5)	Pistafolin a
10	6.27	479.0826	479.0820	-1.239	12.5	$C_{21}H_{19}O_{13}$	316.0216 ($C_{15}H_8O_8$, 12.0)	Myricetin galactoside
11	6.57	449.0716	449.0715	-2.269	12.5	$C_{20}H_{17}O_{12}$	316.0215 ($C_{15}H_8O_8$, 12.0)	Myricetin 3-xyloside
12	6.31	493.0612	493.0613	-2.106	13.5	$C_{21}H_{17}O_{14}$	478.0737 ($C_{21}H_{18}O_{13}$, 13.0) 317.0292 ($C_{15}H_9O_8$, 11.5)	Myricetin glucuronide
13	6.67	463.0875	463.0871	-1.596	12.5	$C_{21}H_{19}O_{12}$	301.0344 ($C_{15}H_9O_7$, 11.5)	Quercetin glycoside
14	7.03	433.0768	433.0765	2.042	12.5	$C_{20}H_{17}O_{11}$	387.2013	Quercetin

							($C_{19}H_{31}O_8$, 4.5)	arabinopyranoside
15	7.21	447.0924	447.0922	-1.822	12.5	$C_{21}H_{19}O_{11}$	401.1442 ($C_{18}H_{25}O_{10}$, 6.5)	Kaempferol glycoside
16	7.61	615.0974	615.0981	-2.841	17.5	$C_{28}H_{23}O_{16}$	463.0869 ($C_{21}H_{19}O_{12}$, 12.5)	Myricetin galloyl Rhamnopyranoside
17	7.81	301.0349	301.0343	-1.448	11.5	$C_{15}H_9O_7$	301.0345 ($C_{15}H_9O_7$, 11.5) 196.0724 ($C_{10}H_{12}O_4$, 5.0)	Quercetin
18	8.12	599.1027	599.1031	-2.642	17.5	$C_{28}H_{23}O_{15}$	447.0919 ($C_{21}H_{19}O_{11}$, 12.5) 301.0343 ($C_{15}H_9O_7$, 11.5) 196.0727 ($C_{10}H_{12}O_4$, 5.0)	Quercetin-O-gallate
19	8.60	285.0402	285.0394	-0.531	11.5	$C_{15}H_9O_6$	285.0401 ($C_{15}H_9O_6$, 11.5) 196.0724	Luteolin

Στον **Πίνακα 28** παρουσιάζεται τα φασματομετρικά δεδομένα των ενώσεων που εντοπίζονται στα εκχυλίσματα των φύλλων του *Pistacia lentiscus* L. Η ταυτοποίηση έγινε βάσει των δεδομένων της δίδυμης φασματομετρίας μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRMS/MS) με σύγκριση με διαδικτυακές βιβλιοθήκες και βιβλιογραφικά δεδομένα. Στον Πίνακα παρατηρούνται ουσίες που έχουν απομονωθεί στα στάδια της απομόνωσης, όπως είναι το σικιμικό οξύ, το μεθυλο-γαλλικό, η κατεχίνη, η γάλλοκατεχίνη και η λουτεολίνη

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ/ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Η παρούσα μελέτη είχε ως αντικείμενο την φυτοχημική μελέτη των φύλλων του μαστιχόδενδρου, *Pistacia lentiscus* της Χίου αλλά και την μεταβολομική μελέτη τους για την ανεύρεση μορίων-βιοδεικτών. Στα πλαίσια αυτά πραγματοποιήθηκε αρχικά ποιοτική ανάλυση των εκχυλισμάτων με διάφορες αναλυτικές μεθόδους και συγκεκριμένα με TLC, ^{1}H NMR και HPLC-DAD. Ακολούθησε απομόνωση σε καθαρή μορφή με τη χρήση χρωματογραφικών μεθόδων και ταυτοποίηση με φασματοσκοπικές και φασματομετρικές μεθόδους συνολικά 11 μορίων και συγκεκριμένα του πρωτοκατεχικού οξέος, του μεθυλεστέρα του γαλλικού οξέος, του σικιμικού οξέος, της κατεχίνης, της γάλλοκατεχίνης, της απιγενίνης, της λουτεολίνης, της τρικετίνης, της μυρικιτρίνης, της κερκετρίνης και του γλυκοπυρανοσίδη της 2-υδροξυ-1,8-κινεόλης. Μάλιστα, το ένα από αυτά παρατηρείται πρώτη φορά στο *είδος Pistacia lentiscus* L. σύμφωνα με τη βιβλιογραφία και είναι ο Γλυκοπυρανοσίδης της 2-υδροξυ-1,8-κινεόλης. Σε επόμενο στάδιο πραγματοποιήθηκε βιολογικός έλεγχος σε τρία εκχυλίσματα και τρεις από τις απομονωμένες ουσίες με πολύ ενθαρρυντικά αποτελέσματα να εμφανίζουν οι δύο καθαρές ουσίες, το σικιμικό οξύ και ο Γλυκοπυρανοσίδης της 2-υδροξυ-1,8-κινεόλης. Ο γλυκοπυρανοσίδης της 2-υδροξυ-1,8-κινεόλης παρουσίασε σχεδόν ολική αναστολή στον πολλαπλασιασμό του μύκητα *Rhizopus* και του ζυγομύκητα *Mucor* ενώ σε μικρότερα επίπεδα παρουσίασε δράση το σικιμικό οξύ έναντι του μύκητα *Rhizopus*.

Παράλληλα πραγματοποιήθηκε μεταβολομική μελέτη με τη χρήση της φασματοσκοπίας NMR. Αρχικά, αναπτύχθηκε συγκεκριμένο πρωτόκολλο προετοιμασίας των δειγμάτων και φασματοσκοπικής μέτρησης και ακολούθησε στατιστική επεξεργασία των δεδομένων με τη χρήση τόσο επιβλεπόμενων, όσο και μη επιβλεπόμενων χημειομετρικών μεθόδων (PCA, PLS-DA και OPLS-DA). Αποτέλεσμα της πολυπαραμετρικής ανάλυσης ήταν ο σαφής διαχωρισμός των

παλαιών φύλλων από τα νέα, καθώς και των περιοχών προέλευσης μεταξύ τους. Σε εξέλιξη βρίσκεται ο προσδιορισμός των μεταβολιτών εκείνων-βιοδεικτών χαρακτηριστικών της ηλικίας και γεωγραφικής της προέλευσης των φύλλων. Τα μοντέλα τα οποία προέκυψαν από την παρούσα μελέτη μπορούν να αποτελέσουν εργαλεία για τον προσδιορισμό άγνωστων δειγμάτων φύλλων π.χ. άλλα είδη *Pistachia*. Επιπλέον με τη χρήση της τεχνικής του HRMS/MS δημιουργήθηκε και με τη μέθοδο dereplication έγινε ανίχνευση επιπλέον μεταβολιτών του *Pistacia lentiscus* της Χίου. Τέλος, εφαρμόστηκαν στατιστικά εργαλεία για την ταυτοποίηση των μορίων-βιοδικτών και συγκεκριμένα της μεθόδου STOCSY. Με τη χρήση του STOCSY έγινε δυνατή η αποκάλυψη δύο μεταβολιτών και συγκεκριμένα του Σικιμικού οξέος και Γλυκοπυρανοσίδη της 2-υδροξυ-1,8-κινεόλης που αποτελούν σημαντικούς δείκτες σχετιζόμενους με την ηλικία ή τη γεωγραφική προέλευση των φύλλων.

Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, ως μελλοντικοί στόχοι τίθενται η απομόνωση και η ταυτοποίηση περισσοτέρων μεταβολιτών από τα φύλλα του *Pistacia lentiscus* της Χίου καθώς ακόμη βρίσκονται ουσίες που δεν είχαν προαναφερθεί στη βιβλιογραφία.

Επίσης, στόχο αποτελεί η επέκταση της μεταβολομικής μελέτης, τόσο προς την εύρεση βιοδεικτών που να συσχετίζονται με διάφορες παραμέτρους όπως η περιοχή και το υψόμετρο, όσο και προς άλλα μέρη και προϊόντα του δέντρου της μαστίχας, με τελικό στόχο τη δημιουργία στατιστικών μοντέλων αποτύπωσης και πρόβλεψης καθώς και βάσεων δεδομένων. Αυτά τα εργαλεία θα βοηθήσουν στην ανάδειξη - με μία απλή επεξεργασία - της προέλευσης ή/και άλλων χαρακτηριστικών γνωστών (προς επιβεβαίωση), καθώς και άγνωστων δειγμάτων, που αναλύονται στο εργαστήριο. Ακόμη, μελλοντικό στόχο αποτελεί η μεταβολομική μελέτη των ίδιων δειγμάτων με την τεχνική της φασματομετρίας μαζών και η συσχέτισή τους με τα αποτελέσματα της μελέτης με NMR.

Τέλος, θα συνεχιστούν οι βιολογικές δοκιμασίες που ήδη έχουν γίνει σε έναν αριθμό δειγμάτων, ώστε να αναδειχθούν και άλλες ουσίες οι οποίες να

εμφανίζουν δραστικότητα έναντι βακτηριακών στελεχών και μυκήτων ενώ θα συνεχιστεί η περαιτέρω μελέτη κυρίως του Γλυκοπυρανοσίδη της 2-υδροξυ-1,8-κινεόλης εξαιτίας της σημαντικής του δράσης και σε άλλα στελέχη αλλά και για την ανεύρεση του μηχανισμού δράσης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Rauf, A. *et al.* Phytochemical, ethnomedicinal uses and pharmacological profile of genus Pistacia. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **86**, 393–404 (2017).
2. Mabberley, D. J. *Mabberley's Plant-book: A Portable Dictionary of Plants, their Classification and Uses*. (Cambridge University Press, 2017).
3. Kafkas, S. & Perl-Treves, R. Interspecific Relationships in Pistacia Based on RAPD Fingerprinting. *HortSci* **37**, 168–171 (2002).
4. Yi, T., Wen, J., Golan-Goldhirsh, A. & Parfitt, D. E. Phylogenetics and reticulate evolution in *Pistacia* (Anacardiaceae). *American Journal of Botany* **95**, 241–251 (2008).
5. Inbar, M. Systematics of Pistacia: Insights from Specialist Parasitic Aphids. *Taxon* **57**, 238–242 (2008).
6. AL-Saghir, M. G. & Porter, D. M. Taxonomic Revision of the Genus Pistacia L. (Anacardiaceae). *AJPS* **03**, 12–32 (2012).
7. Golan-Goldhirsh, A. Bridging the gap between ethnobotany and biotechnology of Pistacia. *Israel Journal of Plant Sciences* **57**, 65–78 (2009).
8. Σαββίδης, Θ. *Το Μαστιχόδενδρο Της Χίου*. (Κυριακίδη Αφοί Α.Ε, 2000).
9. Browicz, K. Pistacia lentiscus cv. Chia (Anacardiaceae) on Chios island. *Pl Syst Evol* **155**, 189–195 (1987).
10. Tutin, T. G. in *Flora Europaea* vol. 2 236–237.

11. Bozorgi, M. *et al.* Five *Pistacia* species (*P. vera* , *P. atlantica* , *P. terebinthus* , *P. khinjuk* , and *P. lentiscus*): A Review of Their Traditional Uses, Phytochemistry, and Pharmacology. *The Scientific World Journal* **2013**, 1–33 (2013).
12. Roitman, J. N., Merrill, G. B. & Beck, J. J. Survey of *ex situ* fruit and leaf volatiles from several *Pistacia* cultivars grown in California: Pistachio volatile analysis. *J. Sci. Food Agric.* **91**, 934–942 (2011).
13. Couladis, M., Özcan, M., Tzakou, O. & Akgül, A. Comparative essential oil composition of various parts of the turpentine tree (*Pistacia terebinthus* L) growing wild in Turkey: Essential oil composition of the turpentine tree. *J. Sci. Food Agric.* **83**, 136–138 (2003).
14. Alma, M. H. *et al.* Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils from the Gum of Turkish Pistachio (*Pistacia vera* L .). *J. Agric. Food Chem.* **52**, 3911–3914 (2004).
15. Sharifi, M. S. & Hazell, S. L. Isolation, Analysis and Antimicrobial Activity of the Acidic Fractions of Mastic, Kurdica, Mutica and Cabolica Gums from Genus Pistacia. *GJHS* **4**, p217 (2011).
16. Yousfi, M. *et al.* Isolation and characterization of a new hispolone derivative from antioxidant extracts of *Pistacia atlantica*. *Phytother. Res.* **23**, 1237–1242 (2009).
17. Romani, A., Pinelli, P., Galardi, C., Mulinacci, N. & Tattini, M. Identification and quantification of galloyl derivatives, flavonoid glycosides and

anthocyanins in leaves of Pistacia lentiscus L. *Phytochem. Anal.* **13**, 79–86 (2002).

18. Tomaino, A. *et al.* Antioxidant activity and phenolic profile of pistachio (Pistacia vera L., variety Bronte) seeds and skins. *Biochimie* **92**, 1115–1122 (2010).
19. Piccolella, S. *et al.* An apolar Pistacia lentiscus L. leaf extract: GC-MS metabolic profiling and evaluation of cytotoxicity and apoptosis inducing effects on SH-SY5Y and SK-N-BE(2)C cell lines. *Food and Chemical Toxicology* **95**, 64–74 (2016).
20. Magiatis, P., Melliou, E., Skaltsounis, A.-L., Chinou, I. & Mitaku, S. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of *Pistacia lentiscus* var. *chia*. *Planta Med* **65**, 749–752 (1999).
21. Duru, M. E. *et al.* Chemical composition and antifungal properties of essential oils of three Pistacia species. *Fitoterapia* **74**, 170–176 (2003).
22. Aissi, O., Boussaid, M. & Messaoud, C. Essential oil composition in natural populations of Pistacia lentiscus L. from Tunisia: Effect of ecological factors and incidence on antioxidant and antiacetylcholinesterase activities. *Industrial Crops and Products* **91**, 56–65 (2016).
23. Douissa, F. B. *et al.* New study of the essential oil from leaves ofPistacia lentiscus L. (Anacardiaceae) from Tunisia. *Flavour Fragr. J.* **20**, 410–414 (2005).
24. Yosr, Z., Imen, B. H. Y., Rym, J., Chokri, M. & Mohamed, B. Sex-related differences in essential oil composition, phenol contents and antioxidant

activity of aerial parts in Pistacia lentiscus L. during seasons. *Industrial Crops and Products* **121**, 151–159 (2018).

25. Bampouli, A. *et al.* Evaluation of total antioxidant potential of Pistacia lentiscus var. chia leaves extracts using UHPLC–HRMS. *Journal of Food Engineering* **167**, 25–31 (2015).
26. Rodríguez-Pérez, C. *et al.* A metabolite-profiling approach allows the identification of new compounds from Pistacia lentiscus leaves. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **77**, 167–174 (2013).
27. Romani, A., Pinelli, P., Galardi, C., Mulinacci, N. & Tattini, M. Identification and quantification of galloyl derivatives, flavonoid glycosides and anthocyanins in leaves of Pistacia lentiscus L. *Phytochem. Anal.* **13**, 79–86 (2002).
28. Degenhardt, J., Köllner, T. G. & Gershenzon, J. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry* **70**, 1621–1637 (2009).
29. Saeidnia, S. & Gohari, A. R. Trypanocidal Monoterpenes. in *Studies in Natural Products Chemistry* vol. 37 173–190 (Elsevier, 2012).
30. Merfort, I. Review of the analytical techniques for sesquiterpenes and sesquiterpene lactones. *Journal of Chromatography A* **967**, 115–130 (2002).
31. Breitmaier, E. *Terpenes*. (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006).
32. Davis, E. M. & Croteau, R. Cyclization Enzymes in the Biosynthesis of Monoterpenes, Sesquiterpenes, and Diterpenes. in *Biosynthesis* (eds.

Leeper, F. J. & Vederas, J. C.) vol. 209 53–95 (Springer Berlin Heidelberg, 2000).

33. Kougan, G. B., Tabopda, T., Kuete, V. & Verpoorte, R. Simple Phenols, Phenolic Acids, and Related Esters from the Medicinal Plants of Africa. in *Medicinal Plant Research in Africa* 225–249 (Elsevier, 2013).
34. Kumar, S. & Pandey, A. K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal* **2013**, 1–16 (2013).
35. Landau, S., Muklada, H., Markovics, A. & Azaizeh, H. Traditional Uses of Pistacia lentiscus in Veterinary and Human Medicine. in *Medicinal and Aromatic Plants of the Middle-East* (eds. Yaniv, Z. & Dudai, N.) vol. 2 163–180 (Springer Netherlands, 2014).
36. Guarrera, P. M., Salerno, G. & Caneva, G. Folk phytotherapeutical plants from Maratea area (Basilicata, Italy). *Journal of Ethnopharmacology* **99**, 367–378 (2005).
37. Said, O., Khalil, K., Fulder, S. & Azaizeh, H. Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Israel, the Golan Heights and the West Bank region. *Journal of Ethnopharmacology* **83**, 251–265 (2002).
38. Ali-Shtayeh, M. S. & Abu Ghdeib, S. I. Antifungal activity of plant extracts against dermatophytes. *Mycoses* **42**, 665–672 (1999).
39. Ljubuncic, P. *et al.* Antioxidant activity and cytotoxicity of eight plants used in traditional Arab medicine in Israel. *Journal of Ethnopharmacology* **99**, 43–47 (2005).

40. Gardeli, C., Vassiliki, P., Athanasios, M., Kibouris, T. & Komaitis, M. Essential oil composition of Pistacia lentiscus L. and Myrtus communis L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food Chemistry* **107**, 1120–1130 (2008).

41. Landau, S. *et al.* Anthelmintic activity of Pistacia lentiscus foliage in two Middle Eastern breeds of goats differing in their propensity to consume tannin-rich browse. *Veterinary Parasitology* **173**, 280–286 (2010).

42. Bennett, D. Growing pains for metabolomics. *The Scientist* **19**, 25–28 (2005).

43. Weckwerth, W. M ETABOLOMICS IN S YSTEMS B IOLOGY. *Annu. Rev. Plant Biol.* **54**, 669–689 (2003).

44. Lindon, J. C., Nicholson, J. K. & Holmes, E. *The handbook of metabonomics and metabolomics*. (Elsevier, 2007).

45. Sumner, L. W., Mendes, P. & Dixon, R. A. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. *Phytochemistry* **62**, 817–836 (2003).

46. Liland, K. H. Multivariate methods in metabolomics – from pre-processing to dimension reduction and statistical analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **30**, 827–841 (2011).

47. Gates, S. C. & Sweeley, C. C. Quantitative metabolic profiling based on gas chromatography. *Clinical Chemistry* **24**, 1663–1673 (1978).

48. Griffiths, W. J. & Wang, Y. Mass spectrometry: from proteomics to metabolomics and lipidomics. *Chem. Soc. Rev.* **38**, 1882 (2009).

49. Hoult, D. I. *et al.* Observation of tissue metabolites using 31P nuclear magnetic resonance. *Nature* **252**, 285–287 (1974).

50. Nicholson, J. K. *et al.* Proton-nuclear-magnetic-resonance studies of serum, plasma and urine from fasting normal and diabetic subjects. *Biochemical Journal* **217**, 365–375 (1984).

51. Bales, J. R. *et al.* Metabolic profiling of body fluids by proton NMR: Self-poisoning episodes with paracetamol (acetaminophen). *Magn. Reson. Med.* **6**, 300–306 (1988).

52. Bales, J. R., Higham, D. P., Howe, I., Nicholson, J. K. & Sadler, P. J. Use of high-resolution proton nuclear magnetic resonance spectroscopy for rapid multi-component analysis of urine. *Clin. Chem.* **30**, 426–432 (1984).

53. Warwick B. Dunn & David. I. Ellis. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **24**, 285–294 (2005).

54. Smith, C. A. *et al.* METLIN: A Metabolite Mass Spectral Database. *Therapeutic Drug Monitoring* **27**, 747–751 (2005).

55. Wishart, D. S. *et al.* HMDB: the Human Metabolome Database. *Nucleic Acids Research* **35**, D521–D526 (2007).

56. Roessner, U., Wagner, C., Kopka, J., Trethewey, R. N. & Willmitzer, L. Simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography-mass spectrometry. *Plant J* **23**, 131–142 (2000).

57. Oksman-Caldentey, K.-M. & Inzé, D. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends in Plant Science* **9**, 433–440 (2004).

58. Delfini, M. *et al.* NMR-BASED METABOLOMIC ANALYSIS FOR THE EVALUATION OF DIFFERENT TREATMENTS ON TWO PISTACHIO CULTIVARS. *Acta Hortic.* 203–210 (2011)

59. Sciubba, F., Capuani, G., Di Cocco, M. E., Avanzato, D. & Delfini, M. Nuclear magnetic resonance analysis of water soluble metabolites allows the geographic discrimination of pistachios (Pistacia vera). *Food Research International* **62**, 66–73 (2014).

60. Rocchetti, G., Chiodelli, G., Giuberti, G. & Lucini, L. Bioaccessibility of phenolic compounds following in vitro large intestine fermentation of nuts for human consumption. *Food Chemistry* **245**, 633–640 (2018).

61. Chaabani, E. *et al.* Extraction of aromas from *Pistacia lentiscus* L. leaves using alternative solvents: COSMO-RS-assisted solvent screening and GC-MS metabolites profiling. *Separation Science and Technology* **55**, 716–727 (2020).

62. Li, X., Jiang, S. & Man, C. Metabolomic analysis of female and male plants of Pistacia chinensis Bunge. *Pakistan Journal of Botany* **48**, 1971–1977 (2016).

63. El Bishbishy, M. H., Gad, H. A. & Aborehab, N. M. Chemometric discrimination of three Pistacia species via their metabolic profiling and

their possible in vitro effects on memory functions. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **177**, (2020).

64. Lindon, J. C. & Nicholson, J. K. Analytical technologies for metabonomics and metabolomics, and multi-omic information recovery. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **27**, 194–204 (2008).
65. Euceda, L. R., Giskeødegård, G. F. & Bathen, T. F. Preprocessing of NMR metabolomics data. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* **75**, 193–203 (2015).
66. Vu, T. & Laukens, K. Getting Your Peaks in Line: A Review of Alignment Methods for NMR Spectral Data. *Metabolites* **3**, 259–276 (2013).
67. Craig, A., Cloarec, O., Holmes, E., Nicholson, J. K. & Lindon, J. C. Scaling and Normalization Effects in NMR Spectroscopic Metabonomic Data Sets. *Anal. Chem.* **78**, 2262–2267 (2006).
68. Esbensen, K. H. *Multivariate data analysis - in practice: an introduction to multivariate data analysis and experimental design*. (CAMO, 2012).
69. Kakkar, S. & Bais, S. A Review on Protocatechuic Acid and Its Pharmacological Potential. *ISRN Pharmacology* **2014**, 1–9 (2014).
70. Semaming, Y., Pannengpetch, P., Chattipakorn, S. C. & Chattipakorn, N. Pharmacological Properties of Protocatechuic Acid and Its Potential Roles as Complementary Medicine. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2015**, 1–11 (2015).

71. Frankle, R. T. Nutrition education in the medical school curriculum: a proposal for action: a curriculum design. *Am. J. Clin. Nutr.* **29**, 105–109 (1976).

72. Mallavadhani, U. V. & Mahapatra, A. A new aurone and two rare metabolites from the leaves of *Diospyros melanoxylon*. *Natural Product Research* **19**, 91–97 (2005).

73. Liu, C.-L., Wang, J.-M., Chu, C.-Y., Cheng, M.-T. & Tseng, T.-H. In vivo protective effect of protocatechuic acid on tert-butyl hydroperoxide-induced rat hepatotoxicity. *Food and Chemical Toxicology* **40**, 635–641 (2002).

74. Kergomard, A. & Renard, M. F. Action of Two Strains of *Streptomyces* on Aromatic Substrates. *Agricultural and Biological Chemistry* **50**, 2913–2914 (1986).

75. Cui, Q., Lewis, I., Jofre, F., Anderson, M. E. & Markley, J. L. 3,4-Dihydroxybenzoic. (2007).

76. Liu, W., Nisar, M. F. & Wan, C. Characterization of Phenolic Constituents from *Prunus cerasifera* Ldb Leaves. *Journal of Chemistry* **2020**, 1–5 (2020).

77. Li, X., Wang, X., Chen, D. & Chen, S. Antioxidant Activity and Mechanism of Protocatechuic Acid in vitro. *FFHD* **1**, 232 (2011).

78. Tanaka, T., Tanaka, T. & Tanaka, M. Potential Cancer Chemopreventive Activity of Protocatechuic Acid. *Journal of Experimental & Clinical Medicine* **3**, 27–33 (2011).

79. Kuete, V. *et al.* Antimicrobial activity of the crude extract, fractions and compounds from stem bark of Ficus ovata (Moraceae). *Journal of Ethnopharmacology* **124**, 556–561 (2009).

80. Chao, C.-Y. & Yin, M.-C. Antibacterial Effects of Roselle Calyx Extracts and Protocatechuic Acid in Ground Beef and Apple Juice. *Foodborne Pathogens and Disease* **6**, 201–206 (2009).

81. Scazzocchio, B. *et al.* Cyanidin-3-O- -Glucoside and Protocatechuic Acid Exert Insulin-Like Effects by Upregulating PPAR Activity in Human Omental Adipocytes. *Diabetes* **60**, 2234–2244 (2011).

82. Asnaashari, M., Farhoosh, R. & Farahmandfar, R. Preservation of gallic acid and methyl gallate on purified Kilka fish oil oxidation by Rancimat. *Food Sci Nutr* **7**, 4007–4013 (2019).

83. Kang, M.-S. *et al.* Effects of methyl gallate and gallic acid on the production of inflammatory mediators interleukin-6 and interleukin-8 by oral epithelial cells stimulated with Fusobacterium nucleatum. *J Microbiol.* **47**, 760–767 (2009).

84. Marzouk, M. S. A., El-Toumy, S. A. A. & Moharram, F. A. Pharmacologically Active Ellagitannins from Terminalia myriocarpa. *Planta med* **68**, 523–527 (2002).

85. Calzada, F. *et al.* Geranins A and B, New Antiprotozoal A-Type Proanthocyanidins from *Geranium niveum* †. *J. Nat. Prod.* **62**, 705–709 (1999).

86. Oidovsambuu, S. *et al.* Protective Effect of Paeonia anomala Extracts and Constituents against tert-Butylhydroperoxide-Induced Oxidative Stress in HepG2 Cells. *Planta Med* **79**, 116–122 (2013).

87. Kamatham, S., Kumar, N. & Gudipalli, P. Isolation and characterization of gallic acid and methyl gallate from the seed coats of Givotia rottleriformis Griff. and their anti-proliferative effect on human epidermoid carcinoma A431 cells. *Toxicology Reports* **2**, 520–529 (2015).

88. Rosas, E. C., Correa, L. B. & das Graças Henriques, M. Antiinflammatory Properties of Schinus terebinthifolius and Its Use in Arthritic Conditions. in *Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases* 489–505 (Elsevier, 2019).

89. Choi, J.-G. *et al.* Methyl Gallate from Galla rhois Successfully Controls Clinical Isolates of Salmonella Infection in Both In Vitro and In Vivo Systems. *PLoS ONE* **9**, e102697 (2014).

90. Madikizela, B., Aderogba, M. A., Finnie, J. F. & Van Staden, J. Isolation and characterization of antimicrobial compounds from Terminalia phanerophlebia Engl. & Diels leaf extracts. *Journal of Ethnopharmacology* **156**, 228–234 (2014).

91. Hernández-García, E. *et al.* Nuclear magnetic resonance spectroscopy data of isolated compounds from Acacia farnesiana (L) Willd fruits and two esterified derivatives. *Data in Brief* **22**, 255–268 (2019).

92. Hsieh, T.-J. *et al.* Protective effect of methyl gallate from Toona sinensis (Meliaceae) against hydrogen peroxide-induced oxidative stress and DNA

damage in MDCK cells. *Food and Chemical Toxicology* **42**, 843–850 (2004).

93. Correa, L. B. *et al.* Anti-inflammatory Effect of Methyl Gallate on Experimental Arthritis: Inhibition of Neutrophil Recruitment, Production of Inflammatory Mediators, and Activation of Macrophages. *J. Nat. Prod.* **79**, 1554–1566 (2016).
94. Herrmann, K. M. & Weaver, L. M. THE SHIKIMATE PATHWAY. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* **50**, 473–503 (1999).
96. Jesús Ibarz, Ma., Ferreira, V., Hernández-Orte, P., Loscos, N. & Cacho, J. Optimization and evaluation of a procedure for the gas chromatographic–mass spectrometric analysis of the aromas generated by fast acid hydrolysis of flavor precursors extracted from grapes. *Journal of Chromatography A* **1116**, 217–229 (2006).
97. Bochkov, D. V., Sysolyatin, S. V., Kalashnikov, A. I. & Surmacheva, I. A. Shikimic acid: review of its analytical, isolation, and purification techniques from plant and microbial sources. *J Chem Biol* **5**, 5–17 (2012).
98. Avula, B., Wang, Y.-H., Smillie, T. J. & Khan, I. A. Determination of Shikimic Acid in Fruits of Illicium Species and Various Other Plant Samples by LC–UV and LC–ESI–MS. *Chroma* **69**, 307–314 (2009).
99. Shataer, D., Abdulla, R., Ma, Q. L., Liu, G. Y. & Aisa, H. A. Chemical Composition of Extract of Corylus avellana Shells. *Chem Nat Compd* **56**, 338–340 (2020).

100. Zhang, J. M. *et al.* Chemical constituents from pine needles of Cedrus deodara. *Chem Nat Compd* **47**, 272–274 (2011).

101. Bradley, D. Star role for bacteria in controlling flu pandemic? *Nat Rev Drug Discov* **4**, 945–946 (2005).

102. Zhang, Y. *et al.* New Approach to the Total Synthesis of (−)-Zeylenone from Shikimic Acid. *Chem. Pharm. Bull.* **54**, 1459–1461 (2006).

103. Candeias, N. R., Assoah, B. & Simeonov, S. P. Production and Synthetic Modifications of Shikimic Acid. *Chem. Rev.* **118**, 10458–10550 (2018).

104. Gadkari, P. V. & Balaraman, M. Catechins: Sources, extraction and encapsulation: A review. *Food and Bioproducts Processing* **93**, 122–138 (2015).

105. Zheng, L. T., Ryu, G.-M., Kwon, B.-M., Lee, W.-H. & Suk, K. Anti-inflammatory effects of catechols in lipopolysaccharide-stimulated microglia cells: Inhibition of microglial neurotoxicity. *European Journal of Pharmacology* **588**, 106–113 (2008).

106. Kuete, V. *et al.* Antimicrobial activity of the crude extracts and compounds from Ficus chlamydocarpa and Ficus cordata (Moraceae). *Journal of Ethnopharmacology* **120**, 17–24 (2008).

107. Bickii, J., Njifutie, N., Ayafor Foyere, J., Basco, L. K. & Ringwald, P. In vitro antimalarial activity of limonoids from Khaya grandifoliola C.D.C. (Meliaceae). *Journal of Ethnopharmacology* **69**, 27–33 (2000).

108. Adesida, A. & Farombi, E. O. Free radical scavenging activities of guava extract in vitro. *Afr J Med Med Sci* **41 Suppl**, 81–90 (2012).

109. Jiang, X. *et al.* Analysis of accumulation patterns and preliminary study on the condensation mechanism of proanthocyanidins in the tea plant [Camellia sinensis]. *Sci Rep* **5**, 8742 (2015).

110. Rossouw, W., Hundt, A. F., Steenkamp, J. A. & Ferreira, D. Oligomeric flavanoids. Part 17. Absolute configurations of flavan-3-ols and 4-arylflavan-3-ols via the Mosher method. *Tetrahedron* **50**, 12477–12488 (1994).

111. Dias, K., Nikolaou, S. & De Giovani, W. F. Synthesis and spectral investigation of Al(III) catechin/β-cyclodextrin and Al(III) quercetin/β-cyclodextrin inclusion compounds. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **70**, 154–161 (2008).

112. Khalesi, S. *et al.* Green tea catechins and blood pressure: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Eur J Nutr* **53**, 1299–1311 (2014).

113. Pietta, P.-G. Flavonoids as Antioxidants. *J. Nat. Prod.* **63**, 1035–1042 (2000).

114. Rice-Evans, C. Flavonoid Antioxidants. *CMC* **8**, 797–807 (2001).

115. Ikigai, H., Nakae, T., Hara, Y. & Shimamura, T. Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1147**, 132–136 (1993).

116. Yang, C. S., Maliakal, P. & Meng, X. I NHIBITION OF C ARCINOGENESIS BY T EA. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **42**, 25–54 (2002).

117. Lotito, S. B. & Fraga, C. G. (+)-Catechin Prevents Human Plasma Oxidation. *Free Radical Biology and Medicine* **24**, 435–441 (1998).

118. Esselen, M. & Barth, S. W. Food-Borne Topoisomerase Inhibitors. in *Advances in Molecular Toxicology* vol. 8 123–171 (Elsevier, 2014).

119. Someya, S., Yoshiki, Y. & Okubo, K. Antioxidant compounds from bananas (Musa Cavendish). *Food Chemistry* **79**, 351–354 (2002).

120. Cen-Pacheco, F. *et al.* Studies on the bioactive flavonoids isolated from *Azadirachta indica*. *Natural Product Research* 1–9 (2019).

121. Hostetler, G. L., Ralston, R. A. & Schwartz, S. J. Flavones: Food Sources, Bioavailability, Metabolism, and Bioactivity. *Adv Nutr* **8**, 423–435 (2017).

122. Venigalla, M., Gyengesi, E. & Münch, G. Curcumin and Apigenin - novel and promising therapeutics against chronic neuroinflammation in Alzheimer′s disease. *Neural Regen Res* **10**, 1181 (2015).

123. Wang, M., Firrman, J., Liu, L. & Yam, K. A Review on Flavonoid Apigenin: Dietary Intake, ADME, Antimicrobial Effects, and Interactions with Human Gut Microbiota. *BioMed Research International* **2019**, 1–18 (2019).

124. Chari, V. M. *et al.* 13C-NMR spectroscopy of biflavanoids. *Phytochemistry* **16**, 1273–1278 (1977).

125. Telange, D. R. *et al.* Formulation and characterization of an apigenin-phospholipid phytosome (APLC) for improved solubility, in vivo bioavailability, and antioxidant potential. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **108**, 36–49 (2017).

126. Rothwell, J. A., Knaze, V. & Zamora-Ros, R. Polyphenols: dietary assessment and role in the prevention of cancers. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* **20**, 512–521 (2017).

127. Patel, D., Shukla, S. & Gupta, S. Apigenin and cancer chemoprevention: Progress, potential and promise (Review). *Int J Oncol* (2007).

128. Nabavi, S., Habtemariam, S., Daglia, M. & Nabavi, S. Apigenin and Breast Cancers: From Chemistry to Medicine. *ACAMC* **15**, 728–735 (2015).

129. Lefort, É. C. & Blay, J. Apigenin and its impact on gastrointestinal cancers. *Mol. Nutr. Food Res.* **57**, 126–144 (2013).

130. Zhao, L. *et al.* Neuroprotective, Anti-Amyloidogenic and Neurotrophic Effects of Apigenin in an Alzheimer's Disease Mouse Model. *Molecules* **18**, 9949–9965 (2013).

131. Popović, M., Caballero-Bleda, M., Benavente-García, O. & Castillo, J. The flavonoid apigenin delays forgetting of passive avoidance conditioning in rats. *J Psychopharmacol* **28**, 498–501 (2014).

132. Cazarolli, L. H. *et al.* Mechanism of action of the stimulatory effect of apigenin-6-C-(2″-O-α-l-rhamnopyranosyl)-β-l-fucopyranoside on 14C-glucose uptake. *Chemico-Biological Interactions* **179**, 407–412 (2009).

133. Salehi, B. *et al.* The Therapeutic Potential of Apigenin. *IJMS* **20**, 1305 (2019).

134. Imran, M. *et al.* Luteolin, a flavonoid, as an anticancer agent: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **112**, 108612 (2019).

135. Hirano, M., Takeda, S., Hitoe, S. & Shimoda, H. Luteolin-rich chrysanthemum flower extract suppresses baseline serum uric acid in Japanese subjects with mild hyperuricemia. *Integr Mol Med* **4**, (2017).

136. Jeong, D. *et al.* Anti-inflammatory activities and mechanisms of Artemisia asiatica ethanol extract. *Journal of Ethnopharmacology* **152**, 487–496 (2014).

137. Singh, P. P. & Chauhan, S. M. S. Activity-guided isolation of antioxidants from the leaves of *Terminalia arjuna*. *Natural Product Research* **28**, 760–763 (2014).

138. Enerstvedt, K. H., Jordheim, M. & Andersen, Ø. M. Isolation and Identification of Flavonoids Found in <i>Zostera marina</i> Collected in Norwegian Coastal Waters. *AJPS* **07**, 1163–1172 (2016).

139. Cai, Q., Rahn, R. O. & Zhang, R. Dietary flavonoids, quercetin, luteolin and genistein, reduce oxidative DNA damage and lipid peroxidation and quench free radicals. *Cancer Letters* **119**, 99–107 (1997).

140. Kim, J. S. & Jobin, C. The flavonoid luteolin prevents lipopolysaccharide-induced NF-kappaB signalling and gene expression by blocking IkappaB kinase activity in intestinal epithelial cells and bone-marrow derived dendritic cells. *Immunology* **115**, 375–387 (2005).

141. Törmäkangas, L. *et al.* In vivo treatment of acute Chlamydia pneumoniae infection with the flavonoids quercetin and luteolin and an alkyl gallate, octyl gallate, in a mouse model. *Biochemical Pharmacology* **70**, 1222–1230 (2005).

142. Liu, A.-L. *et al.* Anti-Influenza Virus Activities of Flavonoids from the Medicinal Plant *Elsholtzia rugulosa*. *Planta Med* **74**, 847–851 (2008).

143. Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. Cancer genes and the pathways they control. *Nat. Med.* **10**, 789–799 (2004).

144. Harborne, J. B. & Williams, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* **55**, 481–504 (2000).

145. Ichimura, T. *et al.* Antihypertensive Effect of an Extract of *Passiflora edulis* Rind in Spontaneously Hypertensive Rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **70**, 718–721 (2006).

146. Andrade-Cetto, A. & Wiedenfeld, H. Hypoglycemic effect of Cecropia obtusifolia on streptozotocin diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* **78**, 145–149 (2001).

147. Ueda, H., Yamazaki, C. & Yamazaki, M. Luteolin as an Anti-inflammatory and Anti-allergic Constituent of Perilla frutescens. *Biol. Pharm. Bull.* **25**, 1197–1202 (2002).

148. Wollenweber, E. & Dörr, M. Occurrence and Distribution of the Flavone Tricetin and its Methyl Derivatives as Free Aglycones. *Natural Product Communications* **3**, 1934578X0800300 (2008).

149. Campos, M. G., Webby, R. F. & Markham, K. R. The Unique Occurrence of the Flavone Aglycone Tricetin in Myrtaceae Pollen. *Zeitschrift für Naturforschung C* **57**, 944–946 (2002).

150. Wishart, D. S. *et al.* HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. *Nucleic Acids Research* **46**, D608–D617 (2018).

151. Wu, S. & Tian, L. A new flavone glucoside together with known ellagitannins and flavones with anti-diabetic and anti-obesity activities from the flowers of pomegranate (*Punica granatum*). *Natural Product Research* **33**, 252–257 (2019).

152. Hsu, Y.-L., Hou, M.-F., Tsai, E.-M. & Kuo, P.-L. Tricetin, a Dietary Flavonoid, Induces Apoptosis through the Reactive Oxygen Species/c-Jun NH_2 -Terminal Kinase Pathway in Human Liver Cancer Cells. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 12547–12556 (2010).

153. Chung, T.-T. *et al.* Tricetin suppresses human oral cancer cell migration by reducing matrix metalloproteinase-9 expression through the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Environmental Toxicology* **32**, 2392–2399 (2017).

154. Hung, J.-Y. *et al.* Tricetin, a dietary flavonoid, suppresses benzo(a)pyrene-induced human non-small cell lung cancer bone metastasis. *International Journal of Oncology* **46**, 1985–1993 (2015).

155. Hobbs, C. A. *et al.* Genotoxicity evaluation of the flavonoid, myricitrin, and its aglycone, myricetin. *Food and Chemical Toxicology* **83**, 283–292 (2015).

156. Elegami, A. A. *et al.* Two very unusual macrocyclic flavonoids from the water lily Nymphaea lotus. *Phytochemistry* **63**, 727–731 (2003).

157. Meotti, F. C. *et al.* Myricitrin as a substrate and inhibitor of myeloperoxidase: Implications for the pharmacological effects of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine* **44**, 109–120 (2008).

158. Barbosa, W. L. R., Peres, A., Gallori, S. & Vincieri, F. F. Determination of myricetin derivatives in Chrysobalanus icaco L. (Chrysobalanaceae). *Rev. bras. farmacogn.* **16**, 333–337 (2006).

159. Hwang, I.-W. & Chung, S.-K. Isolation and Identification of Myricitrin, an Antioxidant Flavonoid, from Daebong Persimmon Peel. *pnf* **23**, 341–346 (2018).

160. Yakubu, O. F., Adebayo, A. H., Dokunmu, T. M., Zhang, Y.-J. & Iweala, E. E. J. Cytotoxic Effects of Compounds Isolated from Ricinodendron heudelotii. *Molecules* **24**, 145 (2019).

161. Chen, W. *et al.* Myricitrin Inhibits Acrylamide-Mediated Cytotoxicity in Human Caco-2 Cells by Preventing Oxidative Stress. *BioMed Research International* **2013**, 1–7 (2013).

162. Domitrović, R. *et al.* Myricitrin exhibits antioxidant, anti-inflammatory and antifibrotic activity in carbon tetrachloride-intoxicated mice. *Chemico-Biological Interactions* **230**, 21–29 (2015).

163. Sun, J. *et al.* Myricitrin Protects against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity by Counteracting Oxidative Stress and Inhibiting Mitochondrial Apoptosis via ERK/P53 Pathway. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2016**, 1–16 (2016).

164. Gathercoal, E. N. The Pharmacognosy of the Medicinal Rhamnus Barks. *The Journal of the American Pharmaceutical Association (1912)* **4**, 360–371 (1915).

165. Mämmelä, P., Savolainen, H., Lindroos, L., Kangas, J. & Vartiainen, T. Analysis of oak tannins by liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **891**, 75–83 (2000).

166. Fabjan, N. *et al.* Tartary Buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) as a Source of Dietary Rutin and Quercitrin. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 6452–6455 (2003).

167. Konishi, T., Nishio, T., Kiyosawa, S., Fujiwara, Y. & Konoshima, T. The Constituents of Taxillus kaempferi and the Host, Pinus thunbergii. I. Catechins and Flavones of Taxillus kaempferi. *YAKUGAKU ZASSHI* **116**, 148–157 (1996).

168. Gadotti, V. M. *et al.* Antinociceptive action of the extract and the flavonoid quercitrin isolated from *Bauhinia microstachya* leaves. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **57**, 1345–1351 (2005).

169. Baiseitova, A., Jenis, J., Kim, J. Y., Li, Z. P. & Park, K. H. Phytochemical analysis of aerial part of Ikonnikovia kaufmanniana and their protection of DNA damage. *Natural Product Research* 1–4 (2019) doi:10.1080/14786419.2019.1607858.

170. Ma, J.-Q., Luo, R.-Z., Jiang, H.-X. & Liu, C.-M. Quercitrin offers protection against brain injury in mice by inhibiting oxidative stress and inflammation. *Food Funct.* **7**, 549–556 (2016).

171. Hasegawa, T., Takano, F., Takata, T., Niiyama, M. & Ohta, T. Bioactive monoterpene glycosides conjugated with gallic acid from the leaves of Eucalyptus globulus. *Phytochemistry* **69**, 747–753 (2008).

172. Ly, T. N., Yamauchi, R., Shimoyamada, M. & Kato, K. Isolation and Structural Elucidation of Some Glycosides from the Rhizomes of Smaller Galanga (*Alpinia officinarum* Hance). *J. Agric. Food Chem.* **50**, 4919–4924 (2002).

173. Someya, Y., Kobayashi, A. & Kubota, K. Isolation and Identification of trans-2- and trans-3-Hydroxy-1,8-cineole Glucosides from Alpinia galanga. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **65**, 950–953 (2001).

174. Nagana Gowda, G. A. & Raftery, D. Can NMR solve some significant challenges in metabolomics? *Journal of Magnetic Resonance* **260**, 144–160 (2015).

175. Kim, H. K., Choi, Y. H. & Verpoorte, R. NMR-based metabolomic analysis of plants. *Nat Protoc* **5**, 536–549 (2010).

176. Harrat, M., Gourine, N., Válega, M., Silva, A. M. S. & Yousfi, M. Seasonal variability of chemical composition and antioxidant activity of lipids (fatty acids and tocopherols) from the leaves of Pistacia lentiscus L. *Food Measure* **14**, 1939–1956 (2020).