



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
———ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837———

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑΣ & ΧΗΜΕΙΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
«Απομόνωση, Ανάπτυξη, Παραγωγή και Έλεγχος Βιοδραστικών
Φυσικών Προϊόντων»

Ζάνιας Γρηγόρης

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2022

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Τμήμα Φαρμακευτικής

Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων

Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα: Απομόνωση, Ανάπτυξη, Παραγωγή και Έλεγχος Βιοδραστικών Φυσικών Προϊόντων.

Διπλωματική εργασία με θέμα: Συμβολή στην φαρμακογνωστική μελέτη του φυτού *Iris albicans* (Lange).

Φοιτητής: Ζανιάς Γρηγόρης, Χημικός, Α.Μ: 190504

Εξεταστική Επιτροπή:

Επιβλέπων καθηγητής: Ν. Αληγιάννης, Αναπληρωτής Καθηγητής του Τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

Μέλη:

Ι. Χήνου, Καθηγήτρια του Τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

Ν. Φωκιαλάκης, Επίκουρος Καθηγητής του Τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

Περίληψη

Η απομόνωση και η ταυτοποίηση φυσικών προϊόντων με αξιόλογες βιολογικές ιδιότητες είναι μια από τις κύριες κατευθύνσεις του Εργαστηρίου Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων. Στα πλαίσια αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας μελετήθηκε το μεταβολικό φορτίο των ριζών του *Iris albicans* της οικογένειας Iridaceae. Προγενέστερες μελέτες, οι οποίες έχουν πραγματοποιηθεί σε άλλα είδη του ίδιου γένους, έχουν καταλήξει στην απομόνωση και ταυτοποίηση πληθώρας δευτερογενών μεταβολιτών με τα φλαβονοειδή και τα τριτερπένια να αποτελούν τις πιο ενδιαφέρουσες, τόσο από την φυτοχημική πλευρά όσο και από την άποψη των βιολογικών ιδιοτήτων. Οι αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία είναι ελάχιστες ως προς το φυτοχημικό περιεχόμενο των ριζών και ακόμη λιγότερο ως προς την πιθανή αντικαρκινική δράση δευτερογενών μεταβολιτών από τις ρίζες του *Iris albicans*. Σκοπός της παρούσης μελέτης ήταν η φυτοχημική μελέτη των ριζών του προαναφερόμενου είδους, για την απομόνωση και ταυτοποίηση δευτερογενών μεταβολιτών και η περαιτέρω μελέτη τους για πιθανή αντικαρκινική δράση απέναντι σε έξι καρκινικές κυτταρικές σειρές του καρκίνου του μαστού.

Ποιο συγκεκριμένα, έγινε συλλογή ολόκληρου του φυτού και μετά το διαχωρισμό σε υπόγεια (ρίζες) και υπέργεια (στελέχη και φύλλα) τμήματα ακολούθησε ξήρανση, κονιοποίηση και εξαντλητική εκχύλιση με διαλύτες διαφορετικών πολικότητων. Μετά την αξιολόγηση των παραγόμενων εκχυλισμάτων με τις τεχνικές TLC και ¹H NMR, επιλέχθηκε το εκχύλισμα του οξικού μεθυλεστέρα των ριζών (EtOAc-Ρίζες) για περαιτέρω μελέτη. Το προαναφερόμενο εκχύλισμα κλασματώθηκε με υγρή χρωματογραφία στήλης υπό κενό (VLC) και προέκυψαν μετά από τις κατάλληλες συνεννώσεις 13 κλάσματα, τα οποία διαχωρίστηκαν με βάση το χημικό περιεχόμενό τους σε (α) μεσαίας έως υψηλής πολικότητας κλάσματα που είναι πλούσια σε φαινολικούς δευτερογενείς μεταβολίτες (κυρίως ισοφλαβόνες και απλές φαινόλες) και (β) σε χαμηλής έως μεσαίας πολικότητας κλάσματα που είναι πλούσια σε τερπενικές ενώσεις (κυρίως στερόλες και ιριδάλες). Ως κύρια μέθοδο διαχωρισμού και απομόνωσης επιλέχθηκε η χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC). Από τα κλάσματα της VLC με πλουσιότερο φαινολικό φορτίο επιλέχθηκαν τα κλάσματα 12 και 13, από τα οποία με τη χρήση αντίστροφης φάσης (RP) HPLC απομονώθηκαν 8 δευτερογενείς μεταβολίτες: 6 ισοφλαβόνες, 1 απλό βενζολικό παράγωγο

και 1 υποκατεστημένη διφαινυλοκετόνη. Αντίστοιχα, στα κλάσματα που ήταν πιο πλούσια σε τερπενικές ενώσεις, επιλέχθηκε το κλάσμα 4 για περαιτέρω μελέτη. Από το προαναφερόμενο κλάσμα, με τη χρήση κανονικής φάσης (NP) HPLC, απομονώθηκαν ως μίγμα 2 δευτερογενείς μεταβολίτες που ανήκουν στην χημική κατηγορία των στερολών. Εκτός από τους 2 προαναφερθέντες μεταβολίτες, προέκυψαν και μίγματα τριτερπενίων, τα οποία περιείχαν 2 ή περισσότερες ιριδάλες και χρήζουν περαιτέρω φυτοχημικής μελέτης. Όλοι οι δευτερογενείς μεταβολίτες ταυτοποιήθηκαν με τη λήψη και μελέτη φασμάτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού και φασματογραφίας μαζών HRESI-(-)MS. Τέλος, η πλειονότητα των απομονωμένων δευτερογενών μεταβολιτών και επιλεγμένα μείγματα Ιριδαλών αξιολογήθηκαν σε διάφορες συγκεντρώσεις για την ανασταλτική τους δράση έναντι του κυτταρικού πολλαπλασιασμού 6 καρκινικών κυτταρικών σειρών γυναικείου καρκίνου του μαστού.

Abstract

The isolation and identification of natural products with notable biological properties is one of the main objectives of the Laboratory of Pharmacognosy and Natural Products. In this master thesis, we explored the secondary metabolite content of the roots of *Iris albicans* from the Iridaceae family. Previous phytochemical studies have been performed on various species of the same genus and have resulted in the isolation and the identification of a plethora of secondary metabolites from which flavonoids and triterpenoids stand out, due to their intriguing phytochemical nature and biological activities. When it comes to the phytochemical profile of the roots of *Iris albicans*, the references in the global bibliography are scarce and even less when it comes to the possible anti-proliferative activity of the secondary metabolites deriving from the roots of said plant. The purpose of this research was the phytochemical study of the roots of *I. albicans*, the isolation and identification of its secondary metabolites and finding out if they have an anti-proliferative action vs six specific breast cancer cell lines.

More specifically the plant material was gathered, split in, underground (Roots)) and aboveground (Leaves and stems) parts which were powdered and subjected to extensive extractions with a series of different polarity solvents. On the basis of the evaluation of the TLC and ¹H NMR profile of the produced extracts, the ethyl acetate extract of the roots (EtOAc-Roots) was selected for further investigation. The above extract was fractionated via liquid chromatography under vacuum (VLC) which, after appropriate poolings, produced 13 fractions that were split according to their chemical content of either (a) medium to high polarity fractions rich in phenolic secondary metabolites (mainly isoflavones and phenols) and (b) low to medium polarity fractions rich in terpenoids (mainly sterols and Iridals). It was decided that certain fractions would undergo additional fractionation with modern analytical technique of high-pressure liquid chromatography (HPLC). Out of the fractions that were rich in phenolic compounds, Fractions 12 and 13 were singled out after their evaluation with ¹H NMR. Through the process of reverse phase HPLC, 8 compounds were isolated from which 6 are isoflavones, 1 is a bis-phenolic derivative and 1 is a benzoic derivative. Respectively, from the fractions that were rich in terpene compounds, fraction 4 was chosen for further investigation. The above-

mentioned fraction was processed through normal phase (NP) HPLC, 2 compounds were isolated, as a mixture, both of which belong to the phytosterol category. Besides the 2 phytosterols several chemical mixtures of terpenes were that contained 2 or more Iridals were isolated that belong to the triterpene chemical category. All of the secondary metabolites that were isolated were identified through the use of one- and two-dimension nuclear magnetic resonance (NMR) and mass spectrometry HRESI- (-) MS. Finally, all the chemical compounds including the Iridal mixtures were tested in various chemical concentrations, for their anti-proliferative bioactivity against 6 breast cancer cell lines.

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος «Απομόνωση, Ανάπτυξη, Παραγωγή και Έλεγχος Βιοδραστικών Φυσικών Προϊόντων» στο εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων του Τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή Νεκτάριο Αληγιάννη για τη δυνατότητα που μου έδωσε να πραγματοποιήσω το ερευνητικό μέρος των μεταπτυχιακών σπουδών μου στο εργαστήριό του. Τον ευχαριστώ για το πολύ ενδιαφέρον θέμα που μου ανέθεσε, καθώς και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε. Επιπλέον, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για τη συνεχή και αδιάλειπτη υποστήριξή του καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου, για τις συμβουλές του, για την ερευνητική του καθοδήγηση και τη βοήθεια του στη συγγραφή της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής καθηγήτρια Ιωάννα Χήνου και επίκουρο καθηγητή Νικόλαο Φωκιαλάκη για τη διόρθωση της διπλωματικής εργασίας, καθώς και για τις ενδιαφέρουσες γνώσεις που μου μετέφεραν μέσα από τα μεταπτυχιακά μαθήματα.

Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στον Δρ. Διονύση Αμπάτη για την ιδιαίτερη βοήθειά του σε πρακτικό και θεωρητικό επίπεδο, σε καθημερινή βάση κατά τη διάρκεια παραμονής μου στο εργαστήριο και κατά τη συγγραφή της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Τον ευχαριστώ για την αρμονική συνεργασία, για την υπομονή του, για όλες τις συμβουλές του, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και για όλα όσα με δίδαξε κατά τη συνεργασία μας.

Ευχαριστώ την ερευνητική ομάδα του επίκουρου Καθηγητή Χρήστου Κοντού (Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ) καθώς και την υποψήφια διδάκτορα Σωτηροπούλου Χριστίνα για την εκτέλεση των βιολογικών ελέγχων και την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

Ευχαριστώ επίσης την ερευνητική ομάδα του Καθηγητή Βαγγέλη Γκίκα (Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ) και τον υποψήφιο διδάκτορα Ηλία Τζαβέλα για την λήψη των φασμάτων μάζας των απομονωμένων ουσιών.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Άκη Αμούντζια για την υποστήριξη και τη βοήθεια του όλα αυτά τα χρόνια.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων για την καθημερινή μας συνεργασία, την κατανόηση, τη βοήθειά τους και για όλες τις στιγμές που μοιραστήκαμε εντός του εργαστηρίου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια και τους φίλους μου για την ηθική ενίσχυση και τη συνεχή υποστήριξη στις επιλογές και τους στόχους μου.

Περιεχόμενα

Περίληψη	3
Abstract.....	5
Περιεχόμενα	9
1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ
.....	19
1.1. Οικογένεια Iridaceae.....	19
1.2. Το γένος <i>Iris</i>	19
1.2.1 Στοιχεία Δρογοϊστορίας.....	22
1.2.2 Στοιχεία Δρογοχημείας.....	23
1.2.2.1 Φλαβονοειδή.....	24
1.2.2.1.1 Ισοφλαβόνες.....	27
1.2.2.1.2 Νεοφλαβονοειδή.....	28
1.2.2.1.3 Φλαβόνες.....	28
1.2.2.1.4 Φλαβονόλες.....	29
1.2.2.1.5 Φλαβανόνες.....	30
1.2.2.1.6 Φλαβανόλες ή Κατεχίνες.....	31
1.2.2.1.7 Ανθοκυανίνες.....	32
1.2.2.1.8 Χαλκόνες.....	33
1.2.2.2 Κινόνες.....	34
1.2.2.4 Απλά Φαινολικά και Βενζολικά Παράγωγα.....	35
1.2.2.5 Στεροειδή.....	36
1.2.2.6 Τερπενοειδή.....	37
1.2.3. Δρογοφαρμακολογία.....	38
1.2.3.1. Φαρμακολογικές δράσεις και χρήσεις των φυτών του γένους <i>Iris</i> στην λαϊκή ιατρική.....	38
1.3. Το είδος <i>Iris albicans</i>	39
1.4. Αντικαρκινική δράση έναντι του καρκίνου του μαστού.....	43
1.4.1. Στατιστικά στοιχεία για τον καρκίνο του μαστού.....	43
1.4.2. Ανατομία του μαστού.....	46
1.4.3. Κατηγοριοποίηση καρκίνου του μαστού.....	47

1.4.4. Αντικαρκινική δράση δευτερογενών μεταβολίτων του γένους <i>Iris</i>	48
1.4.4.1. Ισοφλαβόνες ενάντια στον καρκίνο του μαστού	50
2.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ
.....	52
2.1. Συλλογή φυτικού υλικού	52
2.2. Τεχνική εκχύλισης	52
2.3. Χρωματογραφικές τεχνικές	52
2.3.1. Αναλυτική Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Analytical Thin Layer Chromatography – Analytical TLC).....	53
2.3.2. Υγρή Χρωματογραφία στήλης υπό κενό (VLC)	53
2.3.3. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) και Ημι-παρασκευαστική Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (Semi-Preparative – HPLC)	54
2.4. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)	57
2.5. Μέθοδοι αξιολόγησης βιολογικών ιδιοτήτων.....	58
2.5.1. Κυτταρικές σειρές και συνθήκες καλλιέργειας	58
2.5.2. Μελέτη της αντι-πολλαπλασιαστικής δράσης επιλεγμένων μεταβολιτών με τη μέθοδο της σουλφοροδαμίνης Β (SRB).....	58
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ
.....	60
3.1. Φυτοχημικό προφίλ εκχυλισμάτων του φυτού <i>Iris albicans</i>	60
3.1.1. Μελέτη του εκχυλίσματος οξικού αιθυλεστέρα των ριζών του φυτού <i>Iris albicans</i>	63
3.1.2. Επιλογή κλάσματος της VLC1 προς περαιτέρω μελέτη	66
3.2. Επιλογή και επεξεργασία του κλάσματος VLC1F12 (MeOH10%) με χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (RP-HPLC).	67
3.2.1. Επεξεργασία του κλάσματος VLC1F12 (MeOH10%).....	70
3.2.1.1. Επεξεργασία κλάσματος VLC1F12-FR2.....	72
3.2.1.2. Επεξεργασία του κλάσματος VLC1F12-FR3	73
3.2.1.3. Επεξεργασία του κλάσματος VLC1F12-FR4	75
3.2.1.3.1. Επεξεργασία της κορυφής 3 του VLC1F12-FR4	76
3.2.1.3.2. Επεξεργασία της κορυφής 4 του VLC1F12-FR4	77
3.2.2. Επεξεργασία του κλάσματος VLC1F13 (MeOH 20%).....	78

3.2.2.1. Επεξεργασία του κλάσματος VLC1F(12+13)-FR5.....	79
3.2.2.1.1. Επεξεργασία της κορυφής 5 του VLC1F(12+13)-FR5.....	80
3.3. Επεξεργασία του κλάσματος VLC1F4 χαμηλής προς μέτριας πολικότητας με χρωματογραφία υψηλής απόδοσης κανονικής φάσης (NP-HPLC).....	82
3.3.1. Επεξεργασία του κλάσματος VLC1F4-Zone 4	83
3.4. Ταυτοποίηση απομονωμένων δευτερογενών μεταβολιτών.....	88
3.4.1. Μεταβολίτης 1	88
3.4.2. Μεταβολίτης 2	93
3.4.3. Μεταβολίτης 3	97
3.4.4. Μεταβολίτης 4	102
3.4.5. Μεταβολίτης 5	106
3.4.6. Μεταβολίτης 6	111
3.4.7. Μεταβολίτης 7	115
3.4.8. Μεταβολίτης 8	120
3.4.9. Μεταβολίτες 9 και 10	124
3.5. Μελέτη της αντι-πολλαπλασιαστικής δράσης απομονωμένων μεταβολιτών σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού	128
Συμπεράσματα-Προοπτικές.....	138
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	140

Περιεχόμενα Εικόνων

Εικόνα 1: A. <i>Iris germanica</i> , B. <i>Iris hellenica</i> , C. <i>Iris tuberosa</i> , D. <i>Iris unguicularis</i>	21
Εικόνα 2: Χάρτης με τις τοποθεσίες που φύεται το γένος <i>Iris</i> στην Ελλάδα.....	22
Εικόνα 3: Βασική δομή флаβονοειδών	25
Εικόνα 4: Βιοσύνθεση κυριότερων ομάδων των флаβονοειδών (Knaggs, 2003).....	25
Εικόνα 5: Ταξινόμηση флаβονοειδών	26
Εικόνα 6: Χημικές δομές των Ισοφλαβονών Irgigenin, Irilin D και Tectorigenin.....	27
Εικόνα 7: Χημική δομή του γλυκοσίδη της Isoorientin	29
Εικόνα 8: Χημικές δομές των флаβονολών Quercetin και Kaempferol.....	30
Εικόνα 9: Χημικές δομές των флаβανονών Naringenin, Sakuranetin και Hesperetin.	31
Εικόνα 10: Χημικές δομές των флаβανολών, Aromadendrin και Taxifolin 7,3'-dimethyl ether	32
Εικόνα 11: Χημικές δομές ανθοκυανίνων, Pelargonidin, Peonidin και Cyanidin	33
Εικόνα 12 : Χημικές δομές των κινονών p-βενζοκινόνη και υδροξυκινόνη	34
Εικόνα 13: Χημική δομή του C-γλυκοσίδη Magniferin.....	35
Εικόνα 14: Χημικές δομές των απλών φαινολικών παραγώγων Coniferldehyde, Acetovanillone και p-Hydroxyacetophenone.....	36
Εικόνα 15: Μετατροπή Ιριδαλών σε αρωματικές Ιρόνες.	37
Εικόνα 16: <i>Iris Albicans</i> (By Eric in SF - Own work, CC BY-SA 3.0,).....	40
Εικόνα 17: Τοιχογραφία από την αρχαία Αίγυπτο που απεικονίζει την Ίριδα.....	41
Εικόνα 18: Χημικές δομές δευτερογενών μεταβολιτών από τα φύλλα της <i>I. albicans</i> . Οι μεταβολίτες 1-7 είναι ισοφλαβονοειδή ενώ οι 8-11 ανήκουν στις ξανθόνες.	43
Εικόνα 19: Δεδομένα από Cancer Facts & Figures 2022	44
Εικόνα 20: Δεδομένα από Greece-Global Cancer Observatory.....	45
Εικόνα 21: Σχηματική αναπαράσταση της Υγρής Χρωματογραφίας στήλης υπό κενό	54
Εικόνα 22: Αναπαράσταση μιας τυπικής διάταξης HPLC.....	55
Εικόνα 23: Φασματογράφος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).....	58
Εικόνα 24: Φάσμα ¹ H-NMR του EtOAc εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων του <i>Iris albicans</i>	61
Εικόνα 25: Φάσμα ¹ H-NMR του MeOH εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων του <i>Iris albicans</i>	62
Εικόνα 26: Φάσμα ¹ H-NMR του EtOAc εκχυλίσματος των ριζών του <i>Iris albicans</i>	62
Εικόνα 27: Φάσμα ¹ H-NMR του MeOH εκχυλίσματος των ριζών του <i>Iris albicans</i>	62

Εικόνα 28: Συγκριτικό φάσμα πρωτονίου (^1H NMR) των αρχικών ολικών εκχυλισμάτων του φυτού <i>Iris albicans</i> . Το δείγματα διαλύθηκαν σε δευτεριωμένη MeOD	63
Εικόνα 29: Συνολική TLC σε σύστημα οξικού αιθυλεστέρα (EtOAc) και κυκλοεξανίου (c-Hexane) σε αναλογία 60:40, με όλες τις συνενώσεις από VLC1. Παρατήρηση έγινε στα 254 nm και εμφάνιση με διάλυμα θειικής βανιλίνης	66
Εικόνα 30: Συνολική TLC σε σύστημα οξικού αιθυλεστέρα (EtOAc) και κυκλοεξανίου (c-Hexane) σε αναλογία 60:40, με όλες τις συνενώσεις των κλασμάτων της VLC1. Η ανίχνευση έγινε στα 254 nm και εμφάνιση με διάλυμα θειικής βανιλίνης.....	67
Εικόνα 31: Συγκριτικό χρωματογράφημα όλων των κλασμάτων VLC1 μέτριας προς υψηλής πολικότητας	69
Εικόνα 32: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR για το κλάσμα VLC1F12 (MeOH 10%) σε MeOH- d_4	70
Εικόνα 33: Χρωματογράφημα VLC1F12 (MeOH10%).....	71
Εικόνα 34: Χρωματογράφημα VLC1F12- Fraction 2 με επισημασμένες τις κύριες κορυφές του	73
Εικόνα 35: Χρωματογράφημα VLC1F12- Fraction 3 με επισημασμένες τις κύριες κορυφές που ταυτοποιήθηκαν σαν πιθανοί δευτερογενείς μεταβολίτες	74
Εικόνα 36: Χρωματογράφημα VLC1F12- Fraction 4 με επισημασμένες τις κύριες κορυφές που ταυτοποιήθηκαν σαν πιθανοί δευτερογενείς μεταβολίτες	76
Εικόνα 37: Χρωματογράφημα VLC1F12- Fraction 4 – Peak 3.....	77
Εικόνα 38: Χρωματογράφημα VLC1F12- Fraction 4 – Peak 4.....	78
Εικόνα 39: Χρωματογράφημα VLC1F13 (MeOH20%).....	79
Εικόνα 40: Χρωματογράφημα VLC1F(12+13) – Fraction 5	80
Εικόνα 41: Χρωματογράφημα VLC1F(12+13) – Fraction 5 – Peak 5.....	81
Εικόνα 42: Χρωματογράφημα VLC1F4 σε ημι-παρασκευαστική Normal Phase HPLC.....	83
Εικόνα 43: Χρωματογράφημα VLC1F4 – Zone 4 σε ημι-παρασκευαστική Normal Phase HPLC.....	84
Εικόνα 44: Φάσμα ^1H NMR της VLC1F4-Zone 4-Peak 2.....	85
Εικόνα 45: Φάσμα ^1H NMR της VLC1F4-Zone 4-Peak 3.....	85
Εικόνα 46: Φάσμα ^1H NMR της VLC1F4-Zone 4-Peak 4.....	86
Εικόνα 47: Φάσμα ^1H NMR της VLC1F4-Zone 4-Peak 5.....	87
Εικόνα 48: Φάσμα ^1H NMR της VLC1F4-Zone 4-Peak 6.....	87
Εικόνα 49: Μεταβολίτης 1 (VLC1F12-Fraction 6)	88
Εικόνα 50: TIC φάσμα μάζας Μεταβολίτη 1.....	88
Εικόνα 51: Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη 1.....	90

Εικόνα 52: Φάσμα ^{13}C NMR του μεταβολίτη 1.....	91
Εικόνα 53: Φάσμα NOESY του μεταβολίτη 1.....	92
Εικόνα 54: TIC φάσμα μάζας Μεταβολίτη 2.....	94
Εικόνα 55: Μεταβολίτης 2 (VLC1FR12-F2-Peak5).....	94
Εικόνα 56: Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη 2.....	96
Εικόνα 57: Φάσμα ^{13}C NMR του μεταβολίτη 2.....	96
Εικόνα 58: Μεταβολίτης 3 (VLC1FR12-F2-Peak6).....	97
Εικόνα 59: TIC φάσμα μάζας μεταβολίτη 3.....	98
Εικόνα 60: Φάσματα ^1H NMR και ^{13}C NMR του Μεταβολίτη 3.....	99
Εικόνα 61: Τα 6 συντακτικά ισομερή υδροξυ-μεθοξυ-ακετοφαινόνης με 1,2,4 μοτίβο υποκατάστασης	101
Εικόνα 62: TIC φάσμα μάζας Μεταβολίτη 4.....	102
Εικόνα 63: Μεταβολίτης 4 (VLC1FR12-F2-Peak9).....	103
Εικόνα 64: Φάσμα ^1H NMR της ένωσης VLC1F12-F2-Peak 9.....	104
Εικόνα 65 Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης VLC1F12-F2-Peak 9.....	105
Εικόνα 66: TIC φάσμα μάζας Μεταβολίτη 5.....	106
Εικόνα 67: Μεταβολίτης 5 (VLC12FR3-Peak4).....	107
Εικόνα 68: Φάσμα ^1H NMR του Μεταβολίτη 5.....	108
Εικόνα 69: Φάσμα ^{13}C NMR του Μεταβολίτη 5.....	109
Εικόνα 70: TIC φάσμα μάζας Μεταβολίτη 6.....	111
Εικόνα 71: Μεταβολίτης 6 (VLC1FR12-F4-P3-P2).....	111
Εικόνα 72: Φάσμα ^1H NMR του Μεταβολίτη 6.....	113
Εικόνα 73: Φάσμα HSQC-DEPT του Μεταβολίτη 6.....	113
Εικόνα 74: Φάσμα HMBC του Μεταβολίτη 6.....	114
Εικόνα 75: TIC φάσμα μάζας Μεταβολίτη 7.....	116
Εικόνα 76: Μεταβολίτης 7 (VLC1FR12-F4-P4-Peak 2).....	117
Εικόνα 77: Φάσμα ^1H NMR του Μεταβολίτη 7.....	117
Εικόνα 78: Φάσμα HSQC-DEPT του Μεταβολίτη 7.....	118
Εικόνα 79: Φάσμα HMBC του Μεταβολίτη 7.....	118
Εικόνα 80: Φάσμα NOESY του Μεταβολίτη 7.....	119

Εικόνα 81: TIC φάσμα μάζας Μεταβολίτη 8.....	121
Εικόνα 82: Μεταβολίτης 8 (VLC1FR12-F4-P4-Peak 4)	121
Εικόνα 83: Φάσμα ¹ H NMR του Μεταβολίτη 8, με μεγεθυμένο τμήμα που φαίνονται τα δύο πρωτόνια των φαινολικών υδροξυλομάδων	122
Εικόνα 84: Φάσμα ¹³ C NMR του Μεταβολίτη 8.....	123
Εικόνα 85: Μεταβολίτες 9 (β-σιτοστερόλη) και 10 (στιγμαστερόλη) που απομονώθηκαν ως μίγμα (VLC1FR4-W1).	125
Εικόνα 86: Φάσμα ¹ H-NMR του μείγματος VLC1F4-W1	125
Εικόνα 87: Τμήμα του φάσματος ¹ H-NMR όπου φαίνονται οι κορυφές των μεθυλιών των δύο φυτοστερολών και προσεγγιστικά η αναλογία σιτοστερόλης:στιγμαστερόλης (1:3) στο μίγμα	126
Εικόνα 88: Φάσμα ¹³ C-NMR του μείγματος VLC1F4-W1.....	126
Εικόνα 89: Καμπύλες ανάπτυξης της κυτταρικής σειράς MDA-MB 231 σε μικρή κλίμακα, υπό την επίδραση επιλεγμένων μεταβολιτών (GZ1CAN, GZ2CAN, GZ3CAN, GZ5CAN, GZ6CAN, GZ7CAN, GZ8CAN και GZ9CAN) σε τρία χρονικά σημεία (24, 36, 48h) και στις τελικές συγκεντρώσεις που παρατηρείται IC ₅₀	131
Εικόνα 90: Καμπύλες ανάπτυξης της κυτταρικής σειράς MDA-MB-468 σε μικρή κλίμακα, υπό την επίδραση επιλεγμένων μεταβολιτών (GZ1CAN, GZ2CAN, GZ3CAN, GZ5CAN, GZ6CAN, GZ7CAN, GZ8CAN και GZ9CAN) σε τρία χρονικά σημεία (24, 36, 48h) και στις τελικές συγκεντρώσεις που παρατηρείται IC ₅₀	132
Εικόνα 91: Καμπύλες ανάπτυξης της κυτταρικής σειράς BT-20 σε μικρή κλίμακα, υπό την επίδραση επιλεγμένων μεταβολιτών (GZ1CAN, GZ2CAN, GZ3CAN, GZ5CAN, GZ6CAN, GZ7CAN, GZ8CAN και GZ9CAN) σε τρία χρονικά σημεία (24, 36, 48h) και στις τελικές συγκεντρώσεις που παρατηρείται IC ₅₀	133
Εικόνα 92: Καμπύλες ανάπτυξης της κυτταρικής σειράς BT-474 σε μικρή κλίμακα, υπό την επίδραση επιλεγμένων μεταβολιτών (GZ1CAN, GZ2CAN, GZ3CAN, GZ5CAN, GZ6CAN, GZ7CAN, GZ8CAN και GZ9CAN) σε τρία χρονικά σημεία (24, 36, 48h) και στις τελικές συγκεντρώσεις που παρατηρείται IC ₅₀	133
Εικόνα 93: Καμπύλες ανάπτυξης της κυτταρικής σειράς MCF-7 σε μικρή κλίμακα, υπό την επίδραση επιλεγμένων μεταβολιτών (GZ1CAN, GZ2CAN, GZ3CAN, GZ5CAN, GZ6CAN, GZ7CAN, GZ8CAN και GZ9CAN) σε τρία χρονικά σημεία (24, 36, 48h) και στις τελικές συγκεντρώσεις που παρατηρείται IC ₅₀	134
Εικόνα 94: Καμπύλες ανάπτυξης της κυτταρικής σειράς SK-BR-3 σε μικρή κλίμακα, υπό την επίδραση επιλεγμένων μεταβολιτών (GZ1CAN, GZ2CAN, GZ3CAN, GZ5CAN, GZ6CAN, GZ7CAN, GZ8CAN και GZ9CAN) σε τρία χρονικά σημεία (24, 36, 48h) και στις τελικές συγκεντρώσεις που παρατηρείται IC ₅₀	134
Εικόνα 95: Καμπύλες ανάπτυξης της κυτταρικής σειράς MDA-MB 231 σε μικρή κλίμακα, υπό την επίδραση των GZ12CAN-GZ16CAN σε τρία χρονικά σημεία (24, 36, 48h) και στις τελικές συγκεντρώσεις που παρατηρείται IC ₅₀	136

Εικόνα 96: Καμπύλες ανάπτυξης της κυτταρικής σειράς SK-BR-3 σε μικρή κλίμακα, υπό την επίδραση των GZ12CAN-GZ16CAN σε τρία χρονικά σημεία (24, 36, 48h) και στις τελικές συγκεντρώσεις που παρατηρείται IC50..... 137

Περιεχόμενα Πινάκων

Πίνακας 1: Ταξινόμηση του <i>Iris Alba</i>	39
Πίνακας 2: Δευτερογενείς μεταβολίτες από τα φύλλα της <i>I. albicans</i> . Οι μεταβολίτες 1 έως 7 είναι ισοφλαβονοειδή ενώ οι 8 έως 11 ανήκουν στις ξανθόνες.....	42
Πίνακας 3: Χαρακτηριστικές κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού βάσει του μοριακού προφίλ τους ως προς	48
Πίνακας 4: Αρχικό βάρος των τμημάτων του φυτικού υλικού και τελική απόδοση έπειτα από πολλαπλές εκχυλίσεις. Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.	
Πίνακας 5: Βάρη εκχυλισμάτων και τελική απόδοση συγκριτικά με την αρχική ποσότητα πρώτης ύλης. Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.	
Πίνακας 6: Τα σύστημα οργανικών διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν για τη βαθμιδωτή έκλουση.....	64
Πίνακας 7: Τα κλάσματα του αρχικού διαχωρισμού από την υγρή χρωματογραφία στήλης υπό κενό (VLC1) από το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα (EtOAc) των υπόγειων τμημάτων (ρίζες) του φυτού <i>Iris albicans</i>	65
Πίνακας 8: Σύστημα έκλουσης αναλυτικής RP-HPLC για το κλάσμα VLC1F12 (MeOH10%).....	68
Πίνακας 9: : Σύστημα έκλουσης ημι-παρασκευαστικής RP-HPLC για το VLC1F12 (MeOH10%).....	71
Πίνακας 10: Ποσότητες των κλασμάτων που συλλέχθηκαν από την κλασμάτωση της VLC1F12 (MeOH10%).....	72
Πίνακας 11: Σύστημα έκλουσης ημι-παρασκευαστικής RP-HPLC για το κλάσμα VLC1F12-F2.	73
Πίνακας 12: Σύστημα έκλουσης ημι-παρασκευαστικής Reverse phase HPLC για το κλάσμα VLC1F12-Fraction 3.	74
Πίνακας 13: Σύστημα έκλουσης ημι-παρασκευαστικής Reverse phase HPLC για το κλάσμα VLC1F12-Fraction 4.	75
Πίνακας 14: Σύστημα έκλουσης αναλυτικής Reverse phase HPLC για το κλάσμα VLC1F12- Fraction 4 – Peak 3.....	76
Πίνακας 15: Σύστημα έκλουσης αναλυτικής Reverse phase HPLC για το κλάσμα VLC1F12- Fraction 4 – Peak 4.....	77
Πίνακας 16: Σύστημα έκλουσης ημι-παρασκευαστικής Reverse phase HPLC για το κλάσμα VLC1(F12+13)- Fraction 5.....	80
Πίνακας 17: Σύστημα έκλουσης αναλυτικής Reverse phase HPLC για το κλάσμα VLC1(F12+13)- FR5-Peak 5.....	81
Πίνακας 19: Σύστημα έκλουσης ημι-παρασκευαστικής Normal phase HPLC για το κλάσμα VLC1F4.	82
Πίνακας 20: Ποσότητες και διαχωρισμός των ζωνών του κλάσματος VLC1F4.	83

Πίνακας 21: Σύστημα έκλουσης ημι-παρασκευαστικής Normal phase HPLC για το κλάσμα VLC1F4 – Zone 4.	84
Πίνακας 22: Οι χημικές μετατοπίσεις $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ του μεταβολίτη 1.....	93
Πίνακας 23: Οι χημικές μετατοπίσεις $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ του μεταβολίτη 2.....	96
Πίνακας 24: Οι χημικές μετατοπίσεις $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ του μεταβολίτη 3.....	101
Πίνακας 25: Οι χημικές μετατοπίσεις $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ του μεταβολίτη 4.....	105
Πίνακας 26: Οι χημικές μετατοπίσεις $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ του μεταβολίτη 5.....	109
Πίνακας 27: Οι χημικές μετατοπίσεις $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ του μεταβολίτη 6.....	114
Πίνακας 28: Οι χημικές μετατοπίσεις $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ του μεταβολίτη 7.....	119
Πίνακας 29: Οι χημικές μετατοπίσεις $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ του μεταβολίτη 8.....	123
Πίνακας 31: Οι χημικές μετατοπίσεις $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ των μεταβολιτών 9 και 10.	127
Πίνακας 32 : Δευτερογενείς μεταβολίτες που απομονώθηκαν και ελέγχθηκαν για την αντι-πολλαπλασιαστική τους δράση.....	129
Πίνακας 33: Οι τελικές συγκεντρώσεις για κάθε μια από τις ισοφλαβόνες που χρησιμοποιήθηκαν, για τις οποίες παρατηρείται IC50 στις 48h.....	135
Πίνακας 34: οι τελικές συγκεντρώσεις για κάθε ένα από τα μίγματα τερπενίων που χρησιμοποιήθηκαν, για τις οποίες παρατηρείται IC50 στις 48h.....	137

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Οικογένεια *Iridaceae*

Τα Ιριδοειδή ή Ιριδίδες είναι μια οικογένεια φυτών της τάξεως των Ασπαραγωγών (*Asparagales*), περιλαμβάνει περίπου 75 γένη και 1700 είδη που φύονται σε τροπικές και εύκρατες περιοχές. Χωρίζεται σε 3 μεγάλες υποοικογένειες, τα Κροκοειδή (*Crocoideae*), τα Ιξιοειδή (*Ixioideae*) και τα Ιριδοειδή (*Iridoideae*). Στην οικογένεια των Ιριδοειδών ανήκουν οι γλαδιόλες, οι φρέζες κ.α. γνωστά καλλιεργούμενα (διακοσμητικά και μη) φυτά. Συνήθως αποτελούν πολυετείς πόες με βολβούς, βολβο-κονδύλους ή ριζώματα. Τα φύλλα είναι μακρυά ξιφοειδή ή γραμμοειδή. Τα άνθη τους είναι μονήρη ή τοποθετημένα σε ταξιανθίες, τριμερή, ακτινόμορφα ή ζυγόμορφα. Οι βολβοί, τα ριζώματα και οι κόνδυλοι αναπαράγονται μέσω βλάστησης (Φυτολογία - Εκπαιδευτική εγκυκλοπαίδεια, 1999).

1.2. Το γένος *Iris*

Το γένος *Iris* είναι το μεγαλύτερο γένος φυτών της οικογένειας *Iridaceae*, περιλαμβάνει 260-300 είδη που ανήκουν στα αγγειόσπερμα μονοκοτυλήδονα φυτά. Το όνομα του γένους προέρχεται από το όνομα της ελληνικής θεότητας 'Ιρις', η οποία στη μυθολογία ήταν η ιδεατή, ανθρωπόμορφη ιπτάμενη θεότητα που συμβόλιζε το ουράνιο τόξο.

Το γένος είναι πολύ διαδεδομένο σε όλη τη βόρεια εύκρατη ζώνη. Συναντάται συχνότερα στην Ευρώπη, στη Μέση Ανατολή, στη Βόρεια Αφρική, στην Ασία και σε ολόκληρη τη Βόρεια Αμερική. Οι «Ίριδες» είναι πολυετές πόες που εξέρχονται από κονδυλώδη ριζώματα (ριζωματικές Ίριδες) ή σε πιο ξηρά περιβάλλοντα που αναπτύσσονται από βολβούς (Βολβώδεις Ίριδες). Οι ριζωματικές πόες έχουν 3 με 10 βασικά σπαθωτά φύλλα τα οποία φύονται σε πυκνές συστάδες, ενώ τα φύλλα των βολβωδών ποών είναι κυλινδρικά. Οι ταξιανθίες έχουν σχήμα βεντάλιας και περιέχουν ένα ή περισσότερα συμμετρικά, εξάλοβα άνθη, τα οποία αναπτύσσονται με ή χωρίς ποδίσκο. Αποτελείται από τρία σέπαλα και τρία πέταλα, τα οποία στέκονται όρθια εν μέρει, πίσω από τη βάση των σεπάλων. Αναπτύσσονται από τη βάση τους σε ευρύτερο σχηματισμό και μπορεί να έχουν χαρακτηριστικές φλέβες, γραμμές ή κηλίδες. Στο κέντρο του σέπαλου κάποια φυτά έχουν μια γραμμή από μικροσκοπικά τριχίδια (*bearded Iris*)

τα οποία αποτελούν σημείο προσγείωσης για τους επικονιαστές και οδηγός τους προς το νέκταρ του φυτού.

Φύονται κυρίως σε πετρώδεις ράχες, σε μακί και δασικές εκτάσεις, σε υψόμετρα 400 - 900 μέτρων και ανθίζουν από τα μέσα Απριλίου έως τα τέλη Μαΐου.

Η ελληνική χλωρίδα περιλαμβάνει 15 είδη *Iris*, τα οποία κοινώς αποκαλούνται κρίνα. Τα ελληνικά είδη ίριδας είναι τα εξής:

- *Iris albicans* (*I. florentina*)
- *Iris attica* (*I. falcata*, *I. pumila* subsp. *attica*)
- *Iris germanica* (*I. pallida*, *I. trojana*)
- *Iris hellenica*
- *Iris orientalis* (*I. monnierin*, *I. ochroleuca*, *I. spuria* subsp. *ochroleuca*)
- *Iris planifolia*
- *Iris pseudacorus*
- *Iris reichenbachii* (*I. athoa*, *I. balkana*)
- *Iris sintenisii* subsp. *sintenisii*
- *Iris suaveolens* (*I. rubromarginata*)
- *Iris tuberosa*
- *Iris unguicularis*
- *Iris unguicularis* subsp. *angustifolia*
- *Iris unguicularis* subsp. *carica*
- *Iris unguicularis* subsp. *cretensis* (*I. cretensis*, *I. cretica*, *I. humilis*)



A



B

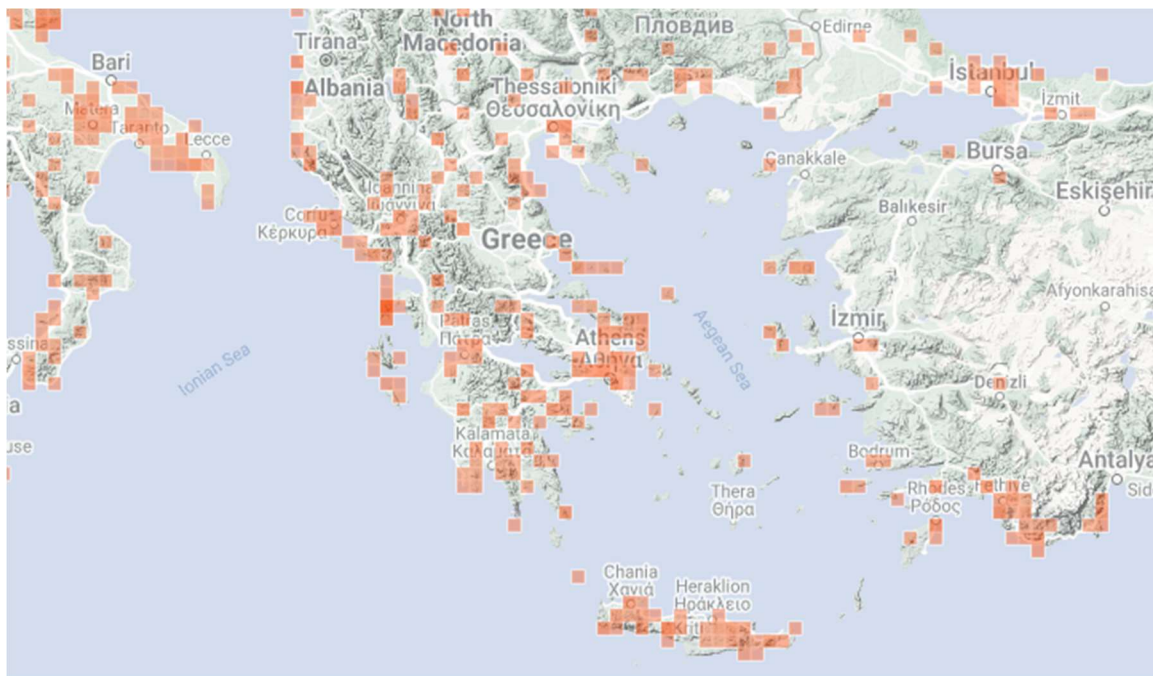


C



D

Εικόνα 1: A. *Iris germanica*, B. *Iris hellenica*, C. *Iris tuberosa*, D. *Iris unguicularis*.



Εικόνα 2: Χάρτης με τις τοποθεσίες που φύεται το γένος *Iris* στην Ελλάδα

1.2.1 Στοιχεία Δρογοϊστορίας

Η ονομασία του φυτού πηγάζει από τη θεά Ίριδα, την αρχαία ελληνική θεότητα του ουράνιου τόξου και αγγελιοφόρου των θεών, κυρίως του Δία και της Ήρας. Μετέφερε τα μηνύματα από το "μάτι του ουρανού" στη γη, χρησιμοποιώντας την καμπύλη του ουράνιου τόξου. Η λέξη *iris* σημαίνει "μάτι του ουρανού" και έτσι δόθηκε αυτό το όνομα στη θεά και εν συνεχεία στο λουλούδι και στην κόρη των ματιών μας.

Στην αρχαία Αίγυπτο το φυτό της ίριδας είχε συμβολικό χαρακτήρα και εκπροσωπούσε τη νίκη, την τάξη και τη δύναμη. Κατά τον 16^ο αιώνα π.χ. υπό την βασιλεία του Τουθμόσις Ι, ριζώματα και βολβοί του φυτού *Iris orientalis* βρέθηκαν στην Αίγυπτο από τη Συρία. Έτσι, άρχισε να εμφανίζεται σαν καλλιτεχνικό μοτίβο στα σκήπτρα των Φαραώ.

Στην αρχαία Ελλάδα, από την οποία πηγάζει και το όνομα του φυτού, μια από τις χαρακτηριστικότερες απεικονίσεις του είναι σε τοιχογραφία του Ακρωτηρίου στην Σαντορίνη (17^ο αιώνα π.Χ.), όπου απεικονίζεται η Ευρυδίκη, γυναίκα του Ορφέα, να προσπαθεί να ξεφύγει από τον Αρισταίο μέσα σε ένα λιβάδι. Δαγκωμένη από ένα δηλητηριώδες φίδι, απεικονίζεται ένα λουλούδι ίριδας στο κολλάρο γύρω από τον λαιμό της ως σύμβολο του επερχόμενου θανάτου της. Στην Τουρκία ήταν το φυτό προτίμησης για τάφους μέχρι και τον 20^ο αιώνα

(κυρίως ποικιλίες με μπλε φύλα). Αντιθέτως στην αρχαία Ιαπωνία οι μπλε ίριδες ήταν το σύμβολο του θάρρους και της τόλμης.

Κατά τη διάρκεια του μεσαίωνα, το φυτό χρησιμοποιήθηκε ως μοτίβο σε πολλούς θεολογικούς πίνακες και ταπετσαρίες για την προστασία έναντι της πονηριάς και της διαφθοράς του διαβόλου. Η αγία 'Birgitta' της Σουηδίας (1307-1373) αναφέρει τις μυτερές άκρες των φύλλων του φυτού σαν σύμβολο του πόνου της Παρθένου Μαρίας. Ανάμεσα στις χρονιές 1340-1800 μ.Χ. παρατηρήθηκαν άνθη ίριδας ως σύμβολο εξουσίας και ανδρείας, στα εμβλήματα της Σικελίας, Ουγγαρίας και της Βρετανίας. Το περιβόητο Γαλλικό έμβλημα (Fleur-de-Lys) πηγάζει από την *Iris florentina* και το παρουσίασε ο 'Louis VII' περί το 1150 μ.Χ. κατά τη διάρκεια της δεύτερης σταυροφορίας. Σε αυτό το έμβλημα και στα επερχόμενα εμβλήματα άλλων Γάλλων βασιλιάδων, τα 3 χρυσά λουλούδια της Ίριδας αναπαριστούσαν πίστη, σοφία και γενναιότητα. Τέλος, η Ίριδα κατέχει τη δεύτερη θέση, μετά το τριαντάφυλλο, σε διάφορα έργα τέχνης γνωστών ζωγράφων όπως οι Λεονάρντο Ντα Βίντσι, Ρενουάρ, Σεζάρ, Βαν Γκόγκ και φυσικά Κλοντ Μονέ. Ακόμη και σήμερα βρίσκει χρήση σε διάφορα λογότυπα εταιρειών και αθλητικών συλλόγων (Kandeler & Ullrich, 2009).

1.2.2 Στοιχεία Δρογοχημείας

Μία πληθώρα τμημάτων (φύλλα, ρίζες κλπ.) των φυτών του γένους *Iris* έχουν αποτελέσει αντικείμενο μελετών τα τελευταία 30 χρόνια και έχει αποδειχτεί ότι αποτελούν πλούσιες πηγές δευτερογενών μεταβολιτών. Παλαιότερα είχαν κύρια χρήση στην παραδοσιακή ιατρική, αργότερα σαν διακοσμητικά φυτά σε κήπους και πάρκα και πιο πρόσφατα μελετώνται για το ευρύ φάσμα των φαρμακολογικών δράσεών τους.

Η ρίζα είναι από τα πιο μελετημένα μέρη των ειδών *Iris*, με πιο χαρακτηριστική περίπτωση την περίπτωση των ριζών του *Iris germanica* που χρησιμοποιείται παραδοσιακά για δερματικές και στοματικές εφαρμογές, όπως σε εξανθήματα και φακίδες και ως αποσυμφορητικό για τον πονόδοντο. Αφεψήματα των ριζών του φυτού χρησιμοποιούνται ως αντισπασμωδικά, διουρητικά και ισχυρά καθαρτικά. Ριζώματα του *Iris dichotoma* Pall. (η Κινέζικη Bai She Gan) χρησιμοποιούνται παραδοσιακά για την ίαση φλεγμονών και διαταραχές του αναπνευστικού συστήματος, όπως επίσης και για την αποτοξίνωση του οργανισμού. Στην

Τουρκική παραδοσιακή ιατρική, τα ριζώματα των φυτών του γένους *Iris*, γνωστά και ως πανζυζ ή susen, χρησιμοποιούνται ως διουρητικά, καθαρτικά και για την αντιμετώπιση στομαχόπνου.

Επίσης, τα ριζώματα αποτελούν σημαντική πηγή αρωματικών ελαίων με πολύ ευχάριστες μυρωδιές. Σε συνδυασμό με το γεγονός ότι οι ρίζες πρέπει να αποξηραθούν για 3 έως 5 χρόνια, τα αρωματικά έλαια είναι από τα πιο ακριβά στην αγορά καθώς καθ' όλο αυτό το χρονικό διάστημα τα λιπαρά και τα έλαια διασπώνται και οξειδώνονται, απελευθερώνοντας αρωματικές ενώσεις, γνωστές ως 'Ιρόνες', οι οποίες έχουν την χαρακτηριστική μυρωδιά βιολετί λουλουδιών.

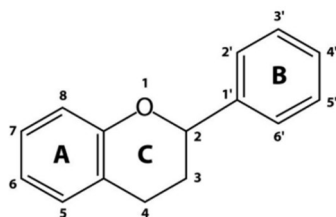
Οι προαναφερόμενες εκτενείς χρήσεις των ριζών των ειδών του γένους *Iris* δικαιολογούν το αυξημένο ερευνητικό ενδιαφέρον για τη μελέτη του χημικού περιεχομένου τους και τον εντοπισμό των μεταβολιτών που είναι υπεύθυνοι για τις αξιόλογες βιολογικές ιδιότητες και φαρμακολογικές δράσεις. Με τη βοήθεια των σύγχρονων τεχνικών απομόνωσης και ταυτοποίησης φυσικών προϊόντων, έχει απομονωθεί μια πληθώρα δευτερογενών μεταβολιτών που ανήκουν σε ποικίλες χημικές κατηγορίες, μεταξύ των οποίων ξεχωρίζουν τα φλαβονοειδή (κυρίως ισοφλαβόνες), οι κινόνες, οι ξανθόνες και C-γλυκοζίτες τους, τα απλά φαινολικά και βενζολικά παράγωγα, τα στεροειδή, οι γλυκοζίτες στυλβενίων και τα τερπενοειδή τύπου ιριδάλης (Singab *et al.*, **2016**) (Kukula-Koch *et al.*, **2015**).

1.2.2.1 Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή ανήκουν στην χημική τάξη των πολυφαινολών και αποτελούν μια από τις μεγαλύτερες χημικές κατηγορίες οργανικών ενώσεων στο φυτικό βασίλειο. Απαντώνται κυρίως στα ανώτερα φυτά και είναι υπεύθυνες για τον χρωματισμό ανθών και καρπών, αλλά βρίσκονται και σε άλλα μέρη του φυτού, όπως είναι οι ρίζες. Η ονομασία προέρχεται από τη λατινική λέξη 'flavus' που σημαίνει κίτρινο, λόγω του έντονου κίτρινου χρώματος τους στις περισσότερες των περιπτώσεων.

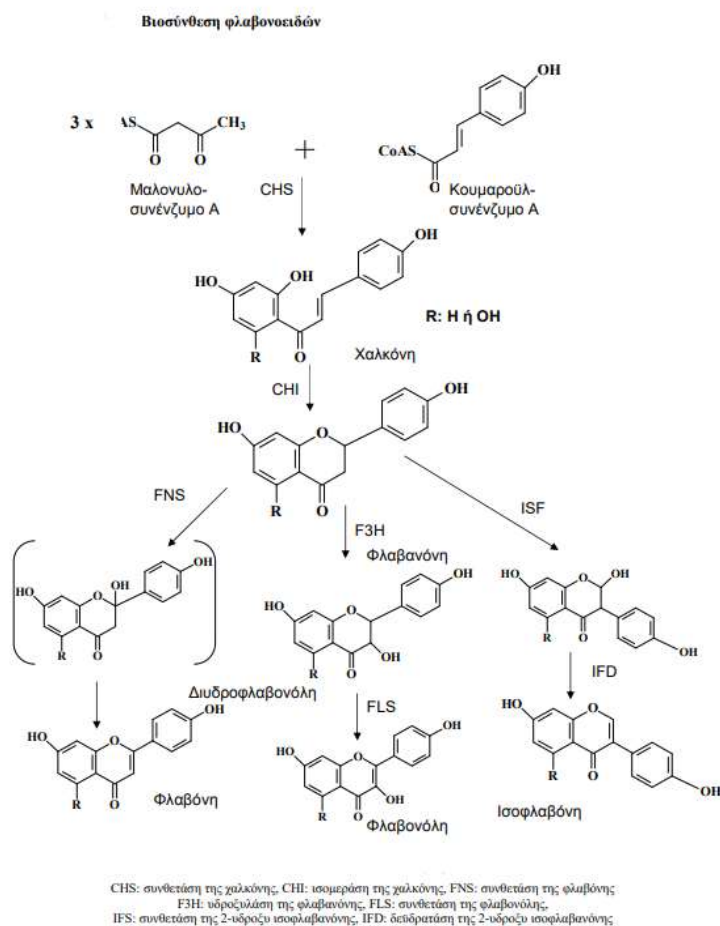
Η βασική χημική δομή των φλαβονοειδών είναι ένας σκελετός 15 ατόμων άνθρακα, διατεταγμένων σε δύο αρωματικούς δακτυλίους 6 ατόμων άνθρακα (A και B δακτύλιοι), οι

οποίοι συνδέονται μεταξύ τους με μια γέφυρα 3 ατόμων άνθρακα που καταλήγει στο σχηματισμό ενός ετεροκυκλικού πυρανικού δακτυλίου (C δακτύλιος) (Karak, 2019).



Εικόνα 3: Βασική δομή φλαβονοειδών

Πρόκειται για μια τεράστια κατηγορία χημικών ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους, τα οποία είναι παράγωγα του συνδυασμού των βιοσυνθετικών οδών του σικιμικού και του οξικού οξέος.

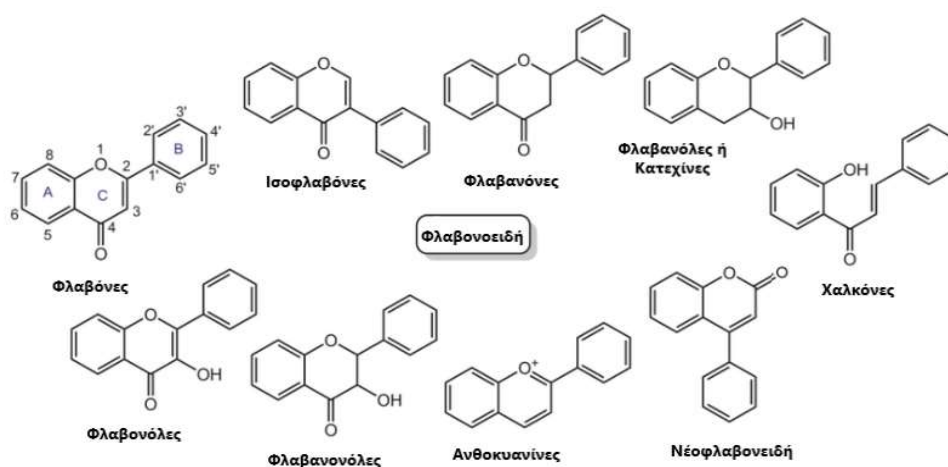


Εικόνα 4: Βιοσύνθεση κυριότερων ομάδων των φλαβονοειδών (Knaggs, 2003)

Απαντώνται είτε σε μορφή γενίνης (άγλυκου) είτε ως γλυκοζίτες, οι οποίοι προκύπτουν μετά από σύνδεση ενός ή περισσότερων σακχάρων στον βασικό σκελετό της γενίνης. Οι θέσεις σύνδεσης των σακχάρων είναι συνήθως οι θέσεις 3 ή/και 7 του βασικού σκελετού, ενώ συνήθως απαντώνται O- ή σπανιότερα C- γλυκοζιτικοί δεσμοί. Οι σακχαριδικές μονάδες που απαντώνται είναι κυρίως ραμνόζη, γλυκόζη, γαλακτόζη, αραβινόζη και ξυλόζη.

Τα φλαβονοειδή μπορούν να χωριστούν σε διάφορες υποκατηγορίες ανάλογα με την θέση σύνδεσης των δακτυλίων B και C, όπως επίσης και στην βάση του βαθμού ακορεστότητας του B δακτυλίου, τον βαθμό οξειδωσης του δακτυλίου C και το είδος των υποκαταστατών στους δακτυλίους A, B και C.

Φλαβονοειδή στα οποία ο B δακτύλιος συνδέεται στη θέση C-3 του C δακτυλίου ονομάζονται ισοφλαβόνες, ενώ τα παράγωγα στα οποία ο B δακτύλιος συνδέεται με τον C-4 του C δακτυλίου είναι γνωστά ως νεοφλαβονοειδή. Ωστόσο, η μεγαλύτερη ομάδα των φλαβονοειδών, τα οποία χαρακτηρίζονται από τη σύνδεση του B δακτυλίου στη θέση C-2 του C δακτυλίου, κατηγοριοποιείται στις ακόλουθες υποομάδες: φλαβόνες, φλαβανόνες, φλαβονόλες, φλαβανονόλες, φλαβανόλες (ή κατεχίνες) και ανθοκυανίνες. Τέλος, στα φλαβονοειδή με ανοιχτό τον C δακτύλιο κατατάσσονται οι χαλκόνες.

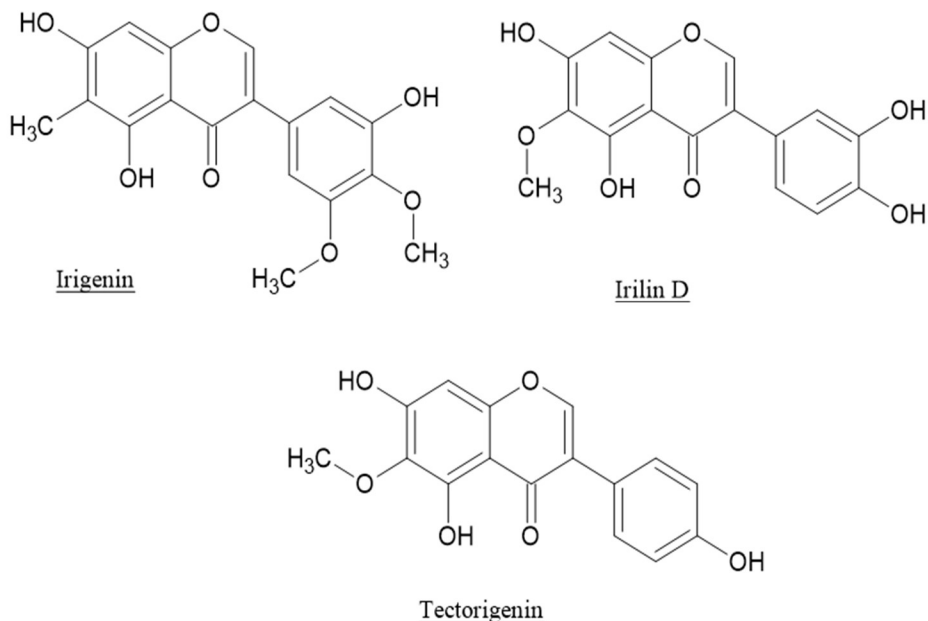


Εικόνα 5: Ταξινόμηση φλαβονοειδών

1.2.2.1.1 Ισοφλαβόνες

Οι Ισοφλαβόνες βρίσκουν ευρεία χρήση στην παραδοσιακή και σύγχρονη ιατρική. Η παρουσία τους στο φυτικό βασίλειο είναι πιο περιορισμένη, σε σύγκριση με τα κοινά φλαβονοειδή, καθώς απαντώνται κυρίως στη σόγια και άλλα οσπριοειδή, ενώ έχουν εντοπιστεί και σε μικροοργανισμούς. Είναι η πρώτη κατηγορία δευτερογενών μεταβολιτών που απομονώθηκαν από το γένος *Iris*. Έως σήμερα, έχουν αναφερθεί 85 ισοφλαβόνες που έχουν απομονωθεί από το φυτό του γένους *Iris*, είτε ως άγλυκα είτε ως γλυκοζίτες (Iwashina & Mizuno, 2020).

Οι ισοφλαβόνες συσσωρεύονται κυρίως στα ριζώματα, αλλά σε αρκετές περιπτώσεις ανευρίσκονται και στα φύλλα ορισμένων ειδών π.χ. *I. pseudacorus* (Hanawa *et al.*, 1991). Δρουν προστατευτικά κατά του καρκίνου και εμφανίζουν αντιβακτηριακή (Orhan *et al.*, 2003), αντιφλεγμονώδη (Atta-Ur-Rahman *et al.*, 2003) και ανασταλτική δράση έναντι της cGMP-φωσφοδιεστεράσης (Nikaido *et al.*, 1982). Ακολουθούν οι δομές αντιπροσωπευτικών ισοφλαβονών που έχουν απομονωθεί από φυτά της οικογένειας Iridaceae.



Εικόνα 6: Χημικές δομές των Ισοφλαβονών Irogenin, Irilin D και Tectorigenin

Η Iriogenin (Ιριγενίνη) έχει απομονωθεί από πολλά είδη *Iris*, όπως το *I. germanica* (Atta-Ur-Rahman *et al.*, **2003**), ενώ έχει μελετηθεί εκτενώς για την αντικαρκινική της δράση έναντι του παγκρεατικού καρκίνου με υποσχόμενα αποτελέσματα (Wanggang Xu *et al.*, **2021**). Η Iriilin D έχει απομονωθεί από την *Belamcanda chinensis* (L.) (Zhang *et al.*, **2011**), ενώ η Tectorigenin έχει εντοπισθεί σε εκχυλίσματα ριζών της *I. kashmiriana* και έχει μελετηθεί για την ισχυρή κυτοτοξική δράση της και την ικανότητα αναστολής του πολλαπλασιασμού επιθήλιακών καρκινικών κυτταρικών σειρών (A549 και Caco-2) (Amin *et al.*, **2013**).

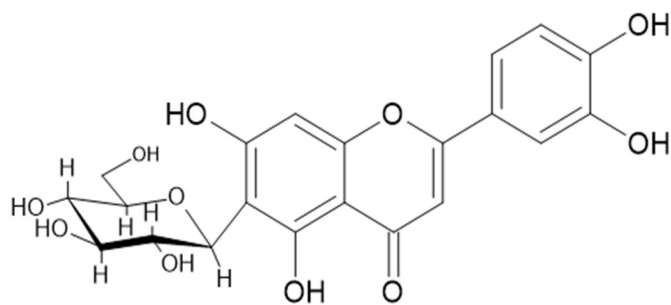
1.2.2.1.2 Νεοφλαβονοειδή

Στα νεοφλαβονοειδή ο δακτύλιος B συνδέεται με τον C στη θέση 4, ενώ στη θέση 2 συναντάται μια καρβονυλομάδα. Η πρώτη απομονωμένη νεοφλαβόνη από φυσικές πηγές ήταν η καλοφιλολίδη (calophyllolide). Η απομόνωση έγινε το 1951 από σπόρους του είδους *Calophyllum inophyllum*. Η συγκεκριμένη υποκατηγορία φλαβονοειδών δεν απαντάται σε φυτά του γένους *Iris* (Iwashina & Mizuno, **2020**).

1.2.2.1.3 Φλαβόνες

Οι φλαβόνες δομικά στερούνται μια υδροξυλομάδα στη θέση 3 του δακτυλίου C. Έχουν διπλό δεσμό μεταξύ των θέσεων 2 και 3 και καρβονύλιο στη θέση 4 του δακτυλίου C. Εμφανίζονται ευρέως σε φύλλα, άνθη και καρπούς ως γλυκοζίτες. Το σέλινο, ο μαϊντανός, οι κόκκινες πιπεριές, το χαμομήλι, η μέντα και το *Ginkgo biloba* είναι από τις σημαντικότερες πηγές φλαβονών. Η λουτεολίνη (luteolin), η απιγενίνη (apigenin) και η τανγκεριτίνη (tangeritin) ανήκουν σε αυτήν την υποκατηγορία φλαβονοειδών (Panche *et al.*, **2016**).

Στο γένος *Iris*, μέχρι το 2008, είχαν απομονωθεί μόνο 2 άγλυκα φλαβονών, η techtochrysin (*I. Lacteal*, *I. Songarica*) και η wogonin (*I. Songarica*) (Wang *et al.*, **2010**). Αντιθέτως, γλυκοζίτες φλαβονών αποτελούν βασικά συστατικά των φυτών του γένους *Iris* και απαντώνται κυρίως στα φύλλα και τα άνθη όλων των ειδών. Είναι γνωστοί 11 γλυκοζίτες φλαβονών (C-Glycosyflavones ή O-Glycosylflavones), στους οποίους το σάκχαρο συνήθως συνδέεται με τον C-6 ή τον C-7 της γενίνης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα γλυκοζίτη φλαβόνης που έχει απομονωθεί από το *I. germanica* είναι η ισοοριεντίνη (Isoorientin) (Asa Kawase, **1968**).



Isoorientin

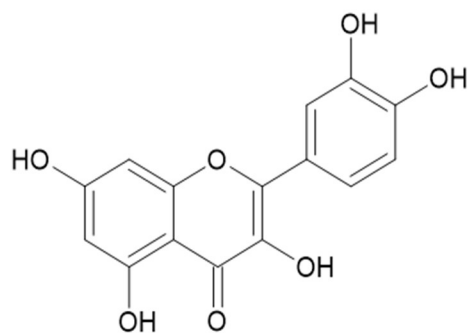
Εικόνα 7: Χημική δομή του γλυκοσίδη της Isoorientin

1.2.2.1.4 Φλαβονόλες

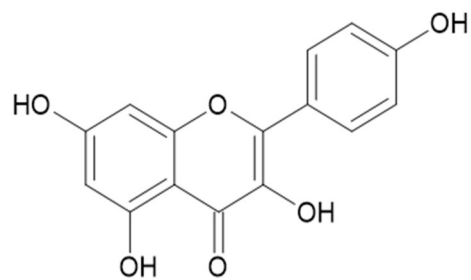
Οι φλαβονόλες είναι φλαβονοειδή με μια υδροξυλομάδα στη θέση 3 και μια καρβονυλομάδα στη θέση 4 του δακτυλίου C. Εμφανίζονται σε αφθονία σε μια ποικιλία ειδών του γένους *Iris*. Οι πιο μελετημένες φλαβονόλες είναι η καιμπφερόλη (kaempferol), η κερκετίνη (quercetin), η μυρικετίνη (myricetin), οι οποίες απαντώνται σε αρκετά είδη *Iris*, όπως τα *I. bracteata*, *I. douglasiana* και *I. innominata*. Η πρόσληψη φλαβονολών συσχετίζεται με ένα ευρύ φάσμα ευεργετικών επιδράσεων στην υγεία του ανθρώπου, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες που σχετίζονται με τη μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων (Panche *et al.*, 2016).

Έχουν εντοπισθεί σε περισσότερα από 24 είδη *Iris*, τόσο ως απλές φλαβονόλες όσο και με τη μορφή μεθοξυλιωμένων παραγώγων, όπως είναι οι ενώσεις ραμναζίνη και ραμνοσιτρίνη που απομονώθηκαν από τα ριζώματα των ειδών *I. domestica* και *I. tectorum*. Παρόμοιες ουσίες βρέθηκαν και στην *I. Milesii*, ενώ 2 σπάνιες φλαβονόλες εντοπίστηκαν στην *I. germanica* (5,2'-dihydroxy-3-methoxy-6,7-methylenedioxyflavone και η 3'-isobutenyl quercetin) (Iwashina & Mizuno, 2020).

Απλές και γνωστές φλαβονόλες που έχει απομονωθεί από πολλά φυτά *Iris* (*I. germanica*, *I. humilis*, *I. graminea*, *I. foresti*, *I. pseudopumila* κ.α.) είναι η κερκετίνη (quercetin) και η καιμπφερόλη (kaempferol) (Iwashina & Mizuno, 2020)



Quercetin

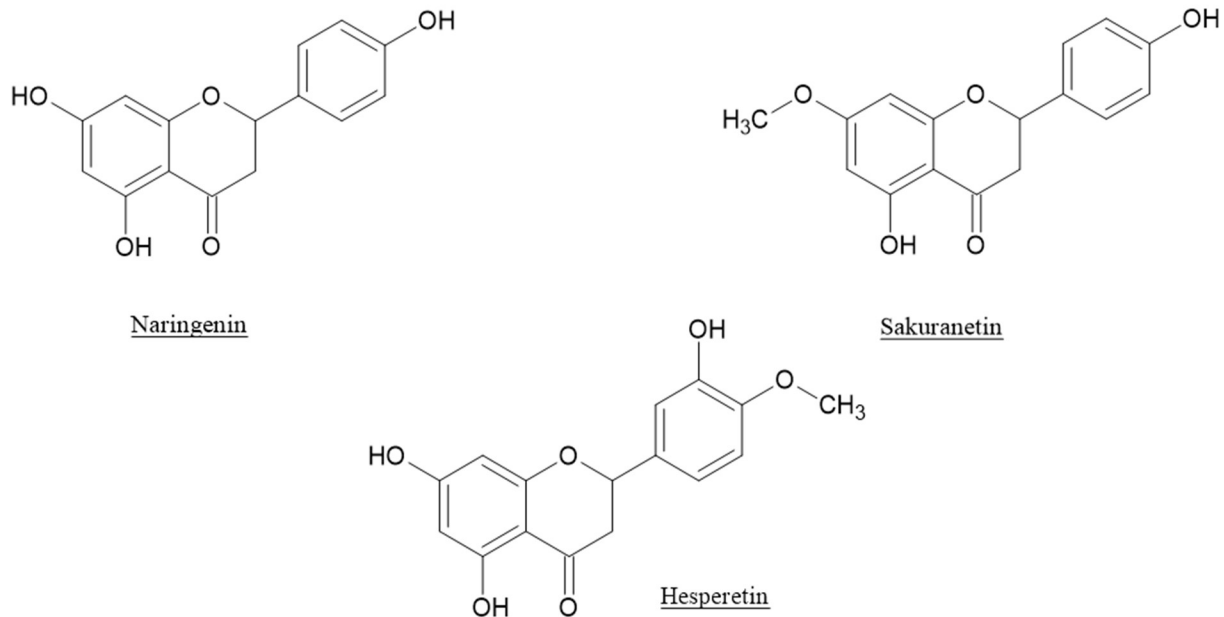


Kaempferol

Εικόνα 8: Χημικές δομές των φλαβονολών Quercetin και Kaempferol

1.2.2.1.5 Φλαβανόνες

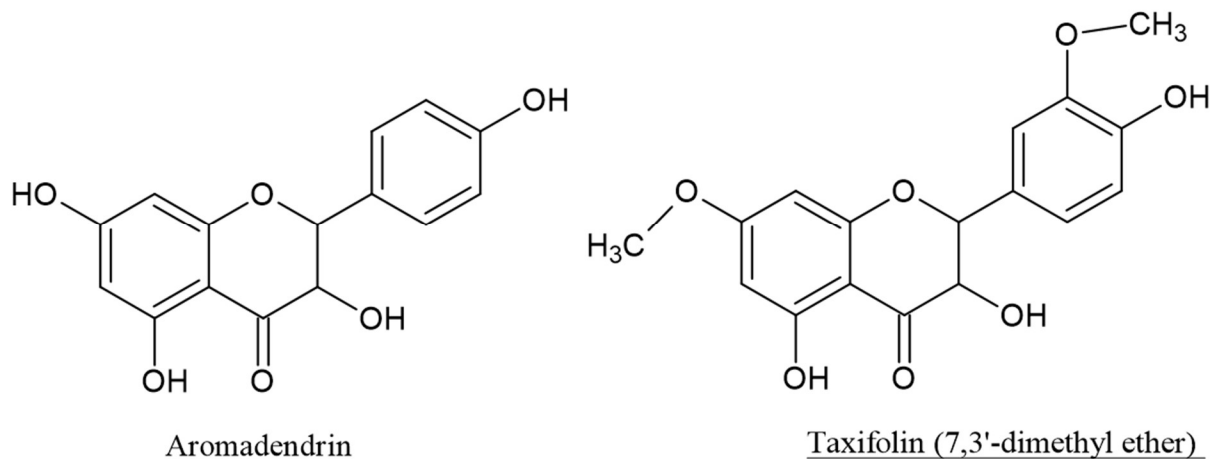
Οι φλαβανόνες, οι οποίες ονομάζονται επίσης και διυδροφλαβόνες, έχουν το δακτύλιο C κορεσμένο και ως εκ τούτου, σε αντίθεση με τις φλαβόνες, ο δεσμός μεταξύ των θέσεων 2 και 3 είναι κορεσμένος. Αυτή είναι η μόνη δομική διαφορά μεταξύ των δύο υποομάδων των φλαβονοειδών. 14 φλαβανόνες σε άγλυκη μορφή έχουν βρεθεί σε 8 είδη *Iris*, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται η ναριγγενίνη (ρίζες *I. domestica*), καθώς επίσης η σακουρανετίνη και η εσπερετίνη που συναντώνται συνήθως σε εσπεριδοειδή (*I. milesii*, *I. crocea*, *I. germanica* (Bhat, **2014**) και *I. tectorum*) (SHU *et al.*, **2010**). Ακόμη, 5 σπάνιες φλαβανόνες έχουν απομονωθεί από τις ρίζες του *I. loczyi* (ή *I. tenuifolia*) (Kojima *et al.*, **1997**). Αντίθετα, δεν έχουν εντοπισθεί φλαβανόνες στα φύλλα των φυτών του είδους *Iris* (Iwashina & Mizuno, **2020**).



Εικόνα 9: Χημικές δομές των φλαβανονών Naringenin, Sakuranetin και Hesperetin.

1.2.2.1.6 Φλαβανόλες ή Κατεχίνες

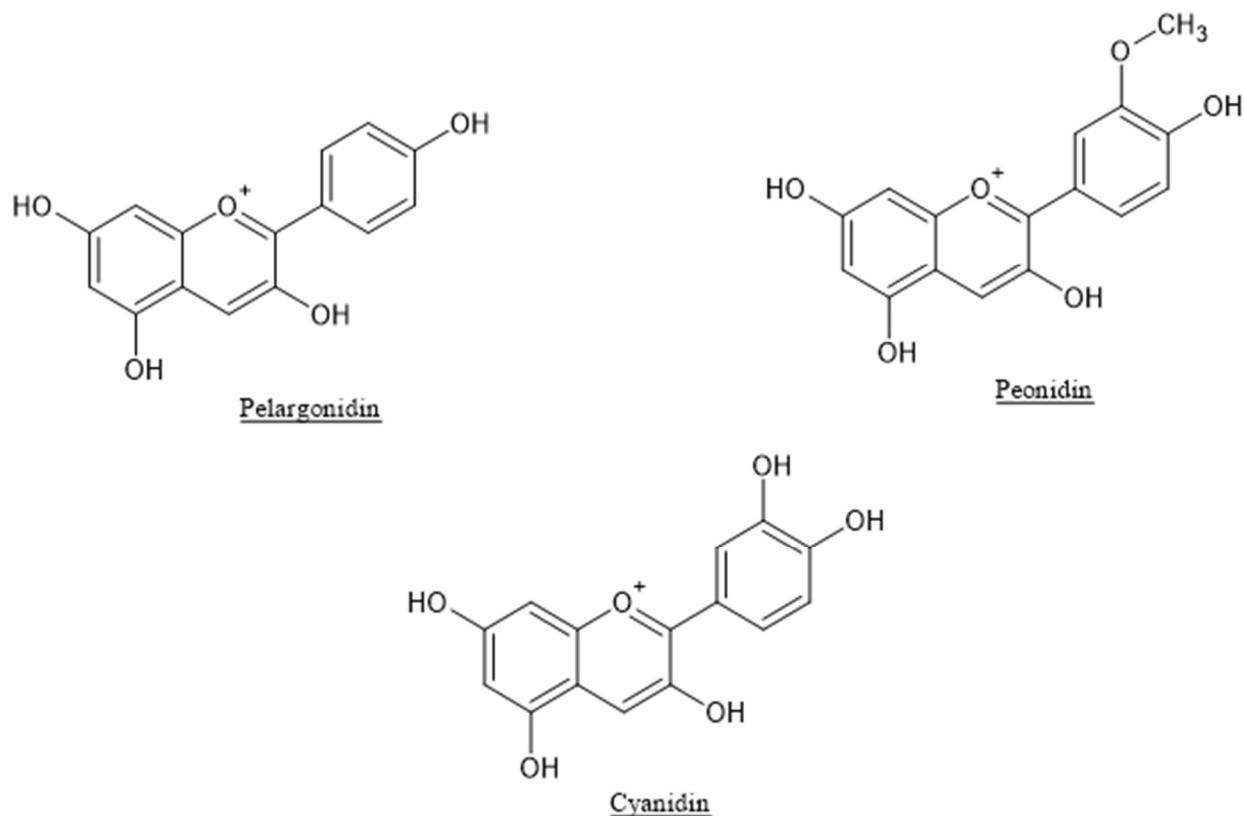
Οι φλαβανόλες, οι οποίες είναι γνωστές επίσης ως διυδροφλαβονόλες ή κατεχίνες, είναι 3-υδροξυ- παράγωγα των φλαβανονών. Είναι μια πολύ διαφοροποιημένη και πολυ-υποκατεστημένη υποομάδα φλαβονοειδών. Οι φλαβανόλες αναφέρονται επίσης και ως φλαβαν-3-όλες, καθώς μία ομάδα υδροξυλίου είναι πάντα συνδεδεμένη στη θέση 3 του δακτυλίου C. Σε αντίθεση με πολλά φλαβονοειδή, δεν υπάρχει διπλός δεσμός μεταξύ των θέσεων 2 και 3. Οι φλαβανόλες εντοπίζονται σε αφθονία σε μπανάνες, μήλα, βατόμουρα, ροδάκινα και αχλάδια. Πολλές διυδροφλαβονόλες (11) έχουν εντοπιστεί σε 8 είδη *Ίρις*, οι οποίες απομονώθηκαν κυρίως σε μορφή αγλύκων, όπως είναι ο 7,3'-διμεθυλαιθέρρα της ταξιφολίνης (SHU *et al.*, **2010**) που έχει απομονωθεί από τα είδη *I. dichotoma* και *I. Tectorum* (Huang *et al.*, **2011**). Ωστόσο, απαντώνται και με τη μορφή γλυκοζιτών, όπως είναι ο 7-O-γλυκοσίδης της αρωμαδενδρίνης που έχει εντοπισθεί στο είδος *I. tectorum* (SHU *et al.*, **2010**). Στην ταξιφολίνη έχουν αποδοθεί πολλές φαρμακολογικές δράσεις, μεταξύ των οποίων ξεχωρίζουν η αντικαρκινική, η αντιδιαβητική, η ήπατοπροστατευτική, η καρδιοπροστατευτική, η συμβολή στην καταπολέμηση του Alzheimer και η δράση της ενάντια στην ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς κυλίδας (AMD, Age-related macular degeneration) (Xie *et al.*, **2017**)



Εικόνα 10: Χημικές δομές των φλαβονολών, Aromadendrin και Taxifolin 7,3'-dimethyl ether

1.2.2.1.7 Ανθοκυανίνες

Οι ανθοκυανίνες είναι χρωστικές ουσίες που ευθύνονται για τα χρώματα στα φυτά και τα φρούτα. Η κυανιδίνη (Cyanidin), η δελφινιδίνη (delphinidin), η μαλβιδίνη (malvidin), η πελαργονιδίνη (pelargonidin) και η παιωνιδίνη (peonidin) είναι οι πιο συχνά απαντώμενες ανθοκυανίνες, καθώς και οι πιο δημοφιλείς στη συμβολή του χρώματος των ανθέων και των καρπών. Το χρώμα της ανθοκυανίνης εξαρτάται από το pH, καθώς και από τη μεθυλίωση ή την ακυλίωση στις ομάδες υδροξυλίου των δακτυλίων A και B (Iwashina, 2013). Ο λόγος για τον οποίο υπάρχει ποικιλία ανθοκυανινών στα φυτά της οικογένειας Iridaceae είναι ότι τα διαφορετικά και ποικίλα χρώματα των φυτών προσελκύουν μια μεγάλη ποικιλία επικονιαστών, της μέλισσας, σκαθάρια, πεταλούδες και μικρά πτηνά. Ο μπλε χρωματισμός αποτελεί μεγαλύτερη προτίμηση της τις μέλισσας, για αυτό το λόγο στα φυτά του γένους *Iris* είναι πιθανή ύπαρξη ανθοκυανίνης που αποτελεί παράγωγο της δελφινιδίνης, η οποία με τη βοήθεια φλαβονών μετατρέπει το μωβ χρώμα σε μπλε. Έχουν ανακαλυφθεί περίπου 95 χρωστικές σε 30 είδη Iridaceae και απαντώνται συχνότερα με μορφή γλυκοζιτών. Η πιο γνωστή ανθοκυανίνη που απαντάται σε όλο το φυτικό βασίλειο είναι η κυανιδίνη, ενώ και άλλες πολύ γνωστές ανθοκυανίνες όπως η πελαργονιδίνη και η πεονίνη έχουν απομονωθεί από τα φύλλα των ειδών *I. dichotoma* και *I. domestica* (Wenji Xu et al., 2018).



Εικόνα 11: Χημικές δομές ανθοκυανίνων, Pelargonidin, Peonidin και Cyanidin

Εκτός από φυτά του γένους *Iris* εμφανίζονται κυρίως στις φλούδες διάφορων φρούτων, όπως είναι διάφορα είδη μούρων, η μαύρη σταφίδα, τα κόκκινα σταφύλια και οι φράουλες. Η σταθερότητα σε συνδυασμό με τα οφέλη για την υγεία του ανθρώπου αποτελούν δύο βασικούς λόγους για την ένταξή τους στη βιομηχανία των τροφίμων σε μια ποικιλία εφαρμογών.

1.2.2.1.8 Χαλκόνες

Χαρακτηρίζονται από την απουσία του δακτυλίου C του βασικού σκελετού των флаβονοειδών (Εικόνα 1). Για το λόγο αυτό αναφέρονται και ως флаβονοειδή ανοιχτής αλυσίδας. Οι χαλκόνες και τα παράγωγά τους έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον των ερευνητών επειδή παρουσιάζουν πολλά θρεπτικά και βιολογικά οφέλη (Panche *et al.*, 2016).

Συγκεκριμένα οι χαλκόνες διαθέτουν αντιμικροβιακές ιδιότητες, οι οποίες εκδηλώνονται μέσω της απενεργοποίησης μικροβιακών ενζύμων, πρωτεϊνών αγγελιοφόρους, βακτηριακών μεμβρανών κ.α. (Karak, 2019). Χαρακτηριστικά παραδείγματα χαλκονών αποτελούν η

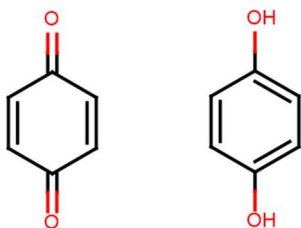
φλοριντζίνη (phloridzin), η φλορετίνη (phloretin) και η χαλκοναρινγενίνη (chalconaringenin). Οι χαλκόνες εντοπίζονται σε σημαντικές ποσότητες σε ντομάτες, αχλάδια, φράουλες και ορισμένα προϊόντα σιταριού.

1.2.2.2 Κινόνες

Οι κινόνες είναι μία ομάδα αρωματικών δικετονών, στις οποίες τα άτομα του άνθρακα των καρβονυλικών ομάδων αποτελούν μέρος του αρωματικού δακτυλίου. Προέρχονται από το βενζόλιο και τα παράγωγά του, με αντικατάσταση δύο ατόμων υδρογόνου από δύο άτομα οξυγόνου. Είναι σώματα κρυσταλλικά, τα οποία έχουν έντονη οσμή και χαρακτηρίζονται τόσο από το έντονο κίτρινο ή κόκκινο χρώμα τους, όσο και από το γεγονός ότι ανάγονται εύκολα προς διϋδροφαινόλες. Τα δύο πιο χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτής της ομάδας είναι η υδροκινόνη και η π-βενζοκινόνη.

Μεγάλος αριθμός π-βενζοκινονών έχουν απομονωθεί από φυτά του γένους *Iris* (π.χ. *I. bungee*) και χρησιμοποιούνται ευρέως στην Κινέζικη σύγχρονη ιατρική ως αντικαρκινικοί παράγοντες (Atta-ur-Rahman *et al.*, **2000**). Έξι π-βενζοκινόνες μαζί με την ιρισοκίνη (*Irisoquin*) έχουν απομονωθεί από της ρίζες του είδους *I. Kumsonensis*. Η ιρισοκίνη είναι γνωστή κυτταροτοξική κινόνη που έχει απομονωθεί και από το εξανικό εκχύλισμα του είδους *I. missouriensis* (Williams & Harborne, **1985**).

Μια άλλη σημαντική υποκατηγορία ενώσεων των κινονών είναι οι άνθρακινόνες, οι οποίες όμως δεν απαντώνται στο γένος *Iris* αλλά εντοπίζονται συχνά στο γένος *Gladiolus*.

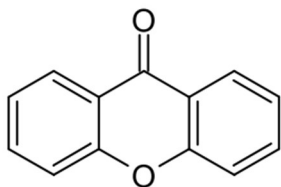


p-βενζοκινόνη

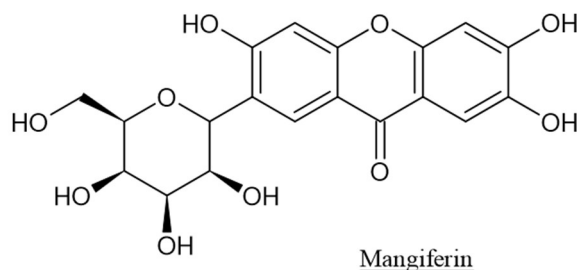
υδροξυκινόνη

Εικόνα 12 : Χημικές δομές των κινονών p-βενζοκινόνη και υδροξυκινόνη

1.2.2.3 Ξανθόνες

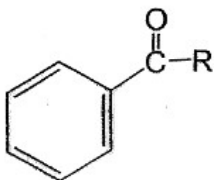


Οι ξανθόνες αποτελούν μία από τις μεγαλύτερες κατηγορίες ενώσεων στη χημεία των φυσικών προϊόντων. Έχουν απομονωθεί από ανώτερα φυτά, μύκητες, φτέρες και λειχήνες, ενώ διαθέτουν αξιοσημείωτες φαρμακολογικές δράσεις, μεταξύ των οποίων ξεχωρίζουν οι αντικαρκινικές ιδιότητες. Τα είδη *Iris* είναι πλούσιες πηγές ξανθονών, οι οποίες απαντώνται συνήθως με τη μορφή C-γλυκοσιδών. 15 Ξανθόνες έχουν απομονωθεί από φυτά του γένους *Iris*, από τις οποίες οι 9 αποτελούν C-γλυκοζίτες. Από τις πιο δημοφιλείς ξανθόνες είναι η μανγιφερίνη και η ισομανγιφερίνη, οι οποίες δεν είναι μόνο διαδεδομένες είδη του γένους *Iris* αλλά και σε ολόκληρο το φυτικό βασίλειο (Zhang *et al.*, 2011). Όσον αφορά το γένος *Iris* έχουν εντοπισθεί σε 41 και 31 είδη, αντίστοιχα. Άλλες ξανθόνες που έχουν ταυτοποιηθεί είναι οι 3,7- dimethoxy- 1,6-dihydroxyxanthone, desmethylbellidifolin , norathriol , nigricanside, bellidifolin και 7- O- methylmangiferin, οι οποίες απομονώθηκαν από το ρίζωμα του είδους *I. nigricans*. Επίσης η ένωση 'nigricanside' έχει απομονωθεί από τα είδη *I. dichotoma* και *I. domestica* (Iwashina & Mizuno, 2020).



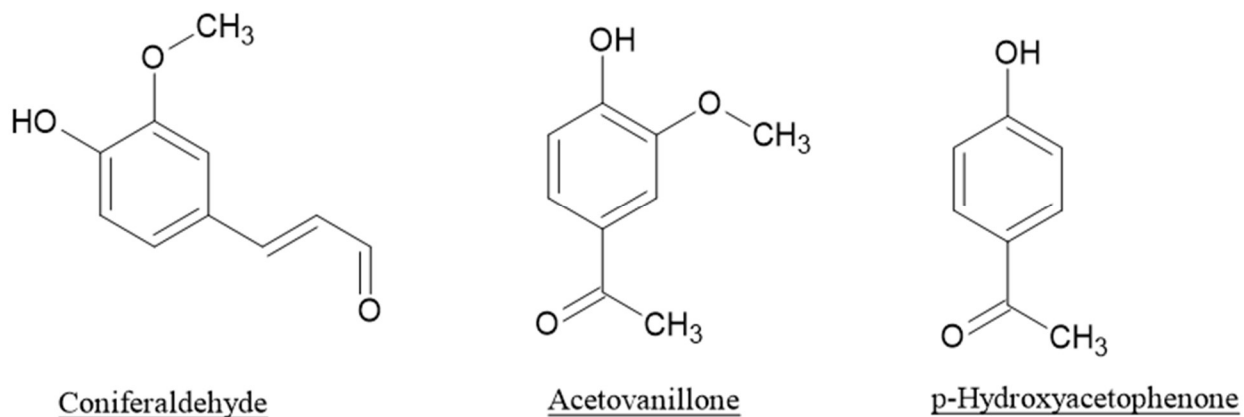
Εικόνα 13: Χημική δομή του C-γλυκοσίδη Magniferin

1.2.2.4 Απλά Φαινολικά και Βενζολικά Παράγωγα



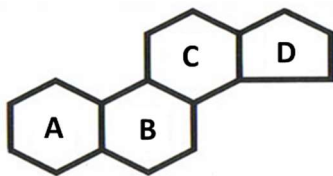
Οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν τη μεγαλύτερη κατηγορία φυτικών δευτερογενών μεταβολιτών. Τα φυτικά είδη του γένους *Iris* περιέχουν έναν μεγάλο αριθμό απλών φαινολικών παραγώγων, τα οποία συνεισφέρουν στις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των φυτών, ενώ επίσης συμβάλλουν και σε πολλές άλλες βιολογικές δράσεις. Στην κατηγορία των παραγώγων του βενζολίου ανήκουν οι

ακετοφαινόνες, οι οποίες απαντώνται σε διάφορα είδη *Iris*, αλλά το μεγαλύτερο ποσοστό τους έχει αναφερθεί στο ρίζωμα του *I. germanica*. (Kukulica-Koch et al., 2015). Άλλες φαινολικές ενώσεις που έχουν απομονωθεί από φυτά *Iris* είναι η ακετυλοβανιλλόνη, η π-υδροξυ-ακετοφαινόνη και η κονειφεραλδεύδη από τις ρίζες της *I. Suaveolens*, οι οποίες μελετήθηκαν για την αντιοξειδωτική τους δράση (Hacıbekiroğlu & Kolak, 2011)



Εικόνα 14: Χημικές δομές των απλών φαινολικών παραγώγων Coniferaldehyde, Acetovanillone και p-Hydroxyacetophenone

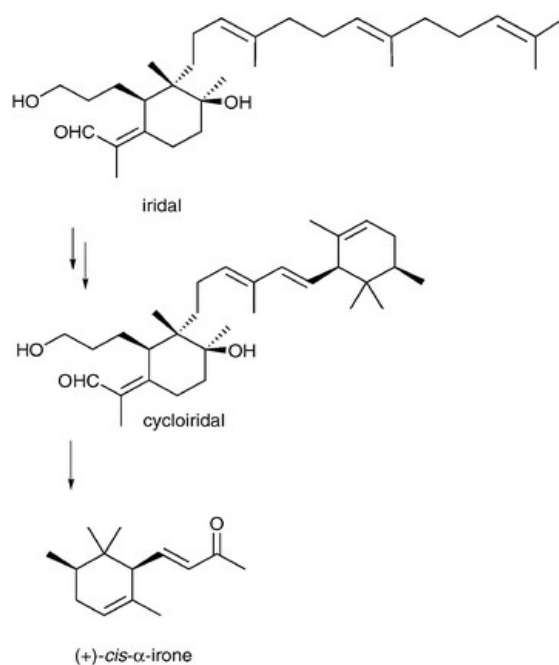
1.2.2.5 Στεροειδή



Ως στεροειδή χαρακτηρίζονται οι οργανικές ενώσεις, οι οποίες αποτελούν παράγωγα του κυκλοπεντανοϋπερυδροφαινανθρενίου. Αποτελούνται δηλαδή, από τους τρεις δακτύλιους του υπερυδροφαινανθρενίου (A, B και C), με τους οποίους συμπυκνώνεται ένας τέταρτος κυκλοπεντανικός δακτύλιος (D). Στα στεροειδή συγκαταλέγονται ενώσεις μεγάλης βιολογικής σημασίας, μεταξύ των οποίων είναι οι στερόλες, τα χολικά οξέα, οι ορμόνες του φύλου (οιστρογόνα και ανδρογόνα), παράγωγα της βιταμίνης D και το άγλυκο τμήμα των καρδιοτονωτικών γλυκοζιτών. Στα φυτά *Iris*, σε αντίθεση με τις αρωματικές ενώσεις που υπάρχουν σε αφθονία, τα στεροειδή έχουν απομονωθεί μόνο από εκχυλίσματα των ριζών των ειδών *I. germanica* (Ibrahim et al., 2012) και *I. suaveolens* (Hacıbekiroğlu & Kolak, 2011).

1.2.2.6 Τερπενοειδή

Τα φυτά του γένους *Iris* περιέχουν μια χαρακτηριστική ομάδα τριτερπενίων, τα οποία είναι γνωστά ως ιριδάλες (Marner *et al.*, 1982). Από το 1982, έχουν καταγραφεί περίπου 30 μέλη αυτής της κατηγορίας στο γένος *Iris*. Οι Ιριδάλες μπορεί να εστεροποιηθούν με λιπαρά οξέα στο -OH της θέσεως C-3 (Seki *et al.*, 1994). Μερικές από αυτές τις ενώσεις μετά από οξειδωτική διάσπαση μετατρέπονται στις αντίστοιχες ιρόνες, οι οποίες ευθύνονται για το χαρακτηριστικό άρωμα (όμοιο με εκείνο της βιολέτας) του αιθέριου ελαίου της ίριδος που χρησιμοποιείται ευρύτατα στην αρωματοποιία (Bonfils *et al.*, 1995). Οι ιρόνες είναι αρωματικά συστατικά που απελευθερώνονται μετά από οξειδωτικές και μεταβολικές διαδικασίες αποικοδόμησης λιπών και ελαίων στο ρίζωμα των φυτών.



Εικόνα 15: Μετατροπή Ιριδαλών σε αρωματικές Ιρόνες.

1.2.3. Δρογοφαρμακολογία

1.2.3.1. Φαρμακολογικές δράσεις και χρήσεις των φυτών του γένους *Iris* στην λαϊκή ιατρική

Για χιλιετίες, τα φαρμακευτικά φυτά είναι αναγνωρισμένα ως πολύτιμη πηγή φυσικών συστατικών με ισχυρές θεραπευτικές ιδιότητες. Ακόμη και σήμερα, οι δευτερογενείς μεταβολίτες που απομονώνονται και ταυτοποιούνται από τα εκχυλίσματα αυτών των φυτών συνεχίζουν να αποτελούν πηγή έμπνευσης για την δημιουργία νέων συνθετικών φαρμάκων. Επίσης, η ευρεία και πολλές φορές ανεξέλεγκτη χρήση των συνθετικών φαρμάκων έχει κάνει τους καταναλωτές δύσπιστους ως προς την ποιότητα, την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητά τους. Σε αντίθεση, τα φυσικά προϊόντα είναι φιλικά ως προς το περιβάλλον και την ανθρώπινη βιολογία, καθώς αναγνωρίζονται εύκολα από τα κύτταρα του ανθρώπινου σώματος χωρίς να προκαλούν προβλήματα στην μεταβολική τους δραστηριότητα. Ως αποτέλεσμα των παραπάνω, τα φαρμακευτικά και αρωματικά φυτά που έχουν χρησιμοποιηθεί παραδοσιακά από διάφορους πολιτισμούς στο πέρασμα των αιώνων αποτελούν αστείρευτη πηγή δραστικών φαρμακευτικών ουσιών, οι οποίες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε μοντέρνες φαρμακοτεχνικές μορφές. Τα φυτά του γένους *Iris*, τα οποία αποτελούν μια τέτοια πηγή, χρησιμοποιούνται στην λαϊκή ιατρική από αρχαιοτάτων χρόνων (Singab *et al.*, 2016).

Φυτά του γένους *Iris* έβρισκαν χρήση στην καθημερινότητα του ανθρώπου για την αντιμετώπιση διάφορων ασθενειών όπως το κρουολόγημα, η ελονοσία, πονόδοντους, μελανιές και εγκαύματα (Lin *et al.*, 2002). Εκχυλίσματα των ριζών του είδους *I. germanica* έχουν χρησιμοποιηθεί για τις θεραπευτικές τους ιδιότητες ως αντισπασμωδικά, για επιβράδυνση των συμπτωμάτων της μετεμμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης, ως διουρητικά και καθαρτικά έναντι σε μολύνσεις της χοληδόχου κύστης. Άλλες εφαρμογές των εκχυλισμάτων είναι η αντιμετώπιση του υψηλού πυρετού, της διόγκωσης του ήπατος και της καταρροής. Επιπλέον, είχαν πολύ σημαντικό ρόλο σε θεραπείες αιματολογικής κάθαρσης και στην αντιμετώπιση αφροδίσιων νοσημάτων (Hanawa *et al.*, 1991)(Atta-Ur-Rahman *et al.*, 2003).

Το ‘Rhizoma Iridis’, μία δρόγη που αποτελείται από μικρά αποξηραμένα κομμάτια των *I. germanica*, *I. pallida* και *I. florentina*, έχει προσελκύσει το καταναλωτικό ενδιαφέρον και χρησιμοποιείται ως εμετικό, αποχρεμπτικό, διουρητικό, καθαρτικό και τονωτικό.

Κονιοποιημένες ρίζες της *I. germanica* βρίσκουν χρήση ως συστατικά σε οδοντόπαστες με καταπραϋντική δράση απέναντι στον πονόδοντο (Rigano *et al.*, 2006)(Wollenweber *et al.*, 2003).

Στην Ευρώπη λαϊκοί θεραπευτές συστήνουν τη χρήση του υδατικού εκχυλίσματος των ριζών της *I. germanica* κατά της αρθρίτιδας (Adams *et al.*, 2009). Στο Ιράν, μικρές δόσεις του “Irsa” (ένα κοινό όνομα που απονέμεται σε φαρμακευτικά φυτά του γένους *Iris*) εφαρμόζονται για τις ισχυρές διουρητικές και αποχρεμπτικές ιδιότητες τους, αλλά σε μεγαλύτερες δόσεις προκαλούνται εμετικά και καθαρτικά επεισόδια. Επιπλέον το ‘Irsa’ αποδείχτηκε χρήσιμο στη θεραπεία πνευμονιών, παθήσεων του ήπατος και έναντι ουρολοιμώξεων και αιμορροΐδων (Ayatollahi *et al.*, 2004).

Αποξηραμένες ρίζες του είδους *I. Domestica* (γνωστό και ως *Belamcanda chinensis*) έχουν χρησιμοποιηθεί στην παραδοσιακή κινέζικη ιατρική για τη θεραπεία του άσθματος, παθήσεων του τραχήλου, του πονόλαιμου, του βήχα και των φλεγμονών (Sang *et al.*, 2004). Περαιτέρω έρευνα έχει αποδείξει ότι τα ίδια ριζώματα είναι πολύ αποτελεσματικά στη στον έλεγχο βακτηριακών λοιμώξεων και μυκητιάσεων.

1.3. Το είδος *Iris albicans*

Το είδος *Iris albicans*, αποτελεί ένα φυσικό υβρίδιο ίριδας, γνωστό και ως ‘Cemetery Iris’ ή ‘White flag Iris’. Είναι ένα είδος *Iris* το οποίο φύτευαν σε μουσουλμανικούς τάφους και φύεται σε πολλές χώρες της μέσης ανατολής και της βόρειας Αφρικής. Σε βάθος χρόνου εξαπλώθηκε στην Ισπανία και από εκεί σε άλλες Ευρωπαϊκές χώρες.

Ταξινόμηση	
Βασίλειο	Plantae
Υποβασίλειο	Viridiplantae
Άθροισμά	Tracheophyta
Υποάθροισμα	Spermatophytina
Κλάση	Magnoliopsida
Τάξη	Asparagales
Οικογένεια	Iridaceae
Γένος	Iris L.
Είδος	Iris albicans



Εικόνα 16: *Iris Albicans* (By Eric in SF - Own work, CC BY-SA 3.0,).

Η περίοδος άνθησης είναι Μάρτιος με Ιούνιο, τα υπέργεια μέρη του φυτού ξηραίνονται κατά περιόδους, ενώ οι ρίζες επιβιώνουν στις περιόδους με δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες (χειμώνας – καλοκαίρι). Το υπέργειο τμήμα του φυτού μπορεί να μεγαλώσει σε ύψος από 30 έως 60 cm. Τα φύλλα της είναι πράσινο-γρι χρώματος, ευρεία και σπαθωτά. Σχηματίζει συνήθως 2 - 3 μεγάλα άνθη σε σχήμα βεντάλιας, τα οποία έχουν γκρι ή ασημένιο μπουμπούκι και στην άνθηση έχουν μήκος 8 cm και χρώμα λευκό, γεγονός στο οποίο και οφείλεται το όνομα του είδους. Καθώς δεν μπορεί να παράγει σπόρους, αποτελεί στείρο υβριδικό φυτό που βασίζεται στους επικονιαστές για την αναπαραγωγή του.

Το είδος *Iris albicans* καλλιεργείται από αρχαιοτάτων χρόνων και ίσως να αποτελεί το παλαιότερο είδος ίριδας που έχει καλλιεργηθεί από τον άνθρωπο. Από το δεύτερο μισό κιόλας του 16^{ου} αιώνα βρίσκουμε καταγραφές των λευκών (λευκά άνθη) θυσανωδών (bearded) μελών του γένους *Iris* στα βοτανικά εγχειρίδια της εποχής. Περιγράφηκε και καταγράφηκε από τον Δανό βοτανολόγο Johan Lange το 1860, ενώ σήμερα θεωρείται από κάποιους βοτανολόγους συνώνυμο με το *I. florentina*. Από εκείνη την περίοδο και μέχρι και σήμερα έχουν δημιουργηθεί μεγάλες ασάφειες και διαφωνίες μεταξύ των βοτανολόγων ως προς την ταξινομική των λευκών Ιρίδων (π.δ *florentina*, *alba*, *albicans*). Η αρχική περιγραφή του Λινναίου στο '*Materia medica*' του 1749, για το *I. florentina* ήταν ότι αποτελούσε μια (λευκή) ποικιλία της πλέον δημοφιλούς και συχνότερα απαντούμενης μωβ ή μπλε ίριδας, της *I. germanica* ή απλούστερα μια αλμπινική

φόρμα της. Όμως, στα μετέπειτα και ώριμα έργα του, όπως είναι το *'Systema naturae'* του 1759 και το *'Species plantarum'* του 1762, το περιγράφει ως ένα διαφορετικό είδος με σημαντικές μορφολογικές διαφορές από το *I. Germanica*, πέρα από το χρώμα των ανθών τους. Το άλλο λευκό είδος ίριδας, *Iris alba*, είναι μάλλον αυτό που συγκεντρώνει τις μεγαλύτερες πιθανότητες να είναι μια λευκή φόρμα του *I. germanica* και όχι ξεχωριστό είδος, όπως αποδέχεται και ο πρώτος βοτανολόγος που το περιέγραψε G. Savi στο *'Flora pisana'* του 1798. Η πλήρης διευκρίνιση της ταξινομικής ασάφειας που προφανώς ακόμα υπάρχει σε αυτήν την μικρή ομάδα Ιρίδων, πρέπει να υποστηριχτεί και με γενετικούς ελέγχους (Martini & Viciani, **2018**). Η προέλευση του φυτού είναι από την Υεμένη και τη Σαουδική Αραβία και παρουσιάζεται σε τοιχογραφίες των βοτανικών κήπων του Τούθμωση Γ', στον ιερό ναό του Αμούν στο Καρνάκ της Αιγύπτου, οι οποίες χρονολογούνται περί του 1420 π.Χ.

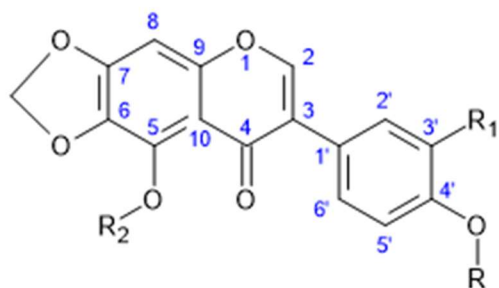


Εικόνα 17: Τοιχογραφία από την αρχαία Αίγυπτο που απεικονίζει την Ίριδα

Παρόλο που έχουν γίνει πολλές φυτοχημικές και φαρμακογνωστικές μελέτες στο γένος *Iris*, για την *Iris albicans* έχουν μελετηθεί μόνο τα υπέργεια τμήματα του φυτού (φύλλα) από την οποία απομονώθηκαν 7 ισοφλαβονοειδή και 4 ξανθόνες (Abdel-Mageed *et al.*, **2018**).

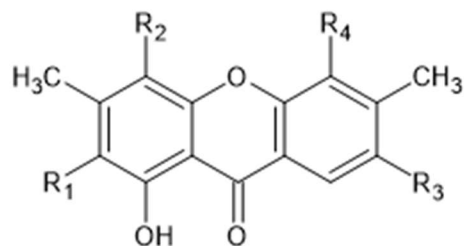
Πίνακας 2: Δευτερογενείς μεταβολίτες από τα φύλλα του είδους *I. albicans*. Οι μεταβολίτες 1-7 είναι ισοφλαβονοειδή ενώ οι 8-11 ανήκουν στις ξανθόνες

1	Irisolone-4'-O-β-D-glucopyranosyl-(1->6)-β-D-glucopyranoside (Germanasim E)
2	Irilone 4'-O-β-D-glycopyranosyl-(1->6)-β-D-glucopyranoside
3	Tectorigenin 7-O-β-D-glucopranoside
4	Irisolidone 7-O-glucoside (tectoridine)
5	Irigenin 7-o-β-D-glucopyranoside (iridin)
6	Iristectorigenin B 7-O-β-D-glucopyranosyl-(1->6)-β-d-glucopyranoside
7	Irisolidone-7-O-β-D-glucopyranosyl-(1->6)-β-d-glucopyranoside
8	Magniferin
9	Isomagniferin
10	Neomagniferin
11	Irisxanthone



1 R= Glc (6-1) Glc, R₁=H, R₂=CH₃

2 R= Glc (6-1) Glc, R₁=H, R₂=H

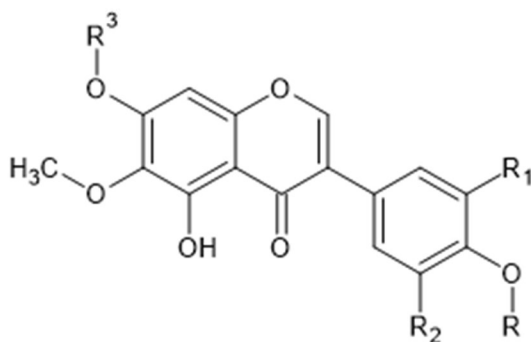


8 R₁= Glc, R₂= H, R₃= OH, R₄= H

9 R₁= H, R₂= Glc, R₃= OH, R₄= H

10 R₁= Glc, R₂= H, R₃= OGlc, R₄= H

11 R₁= Glc, R₂= H, R₃= H, R₄= OCH₃



3 R= H, R₁=H, R₂=H, R₃= Glc

4 R= CH₃, R₁=H, R₂=H, R₃= Glc

5 R= CH₃, R₁=OCH₃, R₂=OH, R₃= Glc

6 R= H, R₁=OCH₃, R₂=H, R₃= Glc (6- 1) Glc

7 R= CH₃, R₁=H, R₂=H, R₃= Glc (6- 1) Glc

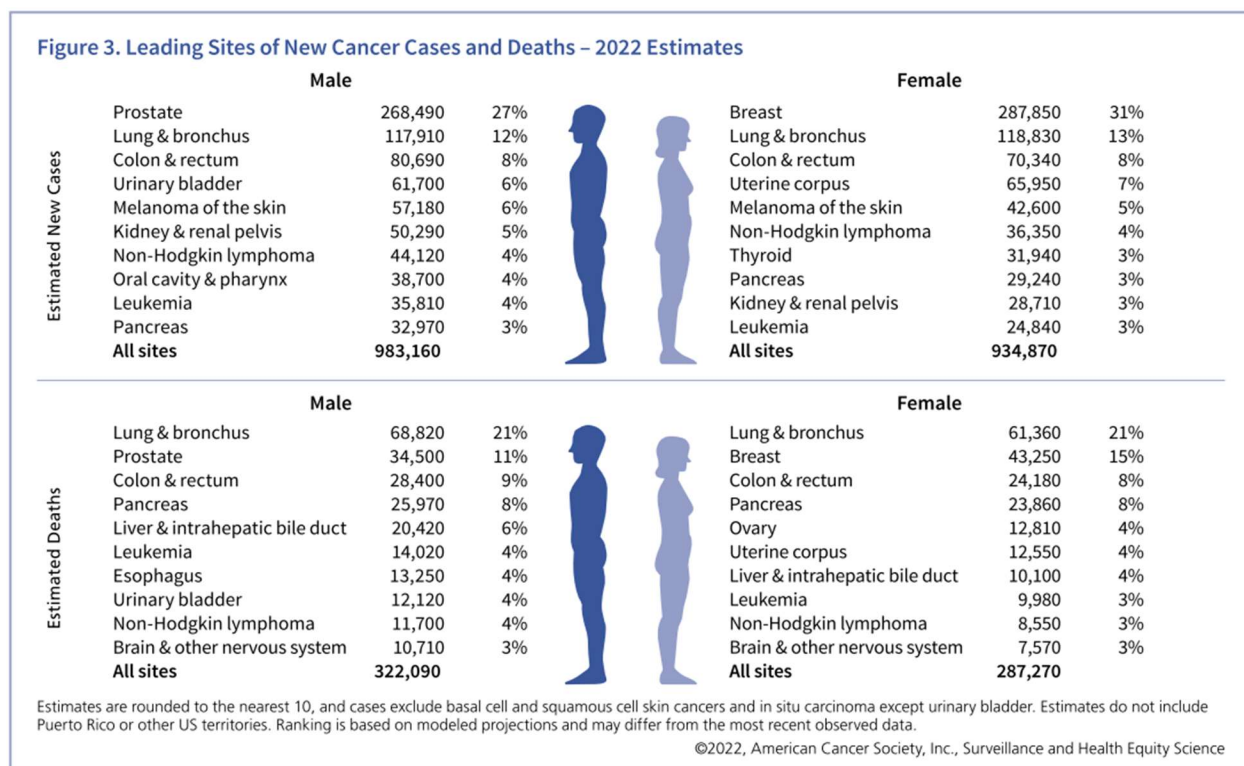
Εικόνα 18: Χημικές δομές δευτερογενών μεταβολιτών από τα φύλλα της *I. albicans*. Οι μεταβολίτες 1-7 είναι ισοφλαβονοειδή ενώ οι 8-11 ανήκουν στις ξανθόνες.

1.4. Αντικαρκινική δράση έναντι του καρκίνου του μαστού

1.4.1. Στατιστικά στοιχεία για τον καρκίνο του μαστού

Ο καρκίνος του μαστού είναι η συχνότερη κακοήθεια του γυναικείου πληθυσμού και η δεύτερη αιτία θανάτου από καρκίνο, μετά τον καρκίνο του πνεύμονα στις γυναίκες. Για το λόγο αυτό αποτελεί μείζον πρόβλημα της δημόσιας υγείας παγκοσμίως. Συγκεκριμένα, στις ΗΠΑ το 2022 καταγράφηκαν 287.850 νέες περιπτώσεις και 43.250 θάνατοι από καρκίνο του μαστού. Επιπρόσθετα, 51.400 in situ καρκινώματα μαστού (πορογενές ή λοβιακό) διαγνώστηκαν το 2021

(American Cancer Society. Cancer Facts & Figures, **2022**). Αντίστοιχα στην Ευρώπη (σε 40 χώρες) το 2008, υπολογίστηκαν 332.000 νέες περιπτώσεις και 89.000 θάνατοι από καρκίνο του μαστού. Επομένως, η επίπτωση της νόσου στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης ήταν 62.8 ανά 100.000 και η θνησιμότητα 16.7 ανά 100.000 γυναίκες ανά έτος (Cardoso *et al.*, **2012**).



Εικόνα 19: Δεδομένα από Cancer Facts & Figures 2022

Στην Ελλάδα, ο καρκίνος του μαστού καταλαμβάνει την δεύτερη θέση πίσω από τον καρκίνο του πνεύμονα ως αιτία θανάτου από καρκίνο και ο μέσος όρος θνησιμότητας υπολογίζεται σε 2.333 γυναίκες ανά έτος, ακολουθούμενος από τον καρκίνο του παχέος εντέρου με μέσο όρο θανάτων 3.431 ανά έτος.

Incidence, Mortality and Prevalence by cancer site

Cancer	New cases				Deaths				5-year prevalence (all ages)	
	Number	Rank	(%)	Cum.risk	Number	Rank	(%)	Cum.risk	Number	Prop. (per 100 000)
Lung	8 960	1	13.9	4.52	7 662	1	23.1	3.67	10 449	100.25
Breast	7 772	2	12.0	7.63	2 333	3	7.0	1.50	30 879	581.83
Colon	6 529	3	10.1	2.54	3 431	2	10.3	0.90	18 545	177.92
Prostate	6 217	4	9.6	6.31	1 835	5	5.5	0.55	25 019	489.05
Bladder	5 645	5	8.7	2.67	1 543	6	4.7	0.42	17 921	171.94
Pancreas	2 302	6	3.6	0.96	2 097	4	6.3	0.84	1 611	15.46
Corpus uteri	2 117	7	3.3	2.35	483	16	1.5	0.35	7 869	148.27
Leukaemia	1 847	8	2.9	0.80	1 314	9	4.0	0.41	5 125	49.17
Liver	1 833	9	2.8	0.78	1 522	7	4.6	0.57	1 664	15.96
Kidney	1 808	10	2.8	0.89	692	11	2.1	0.23	5 190	49.79
Stomach	1 780	11	2.8	0.70	1 347	8	4.1	0.45	2 704	25.94
Non-Hodgkin lymphoma	1 554	12	2.4	0.84	606	13	1.8	0.22	4 869	46.71
Brain, central nervous system	1 401	13	2.2	0.70	1 082	10	3.3	0.51	3 886	37.28
Melanoma of skin	1 313	14	2.0	0.75	295	18	0.89	0.12	4 380	42.02
Thyroid	1 251	15	1.9	0.83	86	24	0.26	0.03	4 683	44.93
Rectum	1 220	16	1.9	0.52	499	15	1.5	0.14	3 785	36.31
Ovary	1 020	17	1.6	0.99	677	12	2.0	0.54	2 834	53.40
Multiple myeloma	917	18	1.4	0.38	590	14	1.8	0.18	2 366	22.70
Larynx	811	19	1.3	0.44	379	17	1.1	0.15	2 665	25.57
Cervix uteri	697	20	1.1	0.77	282	19	0.85	0.23	2 060	38.81
Lip, oral cavity	603	21	0.93	0.28	217	20	0.65	0.08	1 834	17.60
Hodgkin lymphoma	361	22	0.56	0.22	108	22	0.33	0.04	1 303	12.50
Testis	321	23	0.50	0.48	22	32	0.07	0.03	1 373	26.84
Oesophagus	247	24	0.38	0.11	210	21	0.63	0.09	276	2.65
Nasopharynx	193	25	0.30	0.11	92	23	0.28	0.05	640	6.14
Vulva	170	26	0.26	0.09	84	25	0.25	0.03	488	9.20
Salivary glands	157	27	0.24	0.04	75	26	0.23	0.01	473	4.54
Anus	146	28	0.23	0.07	40	30	0.12	0.01	447	4.29
Kaposi sarcoma	116	29	0.18	0.05	22	33	0.07	0.01	352	3.38
Penis	97	30	0.15	0.09	35	31	0.11	0.02	317	6.20
Gallbladder	84	31	0.13	0.03	64	27	0.19	0.02	81	0.78
Oropharynx	78	32	0.12	0.04	46	29	0.14	0.02	216	2.07
Mesothelioma	57	33	0.09	0.03	48	28	0.14	0.03	69	0.66
Hypopharynx	20	34	0.03	0.01	11	34	0.03	0.00	36	0.35
Vagina	15	35	0.02	0.01	7	35	0.02	0.00	45	0.85
All cancer sites	64 530	-	-	26.33	33 166	-	-	11.36	179 828	1725.3

Εικόνα 20: Δεδομένα από Greece-Global Cancer Observatory

Παρά το γεγονός ότι η θνησιμότητα από καρκίνο του μαστού στην Ελλάδα αυξάνει κατά 4% ετησίως την τελευταία εικοσαετία, κυρίως στις ηλικίες μεταξύ 45 και 65 ετών, η συχνότητα εμφάνισης της νόσου παραμένει η χαμηλότερη μεταξύ των Ευρωπαϊκών χωρών (Vrachnis *et al.*, 2015).

Ο καρκίνος του μαστού είναι πολύ συχνότερος στο δυτικό κόσμο και κυρίως στις βιομηχανικές χώρες, όπου την τελευταία εικοσαετία υπολογίζεται ότι η συχνότητα του αυξήθηκε κατά 40% (Key *et al.*, 2001). Ωστόσο, η θνησιμότητα από τη νόσο έχει παραμείνει σταθερή, ενώ την τελευταία 10ετία φαίνεται να παρουσιάζει ελαφρά πτωτική τάση τόσο στις ΗΠΑ όσο και σε κάποιες χώρες της Ευρώπης, κυρίως στις νεότερες ηλικίες, γεγονός που αποδίδεται στην πρόωμη διάγνωση και στην πρόοδο της θεραπευτικής αντιμετώπισης σε όλα τα στάδια του καρκίνου.

1.4.2. Ανατομία του μαστού

Ο μαστός είναι ένας αδένας με πολλές ιδιαιτερότητες καθώς αναπτύσσεται διαφορετικά στο κάθε φύλο. Στις γυναίκες οι μαστοί επηρεάζονται διαρκώς από τα ορμονικά επίπεδα που απαντώνται στις διάφορες φάσεις της ζωής της γυναίκας. Πιο συγκεκριμένα, οι μαστοί της γυναίκας υφίστανται συνεχείς μεταβολές κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, κατά τον εμμηνορυσιακό κύκλο και κατά την περίοδο της εγκυμοσύνης και της γαλουχίας. Στους άνδρες οι μαστοί είναι υποτυπώδεις χωρίς κάποιο βιολογικό ρόλο (Becker *et al.*, 2015).

Η περιοχή του μαστού βρίσκεται έξω από το πρόσθιο θωρακικό τοίχωμα πάνω από το μείζονα θωρακικό και τον πρόσθιο οδοντωτό μυ που συγκρατεί το άνω άκρο πάνω στον κορμό (Editch C.Kordon, Robert A.Mckinght, Chamelli Jhappan, Lothar Henninghausen, Glenn Merlino, 1994) (Pandya & Moore, 2011). Ο μαστός επεκτείνεται ανάμεσα στο δεύτερο και το έκτο πλευρό και αποτελείται από τον ιστό του μαζικού αδένα, τον ινώδη ιστό, το λιπώδη ιστό, τα λεμφαγγεία και τα αγγεία αίματος, αλλά και τα νεύρα (Becker *et al.*, 2015). Η θηλή αποτελείται από σμηγματογόνους και αποκρινείς αδένες, περιβάλλεται από μια κυκλική σκουρόχρωμη περιοχή του δέρματος που ονομάζεται θηλαία άλως. Το σύμπλεγμα θηλή-θηλαία άλως βρίσκεται επί της γαλακτικής γραμμής, η οποία ξεκινάει από τη μασχάλη και καταλήγει στην ηβική περιοχή. Οι μαζικοί αδένες αποτελούνται από μια σειρά πόρων και εκκριτικών λοβίων σχηματίζοντας 15-20 γαλακτοφόρους πόρους, οι οποίοι εκβάλλουν ξεχωριστά καθένας στη θηλή σχηματίζοντας γαλακτοφόρους κόλπους. Οι γαλακτοφόροι κόλποι χρησιμεύουν ως δεξαμενές γάλακτος κατά τη διάρκεια της γαλουχίας (Becker *et al.*, 2015). Οι πόροι και τα λοβία του μαζικού αδένα περιβάλλονται από ένα καλά ανεπτυγμένο στρώμα συνδετικού ιστού. Σε κάποιες περιοχές το στρώμα αυτό καθίσταται πιο πυκνό σχηματίζοντας ανεξάρτητους συνδέσμους, οι οποίοι ονομάζονται κρεμαστήρες σύνδεσμοι του μαστού (Cooper's ligaments). Αυτοί συμφύονται με το χόριο του δέρματος υποστηρίζοντας το μαστό. Στο δέρμα του μαστού υπάρχουν επίσης σμηγματογόνοι και ιδρωτοποιοί αδένες. Στις μη θηλάζουσες γυναίκες επικρατέστερο δομικό στοιχείο του μαστού αποτελεί το λίπος, ενώ ο αδενικός ιστός είναι περισσότερο άφθονος στις θηλάζουσες.

Ο καρκίνος του μαστού αναπτύσσεται στα κύτταρα των αδενοκυψελών, στους πόρους και στα λοβίδια του μαστού. Ανάλογα με την κυτταρική περιοχή της αρχικής εμφάνισης του

καρκίνου εξαρτάται η ταχύτητα ανάπτυξης και η διασπορά του όγκου. Οι όγκοι του μαστού διασπείρονται με τα λεμφαγγεία και τις φλέβες ή με άμεση διήθηση.

1.4.3. Κατηγοριοποίηση καρκίνου του μαστού

Η κατηγοριοποίηση του καρκίνου του μαστού είναι κρίσιμη για την κατανόηση και τη μελέτη της νόσου, γιατί οι διαφορετικοί υποτύποι έχουν διαφορετική πρόγνωση και εξέλιξη (Holliday & Spreirs, 2011). Παλαιότερα η κατηγοριοποίηση βασιζόταν στην ιστοπαθολογική αξιολόγηση του τύπου του καρκίνου και στον προσδιορισμό του σταδίου του καρκίνου. Τα τελευταία χρόνια η ταξινόμηση του καρκίνου βασίζεται στη γονιδιακή έκφραση του οιστρογονικού υποδοχέα (Estrogen Receptor, ER), του προγεστερονικού υποδοχέα (Progesterone Receptor, PR) και του ανθρώπινου επιδερμικού υποδοχέα (Human Epidermal growth factor Receptor 2, HER2). Σύμφωνα με το προφίλ ως προς τους παραπάνω υποδοχείς μπορούμε να προβλέψουμε την πρόγνωση και την απόκριση της ασθενούς στις διάφορες θεραπείες (Rakha & Ellis, 2011); (Vuong *et al.*, 2014).

Οι καρκίνοι του μαστού που χαρακτηρίζονται θετικοί ως προς την έκφραση του οιστρογονικού υποδοχέα ER (ER+) αποτελούν περίπου το 60% των καρκίνων του μαστού και η θεραπευτική τους αντιμετώπιση περιλαμβάνει τη χρήση στεροειδών, όπως είναι η ταμοξιφαίνη ή με αναστολείς αρωματάσης που δρουν παρεμποδίζοντας τη βιοσύνθεση των οιστρογόνων. Οι HER2+ καρκίνοι του μαστού αποτελούν περίπου το 10-15% των καρκίνων του μαστού και αντιμετωπίζονται κυρίως με μονοκλωνικά αντισώματα, όπως είναι η τραστουζουμάμπη. Οι τριπλά αρνητικοί καρκίνοι του μαστού, δεν εκφράζουν κανέναν από τους τρεις υποδοχείς (ER, PR, HER2), αποτελούν το 15-20% των καρκίνων του μαστού και μέχρι στιγμής δεν έχει αναπτυχθεί κάποια εξειδικευμένη θεραπεία (Hudis & Gianni, 2011) ; (Smith *et al.*, 2017); (Dai *et al.*, 2017).

Στον πίνακα 3 παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά των κυτταρικών σειρών καρκίνου του μαστού, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση της πλειονότητας των απομονωμένων μεταβολιτών αλλά και μειγμάτων ιριδαλών στην παρούσα εργασία, καθώς και το προφίλ τους σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης των υποδοχέων ER, PR και HER2.

Πίνακας 3: Χαρακτηριστικές κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού βάσει του μοριακού προφίλ τους ως προς την έκφραση των υποδοχέων ER, PR και HER2

Κυτταρική Σειρά	Τύπος	Τύπος Μορφολογίας	ER	PR	HER2	Μοριακός υπότυπος	Προέλευση
<i>BT-474</i>	Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα	Επιθηλιακός	+	+	+	Luminal B	Πρωτογενές
<i>BT-20</i>	Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα	Επιθηλιακός	-	-	-	Triple negative 1 luminal androgen receptor (LAR)	Πρωτογενές
<i>MCF-7</i>	Αδενοκαρκίνωμα	Επιθηλιακός	+	+	-	Luminal A	Μετάσταση από υπεζωκοτική διάχυση
<i>MDA-MB-468</i>	Αδενοκαρκίνωμα	Επιθηλιακός	-	-	-	Triple negative Basal like A or 1	Μετάσταση από υπεζωκοτική διάχυση
<i>MDA-MB-231</i>	Αδενοκαρκίνωμα	Επιθηλιακός	-	-	-	Triplenegative mesenchymal stem-like (MSL)	Μετάσταση από υπεζωκοτική διάχυση
<i>SK-BR-3</i>	Αδενοκαρκίνωμα	Επιθηλιακός	-	-	+	HER2 positive	Μετάσταση από υπεζωκοτική διάχυση

1.4.4. Αντικαρκινική δράση δευτερογενών μεταβολίτων του γένους *Iris*

Τα τελευταία χρόνια, φυτά του γένους *Iris*, αποτελούν αντικείμενο μελέτης ως προς την απομόνωση ισοφλαβονών με αντικαρκινικές ιδιότητες. Οι ρίζες του είδους *I. pseudacorus* έχουν μελετηθεί για την κυτοτοξικότητα τους σε καρκινικές σειρές (ειδικά για την MCF-7) (Michalak *et al.*, 2021). Ισοφλαβόνες που απομονώθηκαν από το είδος *I. kashmiriana* (Baker) και τα συνθετικά ανάλογα τους δοκιμάστηκαν *in vitro* για την αντικαρκινική τους δράση, με τον υποδοχέα NF-kappa B να αποτελεί το βασικό στόχο. Οι περισσότερες ισοφλαβόνες έδειξαν ικανοποιητική αντικαρκινική και αντιοξειδωτική δράση (Alam *et al.*, 2017). Το κινέζικο φυτό του είδους *I. tectorum* (Maxim) χρησιμοποιούταν από λαϊκούς θεραπευτές για την καταπολέμηση του καρκίνου. Η απομόνωση δύο φλαβονοειδών (7-O-methylaromadendrin και tectorigenin) και η μετέπειτα αξιολόγησή τους σε καρκινικές σειρές (COR-L23) έδειξε ότι η 7-O-

methylaromadendrin προκαλεί *in vitro* κυτταρική απόπτωση, ενώ και οι δύο προαναφερόμενες ενώσεις προκαλούν S phase και G2/M phase αναχαίτηση COR-L23 κυτταρικών σειρών, γεγονός που δικαιολογεί την παραδοσιακή χρήση της *I. tectorum* ως αντικαρκινικό φάρμακο (Fang *et al.*, **2008**). Η ιριγενίνη, είναι μια ισοφλαβόνη που απαντάται συχνά στα περισσότερα είδη *Iris*, έχει μελετηθεί εκτενώς για την αντικαρκινική της δράση έναντι του καρκίνου του ήπατος, καθώς και την ικανότητα της να αναστείλει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών σειρών HepG2 και SNU-182, ανάλογα με την συγκέντρωση της (IC₅₀ value 14 mM). Η τιμή IC₅₀ της ιριγενίνης για τα ηπατικά καρκινικά κύτταρα είναι 9 φορές μεγαλύτερη από ότι στα κανονικά κύτταρα, πράγμα που την καθιστά σημαντικό όπλο απέναντι στον καρκίνο του ήπατος (Xu *et al.*, **2021**). Μελέτες για τις ισοφλαβόνες ιριδίνη, ιριγενίνη και τεκτοριγενίνη, που βρίσκονται πολύ συχνά στα φυτά του γένους *Iris*, έδειξαν ότι και οι τρεις χημικές ενώσεις είχαν διαφορετική δράση σε EGFR υποδοχείς, οι οποίοι με τη σειρά τους ενεργοποιούν το γονίδιο KRAS που δίνει το σήμα στο κύτταρο να διαχωριστεί και να πολλαπλασιαστεί. Η ιριγενίνη και η τεκτοριγενίνη προκάλεσαν διέγερση του EGFR υποδοχέα, αλλά η ιριδίνη και η τεκτοριγενίνη προκάλεσαν την αναχαίτηση του γονιδίου KRAS (Wigfield *et al.*, **2008**). Οι ισοφλαβόνες που απομονώθηκαν από τις ρίζες του είδους *I. germanica* παρουσίασαν ισχυρή *in vitro* αντικαρκινική δράση. Η ιριγενίνη, η ιριδίνη και η ιριφλογενίνη ξεχώρισαν ως πιθανοί αναστολείς ενζύμων που παίρνουν μέρος στη μετατροπή προκαρκινικών κυττάρων σε καρκινικά κύτταρα. Η δράση αυτή συγκρίθηκε με αυτή της γενιστεΐνης, γνωστού αντικαρκινικού φλαβονοειδούς της σόγιας (Wollenweber *et al.*, **2003**).

Αν και υπάρχει λιγότερη βιβλιογραφία σε σύγκριση με τα φλαβονοειδή, τα τριτερπένια επίσης μελετώνται ως πιθανοί αντικαρκινικοί παράγοντες. Τα τριτερπένια μπορούν να δράσουν αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε πολλαπλά στάδια της πρωτεϊνοσύνθεσης, καθιστώντας τα σημαντικά στην μελέτη για ανάπτυξη συνθετικών φαρμάκων (Gill *et al.*, **2016**).

Από το είδος *I. germanica* έχουν απομονωθεί 6 γνωστά τριτερπένια και έχουν μελετηθεί έναντι των ανθρώπινων καρκινικών σειρών A2780 και K562, με όλες τις ουσίες να παρουσιάζουν ικανοποιητικό IC₅₀ σε ένα εύρος συγκεντρώσεων 0.1 με 5.3 µg/ml (Thieme *et al.*, **2001**). Τριτερπένια από τα είδη *I. tectorum* και *Belamcanda chinensis* έχουν μελετηθεί για την ενεργοποίηση την πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι χημική δομή

των Ιριδαλών παίζει σημαντικό ρόλο στην ικανότητα τους να δεσμεύσουν και να ενεργοποιήσουν την PKC (Takahashi *et al.*, **2002**).

1.4.4.1. Ισοφλαβόνες ενάντια στον καρκίνο του μαστού

Υπάρχουν πολλές αντικρουόμενες πληροφορίες για τη δράση των φυτοοιστρογόνων και κυρίως των ισοφλαβονών, ως προς την ανάπτυξη ή την καταπολέμηση του καρκίνου του μαστού. Τα προϊόντα σόγιας είναι πλούσια σε ισοφλαβόνες, οι οποίες λόγω παρόμοιας χημικής δομής με τα φυσικά οιστρογόνα, είναι δυνατό να παρουσιάζουν οιστρογονικές ή/και αντι-οιστρογονικές ιδιότητες. Η συγγένεια με τους οιστρογονικούς υποδοχείς είναι 1000 με 10000 φορές χαμηλότερη από αυτή της 17-β-οιστραδιόλης (φυσικό οιστρογόνο) και αυτό αποτελεί σημαντική πληροφορία ως προς την χορήγηση τους μέσω εξειδικευμένης διατροφής και κατ' επέκταση των συγκεντρώσεων που είναι αναγκαίο να επιτευχθούν στον ανθρώπινο οργανισμό.

Πολλές μελέτες πλέον διαχωρίζουν τις γυναίκες σε δύο κατηγορίες, προεμμηνοπαυσιακές και μετα-εμμηνοπαυσιακές, καθώς τα επίπεδα ενδογενών οιστρογόνων είναι πολύ διαφορετικά μεταξύ τους καθιστώντας τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού πολύ διαφορετικό ανάμεσα στις δύο κατηγορίες. Άλλες μεταβλητές, όπως η ηλικία, η καταγωγή, η ποιότητα ζωής, η παχυσαρκία και η διατροφή αποτελούν σημαντικούς παράγοντες για την κατηγοριοποίηση ασθενών καρκίνου του μαστού σχετικά με την πιθανή επίδραση που έχουν τα φυτοοιστρογόνα. (Chen *et al.*, **2014**)

Η καθημερινή διατροφή πλούσια σε ισοφλαβόνες (π.χ. τα προϊόντα σόγιας περιέχουν την γενιστεΐνη σε μεγάλες ποσότητες) μπορεί να έχει προστατευτικό χαρακτήρα ενάντια στον καρκίνο του μαστού. Το παραπάνω πόρισμα επιβεβαιώνεται κατά κύριο λόγο σε περιοχές της Ασίας, όπου τα προϊόντα σόγιας καταναλώνονται ευρέως στη καθημερινή διατροφή και παράλληλα τα ποσοστά καρκίνου του μαστού είναι πολύ χαμηλότερα συγκριτικά με τον υπόλοιπο κόσμο.

Εκτός από την πρόληψη, η κατανάλωση σόγιας και ισοφλαβονών έχει άμεση επίδραση στα ποσοστά επιβίωσης ασθενών του καρκίνου του μαστού και συμβάλει στη μείωση των θανάτων (Boutas *et al.*, **2022**). Χρειάζεται περισσότερη μελέτη και προσεκτική παρακολούθηση της χορήγησης ισοφλαβονών σε ασθενείς καθώς και καλύτερη χαρτογράφηση της δίαιτας τους,

σε τη διάρκεια της ζωής τους, ώστε να παγιωθεί η αντίληψη ότι μια διατροφή πλούσια σε ισοφλαβόνες μπορεί να αποτελεί μια σημαντική λύση για την αντιμετώπιση της εμφάνισης του καρκίνου του μαστού (Ziaei & Halaby, **2017**).

Αντιθέτως, υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι παρόλες τις θετικές τους δράσεις, οι ισοφλαβόνες φαίνεται να προκαλούν πρόδρομο καρκίνο του μαστού, κυρίως σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, προκαλώντας δυνητικά την παραγωγή περισσότερων ενεργών οιστρογόνων. Ωστόσο, οι συγκεκριμένες έρευνες χρήζουν περαιτέρω μελέτης και τα στοιχεία τους είναι ακόμη ελλιπή (Chen et al., **2014**).

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Συλλογή φυτικού υλικού

Η συλλογή του φυτού *Iris albicans* πραγματοποιήθηκε στην περιοχή 'Καραβίδα' του Νομού Φθιώτιδας, πλησίον του κοιμητηρίου της περιοχής, το Νοέμβριο του 2015. Ακολούθησε ο διαχωρισμός των ριζωμάτων από τα υπέργεια τμήματα, ξήρανση σε σκιερό, καλά αεριζόμενο χώρο, σε θερμοκρασία δωματίου και κονιοποίηση.

2.2. Τεχνική εκχύλισης

Η εκχύλιση αποτελεί το πρωταρχικό βήμα για την παραλαβή των φυσικών προϊόντων από την πρώτη ύλη, η οποία στην παρούσα διπλωματική εργασία ήταν οι ρίζες και τα υπέργεια τμήματα από το φυτό *Iris albicans*. Τα στάδια που περιλαμβάνονται στη διαδικασία της εκχύλισης είναι η διείδυση του διαλύτη στη στερεή μήτρα, η διαλυτοποίηση των ουσιών, η διάχυση των διαλυτοποιημένων ουσιών έξω από τη στερεή μήτρα και τέλος η συλλογή των εξαγόμενων διαλυτοποιημένων ουσιών.

Προκειμένου να εξασφαλιστεί η απαιτούμενη ποσότητα εκχυλισμάτων για να είναι εφικτή η απομόνωση των περιεχόμενων δευτερογενών μεταβολιτών, πραγματοποιήθηκε η παρασκευή των εκχυλισμάτων στην κατάλληλη κλίμακα. Για το σκοπό αυτό 166 g ριζών και 124 g υπέργειων τμημάτων εκχυλίστηκαν με μεθανόλη (MeOH) και οξικό αιθυλεστέρα (EtOAc), σε τρεις κύκλους αρχικά σε υδατόλουτρο υπερήχων (Elma S 100H Elmasonic) για 30 λεπτά χωρίς θέρμανση.

2.3. Χρωματογραφικές τεχνικές

Με σκοπό τον έλεγχο των φυτικών εκχυλισμάτων καθώς και την απομόνωση των περιεχόμενων δευτερογενών μεταβολιτών εφαρμόστηκε μια σειρά χρωματογραφικών τεχνικών, οι οποίες περιγράφονται αναλυτικά στη συνέχεια.

2.3.1. Αναλυτική Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Analytical Thin Layer Chromatography – Analytical TLC)

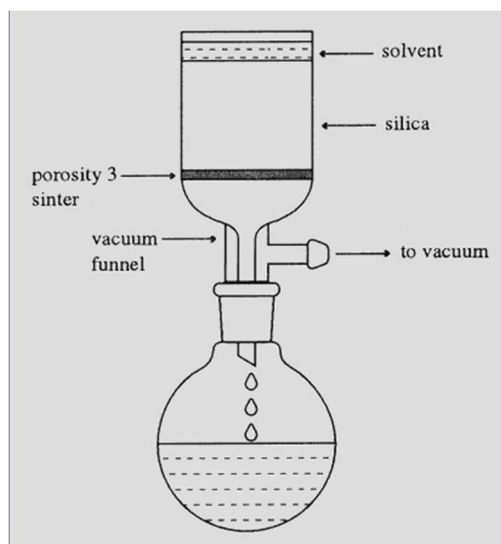
Τα αρχικά, ολικά εκχυλίσματα καθώς και τα περαιτέρω κλάσματά τους ελέγχθηκαν για το χημικό τους περιεχόμενο με τη χρήση χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας. Χρησιμοποιήθηκαν αλουμινένιες και γυάλινες πλάκες με επίστρωση γέλης οξειδίου του πυριτίου (silica gel 60 F-254 Merck), η οποία αποτελεί την στατική φάση και πιο συγκεκριμένα:

- Γέλης οξειδίου του πυριτίου με δείκτη φθορισμού σε φύλλα αλουμινίου 20 x 20 cm, πάχους στιβάδας 0,1 mm (TLC κανονικής φάσεως)
- Γέλης οξειδίου του πυριτίου αντιστρόφου φάσεως (RP-18 F254S) με δείκτη φθορισμού σε φύλλα αλουμινίου 20 x 20 cm, πάχος στιβάδας 0,25 mm (TLC αντιστρόφου φάσεως)

Οι πλάκες μετά την τοποθέτηση των δειγμάτων, τοποθετήθηκαν σε γυάλινους θαλάμους που έχουν ήδη κορεστεί με το κατάλληλο σύστημα διαλυτών (κινητή φάση) και πραγματοποιήθηκε η ανάπτυξη των χρωματογραφημάτων. Ακολούθησε η παρατήρηση των χρωματογραφημάτων στο ορατό και στο υπεριώδες φως και σε μήκη κύματος 254 και 366 nm, ενώ στο τέλος έλαβε χώρα η εμφάνισή τους με μεθανολικό διάλυμα θειϊκής βανιλίνης και θέρμανση στους 300 °C. Το μεθανολικό διάλυμα θειϊκής βανιλίνης παρασκευάστηκε με την ανάμειξη ίσων όγκων διαλυμάτων 5 % βανιλίνης σε μεθανόλη και 5 % π. H₂SO₄ σε μεθανόλη.

2.3.2. Υγρή Χρωματογραφία στήλης υπό κενό (VLC)

Πρόκειται για τεχνική υγρής χρωματογραφίας στην οποία χρησιμοποιείται ανοιχτή γυάλινη στήλη με εφαρμογή κενού. Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε γέλη πυριτίου (silica gel 60H, < 60 μm) κανονικής φάσης, ενώ ως κινητή φάση μίγματα οργανικών διαλυτών σταδιακά αυξανόμενης πολικότητας. Στη συνέχεια και για λόγους συντομίας η παραπάνω τεχνική διαχωρισμού αποκαλείται χρωματογραφία “shot”. Με την συγκεκριμένη τεχνική οι ουσίες ενός δείγματος διαχωρίζονται με βάση την πολικότητά τους, ενώ το σημαντικό πλεονέκτημά της είναι ότι είναι φτηνή, εύκολη και με την ικανότητα διαχείρισης από 20 έως 100 g ακατέργαστου φυτικού εκχυλίσματος. (Blunt *et al.*, 1987)



Εικόνα 21: Σχηματική αναπαράσταση της Υγρής Χρωματογραφίας στήλης υπό κενό

2.3.3. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) και Ημι-παρασκευαστική Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (Semi-Preparative – HPLC)

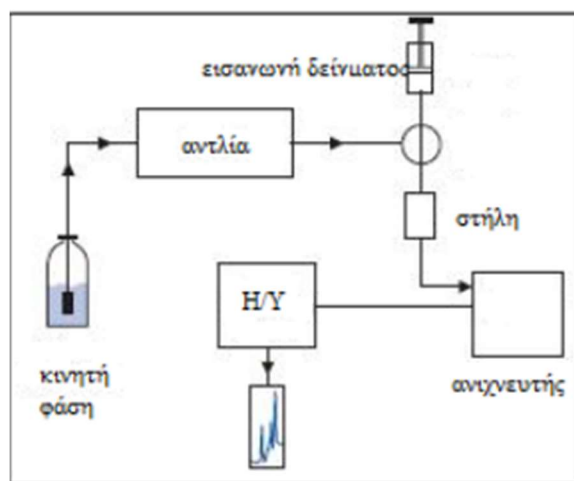
Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) είναι η πιο διαδεδομένη τεχνική ανάλυσης και χρησιμοποιείται τόσο για τον ποιοτικό όσο και για τον ποσοτικό προσδιορισμό διάφορων ουσιών, αλλά και τον διαχωρισμό φυσικών προϊόντων από πολύπλοκα μείγματα. Τα φυσικά προϊόντα και ειδικότερα τα ολικά εκχυλίσματα, λόγω της πολυπλοκότητάς τους καθιστούν δυσκολότερη την ανίχνευση και τον προσδιορισμό των περιεχομένων μεταβολιτών και η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου HPLC είναι καθοριστική για τη διεξαγωγή της ανάλυσης.

Υπάρχει πλήθος διαφορετικών τεχνικών και μεθοδολογιών HPLC, οι οποίες έχουν εφαρμοστεί αποτελεσματικά στην ανάλυση φυσικών προϊόντων, ενώ στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε Ανιχνευτής Υπεριώδους - Ορατού σειράς φωτοδιόδων (Diode Array Detector, DAD ή Photo Diode-Array Detector, PDA). Στους ανιχνευτές αυτούς, εφαρμόζεται πηγή φωτός ευρείας εκπομπής με λυχνίες δευτερίου ή ξένου για το εγγύς υπεριώδες φως και αλογόνου ή βολφραμίου για το ορατό φως και λειτουργούν ικανοποιητικά σε συγκεντρώσεις που φτάνουν μέχρι 10^{-7} g/ml.

Η ακτινοβολία όλων των μηκών κύματος διέρχεται από κυψελίδα και στη συνέχεια σκεδάζεται μέσω των φωτοδιόδων και γίνεται ταυτόχρονη καταγραφή της απορρόφησης του προς εξέταση δείγματος σε όλα τα μήκη κύματος (200-700 nm). Έτσι, μεταβολίτες οι οποίοι

φέρουν χρωμοφόρες ομάδες μπορούν να ανιχνευθούν με αυτή την τεχνική και να προκύψει ένα πλήρες και αξιόπιστο φυτοχημικό προφίλ για κάθε δείγμα. Επιπλέον, πλεονέκτημα του ανιχνευτή φωτοδιόδων είναι η δυνατότητα προσδιορισμού της καθαρότητας της κάθε κορυφής (peak purity), αλλά και η δημιουργία βιβλιοθηκών φασμάτων για να είναι δυνατός ο προσδιορισμός γνωστών δευτερογενών μεταβολιτών σε πολύπλοκα μείγματα.

Η διαβίβαση της υγρής κινητής φάσης σε μια HPLC γίνεται με τη χρήση αντλιών υψηλής πίεσης. Η στατική φάση αποτελείται από πολύ μικρής διαμέτρου σωματιδίων υψηλής διαχωριστικής ικανότητας και επομένως χαρακτηρίζεται από μεγάλη αντίσταση στη ροή της κινητής φάσης. Μια συσκευή HPLC αποτελείται από τα εξής μέρη: το δοχείο ή τα δοχεία κινητής φάσης (διαλυτών), την αντλία, το σύστημα εισαγωγής του δείγματος, την στήλη, τον ανιχνευτή και τον καταγραφέα ή τον ηλεκτρονικό υπολογιστή για τη συλλογή και επεξεργασία των αποτελεσμάτων (Εικόνα 20).



Εικόνα 22: Αναπαράσταση μιας τυπικής διάταξης HPLC

Η HPLC ανάλογα με την φύση της στατικής και κατ' επέκταση της κινητής φάσης με την οποία συνδυάζεται, διακρίνεται σε:

- 1) κανονικής φάσης (NP) με χρωματογραφικό μηχανισμό διαχωρισμού την προσρόφηση, κατά την οποία η στατική φάση είναι πολική (silica gel-SiO₂ ή Al₂O₃) και η κινητή φάση σχετικά μη πολική (εξάνιο και μίγματα οργανικών διαλυτών). Χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό

άπολων σχετικά ουσιών, με την σειρά έκλουσης να υπακούει στο σχήμα, όσο πιο πολική η ουσία τόσο μεγαλύτερος ο χρόνος έκλουσης, και

- 2) αντίστροφης φάσης (RP), με χρωματογραφικό μηχανισμό διαχωρισμού την κατανομή, όπου η στατική φάση είναι μη πολική (SiO₂, με αιθεροποιημένες τις υδροξυλομάδες με αλκύλια ή φαινυλομάδες ή πιο πολικούς τροποποιητές) και η κινητή φάση πολική (μίγματα διαλυτών μεθανόλης ή ακετονιτριλίου ή τετραϋδροφουρανίου με νερό ή ρυθμιστικά διαλύματα). Χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό σχετικά πιο πολικών ουσιών, με την σειρά έκλουσης να είναι η αντίθετη αυτής της κανονικής φάσης.

Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε είναι της ECOM και αποτελείται από τα ακόλουθα τμήματα:

- Αντλία (Analytical HPLC Pump) ECOM, ECP2010 και ECP2010H, με την ικανότητα ανάμειξης τεσσάρων διαφορετικών διαλυτών
- Αυτόματος δειγματολήπτης (Autosampler), Alias, Autosampler
- Μίκτης (mixer) κινητών φάσεων και απαερωτής (degasser), ECOM, ECB2004-ECB2007-ECB2008
- Αυτόματος συλλέκτης κλασμάτων (Fraction collector), ECOM, ECF2096
- Ανιχνευτής φωτοδιόδων (UV-VIS PDA) ECOM, ECDA2800
- Φούρνος στηλών HPLC (Column oven) με ικανότητα υποδοχής 4 διαφορετικών στηλών, Mistral, Model 886
- Λογισμικό επεξεργασίας δεδομένων (Data integration program), Data Apex, Clarity

Οι χρωματογραφικές στήλες που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων είναι οι εξής:

- ReproSil-XR 120 Phenyl, 250x10mm, 5μm, Dr. Maisch Gmhbh, Lot:62/148
- Fortis Diphenyl, 250x10mm, Fortis, Lot: P01170603-1
- ReproSil 100 C18, 250x10mm, 5μm, Dr. Maisch Gmhbh, Lot:5804
- ReproSil-XR 120 C8, 250x10mm, 5μm, Dr. Maisch Gmhbh, Lot:66/028

- Discovery HS C18, 250x4.6mm, 5μm, Fortis
- Fortis UniverSil HS Phenyl, 250x4.6mm, 5μm, Fortis
- Fortis UniverSil HS C8, 250x4.6mm, 5μm, Fortis

2.4. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

Η ταυτοποίηση των δευτερογενών μεταβολιτών πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας κυρίως τη φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR). Πιο συγκεκριμένα τα απομονωμένα συστατικά των εκχυλισμάτων, μετά την απομάκρυνση του διαλύτη με εξάτμιση υπό κενό σε συσκευή 'rotavapor' και την εφαρμογή υψηλού κενού, επαναδιαλύθηκαν σε δευτεριωμένους διαλύτες ανάλογα με την πολικότητά τους. Στη συνέχεια, στα παρασκευαζόμενα διαλύματα πραγματοποιήθηκε λήψη φασμάτων μιας (1D-NMR) και δύο διαστάσεων (2D-NMR). Η λήψη των φασμάτων μιας διαστάσεως 1H-NMR και δύο διαστάσεων COSY (Correlation Spectroscopy), HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) και HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation), έγινε σε φασματογράφους Bruker Advance III 600 MHz και Bruker 400 MHz, οι οποίοι είναι εξοπλισμένοι με ανιχνευτή 5mm 'broadband inverse detection probe' (BBI) (Ο φασματογράφος 600 MHz διαθέτει και ρομποτικό δειγματολήπτη 60 θέσεων (B-ACS 60)), ενώ το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν το TopSpin™.

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για τη λήψη των φασμάτων ήταν η δευτεριωμένη μεθανόλη (CD₃OD), η δευτεριωμένη ακετόνη (CD₃)₂CO, το δευτεριωμένο διμεθυσουλφοξείδιο (DMSO-D₆) και το δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl₃).

Από τη μελέτη των ληφθέντων φασμάτων προέκυψαν συμπεράσματα σχετικά με τα δομικά χαρακτηριστικά των απομονωμένων ενώσεων και καταλήξαμε στην ταυτοποίησή τους. Οι χημικές μετατοπίσεις (δ) εκφράστηκαν σε ppm, ενώ οι σταθερές σύζευξης (J) σε Hz. Η πολλαπλότητα των κορυφών χαρακτηρίστηκε ως s (απλή), brs (ευρεία απλή), d (διπλή), t (τριπλή), q (τετραπλή), dd (διπλή-διπλής) και m (πολλαπλή). Ακολούθησε σύγκριση των πειραματικών τιμών με δεδομένα της βιβλιογραφίας.



Εικόνα 23: Φασματογράφος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)

2.5. Μέθοδοι αξιολόγησης βιολογικών ιδιοτήτων

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, οι κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού που χρησιμοποιήθηκαν επιλέχθηκαν με βάση το διαφορετικό μοριακό προφίλ τους έτσι ώστε να ληφθεί ένα ευρύ φάσμα πληροφοριών κατά τη μελέτη της πιθανής αντι-πολλαπλασιαστικής δράσης των απομονωμένων μεταβολιτών. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού BT-20, BT-474, MCF-7, MDA-MB0231, MDA-MB-468 και SK-BR-3

2.5.1. Κυτταρικές σειρές και συνθήκες καλλιέργειας

Οι καλλιέργειες των καρκινικών κυττάρων πραγματοποιήθηκαν σε θρεπτικό υλικό 'DMEM high glucose' (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) εμπλουτισμένο με 10% (v/v) βόειο εμβρυϊκό ορό (Fetal Bovine Serum, FBS) και 2mM L-γλουταμίνη. Για την προστασία των καλλιεργειών από μικροβιακούς παράγοντες χρησιμοποιήθηκαν τα αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη σε τελικές συγκεντρώσεις 100 U/mL και 100 µg/mL, αντίστοιχα. Οι καλλιέργειες των κυττάρων διατηρούνταν στους 37°C σε συνθήκες υγρασίας και σε ατμόσφαιρα 5% (v/v) CO₂.

2.5.2. Μελέτη της αντι-πολλαπλασιαστικής δράσης επιλεγμένων μεταβολιτών με τη μέθοδο της σουλφοροδαμίνης B (SRB)

Η χρωματομετρική μέθοδος με την χρήση της σουλφοροδαμίνης B αξιοποιεί την ικανότητα της σουλφοροδαμίνης B να προσδέεται σε πρωτεϊνικά στοιχεία των κυττάρων, που έχουν

προηγούμενως μονιμοποιηθεί. Συγκεκριμένα, προσδένεται σε βασικά αμινοξικά κατάλοιπα κάτω από ασθενείς όξινες συνθήκες για τον προσδιορισμό της κυτταρικής πυκνότητας. Η SRB επαναδιαλυτοποιείται κάτω από βασικές συνθήκες. Αξίζει να αναφερθεί, ότι δεν υπάρχει η δυνατότητα διαχωρισμού μεταξύ ζωντανών και νεκρών κυττάρων. Για την εφαρμογή αυτής της μεθόδου χρειάζεται αρχικά επίστρωση σε τριπλέτες μικροπλακιδίων 96 θέσεων με διαφορετικό, σταθερά αυξανόμενο αριθμό κυττάρων. Επωάζονται για 16 ώρες στους 37°C σε συνθήκες υγρασίας και με 5% περιεκτικότητα CO₂, ενώ στη συνέχεια αφαιρείται το θρεπτικό υλικό, προστίθενται σε κάθε πηγαδάκι 75μL από το αντιδραστήριο TCA (20% w/v), και ακολουθεί επώαση για 1 ώρα στους 4°C. Ακολούθως, γίνεται πλύση με νερό βρύσης 4 φορές και αφήνεται το μικροπλακίδιο για στέγνωμα περίπου 1 ώρα. Μετά το πέρας του προαναφερόμενου χρονικού διαστήματος προστίθενται 100μL διαλύματος σουλφοροδαμίνης Β (0,057% w/v) και γίνεται επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Επιπλέον, λαμβάνει χώρα έκπλυση με διάλυμα οξικού οξέος (1% v/v) (4 φορές) και αφήνεται το υπόλειμμα για στέγνωμα σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 1 ώρα. Στη συνέχεια προστίθεται σε κάθε πηγαδάκι διάλυμα Tris base (10mM, pH=10.5) και ανακινείται για 10 λεπτά. Τέλος, μετρείται η απορρόφηση στα 492nm.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Φυτοχημικό προφίλ εκχυλισμάτων του φυτού *Iris albicans*

Το φυτικό υλικό του είδους *Iris albicans* χωρίστηκε σε υπέργεια τμήματα (aerial parts) και ρίζες (roots), ξηράθηκε σε σκιερό και καλά αεριζόμενο χώρο και κονιοποιήθηκε με σκοπό την πιο αποτελεσματική παραλαβή των περιεχόμενων δευτερογενών μεταβολιτών.

Πιο συγκεκριμένα, 124 και 166 γραμμάρια υπέργειων τμημάτων και ριζών αντίστοιχα εκχυλίστηκαν διαδοχικά με διαλύτη τον οξικό αιθυλεστέρα (EtOAc) και μεθανόλη (MeOH), με τη μέθοδο εκχύλισης σε υπερήχους για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε διήθηση υπό κενό για την παραλαβή του υγρού εκχυλίσματος. Η διαδικασία επαναλήφθηκε τρεις φορές για κάθε διαλύτη. Όλα τα εκχυλίσματα συμπυκνώθηκαν σε περιστροφικό αποστακτήρα (Rotavap) και πάρθηκαν φάσματα ^1H NMR για το κάθε ένα.

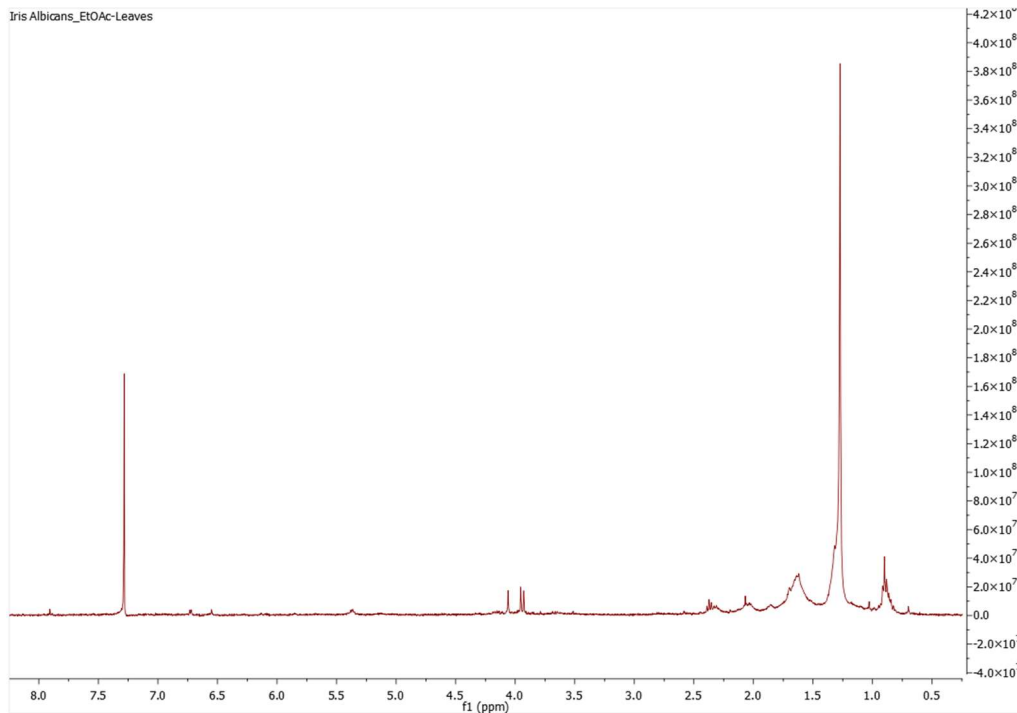
Τα υγρά εκχυλίσματα (MeOH-Ρίζες, MeOH-Υπέργεια, EtOAc-Ρίζες, EtOAc-Υπέργεια) και από τους τρεις κύκλους ανά περίπτωση συνενώθηκαν και μετά την απομάκρυνση των οργανικών διαλυτών προέκυψαν τέσσερα ξηρά εκχυλίσματα με αποδόσεις 7.8 %, 22.7%, 23.9% και 2.4%, αντίστοιχα.

Πίνακας 4: Αρχικό βάρος των τμημάτων του φυτικού υλικού και τελική απόδοση έπειτα από πολλαπλές εκχυλίσεις

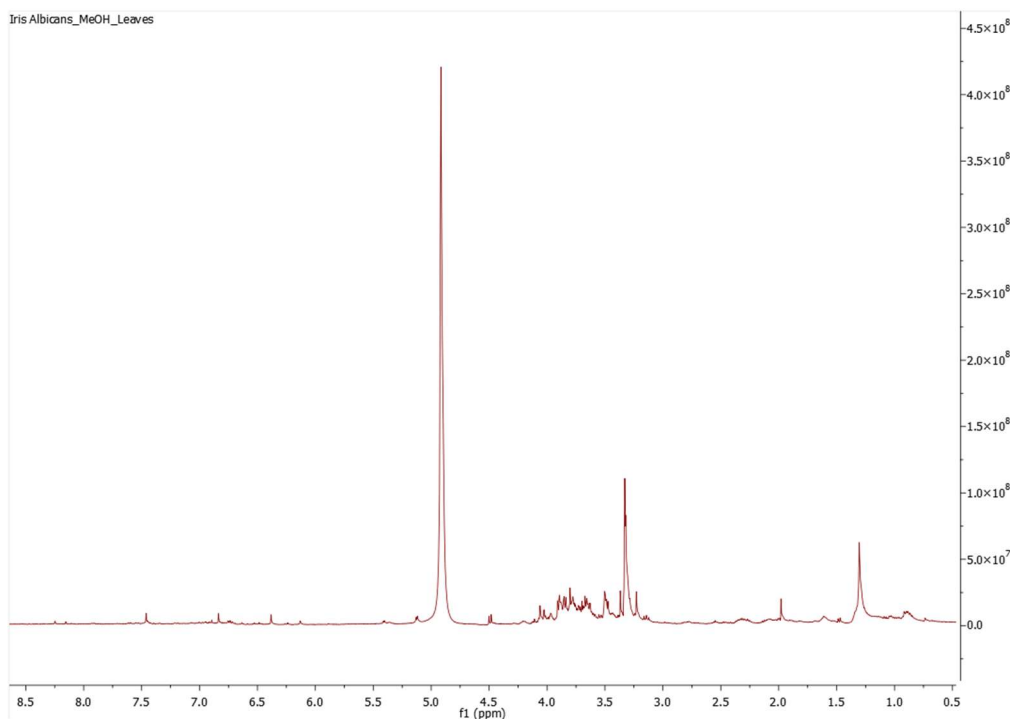
Εκχύλισμα	Αρχικό Βάρος (g)	Τελικό Βάρος (g)	Απόδοση %
MeOH-Ρίζες	166 g	13.1 g	7.8%
EtOAc-Ρίζες		37.8 g	23.9%
MeOH-Υπέργεια	124 g	12.4 g	22.7%
EtOAc-Υπέργεια		2.9 g	2.4%

Βάση των φασμάτων ^1H NMR, το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα των ριζών (EtOAc-Ρίζες) παρουσιάζει την πιο πλούσια φυτοχημική εικόνα, καθώς φάνηκε να περιέχει τόσο μέσης πολικότητας και πολικές ενώσεις, όπως είναι τα ισοφλαβονοειδή, όσο και λιγότερο πολικές, όπως Ιριδάλες, καθιστώντας το πιο ενδιαφέρον για περαιτέρω μελέτη. Το αντίστοιχο

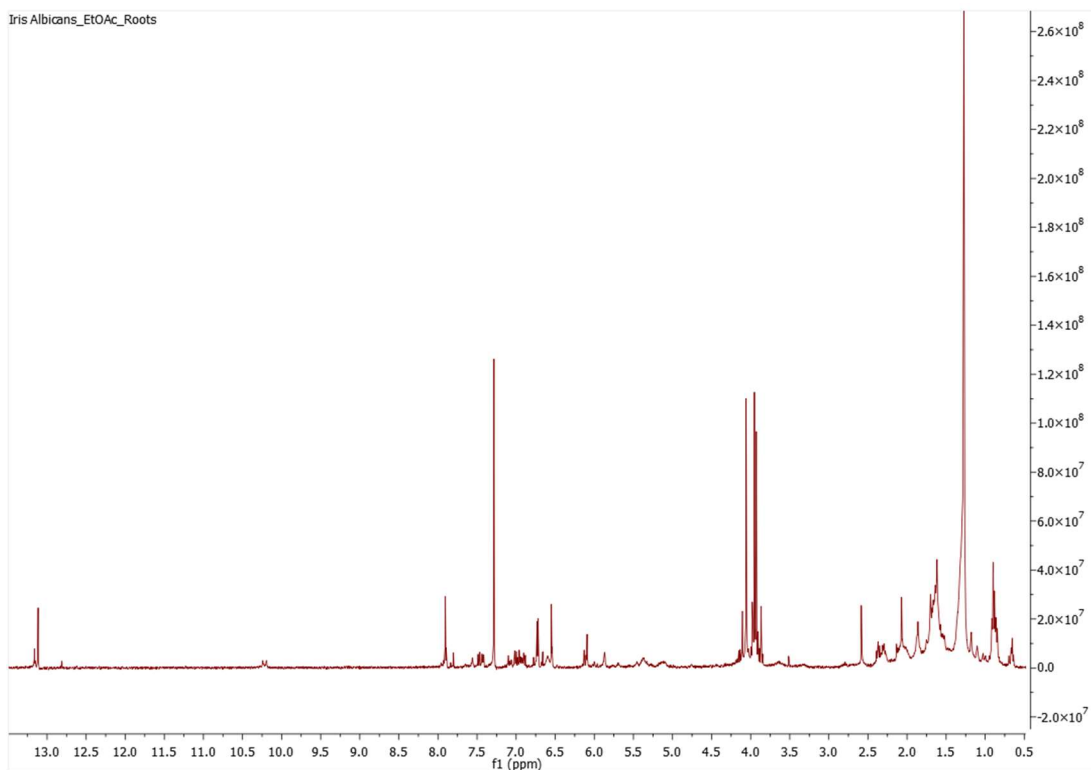
μεθανολικό εκχύλισμα είναι παρόμοιο σε πολικές και μέσης πολικότητας ενώσεις, αλλά ήταν σαφώς μικρότερη η παρουσία τερπενικών ενώσεων. Ακολουθούν τα φάσματα πρωτονίου (^1H NMR) των αρχικών εκχυλισμάτων.



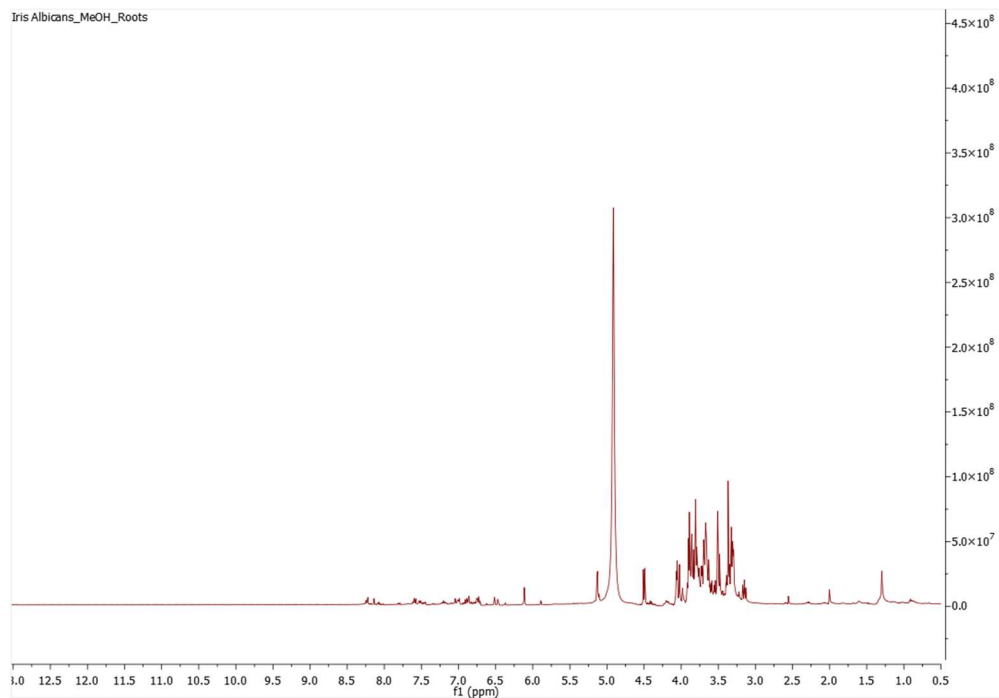
Εικόνα 24: Φάσμα ^1H -NMR του EtOAc εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων του *Iris albicans*



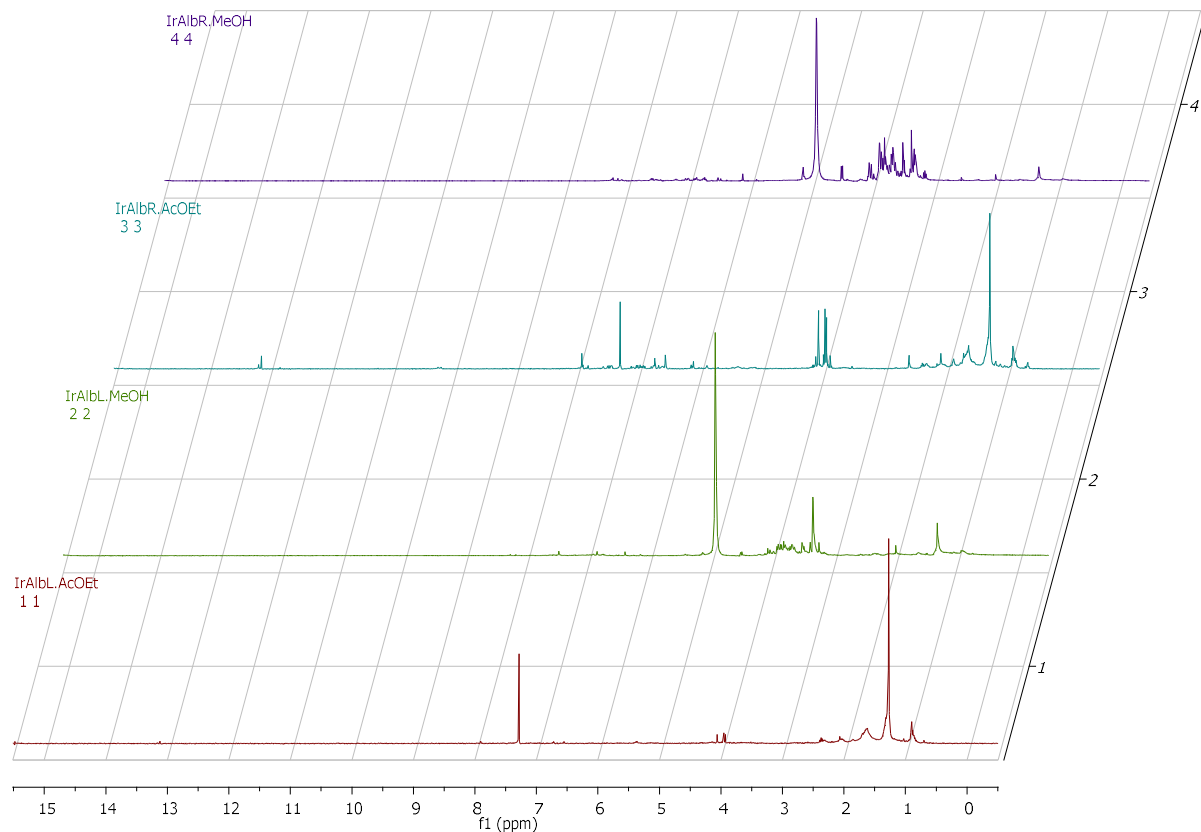
Εικόνα 25: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του MeOH εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων του *Iris albicans*



Εικόνα 26: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του EtOAc εκχυλίσματος των ριζών του *Iris albicans*



Εικόνα 27: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του MeOH εκχυλίσματος των ριζών του *Iris albicans*



Εικόνα 28: Συγκριτικό φάσμα πρωτονίου (^1H NMR) των αρχικών ολικών εκχυλισμάτων του φυτού *Iris albicans*. Τα δείγματα διαλύθηκαν σε δευτεριωμένη MeOD

3.1.1. Μελέτη του εκχυλίσματος οξικού αιθυλεστέρα των ριζών του φυτού *Iris albicans*

Αρχικά στο εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα των υπόγειων τμημάτων του *Iris albicans* (36 g) πραγματοποιήθηκε κλασμάτωση μέσω χρωματογραφίας στήλης υπό κενό (Vacuum Liquid Column Chromatography- VLC1) και αξιολόγησή της μέσω χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (Thin Layer Chromatography-TLC).

Πιο αναλυτικά, λόγω των πολυάριθμων δευτερογενών μεταβολιτών που περιέχονται στο εκχύλισμα του *I. albicans* κρίθηκε ως ευκολότερη λύση η βαθμιδωτή έκλυση χρησιμοποιώντας συνδυασμούς διαλυτών διαφορετικής πολικότητας, ξεκινώντας από άπολους έως και πολικούς διαλύτες.

Η χρωματογραφική στήλη που χρησιμοποιήθηκε είχε ως πληρωτικό υλικό (στατική φάση) γέλη πυριτίου με κόκκους διαμέτρου των 60 μm . Το δείγμα τοποθετήθηκε στην κορυφή

της στήλης αφού προσροφήθηκε σε γέλη πυριτίου με διάμετρο κόκκων 63-200 μ m. Η στήλη εξισορροπήθηκε με αρχικό μίγμα έκλουσης οξικού αιθυλεστέρα (EtOAc) και κυκλοεξανίου (c-Hex) 2:98.

Πίνακας 5: Τα σύστημα οργανικών διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν για τη βαθμιδωτή έκλυση

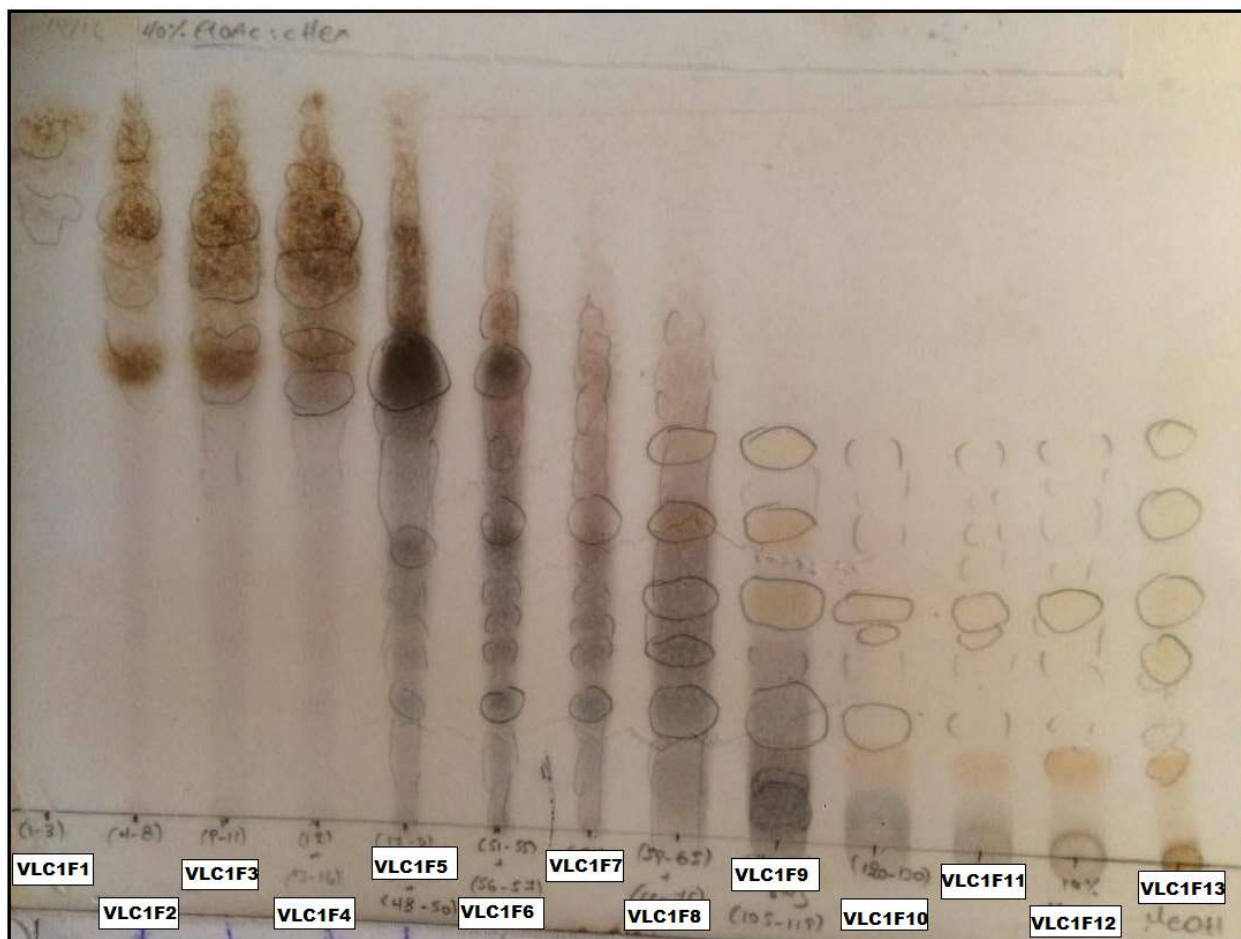
Αριθμός Συστήματος	EtOAc %	c-Hex %	MeOH %	Κλάσματα VLC
1	2	98	0	Εξισορρόπηση
2	5	95	0	1 έως 7
3	10	90	0	8 έως 33
4	15	85	0	34 έως 46
5	20	80	0	47 έως 62
6	25	75	0	63 έως 74
7	35	65	0	75 έως 89
8	50	50	0	90 έως 119
9	60	40	0	120 έως 132
10	100	0	0	EtOAc 100%
11	90	0	10	MeOH 10%
12	80	0	20	MeOH 20%

Τα κλάσματα που συλλέχθηκαν, ελέγχθηκαν με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) κανονικής φάσης με συστήματα ανάπτυξης EtOAc/c-Hex σε αναλογίες 40/60, 5/95, 10/90 και MeOH/CH₂Cl₂ 10/90 και συνενώθηκαν καταλλήλως.

Από την συνολική VLC1 και μετά τις συνενώσεις προέκυψαν τελικά 13 κλάσματα (fractions) που παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 6: Τα κλάσματα του αρχικού διαχωρισμού από την υγρή χρωματογραφία στήλης υπό κενό (VLC1) από το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα (EtOAc) των υπόγειων τμημάτων (ρίζες) του φυτού *Iris albicans*

ΚΛΑΣΜΑΤΑ VLC (VLC1F)	ΣΥΝΕΝΩΣΕΙΣ	Βάρος (mg)
VLC1F1	1 έως 3	55
VLC1F2	4 έως 8	124
VLC1F3	9 έως 11	83
VLC1F4	12 έως 16	224
VLC1F5	17 έως 50	656
VLC1F6	51 έως 57	149
VLC1F7	58	80
VLC1F8	59 έως 76	428
VLC1F9	77 έως 119	113
VLC1F10	120 έως 130	158
VLC1F11	EtOAc 100%	124
VLC1F12	MeOH 10%	448
VLC1F13	MeOH 20%	994

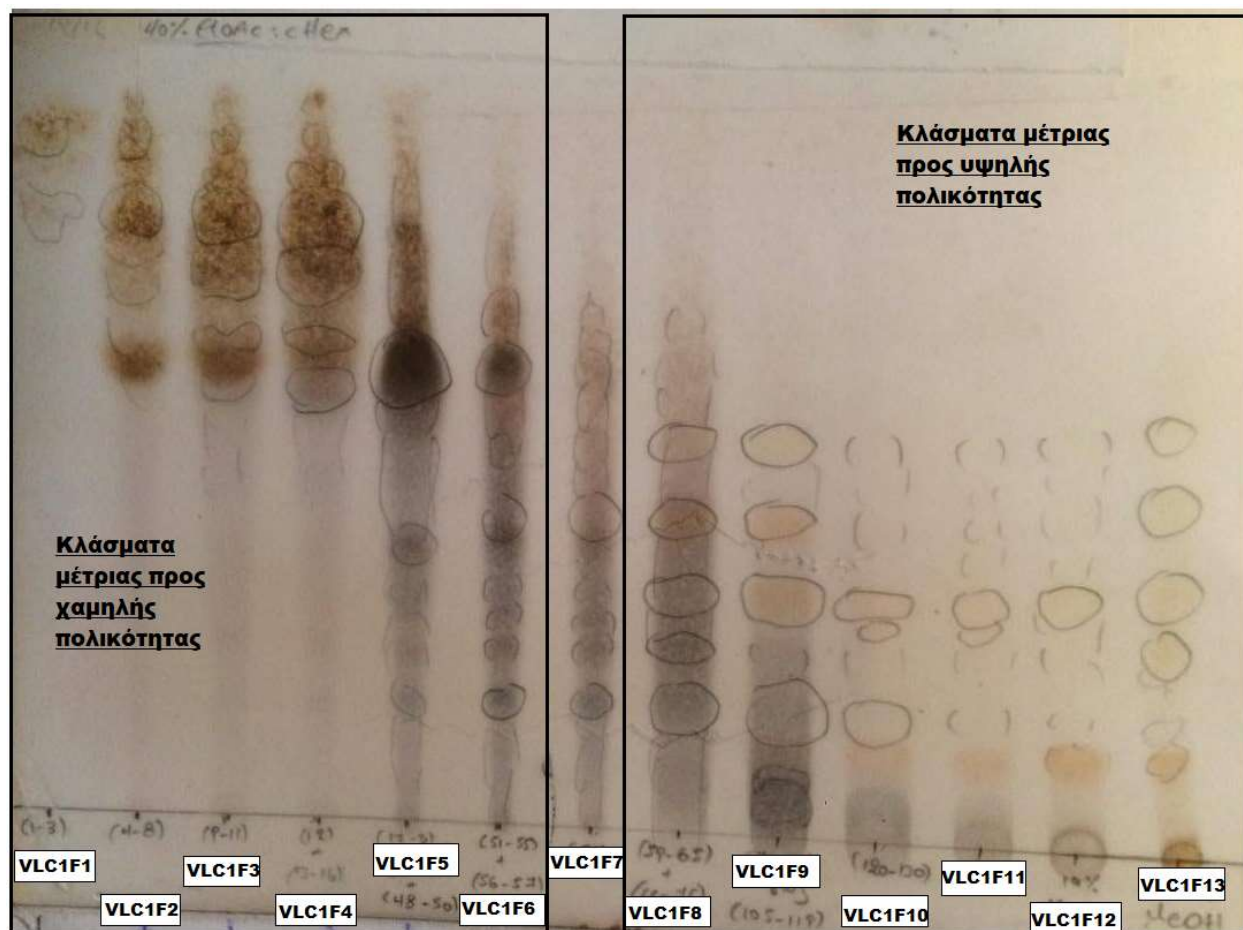


Εικόνα 29: Συνολική TLC σε σύστημα οξικού αιθυλεστέρα (EtOAc) και κυκλοεξανίου (c-Hexane) σε αναλογία 60:40, με όλες τις συνενώσεις από VLC1. Παρατήρηση έγινε στα 254 nm και εμφάνιση με διάλυμα θειικής βανιλίνης

3.1.2. Επιλογή κλασμάτων της VLC1 προς περαιτέρω μελέτη

Μέσω του χρωματογραφικού ελέγχου με TLC, τα κλάσματα χωρίστηκαν σε δύο γενικές κατηγορίες:

- Κλάσματα χαμηλής και μέσης πολικότητας (συνενώσεις **VLC1F1** έως **VLC1F6**). Σε αυτά τα κλάσματα περιέχονται δευτερογενείς μεταβολίτες που ανήκουν κυρίως στην κατηγορία των τερπενίων, όπως είναι οι ιριδάλες.
- Κλάσματα μέσης και υψηλής πολικότητας (συνενώσεις **VLC1F8** έως **VLC1F13**). Σε αυτά τα κλάσματα περιέχονται δευτερογενείς μεταβολίτες που ανήκουν στην κατηγορία των ισοφλαβονών, όπως επίσης και τερπενικές ενώσεις σε μικρή περιεκτικότητα.



Εικόνα 30: Συνολική TLC σε σύστημα οξικού αιθυλεστέρα (EtOAc) και κυκλοεξανίου (c-Hexane) σε αναλογία 60:40, με όλες τις συνενώσεις των κλασμάτων της VLC1. Η ανίχνευση έγινε στα 254 nm και εμφάνιση με διάλυμα θειικής βανιλίνης

Περαιτέρω επεξεργασία όλων των VLC1 κλασμάτων έγινε με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, κανονικής φάσης, για τα κλάσματα μέσης προς χαμηλής πολικότητας (NP-HPLC) και αντίστροφης φάσης για τα κλάσματα μέτριας προς υψηλής πολικότητας (RP-HPLC).

3.2. Επιλογή και επεξεργασία του κλάσματος VLC1F12 (MeOH10%) με χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (RP-HPLC).

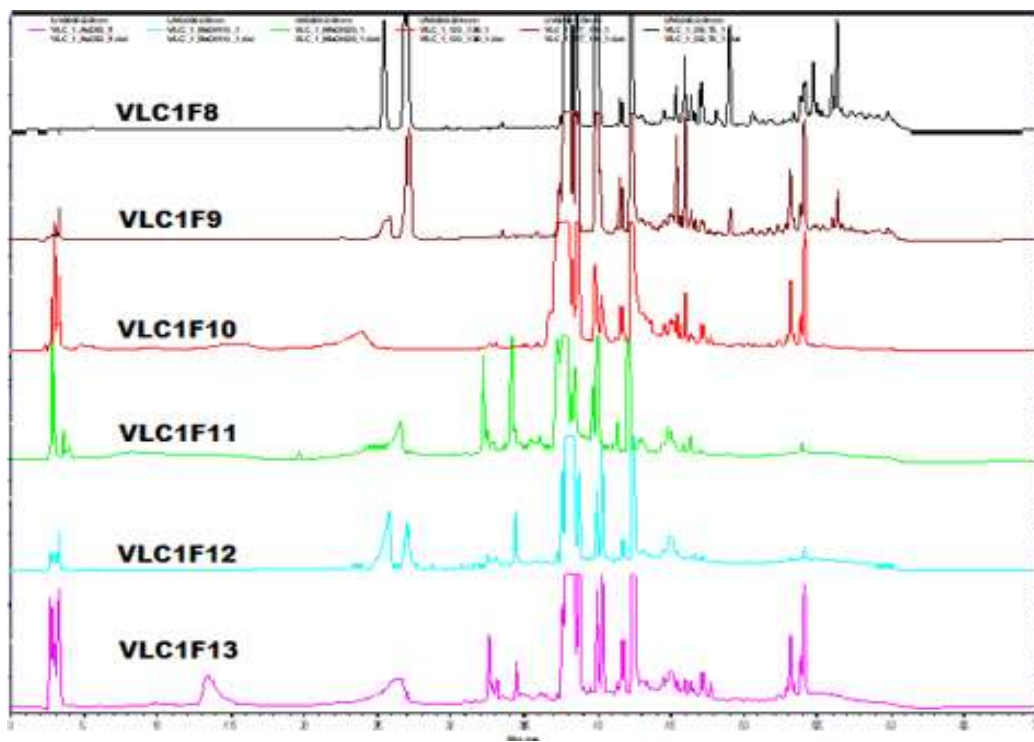
Με σκοπό τον έλεγχο του χημικού περιεχομένου των κλασμάτων υψηλής πολικότητας, πραγματοποιήθηκε ανάλυση με την τεχνική της αναλυτικής RP-HPLC. Από όλα τα κλάσματα παρασκευάστηκαν διαλύματα συγκέντρωσης 10 mg/mL σε μίγμα διαλυτών MeOH:H₂O 80:20.

Σχεδόν σε όλα τα κλάσματα εμφανίστηκε ίζημα, γεγονός το οποίο οφείλεται στην ύπαρξη τερπενικών ενώσεων που καθιζάνουν παρουσία πολικού διαλύτη όπως το νερό. Προκειμένου να μπορέσουν τα διαλύματα να χρησιμοποιηθούν σε HPLC ανάλυση διηθήθηκαν από πτυχωτό ηθμό και στη συνέχεια από πορώδη φίλτρα 0.45μm (τεφλόν). Η χρωματογραφική στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η ReproSil 100 C18, 250x4.6mm, 5μm. Το χρωματογραφικό προφίλ των κλασμάτων παρατηρήθηκε κυρίως στο μήκος κύματος των 254 nm, ενώ η αναλυτική μέθοδος βαθμιδωτής έκλυσης (gradient elusion) που χρησιμοποιήθηκε φαίνεται παρακάτω:

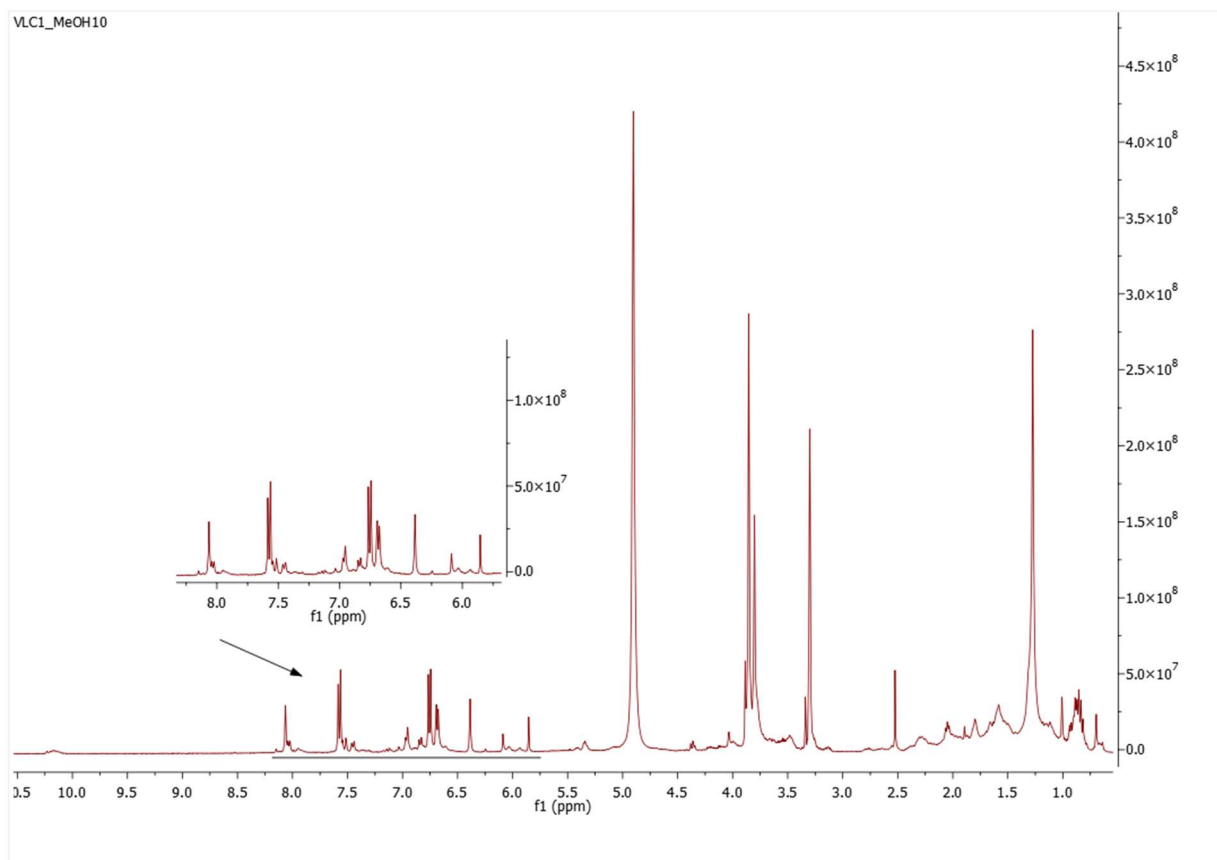
Πίνακας 7: Σύστημα έκλυσης αναλυτικής RP-HPLC για το κλάσμα VLC1F12 (MeOH10%)

<u>Σύστημα Έκλυσης</u>	<u>Flow (ml/min)</u>	<u>Injection Volume (μl)</u>
Gradient	0.8	27
Time (min)	Mobile Phase A: MeOH (%)	Mobile Phase B: H₂O (%)
0	5	95
0 - 3	5 -> 12	95 -> 88
3 - 8	12 -> 15	88 -> 85
8 - 20	15 -> 40	85 -> 60
20 - 24	40	60
24 - 40	40 -> 90	60 -> 10
40 - 45	90 -> 100	10 -> 0
45 - 55	100	0
55 - 65	100 -> 5	0 -> 95

Τα χρωματογραφήματα είχαν παρόμοια εικόνα με μικρές αλλά σημαντικές διαφορές. Τελικά επιλέχθηκε το κλάσμα **VLC1F12 (MeOH10%)** για περαιτέρω μελέτη, λόγω μεγαλύτερης ποσότητας αλλά και του πλούσιου φορτίου σε ισοφλαβόνες, όπως αποτυπώνεται και στο φάσμα ¹H NMR του σε MeOH-d₄ που φαίνεται στην εικόνα 30.



Εικόνα 31: Συγκριτικό χρωματογράφημα όλων των κλασμάτων VLC1 μέτριας προς υψηλής πολικότητας



Εικόνα 32: Φάσμα πρωτονίου ¹H NMR για το κλάσμα VLC1F12 (MeOH 10%) σε MeOH-*d*4

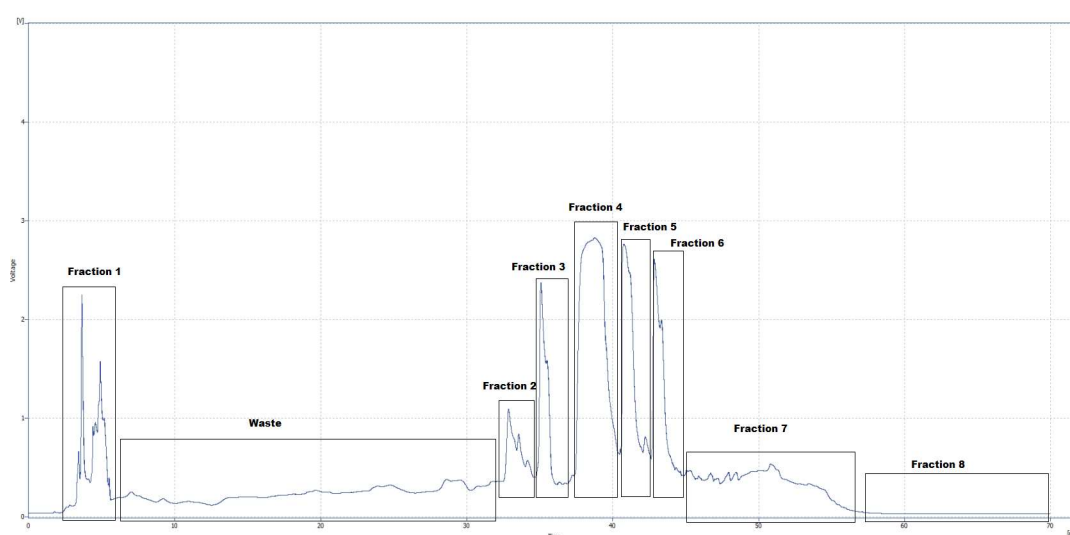
3.2.1. Επεξεργασία του κλάσματος VLC1F12 (MeOH10%)

Το κλάσμα VLC1F12 (448mg) υποβλήθηκε σε ημι-παρασκευαστική υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης αντίστροφης φάσης (Semi-Preparative RP-HPLC). Το δείγμα αραιώθηκε σε μίγμα διαλυτών MeOH:H₂O σε αναλογία 90:10 και σε συγκέντρωση 30 mg/mL. Λόγω σχηματισμού ιζήματος, ακολούθησε διήθηση σε πτυχωτό ηθμό. Η ημι-παρασκευαστική στήλη που χρησιμοποιήθηκε είναι ReproSil 100 C18, 250x10mm, 5μm και η μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε είναι η εξής:

Πίνακας 8 : Σύστημα έκλουσης ημι-παρασκευαστικής RP-HPLC για το VLC1F12 (MeOH10%)

Σύστημα Έκλουσης	Flow (ml/min)	Injection Volume (μl)
Gradient	4,0	250-900
Time (min)	Mobile Phase A: MeOH (%)	Mobile Phase B: H2O (%)
0	5	95
0 - 3	5->12	95->88
3 - 8	12->15	88->85
8 - 20	15->40	85->60
20 - 24	40	60
24 - 40	40->90	60->10
40 - 45	90->100	10->0
45 - 55	100	0
66 - 65	100->4	0->95

Όλοι οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν υψηλής καθαρότητας HPLC, φιλτραρίστηκαν και απαερώθηκαν σε υπέρηχους πριν την εξισορρόπηση του συστήματος. Σύμφωνα με την χρωματογραφική εικόνα, από το κλάσμα VLC1F12 συλλέχθηκαν 8 κορυφές ή ζώνες, μετά από πολλαπλές επαναλήψεις ενέσεων των 250-900 μl που εκτελέστηκαν με εξωτερικό εισαγωγέα δείγματος (injector port).



Εικόνα 33: Χρωματογράφημα VLC1F12 (MeOH10%)

Για την ανίχνευση των εκλουόμενων συστατικών χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής φωτοδιόδων (PDA), ενώ τα κυρίαρχα μήκη κύματος ανίχνευσης ήταν τα 254 και 280 nm. Από τις 8 κορυφές/ζώνες, το VLC1F12 Fraction 6 (F6) ταυτοποιήθηκε ως ο **μεταβολίτης 1**, ενώ τα υπόλοιπα κρίθηκε ότι αποτελούσαν μείγματα 2 ή περισσότερων ουσιών και υποβλήθηκαν σε νέες ημι-παρασκευαστικές χρωματογραφίες HPLC.

Πίνακας 9: Ποσότητες των κλασμάτων που συλλέχθηκαν από την κλασμάτωση της VLC1F12 (MeOH10%)

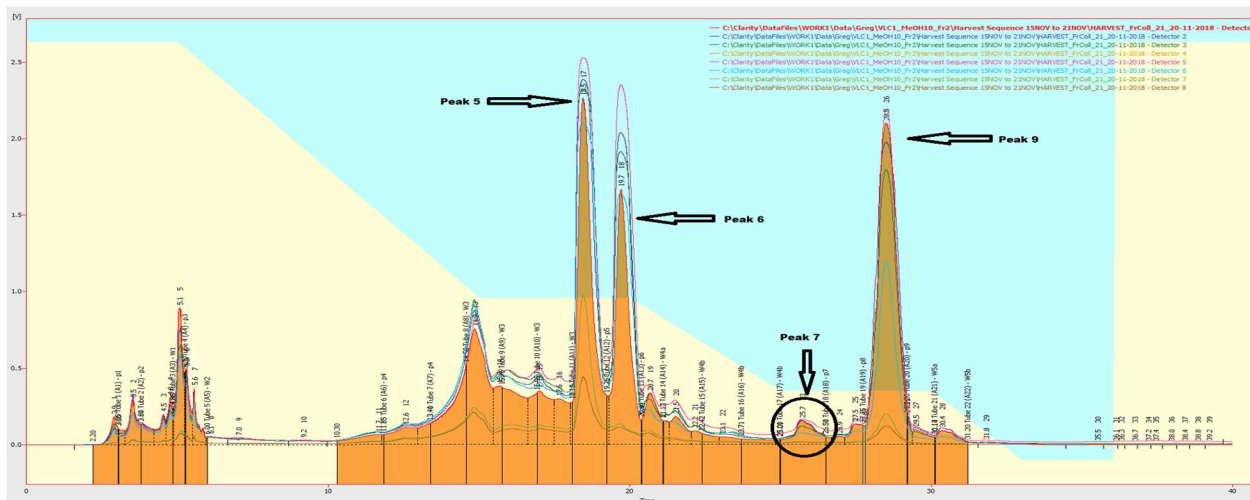
VLC1F12 (MeOH10%)	
Sub Fraction	Βάρος (mg)
F1	22.3
Waste	6.5
F2	58.3
F3	23.1
F4	88.4
F5	23
F6	23.6
F7	4.2
F8	89.9

3.2.1.1. Επεξεργασία κλάσματος VLC1F12-FR2

Το κλάσμα VLC1F12-FR2 (58.3 mg), υποβλήθηκε σε ημι-παρασκευαστική χρωματογραφία υψηλής πίεσης αντίστροφης φάσης (Semi-Prep, RP-HPLC). Το δείγμα, αραιώθηκε με MeOH/H₂O σε τελική συγκέντρωση 10 mg/mL, ενώ η χρωματογραφική στήλη που χρησιμοποιήθηκε είναι η Fortis Diphenyl, 250x10mm. Εφαρμόσθηκε η παρακάτω μέθοδος βαθμιδωτής έκλουσης και η ανίχνευση των εκλουόμενων ουσιών έγινε στα 254/280 nm. Από τις συνολικά 16 κορυφές του χρωματογραφήματος (Εικ. 34), συλλέχθηκαν και ελήφθησαν φάσματα ¹H NMR για τις κορυφές 4,5,6,7,8 και 9 εκ των οποίων οι κορυφές 5, 6 και 9 ταυτοποιήθηκαν ως **μεταβολίτες 2, 3 και 4**, αντίστοιχα.

Πίνακας 10: Σύστημα έκλουσης ημι-παρασκευαστικής RP-HPLC για το κλάσμα VLC1F12-F2

Σύστημα Έκλουσης VLC1F12-Fr2	Flow (ml/min)	Injection Volume (μl)
Gradient	3.5	100
Time (min)	Mobile Phase A: MeOH (%)	Mobile Phase B: H₂O (%)
0 - 5	95	5
5 - 15	95->40	5->60
15 - 20	40	60
20 - 25	40->20	60->80
25 - 30	20	80
30 - 33	20->5	80->95
33 - 36	5	95
36 - 36.5	5->95	95->5
36.5 - 40	95	5



Εικόνα 34: Χρωματογράφημα VLC1F12- Fraction 2 με επισημασμένες τις κύριες κορυφές του

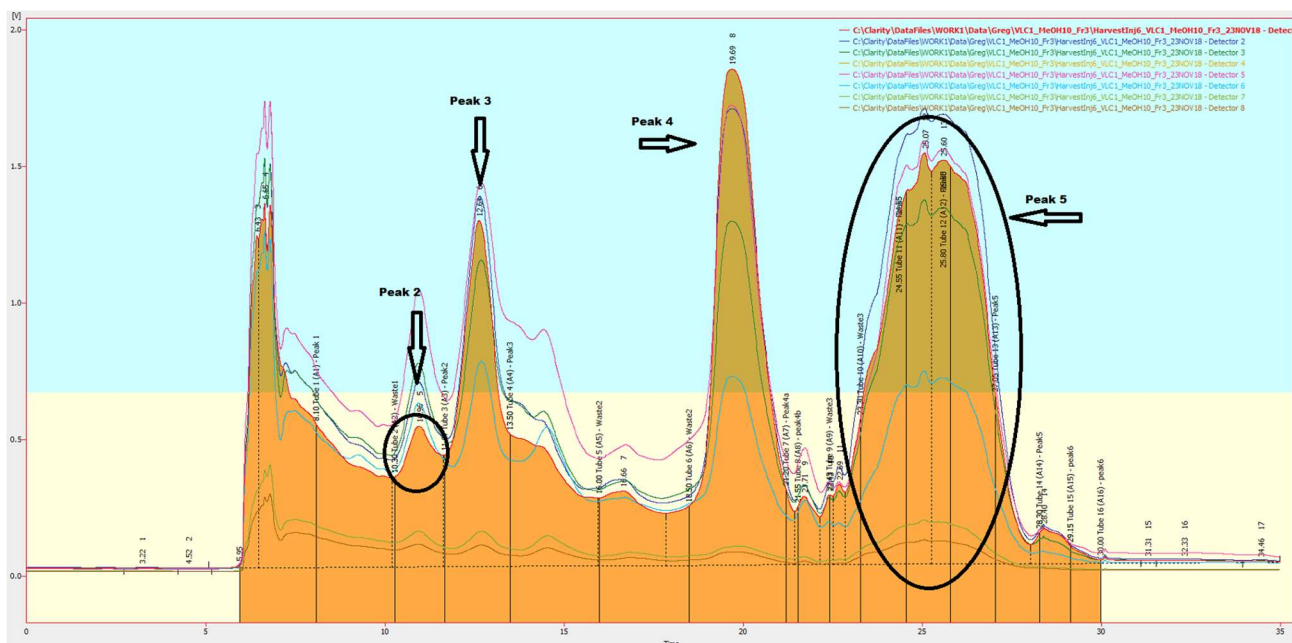
3.2.1.2. Επεξεργασία του κλάσματος VLC1F12-FR3

Το κλάσμα VLC1F12-FR3 (23.1 mg), υποβλήθηκε σε ημι-παρασκευαστική χρωματογραφία υψηλής πίεσης αντίστροφης φάσης (Semi-Prep,RP-HPLC). Το δείγμα αραιώθηκε σε συγκέντρωση 15 mg/mL, ενώ η χρωματογραφική στήλη που χρησιμοποιήθηκε

είναι η Fortis Diphenyl, 250x4.6mm. Εφαρμόσθηκε η παρακάτω μέθοδος βαθμιδωτής έκλουσης και η ανίχνευση των εκλούμενων ουσιών έγινε στα 254 nm. Σύμφωνα με την χρωματογραφική εικόνα εντοπίστηκαν και συλλέχθηκαν 9 κορυφές, εκ των οποίων ελήφθησαν τα φάσματα ¹H-NMR για τις κορυφές 2, 3, 4 και 5. Η κορυφή 4 ταυτοποιήθηκε ως ο **μεταβολίτης 5** ενώ η κορυφή 5 περιείχε τον **μεταβολίτη 4** (όπως και η κορυφή 9 του προηγούμενου κλάσματος **VLC1F12-FR2-Peak 9**) με την οποία και συνενώθηκε.

Πίνακας 11: Σύστημα έκλουσης ημι-παρασκευαστικής Reverse phase HPLC για το κλάσμα VLC1F12- Fraction 3

Σύστημα Έκλουσης VLC1F12-Fr3	Flow (ml/min)	Injection Volume (μl)	
Gradient	2.0/4.0	100	
Time (min)	Mobile Phase A: MeOH (%)	Mobile Phase B: H₂O (%)	Flow mL/min)
0 - 21.2	38	62	2.0
21.2 - 30	38	62	4.0
30-35	38	62	2.0



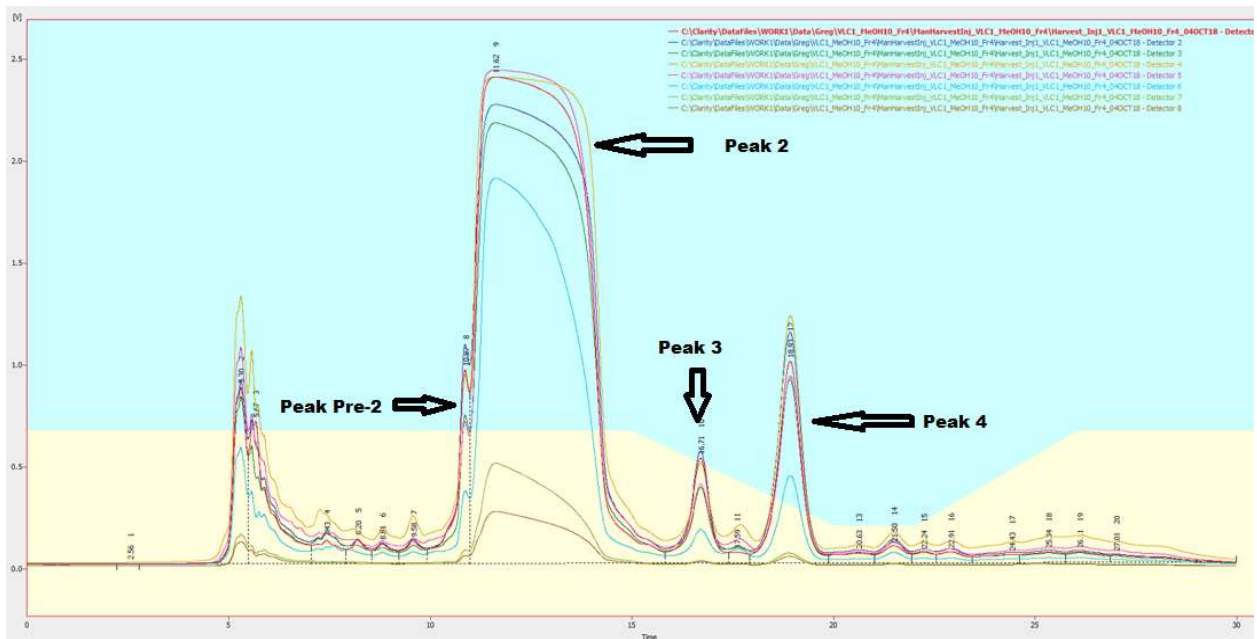
Εικόνα 35: Χρωματογράφημα VLC1F12- Fraction 3 με επισημασμένες τις κύριες κορυφές που ταυτοποιήθηκαν σαν πιθανοί δευτερογενείς μεταβολίτες

3.2.1.3. Επεξεργασία του κλάσματος VLC1F12-FR4

Το κλάσμα **VLC1F12-FR4**, επεξεργάστηκε με ημι-παρασκευαστική χρωματογραφία υψηλής πίεσης αντίστροφης φάσης (Semi-Prep, RP-HPLC). Τα 88.4 mg δείγματος αραιώθηκαν σε συγκέντρωση 10 mg/mL, ενώ η χρωματογραφική στήλη που χρησιμοποιήθηκε είναι η Fortis Diphenyl, 250x10mm. Εφαρμόστηκε η παρακάτω μέθοδος βαθμιδωτής έκλουσης και η ανίχνευση των εκλουόμενων ουσιών έγινε στα 254 nm. Εντοπίστηκαν και συλλέχθηκαν 6 κορυφές, για τις οποίες ελήφθησαν τα φάσματά ¹H-NMR. Η ουσία που αντιστοιχεί στην κορυφή 2 ταυτοποιήθηκε ως ο **μεταβολίτης 4**, ενώ οι κορυφές 3 και 4 βάσει της εικόνας των φασμάτων ¹H-NMR τους έδειξαν ότι περιέχουν δύο ουσίες η κάθε μια και επομένως αποφασίσθηκε ότι χρήζουν περαιτέρω χρωματογραφικού διαχωρισμού.

Πίνακας 12: Σύστημα έκλουσης ημι-παρασκευαστικής Reverse phase HPLC για το κλάσμα VLC1F12- Fraction 4.

Σύστημα Έκλουσης VLC1F12-Fr4	Flow (ml/min)	Injection Volume (μl)
Gradient	2.5	100
Time (min)	Mobile Phase A: MeOH (%)	Mobile Phase B: H ₂ O (%)
0 - 15	31	69
15 - 20	15	85
20 - 22	15	85
22 - 26	31	69
26 - 30	31	69



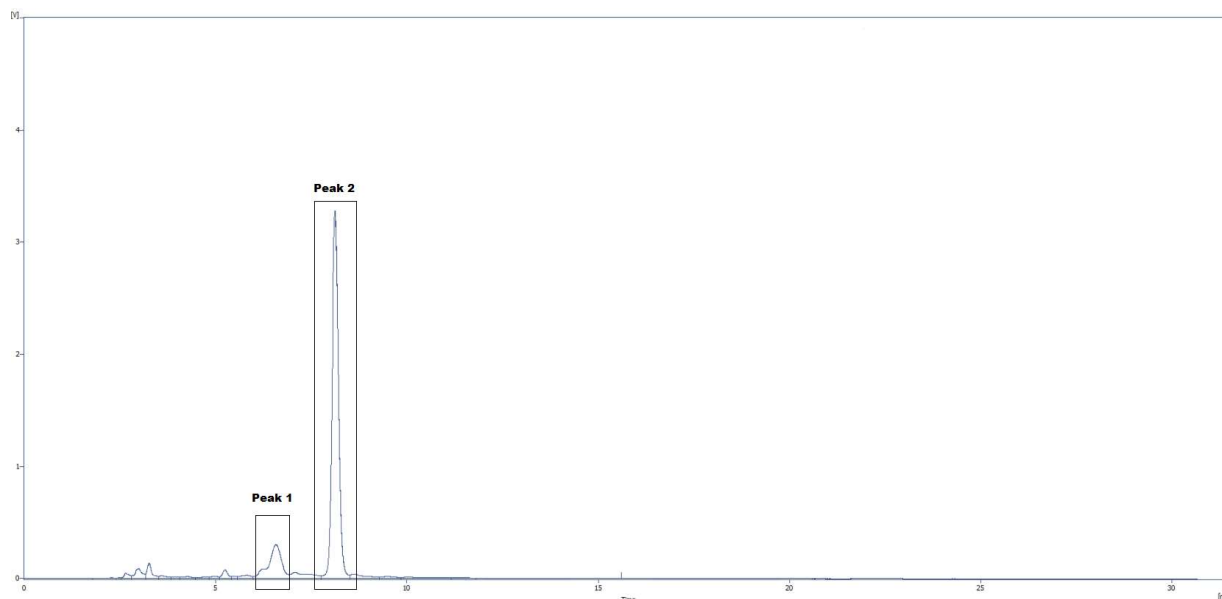
Εικόνα 36: Χρωματογράφημα VLC1F12- Fraction 4 με επισημασμένες τις κύριες κορυφές που ταυτοποιήθηκαν σαν πιθανοί δευτερογενείς μεταβολίτες

3.2.1.3.1. Επεξεργασία της κορυφής 3 του VLC1F12-FR4

Η παρατήρηση του φάσματος πρωτονίου ($^1\text{H-NMR}$) της κορυφής 3 του κλάσματος VLC1-Fr4 φανέρωσε την παρουσία δύο διαφορετικών ενώσεων. Ακολούθησε επεξεργασία με αναλυτική RP-HPLC για την οποία περίπου 4.0 mg αραιώθηκαν σε συγκέντρωση 1.0 mg/ml. Η χρωματογραφική στήλη που χρησιμοποιήθηκε είναι η Fortis Diphenyl, 250x4.6mm. Εφαρμόστηκε η παρακάτω μέθοδος βαθμιδωτής έκλυσης και η ανίχνευση των εκλούμενων ουσιών έγινε στα 254 nm. Η προαναφερόμενη διαδικασία είχε ως αποτέλεσμα τον διαχωρισμό και την συλλογή δύο κορυφών, μίας εκ των οποίων (Peak 2) αποτελεί τον **μεταβολίτη 6**.

Πίνακας 13: Σύστημα έκλυσης αναλυτικής Reverse phase HPLC για το κλάσμα VLC1F12- Fraction 4 – Peak 3.

Σύστημα Έκλυσης VLC1F4-P3	Flow (ml/min)	Injection Volume (μl)	Wavelength :254nm
Isocratic	1.0	27	
Time (min)	Mobile Phase A: H ₂ O%	Mobile Phase B: MeOH%	
0 to 30	30	70	



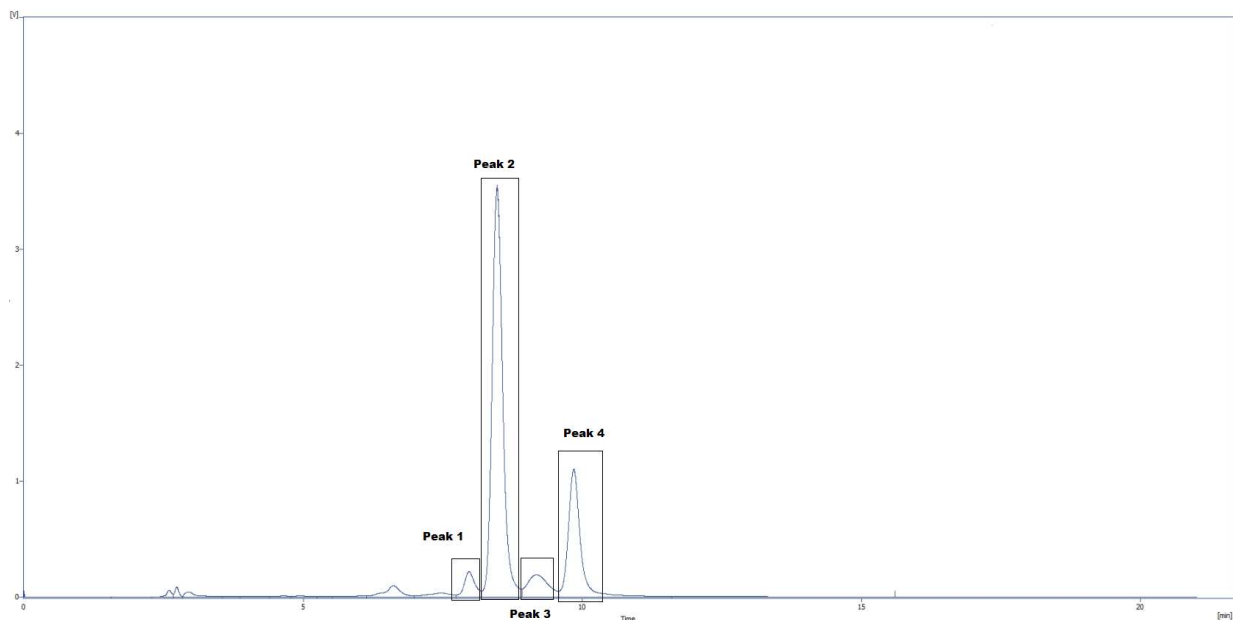
Εικόνα 37: Χρωματογράφημα VLC1F12- Fraction 4 – Peak 3

3.2.1.3.2. Επεξεργασία της κορυφής 4 του VLC1F12-FR4

Η παρατήρηση του φάσματος πρωτονίου ($^1\text{H-NMR}$) της κορυφής 4 του VLC1F12-Fr4, φανέρωσε την παρουσία 2 διαφορετικών ενώσεων και γι' αυτό το λόγο πραγματοποιήθηκε χρωματογραφικός διαχωρισμός με αναλυτική RP-HPLC. Η χρωματογραφική στήλη που χρησιμοποιήθηκε είναι η Fortis Diphenyl (250x4.6mm, 5 μm), το σύστημα ισοκρατικής έκλυσης φαίνεται και η ανίχνευση των εκλουόμενων ουσιών έγινε στα 254 nm. Τελικά απομονώθηκαν οι δύο ουσίες ως κορυφές 2 και 4 (Peak 2, Peak 4), οι οποίες ταυτοποιήθηκαν ως οι **μεταβολίτες 7** και **8**, αντίστοιχα.

Πίνακας 14: Σύστημα έκλυσης αναλυτικής Reverse phase HPLC για το κλάσμα VLC1F12- Fraction 4 – Peak 4.

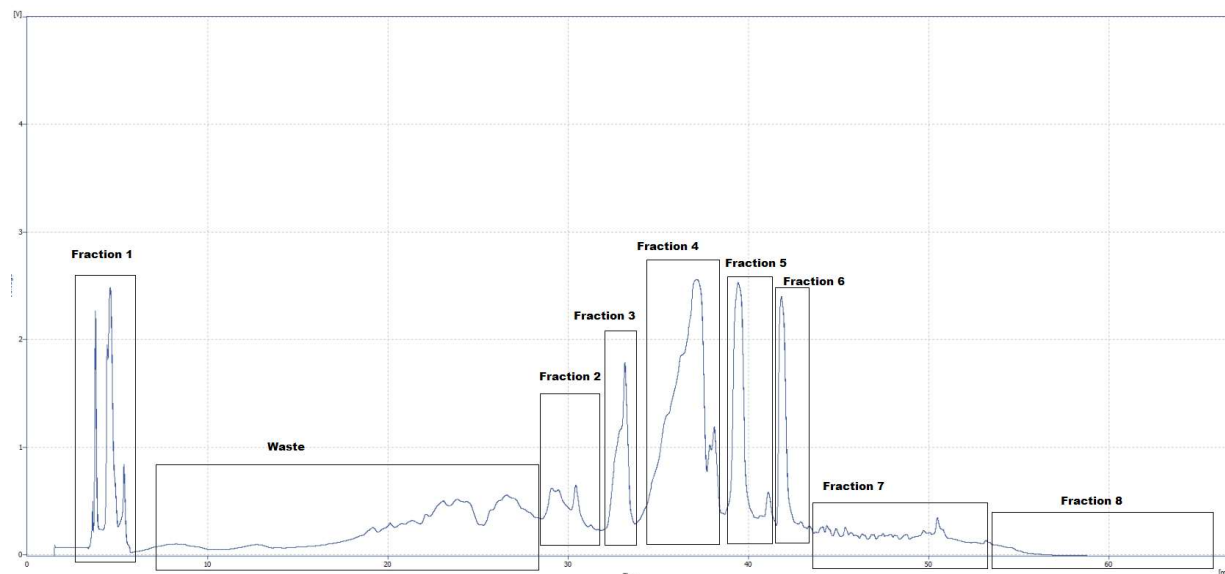
Σύστημα Έκλυσης VLC1F4-P4	Flow (ml/min)	Injection Volume (μl)	Wavelength :254nm
Isocratic	1.0	27	
Time (min)	Mobile Phase A: H ₂ O%	Mobile Phase B: MeOH%	
0 - 25	30	70	



Εικόνα 38: Χρωματογράφημα VLC1F12- Fraction 4 – Peak 4

3.2.2. Επεξεργασία του κλάσματος VLC1F13 (MeOH 20%)

Προκειμένου να εμπλουτιστούν τα ήδη υπάρχοντα κλάσματα και οι δευτερογενείς μεταβολίτες που έχουν ήδη απομονωθεί ώστε να υπάρχει αρκετή ποσότητα για να μελετηθούν οι ιδιότητές τους (π.χ. έλεγχος βιολογικών ιδιοτήτων), έλαβε χώρα η κλασμάτωση για το VLC1F13 (MeOH 20%), καθώς με βάση τη συνολική TLC και το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ παρουσιάζει συγγενική εικόνα με αυτή του VLC1F12 (MeOH10%). Η αναλυτική διαδικασία που χρησιμοποιήθηκε είναι όμοια με αυτή που αναλύθηκε το VLC1F12.



Εικόνα 39: Χρωματογράφημα VLC1F13 (MeOH20%)

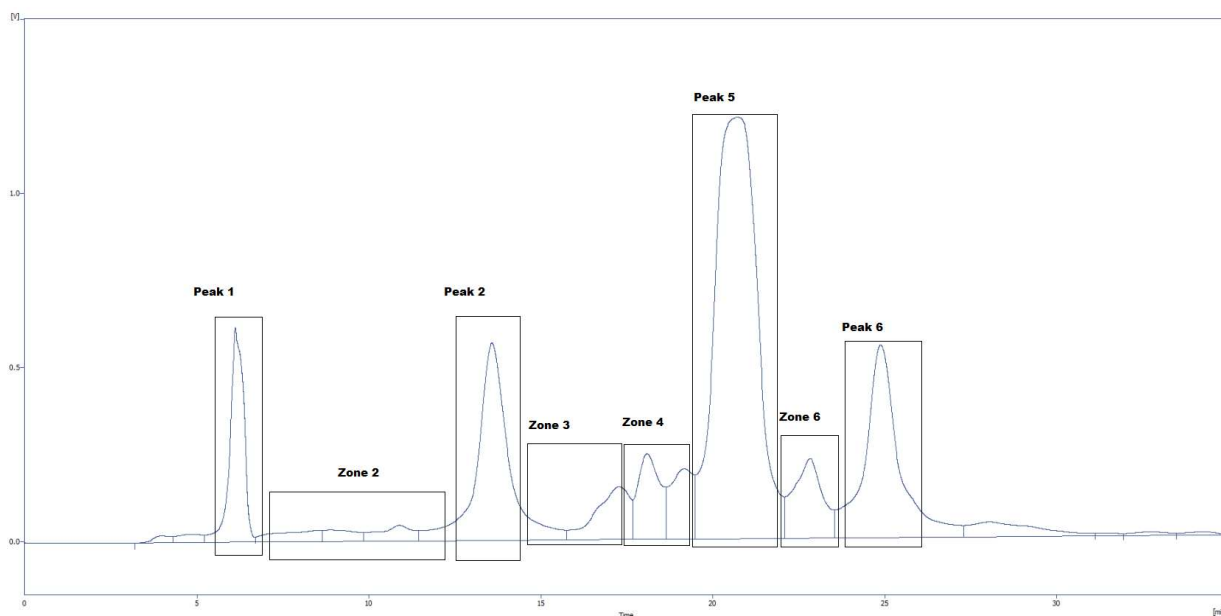
Τα αντίστοιχα κλάσματα συνενώθηκαν με τις υπολειπόμενες ποσότητες των κλασμάτων του VLC1F12.

3.2.2.1. Επεξεργασία του κλάσματος VLC1F(12+13)-FR5

Από τις συνενώσεις προέκυψε το κλάσμα **VLC1F(12+13)-FR5**, το οποίο επεξεργάστηκε με ημι-παρασκευαστική χρωματογραφία υψηλής πίεσης αντίστροφης φάσης (Semi-Prep, RP-HPLC). Το δείγμα αραιώθηκε σε συγκέντρωση 10 mg/mL, ενώ η χρωματογραφική στήλη που χρησιμοποιήθηκε είναι η ReproSil-XR 120 C8 (250x10mm, 5μm). Εφαρμόστηκε η παρακάτω μέθοδος βαθμιδωτής έκλουσης και η ανίχνευση των εκλουόμενων ουσιών έγινε στα 254 και 280 nm. Το χρωματογράφημα χωρίστηκε σε 6 ζώνες από τις οποίες με τη βοήθεια φάσματος ¹H-NMR επιλέχθηκαν οι κορυφές 2 και 5, των οποίων τα φάσματα έδειξαν ότι περιέχουν μίγματα ισοφλαβονών και απαιτείται περαιτέρω καθαρισμός.

Πίνακας 15: Σύστημα έκλουσης ημι-παρασκευαστικής Reverse phase HPLC για το κλάσμα VLC1(F12+13)- Fraction 5.

Σύστημα Έκλουσης VLC1F(12+13) Fr5	Flow (ml/min)	Injection Volume (μl)
Gradient	2.0	100
Time (min)	Mobile Phase A: MeOH (%)	Mobile Phase B: H2O (%)
0 - 5	55	45
5 - 20	55 -> 60	45 -> 40
20 - 25	60	40
25 - 38	60 -> 65	40 -> 35
38 - 43	65	35
43 - 45	65 -> 75	35 -> 30



Εικόνα 40: Χρωματογράφημα VLC1F(12+13) – Fraction 5

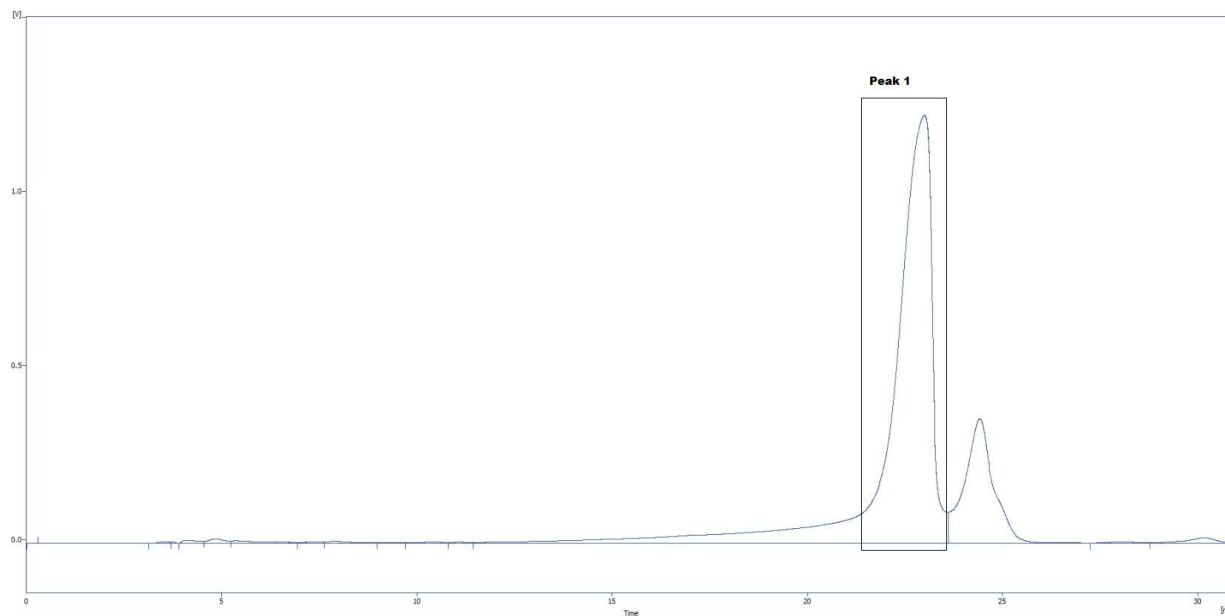
3.2.2.1.1. Επεξεργασία της κορυφής 5 του VLC1F(12+13)-FR5

Το κλάσμα που αντιστοιχεί στην κορυφή 5 του προαναφερόμενου διαχωρισμού, επεξεργάστηκε περαιτέρω με αναλυτική RP-HPLC. Η χρωματογραφική στήλη που χρησιμοποιήθηκε είναι η ReproSil-XR 120 C8 (250x4.6mm, 5μm), το σύστημα βαθμιδωτής έκλουσης φαίνεται παρακάτω, ενώ η ανίχνευση των εκλουόμενων ουσιών έγινε στα 254 nm. Με

την προαναφερόμενη διαδικασία απομονώθηκε η κορυφή 1 (Peak 1) και ταυτοποιήθηκε ως ο **μεταβολίτης 8**, δηλαδή ίδια με την ουσία VLC1F12-Fr4-P4.

Πίνακας 16: Σύστημα έκλουσης αναλυτικής Reverse phase HPLC για το κλάσμα VLC1(F12+13)- FR5- Peak 5.

Σύστημα Έκλουσης VLC1F(12+13)F5-Peak 5	Flow (ml/min)	Injection Volume (μl)	Wavelength :254nm
Gradient	0.8	27	
Time (min)	Mobile Phase A: MeOH (%)	Mobile Phase B: H ₂ O (%)	Flow mL/min)
0 - 49	40	60	0.8
49 - 52	40->5.0	60->95	0.8
52 - 60	5.0	95.0	0.8



Εικόνα 41: Χρωματογράφημα VLC1F(12+13) – Fraction 5 – Peak 5

3.3. Επεξεργασία του κλάσματος VLC1F4 χαμηλής προς μέτριας πολικότητας με χρωματογραφία υψηλής απόδοσης κανονικής φάσης (NP-HPLC)

Ο χρωματογραφικός έλεγχος με TLC σε συνδυασμό με το φάσμα πρωτονίου (¹H-NMR: παρουσία πολλών σημάτων στην αλειφατική περιοχή 2.5-0.0 ppm όπως επίσης και η απλή κορυφή στα σε δ 10.2 που αντιστοιχεί στο αλδεϋδικό πρωτόνιο H-1) έδειξε ότι το κλάσμα VLC1F4 περιέχει δευτερογενείς μεταβολίτες οι οποίοι ανήκουν κυρίως στην κατηγορία των τερπενοειδών. Εξαιτίας της σημαντικής ποσότητας η οποία ήταν διαθέσιμη (224 mg) και της μεγάλης περιεκτικότητας σε σχετικά άπολες ουσίες, χρησιμοποιήθηκε για την επεξεργασία του η τεχνική της ημι-παρασκευαστικής υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, κανονικής φάσης (Semi-Preparative NP-HPLC).

Έπειτα από πολλαπλές δοκιμές χρωματογραφικών συστημάτων, αποφασίσθηκε η εφαρμογή ισοκρατικής έκλουσης με κινητή φάση ένα μείγμα των διαλυτών κυκλοεξάνιο (c-Hex), οξικός αιθυλεστέρας (EtOAc) και ισοπροπυλική αλκοόλη (Isopropyl Alcohol, i-PrOH) σε αναλογία 90.0:9.5:0.5 %. Τα δείγματα αραιώθηκαν με μίγμα διαλυτών cHex:EtOAc:i-PrOH (90:9:1) σε συγκέντρωση 10mg/ml, η ροή έκλουσης ρυθμίστηκε στα 2 ml/min, η ανίχνευση έγινε στα 254 nm και η διάρκεια ανάλυσης ήταν 90 min.

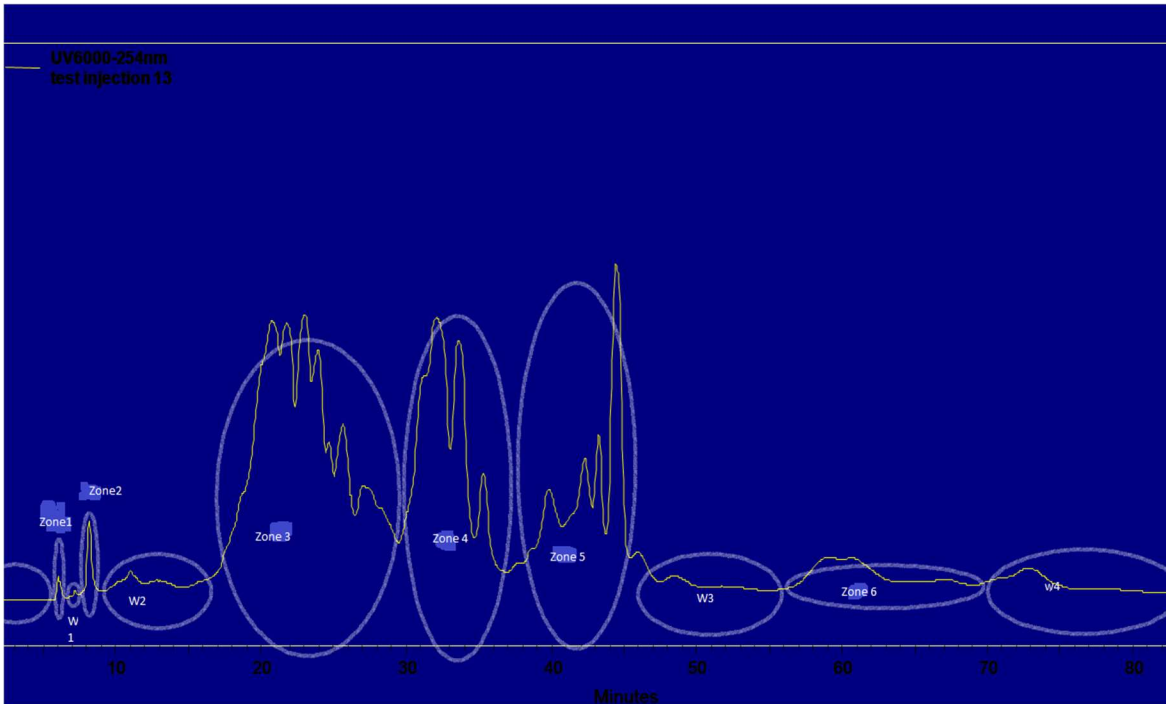
Πίνακας 17: Σύστημα έκλουσης ημι-παρασκευαστικής Normal phase HPLC για το κλάσμα VLC1F4.

Σύστημα Έκλουσης VLC1F4	Flow (ml/min)	Injection Volume (μl)	Wavelength: 254nm
Isocratic	2.0	100	
Time (min)	Mobile Phase A: c-Hex %	Mobile Phase B: EtOAc %	Mobile Phase C: Isopropyl Alc. %
0 - 90	90	9.5	0.5

Εξαιτίας της εμφάνιση πεπλατυσμένων κορυφών, το χρωματογράφημα χωρίστηκε σε ζώνες για περαιτέρω διαχωρισμό, καθώς ήταν προφανές ότι κάθε ζώνη περιέχει πάνω από δύο δευτερογενείς μεταβολίτες. Ακολουθεί πίνακας με τις παρεληφθείσες ζώνες όπως επίσης και το συνολικό χρωματογράφημα:

Πίνακας 18: Ποσότητες και διαχωρισμός των ζωνών του κλάσματος VLC1F4.

VLC1F4	
Zone	Βάρος (mg)
1	3
W(aste) 1	0.6
2	2.2
W(aste) 2	20.5
3	60
4	37.1
5	44
W(aste) 3	10.8
6	7.3
W(aste) 4	12.3



Εικόνα 42: Χρωματογράφημα VLC1F4 σε ημι-παρασκευαστική Normal Phase HPLC

Από τις παραπάνω ζώνες, επιλέχθηκε η Zone 4 λόγω ποσότητας, για περαιτέρω ανάλυση με NP-HPLC.

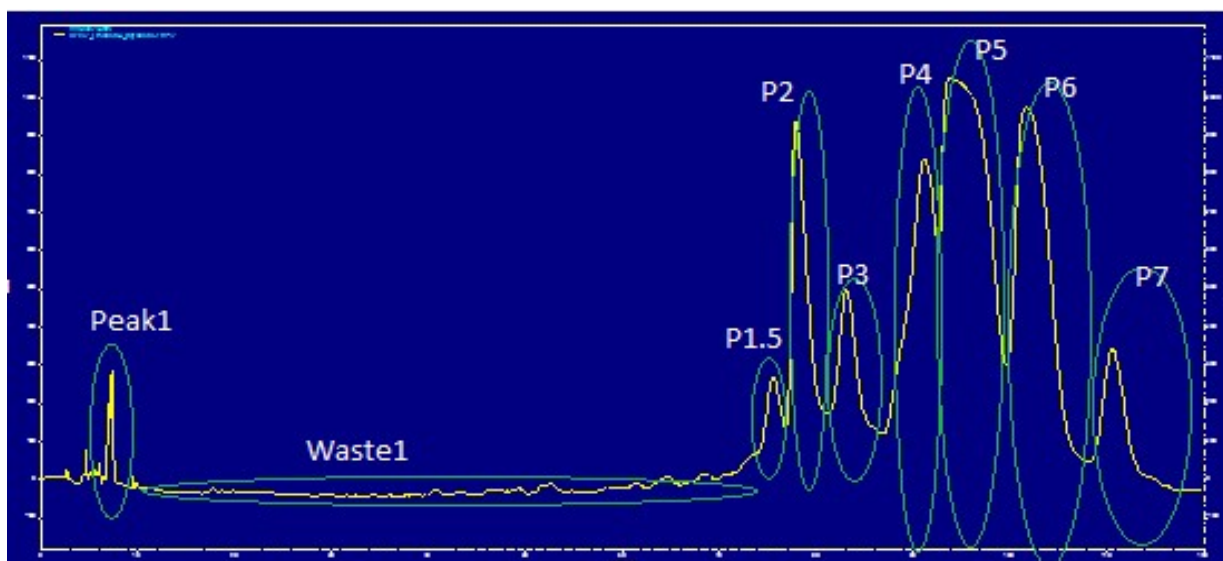
3.3.1. Επεξεργασία του κλάσματος VLC1F4-Zone 4

Το κλάσμα VLC1F4-Zone 4, επεξεργάστηκε με ημι-παρασκευαστική χρωματογραφία, υψηλής πίεσης κανονικής φάσης (Semi-Prep, NP -HPLC). Τα 37.1 mg δείγματος αραιώθηκαν σε

συγκέντρωση 15 mg/mL σε διαλύτη cHex:EtOAc 92:8. Η χρωματογραφική στήλη που χρησιμοποιήθηκε είναι η Fortis Diphenyl, 250x10mm, το σύστημα ισοκρατικής έκλουσης φαίνεται παρακάτω, ενώ η ανίχνευση των εκλούμενων ουσιών έγινε στα 254 nm. Σύμφωνα με την χρωματογραφική εικόνα εντοπίστηκαν και παραλήφθηκαν 8 κορυφές (peaks) και μια ζώνη (W1), για τις οποίες ελήφθησαν τα φάσματα $^1\text{H-NMR}$. Η ζώνη W1 ταυτοποιήθηκε ως μείγμα 2 στερολών που αποτελούν τους **μεταβολίτες 9** και **10** αντίστοιχα, ενώ οι υπόλοιπες κορυφές βάση της εικόνας των φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ έδειξαν ότι περιέχουν 2-3 ουσίες η κάθε μια και επομένως χρήζουν περαιτέρω ανάλυσης.

Πίνακας 19: Σύστημα έκλουσης ημι-παρασκευαστικής Normal phase HPLC για το κλάσμα VLC1F4 – Zone 4.

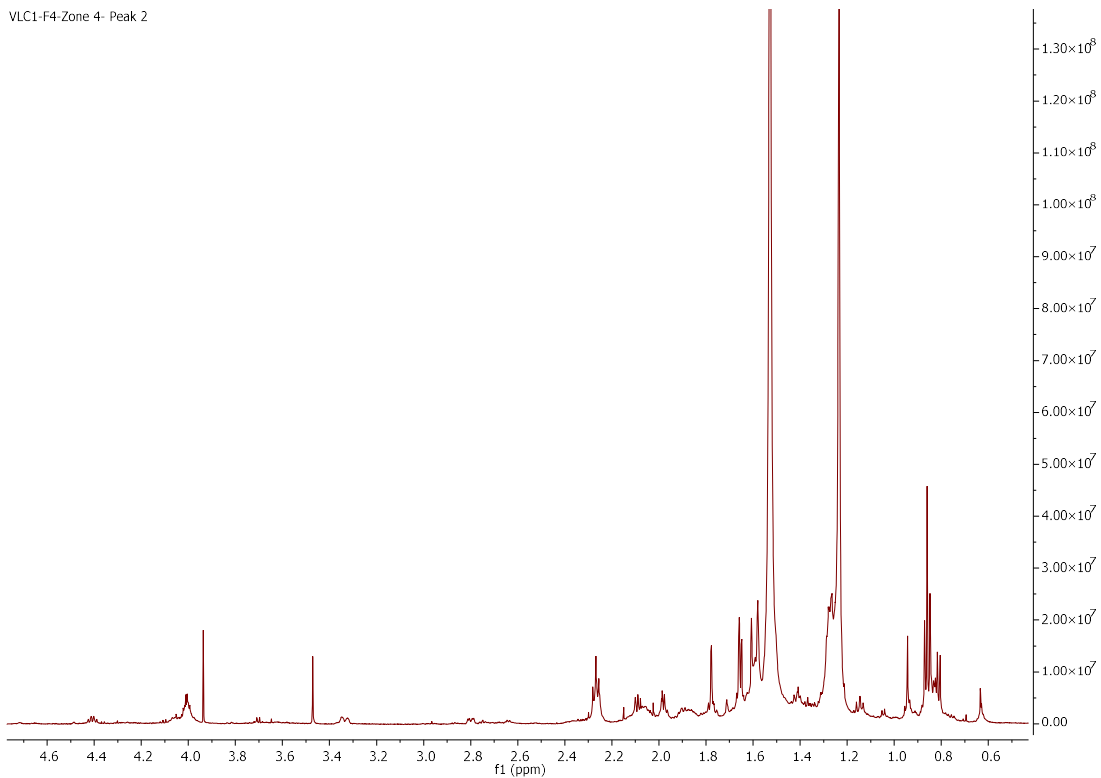
Σύστημα Έκλουσης VLC1F4 - Zone 4	Flow (ml/min)	Injection Volume (μl)	Wavelength :254nm
Isocratic	3.0	100	
Time (min)	Mobile Phase A: c- Hex %	Mobile Phase B: EtOAc %	
0.0 to 90.0	92	8	



Εικόνα 43: Χρωματογράφημα VLC1F4 – Zone 4 σε ημι-παρασκευαστική Normal Phase HPLC

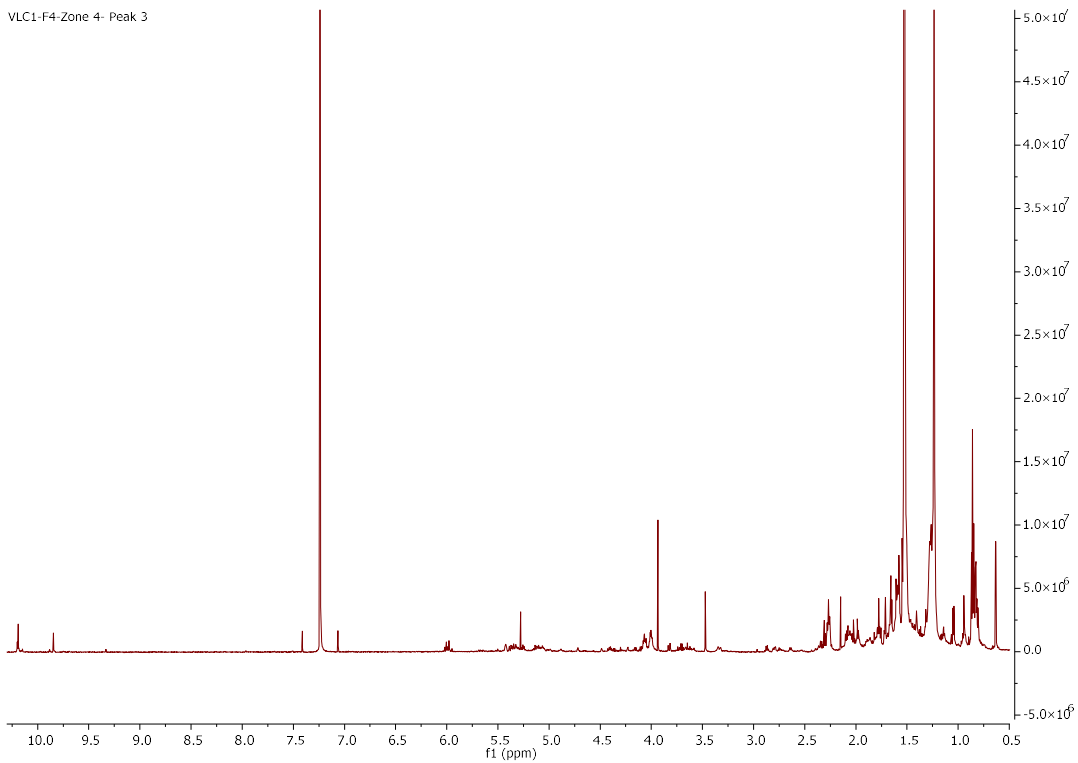
Ακολουθούν, ενδεικτικά τα φάσματα $^1\text{H NMR}$ των κορυφών 2, 3, 4, 5 και 6.

VLC1-F4-Zone 4- Peak 2

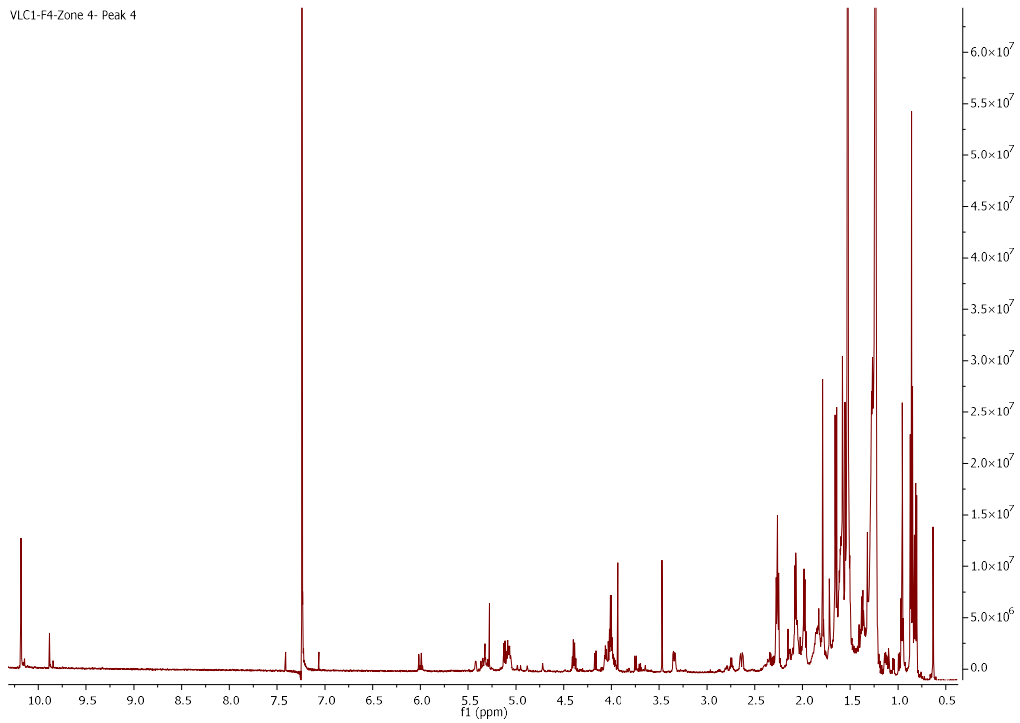


Εικόνα 44: Φάσμα ¹H NMR της VLC1F4-Zone 4-Peak 2

VLC1-F4-Zone 4- Peak 3

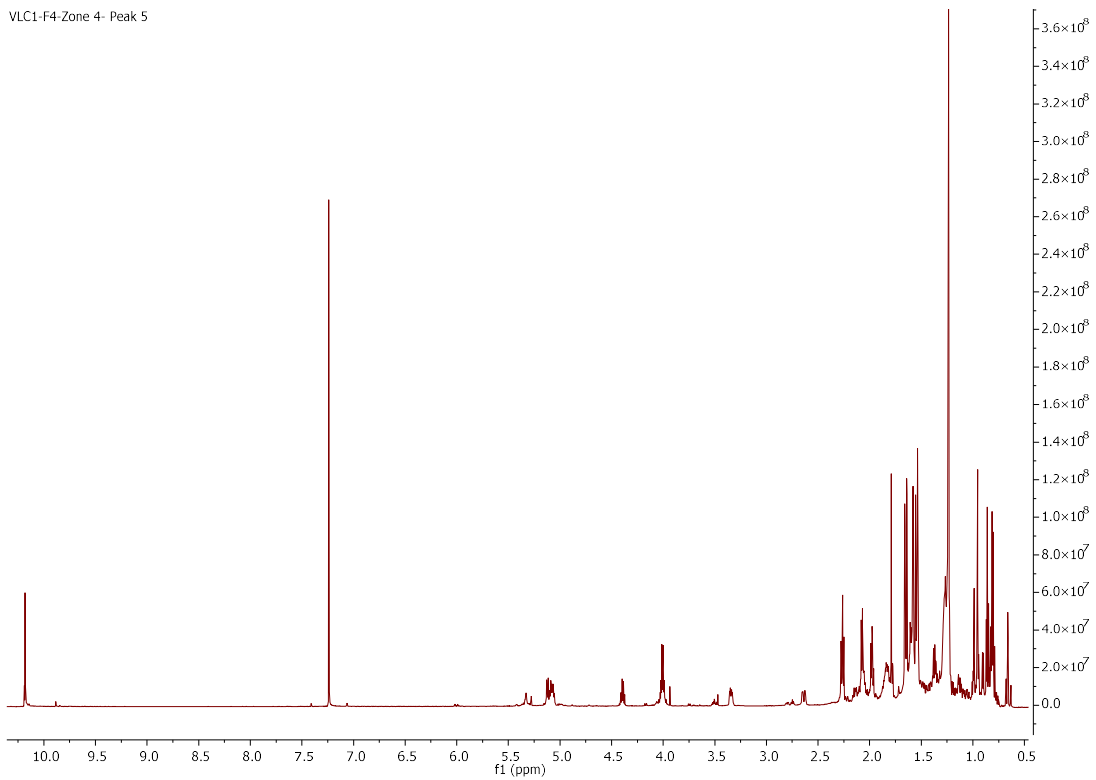


Εικόνα 45: Φάσμα ¹H NMR της VLC1F4-Zone 4-Peak 3



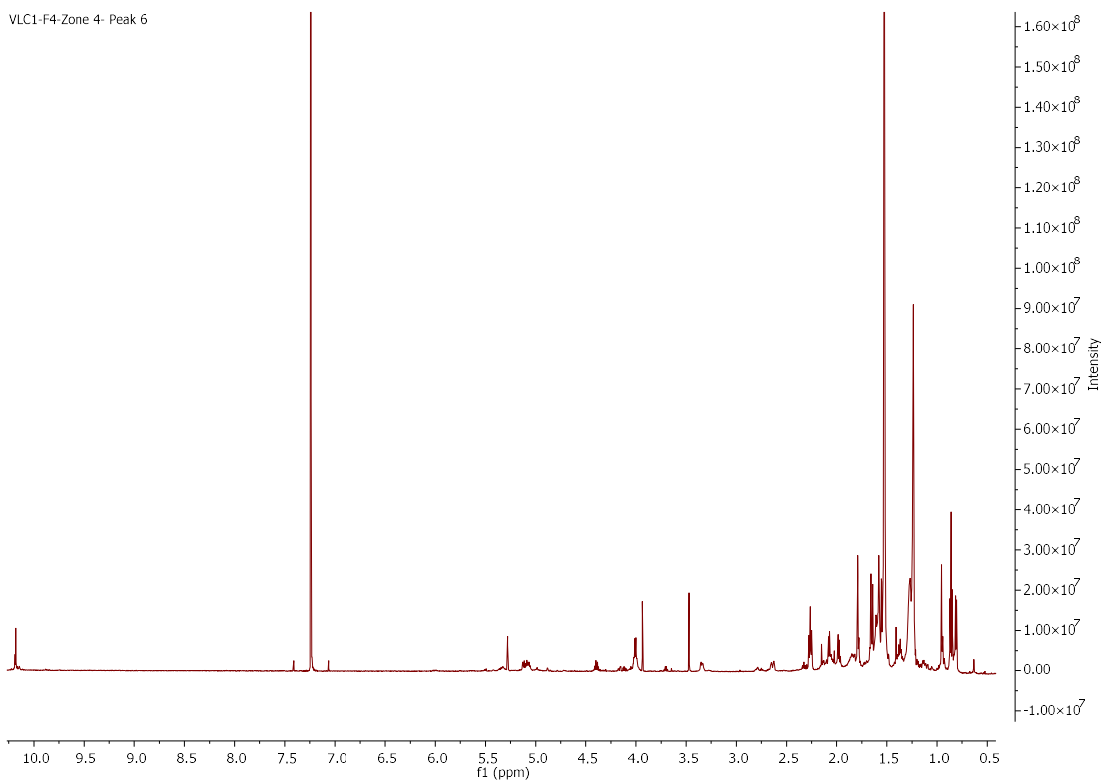
Εικόνα 46: Φάσμα ^1H NMR της VLC1F4-Zone 4-Peak 4

VLC1-F4-Zone 4- Peak 5



Εικόνα 47: Φάσμα ¹H NMR της VLC1F4-Zone 4-Peak 5

VLC1-F4-Zone 4- Peak 6

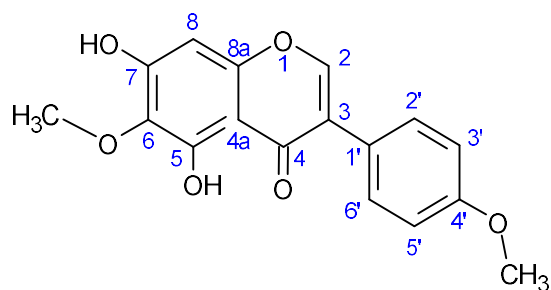


Εικόνα 48: Φάσμα ¹H NMR της VLC1F4-Zone 4-Peak 6

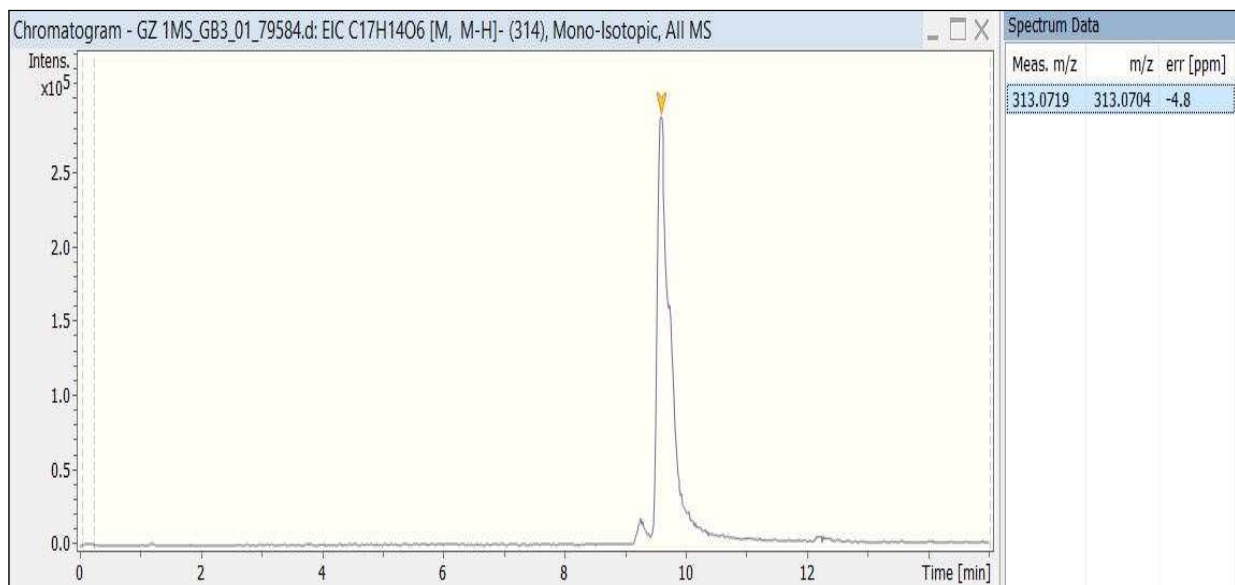
3.4. Ταυτοποίηση απομονωμένων δευτερογενών μεταβολιτών

3.4.1. Μεταβολίτης 1

Το κλάσμα VLC1F12-F6 που εμφανίζεται ως μια απομονωμένη κορυφή στο χρωματογράφημα της ημι-παρασκευαστικής HPLC με χρόνο έκλουσης 14.9 min και απορρόφηση στα 254 και 280 nm, περιέχει καθαρό τον **μεταβολίτη 1** (16.2 mg). Η δομή του μορίου προσδιορίστηκε με βάση τη φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού μίας και δύο διαστάσεων και το φάσμα μάζας HRESI(-)MS.



Εικόνα 49: Μεταβολίτης 1 (VLC1F12-Fraction 6)



Εικόνα 50: TIC φάσμα μάζας Μεταβολίτη 1

Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη 1 έδωσε ψευδομοριακό ιόν $[M-H]^-$ με m/z 313.0704 amu (θεωρητικό m/z 313.0719 amu, err. -4.8 ppm) που αντιστοιχεί σε M.T $C_{17}H_{14}O_6$.

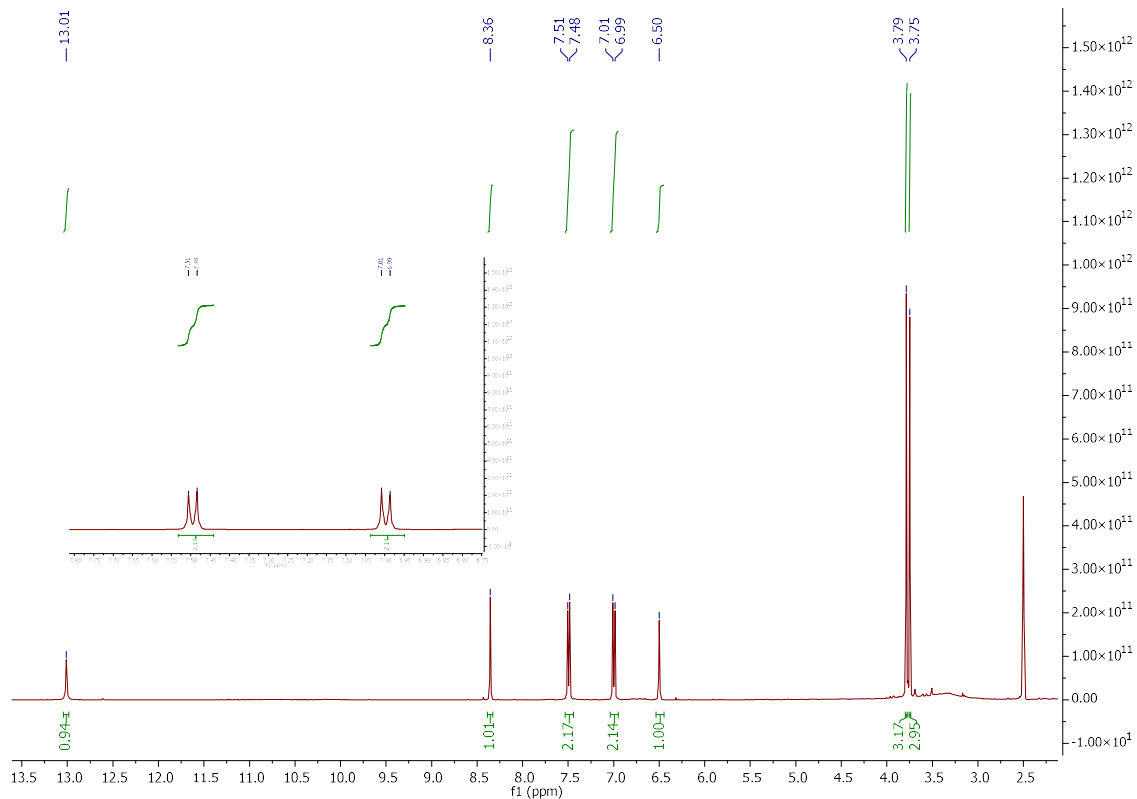
Στο φάσμα ^1H NMR σε $\text{DMSO-}d_6$ παρατηρούμε τις χαρακτηριστικές κορυφές των ισοφλαβονών, αυτές δηλ. του H-2 που συντονίζεται ως απλή στα 8.36 ppm και του H-8 που συντονίζεται επίσης ως απλή στα 6.50 ppm.

Η παρουσία του 5-OH αποδεικνύεται από την εμφάνιση μιας ιδιαίτερα αποθωρακισμένης (λόγω του δεσμού υδρογόνου που σχηματίζει με το καρβονύλιο C-4 σε δ 180.4 ppm), απλής κορυφής με χημική μετατόπιση δ 13.01.

Στο ίδιο φάσμα παρατηρούμε ένα spin σύστημα δύο διπλών κορυφών (δ 7.00, d, 8.8 Hz και δ 7.49 ppm, d, 8.8 Hz), που η κάθε μία ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια (χημικά ισοδύναμα), ενώ στο φάσμα COSY παρατηρείται σύζευξη μεταξύ τους. Η τιμή της σταθεράς σύζευξης ($J=8.8$ Hz) δείχνει ότι τα δύο ζεύγη ισοδύναμων πρωτονίων βρίσκονται σε *ortho*- θέση μεταξύ τους. Αυτό το spin σύστημα (AA'XX') είναι επίσης χαρακτηριστικό του *p*-υποκατεστημένου B δακτυλίου των ισοφλαβονών.

Εντοπίστηκαν ακόμα δύο αρωματικές μεθοξυλομάδες (4'-OCH₃, δ_{H} 3.79, s / δ_{C} 55.2 και 7-OCH₃, δ_{H} 3.75, s / δ_{C} 59.9). Η θέση του 7-OCH₃ αποδόθηκε στην βάση των HMBC συσχετίσεων των μεθοξυλικών πρωτονίων και του 5-OH με τον C-6 (δ 131.6), ενώ η θέση του 4'-OCH₃ καθορίστηκε από τις HMBC συσχετίσεις των πρωτονίων του και των αρωματικών πρωτονίων του B δακτυλίου με τον C-4' (δ 159.1).

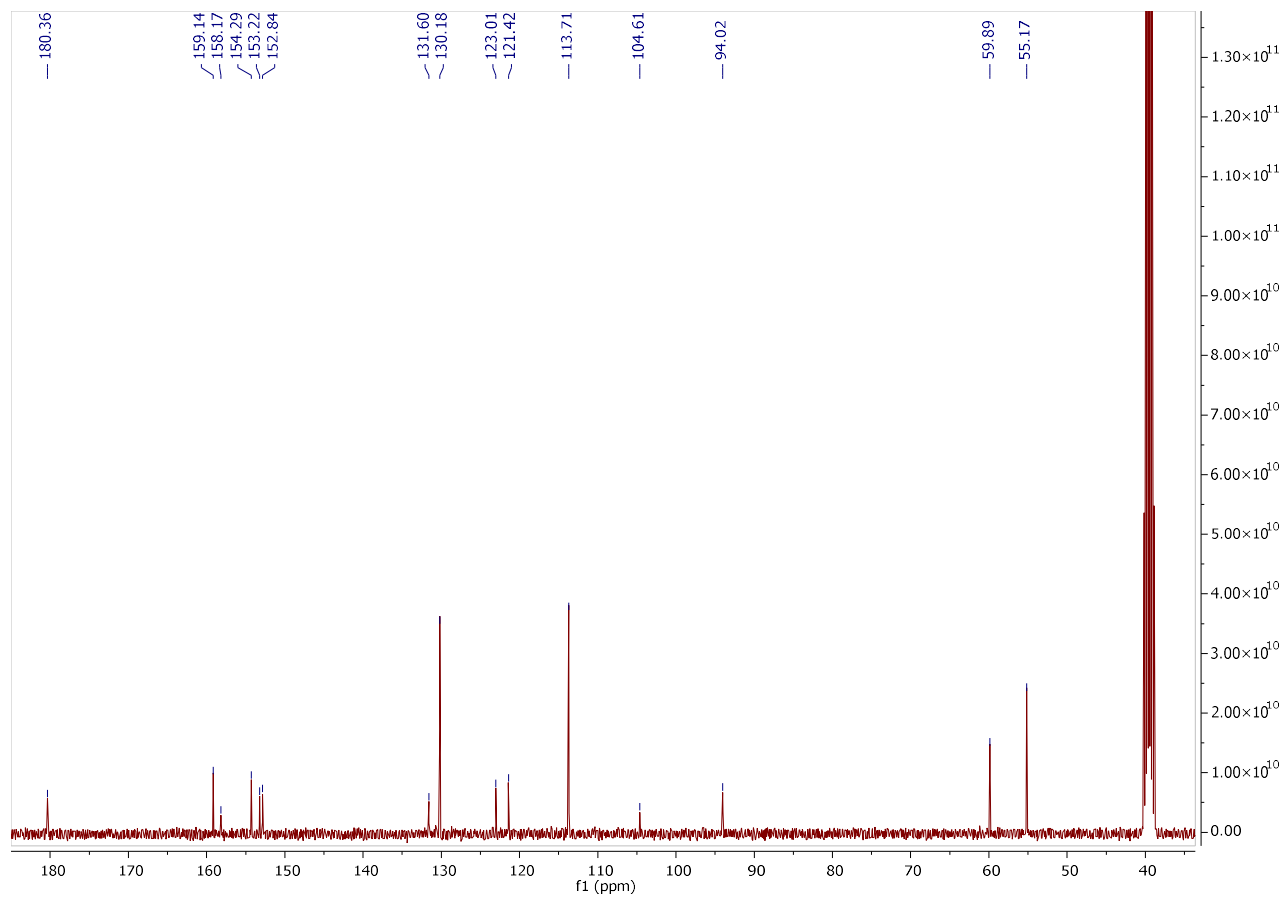
Άλλο ένα δεδομένο που υποστηρίζει την θέση του 4'-OCH₃, ενώ ταυτόχρονα συντελεί στη διάκριση μεταξύ των δύο ζευγών των αρωματικών πρωτονίων του B δακτυλίου (H2'/H6' και H3'/H5') είναι και η ισχυρή NOE σύζευξη των μεθοξυλικών πρωτονίων του 4'-OCH₃ με το ζεύγος H3'/H5' (δ 7.00, d, 8.8 Hz).



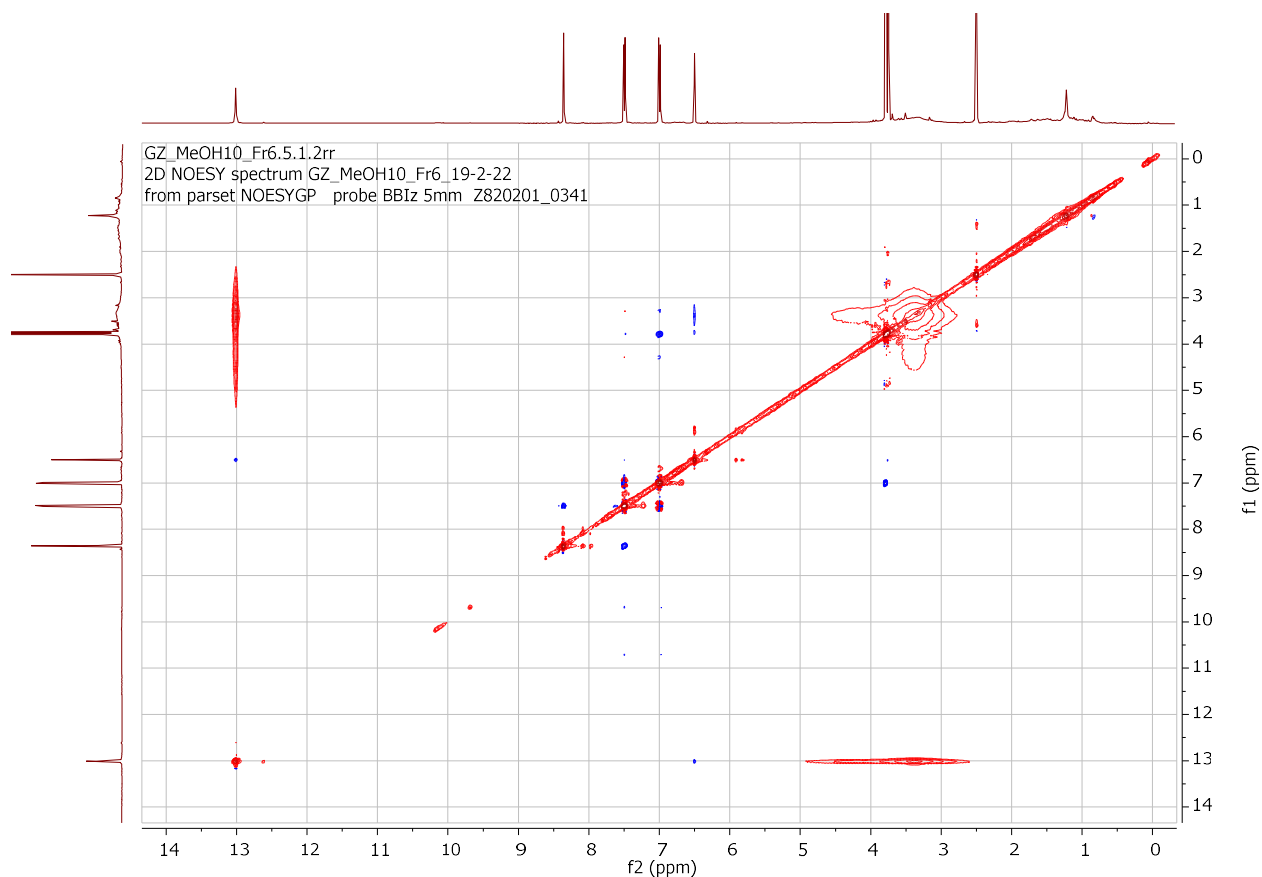
Εικόνα 51: Φάσμα ^1H NMR του **μεταβολίτη 1**

Με βάση τον Μ.Τ., ο **μεταβολίτης 1** διαθέτει ακόμα ένα -OH, το οποίο είναι συνδεδεμένο στον C-7. Η θέση αυτή επιβεβαιώθηκε από τις HMBC συσχετίσεις του H-8 (δ 6.50, s) με τους C-7 (δ 158.2) και C-6 (δ 131.6 ppm).

Οι χημικές μετατοπίσεις όλων των υπόλοιπων ανθράκων του μορίου αποδόθηκαν με την λεπτομερή και συνδυαστική μελέτη των φασμάτων HMBC και HSQC-DEPT.



Εικόνα 52: Φάσμα ^{13}C NMR του μεταβολίτη 1



Εικόνα 53: Φάσμα NOESY του **μεταβολίτη 1**

Η κατά IUPAC ονομασία του **μεταβολίτη 1** είναι 4'-O-Methyltectorigenin ή Irisolidone και αποτελεί μια ισοφλαβόνη που έχει απομονωθεί από διάφορα φυτά του γένους *Iris*, όπως τα είδη *I. germanica* (Ali *et al.*, **1983**), *I. tingitana* και *I. pseudorumila*. Έχει μελετηθεί για την αντικαρκινική (Wollenweber *et al.*, **2003**) και αντιοξειδωτική (Rigano *et al.*, **2007**) της δράση.

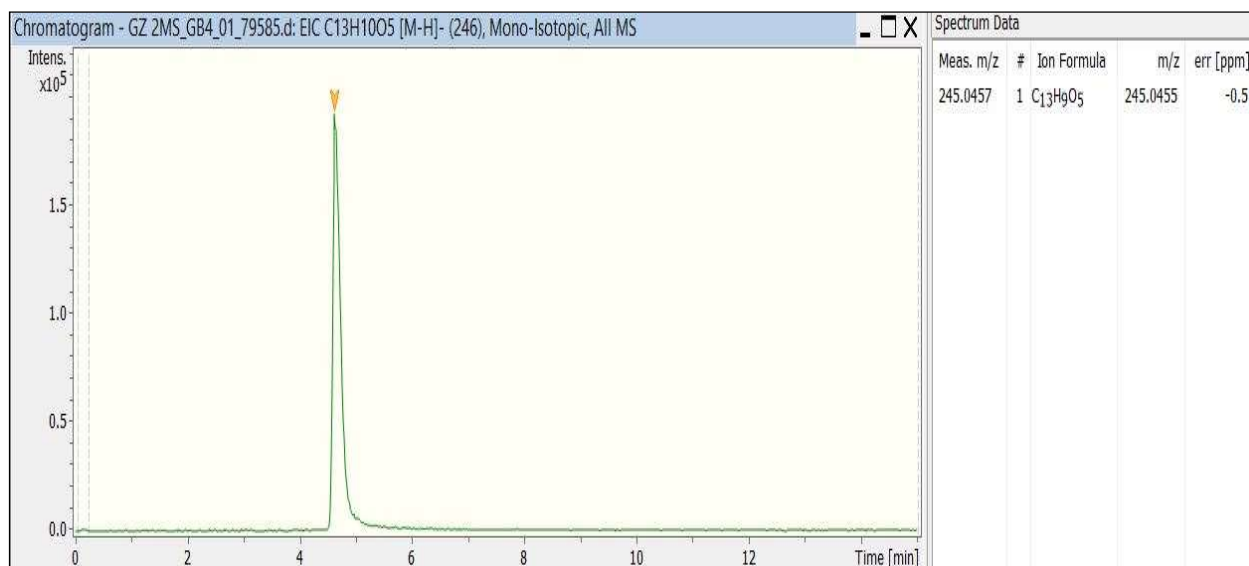
Πίνακας 20: Οι χημικές μετατοπίσεις $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -NMR του **μεταβολίτη 1**

Άτομο	^1H NMR (DMSO- d_6)		^{13}C NMR (DMSO- d_6)
	δ (ppm)	Multiplicity, J (Hz)	δ (ppm)
1	-	-	-
2	8.36	s	154.3
3	-	-	121.4
4	-	-	180.4
4 α	-	-	104.6
5	-	-	153.2
6	-	-	131.6
7	-	-	158.2
8	6.50	s	94.0
8 α	-	-	152.8
1'	-	-	123.0
2'	7.49	d, 8.8	130.2
3'	7.00	d, 8.8	113.8
4'	-	-	159.1
5'	7.00	d, 8.8	113.8
6'	7.49	d, 8.8	130.2
OH-5	13.01	-	-
CH ₃ O-6	3.75	s	59.9
CH ₃ O-4'	3.79	s	55.2

3.4.2. Μεταβολίτης 2

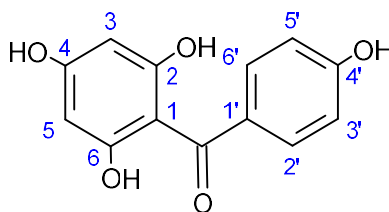
Από το κλάσμα 2 της VLC1F12 απομονώθηκε με ημι-παρασκευαστική RP- HPLC η κορυφή 5, η οποία περιέχει απομονωμένο τον **μεταβολίτη 2** (18.8 mg). Με χρόνο έκλουσης τα 18.37 min

(ανίχνευση στα 254 nm), η δομή του μορίου προσδιορίστηκε με βάση τη φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού μιας και δύο διαστάσεων και το φάσμα μάζας HRESI(-)MS.



Εικόνα 54: TIC φάσμα μάζας Μεταβολίτη 2

Το φάσμα μάζας του **μεταβολίτη 2** έδωσε ψευδομοριακό ιόν [M-H]⁻ με m/z 245.0455 amu (θεωρητικό m/z 245.0457 amu, err. -0.5 ppm) που αντιστοιχεί σε M.T C₁₃H₁₀O₅.

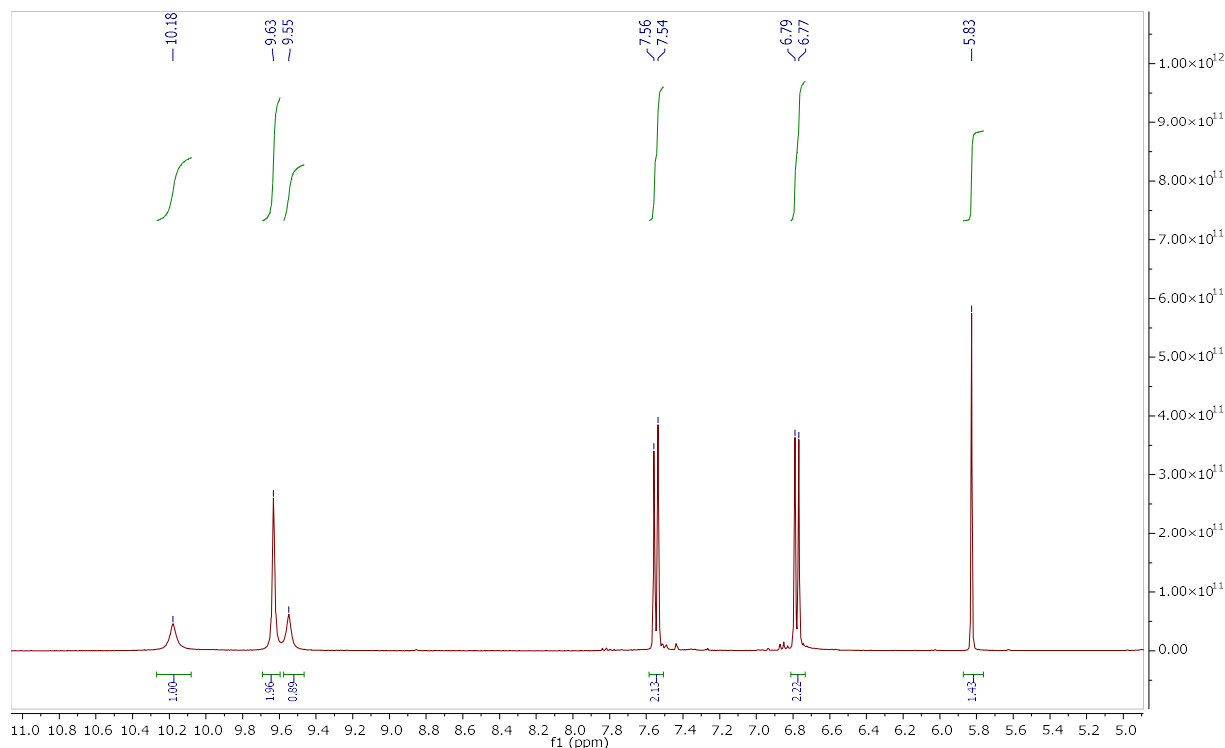


Εικόνα 55: Μεταβολίτης 2 (VLC1FR12-F2-Peak5)

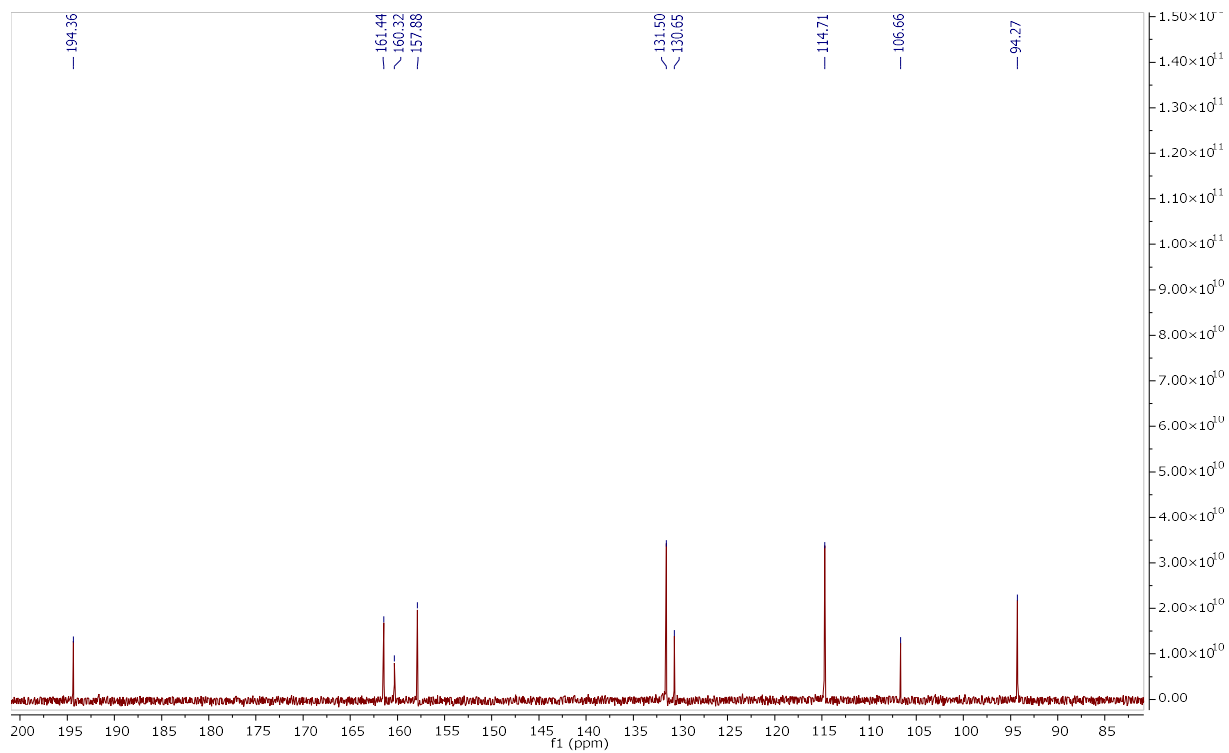
Η γενική εικόνα του φάσματος ¹H NMR σε DMSO-*d*₆ και η σχετικά μικρή μοριακή μάζα του **Μεταβολίτη 2** παρέπεμπε σε φαινολικό παράγωγο. Οι δύο διπλές κορυφές που ολοκληρώνουν για δύο πρωτόνια η κάθε μία (δ 6.78, d, 8.6 Hz και δ 7.55, d, 8.6 Hz) αντιστοιχούν σε *p*-υποκατεστημένο αρωματικό δακτύλιο, ενώ η απλή κορυφή (δ 5.83, s) που ολοκληρώνει για 2 χημικά ισοδύναμα πρωτόνια αντιστοιχεί στον τετράκις και συμμετρικά υποκατεστημένο αρωματικό δακτύλιο. Στο φάσμα ¹H NMR ακόμα διακρίνονται 3 κορυφές φαινολικών

υδροξυλικών πρωτονίων, μία εκ των οποίων (δ 9.63, s) ολοκληρώνει για 2 ισοδύναμα πρωτόνια. Στο φάσμα ^{13}C -NMR ανιχνεύονται συνολικά 9 κορυφές, αντί για τους 13 του Μ.Τ του μεταβολίτη, δεδομένο που συνηγορεί για την ύπαρξη δύο συμμετρικά υποκατεστημένων αρωματικών δακτυλίων στο μόριο, αφού 4 κορυφές στο φάσμα ^{13}C -NMR αντιστοιχούν σε δύο χημικά ισοδύναμους άνθρακες η κάθε μία (C-2/C-6 με δ 160.3, C-3/C-5 με δ 94.3, C-2'/C-6' με δ 130.7, C-3'/C-5' με δ 114.7). Η σύνδεση των δύο αρωματικών δακτυλίων γίνεται με το κετονικό καρβονύλιο C-7, του οποίου ο άνθρακας εξαιτίας της διπλής συζυγίας του με τους δύο αρωματικούς δακτυλίους συντονίζεται σε δ 194.4.

Μετά από την προσεκτική μελέτη της βιβλιογραφίας και σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων ^1H και ^{13}C συμπεράναμε ότι ο **Μεταβολίτης 2** είναι η κατά IUPAC (4-Hydroxyphenyl)-(2,4,6-trihydroxyphenyl)methanone με εμπειρική ονομασία Ιριφλοφαινόνη. Η Ιριφλοφαινόνη αποτελεί παράγωγο βενζοφαινόνης είναι γνωστή για τις αντιοξειδωτικές της ιδιότητες (Khatib *et al.*, **2022**) και έχει απομονωθεί από διάφορα ριζώματα ειδών *Iris*, όπως *I. germanica*, *I. pumila*, *I. humilis*, *I. variegata* (Kostić *et al.*, **2019**) , *I. florentina* (Arikado, **2002**), *I. rotaninii* (Purev *et al.*, **2002**) και από τα φύλλα της *Aquilaria sinensis* (Jin *et al.*, **2009**).



Εικόνα 56: Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη 2



Εικόνα 57: Φάσμα ^{13}C NMR του μεταβολίτη 2

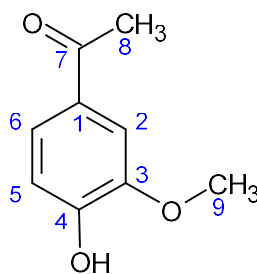
Πίνακας 21: Οι χημικές μετατοπίσεις $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ του μεταβολίτη 2

	^1H NMR (DMSO- d_6)		^{13}C NMR (DMSO- d_6)
Άτομο	δ (ppm)	Multiplicity, J (Hz)	δ (ppm)
1	-	-	106.7
2	-	-	160.3
3	5.83	s	94.3
4	-	-	161.4

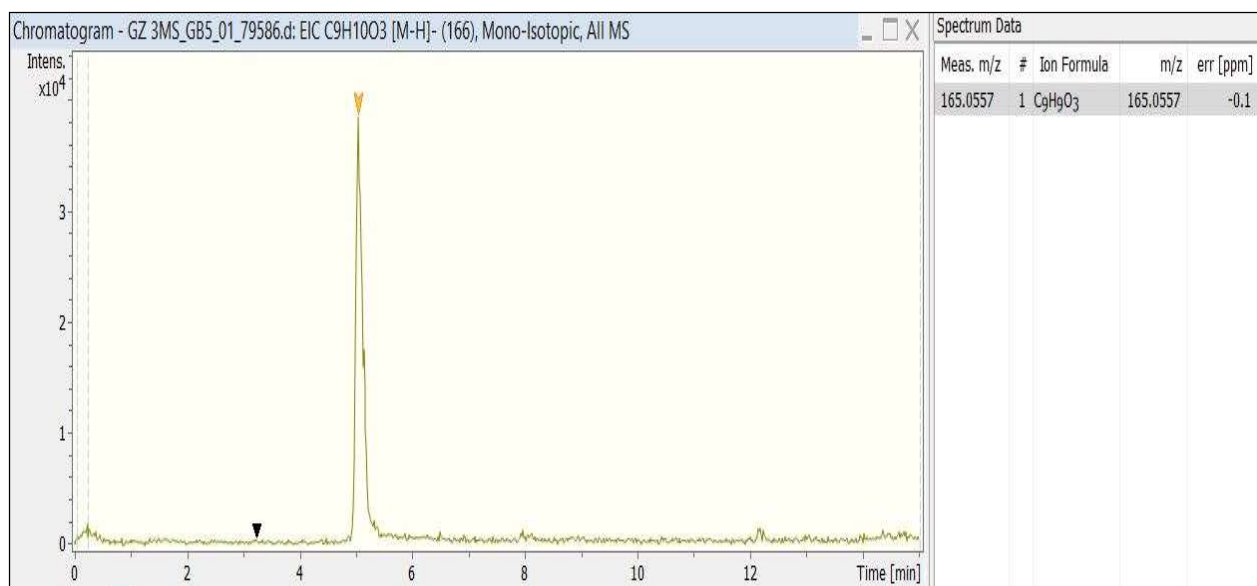
5	5.83	s	94.3
6	-	-	160.3
7	-	-	194.4
1'	-	-	131.5
2'	7.55	d, 8.6	130.7
3'	6.78	d, 8.6	114.7
4'	-	-	157.9
5'	6.78	d, 8.6	114.7
6'	7.55	d, 8.6	130.7
2/6-OH	9.63	br s	160.3
4-OH	10.2	br s	161.4
4'-OH	9.55	br s	157.9

3.4.3. Μεταβολίτης 3

Από το κλάσμα 2 της VLC1F12 προέκυψε με ημι-παρασκευαστική RP-HPLC η κορυφή 6, που περιείχε απομονωμένο τον **μεταβολίτη 3** (5.6 mg). Η κορυφή 6 εκλούστηκε σε χρόνο 19.72 min και ανιχνεύτηκε σε μήκος κύματος 254 nm.

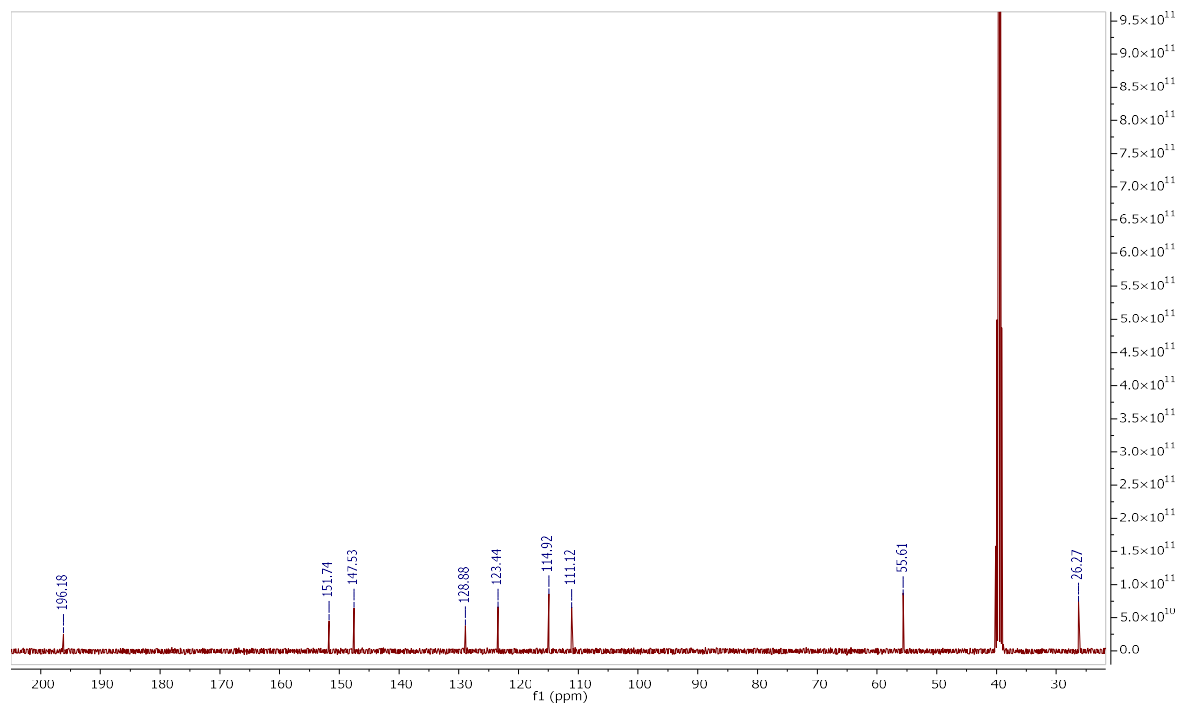
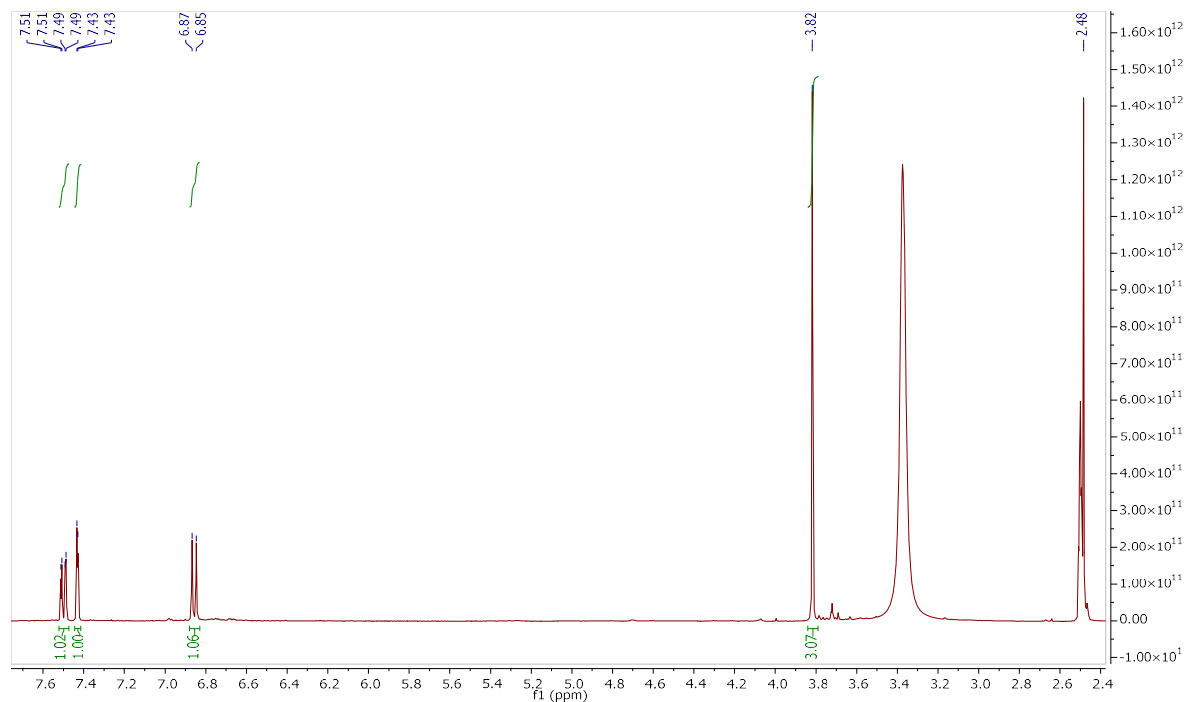


Εικόνα 58: Μεταβολίτης 3 (VLC1FR12-F2-Peak6)



Εικόνα 59: TIC φάσμα μάζας μεταβολίτη 3

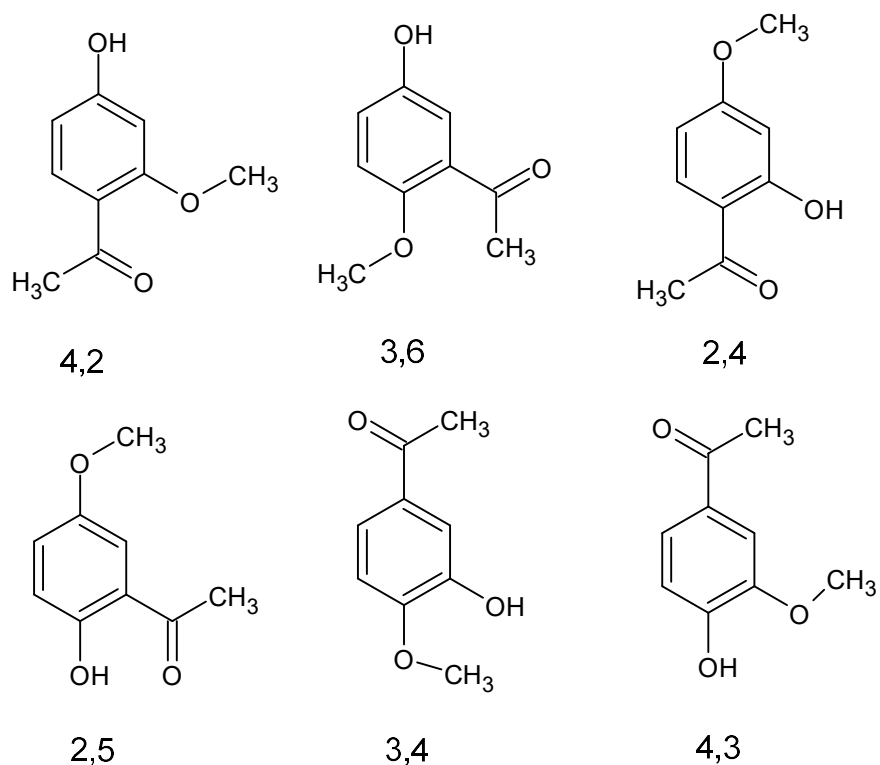
Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη 3 έδωσε ψευδομοριακό ιόν [M-H]⁻ με m/z 165.0557 amu (θεωρητικό m/z 165.0557 amu, err. 0 ppm) που αντιστοιχεί σε M.T C₉H₁₀O₃.



Εικόνα 60: Φάσματα ^1H NMR και ^{13}C NMR του **Μεταβολίτη 3**

Ο έλεγχος των φασμάτων ^1H NMR και ^{13}C NMR σε $\text{DMSO}-d_6$ καθώς και η μικρή σχετική μοριακή μάζα του **Μεταβολίτη 3** οδήγησαν στο ασφαλές συμπέρασμα ότι πρόκειται για ένα τρις-υποκατεστημένο βενζολικό παράγωγο, του οποίου τα τρία αρωματικά πρωτόνια

συντονίζονται ως μια διπλή κορυφή με *ortho*- σταθερά σύζευξης ($J = 8.2 \text{ Hz}$) που αντιστοιχεί στο H-5, μία διπλή διπλών κορυφή με *ortho*- και *meta*- σταθερές σύζευξης ($J_1 = 8.2 \text{ Hz}$ και $J_2 = 2.0 \text{ Hz}$) που αντιστοιχεί στο H-6 και μία διπλή μορυφή με *meta*- σταθερά σύζευξης ($J = 2.0 \text{ Hz}$) που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-2. Επίσης, εντοπίσθηκαν οι ακόλουθοι υποκαταστάτες: ένα ακετύλιο (C-7, δ 196.2 / C-8, δ_{H} 2.48 / δ_{C} 26.3), μία μεθοξυλομάδα (C-9, δ_{H} 3.82 / δ_{C} 55.6) και μία υδροξυλομάδα (4-OH, δεν ανιχνεύτηκε στο $^1\text{H-NMR}$). Το επόμενο ζήτημα ήταν να καθοριστεί ποιο από τα 6 πιθανά συντακτικά ισομερή που φαίνονται στην **εικόνα 61** ήταν ο **μεταβολίτης 3**.



Εικόνα 61: Τα 6 συντακτικά ισομερή υδροξυ-μεθοξυ-ακετοφαινόνης με 1,2,4 μοτίβο υποκατάστασης

Στο φάσμα HMBC εντοπίσαμε τις συσχετίσεις των 2 αρωματικών πρωτονίων H-2 (δ 7.43, d, 2.0) και H-6 (δ 7.50, dd, 8.2, 2.0) με τον καρβονυλικό άνθρακα της ακετυλομάδας (C-7). Αυτόν τον συνδυασμό συσχετίσεων μπορεί να τον δώσουν μόνο τα ισομερή (3,4) και (4,3), όπου τα δύο meta μεταξύ τους αρωματικά πρωτόνια απέχουν τρεις δεσμούς από το καρβονύλιο του ακετυλίου. Η διάκριση μεταξύ των δύο τελευταίων ισομερών έγινε με βάση το φάσμα L-R COSY (μακράς εμβέλειας συσχετίσεις, 5J) και συγκεκριμένα με το σήμα σύζευξης του H-2 με τα μεθοξυλικά πρωτόνια.

Η ένωση κατά IUPAC ονομάζεται 3-methoxy-4-hydroxyacetophenone ή Αποκινύνη ή Ακετοβανιλλόνη. Ανήκει στην ευρύτερη κατηγορία βενζολικών παραγώγων και ευθύνεται κυρίως για το έντονο άρωμα των ριζωμάτων του φυτού και μαζί με τις ισοφλαβόνες για την αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματός τους.

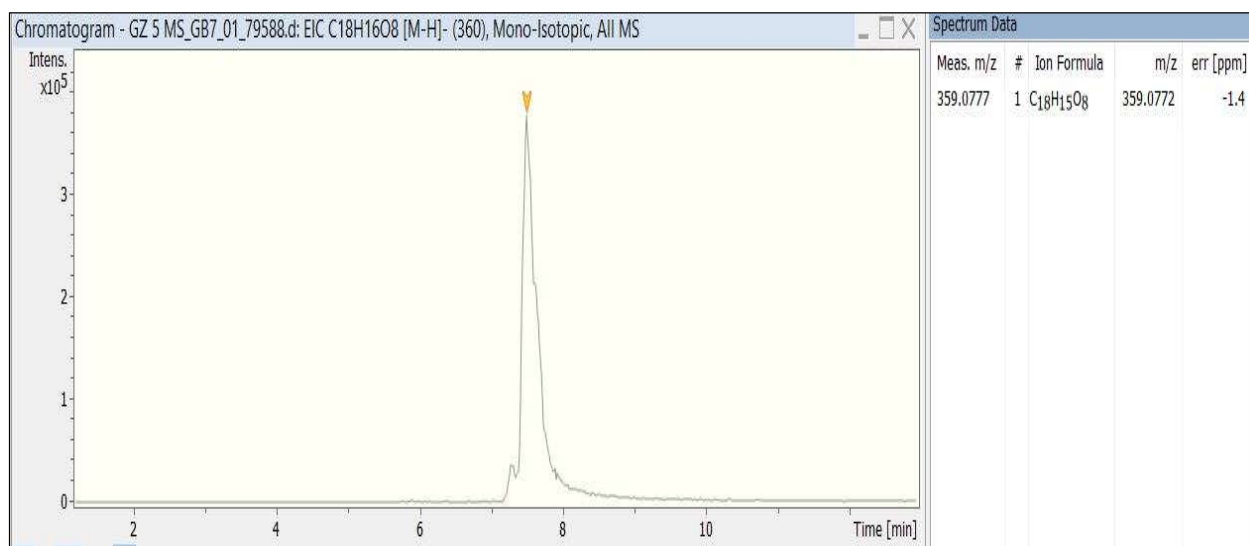
Πίνακας 22: Οι χημικές μετατοπίσεις $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ του μεταβολίτη 3

Άτομο	$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6)		$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6)
	δ (ppm)	Multiplicity, J (Hz)	δ (ppm)
1	-	-	128.9
2	7.43	d, 2.0	114.9
3	-	-	147.5
4	-	-	151.7
5	6.86	d, 8.2	111.1
6	7.50	dd, 8.2, 2.0	123.4
7	-	-	196.2
8	2.48	s	26.3
9	3.82	s	55.6

Η ακετυλοβανιλλόνη ή αποκινύνη είναι μια ένωση που έχει ταυτοποιηθεί και σε άλλα είδη *Iris*, όπως *I. germanica* (Ali *et al.*, **1983**), *I. nigricans* (Al-Khalil *et al.*, **1994**) και *I. tectorum* (Pradhan, **1970**). Επίσης έχει σημαντική δράση σαν αναστολέας της NADPH οξειδάσης και έχει μελετηθεί εκτενώς ως αντιοξειδωτικός παράγοντας (Riganti *et al.*, **2006**).

3.4.4. Μεταβολίτης 4

Ο **μεταβολίτης 4** (5.8 mg) παραλήφθηκε με την κορυφή 9 της ημι-παρασκευαστικής RP-HPLC χρωματογραφίας του κλάσματος VLC1FR12-F2. Εκλούστηκε σε χρόνο 28.53 min και ανιχνεύτηκε στα 254 και στα 280 nm.



Εικόνα 62: TIC φάσμα μάζας **Μεταβολίτη 4**

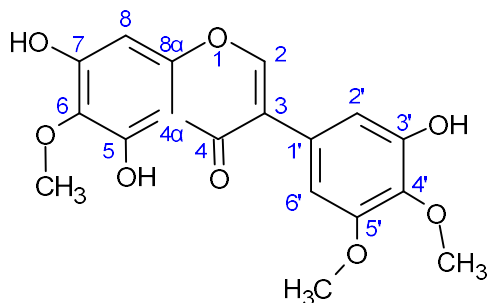
Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη 4 έδωσε ψευδομοριακό ιόν [M-H]⁻ με m/z 359.0772 amu (θεωρητικό m/z 359.0777 amu, err. -1.4 ppm) που αντιστοιχεί σε M.T C₁₈H₁₆O₈.

Όπως και στην περίπτωση του **Μεταβολίτη 1**, στο φάσμα ¹H NMR σε DMSO-*d*₆ του **Μεταβολίτη 4** παρατηρούνται τα χαρακτηριστικά σήματα των 5,6,7-τριυποκατεστημένων ισοφλαβονών, στα οποία περιλαμβάνονται η απλή κορυφή στα 8.37 ppm (H-2) και η απλή κορυφή που συντονίζεται στα 6.49 ppm (H-8). Επίσης εμφανίζεται και η κορυφή του 5-OH που συντονίζεται στα 13.0 ppm.

Η διαφορά μεταξύ των δύο μεταβολιτών στην σχετική μοριακή τους μάζα συνάδει τόσο με το φάσμα ¹H-NMR, στο οποίο εντοπίζεται μία ακόμα μεθοξυλομάδα, όσο και με το φάσμα

^{13}C -NMR όπου παρατηρούνται δύο περισσότεροι οξυγονωμένοι αρωματικοί άνθρακες. Από την μελέτη των φασμάτων HSQC-DEPT, HMBC και ^{13}C -NMR σε $\text{DMSO-}d_6$ και αφού αποδόθηκαν οι χημικές μετατοπίσεις των ατόμων C και H των δακτυλίων A και C έγινε φανερό ότι οι τιμές τους είναι πολύ κοντινές με τις αντίστοιχες του Μεταβολίτη 1, δείχνοντας έτσι ότι οι δομικές διαφορές μεταξύ των δύο μορίων εντοπίζονται στον δακτύλιο B.

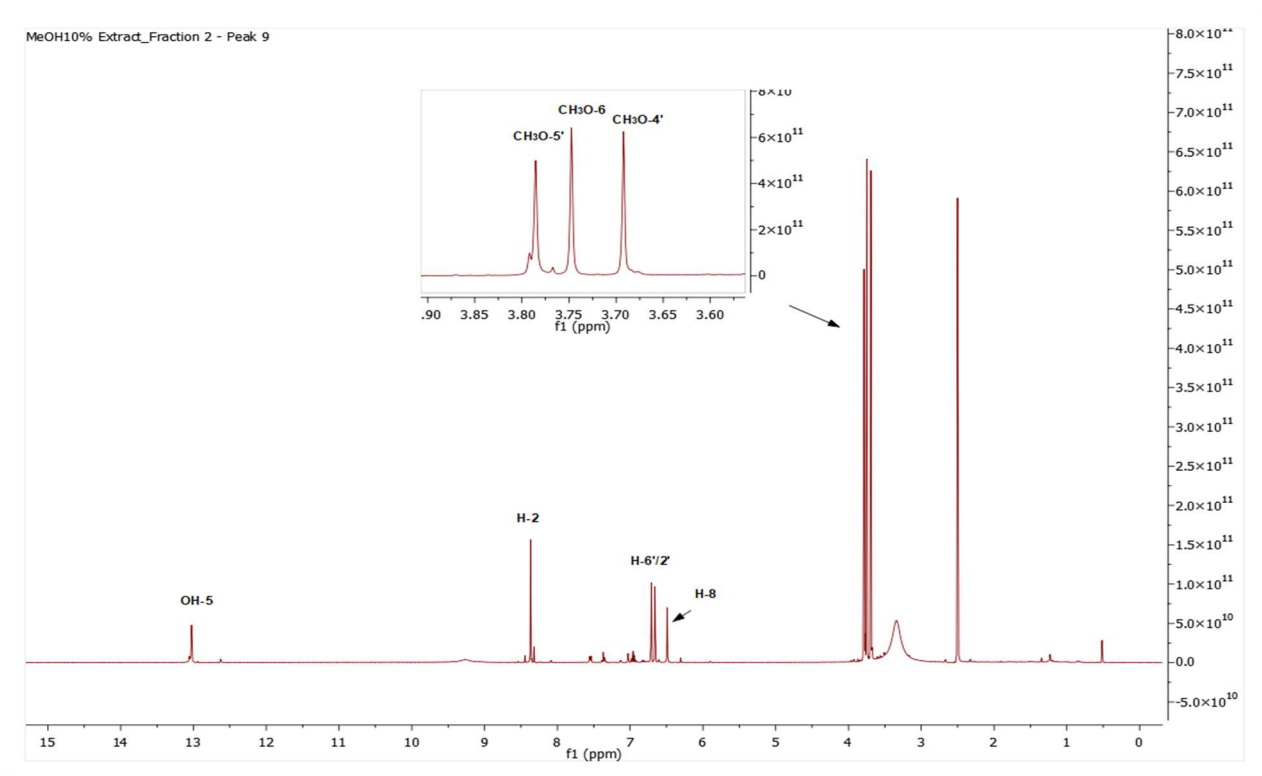
Πράγματι, εκτός από τα H-2 και H-8, στο φάσμα ^1H -NMR εμφανίζονται δύο διπλές κορυφές που αντιστοιχούν στα δύο αρωματικά πρωτόνια H-2' (δ 6.71, d, 2.0 Hz) και H-6' (δ 6.66, d, 2.0 Hz), τα οποία παρουσιάζουν COSY σύζευξη μεταξύ τους. Από το φάσμα HSQC-DEPT βρέθηκε ότι οι άνθρακες με τους οποίους συνδέονται τα παραπάνω πρωτόνια συντονίζονται στα 110.4 ppm (C-2') και στα 104.6 ppm (C-6'). Οι υπόλοιποι τρεις άνθρακες του B δακτυλίου, εκτός από τον C-1' (δ 121.8) που είναι το σημείο σύνδεσης με τον δακτύλιο C, είναι όλοι οξυγονωμένοι και συνδέονται με δύο μεθοξυλομάδες και ένα υδροξύλιο, επιβεβαιώνοντας τις παραπάνω παρατηρήσεις μας. Από όλους τους δυνατούς συνδυασμούς ενός τετράκως υποκατεστημένου B δακτυλίου, τα αρωματικά πρωτόνια βρίσκονται στις θέσεις 2' και 6', επειδή μόνο σε αυτές τις θέσεις είναι δυνατή η εμφάνιση NOE συσχέτισης και των δύο με το H-2, όπως παρατηρήσαμε στο φάσμα NOESY του **Μεταβολίτη 4**, εξαιτίας και της δυνατότητας περιστροφής γύρω από τον δεσμό C3-C1'. Οι δύο μεθοξυλομάδες συνδέονται στους C-4' και C-5' και η υδρόξυ ομάδα στον C-3' αφού μόνο αυτές οι θέσεις καθιστούν τον δακτύλιο B μη συμμετρικό και τα αρωματικά πρωτόνια H-2' και H-6' μη ισοδύναμα. Η επιβεβαίωση της *ortho*-σχέσης του H-6' (6.66 ppm, d, 2.0 Hz) με το 5'-OCH₃ προκύπτει από την ισχυρή NOE σύζευξη μεταξύ τους.



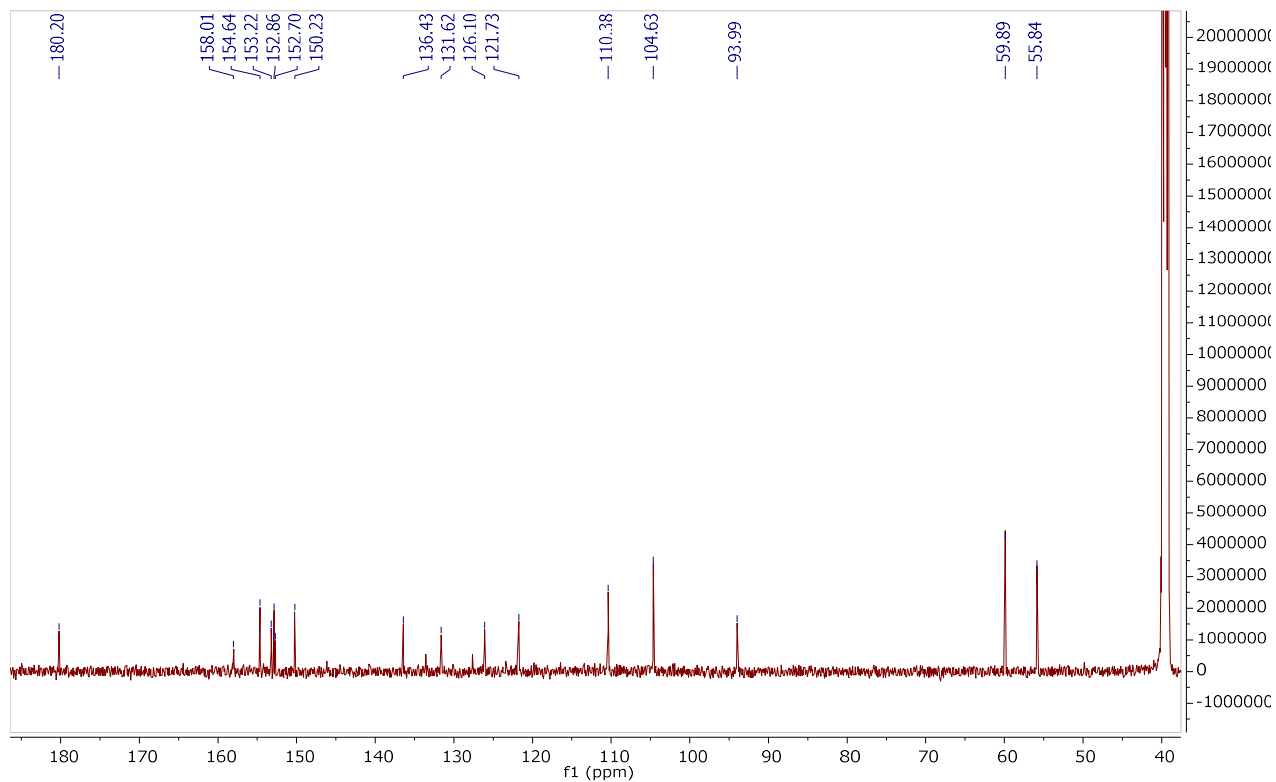
Εικόνα 63: Μεταβολίτης 4 (VLC1FR12-F2-Peak9)

Ο **μεταβολίτης 4** είναι ο 5,7-Dihydroxy-6-methoxy-3-(3-hydroxy-4,5-dimethoxyphenyl)-benzo- γ -pyrone ή εμπειρικά Ιριγενίνη.

Η Ιριγενίνη έχει ταυτοποιηθεί στο παρελθόν σε ποικίλα είδη του γένους *Iris*, όπως τα είδη *I. germanica.*, *I. crocea* , *I. spuria* (Bhat, **2014**), *I. adriatica* (Iwashina & Mizuno, **2020**), *I. florentina* (Nikaido *et al.*, **1982**) και *I. pseudopumila* (Rigano *et al.*, **2007**). Μεταξύ των βιολογικών και φαρμακολογικών δράσεων που έχουν αποδοθεί στην Ιριγενίνη περιλαμβάνεται η αντικαρκινική δράση ενάντια σε ανθρώπινο καρκίνο ήπατος (Wanggang Xu *et al.*, **2021**), όπως επίσης και ενάντια σε επιθηλιακό καρκίνο (Amin *et al.*, **2013**).



Εικόνα 64: Φάσμα ^1H NMR της ένωσης VLC1F12-F2-Peak 9



Εικόνα 65 Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης VLC1F12-F2-Peak 9

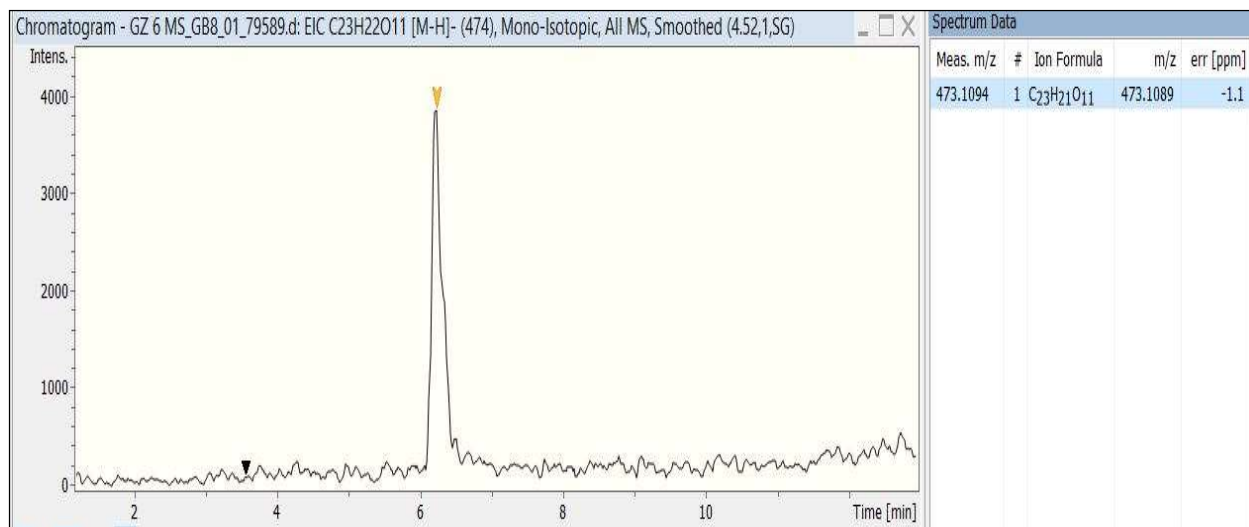
Πίνακας 23: Οι χημικές μετατοπίσεις $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ του μεταβολίτη 4

Άτομο	$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6)		$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6)
	δ (ppm)	Multiplicity, J (Hz)	δ (ppm)
2	8.37	br s	154.6
3	-	-	126.1
4	-	-	180.2
4a	-	-	104.6
5	-	-	153.2
6	-	-	131.6
7	-	-	158.0
8	6.49	br s	94.0
8a	-	-	152.7

1'	-	-	121.8
2'	6.71	d, 2.0	110.4
3'	-	-	150.2
4'	-	-	136.4
5'	-	-	152.8
6'	6.65	d, 2.0	104.6
5-OH	13.03	s	-
6- OCH₃	3.75	s	59.9
4'- OCH₃	3.69	s	59.9
5'- OCH₃	3.79	s	55.9

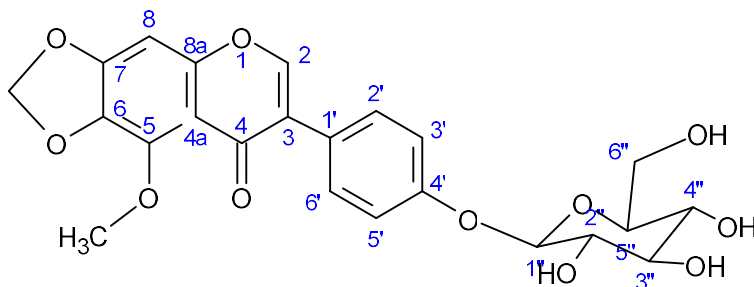
3.4.5. Μεταβολίτης 5

Ο **μεταβολίτης 5** (2,3 mg) απομονώθηκε μέσω semi-preparative HPLC από το κλάσμα VLC1FR12-Fr3-P4, ενώ εκλούστηκε σε χρόνο 19.70 και ανιχνεύτηκε στα 254 και 280 nm.



Εικόνα 66: TIC φάσμα μάζας **Μεταβολίτη 5**

Το φάσμα μάζας του **μεταβολίτη 5** έδωσε ψευδομοριακό ιόν $[M-H]^-$ m/z 473.1089 amu (θεωρητικό 473.1094 amu, err. -1.1 ppm) που αντιστοιχεί σε M.T $C_{23}H_{22}O_{11}$.

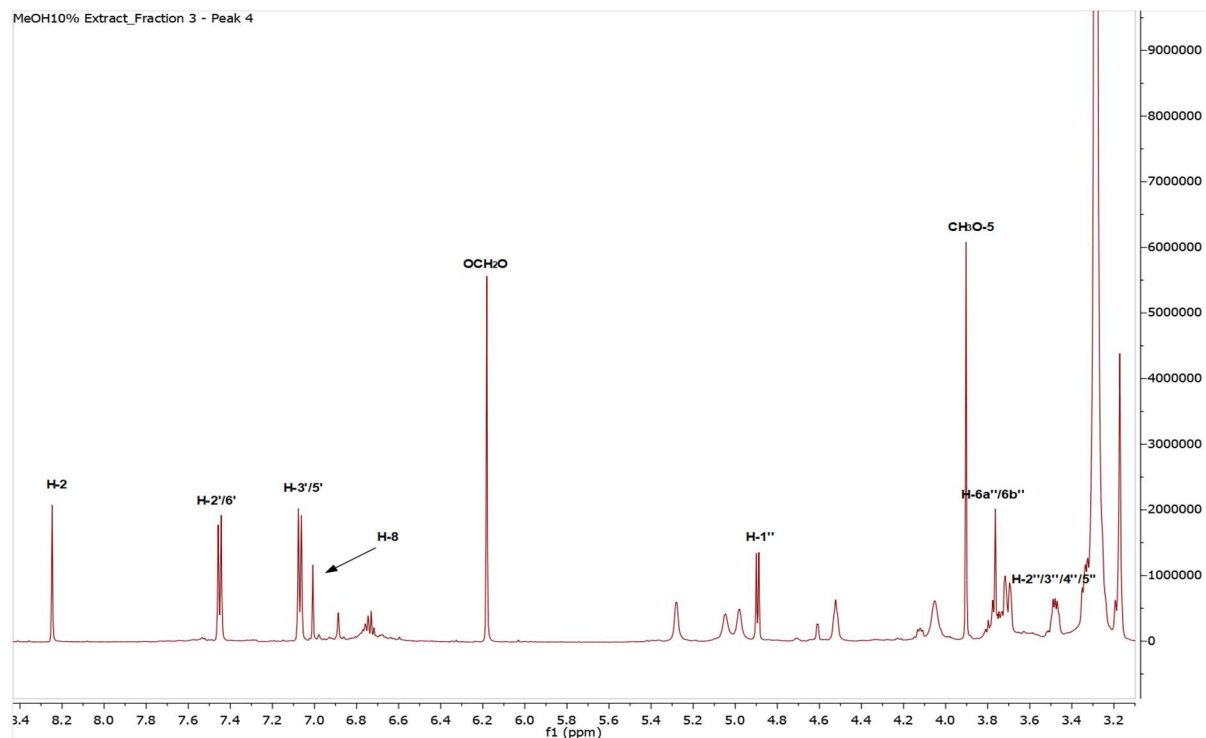


Εικόνα 67: Μεταβολίτης 5 (VLC12FR3-Peak4).

Η μεγαλύτερη σχετική μοριακή μάζα του **Μεταβολίτη 5**, σε συνδυασμό με την εξέταση του φάσματος 1H NMR σε $DMSO-d_6$, οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για γλυκοζυλιωμένη ισοφλαβόνη. Πράγματι ο συνδυασμός των δεδομένων από τα φάσματα 1H NMR, HSQC-DEPT και 1H - 1H COSY αποκάλυψαν την ύπαρξη ανωμερικού πρωτονίου και άνθρακα γλυκόζης (H-1''/C-1'', δ_H 4.90, d, 7.8 Hz / δ_C 100.4), καθώς και των υπόλοιπων σακχαριδικών πρωτονίων και ανθράκων. Η θέση της γλυκοζυλίωσης προσδιορίστηκε ότι είναι η C-4', αφού μόνο αυτή η υποκατάσταση επιτρέπει στα αρωματικά πρωτόνια του Β δακτυλίου να είναι χημικά ισοδύναμα. Έτσι στο φάσμα 1H -NMR παρατηρούμε δύο διπλές κορυφές που ολοκληρώνουν για δύο πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-2'/H-6' (δ 7.45, d, 8.8 Hz) και H-3'/H-5' (δ 7.07, d, 8.8 Hz). Πρόκειται για ένα χαρακτηριστικό spin σύστημα AA'XX' του *p*-υποκατεστημένου Β δακτυλίου των ισοφλαβονών, το οποίο υφίσταται και στον **Μεταβολίτη 1**.

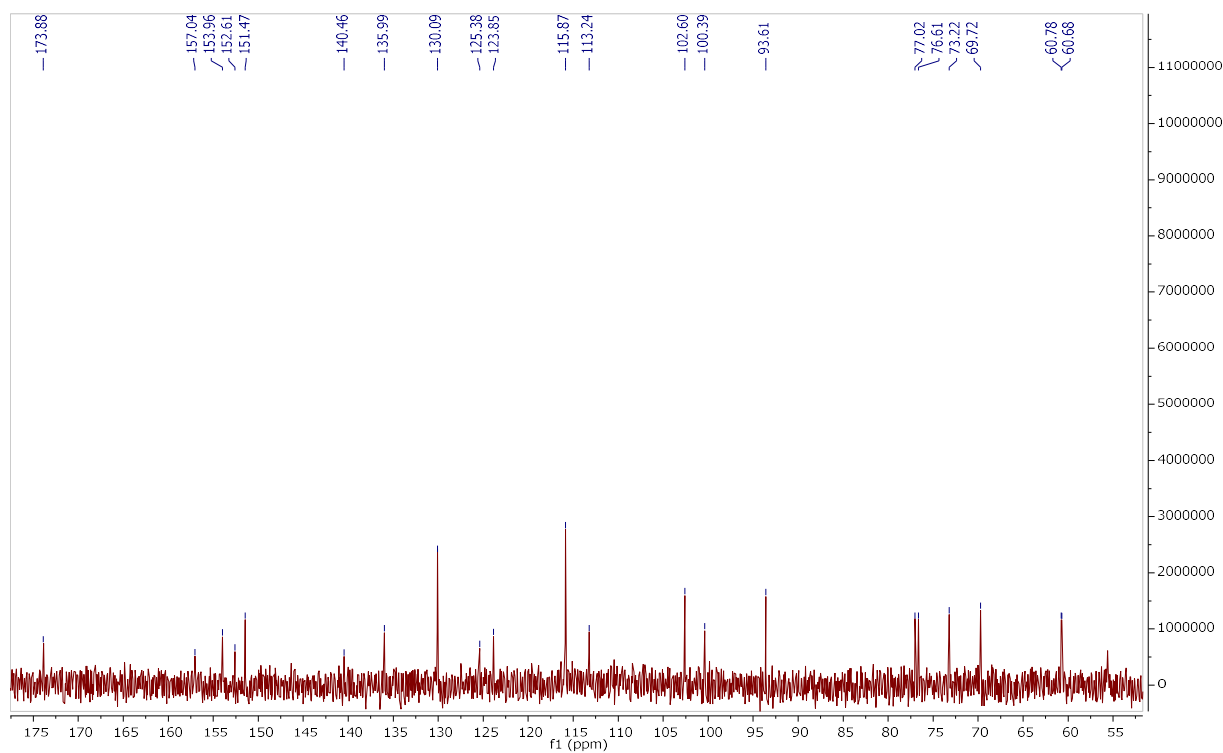
Το υπόλοιπο τμήμα του μορίου είχε επίσης σημαντικές διαφορές από τους **Μεταβολίτες 1** και **4**, όπως φάνηκε από τα φάσματα 1H NMR και ^{13}C NMR. Η απουσία του 5-OH, η παρουσία ενός μεθοξυλίου με υψηλότερες χημικές μετατοπίσεις πρωτονίου και άνθρακα (5-OCH₃, δ_H 3.90, s, δ_C 60.7), σε σύγκριση με τις μεθοξυλομάδες των προηγούμενων ισοφλαβονών, αλλά και η σημαντική προστασία του καρβονυλικού άνθρακα C-4' (δ_C 173.9) συνετέλεσε στο συμπέρασμα της μεθυλίωσης του 5-OH. Επίσης, η απουσία άλλης μεθοξυλομάδας (ή φαινολικού υδροξυλίου) στο μόριο και η παρουσία στο φάσμα 1H -NMR μιας απλής κορυφής που ολοκλήρωνε για δύο

πρωτόνια και αντιστοιχούσε σε άνθρακα στα 102.6 ppm, φανέρωσαν την ύπαρξη μεθυλενοδιόξυ- ομάδας στον δακτύλιο A (-OCH₂O-, δ_H 6.18, δ_C 102.6). Με την συνδυαστική μελέτη των φασμάτων HSQC-DEPT, HMBC αποδόθηκαν οι χημικές μετατοπίσεις όλων των ατόμων πρωτονίου και άνθρακα του **Μεταβολίτη 5**.



Εικόνα 68: Φάσμα ¹H NMR του **Μεταβολίτη 5**

Ο **μεταβολίτης 5**, είναι ο 4'-O-γλυκοζίτης της ιρισολόνης (5-μεθοξυ-6,7-μεθυλενοδιόξυ-4'-υδροξυ-ισοφλαβόνης) ή Germanaism B και έχει απομονωθεί από τα ριζώματα του είδους *I. germanica* (Atta-Ur-Rahman *et al.*, **2003**) και από άλλα είδη του γένους *Iris* (π.χ. *I. pseudorumila* (Rigano *et al.*, **2007**)).



Εικόνα 69: Φάσμα ^{13}C NMR του Μεταβολίτη 5.

Πίνακας 24: Οι χημικές μετατοπίσεις $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ του μεταβολίτη 5

Άτομο	^1H NMR (DMSO- d_6)		^{13}C NMR (DMSO- d_6)
	δ (ppm)	Multiplicity, J (Hz)	δ (ppm)
2	8.25	s	151.5
3	-	-	125.4
4	-	-	173.9
4a	-	-	113.2
5	-	-	140.5
6	-	-	136.1
7	-	-	152.6

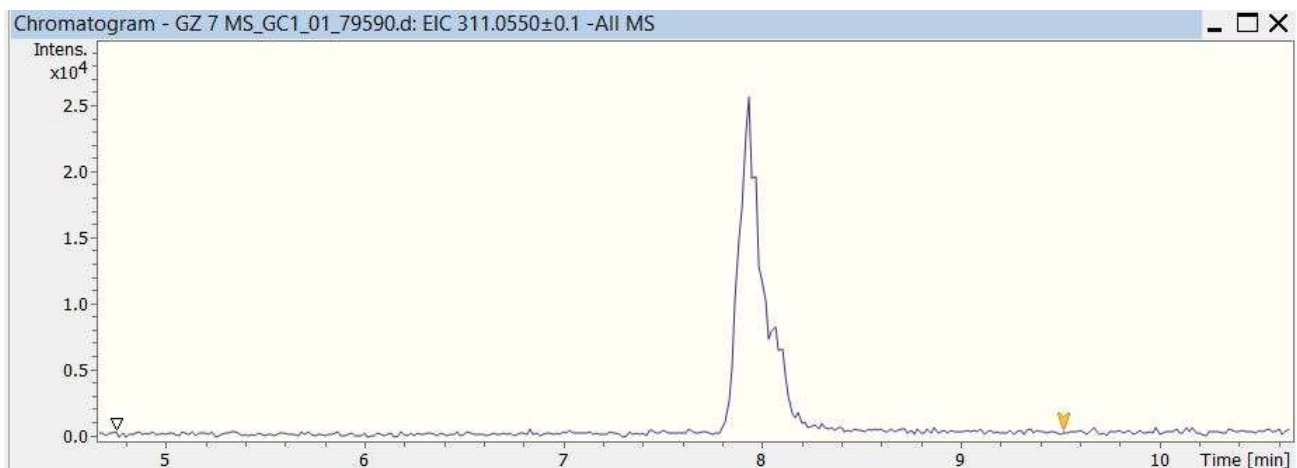
8	7.01	s	93.6
8a	-	-	154.0
1'	-	-	123.9
2'	7.45	d, 8.8	130.1
3'	7.07	d, 8.8	115.9
4'	-	-	157.1
5'	7.07	d, 8.8	115.9
6'	7.45	d, 8.8	130.1
1''	4.90	d, 7.4	100.4
2''	3.26	ovlp	73.2
3''	3.28	m	76.6
4''	3.18	ovlp	69.7
5''	3.34	ovlp	77.0
6''α	3.71	m	60.8
6''β	3.48	dd, 11.8, 5.6	
5 -OCH₃	3.90	s	60.7
-OCH₂O-	6.18	s	102.6

Επίσης έχουν μελετηθεί οι αντιοξειδωτικές, νευροπροστατευτικές και κυτταροτοξικές ιδιότητες της (Conforti *et al.*, 2009), ενώ η δράση της έναντι καρκινικών κυττάρων έχει χαρακτηριστεί ως μέτρια.

3.4.6. Μεταβολίτης 6

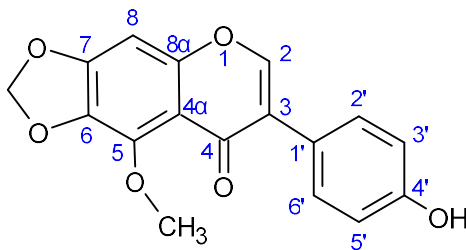
Ο **μεταβολίτης 6** (0.5 mg) απομονώθηκε έπειτα από RP-HPLC χρωματογραφικό διαχωρισμό της κορυφής 3 από το κλάσμα 4 του VLC1FR12. Εκλούστηκε σε χρόνο 8.14 min και ανιχνεύτηκε στα 254 και στα 280 nm.

Το φάσμα μάζας του **μεταβολίτη 6** έδωσε ψευδομοριακό ιόν $[M-H]^-$ με m/z 311.0550 amu (θεωρητικό 311.0556 amu, err. -1.9 ppm) που αντιστοιχεί σε M.T $C_{17}H_{12}O_6$.



Εικόνα 70: TIC φάσμα μάζας Μεταβολίτη 6.

Το φάσμα 1H NMR του **μεταβολίτη 6** σε $(CD_3)_2CO$ έδειξε ότι πρόκειται για άγλυκο ισοφλαβόνης. Αν εξαιρέσουμε τις διαφορές στις χημικές μετατοπίσεις των ατόμων 1H και ^{13}C που οφείλονται στον διαφορετικό δευτεριωμένο δ/τη, το μόριο ταυτίζεται με την γενίνη του **μεταβολίτη 5**. Με συνδυαστική ανάλυση των δεδομένων των φασμάτων HSQC-DEPT, HMBC και του 1H NMR, επιβεβαιώσαμε την δομή και αποδώσαμε όλες τις χημικές μετατοπίσεις των ατόμων H και C της ένωσης.

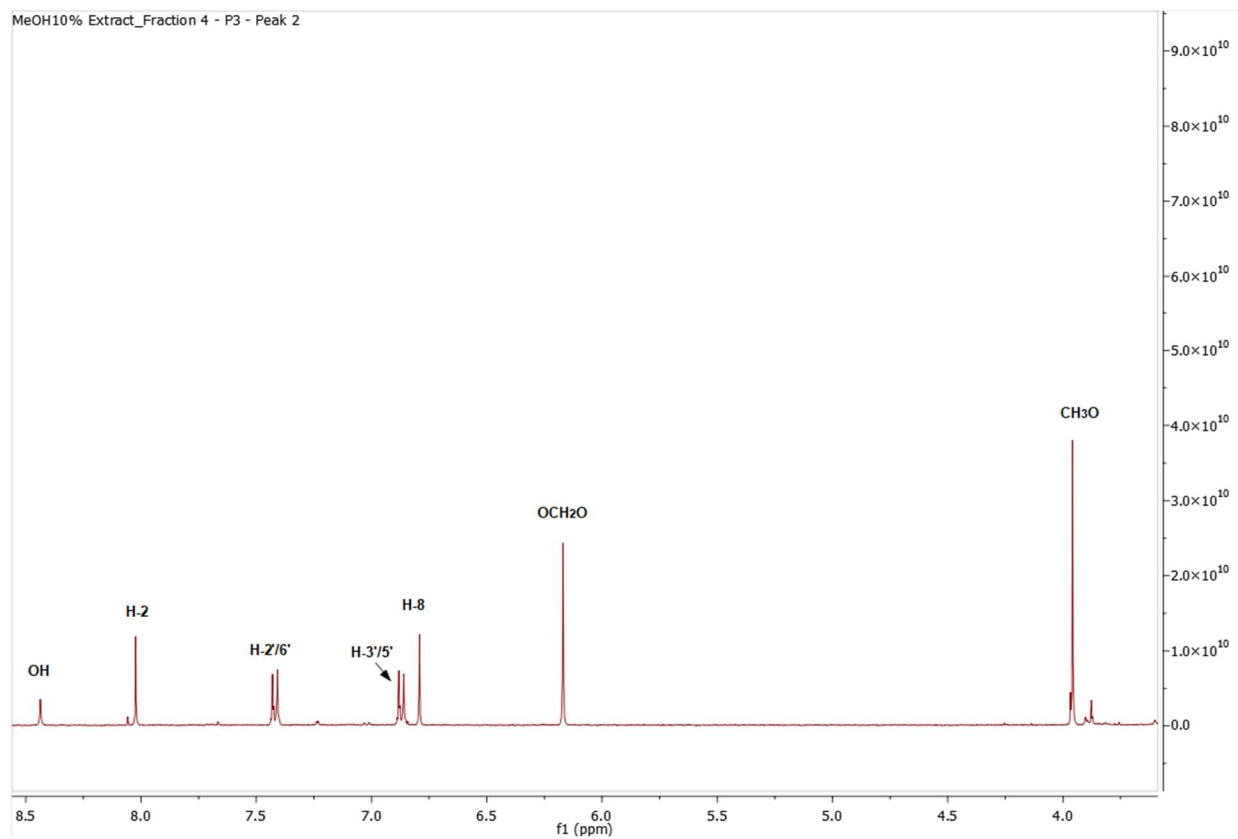


Εικόνα 71: Μεταβολίτης 6 (VLC1FR12-F4-P3-P2)

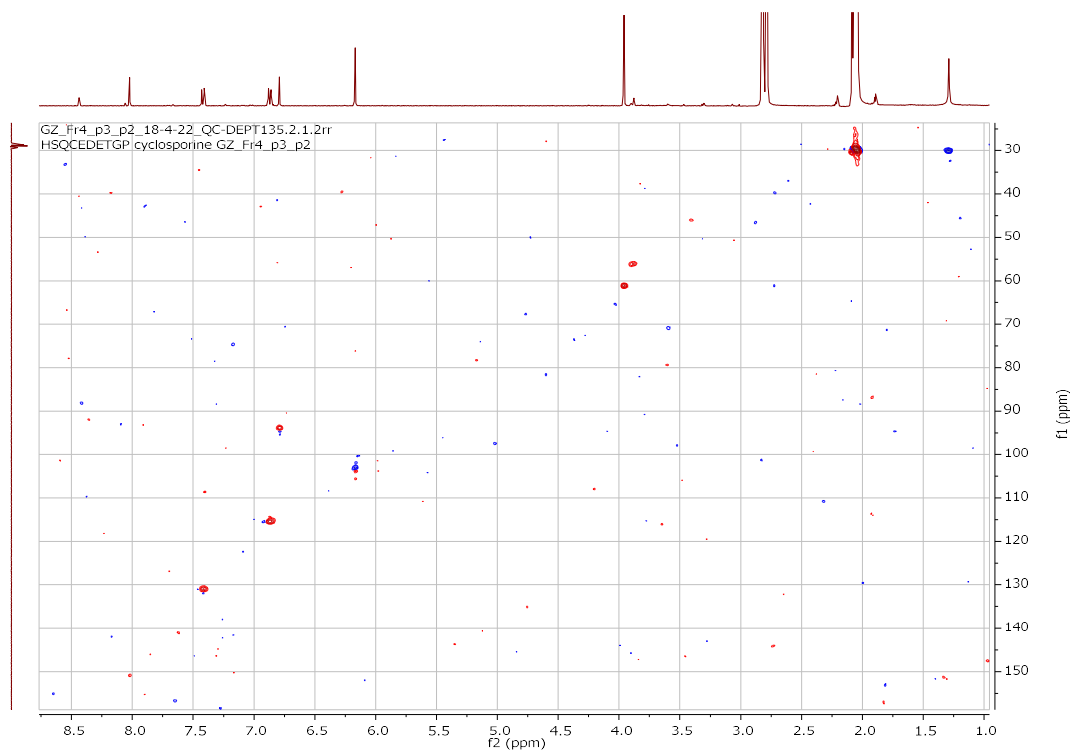
Στο φάσμα ^1H NMR παρατηρούνται οι χαρακτηριστικές κορυφές μιας ισοφλαβόνης στην οποία υπάρχει μεθυλενοδιόξυ- ομάδα στον Α δακτύλιο και το 5-OH είναι μεθυλιωμένο.

Σε δ 8.02 εμφανίζεται μια απλή κορυφή που ολοκληρώνει για 1 πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο H-2, ενώ σε δ 6.87 και 7.42 παρατηρούνται δύο διπλές κορυφές που ολοκληρώνουν για δύο πρωτόνια η κάθε μία. Τα πρωτόνια αυτά είναι τα τέσσερα αρωματικά πρωτόνια του Β δακτυλίου, τα οποία ανά δύο είναι χημικά ισοδύναμα (H-2'/ H-6' και H-3'/ H-5'). Σε δ 6.17, υπάρχει μια απλή κορυφή που αντιστοιχεί στα δύο πρωτόνια του μεθυλενοδιόξυ- ομάδας, ενώ σε δ 3.96 εμφανίζεται μια απλή κορυφή που ολοκληρώνει για τα 3 πρωτόνια και αντιστοιχεί στην μεθοξυλομάδα της θέσεως C-5. Επειδή δεν υπάρχει δυνατότητα σχηματισμού δεσμού υδρογόνου με το καρβονύλιο της θέσεως C-4, ο τελευταίος έχει μετατοπιστεί σε ισχυρότερα πεδία (C-4, δ 175.1), όπως ακριβώς συμβαίνει και στον C-4 του **μεταβολίτη 5**. Τέλος, σε δ 8.34 ppm μια απλή κορυφή που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο του υδροξυλίου της θέσης 4' στον Β δακτύλιο.

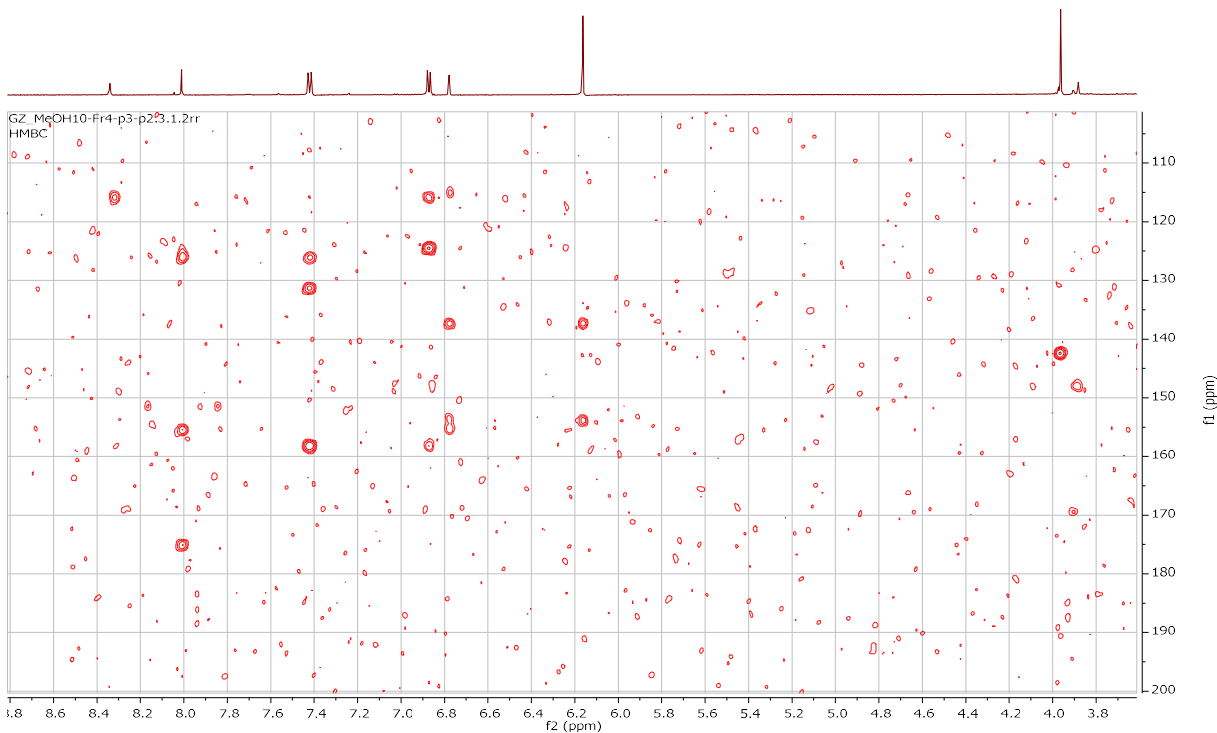
Ο **μεταβολίτης 6** είναι η 5-μεθοξυ-6,7-μεθυλενοδιόξυ-4'-υδροξυισοφλαβόνη, η οποία είναι γνωστή με το εμπειρικό όνομα Ιρισολόνη ή Νιγρισίνη. Η Ιρισολόνη έχει απομονωθεί ξανά από τα εκχυλίσματα ριζών των ειδών *Iris germanica* (Orhan *et al.*, **2003**), *I. adriatica* (Bukvički *et al.*, **2018**), *I. crocea* και *I. spuria* (Bhat, **2014**). Έχει μελετηθεί ως προς την νευροπροστατευτική (Conforti *et al.*, **2009**) και την αντιοξειδωτική της δράση (Rigano *et al.*, **2007**).



Εικόνα 72: Φάσμα ¹H NMR του Μεταβολίτη 6



Εικόνα 73: Φάσμα HSQC-DEPT του Μεταβολίτη 6



Εικόνα 74: Φάσμα HMBC του Μεταβολίτη 6

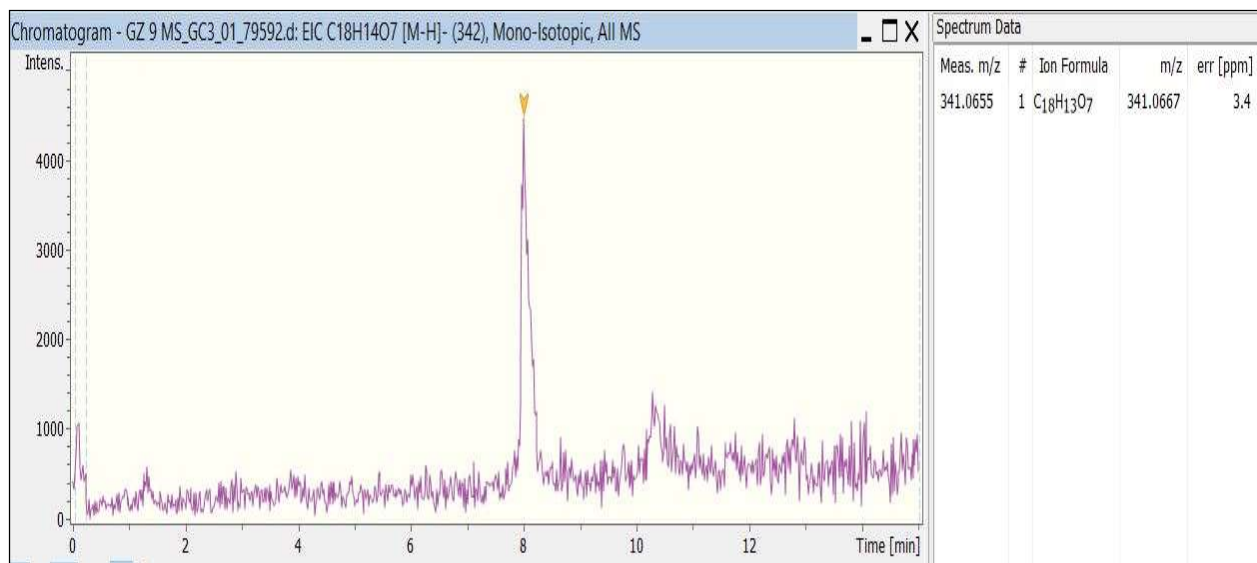
Πίνακας 25: Οι χημικές μετατοπίσεις $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ του μεταβολίτη 6

Άτομο	^1H NMR ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$)		^{13}C NMR ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$)
	δ (ppm)	Multiplicity, J (Hz)	δ (ppm)
2	8.02	s	150.9
3	-	-	126.2
4	-	-	175.1
4a	-	-	115.1
5	-	-	142.4
6	-	-	137.3
7	-	-	153.9

8	6.79	s	93.8
8a	-	-	155.4
1'	-	-	124.6
2'	7.42	d, 8.7	130.9
3'	6.87	d, 8.7	115.4
4'	-	-	158.3
5'	6.87	d, 8.7	115.4
6'	7.42	d, 8.7	130.9
-OCH₂O-	6.17	s	103.8
5'-OCH₃	3.96	s	61.1
4'-OH	8.34	br s	-

3.4.7. Μεταβολίτης 7

Ο **Μεταβολίτης 7** (0.7 mg) απομονώθηκε έπειτα από RP-HPLC χρωματογραφικό διαχωρισμό της κορυφής 4 από το κλάσμα 4 του VLC1FR12. Εκλούεται σε χρόνο 8.48 min και ανιχνεύτηκε στα 254 και στα 280 nm.



Εικόνα 75: TIC φάσμα μάζας Μεταβολίτη 7

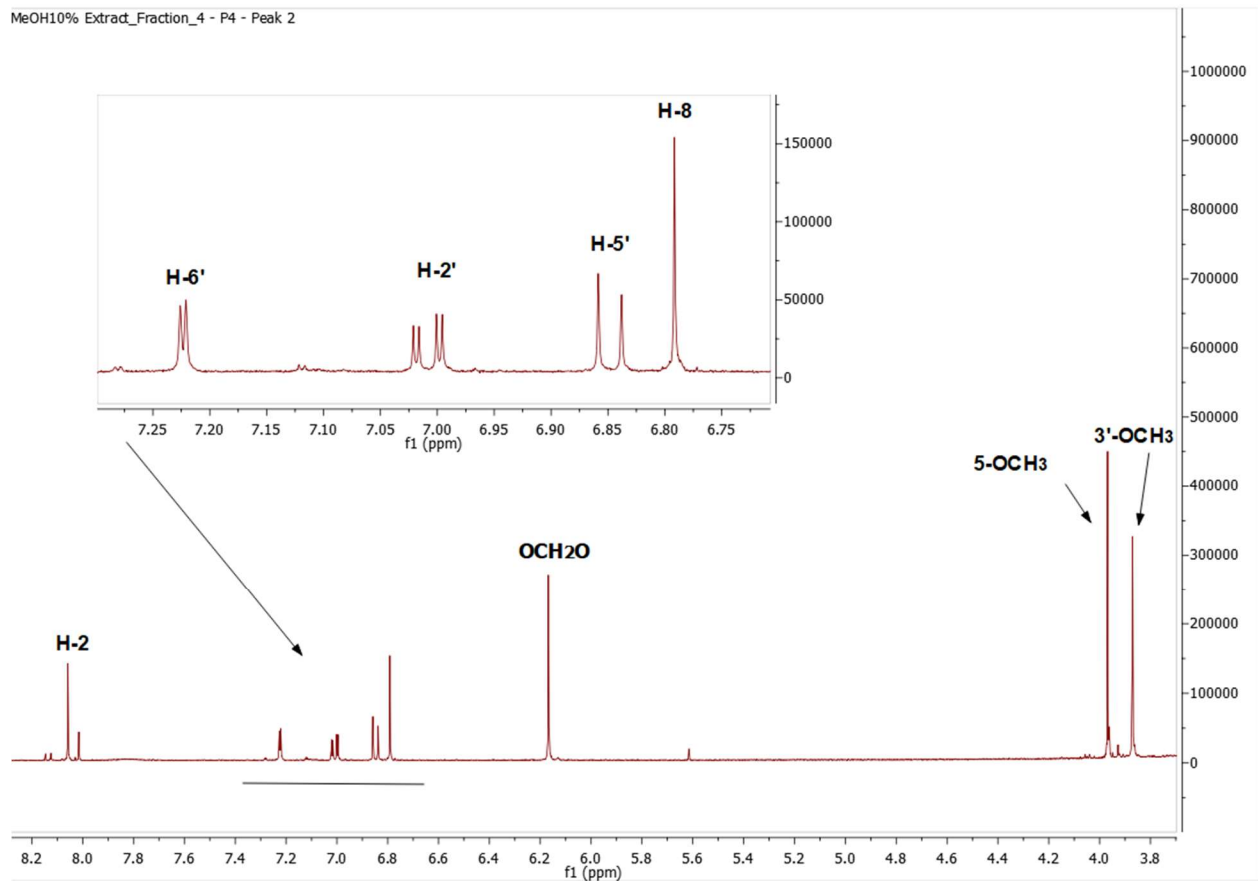
Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη 7 έδωσε ψευδομοριακό ιόν $[M-H]^-$ με m/z 341.0667 amu (θεωρητικό m/z 341.0655 amu, err. 3.4 ppm) που αντιστοιχεί σε Μ.Τ C₁₈H₁₄O₇.

Το φάσμα ¹H-NMR του **Μεταβολίτη 7** σε (CD₃)₂CO έδειξε ότι πρόκειται για ισοφλαβόνη ανάλογης δομής με τον **Μεταβολίτη 6** (δηλαδή με μεθυλωμένο το 5-OH και την παρουσία μεθυλενοδιόξυ- ομάδας στον Α δακτύλιο). Η σύγκριση των σχετικών μοριακών μαζών των δύο μορίων συνηγορεί στο γεγονός ότι ο **Μεταβολίτης 7** διαθέτει μια παραπάνω μεθοξυλομάδα (3'-OCH₃, δ_H 3.85 και δ_C 55.9), η οποία είναι εντοπισμένη στον δακτύλιο Β.

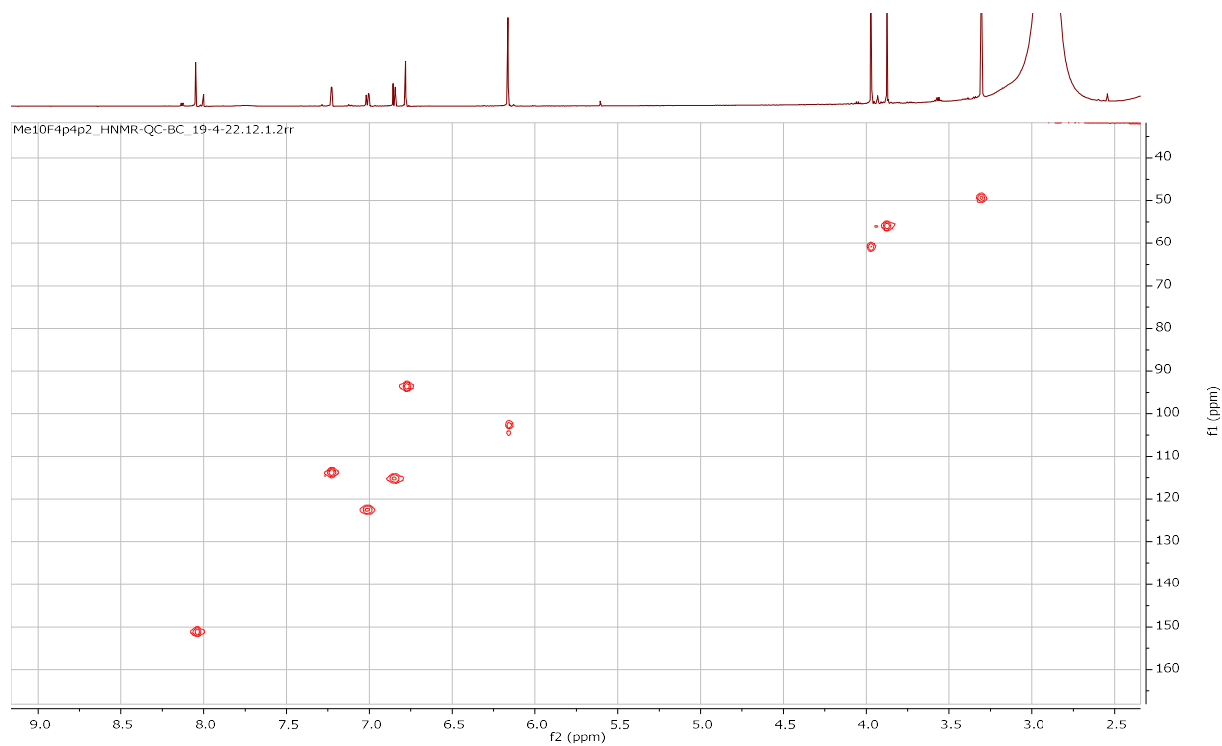
Εκτός από τα χαρακτηριστικές κορυφές των Η-2 (δ 8.05, s) και Η-8 (δ 6.78, s), των δύο πρωτονίων της μεθελενοδιόξυ- ομάδας (-OCH₂O-, δ 6.16, 2H, s) και των πρωτονίων της 5'-μεθοξυλομάδας (δ 3.97, s), στο φάσμα ¹H-NMR εντοπίζονται ακόμα τρεις κορυφές που αντιστοιχούν στα αρωματικά πρωτόνια Η-6' (δ 7.01, dd, 8.2/2.0 Hz), Η-5' (δ 6.85, d, 8.2 Hz), Η-2' (δ 7.23, d, 2.0 Hz) του Β δακτυλίου, τα οποία δημιουργούν ένα *spin* σύστημα AMX τρισυποκατεστημένου δακτυλίου. Οι δύο υποκαταστάτες του Β δακτυλίου είναι η επιπλέον μεθοξυλομάδα (σε σχέση με τον **Μεταβολίτη 6**) και υποχρεωτικά μια υδροξυλομάδα για να υπάρχει συμφωνία με τον Μ.Τ της ένωσης. Οι υποκαταστάτες -OCH₃ και -OH μπορούν να είναι μόνο στις θέσεις C-3' και C-4' αντίστοιχα, επειδή μόνο με αυτή την υποκατάσταση του Β δακτυλίου συμφωνούν οι HMBC συσχετίσεις του Η-2' και του Η-6' με τον C-3 (δ 125.6), αλλά και η ισχυρή NOE σύζευξη του 3'-OCH₃ με το Η-2'.

Εικόνα 76: Μεταβολίτης 7 (VLC1FR12-F4-P4-Peak 2)

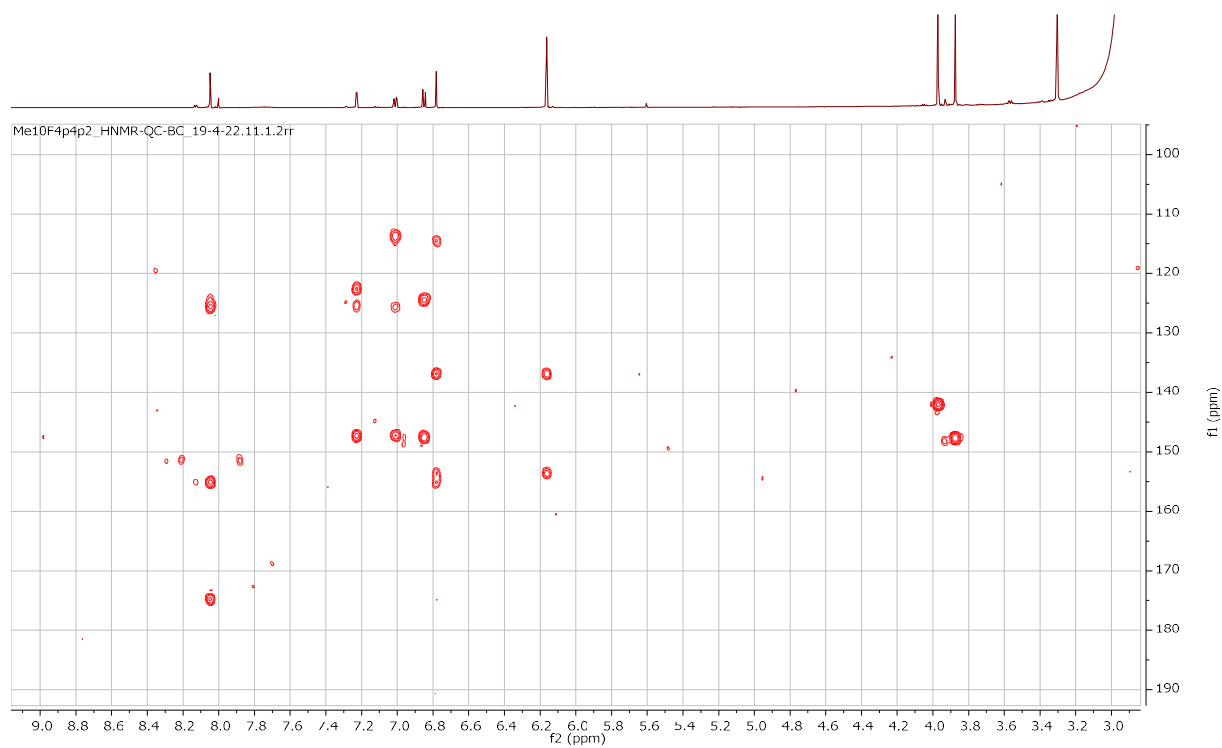
Η ένωση είναι γνωστή ως 5,3'-διμεθοξυ-6,7-μεθυλενοδιοξο-4'-υδροξυισοφλαβόνη ή Ιρισκασμिरιανίνη (Iriskashmirianin) και αποτελεί φυσικό προϊόν που έχει απομονωθεί από τα είδη *I. germanica* και *I. sofarana*.



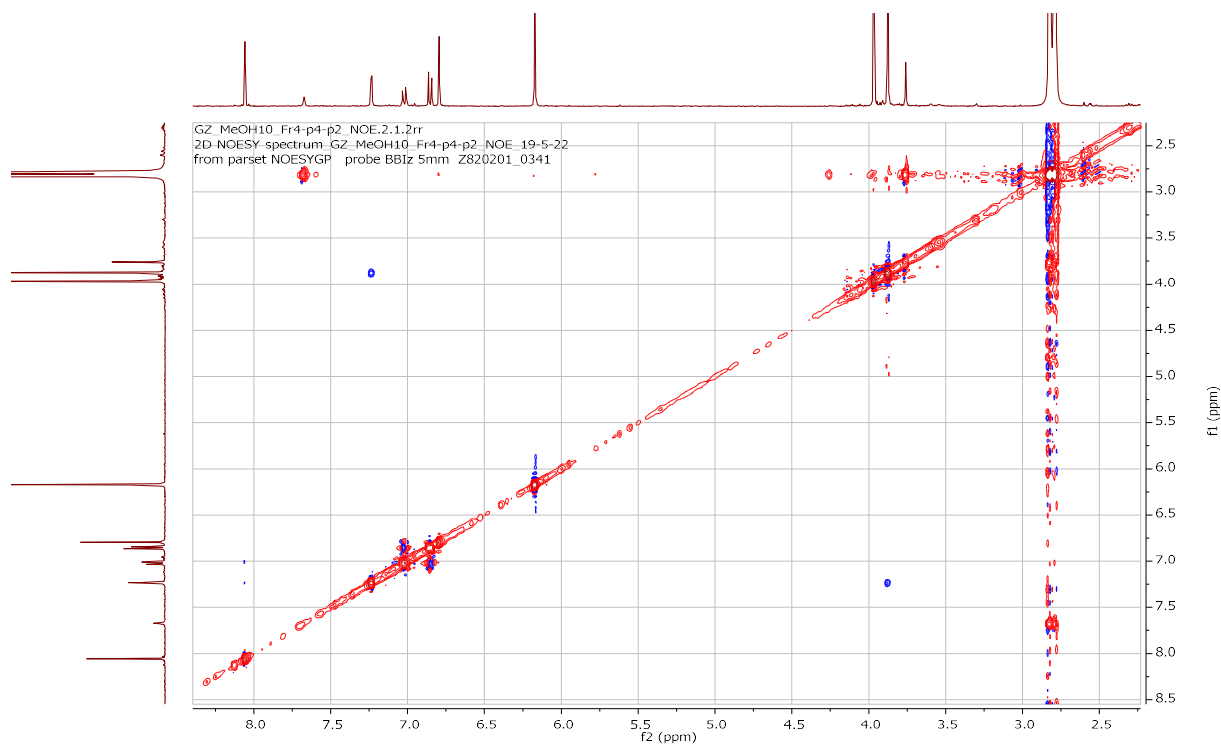
Εικόνα 77: Φάσμα ¹H NMR του Μεταβολίτη 7



Εικόνα 78: Φάσμα HSQC-DEPT του Μεταβολίτη 7



Εικόνα 79: Φάσμα HMBC του Μεταβολίτη 7



Εικόνα 80: Φάσμα NOESY του Μεταβολίτη 7

Πίνακας 26: Οι χημικές μετατοπίσεις $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ του μεταβολίτη 7.

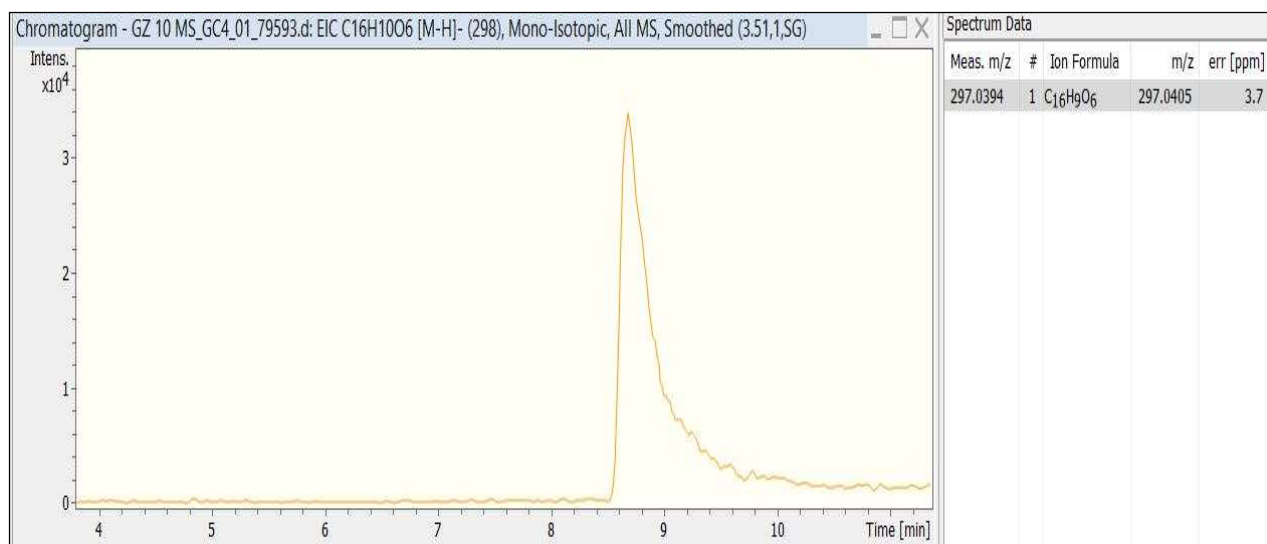
Άτομο	^1H NMR ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$)		^{13}C NMR ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$)
	δ (ppm)	Multiplicity, J (Hz)	δ (ppm)
2	8.05	s	151.1
3	-	-	125.6
4	-	-	174.8
4a	-	-	114.5
5	-	-	142.0
6	-	-	136.9
7	-	-	153.6
8	6.78	s	93.5

8a	-	-	155.1
1'	-	-	124.4
2'	7.23	d, 2.0	113.8
3'	-	-	147.5
4'	-	-	147.2
5'	6.85	d, 8.2	115.1
6'	7.01	dd, 8.2, 2.0	122.6
-OCH₂O-	6.16	s	103.2
5-OCH₃	3.97	s	60.8
4'-OH	-	-	-
3'-OCH₃	3.88	s	55.9

Η Ιρισκασμιριανίνη έχει απομονωθεί από διάφορα είδη *Iris*, όπως είναι τα είδη *I. crocea* (Iwashina & Mizuno, 2020) *I. germanica*, *I. kashmiriana*, *I. petrana* και *I. atrofusca*. Παλαιότερα ήταν γνωστή ως νιγρικανίνη (nigricanin), ενώ έχει μελετηθεί για την αντικαρκινική της δράση που κρίθηκε πως είναι μέτρια (Wollenweber *et al.*, 2003).

3.4.8. Μεταβολίτης 8

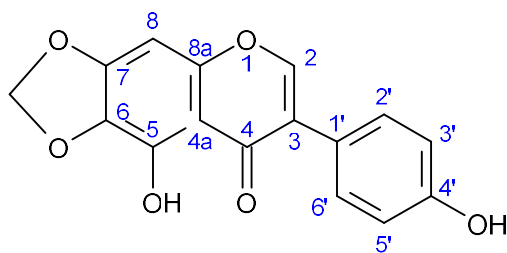
Ο μεταβολίτης 8 (0.4mg +2.8 mg) απομονώθηκε με ημι-παρασκευαστική HPLC χρωματογραφική επεξεργασία της κορυφής 5 του κλάσματος 5 του VLC1FR(12+13), το οποίο προέκυψε έπειτα από την συνένωση των κλασμάτων FR5 του VLC1-MeOH10% (=VLC1FR12) και του VLC1-MeOH20% (=VLC1FR13). Η δομή της ένωσης ταυτοποιήθηκε μέσω πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού μιας και δύο διαστάσεων και βρέθηκε ότι είναι όμοια με τη δομή της ουσίας που υπήρχε στην VLC1FR12FR4P4-P4.



Εικόνα 81: TIC φάσμα μάζας Μεταβολίτη 8.

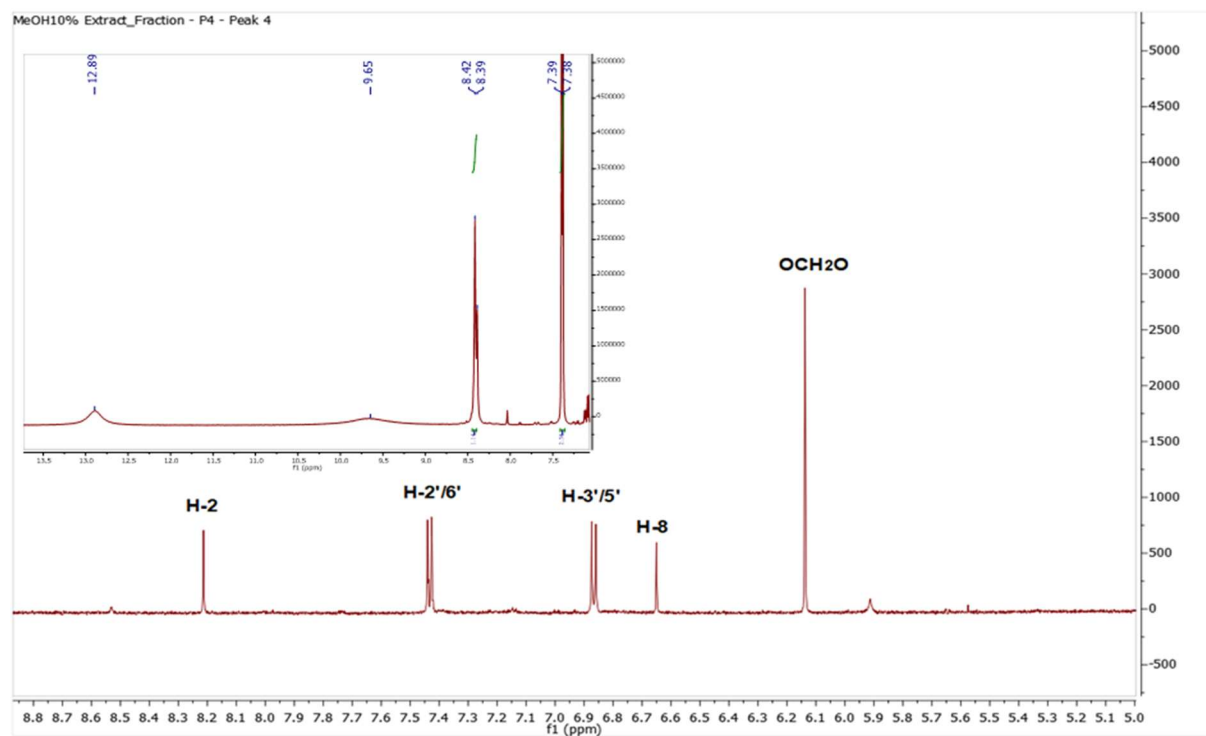
Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη 8 έδωσε ψευδομοριακό ιόν $[M-H]^-$ με m/z 297.0405 amu (θεωρητικό m/z 297.0394 amu, err. 3.7 ppm) που αντιστοιχεί σε M.T C₁₆H₁₀O₆.

Το φάσμα ¹H NMR του **Μεταβολίτη 8** σε (CD₃)₂SO παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα με το αντίστοιχο φάσμα του **Μεταβολίτη 6**. Περιέχει τα ίδια spin συστήματα που περιέχει και η δομή του **Μεταβολίτη 6** με μόνη διαφορά την έλλειψη μεθυλίου στο 5-OH. Το ευκίνητο και εύκολα ανταλλάξιμο αυτό πρωτόνιο δεν έδωσε σε αυτήν την περίπτωση εύκολα παρατηρήσιμη κορυφή στο φάσμα ¹H NMR εξαιτίας μάλλον της ύπαρξης υγρασίας στο DMSO-*d*₆. Εμφανίζεται ως μια πολύ διευρυμένη και κοντή κορυφή σε δ 12.9 . Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήσαμε και για το δεύτερο φαινολικό υδροξύλιο του μορίου στην θέση C-4' (4'-OH, δ 9.65). Επίσης, η διαφορά των 14 amu στις μοριακές μάζες των δύο μεταβολιτών, επιβεβαιώνει την δομή του **Μεταβολίτη 8**. Η απόδοση των χημικών μετατοπίσεων όλων των ατόμων άνθρακα και υδρογόνου έγινε με την συνδυαστική μελέτη των φασμάτων H-H COSY, HSQC-DEPT, HMBC.

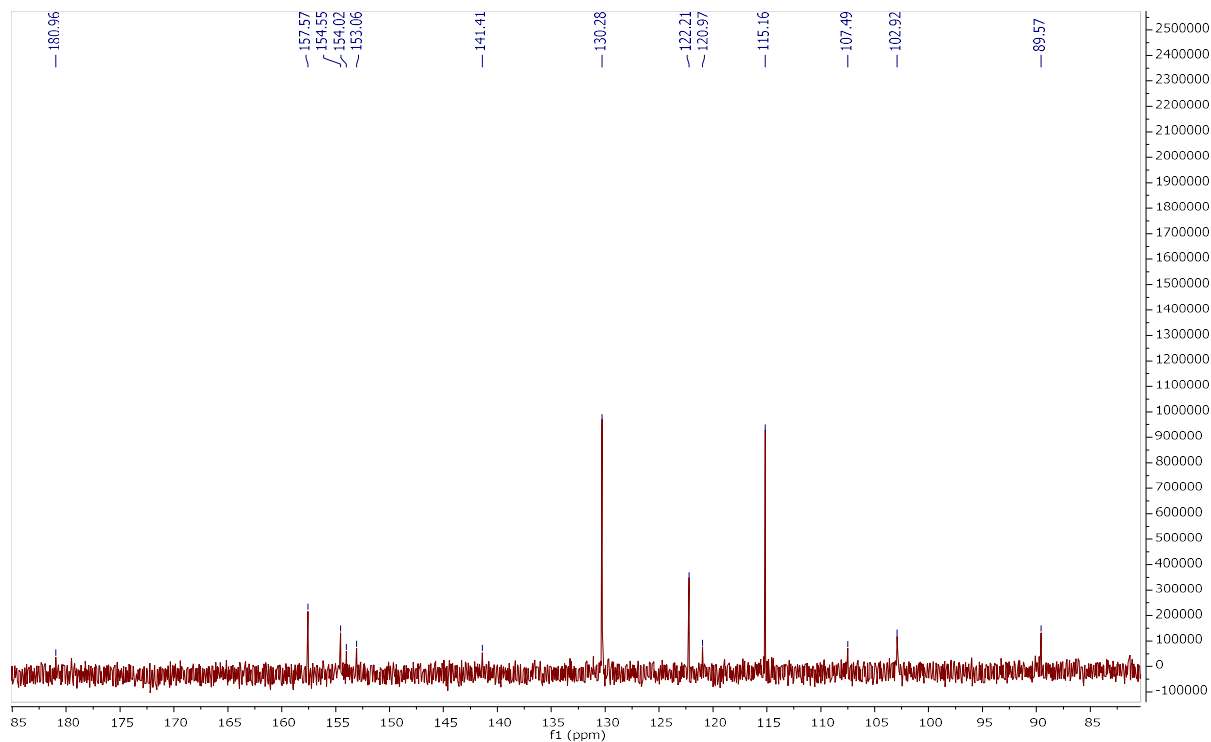


Εικόνα 82: Μεταβολίτης 8 (VLC1FR12-F4-P4-Peak 4)

Η ένωση είναι γνωστή ως 5,4'-διυδροξυ-6,7-μεθυλενοδιοξισοφλαβόνη ή εμπειρικά Ιριλόνη. Η Ιριλόνη απομονώθηκε για πρώτη φορά από το φυτό *I. germanica* (Ibrahim *et al.*, 2012), ενώ έκτοτε έχει εντοπισθεί και σε άλλα είδη του γένους *Iris*, όπως είναι τα *I. pumila*, *I. humilis* και *I. variegata* (Kostić *et al.*, 2019).



Εικόνα 83: Φάσμα ¹H NMR του **Μεταβολίτη 8**, με μεγεθυμένο τμήμα που φαίνονται τα δύο πρωτόνια των φαινολικών υδροξυλομάδων



Εικόνα 84: Φάσμα ^{13}C NMR του **Μεταβολίτη 8**.

Όσον αφορά τις βιολογικές δράσεις της ιριλόνης, έχουν ελεγχθεί οι αντιοξειδωτικές, οι κυτταροπροστατευτικές (Wollenweber *et al.*, **2003**) και οι πιθανές νευροπροστατευτικές της ιδιότητες (Stevens *et al.*, **2003**), αλλά η δραστηκότητά της δεν ήταν αξιόλογη.

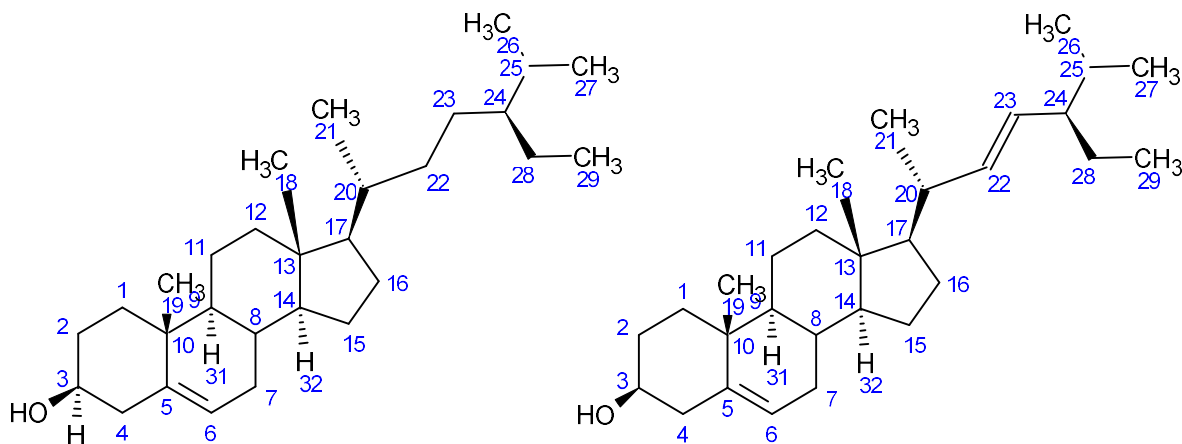
Πίνακας 27: Οι χημικές μετατοπίσεις $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ του **μεταβολίτη 8**.

Άτομο	$^1\text{H-NMR}$ ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$)		$^{13}\text{C-NMR}$ ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$)
	δ (ppm)	Multiplicity, J (Hz)	δ (ppm)
2	8.42	s	154.6
3	-	-	122.2
4	-	-	180.9
4a	-	-	107.4
5	-	-	141.4
6	-	-	129.6
7	-	-	154.0

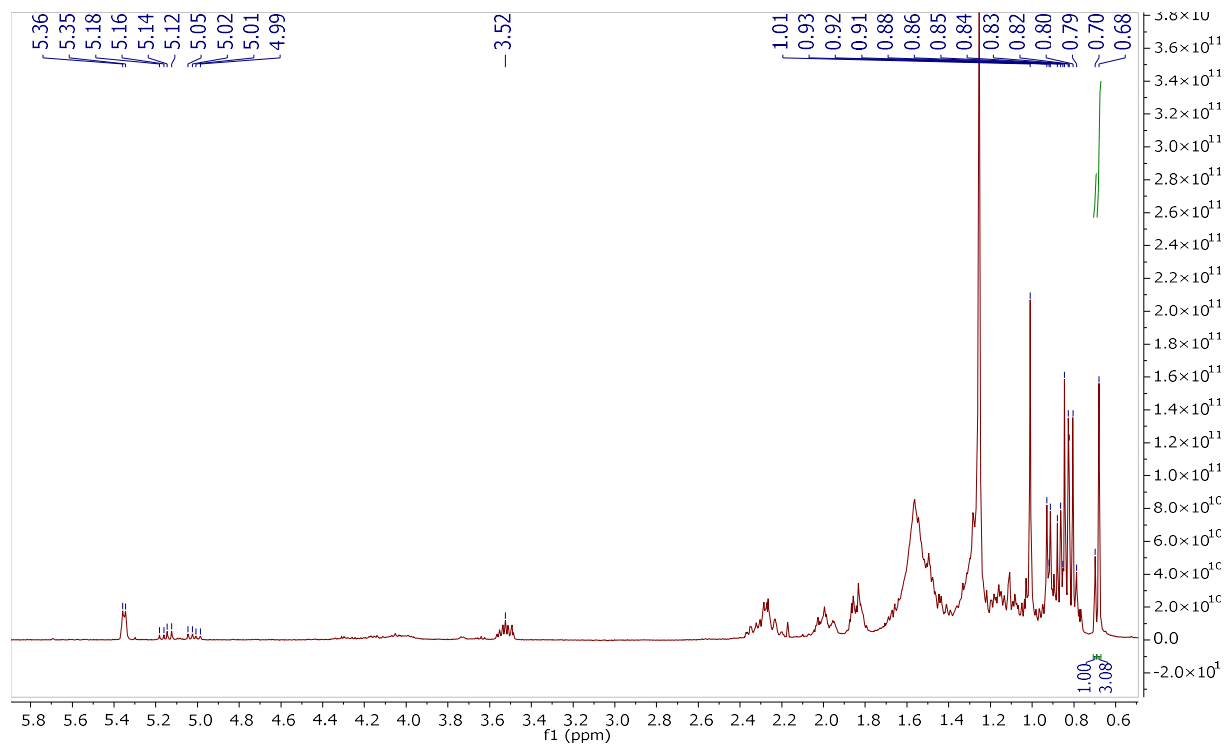
8	6.88	s	89.6
8a	-	-	153.1
1'	-	-	120.9
2'	7.39	d, 8.3	130.3
3'	6.82	d, 8.3	115.2
4'	-	-	157.6
5'	6.82	d, 8.3	115.2
6'	7.39	d, 8.3	130.3
-OCH₂O-	6.17	s	102.9
5-OH	12.9	br s	-
4'-OH	9.64	br s	-

3.4.9. Μεταβολίτες 9 και 10

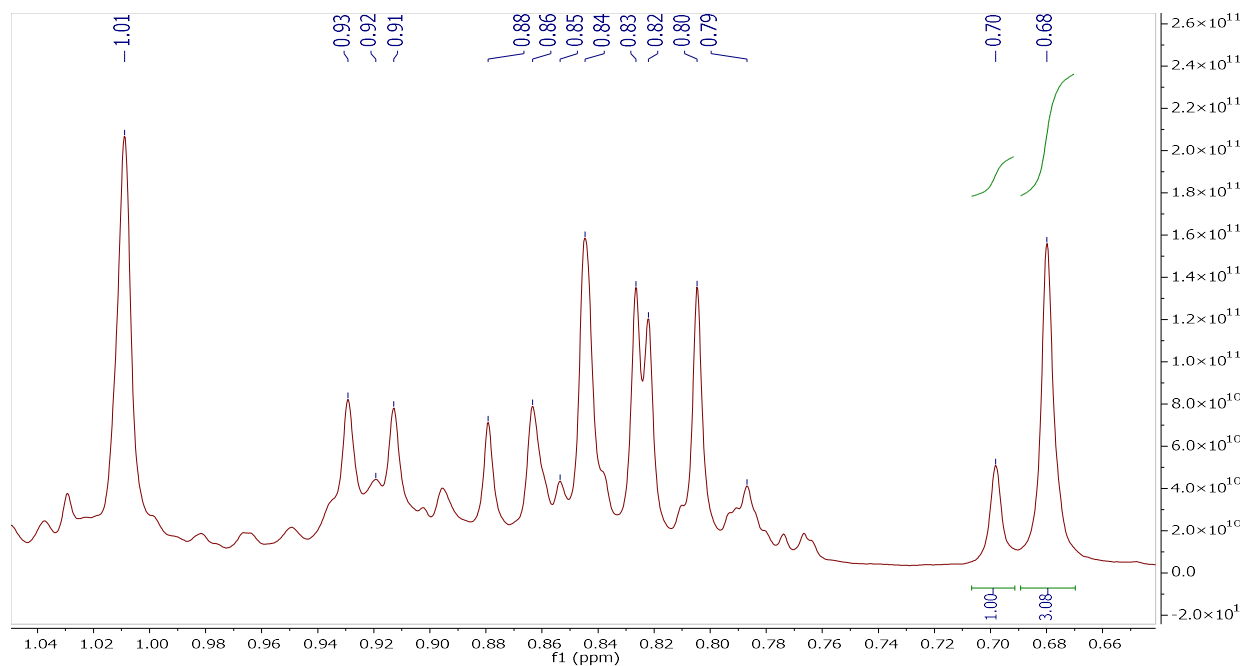
Οι μεταβολίτες **9** και **10** απομονώθηκαν από τη ζώνη 4 του VLC1FR4. Το κλάσμα 4 περιείχε χαμηλότερης πολικότητας ενώσεις, όπως είναι τα τερπένια. Η απομόνωση πραγματοποιήθηκε με ημι-παρασκευαστική NP-HPLC (Normal Phase HPLC) και η ανίχνευση έγινε στα 210 nm. Το φάσμα πρωτονίου (¹H-NMR, CDCl₃) έδειξε ότι το κλάσμα περιείχε κυρίως δύο φυτοστερόλες σε διαφορετική αναλογία. Με προσεκτική σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων των πρωτονίων και των ανθράκων των μεθυλομάδων των δύο μορίων, καθώς και των χημικών μετατοπίσεων των H-3, H-6, H-22 και H-23 με τις αντίστοιχες τιμές της βιβλιογραφίας, όπως επίσης και με την βοήθεια του φάσματος μάζας καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για τις β-σιτοστερόλη (**Μεταβολίτης 9**) και σιγμαστερόλη (**Μεταβολίτης 10**).



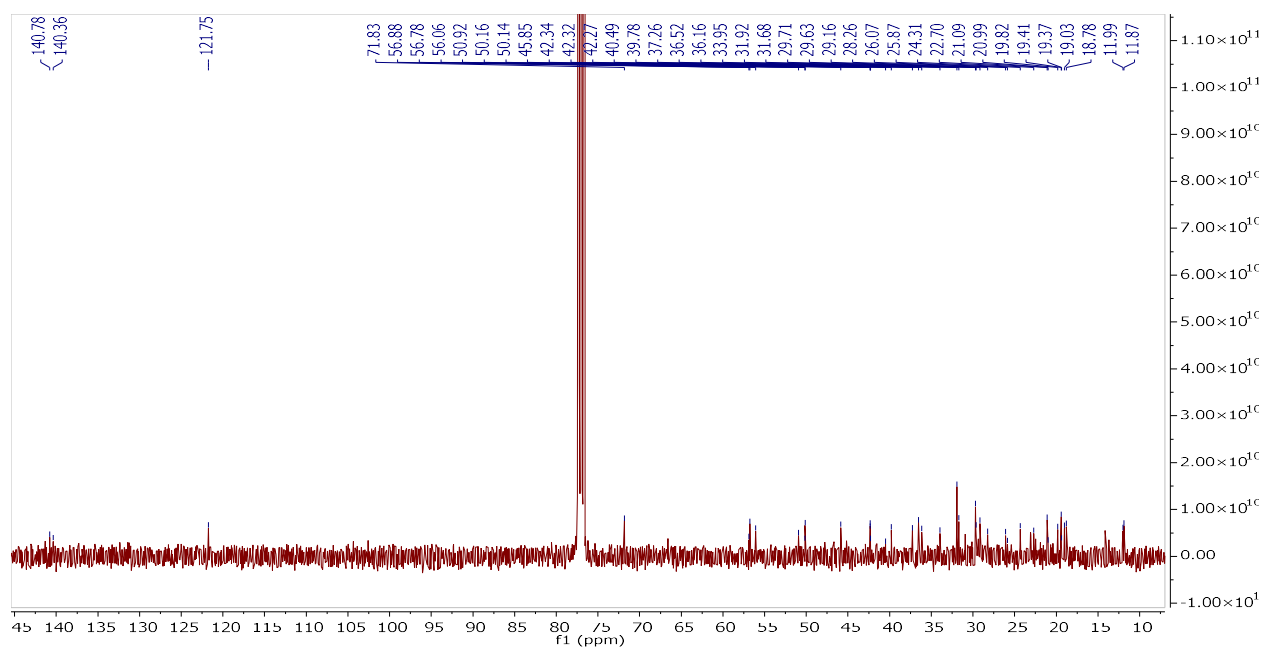
Εικόνα 85: Μεταβολίτες 9 (β-σιτοστερόλη) και 10 (σιγμαστερόλη) που απομονώθηκαν ως μίγμα (VLC1FR4-W1).



Εικόνα 86: Φάσμα ¹H-NMR του μείγματος VLC1F4-W1



Εικόνα 87: Τμήμα του φάσματος ¹H-NMR όπου φαίνονται οι κορυφές των μεθυλιών των δύο φυτοστερολών και προσεγγιστικά η αναλογία σιτοστερόλης:σιγμαστερόλης (1:3) στο μίγμα



Εικόνα 88: Φάσμα ¹³C-NMR του μείγματος VLC1F4-W1.

Πίνακας 28: Οι χημικές μετατοπίσεις $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ των μεταβολιτών 9 και 10

Άτομο	β-Σιτοστερόλη		Στιγμαστερόλη	
	^1H NMR	^{13}C NMR	^1H NMR	^{13}C NMR
	<i>Multiplicity, J (Hz)</i>	<i>δ (ppm)</i>	<i>Multiplicity, J (Hz)</i>	<i>δ (ppm)</i>
1	-	37.3	-	37.3
2	-	31.7	-	31.9
3	3.52, m	71.8	3.52, m	71.8
4	-	42.3	-	42.3
5	-	140.4	-	140.8
6	5.35*, m	121.6	5.36*, m	121.8
7	-	31.9	-	31.9
8	-	31.9	-	31.9
9	-	50.2	-	50.1
10	-	36.2	-	36.5
11	-	21.1	-	21.0
12	-	39.8	-	39.8
13	-	42.3	-	42.4
14	-	56.8	-	56.9
15	-	24.3	-	24.3
16	-	28.3	-	29.2
17	-	56.1	-	56.1
18	0.68, s	11.9	0.70, s	11.9
19	1.01, s	19.4	1.01, s	19.0
20	-	36.5	-	40.5
21	0.92, d, 6.5	18.8	0.93, d, 6.5	21.1

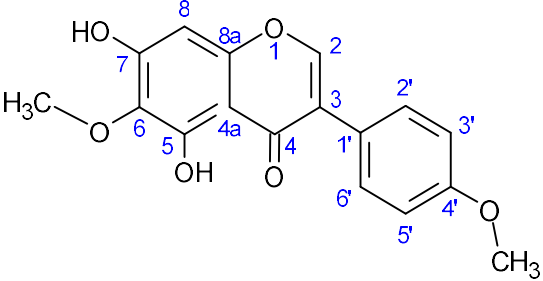
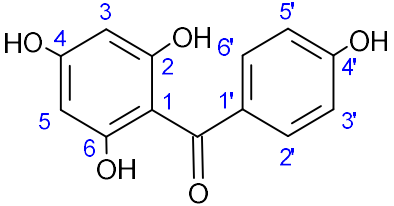
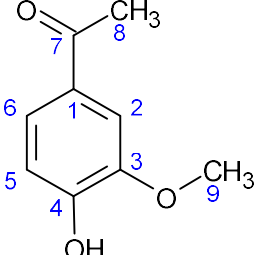
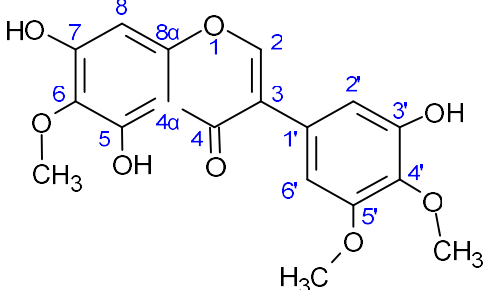
22	-	33.9	5.02, dd,15.1, 8.6	138.6
23	-	26.1	5.15, dd, 15.1, 8.5	129.5
24	-	45.8	-	50.9
25	-	29.6	-	29.7
26	0.81, d, 6.8	19.3	0.81, d, 6.8	19.8
27	0.79, d, 6.8	19.4	0.79, d, 6.8	21.1
28	-	22.7	-	25.8
29	0.84, t, 7.0	12.0	0.84, t, 7.0	12.0

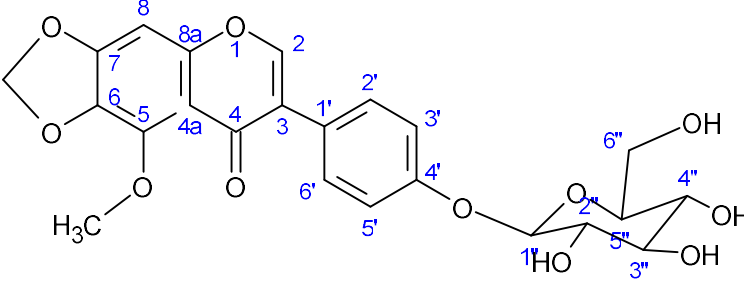
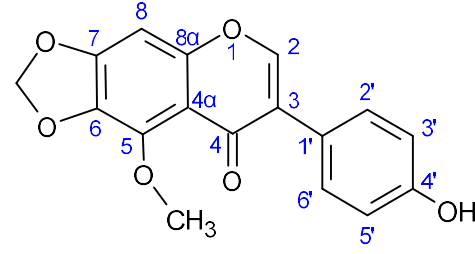
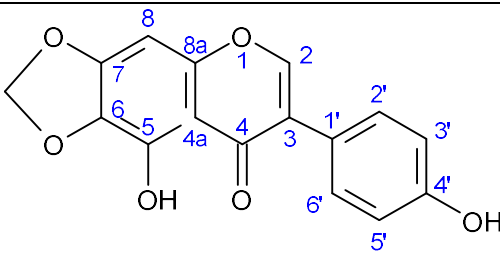
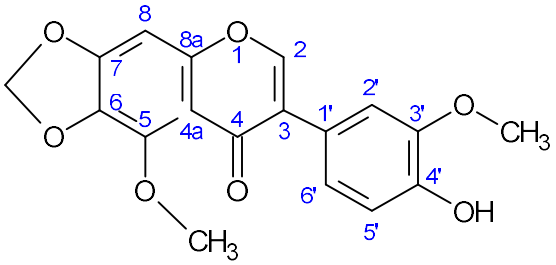
3.5. Μελέτη της αντι-πολλαπλασιαστικής δράσης απομονωμένων μεταβολιτών σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού

Επιλεγμένοι μεταβολίτες που απομονώθηκαν (πίνακας 32) ελέγχθηκαν ως προς τη αντι-πολλαπλασιαστική τους δράση έναντι κυτταρικών σειρών καρκίνου του μαστού. Οι κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού που επιλέχθηκαν και καλλιεργήθηκαν με σκοπό τη μελέτη της αναστολής του πολλαπλασιασμού τους από την επίδραση επιλεγμένων μεταβολιτών ήταν οι εξής: MDA-MB-231, MDA-MB-468, BT-20, BT-474, MCF-7 και SK-BR-3. Τα αποτελέσματα των βιολογικών δοκιμών παρουσιάζονται στις εικόνες 89 έως 94, καθώς και στον πίνακα 33.

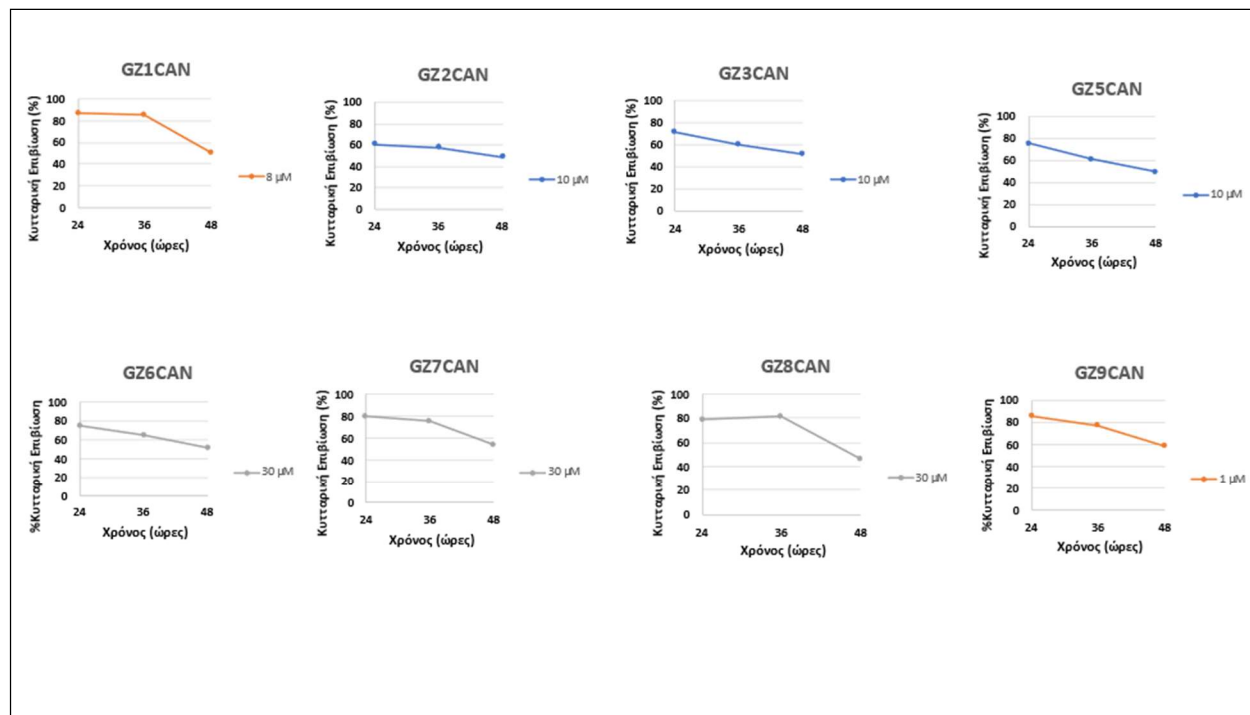
Επιπλέον, μίγματα μεταβολιτών τερπενικής φύσεως (με μεγάλη περιεκτικότητα σε ιριδάλες) πραγματοποιήθηκαν τα αντίστοιχα πειράματα σε δύο μόνο κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού (MDA-MB-231 και SK-BR-3). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στις εικόνες 95, 96 και στον πίνακα 34.

Πίνακας 29 : Δευτερογενείς μεταβολίτες που απομονώθηκαν και ελέγχθηκαν για την αντι-πολλαπλασιαστική τους δράση.

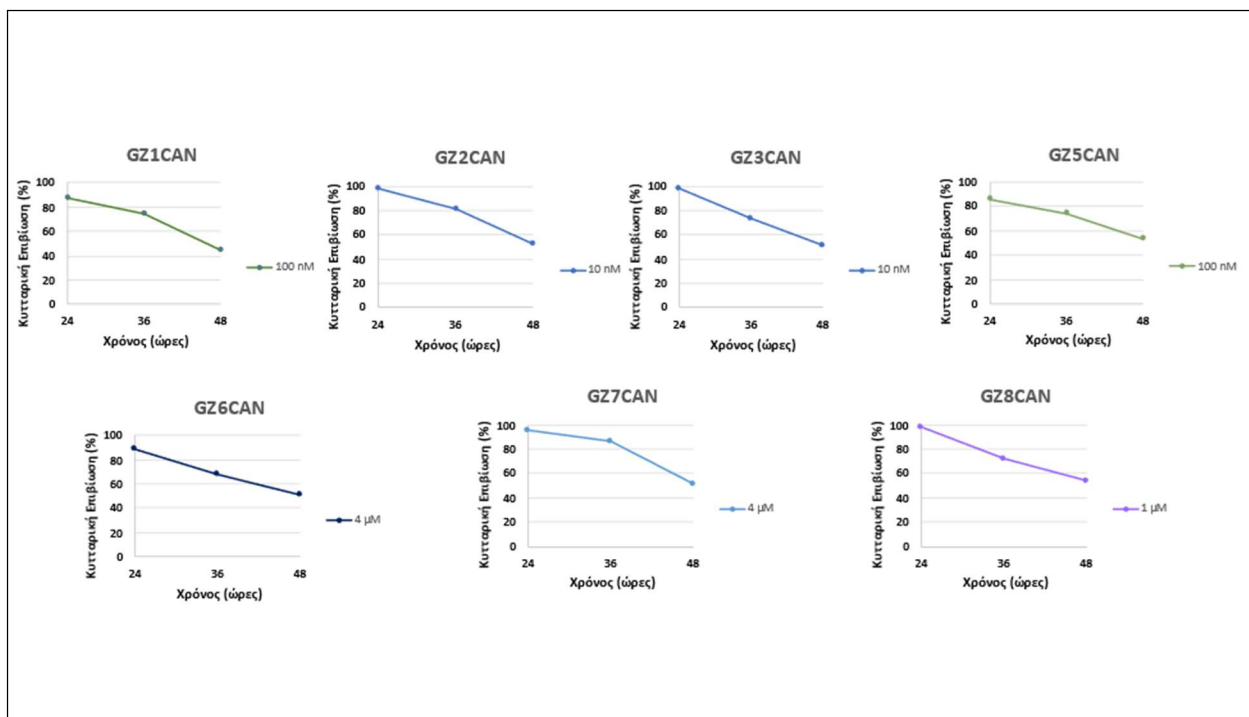
<p>GZ1CAN</p>	 <p><i>Μεταβολίτης 1- VLC1F12-Fraction 6</i></p>
<p>GZ2CAN</p>	 <p><i>Μεταβολίτης 2- VLC1F12-F2-Peak 5</i></p>
<p>GZ3CAN</p>	 <p><i>Μεταβολίτης 3- VLC1F12-F2-Peak 5</i></p>
<p>GZ5CAN</p>	 <p><i>Μεταβολίτης 4- VLC1F12-F2-Peak 9</i></p>

<p>GZ6CAN</p>	 <p><i>Μεταβολίτης 5- VLC1F12-F3-Peak 4</i></p>
<p>GZ7CAN</p>	 <p><i>Μεταβολίτης 6- VLC1F12-F4-P3-Peak 2</i></p>
<p>GZ8CAN</p>	 <p><i>Μεταβολίτης 8- VLC1F12-F4-P4-Peak 4</i></p>
<p>GZ9CAN</p>	 <p><i>Μεταβολίτης 7- VLC1F12-F4-P4-Peak 2</i></p>
<p>GZ12CAN</p>	<p>VLC1-Fraction 4- Zone 3</p>
<p>GZ13CAN</p>	<p>VLC1-Fraction 4- Zone 4</p>
<p>GZ14CAN</p>	<p>VLC1-Fraction 4- Zone 5</p>

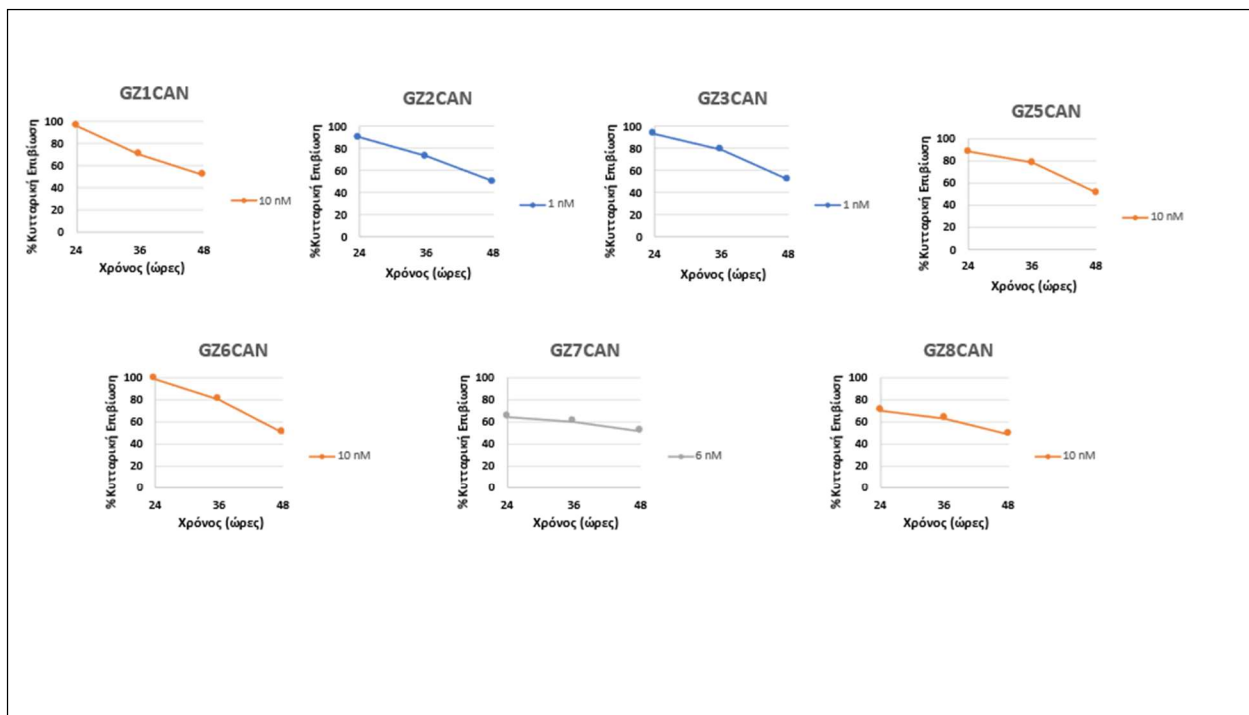
GZ15CAN	VLC1-Fraction 4- Zone 6
GZ16CAN	VLC1-Fraction 4-Zone 4-Peak 5



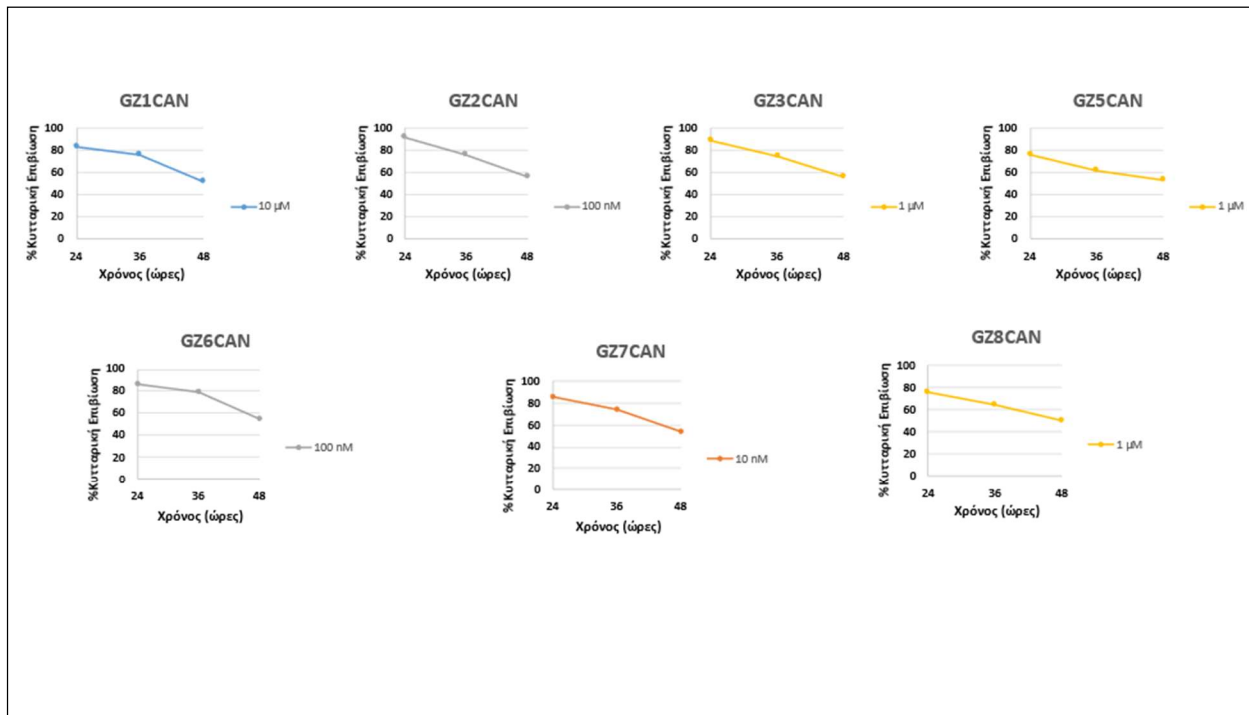
Εικόνα 89: Καμπύλες ανάπτυξης της κυτταρικής σειράς **MDA-MB 231** σε μικρή κλίμακα, υπό την επίδραση επιλεγμένων μεταβολιτών (GZ1CAN, GZ2CAN, GZ3CAN, GZ5CAN, GZ6CAN, GZ7CAN, GZ8CAN και GZ9CAN) σε τρία χρονικά σημεία (24, 36, 48h) και στις τελικές συγκεντρώσεις που παρατηρείται IC₅₀.



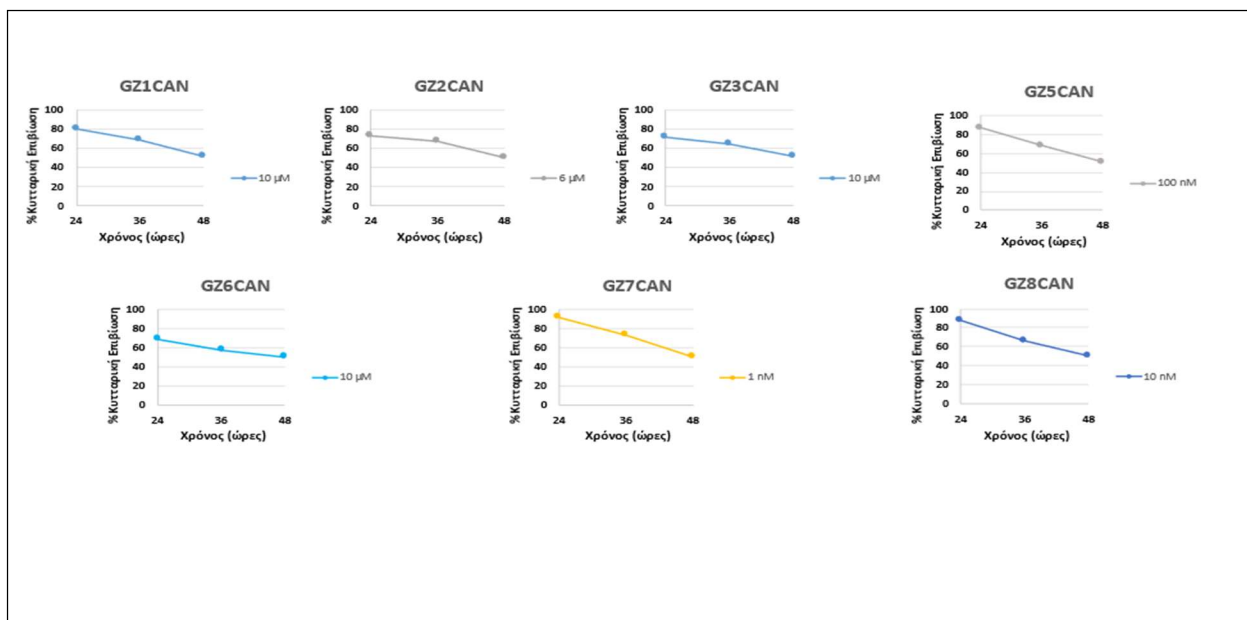
Εικόνα 90: Καμπύλες ανάπτυξης της κυτταρικής σειράς **MDA-MB-468** σε μικρή κλίμακα, υπό την επίδραση επιλεγμένων μεταβολιτών (GZ1CAN, GZ2CAN, GZ3CAN, GZ5CAN, GZ6CAN, GZ7CAN, GZ8CAN και GZ9CAN) σε τρία χρονικά σημεία (24, 36, 48h) και στις τελικές συγκεντρώσεις που παρατηρείται IC50.



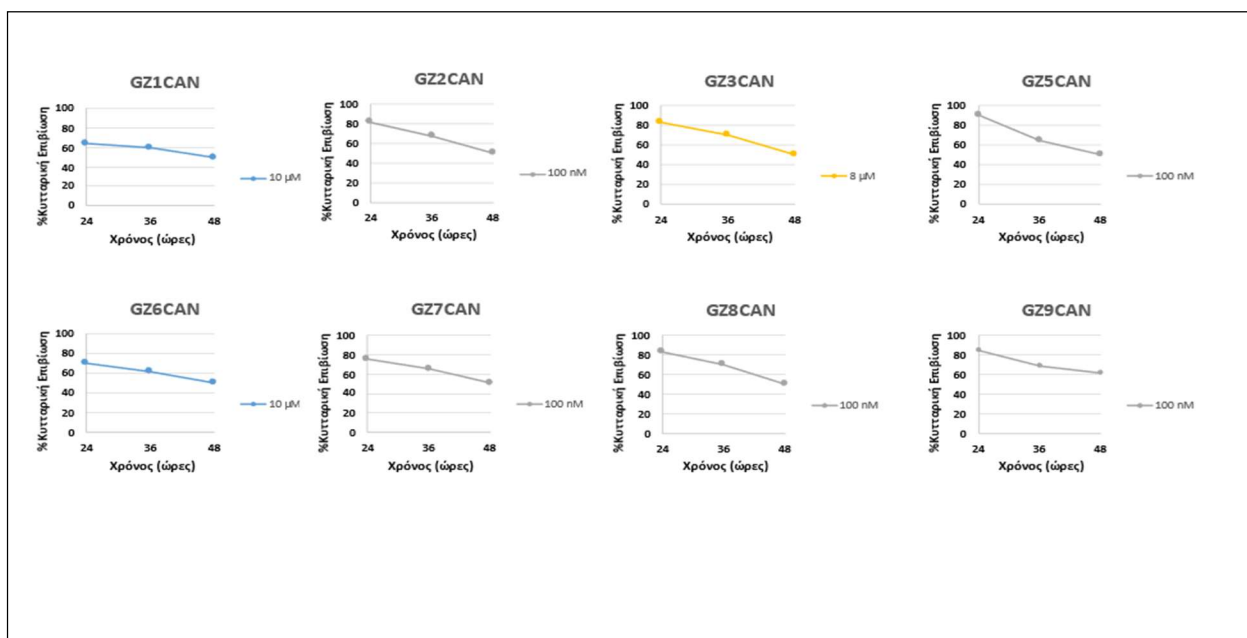
Εικόνα 91: Καμπύλες ανάπτυξης της κυτταρικής σειράς **BT-20** σε μικρή κλίμακα, υπό την επίδραση επιλεγμένων μεταβολιτών (GZ1CAN, GZ2CAN, GZ3CAN, GZ5CAN, GZ6CAN, GZ7CAN, GZ8CAN και GZ9CAN) σε τρία χρονικά σημεία (24, 36, 48h) και στις τελικές συγκεντρώσεις που παρατηρείται IC₅₀.



Εικόνα 92: Καμπύλες ανάπτυξης της κυτταρικής σειράς **BT-474** σε μικρή κλίμακα, υπό την επίδραση επιλεγμένων μεταβολιτών (GZ1CAN, GZ2CAN, GZ3CAN, GZ5CAN, GZ6CAN, GZ7CAN, GZ8CAN και GZ9CAN) σε τρία χρονικά σημεία (24, 36, 48h) και στις τελικές συγκεντρώσεις που παρατηρείται IC₅₀.



Εικόνα 93: Καμπύλες ανάπτυξης της κυτταρικής σειράς **MCF-7** σε μικρή κλίμακα, υπό την επίδραση επιλεγμένων μεταβολιτών (GZ1CAN, GZ2CAN, GZ3CAN, GZ5CAN, GZ6CAN, GZ7CAN, GZ8CAN και GZ9CAN) σε τρία χρονικά σημεία (24, 36, 48h) και στις τελικές συγκεντρώσεις που παρατηρείται IC50.



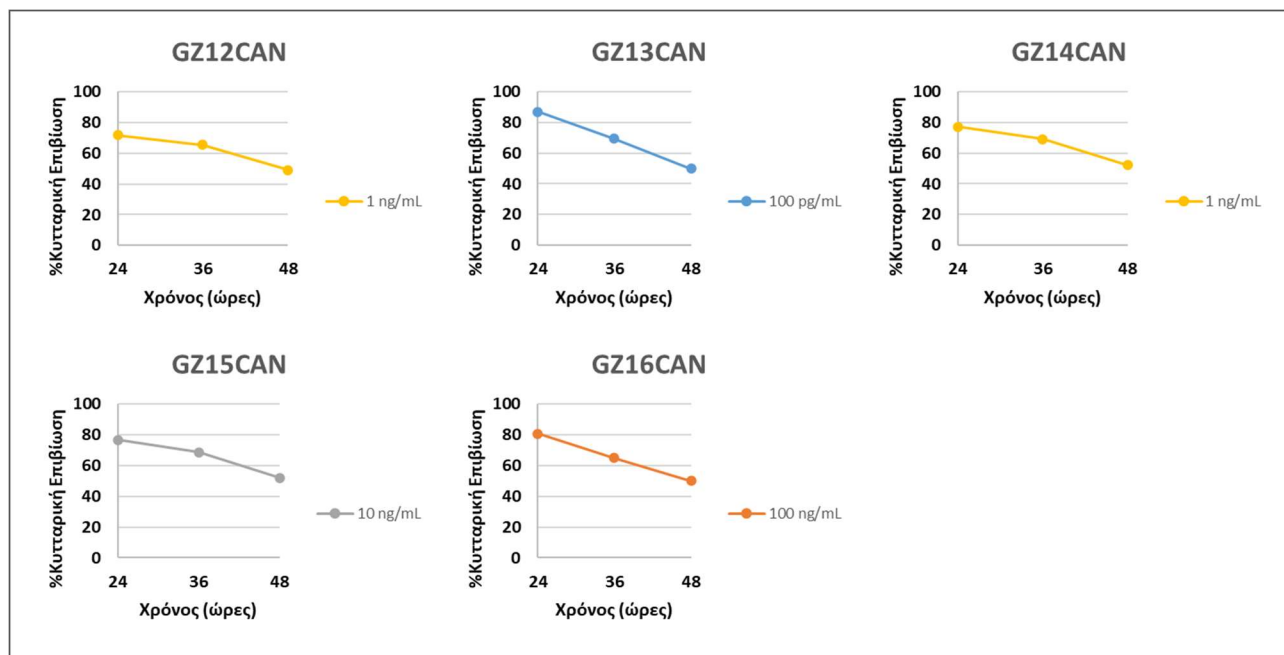
Εικόνα 94: Καμπύλες ανάπτυξης της κυτταρικής σειράς **SK-BR-3** σε μικρή κλίμακα, υπό την επίδραση επιλεγμένων μεταβολιτών (GZ1CAN, GZ2CAN, GZ3CAN, GZ5CAN, GZ6CAN, GZ7CAN, GZ8CAN και GZ9CAN) σε τρία χρονικά σημεία (24, 36, 48h) και στις τελικές συγκεντρώσεις που παρατηρείται IC50.

Πίνακας 30: Οι τελικές συγκεντρώσεις στις οποίες παρατηρείται IC50 στις 48h, για κάθε ένα από τους επιλεγμένους μεταβολίτες (GZ1CAN, GZ2CAN, GZ3CAN, GZ5CAN, GZ6CAN, GZ7CAN, GZ8CAN και GZ9CAN) που ελέγχθηκαν.

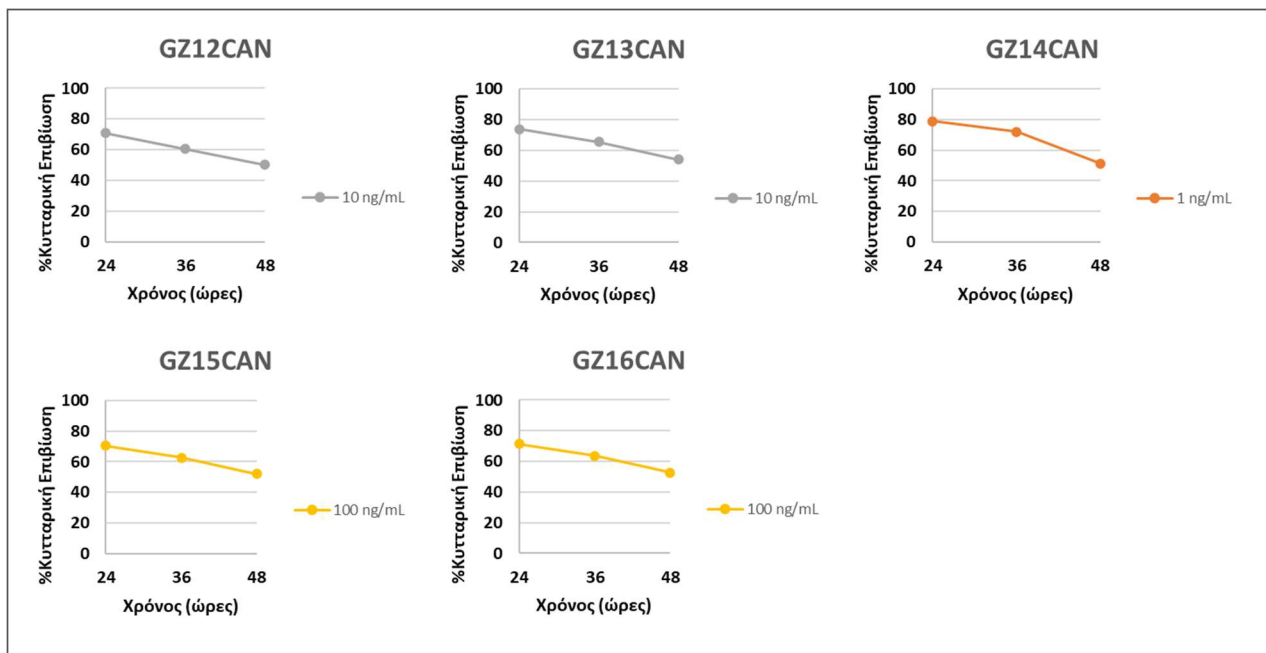
	MDA-MB-231	MDA-MB-468	BT-20	BT-474	MCF-7	SK-BR-3
GZ1CAN	8 μ M	100 nM	10 nM	10 μ M	10 μ M	10 μ M
GZ2CAN	10 μ M	10 nM	1 nM	100 nM	6 μ M	100 nM
GZ3CAN	10 μ M	10 nM	1 nM	1 μ M	10 μ M	8 μ M
GZ5CAN	10 μ M	100 nM	10 nM	100 nM	100 nM	100 nM
GZ6CAN	30 μ M	4 μ M	10 nM	10 nM	10 μ M	10 μ M
GZ7CAN	30 μ M	4 μ M	6 nM	10 nM	1 nM	100 nM
GZ8CAN	30 μ M	1 μ M	1 nM	1 μ M	10 nM	100 nM
GZ9CAN	1 μ M	-	-	-	-	100 nM

Από τον παραπάνω πίνακα είναι άξιο αναφοράς ότι αρκετοί μεταβολίτες παρουσιάζουν ισχυρή αντι-πολλαπλασιαστική δράση σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις (μεταξύ 1-100 nM). Συγκεκριμένα, στην κυτταρική σειρά BT-20 όλοι οι μεταβολίτες παρουσίασαν ισχυρή αντι-πολλαπλασιαστική δράση σε συγκεντρώσεις 1-10 nM. Για τον μεταβολίτη **GZ5CAN** παρατηρήθηκε ισχυρή αντι-πολλαπλασιαστική δράση έναντι όλων των κυτταρικών σειρών, εκτός από τη σειρά MDA-MB-231. Για την κυτταρική σειρά επιθητικού καρκίνου του μαστού MDA-MB-231 ο μεταβολίτης **GZ9CAN** παρουσίασε ισχυρή αντι-πολλαπλασιαστική δράση σε συγκέντρωση 1 μ M, δηλαδή σε μικρότερη συγκέντρωση σε σχέση με τους υπόλοιπους μεταβολίτες που μελετήθηκαν. Για την κυτταρική σειρά καρκίνου του μαστού MCF-7, που είναι επίσης επιθητική, οι μεταβολίτες που παρουσίασαν ισχυρή αντι-πολλαπλασιαστική δράση είναι οι **GZ5CAN**, **GZ7CAN** και **GZ8CAN** σε συγκεντρώσεις 100 nM, 1 nM και 10 nM, αντίστοιχα.

Τα τερπενικά μίγματα GZ12CAN, GZ13CAN, GZ14CAN, GZ15CAN και GZ16CAN ελέγχθηκαν έναντι των καρκινικών σειρών MDA-MB-231 και SK-BR-3. Όλα τα μίγματα παρουσίασαν ικανοποιητική αντι-πολλαπλασιαστική δράση σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (Πίνακας 34) με πιο αξιόλογη την GZ13CAN να έχει δράση σε συγκέντρωση 100 pg/ml έναντι της κυτταρικής σειράς MDA-MB-231, τη μικρότερη από όλα τα κλάσματα που ελέγχθηκαν.



Εικόνα 95: Καμπύλες ανάπτυξης της κυτταρικής σειράς **MDA-MB 231** σε μικρή κλίμακα, υπό την επίδραση των GZ12CAN-GZ16CAN σε τρία χρονικά σημεία (24, 36, 48h) και στις τελικές συγκεντρώσεις που παρατηρείται IC50.



Εικόνα 96: Καμπύλες ανάπτυξης της κυτταρικής σειράς **SK-BR-3** σε μικρή κλίμακα, υπό την επίδραση των GZ12CAN-GZ16CAN σε τρία χρονικά σημεία (24, 36, 48h) και στις τελικές συγκεντρώσεις που παρατηρείται IC50.

Πίνακας 31: Οι τελικές συγκεντρώσεις στις οποίες παρατηρείται IC50 στις 48h, για κάθε ένα από τα μίγματα τερπενίων που αξιολογήθηκαν

	MDA-MB-231	SK-BR-3
GZ12CAN	1 ng/ml	10 ng/ml
GZ13CAN	100 pg/ml	10 ng/ml
GZ14CAN	1 ng/ml	1 ng/ml
GZ15CAN	10 ng/ml	100 ng/ml
GZ16CAN	100 ng/ml	100 ng/ml

Συμπεράσματα-Προοπτικές

- Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία μελετήθηκαν φυτοχημικά οι ρίζες του είδους *Iris albicans*, το οποίο συλλέχθηκε το 2015 στην περιοχή 'Καραβίδα' του Ν. Φθιώτιδας.
- Μεταξύ των εκχυλισμάτων που παρασκευάστηκαν από τα υπέργεια τμήματα και τις ρίζες του φυτού, το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα των ριζών (EtOAc-Ρίζες) παρουσίασε το πιο ενδιαφέρον φυτοχημικό προφίλ
- Από το εκχύλισμα 'EtOAc-Ρίζες' του *I. albicans* απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν οι παρακάτω φαινολικοί δευτερογενείς μεταβολίτες:
 - 4'-Μεθοξυτεκτοριγενίνη (ή Ιριζολιδόνη)
 - Ακετοβανιλόνη
 - Ιριφλοφενόνη
 - Ιριγενίνη
 - Γερμαναΐσμη Β
 - Νιγρισίνη (ή Ιριζολόνη)
 - Ιρισκαζμιαριανίνη
 - Ιρολόνη

καθώς και σε μίγμα οι στερόλες 'β-σιτοστερόλη' και 'στιγμαστερόλη', σε αναλογία περίπου 1:3.

- Μετά από μια σειρά χρωματογραφικών διαχωρισμών έλαβε χώρα μια πρωταρχική κλασμάτωση του τριτερπενικού φορτίου του εκχυλίσματος 'EtOAc-Ρίζες', καταλήγοντας στην παραλαβή μιγμάτων των 2-3 ιριδαλών.
- Η πλειονότητα των φαινολικών μεταβολιτών, όπως επίσης και ιριδαλών, αξιολογήθηκαν ως προς τον βαθμό της αναστολής του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων έξι σειρών γυναικείου καρκίνου του μαστού με αξιόλογα αποτελέσματα. Ο έλεγχος αυτός διενεργείται για πρώτη φορά για τους προαναφερόμενους μεταβολίτες και το σύνολο των συγκεκριμένων καρκινικών σειρών.

Ένας μελλοντικός σχεδιασμός για την φαρμακογνωστική μελέτη του *I. albicans* θα περιελάμβανε:

- την συνέχιση του χρωματογραφικού διαχωρισμού των ιριδαλών και την απομόνωση-ταυτοποίησή τους, με σκοπό την εύρεση νέων μελών αυτής της πολύ ενδιαφέρουσας ομάδας τερπενίων.

- Την ολοκλήρωση της απομόνωσης και ταυτοποίησης των ισοφλαβονών των ριζών (αλλά και των φύλλων) για να γίνει ένας πιο λεπτομερής έλεγχος της σχέσης δομής-δράσης σε σχέση πάντα με τις αντικαρκινικές ιδιότητες ή τις χημειοπροστατευτικές ιδιότητες αυτής της ομάδας των φλαβονοειδών του γένους *Iris*.

Η ανακάλυψη και άλλων μεταβολιτών των προαναφερόμενων κατηγοριών δευτερογενών μεταβολιτών από το είδος *I. albicans* θα μπορούσε να συμβάλει μελλοντικά στην χημειοταξινόμηση της ομάδας των λευκών Ιρίδων.

BIBLIOΓΡΑΦΙΑ

- Abdel-Mageed, W. M., Al-Wahaibi, L. H., Al-Saleem, M. S. M., Gouda, Y. G., Abdel-Kader, M. S., & Ibraheim, Z. Z. (2018). Phytochemical and chemotaxonomic study on *Iris albicans* Lange leaves. *Biochemical Systematics and Ecology*, *76*, 32–34. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2017.11.007>
- Adams, M., Berset, C., Kessler, M., & Hamburger, M. (2009). Medicinal herbs for the treatment of rheumatic disorders—A survey of European herbals from the 16th and 17th century. *Journal of Ethnopharmacology*, *121*(3), 343–359. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.11.010>
- Alam, A., Jaiswal, V., Akhtar, S., Jayashree, B. S., & Dhar, K. L. (2017). Isolation of isoflavones from *Iris kashmiriana* Baker as potential anti proliferative agents targeting NF-kappaB. *Phytochemistry*, *136*, 70–80. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.01.002>
- Ali, A. A., El-Emary, N. A., El-Moghazi, M. A., Darwish, F. M., & Frahm, A. W. (1983). Three isoflavonoids from *Iris germanica*. *Phytochemistry*, *22*(9), 2061–2063. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(83\)80045-4](https://doi.org/10.1016/0031-9422(83)80045-4)
- Arikado, H. (2002). NII-Electronic Library Service. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, *43*, 2091.
- Atta-ur-Rahman, Choudhary, M. I., Nur-e-Alam, M., Ndogonii, P. Ö., Badarchiin, T., & Purevsuren, G. (2000). Two new quinones from *Iris bungei*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, *48*(5), 738–739. <https://doi.org/10.1248/cpb.48.738>
- Atta-Ur-Rahman, Nasim, S., Baig, I., Orhan, I., Sener, B., Ayanoglu, F., & Choudhary, M. I. (2003). Isoflavonoid Glycosides from the Rhizomes of *Iris germanica*. *Helvetica Chimica Acta*, *86*(10), 3354–3362. <https://doi.org/10.1002/hlca.200390278>
- Ayatollahi, S. M., Moein, M. R., Choudhary, M. I., Sciences, M., & Box, P. O. (2004). TWO ISOFLAVONES FROM *IRIS SONGARICA* SCHRENK. *Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Shaheed Beheshti University of*. *12*(2), 30–33.
- Becker, F. G., Cleary, M., Team, R. M., Holtermann, H., The, D., Agenda, N., Science, P., Sk, S. K., Hinnebusch, R., Hinnebusch A, R., Rabinovich, I., Olmert, Y., Uld, D. Q. G. L. Q., Ri, W. K. H. U., Lq, V., Frxqwu, W. K. H., Zklfk, E., Edvhg, L. V, Wkh, R. Q., ... (2015). فاطمی, ح. No 主観的健康感を中心とした在宅高齢者における健康関連指標に関する共分散構造分析Title. In *Syria Studies* (Vol. 7, Issue 1). https://www.researchgate.net/publication/269107473_What_is_governance/link/548173090cf22525dcb61443/download%0Ahttp://www.econ.upf.edu/~reynal/Civilwars_12December2010.pdf%0Ahttps://think-asia.org/handle/11540/8282%0Ahttps://www.jstor.org/stable/41857625
- Blunt, J. W., Calder, V. L., Fenwick, G. D., Lake, R. J., McCombs, J. D., Munro, M. H. G., & Perry, N. B. (1987). Reverse phase flash chromatography. A Method for the rapid partitioning of natural product extracts. *Journal of Natural Products*, *50*(2), 290–292. <https://doi.org/10.1021/np50050a039>
- Bonfils, J. P., Bonfils, C., Larroque, C., Surjus, A., Gleize, D., & Sauvaire, Y. (1995). Lipid composition of microsomes of *Iris germanica* rhizomes. *Phytochemistry*, *38*(3), 585–587. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(94\)00724-8](https://doi.org/10.1016/0031-9422(94)00724-8)
- Boutas, I., Kontogeorgi, A., Dimitrakakis, C., & Kalantaridou, S. N. (2022). Soy Isoflavones and Breast

- Cancer Risk: A Meta-analysis. *In Vivo*, 36(2), 556–562. <https://doi.org/10.21873/INVIVO.12737>
- Cardoso, F., Harbeck, N., Fallowfield, L., Kyriakides, S., & Senkus, E. (2012). Locally recurrent or metastatic breast cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 23(SUPPL. 7). <https://doi.org/10.1093/annonc/mds232>
- Chen, M., Rao, Y., Zheng, Y., Wei, S., Li, Y., Guo, T., & Yin, P. (2014). Association between soy isoflavone intake and breast cancer risk for pre- and post-menopausal women: A meta-analysis of epidemiological studies. *PLoS ONE*, 9(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089288>
- Conforti, F., Rigano, D., Menichini, F., Loizzo, M. R., & Senatore, F. (2009). Protection against neurodegenerative diseases of Iris pseudopumila extracts and their constituents. *Fitoterapia*, 80(1), 62–67. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2008.10.005>
- Dai, X., Cheng, H., Bai, Z., & Li, J. (2017). Breast cancer cell line classification and Its relevance with breast tumor subtyping. *Journal of Cancer*, 8(16), 3131–3141. <https://doi.org/10.7150/jca.18457>
- Editch C.Kordon, Robert A.Mckinght, Chamelli Jhappan, Lothar Henninghausen, Glenn Merlino, G. H. S. (1994). *Ectopic TGFβ1 Expression in the Secretory Mammary Epithelium Stem Cell Population* (pp. 47–61).
- Fang, R., Houghton, P. J., & Hylands, P. J. (2008). Cytotoxic effects of compounds from Iris tectorum on human cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology*, 118(2), 257–263. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.04.006>
- Gill, B. S., Kumar, S., & Naveget. (2016). Triterpenes in cancer: significance and their influence. *Molecular Biology Reports*, 43(9), 881–896. <https://doi.org/10.1007/s11033-016-4032-9>
- Hanawa, F., Tahara, S., & Mizutani, J. (1991). Flavonoids produced by Iris pseudacorus leaves treated with cupric chloride. *Phytochemistry*, 30(7), 2197–2198. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)83613-P](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)83613-P)
- Holliday, D. L., & Speirs, V. (2011). Choosing correct breast cancer cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Research*, 13(4), 1–7. <http://download.springer.com/static/pdf/110/art%253A10.1186%252Fbcr2889.pdf?originUrl=http%3A%2F%2Fbreast-cancer-research.biomedcentral.com%2Farticle%2F10.1186%2Fbcr2889&token2=exp=1494268443~acl=%2Fstatic%2Fpdf%2F110%2Fart%25253A10.1186%25252Fbcr2889.pdf>
- Hudis, C. A., & Gianni, L. (2011). Triple-Negative Breast Cancer: An Unmet Medical Need. *The Oncologist*, 16(S1), 1–11. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2011-s1-01>
- Iwashina, T., & Mizuno, T. (2020). Flavonoids and Xanthones From the Genus Iris: Phytochemistry, Relationships with Flower Colors and Taxonomy, and Activities and Function. *Natural Product Communications*, 15(10). <https://doi.org/10.1177/1934578X20937151>
- Jin, Q. I., Lu, J. J., Liu, J. H., & Yu, B. Y. (2009). Flavonoid and a rare benzophenone glycoside from the leaves of aquilaria sinensis. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 57(2), 134–137. <https://doi.org/10.1248/cpb.57.134>
- Kandeler, R., & Ullrich, W. R. (2009). Symbolism of plants: Examples from European-Mediterranean culture presented with biology and history of art. *Journal of Experimental Botany*, 60(4), 1067–1068. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp042>

- Key, T. J., Verkasalo, P. K., & Banks, E. (2001). Epidemiology of breast cancer. *Lancet Oncology*, 2(3), 133–140. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(00\)00254-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(00)00254-0)
- Khatib, S., Faraloni, C., & Bouissane, L. (2022). Exploring the Use of Iris Species: Antioxidant Properties, Phytochemistry, Medicinal and Industrial Applications. *Antioxidants*, 11(3), 1–30. <https://doi.org/10.3390/antiox11030526>
- Kostić, A., Gašić, U. M., Pešić, M. B., Stanojević, S. P., Barać, M. B., Mačukanović-Jocić, M. P., Avramov, S. N., & Tešić, Ž. L. (2019). Phytochemical Analysis and Total Antioxidant Capacity of Rhizome, Above-Ground Vegetative Parts and Flower of Three Iris Species. *Chemistry and Biodiversity*, 16(3). <https://doi.org/10.1002/cbdv.201800565>
- Kukula-Koch, W., Sieniawska, E., Widelski, J., Urjin, O., Głowniak, P., & Skalicka-Woźniak, K. (2015). Major secondary metabolites of Iris spp. *Phytochemistry Reviews*, 14(1), 51–80. <https://doi.org/10.1007/s11101-013-9333-1>
- Lin, J., Puckree, T., & Mvelase, T. P. (2002). Anti-diarrhoeal evaluation of some medicinal plants used by Zulu traditional healers. *Journal of Ethnopharmacology*, 79(1), 53–56. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00353-1](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00353-1)
- Marner, F. J., Krick, W., Gellrich, B., Jaenicke, L., & Winter, W. (1982). Irigermanal and Iridogermanal: Two New Triterpenoids from Rhizomes of Iris germanica L. *Journal of Organic Chemistry*, 47(13), 2531–2536. <https://doi.org/10.1021/jo00134a007>
- Martini, G., & Viciani, D. (2018). What happened to linnaeus's iris florentina? Re-evaluation of this taxon at species level. *Taxon*, 67(2), 395–400. <https://doi.org/10.12705/672.8>
- Michalak, A., Krauze-Baranowska, M., Migas, P., Kawiak, A., Kokotkiewicz, A., & Królicka, A. (2021). Iris pseudacorus as an easily accessible source of antibacterial and cytotoxic compounds. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 195. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113863>
- Pandya, S., & Moore, R. G. (2011). Breast development and anatomy. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 54(1), 91–95. <https://doi.org/10.1097/GRF.0b013e318207ffe9>
- Purev, O., Purevsuren, C., Narantuya, S., Lkhagvasuren, S., Mizukami, H., & Nagatsu, A. (2002). New isoflavones and flavanol from Iris potaninii. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 50(10), 1367–1369. <https://doi.org/10.1248/cpb.50.1367>
- Rakha, E. A., & Ellis, I. O. (2011). Modern classification of breast cancer: Should we stick with morphology or convert to molecular profile characteristics. *Advances in Anatomic Pathology*, 18(4), 255–267. <https://doi.org/10.1097/PAP.0b013e318220f5d1>
- Rigano, D., Formisano, C., Grassia, A., Grassia, G., Perrone, A., Piacente, S., Vuotto, M. L., & Senatore, F. (2007). Antioxidant flavonoids and isoflavonoids from rhizomes of Iris pseudopumila. *Planta Medica*, 73(1), 93–96. <https://doi.org/10.1055/s-2006-957071>
- Rigano, D., Grassia, A., Formisano, C., Basile, A., Sorbo, S., & Senatore, F. (2006). Antibacterial and allelopathic activity of methanolic extract from Iris pseudopumila rhizomes. *Fitoterapia*, 77(6), 460–462. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2006.05.009>
- Sang, H. J., Yeon, S. L., Soon, S. L., Lee, S., Kuk, H. S., & Yeong, S. K. (2004). Antioxidant activities of isoflavones from the rhizomes of Belamcanda chinensis on carbon tetrachloride-induced hepatic injury in rats. *Archives of Pharmacal Research*, 27(2), 184–188. <https://doi.org/10.1007/BF02980104>

- Seki, K., Tomihari, T., Haga, K., & Kaneko, R. (1994). Iristectorene B, a monocyclic triterpene ester from *Iris tectorum*. *Phytochemistry*, *36*(2), 433–438. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)97090-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)97090-0)
- Singab, A. N. B., Ayoub, I. M., El-Shazly, M., Korinek, M., Wu, T. Y., Cheng, Y. Bin, Chang, F. R., & Wu, Y. C. (2016). Shedding the light on Iridaceae: Ethnobotany, phytochemistry and biological activity. *Industrial Crops and Products*, *92*, 308–335. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.07.040>
- Smith, S. E., Mellor, P., Ward, A. K., Kendall, S., McDonald, M., Vizeacoumar, F. S., Vizeacoumar, F. J., Napper, S., & Anderson, D. H. (2017). Molecular characterization of breast cancer cell lines through multiple omic approaches. *Breast Cancer Research*, *19*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13058-017-0855-0>
- Stevens, J. F., Klimo, K., & Frank, N. (2003). *Wollenweber2003*.
- Takahashi, K., Suzuki, S., Hano, Y., & Nomura, T. (2002). Protein kinase C activation by iridal type triterpenoids. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, *25*(4), 432–436. <https://doi.org/10.1248/bpb.25.432>
- Thieme, G., Stuttgart, V., & York, N. (2001). In 1986, Wong et al. revealed a cytotoxic effect of a triterpenoid from. *67*, 79–81.
- Vrachnis, N., Vlachadis, N., Salakos, N., Vlachadi, M., & Iliodromiti, Z. (2015). Cancer mortality in Greece during the financial crisis. *Acta Oncologica*, *54*(2), 287–288. <https://doi.org/10.3109/0284186X.2014.958785>
- Vuong, D., Simpson, P. T., Green, B., Cummings, M. C., & Lakhani, S. R. (2014). Molecular classification of breast cancer. *Virchows Archiv*, *465*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s00428-014-1593-7>
- Wigfield, A., Eccles, J., & Rodriguez, D. (2008). Oops ! It looks like you ' re in the wrong aisle. *Global Conference on Business and Finance Proceedings*, *3*(2).
- Williams, C. A., & Harborne, J. B. (1985). Biflavonoids, Quinones and Xanthones as Rare Chemical Markers in the Family Iridaceae. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, *40*(5–6), 325–330. <https://doi.org/10.1515/znc-1985-5-608>
- Wollenweber, E., Stevens, J. F., Klimo, K., Knauft, J., Frank, N., & Gerhäuser, C. (2003). Cancer chemopreventive in vitro activities of isoflavones isolated from *Iris germanica*. *Planta Medica*, *69*(1), 15–20. <https://doi.org/10.1055/s-2003-37030>
- Xu, W., Kuang, Y., Wang, D., Li, Z., & Xia, R. (2021). Iriogenin exerts anticancer effects on human liver cancer cells via induction of mitochondrial apoptosis and cell cycle arrest. *Applied Biological Chemistry*, *64*(1). <https://doi.org/10.1186/s13765-020-00570-6>
- Ziaei, S., & Halaby, R. (2017). Dietary Isoflavones and Breast Cancer Risk. *Medicines*, *4*(4), 18. <https://doi.org/10.3390/medicines4020018>