

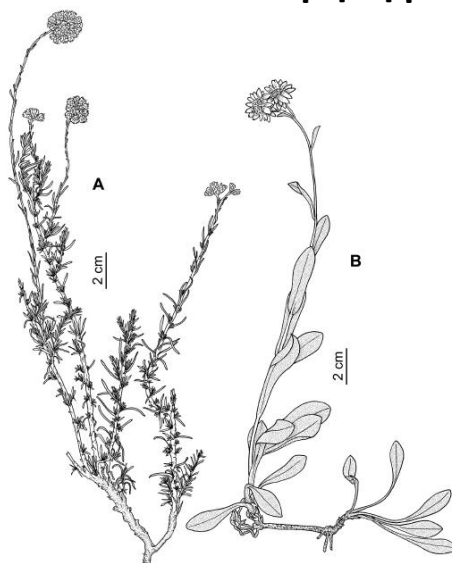


ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Φαρμακογνωστική μελέτη του γένους *Helichrysum* Mill. (Asteraceae)
στην Ελλάδα. Μελέτη του στενοενδημικού είδους
H. amorginum και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας



ΙΟΡΔΑΝΗΣ Π. ΣΑΜΑΝΙΔΗΣ
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ
2023

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Δρ. Μητάκου Σοφία

Καθηγήτρια (επιβλέπουσα), Τμήμα Φαρμακευτικής, Ε.Κ.Π.Α.

Δρ. Σκαλτσούνης Αλέξιος-Λέανδρος

Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, Ε.Κ.Π.Α.

Δρ. Μαλούπα Ελένη

Διευθύντρια Ερευνών, Ινστιτούτο Γενετικής Βελτίωσης και Φυτογενετικών Πόρων (ΙΓΒΦΠ), Βαλκανικός Βοτανικός Κήπος Κρουσίων (ΒΒΚΚ), ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Δρ. Μητάκου Σοφία

Καθηγήτρια (επιβλέπουσα), Τμήμα Φαρμακευτικής, Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων Ε.Κ.Π.Α.

Δρ. Σκαλτσούνης Αλέξιος-Λέανδρος

Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων Ε.Κ.Π.Α.

Δρ. Τζάκου Όλγα

Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων Ε.Κ.Π.Α.

Δρ. Μαρία Χαλαμπαλάκη

Αν. Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, Τμήμα Φαρμακευτικής, Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων Ε.Κ.Π.Α.

Δρ. Σταύρος Λαλάς

Καθηγητής, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Δρ. Ελένη Μαλούπα

Διευθύντρια Ερευνών, ΙΓΒΦΠ, ΒΒΚΚ, ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ

Δρ. Νίκος Κρίγκας

Εντεταλμένος Ερευνητής, ΙΓΒΦΠ, ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Μέσα από την παρούσα διατριβή θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλους αυτούς που συνέβαλαν στην ολοκλήρωσή της.

Καταρχήν, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Σκαλτσούνη Αλέξιο-Λέανδρο (Τμήμα Φαρμακευτικής, Ε.Κ.Π.Α.), Διευθυντή Εργαστηρίου Αξιοποίησης Βιοδραστικών Φυσικών Προϊόντων Ε.Κ.Π.Α., που με ενέταξε στην ερευνητική του ομάδα για την εκπόνηση της διατριβής μου.

Ευχαριστώ την επιβλέπουσα Καθηγήτρια Μητάκου Σοφία (Τμήμα Φαρμακευτικής, Ε.Κ.Π.Α.), για το συνεχές ενδιαφέρον και την στήριξή της.

Ευχαριστώ την Διευθύντρια Ερευνών ΙΓΒΦΠ, ΒΒΚΚ Δρ. Μαλούπα Ελένη (ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ) για την αδειοδότηση προμήθειας φυτικού υλικού από τον ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ.

Ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, την Καθηγήτρια Τζάκου Όλγα (Τμήμα Φαρμακευτικής, Ε.Κ.Π.Α.) για το συνεχές ενδιαφέρον της, την Δρ. Χαλαμπαλάκη Μαρία (Αν. Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, Ε.Κ.Π.Α.) για την καθοδήγηση και επιστημονική υποστήριξη, τους Δρ. Κρίγκα Νίκο (Εντεταλμένος Ερευνητής, ΙΓΒΦΠ, ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ) καθώς και τον Καθηγητή Σταύρο Λαλά (Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας) για τη αποδοχή της συμμετοχής του στην επταμελή εξεταστική επιτροπή.

Ευχαριστώ τον Δρ. Τσοκτουρίδη Γιώργο (Εντεταλμένος Ερευνητής, ΙΓΒΦΠ, ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ) για την προμήθεια φυτικού υλικού και την επιστημονική υποστήριξη που μου προσέφερε.

Από το Τμήμα Φαρμακευτικής Ε.Κ.Π.Α., Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων:

Ευχαριστώ τους Δρ. Πετράκη Ελευθέριο και Δρ. Παπαευσταθίου Γιώργο για την συνεργασία μας σε μέρος της ενότητας μελέτης των πτητικών συστατικών του *H. amorginum*.

Ευχαριστώ την Δρ. Σακαβίτση Μαριλένα για την συνεργασία μας στην ενότητα της απομόνωσης και χαρακτηρισμού των μη πτητικών μεταβολιτών του *H. amorginum* καθώς και της μεταβολομικής μελέτης εκχυλισμάτων από *H. amorginum*.

Ευχαριστώ τους Δρ. Νίκου Θεοδώρα για την λήψη των φασμάτων LC-MS και Δρ. Μιχαλίδη Δημήτρη για την βοήθειά του στην κλασματοποίηση εκχυλισμάτων με την τεχνική CPC.

Ευχαριστώ την Δρ. Αντωνιάδη Λεμονιά για την συνεργασία μας στην αποτίμηση βιοδραστικότητας εκχυλισμάτων από *H. amorginum*.

Ευχαριστώ πολύ όλα τα μέλη του εργαστηρίου για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας.

Ευχαριστώ την εταιρεία Κορρές Φυσικά Προϊόντα Α.Ε., την Λένα Φιλίππου και τον Γιώργο Σταυρόπουλο για την προμήθεια βιολογικά καλλιεργούμενου *H. amorginum*.

Ευχαριστώ θερμά την Φωτεινή Καψάλη, Μαρία Πλατανιά, Μαρία Κατσάτσου και Εβίτα Καλαντζή από την γραμματεία του Τμήματος Φαρμακευτικής Ε.Κ.Π.Α.

Τέλος, ευχαριστώ τους γονείς μου, την αδερφή μου και την Βασιλική για όλη την βοήθεια και την συμπαράσταση να πραγματοποιήσω του στόχους μου. Ιδιαίτερες ευχαριστίες αποδίδω στην ΚοινΣΕπ Συνεργασία για την Αμοργό για την προμήθεια του *H. italicum* subsp. *italicum*, στον Δρ. Λευτέρη Καλπουτζάκη (Ε.ΔΙ.Π., Τμήμα Φαρμακευτικής, Ε.Κ.Π.Α.) για την προμήθεια του *H. luteoalbum* και στον φυσιολόγο Κοφινά-Καλλέργη Γιάννη, έναν εξερευνητή της ελληνικής φύσης, προς τιμή του οποίου αποδίδονται το νεοανακαλυφθέν ζωικό είδος *Dolichoptera kofinasi* Di Russo & Rampini και το φυτικό είδος *Centaurea kofinassi* Kit Tan και ο οποίος με έφερε σε επαφή με τους οικότοπους ειδών του γένους *Helichrysum* σε Πελοπόννησο, Κρήτη, και Άγιο Όρος.

ΑΦΙΕΡΩΣΗ

Στους εξερευνητές βοτανικούς

Boissier, P. E.

Loudon, J. C.

Nyman, C. F.

Rechinger, K. H.

Reichenbach, H. G. L.

Rothmaler, W.

Rouy, G.

Vaillant, S.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	2
ΑΦΙΕΡΩΣΗ	4
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	5
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΜΕ ΕΙΚΟΝΕΣ	9
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΜΕ ΕΙΚΟΝΕΣ ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΟΣ	13
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΜΕ ΠΙΝΑΚΕΣ	14
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΜΕ ΠΙΝΑΚΕΣ ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΟΣ.....	16
Συντομογραφίες	18
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	19
ABSTRACT	20
ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ.....	21
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Εισαγωγή στο γένος <i>Helichrysum</i> Mill.....	22
1.1 Η οικογένεια <i>Asteraceae</i>	23
1.1.1 Το γένος <i>Helichrysum</i> Mill.	23
1.1.2 Φυτοχημεία του γένους <i>Helichrysum</i> Mill.	27
1.1.3 Φαρμακολογικές δράσεις του γένους <i>Helichrysum</i>	45
1.2 Το γένος <i>Helichrysum</i> στην Ευρώπη και Μεσόγειο	49
1.2.1 Το σύμπλεγμα <i>H. italicum</i> (Roth) G. Don fil. (<i>H. italicum</i> complex)	51
1.2.2 Τα taxa του <i>H. stoechas</i> (L.) Moench	53
1.3 Το γένος <i>Helichrysum</i> στην Ελλάδα	55
1.3.1 <i>Helichrysum amorginum</i> Boiss. & Orph. (Ελίχρυσος αμοργινό)	62
1.3.2 <i>Helichrysum doerfleri</i> Rech. f. (Ελίχρυσος του Ντοέρφλερ)	64
1.3.3 <i>Helichrysum sibthorpii</i> Rouy (Ελίχρυσος του Σίμπθορπ)	66
1.3.4 <i>Helichrysum taenari</i> Rothm. (Ελίχρυσος του Ταίναρου)	67
1.3.5 <i>Helichrysum heldreichii</i> Boiss. (ελίχρυσος του Χελδράιχ)	69
1.3.6 <i>Helichrysum italicum</i> (Roth) G.Don subsp. <i>italicum</i>	71
1.3.7 <i>Helichrysum italicum</i> (Roth) G.Don subsp. <i>microphyllum</i> (Willd.) Nyman	72
1.3.8 <i>Helichrysum stoechas</i> (L.) Moench subsp. <i>barrelieri</i> (Ten.) Nyman (Ελίχρυσος στοιχάς, πολύτιμος Ελίχρυσος)	74
1.3.9 <i>Helichrysum plicatum</i> DC.	76
1.3.10 <i>Helichrysum luteoalbum</i> (L.) Rchb.	77
1.3.11 <i>Helichrysum orientale</i> (L.) Vaill. (Ελίχρυσος της Ανατολής)	78
1.4 Βιβλιογραφία	80

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. Μελέτη φυτοχημικού προφίλ των 11 άγριων taxa <i>Helichrysum</i> ελληνικής προέλευσης.....	87
2.1 Σκοπός εργασίας	88
2.1.1 Εισαγωγή.....	88
2.2 Υλικά και Μέθοδοι	91
2.2.1 Όργανα-Υλικά.....	91
2.2.2 Συλλογή δειγμάτων 11 ελληνικών ελίχρυσων	91
2.2.3 Ξήρανση και κονιοποίηση της δρόγης	93
2.2.4 Προετοιμασία δειγμάτων για UPLC-HR(ESI-)MS/MSMS	93
2.2.5 Μέθοδος ανάλυσης UPLC-HR(ESI-)MS/MSMS	94
2.2.6 Επεξεργασία δεδομένων	94
2.2.7 Μεθοδολογία ταυτοποίησης μεταβολιτών	94
2.3 Αποτελέσματα-Συζήτηση	95
2.3.1 Ταυτοποίηση δευτερογενών μεταβολιτών	95
2.4 Συμπεράσματα	122
2.5 Βιβλιογραφία	122
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Μελέτη αιθέριων ελαίων από 9 <i>ex situ</i> γονότυπους <i>H. amorginum</i>	131
3.1 Σκοπός εργασίας	132
3.1.1 Εισαγωγή.....	132
3.2 Υλικά και Μέθοδοι	139
3.2.1 Όργανα-Υλικά.....	139
3.2.2 Συλλογή και αρχική επεξεργασία της δρόγης.....	139
3.2.3 Επιλογή πρωτοκόλλου απόσταξης	139
3.2.4 Μέθοδος Ανάλυσης Αέρια Χρωματογραφία με Φασματομετρία Μάζας (GC-MS)	140
3.2.5 Επεξεργασία δεδομένων και στατιστική ανάλυση	140
3.2.6 Μεθοδολογία ταυτοποίησης μεταβολιτών	141
3.3 Συζήτηση αποτελεσμάτων	141
3.3.1 Ταυτοποίηση δευτερογενών μεταβολιτών αιθέριων ελαίων HA και HIS	141
3.3.2 Ιεραρχική Ανάλυση Συστάδων (HCA) και Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA).....	156
3.4 Συμπεράσματα	168
3.5 Βιβλιογραφία	170
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. Μελέτη μεταβολικού προφίλ εκχυλισμάτων από <i>ex situ</i> καλλιεργούμενους γονότυπους <i>Helichrysum amorginum</i>	173
4.1 Σκοπός εργασίας	174
4.1.1 Εισαγωγή.....	174
4.2 Υλικά και Μέθοδοι	191
4.2.1 Όργανα-Υλικά.....	191

4.2.2 Συλλογή και αρχική επεξεργασία της δρόγης.....	192
4.2.3 Ξήρανση και κονιοποίηση της δρόγης.....	192
4.2.4 Επιλογή πρωτοκόλλου εκχύλισης.....	192
4.2.5 Προετοιμασία δειγμάτων για UPLC-HR(ESI-)MS/MSMS	193
4.2.6 Μέθοδος Ανάλυσης UPLC-HR(ESI-)MS/MSMS	193
4.2.7 Στατιστική προεργασία και χημειομετρία	194
4.2.8 Μεθοδολογία ταυτοποίησης μεταβολιτών	195
4.3 Συζήτηση αποτελεσμάτων	196
4.3.1 Παράμετροι επικύρωσης μεθόδου ανάλυσης UPLC-HR(ESI-)MS.	196
4.3.2 Ταυτοποίηση δευτερογενών μεταβολιτών του QC-pooled δείγματος (Dereplication protocols)	197
4.3.3 Προεργασία δεδομένων για την δημιουργία μητρικού πίνακα μεταβολιτών	197
4.3.4 Ανάλυση κύριων συνιστωσών (Principal Components Analysis, PCA)	198
4.3.5 Διακριτική ανάλυση Ορθογωνίων Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis-OPLS-DA).....	199
4.3.6 Ταυτοποίηση μεταβολιτών.....	201
4.4 Συμπεράσματα	219
4.5 Βιβλιογραφία	220
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών <i>Helichrysum amorginum</i> από βιολογική καλλιέργεια στην Αμοργό και <i>in vitro</i> αποτίμηση βιοδραστικότητας.....	230
5.1 Σκοπός εργασίας	231
5.2 Υλικά και Μέθοδοι	232
5.2.1 Όργανα-Υλικά.....	232
5.2.2 Συλλογή και αρχική επεξεργασία της δρόγης.....	234
5.2.3 Επιλογή πρωτοκόλλου παρασκευής εκχυλίσων	234
5.2.4 Μέθοδος Ανάλυσης Υγρής Χρωματογραφίας (UPLC) συζευγμένης με φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας με αναλυτή τροχιακής παγίδας (HR(ESI-)MS/MSMS- Orbitrap).....	235
5.2.5 Μέθοδος Ανάλυσης Αέρια Χρωματογραφία με Φασματομετρία Μάζας (GC-MS)	237
5.2.6 Μέθοδος ανάλυσης 1D, 2D - ^1H , ^{13}C NMR	237
5.2.7 <i>In vitro</i> τεστ παγίδευσης ελεύθερης ρίζας (DPPH)	237
5.2.8 <i>In vitro</i> τεστ αναστολής ενζύμου τυροσινάση (tyrosinase inhibition assay)	239
5.3 Αποτελέσματα-Συζήτηση	241
5.3.1 Ποιοτική μελέτη εκχυλισμάτων (profiling) με GC-MS, LC-ESI(±)-HRMS, ^1H NMR	241
5.3.2 Απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών από MeOH εκχύλισμα ταξιανθιών HA μετά από διαδοχικές εκχυλίσεις με n-hexane, DCM	262
5.3.3 Απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών από DCM εκχύλισμα ταξιανθιών HA	274

5.3.4 Φασματοσκοπικά και φασματομετρικά δεδομένα των δευτερογενών μεταβολιτών που απομονώθηκαν από το φυτικό υλικό <i>Helichrysum amorginum</i> flos (ταξιανθίες από βιολογική καλλιέργεια Κατάπολα Αμοργού, συγκομιδή 2017, 2020)	282
5.3.5 Αποτίμηση <i>in vitro</i> αντιοξειδωτικής δράσης (DPPH) και αναστολής ενζύμου τυροσινάσης	324
5.4 Συμπεράσματα	325
5.5 Βιβλιογραφία	326
ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ.....	334
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	337
Παράρτημα Κεφαλαίου 2	338
Παράρτημα Κεφαλαίου 3	373
Παράρτημα Κεφαλαίου 4	374
Παράρτημα Κεφαλαίου 5	385

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΜΕ ΕΙΚΟΝΕΣ

Κεφάλαιο 1

- Εικόνα 1.1: Παγκόσμια κατανομή ειδών του γένους *Helichrysum*
Εικόνα 1.2: Εξάπλωση μελών του γένους *Helichrysum* στην Ευρώπη, Β. Αφρική και Ανατολική Μεσόγειο
Εικόνα 1.3: Γεωγραφική κατανομή των Μεσογειακών υποειδών του *Helichrysum italicum*
Εικόνα 1.4: Γεωγραφική εξάπλωση του Μεσογειακού είδους *H. stoechas*
Εικόνα 1.5: Γεωγραφική κατανομή καταγεγραμμένων συνόλων ειδών σε 13 φυτογεωγραφικές περιοχές της Ελλάδας
Εικόνα 1.6: Τύποι σχημάτων Μεσογειακών και Ασιατικών ελίχρυσων
Εικόνα 1.7: Τύποι ταξιανθιών (κεφάλια) Μεσογειακών και Ασιατικών ελίχρυσων
Εικόνα 1.8: Μορφολογική συγγένεια μεταξύ Ελληνικών ειδών και μεταξύ Ελληνικών και άλλων ειδών *Helichrysum*
Εικόνα 1.9: Γεωγραφική κατανομή 52 θεωρούμενων καταφυγίων στην περιοχή της Μεσογείου
Εικόνα 1.10: Αριστερά: Υπέργειο μέρος *H. amorginum*, Δεξιά: Γεωγραφική κατανομή
Εικόνα 1.11: Αριστερά: Υπέργειο μέρος *H. doerfleri*, Δεξιά: Γεωγραφική κατανομή
Εικόνα 1.12: Αριστερά: Υπέργειο μέρος *H. sibthorpii*, Δεξιά: Γεωγραφική κατανομή
Εικόνα 1.13: Αριστερά: Υπέργειο μέρος *H. taenari*, Δεξιά: Γεωγραφική κατανομή
Εικόνα 1.14: Αριστερά: Υπέργειο μέρος *H. heldreichii*, Δεξιά: Γεωγραφική κατανομή
Εικόνα 1.15: Αριστερά: Υπέργειο μέρος *H. italicum* subsp. *italicum*, Δεξιά: Γεωγραφική κατανομή
Εικόνα 1.16: Αριστερά: Υπέργειο μέρος *H. italicum* subsp. *microphyllum*, Δεξιά: Γεωγραφική κατανομή
Εικόνα 1.17: Αριστερά: Υπέργειο μέρος *H. stoechas* subsp. *barrelieri*, Δεξιά: Γεωγραφική κατανομή
Εικόνα 1.18: Αριστερά: Υπέργειο μέρος *H. plicatum*, Δεξιά: Γεωγραφική κατανομή
Εικόνα 1.19: Αριστερά: Υπέργειο μέρος *H. luteoalbum*, Δεξιά: Γεωγραφική κατανομή
Εικόνα 1.20: Αριστερά: Υπέργειο μέρος *H. orientale*, Δεξιά: Γεωγραφική κατανομή

Κεφάλαιο 2

- Εικόνα 2.1: Ποσοστά ταυτοποιημένων και ημι-ταυτοποιημένων μεταβολιτών στα 11 μεθανολικά εκχυλίσματα ελληνικών ελίχρυσων H1-H11
Εικόνα 2.2: Μεταβολίτες M1-M308 και συχνότητες εμφανίσεων στα 11 μεθανολικά εκχυλίσματα των αυτοφυών *Helichrysum* spp. ελληνικής προέλευσης
Εικόνα 2.3: Ποσοστά φυτοχημικών κατηγοριών στους 164 ημι- και ταυτοποιημένους μεταβολίτες των 11 μεθανολικών εκχυλισμάτων των αυτοφυών taxa *Helichrysum* ελληνικής προέλευσης

Κεφάλαιο 3

- Εικόνα 3.1: Εξίσωση υπολογισμού δεικτών κατακράτησης (RI)
Εικόνα 3.2: Χρωματογράφημα ολικών ιόντων (TIC) των συστατικών αιθέριου ελαίου του γονότυπου *H. amorginum* HA_15.5887_391
Εικόνα 3.3: Χρωματογράφημα ολικών ιόντων (TIC) των συστατικών αιθέριου ελαίου του εμπορικού σκευάσματος *H. italicum* subsp. *serotinum*
Εικόνα 3.4: Δενδροδιάγραμμα 10 δειγμάτων (GENOTYPE #1-10) εννέα γονότυπων *ex situ* καλλιεργούμενου HA. Όπου genotype #9: gen9.1, genotype #10: gen9.2. Παρουσιάζονται 5 clusters για X=6
Εικόνα 3.5: Διάγραμμα scree plot ιδιοτιμών και κύριων συνιστωσών της PCA ανάλυσης των 10 δειγμάτων *ex situ* καλλιεργούμενου HA
Εικόνα 3.6: Διάγραμμα 2 κυρίων συνιστωσών πριν την περιστροφή των αξόνων της PCA ανάλυσης των 10 δειγμάτων HA
Εικόνα 3.7: Διάγραμμα 2 κυρίων συνιστωσών μετά την περιστροφή των αξόνων της PCA ανάλυσης των 10 δειγμάτων HA
Εικόνα 3.8: Διάγραμμα scree plot ιδιοτιμών και κύριων συνιστωσών της PCA ανάλυσης των 9 κύριων συστατικών HA
Εικόνα 3.9: Διάγραμμα 2 κυρίων συνιστωσών πριν την περιστροφή των αξόνων της PCA ανάλυσης των 9 κύριων συστατικών HA
Εικόνα 3.10: Διάγραμμα 2 κυρίων συνιστωσών μετά την περιστροφή των αξόνων της PCA ανάλυσης των 9 κύριων συστατικών HA

Κεφάλαιο 4

Εικόνα 4.1: Παραδείγματα ανώριμης ταξιανθίας *H. amorginum* γονότυπων Μαρτίου (αριστερά) και ώριμης ταξιανθίας γονότυπων Ιουνίου (δεξιά). Παρατηρείται η απουσία ανεπτυγμένων ανθιδίων στους γονότυπους Μαρτίου (προσωπικές φωτογραφίες)

Εικόνα 4.2: Γενικό σχεδιάγραμμα *de novo* βιοσύνθεσης φλαβονοειδών στους φυτικούς οργανισμούς

Εικόνα 4.3: Γενικό σχεδιάγραμμα *de novo* βιοσύνθεσης καφεοϋλο-κινικο οξέων και παραγώγων στους φυτικούς οργανισμούς

Εικόνα 4.4: Γενικό σχεδιάγραμμα *de novo* βιοσύνθεσης λιπαρών οξέων και παραγώγων στα φυτά

Εικόνα 4.5: Γενικό σχεδιάγραμμα *de novo* βιοσύνθεσης κινικού οξέως

Εικόνα 4.6: Γενικό σχεδιάγραμμα *de novo* βιοσύνθεσης του μαλικού οξέως

Εικόνα 4.7: Γενικό σχεδιάγραμμα *de novo* βιοσύνθεσης του γλουκονικού οξέως

Εικόνα 4.8: Γενικό σχεδιάγραμμα *de novo* βιοσύνθεσης γλουκονικού οξέως

Εικόνα 4.9: Γενικό σχεδιάγραμμα *de novo* βιοσύνθεσης α -πυρόνης 6-(2',4'-dihydroxy-6'-methylphenyl)-4-hydroxy-2-pyrone στο φυτό *Drosophyllum lusitanicum* μέσω του βιοσυνθετικού μονοπατιού των πολυκετιδίων

Εικόνα 4.10: Γενικό σχεδιάγραμμα *de novo* βιοσύνθεσης υποκατεστημένης α -πυρόνης από το σύστημα PKS III

Εικόνα 4.11: Γενικό σχεδιάγραμμα *de novo* βιοσύνθεσης φλορογλουσινόλης μέσω του βιοσυνθετικού μονοπατιού των πολυκετιδίων

Εικόνα 4.12: Δισδιάστατη δομή της αρζανόλης (ετεροδιμερές α -πυρόνης- φλορογλουσινόλης)

Εικόνα 4.13: UPLC-HRMS χρωματογράφημα βασικών ιόντων του QC-pooled δείγματος σε αρνητικό ιονισμό

Εικόνα 4.14: Ενδεικτικό RSD (%) του χρόνου ανάσχεσης (Rt) των astragalin, tiliroside και arigenin σε 20 QC- pooled δείγματα

Εικόνα 4.15: Διάγραμμα συντεταγμένων των 62 δειγμάτων *ex situ* καλλιεργούμενων γονοτύπων *Helichrysum amorginum* με κλιμάκωση Pareto

Εικόνα 4.16: Διάγραμμα OPLS-DA σε κλιμάκωση Pareto, των 62 δειγμάτων *ex situ* καλλιεργούμενων γονοτύπων *Helichrysum amorginum*

Εικόνα 4.17: S-plot του OPLS-DA scores plot

Εικόνα 4.18: Επικύρωση του OPLS-DA scores plot με δοκιμή Permutation, για τον μήνα Μάρτιο

Εικόνα 4.19: Επικύρωση του OPLS-DA scores plot με δοκιμή Permutation, για τον μήνα Ιούνιο

Εικόνα 4.20: OPLS-DA διάγραμμα φορτίων (loadings plot) των 62 *ex situ* καλλιεργούμενων γονοτύπων του *H. amorginum*

Εικόνα 4.21: UPLC-HRMS χρωματογραφήματα βασικών ιόντων δύο τυχαίων εκχυλίσμάτων που συλλέχθηκαν τον μήνα Μάρτιο (πάνω) και τον Ιούνιο (κάτω), σε αρνητικό ιονισμό

Εικόνα 4.22: Θηκογράμματα των σημαντικών μεταβολιτών φλαβονοειδών και παραγώγων Απιγενίνη (1), 3-O-ακετυλοεξοσίδης καεμπερόλης (5), 3-O-γλουκοζίτης καεμπερόλης (12), Κερσετίνη (15), Τιλιοσίδης (14), 3-O-[6''-O-(trans-p-κουμαρόυλο)-3''-O-ακέτυλο]-6-D-γλυκοκυρανοζίτης καεμπερόλης (13), 5,3',4'-τριύδροξυ-6,7,8-τριμεθόξυ φλαβόνη (16) για τους μήνες Μάρτιο και Ιούνιο

Εικόνα 4.23: Θηκογράμματα των σημαντικών μεταβολιτών οξέων και παραγώγων πινελικό οξύ (19), καφεοϋλο κινικο οξύ (29), δικαφεοϋλοκινικο οξύ (25) για τους εξεταζόμενους *ex situ* καλλιεργούμενους γονότυπους του *Helichrysum amorginum* κατά τους μήνες Μάρτιο και Ιούνιο

Εικόνα 4.24: Θηκογράμματα των σημαντικών μεταβολιτών πυρόνης-φλορογλουσινόλης και παραγώγων αρζανόλη (39), παράγωγο πυρόνης 1 (43), παράγωγο πρένυλο φλορογλουσινόλης (55),) για τους εξεταζόμενους *ex situ* καλλιεργούμενους γονότυπους του *Helichrysum amorginum* κατά τους μήνες Μάρτιο και Ιούνιο

Κεφάλαιο 5

Εικόνα 5.1: ^1H NMR των *n*-hexane ολικών εκχυλίσμάτων ταξιανθιών (κόκκινη γραμμή) και φυλλωδών στελεχών (μπλε γραμμή) του βιολογικώς καλλιεργούμενου *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό (συγκομιδή 2017)

Εικόνα 5.2: Χρωματογράφημα TIC εξανικού εκχυλίσματος ταξιανθιών (άνω) και φυλλωδών στελεχών (κάτω)) του βιολογικώς καλλιεργούμενου *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό (συγκομιδή 2017)

Εικόνα 5.3: UHPLC-ESI-($\pm$)-HRMS χρωματογραφήματα κύριων κορυφών (base peak) του ολικού DCM εκχυλίσματος ταξιανθιών *H. amorginum* μετά από εκχύλιση με *n*-hexane

Εικόνα 5.4: UHPLC-ESI-($\pm$)-HRMS χρωματογραφήματα κύριων κορυφών (base peak) του ολικού DCM εκχυλίσματος φυλλωδών στελεχών *H. amorginum* από εκχύλιση με *n*-hexane (από UHPLC-ESI-($\pm$)-HRMS)

Εικόνα 5.5: Μοριακή δομή θραύσματος α -pyrone σε αρνητικό ιονισμό

Εικόνα 5.6: UHPLC-ESI-($\pm$)-HRMS χρωματογραφήματα κύριων κορυφών (base peak) του ολικού MeOH εκχυλίσματος ταξιανθιών *H. amorginum* μετά από συνεχόμενη εκχύλιση με *n*-hexane και DCM

Εικόνα 5.7: UHPLC-ESI-($\pm$)-HRMS χρωματογραφήματα κύριων κορυφών (base peak) του ολικού MeOH εκχυλίσματος φυλλωδών στελεχών *H. amorginum* μετά από συνεχόμενη εκχύλιση με *n*-hexane και DCM

Εικόνα 5.8: UHPLC-ESI-(±)-HRMS χρωματογραφήματα κύριων κορυφών (*base peak*) του ολικού H₂O εκχυλίσματος ταξιανθιών *H. amorginum* μετά από συνεχή εκχύλιση με *n*-hexane, DCM, MeOH

Εικόνα 5.9: UHPLC-ESI-(±)-HRMS χρωματογραφήματα κύριων κορυφών (*base peak*) του ολικού H₂O εκχυλίσματος φυλλωδών στελεχών *H. amorginum* μετά από συνεχή εκχύλιση με *n*-hexane, DCM, MeOH

Εικόνα 5.10: Παράγωγα καφεοϋλο-κινικο οξέως

Εικόνα 5.11: Σχεδιάγραμμα απομόνωσης μεταβολιτών 1-9 από ολικό MeOH εκχύλισμα (HA2017FexUSm_290318_001) διαδοχικής εκχύλισης ταξιανθιών *H. amorginum* (2017) βιολογικής καλλιέργειας

Εικόνα 5.12: MeOH εκχύλισμα ταξιανθιών HA διαλυτοποιημένο στις πάνω και κάτω φάσεις του συστήματος CPC sys1 (S13)

Εικόνα 5.13: MeOH εκχύλισμα ταξιανθιών HA διαλυτοποιημένο στις πάνω και κάτω φάσεις του συστήματος CPC sys1 (S13)

Εικόνα 5.14: TLC χρωματογραφήματα κλασμάτωσης (1^{ου} FCPC) MeOH εκχυλίσματος ταξιανθιών *H. amorginum* 2017 @ 254nm

Εικόνα 5.15: TLC χρωματογραφήματα κλασμάτωσης (1^{ου} FCPC) MeOH εκχυλίσματος ταξιανθιών *H. amorginum* 2017 @ 366nm

Εικόνα 5.16: TLC χρωματογραφήματα κλασμάτωσης (1^{ου} FCPC) MeOH εκχυλίσματος ταξιανθιών *H. amorginum* 2017

Εικόνα 5.17: TLC χρωματογραφήματα συνενωμένων κλασμάτων (1^{ου} CPC) MeOH εκχυλίσματος ταξιανθιών HA 2017 @ 254nm

Εικόνα 5.18: TLC χρωματογραφήματα συνενωμένων κλασμάτων (1^{ου} CPC) MeOH εκχυλίσματος ταξιανθιών HA 2017 @ 366nm

Εικόνα 5.19: TLC χρωματογραφήματα συνενωμένων κλασμάτων (1^{ου} CPC) MeOH εκχυλίσματος ταξιανθιών HA 2017

Εικόνα 5.20: TLC χρωματογραφήματα κανονικής φάσης τελικών συνενωμένων κλασμάτων (1^{ου} FCPC) MeOH εκχυλίσματος ταξιανθιών HA 2017

Εικόνα 5.21: TLC χρωματογραφήματα κανονικής φάσης τελικών συνενωμένων κλασμάτων (2^{ου} FCPC του κλάσματος f12-14) MeOH εκχυλίσματος ταξιανθιών HA 2017

Εικόνα 5.22: Σχεδιάγραμμα απομόνωσης μεταβολιτών 11-15 από ολικό DCM εκχύλισμα μη συνεχόμενης εκχύλισης ταξιανθιών *H. amorginum* (2020) βιολογικής καλλιέργειας

Εικόνα 5.23: TLC χρωματογραφήματα κανονικής φάσης τελικών συνενωμένων κλασμάτων (1^{ου} FCPC) DCM εκχυλίσματος κάτω φάσης ταξιανθιών HA 2020

Εικόνα 5.24: ¹H NMR φάσματα των συνενωμένων κλασμάτων DCM *f* series (600MHz, CDCl₃)

Εικόνα 5.25: TLC χρωματογραφήματα κανονικής φάσης DCM εκχυλίσματος (κλάσμα DCM f11-12) (2^{ου} FCPC) ταξιανθιών HA 2020

Εικόνα 5.26: TLC χρωματογραφήματα κανονικής φάσης τελικών συνενωμένων κλασμάτων DCM *sf* series (2^{ου} FCPC, f11-12) DCM εκχυλίσματος ταξιανθιών HA 2020

Εικόνα 5.27: Δομή kaempferol-3-O-glucoside (astragalin) (1)

Εικόνα 5.28: Φάσμα HRMS πλήρους σάρωσης (Full Scan) astragalin (1)

Εικόνα 5.29: Φάσμα ¹H-NMR του άγλυκου μέρους του astragalin (1) σε CD₃OD (αρωματική περιοχή)

Εικόνα 5.30: Προβολή Newman των πρωτονίων H-6a'', H-6b'' ως προς τον πρωτόνιο H-5 του σακχάρου του kaempferol-3-O-glucoside (astragalin)

Εικόνα 5.31: Φάσμα ¹H-NMR του astragalin (1) σε CD₃OD (περιοχή ανωμερικών πρωτονίων και πρωτονίων σακχάρων)

Εικόνα 5.32: Δομή kaempferol-3-O-β-D-(6-O-trans-p-coumaroyl) glucopyranoside (tiliroside)

Εικόνα 5.33: Φάσμα HRMS πλήρους σάρωσης (Full Scan) του tiliroside

Εικόνα 5.34: Φάσμα ¹H-NMR του άγλυκου μέρους του tiliroside (2) σε CD₃OD (αρωματική περιοχή)

Εικόνα 5.35: Φάσμα ¹H-NMR του tiliroside (2) σε CD₃OD (περιοχή ανωμερικών πρωτονίων και πρωτονίων σακχάρων).

Εικόνα 5.36: Δομή 5,7-dihydroxyphthalide

Εικόνα 5.37: Φάσμα HRMS πλήρους σάρωσης (Full Scan) του 5,7-dihydroxyphthalide (3)

Εικόνα 5.38: Δομή 4-hydroxybenzaldehyde

Εικόνα 5.39: Φάσμα HRMS πλήρους σάρωσης (Full Scan) του 4-hydroxybenzaldehyde (4)

Εικόνα 5.40: Φάσμα ¹H-NMR του 4-hydroxybenzaldehyde (4) σε CD₃OD (περιοχή αρωματικών και αλδεϋδικών πρωτονίων)

Εικόνα 5.41: Δομή Apigenin

Εικόνα 5.42: Φάσμα HRMS πλήρους σάρωσης (Full Scan) του apigenin (5)

Εικόνα 5.43: Φάσμα ¹H-NMR του apigenin (5) σε CD₃OD (περιοχή αρωματικών)

Εικόνα 5.44: Δομή Luteolin

Εικόνα 5.45: Φάσμα HRMS πλήρους σάρωσης (Full Scan) του luteolin (6)

Εικόνα 5.46: Δομή Quercetin

Εικόνα 5.47: Φάσμα HRMS πλήρους σάρωσης (Full Scan) του quercetin (7)

Εικόνα 5.48: Δομή (S,Z)-3-hydroxy-2-((2-methylbut-2-enoyl)oxy)propyl decanoate

Εικόνα 5.49: Φάσμα HRMS πλήρους σάρωσης (Full Scan) του (S,Z)-3-hydroxy-2-((2-methylbut-2-enoyl)oxy)propyl decanoate (8)

Εικόνα 5.50: Δομή 3,4-dihydroxy-5-((4-hydroxybenzoyl)oxy)benzoic acid

Εικόνα 5.51: Φάσμα HRMS πλήρους σάρωσης (Full Scan) του 3,4-dihydroxy-5-((4-hydroxybenzoyl)oxy)benzoic acid

Εικόνα 5.52: Δομή 5,7-dihydroxy-3,6,8-trimethoxyflavone

Εικόνα 5.53: Χρωματογράφημα κύριων κορυφών, κορυφής μεταβολίτη 10 (Rt=11.52min) και MS² προφίλ θραυσματοποίησης σε θετικό ιονισμό

Εικόνα 5.54: Φασματοσκοπικά δεδομένα (600 MHz, CD₃OD) και HMBC συσχετισμοί πυρήνων H-C του 5,7-dihydroxy-3,6,8-trimethoxyflavone (10)

Εικόνα 5.55: Δομή 3-hydroxy-4,4-dimethyl-4-butyrolactone

Εικόνα 5.56: Δομή Scopoletin

Εικόνα 5.57: Προτεινόμενη δομή 3-(3-benzoyl-2,4,6-trihydroxy-5-(3-methylbut-2-en-1-yl)benzyl)-6-ethyl-4-hydroxy-5-methyl-2H-pyran-2-one

Εικόνα 5.58: Μοριακό ιόν του $[M-H]^-$: 463 του μεταβολίτη 13 και χρόνοι έκλουσης των κορυφών βάσης στη ζώνη D (JS6) από RP-Prep-TLC του κλάσματος fr45-53 (2^o FCPC, ολικό εκχύλισμα ταξιανθιών *H. amorginum* 2020 μη συνεχόμενης εκχύλισης)

Εικόνα 5.59: Άνω: Μοριακό ιόν του $[M-H]^-$: 463 του μεταβολίτη 13 και χρόνος έκλουσης της κορυφής βάσης. Κάτω: Προφίλ θραυσματοποίησης μοριακού ιόντος $[M-H]^-$: 463 (ολικό DCM εκχύλισμα ταξιανθιών *H. amorginum* 2017 συνεχόμενης εκχύλισης)

Εικόνα 5.60: Προτεινόμενα κύρια θραύσματα μεταβολίτη 13 σε ESI negative

Εικόνα 5.61: Προφίλ θραυσματοποίησης μεταβολίτη 13 στην ζώνη D (JS6) (αρνητικός ιονισμός) με εμφάνιση του θραύσματος 153

Εικόνα 5.62: Δομή Heliarzanol

Εικόνα 5.63: Προτεινόμενα κύρια θραύσματα μεταβολίτη 14 (heliarzanol) σε ESI negative

Εικόνα 5.64: Προφίλ θραυσματοποίησης μεταβολίτη 14 στην ζώνη A (αρνητικός ιονισμός) με εμφάνιση των θραυσμάτων 291, 279, 153

Εικόνα 5.65: Προτεινόμενη δομή 3-(3-benzoyl-2,4,6-trihydroxy-5-(2-hydroxy-3-methylbut-3-en-1-yl)benzyl)-6-ethyl-4-hydroxy-5-methyl-2H-pyran-2-one

Εικόνα 5.66: Προτεινόμενα κύρια θραύσματα μεταβολίτη 15 ($C_{27}H_{28}O_8$) σε ESI negative

Εικόνα 5.67: Προφίλ θραυσματοποίησης μεταβολίτη 15 ($R_t=11.67\text{min}$) στην ζώνη A (αρνητικός ιονισμός) με εμφάνιση των θραυσμάτων 325, 313, 153

Εικόνα 5.68: Παράγωγα φλορογλουσινόλης 3-neryl-1-benzoyl-phloroglucinol (1, 2) και 2-methyl-2-[4,4-dimethylpent-3-en-yl]-5,7-dihydroxy-6-benzoyl chroman (3) που έχουν απομονωθεί από το είδος *H. monticola*

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΜΕ ΕΙΚΟΝΕΣ ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΟΣ

Παράρτημα Κεφαλαίου 2

Εικόνα Π2.1: (H1) *Helichrysum amorginum* Boiss. & Orph. (HA_2013). Κάτω: Αυτοφυές υποκείμενο στο φυσικό του ενδιαίτημα (2011), Άνω αριστερά: Ταξιανθίες (2013), Άνω δεξιά: Αλεσμένα ανθοφόρα στελέχη (2013)

Εικόνα Π2.2: (H2) *Helichrysum doerfleri* Rech. f. (HD_2019). Άνω: Αυτοφυές άτομο στο φυσικό του ενδιαίτημα (2019), Κάτω: Υπέργειο μέρος (2019)

Εικόνα Π2.3: (H3) *Helichrysum heldreichii* Boiss. (HHa_2019). Αριστερά: Αυτοφυές άτομο στο φυσικό του ενδιαίτημα (2019), Δεξιά: Ταξιανθία κόρυμβος με κεφάλια (2019)

Εικόνα Π2.4: (H4) *Helichrysum italicum* (Roth.) G. Don subsp. *italicum* (HIIa_2018). Άνω αριστερά: Ταξιανθίες κόρυμβος με επιμέρους κεφάλια (2018), Άνω δεξιά: Ταξιανθία, κεφάλιο (2018), Κάτω: Υπέργειο μέρος (2018)

Εικόνα Π2.5: (H5) *Helichrysum italicum* subsp. *microphyllum* (Willd.) Nyman (HIM_2019). Άνω αριστερά: Αυτοφυή άτομα στο φυσικό τους ενδιαίτημα (2019), Άνω δεξιά: Υπέργειο μέρος (2019), Κάτω: Στελέχη με κόρυμβο και επιμέρους κεφάλια (2019)

Εικόνα Π2.6: (H6) *Helichrysum luteoalbum* (L.) Rchb. (HL_2020). Αριστερά: Υπέργειο μέρος (2020), Δεξιά: Στελέχη με κόρυμβο και επιμέρους κεφάλια (2020)

Εικόνα Π2.7: (H7) *Helichrysum orientale* (L.) Vaill. (HOk_2018). Άνω: Στελέχη με κόρυμβο και επιμέρους κεφάλια (2018), Κάτω: Ταξιανθία, κεφάλιο με θράκτια (2018)

Εικόνα Π2.8: (H8) *Helichrysum plcatum* DC (HPv_2020). Άνω: Κόρυμβος με επιμέρους κεφάλια (2020), Κάτω: Υπέργειο μέρος (2020)

Εικόνα Π2.9: (H9) *Helichrysum sibthorpii* Rouy (HS_2019). Άνω: Αυτοφυές άτομο στο φυσικό του ενδιαίτημα (2019), Κάτω: Υπέργειο μέρος (2019)

Εικόνα Π2.10: (H10) *Helichrysum stoechas* subsp. *barrelieri* (Ten.) Nyman (HSBr_2016). Άνω αριστερά: Αυτοφυή άτομα στο φυσικό τους ενδιαίτημα (2016), Άνω δεξιά: Υπέργειο μέρος (2016), Κάτω: Κόρυμβος με επιμέρους κεφάλια (2016)

Εικόνα Π2.11: (H11) *Helichrysum taenari* Rothm (HT_2019). Αριστερά: Αυτοφυές άτομο στο φυσικό του ενδιαίτημα (2019), Δεξιά: Κόρυμβος με επιμέρους κεφάλια (2019)

Εικόνα Π2.12: Σύγκριση ταξιανθιών (κεφάλια) *H. stoechas* subsp. *barrelieri* (αριστερά, 2016) και *H. italicum* subsp. *italicum* (δεξιά, 2018) σε παρόμοιο στάδιο ωρίμανσης. *H. stoechas* subsp. *barrelieri*: Καμπανοειδής μορφή ταξιανθίας, *H. italicum* subsp. *italicum*: Μικρότερη κυλινδρική μορφή ταξιανθίας

Παράρτημα Κεφαλαίου 3

Εικόνα Π3.1: Δείγμα ζωντανού φυτού γονότυπου HA *ex situ* καλλιέργειας του ΕΛΓΟ-Δήμητρα (αριστερά) που χρησιμοποιήθηκε για την απόσταξη αιθέριου ελαίου (δεξιά)

Παράρτημα Κεφαλαίου 5

Εικόνα Π5.1: Προτεινόμενο διάγραμμα θραυσματοποίησης σε αρνητικό ιονισμό των μεταβολιτών 13, 14, 15

Εικόνα Π5.2: ^1H NMR φάσμα του μεταβολίτη **10**: 5,7-dihydroxy-3,6,8-trimethoxyflavone σε CDCl_3 (600MHz)

Εικόνα Π5.3: COSY NMR φάσμα του μεταβολίτη **10**: 5,7-dihydroxy-3,6,8-trimethoxyflavone σε CDCl_3 (600MHz)

Εικόνα Π5.4: HSQC/DEPT NMR φάσμα του μεταβολίτη **10**: 5,7-dihydroxy-3,6,8-trimethoxyflavone σε CDCl_3 (600MHz)

Εικόνα Π5.5: HMBC NMR φάσμα του μεταβολίτη **10**: 5,7-dihydroxy-3,6,8-trimethoxyflavone σε CDCl_3 (600MHz)

Εικόνα Π5.6: ^1H NMR φάσμα του μεταβολίτη **11**: 3-hydroxy-4,4-dimethyl-4-butyrolactone σε CDCl_3 (600MHz)

Εικόνα Π5.7: COSY NMR φάσμα του μεταβολίτη **11**: 3-hydroxy-4,4-dimethyl-4-butyrolactone σε CDCl_3 (600MHz)

Εικόνα Π5.8: HSQC/DEPT NMR φάσμα του μεταβολίτη **11**: 3-hydroxy-4,4-dimethyl-4-butyrolactone σε CDCl_3 (600MHz)

Εικόνα Π5.9: HMBC NMR φάσμα του μεταβολίτη **11**: 3-hydroxy-4,4-dimethyl-4-butyrolactone σε CDCl_3 (600MHz)

Εικόνα Π5.10: ^1H NMR φάσμα του μεταβολίτη **12**: scopoletin σε CDCl_3 (600MHz)

Εικόνα Π5.11: COSY NMR φάσμα του μεταβολίτη **12**: scopoletin σε CDCl_3 (600MHz)

Εικόνα Π5.12: HSQC/DEPT NMR φάσμα του μεταβολίτη **12**: scopoletin σε CDCl_3 (600MHz)

Εικόνα Π5.13: HMBC NMR φάσμα του μεταβολίτη **12**: scopoletin σε CDCl_3 (600MHz)

Εικόνα Π5.14: ^1H NMR φάσμα του μεταβολίτη **13**: 3-(3-benzoyl-2,4,6-trihydroxy-5-(3-methylbut-2-en-1-yl)benzyl)-6-ethyl-4-hydroxy-5-methyl-2H-pyran-2-one ($\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{O}_7$) σε CDCl_3 (600MHz)

Εικόνα Π5.15: COSY NMR φάσμα του μεταβολίτη **13**: 3-(3-benzoyl-2,4,6-trihydroxy-5-(3-methylbut-2-en-1-yl)benzyl)-6-ethyl-4-hydroxy-5-methyl-2H-pyran-2-one ($C_{27}H_{28}O_7$) σε $CDCl_3$ (600MHz)

Εικόνα Π5.16: HSQC/DEPT NMR φάσμα του μεταβολίτη **13**: 3-(3-benzoyl-2,4,6-trihydroxy-5-(3-methylbut-2-en-1-yl)benzyl)-6-ethyl-4-hydroxy-5-methyl-2H-pyran-2-one ($C_{27}H_{28}O_7$) σε $CDCl_3$ (600MHz)

Εικόνα Π5.17: HMBC NMR φάσμα του μεταβολίτη **13**: 3-(3-benzoyl-2,4,6-trihydroxy-5-(3-methylbut-2-en-1-yl)benzyl)-6-ethyl-4-hydroxy-5-methyl-2H-pyran-2-one ($C_{27}H_{28}O_7$) σε $CDCl_3$ (600MHz)

Εικόνα Π5.18: ^1H NMR φάσμα του μεταβολίτη **5**: arigenin σε MeOD (600MHz)

Εικόνα Π5.19: ^1H NMR φάσμα του μεταβολίτη **4**: 4-hydroxybenzaldehyde σε MeOD (600MHz)

Εικόνα Π5.20: ^1H NMR φάσμα του μεταβολίτη **2**: tiliroside σε MeOD (600MHz)

Εικόνα Π5.21: COSY NMR φάσμα του μεταβολίτη **2**: tiliroside σε MeOD (600MHz)

Εικόνα Π5.22: HSQC/DEPT NMR φάσμα του μεταβολίτη **2**: tiliroside σε MeOD (600MHz)

Εικόνα Π5.23: HMBC NMR φάσμα του μεταβολίτη **2**: tiliroside σε $CDCl_3$ (600MHz)

Εικόνα Π5.24: ^1H NMR φάσμα του μεταβολίτη **1**: astragalin σε MeOD (600MHz)

Εικόνα Π5.25: COSY NMR φάσμα του μεταβολίτη **1**: astragalin σε MeOD (600MHz)

Εικόνα Π5.26: HSQC/DEPT NMR φάσμα του μεταβολίτη **1**: astragalin σε MeOD (600MHz)

Εικόνα Π5.27: HMBC NMR φάσμα του μεταβολίτη **1**: astragalin σε $CDCl_3$ (600MHz)

Εικόνα Π5.28: COSY, HMBC συσχετισμοί του μεταβολίτη **13** σε $CDCl_3$ (600MHz)

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΜΕ ΠΙΝΑΚΕΣ

Κεφάλαιο 1

Πίνακας 1.1: Ταξινόμηση του γένους *Helichrysum* σύμφωνα με τη βάση δεδομένων TICA και σύστημα ταξινόμησης APG IV

Πίνακας 1.2: Παραδοσιακή χρήση ειδών του γένους *Helichrysum* στην Αφρική και Ασία

Πίνακας 1.3: Παραδείγματα δευτερογενών μεταβολιτών των μελών του γένους *Helichrysum*

Πίνακας 1.4: Φαρμακολογικές δράσεις ειδών του γένους *Helichrysum*

Πίνακας 1.5: Παραδοσιακή χρήση ειδών του γένους *Helichrysum* στην Ευρώπη και Μεσόγειο

Πίνακας 1.6: Γεωγραφική εξάπλωση υποειδών του *H. italicum*

Πίνακας 1.7: Κύριοι πτητικοί μεταβολίτες που έχουν αναφερθεί σε ταχά του *Helichrysum stoechas*

Πίνακας 1.8: Αριθμός Ελληνικών ενδημικών αγγειόσπερμων ειδών, υποειδών και ταχά (είδη και υποείδη) για κάθε χλωριδική περιοχή της Ελλάδας

Πίνακας 1.9: Γεωγραφική εξάπλωση σε φυτογεωγραφικές περιοχές της Ελλάδας ενδημικών και ιθαγενών ταχά ελίχρυσων της Ελλάδας με επιμέρους περιοχές εξάπλωσης στην Ελλάδα από το βοτανικό μουσείου της Λούνδης

Πίνακας 1.10: Κατηγοριοποίηση Ελληνικών ειδών και υποειδών ελίχρυσων ανά section

Πίνακας 1.11: Ενδεικτικοί μήνες άνθισης των ελίχρυσων του Ελλαδικού χώρου σύμφωνα με παρατήρησή τους.

Πίνακας 1.12: Κατηγορία κινδύνου εξαφάνισης Ελληνικών ειδών *Helichrysum* σύμφωνα με Διεθνή Ένωση για τη Διατήρηση της Φύσης (International Union for the Conservation of Nature, IUCN 2021) και εκτός τόπου διατήρησή τους

Κεφάλαιο 2

Πίνακας 2.1: Εκχυλίσματα Ευρωπαϊκών και Μεσογειακών ειδών του γένους *Helichrysum* που μελετήθηκαν ως προς το φυτοχημικό προφίλ τους με την τεχνική υγρής χρωματογραφίας, συζευγμένη με φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας

Πίνακας 2.2: Φασματομετρικά (m/z , EC , $RDBeq$), χρωματογραφικά (R_t) δεδομένα μεταβολιτών που εντοπίστηκαν στα 11 αυτοφυή ταχά *Helichrysum* ελληνικής προέλευσης

Πίνακας 2.3: Χρονική ζώνη 0-8.50min έκλουσης μεταβολιτών

Πίνακας 2.4: Χρονική ζώνη 7.78-17.77min έκλουσης μεταβολιτών

Πίνακας 2.5: 23 μεθυλιωμένα φλαβονοειδή που εντοπίστηκαν στα μεθανολικά εκχυλίσματα των 11 αυτοφυών ελίχρυσων ελληνικής προέλευσης

Πίνακας 2.6: 30 δομές πυρονών και παραγώγων που εντοπίστηκαν στα μεθανολικά εκχυλίσματα των 11 αυτοφυών ελίχρυσων ελληνικής προέλευσης

Κεφάλαιο 3

Πίνακας 3.1: Κύριοι μεταβολίτες αιθέρων ελαίων από το υπέργειο μέρος Ελληνικών ειδών *Helichrysum* (A: άγριο, E: ενδημικό, I: ιθαγενές)

Πίνακας 3.2: Πτητικοί μεταβολίτες ($n = 69$) που ανιχνεύθηκαν στα αιθέρια έλαια (10 δείγματα) εννέα καλλιεργούμενων γονότυπων *H. amorginum*

Πίνακας 3.3: Χρωματογραφικά (Rt, RI) και ποσοτικά δεδομένα (% peak area) πτητικών μεταβολιτών που ανιχνεύθηκαν στα αιθέρια έλαια (10 δείγματα) εννέα *ex situ* καλλιεργούμενων γονότυπων *H. amorginum*

Πίνακας 3.4: Χρωματογραφικά (Rt, RI) και ποσοτικά δεδομένα (% peak area) 43 πτητικών μεταβολιτών που ανιχνεύθηκαν στο αιθέριο έλαιο του εμπορικού σκευάσματος *H. italicum subsp. serotinum*

Πίνακας 3.5: Επεξηγηματικός πίνακας διακύμανσης βάσει των ιδιοτιμών και κύριων συνιστωσών της PCA ανάλυσης των 10 δειγμάτων *ex situ* καλλιεργούμενου HA

Πίνακας 3.6: Επεξηγηματικός πίνακας της ικανοποίησης των προϋποθέσεων της PCA ανάλυσης των 10 δειγμάτων *ex situ* καλλιεργούμενου HA

Πίνακας 3.7: Συγκριτικός πίνακας PCA συσχετίσεων των 10 δειγμάτων HA ως προς τις δύο κύριες συνιστώσεις πριν και μετά την περιστροφή των αξόνων

Πίνακας 3.8: Επεξηγηματικός πίνακας της ικανοποίησης των προϋποθέσεων της PCA ανάλυσης των 9 κύριων συστατικών HA

Πίνακας 3.9: Επεξηγηματικός πίνακας διακύμανσης βάσει των ιδιοτιμών και κύριων συνιστωσών της PCA ανάλυσης των εννέα κύριων συστατικών HA

Πίνακας 3.10: Επεξηγηματικός πίνακας PCA συσχετίσεων των 9 κύριων συστατικών HA ως προς τις δύο κύριες συνιστώσεις πριν την περιστροφή των αξόνων

Πίνακας 3.11: Επεξηγηματικός πίνακας PCA συσχετίσεων των εννέα κύριων συστατικών HA ως προς τις δύο κύριες συνιστώσεις μετά την περιστροφή των αξόνων

Κεφάλαιο 4

Πίνακας 4.1: Πίνακας ρυθμιζόμενων παραμέτρων κατά την προεργασία των δεδομένων με το λογισμικό MZmine 2.53

Πίνακας 4.2: Φασματομετρικά (m/z , EC, RDBeq), χρωματογραφικά (Rt) δεδομένα και VIP τιμές των φλαβονοειδών και παραγώγων που εντοπίστηκαν στα φυτά *H. amorginum* που συλλέχθηκαν τον Μάρτιο και τον Ιούνιο

Πίνακας 4.3: Φασματομετρικά (m/z , EC, RDBeq), χρωματογραφικά (Rt) δεδομένα και VIP τιμές των οξέων και παραγώγων όπως εντοπίστηκαν στους εξεταζόμενους *ex situ* καλλιεργούμενους γονότυπους του *Helichrysum amorginum* που συλλέχθηκαν τον Μάρτιο και τον Ιούνιο

Πίνακας 4.4: Φασματομετρικά (m/z , EC, RDBeq), χρωματογραφικά (Rt) δεδομένα και VIP τιμές των πυρόνης-φλορογλουσινόλης και παραγώγων που εντοπίστηκαν στα φυτά *H. amorginum* που συλλέχθηκαν τον Μάρτιο και τον Ιούνιο

Κεφάλαιο 5

Πίνακας 5.1: Γενική μέθοδος UHPLC-HRMS άπολων (DCM), πολικών (MeOH, H₂O) εκχυλισμάτων ταξιανθιών και φυλλωδών στελεχών *H. amorginum*

Πίνακας 5.2: Ενδεικτική ταυτοποίηση μεταβολιτών σε ολικά *n*-hexane εκχυλίσματα εκχυλίσματα ταξιανθιών (T) και φυλλωδών (Φ) στελεχών του βιολογικώς καλλιεργούμενου *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό (συγκομιδή 2017).

Πίνακας 5.3: Ενδεικτική ταυτοποίηση μεταβολιτών σε ολικά DCM εκχυλίσματα ταξιανθιών (T) και φυλλωδών στελεχών (Φ) *Helichrysum amorginum* μετά από διαδοχικές εκχυλίσσεις με *n*-hexane με UHPLC-ESI(-)-HRMS

Πίνακας 5.4.: Ενδεικτική ταυτοποίηση μεταβολιτών σε ολικά MeOH εκχυλίσματα ταξιανθιών και στελεχών *H. amorginum* μετά από διαδοχικές εκχυλίσσεις με *n*-hexane και DCM με UHPLC-ESI(-)-HRMS

Πίνακας 5.5: Φλαβονοειδή kaempferol

Πίνακας 5.6: Ενδεικτική ταυτοποίηση μεταβολιτών σε ολικά H₂O εκχυλίσματα ταξιανθιών και στελεχών *H. amorginum* μετά από διαδοχικές εκχυλίσσεις με *n*-hexane, DCM, MeOH με UHPLC-ESI(-)-HRMS (CQA: καφεοϋλοκινικό οξύ, flav.: φλαβονοειδές)

Πίνακας 5.7: Συστήματα διαλυτών και αναλογίες όγκων για την επιλογή κατάλληλου διαφαντικού συστήματος διαλυτών για την κλασμάτωση του MeOH εκχυλίσματος με 1° CPC

Πίνακας 5.8: Διερεύνηση θελτιστοποίησης διαχωρισμού φάσεων στο διαφαντικό σύστημα EtOAc:MeOH:AA1%

Πίνακας 5.9: Διερεύνηση θελτιστοποίησης διαχωρισμού φάσεων στο διαφαντικό σύστημα EtOAc:MeOH:AA1% (sys1, sys2, sys3) με προσθήκη μεθανολικού εκχυλίσματος ταξιανθιών ταξιανθιών *Helichrysum amorginum* (συγκομιδή βιολογικής καλλιέργειας 2017)

Πίνακας 5.10: Συνθήκες κλασμάτωσης με χρωματογραφία κατ' αντιστροφή (FCPC) MeOH εκχυλίσματος ταξιανθιών *Helichrysum amorginum* (συγκομιδή βιολογικής καλλιέργειας 2017)

Πίνακας 5.11: Ομάδες και θάρη συνενωμένων κλασμάτων 1^{ου} CPC MeOH εκχυλίσματος HA 2017
 Πίνακας 5.12: Τελικές συνενώσεις κλασμάτων (MeOH f series) 1^{ου} CPC MeOH εκχυλίσματος HA 2017
 Πίνακας 5.13: Συνθήκες κλασμάτωσης με χρωματογραφία κατ' αντιρροή (FCPC) δείγματος f12-14
 Πίνακας 5.14: Διερεύνηση βελτιστοποίησης διαχωρισμού φάσεων στο διφασικό σύστημα n-hexane:EtOAc:EtOH:AA1% με και χωρίς προσθήκη κλάσματος f12-14 του 1^{ου} CPC του MeOH εκχυλίσματος ταξιανθιών HA 2017
 Πίνακας 5.15: Τελικές συνενώσεις κλασμάτων (MeOH f series) 1^{ου} CPC MeOH εκχυλίσματος HA 2017
 Πίνακας 5.16: Διερεύνηση βελτιστοποίησης διαχωρισμού φάσεων με και χωρίς προσθήκη δείγματος (κάτω πολική φάση) του 1^{ου} CPC στο DCM εκχύλισμα ταξιανθιών HA 2020
 Πίνακας 5.17: Συνθήκες κλασμάτωσης με χρωματογραφία κατ' αντιρροή (FCPC) δείγματος DCM εκχύλισμα (κάτω πολικής στοιβάδας) ταξιανθιών HA
 Πίνακας 5.18: Τελικές συνενώσεις κλασμάτων (DCM f series) 1^{ου} CPC DCM εκχυλίσματος κάτω φάσης ταξιανθιών HA 2020
 Πίνακας 5.19: Διερεύνηση βελτιστοποίησης διαχωρισμού φάσεων με και χωρίς προσθήκη δείγματος DCM f11-12 του 1^{ου} CPC του DCM εκχυλίσματος ταξιανθιών HA 2020
 Πίνακας 5.20: Συνθήκες κλασμάτωσης με χρωματογραφία κατ' αντιρροή (FCPC) δείγματος f11-12
 Πίνακας 5.21: Τελικές συνενώσεις κλασμάτων (DCM sf series) 2^{ου} CPC (δείγμα κλάσμα f11-12) DCM εκχυλίσματος ταξιανθιών HA 2020
 Πίνακας 5.22: Τελικές συνενώσεις κλασμάτων (DCM sf 6-9) ανοικτής στήλης silica gel
 Πίνακας 5.23: Κλασμάτωση DCM sf 45-53 με prepTLC
 Πίνακας 5.24: Φασματοσκοπικά δεδομένα (600 MHz, CD₃OD) του astragalin (1)
 Πίνακας 5.25: Φασματοσκοπικά δεδομένα (600 MHz, CD₃OD) του tiliroside (2)
 Πίνακας 5.26: Φασματοσκοπικά δεδομένα (600 MHz, MeOD) του 4-hydroxybenzaldehyde (4)
 Πίνακας 5.27: Φασματοσκοπικά δεδομένα (600 MHz, MeOD) του apigenin (5)
 Πίνακας 5.28: Φασματοσκοπικά δεδομένα (600 MHz, CDCl₃) του 5,7-dihydroxy-3,6,8-trimethoxyflavone (10)
 Πίνακας 5.29: Δομές ισομερών O-Me-φλαβονοειδών με μοριακό τύπο C₁₈H₁₆O₇
 Πίνακας 5.30: Φασματοσκοπικά δεδομένα (600 MHz, CDCl₃) 3-hydroxy-4,4-dimethyl-4-butyrolactone (11)
 Πίνακας 5.31: Φασματοσκοπικά δεδομένα (600 MHz, CDCl₃) scopoletin (12)
 Πίνακας 5.32: Φασματοσκοπικά δεδομένα (600 MHz, CDCl₃) του 3-(3-benzoyl-2,4,6-trihydroxy-5-(3-methylbut-2-en-1-yl)benzyl)-6-ethyl-4-hydroxy-5-methyl-2H-pyran-2-one (13)
 Πίνακας 5.33: Ετεροδιμερή α-πυρόνης-φλορογλουσινόλης
 Πίνακας 5.34: Ποσοστά IC50 εκχυλισμάτων HA στα τεστ DPPH, tyrosinase inhibition assay

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΜΕ ΠΙΝΑΚΕΣ ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΟΣ

Παράρτημα Κεφαλαίου 2

Πίνακας Π2.1: Αποδόσεις εκχυλίσεων 11 ελληνικών δρογών ελίχρυσων που χρησιμοποιήθηκαν για την LC-HRMS ανάλυση
 Πίνακας Π2.2: (H1) HA_2013, Χρωματογραφικά και φασματομετρικά δεδομένα LC-HRMS ανάλυσης μεθανολικού εκχυλίσματος *H. amorginum*
 Πίνακας Π2.3: (H2) HD_2019, Χρωματογραφικά και φασματομετρικά δεδομένα LC-HRMS ανάλυσης μεθανολικού εκχυλίσματος *H. doerfleri*
 Πίνακας Π2.4: (H3) HHa_2019, Χρωματογραφικά και φασματομετρικά δεδομένα LC-HRMS ανάλυσης μεθανολικού εκχυλίσματος *H. heldreichii*
 Πίνακας Π2.5: (H4) HIIa_2018, Χρωματογραφικά και φασματομετρικά δεδομένα LC-HRMS ανάλυσης μεθανολικού εκχυλίσματος *H. italicum* subsp. *italicum*
 Πίνακας Π2.6: (H5) HIM_2019 Χρωματογραφικά και φασματομετρικά δεδομένα LC-HRMS ανάλυσης μεθανολικού εκχυλίσματος *H. italicum* subsp. *microphyllum*
 Πίνακας Π2.7: (H6) HL_2020, Χρωματογραφικά και φασματομετρικά δεδομένα LC-HRMS ανάλυσης μεθανολικού εκχυλίσματος *H. luteoalbum*
 Πίνακας Π2.8: (H7) HOk_2018, Χρωματογραφικά και φασματομετρικά δεδομένα LC-HRMS ανάλυσης μεθανολικού εκχυλίσματος *H. orientale*
 Πίνακας Π2.9: (H8) HPv_2020, Χρωματογραφικά και φασματομετρικά δεδομένα LC-HRMS ανάλυσης μεθανολικού εκχυλίσματος *H. plicatum*
 Πίνακας Π2.10: (H9) HS_2019, Χρωματογραφικά και φασματομετρικά δεδομένα LC-HRMS ανάλυσης μεθανολικού εκχυλίσματος *H. sibthorpii*

Πίνακας Π2.11: (H10) HSB_r_2016, Χρωματογραφικά και φασματομετρικά δεδομένα LC-HRMS ανάλυσης μεθανολικού εκχυλίσματος *H. stoechas* subsp. *barrelieri*

Πίνακας Π2.12: (H11) HT_2019, Χρωματογραφικά και φασματομετρικά δεδομένα LC-HRMS ανάλυσης μεθανολικού εκχυλίσματος *H. taenari*

Παράρτημα Κεφαλαίου 3

Πίνακας Π3.1: Βάρη φυτικών υλικών και αποδόσεις αιθέριων ελαίων από δείγματα των εννέα *ex situ* γονότυπων *H. amorginum* (ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ)

Παράρτημα Κεφαλαίου 4

Πίνακας Π4.1: Πίνακας με VIP μεταβολιτών

Πίνακας Π4.2: Κωδικοί 62 δειγμάτων από τους 19 *ex situ* γονότυπους *H. amorginum* (ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ)

Πίνακας Π4.3: Ημερομηνίες συλλογής δειγμάτων των 19 *ex situ* καλλιεργούμενων γονότυπων *Helichrysum amorginum* (ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ)

Πίνακας Π4.4: Χαρακτηρισμός 87 μεταβολιτών στο συνενωμένο δείγμα (QC pooled 1) που προέκυψε από τα 62 δείγματα των *stock solutions* των μεθανολικών εκχυλισμάτων

Παράρτημα Κεφαλαίου 5

Πίνακας Π5.1: Αποδόσεις και εμφάνιση ολικών εκχυλισμάτων ταξιανθιών και στελεχών *H. amorginum* 2017 από διαδοχικές εκχυλίσεις και ολικού DCM εκχυλίσματος ταξιανθιών *H. amorginum* 2020

Συντομογραφίες

Ac	acetyl	N2	nitrogen
D	dextro	p	para
EC	elemental Composition	RDBeq	ring double bond equivalent
He	helium	Rt	retention time
kV	kilovolt	sect.	secta
m/z	ion Mass over Charge		
μL , μl	microliter		
mL, ml	milliliter		
GC-MS	gas chromatography mass spectrometry		
ESI	electron spray ionization		
HCA	hierarchical cluster analysis		
HRMS	high resolution mass spectrometry		
LC-MS	liquid chromatography mass spectrometry		
NMR	nuclear magnetic resonance		
OPLS-DA	orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis		
PCA	principal component analysis		
%RSD	% relative standard deviation		
Rt	retention time		
UPLC	ultra performance liquid chromatography		
XIC	extracted-ion chromatogram		
EC	East central		
EAe	East Aegean islands		
IoI	Ionian islands		
KK	Kriti & Karpathos		
KiK	Kiklades		
NE	North East		
NAe	North Aegean Islands		
NC	North Central		
NPi	Nothern Pindos		
Pe	Peloponnisos		
SPi	Southern Pindos		
StE	Stereia Ellas		
WAe	West Aegean		

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διατριβή, που αναπτύσσεται σε πέντε κεφάλαια, επικεντρώνεται για πρώτη φορά στη μελέτη της φυτοχημείας των 11 taxa (10 είδη, 2 υποείδη) του γένους *Helichrysum* ελληνικής προέλευσης και ειδικότερα του είδους *H. amorginum*.

Στο Κεφάλαιο 1 γίνεται εισαγωγή στην οικογένεια Asteraceae και στο γένος *Helichrysum*, όπου αναφέρονται βοτανικές, φυτοχημικές, και εθνοφαρμακολογικές πληροφορίες των ειδών του γένους. Αυτές οι πληροφορίες εστιάζονται μετά στα 11 ιθαγενή είδη (έξι ενδημικά ή υπενδημικά) που φύονται στην Ελλαδική χώρα.

Ακολούθως, στο Κεφάλαιο 2 περιγράφεται η ποιοτική ανάλυση μεθανολικών εκχυλισμάτων των 11 taxa *Helichrysum* Mill. ελληνικής προέλευσης που συλλέχθηκαν από το φυσικό περιβάλλον με την τεχνική UPLC-HRMS. Περιγράφονται οι χημικές κατηγορίες των μεταβολιτών που προτείνονται με την συγκεκριμένη μεθοδολογία και γίνεται σχολιασμός για κάθε αυτοφυούς taxon ελίχρυσου.

Στο Κεφάλαιο 3 πραγματοποιείται μελέτη περίπτωσης ενός από τα 10 είδη ελληνικής προέλευσης και συγκεκριμένα του *H. amorginum*. Έγινε ποιοτική ανάλυση αιθέριων ελαίων 9 *ex situ* καλλιεργημένων γονότυπων *H. amorginum* από το Ινστιτούτο Γενετικής Βελτίωσης και Φυτογενετικών Πόρων του ΕΛΓΟ «Δήμητρα» (Θεσ/κη), με βάση την αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με αναλυτή μάζας (GC-MS). Πραγματοποιήθηκε Ιεραρχική Ανάλυση Συστάδων (HCA) και Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA) για τον εντοπισμό διαφορών/ομοιοτήτων ανάμεσα στα αιθέρια έλαια (between-groups) των 10 δειγμάτων των εννέα γονότυπων καθώς και ανάλυση κυρίων συνιστωσών στα ποσοστά (%) των 9 κυριότερων συστατικών των 10 δειγμάτων των εννέα γονότυπων.

Στο κεφάλαιο 4 πραγματοποιείται μεταβολομική ανάλυση με την τεχνική UPLC-HRMS 19 γονότυπων *H. amorginum ex situ* καλλιέργειας από το Ινστιτούτο Γενετικής Βελτίωσης και Φυτογενετικών Πόρων του ΕΛΓΟ «Δήμητρα» (Θεσ/κη). Παρασκευάστηκαν μεθανολικά εκχυλίσματα τα οποία αναλύθηκαν με την τεχνική UPLC-HRMS και εφαρμόστηκε ένα μεταβολομικό μοντέλο διάκρισης της ποιοτικής σύστασης εκχυλισμάτων με γνώμονα την ανάδειξη συγκεκριμένων μεταβολιτών – βιοδεικτών υπεύθυνων για την εποχική διακύμανση του μεταβολικού τους προφίλ.

Τέλος, στο Κεφάλαιο 5 πραγματοποιήθηκε ποιοτική ανάλυση εκχυλισμάτων με την τεχνική GC-MS, UPLC-HRMS καθώς και απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών από *in situ*, βιολογικής καλλιέργειας, φυτικό υλικό *H. amorginum* της εταιρείας ΚΟΡΡΕΣ ΦΥΣΙΚΑ ΠΡΟΙΟΝΤΑ Α.Ε. Επίσης, μελετήθηκε η ικανότητα παγίδευσης ελεύθερης ρίζας (DPPH) και αναστολής του ενζύμου τυροσινάση από εκχυλίσματα του *H. amorginum* σε *in vitro* τεστ.

ABSTRACT

The present Doctoral thesis, which is developed in 5 chapters, focuses for the first time on the phytochemical study of 11 taxa (10 species, 2 subspecies) of the genus *Helichrysum* of Greek origin and in particular the species *H. amorginum*.

Chapter 1 introduces the family Asteraceae and the genus *Helichrysum*, referring to botanical, phytochemical, ethnopharmacological information of the species of the genus. This information is then focused on the 11 Greek native taxa (six endemic or subendemic) that are found as wild-growing in Greece.

In Chapter 2, the qualitative analysis of methanolic extracts of 11 Greek taxa of *Helichrysum* Mill. sourced from the wild is described using the UPLC-HRMS technique. The chemical categories of the metabolites designated by the specific methodology are described with comments for each wild taxon.

In Chapter 3, a case study is carried out regarding one of the 10 species of Greek origin, namely *H. amorginum*. Qualitative analysis of essential oils of nine *ex situ* cultivated *H. amorginum* genotypes from the Institute of Plant Breeding and Genetic Resources, Hellenic Agricultural Organization Demeter (ELGO Dimitra), Themi - Thessaloniki was performed, based on gas chromatography coupled with mass spectrometer (GC-MS). Hierarchical Cluster Analysis (HCA) and Principal Component Analysis (PCA) were employed to identify differences/similarities between the essential oils (between-groups) among the 10 samples of the nine genotypes as well as a principal component analysis in percentages (%) of the nine main components of the 10 samples of the nine genotypes.

In Chapter 4, a metabolomic analysis is carried out using the UPLC-HRMS technique regarding 19 genotypes of *H. amorginum ex situ* cultivated at the Institute of Plant Breeding and Genetic Resources, Hellenic Agricultural Organization Demeter (ELGO Dimitra), Themi - Thessaloniki. Methanolic extracts were prepared and analyzed with the UPLC-HRMS technique and a metabolomic model was applied to distinguish the qualitative composition of extracts based on the identification of specific metabolites - biomarkers which are responsible for the seasonal variation of their metabolic profile.

Finally, in Chapter 5, a qualitative analysis of extracts was carried out using the GC-MS, UPLC-HRMS technique, as well as the isolation of secondary metabolites from organically cultivated *H. amorginum* by the company Korres Natural Products SA in its original native range in Amorgos Island. Also, the DPPH free radical scavenging activity as well as tyrosinase enzyme inhibition of *H. amorginum* extracts were studied.

ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Ο σκοπός της διατριβής είναι η συνεισφορά στην άγνωστη μέχρι τώρα φυτοχημεία των 11 ελληνικών, αυτοφυών taxa του γένους *Helichrysum* Mill. Στα μέλη αυτού του γένους που έχει παγκόσμια εξάπλωση, αποδίδονται εκτεταμένες εθνοφαρμακολογικές χρήσεις και αυτά συχνά αποτελούν πηγή δευτερογενών μεταβολιτών με αξιοσημείωτες φαρμακολογικές ιδιότητες. Με γνώμονα αυτά τα γενικά χαρακτηριστικά πραγματοποιήθηκε συλλογή και φυτοχημική ανάλυση των αυτοφυών ελληνικών taxa μέσω της οποίας εξήχθησαν ποιοτικά συμπεράσματα σχετικά με τους μη πτητικούς μεταβολίτες των εκχυλισμάτων τους.

Ειδικότερα και επιπρόσθετα, μελετήθηκε για πρώτη φορά το στενοενδημικό είδος *H. amorginum*. Συγκεκριμένα, αναλύθηκαν πτητικά συστατικά των αιθέριων ελαίων *ex situ* καλλιεργημένων γονότυπων και επιχειρήθηκε η διάκρισή τους βάσει του περιεχομένου τους σε συγκεκριμένους μεταβολίτες. Παράλληλα, αναλύθηκαν μεθανολικά εκχυλίσματα *ex situ* καλλιεργημένων γονότυπων σε διαφορετικούς μήνες ωρίμανσης, όπου μέσω ενός μεταβολομικού μοντέλου επιχειρήθηκε η διάκρισή τους ως προς την βιοσύνθεση συγκεκριμένων μεταβολιτών. Ακόμη, μελετήθηκαν ποιοτικά εκχυλίσματα αυξανόμενης πολικότητας από υπέργεια μέρη *H. amorginum* οργανικής καλλιέργειας στην Αμοργό (απ' όπου προήλθε το αυτοφύες υλικό που πολλαπλασιάστηκε και εγκλιματίστηκε σε ανθρωπογενής συνθήκες), και δημιουργήθηκαν πρωτόκολλα απομόνωσης δευτερογενών μεταβολιτών από μεθανολικά και διχλωρομεθανικά εκχυλίσματα. Όλες οι ταυτοποιημένες δομές αποτελούν πρώτες αναφορές για το είδος *H. amorginum*, ενώ ειδικότερα προτείνονται δύο νέες δομές που αποτελούν νέα φυσικά προϊόντα και ανήκουν στα ετεροδιμερή α-πυρόνης-φλορογλουσινόλης. Τέλος, μελετήθηκε σε εκχυλίσματα η ικανότητα παγίδευσης ελεύθερης ρίζας DPPH ως *in vitro* δοκιμή αξιολόγησης της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας καθώς και η ικανότητα αναστολής του ενζύμου τυροσινάση ως δοκιμή αξιολόγησης της δυννητικής προστασίας από διαταραχές μελάγχρωσης του δέρματος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Εισαγωγή στο γένος *Helichrysum* Mill.

1.1 Η οικογένεια *Asteraceae*

Η οικογένεια *Asteraceae* (*Compositae*) περιεγράφηκε πρώτη φορά από τον Γερμανό βοτανικό Paul Dietrich Giseke (1741–1796) ως *Compositae* Giseke το 1792 στη δημοσίευση *Prael. Ord. Nat. Pl.: 538* και από τον Ρώσο βοτανικό Ivan Ivanovich Martynov (Martynov) (1771–1833) ως *Asteraceae* Martynov το 1820 στη δημοσίευση *Tekhnno-Bot. Slovar: 55*. Αναφέρεται ως η πολυπληθέστερη οικογένεια αναγνωρισμένων φυτικών ειδών με 24.000-30.000 είδη σε 1600-1700 γένη από ένα σύνολο 250.000-350.000 φυτικών ειδών παγκοσμίως (Funk et al. 2009). Η οικογένεια αυτή είναι η πιο πλούσια της Ελληνικής χλωρίδας αγγειόσπερμων με 749 είδη σε 113 γένη, εμπεριέχοντας το 13% όλων των Ελληνικών ειδών (Panayotis Dimopoulos, 2013). Η οικογένεια αυτή χαρακτηρίζεται από: (α) ανθίδια (florets) διατεταγμένα σε μια ανθοθήκη με κεντρομόλα αναπτυσσόμενα ταξιανθίες κεφάλια που περιβάλλονται από βράκτια, (β) ανθίδια με συντηγμένους ανθήρες σε δακτύλιο και γύρη ωθούμενη προς τα πάνω ή προς τα κάτω από τον στύλο, και (γ) χαρακτηριστικούς μονόσπερμους καρπούς που ονομάζονται αχαινία που συχνά φέρουν πάππο (ειδικό δακτύλιο τριχών) με τη βοήθεια του οποίου ύπτανται. Υπάρχει μεγάλη διαφοροποίηση στα μέλη της οικογένειας και περιλαμβάνονται είδη ετήσια (πόες) ή πολυετή όπως πόες, θάμνοι, δέντρα (ή και επίφυτα σε τροπικές περιοχές) που ευδοκιμούν από παραθαλάσσια πεδία και δάση έως ανοιχτά πεδία μεγάλου υψομέτρου.

1.1.1 Το γένος *Helichrysum* Mill.

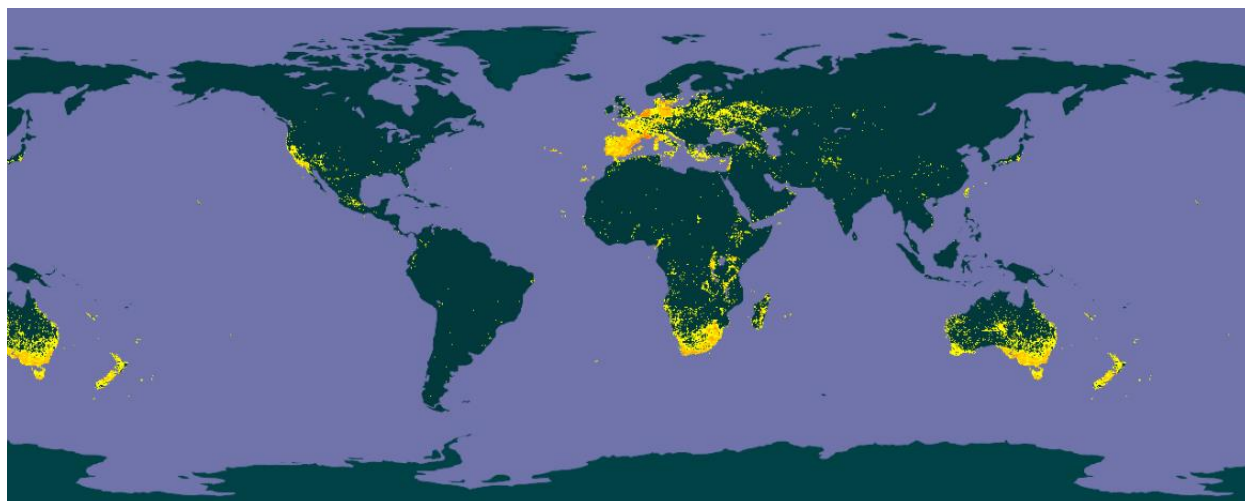
Το γένος *Helichrysum* Mill. ανήκει στην οικογένεια *Asteraceae* και η περιγραφή του σύμφωνα με το διωνυμικό σύστημα του Κάρολου Λινναίου αποδίδεται στον Σκωτσέζο βοτανικό Phillip Miller (*Gard. Dict. Abr., ed. 4: [462], 1754*). Η ετυμολογία της σύνθετης λέξης *helichrysum* (*helikhrusos*) προκύπτει από τα συνθετικά της Λατινικής λέξης *helix* (ἐλίσσω, *helisso*) ή της ελληνικής λέξης *helios* (ἥλιος) και της ελληνικής λέξης *chrūsos* (*khrosos*, *chrysos*). Η αρχαιότερη αναφορά της λέξης «ελίχρυσος» αποδίδεται στον Θεόφραστο από την Ερεσό (370-287 π.Χ.) στο έργο του «Περί φυτών ιστορίας, Ι', 19, 3», όπου περιγράφει την χρήση ενός φυτικού είδους με την ονομασία «ελειόχρυσος». Το όνομα «ελίχρυσος» αναφέρεται επίσης στο έργο του Έλληνα ποιητή Θεόκριτου (300-260 π.Χ.) «Ειδύλλια, Ι. Θυρσίς ή Ωδή, ΙΙ. Φαρμακεύτριαι» και στο έργο του αρχαίου επιστήμονα Αθηναίου από την Ναυκρατίδα (170-223 μ.Χ.) «Δειπνοσοφισταί». Η οικογένεια χαρακτηρίζεται από πόες και θάμνους συχνά καλυμμένους με λευκό στρώμα κυτταρίνης, φύλλα εναλλάξ, απλά, ολόκληρα, ταξιανθία κεφάλιο με βράκτια μικρού ως μεσαίου μεγέθους που είναι μονήρης ή συγκεντρωμένες ταξιανθίες κεφάλια σε σύνθετους κορύμβους. Η ταξιανθία κεφάλιο με πολυάριθμα βράκτια είναι κυλινδρική, καμπανοειδής έως ημισφαιρική. Τα ανθίδια είναι συχνά κίτρινα, τα εξωτερικά σωληνοειδή ανθίδια είναι συνήθως θηλυκά και τα εσωτερικά είναι

ερμαφρόδιτα, ενώ τα σπέρματα (αχαίνια) φέρουν συχνά τριχοειδή πάππο (T.G. Tutin 1976). Η ταξινόμηση του γένους *Helichrysum* Mill., σύμφωνα με τις πιο πρόσφατες ενημερώσεις της βάσης δεδομένων TICA [TICA (The International Compositae Alliance) - Global Compositae Database, Compositae Working Group (CWG) 2022]] και σύμφωνα με την τέταρτη έκδοση του συστήματος ταξινόμησης αγγειόσπερμων APG IV (The Angiosperm Phylogeny Group 1985) φαίνονται στον Πίνακα 1.1.

Πίνακας 1.1: Ταξινόμηση του γένους *Helichrysum* σύμφωνα με τη βάση δεδομένων TICA και σύστημα ταξινόμησης APG IV

TICA (GCD)		APG IV	
Kingdom:	Plantae (<i>Plants</i>)	Domain	Eukaryota
Subkingdom:	Viridiplantae (<i>Green plants</i>)	(Unranked)	Archaeplastida
Infrakingdom:	Streptophyta (<i>Land plants</i>)	Regnum:	Plantae
Phyllum division:	Tracheophyta (<i>Vascular plants</i>)	Cladus:	Angiosperms
Subphyllum (subdivision):	Spermatophytina (<i>Spermatophytes, phanerogames</i>)	Cladus:	Eudicots
Class:	Magnoliopsida (<i>Dicotyledons</i>)	Cladus:	Core eudicots
Superorder:	Asteranae	Cladus:	Superasterids
Order:	Asterales	Cladus:	Asterids
Family:	Compositae	Cladus:	Euasterids II
Subfamily:	Asteroideae	Order:	Asterales
Tribe:	Gnaphalieae	Family:	Asteraceae (<i>Aster family, sunflowers</i>)
Genus:	<i>Helichrysum</i> (<i>Straw family</i>)	Subfamily:	Asteroideae
		Tribe:	Gnaphalieae
		Genus:	<i>Helichrysum</i>

Το γένος *Helichrysum* αποτελεί ένα από τα πιο πλούσια σε μέλη και ταξινομικά δύσκολο γένος με εκτεταμένη βιογεωγραφία (Εικόνα 1.1) περιλαμβάνοντας είδη που εξαπλώνονται στην Αφρική (και Μακαρονησία, Μαγαδασκάρη), Ευρώπη, σε μεγάλο τμήμα της Ασία και τμήμα της Αυστραλίας. Τα 8 είδη ελίχρυσου της Αυστραλίας παρουσιάζουν ένα συγκεχυμένο ιστορικό ταξινόμησης καθώς μια σύγχρονη μελέτη μοριακής φυλογένεσης κατατάσσει τα είδη *H. macranthum* Benth. και *H. milliganii* Hook.f. στο γένος *Xerochrysum* Tzvelev, τα είδη *H. leucopsidium* DC. και *H. rutidolepis* DC. στο γένος *Coronidium*, το είδος *H. luteoalbum* (L.) Rchb. στο γένος *Helichrysum*, ενώ τα είδη *H. calvertianum* (F.Muell.) F.Muell., *H. oligochaetum* F.Muell. και *H. pumilum* Hook.f. να παραμένουν ταξινομικά ως μη επιλυμένες περιπτώσεις οντοτήτων (Schmidt-Lebuhr et al. 2015). Παγκοσμίως, περιγράφονται περίπου 500-600 taxa (~603 σύμφωνα με την βάση δεδομένων TICA) και η φυλογενετική ανάλυση του γένους ορίζει ως προέλευσή των μελών του γένους την περιοχή της Ν. Αφρικής (~244-250 είδη), με είδη που επεκτάθηκαν ανατολικά και δυτικά στο Βόρειο ημισφαίριο και υπέστησαν μορφολογική διαφοροποίηση σε διαφορετικά φυτογεωγραφικά περιβάλλοντα (Galbany-Casals et al. 2009).



Εικόνα 1.1: Παγκόσμια κατανομή ειδών του γένους *Helichrysum* (GBIF Secretariat (2021). Από: GBIF Backbone Taxonomy, Checklist dataset (<https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org, 2022-05-24. 2021)

Πολλά είδη του γένους παρουσιάζουν ιδιαίτερο εθνοφαρμακολογικό ενδιαφέρον, αφού χρησιμοποιούνται παραδοσιακά για την θεραπεία παθήσεων των ανθρώπινων συστημάτων όπως αναπνευστικό, γαστρεντερικό και ουροποιητικό. Μερικά από τα είδη που επισημαίνονται για τις παραδοσιακές, θεραπευτικές τους χρήσεις σε Ασία και Αφρική παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.2 (Akaberi, Sahebkar et al. 2019). Επίσης, χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν το είδος *H. stoechas* (L.) Moench subsp. *barrelieri* (Ten.) Nyman που καταναλώνεται ως αφέψημα σε μίγμα βοτάνων με την ονομασία 'Zahraa' στην Συρία με χωνευτικές ιδιότητες (Carmona et al. 2005) και τα είδη *H. odoratissimum* (L.) Sweet και *H. petiolare* Hilliard & B.L.Burtt που καταναλώνονται στην Αφρική με την ονομασία 'Imphepho' για την ανακούφιση γαστρεντερικών και αναπνευστικών παθήσεων, πυρετού και λοιμώξεων του ουροποιητικού συστήματος (Khotso Serabele et al. 2021).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Εισαγωγή στο γένος *Helichrysum* Mill.

Πίνακας 1.2: Παραδοσιακή χρήση ειδών του γένους *Helichrysum* στην Αφρική και Ασία (για πλήρη επιστημονική ονοματολογία των ειδών και υποειδών, βλέπε: <https://powo.science.kew.org/>)

<i>Helichrysum</i> spp.	Παραδοσιακή χρήση	Περιοχή	Δρόγη/Τρόπος χορήγησης
<i>H. adenocarpum</i>	Διάρροια και έμετος στα παιδιά	N. Αφρική	Ρίζα/αφέψημα
<i>H. appendiculatum</i>	Μολύνσεις αναπνευστικού συστήματος	N. Αφρική	Ωμά μασόμενα φύλλα
<i>H. appendiculatum</i>	Ευλογία	N. Αφρική	Ολόκληρο φυτό/επίδεσμος σε πληγές
<i>H. appendiculatum</i>	Ανθελμινθικό	N. Αφρική	Ολόκληρο φυτό/επίδεσμος σε πληγές
<i>H. appendiculatum</i>	Βήχας, κρυολόγημα, εξωτερικά σε πληγές	N. Αφρική	Ρίζα/επίδεσμος σε πληγές
<i>H. appendiculatum</i>	Χαλαρωτικό σώματος και μείωση πρηξίματος	N. Αφρική	Ρίζα/αλεσμένο και καμένο και αλειμμένο στο σώμα
<i>H. argyrophyllum</i>	Εντερικά προβλήματα	N. Αφρική	Ρίζα/έγχυμα
<i>H. athrixifolium</i>	Στηθόπονος	N. Αφρική	Καπνός των φύλλων
<i>H. caespititium</i>	Πονοκέφαλος	N. Αφρική	Ολόκληρο φυτό/καπνός
<i>H. caespititium</i>	Ναυτία, τονωτικό	N. Αφρική	Ρίζα/έγχυμα
<i>H. caespititium</i>	Επούλωση πληγών	N. Αφρική	Ολόκληρο φυτό/αλοιφή
<i>H. callicomum</i>	Κολικοί	N. Αφρική	Κλύσμα
<i>H. calophalum</i>	Υπερλειτουργία του κατώτερου γαστρεντερικού σωλήνα	N. Αφρική	Ρίζα
<i>H. cochleariforme</i>	Βήχας	N. Αφρική	Έγχυμα
<i>H. cochleariforme</i>	Λοιμώξεις της αναπνευστικής οδού	N. Αφρική	Ολόκληρο φυτό/έγχυμα
<i>H. conglobatum</i> subsp. <i>conglobatum</i>	Αρθρίτιδα, ρευματισμοί	Λίβανος	Αφέψημα
<i>H. cooperi</i>	Γούρι αγάπης	N. Αφρική	Φύλλα/αλοιφή
<i>H. crispum</i>	Βήχας, βρογχίτιδα, ουρολοιμώξεις και φυματίωση	N. Αφρική	
<i>H. crispum</i>	Κρυολόγημα και βήχας	N. Αφρική	Φύλλα/έγχυμα
<i>H. crispum</i>	Εμετικό και καθαρτικό	N. Αφρική	Ρίζα/εκχύλισμα
<i>H. dregeanum</i>	Κρυολόγημα	N. Αφρική	Φύλλα/καπνός
<i>H. ecklonis</i>	Διάρροια στα παιδιά	N. Αφρική	Ρίζα/αφέψημα
<i>H. faradifani</i>	Επουλωτικός και απολυμαντικός παράγοντας πληγών, απολυμαντικό, σύφιλη, διάρροια, βήχας και πονοκέφαλος	Μαγαδασκάρη	
<i>H. foetidum</i>	Μολυσμένες πληγές	N. Αφρική	Φύλλα/κατάπλασμα
<i>H. foetidum</i>	Γρίπη	N. Αφρική	Φύλλα/εκχύλισμα
<i>H. foetidum</i>	Μολυσμένα τραύματα και έρπης	N. Αφρική	Φύλλα/επίδεσμος σε πληγές
<i>H. foetidum</i>	Προβλήματα όρασης	N. Αφρική	Ρίζα/εκχύλισμα
<i>H. fulgidum</i>	Πλύσιμο των ερεθισμένων ματιών	N. Αφρική	Αφέψημα
<i>H. graveolens</i>	Έλεγχος των συμπτωμάτων του σακχαρώδη διαβήτη, επούλωση πληγών και ως διουρητικό	Τουρκία	Ταξιανθία
<i>H. kraussii</i>	Βήχας και πνευμονική φυματίωση	N. Αφρική	Ταξιανθία και σπέρματα/καπνός
<i>H. longifolium</i>	Επούλωση πληγών	N. Αφρική	Φύλλα
<i>H. miconiifolium</i>	Εντερικά παράσιτα	N. Αφρική	Αφέψημα
<i>H. miconiifolium</i>	Στηθόπονος	N. Αφρική	Ολόκληρο φυτό/αφέψημα
<i>H. nudifolium</i> var. <i>leiopodium</i>	Λοιμώξεις της αναπνευστικής οδού	N. Αφρική	Ρίζα
<i>H. nudifolium</i> var. <i>leiopodium</i>	Πονοκέφαλος	N. Αφρική	Φύλλα/εισπνοή καπνού
<i>H. nudifolium</i> var. <i>leiopodium</i>	Κολικοί παιδιών	N. Αφρική	Αφέψημα ως κλύσμα
<i>H. odoratissimum</i>	Πληγές και εγκαύματα	N. Αφρική	Φύλλα/επίδεσμος σε πληγές
<i>H. odoratissimum</i>	Πονοκέφαλος	N. Αφρική	Φύλλα/καπνός
<i>H. odoratissimum</i>	Τονωτικό για εγκύους	N. Αφρική	Φύλλα/αφέψημα
<i>H. oligocephalum</i>	Κρυολόγημα (σε συνδυασμό με άλλα βότανα)	Ιράν	Υπέργειο μέρος/σκόνη σε συνδυασμό με άλλα βότανα
<i>H. panduratum</i>	Ελονοσία	N. Αφρική	Ολόκληρο φυτό/χυμός

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Εισαγωγή στο γένος *Helichrysum* Mill.

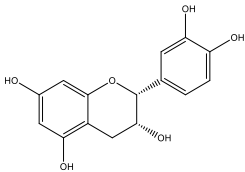
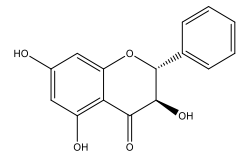
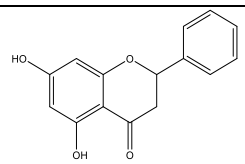
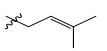
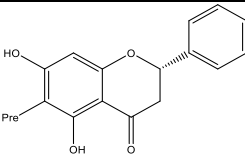
<i>H. pandurifolium</i>	Αναπνευστικές παθήσεις, πόνος στην πλάτη, καρδιακά προβλήματα, νεφρική νόσο και πέτρες στα νεφρά	N. Αφρική	Έγχυμα
<i>H. patulum</i>	Καρδιακά προβλήματα, οσφυαλγία, νεφρική νόσο, στεφανιαία θρόμβωση, παθήσεις/λοιμώξεις της ουροδόχου κύστης, άσθμα και γρίπη	N. Αφρική	Έγχυμα
<i>H. pedunculatum</i>	Αντισηπτικό	N. Αφρική	Φύλλα και ρίζα/έγχυμα
<i>H. pedunculatum</i>	Φλεγμονές και πληγές	N. Αφρική	Φύλλα
<i>H. petiolare</i>	Βήχας, κρυολόγημα, καταρροή, πονοκέφαλος, πυρετός, διαταραχές εμμήνου ρύσεως και λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος	N. Αφρική	Φύλλα/αφέψημα
<i>H. petiolare</i>	Τονωτικό ανδρών	N. Αφρική	Ρίζα/αφέψημα
<i>H. plicatum</i>	Γαστρικές και ηπατικές διαταραχές, ίκτερος, δυσουρία και πέτρες στα νεφρά	Τουρκία	Ταξιανθία /έγχυμα, αφέψημα
<i>H. plicatum</i>	Επούλωση πληγών	Τουρκία	Αφέψημα σε αλοιφή
<i>H. plicatum</i>	Αντιδιαβητικό	Τουρκία	Ταξιανθία /έγχυμα
<i>H. plicatum</i> subsp. <i>plicatum</i>	Επούλωση πληγών	Τουρκία	Ταξιανθία /αφέψημα
<i>H. plicatum</i> subsp. <i>plicatum</i>	Μολύνσεις ουροποιητικού συστήματος	Τουρκία	Υπέργειο μέρος/έγχυμα
<i>H. pallasii</i>	Μολύνσεις ουροποιητικού συστήματος	Τουρκία	Ταξιανθία /αφέψημα
<i>H. rubicundum</i>	Μολύνσεις αναπνευστικού συστήματος	Τουρκία	Υπέργειο μέρος/έγχυμα

1.1.2 Φυτοχημεία του γένους *Helichrysum* Mill.

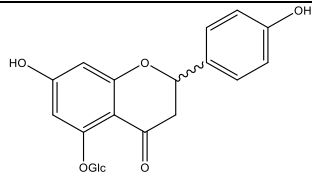
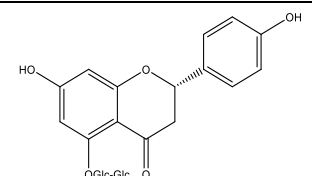
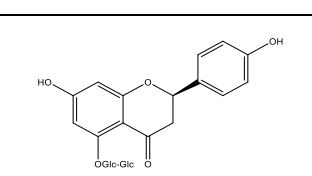
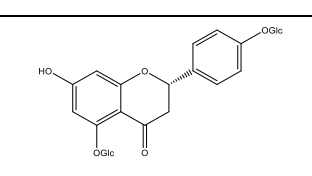
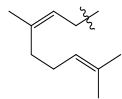
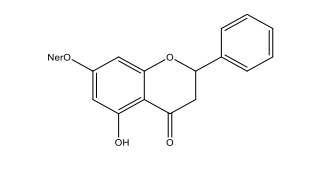
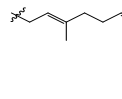
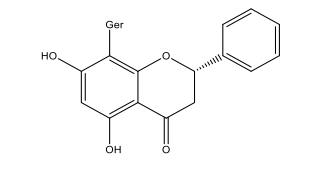
Το γένος παρουσιάζει μια μεγάλη ποικιλία διαφορετικών ομάδων δευτερογενών μεταβολιτών με δομική πολυπλοκότητα και σημαντικό βαθμό διαφοροποίησης εντός των ίδιων δομικών σκελετών λόγω της διαφορετικής χημικής υποκατάστασης. Οι κυριότεροι δευτερογενείς μεταβολίτες των μελών του γένους (Πίνακας 1.3) περιλαμβάνουν φαινολικές και οξυγονωμένες ενώσεις, ενώ αζωτούχες ενώσεις όπως για παράδειγμα τα αλκαλοειδή απουσιάζουν, τα οποία μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε: Φλαβονοειδή (**1-20**), Χαλκόνες (**21-26**), Φαινολικά οξέα και παράγωγα (**27-29**), Λιγνάνια (**30-33**), Βενζοφουράνια (**34-36**), Φθαλίδια (**37-39**), Φλορογλυκινόλες (**40-42**), Πυρόνες (**43-46**), Ετεροδιμερή πυρόνης-φλορογλυκινόλης (**47-49**), Κουμαρίνες (**50-52**), Ακετοφαινόνες (**53-56**), Τερπένια όπως Μονοτερπένια (**57**), Σεσκιτερπένια (**58-60**), Διτερπένια (**61-64**), Τριτερπένια (**65-66**) καθώς και Θειοφένια και παράγωγα (**67-70**).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Εισαγωγή στο γένος *Helichrysum* Mill.

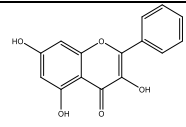
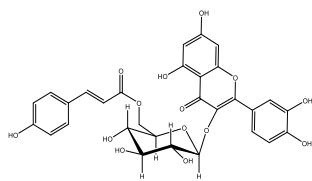
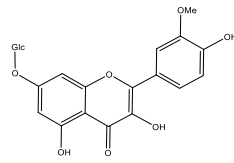
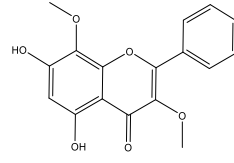
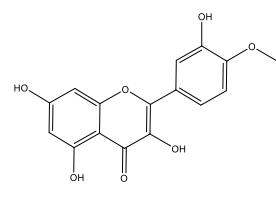
Πίνακας 1.3: Παραδείγματα δευτερογενών μεταβολιτών των μελών του γένους *Helichrysum* (για πλήρη επιστημονική ονοματολογία των ειδών και υποειδών, βλέπε: <https://powo.science.kew.org/>)

Φλαβανόλες					
Αριθμός	Τύπος υποκατάστασης ή κατηγορία	Μεταβολίτης	Δομή	<i>Helichrysum</i> spp.	Αναφορά
1	Αγλυκο φλαβανόλης	Επικατεχίνη Epicatechin		<i>H. plicatum</i> subsp. <i>pseudoplicatum</i>	(Albayrak et al. 2010)
Φλαβανονόλες					
Αριθμός	Τύπος υποκατάστασης ή κατηγορία	Μεταβολίτης	Δομή	<i>Helichrysum</i> spp.	Αναφορά
2	Αγλυκο φλαβανονόλης	Πινομπανσκίνη Pinobanksin		<i>H. stoechas</i> subsp. <i>barrelieri</i> <i>H. platypterum</i>	(Gokhan Zengin et al. 2020) (Jakupovic et al. 1986)
Φλαβανόνες					
Αριθμός	Τύπος υποκατάστασης ή κατηγορία	Μεταβολίτης	Δομή	<i>Helichrysum</i> spp.	Αναφορά
3	Αγλυκο φλαβανόνης	Πινοσεμπρίνη Pinocembrin		<i>H. stoechas</i> subsp. <i>barrelieri</i>	(Gokhan Zengin et al. 2020)
4	Prenyl- (Pre) 	Ισογλαμπρανίνη Isoglabranin (6-prenylpinocembrin)		<i>H. teretifolium</i>	(Popoola et al. 2015)

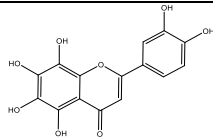
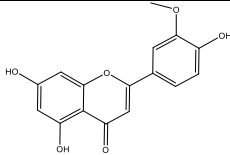
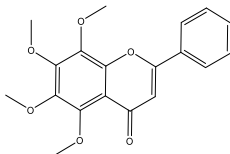
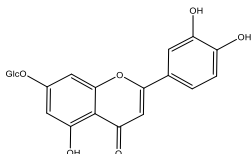
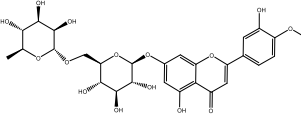
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Εισαγωγή στο γένος *Helichrysum* Mill.

5	Γλυκοζίτης φλαβονόνης Glc: γλυκόζη	Ελιχρυσίνη A, B Helichrysin (+)-A, (-)-B (Naringenin glucoside)		<i>H. arenarium</i>	(Morikawa et al. 2015)
6	Γλυκοζίτης φλαβονόνης Glc: γλυκόζη	Αρεναριουμοζίτης I Arenariumoside I ((2S)-naringenin-5-O-diglucoside)		<i>H. arenarium</i>	(Toshio Morikawa et al. 2009)
7	Διγλυκοζίτης φλαβονόνης Glc: γλυκόζη	Αρεναριουμοζίτης II Arenariumoside II ((2R)-naringenin-5-O-diglucoside)		<i>H. arenarium</i>	(Toshio Morikawa et al. 2009)
8	Διγλυκοζίτης φλαβονόνης Glc: γλυκόζη	Αρεναριουμοζίτης IV Arenariumoside IV ((2S)-naringenin-5,4'-di-O-glucoside)		<i>H. arenarium</i>	(Toshio Morikawa et al. 2009)
9	Neryl- (Ner) 	7-O-νερυλο πινοσεμπρίνη 7-O-neryl pinocembrin		<i>H. retrorsum</i>	(Michel Randriamahy et al. 1992)
10	Geranyl- (Ger) 	5,7-διυδροξυ-6-γερανυλο-φλαβανόνη 5,7-dihydroxy-6-geranyl-flavanone		<i>H. hypocephalum</i>	(Ferdinand Bohlmann 1979)

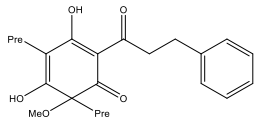
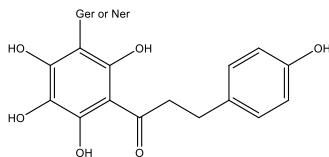
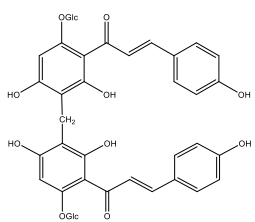
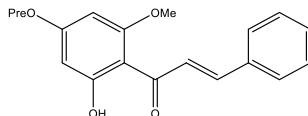
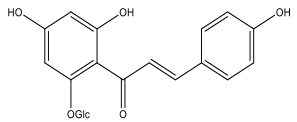
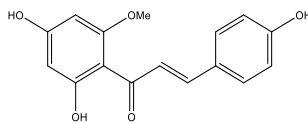
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Εισαγωγή στο γένος *Helichrysum* Mill.

Φλαβονόλες					
Αριθμός	Τύπος υποκατάστασης ή κατηγορία	Μεταβολίτης	Δομή	<i>Helichrysum</i> spp.	Αναφορά
11	Άγλυκο φλαβονόλης	Γκαλαντζίνη Galangin		<i>H. tenuifolium</i>	(Ferdinand Bohlmann 1979a)
12	Γλυκοζίτης κουμαρόνιο φλαβονόλης	Ελιχρυσοζίτης Helichrysoside (Quercetin 3-O-(6''-O-p-coumaroyl)-glucoside)		<i>H. plicatum</i>	(Bojan Vujic et al. 2020)
13	Γλυκοζίτης μεθοξυλιωμένης φλαβονόλης Me: μεθυλο Glc: γλυκόζη	Μπρασικίνη Brassicin (Isorhamnetin 7-O-β-D-glucopyranoside)		<i>H. conglobatum</i>	(Maged G. El-Ghazooly et al. 2003)
14	Άγλυκο μεθοξυλιωμένης φλαβονόλης	Γναφαλίνη Gnaphaliin		<i>H. italicum</i>	(Merikli et al. 1980)
15	Άγλυκο μεθοξυλιωμένης φλαβονόλης	4'-μεθοξυκερεσετίνη 4'-methoxyquercetin		<i>H. teretifolium</i>	(Popoola et al. 2015)
Φλαβόνες					
Αριθμός	Τύπος υποκατάστασης ή κατηγορία	Μεταβολίτης	Δομή	<i>Helichrysum</i> spp.	Αναφορά

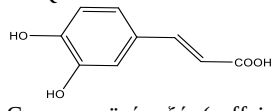
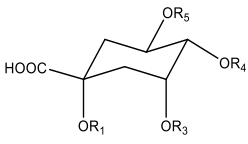
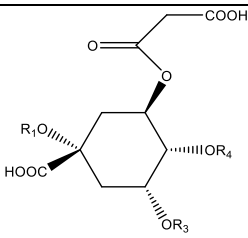
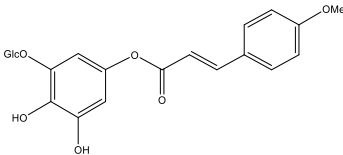
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Εισαγωγή στο γένος *Helichrysum* Mill.

16	Πολύ-υδροξυλιωμένη φλαβόνη	Μπιταλοσιδίνη Bitalosidin		<i>H. italicum</i>	(Svetolik Maksimovic et al. 2017)
17	Μεθοξυλιωμένη φλαβόνη	Χρυσοεριόλη Chrysoeriol (3'-methoxyapigenin)		<i>H. plicatum</i>	(Bojan Vujic et al. 2020)
18	Πολύ-μεθοξυλιωμένη φλαβόνη	5,6,7,8-τετραμεθοξυφλαβόνη 5,6,7,8-tetramethoxyflavone		<i>H. mundii</i>	(Ferdinand Bohlmann et al. 1980)
19	Διγλυκοζίτης φλαβόνης	Κυναροζίτης Cynaroside		<i>H. arenarium</i>	(Pljevljakušić et al. 2018)
20	Διγλυκοζίτης μεθοξυλιωμένης φλαβόνης	Διοσμίνη Diosmin (Diosmetin-7-O-rutinoside)		<i>H. arenarium</i>	(Pljevljakušić et al. 2018)

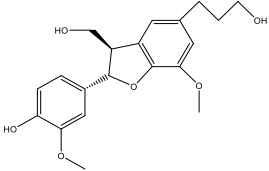
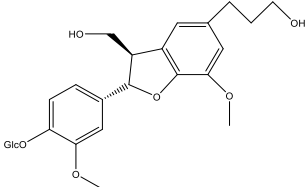
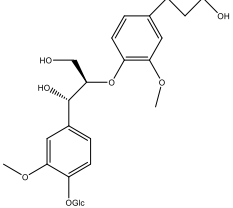
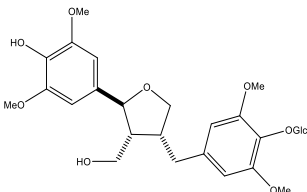
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Εισαγωγή στο γένος *Helichrysum* Mill.

Χαλκόνες					
Αριθμός	Τύπος υποκατάστασης ή κατηγορία	Μεταβολίτης	Δομή	<i>Helichrysum</i> spp.	Αναφορά
21	Πρενυλιωμένη διϋδρο-χαλκόνη	Ελιλουπολόνη Helilupolone		<i>H. tenuiculum</i>	(Bohlmann et al. 1979)
22	Ger: γεράνυλο Ner: νέρυλο	4,2',4',5',6'-πενταϋδροξυ-3'-γεράνυλο -7,8- διϋδρο-χαλκόνη 4,2',4',5',6'-πενταϋδροξυ-3'-νέρυλο -7,8- διϋδρο-χαλκόνη 4,2',4',5',6'-pentahydroxy-3'-geranyl or neryl-7,8-dihydrochalcone		<i>H. monticola</i>	(Ferdinand Bohlmann & Zdero 1980)
23	Διμερές χαλκόνης Glc: γλυκόζη	Τομοροζίτης B Tomoroside B		<i>H. zivojinii</i>	(Ivana S. Aljancic et al. 2014)
24	Πρενυλιωμένη μεθοξυ χαλκόνη	4',6'-dihydroxy-2-methoxychalcone-4'-O-(3,3'-dimethylallyl ether)		<i>H. rugulosum</i>	(Bohlmann and Misra 1984)
25	Γλυκοξυλιωμένη χαλκόνη	Ισοσαλιπουροζίτης Isosalipurposide (chalconaringenin-2'-O-β-D-glucoside)		<i>H. plicatum</i>	(Bojan Vujic et al. 2020)
26	Μεθοξυλιωμένη χαλκόνη	Ελιχρσετίνη Helichrysetin (6'-methoxy-2',4,4'-trihydroxy-chalcone)		<i>H. heterolasium</i>	(Ferdinand Bohlmann 1979b)

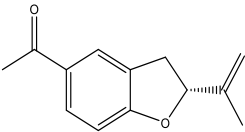
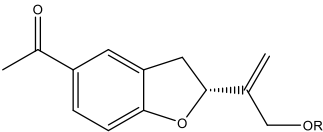
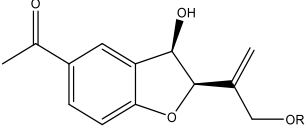
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Εισαγωγή στο γένος *Helichrysum* Mill.

Φαινολικά οξέα και παράγωγα					
Αριθμός	Τύπος υποκατάστασης ή κατηγορία	Μεταβολίτης	Δομή	<i>Helichrysum</i> spp.	Αναφορά
27	Δικαφεοϋλο κινικό οξύ Dicaffeoylquinic acid: DCQ  C = καφεϊκό οξύ (caffeic acid)	1,3-DCQ (R ₁ :C, R ₃ :C, R ₄ :H, R ₅ :H) 1,4-DCQ (R ₁ :C, R ₃ :H, R ₄ :C, R ₅ :H) 1,5-DCQ (R ₁ :C, R ₃ :H, R ₄ :H, R ₅ :C) 3,4-DCQ (R ₁ :H, R ₃ :C, R ₄ :C, R ₅ :H) 3,5-DCQ (R ₁ :H, R ₃ :C, R ₄ :H, R ₅ :C) 4,5-DCQ (R ₁ :H, R ₃ :H, R ₄ :C, R ₅ :C)		<i>H. obconicum</i>	(Sandra Gouveia 2011)
28	5-μαλύνυλο-1,3,4-τρίκαφεοϋλο κινικό οξύ 5-malonyl-1,3,4-TCQA C = καφεϊκό οξύ (caffeic acid)	R ₁ = R ₃ = R ₄ = C		<i>H. populifolium</i>	(Heino Martin Heyman et al. 2015)
29	Παράγωγο κιναμικού οξέως Glc = γλυκόζη	Καμερουνενοζίτης A Cameroonenoside A		<i>H. cameroonense</i>	(Kakam Zanetsie Antoine et al. 2011)

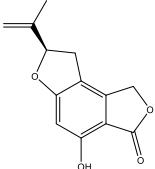
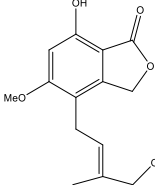
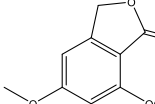
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Εισαγωγή στο γένος *Helichrysum* Mill.

Λιγνάνια					
Αριθμός	Τύπος υποκατάστασης ή κατηγορία	Μεταβολίτης	Δομή	<i>Helichrysum</i> spp.	Αναφορά
30	Νεολιγνάνιο Neolignan	Διυδροδεϋδροδικονιφερυλική αλκοόλη Dihydrodehydrodiconiferyl alcohol		<i>H. italicum</i>	(Brigida D'Abrosca et al. 2013)
31	Γλυκοζίτης νεολιγνανίου Neolignane glycoside Glc: γλυκόζη	4- <i>O</i> - β - <i>D</i> -γλυκοζίτης διυδροδεϋδροδικονιφερυλικής αλκοόλης		<i>H. arenarium</i>	(Brigida D'Abrosca et al. 2013)
32	Γλυκοζίτης οξυνεολιγνανίου Oxynelignan glycoside Glc: γλυκόζη	(7 <i>S</i> ,8 <i>R</i>)-erythro-7,9,9'-trihydroxy-3,3'-dimethoxy-8- <i>O</i> -4'-neolignan-4- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucopyranoside		<i>H. italicum</i>	(Brigida D'Abrosca et al. 2013)
33	Γλυκοζίτης λιγνανίου Glc: γλυκόζη	tortoside B		<i>H. arenarium</i>	(Toshio Morikawa et al. 2009)

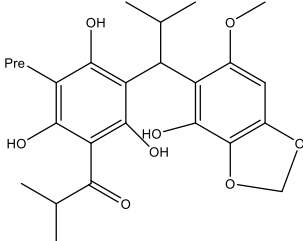
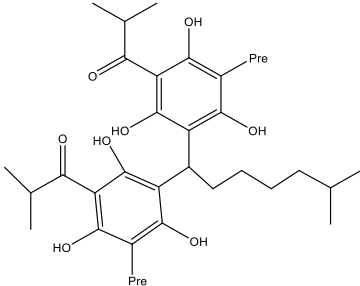
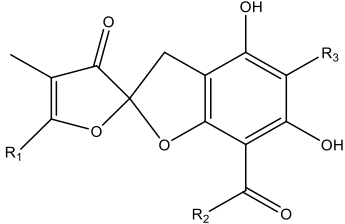
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Εισαγωγή στο γένος *Helichrysum* Mill.

Βενζοφουράνια					
Αριθμός	Τύπος υποκατάστασης ή κατηγορία	Μεταβολίτης	Δομή	<i>Helichrysum</i> spp.	Αναφορά
34	Διϋδροβενζοφουράνιο Dihydrobenzofuran	Τρεμετόνη Tremetone		<i>H. argyrophyllum</i>	(Jakupovic et al. 1989)
35	Διϋδροβενζοφουράνιο Dihydrobenzofuran R: ολεόυλο n-νονανόυλο ακέυλο προπιόνυλο ισοβουτύρυλο α-μεθυλοβουτύρυλο ισοκαπρόυλο	Μπιταλίνη Α Bitalin A		<i>H. italicum</i> subsp. <i>microphyllum</i>	(Tagliatela-Scafati et al. 2013)
36	Διϋδροβενζοφουράνιο Dihydrobenzofuran	α) Γναφαλιόλη Gnaphaliol (R: H) β) 10-ακετοξυτοξόλη 10-acetoxytolol (R: Ac)		α) <i>H. italicum</i> subsp. <i>italicum</i> β) <i>H. italicum</i>	α) (Rigano et al. 2014) β) (Merikli et al. 1980)

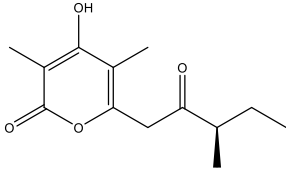
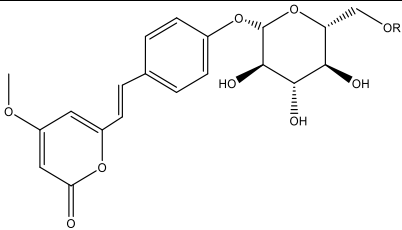
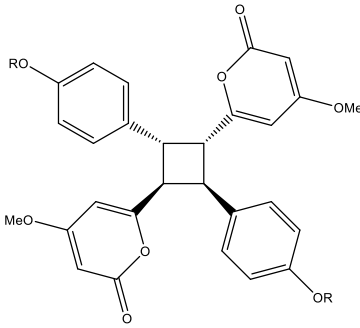
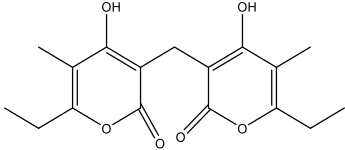
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Εισαγωγή στο γένος *Helichrysum* Mill.

Φθαλίδια					
Αριθμός	Τύπος υποκατάστασης ή κατηγορία	Μεταβολίτης	Δομή	<i>Helichrysum</i> spp.	Αναφορά
37		Πλατυπτεροφθαλίδιο Platypterothalide		<i>H. platypterum</i>	(Jakupovic et al. 1987)
38	Xyl: ξυλόζη	Αρενοφθαλίδιο A Arenophthalide A		<i>H. arenarium</i>	(Vrkoč et al. 1975)
39	Glc: γλυκόζη	Εβεργλαστοζίτης H Everlastoside H		<i>H. arenarium</i>	(Morikawa et al. 2009)

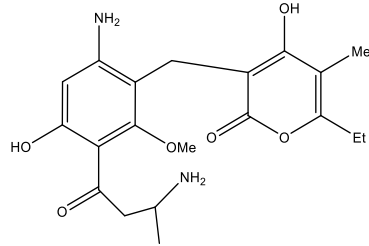
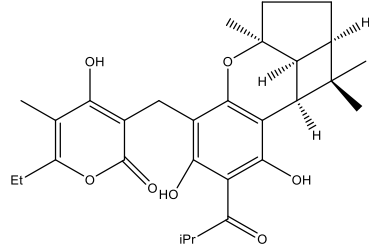
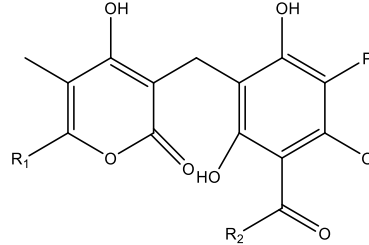
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Εισαγωγή στο γένος *Helichrysum* Mill.

Φλορογλουσινόλες					
Αριθμός	Τύπος υποκατάστασης ή κατηγορία	Μεταβολίτης	Δομή	<i>Helichrysum</i> spp.	Αναφορά
40	Pre: πρενυλο	Ελινουντιφολίνη Helinudifolin		<i>H. nudifolium</i> var. <i>nudifolium</i>	(Jakupovic et al. 1986)
41	Pre: πρενυλο	1,1-bis-[5'-(3'',3''-dimethylallyl)-(1')-1'-isobutyrylphloroglucinol-(3')]-6-methylheptane		<i>H. platypterum</i>	(Jakupovic et al. 1986)
42	Me: μεθυλο Et: αιθυλο iPr: ισοπροπυλο 2MePr: 2-μεθυλπροπυλο Pre: πρενυλο Ger: γερανυλο	Ελίσπιοκετάλες A-H Helispiroketal A-H A: (R ₁ : Me, R ₂ : Me, R ₃ : Pre) B: (R ₁ : Me, R ₂ : Et, R ₃ : Pre) C: (R ₁ : Et, R ₂ : iPr, R ₃ : Pre) D: (R ₁ : Me, R ₂ : 2MePr, R ₃ : Pre) E: (R ₁ : Me, R ₂ : iPr, R ₃ : Pre) F: (R ₁ : Et, R ₂ : Me, R ₃ : Pre) G: (R ₁ : Me, R ₂ : iPr, R ₃ : Ger) H: (R ₁ : Me, R ₂ : Me, R ₃ : Ger)		<i>H. oocephalum</i>	(Akaberi, Danton, et al. 2019)

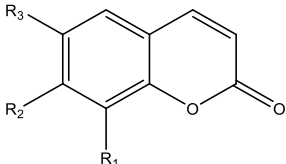
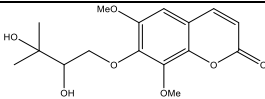
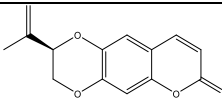
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Εισαγωγή στο γένος *Helichrysum* Mill.

Πυρόνες					
Αριθμός	Τύπος υποκατάστασης ή κατηγορία	Μεταβολίτης	Δομή	<i>Helichrysum</i> spp.	Αναφορά
43		Μικροπυρόνη Micropyrone		<i>H. italicum</i> subsp. <i>microphyllum</i>	(Appendino et al. 2007)
44	Στυρυλοπυρόνη Styrylpyrone R: 3-υδροξυ-3-μεθυλο)γλουταρυλο	Desmethylyangonine-4'-O-(6''-O-(3-hydroxy-3-methyl)glutaryl)-β-D-glucopyranoside		<i>H. italicum</i>	(Brigida D'Abrosca et al. 2013)
45	Στυρυλοπυρόνη Styrylpyrone R: β-D-glucose	Αχυροδιμερές C Achyrodimer C			(Brigida D'Abrosca et al. 2013)
46		Ελιπυρόνη A Helipyrene A			(Lutz Opitz 1970)

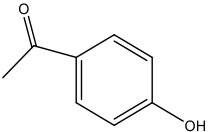
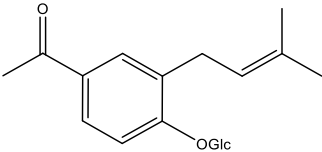
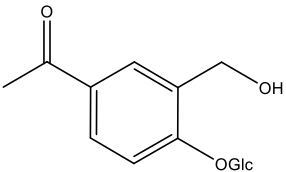
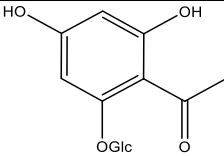
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Εισαγωγή στο γένος *Helichrysum* Mill.

Ετεροδιμερή Πυρόνης-Φλορογλουσινόλης					
Αριθμός	Τύπος υποκατάστασης ή κατηγορία	Μεταβολίτης	Δομή	<i>Helichrysum</i> spp.	Αναφορά
47	Et: αιθυλο Me: μεθυλο	Ελιχρυταλίσίνη Α Helichrytalicine A		<i>H. italicum</i>	(Brigida D'Abrosca et al. 2016)
48	iPr: ισοπροπυλο	Ελικυκλόλη Helicyclol		<i>H. oocephalum</i>	(Akaberi, Danton, et al. 2019)
49	Et: αιθυλο Me: μεθυλο iPr: ισοπροπυλο 2MePr: 2-μεθυλπροπυλο	23-methyl-6-O-desmethyllauricepyrone (R ₁ : Et, R ₂ : 2MePr) Νοραουρισεπυρόνη (R ₁ : Et, R ₂ : iPr) Norauricepyrone Αρενόλη Β (R ₁ : Me, R ₂ : iPr) Arenol B Αρενόλη C (R ₁ : Me, R ₂ : 2MePr) Arenol C		<i>H. oocephalum</i>	(Akaberi, Danton, et al. 2019)

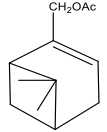
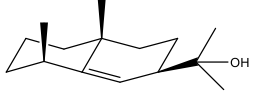
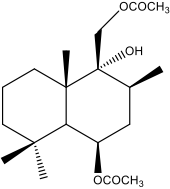
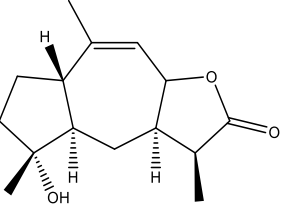
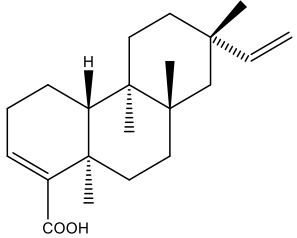
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Εισαγωγή στο γένος *Helichrysum* Mill.

Κουμαρίνες					
Αριθμός	Τύπος υποκατάστασης ή κατηγορία	Μεταβολίτης	Δομή	<i>Helichrysum</i> spp.	Αναφορά
50	α) R1: -H, R2: -OH, R3: -H β) R1: -H, R2: -OH, R3: -OH γ) R1: -H, R2: -OH, R3: -OGlc δ) R1: -H, R2: -OH, R3: -OMe ε) R1: -H, R2: -OGlc, R3: -OMe	α) Ουμπελιφερόνη Umbelliferone β) Εσκουλετίνη Esculetin γ) Εσκούλίνη Esculin δ) Σκοπολετίνη Scopoletin ε) Σκοπολίνη Scopolin		α) <i>H. arenarium</i> β) <i>H. stoechas</i> barr. γ) <i>H. stoechas</i> barr. δ) <i>H. arenarium</i> ε) <i>H. arenarium</i>	α) (A. I. Derkach et al. 1986) β) (Gokhan Zengin et al. 2020) γ) (Gokhan Zengin et al. 2020) δ) (A. I. Derkach 1986) ε) (Toshio Morikawa et al. 2009)
51		2',3'-διϋδροξυπουμπερουλίνη 2',3'-dihydroxyubерulin		<i>H. plicatum</i>	(Bojan Vujic et al. 2020)
52		Ομπλικουίνη Obliquin		<i>H. serpyllifolium</i>	(Ferdinand Bohlmann & Christa Zdero 1980)

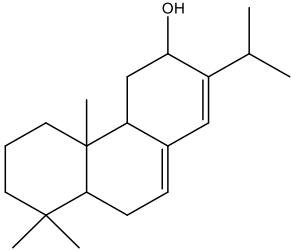
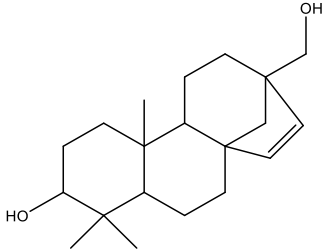
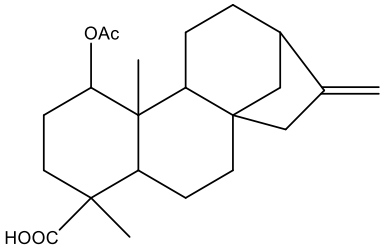
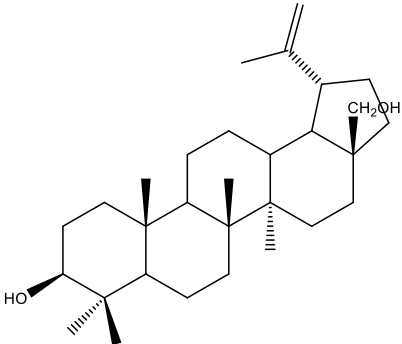
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Εισαγωγή στο γένος *Helichrysum* Mill.

Ακετοφαινόνες					
Αριθμός	Τύπος υποκατάστασης ή κατηγορία	Μεταβολίτης	Δομή	<i>Helichrysum</i> spp.	Αναφορά
53		Πισεόλη Piceol		<i>H. drakensbergense</i>	(Ferdinand Bohlmann & Abtoinnettes Uwita 1979)
54		3-(3-methyl-2-butenyl)acetophenone-4-O- α -D-glucopyranoside		<i>H. italicum</i>	(Sala et al. 2001)
55		3-(2-hydroxyethyl)acetophenone-4-O- α -D-glucopyranoside		<i>H. italicum</i>	(Sala et al. 2001)
56		Μυρσιαφαινόνη Α Myrciaphenone A		<i>H. arenarium</i>	(Pljevljakušić et al. 2018)

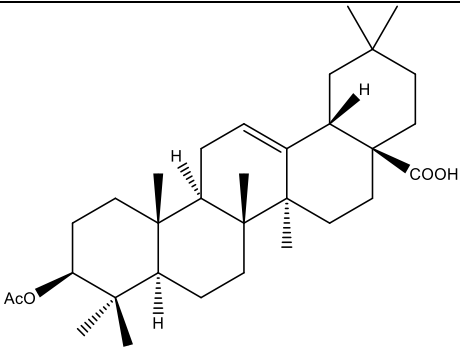
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Εισαγωγή στο γένος *Helichrysum* Mill.

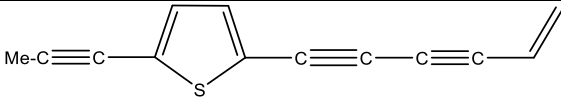
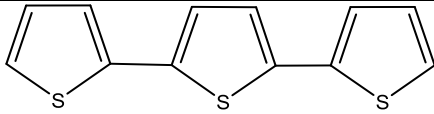
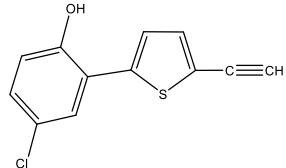
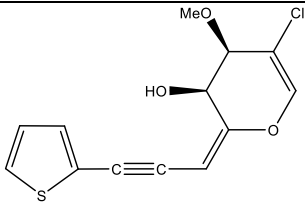
Τερπένια					
Αριθμός	Τύπος υποκατάστασης ή κατηγορία	Μεταβολίτης	Δομή	<i>Helichrysum</i> spp.	Αναφορά
57	Μονοτερπένια Ac: ακετυλο	Οξική μυρτενόλη Myrtenol acetate		<i>H. heterolasium</i>	(Ferdinand Bohlmann 1979b)
58	Σεσκιτερπένια ευδεσμανίου (eudesman sesquiterpene)	Ευδεσμ-5-εν-11-ολη Eudesm-5-en-11-ol		<i>H. italicum</i>	(Bianchini et al. 2004)
59	Σεσκιτερπένια δριμανίου (drimane sesquiterpene)	6,11-διακετυλο-9,11- διϋδροξυδριμάνιο 6,11-diacetyl-9,11- dihydroxydrimane		<i>H. italicum</i>	(Angela Mari et al. 2014)
60	Σεσκιτερπένια γουαϊανίου (guaiane sesquiterpene)	4a-hydroxy-11aH-guai-9-en- 12,8a-olide		<i>H. splendidum</i>	(Jakupovic et al. 1989)
61	Διτερπένια πιμαρανίου (pimarane sesquiterpene)	3,15-erythroxyadien-18-oic acid		<i>H. refluxum</i>	(Ferdinand Bohlmann et al. 1985)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Εισαγωγή στο γένος *Helichrysum* Mill.

62	Διτερπένια αβιετανίου (abietane sesquiterpene)	7,13-abietadien-12β-ol		<i>H. formosissimum</i>	(J. Jakupovic et al. 1990)
63	Διτερπένια σταχενίου (stachene sesquiterpene)	15-stachene-3,17-diol		<i>H. dendroideum</i>	(Lloyd & Fales 1967)
64	Διτερπένια καουρενίου (kaurene sesquiterpene)	Acetyl-16-kauren-19-oic acid		<i>H. chionosphaerum</i>	(Jakupovic et al. 1989)
65	Τριτερπένια	Μπετουλίνη Betulin		<i>H. dendroideum</i>	(Lloyd & Fales 1967)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Εισαγωγή στο γένος *Helichrysum* Mill.

66	Τριτερπένια	3-ακετυλο-28-ολεαનોϊκό οξύ 3-acetyl-28-oleananoic acid		<i>H. chrysargyrum</i>	(Ferdinand Bohlmann & Christa Zdero 1979)

Άλλες κατηγορίες					
Αριθμός	Τύπος υποκατάστασης ή κατηγορία	Μεταβολίτης	Δομή	<i>Helichrysum</i> spp.	Αναφορά
67	Θειοφένιο	2-(hexa-5-en-1,3-diyn-1-yl)-5-(prop-1-yn-1-yl)thiophene		<i>H. populifolium</i>	(Ferdinand Bohlmann et al. 1980)
68	Θειοφένιο	2,2',5',2''-terthiophene		<i>H. polycladum</i>	(Ferdinand Bohlmann et al. 1980)
69	Παράγωγο θειοφενίου	4-chloro-2-(5-ethynylthiophen-2-yl)phenol		<i>H. trilineatum</i>	(Ferdinand Bohlmann et al. 1980)
70	Παράγωγο θειοφενίου	(3S,4R,E)-5-chloro-4-methoxy-2-(3-(thiophen-2-yl)prop-2-yn-1-ylidene)-3,4-dihydro-2H-pyran-3-ol		<i>H. acutatum</i>	(Ferdinand Bohlmann et al. 1979)

1.1.3 Φαρμακολογικές δράσεις του γένους *Helichrysum*

Οι φαρμακολογικές δράσεις των ειδών του γένους έχουν μελετηθεί με πειράματα *in vivo* (**6, 7, 11, 12, 19, 21**) και *in vitro* (**1-5, 8-10, 13-18, 20, 22-24**) τόσο σε εκχυλίσματα (**1-13**) όσο και σε απομονωμένες χημικές ενώσεις (**14-24**), όπως αναφέρονται στον Πίνακα 1.4 στις δημοσιεύσεις (Akaberi, Sahebkar, et al. 2019) και (Vittoria Borgonetti et al. 2020).

Οι *in vitro* μελέτες αφορούν σε πλήθος διαφορετικών δράσεων και ιδιοτήτων όπως:

- μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του μεθανολικού εκχυλίσματος *H. foetidum* Moench. στα τεστ ABTS, DPPH, β-καροτένιου/λινολεϊκού οξέως, παγίδευσης ριζών υπεροξειδίου του υδρογόνου, ανιόντων υπεροξειδίου, υποχλωριώδους οξέος (**1**),
- μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του μεθανολικού εκχυλίσματος *H. sanguineum* (L.) Kostel. στο τεστ DPPH (**2**),
- μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του μεθανολικού εκχυλίσματος *H. teretifolium* (L.) Sweet στο τεστ αναστολής Fe (II)-induced microsomal lipid peroxidation και στην αναστολή των ενζύμων τυροσινάσης και ελαστάσης (**3**),
- μέτρηση αναστολής ακετυλοχολινεστεράσης του υδατικού εκχυλίσματος *H. stoechas* (L.) Moench. (**4**),
- δοσοεξαρτώμενη αντιπολλαπλασιαστική δράση του μεθανολικού εκχυλίσματος *H. stoechas* σε κύτταρα HeLa με την μέθοδο MTT (**5**),
- αντιμικροβιακή δράση του εκχυλίσματος διαιθυλαιθέρα του *H. italicum* (Roth) G.Don ως προς τους μικροοργανισμούς *Bacillus subtilis* και τον ιό *Herpes simplex* (**8**) και του μεθανολικού εκχυλίσματος ως προς το *Micrococcus luteus* (**9**),
- χαλαρωτική δράση του αιθανολικού εκχυλίσματος του *H. plicatum* DC. σε απομονωμένο ειλεό ποντικών (**10**),
- αντιπρωτοζωϊκή δράση του διχλωρομεθανικού εκχυλίσματος *H. ocephalum* Boiss. ως προς τον μικροοργανισμό *Leishmania donovani* (**13**),
- αντιοξειδωτική δράση των παραγώγων ακυλοφλορογλυκινόλης Helinivene A, B από το *H. palmphylicum* P.H.Davis & Kupicha (syn. *H. niveum* Boiss. & Heldr.) στα τεστ FRAP, ORAC, TEAC, Fe (II)-induced microsomal lipid peroxidation και την ικανότητα αναστολής της τυροσινάσης (**14**),
- αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη, αντι HIV δράση και ικανότητα αναστολής τυροσινάσης του ετεροδιμερούς πυρόνης-φλορογλουσινόλης αρζανόλη από το *H. italicum* subsp. *microphyllum* (Willd.) Nyman (**15**),

- αντιοξειδωτική προστασία των μεθυλοαρζανόλη, ελιτυρόνη από το *H. italicum* subsp. *microphyllum* ως προς το λινολεϊκού οξέως **(16)**,
- αναστολή της τυροσινάσης από την αρενόλη από *H. pampphylicum* **(17)**, στην αναστολή LDL οξείδωσης από την φλορογλουσινόλη 2-(2-methyl-butanoyl)-4-prenylphloroglucinol από *H. paronychioides* DC. **(18)**,
- αντι-αθηροσκληρωτική δράση των φλαβονοειδών ναρινουτίνη, ναρινγενίνη, εριοδικτυόλη, λουτεολίνη, γκαλουτεολίνη, αστραγαλίνη, καεμπφερόλη από *H. arenarium* (L.) Moench σε μοντέλο που χρησιμοποιεί αγγειακό δακτύλιο θωρακικής αορτής, όπου βρέθηκε ότι αναστέλλουν την έκφραση των vegff, CRPg, JNK2h, p38 και NO (μονοξείδιο του αζώτου) σε διαφορετικό επίπεδο, μειώνουν την έκφραση του CRP, αναστέλλουν τις κινάσες JNK2 και p38, και στη συνέχεια καταστέλλουν το μονοπάτι κινάσης (MAPK) που ενεργοποιείται με μιτοχόνδρια, το οποίο οδήγησε στη μείωση της σύνθεσης NO, της έκφρασης VEGF και της έκφραση του ενδοθηλιακού παράγοντα συγκόλλησης **(20)**,
- αντιοξειδωτική δράση (Fe (II)-induced microsomal lipid peroxidation), αναστολή τυροσινάσης και ελαστάσης των κερκετίνης, 4'-μεθοξυκερκετίνης από *H. teretifolium* **(22)**,
- αντικαρκινική δράση των 7-O-β-D-γλουκοκυρανοζίτης ναρινγενίνης, 7-O-β-D-γλουκοκυρανοζίτης απιγενίνης, 7-O-γεντιοβιοζίτης απιγενίνης, 7,4-di-O-β-D-γλουκοκυρανοζίτης απιγενίνης από *H. arenarium* μέσω αναστολής του TNF-α παράγοντα που βοηθά στην μείωση της κυτταροτοξικότητας σε καρκινικές σειρές **(23)**,
- αντικαρκινική δράση των γλυκοσιδικών διμερών χαλκόνης tomoside A και B από το *H. zivojinii* Černjavski & Soska στα NCI-H460 και NCI-H460/R κύτταρα με το tomoside A να αναστέλλει την έκφραση των topo I^α και hif-1^α και να διεγείρει την αντικαρκινική δράση της δοξορουβικίνης και με το tomoside B να αυξάνει την έκφραση του hif-1^α **(24)**.

Οι μέχρι προσφάτως *in vivo* μελέτες αφορούν σε:

- δοσοεξαρτώμενη αγχολυτική δράση του μεθανολικού εκχυλίσματος *H. stoechas* με το τεστ LDB (light-dark box) και ικανότητά αύξησης της έκφρασης του p-ERK44/42 και του εγκεφαλικού νευροτροφικού παράγοντα (BDNF) στον ιππόκαμπο **(6)**,

- αντιδιαβητική του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος *H. italicum* που βελτίωσε το μεταγευματικό γλυκαιμικό έλεγχο σε αρουραίους, αναστέλλοντας την δραστικότητα του ενζύμου α-γλυκοζιτάσης και μειώνοντας την πρόσληψη γλυκόζης **(7)**,
- νεφροπροστατευτική δράση του αιθανολικού εκχυλίσματος από *H. plicatum* subsp. *plicatum* σε ποντίκια με μείωση της νεφροτοξικότητας που προκαλείται από την γενταμικίνη, τη μείωση του αζώτου ουρίας και κρεατινίνης στο αίμα του ορού, των οξειδωτικών δεικτών ήπατος και νεφρών, της σωληνοειδούς νέκρωσης, την αύξηση των αντιοξειδωτικών ενζύμων και επιπέδων μηλοναλδεΐδης του ήπατος και των νεφρών **(11)**,
 - επουλωτική δράση του μεθανολικού εκχυλίσματος από *H. graveolens* Hilliard σε μοντέλα γραμμικών τομών και μοντέλα πληγών κυκλικής εκτομής με σημαντικές αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές δράσεις και αναστολή των αποδομητικών ενζύμων υαλουρονιδάσης και κολλαγενάσης **(12)**,
 - αντιφλεγμονώδη δράση σε ποντίκια των ακετοφαινονών 4-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl) acetophenone και 4-hydroxy-3-(2-hydroxy-3-isopentenyl) acetophenone από *H. italicum* σε μελέτη αναστολής του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέως, όπου η 4-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl) acetophenone είναι διπλός αναστολέας της κυκλοξυγενάσης και 5-λιποξυγενάσης και το 4-hydroxy-3-(2-hydroxy-3-isopentenyl) acetophenone εκλεκτικός αναστολέας της 5-λιποξυγενάσης **(19)**,
 - αντιδιαβητική δράση των aureusidin 6-*O*- β -*D*-glucopyranoside, chalconaringenin 2'-*O*- β -*D*-glucopyranoside από *H. arenarium* με αναστολή της αύξησης της γλυκόζης στο αίμα σε ποντίκια, αναστολή της ενζυματικής δράσης της διπεπτιδυλο πεπτιδάσης-IV **(21)**.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Εισαγωγή στο γένος *Helichrysum* Mill.

Πίνακας 1.4: Φαρμακολογικές δράσεις ειδών του γένους *Helichrysum* (YM: υπέργαιο μέρος, T:Ταξιανθίες με ανθίδια) (για πλήρη επιστημονική ονοματολογία των ειδών και υποειδών, βλέπε: <https://powo.science.kew.org/>)

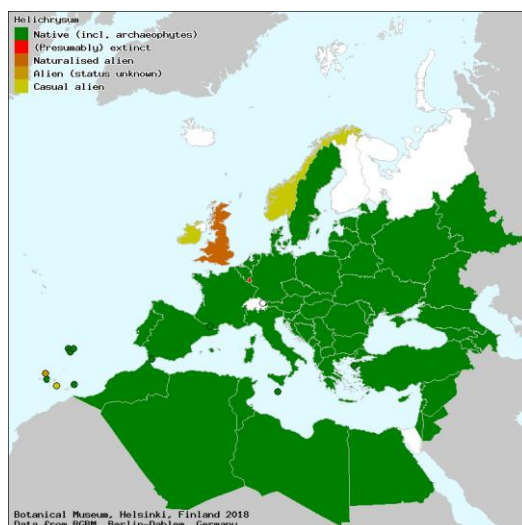
Αρ.	<i>Helichrysum</i> spp.	Χημική ένωση ή εκχύλισμα	Φυτικό όργανο	Φαρμακολογική δράση	Δοκιμή	αναφορά
1	<i>H. foetidum</i>	Μεθανολικό εκχύλισμα	YM	Αντιοξειδωτική	<i>in vitro</i>	(Akaberi, Sahebkar, et al. 2019)
2	<i>H. sanguineum</i>	Μεθανολικό εκχύλισμα	YM	Αντιοξειδωτική	<i>in vitro</i>	
3	<i>H. teretifolium</i>	Μεθανολικό εκχύλισμα	YM	Αντιοξειδωτική, αναστολή τυροσινάσης, ελαστάσης	<i>in vitro</i>	
4	<i>H. stoechas</i>	Υδατικό εκχύλισμα	YM	Αναστολή ακετυλοχολινεστεράσης	<i>in vitro</i>	
5	<i>H. stoechas</i>	Μεθανολικό εκχύλισμα	YM	Αντιπολλαπλασιαστική	<i>in vitro</i>	
6	<i>H. stoechas</i>	Μεθανολικό εκχύλισμα	YM	Αγχωλυτική	<i>in vivo</i>	(Vittoria Borgonetti et al. 2020)
7	<i>H. italicum</i>	Υδρομεθανολικό εκχύλισμα	YM	Αντιδιαβητική	<i>in vivo</i>	(Akaberi, Sahebkar, et al. 2019)
8	<i>H. italicum</i>	Εκχύλισμα διαιθυλαιθέρα	T	Αντιμικροβιακή	<i>in vitro</i>	
9	<i>H. italicum</i>	Μεθανολικό εκχύλισμα	YM	Αντιμικροβιακή	<i>in vitro</i>	
10	<i>H. plicatum</i>	Αιθανολικό εκχύλισμα	T	Χαλαρωτική δράση	<i>in vitro</i>	
11	<i>H. plicatum</i> subsp. <i>plicatum</i>	Αιθανολικό εκχύλισμα	YM	Νεφροπροστατευτική	<i>in vivo</i>	
12	<i>H. graveolens</i>	Μεθανολικό εκχύλισμα	T	Επούλωση πληγών	<i>in vivo</i>	
13	<i>H. ocephalum</i>	Διχλωρομεθανικό εκχύλισμα	YM	Αντιπρωτοζωϊκή	<i>in vitro</i>	
14	<i>H. niveum</i>	Helinivene A, B	YM	Αντιοξειδωτική, αναστολή τυροσινάσης	<i>in vitro</i>	
15	<i>H. italicum</i> subsp. <i>microphyllum</i>	Αρζανόλη	YM	Αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδης, αντι HIV, αναστολή τυροσινάσης	<i>in vitro</i>	
16	<i>H. italicum</i> subsp. <i>microphyllum</i>	Μεθυλοαρζανόλη, ελιπυρόνη	YM	Αντιοξειδωτική	<i>in vitro</i>	
17	<i>H. niveum</i>	αρενόλη	YM	Αναστολή τυροσινάσης	<i>in vitro</i>	
18	<i>H. paronychioides</i>	2-(2-methyl-butanoyl)-4-prenylphloroglucinol	YM	Αντιοξειδωτική	<i>in vitro</i>	
19	<i>H. italicum</i>	4-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)acetophenone και 4-hydroxy-3-(2-hydroxy-3-isopentenyl)acetophenone	YM	Αντιφλεγμονώδης	<i>in vivo</i>	(Akaberi, Sahebkar, et al. 2019)
20	<i>H. arenarium</i>	Naritin, naringin, eriodictyol, luteolin, galuteolin, astragalin, kaempferol	T	Αντι-αθηροσκληρωτική	<i>in vitro</i>	

21	<i>H. arenarium</i>	Aureusidin 6-O-β-D-glucopyranoside, chalconaringenin 2'-O-β-D-glucopyranoside	T	Αντιδιαβητική	<i>in vivo</i>	
22	<i>H. teretifolium</i>	quercetin, 4'-methoxyquercetin	YM	Αντιοξειδωτική, αναστολή τυροσινάσης, ελαστάσης	<i>in vitro</i>	
23	<i>H. arenarium</i>	Naringenin 7-O-β-D-glucopyranoside, apigenin 7-O-β-D-glucopyranoside, apigenin 7-O-gentiobioside, apigenin 7,4-di-O-β-D-glucopyranoside	T	Αντικαρκινική	<i>in vitro</i>	
24	<i>H. zivojinii</i>	Tomoroside A and B	YM	Αντικαρκινική	<i>in vitro</i>	

1.2 Το γένος *Helichrysum* στην Ευρώπη και Μεσόγειο

Το γένος *Helichrysum* στην Ευρώπη αντιπροσωπεύεται κυρίως από ιθαγενή (32 είδη) αλλά περιλαμβάνει και ορισμένα ξενικά είδη (π.χ. *H. petiolare* Hilliard & B.L.Burtt) που έχουν εισαχθεί από άλλες περιοχές και να έχουν εγκλιματιστεί σε περιοχές της βόρειας Ευρώπης λόγω ανθρωπογενών κυρίως παραγόντων (Εικόνα 1.2), με την ταξινόμηση κάποιων εκ από αυτά να χρήζει περαιτέρω διερεύνησης (T.G. Tutin 1976, Maggio et al. 2016). Στην Κεντρική και Βόρεια Ευρώπη επικρατεί το ιθαγενές είδος *H. arenarium*, ενώ η ομάδα των Μεσογειακών-Ασιατικών ειδών του γένους αποτελεί έναν μονοφυλετικό κλάδο που αντιπροσωπεύεται στην Μεσόγειο από περίπου 65 taxa (~35 στην Ανατολική και ~20 στην Κεντρική και Δυτική Μεσόγειο) σύμφωνα με (Maggio et al. 2016). Αξίζει να σημειωθεί ότι η Μεσογειακή λεκάνη αποτελεί ένα λίκνο βιοποικιλότητας, όπου συγκεντρώνει περίπου το 10% των αγγειόσπερμων φυτών, παγκοσμίως, σε περίπου 1,65% της γήινης επιφάνειας. Σε αυτό το επίκεντρο, όπου διάφορες ιστορικές διαδικασίες και περιβαλλοντικές συνθήκες έχουν συμβάλλει και συνεχίζουν να συμβάλλουν σε διαρκείς χλωριδικές ανακατανομές και ενεργές ειδοπλασίες, συναντώνται πολλά ενδημικά είδη ελίχρυσων (και στην Ελλάδα) καθώς και τα ευρείας εξάπλωσης taxa του συμπλέγματος *H. italicum* και taxa του *H. stoechas* (M. Galbany-Casals et al. 2011).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Εισαγωγή στο γένος *Helichrysum* Mill.



Εικόνα 1.2: Εξάπλωση μελών του γένους *Helichrysum* στην Ευρώπη, Β. Αφρική και Ανατολική Μεσόγειο. Ιθαγενή είδη εντοπίζονται σε χώρες με πράσινο χρώμα (πηγή: Euro-Mediterranean plant diversity, Euro+Med PlantBase 2022)

Είδη του γένους *Helichrysum* χρησιμοποιούνται στη λαϊκή, Ευρωπαϊκή θεραπευτική για την θεραπεία παθήσεων των ανθρώπινων συστημάτων όπως πεπτικό, ουροποιητικό, αναπνευστικό, αισθητήριων οργάνων όπως παθήσεις οφθαλμών. Μερικά από τα είδη που επισημαίνονται για τις παραδοσιακές, θεραπευτικές τους χρήσεις σε Ευρωπαϊκές χώρες παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.5 (Akaberi, Sahebkar, et al. 2019; Antunes Viegas et al. 2014).

Πίνακας 1.5: Παραδοσιακή χρήση ειδών του γένους *Helichrysum* στην Ευρώπη και Μεσόγειο (YM: υπέργαιο μέρος, T: Ταξιανθίες με ανθίδια) (για πλήρη επιστημονική ονοματολογία των ειδών και υποειδών, βλέπε: <https://powo.science.kew.org/>)

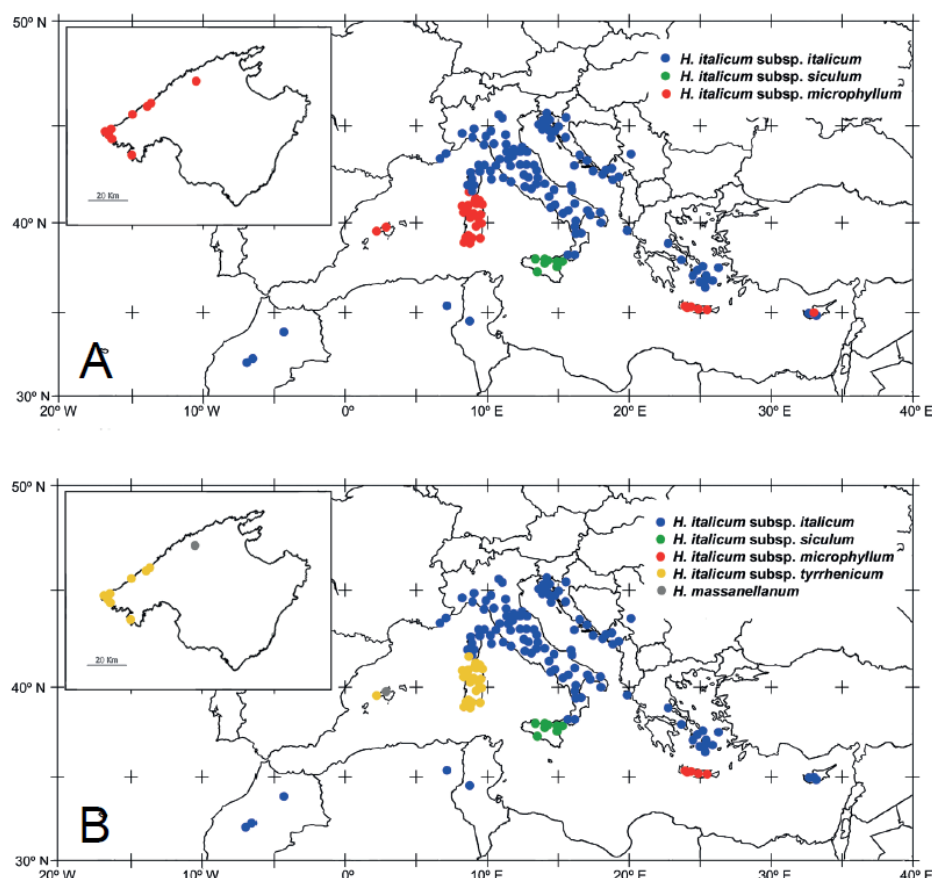
Ευρώπη				
<i>Helichrysum</i> spp.	Παραδοσιακή χρήση	Περιοχή	Δρόγη / Τρόπος χορήγησης	Αναφορά
<i>H. arenarium</i>	Χολαγωγικό, χολερετικό, ηπατοπροστατευτικό και αποτοξινωτικό	Ευρώπη	YM	(Akaberi, Sahebkar, et al. 2019)
<i>H. italicum</i>	Πεπτικές διαταραχές, καταρροή, αναλγητικό, ανθελμινθικό, αντι-οδονταλγικό, στυπτικό, αντιεμετικό, τονωτικό, αντιαλλεργικό, καθαριστικό στομάχου, αντιβηχικό, κρυολόγημα, τραχειίτιδα και λαρυγγίτιδα, δερματικές παθήσεις και στοματικό αντισηπτικό, διαταραχές του ήπατος και της χοληδόχου, αϋπνία, πονοκέφαλος, άσθμα	Ευρώπη	YM	
<i>H. italicum</i>	Χωνευτικό, αντικαταρροϊκό	Ισπανία	T/έγχυμα	(Antunes Viegas et al. 2014)
<i>H. italicum</i>	Διαταραχές ήπατος και χολή, βήχας	Βοσνία, Ερζεγοβίνη	T/έγχυμα	
<i>H. melaleucum</i>	Βρογχίτιδα, βήχας και φαρυγγίτιδα, καρδιοτονωτικό	Πορτογαλία	T και φύλλα/έγχυμα	
<i>H. obconicum</i>	Διαταραχές του στομάχου και του εντέρου	Πορτογαλία	T και φύλλα/έγχυμα	

<i>H. orientale</i>	Άσθμα και βήχας	Πορτογαλία	Τ/έγχυμα	
<i>H. stoechas</i>	Πόνος δοντιών, ουρολογικές παθήσεις και πεπτικές διαταραχές	Ισπανία	Τ/έγχυμα	
<i>H. stoechas</i>	Επιπεφυκίτιδα και οφθαλμικές λοιμώξεις, φαρυγγίτιδα και αμυγδαλίτιδα, πληγές, αιμορροΐδες, εντερικές παρασιτικές λοιμώξεις, πονόδοντος, νεφρικές διαταραχές	Ισπανία	Τ και στελέχη ως αφέψημα και αλοιφή	
<i>H. stoechas</i>	Χωνευτικό	Ισπανία	ΥΜ/έγχυμα	
<i>H. stoechas</i> <i>subsp.</i> <i>stoechas</i>	Παθήσεις όρασης	Ισπανία	Τ/έγχυμα	
<i>H. stoechas</i> <i>subsp.</i> <i>barrelieri</i>	Κοινό κρυολόγημα, αποχρεμπτικό	Ελλάδα	Τ/αφέψημα	(Evangelos Axiotis et al. 2018)
<i>H. stoechas</i> <i>subsp.</i> <i>barrelieri</i>	Αντιμικροβιακός παράγοντας για δερματικές πληγές	Ελλάδα	Αιθέριο έλαιο	

1.2.1 Το σύμπλεγμα *H. italicum* (Roth) G. Don fil. (*H. italicum* complex)

Το θερμόφιλο, Μεσογειακό είδος *H. italicum* παρουσιάζει έναν έντονο πολυμορφισμό με διαφορετικά υποείδη (Daniel Antunes Viegas et al. 2014) που κατανέμονται στην Ανατολική, Κεντρική, Δυτική Μεσόγειο (Πίνακας 1.6), και το γεγονός αυτό κάνει την ταξινόμηση των υποειδών του μια διαδικασία διαρκούς μελέτης. Στην Ευρωπαϊκή χλωρίδα (T.G. Tutin 1976) τα υποείδη του *H. italicum* αναφέρονται ως τρία: *subsp. italicum*, *subsp. microphyllum*, *subsp. serotinum* (Boiss.) P.Fourn. Σε νεότερη δημοσίευση (Galbany-Casals et al. 2006) οριοθετούνται 3 υποείδη: (α) *subsp. italicum* με γεωγραφική εξάπλωση σε Ιταλία, Κροατία, Ανατολικές ακτές Γαλλίας, Κορσική, Βοσνία-Ερζεγοβίνη, Σερβία, Μαυροβούνιο, Σλοβενία, Ελλάδα (Αιγαίο), Κύπρο, ακτές Αλγερίας, Μαρόκου, και Τυνησίας, (β) *subsp. siculum* (Jord. & Fourn.) Galbany & al. (ιθαγενές και ενδημικό της Σικελίας), (γ) *subsp. microphyllum* με γεωγραφική εξάπλωση σε Μαγιόρκα, Κορσική, Σαρδηνία, Κρήτη, και Κύπρο. Από συνδυαστικές μορφολογικές και γενετικές αναλύσεις γίνεται επίσης διάκριση δύο μορφών του *H. italicum* από Ανατολική και Δυτική Μεσόγειο (M. Galbany-Casals et al. 2011). Τέλος, σε πρόσφατη δημοσίευση (S. Herrando-Moraira et al. 2016) προτείνονται βάσει μορφολογικών χαρακτηριστικών τα παρακάτω υποείδη: (α) *subsp. italicum* με γεωγραφική εξάπλωση σε Ιταλία, Κροατία, Μεσογειακές ακτές Γαλλίας, Κορσικής, Βοσνία-Ερζεγοβίνη, Ελλάδα (κυρίως Αιγαίο), και Κύπρο, (β) *subsp. microphyllum* (ενδημικό της Κρήτης), (γ) *subsp. siculum* (ενδημικό της Σικελίας), δ) *subsp. tyrrhenicum* (Bacch., Brullo & Giusso) Herrando, J.M.Blanco, L.Sáez & Galbany (Κορσική, Σαρδηνία, Μαγιόρκα, Δραγονέρα), και περιγράφεται επιπρόσθετα (ε) το νέο είδος *H. massanellum* Herrando, J.M.Blanco, L.Sáez & Galbany που αντιπροσωπεύει διακριτούς ορεινούς πληθυσμούς της Μαγιόρκα (τοπικό ενδημικό Μαγιόρκας), οι οποίοι μέχρι προηγουμένως θεωρούνταν ως *H. italicum subsp. microphyllum*. Στην Εικόνα 1.3

παρουσιάζεται η γεωγραφική κατανομή των υποειδών του *H. italicum* σύμφωνα με τη νεότερη δημοσίευση (S. Herrando-Moraira et al.2016).



Εικόνα 1.3: Γεωγραφική κατανομή των Μεσογειακών υποειδών του *Helichrysum italicum*

Πίνακας 1.6: Γεωγραφική εξάπλωση υποειδών του *Helichrysum italicum*

Υποείδη <i>H. italicum</i>	Γεωγραφική εξάπλωση
<i>H. italicum</i> (Roth) G.Don subsp. <i>italicum</i>	Μεσόγειος
<i>H. italicum</i> (Roth) G.Don subsp. <i>microphyllum</i> (Willd.) Nyman	Βαlearίδες νήσοι, Σαρδηνία, Κορσική, Κρήτη, Κύπρος
<i>H. italicum</i> subsp. <i>picardii</i> Franco	Γαλλία, Ιταλία, Πορτογαλία, Ισπανία
<i>H. italicum</i> subsp. <i>pseudolitoreum</i> (Fiori) Bacch. & al.	Ιταλία (όρη Argentario, Gargano, Conero)
<i>H. italicum</i> subsp. <i>serotinum</i> (Boiss.) P. Fourn	Ιβηρική χερσόνησος
<i>H. italicum</i> subsp. <i>siculum</i> (Jord. & Fourr.) Galbany & al.	Σικελία

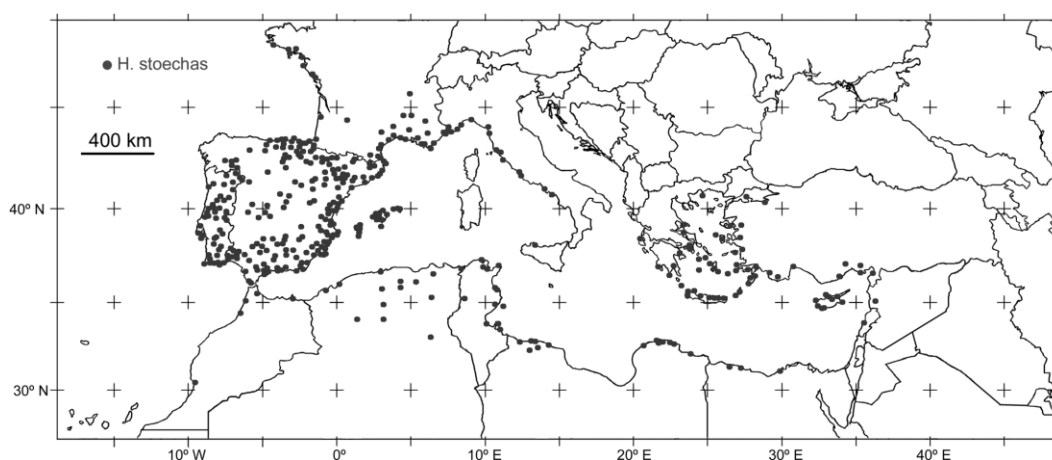
Αναφορικά με τους πτητικούς μεταβολίτες που περιέχονται στα αιθέρια έλαια από υδροαπόσταξη των δύο υποειδών *H. italicum* subsp. *microphyllum* και subsp. *italicum* που απαντούν στην Ελλάδα, αυτοί αποτελούνται κυρίως από μονο- και σεσκι- τερπένια, με σημαντική περιεκτικότητα σε β-δικετόνες (ιταλιδiónες) στο ομώνυμο υποείδος. Τυχόν διαφορές στις αποδόσεις απόσταξης, στον αριθμό και τα ποσοστά των προσδιορισμένων απομονωμένων ενώσεων είναι συνήθως συνέπεια της διαφορετικής γεωγραφικής περιοχής, των διαφορετικών συνθηκών ανάπτυξης και διαφορετικών

βιοτικών αλληλεπιδράσεων. Οι κύριες ενώσεις των παραλαμβανόμενων αιθέριων ελαίων είναι συνήθως τα μονοτερπένια α-πινένιο, λιμονένιο, νερόλη, οξικό νερύλιο και προπανοϊκό νερύλιο και τα σεσκιτερπένια α- και β-σελινένιο, αγ- και γ-κουρκουμένιο, τρανσ-β-καρυοφυλλένιο, και ευδεσμ-5-εν-11-όλη. Η χαρακτηριστική οσμή κάρυ που συνηθίζεται να έχουν είδη του γένους *Helichrysum* (carry plant, pseudocarry), έχει βρεθεί ότι οφείλεται στις ενώσεις οξικό νερύλιο, α-πινένιο, α- και β- ευδεσμόλη, προπιονικό γερανύλιο, λιμονένιο και καμφένιο όπως φάνηκε από μελέτη του αιθέριου έλαιο του *H. italicum* subsp. *italicum* (Svetolik Maksimovic et al. 2017). Σύμφωνα με την πιο πρόσφατη βιβλιογραφία, οι πιο κοινές ενώσεις που ανιχνεύονται σε πτητικά κλάσματα εκχυλισμάτων *H. italicum* από υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα είναι παρόμοιες με εκείνες που λαμβάνονται με άτμο- ή ύδρο- απόσταξη και αναφέρονται στις ενώσεις α-πινένιο, νερόλη, οξικό νερύλιο, γ-κουρκουμένιο, ισομερή προπανοϊκού νερυλίου, σεληνιένιο και ισομερή καρυοφυλλενίου, με σημαντικές περιεκτικότητες σε κήρους. Οι μη πτητικοί μεταβολίτες που έχουν απομονωθεί από το είδος *H. italicum* αφορούν κυρίως σε φαινολικές ενώσεις όπως φλαβονοειδή, ακετοφαινόνες, φλορογλουσινόλες, πυρόνες, διϋδροβενζοφουράνια (tremetones), κουμαρίνες και γλυκοσίδες αυτών, φαινολικά οξέα και παράγωγά τους καθώς επίσης και λιγνάνια, λιπίδια και τριτερπένια. Οι κυριότεροι οργανικοί διαλύτες που αναφέρονται στην βιβλιογραφία για την εκχύλιση των ενώσεων αυτών είναι η ακετόνη, μεθανόλη, αιθανόλη, χλωροφόρμιο, πετρελαϊκός αιθέρας, διχλωρομεθάνιο και διαιθυλαιθέρας (Svetolik Maksimovic et al. 2017). Τα διαφορετικά υποείδη του *H. italicum* παρουσιάζουν μια εκτεταμένη εθνοφαρμακολογική χρήση σε μορφή αφεψήματος, εγχύματος, αιθέριου ελαίου ή κονιορτοποιημένης δρόγης, κυρίως σε Μεσογειακές χώρες όπως Πορτογαλία, Ισπανία, Ιταλία, Βοσνία και Ερζεγοβίνη (Daniel Antunes Viegas et al. 2014).

1.2.2 Τα taxa του *H. stoechas* (L.) Moench

Το είδος *H. stoechas*, στο πλαίσιο της πιο πρόσφατης ταξινόμησης, περιλαμβάνει δύο κύρια υποείδη το subsp. *barrelieri* με εξάπλωση από την Σικελία έως την Αν. Μεσόγειο και το susp. *stoechas* με εξάπλωση κυρίως από τη δυτική Κροατία και προς τα δυτικά όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.4 (Galbany-Casals et al. 2006). Επιπλέον, έχουν αναφερθεί δύο ποικιλίες του *H. stoechas* subsp. *barrelieri*, οι var. *scandens* και var. *spathulatum* από το νησί της Κρήτης (Roussis et al. 2002). Σύμφωνα με Galbany-Casals et al. (2006), οι αυτοφυείς πληθυσμοί του *H. stoechas* υβριδίζουν με φυσικό τρόπο αλλά διαπιστώνεται και φαινοτυπική διαφοροποίηση λόγω διαφορετικών περιβαλλοντικών συνθηκών, με αποτέλεσμα κανένα υποείδος να μη μπορεί εύκολα να αναγνωριστεί ταξινομικά στο πλαίσιο της φαινοτυπικής μεταβλητότητας του *H. stoechas*. Ως παραδείγματα αυτής της φαινοτυπικής διαφοροποίησης αναφέρονται αρκετές διαφορετικές ποικιλίες όπως var. *caespitosum* Will. από τη μεσογειακή ακτή της

Ισπανίας, var. *argentatum* P. Palau από τις Βαλεαρίδες Νήσους, var. *maritimum* Lange από τις ακτές του Ατλαντικού της Ισπανίας και var. *psammiticum* Fiori από την ακτή της Τοσκάνης της Ιταλίας.



Εικόνα 1.4: Γεωγραφική εξάπλωση του Μεσογειακού είδους *H. stoechas* (Πηγή: Galbany-Casals et al. 2006)

Οι κύριοι πτητικοί μεταβολίτες που περιέχονται στα αιθέρια έλαια από υδροαπόσταξη των *H. stoechas* (Γαλλία), *H. stoechas* subsp. *stoechas* (Ισπανία) και από απόσταξη μεθ' υδρατμών των *H. stoechas* (Β. Λιβύη), *H. stoechas* subsp. *barrelieri* (Ελλάδα) παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.7. Σε αυτά τα τέσσερα ταχα διαφορετικής προέλευσης και έτους συγκομιδής, παρατηρείται μια παρόμοια χημική σύσταση που αποτελείται από τα μονοτερπένια α -πινένιο, λιμονένιο και τα σεσκιτερπένια β -καρυοφυλλένιο, χουμουλένιο και α -μπισαμπολόλη.

Πίνακας 1.7: Κύριοι πτητικοί μεταβολίτες που έχουν αναφερθεί σε ταχα του *Helichrysum stoechas*

Taxon	Χώρα προέλευσης	Κύριοι μεταβολίτες αιθέριου ελαίου	Μέθοδος απόσταξης	Αναφορά
<i>H. stoechas</i>	Γαλλία	α -pinene, β -caryophyllene, limonene, α -humulene	υδροαπόσταξη	(Vernin and Poite 1998)
<i>H. stoechas</i> subsp. <i>stoechas</i>	Ισπανία	α -pinene, β -caryophyllene, epi- α -bisabolol	υδροαπόσταξη	(Tsoukatou et al. 1999)
<i>H. stoechas</i>	Β. Λιβύη	α -pinene, β -caryophyllene, limonene, α -bisabolol	Μεθ' υδρατμών	(E.A. Sobhy 2007)
<i>H. stoechas</i> subsp. <i>barrelieri</i>	Ελλάδα	α -pinene, β -caryophyllene, limonene, α -humulene, caryophyllene oxide	Μεθ' υδρατμών	(Chinou et al. 1997)

Οι μη πτητικοί μεταβολίτες που έχουν απομονωθεί από το είδος *H. stoechas* αφορούν κυρίως σε φαινολικές ενώσεις όπως φλαβονοειδή, παράγωγα πυρόνης, κουμαρίνες, φαινολικά οξέα και παράγωγά τους (Gokhan Zengin et al. 2020). Τα υποείδη του *H. stoechas* παρουσιάζουν μια εκτεταμένη

εθνοφαρμακολογική χρήση σε μορφή αφεψήματος, εγχύματος, αλοιφής ή κονιορτοποιημένης δρόγης κυρίως σε Μεσογειακές χώρες όπως Πορτογαλία, Ισπανία, Βαlearίδες νήσοι (Daniel Antunes Viegas et al. 2014).

1.3 Το γένος *Helichrysum* στην Ελλάδα

Η χλωρίδα αγγειόσπερμων της Ελλάδας περιλαμβάνει 6811 taxa (5927 είδη και 2008 υποείδη, συμπεριλαμβάνονται ιθαγενή και εγκλιματισμένα φυτά), που κατανέμονται σε 1089 γένη και 184 οικογένειες (<https://portal.cybertaxonomy.org/flora-greece/content>), εκ των οποίων τουλάχιστον 22% είναι ενδημικά της χώρας (Panayotis Dimopoulos et al. 2013) (Πίνακας 1.8). Το γένος *Helichrysum* στην Ελλάδα αντιπροσωπεύεται από 11 taxa (είδη και υποείδη), εκ των οποίων 5 είναι ενδημικά της χώρας. Τα 11 taxa είναι κατηγοριοποιημένα σε τρεις ομάδες (sections) και αυτοφύονται συνολικά και στις 13 φυτογεωγραφικές περιοχές της χώρας (Πίνακας 1.9, Εικόνα 1.5). Από αυτά, το *H. stoechas* subsp. *barrelieri* εμφανίζει τη μεγαλύτερη εξάπλωση (9 φυτογεωγραφικές περιοχές), ενώ τα *H. amorginum*, *H. taenari*, *H. sibthorpii*, *H. doerfleri*, *H. heldreichii* είναι τοπικά ενδημικά είδη περιορισμένης εξάπλωσης (Panayotis Dimopoulos et al. 2013).

Πίνακας 1.8: Αριθμός Ελληνικών ενδημικών αγγειόσπερμων ειδών, υποειδών και taxa (είδη και υποείδη) για κάθε χλωριδική περιοχή της Ελλάδας (Πηγή: Panayotis Dimopoulos et al. 2013)

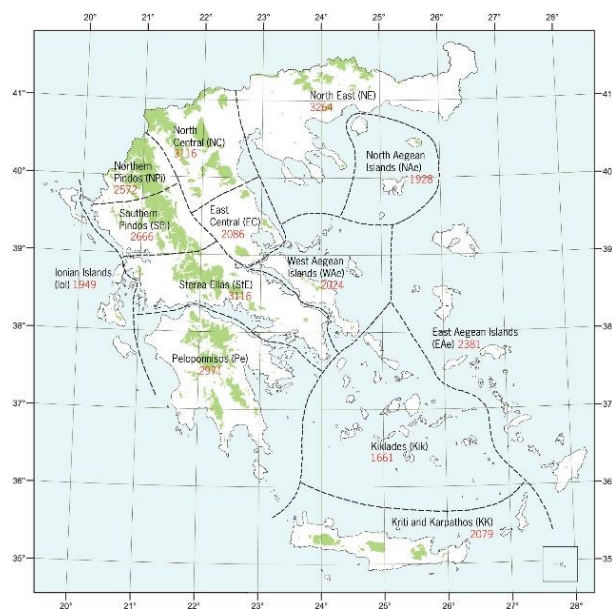
Χλωριδική περιοχή	Αριθμός ταξινομικών μονάδων		
	Είδη	Υποείδη	Taxa
NAe (Νησιά Βόρειου Αιγαίου)	57	19	57
IoI (Ιόνια Νησιά)	86	35	92
EC (Ανατολική Κεντρική)	95	34	96
NE (Βόρεια Ανατολική)	121	49	130
NPi (Βόρεια Πίνδος)	146	46	151
E Ae (Νησιά Ανατολικού Αιγαίου)	152	50	160
SPi (Νότια Πίνδος)	152	53	160
Kik (Κυκλάδες)	146	55	161
NC (Βόρεια Κεντρική)	181	71	194
WAe (Νησιά Δυτικού Αιγαίου)	192	64	202
StE (Στερεά Ελλάδα)	341	128	368
KK (Κρήτη και Κάρπαθος)	362	122	395
Pe (Πελοπόννησος)	430	151	468

Πίνακας 1.9: Γεωγραφική εξάπλωση σε φυτογεωγραφικές περιοχές της Ελλάδας (βλέπε <https://portal.cybertaxonomy.org/flora-greece/annotations>) ενδημικών και ιθαγενών taxa ελίχρυσων της Ελλάδας με επιμέρους περιοχές εξάπλωσης στην Ελλάδα από το βοτανικό μουσείο της Λούνδης (http://herbarium.emg.umu.se/standard_search.html) και Arne Strid (2016)

	Είδη και υποείδη Ελληνικών ελίχρυσων	Γεωγραφική εξάπλωση	Φυτογεωγραφική περιοχή	Ενδημισμός	Χρώμα ώριμων ταξιανθιών
1	<i>H. amorginum</i> Boiss. & Orph.	Αμοργός, Άνυδρος, Κέρος	KiK	NAI	ΛΕΥΚΟ
2	<i>H. taenari</i> Rothm.	Ακρωτήριο Μαλέας, Ακρωτήριο Ταίναρο	Pe	NAI	ΛΕΥΚΟ
3	<i>H. sibthorpii</i> Rouy	Όρος Άθως	NE	NAI	ΛΕΥΚΟ
4	<i>H. doerfleri</i> Rech. f.	Όρος Θρυπτής	KK	NAI	ΛΕΥΚΟ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Εισαγωγή στο γένος *Helichrysum* Mill.

5	<i>H. heldreichii</i> Boiss.	Φαράγγι Αράδαινας, Φαράγγι Σαμαριάς	KK	NAI	KITPINO
6	<i>H. orientale</i> (L.) Vaill.	Ελλάδα (Σκυροπούλα, Κύθηρα, Αμοργός και Κυκλάδες, Ελαφόνησος, Ρόδος, Σάμος, Λέσβος, Χίος, Ικαρία, Κάρπαθος, Κρήτη), Τουρκία, Αίγυπτος	Pe, WAe, EAe, KiK, KK	OXI	KITPINO
7	<i>H. plicatum</i> DC.	Βαρνούντας, βόρεια και νότια Πίνδος (ευρεία εξάπλωση στην Ανατολική Μεσόγειο)	NC, NPi, SPi, StE, Pe	OXI	KITPINO
8	<i>H. luteoalbum</i> (L.) Rchb.	Πρέσπες, Λίμνη Στυμφαλίας, Όρος Πατέρας, Λευκά Όρη, Ψηλορείτης (ευρεία εξάπλωση σε Ευρώπη, Αφρική, Ασία και Αυστραλία)	NE, NC, EC, NAe, StE, WAe, Pe, EAe, KK	OXI	ΛΕΥΚΟ-KOKKINO
9	<i>H. stoechas</i> subsp. <i>barrelieri</i> (Ten.) Nyman	Νησιά Αιγαίου, Πελοπόννησος, Αττική, Εύβοια, Ζάκυνθος (ευρεία εξάπλωση στην Ανατολική Μεσόγειο και την Αραβική Χερσόνησο)	IoI, StE, EC, Pe, WAe, NAe, EAe, KiK, KK	OXI	KITPINO
10	<i>H. italicum</i> (Roth.) G. Don subsp. <i>italicum</i>	Κυκλάδες, Ικαρία (ευρεία εξάπλωση στη Μεσόγειο)	IoI, EAe, KiK	OXI	KITPINO
11	<i>H. italicum</i> subsp. <i>microphyllum</i> (Willd.) Nyman	Κύριοι ορεινοί όγκοι Κρήτης, Κυκλάδες (Μήλος)	WAe, EAe, KiK, KK	OXI	KITPINO



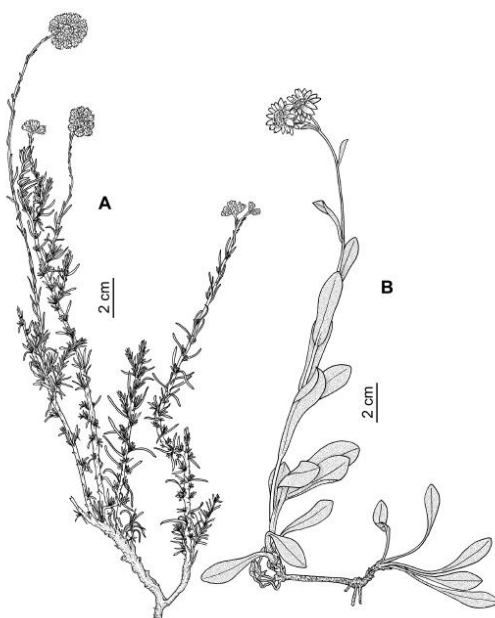
Εικόνα 1.5: Γεωγραφική κατανομή καταγεγραμμένων συνόλων ειδών σε 13 φυτογεωγραφικές περιοχές της Ελλάδας (Πηγή: Panayotis Dimopoulos et al. 2013)

Οι ομάδες κατηγοριοποίησης των ελίχρυσων κατά Clapham (1976) (Galbany-Casals et al. 2006) είναι οι *sect. Helichrysum* και *sect. Virginea* (DC.) Gren. & Godr., ενώ κατά την Ευρωπαϊκή χλωρίδα οι *sect. Helichrysum*, *sect. Virginea* και *sect. Xerochlaena* (DC.) Benthham (T.G. Tutin 1976). Σύμφωνα με νεώτερα δεδομένα (Gren & Galbany-Casals 2006), τα *H. stoechas* subsp. *barrelieri*, *H. heldreichii*, *H. italicum* subsp.

microphyllum και *H. italicum* subsp. *italicum* ανήκουν στην sect. *Stoechadina* (DC.) Gren. & Godr. Λαμβάνοντας υπόψη τις πιο πρόσφατες εργασίες (Gren & Galbany-Casals 2006, Galbany-Casals et al. 2009) η ομαδοποίηση μορφολογικής ταξινόμησης των Ελληνικών ειδών και υποειδών φαίνεται στον Πίνακα 1.10.

Πίνακας 1.10: Κατηγοριοποίηση Ελληνικών ειδών και υποειδών ελίχρυσων ανά section

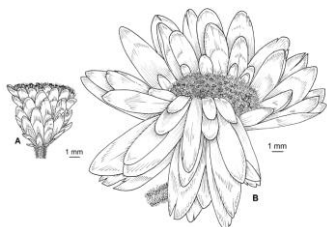
Ελληνικό είδος ή υποείδος του γένους <i>Helichrysum</i>	Section
<i>H. stoechas</i> subsp. <i>barrelieri</i>	<i>Stoechadina</i>
<i>H. italicum</i> subsp. <i>italicum</i>	<i>Stoechadina</i>
<i>H. italicum</i> subsp. <i>microphyllum</i>	<i>Stoechadina</i>
<i>H. heldreichii</i>	<i>Stoechadina</i>
<i>H. orientale</i>	<i>Helichrysum</i>
<i>H. plicatum</i>	<i>Helichrysum</i>
<i>H. luteoalbum</i>	<i>Helichrysum</i>
<i>H. amorginum</i>	<i>Virginea</i>
<i>H. taenari</i>	<i>Virginea</i>
<i>H. sibthorpii</i>	<i>Virginea</i>
<i>H. doerfleri</i>	<i>Virginea</i>



Εικόνα 1.6: Τύποι σχημάτων Μεσογειακών και Ασιατικών ελίχρυσων (Galbany-Casals et al. 2009)

Σύμφωνα με την Εικόνα 1.6 και τον Πίνακα 1.10, τα ελίχρυσια της Ελλάδας που ανήκουν στην sect. *Stoechadina* έχουν τον σχηματικό τύπο μορφής A και περιγράφονται ως θαμνώδη φυτά με καλά αναπτυγμένα στελέχη χωρίς φύλλα σε ροζέτα, ενώ αυτά που ανήκουν στις sect. *Helichrysum* και *Virginea* έχουν τον σχηματικό τύπο μορφής B και περιγράφονται ως πολυετή και ξυλώδη στην βάση φυτά τους με πώδες υπέργειο μέρος.

Όσον αφορά τον τύπο σχήματος των ταξιανθιών (Εικόνα 1.7) τα ελίχρυσια της Ελλάδας που ανήκουν στις sect. *Stoechadina* και *Helichrysum* έχουν ταξιανθίες με σχηματικό τύπο Α και περιγράφονται με μη ακτινωτά βράκτια παρόμοια σε μήκος με τα ανθίδια και εσωτερικά βράκτια που είναι μακρύτερα από τα μεσαία, ενώ αυτά που ανήκουν στη sect. *Virginea* έχουν ταξιανθίες με σχηματικό τύπο Β και περιγράφονται με ακτινωτά βράκτια που εκτείνονται πέρα από τα ανθίδια και τα οποία είναι μακρύτερα από τα εσωτερικά βράκτια. Οι ενδεικτικοί μήνες άνθισης των ελίχρυσων στην Ελλάδα παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.11.

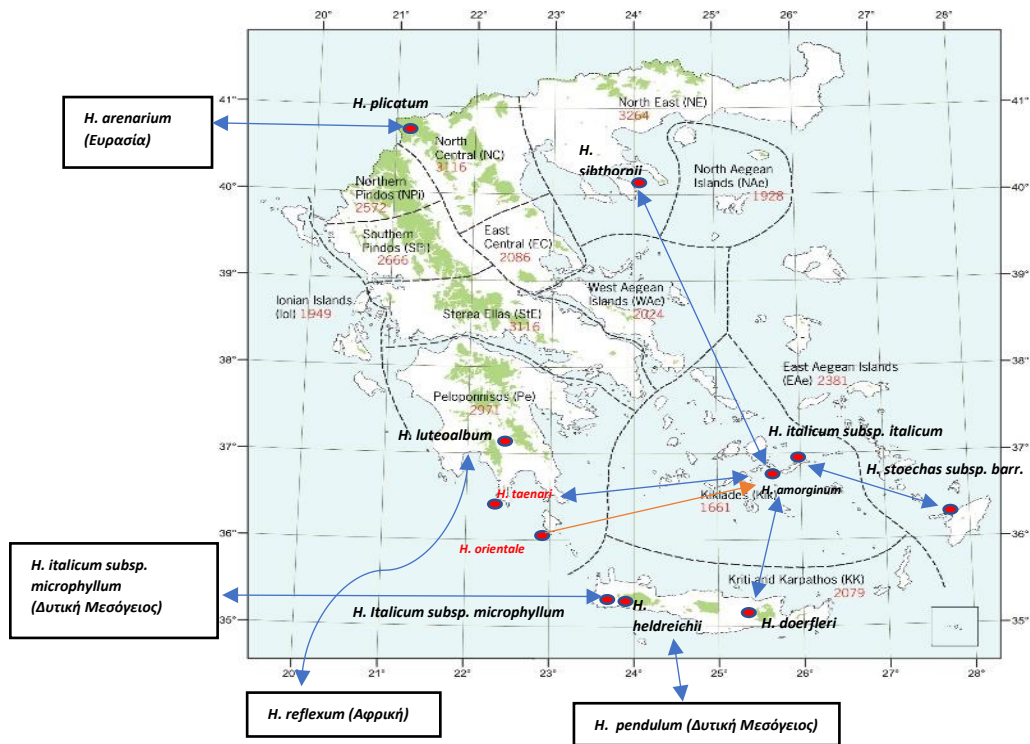


Εικόνα 1.7: Τύποι ταξιανθιών (κεφάλια) Μεσογειακών και Ασιατικών ελίχρυσων (Galbany-Casals et al. 2009)

Πίνακας 1.11: Ενδεικτικοί μήνες άνθισης των ελίχρυσων του Ελλαδικού χώρου σύμφωνα με παρατήρησή τους. Η περίοδος της άνθισης τους εξαρτάται από τις ετήσιες κλιματολογικές συνθήκες (Greek Flora 2022)

Είδη και υποείδη Ελληνικών ελίχρυσων	Ι	Φ	Μ	Α	Μ	Ι	Ι	Α	Σ	Ο	Ν	Δ
<i>H. stoechas</i> subsp. <i>barrelieri</i> (Ten.) Nyman												
<i>H. orientale</i> (L.) Vaill.												
<i>H. amorginum</i> Boiss. & Orph.												
<i>H. heldreichii</i> Boiss.												
<i>H. doerfleri</i> Rech. F.												
<i>H. sibthorpii</i> Rouy												
<i>H. plicatum</i> DC.												
<i>H. taenari</i> Rothm.												
<i>H. luteoalbum</i> (L.) Rchb.												
<i>H. italicum</i> (Roth.) G. Don subsp. <i>italicum</i>												
<i>H. italicum</i> subsp. <i>microphyllum</i> (Willd.) Nyman												

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Εισαγωγή στο γένος *Helichrysum* Mill.

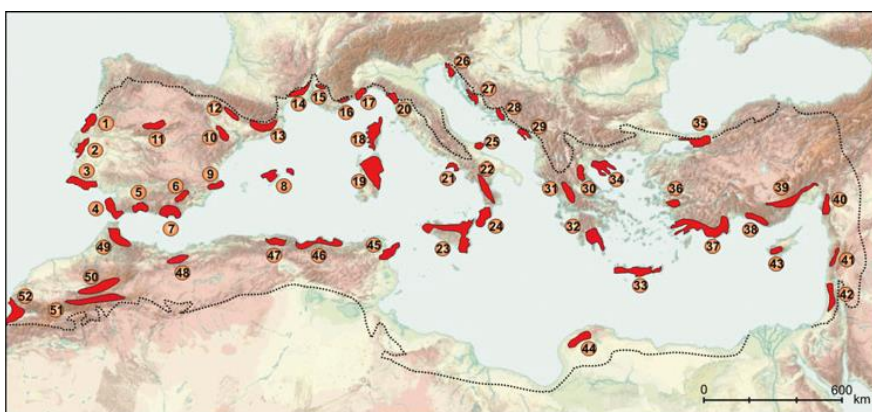


Εικόνα 1.8: Μορφολογική συγγένεια μεταξύ Ελληνικών ειδών και μεταξύ Ελληνικών ειδών και μεταξύ Ελληνικών και άλλων ειδών *Helichrysum* (Πηγή: Arne Strid 2016)

Επιπρόσθετα, στην Εικόνα 1.8 παρουσιάζονται οι μορφολογικές συγγένειες μεταξύ των Ελληνικών ειδών αλλά και μεταξύ κάποιων εξ αυτών με είδη που φύονται στην Κεντρική-Βόρεια Ευρώπη, Δυτική Μεσόγειο και Νότια Αφρική. Ταξινομικά συγγενή είδη είναι τα *H. amorginum*, *H. sibthornii*, *H. doerfleri*, *H. taenari* (Arne Strid 2016), το *H. italicum* subsp. *italicum* με το *H. stoechas* subsp. *barrelieri* (Arne Strid 2016), το *H. luteoalbum* με το Αφρικανικό είδος *H. reflexum* N.E.Br. (Arne Strid 2016), το *H. italicum* subsp. *microphyllum* με είδη της Κεντρικής Μεσογείου (Arne Strid 2016), το *H. plicatum* με το *H. arenarium* (L.) Moench. (Pljevljakušić et al. 2018), *H. heldreichii* με το *H. pendulum* (C.Presl) C.Presl (συν. *H. rupestre* Boiss.) (Arne Strid 2016).

Σύμφωνα με μελέτη της προσαρμοστικής ποικιλοτήτας και της δομής πληθυσμών του *H. italicum* στην περιοχή της Αδριατικής έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι το είδος αυτό προέρχεται από προγονικές απομονωμένες ομάδες που επιζούσαν εκεί σε μικροοικολογικά ευνοϊκά καταφύγια κατά την γεωλογική εποχή του Πλειστόκαινου (2.588.000 - 11.700 χρόνια πριν), όπου αργότερα ενωποιήθηκαν με την παρουσία ευνοϊκότερων κλιματολογικών συνθηκών (Tonka Ninčević et al. 2021). Η συγκεκριμένη υπόθεση ενισχύεται από την αναγνώριση τεσσάρων θεωρούμενων παγετωνικών καταφυγίων (Εικόνα 1.9, καταφύγια 26-29) στις Ανατολικές Αδριατικές ακτές και στις παραλιακές Δειναρικές Άλπεις από ένα

σύνολο 52 αναγνωρισμένων καταφυγίων που εντοπίζονται στη Μεσόγειο (Frederic Medail 2009). Συμπερασματικά, από την Εικόνα 1.9 θα μπορούσε να υποτεθεί ότι τα στενοενδημικά Ελληνικά είδη *H. doerfleri* και *H. heldreichii* (καταφύγιο 33 – Κρήτη), *H. taenari* (καταφύγιο 32 - Πελοπόννησος), *H. sibthorpii* (καταφύγιο 34 – Χερσόνησος Άθωνα) είναι κατάλοιπα της συγκεκριμένης γεωλογικής εποχής με σαφή γενετική και φαινοτυπική διαφοροποίηση λόγω των ιδιαίτερων γεωλογικά απομονωμένων οικοτόπων όπου και ευδοκμούν.



Εικόνα 1.9: Γεωγραφική κατανομή 52 θεωρούμενων καταφυγίων στην περιοχή της Μεσογείου (Πηγή: Frederic Medail 2009)

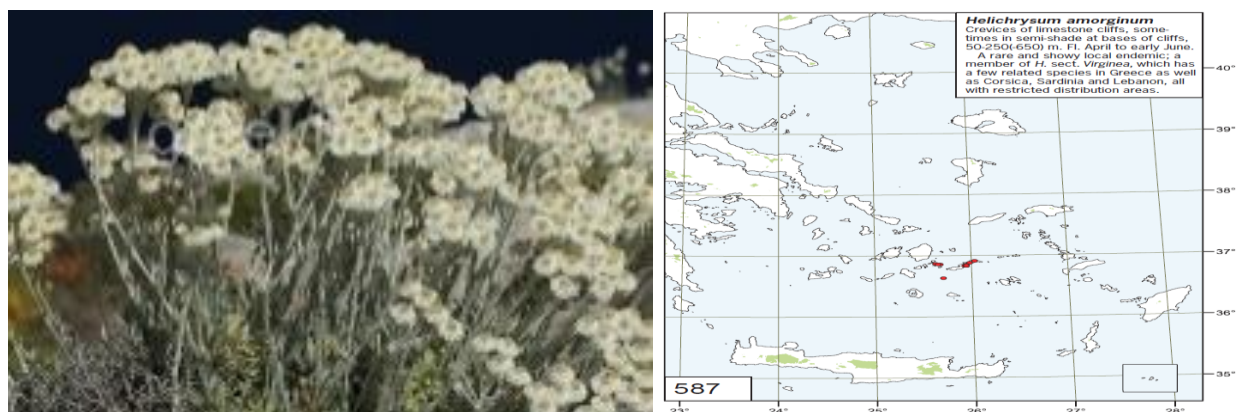
Η προστασία και διατήρηση του φυτικού κεφαλαίου της Ελληνικής χλωρίδας αποτελεί μια θεσμική θωράκιση της βιοποικιλότητας σε τοπικό αλλά και οικουμενικό πλαίσιο. Σύμφωνα με το προεδρικό διάταγμα 67/1981 τα ενδημικά είδη *H. amorginum*, *H. heldreichii*, *H. doerfleri*, *H. sibthorpii*, *H. taenari* είναι κηρυγμένα ως προστατευμένα είδη και επιπρόσθετα σύμφωνα με την οδηγία 92/43/ΕΟΚ το είδος *H. sibthorpii* βρίσκεται σε καθεστώς αυστηρής προστασίας. Η διατήρηση πολλαπλασιαστικού υλικού και η αναπαραγωγή πολλών απειλούμενων και κινδυνευόντων ειδών της Ελληνικής χλωρίδας πραγματοποιείται από το Ινστιτούτο Γενετικής Βελτίωσης και Φυτογενετικών Πόρων του ΕΛΓΟ – ΔΗΜΗΤΡΑ (Θεσ/νίκη). Στον Πίνακα 1.12 αναφέρεται η κατηγορία κινδύνου εξαφάνισης κάθε είδους και υποείδους *Helichrysum* της Ελλάδας σύμφωνα με την Διεθνή Ένωση για τη Διατήρηση της Φύσης (International Union for the Conservation of Nature, IUCN 2021).

Πίνακας 1.12: Κατηγορία κινδύνου εξαφάνισης Ελληνικών ειδών *Helichrysum* σύμφωνα με Διεθνή Ένωση για τη Διατήρηση της Φύσης (International Union for the Conservation of Nature, IUCN 2021) και εκτός τόπου διατήρησή τους

<i>Helichrysum</i> spp.	International Union for Conservation of Nature (IUCN) Κατηγορία κινδύνου εξαφάνισης	Ex situ διατήρηση
<i>H. stoechas</i> subsp. <i>barrelieri</i> (Ten.) Nyman	Δεν έχει αξιολογηθεί. (λόγω ευρείας εξάπλωσης έχει σταθερό πληθυσμό και δεν θεωρείται απειλούμενο είδος)	Διατηρείται στον οργανισμό ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ (Θεσ/νίκη)
<i>H. orientale</i> (L.) Vaill.	Δεν έχει αξιολογηθεί. (λόγω ευρείας εξάπλωσης έχει σταθερό πληθυσμό και δεν θεωρείται απειλούμενο είδος)	Διατηρείται στον οργανισμό ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ (Θεσ/νίκη)
<i>H. amorginum</i> Boiss. & Orph.	Δεν έχει αξιολογηθεί	Διατηρείται στον οργανισμό ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ (Θεσ/νίκη)
<i>H. heldreichii</i> Boiss.	Σχεδόν απειλούμενο (Near Threatened)	Διατηρείται στον οργανισμό ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ (Θεσ/νίκη)
<i>H. doerfleri</i> Rech. F.	Κινδυνεύον (Endangered)	Διατηρείται στον οργανισμό ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ (Θεσ/νίκη)
<i>H. sibthorpii</i> Rouy	Κινδυνεύον (Endangered)	Διατηρείται σε μορφή σπερμάτων στον οργανισμό ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ (Θεσ/νίκη)
<i>H. plicatum</i> DC.	Δεν έχει αξιολογηθεί	Διατηρείται στον οργανισμό ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ (Θεσ/νίκη)
<i>H. taenari</i> Rothm.	Τρωτό (Vulnerable)	Διατηρείται στον οργανισμό ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ (Θεσ/νίκη)
<i>H. luteoalbum</i> (L.) Rchb.	Δεν έχει αξιολογηθεί	-
<i>H. italicum</i> (Roth.) G. Don subsp. <i>italicum</i>	Δεν έχει αξιολογηθεί	-
<i>H. italicum</i> subsp. <i>microphyllum</i> (Willd.) Nyman	Δεν έχει αξιολογηθεί	Διατηρείται στον οργανισμό ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ (Θεσ/νίκη)

Στα ακόλουθα κείμενα παρατίθενται πληροφορίες αναφορικά με την βοτανική περιγραφή, οικολογία και γεωγραφική εξάπλωση των 11 Ελληνικών taxa *Helichrysum*. Παράλληλα, δίνονται πληροφορίες για την ιστορία και εθνοβοτανική χρήση τους στην Ελλάδα αλλά και στοιχεία δρογοχημείας και δρογοφαρμακολογίας. Η εθνοβοτανική αποτελεί έναν διεπιστημονικό κλάδο που περιλαμβάνει τη γνώση και χρήση των φυτών, αλλά και την οικολογία τους στο πλαίσιο της πολιτιστικής, κοινωνικής και οικονομικής σημασίας τους. Μελετά την αλληλεπίδραση ανθρώπων-φυτών ιστορικά και διαπολιτισμικά δηλαδή τον ρόλο των φυτών στην ανθρώπινη κουλτούρα και τις σχετικές πρακτικές που εφαρμόζονται. Παράλληλα, η εθνοφαρμακολογία εξετάζει την χρήση των φαρμακευτικών φυτών στην παραδοσιακή ιατρική των τοπικών ανθρώπινων κοινωνιών και εμπεριέχει την μελέτη του φυτοχημικού προφίλ τους, την φαρμακολογική δράση τους μέσα από κλινικές μελέτες, την ποιότητα και σύνθεσή τους, συμπεριλαμβανομένων των εμπορικών εφαρμογών τους.

1.3.1 *Helichrysum amorginum* Boiss. & Orph. (Ελίχρυσσο αμοργινό)



Εικόνα 1.10: Αριστερά: Υπέργειο μέρος *Helichrysum amorginum* (Greek Flora 2022), Δεξιά: Γεωγραφική κατανομή (Arne Strid 2016)

Δρογοετυμολογία, βοτανική περιγραφή, οικολογία και γεωγραφική εξάπλωση

Το *H. amorginum* αναφέρθηκε πρώτη φορά από τον Ελβετό βοτανικό Pierre Edmond Boissier (Swiss) το 1856 στην δημοσίευση *Diagn. Pl. Or. Nov.* 3(5): 110, και αργότερα συλλέχθηκε επίσης από τον βοτανικό Θεόδωρο Ορφανίδη το 1870 και από τον Χρήστο Λεώνη το 1898 από το νησί της Αμοργού. Το όνομα του φυτικού είδους (*amorginum*) προέρχεται από την λέξη «αμοργίς» που πιθανώς ταυτίζεται με την «Λινοκάλαμη η Αμοργαία», το οποίο χρησιμοποιούταν στην αρχαιότητα για την παρασκευή κόκκινης βαφής και την ετοιμασία των «άλικων αμοργίδων», ήτοι κόκκινοι χιτώνες της Αμοργού. Το φυτό απαντάται στην χλωριδική περιοχή *Kik* στα Βόρεια και Κεντρικά του νησιού της Αμοργού σε υψόμετρο 200-700m, στην περιοχή του μοναστηριού Χοζοβιώτισσας με νότια και νοτιοανατολική έκθεση, καθώς και στις νήσους Άνυδρος (Αμοργοπούλα) και Κέρος, με επιπλέον δείγματα μικρότερων πληθυσμών να έχουν εντοπιστεί και σε γειτονικά νησιά (Panayiotis Trigas et al. 2021). Ανθίζει το Μάρτιο-Απρίλιο (έναρξη ανθοφορίας), βρίσκεται συνήθως σε πλήρη άνθιση το Μάιο-(Ιούνιος) και έως τον Ιούλιο (τέλος ανθοφορίας) έχει ολοκληρωθεί ο σχηματισμός καρπών. Αποτελεί ένα σπάνιο ημικρυπτόφυτο, που φύεται σε σχισμές ασβεστολιθικών βράχων ως χασμόφυτο και εντοπίζεται σε μικρούς πληθυσμούς. Το φυτό περιγράφεται ως πολυετές, ημι-αποξυλωμένο στην βάση, με γκρι- ως λευκό τρίχωμα και με όρθιους βλαστούς 10-30 cm, με φύλλα αντιλογχοειδή (ως 40 mm) και ταξιανθίες κεφάλια (6-15 σε τελικό σχηματισμό κορύμβου) με περίβλημα κωδωνοειδές (10-15 mm) και ωοειδή, προμήκη, αμβλέα χαλαρά επικαλυπτόμενα βράκτια που είναι χρώματος τριανταφυλλί έως ρόδινα (στον σχηματισμό μπουμπουκιού) και λευκά στην άνθιση, και φέρουν κίτρινα ανθίδια (Burkhard Biel 2018). Αποτελεί διπλοειδή οργανισμό με αριθμό χρωμοσωμάτων $2n=28$ (Panayotis Dimopoulos, 2013).

Δρογοϊστορία και εθνοβοτανική

Το *H. amorginum* αναφέρεται ως «σταθούρι» στην κοινωνία της Αμοργού και είναι συνυφασμένο με λαογραφικά κυρίως στοιχεία όπως θρησκευτικές εξυμνήσεις (Μ. Δεσποτίδης, εφημερίδα Αμοργός, φύλλο 9, 1961) ή λογοτεχνικές αναφορές (Μ. Γ. Γεράκης, ποιητική συλλογή Ασημοστάλες).

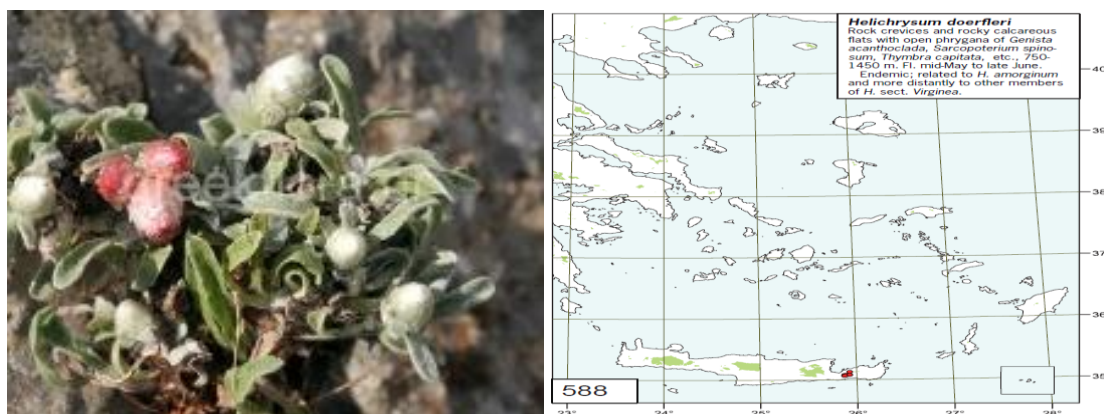
Δρογοχημεία

Η χημική σύνθεση του *H. amorginum* έχει μελετηθεί μόνο ως προς το αιθέριο έλαιο του υπέργειου μέρους (πιθανόν σε αυτοφύες υλικό) με κύριους μεταβολίτες geraniol (32,11%), geranyl acetate (20,76%), neryl acetate (17,54%) από ένα σύνολο 25 συστατικών (89,98%) με απόδοση 0,31% v/w (Chinou et al. 1996) και spathulenol (36,6%), β-pinene (12,5%) από ένα σύνολο 29 συστατικών (85%) με απόδοση 0,23% v/w (Chinou et al. 2004).

Δρογοφαρμακολογία και εθνοφαρμακολογία

Δεν υπάρχουν αναφορές εθνοφαρμακολογικής χρήσης του *H. amorginum*. Το αιθέριο έλαιο στην δημοσίευση (Chinou et al. 1996) βρέθηκε να επιδεικνύει σημαντική αντιβακτηριδιακή δράση (MIC mg/ml) στους μικροοργανισμούς *Staphylococcus aureus* (0,75), *S. epidermidis* (0,75), *Pseudomonas aeruginosa* (1,25), *Klebsiella pneumoniae* (1,25), *Enterobacter cloacae* (1,25), *E. coli* (7,5) και στην δημοσίευση (Chinou et al. 2004) σημαντική δράση (MIC 0,75-7,5 mg/ml) στους ίδιους μικροοργανισμούς αλλά ήταν ανενεργό στους μύκητες *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *Torulopsis glabrata*.

1.3.2 *Helichrysum doerfleri* Rech. f. (Ελίχρυσο του Ντοέρφλερ)



Εικόνα 1.11: Αριστερά: Υπέργειο μέρος *Helichrysum doerfleri* (Greek Flora 2022), Δεξιά: Γεωγραφική κατανομή (Arne Strid 2016)

Δρογοετυμολογία, βοτανική περιγραφή, οικολογία και γεωγραφική εξάπλωση

Το *H. doerfleri* αναφέρθηκε πρώτη φορά από τον Αυστριακό βοτανικό Karl Heinz Rechinger το 1934 στην δημοσίευση *Magyar Bot. Lapok* 33: 15 και συλλέχθηκε στην Κρήτη από την κορυφή Αφέντης (Καβούσι Λασιθίου - όρος Θρυπτής). Κατά καιρούς έχει εντοπιστεί και συλλεγεί από διάφορους βοτανικούς. Το επίθετο του φυτικού είδους (*doerfleri*) προέρχεται από το επίθετο του Αυστριακού βοτανικού Ignaz Dörfler (1866 – 1950) και απαντάται στην χλωριδική περιοχή ΚΚ και ειδικά στο ΒΑ του Ν. Λασιθίου στις κορυφές Αφέντη Καβούσι και Κλήρος της Θρυπτής σε υψόμετρο 800-1400 m (τοπικό ενδημικό Κρήτης). Η ανθοφορία του διαρκεί μεταξύ Μαΐου-Ιουνίου και φύεται σε ασβεστολιθικά, βραχώδη εδάφη σε ανοικτές περιοχές σε σχισμές βράχων ή κάτω από ακανθώδεις θάμνους με συνοδά είδη τα *Daphne oleoides* Schreb., *Rhamnus lycioides* L. και *Thymus capitata* (L.) Cav. Αποτελεί ένα σπάνιο, τοπικό ενδημικό ημικρυπτόφυτο που εντοπίζεται σε μικρούς πληθυσμούς και ανήκει στα κινδυνεύοντα (ΕΝ) είδη της Ελληνικής χλωρίδας. Το φυτό περιγράφεται ως νανώδης θάμνος με πυκνούς βλαστούς και ρόδακες φύλλων, ανθικά στελέχη (ως 8cm) με λευκό τρίχωμα, φύλλα ρόδακα που είναι γραμμοειδή-σπατουλοειδή και λευκοπράσινα, με πολυάριθμα και αντιλογχοειδή-σπατουλοειδή φύλλα βλαστού. Τα κεφάλια (ταξιανθίες) είναι πεπλατυσμένα, σφαιρικά, με πολυάριθμα, στιλπνά, υπόλευκα, μεμβρανώδη βράκτια (εξωτερικά ωοειδή, εσωτερικά λογχοειδή) και τα ανθίδια είναι κίτρινα, νηματοειδή-σωληνοειδή και τα αχάινια καστανά, περίπου 1 mm με μικρά λευκωπά στίγματα και λευκές τρίχες πάππου. Αποτελεί διπλοειδή οργανισμό με αριθμό χρωμοσωμάτων $2n=28$, και είναι μορφολογικά και ταξινομικά συγγενές με το *H. sibthorpii* (Όρος Άθως). Έχει περίοδο ανθοφορίας από Μάιο μέχρι Ιούνιο (Panayotis Dimopoulos et al. 2013; Φοίτος et al. 2009; Arne Strid 2016).

Δρογοϊστορία και εθνοβοτανική

Λόγω της σπανιότητας του *H. doerfleri*, δεν υπάρχουν ιστορικές ή εθνοβοτανικές αναφορές για την χρήση του.

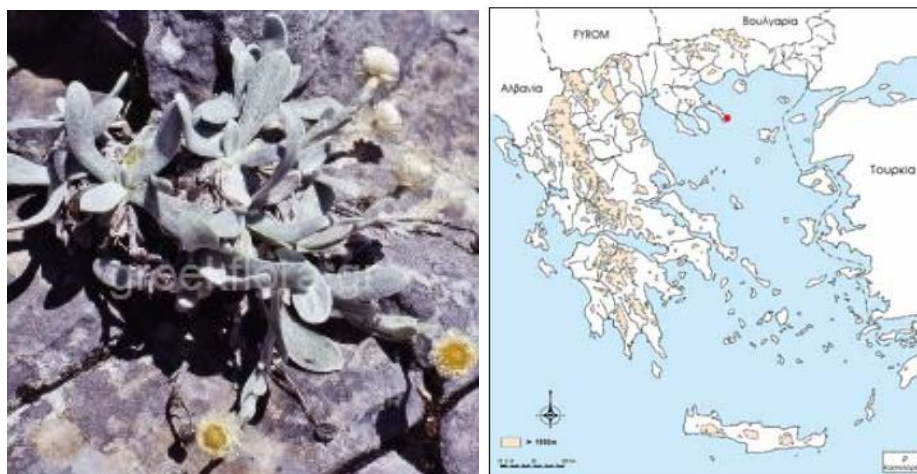
Δρογοχημεία

Η χημική σύνθεση του *H. doerfleri* έχει μελετηθεί μόνο ως προς το αιθέριο έλαιο του υπέργειου μέρους άγριας συλλογής με κύριους μεταβολίτες πριν και κατά την άνθιση τα α-, β-, γ-, δ- και ερι-γ-eudesmol με απόδοση αιθέριου ελαίου 0,003 και 0,022%, αντίστοιχα. Επίσης, ανιχνεύθηκαν οι στερόλες 3β-22E-stigmasta-5,22-dienol, 3β-24S-stigmast-5-enol και βιταμίνη Ε. Τέλος, κατά την διάρκεια της άνθισης παρατηρήθηκε δραματική αύξηση του ποσοστού σε καρβακρόλη (Roussis et al. 2000).

Δρογοφαρμακολογία και εθνοφαρμακολογία

Δεν υπάρχουν αναφορές εθνοφαρμακολογικής χρήσης του *H. doerfleri*. Πειράματα βακτηριοστατικής δράσης του αιθέριου ελαίου δεν έδειξαν δράση (Roussis et al. 2000).

1.3.3 *Helichrysum sibthorpii* Rouy (Ελίχρυσο του Σίμπθορπ)



Εικόνα 1.12: Αριστερά: Υπέργειο μέρος *Helichrysum sibthorpii* (Greek Flora 2022), Δεξιά: Γεωγραφική κατανομή (από: Φοίτος et al. 2009)

Δρογοετυμολογία, βοτανική περιγραφή, οικολογία και γεωγραφική εξάπλωση

Το *H. sibthorpii* αναφέρθηκε πρώτη φορά από τον Γάλλο βοτανικό Georges Rouy (1851-1924) το 1900 στην δημοσίευση *Pl. Eur. Rar. 13: 103* και συλλέχθηκε από την κορυφή του όρους Άθως στην χερσόνησο του Αγίου Όρους. Το επίθετο του φυτικού είδους (*sibthorpii*) προέρχεται από τον Άγγλο βοτανικό John Sibthorp (1758 – 1796). Φύεται στην χλωριδική περιοχή NE, αποκλειστικά και μόνο στην κορυφή και απόκρημνες πλαγιές του όρους Άθως σε υψόμετρο 1840-2023m, σε σχισμές ασβεστολιθικών βράχων σε νότιες, νοτιοδυτικές και δυτικές εκθέσεις με συνοδά είδη όπως *Aethionema orbiculatum* (Boiss.) Hayek και *Silene orphanidis* Boiss. (τοπικά ενδημικά επίσης), *Arabis bryoides* Boiss., *Asperula suberosa* Guss., *Draba lasiocarpa* Rochel subsp. *lasiocarpa* και σε ανατολικές εκθέσεις με τα είδη *Draba lasiocarpa* και *Potentilla speciosa* Willd. subsp. *speciosa*. Αποτελεί ένα σπάνιο, τοπικό ενδημικό ημικρυπτόφυτο που εντοπίζεται ως χασμόφυτο σε μικρούς πληθυσμούς και ανήκει στα κινδυνεύοντα (EN) είδη της Ελληνικής χλωρίδας. Το φυτό περιγράφεται ως πολυετές με σκουρόχρωμα περιβλήματα στην βάση του, έχει φύλλα βάσης ελλειψοειδή ως λογχοειδή που σχηματίζουν ρόδακες και ανθοφόρα στελέχη μήκους 5-17cm με κεφάλια (ταξιανθίες) στην άκρη των βλαστών και βράκτια λευκωπά και ημιδιαφανή, με άνθη ερμαφρόδιτα, και αχαινία κυλινδρικά, με αποστρογγυλωμένα άκρα και πάππο αχαινίου με τραχιές τρίχες ίσου μήκους με τα ανθίδια. Αποτελεί διπλοειδή οργανισμό με αριθμό χρωμοσωμάτων $2n=28 \pm 1B$ και είναι περισσότερο μορφολογικά και ταξινομικά συγγενές με το *H. doerfleri*. Έχει περίοδο ανθοφορίας από Ιούνιο μέχρι Σεπτέμβριο (Panayotis Dimopoulos, 2013; Φοίτος et al. 2009).

Δρογοϊστορία και εθνοβοτανική

Λόγω της σπανιότητας του *H. sibthorpii* δεν υπάρχουν ιστορικές ή εθνοβοτανικές αναφορές για την χρήση του στην Ελλάδα.

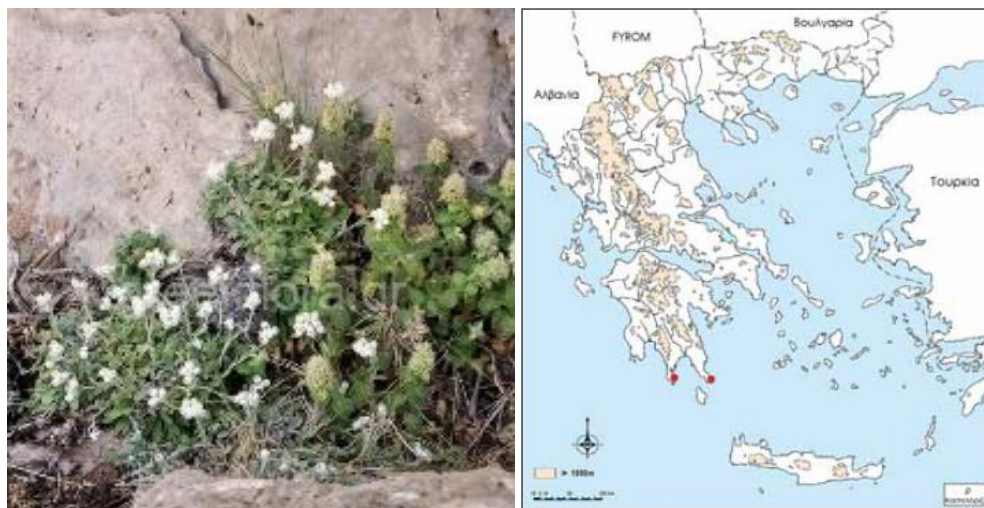
Δρογοχημεία

Λόγω της σπανιότητας του *H. sibthorpii* δεν υπάρχουν φυτοχημικές αναφορές.

Δρογοφαρμακολογία και εθνοφαρμακολογία

Λόγω της σπανιότητας του *H. sibthorpii* δεν υπάρχουν φαρμακολογικές ή εθνοφαρμακολογικές αναφορές για την χρήση του στην Ελλάδα.

1.3.4 *Helichrysum taenari* Rothm. (Ελίχρυσο του Ταίναρου)



Εικόνα 1.13: Αριστερά: Υπέργειο μέρος *Helichrysum taenari* (Greek Flora 2022), Δεξιά: Γεωγραφική κατανομή (Από: Φοίτος et al. 2009)

Δρογοετυμολογία, βοτανική περιγραφή, οικολογία και γεωγραφική εξάπλωση

Το *H. taenari* αναφέρθηκε πρώτη φορά από τον Γερμανό βοτανικό Werner Rothmaler (1908-1962) το 1944 στην δημοσίευση *Bot. Jahrb. Syst.* 73(4): 418-452 και συλλέχθηκε στην Πελοπόννησο από το Ακρωτήριο Ταίναρο. Το επίθετο του φυτικού είδους (*taenari*) προέρχεται από το ομώνυμο ακρωτήριο. Φύεται στην χλωριδική περιοχή *Pe* στις απολήξεις των ακρωτηρίων Ταίναρο (200-280 m) και Μαλέα (300-400 m) με συνοδά είδη τα *Calycotome villosa* (Poir.) Link, *Centaurea raphanina* Sm. subsp. *mixta* (DC.) Runemark, *Hellenocarum multiflorum* (L.) H. Wolff, *Euphorbia acanthothamnus* Heldr. & Sartori ex Boiss., *E. dendroides* L., *Lamyropsis cynaroides* (Lam.) Dittrich, *Micromeria Juliana* (L.) Benth. ex Rchb., *Onosma frutescens* Lam., *Parietaria cretica* L., *Phlomis fruticosa* L., *Ptilostemon chamaepeuce* (L.) Less.,

Stachys canescens Bory & Chaub., *Asperula taygeta* (Boiss. & Heldr.) P. Caputo & Del Guacchio, *Thymbra capitata*, *Erica manipuliflora* Salisb., *Inula candida* (L.) Cass. subsp. *limonella* (Halácsy) Rech.f., *Pistacia lentiscus* L., *Quercus coccifera* L., και *Stachys chrysanthra* Boiss. & Heldr. Αποτελεί ένα σπάνιο, τοπικό ενδημικό ημικρυπτόφυτο που εντοπίζεται ως χασμόφυτο σε μικρούς πληθυσμούς, συνήθως σε ασβεστολιθικούς βράχους, χαράδρες και κρημνούς με θαλάσσια ή βόρεια έκθεση και ανήκει στα τρωτά (VU) είδη της Ελληνικής χλωρίδας. Το φυτό περιγράφεται ως πολυετής πόα με αποξυλωμένο, διακλαδισμένο στέλεχος βάσης, με φύλλα βάσης ελλειπτικά έως αντιλογχοειδή, φαιοπράσινα, με τρίχωμα, και φύλλα βλαστού στενότερα, λογχοειδή έως επιμήκη. Φέρει ευθραύστους βλαστούς ανορθωμένους ή σε πλάγια διάταξη που εκφύονται από κάθε ρόδακα φύλλων και ταξιανθία με 5-25 κωδωνοειδή κεφάλια με λευκά, στιλπνά και μεμβρανώδη βράκτια με πρασινωπή βάση που φέρει αδένες και κίτρινα, αδενώδη ανθίδια με τριγωνικούς λοβούς, ενώ τα κυλινδρικά, καστανά, με αραιούς διαφανείς αδένες αχαίνια έχουν λευκό πάππο με τραχείες τρίχες. Αποτελεί οργανισμό με άγνωστο χρωμοσωματικό αριθμό και είναι περισσότερο μορφολογικά κοντά στο *H. amorginum*. Έχει περίοδο ανθοφορίας από Μάιο μέχρι Ιούνιο και αποτελεί τρωτό είδος (VU) της ελληνικής χλωρίδας (Panayotis Dimopoulos, 2013; Φοίτος et al. 2009).

Δρογοϊστορία και εθνοβοτανική

Ο ολότυπος του φυτικού είδους είχε κατατεθεί στο ερμπάριο του βοτανικού κήπου – βοτανικό μουσείο του Βερολίνου και η καταστροφή του ερμπαρίου κατά το 2^ο Παγκόσμιο Πόλεμο οδήγησε στην εξαφάνιση αποδεικτικών στοιχείων πολλών νέων, ανακαλυφθέντων φυτικών ειδών ανάμεσα στα οποία και το *H. taenari*. Ορίστηκε νεότυπος του είδους αφού ανακαλύφθηκε ξανά το 1986 από τον Σουηδό βοτανικό Arne Strid στο ακρωτήριο Ταίναρο. Λόγω της σπανιότητας του *H. taenarii* δεν υπάρχουν εθνοβοτανικές αναφορές για την χρήση του (Φοίτος et al. 2009).

Δρογοχημεία

Η χημική σύνθεση του *H. taenari* έχει μελετηθεί μόνο ως προς το αιθέριο έλαιο του υπέργειου μέρους άγριας συλλογής, με κύριους μεταβολίτες geraniol (50%), camphene (18,6%) και α-pinene (8,93%) (M. Tsoukatou et al. 2000).

Δρογοφαρμακολογία και εθνοφαρμακολογία

Λόγω της σπανιότητας του *H. taenari* δεν υπάρχουν φαρμακολογικές ή εθνοφαρμακολογικές αναφορές για την χρήση του.

1.3.5 *Helichrysum heldreichii* Boiss. (ελίχρυσος του Χελδράιχ)



Εικόνα 1.14: Αριστερά: Υπέργειο μέρος *Helichrysum heldreichii* (Greek Flora 2022), Δεξιά: Γεωγραφική κατανομή (Φοίτος et al. 2009)

Δρογοετυμολογία, βοτανική περιγραφή, οικολογία και γεωγραφική εξάπλωση

Το *H. heldreichii* αναφέρθηκε πρώτη φορά από τον Ελβετό βοτανικό Pierre Edmond Boissier (1810-1885) το 1875 στη δημοσίευση *Fl. Or.* 3: 229 και συλλέχθηκε πρώτη φορά στην Αγία Ρούμελη (Ν. Χανίων) στην Κρήτη. Το επίθετο του φυτικού είδους (*heldreichii*) προέρχεται από τον Γερμανό βοτανολόγο Theodor Heinrich Hermann von Heldreich (1822–1902). Φύεται στην χλωριδική περιοχή ΚΚ στα φαράγγια Σαμαριάς, Αράδαινας και ίσως σε γειτονικά φαράγγια που δεν έχουν ακόμα ερευνηθεί. Αποτελεί ένα σπάνιο, τοπικό ενδημικό χαμαίφυτο της Κρήτης, που ως υποχρεωτικό χασμόφυτο εντοπίζεται σε μικρούς πληθυσμούς σε ασβεστολιθικούς βράχους, χαράδρες και κρημνούς και ανήκει στα σχεδόν απειλούμενα (NT) είδη της Ελληνικής χλωρίδας. Το φυτό περιγράφεται ως μικρός θάμνος με λευκωπό τρίχωμα και βλαστούς εύκαμπτους, ανερχόμενους, με φύλλα κατ' εναλλαγή, απλά, γραμμοειδή με στρεφόμενα άκρα. Η υπερταξιανθία σχηματίζει σύνθετο κόρυμβο με πολλά μικρά κεφάλια (ταξιανθία), που είναι ωοειδή πριν την ωρίμανση και αργότερα κωδωνοειδή και περικλείονται από λεπιοειδή ωοειδή έως λογχοειδή βράκτια ανοικτού κίτρινου χρώματος, με βάση εριώδη, με σωληνοειδή πορτοκαλόχρωα έως κίτρινα ανθίδια. Αποτελεί διπλοειδή οργανισμό με χρωμοσωματικό αριθμό $2n=28$ και έχει περίοδο άνθισης το Μάιο ως τον Ιούνιο. (Panayotis Dimopoulos, 2013; Φοίτος et al. 2009).

Δρογοϊστορία και εθνοβοτανική

Λόγω της σπανιότητας του *H. heldreichii* δεν υπάρχουν ιστορικές ή εθνοβοτανικές αναφορές για την χρήση του στην Ελλάδα.

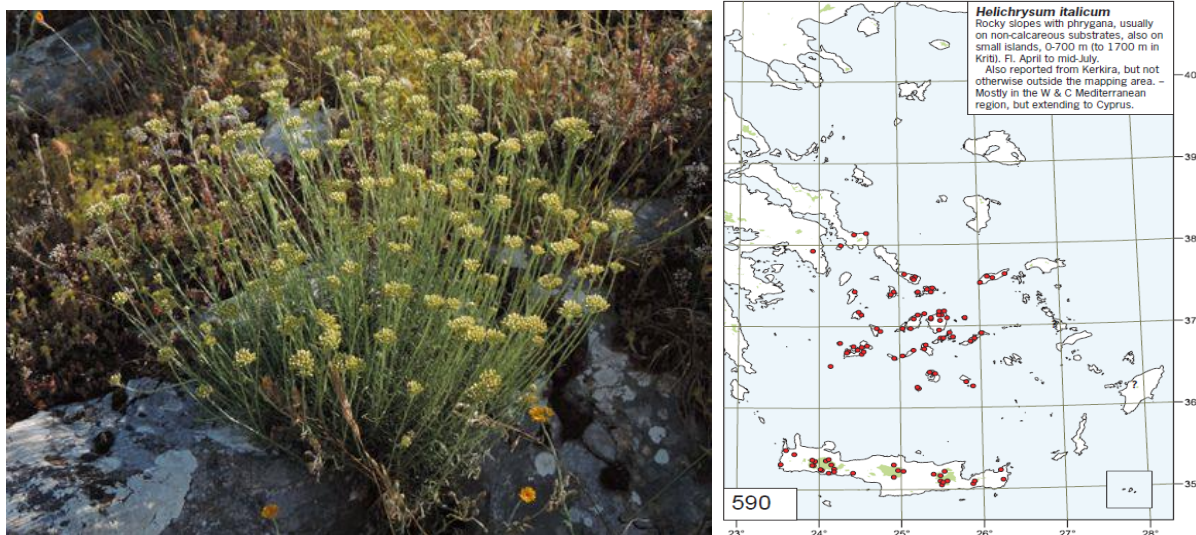
Δρογοχημεία

Η χημική σύνθεση του αυτοφυούς *H. heldreichii* έχει μελετηθεί μόνο ως προς το αιθέριο έλαιο του υπέργειου μέρους με κύριους μεταβολίτες *E*-caryophyllene (38,52%), caryophyllene oxide (10,35%) - (92,68%, απόδοση 0,088% v/w) (Roussis et al. 2000).

Δρογοφαρμακολογία και εθνοφαρμακολογία

Λόγω της σπανιότητας του *H. heldreichii* δεν υπάρχουν εθνοφαρμακολογικές αναφορές για την χρήση του. Μελετήθηκε (Roussis et al. 2000) η αντιβακτηριδιακή δράση του αιθέριου ελαίου μετά την άνθιση ως προς τους μικροοργανισμούς *S. aureus*, *S. epidermis*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *E. cloacae* και έδειξε ικανοποιητική δράση (μετρούμενες διάμετροι ζωνών ανάσχεσης) σε σχέση με μη χαρακτηρισμένα εκχυλίσματα (δισουλαιθέρα:διχλωρομεθάνιο, 1:1) φύλλων και ταξιανθιών του φυτού.

1.3.6 *Helichrysum italicum* (Roth) G.Don subsp. *italicum*



Εικόνα 1.15: Αριστερά: Υπέργειο μέρος *Helichrysum italicum* subsp. *italicum* (GBIF Secretariat (2021), GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org, 2022-05-24. 2021), Δεξιά: Γεωγραφική κατανομή (Arne Strid 2016)

Δρογοετυμολογία, βοτανική περιγραφή, οικολογία και γεωγραφική εξάπλωση

Το *H. italicum* subsp. *italicum* αναφέρθηκε πρώτη φορά από τον Σκωτσέζο βοτανικό John Claudius Loudon (1783–1843) το 1830 στη δημοσίευση *Hort. Brit.* 342 χωρίς αναγραφόμενη τοποθεσία συλλογής. Νεότυπος αναφέρθηκε από την Γεωργιάδου Ε. στο έργο *Flora of Cyprus* vol. 2, 1985 (Galbany-Casals et al. 2006). Το επίθετο του φυτικού είδους (*italicum*) αναφέρεται στην χώρα της Ιταλίας. Φύεται στις χλωριδικές περιοχές *KiK*, *E Ae*, *Iol* και αποτελεί ένα ιθαγενές, μη περιορισμένης εμβέλειας, χαμαίφυτο με ενδιαίτημα ξερικά, Μεσογειακά φρύγανα και λιβάδια σε ευρύτατο υψομετρικό εύρος (0-2200 m). Το φυτό φτάνει ως 70 cm ύψος με ποώδη μέρη και ανθοφόρα στελέχη 18-36 cm, βασικά και μεσαία φύλλα γραμμικά, περιστρεφόμενα κι όχι κυματοειδή μήκους 12-37 mm. Τα μασχαλιαία φύλλα έχουν μήκος 4-9,5mm, όταν εμφανίζονται, και η ταξιανθία είναι κυλινδρική ως στενά καμπανοειδής, ενώ τα εξωτερικά και εσωτερικά βράκτια φύλλα (22-40 ανά ταξιανθία), είναι γραμμικά, λογχοειδή, και εσωτερικά υπάρχουν πολλά ανθίδια (14-31 ανά ταξιανθία), που μετατρέπονται μετά τη γονιμοποίηση σε κυλινδρικά ως ωοειδή αχαίνια, με λευκές διάσπαρτες τρίχες, και πάππο 2-4 mm (S. Herrando-Moraira et al. 2016). Αποτελεί διπλοειδή οργανισμό με χρωμοσωματικό αριθμό $2n=28$ και έχει περίοδο άνθισης το Μάιο ως το Σεπτέμβριο, ανάλογα με το γεωγραφικό πλάτος και υψόμετρο του ενδιαιτήματος.

Δρογοϊστορία και εθνοβοτανική

Δεν υπάρχουν ιστορικές ή εθνοβοτανικές αναφορές για την χρήση του στην Ελλάδα.

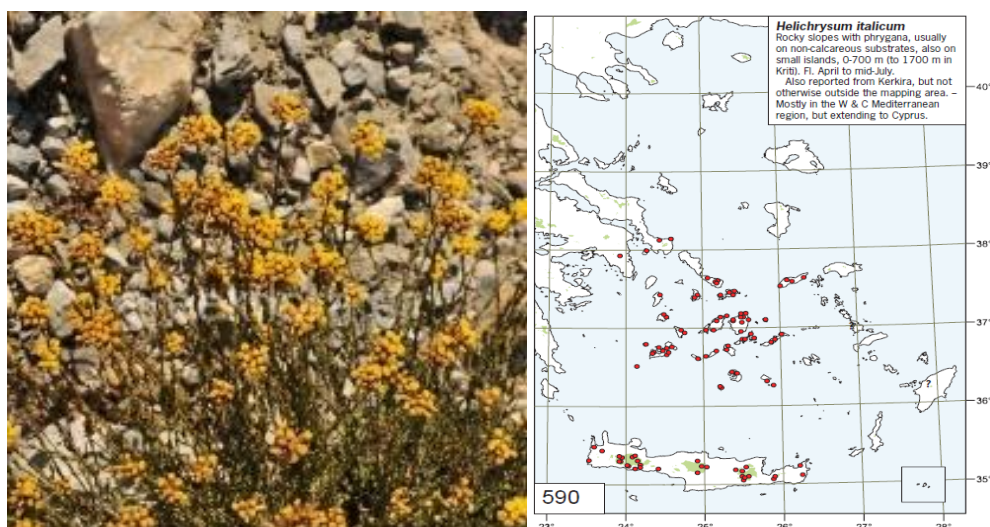
Δρογοχημεία

Η χημική σύνθεση του αυτοφυούς ελληνικού (Αμοργός) *H. italicum* subsp. *italicum* έχει μελετηθεί μόνο ως προς το αιθέριο έλαιο του υπέργειου μέρους με κύριους μεταβολίτες geraniol (35,59%), geranyl acetate (14,69%), nerolidol (11,86%) - (82,06%, απόδοση 0,46% v/w) (Chinou et al. 1996).

Δρογοφαρμακολογία και εθνοφαρμακολογία

Δεν υπάρχει συστηματική, εθνοφαρμακολογική αναφορά για την χρήση του στην Ελλάδα. Στην παραπάνω δημοσίευση (Chinou et al. 1996), το αιθέριο έλαιο του *H. italicum* subsp. *italicum* βρέθηκε να επιδεικνύει σημαντική αντιβακτηριδιακή δράση (MIC mg/ml) στους μικροοργανισμούς *S. aureus* και *S. epidermidis* (3,25), ασθενέστερη στους *P. aeruginosa* (3,50), *K. pneumoniae* (3,50), *E. cloacae* (3,50) και καμία στην *E. coli*.

1.3.7 *Helichrysum italicum* (Roth) G.Don subsp. *microphyllum* (Willd.) Nyman



Εικόνα 1.16: Αριστερά: Υπέργειο μέρος *Helichrysum italicum* subsp. *microphyllum* (GBIF Secretariat (2021), GBIF Backbone Taxonomy, Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org, 2022-05-24. 2021), Δεξιά: Γεωγραφική κατανομή (Arne Strid 2016)

Δρογοετυμολογία, βοτανική περιγραφή, οικολογία και γεωγραφική εξάπλωση

Το *H. italicum* subsp. *microphyllum* αναφέρθηκε πρώτη φορά από τον Σουηδό βοτανικό Carl Fredrik Nyman (1820-1893) το 1879 στη δημοσίευση *Consp. Fl. Eur.*, 382. Το όνομα του φυτικού είδους (*microphyllum*) αναφέρεται στο μικρότερο μήκος των φύλλων στελεχών σε σχέση με το υποείδος

italicum. Φύεται στις χλωριδικές περιοχές ΚΚ, ΚίΚ, ΕΑε, WΑε και αποτελεί ένα ιθαγενές, χαμαίφυτο με ενδιαίτημα ξερικά, Μεσογειακά φρύγανα, λιβάδια και δάση. Το φυτό φτάνει ως 40 cm ύψος με ποώδη μέρη και ανθοφόρα στελέχη 3,2-22 cm με άφθονα μασχαλιαία φύλλα. Τα φύλλα βάσης και τα μεσαία φύλλα είναι γραμμικά προς γραμμικά- λογχοειδή ενώ τα μασχαλιαία φύλλα έχουν μήκος 1,5-3,7mm. Η ταξιανθία είναι κυλινδρική ως στενά καμπανοειδής, τα εξωτερικά βράκτια φύλλα (20-33 ανά ταξιανθία) είναι γραμμικά-λογχοειδή ως λογχοειδή και τα εσωτερικά βράκτια είναι σπαθοειδή με στρογγυλεμένες άκρες. Μετά την γονιμοποίηση, τα ανθίδια (13-25 ανά ταξιανθία) μετατρέπονται σε κυλινδρικά ως ωοειδή αχαίνια, με λευκές διάσπαρτες τρίχες και πάππο μήκους 2,2-3,5 mm (S. Herrando-Moraira et al. 2016). Αποτελεί διπλοειδή οργανισμό με χρωμοσωματικό αριθμό $2n=28$ και έχει περίοδο άνθισης τον Μάιο έως το Σεπτέμβριο, ανάλογα με το γεωγραφικό πλάτος και υψόμετρο του ενδιαιτήματος.

Δρογοϊστορία και εθνοβοτανική

Δεν υπάρχουν ιστορικές ή εθνοβοτανικές αναφορές για την χρήση του στην Ελλάδα.

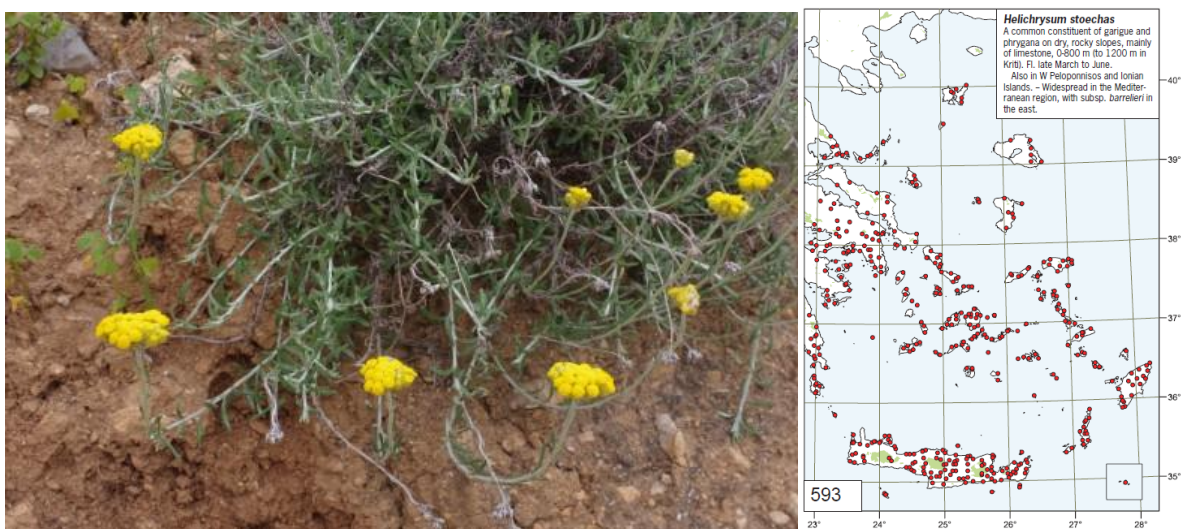
Δρογοχημεία

Η χημική σύνθεση του αυτοφυούς ελληνικού (Κρήτη) *H. italicum* subsp. *microphyllum* έχει μελετηθεί μόνο ως προς το αιθέριο έλαιο του υπέργειου μέρους με κύριους μεταβολίτες τους σεσκιτερπενικούς υδρογονάνθρακες β-selinene, γ-curcumenene, α-pinene (πριν την άνθιση), και linalool (μετά την άνθιση). Επίσης, στα φύλλα ανιχνεύθηκαν οι στερόλες 3β-22E-stigmasta-5,22-dienol, 3β-24S-stigmast-5-enol και βιταμίνη E (Roussis et al. 2000).

Δρογοφαρμακολογία και εθνοφαρμακολογία

Δεν υπάρχει συστηματική, εθνοφαρμακολογική αναφορά για την χρήση του στην Ελλάδα. Στην παραπάνω δημοσίευση (Roussis et al. 2000), η μελέτη αντιμικροβιακής δράσης του αιθέριου ελαίου μετά την άνθιση ως προς τους μικροοργανισμούς *S. aureus*, *S. epidermis*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *E. cloacae* έδειξε ικανοποιητική δράση (μετρούμενες διάμετροι ζωνών ανασχεσης) σε σχέση με μη χαρακτηρισμένα εκχυλίσματα (δισουλφαιθέρα:διχλωρομεθάνιο, 1:1) φύλλων και ταξιανθιών του φυτού.

1.3.8 *Helichrysum stoechas* (L.) Moench subsp. *barrelieri* (Ten.) Nyman (Ελίχρυσο στοιχάς, πολύτιμος Ελίχρυσος)



Εικόνα 1.17: Αριστερά: Υπέργειο μέρος *Helichrysum stoechas* subsp. *barrelieri* (Panayotis Dimopoulos, 2013), Δεξιά: Γεωγραφική κατανομή (Arne Strid 2016)

Δρογοετυμολογία, βοτανική περιγραφή, οικολογία και γεωγραφική εξάπλωση

Το *H. stoechas* subsp. *barrelieri* αναφέρθηκε πρώτη φορά από τον Σουηδό βοτανικό Carl Fredrik Nyman (1820-1893) το 1879 στη δημοσίευση *Consp. Fl. Eur.*, 381. Το επίθετο *stoechas* σημαίνει «πολύτιμος» και το *barrelieri* προκύπτει από το όνομα του Γάλλου βοτανικού του 17^{ου} αιώνα Jacques Barrelier. Φύεται στις χλωριδικές περιοχές *IoI*, *Pe*, *StE*, *EC*, *Nae*, *WAe*, *Kik*, *KK*, *EAe* και αποτελεί ένα ιθαγενές χαμαίφυτο με ενδιαίτημα ξερικά, Μεσογειακά φρύγανα και λιβάδια και δάση. Το φυτό περιγράφεται ως πολυετές, θαμνώδες ή ημιθαμνώδες με πυκνό αραχνοειδές τρίχωμα και φυλλώδη, ανθοφόρα ανερχόμενα στελέχη που καταλήγουν σε πυκνές, τελικά διακλαδισμένες ταξιανθίες. Έχει ετερόγαμες ταξιανθίες και σπάνια ομόγαμες με ερμαφρόδιτα ανθίδια που φέρουν όρθια, επίπεδα βράκτια, περίπου ίσου μήκους με τα ανθίδια, ενώ τα μεσαία βράκτια είναι ισομήκη με τα εσωτερικά, και δίσκος ανθιδίων είναι κυλινδρικός ως ωοειδής και τα σπέρματα φέρουν πάππο με τρίχωμα (Galbaný-Casals et al. 2006). Αποτελεί διπλοειδή οργανισμό με χρωμοσωματικό αριθμό $2n=28$ και έχει περίοδο άνθισης το Μάρτιο ως το Μάιο (Ιούνιο), ανάλογα με το γεωγραφικό πλάτος και υψόμετρο του ενδιαιτήματος.

Δρογοϊστορία και εθνοβοτανική

Το φυτικό είδος είναι πολύ διαδεδομένο στην Ελλάδα και αναφέρεται ως αμάραντος (Πελοπόννησος, ωστόσο, δεν πρέπει να συγχέεται με το *Limonium sinuatum*), Ανθοΐδα (Κρήτη), Αθάνατος ή Σεμπρεβίβα (Κύθηρα), και Καλομοιθιά (Θήρα).

Δρογοχημεία

Η χημική σύνθεση του αυτοφυούς ελληνικού (Κρήτη) *H. stoechas* subsp. *barrelieri* έχει μελετηθεί μόνο ως στις το αιθέριο έλαιο του υπέργειου μέρους στις ποικιλίες: *var. scandens* Guss. με κύριους μεταβολίτες τα β-caryophyllene (33,6%), α-humulene (21,1%), isoeugenol (7,8%) (87%, απόδοση 0,13% v/w), και *var. spathulatum* Raulin με κύριους μεταβολίτες τα β-caryophyllene (27,9%), α-humulene (13,4%), α-pinene (12,0%) (89,8%, απόδοση 0,17%) (Roussis et al. 2002).

Δρογοφαρμακολογία και εθνοφαρμακολογία

Εθνοφαρμακολογική αναφορά στην Ελλάδα αφορά την χρήση του ως αιθέριο έλαιο σύμφωνα με τον Πίνακα 1.5 στην υποενότητα 1.2 (Evangelos Axiotis et al. 2018). Στην δημοσίευση των Roussis et al. (2002), η μελέτη αντιμικροβιακής δράσης των αιθέριου ελαίου μετά την άνθιση ως προς τους μικροοργανισμούς *S. aureus* (7,5), *S. epidermis* (20), *P. aeruginosa* (8,5), *E. coli* (3,25), *E. cloacae* (20), *K. pneumoniae* (15,25), *C. albicans* (6,5), *C. tropicalis* (6,8), *T. glabrata* (3,25) έδειξε ικανοποιητική δράση (MIC µg/ml) για το *var. spathulatum* και καθόλου δράση για το *var. scandens*.

1.3.9 *Helichrysum plicatum* DC.



Εικόνα 1.18: Αριστερά: Υπέργειο μέρος *Helichrysum plicatum* (Greek Flora 2022), Δεξιά: Γεωγραφική κατανομή (GBIF Secretariat (2021), GBIF Backbone Taxonomy, Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org, 2022-05-24. 2021)

Δρογοετυμολογία, βοτανική περιγραφή, οικολογία και γεωγραφική εξάπλωση

Το *H. plicatum* αναφέρθηκε πρώτη φορά από τον Σουηδό βοτανικό Augustin Pyrame de Candolle (1778–1841) το 1838 στη δημοσίευση *Prodromus Systematis Naturalis Regni Vegetabilis* 6:183. Το επίθετο (*plicatum*) αναφέρεται στην υφή των φύλλων που παρουσιάζουν πτυχώσεις (πιέτες). Φύεται στις χλωριδικές περιοχές *NPi*, *SPi*, *Pe*, *StE*, *NC* και αποτελεί ένα ιθαγενές, χαμαίφυτο της Ανατολικής Μεσογείου με ενδιαίτημα εύκρατα, υπομεσογειακά λιβάδια και ορεινές περιοχές μεγάλου υψομέτρου. Το φυτό περιγράφεται ως πολυετές, με ισχνό αδενικό τρίχωμα και όρθιους ή πρηνής ανθισμένους βλαστούς, προεξέχοντες από ξυλώδεις, διακλαδιζόμενες βάσεις. Τα φύλλα βάσης είναι γραμμικά με στρογγυλεμένες κορυφές και κωνικές βάσεις, τα φύλλα υπέργειων στελεχών είναι περίβλαστα, γραμμικά-γωνιακά ως γραμμικά. Οι ημισφαιρικές ερμαφρόδιτες ή θηλυκές ταξθανθίες φέρουν φυλλάρια με αμβλύ έως οξύ σχήμα ακανόνιστου χρώματος (κίτρινο ή κρεμώδες). Ανθίζει από τον Ιούλιο έως το Σεπτέμβριο, ανάλογα με το ενδιαίτημα που συναντάται (P.H. Davis D. 1975).

Δρογοϊστορία και εθνοβοτανική

Υπάρχει μη διασταυρωμένη πληροφορία ότι στην περιοχή της Ηπείρου (βιότοπος του *H. plicatum* στην Ελλάδα) το φυτό χρησιμοποιούνταν ως φυσικό σκοροαπωθητικό αντί της ναφθαλίνης.

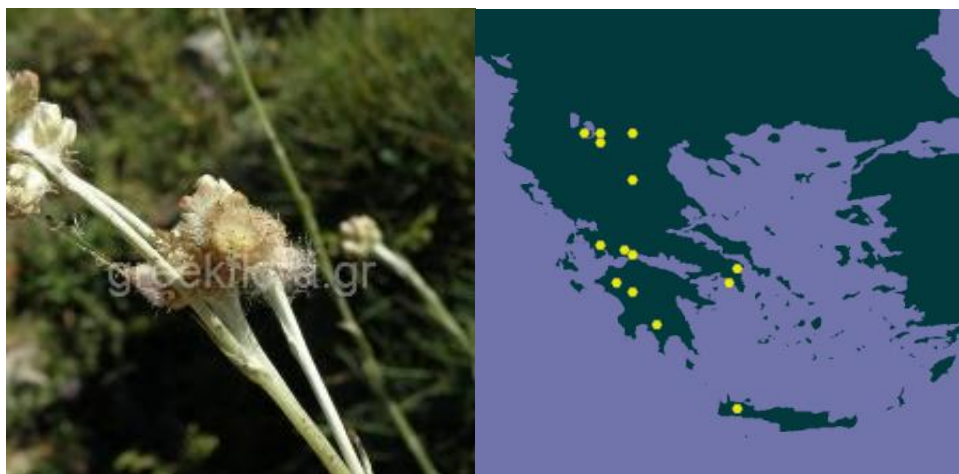
Δρογοχημεία

Δεν υπάρχουν φυτοχημικές αναφορές του είδους από την Ελλάδα.

Δρογοφαρμακολογία και εθνοφαρμακολογία

Δεν υπάρχουν φαρμακολογικές ή εθνοφαρμακολογικές αναφορές για την χρήση του στην Ελλάδα.

1.3.10 *Helichrysum luteoalbum* (L.) Rchb.



Εικόνα 1.19: Αριστερά: Υπέργειο μέρος *Helichrysum luteoalbum* (Greek Flora 2022), Δεξιά: Γεωγραφική κατανομή (GBIF Secretariat (2021), GBIF Backbone Taxonomy, Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org, 2022-05-24. 2021)

Δρογοετυμολογία, βοτανική περιγραφή, οικολογία και γεωγραφική εξάπλωση

Το *H. luteoalbum* αναφέρθηκε πρώτη φορά από τον Γερμανό βοτανικό Heinrich Gottlieb Ludwig Reichenbach (1793–1879) το 1829 στην δημοσίευση *Handb. Gewächsk.*, ed. 2. 2(2): 1460. Το επίθετο (*luteoalbum*) σημαίνει κίτρινο-λευκό και οφείλεται στον χρωματισμό των φυλλαρίων των ταξιανθιών του. Φύεται στις χλωριδικές περιοχές *Pe*, *StE*, *EC*, *NC*, *NE*, *Nae*, *WAe*, *KK*, *E Ae* και αποτελεί ένα ιθαγενές θερόφυτο, με ενδιαίτημα υγρές αγροτικές περιοχές (λίμνες, ποτάμια) και αστικές περιοχές κοντά σε συγκεντρώσεις υδάτων. Το φυτό περιγράφεται ως ετήσιο με ύψος έως 50 cm, με όλο το υπέργειο μέρος του καλυμμένο από υπόλευκο τρίχωμα, με πολλούς βλαστούς που ανέρχονται από την βάση καμπυλωμένοι. Τα ωοειδή φύλλα είναι άμισχα στη βάση με διαστάσεις έως 8 x 1cm και γίνονται μικρότερα και λογχοειδή ή γραμμικά στα ανώτερα τμήματα και γκριζωπά ή υπόλευκα και αραχνοειδή και στις δύο πλευρές τους. Η ταξιανθία αποτελείται από πυκνά κεφάλια που σχηματίζουν τελικούς κορύμβους και φέρει βράκτια σε τρεις γραμμές με χρώμα ανοιχτό καφέ έως υπόλευκο και έχει εξωτερικά πολυάριθμα θηλυκά υπόλευκα ανθίδια, τα οποία μετατρέπονται μετά τη γονιμοποίηση σε ελλειψοειδή αχαίνια με πάππο που έχει πολλές μαλακές τρίχες. Η περίοδος άνθισης είναι από τον Απρίλιο έως τον Ιούλιο, ανάλογα με το ενδιαίτημα που συναντάται (Ali Esmail Al-Snafi 2019).

Δρογοϊστορία και Εθνοβοτανική

Δεν υπάρχουν ιστορικές ή εθνοβοτανικές αναφορές για την χρήση του στην Ελλάδα.

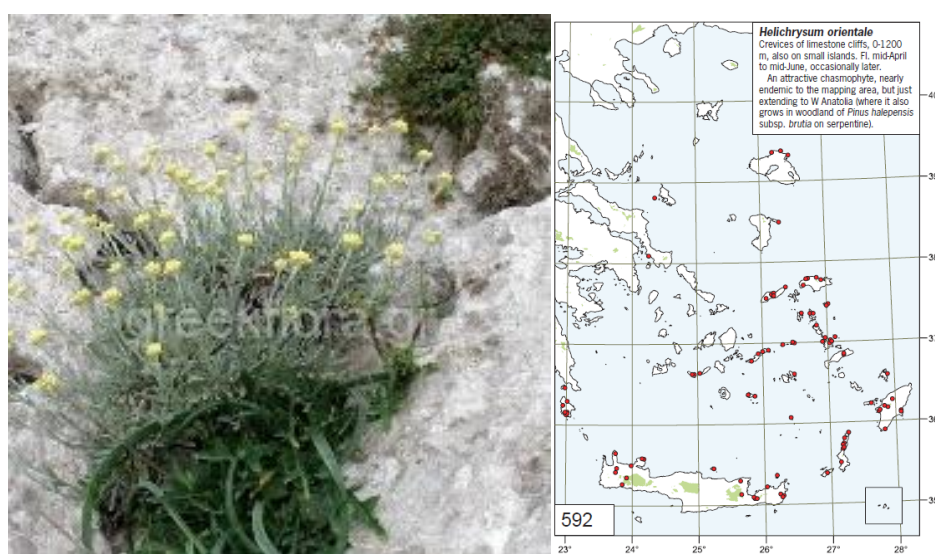
Δρογοχημεία

Δεν υπάρχουν φυτοχημικές αναφορές του είδους από την Ελλάδα.

Δρογοφαρμακολογία και εθνοφαρμακολογία

Δεν υπάρχουν φαρμακολογικές ή εθνοφαρμακολογικές αναφορές για την χρήση του στην Ελλάδα.

1.3.11 *Helichrysum orientale* (L.) Vaill. (Ελίχρυσος της Ανατολής)



Εικόνα 1.20: Αριστερά: Υπέργειο μέρος *Helichrysum orientale* (Greek Flora 2022), Δεξιά: Γεωγραφική κατανομή (Arne Strid 2016)

Δρογοετυμολογία, βοτανική περιγραφή, οικολογία και γεωγραφική εξάπλωση

Το *H. orientale* αναφέρθηκε πρώτη φορά από τον Γάλλο βοτανικό Sébastien Vaillant (1669–1722) το 1754 στην δημοσίευση *Königl. Akad. Wiss. Paris Phys. Abh.* 5. Το επίθετο (*orientale*) σημαίνει «ανατολικό» λόγω του ότι είναι είδος ιθαγενές της Ανατολικής Μεσογείου. Φύεται στις χλωριδικές περιοχές *Pe*, *WAe*, *Kik*, *KK*, *E Ae* και αποτελεί ένα ιθαγενές ημικρυπτόφυτο, με ενδιαίτημα βράχια και χαράδρες. Το φυτό περιγράφεται ως θαμνίσκος με κοντή ξυλώδη βάση, στελέχη ύψους 10-60 cm με πυκνά φύλλα και πυκνές ροζέτες φύλλων βάσης. Οι ανθοφόροι βλαστοί είναι φυλλώδεις σε όλο το μήκος τους, με φύλλα που γίνονται προοδευτικά μικρότερα και απουσιάζουν προς την κορυφή του στελέχους, και ταξιανθίες ετερόγαμα, δισκοειδή έως καμπανοειδή ή ευρέως κυλινδρικά κεφάλια διάμετρου περίπου 80 mm που φέρουν εσωτερικά βράκτια σαφώς μικρότερα από τα μεσαία και ελαφρώς μικρότερα σε μήκος από τα ανθίδια και εξωτερικά βράκτια διαστάσεων περίπου 4 mm x 3 mm. Τα

ανθίδια του δίσκου είναι ερμαφρόδιτα, διαστάσεων περίπου 5 mm x 3 mm, με ανθήρα κυλινδρικό ενσωματωμένο στην στεφάνη, και κυλινδρικά αχαίνια 1-1,5 mm. Αποτελεί διπλοειδή οργανισμό με χρωμοσωματικό αριθμό $2n=28$ και έχει περίοδο άνθισης από το Μάρτιο έως τον Ιούνιο (Ιούλιο), ανάλογα με το γεωγραφικό πλάτος και υψόμετρο του ενδιαιτήματος (Hind et al. 2007).

Δρογοϊστορία και Εθνοβοτανική

Στα Κύθηρα το φυτικό είδος είναι γνωστό πολλές δεκαετίες και η τοπική κοινωνία το εκμεταλλεύεται (υπέργειο μέρος) κυρίως για εμπορική χρήση ως αναμνηστικό ή διακοσμητικό φυτό.

Δρογοχημεία

Η χημική σύνθεση του αυτοφυούς ελληνικού (Κύθηρα) *H. orientale* έχει μελετηθεί μόνο ως προς το αιθέριο έλαιο του υπέργειου μέρους με κύριους μεταβολίτες γραμμικούς υδρογονάνθρακες, caryophyllene oxide, E-caryophyllene, carvacrol (απόδοση ελαίου 0,031% v/w). Επίσης, στις ταξιανθίες ανιχνεύθηκαν οι στερόλες 3β-22E-stigmasta-5,22-dienol, 3β-24S-stigmast-5-enol και βιταμίνη E (Roussis et al. 2000).

Δρογοφαρμακολογία και εθνοφαρμακολογία

Δεν υπάρχουν εθνοφαρμακολογικές αναφορές για την χρήση του στην Ελλάδα. Στην ίδια δημοσίευση (Roussis et al. 2000) η μελέτη αντιβακτηριδιακής δράσης του αιθέριου ελαίου μετά την άνθιση ως προς τους μικροοργανισμούς *S. aureus*, *S. epidermis*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, έδειξε ικανοποιητική δράση (μετρούμενες διάμετροι ζωνών ανάσχεσης) σε σχέση με μη χαρακτηρισμένα εκχυλίσματα (διαιθυλαιθέρα:διχλωρομεθάνιο, 1:1) φύλλων και ταξιανθιών του φυτού.

1.4 Βιβλιογραφία

- A. I. Derkach, N. F. Komissarenko, V. T. Chernobai. 1986. "Coumarins of the Inflorescences of *Calendula officinalis* and *Helichrysum arenarium*." *Chemistry of Natural Products* 6: 722–23.
- Akaberi, Maryam, Ombeline Danton, Zahra Tayarani-Najaran, Javad Asili, Mehrdad Iranshahi, S. Ahmad Emami, and Matthias Hamburger. 2019. "HPLC-Based Activity Profiling for Antiprotozoal Compounds in the Endemic Iranian Medicinal Plant *Helichrysum ooecephalum*." *Journal of Natural Products* 82 (4): 958–69. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.8b01031>.
- Akaberi, Maryam, Amirhossein Sahebkar, Narjes Azizi, and Seyed Ahmad Emami. 2019. "Everlasting Flowers: Phytochemistry and Pharmacology of the Genus *Helichrysum*." *Industrial Crops and Products* 138 (April): 111471. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111471>.
- Albayrak, Sevil, Ahmet Aksoy, Osman Sağdıç, and Ümit Budak. 2010. "Phenolic Compounds and Antioxidant and Antimicrobial Properties of *Helichrysum* Species Collected from Eastern Anatolia, Turkey." *Turkish Journal of Biology* 34 (4): 463–73. <https://doi.org/10.3906/biy-0901-4>.
- Ali Esmail Al-Snafi. 2019. "The Medical Benefit of *Gnaphalium luteoalbum*-A Review." *IOSR Journal of Pharmacy* 9 (5): 40–44.
- Angela Mari, Assunta Napolitano, Milena Masullo, Cosimo Pizza, Sonia Piacente. 2014. "Identification and Quantitative Determination of the Polar Constituents in *Helichrysum italicum* Flowers and Derived Food Supplements." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 96: 249–55. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.04.005>.
- Antunes Viegas, Daniel, Ana Palmeira-De-Oliveira, Lígia Salgueiro, José Martinez-De-Oliveira, and Rita Palmeira-De-Oliveira. 2014. "*Helichrysum italicum*: From Traditional Use to Scientific Data." *Journal of Ethnopharmacology* 151 (1): 54–65. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.11.005>.
- Appendino, Giovanni, Michela Ottino, Nieves Marquez, Federica Bianchi, Anna Giana, Mauro Ballero, Olov Sterner, Bernd L. Fiebich, and Eduardo Munoz. 2007. "Arzanol, an Anti-Inflammatory and Anti-HIV-1 Phloroglucinol α -Pyrone from *Helichrysum italicum* ssp. *microphyllum*." *Journal of Natural Products* 70 (4): 608–12. <https://doi.org/10.1021/np060581r>.
- Arne Strid. 2016. *Strid A. 2016: Atlas of the Aegean Flora. Part 2: Maps. – Berlin: Botanic Garden and Botanical Museum Berlin, Freie Universität Berlin. – Englera 33(2). Edited by Nicholas J. Turland. 1st ed. Berlin: Botanic Garden and Botanical Museum Berlin.*
- Bianchini, Ange, Félix Tomi, Pascal Richomme, Antoine François Bernardini, and Joseph Casanova. 2004. "Eudesm-5-En-11-Ol from *Helichrysum italicum* Essential Oil." *Magnetic Resonance in Chemistry* 42 (11): 983–84. <https://doi.org/10.1002/mrc.1458>.
- Bohlmann, F, and L N Misra. 1984. "New Prenylflavanones and Chalcones from *Helichrysum rugulosum*." *Planta Medica* 50 (3): 271–72. <https://doi.org/10.1055/s-2007-969699>.
- Bohlmann, Ferdinand, and Christa Zdero. 1980. "Neue Geranylphloroglucin-Derivate Aus *Helichrysum monticola*." *Phytochemistry* 19 (4): 683–84. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(80\)87039-7](https://doi.org/10.1016/0031-9422(80)87039-7).
- Bohlmann, Ferdinand, Christa Zdero, Wolf Rainer Abraham, Antoinette Suwita, and Michael Grenz. 1980. "Neue Diterpene Und Neue Dihydrochalkon-Derivate Sowie Weitere Inhaltsstoffe Aus *Helichrysum*-Arten." *Phytochemistry* 19 (5): 873–79. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(80\)85129-6](https://doi.org/10.1016/0031-9422(80)85129-6).
- Bohlmann, Ferdinand, Jürgen Ziesche, and Pradip K. Mahanta. 1979. "Neue Chalkon-Derivate Und

- Humulon-Ähnliche Verbindungen Aus *Helichrysum*-Arten.” *Phytochemistry* 18 (6): 1033–36. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)91472-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)91472-9).
- Bojan Vujic, Vera Vidakovic, Milka Jadranin, Irena Novakovic, Snežana Trifunovic, Vele Tešević, Boris Mandić. 2020. “Composition, Antioxidant Potential, and Antimicrobial Activity of *Helichrysum plicatum* DC. Various Extracts.” *Plants* 9: 337. <https://doi.org/10.3390/plants9030337>.
- Brigida D’Abrosca, Elisabetta Buommino, Grazia D’Angelo, Lorena Coretti, Monica Scognamiglio, Valeria Severino, Severina Pacifico, Giovanna Donnarumma, Antonio Fiorentino. 2013. “Spectroscopic Identification and Anti-Biofilm Properties of Polar Metabolites from the Medicinal Plant *Helichrysum italicum* against *Pseudomonas aeruginosa*.” *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 21: 7038–46. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.09.019>.
- Brigida D’Abrosca, Elisabetta Buommino, Pina Caputo, Monica Scognamiglio, and Antonio Fiorentino Angela Chambery, Giovanna Donnarumma. 2016. “Phytochemical Study of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don: Spectroscopic Elucidation of Unusual Amino-Phlorogucinols and Antimicrobial Assessment of Secondary Metabolites from Medium Polar Extract.” *Phytochemistry* 132: 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.09.012>.
- Burkhard Biel, Kit Tan. 2018. *Ενδημικά Φυτά Της Ελλάδας - Αμοργός*. Edited by Δημήτρης Περδετζόγλου. 1st ed. Ελλάδα: Δήμος Αμοργού -Ελλάδα.
- Carmona, M. D., R. Llorach, C. Obon, and D. Rivera. 2005. “‘Zahraa’, a Unani Multicomponent Herbal Tea Widely Consumed in Syria: Components of Drug Mixtures and Alleged Medicinal Properties.” *Journal of Ethnopharmacology* 102 (3): 344–50. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.06.030>.
- Chinou, Ioanna B., Christos Bougatsos, and Dimitrios Perdetzoglou. 2004. “Chemical Composition and Antimicrobial Activities of *Helichrysum amorginum* Cultivated in Greece.” *Journal of Essential Oil Research* 16 (3): 243–45. <https://doi.org/10.1080/10412905.2004.9698711>.
- Chinou, Ioanna B., Vassilios Roussis, Dimitrios Perdetzoglou, and Anargiros Loukis. 1996. “Chemical and Biological Studies on Two *Helichrysum* Species of Greek Origin.” *Planta Medica* 62 (4): 377–79. <https://doi.org/10.1055/s-2006-957914>.
- Chinou, Ioanna B., Vassilios Roussis, Dimitrios Perdetzoglou, Olga Tzakou, and Anargiros Loukis. 1997. “Chemical and Antibacterial Studies of Two *Helichrysum* Species of Greek Origin.” *Planta Medica* 63 (2): 181–83. <https://doi.org/10.1055/s-2006-957641>.
- Compositae Working Group (CWG). 2022. “<https://www.compositae.org> on 2022-05-24.” 2022. <https://doi.org/10.14284/411>.
- Daniel Antunes Viegas, AnaPalmeira-de-Oliveira, LígiaSalgueiro, and RitaPalmeira-de-Oliveira José Martinez-de-Oliveira. 2014. “*Helichrysum italicum*: From Traditional Use to Scientific Data.” *Journal of Ethnopharmacology* 151: 54–65. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.11.005>.
- E.A. Sobhy, S.S. El-Feky. 2007. “Chemical Constituents and Antimicrobial Activity of *Helichrysum stoechas*.” *Asian Journal of Plant Sciences* 6 (4): 692–95. <https://doi.org/10.3923/ajps.2007.692.695>.
- Evangelos Axiotis, Maria Halabalaki, Leandros A. Skaltsounis. 2018. “An Ethnobotanical Study of Medicinal Plants in the Greek Islands of North Aegean Region.” *Frontiers in Pharmacology* 9 (409): 1–6. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00409>.
- Ferdinand Bohlmann, Christa Zdero, Jurgen Ziesche. 1979. “Neue Flavone Und Phloroglucin-Derivate Aus

- Helichrysum* Herbaceum Und *Helichrysum chrysargyrum*.” *Phytochemistry* 18: 1375–78. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(79\)83026-5](https://doi.org/10.1016/0031-9422(79)83026-5).
- Ferdinand Bohlmann, Lievy Hartono, Jasmin Jakupovic. 1985. “A Diterpene Related To Erythroxydiol From *Helichrysum refluxum*.” *Phytochemistry* 24 (3): 611–12. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)80783-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)80783-9).
- Ferdinand Bohlmann, Abtoinettes Uwita. 1979. “Weitere Phloroglucin-Derivate Aus *Helichrysum* Arten.” *Phytochemistry* 18: 2046–49. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)82740-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)82740-5).
- Ferdinand Bohlmann, Christa Zdero. 1980. “Neue Obliquin-Derivate Aus *Helichrysum serpyllifolium*.” *Phytochemistry* 19: 331–32. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)81988-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)81988-3).
- Ferdinand Bohlmann, Wolf-Rainer Abraham. 1979. “Neue Diterpene Aus *Helichrysum Acutatum*.” *Phytochemistry* 18: 1754–56. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(79\)80208-3](https://doi.org/10.1016/0031-9422(79)80208-3).
- Ferdinand Bohlmann, Wolf-Rainer Anraham. 1979. “Neue Prenylflavanone Aus *Helichrysum hypocephalum*.” *Phytochemistry* 18: 1851–53. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(79\)83068-X](https://doi.org/10.1016/0031-9422(79)83068-X).
- Ferdinand Bohlmann, Wolf-Rainer Abraham. 1979a. “Neue, Chlorsubstituierte Thiophenacetylenverbindungen Mit Ungewöhnlicher Struktur Aus *Helichrysum*-Arten.” *Phytochemistry* 18: 839–42. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(79\)80024-2](https://doi.org/10.1016/0031-9422(79)80024-2).
- . 1979b. “Neue Diterpene Und Weitere Inhaltsstoffe Aus *Helichrysum calliconum* Und *Helichrysum heterolasium*.” *Phytochemistry* 18: 889–91. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(79\)80043-6](https://doi.org/10.1016/0031-9422(79)80043-6).
- Frederic Medail, Katia Diadema. 2009. “Glacial Refugia Influence Plant Diversity Patterns in the Mediterranean Basin.” *Journal of Biogeography* 36: 1333–45. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2008.02051.x>.
- Funk, Vicki A, Alfonso Susanna, Tod F Stuessy, and Harold Robinson. 2009. “Chapter 11: Classification of Compositae.” In *Systematics, Evolution, and Biogeography of Compositae*, 171–89.
- Galbany-Casals, Mercè, Núria Garcia-Jacas, Llorenç Sáez, Carles Benedí, and Alfonso Susanna. 2009. “Phylogeny, Biogeography, and Character Evolution in Mediterranean, Asiatic, and Macaronesian *Helichrysum* (Asteraceae, Gnaphalieae) Inferred from Nuclear Phylogenetic Analyses.” *International Journal of Plant Sciences* 170 (3): 365–80. <https://doi.org/10.1086/596332>.
- Galbany-Casals, Mercè, Llorenç Sáez, and Carles Benedí. 2006. “A Taxonomic Revision of *Helichrysum* Sect. *Stoechadina* (Asteraceae, Gnaphalieae).” *Canadian Journal of Botany* 84 (8): 1203–32. <https://doi.org/10.1139/B06-082>.
- Galbany-Casals, Mercè, Llorenç Sáez, Carles Benedí, and Charles E. Jarvis. 2006. “Typification of Names in *Gnaphalium* L. and *Helichrysum* Mill. (Asteraceae), and Some Taxonomic Notes.” *Taxon* 55 (2): 489–501. <https://doi.org/10.2307/25065597>.
- GBIF Secretariat (2021). GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org on 2022-05-24. 2021. “<https://www.gbif.org/species/3131108>.” 2021. <https://doi.org/https://doi.org/10.15468/39omei>.
- Gokhan Zengin, Aleksandra Cvetanović, Uroš Gašić, Živoslav Tešić, Alena Stupar, Marie Carene Nancy Picot-Allain Gizem Bulut, Kouadio Ibrahime Sinan, Sengul Uysal, and Mohamad Fawzi Mahomoodally. 2020. “A Comparative Exploration of the Phytochemical Profiles and

- Biopharmaceutical Potential of *Helichrysum stoechas* subsp. *barrelieri* Extracts Obtained via Five Extraction Techniques.” *Process Biochemistry* 91: 113–25. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.12.002>.
- Greek Flora. 2022. “<https://www.greekflora.gr/el/Default.aspx>.” 2022. <https://www.greekflora.gr/el/Default.aspx>.
- Gren, Stoechadina D C, and Mercè Galbany-casals. 2006. “Conspectus of *Helichrysum* Mill. Sect. Stoechadina (DC.) Gren. and Godr.(Asteraceae, Gnaphalieae).” *Orsis: Organismes i Sistemes* 21: 59–81.
- Heino Martin Heyman; Franois Senejoux; Isabell Seibert; Thomas Klimkait; Vinesh Jaichand Maharaj; Jacobus Johannes Marion Meyer. 2015. “Identification of Anti-HIV Active Dicafeoylquinic- and Tricafeoylquinic Acids in *Helichrysum populifolium* by NMR-Based Metabolomic Guided Fractionation.” *Fitoterapia* 103: 155–64. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2015.03.024>.
- Hind, Nicholas, Kit Strange, and Jeremy Broome. 2007. “603. *Helichrysum orientale*.” *Curtis’s Botanical Magazine* 24 (4): 251–59. <https://doi.org/10.1111/j.1467-8748.2007.00602.x>.
- IUCN. 2021. “IUCN. 2021. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2021-3. <https://www.iucnredlist.org>. Accessed on 26.05.2022.” 2021. <https://www.iucnredlist.org>.
- Ivana S. Aljancic, Ivan Vuckovic, Milka Jadranin, Milica Pešic, Iris Đord-ovic, Ana Podolski-Renic, and Slobodan M. Milosavljevic Sonja Stojkovic, Nebojša Menkovic, Vlatka E. Vajs. 2014. “Two Structurally Distinct Chalcone Dimers from *Helichrysum zivojinii* and Their Activities in Cancer Cell Lines.” *Phytochemistry* 98: 190–96. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.11.025>.
- J. Jakupovic, M. Grenz, F. Bohlmann, G. M. Mungai. 1990. “12 β -hydroxyabieta-7,13-diene and other constituents from east african *Helichrysum* species.” *Phytochemistry* 29 (5): 1589–90. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(90\)80127-3](https://doi.org/10.1016/0031-9422(90)80127-3).
- Jakupovic, J., J. Kuhnke, A. Schuster, M. A. Metwally, and F. Bohlmann. 1986. “Phloroglucinol Derivatives and Other Constituents from South African *Helichrysum* Species.” *Phytochemistry* 25 (5): 1133–42. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)81569-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)81569-1).
- Jakupovic, J., A. Schuster, H. Sun, F. Bohlmann, and D. S. Bhakuni. 1987. “Prenylated Phthalides from *Anaphalis araneosa* and *Helichrysum platypterum*.” *Phytochemistry* 26 (2): 580–81. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)81462-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)81462-4).
- Jakupovic, J., C. Zdero, M. Grenz, F. Tschirz, L. Lehmann, S. M. Hashemi-Nejad, and F. Bohlmann. 1989. “Twenty-One Acylphloroglucinol Derivatives and Further Constituents from South African *Helichrysum* Species.” *Phytochemistry* 28 (4): 1119–31. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(89\)80195-5](https://doi.org/10.1016/0031-9422(89)80195-5).
- Kakam Zanetsie Antoine, Hidayat Hussain, Etienne Dongo, Karsten Krohn, Barbara Schulz. 2011. “Cameroonenoside A: A New Antialgal Phenolic Glycoside from *Helichrysum cameroonense*.” *Rec. Nat. Prod.* 5 (a): 305–8.
- Khotso Serabele, Weiyang Chen, Sidonie Tankeu, Sandra Combrinck, Clinton G.L. Veale, and Alvaro Viljoen Sandy van Vuuren, Sushil K. Chaudhary. 2021. “Comparative Chemical Profiling and Antimicrobial Activity of Two Interchangeably Used ‘Imphepho’ Species (*Helichrysum odoratissimum* and *Helichrysum petiolare*).” *South African Journal of Botany* 137: 117–32. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.09.023>.

- Lloyd, H. A., and H. M. Fales. 1967. "Terpene Alcohols of *Helichrysum dendroideum*." *Tetrahedron Letters* 8 (48): 4891–95. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)89626-X](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)89626-X).
- Lutz Opitz, Rudolf Hiinsel. 1970. "Helipyron, Ein Methylen-Bis-Triacetiurelacton Aus *Helichrysum italicum*." *Tetrahedron Letters* 38: 3369–70. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)98478-3](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)98478-3).
- M. Galbany-Casals, J. M. Blanco-Moreno, N. Garcia-Jacas, I. Breitwieser, R. D. Smissen. 2011. "Genetic Variation in Mediterranean *Helichrysum italicum* (Asteraceae; Gnaphalieae): Do Disjunct Populations of subsp. *microphyllum* Have a Common Origin?" *Plant Biology* 13: 678–87. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2010.00411.x>.
- M. Tsoukatou, Panos Petrakis, I. Chinou, Catherine Harvala, Vassilios Roussis. 2000. "AMAPSEEC, L16 - Chemical Variability and Chemotaxonomic Studies on Members of the Genus *Helichrysum* Growing in Greece." In *1st Congress on Medicinal and Aromatic Plants of South-Eastern Europe*, edited by M. Sekulovic, D., Maksimovic, S. & Ristic. Belgrade. http://www.amapseec.com/cmapseec.1/papers/pap_op16.htm.
- Maged G. El-Ghazooly, Abdalla M. El-Lakany, Mohamed I. Abou-Shoer, Amal H. Aly. 2003. "Chemical Constituents of *Helichrysum conglobatum* Growing in Egypt." *Natural Product Sciences* 9 (4): 213–19.
- Maggio, Antonella, Maurizio Bruno, Riccardo Guarino, Felice Senatore, and Vincenzo Ilardi. 2016. "Contribution to a Taxonomic Revision of the Sicilian *Helichrysum* Taxa by PCA Analysis of Their Essential-Oil Compositions." *Chemistry and Biodiversity* 13 (2): 151–59. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201500052>.
- Merikli, A L I H, Ferdinand Bohlmann, and Christa Zderoo. 1980. "Pyron-Derivate *Helichrysum*-Arten ." *Phytochemistry* 19: 639–44. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(80\)87030-0](https://doi.org/10.1016/0031-9422(80)87030-0).
- Michel Randriaminahy, Peter Proksch, Ludger Witteb, and Victor Wray. 1992. "Lipophilic Phenolic Constituents from *Helichrysum* Species Endemic to Madagascar." *Z. Naturforsch.* 47c: 10–16.
- Morikawa, Toshio, Kiyofumi Ninomiya, Junji Akaki, Namiko Kakihara, Hiroyuki Kuramoto, Yurie Matsumoto, Takao Hayakawa, et al. 2015. "Dipeptidyl Peptidase-IV Inhibitory Activity of Dimeric Dihydrochalcone Glycosides from Flowers of *Helichrysum arenarium*." *Journal of Natural Medicines*. <https://doi.org/10.1007/s11418-015-0914-8>.
- Morikawa, Toshio, Li Bo Wang, Kiyofumi Ninomiya, Seikou Nakamura, Hisashi Matsuda, Osamu Muraoka, Li Jun Wu, and Masayuki Yoshikawa. 2009. "Medicinal Flowers. XXX. Eight New Glycosides, Everlastosides F - M, from the Flowers of *Helichrysum arenarium*." *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 57 (8): 853–59. <https://doi.org/10.1248/cpb.57.853>.
- Morone-Fortunato, I., C. Montemurro, C. Ruta, R. Perrini, W. Sabetta, A. Blanco, E. Lorusso, and P. Avato. 2010. "Essential Oils, Genetic Relationships and in Vitro Establishment of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *italicum* from Wild Mediterranean Germplasm." *Industrial Crops and Products* 32 (3): 639–49. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.07.023>.
- P.H. Davis D. 1975. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Vol. 5*. Edited by Edinburgh University Press. Edinburgh: T. and A. Constable Ltd.
- Panayiotis Trigas, Eleftherios Kalpoutzakis, Epaminondas Kalogiannis, and Theophanis Anna-Thalassini Valli, Konstantinos Kougioumoutzis, Konstantinos Katopodis, Constantinidis. 2021. "Noteworthy New Floristic Records from Greece." *Botanica Serbica* 45 (2): 321–31.

<https://doi.org/10.2298/BOTSERB2102321T>.

- Panayotis Dimopoulos, Thomas Raus, Erwin Bergmeier, Theophanis Constantinidis, Gregoris Iatrou, Stella Kokkini, Arne Strid & Dimitrios Tzanoudakis. 2013. *Vascular Plants of Greece: An Annotated Checklist*. Edited by Nicholas J. Turland. Botanischer Garten und Botanisches Museum Berlin-Dahlem & Hellenic Botanical Society, 2013.
- PlantBase, The Euro+Med. 2022. "*Helichrysum* Mill., Published on the Internet [Http://Ww2.Bgbm.Org/EuroPlusMed/](http://Ww2.Bgbm.Org/EuroPlusMed/), 26-5-2022." <http://ww2.bgbm.org/EuroPlusMed/>.
- Pljevljakušić, Dejan, Dubravka Bigović, Teodora Janković, Slavica Jelačić, and Katarina Šavikin. 2018. "Sandy Everlasting (*Helichrysum arenarium* (L.) Moench): Botanical, Chemical and Biological Properties." *Frontiers in Plant Science* 9 (August): 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01123>.
- Popoola, Olugbenga K., Jeanine L. Marnewick, Fanie Rautenbach, Farouk Ameer, Emmanuel I. Iwuoha, and Ahmed A. Hussein. 2015. "Inhibition of Oxidative Stress and Skin Aging-Related Enzymes by Prenylated Chalcones and Other Flavonoids from *Helichrysum teretifolium*." *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules20047143>.
- Rigano, Daniela, Carmen Formisano, Ester Pagano, Felice Senatore, Sonia Piacente, Milena Masullo, Raffaele Capasso, Angelo A. Izzo, and Francesca Borrelli. 2014. "A New Acetophenone Derivative from Flowers of *Helichrysum italicum* (Roth) Don ssp. *italicum*." *Fitoterapia* 99 (1): 198–203. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2014.09.019>.
- Roussis, Vassilios, Maria Tsoukatou, Ioanna B. Chinou, and Catherine Harvala. 2002. "Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oils of Two *Helichrysum stoechas* Varieties Growing in the Island of Crete." *Journal of Essential Oil Research* 14 (6): 459–61. <https://doi.org/10.1080/10412905.2002.9699920>.
- Roussis, Vassilios, Maria Tsoukatou, Panos V. Petrakis, Ioanna Chinou, Melpomeni Skoula, and Jeffrey B. Harborne. 2000. "Volatile Constituents of Four *Helichrysum* Species Growing in Greece." *Biochemical Systematics and Ecology* 28 (2): 163–75. [https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(99\)00046-0](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(99)00046-0).
- S. Herrando-Moraira, J. M. Blanco-Moreno, L. Saez, M. Galbany-Casals. 2016. "Re-Evaluation of the *Helichrysum italicum* Complex (Compositae: Gnaphalieae): A New Species from Majorca (Balearic Islands)." *Collectanea Botanica* 35 (e009): 1–29. <https://doi.org/10.3989/collectbot.2016.v35.009>.
- Sala, A., M. Del Carmen Recio, R. M. Giner, S. Máñez, and J. L. Ríos. 2001. "New Acetophenone Glucosides Isolated from Extracts of *Helichrysum italicum* with Antiinflammatory Activity." *Journal of Natural Products* 64 (10): 1360–62. <https://doi.org/10.1021/np010125x>.
- Sandra Gouveia, Paula C. Castilho. 2011. "Characterisation of Phenolic Acid Derivatives and Flavonoids from Different Morphological Parts of *Helichrysum obconicum* by a RP-HPLC–DAD(–)–ESI–MSn Method." *Food Chemistry* 129: 645–51. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.078>.
- Schmidt-Lebuhn, Alexander N., Jeremy J. Bruhl, Ian R.H. Telford, and Paul G. Wilson. 2015. "Phylogenetic Relationships of *Coronidium*, *Xerochrysum* and Several Neglected Australian Species of '*Helichrysum*' (Asteraceae: Gnaphalieae)." *Taxon* 64 (1): 96–109. <https://doi.org/10.12705/641.5>.
- Svetolik Maksimovic, Vanja Tadic, Dejan Skala, Irena Zizovic. 2017. "Separation of Phytochemicals from *Helichrysum italicum*: An Analysis of Different Isolation Techniques and Biological Activity of Prepared Extracts." *Phytochemistry* 138: 9–28. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.01.001>.

- T.G. Tutin, V.H. Heywood, N.A. Burges, D.M. Moore, D.H. Valentine, S.M. Walters, D.A. Webb, ed. 1976. *Flora Europaea, Plantaginaceae to Compositae (and Rubiaceae)*. 1st ed. Great Britain: Cambridge University Press.
- Tagliatalata-Scafati, Orazio, Federica Pollastro, Giuseppina Chianese, Alberto Minassi, Simon Gibbons, Warunya Arunotayanun, Blessing Mabebie, Mauro Ballero, and Giovanni Appendino. 2013. "Antimicrobial Phenolics and Unusual Glycerides from *Helichrysum italicum* subsp. *microphyllum*." *Journal of Natural Products* 76 (3): 346–53. <https://doi.org/10.1021/np3007149>.
- The Angiosperm Phylogeny Group. 1985. "Botanical Journal of the Linnean Society." *Botanical Journal of the Linnean Society* 90 (3): i–ii. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1985.tb00376.x>.
- TICA (The International Compositae Alliance) - Global Compositae Database. n.d. "https://www.compositae.org/gcd.php." <https://doi.org/https://doi.org/10.14284/411>.
- Tonka Ninčević, Marija Jug-Dujaković, Martina Grdiša, Zlatko Liber, Filip Varga, Dejan Pljevljakušić, Zlatko Šatović. 2021. "Population Structure and Adaptive Variation of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don along Eastern Adriatic Temperature and Precipitation Gradient." *Scientific Reports* 11 (24333): 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03548-6>.
- Toshio Morikawa, Li-Bo Wang, Seikou Nakamura, Kiyofumi Ninomiya, Eri Yokoyama, Hisashi Matsuda, Osamu Muraoka, Li-Jun Wu, and Masayuki Yoshikawa. 2009. "Medicinal Flowers. Xxvii.1) New Flavanone and Chalcone Glycosides, Arenariumosides i, ii, iii, and iv, and Tumor Necrosis Factor- α Inhibitors from Everlasting, Flowers of *Helichrysum arenarium*." *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 57 (4): 361–67. <https://doi.org/10.1248/cpb.57.361>.
- Tsoukatou, Maria, Vassilios Roussis, Ioanna Chinou, Panos V. Petrakis, and Antonio Ortiz. 1999. "Chemical Composition of the Essential Oils and Headspace Samples of Two *Helichrysum* Species Occurring in Spain." *Journal of Essential Oil Research* 11 (4): 511–16. <https://doi.org/10.1080/10412905.1999.9701198>.
- Vernin, Gaston, and Jean Claude Poite. 1998. "GC/MS Analysis of Volatile Components of Everlasting (*Helichrysum stoechas* L.) Essential Oil." *Journal of Essential Oil Research* 10 (5): 553–57. <https://doi.org/10.1080/10412905.1998.9700969>.
- Vittoria Borgonetti, Francisco Les, Víctor López, Nicoletta Galeotti. 2020. "Attenuation of Anxiety-Like Behavior by *Helichrysum stoechas* (L.) Moench Methanolic Extract through Up-Regulation of ERK Signaling Pathways in Noradrenergic Neurons." *Pharmaceuticals* 13: 472. <https://doi.org/10.3390/ph13120472>.
- Vrkoč, Jan, Miloš Buděšínský, Ladislav Dolejš, and Soňa Vašíčková. 1975. "Arenophthalide A: A New Phthalide Glycoside from *Helichrysum arenarium* Roots." *Phytochemistry* 14 (8): 1845–48. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(75\)85308-8](https://doi.org/10.1016/0031-9422(75)85308-8).
- Φοίτος, Δ, Θ Κωσταντινίδης, and Γ Καμάρη. 2009. *Βιβλίο Ερυθρών Δεδομένων Των Σπάνιων & Απειλούμενων Φυτών Της Ελλάδας -Τόμος 2*. Edited by Θεοφάνης Κωνσταντινίδης & Γεωργία Καμάρη Δημήτριος Φοίτος. Πάτρα: Ελληνική Βοτανική Εταιρεία.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. Μελέτη φυτοχημικού προφίλ των 11 άγριων taxa *Helichrysum* ελληνικής προέλευσης

2.1 Σκοπός εργασίας

Σκοπό της παρούσας μελέτης αποτελεί η για πρώτη φορά ποιοτική ανάλυση των κύριων συστατικών των μεθανολικών και ολικών εκχυλισμάτων από υπέργεια μέρη των 11 αυτοφυών taxa ελίχρυσων που απαντούν στην Ελλάδα. Η συγκεκριμένη, μη στοχευμένη μελέτη του φυτοχημικού προφίλ των εκχυλισμάτων διεξήχθη με την διαδικασία ταυτοποίησης δευτερογενών μεταβολιτών σε μίγματα (dereplication), με την βοήθεια ενόργανης ανάλυσης που περιελάμβανε υγρή χρωματογραφία υπερυψηλής απόδοσης (UHPLC), συζευγμένη με φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (HR-MS), με ανιχνευτή τροχιακής παγίδευσης ιόντων (OrbiTrap) και τεχνική ιονισμού ηλεκτροψεκασμού (ESI +/-, θετικός και αρνητικός ιονισμός).

2.1.1 Εισαγωγή

Το γένος *Helichrysum* παρουσιάζει μια μεγάλη ποικιλία σε φαινολικούς και οξυγονωμένους δευτερογενείς μεταβολίτες οι οποίοι, εξαιρουμένων των πτητικών μεταβολιτών (τερπένια), μπορούν να ταξινομηθούν σε πέντε κύριους δομικούς τύπους: φλαβονοειδή και χαλκόνες, φαινολικά οξέα, πυρόνες, βενζοφουράνια, φλορογλουσινόλες (Akaberi et al. 2019). Οι κυριότεροι διαλύτες εκχύλισης για τις μελέτες (profiling) των ολικών εκχυλισμάτων περιλαμβάνουν τα μεθανόλη, αιθανόλη, ακετονιτρίλιο, διχλωρομεθάνιο, υδροαλκοολικά και υδρομεθανολικά μίγματα με την ταυτοποίηση των μεταβολιτών να έχει πραγματοποιηθεί με 2 κατηγορίες αναλυτών μάζας τροχιακής παγίδευσης ιόντων (OrbiTrap) και τετραπόλου-χρόνου πτήσης (Q-TOF) όπως φαίνεται στον Πίνακα 2.1.

Ενδεικτικές βιβλιογραφικές μελέτες του φυτοχημικού προφίλ μεθανολικών εκχυλισμάτων Ευρωπαϊκών ειδών του γένους *Helichrysum* παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.1 και έχουν διεξαχθεί στα είδη:

- *H. devium* J.Y.Johnson, με ανίχνευση 34 μεταβολιτών μεταξύ των οποίων quinic acid, παράγωγα βενζοϊκών οξέων όπως του protocatechuic acid, παράγωγα υδροξυκινναμικών οξέων όπως mono-, di-, tri-caffeoylquinic acids, malonyldicaffeoylquinic acids, caffeoylferuloylquinic acids καθώς και *O*-γλυκοζυλιωμένα φλαβονοειδή των quercetin, luteolin, *O*-γλυκοζυλιωμένα, μεθυλιωμένα φλαβονοειδή όπως isorhamnetin-*O*-hexoside και άγλυκα luteolin, apigenin.

- *H. melaleucum* Rchb. Ex Holl, με ανίχνευση 68 μεταβολιτών μεταξύ των οποίων quinic acid, παράγωγα υδροξυκινναμικών οξέων όπως των caffeic acid, coumaric acid, ferulic acid (mono-, di-caffeoylquinic acids, coumaroylcaffeoylquinic acids, malonylcaffeoylquinic acids, caffeoylferuloylquinic acids) *O*-γλυκοζυλιωμένα φλαβονοειδή των kaempferol, quercetin, *O*-γλυκοζυλιωμένα, μεθυλιωμένα φλαβονοειδή των mearnsetin, isorhamnetin, hispidulin, άγλυκο apigenin και ειδικά το *O*-γλυκοζυλιωμένο

λιγνάνιο pinoresinol-4-*O*-hexoside και η ανθρακινόνη 1,2,6-trihydroxy-7,8-dimethoxy-3-methylantraquinone.

- *H. monizii* Lowe, με ανίχνευση 33 μεταβολιτών μεταξύ των οποίων quinic acid, παράγωγα φαινολικών οξέων όπως του protocatechuic acid, παράγωγα υδροξυκινναμικών οξέων όπως των caffeic, coumaric, ferulic acids (mono-, di-, tri-caffeoylquinic acids, feruloylquinic acids, coumaroylquinic acids, malonyldicaffeoylquinic acids, caffeoylferuloylquinic acids, caffeoylcoumaroylquinic acids), *O*-γλυκοζυλιωμένα, μεθυλιωμένα флаβονοειδή των isorhamnetin, hispidulin και ειδικά το *O*-γλυκοζυλιωμένο λιγνάνιο medioresinol-*O*-hexoside και η ακετοφαινόνη brevifolin.

- *H. obconicum* DC., με ανίχνευση 50 μεταβολιτών μεταξύ των οποίων quinic acid, παράγωγα φαινολικών οξέων όπως των υδροξυκινναμικών οξέων caffeic, coumaric acids (caffeoylquinic acids, malonylcaffeoylquinic acids, coumaroylquinic acids, caffeoylshikimic acids), *O*-γλυκοζυλιωμένα флаβονοειδή των kaempferol, quercetin apigenin, άγλυκα apigenin, kaempferol, μεθυλιωμένα флаβονοειδή και ειδικά το γλυκοζυλιωμένο ιριδοειδές lamiridosins-di-*O*-hexoside.

- *H. plicatum*, με ανίχνευση 142 μεταβολιτών μεταξύ των οποίων παράγωγα α-, γ-πυrones, флаβονοειδή των δομικών τύπων (flavone, flavanone, flavonol, chalcone), τερπένια (σεσκιτερπένια, διτερπένια), φλορογλουσινόλες, φθαλίδια, φαινολικά οξέα, ακετοφαινόλες, πολυακόρεστα λιπαρά οξέα.

- *H. stoechas* και *H. stoechas* subsp. *barrelieri*, με ανίχνευση 20 και 107 μεταβολιτών, αντίστοιχα, μεταξύ των οποίων παράγωγα υδροξυβενζοϊκών και υδροξυκινναμικών οξέων, κουμαρίνες, παράγωγα флаβονοειδών και πυρονών.

- *H. zivojinii*, με ανίχνευση 14 μεταβολιτών μεταξύ των οποίων παράγωγα βενζοϊκού οξέως (phthalic acid), υδροξυκινναμικών οξέων (chlorogenic acids), παράγωγα *O*-γλυκοζυλιωμένων флаβονοειδών των quercetin, luteolin, kaempferol, apigenin, άγλυκα naringenin, apigenin.

- *H. italicum* subsp. *italicum* και subsp. *tyrrhenicum*, με ανίχνευση 100 μεταβολιτών μεταξύ των οποίων παράγωγα υδροξυβενζοϊκού οξέως, υδροξυκινναμικών οξέων, παράγωγα флаβονοειδών, κουμαρίνες, παράγωγα πυρονών.

Πίνακας 2.1: Εκχυλίσματα Ευρωπαϊκών και Μεσογειακών ειδών του γένους *Helichrysum* που μελετήθηκαν ως προς το φυτοχημικό προφίλ τους με την τεχνική υγρής χρωματογραφίας, συζευγμένη με φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας

<i>Helichrysum</i> sp.	Προέλευση δρόγης	Διαλύτης εκχύλισης	Τεχνική ανάλυσης	Αναφορά
<i>H. devium</i>	Πορτογαλία	MeOH	LC-DAD/ESI-MS ⁿ	(Sandra C. Gouveia 2009)
<i>H. melaleucum</i>	Πορτογαλία	MeOH	LC-DAD/ESI-MS ⁿ	(Sandra C. Gouveia 2010)
<i>H. monizii</i>	Πορτογαλία	MeOH	LC-DAD/ESI-MS ⁿ	(Sandra Gouveia 2012)
<i>H. obconicum</i>	Πορτογαλία	MeOH	LC-DAD/ESI-MS ⁿ	(Sandra Gouveia 2011b)
<i>H. stoechas</i> subsp. <i>barrelieri</i>	Τουρκία	EtOH	UHPLC-HRMS	(Gokhan Zengin et al. 2020)
<i>H. stoechas</i>	Αλγερία	70% MeOH	LC-ESI-MS	(Abdallah Kherbache et al. 2020)
<i>H. plicatum</i>	Σερβία, Β. Μακεδονία	96% EtOH, DCM, ACN	HPLC-DAD/ESI-TOF-MS	(Bojan Vujic et al. 2020)
<i>H. zivojinii</i>	Β. Μακεδονία	Hexane, DCM, EtOAc, BuOH, MeOH	HPLC-DAD-TOF-MS	(Matić et al. 2013)
<i>H. italicum</i> subsp. <i>italicum</i>	Σλοβενία	MeOH/EtOH:H ₂ O	HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS	(Kramberger et al. 2020)
<i>H. italicum</i> subsp. <i>tyrrhenicum</i>				

2.2 Υλικά και Μέθοδοι

2.2.1 Όργανα-Υλικά

Χρησιμοποιήθηκαν: α) Συσκευή εκχύλισης Ultrasonic bath (Elmasonic S 100 H, 37KHz, 150W), β) Σύστημα υγρής χρωματογραφίας υπερυψηλής απόδοσης, συζευγμένης με υβριδικό φασματοόμετρο μαζών (Ultra-High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry), με αναλυτή γραμμικής παγίδας ιόντων (linear ion trap - LTQ) σε σειρά με τροχιακή παγίδα ιόντων (orbital trap-Orbitrap / Fourier Transform Mass Spectrometer), γ) Μεθανόλη για τα αναλυτικά πειράματα καθαρότητας αναλυτικού βαθμού (LC-MS grade, Merck), δ) Νερό από συσκευή παραγωγής υπερκάθολου νερού (Milli-Q®), ε) Αναλυτική στήλη αντίστροφης φάσης UPLC®-Column Acquity BEH C18 (50x1.0 mm; 1.7μm), στ) Σύριγγες και φίλτρα σύριγγας PTFE, γυάλινα vial 14ml (Sigma Aldrich).

2.2.2 Συλλογή δειγμάτων 11 ελληνικών ελίχρυσων

Για τον εντοπισμό των θέσεων και των σημείων των ειδών H2, H3, H5, H9, H10, H11 που αναφέρονται παρακάτω (προσωπικές συλλογές) χρησιμοποιήθηκαν οι εφαρμογές γεωεντοπισμού Map Coordinates v5.2.5, Mobile Topographer v9.3.2, Google Earth v9.168.0.0, Google Maps καθώς και προσωπικές συνεντεύξεις με τον ερασιτέχνη βοτανικό Γιάννη Κοφινά-Καλλέργη (Greek Flora). Η αναγνώριση των ειδών έγινε βάσει κλειδών (Arne Strid 2016).

(H1) *Helichrysum amorginum* αναγνωρίστηκε και συλλέχθηκε στο φυσικό του ενδιαίτημα σε βραχώδες, ασβεστολιθικό σημείο (≈300m) στην περιοχή της Μονής Χοζοβιώτισσας (Αμοργός) την άνοιξη του έτους 2013 από τους Δρ. Γιώργο Τσοκτουρίδη και Δρ. Νίκο Κρίγκα. Δείγμα του φυτικού υλικού διατηρείται στο αναγνωρισμένο ερμπάριο του Βαλκανικού Βοτανικού Κήπου Κρουσσίων (BBGK), του Ινστιτούτου Γενετικής Βελτίωσης και Φυτογενετικών Πόρων (Ι.Γ.Β. Φ.Π.) του Ελληνικού Γεωργικού Οργανισμού - "Δήμητρα" (ΕΛΓΟ - Δήμητρα) στη Θέρμη Θεσσαλονίκης. Φωτογραφία του αυτοφυούς δείγματος φαίνεται στην Εικόνα Π2.1 του παραρτήματος Κεφ. 2 (σελ. 339).

(H2) *Helichrysum doerfleri* που αναγνωρίστηκε και συλλέχθηκε στο φυσικό του ενδιαίτημα σε βραχώδες, ασβεστολιθικό σημείο (≈1312 m) στο όρος Θρυπτή (Κρήτη) στις 24.6.2019 από τον Υπ. Δρ. Ιορδάνη Σαμανίδη. Δείγμα του φυτικού υλικού διατηρείται στο ερμπάριο BBGK του Ι.Γ.Β. Φ.Π.) στη Θέρμη Θεσσαλονίκης με κωδικό 20,136. Φωτογραφία του αυτοφυούς δείγματος φαίνεται στην Εικόνα Π2.2 του παραρτήματος Κεφ. 2 (σελ. 340).

(H3) *Helichrysum heldreichii* αναγνωρίστηκε και συλλέχθηκε στο φυσικό του ενδιαίτημα σε βραχώδες, ασβεστολιθικό σημείο (≈520m) στο φαράγγι Αράδαινας (Κρήτη) στις 23.6.2019 από τον ερασιτέχνη βοτανικό Γιάννη Κοφινά-Καλλέργη και τον Υπ. Δρ. Ιορδάνη Σαμανίδη. Δείγμα του φυτικού

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. Μελέτη φυτοχημικού προφίλ των 11 άγριων taxa *Helichrysum* Mill. ελληνικής προέλευσης. υλικού διατηρείται στο ερμπάριο BBGK του Ι.Γ.Β.Φ.Π. στη Θέρμη Θεσσαλονίκης με κωδικό 20,134. Φωτογραφία του άγριου δείγματος φαίνεται στην Εικόνα Π2.3 του παραρτήματος Κεφ. 2 (σελ. 341).

(H4) *Helichrysum italicum* subsp. *italicum* συλλέχθηκε στο φυσικό του ενδιαίτημα στην Αμοργό το καλοκαίρι του 2019 από την ΚοινΣΕπ Συνεργασία για την Αμοργό. Το δείγμα αναγνωρίστηκε από τον Υπ. Δρ. Ιορδάνη Σαμανίδη. Φωτογραφία του αυτοφυούς δείγματος φαίνεται στην Εικόνα Π2.4 του παραρτήματος Κεφ. 2 (σελ. 342). Το δείγμα επιβεβαιώθηκε με σύγκριση της ταξιανθίας του με αυτήν του *H. stoechas* subsp. *barrelieri* (συγγενές μορφολογικά είδος) βάσει της κλείδας του Strid (2016) (Εικόνα Π2.12, σελ. 350) (Arne Strid 2016).

(H5) *Helichrysum italicum* subsp. *microphyllum* αναγνωρίστηκε και συλλέχθηκε στο φυσικό του ενδιαίτημα σε βραχώδες, ασβεστολιθικό σημείο (~573 m) σε περιοχή των Σφακίων (Κρήτη) στις 23.6.2019 από τον ερασιτέχνη βοτανικό Γιάννη Κοφινά-Καλλέργη και τον Υπ. Δρ. Ιορδάνη Σαμανίδη. Δείγμα του φυτικού υλικού διατηρείται στο ερμπάριο BBGK του Ι.Γ.Β. Φ.Π. στη Θέρμη Θεσσαλονίκης με κωδικό 20,132. Φωτογραφία του αυτοφυούς δείγματος φαίνεται στην Εικόνα Π2.5 του παραρτήματος Κεφ. 2 (σελ. 343).

(H6) *Helichrysum luteoalbum* αναγνωρίστηκε και συλλέχθηκε στο φυσικό του ενδιαίτημα σε περιοχή του όρους Πάρνωννα (Πελοπόννησος) στις 25.6.2020 από τον Δρ. Ελευθέριο Καλπουτζάκη. Δείγμα του φυτικού υλικού διατηρείται στο ερμπάριο του Τμήματος Φαρμακευτικής, Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Προϊόντων του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Φωτογραφία του αυτοφυούς δείγματος φαίνεται στην Εικόνα Π2.6 του παραρτήματος Κεφ. 2 (σελ. 344).

(H7) *Helichrysum orientale* αναγνωρίστηκε και αγοράστηκε από τοπική αγορά των Κυθήρων τον Μάιο 2019 από τον Υπ. Δρ. Ιορδάνη Σαμανίδη. Πρόκειται για αυτοφυές δείγμα συγκομιδής 2018 από την νήσο Χύτρα των Κυθήρων. Δείγμα του φυτικού υλικού διατηρείται στο ερμπάριο BBGK του Ι.Γ.Β. Φ.Π. στη Θέρμη Θεσσαλονίκης με κωδικό 20,133. Φωτογραφία του αυτοφυούς δείγματος φαίνεται στην Εικόνα Π2.7 του παραρτήματος Κεφ. 2 (σελ. 345).

(H8) *Helichrysum plicatum* αναγνωρίστηκε και συλλέχθηκε στο φυσικό του ενδιαίτημα στο Όρος Βαρνούνας (Φλώρινα) το καλοκαίρι του 2020 από τον Δρ. Νίκο Κρίγκα. Δείγμα του φυτικού υλικού διατηρείται στο ερμπάριο BBGK του Ι.Γ.Β. Φ.Π. στη Θέρμη Θεσσαλονίκης. Φωτογραφία του αυτοφυούς δείγματος φαίνεται στην Εικόνα Π2.8 του παραρτήματος Κεφ. 2 (σελ. 346).

(H9) *Helichrysum sibthorpii* αναγνωρίστηκε και συλλέχθηκε στο φυσικό του ενδιαίτημα σε βραχώδες, ασβεστολιθικό σημείο (1950-2033 m) στην κορυφή του όρους Άθως (Αγ. Όρος) στις 05.08.2019 από τον ερασιτέχνη βοτανικό Γιάννη Κοφινά-Καλλέργη και τον Υπ. Δρ. Ιορδάνη Σαμανίδη. Δείγμα του φυτικού υλικού διατηρείται στο ερμπάριο BBGK του Ι.Γ.Β.Φ.Π. στη Θέρμη Θεσσαλονίκης με

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. Μελέτη φυτοχημικού προφίλ των 11 άγριων taxa *Helichrysum* Mill. ελληνικής προέλευσης. κωδικό 20,137. Φωτογραφία του αυτοφυούς δείγματος φαίνεται στην Εικόνα Π2.9 του παραρτήματος Κεφ. 2 (σελ. 347).

(H10) *Helichrysum stoechas subsp. barrelieri* (Ten.) Nyman αναγνωρίστηκε και συλλέχθηκε στο φυσικό του ενδιαίτημα σε βραχώδες, ασβεστολιθικό σημείο (106 m) στον λόφο Αγ. Στεφάνου (Μόντε Σμιθ, Ρόδος) στις 25.04.2016 από τον Υπ. Δρ. Ιορδάνη Σαμανίδη. Δείγμα του φυτικού υλικού διατηρείται στο ερμπάριο του Τμήματος Φαρμακευτικής, Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Προϊόντων του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Φωτογραφία του αυτοφυούς δείγματος φαίνεται στην Εικόνα Π2.10 του παραρτήματος Κεφ. 2 (σελ. 348).

(H11) *Helichrysum taenari* αναγνωρίστηκε και συλλέχθηκε στο φυσικό του ενδιαίτημα σε βραχώδες, ασβεστολιθικό σημείο (≈ 425 m) στο ακρωτήριο Ταίναρο (Πελοπόννησος) στις 17.05.2019 από τον ερασιτέχνη βοτανικό Γιάννη Κοφινά-Καλλέργη και τον Υπ. Δρ. Ιορδάνη Σαμανίδη. Δείγμα του φυτικού υλικού διατηρείται στο ερμπάριο BBGK του Ι.Γ.Β.Φ.Π. στη Θέρμη Θεσσαλονίκης με κωδικό 20,135. Φωτογραφία του αυτοφυούς δείγματος φαίνεται στην Εικόνα Π2.11 του παραρτήματος Κεφ. 2 (σελ. 349).

2.2.3 Ξήρανση και κονιοποίηση της δρόγης

Χρησιμοποιήθηκαν ως δρόγες τα υπέργεια μέρη των taxa H1-H11. Τα δείγματα ξηράθηκαν υπό σκιά στους $+20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ για 7 ημέρες και κονιοροτοποιήθηκαν με την χρήση μπλέντερ. Κάθε δείγμα αποτελούνταν από αναλογία βάρους ταξιανθιών: φυλλωδών στελεχών περίπου 1:1 και μετά την κοπή διατηρήθηκαν στους $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ σε πλαστικές συσκευασίες PET για περαιτέρω επεξεργασία.

2.2.4 Προετοιμασία δειγμάτων για UPLC-HR(ESI-)MS/MSMS

Ποσότητα 210-240 mg κονιοροποιημένης, ξηρής δρόγης τοποθετήθηκε σε vial 14 ml με 5 ml MeOH LC-MS grade και εκχυλίστηκαν σε λουτρό υπερήχων για 15 min σε θερμοκρασιακό εύρος $25^{\circ} - 40^{\circ}$. Το μίγμα αφέθηκε σε σκοτεινό σημείο για 24 h και φιλτραρίστηκε από φίλτρο σύριγγας 0,45 μm PTFE. Η εκχυλισμένη δρόγη εκχυλίστηκε ξανά υπό τις ίδιες συνθήκες. Τα φιλτραρισμένα εκχυλίσματα συνενώθηκαν και ξηράθηκαν σε περιστρεφόμενο εξατμιστήρα σε λουτρό νερού $<40^{\circ}$ και υπό υψηλό κενό. Τα ξηρά εκχυλίσματα ανασυστάθηκαν σε τελική συγκέντρωση 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ με MeOH LC-MS grade και απιονισμένο νερό για την LC-MS ανάλυση. Οι αποδόσεις των εκχυλίσεων παρουσιάζονται στον Πίνακα Π2.1 στο παράρτημα του Κεφαλαίου 2 (σελ. 351).

2.2.5 Μέθοδος ανάλυσης UPLC-HR(ESI-)/MS/MSMS

Η μέθοδος της χρωματογραφικής ανάλυσης είχε ως στόχο τον επαρκή διαχωρισμό των μεταβολιτών και η φασματομετρική μέθοδος τον ιονισμό όσο το δυνατόν περισσότερων μορίων και την καταγραφή τους. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης Α το νερό με προσθήκη φορμικού οξέος ($\text{H}_2\text{O}+0,1\%\text{FA}$) και ως Β το ακετονιτριλίο (ACN) για την ανάπτυξη αναλυτικής μεθόδου βαθμιδωτής έκλουσης ($t=18\text{min}$). Η έκλουση ξεκίνησε με 5% του Β και σε 1 min έφτασε το 15%. Στα επόμενα 1-15 min το ποσοστό του Β έφτασε το 100%. Στα 15-17 min, ο διαλύτης Β διατηρήθηκε στο 100% και στα 17-17.50 min μειώθηκε στο 95% και διατηρήθηκε για μεταξύ των 17.50-20.0 min δηλαδή στις αρχικές συνθήκες για την εξισορρόπηση του. Η θερμοκρασία στήλης διατηρήθηκε σταθερή στους 40°C. Ο συνολικός χρόνος ανάλυσης ήταν 20 min με ρυθμό ροής 400 $\mu\text{L}/\text{min}$. Ο όγκος δείγματος που εισαγόταν κάθε φορά στο σύστημα ορίστηκε στα 10 μL και η θερμοκρασία του αυτόματου δειγματολήπτη στους 7°C. Τα φάσματα μάζας ελήφθησαν σε συνθήκες αρνητικού και θετικού ιονισμού χρησιμοποιώντας πηγή ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI). Η θερμοκρασία τριχοειδούς ορίστηκε στα 350°C, το δυναμικό πηγής 3,60kV (pos), 2,70kV (neg) και το δυναμικό φακών -3.00V (lens 0), -15.00V (lens 1) σε positive mode και +3.00V (lens 0), +15.00V (lens 1) σε negative mode. Η ροή αερίων sheath και auxiliary προσαρμόστηκαν στα 45 and 15 arb, αντιστοίχως. Τα φάσματα μάζας κατέγραψαν ένα εύρος μαζών 113-1000 m/z , με resolving power 30,000 στα 500 m/z και ρυθμό σάρωσης 1 microscan/sec. Τα πειράματα HRMS/MS λήφθηκαν με μέθοδο data-depending method με collision energy 35,0% ($q = 0,25$). Το σύστημα βαθμονομήθηκε ανά 50 ενέσεις με ειδικό διάλυμα βαθμονόμησης.

2.2.6 Επεξεργασία δεδομένων

Τα δεδομένα που προέκυψαν από τις αναλύσεις των 11 μεθανολικών εκχυλισμάτων σε +/- ιονισμό καταγράφηκαν ως αρχεία Xcalibur raw files (.raw, Thermo) και επεξεργάστηκαν με την βοήθεια του λογισμικού Xcalibur™ 2.0.7 Software (Thermo Scientific).

2.2.7 Μεθοδολογία ταυτοποίησης μεταβολιτών

Η επιλογή των μεταβολιτών στα χρωματογραφήματα των 11 μεθανολικών εκχυλισμάτων έγινε βάσει του επιπέδου θορύβου ($>1 \times 10^5$), του σήματος του κύριου ψευδομοριακού ιόντος (σε θετικό ή αρνητικό ιονισμό) και των EC, RDBeq σύμφωνα με το φάσμα μάζας κάθε κορυφής. Η ταυτοποίηση των μεταβολιτών, όπου ήταν δυνατό, έγινε με σύγκριση του προφίλ θραυσματοποίησης με βιβλιογραφικά δεδομένα.

2.3 Αποτελέσματα-Συζήτηση

2.3.1 Ταυτοποίηση δευτερογενών μεταβολιτών

Από την ποιοτική ανάλυση των 11 μεθανολικών εκχυλισμάτων των 11 taxa ελληνικών ελίχρυσων, εντοπίστηκαν 308 (100%) διαφορετικοί μεταβολίτες (M1-M308) σε θετικό ή αρνητικό ιοντισμό από τους οποίους 144 (46,75%) άγνωστοι και 164 (53,25%) ημι- και ταυτοποιημένοι. Οι 308 μεταβολίτες δημιουργούν ένα σύνολο 523 εμφανίσεων (άθροισμα +) σε όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν (Πίνακας 2.2). Τα χρωματογραφικά και φασματομετρικά δεδομένα των μεταβολιτών παρουσιάζονται στους Πίνακες Π2.2-2.12 του παραρτήματος του Κεφαλαίου 2 (σελ. 351-372).

Στο σύνολο των μεταβολιτών το μεγάλο ποσοστό των μη ταυτοποιημένων (46,75%) αποδίδεται στην έλλειψη επαρκών βιβλιογραφικών, φασματομετρικών δεδομένων για απομονωμένους μεταβολίτες ή και αντίστοιχες μελέτες dereplication των συγκεκριμένων και διαφορετικών ειδών ελίχρυσων. Το μεγαλύτερο ποσοστό μη ταυτοποιημένων (>50%) εντοπίστηκε στα είδη *H. heldreichii* (H3, 53,16%), *H. sibthorpii* (H9, 52,63%) κι ακολουθούν με φθίνουσα σειρά τα είδη *H. plicatum* (H8, 38,64%), *H. italicum* subsp. *microphyllum* (H5, 32,84%), τα *H. stoechas* subsp. *barrelieri* (H10, 23,81%), *H. amorginum* (H1, 23,08%), *H. taenari* (H11, 22,50%) και τέλος, τα *H. italicum* subsp. *italicum* (H4, 15,79%), *H. luteoalbum* (H6, 13,64%), *H. orientale* (H7, 12,50%) και *H. doerfleri* (H2, 10%), όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.1.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. Μελέτη φυτοχημικού προφίλ των 11 άγριων taxa *Helichrysum* Mill. ελληνικής προέλευσης.

Πίνακας 2.2: Φασματομετρικά (*m/z*, *EC*, *RDBeq*), χρωματογραφικά (*Rt*) δεδομένα μεταβολιτών που εντοπίστηκαν στα 11 αυτοφυή taxa *Helichrysum* ελληνικής προέλευσης

Μεταβολίτης	ID	Εύρος <i>Rt</i> (min)	IM (+/-)	EC	H1 (HA_2013)	H2 (HD_2019)	H3 (HHa_2019)	H4 (HIIa_2018)	H5 (HIM_2019)	H6 (HL_2020)	H7 (HOk_2018)	H8 (HPv_2020)	H9 (HS_2019)	H10 (HSBr_2016)	H11 (HT_2019)	Αρ. Εμφανίσεων
M1	Glucuheptonic acid	0,75	-	C ₇ H ₁₃ O ₈			+					+				2
M2	Hexose	0,76	-	C ₆ H ₁₁ O ₆							+					1
M3	Quinic acid	0,84-0,90	-	C ₇ H ₁₁ O ₆		+		+	+	+		+	+	+	+	8
M4	Malic acid	0,91-1,00	-	C ₄ H ₅ O ₅	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	11
M5	Succinic acid	1,36	-	C ₄ H ₅ O ₄						+						1
M6	Unknown	1,46	-	C ₆ H ₁₁ O ₄									+			1
M7	Caffeoyl glucose	1,62	-	C ₁₅ H ₁₇ O ₉								+				1
M8	Protocatechuic acid- <i>O</i> -hexoside	2,21-2,33	-	C ₁₃ H ₁₅ O ₉			+	+	+	+		+	+	+		7
M9	Disaccharide 1	2,39-2,47	-	C ₁₂ H ₂₁ O ₉		+	+									2
M10	Caffeoylquinic acid 1	2,60-2,70	-	C ₁₆ H ₁₇ O ₉			+	+				+	+	+		5
M11	2,4-Dihydroxybenzoic acid	2,94-3,07	-	C ₇ H ₅ O ₄				+		+						2
M12	Protocatechuic acid	2,99	-	C ₇ H ₅ O ₄										+		1
M13	Syringic acid 4- <i>O</i> -β- <i>D</i> - glucopyranoside	3,14	-	C ₁₅ H ₁₉ O ₁₀							+					1
M14	Disaccharide 2	3,46	-	C ₁₂ H ₂₁ O ₉			+									1
M15	2-Isopropyl malic acid	3,47	-	C ₇ H ₁₁ O ₅					+							1
M16	Caffeoylquinic acid 2	3,48-3,66	-	C ₁₆ H ₁₇ O ₉			+	+	+	+		+	+		+	7
M17	Caffeoyl hexoside	3,84-4,38	-	C ₁₅ H ₁₇ O ₉		+		+	+	+	+	+	+	+	+	9
M18	1- <i>O</i> -Protocatechuy-β- <i>D</i> -xylopyranoside (uralenneoside)	4,00	-	C ₁₂ H ₁₃ O ₈									+			1
M19	Hydroxycinnamic acid derivative	4,00	-	C ₁₅ H ₁₉ O ₉					+							1
M20	Aesculin	4,05-4,12	-	C ₁₅ H ₁₅ O ₉			+	+								2
M21	Unknown	4,27	-	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₃				+								1
M22	Quercetagetin-3,7-di- <i>O</i> -hexoside	4,28	-	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₈			+									1
M23	p-Benzoic acid	4,34	-	C ₇ H ₅ O ₃	+											1
M24	Caffeoylquinic acid 3	4,43-4,49	-	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	11
M25	Licoagroside B	4,70	-	C ₁₈ H ₂₃ O ₁₂	+											1
M26	Unknown	4,80	-	C ₉ H ₁₃ O ₅			+									1

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. Μελέτη φυτοχημικού προφίλ των 11 άγριων taxa *Helichrysum* Mill. ελληνικής προέλευσης.

M27	Caffeic acid	4,85-4,93	-	C ₉ H ₇ O ₄	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	11

Πίνακας 2.2 συνέχεια

Μεταβολίτης	ID	Εύρος Rt (min)	IM (+/-)	EC	H1 (HA_2013)	H2 (HD_2019)	H3 (HHa_2019)	H4 (HIIa_2018)	H5 (HIM_2019)	H6 (HL_2020)	H7 (HOK_2018)	H8 (HPv_2020)	H9 (HS_2019)	H10 (HSBr_2016)	H11 (HT_2019)	Αρ. Εμφανίσεων
M28	Aesculetin	4,86	-	C ₉ H ₅ O ₄			+									1
M29	Unknown	4,93	-	C ₁₉ H ₂₇ O ₁₂	+											1
M30	Unknown	4,94	-	C ₁₈ H ₂₅ O ₁₀	+											1
M31	Caffeoyl glycerol	5,00	-	C ₁₂ H ₁₃ O ₆											+	1
M32	Unknown	5,04	-	C ₁₈ H ₂₇ O ₉			+									1
M33	Dicaffeoylquinic acid 1	5,05-5,10	-	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₂			+	+			+	+	+	+		6
M34	Unknown	5,13-5,16	-	C ₂₀ H ₃₁ O ₁₀			+			+	+					3
M35	Isovitexin 2"- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucoside HCOOH adduct	5,14	-	C ₂₈ H ₃₁ O ₁₇								+				1
M36	Unknown	5,16	-	C ₁₉ H ₁₉ O ₁₁											+	1
M37	Myricetin-3- <i>O</i> -glucoside	5,22-5,31	-	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₃				+						+		2
M38	Kaempferol diglycoside	5,25	-	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆											+	1
M40	5- <i>O</i> -Feruloylquinic acid	5,31-5,39	-	C ₁₇ H ₁₉ O ₉		+	+			+	+	+	+	+	+	8
M41	Gnaphaliol- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucopyranoside as formate adduct	5,35	-	C ₂₀ H ₂₅ O ₁₁					+							1
M42	Quercetin glycoside 1	5,40	-	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂					+							1
M43	Unknown	5,41	-	C ₂₃ H ₂₁ O ₁₀										+		1
M44	Unknown	5,48-5,50	-	C ₁₀ H ₁₁ O ₇		+							+			2
M45	Unknown	5,51-5,57	-	C ₂₀ H ₂₉ O ₁₂						+			+			2
M46	Delphinidin-3-glycoside	5,56	-	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂				+								1
M47	Naringenin- <i>O</i> -hexoside 1	5,62	-	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀							+	+				2
M48	Naringenin- <i>O</i> -hexoside 2	5,72-5,77	-	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀							+	+				2
M49	Myricetin malonylhexoside	5,70	-	C ₂₄ H ₂₁ O ₁₆				+								1
M50	Unknown	5,70	-	C ₂₀ H ₂₇ O ₁₀					+							1
M51	Unknown	5,71	-	C ₁₅ H ₂₁ O ₈			+									1
M52	Unknown	5,75	-	C ₂₇ H ₃₅ O ₁₃			+									1
M53	Hydroxyjasmonate	5,75	-	C ₁₂ H ₁₇ O ₄					+							1

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. Μελέτη φυτοχημικού προφίλ των 11 άγριων taxa *Helichrysum* Mill. ελληνικής προέλευσης.

M54	Quercetin glycoside 2	5,79-5,83	-	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	+	+	+	+	+	+			+	+	+	9

Πίνακας 2.2 συνέχεια

Μεταβολίτης	ID	Εύρος Rt (min)	IM (+/-)	EC	H1 (HA_2013)	H2 (HD_2019)	H3 (HHa_2019)	H4 (HIIa_2018)	H5 (HIM_2019)	H6 (HL_2020)	H7 (HOK_2018)	H8 (HPv_2020)	H9 (HS_2019)	H10 (HSBr_2016)	H11 (HT_2019)	Αρ. Εμφανίσεων
M55	Kaempferol-3-O-glucoside	5,84-6,19	-	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	+	+				+	+				+	5
M56	Unknown	5,90	-	C ₁₀ H ₁₁ O ₅			+									1
M57	Unknown	5,96	-	C ₂₅ H ₃₃ O ₁₄					+							1
M58	Dicaffeoylquinic acid 2	5,96-6,13	-	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₂	+	+		+		+	+	+	+	+	+	9
M59	5,6,4'-Trihydroxy-3'-methoxyflavone-7-O-β-glucoside	6,00	-	C ₂₂ H ₂₁ O ₁₂								+				1
M60	Unknown	6,04	-	C ₂₅ H ₃₉ O ₁₃									+			1
M61	Dicaffeoylquinic acid 3	6,16-6,22	-	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₂			+		+	+					+	4
M62	Malonyl-dicaffeoylquinic acid	6,22	-	C ₂₈ H ₂₅ O ₁₅				+						+		2
M63	Kaempferol-7-O-hexoside	6,25	-	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁						+						1
M64	Apigenin-6-C-glucoside	6,30-6,36	-	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀						+		+			+	3
M65	Unknown	6,42	-	C ₂₃ H ₁₉ O ₉										+		1
M66	Eriodictyol-O-hexoside	6,44	-	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁				+								1
M67	Kaempferol-O-acetylhexoside	6,45-6,75	-	C ₂₃ H ₂₁ O ₁₂	+	+										2
M68	Dicaffeoylquinic acid 4	6,45	-	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₂											+	1
M69	Unknown	6,47-6,50	-	C ₂₅ H ₂₅ O ₁₁			+							+	+	3
M70	Quercetin glycoside 3	6,48-6,60	-	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂			+	+	+					+		4
M71	Luteolin glycoside	6,56	-	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁											+	1
M72	Unknown	6,60-6,71	-	C ₉ H ₁₅ O ₄	+	+	+	+		+	+		+	+	+	9
M73	Naringenin-O-hexoside 3	6,76-6,78	-	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀							+	+				2
M74	4-Feruloyl-5-caffeoylquinic acid	6,77	-	C ₂₆ H ₂₅ O ₁₂				+								1
M75	Unknown	6,78	-	C ₁₃ H ₁₉ O ₄					+							1
M76	Desmethylyangonine-4'-O-(6"-O-(3-hydroxy-3-methyl)glutaryl)-β-D-glucopyranoside	6,78	-	C ₂₆ H ₂₉ O ₁₃	+											1
M77	Oxododecanedioic acid	6,78	-	C ₁₂ H ₁₉ O ₅									+			1

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. Μελέτη φυτοχημικού προφίλ των 11 άγριων taxa *Helichrysum* Mill. ελληνικής προέλευσης.

M78	Feruloyl-caffeoylquinic acid	6,79	-	C ₂₆ H ₂₅ O ₁₂										+		1
M79	Dicafeoylquinic acid methyl ester	6,80	-	C ₂₆ H ₂₅ O ₁₂			+									1
M80	Kaempferol dihexoside 1	6,81-6,84	-	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₄	+	+		+						+	+	5

Πίνακας 2.2 συνέχεια

Μεταβολίτης	ID	Εύρος Rt (min)	IM (+/-)	EC	H1 (HA_2013)	H2 (HD_2019)	H3 (HHa_2019)	H4 (HIIa_2018)	H5 (HIM_2019)	H6 (HL_2020)	H7 (HOk_2018)	H8 (HPv_2020)	H9 (HS_2019)	H10 (HSBr_2016)	H11 (HT_2019)	Αρ. Εμφανίσεων
M81	Unknown	6,83	+	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₁			+									1
M82	Unknown	6,95	+	C ₁₅ H ₂₁ O ₆			+									1
M83	Quercetin coumaroylglucoside	6,90	-	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₄			+									1
M84	Unknown	6,94	-	C ₁₄ H ₁₇ O ₅									+			1
M85	Coumarin analogue 1	7,04	-	C ₁₅ H ₁₇ O ₇									+			1
M86	Apigenin caffeoylhexoside 1	7,05	-	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₃						+						1
M87	Unknown	7,07	-	C ₂₂ H ₂₃ O ₉			+									1
M88	Kaempferol or luteolin derivative	7,08-7,14	-	C ₂₉ H ₂₇ O ₁₄	+										+	2
M89	Quercetin-7-O-caffeoylhexoside	7,08-7,15	-	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₅		+	+							+		3
M90	Unknown	7,17-7,20	-	C ₂₁ H ₂₇ O ₉	+				+							2
M91	Kaempferol dihexoside 2	7,19	-	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₄						+						1
M92	Unknown	7,19	-	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₀			+									1
M93	Tiliroside	7,24-7,30	-	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₃	+	+			+		+		+	+	+	7
M94	Apigenin caffeoylhexoside 2	7,30	-	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₃						+						1
M95	Quercetin coumaroylglucoside analogue	7,36-7,38	-	C ₃₀ H ₂₉ O ₁₅			+		+							2
M96	Unknown	7,39	-	C ₁₅ H ₁₅ O ₇					+							1
M97	Luteolin	7,42-7,52	-	C ₁₅ H ₉ O ₆	+				+	+		+			+	5
M98	Quercetin	7,44-7,53	-	C ₁₅ H ₉ O ₇	+	+	+	+	+					+		6
M99	Tribuloside	7,44	-	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₃											+	1
M100	Kaempferol dihexoside 3	7,45	-	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₄			+									1
M101	7-(2,3-dihydroxy-3-methylbutoxy)-5-hydroxy-6-methoxy-2H-1-benzopyran-2-one	7,50	-	C ₁₅ H ₁₇ O ₇					+							1
M102	Unknown	7,51	-	C ₂₆ H ₂₉ O ₁₃				+								1

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. Μελέτη φυτοχημικού προφίλ των 11 άγριων taxa *Helichrysum* Mill. ελληνικής προέλευσης.

M103	Unknown	7,54	-	C ₁₂ H ₁₃ O ₅					+							1
M104	Unknown	7,54-7,57	-	C ₂₃ H ₂₅ O ₉			+								+	2
M105	Unknown	7,58	-	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₃								+				1
M106	Unknown	7,59	-	C ₁₁ H ₁₃ O ₅									+			1

Πίνακας 2.2 συνέχεια

Μεταβολίτης	ID	Εύρος Rt (min)	IM (+/-)	EC	H1 (HA_2013)	H2 (HD_2019)	H3 (HHa_2019)	H4 (Hlla_2018)	H5 (HIM_2019)	H6 (HL_2020)	H7 (HOk_2018)	H8 (HPv_2020)	H9 (HS_2019)	H10 (HSBr_2016)	H11 (HT_2019)	Αρ. Εμφανίσεων
M107	Unknown	7,60-7,62	-	C ₁₆ H ₁₉ O ₆			+		+							2
M108	Kaempferol glycoside	7,62	-	C ₃₀ H ₂₉ O ₁₄	+											1
M109	Dihydrokaempferol	7,65	-	C ₁₅ H ₁₁ O ₆								+				1
M110	Hydroxycinnamic acid derivative 1	7,68-7,70	-	C ₂₁ H ₂₇ O ₉				+						+		2
M111	Kaempferol-3-O-sophoroside-7-O-glucoside	7,68	-	C ₃₂ H ₂₇ O ₁₅	+	+										2
M112	Unknown	7,70	-	C ₂₂ H ₁₇ O ₈											+	1
M113	Isorhamnetin	7,78	-	C ₁₆ H ₁₁ O ₇					+							1
M114	Unknown	7,79	-	C ₁₆ H ₂₁ O ₇									+			1
M115	Unknown	7,82	-	C ₁₆ H ₉ O ₆					+							1
M116	Methylated flavonoid 1	7,85	-	C ₁₈ H ₁₅ O ₉								+				1
M117	Unknown	7,86	-	C ₁₆ H ₁₉ O ₇									+			1
M118	Unknown	7,87	-	C ₁₄ H ₁₉ O ₅									+			1
M119	Unknown	7,89	-	C ₂₆ H ₂₇ O ₁₂			+									1
M120	6-ethyl-4-hydroxy-5-methyl-3-(3-oxopentyl)-2H-pyran-2-one	7,90	-	C ₁₃ H ₁₇ O ₄					+							1
M121	Unknown	7,94	+	C ₁₃ H ₁₅ O ₃			+									1
M122	Unknown	8,00	-	C ₁₂ H ₁₃ O ₆									+			1
M123	Unknown (prenylated)	8,09	-	C ₂₀ H ₂₇ O ₅									+			1
M124	Unknown	8,10	+	C ₁₆ H ₂₁ O ₆			+									1
M125	Apigenin	8,12-8,18	-	C ₁₅ H ₉ O ₅	+					+		+			+	4
M126	C18 Trihydroxy fatty acid 1	8,16-8,26	-	C ₁₈ H ₃₁ O ₅			+	+					+	+		4
M127	Naringenin	8,18-8,20	-	C ₁₅ H ₁₁ O ₅					+		+					2

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. Μελέτη φυτοχημικού προφίλ των 11 άγριων taxa *Helichrysum* Mill. ελληνικής προέλευσης.

M128	Kaempferol-3- <i>O</i> -[6''- <i>O</i> -(trans- <i>p</i> -coumaroyl)-3''- <i>O</i> -acetyl]- β - <i>D</i> -glucopyranoside	8,19-8,27	-	C ₃₂ H ₂₇ O ₁₄	+	+										2
M129	Unknown	8,26	-	C ₂₁ H ₂₃ O ₈					+							1
M130	Kaempferol	8,30-8,33	-	C ₁₅ H ₉ O ₆	+		+				+					3
M131	Homooriodictyol	8,31	-	C ₁₆ H ₁₃ O ₆					+							1
M132	Unknown	8,34	+	C ₁₅ H ₂₁ O ₅			+									1

Πίνακας 2.2 συνέχεια

Μεταβολίτης	ID	Εύρος Rt (min)	IM (+/-)	EC	H1 (HA_2013)	H2 (HD_2019)	H3 (HHa_2019)	H4 (HIIa_2018)	H5 (HIM_2019)	H6 (HL_2020)	H7 (HOK_2018)	H8 (HPv_2020)	H9 (HS_2019)	H10 (HSBr_2016)	H11 (HT_2019)	Αρ. Εμφανίσεων
M133	Coumarin analogue 2	8,36	-	C ₁₅ H ₁₇ O ₇									+			1
M134	Unknown	8,38	-	C ₂₁ H ₂₅ O ₈					+							1
M135	Hydroxycinnamic acid derivative 2	8,40	-	C ₂₅ H ₂₇ O ₁₀				+						+		2
M136	Unknown	8,41	-	C ₁₉ H ₁₅ O ₈			+									1
M137	a) 3,5-dimethyl-6-isopropyl-4-methoxy-a-pyrone, b) 2-methoxy-3,5-dimethyl-6-(1-methylethyl)-4H-pyran-4-one	8,43	-	C ₁₁ H ₁₅ O ₃					+							1
M138	Unknown	8,46	+	C ₁₆ H ₂₃ O ₆			+									1
M139	Unknown phloroglucinol	8,48	-	C ₁₅ H ₂₁ O ₅									+			1
M140	Pinobanskin	8,50	-	C ₁₅ H ₁₁ O ₅			+		+							2
M141	Unknown	8,50-8,56	-	C ₁₇ H ₂₁ O ₇									+		+	2
M142	Pyrone derivative 1	8,51	-	C ₁₇ H ₂₃ O ₇									+			1
M143	Unknown	8,55	-	C ₂₃ H ₂₁ O ₈			+									1
M144	Unknown	8,56	+	C ₁₇ H ₂₃ O ₇			+									1
M145	C18 Trihydroxy fatty acid 2	8,56-8,69	-	C ₁₈ H ₃₃ O ₅	+	+	+	+		+	+		+	+	+	9
M146	Dilignol analogue 1	8,62	-	C ₂₀ H ₂₃ O ₇			+									1
M147	Coumarin analogue	8,67	-	C ₁₅ H ₁₇ O ₇					+							1
M148	Methylated flavonoid 2	8,68	-	C ₁₈ H ₁₅ O ₈								+				1
M149	Unknown	8,75	-	C ₁₆ H ₂₁ O ₅									+			1
M150	Micropyrone	8,76	-	C ₁₄ H ₁₉ O ₄					+							1
M151	Unknown	8,79-8,80	-	C ₁₇ H ₁₃ O ₆			+	+						+		3
M152	Dilignol analogue 2	8,85-8,90	-	C ₂₀ H ₂₃ O ₇			+	+						+		3

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. Μελέτη φυτοχημικού προφίλ των 11 άγριων taxa *Helichrysum* Mill. ελληνικής προέλευσης.

M153	3,5-Dihydroxy-hexadecanoic acid	8,90	-	C ₁₆ H ₃₁ O ₄		+										1
M154	Unknown	8,91	-	C ₂₁ H ₂₅ O ₅								+				1
M155	Unknown	8,94-8,96	-	C ₂₁ H ₂₅ O ₈	+				+							2
M156	Flavonoid derivative	8,97	-	C ₂₃ H ₁₇ O ₈											+	1
M157	Unknown	8,98	-	C ₁₃ H ₁₅ O ₆									+			1
M158	Unknown	9,02	-	C ₁₅ H ₁₉ O ₅									+			1

Πίνακας 2.2 συνέχεια

Μεταβολίτης	ID	Εύρος Rt (min)	IM (+/-)	EC	H1 (HA_2013)	H2 (HD_2019)	H3 (HHa_2019)	H4 (HIIa_2018)	H5 (HIM_2019)	H6 (HL_2020)	H7 (HOK_2018)	H8 (HPv_2020)	H9 (HS_2019)	H10 (HSBr_2016)	H11 (HT_2019)	Αρ. Εμφανίσεων
M159	Unknown	9,02	-	C ₁₈ H ₁₃ O ₈			+									1
M160	Unknown	9,05	-	C ₁₉ H ₁₉ O ₉					+							1
M161	Unknown	9,09	-	C ₂₃ H ₂₅ O ₆								+				1
M162	Unknown	9,14	-	C ₁₈ H ₂₃ O ₇	+											1
M163	Unknown	9,22	-	C ₁₈ H ₂₁ O ₇											+	1
M164	Methylated flavonoid 3	9,30	-	C ₁₉ H ₁₇ O ₉						+						1
M165	Trihydroxy-methoxyflavone	9,11	-	C ₁₆ H ₁₁ O ₆					+							1
M166	Unknown	9,13	-	C ₁₈ H ₂₃ O ₇									+			1
M167	Unknown	9,19	-	C ₁₆ H ₁₇ O ₇					+							1
M168	Unknown	9,35	+	C ₂₀ H ₂₃ O ₆			+									1
M169	Unknown	9,38	-	C ₂₂ H ₂₇ O ₉											+	1
M170	Unknown	9,38	-	C ₂₁ H ₂₅ O ₇			+									1
M171	Araneophthalide	9,41	-	C ₁₅ H ₁₇ O ₆					+				+			2
M172	Unknown	9,42	-	C ₁₄ H ₁₁ O ₄								+				1
M173	Unknown	9,46	-	C ₁₉ H ₁₅ O ₈			+									1
M174	Unknown	9,48	-	C ₁₇ H ₁₅ O ₈		+										1
M175	Unknown	9,48	-	C ₂₂ H ₁₉ O ₇										+		1
M176	Arzanol analogue	9,50	-	C ₂₂ H ₂₇ O ₈											+	1
M177	Unknown	9,54	+	C ₁₈ H ₁₅ O ₈			+									1
M178	Unknown	9,56	-	C ₂₀ H ₂₁ O ₇			+									1

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. Μελέτη φυτοχημικού προφίλ των 11 άγριων taxa *Helichrysum* Mill. ελληνικής προέλευσης.

M179	Unknown	9,60	-	C ₁₃ H ₁₇ O ₅									+			1
M180	Unknown	9,64	-	C ₂₁ H ₂₅ O ₇			+									1
M181	Unknown	9,64	-	C ₂₃ H ₂₇ O ₆								+				1
M182	Unknown	9,72	-	C ₂₆ H ₃₁ O ₈			+									1
M183	Prenylated polyphenol	9,73	-	C ₂₂ H ₂₃ O ₄		+										1
M184	Methylated flavonoid 4	9,75	+	C ₁₉ H ₁₉ O ₉						+						1

Πίνακας 2.2 συνέχεια

Μεταβολίτης	ID	Εύρος Rt (min)	IM (+/-)	EC	H1 (HA_2013)	H2 (HD_2019)	H3 (HHa_2019)	H4 (HIIa_2018)	H5 (HIM_2019)	H6 (HL_2020)	H7 (HOK_2018)	H8 (HPv_2020)	H9 (HS_2019)	H10 (HSBr_2016)	H11 (HT_2019)	Αρ. Εμφανίσεων
M185	Unknown	9,78	-	C ₁₇ H ₁₉ O ₈					+							1
M186	Unknown	9,78	-	C ₁₉ H ₂₃ O ₈									+			1
M187	Methylated flavonoid 5	9,82	-	C ₁₈ H ₁₅ O ₈									+			1
M188	Unknown	9,85	-	C ₂₃ H ₂₅ O ₆								+				1
M189	Unknown	9,90	-	C ₂₃ H ₂₉ O ₈									+			1
M190	Unknown	9,90	-	C ₂₄ H ₂₁ O ₉			+									1
M191	Unknown	9,93-9,95	-	C ₂₃ H ₂₁ O ₇				+	+							2
M192	Methylated flavonoid 6	9,96	+	C ₁₈ H ₁₇ O ₈	+											1
M193	Unknown	9,96	-	C ₁₈ H ₂₁ O ₅			+									1
M194	Unknown	9,99	-	C ₂₁ H ₂₃ O ₄								+				1
M195	Unknown	9,99	+	C ₁₉ H ₁₇ O ₈			+									1
M196	Pyrone derivative 2	10,02	-	C ₁₄ H ₁₇ O ₅									+			1
M197	Unknown	10,10	-	C ₂₆ H ₃₁ O ₈			+									1
M198	Unknown	10,13	-	C ₂₃ H ₂₅ O ₆								+				1
M199	Pinocembrin	10,14	-	C ₁₅ H ₁₁ O ₄					+					+		2
M200	Unknown	10,14-10,16	+	C ₁₉ H ₂₅ O ₈			+									1
M201	Unknown	10,22	-	C ₁₈ H ₂₁ O ₅			+									1
M202	Unknown	10,25	+	C ₂₆ H ₃₁ O ₇			+									1

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. Μελέτη φυτοχημικού προφίλ των 11 άγριων taxa *Helichrysum* Mill. ελληνικής προέλευσης.

M203	Methylated flavonoid 7	10,25	+	C ₁₉ H ₁₉ O ₈						+						1
M204	Methylated flavonoid 8	10,26	+	C ₁₈ H ₁₇ O ₈		+										1
M205	Unknown	10,28	-	C ₂₅ H ₂₃ O ₉			+									1
M206	Unknown	10,30	-	C ₁₇ H ₂₁ O ₇									+			1
M207	Unknown	10,34	+	C ₂₄ H ₂₃ O ₉			+									1
M208	6-Demethylacronylin	10,34	-	C ₁₃ H ₁₅ O ₄					+							1
M209	Terpene 1	10,38-10,50	-	C ₁₇ H ₂₅ O ₄	+	+	+	+			+			+	+	7
M210	Unknown	10,39	-	C ₁₉ H ₂₇ O ₆									+			1

Πίνακας 2.2 συνέχεια

Μεταβολίτης	ID	Εύρος Rt (min)	IM (+/-)	EC	H1 (HA_2013)	H2 (HD_2019)	H3 (HHa_2019)	H4 (HIIa_2018)	H5 (HIIM_2019)	H6 (HL_2020)	H7 (HOK_2018)	H8 (HPv_2020)	H9 (HS_2019)	H10 (HSBr_2016)	H11 (HT_2019)	Αρ. Εμφανίσεων
M211	Unknown	10,40	-	C ₂₁ H ₂₃ O ₄								+				1
M212	Unknown	10,44	-	C ₂₄ H ₃₁ O ₈									+			1
M213	Unknown	10,54	-	C ₁₉ H ₂₅ O ₄									+			1
M214	Terpene 2	10,55-10,85	+	C ₁₇ H ₂₅ O ₃	+	+		+			+			+		5
M215	5,7-Dihydroxy-3-methoxyflavone	10,57	-	C ₁₆ H ₁₁ O ₅					+							1
M216	Methylated flavonoid 9	10,73	+	C ₁₉ H ₁₉ O ₈						+						1
M217	Unknown	10,76	+	C ₂₅ H ₂₅ O ₉			+									1
M218	Methylated flavonoid 10	10,90	+	C ₂₀ H ₂₁ O ₉						+						1
M219	Unknown	10,91	-	C ₂₃ H ₂₅ O ₅								+				1
M220	Unknown	10,92	-	C ₁₈ H ₂₃ O ₇									+			1
M221	Methylated flavonoid 11	10,93	+	C ₁₆ H ₁₃ O ₆			+									1
M222	Methylated flavonoid 12	10,96	+	C ₁₇ H ₁₅ O ₆						+						1
M223	Unknown	11,00	-	C ₁₇ H ₂₁ O ₆									+			1
M224	Methylated flavonoid 13	11,00-11,17	+	C ₁₈ H ₁₇ O ₇			+			+						2
M225	Plicatipyrene	11,06	-	C ₂₂ H ₂₅ O ₈					+							1
M226	Unknown	11,10	-	C ₂₃ H ₂₅ O ₅								+				1

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. Μελέτη φυτοχημικού προφίλ των 11 άγριων taxa *Helichrysum* Mill. ελληνικής προέλευσης.

M227	Unknown	11,12	-	C ₂₀ H ₂₉ O ₆									+			1
M228	Unknown	11,17	-	C ₂₁ H ₂₅ O ₇					+							1
M229	Unknown	11,29	-	C ₂₃ H ₂₅ O ₆								+				1
M230	Methylated flavonoid 14	11,31	+	C ₁₇ H ₁₅ O ₆			+									1
M231	Unknown prenylated	11,50	-	C ₂₀ H ₂₇ O ₄									+			1
M232	Unknown	11,63	-	C ₁₄ H ₁₇ O ₄									+			1
M233	Plicatipyrone analogue 1	11,87	-	C ₂₂ H ₂₅ O ₈					+							1
M234	Unknown	11,88	-	C ₂₃ H ₂₅ O ₅								+				1
M235	Methylated flavonoid 15	12,00	+	C ₁₈ H ₁₇ O ₇	+						+			+		3
M236	Arenol	12,01	-	C ₂₁ H ₂₃ O ₇					+							1

Πίνακας 2.2 συνέχεια

Μεταβολίτης	ID	Εύρος Rt (min)	IM (+/-)	EC	H1 (HA_2013)	H2 (HD_2019)	H3 (HHa_2019)	H4 (HIIa_2018)	H5 (HIM_2019)	H6 (HL_2020)	H7 (HOK_2018)	H8 (HPv_2020)	H9 (HS_2019)	H10 (HSBr_2016)	H11 (HT_2019)	Αρ. Εμφανίσεων
M237	Methylated flavonoid 16	12,03	+	C ₂₁ H ₂₃ O ₉						+						1
M238	Unknown	12,08	-	C ₂₁ H ₂₅ O ₆					+							1
M239	Methylated flavonoid 17	12,29-12,37	+	C ₁₈ H ₁₇ O ₇		+	+			+					+	4
M240	Diterpene	12,46	+	C ₁₈ H ₂₉ O ₂						+						1
M241	Unknown	12,56	-	C ₁₅ H ₁₉ O ₄									+			1
M242	Methylated flavonoid 18	12,56	+	C ₁₈ H ₁₇ O ₆						+						1
M243	Pinostrobin	12,67	+	C ₁₆ H ₁₅ O ₄											+	1
M244	C18 Hydroxy fatty acid	12,84	-	C ₁₈ H ₃₁ O ₃		+										1
M245	Methylated flavonoid 19	12,80	+	C ₂₀ H ₂₁ O ₈						+						1
M246	Unknown	12,80	-	C ₂₁ H ₂₃ O ₃								+				1
M247	Arzanol	12,85	-	C ₂₂ H ₂₅ O ₇					+				+			2
M248	Methylated flavonoid 20	12,88	+	C ₁₉ H ₁₉ O ₇			+									1
M249	C17 Hydroxy fatty acid 2	12,89-13,37	+	C ₁₇ H ₃₄ O ₅	+	+		+			+			+	+	6
M250	C17 Hydroxy fatty acid 1	12,93	+	C ₁₇ H ₃₆ O ₅											+	1
M251	Unknown	13,04	+	C ₂₂ H ₂₅ O ₆											+	1

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. Μελέτη φυτοχημικού προφίλ των 11 άγριων taxa *Helichrysum* Mill. ελληνικής προέλευσης.

M252	Unknown	13,16	-	C ₁₆ H ₂₁ O ₄									+			1
M253	Triterpene 3	13,22	+	C ₂₉ H ₄₇ O											+	1
M254	Linolenic acid	13,24	+	C ₁₈ H ₃₁ O ₂		+										1
M255	Unknown	13,28	+	C ₂₂ H ₂₅ O ₆											+	1
M256	Oxygenated aliphatic hydrocarbon	13,28	+	C ₁₇ H ₃₄ O ₅						+						1
M257	Plicatipyron analogue 2	13,32-13,33	-	C ₂₂ H ₂₅ O ₈					+				+			2
M258	Pyrone derivative 3	13,42	-	C ₂₅ H ₃₁ O ₈									+			1
M259	Unknown	13,58	-	C ₁₈ H ₂₁ O ₅									+			1
M260	3-Methylarzanol	13,66-13,67	-	C ₂₃ H ₂₇ O ₇					+				+			2
M261	Auricepyron analogue	13,70	+	C ₂₅ H ₃₃ O ₇						+						1
M262	Unknown	13,74	-	C ₁₇ H ₂₃ O ₄									+			1
M263	Unknown	13,77	-	C ₂₃ H ₂₅ O ₄									+			1

Πίνακας 2.2 συνέχεια

Μεταβολίτης	ID	Εύρος Rt (min)	IM (+/-)	EC	H1 (HA_2013)	H2 (HD_2019)	H3 (HHa_2019)	H4 (HIIa_2018)	H5 (HIM_2019)	H6 (HL_2020)	H7 (HOK_2018)	H8 (HPv_2020)	H9 (HS_2019)	H10 (HSBr_2016)	H11 (HT_2019)	Αρ. Εμφανίσεων
M264	Unknown	13,90-13,92	+	C ₈ H ₅ O ₃				+						+		2
M265	3-Methylarzanol isomer	14,00	-	C ₂₃ H ₂₇ O ₇									+			1
M266	Heterodimer pyrone-phloroglucinol	14,05	-	C ₂₃ H ₂₇ O ₈					+							1
M267	Unknown	14,08	-	C ₂₄ H ₃₁ O ₆									+			1
M268	Oxygenated aliphatic hydrocarbon	14,15	+	C ₁₇ H ₃₆ O ₅						+						1
M269	Unknown	14,21	-	C ₂₃ H ₂₇ O ₆									+			1
M270	6-O-desmethyllauricepyron or arenol C analogue	14,25-14,50	-	C ₂₄ H ₂₉ O ₇					+				+			2
M271	Unknown	14,90	+	C ₂₆ H ₃₉ O ₈						+						1
M272	Heliarzanol analogue	15,01	-	C ₂₄ H ₂₉ O ₈					+							1
M273	Unknown	15,01	+	C ₂₃ H ₃₃ O ₃										+		1
M274	Auricepyron analogue	15,14	-	C ₂₅ H ₃₁ O ₇					+							1
M275	Triterpenic acid 1	15,16-15,25	+	C ₃₀ H ₄₅ O ₂				+						+		2
M276	Auricepyron analogue 1	15,20	-	C ₂₅ H ₃₁ O ₇									+			1
M277	Unknown	15,34	+	C ₂₁ H ₄₂ O ₅										+		1

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. Μελέτη φυτοχημικού προφίλ των 11 άγριων taxa *Helichrysum* Mill. ελληνικής προέλευσης.

M278	Triterpenic acid 2	15,57-15,60	+	C ₃₀ H ₄₇ O ₂				+						+		2
M279	Triterpene 1	15,60	+	C ₂₉ H ₄₀ O			+									1
M280	Pyrone derivative 4	15,64-15,65	-	C ₂₅ H ₃₁ O ₈	+				+				+			3
M281	Italipyrone	15,69-15,73	-	C ₂₂ H ₂₃ O ₇	+				+							2
M282	Unknown	15,80	-	C ₃₃ H ₃₇ O ₁₁	+											1
M283	Pyrone derivative 5	15,90	-	C ₂₇ H ₂₅ O ₇	+											1
M284	Unknown prenylated	15,94	-	C ₂₅ H ₃₅ O ₄									+			1
M285	Unknown	15,99	-	C ₂₇ H ₃₁ O ₉	+											1
M286	Unknown	16,00	-	C ₂₆ H ₂₇ O ₁₀					+							1
M287	Pyrone derivative 6	16,08	-	C ₂₅ H ₃₁ O ₈									+			1
M288	Unknown	16,16	-	C ₂₆ H ₃₃ O ₇					+							1
M289	Helicerastripyrene	16,17	-	C ₂₇ H ₃₃ O ₇									+			1

Πίνακας 2.2 συνέχεια

Μεταβολίτης	ID	Εύρος Rt (min)	IM (+/-)	EC	H1 (HA_2013)	H2 (HD_2019)	H3 (HHa_2019)	H4 (HIIa_2018)	H5 (HIM_2019)	H6 (HL_2020)	H7 (HOk_2018)	H8 (HPv_2020)	H9 (HS_2019)	H10 (HSBr_2016)	H11 (HT_2019)	Αρ. Εμφανίσεων
M290	Unknown prenylated	16,21	-	C ₂₆ H ₃₇ O ₅							+		+			2
M291	Unknown	16,26	+	C ₂₄ H ₃₅ O ₃			+									1
M292	Unknown	16,35	-	C ₂₆ H ₃₃ O ₈					+							1
M293	Lupulone	16,40-16,41	-	C ₂₆ H ₃₇ O ₄						+			+			2
M294	Triterpene 2	16,44	+	C ₂₉ H ₄₇ O			+									1
M295	Pyrone derivative 7	16,47	-	C ₂₃ H ₂₅ O ₇	+											1
M296	Unknown	16,60	-	C ₃₄ H ₃₉ O ₁₁	+											1
M297	Unknown	16,65	-	C ₂₆ H ₃₇ O ₅						+						1
M298	Unknown	16,70	-	C ₃₁ H ₃₃ O ₇								+				1
M299	Unknown	16,70	-	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₀					+							1
M300	3-[[3-acetyl-5-(3,7-dimethyl-2,6-octadienyl)-2,4,6-trihydroxyphenyl]methyl]-4-hydroxy-5-methyl-6-propyl-2H-pyran-2-one or 3-[[3-(3,7-dimethyl-2,6-octadien-1-yl)-2,4,6-trihydroxy-5-(2-methyl-1-oxopropyl)phenyl]methyl]-4-hydroxy-5,6-dimethyl-2H-pyran-2-one	16,75	-	C ₂₈ H ₃₅ O ₇								+				1

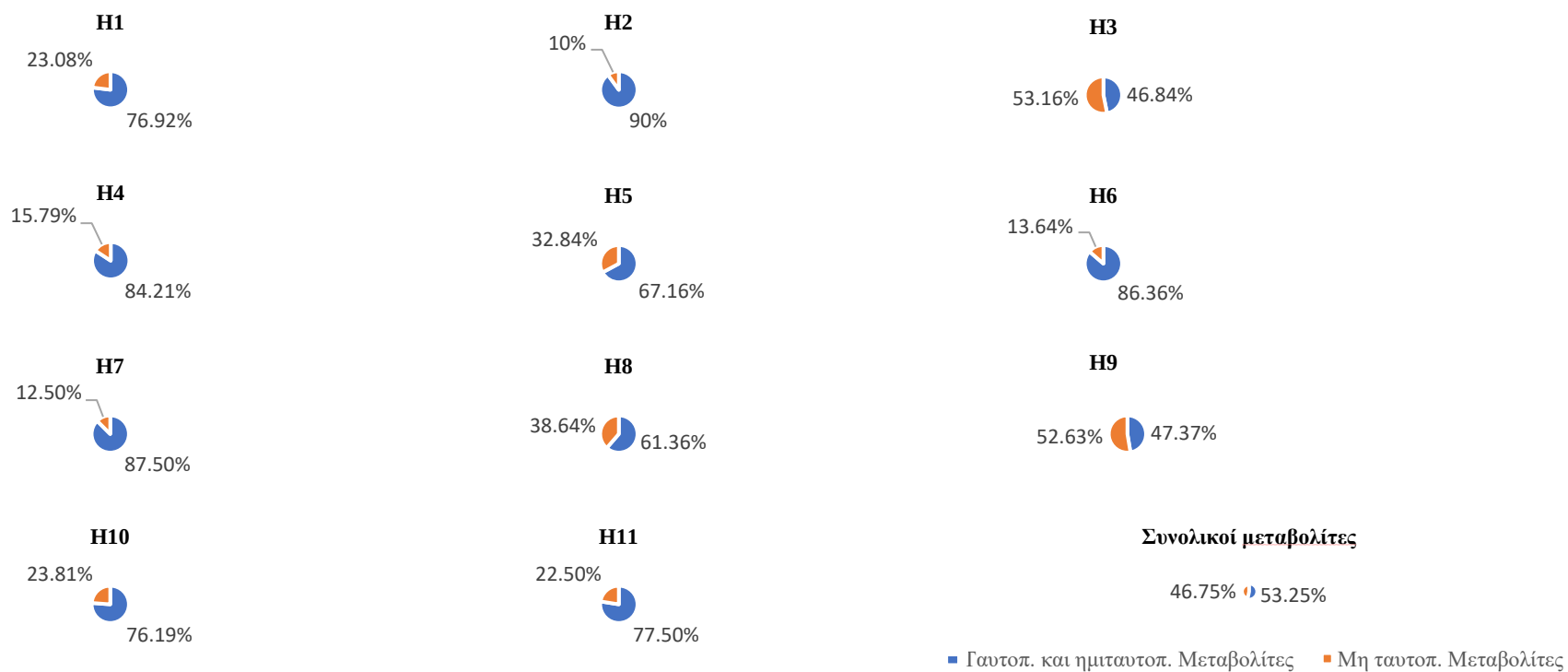
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. Μελέτη φυτοχημικού προφίλ των 11 άγριων taxa *Helichrysum* Mill. ελληνικής προέλευσης.

M301	Unknown	16,84	-	C ₂₅ H ₃₁ O ₇						+						1
M302	Unknown	16,91	-	C ₂₇ H ₃₁ O ₉					+							1
M303	Pyrone derivative 8	16,94	-	C ₂₄ H ₂₇ O ₇									+			1
M304	Unknown	16,97	-	C ₃₂ H ₃₅ O ₇								+				1
M305	Auricepyron analogue 2	17,11	-	C ₂₅ H ₃₁ O ₇									+			1
M306	Unknown	17,30	-	C ₂₉ H ₃₇ O ₈									+			1
M307	3-[[3-(3,7-dimethyl-2,6-octadien-1-yl)-2,4,6-trihydroxy-5-(2-methyl-1-oxobutyl)phenyl]methyl]-4-hydroxy-5,6-dimethyl-2H-pyran-2-one	17,36-17,43	-	C ₂₉ H ₃₇ O ₇								+	+			2
M308	Unknown	17,77	-	C ₃₀ H ₃₉ O ₇									+			1

Πίνακας 2.2: συνέχεια

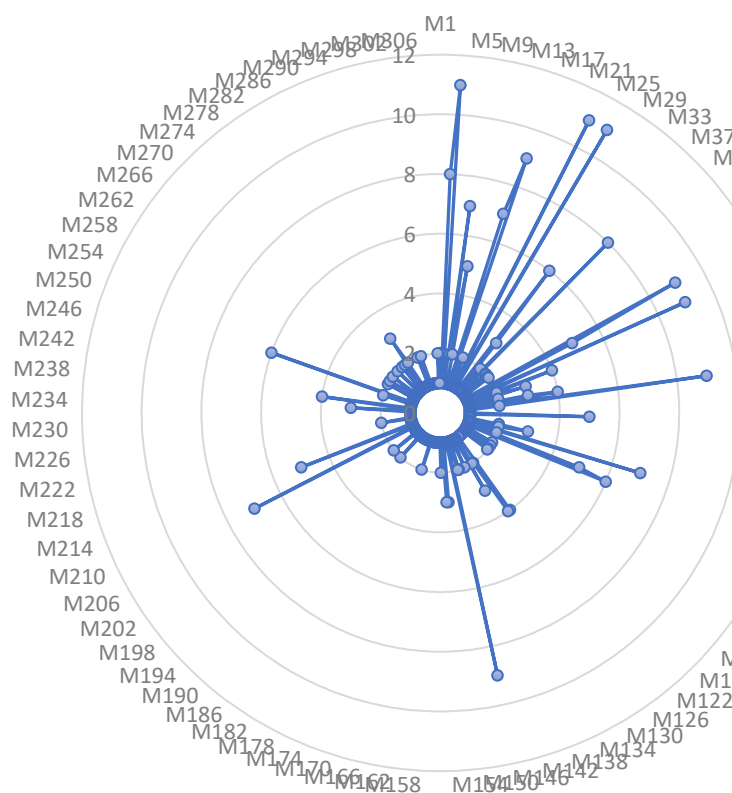
	H1-H11	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11
Συνολικές δομές μεταβολιτών	308 (100%)	39 (100%)	30 (100%)	79 (100%)	38 (100%)	67 (100%)	44 (100%)	24 (100%)	44 (100%)	76 (100%)	42 (100%)	40 (100%)
Συνολικές εμφανίσεις μεταβολιτών (σύνολο +)	523	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ταυτοποιημένες και ημιταυτοποιημένες δομές	164 (53.25%)	30 (76.92%)	27 (90%)	37 (46.84%)	32 (84.21%)	45 (67.16%)	38 (86.36%)	21 (87.5%)	27 (61.36%)	36 (47.37%)	32 (76.19%)	31 (77.5%)
Μη ταυτοποιημένες δομές	144 (46.75%)	9 (23.08%)	3 (10%)	42 (53.16%)	6 (15.79%)	22 (32.84%)	6 (13.64%)	3 (12.5%)	17 (38.64%)	40 (52.63%)	10 (23.81%)	9 (22.5%)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. Μελέτη φυτοχημικού προφίλ των 11 άγριων taxa *Helichrysum* Mill. ελληνικής προέλευσης.

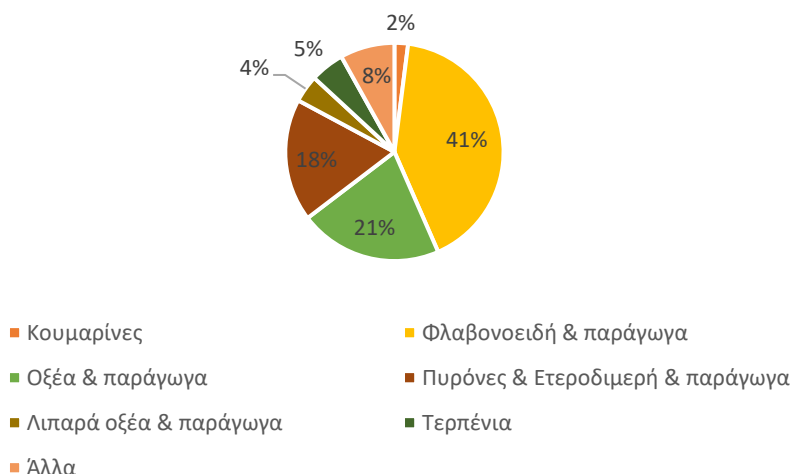


Εικόνα 2.1: Ποσοστά ταυτοποιημένων και ημι-ταυτοποιημένων μεταβολιτών στα 11 μεθανολικά εκχυλίσματα ελληνικών ελίχρυσων H1-H11

Σύμφωνα με την Εικόνα 2.2 και από δεδομένα του Πίνακα 2.2 οι μεταβολίτες με την συχνότερη εμφάνιση είναι με **11** εμφανίσεις σε όλα τα είδη είναι τα malic acid (M4), caffeoylquinic acid 3 (M24), caffeic acid (M27), με **9** εμφανίσεις τα caffeoyl hexoside (M17), quercetin glycoside 2 (M54), dicaffeoylquinic acid 2 (M58), άγνωστος μεταβολίτης (M72), C18 trihydroxy fatty acid 2 (M145), με **8** εμφανίσεις τα quinic acid (M3), 5-*O*-feruloylquinic acid (M40), με **7** εμφανίσεις τα protocatechuic acid-*O*-hexoside (M8), caffeoylquinic acid 2 (M16), tiliroside (M93), terpene 1 (M209), με **6** εμφανίσεις τα dicaffeoylquinic acid 1 (M33), quercetin (M98), C17 hydroxy fatty acid 2 (M249), και με **5** εμφανίσεις τα caffeoylquinic acid 1 (M10), kaempferol dihexoside 1 (M80), luteolin (M97), και terpene 2 (M214). Επιπρόσθετα, το σύνολο των 164 ημι- και ταυτοποιημένων μεταβολιτών των μεθανολικών εκχυλισμάτων αποτελείται κατά φθίνουσα σειρά από Φλαβονοειδή και παράγωγα (41%), Οξέα και παράγωγα (21%), Πυρόνες και Ετεροδιμερή και παράγωγα (18%), Άλλα (8%), Τερπένια (5%), Λιπαρά οξέα και παράγωγα (4%), Κουμαρίνες (2%), όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.3.



Εικόνα 2.2: Μεταβολίτες M1-M308 και συχνότητες εμφανίσεων στα 11 μεθανολικά εκχυλίσματα των αυτοφυών *Helichrysum* spp. ελληνικής προέλευσης.



Εικόνα 2.3: Ποσοστά φυτοχημικών κατηγοριών στους 164 ημι- και ταυτοποιημένους μεταβολίτες των 11 μεθανολικών εκχυλισμάτων των αυτοφυών taxa *Helichrysum* ελληνικής προέλευσης

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 2.2 οι 308 μεταβολίτες και συγκεκριμένα οι ημι- και ταυτοποιημένοι, μπορούν να διαχωριστούν χρωματογραφικά σε 2 ομάδες (ζώνες έκλουσης) σύμφωνα με τους χρόνους ανάσχεσης (R_t), σύμφωνα με την σχετική τους πολικότητα ως προς το πληρωτικό υλικό της χρωματογραφικής στήλης (C18, αντίστροφης φάσης) που χρησιμοποιήθηκε.

Ζώνη έκλουσης 0-8,50 min

Η πρώτη ομάδα αφορά μεταβολίτες που εκκλύονται στην χρονική ζώνη των 0-8.50min και περιλαμβάνει τις γενικές κατηγορίες των: **(α) Σάκχαρα**, με τους μεταβολίτες M2, M9, M14, **(β) Κουμαρίνες** με τους μεταβολίτες M20, M28, M85, M101, M133, **(γ) Οξέα και παράγωγα**, με τους μεταβολίτες M1, M3, M4, M5, M7, M8, M10, M11, M12, M13, M15, M16, M17, M18, M19, M23, M24, M25, M27, M31, M33, M40, M53, M58, M61, M62, M68, M74, M77, M78, M79, M80, M110, M135, **(δ) Φλαβονοειδή και παράγωγα**, με τους μεταβολίτες M22, M35, M37, M38, M41, M42, M46, M47, M48, M49, M54, M55, M59, M63, M64, M66, M67, M70, M71, M73, M76, M80, M83, M86, M88, M89, M91, M93, M94, M95, M97, M98, M99, M100, M101, M108, M109, M111, M125, M127, M128, M130, M131, M140, **(ε) άλλοι**, με τον μεταβολίτη M76, όπως φαίνεται συγκεντρωτικά στον Πίνακα 2.3.

Οι κουμαρίνες, τα οξέα και παράγωγα, φλαβονοειδή και παράγωγα αποτελούν γνωστές, χαρακτηριστικές οικογένειες μεταβολιτών του γένους *Helichrysum* (Akaberi et al. 2019). Στην ζώνη των 0-8,50 min εκκλύονται με παρουσία σχεδόν σε όλα τα είδη τα οξέα quinic acid (M3), malic acid (M4), άγλυκα και γλυκοζίτες βενζοϊκών οξέων (M8, M11, M12, M13, M18, M23), παράγωγα υδροξυκινηματικών οξέων (M7, M10, M16, M17, M19, M24, M27, M31, M33, M40, M58, M61, M62, M68, M74, M78, M79, M110, M135), άγλυκα και γλυκοζυλιωμένα φλαβονοειδή όπως φλαβονόλες και παράγωγα των quercetin (M42,

M54, M70, M83, M89, M95, M98), kaempferol (M38, M55, M63, M67, M80, M91, M93, M100, M108, M111, M128, M130), φλαβανόνες και παράγωγα της naringenin (M47, M48, M73, M127), φλαβόνες και παράγωγα της arigenin (M64, M86, M94, M125). Στην κατηγορία των κουμαρινών η aesculin εντοπίστηκε στα είδη H3, H4 κι έχει αναφερθεί στο είδος *H. stoechas* subsp. *barrelieri* (Gokhan Zengin et al. 2020) ενώ η aesculetin εντοπίστηκε στο είδος H3 κι έχει αναφερθεί στα είδη *H. arenarium*, *H. stoechas* subsp. *barrelieri* (A. I. Derkach, N. F. Komissarenko 1986; Gokhan Zengin et al. 2020). Αποτελούν δύο μεταβολίτες με αξιοσημείωτες φαρμακολογικές ιδιότητες όπως αντιοξειδωτική, ανιφλεγμονώδη, αντιδιαβητική, αντικαρκινική, νευροπροστατευτική, αντιϊκή, αντιβακτηριδιακή, αντιθρομβωτική, καρδιοπροστατευτική (Chun-Xiao Li et al. 2022; Linlin Zhang et al. 2022). Οι μεταβολίτες με EC C₁₅H₁₇O₇ σε αρνητικό ιονισμό, που εντοπίζονται στα είδη H5 (M101, 7,50 min και M147, 8,67 min) και H9 (M85, 7,04min και M133, 8,36 min), οι οποίοι εμφανίζουν κοινό προφίλ θραυσματοποίησης με χαρακτηριστικά ιόντα τα 291 [M-H-H₂O]⁻, 265 [M-H-CO₂]⁻ αποδόθηκαν επιφυλακτικά ως ανάλογα της κουμαρίνης 7-(2,3-dihydroxy-3-methylbutoxy)-5-hydroxy-6-methoxy-2H-1-benzopyran-2-one, η οποία έχει αναφερθεί στο είδος *H. plicatum* (Bojan Vujic et al. 2020).

Πίνακας 2.3: Χρονική ζώνη 0-8,50 min έκλυσης μεταβολιτών

ΧΡΟΝΙΚΗ ΖΩΝΗ 0-8,50 min												
Μεταβολίτης	ID	H1 (HA_2013)	H2 (HD_2019)	H3 (HHa_2019)	H4 (HIIa_2018)	H5 (HIM_2019)	H6 (HL_2020)	H7 (HOk_2018)	H8 (HPv_2020)	H9 (HS_2019)	H10 (HSBr_2016)	H11 (HT_2019)
Σάκχαρα												
M2	Hexose							+				
M9	Disaccharide 1		+	+								
M14	Disaccharide 2			+								
Κουμαρίνες												
M20	Aesculin			+	+							
M28	Aesculetin			+								
M85	Coumarin analogue 1									+		
M101	7-(2,3-dihydroxy-3-methylbutoxy)-5-hydroxy-6-methoxy-2H-1-benzopyran-2-one (coumarin derivative)					+						
M133	Coumarin analogue 2									+		
Οξέα και παράγωγα												
M1	Glucosaminic acid			+					+			
M3	Quinic acid		+		+	+	+		+	+	+	+
M4	Malic acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M5	Succinic acid						+					
M7	Caffeoyl glucose								+			

M8	Protocatechuic acid- <i>O</i> -hexoside			+	+	+	+		+	+	+	
M10	Caffeoylquinic acid 1			+	+				+	+	+	
M11	2,4-Dihydrobenzoic acid				+		+					
M12	Protocatechuic acid										+	
M13	Syringic acid 4- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucopyranoside							+				
M15	2-Isopropyl malic acid					+						
M16	Caffeoylquinic acid 2			+	+	+	+		+	+		+
M17	Caffeoyl hexoside		+		+	+	+	+	+	+	+	+
M18	1- <i>O</i> -Protocatechuy- β - <i>D</i> -xylopyranoside (uralennoeside)									+		
M19	Hydroxycinnamic acid derivative					+						
M23	p-Benzoic acid	+										
M24	Caffeoylquinic acid 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M25	Licoagroside B	+										
M27	Caffeic acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M31	Caffeoyl glycerol											+
M33	Dicafeoylquinic acid 1			+	+			+	+	+	+	
M40	5- <i>O</i> -Feruloylquinic acid		+	+			+	+	+	+	+	+
M53	Hydroxyjasmonate					+						
M58	Dicafeoylquinic acid 2	+	+		+		+	+	+	+	+	+
M61	Dicafeoylquinic acid 3			+		+	+					+
M62	Malonyl-dicafeoylquinic acid				+						+	
M68	Dicafeoylquinic acid 4											+
M74	4-Feruloyl-5-cafeoylquinic acid				+							
M77	Oxododecanedioic acid									+		
M78	Feruloyl-cafeoylquinic acid										+	
M79	Dicafeoylquinic acid methyl ester			+								
M80	Kaempferol dihexoside 1	+	+		+						+	+
M110	Hydroxycinnamic acid derivative 1				+						+	
M135	Hydroxycinnamic acid derivative 2				+						+	
Φλαβονοειδή και παράγωγα												
M22	Quercetagenin-3,7-di- <i>O</i> -hexoside			+								
M35	Isovitexin 2''- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucoside HCOOH adduct								+			
M37	Myricetin-3- <i>O</i> -glucoside				+						+	
M38	Kaempferol diglycoside											+

M41	Gnaphaliol- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside as formate adduct					+						
M42	Quercetin glycoside 1					+						
M46	Delphinidin-3-glycoside				+							
M47	Naringenin- <i>O</i> -hexoside 1							+	+			
M48	Naringenin- <i>O</i> -hexoside 2							+	+			
M49	Myricetin malonylhexoside				+							
M54	Quercetin glycoside 2	+	+	+	+	+	+			+	+	+
M55	Kaempferol-3- <i>O</i> -glucoside	+	+				+	+				+
M59	5,6,4'-Trihydroxy-3'-methoxyflavone-7- <i>O</i> - β -glucoside								+			
M63	Kaempferol-7- <i>O</i> -hexoside						+					
M64	Apigenin-6- <i>C</i> -glucoside						+		+			+
M66	Eriodictyol- <i>O</i> -hexoside				+							
M67	Kaempferol- <i>O</i> -acetylhexoside	+	+									
M70	Quercetin glycoside 3			+	+	+					+	
M71	Luteolin glycoside											+
M73	Naringenin- <i>O</i> -hexoside 3							+	+			
M80	Kaempferol dihexoside 1	+	+		+						+	+
M83	Quercetin coumaroylglucoside			+								
M86	Apigenin caffeoylhexoside 1						+					
M88	Kaempferol or luteolin derivative	+										+
M89	Quercetin-7- <i>O</i> -caffeoylhexoside		+	+							+	
M91	Kaempferol dihexoside 2						+					
M93	Tiliroside	+	+			+		+		+	+	+
M94	Apigenin caffeoylhexoside 2						+					
M95	Quercetin coumaroylglucoside analogue			+		+						
M97	Luteolin	+				+	+		+			+
M98	Quercetin	+	+	+	+	+					+	
M99	Tribuloside											+
M100	Kaempferol dihexoside 3			+								
M108	Kaempferol glycoside	+										
M109	Dihydrokaempferol								+			
M111	Kaempferol-3- <i>O</i> -sophoroside-7- <i>O</i> -glucoside	+	+									
M125	Apigenin	+					+		+			+
M127	Naringenin					+		+				

M128	Kaempferol-3-O-[6''-O-(trans-p-coumaroyl)-3''-O-acetyl]-β-D-glucopyranoside	+	+									
M130	Kaempferol	+		+				+				
M131	Homoeriodictyol					+						
M140	Pinobanskin			+		+						
Άλλοι												
M76	Desmethylyangonine-4'-O-(6"-O-(3-hydroxy-3-methyl)glutaryl)-β-D-glucopyranoside (lactone derivative)	+										

Ζώνη έκλουσης 7,78-17,77min

Η δεύτερη ομάδα αφορά μεταβολίτες που εκκλύονται στην χρονική ζώνη των 7,78-17,77 min και περιλαμβάνει τις γενικές κατηγορίες των: **(α) Φλαβονοειδή και παράγωγα**, με τους μεταβολίτες M113, M116, M137, M148, M156, M164, M165, M184, M187, M192, M199, M203, M204, M215, M216, M218, M221, M222, M224, M230, M235, M237, M239, M242, M243, M245, M248, **(β) Πυρόνες και παράγωγα**, με τους μεταβολίτες M120, M142, M150, M196, M258, M280, M283, M287, M295, M303, **(γ) Ετεροδιμερή πυρόνης-φλορογλουσινόλης**, με τους μεταβολίτες M176, M225, M233, M236, M247, M257, M260, M261, M265, M266, M270, M272, M274, M276, M281, M289, M300, M305, M307, **(δ) Λιπαρά οξέα και παράγωγα**, με τους μεταβολίτες M126, M145, M153, M244, M249, M250, M254, **(ε) Τερπένια**, με τους μεταβολίτες M209, M214, M240, M253, M275, M278, M279, M294, **(στ) άλλοι**, με τους μεταβολίτες M146, M147, M152, M171, M208, M256, M268, M293, όπως φαίνεται συγκεντρωτικά στον Πίνακα 2.4.

Τα φλαβονοειδή και παράγωγα, πυρόνες και παράγωγα, λιπαρά οξέα και παράγωγα, τερπένια αποτελούν χαρακτηριστικές οικογένειες μεταβολιτών του γένους *Helichrysum* (Akaberi et al. 2019). Στην ζώνη των 7.78-17.77min εκκλύονται κυρίως λιπόφιλα, μεθυλιωμένα φλαβονοειδή (M113, M116, M148, M164, M165, M184, M187, M192, M203, M204, M215, M216, M218, M221, M222, M224, M230, M235, M237, M239, M242, M243, M245, M248) με χαρακτηριστική παρουσία της κατηγορίας στα είδη H3, H6, παράγωγα πυρόνης (M142, M196, M258, M280, M283, M287, M295, M303) με χαρακτηριστική παρουσία της κατηγορίας στα είδη H1, H5, H9, ετεροδιμερή πυρόνης-φλορογλουσινόλης (M247, M257, M260, M270, M281, M307) με χαρακτηριστική παρουσία της κατηγορίας στα είδη H5, H9, C17-C18 υδροξυ- λιπαρά οξέα (M126, M145, M153, M244, M249, M250, M254) με χαρακτηριστική παρουσία της κατηγορίας στα είδη H2, H4, H10, H11, τερπένια (M209, M214, M275, M278) με χαρακτηριστική παρουσία της κατηγορίας στα είδη H3, H4, H10.

Πίνακας 2.4: Χρονική ζώνη 7,78-17,77min έκλουσης μεταβολιτών

ΧΡΟΝΙΚΗ ΖΩΝΗ 7,78-17,77 min												
Μεταβολίτης	ID	H1 (HA_2013)	H2 (HD_2019)	H3 (HHa_2019)	H4 (HIIa_2018)	H5 (HIM_2019)	H6 (HL_2020)	H7 (HOk_2018)	H8 (HPv_2020)	H9 (HS_2019)	H10 (HSBr_2016)	H11 (HT_2019)
Φλαβονοειδή και παράγωγα												
M113	Isorhamnetin					+						
M116	Methylated flavonoid 1								+			
M148	Methylated flavonoid 2								+			
M156	Flavonoid derivative											+
M164	Methylated flavonoid 3						+					
M165	Trihydroxy-methoxyflavone					+						
M184	Methylated flavonoid 4						+					
M187	Methylated flavonoid 5									+		
M192	Methylated flavonoid 6	+										
M199	Pinocembrin					+					+	
M203	Methylated flavonoid 7						+					
M204	Methylated flavonoid 8		+									
M215	5,7-Dihydroxy-3-methoxyflavone					+						
M216	Methylated flavonoid 9						+					
M218	Methylated flavonoid 10						+					
M221	Methylated flavonoid 11			+								
M222	Methylated flavonoid 12						+					
M224	Methylated flavonoid 13			+			+					
M230	Methylated flavonoid 14			+								
M235	Methylated flavonoid 15	+						+			+	
M237	Methylated flavonoid 16						+					
M239	Methylated flavonoid 17		+	+			+					+
M242	Methylated flavonoid 18						+					
M243	Pinostrobin											+
M245	Methylated flavonoid 19						+					
M248	Methylated flavonoid 20			+								
Πυρόνες και παράγωγα												
M120	6-ethyl-4-hydroxy-5-methyl-3-(3-oxopentyl)-2H-pyran-2-one					+						
M137	a) 3,5-dimethyl-6-isopropyl-4-methoxy-a-pyron, b) 2-methoxy-3,5-dimethyl-6-(1-methylethyl)-4H-pyran-4-one					+						
M142	Pyrone derivative 1									+		
M150	Micropyrone					+						
M196	Pyrone derivative 2									+		
M258	Pyrone derivative 3									+		
M280	Pyrone derivative 4	+				+				+		
M283	Pyrone derivative 5	+										
M287	Pyrone derivative 6									+		
M295	Pyrone derivative 7	+										
M303	Pyrone derivative 8									+		
Ετεροδιμερή πυρόνης-φλορογλουσινόλης												

M176	Arzanol analogue											+
M225	Plicatipyron					+						
M233	Plicatipyron analogue 1					+						
M236	Arenol					+						
M247	Arzanol					+				+		
M257	Plicatipyron analogue 2					+				+		
M260	3-Methylarzanol					+				+		
M261	Auricepyron analogue						+					
M265	3-Methylarzanol isomer									+		
M266	Heterodimer pyrone-phloroglucinol					+						
M270	6-O-desmethyllauricepyron or arenol C analogue					+				+		
M272	Heliarzanol analogue					+						
M274	Auricepyron analogue					+						
M276	Auricepyron analogue 1									+		
M281	Italipyron	+				+						
M289	Helicerastripyron								+			
M300	3-[[3-acetyl-5-(3,7-dimethyl-2,6-octadienyl)-2,4,6-trihydroxyphenyl]methyl]-4-hydroxy-5-methyl-6-propyl-2H-pyran-2-one or 3-[[3-(3,7-dimethyl-2,6-octadien-1-yl)-2,4,6-trihydroxy-5-(2-methyl-1-oxopropyl)phenyl]methyl]-4-hydroxy-5,6-dimethyl-2H-pyran-2-one								+			
M305	Auricepyron analogue 2									+		
M307	3-[[3-(3,7-dimethyl-2,6-octadien-1-yl)-2,4,6-trihydroxy-5-(2-methyl-1-oxobutyl)phenyl]methyl]-4-hydroxy-5,6-dimethyl-2H-pyran-2-one								+	+		
Λιπαρά οξέα και παράγωγα												
M126	C18 Trihydroxy fatty acid 1			+	+					+	+	
M145	C18 Trihydroxy fatty acid 2	+	+	+	+		+	+		+	+	+
M153	3,5-Dihydroxy-hexadecanoic acid		+									
M244	C18 Hydroxy fatty acid		+									
M249	C17 Hydroxy fatty acid 2	+	+		+			+			+	+
M250	C17 Hydroxy fatty acid 1											+
M254	Linolenic acid		+									
Τερπένια												
M209	Terpene 1	+	+	+	+			+			+	+
M214	Terpene 2	+	+		+			+			+	
M240	Diterpene						+					
M253	Triterpene 3											+
M275	Triterpenic acid 1				+						+	
M278	Triterpenic acid 2				+						+	
M279	Triterpene 1			+								
M294	Triterpene 2			+								
Άλλοι												
M146	Dilignol analogue 1			+								
M147	Coumarin analogue					+						

M152	Dilignol analogue 2			+	+						+	
M171	Araneophthalide					+				+		
M208	6-Demethylacronylin					+						
M256	Oxygenated aliphatic hydrocarbon						+					
M268	Oxygenated aliphatic hydrocarbon						+					
M293	Lupulone						+			+		

Μεθυλιωμένα φλαβονοειδή (ζώνη έκλουσης 7,78-17,77min)

Από το σύνολο των ημι- και ταυτοποιημένων μεταβολιτών το 14% (23 μεταβολίτες) αντιστοιχεί σε μεθυλιωμένα φλαβονοειδή (Πίνακας 2.5), μια σημαντική κατηγορία μεταβολιτών με αντιοξειδωτική, αντικαρκινική, ανοσοτροποποιητική δράση (Lingrong Wen et al. 2017), τα οποία εντοπίζονται συνήθως ως μονο- ή πολυ- *O*-μεθυλιωμένα σε διάφορα είδη ελίχρυσων όπως *H. luteoalbum* (Ali Esmail Al-Snafi 2019), *H. nitens* (Tomas-Barberán et al. 1988), *H. chasmolycicum* P.H.Davis (S. Süzgeç-Selçuk 2011), *Helichrysum stoechas* subsp. *stoechas* (syn. *H. decumbens* Cambess.) (Tomás-Lorente et al. 1989). Τα 23 μεθυλιωμένα φλαβονοειδή αναγνωρίστηκαν σε θετικό ή αρνητικό ιονισμό βάσει του παρόμοιου προφίλ θραυσματοποίησης του ψευδομοριακού ιόντος, δηλαδή, στην απομάκρυνση μέθυλο ομάδων με $m/z = 15$ Da (Πίνακες παραρτήματος Π2.2-Π2.12, σελ. 351-372) με την απόδοση της απόλυτης θέσης των υποκαταστατών να μην είναι εφικτή σε όλους τους μεταβολίτες εν απουσία επαρκών βιβλιογραφικών, φασματομετρικών δεδομένων. Συγκεκριμένα, βάσει των διαφορετικών R_t και του αριθμού εμφανίσεων ανά είδος αναγνωρίστηκαν 4 C16 Me-φλαβονοειδή στα είδη H5>H3, 2 C17 Me-φλαβονοειδή στα H3, H6, 9 C18 Me-φλαβονοειδή στα είδη H6>H1, H2, H3, H8>H7, H10, H11, 5 C19 Me-φλαβονοειδή στα είδη H6>H3, 2 C20 Me-φλαβονοειδή στο είδος H6, 1 C21 Me-φλαβονοειδές στο είδος H6. Περισσότερες εμφανίσεις παρουσιάζουν τα C18 Me-φλαβονοειδή M224 στα είδη H3, H6, M235 στα είδη H1, H7, H10, M239 στα είδη H2, H3, H6, H11.

Πίνακας 2.5: 23 μεθυλιωμένα φλαβονοειδή που εντοπίστηκαν στα μεθανολικά εκχυλίσματα των 11 αυτοφυών ελίχρυσων ελληνικής προέλευσης

	Μεταβολίτης	R_t (min)	EC (neutral)	ID	H1 (HA_2013)	H2 (HD_2019)	H3 (HHa_2019)	H4 (HIIa_2018)	H5 (HIM_2019)	H6 (HL_2020)	H7 (HOk_2018)	H8 (HPv_2020)	H9 (HS_2019)	H10 (HSBr_2016)	H11 (HT_2019)
1	M113	7,78	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	Isorhamnetin					+						
2	M116	7,85	C ₁₈ H ₁₆ O ₉	Methylated flavonoid 1								+			
3	M148	8,68	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	Methylated flavonoid 2								+			

4	M164	9,30	C ₁₉ H ₁₈ O ₉	Methylated flavonoid 3						+					
5	M165	9,11	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	Trihydroxy-methoxyflavone					+						
6	M184	9,75	C ₁₉ H ₁₈ O ₉	Methylated flavonoid 4						+					
7	M187	9,82	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	Methylated flavonoid 5									+		
8	M192	9,96	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	Methylated flavonoid 6	+										
9	M203	10,25	C ₁₉ H ₁₈ O ₈	Methylated flavonoid 7						+					
10	M204	10,26	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	Methylated flavonoid 8		+									
11	M215	10,57	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	5,7-Dihydroxy-3-methoxyflavone					+						
12	M216	10,73	C ₁₉ H ₁₈ O ₈	Methylated flavonoid 9						+					
13	M218	10,90	C ₂₀ H ₂₀ O ₉	Methylated flavonoid 10						+					
14	M221	10,93	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	Methylated flavonoid 11			+								
15	M222	10,96	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	Methylated flavonoid 12						+					
16	M224	11-11,17	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	Methylated flavonoid 13			+			+					
17	M230	11,31	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	Methylated flavonoid 14			+								
18	M235	12,00	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	Methylated flavonoid 15	+						+			+	
19	M237	12,03	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	Methylated flavonoid 16						+					
20	M239	12,29-12,37	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	Methylated flavonoid 17		+	+			+					+
21	M242	12,56	C ₁₈ H ₁₆ O ₆	Methylated flavonoid 18						+					
22	M245	12,80	C ₂₀ H ₂₀ O ₈	Methylated flavonoid 19						+					
23	M248	12,88	C ₁₉ H ₁₈ O ₇	Methylated flavonoid 20			+								

Παράγωγα πυρόνης (ζώνη έκλουσης 7,78-17,77min)

Από το σύνολο των ημι- και ταυτοποιημένων μεταβολιτών το 18% (30 μεταβολίτες) αντιστοιχεί σε πυρόνες και παράγωγα (Πίνακας 2.6), μια σημαντική κατηγορία μεταβολιτών, ειδικά αυτή που περιέχει την φαρμακοφόρο ομάδα της α-πυρόνης (ή 2-πυρόνης), η οποία κατηγορία παρουσιάζει φαρμακολογικές ιδιότητες όπως αντι-HIV, αντιφυματιωτική, αντικαρκινική, αντιμικροβιακή, αντιμυκητιακή, αντιερεθιστική, νευροπροστατευτική, ανοσοτροποποιητική και αναστολής των ενζύμων ελαστάσης, κυκλοοξυγενάσης (COX), παγκρεατική εστεράση χοληστερόλης (Zubair Shanib Bhata et al. 2017). Στο γένος *Helichrysum* αναφέρονται κυρίως οι α-πυρόνες (Inder Pal Singh 2006; Akaberi, Sahebkar, et al. 2019) ως μονομερή ή και γλυκοζυλιωμένα, ως ομοδιμερή, διμερή ή ετεροδιμερή με ή χωρίς πρενυλο- υποκατάσταση, η οποία μπορεί να υφίσταται αναδιάταξη ή διπλασιασμό σχηματίζοντας την γερανυλο- ομάδα, η οποία μπορεί να

υφίσταται κυκλοποίηση σχηματίζοντας παράγωγα χρωμανίου και βενζοφουρανίου. Οι πρενυλο- και γερανυλο- ομάδες παρατηρούνται συνήθως σε γειτονικούς βενζολικούς δακτυλίους των ετεροδιμερών, ενώ κοινοί υποκατάστατες του α-πυρανικού δακτυλίου είναι οι μεθυλο-, αιθυλο-, ισοπροπυλο- και 1-βουτυλο- ομάδες.

Συγκεκριμένα, βάσει των διαθέσιμων βιβλιογραφικών δεδομένων αναγνωρίστηκαν οι παρακάτω υποκατηγορίες πυρονών:

(α) μονομερές υποκατεστημένες (M120, M137, M150), **(β) ετεροδιμερή πυρόνης-φλορογλουσινόλης** όπως ανάλογα **arzanol** (M247, M176), 3-methyl arzanol (M260, M265), ανάλογο heliarzanol (M272), **(γ) ετεροδιμερή πυρόνης-φλορογλουσινόλης** όπως ανάλογα **plicatipyron** (M225, M233, M257), **(δ) ετεροδιμερή πυρόνης-φλορογλουσινόλης** όπως ανάλογα **auriceryron** (M261, M274, M276, M305), **(ε) άλλα ετεροδιμερή** όπως arenol (M236), italipyron (M281), Helicerastripyron (M289), οι μεταβολίτες M266, M270, M300, M307, **(στ) παράγωγα πυρόνης** (M142, M196, M258, M280, M283, M287, M295, M303) βάσει του προφίλ θραυσματοποίησης του ψευδομοριακού ιόντος, δηλαδή, στην απομάκρυνση ομάδας α-πυρόνης με $m/z = 153$ Da (Tomás-Lorente et al. 1989) (Πίνακες παραρτήματος Π2.2-Π2.12, σελ. 351-372).

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι περισσότερες εμφανίσεις πυρονών και παραγώγων αφορούν τα είδη H5 (15 εμφανίσεις) και H9 (14 εμφανίσεις).

Πίνακας 2.6: 30 δομές πυρονών και παραγώγων που εντοπίστηκαν στα μεθανολικά εκχυλίσματα των 11 αυτοφυών ελίχρυσων ελληνικής προέλευσης

	Μεταβολίτης	Rt(min)	EC (neutral)	ID	H1 (HA_2013)	H2 (HD_2019)	H3 (HHa_2019)	H4 (HIIa_2018)	H5 (HIM_2019)	H6 (HL_2020)	H7 (HOk_2018)	H8 (HPv_2020)	H9 (HS_2019)	H10 (HSBr_2016)	H11 (HT_2019)
1	M120	7,90	C ₁₃ H ₁₈ O ₄	6-ethyl-4-hydroxy-5-methyl-3-(3-oxopentyl)-2H-pyran-2-one					+						
2	M137	8,43	C ₁₁ H ₁₆ O ₃	a) 3,5-dimethyl-6-isopropyl-4-methoxy-a-pyron, b) 2-methoxy-3,5-dimethyl-6-(1-methylethyl)-4H-pyran-4-one					+						
3	M142	8,51	C ₁₇ H ₂₄ O ₇	Pyron derivative 1									+		
4	M150	8,76	C ₁₄ H ₂₀ O ₄	Micropyron					+						
5	M196	10,02	C ₁₄ H ₁₈ O ₅	Pyron derivative 2									+		

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. Μελέτη φυτοχημικού προφίλ των 11 άγριων taxa *Helichrysum* Mill. ελληνικής προέλευσης.

6	M258	13,42	C ₂₅ H ₃₂ O ₈	Pyrone derivative 3										+		
7	M280	15,64-15,65	C ₂₅ H ₃₂ O ₈	Pyrone derivative 4	+				+					+		
8	M283	15,90	C ₂₇ H ₂₆ O ₇	Pyrone derivative 5	+											
9	M287	16,08	C ₂₅ H ₃₂ O ₈	Pyrone derivative 6										+		
10	M295	16,47	C ₂₃ H ₂₆ O ₇	Pyrone derivative 7	+											
11	M303	16,94	C ₂₄ H ₂₈ O ₇	Pyrone derivative 8										+		
12	M176	9,50	C ₂₂ H ₂₈ O ₈	Arzanol analogue												+
13	M225	11,06	C ₂₂ H ₂₆ O ₈	Plicatipyrene					+							
14	M233	11,87	C ₂₂ H ₂₆ O ₈	Plicatipyrene analogue 1					+							
15	M236	12,01	C ₂₁ H ₂₄ O ₇	Arenol					+							
16	M247	12,85	C ₂₂ H ₂₆ O ₇	Arzanol					+					+		
17	M257	13,32-13,33	C ₂₂ H ₂₆ O ₈	Plicatipyrene analogue 2					+					+		
18	M260	13,66-13,67	C ₂₃ H ₂₈ O ₇	3-Methylarzanol					+					+		
19	M261	13,70	C ₂₅ H ₃₂ O ₇	Auricepyron analogue						+						
20	M265	14,00	C ₂₃ H ₂₈ O ₇	3-Methylarzanol isomer										+		
21	M266	14,05	C ₂₃ H ₂₈ O ₈	Heterodimer pyrone-phloroglucinol					+							
22	M270	14,25-14,50	C ₂₄ H ₃₀ O ₇	6-O-desmethyauricepyron or arenol C analogue					+					+		
23	M272	15,01	C ₂₄ H ₃₀ O ₈	Heliarzanol analogue					+							
24	M274	15,14	C ₂₅ H ₃₂ O ₇	Auricepyron analogue					+							
25	M276	15,20	C ₂₅ H ₃₂ O ₇	Auricepyron analogue 1										+		
26	M281	15,69-15,73	C ₂₂ H ₂₄ O ₇	Italipyrene	+				+							
27	M289	16,17	C ₂₇ H ₃₄ O ₇	Helicerastripyrene									+			
28	M300	16,75	C ₂₈ H ₃₆ O ₇	3-[[3-acetyl-5-(3,7-dimethyl-2,6-octadienyl)-2,4,6-trihydroxyphenyl]methyl]-4-hydroxy-5-methyl-6-propyl-2H-pyran-2-one or 3-[[3-(3,7-dimethyl-2,6-octadien-1-yl)-2,4,6-trihydroxy-5-(2-methyl-1-oxopropyl)phenyl]methyl]-4-hydroxy-5,6-dimethyl-2H-pyran-2-one									+			
29	M305	17,11	C ₂₅ H ₃₂ O ₇	Auricepyron analogue 2										+		
30	M307	17,36-17,43	C ₂₉ H ₃₈ O ₇	3-[[3-(3,7-dimethyl-2,6-octadien-1-yl)-2,4,6-trihydroxy-5-(2-methyl-1-oxobutyl)phenyl]methyl]-4-hydroxy-5,6-dimethyl-2H-pyran-2-one									+	+		

2.4 Συμπεράσματα

Η ανάλυση των 11 μεθανολικών εκχυλισμάτων 11 αυτοφυών taxa *Helichrysum* ελληνικής προέλευσης με υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας απέδωσε 308 μοριακούς τύπους διαφορετικών μεταβολιτών από τους οποίους οι 164 ημι- και ταυτοποιημένοι ανήκουν σε γνωστές κατηγορίες εκπροσώπων του γένους *Helichrysum*.

Διακρίθηκαν δύο χρωματογραφικές ζώνες έκλουσης μεταβολιτών βάσει του χρόνου ανάσχεσης γεγονός που υποδεικνύει την σχετική τους πολικότητα ως προς το πληρωτικό υλικό της χρωματογραφικής στήλης που χρησιμοποιήθηκε.

Η ζώνη 0-8,50 min περιλαμβάνει τις γενικές κατηγορίες μεταβολιτών: (α) Σάκχαρα, (β) Κουμαρίνες, (γ) Οξέα και παράγωγα, (δ) Φλαβονοειδή και παράγωγα και πιο ειδικά άγλυκα και γλυκοζυλιωμένα παράγωγα φαινολικών οξέων, φλαβονοειδών η παρουσία των οποίων είναι ευρεία σε όλα τα υπό μελέτη δείγματα (H1-H11).

Η ζώνη 7,78-17,77 min περιλαμβάνει τις γενικές κατηγορίες μεταβολιτών: (α) Φλαβονοειδή και παράγωγα, (β) Πυρόνες και παράγωγα, (γ) Ετεροδιμερή πυρόνης-φλορογλουσινόλης, (δ) Λιπαρά οξέα και παράγωγα, , (ε) Τερπένια, (στ) άλλοι μεταβολίτες και ειδικότερα λιτόφιλα, μεθυλιωμένα φλαβονοειδή με χαρακτηριστική παρουσία της κατηγορίας στα είδη H3 και H6, παράγωγα πυρόνης με χαρακτηριστική παρουσία της κατηγορίας στα είδη H1, H5 και H9, ετεροδιμερή πυρόνης-φλορογλουσινόλης με χαρακτηριστική παρουσία της κατηγορίας στα είδη H5 και H9, C17-C18 υδροξυ- λιπαρά οξέα με χαρακτηριστική παρουσία της κατηγορίας στα είδη H2, H4, H10 και H11, τερπένια με χαρακτηριστική παρουσία της κατηγορίας στα είδη H3, H4 και H10.

Επιπρόσθετα, τα είδη H3, H6 αποτελούν πηγή μεθυλιωμένων φλαβονοειδών. Το είδος H5 (*H. italicum* subsp. *microphyllum*) είναι γνωστό για την απομόνωση του φαρμακολογικά ενεργού ετεροδιμερούς πυρόνης-φλορογλουσινόλης arzanol (Appendino et al. 2007) και η ύπαρξη μεγάλου αριθμού πυρονών και παραγώγων καθιστά το είδος H9 (*H. sibthorpii*) υποσχόμενο ως προς το περιεχόμενό του σε ανάλογους μεταβολίτες.

2.5 Βιβλιογραφία

- A. I. Derkach, N. F. Komissarenko, V. T. Chernobai. 1986. "Coumarins of the Inflorescences of *Calendula Officinalis* and *Helichrysum arenarium*." *Chemistry of Natural Compounds* 22: 722–23. <https://doi.org/10.1007/BF00598365>.
- Abdallah Kherbache, Abderrahmane Senator, Saliha Laouicha, Raed M. Al-Zoubi, and Hamama Bouriche. 2020. "Phytochemical Analysis, Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of *Helichrysum stoechas*

- (L.) Moench Extracts.” *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 29 (101826): 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101826>.
- Abdel-Hady, Heba, Mortada Mohamed El-Sayed, Mahfouz Mohamed Abdel-Gawad, Eman Ahmed El-Wakil, El Sayed Saleh Abdel-Hameed, and Ezzat El Sayed Abdel-Lateef. 2018. “LC-ESI-MS Analysis, Antitumor and Antioxidant Activities of Methanolic Extract of Egyptian *Allium Kurrat*.” *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 8 (7): 85–92. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2018.8714>.
- Ahmed Serag, Mostafa H. Baky, Stefanie Doll, Mohamed A. Farag. 2020. “UHPLC-MS Metabolome Based Classification of Umbelliferous Fruit Taxa: A Prospect for Phytoequivalency of Its Different Accessions and in Response to Roasting.” *RSC Adv.* 10: 76–85. <https://doi.org/10.1039/c9ra07841j>.
- Ajay P. Singh, Yifei Wang, Rachel M. Olson, Devanand Luthria, Gary S. Banuelos, and Ted Wilson Sajeemas Pasakdee, Nicholi Vorsa. 2017. “LC-MS-MS Analysis and the Antioxidant Activity of Flavonoids from Eggplant Skins Grown in Organic and Conventional Environments.” *Food and Nutrition Sciences* 8: 873–88. <https://doi.org/10.4236/fns.2017.89063>.
- Akaberi, Maryam, Ombeline Danton, Zahra Tayarani-Najaran, Javad Asili, Mehrdad Iranshahi, S. Ahmad Emami, and Matthias Hamburger. 2019. “HPLC-Based Activity Profiling for Antiprotozoal Compounds in the Endemic Iranian Medicinal Plant *Helichrysum ocephalum*.” *Journal of Natural Products* 82 (4): 958–69. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.8b01031>.
- Akaberi, Maryam, Amirhossein Sahebkar, Narjes Azizi, and Seyed Ahmad Emami. 2019. “Everlasting Flowers: Phytochemistry and Pharmacology of the Genus *Helichrysum*.” *Industrial Crops and Products* 138 (April): 111471. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111471>.
- Alessandro Venditti, Claudia Lattanzi, Luigi Ornano, Filippo Maggi, Cinzia, Armandodoriano Sanna, Mauro Ballero, Antonello Alvino, Mauro Serafini, and Bianco. 2016. “A New Glucosidic Phthalide from *Helichrysum microphyllum* subsp. *tyrrhenicum* from La Maddalena Island (Sardinia, Italy).” *Natural Product Research* 30 (7): 789–95. <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1067619>.
- Ali Esmail Al-Snafi. 2019. “The Medical Benefit of *Gnaphalium luteoalbum*-A Review.” *IOSR Journal of Pharmacy* 9 (5): 40–44.
- Ana María Gómez-Caravaca, Vito Verardo, Moreno Toselli, Antonio Segura-Carretero, Alberto Fernández-Gutiérrez, Maria Fiorenza Caboni. 2013. “Determination of the Major Phenolic Compounds in Pomegranate Juices by HPLC–DAD–ESI–MS.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61: 5328–37. <https://doi.org/10.1021/jf400684n>.
- Angel Rumbero, Fco. Javier Arriaga-Giner, Eckhard Wollenweber. 2000. “A New Oxyprenyl Coumarin and Highly Methylated Flavones from the Exudate of *Ozothamnus lycopodioides* (Asteraceae).” *Z. Naturforsch.* 55c: 1–4. <https://doi.org/10.1515/znc-2000-1-202>.
- Appendino, Giovanni, Michela Ottino, Nieves Marquez, Federica Bianchi, Anna Giana, Mauro Ballero, Olov Sterner, Bernd L. Fiebich, and Eduardo Munoz. 2007. “Arzanol, an Anti-Inflammatory and Anti-HIV-1 Phloroglucinol α -Pyrone from *Helichrysum italicum* ssp. *microphyllum*.” *Journal of Natural Products* 70 (4): 608–12. <https://doi.org/10.1021/np060581r>.
- Arne Strid. 2016. *Strid A. 2016: Atlas of the Aegean Flora. Part 2: Maps. – Berlin: Botanic Garden and Botanical Museum Berlin, Freie Universität Berlin. – Englera 33(2).* Edited by Nicholas J. Turland. 1st ed. Berlin: Botanic Garden and Botanical Museum Berlin.

- Bohlmann Ferdinand, Zdero Christa. 1980. "Neue Phloroglucin-Derivate Aus *Helichrysum*-Arten." *Phytochemistry* 19: 153–55. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(80\)85038-2](https://doi.org/10.1016/0031-9422(80)85038-2).
- Bojan Vujic, Vera Vidakovic, Milka Jadranin, Irena Novakovic, Snežana Trifunovic, Vele Tešević, Boris Mandić. 2020. "Composition, Antioxidant Potential, and Antimicrobial Activity of *Helichrysum plicatum* DC. Various Extracts." *Plants* 9: 337. <https://doi.org/10.3390/plants9030337>.
- Brieudes, Vincent, Apostolis Angelis, Konstantina Vougiannopoulou, Harris Pratsinis, Dimitris Kletsas, Sofia Mitakou, Maria Halabalaki, and Leandros A. Skaltsounis. 2016. "Phytochemical Analysis and Antioxidant Potential of the Phytonutrient-Rich Decoction of *Cichorium spinosum* and *C. intybus*." *Planta Medica* 82 (11–12): 1070–78. <https://doi.org/10.1055/s-0042-107472>.
- Brito, Anghel, Javier E. Ramirez, Carlos Areche, Beatriz Sepúlveda, and Mario J. Simirgiotis. 2014. "HPLC-UV-MS Profiles of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Fruits from Three *Citrus* Species Consumed in Northern Chile." *Molecules* 19 (11): 17400–421. <https://doi.org/10.3390/molecules191117400>.
- C.T. Sulaiman, Satheesh George, Indira Balachandran. 2013. "Characterization of Phenolic Compounds in Fruit Extracts of Three Medicinal Plants Using Liquid Chromatography-Negative Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry." *TACL* 3 (5&6): 322–29. <https://doi.org/10.1080/22297928.2013.861167>.
- Cassandra L. Quave, James T. Lyles, Jeffery S. Kavanaugh, Kate Nelson, Corey, and Alexander R. Horswill P. Parlet, Heidi A. Crosby, Kristopher P. Heilmann. 2015. "*Castanea sativa* (European Chestnut) Leaf Extracts Rich in Ursene and Oleanene Derivatives Block *Staphylococcus Aureus* Virulence and Pathogenesis without Detectable Resistance." *PLoS ONE* 10(8) (e0136486): 1–32. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136486>.
- Chen, Guilin, Xun Li, Flora Saleri, and Mingquan Guo. 2016. "Analysis of Flavonoids in *Rhamnus davurica* and Its Antiproliferative Activities." *Molecules* 21 (10): 1–14. <https://doi.org/10.3390/molecules21101275>.
- Chen, Haifang, Mulan Li, Chen Zhang, Wendi Du, Haihua Shao, Yulin Feng, Wugang Zhang, and Shilin Yang. 2018. "Isolation and Identification of the Anti-Oxidant Constituents from *Loropetalum chinense* (R. Brown) Oliv. Based on UHPLC-Q-TOF-MS/MS." *Molecules* 23 (7). <https://doi.org/10.3390/molecules23071720>.
- Chun-xiao Li, Jing-chun Li, Jiang Lai, Ying Liu. 2022. "The Pharmacological and Pharmacokinetic Properties of Esculin: A Comprehensive Review." *Phytotherapy Research* 36: 2434–48. <https://doi.org/10.1002/ptr.7470>.
- D'Abrosca, Brigida, Elisabetta Buommino, Grazia D'Angelo, Lorena Coretti, Monica Scognamiglio, Valeria Severino, Severina Pacifico, Giovanna Donnarumma, and Antonio Fiorentino. 2013. "Spectroscopic Identification and Anti-Biofilm Properties of Polar Metabolites from the Medicinal Plant *Helichrysum italicum* against *Pseudomonas aeruginosa*." *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 21 (22): 7038–46. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.09.019>.
- Dairpoosh, Farnoosh. 2011. "Profile of the Polyphenols in a European Diet." Jacobs. <https://opus.jacobs-university.de/frontdoor/index/index/docId/112>.
- Eirini Kouloura. 2019. "Phytochemical Investigation of *Acronychia* Species Using NMR and LC MS Based Dereplication and Metabolomics Approaches." National and Kapodistrian University of Athens, University Paris Descartes. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01674263v2>.

- Emmanuel Ayobami Makinde, Chitchamai Ovatlarnporn, Chonlatid Sontimuang, Gaëtan Herbet, Opeyemi Joshua Olatunji. 2020. "Chemical Constituents From the Aerial Part of *Tiliacora triandra* (Colebr.) Diels and Their α -Glucosidase and α -Amylase Inhibitory Activity." *Natural Product Communications* 15 (1): 1–4. <https://doi.org/10.1177/1934578X19899595>.
- Evanthia Dina, Argyro Vontzalidou, Antigoni Cheilari, Panagiotis Bagatzounis, Eftyxia Agapidou, Ilias Giannenas, Katerina Grigoriadou, Nektarios Aligiannis. 2022. "Sustainable Use of Greek Herbs By-Products, as an Alternative Source of Biologically Active Ingredients for Innovative Products." *Frontiers in Nutrition* 9 (April art867666): 1–13. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.867666>.
- F. Bohlmann, L. N. Misra, J. Jakupovic. 1984. "Weitere Phioroglucin- Und -Pyron-Derivate Aus *Helichrysum*-Arten." *Planta Medica* 50: 174–76. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)82740-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)82740-5).
- Felipe, Daniele F., Lara Z.S. Brambilla, Carla Porto, Eduardo J. Pilau, and Diógenes A.G. Cortez. 2014. "Phytochemical Analysis of *Pfaffia glomerata* Inflorescences by LC-ESI-MS/MS." *Molecules* 19 (10): 15720–34. <https://doi.org/10.3390/molecules191015720>.
- Fernández-Arroyo, S., E. Barrajón-Catalán, V. Micol, A. Seguera-Carretero, and A. Fernández-Gutiérrez. 2010. "High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection Coupled to Electrospray Time-of-Flight and Ion-Trap Tandem Mass Spectrometry to Identify Phenolic Compounds from a *Cistus ladanifer* Aqueous Extract." *Phytochemical Analysis* 21 (4): 307–13. <https://doi.org/10.1002/pca.1200>.
- Francescato, Leandro N., Silvia L. Debenedetti, Thiago G. Schwanz, Valquiria L. Bassani, and Amélia T. Henriques. 2013. "Identification of Phenolic Compounds in *Equisetum giganteum* by LC-ESI-MS/MS and a New Approach to Total Flavonoid Quantification." *Talanta* 105: 192–203. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.11.072>.
- Gampe, Nóra, András Darcsi, Andrea Nagyné Nedves, Imre Boldizsár, László Kursinszki, and Szabolcs Béni. 2019. "Phytochemical Analysis of *Ononis arvensis* L. by Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectrometry." *Journal of Mass Spectrometry* 54 (2): 121–33. <https://doi.org/10.1002/jms.4308>.
- Gokhan Zengin, Aleksandra Cvetanović, Uroš Gašić, Živoslav Tešić, Alena Stupar, Marie Carene Nancy Picot-Allain Gizem Bulut, Kouadio Ibrahime Sinan, Sengul Uysal, and Mohamad Fawzi Mahomoodally. 2020. "A Comparative Exploration of the Phytochemical Profiles and Biopharmaceutical Potential of *Helichrysum stoechas* subsp. *barrelieri* Extracts Obtained via Five Extraction Techniques." *Process Biochemistry* 91: 113–25. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.12.002>.
- Gomes, D.; et.al. 2018. "Comparison of Bioactive Compounds Content in Leaf Extracts of *Passiflora incarnata*, *P. caerulea* and *P. alata* and in Vitro Cytotoxic Potential on Leukemia Cell Lines." *Revista Brasileira de Farmacognosia* 28: 703–9. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.01.006>.
- Greek Flora. 2022. "https://www.greekflora.gr/el/Default.aspx." 2022. <https://www.greekflora.gr/el/Default.aspx>.
- Gregorio Peron, Deepak Raj Pant, Shyam Sharan Shrestha, Sangeeta Rajbhandary, Stefano Dall'Acqua. 2020. "An Integrated LC-ESI-MSn and High Resolution LC-ESI-QTOF Approach for the Identification of Phloroglucinols from Nepalese *Hypericum japonicum*." *Molecules* 25 (5937): 1–12. <https://doi.org/10.3390/molecules25245937>.
- Huading Zhao, Xin Hu, Xiaoqin Chen, Shuyun Shi, Xinyu Jiang, Xuejuan Liang, Wei Chen, Shuihan Zhang. 2015. "Analysis and Improved Characterization of Minor Antioxidants From leaves of *Malus doumeri* Using a Combination of Major Constituents' knockout with High-Performance Liquid Chromatography Diode

- Arraydetector–Quadrupole Time-of-Flight Tandem Mass Spectrometry.” *Journal of Chromatography A* 1398: 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.04.018>.
- Inder Pal Singh, Sandip B. Bharate. 2006. “Phloroglucinol Compounds of Natural Origin.” *Natural Product Reports* 23: 558–91. <https://doi.org/10.1039/b600518g>.
- J. Jakupovic, J. Kuhnke. A. Schuster, M. A. Metwally, F. Bohlmann. 1986. “Phloroglucinol Derivatives And Other Constituents From South African *Helichrysum* Species.” *Phytochemistry* 25 (5): 1133–42. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)81569-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)81569-1).
- Jakupovic, J., A. Schuster, H. Sun, F. Bohlmann, and D. S. Bhakuni. 1987. “Prenylated Phthalides from *Anaphalis Araneosa* and *Helichrysum platypterum*.” *Phytochemistry* 26 (2): 580–81. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)81462-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)81462-4).
- Jinguo Kang, William E. Price, John Ashton, Linda C. Tapsell, Stuart Johnson. 2016. “Identification and Characterization of Phenolic Compounds in Hydromethanolic Extracts of *Sorghum* Wholegrains by LC-ESI-MSn.” *Food Chemistry* 211: 215–26. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.052>.
- Jingya Ruan, Jiejing Yan, Dandan Zheng, Fan Sun, Jianli Wang, Lifeng Han, and and Tao Wang Yi Zhang. 2019. “Comprehensive Chemical Profiling in the Ethanol Extract of *Pluchea indica* Aerial Parts by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Analysis of Its Silica Gel Column Chromatography Fractions.” *Molecules* 24 (2784): 1–20. <https://doi.org/10.3390/molecules24152784>.
- Katarzyna Lech, Katarzyna Witkoś, Maciej Jarosz. 2014. “HPLC–UV–ESI MS/MS Identification of the Color Constituents of Sawwort (*Serratula tinctoria* L.).” *Anal Bioanal Chem* 406: 3703–8. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7589-3>.
- Katja Kramberger, Darja Barlic-Maganja, Dunja Bandelj, Alenka Baruca Arbeiter, Kelly Peeters, Ana Miklavcic Višnjevec, Zala Jenko Pražnikar. 2020. “HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS Determination of Bioactive Compounds and Antioxidant Activity Comparison of the Hydroalcoholic and Water Extracts from Two *Helichrysum italicum* Species.” *Metabolites* 10: 403. <https://doi.org/10.3390/metabo10100403>.
- Konda, Chiharu. 2013. “Structural Analysis of Carbohydrates by Mass Spectrometry.” Purdue. https://docs.lib.purdue.edu/open_access_dissertations/141.
- Kramberger, Katja, Darja Barlič-Maganja, Dunja Bandelj, Alenka Baruca Arbeiter, Kelly Peeters, Ana Miklavčič Višnjevec, and Zala Jenko Pražnikar. 2020. “HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS Determination of Bioactive Compounds and Antioxidant Activity Comparison of the Hydroalcoholic and Water Extracts from Two *Helichrysum italicum* Species.” *Metabolites* 10 (10): 1–25. <https://doi.org/10.3390/metabo10100403>.
- Kris Morreel, Hoon Kim, Fachuang Lu, Oana Dima, Takuya Akiyama, Ruben Vanholme, Claudiu Niculaes, Geert Goeminne, Dirk Inze, Eric Messens, John Ralph, Wout Boerjan. 2010. “Mass Spectrometry-Based Fragmentation as an Identification Tool in Lignomics.” *Analytical Chemistry* 82: 8095–8105. <https://doi.org/10.1021/ac100968g>.
- Li-li Wang, Yun-bin Zhang, Xiao-ya Sun, Sui-qing Chen. 2016. “Simultaneous Quantitative Analysis of Main Components in *Linderae Reflexae* Radix with One Single Marker.” *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* 39 (8): 422–27. <https://doi.org/10.1080/10826076.2016.1169429>.
- Li, Wei, Yoshihisa Asada, and Takafumi Yoshikawa. 2000. “Flavonoid Constituents from *Glycyrrhiza glabra* Hairy Root Cultures.” *Phytochemistry*. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00337-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00337-X).
- Lingrong Wen, Yueming Jiang, Jiali Yang, Yupeng Zhao, Miaomiao Tian, Bao Yang. 2017. “Structure,

- Bioactivity, and Synthesis of Methylated Flavonoids." *Annals Of The New York Academy Of Sciences* 1398: 120–29. <https://doi.org/10.1111/nyas.13350>.
- Linlin Zhang, Qingxuan Xie, Xiaofang Li. 2022. "Esculetin: A Review of Its Pharmacology and Pharmacokinetics." *Phytotherapy Research* 36: 279–98. <https://doi.org/10.1002/ptr.7311>.
- Lv, Xin, Jian Zhi Sun, Shi Zhao Xu, Qian Cai, and Yu Qiang Liu. 2018. "Rapid Characterization and Identification of Chemical Constituents in *Gentiana* Radix before and after Wine-Processed by UHPLC-LTQ-Orbitrap MSn." *Molecules* 23 (12). <https://doi.org/10.3390/molecules23123222>.
- Magdalena Pawlak, Agnieszka Klupczynska, Zenon J Kokot, Jan Matysiak. 2020. "Extending Metabolomic Studies of *Apis mellifera* Venom: LC-MS-Based Targeted Analysis of Organic Acids." *Toxins* 12 (14): 1–13. <https://doi.org/10.3390/toxins12010014>.
- Mariana Rey, María S. Kruse, Rocío N. Magrini-Huamán, Jessica Gómez, Mario J. Simirgiotis, and Héctor Coirini Alejandro Tapia, Gabriela E. Feresin. 2021. "*Tessaria absinthioides* (Hook. & Arn.) DC. (Asteraceae) Decoction Improves the Hypercholesterolemia and Alters the Expression of LXRs in Rat Liver and Hypothalamus." *Metabolites* 11 (579): 1–16. <https://doi.org/10.3390/metabo11090579>.
- Marisa R. Barroso, Lillian Barros, Montserrat Duenas, Ana Maria Carvalho, Celestino Santos-Buelga, Isabel P. Fernandes, Maria F. Barreiro, Isabel C.F.R. Ferreira. 2014. "Exploring the Antioxidant Potential of *Helichrysum stoechas* (L.) Moench Phenolic Compounds for Cosmetic Applications: Chemical Characterization, Microencapsulation and Incorporation into a Moisturizer." *Industrial Crops & Products* 53: 330–36. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.01.004>.
- Mariusz Kowalczyk, Agata Rolnik, Weronika Adach, Magdalena Kluska, Michał Juszcak, and Anna Stochmal Łukasz Grabarczyk, Katarzyna Wozniak, Beata Olas. 2021. "Multifunctional Compounds in the Extract from Mature Seeds of *Vicia Faba* var. *minor*: Phytochemical Profiling, Antioxidant Activity and Cellular Safety in Human Selected Blood Cells in in Vitro Trials." *Biomedicine & Pharmacotherapy* 139 (111718): 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111718>.
- Maryam Akaberi, Amirhossein Sahebkar, Narjes Azizi, Seyed Ahmad Emami. 2019. "Everlasting Flowers: Phytochemistry and Pharmacology of the Genus *Helichrysum*." *Industrial Crops & Products* 138 (111471): 1–21. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111471>.
- Maryam Akaberi, Zahra Tayarani Najaran, Narjes Azizi, Seyed Ahmad Emami. 2021. "Metabolite Profiling and Antiprotozoal Activity of Three Endemic Iranian *Helichrysum* Species." *Industrial Crops & Products* 174 (114196): 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114196>.
- Matić, Ivana Z., Ivana Aljančić, Željko Žižak, Vlatka Vajs, Milka Jadranin, Slobodan Milosavljević, and Zorica D. Juranić. 2013. "In Vitro Antitumor Actions of Extracts from Endemic Plant *Helichrysum zivojinii*." *BMC Complementary and Alternative Medicine* 13 (36): 1–12. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-36>.
- Mohamed A. Farag, Eman M. Kabbash, Ahmed Mediani, Stefanie Döll, Tuba Esatbeyoglu, Sherif M. Affifi. 2022. "Comparative Metabolite Fingerprinting of Four Different Cinnamon Species Analyzed via UPLC–MS and GC–MS and Chemometric Tools." *Molecules* 27 (2935): 1–22. <https://doi.org/10.3390/molecules27092935>.
- Morikawa, Toshio, Li Bo Wang, Kiyofumi Ninomiya, Seikou Nakamura, Hisashi Matsuda, Osamu Muraoka, Li Jun Wu, and Masayuki Yoshikawa. 2009. "Medicinal Flowers. XXX. Eight New Glycosides, Everlastosides F - M, from the Flowers of *Helichrysum arenarium*." *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 57 (8): 853–

59. <https://doi.org/10.1248/cpb.57.853>.

- Nayane B. M. Sinosaki, Angélica P. P. Tonin, Marcos A. S. Ribeiro, Camila B. Poliseli, Sharise B. Roberto, Roberta da Silveira, Jesuí V. Visentainer, A, and Eduardo C. Meurer Oscar O. Santos. 2020. "Structural Study of Phenolic Acids by Triple Quadrupole Mass Spectrometry with Electrospray Ionization in Negative Mode and H/D Isotopic Exchange." *J. Braz. Chem. Soc.* 31 (2): 402–8. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190197>.
- Pereira, Catarina Guerreiro, Luísa Barreira, Sebastiaan Bijttebier, Luc Pieters, Vanessa Neves, Maria João Rodrigues, Ricardo Rivas, João Varela, and Luísa Custódio. 2017. "Chemical Profiling of Infusions and Decoctions of *Helichrysum italicum* subsp. *picardii* by UHPLC-PDA-MS and in Vitro Biological Activities Comparatively with Green Tea (*Camellia sinensis*) and Rooibos Tisane (*Aspalathus Linearis*)." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 145: 593–603. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.07.007>.
- Pljevljakušić, Dejan, Dubravka Bigović, Teodora Janković, Slavica Jelačić, and Katarina Šavikin. 2018. "Sandy Everlasting (*Helichrysum arenarium* (L.) Moench): Botanical, Chemical and Biological Properties." *Frontiers in Plant Science* 9 (August 1123): 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01123>.
- Poolsak Sahakitpichan, Wannaporn Disadee, Somsak Ruchirawat, Kanchanapoom, Tripetch. 2011. "3-Hydroxydihydrobenzofuran Glucosides from *Gnaphalium polycaulon*." *Chemical Pharmaceutical Bulletin* 59 (9): 1160–62. <https://doi.org/10.1248/cpb.59.1160>.
- Reed, Kyle A. 2009. "Identification of Phenolic Compounds from Peanut Skin Using HPLC-MSn." *ProQuest Dissertations and Theses*, 391. https://manchester.idm.oclc.org/login?url=https://search.proquest.com/docview/1033237266?accountid=12253%0Ahttp://manfe.hosted.exlibrisgroup.com/openurl/44MAN/44MAN_services_page?genre=dissertations+%26+theses&atitle=&author=Reed%2C+Kyle+A.&volume=&issue.
- Rios, J. L., M. C. Recio, and A. Villar. 1991. "Isolation and Identification of the Antibacterial Compounds from *Helichrysum stoechas*." *Journal of Ethnopharmacology* 33 (1–2): 51–55. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(91\)90160-F](https://doi.org/10.1016/0378-8741(91)90160-F).
- Romero, Néstor, Carlos Areche, Jaime Cubides-Cárdenas, Natalia Escobar, Olimpo García-Beltrán, Mario J. Simirgiotis, and Ángel Céspedes. 2020. "In Vitro Anthelmintic Evaluation of *Gliricidia sepium*, *Leucaena leucocephala*, and *Pithecellobium dulce*: Fingerprint Analysis of Extracts by UHPLC-Orbitrap Mass Spectrometry." *Molecules* 25 (13): 1–17. <https://doi.org/10.3390/molecules25133002>.
- Rudolf Hansel, Eva-Maria Cybulski, Bayhan Cubukcu, Ali H. Mericli, Ferdinand Bohlmann, Christa Zdero. 1980. "Neue Pyron-Derivate Aus *Helichrysum*-Arten." *Phytochemistry* 19: 639–44. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(80\)87030-0](https://doi.org/10.1016/0031-9422(80)87030-0).
- S. Süzgeç-Selçuk, A.S. Birteksöz. 2011. "Flavonoids of *Helichrysum chasmolycicum* and Its Antioxidant and Antimicrobial Activities." *South African Journal of Botany* 77: 170–74. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2010.07.017>.
- Sandra C. Gouveia, Paula C. Castilho. 2009. "Analysis of Phenolic Compounds from Different Morphological Parts of *Helichrysum devium* by Liquid Chromatography with On-Line UV and Electrospray Ionization Mass Spectrometric Detection." *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 23: 3939–53. <https://doi.org/10.1002/rcm.4335>.
- . 2010. "Characterization of Phenolic Compounds in *Helichrysum melaleucum* by High-Performance

- Liquid Chromatography with on-Line Ultraviolet and Mass Spectrometry Detection.” *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 24: 1851–68. <https://doi.org/10.1002/rcm.4585>.
- Sandra Gouveia, Paula C. Castilho. 2011a. “Characterisation of Phenolic Acid Derivatives and Flavonoids from Different Morphological Parts of *Helichrysum obconicum* by a RP-HPLC–DAD(–)–ESI–MSn Method.” *Food Chemistry* 129: 645–51. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.078>.
- . 2011b. “Characterisation of Phenolic Acid Derivatives and Flavonoids from Different Morphological Parts of *Helichrysum obconicum* by a RP-HPLC–DAD(–) ESI MSn Method.” *Food Chemistry* 129: 333–44. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.078>.
- . 2012. “*Helichrysum monizii* Lowe: Phenolic Composition and Antioxidant Potential.” *Phytochemical Analysis* 23: 72–83. <https://doi.org/10.1002/pca.1326>.
- Tomas-Barberán, Francisco A., Jerome D. Msonthi, and Kurt Hostettmann. 1988. “Antifungal Epicuticular Methylated Flavonoids from *Helichrysum nitens*.” *Phytochemistry* 27 (3): 753–55. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(88\)84087-1](https://doi.org/10.1016/0031-9422(88)84087-1).
- Tomás-Lorente, Francisco, Esther Iniesta-Sanmartín, Francisco A. Tomás-Barberán, Wolfram Trowitzsch-Kienast, and Victor Wray. 1989. “Antifungal Phloroglucinol Derivatives and Lipophilic Flavonoids from *Helichrysum decumbens*.” *Phytochemistry* 28 (6): 1613–15. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)97809-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)97809-9).
- Wang, Jinfeng, Ziyao Jia, Zhihao Zhang, Yutong Wang, Xi Liu, Linghua Wang, Ruichao Lin, and Thomas J. Schmidt. 2017. “Analysis of Chemical Constituents of *Melastoma dodecandrum* Lour. By UPLC–ESI–Q–Exactive Focus–MS/MS.” *Molecules* 22 (3): 1–20. <https://doi.org/10.3390/molecules22030476>.
- Wu, Yan Qi, Ya Li, Xian Feng Lin, Zhong Li Liu, and Yu Li. 2003. “Phenolic Compounds from *Anaphalis aureo-punctata*.” *Pharmazie* 58 (11): 833–35. <https://doi.org/10.1002/chin.200410182>.
- Xuan Zeng ID , Weiwei Su, Yuying Zheng ID , Hong Liu ID , Panlin Li, Weijian Zhang, Yuting Liang, and Hongliang Yao Yang Bai ID, Wei Peng. 2018. “UFLC–Q–TOF–MS/MS–Based Screening and Identification of Flavonoids and Derived Metabolites in Human Urine after Oral Administration of *Exocarpium Citri Grandis* Extract.” *Molecules* 23: 895. <https://doi.org/10.3390/molecules23040895>.
- Ying-yi Li, Ye-ying Song, Chang-hui Liu, Xiao-tao Huang, Xia Zheng, Neng Li, Mei-li Xu, and Ning-sheng Wang Sui-qing Mi. 2012. “Simultaneous Determination of Esculin and Its Metabolite Esculetin in Rat Plasma by LC–ESI–MS/MS and Its Application in Pharmacokinetic Study.” *Journal of Chromatography B* 907: 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.08.027>.
- Ying-Yu Hsu Kao, Tsai-Hua. 2019. “Evaluation of Prenylflavonoids and Hop Bitter Acids in Surplus Yeast.” *Journal Food Science Technology* 56 (4): 1939–53. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03660-6>.
- Zhuan-Hong Li, Han Guo, Wen-Bin Xu, Juan Ge, Xin Li, and Da-Jun He Mireguli Alimu. 2016. “Rapid Identification of Flavonoid Constituents Directly from PTP1B Inhibitive Extract of Raspberry (*Rubus Idaeus* L.) Leaves by HPLC–ESI–QTOF–MS–MS.” *Journal of Chromatographic Science* 54 (5): 805–10. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmw016>.
- Zubair Shanib Bhata, Muzafar Ahmad Rather, Mubashir Maqbool, Hafiz UL Lah, Syed Khalid Yousuf, Zahoor Ahmad. 2017. “A-Pyrones: Small Molecules with Versatile Structural Diversity Reflected in Multiple Pharmacological Activities-an Update.” *Biomedicine & Pharmacotherapy* 91: 265–77. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.04.012>.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. Μελέτη φυτοχημικού προφίλ των 11 άγριων taxa *Helichrysum* Mill. ελληνικής προέλευσης.

Φοίτος, Δ, Θ Κωσταντινίδης, και Γ Καμάρη. 2009. *Βιβλίο Ερυθρών Δεδομένων Των Σπάνιων & Απειλούμενων Φυτών Της Ελλάδας -Τόμος 2*. Edited by Θεοφάνης Κωνσταντινίδης & Γεωργία Καμάρη
Δημήτριος Φοίτος. Πάτρα: Ελληνική Βοτανική Εταιρεία

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Μελέτη αιθέριων ελαίων από 9 *ex situ* γονότυπους *H. amorginum*

3.1 Σκοπός εργασίας

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η για πρώτη φορά ποιοτική σύγκριση των κύριων συστατικών των αιθέριων ελαίων από *ex situ* καλλιεργούμενους γονότυπους *H. amorginum* (HA) με βιβλιογραφικά δεδομένα από αυτοφυές υλικό του ίδιου είδους ως συνεισφορά στην διερεύνηση του φυτοχημικού προφίλ των πτητικών μεταβολιτών του. Επίσης, η ποιοτική σύγκριση των αιθέριων ελαίων των υπό εξέταση γονότυπων με τις τεχνικές Hierarchical Cluster Analysis (HCA) και Principal Component Analysis (PCA) καθώς και η πρόταση χημειοταξινόμησης του είδους *H. amorginum* ως προς το προφίλ του αιθέριου ελαίου του σε σχέση με άλλα Ευρωπαϊκά και Μεσογειακά είδη του γένους *Helichrysum*. Συγκεκριμένα, τα νωπά δείγματα του υπέργειου μέρους των 9 γονότυπων του HA που διατηρούνται σε εκτός τόπου συνθήκες στο Ι.Γ.Β.Φ.Π., συλλέχθηκαν και αποστάχτησαν τον Μάιο 2020. Τα αιθέρια έλαια HA καθώς και ένα εμπορικό δείγμα *H. italicum* subsp. *serotinum* (HIS), που χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα αναφοράς για την σύγκριση, αναλύθηκαν με την τεχνική αέριας χρωματογραφίας συζευγμένη με αναλυτή φασματομετρίας μάζας (GC-MS) για την ταυτοποίηση και ποσοτικό προσδιορισμό των συστατικών τους. Τα αποτελέσματα που αφορούσαν τα αιθέρια έλαια των γονότυπων υπεβλήθησαν σε στατιστική ανάλυση.

3.1.1 Εισαγωγή

Οι βιβλιογραφικές μελέτες της χημικής σύστασης των αιθέριων ελαίων αυτοφυών ειδών-υποειδών *Helichrysum* Ελληνικής προέλευσης παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1 και αναφέρονται στα είδη *H. amorginum* (**1**, **2**), *H. doerfleri* (**3**), *H. heldreichii* (**4**), *H. italicum* subsp. *italicum* (**5**), *H. italicum* subsp. *microphyllum* (**6**), *H. orientale* (**7**), *H. stoechas* subsp. *barrelieri* (**8**), *H. stoechas* subsp. *barrelieri* var. *scandens* (**9**), *H. stoechas* subsp. *barrelieri* var. *spathulatum* (**10**), *H. taenari* (**11**). Στον πίνακα αναφέρονται οι κυριότεροι μεταβολίτες των μελετών, οι οποίοι στην πλειονότητα τους ανήκουν στις κατηγορίες οξυγονωμένων και μη οξυγονωμένων μονοτερπενίων και σесκιτερπενίων, κάτι που συμφωνεί με την γενική παραδοχή της σύστασης των πτητικών μεταβολιτών του γένους (Akaberi et al. 2019). Επίσης, αναφέρονται οι κατηγορίες C10, C14, C16 λιπαρών οξέων και C12, C27, C29, C31 υδρογονανθράκων στα είδη *H. heldreichii* (**4**) (tetradecanoic acid 1,54%, hexadecenoic acid 2,66%, nonacosane 1,65%, hentriacontane 1,45%), *H. orientale* (**7**) (tetradecanoic acid 4,84%, hexadecenoic acid 17,5%, heptacosane 4,57%, nonacosane 11,07%, hentriacontane 5,54%), *H. italicum* subsp. *microphyllum* (**6**) (dodecane 6,43-6,71%), *H. stoechas* subsp. *barrelieri* (**8**) (decanoic acid 2,2%), ενώ περιγράφονται ελάχιστες αναφορές παρουσίας διτερπενίων (**10**).

Αναφορικά με την μελέτη του αιθέριου ελαίου *H. amorginum* (**HA**, **1**, **2**) σε δύο διαφορετικά έτη συλλογής βρέθηκε να περιέχει διαφορετικά κύρια συστατικά. Την περίοδο συλλογής Ιούνιος-Ιούλιος 1994

αποτελούνταν κυρίως από τη μονοτερπενική αλκοόλη geraniol (32,11%) και τους μονοτερπενικούς εστέρες geranyl acetate (20,76%) και neryl acetate (17,54%) ενώ την περίοδο συλλογής Ιούνιος-Ιούλιος 1998 από την σεσκιτερπενική αλκοόλη spathulenol (36.6%), και τον μονοτερπενικό υδρογονάνθρακα β-pinene (12.5%). Ο ίδιος κύριος μεταβολίτης geraniol στην περίπτωση (1) του *H. amorginum* βρέθηκε και στα αιθέρια έλαια του *H. taenari* (HT, 11) με κύρια συστατικά geraniol 50%, camphene 18.6% και α-pinene 8.9%, του *H. italicum* subsp. *italicum* (HII, 5) με κύρια συστατικά geraniol 35,59%, geranyl acetate 14,69%, E-nerolidol 11,86% και neryl acetate 7,25%.

Ανάλογη ομαδοποίηση ως προς τον κύριο μεταβολίτη E-caryophyllene (trans-β-caryophyllene) εμφανίζεται στα αιθέρια έλαια των ειδών *H. heldreichii* (HH, 4) με κύρια συστατικά E-caryophyllene 38,52%, caryophyllene oxide 10,35% και caryophyllenol I 5,8%, *H. stoechas* subsp. *barrelieri* (HSB, 8) με κύρια συστατικά β-caryophyllene 15,6% και β-elemene 13,1%, *H. stoechas* subsp. *barrelieri* var. *scandens* (HSBSc, 9) με κύρια συστατικά β-caryophyllene 33,6%, α-humulene 21,1% και E-iso eugenol acetate 7,8%, *H. stoechas* subsp. *barrelieri* var. *spathulatum* (HSBSp, 10) με κύρια συστατικά β-caryophyllene 27,9%, α-humulene 13,4%, α-pinene 12%, limonene 9% και caryophyllene oxide 6,5%.

Επιπρόσθετα, τα αιθέρια έλαια των ειδών *H. doerfleri* (HD, 3), *H. orientale* (HO, 7) και *H. italicum* subsp. *microphyllum* (HIM, 6) εμφανίζουν μια τελείως διαφορετική σύσταση ως προς τους κύριους μεταβολίτες με κύρια συστατικά α-eudesmol 7-11,72%, β-eudesmol 6,23-9,80% και carvacrol 8,39-42,50% για το (HD, 3), hexadecenoic acid 17,5%, nonacosane 11,07% και hentriacontane 5,54% για το (HO, 7), β-selinene 16,69-17,15%, γ-curcumene 6,59-13,72% και α-pinene tr-8,17% για το (HIM, 6).

Αξίζει να σημειωθεί ότι στην φυτοχημεία του γένους *Helichrysum*, και συγκεκριμένα των τερπενοειδών, έχει περιγράψει η παρουσία διτερπενίων τύπου πιμαρανίου, αβιετανίου, σταχενίου και καουρενίου, όπως περιγράφεται στην Υποενότητα 1.1.2 του Κεφαλαίου 1. Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα η προέλευση των διτερπενίων αφορά κυρίως στην απομόνωσή τους με οργανικούς διαλύτες, όπως έχει αναφερθεί στα Αφρικανικά είδη *H. refluxum*, *H. chionospaerum* DC., *H. formosissimum* Sch.Bip., *H. nudifolium* (L.) Less., *H. Aureum* (Hoult.) Merr., *H. cooperi* Harv., *H. fulvum* N.E.Br., *H. foetidum* Moench. και *H. tenax* M.D.Hend. var. *tenax* (Akaberi et al. 2019; Drewes et al. 2006). Επίσης, η ανίχνευση και ο χαρακτηρισμός διτερπενίων, όπως των totarene, beyerene, cembrene, neocembrene και bifloratriene έχει αναφερθεί σε αιθέρια έλαια ειδών ελίχρυσων, όπως στην περίπτωση του ιθαγενούς είδους *H. graveolens* (M.Bieb.) Sweet στην Α. Ευρώπη, Καύκασο, Τουρκία και Ιράν (Reidel et al. 2017) και του cembrene στην περίπτωση του *H. arenarium* subsp. *aucheri* (Ebru Hatice Tıǧlı Kaytanlioğlu et al. 2021).

Πίνακας 3.1: Κύριοι μεταβολίτες αιθέριων ελαίων από το υπέργειο μέρος αυτοφυών Ελληνικών ειδών *Helichrysum* (A: αυτοφυές, E: ενδημικό, I: ιθαγενές)

	Taxa	Προέλευση	Κύριοι Μεταβολίτες	Σχετική Αφθονία	Κατηγορία Μεταβολιτών	Αναφορά
1	<i>H. amorginum</i> Boiss. & Orph.	Αμοργός (A, E)	geraniol geranyl acetate neryl acetate E-nerolidol citronellyl acetate nerol γ-cadinene	32,11% 20,76% 17,54% 6,85% 6,60% 1,33% 1,18% Σύνολο 86,37% από 92,65%	Monoterpene oxygenated Monoterpene ester Monoterpene ester Sesquiterpene oxygenated Monoterpene ester Monoterpene oxygenated Sesquiterpene hydrocarbon	(Chinou et al. 1996)
2	<i>H. amorginum</i> Boiss. & Orph.	Αμοργός (A, E)	spathulenol β-pinene myrtenal terpine-4-ol α-pinene myrtenol 1,8-cineole trans-carveol trans-piperitol p-cymen-8-ol γ-eudesmol phellandral	36,6% 12,5% 5,5% 5,0% 4,3% 3,6% 3,5% 2,3% 1,2% 1,1% 1,1% 1,0% Σύνολο 76,7% από 85%	Sesquiterpene oxygenated Monoterpene hydrocarbon Monoterpene oxygenated Monoterpene oxygenated Monoterpene hydrocarbon Monoterpene oxygenated Monoterpene oxygenated Monoterpene oxygenated Monoterpene oxygenated Monoterpene oxygenated Sesquiterpene oxygenated Monoterpene oxygenated	(Chinou et al. 2004)

3	<i>H. doerfleri</i> Rech. f.	Κρήτη (A, E)	<i>α</i>-eudesmol 11,72 – 7,00% <i>β</i>-eudesmol 9,80 – 6,23% carvacrol 8,39 – 42,50% 10<i>epi</i>-<i>γ</i>-eudesmol 4,97 – 3,25% <i>γ</i>-eudesmol 4,87 – 2,70% <i>δ</i>-cadinene 3,70 – 0,86% Spathulenol 2,54% selina-3,7(11)diene 2,76 – 2,80% <i>γ</i>-cadinene 2,18 – 0,67% <i>α</i>-<i>epi</i>-cadinol 1,81 – 2,50% <i>γ</i>-muurolene 1,80 – 0,54% <i>β</i>-E-ionone 1,63% E-caryophyllene 1,57 – 3,44% decanal 1,12 – 1,10% Σύνολο (πριν) 58,86% από 89,82% Σύνολο (κατά) 73,59% από 87,61%	Sesquiterpene oxygenated Sesquiterpene oxygenated Monoterpene oxygenated Sesquiterpene oxygenated Sesquiterpene oxygenated Sesquiterpene hydrocarbon Sesquiterpene oxygenated Sesquiterpene hydrocarbon Sesquiterpene hydrocarbon Sesquiterpene oxygenated Sesquiterpene hydrocarbon Ketone Sesquiterpene hydrocarbon Monoterpene oxygenated	(Roussis et al. 2000)
4	<i>H. heldreichii</i> Boiss.	Κρήτη (A, E)	E-caryophyllene 38,52% caryophyllene oxide 10,35% caryophyllenol I (exo methylene isomer) 5,8% carvacrol 3,31% <i>α</i>-humulene 2,85% p-cymene 2,82% hexadecenoic acid 2,66% caryophyllenol II 2,08% E-9-<i>epi</i>-14-hydroxy-caryophyllene 1,96% nonacosane 1,65% <i>γ</i>-terpinene 1,91% tetradecanoic acid 1,54% <i>β</i>-himachalene oxide 1,48% hentriacontane 1,45% <i>β</i>-pinene 1,05% Σύνολο 79,43% από 92,68%	Sesquiterpene hydrocarbon Sesquiterpene oxygenated Sesquiterpene oxygenated Monoterpene oxygenated Sesquiterpene hydrocarbon Monoterpene hydrocarbon Fatty acid Sesquiterpene oxygenated Sesquiterpene oxygenated Linear hydrocarbon (C₂₉H₆₀) Monoterpene hydrocarbon Fatty acid Sesquiterpene oxygenated Linear hydrocarbon (C₃₁H₆₄) Monoterpene hydrocarbon	(Roussis et al. 2000)

5	<i>H. italicum</i> (Roth) G. Don subsp. <i>italicum</i>	Αμοργός (A, I)	geraniol geranyl acetate E-nerolidol neryl acetate citronellyl acetate γ -cadinene nerol	35,59% 14,69% 11,86% 7,25% 3,15% 1,94% 1,55% Σύνολο 76,03% από 90,57%	Monoterpene oxygenated Monoterpene ester sesquiterpene oxygenated Monoterpene ester Monoterpene ester Sesquiterpene hydrocarbon Monoterpene oxygenated	(Chinou et al. 1996)
6	<i>H. italicum</i> subsp. <i>microphyllum</i> (Willd.) Nyman	Κρήτη (A, E)	β -selinene γ -curcumene α -pinene dodecane italicene p-menth-1-en-4-ol γ -terpinene α -selinene α -cadinol 1,8-cineole E-caryophyllene α -copaene p-cymene α -terpinene benzaldehyde 3-methylhexanone β -pinene limonene α -terpineol E- β -farnesene caryophyllene oxide	<u>Πριν – Κατά την άνθιση</u> 17,15 – 16,69% 13,72 – 6,59% 8,17 – tr 6,43 – 6,71% 5,09 – 1,40% 5,17 – 4,30% 3,94 – 2,18% 3,83 – 5,39% 3,13 – 3,28% 3,73 – 4,00% 1,58 – 2,05% 1,11 – 0,22% 1,21 – 0,80% 1,10 – 0,52% 1,58 – 1,32% 1,93 – 1,82% 2,13 – 0,1% 1,93% 0,59 – 1,75% 0 – 1,78% 0 – 5,14% Σύνολο (πριν) 83,52% από 95,58% Σύνολο (κατά) 66,04% από 93,65%	Monoterpene hydrocarbon Monoterpene hydrocarbon Monoterpene hydrocarbon Linear hydrocarbon (C₁₂H₂₆) Sesquiterpene hydrocarbon Monoterpene oxygenated Monoterpene hydrocarbon Monoterpene hydrocarbon Sesquiterpene oxygenated Monoterpene oxygenated Sesquiterpene hydrocarbon Sesquiterpene hydrocarbon Monoterpene hydrocarbon Monoterpene hydrocarbon Aldehyde Ketone Monoterpene hydrocarbon Monoterpene hydrocarbon Monoterpene oxygenated Sesquiterpene hydrocarbon Sesquiterpene oxygenated	(Roussis et al. 2000)

7	<i>H. orientale</i> (L.) Vaill.	Κύθηρα (A, I)	hexadecenoic acid 17,5% nonacosane 11,07% hentriacontane 5,54% tetradecanoic acid 4,84% heptacosane 4,57% caryophyllene oxide 4,36% E-caryophyllene 4,19% carvacrol 2,98% spathulenol 2,64% α-cadinene 2,57% cadina-1,4-diene 2,44% 6,10,14-trimethyl-2-pentadecanone 2,06% aromadendrene 1,83% 9,12,15-octadecatrienoic acid ethyl ester 1,67% dehydro-aromadendrene 1,55% α-epi-Cadinol 1,54% β-selinene 1,29% pentacosane 1,25% desmethoxyencecalin 1,13% decanal 1,01% valerianol 1,00% Σύνολο 77,03% από 98,61%	Fatty acid Linear hydrocarbon (C₂₉H₆₀) Linear hydrocarbon (C₃₁H₆₄) Fatty acid Linear hydrocarbon (C₂₇H₅₆) Sesquiterpene oxygenated Sesquiterpene hydrocarbon Monoterpene oxygenated Sesquiterpene oxygenated Sesquiterpene hydrocarbon Sesquiterpene hydrocarbon Ketone Sesquiterpene hydrocarbon Fatty acid ester Sesquiterpene hydrocarbon Sesquiterpene oxygenated Sesquiterpene hydrocarbon Linear hydrocarbon (C ₂₅ H ₅₂) chromene Aldehyde Sesquiterpene oxygenated	(Roussis et al. 2000)
8	<i>H. stoechas</i> subsp. <i>barrelieri</i> (Ten) Nyman	Αττική (A, I)	β-caryophyllene 15,6% β-elemene 13,1% benzyl benzoate 5,7% 1H-cyclopropane-azulene-4-ol 5,1% allo-aromadendrene 4,7% torreol 3,6% α-humulene 3,4% δ-cadinol 2,9% δ-cadinene 2,9% decanoic acid 2,2% spathulenol 2,2% viridiflorol 1,6% globulol 1,5% naphthalene 1,5% α-gurjunene 1,4% aromadendrene 1,2% β-selinene 1,0% Σύνολο 69,6% από 73,08%	Sesquiterpene hydrocarbon Sesquiterpene hydrocarbon Phenolic acid ester Sesquiterpene oxygenated Sesquiterpene hydrocarbon Sesquiterpene oxygenated Sesquiterpene hydrocarbon Sesquiterpene oxygenated Sesquiterpene hydrocarbon Fatty acid Sesquiterpene oxygenated Sesquiterpene oxygenated Sesquiterpene oxygenated Polycyclic aromatic hydrocarbon Sesquiterpene hydrocarbon Sesquiterpene hydrocarbon Sesquiterpene hydrocarbon	(Chinou et al. 1997)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Μελέτη αιθέριων ελαίων από 9 *ex situ* γονότυπους *H. amorginum*

9	<i>H. stoechas</i> (L.) Moench subsp. <i>barrelieri</i> (Teno) Nyman var. <i>scandens</i> Guss.	Κρήτη (A, I)	β-caryophyllene α-humulene E-isoeugenol acetate β-selinene α-selinene α -copaene caryophyllene oxide cis- β -guaiene α -guaiene δ -cadinene	33,6% 21,1% 7,8% 4,9% 4,3% 1,8% 1,6% 1,5% 1,3% 1,0% Σύνολο 78,9% από 87%	Sesquiterpene hydrocarbon Sesquiterpene hydrocarbon Phenol ester Sesquiterpene hydrocarbon Sesquiterpene hydrocarbon Sesquiterpene hydrocarbon Sesquiterpene oxygenated Sesquiterpene hydrocarbon Sesquiterpene hydrocarbon Sesquiterpene hydrocarbon	(Roussis et al. 2002)
10	<i>H. stoechas</i> subsp. <i>barrelieri</i> var. <i>spathulatum</i> (Raulin)	Κρήτη (A, I)	β-caryophyllene α-humulene α-pinene limonene caryophyllene oxide kaurene Z-3-hexenol α -fenchene β -selinene β -pinene α -copaene α -selinene humulene epoxide II dihydro-eudesmol selin-11-en-4- α -ol	27,9% 13,4% 12,0% 9,0% 6,5% 3,0 2,1 1,7 1,6 1,4 1,3 1,3 1,3 1,2 1,0 Σύνολο 84,7% από 89,8%	Sesquiterpene hydrocarbon Sesquiterpene hydrocarbon Monoterpene hydrocarbon Monoterpene hydrocarbon Sesquiterpene oxygenated Diterpene hydrocarbon Olefinic alcohol Monoterpene hydrocarbon Sesquiterpene hydrocarbon Monoterpene hydrocarbon Sesquiterpene hydrocarbon Sesquiterpene hydrocarbon Sesquiterpene oxygenated Sesquiterpene oxygenated Sesquiterpene oxygenated	(Roussis et al. 2002)
11	<i>H. taenari</i> Rothm.	Πελοπόννησος (A, E)	geraniol camphene α-pinene tricyclene verbenone cis-verbenol 2,7,7-trimethylbicyclo [2.2.1]-hept-2-ene	50% 18,6% 8,9% 2,4% 1,5% 1,5% 1,5% Σύνολο 84,4% από 87,41%	Monoterpene oxygenated Monoterpene hydrocarbon Monoterpene hydrocarbon Monoterpene hydrocarbon Monoterpene oxygenated Monoterpene oxygenated Monoterpene hydrocarbon	(Chinou et al. 1997)

3.2 Υλικά και Μέθοδοι

3.2.1 Όργανα-Υλικά

Κανονικό εξάνιο ($n\text{-C}_6\text{H}_{14}$, $\geq 98\%$, GC-MS SupraSolv[®], Supelco), διαιθυλαιθέρας (Et_2O , $\geq 99,8\%$, Sigma Aldrich) προμηθεύθηκαν από την εταιρία Sigma Aldrich. Διχλωρομεθάνιο (CH_2Cl_2 , $\geq 99,95\%$, stabilized with ethanol) προμηθεύθηκε από την εταιρία Carlo Erba. Όλοι οι διαλύτες αποστάχθηκαν 1 φορά πριν την χρήση τους. Νερό δικτύου αποστάχθηκε 1 φορά πριν την χρήση του. Άνυδρο θειϊκό νάτριο (Na_2SO_4 , anhydrous for analysis EMSURE[®] ACS,ISO,Reag. Ph Eur., Supelco) προμηθεύθηκε από την εταιρία Sigma Aldrich. Ομόλογη σειρά κορεσμένων αλκανίων ($\text{C}_7\text{-C}_{30}$ saturated alkanes, certified reference material, 1000 $\mu\text{g/mL}$ each component in hexane) προμηθεύθηκε από την εταιρία Sigma Aldrich. Εμπορικό σκεύασμα βιολογικού αιθέριου ελαίου *H. italicum* subsp. *serotinum* (HIS) προμηθεύθηκε από την εταιρία Pranarom (lot: OF13154 (G), 0613 ITALIE).

3.2.2 Συλλογή και αρχική επεξεργασία της δρόγης

Οι εννέα γονότυποι *H. amorginum* (HA) παραλήφθηκαν σε πλήρη άνθιση ως ζωντανά φυτά σε φυτοδοχεία τον Μάιο 2020 προερχόμενοι από *ex situ* καλλιέργεια στο Ινστιτούτο Γενετικής Βελτίωσης και Φυτογενετικών Πόρων του ΕΛΓΟ «Δήμητρα» (Θεσ/νίκη). Αποτελούνταν από συνολικά 10 δείγματα, δηλαδή, εννέα γονότυποι με δύο επαναλήψεις (άτομα) του γονότυπου *gen9* (15,5893-Z6, 1^ο και 2^ο άτομο). Το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την απόσταξη αφορά στο νωπό, υπέργειο μέρος (ταξιανθίες και φυλλώδη στελέχη) κομμένα 2 cm πάνω από την επιφάνεια του υλικού ανάπτυξης των φυτών (Εικόνα Π3.1, Παράρτημα Κεφ. 3, σελ. 374). Αναλυτικές πληροφορίες παρουσιάζονται στον Πίνακα Π3.1 του Παραρτήματος Κεφ. 3, σελ. 374.

3.2.3 Επιλογή πρωτοκόλλου απόσταξης

Όλες οι υδροαποστάξεις των γονότυπων *H. amorginum* πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με την ίδια τυπική διαδικασία απόσταξης σε τροποποιημένη διάταξη απόσταξης τύπου Clevenger. Την προγραμματισμένη ημέρα απόσταξης, το υπέργειο μέρος του φρέσκου φυτικού υλικού αφαιρέθηκε από τα δοχεία φύτευσης, κόπηκε σε μικρά κομμάτια, αναμίχθηκε με 1 L απιονισμένο νερό σε 2 L σφαιρική φιάλη και αποστάχθηκε για 1 h (Angioni et al. 2003). Λόγω της μικροποσότητας, το αιθέριο έλαιο στο θάλαμο συλλογής της συσκευής, διαλύθηκε με 2 mL μίγματος *n*-hexane-diethyl ether (1:1 v/v) και συλλέχθηκε με πιπέτα Pasteur σε γυάλινο φιαλίδιο. Το διάλυμα ξηράθηκε με άνυδρο Na_2SO_4 . Όλα τα δείγματα των αποστάξεων διατηρήθηκαν στους -20°C μέχρι την ημέρα της χρωματογραφικής ανάλυσής τους. Μετά την ανάλυση όλα τα δείγματα συμπυκνώθηκαν ήπια, με ρεύμα N_2 , μέχρι σταθερού βάρους

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Μελέτη αιθέριων ελαίων από 9 *ex situ* γονότυπους *H. amorginum*

και ζυγίστηκαν για τον υπολογισμό της απόδοσης απόσταξης, εκφρασμένης σε mg αιθέριου ελαίου ανά 100 g νωπού φυτικού υλικού. Όλα τα αιθέρια έλαια προέκυψαν ως πυκνόρρευστα υγρά, χρώματος κίτρινο-πορτοκαλί με έντονη, χαρακτηριστική οσμή. Οι αποδόσεις των αποστάξεων φαίνονται στον πίνακα Π3.1 του Παραρτήματος του Κεφ. 3, σελ. 374.

3.2.4 Μέθοδος Ανάλυσης Αέρια Χρωματογραφία με Φασματομετρία Μάζας (GC-MS)

Η χημική σύσταση των αιθέριων ελαίων προσδιορίστηκε με αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με αναλυτή μάζας. Συνολικά 10 δείγματα αιθέριων ελαίων από τους εννέα γονότυπους διαχωρίστηκαν χρωματογραφικά σε σύστημα Finnigan Trace GC Ultra 2000 (Thermo Electron Corporation, USA), εξοπλισμένο με αυτόματο δειγματολήπτη AI 3000, χρωματογραφική τριχοειδή στήλη Trace TR-5MS (Thermo Scientific, USA, I.D. $\times$ L = 30 m $\times$ 0,25 mm, 0,25 μ m film thickness, πληρωτικό υλικό 5% Phenyl Polysilphenylene-siloxane) με ρυθμίσεις $\Theta_{\text{injector}} = 220^{\circ}\text{C}$, $\Theta_{\text{detector}} = 260^{\circ}\text{C}$, με αέριο έκλουσης He σε ρυθμό ροής 1,3 mL/min. Για όλες τις αναλύσεις των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε θερμοκρασιακό πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης αρχίζοντας από 40°C (2 min, ισόθερμα), αύξηση θερμοκρασίας με ρυθμό $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ έως 120°C , με ρυθμό $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ έως 180°C , με ρυθμό $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ έως 210°C , με ρυθμό $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ έως 280°C και διατήρηση ισόθερμα στους 280°C για 10 min. Ο ολικός χρόνος ανάλυσης ήταν 70 min. Στο σύστημα ήταν συζευγμένος αναλυτής μάζας Finnigan Trace DSQ mass selective detector, σε λειτουργία θετικού ιονισμού (electron ionization, positive mode) με ενέργεια ιονισμού 70 eV και ρύθμιση εύρους ανίχνευσης μάζας ιόντων (full scan mass range) m/z 40–600.

Όλα τα υπό ανάλυση δείγματα εγχύθηκαν σε όγκο 1 μL σε splitless mode. Για τον υπολογισμό του χρόνου ανάσχεσης (R_t , retention time) των συστατικών των αιθέριων ελαίων των γονότυπων τα δείγματα διαλυμένα σε n-hexane-Et₂O χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω αραιώση. Το εμπορικό δείγμα αιθέριου ελαίου *H. italicum* subsp. *serotinum* πριν την ανάλυση αραιώθηκε με διχλωρομεθάνιο σε συγκέντρωση 2,6 mg/mL. Για τον υπολογισμό των συντελεστών κατακράτησης (R_I , retention indices) των συστατικών των αιθέριων ελαίων αλλά και για τον υπολογισμό δεικτών Kovats, 100 μL διαλύματος 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ σε εξάνιο κορεσμένων υδρογονανθράκων ομόλογης σειράς C₇-C₃₀ διαλύθηκαν με 900 μL n-hexane σε τελικό όγκο 1 ml (n-alkanes stock solution). Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιήθηκε επίσης για τον εμβολιασμό (spiking) των διαλυμάτων των ελαίων σε αναλογία 900 μL διαλύματος αιθέριου ελαίου και 100 μL n-alkanes stock solution.

3.2.5 Επεξεργασία δεδομένων και στατιστική ανάλυση

Τα δεδομένα που προέκυψαν από τις αναλύσεις των 10 δειγμάτων γονότυπων HA και ενός δείγματος HIS με αέρια χρωματογραφία μάζας καταγράφηκαν ως αρχεία Xcalibur raw files (.raw,

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Μελέτη αιθέριων ελαίων από 9 *ex situ* γονότυπους *H. amorginum*

Thermo) και επεξεργάστηκαν με την βοήθεια του λογισμικού Xcalibur™ 2.0.7 Software (Thermo Scientific). Όλα τα χρωματογραφήματα παρελήφθησαν ως ολικά χρωματογραφήματα ιόντων (TIC), βάσει των οποίων επιλέχθηκαν οι χρόνοι ανάσχεσης των κορυφών και οι υπολογισμοί δεικτών κατακράτησης (Retention Indices) RI έγιναν με την βοήθεια του λογισμικού Microsoft® Excel® 1997-2003 Worksheet σε αρχεία (.xls). Οι αναλύσεις Hierarchical Cluster Analysis (HCA) και Principal Component Analysis (PCA) έγιναν με την βοήθεια του λογισμικού IBM® SPSS® Statistics version 26 σε αρχεία (.sav), (.spv).

3.2.6 Μεθοδολογία ταυτοποίησης μεταβολιτών

Η επιλογή των μεταβολιτών στα χρωματογραφήματα κάθε δείγματος αιθέριου ελαίου έγινε με βάση τέσσερις φορές την ένταση του θορύβου, καταλήγοντας συνολικά σε ένα εύρος έντασης επιλεγμένων σημάτων $3,60 \times 10^6$ έως $7,48 \times 10^6$. Οι συντελεστές κατακράτησης (RI) των συστατικών των αιθέριων ελαίων μετρήθηκαν σε υπολογιστικά φύλλα excel σύμφωνα με τους χρόνους ανάσχεσης της ομόλογης σειράς κορεσμένων αλκανίων (C_7 - C_{30}), όπως περιγράφεται στην δημοσίευση (Mary Lucero et al. 2009) και σύμφωνα με την εξίσωση της Εικόνας 3.1. Η ταυτοποίηση των μεταβολιτών έγινε με σύγκριση των φασματομετρικών τους δεδομένων με βιβλιογραφικές αναφορές RI και τις βάσεις δεδομένων Wiley 2007, NIST 2011, Adams (Robert P. Adams 2017, Wiley Science Solutions 2007, NIST Mass Spectrometry Data Center 2011).

$$RI = \frac{100 * n + [\log(RT_{unknown} - v) - \log(RT_{smaller alkane} - v)]}{\log(RT_{larger alkane} - v) - \log(RT_{smaller alkane} - v)}$$

Εικόνα 3.1: Εξίσωση υπολογισμού δεικτών κατακράτησης (RI). Όπου n = ο αριθμός του C στο μικρότερο αλκάνιο, v = κενός χρόνος στήλης, $RT_{unknown}$ = ο χρόνος ανάσχεσης του αγνώστου, $RT_{smaller alkane}$ = ο χρόνος ανάσχεσης του μικρότερου αλκανίου, $RT_{larger alkane}$ = ο χρόνος ανάσχεσης του μεγαλύτερου αλκανίου. Όλοι οι χρόνοι εκφράζονται σε δευτερόλεπτα (sec)

3.3 Συζήτηση αποτελεσμάτων

3.3.1 Ταυτοποίηση δευτερογενών μεταβολιτών αιθέριων ελαίων HA και HIS

Στην Εικόνα 3.2 παρουσιάζεται τυπικό χρωματογράφημα ολικών ιόντων (TIC) των συστατικών του αιθέριου ελαίου του γονότυπου *H. amorginum* HA 15,5887-391 με το πιο πλούσιο προφίλ συστατικών (63 κορυφές) από τους εννέα γονότυπους HA. Βάσει του χρωματογραφήματος της Εικόνας 3.2 και από την συγκριτική μελέτη των υπόλοιπων χρωματογραφημάτων των εννέα γονότυπων (10 δείγματα) επιλέχθηκαν συνολικά 69 κορυφές που αντιστοιχούν σε πτητικούς μεταβολίτες, οι οποίοι μετρήθηκαν ως προς την ποσοστιαία σχετική τους αφθονία (% peak area) και από τους οποίους ταυτοποιήθηκαν οι 62 σύμφωνα με την μεθοδολογία που περιγράφεται στην υποενότητα 3.2.6. Οι 69

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Μελέτη αιθέριων ελαίων από 9 *ex situ* γονότυπους *H. amorginum*

μεταβολίτες παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.2 και κατηγοριοποιούνται σε δύο αλειφατικές αλκοόλες (**1, 32**), τρεις αλειφατικούς εστέρες (**2, 51, 62**), ένα μονοϋδροξυ βενζοϊκό οξύ (**27**), μία αλειφατική λακτόνη (**53**), εννέα αλειφατικούς υδρογονάνθρακες (**59, 61, 63-69**), 27 σεσκιτερπένια (**3-26, 28-30**), 19 διτερπένια (**31, 33-46, 49, 52, 58, 60**), επτά μη ταυτοποιημένους μεταβολίτες (**47, 48, 50, 54-57**) από τους οποίους, σύμφωνα με το προφίλ θραυσματοποίησης και την βάση δεδομένων NIST, οι **47, 54, 55** συνηγορούν σε παράγωγα της γερανιόλης και ο **48** σε παράγωγο του οκτανοϊκού οξέως.

Στην Εικόνα 3.3 παρουσιάζεται τυπικό χρωματογράφημα ολικών ιόντων (TIC) των συστατικών του εμπορικού σκευάσματος αιθέριου ελαίου *H. italicum* subsp. *serotinum*. Από το χρωματογράφημα ταυτοποιήθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν 43 κορυφές που αντιστοιχούν στο 99,98% του συνολικού εμβαδού των κορυφών. Οι 43 μεταβολίτες παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.4 και κατηγοριοποιούνται σε τέσσερεις μονοτερπενικούς υδρογονάνθρακες (**1-4**), έξι μονοτερπενικούς εστέρες (**5, 9, 11-13, 21**), τρεις μονοτερπενικές αλκοόλες (**6-8**), μία μονοτερπενική κετόνη (**10**), 17 σεσκιτερπενικούς υδρογονάνθρακες (**14-19, 22-26, 28-32, 35**), επτά σεσκιτερπενικές αλκοόλες (**27, 33, 39-43**), ένα σεσκιτερπενικό αιθέρα (**34**), μία σεσκιτερπενική κετόνη (**36**), και ένα σεσκιτερπενικό εποξείδιο (**38**).

Από τις Εικόνες 3.2, 3.3 και τους Πίνακες 3.2, 3.4 αποδεικνύεται ότι τα αιθέρια έλαια των γονότυπων HA εμφανίζουν ένα διαφορετικό προφίλ μεταβολιτών με επικρατέστερα σεσκιτερπένια, διτερπένια και αλειφατικούς υδρογονάνθρακες ($R_t = 7-66\text{min}$) σε αντίθεση με το αιθέριο έλαιο του HIS που είναι πλούσιο σε μονοτερπένια και σεσκιτερπένια ($R_t = 9-33\text{min}$).

Πιο συγκεκριμένα, από τους Πίνακες 3.3, 3.4 των ποσοτικών δεδομένων (% peak area) για τους γονότυπους του HA παρατηρούνται τα ακόλουθα εύρη κατηγοριών: ολικά σεσκιτερπένια 1,5-12,5%, ολικά διτερπένια 40,2-70,3%, αλειφατικοί υδρογονάνθρακες 7,8-39,8%, ενώ στο HIS ολικά μονοτερπένια 45,53%, ολικά σεσκιτερπένια 52,27%. Δηλαδή, οι γονότυποι HA διακρίνονται από μεγάλο ποσοστό διτερπενίων, ενώ το αιθέριο έλαιο του HIS από μεγάλο ποσοστό σεσκιτερπενίων.

Επίσης, από τους Πίνακες 3.3, 3.4 οι γονότυποι HA περιέχουν εύρη ολικών οξυγονωμένων ουσιών 12,3-21,8% και ολικών μη οξυγονωμένων ουσιών 62,2-72,4%, ενώ το HIS ολικές οξυγονωμένες 41,56% και ολικές μη οξυγονωμένες ουσίες 56,24%. Δηλαδή, στα αιθέρια έλαια των HA επικρατούν περισσότερο μη οξυγονωμένες ουσίες, ενώ το αιθέριο έλαιο HIS περιέχει πιο ισορροπημένη αναλογία ολικών μη οξυγονωμένων προς ολικών οξυγονωμένων ίση με 1,35.

Αναφορικά με τις κατηγορίες χημικών ενώσεων που συνεισφέρουν στον αρωματικό χαρακτήρα των αιθέριων ελαίων στους γονότυπους HA παρατηρούνται με αύξουσα σειρά τα ολικά μη οξυγονωμένα σεσκιτερπένια και διτερπένια 29,4-60,0% > αλκοόλες 3,7-11,8% > εστέρες (και λακτόνες) 0,2-2,5% > κετόνες 0,2-0,5% > εποξείδια 0-0,5%, ενώ στο HIS με αύξουσα σειρά τα ολικά μη οξυγονωμένα

μονοτερπένια και σεσκιτερπένια 56,24% > εστέρες (και λακτόνες) 26,63% > αλκοόλες 11,24% > κετόνες 2,78% > αιθέρες 0,49% > εποξειδία 0,42%. Δηλαδή, στους γονότυπους HA επικρατούν ολικά μη οξυγονωμένα σεσκιτερπένια-διτερπένια και αλκοόλες, ενώ στο HIS ολικά μη οξυγονωμένα μονοτερπένια-σεσκιτερπένια, εστέρες, αλκοόλες και κετόνες.

Από τον Πίνακα 3.3 ως κύρια συστατικά των αιθέριων ελαίων των γονότυπων HA αναγνωρίστηκαν τα διτερπένια isopimara-9(11),15-diene (**34**) με εύρος 1,6-31,4%, dolabradiene (**41**) με εύρος 4,3-15,5%, (Z,Z)-geranyl linalool (**39**) με εύρος 6,2-12,9% και οι υδρογονάνθρακες pentacosane (**63**) με εύρος 1,9-12%, nonacosane (**67**) με εύρος 2,3-10%, heptacosane (**65**) με εύρος 1,7-10%. Σε αμέσως μικρότερη αφθονία αναγνωρίστηκαν τα διτερπένια cembrene (**38**) με εύρος 0,4-6,9%, geranyl p-cymene (**40**) με εύρος 2,4-5,4%, rimuene (**33**) με εύρος 0,9-4,7%, (E,E)-geranyl linalool (**46**) με εύρος 1,1-3,8%, (Z,E)-geranyl linalool (**44**) με εύρος 0,7-3,8%, laurene (**31**) με εύρος 1,1-3,5%, β -springene (**35**) με εύρος 0,5-3,0%, bifloratriene (**43**) με εύρος 0,7-2,3%, τα σεσκιτερπένια β -caryophyllene (**5**) με εύρος 0,7-2,2%, γ -cadinene (**13**) με εύρος 0,3-1,4% και οι υδρογονάνθρακες tricosane (**59**) με εύρος 0.-2,4%, untriacontane (**69**) με εύρος 0,8-3%. Σημειώνεται ότι, όπως αναφέρθηκε στην υποενότητα 3.1.1, τα διτερπένια cembrene, bifloratriene έχουν αναφερθεί στο αιθέριο έλαιο του *H. graveolens* και το cembrene στο αιθέριο έλαιο του *H. arenarium* subsp. *aucheri*, ενώ ένα διτερπένιο τύπου πιμαρανίου (3,15-erythroxyliadien-18-oic acid) έχει απομονωθεί από το είδος *H. refluxum* (Ferdinand Bohlmann et al. 1985).

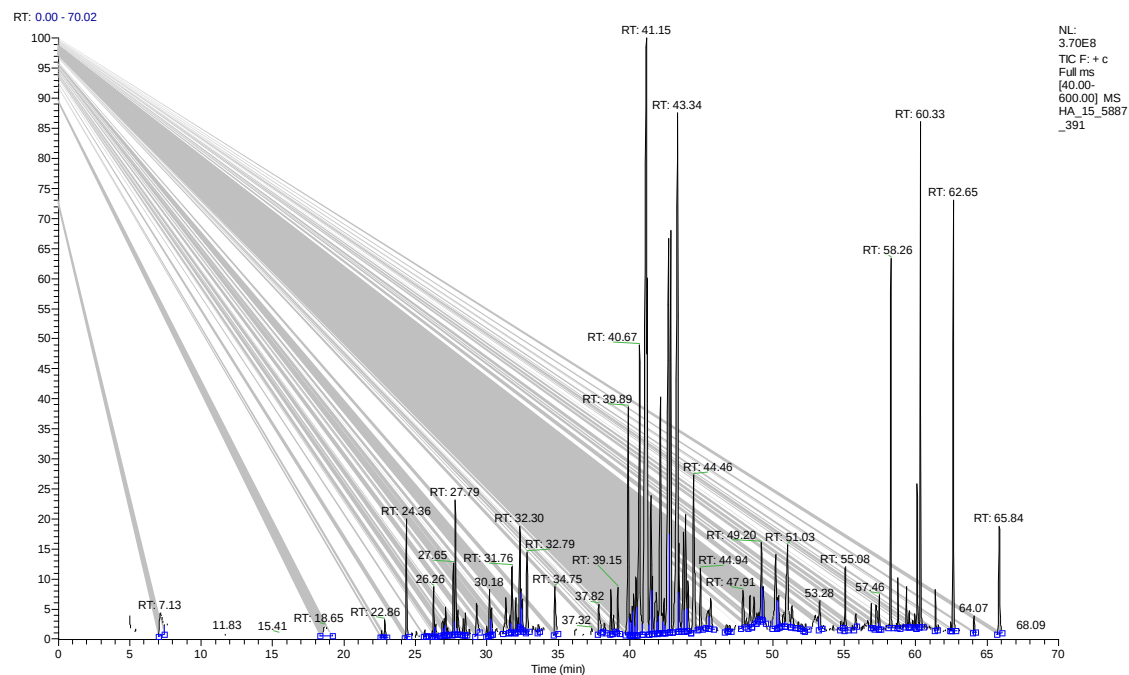
Η ποιοτική σύσταση των αιθέριων ελαίων των εννέα γονότυπων HA διαφέρει σημαντικά με τις δύο βιβλιογραφικές αναφορές σύστασης αιθέριων ελαίων καλλιεργούμενων HA, όπως αυτές περιγράφονται στον Πίνακα 3.1 στις καταχωρήσεις **1**, **2** στην Υποενότητα 3.1.1. Συγκεκριμένα, στην δημοσίευση (Chinou et al. 1996) ως κύρια συστατικά του HA αναφέρονται τα μονοτερπένια geraniol (32,11%), geranyl acetate (20,76%), neryl acetate (17,54%), citronellyl acetate (6,60%) και το σεσκιτερπένιο E-nerolidol (6,85%), ενώ στην δημοσίευση (Chinou et al. 2004) ως κύρια συστατικά του HA αναφέρονται το σεσκιτερπένιο spathulenol (36,6%) και τα μονοτερπένια β -pinene (12,5%), myrtenal (5,5%), terpinen-4-ol (5,0%). Από την βιβλιογραφική σύγκριση των αιθέριων ελαίων συμπεραίνεται ότι στην παρούσα μελέτη τα αιθέρια έλαια των εννέα καλλιεργημένων γονότυπων HA σχηματίζουν μια συστάδα δειγμάτων πλούσια σε διτερπένια και αλειφατικούς υδρογονάνθρακες και διαφοροποιούνται από τα δύο δείγματα προηγούμενων δημοσιεύσεων (Chinou et al. 1996, Chinou et al. 2004), που αναφέρονται επίσης από καλλιεργημένο HA (χωρίς να διευκρινίζεται τόπος και τρόπος καλλιέργειας), τα οποία εμφανίζουν μια ασύμφωνη μεταξύ τους σύσταση σε μονοτερπένια και σεσκιτερπένια.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Μελέτη αιθέριων ελαίων από 9 *ex situ* γονότυπους *H. amorginum*

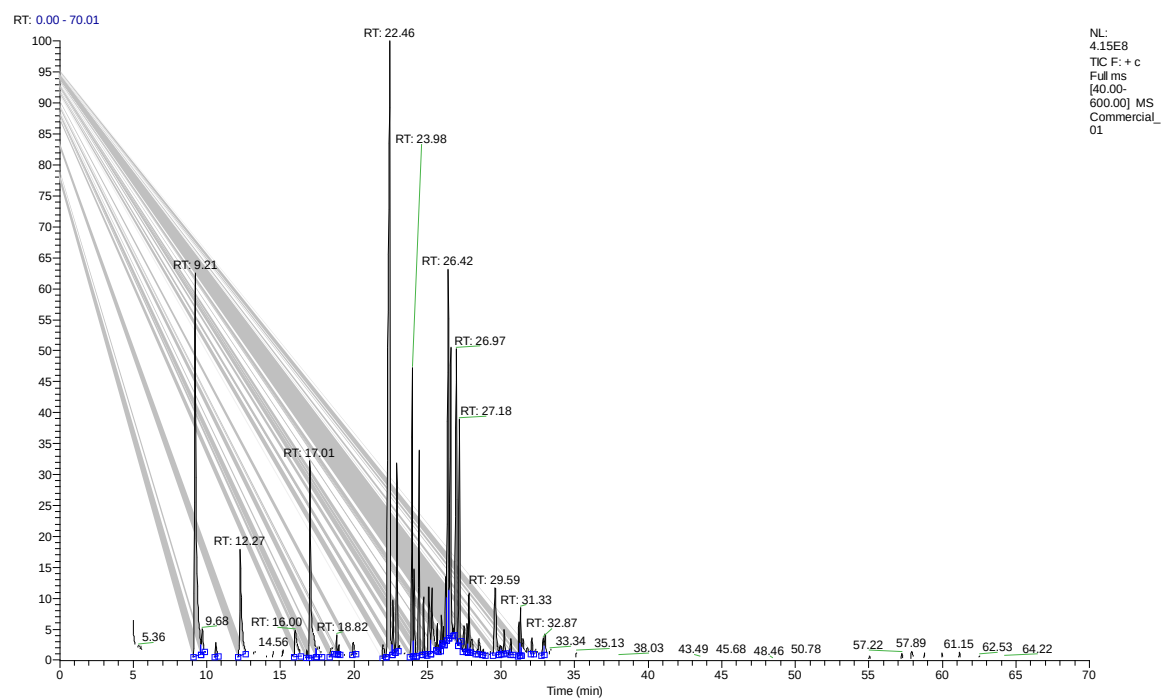
Ανάλογη διαφοροποίηση παρουσιάζει η σύσταση των αιθέριων ελαίων των εννέα γονότυπων HA ως προς το αιθέριο έλαιο του HIS (Πίνακας 3.4) που περιέχει ως κύρια συστατικά τα σεσκιτερπένια neryl acetate (**13**) 22,56%, α -cuprenene (**26**) 8,45%, trans-cycloisolongifol-5-ol (**27**) 7,19%, δ -cadinene (**28**) 6,02%, α -himachalene (**16**) 5,43% και το μονοτερπένιο α -pinene (**1**) 12,99%. Το εμπορικό αιθέριο έλαιο HIS παρουσιάζει ομοιότητες ως προς το κύριο συστατικό neryl acetate με τα έλαια από HII (neryl acetate 16,60%, γ -curcumene 15,98%) και HIM (neryl acetate 38,60%, linalool 17,28%, nerol 14,55%, limonene 10,73%) όπως περιγράφονται σε προηγούμενη δημοσίευση (Tucker et al. 1997) και με το έλαιο του HII άλλης δημοσίευσης (Chinou et al. 1996) που περιέχει neryl acetate 7,25% και ως κύριο συστατικό το γεωμετρικό ισομερές του geranyl acetate 14,69% και geraniol 35,59%. Εμφανίζεται όμως να διαφέρει από αντίστοιχο δείγμα HIS σύμφωνα με δημοσίευση σύστασης ελαίου HIS (Maria Tsoukatou et al. 1999), που βρέθηκε να περιέχει ως κύρια συστατικά τα guaialol 8,9%, nerol 7%, και β -caryophyllene 6%.

Από τις παραπάνω αναλύσεις των αιθέριων ελαίων θα μπορούσε να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι οι γονότυποι HA πιθανόν να αποτελούν μια διακριτή ομάδα χημειότυπου σε σχέση με τις δύο βιβλιογραφικές περιπτώσεις HA καθώς η διαφορετική σύσταση των δύο τελευταίων μπορεί να οφείλεται σε άλλους πιθανούς χημειότυπους ή σε άλλους παράγοντες που επηρεάζουν την χημική μεταβλητότητα των αιθέριων ελαίων. Το συμπέρασμα αυτό ενισχύεται και από μελέτη του αιθέριου ελαίου HIM (Angioni et al. 2003) σε δείγματα δύο χημειότυπων, του χημειότυπου A που είναι πλούσιος σε nerol και εστέρες (acetate, propionate) και του χημειότυπου B που είναι πλούσιος σε rosifolol.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Μελέτη αιθέριων ελαίων από 9 *ex situ* γονότυπους *H. amorginum*



Εικόνα 3.2: Χρωματογράφημα ολικών ιόντων (TIC) των συστατικών αιθέριου ελαίου του γονότυπου *Helichrysum amorginum* HA15,5887-391



Εικόνα 3.3: Χρωματογράφημα ολικών ιόντων (TIC) των συστατικών αιθέριου ελαίου του εμπορικού σκευάσματος *Helichrysum italicum subsp. serotinum*

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Μελέτη αιθέριων ελαίων από 9 *ex situ* γονότυπους *H. amorginum*

Πίνακας 3.2: Πτητικοί μεταβολίτες (n=69) που ανιχνεύθηκαν στα αιθέρια έλαια (10 δείγματα) εννέα καλλιεργούμενων γονότυπων *Helichrysum amorginum*

	Μεταβολίτης	RT (min)	RI (υπολ.)	RI(βιβλ.)	Μορ. τύπος	Μορ. Βάρος	Τύπος μεταβολίτη	Αναφορά
1	(3E)-hexenol	7,13	870	844	C ₆ H ₁₂ O	100	aliphatic unsaturated primary alcohol	(Robert P. Adams 2017)
2	(3Z)-hexenyl valerate	18,65	1250	1279	C ₁₁ H ₂₀ O ₂	184	aliphatic unsaturated ester	
3	α -ylangene	22,63	1376	1373	C ₁₅ H ₂₄	204	sesquiterpene	
4	α -copaene	22,86	1383	1374	C ₁₅ H ₂₄	204	sesquiterpene	
5	β -caryophyllene	24,36	1428	1417	C ₁₅ H ₂₄	204	sesquiterpene	
6	humulene (α -caryophyllene)	25,65	1465	1452	C ₁₅ H ₂₄	204	sesquiterpene	
7	γ -muurolene	26,26	1482	1478	C ₁₅ H ₂₄	204	sesquiterpene	
8	α -amorphene	26,42	1487	1483	C ₁₅ H ₂₄	204	sesquiterpene	
9	trans-muurola-4(14),5-diene	26,91	1500	1493	C ₁₅ H ₂₄	204	sesquiterpene	
10	epizonarene	27,02	1503	1501	C ₁₅ H ₂₄	204	sesquiterpene	
11	α -muurolene	27,12	1506	1500	C ₁₅ H ₂₄	204	sesquiterpene	
12	δ -cadinene	27,65	1522	1522	C ₁₅ H ₂₄	204	sesquiterpene	
13	γ -cadinene	27,79	1526	1526	C ₁₅ H ₂₄	204	sesquiterpene	(Tae Yung Chung et al.1993)
14	trans-cadina-1,4-diene	28,34	1542	1533	C ₁₅ H ₂₄	204	sesquiterpene	(Robert P. Adams 2017)
15	α -cadinene	28,49	1547	1537	C ₁₅ H ₂₄	204	sesquiterpene	
16	(E)-nerolidol	29,27	1568	1561	C ₁₅ H ₂₆ O	222	sesquiterpene	
17	caryophyllenyl alcohol	29,98	1588	1570	C ₁₅ H ₂₆ O	222	sesquiterpene	
18	caryophyllene oxide	30,18	1593	1582	C ₁₅ H ₂₄ O	220	sesquiterpene	
19	globulol	30,32	1597	1590	C ₁₅ H ₂₆ O	222	sesquiterpene	
20	1,10-di-epi-cubenol	31,31	1618	1628	C ₁₅ H ₂₆ O	222	sesquiterpene	
21	epiglobulol	31,59	1634	1633	C ₁₅ H ₂₆ O	222	sesquiterpene	(Luis Miguel Pombo Ospina et al. 2016)
22	1-epi-cubenol	31,76	1639	1627	C ₁₅ H ₂₆ O	222	sesquiterpene	(Robert P. Adams 2017)
23	cubenol	32,03	1647	1645	C ₁₅ H ₂₆ O	222	sesquiterpene	
24	tau-cadinol	32,3	1655	1648	C ₁₅ H ₂₆ O	222	sesquiterpene	(Viña and Murillo 2003)
25	α -Cadinol	32,79	1669	1652	C ₁₅ H ₂₆ O	222	sesquiterpene	

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Μελέτη αιθέριων ελαίων από 9 *ex situ* γονότυπους *H. amorginum*

26	iso-longifolol	34,75	1725	1728	C ₁₅ H ₂₆ O	222	sesquiterpene	(Robert P. Adams 2017)
27	2-ethylhexyl-salicylate	37,82	1769	1807	C ₁₅ H ₂₂ O ₃	250	monohydroxybenzoic acid ester	(Tameo Okumura 1991)
28	eudesm-7(11)-en-4-ol, acetate	38,67	1839	1839	C ₁₇ H ₂₈ O ₂	264	sesquiterpene	(Robert P. Adams 2017)
29	hexahydrofarnesyl acetone	38,87	1845	1845	C ₁₈ H ₃₆ O	268	sesquiterpene	(Babushok, Linstrom et al. 2011)
30	(Z)-lanceol acetate	39,15	1853	1854	C ₁₇ H ₂₆ O ₂	262	sesquiterpene	(Robert P. Adams 2017)
31	laurenene	39,89	1875	1879	C ₂₀ H ₃₂	272	diterpene	
32	1-hexadecanol	40,43	1890	1880	C ₁₆ H ₃₄ O	242	aliphatic alcohol	(Babushok, Linstrom et al. 2011)
33	rimuene	40,67	1897	1896	C ₂₀ H ₃₂	272	diterpene	(Robert P. Adams 2017)
34	isopimara-9(11),15-diene	41,15	1910	1906	C ₂₀ H ₃₂	272	diterpene	(Xu et al. 2015)
35	β-springene ((E,E)-7,11,15-Trimethyl-3-methylene-1,6,10,14-hexadecatetraene)	41,47	1919	1918	C ₂₀ H ₃₂	272	diterpene	(Heinrich et al. 2002)
36	totarene	41,57	1922	1922	C ₂₀ H ₃₂	272	diterpene	(Robert P. Adams 2017)
37	beyerene	41,78	1928	1931	C ₂₀ H ₃₂	272	diterpene	
38	cembrene	42,14	1938	1937	C ₂₀ H ₃₂	272	diterpene	
39	(Z,Z)-geranyl linalool	42,71	1954	1936	C ₂₀ H ₃₄ O	290	diterpene	(M. Sabih Ozer et al. 2010)
40	geranyl-p-cymene	42,86	1958	1950	C ₂₀ H ₃₀	270	diterpene	(Asta Judzentiene et al. 2009)
41	dolabradiene	43,34	1971	1973	C ₂₀ H ₃₂	272	diterpene	(Robert P. Adams 2017)
42	sclarene	43,43	1973	1974	C ₂₀ H ₃₂	272	diterpene	
43	bifloratriene	43,74	1981	1977	C ₂₀ H ₃₂	272	diterpene	
44	(Z,E)-geranyl linalool	43,89	1985	1998	C ₂₀ H ₃₄ O	290	diterpene	
45	dolabradiene <13-epi->	44,06	1990	2000	C ₂₀ H ₃₂	272	diterpene	
46	(E,E)-geranyl linalool	44,46	2001	2026	C ₂₀ H ₃₂	272	diterpene	
47	unknown geranyl derivative 1	44,94	2014	-	-	-	-	(Wiley Science Solutions 2007; NIST Mass Spectrometry Data Center 2011)
48	unknown octanoic acid derivative	45,66	2033	-	-	-	-	

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Μελέτη αιθέριων ελαίων από 9 *ex situ* γονότυπους *H. amorginum*

49	Abietatriene	46,71	2061	2055	C ₂₀ H ₃₀	270	diterpene	(Robert P. Adams 2017)
50	unknown	47,91	2092	-	-	-	-	-
51	ambrettolide (natural musk ambrette)	48,4	2105	2060	C ₁₆ H ₂₈ O ₂	252	aliphatic ester	(Ming-Quan Hang et al. 2012)
52	phytol	48,69	2112	2111	C ₂₀ H ₄₀ O	128	diterpene	(Tae Yung Chung et al.1993)
53	5-Dodecylidihydro-2(3H)-furanone (γ-hexadecalactone)	48,82	2116	2120	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	254	aliphatic lactone	(Leon N. Nixon et al. 1979)
54	unknown geranyl derivative 2	49,2	2126	-	-	-	-	(Wiley Science Solutions 2007; NIST Mass Spectrometry Data Center 2011)
55	unknown geranyl derivative 3	49,32	2129	-	-	-	-	
56	unknown	50,19	2152	-	-	-	-	-
57	unknown	51,03	2174	-	-	-	-	-
58	trans-geranylgeraniol	51,22	2178	2201	C ₂₀ H ₃₄ O	290	diterpene	(Houdkova et al. 2020)
59	tricosane	55,08	2299	2300	C ₂₃ H ₄₈	324	aliphatic saturated hydrocarbon	(Robert P. Adams 2017)
60	totarol	55,55	2324	2314	C ₂₀ H ₃₀ O	286	diterpene	
61	tetracosane	56,89	2399	2400	C ₂₄ H ₅₀	338	aliphatic saturated hydrocarbon	
62	1,3-Diaceto-2-myristin	57,2	2422	2416	C ₂₁ H ₃₈ O ₆	386	aliphatic ester	(Mitaka et al. 2020)
63	pentacosane	58,26	2500	2500	C ₂₅ H ₅₂	352	aliphatic saturated hydrocarbon	(Robert P. Adams 2017)
64	hexacosane	59,34	2597	2600	C ₂₆ H ₅₄	366	aliphatic saturated hydrocarbon	
65	heptacosane	60,33	2685	2700	C ₂₇ H ₅₆	380	aliphatic saturated hydrocarbon	
66	octacosane	61,38	2776	2800	C ₂₈ H ₅₈	394	aliphatic saturated hydrocarbon	
67	nonacosane	62,65	2885	2900	C ₂₉ H ₆₀	408	aliphatic saturated hydrocarbon	
68	triacontane	64,07	3003	3000	C ₃₀ H ₆₂	422	aliphatic saturated hydrocarbon	
69	untriacontane	65,84	3147	3100	C ₃₁ H ₆₄	436	aliphatic saturated hydrocarbon	

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Μελέτη αιθέριων ελαίων από 9 *ex situ* γονότυπους *H. amorginum*

Πίνακας 3.3: Χρωματογραφικά (Rt, RI) και ποσοτικά δεδομένα (% peak area) πτητικών μεταβολιτών που ανιχνεύθηκαν στα αιθέρια έλαια (10 δείγματα) εννέα *ex situ* καλλιεργούμενων γονότυπων *Helichrysum amorginum*

	Μεταβολίτης	RT (min)	RI (υπολ.)	RI (βιβλ.)	gen1 (63)	gen2 (K2-526)	gen3 (N1-542)	gen4 (Z4-532)	gen5 (391)	gen6 (D2-578)	gen7 (Z10-563)	gen8 (67)	gen9.1 (Z6-1st)	gen9.2 (Z6-2nd)	Μοριακός τύπος	Μοριακό βάρος
1	(3E)-hexenol	7,13	870	844	-	-	-	-	0,8	-	-	-	-	-	C ₆ H ₁₂ O	100
2	(3Z)-hexenyl valerate	18,65	1250	1279	-	-	-	-	0,6	-	-	-	-	-	C ₁₁ H ₂₀ O ₂	184
3	α -ylangene	22,63	1376	1373	-	0,1	-	-	0,1	-	-	-	-	-	C ₁₅ H ₂₄	204
4	α -copaene	22,86	1383	1374	0,2	0,2	-	-	0,2	-	-	-	-	-	C ₁₅ H ₂₄	204
5	β -caryophyllene	24,36	1428	1417	0,8	2,2	1,4	0,7	1,2	1,6	0,9	1,1	1,1	2,0	C ₁₅ H ₂₄	204
6	humulene (α -caryophyllene)	25,65	1465	1452	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	C ₁₅ H ₂₄	204
7	γ -muurolene	26,26	1482	1478	0,3	0,4	0,4	-	0,5	-	0,2	0,4	-	-	C ₁₅ H ₂₄	204
8	α -amorphene	26,42	1487	1483	-	0,1	-	-	0,2	-	-	-	-	-	C ₁₅ H ₂₄	204
9	trans-muurola-4(14),5-diene	26,91	1500	1493	-	0,2	0,2	-	0,2	-	-	-	-	-	C ₁₅ H ₂₄	204
10	epizonarene	27,02	1503	1501	0,1	0,1	0,2	-	0,2	-	-	0,2	-	-	C ₁₅ H ₂₄	204
11	α -muurolene	27,12	1506	1500	-	0,2	-	-	0,3	-	-	-	-	-	C ₁₅ H ₂₄	204
12	δ -cadinene	27,65	1522	1522	0,3	0,4	-	0,2	0,7	-	0,2	0,8	-	-	C ₁₅ H ₂₄	204
13	γ -cadinene	27,79	1526	1526	0,7	1,0	1,1	0,3	1,4	-	0,6	-	-	-	C ₁₅ H ₂₄	204
14	trans-cadina-1,4-diene	28,34	1542	1533	-	0,1	-	-	0,2	-	-	-	-	-	C ₁₅ H ₂₄	204
15	α -cadinene	28,49	1547	1537	-	0,1	0,2	-	0,2	-	-	-	-	-	C ₁₅ H ₂₄	204
16	(E)-nerolidol	29,27	1568	1561	-	-	-	-	0,5	-	-	0,2	-	-	C ₁₅ H ₂₆ O	222
17	caryophyllenyl alcohol	29,98	1588	1570	-	0,1	-	-	0,1	-	-	-	-	-	C ₁₅ H ₂₆ O	222
18	caryophyllene oxide	30,18	1593	1582	0,1	0,3	0,3	-	0,5	-	-	0,2	-	-	C ₁₅ H ₂₄ O	220
19	globulol	30,32	1597	1590	0,2	0,1	-	-	0,3	-	-	-	-	-	C ₁₅ H ₂₆ O	222
20	1,10-di-epi-cubenol	31,31	1618	1628	0,1	0,2	-	-	0,6	-	-	0,2	-	-	C ₁₅ H ₂₆ O	222

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Μελέτη αιθέριων ελαίων από 9 *ex situ* γονότυπους *H. amorginum*

21	epiglobulol	31,59	1634	1633	0,5	0,2	-	-	0,2	-	-	0,2	-	-	C ₁₅ H ₂₆ O	222
22	1-epi-cubenol	31,76	1639	1627	-	0,5	0,3	-	0,8	-	0,2	0,4	-	-	C ₁₅ H ₂₆ O	222
23	cubenol	32,03	1647	1645	0,2	0,3	0,2	-	0,3	-	-	0,2	-	-	C ₁₅ H ₂₆ O	222
24	tau-cadinol	32,3	1655	1648	0,7	1,0	0,6	0,2	1,0	-	0,4	0,7	-	-	C ₁₅ H ₂₆ O	222
25	α-Cadinol	32,79	1669	1652	0,8	0,7	0,6	0,4	1,0	-	0,5	0,7	-	-	C ₁₅ H ₂₆ O	222
26	iso-longifolol	34,75	1725	1728	0,5	0,4	0,2	0,8	0,7	-	0,3	0,3	-	-	C ₁₅ H ₂₆ O	222
27	2-ethylhexyl-salicylate	37,82	1769	1807	-	-	-	-	0,5	-	-	-	-	-	C ₁₅ H ₂₂ O ₃	250
28	eudesm-7(11)-en-4-ol, acetate	38,67	1839	1839	0,2	0,3	0,5	0,6	0,5	-	0,2	0,4	-	0,2	C ₁₇ H ₂₈ O ₂	264
29	hexahydrofarnesyl acetone	38,87	1845	1845	0,5	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4	0,2	0,2	0,2	0,3	C ₁₈ H ₃₆ O	268
30	(Z)-lanceol acetate	39,15	1853	1854	0,2	0,3	0,6	0,7	0,5	0,2	0,2	-	0,2	0,2	C ₁₇ H ₂₆ O ₂	262
31	laurenene	39,89	1875	1879	1,2	1,5	3,0	3,5	2,8	1,4	1,3	2,2	1,1	1,3	C ₂₀ H ₃₂	272
32	1-hexadecanol	40,43	1890	1880	-	-	-	-	0,8	-	-	-	-	-	C ₁₆ H ₃₄ O	242
33	rimuene	40,67	1897	1896	-	1,4	2,5	4,7	4,5	1,3	1,0	2,0	0,9	1,1	C ₂₀ H ₃₂	272
34	isopimara-9(11),15-diene	41,15	1910	1906	1,6	22,9	28,0	31,4	15,2	18,2	24,6	20,5	14,7	17,1	C ₂₀ H ₃₂	272
35	β-springene ((E,E)-7,11,15-Trimethyl-3-methylene-1,6,10,14-hexadecatetraene)	41,47	1919	1918	2,3	-	1,1	0,5	1,8	1,5	1,6	2,0	2,9	3,0	C ₂₀ H ₃₂	272
36	totarene	41,57	1922	1922	-	1,2	0,3	0,2	0,5	-	0,4	0,6	-	-	C ₂₀ H ₃₂	272
37	beyerene	41,78	1928	1931	0,5	0,3	0,8	0,6	0,8	0,5	0,5	0,7	0,3	0,5	C ₂₀ H ₃₂	272
38	cembrene	42,14	1938	1937	0,4	4,6	6,9	4,7	3,5	3,9	5,0	4,4	3,1	3,9	C ₂₀ H ₃₂	272
39	(Z,Z)-geranyl linalool	42,71	1954	1936	8,7	8,4	7,2	7,5	6,8	6,2	9,9	9,5	12,9	12,4	C ₂₀ H ₃₄ O	290
40	geranyl-p-cymene	42,86	1958	1950	5,4	2,8	2,5	2,4	4,7	3,1	3,4	4,7	5,3	4,8	C ₂₀ H ₃₀	270
41	dolabradiene	43,34	1971	1973	11,9	10,6	8,0	4,3	9,0	7,4	12,4	11,0	15,5	14,9	C ₂₀ H ₃₂	272
42	sclarene	43,43	1973	1974	1,6	0,9	1,3	1,1	0,8	0,9	1,5	0,9	-	0,7	C ₂₀ H ₃₂	272
43	bifloratriene	43,74	1981	1977	2,3	1,0	0,9	0,7	1,4	1,7	1,3	1,5	1,7	1,7	C ₂₀ H ₃₂	272
44	(Z,E)-geranyl linalool	43,89	1985	1998	3,8	1,6	1,1	0,7	1,6	1,3	1,7	2,0	2,4	2,3	C ₂₀ H ₃₄ O	290

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Μελέτη αιθέριων ελαίων από 9 *ex situ* γονότυπους *H. amorginum*

45	dolabradiene <13-epi->	44,06	1990	2000	-	0,8	1,2	1,5	0,6	0,7	0,9	0,8	0,6	0,7	C ₂₀ H ₃₂	272
46	(E,E)-geranyl linalool	44,46	2001	2026	-	2,8	2,0	1,1	2,6	2,8	3,2	3,0	3,8	3,7	C ₂₀ H ₃₂	272
47	unknown geranyl derivative 1	44,94	2014	-	1,0	0,7	0,6	0,8	0,8	0,7	1,0	0,9	1,1	1,0	-	-
48	unknown octanoic acid derivative	45,66	2033	-	-	0,1	0,3	0,3	0,6	-	0,2	0,7	0,4	-	-	-
49	Abietatriene	46,71	2061	2055	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	C ₂₀ H ₃₀	270
50	unknown	47,91	2092	-	-	0,3	0,3	1,2	0,6	0,4	0,3	0,3	0,4	-	-	-
51	ambrettolide (natural musk ambrette)	48,4	2105	2060	0,1	0,2	-	0,5	0,5	0,2	-	-	-	-	C ₁₆ H ₂₈ O ₂	252
52	phytol	48,69	2112	2111	0,7	0,4	-	-	0,4	1,3	0,7	-	1,3	1,2	C ₂₀ H ₄₀ O	128
53	5-Dodecyldihydro-2(3H)-furanone (γ-hexadecalactone)	48,82	2116	2120	-	-	-	-	-	-	0,4	-	-	-	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	254
54	unknown geranyl derivative 2	49,2	2126	-	0,5	-	4,1	4,3	1,0	4,5	3,3	2,3	1,9	2,1	-	-
55	unknown geranyl derivative 3	49,32	2129	-	-	3,2	-	-	0,5	-	-	-	-	-	-	-
56	Unknown	50,19	2152	-	0,7	1,6	2,0	2,3	1,5	1,4	2,6	2,0	3,7	2,6	-	-
57	Unknown	51,03	2174	-	2,0	1,9	1,3	1,3	1,7	2,2	2,3	2,1	3,4	2,5	-	-
58	trans-geranylgeraniol	51,22	2178	2201	-	-	0,5	0,5	-	-	0,4	-	-	-	C ₂₀ H ₃₄ O	290
59	Tricosane	55,08	2299	2300	2,4	0,8	0,5	0,7	0,7	0,7	0,5	0,5	0,6	0,5	C ₂₃ H ₄₈	324
60	Totarol	55,55	2324	2314	-	-	-	-	-	-	0,3	-	0,3	0,3	C ₂₀ H ₃₀ O	286
61	Tetracosane	56,89	2399	2400	1,0	0,4	0,2	0,2	0,1	0,4	-	-	0,2	-	C ₂₄ H ₅₀	338
62	1,3-Diaceto-2-myristin	57,2	2422	2416	-	-	-	-	-	-	-	0,4	-	-	C ₂₁ H ₃₈ O ₆	386
63	Pentacosane	58,26	2500	2500	12,0	3,2	1,9	2,7	2,7	6,2	2,2	2,0	3,0	2,8	C ₂₅ H ₅₂	352
64	Hexacosane	59,34	2597	2600	0,9	0,3	0,2	0,2	0,2	0,5	0,2	0,2	0,2	0,2	C ₂₆ H ₅₄	366
65	Heptacosane	60,33	2685	2700	10,0	2,5	1,7	2,5	3,1	6,2	2,4	2,2	3,7	4,0	C ₂₇ H ₅₆	380
66	Octacosane	61,38	2776	2800	0,7	0,2	0,2	0,2	0,3	0,6	0,2	0,2	0,3	0,3	C ₂₈ H ₅₈	394
67	Nonacosane	62,65	2885	2900	10,0	3,1	2,3	2,8	4,0	8,3	3,8	2,7	5,4	5,2	C ₂₉ H ₆₀	408
68	Triacontane	64,07	3003	3000	0,3	0,1	-	-	0,2	0,3	-	-	0,2	0,2	C ₃₀ H ₆₂	422

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Μελέτη αιθέριων ελαίων από 9 *ex situ* γονότυπους *H. amorginum*

69	Untriacontane	65,84	3147	3100	2,5	0,9	0,8	0,9	1,5	3,0	1,4	0,8	2,0	2,0	C ₃₁ H ₆₄	436

εντοπισμένες κορυφές	43	57	45	40	63	33	44	44	33	32
%peak area εντοπισμένων κορυφών	90,7	90,2	90,3	90,0	91,8	90,0	95,0	88,9	94,7	95,4
ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ	gen1 (63)	gen2 (K2-526)	gen3 (N1-542)	gen4 (Z4-532)	gen5 (391)	gen6 (D2-578)	gen7 (Z10-563)	gen8 (67)	gen9.1 (Z6-1st)	gen9.2 (Z6-2nd)
Σεσκιτερπένια (μη οξυγ. υδρογονάνθρακες)	2,4	5,2	3,4	1,2	5,2	1,6	1,9	2,5	1,1	2,0
Σεσκιτερπένια (οξυγονωμένα)	4,0	4,4	3,4	2,9	7,3	0,6	2,0	3,6	0,4	0,7
Διτερπένια (μη οξυγ. υδρογονάνθρακες)	27,0	47,8	56,6	55,3	45,5	40,6	54,0	51,1	45,9	49,7
Διτερπένια (οξυγονωμένα)	13,2	13,3	10,6	9,9	11,4	11,5	16,3	14,4	20,7	19,8
Αλειφατικοί κορ. υδρογονάνθρακες	39,8	11,5	7,8	10,1	12,7	26,3	10,6	8,6	15,6	15,1
Άλλα	0,1	0,2	0	0,5	3,1	0,2	0,4	0,4	0	0
Μη ταυτοποιημένα	4,2	7,8	8,5	10,1	6,6	9,2	9,8	8,3	11,0	8,1
Σύνολο	90,7	90,2	90,3	90,0	91,8	90,0	95,0	88,9	94,7	95,4
Ολικά σεσκιτερπένια	6,4	9,6	6,8	4,1	12,5	2,2	3,9	6,1	1,5	2,7
Ολικά διτερπένια	40,2	61,1	67,2	65,2	56,9	52,1	70,3	65,5	66,6	69,5
Ολικά οξυγονωμένα	17,3	17,9	14,1	13,2	21,8	12,3	18,6	18,4	21,1	20,5
Ολικά μη οξυγονωμένα	69,2	64,5	67,7	66,8	63,5	72,4	66,6	62,2	62,6	66,8
Μη οξυγ. υδρογονάνθρακες (σεσκ. & διτερπ.)	29,4	53,0	60,0	56,5	50,7	42,2	55,9	53,6	47,0	51,7
Αλκοόλες	7,5	8,3	5,4	3,7	11,8	5,3	7,7	7,7	7,8	7,5
Εστέρες (και λακτόνες)	0,5	0,8	1,1	1,8	2,5	0,4	0,8	0,8	0,2	0,4
Κετόνες	0,5	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4	0,2	0,2	0,2	0,3
Εποξειδία	0,1	0,3	0,3	0	0,5	0	0	0,2	0	0

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Μελέτη αιθέριων ελαίων από 9 *ex situ* γονότυπους *H. amorginum*

Πίνακας 3.4: Χρωματογραφικά (Rt, RI) και ποσοτικά δεδομένα (% peak area) 43 πτητικών μεταβολιτών που ανιχνεύθηκαν στο αιθέριο έλαιο του εμπορικού σκευάσματος *Helichrysum italicum* subsp. *serotinum* (MH: monoterpene hydrocarbon, MEs: monoterpene ester, MA: monoterpene alcohol, MK: monoterpene ketone, SH: sesquiterpene hydrocarbon, SA: sesquiterpene alcohol, SEt: sesquiterpene ether, SK: sesquiterpene ketone, SEp: sesquiterpene epoxide)

	Μεταβολίτης	RT(min)	RI(υπολ.)	RI(βιβλ.)	%Area	Μορ. τύπος	Μορ. βάρος	Τύπος μεταβολίτη	Αναφορά
1	α -pinene	9,21	941	932	12,99	C ₁₀ H ₁₆	136	MH	(Robert P. Adams 2017, Wiley Science Solutions 2007, NIST Mass Spectrometry Data Center 2011)
2	α -fenchene	9,68	956	945	0,76	C ₁₀ H ₁₆	136	MH	
3	β -pinene	10,62	984	974	0,28	C ₁₀ H ₁₆	136	MH	
4	limonene	12,27	1038	1024	3,62	C ₁₀ H ₁₆	136	MH	
5	isoamyl angelate	16	1160	1143	1,23	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	170	MEs	
6	borneol	16,78	1185	1165	0,14	C ₁₀ H ₁₈ O	154	MA	
7	exo-2,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-ol	17,6	1213	1203	0,63	C ₁₀ H ₁₈ O	154	MA	(Jose A. Sotomayor et al. 2004)
8	nerol (Z-geraniol)	18,46	1243	1227	0,34	C ₁₀ H ₁₈ O	154	MA	(Robert P. Adams 2017, Wiley Science Solutions 2007, NIST Mass Spectrometry Data Center 2011)
9	β -fenchyl acetate	18,82	1255	1229	0,26	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	196	MEs	
10	(E)-3-decen-2-one	18,97	1260	1234	0,14	C ₁₀ H ₁₈ O	154	MK	
11	3-methylamyl angelate	19,94	1292	1249	0,33	C ₁₁ H ₂₀ O ₂	184	MEs	
12	δ -terpinyl acetate	21,96	1356	1316	0,38	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	196	MEs	
13	neryl acetate	22,46	1371	1359	22,56	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	196	MEs	
14	α -ylangene	22,67	1378	1373	0,96	C ₁₅ H ₂₄	204	SH	
15	α -copaene	22,91	1385	1374	3,78	C ₁₅ H ₂₄	204	SH	
16	α -himachalene	23,98	1416	1449	5,43	C ₁₅ H ₂₄	204	SH	
17	amorpha-4,11-diene	24,09	1420	1449	1,72	C ₁₅ H ₂₄	204	SH	
18	9-epi-(E)-caryophyllene	24,44	1430	1464	3,39	C ₁₅ H ₂₄	204	SH	
19	β -acoradiene	24,74	1439	1469	0,94	C ₁₅ H ₂₄	204	SH	
20	unknown	25,08	1449	-	1,99	-	-	-	-
21	neryl isobutanoate	25,29	1455	1490	1,87	C ₁₄ H ₂₄ O ₂	224	MEs	(Robert P. Adams 2017, Wiley Science)
22	viridiflorene	25,65	1465	1496	0,42	C ₁₅ H ₂₄	204	SH	
23	α -selinene	25,94	1473	1498	0,4	C ₁₅ H ₂₄	204	SH	

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Μελέτη αιθέριων ελαίων από 9 *ex situ* γονότυπους *H. amorginum*

24	α -muurolene	26,07	1477	1500	0,24	C ₁₅ H ₂₄	204	SH	Solutions 2007, NIST Mass Spectrometry Data Center 2011)
25	trans- β -guaiene	26,24	1482	1502	1,03	C ₁₅ H ₂₄	204	SH	
26	α -cuprenene	26,42	1487	1505	8,45	C ₁₅ H ₂₄	204	SH	
27	trans-cycloisolongifol-5-ol	26,59	1491	1513	7,19	C ₁₅ H ₂₄ O	220	SA	
28	δ -cadinene	26,97	1502	1522	6,02	C ₁₅ H ₂₄	204	SH	
29	zonarene	27,18	1508	1528	3,62	C ₁₅ H ₂₄	204	SH	
30	trans-cadina-1,4-diene	27,48	1517	1533	0,6	C ₁₅ H ₂₄	204	SH	
31	α -cadinene	27,69	1523	1537	0,42	C ₁₅ H ₂₄	204	SH	
32	selina-3,7(11)-diene	27,82	1527	1545	1,05	C ₁₅ H ₂₄	204	SH	
33	elemol	28	1532	1548	0,52	C ₁₅ H ₂₆ O	222	SA	
34	cis-cadinene ether	28,49	1547	1552	0,49	C ₁₅ H ₂₄ O	220	Set	
35	β -calacorene	28,78	1555	1564	0,12	C ₁₅ H ₂₀	200	SH	
36	3,5,7,10-Tetramethylundec-9-ene-4,6-dione	29,59	1577	1570	2,64	C ₁₅ H ₂₆ O ₂	238	SK	(I. Morone-Fortunato et al. 2010)
37	unknown	29,92	1586	-	0,19	-	-	-	-
38	caryophyllene oxide	30,22	1594	1582	0,42	C ₁₅ H ₂₄ O	220	SEp	(Robert P. Adams 2017, Wiley Science Solutions 2007, NIST Mass Spectrometry Data Center 2011)
39	guaiol	30,66	1607	1600	0,33	C ₁₅ H ₂₆ O	222	SA	
40	1,10-di-epi-cubenol	31,21	1623	1618	0,58	C ₁₅ H ₂₆ O	222	SA	
41	2-(4a,8-dimethyl-2,3,4,4a,5,6,7,8-octahydro-2-napthalenyl)-2-propanol	31,33	1627	1627	0,82	C ₁₅ H ₂₄ O	220	SA	
42	cubenol	32,09	1649	1645	0,3	C ₁₅ H ₂₆ O	222	SA	
43	α -eudesmol	32,87	1671	1652	0,39	C ₁₅ H ₂₆ O	222	SA	

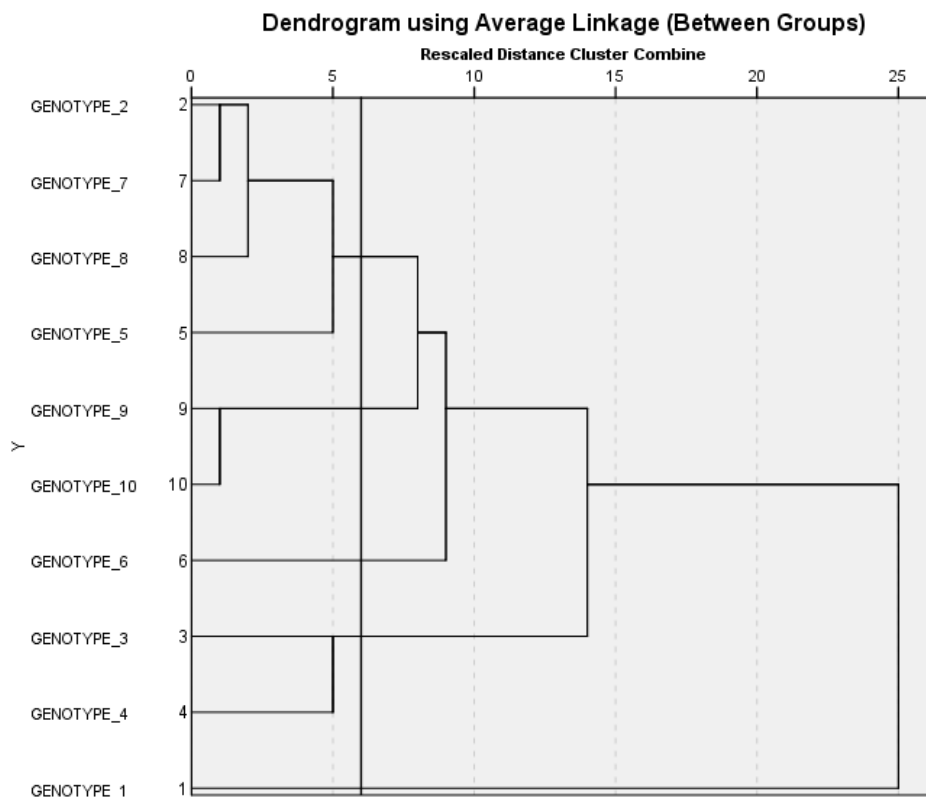
Εντοπισμένες κορυφές	43
%peak area εντοπισμένων κορυφών	99,98
ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ	
Μονοτερπένια (μη οξυγ. υδρογονάνθρακες)	17,65
Μονοτερπένια (οξυγονομένα)	27,88
Σεσκιτερπένια (μη οξυγ.υδρογονάνθρακες)	38,59

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Μελέτη αιθέριων ελαίων από 9 *ex situ* γονότυπους *H. amorginum*

Σεσκιτερπένια (οξυγονωμένα)	13,68
Μη ταυτοποιημένα	2,18
Σύνολο	99,98
Ολικά Μονοτερπένια	45,53
Ολικά Σεσκιτερπένια	52,27
Ολικά οξυγονωμένα	41,56
Ολικά μη οξυγονωμένα	56,24
Μη οξυγ.υδρογονάνθρακες (μονοτερπ. και σεσκιτερπ.)	56,24
Αλκοόλες	11,24
Εστέρες (και λακτόνες)	26,63
Κετόνες	2,78
Εποξειδία	0,42
Αιθέρες	0,49

3.3.2 Ιεραρχική Ανάλυση Συστάδων (HCA) και Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA)

Για τον εντοπισμό διαφορών/ομοιοτήτων ανάμεσα στα αιθέρια έλαια (between-groups) των 10 δειγμάτων των εννέα γονότυπων εφαρμόστηκε η μη εποπτευόμενη τεχνική ιεραρχικής ταξινόμησης (HCA), βάσει των ποσοστών (%) των 69 κορυφών (variables), με συσσωρευτικό (agglomerative) αλγόριθμο και επανακλιμάκωση των τιμών σε μέσο όρο ίσο με 1. Με αυτόν τον τρόπο, όλα τα συστατικά των αιθέριων ελαίων ήταν ισοζυγισμένα και μετρήθηκαν οι Ευκλείδειες αποστάσεις ανάμεσα στα ζεύγη των γονότυπων (Hans Wohlmuth et al. 2006). Στην Εικόνα 3.4 απεικονίζεται σε δενδροδιάγραμμα η ομαδοποίηση των 10 δειγμάτων (GENOTYPE #1-10) των εννέα γονότυπων HA (*gen1-gen9*), όπου φαίνεται ο σχηματισμός πέντε υποσυνόλων για επιλεγμένη επανακλιμακούμενη απόσταση ίση με 6. Η κάθετη γραμμή στην Εικόνα 3.4 διακρίνει τα υποσύνολα (*gen2, gen7, gen8, gen5*), (*gen9, gen10*), *gen6*, (*gen3, gen4*), *gen1*, όπου GENOTYPE #9 = *gen9.1* (άτομο 1 γονότυπου 15,5893-Z6) και GENOTYPE #10 = *gen9.2* (άτομο 2 γονότυπου 15,5893-Z6). Με την συγκεκριμένη ταξινόμηση, η γενετική ομοιότητα των ατόμων 1 και 2, που αποτελούν κλώνους του γονότυπου 15,5893-Z6 (*gen9*) επιβεβαιώνεται μέσα από την παρόμοια χημική σύσταση των αιθέριων ελαίων τους, όπως αποδεικνύεται από το υποσύνολο GENOTYPE 9, 10. Στο δενδροδιάγραμμα διαχωρίζεται εμφανώς ο γονότυπος 1 (*gen1*) από τους εννέα γονότυπους, ο οποίος χαρακτηρίζεται από το υψηλότερο ποσοστό σε αλειφατικούς κορεσμένους υδρογονάνθρακες (39,8%) και με το χαμηλότερο ποσοστό σε ολικά διτερπένια (40,2%). Παρόμοιο διαχωρισμός ισχύει για το γονότυπο 6 (*gen6*) που σχηματίζει ένα ξεχωριστό υποσύνολο και χαρακτηρίζεται από την αμέσως μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε αλειφατικούς κορεσμένους υδρογονάνθρακες (26,3%) μετά το *gen1*. Επίσης, οι γονότυποι *gen3, gen4* σχηματίζουν ένα ξεχωριστό υποσύνολο με ομοιότητες στην σύστασή των οξυγονωμένων σεσκιτερπενίων (34% και 2,9%, αντίστοιχα), μη οξυγονωμένων διτερπενικών υδρογονανθράκων (56,6% και 55,3%, αντίστοιχα), οξυγονωμένων διτερπενίων (10,6% και 9,9%, αντίστοιχα). Τέλος, ένα πιο ετερογενές υποσύνολο σχηματίζουν οι γονότυποι *gen2, gen5, gen7, gen8*.



Εικόνα 3.4: Δενδροδιάγραμμα 10 δειγμάτων (GENOTYPE #1-10) εννέα γονότυπων *ex situ* καλλιεργούμενου *Helichrysum amorginum* (HA). Όπου genotype #9: *gen9.1*, genotype #10: *gen9.2*. Παρουσιάζονται 5 ομάδες (clusters) για $X=6$

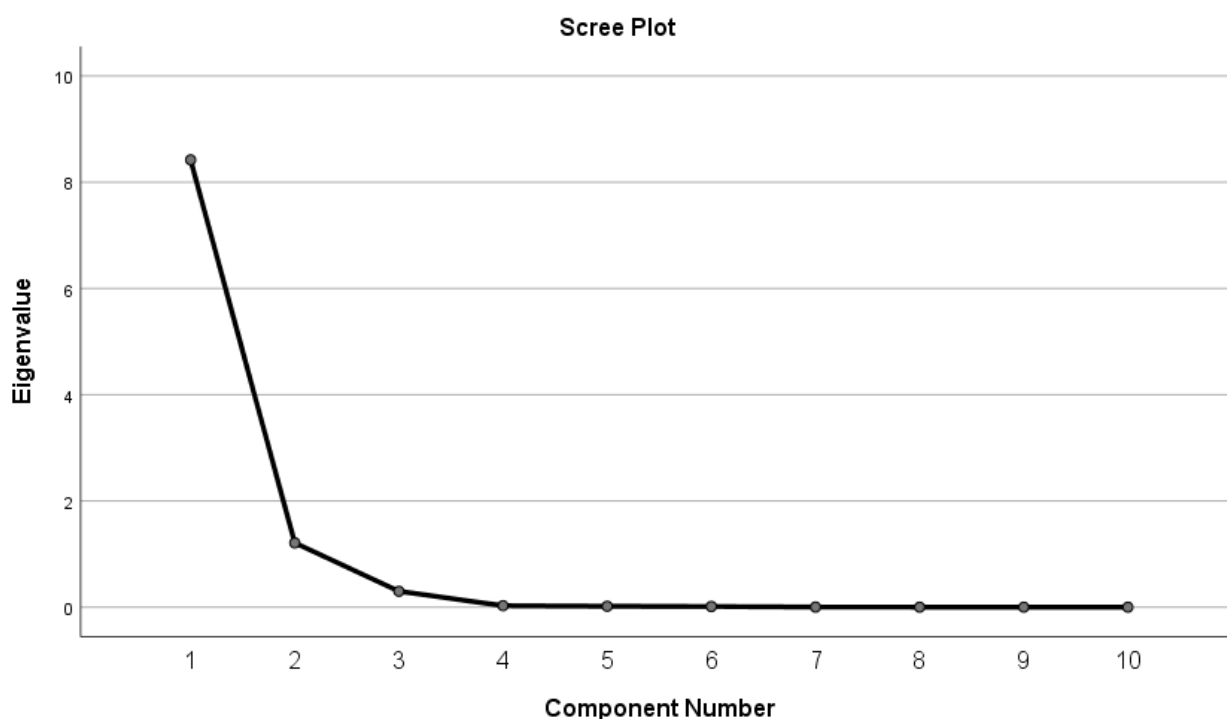
Τα δεδομένα του Πίνακα 3.3 υπεβλήθησαν σε ανάλυση κυρίων συνιστωσών ως προς τη σύσταση (%) των 10 αιθέριων ελαίων των εννέα γονότυπων με ικανοποιητική τιμή Kaiser–Meyer–Olkin (KMO) test = 0,802 $\geq$ 0,50 αναφορικά με την επάρκεια των δεδομένων για την παραγοντική ανάλυση και με τιμή Bartlett’s test $p = 0,000 < 0,05$ που ικανοποιεί την συνθήκη σφαιρικότητας (Πίνακας 3.6).

Από το διάγραμμα scree plot (Εικόνα 3.5) και τον Πίνακα 3.5 εντοπίστηκαν δύο κύριες συνιστώσες (components 1, 2) με ιδιοτιμή (eigenvalue) > 1 , που εξηγούν αθροιστικά με ικανοποιητικό ποσοστό το 96,318% της μεταβλητότητας του μοντέλου. Στη συνέχεια, τα αποτελέσματα ομαδοποίησης των 10 δειγμάτων απεικονίστηκαν σε διαγράμματα των δύο κύριων συνιστωσών (Εικόνες 3.6, 3.7) πριν και μετά την περιστροφή των αξόνων με την μέθοδο Varimax, αντίστοιχα.

Από τις Εικόνες 3.6, 3.7 παρατηρείται ισχυρή συσχέτιση του δείγματος Genotype_1 (*gen1*) ως προς την 2^η κύρια συνιστώσα και ισχυρή συσχέτιση των δειγμάτων Genotype_2-10 με την 1^η κύρια συνιστώσα τα οποία σχηματίζουν μια κλειστή συστάδα. Επίσης, από τις Εικόνες 3.6 και 3.7 παρατηρείται η τάση ομαδοποίησης των δειγμάτων στα υποσύνολα (*gen1*), (*gen2*, *gen5*, *gen7*, *gen8*), (*gen3*, *gen4*), (*gen6*) και (*gen9*, *gen10*). Από τον συγκριτικό Πίνακα 3.7. του PCA γονότυπων επιβεβαιώνεται η μορφή

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Μελέτη αιθέριων ελαίων από 9 *ex situ* γονότυπους *H. amorginum*

ομαδοποίησης του HCA μέσα από την αυξομείωση των τιμών συσχέτισης με τις κύριες συνιστώσες 1 και 2, ειδικά μετά την μέθοδο Varimax περιστροφής των αξόνων. Πιο συγκεκριμένα, στα δείγματα Genotype 1 (*gen1*), Genotype 6 (*gen6*), Genotype 9 (*gen9.1*), Genotype 10 (*gen9.2*) παρατηρείται αύξηση συσχέτισης με την 2^η συνιστώσα, τα οποία και περιέχουν το μεγαλύτερο ποσοστό σε αλειφατικούς κορεσμένους υδρογονάνθρακες. Το υποσύνολο (*gen3*, *gen4*) πριν και μετά την περιστροφή των αξόνων διατηρεί την ισχυρή συσχέτιση με τη 1^η συνιστώσα, ενώ το υποσύνολο των (*gen2*, *gen5*, *gen7*, *gen8*) διατηρεί μετά την περιστροφή ισχυρή σύνδεση με την 1^η συνιστώσα και ίδιας τάξης μεγέθους αύξηση ως προς την 2^η συνιστώσα.



Εικόνα 3.5: Διάγραμμα *scree plot* ιδιοτιμών και κύριων συνιστωσών της PCA ανάλυσης των 10 δειγμάτων *ex situ* καλλιεργούμενου *Helichrysum amorginum* (HA)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Μελέτη αιθέριων ελαίων από 9 *ex situ* γονότυπους *H. amorginum*

Πίνακας 3.5: Επεξηγηματικός πίνακας διακύμανσης βάσει των ιδιοτιμών και κύριων συνιστωσών της PCA ανάλυσης των 10 δειγμάτων *ex situ* καλλιεργούμενου *Helichrysum amorginum* (HA)

Total Variance Explained							Rotation Sums of Squared Loadings ^a Total
	Initial Eigenvalues			Extraction Sums of Squared Loadings			
Component	Total	% of Variance	Cumulative %	Total	% of Variance	Cumulative %	
1	8.420	84.204	84.204	8.420	84.204	84.204	8.375
2	1.211	12.114	96.318	1.211	12.114	96.318	1.888
3	.300	3.001	99.319				
4	.029	.287	99.606				
5	.018	.183	99.789				
6	.014	.138	99.926				
7	.003	.031	99.958				
8	.002	.023	99.981				
9	.001	.012	99.992				
10	.001	.008	100.000				

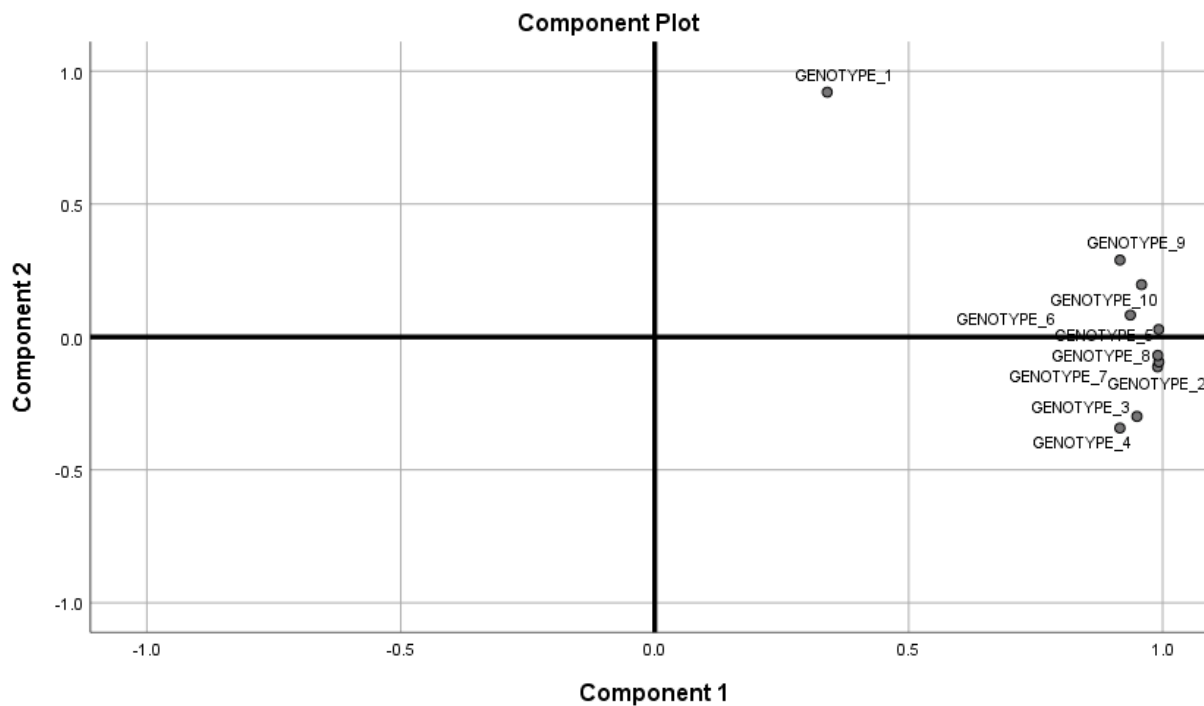
Extraction Method: Principal Component Analysis.

a. When components are correlated, sums of squared loadings cannot be added to obtain a total variance.

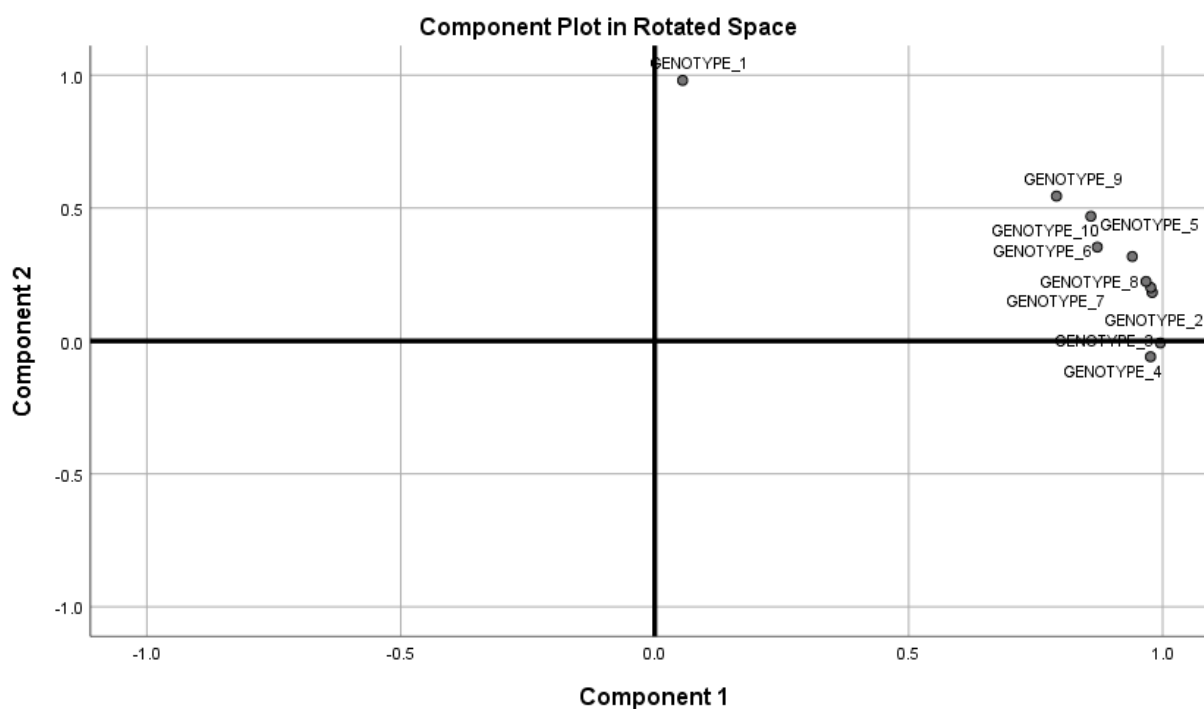
Πίνακας 3.6: Επεξηγηματικός πίνακας της ικανοποίησης των προϋποθέσεων της PCA ανάλυσης των 10 δειγμάτων *ex situ* καλλιεργούμενου *Helichrysum amorginum* (HA)

KMO and Bartlett's Test	
Kaiser-Meyer-Olkin Measure of Sampling Adequacy.	.802
Bartlett's Test of Sphericity	Approx. Chi-Square
	df
	Sig.
	578.065
	45
	.000

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Μελέτη αιθέριων ελαίων από 9 *ex situ* γονότυπους *H. amorginum*



Εικόνα 3.6: Διάγραμμα δύο κυρίων συνιστωσών πριν την περιστροφή των αξόνων της PCA ανάλυσης των 10 δειγμάτων *ex situ* καλλιεργούμενου *Helichrysum amorginum* (HA)



Rotated Component Matrix^a

	Component	
	1	2
GENOTYPE_1	.055	.980
GENOTYPE_2	.979	.182
GENOTYPE_3	.995	-.008
GENOTYPE_4	.976	-.060
GENOTYPE_5	.940	.318
GENOTYPE_6	.871	.353
GENOTYPE_7	.977	.201
GENOTYPE_8	.967	.224
GENOTYPE_9	.791	.545
GENOTYPE_10	.859	.469

Extraction Method: Principal Component

Analysis.

Rotation Method: Varimax with Kaiser

Normalization.

a. Rotation converged in 3 iterations.

Εικόνα 3.7: Διάγραμμα δύο κυρίων συνιστωσών μετά την περιστροφή των αξόνων της PCA ανάλυσης των 10 δειγμάτων *ex situ* καλλιεργούμενου *Helichrysum amorginum* (HA)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Μελέτη αιθέριων ελαίων από 9 *ex situ* γονότυπους *H. amorginum*

Πίνακας 3.7: Συγκριτικός πίνακας PCA συσχετίσεων των 10 δειγμάτων HA ως προς τις δύο κύριες συνιστώσες πριν και μετά την περιστροφή των αξόνων

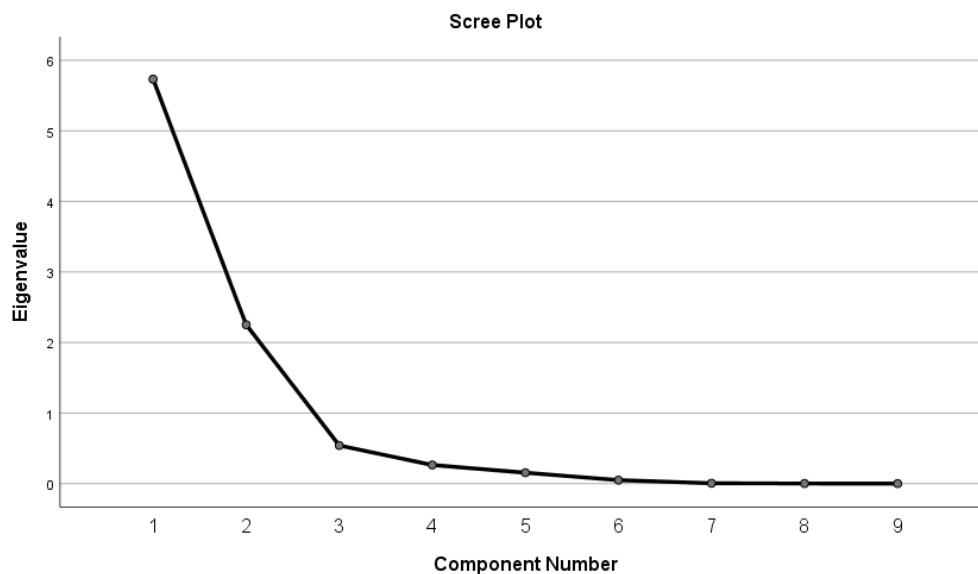
Component Matrix ^a			Rotated Component Matrix ^a		
	Component			Component	
	1	2		1	2
GENOTYPE_1	0.34	0.921	GENOTYPE_1	0.055	0.98
GENOTYPE_2	0.99	-0.112	GENOTYPE_2	0.979	0.182
GENOTYPE_7	0.993	-0.094	GENOTYPE_7	0.977	0.201
GENOTYPE_8	0.99	-0.07	GENOTYPE_8	0.967	0.224
GENOTYPE_5	0.992	0.028	GENOTYPE_5	0.94	0.318
GENOTYPE_3	0.949	-0.299	GENOTYPE_3	0.995	-0.008
GENOTYPE_4	0.916	-0.343	GENOTYPE_4	0.976	-0.06
GENOTYPE_6	0.936	0.082	GENOTYPE_6	0.871	0.353
GENOTYPE_9	0.916	0.289	GENOTYPE_9	0.791	0.545
GENOTYPE_10	0.958	0.197	GENOTYPE_10	0.859	0.469

Πραγματοποιήθηκε, επίσης, ανάλυση κυρίων συνιστωσών στα ποσοστά (%) των εννέα κυριότερων συστατικών των 10 δειγμάτων των εννέα γονότυπων HA, που αποτελούνται από τα isopimara-9(11),15-diene (**34**, 1,6-31,4%), cembrene (**38**, 0,4-6,9%), (Z,Z)-geranyl linalool (**39**, 6,2-12,9%), geranyl-p-cymene (**40**, 2,5-5,4%), dolabradene (**41**, 4,3-15,5%), pentacosane (**63**, 1,9-12%), heptacosane (**65**, 1,7-10%), nonacosane (**67**, 2,3-10%), untriacontane (**69**, 0,8-2,5%), όπως φαίνονται στον Πίνακα 3.3 της Υποενότητας 3.3.1. Η τιμή Kaiser–Meyer–Olkin (KMO) test = 0,478 βρέθηκε οριακά $\approx 0,50$ και ήταν αποδεκτή για την επάρκεια των δεδομένων για την παραγοντική ανάλυση και η τιμή Bartlett's test $p = 0,000 < 0,05$ που ικανοποιεί την συνθήκη σφαιρικότητας (Πίνακας 3.8). Σύμφωνα με το scree plot της Εικόνας 3.8 και τον Πίνακα 3.9 βρέθηκαν δύο κύριες συνιστώσες με ιδιοτιμή (eigenvalue) > 1 που αιτιολογούν αθροιστικά το 88,718% της μεταβλητότητας του μοντέλου. Στη συνέχεια, τα αποτελέσματα ομαδοποίησης των εννέα μεταβλητών απεικονίστηκαν σε διαγράμματα των δύο συνιστωσών πριν και μετά την περιστροφή των αξόνων με την μέθοδο Varimax, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.9-Πίνακας 3.10 και Εικόνα 3.10-Πίνακας 3.11, αντίστοιχα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Μελέτη αιθέριων ελαίων από 9 *ex situ* γονότυπους *H. amorginum*

Πίνακας 3.8: Επεξηγηματικός πίνακας της ικανοποίησης των προϋποθέσεων της PCA ανάλυσης των εννέα κύριων συστατικών *ex situ* καλλιεργούμενου *Helichrysum amorginum* (HA)

KMO and Bartlett's Test		
Kaiser-Meyer-Olkin Measure of Sampling Adequacy.		.478
Bartlett's Test of Sphericity	Approx. Chi-Square	130.872
	df	36
	Sig.	.000



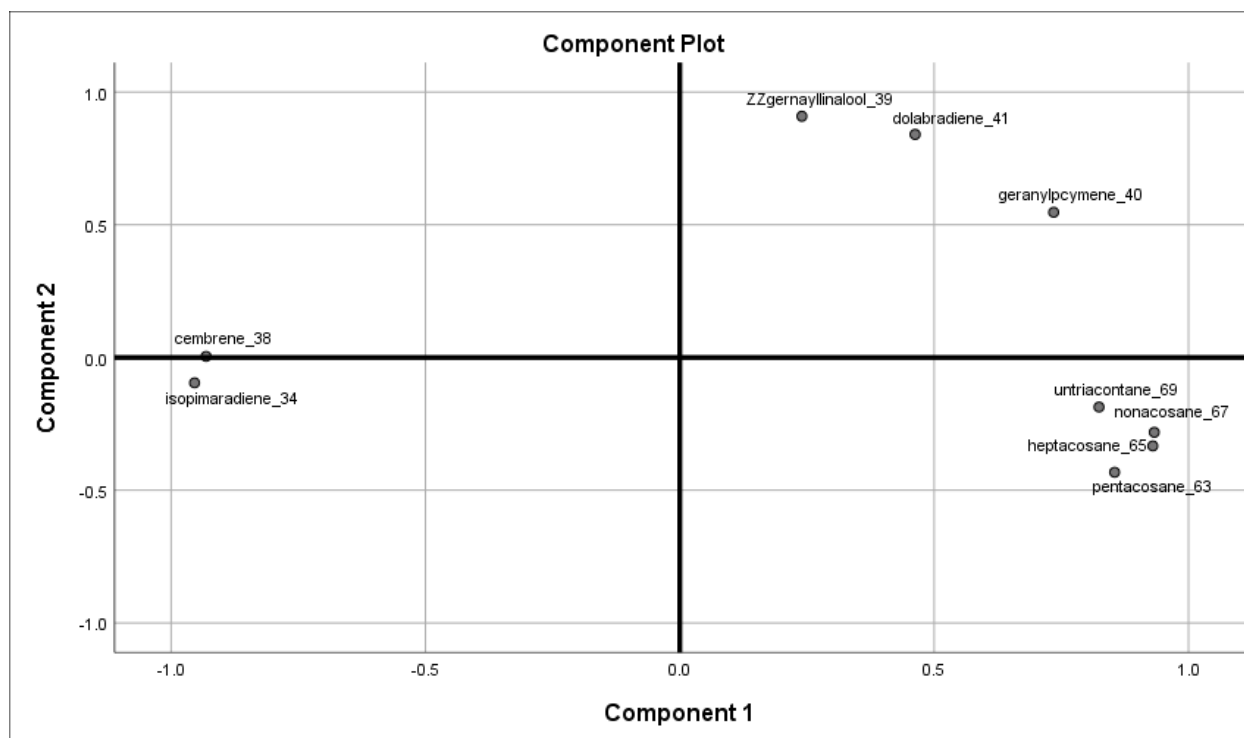
Εικόνα 3.8: Διάγραμμα *scree plot* ιδιοτιμών και κύριων συνιστωσών της PCA ανάλυσης των εννέα κύριων συστατικών *ex situ* καλλιεργούμενου *Helichrysum amorginum* (HA)

Πίνακας 3.9: Επεξηγηματικός πίνακας διακύμανσης βάσει των ιδιοτιμών και κύριων συνιστωσών της PCA ανάλυσης των εννέα κύριων συστατικών *ex situ* καλλιεργούμενου *Helichrysum amorginum* (HA)

Total Variance Explained						
Component	Total	Initial Eigenvalues		Extraction Sums of Squared Loadings		
		% of Variance	Cumulative %	Total	% of Variance	Cumulative %
1	5.732	63.693	63.693	5.732	63.693	63.693
2	2.252	25.025	88.718	2.252	25.025	88.718
3	.540	6.003	94.720			
4	.264	2.934	97.654			
5	.154	1.714	99.368			
6	.049	.549	99.917			
7	.006	.062	99.979			
8	.002	.020	99.999			
9	7.127E-5	.001	100.000			

Extraction Method: Principal Component Analysis.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Μελέτη αιθέριων ελαίων από 9 *ex situ* γονότυπους *H. amorginum*



Εικόνα 3.9: Διάγραμμα δύο κυρίων συνιστωσών πριν την περιστροφή των αξόνων της PCA ανάλυσης των εννέα κύριων συστατικών *ex situ* καλλιεργούμενου *Helichrysum amorginum* (HA)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Μελέτη αιθέριων ελαίων από 9 *ex situ* γονότυπους *H. amorginum*

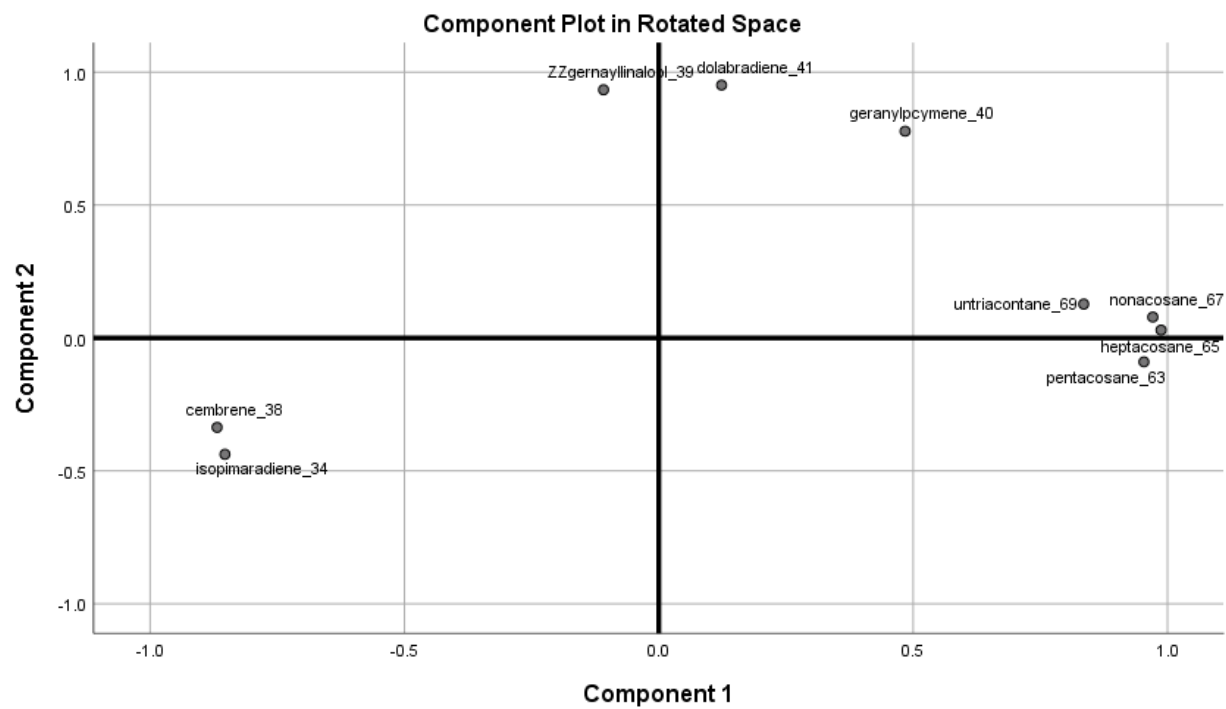
Πίνακας 3.10: Επεξηγηματικός πίνακας PCA συσχετίσεων των εννέα κύριων συστατικών *ex situ* καλλιεργούμενου *Helichrysum amorginum* (HA) ως προς τις δύο κύριες συνιστώσεις πριν την περιστροφή των αξόνων

	Component Matrix ^a	
	Component 1	Component 2
isopimaradiene_34	-.954	-.096
cembrene_38	-.931	.004
ZZgernayllinalool_39	.240	.909
geranylpcymene_40	.735	.547
dolabradiene_41	.462	.840
pentacosane_63	.855	-.432
heptacosane_65	.930	-.333
nonacosane_67	.933	-.282
untriacontane_69	.824	-.187

Extraction Method: Principal Component
Analysis.

a. 2 components extracted.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Μελέτη αιθέριων ελαίων από 9 *ex situ* γονότυπους *H. amorginum*



Εικόνα 3.10: Διάγραμμα δύο κυρίων συνιστωσών μετά την περιστροφή των αξόνων της PCA ανάλυσης των εννέα κύριων συστατικών *ex situ* καλλιεργούμενου *Helichrysum amorginum* (HA)

Πίνακας 3.11: Επεξηγηματικός πίνακας PCA συσχετίσεων των εννέα κύριων συστατικών *ex situ* καλλιεργούμενου *Helichrysum amorginum* (HA) ως προς τις δύο κύριες συνιστώσες μετά την περιστροφή των αξόνων

	Component	
	1	2
isopimaradiene_34	-.853	-.438
cembrene_38	-.868	-.336
ZZgeranylinalool_39	-.109	.934
geranylpcymene_40	.484	.778
dolabradiene_41	.123	.951
pentacosane_63	.954	-.090
heptacosane_65	.987	.030
nonacosane_67	.971	.079
untriacontane_69	.835	.127

Extraction Method: Principal Component

Analysis.

Rotation Method: Varimax with Kaiser

Normalization.

a. Rotation converged in 3 iterations.

Όπως φαίνεται στο διάγραμμα συνιστωσών πριν την περιστροφή των αξόνων (Εικόνα 3.9 και Πίνακας 3.10) οι μεταβολίτες isopimara-9(11),15-diene (**34**), cembrene (**38**) και οι μεταβολίτες pentacosane (**63**), heptacosane (**65**), nonacosane (**67**), untriacontane (**69**) εμφανίζουν ισχυρή συσχέτιση με την 1^η κύρια συνιστώσα με μεγάλο βαθμό αρνητικής ή θετικής αλληλεξάρτησης στις συγκεντρώσεις τους. Επίσης, τα (Z,Z)-geranyl linalool (**39**), dolabradiene (**41**) εμφανίζουν ισχυρή συσχέτιση με την 2^η κύρια συνιστώσα. Η περιστροφή των αξόνων με την μέθοδο Varimax (Εικόνα 3.10 και Πίνακας 3.11) έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της συσχέτισης των (Z,Z)-geranyl linalool (**39**), dolabradiene (**41**) με την 2^η κύρια συνιστώσα. Από τα παραπάνω στοιχεία συμπεραίνεται ότι τα διτερπένια isopimara-9(11),15-diene (**34**), cembrene (**38**) μαζί με τους αλειφατικούς υδρογονάνθρακες pentacosane (**63**), heptacosane (**65**), nonacosane (**67**), untriacontane (**69**) ευθύνονται κατά κύριο λόγο για την μεταβλητότητα της χημικής σύστασης των γονότυπων που, συμπληρωματικά, ενισχύεται με την συνεισφορά των διτερπενίων (Z,Z)-geranyl linalool (**39**), και dolabradiene (**41**).

3.4 Συμπεράσματα

Η ανάλυση 10 δειγμάτων εννέα γονότυπων *ex situ* καλλιεργούμενου *Helichrysum amorginum* (HA) αποκάλυψε την παρουσία 69 μεταβολιτών που παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.2 και κατηγοριοποιούνται σε δύο αλειφατικές αλκοόλες (**1**, **32**), τρεις αλειφατικούς εστέρες (**2**, **51**, **62**), ένα μονοϋδροξυ βενζοϊκό οξύ (**27**), μία αλειφατική λακτόνη (**53**), εννέα αλειφατικούς υδρογονάνθρακες (**59**, **61**, **63-69**), 27 σεσκιτερπένια (**3-26**, **28-30**), 19 διτερπένια (**31**, **33-46**, **49**, **52**, **58**, **60**) και επτά μη ταυτοποιημένους (**47**, **48**, **50**, **54-57**).

Τα αιθέρια έλαια των *ex situ* καλλιεργούμενων γονότυπων *Helichrysum amorginum* (HA) εμφανίζουν ένα διαφορετικό προφίλ μεταβολιτών με επικρατέστερα σεσκιτερπένια, διτερπένια και αλειφατικούς υδρογονάνθρακες σε αντίθεση με (α) το αιθέριο έλαιο του HIS που είναι πλούσιο σε μονοτερπένια και σεσκιτερπένια και (β) τις δύο προηγούμενες βιβλιογραφικές αναφορές για το αιθέριο έλαιο HA όπου ως κύρια συστατικά του HA αναφέρονται τα μονοτερπένια geraniol (32,11%), geranyl acetate (20,76%), neryl acetate (17,54%), citronellyl acetate (6,60%) και το σεσκιτερπένιο E-nerolidol (6,85%) (Chinou et al. 1996), ή το σεσκιτερπένιο spathulenol (36,6%) και τα μονοτερπένια β-pinene (12,5%), myrtenal (5,5%) και terpinen-4-ol (5,0%) (Chinou et al. 2004).

Στα αιθέρια έλαια των *ex situ* καλλιεργούμενων γονότυπων HA παρατηρούνται τα ακόλουθα εύρη κατηγοριών μεταβολιτών: ολικά σεσκιτερπένια 1,5-12,5%, ολικά διτερπένια 40,2-70,3%, αλειφατικοί υδρογονάνθρακες 7,8-39,8%, ενώ στο HIS ολικά μονοτερπένια 45,53%, ολικά σεσκιτερπένια 52,27%. Δηλαδή, οι γονότυποι HA διακρίνονται από μεγάλο ποσοστό διτερπενίων.

Στα αιθέρια έλαια των *ex situ* καλλιεργούμενων γονότυπων HA επικρατούν περισσότερο μη οξυγονωμένες ουσίες και συγκεκριμένα ολικά μη οξυγονωμένα σεσκιτερπένια-διτερπένια και αλκοόλες, ενώ στο εμπορικό δείγμα αιθέριου ελαίου HIS ολικά μη οξυγονωμένα μονοτερπένια-σεσκιτερπένια, εστέρες, αλκοόλες και κετόνες.

Ως κύρια συστατικά των αιθέριων ελαίων των *ex situ* καλλιεργούμενων γονότυπων HA αναγνωρίστηκαν τα διτερπένια isopimar-9(11),15-diene (**34**) με εύρος 1,6-31,4%, dolabradiene (**41**) με εύρος 4,3-15,5%, (Z,Z)-geranyl linalool (**39**) με εύρος 6,2-12,9% και οι υδρογονάνθρακες pentacosane (**63**) με εύρος 1,9-12%, nonacosane (**67**) με εύρος 2,3-10%, heptacosane (**65**) με εύρος 1,7-10%. Σε αμέσως μικρότερη αφθονία αναγνωρίστηκαν τα διτερπένια cembrene (**38**) με εύρος 0,4-6,9%, geranyl p-cymene (**40**) με εύρος 2,4-5,4%, rimuene (**33**) με εύρος 0,9-4,7%, (E,E)-geranyl linalool (**46**) με εύρος 1,1-3,8%, (Z,E)-geranyl linalool (**44**) με εύρος 0,7-3,8%, laurene (**31**) με εύρος 1,1-3,5%, β-springene (**35**) με εύρος 0,5-3,0%, bifloratriene (**43**) με εύρος 0,7-2,3%, τα σεσκιτερπένια β-caryophyllene (**5**) με εύρος 0,7-2,2%,

γ -cadinene (**13**) με εύρος 0,3-1,4% και οι υδρογονάνθρακες tricosane (**59**) με εύρος 0.-2,4%, και untriacontane (**69**) με εύρος 0,8-3%.

Με εφαρμογή της Ιεραρχικής Ανάλυσης Συστάδων στα 10 δείγματα των *ex situ* καλλιεργούμενων γονότυπων ΗΑ προέκυψε δενδροδιάγραμμα στο οποίο εμφανίζονται πέντε υποσύνολα δειγμάτων γονότυπων που επιβεβαιώθηκαν με εφαρμογή Ανάλυσης Κύριων Συνιστωσών. Τα πέντε υποσύνολα είναι τα ακόλουθα:

(1) ο γονότυπος 1 (*gen1*), ο οποίος χαρακτηρίζεται από το υψηλότερο ποσοστό σε αλειφατικούς κορεσμένους υδρογονάνθρακες (39,8%) και με το χαμηλότερο ποσοστό σε ολικά διτερπένια (40,2%),

(2) ο γονότυπος 6 (*gen6*) που σχηματίζει ένα ξεχωριστό υποσύνολο και χαρακτηρίζεται από την αμέσως μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε αλειφατικούς κορεσμένους υδρογονάνθρακες (26,3%) μετά το *gen1*,

(3) οι γονότυποι (*gen3*, *gen4*) που σχηματίζουν ένα ξεχωριστό υποσύνολο με ομοιότητες στη σύστασή των οξυγονωμένων σεσκιτερπενίων (3,4% και 2,9%, αντίστοιχα), μη οξυγονωμένων διτερπενικών υδρογονανθράκων (56,6% και 55,3%, αντίστοιχα), οξυγονωμένων διτερπενίων (10,6% και 9,9%, αντίστοιχα),

(4) οι γονότυποι (*gen2*, *gen5*, *gen7*, *gen8*, 5) τα δείγματα GENOTYPE #9 = *gen9.1* (άτομο 1 γονότυπου 15,5893-Z6) και GENOTYPE #10 = *gen9.2* (άτομο 2 γονότυπου 15,5893-Z6) που αποτελούν κλώνους του γονότυπου 15,5893-Z6 (*gen9*).

Με εφαρμογή Ανάλυσης Κύριων Συνιστωσών στα ποσοστά (% peak area) των εννέα κυριότερων συστατικών των αιθέριων ελαίων των γονότυπων ΗΑ συμπεραίνεται ότι τα διτερπένια isopimar-9(11),15-diene (**34**), cembrene (**38**) μαζί με τους αλειφατικούς υδρογονάνθρακες pentacosane (**63**), heptacosane (**65**), nonacosane (**67**), untriacontane (**69**) ευθύνονται κατά κύριο λόγο για την μεταβλητότητα της χημικής σύστασης των γονότυπων που συμπληρωματικά, ενισχύεται με την συνεισφορά των διτερπενίων (Z,Z)-geranyl linalool (**39**), dolabradiene (**41**).

Οι *ex situ* καλλιεργούμενοι γονότυποι ΗΑ πιθανόν να αποτελούν μια διακριτή ομάδα χημειότυπου πιο πλούσιου σε διτερπένια και αλειφατικούς υδρογονάνθρακες σε σχέση με τις δύο βιβλιογραφικές περιπτώσεις ΗΑ με την διαφορετική σύσταση των δύο τελευταίων να οφείλεται σε άλλους πιθανούς χημειότυπους ή άλλους παράγοντες που επηρεάζουν την χημική μεταβλητότητα των αιθέριων ελαίων.

3.5 Βιβλιογραφία

- Akaberi, Maryam, Amirhossein Sahebkar, Narjes Azizi, and Seyed Ahmad Emami. 2019. "Everlasting Flowers: Phytochemistry and Pharmacology of the Genus *Helichrysum*." *Industrial Crops and Products* 138 (April): 111471. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111471>.
- Angioni, Alberto, Andrea Barra, Marco Arlorio, Jean Daniel Coisson, Maria T. Russo, Filippo M. Pirisi, Maurizio Satta, and Paolo Cabras. 2003. "Chemical Composition, Plant Genetic Differences, and Antifungal Activity of the Essential Oil of *Helichrysum Italicum* G. Don ssp. *microphyllum* (Willd) Nym." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (4): 1030–34. <https://doi.org/10.1021/jf025940c>.
- Asta Judzentiene, Félix Tomi, Joseph Casanova. 2009. "Analysis of Essential Oils of *Artemisia absinthium* L. from Lithuania by CC, GC(RI), GC-MS and ¹³C NMR." *Natural Product Communications* 4 (8): 1113–18. <https://doi.org/10.1177/1934578X0900400820>.
- Babushok, V. I., P. J. Linstrom, and I. G. Zenkevich. 2011. "Retention Indices for Frequently Reported Compounds of Plant Essential Oils." *Journal of Physical and Chemical Reference Data* 40 (4). <https://doi.org/10.1063/1.3653552>.
- Chinou, Ioanna B., Christos Bougatsos, and Dimitrios Perdetzoglou. 2004. "Chemical Composition and Antimicrobial Activities of *Helichrysum amorginum* Cultivated in Greece." *Journal of Essential Oil Research* 16 (3): 243–45. <https://doi.org/10.1080/10412905.2004.9698711>.
- Chinou, Ioanna B., Vassilios Roussis, Dimitrios Perdetzoglou, and Anargiros Loukis. 1996. "Chemical and Biological Studies on Two *Helichrysum* Species of Greek Origin." *Planta Medica* 62 (4): 377–79. <https://doi.org/10.1055/s-2006-957914>.
- Chinou, Ioanna B., Vassilios Roussis, Dimitrios Perdetzoglou, Olga Tzakou, and Anargiros Loukis. 1997. "Chemical and Antibacterial Studies of Two *Helichrysum* Species of Greek Origin." *Planta Medica* 63 (2): 181–83. <https://doi.org/10.1055/s-2006-957641>.
- Drewes, Siegfried E., K. Esther Mudau, Sandy F. Van Vuuren, and Alvaro M. Viljoen. 2006. "Antimicrobial Monomeric and Dimeric Diterpenes from the Leaves of *Helichrysum tenax* Var. *tenax*." *Phytochemistry* 67 (7): 716–22. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.12.015>.
- Ebru Hatice Tıǧlı Kaytanlıoǧlu, Sevgin Özderin, Hüseyin Fakir, Emre Gümüşay. 2021. "Determination of Volatile Components of *Helichrysum arenarium* subsp. *aucheri* Naturally Distributed in Two Different Regions." *European Journal of Science and Technology*, no. 25: 152–58. <https://doi.org/10.31590/ejosat.887605>.
- Ferdinand Bohlmann, Lievy Hartono, Jasmin Jakupovic. 1985. "A diterpene related to erythroxydiol from *Helichrysum refluxum*." *Phytochemistry* 24 (3): 611–12. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)80783-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)80783-9).
- Hans Wohlmuth, Mike K. Smith, Lyndon O. Brooks, Stephen P. Myers, David N. Leach. 2006. "Essential Oil Composition of Diploid and Tetraploid Clones of Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) Grown in Australia." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 1414–19. <https://doi.org/10.1021/jf0521799>.
- Heinrich, G., H. W. Pfeifhofer, E. Stabentheiner, and T. Sawidis. 2002. "Glandular Hairs of *Sigesbeckia jorullensis* Kunth (Asteraceae): Morphology, Histochemistry and Composition of Essential Oil." *Annals of Botany* 89 (4): 459–69. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf062>.

- Houdkova, Marketa, Genesis Albarico, Ivo Daskocil, Jan Tauchen, Klara Urbanova, Edgardo E. Tulin, and Ladislav Kokoska. 2020. "Vapors of Volatile Plant-Derived Products Significantly Affect the Results of Antimicrobial, Antioxidative and Cytotoxicity Microplate-Based Assays." *Molecules (Basel, Switzerland)* 25 (24). <https://doi.org/10.3390/molecules25246004>.
- I. Morone-Fortunato, C. Montemurro, C. Ruta, R. Perrini, W. Sabetta, A. Blancob, E. Lorusso, P. Avato. 2010. "Essential Oils, Genetic Relationships and in Vitro Establishment of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *italicum* from Wild Mediterranean Germplasm." *Industrial Crops & Products* 32: 639–49. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.07.023>.
- Jose A. Sotomayor, Rosa M. Martiane, Antonio J. Garcia, Maria J. Jordan. 2004. "*Thymus zygis* subsp. *gracilis*: Watering Level Effect on Phytomass Production and Essential Oil Quality." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 5418–24. <https://doi.org/10.1021/jf0496245>.
- Leon N. Nixon, Edmon Wong, Cecil B. Johnson, Edward J. Birch. 1979. "Nonacidic Constituents of Volatiles from Cooked Mutton." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 27 (2): 355–59. <https://doi.org/10.1021/jf60222a044>.
- Luis Miguel Pombo Ospina, Paola Borrego Muñoz, Javier Matulevich, Aníbal Alfonso Teherán, Leidy Barajas Villamizar. 2016. "Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Three Plant Species from the Sabana of Bogota (Colombia): *Myrcianthes leucoxyla*, *Vallea stipularis* and *Phyllanthus salviifolius*." *Natural Product Communications* 11 (12): 1913–18. <https://doi.org/10.1177/1934578X1601101234>.
- M. Sabih Ozer, Cengiz Sarikurcu, Bektas Tepe, Sendil Can. 2010. "Essential Oil Composition and Antioxidant Activities of Alkanet (*Alkanna tinctoria* subsp. *tinctoria*)." *Food Sci. Biotechnol.* 19 (5): 1177–83. <https://doi.org/10.1007/s10068-010-0168-x>.
- Maria Tsoukatou, Vassilios Roussis, Ioanna Chinou, Panos V. Petrakis, and Ortiz Antonio. 1999. "Chemical Composition of the Essential Oils and Headspace Samples of Two *Helichrysum* Species Occurring in Spain." *Journal of Essential Oil Research* 11: 511–16. <https://doi.org/10.1080/10412905.1999.9701198>.
- Mary Lucero, Rick Estell, María Tellez, Ed Fredrickson. 2009. "A Retention Index Calculator Simplifies Identification of Plant Volatile Organic Compounds." *Phytochemical Analysis* 20: 378–84. <https://doi.org/10.1002/pca.1137>.
- Ming-Quan Hang, Qing-Qing Zou, Hong-Yu Tian, Bao-Guo Sun, Hai-Tao Chen. 2012. "Analysis of Volatile Components from *Dictyophora rubrovolata* Zang, Ji et Liou." *Procedia Engineering* 37: 240–49. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2012.04.234>.
- Mitaka, Yuki, Shigeru Matsuyama, Nobuaki Mizumoto, Kenji Matsuura, and Toshiharu Akino. 2020. "Chemical Identification of an Aggregation Pheromone in the Termite *Reticulitermes speratus*." *Scientific Reports* 10 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64388-4>.
- NIST Mass Spectrometry Data Center. 2011. "NIST Mass Spectrometry Data Center." 2011. <https://chemdata.nist.gov/>.
- Reidel, Rose Vanessa Bandeira, Pier Luigi Cioni, Barbara Ruffoni, Claudio Cervelli, and Luisa Pistelli. 2017. "Aroma Profile and Essential Oil Composition of *Helichrysum* Species." *Natural Product Communications* 12 (6): 977–82. <https://doi.org/10.1177/1934578x1701200636>.
- Robert P. Adams. 2017. "Identification of essential oil components by gas chromatography/mass

spectrometry, Ed. 4.1.” Allured publishing, 2007.

- Roussis, Vassilios, Maria Tsoukatou, Ioanna B. Chinou, and Catherine Harvala. 2002. “Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oils of Two *Helichrysum stoechas* Varieties Growing in the Island of Crete.” *Journal of Essential Oil Research* 14 (6): 459–61. <https://doi.org/10.1080/10412905.2002.9699920>.
- Roussis, Vassilios, Maria Tsoukatou, Panos V. Petrakis, Ioanna Chinou, Melpomeni Skoula, and Jeffrey B. Harborne. 2000. “Volatile Constituents of Four *Helichrysum* Species Growing in Greece.” *Biochemical Systematics and Ecology* 28 (2): 163–75. [https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(99\)00046-0](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(99)00046-0).
- Tae Yung Chung, Jason P. Eiserich, Takayuki Shibamoto. 1993. “Volatile Compounds Isolated from Edible Korean Chamchwi (*Aster scaber* Thunb).” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41: 1693–97. <https://doi.org/10.1021/jf00034a033>.
- Tameo Okumura. 1991. “Retention Indices of Environmental Chemicals on Methyl Silicone Capillary Column.” *Journal of Environmental Chemistry* 1 (2): 333–58. <https://doi.org/10.5985/jec.1.333>.
- Tucker, Arthur O., Michael J. Maciarello, Days J. Charles, and James E. Simon. 1997. “Volatile Leaf Oil of the Curry Plant [*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don subsp. *italicum*] and Dwarf Curry Plant [subsp. *microphyllum* (Willd.) Nyman] in the North American Herb Trade.” *Journal of Essential Oil Research* 9 (5): 583–85. <https://doi.org/10.1080/10412905.1997.9700781>.
- Viña, Amparo, and Elizabeth Murillo. 2003. “Essential Oil Composition from Twelve Varieties of Basil (*Ocimum* spp.) Grown in Colombia.” *Journal of the Brazilian Chemical Society* 14 (5): 744–49. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532003000500008>.
- Wiley Science Solutions. 2007. “Wiley Registry of Mass Spectral Data.” 2022 John Wiley & Sons; Inc. 2007. <https://sciencesolutions.wiley.com/solutions/technique/gc-ms/#>.
- Xu, Guan Ling, Di Geng, Meng Xie, Kai Yue Teng, Yu Xin Tian, Zi Zhen Liu, Cheng Yan, et al. 2015. “Chemical Composition, Antioxidative and Anticancer Activities of the Essential Oil: Curcuma Rhizoma-Sparganii Rhizoma, a Traditional Herb Pair.” *Molecules* 20 (9): 15781–96. <https://doi.org/10.3390/molecules200915781>.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. Μελέτη μεταβολικού προφίλ εκχυλισμάτων
από *ex situ* καλλιεργούμενους γονότυπους *Helichrysum*
amorginum

4.1 Σκοπός εργασίας

Κύριο στόχο της παρούσας μελέτης αποτελεί η πρόταση ενός μεταβολομικού μοντέλου διάκρισης εκχυλισμάτων από *ex situ* γονότυπους του είδους *H. amorginum*, κάτι που γίνεται για πρώτη φορά, με γνώμονα την ανάδειξη συγκεκριμένων μεταβολιτών – βιοδεικτών που ευθύνονται για την εποχική διακύμανση του μεταβολικού τους προφίλ. Συγκεκριμένα, τα δείγματα των *ex situ* καλλιεργούμενων γονότυπων του *H. amorginum*, συλλέχθηκαν την περίοδο Μαρτίου – Ιουνίου, τις χρονιές 2016-2020. Παράλληλο στόχο αποτέλεσε η ανάπτυξη και η εφαρμογή μεταβολομικών μεθοδολογιών με την χρήση σύγχρονης, ευαίσθητης και υψηλής διακριτικής ικανότητας τεχνικής φασματομετρίας μάζας (HRMS) συζευγμένη με αναλυτή μαζών τροχιακής παγίδας ιόντων (Orbitrap).

4.1.1 Εισαγωγή

4.1.1.1 Φυτομεταβολομική

Η βιολογία συστημάτων (systems biology) αποτελεί ένα διεπιστημονικό πεδίο έρευνας βασιζόμενο στην βιολογία το οποίο εστιάζει σε πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις των βιολογικών συστημάτων έχοντας μία ολιστική προοπτική. Τα τελευταία χρόνια το συγκεκριμένο πεδίο έρευνας έχει υιοθετήσει τις λεγόμενες τεχνολογίες “ομικής” (omics). Απώτερος σκοπός των τεχνολογιών αυτών είναι η μη στοχευμένη και γενικευμένη ταυτοποίηση των γονιδιακών προϊόντων (γονιδίων, πρωτεϊνών, μεταβολιτών), τα οποία είναι παρόντα σε κάποιο βιολογικό σύστημα (Weckwerth 2003) χρησιμοποιώντας ως εργαλεία τόσο αναλυτικές τεχνικές όσο και στατιστικές μεθόδους ανάλυσης.

Η μεταβολομική, έχει ως αντικείμενο την αποτύπωση του συνόλου των μεταβολιτών που παράγονται από έναν οργανισμό δηλαδή, το λεγόμενο μεταβόλωμα (Liland 2011). Το μεταβόλωμα μπορεί επίσης να θεωρηθεί ως το σύνολο των τελικών προϊόντων της γονιδιακής έκφρασης, ορίζοντας έτσι τον βιοχημικό φαινότυπο ενός κυττάρου ή ενός ιστού (Sumner et al. 2003). Πρόκειται για ένα δυναμικό στοιχείο το οποίο συνεχώς υπόκειται σε αλλαγές ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης του οργανισμού και των περιβαλλοντικών ερεθισμάτων που αυτός δέχεται. Παρόλο που θεωρείται απαραίτητο τμήμα της μελέτης ενός βιολογικού συστήματος, η μεταβολομική, αρχικά, δεν συμπεριλήφθηκε στο φάσμα της λειτουργικής γενωμικής. Εξαιτίας όμως της μεγάλης προόδου που επιτεύχθηκε στον συγκεκριμένο τομέα, θεωρείται πλέον αναπόσπαστο κομμάτι της (Liland 2011; Weckwerth 2003), το οποίο μάλιστα προβλέπεται να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην σύνδεση του φαινότυπου με τον γονότυπο. Επίσης, αναμένεται να διαδραματίσει καθοριστικό ρόλο στην προσέγγιση της πλήρους αποκρυπτογράφησης του γονιδιώματος και της κατανόησης της γονιδιακής έκφρασης, σχετίζοντας το γονίδιο όχι μόνο με την παραγωγή πρωτεϊνών αλλά και με την λειτουργία τους (Hall 2006). Ακόμη έχει διατυπωθεί ότι το μεταβόλωμα μπορεί να προσφέρει ίσως την πιο ολοκληρωμένη

«λειτουργική» πληροφορία σε σύγκριση με τις υπόλοιπες τεχνολογίες «ομικής». Όμως, η πολυπλοκότητα των βιολογικών συστημάτων και η χημική ποικιλία που χαρακτηρίζει τα περισσότερα από αυτά καθιστούν την προσπάθεια αποτύπωσης του μεταβολώματος μία εξαιρετικά δύσκολη διαδικασία για την οποία απαιτούνται πολύπλοκες και εξειδικευμένες τεχνολογίες και μέθοδοι. Η μεταβολομική καλείται να αποτυπώσει πλήθος μεταβολιτών με χημικό εύρος που κυμαίνεται από ιονικά ανόργανα μόρια έως υδρόφιλους υδατάνθρακες, υδροφοβικά λιπίδια και πολύπλοκα φυσικά προϊόντα (Sumner et al. 2003).

Συμπερασματικά, η μεταβολομική αποδείχτηκε ένα χρήσιμο εργαλείο για την κατανόηση του ανθρώπινου μεταβολισμού καθώς και ένα πολύτιμο διαγνωστικό μέσο. Πιο συγκεκριμένα, η εφαρμογή των μεταβολομικών προσεγγίσεων στα φυτικά βιολογικά συστήματα άρχισε να αποτελεί αντικείμενο έρευνας μόλις την δεκαετία του '90. Τα πρώτα δημοσιευμένα αποτελέσματα των ερευνών της μεταβολομικής πάνω σε φυτικά υλικά (Roessner et al. 2000) κρίθηκαν ικανοποιητικά και κατά συνέπεια ο αριθμός των ακαδημαϊκών ομάδων που χρησιμοποιούν και που συνεισφέρουν στο συγκεκριμένο πεδίο αυξάνεται εκθετικά (Sumner et al. 2003).

Η φυτομεταβολομική αποτελεί ένα σύνθετο πεδίο έρευνας εξαιτίας της μεγάλης ποικιλίας αλλά και της χημικής πολυπλοκότητας των φυτικών ειδών. Τα φυτά ως αυτότροφοι οργανισμοί, έχουν αναπτύξει περίπλοκες πολυκύτταρες δομές, με διαφορετική λειτουργία, ώστε να διασφαλίσουν την επιβίωσή τους σε ένα μεταβαλλόμενο περιβάλλον. Οι δομές των φυτών (όργανα όπως π.χ. ταξιανθίες, φύλλα, ρίζες, βλαστοί, αγγειώδες σύστημα), περιλαμβάνουν πολλούς διαφορετικούς τύπους κυττάρων (επιδερμίδα, παρεγχυματικά κύτταρα, τρίχωμα, αδένες, κ.ά.) οι οποίες διακρίνονται από διαφορετικό μεταβολισμό. Παράγοντες όπως το κλίμα, οι εποχές και η γεωγραφία επηρεάζουν τον κυτταρικό μεταβολισμό και κατά συνέπεια την λειτουργία του φυτικού οργανισμού και η επίδραση αυτή αντικατοπτρίζεται στους παραγόμενους μεταβολίτες. Επιπλέον, επίδραση στον μεταβολισμό έχουν αβιοτικοί παράγοντες όπως το φως, έδαφος, το νερό αλλά και βιοτικοί όπως η ανταγωνιστικά φυτικά είδη, εχθροί και ασθένειες. Πρόκειται για παράγοντες καταπόνησης (στρες) για την προστασία από τους οποίους τα φυτά έχουν αναπτύξει ένα πολύπλοκο σύστημα άμυνας με την παραγωγή εξειδικευμένων μεταβολιτών. Οι μεταβολίτες αυτοί ονομάζονται φυτοαλεξίνες και θεωρούνται τα αντισώματα των φυτικών οργανισμών. Πολλές φορές είναι κοινοί σε όλους τους οργανισμούς, άλλοι όμως είναι ειδικοί σε επίπεδο γένους ή ακόμα και είδους (Jeandet 2015).

Ο συνολικός αριθμός των μεταβολιτών που παράγονται στο φυτικό βασίλειο συμπεριλαμβανομένων των δευτερογενών μεταβολιτών είναι εξαιρετικά μεγάλος. Περίπου 10^5 δευτερογενείς μεταβολίτες έχουν ανακαλυφθεί στο φυτικό βασίλειο (Oksman-Caldentey et al. 2004). Η

πολυπλοκότητά τους αποτελεί πρόκληση για την μεταβολομική και καθιστά την φυτομεταβολομική ένα από τα ζητήματα που απασχολούν τη σύγχρονη έρευνα (Hall 2006).

Η κατανόηση της μεταβολικής σύστασης των φυτικών ιστών έχει αξιόλογη διαγνωστική και προγνωστική αξία (Hall 2006). Για τον λόγο αυτό η φυτομεταβολομική έχει εφαρμογές πέραν της απλής αναγνώρισης της χημικής σύστασης ενός φυτού. Η δημιουργία μεταβολικών αποτυπωμάτων σε είδη, γονότυπους ή ακόμα και οικότυπους έχει χρησιμοποιηθεί για ταξινομικούς σκοπούς καθώς και για την παρακολούθηση και διερεύνηση βιοχημικών μονοπατιών στα πλαίσια της φυσιολογίας φυτών (Gorinstein et al. 2014, Huhman et al. 2002). Η παρακολούθηση της συμπεριφοράς μίας ορισμένης ομάδας μεταβολιτών μπορεί να δώσει πληροφορίες σχετικά με τις αντιδράσεις φυτικών συστημάτων σε εφαρμοζόμενα εξωγενή χημικά ή φυσικά ερεθίσματα (Bednarek et al. 2001, Chong et al. 2001) καθώς και να επιτρέψει την ταξινόμηση τους ανάλογα με τις αντιδράσεις αυτές. Παράδειγμα αποτελεί η διάκριση στελεχών του ίδιου φυτού σε ανθεκτικά ή μη κατά την προσβολή τους από παθογόνους παράγοντες (Jahangir et al. 2008). Σημαντική είναι ακόμη η συμβολή της μεταβολομικής στην μελέτη αναπτυξιακών διαδικασιών των φυτών, όπως είναι η εδραίωση συμβιωτικών σχέσεων (Rasmussen et al. 2009), ενώ πολλά υποσχόμενη μελλοντικά είναι η εφαρμογή της στην τεχνολογία των διαγονιδιακών φυτών και στην σύγκριση του μεταβολικού περιεχομένου αυτών και των αντίστοιχων μη μεταλλαγμένων (Sumner et al. 2003). Η φυτομεταβολομική μπορεί να αποτελέσει χρήσιμο εργαλείο για την αξιολόγηση της χρήσης φυτών στην παραδοσιακή ιατρική και την σύνδεσή της με την σύγχρονη ιατρική μέσω του εντοπισμού βιοδεικτών με ενδιαφέρουσες βιολογικές ιδιότητες και με προοπτική φαρμακευτικής χρήσης στον άνθρωπο (Liu et al. 2010, Kim et al. 2008).

Η μεταβολομική προσέγγιση φυτικών συστημάτων απαιτεί ιδιαίτερους χειρισμούς από το στάδιο της καλλιέργειας ως το στάδιο της επεξεργασίας των δεδομένων που προκύπτουν. Τα βασικά βήματα της συγκεκριμένης προσέγγισης είναι τα εξής: καλλιέργεια φυτού, δειγματοληψία, εκχύλιση, ανάλυση, μετατροπή ακατέργαστων δεδομένων σε επεξεργάσιμες μορφές, επεξεργασία δεδομένων και εκτεταμένη χρήση βιοπληροφορικής για την οργάνωση, τον χειρισμό και την εξαγωγή της πληροφορίας (data mining) (Fukusaki & Kobayashi 2005).

Κάθε στάδιο, από την καλλιέργεια μέχρι το τελικό προφίλ πρέπει να είναι απολύτως ελεγχόμενο και να συνοδεύεται από μετα-δεδομένα (meta-data) δηλαδή δεδομένα, πληροφορίες που περιγράφουν και χαρακτηρίζουν ένα δεδομένο, τα οποία είναι καθοριστικά για την μετέπειτα ταξινόμηση και «εξόρυξη» της πληροφορίας. Για την απόκτηση μίας ευρείας μεταβολικής εικόνας απαιτείται ο συνδυασμός πολλών τεχνικών (Wolfender et al. 2015).

Η τεχνική LC-MS βρίσκει εφαρμογές τόσο ως διαγνωστικό εργαλείο στον τομέα της υγείας και στην κλινική έρευνα όσο και στον τομέα της φυτομεταβολομικής για τον προσδιορισμό του μεταβολώματος φυτικών συστημάτων (Dunn & Ellis 2005), ενώ θεωρείται συμπληρωματική προς την φασματοσκοπία NMR για την δυνατότητα εξαγωγής μεγάλου όγκου πληροφοριών κατά τις μεταβολομικές προσεγγίσεις (Lenz et al. 2004).

Οι μεταβολομικές μελέτες καταλήγουν σε ένα σύνολο πολυπαραμετρικών δεδομένων τα οποία χρήζουν επεξεργασίας μέσω λογισμικών οπτικοποίησης, χημειομετρίας και βιοπληροφορικής με στόχο σε ένα πρώτο στάδιο την ερμηνεία τους και την δημιουργία μεταβολομικών αποτυπωμάτων διαγνωστικής ή ταξινομικής αξίας και σε ένα δεύτερο στάδιο την ταυτοποίηση των ουσιών που αποτελούν αίτια της διάγνωσης ή της ταξινόμησης αντίστοιχα. Οι ουσίες αυτές αποτελούν τους βιοδείκτες (biomarkers) οι οποίοι καθορίζουν την βιολογική κατάσταση που εξετάζεται (Lindon & Nicholson 2008). Χωρίς τη χρήση στατιστικών μεθόδων η «εξόρυξη» πληροφοριών και η ερμηνεία του μεγάλου όγκου δεδομένων θα ήταν αδύνατη.

Σε αυτήν την διαχείριση πληροφοριών, κρίσιμο στάδιο αποτελεί η προεπεξεργασία των δεδομένων που προκύπτουν από τις αναλύσεις. Πρόκειται για μία προσπάθεια ελάττωσης της περιπλοκότητας των δεδομένων, ώστε να μπορέσουν να διευκολύνουν την ανάλυση, την ερμηνεία τους και την εξαγωγή της πληροφορίας (Castillo et al. 2011, Myers et al. 2017).

Κοινό χαρακτηριστικό όλων των μεταβολομικών τεχνικών είναι η παραγωγή δεδομένων πολλών διαστάσεων (high-dimensional data). Για την διαχείριση αυτών των πολυπαραμετρικών μεταβολομικών δεδομένων υπάρχουν πολλά στατιστικά εργαλεία τα οποία στο σύνολό τους συνιστούν ένα βασικό τμήμα της χημειομετρίας. Οι διάφορες χημειομετρικές μέθοδοι μπορούν να ταξινομηθούν, ανάλογα με τον βαθμό επέμβασης του ερευνητή, σε επιβλεπόμενες και μη επιβλεπόμενες. Στις επιβλεπόμενες μεθόδους είναι απαραίτητος ο *a priori* καθορισμός των ομάδων στις οποίες ανήκουν τα δείγματα. Στις μη επιβλεπόμενες, ο διαχωρισμός των δειγμάτων γίνεται χωρίς να έχει προηγηθεί ταξινόμησή τους σε ομάδες (Weckwerth 2003).

Με την προεργασία των αναλυτικών δεδομένων, όπως αυτή περιεγράφηκε προηγουμένως, επιτυγχάνεται μία εξομάλυνση και μία απλοποίηση τόσο της διαδικασίας όσο και των δεδομένων. Τις περισσότερες φορές τα αποτελέσματα μπορούν να τοποθετηθούν σε έναν πίνακα. Ο μητρικός αυτός πίνακας αποτελείται από στήλες και γραμμές οι οποίες αντιπροσωπεύουν τις μεταβλητές (variables). Στις σειρές αναφέρονται οι παρατηρήσεις (observations) και τα φορτία (loadings) τα οποία αποτελούν την πληροφορία της κάθε παρατήρησης για κάθε μεταβλητή.

Στην περίπτωση της μεταβολομικής, στην ανάλυση δηλαδή με βάση την τεχνική LC-MS, οι παρατηρήσεις αποτελούν το σύνολο των δειγμάτων και οι μεταβλητές εμπεριέχουν την φασματική πληροφορία που στην περίπτωση αυτή είναι οι παρατηρηθείσες κορυφές σε κάθε τμήμα του φάσματος. Οι κορυφές στην περίπτωση της τεχνικής LC-MS καθορίζονται από το λόγο m/z που χαρακτηρίζει την μάζα κάθε εντοπιζόμενου μονοϊσοτοπικού ιόντος, συνοδευόμενο από τον χρόνο ανάσχεσής του (Retention time - Rt). Τα φορτία (loadings) αποτελούνται από τα εμβαδά των εντοπιζόμενων κορυφών (peak area) (Coble and Fraga 2014, Fang & Gonzalez 2014).

Οι κυριότερες μέθοδοι προβολής που χρησιμοποιούνται κατά τις προσεγγίσεις πολυπαραμετρικής ανάλυσης, αλλά και της παρούσας μελέτης περιλαμβάνουν την ανάλυση κυρίων συνιστωσών (Principal Components Analysis - PCA), και την ανάλυση ορθογώνιων επιμέρους ελαχίστων τετραγώνων (Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis – OPLS-DA). Συγκεκριμένα, η ανάλυση κυρίων συνιστωσών (Principal Components Analysis - PCA) είναι μία από τις μη επιβλεπόμενες μεθόδους που χρησιμοποιείται πολύ συχνά και επιτρέπει τη δημιουργία ενός στατιστικού μοντέλου χωρίς την παρέμβαση του ερευνητή. Στόχος της PCA είναι να μειώσει τον αριθμό των διαστάσεων ενός συνόλου δεδομένων, επιτρέποντας διανύσματα πολλών διαστάσεων να προβληθούν σε ένα υπερεπίπεδο λιγότερων διαστάσεων. Το επίπεδο αυτό στο οποίο τελικά οι παρατηρήσεις προβάλλονται ονομάζεται διάγραμμα συντεταγμένων (scores plot) και μέσω αυτού οπτικοποιείται η σχέση μεταξύ των παρατηρήσεων βάσει των μεταβλητών. Γίνεται φανερό δηλαδή, κάποια πιθανή ομαδοποίηση, τάση για ομαδοποίηση και κάποιες ακραίες τιμές. Συμπληρωματικό του scores plot στην ερμηνεία των δεδομένων είναι το διάγραμμα φορτίων (loadings plot), το οποίο περιγράφει την επίδραση των μεταβλητών στις παρατηρήσεις (δείγματα) καθώς και την μεταξύ τους σχέση. Στα loadings plots, κάθε σημείο στο διάγραμμα απεικόνισης αντιστοιχεί στην πληροφορία (ppm, m/z -Rt) που χαρακτηρίζει την παρατήρηση (δείγμα) ενώ η σχετική του θέση, την σημαντικότητα και τη βαρύτητα ως προς την τάση διαχωρισμού. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι κατευθύνσεις των παρατηρήσεων σε ένα scores plot, όπως είναι λογικό, ανταποκρίνονται στις κατευθύνσεις των φορτίων στο αντίστοιχο loadings plot (Zhou et al. 2012).

Η μέθοδος ανάλυσης ορθογώνιων μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis – OPLS-DA), ανήκει στις επιβλεπόμενες στατιστικές μεθόδους, είναι δηλαδή απαραίτητος ο *a priori* καθορισμός των ομάδων στις οποίες ανήκουν οι παρατηρήσεις (δείγματα) και βρίσκεται σε στενή σχέση με τη μέθοδο PCA. Ωστόσο, δεν έχει ως στόχο τη ανεύρεση της μέγιστης διακύμανσης μεταξύ των ανεξάρτητων μεταβλητών αλλά προσπαθεί να απεικονίσει προβλεπόμενες και παρατηρούμενες μεταβλητές (predicted and observed variables) σε ένα νέο χώρο. Η OPLS μέθοδος είναι μία τροποποίηση της PLS, η οποία περιλαμβάνει την εφαρμογή ενός Orthogonal Signal Correction (OSC)

φίλτρου. Κατ' αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η βελτιστοποίηση της απόδοσης ενός μοντέλου PLS. Αρχή της μεθόδου είναι ο διαχωρισμός της συστηματικής ποικιλομορφίας στο X σε δύο μέρη, ένα γραμμικά συσχετιζόμενο με το Y και ένα μη συσχετιζόμενο, δηλαδή ορθογώνιο στο Y. Αυτός ο διαχωρισμός των δεδομένων του X πίνακα διευκολύνει την αποκωδικοποίηση και την εφαρμογή του μοντέλου σε νέα δείγματα, αποκλείοντας από τη στατιστική επεξεργασία τα δεδομένα του πίνακα X που είναι ορθογώνια στην απόκριση του πίνακα Y. Η OPLS-DA μέθοδος είναι κατάλληλη για την ταξινόμηση δεδομένων τα οποία χαρακτηρίζονται από υψηλά συσχετιζόμενες μεταβλητές, οι οποίες προσδίδουν «θόρυβο» στη στατιστική διαδικασία (Gromski et al. 2015).

4.1.1.2 Φυτομεταβολομική στο γένος *Helichrysum*

Σύμφωνα με βιβλιογραφική έρευνα η εφαρμογή της μεταβολομικής σε είδη του γένους *Helichrysum* για τον εντοπισμό δευτερογενών, μη πτητικών μεταβολιτών έχει διεξαχθεί κυρίως με την τεχνική NMR και σε λιγότερο βαθμό με την τεχνική LC-MS. Οι κυριότεροι, γενικοί λόγοι για αυτήν την επιλογή της τεχνικής NMR έχουν να κάνουν με τον μικρότερο χρόνο ετοιμασίας δείγματος, τον μικρότερο χρόνο ανάλυσης ανά δείγμα, τις μικρότερες δαπάνες αναλωσίμων και ενέργειας που επιτρέπουν αποτελεσματικά μεγαλύτερο αριθμό ανάλυσης δειγμάτων (high-throughput analysis) καθώς και το γεγονός ότι αποτελεί μια μη καταστροφική μέθοδο ανάλυσης. Παραδείγματα μεταβολομικής έρευνας έχουν διεξαχθεί στα είδη *H. populifolium* DC. (Heino Martin Heyman 2015), *H. mimetes* S.Moore (S.E. Yazdi 2019) και *H. aureonitens* Sch. Bip. (Garland Kgosi More 2022) για τον εντοπισμό μεταβολιτών με anti-HIV και anti-RVFX δράση, αντίστοιχα. Επίσης, στο είδος *H. italicum* για την μελέτη της εποχικής διακύμανσης δευτερογενών μεταβολιτών (Monica Scognamiglio 2015) καθώς και σε δείγματα του ίδιου είδους για την επισήμανση ποσοτικών διαφορών στις συγκεντρώσεις βιοδραστικών μεταβολιτών (Antonietta Cerulli 2021). Η τεχνική LC-MS έχει εφαρμοστεί στην περίπτωση του *H. italicum* για τον χαρακτηρισμό και την ποιοτική σύγκριση εκχυλισμάτων του με διαφορετικά φυτικά είδη (L. Mattoli 2006) και προσφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα ως προς τον πιο λεπτομερή χαρακτηρισμό του μεταβολομικού αποτυπώματος και ως προς το γεγονός ότι στα φάσματα NMR παρουσιάζονται σημαντικές αλληλεπικαλύψεις σημάτων που δυσχεραίνουν την επεξεργασία των δεδομένων. Αξίζει να σημειωθεί ότι δεν έχουν αναφερθεί μελέτες μεταβολομικής με NMR ή LC-MS στο είδος *H. amorginum*.



Εικόνα 4.1: Παραδείγματα ανώριμης ταξιανθίας *H. amorginum* γονότυπων Μαρτίου (αριστερά) και ώριμης ταξιανθίας γονότυπων Ιουνίου (δεξιά). Παρατηρείται η απουσία ανεπτυγμένων ανθιδίων στους γονότυπους Μαρτίου (προσωπικές φωτογραφίες) (φωτογράφηση: Ι. Σαμανίδης)

4.1.1.3 Γενικά βιοσυνθετικά μονοπάτια κύριων κατηγοριών φυσικών προϊόντων του *Helichrysum sp.*

Φλαβονοειδή και παράγωγα

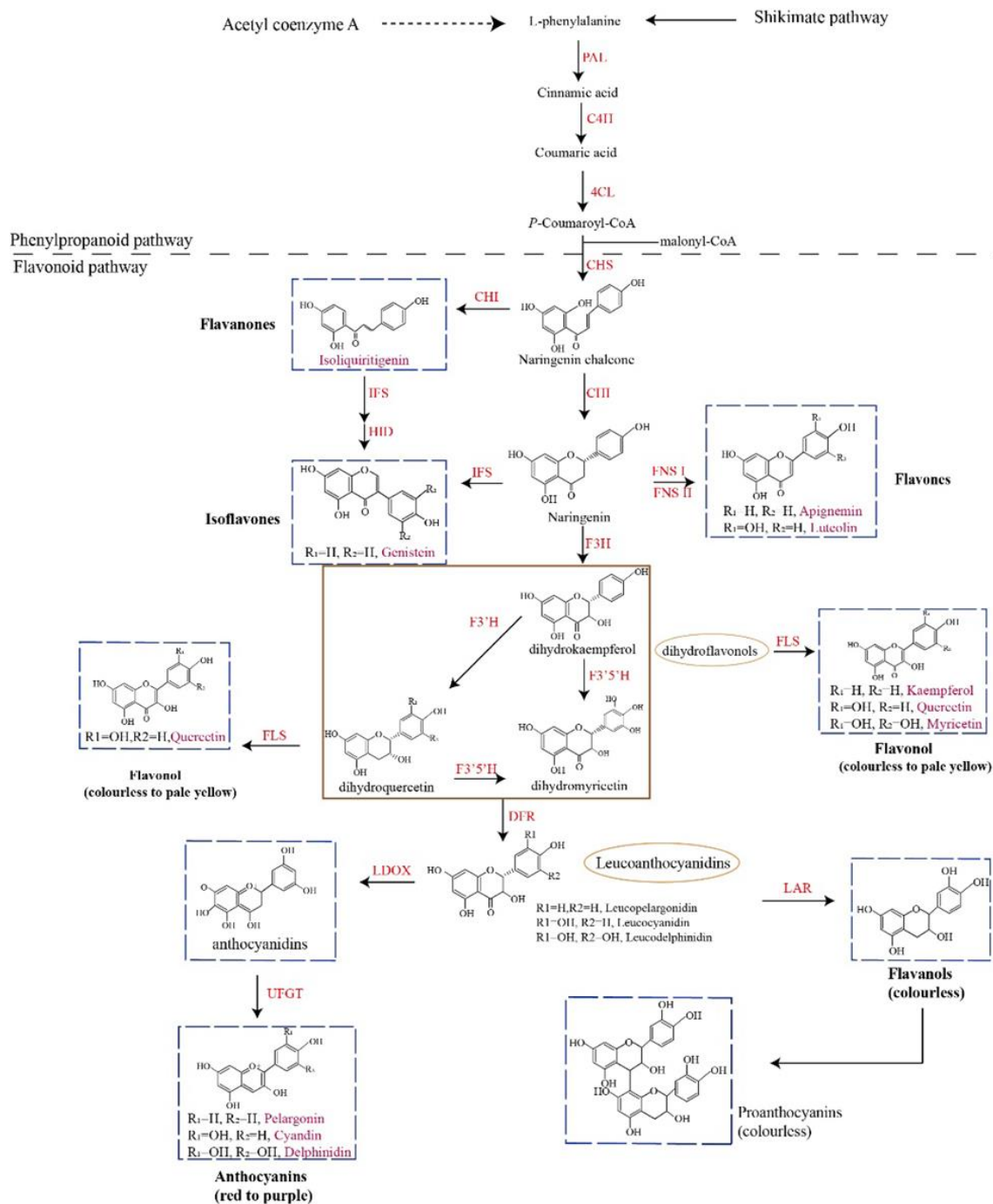
Σύμφωνα με το βιοσυνθετικό μονοπάτι φαινυλοπροπανοειδών (Εικόνα 4.2) (Shen et al. 2022), η βιοσύνθεση των φλαβονοειδών ξεκινάει με την ένωση των βιοσυνθετικών μονοπατιών του σικιμικού οξέως και του ακετυλο συνενζύμου Α προς τον σχηματισμό της L-φαινυλαλανίνης και του p-κουμαροϋλο συνενζύμου Α. Με την προσθήκη του μαλονυλο συνενζύμου Α που προάγει την C2 προέκταση της δομής του υποστρώματος p-κουμαρούλο συνενζύμου Α, παράγονται μέσω της χαλκόνης της ναρινγενίνης και της ναρινγενίνης διάφορες πρωτογενείς άγλυκες δομές φλαβονοειδών, όπως φλαβονονών, φλαβονών και φλαβονολών. Γλυκοζυλίωση άγλυκων φλαβονολών όπως της καεμπερόλης με UGT, UDP-εξαρτώμενες γλουκοζυλοτρασφεράσες (Justine Laoué et al. 2022) οδηγεί στον σχηματισμό γλυκοζυλιωμένων φλαβονολών, ενώ O-μεθυλίωση με μεθυλοτρασφεράσες (Liu et al. 2022) οδηγεί στον σχηματισμό μεθοξυλιωμένων φλαβονολών, όπως της ισοραμεντίνης και της φλαβόνης 5,3',4'-τριυδροξυ-6,7,8-τριμεθοξυφλαβόνης.

Οι φλαβονόλες βιοσυντίθενται στο ενδοπλαστικό δίκτυο των φυτικών κυττάρων, γλυκοζυλιώνονται στο κυτταρόπλασμα, όπου γίνονται πιο υδατοδιαλυτές και μεταφερόμενες συσσωρεύονται κυρίως στα κενοσώματα διαφόρων τύπων κυττάρων, όπως επιδερμικά, υποεπιδερμικά και προστατευτικά κύτταρα στομάτων, στα οποία πιθανολογείται ότι μειώνουν με την αντιοξειδωτική τους δράση τα υψηλά επίπεδα υπεροξειδίου του υδρογόνου.

O-μεθυλιωμένα παράγωγα φλαβονολών συσσωρεύονται, επίσης, στους εξωτερικούς ιστούς φύλλων (επιδερμίδα και εξωτερικές δομές αποθήκευσης), όπου βελτιστοποιούν τον ρόλο τους ως προστατευτικά έναντι υπεριώδους ακτινοβολίας και ως προς την παγίδευση ελεύθερων ριζών ROS (Justine Laoué et al. 2022). Επιπρόσθετα, η O-μεθυλίωση των φλαβονοειδών εξυπηρετεί βιοχημικές

διεργασίες που έχουν να κάνουν με την βιοσύνθεση φυτοαλεξινών για την προστασία του φυτικού υποκειμένου από φυτοπαθογόνες μολύνσεις και με αλληλοπαθητικές επιδράσεις, όπως στην περίπτωση της ισοραμνετίνης (Liu et al. 2022) που βιοσυνθετικά προέρχεται από το πρόδρομο μόριο της κερσετίνης με την μεθυλίωση της 3' υδροξυ ομάδας καταλυόμενη από την 3'-Ο-μεθυλοτρανσφεράση (Liu et al. 2022).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. Μελέτη μεταβολικού προφίλ εκχυλισμάτων από *ex situ* καλλιεργημένους γονότυπους *H. amorginum*



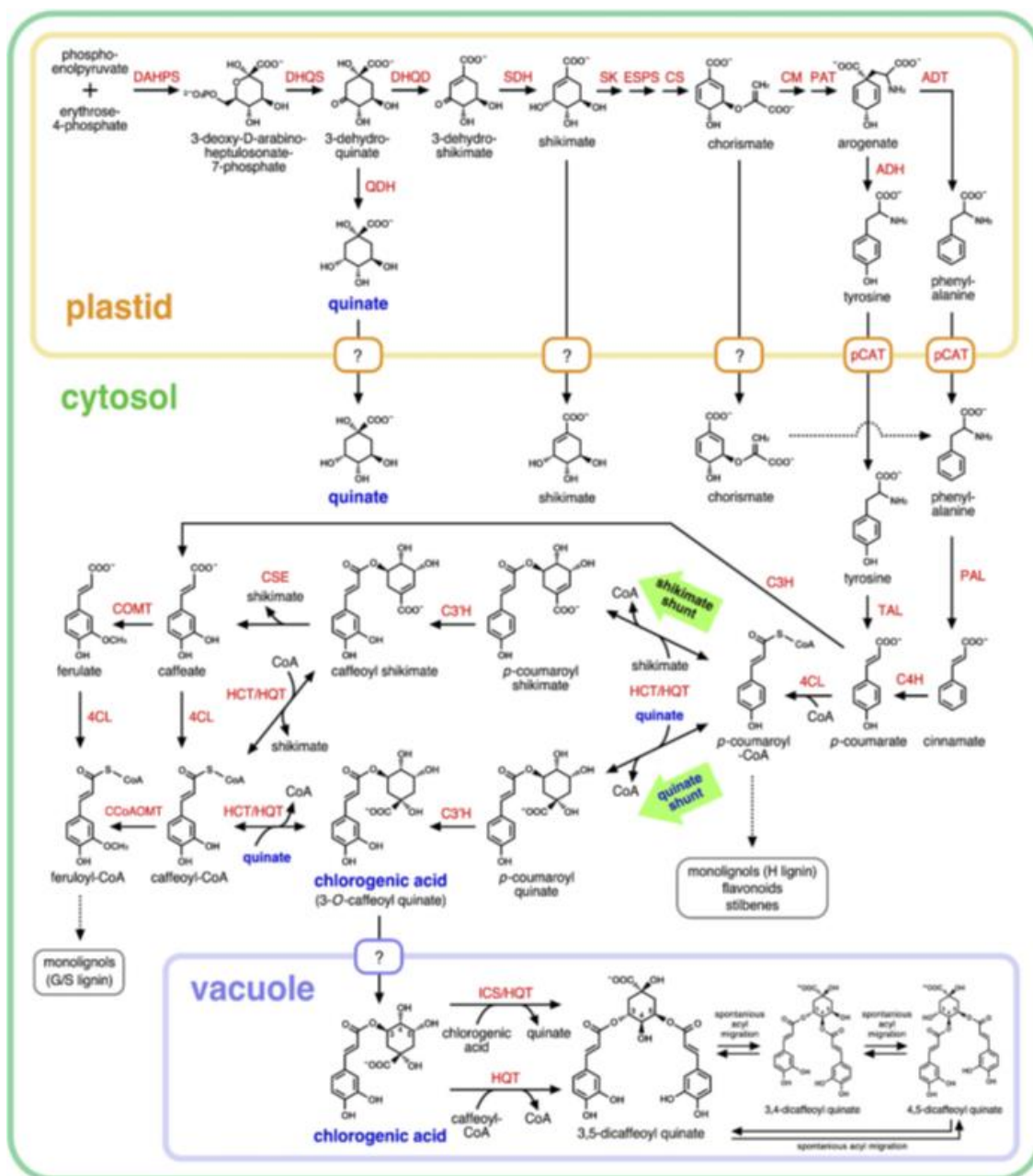
Εικόνα 4.2: Γενικό σχεδιάγραμμα *de novo* βιοσύνθεσης φλαβονοειδών στους φυτικούς οργανισμούς (Shen et al. 2022)

Οξέα και παράγωγα

Καφεοϋλο κινικο οξέα και παράγωγα

Η βιοσύνθεση των καφεοϋλο κινικο οξέων και παραγώγων (Εικόνα 4.3) ξεκινάει από το βιοσυνθετικό μονοπάτι του σικιμικού οξέως στα πλαστίδια προς παραγωγή του κινικού ιόντος και των τυροσίνης και φαινυλαλανίνης, τα οποία μεταφέρονται στο κυτταρόπλασμα. Εκεί μέσω του βιοσυνθετικού μονοπατιού των φαινυλοπροπανοειδών μετατρέπονται μέσω των τρασφερασών HQT/HCT και κυρίως μέσω της υποδιακλάδωσης του κινικού ιόντος από την HQT, στο 3-Ο-καφεοϋλο-κινικο ανιόν (ανιόν χλωρογενικού οξέως). Το ανιόν χλωρογενικού οξέως μεταφέρεται στα κενοσώματα για μακροχρόνια χρήση, όπου με την καταλυτική δράση της τρασφεράσης HQT μετατρέπεται στα 3,4-, 3,5-, 4,5-δικαφεοϋλο παράγωγα. Η σύνθεση δικαφεοϋλο παραγώγων σε άλλους φυτικούς οργανισμούς όπως στο *Ipomoea batatas* μπορεί να πραγματοποιηθεί και από άλλα ένζυμα, όπως στην περίπτωση της isochlorogenic acid (3,5-diCQA) συνθάσης (IbICS) που καταλύει την σύνθεση του 3,5- δικαφεοϋλο παραγώγου (Alcázar Magaña et al. 2021).

Τα καφεοϋλο κινικο οξέα στους φυτικούς οργανισμούς έχουν αμυντικό ρόλο σε βιοτικούς και αβιοτικούς στρεσογόνους παράγοντες και η συγκέντρωσή τους εξαρτάται από το οντογενετικό στάδιο του φυτού, γενετικούς παράγοντες, την γεωγραφική προέλευση (Alcázar Magaña et al. 2021). Παράδειγμα αποτελεί η βιοσύνθεσή του χλωρογενικού οξέως (3-Ο-καφεοϋλο κινικο οξύ) στους καρπούς του *Vaccinium myrtillus* St.-Lag. που η συγκέντρωσή του ενισχύεται κατά την διάρκεια μεγαλύτερης φωτοπεριόδου (>12 h) (Uleberg et al. 2012). Επιπρόσθετα, για τα καφεοϋλο κινικο οξέα έχει προταθεί ότι η βιοσύνθεσή τους εξυπηρετεί την αποθήκευση μονομερών λιγνίνης (Alcázar Magaña et al. 2021).



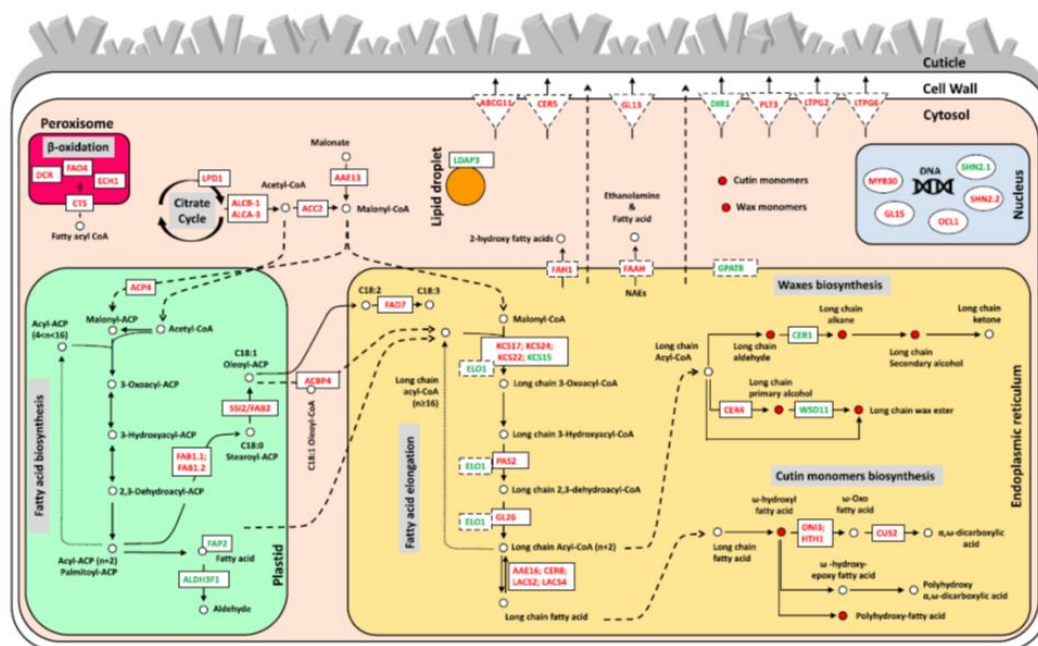
Εικόνα 4.3: Γενικό σχεδιάγραμμα *de novo* βιοσύνθεσης καφεοϋλο-κινικό οξέων και παραγώγων στους φυτικούς οργανισμούς (Alcázar Magaña et al. 2021)

Λιπαρά οξέα και παράγωγα

Η βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων στα φυτά λαμβάνει χώρα στα πλαστίδια και προέρχεται από το ακετυλο συνένζυμο Α με την καταλυτική δράση της πλαστιδικής πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης, με κύριο προϊόν το παλμιτικό οξύ. Άλλες αλλαγές όπως επιμήκυνση, αποκορεσμός, υδροξυλίωση και εποξείδωση συμβαίνουν κυρίως στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Για τον σχηματισμό λιπαρών οξέων

απαιτούνται δύο ενζυμικά συστήματα: η ακετυλ CoA καρβοξυλάση (ACCase) και συνθετάση λιπαρού οξέος, ένα πολυενζυμικό σύμπλοκο που υπάρχει στους χλωροπλάστες (AID 2020).

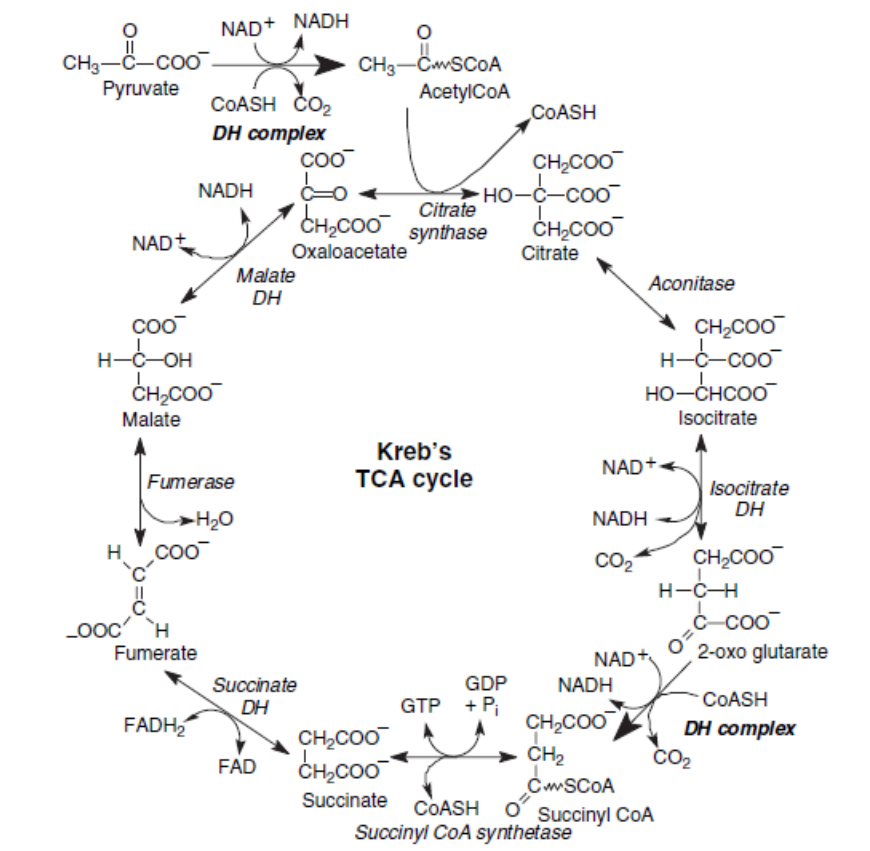
Τα C16 και C18 υδροξυ-λιπαρά οξέα συμμετέχουν μέσω διασταυρωμένων εστερικών δεσμών ανάμεσα στις τερματικές καρβοξυλο ομάδες και τις εσωτερικές υδροξυ ομάδες των ανθρακικών αλυσίδων προς τον σχηματισμό της κουτίνης (cutin), το οποίο είναι ένα πολυμερές που συναντάται στα επιφανειακά επιδερμικά λιπίδια (cuticular lipids) των επίγειων φυτικών οργανισμών (Εικόνα 4.4) (Browse 1995). Τα επιφανειακά επιδερμικά λιπίδια, που βιοσυνσυνθετούνται στην επιδερμίδα (cuticle), προσφέρουν την απαραίτητη εξωτερικά αδιαβροχοποίηση των φυτικών ιστών, εμποδίζουν την εσωτερική απώλεια υγρασίας και προσφέρουν προστασία έναντι παθογόνων και περιβαλλοντικών στρεσογόνων παραγόντων.



Εικόνα 4.4: Γενικό σχεδιάγραμμα *de novo* βιοσύνθεσης λιπαρών οξέων και παραγώγων στα φυτά (Castorina et al. 2020)

Κινικο οξύ

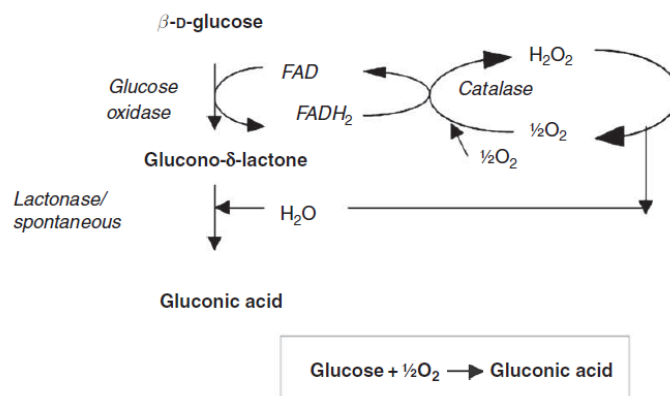
Το κινικο οξύ σχηματίζεται στο βιοσυνθετικό μονοπάτι του σικιμικού οξέως το οποίο αποτελείται από επτά διαδοχικά ενζυματικά στάδια και ξεκινάει με μια συμπύκνωση τύπου αλδόλης δύο φωσφορυλιωμένων ενώσεων, το φωσφοενολοπυρουβικό οξύ (PEP) από το μονοπάτι της γλυκόλυσης και τον υδατάνθρακα 4-φωσφορική-D-ερυθρόζη από τον κύκλο της φωσφορικής πεντόζης, για να προκύψει το 3-δεοξυ-D-αραβινο-7-φωσφορικό επτουλοζονικό οξύ (DAHP). Σε δεύτερο στάδιο απώλεια ενός



Εικόνα 4.6: Γενικό σχεδιάγραμμα *de novo* βιοσύνθεσης του μαλικού οξέως (I. Goldberg & J. S. Rokem 2009)

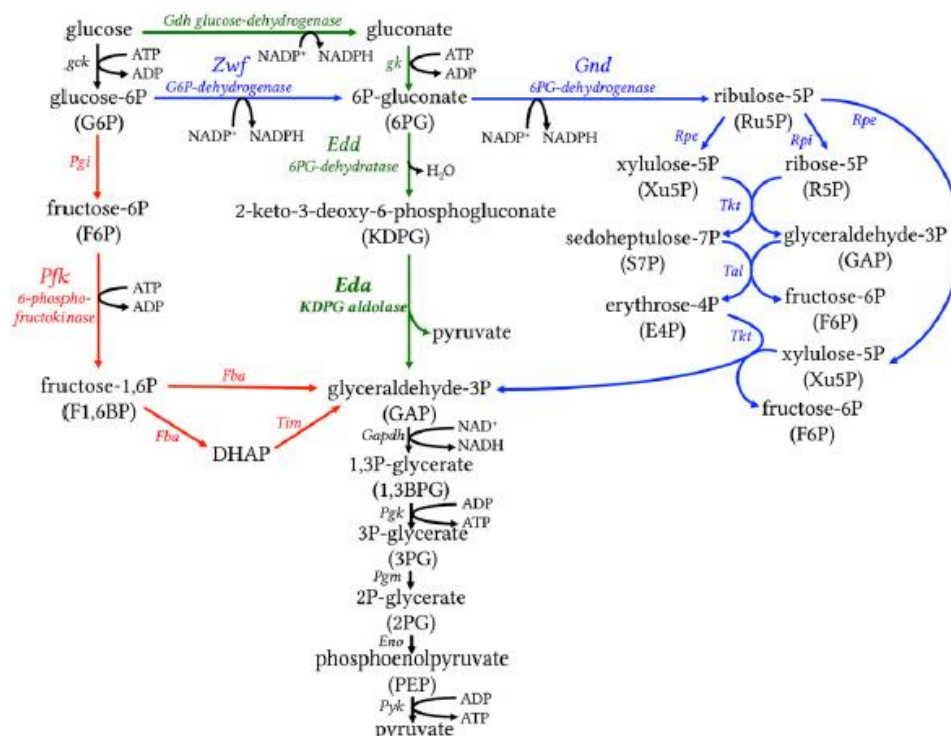
Γλουκονικό οξύ

Το D-γλουκονικό (ή γλυκονικό) οξύ, που ανήκει στην κατηγορία των αλδονικών οξέων, σχηματίζεται στους μικροοργανισμούς και στα φυτά από οξειδάσες, όπως η οξειδάση της γλυκόζης, που περιέχουν το οξειδοαναγωγικό συνένζυμο φλαβίνης (Packter 1985). Ο σχηματισμός γίνεται έξω από την κυτταροπλάσματική μεμβράνη από την οξειδάση της γλυκόζης που, τουλάχιστον σε μύκητες οι οποίοι συσσωρεύουν γλουκονικό οξύ, εντοπίζεται στο κυτταρικό τοίχωμα. Η γλυκόζη (D-γλυκοκυρανόζη) οξειδώνεται σε 2 στάδια πρώτα σε D-γλυκονο-1,5-λακτόνη με σχηματισμό υπεροξειδίου του υδρογόνου το οποίο με δράση της καταλάσης μετατρέπεται σε οξυγόνο και νερό. Σε δεύτερο στάδιο με δράση της λακτονάσης ή αυθόρμητη υδρόλυση σχηματίζεται το γλουκονικό οξύ (Εικόνα 4.7) (I. Goldberg & J. S. Rokem 2009).



Εικόνα 4.7: Γενικό σχεδιάγραμμα *de novo* βιοσύνθεσης του γλουκονικού οξέως (I. Goldberg & J. S. Rokem 2009)

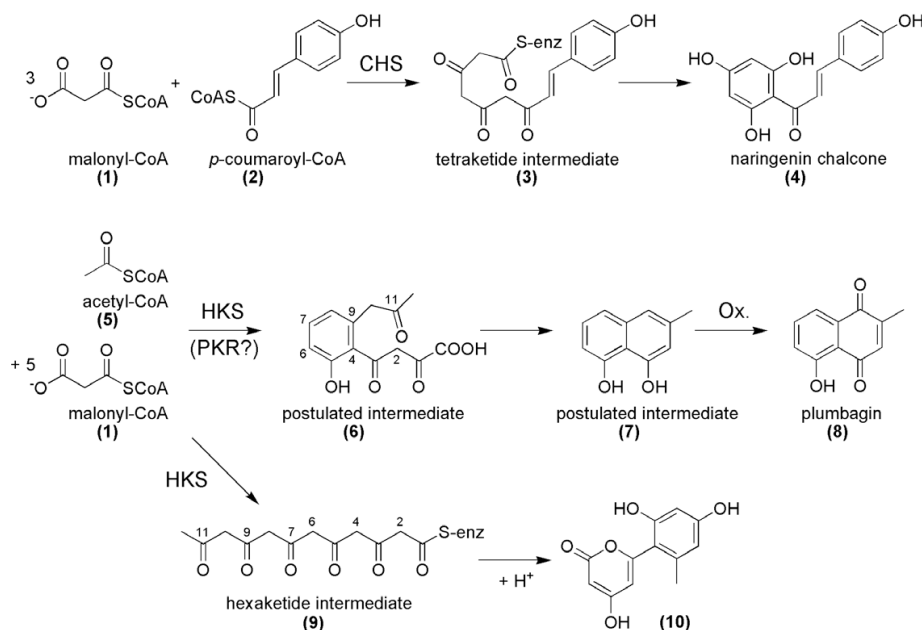
Ένας από τους κύριους φυσιολογικούς ρόλους του γλουκονικού οξέως είναι ότι αποτελεί ένα ενδιάμεσο μόριο του καταβολισμού της γλυκόζης κατά την φωτοσυνθετική διαδικασία προς την παραγωγή ATP, NAD(P)H και βιοσυνθετικών πρόδρομων μορίων για τον σχηματισμό αμινοξέων, νουκλεοτιδίων και λιπαρών οξέων. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα η οξείδωση της γλυκόζης πραγματοποιείται μέσω των βιοσυνθετικών μονοπατιών Embden–Meyerhof–Parnas (EMP) pathway (γλυκόλυση) και Oxidative pentose phosphate (OPP). Επιπρόσθετα, σε κυανοβακτήρια και ανώτερα φυτά έχει αποδειχθεί η μετατροπή της γλυκόζης σε γλουκονικό οξύ μέσω του βιοσυνθετικού μονοπατιού Entner–Doudoroff (ED) με την καταλυτική δράση του ενζύμου KDPG αλδολάση στο φυτό *Hordeum vulgare* L. (Εικόνα 4.8) (Xi Chena et al., 2016).



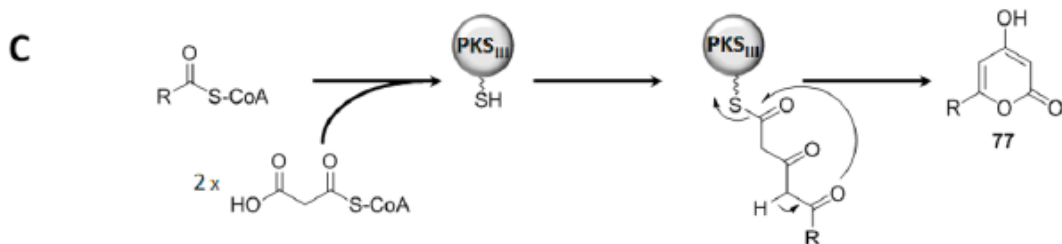
Εικόνα 4.8: Γενικό σχεδιάγραμμα *de novo* βιοσύνθεσης γλουκονικού οξέως. Μπλε διακλάδωση: OPP μονοπάτι, Κόκκινη διακλάδωση: EMP μονοπάτι, Πράσινη διακλάδωση: ED μονοπάτι (Xi Chena et al., 2016)

Πυρόνες-φλορογλουσινόλες και παράγωγα

Η αποσαφήνιση όπως βιοσύνθεσης των πυρονών όπως α-, γ- πυρόνες παρέμενε άγνωστη για χρόνια και σήμερα είναι ευρέως πιο αποδεκτό ότι οι περισσότερες α-πυρόνες βιοσυντίθενται μέσω του βιοσυνθετικού μονοπατιού των πολυκετιδίων και συγκεκριμένα μέσω των ενζυμικών συστημάτων συνθασών πολυκετιδίων (PKS) I, II, III. Πολλά από τα παράγωγα α-πυρόνης, που έχουν περισσότερο μελετηθεί ως δευτερογενείς μεταβολίτες από μύκητες και βακτήρια, αποδίδονται βιοσυνθετικά στα συστήματα PKS (polyketide synthase systems) με το σύστημα PKS III να έχει ανακαλυφθεί πρώτα σε φυτά (Εικόνα 4.10) (Schäberle 2016). Παράδειγμα βιοσύνθεσης παραγώγου α-πυρόνης με το σύστημα PKS III αποτελεί το διμερές 6-(2',4'-dihydroxy-6'-methylphenyl)-4-hydroxy-2-pyrone (10) από το φυτό *Drosophyllum lusitanicum* (L.) Link (Εικόνα 4.9) (Jindaprasert et al. 2008). Ο σχηματισμός της α-πυρόνης (10) βιοκαταλύεται από την συνθάση εξακετιδίου (HKS) με την σύμπτυξη 5 μορίων μαλονυλο-CoA μέσω Claisen αντιδράσεων και αποκαρβοξυλίωσης και C2 επιμήκυνσης με 1 μόριο ακετυλο-CoA, όπου υπό όξινες συνθήκες πραγματοποιείται κυκλοποίηση (σχηματισμός βενζολικού δακτυλίου) και λακτονοποίηση (σχηματισμός δακτυλίου πυρόνης) του ενδιάμεσου εξακετιδίου (9).

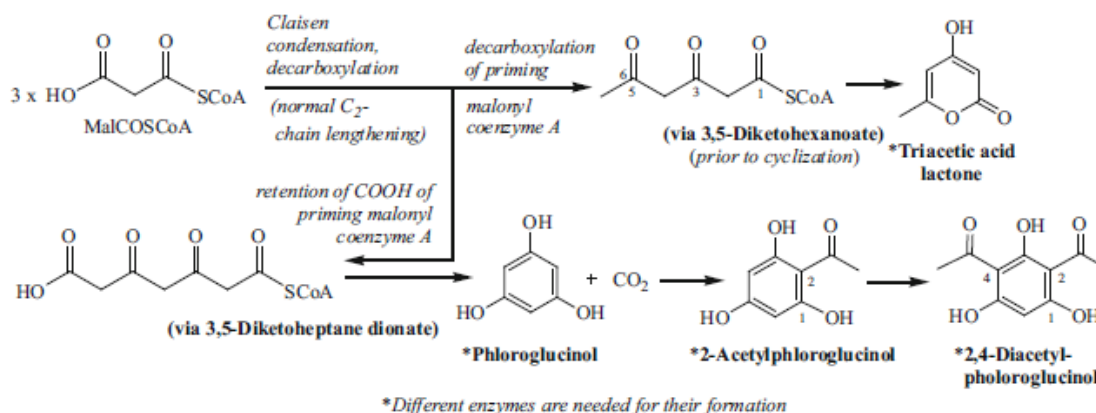


Εικόνα 4.9: Γενικό σχεδιάγραμμα *de novo* βιοσύνθεσης α -πυρόνης 6-(2',4'-dihydroxy-6'-methylphenyl)-4-hydroxy-2-pyrone στο φυτό *Drosophyllum lusitanicum* μέσω του βιοσυνθετικού μονοπατιού των πολυκετιδίων (Jindaprasert et al. 2008)

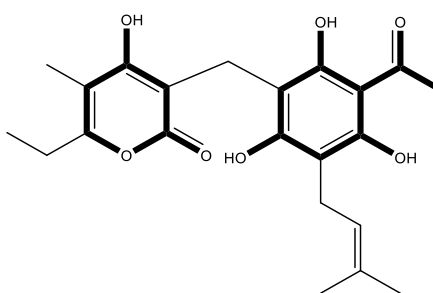


Εικόνα 4.10: Γενικό σχεδιάγραμμα *de novo* βιοσύνθεσης υποκατεστημένης α -πυρόνης από το σύστημα PKS III (Schäberle 2016)

Ομοίως, η βιοσύνθεση των φλορογλουσινολών ακολουθεί το βιοσυνθετικό μονοπάτι των πολυκετιδίων κατά το οποίο 3 μόρια μαλονυλο CoA συμπυκνώνονται προς σχηματισμό του ενδιάμεσου 3,5-diketoheptane dionate (πρόδρομο μόριο για τον σχηματισμό του δακτυλίου φλορογλουσινόλης). Επιπρόσθετες ενζυμικές αντιδράσεις μπορούν να οδηγήσουν στο σχηματισμό παραγώγων φλορογλουσινόλης, όπως το 2-ακετυλο παράγωγο της φλορογλουσινόλης (Εικόνα 4.11) (Talapatra et al. 2015).



Εικόνα 4.11: Γενικό σχεδιάγραμμα *de novo* βιοσύνθεσης φλορογλουσινόλης μέσω του βιοσυνθετικού μονοπατιού των πολυκετιδίων (Talapatra et al. 2015)



Εικόνα 4.12: Δισδιάστατη δομή της αρζανόλης (ετεροδιμερές α-πυρόνης- φλορογλουσινόλης)

Έχει υποτεθεί ότι ο οικολογικός ρόλος των πυρονών στους φυτικούς οργανισμούς (π.χ. *Gerbera* spp.) που βιοσυνθέτει τα παράγωγα gerberin, parasorbosides, αποσκοπεί στην προστασία τους από εχθρούς (έντομα) και ασθένειες (παθογόνους μικροοργανισμούς) (Bisht et al. 2021). Παράλληλα, ο ρόλος των παραγώγων φλορογλουσινόλης, που έχουν απομονωθεί από διάφορα φυτικά είδη όπως είδη του γένους *Hypericum*, παραμένει λιγότερο κατανοητός και υποτίθεται ότι τα παράγωγα αυτά δρουν ως προσελκυστικές ουσίες επικονιαστών ή ως απωθητικές ουσίες φυτοφάγων οργανισμών (Crockett et al. 2016).

4.2 Υλικά και Μέθοδοι

4.2.1 Όργανα-Υλικά

Χρησιμοποιήθηκαν: α) Συσκευή εκχύλισης Ultrasonic bath (Elmasonic S 100 H, 37KHz, 150W), β) Σύστημα υγρής χρωματογραφίας υπερύψηλης απόδοσης συζευγμένης με υβριδικό φασματόμετρο μαζών (Ultra-High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry) με αναλυτή γραμμικής

παγίδας ιόντων (linear ion trap - LTQ) σε σειρά με τροχιακή παγίδα ιόντων (orbital trap-Orbitrap / Fourier Transform Mass Spectrometer) Discovery, Thermo Scientific, γ) Διαλύτες για τα αναλυτικά πειράματα καθαρότητας αναλυτικού βαθμού (Merck). Νερό από συσκευή παραγωγής υπερκαθαρού νερού (Milli-Q®), δ) Αναλυτική στήλη αντίστροφης φάσης UPLC®-Column Acquity BEH C18 (50x1.0 mm; 1.7μm). Τα λογισμικά που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα ακόλουθα: Simca-P 14.1 (Umetrics), Mzmine 2.53, Xcalibur 2.2 (ThermoScientific).

4.2.2 Συλλογή και αρχική επεξεργασία της δρόγης

Το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη αφορά στο υπέργειο μέρος (ταξιανθίες και φυλλώδη στελέχη) 19 γονότυπων *H. amorginum ex situ* καλλιέργειας και προέλευσης από το Ινστιτούτο Γενετικής Βελτίωσης και Φυτογενετικών Πόρων του ΕΛΓΟ «Δήμητρα» (Θεσ/νίκη). Συνολικά, 62 συνολικά δείγματα από όλους τους γονότυπους συλλέχθηκαν τις ημερομηνίες Απρίλιος 2016, Μάρτιος 2019, Ιούνιος 2019, Μάιος 2020. Αναλυτικές πληροφορίες παρουσιάζονται στον Πίνακα Π4.3 του παραρτήματος του Κεφ. 4, σελ. 381.

4.2.3 Ξήρανση και κονιοποίηση της δρόγης

Σε κάθε περίπτωση συλλογής και από την ημερομηνία κοπής τους στον ΕΛΓΟ «Δήμητρα», τα δείγματα των γονότυπων παρελήφθησαν εντός τεσσάρων ημερών ως νωπά κομμένα υπέργεια μέρη τοποθετημένα σε πλαστικές PET συσκευασίες. Στη συνέχεια τα δείγματα ξηράθηκαν υπό σκιά στους $+20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ για επτά ημέρες και κονιοροποιήθηκαν με την χρήση μπλέντερ. Κάθε δείγμα (δρόγη) αποτελούνταν από αναλογία βάρους ταξιανθιών: φυλλωδών στελεχών περίπου 1:1 και μετά την κοπή διατηρήθηκαν στους $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ σε πλαστικές συσκευασίες PET για περαιτέρω επεξεργασία.

4.2.4 Επιλογή πρωτοκόλλου εκχύλισης

Για την εκχύλιση των 62 δειγμάτων γονότυπων ≈ 100 mg δρόγης τοποθετήθηκαν σε Errendorf 5 ml με 4 ml MeOH ποιότητας LC-MS και εκχυλίστηκαν σε λουτρό υπερήχων για 15 min σε θερμοκρασιακό εύρος ($\Theta_{\text{APX.}} = 30^{\circ} - \Theta_{\text{ΤΕΛ.}} 40^{\circ}$). Η εκχύλιση επαναλήφθηκε για άλλα 15 min με ίδια ποσότητα φρέσκου διαλύτη με ακινησία για ~ 24 h σε θερμοκρασία $20-25^{\circ}\text{C}$. Η εκχύλιση επαναλήφθηκε για τρίτη φορά με ίδια ποσότητα φρέσκου διαλύτη στις ίδιες συνθήκες. Όλα τα υγρά εκχυλίσματα συνενώθηκαν, φιλτραρίστηκαν από φίλτρο σύριγγας $0,45 \mu\text{m}$ PTFE και ξηράθηκαν υπό κενό με χρήση περιστρεφόμενου εξατμιστήρα σε λουτρό θερμού νερού ($<40^{\circ}$) και κατόπιν υπό υψηλό κενό. Οι αποδόσεις των 62 ξηρών μεθανολικών εκχυλισμάτων κυμάνθηκαν από min. 7,1 – max. 20,7% β/β με μέσο όρο 14,2% και τυπική απόκλιση ίση με 3,0. Αναλυτικές πληροφορίες των βαρών ξηρής δρόγης και % αποδόσεις ξηρών, μεθανολικών εκχυλισμάτων παρουσιάζονται στον Πίνακα Π4.2 του παραρτήματος του Κεφ. 4, σελ. 378.

4.2.5 Προετοιμασία δειγμάτων για UPLC-HR(ESI-)MS/MSMS

Τα 62 ξηρά μεθανολικά εκχυλίσματα που προέκυψαν από την εκχύλιση ανασυστήθηκαν ανάλογα με το βάρος του εκχυλίσματος, με προσθήκη 2 ή 4 ml MeOH ποιότητας LC-MS για την παρασκευή του stock solution. Από αυτό ελήφθησε με πιπέτα ακριβείας κατάλληλος όγκος υγρού εκχυλίσματος στο οποίο προστέθηκε συγκεκριμένος και μεταβαλλόμενος όγκος νερού, για να δημιουργηθούν τελικά διαλύματα ονομαστικής συγκέντρωσης 300 µg/ml κι όγκου 1000 µl. Παράλληλα, με τα 62 δείγματα των stock solutions των εκχυλίσμάτων προετοιμάστηκε κι ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα (pooled sample), με ανάμειξη 100 µL από κάθε ένα από τα 62 επιμέρους stock solutions, το οποίο ξηράνθηκε υπό κενό κι ανασυστήθηκε με τον ίδιο τρόπο προς την παρασκευή διαλύματος μεθανόλης-νερού ονομαστικής συγκέντρωσης 300 µg/ml κι όγκου 1000 µL. Τέλος, παρασκευάστηκε το δείγμα ποιοτικού ελέγχου (QC sample) με Ρουτίνη σε συγκέντρωση 200 ng/ml.

4.2.6 Μέθοδος Ανάλυσης UPLC-HR(ESI-)MS/MSMS

Η μέθοδος της χρωματογραφικής ανάλυσης είχε ως στόχο τον επαρκή διαχωρισμό των μεταβολιτών και η φασματομετρική μέθοδος τον ιονισμό όσο το δυνατόν περισσότερων μορίων και την καταγραφή τους. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης Α το νερό με προσθήκη φορμικού οξέος ($H_2O+0,1\%FA$) και ως Β το ακετονιτρίλιο (ACN) για την ανάπτυξη αναλυτικής μεθόδου βαθμιδωτής έκλουσης ($t=23\text{min}$). Η έκλουση ξεκίνησε με 5% του Β και σε 2 min έφτασε το 15%. Στα επόμενα 7 min το ποσοστό του Β έφτασε το 42%. Στα 12 min, ο διαλύτης Β έφτασε το 78% και στα 15 min έφτασε το 100%, και διατηρήθηκε για 4 min. Το επόμενο min το σύστημα διαλυτών επέστρεψε στις αρχικές συνθήκες και παρέμεινε σε αυτές για 3 min για την εξισορρόπησης του. Η θερμοκρασία στήλης διατηρήθηκε σταθερή στους 40°C. Ο συνολικός χρόνος ανάλυσης ήταν 23 min με ρυθμό ροής 400 µl/min. Ο όγκος δείγματος που εισαγόταν κάθε φορά στο σύστημα ορίστηκε στα 10 µl και η θερμοκρασία του αυτόματου δειγματολήπτη στους 7°C. Τα φάσματα μάζας ελήφθησαν σε συνθήκες αρνητικού ιονισμού χρησιμοποιώντας πηγή ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI). Η θερμοκρασία τριχοειδούς ορίστηκε στα 350°C, η τάση τριχοειδούς στα -10 V, ο φακός σωλήνα στα -40 V. Η ροή αερίων sheath και auxiliary προσαρμόστηκαν στα 40 and 10 arb, αντιστοίχως. Τα φάσματα μάζας κατέγραψαν ένα εύρος μαζών 113-1000 m/z , με resolving power 30000 στα 500 m/z και ρυθμό σάρωσης 1 microscan/sec. Τα πειράματα HRMS/MS λήφθηκαν με μέθοδο data-depending method με collision energy 35,0% ($q = 0,25$). Το σύστημα καλιμπραρίστηκε ανά 50 ενέσεις με ειδικό διάλυμα βαθμονόμησης.

Τα αποτελέσματα χρησιμοποιήθηκαν στην συνέχεια για τις ανάγκες της μεταβολομικής μελέτης (Ενότητα 4.3.4) αλλά και για την απόδοση χημικής δομής στους εντοπισμένους 97 μεταβολίτες (Ενότητα 4.3.2), (Παράρτημα Κεφ. 4, Πίνακας Π4.4, σελ. 382).

4.2.7 Στατιστική προεργασία και χημειομετρία

Στην μεταβολομική ανάλυση με βάση την τεχνική LC-MS κρίσιμο στάδιο αποτελεί η προεργασία των δεδομένων. Τα δεδομένα που προέκυψαν από τις αναλύσεις των 62 δειγμάτων με υγρή χρωματογραφία υπερύψηλης απόδοσης, συζευγμένη με φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας με αναλυτή τροχιακής παγίδας (Orbitrap) καταγράφηκαν με το λογισμικό Xcalibur 2.2. Raw files (.raw, Thermo) και επεξεργάστηκαν με την βοήθεια του λογισμικού MZmine 2.53 ώστε να διευκολυνθεί η περαιτέρω μελέτη.

Πραγματοποιήθηκαν αρκετές δοκιμές προεργασίας των δειγμάτων. Μέσω εναλλαγών στις διαδικασίες της κατασκευής χρωματογραφήματος (chromatogram builder), της αποσυνέλιξης (deconvolution), της αποϊσοτόπισης (deisotoping), της κανονικοποίησης χρόνου ανάσχεσης (Rt normalization), της ευθυγράμμισης (join aligner), της πλήρωσης των κενών (gap filling) και της γραμμικής κανονικοποίησης (linear normalizer) προέκυψαν μοντέλα εκ των οποίων επιλέχθηκε το πιο ικανοποιητικό. Στον Πίνακα 4.2 αναγράφονται οι παράμετροι που μεταβλήθηκαν κατά την προεργασία αντιστοίχως.

Πίνακας 4.1: Πίνακας ρυθμιζόμενων παραμέτρων κατά την προεργασία των δεδομένων με το λογισμικό MZmine 2.53

MZmine 2.53	
1.Mass Detection	
RT	0-18min
Noise Level	9.0E4
2.Chromatogram Builder	
Time span	0.03
3.Chromatogram deconvolution	
Algorithm	Baseline cut-off
Peak duration	0.03-0.5min
4.Isotopic peaks grouper	
m/z tolerance	0.01-5ppm
RT tolerance	0.05min
5.Alignment	
Algorithm	Join aligner
6.Filtering: Feature lists row filter	
Min peaks per row	2
7.Gap Filling	
Intensity tolerance	20%

Τα παραπάνω δεδομένα εξήχθησαν ως αρχείο .csv για την εισαγωγή τους στο SIMCA 14.1 (Umetrics, Sweden). Κυρίως, η ανάλυση κύριας συνιστώσας (PCA) και η ορθογώνια μερική ανάλυση ελάχιστων τετραγώνων-διάκρισης (OPLS-DA) εφαρμόστηκαν για τη διάκριση δειγμάτων και τον προσδιορισμό στατιστικά σημαντικών μεταβολιτών που είναι υπεύθυνοι για τις παρατηρούμενες τάσεις

και ταξινομήσεις. Για το σκοπό αυτό, εκτιμήθηκαν και αξιολογήθηκαν οι τιμές Variable Importance in Projection (VIP) των μοντέλων OPLS-DA που κατατάσσουν τη μεταβλητή συνεισφορά. Οι βαθμολογίες VIP >1 θεωρήθηκαν ως στατιστικά σημαντικές.

Τα παραγόμενα μοντέλα αξιολογήθηκαν για τις παραμέτρους R² και Q² που υποδεικνύουν το μέτρο της προσαρμογής και την προβλεψιμότητα, αντίστοιχα. Μόνο μοντέλα με τιμές R² κοντά στο 1, τιμές Q² πάνω από 0,5 ή μοντέλα με χαμηλότερη τιμή R² αλλά κοντά στην τιμή Q² έγιναν αποδεκτά. Εφαρμόστηκε επίσης δοκιμή Permutation για περαιτέρω επικύρωση των μοντέλων. Ομοίως, μόνο τα μοντέλα που πέτυχαν στη δοκιμή Permutation χρησιμοποιήθηκαν για την οπτικοποίηση δεδομένων και τους υπολογισμούς των VIP.

4.2.8 Μεθοδολογία ταυτοποίησης μεταβολιτών

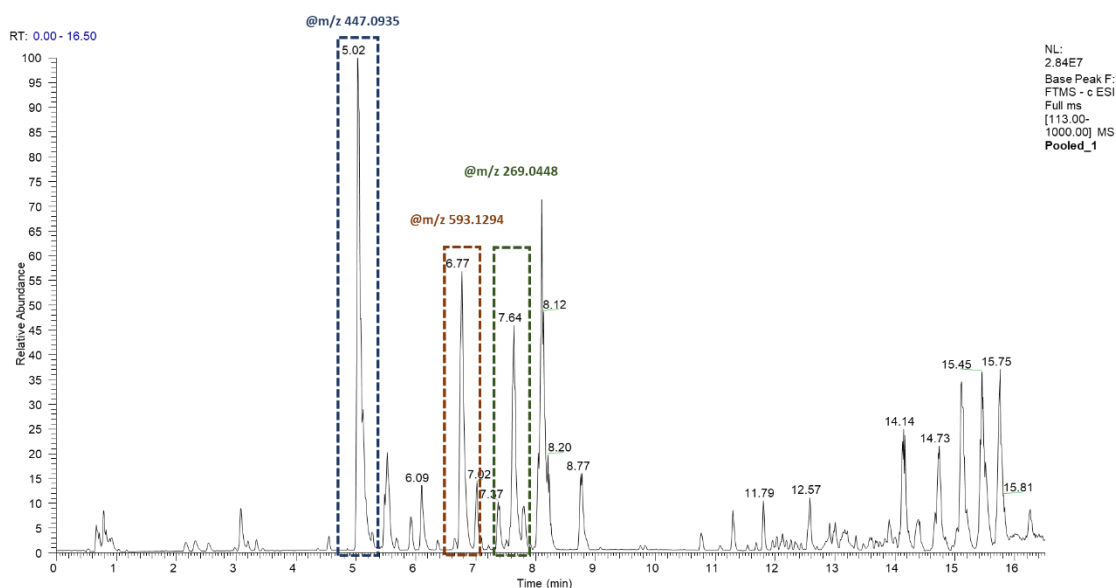
Με βάση τους υπολογισμούς VIP δημιουργήθηκε ένας κατάλογος με σημαντικά χαρακτηριστικά για κάθε σύνολο δεδομένων και υποβλήθηκε σε διαδικασία ταυτοποίησης. Αρχικά, διερευνήθηκαν τα χρωματογραφήματα LC-HRMS και τα αντίστοιχα φάσματα HRMS (< 2 ppm). Η προτεινόμενη στοιχειακή σύνθεση (EC) κάθε ανιχνευόμενης κορυφής μαζί με ισοτοπικά μοτίβα και τιμές ισοδύναμου διπλού δεσμού δακτυλίου (RDBeq) χρησιμοποιήθηκαν περαιτέρω για την επιβεβαίωση των προτεινόμενων δομών. Επιπλέον, τα φάσματα HRMS/MS συνέβαλαν στον εντοπισμό συγκεκριμένων χημικών οντοτήτων με βάση τις εσωτερικές βάσεις δεδομένων. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν διαδικτυακές βάσεις δεδομένων για πρόσθετες δομικές πληροφορίες (Scopus, Google Scholar).

4.3 Συζήτηση αποτελεσμάτων

4.3.1 Παράμετροι επικύρωσης μεθόδου ανάλυσης UPLC-HR(ESI-)MS.

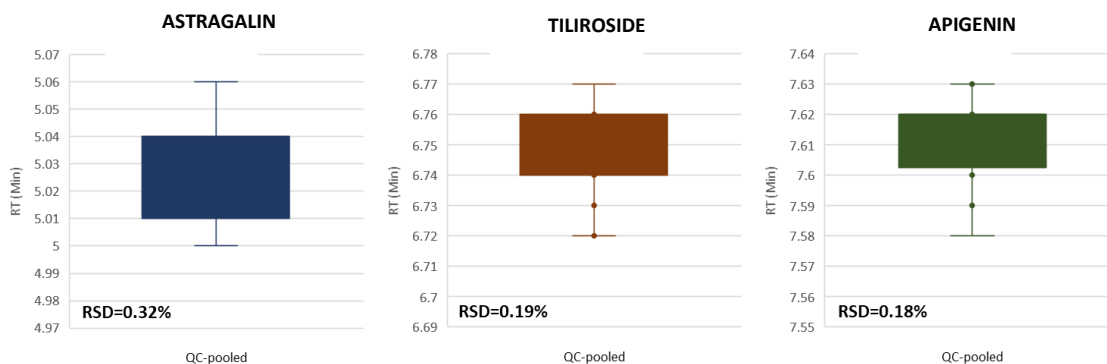
Το δείγμα QC-pooled (Ενότητα 4.2.5) εγχύθηκε και μετρήθηκε κάθε 50 ενέσεις για να αξιολογηθεί η επαναληψιμότητα της ανάλυσης. Οι παράμετροι του χρόνου ανάσχεσης (R_t), η ακρίβεια μάζας και το εμβαδό κορυφής (peak area) αξιολογήθηκαν σε κάθε έγχυση QC. Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκαν τρεις κορυφές που είχαν διαφορετικό R_t που καλύπτει όσο το δυνατόν τον χρόνο της ένεσης και διαφορετικό εύρος μάζας για να καλύψει όσο το δυνατόν το εύρος μάζας σάρωσης.

Επιλέχθηκαν τα astragalin (m/z : 447,0935, R_t =5,02), tiliroside (m/z : 593,1294, R_t =6,77) και arigenin (m/z : 269,0448, R_t =7,64) που ικανοποιούσαν τα παραπάνω κριτήρια. Στην εικόνα 4.13 απεικονίζονται οι συγκεκριμένες κορυφές σε ένα δείγμα QC-pooled.



Εικόνα 4.13: UPLC-HRMS χρωματογράφημα βασικών ιόντων του QC-pooled δείγματος σε αρνητικό ιονισμό. Οι σχολιασμένες κορυφές αντιπροσωπεύουν τις επιλεγμένες ενώσεις που χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της επαναληψιμότητας της ανάλυσης. Astragalin @ m/z 447,0935, tiliroside @ m/z 593,1294, arigenin @ m/z 269.0448

Αρχικά, το % RSD του χρόνου ανάσχεσης (R_t) πρέπει να είναι μικρότερο του 1% ενώ το % RSD του εμβαδού κορυφής (peak area) πρέπει να είναι μικρότερο του 10%. Ακόμη, η ακρίβεια μάζας θα πρέπει να είναι μικρότερη από 5 ppm. Τα astragalin, tiliroside, arigenin εξετάσθηκαν ως προς τα κριτήρια αυτά. Η εικόνα 4.14 απεικονίζει το % RSD του χρόνου ανάσχεσης (R_t) για τους επιλεγμένους μεταβολίτες. Η ίδια διαδικασία εφαρμόσθηκε και για την παράμετρο του εμβαδού κορυφής (peak area).



Εικόνα 4.14: Ενδεικτικό RSD (%) του χρόνου ανάσχεσης (Rt) των astragalin, tiliroside, apigenin σε 20 QC-pooled δείγματα

Όπως φαίνεται στην εικόνα 4.14, το % RSD του χρόνου ανάσχεσης (Rt) είναι 0,32% για το astragalin, 0,19% για το tiliroside και 0,18% για το apigenin. Οι ίδιες εκτιμήσεις πραγματοποιήθηκαν για την παράμετρο του εμβαδού κορυφής (peak area). Εν συντομία, οι υπολογισμοί έδειξαν RSD = 8,9% για το astragalin, RSD = 9,46% για το tiliroside και RSD = 8,79% για το apigenin. Η ακρίβεια μάζας ήταν για όλους του μεταβολίτες <2 ppm. Η μέθοδος αξιολογήθηκε ως ακριβής και επαναλαμβανόμενη για την ανάλυση δειγμάτων. Επιπλέον, οι ενέσεις και οι επαναλήψεις κάθε δείγματος τυχαιοποιήθηκαν, για να επιτευχθεί πιο αξιόπιστη αξιολόγηση των ενέσεων QC-pooled.

4.3.2 Ταυτοποίηση δευτερογενών μεταβολιτών του QC-pooled δείγματος (Dereplication protocols)

Στο παράρτημα του Κεφ. 4, στον Πίνακα Π4.4 (σελ. 382) παρουσιάζονται 97 γνωστοί κι άγνωστοι μεταβολίτες που εντοπίστηκαν στο συνενωμένο δείγμα (QC pooled 1) που προέκυψε από τα 62 δείγματα των stock solutions των μεθανολικών εκχυλισμάτων, όπως περιγράφεται στην ενότητα 4.2.5. Ο Πίνακας Π4.4 χρησιμοποιήθηκε επικουρικά για την ταυτοποίηση των στατιστικά σημαντικών μεταβλητών (VIP > 1) που προέκυψαν από το μοντέλο όπως περιγράφεται στην ενότητα 4.3.6.

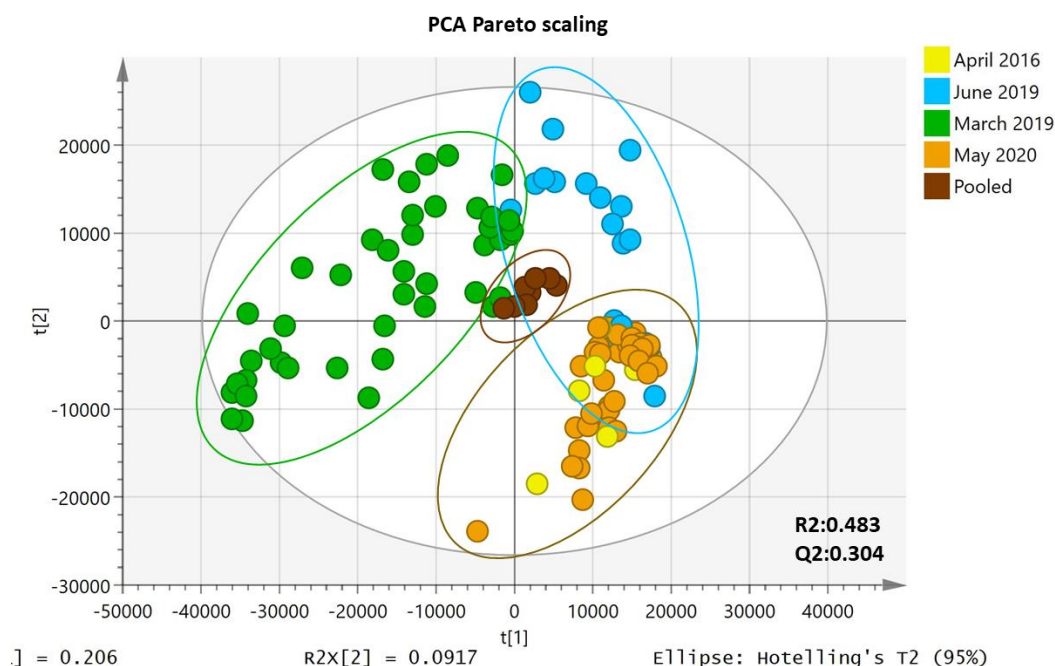
4.3.3 Προεργασία δεδομένων για την δημιουργία μητρικού πίνακα μεταβολιτών

Αποτέλεσμα της προεργασίας των δεδομένων ήταν ο μητρικός πίνακας των δεδομένων στον οποίο βασίστηκε η πολυπαραμετρική ανάλυση. Στον πίνακα αυτόν, τις παρατηρήσεις (observations) αποτελούσαν τα 62 εκχυλίσματα, τις μεταβλητές (variables) αποτελούσαν οι λόγοι m/z των εντοπισμένων ψευδομοριακών ιόντων $[M-H]^+$ σε συνδυασμό με τους αντίστοιχους χρόνους ανάσχεσης Rt (retention time) και τα φορτία αποτελούνταν από το εμβαδόν κάθε εντοπιζόμενης κορυφής (peak area). Ο μητρικός πίνακας, που αρχικά προέκυψε από την προεργασία των δεδομένων, αποτελούνταν από περίπου 1624 μεταβλητές. Επεμβαίνοντας στην σύστασή του και διαγράφοντας ψευδείς κορυφές λόγω θορύβου, η ύπαρξη των οποίων ήταν αναπόφευκτη και μεταβλητές κορυφών οι οποίες

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. Μελέτη μεταβολικού προφίλ εκχυλισμάτων από *ex situ* καλλιεργημένους γονότυπους *H. amorginum* εντοπίζονταν περισσότερο από μία φορές, προέκυψε ο τελικός πίνακας, ο οποίος αποτελούνταν από 145 μεταβλητές.

4.3.4 Ανάλυση κύριων συνιστωσών (Principal Components Analysis, PCA)

Για την δημιουργία μοντέλου PCA των εξήντα δύο δειγμάτων με βάση τα φάσματα μάζας τους με αναλυτή Orbitrap χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Simca-P 14.1 (Umetrics). Χρησιμοποιώντας τα δεδομένα του μητρικού πίνακα, που προέκυψε από την προεργασία, δημιουργήθηκαν μοντέλα χρησιμοποιώντας την κλίμακα Pareto για την εξαγωγή όσο το δυνατόν πληρέστερης πληροφορίας σχετικά με τους βιοδείκτες του μοντέλου. Στόχος της παραπάνω οπτικοποίησης ήταν ο εντοπισμός των στατιστικά και πιθανώς βιοχημικά σημαντικών μεταβολιτών, όντας πιθανώς υπεύθυνοι για την εποχική παραλλακτικότητα των γονότυπων του *H. amorginum*.



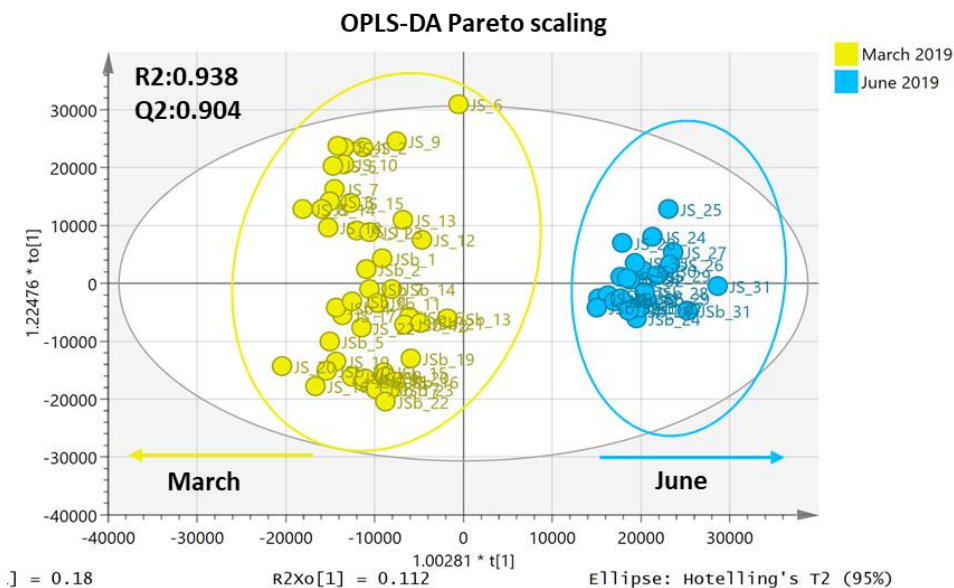
Εικόνα 4.15: Διάγραμμα συντεταγμένων των 62 δειγμάτων *ex situ* καλλιεργούμενων γονοτύπων *Helichrysum amorginum* με κλιμάκωση Pareto. Διακρίνεται η ομαδοποίηση των δειγμάτων ανά μήνα συλλογής: Απρίλιος 2016, Ιούνιος 2019, Μάρτιος 2019, Μάιος 2020 και συγκεντρωμένα δείγματα (Pooled)

Στο διάγραμμα της Εικόνας 4.15 παρατηρείται σαφής διαχωρισμός μεταξύ των τεσσάρων τάξεων ως προς τις δύο κύριες συνιστώσες. Από την θέση που λαμβάνουν οι παρατηρήσεις στο διάγραμμα παρατηρείται ότι τα δείγματα κάθε τάξης συντάσσονται σε συστάδες (clusters). Η δημιουργία συστάδων οφείλεται στην ύπαρξη ομοιοτήτων σε επίπεδο περιεχομένου μεταβλητών για τα δείγματα αυτά, γεγονός που αποτελεί ένδειξη επαναληψιμότητας της αναλυτικής διαδικασίας που προηγήθηκε. Τα δείγματα του Μαΐου 2020, και του Απριλίου 2016 δημιούργησαν μια συστάδα που διαφοροποιείται από

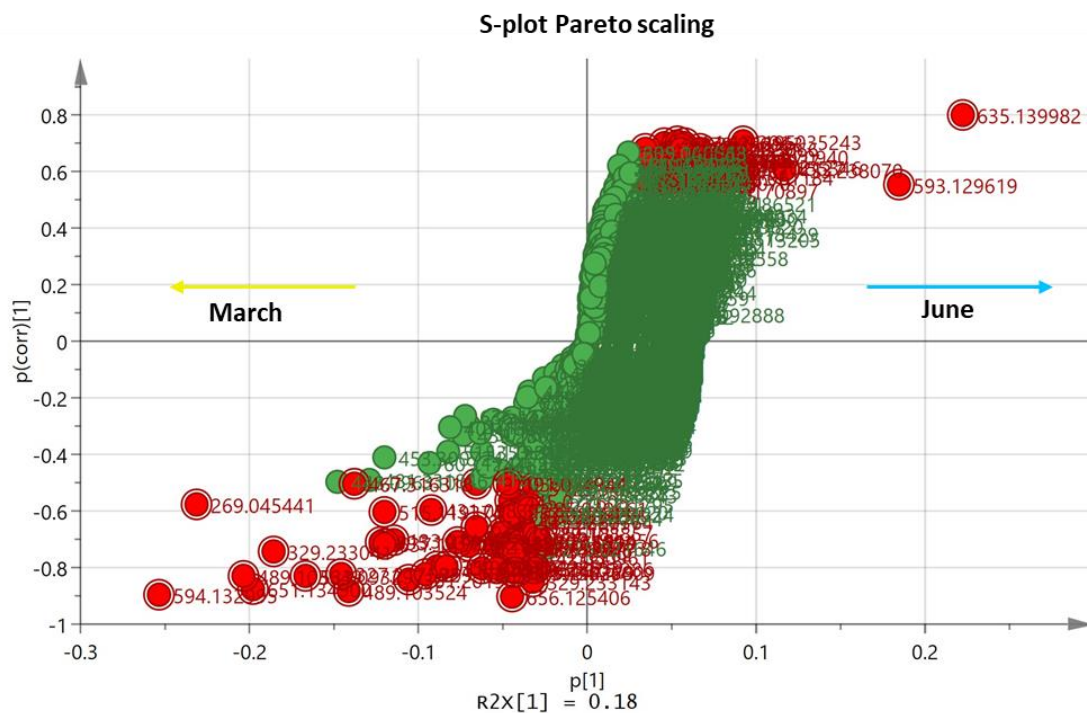
τα δείγματα του Ιουνίου 2019, μερικώς ως προς την δεύτερη κύρια συνιστώσα $t(2)$. Όμως και οι τρεις συστάδες των θερμότερων μηνών ασχέτως της χρονιάς συγκομιδής διαφοροποιούνται ως προς τις δύο κύριες συνιστώσες $t(1)$, $t(2)$ με τα δείγματα του Μαρτίου 2019. Συμπερασματικά, οι γονότυποι του *H. amorginum* δεν διαφοροποιούνται σημαντικά στις διαφορετικές χρονιές εσοδείας, αλλά εμφανίζουν σημαντική τάση διαφοροποίησης ως προς την χημική τους σύσταση μεταξύ των μηνών συλλογής τους. Συνεπώς, για να αναδειχθούν οι μεταβολίτες που επηρεάζουν σημαντικά το στατιστικό μοντέλο και πιθανώς συμβάλουν στην εποχική διαφοροποίηση του φυτοχημικού προφίλ των γονότυπων, εφαρμόστηκε η επιβλεπόμενη μέθοδος OPLS-DA.

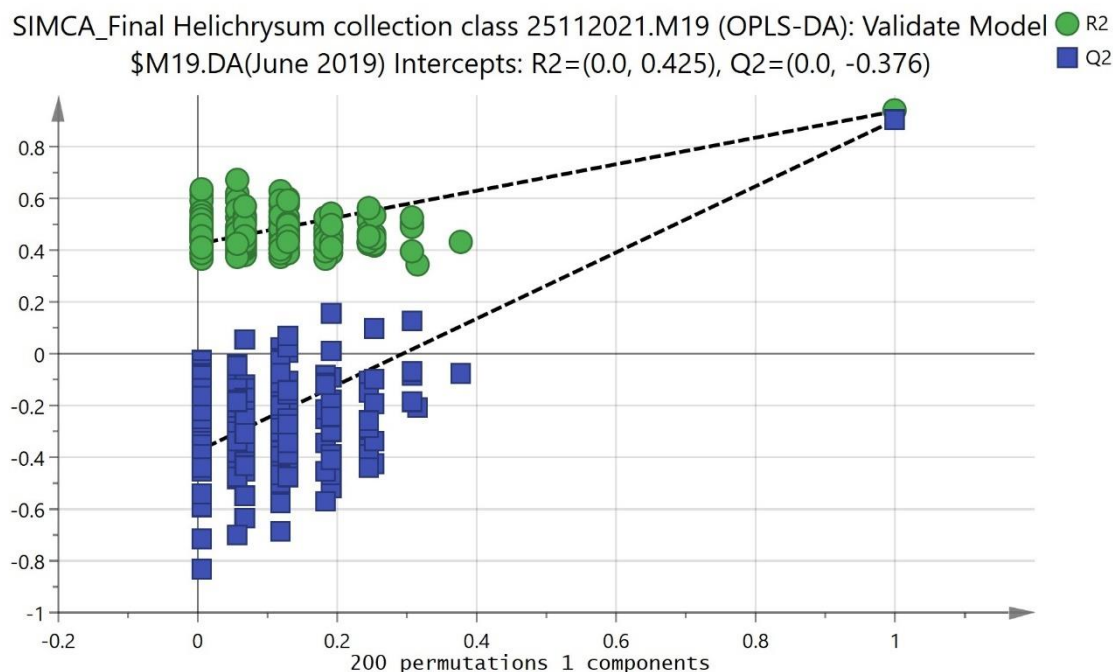
4.3.5 Διακριτική ανάλυση Ορθογωνίων Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis-OPLS-DA).

Στο διάγραμμα OPLS-DA, που απεικονίζεται στην Εικόνα 4.16, οι παράμετροι προσαρμογής (R^2 , Q^2) είναι μεγαλύτερες του 0,5, κοντά στην μονάδα και οι δύο έχουν κοντινές τιμές μεταξύ τους. Τα στοιχεία αυτά μαρτυρούν την καλή προβλεψιμότητα του μοντέλου.



Εικόνα 4.16: Διάγραμμα OPLS-DA σε κλιμάκωση Pareto, των 62 δειγμάτων *ex situ* καλλιεργούμενων γονοτύπων *Helichrysum amorginum*. Οι παρατηρήσεις είναι χρωματισμένες και ομαδοποιημένες ανάλογα με τον μήνα συλλογής, κίτρινο για τον Μάρτιο 2019, γαλάζιο για τον Ιούνιο 2019. Απεικονίζονται επίσης οι παράμετροι προσαρμογής (R^2 , Q^2)

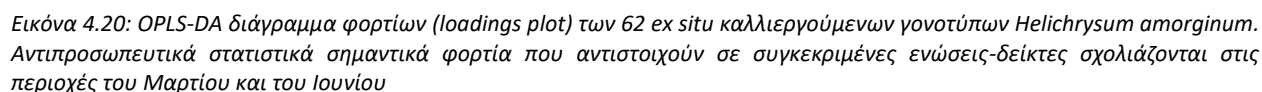


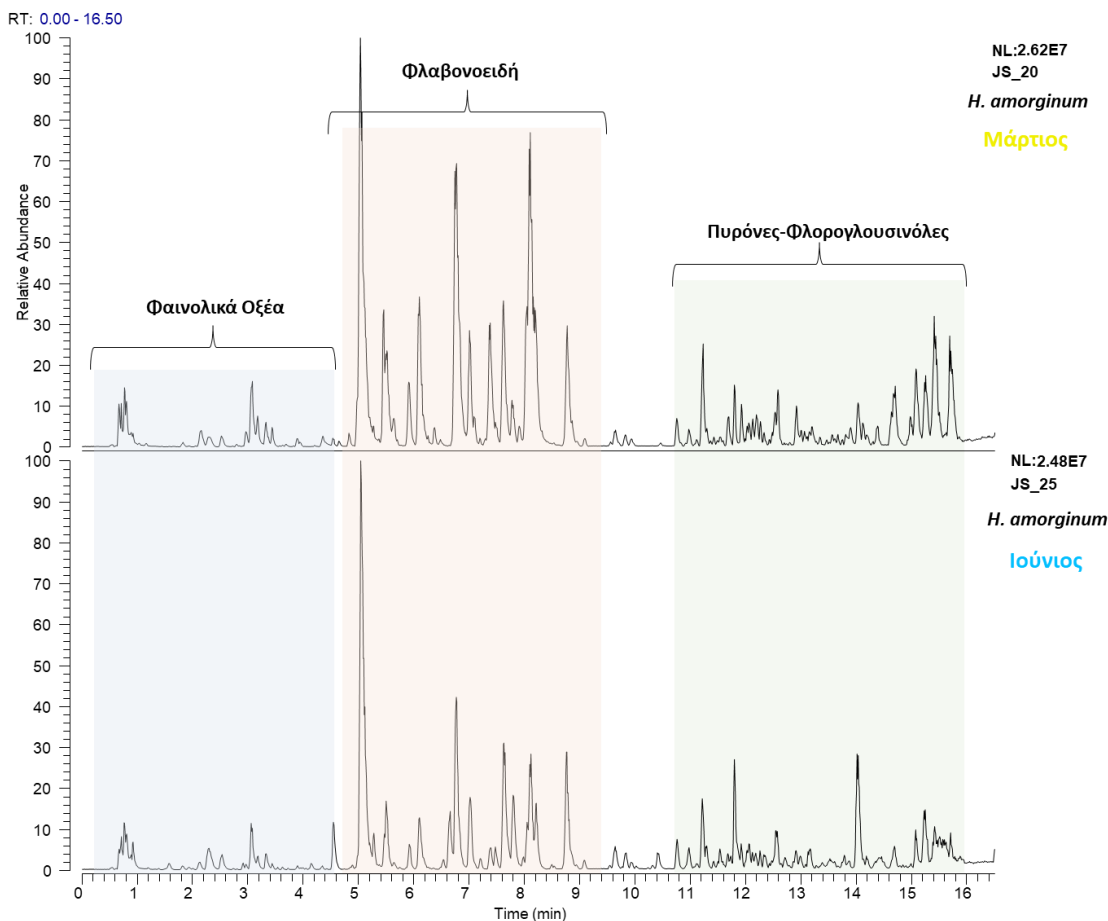


Εικόνα 4.19: Επικύρωση του OPLS-DA scores plot με δοκιμή Permutation, για τον μήνα Ιούνιο

4.3.6 Ταυτοποίηση μεταβολιτών

Συμπληρωματικά με το S-plot (Εικόνα 4.17) του επικυρωμένου OPLS-DA scores plot (Εικόνες 4.18, 4.19), για τους μήνες Μάρτιο, Ιούνιο μελετήθηκε εξονυχιστικά και το διάγραμμα φορτίων (loadings plot Εικόνα 4.20) για την ταυτοποίηση των μορίων-δεικτών που είναι υπεύθυνα για την παρατηρηθείσα ταξινόμηση και συσχετίζονται με την εποχικότητα των γονότυπων *H. amorginum*. Οι τιμές VIP χρησιμοποιήθηκαν για την ιεράρχηση των μεταβλητών που εντοπίστηκαν. Συνολικά 85 μεταβλητές με $VIP > 1$ και $\rho(\text{corr}) > 0,5$ εντοπίσθηκαν στα 62 εκχυλίσματα του *H. amorginum*. Η εξαιρετικά υψηλή ακρίβεια ανάλυσης μάζας του αναλυτή Orbitrap συνέβαλε δραστικά στην ταυτοποίηση των μεταβολιτών με υψηλή αξιοπιστία. Οι στατιστικά σημαντικές ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον πίνακα του παραρτήματος Κεφ. 4, Π4.1, σελ. 375.





Εικόνα 4.21: UPLC-HRMS χρωματογραφήματα βασικών ιόντων δύο τυχαίων εκχυλισμάτων που συλλέχθηκαν τον μήνα Μάρτιο (πάνω) και τον Ιούνιο (κάτω), σε αρνητικό ιονισμό. Οι σχολιασμένες περιοχές αντιπροσωπεύουν τους μεταβολίτες που ανήκουν στα φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή και πυρόνες-φλορογλουσινόλες. Οι οπτικές διαφορές είναι χαρακτηριστικές για όλες τις κατηγορίες

Επιπλέον, όπως φαίνεται από την Εικόνα 4.21, από τα UPLC-HRMS χρωματογραφήματα βασικών ιόντων ανακτήθηκαν πολύ σημαντικές πληροφορίες σχετικά με την ταυτότητα των ενώσεων που εντοπίστηκαν στα διαγράμματα φορτίων. Έτσι, πραγματοποιήθηκε η κύρια κατηγοριοποίηση μεταξύ των κύριων χημικών ομάδων φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή και πυρόνες-φλορογλουσινόλες. Με την βοήθεια των χρωματογραφημάτων εξαγωγής ιόντων (XIC), τον χρόνο ανάσχεσης κάθε κορυφής (Rt), την προτεινόμενη μοριακή φόρμουλα (EC), τον βαθμό ακορεστότητας (RDBeq), την ακρίβεια μάζας <5 ppm και σε συνδυασμό με τα φάσματα δίδυμης φασματομετρίας (MS²), διευκολύνθηκε σημαντικά η διαδικασία ταυτοποίησης των μεταβολιτών.

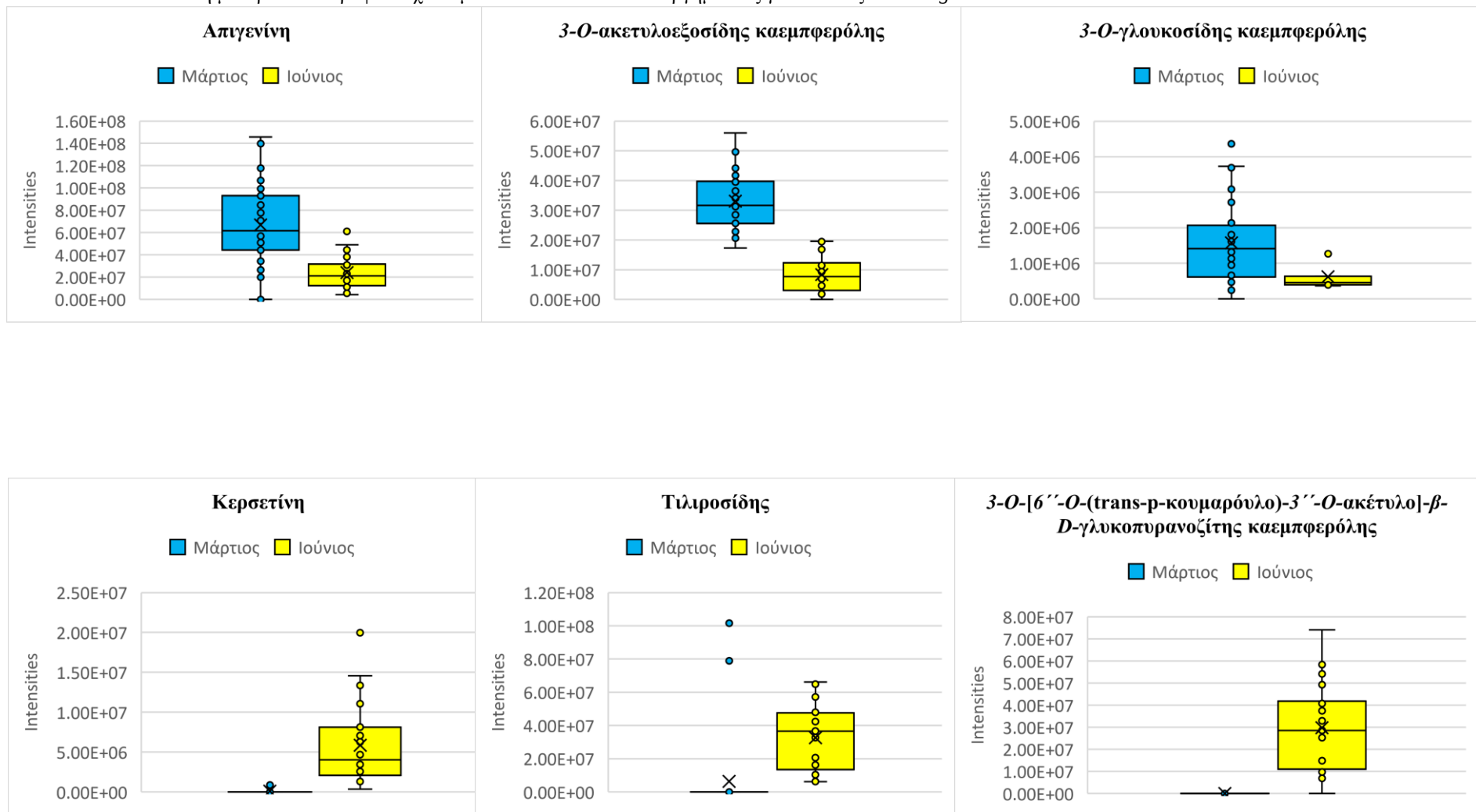
Συγκεκριμένα, στον Πίνακα 4.2 παρουσιάζονται 18 στατιστικά σημαντικοί μεταβολίτες (μεταβλητές) που ανήκουν στην κατηγορία των φλαβονοειδών και παραγώγων τους και συνεισφέρουν ως κατηγορία στην διάκριση του φυτοχημικού προφίλ των γονότυπων του είδους κατά τους μήνες Μάρτιο και Ιούνιο.

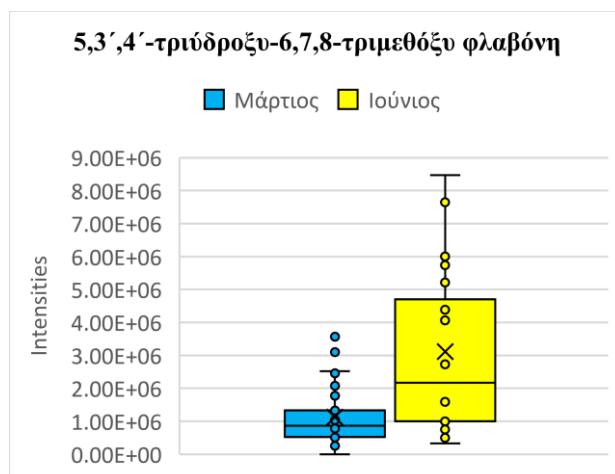
Κατά τον μήνα Μάρτιο, 12 μεταβολίτες (**1-12**) εντοπίστηκαν που ανήκαν στις υποκατηγορίες των **φλαβονολών** (**2-6, 9, 10, 12**) από τους οποίους επτά γλυκοζυλιωμένοι (**2-6, 10, 12**) και ένα άγλυκο (**9**), **φλαβονών** (**1, 7**) από τους οποίους ένας γλυκοζυλιωμένος (**7**) και ένα άγλυκο (**1**) και **φλαβανονών** (**8, 11**) από τους οποίους δύο άγλυκοι (**8, 11**). Οι άγλυκοι μεταβολίτες τον μήνα Μάρτιο αποτελούνται από τέσσερα φλαβονοειδή απιγενίνη (**1**), ναρινγενίνη (**8**), καεμπφερόλη (**9**), εριοδικτυόλη (**11**) και οι οκτώ γλυκοζυλιωμένοι από τον 7-Ο γλυκοζίτη της απιγενίνης (**7**) και επτά γλυκοζυλιωμένα παράγωγα της καεμπφερόλης από τα οποία τρία ισομερή Ο-ακετυλο εξόζης (**2, 5, 10**), τον 3-Ο-γλυκοζίτη (**12**), το παράγωγο 3-Ο-μαλονυλ-εξόζης (**4**), ένα δισακχαρίτη εξόζης (**6**) και ένα παράγωγο 3-Ο-σοφορόζης-7-Ο-γλυκόζης (**3**).

Στη συνέχεια, τον μήνα Ιούνιο, εντοπίστηκαν επτά μεταβολίτες (**12-18**) που ανήκαν στις υποκατηγορίες των **φλαβονολών** (**12-15, 17, 18**) από τους οποίους τέσσερεις γλυκοζυλιωμένοι (**12-14, 18**) και ένα άγλυκο (**17**), **φλαβονών** (**16**) από τα οποία ένα άγλυκο (**16**). Οι άγλυκοι μεταβολίτες τον μήνα Ιούνιο αποτελούνταν από τρία φλαβονοειδή κερσετίνη (**15**), 5,3',4'-τριυδροξυ-6,7,8-τριμεθόξυφλαβόνη (**16**), ισοραμνετίνη (**17**) και οι τέσσερεις γλυκοζυλιωμένοι από τα παράγωγα 3-Ο-[6''-Ο-(trans-p-κουμαροϋλο)-3''-Ο-ακετυλο]-β-d-γλυκοπυρανοζίτη (**13**), 3-Ο-γλυκοζίτη (**12**) της καεμπφερόλης καθώς και τα παράγωγα της καεμπφερόλης τιλιοροζίτης (**14**) με το *cis* ισομερές του τριμπουλοζίτη (**18**).

Συγκρίνοντας τις δύο κατηγορίες μεταβολιτών των δύο μηνών, συμπεραίνεται ότι η βιοσύνθεση των φλαβονοειδών και παραγώγων ξεκινάει πριν την πλήρη άνθιση κατά το στάδιο σχηματισμού των ανώριμων ταξιανθιών τον μήνα Μάρτιο. Και στους δύο μήνες εντοπίζονται κυρίως φλαβονοειδή παράγωγα της καεμπφερόλης (**2, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 12, 13, 14, 18**). Τον μήνα Ιούνιο βιοσυντίθενται διαφορετικού τύπου γλυκοζυλιωμένα φλαβονοειδή της καεμπφερόλης που περιέχουν το p-κουμαρικό οξύ (**13, 14, 18**). Επίσης, τον μήνα Ιούνιο παρατηρούνται τα μεθοξυλιωμένα φλαβονοειδή 5,3',4'-τριυδροξυ-6,7,8-τριμεθοξυφλαβόνη (**16**), ισοραμνετίνη (**17**).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. Μελέτη μεταβολικού προφίλ εκχυλισμάτων από *ex situ* καλλιεργημένους γονότυπους *H. amorginum*





Εικόνα 4.22: Θηκογράμματα των σημαντικών μεταβολιτών φλαβονοειδών και παραγώγων: Απιγενίνη (1), 3-Ο-ακετυλοεξοσίδης καεμπφερόλης (5), 3-Ο-γλυκοζίτης καεμπφερόλης (12), Κερσετίνη (15), Τιλροσίδης (14), 3-Ο-[6''-Ο-(trans-p-κουμαροϋλο)-3''-Ο-ακέτυλο]-6-D-γλυκοκυρανοζίτης καεμπφερόλης (13), 5,3',4'-τριϋδροξυ-6,7,8-τριμεθόξυ φλαβόνη (16) για τους μήνες Μάρτιο και Ιούνιο

Οι μεταβολίτες της κατηγορίας με την μεγαλύτερη συνεισφορά στο μοντέλο ($VIP > 1$) για τον μήνα Μάρτιο ήταν τα φλαβονοειδή (**1-12**), ενώ για τον μήνα Ιούνιο τα φλαβονοειδή (**12-18**). Όπως απεικονίζεται στα θηκογράμματα της Εικόνας 4.22, στατιστικά σημαντικοί δείκτες μπορούν να θεωρηθούν για τον μήνα Μάρτιο οι μεταβολίτες απιγενίνη (**1**), 3-Ο-ακετυλοεξοσίδης καεμπφερόλης (**5**), 3-Ο-γλυκοζίτης καεμπφερόλης (**12**) και για τον μήνα Ιούνιο οι μεταβολίτες κερσετίνη (**15**), τιλιοσίδης (**14**), 3-Ο-[6''-Ο-(trans-p-κουμαροϋλο)-3''-Ο-ακετυλο]-β-D-γλυκοκυρανοζίτης καεμπφερόλης (**13**), 5,3',4'-τριϋδροξυ-6,7,8-τριμεθοξυ φλαβόνη (**16**).

Οι 18 σημαντικοί μεταβολίτες της κατηγορίας, που παρατηρούνται τους δύο μήνες, μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις συστάδες άγλυκων υδροξυλιωμένων (**1, 8, 9, 11, 15**), Ο-γλυκοζυλιωμένων (**2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 12, 13, 14, 18**) και Ο-μεθυλιωμένων (**16, 17**) φλαβονοειδών και παραγώγων.

Κατά συνέπεια, θα μπορούσε να διατυπωθεί ότι τον μήνα Μάρτιο με τον σχηματισμό των ανώριμων ταξιανθιών, η σταδιακή αύξηση της ηλιοφάνειας δίνει το έναυσμα της βιοσύνθεσης κυρίως στατιστικά σημαντικών για την διαφοροποίηση του χημικού προφίλ γονότυπων του *H. amorginum* όπως τα γλυκοζυλιωμένα φλαβονοειδή της καεμπφερόλης, και συνεχίζεται τον μήνα Ιούνιο με βιοσυσσώρευση στατιστικά σημαντικών διαφορετικών παραγώγων καεμπφερόλης καθώς και Ο-μεθυλιωμένων φλαβονοειδών ως γενετικά προκαθορισμένων αποκρίσεων σε εξωγενείς παράγοντες όπως ηλιακή ακτινοβολία και φυτοπαθογόνες προσβολές.

Ο-γλυκοζυλιωμένα παράγωγα της καεμπφερόλης όπως ο 3-Ο-γλυκοζίτης της έχουν εντοπιστεί κυρίως σε συγκεκριμένα όργανα, όπως άνθη του είδους *Malus domestica* (Suckow) Borkh. (Chen et al. 2021). Παρόμοια τάση βιοσυσσώρευσης για το φλαβονοειδές 3-Ο-γλυκοζίτη της καεμπφερόλης παρουσιάστηκε στους γονότυπους του *H. amorginum*.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. Μελέτη μεταβολικού προφίλ εκχυλισμάτων από *ex situ* καλλιεργημένους γονότυπους *H. amorginum*

Πίνακας 4.2: Φασματομετρικά (m/z , EC , RDB_{eq}), χρωματογραφικά (R_t) δεδομένα και VIP τιμές των φλαβονοειδών και παραγώγων που εντοπίστηκαν στα φυτά *Helichrysum amorginum* που συλλέχθηκαν τον Μάρτιο και τον Ιούνιο

No	$R_t(\text{min})$	EC	$[M-H]^-$ m/z	RDB_{eq}	VIP	Μεταβολίτης	Μήνας Συλλογής
1	7,61	$C_{15}H_9O_5$	269,0454	11,5	9,13212	Apigenin	Μάρτιος
2	5,49	$C_{23}H_{21}O_{12}$	489,1036	13,5	7,64495	Kaempferol- <i>O</i> -acetylhexoside isomer 1	Μάρτιος
3	7,36	$C_{32}H_{27}O_{15}$	651,1349	19,5	7,15722	Kaempferol-3- <i>O</i> -sophoroside-7- <i>O</i> -glucoside	Μάρτιος
4	5,49	$C_{24}H_{21}O_{14}$	533,0933	13,5	6,27932	Kaempferol-3- <i>O</i> -malonyl-hexoside	Μάρτιος
5	5,90	$C_{23}H_{21}O_{12}$	489,1035	13,5	5,16943	Kaempferol-3- <i>O</i> -acetylhexoside	Μάρτιος
6	6,08	$C_{30}H_{25}O_{14}$	609,1245	18,5	3,91229	Kaempferol dihexoside	Μάρτιος
7	5,25	$C_{21}H_{19}O_{10}$	431,0983	12,5	3,49908	Apigenin-7- <i>O</i> -glucoside	Μάρτιος
8	7,56	$C_{15}H_{11}O_5$	271,0593	10,5	2,64608	Naringenin	Μάρτιος
9	7,78	$C_{15}H_9O_6$	285,0403	11,5	2,09038	Kaempferol	Μάρτιος
10	6,20	$C_{23}H_{21}O_{12}$	489,1037	13,5	1,60461	Kaempferol- <i>O</i> -acetylhexoside isomer 2	Μάρτιος
11	5,40	$C_{15}H_{11}O_6$	287,0561	10,5	1,43803	Eriodictyol	Μάρτιος
12	5,58	$C_{21}H_{19}O_{11}$	447,0932	12,5	1,07807	Kaempferol-3- <i>O</i> -glucoside	Μάρτιος/Ιούνιος

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. Μελέτη μεταβολικού προφίλ εκχυλισμάτων από *ex situ* καλλιεργημένους γονότυπους *H. amorginum*

13	8,09	C ₃₂ H ₂₇ O ₁₄	635,14	19,5	8,02997	Kaempferol-3-O-[6''-O-(trans-p-coumaroyl)-3''-O-acetyl]- <i>b</i> -D-glucopyranoside	Ιούνιος
14	6,75	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₃	593,1296	18,5	6,80702	Tiliroside	Ιούνιος
15	6,63	C ₁₅ H ₉ O ₇	301,0352	11,5	3,35272	Quercetin	Ιούνιος
16	9,81	C ₁₈ H ₁₅ O ₈	359,0771	11,5	1,79191	5,3',4'-trihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavone	Ιούνιος
17	7,96	C ₁₆ H ₁₁ O ₇	315,0508	11,5	1,75443	Isorhamnetin	Ιούνιος
18	7,00	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₃	593,1297	18,5	1,48572	Tribuloside	Ιούνιος

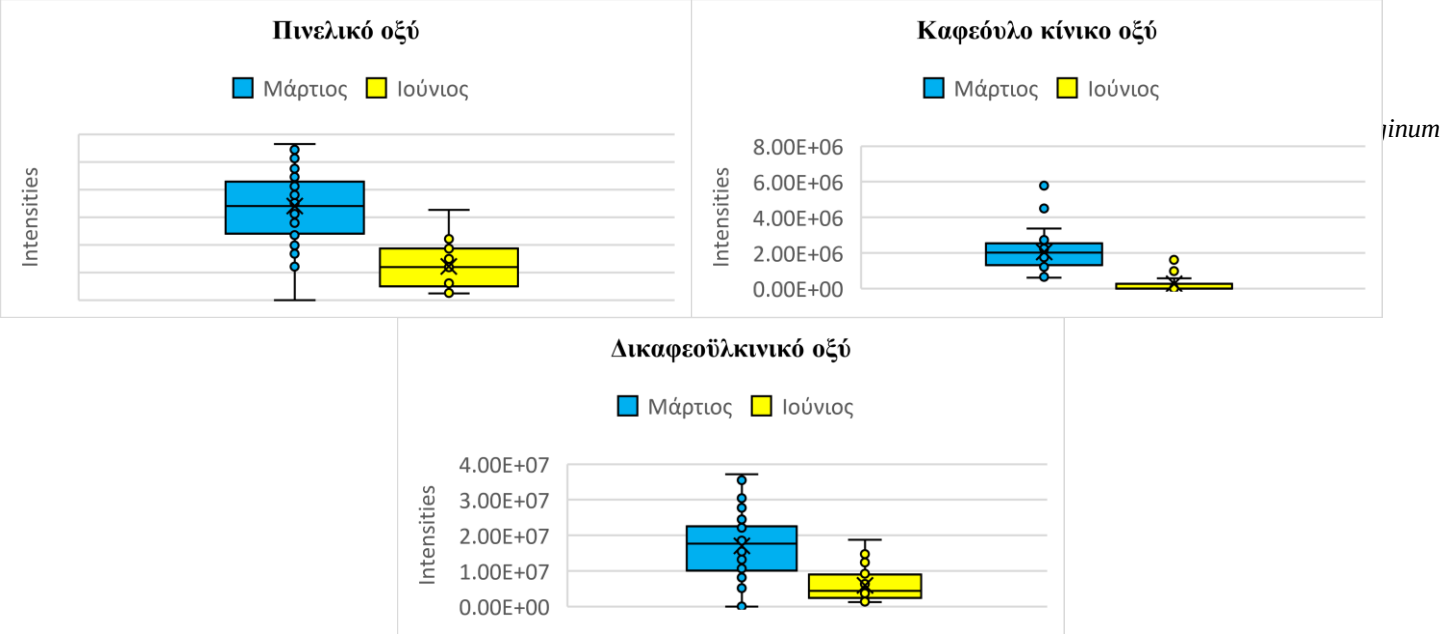
Αντιστοίχως, στον Πίνακα 4.3 παρουσιάζονται 19 στατιστικά σημαντικοί μεταβολίτες (VIP >1) που ανήκουν στην κατηγορία των οξέων και παραγώγων και συνεισφέρουν ως κατηγορία στην διάκριση του φυτοχημικού προφίλ των γονότυπων του είδους κατά τους μήνες Μάρτιο και Ιούνιο.

Συνολικά 14 μεταβολίτες (**19-30, 37, 38**) εντοπίζονται τον μήνα Μάρτιο και ανήκουν στις υποκατηγορίες των **απλών υδροξυ- αλειφατικών οξέων (22, 27, 37, 38), υποκατεστημένων φαινολικών οξέων (24, 30)** από τα οποία ένας γλυκοζίτης (**24**), **καφεοϋλο παράγωγα του κινικο οξέως (21, 25, 29), λιπαρών και υδροξυ- λιπαρών οξέων (19, 20, 23, 26, 28)** εκ των οποίων τρία μονο-υδροξυ λιπαρά οξέα (**23, 26, 28**), 2 τρι-ϋδροξυ λιπαρά οξέα (**19, 20**).

Συνολικά 11 μεταβολίτες (**22, 25, 30-38**) εντοπίστηκαν τον μήνα Ιούνιο και ανήκουν στις υποκατηγορίες των **απλών υδροξυ- αλειφατικών οξέων (22, 37, 38), φαινολικών οξέων (30, 31)** από τα οποία ένας εστέρας γλυκερόλης (**31**), **καφεοϋλο παράγωγα του κινικο οξέως (25, 34, 35)** από τα οποία το (**35**) σχηματίζει το προϊόν προσθήκης με φορμικό οξύ [M-H+HCOOH]⁺, ένα λιπαρό δικαρβοξυλικό οξύ (**33**), ένα δι-υδροξυ λιπαρό οξύ (**32**), και ένα τρι-υδροξυ λιπαρό οξύ (**36**).

Συγκρίνοντας τα είδη των μεταβολιτών μεταξύ των δύο μηνών, συμπεραίνεται ότι η βιοσύνθεση των οξέων και παραγώγων ξεκινάει πριν την πλήρη άνθιση κατά το στάδιο σχηματισμού των ανώριμων ταξιανθιών τον μήνα Μάρτιο. Η πλειονότητα τους αφορούν παράγωγα του καφεοϋλο κινικο οξέως (**21, 25, 29**) και C18- υδροξυ λιπαρών οξέων (**19, 20, 26, 28**). Σύμφωνα με τους κοινούς χρόνους ανάσχεσης Rt και τις μάζες των ψευδομοριακών ιόντων τον μήνα Ιούνιο ήταν κοινά με τον μήνα Μάρτιο τα απλά υδροξυ αλειφατικά οξέα μαλικό οξύ (**22**), 2-ισοπροπυλ-μαλικό οξύ (**37**), γλουκονικό οξύ (**38**) και ένα ισομερές δι- καφεοϋλο κινικο οξέως (**25**) και το υδροξυκιναμικό οξύ καφεϊκό οξύ (**30**).

Όπως απεικονίζεται στα θηκογράμματα της Εικόνας 4.23, στατιστικά σημαντικοί δείκτες που εντοπίστηκαν περισσότερο τον μήνα Μάρτιο σε σχέση με τον μήνα Ιούνιο είναι οι μεταβολίτες πινελικό οξύ (**19**), καφεοϋλο κινικο οξύ (**29**), δικαφεοϋλοκινικο οξύ (**25**).



Εικόνα 4.23: Θηκογράμματα των σημαντικών μεταβολιτών οξέων και παραγώγων όπως πινελικό οξύ (19), καφεοϋλο κινικο οξύ (29), δικαφεοϋλοκινικό οξύ (25) για τους εξεταζόμενους *ex situ* καλλιεργούμενους γονότυπους του *Helichrysum amorginum* κατά τους μήνες Μάρτιο και Ιούνιο

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. Μελέτη μεταβολικού προφίλ εκχυλισμάτων από *ex situ* καλλιεργημένους γονότυπους *H. amorginum*

Πίνακας 4.3: Φασματομετρικά (m/z , EC , $RDBeq$), χρωματογραφικά (Rt) δεδομένα και VIP τιμές των οξέων και παραγώγων όπως εντοπίστηκαν στους εξεταζόμενους *ex situ* καλλιεργούμενους γονότυπους του *Helichrysum amorginum* που συλλέχθηκαν τον Μάρτιο και τον Ιούνιο

No	Rt(min)	EC	M-H] ⁻ m/z	RDB	VIP	Μεταβολίτης	Μήνας
19	8,75	C ₁₈ H ₃₃ O ₅	329,233	2,5	7,07766	Pinellic acid	Μάρτιος
20	8,11	C ₁₈ H ₃₁ O ₅	327,2176	2,5	5,31531	Trihydroxy octadecadienoic acid	Μάρτιος
21	5,45	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₂	515,1194	14,5	4,37098	Dicaffeoylquinic acid 2	Μάρτιος
22	0,80	C ₄ H ₅ O ₅	133,0142	2,5	4,15036	Malic acid	Μάρτιος/Ιούνιος
23	7,07	C ₁₆ H ₂₉ O ₅	301,202	2,5	3,90414	Hydroxy fatty acid	Μάρτιος
24	2,13	C ₁₅ H ₁₉ O ₁₀	359,0982	6,5	3,07337	Syringic acid 4- <i>O</i> - β -D glucopyranoside	Μάρτιος
25	5,06	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₂	515,1192	14,5	3,05022	Dicaffeoylquinic acid 1	Μάρτιος/Ιούνιος
26	12,11	C ₁₈ H ₂₉ O ₃	293,2122	4,5	2,84167	Helenylonic acid	Μάρτιος
27	0,77	C ₇ H ₁₁ O ₆	191,0561	2,5	2,43704	Quinic acid	Μάρτιος
28	12,55	C ₁₈ H ₃₁ O ₃	295,2279	3,5	2,32903	Hydroxy octadecadienoic acid	Μάρτιος
29	3,05	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	353,0875	8,5	2,25698	Caffeoyl quinic acid 2	Μάρτιος
30	3,32	C ₉ H ₇ O ₄	179,0349	6,5	1,97303	Caffeic acid	Μάρτιος/Ιούνιος

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. Μελέτη μεταβολικού προφίλ εκχυλισμάτων από *ex situ* καλλιεργημένους γονότυπους *H. amorginum*

31	3,42	C ₁₂ H ₁₃ O ₆	253,0717	6,5	1,79549	Caffeoyl glycerol	Ιούνιος
32	11,10	C ₁₈ H ₃₁ O ₄	311,2226	3,5	1,79333	Dihydroxy octadecadienoic acid	Ιούνιος
33	11,67	C ₁₈ H ₃₃ O ₄	313,2384	2,5	1,70969	Octadecanedioic acid	Ιούνιος
34	2,30	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	353,0876	8,5	1,58085	Caffeoyl quinic acid 1	Ιούνιος
35	3,07	C ₁₇ H ₁₉ O ₁₁	399,0932	8,5	1,43161	Caffeoyl quinic acid 2 adduct	Ιούνιος
36	9,68	C ₁₈ H ₃₃ O ₅	329,2331	2,5	1,15875	Trihydroxy octadecenoic acid	Ιούνιος
37	2,51	C ₇ H ₁₁ O ₅	175,0612	2,5	1,06196	2-Isopropyl malic acid	Μάρτιος/Ιούνιος
38	0,77	C ₆ H ₁₁ O ₇	195,0508	1,5	2,45501	Gluconic acid	Μάρτιος/Ιούνιος

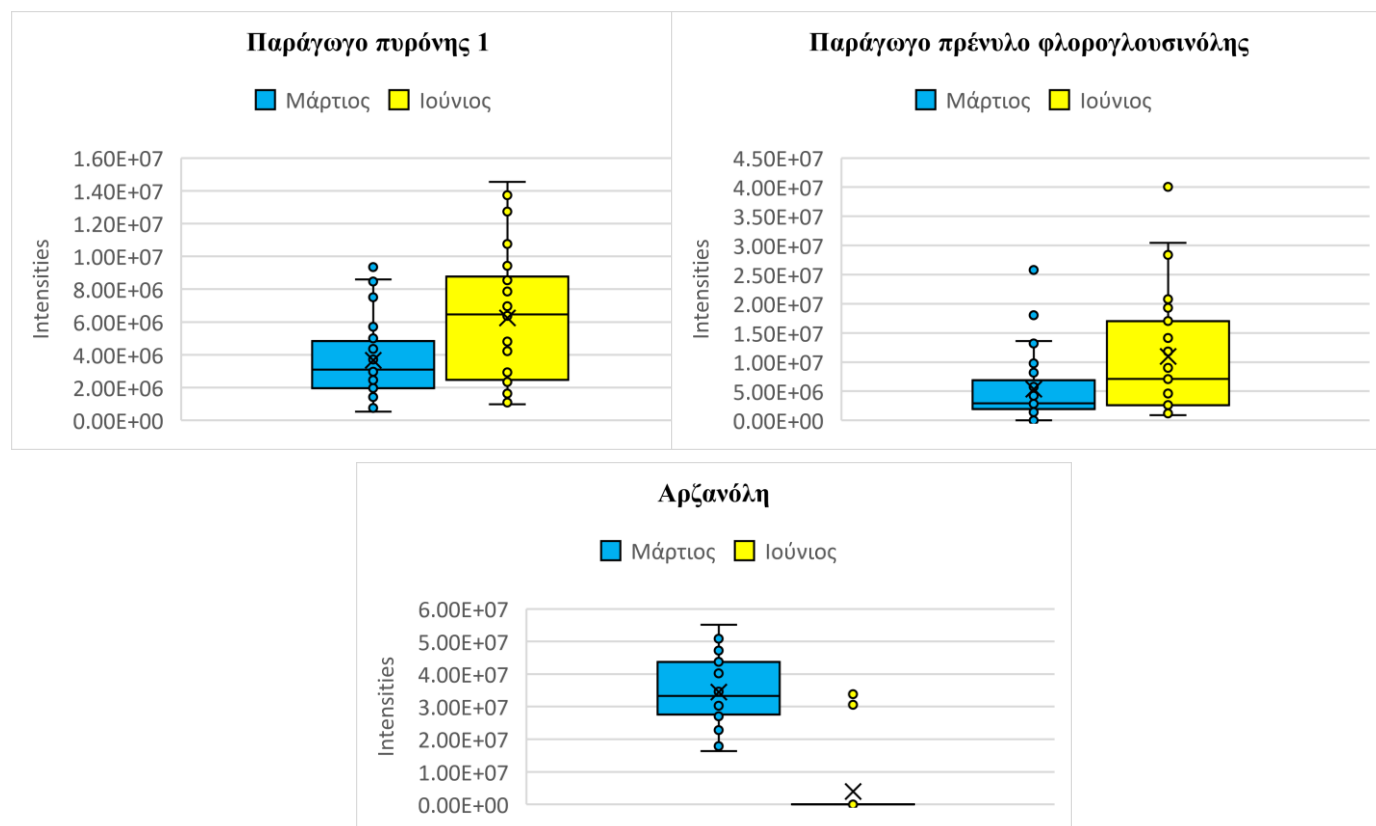
Στον Πίνακα 4.4 παρουσιάζονται 25 στατιστικά σημαντικοί μεταβολίτες (VIP >1) που ανήκουν στην κατηγορία των πυρονών-φλορογλουσινολών και παραγώγων και συνεισφέρουν ως κατηγορία στην διάκριση του φυτοχημικού προφίλ των γονότυπων του είδους κατά τους μήνες Μάρτιο και Ιούνιο.

Συνολικά 15 μεταβολίτες (**39-53**) εντοπίζονται τον μήνα Μάρτιο και ανήκουν στις υποκατηγορίες **ετεροδιμερών πυρόνης-φλορογλουσινόλης (39, 41, 42, 45, 46, 47, 51), μη ταυτοποιημένων παραγώγων πυρόνης**, που αιτιολογούνται από την παρουσία του MS² θραύσματος $m/z = 153$ με μοριακό τύπο C₈H₉O₃ και RDBeq = 4,5 (**40, 43, 44, 48, 49, 50, 52**), **μη ταυτοποιημένων παραγώγων φλορογλουσινόλης (53)** ανάλογο με την δομή του παραγώγου φλορογλουσινόλης 4-[3,5-dihydroxy-4-(2-methyl-1-oxopropyl)phenoxy]-2-methyl-2-butenic acid methyl ester που έχει απομονωθεί από το είδος *H. asperum* (Thunb.) Hilliard & B.L.Burt var. *albidulum* (DC.) Hilliard (Jakupovic et al. 1989).

Συνολικά 16 μεταβολίτες (**39, 42, 43, 45, 47, 54-63**) εντοπίζονται τον μήνα Ιούνιο και ανήκουν στις υποκατηγορίες **ετεροδιμερών πυρόνης-φλορογλουσινόλης (39, 42, 45, 47, 54, 57, 58, 61), μη ταυτοποιημένων παραγώγων πυρόνης**, που αιτιολογούνται από την παρουσία του MS² θραύσματος $m/z = 153$ με μοριακό τύπο C₈H₉O₃ και RDB = 4,5 (**40, 43, 56, 59, 60, 62**), **μη ταυτοποιημένων παραγώγων φλορογλουσινόλης (55) και (63)** ανάλογο με την δομή του παραγώγου φλορογλουσινόλης (E)-4-(3,5-dihydroxy-4-(2-methylbutanoyl)phenoxy)-2-methylbut-2-en-1-yl acetate, που έχει απομονωθεί από το είδος *H. asperum* var. *albidulum* (Jakupovic et al. 1989). Στα μη ταυτοποιημένα παράγωγα φλορογλουσινόλης ο μεταβολίτης (**55**) με ψευδομοριακό ιόν [M-H]⁻ C₁₈H₁₇O₄, RDB = 10,5 εμφανίζει την παρουσία του MS² θραύσματος $m/z = 69$ με μοριακό τύπο C₅H₉ και RDB = 1,5, που αντιστοιχεί στην απομάκρυνση μιας πρενυλο ομάδας. Το παράγωγο 55 είναι ανάλογο με την δομή των παραγώγων φλορογλουσινόλης (2,6-dihydroxy-4-((3-methylbut-2-en-1-yl)oxy)phenyl)(phenyl)methanone και phenyl(2,4,6-trihydroxy-3-(3-methylbut-2-en-1-yl)phenyl)methanone, που έχουν απομονωθεί από τα είδη *H. asperum* var. *albidulum* και *H. asperum*, *H. Candolleanum* H. Buek, αντίστοιχα (Jakupovic et al. 1989).

Συγκρίνοντας τα είδη των μεταβολιτών τους δύο μήνες συμπεραίνεται ότι η βιοσύνθεση των πυρονών-φλορογλουσινολών και παραγώγων τους ξεκινάει πριν την πλήρη άνθιση κατά το στάδιο σχηματισμού των ανώριμων ανθοκεφαλών τον μήνα Μάρτιο και διατηρείται με σημαντικό αριθμό στατιστικά σημαντικών μεταβολιτών τον μήνα Ιούνιο. Κοινοί μεταβολίτες που ανιχνεύονται τους δύο μήνες σύμφωνα με παραπλήσιους χρόνους ανάσχεσης είναι οι: ετεροδιμερή πυρόνης-φλορογλουσινόλης αρζανόλη (**39**), αρενόλη (**42**), ισομερές ηλιαρζανόλης (**45**), ανάλογο αρζανόλης (**47**) και τα μη ταυτοποιημένα παράγωγα πυρόνης (**40, 43**).

Όπως απεικονίζεται στα θηκογράμματα της Εικόνας 4.24, στατιστικά σημαντικοί δείκτες που εντοπίζονται περισσότερο τον μήνα Μάρτιο σε σχέση με τον μήνα Ιούνιο είναι οι μεταβολίτες αρζανόλη (39), παράγωγο πυρόνης 1 (43), ενώ τον μήνα Ιούνιο το παράγωγο πρενυλο φλορογλουσινόλης (55). Σύμφωνα με τα βιοσυνθετικά μονοπάτια που απεικονίζονται στις εικόνες 4.9, 4.10, 4.11 στην ενότητα 4.1.1.3 η βιοσύνθεση των ετεροδιμερών α-πυρόνης- φλορογλουσινόλης (39, 41, 42, 45, 46, 47, 51) μπορεί να θεωρηθεί ότι προέρχεται από το βιοσυνθετικό μονοπάτι των πολυκετιδίων όπως στην περίπτωση της αρζανόλης (39) (Εικόνα 4.12), όπου περιέχονται δύο υποκατεστημένοι δακτύλιοι α-πυρόνης και φλορογλουσινόλης ενωμένοι με μια μεθυλενική γέφυρα ($-CH_2-$). Ο πλευρικός υποκαταστάτης αιθυλο-ομάδα στον δακτύλιο της πυρόνης βιοσυνθετικά μπορεί να προέρχεται από το αιθυλο συνένζυμο Α (Εικόνα 4.10, R = αιθυλομάδα), ενώ ο δεύτερος υποκαταστάτης (μεθυλο ομάδα) στον δακτύλιο της πυρόνης και η πρενυλο ομάδα στο δακτύλιο της φλορογλουσινόλης είναι πιθανό να εισέρχονται σε ακόλουθα βιοσυνθετικά στάδια με την καταλυτική δράση μεθυλο και πρενυλο τρανσφερασών.



Εικόνα 4.24: Θηκογράμματα των σημαντικών μεταβολιτών πυρόνης-φλορογλουσινόλης και παραγώγων αρζανόλη (39), παράγωγο πυρόνης 1 (43), παράγωγο πρενυλο φλορογλουσινόλης (55) για τους τους εξεταζόμενους *ex situ* καλλιεργούμενους γονότυπους του *Helichrysum amorginum* κατά τους μήνες Μάρτιο και Ιούνιο

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. Μελέτη μεταβολικού προφίλ εκχυλισμάτων από *ex situ* καλλιεργημένους γονότυπους *H. amorginum*

Πίνακας 4.4: Φασματομετρικά (*m/z*, *EC*, *RDBeq*), χρωματογραφικά (*Rt*) δεδομένα και *VIP* τιμές των πυρόνης-φλορογλουσινόλης και παραγώγων που εντοπίστηκαν στα φυτά *Helichrysum amorginum* που συλλέχθηκαν τον Μάρτιο και τον Ιούνιο

No	Rt (min)	EC	M-H] ⁺ <i>m/z</i>	RDB	VIP	Μεταβολίτης	Μήνας
39	17,04	C ₂₂ H ₂₅ O ₇	401,1603	10,5	4,28875 1,22857	Arzanol	Μάρτιος/ Ιούνιος
40	14,65	C ₂₃ H ₂₅ O ₇	413,1609	11,5	2,48399 1,24151	Pyrone derivative 2	Μάρτιος/ Ιούνιος
41	17,65	C ₂₅ H ₃₁ O ₇	443,2072	10,5	2,1564	Auricepyrone analogue	Μάρτιος
42	16,89	C ₂₁ H ₂₃ O ₇	387,1446	10,5	1,90783 1,20792	Arenol	Μάρτιος/ Ιούνιος
43	12,94	C ₂₅ H ₃₁ O ₈	459,2023	10,5	1,906 3,11302	Pyrone derivative 1	Μάρτιος/ Ιούνιος
44	14,37	C ₂₄ H ₂₇ O ₇	427,1761	11,5	1,85357	Pyrone derivative isomer 1; analogue to 22-methyl-22-ethyl-italipyrone	Μάρτιος
45	16,79	C ₂₄ H ₂₉ O ₈	445,1866	10,5	1,60853 1,09465	Heliarzanol isomer 3	Μάρτιος/ Ιούνιος
46	17,17	C ₂₃ H ₂₇ O ₇	415,1762	10,5	1,59437	3-Methylarzanol	Μάρτιος
47	16,64	C ₂₃ H ₂₇ O ₈	431,171	10,5	1,5927	Arzanol analogue 3	Μάρτιος/

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. Μελέτη μεταβολικού προφίλ εκχυλισμάτων από *ex situ* καλλιεργημένους γονότυπους *H. amorginum*

					1,51789		Ιούνιος
48	16,61	C ₂₇ H ₂₇ O ₈	479,1709	14,5	1,53789	Pyrone derivative 3	Μάρτιος
49	15,11	C ₂₄ H ₂₇ O ₇	427,249	11,5	1,47596	Pyrone derivative isomer 2; analogue to 22-methyl-22-ethyl-italipyrone	Μάρτιος
50	14,06	C ₂₃ H ₂₅ O ₇	413,1608	11,5	1,34469	Pyrone derivative 1	Μάρτιος
51	14,20	C ₂₂ H ₂₃ O ₇	399,1451	11,5	1,23864	Italipyrone	Μάρτιος
52	13,66	C ₂₇ H ₂₅ O ₇	461,1604	15,5	1,07265	Pyrone derivative	Μάρτιος
53	11,03	C ₁₆ H ₁₉ O ₆	307,1188	7,5	1,01436	Phloroglucinol derivative analogue to 4-[3,5-dihydroxy-4-(2-methyl-1-oxopropyl)phenoxy]-2-methyl-2-butenic acid methyl ester	Μάρτιος
54	12,05	C ₂₃ H ₂₇ O ₈	431,1709	10,5	3,06893	Arzanol analogue 1	Ιούνιος
55	11,79	C ₁₈ H ₁₇ O ₄	297,1132	10,5	2,51434	Prenyl phloroglucinol derivative	Ιούνιος
56	11,92	C ₂₇ H ₂₇ O ₈	479,1709	14,5	2,48536	Pyrone derivative 1	Ιούνιος
57	12,52	C ₂₄ H ₂₉ O ₈	445,1865	10,5	2,40853	Heliarzanol isomer 1	Ιούνιος
58	12,60	C ₂₃ H ₂₇ O ₈	431,1712	10,5	1,94601	Arzanol analogue 2	Ιούνιος
59	12,35	C ₂₇ H ₂₇ O ₈	479,1709	14,5	1,88887	Pyrone derivative 2	Ιούνιος

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. Μελέτη μεταβολικού προφίλ εκχυλισμάτων από *ex situ* καλλιεργημένους γονότυπους *H. amorginum*

60	13,27	C ₂₅ H ₃₁ O ₈	459,2022	10,5	1,66169	Pyrone derivative 2	Ιούνιος
61	12,96	C ₂₄ H ₂₉ O ₈	445,1866	10,5	1,55959	Heliarzanol isomer 2	Ιούνιος
62	13,15	C ₂₁ H ₂₅ O ₇	389,1605	9,5	1,48411	Pyrone derivative	Ιούνιος
63	12,13	C ₁₈ H ₂₃ O ₆	335,15	7,5	1,15257	Phloroglucinol derivative equal to (E)-4-(3,5-dihydroxy-4-(2-methylbutanoyl)phenoxy)-2-methylbut-2-en-1-yl acetate	Ιούνιος

4.4 Συμπεράσματα

Η εφαρμογή του μοντέλου με PCA Pareto Scaling σε 62 δείγματα 19 γονότυπων *H. amorginum* συλλογής κατά τον Απρίλιο 2016, Μάρτιο 2019, Ιούνιο 2019 και Μάιο 2020 οδήγησε στο συμπέρασμα ότι τα δείγματα του Μαΐου 2020 και του Απριλίου 2016 δημιούργησαν μια συστάδα που διαφοροποιείται από τα δείγματα του Ιουνίου 2019, μερικώς ως προς την δεύτερη κύρια συνιστώσα $t(2)$. Όμως και οι τρεις συστάδες των θερμότερων μηνών ασχέτως της χρονιάς συγκομιδής διαφοροποιούνται ως προς τις δύο κύριες συνιστώσες $t(1)$, $t(2)$ σε σχέση με τα δείγματα του Μαρτίου 2019. Συμπερασματικά, οι γονότυποι του *H. amorginum* δεν διαφοροποιούνται σημαντικά στις διαφορετικές χρονιές εσοδείας, αλλά εμφανίζουν σημαντική τάση διαφοροποίησης ως προς την χημική τους σύσταση μεταξύ των μηνών συλλογής τους.

Με εφαρμογή της επιβλεπόμενης μεθόδου OPLS-DA scores plot (Εικόνες 4.18, 4.19), μελετήθηκε εξονυχιστικά και το διάγραμμα φορτίων (Εικόνα 4.20) για την ταυτοποίηση των μορίων-δεικτών που είναι υπεύθυνα για την παρατηρηθείσα ταξινόμηση και συσχετίζονται με την εποχικότητα του *H. amorginum*: Αναγνωρίστηκαν τρεις στατιστικά σημαντικές κατηγορίες μεταβολιτών: φλαβονοειδή και παράγωγα (Πίνακας 4.1), οξέα και παράγωγα (Πίνακας 4.2), πυρόνες-φλορογλουσινόλες και παράγωγα (Πίνακας 4.3) που συνεισφέρουν στην διάκριση του μεταβολώματος των υπό εξέταση γονότυπων *H. amorginum* τους μήνες Μάρτιο 2019 και Ιούνιο 2019.

Και οι τρεις κατηγορίες μεταβολιτών εντοπίζονται σε πρώιμο στάδιο ανάπτυξης των ανώριμων ταξιανθιών (Μάρτιος). Στατιστικά σημαντικοί δείκτες της κατηγορίας φλαβονοειδή και παράγωγα που διαφοροποιούν τους γονότυπους *H. amorginum* του μήνες Μάρτιο 2019 και Ιούνιο 2019 είναι για τον μήνα Μάρτιο οι μεταβολίτες απιγενίνη (**1**), 3-Ο-ακετυλοεξοσίδης καεμπφερόλης (**5**), 3-Ο-γλυκοζίτης καεμπφερόλης (**12**), και για τον μήνα Ιούνιο οι μεταβολίτες κερσετίνη (**15**), τιλροσίδης (**14**), 3-Ο-[6'-Ο-(trans-p-κουμαροϋλο)-3''-Ο-ακετυλο]-β-D-γλυκοκυρανοζίτης καεμπφερόλης (**13**), 5,3',4'-τριϋδροξυ-6,7,8-τριμεθοξυ φλαβόνη (**16**). Στατιστικά σημαντικοί δείκτες της κατηγορίας οξέα και παράγωγα που διαφοροποιούν τους γονότυπους *H. amorginum* τους μήνες Μάρτιος 2019 και Ιούνιος 2019 είναι για τον μήνα Μάρτιο οι μεταβολίτες πινελικό οξύ (**19**), καφεοϋλο κινικό οξύ (**29**), δικαφεοϋλ-κινικό οξύ (**25**). Στατιστικά σημαντικοί δείκτες της κατηγορίας πυρόνης-φλορογλουσινόλης και παραγώγων που διαφοροποιούν τους γονότυπους *H. amorginum* του μήνες Μάρτιο 2019 και Ιούνιο 2019 είναι για τον μήνα Μάρτιο οι μεταβολίτες αρζανόλη (**39**), παράγωγο πυρόνης 1 (**43**), ενώ τον μήνα Ιούνιο το παράγωγο πρενυλο φλορογλουσινόλης (**55**).

4.5 Βιβλιογραφία

- Abdel-Hady, Heba, Mortada Mohamed El-Sayed, Mahfouz Mohamed Abdel-Gawad, Eman Ahmed El-Wakil, El Sayed Saleh Abdel-Hameed, and Ezzat El Sayed Abdel-Lateef. 2018. "LC-ESI-MS Analysis, Antitumor and Antioxidant Activities of Methanolic Extract of Egyptian *Allium Kurrat*." *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 8 (7): 85–92. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2018.8714>.
- AID, Fatiha. 2020. "Plant Lipid Metabolism." *Advances in Lipid Metabolism*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.81355>.
- Ajay P. Singh, Yifei Wang, Rachel M. Olson, Devanand Luthria, Gary S. Banuelos, and Ted Wilson Sajeemas Pasakdee, Nicholi Vorsa. 2017. "LC-MS-MS Analysis and the Antioxidant Activity of Flavonoids from Eggplant Skins Grown in Organic and Conventional Environments." *Food and Nutrition Sciences* 8: 873–88. <https://doi.org/10.4236/fns.2017.89063>.
- Akaberi, Maryam, Ombeline Danton, Zahra Tayarani-Najaran, Javad Asili, Mehrdad Iranshahi, S. Ahmad Emami, and Matthias Hamburger. 2019. "HPLC-Based Activity Profiling for Antiprotozoal Compounds in the Endemic Iranian Medicinal Plant *Helichrysum ocephalum*." *Journal of Natural Products* 82 (4): 958–69. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.8b01031>.
- Alcázar Magaña, Armando, Naofumi Kamimura, Amala Soumyanath, Jan F. Stevens, and Claudia S. Maier. 2021. "Caffeoylquinic Acids: Chemistry, Biosynthesis, Occurrence, Analytical Challenges, and Bioactivity." *Plant Journal*. <https://doi.org/10.1111/tpj.15390>.
- Antonietta Cerulli; Milena Masullo; Sonia Piacente. 2021. "Metabolite Profiling of *Helichrysum italicum* Derived Food Supplements by ¹H-NMR-Based Metabolomics." *Molecules* 2021, 26, 6619 26 (21): 6619. <https://doi.org/10.3390/molecules26216619>.
- Bednarek, P., R. Frański, L. Kerhoas, J. Einhorn, P. Wojtaszek, and M. Stobiecki. 2001. "Profiling Changes in Metabolism of Isoflavonoids and Their Conjugates in *Lupinus albus* Treated with Biotic Elicitor." *Phytochemistry* 56 (1): 77–85. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00366-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00366-6).
- Bisht, Renu, Aniket Bhattacharyya, Ankita Shrivastava, and Priti Saxena. 2021. "An Overview of the Medicinally Important Plant Type III PKS Derived Polyketides." *Frontiers in Plant Science*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.746908>.
- Bohlmann Ferdinand, Zdero Christa. 1980. "Neue Phloroglucin-Derivate Aus *Helichrysum*-Arten." *Phytochemistry* 19: 153–55. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(80\)85038-2](https://doi.org/10.1016/0031-9422(80)85038-2).

- Brito, Anghel, Javier Ramirez, Carlos Areche, Beatriz Sepúlveda, Mario Simirgiotis, and Derek J. McPhee. 2014. "HPLC-UV-MS Profiles of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Fruits from Three *Citrus* Species Consumed in Northern Chile." *Molecules* 19 (11): 17400–421. <https://doi.org/10.3390/molecules191117400>.
- Browse, John Ohlrogge; John. 1995. "Lipid Biosynthesis." *The Plant Cell* 7: 957–70. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.7.957>.
- Buckingham, John, and V. Ranjit N. Munasinghe. 2015. "Dictionary of Flavonoids with CD-ROM." *Dictionary of Flavonoids with CD-ROM*. <https://doi.org/10.1201/b18170>.
- Castillo, Sandra, Peddinti Gopalacharyulu, Laxman Yetukuri, and Matej Orešič. 2011. "Algorithms and Tools for the Preprocessing of LC–MS Metabolomics Data." *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 108 (1): 23–32. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOLAB.2011.03.010>.
- Castorina, Giulia, Frédéric Domergue, Matteo Chiara, Massimo Zilio, Martina Persico, Valentina Ricciardi, David Stephen Horner, and Gabriella Consonni. 2020. "Drought-Responsive ZmFDL1/MYB94 Regulates Cuticle Biosynthesis and Cuticle-Dependent Leaf Permeability¹." *Plant Physiology*. <https://doi.org/10.1104/PP.20.00322>.
- Chen, Guilin, Xun Li, Flora Saleri, and Mingquan Guo. 2016. "Analysis of Flavonoids in *Rhamnus davurica* and Its Antiproliferative Activities." *Molecules* 21 (10): 1–14. <https://doi.org/10.3390/molecules21101275>.
- Chen, Haifang, Mulan Li, Chen Zhang, Wendi Du, Haihua Shao, Yulin Feng, Wugang Zhang, and Shilin Yang. 2018. "Isolation and Identification of the Anti-Oxidant Constituents from *Loropetalum chinense* (R. Brown) Oliv. Based on UHPLC–Q-TOF-MS/MS." *Molecules* 23 (7). <https://doi.org/10.3390/molecules23071720>.
- Chen, Weifeng, Zhengcao Xiao, Yule Wang, Jinxiao Wang, Rui Zhai, Kui Lin-Wang, Richard Espley, Fengwang Ma, and Pengmin Li. 2021. "Competition between Anthocyanin and Kaempferol Glycosides Biosynthesis Affects Pollen Tube Growth and Seed Set of *Malus*." *Horticulture Research*. <https://doi.org/10.1038/s41438-021-00609-9>.
- Chong, J., M. A. Pierrel, R. Atanassova, D. Werck-Reichhart, B. Fritig, and P. Saindrenan. 2001. "Free and Conjugated Benzoic Acid in Tobacco Plants and Cell Cultures. Induced Accumulation upon Elicitation of Defense Responses and Role as Salicylic Acid Precursors." *Plant Physiology* 125 (1): 318–28. <https://doi.org/10.1104/PP.125.1.318>.

- Coble, Jamie B., and Carlos G. Fraga. 2014. "Comparative Evaluation of Preprocessing Freeware on Chromatography/Mass Spectrometry Data for Signature Discovery." *Journal of Chromatography A* 1358: 155–64. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.06.100>.
- Crockett, Sara L., Olaf Kunert, Eva Maria Pferschy-Wenzig, Melissa Jacob, Wolfgang Schuehly, and Rudolf Bauer. 2016. "Phloroglucinol and Terpenoid Derivatives from *Hypericum cistifolium* and *H. galioides* (Hypericaceae)." *Frontiers in Plant Science*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00961>.
- D'Abrosca, Brigida, Elisabetta Buommino, Pina Caputo, Monica Scognamiglio, Angela Chambery, Giovanna Donnarumma, and Antonio Fiorentino. 2016. "Phytochemical Study of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don: Spectroscopic Elucidation of Unusual Amino-Phlorogucinols and Antimicrobial Assessment of Secondary Metabolites from Medium-Polar Extract." *Phytochemistry* 132: 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.09.012>.
- Dunn, Warwick B., and David I. Ellis. 2005. "Metabolomics: Current Analytical Platforms and Methodologies." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 24 (4): 285–94. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2004.11.021>.
- Eirini Kouloura, Maria Halabalaki, Marie-Christine Lallemand, Sangkil Nam, Richard Jove, and and Alexios-Leandros Skaltsounis Marc Litaudon, Khalijah Awang, Hamid A. Hadi. 2012. "Cytotoxic Prenylated Acetophenone Dimers from *Acronychia pedunculata*." *J. Nat. Prod.* 75: 1270–76. <https://doi.org/10.1021/np201007a>.
- Fang, Zhong Ze, and Frank J. Gonzalez. 2014. "LC-MS-Based Metabolomics: An Update." *Archives of Toxicology* 88 (8): 1491–1502. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1234-6>.
- Felipe, Daniele F., Lara Z.S. Brambilla, Carla Porto, Eduardo J. Pilau, and Diógenes A.G. Cortez. 2014. "Phytochemical Analysis of *Pfaffia glomerata* Inflorescences by LC-ESI-MS/MS." *Molecules* 19 (10): 15720–34. <https://doi.org/10.3390/molecules191015720>.
- Francescato, Leandro N., Silvia L. Debenedetti, Thiago G. Schwanz, Valquiria L. Bassani, and Amélia T. Henriques. 2013. "Identification of Phenolic Compounds in *Equisetum giganteum* by LC-ESI-MS/MS and a New Approach to Total Flavonoid Quantification." *Talanta* 105: 192–203. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.11.072>.
- Fukusaki, Eiichiro, and Akio Kobayashi. 2005. "Plant Metabolomics: Potential for Practical Operation." *Journal of Bioscience and Bioengineering* 100 (4): 347–54. <https://doi.org/10.1263/JBB.100.347>.

- Gampe, Nóra, András Darcsi, Andrea Nagyné Nedves, Imre Boldizsár, László Kursinszki, and Szabolcs Béni. 2019. "Phytochemical Analysis of *Ononis arvensis* L. by Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectrometry." *Journal of Mass Spectrometry* 54 (2): 121–33. <https://doi.org/10.1002/jms.4308>.
- Garland Kgosi More; Jacques Vervoort; Paul Anton Steenkamp; Gerhard Prinsloo. 2022. "Metabolomic Profile of Medicinal Plants with Anti-RVSV Activity." *Heliyon* 8 (2022) E08936 8. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e08936>.
- Georgios A. Koulis, Aristeidis S. Tsagkaris, Reza Aalizadeh, Marilena E. Dasenaki, Eleni I. Panagopoulou, Spyros Drivelos, Michał Halagarda, Constantinos A. Georgiou, Charalampos Proestos and Nikolaos S. Thomaidis. 2021. "Honey Phenolic Compound Profiling and Authenticity Assessment Using HRMS Targeted and Untargeted Metabolomics." *Molecules* 26 (9): 1–21. <https://doi.org/10.3390/molecules26092769>.
- Gokhan Zengina, Aleksandra Cvetanovićb, Uroš Gašićc, Živoslav Tešićc, Alena Stupard, Marie Carene Nancy Picot-Allainh Gizem Bulute, Kouadio Ibrahime Sinana, Sengul Uysalf, and Mohamad Fawzi Mahomoodally. 2020. "A Comparative Exploration of the Phytochemical Profiles and Biopharmaceutical Potential of *Helichrysum stoechas* subsp. *barrelieri* Extracts Obtained via Five Extraction Techniques." *Process Biochemistry* 91: 113–25. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.12.002>.
- Gorinstein, Shela, Marina Zemser, Francisco Vargas-Albores, and Jose Luis Ochoa. 2014. "Classification of Seven Species of Cactaceae Based on Their Chemical and Biochemical Properties." *OUP* 59 (11): 2022–27. <https://doi.org/10.1271/BBB.59.2022>.
- Gromski, Piotr S., Howbeer Muhamadali, David I. Ellis, Yun Xu, Elon Correa, Michael L. Turner, and Royston Goodacre. 2015. "A Tutorial Review: Metabolomics and Partial Least Squares-Discriminant Analysis - a Marriage of Convenience or a Shotgun Wedding." *Analytica Chimica Acta* 879 (June): 10–23. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.012>.
- Haisong Yang, Wensi Lin, Jianmei Zhang, Weiwei Lin, Peng Xu, Jing Li, Xiaomei Ling. 2014. "Metabonomic Analysis of the Toxic Effects of TM208 in Rat Urine by HPLC-ESI-IT-TOF/MS." *Journal of Chromatography B* 959: 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.03.036>.
- Hall, Robert D. 2006. "Plant Metabolomics: From Holistic Hope, to Hype, to Hot Topic." *New Phytologist* 169 (3): 453–68. <https://doi.org/10.1111/J.1469-8137.2005.01632.X>.

- Heino Martin Heyman; Franois Senejoux; Isabell Seibert; Thomas Klimkait; Vinesh Jaichand Maharaj; Jacobus Johannes Marion Meyer. 2015. "Identification of Anti-HIV Active Dicafeoylquinic- and Tricafeoylquinic Acids in *Helichrysum populifolium* by NMR-Based Metabolomic Guided Fractionation." *Fitoterapia* 103: 155–64. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2015.03.024>.
- Huhman, David V., and Lloyd W. Sumner. 2002. "Metabolic Profiling of Saponins in *Medicago sativa* and *Medicago truncatula* Using HPLC Coupled to an Electrospray Ion-Trap Mass Spectrometer." *Phytochemistry* 59 (3): 347–60. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00432-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00432-0).
- I. Goldberg and J. S. Rokem. 2009. "Organic and Fatty Acid Production, Microbial." *Encyclopedia of Microbiology*, 421–42. <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00156-5>.
- Jahangir, Muhammad, Hye Kyong Kim, Young Hae Choi, and Robert Verpoorte. 2008. "Metabolomic Response of *Brassica rapa* Submitted to Pre-Harvest Bacterial Contamination." *Food Chemistry* 107 (1): 362–68. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2007.08.034>.
- Jakupovic, J., A. Schuster, H. Sun, F. Bohlmann, and D. S. Bhakuni. 1987. "Prenylated Phthalides from *Anaphalis araneosa* and *Helichrysum platypterum*." *Phytochemistry* 26 (2): 580–81. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)81462-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)81462-4).
- Jakupovic, J., C. Zdero, M. Grenz, F. Tschritzis, L. Lehmann, S. M. Hashemi-Nejad, and F. Bohlmann. 1989. "Twenty-One Acylphloroglucinol Derivatives and Further Constituents from South African *Helichrysum* Species." *Phytochemistry* 28 (4): 1119–31. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(89\)80195-5](https://doi.org/10.1016/0031-9422(89)80195-5).
- Jeandet, Philippe. 2015. "Phytoalexins: Current Progress and Future Prospects." *Molecules* 2015, Vol. 20, Pages 2770-2774 20 (2): 2770–74. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES20022770>.
- Jindaprasert, Aphacha, Karin Springob, Jürgen Schmidt, Wanchai De-Eknamkul, and Toni M. Kutchan. 2008. "Pyrone Polyketides Synthesized by a Type III Polyketide Synthase from *Drosophyllum lusitanicum*." *Phytochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.03.013>.
- Justine Laoué; Catherine Fernandez; Elena Ormeño. 2022. "Plant Flavonoids in Mediterranean Species: A Focus on Flavonols as Protective Metabolites under Climate Stress." *Plants* 11: 172. <https://doi.org/10.3390/plants11020172>.
- Khaled A. Nematallah, Nahla A. Ayoub, Essam Abdelsattar, Meselhy R. Meselhy, Rania M. Hathout Mohey M. Elmazar, Ahmed H. El-Khatib, Michael W. Linscheid, and Shaker A. Mousa Kavitha Godugu, Aya Adel. 2018. "Polyphenols LC-MS2 Profile of Ajwa Date Fruit (*Phoenix dactylifera* L.) and Their Microemulsion:

- Potential Impact on Hepatic Fibrosis.” *Journal of Functional Foods* 49: 401–11. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.08.032>.
- Kim, Young S, Padma Maruvada, and John a Milner. 2008. “Metabolomics in Biomarker Discovery: Future Uses for Cancer Prevention.” *Future Oncology (London, England)* 4 (1): 93–102. <https://doi.org/10.2217/14796694.4.1.93>.
- Kramberger, Katja, Darja Barlič-Maganja, Dunja Bandelj, Alenka Baruca Arbeiter, Kelly Peeters, Ana Miklavčič Višnjevec, and Zala Jenko Pražnikar. 2020. “HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS Determination of Bioactive Compounds and Antioxidant Activity Comparison of the Hydroalcoholic and Water Extracts from Two *Helichrysum italicum* Species.” *Metabolites* 10 (10): 1–25. <https://doi.org/10.3390/metabo10100403>.
- L. Mattoli; F. Cangi; A. Maidecchi; C. Ghiara; E. Ragazzi; M. Tubaro; L. Stella; F. Tisato; P. Traldi. 2006. “Metabolomic Fingerprinting of Plant Extracts.” *J. Mass Spectrom.* 41: 1534–1545. <https://doi.org/10.1002/jms.1099>.
- Le-yue Du, Min Zhao, Jin-hua Tao, Da-wei Qian, Shu Jiang, and and Jin-ao Duan Er-xin Shang, Jian-ming Guo, Pei Liu, Shu-lan Su. 2017. “The Metabolic Profiling of Isorhamnetin-3-ONEohesperidoside Produced by Human Intestinal Flora Employing UPLC-Q-TOF/MS.” *Journal of Chromatographic Science* 55 (3): 243–50. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmw176>.
- Lenz, E. M., J. Bright, R. Knight, I. D. Wilson, and H. Major. 2004. “Cyclosporin A-Induced Changes in Endogenous Metabolites in Rat Urine: A Metabonomic Investigation Using High Field ¹H NMR Spectroscopy, HPLC-TOF/MS and Chemometrics.” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 35 (3): 599–608. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2004.02.013>.
- Li, Wei, Yoshihisa Asada, and Takafumi Yoshikawa. 2000. “Flavonoid Constituents from *Glycyrrhiza glabra* Hairy Root Cultures.” *Phytochemistry* 55 (5): 447–56. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00337-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00337-X).
- Liland, Kristian Hovde. 2011. “Multivariate Methods in Metabolomics – from Pre-Processing to Dimension Reduction and Statistical Analysis.” *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 30 (6): 827–41. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2011.02.007>.
- Lindon, John C., and Jeremy K. Nicholson. 2008. “Analytical Technologies for Metabonomics and Metabolomics, and Multi-Omic Information Recovery.” *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 27 (3): 194–204. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2007.08.009>.

- Liu, Ning Qing, Martine Cao, Michel Fr  d  rich, Young Hae Choi, Robert Verpoorte, and Frank van der Kooy. 2010. "Metabolomic Investigation of the Ethnopharmacological Use of *Artemisia afra* with NMR Spectroscopy and Multivariate Data Analysis." *Journal of Ethnopharmacology* 128 (1): 230–35. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2010.01.020>.
- Liu, Yuting, Alisdair R. Fernie, and Takayuki Tohge. 2022. "Diversification of Chemical Structures of Methoxylated Flavonoids and Genes Encoding Flavonoid-O-Methyltransferases." *Plants*. <https://doi.org/10.3390/plants11040564>.
- Martha Ludwig. 2016. "The Roles of Organic Acids in C4 Photosynthesis." *Frontiers in Plant Science*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00647>.
- Martucci, Maria Elvira Poleti, Ric C.H. De Vos, Carlos Alexandre Carollo, and Leonardo Gobbo-Neto. 2014. "Metabolomics as a Potential Chemotaxonomical Tool: Application in the Genus *Vernonia* Schreb." *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093149>.
- Maryam Akaberi, Zahra Tayarani Najaran, Narjes Azizi, Seyed Ahmad Emami. 2021. "Metabolite Profiling and Antiprotozoal Activity of Three Endemic Iranian *Helichrysum* Species." *Industrial Crops & Products* 174 (114196): 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114196>.
- Merikli, A L I H, Ferdinand Bohlmann, and Christa Zderoo. 1980. "Pyron-Derivate *Helichrysum*-Arten "." *Phytochemistry* 19: 639–44. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(80\)87030-0](https://doi.org/10.1016/0031-9422(80)87030-0).
- Michel Randriaminahy, Peter Proksch, Ludger Witteb, and Victor Wray. 1992. "Lipophilic Phenolic Constituents from *Helichrysum* Species Endemic to Madagascar." *Z. Naturforsch.* 47c: 10–16.
- Monica Scognamiglio; Brigida D'Abrosca; Assunta Esposito; Antonio Fiorentino. 2015. "Chemical Composition and Seasonality of Aromatic Mediterranean Plant Species by NMR-Based Metabolomics." *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2015/258570>.
- Morikawa, Toshio, Li Bo Wang, Kiyofumi Ninomiya, Seikou Nakamura, Hisashi Matsuda, Osamu Muraoka, Li Jun Wu, and Masayuki Yoshikawa. 2009. "Medicinal Flowers. XXX. Eight New Glycosides, Everlastosides F - M, from the Flowers of *Helichrysum arenarium*." *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 57 (8): 853–59. <https://doi.org/10.1248/cpb.57.853>.
- Myers, Owen D., Susan J. Sumner, Shuzhao Li, Stephen Barnes, and Xiuxia Du. 2017. "One Step Forward for Reducing False Positive and False Negative Compound Identifications from Mass Spectrometry Metabolomics Data: New Algorithms for Constructing Extracted Ion Chromatograms and Detecting

- Chromatographic Peaks.” *Analytical Chemistry* 89 (17): 8696–8703. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b00947>.
- Norma Francenia Santos-Sánchez, Raúl Salas-Coronado, Beatriz Hernández-Carlos, Claudia Villanueva-Cañongo. 2019. “Shikimic Acid Pathway in Biosynthesis of Phenolic Compounds.” In *Plant Physiological Aspects of Phenolic Compounds*, 1–15. <https://doi.org/10.5772/intechopen.83815>.
- Oksman-Caldentey, Kirsi Marja, and Dirk Inzé. 2004. “Plant Cell Factories in the Post-Genomic Era: New Ways to Produce Designer Secondary Metabolites.” *Trends in Plant Science* 9 (9): 433–40. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2004.07.006>.
- Packter, NM. 1985. “Secondary Metabolism in Microorganisms, Plants and Animals.” *Biochemical Education*. [https://doi.org/10.1016/0307-4412\(85\)90096-2](https://doi.org/10.1016/0307-4412(85)90096-2).
- Rasmussen, Susanne, Anthony J. Parsons, and Jonathan A. Newman. 2009. “Metabolomics Analysis of the Lolium Perenne-Neotyphodium Lolii Symbiosis: More than Just Alkaloids?” *Phytochemistry Reviews* 8 (3): 535–50. <https://doi.org/10.1007/S11101-009-9136-6/FIGURES/6>.
- Rios, J. L., M. C. Recio, and A. Villar. 1991. “Isolation and Identification of the Antibacterial Compounds from *Helichrysum stoechas*.” *Journal of Ethnopharmacology* 33 (1–2): 51–55. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(91\)90160-F](https://doi.org/10.1016/0378-8741(91)90160-F).
- Roessner, Ute, Cornelia Wagner, Joachim Kopka, Richard N. Trethewey, and Lothar Willmitzer. 2000. “Technical Advance: Simultaneous Analysis of Metabolites in Potato Tuber by Gas Chromatography-Mass Spectrometry.” *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 23 (1): 131–42. <https://doi.org/10.1046/J.1365-313X.2000.00774.X>.
- Romero, Néstor, Carlos Areche, Jaime Cubides-Cárdenas, Natalia Escobar, Olimpo García-Beltrán, Mario J. Simirgiotis, and Ángel Céspedes. 2020. “In Vitro Anthelmintic Evaluation of *Gliricidia sepium*, *Leucaena leucocephala*, and *Pithecellobium dulce*: Fingerprint Analysis of Extracts by UHPLC-Orbitrap Mass Spectrometry.” *Molecules* 25 (13): 1–17. <https://doi.org/10.3390/molecules25133002>.
- Ruan, Jingya, Jiejing Yan, Dandan Zheng, Fan Sun, Jianli Wang, Lifeng Han, Yi Zhang, and Tao Wang. 2019. “Comprehensive Chemical Profiling in the Ethanol Extract of *Pluchea Indica* Aerial Parts by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Analysis of Its Silica Gel Column Chromatography Fractions.” *Molecules* 24 (15). <https://doi.org/10.3390/molecules24152784>.
- S.E. Yazdi; G. Prinsloo; H.M. Heyman; C.B. Oosthuizen; T. Klimkait; J.J.M. Meyer. 2019. “Anti-HIV-1 Activity

- of Quinic Acid Isolated from *Helichrysum mimetes* Using NMR-Based Metabolomics and Computational Analysis.” *South African Journal of Botany* 126: 328–39. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.04.023>.
- Schäberle, Till F. 2016. “Biosynthesis of α -Pyrones.” *Beilstein Journal of Organic Chemistry*. <https://doi.org/10.3762/bjoc.12.56>.
- Shen, Nan, Tongfei Wang, Quan Gan, Sian Liu, Li Wang, and Biao Jin. 2022. “Plant Flavonoids: Classification, Distribution, Biosynthesis, and Antioxidant Activity.” *Food Chemistry* 383: 132531. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132531>.
- Sumner, Lloyd W., Pedro Mendes, and Richard A. Dixon. 2003. “Plant Metabolomics: Large-Scale Phytochemistry in the Functional Genomics Era.” *Phytochemistry* 62 (6): 817–36. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00708-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00708-2).
- Taglialatela-Scafati, Orazio, Federica Pollastro, Giuseppina Chianese, Alberto Minassi, Simon Gibbons, Warunya Arunotayanun, Blessing Mabebie, Mauro Ballero, and Giovanni Appendino. 2013. “Antimicrobial Phenolics and Unusual Glycerides from *Helichrysum italicum* subsp. *microphyllum*.” *Journal of Natural Products* 76 (3): 346–53. <https://doi.org/10.1021/np3007149>.
- Talapatra, Sunil Kumar, Bani Talapatra, and K. C. Nicolaou. 2015. “Chemistry of Plant Natural Products: Stereochemistry, Conformation, Synthesis, Biology, and Medicine.” *Chemistry of Plant Natural Products: Stereochemistry, Conformation, Synthesis, Biology, and Medicine*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-45410-3>.
- Uleberg, Eivind, Jens Rohloff, Laura Jaakola, Kajetan Tröst, Olavi Junttila, Hely Häggman, and Inger Martinussen. 2012. “Effects of Temperature and Photoperiod on Yield and Chemical Composition of Northern and Southern Clones of Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.).” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/jf302924m>.
- Vidal-Casanella, Oscar, Nerea Nuñez, Sonia Sentellas, Oscar Núñez, and Javier Saurina. 2020. “Characterization of Turmeric and Curry Samples by Liquid Chromatography with Spectroscopic Detection Based on Polyphenolic and Curcuminoid Contents.” *Separations*. <https://doi.org/10.3390/separations7020023>.
- Wang, Jinfeng, Ziyao Jia, Zhihao Zhang, Yutong Wang, Xi Liu, Linghua Wang, Ruichao Lin, and Thomas J. Schmidt. 2017. “Analysis of Chemical Constituents of *Melastoma dodecandrum* Lour. By UPLC-ESI-Q-Exactive Focus-MS/MS.” *Molecules* 22 (3). <https://doi.org/10.3390/molecules22030476>.

- Wang, Xin, Guohua Ding, Baodong Liu, and Quanxi Wang. 2020. "Flavonoids and Antioxidant Activity of Rare and Endangered Fern: *Isoetes sinensis*." *PLoS ONE* 15 (5): 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232185>.
- Weckwerth, Wolfram. 2003. "Metabolomics in Systems Biology." *Annual Review of Plant Biology* 54: 669–89. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.ARPLANT.54.031902.135014>.
- Wolfender, Jean Luc, Guillaume Marti, Aurélien Thomas, and Samuel Bertrand. 2015. "Current Approaches and Challenges for the Metabolite Profiling of Complex Natural Extracts." *Journal of Chromatography A* 1382: 136–64. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.10.091>.
- Wu, Yan Qi, Ya Li, Xian Feng Lin, Zhong Li Liu, and Yu Li. 2003. "Phenolic Compounds from *Anaphalis aureo-punctata*." *Pharmazie* 58 (11): 833–35. <https://doi.org/10.1002/chin.200410182>.
- Xi Chena, Karoline Schreiber, Jens Appela, Alexander Makowkaa, Berit Fähnricha, Mayo Roettgerb, Mohammad R. Hajirezaeic, Frank D. Sönnichsend, Peter Schönheite, William F. Martinb, and Kirstin Gutekunst. 2016. "The Entner–Doudoroff Pathway Is an Overlooked Glycolytic Route in Cyanobacteria and Plants." *PNAS* 113 (19): 5441–5446. <https://doi.org/10.1073/pnas.1521916113>.
- Xu, Yuanyuan, Yuan Gao, Zhong Chen, Guochun Zhao, Jiming Liu, Xin Wang, Shilun Gao, Duanguang Zhang, and Liming Jia. 2021. "Metabolomics Analysis of the Soapberry (*Sapindus mukorossi* Gaertn.) Pericarp during Fruit Development and Ripening Based on UHPLC-HRMS." *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91143-0>.
- Zhao, Huading, Xin Hu, Xiaoqin Chen, Shuyun Shi, Xinyu Jiang, Xuejuan Liang, Wei Chen, and Shuihan Zhang. 2015. "Analysis and Improved Characterization of Minor Antioxidants from Leaves of *Malus doumeri* Using a Combination of Major Constituents' Knockout with High-Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detector-Quadrupole Time-of-Flight Tandem Mass Spectromet." *Journal of Chromatography A* 1398: 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.04.018>.
- Zhou, Bin, Jun Feng Xiao, Leepika Tuli, and Habtom W. Ressim. 2012. "LC-MS-Based Metabolomics." *Molecular BioSystems* 8 (2): 470–81. <https://doi.org/10.1039/C1MB05350G>.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών *Helichrysum amorginum* από βιολογική καλλιέργεια στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας

5.1 Σκοπός εργασίας

Σκοπό της μελέτης του κεφαλαίου 5 αποτελούν οι παρακάτω μελέτες που διεξάγονται για πρώτη φορά:

(α) Η ποιοτική μελέτη ολικών εκχυλισμάτων αυξανόμενης πολικότητας από διαδοχικές εκχυλίσσεις ταξιανθιών και φυλλωδών στελεχών του *H. amorginum* (HA) με διαλύτες αυξανόμενης πολικότητας. Η συγκεκριμένη επιλογή έγινε αφενός γιατί εξάγονται συμπεράσματα της πολικότητας μεγάλου φάσματος μεταβολιτών που εμφανίζονται σε κάθε εκχύλισμα κλιμακούμενης πολικότητας, και αφετέρου με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται μία εξαντλητική απομόνωση όλων των κατηγοριών δευτερογενών μεταβολιτών του φυτικού υλικού.

(β) Η απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών από ολικό μεθανολικό (MeOH) εκχύλισμα μετά από διαδοχικές εκχυλίσσεις με διαλύτες αυξανόμενης πολικότητας καθώς και από ολικό διχλωρομεθανικό (DCM) εκχύλισμα απευθείας εκχύλισης ταξιανθιών *H. amorginum* (HA). Η επιλογή της εξέτασης των ταξιανθιών έγινε μετά από ποιοτική σύγκριση των φασμάτων μάζας των δύο φυτικών οργάνων (ταξιανθίες και στελέχη). Τα φάσματα των δύο εκχυλισμάτων και των δύο οργάνων εμφανίζουν ικανοποιητικές ομοιότητες και καθιστούν την εξέταση των ταξιανθιών προτιμητέα λόγω της χαμηλότερης παρουσίας χλωροφύλλης, γεγονός το οποίο δημιουργεί παρεμποδίσεις στην κλασματοποίηση των ολικών εκχυλισμάτων. Η επιλογή των δύο διαλυτών (DCM, MeOH) έγινε μετά από προσεκτική εξέταση της βιβλιογραφίας για την εκχύλιση άπολων έως μέτρια πολικών μεταβολιτών με DCM και μέτρια πολικών έως πολικών με MeOH σε άλλα είδη του γένους *Helichrysum* (Svetolik Maksimovic et al. 2007).

(γ) Η μελέτη ικανότητας παγίδευσης ελεύθερης ρίζας (DPPH) και αναστολής του ενζύμου τυροσινάση από εκχυλίσματα κλιμακούμενης πολικότητας HA.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

5.2 Υλικά και Μέθοδοι

5.2.1 Όργανα-Υλικά

Για τις εκχυλίσεις τα n-hexane, dichloromethane (DCM), methanol (MeOH), νερό (H₂O) (Reagent grade) προμηθεύθηκαν από Sigma-Aldrich και αποστάχθηκαν πριν την χρήση τους.

Για την ανάλυση με LC-ESI-(±)-HRMS τα formic acid (FA), acetonitrile (ACN) (LC-MS grade) προμηθεύθηκαν από Sigma-Aldrich.

Για την ανάλυση με GC-MS το dichloromethane (GC-MS grade) προμηθεύθηκε από Sigma-Aldrich. Για την ανάλυση με 1D, 2D - ¹H, ¹³C NMR τα methanol-d₄ (MeOD), chloroform-d (CDCl₃), deuterium oxide (D₂O) προμηθεύθηκαν από Sigma-Aldrich.

Για την ανάλυση μέτρησης αναστολής DPPH τα DPPH, ethanol absolute (EtOH abs), gallic acid προμηθεύθηκαν από Sigma-Aldrich.

Για την ανάλυση μέτρησης αναστολής τυροσινάσης: Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, H₂O, NaOH, kojic acid, L-DOPA, mushroom tyrosinase προμηθεύθηκαν από Sigma-Aldrich.

Για αναλυτικές χρωματογραφικές μεθόδους

Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας. Χρησιμοποιήθηκαν πλάκες αλουμινίου κανονικής και αντίστροφης φάσης με επίστρωση γέλης πυριτίου με πάχος στιβάδας 0,1 mm (Silica gel 60 F₂₅₄-Merck/ Silica gel 60 RP-18 F₂₅₄S). Τα χρωματογραφήματα ελέγχθηκαν με λαμπτήρες υπεριώδους ακτινοβολίας, σε μήκη κύματος 254 nm και 366 nm και ακολούθησε ψεκασμός με μεθανολικό διάλυμαθεικής βανιλίνης και θέρμανση.

Αέρια Χρωματογραφία. Για την αέρια χρωματογραφία χρησιμοποιήθηκε σύστημα 8890 Agilent, εξοπλισμένο με αυτόματο δειγματολήπτη 7693A Agilent, χρωματογραφική τριχοειδή στήλη Agilent HP-5MS 30 m/0,25 mm/0,25 μm με ρυθμίσεις Θ_{injector} = 220°C, Θ_{detector} = 230°C, με αέριο έκλουσης He σε ρυθμό ροής 1 mL/min. Στο σύστημα ήταν συζευγμένος αναλυτής μάζας απλού τετραπόλου 5877B Agilent σε λειτουργία θετικού ιονισμού (electron ionization, positive mode) με ενέργεια ιονισμού 70 eV και ρύθμιση εύρους ανίχνευσης μάζας ιόντων (full scan mass range) *m/z* 45-550. Όλα τα υπό ανάλυση δείγματα (εξανικά εκχυλίσματα) εγχύθηκαν σε όγκο 1 μL σε splitless mode. Η επεξεργασία των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό MSD ChemStation F.01.03.2357 (Agilent Technologies, Inc.)

Υγρή Χρωματογραφία Υπερύψηλης Απόδοσης συνδεδεμένη με υβριδικό φασματογράφο μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας. UHPLC: Thermo Finnigan Accela High Speed: αντλία Accela, αυτόματος δειγματολήπτης Accela και ανιχνευτής συστοιχίας φωτοδιόδων (PDA) Accela. MS: Υβριδικός φασματογράφος μάζας που περιλαμβάνει συνδυασμό γραμμικής παγίδας ιόντων (Ion trap - LTQ XL) και

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

τροχιακή παγίδα ιόντων (Orbital trap – Orbitrap) LTQ-Orbitrap Discovery (Thermo Scientific - Bremen, Germany) εφοδιασμένο με πηγή ιονισμού τύπου ηλεκροψεκασμού (Electrospray - ESI).

Για παρασκευαστικές χρωματογραφικές μεθόδους

Παρασκευαστική Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (Prep-TLC). Υάλινες πλάκες κανονικής φάσης επιστρωμένες με γέλη πυριτίου με πάχος στιβάδας 1 mm (Silica gel 60 F254-Merck). Υάλινες πλάκες αντιστρόφου φάσεως επιστρωμένες με γέλη SiO₂ 5 x 10 cm με πάχος στιβάδας 0,25 mm (Silica gel 60 RP-18 F254S).

Υγρή Χρωματογραφία Στήλης Χαμηλής Πίεσης: (α) Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε γέλη πυριτίου διαμέτρου 0,04-0,06 mm. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκαν οργανικοί διαλύτες κατάλληλης κατά περίπτωση πολικότητας, (β) Sephadex LH-20 (γέλη υδροξυλιωμένης δεξτράνης με μέγεθος κόκκων 25-100 μm). Πριν τη χρήση, η γέλη αφέθηκε να διογκωθεί με το διαλύτη έκλουσης για 24 h.

Χρωματογραφία Κατανομής με Φυγοκέντρηση (Fast Centrifugal Partition Chromatography, FCPC). Χρησιμοποιήθηκε το σύστημα FCPC KROMATON που περιλαμβάνει: Αντλία Lab Alliance. Σύστημα εισαγωγής. Σύστημα περιστροφής. Στήλη χωρητικότητας: 200 ml ή 1000 ml. Συλλέκτη Buchi fraction collector B-684.

Για φασματοσκοπικές, φασματομετρικές, φασματοφωτομετρικές μεθόδους

Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR). Για τη λήψη των φασμάτων Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού χρησιμοποιήθηκαν ο φασματογράφος Advance III Bruker BioSpin με 5 mm BBI probe στα 600 MHz. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στην λήψη φασμάτων ήταν:

Δευτεριωμένο χλωροφόρμιο CDCl₃ (7,23ppm/¹H-NMR, 77,0ppm/¹³C-NMR)

Δευτεριωμένη μεθανόλη MeOD (4,8 και 3,33ppm/¹H-NMR, 49,0ppm/¹³C-NMR)

Δευτεριωμένο νερό D₂O (4,65 ppm/¹H-NMR)

Οι χημικές μετατοπίσεις εκφράζονται σε δ (ppm) και οι σταθερές σύζευξης *J* σε Hertz (Hz). Η πολλαπλότητα των κορυφών των φασμάτων εκφράζεται ως *s* (single): απλή, *brs* (broad singlet): ευρεία απλή, *d* (double): διπλή, *t* (triple): τριπλή, *q* (quintuplet): τετραπλή, *dd* (double of doublets): διπλή διπλής, *m* (multiple): πολλαπλή. Ελήφθησαν φάσματα μίας διάστασης ¹H-NMR και ¹³C-NMR, καθώς και φάσματα δύο διαστάσεων, COSY (Correlation spectroscopy), HSQC (Heteronuclear single Quantum Coherence), HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence).

Φασματομετρία Μάζας Υψηλής Διακριτικής Ικανότητας. Για την λήψη φασμάτων μάζας HR-ESI-MS χρησιμοποιήθηκε φασματογράφος LTQ-Orbitrap Discovery (Thermo Finnigan). Τα δείγματα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

προετοιμάστηκαν με MeOH ή και μίγματα με H₂O (LC-MS grade) σε τελική συγκέντρωση 1 mg/ml για αρχικά κλάσματα και ολικά εκχυλίσματα και σε συγκέντρωση 100 µg/ml για καθαρά μόρια.

Φασματοφωτομετρία. Για τις μετρήσεις απορρόφησης των διαλυμάτων στις μεθόδους παγίδευσης ελεύθερης ρίζας DPPH και αναστολής τυροσινάσης χρησιμοποιήθηκε η συσκευή microplate reader Infinite® 200 PRO (Tecan Group Ltd., Männedorf).

5.2.2 Συλλογή και αρχική επεξεργασία της δρόγης

(α) Για την ποιοτική μελέτη χρησιμοποιήθηκαν αποξηραμένες ταξιανθίες και φυλλώδη στελέχη του *H. amorginum* βιολογικής καλλιέργειας στην περιοχή προέλευσης των φυτών (Κατάπολα, Αμοργός, buffer zone samples), συγκομιδής Ιούνιος 2017.

(β) Η μελέτη απομόνωσης μεταβολιτών πραγματοποιήθηκε σε ολικό MeOH εκχύλισμα αποξηραμένων ταξιανθιών *H. amorginum* βιολογικής καλλιέργειας στην περιοχή προέλευσης των φυτών (Κατάπολα, Αμοργός) και σε ολικό DCM εκχύλισμα αποξηραμένων ταξιανθιών *H. amorginum* βιολογικής καλλιέργειας (Αιγιάλη, Αμοργός), συγκομιδής 2020.

5.2.3 Επιλογή πρωτοκόλλου παρασκευής εκχυλίσμων

(α) Επιλέχθηκε η μεθοδολογία διαδοχικής, στερεάς - υγρής εκχύλισης με διαλύτες αυξανόμενης πολικότητας (n-hexane, DCM, MeOH, H₂O) που εφαρμόστηκε ξεχωριστά στις ταξιανθίες και στα φυλλώδη στελέχη του *H. amorginum* και αποσκοπεί στην παρασκευή ολικών εκχυλισμάτων: άπολων (n-hexane), άπολων ως μέτρια πολικών (DCM), μέτρια πολικών ως πολικών (MeOH), πολικών (H₂O). Οι εκχυλίσεις πραγματοποιήθηκαν σε κυλινδρικό, inox δοχείο 4 L συνδεδεμένο με γεννήτρια υπερήχων (R.E.U.S., type PEX3NS, No 1404172, power 200W, 24kHz). Συνολικά 90-100 g κονιοποιημένου φυτικού υλικού εκχυλίστηκαν με δύο επαναλήψεις με περίσσεια διαλύτη σε ένα τυπικό εύρος 4-8 g φυτικό υλικό/ml διαλύτη για μία ώρα ανά επανάληψη και σε θερμοκρασιακό εύρος 18-35°C. Μετά από κάθε επανάληψη το μίγμα διηθήθηκε υπό κενό μέσα από χάρτινο φίλτρο κυτταρίνης με ονομαστικό πορώδες 20 µm. Τα διηθήματα ενώθηκαν και το διαβρεγμένο φυτικό υλικό εκχυλίστηκε ξανά με τον ίδιο διαλύτη. Ανάμεσα σε διαφορετικούς διαλύτες μεσολάβησε μερική ξήρανση του διαβρεγμένου φυτικού υλικού σε ρεύμα αέρα πάνω σε χάρτινα φίλτρα. Τα υγρά, ενωμένα εκχυλίσματα κάθε διαλύτη συμπυκνώθηκαν μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση σε περιστροφικό εξατμιστήρα σε θερμοκρασία λουτρού 40°C και με βοήθεια αντλίας υψηλού κενού για 30 min. Τα H₂O εκχυλίσματα ξηράθηκαν περαιτέρω με κρουοεξάχνωση. Οι

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

αποδόσεις και η μακροσκοπική εμφάνιση των ολικών εκχυλισμάτων φαίνονται στον Πίνακα του Παραρτήματος Π5.1, σελ. 386. Όλα τα εκχυλίσματα διατηρήθηκαν στους -18°C.

(β) Το ολικό MeOH εκχύλισμα συνεχόμενης εκχύλισης παρασκευάστηκε σύμφωνα με την μέθοδο της διαδοχικής εκχύλισης με διαλύτες αυξανόμενης πολικότητας (βλ. α)). Για την παρασκευή του ολικού DCM εκχυλίσματος μη συνεχόμενης εκχύλισης χρησιμοποιήθηκαν 926 g κονιοποιημένων ταξιανθιών και 7,5 L απεσταγμένου DCM διαμοιρασμένα σε γυάλινα δοχεία (αναλογία φυτικού υλικού : διαλύτη = 1 : 8) και εφαρμόστηκε η τεχνική της στατικής εμβροχής σε θερμοκρασία 18-25°C με περιοδική ανακίνηση του μίγματος για 72 h. Η διαδικασία εκχύλισης πραγματοποιήθηκε τρεις φορές με την ίδια ποσότητα φρέσκου ανακυκλωμένου διαλύτη. Η υγρή φάση διαχωρίστηκε από το φυτικό υλικό με χάρτινο φίλτρο κυτταρίνης ονομαστικού πορώδους 20 μm. Το συνολικό εκχύλισμα συμπυκνώθηκε μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση σε περιστροφικό εξατμιστήρα σε θερμοκρασία λουτρού 40°C και με βοήθεια αντλίας υψηλού κενού για 30 min και διατηρήθηκε στους -18°C. Η απόδοση και η οργανοληπτική εμφάνιση του ολικού εκχυλίσματος φαίνεται στον Πίνακα του Παραρτήματος Π5.1, σελ. 386.

5.2.4 Μέθοδος Ανάλυσης Υγρής Χρωματογραφίας (UPLC) συζευγμένης με φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας με αναλυτή τροχιακής παγίδας (HR(ESI-)MS/MSMS- Orbitrap)

Τα ολικά DCM, MeOH, H₂O εκχυλίσματα ταξιανθιών και φυλλωδών στελεχών του *H. amorginum* συνεχόμενης εκχύλισης αναλύθηκαν ποιοτικά με την τεχνική της υγρής χρωματογραφίας (LC) συνδεδεμένη με φασματογράφο μάζας σε αρνητικό και θετικό ιονισμό με πηγή ηλεκτροψεκασμού (ESI), αναλυτή FT τροχιακής παγίδας ιόντων (Orbital trap-Orbitrap Thermo) υψηλής διακριτικής ικανότητας (mass resolution 30000-100000) με ακρίβεια μάζας (mass accuracy: 2-3 ppm) και δυνατότητα λήψης φασμάτων MS/MS υψηλής διακριτικής ικανότητας.

Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφική στήλη Hypersil Gold column (100 x 2,1 mm i.d., 3 μm particle size, Thermo Scientific) με όγκο ενέσιμου δείγματος 10 μL. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε υδατικό διάλυμα φορμικού οξέος (FA) 0,1% (v/v) (Διαλύτης Α) και 100% Ακετονιτρίλιο (ACN) (Διαλύτης Β). Η χρωματογραφική μέθοδος παρουσιάζεται στον Πίνακα 5.1.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

Πίνακας 5.1: Γενική μέθοδος UHPLC-HRMS άπολων (DCM), πολικών (MeOH, H₂O) εκχυλισμάτων ταξιανθιών και φυλλωδών στελεχών *Helichrysum amorginum*

	Χρόνος έκλουσης (min)	H ₂ O +0.1% FA(%)	ACN(%)	Ροή (μl/min)
1	00,00	98,00	2,00	400,00
2	02,00	98,00	2,00	400,00
3	18,00	00,00	100,00	400,00
4	20,00	00,00	100,00	400,00
5	21,00	98,00	02,00	400,00
6	25,00	98,00	02,00	400,00

Οι ρυθμίσεις για την πηγή ιονισμού ορίστηκαν ως εξής: Θερμοκρασία στο τριχοειδές (capillary temperature) 350°C, δυναμικό τριχοειδούς (capillary voltage) -30V (negative mode) και +40V (positive mode), δυναμικό ψεκασμού (spray voltage) 2,7kV (negative mode) και 3,5kV (positive mode), ροή αέριου N₂ στο τριχοειδές (sheath gas) 40 arb και βοηθητικού αέριου N₂ (auxiliary gas) 10 arb. Για όλες τις μετρήσεις *m/z* όριο εμπιστοσύνης (mass tolerance) ορίστηκαν τα 5 ppm. Φασματομετρικές και χρωματογραφικές παράμετροι όπως ο χρόνος συγκράτησης (Rt), προτεινόμενοι μοριακοί τύποι (EC) και ο βαθμός ακορεστότητας (RDBeq.) μελετήθηκαν για τις κύριες κορυφές σε κάθε εκχύλισμα χρησιμοποιώντας τα φάσματα μάζας πλήρους σάρωσης (Full scan), ενώ σε ένα δεύτερο στάδιο μελετήθηκαν τα φάσματα δίδυμης φασματομετρίας HRMS/MS και το μοτίβο θραυσματοποίησης (fragmentation pattern). Αρχικά επιλέχθηκαν από το ολικό χρωματογράφημα όλες οι κορυφές που εμφάνισαν καλό διαχωρισμό και ένταση σήματος >1 x 10⁵ relative abundance. Στη συνέχεια, οι κορυφές αυτές, κατατάχθηκαν σύμφωνα με τους χρόνους κατακράτησής (Rt) τους. Ο χρόνος έκλουσης της κάθε κορυφής δίνει πληροφορίες για την πολικότητα των ενώσεων. Επιπρόσθετα, το εύρος μαζών που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση ήταν *m/z* 115 έως 1000 Da. Παράλληλα, η υψηλή διακριτική ικανότητα του αναλυτή Orbitrap επιτρέπει την πρόβλεψη των πιθανών μοριακών τύπων των επιλεγμένων κορυφών με μεγάλη ακρίβεια. Το όριο ακρίβειας - απόκλιση θεωρητικής και πειραματικής τιμής τέθηκε $\Delta m \leq 5$ ppm χωρίς περιορισμό στον βαθμό ακορεστότητας RDBeq. Τέλος, ο αποκλεισμός του ατόμου του N στους προτεινόμενους μοριακούς τύπους, οδήγησε σε μεγαλύτερο περιορισμό του αριθμού των προεπιλεγμένων κορυφών. Τα δεδομένα καταγράφηκαν ως αρχεία Xcalibur raw files (.raw, Thermo) και επεξεργάστηκαν με την βοήθεια του λογισμικού Xcalibur™ 2.0.7 Software (Thermo Scientific).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

5.2.5 Μέθοδος Ανάλυσης Αέρια Χρωματογραφία με Φασματομετρία Μάζας (GC-MS)

Δείγμα ολικού n-hexane εκχυλίσματος από ταξιανθίες HA διαλύθηκε με DCM σε συγκέντρωση 5,8 mg/ml. Δείγμα ολικού n-hexane εκχυλίσματος από στελέχη HA διαλύθηκε με DCM σε συγκέντρωση 5,4 mg/ml. Τα δύο δείγματα διαχωρίστηκαν χρωματογραφικά σε σύστημα 8890 Agilent, εξοπλισμένο με αυτόματο δειγματολήπτη 7693A Agilent, χρωματογραφική, τριχοειδή στήλη Agilent HP-5MS 30 m/0,25 mm/0,25 μ m με ρυθμίσεις $\Theta_{\text{injector}} = 220^{\circ}\text{C}$, $\Theta_{\text{detector}} = 230^{\circ}\text{C}$ με αέριο έκλουσης ήλιο σε ρυθμό ροής 1 mL/min. Για όλες τις αναλύσεις των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε θερμοκρασιακό πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης αρχίζοντας από 60°C , αύξηση θερμοκρασίας με ρυθμό $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ έως 280°C , και διατήρηση ισόθερμα στους 280°C για 5 min. Ο ολικός χρόνος ανάλυσης ήταν 60 min. Στο σύστημα ήταν συζευγμένος αναλυτής μάζας απλού τετραπόλου 5877B Agilent, σε λειτουργία θετικού ιονισμού (electron ionization, positive mode) με ενέργεια ιονισμού 70 eV και ρύθμιση εύρους ανίχνευσης μάζας ιόντων (full scan mass range) m/z 45-550. Όλα τα υπό ανάλυση δείγματα εγχύθηκαν σε όγκο 1 μ L σε splitless mode. Η επεξεργασία των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό MSD ChemStation F.01.03.2357 (Agilent Technologies, Inc.) και τις βάσεις δεδομένων Wiley 2007, NIST 2011. Η ταυτοποίηση των μεταβολιτών έγινε βάσει βιβλιογραφικών δεδομένων.

5.2.6 Μέθοδος ανάλυσης 1D, 2D - ^1H , ^{13}C NMR

Τα MeOH εκχυλίσματα ταξιανθιών και στελεχών HA διαλύθηκαν σε MeOD, τα H₂O εκχυλίσματα σε D₂O και τα DCM εκχυλίσματα σε CDCl₃ σε συγκεντρώσεις 5-10 mg/600 μ l για ολικά εκχυλίσματα και 1-5 mg/600 μ l για κλάσματα και απομονωμένες ουσίες. Κάθε διάλυμα διατηρούνταν στους $+5^{\circ}\text{C}$ πριν την ανάλυση.

5.2.7 *In vitro* τεστ παγίδευσης ελεύθερης ρίζας (DPPH)

Χρησιμοποιήθηκε τροποποιημένη βιβλιογραφική μέθοδος (Anis Arnous et al. 2002). Για την παρασκευή του διαλύματος DPPH ζυγίστηκαν $\approx 12,4$ mg αντιδραστηρίου DPPH και προστέθηκαν 100 mL EtOH abs. Το διάλυμα παρασκευάστηκε με έντονη ανάδευση λίγο πριν τη διεξαγωγή του πειράματος απουσία φωτός. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το γαλλικό οξύ (gallic acid) σε συγκέντρωση που αντιστοιχεί σε $\text{IC}_{50} = 100$ $\mu\text{g}/\text{mL}$. Παρασκευάστηκαν επτά συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων ώστε να είναι δυνατός ο υπολογισμός του IC_{50} .

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

Συγκέντρωση (Eppendorf)	Συγκέντρωση (θέσης πλάκας)	Κωδικός
10 mg/mL	500 µg/mL	C1
5 mg/mL	250 µg/mL	C2
2 mg/mL	100 µg/mL	C3
1 mg/mL	50 µg/mL	C4
400 µg/mL	20 µg/mL	C5
200 µg/mL	10 µg/mL	C6
100 µg/mL	5 µg/mL	C7

- Στη συνέχεια ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

Βήμα 1^ο: Φόρτωση πλάκας.

Σε διάφανη πλάκα 96 θέσεων προστέθηκαν τα ακόλουθα:

- DPPH σε όλες τις θέσεις (190 µL)
- EtOH στις θέσεις blank (190 µL)
- Δείγματα εκχυλισμάτων (10 µL)

Βήμα 2^ο: Ελαφριά ανάδευση κι επώαση για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου (25°C) απουσία φωτός.

Βήμα 3^ο: Μέτρηση απορρόφησης στο φωτόμετρο στα 517 nm.

Η μεταβολή της έντασης της απορρόφησης (% μείωση), η οποία είναι αποτέλεσμα της παρουσίας αντιοξειδωτικών ουσιών κι αντικατοπτρίζει την μείωση της ποσότητας της ελεύθερης ρίζας, υπολογίζεται βάσει του ακόλουθου μαθηματικού τύπου:

$$\text{Ποσοστό (\%)} \text{ Αναστολής} = \text{Ποσοστό (\%)} \text{ Δέσμευσης ρίζας} = \frac{[(A-B)-(C-D)]}{(A-B)} \times 100$$

Όπου:

A: η απορρόφηση του μάρτυρα (control)

B: η απορρόφηση (blank) του μάρτυρα (control)

C: η απορρόφηση του δείγματος

D: η απορρόφηση (blank) του δείγματος

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

5.2.8 *In vitro* τεστ αναστολής ενζύμου τυροσινάσης (tyrosinase inhibition assay)

Χρησιμοποιήθηκε τροποποιημένη βιβλιογραφική μέθοδος (Ebru Deveci et al. 2018). Η αναστολή του ενζύμου τυροσινάσης προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά χρησιμοποιώντας L-DOPA ως υπόστρωμα και προσδιορίστηκε η απελευθέρωση της ντοπακινόνης με μέτρηση στα 475 nm. Παρασκευάστηκαν τα ακόλουθα διαλύματα.

- **Διαλύματα εργασίας:**

1. PBS Buffer

Παρασκευάστηκε 1 L ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (PBS Buffer) συγκέντρωσης 1/15 M, pH=6,8. Ζυγίστηκαν $\approx 5,005$ g Na_2HPO_4 και $\approx 5,758$ g NaH_2PO_4 και διαλύθηκαν σε περίπου 800 ml H_2O διπλής απόσταξης. Στην περίπτωση που απαιτήθηκε ρύθμιση του pH, προστέθηκε διάλυμα NaOH έως pH=6,8 και H_2O έως 1000 ml.

2. Διάλυμα Τυροσινάσης

Από το αρχικό stock solution του ενζύμου (25000 U/ml) βρέθηκε η ενεργή του συγκέντρωση (92 U/ml). Για την εφαρμογή σε κάθε 96-θέσεων πλάκα απαιτήθηκαν περίπου 3 ml ενζύμου. Έτσι, έγινε η κατάλληλη αραιώση στον απαιτούμενο όγκο. Το διάλυμα αυτό παρασκευάστηκε πριν την πλήρωση της πλάκας.

3. Διάλυμα Kojic Acid

Παρασκευάστηκε διάλυμα συγκέντρωσης 250 μM . Η συγκέντρωση αυτή ήταν κατάλληλη ώστε μετά την αραιώση στον τελικό όγκο μέσα στη θέση να οδηγήσει σε αναστολή περίπου 50%. Η τελική συγκέντρωση ήταν 50 μM .

Για να ετοιμαστεί την αρχική συγκέντρωση, ζυγίστηκε κατάλληλη ποσότητα Kojic Acid (M_r : 142,1119 g/mol) και υπολογίστηκε με βάση τον τύπο: $m=C \cdot V \cdot M_r$

$$V(\text{mL}) = \frac{m(\text{mg})}{C(\text{mM}) * M_r \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right)} = \left(\frac{X(\text{mg})}{35,527975} \right) * 1000$$

4. Διάλυμα υποστρώματος L-Dopa

Παρασκευάστηκε εκ νέου στην απαιτούμενη για το πείραμα ποσότητα το διάλυμα του υποστρώματος L-Dopa σε συγκέντρωση 2,5 mM. Για κάθε πλάκα απαιτήθηκαν περίπου 4,5 ml. Για την παρασκευή του διαλύματος ζυγίστηκε ποσότητα L-Dopa $\approx 2,5$ -3 mg (M_r : 197,19 g/mol) και κατόπιν διαλύθηκε στον απαιτούμενο όγκο PBS buffer, ο οποίος υπολογίστηκε με ακρίβεια βάσει του τύπου:

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

$$V(mL) = \frac{m(mg)}{C(mM) * Mr\left(\frac{g}{mol}\right)} = \left(\frac{X(mg)}{492.975}\right) * 1000$$

5. Διαλύματα εκχυλισμάτων

Εξετάστηκαν οι παρακάτω συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων.

Εκχυλίσματα		Καθαρές ουσίες	
Αρχική συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση	Αρχική συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση
1,5 mg/ml	300 µg/ml	2,5 mM	500 µM
750 µg/ml	150 µg/ml	500 µM	100 µM
375 µg/ml	75 µg/ml	125 µM	25 µM

Για την διεξαγωγή του πειράματος ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

Βήμα 1^ο: Φόρτωση πλάκας

Σε διάφανη πλάκα 96 θέσεων προστέθηκαν τα:

- Buffer σε όλα τις θέσεις (80 µl)
- εκχυλίσματα προς μελέτη (40 µl)
- ένζυμο, εκτός του blank (40 µl)

Βήμα 2^ο: Ελαφριά ανάδευση και επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (25°C) σε σκοτεινό μέρος.

Βήμα 3^ο: Προσθήκη διαλύματος υποστρώματος L-Dopa (40 µl) σε όλες τις θέσεις.

Βήμα 4^ο: Επώαση για 10-15 min σε θερμοκρασία δωματίου (25°C) απουσία φωτός.

Βήμα 5^ο: Μέτρηση απορρόφησης στα 475 nm.

Για τον υπολογισμό του ποσοστού της αναστολής χρησιμοποιήθηκε η μαθηματική εξίσωση:

$$\text{Inhibition(\%)} = \frac{(A_{\text{control}} - A_{\text{control's blank}}) - (A_{\text{sample}} - A_{\text{sample's blank}})}{(A_{\text{control}} - A_{\text{control's blank}})}$$

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

5.3 Αποτελέσματα-Συζήτηση

5.3.1 Ποιοτική μελέτη εκχυλισμάτων (profiling) με GC-MS, LC-ESI-(±)-HRMS, ¹H NMR

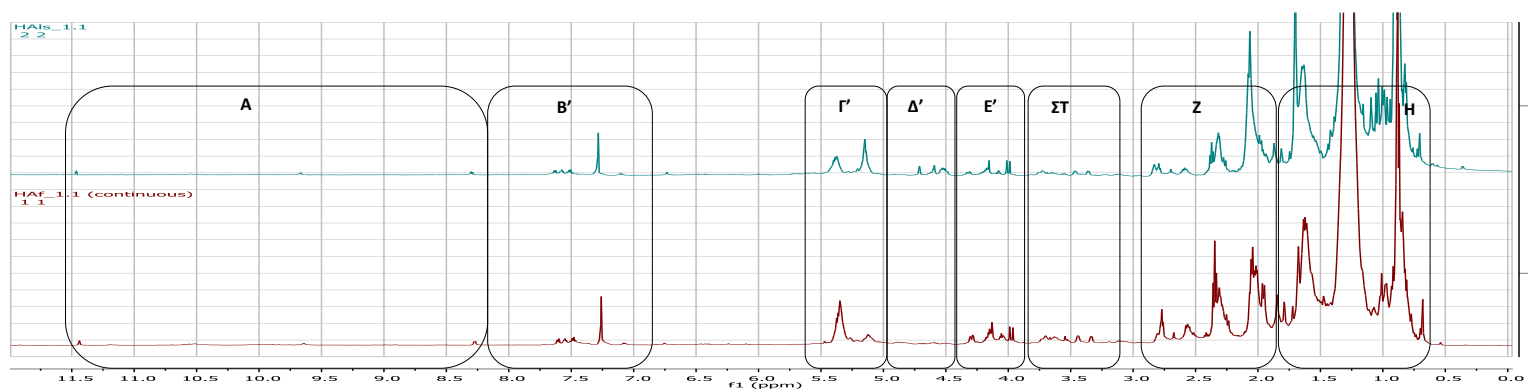
5.3.1.1 Ολικό n-hexane εκχύλισμα από ταξιανθίες και στελέχη ΗΑ

Στο γένος *Helichrysum* έχουν μελετηθεί λιπόφιλα εκχυλίσματα και έχουν ταυτοποιηθεί συστατικά όπως παράγωγα λιπαρών οξέων και τερπενοειδή, κουμαρίνες όπως η σκοπολετίνη, λιπίδια και στερόλες (Akaberi, Sahebkar, et al. 2019, Pljevljakušić et al. 2018). Τα φάσματα πρωτονίων ¹H NMR των ολικών n-hexane εκχυλισμάτων ταξιανθιών και στελεχών φαίνονται στην Εικόνα 5.1, όπου διακρίνονται περιοχές σημάτων αλειφατικών πρωτονίων (0,7-1,9 ppm), αλλυλικών/ακετυλενικών/καρβονυλικών σημάτων πρωτονίων (1,9-3,0 ppm), καρβονυλικών (3,3-3,8 ppm), πρωτονίων γειτονικών σε ετεροάτομο Ο (οξυγόνο) (3,9-4,4 ppm), πρωτονίων γειτονικών σε ετεροάτομο Ο ή Χ (π.χ. αλογόνο) (4,4-4,8 ppm), βινυλικών πρωτονίων όπως των διπλών δεσμών των λιπαρών οξέων (5-5,5 ppm), πρωτονίων συζυγιακών διπλών δεσμών όπως αρωματικών (6,8-8,2 ppm) και τετραπυρρολικών πρωτονίων όπως στην περίπτωση των χλωροφυλλών (8-11,4 ppm) ή αλδεϋδικών πρωτονίων ή πρωτονίων καρβοξυλομάδων.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η περιοχή σημάτων 4,4-4,8 ppm δεν εμφανίζεται με μεγάλη ένταση στο εκχύλισμα ταξιανθιών και ότι και στα δύο εκχυλίσματα παρατηρούνται μη αμελητέα σήματα στην περιοχή 6,8-7,7 ppm των συζυγιακών διπλών δεσμών (ή/και αρωματικών πρωτονίων) γεγονός που πιθανώς να παραπέμπει στην ύπαρξη αρωματικών δακτυλίων ή συζυγιακών ενίων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

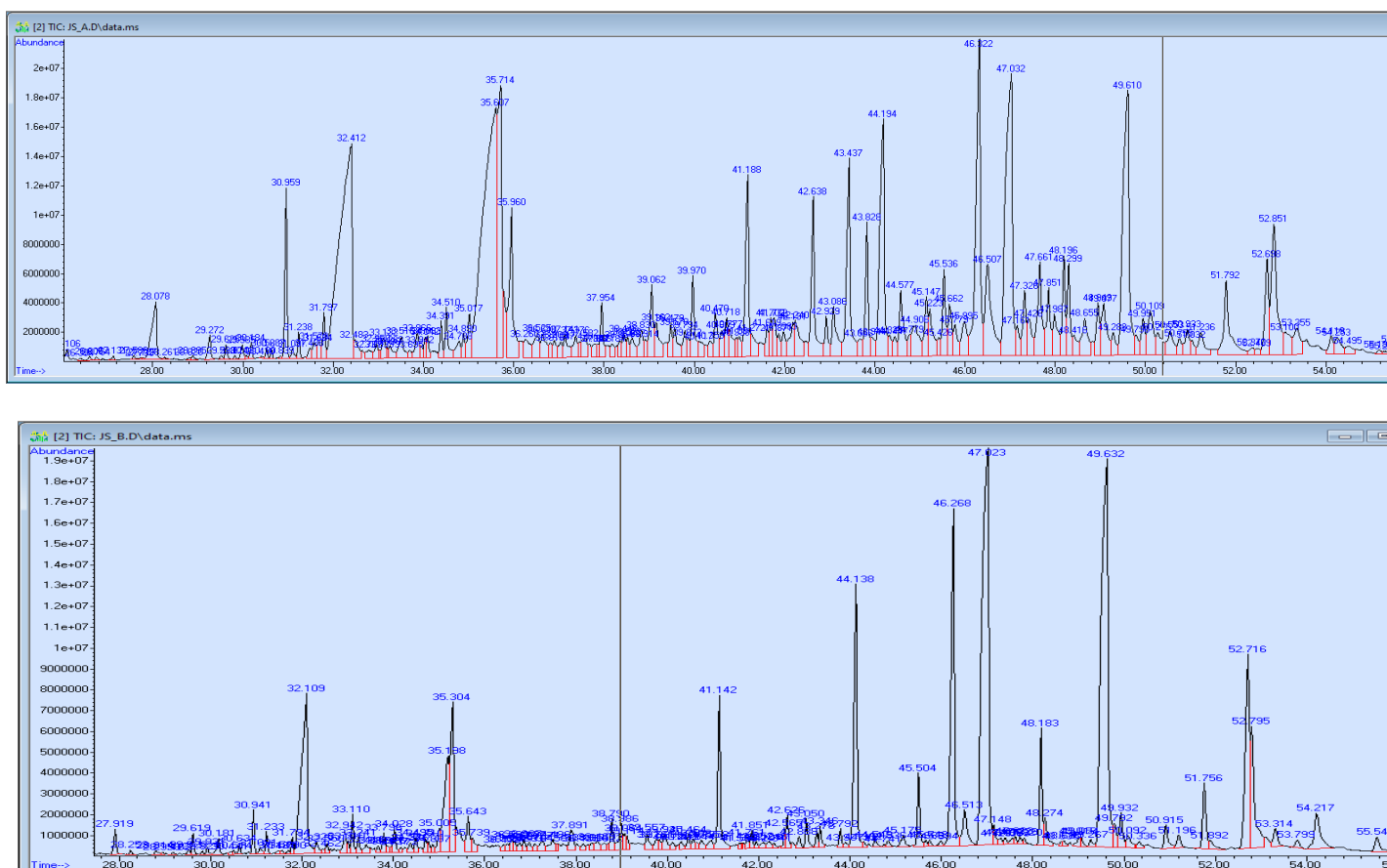
Αρίθμηση περιοχών φασμάτων ¹ H NMR	Χημικές μετατοπίσεις (ppm), CDCl ₃ (7.26ppm, 600MHz)							
	A'	B'	Γ'	Δ'	Ε'	ΣΤ'	Ζ'	Η'
Στελέχη (μπλε γραμμή)	8,0-11,5	6,8-7,7	5-5,5	4,4-4,8	3,9-4,4	3,3-3,8	1,9-3,0	0,7-1,9
Ταξιανθίες (κόκκινη γραμμή)	8,0-11,5	6,8-7,7	5-5,5	-	3,9-4,4	3,3-3,8	1,9-3,0	0,7-1,9
Χημική κατηγορία σημάτων	RCH=O RCOOH HN-CH=CRN=	R1R2C=CR3-H Ar-H	R1R2C=CR3-H	H-C-X H-C-O	R1R2CH-O-	Carbinolic region R1CH- (C=O)R2	RC≡CH R1R2C=CRCH3 CH3RC=O	R-CH3, R1R2CH2, R1R2R3CH



Εικόνα 5.1: ¹H NMR των *n*-hexape ολικών εκχυλισμάτων ταξιανθιών (κόκκινη γραμμή) και φυλλώδων στελεχών (μπλε γραμμή) του βιολογικώς καλλιεργούμενου *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό (συγκομιδή 2017)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

Τα χρωματογράφημα ολικών ιόντων (TIC) της ανάλυσης των n-hexane εκχυλισμάτων ταξιανθιών και των φυλλωδών στελεχών σε θετικό ιονισμό παρουσιάζονται στην Εικόνα 5.2.



Εικόνα 5.2: Χρωματογράφημα TIC εξανικού εκχυλίσματος ταξιανθιών (άνω) και φυλλωδών στελεχών (κάτω) του βιολογικώς καλλιεργούμενου *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό (συγκομιδή 2017)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

Σύμφωνα με τον Πίνακα 5.2, στο εύρος χρόνου έκλουσης 28-55 min, ταυτοποιήθηκαν τα λιπαρά οξέα και εστέρες **1, 3, 4, 5, 6, 7**, η μεθοξυ φλαβόνη **11**, οι αλειφατικοί υδρογονάνθρακες **8, 9, 10, 12, 13**, το διτερπένιο **2**, οι φυτοστερόλες **14, 15**, οι πεντακυκλικές τριτερπενόλες **16, 18**, το τετρακυκλικό τριτερπένιο **17** και το οξυγονωμένο, τετρακυκλικό τριτερπένιο **19**. Οι 11, 14, 15 έχουν εντοπιστεί στο είδος *H. arenarium* (Pljevljakušić et al. 2018), ο 16 στο είδος *H. calliconum* Harv. (Ferdinard Bohlmann 1979), ο 18 στο είδος *H. polycladum* Klatt (Bohlmann et al. 1980).

Πίνακας 5.2: Ενδεικτική ταυτοποίηση με GC-MS μεταβολιτών σε ολικά *n*-hexane εκχυλίσματα ταξιανθιών (Τ) και φυλλωδών (Φ) στελεχών του βιολογικώς καλλιεργούμενου *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό (συγκομιδή 2017)

Κορυφή	Rt (min)	Μοριακός τύπος	Κύρια θραύσματα	M.B.	Match quality	ένωση	Όργανο φυτού
1	28,09	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	199, 185, 171, 143, 129, 73, 60, 55	228,21	99%	Tetradecanoic acid (myristic acid)	T
2	30,95	C ₂₀ H ₃₀	227, 185, 159, 145, 132, 119, 105, 91, 69	270,24	97%	Geranyl-p-cymene	T
3	32,33	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	227, 213, 199, 185, 171, 157, 129, 115, 97, 83, 73, 60, 55	256,24	98%	Hexadecenoic acid	T, Φ
4	35,19	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	150, 135, 123, 109, 95, 81, 67, 55	294,25	93%	Methyl linoleate	Φ
5	35,30	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	264, 222, 151, 111, 83, 79, 55	282,26	96%	9-Octadecenoic acid (oleic acid)	T, Φ
6	35,51	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	264, 222, 151, 137, 123, 109, 95, 81, 67, 55	280,24	97%	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-	T
7	35,96	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	241, 227, 199, 185, 171, 157, 143, 129, 111, 97, 83, 73, 60, 55	284,27	99%	Octadecanoic acid	T
8	41,13	C ₁₉ H ₄₀	225, 197, 183, 169, 155, 141, 127, 113, 85, 71, 57	268,31	97%	Nonadecane	Φ
9	44,18	C ₂₇ H ₅₆	323, 309, 281, 253, 239, 225, 211, 197, 183, 169, 155, 141, 127, 113, 99, 85, 71, 57	380,44	90%	Heptacosane	T, Φ
10	45,14	C ₂₈ H ₅₈	365, 337, 183, 169, 155, 141, 127, 113, 93, 85, 71, 57	394,45	99%	3-Methylheptacosane	T

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

11	46,31	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	329, 315, 301, 286, 268, 258, 243, 215, 172, 131, 105, 77, 69	344,09	95%	3,5-Dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavone (4H-1-Benzopyran-4-one,3,5-dihydroxy-6,7,8-trimethoxy-2-phenyl-)	T, Φ
12	47,00	C ₃₀ H ₆₂	337, 323, 309, 295, 281, 267, 253, 239, 225, 197, 183, 169, 155, 141, 127, 113, 99, 85, 71, 57	422,48	91%	Triacontane	T, Φ
13	49,57	C ₃₁ H ₆₄	323, 281, 267, 253, 239, 225, 197, 183, 169, 155, 141, 127, 113, 99, 85, 71, 57	436,50	90%	Untriacontane	T, Φ
14	51,80	C ₂₉ H ₄₈ O	397, 379, 369, 351, 300, 271, 255, 213, 199, 159, 145, 133, 119, 105, 95, 83, 69, 55	412,37	99%	Stigmasterol	T, Φ
15	52,87	C ₂₉ H ₅₀ O	396, 381, 354, 329, 303, 273, 255, 231, 213, 199, 159, 145, 133, 119, 107, 95, 81, 69, 55	414,39	99%	γ-sitosterol	T, Φ
16	53,35	C ₃₀ H ₅₀ O	218, 203, 189, 175, 161, 147, 135, 119, 107, 95, 81, 69, 55	426,39	99%	β-amyrin	T, Φ
17	54,10	C ₂₉ H ₄₈	381, 288, 275, 255, 213, 199, 173, 159, 147, 133, 121, 105, 95, 81, 69, 57	396,38	99%	Stigmasta-3,5-diene	T
18	54,29	C ₃₀ H ₅₀ O	411, 367, 271, 255, 218, 203, 189, 175, 161, 147, 135, 121, 105, 95, 81, 69, 55	426,39	90%	α-amyrin	T, Φ
19	55,55	C ₂₉ H ₄₈ O	397, 370, 355, 327, 314, 289, 271, 229, 203, 187, 175, 161, 149, 135, 124, 107, 95, 81, 69, 55	412,37	95%	Stigmast-4-en-3-one	T, Φ

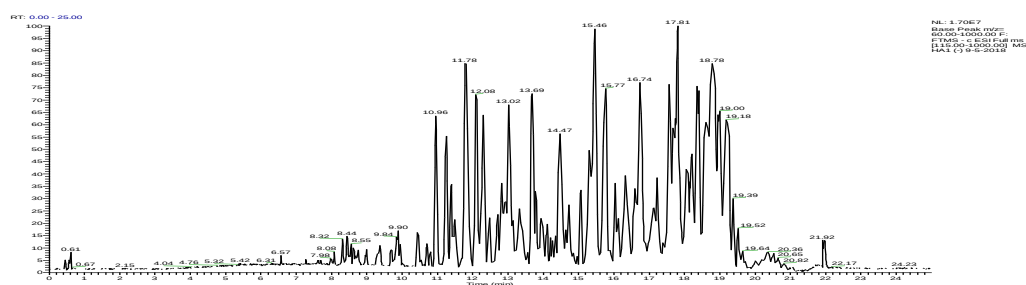
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

5.3.1.2 Ολικό DCM εκχύλισμα από ταξιανθίες, στελέχη HA (διαδοχική εκχύλιση)

Τα ολικά DCM εκχυλίσματα ταξιανθιών και φυλλωδών στελεχών του *H. amorginum*, μετά από συνεχόμενη εκχύλιση του φυτικού υλικού με n-hexane, αναλύθηκαν ποιοτικά με την τεχνική της υγρής χρωματογραφίας υπερύψηλης απόδοσης (UHPLC) συνδεδεμένη με φασματογράφο μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRMS) σε αρνητικό και θετικό ιονισμό με την μέθοδο που περιγράφεται στην Υποενότητα 5.2.4.

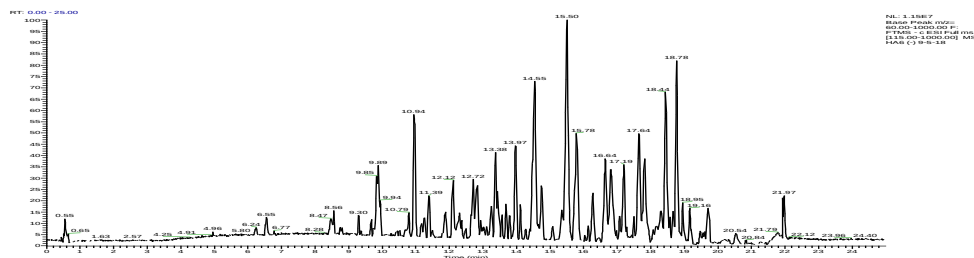
Τα χρωματογραφήματα της ανάλυσης των εκχυλισμάτων ταξιανθιών σε θετικό και αρνητικό ιονισμό παρουσιάζονται στην Εικόνα 5.3 και των φυλλωδών στελεχών στην Εικόνα 5.4.

DCM inflorescence extract, ESI-

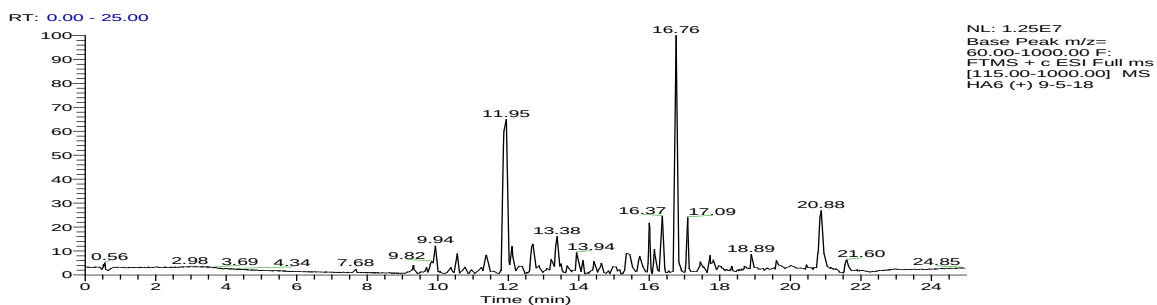


ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

DCM leafy stem extract, ESI-



DCM leafy stem extract, ESI+



Εικόνα 5.4: UHPLC-ESI-(±)-HRMS χρωματογραφήματα κύριων κορυφών (*base peaks*) του ολικού DCM εκχυλίσματος φυλλωδών στελεχών *Helichrysum amorginum* από εκχύλιση με *n*-hexane (από UHPLC-ESI-(±)-HRMS)

Από τις εικόνες των χρωματογραφημάτων διαπιστώνεται ότι τα DCM εκχυλίσματα των ταξιανθιών και φυλλωδών στελεχών του *H. amorginum* είναι πλούσια σε μεταβολίτες άπολους ως μέτριας πολικότητας κι ότι ιονίζονται καλύτερα σε αρνητικό ιονισμό. Για τον λόγο αυτό επιλέχθηκε η εξέταση των φασματομετρικών δεδομένων σε αρνητικό ιονισμό με παράλληλο όμως έλεγχο στον θετικό ιονισμό (έξτρα κορυφές που ιονίζονται καλύτερα με θετικό ιονισμό συμπεριλήφθηκαν στους πίνακες). Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον Πίνακα 5.3.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

Πίνακας 5.3: Ενδεικτική ταυτοποίηση μεταβολιτών σε ολικά DCM εκχυλίσματα ταξιανθιών (Τ) και φυλλωδών στελεχών (Φ) *Helichrysum amorginum* μετά από διαδοχικές εκχυλίσεις με *n*-hexane με UHPLC-ESI(-)-HRMS

Κορυφή	T (min)		Πειραματική	Θεωρητική	Δm ppm	RDBeq	Κύρια Θραύσματα MS ²	Ενδεικτική ονομασία μεταβολίτη	Όργανο φυτού	Αναφορά
		[M-H] ⁻	[M-H] ⁻	(m/z)						
1	6,57	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	447,0932	447,0933	-0,2	12,5	285	luteolin glycoside	Φ	(Zhuan-Hong Li et al. 2016)
2	8,08	C ₁₆ H ₁₉ O ₇	323,1136	323,1135	-0,3	7,5	279 [M-H-CO ₂] ⁻ , 221	unknown	Φ	-
3	8,32	C ₁₅ H ₉ O ₅	269,0455	269,0457	0,7	11,5	225, 151	apigenin	Φ	(Brito et al. 2014)
4	8,44	C ₁₅ H ₉ O ₆	285,0405	285,0406	0,4	11,5	257, 241, 229, 213, 151, 107	kaempferol	Φ	(Chen et al. 2016)
5	8,55	C ₂₀ H ₁₉ O ₇	371,1136	371,1137	0,3	11,5	327 [M-H-CO ₂] ⁻	unknown	Τ, Φ	-
6	8,62	C ₁₆ H ₁₁ O ₇	315,051	315,0511	0,3	11,5	300	isorhamnetin	Τ	(Gokhan Zengina et al. 2020)
7	8,75	C ₁₇ H ₂₁ O ₇	337,1293	337,1293	0,1	7,5	293 [M-H-CO ₂] ⁻	unknown	Τ	-
8	8,8	C ₁₅ H ₁₇ O ₇	309,0979	309,0969	-0,2	7,5	291 [M-H-CO ₂] ⁻ , 265, 247, 237, 181, 139	Coumarin analogue	Τ	(Bojan Vujic et al. 2020; Angel Rumero et al. 2000)
9	8,96	C ₂₂ H ₂₃ O ₅	367,1551	367,155	-0,1	11,5	298, 283, 270	unknown	Τ	-
10	8,99	C ₁₈ H ₃₃ O ₅	329,233	329,2336	0,7	2,5	311, 309, 293, 229, 211, 183, 171	C18 Trihydroxy fatty acid 2	Τ	(Mariana Rey et al. 2021)
11	9,37	C ₁₈ H ₂₃ O ₇	351,1449	351,145	0,1	7,5	307 [M-H-CO ₂] ⁻	unknown	Τ, Φ	-
12	9,69	C ₁₅ H ₁₇ O ₆	293,1031	293,1032	0,6	7,5	235, 221, 191	unknown	Τ, Φ	-
13	9,73	C ₁₆ H ₁₉ O ₇	323,1136	323,1136	-0,2	7,5	279 [M-H-CO ₂] ⁻	unknown	Φ	-
14	9,84	C ₂₀ H ₁₉ O ₇	371,1136	371,1138	0,5	11,5	327 [M-H-CO ₂] ⁻	unknown	Τ, Φ	-
15	9,95	C ₁₈ H ₁₅ O ₈	359,0772	359,0772	0	11,5	344 [M-H-CH ₃] ⁻ , 331, 225, 210, 194	Methylated flavonoid	Τ, Φ	-
16	10,44	C ₂₁ H ₂₃ O ₈	403,1398	403,14	0,3	10,5	251, 139	unknown	Τ, Φ	-
17	10,54	C ₁₇ H ₂₁ O ₇	337,1293	337,1293	0	7,5	319, 293, 275, 221, 181	unknown	Τ	-
18	10,7	C ₁₆ H ₁₉ O ₆	307,1187	307,119	0,8	7,5	263 [M-H-CO ₂] ⁻ , 251, 219, 165	unknown	Τ, Φ	-
19	10,8	C ₁₈ H ₁₅ O ₅	311,0925	311,0927	0,4	11,5	283 [M-H-CO] ⁻	unknown	Τ	-
20	11	C ₂₀ H ₁₉ O ₆	355,1187	355,119	0,6	11,5	311 [M-H-CO ₂] ⁻	unknown	Τ, Φ	-

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

21	11,26	C ₂₂ H ₂₅ O ₈	417,1555	417,1558	0,6	10,5	251, 153	Plicatipyrone analogue 1	T	(Bojan Vujic et al. 2020)
22	11,4	C ₂₆ H ₂₅ O ₈	465,1555	465,1561	1,2	14,5	325, 313	unknown	T, Φ	-
23	11,5	C ₂₂ H ₂₅ O ₈	417,1555	417,1558	0,7	10,5	251, 153	Plicatipyrone analogue 2	T, Φ	(Bojan Vujic et al. 2020)
24	11,81	C ₂₂ H ₂₃ O ₄	351,1602	351,1604	0,7	11,5	287, 196	unknown	T, Φ	-
25	12,11	C ₂₇ H ₂₇ O ₈	479,1711	479,1714	0,6	14,5	325, 313, 153 [C ₈ H ₉ O ₃]-	pyrone derivative	T, Φ	-
26	12,2	C ₁₉ H ₂₅ O ₄	317,1759	317,1758	0,1	7,5	248, 180, 152	unknown	T	-
27	12,3	C ₂₃ H ₂₇ O ₈	431,1711	431,1713	0,2	10,5	265, 153 [C ₈ H ₉ O ₃]-	pyrone derivative	Φ	-
28	12,49	C ₁₆ H ₁₇ O ₅	289,1081	289,1084	0,8	8,5	261 [M-H-CO]-, 245, 217	unknown	T	-
29	12,7	C ₂₀ H ₁₇ O ₅	337,1081	337,1082	0,2	12,5	309 [M-H-CO]-, 259, 231, 145	unknown	T, Φ	-
30	12,88	C ₂₇ H ₂₇ O ₈	479,1711	479,1715	0,7	14,5	325, 313, 153 [C ₈ H ₉ O ₃]-	pyrone derivative	T, Φ	-
31	12,98	C ₁₈ H ₃₁ O ₃	295,2279	295,228	0,4	3,5	277 [M-H-H ₂ O]-, 171	C18 Hydroxy fatty acid	Φ	(Ahmed Serag et al. 2020)
32	13,02	C ₂₄ H ₂₉ O ₈	445,1868	445,1871	0,7	10,5	291, 279, 153	Heliarzanol analogue	T, Φ	(Kramberger et al. 2020)
33	13,14	C ₁₇ H ₁₉ O ₅	303,1238	303,124	0,5	8,5	285, 275 [M-H-CO]-	unknown	T	-
34	13,32	C ₂₀ H ₂₇ O ₄	331,1915	331,1915	0	7,5	262, 234, 194, 166	unknown	T	-
35	13,41	C ₂₁ H ₂₃ O ₈	403,1398	403,14	0,4	10,5	263, 251, 237	unknown	T, Φ	-
36	13,56	C ₁₉ H ₁₇ O ₅	325,1081	325,1082	0,3	11,5	247, 145	unknown	T, Φ	-
37	13,69	C ₂₅ H ₃₁ O ₈	459,2024	459,2026	0,2	10,5	293, 235, 153 [C ₈ H ₉ O ₃]-	pyrone derivative	T, Φ	-
38	13,78	C ₁₈ H ₂₁ O ₅	317,1394	317,1396	0,4	8,5	289	unknown	T, Φ	-
39	13,89	C ₂₂ H ₂₅ O ₆	385,1657	385,1657	0	10,5	287, 273	unknown	T	-
40	13,94	C ₂₄ H ₂₉ O ₈	445,1868	445,187	0,3	10,5	293	unknown	T	-
41	13,99	C ₂₅ H ₂₆ O ₆	433,1657	433,1659	0,4	14,5	321	unknown	T, Φ	-
42	14,07	C ₁₇ H ₂₃ O ₄	291,1602	291,1604	0,7	6,5	276, 233, 221, 208, 195, 152	unknown	T	-
43	14,12	C ₂₅ H ₂₆ O ₆	433,1657	433,1656	-0,1	14,5	321	unknown	T, Φ	-
44	14,21	C ₂₂ H ₂₉ O ₄	357,2071	357,2072	0	8,5	339, 313, 311, 179	unknown	T	-
45	14,27	C ₂₇ H ₂₇ O ₈	479,1711	479,1714	0,5	14,5	325, 313	unknown	Φ	-
46	14,34	C ₂₃ H ₂₄ O ₅	365,1758	365,1758	-0,1	11,5	321, 287, 253, 219, 145	unknown	T	-

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

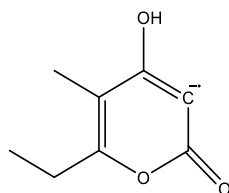
47	14,47	C ₂₂ H ₂₅ O ₈	417,1555	417,1554	-0,1	10,5	263, 251, 233, 209	plicatipyrone analogue	T, Φ	(Bojan Vujic et al. 2020)
48	14,55	C ₂₆ H ₂₅ O ₈	465,1555	465,1558	0,5	14,5	325, 313	unknown	Φ	-
49	14,63	C ₂₆ H ₂₃ O ₇	447,1449	447,1452	0,6	15,5	307, 295	unknown	T, Φ	-
50	14,73	C ₂₂ H ₂₅ O ₈	417,1555	417,1557	0,5	10,5	263, 251, 233, 209	plicatipyrone analogue	T, Φ	(Bojan Vujic et al. 2020)
51	14,85	C ₃₁ H ₃₅ O ₉	551,2287	551,2287	0	14,5	411, 399	unknown	Φ	-
52	15,07	C ₂₂ H ₂₃ O ₇	399,1449	399,1451	0,5	11,5	245, 233, 153	italipyrone	Φ	(Kramberger et al. 2020)
53	15,29	C ₂₈ H ₃₃ O ₅	449,2333	449,2335	0,3	12,5	310, 267, 242	unknown	Φ	-
54	15,34	C ₂₇ H ₂₅ O ₇	461,1606	461,1611	1,1	15,5	295, 153 [C ₈ H ₉ O ₃]-	pyrone derivative	T, Φ	-
55	15,46	C ₂₇ H ₂₇ O ₈	479,1711	479,1714	0,5	14,5	325, 313, 269, 241	unknown	T, Φ	-
56	15,77	C ₂₃ H ₂₇ O ₈	431,1711	431,1715	0,8	10,5	291, 279, 277, 265, 247, 193	unknown	T, Φ	-
57	15,89	C ₂₅ H ₃₁ O ₈	459,2024	459,2027	0,4	10,5	305, 293	unknown	Φ	-
58	16,04	C ₂₃ H ₂₅ O ₇	413,1606	413,1608	0,4	11,5	247, 153 [C ₈ H ₉ O ₃]-	pyrone derivative	T, Φ	-
59	16,12	C ₂₂ H ₂₃ O ₇	399,1449	399,1451	0,3	11,5	245, 233, 153	italipyrone analogue	T, Φ	(Kramberger et al. 2020)
60	16,33	C ₂₁ H ₂₃ O ₇	387,1449	387,1449	0	10,5	247, 235, 139	arenol	T, Φ	(Rios et al. 1991)
61	16,42	C ₂₈ H ₃₇ O ₉	517,2443	517,2447	0,7	10,5	363, 351	unknown	Φ	-
62	16,74	C ₂₄ H ₂₉ O ₈	445,1868	445,1871	0,7	10,5	305, 293, 291, 279, 261	Heliarzanol analogue	T, Φ	(Kramberger et al. 2020)
63	16,96	C ₂₈ H ₃₉ O ₅	455,2803	455,2803	0	9,5	386 [M-H-prenyl]-, 315, 263, 247, 180	prenyl derivative	T, Φ	-
64	17,07	C ₂₃ H ₂₅ O ₇	413,1606	413,1607	0,2	11,5	273, 261, 247	pyrone derivative	Φ	-
65	17,14	C ₂₇ H ₂₅ O ₇	461,1606	461,161	0,8	15,5	307, 295, 153 [C ₈ H ₉ O ₃]-	pyrone derivative	T, Φ	-
66	17,22	C ₂₃ H ₃₁ O ₄	371,2228	371,2228	0	8,5	302, 234, 233, 219, 206, 179, 166, 138	unknown	T	-
67	17,28	C ₃₃ H ₄₁ O ₅	517,2959	517,296	0,1	13,5	449, 393, 351, 309, 267, 242	unknown	Φ	-
68	17,57	C ₂₅ H ₃₁ O ₈	459,2024	459,2031	1,3	10,5	305, 293	unknown	T, Φ	-
69	17,81	C ₂₂ H ₂₅ O ₇	401,1606	401,1609	0,7	10,5	247, 235, 205, 191, 166, 153[C ₈ H ₉ O ₃]-	Arzanol	T, Φ	(Kramberger et al. 2020)
70	18,17	C ₂₅ H ₂₉ O ₇	441,1919	441,1919	0	11,5	275	unknown	Φ	-
71	18,21	C ₂₄ H ₃₃ O ₄	385,2384	385,2383	-0,3	8,5	316, 248, 247, 193, 180, 152	unknown	T, Φ	-
72	18,35	C ₂₆ H ₂₅ O ₇	449,1606	449,1607	0,2	14,5	309, 297	unknown	T, Φ	-

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

73	18,61	C ₂₃ H ₂₇ O ₇	415,1762	415,1764	0,4	10,5	261, 249, 153 [C ₈ H ₉ O ₃]-	pyrone derivative	T, Φ	-
74	18,78	C ₂₇ H ₂₇ O ₇	463,1762	463,1765	0,4	14,5	309, 297	unknown	T, Φ	-
75	19	C ₂₄ H ₂₉ O ₇	429,1919	429,1918	-0,7	10,5	289, 275, 263, 153 [C ₈ H ₉ O ₃]-	pyrone derivative	T, Φ	-
76	19,18	C ₂₅ H ₃₁ O ₇	443,2075	443,2078	0,6	10,5	289, 277	unknown	T, Φ	-
77	19,39	C ₂₇ H ₃₃ O ₇	469,2232	469,2233	0,3	11,5	329, 315, 303	unknown	T, Φ	-
78	19,52	C ₂₈ H ₃₅ O ₇	483,2388	483,2388	0	11,5	343, 329, 317	unknown	T, Φ	-
79	19,64	C ₂₉ H ₃₇ O ₇	497,2545	497,2548	0,6	11,5	357, 343, 331	unknown	T, Φ	-
80	19,72	C ₃₀ H ₃₉ O ₇	511,2701	511,2702	0,1	11,5	357, 345	unknown	T	-
81	20,01	C ₃₆ H ₃₅ O ₁₁	643,2185	643,2184	-0,1	19,5	-	unknown	T	-
82	20,2	C ₃₃ H ₃₇ O ₁₁	609,2341	609,2341	0	15,5	469, 457, 455, 443, 361	unknown	T	-
83	20,36	C ₃₄ H ₃₉ O ₁₁	623,2498	623,2498	0	15,5	483, 471, 469, 457, 375	unknown	T	-
84	20,41	C ₃₉ H ₄₁ O ₁₁	685,2654	685,2651	-0,4	19,5	531, 519, 375	unknown	T	-
85	20,54	C ₃₅ H ₄₁ O ₁₁	637,2654	637,2654	0	15,5	485, 483, 471, 375	unknown	T	-
86	20,65	C ₃₆ H ₄₃ O ₁₁	651,2811	651,2808	-0,4	15,5	497, 485, 375, 361	unknown	T	-
87	20,82	C ₃₇ H ₄₅ O ₁₁	665,2967	665,2961	-0,9	15,5	511, 499, 375, 287	unknown	T	-

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

Οι ταυτοποιημένοι μεταβολίτες του Πίνακα 5.3 κατηγοριοποιούνται σε πέντε φλαβονοειδή και παράγωγα, όπως ο γλυκοσίδης luteolin glycoside **(1)**, τα άγλυκα apigenin **(3)**, kampferol **(4)**, τα μεθυλιωμένα φλαβονοειδή isorhamnetin **(6)** και **(15)** και σε τέσσερα διάφορα όπως το ανάλογο κουμαρίνης **(8)**, τα C18 υδροξυ λιπαρά οξέα **(10)**, **(31)** και ο άγνωστος πρενυλιωμένος μεταβολίτης **(63)** που ανιχνεύθηκε από το χαρακτηριστικό ιόν με 386 Da, που αντιστοιχεί στην απομάκρυνση πρένυλο ομάδας C₅H₉ (69 Da) από το [M-H]⁻ (455 Da). Επίσης, ένας σημαντικός αριθμός 20 μεταβολιτών ανήκει στα παράγωγα πυρόνης όπως plicatipyrgone analogues **(21)**, **(23)**, **(47)**, **(50)**, heliarzanol analogues **(32)**, **(62)**, italipyrgones **(52)**, **(59)**, arzanol **(69)**, arenol **(60)** και τα **(25)**, **(27)**, **(30)**, **(37)**, **(54)**, **(58)**, **(64)**, **(65)**, **(73)**, **(75)** που αντιστοιχούν σε παράγωγα α-πυρόνης με χαρακτηριστικό θραύσμα 153 Da που αντιστοιχεί στον δομικό τύπο της Εικόνας 5.5.



Chemical Formula: C₈H₉O₃⁻
Exact Mass: 153.06

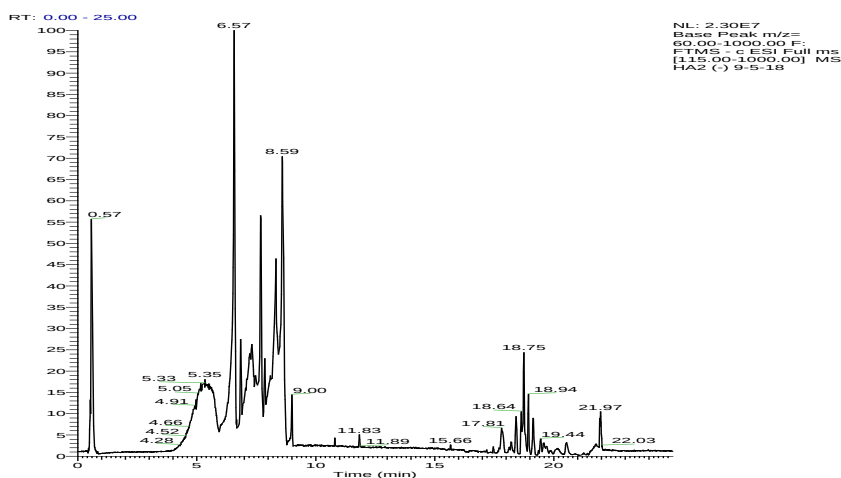
Εικόνα 5.5: Μοριακή δομή θραύσματος α-pyrone σε αρνητικό ιονισμό

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

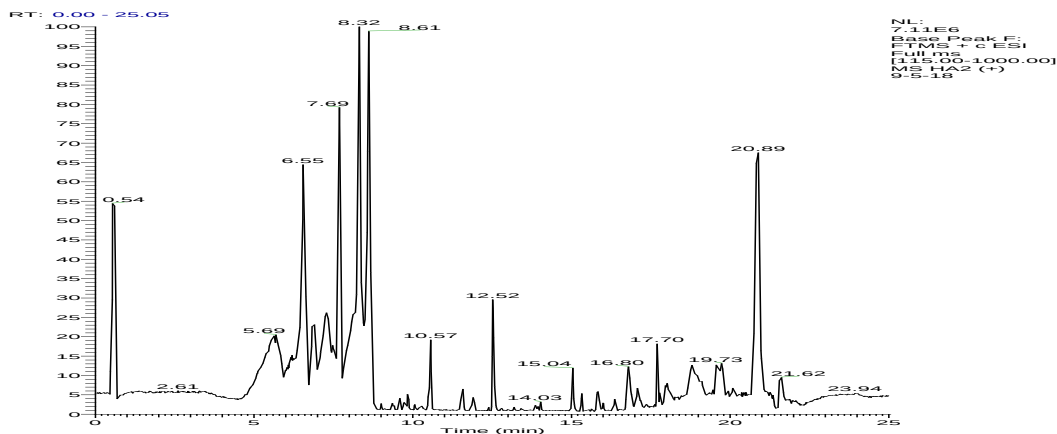
5.3.1.3 Ολικό MeOH εκχύλισμα από ταξιανθίες, στελέχη HA (διαδοχική εκχύλιση)

Τα ολικά MeOH εκχυλίσματα ταξιανθιών και φυλλωδών στελεχών του *H. amorginum* μετά από συνεχόμενη εκχύλιση με n-hexane και DCM αναλύθηκαν επίσης με την τεχνική UHPLC-ESI-(±)-HRMS με τις ίδιες χρωματογραφικές και φασματομετρικές παραμέτρους που εφαρμόστηκαν στο εκχύλισμα DCM (βλ. Υποενότητα 5.2.4). Τα χρωματογραφήματα της ανάλυσης των MeOH εκχυλισμάτων ταξιανθιών σε θετικό και αρνητικό ιονισμό παρουσιάζονται στην Εικόνα 5.6 και των φυλλωδών στελεχών στην Εικόνα 5.7.

MeOH inflorescence extract, ESI-



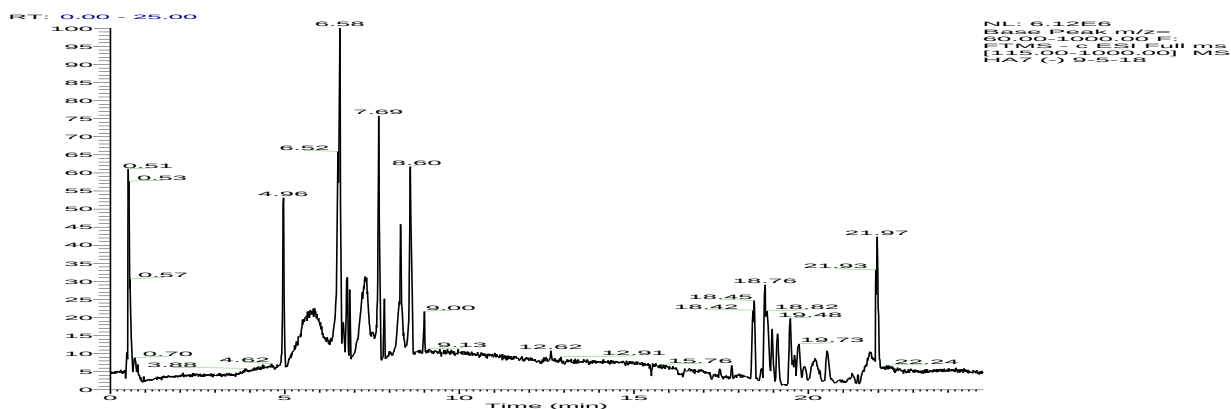
MeOH inflorescence extract, ESI+



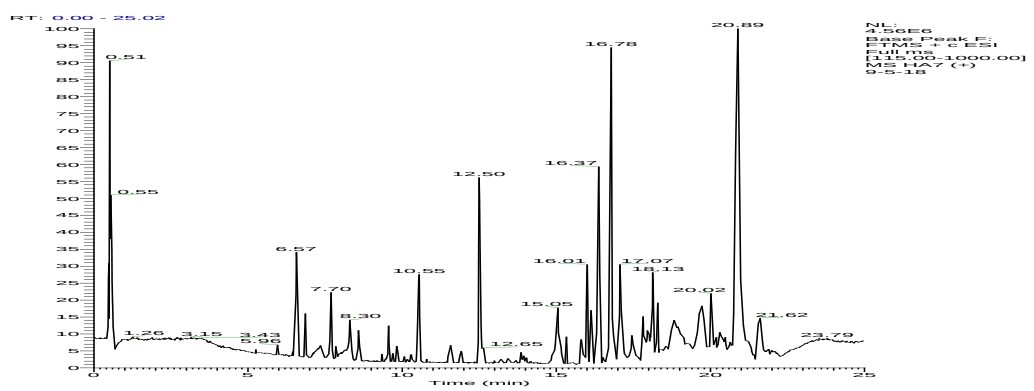
Εικόνα 5.6: UHPLC-ESI-(±)-HRMS χρωματογραφήματα κύριων κορυφών (base peaks) του ολικού MeOH εκχυλίσματος ταξιανθιών *Helichrysum amorginum* μετά από συνεχόμενη εκχύλιση με n-hexane και DCM

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

MeOH leafy stem extract, ESI-



MeOH leafy stem extract, ESI+



Εικόνα 5.7: UHPLC-ESI-(±)-HRMS χρωματογραφήματα κύριων κορυφών (base peaks) του ολικού MeOH εκχυλίσματος φυλλωδών στελεχών *Helichrysum. amorginum* μετά από συνεχή εκχύλιση με *n*-hexane και DCM

Από τις εικόνες των χρωματογραφημάτων 5.6 και 5.7 διαπιστώνεται ότι τα MeOH εκχυλίσματα των ταξιανθιών και φυλλωδών του *H. amorginum* είναι λιγότερα πλούσια σε μεταβολίτες σε σχέση με τα DCM εκχυλίσματα (Εικόνες 5.3, 5.4). Επιβεβαιώνεται η μεγάλη περιεκτικότητα του φυτικού υλικού σε άπολους ως μέτριας πολικότητας μεταβολίτες με μεγάλη συνάφεια ως προς την πολικότητα του DCM καθώς κι ότι η μεθοδολογία εκχύλισης με αυξανόμενη πολικότητα διαλυτών επέτρεψε την πιο ευκρινή μελέτη των πολικών μεταβολιτών σε αρνητικό ιονισμό. Τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης 15 μεταβολιτών που ανιχνεύθηκαν σε ταξιανθίες (Τ) και φυλλώδη στελέχη (Φ) σε αρνητικό ιονισμό παρατίθενται στον Πίνακα 5.4.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

Πίνακας 5.4.: Ενδεικτική ταυτοποίηση μεταβολιτών σε ολικά MeOH εκχυλίσματα ταξιανθιών και στελεχών *Helichrysum amorginum* μετά από διαδοχικές εκχυλίσεις με *n*-hexane και DCM με UHPLC-ESI(-)-HRMS (T: ταξιανθίες, Φ: φυλλώδες στέλεχος, CQA: Καφεοϋλοκινικό οξύ, flav.: φλαβονοειδές, OH-FA: υδροξυ λιπαρό οξύ, Het pyr-phlor.: Ετεροδιμερές α-πυρόνης – φλορογλουσινόλης, pyr. der.: παράγωγο πυρόνης)

Κορ υφή	t(min)	[M-H] ⁺	Πειραματική	Θεωρητική	Δm ppm	RD Beq	Κύρια Θραύσματα MS ²	Ενδεικτική ονομασία μεταβολίτη	Όργανο φυτού	Κατηγορία μεταβολίτη
			[M-H] ⁺ (m/z)	[M-H] ⁺ (m/z)						
1	4,32	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	353,0875	353,0867	-0,8	8,5	191, 179, 173, 87	5-O-caffeoylquinic acid (neo-chlorogenic acid)	T, Φ	CQA
2	4,96	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	353,0878	353,0867	-0,8	8,5	191, 179, 173	4-O-caffeoylquinic acid (crypto-chlorogenic acid)	T, Φ	CQA
3	6,52	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₂	515,1195	515,1199	0,7	14,5	353, 191	Dicafeoylquinic acid isomer 1	T, Φ	CQA
4	6,58	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	447,0933	447,0933	0,01	12,5	327, 285, 284, 255, 227, 181	Kaempferol-3-O-glucoside	T, Φ	flav.
5	6,79	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₂	515,1195	515,1197	0,3	14,5	353, 191	Dicafeoylquinic acid isomer 2	Φ	CQA
6	6,86	C ₂₃ H ₂₁ O ₁₂	489,1038	489,1038	- 0,05	13,5	287, 285, 284, 196	Kaempferol 3-O-acetylhexoside	T, Φ	flav.
7	7,00- 7,68	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₃	593,1301	593,1306	0,8	18,5	285	Tiliroside (Kaempferol 3-O-β-D-(6"-O- (E)-p-coumaroyl) glucopyranoside)	T, Φ	flav.
8	7,89	C ₁₅ H ₉ O ₅	269,0455	269,046	1,5	11,5	269, 225	Apigenin	T, Φ	flav.
9	8,00- 8,69	C ₃₂ H ₂₇ O ₁₄	635,1406	635,1395	0,00	19,5	575, 489, 285	Kaempferol-3-O-{6"-O-(trans-p- coumaroyl)-3"-O-acetyl}-b-d- glucopyranoside	T, Φ	flav.
10	9,00	C ₁₈ H ₃₃ O ₅	329,2329	329,2328	- 1,23	2,5	229, 211, 171	Pinelllic acid	T, Φ	OH-FA
11	17,81	C ₂₂ H ₂₅ O ₇	401,1607	401,1595	- 0,03	10,5	247, 235, 205, 191, 166, 153 (pyrone fragment C ₈ H ₉ O ₃)	Arzanol	T, Φ	Het pyr- phlor.
12	18,65	C ₂₃ H ₂₇ O ₇	415,1762	415,1751	- 0,11	10,5	415, 261, 249, 205, 193, 180, 153 (pyrone fragment C ₈ H ₉ O ₃), 109	3-Methylarzanol	T, Φ	Het pyr- phlor.
13	18,76	C ₂₇ H ₂₇ O ₇	463,1762	463,1763	0,1	14,5	309, 297, 227, 153 (pyrone fragment C ₈ H ₉ O ₃)	Pyrene derivative	T, Φ	pyr. der.
14	18,96	C ₂₄ H ₂₉ O ₇	429,1919	429,1917	-0,4	10,5	153 (pyrone fragment C ₈ H ₉ O ₃)	6-O-desmethyllauricepyron or arenol C analogue	T, Φ	pyr. der.
15	19,12	C ₂₅ H ₃₁ O ₇	443,2076	443,2064	0,1	10,5	153 (pyrone fragment C ₈ H ₉ O ₃)	Auricepyron analogue	T, Φ	pyr. der.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

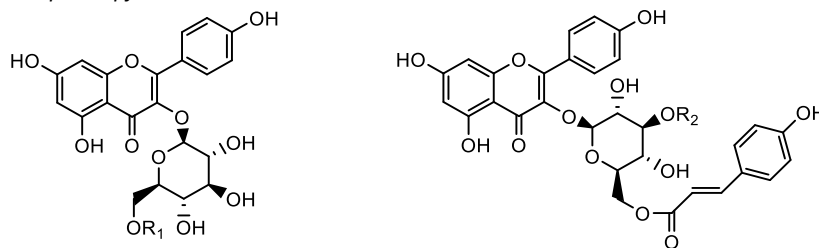
Οι κορυφές **1**, **2** ($R_t = 4,32$ min και $4,96$ min) με ίδια πειραματική τιμή ψευδομοριακού ιόντος $m/z = 353,087$, μοριακό τύπο $[M-H]^-$: $C_{16}H_{17}O_9$ και βαθμό ακορεστότητας $RDBeq = 8,5$ ταυτοποιήθηκαν ως γεωμετρικά ισομερή μονοακυλο – καφεοϋλο – κινικο οξέων (**monoacyl-CQAs**) με χαρακτηριστικό ιοντικό θραύσμα $m/z = 191$ που αντιστοιχεί στο $[quinic\ acid]^-$ (Kramberger et al. 2020). Οι κορυφές **3** ($R_t = 6,52$ min, σε ταξιανθίες και στελέχη), **5** ($6,79$ min, στα στελέχη) με ίδια πειραματική τιμή ψευδομοριακού ιόντος $m/z = 515,119$, μοριακό τύπο $[M-H]^-$: $C_{25}H_{23}O_{12}$ και βαθμό ακορεστότητας $RDBeq = 14,5$ ταυτοποιήθηκαν ως δύο γεωμετρικά ισομερή δικαφεοϋλο - κινικο οξέων (**di-CQAs**) με χαρακτηριστικά ιοντικά θραύσματα $m/z = 353$ (καφεοϋλο - κινικο οξύ) και $m/z = 191$ (Kramberger et al. 2020). Επίσης, ταυτοποιήθηκαν τέσσερα παράγωγα του φλαβονοειδούς **kaempferol** (βλ. Πίνακα 5.5): η κορυφή **4** ($R_t = 6,58$ min) με πειραματική τιμή ψευδομοριακού ιόντος $m/z = 447,0933$, μοριακό τύπο $[M-H]^-$: $C_{21}H_{19}O_{11}$ και βαθμό ακορεστότητας $RDBeq = 12,5$ ως γλυκοζίτης της kaempferol (**kaempferol-3-O-glucoside**) με χαρακτηριστικά ιοντικά θραύσματα $m/z = 327, 285, 284, 255, 227, 181$ (Leandro N.Francescato et al. 2013), η κορυφή **6** ($R_t = 6,86$ min) με πειραματική τιμή ψευδομοριακού ιόντος $m/z = 489,1038$, μοριακό τύπο $[M-H]^-$: $C_{23}H_{21}O_{12}$ και βαθμό ακορεστότητας $RDBeq = 13,5$ ως ο ακετυλο γλυκοζίτης **kaempferol 3-O-acetylhexoside** με χαρακτηριστικά ιοντικά θραύσματα $m/z = 287, 285, 284, 196$ (Abdel-Hady et al. 2018), η κορυφή **7** ($R_t = 7-7.68$ min) με πειραματική τιμή ψευδομοριακού ιόντος $m/z = 593,1301$, μοριακό τύπο $[M-H]^-$: $C_{30}H_{25}O_{13}$ και βαθμό ακορεστότητας $RDBeq = 18,5$ ως το φλαβονοειδές **tiliroside (kaempferol 3-O- β -D-(6''-O-(E)-p-coumaroyl) glucopyranoside)** με χαρακτηριστικό ιοντικό θραύσμα $m/z = 285$ (Felipe et al. 2014), η κορυφή **9** ($R_t = 8,00-8,69$) με πειραματική τιμή ψευδομοριακού ιόντος $m/z = 635,1406$, μοριακό τύπο $[M-H]^-$: $C_{32}H_{27}O_{14}$ και βαθμό ακορεστότητας $RDBeq = 19,5$ ως το ακετυλο παράγωγο του **tiliroside kaempferol-3-O-[6''-O-(trans-p-coumaroyl)-3''-O-acetyl]- β -D-glucopyranoside** με χαρακτηριστικά ιοντικά θραύσματα $m/z = 575, 489, 285$ (Wu, Y.-Q. et al. 2003).

Η κορυφή **8** ($R_t = 7,89$ min) με πειραματική τιμή ψευδομοριακού ιόντος $m/z = 269,0455$, μοριακό τύπο $[M-H]^-$: $C_{15}H_9O_5$ και βαθμό ακορεστότητας $RDBeq = 11,5$ ως το φλαβονοειδές **apigenin** με χαρακτηριστικά ιοντικά θραύσματα $m/z = 269$ και 225 (Chen et al. 2016; Brito et al. 2014). Η κορυφή **10** ($R_t = 9,00$ min) με πειραματική τιμή ψευδομοριακού ιόντος $m/z = 329,2329$, μοριακό τύπο $[M-H]^-$: $C_{18}H_{33}O_5$ και βαθμό ακορεστότητας $RDBeq = 2,5$ ως το ακόρεστο λιπαρό οξύ **pinellic acid** με χαρακτηριστικά ιοντικά θραύσματα $m/z = 229, 211, 171$ (Jingya Ruan et al. 2019). Στην περιοχή $R_t = 17-20$ min εντοπίστηκαν πέντε παράγωγα πυρόνης όπως αποδείχθηκε από το κοινό χαρακτηριστικό θραύσμα με $m/z = 153$ ($C_8H_9O_3$). Συγκεκριμένα, η κορυφή **11** ($R_t = 17,81$ min) με πειραματική τιμή

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

ψευδομοριακού ιόντος $m/z = 401,1607$, μοριακό τύπο $[M-H]^-$: $C_{22}H_{25}O_7$ και βαθμό ακορεστότητας RDBeq = 10,5 ως το ετεροδιμερές α-πυρόνης – φλορογλουσινόλης **arzanol** με χαρακτηριστικά ιοντικά θραύσματα $m/z = 247, 235, 205, 191, 166, 153$ (Kramberger et al. 2020), η κορυφή **12** ($R_t = 18,65$ min) με πειραματική τιμή ψευδομοριακού ιόντος $m/z = 415,1762$, μοριακό τύπο $[M-H]^-$: $C_{23}H_{27}O_7$ και βαθμό ακορεστότητας RDBeq = 10,5 ως το ετεροδιμερές α-πυρόνης - φλορογλουσινόλης **3-methyl arzanol** με χαρακτηριστικά ιοντικά θραύσματα $m/z = 415, 261, 249, 205, 193, 180, 153$ (Kramberger et al. 2020), η κορυφή **13** ($R_t = 18,76$ min) με πειραματική τιμή ψευδομοριακού ιόντος $m/z = 463,1762$, μοριακό τύπο $[M-H]^-$: $C_{27}H_{27}O_7$ και βαθμό ακορεστότητας RDBeq = 14,5 ως άγνωστο παράγωγο πυρόνης με χαρακτηριστικά ιοντικά θραύσματα $m/z = 309, 297, 227, 153$, η κορυφή **14** ($R_t = 18,96$ min) με πειραματική τιμή ψευδομοριακού ιόντος $m/z = 429,1919$, μοριακό τύπο $[M-H]^-$: $C_{24}H_{29}O_7$ και βαθμό ακορεστότητας RDBeq = 10,5 ως παράγωγο πυρόνης ανάλογο των ισοβαρών ετεροδιμερών πυρόνης - φλορογλουσινόλης **arenol C** και **6-O-desmethyllauricepyrone** (Merikli et al.1980, Akaberi, Danton, et al. 2019, Maryam Akaberi et al. 2021), η κορυφή **15** ($R_t = 19,12$ min) με πειραματική τιμή ψευδομοριακού ιόντος $m/z = 443,2076$, μοριακό τύπο $[M-H]^-$: $C_{25}H_{31}O_7$ και βαθμό ακορεστότητας RDBeq = 10,5 ως παράγωγο πυρόνης ανάλογο των ισοβαρών ετεροδιμερών πυρόνης - φλορογλουσινόλης **auricepyrone** και **23-methyl-6-O-desmethyllauricepyrone** (Bohlmann Ferdinand 1980, Merikli et al. 1980, Akaberi, Danton, et al. 2019).

Πίνακας 5.5: Φλαβονοειδή *kaempferol*



Φλαβονοειδή <i>kaempferol</i>	R1	R2
kaempferol 3-O-glucoside	H	-
kaempferol 3-O-acetylhexoside	-COCH ₃	-
tiliroside (trans-)	-	H
tribuloside (cis-tiliroside)	-	H
kaempferol-3-O-[6"-O-(trans-p-coumaroyl)-3"-O-acetyl]-b-d-glucopyranoside	-	-COCH ₃

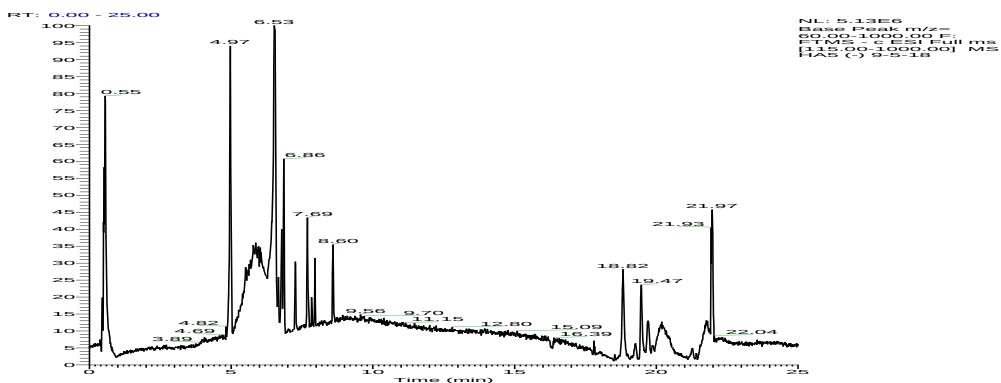
5.3.1.4 Ολικό H₂O εκχύλισμα από ταξιανθίες, στελέχη HA (διαδοχική εκχύλιση)

Τα ολικά H₂O εκχυλίσματα ταξιανθιών και φυλλωδών στελεχών του *H. amorginum* μετά από συνεχόμενη εκχύλιση με n-hexane, DCM, MeOH αναλύθηκαν επίσης με την τεχνική UHPLC-ESI-(±)-HRMS

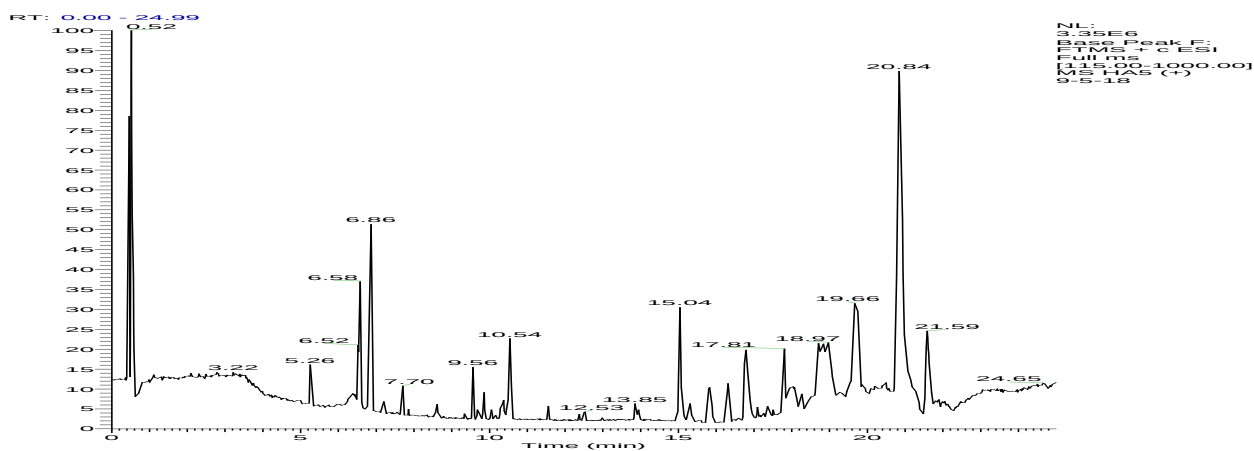
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

με τις ίδιες χρωματογραφικές και φασματομετρικές παραμέτρους που εφαρμόστηκαν στο εκχύλισμα DCM και MeOH (βλ. Υποενότητα 5.2.4). Τα χρωματογραφήματα της ανάλυσης των H₂O εκχυλισμάτων ταξιανθιών σε θετικό και αρνητικό ιονισμό παρουσιάζονται στην Εικόνα 5.8 και των φυλλωδών στελεχών στην Εικόνα 5.9.

H₂O inflorescence extract, ESI-



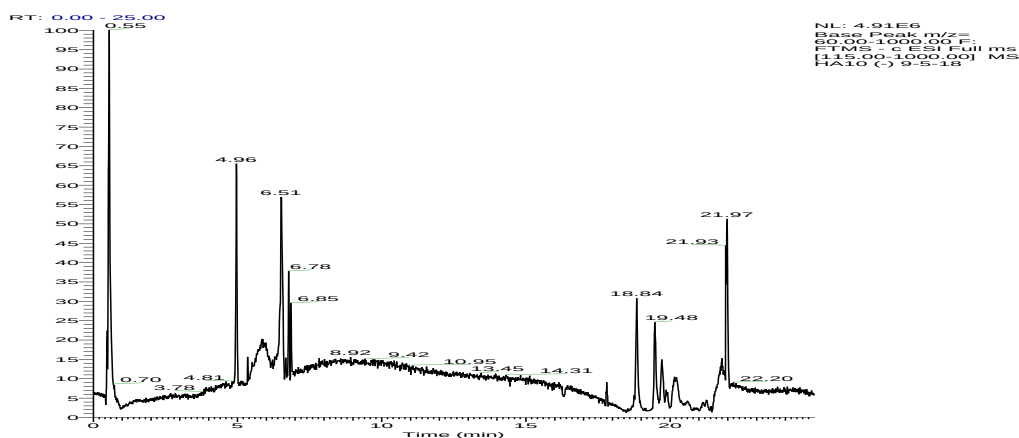
H₂O inflorescence extract, ESI+



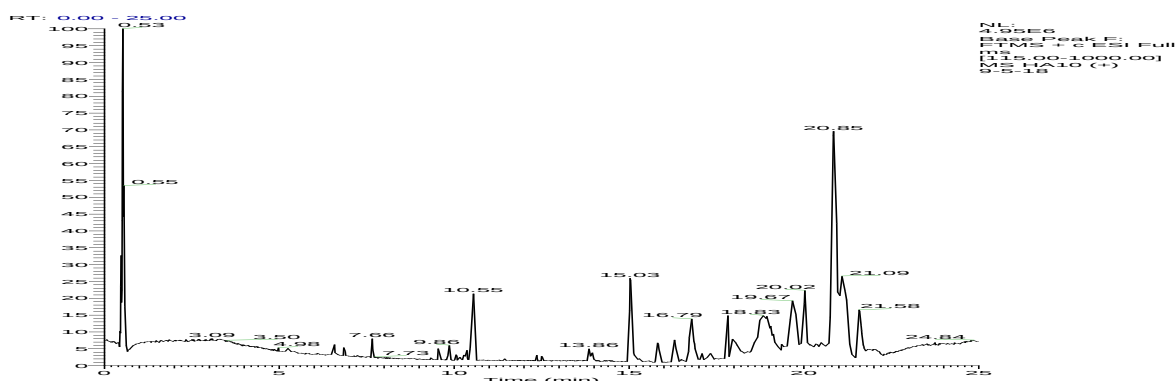
Εικόνα 5.8: UHPLC-ESI-(±)-HRMS χρωματογραφήματα κύριων κορυφών (base peak) του ολικού H₂O εκχυλίσματος ταξιανθιών *Helichrysum amorginum* μετά από συνεχόμενη εκχύλιση με *n*-hexane, DCM, MeOH

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

H₂O leafy stem extract, ESI-



H₂O leafy stem extract, ESI+



Εικόνα 5.9: UHPLC-ESI-(±)-HRMS χρωματογραφήματα κύριων κορυφών (*base peaks*) του ολικού H₂O εκχυλίσματος φυλλωδών στελεχών *Helichrysum amorginum* μετά από συνεχόμενη εκχύλιση με *n*-hexane, DCM, MeOH

Από τις εικόνες των χρωματογραφημάτων 5.8 και 5.9 διαπιστώνεται ότι τα H₂O εκχυλίσματα των ταξιανθιών και φυλλωδών στελεχών του *H. amorginum* είναι λιγότερα πλούσια σε μεταβολίτες σε σχέση με τα MeOH εκχυλίσματα (Εικόνες 5.6, 5.7) με εμφανή την απουσία παραγώγων πυρόνης και την παρουσία κυρίως παραγώγων καφεοϋλο-κινικών οξέων και γλυκοζιτών καεμφερόλης. Τα αποτελέσματα της ενδεικτικής ταυτοποίησης 10 μεταβολιτών που ανιχνεύθηκαν στις ταξιανθίες (T) και φυλλώδη στελέχη (Φ) σε αρνητικό ιονισμό παρατίθενται στον Πίνακα 5.6.

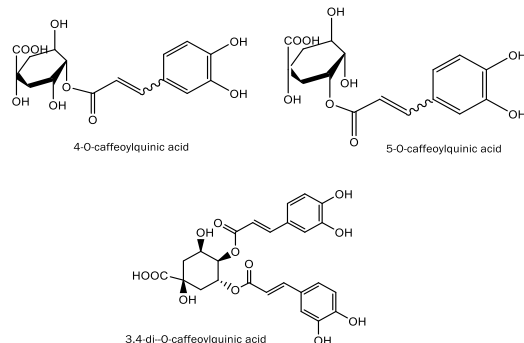
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

Πίνακας 5.6: Ενδεικτική ταυτοποίηση μεταβολιτών σε ολικά H₂O εκχυλίσματα ταξιανθιών (T) και φυλλωδών στελεχών (Φ) *Helichrysum amorginum* μετά από διαδοχικές εκχυλίσεις με *n*-hexane, DCM, MeOH με UHPLC-ESI(-)-HRMS (CQA: καφεοϋλοκινικό οξύ, flav.: φλαβονοειδές)

Κορυφή	Rt (min)	EC	Experimental	Theoretical	Δm	RDBeq	Fragments MSMS (ESI negative)	Compound category	Plant organ	Κατηγορία μεταβολίτη
		[M-H] ⁻	[M-H] ⁻ (m/z)		ppm					
1	4,97	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	353,0876	353,0867	-0,8	8,5	191, 135, 127, 111	cis-5-O-caffeoylquinic acid	T, Φ	CQA
2	6,53	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₂	515,1198	515,1184	0,6	14,5	353, 203, 191, 179, 173	3,4-dicaffeoyl quinic acid	T, Φ	CQA
3	6,67	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₂	515,1197	515,1184	0,4	14,5	353, 191, 179	dicaffeoyl quinic acid isomer 1	T, Φ	CQA
4	6,78	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₂	515,1197	515,1184	0,4	14,5	353, 191, 179	dicaffeoyl quinic acid isomer 2	T, Φ	CQA
5	6,86	C ₂₃ H ₂₁ O ₁₂	489,1041	489,1028	0,5	13,5	287, 285, 284, 196	kaempferol 3-O-acetylhexoside	T, Φ	flav.
6	7,26	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₄	609,1246	609,1239	-0,5	18,5	463, 447, 323, 285, 243, 241, 229	kaempferol dihexoside	T	flav.
7	7,69	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₃	593,1300	593,1290	-0,1	18,5	447, 307, 285	trans - tiliroside (Kaempferol 3-O-β-D-(6"-O-(E)-p-coumaroyl) glucopyranoside)	T	flav.
8	7,84	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₃	593,1299	593,1290	-0,3	18,5	447, 307, 285	tribuloside (cis-tiliroside)	T	flav.
9	7,94	C ₃₃ H ₂₇ O ₁₇	695,1242	695,1243	-1,7	20,5	533, 371	tricaffeoyl hexaric acid	Φ	CQA
10	8,60	C ₃₂ H ₂₇ O ₁₄	635,1403	635,1395	-0,5	19,5	636, 285	kaempferol-3-O-[6"-O-(trans-p-coumaroyl)-3"-O-acetyl]-β-D-glucopyranoside	T	flav.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

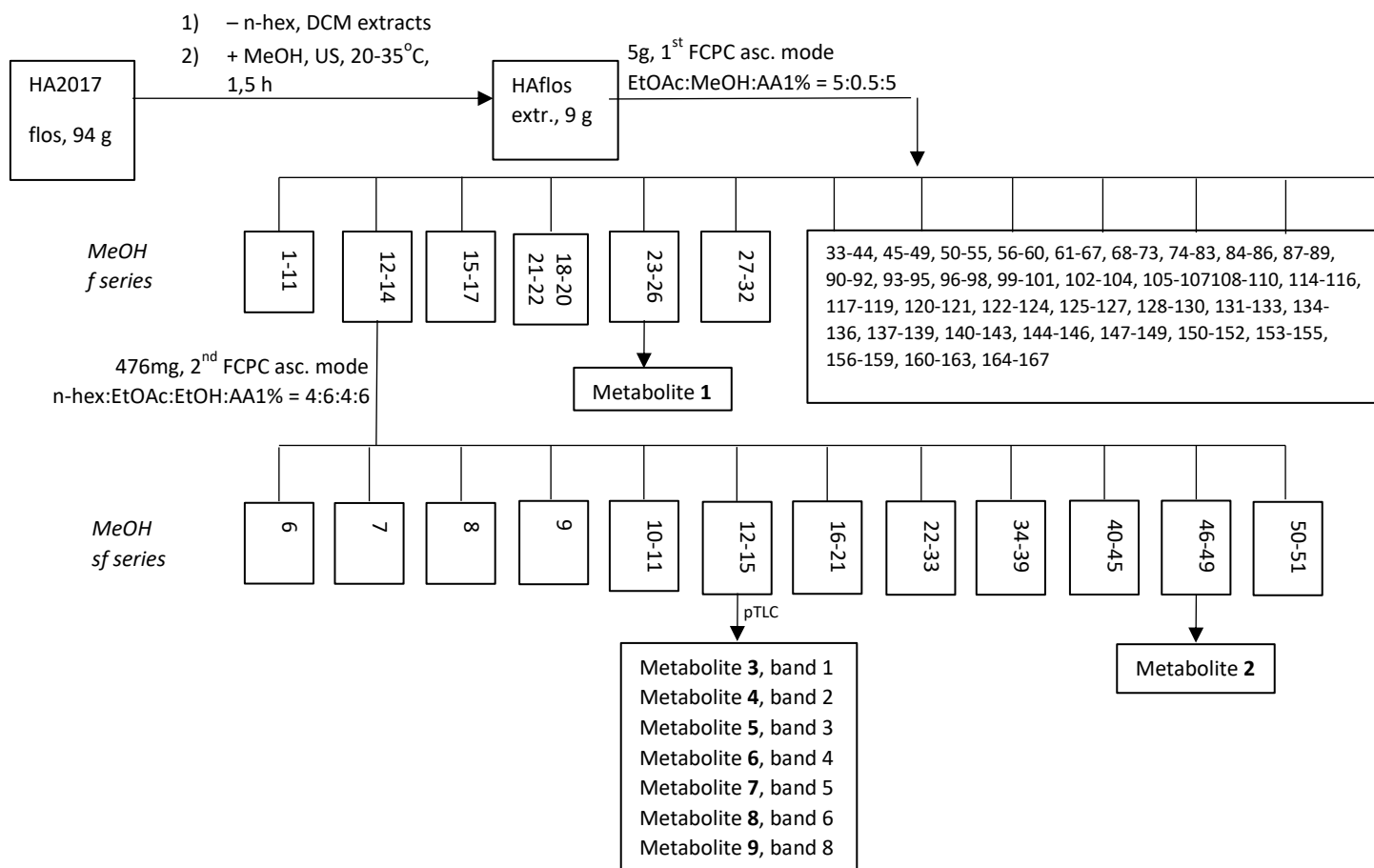
Οι κορυφές **5**, **7**, **10** ταυτοποιήθηκαν ως τα **kaempferol 3-O-acetylhexoside**, **trans – tiliroside**, **kaempferol-3-O-[6''-O-(trans-p-coumaroyl)-3''-O-acetyl]-β-D-glucopyranoside** τα φασματομετρικά δεδομένα των οποίων περιγράφονται στον Πίνακα 5.4 στο MeOH εκχύλισμα, όπου και ανιχνεύθηκαν επίσης. Η κορυφή **6** ($R_t = 7,26$ min) με πειραματική τιμή ψευδομοριακού ιόντος $m/z = 609,1246$, μοριακό τύπο $[M-H]^-$: $C_{30}H_{25}O_{14}$ και βαθμό ακορεστότητας $RDBeq = 18,5$ ταυτοποιήθηκε ως το **kaempferol dihexoside** (Kramberger et al. 2020) με χαρακτηριστικά ιοντικά θραύσματα $m/z = 463, 447, 323, 285, 243, 241, 229$. Η κορυφή **8** ($R_t = 7,84$ min) με πειραματική τιμή ψευδομοριακού ιόντος $m/z = 593,1299$, μοριακό τύπο $[M-H]^-$: $C_{30}H_{25}O_{13}$ και βαθμό ακορεστότητας $RDBeq = 18,5$ ταυτοποιήθηκε ως το *cis* ισομερές του **tiliroside** με χαρακτηριστικά ιοντικά θραύσματα $m/z = 447, 307, 285$ και μεταγενέστερο χρόνο κατακράτησης από το *trans* ισομερές ($R_t = 7,69$ min) (Felipe et al. 2014). Η κορυφή **1** ($R_t = 4,97$ min) με πειραματική τιμή ψευδομοριακού ιόντος $m/z = 353,0876$, μοριακό τύπο $[M-H]^-$: $C_{16}H_{17}O_9$ και βαθμό ακορεστότητας $RDBeq = 8,5$ ταυτοποιήθηκε ως το **cis-5-O-caffeoylquinic acid** με χαρακτηριστικά ιοντικά θραύσματα $m/z = 191, 135, 127, 111$ (Kramberger et al. 2020). Η κορυφή **2** ($R_t = 6,53$ min) με πειραματική τιμή ψευδομοριακού ιόντος $m/z = 515,1198$, μοριακό τύπο $[M-H]^-$: $C_{25}H_{23}O_{12}$ και βαθμό ακορεστότητας $RDBeq = 14,5$ ταυτοποιήθηκε ως το **3,4-dicaffeoyl quinic acid** με χαρακτηριστικά ιοντικά θραύσματα $m/z = 353, 203, 191, 179, 173$ (Kramberger et al. 2020) ενώ οι κορυφές **3**, **4** ($R_t = 6,67$ και $6,78$ min) με ίδια πειραματική τιμή ψευδομοριακού ιόντος $m/z = 515,1197$, μοριακό τύπο $[M-H]^-$: $C_{25}H_{23}O_{12}$ και βαθμό ακορεστότητας $RDBeq = 14,5$ με χαρακτηριστικά ιοντικά θραύσματα $m/z = 353, 191, 179$ ταυτοποιήθηκαν ως **ισομερή di-caffeoyl quinic acids** (Kramberger et al. 2020). Η κορυφή **9** ($R_t = 7,94$ min) με πειραματική τιμή ψευδομοριακού ιόντος $m/z = 695,1242$, μοριακό τύπο $[M-H]^-$: $C_{33}H_{27}O_{17}$ και βαθμό ακορεστότητας $RDBeq = 20,5$ ταυτοποιήθηκε ως το **tricaffeoyl hexaric acid** με χαρακτηριστικά ιοντικά θραύσματα $m/z = 533$ και 371 (Kramberger et al. 2020).



Εικόνα 5.10: Παράγωγα καφεούλο-κινικο οξέως

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

5.3.2 Απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών από MeOH εκχύλισμα ταξιανθιών HA μετά από διαδοχικές εκχυλίσεις με n-hexane, DCM



Εικόνα 5.11: Σχεδιάγραμμα απομόνωσης μεταβολιτών 1-9 από ολικό MeOH εκχύλισμα (HA2017FexUSm_290318_001) διαδοχικής εκχύλισης ταξιανθιών *Helichrysum amorginum* (2017) βιολογικής καλλιέργειας

Για την απομόνωση των δευτερογενών **μεταβολιτών 1-9** (βλ. φασματοσκοπικά και φασματομετρικά δεδομένα στην υποενότητα 5.3.4), από το ολικό, MeOH εκχύλισμα ταξιανθιών συνεχόμενης εκχύλισης, χρησιμοποιήθηκε η μεθοδολογία κλασμάτωσης με τις χρωματογραφικές μεθόδους που φαίνονται στην Εικόνα 5.11. Εν συντομία, ποσότητα ταξιανθιών HA βιολογικής καλλιέργειας 2017 εκχυλίστηκε διαδοχικά με την βοήθεια συσκευής υπερήχων (UAE, ultrasound assisted extraction) με διαλύτες n-hexane, DCM, MeOH. Το MeOH εκχύλισμα μετά από ξήρανση υπεβλήθη σε 1^η χρωματογραφία κατ' αντιστροφή (CPC) (**α**) από όπου προέκυψαν τα συνενωμένα κλάσματα της σειράς MeOH f (MeOH f series) f1-11 έως f153-167 με τον **μεταβολίτη 1** να εντοπίζεται στο κλάσμα f23-26. Σε

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

δεύτερο βήμα **(β)** επιλέχθηκε το συνενωμένο κλάσμα f12-14, στο οποίο υπεβλήθη 2^η χρωματογραφία κατ' αντιρροή από όπου προέκυψαν τα συνενωμένα κλάσματα της σειράς MeOH sf (MeOH sf series) sf6 έως sf50-51. Από τα οποία στο sf46-49 εντοπίστηκε ο **μεταβολίτης 2** και στο sf12-15 μετά από διαχωρισμό με παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας **(γ)** εντοπίστηκαν οι **μεταβολίτες 3-9**.

(α) Κλασμάτωση με 1^η εφαρμογή CPC στο ολικό MeOH εκχύλισμα ταξιανθιών (MeOH f series)

Για την επιλογή κατάλληλου διφασικού συστήματος διαλυτών υγρής-υγρής εκχύλισης χρωματογραφίας κατ' αντιρροή δοκιμάστηκαν τα συστήματα διαλυτών του Πίνακα 5.7 (οι αριθμοί αντιστοιχούν σε αναλογίες όγκου), οι οποίοι σχηματίζουν διφασικό σύστημα. Ο τελικός όγκος ανάμιξης του κάθε συστήματος διαλυτών ήταν 4ml μέσα σε δοκιμαστικό σωλήνα ο οποίος τοποθετήθηκε σε vortex και μετά την εφαρμογή ανακίνησης μετρήθηκε ο χρόνος διαχωρισμού φάσεων διαλυτών και σημειώθηκαν παρατηρήσεις (θόλωμα φάσης, όγκος άνω/κάτω φάσης) και διαπιστώθηκε αν υπήρχε ικανοποιητικός ή όχι 1^{ος} διαχωρισμός φάσεων (διφασικότητα). Σε δεύτερο βήμα προστέθηκαν σε κάθε σύστημα διαλυτών 10-20mg ξηρού, MeOH εκχυλίσματος και σημειώθηκαν οι αντίστοιχες παρατηρήσεις από τις οποίες έγινε η αξιολόγηση καταλληλότητας του συστήματος (2^{ος} διαχωρισμός φάσεων).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

Πίνακας 5.7: Συστήματα διαλυτών και αναλογίες όγκων για την επιλογή κατάλληλου διαφασικού συστήματος διαλυτών για την κλασμάτωση του MeOH εκχυλίσματος με 1° CPC (c-Hex: cyclohexane, EtOAc: ethyl acetate, ACN: acetonitrile, n-Bu: n-butanol, i-Pr: isopropanol, AA: acetic acid, MtBe: methyl-t-butyl ether)

Σύσ/μα	c-Hex	EtOAc	MeOH	H ₂ O	ACN	n-Bu	EtOH	i-Pr	AcOH	1% HCl	1% AA	DCM	MtBe	Et ₂ O	Παρατηρήσεις	Συμπέρασμα
S1	1	6	1,5	7,5											1 ^{ος} : 50sec 2 ^{ος} : 60sec, κάτω φάση θολή	Άκυρο
S2	2	8	5	5											1 ^{ος} : 35sec 2 ^{ος} : 58sec	Μετρίως Καλό
S3	3	8	3	10											1 ^{ος} : 50sec 2 ^{ος} : 58sec	Άκυρο
S4	8	6	7	10											1 ^{ος} : 50sec 2 ^{ος} : >1min	Άκυρο
S5	8	8	6	6											1 ^{ος} : 30sec 2 ^{ος} : 40sec, θολή κάτω φάση	Άκυρο
S6	8	16	7	10											1 ^{ος} : 30sec 2 ^{ος} : 40sec, θολή κάτω φάση	Άκυρο
S7	10	11	11	8											1 ^{ος} : 26sec 2 ^{ος} : 36sec	Μετρίως Καλό
S8	10	13	13	10											1 ^{ος} : 30sec 2 ^{ος} : 57sec	Μετρίως Καλό
S9	2	2	1	2	0,6										1 ^{ος} : 32sec 2 ^{ος} : 45sec, θολή κάτω φάση	Άκυρο
S10	2	1				3			1	5					1 ^{ος} : 43sec 2 ^{ος} : 40sec	Μετρίως Καλό
S11		5	1	5											1 ^{ος} : 40sec 2 ^{ος} : 50sec, θολή κάτω φάση	Άκυρο
S12		20	1	20											1 ^{ος} : 30sec 2 ^{ος} : 40sec, θολή κάτω φάση	Άκυρο
S13		5	0,5								5				1 ^{ος} : 35sec 2 ^{ος} : 40sec	Μετρίως Καλό
S14		5		5			1								1 ^{ος} : 20sec 2 ^{ος} : >1min	Άκυρο
S15		25		25			1								1 ^{ος} : 40sec 2 ^{ος} : 35sec, θολή κάτω φάση	Άκυρο
S16		4		5			1		0,25						1 ^{ος} : 25sec 2 ^{ος} : 55sec	Μετρίως Καλό
S17		14		8				0,8							1 ^{ος} : 55sec 2 ^{ος} : 25sec, θολή κάτω φάση	Άκυρο
S18		3,5		0,2				0,2							Όχι καλός διαχωρισμός	Άκυρο
S19		2		3		1									1 ^{ος} : 20sec 2 ^{ος} : 37sec, θολή κάτω φάση	Άκυρο
S20		3,5	1,1	4,4		1									Όχι καλός διαχωρισμός	Άκυρο
S21		1,5		2,5		0,3	5								Όχι καλός διαχωρισμός	Άκυρο
S22				0,8				1,3				0,7			Όχι καλός διαχωρισμός	Άκυρο
S23				0,5	0,2									0,4	Όχι καλός διαχωρισμός	Άκυρο
S24				5	1	3							1		Όχι καλός διαχωρισμός	Άκυρο
S25				5	1	2							2		1 ^{ος} : 10sec 2 ^{ος} : 55sec	Μετρίως Καλό

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

Από τον Πίνακα 5.7 τα συστήματα S2/S7/S8/S10/S13/S16/S25 εμφάνισαν ικανοποιητική διαφαικότητα (<60 sec και τις δύο διαχωρισμούς) και ικανοποιητική διαλυτότητα. Τα συστήματα S2/S7/S8/S16 απαρτίζονται από τέσσερις διαλύτες, ενώ τα συστήματα S10/S25 περιέχουν n-butanol που με υψηλό σημείο βρασμού, που εμφανίζει δυσκολίες στην εξάτμισή της. Για τους λόγους αυτούς επιλέχθηκε να διερευνηθεί το σύστημα S13 που αποτελείται από τρεις διαλύτες (EtOAc-MeOH-Acetic acid 1%) και αποτελεί ένα γνωστό σύστημα από την βιβλιογραφία για το διαχωρισμό και απομόνωση φαινολικού τύπου ουσιών και συγκεκριμένα φλαβονοειδών, όπως στην περίπτωση του *H. arenarium* (Yang et al. 2009).

Με την επιλογή του συστήματος S13 ακολούθησε διερεύνηση βελτιστοποίησης του 1^{ου} διαχωρισμού, αυξάνοντας την αναλογία του “best solvent” στο τριτλό σύστημα, δηλαδή του MeOH, από 0.5 σε 3.5 μέρη όγκου. Παρατηρήθηκαν οι επιπτώσεις στη διαφαικότητα του συστήματος και στον χρόνο διαχωρισμού των φάσεων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.8.

Πίνακας 5.8: Διερεύνηση βελτιστοποίησης διαχωρισμού φάσεων στο διφασικό σύστημα EtOAc:MeOH:AA1%

Σύσ/μα	EtOAc (vol. parts)	MeOH (vol. parts)	AA 1 % (vol. parts)	Final vol. (ml)	EtOAc (ml)	MeOH (ml)	AA 1 % (ml)	Upper phase (cm)	Lower phase (cm)	Διαχ/μός (sec)
sys1 (S13)	5	0,5	5	4	1,904	0,192	1,904	1,5	2	20
sys2	5	1	5	4	1,818	0,363	1,818	1,5	2	15
sys3	5	1,5	5	4	1,739	0,522	1,739	1,1	1,7	15
sys4	5	2	5	4	1,666	0,666	1,666	1	1,9	20
sys5	5	2,5	5	4	1,600	0,800	1,600	1,1	2,4	20
sys6	5	3	5	4	1,538	0,923	1,538	0,7	2,1	33
sys7	5	3,5	5	4	1,481	1,037	1,481	Μία φάση		n.a.

Αύξηση του όγκου MeOH συνεπάγεται αύξηση του όγκου της κάτω φάσης του διφασικού συστήματος (sys5, sys6) με έσχατη περίπτωση την sys7 (MeOH 3,5 parts), που οδηγεί τους τρεις διαλύτες σε μία ενιαία φάση (πλήρη ανάμιξη). Το sys4 απορρίφθηκε συγκριτικά με το sys1 λόγω μεγαλύτερου ποσοστού MeOH και μεγαλύτερης αναλογίας όγκου της κάτω φάσης. Για το λόγο αυτό επιλέχθηκαν τα συστήματα sys1 (S13), sys2, sys3 για την δοκιμή του διαχωρισμού με προσθήκη του MeOH εκχυλίσματος (Πίνακας 5.9).

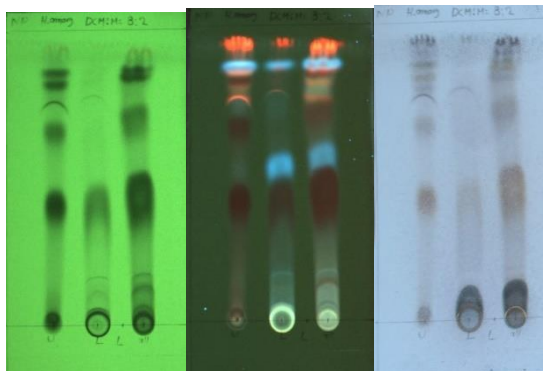
Πίνακας 5.9: Διερεύνηση βελτιστοποίησης διαχωρισμού φάσεων στο διφασικό σύστημα EtOAc:MeOH:AA1% (sys1, sys2, sys3) με προσθήκη μεθανολικού εκχυλίσματος ταξιανθιών *Helichrysum amorginum* (συγκομιδή βιολογικής καλλιέργειας 2017)

Σύστημα	EtOAc (vol. parts)	MeOH (vol. parts)	Acetic acid 1 % (vol. parts)	Μάζα εκχ/τος (mg)	Upper phase (cm)	Lower phase (cm)	Διαχωρισμός (sec)
sys1 (S13)	5	0,5	5	10,8	1,1	1,7	30
sys2	5	1	5	9,7	1	1,9	>60
sys3	5	1,5	5	9,6	1	1,9	60

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

Με την διάλυση του MeOH εκχυλίσματος στα συστήματα sys2/sys3 παρατηρήθηκε σχεδόν διπλασιασμός του χρόνου διαχωρισμού των φάσεων και για το λόγο αυτό το σύστημα sys1 (S13) αποτελούμενο από EtOAc-MeOH-Acetic acid 1% σε αναλογία όγκων 5-0,5-5 επιλέχθηκε ως το τελικό σύστημα για την κλασμάτωση του ολικού MeOH εκχυλίσματος (1^ο CPC). Η άνω φάση του sys1(S13) αποτελείται κυρίως από οξικό EtOAc και MeOH και η κάτω φάση από MeOH και acetic acid 1%.

Η ποιοτική εξέταση του διαλυτοποιημένου MeOH εκχυλίσματος HA στις άνω και κάτω φάσεις του sys1 (S13) έγινε με TLC κανονικής (Εικόνα 5.12) και αντίστροφης φάσης (Εικόνα 5.13).



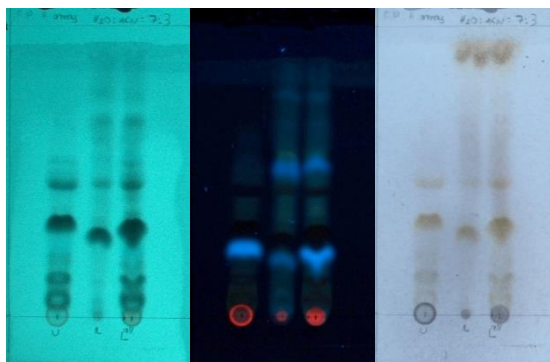
Εικόνα 5.12: MeOH εκχύλισμα ταξιανθιών *Helichrysum amorginum* διαλυτοποιημένο στις πάνω και κάτω φάσεις του συστήματος CPC sys1 (S13). 1^ο spot(U): αριστερά/άνω φάση, 2^ο (L) spot: κέντρο/κάτω φάση, 3^ο spot: δεξιά/ολικό MeOH εκχύλισμα. (πλάκες TLC κανονικής φάσης, διαλύτης ανάπτυξης DCM:MeOH = 8:2, φωτογράφιση @ 254 nm (αριστερά), 366 nm (κέντρο) και ορατό (δεξιά) μετά από ψεκασμό με αντιδραστήριο θειϊκής βανιλίνης, θέρμανση 100-200°C, 1-5 min, 13,7mg εκχ./4 ml sys1(S13))

Από την ποιοτική χρωματογραφική ανάλυση λεπτής στοιβάδας σε κανονική φάση (Εικόνα 5.12) διαφαίνονται:

- Η μερική κατανομή των μεταβολιτών του MeOH εκχυλίσματος στην πάνω και κάτω φάση του διφασικού sys1(S13) με ορισμένους μεταβολίτες να εντοπίζονται μόνο σε μία από τις δύο φάσεις (βλ. κέντρο @ 366nm, blue bands).
- Στα 366 nm εμφανίζεται και στα τρία δείγματα ο χαρακτηριστικός έντονος κόκκινος φθορισμός στις ζώνες με υψηλό R_f που αντιστοιχεί στην παρουσία χλωροφυλλών.
- Στα 366 nm εμφανίζεται έντονος μπλε φθορισμός που αντιστοιχεί σε φαινολικούς ή/και τερπενοειδή μεταβολίτες.
- Στα 254 nm και 366 nm σε μεσαία R_f και άνω του μέσου εμφανίζονται και στα τρία spot σκούρες καφέ ζώνες που στο ορατό εμφανίζονται ως κίτρινες-καφέ μετά από εφαρμογή αντιδραστηρίου εμφάνισης. Οι μεταβολίτες αυτοί κατατάσσονται σε φαινολικού τύπου (π.χ. φλαβονοειδή άγλυκα/γλυκοσίδες).
- Στην εικόνα του ορατού μετά από εφαρμογή αντιδραστηρίου θειϊκής βανιλίνης εμφανίζονται σε χαμηλά R_f κοντά στην βάση του κεντρικού και δεξιού spot, σκούρες καφέ-μπλε ζώνες που αντιστοιχούν σε

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

υδατάνθρακες κι επιβεβαιώνεται από το γεγονός ότι εντοπίζονται μόνο στην υδρόφιλη κάτω φάση του sys1(S13).



Εικόνα 5.13: MeOH εκχύλισμα ταξιανθιών *Helichrysum amorginum* διαλυτοποιημένο στις πάνω και κάτω φάσεις του συστήματος CPC sys1 (S13). 1^ο spot(U): αριστερά/άνω φάση, 2^ο spot(L): κέντρο/κάτω φάση, 3^ο spot: δεξιά/ολικό MeOH εκχύλισμα. (πλάκες TLC αντίστροφης φάσης, διαλύτης ανάπτυξης H₂O:ACN = 7:3, φωτογράφιση @ 254 nm (αριστερά), 366 nm (κέντρο), ορατό (δεξιά) μετά από ψεκασμό με αντιδραστήριο θειικής βανιλίνης, θέρμανση 100-200°C, 1-5 min, 13,7 mg εκχ./4 ml sys1(S13))

Η ποιοτική χρωματογραφική ανάλυση λεπτής στοιβάδας σε αντίστροφη φάση (Εικόνα 5.13) δείχνει:

- Η μερική κατανομή των μεταβολιτών του MeOH εκχυλίσματος στην πάνω και κάτω φάση του διφασικού sys1(S13) με ορισμένους μεταβολίτες να εντοπίζονται μόνο σε μία από τις δύο φάσεις (βλ. κέντρο @ 366nm, blue bands).
- Στα 366 nm εμφανίζεται και στα τρία δείγματα ο χαρακτηριστικός έντονος κόκκινος φθορισμός που αντιστοιχεί στην παρουσία χλωροφυλλών.
- Στα 366 nm εμφανίζεται σε όλα τα spots έντονος μπλε φθορισμός που αντιστοιχεί σε μεταβολίτες φαινολικών ή/και τερπενοειδών.
- Στα 366 nm εμφανίζονται σε όλα τα spot ισχνός πράσινος φθορισμός που πιθανόν να αντιστοιχεί σε τερπενοειδή.
- Στην εικόνα του ορατού μετά από εφαρμογή αντιδραστηρίου εμφάνισης σε μεσαία R_f όλων των spots, εμφανίζονται κίτρινες-καφέ ζώνες που αντιστοιχούν σε φαινολικού τύπου δευτερογενείς μεταβολίτες.

Βάσει των προηγούμενων αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε κλασμάτωση 5,5047 g ολικού, MeOH εκχυλίσματος ταξιανθιών HA 2017 με την τεχνική Fast Centrifugal Partition Chromatography (FCPC). Οι συνθήκες του πειράματος αναφέρονται στον Πίνακα 5.10.

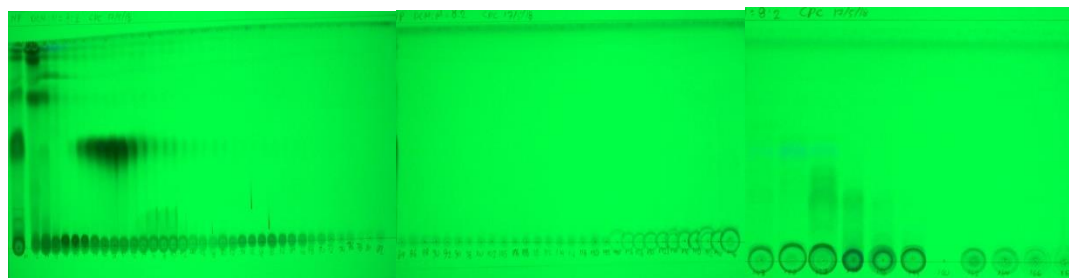
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

Πίνακας 5.10: Συνθήκες κλασμάτωσης με χρωματογραφία κατ' αντιστροφή (FCPC) MeOH εκχυλίσματος ταξιανθιών *Helichrysum amorginum* (συγκομιδή βιολογικής καλλιέργειας 2017)

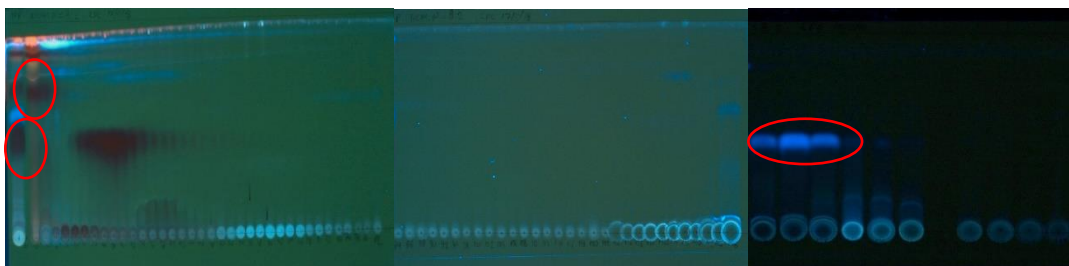
Στήλη FCPC	1 L
Solvent System 13 (sys1)	EtOAc-MeOH-Acetic acid 1%
Upper phase	1,5 L (EtOAc- MeOH)
Lower phase	1,5 L (MeOH-Acetic acid 1%)
Loop	10 ml
Sample HA2017FexUSm_290318_001	5,5047g
Solvent insertion type	Ascending mode, tubes 1-105, 20 ml/tube, 700 rpm
Solvent insertion type	Extrusion, tubes 106-167, 20 ml/tube, 700 rpm

Για την προετοιμασία του διαλύτη S13 1,43 L EtOAc, 0,143 L MeOH, 1,43 L Acetic acid 1% αναμίχθηκαν και αφέθηκαν προς σχηματισμό διφασικού συστήματος σε διαχωριστική χοάνη. Έγινε εισαγωγή ~1 L lower phase για την αντικατάσταση διαλύματος συντήρησης MeOH:H₂O = 1:1 από την στήλη. Έγινε εισαγωγή upper phase στην στήλη με ρυθμό 10 ml/min σε 700 rpm σε ascending mode για εξισορρόπηση της στήλης. Διαλύθηκαν 5,5047 g εκχυλίσματος σε 7 ml lower phase και 2 ml upper phase με χρήση υπέρηχων. Συνολικά ~5 g δείγματος εισήχθησαν σε loop 10 ml. Άρχισε εισαγωγή upper phase με ρυθμό 20 ml/tube σε ascending mode με autosampler. Πληρώθηκαν 105 δοκιμαστικοί σωλήνες. Από τον 106 σωλήνα έγινε εισαγωγή της lower phase (extrusion mode) με ρυθμό 20 ml/tube. Πληρώθηκαν οι δοκιμαστικοί 106-167.

Από την 1^η κλασμάτωση συγκεντρώθηκαν 167 κλάσματα των οποίων η ποιοτική χρωματογραφική ανάλυση λεπτής στοιβάδας κανονικής φάσης φαίνεται στην Εικόνα 5.14.

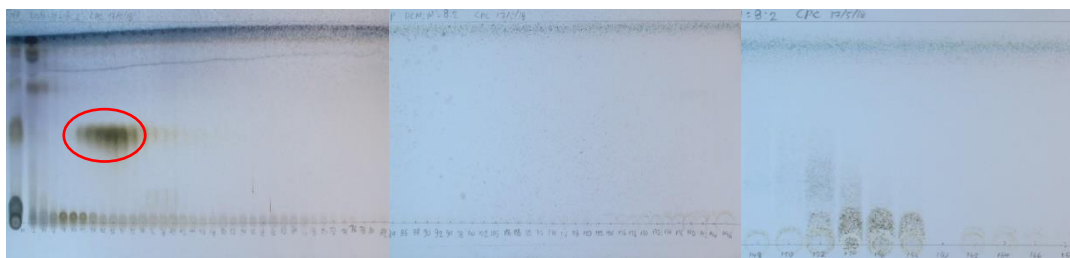


Εικόνα 5.14: TLC χρωματογραφήματα κλασμάτωσης (1^{ου} FCPC) MeOH εκχυλίσματος ταξιανθιών *Helichrysum amorginum* 2017 @ 254 nm



Εικόνα 5.15: TLC χρωματογραφήματα κλασμάτωσης (1^{ου} FCPC) MeOH εκχυλίσματος ταξιανθιών *Helichrysum amorginum* 2017 @ 366 nm

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.



Εικόνα 5.16: TLC χρωματογραφήματα κλασμάτωσης (1^{ου} FCPC) MeOH εκχυλίσματος ταξιανθιών *Helichrysum amorginum* 2017 (φωτογράφιση στο ορατό μετά από ψεκασμό με αντιδραστήριο θειικής βανιλίνης, θέρμανση 150-200°C, 1-5 min)

Από την πρώτη κλασμάτωση του MeOH εκχυλίσματος προέκυψε:

- Στα κλάσματα 19-54 (αριστερές εικόνες) η κύρια παρουσία ενός μεταβολίτη με μέσο R_f και ισχυρή σκούρα απορρόφηση στα 254 και 366 nm και καφέ χρωματισμό μετά από εφαρμογή αντιδραστήριου εμφάνισης στο ορατό όπως επισημαίνεται στην Εικόνα 5.16 με κόκκινο χρώμα.
- Στα χρωματογραφήματα στα 366 nm εμφανίζονται κι άλλες σκούρες ζώνες με υψηλότερο R_f στα κλάσματα 10-18 (αριστερή εικόνα) και το ίδιο καφέ χρωματισμό στο ορατό κάτι που συνηγορεί στην κατάταξή τους στην οικογένεια των φαινολικών ενώσεων. Επίσης, στα κλάσματα 148-152 εμφανίζονται ζώνες με έντονο μπλε φθορισμό (δεξιά εικόνα).

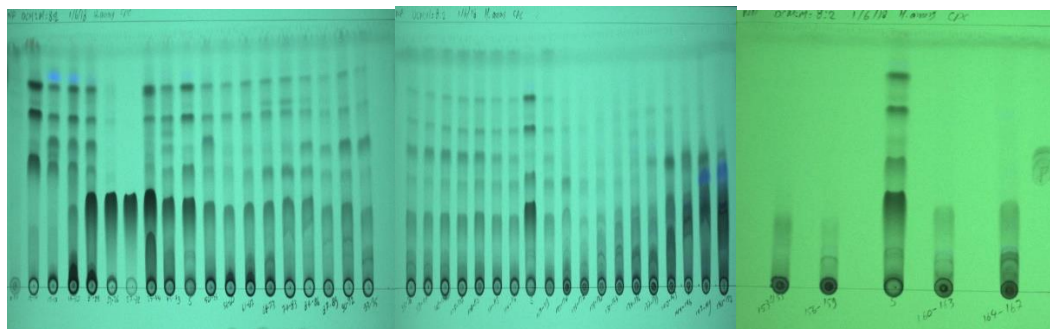
Σε ένα επόμενο βήμα πραγματοποιήθηκε η συνένωση των παραπάνω κλασμάτων (1-167) τα οποία ομαδοποιήθηκαν σε 40 δείγματα που συμπυκνώθηκαν μέχρι ξηρού και κατόπιν ζυγίστηκαν. Το συνολικό ξηρό βάρος των συνενωμένων κλασμάτων μετρήθηκε 4,194 g και αντιστοιχεί στο 76,19% του αρχικού ολικού βάρους του MeOH εκχυλίσματος. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 5.11.

Πίνακας 5.11: Ομάδες και βάρη συνενωμένων κλασμάτων 1^{ου} CPC MeOH εκχυλίσματος HA 2017

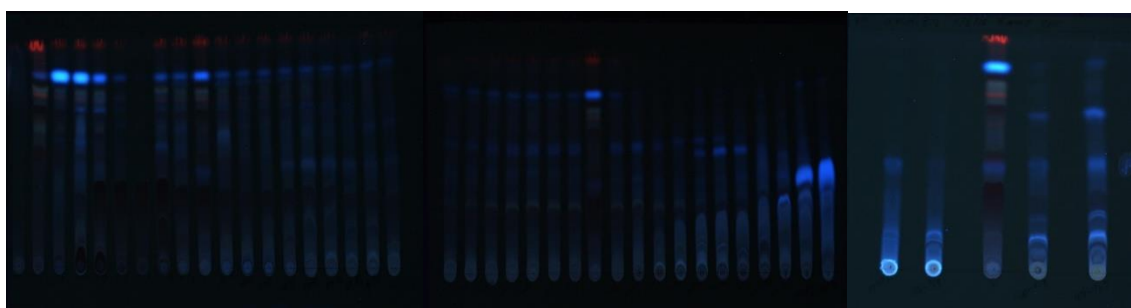
a/a	Ομάδα συνενωμένων κλασμάτων	Βάρος (g)	a/a	Ομάδα συνενωμένων κλασμάτων	Βάρος (g)
1	1-11	0,004	21	102-104	0,002
2	12-14	0,476	22	105-107	0,001
3	15-17	0,076	23	108-110	0,002
4	18-20	0,0607	24	114-116	0,002
5	21-22	0,038	25	117-119	0,002
6	23-26	0,135	26	120-121	0
7	27-32	0,270	27	122-124	0,044
8	33-44	0,053	28	125-127	0,036
9	45-49	0,0175	29	128-130	0,002
10	50-55	0,012	30	131-133	0,008
11	56-60	0,025	31	134-136	0,007
12	61-67	0,015	32	137-139	0,006
13	68-73	0,014	33	140-143	0,013
14	74-83	0,013	34	144-146	0,017
15	84-86	0,003	35	147-149	0,030
16	87-89	0,006	36	150-152	0,100
17	90-92	0,004	37	153-155	2,011
18	93-95	0,002	38	156-159	0,664
19	96-98	0,001	39	160-163	0,014
20	99-101	0,002	40	164-167	0,006

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

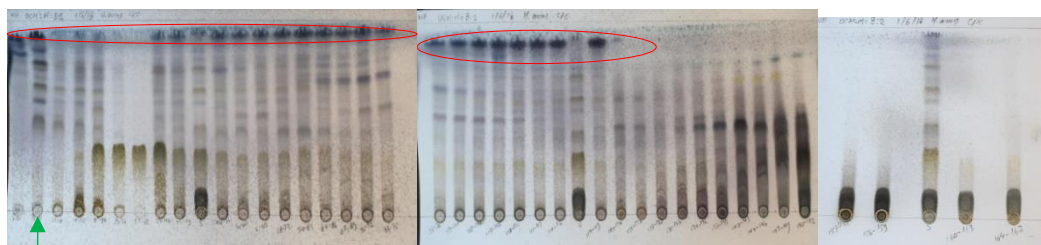
Η ποιοτική χρωματογραφική ανάλυση λεπτής στοιβάδας κανονικής φάσης των συνενωμένων κλασμάτων φαίνεται στις Εικόνες 5.17, 5.18, 5.19.



Εικόνα 5.17: TLC χρωματογραφήματα συνενωμένων κλασμάτων (1^{ου} CPC) MeOH εκχυλίσματος ταξιανθιών *Helichrysum amorginum* 2017 @ 254 nm



Εικόνα 5.18: TLC χρωματογραφήματα συνενωμένων κλασμάτων (1^{ου} CPC) MeOH εκχυλίσματος ταξιανθιών *Helichrysum amorginum* 2017 @ 366 nm



Εικόνα 5.19: TLC χρωματογραφήματα συνενωμένων κλασμάτων (1^{ου} CPC) MeOH εκχυλίσματος ταξιανθιών *Helichrysum amorginum* 2017 (φωτογράφιση στο ορατό μετά από ψεκασμό με αντιδραστήριο θειικής βανιλίνης, θέρμανση 150-200°C, 1-5 min)

Από την πρώτη συνένωση των κλασμάτων (1-167) Εικόνες 5.17, 5.18, 5.19 διαπιστώθηκε:

- Η έκλουση των χλωροφυλλών ως το κλάσμα 119 (Εικόνα 5.19, κόκκινη επισήμανση).
- Η ύπαρξη του κλάσματος 12-14 με βάρος 0,476 g (Εικόνα 5.19, πράσινο βέλος) με πλούσιο προφίλ.
- Η παρουσία ζώνης με υψηλό R_f στα κλάσματα 12-28 (Εικόνα 5.19) που εμφανίζει έντονο μπλε φθορισμό.
- Η παρουσία ζωνών στα κλάσματα 147-152 και 153-167 (Εικόνα 5.18) που εμφανίζουν μπλε φθορισμό.
- Η παρουσία ζώνης στα κλάσματα 134-149 (Εικόνα 5.19) σε μέσο R_f που στο ορατό χρωματίζεται έντονα καφέ.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

- Η παρουσία διακριτής ζώνης σε μεγάλη καθαρότητα στα κλάσματα 23-26 και 27-32 από όπου απομονώθηκε ο **μεταβολίτης 1** (επιλογή κλάσματος 23-26).
- Η ανομοιόμορφη κατανομή του βάρους των κλασμάτων 153-155 (2,011 g, 48% του βάρους των συνολικών κλασμάτων) και των 156-159 (0,664 g, 16% του βάρους των συνολικών κλασμάτων) τα οποία αποτελούνται κυρίως από υδατάνθρακες.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε 2^η συνένωση των 40 κλασμάτων MeOH f series από την οποία προέκυψαν 13 τελικά συνενωμένα κλάσματα της σειράς MeOH f series τα οποία ομαδοποιήθηκαν σύμφωνα με το προφίλ των Εικόνων 5.17, 5.18, 5.19, ζυγίστηκαν (Πίνακας 5.12) κι εξετάστηκαν ποιοτικά με TLC κανονικής φάσης (Εικόνα 5.20).

Πίνακας 5.12: Τελικές συνενώσεις κλασμάτων (MeOH f series) 1^{ου} CPC MeOH εκχυλίσματος HA 2017

α/α	Ομάδες τελικών συνενωμένων κλασμάτων	Βάρος (mg)	Σχόλια
1	f1-11	4	Μίγμα
2	f12-14	476	Κλασμάτωση με 2^ο FCPC
3	f15-17	76	Μίγμα
4	f18-22	99	Μίγμα
5	f23-26	135	Μεταβολίτης 1
6	f27-32	270	Μεταβολίτης 1
7	f33-55	82	Μίγμα
8	f56-83	67	Μίγμα
9	f84-119	27	Μίγμα
10	f122-130	82	Μίγμα
11	f131-139	21	Μίγμα
12	f140-152	160	Μίγμα
13	f153-167	2695	Μίγμα (υδατάνθρακες)
Σύνολο		4194	



Εικόνα 5.20: TLC χρωματογραφήματα κανονικής φάσης τελικών συνενωμένων κλασμάτων (1^{ου} FCPC) MeOH εκχυλίσματος ταξιανθιών *Helichrysum amorginum* 2017 @ 254 nm, 366 nm, φωτογράφιση στο ορατό μετά από ψεκασμό με αντιδραστήριο θειικής θανιλίνης, θέρμανση 150-200°C, 1-5 min

Από τον Πίνακα 5.12 το κλάσμα f12-14 λόγω ικανοποιητικού βάρους επιλέχθηκε για 2^η κλασμάτωση με CPC, τα κλάσματα f23-26 και f27-32 προσδιορίστηκαν ως κλάσματα του μεταβολίτη 1, τα κλάσματα f1-11, f15-17, f18-22, f33-55, f56-83, f84-119, f122-130, f131-139, f140-152 ως μίγματα δεν επελέγησαν για περαιτέρω ανάλυση, ενώ το κλάσμα f153-167 απορρίφθηκε ως μίγμα υδατανθράκων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

Σημειώνεται ότι στο MeOH εκχύλισμα ταξιανθιών HA 2017 το βάρος των κλασμάτων f23-26 & f27-32 (**μεταβολίτης 1**) αποτελεί το ≈9,6% του συνολικού βάρους των κλασμάτων.

(β) Κλασμάτωση με 2^η εφαρμογή CPC στο συνενωμένο κλάσμα f12-14 (MeOH sf series)

Για την επιλογή κατάλληλου διφασικού συστήματος διαλυτών υγρής-υγρής εκχύλισης χρωματογραφίας κατ' αντιρροή του κλάσματος f12-14 δοκιμάστηκαν τα συστήματα διαλυτών του Πίνακα 5.14 ακολουθώντας την ίδια μεθοδολογία με την κλασμάτωση του 1^{ου} CPC (α). Από τον Πίνακα 5.14 επιλέχθηκε ως καταλληλότερο το σύστημα διαλυτών S28 λόγω του χρόνου εξισορρόπησης των στοιβάδων (12 sec με δείγμα), του ύψους όγκου των φάσεων (U1,3/L 1,5 cm με δείγμα) και της κατανομής των μεταβολιτών στις άνω/κάτω φάσεις.

Βάσει των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε κλασμάτωση ≈424 mg δείγματος f12-14 με την τεχνική Fast Centrifugal Partition Chromatography (FCPC). Οι συνθήκες του πειράματος αναφέρονται στον παρακάτω Πίνακα 5.13.

Πίνακας 5.13: Συνθήκες κλασμάτωσης με χρωματογραφία κατ' αντιρροή (FCPC) δείγματος f12-14

Στήλη FCPC	200 ml
Solvent System S28	n-hex-EtOAc-EtOH-Acetic acid 1%
Upper phase	1 L (n-hex-EtOAc)
Lower phase	1 L (EtOH-Acetic acid 1%)
Loop	2 ml
Sample f12-14	424 mg
Solvent insertion type	Ascending mode, tubes 1-70, 10 ml/tube, 700 rpm
Solvent insertion type	Extrusion, tubes 40-70, 5 ml/tube, 700 rpm

Για την προετοιμασία του διαλύτη S28 0,4 L n-hexane, 0,6 L EtOAc, 0,4 L EtOH, 0,6 L acetic acid 1% αναμίχθηκαν και αφέθηκαν προς σχηματισμό διφασικού συστήματος σε διαχωριστική χοάνη. Έγινε εισαγωγή ~0,25 L lower phase για την αντικατάσταση διαλύματος συντήρησης MeOH:H₂O = 1:1 από την στήλη. Έγινε εισαγωγή upper phase στην στήλη με ρυθμό 5 ml/min σε 850 rpm σε ascending mode για εξισορρόπηση της στήλης. Διαλύθηκαν 424 mg εκχυλίσματος σε 0,8 ml lower phase και 1,2 ml upper phase με χρήση υπέρηχων και εισήχθησαν σε loop 2 ml. Άρχισε εισαγωγή upper phase με ρυθμό 10ml/tube σε ascending mode με autosampler. Πληρώθηκαν 70 δοκιμαστικοί σωλήνες. Από τον #40 σωλήνα έγινε εισαγωγή της lower phase (extrusion mode) με ρυθμό 5 ml/tube. Πληρώθηκαν οι δοκιμαστικοί #40-#70.

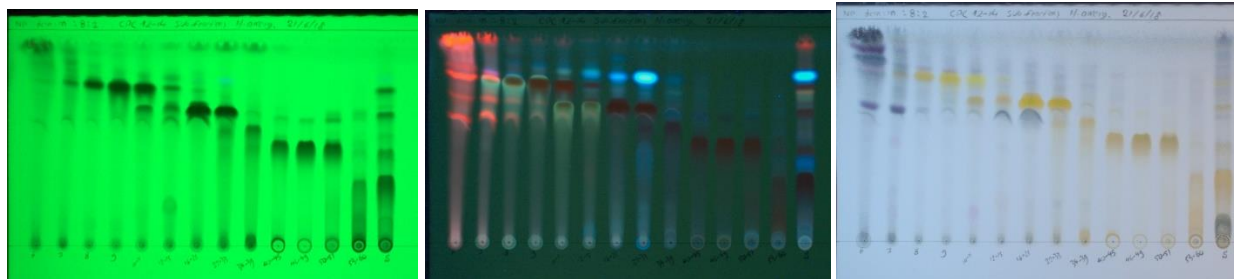
Από την 2^η κλασμάτωση συγκεντρώθηκαν 70 κλάσματα τα οποία συνενώθηκαν σε 13 MeOH sf series κλάσματα (Πίνακας 5.15) και πραγματοποιήθηκε η ποιοτική χρωματογραφική ανάλυση λεπτής στοιβάδας κανονικής φάσης (Εικόνα 5.21). Στο κλάσμα sf46-49 εντοπίστηκε ο **μεταβολίτης 2**, ενώ στο

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

κλάσμα sf12-15 πραγματοποιήθηκε παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας κανονικής φάσης (γ) με εφαρμογή 7,2 mg sf12-15 σε σύστημα ανάπτυξης DCM:MeOH=8:2, ανάπτυξη 13 cm.

Πίνακας 5.14: Διερεύνηση βελτιστοποίησης διαχωρισμού φάσεων στο διφασικό σύστημα *n*-hexane:EtOAc:EtOH:AA1% με και χωρίς προσθήκη κλάσματος f12-14 του 1^{ου} CPC του MeOH εκχυλίσματος ταξιανθιών *Helichrysum amorginum* 2017

Σύστημα	n-hexane (vol. parts)	EtOAc (vol. parts)	EtOH (vol. parts)	Acetic acid 1 % (vol. parts)	Βάρος f12-14 (mg)	Upper phase χωρίς/με f12-14 (cm)	Lower phase χωρίς/με f12-14 (cm)	Διαχωρισμός (sec) χωρίς/με f12-14
S26	8	2	4	6	10,9	1,3/1,3	1,5/1,5	15/50
S27	6	4	4	6	10,8	1,3/1,2	1,6/1,5	22/11
S28	4	6	4	6	16	1,3/1,3	1,5/1,5	26/12
S29	2	8	4	6	14	1,6/1,6	1,4/1,5	45/22



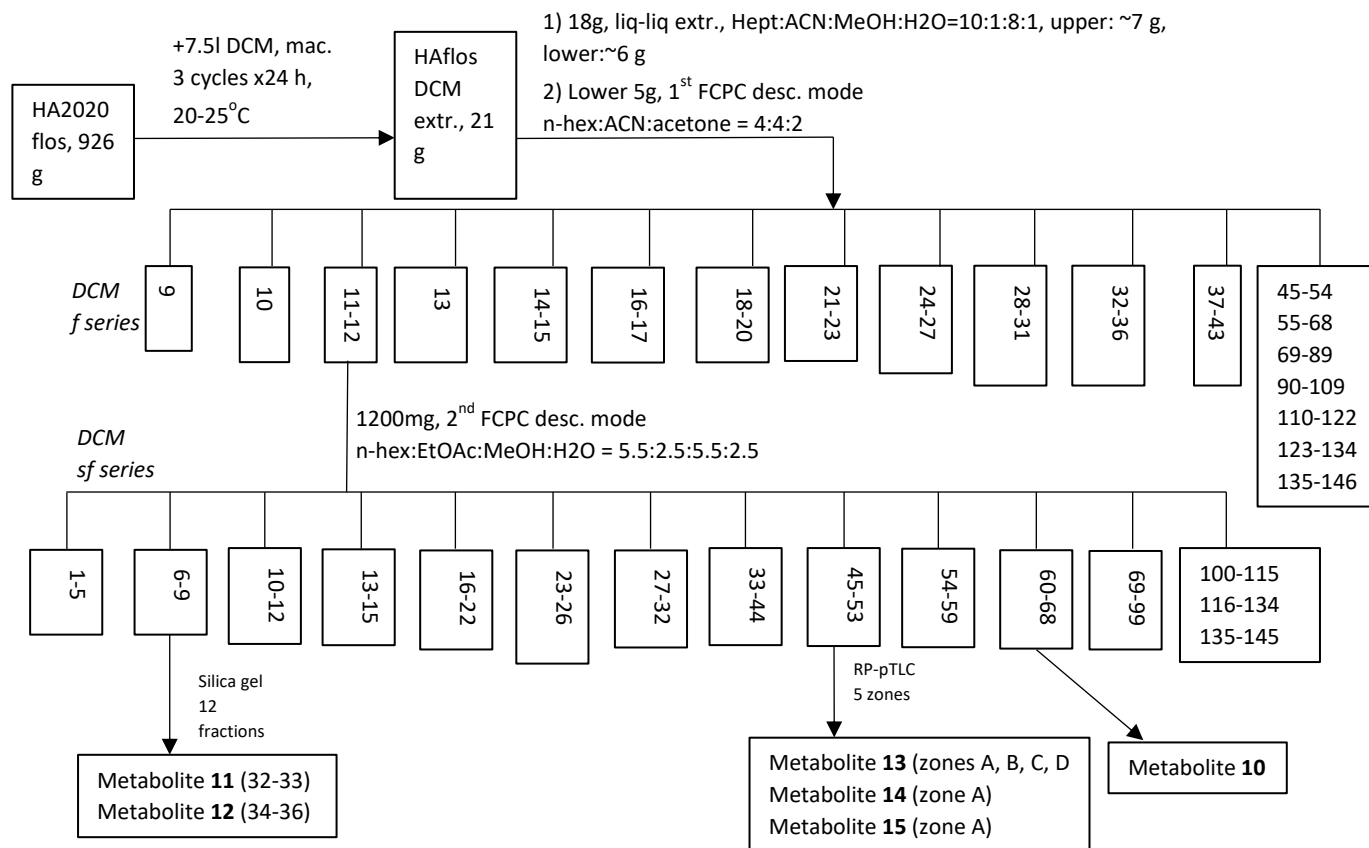
Εικόνα 5.21: TLC χρωματογραφήματα κανονικής φάσης τελικών συνενωμένων κλασμάτων (2^{ου} FCPC του κλάσματος f12-14) MeOH εκχυλίσματος ταξιανθιών *Helichrysum amorginum* 2017 @ 254 nm, 366 nm, φωτογράφιση στο ορατό μετά από ψεκασμό με αντιδραστήριο θειικής βανιλίνης, θέρμανση 150-200°C, 1-5 min

Πίνακας 5.15: Τελικές συνενώσεις κλασμάτων (MeOH f series) 1^{ου} CPC MeOH εκχυλίσματος ταξιανθιών *Helichrysum amorginum* 2017

a/a	Ομάδες τελικών συνενωμένων κλασμάτων	Βάρος (mg)	Σχόλια
1	sf6	80,9	μίγμα
2	sf7	3,5	Μίγμα
3	sf8	6,2	μίγμα
4	sf9	3,3	μίγμα
5	sf10-11	7,4	μίγμα
6	sf12-15	7,2	Μεταβολίτες 3-9 (p-TLC)
7	sf16-21	15,5	μίγμα
8	sf22-33	12,3	μίγμα
9	sf34-39	6,5	μίγμα
10	sf40-45	5,9	μίγμα
11	sf46-49	31,9	Μεταβολίτης 2
12	sf50-51	4,5	μίγμα
13	sf53-60	239	μίγμα
Σύνολο		424	

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

5.3.3 Απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών από DCM εκχύλισμα ταξιανθιών ΗΑ



Εικόνα 5.22: Σχεδιάγραμμα απομόνωσης μεταβολιτών 11-15 από ολικό DCM εκχύλισμα μη συνεχόμενης εκχύλισης ταξιανθιών *Helichrysum amorginum* (2020) βιολογικής καλλιέργειας

Για την απομόνωση των δευτερογενών **μεταβολιτών 11-15** (βλ. φασματοσκοπικά και φασματομετρικά δεδομένα στην Υποενότητα 5.3.4), από το ολικό, DCM εκχύλισμα ταξιανθιών μη συνεχόμενης εκχύλισης, χρησιμοποιήθηκε η μεθοδολογία κλασμάτωσης με τις χρωματογραφικές μεθόδους που φαίνονται στην Εικόνα 5.22. Εν συντομία, ποσότητα ταξιανθιών HA βιολογικής καλλιέργειας 2020 εκχυλίστηκε διαδοχικά με στατική εμβροχή (static maceration) με DCM. Το ολικό DCM εκχύλισμα μετά από ξήρανση υπεβλήθη σε υγρή-υγρή κατανομή σε διφασικό σύστημα διαλυτών Hept:ACN:MeOH:H₂O από το οποίο επιλέχθηκε η κάτω πολική στοιβάδα που μετά από ξήρανση απέδωσε στερεό εκχύλισμα. Το οποίο υπεβλήθη σε 1^η χρωματογραφία κατ' αντιρροή (CPC), από όπου προέκυψαν τα συνενωμένα κλάσματα της σειράς DCM f (DCM f series) f9 έως f135-146. Σε δεύτερο βήμα επιλέχθηκε το συνενωμένο κλάσμα f11-12, στο οποίο υπεβλήθη 2^η χρωματογραφία κατ' αντιρροή, από όπου προέκυψαν τα συνενωμένα κλάσματα της σειράς DCM sf (DCM sf series) sf1-5 έως sf135-145. Από τα οποία το sf6-9 κλασματώθηκε με χρωματογραφία ανοιχτής στήλης (silica gel), όπου εντοπίστηκαν οι

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

μεταβολίτες 11 (κλάσμα 32-33), **12** (κλάσμα 34-36) και το sf45-53 διαχωρίστηκε με παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας αντίστροφης φάσης, όπου εντοπίστηκαν οι **μεταβολίτες 13-15**.

(α) Κλασμάτωση με 1^η εφαρμογή CPC στο DCM εκχύλισμα (κάτω πολικής στοιβάδας) ταξιανθιών HA (DCM f series)

Για την επιλογή κατάλληλου διφασικού συστήματος διαλυτών υγρής-υγρής εκχύλισης χρωματογραφίας κατ' αντιρροή του εκχυλίσματος κάτω φάσης δοκιμάστηκαν τα 4 συστήματα διαλυτών του Πίνακα 5.16. Από τον Πίνακα 5.16 επιλέχθηκε ως καταλληλότερο το σύστημα διαλυτών S3 λόγω του χρόνου εξισορρόπησης των στοιβάδων (10 sec με δείγμα), του σχετικά ικανοποιητικού ύψους όγκου των φάσεων (U1,5/L3,5 cm με δείγμα) και της κατανομής των μεταβολιτών στις άνω/κάτω φάσεις.

Πίνακας 5.16: Διερεύνηση βελτιστοποίησης διαχωρισμού φάσεων με και χωρίς προσθήκη δείγματος (κάτω πολική φάση) του 1^{ου} CPC στο DCM εκχύλισμα ταξιανθιών HA 2020

Σύστημα	n-hexane (vol. parts)	EtoAc (vol. parts)	Acetone (vol. parts)	ACN (vol. parts)	MeOH (vol. parts)	H ₂ O (vol. parts)	Βάρος δείγματος (mg)	Upper phase με δείγμα (cm)	Lower phase με δείγμα (cm)	Διαχωρισμός (sec) χωρίς/με δείγμα
S1.1	5	5			5	5	10	2	2	15/20
S1.2	4	6			7	3	10	1,1	2,6	15/20
S1.3	10	1			10	1	10	2	2	15/20
S2	10	1	2		10	1	10	2	3,3	14/30
S3	4		2	4			10	1,5	3,5	7/10
S4.1	3	1	2	4			10	0,3	4	Άκυρο (upper phase)
S4.2	2	2	2	4			10	-	-	Άκυρο μονοφασικό

Βάσει των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε κλασμάτωση ≈5 g δείγματος με την τεχνική reversed phase Fast Centrifugal Partition Chromatography (FCPC). Οι συνθήκες του πειράματος αναφέρονται στον Πίνακα 5.17:

Πίνακας 5.17: Συνθήκες κλασμάτωσης με χρωματογραφία κατ' αντιρροή (FCPC) δείγματος DCM εκχύλισμα (κάτω πολικής στοιβάδας) ταξιανθιών *Helichrysum amorginum*

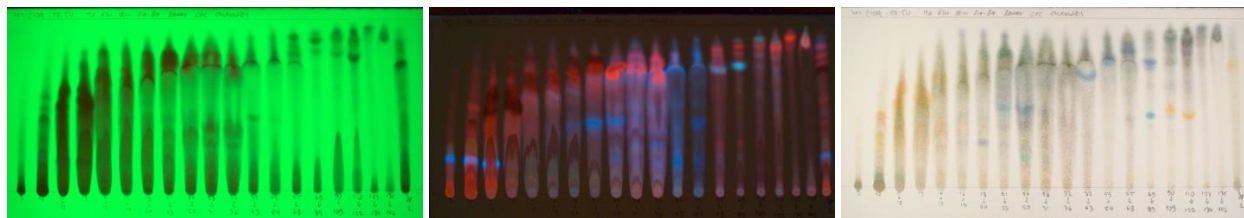
Στήλη FCPC	1000 ml
Solvent System S3	n-hex-ACN-Acetone
Upper phase	~2 L (n-hex-ACN)
Lower phase	~2 L (ACN-Acetone)
Loop	50 ml
Sample	5 g
Solvent insertion type	Descending mode, 15 ml/tube, 700 rpm
Solvent insertion type	Extrusion, 15 ml/tube, 700 rpm

Για την προετοιμασία του διαλύτη S3 2,4 L n-hexane, 2,4 L ACN, 1,2 L Acetone αναμίχθηκαν και αφέθηκαν προς σχηματισμό διφασικού συστήματος σε διαχωριστική χοάνη. Έγινε εισαγωγή σε descending mode ~1,25 L upper phase (20 ml/min, 200 rpm) για την αντικατάσταση διαλύματος

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

συντήρησης MeOH:H₂O = 1:1 από την στήλη. Έγινε εισαγωγή lower phase στην στήλη με ρυθμό 15 ml/min σε 700 rpm σε descending mode για εξισορρόπηση της στήλης. Διαλύθηκαν ~5 g εκχυλίσματος σε 20 ml lower και 20 ml upper phase με χρήση υπέρηχων και εισήχθησαν σε loop 50 ml. Άρχισε εισαγωγή lower phase με ρυθμό 10 ml/tube σε descending mode με autosampler και extrusion upper phase. Πληρώθηκαν 109 δοκιμαστικοί σωλήνες.

Από την 1^η κλασμάτωση συγκεντρώθηκαν 109 κλάσματα τα οποία συνενώθηκαν σε 19 DCM f series κλάσματα (Πίνακας 5.18) και πραγματοποιήθηκε η ποιοτική χρωματογραφική ανάλυση λεπτής στοιβάδας κανονικής φάσης με σύστημα ανάπτυξης DCM:MeOH=98:2 (Εικόνα 5.23).



Εικόνα 5.23: TLC χρωματογραφήματα κανονικής φάσης τελικών συνενωμένων κλασμάτων (1^{ου} FCPC) DCM εκχυλίσματος κάτω φάσης ταξιανθιών *Helichrysum amorginum* 2020 @ 254 nm, 366 nm, φωτογράφιση στο ορατό μετά από ψεκασμό με αντιδραστήριο θειικής βανιλίνης, θέρμανση 150-200°C, 1-5 min

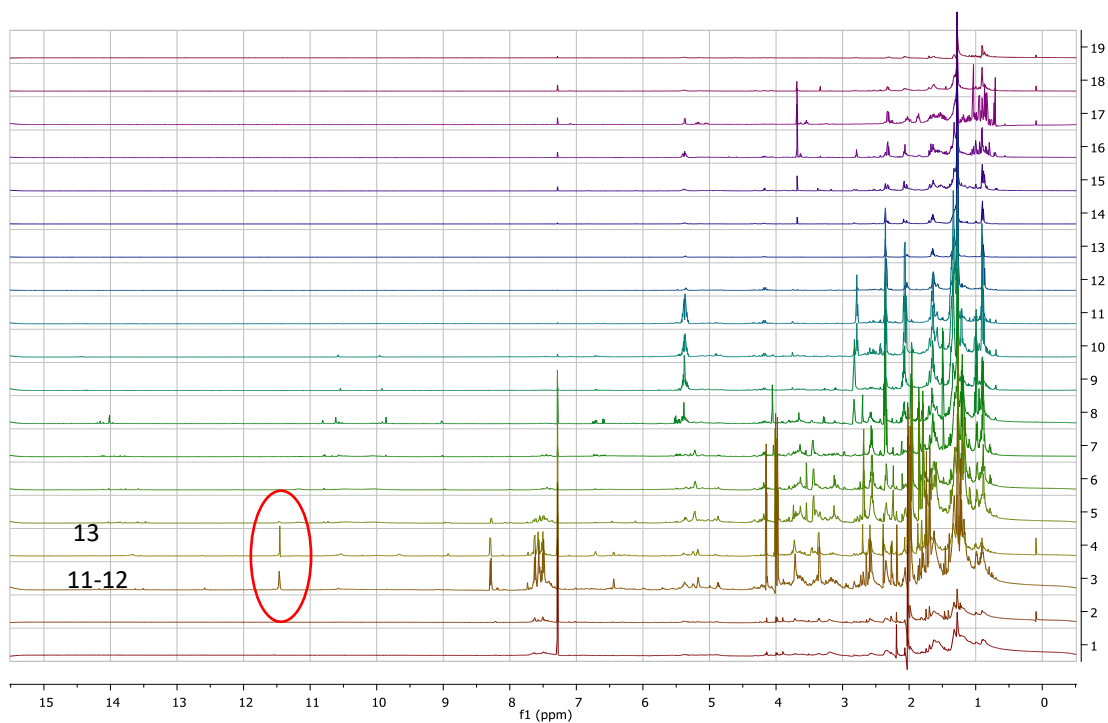
Πίνακας 5.18: Τελικές συνενώσεις κλασμάτων (DCM f series) 1^{ου} CPC DCM εκχυλίσματος κάτω φάσης ταξιανθιών *Helichrysum amorginum* 2020

a/a	Ομάδες τελικών συνενωμένων κλασμάτων	Βάρος (mg)	Σχόλια
1	f9	135	μίγμα
2	f10	90	μίγμα
3	f11-12	1300	μίγμα
4	f13	349	μίγμα
5	f14-15	394	μίγμα
6	f16-17	327	μίγμα
7	f18-20	352	μίγμα
8	f21-23	195	μίγμα
9	f24-27	183	μίγμα
10	f28-31	124	μίγμα
11	f32-36	195	μίγμα
12	f37-43	151	μίγμα
13	f45-54	202	μίγμα
14	f55-68	92	μίγμα
15	f69-89	60	μίγμα
16	f90-109	50	μίγμα
17	f110-122	102	μίγμα
18	f123-134	47	μίγμα
19	f135-146	76	μίγμα
Σύνολο		4030	

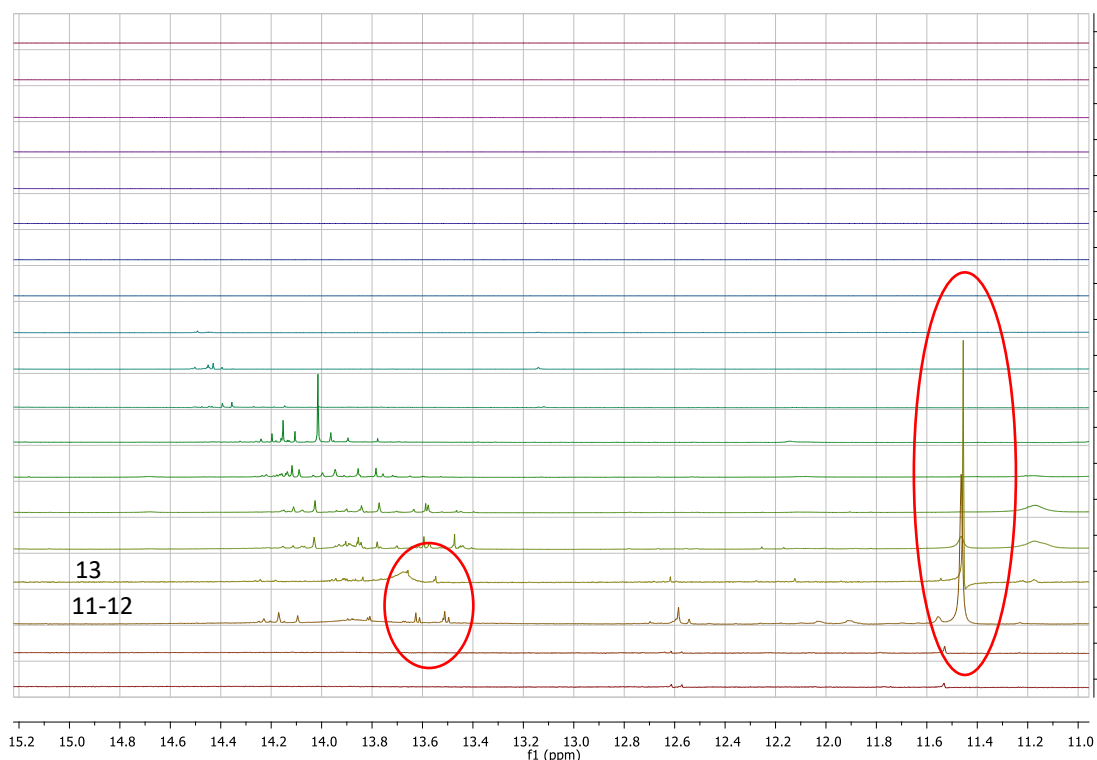
Από την Εικόνα 5.23 η ποιοτική ανάλυση με TLC των κλασμάτων δείχνει περίπλοκα μίγματα μεταβολιτών. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε η λήψη φασμάτων ¹H NMR των κλασμάτων, όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 5.24. Από τα φάσματα αναγνωρίστηκαν και τα κλάσματα 11-12 και 13 που περιέχουν την οξεία, απλή κορυφή στα δ_H 11,4-11,5 ppm σε συνδυασμό με σήματα στα δ_H 13,4-13,7ppm

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

που υποδεικνύουν ισχυρά απεντοπισμένους πυρήνες H, που μπορεί να οφείλονται σε ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου και αποτελούν επίσης ένδειξη ομάδων -O-H πάνω σε δακτυλίους φλορογλουσινόλης. Λόγω του παρόμοιου φασματοσκοπικού προφίλ επιλέχθηκε για κλασμάτωση με CPC το 11-12 με το μεγαλύτερο βάρος (1300 mg).



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.



Εικόνα 5.24: ^1H NMR φάσματα των συνενωμένων κλασμάτων DCM *f* series (600MHz, CDCl_3)

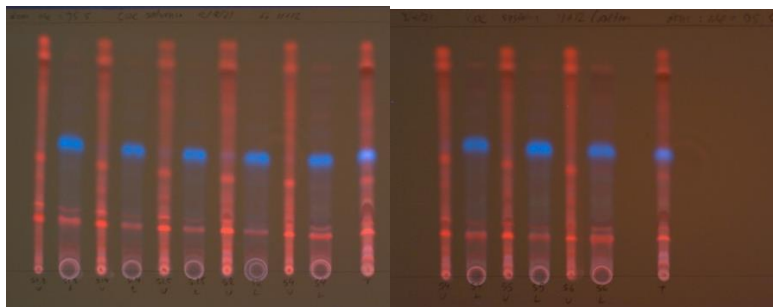
(β) Κλασμάτωση με 2^η εφαρμογή CPC στο συνενωμένο κλάσμα f11-12 (DCM sf series)

Για την επιλογή κατάλληλου διφασικού συστήματος διαλυτών υγρής-υγρής εκχύλισης χρωματογραφίας κατ' αντιστροφή του εκχυλίσματος κάτω φάσης δοκιμάστηκαν τα 10 συστήματα διαλυτών του Πίνακα 5.19. Από τον Πίνακα 5.19 επιλέχθηκε ως καταλληλότερο το σύστημα διαλυτών S4 (παρόμοιο σύστημα με S5) λόγω του χρόνου εξισορρόπησης των στοιβάδων (20 sec με δείγμα), του σχετικά ικανοποιητικού ύψους όγκου των φάσεων (U1,2/L 1,6 cm με δείγμα), του μειωμένου όγκου νερού σε σχέση με τα S1-S3 και της κατανομής των μεταβολιτών στις άνω/κάτω φάσεις.

Πίνακας 5.19: Διερεύνηση βελτιστοποίησης διαχωρισμού φάσεων με και χωρίς προσθήκη δείγματος DCM f11-12 του 1^{ου} CPC του DCM εκχυλίσματος ταξιανθιών *Helichrysum amorginum* 2020

Σύστημα	n-hexane (vol. parts)	EtOAc (vol. parts)	MeOH (vol. parts)	H ₂ O (vol. parts)	Βάρος δείγματος (mg)	Upper phase με δείγμα (cm)	Lower phase με δείγμα (cm)	Διαχωρισμός (sec) με δείγμα
S1.1	9	0	5	3	10	-	-	Άκυρο (γαλάκτωμα)
S1.2	8	1	5	3	10	1,2	1,5	20
S1.3	7	2	5	3	10	1,2	1,4	10
S1.4	6	3	5	3	10	1,2	1,6	20
S1.5	5	4	5	3	10	1,3	1,6	20
S2	6,5	5,5	6	4	10	1,3	1,5	20
S3	5	5,5	5,5	4	10	-	-	Άκυρο (γαλάκτωμα)
S4	5,5	2,5	5,5	2,5	10	1,2	1,6	20
S5	5,5	2	6	2,5	10	1,2	1,4	20
S6	5,5	1,5	6,5	2,5	10	1	1,8	60

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.



Εικόνα 5.25: TLC χρωματογραφήματα κανονικής φάσης DCM εκχυλίσματος (κλάσμα DCM f11-12) (2^{ου} FCPC) ταξιανθιών *Helichrysum amorginum* 2020 @ 254 nm, 366 nm, φωτογράφιση στο ορατό μετά από ψεκασμό με αντιδραστήριο θειικής βανιλίνης, θέρμανση 150-200°C, 1-5 min

Βάσει των αποτελεσμάτων (Πίνακας 5.19, Εικόνα 5.25) πραγματοποιήθηκε κλασμάτωση ≈ 1300 mg δείγματος με την τεχνική reversed phase Fast Centrifugal Partition Chromatography (FCPC). Οι συνθήκες του πειράματος αναφέρονται στον Πίνακα 5.20.

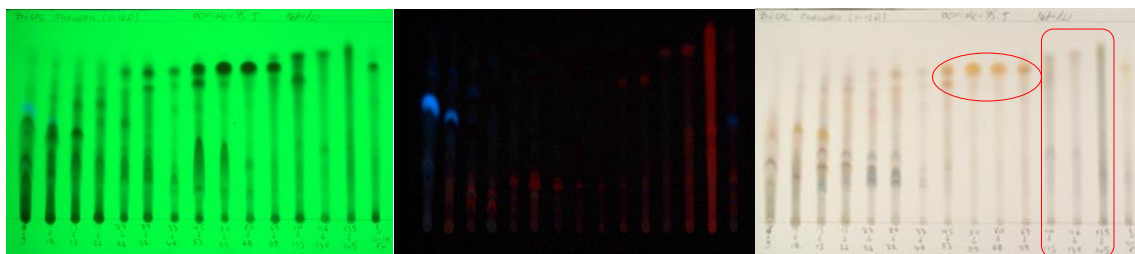
Πίνακας 5.20: Συνθήκες κλασμάτωσης με χρωματογραφία κατ' αντιρροή (FCPC) δείγματος f11-12

Στήλη FCPC	200 ml
Solvent System S4	n-hex-EtOAc-MeOH-H ₂ O
Upper phase	$\sim 1,5$ L (n-hex-EtOAc)
Lower phase	$\sim 1,5$ L (EtOAc-MeOH-H ₂ O)
Loop	2 ml
Sample f11-12	1300 mg
Solvent insertion type	Descending mode, 15 ml/tube, 650 rpm
Solvent insertion type	Extrusion, tubes, 15 ml/tube, 650 rpm

Για την προετοιμασία του διαλύτη S4 ~ 1 L n-hexane, 0,5 L EtOAc, ~ 1 L MeOH, 0,5 L H₂O αναμίχθηκαν και αφέθηκαν προς σχηματισμό διφασικού συστήματος σε διαχωριστική χοάνη. Έγινε εισαγωγή σε descending mode $\sim 0,5$ L upper phase (20 ml/min, 200 rpm) για την αντικατάσταση διαλύματος συντήρησης MeOH:H₂O = 1:1 από την στήλη. Έγινε εισαγωγή lower phase στην στήλη με ρυθμό 15 ml/min σε 650 rpm σε descending mode για εξισορρόπηση της στήλης. Διαλύθηκαν ~ 1300 mg εκχυλίσματος σε 1 ml lower και 1 ml upper phase με χρήση υπέρηχων και εισήχθησαν σε loop 2 ml. Άρχισε εισαγωγή lower phase με ρυθμό 15 ml/tube σε descending mode με autosampler και extrusion upper phase. Πληρώθηκαν 145 δοκιμαστικοί σωλήνες.

Από την κλασμάτωση συγκεντρώθηκαν 145 κλάσματα τα οποία συνενώθηκαν σε 15 DCM sf series κλάσματα (Πίνακας 5.21) και πραγματοποιήθηκε η ποιοτική χρωματογραφική ανάλυση λεπτής στοιβάδας κανονικής φάσης με σύστημα ανάπτυξης DCM:MeOH=95:5 (Εικόνα 5.26).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.



Εικόνα 5.26: TLC χρωματογραφήματα κανονικής φάσης τελικών συνενωμένων κλασμάτων DCM *sf series* (2^{ου} FCPC, *f11-12*) DCM εκχυλίσματος ταξιανθιών *Helichrysum amorginum* 2020 @ 254 nm, 366 nm, φωτογράφιση στο ορατό μετά από ψεκασμό με αντιδραστήριο θειικής βανιλίνης, θέρμανση 150-200°C, 1-5 min

Πίνακας 5.21: Τελικές συνενώσεις κλασμάτων (DCM *sf series*) 2^{ου} CPC (δείγμα κλάσμα *f11-12*) DCM εκχυλίσματος ταξιανθιών *Helichrysum amorginum* 2020

a/a	Ομάδες τελικών συνενωμένων κλασμάτων	Βάρος (mg)	Σχόλια
1	sf1-5	-	μίγμα
2	sf6-9	137,3	μίγμα
3	sf10-12	175,8	μίγμα
4	sf13-15	57,7	μίγμα
5	sf16-22	97,4	μίγμα
6	sf23-26	44,4	μίγμα
7	sf27-32	60,8	μίγμα
8	sf33-44	90,7	μίγμα
9	sf45-53	69,9	μίγμα
10	sf54-59	58,4	μίγμα
11	sf60-68	59,6	μίγμα
12	sf69-99	54,3	μίγμα
13	sf100-115	37,3	μίγμα
14	sf116-134	76,5	μίγμα
15	sf135-145	67,4	μίγμα
Σύνολο		1087,5	

Από την Εικόνα 5.26 η ποιοτική ανάλυση με TLC των κλασμάτων δείχνει περίπλοκα μίγματα στα κλάσματα sf6-9 έως sf33-44, απλούστερα μίγματα στα κλάσματα sf45-53 έως sf69-99 και μίγματα που περιέχουν χλωροφύλλες sf100-115 έως sf135-145. Από τα παραπάνω επιλέχθηκε το κλάσμα sf6-9 λόγω ικανοποιητικού βάρους για κλασμάτωση με ανοικτή στήλη silica gel και το πιο εμπλουτισμένο κλάσμα sf45-53 ανάμεσα στα παρόμοιας σύστασης sf54-59, sf60-68, sf69-99 για κλασμάτωση με prepTLC.

γ) κλασμάτωση sf6-9 με ανοικτή στήλη silica gel

Το κλάσμα sf6-9 υποβλήθηκε σε κλασμάτωση με ανοικτή στήλη silica gel σύμφωνα με τα δεδομένα του Πίνακα 5.22. Στα κλάσματα 32-33 εντοπίστηκε ο **μεταβολίτης 11** και στο κλάσμα 34-36 ο **μεταβολίτης 12**.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

Πίνακας 5.22: Τελικές συνενώσεις κλασμάτων (DCM sf 6-9) ανοικτής στήλης *silica gel*

Βάρος sf6-9	100mg
Διαλύτες βαθμιδωτής έκλουσης	n-Hex-EtOAc: 90-10 έως 0-100 EtOAc-MeOH: 90-10 έως 0-100
Κλάσμα 15-21	0,8 mg
Κλάσμα 23-29	1,3 mg
Κλάσμα 32-33	0,8 mg
Κλάσμα 34-36	2 mg
Κλάσμα 37-39	0,4 mg
Κλάσμα 41-49	1,3 mg
Κλάσμα 51-59	3,6 mg
Κλάσμα 60-73	3,2 mg
Κλάσμα 75 (MeOH elution)	5 mg
Κλάσμα 77 (MeOH elution)	2,3 mg
Κλάσμα 79 (MeOH elution)	0,9 mg
Κλάσμα 80-107 (MeOH elution)	23 mg

δ) κλασμάτωση sf45-53 με prepTLC

Το κλάσμα sf45-53 υποβλήθηκε σε κλασμάτωση με prepTLC σύμφωνα με τα δεδομένα του Πίνακα 5.23. Στις ζώνες A, B, C, D εντοπίστηκε ο **μεταβολίτης 13**, στην ζώνη A ο **μεταβολίτης 14**, στη ζώνη A ο **μεταβολίτης 15**.

Πίνακας 5.23: Κλασμάτωση DCM sf 45-53 με prepTLC

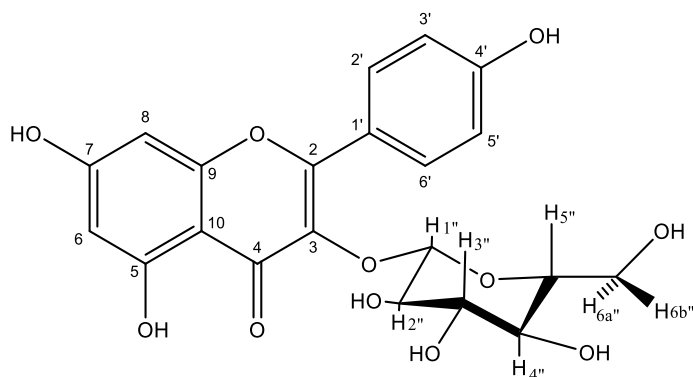
Βάρος sf45-53	20 mg
TLC	Reversed phase
Διαλύτες έκλουσης	ACN:H ₂ O:Acetic acid = 160:40:1
Χρόνος ανάπτυξης	1 h
ζώνες	5 (A-E) bottom to top
A	0,8 mg
B	0,2 mg
C	0,1 mg
D	1 mg
E	n.a.

Συνολικά εντοπίστηκαν και χαρακτηρίστηκαν 15 μεταβολίτες τα φασματοσκοπικά και φασματομετρικά δεδομένα των οποίων παρουσιάζονται στην Υποενότητα 5.3.4.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

5.3.4 Φασματοσκοπικά και φασματομετρικά δεδομένα των δευτερογενών μεταβολιτών που απομονώθηκαν από το φυτικό υλικό *Helichrysum amorginum* flos (ταξιανθίες από βιολογική καλλιέργεια Κατάπολα Αμοργού, συγκομιδή 2017, 2020)

Μεταβολίτης 1: kaempferol-3-O-β-D-glucoside (astragalin)

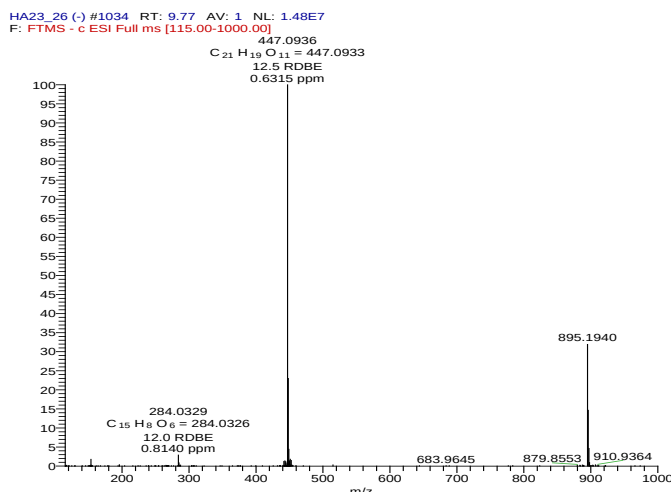


Εικόνα 5.27: Δομή kaempferol-3-O-glucoside (astragalin) (1)

Ο μεταβολίτης **astragalin** απομονώθηκε από τα ταξιανθίες του *H. amorginum* (συγκομιδής 2017) και συγκεκριμένα από το MeOH, ολικό εκχύλισμα διαδοχικής εκχύλισης μετά από n-hexane και DCM εκχυλίσσεις. Η απομόνωση επιτεύχθηκε μετά από κλασματοποίηση του MeOH εκχυλίσματος με την χρωματογραφική μέθοδο FCPC, που είχε ως αποτέλεσμα την παραλαβή του μεταβολίτη στα συνενωμένα κλάσματα f23-26 ως υποκίτρινο-κίτρινο στερεό (135mg). Κατά την χρωματογραφική ανάλυση με TLC μετά από ψεκασμό με διάλυμα θειϊκής βανιλίνης και θέρμανση ο μεταβολίτης χρωματίζεται κίτρινο-καφέ.

Το μοριακό βάρος του ουδέτερου μορίου (MB: 448.1000) προσδιορίστηκε με φασματογράφο μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (High Resolution MS-Orbitrap analyzer) με την μέθοδο του ηλεκτροψεκασμού (ESI), σε αρνητικό ιονισμό. Αντιστοιχεί στο μοριακό τύπο $C_{21}H_{20}O_{11}$ (RDBeq=12) με κύριο μοριακό ιόν $[M-H]^-$ 447.0933 ($C_{21}H_{19}O_{11}$).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.



Εικόνα 5.28: Φάσμα HRMS πλήρους σάρωσης (Full Scan) astragalin (1)

Με βάση την φασματοσκοπία NMR (COSY, HSQC-DEPT και HMBC) (Παράρτημα) προσδιορίστηκε η δομή του astragalin.

Ταυτοποίηση άγλυκου μέρους astragalin

Στο Φάσμα ¹HNMR του astragalin (Πίνακας 5.24) παρατηρούνται σήματα συντονισμού στην αρωματική περιοχή.

Στα δ_H 8,08 και 6,92 παρατηρούνται δύο αποθωρακισμένες, διπλές κορυφές με σταθερές σύζευξης *J*(Hz)=8,92 και ολοκλήρωση δύο ισοδύναμα, αρωματικά πρωτόνια για καθεμία, που υποδηλώνουν ένα AA BB spin σύστημα υποκατάστασης, για τα H-2'/H-6' σε δ_H 8,08 (2H, *d*, *J*=8,92 Hz) (δ_c 132,43) και για τα H-3'/H-5' σε δ_H 6,92 (2H, *d*, *J*=8,92 Hz) (δ_c 116,26) (HSQC, COSY).

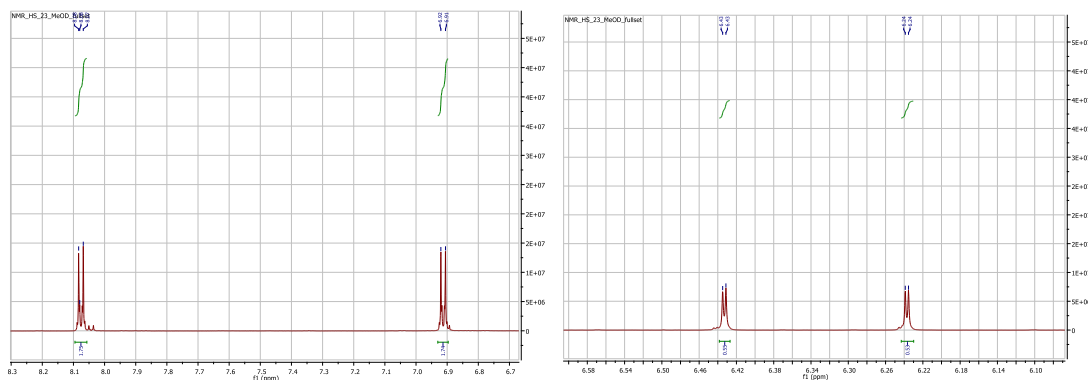
Στα δ_H 6.23 και 6.43 παρατηρούνται δύο αποθωρακισμένες, διπλές κορυφές με ασθενέστερες σταθερές σύζευξης *J*(Hz)=2,1 και ολοκλήρωση ένα αρωματικό πρωτόνιο για καθεμία, που υποδηλώνουν ένα AB spin σύστημα υποκατάστασης με τους δύο πυρήνες πρωτονίων σε meta θέση για τα H-8 σε δ_H 6.43 (1H, *d*, *J*=2,1 Hz) (δ_c 94,95) και H-6 σε δ_H 6,23 (1H, *d*, *J*=2,1 Hz) (δ_c 100,01) (HSQC, COSY).

Από τα φάσμα HMBC καταγράφηκαν οι παρακάτω συζεύξεις (³J, ⁴J) που τεκμηρίωσαν την δομή του άγλυκου μέρους του astragalin και συγκεκριμένα των H-6 με τους C-8, C-10, C-5, C-7, του H-8 με τους C-6, C-10, C-9, C-7, των H-2', -6' με τους C-5', -3', C-6', -2', C-2, C-3, C-4', των H-3', -5' με τους C-5', -3', C-1', C-4'.

Από το φάσμα HMBC εντοπίστηκαν οι οξυγονωμένοι [-CH-(OH)-] άνθρακες 3 (δ_c 159,32), 5 (δ_c 163,27), 7 (δ_c 166,19), 4' (δ_c 161,75). Επιπρόσθετα, στο φάσμα HSQC εμφανίζεται ένας οξυγονωμένος άνθρακας σε δ_c 179,73, ο οποίος αντιστοιχεί στον άνθρακα C-4 του πυρανικού δακτυλίου. Από τα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

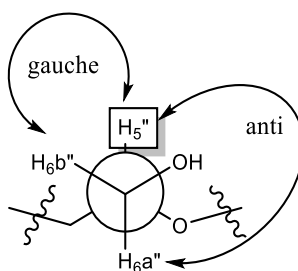
προηγούμενα φασματοσκοπικά δεδομένα το άγλυκο μέρος του astragalin ταυτοποιήθηκε ως η kaempferol.



Εικόνα 5.29: Φάσμα ^1H -NMR του άγλυκου μέρους του astragalin (1) σε CD_3OD (αρωματική περιοχή)

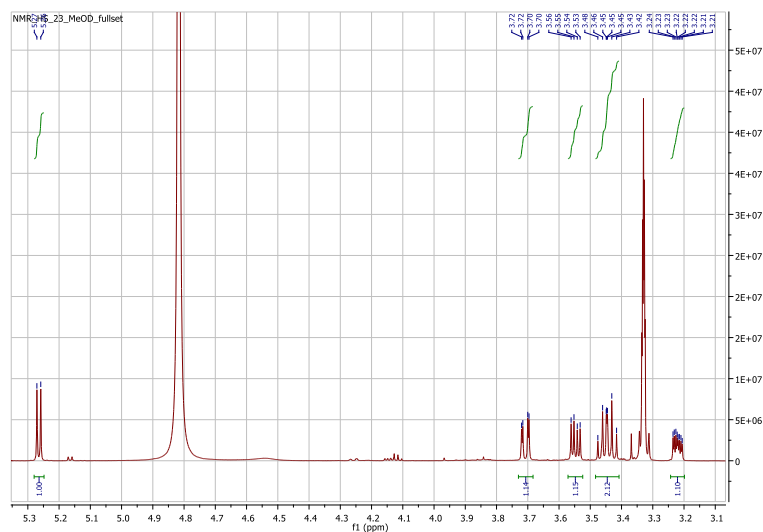
Ταυτοποίηση σακχάρου astragalin

Στα δ_{H} 5.27 παρατηρείται μια διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης $J(\text{Hz}) = 7,45$ και ολοκλήρωση 1, που αντιστοιχεί σε ανωμερικό πρωτόνιο σακχάρου $\text{H}-1''$, δ_{H} 5,27 (1H, *d*, $J=7,45$ Hz) (δ_{C} 104,29) καθώς και οι πολλαπλές κορυφές που αντιστοιχούν στους πυρήνες $\text{H}-2''$, $\text{H}-3''$ στα δ_{H} 3,47 (2H, *m*) (δ_{C} 76,02, 78,34), $\text{H}-4''$ στα δ_{H} 3,33 (1H, *m*) (δ_{C} 78,31), $\text{H}-5''$ στα δ_{H} 3,23 (1H, *m*) (δ_{C} 78,66). Επιπρόσθετα, εμφανίζονται δύο διπλή της διπλής κορυφές, που αντιστοιχούν στο πρωτόνιο $\text{H}-6\text{a}''$ στα δ_{H} 3,56 (1H, *dd*, $J=11,89\text{Hz}$, $5,51\text{Hz}$) (δ_{C} 62,83) σε διαμόρφωση -CH-(geminal) *anti* to $\text{H}5''$ και στο πρωτόνιο $\text{H}-6\text{b}''$ στα δ_{H} 3,72 (1H, *dd*, $J=11,89\text{Hz}$, $2,38\text{Hz}$) (δ_{C} 62,83) σε διαμόρφωση -CH-(geminal) *gauche* to $\text{H}5''$.



Εικόνα 5.30: Προβολή Newman των πρωτονίων $\text{H}-6\text{a}''$, $\text{H}-6\text{b}''$ ως προς τον πρωτόνιο $\text{H}-5$ του σακχάρου του kaempferol-3-*O*-glucoside (astragalin)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.



Εικόνα 5.31: Φάσμα ^1H -NMR του *astragalin* (1) σε CD_3OD (περιοχή ανωμερικών πρωτονίων και πρωτονίων σακχάρων)

Από τα προηγούμενα φασματοσκοπικά δεδομένα το σάκχαρο του *astragalin* ταυτοποιήθηκε ως η β -D-glucose. Η δομή του *astragalin* επιβεβαιώθηκε από τη σύγκριση των πειραματικών τιμών με τα βιβλιογραφικά δεδομένα (Fatemeh Ghavam-Haghi 2017). Τα φάσματα 1D, 2D παρουσιάζονται στις Εικόνες του Παραρτήματος Π5.24-Π5.27, σελ. 410-413.

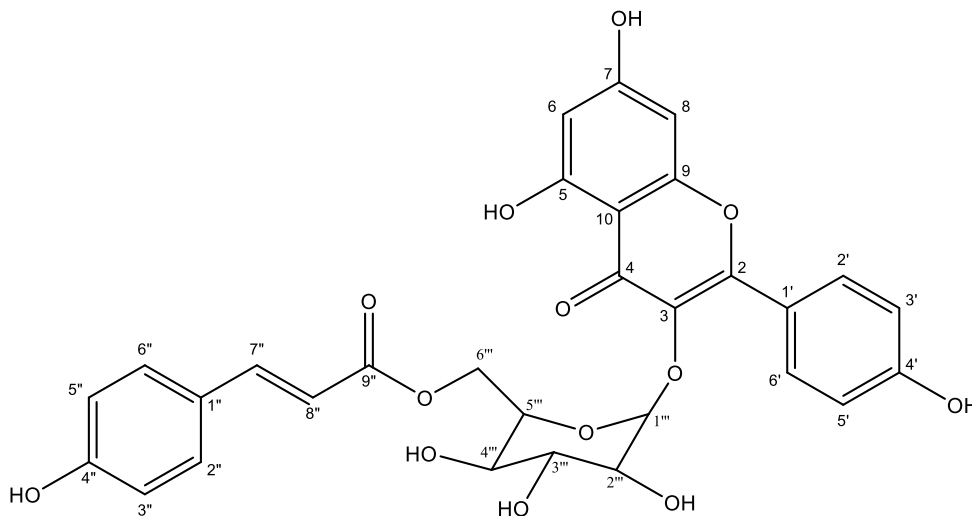
Πίνακας 5.24: Φασματοσκοπικά δεδομένα (600 MHz, CD_3OD) του *astragalin* (1)

Atom	^1H (ppm)	Mult/ty	J (Hz)	^1H Type	^1H Integration	^{13}C (ppm)	HMBC Correlations
2	-	-	-	-	-	158,76	-
3	-	-	-	-	-	159,32	-
4	-	-	-	-	-	179,73	-
5	-	-	-	-	-	163,27	-
6	6,23	d	2,1	=CH-	1	100,01	C8, C10, C5, C7
7	-	-	-	-	-	166,19	-
8	6,43	d	2,1	=CH-	1	94,95	C6, C10, C9, C7
9	-	-	-	-	-	158,72	-
10	-	-	-	-	-	104,3	-
1'	-	-	-	-	-	123,01	-
2', 6'	8,08	d	8,92	=CH-	2	132,43	C5'-3', C6'-2', C2, C3, C4'
3', 5'	6,92	d	8,92	=CH-	2	116,26	C5'-3', C1', C4'
4'	-	-	-	-	-	161,75	-
1''	5,27	d	7,45	-O-CH-O-	1	104,29	-
2'', 3''	3,47	m	-	-CH(OH)-	2	76,02, 78,34	C2'', C4'', C1''
4''	3,33	m	-	-CH(OH)-	1	78,31	-
5''	3,23	m	-	-O-CH(CH)-	1	78,66	-
6a''	3,56	dd	11,89, 5,51	-CH-(geminal) anti to H5''	1	62,83	C5''
6b''	3,72	dd	11,89, 2,38	-CH-(geminal) gauche to H5''	1	62,83	C5''

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

Ο μεταβολίτης astragalín έχει απομονωθεί και από άλλα είδη του γένους *Helichrysum* (Maryam Akaberi et al. 2019). Αποτελεί ένα σημαντικό εκπρόσωπο της κατηγορίας των γλυκοζυλιωμένων φλαβονοειδών με πολλαπλές δράσεις όπως αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη, αντικαρκινική, νευροπροστατευτική, καρδιοπροστατευτική (Ammara Riaz et al. 2018).

Μεταβολίτης 2: kaempferol-3-O-β-D-(6-O-trans-p-coumaroyl) glucopyranoside

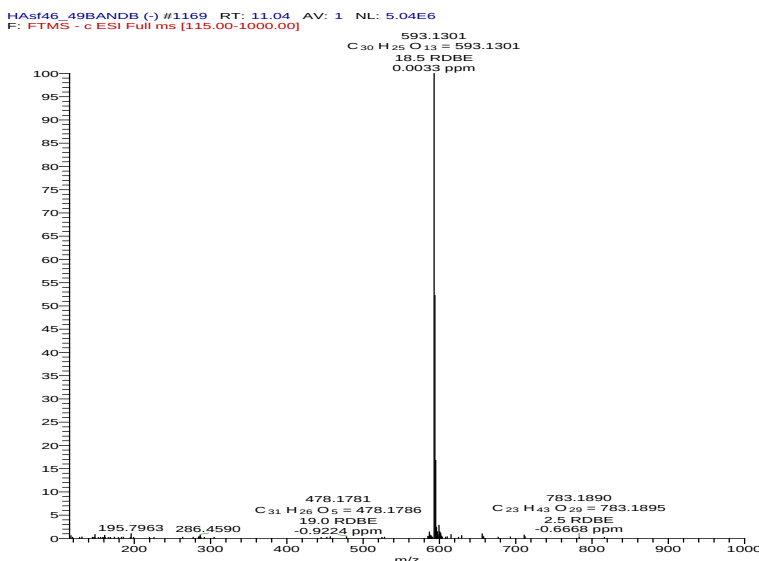


Εικόνα 5.32: Δομή kaempferol-3-O-β-D-(6-O-trans-p-coumaroyl) glucopyranoside (tiliroside)

Ο μεταβολίτης **tiliroside** απομονώθηκε από τις ταξιανθίες του *H. amorginum* (συγκομιδής 2017) και συγκεκριμένα από το MeOH, ολικό εκχύλισμα διαδοχικής εκχύλισης μετά από n-hexane και DCM εκχυλίσσεις. Η απομόνωση επιτεύχθηκε μετά από κλασματοποίηση του MeOH εκχυλίσματος με την χρωματογραφική μέθοδο FCPC, που είχε ως αποτέλεσμα την παραλαβή του ενοποιημένου κλάσματος f12-14, το οποίο υποβλήθηκε σε δεύτερη κλασμάτωση με FCPC, αποδίδοντας τον μεταβολίτη 2 στα υποκλάσματα sf46-49, ο οποίος μετά από διαχωρισμό με *prep*-TLC (band 4) απομονώθηκε ως κίτρινο στερεό (31.9mg). Κατά την χρωματογραφική ανάλυση με TLC μετά από ψεκασμό με διάλυμα θειϊκής βανιλίνης και θέρμανση ο μεταβολίτης χρωματίζεται κίτρινο-καφέ.

Το μοριακό βάρος του ουδέτερου μορίου (MB: 594.1367) προσδιορίστηκε με φασματογράφο μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (High Resolution MS-Orbitrap analyzer) με την μέθοδο του ηλεκτροψεκασμού (ESI), σε αρνητικό ιονισμό. Αντιστοιχεί στο μοριακό τύπο $C_{30}H_{26}O_{13}$ (RDBeq=18) με κύριο μοριακό ιόν $[M-H]^-$ 593,1301 ($C_{30}H_{25}O_{13}$).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.



Εικόνα 5.33: Φάσμα HRMS πλήρους σάρωσης (Full Scan) του *tiliroside*

Με βάση την φασματοσκοπία NMR (COSY, HSQC-DEPT και HMBC) (Παράρτημα Κεφ. 5) προσδιορίστηκε η δομή του *tiliroside*.

Ταυτοποίηση άγλυκου μέρους *tiliroside*

Στο Φάσμα ^1H NMR του *tiliroside* (2) (Πίνακας 5.25) παρατηρούνται σήματα συντονισμού στην αρωματική περιοχή.

Στα δ_{H} 8,01 και 6,85 παρατηρούνται δύο αποθωρακισμένες, διπλές κορυφές με σταθερές σύζευξης $J(\text{Hz})=8,83$ και ολοκλήρωση δύο ισοδύναμα, αρωματικά πρωτόνια για καθεμία, που υποδηλώνουν ένα AA BB spin σύστημα υποκατάστασης, για τα H-2'/H-6' σε δ_{H} 8,01 (2H, d , $J=8,83\text{Hz}$) (δ_{C} 130,74) και για τα H-3'/H-5' σε δ_{H} 6,85 (2H, d , $J=8,83\text{Hz}$) (δ_{C} 114,75) (HSQC, COSY). Στα δ_{H} 6,32 και 6,15 παρατηρούνται δύο αποθωρακισμένες, διπλές κορυφές με ασθενέστερες σταθερές σύζευξης $J(\text{Hz})=2,1$ και ολοκλήρωση ένα αρωματικό πρωτόνιο για καθεμία, που υποδηλώνουν ένα AB spin σύστημα υποκατάστασης με τους δύο πυρήνες πρωτονίων σε meta θέση για τα H-8 σε δ_{H} 6,32 (1H, d , $J=1,59\text{Hz}$) (δ_{C} 93,58) και H-6 σε δ_{H} 6,15 (1H, d , $J=1,83\text{Hz}$) (δ_{C} 98,88) (HSQC, COSY).

Από τα φάσμα HMBC καταγράφηκαν οι παρακάτω συζεύξεις (^3J , ^4J) που τεκμηρίωσαν την δομή του άγλυκου μέρους της *astragalín* και συγκεκριμένα των H-6 με τους C-8, C-10, C-5, C-7, του H-8 με τους C-6, C-10, C-9, C-7, C-4 των H-2', -6' με τους C-5', -3', C-6', -2', C-2, C-4', των H-3', -5' με τους C-5', -3', C-1', C-4'.

Από το φάσμα HMBC εντοπίστηκαν οι οξυγονωμένοι [-CH-(OH)-] άνθρακες 3 (δ_{C} 133,82), 5 (δ_{C} 162,17), 7 (δ_{C} 165,90), 4' (δ_{C} 160,17). Στο φάσμα HSQC εμφανίζεται ένας οξυγονωμένος άνθρακας σε δ_{C}

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

178,10, ο οποίος αντιστοιχεί στον άνθρακα C-4 του πυρανικού δακτυλίου. Από τα προηγούμενα φασματοσκοπικά δεδομένα το πρώτο άγλυκο μέρος ταυτοποιήθηκε ως η kaempferol.

Επιπρόσθετα, στην αρωματική περιοχή παρατηρήθηκαν στα δ_H 7,43 και δ_H 6,11 δύο αποθωρακισμένες, διπλές κορυφές με μεγάλες σταθερές σύζευξης $J(\text{Hz})=15,93$ και ολοκλήρωση ένα αρωματικό πρωτόνιο για καθεμία, που υποδηλώνουν δύο βινυλικά πρωτόνια σε *trans* διαμόρφωση για τα H-8'' σε δ_H 7,43 (1H, *d*, $J=15,93\text{Hz}$) (δ_C 145,15) και H-7'' σε δ_H 6,11 (1H, *d*, $J=15,93\text{Hz}$) (δ_C 113,41) (HSQC, COSY).

Στα δ_H 7,34 και 6,83 παρατηρούνται δύο αποθωρακισμένες, διπλές κορυφές με σταθερές σύζευξης $J(\text{Hz})=8,55$ και ολοκλήρωση δύο ισοδύναμα, αρωματικά πρωτόνια για καθεμία, που υποδηλώνουν ένα AA BB spin σύστημα υποκατάστασης, για τα H-2''/H-6'' σε δ_H 7,34 (2H, *d*, $J=8,55\text{Hz}$) (δ_C 129,68) και για τα H-3''/H-5'' σε δ_H 6,83 (2H, *d*, $J=8,55\text{Hz}$) (δ_C 114,92) (HSQC, COSY).

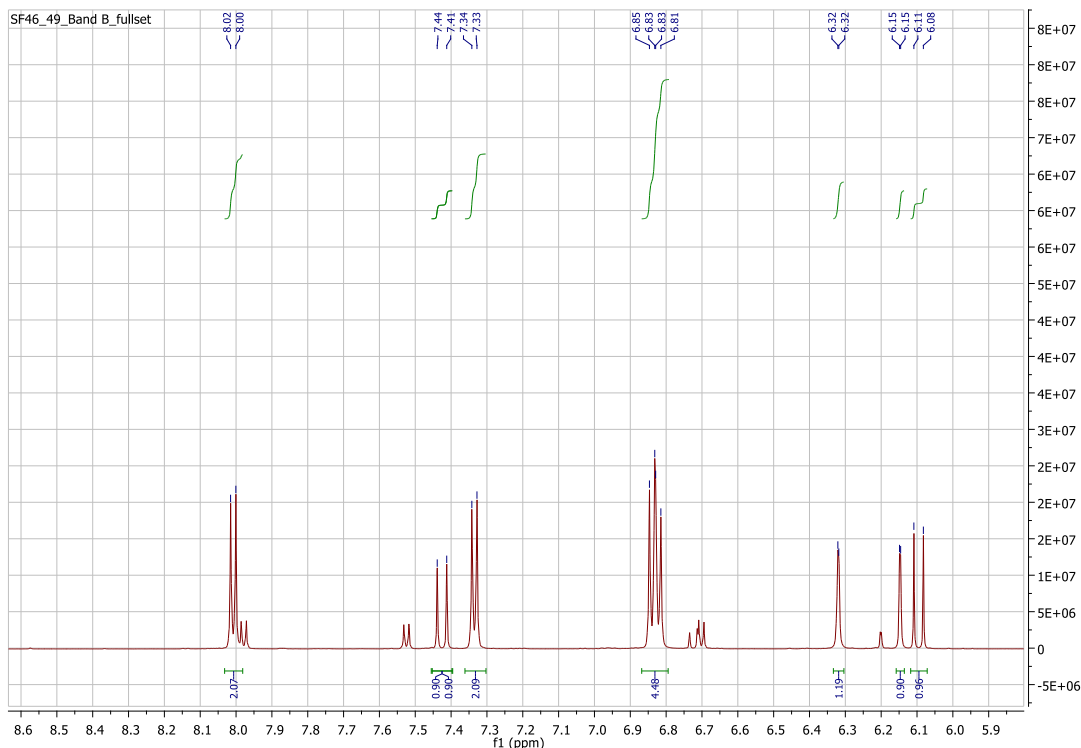
Από τα φάσμα HMBC καταγράφηκαν οι παρακάτω συζεύξεις (^3J , ^4J) των H-2'', 6'' με τους C5''/3'', C2''/6'', C8'', C4'', των H3'', 5'' με τους C5''/3'', C1'', C4''.

Από το φάσμα HMBC εντοπίστηκε ο οξυγονωμένος [-CH-(OH)-] άνθρακας C-4'' (δ_C 160,17).

Στο φάσμα HSQC εμφανίζεται ένας οξυγονωμένος άνθρακας σε δ_C 167,73, ο οποίος αντιστοιχεί στον καρβονυλικό άνθρακα C-9''.

Από τα προηγούμενα φασματοσκοπικά δεδομένα το δεύτερο άγλυκο μέρος ταυτοποιήθηκε ως το *p*-coumaric acid.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.



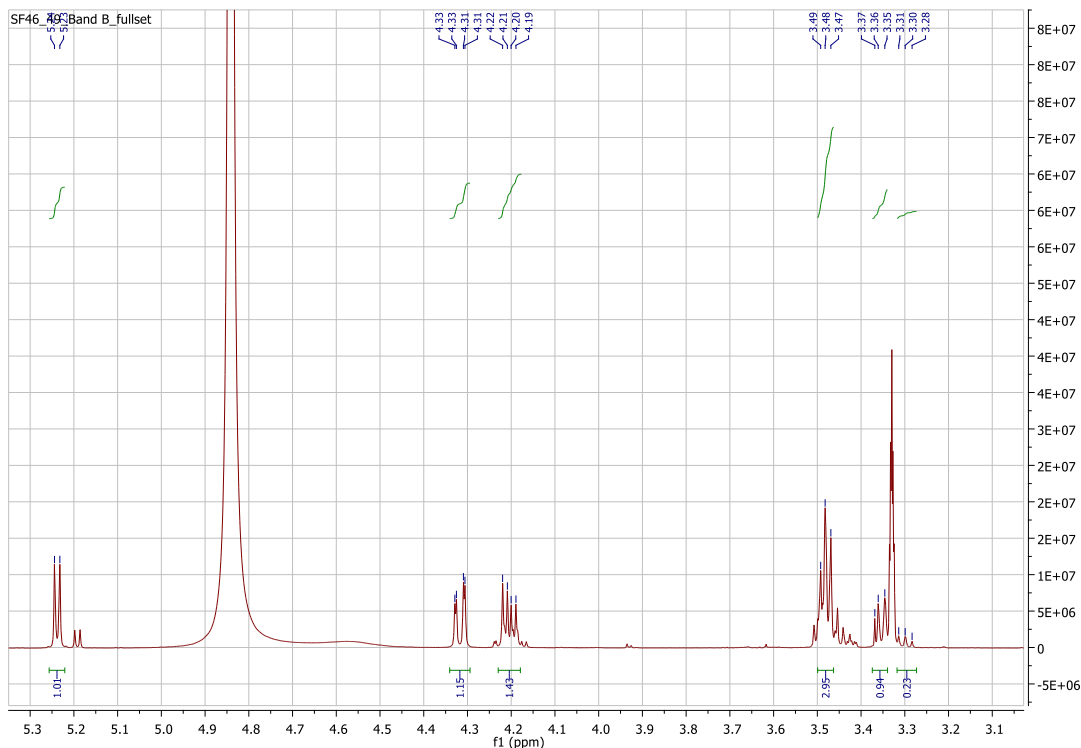
Εικόνα 5.34:Φάσμα ¹H-NMR του άγλυκου μέρους του *tiliroside* (2) σε CD₃OD (αρωματική περιοχή)

Ταυτοποίηση σακχάρου *tiliroside*

Στα δ_H 5,24 παρατηρείται μια διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης $J(\text{Hz})=7,39$ και ολοκλήρωση 1, που αντιστοιχεί σε ανωμερικό πρωτόνιο σακχάρου H-1''', δ_H 5.24 (1H, *d*, $J=7,39\text{Hz}$) (δ_C 102,73) καθώς και οι πολλαπλές κορυφές που αντιστοιχούν στους πυρήνες H-2''', H-3''' στα δ_H 3,49 (2H, *m*) (δ_C 74,68, 76,74), H-4''' στα δ_H 3,33 (1H, *m*) (δ_C 70,36), H-5''' στα δ_H 3,37 (1H, *m*) (δ_C 70,55). Επιπρόσθετα, εμφανίζονται δύο διπλή της διπλής κορυφές, που αντιστοιχούν στο πρωτόνιο H-6a''' στα δ_H 4,22 (1H, *dd*, $J=11,68\text{Hz}$, 6,54Hz) (δ_C 62,81) σε διαμόρφωση -CH-(geminal) *anti* to H5''' και στο πρωτόνιο H-6b''' στα δ_H 4,33 (1H, *dd*, $J=11,75\text{Hz}$, 2,12Hz) (δ_C 62,81) σε διαμόρφωση -CH-(geminal) *gauche* to H5'''.

Τα προηγούμενα φασματοσκοπικά δεδομένα παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα με αυτά του σακχάρου του *astragalin*. Κατά συνέπεια το σάκχαρο του *tiliroside* ταυτοποιήθηκε ως η β-D-glucose.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.



Εικόνα 5.35: Φάσμα ^1H -NMR του *tiliroside* (2) σε CD_3OD (περιοχή ανωμερικών πρωτονίων και πρωτονίων σακχάρων).

Η παραπάνω δομή επιβεβαιώθηκε από τη σύγκριση των πειραματικών τιμών με τα βιβλιογραφικά δεδομένα (Luhata et al. 2016). Τα φάσματα 1D, 2D παρουσιάζονται στις Εικόνες του Παραρτήματος Π5.20-Π5.23, σελ. 406-409.

Πίνακας 5.25: Φασματοσκοπικά δεδομένα (600 MHz, CD_3OD) του *tiliroside* (2)

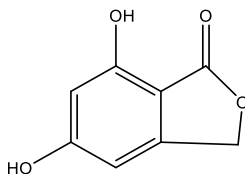
Atom	^1H (ppm)	Mult/ty	<i>J</i> (Hz)	^1H Type	^1H Integration	^{13}C (ppm)	HMBC Correlations
2	-	-	-	-	-	157,96	-
3	-	-	-	-	-	133,82	-
4	-	-	-	-	-	178,10	-
5	-	-	-	-	-	162,17	-
6	6,15	d	1,83	=CH-	1	98,88	C8, C10, C5, C7
7	-	-	-	-	-	165,90	-
8	6,32	d	1,59	=CH-	1	93,58	C6, C10, C9, C7, C4
9	-	-	-	-	-	157,29	-
10	-	-	-	-	-	104,10	-
1'	-	-	-	-	-	125,89	-
2', 6'	8,01	d	8,83	=CH-	2	130,74	C3'/5', C2'/6', C2, C4'
3', 5'	6,85	d	8,94	=CH-	2	114,75	C3'/5', C1', C4'
4'	-	-	-	-	-	160,31	-

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

1''	-	-	-	-	-	125,89	-
2'', 6''	7,34	d	8,55	=CH-	2	129,68	C5''/3'', C2''/6'', C8'', C4''
3'', 5''	6,83	d	8,67	=CH-	2	114,92	C5''/3'', C1'', C4''
4''	-	-	-	-	-	160,17	-
7''	6,11	d	15,92	=CH-	1	113,41	C1'', C9''
8''	7,43	d	15,93	=CH-	1	145,15	C7'', C1'', C6''/2'', C9''
9''	-	-	-	-	-	167,73	-
1'''	5,24	d	7,39	-O-CH-O-	1	102,73	C2''', C3
2''', 3'''	3,49	m	-	-CH(OH)-	2	74,72, 76,74	C2''', C3''', C1'''
4'''	3,33	m	-	-CH(OH)-	1	74,69	-
5'''	3,37	m	-	-O-CH(CH)-	1	70,55	-
6a'''	4,22	dd	11,68, 6,54	-CH-(geminal) anti to H5'''	1	62,81	C5''', C2''', C9''
6b'''	4,33	dd	11,75, 2,12	-CH-(geminal) gauche to H5'''	1	62,81	C5''', C9''

Το tiliroside έχει απομονωθεί και από άλλα είδη του γένους *Helichrysum* (Zenon Weglarz et al. 2022). Αποτελεί ένα σημαντικό εκπρόσωπο της κατηγορίας των σύνθετων, γλυκοζυλιωμένων φλαβονοειδών με υδροξύ κινναμικά οξέα. Χρησιμοποιείται παραδοσιακά για την διατροφική και θεραπευτική του αξία για θεραπεία πληγών, διάρροιας και εμφανίζει δράσεις όπως αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη, ηπατοπροστατευτική, αντιαλλεργική, αντιθρομβωτική, νευροπροστατευτική, οιστρογόνο, αντιδιαβητική, αντιμικροβιακή, αναστολής χολινεστεράσης, τυροσινάσης (Daniel M. Grochowski et al. 2018).

Μεταβολίτης 3: 5,7-dihydroxyphthalide



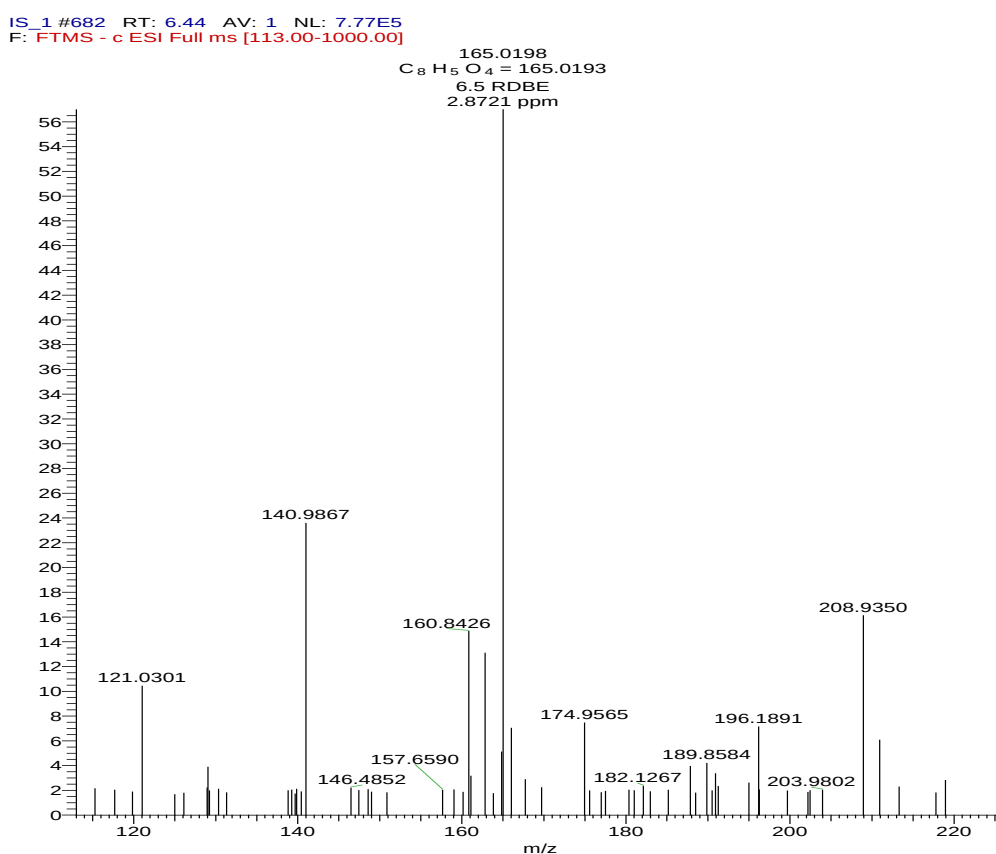
Εικόνα 5.36: Δομή 5,7-dihydroxyphthalide

Ο μεταβολίτης **5,7-dihydroxyphthalide** ταυτοποιήθηκε κυρίως με φασματομετρικά δεδομένα από το band 1 του prepTLC του υποκλάσματος sf12-15 του δεύτερου FCPC, του κλάσματος f12-14 του πρώτου FCPC από το MeOH εκχύλισμα ταξιανθιών του *H. amorginum* (συγκομιδής 2017) μετά από διαδοχικές εκχυλίσεις με n-hexane και DCM.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

Το μοριακό βάρος του ουδέτερου μορίου (MB: 166,0260) προσδιορίστηκε με φασματογράφο μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (High Resolution MS-Orbitrap analyzer) με την μέθοδο του ηλεκτροψεκασμού (ESI), σε αρνητικό ιονισμό. Αντιστοιχεί στο μοριακό τύπο $C_8H_6O_4$ (RDBeq=6) με κύριο μοριακό ιόν $[M-H]^-$ 165,0193 ($C_8H_5O_4$) και θραύσματα m/z $[M-2H]^{2-}$ 164, $[M-H-CO_2]^-$ 121, $[M-H_2O]^-$ 147.

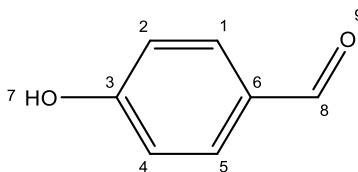
Το 5,7-dihydroxyphthalide έχει απομονωθεί και από άλλα είδη του γένους *Helichrysum* (Bojan Vujic et al. 2020). Αποτελεί έναν εκπρόσωπο της κατηγορίας των υποκατεστημένων φθαλιδίων έχει μελετηθεί σε εκχυλίσματα υπέργειου μέρους του *Rumex maritimus* L., όπου βρέθηκε να επιδεικνύει φυτοτοξική δράση (M. S. Islama et al. 2018).



Εικόνα 5.37: Φάσμα HRMS πλήρους σάρωσης (Full Scan) του 5,7-dihydroxyphthalide (3)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

Μεταβολίτης 4: 4-hydroxybenzaldehyde



Εικόνα 5.38: Δομή 4-hydroxybenzaldehyde

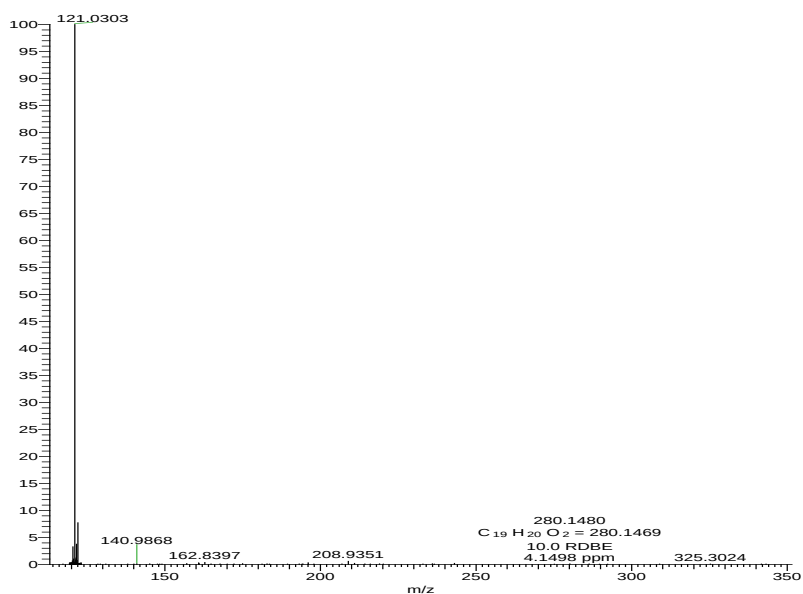
Ο μεταβολίτης **4-hydroxybenzaldehyde** ταυτοποιήθηκε με φασματοσκοπικά (^1H NMR) και φασματομετρικά δεδομένα και απομονώθηκε από το ολικό MeOH εκχύλισμα (συνεχόμενης στερεής-υγρής εκχύλισης) ταξιανθιών του *H. amorginum* (2017) μετά από διαδοχικές εκχυλίσεις με n-hexane και DCM, το οποίο κλασματοποιήθηκε με 1° FCPC, από το οποίο επιλέχθηκε το συνενωμένο κλάσμα f12-14, το οποίο κλασματοποιήθηκε με 2° FCPC, από το οποίο επιλέχθηκε το συνενωμένο κλάσμα sf12-15, το οποίο κλασματοποιήθηκε με prepTLC αποδίδοντας στο band 2 τον μεταβολίτη 4.

Το μοριακό βάρος του ουδέτερου μορίου (MB: 122,0362) προσδιορίστηκε με φασματογράφο μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (High Resolution MS-Orbitrap analyzer) με την μέθοδο του ηλεκτροψεκασμού (ESI), σε αρνητικό ιονισμό. Αντιστοιχεί στο μοριακό τύπο $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2$ με κύριο μοριακό ιόν $[\text{M-H}]^-$ 121,0302 ($\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_2$).

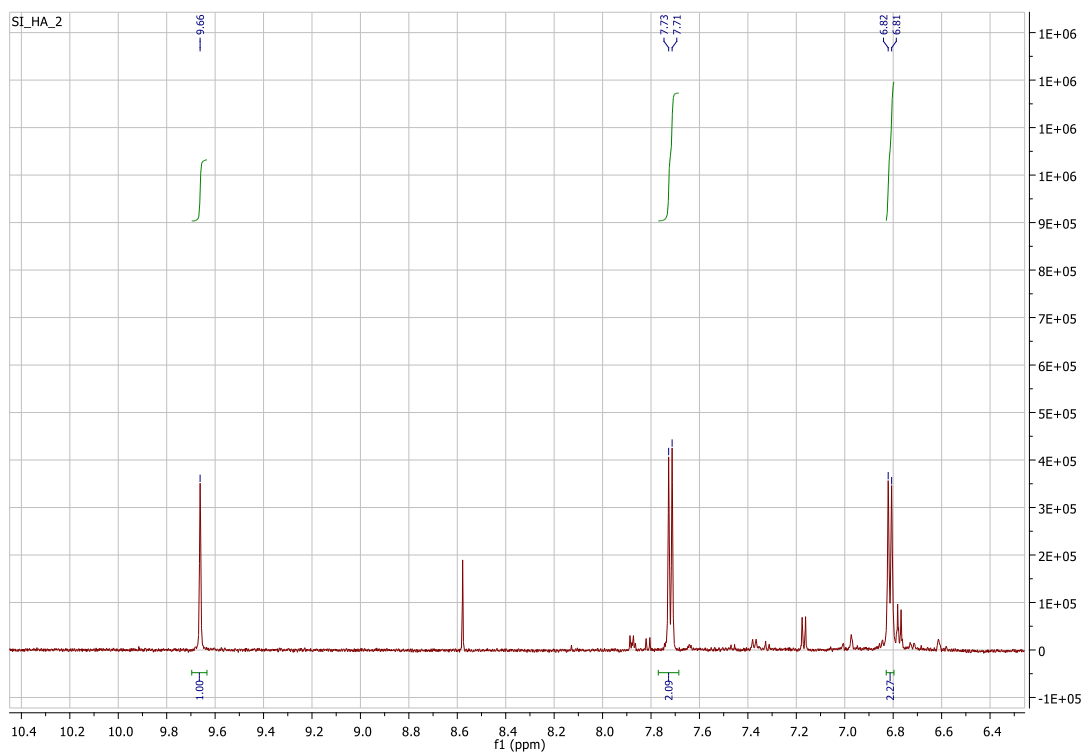
Στο φάσμα ^1H NMR του (4) (Πίνακας 5.26) παρατηρούνται σήματα συντονισμού στην αρωματική περιοχή. Στα δ_{H} 7,73 και 6,82 παρατηρούνται δύο αποθωρακισμένες, διπλές κορυφές με σταθερές σύζευξης $J(\text{Hz})=8,5$ και ολοκλήρωση δύο ισοδύναμα, αρωματικά πρωτόνια για καθεμία, που υποδηλώνουν ένα AA BB spin σύστημα υποκατάστασης, για τα H-1/H-5 σε δ_{H} 7,73 (2H, d, $J=8,5\text{Hz}$) και για τα H-2/H-4 σε δ_{H} 6,82 (2H, d, $J=8,5\text{Hz}$). Επιπρόσθετα, στα δ_{H} 9,66 παρατηρήθηκε μια αποθωρακισμένη, απλή κορυφή πρωτονίου αλδεϋδομάδας δ_{H} 9,66 (1H, s). Το φάσμα 1D παρουσιάζεται στην Εικόνα του Παραρτήματος Π5.19, σελ. 405.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

IS_2 #727 RT: 6.88 AV: 1 NL: 1.54E7
F: FTMS - c ESI Full ms [113.00-1000.00]



Εικόνα 5.39: Φάσμα HRMS πλήρους σάρωσης (Full Scan) του 4-hydroxybenzaldehyde (4)



Εικόνα 5.40: Φάσμα ^1H -NMR του 4-hydroxybenzaldehyde (4) σε CD_3OD (περιοχή αρωματικών και αλδεϋδικών πρωτονίων)

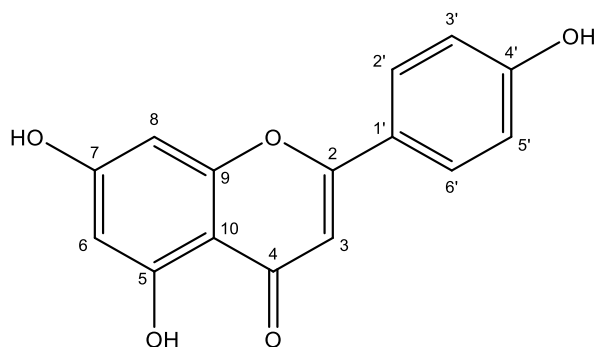
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

Πίνακας 5.26: Φασματοσκοπικά δεδομένα (600 MHz, MeOD) του 4-hydroxybenzaldehyde (4)

Atom	¹ H (ppm)	Mult/ty	J (Hz)	¹ H Type	¹ H Integration
1-5	7,73	d	8,50	=C-H	2
2-4	6,82	d	8,50	=C-H	2
8	9,66	s	-	-C(=O)-H	1

Το 4-hydroxybenzaldehyde αποτελεί την ανηγμένη μορφή του 4-hydroxy benzoic acid το οποίο έχει απομονωθεί και από άλλα είδη του γένους *Helichrysum* (Pljevljaković et al. 2018). Το **(4)** αποτελεί έναν εκπρόσωπο της κατηγορίας υποκατεστημένων αρωματικών αλδευδών και εμφανίζει δράσεις όπως αντιφλεγμονώδη, αντι-αγγειογόνο, αντι-αλγαισθησίας (Lim et al. 2008).

Μεταβολίτης 5: Apigenin



Εικόνα 5.41: Δομή Apigenin

Ο μεταβολίτης **apigenin** ταυτοποιήθηκε με φασματοσκοπικά (¹H NMR) και φασματομετρικά δεδομένα και απομονώθηκε από το ολικό MeOH εκχύλισμα (συνεχόμενης στερεής-υγρής εκχύλισης) ταξιανθιών του *H. amorginum* (2017) μετά από διαδοχικές εκχυλίσσεις με n-hexane και DCM, το οποίο κλασματοποιήθηκε με 1° FCPC, από το οποίο επιλέχθηκε το συνενωμένο κλάσμα f12-14, το οποίο κλασματοποιήθηκε με 2° FCPC, από το οποίο επιλέχθηκε το συνενωμένο κλάσμα sf12-15, το οποίο κλασματοποιήθηκε με prepTLC αποδίδοντας στο band 3 (μίγμα) τον μεταβολίτη 5.

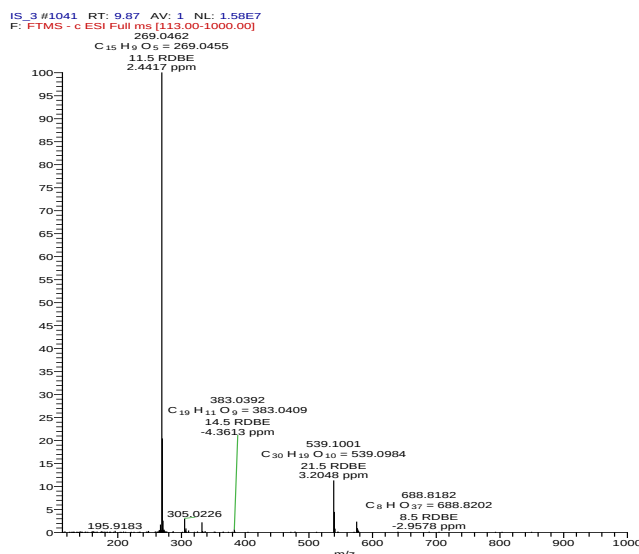
Το μοριακό βάρος του ουδέτερου μορίου (MB:270.0522) προσδιορίστηκε με φασματογράφο μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (High Resolution MS-Orbitrap analyzer) με την μέθοδο του ηλεκτροψεκασμού (ESI), σε αρνητικό ιονισμό. Αντιστοιχεί στο μοριακό τύπο C₁₅H₁₀O₅ (RDBeq=11) με κύριο μοριακό ιόν [M-H]⁻ 269,0455 (C₁₅H₉O₅) και χαρακτηριστικά θραύσματα m/z 225, 201, 151 (Brito et al. 2014).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

Στο Φάσμα ^1H NMR του arigenin (5) (Εικόνα Π5.18, σελ. 404 και Πίνακας 5.27) παρατηρούνται σήματα συντονισμού στην αρωματική περιοχή. Στα δ_{H} 7.83 και 6.92 παρατηρούνται δύο αποθωρακισμένες, διπλές κορυφές με σταθερές σύζευξης $J(\text{Hz})=8.82$ και ολοκλήρωση δύο ισοδύναμα, αρωματικά πρωτόνια για καθεμία, που υποδηλώνουν ένα AA BB spin σύστημα υποκατάστασης, για τα H-2'/H-6' σε δ_{H} 7,83 (2H, *d*, $J=8,82\text{Hz}$) και για τα H-3'/H-5' σε δ_{H} 6,92 (2H, *d*, $J=8,82\text{Hz}$). Στα δ_{H} 6,30 και 6,09 παρατηρούνται δύο αποθωρακισμένες, διπλές κορυφές με ασθενέστερες σταθερές σύζευξης $J(\text{Hz})=1,75$ και ολοκλήρωση ένα αρωματικό πρωτόνιο για καθεμία, που υποδηλώνουν ένα AB spin σύστημα υποκατάστασης με τους δύο πυρήνες πρωτονίων σε meta θέση για τα H-8 σε δ_{H} 6.30 (1H, *d*, $J=1,75\text{Hz}$) και H-6 σε δ_{H} 6,09 (1H, *d*, $J=1,75\text{Hz}$). Στα δ_{H} 6,48 παρατηρείται μια αποθωρακισμένη, απλή κορυφή με ολοκλήρωση ένα αρωματικό πρωτόνιο που αντιστοιχεί στο H-3 δ_{H} 6,48 (1H, *s*).

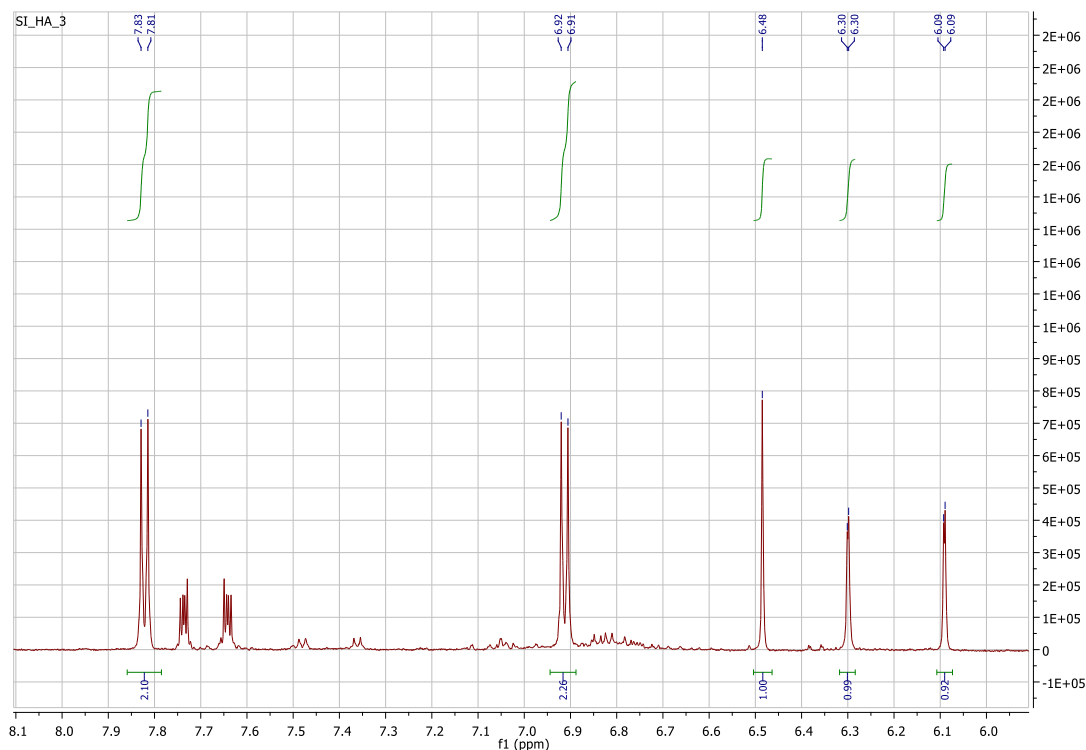
Πίνακας 5.27: Φασματοσκοπικά δεδομένα (600 MHz, MeOD) του arigenin (5)

Atom	^1H (ppm)	Mult/ty	J (Hz)	^1H Type	^1H Integration
3	6,48	s	-	=CH-	1
6	6,09	d	1,75	=CH-	1
8	6,30	d	1,75	=CH-	1
2', 6'	7,83	d	8,82	=CH-	2
3', 5'	6,92	d	8,82	=CH-	2



Εικόνα 5.42: Φάσμα HRMS πλήρους σάρωσης (Full Scan) του arigenin (5)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

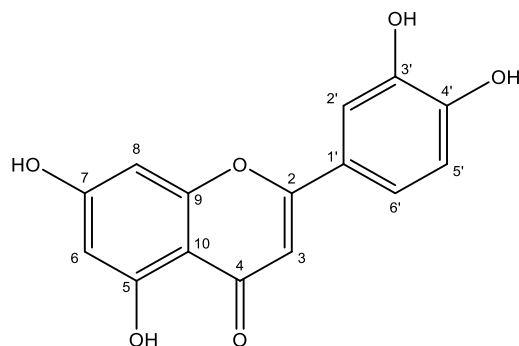


Εικόνα 5.43: Φάσμα ¹H-NMR του arigenin (5) σε CD₃OD (περιοχή αρωματικών)

Ο μεταβολίτης arigenin έχει απομονωθεί και από άλλα είδη του γένους *Helichrysum* (Maryam Akaberi et al. 2019). Αποτελεί ένα σημαντικό εκπρόσωπο της κατηγορίας των φλαβονοειδών με δράσεις όπως αντιοξειδωτική, αντικαρκινική, αντιδιαβητική και θετικές επιδράσεις σε ασθένειες του ΚΝΣ όπως νόσος Alzheimer, αϋπνία, αμνησία (Bahare Salehi et al. 2019).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

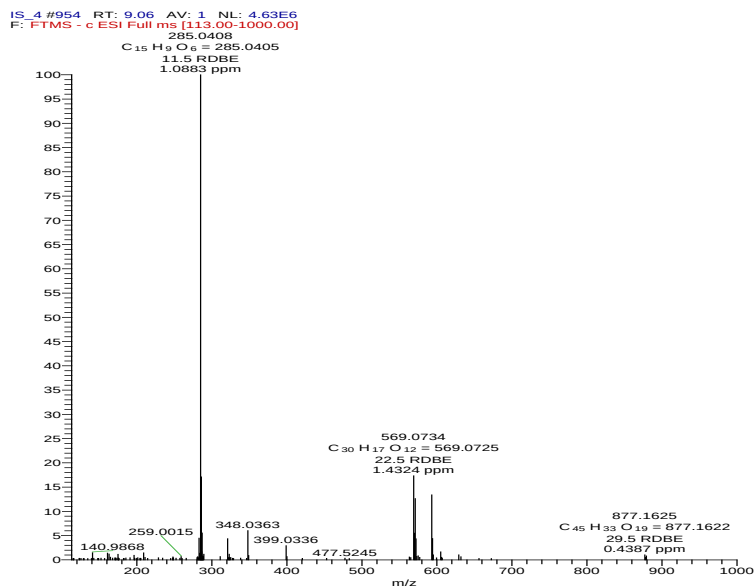
Μεταβολίτης 6: Luteolin



Εικόνα 5.44: Δομή Luteolin

Ο μεταβολίτης **luteolin** ταυτοποιήθηκε κυρίως με φασματομετρικά δεδομένα από το band 4 του prepTLC του υποκλάσματος sf12-15 του δεύτερου FCPC, του κλάσματος f12-14 του πρώτου FCPC από το MeOH εκχύλισμα ταξιανθιών του *H. amorginum* (συγκομιδής 2017) μετά από διαδοχικές εκχυλίσεις με n-hexane και DCM.

Το μοριακό βάρος του ουδέτερου μορίου (MB: 286.0471) προσδιορίστηκε με φασματογράφο μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (High Resolution MS-Orbitrap analyzer) με την μέθοδο του ηλεκτροψεκασμού (ESI), σε αρνητικό ιονισμό. Αντιστοιχεί στο μοριακό τύπο $C_{15}H_{10}O_6$ (RDBeq=11) με κύριο μοριακό ιόν $[M-H]^-$ 285,0405 ($C_{15}H_9O_6$) και χαρακτηριστικά θραύσματα m/z 243, 241, 151, 133 (Lech et al. 2014).

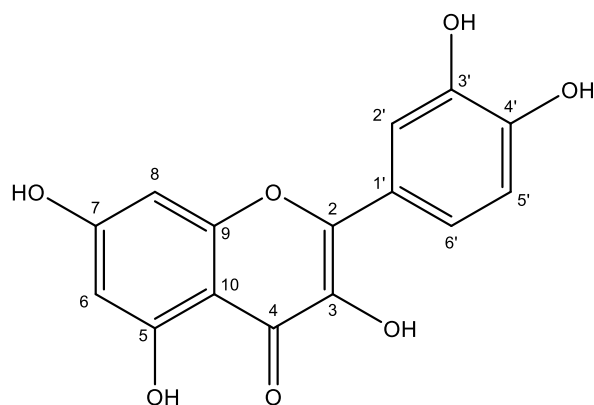


Εικόνα 5.45: Φάσμα HRMS πλήρους σάρωσης (Full Scan) του luteolin (6)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

Ο μεταβολίτης luteolin έχει απομονωθεί και από άλλα είδη του γένους *Helichrysum* (Akaberi et al. 2019). Αποτελεί ένα σημαντικό εκπρόσωπο της κατηγορίας των флаβονοειδών με δράσεις όπως αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη, αντιμικροβιακή, αντικαρκινική, αντιαλλεργική (López-lázaro 2009).

Μεταβολίτης 7: Quercetin

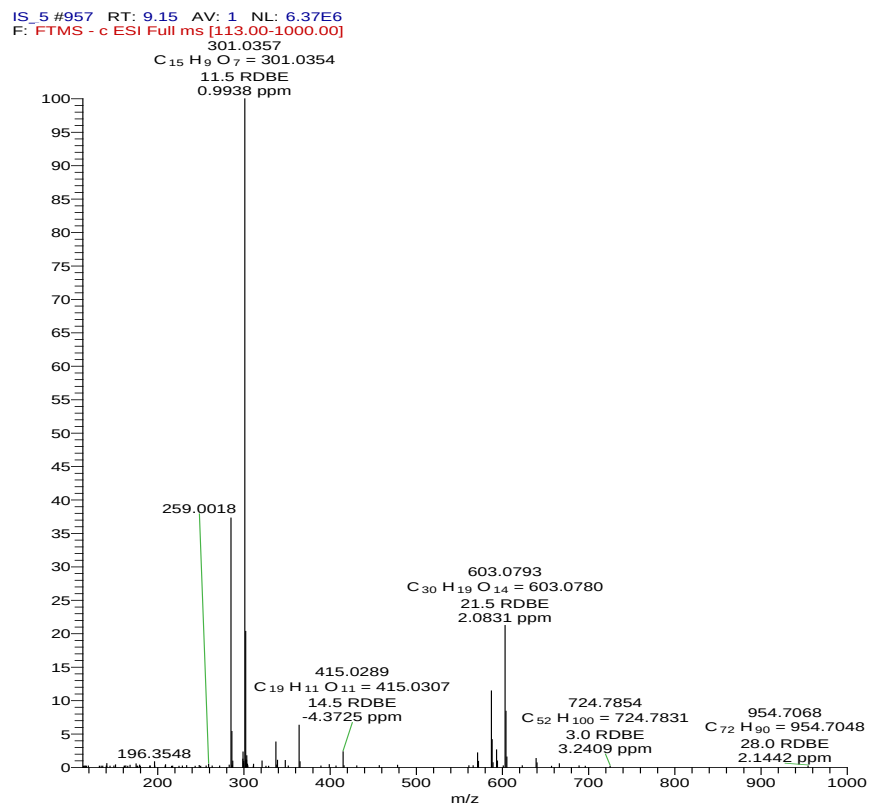


Εικόνα 5.46: Δομή Quercetin

Ο μεταβολίτης **quercetin** ταυτοποιήθηκε κυρίως με φασματομετρικά δεδομένα από το band 5 του prepTLC του υποκλάσματος sf12-15 του δεύτερου FCPC, του κλάσματος f12-14 του πρώτου FCPC από το MeOH εκχύλισμα ταξιανθιών του *H. amorginum* (συγκομιδής 2017) μετά από διαδοχικές εκχυλίσεις με n-hexane και DCM.

Το μοριακό βάρος του ουδέτερου μορίου (MB: 302,0421) προσδιορίστηκε με φασματογράφο μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (High Resolution MS-Orbitrap analyzer) με την μέθοδο του ηλεκτροψεκασμού (ESI), σε αρνητικό ιονισμό. Αντιστοιχεί στο μοριακό τύπο $C_{15}H_{10}O_7$ (RDBeq=11) με κύριο μοριακό ιόν $[M-H]^-$ 301,0354 ($C_{15}H_9O_7$) και χαρακτηριστικά θραύσματα m/z 179, 151 (Brito et al. 2014).

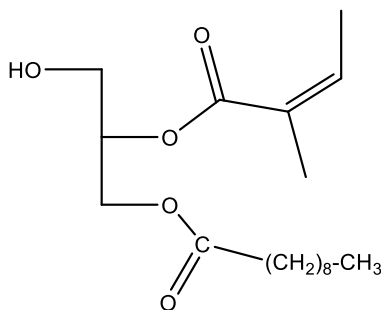
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.



Εικόνα 5.47: Φάσμα HRMS πλήρους σάρωσης (Full Scan) του quercetin (7).

Ο μεταβολίτης quercetin έχει απομονωθεί και από άλλα είδη του γένους *Helichrysum* (Maryam Akaberi et al. 2019). Αποτελεί ένα σημαντικό εκπρόσωπο της κατηγορίας των φλαβονοειδών με δράσεις όπως αντιφλεγμονώδη, αντιυπερτασική, αντιυπερχοληστερολαιμική, αντιαθηρωματική (Alexander Victor Anand David et al. 2016).

Μεταβολίτης 8: (S,Z)-3-hydroxy-2-[(2-methylbut-2-enoyl)oxy]propyl decanoate

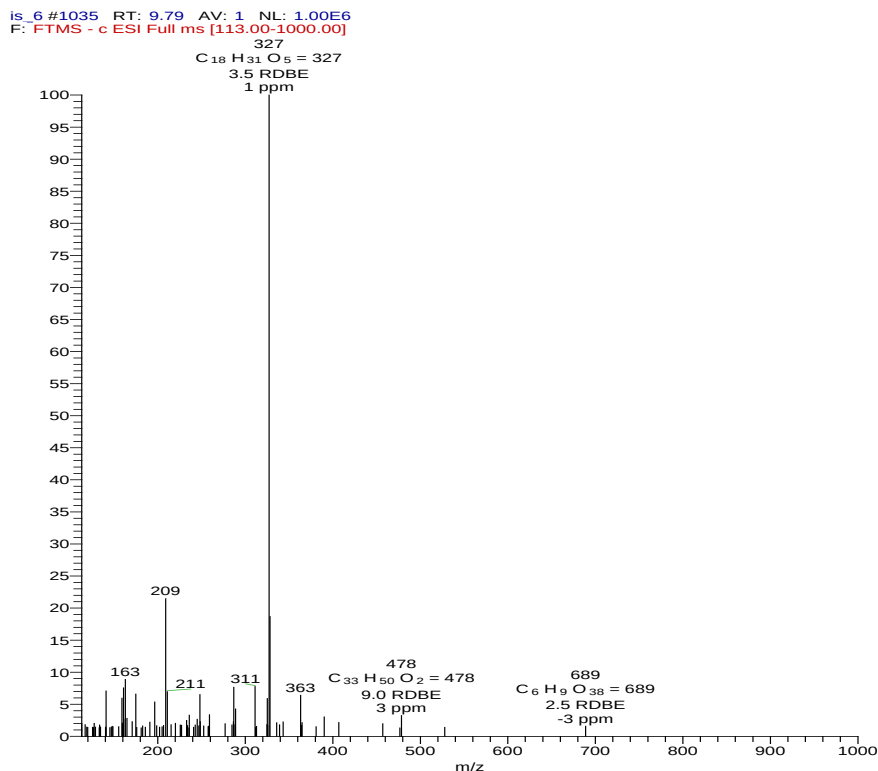


Εικόνα 5.48: Δομή (S,Z)-3-hydroxy-2-[(2-methylbut-2-enoyl)oxy]propyl decanoate

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

Ο μεταβολίτης **(S,Z)-3-hydroxy-2-[(2-methylbut-2-enoyl)oxy]propyl decanoate** ταυτοποιήθηκε κυρίως με φασματομετρικά δεδομένα από το band 6 του prepTLC του υποκλάσματος sf12-15 του δεύτερου FCPC, του κλάσματος f12-14 του πρώτου FCPC από το MeOH εκχύλισμα ταξιανθιών του *H. amorginum* (συγκομιδής 2017) μετά από διαδοχικές εκχυλίσσεις με n-hexane και DCM.

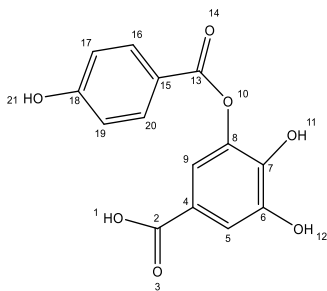
Το μοριακό βάρος του ουδέτερου μορίου (MB: 328,2244) προσδιορίστηκε με φασματογράφο μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (High Resolution MS-Orbitrap analyzer) με την μέθοδο του ηλεκτροψεκασμού (ESI), σε αρνητικό ιονισμό. Αντιστοιχεί στο μοριακό τύπο $C_{18}H_{32}O_5$ (RDBeq= 3) με κύριο μοριακό ιόν $[M-H]^-$ 327,2177 ($C_{18}H_{31}O_5$) και χαρακτηριστικά θραύσματα m/z $[M-H_2O]^-$ 309 που αντιστοιχεί στην μοριακή φόρμουλα $C_{18}H_{29}O_4$, $[M-OAng]^+$ 229 που αντιστοιχεί στην μοριακή φόρμουλα $C_{13}H_{25}O_3$.



Εικόνα 5.49: Φάσμα HRMS πλήρους σάρωσης (Full Scan) του (S,Z)-3-hydroxy-2-[(2-methylbut-2-enoyl)oxy]propyl decanoate (8)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

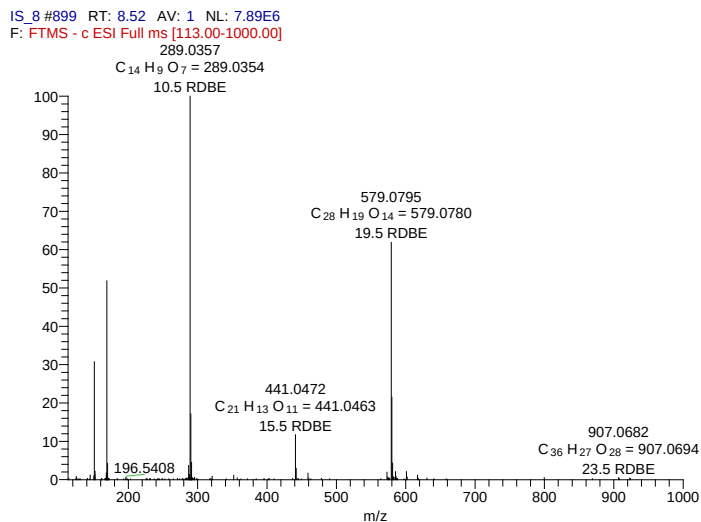
Μεταβολίτης 9: 3,4-dihydroxy-5-[(4-hydroxybenzoyl)oxy]benzoic acid



Εικόνα 5.50: Δομή 3,4-dihydroxy-5-[(4-hydroxybenzoyl)oxy]benzoic acid

Ο μεταβολίτης **3,4-dihydroxy-5-[(4-hydroxybenzoyl)oxy]benzoic acid** ταυτοποιήθηκε κυρίως με φασματομετρικά δεδομένα από το band 8 του prepTLC του υποκλάσματος sf12-15 του δεύτερου FCPC, του κλάσματος f12-14 του πρώτου FCPC από το MeOH εκχύλισμα ταξιανθιών του *H. amorginum* (συγκομιδής 2017) μετά από διαδοχικές εκχυλίσεις με n-hexane και DCM.

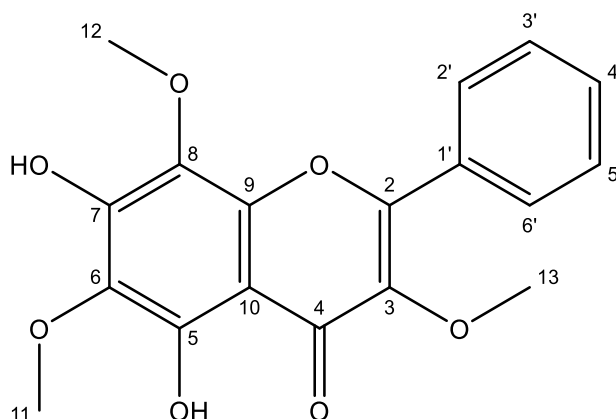
Το μοριακό βάρος του ουδέτερου μορίου (MB: 290,0421) προσδιορίστηκε με φασματογράφο μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (High Resolution MS-Orbitrap analyzer) με την μέθοδο του ηλεκτροψεκασμού (ESI), σε αρνητικό ιονισμό. Αντιστοιχεί στο μοριακό τύπο $C_{14}H_{10}O_7$ (RDBeq= 10) με κύριο μοριακό ιόν $[M-H]^-$ 289,0354 ($C_{14}H_9O_7$) και χαρακτηριστικά θραύσματα m/z $[M-p\text{-hydroxybenzoic acid}]^-$ 169 που αντιστοιχεί στην μοριακή φόρμουλα $C_7H_5O_5$. Επίσης, παρατηρήθηκε το διμερές $[2M-H]^-$ με m/z 579, που αντιστοιχεί στην μοριακή φόρμουλα $C_{28}H_{19}O_{14}$.



Εικόνα 5.51: Φάσμα HRMS πλήρους σάρωσης (Full Scan) του 3,4-dihydroxy-5-[(4-hydroxybenzoyl)oxy]benzoic acid

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

Μεταβολίτης 10: 5,7-dihydroxy-3,6,8-trimethoxyflavone



Εικόνα 5.52: Δομή 5,7-dihydroxy-3,6,8-trimethoxyflavone

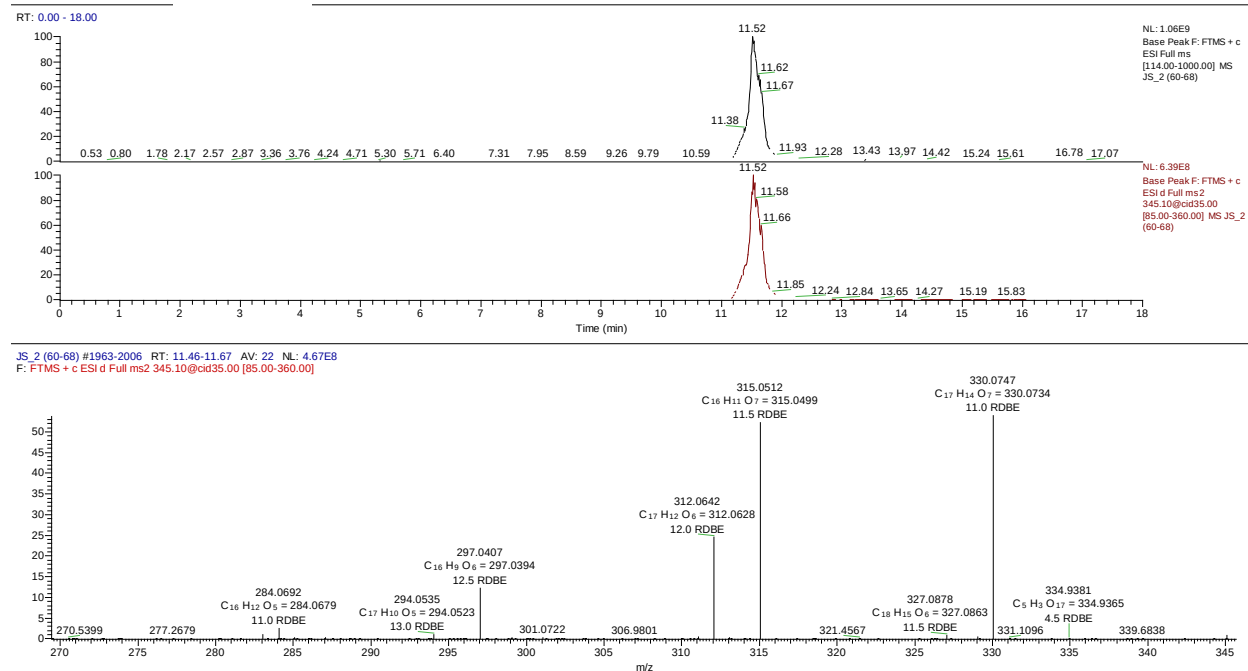
Ο μεταβολίτης **5,7-dihydroxy-3,6,8-trimethoxyflavone** ταυτοποιήθηκε με φασματομετρικά και φασματοσκοπικά δεδομένα και απομονώθηκε από το ολικό DCM εκχύλισμα (μη συνεχόμενης στερεής-υγρής εκχύλισης) ταξιανθιών του *H. amorginum* (2020) και συγκεκριμένα μετά από υγρή-υγρή κατανομή του ολικού DCM εκχυλίσματος από το ξηρό εκχύλισμα της κάτω φάσης, το οποίο κλασματοποιήθηκε με 1^ο FCPC, από το οποίο επιλέχθηκε το συνενωμένο κλάσμα fr11-12, το οποίο κλασματοποιήθηκε με 2^ο FCPC, από το οποίο επιλέχθηκε το συνενωμένο κλάσμα fr60-68, το οποίο απέδωσε 59.6mg του μεταβολίτη ως κίτρινο στερεό.

Το μοριακό βάρος του ουδέτερου μορίου (MB: 344,0890) προσδιορίστηκε με φασματογράφο μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (High Resolution MS-Orbitrap analyzer) με την μέθοδο του ηλεκτροψεκασμού (ESI), σε θετικό ιονισμό. Αντιστοιχεί στο μοριακό τύπο $C_{18}H_{16}O_7$ (RDBeq=11), χρόνο έκλουσης $R_t=11.52\text{min}$ με κύριο μοριακό ιόν $[M+H]^+$ 345,0966 ($C_{18}H_{17}O_7$) και χαρακτηριστικά θραύσματα 330 ($C_{17}H_{14}O_7^+$, RDB=11), 315 ($C_{16}H_{11}O_7^+$, RDB=11.5) αντιστοιχούν σε διαδοχικές απομακρύνσεις δύο μεθυλο ομάδων (m/z 15 Da), 312 και 297 ($C_{16}H_9O_6^+$, RDB=12.5) που αντιστοιχεί στην απομάκρυνση H_2O (m/z 18 Da) από το ιόν με m/z 315 όπως φαίνεται στην Εικόνα 5.53.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

C:\Users\..._US_2 (60-68)

7/27/2021 12:13:16 PM



Εικόνα 5.53: Χρωματογράφημα κύριων κορυφών, κορυφής μεταβολίτη 10 (Rt=11.52min) και MS² προφίλ θραυσματοποίησης σε θετικό ιονισμό

Με βάση την φασματοσκοπία NMR (¹H, COSY, HSQC-DEPT και HMBC) (Εικόνες Π5.2-5.5, σελ. 388-391 και Πίνακας 5.28, σελ. 307) προσδιορίστηκε η δομή του μεταβολίτη 10 (ισομερές 104), ο οποίος είναι ένα *O*-μεθυλιωμένο φλαβονοειδές ένα από τα 5 γνωστά με μοριακό τύπο C₁₈H₁₆O₇ που έχουν απομονωθεί από διάφορα είδη ελίχρυσων (Πίνακας 5.29, σελ. 307). Η σχετική θέση των υποκαταστατών στον δακτύλιο A προσδιορίστηκε κυρίως με φάσμα HMBC και βιβλιογραφικά δεδομένα, καθώς δεν ήταν εφικτή η λήψη φάσματος NOE.

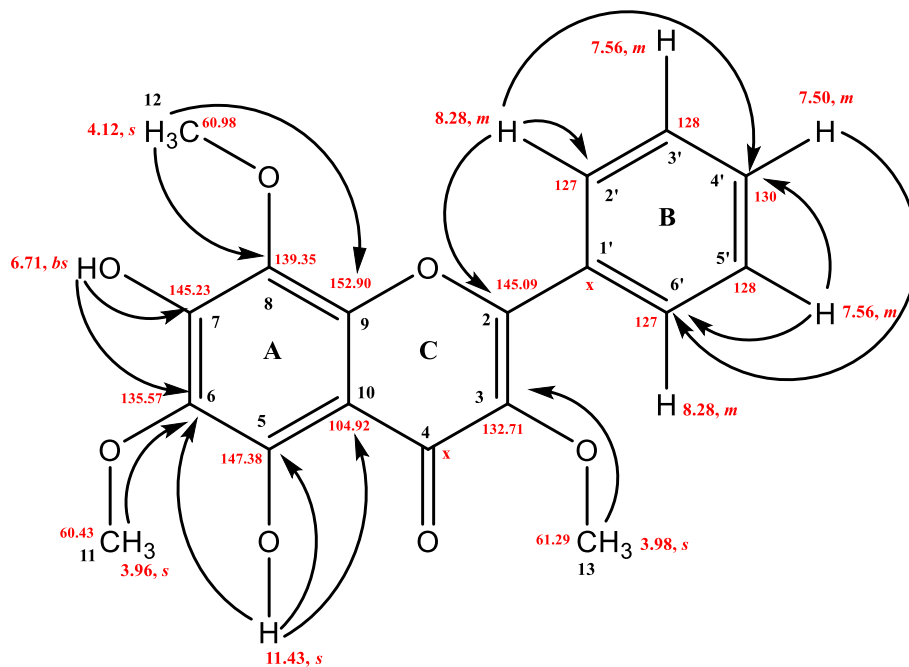
Συγκεκριμένα, εντοπίστηκαν πέντε αρωματικοί πυρήνες H που αντιστοιχούν στις θέσεις 2'/6', 3'/5', 4' ενός μονοϋποκατεστημένου βενζολικού δακτυλίου οι οποίοι δίνουν συσχετισμούς με τους αρωματικούς άνθρακες του δακτυλίου (Εικόνα 5.54) γεγονός που αποκλείει τις δομές 103, 100 του Πίνακα 5.29, όπου περιέχονται ομάδες βενζυλικές -OH ομάδες.

Στο ισομερές 104 (μεταβολίτης 10) η θέση της υδροξυ ομάδας στην θέση 5 επιβεβαιώθηκε από την μοναδική, οξεία, απλή κορυφή δ_H 11,43 που αποδεικνύει ενδομοριακό δεσμό υδρογόνου με την καρβονυλο ομάδα του δακτυλίου χρωμόνης (A-C fused ring). Η θέση της μεθοξυ ομάδας στον C-6 και της -OH ομάδας στη θέση 7 επιβεβαιώθηκε από ασθενή σήματα συσχετισμού στο φάσμα HMBC μεταξύ των πυρήνων δ_H 3,96 και δ_H 6,71 με τον C-6 (δ_C 135,57). Τέλος, η θέση της μεθοξυ ομάδας στον C-8 επιβεβαιώθηκε από ασθενή σήματα συσχετισμού στο φάσμα HMBC μεταξύ των πυρήνων δ_H 4,12 με τους C-8 και C-9.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

Η δομή του ισομερούς 102 αποκλείστηκε διότι ο πυρήνας H της υδροξυ ομάδας στην θέση 3 θα έπρεπε να εντοπίζεται σε $\delta_H > 9$, ενώ στο φάσμα του μεταβολίτη 10 εντοπίζεται μόνο μία οξεία, απλή κορυφή στα 11,43ppm (πυρήνας H ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου στο OH του C-5) και μία ευρεία, απλή στα 6,71ppm (θέση C-3) με ολοκλήρωση 1H η κάθε μία.

Συμπερασματικά, τα φασματοσκοπικά δεδομένα του ισομερούς 104 (μεταβολίτης 10) μοιάζουν με εκείνα του ισομερούς 101 (Percival B. Legoale 2013), όπου οι θέσεις των 2 -OH ομάδων στους C-5, C-6 και της μεθοξυ ομάδας του C-7 έχουν επιβεβαιωθεί από πείραμα NOE. Στην περίπτωση του ισομερούς 104 η σχετική θέση των υποκαταστατών στους C-5, C-6, C-7, C-8 μπορεί να επιβεβαιωθεί μόνο από ^1H NMR και HMBC συσχετισμούς δηλαδή α) θέση του -OH στον C-5 λόγω ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου (δ_H 11,43, sharp singlet), β) θέση της -OCH₃ στον C-8 με συσχετισμό H-C με τον C-9 (^4J correlation), γ) θέση της -OCH₃ στον C-6 με ισχυρό συσχετισμό H-C με τον C-6 (^3J correlation), δ) εναπομένουσα θέση -OH στον C-7 από τον ασθενή συσχετισμό H-C με τον C-6 (^3J correlation).



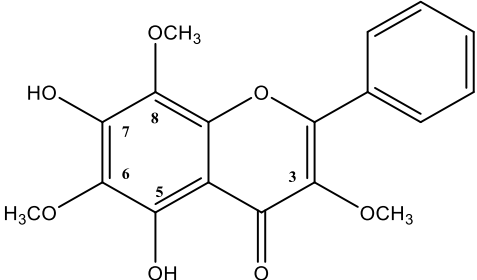
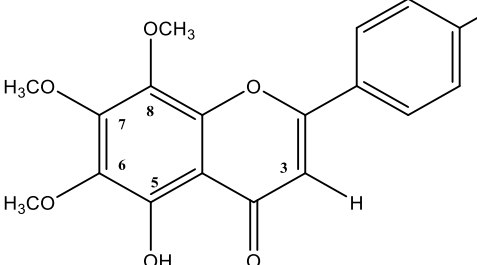
Εικόνα 5.54: Φασματοσκοπικά δεδομένα (600 MHz, CD₃OD) και HMBC συσχετισμοί πυρήνων H-C του 5,7-dihydroxy-3,6,8-trimethoxyflavone (10)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

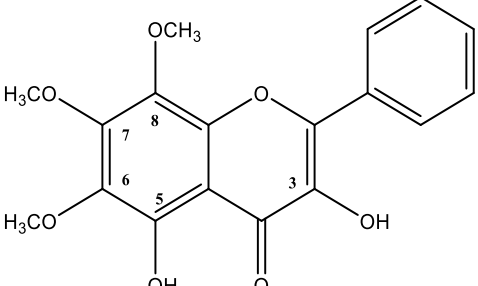
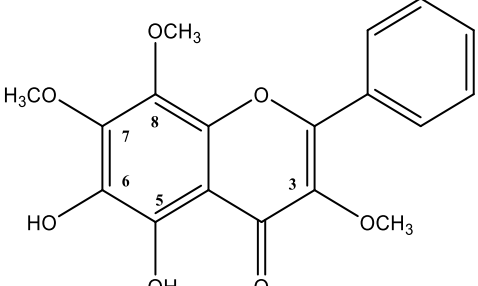
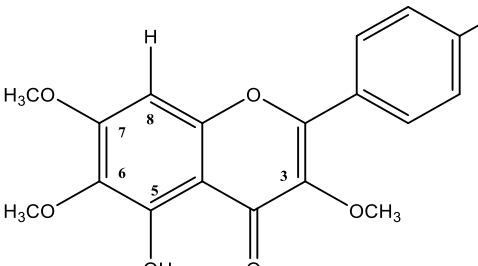
Πίνακας 5.28: Φασματοσκοπικά δεδομένα (600 MHz, CDCl₃) του 5,7-dihydroxy-3,6,8-trimethoxyflavone (10)

Atom	¹ H (ppm)	Mult/ty	J (Hz)	¹ H Type	¹ H Integration	¹³ C (ppm)	HMBC Correlations
2	-	-	-	-	-	145,09	-
3	-	-	-	-	-	132,71	-
4	-	-	-	-	-	-	-
5	11,43	sharp s	-	-OH	1	147,38	C5, C6, C10
6	-	-	-	-	-	135,57	-
7	6,7	bs-	-	-OH	1	145,23	C7, C6
8	-	-	-	-	-	139,35	-
9	-	-	-	-	-	152,90	-
10	-	-	-	-	-	104,92	-
11	3,93	s	-	-OCH ₃	3	60,43	C6
12	4,10	s	-	-OCH ₃	3	60,98	C8, C9
13	3,96	s	-	-OCH ₃	3	61,29	C3
1'	-	-	-	-	-	-	-
2', 6'	8,25	m	1,37/8,62	=CH-	2	127	C2, C2', C4'
3', 5'	7,53	m	7,42/14,85	=CH-	2	128	C4', C6'
4'	7,50	m	7,17/14,60	=CH-	1	130	C6'

Πίνακας 5.29: Δομές ισομερών Ο-Με-φλαβονοειδών με μοριακό τύπο C₁₈H₁₆O₇ (για πλήρη επιστημονική ονομασία των *Helichrysum* spp., βλέπε <https://powo.science.kew.org/>)

	Ισομερή C ₁₈ H ₁₆ O ₇	Είδος ελίγρυσου	Αναφορά
104		<i>H. decumbens</i>	(Tomás-Lorente et al. 1989)
103		<i>H. benthami</i>	(Michel Randriaminahy et al. 1992)

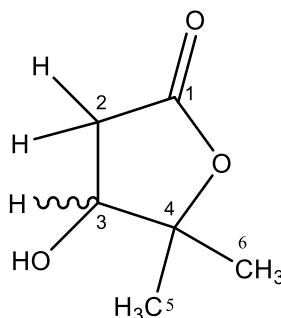
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

102		<i>H. arenarium</i> <i>H. graveolens</i> <i>H. odoratissimum</i>	(Pljeljakušić et al. 2018) (R. Hansel 1972) (Luc Van Puyvelde et al. 1989)
101		<i>H. kraussi</i>	(Percival B. Legoale 2013)
100		<i>H. tomentosulum</i>	(Jakupovic et al. 1989)

Ο μεταβολίτης 5,7-dihydroxy-3,6,8-trimethoxyflavone αποτελεί ένα σημαντικό εκπρόσωπο της κατηγορίας των μεθυλιωμένων флаβονοειδών και επιδεικνύει αντικαρκινική δράση (Timothy M. Le Jeune et al. 2015).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

Μεταβολίτης 11: 3-hydroxy-4,4-dimethyldihydrofuran-2(3H)-one (3-hydroxy-4,4-dimethyl-4-butyrolactone)



Εικόνα 5.55: Δομή 3-hydroxy-4,4-dimethyl-4-butyrolactone

Ο μεταβολίτης **3-hydroxy-4,4-dimethyl-4-butyrolactone** ταυτοποιήθηκε κυρίως με φασματοσκοπικά δεδομένα και απομονώθηκε από το ολικό DCM εκχύλισμα (μη συνεχόμενης στερεής-υγρής εκχύλισης) ταξιανθιών του *H. amorginum* (2020) και συγκεκριμένα μετά από υγρή-υγρή κατανομή του ολικού DCM εκχυλίσματος από το ξηρό εκχύλισμα της κάτω φάσης, το οποίο κλασματοποιήθηκε με 1° FCPC από το οποίο επιλέχθηκε το συνενωμένο κλάσμα fr11-12, το οποίο κλασματοποιήθηκε με 2° FCPC από το οποίο επιλέχθηκε το συνενωμένο κλάσμα fr6-9, το οποίο μετά από κλασμάτωση με ανοικτή στήλη silica gel απέδωσε στο συνενωμένο κλάσμα 32-33, 0,8mg του μεταβολίτη 11.

Το μοριακό βάρος του μορίου (MB:130,0624) προσδιορίστηκε με φασματογράφο μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (High Resolution MS-Orbitrap analyzer) με την μέθοδο του ηλεκτροψεκασμού (ESI), σε αρνητικό ιονισμό. Αντιστοιχεί στο μοριακό τύπο $C_6H_{10}O_3$ (RDBeq=2), χρόνο έκλουσης $Rt \approx 1$ min με κύριο μοριακό ιόν $[M-H]^-$ 129,0556 ($C_6H_9O_3$).

Με βάση την φασματοσκοπία NMR (^1H , COSY, HSQC-DEPT και HMBC) (Πίνακας 5.30, Εικόνες Π5.6-Π5.9, σελ. 392-395) προσδιορίστηκε η δομή του μεταβολίτη 11, η οποία είναι μια υδροξυλακτόνη που έχει απομονωθεί από το DCM εκχύλισμα υπέργειου μέρους του *Anaphalis margaritacea* (L.) Benth. & Hook.f. και θεωρείται προϊόν αποικοδόμησης των κουμαρινών (Ahmed A. Ahmed et al. 2004) καθώς και από το μεθανολικό εκχύλισμα καρπού του είδους *Cinnamomum parthenoxylon* (Jack) Meisn. (syn. *Cinnamomum inunctum* (Nees) Meisn.) (Fuchino et al. 2015).

Συγκεκριμένα, από το ^1H NMR φάσμα εντοπίστηκαν δύο απλές κορυφές δ_H 1,42, δ_H 1,36 με ολοκλήρωση 3H η κάθε μία που αντιστοιχούν σε δύο geminal μεθυλο ομάδες συνενωμένες σε άνθρακα που γειτνιάζει σε ετεροάτομο C-4 (δ_C 87,44) και που από το φάσμα HMBC δίνουν συσχετισμούς με τους άνθρακες C-6, C-3, C-4 και C-5, C-3, C-4 αντίστοιχα. Επιπρόσθετα, εντοπίστηκαν δύο dd κορυφές στα δ_H 2,91(1H, dd, $J = 6,41, 6,34$) και δ_H 2,53 (1H, dd, $J = 3,35, 3,32$) που αντιστοιχούν σε δύο geminal πυρήνες H συνενωμένους στον άνθρακα C-2 ($\delta_C \approx 38$) οι οποίοι από το φάσμα HMBC δίνουν συσχετισμούς με τους

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

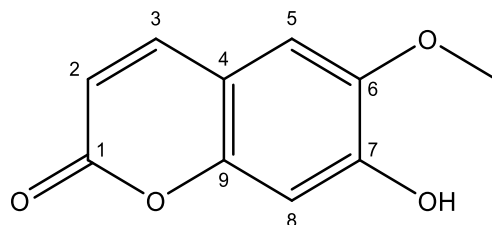
C-4, C-1 και C-3, C-4, C-1, αντίστοιχα. Ακόμη, εντοπίστηκε μία *dd* κορυφή στα δ_H 4,19 (1H, *dd*, *J*= 3,34, 3,01) που δίνει συσχετισμό με τον C-1. Από το φάσμα COSY εντοπίστηκαν οι συσχετισμοί του πυρήνα δ_H 4,19 με τους geminal πυρήνες στα δ_H 2,91, δ_H 2,53, του πυρήνα δ_H 2,91 με τους πυρήνες δ_H 2,53, δ_H 4,19 και του πυρήνα δ_H 2,53 με τους πυρήνες δ_H 2,91, δ_H 4,19 γεγονός που αποδεικνύει την γειτονική θέση των geminal H του C-2 με το H του C-3. Επίσης από το φάσμα HMBC εντοπίστηκε καρβονυλικός άνθρακας C-1 δ_C ≈174,7 που δικαιολογεί τον εστερικό δεσμό της λακτόνης. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα είναι σε συμφωνία με την βιβλιογραφία (Ahmed A. Ahmed et al. 2004).

Πίνακας 5.30: Φασματοσκοπικά δεδομένα (600 MHz, CDCl₃) 3-hydroxy-4,4-dimethyl-4-butyrolactone (11)

Atom	¹ H (ppm)	Mult/ty	<i>J</i> (Hz)	¹ H Type	¹ H Integration	¹³ C (ppm)	HMBC Correlations
3	4,19	dd	3,34, 3,01	C-H	1	73,97	C1
2	2,91	dd	6,41, 6,34	C-H	1	38,08	C4, C1
2	2,53	dd	3,35, 3,32	C-H	1	38,31	C3, C4, C1
5	1,42	s	-	C-H	3	21	C6, C3, C4
6	1,36	s	-	C-H	3	26,25	C5, C3, C4
1	-	-	-	-	-	174,66	-

Το 3-hydroxy-4,4-dimethyl-4-butyrolactone έχει απομονωθεί από το είδος *Hypericum perforatum* L.. Αποτελεί έναν εκπρόσωπο της κατηγορίας των λακτονών και έχει μελετηθεί ως προς την αναστολή της ακετυλοχολινεστεράσης δηλαδή της αντρυπερτασικής της δράσης για την μείωση καρδιαγγειακών ασθενειών (Mokwelu 2019).

Μεταβολίτης 12: Scopoletin



Εικόνα 5.56: Δομή Scopoletin

Ο μεταβολίτης **scopoletin** ταυτοποιήθηκε κυρίως με φασματοσκοπικά δεδομένα και φασματομετρικά δεδομένα και απομονώθηκε από το ολικό DCM εκχύλισμα (μη συνεχόμενης στερεής-υγρής εκχύλισης) ταξιανθιών του *H. amorginum* (2020) και συγκεκριμένα μετά από υγρή-υγρή κατανομή του ολικού DCM εκχυλίσματος από το ξηρό εκχύλισμα της κάτω φάσης, το οποίο κλασματοποιήθηκε με 1^ο FCPC από το οποίο επιλέχθηκε το συνενωμένο κλάσμα fr11-12, το οποίο κλασματοποιήθηκε με 2^ο FCPC από το οποίο επιλέχθηκε το συνενωμένο κλάσμα fr6-9, το οποίο μετά από κλασμάτωση με ανοικτή στήλη silica gel απέδωσε στο συνενωμένο κλάσμα 34-36 (2 mg) μίγμα του μεταβολίτη 12.

Το μοριακό βάρος του ουδέτερου μορίου (MB:192,0417) προσδιορίστηκε με φασματογράφο μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (High Resolution MS-Orbitrap analyzer) με την μέθοδο του ηλεκτροψεκασμού (ESI), σε αρνητικό ιονισμό. Αντιστοιχεί στο μοριακό τύπο C₁₀H₈O₄ (RDBeq=7), χρόνο έκλουσης Rt≈4,34 min με κύριο μοριακό ιόν [M-H]⁻ 191.0348 (C₁₀H₇O₄) και χαρακτηριστικά θραύσματα *m/z* 176 [M-H-CH₃]⁻, 163 [M-H-CH₃-OH]⁻, 132 [M-H-CH₃-CO₂]⁻.

Με βάση την φασματοσκοπία NMR (¹H, COSY, HSQC-DEPT και HMBC) (Πίνακας 5.31, Εικόνες Π5.10-Π5.13, σελ. 396-399) προσδιορίστηκε η δομή του μεταβολίτη 12.

Συγκεκριμένα, από το ¹H NMR φάσμα εντοπίστηκαν δύο διπλές κορυφές δ_H 6,24 (1H, *d*, 9,45Hz), δ_H 7,56 (1H, *d*, 9,47Hz) οι οποίες είναι γειτονικοί βινυλικοί πυρήνες που συσχετίζονται κατά COSY και αντιστοιχούν στους C-2, C-3. Επιπρόσθετα, ο δ_H 7,56 δίνει HMBC συσχετισμό (³J) με άνθρακα καρβονυλίου δ_C 174,55 που επιβεβαιώνει τον λακτονικό δεσμό. Επιπλέον, εντοπίστηκε στα δ_H 3,92 μια απλή κορυφή (3H, *s*) στην χαρακτηριστική περιοχή των μεθοξυ ομάδων που αντιστοιχεί στον C-6. Τέλος, εντοπίστηκαν δύο απλές κορυφές δ_H 6,82 (1H, *s*), δ_H 6,89 (1H, *s*) του βενζολικού δακτυλίου που αντιστοιχούν στους C-8, C-5 εκ των οποίων ο πυρήνας δ_H 6,82 δίνει HMBC συσχετισμό με τον C-9 (δ_C 149,65).

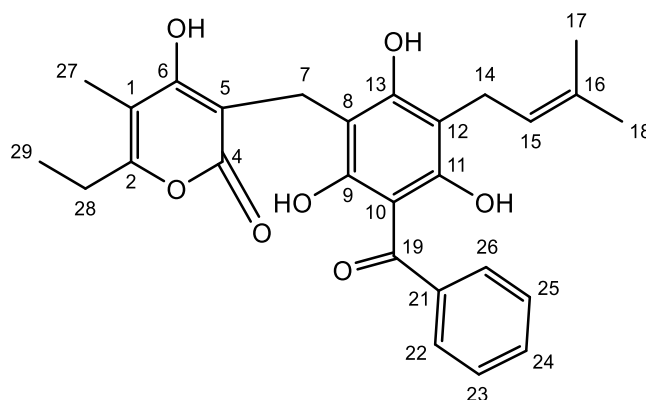
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

Πίνακας 5.31: Φασματοσκοπικά δεδομένα (600 MHz, CDCl₃) *scopoletin* (12)

Atom	¹ H (ppm)	Mult/ty	J (Hz)	¹ H Type	¹ H Integration	¹³ C (ppm)	HMBC Correlations
2	6,24	d	9,45	=C-H	1	113,12	-
8	6,82	s	-	=C-H	1	107,16	149,65
5	6,89	s	-	=C-H	1	102,87	-
3	7,56	d	9,47	=C-H	1	142,82	174,55
6	3,92	s	-	=C-H	3	55,93	-
1	-	-	-	-	-	174,55	-
9	-	-	-	-	-	149,65	-

Το *scopoletin* έχει απομονωθεί και από άλλα είδη του γένους *Helichrysum*, όπως από το sCO₂ εκχύλισμα ταξιανθιών του *H. italicum* subsp. *italicum* (Jokić et al. 2016) και επιδεικνύει ποικίλες φαρμακολογικές ιδιότητες (Joshi et al. 2021). Αποτελεί έναν εκπρόσωπο της κατηγορίας των κουμαρινών με δράσεις όπως αντικαρκινική, αντιδιαβητική, αντιφλεγμονώση, καρδιοπροστατευτική, ηπατοπροστατευτική (Dey Parama et al. 2022).

Μεταβολίτης 13: 3-[3-benzoyl-2,4,6-trihydroxy-5-(3-methylbut-2-en-1-yl)benzyl]-6-ethyl-4-hydroxy-5-methyl-2H-pyran-2-one (C₂₇H₂₈O₇)



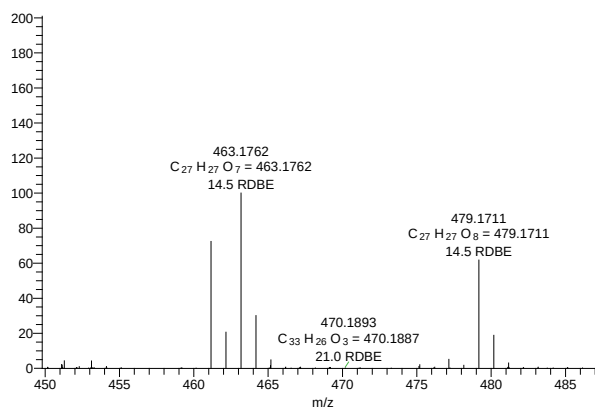
Εικόνα 5.57: Προτεινόμενη δομή 3-[3-benzoyl-2,4,6-trihydroxy-5-(3-methylbut-2-en-1-yl)benzyl]-6-ethyl-4-hydroxy-5-methyl-2H-pyran-2-one

Ο μεταβολίτης **3-[3-benzoyl-2,4,6-trihydroxy-5-(3-methylbut-2-en-1-yl)benzyl]-6-ethyl-4-hydroxy-5-methyl-2H-pyran-2-one** απομονώθηκε από το ολικό DCM εκχύλισμα (μη συνεχόμενης στερεής-υγρής εκχύλισης) ταξιανθιών του *H. amorginum* (2020) και συγκεκριμένα μετά από υγρή-υγρή

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

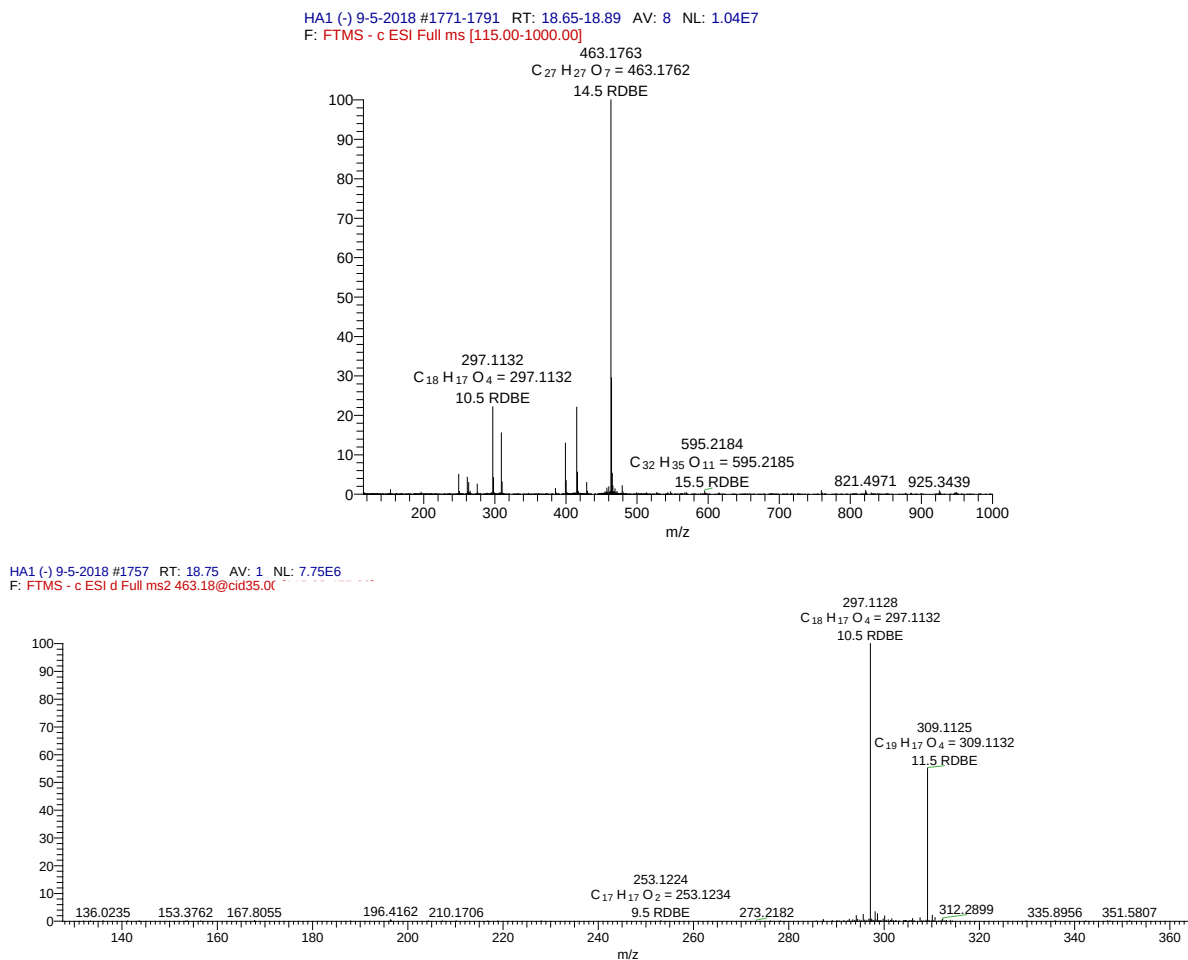
κατανομή του ολικού DCM εκχυλίσματος, από το ξηρό εκχύλισμα της κάτω φάσης, το οποίο κλασματοποιήθηκε με 1^ο FCPC, από το οποίο επιλέχθηκε το συνενωμένο κλάσμα fr11-12, το οποίο κλασματοποιήθηκε με 2^ο FCPC, από το οποίο επιλέχθηκε το συνενωμένο κλάσμα fr45-53, το οποίο διαχωρίστηκε με RP-Prep-TLC σε 5 ζώνες (Α-Ε με σειρά αρίθμησης από αρχή μετώπου ανάπτυξης και προς τα άνω). Ο μεταβολίτης 13 εντοπίστηκε με ανάλυση LC-HRMS σε παραπλήσια Rt (min) στις ζώνες Α (Rt=14,87 min), Β (Rt=14,75 min), C (Rt=14,85 min), D (Rt=14,76 min) και παραλήφθηκε από την ζώνη Α (μίγμα) ως υποκίτρινο έως άγχρωμο στερεό για την ανάλυση των φασματοσκοπικών του ιδιοτήτων (Εικόνες Π5.14-Π5.17, σελ. 400-403). Οι φασματομετρικές ιδιότητες του 13 λόγω καλύτερου προφίλ θραυσματοποίησης επιλέχθηκαν από την ζώνη D (Εικόνα 5.58). Σημειώνεται, επίσης, ότι ο μεταβολίτης 13 ανιχνεύθηκε με LC-HRMS στο DCM εκχύλισμα συνεχόμενης εκχύλισης ταξιανθιών *H. amorginum* (συγκομιδής 2017) με ίδιο προφίλ θραυσματοποίησης (θραύσματα m/z 309, 297, 153) (Εικόνα 5.59).

JS_6 #2617 RT: 14.76 AV: 1 NL: 2.16E5
F: FTMS - c ESI Full ms [113.00-1000.00]



Εικόνα 5.58:Μοριακό ιόν του $[M-H]^-$: 463 του μεταβολίτη 13 και χρόνοι έκλουσης των κορυφών βάσης στη ζώνη D (JS6) από RP-Prep-TLC του κλάσματος fr45-53 (2^ο FCPC, ολικό εκχύλισμα ταξιανθιών *Helichrysum amorginum* 2020 μη συνεχόμενης εκχύλισης)

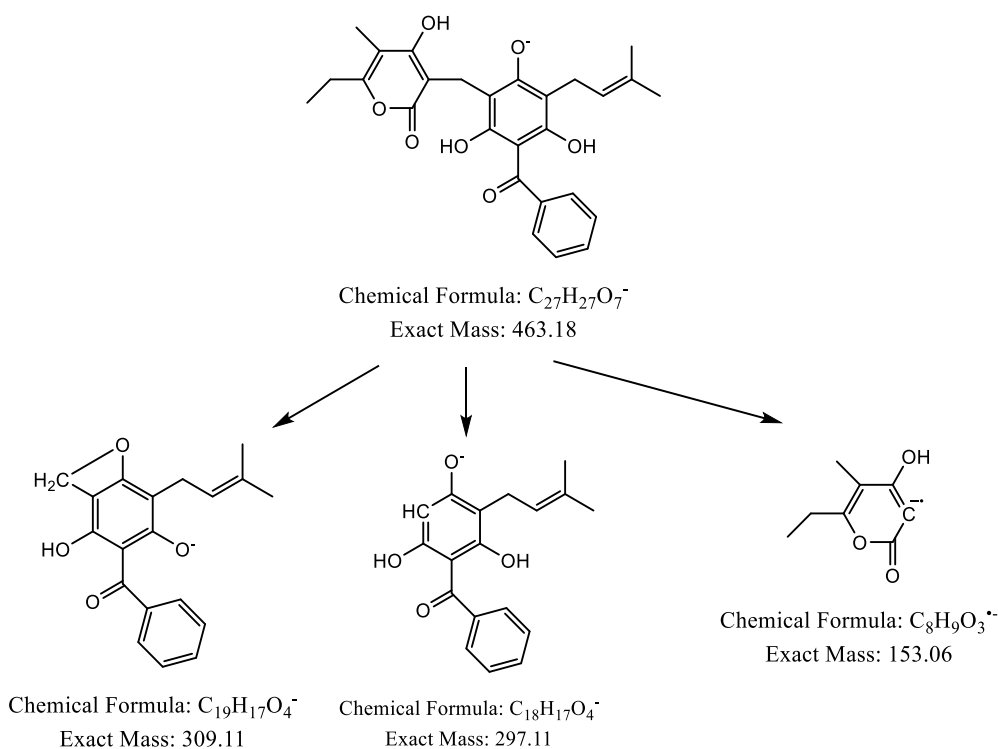
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.



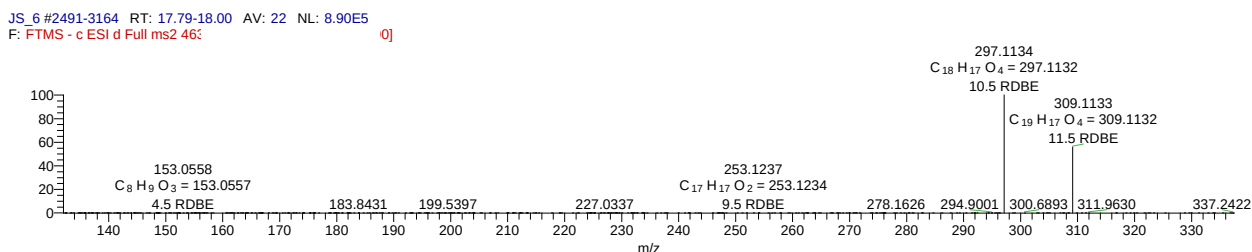
Εικόνα 5.59: Άνω: Μοριακό ιόν του [M-H]⁻: 463 του μεταβολίτη 13 και χρόνος έκλουσης της κορυφής βάσης. Κάτω: Προφίλ θραυσματοποίησης μοριακού ιόντος [M-H]⁻: 463 (ολικό DCM εκχύλισμα ταξιανθιών *H. amorginum* 2017 συνεχόμενης εκχύλισης)

Το μοριακό βάρος του ουδέτερου μορίου (MB: 464,1829) προσδιορίστηκε με φασματογράφο μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (High Resolution MS-Orbitrap analyzer) με την μέθοδο του ηλεκτροψεκασμού (ESI), σε αρνητικό ιονισμό. Αντιστοιχεί στο μοριακό τύπο C₂₇H₂₈O₇ (RDBeq=14) με κύριο μοριακό ιόν [M-H]⁻ 463,1762 (C₂₇H₂₇O₇) και χαρακτηριστικά θραύσματα 309 (C₁₉H₁₇O₄⁻, RDB=11.5), 297 (C₁₈H₁₇O₄⁻, RDB=10,5), 153 (C₈H₉O₃⁻, RDB=4,5) όπως φαίνεται στις Εικόνες 5.60, 5.61. Το θραύσμα με *m/z* 153 (RDB=4,5) είναι χαρακτηριστικό της α-pyrone με υποκαταστάτες Me, Et (Tomás-Lorente et al. 1989). Προτεινόμενο διάγραμμα θραυσματοποίησης παρουσιάζεται στην Εικόνα Π5.1 (Παράρτημα Κεφ. 5, σελ. 387).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.



Εικόνα 5.60: Προτεινόμενα κύρια θραύσματα μεταβολίτη 13 σε ESI negative



Εικόνα 5.61: Προφίλ θραυσματοποίησης μεταβολίτη 13 στην ζώνη D (JS6) (αρνητικός ιονισμός) με εμφάνιση του θραύσματος 153

Με βάση την φασματοσκοπία NMR (^1H , COSY, HSQC-DEPT και HMBC) (Πίνακας 5.32 και Εικόνες Π5.14-Π5.17, σελ. 400-403) προσδιορίστηκε η δομή του μεταβολίτη 13, ο οποίος είναι ένα ετεροδιμερές πυρόνης-φλορογλουσινόλης και αποτελείται από τις ομάδες: (α) υποκατεστημένη α-πυρόνη, (β) μεθυλενική γέφυρα (C7), (γ) δακτύλιος φλορογλουσινόλης, (δ) γέφυρα κετόνης (C19), (ε) πρένυλο ομάδα δακτυλίου φλορογλουσινόλης, (στ) βενζολικός δακτύλιος. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη 13 είναι όμοια με άλλα ετεροδιμερή πυρόνης-φλορογλουσινόλης όπως του *heliarzanol* (Tagliatela-Scafati et al. 2013) τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την επιβεβαίωση της δομής του 13.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

(α) υποκατεστημένη α-πυρόνη

Στα δ_H 1,94 ^1H NMR παρατηρήθηκε μια απλή κορυφή με ολοκλήρωση 3H σχετιζόμενα από το HSQC με αλειφατικό C στα δ_C 9,21 και από το HMBC με τους C-1, C-2, C-6, από όπου και συμπεραίνεται η ύπαρξη ανεξάρτητης $-CH_3$ ομάδας. Στα δ_H 1,18 παρατηρήθηκε μια τριπλή κορυφή (3H, t , $J = 7.59$, 15,17Hz) σχετιζόμενα από το HSQC με αλειφατικό C στα δ_C 11,30 και από το HMBC με τους C-2, C-28 και επίσης στα δ_H 2,55 μια τετραπλή κορυφή (2H, qd , $J = 7,63$, 15,39Hz) σχετιζόμενα από το HSQC με αλειφατικό C στα δ_C 24,16 και από το HMBC με τους C-1, C-2, C-29. Επίσης, οι πυρήνες δ_H 1,18 και δ_H 2,55 συσχετίζονται σύμφωνα με το φάσμα COSY. Από τα παραπάνω συμπεραίνεται η ύπαρξη μιας ανεξάρτητης $-CH_2CH_3$ ομάδας. Στα δ_H 9,6 παρατηρήθηκε μια ευρεία απλή κορυφή με ολοκλήρωση 1H που σχετίζεται με το OH του C-6 και από το HMBC με τους C-1, C-6. Επίσης, δεδομένα που συνηγορούν στην ύπαρξη του δακτυλίου α-πυρόνης είναι ο C-4 στα δ_C 174,91 που παραπέμπει σε C εστερικού δεσμού, οι C-2 (δ_C 161,53), C-6 (δ_C 167,26) που παραπέμπουν σε C γειτονικούς σε ετεροάτομα, ο C-5 (δ_C 101,28) που παραπέμπει σε βινυλικό C.

(β) μεθυλενική γέφυρα (C7)

Στα δ_H 3,67 παρατηρήθηκε μια ευρεία απλή κορυφή με ολοκλήρωση 2H σχετιζόμενα από το HSQC με αλειφατικό C στα δ_C 17,71 και από το HMBC με τους C-4, C-5, C-9, C-10, C-13 από όπου και συμπεραίνεται η ύπαρξη ανεξάρτητης $-CH_2$ ομάδας η οποία γεφυρώνει δύο δακτυλίου.

(γ) δακτύλιος φλορογλουσινόλης

Στον δακτύλιο φλορογλουσινόλης εντοπίζονται οι άνθρακες C-9 (δ_C 158,74), C-10 (δ_C 105,87), C-11 (δ_C 156,93), C-13 (δ_C 162,57) που παραπέμπουν σε γειτνίαση με ετεροάτομα καθώς και τρεις αποθωρακισμένες απλές κορυφές στα δ_H 10,47 (1H, bs), δ_H 13,61 (1H, s), δ_H 6,22 (1H, s) που παραπέμπουν σε $-OH$ ομάδες οι οποίες σχετίζονται με τους άνθρακες C-9, C-11, C-13. Επίσης, εντοπίζονται οι τεταρτοταγής, αρωματικοί άνθρακες C-8 (δ_C 102,26), C-12 (δ_C 108,86), C-10 (δ_C 105,87) σε υψηλότερα πεδία που συνεπάγεται ότι δεν σχετίζονται με κάποιο ετεροάτομο.

(δ) γέφυρα κετόνης (C19)

Στα δ_C 199,15 εντοπίζεται C που παραπέμπει σε κετονική ομάδα που συσχετίζεται από το HMBC με τα H-22/26 (δ_H 7,58) και H-23/25 (δ_H 7,45).

(ε) πρένυλο ομάδα δακτυλίου φλορογλουσινόλης

Στα δ_H 1,65, δ_H 1,70 παρατηρήθηκαν δύο απλές κορυφές με ολοκλήρωση 3H η κάθε μία, τα οποία 3H είναι σχετιζόμενα από το HSQC με αλειφατικούς C στα δ_C 17,94, δ_C 25,70, αντίστοιχα, και από το HMBC με τους C-17, C-15, C-16 και C-18, C-15, C-16 από όπου και συμπεραίνεται η ύπαρξη δύο ανεξάρτητων $-CH_3$ ομάδων. Επίσης, στο ίδιο σύστημα εντοπίζεται ένας τεταρτοταγής, βινυλικός C (δ_C 134,84). Στα δ_H

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

3.31 εντοπίστηκε μια διπλή κορυφή (2H, d, $J=7,01\text{Hz}$) σχετιζόμενη από το HSQC με αλειφατικό C στα δ_c 21,98 και από το HMBC με τους C-11, C-12, C-13, C-15, C-16 καθώς και στα δ_H 5,13 εντοπίστηκε μια tt κορυφή (1H, tt, $J=1.20\text{Hz}$, 7.04Hz) σχετιζόμενη από το HSQC με βινυλικό C στα δ_c 121,62 και από το HMBC με τους C-14, C-17, C-18. Επιπρόσθετα, τα H στα δ_H 5,13 συσχετίζονται κατά COSY με τα H στα δ_H 3,31. Τα παραπάνω συνηγορούν στην ύπαρξη πρενυλο ομάδας τοποθετημένη στην θέση C-12 του δακτυλίου φλορογλουσινόλης.

(στ) βενζολικός δακτύλιος

Στην αρωματική περιοχή παρατηρούνται οι πολλαπλές κορυφές στα:

δ_H 7,58 (2H, m, $J=1,58\text{Hz}$, $6,87\text{Hz}$) σχετιζόμενη από το HSQC με βινυλικό C στα δ_c 127,83 και από το HMBC με τους C23, C25, C24, C19 και αποδίδεται σε 2H ortho θέσης βενζολικού δακτυλίου.

δ_H 7,53 (1H, m, $J=1,3\text{ Hz}$, $1,8\text{ Hz}$, $7,4\text{ Hz}$) σχετιζόμενη από το HSQC με βινυλικό C στα δ_c 12860 και από το HMBC με τους C22, C26, C21 και αποδίδεται σε 1H para θέσης βενζολικού δακτυλίου.

δ_H 7.45 (2H, m, $J=496\text{ Hz}$, $7,8\text{ Hz}$) σχετιζόμενη από το HSQC με βινυλικό C στα δ_c 131,79 και από το HMBC με τους C24, C21, C19 και αποδίδεται σε 2H meta θέσης βενζολικού δακτυλίου. Τα παραπάνω συνηγορούν στην ύπαρξη μη υποκατεστημένου βενζολικού δακτυλίου ενωμένο με την ομάδα κετόνης μέσω του αρωματικού C-21 στα δ_c 140,50.

Οι συσχετίσεις COSY, HMBC του μεταβολίτη 13 παρουσιάζονται στην Εικόνα Π5.28 (Παράρτημα Κεφ.5, σελίδα 414).

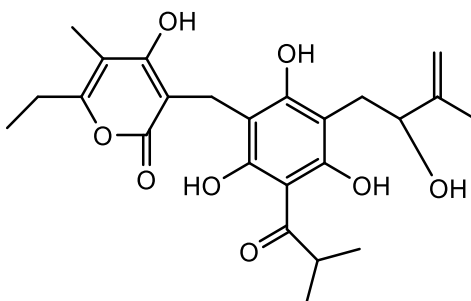
Πίνακας 5.32: Φασματοσκοπικά δεδομένα (600 MHz, CDCl_3) του 3-(3-benzoyl-2,4,6-trihydroxy-5-(3-methylbut-2-en-1-yl)benzyl)-6-ethyl-4-hydroxy-5-methyl-2H-pyran-2-one (13)

Atom	^1H (ppm)	Mult/ty	J (Hz)	^1H Type	^1H Integration	^{13}C (ppm)	HMBC Correlations
1	-	-	-	-	-	108,6	-
2	-	-	-	-	-	161,53	-
4	-	-	-	-	-	174,91	-
5	-	-	-	-	-	101,28	-
6	-	-	-	-	-	167,26	-
7	3,67	bs	-	-CH2-	2	17,71	C5, C9, C13, C4, C10
8	-	-	-	-	-	102,26	-
9	-	-	-	-	-	158,74	-
10	-	-	-	-	-	105,87	-
11	-	-	-	-	-	156,93	-
12	-	-	-	-	-	108,86	-
13	-	-	-	-	-	162,57	-
14	3,31	d	7,01	-CH2-	2	21,98	C12, C15, C16, C11, C13

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

15	5,13	<i>tt</i>	1,20, 7,04	=CH-	1	121,62	C17, C14, C18
16	-	-	-	-	-	134,84	-
17	1,70	<i>s</i>	-	-CH ₃	3	25,70	C18, C15, C16
18	1,65	<i>s</i>	-	-CH ₃	3	17,94	C17, C15, C16
19	-	-	-	-	-	199,15	-
21	-	-	-	-	-	140,50	-
22, 26	7,58	<i>m</i>	1,58, 6,87	=CH-	2	127,83	C25, C23, C24, C19
23, 25	7,45	<i>m</i>	4,96, 7,8	=CH-	2	131,79	C24, C21, C19
24	7,53	<i>m</i>	1,3, 1,8, 7,4	=CH-	1	128,60	C22, C26, C21
27	1,94	<i>s</i>	-	-CH ₃	3	9,21	C1, C2, C6
28	2,55	<i>qd</i>	7,63, 15,39	-CH ₂ -	2	24,16	C1, C2, C29
29	1,18	<i>t</i>	7,59, 15,17	-CH ₃	3	11,30	C2, C28
9* (phloroglucinol -OH)	10,47	<i>bs</i>	-	-OH	1	-	-
11* (phloroglucinol -OH)	13,61	<i>s</i>	-	-OH	1	-	-
13* (phloroglucinol -OH)	6,22	<i>s</i>	-	-OH	1	-	-
6* (pyrone - OH)	9,6	<i>s</i>	-	-OH	1	-	-

Μεταβολίτης 14: Heliarzanol



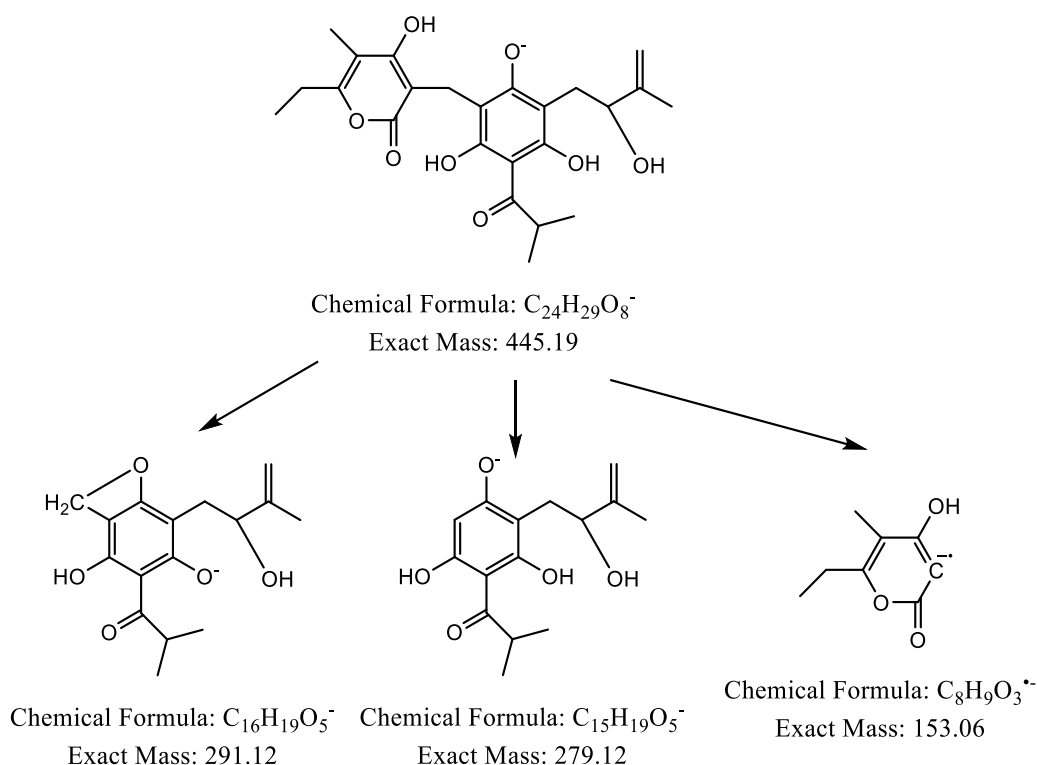
Εικόνα 5.62: Δομή Heliarzanol

Ο μεταβολίτης **heliarzanol** ταυτοποιήθηκε κυρίως με φασματομετρικά δεδομένα από το ολικό DCM εκχύλισμα (μη συνεχόμενης στερεής-υγρής εκχύλισης) ταξιανθιών του *H. amorginum* (2020) και συγκεκριμένα μετά από υγρή-υγρή κατανομή του ολικού DCM εκχυλίσματος από το ξηρό εκχύλισμα της κάτω φάσης, το οποίο κλασματοποιήθηκε με 1^ο FCPC από το οποίο επιλέχθηκε το συνενωμένο κλάσμα fr11-12, το οποίο κλασματοποιήθηκε με 2^ο FCPC από το οποίο επιλέχθηκε το συνενωμένο κλάσμα fr45-

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

53, το οποίο διαχωρίστηκε με RP-Prep-TLC σε πέντε ζώνες (Α-Ε με σειρά αρίθμησης από αρχή μετώπου ανάπτυξης και προς τα άνω). Ο μεταβολίτης 14 εντοπίστηκε με ανάλυση LC-HRMS στην ζώνη Α (μίγμα) σε $R_t=11,48$ min, ενώ παρατηρήθηκε και ισομερές του σε $R_t=11,39$ min (Kramberger et al. 2020).

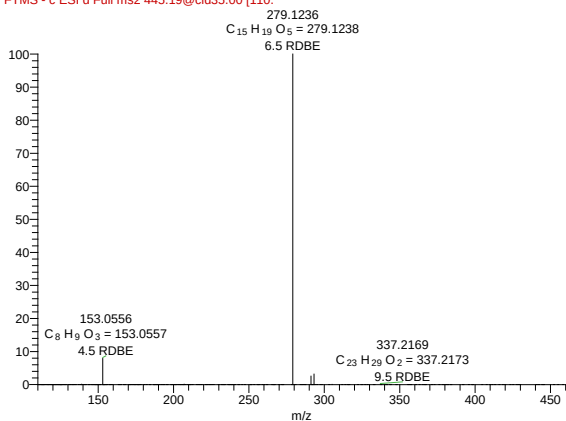
Το μοριακό βάρος του ουδέτερου μορίου (MB: 446,1935) προσδιορίστηκε με φασματογράφο μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (High Resolution MS-Orbitrap analyzer) με την μέθοδο του ηλεκτροψεκασμού (ESI), σε αρνητικό ιονισμό. Αντιστοιχεί στο μοριακό τύπο $C_{24}H_{30}O_8$ (RDBeq=10) με κύριο μοριακό ιόν $[M-H]^-$ 445,1861 ($C_{24}H_{29}O_8$) και χαρακτηριστικά θραύσματα 291 ($C_{16}H_{19}O_5^-$, RDB=7), 270 ($C_{15}H_{19}O_5^-$, RDB=6), 153 ($C_8H_9O_3^-$, RDB=4) όπως φαίνεται στην Εικόνα 5.63. Το θραύσμα με m/z 153 (RDB=4) είναι χαρακτηριστικό της α -pyrone με υποκαταστάτες Me, Et (Tomás-Lorente et al. 1989). Προτεινόμενο διάγραμμα θραυσματοποίησης παρουσιάζεται στην Εικόνα Π5.1 (Παράρτημα Κεφ. 5, σελ. 387).



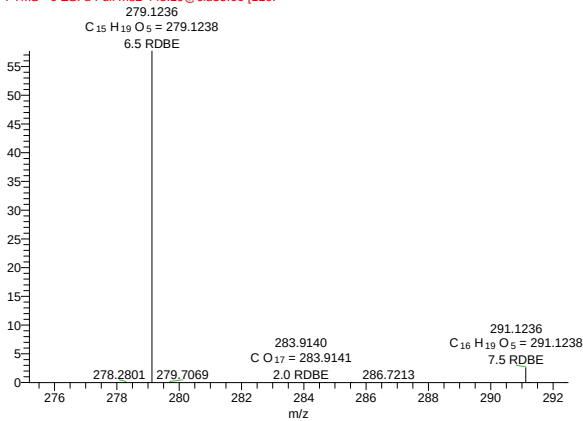
Εικόνα 5.63: Προτεινόμενα κύρια θραύσματα μεταβολίτη 14 (heliarzanol) σε ESI negative

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

JS_pureA NEG rep #1800-1825 RT: 11.46-11.56 AV: 10 NL: 4.44E5
F: FTMS - c ESI d Full ms2 445.19@cid35.00 [110.00-460.00]

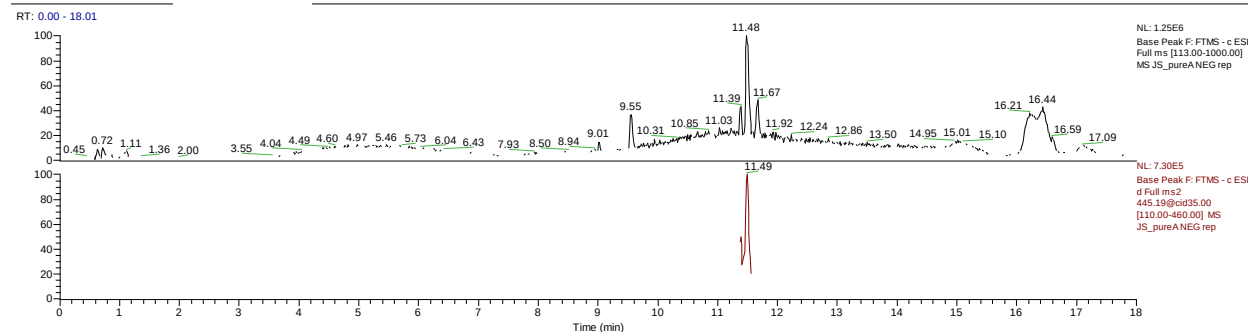


JS_pureA NEG rep #1800-1825 RT: 11.46-11.56 AV: 10 NL: 4.44E5
F: FTMS - c ESI d Full ms2 445.19@cid35.00 [110.00-460.00]

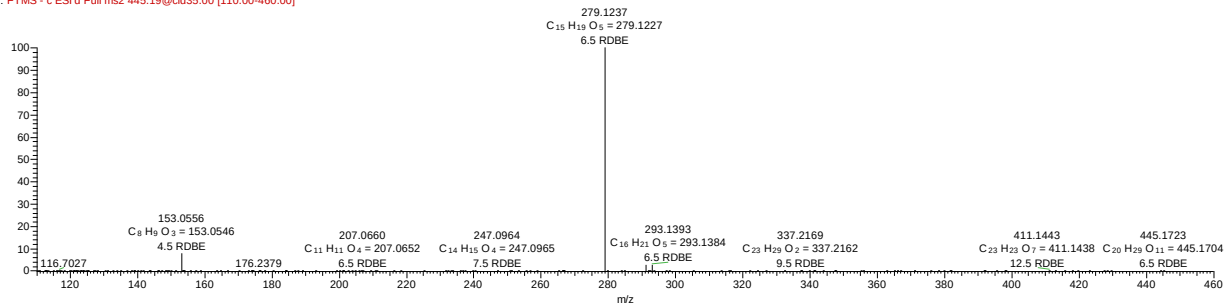


C:\Users\...JS_pureA NEG re-

10/23/2021 11:17:08 PM



JS_pureA NEG rep #1807-1821 RT: 11.47-11.54 AV: 7 NL: 5.39E5
F: FTMS - c ESI d Full ms2 445.19@cid35.00 [110.00-460.00]

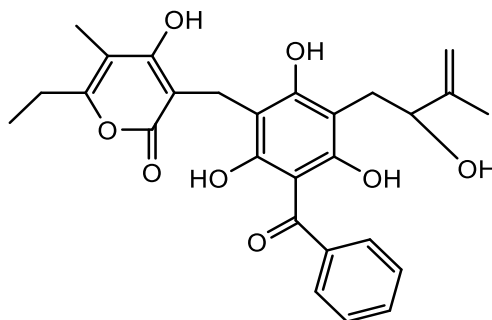


Εικόνα 5.64: Προφίλ θραυσματοποίησης μεταβολίτη 14 στην ζώνη Α (αρνητικός ιονισμός) με εμφάνιση των θραυσμάτων 291, 279, 153

Ο μεταβολίτης heliarzanol έχει απομονωθεί από το είδος *H. italicum* subsp. *microphyllum* (Tagliatalata-Scafati et al. 2013).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

Μεταβολίτης 15: 3-(3-benzoyl-2,4,6-trihydroxy-5-(2-hydroxy-3-methylbut-3-en-1-yl)benzyl)-6-ethyl-4-hydroxy-5-methyl-2H-pyran-2-one (C₂₇H₂₈O₈)

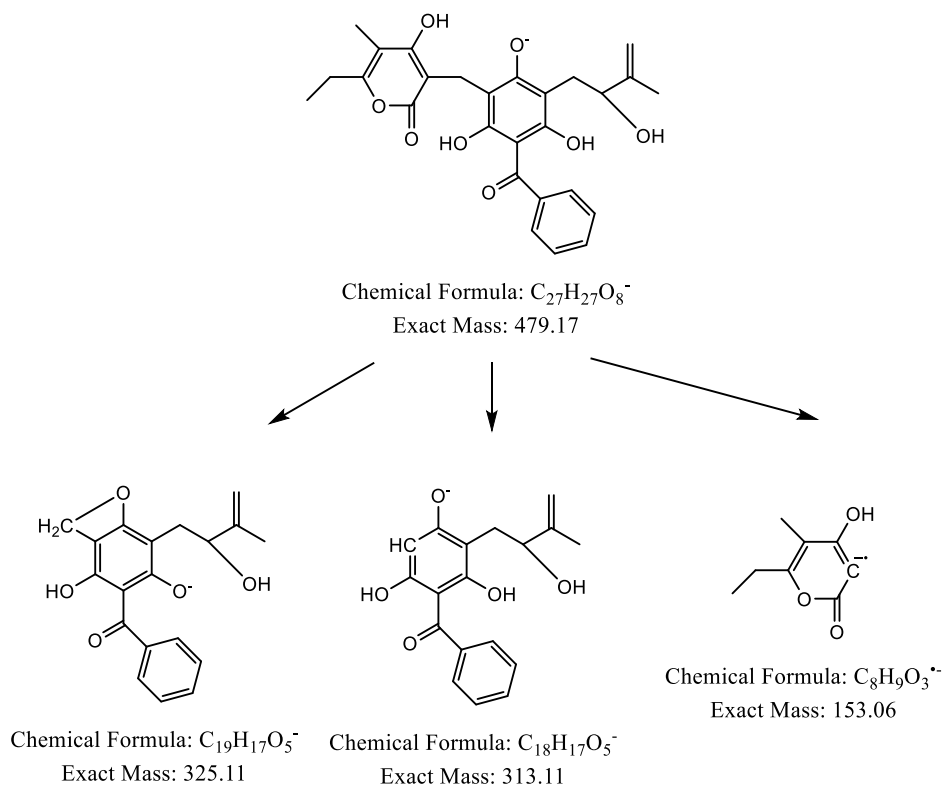


Εικόνα 5.65:Προτεινόμενη δομή 3-(3-benzoyl-2,4,6-trihydroxy-5-(2-hydroxy-3-methylbut-3-en-1-yl)benzyl)-6-ethyl-4-hydroxy-5-methyl-2H-pyran-2-one

Ο μεταβολίτης **15** ταυτοποιήθηκε κυρίως με φασματομετρικά δεδομένα από το ολικό DCM εκχύλισμα (μη συνεχόμενης στερεής-υγρής εκχύλισης) ταξιανθιών του *H. amorginum* (2020) και συγκεκριμένα μετά από υγρή-υγρή κατανομή του ολικού DCM εκχυλίσματος από το ξηρό εκχύλισμα της κάτω φάσης, το οποίο κλασματοποιήθηκε με 1^ο FCPC από το οποίο επιλέχθηκε το συνενωμένο κλάσμα fr11-12, το οποίο κλασματοποιήθηκε με 2^ο FCPC από το οποίο επιλέχθηκε το συνενωμένο κλάσμα fr45-53, το οποίο διαχωρίστηκε με RP-Prep-TLC σε πέντε ζώνες (Α-Ε με σειρά αρίθμησης από αρχή μετώπου ανάπτυξης και προς τα άνω). Ο μεταβολίτης 15 εντοπίστηκε με ανάλυση LC-HRMS στην ζώνη Α (μίγμα) σε Rt=11,67 min.

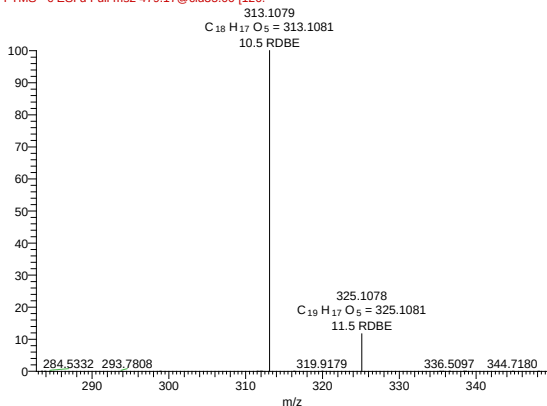
Το μοριακό βάρος του ουδέτερου μορίου (MB: 480,1779) προσδιορίστηκε με φασματογράφο μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (High Resolution MS-Orbitrap analyzer) με την μέθοδο του ηλεκτροψεκασμού (ESI), σε αρνητικό ιονισμό. Αντιστοιχεί στο μοριακό τύπο C₂₇H₂₈O₈ (RDBeq=14) με κύριο μοριακό ιόν [M-H]⁻ 479,1706 (C₂₇H₂₇O₈) και χαρακτηριστικά θραύσματα 325 (C₁₉H₁₇O₅⁻, RDB=11), 313 (C₁₈H₁₇O₅⁻, RDB=10), 153 (C₈H₉O₃⁻, RDB=4) όπως φαίνεται στις Εικόνες 5.66-5.67. Το θραύσμα με *m/z* 153 (RDB=4) είναι χαρακτηριστικό της α-pyrone με υποκαταστάτες Me, Et (Tomás-Lorente et al. 1989). Προτεινόμενο διάγραμμα θραυσματοποίησης παρουσιάζεται στην Εικόνα Π5.1 (Παράρτημα Κεφ. 5, σελ. 387).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

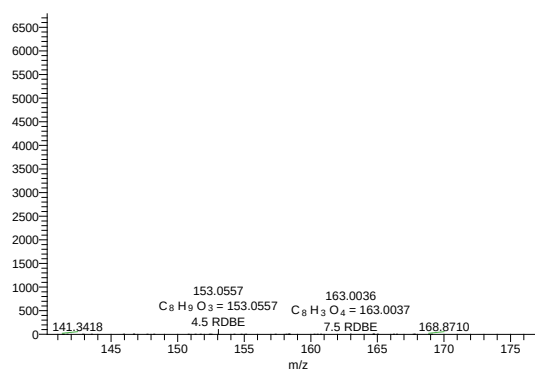


Εικόνα 5.66: Προτεινόμενα κύρια θραύσματα μεταβολίτη 15 ($C_{27}H_{28}O_8$) σε ESI negative

JS_pureA NEG rep #1830-1853 RT: 11.65-11.70 AV: 6 NL: 4.12E5
F: FTMS - c ESI d Full ms2 479.17@cid35.00 [120]



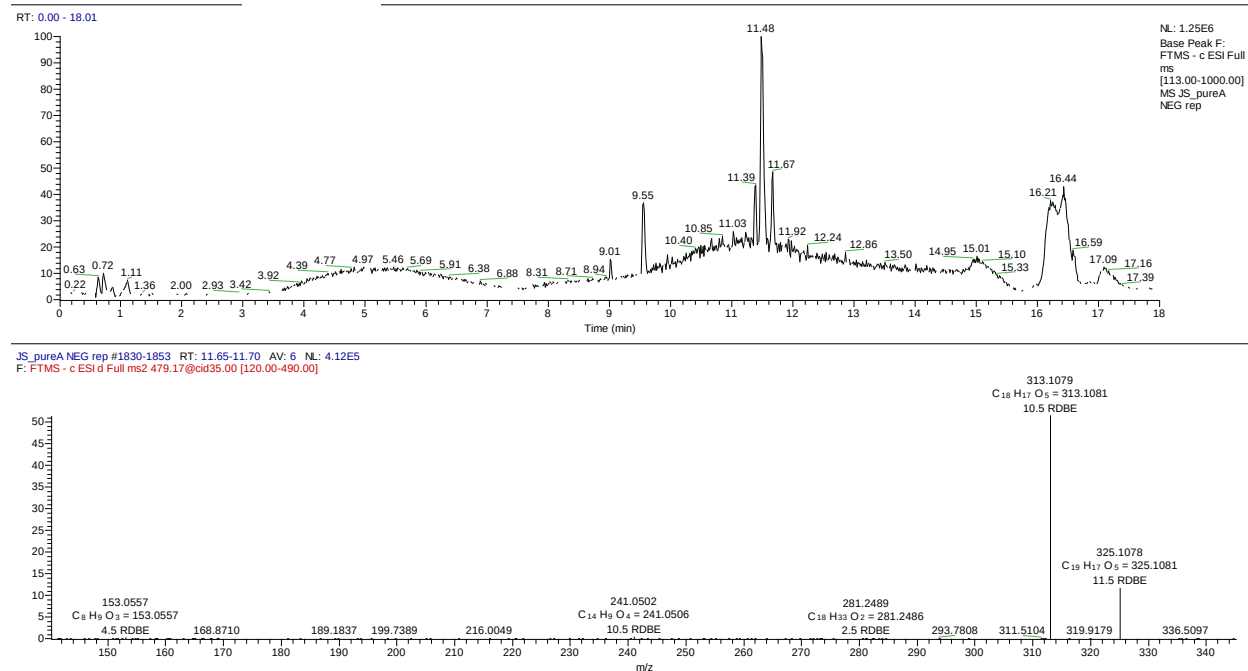
JS_pureA NEG rep #1830-1853 RT: 11.65-11.70 AV: 6 NL: 1.36E3
F: FTMS - c ESI d Full ms2 479.17@cid35.00 [120]



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

C:\Users\...US_pureA NEG rep

10/23/2021 11:17:08 PM

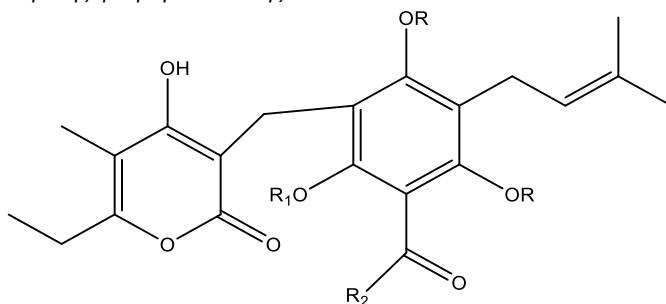


Εικόνα 5.67: Προφίλ θραυσματοποίησης μεταβολίτη 15 ($R_t=11,67$ min) στην ζώνη A (αρνητικός ιονισμός) με εμφάνιση των θραυσμάτων 325, 313, 153

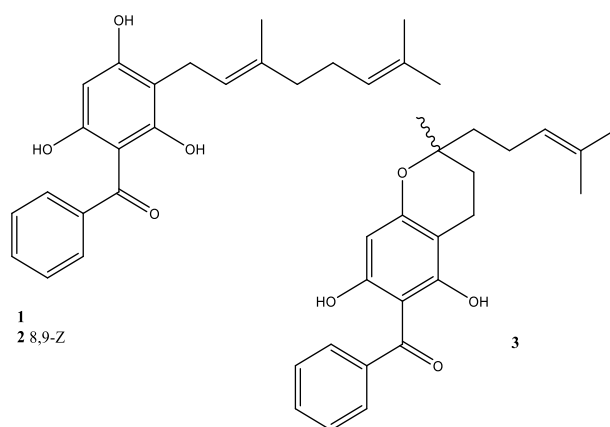
Οι μεταβολίτες **13**, **14**, **15** ανήκουν στην κατηγορία ετεροδιμερών α-πυρόνης-φλορογλουσινόλης και ομοιάζουν δομικά με τα ετεροδιμερή του Πίνακα 5.33 που έχουν απομονωθεί από άλλα είδη *Helichrysum* με εξαίρεση τον γνωστό μεταβολίτη **14** (heliarzanol) όπου ο πρένυλο υποκαταστάτης έχει υποστεί αναδιάταξη. Συγκεκριμένα, ο προτεινόμενος μεταβολίτης **13** σύμφωνα με την γενική δομή του Πίνακα 5.33 περιέχει τους υποκαταστάτες R_1 : H, R_2 : Ph, ενώ ο προτεινόμενος μεταβολίτης **15** είναι παράγωγο της heliarzanol και περιέχει τους υποκαταστάτες R_1 : H, R_2 : Ph. Επιπρόσθετα, στις προτεινόμενες δομές των ετεροδιμερών μεταβολιτών **13**, **15** η παρουσία και θέση του Ph υποκαταστάτη συνδεδεμένου στην ομάδα κετόνης του δακτυλίου φλορογλουσινόλης μπορεί να επιβεβαιωθεί βιοσυνθετικά από γνωστές, απομονωμένες δομές παραγώγων φλορογλουσινόλης που περιέχουν την συγκεκριμένη δομική σχέση Ph-(C=O)-R (R: phloroglucinol ring), όπως των ισομερών 3-neryl-1-benzoyl-phloroglucinol (**1**, **2**) και 2-methyl-2-[4,4-dimethylpent-3-en-yl]-5,7-dihydroxy-6-benzoyl chroman (**3**) που έχουν απομονωθεί από το είδος *H. monticola* Hilliard (Bohlmann & Zdero 1980) (Εικόνα 5.68).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

Πίνακας 5.33: Ετεροδιμερή α-πυρόνης-φλορογλουσινόλης



Ετεροδιμερή α-πυρόνης-φλορογλουσινόλης	R	R1	R2	<i>Helichrysum</i> sp.	Αναφορά
arzanol	H	H	CH ₃	<i>H. italicum</i> subsp. <i>microphyllum</i>	(Appendino et al. 2007)
auricepyrone	H	CH ₃	iPr	<i>H. auriceps</i> , <i>H. cephaloideum</i>	(Bohlmann Ferdinand 1980)
6-O-desmethylauricepyrone	H	H	iPr	<i>H. odoratissimum</i>	(Mericli et al. 1980)
23-Me-6-O-desmethylauricepyrone	H	H	iBu	<i>H. odoratissimum</i>	(Mericli et al. 1980)
23-Me-methylauricepyrone	H	CH ₃	iBu	<i>H. auriceps</i> , <i>H. cephaloideum</i>	(Bohlmann Ferdinand 1980)



Εικόνα 5.68: Παράγωγα φλορογλουσινόλης 3-neryl-1-benzoyl-phloroglucinol (1, 2) και 2-methyl-2-[4,4-dimethylpent-3-en-yl]-5,7-dihydroxy-6-benzoyl chroman (3) που έχουν απομονωθεί από το είδος *Helichrysum monticola*

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

5.3.5 Αποτίμηση *in vitro* αντιοξειδωτικής δράσης (DPPH) και αναστολής ενζύμου τυροσινάσης

Οι αναλύσεις των έξι εκχυλισμάτων HA (3 ταξιανθιών (T) και τριών φυλλωδών στελεχών (Φ)) από εκχυλίσαις με διαλύτες αυξανόμενης πολικότητας (DCM, MeOH, H₂O) στα τεστ DPPH και αναστολής τυροσινάσης παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.34. Και τα έξι εκχυλίσματα παρουσιάζουν χαμηλή αντιοξειδωτική δράση στο συγκεκριμένο τεστ (IC₅₀ >200 µg/mL) (Melania Priska et al. 2019) σε σχέση με άλλα είδη ελίχρυσων και εκχυλίσματα αυτών (Albayrak et al. 2010, Kolajo Adedamola Akinyede et al. 2022, Zenon Weglarz et al. 2022). Αναφορικά με την δράση τους στην αναστολή της τυροσινάσης όλα τα DCM εκχυλίσματα βρέθηκαν ανενεργά, το MeOH εκχύλισμα των φυλλωδών στελεχών βρέθηκε ανενεργό, το MeOH εκχύλισμα των ταξιανθιών παρουσίασε χαμηλή δράση (IC₅₀=265 µg/mL), ενώ τα H₂O εκχυλίσματα των ταξιανθιών (IC₅₀=64 µg/mL) και φυλλωδών στελεχών (IC₅₀=103 µg/mL) παρουσίασαν μέτρια δράση. Χαμηλές τιμές IC₅₀ αιθανολικών, ολικών εκχυλισμάτων έχουν παρατηρηθεί και στην περίπτωση των ταξιανθιών *H. arenarium* (IC₅₀=13,64 mg/mL) (Mustafa Akin et al. 2019) και φύλλων *H. petiolare* (IC₅₀ <5% για 25-200 µg/µL) (Idowu Jonas Sagbo 2020). Η τιμή IC₅₀ του υδατικού εκχυλίσματος (IC₅₀=64 µg/mL) βρίσκεται κοντά σε αυτήν του MeOH ολικού εκχυλίσματος υπέργειου μέρους *H. teretifolium* (L.) Sweet (IC₅₀=83,517 µg/mL) (Poroola et al. 2015). Τα υδατικά εκχυλίσματα HA παρουσίασαν καλύτερη δράση κάτι που σύμφωνα με την βιβλιογραφία πιθανολογείται ότι οφείλεται στην παρουσία παραγώγων καφεοϋλο-κινικο οξέων (Strzerek-Gomółka et al. 2021) (βλ. Υποενότητα 5.3.1.4).

Πίνακας 5.34: Ποσοστά IC₅₀ εκχυλισμάτων HA στα τεστ DPPH, tyrosinase inhibition assay

Όργανο φυτού HA	Διαλύτης εκχύλισης	Κωδικός δείγματος	Δείγμα	Inhibitory Activities (IC ₅₀ ± % STDEV; µg/mL)	
				DPPH	Tyrosinase
T	DCM	HA2017FexUSdcm290318	HA1	>500	-
T	MeOH	HA2017FexUSm290318	HA2	351,772 ± 7,024	265,219 ± 1,726
T	H ₂ O	HA2017FexUSw290318	HA3	328,207 ± 4,639	63,694 ± 1,887
Φ	DCM	HA2017LSexUSdcm040418	HA4	>500	-
Φ	MeOH	HA2017LSexUSm040418	HA5	327,172 ± 5,264	-
Φ	H ₂ O	HA2017LSexUSw040418	HA6	247,414 ± 4,712	102,639 ± 1,101
			Gallic Acid	≈50% αναστολή (C=5 µg/mL)	n.a.
			Kojic acid	n.a.	≈42% αναστολή (C=10 µM)

5.4 Συμπεράσματα

Η ποιοτική ανάλυση ταξιανθιών και φυλλωδών στελεχών οργανικής *in situ* καλλιέργειας *H. amorginum* πραγματοποιήθηκε με την τεχνική GC-MS σε n-hexane εκχυλίσματα, όπου και εντοπίστηκαν δευτερογενείς μεταβολίτες που ανήκουν στις κατηγορίες των **λιπαρών οξέων και παραγώγων, φυτοστερολών και τριτερπενίων**. Αναλόγως η ανάλυση με την τεχνική LC-MS σε DCM εκχυλίσματα εμφάνισε μεταβολίτες που ανήκουν στην κατηγορία των **φλαβονοειδών** και παραγώγων (άγλυκα, γλυκοζυλιωμένα, μεθυλιωμένα) και **παραγώγων πυρόνης**. Σε MeOH εκχυλίσματα εντοπίστηκαν **παράγωγα καφεοϋλο-κινικο οξέως, παράγωγα του φλαβονοειδούς kaempferol και παράγωγα πυρόνης**. Σε H₂O εκχυλίσματα εντοπίστηκαν **παράγωγα καφεοϋλο-κινικο οξέως και παράγωγα του φλαβονοειδούς kaempferol**. Όλες οι κατηγορίες μεταβολιτών είναι τυπικές του γένους *Helichrysum* όπως επισκοπείται στη βιβλιογραφία.

Η απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών από ολικό MeOH εκχύλισμα ταξιανθιών *H. amorginum* (συνεχόμενη εκχύλιση) απέδωσε ένα γλυκοζυλιωμένο φλαβονοειδές **kaempferol-3-O-β-D-glucoside (1)**, ένα σύνθετο φλαβονοειδές **kaempferol-3-O-β-D-(6-O-trans-p-coumaroyl) glucopyranoside (2)**, τα φλαβονοειδή **apigenin (5)**, **luteolin (6)** και **quercetin (7)**, ένα φθαλίδιο **5,7-dihydroxyphthalide (3)**, μία αρωματική αλδεϋδη **4-hydroxybenzaldehyde (4)**, έναν εστέρα γλυκερόλης **(S,Z)-3-hydroxy-2-((2-methylbut-2-enoyl)oxy)propyl decanoate (8)** και ένα διμερές βενζοϊκού οξέως **3,4-dihydroxy-5-((4-hydroxybenzoyl)oxy)benzoic acid (9)**.

Η απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών από ολικό DCM εκχύλισμα ταξιανθιών *H. amorginum* (μη συνεχόμενη εκχύλιση) απέδωσε το μεθυλιωμένο φλαβονοειδές **5,7-dihydroxy-3,6,8-trimethoxyflavone (10)**, μία υδροξυ λακτόνη **3-hydroxy-4,4-dimethyldihydrofuran-2(3H)-one (11)**, μία κουμαρίνη **scopoletin (12)** και τρία ετεροδιμερή α-πυρόνης-φλορογλουσινόλης το **heliarzanol (14)**, το **3-(3-benzoyl-2,4,6-trihydroxy-5-(3-methylbut-2-en-1-yl)benzyl)-6-ethyl-4-hydroxy-5-methyl-2H-pyran-2-one (13)** είναι νέο φυσικό προϊόν και το παράγωγο heliarzanol **3-(3-benzoyl-2,4,6-trihydroxy-5-(2-hydroxy-3-methylbut-3-en-1-yl)benzyl)-6-ethyl-4-hydroxy-5-methyl-2H-pyran-2-one (15)** που αποτελεί επίσης νέο φυσικό προϊόν.

Αναφορικά με την ικανότητα παγίδευσης ελεύθερης ρίζας (DPPH) των έξι εκχυλισμάτων *H. amorginum* (3 ταξιανθιών και 3 φυλλωδών στελεχών) από εκχυλίσσεις με διαλύτες αυξανόμενης πολικότητας (DCM, MeOH, H₂O) διαπιστώθηκε ότι παρουσιάζουν χαμηλή αντιοξειδωτική δράση στο συγκεκριμένο τεστ (IC₅₀ >200 μg/mL). Αναφορικά με την δράση τους στην αναστολή της τυροσινάσης όλα τα DCM εκχυλίσματα και το MeOH εκχύλισμα των φυλλωδών στελεχών δεν έδειξαν ανασταλτική δράση, το MeOH εκχύλισμα των ταξιανθιών παρουσίασε χαμηλή δράση (IC₅₀=265 μg/mL), ενώ τα H₂O

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

εκχυλίσματα των ταξιανθιών (IC₅₀=64 µg/mL) και φυλλωδών στελεχών (IC₅₀=103 µg/mL) παρουσίασαν μέτρια δράση η οποία αποδίδεται στην παρουσία παραγώγων καφεοϋλο-κινικο οξέων.

5.5 Βιβλιογραφία

- Abdel-Hady, Heba, Mortada Mohamed El-Sayed, Mahfouz Mohamed Abdel-Gawad, Eman Ahmed El-Wakil, El Sayed Saleh Abdel-Hameed, and Ezzat El Sayed Abdel-Lateef. 2018. "LC-ESI-MS Analysis, Antitumor and Antioxidant Activities of Methanolic Extract of Egyptian *Allium Kurrat*." *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 8 (7): 85–92. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2018.8714>.
- Ahmed A. Ahmed, Taha A. Hussein, Ahmed A. Mahmoud, Mohamed A. Farag, Paul W. Pare, Małgorzata Wojcinska, Joe Karchesy, Tom J. Mabry. 2004. "Nor-Ent-Kaurane Diterpenes and Hydroxylactones from *Antennaria geyeri* and *Anaphalis margaritacea*." *Phytochemistry* 65: 2539–2543. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.08.002>.
- Ahmed Serag, Mostafa H. Baky, Stefanie Doll and Mohamed A. Farag. 2020. "UHPLC-MS Metabolome Based Classification of Umbelliferous Fruit Taxa: A Prospect for Phytoequivalency of Its Different Accessions and in Response to Roasting." *RSC Adv.* 10 (76): 1–10. <https://doi.org/10.1039/c9ra07841j>.
- Akaberi, Maryam, Ombeline Danton, Zahra Tayarani-Najaran, Javad Asili, Mehrdad Iranshahi, S. Ahmad Emami, and Matthias Hamburger. 2019. "HPLC-Based Activity Profiling for Antiprotozoal Compounds in the Endemic Iranian Medicinal Plant *Helichrysum ooecephalum*." *Journal of Natural Products* 82 (4): 958–69. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.8b01031>.
- Akaberi, Maryam, Amirhossein Sahebkar, Narjes Azizi, and Seyed Ahmad Emami. 2019. "Everlasting Flowers: Phytochemistry and Pharmacology of the Genus *Helichrysum*." *Industrial Crops and Products* 138 (April): 111471. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111471>.
- Albayrak, Sevil, Ahmet Aksoy, Osman Sagdic, and Ergin Hamzaoglu. 2010. "Compositions, Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Helichrysum* (Asteraceae) Species Collected from Turkey." *Food Chemistry* 119 (1): 114–22. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.06.003>.
- Alexander Victor Anand David, Radhakrishnan Arulmoli, Subramani Parasuraman. 2016. "Overviews of Biological Importance of Quercetin: A Bioactive Flavonoid." *Pharmacognosy Reviews* 10 (20): 1–6. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.194044>.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

Ammara Riaz, Azhar Rasul, Ghulam Hussain, Muhammad Kashif Zahoor, Farhat Jabeen, Zinayyera Subhani, Tahira Younis, Muhammad Ali, Iqra Sarfraz, Selamoglu Zeliha. 2018. "Astragalin: A Bioactive Phytochemical with Potential Therapeutic Activities." *Advances in Pharmacological Sciences* 2018: 15. <https://doi.org/10.1155/2018/9794625>.

Angel Rumbero, Fco. Javier Arriaga-Giner, Eckhard Wollenweber. 2000. "A New Oxyprenyl Coumarin and Highly Methylated Flavones from the Exudate of *Ozothamnus lycopodioides* (Asteraceae)." *Z. Naturforsch.* 55c: 1–4. <https://doi.org/10.1515/znc-2000-1-202>.

Anis Arnous, Dimitris P. Makris, and Panagiotis Kefalas. 2002. "Correlation of Pigment and Flavanol Content with Antioxidant Properties in Selected Aged Regional Wines from Greece." *Journal of Food Composition and Analysis* 15: 655–65. <https://doi.org/10.1006/jfca.2002.1070>.

Appendino, Giovanni, Michela Ottino, Nieves Marquez, Federica Bianchi, Anna Giana, Mauro Ballero, Olov Sterner, Bernd L. Fiebich, and Eduardo Munoz. 2007. "Arzanol, an Anti-Inflammatory and Anti-HIV-1 Phloroglucinol α -Pyrone from *Helichrysum italicum* ssp. *microphyllum*." *Journal of Natural Products* 70 (4): 608–12. <https://doi.org/10.1021/np060581r>.

Bahare Salehi, Alessandro Venditti, Mehdi Sharifi-Rad, Dorota Kregiel, Javad Sharifi-Rad, Alessandra Durazzo, Massimo Lucarini, Antonello Santini, Eliana B. Souto, Ettore Novellino, Hubert Antolak, Elena Azzini, William N. Setzer, Natália Martins. 2019. "The Therapeutic Potential of Apigenin." *International Journal of Molecular Sciences* 20 (1305): 1–26. <https://doi.org/10.3390/ijms20061305>.

Bohlmann, Ferdinand, and Christa Zdero. 1980. "Neue Geranylphloroglucin-Derivate Aus *Helichrysum monticola*." *Phytochemistry* 19 (4): 683–84. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(80\)87039-7](https://doi.org/10.1016/0031-9422(80)87039-7).

Bohlmann Ferdinand, Zdero Christa. 1980. "Neue Phloroglucin-Derivate Aus *Helichrysum*-Arten." *Phytochemistry* 19: 153–55. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(80\)85038-2](https://doi.org/10.1016/0031-9422(80)85038-2).

Bohlmann, Ferdinand, Christa Zdero, Wolf Rainer Abraham, Antoinette Suwita, and Michael Grenz. 1980. "Neue Diterpene Und Neue Dihydrochalkon-Derivate Sowie Weitere Inhaltsstoffe Aus *Helichrysum*-Arten." *Phytochemistry* 19 (5): 873–79. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(80\)85129-6](https://doi.org/10.1016/0031-9422(80)85129-6).

Bojan Vujic, Vera Vidakovic, Milka Jadranin, Irena Novakovic, Snežana Trifunovic, Vele Tešević, Boris Mandić. 2020. "Composition, Antioxidant Potential, and Antimicrobial Activity of *Helichrysum plicatum* DC. Various Extracts." *Plants* 9: 337. <https://doi.org/10.3390/plants9030337>.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

Brito, Anghel, Javier E. Ramirez, Carlos Areche, Beatriz Sepúlveda, and Mario J. Simirgiotis. 2014. "HPLC-UV-MS Profiles of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Fruits from Three *Citrus* Species Consumed in Northern Chile." *Molecules* 19 (11): 17400–421. <https://doi.org/10.3390/molecules191117400>.

Chen, Guilin, Xun Li, Flora Saleri, and Mingquan Guo. 2016. "Analysis of Flavonoids in *Rhamnus davurica* and Its Antiproliferative Activities." *Molecules* 21 (10): 1–14. <https://doi.org/10.3390/molecules21101275>.

Daniel M. Grochowski, Marcello Locatelli, Sebastian Granica, Francesco Cacciagrano, and Michał Tomczyk. 2018. "A Review on the Dietary Flavonoid Tiliroside." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 17: 1–27. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12389>.

Dey Parama, Sosmitha Girisa, Elina Khatoon, Aviral Kumar, Mohammed S. Alqahtani, and Ajaikumar B. Kunnumakkara Mohamed Abbas, Gautam Sethi. 2022. "An Overview of the Pharmacological Activities of Scopoletin against Different Chronic Diseases." *Pharmacological Research* 179 (106202): 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2022.106202>.

Ebru Deveci, Gulsen Tel-Çayan, and Mehmet Emin Duru. 2018. "Phenolic Profile, Antioxidant, Anticholinesterase, and Anti-Tyrosinase Activities of the Various Extracts of *Ferula elaeochytris* and *Sideritis stricta*." *International Journal of Food Properties* 21 (1): 771–83. <https://doi.org/10.1080/10942912.2018.1431660>.

Fatemeh Ghavam-Haghi, Masoud Sadeghi Dinani. 2017. "Isolation and Identification of Astragalin and 2-Methoxy Tyrosol from the Bulbs of *Allium paradoxum*." *Journal Herbmed Pharmacology* 6: 114–18.

Felipe, Daniele F., Lara Z.S. Brambilla, Carla Porto, Eduardo J. Pilau, and Diógenes A.G. Cortez. 2014. "Phytochemical Analysis of *Pfaffia glomerata* Inflorescences by LC-ESI-MS/MS." *Molecules* 19 (10): 15720–34. <https://doi.org/10.3390/molecules191015720>.

Ferdinand Bohlmann, Wolf-Rainer Abraham. 1979. "Neue Diterpene Und Weitere Inhaltsstoffe Aus *Helichrysum calliconum* Und *Helichrysum heterolasium*." *Phytochemistry* 18: 889–91. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(79\)80043-6](https://doi.org/10.1016/0031-9422(79)80043-6).

Fuchino, Hiroyuki, Aya Yazawa, Fumiyuki Kiuchi, Nobuo Kawahara, Yutaka Takahashi, and Motoyoshi Satake. 2015. "Novel Monoterpene Lactones from *Cinnamomum inunctum*." *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 63 (10): 833–36. <https://doi.org/10.1248/cpb.c15-00368>.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

Gokhan Zengina, Aleksandra Cvetanovićb, Uroš Gašićc, Živoslav Tešić, Alena Stupar, Gizem Bulut, Kouadio

Ibrahime Sinan, Sengul Uysal, Marie Carene Nancy Picot-Allain, Mahomoodally, Mohamad Fawzi.

2020. “A Comparative Exploration of the Phytochemical Profiles and Biopharmaceutical Potential of *Helichrysum stoechas* subsp. *barrelieri* Extracts Obtained via Five Extraction Techniques.” *Process Biochemistry* 91: 113–25. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.12.002>.

Idowu Jonas Sagbo, Wilfred Otang-Mbeng. 2020. “Evaluation of the Efficacy of Ethanol Leaf Extract of *Helichrysum petiolare* Hilliard and B.L. Burt against Skin Aging.” *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 19 (12): 2631–38. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v19i12.22>.

Jakupovic, J., C. Zdero, M. Grenz, F. Tschritzis, L. Lehmann, S. M. Hashemi-Nejad, and F. Bohlmann. 1989. “Twenty-One Acylphloroglucinol Derivatives and Further Constituents from South African *Helichrysum* Species.” *Phytochemistry* 28 (4): 1119–31. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(89\)80195-5](https://doi.org/10.1016/0031-9422(89)80195-5).

Jingya Ruan, Jiejing Yan, Dandan Zheng, Fan Sun, Jianli Wang, Lifeng Han, and and Tao Wang Yi Zhang. 2019. “Comprehensive Chemical Profiling in the Ethanol Extract of *Pluchea indica* Aerial Parts by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Analysis of Its Silica Gel Column Chromatography Fractions.” *Molecules* 24 (2784): 1–20. <https://doi.org/10.3390/molecules24152784>.

Jokić, Stela, Marina Rajić, Blanka Bilić, and Maja Molnar. 2016. “Supercritical Extraction of Scopoletin from *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don Flowers.” *Phytochemical Analysis* 27 (5): 290–95. <https://doi.org/10.1002/pca.2630>.

Joshi, H, V Gajera, and A Katariya. 2021. “Review on Scopoletin: A Phenolic Coumarin With Its Medicinal Properties.” *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 12 (7): 3567. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.12\(7\).3567-80](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.12(7).3567-80).

Kolajo Adedamola Akinyede, Gail Denise Hughes, Okobi Eko Ekpo, and and Oluwafemi Omoniyi Oguntibeju. 2022. “Comparative Study of the Antioxidant Constituents, Activities and the GC-MS Quantification and Identification of Fatty Acids of Four Selected *Helichrysum* Species.” *Plants* 11 (998). <https://doi.org/10.3390/plants11080998>.

Kramberger, Katja, Darja Barlič-Maganja, Dunja Bandelj, Alenka Baruca Arbeiter, Kelly Peeters, Ana Miklavčič Višnjevec, and Zala Jenko Pražnikar. 2020. “HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS Determination of Bioactive Compounds and Antioxidant Activity Comparison of the Hydroalcoholic and Water Extracts

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

- from Two *Helichrysum italicum* Species.” *Metabolites* 10 (10): 1–25.
<https://doi.org/10.3390/metabo10100403>.
- Leandro N. Francescato, Silvia L. Debenedetti, Thiago G. Schwanz, Valquiria L. Bassani T. Henriques, Amelia. 2013. “Identification of Phenolic Compounds in *Equisetum giganteum* by LC–ESI–MSMS and a New Approach to Total Flavonoid Quantification.” *Talanta* 105: 409–16.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.11.072>.
- Lech, Katarzyna, Katarzyna Witkoś, and Maciej Jarosz. 2014. “HPLC–UV–ESI MS/MS Identification of the Color Constituents of Sawwort (*Serratula tinctoria* L.) Euroanalysis XVII.” *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 406 (15): 3703–8. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7589-3>.
- Lim, Eun Ju, Hyun Jung Kang, Hyun Joo Jung, Kyunghoon Kim, Chang Jin Lim, and Eun Hee Park. 2008. “Anti-Inflammatory, Anti-Angiogenic and Anti-Nociceptive Activities of 4-Hydroxybenzaldehyde.” *Biomolecules and Therapeutics* 16 (3): 231–36. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2008.16.3.231>.
- López-lázaro, Miguel. 2009. “Distribution and Biological Activities of the Flavonoid Luteolin.” *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 9: 31–59. <https://doi.org/10.2174/138955709787001712>.
- Luc Van Puyvelde, Norbert De Kimpe, Jean Costa, Viateur Munyjabo, Speciosa Nyirankuliza, Etienne Hakizamungu, and Nice as Schamp. 1989. “Isolation Of Flavonoids And A Chalcone From *Helichrysum odoratissimum* And Synthesis Of Helichrysetin.” *Journal of Natural Products* 52 (3): 629–33.
<https://doi.org/10.1021/np50063a025>.
- Luhata, Lokadi, Namboole Munkombwe, and Hanzooma Hatwiko. 2016. “Isolation and 1H-NMR Identification of a Tiliroside from *Odontonema strictum* (Acanthaceae).” *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 5 (1): 206–10.
<https://pdfs.semanticscholar.org/f51e/65574033402e5b5f077af6f34278bc5e8b13.pdf>.
- M. S. Islama, A. Iwasaki, K. Suenaga and H. Kato-Noguchi. 2018. “Evaluation of Phytotoxic Potential and Identification of Phytotoxic Compounds in *Rumex maritimus*.” *Plant Biosystems* 152: 804–9.
<https://doi.org/10.1080/11263504.2017.1338630>.
- Mariana Rey, María S. Kruse, Rocío N. Magrini-Huamán, Jessica Gómez, Mario J. Simirgiotis, and and Héctor Coirini Alejandro Tapia, Gabriela E. Feresin. 2021. “*Tessaria absinthioides* (Hook. & Arn.) DC. (Asteraceae) Decoction Improves the Hypercholesterolemia and Alters the Expression of LXRs in Rat Liver and Hypothalamus.” *Metabolites* 11 (9): 579. <https://doi.org/10.3390/metabo11090579>.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

Maryam Akaberi, Amirhossein Sahebkar, Narjes Azizi, Seyed Ahmad Emami. 2019. “Everlasting Flowers: Phytochemistry and Pharmacology of the Genus *Helichrysum*.” *Industrial Crops & Products* 138 (111471): 1–21. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111471>.

Maryam Akaberi, Zahra Tayarani Najaran, Narjes Azizi, Seyed Ahmad Emami. 2021. “Metabolite Profiling and Antiprotozoal Activity of Three Endemic Iranian *Helichrysum* Species.” *Industrial Crops & Products* 174 (114196). <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114196>.

Melania Priska, Natalia Peni, Ludovicus Carvallo. 2019. “Phytochemicals Screening and Antioxidant Effectiveness of Garlic (*Allium sativum*) from Timor Island.” *Biosaintifika* 11 (1): 1–7. <https://doi.org/10.15294/biosaintifika.v11i1.17313>.

Merikli, A L I H, Ferdinand Bohlmann, and Christa Zderoo. 1980. “Pyron-Derivate *Helichrysum*-Arten ”.” *Phytochemistry* 19: 639–44. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(80\)87030-0](https://doi.org/10.1016/0031-9422(80)87030-0).

Michel Randriaminahy, Peter Proksch, Ludger Witteb, and Victor Wray. 1992. “Lipophilic Phenolic Constituents from *Helichrysum* Species Endemic to Madagascar.” *Z. Naturforsch.* 47c: 10–16.

Mokwelu, Onyinye Vivian. 2019. “Bioassay Guided Fractionation Of Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor Compound From *Hypericum perforatum*.” Western Cape. <http://hdl.handle.net/11394/6975>.

Mustafa Akin and Neslihan Saki. 2019. “Antimicrobial, DPPH Scavenging and Tyrosinase Inhibitory Activities of *Thymus vulgaris*, *Helichrysum arenarium* and *Rosa damascena* Mill. Ethanol Extracts by Using TLC Bioautography and Chemical Screening Methods.” *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* 42 (7–8): 204–16. <https://doi.org/10.1080/10826076.2019.1591977>.

Percival B. Legoale, Mahlori J. Mashimbye and Teunis van Ree. 2013. “Antiinflammatory and Antioxidant Flavonoids from *Helichrysum kraussii* and *H. odoratissimum* Flowers.” *Natural Product Communications* 8 (10): 1403–4.

Pljevljakušić, Dejan, Dubravka Bigović, Teodora Janković, Slavica Jelačić, and Katarina Šavikin. 2018. “Sandy Everlasting (*Helichrysum arenarium* (L.) Moench): Botanical, Chemical and Biological Properties.” *Frontiers in Plant Science* 9 (August 1123): 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01123>.

Popoola, Olugbenga K., Jeanine L. Marnewick, Fanie Rautenbach, Farouk Ameer, Emmanuel I. Iwuoha,

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

- and Ahmed A. Hussein. 2015. "Inhibition of Oxidative Stress and Skin Aging-Related Enzymes by Prenylated Chalcones and Other Flavonoids from *Helichrysum teretifolium*." *Molecules* 20 (4): 7143–55. <https://doi.org/10.3390/molecules20047143>.
- R. Hansel, B. Cubukcu. 1972. "3,5-Dihydroxy-6,7,8-Trimethoxyflavon Aus Helzchr Ysum Graveolens." *Phytochemistry* 11: 2632.
- Rios, J. L., M. C. Recio, and A. Villar. 1991. "Isolation and Identification of the Antibacterial Compounds from *Helichrysum stoechas*." *Journal of Ethnopharmacology* 33 (1–2): 51–55. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(91\)90160-F](https://doi.org/10.1016/0378-8741(91)90160-F).
- Strzępek-Gomółka, Marcelina, Katarzyna Gaweł-Bęben, Apostolis Angelis, Beata Antosiewicz, Zuriyadda Sakipova, Kaldanay Kozhanova, Kazimierz Głowniak, and Wirginia Kukula-Koch. 2021. "Identification of Mushroom and Murine Tyrosinase Inhibitors from *Achillea biebersteinii* Afan. Extract." *Molecules* 26 (4). <https://doi.org/10.3390/molecules26040964>.
- Svetolik Maksimovic, Vanja Tadic, Dejan Skala, Irena Zizovic. 2007. "Separation of Phytochemicals from *Helichrysum italicum*: An Analysis of Different Isolation Techniques and Biological Activity of Prepared Extracts." *Phytochemistry* 138: 9–28. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.01.001>.
- Tagliatela-Scafati, Orazio, Federica Pollastro, Giuseppina Chianese, Alberto Minassi, Simon Gibbons, Warunya Arunotayanun, Blessing Mabebie, Mauro Ballero, and Giovanni Appendino. 2013. "Antimicrobial Phenolics and Unusual Glycerides from *Helichrysum italicum* Subsp. *microphyllum*." *Journal of Natural Products* 76 (3): 346–53. <https://doi.org/10.1021/np3007149>.
- Timothy M. LeJeune, Hei Yin Tsui, Laura B. Parsons, Gerald E. Miller, Crystal Whitted, Kayla E. Lynch, Robert E. Ramsauer, Jasmine U. Patel, Jarrett E. Wyatt, Doris S. Street, Carolyn B. Adams, Brian McPherson, Hei Man Tsui, Julie A. Evans, Christopher Li, Victoria E. Palau. 2015. "Mechanism of Action of Two Flavone Isomers Targeting Cancer Cells with Varying Cell Differentiation Status." *PLoS ONE* 10 (11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142928>.
- Tomás-Lorente, Francisco, Esther Iniesta-Sanmartín, Francisco A. Tomás-Barberán, Wolfram Trowitzsch-Kienast, and Victor Wray. 1989. "Antifungal Phloroglucinol Derivatives and Lipophilic Flavonoids from *Helichrysum decumbens*." *Phytochemistry* 28 (6): 1613–15. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)97809-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)97809-9).
- Wu, Yan Qi, Ya Li, Xian Feng Lin, Zhong Li Liu, and Yu Li. 2003. "Phenolic Compounds from *Anaphalis aureo-*

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μελέτη μη πτητικών μεταβολιτών από βιολογική καλλιέργεια του *Helichrysum amorginum* στην Αμοργό και *in vitro* αποτίμηση βιοδραστικότητας.

punctata.” *Pharmazie* 58 (11): 833–35. <https://doi.org/10.1002/chin.200410182>.

Yang, Yi, Yun Huang, Dongyu Gu, Abulimiti Yili, Gulnar Sabir, and Haji Akber Aisa. 2009. “Separation and Purification of Three Flavonoids from *Helichrysum arenarium* (L.) Moench by HSCCC.” *Chromatographia* 69 (9–10): 963–67. <https://doi.org/10.1365/s10337-009-0986-2>.

Zenon Weglarz, Olga Kosakowska, Ewelina Pióro-Jabrucka, Jarosław L. Przybył, and Katarzyna Barbara Baczek Małgorzata Gniewosz, Karolina Krasniewska, Marek S. Szyndel, Rosaria Costa. 2022. “Antioxidant and Antibacterial Activity of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don. from Central Europe.” *Pharmaceuticals* 15: 735. <https://doi.org/10.3390/ph15060735>.

Zhuan-Hong Li, Han Guo, Wen-Bin Xu, Juan Ge, Xin Li, and and Da-Jun He Mireguli Alimu. 2016. “Rapid Identification of Flavonoid Constituents Directly from PTP1B Inhibitive Extract of Raspberry (*Rubus idaeus* L.) Leaves by HPLC–ESI–QTOF–MS–MS.” *Journal of Chromatographic Science* 54 (5): 805–10. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmw016>.

ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Στο **κεφάλαιο 1** της παρούσας διατριβής έγινε μία εισαγωγή στην οικογένεια Asteraceae και στο γένος *Helichrysum* όπου περιγράφηκαν βιβλιογραφικά η φυτοχημεία και οι φαρμακολογικές ιδιότητες των μελών του γένους. Κατόπιν γίνεται αναφορά σχετικά με τα μέλη του γένους στην Ευρώπη και αναφέρονται δύο αντιπροσωπευτικά του είδη με ευρεία εξάπλωση τα *H. italicum* και *H. stoechas*. Στη συνέχεια, ακολούθησε μία αναλυτική περιγραφή των 11 ιθαγενή taxa (είδη και υποείδη) του γένους που αυτοφύονται στην Ελλάδα μεταξύ των οποίων και πέντε ενδημικά.

Στο **κεφάλαιο 2** πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά η ποιοτική ανάλυση 11 μεθανολικών εκχυλισμάτων των 11 taxa του γένους *Helichrysum* που αυτοφύονται στην Ελλάδα μετά από συλλογή δρογών στο φυσικό περιβάλλον. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με την τεχνική UPLC-HRMS με την οποία ήταν εφικτό να προσδιοριστούν δευτερογενείς μεταβολίτες μέσω σύγκρισης με βιβλιογραφικά δεδομένα, να ταξινομηθούν σε κατηγορίες, και να σχολιαστούν στα είδη που μελετήθηκαν.

Εν συνεχεία στα κεφάλαια 3, 4 και 5 παρουσιάστηκε η πολύπλευρη μελέτη του στενοενδημικού είδους *H. amorginum*. Στο **κεφάλαιο 3** πραγματοποιείται για πρώτη φορά η ποιοτική ανάλυση αιθέριων ελαίων με την τεχνική GC-MS από 9 *ex situ* καλλιεργούμενους γονότυπους *H. amorginum* με σκοπό την εξαγωγή συμπερασμάτων για την σύστασή τους αλλά και τον εντοπισμό ποιοτικών διαφορών ανά γονότυπο με στατιστικές μεθόδους.

Στο **κεφάλαιο 4** πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά η μελέτη του μεταβολομικού προφίλ 62 μεθανολικών εκχυλισμάτων που προέρχονται από 19 *ex situ* καλλιεργούμενους γονότυπους *H. amorginum* με την τεχνική UPLC-HRMS. Η μελέτη αφορούσε στις ποιοτικές διαφορές της σύστασης των εκχυλισμάτων σε μη πτητικούς μεταβολίτες, οι οποίες οφείλονται στα διαφορετικά στάδια ανάπτυξης και εποχιακή ποικιλιότητα των γονότυπων.

Στο **κεφάλαιο 5** πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά η ποιοτική ανάλυση εκχυλισμάτων αυξανόμενης πολικότητας με τις τεχνικές GC-MS, UPLC-HRMS σε υπέργειο μέρος *H. amorginum* από βιολογική καλλιέργεια στην Αμοργό, που αποτελεί την περιοχή καταγωγής του. Επίσης, αναπτύχθηκαν πρωτόκολλα κλασματοποίησης μεθανολικού και διχλωρομεθανικού εκχυλίσματος ταξιανθιών *H. amorginum* βιολογικής καλλιέργειας από τα οποία χαρακτηρίστηκαν με φασματομετρικές και φασματοσκοπικές μεθόδους 15 μεταβολίτες που αποτελούν πρώτες αναφορές για το είδος *H. amorginum*. Συγκεκριμένα, ταυτοποιήθηκαν 6 φλαβονοειδή, ένα φθαλίδιο, μία αλδεΐδη, ένας εστέρας γλυκερόλης, ένα διμερές παράγωγο βενζοϊκού οξέως, μία λακτόνη, μία κουμαρίνη, και τρία ετεροδιμερή πυρόνης-φλορογλουσινόλης. Από τα τρία ετεροδιμερή, οι μεταβολίτες **13**: 3-[3-benzoyl-2,4,6-trihydroxy-5-(3-methylbut-2-en-1-yl)benzyl]-6-ethyl-4-hydroxy-5-methyl-2H-pyran-2-one και **15**: 3-(3-benzoyl-2,4,6-trihydroxy-5-(2-hydroxy-3-methylbut-3-en-1-yl)benzyl)-6-ethyl-4-hydroxy-5-methyl-2H-pyran-2-one

αποτελούν νέα φυσικά προϊόντα. Τέλος, στο κεφάλαιο 5 έγινε *in vitro* αποτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης με την μέθοδο DPPH και της ικανότητας αναστολής του ενζύμου τυροσινάση σε εκχυλίσματα αυξανόμενης πολικότητας *H. amorginum*, όπου δεν παρατηρήθηκαν αξιοσημείωτες δράσεις.

Μελλοντικοί στόχοι και προοπτικές της παρούσας έρευνας αφορούν:

- Στην απομόνωση μεγαλύτερης ποσότητας αιθέριου ελαίου *H. amorginum* με σκοπό την απομόνωση και ταυτοποίηση των κύριων πτητικών μεταβολιτών με φασματοσκοπικές μεθόδους (NMR) και χρωματογραφία GC-MS.
- Στην διεξαγωγή ειδικών μεταβολομικών μελετών σε εκχυλίσματα *H. amorginum* με φασματοσκοπικές μεθόδους (NMR).
- Στην πιο διεξοδική φυτοχημική μελέτη του διχλωρομεθανικού εκχυλίσματος *H. amorginum* από ταξιανθίες ή/και στελέχη.
- Στην πιο διεξοδική μελέτη της βιοδραστικότητας εκχυλισμάτων και κλασμάτων του *H. amorginum*.
- Στην μελέτη όλων των ανωτέρω σε άλλα είδη ελίχρυσων ελληνικής προέλευσης, με προτεραιότητα στα ενδημικά είδη.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Παράρτημα Κεφαλαίου 2



Εικόνα Π2.1: (H1) *Helichrysum amorginum* Boiss. & Orph. (HA_2013). Κάτω: Αυτοφυές υποκείμενο στο φυσικό του ενδιαίτημα (2011), Άνω αριστερά: Ταξιανθίες (2013), Άνω δεξιά: Αλεσμένα ανθοφόρα στελέχη (2013). Φωτογράφιση: Ι. Σαμανίδης



Εικόνα Π2.2: (H2) *Helichrysum doerfleri* Rech. f. (HD_2019). Άνω: Αυτοφυές άτομο στο φυσικό του ενδιαίτημα (2019), Κάτω: Υπέργειο μέρος (2019). Φωτογράφιση: Ι. Σαμανίδης



Εικόνα Π2.3: (H3) *Helichrysum heldreichii* Boiss. (HHa_2019). Αριστερά: Αυτοφυές άτομο στο φυσικό του ενδιαίτημα (2019), Δεξιά: Ταξιανθία κόρυμβος με κεφάλια (2019). Φωτογράφιση: Ι. Σαμανίδης



Εικόνα Π2.4: (H4) *Helichrysum italicum* (Roth.) G. Don subsp. *italicum* (HIIa_2018). Άνω αριστερά: Ταξιανθίες κόρυμβος με επιμέρους κεφάλια (2018), Άνω δεξιά: Ταξιανθία, κεφάλιο (2018), Κάτω: Υπέργειο μέρος (2018). Φωτογράφιση: Ι. Σαμανίδης



Εικόνα Π2.5: (H5) *Helichrysum italicum* subsp. *microphyllum* (Willd.) Nyman (HIM_2019). Άνω αριστερά: Αυτοφυή άτομα στο φυσικό τους ενδιαίτημα (2019), Άνω δεξιά: Υπέργειο μέρος (2019), Κάτω: Στελέχη με κόρυμβο και επιμέρους κεφάλια (2019). Φωτογράφιση: Ι. Σαμανίδης



Εικόνα Π2.6: (H6) *Helichrysum luteoalbum* (L.) Rchb. (HL_2020). Αριστερά: Υπέργειο μέρος (2020), Δεξιά: Στελέχη με κόρυμβο και επιμέρους κεφάλια(2020). Φωτογράφιση: Ι. Σαμανίδης



Εικόνα Π2.7: (H7) *Helichrysum orientale* (L.) Vaill. (HOK_2018). Άνω: Στελέχη με κόρυμβο και επιμέρους κεφάλια (2018), Κάτω: Ταξιανθία, κεφάλιο με θράκτια (2018). Φωτογράφιση: Ι. Σαμανίδης



Εικόνα Π2.8: (H8) *Helichrysum plicatum* DC (HPv_2020). Άνω: Κόρυμβος με επιμέρους κεφάλια (2020), Κάτω: Υπέργειο μέρος (2020). Φωτογράφιση: Ι. Σαμανίδης



Εικόνα Π2.9: (H9) *Helichrysum sibthorpii* Rouy (HS_2019). Άνω: Αυτοφυές άτομο στο φυσικό του ενδιαίτημα (2019), Κάτω: Υπέργειο μέρος (2019).
Φωτογράφιση: Γ. Κοφινάς-Καλλέργης



Εικόνα Π2.10: (H10) *Helichrysum stoechas* subsp. *barrelieri* (Ten.) Nyman (HSBr_2016). Άνω αριστερά: Αυτοφυή άτομα στο φυσικό τους ενδιαίτημα (2016), Άνω δεξιά: Υπέργειο μέρος (2016), Κάτω: Κόρυμβος με επιμέρους κεφάλια (2016). Φωτογράφιση: Ι. Σαμανίδης



Εικόνα Π2.11: (H11) *Helichrysum taenari* Rothm (HT_2019). Αριστερά: Αυτοφυές άτομο στο φυσικό του ενδιαίτημα (2019), Δεξιά: Κόρυμβος με επιμέρους κεφάλια (2019). Φωτογράφιση: Ι. Σαμανίδης



Εικόνα Π2.12: Σύγκριση ταξιανθιών (κεφάλια) *H. stoechas* subsp. *barrelieri* (αριστερά, 2016) και *H. italicum* subsp. *italicum* (δεξιά, 2018) σε παρόμοιο στάδιο ωρίμανσης. *H. stoechas* subsp. *barrelieri*: Καμπανοειδής μορφή ταξιανθίας, *H. italicum* subsp. *italicum*: Μικρότερη κυλινδρική μορφή ταξιανθίας. Φωτογράφιση: Ι. Σαμανίδης

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας Π2.1: Αποδόσεις εκχυλίσεων 11 δρογών ελληνικών ελίχρυσων που χρησιμοποιήθηκαν για την LC-HRMS ανάλυση

Hx	Είδος	Κωδικός δείγματος	Προέλευση	Βάρος δρόγης (υπέργριο μέρος) mg	Άδειο vial (g)	Μικτό βάρος (g)	Καθαρό βάρος μεθανολικού εκχυλίσματος (g)	Απόδοση (% w/w)
H1	<i>H. amorginum</i>	HA_2013	Αμοργός	220	14,3074	14,3963	0,0889	40,41
H2	<i>H. doerfleri</i>	HD_2019	Όρος Θρυπτής (Κρήτη)	240	14,3384	14,3840	0,0456	19
H3	<i>H. heldreichii</i>	HHa_2019	Φαράγγι Αράδαινας (Κρήτη)	220	14,1846	14,2300	0,0454	20,64
H4	<i>H. italicum subsp. italicum</i>	HIIa_2018	Αμοργός	210	14,3274	14,3840	0,0566	26,95
H5	<i>H. italicum subsp. microphyllum</i>	HIM_2019	Σφακιά (Κρήτη)	210	14,2811	14,3337	0,0526	25,05
H6	<i>H. luteoalbum</i>	HL_2020	Όρος Πάρωνας (Πελοπ.)	210	14,4002	14,4154	0,0152	7,24
H7	<i>H. orientale</i>	HOa_2018	Κύθηρα	320	14,2622	14,3735	0,1113	34,78
H8	<i>H. plicatum</i>	HPv_2020	Όρος Βαρνούντας (Φλώρινα)	260	14,3596	14,4404	0,0808	31,08
H9	<i>H. sibthorpii</i>	HS_2019	Όρος Άθως (Αγ. Όρος)	230	14,2288	14,2520	0,0232	10,09
H10	<i>H. stoechas subsp. barrelieri</i>	HSBr_2016	Ρόδος	240	14,4118	14,4831	0,0713	29,71
H11	<i>H. taenari</i>	HT_2019	Ακρ. Ταίναρο (Πελοπ.)	220	14,3349	14,4375	0,1026	46,6

Πίνακας Π2.2: (H1) HA_2013, Χρωματογραφικά και φασματομετρικά δεδομένα LC-HRMS ανάλυσης μεθανολικού εκχυλίσματος *Helichrysum amorginum*

No	Rt (min)	EC [M-H] ⁺ / [M+H] ⁺	RDB	IM	Experimental m/z	Theoretical m/z	Δm (ppm)	Μεταβολίτης	Fragments MSMS	Αναφορά
1	0,95	C ₄ H ₅ O ₅	2,5	neg	133,0138	133,0142	-3,282	Malic acid	-	(Wang et al. 2017)
2	4,34	C ₇ H ₅ O ₃	5,5	neg	137,024	137,0244	-2,9	p-Benzoic acid	-	(Gokhan Zengin et al. 2020)
3	4,44	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	8,5	neg	353,0867	353,0878	-3,215	Caffeoylquinic acid 3	191, 179, 161, 135	(Kramberger et al. 2020)
4	4,7	C ₁₈ H ₂₃ O ₁₂	7,5	neg	431,1181	431,1195	-3,176	Licoagroside B	-	(Gampe et al. 2019, Li et al. 2000, Morikawa et al. 2009)
5	4,89	C ₉ H ₇ O ₄	6,5	neg	179,0344	179,035	-3,195	Caffeic acid	-	(Nayane B. M. Sinosaki et al. 2020)
6	4,93	C ₁₉ H ₂₇ O ₁₂	6,5	neg	447,149	447,1508	-3,912	unknown	-	-
7	4,94	C ₁₈ H ₂₅ O ₁₀	6,5	neg	401,1439	401,1453	-3,565	unknown	-	-
8	5,79	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	12,5	neg	463,0866	463,0882	-3,432	Quercetin glycoside 2	-	(Gokhan Zengin et al. 2020)
9	6	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₂	14,5	neg	515,1176	515,1195	-3,784	Dicaffeoylquinic acid 2	-	(Kramberger et al. 2020)
10	6,16	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	12,5	neg	447,0912	447,0933	-4,618	Kaempferol-3-O-glucoside	327, 285, 284, 283, 255, 227, 211, 181, 175	(Francescato et al. 2013)
11	6,66	C ₉ H ₁₅ O ₄	2,5	neg	187,0969	187,0976	-3,753	unknown	169 [M-H-H ₂ O] ⁺ , 125 [M-H-H ₂ O-CO ₂] ⁺	-
12	6,75	C ₂₃ H ₂₁ O ₁₂	13,5	neg	489,1019	489,1038	-3,924	Kaempferol acetylglucoside	447, 285, 284, 255, 227	(Kramberger et al. 2020)
13	6,78	C ₂₆ H ₂₉ O ₁₃	12,5	neg	549,1595	549,1614	-3,303	Desmethylyangonine-4'-O-(6"-O-(3-hydroxy-3-methyl)glutaryl)-β-D-glucopyranoside	-	(D'Abrosca et al. 2013)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

14	6,82	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₄	18,5	neg	609,1229	609,125	-3,478	Kaempferol dihexoside 1	447 [M-H-hexose] ⁻ , 285 [M-H-2hexose] ⁻	-
15	7,08	C ₂₉ H ₂₇ O ₁₄	16,5	neg	599,1386	599,1406	-3,369	Kaempferol or luteolin derivative	-	-
16	7,17	C ₂₁ H ₂₇ O ₉	8,5	neg	423,1644	423,1661	-3,912	unknown	-	-
17	7,26	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₃	18,5	neg	593,128	593,1301	-3,497	Tiliroside	447, 307, 285	(Felipe et al. 2014)
18	7,44	C ₁₅ H ₉ O ₆	11,5	neg	285,0396	285,0405	-2,986	Luteolin	-	(Gokhan Zengin et al. 2020)
19	7,53	C ₁₅ H ₉ O ₇	11,5	neg	301,0344	301,0354	-3,375	Quercetin	-	(Brito et al. 2014)
20	7,62	C ₃₀ H ₂₉ O ₁₄	16,5	neg	613,1543	613,1563	-3,227	Kaempferol glycoside	459, 447, 297, 285, 284	-
21	7,68	C ₃₂ H ₂₇ O ₁₅	19,5	neg	651,1334	651,1355	-3,353	Kaempferol-3-O-sophoroside-7-O-glucoside	609, 285	(Francescato et al. 2013)
22	8,12	C ₁₅ H ₉ O ₅	11,5	neg	269,0447	269,0455	-3,11	Apigenin	225, 201, 151	(Brito et al. 2014)
23	8,27	C ₃₂ H ₂₇ O ₁₄	19,5	neg	635,1385	635,1406	-3,367	Kaempferol-3-O-[6"-O-(trans-p-coumaroyl)-3"-O-acetyl]-β-D-glucopyranoside	285	(Wu et al. 2003)
24	8,31	C ₁₅ H ₉ O ₆	11,5	neg	285,0396	285,0405	-3,197	Kaempferol	-	-
25	8,66	C ₁₈ H ₃₃ O ₅	2,5	neg	329,2321	329,2333	-3,728	C18 Trihydroxy fatty acid 2	229, 211, 171	(Jingya Ruan et al. 2019)
26	8,96	C ₂₁ H ₂₅ O ₈	9,5	neg	405,1542	405,1555	-3,088	unknown	-	-
27	9,14	C ₁₈ H ₂₃ O ₇	7,5	neg	351,1441	351,1449	-2,353	unknown	-	-
28	9,96	C ₁₈ H ₁₇ O ₈	10,5	pos	361,0916	361,0929	-0,509	Methylated flavonoid 6	346 [M+H-CH ₃] ⁺ , 331 [M+H-2CH ₃] ⁺	-
29	10,42	C ₁₇ H ₂₅ O ₄	5,5	neg	293,1749	293,1758	-3,283	Terpene 1	236, 221	(Ahmed Serag et al. 2020)
30	10,56	C ₁₇ H ₂₅ O ₃	5,5	pos	277,1799	277,1809	0,176	Terpene 2	235, 221	-
31	12	C ₁₈ H ₁₇ O ₇	10,5	pos	345,0967	345,098	-0,404	Methylated flavonoid 15	330 [M+H-CH ₃] ⁺ , 315 [M+H-2CH ₃] ⁺	-
32	12,95	C ₁₇ H ₃₄ O ₅	1	pos	318,2404	318,2412	0,894	C17 Hydroxy fatty acid 2	-	(Emmanuel Ayobami Makinde et al. 2020)
33	15,64	C ₂₅ H ₃₁ O ₈	10,5	neg	459,201	459,2024	-3,095	Pyrone derivative 4	153	-
34	15,69	C ₂₂ H ₂₃ O ₇	11,5	neg	399,1436	399,1449	-3,348	Italipyrone	-	-
35	15,8	C ₃₃ H ₃₇ O ₁₁	15,5	neg	609,2319	609,2341	-3,718	unknown	-	-
36	15,9	C ₂₇ H ₂₅ O ₇	15,5	neg	461,1589	461,1606	-3,548	Pyrone derivative 5	153	-
37	15,99	C ₂₇ H ₃₁ O ₉	12,5	neg	499,1953	499,1974	-4,098	unknown	-	-
38	16,47	C ₂₃ H ₂₅ O ₇	11,5	neg	413,1589	413,1606	-3,961	Pyrone derivative 7	153	-
39	16,6	C ₃₄ H ₃₉ O ₁₁	15,5	neg	623,2475	623,2498	-3,667	unknown	469, 457, 443, 375, 333, 289, 247, 221	-

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας Π2.3: (H2) HD_2019, Χρωματογραφικά και φασματομετρικά δεδομένα LC-HRMS ανάλυσης μεθανολικού εκχυλίσματος *Helichrysum doerfleri*

No	Rt (min)	EC [M-H] ⁻ / [M+H] ⁺	RDB	IM	Experimental m/z	Theoretical m/z	Δm (ppm)	Μεταβολίτης	Fragments MSMS	Αναφορά
1	0,86	C ₇ H ₁₁ O ₆	2,5	neg	191,0556	191,0561	-2,833	Quinic acid	173, 171, 127	(Sandra Gouveia 2011a)
2	1	C ₄ H ₅ O ₅	2,5	neg	133,0138	133,0142	-3,658	Malic acid	115	(Wang et al. 2017)
3	2,39	C ₁₂ H ₂₁ O ₉	2,5	neg	309,1181	309,1191	-3,253	Disaccharide 1	263 [M-H-CH ₂ O ₂] ⁻	(Dairpoosh 2011)
4	4	C ₁₅ H ₁₇ O ₉	7,5	neg	341,0866	341,0878	-3,592	Caffeoyl hexoside	179 [M-H-hexosyl] ⁻ , 135 [M-H-hexosyl-CO ₂] ⁻	(Romero et al. 2020)
5	4,48	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	8,5	neg	353,0863	353,0878	-4,348	Caffeoylquinic acid 3	191, 179, 173, 161, 135	(Kramberger et al. 2020)
6	4,93	C ₉ H ₇ O ₄	6,5	neg	179,0344	179,035	-3,307	Caffeic acid	161, 135, 109	(Nayane B. M. Sinosaki et al. 2020)
7	5,37	C ₁₇ H ₁₉ O ₉	8,5	neg	367,1021	367,1035	-3,665	5-O-Feruloylquinic acid	191, 173, 134	(Marisa R. Barroso et al. 2014)
8	5,5	C ₁₀ H ₁₁ O ₇	5,5	neg	243,0502	243,051	-3,439	unknown	228 [M-H-CH ₃] ⁻	-
9	5,82	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	12,5	neg	463,0865	463,0882	-3,756	Quercetin glycoside 2	301, 300, 273, 179, 151	(Gokhan Zengin et al. 2020)
10	6,1	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₂	14,5	neg	515,1178	515,1195	-3,299	Dicaffeoylquinic acid 2	353, 203, 191, 179, 173, 135	(Kramberger et al. 2020)
11	6,19	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	12,5	neg	447,0916	447,0933	-3,745	Kaempferol-3-O-glucoside	327, 285, 284, 255, 227, 211, 181, 175	(Francescato et al. 2013)
12	6,45	C ₂₃ H ₂₁ O ₁₂	13,5	neg	489,1022	489,1038	-3,372	Kaempferol-O-acetylhexoside	429, 327, 285, 284, 255, 213, 151	(Abdel-Hady et al. 2018)
13	6,68	C ₉ H ₁₅ O ₄	2,5	neg	187,0969	187,0976	-3,7	unknown	169 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 125 [M-H-H ₂ O-CO ₂] ⁻	-
14	6,84	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₄	18,5	neg	609,1226	609,125	-3,872	Kaempferol dihexoside 1	447 [M-H-hexose] ⁻ , 285 [M-H-2hexose] ⁻	-
15	7,15	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₅	18,5	neg	625,1174	625,1199	-3,94	Quercetin-7-O-(caffeoyl)-hexoside	463, 445, 323, 301, 273, 257, 179	(Gokhan Zengin et al. 2020)
16	7,25	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₃	18,5	neg	593,1274	593,1301	-4,424	Tiliroside	447, 307, 285	(Felipe et al. 2014)
17	7,52	C ₁₅ H ₉ O ₇	11,5	neg	301,0344	301,0354	-3,275	Quercetin	178, 151	(Brito et al. 2014)
18	7,7	C ₃₂ H ₂₇ O ₁₅	19,5	neg	651,1334	651,1355	-3,353	Kaempferol-3-O-sophoroside-7-O-glucoside	609, 285	(Francescato et al. 2013)
19	8,19	C ₃₂ H ₂₇ O ₁₄	19,5	neg	635,138	635,1406	-4,139	Kaempferol-3-O-[6''-O-(trans-p-coumaroyl)-3''-O-acetyl]-β-D-glucopyranoside	285	(Wu et al. 2003)
20	8,68	C ₁₈ H ₃₃ O ₅	2,5	neg	329,2321	329,2333	-3,819	C18 Trihydroxy fatty acid 2	229, 211, 171	(Jingya Ruan et al. 2019)
21	8,9	C ₁₆ H ₃₁ O ₄	1,5	neg	287,222	287,2228	-2,551	3,5-Dihydroxy-hexadecanoic acid	-	(Wang et al. 2017)
22	9,48	C ₁₇ H ₁₅ O ₈	10,5	neg	347,0761	347,0772	-3,258	unknown	-	-
23	9,73	C ₂₂ H ₂₃ O ₄	11,5	neg	351,1589	351,1602	-3,538	Prenylated polyphenol	282 [M-H-prenyl] ⁻	-
24	10,26	C ₁₈ H ₁₇ O ₈	10,5	pos	361,0916	361,0918	-0,675	Methylated flavonoid 8	346 [M+H-CH ₃] ⁺ , 331 [M+H-2CH ₃] ⁺	-

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

25	10,42	C ₁₇ H ₂₅ O ₄	5,5	neg	293,175	293,1758	-2,669	Terpene 1	236, 221	(Ahmed Serag et al. 2020)
26	10,85	C ₁₇ H ₂₅ O ₃	5,5	pos	277,1796	277,1798	-0,69	Terpene 2	235, 221	-
27	12,3	C ₁₈ H ₁₇ O ₇	10,5	pos	345,0963	345,0969	-1,563	Methylated flavonoid 17	330 [M+H-CH ₃] ⁺ , 315 [M+H-2CH ₃] ⁺	-
28	12,84	C ₁₈ H ₃₁ O ₃	3,5	neg	295,2273	295,2279	-2,06	C18 Hydroxy fatty acid	-	(Ahmed Serag et al. 2020)
29	13,24	C ₁₈ H ₃₁ O ₂	3,5	pos	279,2318	279,2319	-0,06	Linolenic acid	261, 223, 209	(Ahmed Serag et al. 2020)
30	13,34	C ₁₇ H ₃₄ O ₅	1	pos	318,2401	318,2401	0,014	C17 Hydroxy fatty acid 2	300 [M+H-H ₂ O] ⁺	-

Πίνακας Π2.4: (H3) ΗΗα_2019, Χρωματογραφικά και φασματομετρικά δεδομένα LC-HRMS ανάλυσης μεθανολικού εκχυλίσματος *Helichrysum heldreichii*

No	Rt (min)	EC [M-H] ⁻ / [M+H] ⁺	RDB	IM	Experimental m/z	Theoretical m/z	Δm (ppm)	Μεταβολίτης	Fragments MSMS	Αναφορά
1	0,76	C ₇ H ₁₃ O ₈	1,5	neg	225,0608	225,0605	-3,691	Glucosylheptonic acid	179	(Brieudes et al. 2016)
2	0,91	C ₄ H ₅ O ₅	2,5	neg	133,0138	133,0131	-3,508	Malic acid	115	(Wang et al. 2017)
3	2,33	C ₁₃ H ₁₅ O ₉	6,5	neg	315,0711	315,0711	-3,318	Protocatechuic acid O-hexoside	153, 152, 109, 108	(Kramberger et al. 2020)
4	2,47	C ₁₂ H ₂₁ O ₉	2,5	neg	309,1183	309,118	-2,638	Disaccharide 1	263 [M-H-CH ₂ O ₂] ⁻	(Dairpoosh 2011)
5	2,7	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	8,5	neg	353,0868	353,0867	-2,96	Caffeoylquinic acid 1	191, 179, 161, 135	(Kramberger et al. 2020)
6	3,46	C ₁₂ H ₂₁ O ₉	2,5	neg	309,1181	309,118	-3,35	Disaccharide 2	263, 161	(Dairpoosh 2011)
7	3,65	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	8,5	neg	353,0866	353,0867	-3,385	Caffeoylquinic acid 2	191, 179, 173, 161, 135	(Kramberger et al. 2020)
8	4,12	C ₁₅ H ₁₅ O ₉	8,5	neg	339,0709	339,0711	-3,643	6-(β-D-glucopyranosyloxy)-7-hydroxy-2H-1-benzopyran-2-one (aesculin)	177	(Gokhan Zengin et al. 2020)
9	4,28	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₈	13,5	neg	641,1334	641,1348	-4,02	Quercetagenin-3,7-di-O-hexoside	479, 317	(Gokhan Zengin et al. 2020)
10	4,47	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	8,5	neg	353,0861	353,0867	-4,858	Caffeoylquinic acid 3	191, 179, 173, 161, 135	(Kramberger et al. 2020)
11	4,8	C ₉ H ₁₃ O ₅	3,5	neg	201,0761	201,0757	-3,863	unknown	157, 139	-
12	4,86	C ₉ H ₅ O ₄	7,5	neg	177,0187	177,0182	-3,344	Aesculetin	149, 133, 105, 89	(Gokhan Zengin et al. 2020)
13	4,95	C ₉ H ₇ O ₄	6,5	neg	179,0344	179,0339	-3,474	Caffeic acid	135	(Gokhan Zengin et al. 2020)
14	5,04	C ₁₈ H ₂₇ O ₉	5,5	neg	387,1648	387,165	-3,269	unknown	369 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 207, 163	-
15	5,09	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₂	14,5	neg	515,1179	515,1184	-3,182	Dicaffeoylquinic acid 1	353, 203, 191, 179, 173, 161	(Kramberger et al. 2020)
16	5,16	C ₂₀ H ₃₁ O ₁₀	5,5	neg	431,1908	431,1912	-3,48	unknown	385, 223	-
17	5,31	C ₁₇ H ₁₉ O ₉	8,5	neg	367,1024	367,1024	-2,902	5-O-Feruloylquinic acid	191, 173, 134	(Marisa R. Barroso et al. 2014)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

18	5,71	C ₁₅ H ₂₁ O ₈	5,5	neg	329,1229	329,1231	-4,044	unknown	285 [M-H-CO ₂] ⁻ , 229, 179, 155	-
19	5,75	C ₂₇ H ₃₅ O ₁₃	10,5	neg	567,2063	567,2072	-3,551	unknown	521, 359, 341, 329	-
20	5,83	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	12,5	neg	463,0864	463,0871	-3,82	Quercetin glycoside 2	301, 300, 179, 151	(Kramberger et al. 2020)
21	5,9	C ₁₀ H ₁₁ O ₅	5,5	neg	211,0604	211,0601	-3,822	unknown	167 [M-H-CO ₂] ⁻ , 123 [167-CO ₂] ⁻	-
22	6,16	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₂	14,5	neg	515,1171	515,1184	-4,6	Dicaffeoylquinic acid 3	353, 203, 191, 179, 173	(Kramberger et al. 2020)
23	6,49	C ₂₅ H ₂₅ O ₁₁	13,5	neg	501,1385	501,1391	-3,541	unknown	339, 323, 177	-
24	6,6	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	12,5	neg	463,0866	463,0871	-3,82	Quercetin glycoside 3	301, 179, 151	(Kramberger et al. 2020)
25	6,71	C ₉ H ₁₅ O ₄	2,5	neg	187,0969	187,0965	-3,86	unknown	169 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 125 [M-H-H ₂ O-CO ₂] ⁻	-
26	6,8	C ₂₆ H ₂₅ O ₁₂	14,5	neg	529,1333	529,1341	-3,495	Dicaffeoylquinic acid methyl ester	367, 353, 191, 179, 173	(Pereira et al. 2017)
27	6,83	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₁	14,5	pos	499,1233	499,1235	-0,457	unknown	319, 163	-
28	6,9	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₄	18,5	neg	609,1225	609,1239	-4,069	Quercetin coumaroylglucoside	463, 301, 300, 255	(Kramberger et al. 2020)
29	6,95	C ₁₅ H ₂₁ O ₆	5,5	pos	297,1331	297,1333	-0,487	unknown	279 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 223	-
30	7,07	C ₂₂ H ₂₃ O ₉	11,5	neg	431,1333	431,1337	-3,306	unknown	387 [M-H-CO ₂] ⁻ , 179, 161	-
31	7,09	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₅	18,5	neg	625,1174	625,1188	-3,94	Quercetin-7-O-(caffeoyl)-hexoside	463, 445, 323, 301, 273, 257, 179	(Gokhan Zengin et al. 2020)
32	7,19	C ₂₃ H ₂₅ O ₁₀	18,5	neg	461,1437	461,1442	-3,427	unknown	179, 161	-
33	7,38	C ₃₀ H ₂₉ O ₁₅	16,5	neg	629,1483	629,1501	-4,678	Quercetin coumaroylglucoside analogue	463, 301	(Kramberger et al. 2020)
34	7,45	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₄	18,5	neg	609,1223	609,1239	-4,381	Kaempferol dihexoside 3	463, 447, 323, 285	(Kramberger et al. 2020)
35	7,5	C ₁₅ H ₉ O ₇	11,5	neg	301,0342	301,0343	-3,973	Quercetin	283, 257, 179, 51, 107	(Gokhan Zengin et al. 2020)
36	7,57	C ₂₃ H ₂₅ O ₉	11,5	neg	445,1487	445,1493	-3,944	unknown	401 [M-H-CO ₂] ⁻ , 179, 161	-
37	7,62	C ₁₆ H ₁₉ O ₆	7,5	neg	307,1176	307,1176	-3,457	unknown	289 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 195, 167	-
38	7,89	C ₂₆ H ₂₇ O ₁₂	13,5	neg	531,1489	531,1497	-3,52	unknown	487 [M-H-CO ₂] ⁻ , 341, 203	-
39	7,94	C ₁₃ H ₁₅ O ₃	6,5	pos	219,1015	219,1016	-0,635	unknown	201 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 183, 159	-
40	8,1	C ₁₆ H ₂₁ O ₆	6,5	pos	309,1329	309,1333	-1,083	unknown	291 [M+H-H ₂ O] ⁺	-
41	8,26	C ₁₈ H ₃₁ O ₅	3,5	neg	327,2163	327,2166	-4,148	C18 Trihydroxy fatty acid 1	309, 291, 229, 211, 171	(Ahmed Serag et al. 2020)
42	8,33	C ₁₅ H ₉ O ₆	11,5	neg	285,0394	285,0394	-3,723	Kaempferol	285, 257, 241, 229, 213, 185, 151, 107, 93	(Chen et al. 2016)
43	8,34	C ₁₅ H ₂₁ O ₅	5,5	pos	281,1381	281,1384	-0,926	unknown	263 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 235	-
44	8,41	C ₁₉ H ₁₅ O ₈	12,5	neg	371,0757	371,0761	-4,206	unknown	353 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 327, 283	-

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

45	8,46	C ₁₆ H ₂₃ O ₆	5,5	pos	311,1485	311,1489	-1,43	unknown	293 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 279, 265, 237, 155	-
46	8,51	C ₁₅ H ₁₁ O ₅	10,5	neg	271,0604	271,0601	-2,976	Pinobanskin	253 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 225, 191, 151, 125	(Gokhan Zengin et al. 2020)
47	8,55	C ₂₃ H ₂₁ O ₈	13,5	neg	425,1226	425,1231	-3,695	unknown	407 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 311	-
48	8,56	C ₁₇ H ₂₃ O ₇	6,5	pos	339,1434	339,1438	-1,266	unknown	321 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 293	-
49	8,59	C ₁₈ H ₃₃ O ₅	2,5	neg	329,2321	329,2323	-3,819	C18 Trihydroxy fatty acid 3	311 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 229, 211, 171	(Ahmed Serag et al. 2020)
50	8,62	C ₂₀ H ₂₃ O ₇	9,5	neg	375,1437	375,1438	-3,162	Dilignol analogue 1	357 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 331 [M-H-CO ₂] ⁻	(Kris Morreel et al. 2010)
51	8,8	C ₁₇ H ₁₃ O ₆	11,5	neg	313,0706	313,0707	-3,742	unknown	295 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 269	-
52	8,9	C ₂₀ H ₂₃ O ₇	9,5	neg	375,1433	375,1438	-4,388	Dilignol analogue 2	357 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 331 [M-H-CO ₂] ⁻	(Kris Morreel et al. 2010)
53	9,02	C ₁₈ H ₁₃ O ₈	12,5	neg	357,0602	357,0605	-3,867	unknown	339 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 313, 298	-
54	9,35	C ₂₀ H ₂₃ O ₆	9,5	pos	359,1487	359,1489	-0,654	unknown	341 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 313	-
55	9,38	C ₂₁ H ₂₅ O ₇	9,5	neg	389,159	389,1595	-4,128	unknown	345 [M-H-CO ₂] ⁻	-
56	9,46	C ₁₉ H ₁₅ O ₈	12,5	neg	371,0757	371,0761	-4,125	unknown	353 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 327, 312	-
57	9,54	C ₁₈ H ₁₅ O ₈	11,5	pos	359,0759	359,0761	-0,763	unknown	341 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 313	-
58	9,56	C ₂₀ H ₂₁ O ₇	10,5	neg	373,1277	373,1282	-4,251	unknown	355 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 329	-
59	9,64	C ₂₁ H ₂₅ O ₇	9,5	neg	389,159	389,1595	-4,128	unknown	345 [M-H-CO ₂] ⁻	-
60	9,72	C ₂₆ H ₃₁ O ₈	11,5	neg	471,2003	471,2013	-4,438	unknown	453 [M-H-H ₂ O] ⁻	-
61	9,9	C ₂₄ H ₂₁ O ₉	14,5	neg	453,1172	453,118	-4,227	unknown	435 [M-H-H ₂ O] ⁻	-
62	9,96	C ₁₈ H ₂₁ O ₅	8,5	neg	317,1382	317,1384	-4,09	unknown	273, 259, 167	-
63	9,99	C ₁₉ H ₁₇ O ₈	11,5	pos	373,0915	373,0918	-0,815	unknown	355 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 327	-
64	10,1	C ₂₆ H ₃₁ O ₈	11,5	neg	471,2005	471,2013	-4,12	unknown	453 [M-H-H ₂ O] ⁻	-
65	10,14	C ₁₉ H ₂₅ O ₈	7,5	pos	381,1541	381,1544	-0,903	unknown	305, 293, 273	-
66	10,22	C ₁₈ H ₂₁ O ₅	8,5	neg	317,138	317,1384	-4,563	unknown	273, 259, 167	-
67	10,25	C ₂₆ H ₃₁ O ₇	11,5	pos	455,2064	455,2064	-0,153	unknown	437 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 335	-
68	10,28	C ₂₅ H ₂₃ O ₉	14,5	neg	467,1333	467,1337	-3,116	unknown	449	-
69	10,34	C ₂₄ H ₂₃ O ₉	13,5	pos	455,1333	455,1337	-0,854	unknown	437 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 313	-
70	10,5	C ₁₇ H ₂₅ O ₄	5,5	neg	293,1748	293,1747	-3,522	Terpene 1	236, 221	(Ahmed Serag et al. 2020)
71	10,76	C ₂₅ H ₂₅ O ₉	13,5	pos	469,149	469,1493	-0,615	unknown	451 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 413, 327	-
72	10,93	C ₁₆ H ₁₃ O ₆	10,5	pos	301,0705	301,0707	-0,547	Methylated flavonoid 11	286 [M+H-CH ₃] ⁺	-

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

73	11,17	C ₁₈ H ₁₇ O ₇	10,5	pos	345,0962	345,0969	-1,911	Methylated flavonoid 13	330 [M+H-CH ₃] ⁺ , 315 [M+H-2CH ₃] ⁺	-
74	11,31	C ₁₇ H ₁₅ O ₆	10,5	pos	315,0858	315,0863	-1,57	Methylated flavonoid 14	300 [M+H-CH ₃] ⁺ , 282 [M+H-CH ₃ -H ₂ O] ⁺	-
75	12,37	C ₁₈ H ₁₇ O ₇	10,5	pos	345,0962	345,0969	-1,997	Methylated flavonoid 17	330 [M+H-CH ₃] ⁺ , 315 [M+H-2CH ₃] ⁺ , 297 [M+H-2CH ₃ -H ₂ O] ⁺	-
76	12,88	C ₁₉ H ₁₉ O ₇	10,5	pos	359,1119	359,1125	-1,725	Methylated flavonoid 20	344 [M+H-CH ₃] ⁺ , 329 [M+H-2CH ₃] ⁺ , 311 [M+H-2CH ₃ -H ₂ O] ⁺	-
77	15,6	C ₂₉ H ₄₀ O	5,5	pos	413,3775	413,3778	-0,635	Triterpene 1	395 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 297, 255, 241	-
78	16,26	C ₂₄ H ₃₅ O ₃	7,5	pos	371,258	371,2581	-0,273	unknown	353 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 167	-
79	16,44	C ₂₉ H ₄₇ O	6,5	pos	411,3618	411,3621	-1,266	Triterpene 2	393 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 327 [M+H-C ₆ H ₁₂] ⁺ , 309	-

Πίνακας Π2.5: (H4) Hlla_2018, Χρωματογραφικά και φασματομετρικά δεδομένα LC-HRMS ανάλυσης μεθανολικού εκχυλίσματος *Helichrysum italicum subsp. italicum*

No	Rt (min)	EC [M-H] ⁻ / [M+H] ⁺	RDB	IM	Experimental m/z	Theoretical m/z	Δm (ppm)	Μεταβολίτης	Fragments MSMS	Αναφορά
1	0,84	C ₇ H ₁₁ O ₆	2,5	neg	191,0554	191,0561	-3,88	Quinic acid	173, 171, 127	(Sandra Gouveia 2011a)
2	0,94	C ₄ H ₅ O ₅	2,5	neg	133,0137	133,0142	-4,41	Malic acid	115	(Wang et al. 2017)
3	2,21	C ₁₃ H ₁₅ O ₉	6,5	neg	315,0711	315,0722	-3,318	Protocatechuic acid -O-hexoside	153, 152, 109, 108	(Kramberger et al. 2020)
4	2,6	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	8,5	neg	353,0865	353,0878	-3,555	Caffeoylquinic acid 1	191, 179, 173, 161, 135	(Kramberger et al. 2020)
5	2,94	C ₇ H ₅ O ₄	5,5	neg	153,0188	153,0193	-3,672	2,4-Dihydroxybenzoic acid	109	(Kramberger et al. 2020)
6	3,48	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	8,5	neg	353,0865	353,0878	-3,64	Caffeoylquinic acid 2	191, 179, 173, 161, 135	(Kramberger et al. 2020)
7	4,05	C ₁₅ H ₁₅ O ₉	8,5	neg	339,071	339,0722	-3,466	Aesculin	177	(Ying-yi Li et al. 2012)
8	4,27	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₃	13,5	neg	477,0659	477,0675	-3,362	unknown	-	-
9	4,36	C ₁₅ H ₁₇ O ₉	7,5	neg	341,0865	341,0878	-3,944	Caffeoyl hexoside	179, 135	(Romero et al. 2020)
10	4,43	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	8,5	neg	353,0862	353,0878	-4,688	Caffeoylquinic acid 3	191, 179, 173, 161, 135	(Kramberger et al. 2020)
11	4,85	C ₉ H ₇ O ₄	6,5	neg	179,0344	179,035	-3,363	Caffeic acid	161, 135	(Nayane B. M. Sinosaki et al. 2020)
12	5,06	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₂	14,5	neg	515,1176	515,1195	-3,668	Dicaffeoylquinic acid 1	353, 203, 191, 179, 173, 161	(Kramberger et al. 2020)
13	5,22	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₃	12,5	neg	479,0814	479,0831	-3,661	Myricetin-3-O-glucoside	317	(Marisa R. Barroso et al. 2014)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

14	5,56	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂	11,5	neg	465,102	465,1038	-3,933	Delphinidin-3-glycoside	303	(Ana María Gómez-Caravaca et al. 2013)
15	5,7	C ₂₄ H ₂₁ O ₁₆	14,5	neg	565,0813	565,0835	-3,907	Myricetin malonylhexoside	521, 317	(Kramberger et al. 2020)
16	5,78	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	12,5	neg	463,0861	463,0882	-4,49	Quercetin glycoside 2	301, 300, 179, 151	(Kramberger et al. 2020)
17	6,11	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₂	14,5	neg	515,117	515,1195	-4,852	Dicaffeoylquinic acid 2	353, 203, 191, 179, 173, 161	(Kramberger et al. 2020)
18	6,22	C ₂₈ H ₂₅ O ₁₅	16,5	neg	601,1172	601,1199	-4,497	Malonyl-dicaffeoylquinic acid	557, 515, 439, 395, 377	(Gokhan Zengin et al. 2020)
19	6,44	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	11,5	neg	449,107	449,1089	-4,33	Eriodictyol-O-hexoside	287, 151, 135	(Kramberger et al. 2020)
20	6,48	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	12,5	neg	463,0864	463,0882	-3,885	Quercetin glycoside 3	301, 179, 151	(Kramberger et al. 2020)
21	6,67	C ₉ H ₁₅ O ₄	2,5	neg	187,0968	187,0976	-4,234	unknown	169 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 125 [M-H-H ₂ O-CO ₂] ⁻	-
22	6,77	C ₂₆ H ₂₅ O ₁₂	14,5	neg	529,1334	529,1351	-3,382	4-Feruloyl-5-caffeoylquinic acid	367, 353, 193	(Kramberger et al. 2020)
23	6,84	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₄	18,5	neg	609,1223	609,125	-4,381	Kaempferol dihexoside 1	463, 447, 323, 285, 241, 229	(Kramberger et al. 2020)
24	7,44	C ₁₅ H ₉ O ₇	11,5	neg	301,0342	301,0354	-3,973	Quercetin	178, 151	(Brito et al. 2014)
25	7,51	C ₂₆ H ₂₉ O ₁₃	12,5	neg	549,1592	549,1614	-3,868	unknown	-	-
26	7,68	C ₂₁ H ₂₇ O ₉	8,5	neg	423,1644	423,1661	-3,842	Hydroxycinnamic acid derivative 1	179 [C ₉ H ₇ O ₄] ⁻ , 161 [C ₉ H ₇ O ₄ -H ₂ O] ⁻	-
27	8,2	C ₁₈ H ₃₁ O ₅	3,5	neg	327,2164	327,2177	-4,056	C18 Trihydroxy fatty acid 1	309 [M-H ₂ O] ⁻ , 291 [M-2H ₂ O] ⁻ , 273 [M-3H ₂ O] ⁻ , 239, 229, 211, 183, 171	(Mariana Rey et al. 2021)
28	8,4	C ₂₅ H ₂₇ O ₁₀	12,5	neg	487,1593	487,161	-3,428	Hydroxycinnamic acid derivative 2	179 [C ₉ H ₇ O ₄] ⁻ , 161 [C ₉ H ₇ O ₄ -H ₂ O] ⁻	-
29	8,64	C ₁₈ H ₃₃ O ₅	2,5	neg	329,232	329,2333	-4,001	C18 Trihydroxy fatty acid 2	311 [M-H ₂ O] ⁻ , 293 [M-2H ₂ O] ⁻ , 275 [M-3H ₂ O] ⁻ , 229, 211, 183, 171	(Mariana Rey et al. 2021)
30	8,8	C ₁₇ H ₁₃ O ₆	11,5	neg	313,0707	313,0718	-3,358	unknown	295 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 269 [M-H-CO ₂] ⁻	-
31	8,87	C ₂₀ H ₂₃ O ₇	9,5	neg	375,1435	375,1449	-3,829	Dilignol analogue 2	357 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 331 [M-H-CO ₂] ⁻	(Kris Morreel et al. 2010)
32	9,93	C ₂₃ H ₂₁ O ₇	13,5	neg	409,1276	409,1293	-4,122	unknown	-	-
33	10,38	C ₁₇ H ₂₅ O ₄	5,5	neg	293,1748	293,1758	-3,522	Terpene 1	236, 221	(Ahmed Serag et al. 2020)
34	10,55	C ₁₇ H ₂₅ O ₃	5,5	pos	277,1797	277,1809	-0,257	Terpene 2	235, 221	-
35	12,89	C ₁₇ H ₃₄ O ₅	1	pos	318,24	318,2412	-0,363	C17 hydroxy fatty acid 2	300 [M+H-H ₂ O] ⁺	-
36	13,9	C ₈ H ₅ O ₃	6,5	pos	149,0235	149,0234	0,869	unknown	121 [M+H-CO] ⁺	-
37	15,16	C ₃₀ H ₄₅ O ₂	8,5	pos	437,3411	437,3425	-0,725	Triterpenic acid 1	395 [M+H-CO ₂] ⁺	-
38	15,57	C ₃₀ H ₄₇ O ₂	7,5	pos	439,357	439,3582	-0,062	Triterpenic acid 2	395 [M+H-CO ₂] ⁺	-

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας Π2.6: (H5) HIM_2019 Χρωματογραφικά και φασματομετρικά δεδομένα LC-HRMS ανάλυσης μεθανολικού εκχυλίσματος *H. italicum subsp. microphyllum*

No	Rt (min)	EC [M-H] ⁻ / [M+H] ⁺	RDB	IM	Experimental m/z	Theoretical m/z	Δm (ppm)	Μεταβολίτης	Fragments MSMS	Αναφορά
1	0,86	C ₇ H ₁₁ O ₆	2,5	neg	191,0554	191,0561	-3,723	Quinic acid	173, 171, 155, 127, 111, 109	(Sandra Gouveia 2011a)
2	0,97	C ₄ H ₅ O ₅	2,5	neg	133,0137	133,0142	-3,733	Malic acid	115	(Wang et al. 2017)
3	2,3	C ₁₃ H ₁₅ O ₉	6,5	neg	315,0711	315,0722	-3,222	Protocatechuic acid -O-hexoside	153, 109	(Kramberger et al. 2020)
4	3,47	C ₇ H ₁₁ O ₅	2,5	neg	175,0607	175,01612	-2,952	2-Isopropyl malic acid	157, 113, 85	(Wang et al. 2017)
5	3,6	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	8,5	neg	353,0867	353,0878	-3,215	Caffeoylquinic acid 2	191, 179, 161, 135	(Kramberger et al. 2020)
6	4	C ₁₅ H ₁₉ O ₉	6,5	neg	343,1023	343,1035	-3,484	Hydroxycinnamic acid derivative	297, 179, 135	-
7	4,38	C ₁₅ H ₁₇ O ₉	7,5	neg	341,0867	341,0878	-3,153	7-O-β-(D-glucopyranosyl)-5-methoxy-1(3H)-isobenzofuranone or 6-O-(β-D-glucopyranosyloxy)-4-methoxy-1(3H)-isobenzofuranone	179 [M-H-hexosyl] ⁻ , 135 [M-H-hexosyl-CO ₂] ⁻	(Alessandro Venditti et al. 2016)
8	4,48	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	8,5	neg	353,0862	353,0878	-4,518	Caffeoylquinic acid 3	191, 179, 135, 111	(Kramberger et al. 2020)
9	4,9	C ₉ H ₇ O ₄	6,5	neg	179,0343	179,035	-3,977	Caffeic acid	161, 135, 107	(Nayane B. M. Sinosaki et al. 2020)
10	5,35	C ₂₀ H ₂₅ O ₁₁	8,5	neg	395,1336	395,1348	-3,026	Gnaphaliol-O-β-D-glucopyranoside as formate adduct 441 [C ₂₀ H ₂₅ O ₁₁] ⁻	395 [M-H-COOH] ⁻ , 215 [395-hexose] ⁻	(Alessandro Venditti et al. 2016, Poolsak Sahakitpichan et al. 2011)
11	5,4	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	12,5	neg	463,0862	463,0882	-4,295	Quercetin glycoside 1	301	(Kramberger et al. 2020)
12	5,7	C ₂₀ H ₂₇ O ₁₀	7,5	neg	427,1596	427,161	-3,255	unknown	381, 363, 219	-
13	5,75	C ₁₂ H ₁₇ O ₄	4,5	neg	225,1125	225,1132	-3,12	Hydroxyjasmonate	207, 181, 151	(Mariusz Kowalczyk et al. 2021)
14	5,8	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	12,5	neg	463,0862	463,0882	-4,231	Quercetin glycoside 2	301	(Kramberger et al. 2020)
15	5,96	C ₂₅ H ₃₃ O ₁₄	9,5	neg	557,1855	557,1876	-3,749	unknown	511	-
16	6,18	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₂	14,5	neg	515,1172	515,1195	-4,483	Dicaffeoylquinic acid 3	353, 317, 299, 255, 203	(Kramberger et al. 2020)
17	6,56	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	12,5	neg	463,0868	463,0882	-3,108	Quercetin glycoside 3	301	(Kramberger et al. 2020)
18	6,78	C ₁₃ H ₁₉ O ₄	4,5	neg	239,1281	239,1289	-3,481	unknown	195 [M-H-CO ₂] ⁻ , 137, 101, 99	-
19	7,2	C ₂₁ H ₂₇ O ₉	8,5	neg	423,1646	423,1661	-3,416	unknown	405 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 335, 293, 275, 243, 201, 167, 137	-
20	7,3	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₃	18,5	neg	593,1279	593,1301	-3,598	Tiliroside	447, 307, 285	(Felipe et al. 2014)
21	7,36	C ₃₀ H ₂₉ O ₁₅	16,5	neg	629,149	629,1512	-3,502	Quercetin coumaroylglucoside analogue	463, 301	(Kramberger et al. 2020)
22	7,39	C ₁₅ H ₁₅ O ₇	8,5	neg	307,0814	307,0823	-2,951	unknown	195	-
23	7,42	C ₁₅ H ₉ O ₆	11,5	neg	285,0396	285,0405	-3,092	Luteolin	257, 241, 223, 217, 213, 199, 197, 175	(Gokhan Zengin et al. 2020)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

24	7,5	C ₁₅ H ₁₇ O ₇	7,5	neg	309,0968	309,098	-3,902	7-(2,3-dihydroxy-3-methylbutoxy)-5-hydroxy-6-methoxy-2H-1-benzopyran-2-one	291 [M-H-H ₂ O] ⁻ ; 265 [M-H-CO ₂] ⁻ ; 247, 237, 196 [M-H-CO ₂ -prenyl] ⁻	(Bojan Vujic et al. 2020, Angel Rumbero et al. 2000)
25	7,51	C ₁₅ H ₉ O ₇	11,5	neg	301,0345	301,0354	-3,076	Quercetin	178, 151	(Brito et al. 2014)
26	7,54	C ₁₂ H ₁₃ O ₅	6,5	neg	237,0759	237,0768	-3,825	unknown	219 [M-H-H ₂ O] ⁻ ; 193 [M-H-CO ₂] ⁻ ; 149	-
27	7,6	C ₁₆ H ₁₉ O ₆	7,5	neg	307,1176	307,1187	-3,782	unknown	289 [M-H-H ₂ O] ⁻ ; 195, 167	-
28	7,78	C ₁₆ H ₁₁ O ₇	11,5	neg	315,0497	315,051	-4,177	Isorhamnetin	300, 283, 271, 255, 243	(Gokhan Zengin et al. 2020)
29	7,82	C ₁₆ H ₉ O ₆	12,5	neg	297,0395	297,0405	-3,169	unknown	269 [M-H-CO] ⁻	-
30	7,9	C ₁₃ H ₁₇ O ₄	5,5	neg	237,1123	237,1132	-4,058	6-ethyl-4-hydroxy-5-methyl-3-(3-oxopentyl)-2H-pyran-2-one	193 [M-H-CO ₂] ⁻	(Bojan Vujic et al. 2020; Rudolf Hansel et al. 1980)
31	8,2	C ₁₅ H ₁₁ O ₅	10,5	neg	271,0602	271,0612	-3,53	Naringenin	177, 151, 107, 65	(Gokhan Zengin et al. 2020)
32	8,26	C ₂₁ H ₂₃ O ₈	10,5	neg	403,1383	403,1398	-3,872	unknown	385 [M-H-H ₂ O] ⁻ ; 317, 289, 249	-
33	8,31	C ₁₆ H ₁₃ O ₆	10,5	neg	301,0706	301,0718	-3,791	Homoeriodictyol	286, 273, 242, 177, 165, 151, 107	(Jinguo Kang et al. 2016)
34	8,38	C ₂₁ H ₂₅ O ₈	9,5	neg	405,1541	405,1555	-3,408	unknown	387 [M-H-H ₂ O] ⁻ ; 319, 291, 251	-
35	8,43	C ₁₁ H ₁₅ O ₃	4,5	neg	195,1019	195,1027	-3,73	a) 3,5-dimethyl-6-isopropyl-4-methoxy- α -pyron, b) 2-methoxy-3,5-dimethyl-6-(1-methylethyl)-4H-pyran-4-one	151 [M-H-CO ₂] ⁻	(a) F. Bohlmann et al. 1984; J.Jakupovic et al. 1986, (b) Bojan Vujic et al. 2020)
36	8,5	C ₁₅ H ₁₁ O ₅	10,5	neg	271,0601	271,0612	-3,972	Pinobanskin	253, 225, 215, 209, 197, 151	(Gokhan Zengin et al. 2020)
37	8,67	C ₁₅ H ₁₇ O ₇	7,5	neg	309,0967	309,098	-3,999	Coumarin analogue	265 [M-H-CO ₂] ⁻ ; 247 [M-H-CO ₂ -H ₂ O] ⁻	(Bojan Vujic et al. 2020; Angel Rumbero et al. 2000)
38	8,76	C ₁₄ H ₁₉ O ₄	5,5	neg	251,1279	251,1289	-3,991	Micropyrone	207 [M-H-CO ₂] ⁻	(Appendino et al. 2007)
39	8,94	C ₂₁ H ₂₅ O ₈	9,5	neg	405,1541	405,1555	-3,408	unknown	387 [M-H-H ₂ O] ⁻ ; 336	-
40	9,05	C ₁₉ H ₁₉ O ₉	10,5	neg	391,1019	391,1035	-3,977	unknown	237, 225, 181	-
41	9,11	C ₁₆ H ₁₁ O ₆	11,5	neg	299,0552	299,0561	-3,114	Trihydroxy-methoxyflavone	284, 256, 239, 211	(Gokhan Zengin et al. 2020)
42	9,19	C ₁₆ H ₁₇ O ₇	8,5	neg	321,0967	321,098	-3,85	unknown	277 [M-H-CO ₂] ⁻ ; 249	-
43	9,41	C ₁₅ H ₁₇ O ₆	7,5	neg	293,108	293,1031	-4,27	Araneophthalide	249 [M-H-CO ₂] ⁻	(Jakupovic et al. 1987)
44	9,78	C ₁₇ H ₁₉ O ₈	8,5	neg	351,1074	351,1085	-3,278	unknown	319, 291, 275, 261, 235	-
45	9,95	C ₂₃ H ₂₁ O ₇	13,5	neg	409,1279	409,1293	-3,437	unknown	391 [M-H-H ₂ O] ⁻ ; 381, 323, 295	-
46	10,16	C ₁₅ H ₁₁ O ₄	10,5	neg	255,0653	255,0663	-4,007	Pinocembrin	213, 187, 185, 169, 151, 145, 107	(Gokhan Zengin et al. 2020)
47	10,34	C ₁₃ H ₁₅ O ₄	6,5	neg	235,0966	235,0976	-4,178	6-Demethylacronylin	191 [C ₁₂ H ₁₅ O ₂] ⁻	(Eirini Kouloura 2019)
48	10,57	C ₁₆ H ₁₁ O ₅	11,5	neg	283,0603	283,0612	-3,062	5,7-Dihydroxy-3-methoxyflavone	268, 239, 211	(Bojan Vujic et al. 2020; Pereira et al. 2017)
49	11,06	C ₂₂ H ₂₅ O ₈	10,5	neg	417,1542	417,1555	-2,495	Plicatipyrone	251, 153	(Bojan Vujic et al. 2020)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

50	11,17	C ₂₁ H ₂₅ O ₇	9,5	neg	389,1596	389,1606	-2,483	unknown	371 [M-H-H ₂ O] ⁺ ; 317, 303, 277, 263, 251	-
51	11,87	C ₂₂ H ₂₅ O ₈	10,5	neg	417,1542	417,1555	-2,999	Plicatipyron analogue 1	251, 153	(Bojan Vujic et al. 2020)
52	12,01	C ₂₁ H ₂₃ O ₇	10,5	neg	387,144	387,1449	-2,522	Arenol	275, 247, 235, 139	(Rios et al. 1991)
53	12,08	C ₂₁ H ₂₅ O ₆	9,5	neg	373,1645	373,1657	-3,22	unknown	287, 261, 247, 235	-
54	12,86	C ₂₂ H ₂₅ O ₇	10,5	neg	401,1586	401,1606	-4,927	Arzanol	247, 235, 205, 191, 166, 153	(Kramberger et al. 2020)
55	13,32	C ₂₂ H ₂₅ O ₈	10,5	neg	417,1539	417,1555	-3,742	Plicatipyron analogue 2	263, 251	(Bojan Vujic et al. 2020)
56	13,67	C ₂₃ H ₂₇ O ₇	10,5	neg	415,175	415,1762	-3,05	3-Methylarzanol	261, 249, 247, 235, 205, 193, 180, 153	(Kramberger et al. 2020)
57	14,05	C ₂₃ H ₂₇ O ₈	10,5	neg	431,1696	431,1711	-3,667	Heterodimer pyrone-phloroglucinol	263, 251	-
58	14,25	C ₂₄ H ₂₉ O ₇	10,5	neg	429,1906	429,1919	-2,951	6-O-desmethyllauricepyron or arenol C analogue	275, 263, 247, 235, 153	(Rudolf Hansel et al. 1980.; Akaberi, Danton, et al. 2019.; Maryam Akaberi et al. 2021)
59	15,01	C ₂₄ H ₂₉ O ₈	10,5	neg	445,1853	445,1868	-3,417	Heliarzanol analogue	291, 279, 261, 193	(Kramberger et al. 2020)
60	15,14	C ₂₅ H ₃₁ O ₇	10,5	neg	443,2059	443,2075	-3,738	Auricepyron analogue	289, 277, 263, 249, 235, 153	(Bohlmann Ferdinand 1980; Rudolf Hansel et al. 1980)
61	15,64	C ₂₅ H ₃₁ O ₈	10,5	neg	459,2007	459,2024	-3,835	Pyrone derivative 4	305, 293, 291, 279	-
62	15,73	C ₂₂ H ₂₃ O ₇	11,5	neg	399,1436	399,1449	-3,198	Italipyron	245, 233, 153	(Kramberger et al. 2020)
63	16	C ₂₆ H ₂₇ O ₁₀	13,5	neg	499,1588	499,161	-4,268	unknown	333	-
64	16,16	C ₂₆ H ₃₃ O ₇	10,5	neg	457,2219	457,2232	-2,814	unknown	289, 277, 275, 263	-
65	16,35	C ₂₆ H ₃₃ O ₈	10,5	neg	473,2166	473,2181	-3,257	unknown	305, 293, 291, 279	-
66	16,7	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₀	13,5	neg	513,1746	513,1766	-3,898	unknown	347, 333	-
67	16,91	C ₂₇ H ₃₁ O ₉	12,5	neg	499,1957	499,1974	-3,297	unknown	430, 333	-

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας Π2.7: (H6) HL_2020, Χρωματογραφικά και φασματομετρικά δεδομένα LC-HRMS ανάλυσης μεθανολικού εκχυλίσματος *Helichrysum luteoalbum*

No	Rt (min)	EC [M-H] ⁻ / [M+H] ⁺	RDB	IM	Experimental m/z	Theoretical m/z	Δm (ppm)	Μεταβολίτης	Fragments MSMS	Αναφορά
1	0,86	C ₇ H ₁₁ O ₆	2,5	neg	191,0556	191,055	-2,519	Quinic acid	173, 171, 127	(Sandra Gouveia 2011a)
2	0,93	C ₄ H ₅ O ₅	2,5	neg	133,0138	133,0142	-3,056	Malic acid	115	(Wang et al. 2017)
3	1,36	C ₄ H ₅ O ₄	2,5	neg	117,0189	117,0193	-3,606	Succinic acid	99, 73	(Magdalena Pawlak et al. 2020)
4	2,27	C ₁₃ H ₁₅ O ₉	6,5	neg	315,0713	315,0722	-2,746	Protocatechuic acid -O-hexoside	-	(Kramberger et al. 2020)
5	3,07	C ₇ H ₅ O ₄	5,5	neg	153,0189	153,0193	-2,561	2,4-Dihydroxybenzoic acid	109	(Kramberger et al. 2020)
6	3,56	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	8,5	neg	353,0867	353,0867	-3,045	Caffeoylquinic acid 2	353, 203, 191, 179, 173, 161, 135	(Kramberger et al. 2020)
7	4,21	C ₁₅ H ₁₇ O ₉	7,5	neg	341,0866	341,0867	-3,592	Caffeoyl hexoside	179, 135	(Romero et al. 2020)
8	4,47	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	8,5	neg	353,0865	353,0867	-3,81	Caffeoylquinic acid 3	353, 203, 191, 179, 173, 161, 135	(Kramberger et al. 2020)
9	4,86	C ₉ H ₇ O ₄	7,5	neg	177,0188	177,0182	-2,836	Caffeic acid	161, 135	(Nayane B. M. Sinosaki et al. 2020)
10	5,13	C ₂₀ H ₃₁ O ₁₀	5,5	neg	431,191	431,1912	-2,992	unknown	385	-
11	5,34	C ₁₇ H ₁₉ O ₉	8,5	neg	367,1023	367,1024	-3,256	5-O-Feruloylquinic acid	193, 191, 173, 134	(Marisa R. Barroso et al. 2014)
12	5,51	C ₂₀ H ₂₉ O ₁₂	6,5	neg	461,1649	461,1654	-3,447	unknown	415	-
13	5,8	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	12,5	neg	463,0866	463,0871	-3,367	Quercetin glycoside 2	301, 300, 179, 151	(Kramberger et al. 2020)
14	5,84	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	12,5	neg	447,0919	447,0922	-3,186	Kaempferol-3-O-glucoside	327, 285, 284, 283, 175	(Francescato et al. 2013)
15	6,01	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₂	14,5	neg	515,1179	515,1184	-3,182	Dicaffeoylquinic acid 2	353, 203, 191, 179, 173, 161	(Kramberger et al. 2020)
16	6,16	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₂	14,5	neg	515,1174	515,1184	-4,134	Dicaffeoylquinic acid 3	353, 203, 191, 179, 173, 161	(Kramberger et al. 2020)
17	6,25	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	12,5	neg	447,0916	447,0922	-3,678	Kaempferol-7-O-hexoside	327, 285, 284	(Gokhan Zengin et al. 2020)
18	6,36	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀	12,5	neg	431,0969	431,0973	-3,433	Apigenin-6-C-glucoside	431, 311, 269	(Gomes 2018)
19	6,69	C ₉ H ₁₅ O ₄	2,5	neg	187,0969	187,0965	-3,593	unknown	169 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 125 [M-H-H ₂ O-CO ₂] ⁻	-
20	7,05	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₃	18,5	neg	593,1278	593,129	-3,8	Apigenin caffeoylhexoside 1	323, 269	(Evanthia Dina et al. 2022)
21	7,19	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₄	18,5	neg	609,1227	609,1239	-3,774	Kaempferol dihexoside 2	463, 447, 323, 285, 243, 241, 229	(Kramberger et al. 2020)
22	7,3	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₃	18,5	neg	593,1279	593,129	-3,699	Apigenin caffeoylhexoside 2	323, 269	(Evanthia Dina et al. 2022)
23	7,45	C ₁₅ H ₉ O ₆	11,5	neg	285,0392	285,0394	-4,6	Luteolin	175, 151, 133	(Gokhan Zengin et al. 2020)
24	8,18	C ₁₅ H ₉ O ₅	11,5	neg	269,0443	269,0444	-4,82	Apigenin	225, 201, 151	(Brito et al. 2014)
25	8,65	C ₁₈ H ₃₃ O ₅	2,5	neg	329,2321	329,2323	-3,91	C18 Trihydroxy fatty acid 2	314, 311, 309 [M-H ₂ O] ⁻ , 293, 291 [M-H ₂ O] ⁻ , 229, 211, 183, 171	(Mariana Rey et al. 2021)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

26	9,3	C ₁₉ H ₁₇ O ₉	11,5	neg	389,0864	389,0867	-3,535	Methylated flavonoid 3	374 [M-H-CH ₃] ⁻	-
27	9,75	C ₁₉ H ₁₉ O ₉	10,5	pos	391,1024	391,1024	0,004	Methylated flavonoid 4	376 [M+H-CH ₃] ⁺ , 361 [M+H-2CH ₃] ⁺ , 343 [M+H-2CH ₃ -H ₂ O] ⁺	-
28	10,25	C ₁₉ H ₁₉ O ₈	10,5	pos	375,1074	375,1074	-0,224	Methylated flavonoid 7	360 [M+H-CH ₃] ⁺ , 345 [M+H-2CH ₃] ⁺	-
29	10,73	C ₁₉ H ₁₉ O ₈	10,5	pos	375,1068	375,1074	-1,77	Methylated flavonoid 9	360 [M+H-CH ₃] ⁺ , 345 [M+H-2CH ₃] ⁺ , 327 [M+H-2CH ₃ -H ₂ O] ⁺	-
30	10,9	C ₂₀ H ₂₁ O ₉	10,5	pos	405,1174	405,118	-1,502	Methylated flavonoid 10	390 [M+H-CH ₃] ⁺ , 375 [M+H-2CH ₃] ⁺ , 372, 357 [M+H-2CH ₃ -H ₂ O] ⁺	-
31	10,96	C ₁₇ H ₁₅ O ₆	10,5	pos	315,0861	315,0863	-0,618	Methylated flavonoid 12	300 [M+H-CH ₃] ⁺ , 285 [M+H-2CH ₃] ⁺	-
32	11	C ₁₈ H ₁₇ O ₇	10,5	pos	345,0965	345,0969	-1,099	Methylated flavonoid 13	330 [M+H-CH ₃] ⁺ , 315 [M+H-2CH ₃] ⁺	-
33	12,03	C ₂₁ H ₂₃ O ₉	10,5	pos	419,1332	419,1337	-1,142	Methylated flavonoid 16	404 [M+H-CH ₃] ⁺ , 389 [M+H-2CH ₃] ⁺ , 371 [M+H-2CH ₃ -H ₂ O] ⁺	-
34	12,29	C ₁₈ H ₁₇ O ₇	10,5	pos	345,0964	345,0969	-1,36	Methylated flavonoid 17	330 [M+H-CH ₃] ⁺ , 315 [M+H-2CH ₃] ⁺	-
35	12,46	C ₁₈ H ₂₉ O ₂	4,5	pos	277,2161	277,2162	-0,529	Diterpene	259 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 241, 195, 163, 149, 135, 121, 107, 93, 81	-
36	12,56	C ₁₈ H ₁₇ O ₆	10,5	pos	329,1016	329,102	-1,047	Methylated flavonoid 18	314 [M+H-CH ₃] ⁺ , 299 [M+H-2CH ₃] ⁺	-
37	12,8	C ₂₀ H ₂₁ O ₈	10,5	pos	389,1229	389,1231	-0,524	Methylated flavonoid 19	374 [M+H-CH ₃] ⁺ , 359 [M+H-2CH ₃] ⁺ , 341 [M+H-2CH ₃ -H ₂ O] ⁺	-
38	13,28	C ₁₇ H ₃₄ O ₅	1	pos	318,2399	318,2401	-0,552	Oxygenated aliphatic hydrocarbon	300	-
39	13,7	C ₂₅ H ₃₃ O ₇	9,5	pos	445,2217	445,2221	-0,763	Auricepyron analogue	389, 361, 291, 279, 223	-
40	14,15	C ₁₇ H ₃₆ O ₅	0	pos	320,2556	320,2557	-0,549	Oxygenated aliphatic hydrocarbon	194 [M+H-C ₉ H ₁₈] ⁺	-
41	14,9	C ₂₆ H ₃₉ O ₈	7,5	pos	479,2618	479,2639	-4,454	unknown	367, 318	-
42	16,4	C ₂₆ H ₃₇ O ₄	8,5	neg	413,2686	413,2697	-2,766	Lupulone	369 [M-H-CO ₂] ⁻ , 344 [M-H-prenyl] ⁻ , 301 [M-H-prenyl-C ₃ H ₇] ⁻ , 289, 276, 233, 208, 152	(Ying-Yu Hsu Kao 2019)
43	16,65	C ₂₆ H ₃₇ O ₅	8,5	neg	429,2631	429,2646	-3,698	unknown	411, 333, 263	-
44	16,84	C ₂₅ H ₃₁ O ₇	10,5	neg	443,206	443,2075	-3,467	unknown	289, 277	-

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας Π2.8: (H7) ΗΟκ_2018, Χρωματογραφικά και φασματομετρικά δεδομένα LC-HRMS ανάλυσης μεθανολικού εκχυλίσματος *Helichrysum orientale*

No	Rt (min)	EC [M-H] ⁻ / [M+H] ⁺	RDB	IM	Experimental m/z	Theoretical m/z	Δm (ppm)	Μεταβολίτης	Fragments MSMS	Αναφορά
1	0,76	C ₆ H ₁₁ O ₆	1,5	neg	179,0555	179,0561	-3,247	Hexose	161, 141, 135, 117, 99, 87	(Konda 2013)
2	0,94	C ₄ H ₅ O ₅	2,5	neg	133,0137	133,0142	-3,883	Malic acid	-	(Wang et al. 2017)
3	3,14	C ₁₅ H ₁₉ O ₁₀	6,5	neg	359,0971	359,0984	-3,425	Syringic acid 4-O-β-D-glucopyranoside	-	(Huading Zhao et al. 2015)
4	3,94	C ₁₅ H ₁₇ O ₉	7,5	neg	341,0865	341,0878	-3,768	Caffeoyl hexoside	179, 135	(Romero et al. 2020)
5	4,46	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	8,5	neg	353,0863	353,0878	-4,263	Caffeoylquinic acid 3	191, 179, 173, 161, 135, 127	(Kramberger et al. 2020)
6	4,88	C ₉ H ₇ O ₄	6,5	neg	179,0343	179,035	-3,642	Caffeic acid	161, 135	(Nayane B. M. Sinosaki et al. 2020)
7	5,08	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₂	14,5	neg	515,1176	515,1195	-3,784	Dicaffeoylquinic acid 1	353, 203, 191, 179, 173, 161	(Kramberger et al. 2020)
8	5,13	C ₂₀ H ₃₁ O ₁₀	5,5	neg	431,1909	431,1923	-3,271	unknown	-	-
9	5,34	C ₁₇ H ₁₉ O ₉	8,5	neg	367,1023	367,1035	-3,256	5-O-Feruloylquinic acid	193, 191, 173, 134	(Marisa R. Barroso et al. 2014)
10	5,62	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀	11,5	neg	433,1122	433,114	-4,248	Naringenin-O-hexoside 1	313, 271, 151	(Gokhan Zengin et al. 2020)
11	5,72	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀	11,5	neg	433,1119	433,114	-4,803	Naringenin-O-hexoside 2	313, 271, 151	(Gokhan Zengin et al. 2020)
12	6,07	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₂	14,5	neg	515,1175	515,1195	-3,901	Dicaffeoylquinic acid 2	353, 203, 191, 179, 173, 161	(Kramberger et al. 2020)
13	6,18	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	12,5	neg	447,0911	447,0933	-4,819	Kaempferol-3-O-glucoside	327, 285, 284, 283, 255, 227, 211, 181, 175	(Francescato et al. 2013)
14	6,66	C ₉ H ₁₅ O ₄	2,5	neg	187,0969	187,0976	-3,86	unknown	169 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 125 [M-H-H ₂ O-CO ₂] ⁻	-
15	6,76	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀	11,5	neg	433,112	433,114	-4,664	Naringenin-O-hexoside 3	313, 271, 151	(Gokhan Zengin et al. 2020)
16	7,24	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₃	18,5	neg	593,1276	593,1301	-4,12	Tilioside	447, 307, 285, 257, 241, 229, 213	(Felipe et al. 2014)
17	8,18	C ₁₅ H ₁₁ O ₅	10,5	neg	271,0602	271,0612	-3,751	Naringenin	177, 151, 119, 107, 93, 83	(Xuan Zeng ID et al. 2018)
18	8,3	C ₁₅ H ₉ O ₆	11,5	neg	285,0393	285,0405	-3,934	Kaempferol	285, 257, 241, 229, 213, 185, 151, 107	(Chen et al. 2016)
19	8,64	C ₁₈ H ₃₃ O ₅	2,5	neg	329,2321	329,2333	-3,728	C18 Trihydroxy fatty acid 2	311 [M-H ₂ O] ⁻ , 293 [M-2H ₂ O] ⁻ , 275 [M-3H ₂ O] ⁻ , 229, 211, 183, 171	(Mariana Rey et al. 2021)
20	10,4	C ₁₇ H ₂₅ O ₄	5,5	neg	293,1748	293,1758	-3,624	Terpene 1	236, 221	(Ahmed Serag et al. 2020)
21	10,55	C ₁₇ H ₂₅ O ₃	5,5	pos	277,1798	277,1798	-0,148	Terpene 2	235, 221	-
22	12	C ₁₈ H ₁₇ O ₇	10,5	pos	345,0966	345,0969	-0,838	Methylated flavonoid 15	330 [M+H-CH ₃] ⁺ , 315 [M+H-2CH ₃] ⁺	-
23	13	C ₁₇ H ₃₄ O ₅	1	pos	318,2404	318,2401	1,082	C17 Hydroxy fatty acid 2	300 [M+H-H ₂ O] ⁺	-
24	16,21	C ₂₆ H ₃₇ O ₅	8,5	neg	429,263	429,2646	-3,838	unknown prenylated	-	-

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας Π2.9: (H8) HPv_2020, Χρωματογραφικά και φασματομετρικά δεδομένα LC-HRMS ανάλυσης μεθανολικού εκχυλίσματος *Helichrysum plicatum*

No	Rt (min)	EC [M-H] ⁻ / [M+H] ⁺	RDB	IM	Experimental m/z	Theoretical m/z	Δm (ppm)	Μεταβολίτης	Fragments MSMS	Αναφορά
1	0,76	C ₇ H ₁₃ O ₈	1,5	neg	225,0607	225,0616	-3,735	Glucoheptonic acid	179	(Brieudes et al. 2016)
2	0,9	C ₇ H ₁₁ O ₆	2,5	neg	191,0554	191,0561	-3,723	Quinic acid	173, 171, 155, 127, 111, 109	(Sandra Gouveia 2011a)
3	0,99	C ₄ H ₅ O ₅	2,5	neg	133,0137	133,0142	-3,733	Malic acid	115	(Wang et al. 2017)
4	1,62	C ₁₅ H ₁₇ O ₉	7,5	neg	341,0868	341,0878	-2,889	Caffeoyl glucose	179, 135	(C.T. Sulaiman et al. 2013)
5	2,24	C ₁₃ H ₁₅ O ₉	6,5	neg	315,0713	315,0722	-2,841	Protocatechuic acid- <i>O</i> -hexoside	153, 152, 109, 108	(Kramberger et al. 2020)
6	2,64	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	8,5	neg	353,0865	353,0878	-3,555	Caffeoylquinic acid 1	191, 179, 173, 161, 135	(Kramberger et al. 2020)
7	3,58	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	8,5	neg	353,0867	353,0878	-3,13	Caffeoylquinic acid 2	191, 179, 173, 161, 135	(Kramberger et al. 2020)
8	3,84	C ₁₅ H ₁₇ O ₉	7,5	neg	341,0866	341,0878	-3,416	Caffeoyl hexoside	179, 135	(Romero et al. 2020)
9	4,47	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	8,5	neg	353,0862	353,0878	-4,518	Caffeoylquinic acid 3	191, 179, 173, 161, 135	(Kramberger et al. 2020)
10	4,91	C ₉ H ₇ O ₄	6,5	neg	179,0343	179,035	-3,698	Caffeic acid	161, 135	(Nayane B. M. Sinosaki et al. 2020)
11	5,09	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₂	14,5	neg	515,1178	515,1195	-3,299	Dicaffeoylquinic acid 1	353, 335, 203, 191, 179, 173, 161, 135	(Kramberger et al. 2020)
12	5,14	C ₂₈ H ₃₁ O ₁₇	13,5	neg	639,1541	639,1567	-4,009	Isovitexin 2''- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucoside HCOOH adduct	593, 431, 477, 311	(Lv et al. 2018)
13	5,38	C ₁₇ H ₁₉ O ₉	8,5	neg	367,1024	367,1035	-2,902	5- <i>O</i> -Feruloylquinic acid	193, 191, 173, 134	(Marisa R. Barroso et al. 2014)
14	5,62	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀	11,5	neg	433,112	433,114	-4,595	Naringenin- <i>O</i> -hexoside 1	313, 271, 151	(Gokhan Zengin et al. 2020)
15	5,77	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀	11,5	neg	433,1119	433,114	-4,803	Naringenin- <i>O</i> -hexoside 2	313, 271, 151	(Gokhan Zengin et al. 2020)
16	6	C ₂₂ H ₂₁ O ₁₂	12,5	neg	477,102	477,1038	-3,834	5,6,4'-Trihydroxy-3'-methoxyflavone-7- <i>O</i> -β-glucoside	433, 315	(Pljevljakušić et al. 2018)
17	6,13	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₂	14,5	neg	515,117	515,1195	-4,852	Dicaffeoylquinic acid 2	353, 335, 203, 191, 179, 173, 161	(Kramberger et al. 2020)
18	6,35	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀	12,5	neg	431,0966	431,0984	-4,199	Apigenin-6- <i>C</i> -glucoside	431, 311, 269	(Gomes 2018)
19	6,78	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀	11,5	neg	433,1122	433,114	-4,179	Naringenin- <i>O</i> -hexoside 3	313, 271, 151	(Gokhan Zengin et al. 2020)
20	7,42	C ₁₅ H ₉ O ₆	11,5	neg	285,0394	285,0405	-3,618	Luteolin	175, 151, 133	(Gokhan Zengin et al. 2020)
21	7,58	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₃	14,5	neg	531,1125	531,1144	-3,509	unknown	471, 327, 285, 284, 255	(Cassandra L. Quave et al. 2015)
22	7,65	C ₁₅ H ₁₁ O ₆	10,5	neg	287,0552	287,0561	-3,035	Dihydrokaempferol	269, 243	(Reed 2009)
23	7,85	C ₁₈ H ₁₅ O ₉	11,5	neg	375,0704	375,0722	-4,68	Methylated flavonoid 1	360 [M-H-CH ₃] ⁻	-
24	8,14	C ₁₅ H ₉ O ₅	11,5	neg	269,0443	269,0455	-4,708	Apigenin	225, 201, 151	(Brito et al. 2014)
25	8,68	C ₁₈ H ₁₅ O ₈	11,5	neg	359,0757	359,0772	-4,179	Methylated flavonoid 2	344 [M-H-CH ₃] ⁻	-

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

26	8,91	C ₂₁ H ₂₅ O ₅	9,5	neg	357,1696	357,1707	-3,324	unknown	313 [M-H-CO ₂] ⁻ ; 225, 145, 119	-
27	9,09	C ₂₃ H ₂₅ O ₆	11,5	neg	397,1641	397,1657	-3,957	unknown	379 [M-H-H ₂ O] ⁻ ; 255, 241	-
28	9,42	C ₁₄ H ₁₁ O ₄	9,5	neg	243,0652	243,0663	-4,452	unknown	228 [M-H-CH ₃] ⁻ ; 227 [M-2H-CH ₃] ⁻ ; 165, 145	-
29	9,64	C ₂₃ H ₂₇ O ₆	10,5	neg	399,1796	399,1813	-4,363	unknown	381 [M-H-H ₂ O] ⁻ ; 355, 321, 253, 228, 185, 143	-
30	9,85	C ₂₃ H ₂₅ O ₆	11,5	neg	397,1643	397,1657	-3,404	unknown	379 [M-H-H ₂ O] ⁻ ; 241, 161	-
31	9,99	C ₂₁ H ₂₃ O ₄	10,5	neg	339,159	339,1602	-3,487	unknown	295, 277, 237, 200, 157, 119	-
32	10,13	C ₂₃ H ₂₅ O ₆	11,5	neg	397,1643	397,1657	-3,479	unknown	379 [M-H-H ₂ O] ⁻ ; 339, 309, 251, 241, 145	-
33	10,4	C ₂₁ H ₂₃ O ₄	10,5	neg	339,1589	339,1602	-3,87	unknown	321, 295, 225, 157, 145, 119	-
34	10,91	C ₂₃ H ₂₅ O ₅	11,5	neg	381,1693	381,1707	-3,77	unknown	363 [M-H-H ₂ O] ⁻ ; 337 [M-H-CO ₂] ⁻ ; 282, 253, 241, 229, 199, 145, 119	-
35	11,1	C ₂₃ H ₂₅ O ₅	11,5	neg	381,1692	381,1707	-4,006	unknown	337 [M-H-CO ₂] ⁻ ; 303, 267, 235, 199, 145, 119	-
36	11,29	C ₂₃ H ₂₅ O ₆	11,5	neg	397,1645	397,1657	-2,875	unknown	379 [M-H-H ₂ O] ⁻ ; 244	-
37	11,88	C ₂₃ H ₂₅ O ₅	11,5	neg	381,1696	381,1707	-2,878	unknown	363 [M-H-H ₂ O] ⁻ ; 255, 241, 229, 197, 163	-
38	12,8	C ₂₁ H ₂₃ O ₃	10,5	neg	323,1643	323,1653	-3,057	unknown	279 [M-H-CO ₂] ⁻	-
39	13,77	C ₂₃ H ₂₅ O ₄	11,5	neg	365,1742	365,1758	-4,58	unknown	321, 287, 241, 228, 201, 145	-
40	16,17	C ₂₇ H ₃₃ O ₇	11,5	neg	469,2215	469,2232	-3,637	Helicerastripyrene	315, 303, 153	(Bojan Vujic et al. 2020)
41	16,7	C ₃₁ H ₃₃ O ₇	15,5	neg	517,2213	517,2232	-3,609	unknown	377, 365	-
42	16,75	C ₂₈ H ₃₅ O ₇	11,5	neg	483,237	483,2388	-3,842	3-[[[3-acetyl-5-(3,7-dimethyl-2,6-octadienyl)-2,4,6-trihydroxyphenyl]methyl]-4-hydroxy-5-methyl-6-propyl-2H-pyran-2-one or 3-[[[3-(3,7-dimethyl-2,6-octadien-1-yl)-2,4,6-trihydroxy-5-(2-methyl-1-oxopropyl)phenyl]methyl]-4-hydroxy-5,6-dimethyl-2H-pyran-2-one	329, 317	(Bojan Vujic et al. 2020)
43	16,97	C ₃₂ H ₃₅ O ₇	15,5	neg	531,2364	531,2388	-4,587	unknown	487 [M-H-CO ₂] ⁻ ; 377, 365	-
44	17,43	C ₂₉ H ₃₇ O ₇	11,5	neg	497,2525	497,2545	-3,915	3-[[[3-(3,7-dimethyl-2,6-octadien-1-yl)-2,4,6-trihydroxy-5-(2-methyl-1-oxobutyl)phenyl]methyl]-4-hydroxy-5,6-dimethyl-2H-pyran-2-one	343, 331	(Bojan Vujic et al. 2020)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας Π2.10: (H9) HS_2019, Χρωματογραφικά και φασματομετρικά δεδομένα LC-HRMS ανάλυσης μεθανολικού εκχυλίσματος *H. sibthorpii*

No	Rt (min)	EC [M-H] ⁻ / [M+H] ⁺	RDB	IM	Experimental m/z	Theoretical m/z	Δm (ppm)	Μεταβολίτης	Fragments MSMS	Αναφορά
1	0,85	C ₇ H ₁₁ O ₆	2,5	neg	191,0555	191,0561	-3,304	Quinic acid	-	(Sandra Gouveia 2011a)
2	0,97	C ₄ H ₅ O ₅	2,5	neg	133,0138	133,0142	-3,432	Malic acid	115	(Wang et al. 2017)
3	1,46	C ₆ H ₁₁ O ₄	1,5	neg	147,0659	147,0663	-2,394	unknown	129 [M-H-H ₂ O] ⁻	-
4	2,3	C ₁₃ H ₁₅ O ₉	6,5	neg	315,0713	315,0722	-2,841	Protocatechuic acid- <i>O</i> -hexoside	153, 152, 109, 108	(Kramberger et al. 2020)
5	2,65	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	8,5	neg	353,0869	353,0878	-2,536	Caffeoylquinic acid 1	191, 179, 173, 161, 135	(Kramberger et al. 2020)
6	3,6	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	8,5	neg	353,087	353,0878	-2,337	Caffeoylquinic acid 2	191, 179, 173, 161, 135	(Kramberger et al. 2020)
7	3,9	C ₁₅ H ₁₇ O ₉	7,5	neg	341,0867	341,0878	-3,241	Caffeoyl hexoside	179, 135	(Romero et al. 2020)
8	4	C ₁₂ H ₁₃ O ₈	6,5	neg	285,0609	285,0616	-2,598	1- <i>O</i> -Protocatechuyl-β- <i>D</i> -xylopyranose (uralenneoside)	153, 109	(Fernández-Arroyo et al. 2010)
9	4,48	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	8,5	neg	353,0863	353,0878	-4,263	Caffeoylquinic acid 3	191, 179, 173, 161, 135	(Kramberger et al. 2020)
10	4,9	C ₉ H ₇ O ₄	6,5	neg	179,0345	179,035	-2,804	Caffeic acid	161, 135	(Nayane B. M. Sinasaki et al. 2020)
11	5,1	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₂	14,5	neg	515,1182	515,1195	-2,464	Dicafeoylquinic acid 1	353, 203, 191, 179, 173, 161	(Kramberger et al. 2020)
12	5,34	C ₁₇ H ₁₉ O ₉	8,5	neg	367,1023	367,1035	-3,175	5- <i>O</i> -Feruloylquinic acid	191, 173, 134	(Marisa R. Barroso et al. 2014)
13	5,48	C ₁₀ H ₁₁ O ₇	5,5	neg	243,0502	243,051	-3,563	unknown	228 [M-H-CH ₃] ⁻	-
14	5,57	C ₂₀ H ₂₉ O ₁₂	6,5	neg	461,1652	461,1664	-2,731	unknown	415	-
15	5,79	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	12,5	neg	463,0867	463,0882	-3,302	Quercetin glycoside 2	301	(Kramberger et al. 2020)
16	6,04	C ₂₅ H ₃₉ O ₁₃	6,5	neg	547,238	547,2396	-2,877	unknown	501, 353, 311, 293, 221	-
17	6,13	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₂	14,5	neg	515,1171	515,1195	-4,6	Dicafeoylquinic acid 2	353, 203, 191, 179, 173, 161	(Kramberger et al. 2020)
18	6,67	C ₉ H ₁₅ O ₄	2,5	neg	187,097	187,0976	-3,219	unknown	169 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 125 [M-H-H ₂ O-CO ₂] ⁻	-
19	6,78	C ₁₂ H ₁₉ O ₅	3,5	neg	243,123	243,1238	-3,278	Oxododecanedioic acid	225, 181	(Mohamed A. Farag et al. 2022)
20	6,94	C ₁₄ H ₁₇ O ₅	6,5	neg	265,1074	265,1081	-2,742	unknown	247 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 207, 193	-
21	7,04	C ₁₅ H ₁₇ O ₇	7,5	neg	309,0968	309,098	-3,805	Coumarin analogue 1	291 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 265, 247	(Bojan Vujic et al. 2020; Angel Rumero et al. 2000)
22	7,26	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₃	18,5	neg	593,1282	593,1301	-3,193	Tiliroside	447, 307, 285	(Felipe et al. 2014)
23	7,59	C ₁₁ H ₁₃ O ₅	5,5	neg	225,0761	225,0768	-3,407	unknown	207 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 180	-
24	7,79	C ₁₆ H ₂₁ O ₇	6,5	neg	325,1283	325,1293	-3,003	unknown	293, 281, 249, 237, 221, 205, 171, 139	-
25	7,86	C ₁₆ H ₁₉ O ₇	7,5	neg	323,1127	323,1136	-2,774	unknown	279 [M-H-CO ₂] ⁻	-

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

26	7,87	C ₁₄ H ₁₉ O ₅	5,5	neg	251,1281	251,1289	-3,195	unknown	207 [M-H-CO ₂] ⁻ , 179, 167	-
27	8	C ₁₂ H ₁₃ O ₆	6,5	neg	253,0709	253,0718	-3,325	unknown	235 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 209 [M-H-CO ₂] ⁻	-
28	8,09	C ₂₀ H ₂₇ O ₅	7,5	neg	347,1852	347,1864	-3,333	unknown prenylated	278 [M-H-prenyl] ⁻	-
29	8,26	C ₁₈ H ₃₁ O ₅	3,5	neg	327,2164	327,2177	-3,873	C18 Trihydroxy fatty acid 1	309 [M-H ₂ O] ⁻ , 291 [M-2H ₂ O] ⁻ , 273 [M-3H ₂ O] ⁻ , 239, 229, 211, 183, 171	(Mariana Rey et al. 2021)
30	8,36	C ₁₅ H ₁₇ O ₇	7,5	neg	309,0971	309,098	-2,899	Coumarin analogue 2	291 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 265, 247, 237, 181, 139	(Bojan Vujic et al. 2020; Angel Rumbero et al. 2000)
31	8,48	C ₁₅ H ₂₁ O ₅	5,5	neg	281,1384	281,1394	-3,724	unknown phloroglucinol	263 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 249, 237, 179, 171, 127, 109	(Gregorio Peron et al. 2020)
32	8,5	C ₁₇ H ₂₁ O ₇	7,5	neg	337,128	337,1293	-3,904	unknown	319 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 293 [M-H-CO ₂] ⁻ , 235, 195, 129	-
33	8,51	C ₁₇ H ₂₃ O ₇	6,5	neg	339,1434	339,1449	-4,412	Pyrone derivative 1	307, 295 [M-H-CO ₂] ⁻ , 279, 263, 237, 235, 205, 153 [C ₈ H ₉ O ₃] ⁻	-
34	8,7	C ₁₈ H ₃₃ O ₅	2,5	neg	329,2322	329,2333	-3,546	C18 Trihydroxy fatty acid 2	311 [M-H ₂ O] ⁻ , 293 [M-2H ₂ O] ⁻ , 275 [M-3H ₂ O] ⁻ , 229, 211, 183, 171	(Mariana Rey et al. 2021)
35	8,75	C ₁₆ H ₂₁ O ₅	6,5	neg	293,1387	293,1394	-2,548	unknown	275 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 235, 221, 191, 165, 141	-
36	8,98	C ₁₃ H ₁₅ O ₆	6,5	neg	267,0864	267,0874	-3,937	unknown	249 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 223 [M-H-CO ₂] ⁻ , 193, 179	-
37	9,02	C ₁₅ H ₁₉ O ₅	6,5	neg	279,1228	279,1238	-3,464	unknown	235 [M-H-CO ₂] ⁻ , 191	-
38	9,13	C ₁₈ H ₂₃ O ₇	7,5	neg	351,1438	351,1449	-3,122	unknown	307 [M-HCO ₂] ⁻ , 289 [307-H ₂ O] ⁻	-
39	9,41	C ₁₅ H ₁₇ O ₆	7,5	neg	293,1023	293,1031	-2,496	Araneophthalide	249 [M-H-CO ₂] ⁻	(Jakupovic et al. 1987)
40	9,6	C ₁₃ H ₁₇ O ₅	5,5	neg	253,1073	253,1081	-3,149	unknown	235 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 208, 183, 165, 141, 109	-
41	9,78	C ₁₉ H ₂₃ O ₈	8,5	neg	379,1385	379,1398	-3,484	unknown	361 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 335 [M-H-CO ₂] ⁻ , 307 [335-CO] ⁻ , 267, 209, 165	-
42	9,82	C ₁₈ H ₁₅ O ₈	11,5	neg	359,0762	359,0772	-2,815	Methylated flavonoid 5	344 [M-H-CH ₃] ⁻ , 331, 225, 210, 194	-
43	9,9	C ₂₃ H ₂₉ O ₈	9,5	neg	433,1854	433,1868	-3,165	unknown	415 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 405 [M-H-CO] ⁻ , 377, 347, 319, 279, 221, 177, 135	-
44	10,02	C ₁₄ H ₁₇ O ₅	6,5	neg	265,1074	265,1081	-2,968	Pyrone derivative 2	247 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 233, 195, 180, 153 [C ₈ H ₉ O ₃] ⁻	-
45	10,3	C ₁₇ H ₂₁ O ₇	7,5	neg	337,1293	337,1293	-2,985	unknown	319 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 293 [M-H-CO ₂] ⁻ , 275 [293-H ₂ O] ⁻ , 221, 181, 141	-
46	10,39	C ₁₉ H ₂₇ O ₆	6,5	neg	351,1804	351,1813	-2,539	unknown	333 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 279	-
47	10,44	C ₂₄ H ₃₁ O ₈	9,5	neg	447,2015	447,2024	-2,149	unknown	429 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 419 [M-H-CO ₂] ⁻ , 333, 293	-
48	10,54	C ₁₉ H ₂₅ O ₄	7,5	neg	317,175	317,1758	-2,656	unknown	289 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 248, 220, 180, 152	-
49	10,92	C ₁₈ H ₂₃ O ₇	7,5	neg	351,144	351,1449	-2,695	unknown	307 [M-HCO ₂] ⁻ , 289 [307-H ₂ O] ⁻ , 235, 181, 125	-
50	11	C ₁₇ H ₂₁ O ₆	7,5	neg	321,1336	321,1344	-2,434	unknown	303 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 277 [M-H-CO ₂] ⁻ , 259 [277-H ₂ O] ⁻ , 233, 207, 165, 111	-
51	11,12	C ₂₀ H ₂₉ O ₆	6,5	neg	365,1961	365,197	-2,333	unknown	347 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 293	-

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

52	11,5	C ₂₀ H ₂₇ O ₄	7,5	neg	331,1905	331,1915	-2,907	unknown prenylated	303 [M-H-H ₂ O] ⁻ ; 262 [M-H-prenyl] ⁻ , 234 [262-CO] ⁻ , 194, 166	-
53	11,63	C ₁₄ H ₁₇ O ₄	6,5	neg	249,1123	249,1132	-3,582	unknown	234 [M-H-CH ₃] ⁻ ; 207, 191, 179, 166, 151, 125	-
54	12,56	C ₁₅ H ₁₉ O ₄	6,5	neg	263,1281	263,1289	-2,821	unknown	248 [M-H-CH ₃] ⁻ ; 207, 205, 193, 180, 151	-
55	12,85	C ₂₂ H ₂₅ O ₇	10,5	neg	401,1595	401,1606	-2,558	Arzanol	247, 235, 205, 191, 166, 153 [C ₈ H ₉ O ₃] ⁻	(Kramberger et al. 2020)
56	13,16	C ₁₆ H ₂₁ O ₄	6,5	neg	277,1436	277,1445	-3,401	unknown	262 [M-H-CH ₃] ⁻ ; 259 [M-H-H ₂ O] ⁻ ; 233 [M-H-CO ₂] ⁻ ; 219, 207, 194, 179	-
57	13,33	C ₂₂ H ₂₅ O ₈	10,5	neg	417,1545	417,1555	-2,28	Plicatipyron analogue 2	263, 251, 153 [C ₈ H ₉ O ₃] ⁻	(Bojan Vujic et al. 2020)
58	13,42	C ₂₅ H ₃₁ O ₈	10,5	neg	459,2009	459,2024	-3,421	Pyrone derivative 3	293, 153 [C ₈ H ₉ O ₃] ⁻	-
59	13,58	C ₁₈ H ₂₁ O ₅	8,5	neg	317,1385	317,1394	-3,112	unknown	299 [M-H-H ₂ O] ⁻ ; 289 [M-H-CO] ⁻ ; 248	-
60	13,66	C ₂₃ H ₂₇ O ₇	10,5	neg	415,1752	415,1762	-2,544	3-Methylarzanol	261, 249, 247, 235, 205, 193, 180, 153	(Kramberger et al. 2020)
61	13,74	C ₁₇ H ₂₃ O ₄	6,5	neg	291,1594	291,1602	-2,619	unknown	279 [M-H-CH ₃] ⁻ ; 273 [M-H-H ₂ O] ⁻ ; 233, 221, 208, 207, 179	-
62	14	C ₂₃ H ₂₇ O ₇	10,5	neg	415,175	415,1762	-2,906	3-Methylarzanol isomer	261, 249, 205, 193, 180, 153	(Kramberger et al. 2020)
63	14,08	C ₂₄ H ₃₁ O ₆	9,5	neg	415,2115	415,2126	-2,702	unknown	397 [M-H-H ₂ O] ⁻ ; 346, 329, 303, 289, 277, 261, 249	-
64	14,21	C ₂₃ H ₂₇ O ₆	10,5	neg	399,1804	399,1813	-2,309	unknown	355 [M-H-CO ₂] ⁻ ; 287	-
65	14,5	C ₂₄ H ₂₉ O ₇	10,5	neg	429,1906	429,1919	-3,091	6-O-desmethyllauricepyron or arenol C analogue	275, 263, 247, 153	(Rudolf Hansel et al. 1980; Akaberi, Danton, et al. 2019; Maryam Akaberi et al. 2021)
66	15,2	C ₂₅ H ₃₁ O ₇	10,5	neg	443,2057	443,2075	-4,144	Auricepyron analogue 1	289, 277, 261, 193, 153 [C ₈ H ₉ O ₃] ⁻	-
67	15,65	C ₂₅ H ₃₁ O ₈	10,5	neg	459,2004	459,2024	-4,423	Pyrone derivative 4	305, 293, 153 [C ₈ H ₉ O ₃] ⁻	-
68	15,94	C ₂₅ H ₃₅ O ₄	8,5	neg	399,2527	399,2541	-3,489	unknown prenylated	355 [M-H-CO ₂] ⁻ ; 330 [M-H-prenyl] ⁻ ; 287, 275, 262, 219	-
69	16,08	C ₂₅ H ₃₁ O ₈	10,5	neg	459,201	459,2024	-3,16	Pyrone derivative 6	305, 293, 153 [C ₈ H ₉ O ₃] ⁻	-
70	16,21	C ₂₆ H ₃₇ O ₅	8,5	neg	429,2628	429,2646	-4,257	unknown prenylated	360 [M-H-prenyl] ⁻ ; 290, 289, 247, 235, 222	-
71	16,41	C ₂₆ H ₃₇ O ₄	8,5	neg	413,2677	413,2697	-4,992	Lupulone	369 [M-H-CO ₂] ⁻ ; 344 [M-H-prenyl] ⁻ ; 301 [M-H-prenyl-C ₃ H ₇] ⁻ ; 289, 276, 233, 208, 152	(Ying-Yu Hsu Kao 2019)
72	16,94	C ₂₄ H ₂₇ O ₇	11,5	neg	427,175	427,1762	-2,965	Pyrone derivative 8	261, 153 [C ₈ H ₉ O ₃] ⁻	-
73	17,11	C ₂₅ H ₃₁ O ₇	10,5	neg	443,206	443,2075	-3,467	Auricepyron analogue 2	399, 289, 277, 261, 193, 153 [C ₈ H ₉ O ₃] ⁻	-
74	17,3	C ₂₉ H ₃₇ O ₈	11,5	neg	513,2473	513,2494	-4,055	unknown	359, 347, 289, 277	-
75	17,36	C ₂₉ H ₃₇ O ₇	11,5	neg	497,2529	497,2545	-3,111	3-[[3-(3,7-dimethyl-2,6-octadien-1-yl)-2,4,6-trihydroxy-5-(2-methyl-1-oxobutyl)phenyl]methyl]-4-	357, 345, 343, 331	(Bojan Vujic et al. 2020)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

								hydroxy-5,6-dimethyl-2H-pyran-2-one		
76	17,77	C ₃₀ H ₃₉ O ₇	11.5	neg	511,2685	511,2701	-3,26	unknown	467 [M-H-CO ₂] ⁻ , 357, 345, 331	-

Πίνακας Π2.11: (H10) HSB_r_2016, Χρωματογραφικά και φασματομετρικά δεδομένα LC-HRMS ανάλυσης μεθανολικού εκχυλίσματος *Helichrysum stoechas subsp. barrelieri*

No	Rt (min)	EC [M-H] ⁻ / [M+H] ⁺	RDB	IM	Experimental m/z	Theoretical m/z	Δm (ppm)	Μεταβολίτης	Fragments MSMS	Αναφορά
1	0,84	C ₇ H ₁₁ O ₆	2,5	neg	191,0555	191,0561	-3,304	Quinic acid	173, 171, 155, 127, 111, 109	(Sandra Gouveia 2011a)
2	0,94	C ₄ H ₅ O ₅	2,5	neg	133,0137	133,0142	-3,959	Malic acid	115	(Wang et al. 2017)
3	2,25	C ₁₃ H ₁₅ O ₉	6,5	neg	315,0713	315,0722	-2,841	Protocatechuic acid-O-hexoside	153, 152, 109, 108	(Kramberger et al. 2020)
4	2,6	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	8,5	neg	353,0869	353,0878	-2,621	Caffeoylquinic acid 1	191, 179, 173, 161, 135	(Kramberger et al. 2020)
5	2,99	C ₇ H ₅ O ₄	5,5	neg	153,0189	153,0193	-2,758	Protocatechuic acid	109, 95, 79, 59	(Gokhan Zengin et al. 2020)
6	4,37	C ₁₅ H ₁₇ O ₉	7,5	neg	341,0865	341,0878	-3,856	Caffeoyl hexoside	179, 135	(Romero et al. 2020)
7	4,45	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	8,5	neg	353,0861	353,0878	-4,858	Caffeoylquinic acid 3	191, 179, 173, 161, 135	(Kramberger et al. 2020)
8	4,88	C ₉ H ₇ O ₄	6,5	neg	179,0344	179,035	-3,474	Caffeic acid	161, 135, 121	(Nayane B. M. Sinosaki et al. 2020)
9	5,05	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₂	14,5	neg	515,1175	515,1195	-3,901	Dicaffeoylquinic acid isomer 1	353, 203, 191, 179, 173, 161, 135	(Kramberger et al. 2020)
10	5,31	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₃	12,5	neg	479,0818	479,0831	-2,701	Myricetin-3-O-glucoside	317	(Marisa R. Barroso et al. 2014)
11	5,39	C ₁₇ H ₁₉ O ₉	8,5	neg	367,1023	367,1035	-3,175	5-O-Feruloylquinic acid	193, 191, 173, 134	(Marisa R. Barroso et al. 2014)
12	5,41	C ₂₃ H ₂₁ O ₁₀	13,5	neg	457,1158	457,114	3,85	unknown	-	-
13	5,78	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	12,5	neg	463,0863	463,0882	-4,101	Quercetin glycoside 2	301, 300, 273, 255, 179, 151	(Gokhan Zengin et al. 2020)
14	5,96	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₂	14,5	neg	515,1175	515,1195	-3,901	Dicaffeoylquinic acid isomer 2	353, 203, 191, 179, 173, 161	(Kramberger et al. 2020)
15	6,22	C ₂₈ H ₂₅ O ₁₅	16,5	neg	601,1173	601,1199	-4,297	Malonyl-dicaffeoylquinic acid	557, 515, 439, 395, 377	(Gokhan Zengin et al. 2020)
16	6,42	C ₂₃ H ₁₉ O ₉	14,5	neg	439,1053	439,1035	4,246	unknown	-	-
17	6,47	C ₂₅ H ₂₅ O ₁₁	13,5	neg	501,1386	501,1402	-3,302	unknown	-	-
18	6,49	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	12,5	neg	463,0867	463,0882	-3,237	Quercetin glycoside 3	301, 273, 179, 151	(Gokhan Zengin et al. 2020)
19	6,67	C ₉ H ₁₅ O ₄	2,5	neg	187,0969	187,0976	-3,593	unknown	169 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 125 [M-H-H ₂ O-CO ₂] ⁻	-
20	6,79	C ₂₆ H ₂₅ O ₁₂	14,5	neg	529,1334	529,1351	-3,268	Feruloyl-caffeoyl-quinic acid	367, 353, 191	(Gokhan Zengin et al. 2020)
21	6,84	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₄	18,5	neg	609,1222	609,125	-4,578	Kaempferol dihexoside 1	463, 447, 323, 285, 241, 229	(Kramberger et al. 2020)
22	7,08	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₅	18,5	neg	625,1172	625,1199	-4,324	Quercetin-7-O-(caffeoyl)-hexoside	463, 445, 323, 301, 273, 257, 179	(Gokhan Zengin et al. 2020)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

23	7,24	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₃	18,5	neg	593,1275	593,1301	-4,323	Tilioside	447, 307, 285, 257, 241, 229, 213	(Felipe et al. 2014)
24	7,46	C ₁₅ H ₉ O ₇	11,5	neg	301,0342	301,0354	-3,973	Quercetin	283, 271, 257, 179, 151, 107	(Gokhan Zengin et al. 2020)
25	7,54	C ₂₃ H ₂₅ O ₉	11,5	neg	445,1487	445,1504	-3,876	unknown	-	-
26	7,7	C ₂₁ H ₂₇ O ₉	8,5	neg	423,1644	423,1661	-3,912	Hydroxycinnamic acid derivative 1	179 [C ₉ H ₇ O ₄] ⁻ , 161 [C ₉ H ₇ O ₄ -H ₂ O] ⁻	-
27	8,16	C ₁₈ H ₃₁ O ₅	3,5	neg	327,2164	327,2177	-3,873	C18 Trihydroxy fatty acid 1	309 [M-H ₂ O] ⁻ , 291 [M-2H ₂ O] ⁻ , 273 [M-3H ₂ O] ⁻ , 239, 229, 211, 183, 171	(Mariana Rey et al. 2021)
28	8,4	C ₂₅ H ₂₇ O ₁₀	12,5	neg	487,1593	487,161	-3,49	Hydroxycinnamic acid derivative 2	179 [C ₉ H ₇ O ₄] ⁻ , 161 [C ₉ H ₇ O ₄ -H ₂ O] ⁻	-
29	8,56	C ₁₈ H ₃₃ O ₅	2,5	neg	329,2321	329,2333	-3,637	C18 Trihydroxy fatty acid 2	311 [M-H ₂ O] ⁻ , 293 [M-2H ₂ O] ⁻ , 275 [M-3H ₂ O] ⁻ , 229, 211, 183, 171	(Mariana Rey et al. 2021)
30	8,79	C ₁₇ H ₁₃ O ₆	11,5	neg	313,0707	313,0718	-3,454	unknown	295 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 269 [M-H-CO ₂] ⁻	-
31	8,85	C ₂₀ H ₂₃ O ₇	9,5	neg	375,1437	375,1449	-3,162	Dilignol analogue 2	357 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 331 [M-H-CO ₂] ⁻	(Kris Morreel et al. 2010)
32	9,48	C ₂₂ H ₁₉ O ₇	13,5	neg	395,112	395,1136	-4,116	unknown	377 [M-H-H ₂ O] ⁻	-
33	10,14	C ₁₅ H ₁₁ O ₄	10,5	neg	255,0652	255,0663	-4,243	Pinocembrin	-	(Gokhan Zengin et al. 2020)
34	10,4	C ₁₇ H ₂₅ O ₄	5,5	neg	293,175	293,1758	-2,772	Terpene 1	236, 221	(Ahmed Serag et al. 2020)
35	10,55	C ₁₇ H ₂₅ O ₃	5,5	pos	277,1797	277,1798	-0,257	Terpene 2	235, 221	-
36	12	C ₁₈ H ₁₇ O ₇	10,5	pos	345,0967	345,0969	-0,404	Methylated flavonoid 15	330 [M+H-CH ₃] ⁺ , 315 [M+H-2CH ₃] ⁺	-
37	12,92	C ₁₇ H ₃₄ O ₅	1	pos	318,2399	318,2401	-0,458	C17 Hydroxy fatty acid 2	300 [M+H-H ₂ O] ⁺	-
38	13,92	C ₈ H ₅ O ₃	6,5	pos	149,0233	149,0233	-0,272	unknown	-	-
39	15,01	C ₂₃ H ₃₃ O ₃	7,5	pos	357,2421	357,2424	-0,9	unknown	-	-
40	15,25	C ₃₀ H ₄₅ O ₂	8,5	pos	437,341	437,3414	-1	Triterpenic acid 1	395 [M+H-CO ₂] ⁺	-
41	15,34	C ₂₁ H ₄₂ O ₅	1	pos	374,3025	374,3027	-0,416	unknown	-	-
42	15,6	C ₃₀ H ₄₇ O ₂	7,5	pos	439,357	439,3571	-0,221	Triterpenic acid 2	395 [M+H-CO ₂] ⁺	-

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας Π2.12: (H11) HT_2019, Χρωματογραφικά και φασματομετρικά δεδομένα LC-HRMS ανάλυσης μεθανολικού εκχυλίσματος *Helichrysum taenari*

No	Rt (min)	EC [M-H] ⁺ / [M+H] ⁺	RDB	IM	Experimental m/z	Theoretical m/z	Δm (ppm)	Μεταβολίτης	Fragments MSMS	Αναφορά
1	0,87	C ₇ H ₁₁ O ₆	2,5	neg	191,0555	191,0561	-3,304	Quinic acid	-	(Sandra Gouveia 2011a)
2	0,93	C ₄ H ₅ O ₅	2,5	neg	133,0138	133,0142	-3,658	Malic acid	-	(Wang et al. 2017)
3	3,66	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	8,5	neg	353,0866	353,0878	-3,3	Caffeoylquinic acid 2	191, 179, 161, 135	(Kramberger et al. 2020)
4	4,01	C ₁₅ H ₁₇ O ₉	7,5	neg	341,0865	341,0878	-3,68	Caffeoyl hexoside	179 [M-H-hexosyl] ⁺ , 135 [M-H-hexosyl-CO ₂] ⁺	(Romero et al. 2020)
5	4,49	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	8,5	neg	353,0862	353,0878	-4,688	Caffeoylquinic acid 3	191, 179, 135	(Kramberger et al. 2020)
6	4,91	C ₉ H ₇ O ₄	6,5	neg	179,0343	179,035	-3,865	Caffeic acid	161, 135, 109	(Nayane B. M. Sinosaki et al. 2020)
7	5	C ₁₂ H ₁₃ O ₆	6,5	neg	253,0708	253,0718	-3,68	Caffeoyl glycerol	-	(Gokhan Zengin et al. 2020)
8	5,16	C ₁₉ H ₁₉ O ₁₁	10,5	neg	423,0918	423,0933	-3,509	unknown	379 [M-H-CO ₂] ⁺ , 287, 261, 217	-
9	5,25	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆	13,5	neg	609,1438	609,1461	-3,789	Kaempferol diglycoside	-	(Ajay P. Singh et al. 2017)
10	5,37	C ₁₇ H ₁₉ O ₉	8,5	neg	367,1024	367,1035	-2,82	5-O-Feruloylquinic acid	193, 191, 173, 134	(Marisa R. Barroso et al. 2014)
11	5,82	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	12,5	neg	463,0862	463,0882	-4,295	Quercetin glycoside 2	301, 179	(Katja Kramberger et al. 2020)
12	6,02	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₂	14,5	neg	515,1175	515,1195	-3,901	Dicaffeoylquinic acid 2	353, 203, 191, 179, 173	(Kramberger et al. 2020)
13	6,13	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	12,5	neg	447,0918	447,0933	-3,388	Kaempferol-3-O-glucoside	327, 285, 284, 283, 255, 227, 211, 181, 175	(Francescato et al. 2013)
14	6,22	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₂	14,5	neg	515,1172	515,1195	-4,367	Dicaffeoylquinic acid 3	353, 203, 191, 179, 173, 161	(Kramberger et al. 2020)
15	6,3	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀	12,5	neg	431,0971	431,0984	-2,992	Apigenin-6-C-glucoside	-	(Gomes 2018)
16	6,45	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₂	14,5	neg	515,118	515,1195	-2,949	Dicaffeoylquinic acid 4	353, 203, 191, 179, 173, 161	(Kramberger et al. 2020)
17	6,5	C ₂₅ H ₂₅ O ₁₁	13,5	neg	501,1385	501,1402	-3,422	unknown	339, 323, 177	-
18	6,56	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	12,5	neg	447,0918	447,0933	-3,321	Luteolin glycoside	285, 175, 151, 133	(Zhuan-Hong Li et al. 2016)
19	6,7	C ₉ H ₁₅ O ₄	2,5	neg	187,0969	187,0976	-3,54	unknown	169 [M-H-H ₂ O] ⁺ , 125 [M-H-H ₂ O-CO ₂] ⁺	-
20	6,81	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₄	18,5	neg	609,1223	609,125	-4,479	Kaempferol dihexoside 1	447, 285	-
21	7,14	C ₂₉ H ₂₇ O ₁₄	16,5	neg	599,1385	599,1406	-3,569	Kaempferol or luteolin derivative	459, 447	-
22	7,27	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₃	18,5	neg	593,1279	593,1301	-3,699	Tiliroside	447, 307, 285	(Felipe et al. 2014)
23	7,44	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₃	18,5	neg	593,1282	593,1301	-3,193	Tribuloside	447, 307, 285	(Chen et al. 2018)
24	7,52	C ₁₅ H ₉ O ₆	11,5	neg	285,0396	285,0405	-3,197	Luteolin	285, 199, 175, 151, 133, 107	(Katarzyna Lech et al. 2014)
25	7,7	C ₂₂ H ₁₇ O ₈	14,5	neg	409,0915	409,0929	-3,424	unknown	391 [M-H-H ₂ O] ⁺	-

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

26	8,15	C ₁₅ H ₉ O ₅	11,5	neg	269,0443	269,0455	-4,82	Apigenin	225, 201, 151	(Brito et al. 2014)
27	8,56	C ₁₇ H ₂₁ O ₇	7,5	neg	337,1281	337,1293	-3,37	unknown	293 [M-H-CO ₂] ⁻	-
28	8,69	C ₁₈ H ₃₃ O ₅	2,5	neg	329,2321	329,2333	-3,91	C18 Trihydroxy fatty acid 2	311, 309 [M-H ₂ O] ⁻ , 293, 291 [M-2H ₂ O] ⁻ , 229, 211, 183, 171	(Mariana Rey et al. 2021)
29	8,97	C ₂₃ H ₁₇ O ₈	15,5	neg	421,0915	421,0929	-3,255	Flavonoid derivative	281, 269	-
30	9,22	C ₁₈ H ₂₁ O ₇	8,5	neg	349,128	349,1293	-3,684	unknown	331 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 277, 249	-
31	9,38	C ₂₂ H ₂₇ O ₉	9,5	neg	435,1648	436,1661	-2,816	unknown	-	-
32	9,52	C ₂₂ H ₂₇ O ₈	9,5	neg	419,1696	419,1711	-3,7	Arzanol analogue	401, 319	-
33	10,44	C ₁₇ H ₂₅ O ₄	5,5	neg	293,1749	293,1758	-3,181	Terpene 1	236, 221	(Ahmed Serag et al. 2020)
34	12,37	C ₁₈ H ₁₇ O ₇	10,5	pos	345,0965	345,0969	-1,012	Methylated flavonoid 17	300 [M+H-CH ₃] ⁺ , 315 [M+H-2CH ₃] ⁺	-
35	12,67	C ₁₆ H ₁₅ O ₄	9,5	pos	271,0965	271,0965	-0,057	Pinostrobin	167, 131	(Li-li Wang et al 2016)
36	12,93	C ₁₇ H ₃₆ O ₅	0	pos	320,2558	320,2557	0,326	C17 Hydroxy fatty acid 1	302 [M+H-H ₂ O] ⁻	-
37	13,04	C ₂₂ H ₂₅ O ₆	10,5	pos	385,1646	385,1646	-0,039	unknown	367 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 315	-
38	13,22	C ₂₉ H ₄₇ O	6,5	pos	411,362	411,3621	-0,347	Triterpene 3	393, 327, 309, 295, 271, 255, 253, 215	-
39	13,28	C ₂₂ H ₂₅ O ₆	10,5	pos	385,1643	385,1646	-0,662	unknown	367 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 315	-
40	13,37	C ₁₇ H ₃₄ O ₅	1	pos	318,2401	318,2401	0,014	C17 Hydroxy fatty acid 2	300 [M+H-H ₂ O] ⁺	-

Παράρτημα Κεφαλαίου 3

Πίνακας Π3.1: Βάρη φυτικών υλικών και αποδόσεις αιθέριων ελαίων από 10 δείγματα των 9 *ex situ* καλλιεργούμενων γονότυπων *Helichrysum amorginum* (ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ)

#	Κωδικός δείγματος	Γονότυπος	Βάρος φρέσκου υπέργειου μέρους (g)	Βάρος αιθέριου ελαίου μετά από ξήρανση (g)	Απόδοση (% β/β)
HA1	15,5866-63	<i>gen1</i>	243,2	0,00144	0,0006
HA2	15,5871-K2-526	<i>gen2</i>	238,5	0,0039	0,002
HA3	15,5875-N1-542	<i>gen3</i>	140	0,00412	0,003
HA4	15,5886-Z4-532	<i>gen4</i>	212,3	0,0051	0,002
HA5	15,5887-391	<i>gen5</i>	208	0,00285	0,001
HA6	15,5888-D2-578	<i>gen6</i>	157	0,0071	0,005
HA7	15,5889-Z10-563	<i>gen7</i>	138,5	0,0033	0,002
HA8	15,5892-67	<i>gen8</i>	228	0,004	0,002
HA9	15,5893-Z6-1stpot	<i>gen9.1</i>	95	0,00071	0,0007
HA10	15,5893-Z6-2ndpot	<i>gen9.2</i>	121,5	0,00356	0,003



Εικόνα Π3.1: Δείγμα ζωντανού φυτού γονότυπου *Helichrysum amorginum ex situ* καλλιέργειας του ΕΛΓΟ-Δήμητρα (αριστερά) που χρησιμοποιήθηκε για την απόσταξη αιθέριου ελαίου (δεξιά)

Παράρτημα Κεφαλαίου 4*Πίνακας Π4.1: Πίνακας με VIP μεταβολιτών*

No	Var ID (Primary)	p(corr)	VIP
1	113,03560975669_0,667009468599033	-0,817935	1,07811
2	131,046197333303_0,667988435374149	-0,798482	3,25278
3	132,030225626627_0,743831755555555	-0,618354	1,32815
4	133,014167877564_0,804042911646586	-0,706157	4,15036
5	135,045118953404_3,31847299625468	-0,729168	1,15425
6	142,050961044599_1,1560646226415	-0,763367	1,20697
7	165,040496467141_0,769455921568627	0,579717	1,17236
8	175,061184960442_2,28612144144144	0,579427	2,73571
9	175,06121727728_2,95740530465949	-0,727429	1,71795
10	179,034930358061_3,32054198198197	-0,72209	1,97303
11	179,056163460867_0,700308214285714	0,70257	2,10572
12	179,056181093541_0,76151806910569	-0,677693	1,87473
13	191,034944354363_4,35018701257861	-0,502191	1,77826
14	191,056083628336_0,774332633333333	-0,503145	2,43704
15	195,050837523955_0,770060200501252	0,637444	2,45501
16	253,071651045098_3,42980987951807	-0,718516	1,79549
17	262,072172527071_5,00359932489451	-0,725059	2,53113
18	269,045441381189_7,61681799116997	-0,578624	9,13212
19	273,170762033173_5,68201755050505	-0,751085	1,61291
20	285,040661542843_6,76340884615384	-0,589627	1,27934
21	290,088118015375_0,907526203007518	0,642757	1,795
22	293,212212549497_12,1182080821917	-0,708248	2,84167
23	299,186318766276_6,35578464444444	-0,820669	3,52058
24	301,035243340258_6,63362051886792	0,705099	3,35272
25	301,201991130396_7,07742170103092	-0,84219	3,90414
26	307,191456353486_9,95099360696517	-0,700961	1,00821
27	309,097880249023_8,29141866666666	0,554148	1,1

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

28	311,222559611002_11,1050782567049	-0,798199	1,79333
29	313,238366699218_11,6753836805555	-0,617425	1,70969
30	315,05084102855_7,96509399999999	0,653171	1,75443
31	317,054657153868_0,817399775280898	-0,516151	1,13272
32	327,217582146853_8,11023849889624	-0,823491	5,31531
33	329,233041144036_8,75167638528138	-0,741033	7,07766
34	329,233143709143_9,68195404761904	-0,84775	1,15875
35	347,18626599434_13,4320681623931	0,580842	1,03045
36	351,144718170166_9,17959604166666	0,571618	1,21258
37	351,144809376109_11,4138068181818	0,634814	1,2611
38	353,087643673545_2,30960133771929	-0,610138	1,58085
39	359,077070631422_9,81417015015014	0,557702	1,79191
40	359,098154449462_2,13215311666666	-0,798863	3,07337
41	369,134215291341_11,8789887222222	0,560807	1,06677
42	371,113480567932_9,92216555059524	0,63969	1,83953
43	389,108857064876_1,02139735849056	-0,677332	1,13081
44	391,260046525435_12,5526751515151	-0,736158	1,58173
45	393,275790405273_13,0656448571428	-0,710336	1,49663
46	403,139735828746_10,4408009090909	0,517573	1,08993
47	417,082777853573_5,35849574509803	-0,638171	1,44269
48	417,155346077932_11,2830036032863	0,611831	3,32741
49	417,155457440544_12,0306386519607	0,599786	1,77198
50	431,098302511344_5,25959981203008	-0,598927	3,49908
51	431,11930979853_3,30973190217391	0,627591	1,35605
52	431,170940298783_12,0592638596491	0,655963	3,06893
53	431,171195348103_12,6039832291666	0,709181	1,94601
54	433,238070336457_14,0088198909657	0,604448	4,35413
55	445,077605183919_5,41915766666666	-0,564616	1,67286
56	445,186599731445_12,9608503015873	0,62906	1,55959
57	447,150500882056_3,44161166666666	0,680314	1,24043
58	449,233096036044_14,177534047619	0,555709	1,00777

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

59	449,233131111442_13,7700514502164	0,68162	2,00381
60	455,280364839157_15,7209130858085	-0,639256	1,2424
61	459,202127189279_12,9007206542056	0,611195	3,11302
62	459,202229817708_13,2763112365591	0,703895	1,66169
63	467,316318187838_15,413552745098	-0,502258	6,00628
64	479,170897232858_11,9206489035087	0,533752	2,48536
65	479,170923323858_12,3564729365079	0,687694	1,88887
66	489,103524047058_5,90742437229437	-0,880502	5,16943
67	489,103649585278_5,49198271645021	-0,829138	7,64495
68	489,103683991865_6,20056041666666	-0,711712	1,60461
69	515,119374521962_5,45290477855478	-0,606782	4,37098
70	533,093297784978_5,49267174242424	-0,82743	6,27932
71	593,129619822782_6,75220671568627	0,556376	6,80702
72	594,132995018592_6,75016980769231	-0,899276	9,19077
73	594,133066538217_7,00608747747747	0,683304	2,41107
74	595,135260479266_7,00015451282051	-0,816314	1,56916
75	625,119417826334_6,51744749999999	0,541824	1,06618
76	629,106285194297_6,75168497835497	-0,801853	2,25539
77	631,103286148665_6,75060147186147	-0,800736	1,11458
78	635,139982910156_8,09460684444444	0,799644	8,02997
79	637,145781707763_8,09470208333333	-0,719087	4,32384
80	651,13490097244_7,36728254329004	-0,873452	7,15722
81	656,125406693439_6,75379139455782	-0,900405	1,61975
82	671,116771521935_8,09521311538461	-0,653663	2,36656
83	673,114179744276_8,09163375968992	-0,818538	1,52597
84	698,135976762914_8,07901298507462	-0,80567	1,95116
85	895,193768984311_5,0300969047619	-0,707741	4,7382

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας Π4.2: Κωδικοί 62 δειγμάτων από τους 19 *ex situ* καλλιεργούμενους γονότυπους *Helichrysum amorginum* (ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ)

Αρίθμηση	Κωδικός δείγματος γονότυπου	Βάρος δρόγης (mg)	Καθαρό βάρος μεθανολικού εκχυλίσματος (mg)	% Απόδοση (β/β)	Με αχαίνια
1	3.2019_15,5888-81	100	12,2	12,2	ΌΧΙ
2	3.2019_15,5888_D2-82	100	8,6	8,6	ΌΧΙ
3	3.2019_15,5888-85	110	14	12,7	ΌΧΙ
4	3.2019_15,5888-86	100	12,6	12,6	ΌΧΙ
5	3.2019_15,5888-88	100	12	12,0	ΌΧΙ
6	3.2019_15,5892_A1-78	100	14,8	14,8	ΌΧΙ
7	3.2019_15,5892_Z8-71	100	18,9	18,9	ΌΧΙ
8	3.2019_15,5892_Z9-65	100	18,9	18,9	ΌΧΙ
9	3.2019_15,5863_K1-59	100	18	18,0	ΌΧΙ
10	3.2019_15,5870-22	100	16	16,0	ΌΧΙ
11	3.2019_15,5891-153	110	17,8	16,2	ΌΧΙ
12	3.2019_15,5893-119	100	18,6	18,6	ΌΧΙ
13	3.2019_15,5877-8	110	19,6	17,8	ΌΧΙ
14	3.2019_15,5887-43	120	10,5	8,8	ΌΧΙ
15	3.2019_15,5875_D3-137	110	14,3	13,0	ΌΧΙ
16	3.2019_15,5875_N2-145	100	17,6	17,6	ΌΧΙ
17	3.2019_15,5871-352	110	18,3	16,6	ΌΧΙ
18	3.2019_15,5874-26	110	15,5	14,1	ΌΧΙ
19	3.2019_15,5868-111	110	14,9	13,5	ΌΧΙ
20	3.2019_15,5873-106	110	17,2	15,6	ΌΧΙ
21	3.2019_15,5869-92	100	15,5	15,5	ΌΧΙ
22	3.2019_15,5866_Z11-64	110	12,4	11,3	ΌΧΙ
23	3.2019_15,5874-400	100	20,7	20,7	ΌΧΙ
24	6.2019_15,5863-596	110	14,1	12,8	ΝΑΙ
25	6.2019_15,5863-597	100	15,9	15,9	ΝΑΙ
26	6.2019_15,5863-590	120	15,8	13,2	ΝΑΙ
27	6.2019_15,5870 No15	130	16,8	12,9	ΝΑΙ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

28	6.2019_15,5893A	110	16,2	14,7	NAI
29	6.2019_15,5877	100	17,2	17,2	NAI
30	6.2019_15,5877-10	100	12,5	12,5	NAI
31	6.2019_15,5887-48	130	9,2	7,1	NAI
32	6.2019_15,5875-591	110	12,6	11,5	NAI
33	6.2019_15,5875-140	120	18,9	15,7	NAI
34	6.2019_15,5871	110	16,4	14,9	NAI
35	6.2019_15,5871-K2	110	16,5	15,0	NAI
36	6.2019_15,5868	100	10,5	10,5	NAI
37	5.2020_15,5888-88	100	11,8	11,8	NAI
38	5.2020_15,5892-553	110	15,5	14,1	NAI
39	5.2020_15,5892-71	100	13,7	13,7	NAI
40	5.2020_15,5863-596	100	10,6	10,6	NAI
41	5.2020_15,5863-597	120	18	15,0	NAI
42	5.2020_15,5891-512	110	19,2	17,5	NAI
43	5.2020_15,5891-504	120	12,5	10,4	NAI
44	5.2020_15,5891_Δ4-540	120	18,8	15,7	NAI
45	5.2020_15,5893-119	110	20,5	18,6	NAI
46	5.2020_15,5877-6	120	9,3	7,8	NAI
47	5.2020_15,5887-43	110	14,6	13,3	NAI
48	5.2020_15,5875_N2-145	120	17,2	14,3	NAI
49	5.2020_15,5875-591	100	13,5	13,5	NAI
50	5.2020_15,5871-552	120	16,7	13,9	NAI
51	5.2020_15,5871_K2-527	110	20,4	18,5	NAI
52	5.2020_15,5874-498	120	12,7	10,6	NAI
53	5.2020_15, 5868	100	14,8	14,8	NAI
54	5.2020_15,5873-579	110	16,2	14,7	NAI
55	5.2020_15,5869-Z6	100	15,1	15,1	NAI
56	5.2020_15,5866_Z11-64	110	14,4	13,1	NAI
57	5.2020_AMO-ROZ	120	18,6	15,5	NAI

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

58	5.2020_AMO-HISTO	110	18,2	16,5	NAI
59	5.2020_15,5886-536	100	8,2	8,2	NAI
60	4.2016_15,5886	100	16,2	16,2	NAI
61	4.2016_15,5888	100	14,8	14,8	NAI
62	4.2016_15,5892	100	14	14,0	NAI

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας Π4.3: Ημερομηνίες συλλογής δειγμάτων των 19 *ex situ* καλλιεργούμενων γονότυπων *Helichrysum amorginum* (ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ)

Αυθαίρετη αρίθμηση	Γονότυποι	Απρίλιος 2016	Μάρτιος 2019	Ιούνιος 2019	Μάιος 2020	Σύνολα δειγμάτων ανά γονότυπο
1	γονότυπος 15,5888	HA_5888	HA_15,5888-81 HA_15,5888_D2-82 HA_15,5888-85 HA_15,5888-86 HA_15,5888-88		15,5888-88	7
2	γονότυπος 15,5892	HA_5892	HA_15,5892_A1-78 HA_15,5892_Z8-71 HA_15,5892_Z9-65		15,5892-553 15,5892-71	6
3	γονότυπος 15,5863		HA_15,5863_K1-59	15,5863-596 15,5863-597 15,5863-590	15,5863-596 15,5863-597	6
4	γονότυπος 15,5870		HA_15,5870-22	15,5870 No15		2
5	γονότυπος 15,5891		HA_15,5891-153		15,5891-512 15,5891-504 15,5891 Δ4-540	4
6	γονότυπος 15,5893		HA_15,5893-119	15,5893A	15,5893-119	3
7	γονότυπος 15,5877		HA_15,5877-8	15,5877 15,5877-10	15,5877-6	4
8	γονότυπος 15,5887		HA_15,5887-43	15,5887-48	15,5887-43	3
9	γονότυπος 15,5875		HA_15,5875_D3-137 HA_15,5875_N2-145	15,5875-591 15,5875-140	15,5875_N2-145 15,5875-591	6
10	γονότυπος 15,5871		HA_15,5871-352	15,5871 15,5871-K2	15,5871-552 15,5871_K2-527	5
11	γονότυπος 15,5874		HA_15,5874-26		15,5874-498	2
12	γονότυπος 15,5868		HA_15,5868-111	15,5868	15, 5868	3
13	γονότυπος 15,5873		HA_15,5873-106		15,5873-579	2
14	γονότυπος 15,5869		HA_15,5869-92		15,5869-Z6	2
15	γονότυπος 15,5866		HA_15,5866_Z11-64		15,5866_Z11-64	2
16	γονότυπος AMO-ROZ				AMO-ROZ	1
17	γονότυπος 15,5874		15,5874-400			1
18	γονότυπος AMO-HISTO				AMO-HISTO	1
19	γονότυπος 15,5886	HA_15,5886			HA_15,5886	2
Σύνολα δειγμάτων ανά χρονιά		3	23	13	23	62

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας Π4.4: Χαρακτηρισμός 97 μεταβολιτών στο συνενωμένο δείγμα (QC pooled 1) που προέκυψε από τα 62 δείγματα των stock solutions των μεθανολικών εκχυλισμάτων

Αριθμηση	μεταβολίτης	EC [M-H] ⁻	RDBeq	Rt (min)	ESI -				αναφορά
					Θεωρητική m/z [M-H] ⁻	Πειραματική m/z [M-H] ⁻	Δ(ppm)	MS Θραύσματα	
1	Gluconic acid	C ₆ H ₁₁ O ₇	1,5	0,77	195,0510	195,0512	0,790	n.a	(Haisong Yang et al., 2014)
2	Quinic acid	C ₇ H ₁₁ O ₆	2,5	0,78	191,0561	191,0562	0,464	173, 127, 111, 93, 85	(Georgios A. Koulis et al., 2021)
3	Malic acid	C ₄ H ₅ O ₅	2,5	0,82	133,0142	133,0143	0,176	115	(Wang et al. 2017)
4	Syringic acid 4-O-β-D glucopyranoside	C ₁₅ H ₁₉ O ₁₀	6,5	2,16	359,0972	359,0984	-0,195	197, 182	(Zhao et al. 2015)
5	Caffeoyl quinic acid 1	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	8,5	2,34	353,0872	353,0880	0,665	191, 179, 135	(Kramberger et al. 2020)
6	2-Isopropyl malic acid	C ₇ H ₁₁ O ₅	2,5	2,54	175,0601	175,0613	0,647	157, 113, 85	(Wang et al. 2017)
7	Caffeoyl quinic acid 2	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	8,5	2,97	353,0867	353,0881	0,891	191, 179, 135	(Kramberger et al. 2020)
8	Caffeoyl quinic acid 3	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	8,5	3,07	353,0872	353,0878	-0,100	191, 179, 135	(Kramberger et al. 2020)
9	Caffeoyl quinic acid 4	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	8,5	3,19	353,0872	353,0878	0,155	191, 179, 173, 135	(Kramberger et al. 2020)
10	Caffeic acid	C ₉ H ₇ O ₄	6,5	3,32	179,0350	179,0350	0,212	135	(Gokhan Zengina et al. 2020)
11	Licoagroside B	C ₁₈ H ₂₃ O ₁₂	7,5	3,34	431,1189	431,1197	0,582	287 [C ₁₂ H ₁₅ O ₈] ⁻ , 143 [C ₆ H ₇ O ₄] ⁻	(Gampe et al. 2019; Li et al.2000; Morikawa et al. 2009)
12	Caffeoyl glycerol	C ₁₂ H ₁₃ O ₆	6,5	3,44	253,0707	253,0720	1,101	179, 161, 135	(Gokhan Zengina et al. 2020)
13	Kaempferol diglycoside	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆	13,5	4,36	609,1450	609,1462	0,118	284, 271, 227, 255	(Ajay P. Singh et al. 2017)
14	Quercetin glycoside	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	12,5	4,55	463,0877	463,0881	-0,279	301, 179	(Kramberger et al. 2020)
15	Kaempferol-3-O-glucoside	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	12,5	5,02	447,0927	447,0930	-0,659	327, 285, 284, 283, 255, 227, 211, 181, 175	(Francescato et al., 2013)
16	Apigenin-7-O-glucoside	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀	12,5	5,38	431,0978	431,0987	0,812	253, 161, 117	(Romero et al. 2020)
17	Eriodictyol	C ₁₅ H ₁₁ O ₆	10,5	5,40	287,0561	287,0563	0,657	259, 243, 201, 151, 125	(Brito et al. 2014)
18	Dicaffeoylquinic acid 1	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₂	14,5	5,47	515,1190	515,1196	0,137	353, 317, 299, 255, 203	(Kramberger et al. 2020)
19	Kaempferol 3-O-acetylhexoside 1	C ₂₃ H ₂₁ O ₁₂	13,5	5,50	489,1038	489,1040	0,308	429, 327, 285, 284, 255, 213, 151	(Abdel-Hady et al. 2018)
20	Kaempferol-3-O-malonyl-hexoside	C ₂₄ H ₂₁ O ₁₄	14,5	5,52	533,0931	533,0938	0,134	285	(Martucci et al. 2014)
21	Kaempferol 3-O-acetylhexoside	C ₂₃ H ₂₁ O ₁₂	13,5	5,91	489,1033	489,1038	-0,060	429, 327, 285, 284, 255, 213	(Abdel-Hady et al. 2018)
22	Kaempferol dihexoside	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₄	18,5	6,09	609,1244	609,1248	-0,359	463, 447, 323, 285, 243, 241, 229	(Kramberger et al. 2020)
23	Kaempferol 3-O-acetylhexoside 2	C ₂₃ H ₂₁ O ₁₂	13,5	6,20	489,1038	489,1040	0,370	429, 327, 285, 284, 255, 213	(Abdel-Hady et al. 2018)
24	Dicaffeoylquinic acid 2	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₂	14,5	6,36	515,1190	515,1199	0,720	353, 317, 299, 255, 203, 179, 161, 135	(Kramberger et al. 2020)
25	Quercetin	C ₁₅ H ₉ O ₇	11,5	6,65	301,0348	301,0354	0,180	178, 151	(Brito et al. 2014)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

26	Tiliroside	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₃	18,5	6,77	593,1295	593,1298	-0,512	447, 307, 285	(Felipe et al. 2014)
27	Tribuloside	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₃	18,5	7,02	593,1295	593,1295	-1,018	447, 307, 285, 163	(Chen et al. 2018)
28	Hydroxy fatty acid	C ₁₆ H ₂₉ O ₅	2,5	7,07	301,2020	301,2024	1,038	283, 171, 129, 127	(Xu et al. 2021)
29	Tricaffeoyl hexaric acid	C ₃₃ H ₂₇ O ₁₇	20,5	7,21	695,1248	695,1257	0,428	533, 371, 209, 191	(Kramberger et al. 2020)
30	Kaempferol-3-O-sophoroside-7-O-glucoside	C ₃₂ H ₂₇ O ₁₅	19,5	7,37	651,1350	651,1352	-0,589	609, 285	(Francescato et al., 2013)
31	Kaempferol glycoside	C ₃₀ H ₂₉ O ₁₄	16,5	7,51	613,1552	613,1564	0,149	459, 447, 297, 285, 284, 227, 211, 181	n.a.
32	Naringenin	C ₁₅ H ₁₁ O ₅	10,5	7,58	271,0606	271,0610	-0,726	271, 185, 151, 125, 119	(Chen et al. 2016)
33	Apigenin	C ₁₅ H ₉ O ₅	11,5	7,64	269,0455	269,0449	-2,552	225, 201, 151	(Brito et al. 2014)
34	Kaempferol	C ₁₅ H ₉ O ₆	11,5	7,80	285,0399	285,0404	-0,320	285, 257, 241, 229, 213, 185, 151, 107, 93	(Chen et al. 2016)
35	Isorhamnetin	C ₁₆ H ₁₁ O ₇	11,5	7,98	315,0499	315,0513	0,775	300, 151	(Le-yue Du et al. 2017)
36	Kaempferol-3-O-[6''-O-(trans-p-coumaroyl)-3''-O-acetyl]-β-D-glucopyranoside	C ₃₂ H ₂₇ O ₁₄	19,5	8,10	635,1401	635,1402	-0,675	285	(Wu et al. 2003)
37	Trihydroxy octadecadienoic acid 1	C ₁₈ H ₃₁ O ₅	3,5	8,11	327,2177	327,2183	1,903	n.a.	(Khaled A. Nematallah et al. 2018)
38	Pinellic acid	C ₁₈ H ₃₃ O ₅	2,5	8,77	329,2328	329,2329	-1,237	229, 211, 171	(Ruan et al. 2019)
39	3,5-Dihydroxy-hexadecanoic acid	C ₁₆ H ₃₁ O ₄	1,5	9,08	287,2217	287,2230	0,722	269, 241	(Wang et al. 2017)
40	Trihydroxy octadecenoic acid	C ₁₈ H ₃₃ O ₅	2,5	9,68	329,2333	329,2335	0,524	311, 293, 275	(Khaled A. Nematallah et al. 2018)
41	Araneophthalide	C ₁₅ H ₁₇ O ₆	7,5	9,75	293,1025	293,1035	1,667	249 [M-CO ₂] ⁻ , 191 [M-CO ₂ -C ₃ H ₇ O] ⁻	(Jakupovic et al. 1987)
42	5,3',4'-trihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavone	C ₁₈ H ₁₅ O ₈	11,5	9,82	359,0761	359,0774	0,499	344, 331, 225, 210, 195	(Michel Randriaminahy et al. 1992)
43	Άγνωστο	C ₁₇ H ₂₅ O ₄	5,5	10,76	293,1747	293,1760	0,673	n.a.	n.a.
44	Phloroglucinol derivative analogue to 4-[3,5-dihydroxy-4-(2-methyl-1-oxopropyl)phenoxy]-2-methyl-2-butenic acid methyl ester	C ₁₆ H ₁₉ O ₆	7,5	11,07	307,1176	307,1191	1,200	263 [M-H-CO ₂] ⁻ , 194 [M-H-C ₆ H ₉ O ₂] ⁻	(Jakupovic et al. 1989)
45	Dihydroxy octadecadienoic acid	C ₁₈ H ₃₁ O ₄	3,5	11,11	311,2228	311,2227	-0,105	293, 275	(Khaled A. Nematallah et al. 2018)
46	Άγνωστο	C ₂₀ H ₁₉ O ₆	11,5	11,29	355,1176	355,1188	0,249	n.a.	n.a.
47	Acronyline	C ₁₄ H ₁₇ O ₄	6,5	11,53	249,1121	249,1134	0,513	219 [M-H-2CH ₃] ⁻ , 180 [M-H-prenyl] ⁻	(D'Abrosca et al. 2016; Kouloura et al. 2012)
48	Octadecanedioic acid	C ₁₈ H ₃₃ O ₄	2,5	11,68	313,2373	313,2385	0,087	295 [M-H-H ₂ O] ⁻	(Wang et al., 2017)
49	Prenyl phloroglucinol derivative	C ₁₈ H ₁₇ O ₄	10,5	11,79	297,1121	297,1131	1,501	228 [M-H-prenyl] ⁻	(Jakupovic et al., 1989)
50	Pyrone derivative	C ₂₇ H ₂₇ O ₈	14,5	11,95	479,1700	479,1716	0,895	325, 313, 153 (pyrone fragment C ₈ H ₉ O ₃)	n.a.
51	Tetrahydrocurcumin	C ₂₁ H ₂₅ O ₆	9,5	12,02	373,1646	373,1660	0,880	235 [C ₁₃ H ₁₄ O ₄] ⁻ , 193 [C ₁₁ H ₁₃ O ₃] ⁻	(Vidal-Casanella et al., 2020)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

52	Helenyonic acid (9-hydroxy-10E-octadecen-12-ynoic acid)	C ₁₈ H ₂₉ O ₃	4,5	12,19	293,2111	293,2125	1,030	249, 197, 195, 185, 113	(Wang et al., 2020)
53	Άγνωστο	C ₂₅ H ₂₅ O ₆	13,5	12,25	421,1646	421,1658	0,399	n.a.	n.a.
54	Phloroglucinol derivative equal to (E)-4-(3,5-dihydroxy-4-(2-methylbutanoyl)phenoxy)-2-methylbut-2-en-1-yl acetate	C ₁₈ H ₂₃ O ₆	7,5	12,36	335,1489	335,1502	0,681	[M-H-C ₅ H ₉ O] ⁺ : 251 (C ₁₃ H ₁₅ O ₅) [251-C ₂ OH ₃] ⁺ : 209 (C ₁₁ H ₁₃ O ₄)	(Jakupovic et al. 1989)
55	Prenylated flavonoid	C ₂₀ H ₁₇ O ₅	12,5	12,43	337,1076	337,1082	0,098	[M-H-CO] ⁺ : 309, [M-H-prenyl] ⁺ : 268	n.a.
56	Hydroxy octadecadienoic acid	C ₁₈ H ₃₁ O ₃	3,5	12,55	295,2279	295,2281	0,955	277	(Khaled A. Nematallah et al. 2018)
57	Prenylated polyphenol	C ₂₆ H ₂₇ O ₆	13,5	12,57	435,1808	435,1813	0,065	[M-H-C ₅ H ₉] ⁺ : 366	(Buckingham & Munasinghe 2015)
58	Άγνωστο	C ₂₅ H ₂₃ O ₆	14,5	12,69	419,1495	419,1505	1,046	n.a.	n.a.
59	Άγνωστο	C ₂₃ H ₂₉ O ₆	9,5	12,92	401,1959	401,1974	0,992	n.a.	n.a.
60	Prenylated polyphenol	C ₂₂ H ₂₃ O ₄	11,5	12,94	351,1591	351,1605	0,790	[M-H- C ₅ H ₉] ⁺ : 282 (C ₁₇ H ₁₄ O ₄)	(Buckingham & Munasinghe 2015)
61	Pyrone derivative	C ₂₅ H ₃₁ O ₈	10,5	12,98	459,2013	459,2023	-0,307	293, 153 (pyrone fragment C ₈ H ₉ O ₃)	n.a.
62	Άγνωστο	C ₂₂ H ₂₅ O ₆	10,5	13,04	385,1646	385,1661	1,164	n.a.	n.a.
63	Άγνωστο	C ₂₆ H ₂₅ O ₆	14,5	13,08	433,1646	433,1659	0,596	n.a.	n.a.
64	Prenylated phloroglucinol analogue to phenyl(2,4,6-trihydroxy-3,5-bis(3-methylbut-2-en-1-yl)phenyl)methanone	C ₂₃ H ₂₅ O ₄	11,5	13,12	365,1747	365,1760	0,431	296 [M-H-C ₅ H ₉] ⁺ ; 287 [(M-2H-C ₆ H ₅) ⁺]; 227 [M-H-2C ₅ H ₉] ⁺	(Jakupovic et al. 1989)
65	Pyrone derivative	C ₂₁ H ₂₅ O ₇	9,5	13,16	389,1595	389,1609	0,729	223, 153 (pyrone fragment C ₈ H ₉ O ₃)	n.a.
66	Άγνωστο	C ₂₄ H ₃₁ O ₆	9,5	13,20	415,2115	415,2129	0,742	329, 303, 289, 277	n.a.
67	Άγνωστο	C ₂₃ H ₂₇ O ₆	10,5	13,34	399,1802	399,1816	0,672	328, 301, 287, 273	n.a.
68	Prenylated polyphenol with pyrone moiety	C ₂₉ H ₄₁ O ₅	9,5	13,46	469,2949	469,2960	0,154	400 [M-H-C ₅ H ₉] ⁺ ; 327, 301, 288, 273, 152 (pyrone fragment C ₇ H ₄ O ₄)	n.a.
69	Prenylated polyphenol with pyrone moiety	C ₂₉ H ₄₁ O ₆	9,5	13,60	485,2898	485,2913	1,323	416 [M-H-C ₅ H ₉] ⁺ ; 327, 301, 288, 273, 166 (pyrone fragment C ₈ H ₆ O ₄)	n.a.
70	Pyrone derivative	C ₂₇ H ₂₅ O ₇	15,5	13,66	461,1595	461,1608	0,485	295, 153 (pyrone fragment C ₈ H ₉ O ₃)	n.a.
71	Prenylated polyphenol analogue to hyperbeanols and aristophenone A	C ₃₃ H ₄₁ O ₆	13,5	13,70	533,2898	533,2911	0,408	515 [M-H-H ₂ O] ⁺ ; 501, 464 [M-H-C ₅ H ₉] ⁺ ; 437, 419, 395 [M-H-2C ₅ H ₉] ⁺ ; 387, 380, 368, 364, 321, 311, 296, 284, 275	n.a.
72	Pyrone derivative	C ₂₇ H ₂₇ O ₇	14,5	13,75	463,1751	463,1762	-0,035	297, 153 (pyrone fragment C ₈ H ₉ O ₃)	n.a.
73	Prenylated polyphenol with pyrone moiety	C ₃₀ H ₄₃ O ₅	9,5	13,83	483,3105	483,3116	0,025	465, 439, 421, 414 [M-H-C ₅ H ₉] ⁺ ; 397, 387, 371, 355, 345 [M-H-2C ₅ H ₉] ⁺ ; 330, 315, 287, 275, 262, 219, 207, 194, 152 152 (pyrone fragment C ₇ H ₄ O ₄)	n.a.
74	Prenylated polyphenol	C ₃₀ H ₄₃ O ₆	9,5	13,90	499,3054	499,3065	-0,045	481 [M-H-H ₂ O] ⁺ ; 467, 430 [M-H-C ₅ H ₉] ⁺ ; 403, 385, 361, 346, 277, 249, 194	n.a.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

75	Cycloarzanol	C ₂₄ H ₃₃ O ₄	8,5	14,01	385,2373	385,2385	0,071	341, 316, 301, 273, 248, 205, 180	(Akaberi et al. 2019)
76	Pyrone derivative	C ₂₃ H ₂₅ O ₇	11,5	14,07	413,1595	413,1610	1,122	247, 153 (pyrone fragment C ₈ H ₉ O ₃)	n.a.
77	Italipyrone	C ₂₂ H ₂₃ O ₇	11,5	14,25	399,1444	399,1455	1,387	399, 245, 233, 153 (pyrone fragment C ₈ H ₉ O ₃), 109	(Kramberger et al. 2020)
78	Pyrone derivative	C ₂₅ H ₃₅ O ₄	8,5	14,37	399,2530	399,2542	0,394	355, 330, 315, 287, 275, 262, 247, 219, 194, 152 (pyrone fragment C ₇ H ₄ O ₄)	n.a.
79	Pyrone derivative	C ₂₃ H ₂₅ O ₇	11,5	14,67	413,1595	413,1611	1,267	369, 344, 329, 301, 276, 261, 247, 233, 153 (pyrone fragment C ₈ H ₉ O ₃)	n.a.
80	Pyrone derivative	C ₂₈ H ₃₉ O ₄	9,5	14,73	439,2843	439,2855	0,175	395, 370, 327, 302, 301, 259, 234, 191, 166, 149, 138 (pyrone fragment C ₇ H ₆ O ₃)	n.a.
81	Pyrone derivative analogue to 22-methyl-22-ethyl-italipyrone	C ₂₄ H ₂₇ O ₇	11,5	15,04	427,1751	427,1763	0,102	383, 315, 301, 287, 275, 261, 247, 233, 221, 153 (pyrone fragment C ₈ H ₉ O ₃)	(Merikli et al. 1980)
82	Prenylated polyphenol with pyrone moiety	C ₂₉ H ₄₁ O ₄	9,5	15,11	453,2999	453,3008	-0,426	409, 384 [M-H-C ₅ H ₉] ⁻ ; 341, 316, 315, 273, 261, 248, 205, 193, 180, 152 (pyrone fragment C ₇ H ₄ O ₄)	n.a.
83	Prenylated polyphenol with pyrone moiety	C ₃₀ H ₄₃ O ₄	9,5	15,45	467,3156	467,3167	-0,071	423, 398 [M-H-C ₅ H ₉] ⁻ ; 355, 330, 329, 287, 275, 262, 219, 207, 194, 152 (pyrone fragment C ₇ H ₄ O ₄)	n.a.
84	Prenylated polyphenol	C ₃₃ H ₄₁ O ₄	13,5	15,50	501,2999	501,3006	-0,864	457, 432 [M-H-C ₅ H ₉] ⁻ ; 423, 389, 365, 363, 321, 309, 296, 295, 253, 241, 228	n.a.
85	Olelybitalin A	C ₃₁ H ₄₅ O ₄	9,5	15,75	481,3318	481,3321	0,634	343 [M-H-C ₁₀ H ₁₈] ⁻ ; 301 [M-H-C ₁₃ H ₂₄] ⁻ ; 289 [M-H-C ₁₄ H ₂₄] ⁻ ; 276 [M-H-C ₁₅ H ₂₅] ⁻ ; 233 [M-H-C ₁₈ H ₃₂] ⁻	(Taglialatela-Scafati et al. 2013)
86	Άγνωστο	C ₂₂ H ₂₅ O ₈		16,26		417,1551		277, 263, 251, 233, 221, 209, 193, 179, 167, 153 (pyrone fragment C ₈ H ₉ O ₃)	n.a.
87	Άγνωστο	C ₂₇ H ₂₇ O ₈	14,5	16,61	479,1700	479,1711	-0,065		n.a.
88	Arzanol analogue	C ₂₃ H ₂₇ O ₈	10,5	16,68	431,1700	431,1712	0,206		n.a.
89	Pyrone derivative	C ₂₇ H ₂₅ O ₇	15,5	16,72	461,1600	461,1608	1,674	417, 359, 315, 307, 295, 279, 223, 153 (pyrone fragment C ₈ H ₉ O ₃)	n.a.
90	Heliarzanol 2	C ₂₄ H ₂₉ O ₈	10,5	16,79	445,1862	445,1868	0,020	445, 291, 279, 261	(Kramberger et al. 2020)
91	Arenol	C ₂₁ H ₂₃ O ₇	10,5	16,86	387,1444	387,1446	0,625	261, 247, 235, 205, 166, 139 (pyrone fragment C ₇ H ₇ O ₃)	(Rios et al. 1991)
92	Arzanol	C ₂₂ H ₂₅ O ₇	10,5	17,05	401,1600	401,1599	1,661	247, 235, 205, 191, 166, 153 (pyrone fragment C ₈ H ₉ O ₃)	(Kramberger et al. 2020)
93	Άγνωστο	C ₂₆ H ₂₅ O ₇	14,5	17,15	449,1595	449,1607	0,298		n.a.
94	3-Methylarzanol	C ₂₃ H ₂₇ O ₇	10,5	17,22	415,1757	415,1761	0,329	415, 261, 249, 205, 193, 180, 153 (pyrone fragment C ₈ H ₉ O ₃), 109	(Kramberger et al. 2020)
95	Άγνωστο	C ₂₇ H ₂₇ O ₇	14,5	17,34	463,1757	463,1758	0,964	309, 297, 227, 153 (pyrone fragment C ₈ H ₉ O ₃)	n.a.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

96	6-O-desmethyllauricepyron or arenol C analogue	C ₂₄ H ₂₉ O ₇	10,5	17,47	429,1913	429,1913	0,112	153 (pyrone fragment C ₈ H ₉ O ₃)	(Akaberi et al. 2019; MaryamAkaberi et al. 2021; Mericli, et al. 1980)
97	Auricepyron analogue	C ₂₅ H ₃₁ O ₇	10,5	17,56	443,2070	443,2072	0,591	153 (pyrone fragment C ₈ H ₉ O ₃)	(Bohlmann Ferdinand 1980; Mericli et al. 1980)

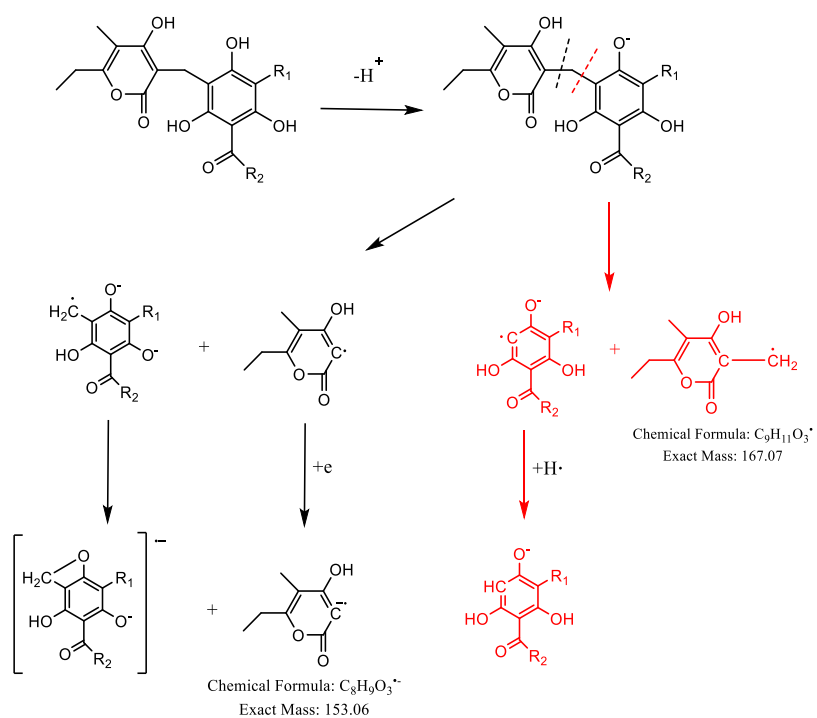
Παράρτημα Κεφαλαίου 5

Πίνακας Π5.1: Αποδόσεις και εμφάνιση ολικών εκχυλισμάτων ταξιανθιών και στελεχών *Helichrysum amorginum* 2017 από διαδοχικές εκχυλίσεις και ολικού DCM εκχυλίσματος ταξιανθιών *H. amorginum* 2020

Φυτικό υλικό (g)	Ταξιανθίες <i>H. amorginum</i> 2017 (94 g)				Φυλλώδη στελέχη <i>H. amorginum</i> 2017 (104 g)			
Ολικό εκχύλισμα	n-hexane	DCM	MeOH	H ₂ O	n-hexane	DCM	MeOH	H ₂ O
Βάρος (g)/%απόδοση	0,988/1,05	1,3675/1,45	8,9576/9,67	9/10,76	0,918/0,88	2,4009/2,3	6,1821/6,08	15,5/16,24
Εμφάνιση	Κίτρινο, κηρώδες	Κίτρινο, κηρώδες	Σκούρο κίτρινο, κολλώδες	Καφέ, εύθρυπτο	Πράσινο, κηρώδες	Πράσινο, κηρώδες	Σκούρο πράσινο, κολλώδες	Καφέ, εύθρυπτο

Φυτικό υλικό (g)	Ταξιανθίες <i>H. amorginum</i> 2020 (926 g)
Ολικό εκχύλισμα	DCM
Βάρος(g)/%απόδοση	21/2,27%
εμφάνιση	Σκούρο Κίτρινο, κηρώδες

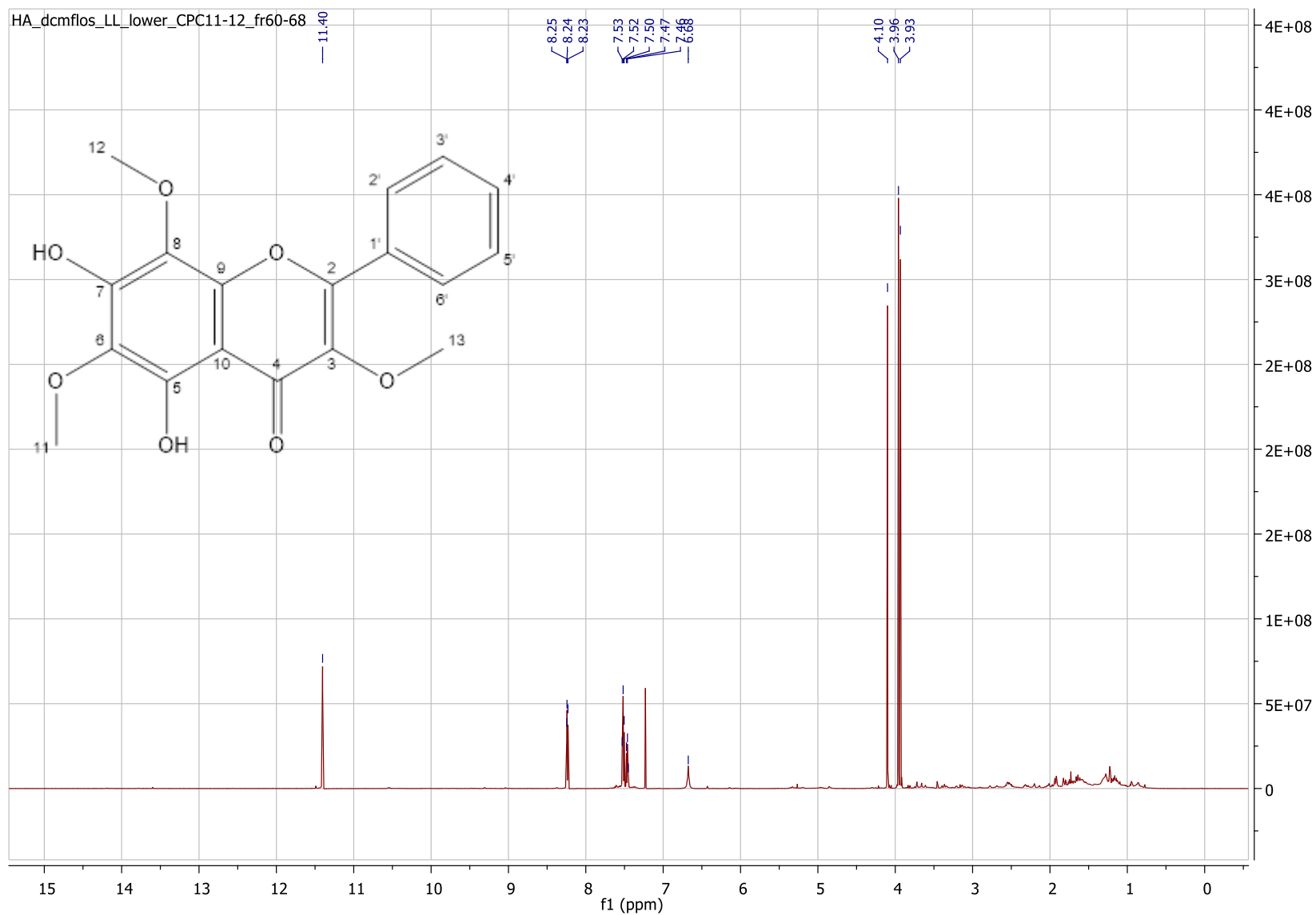
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



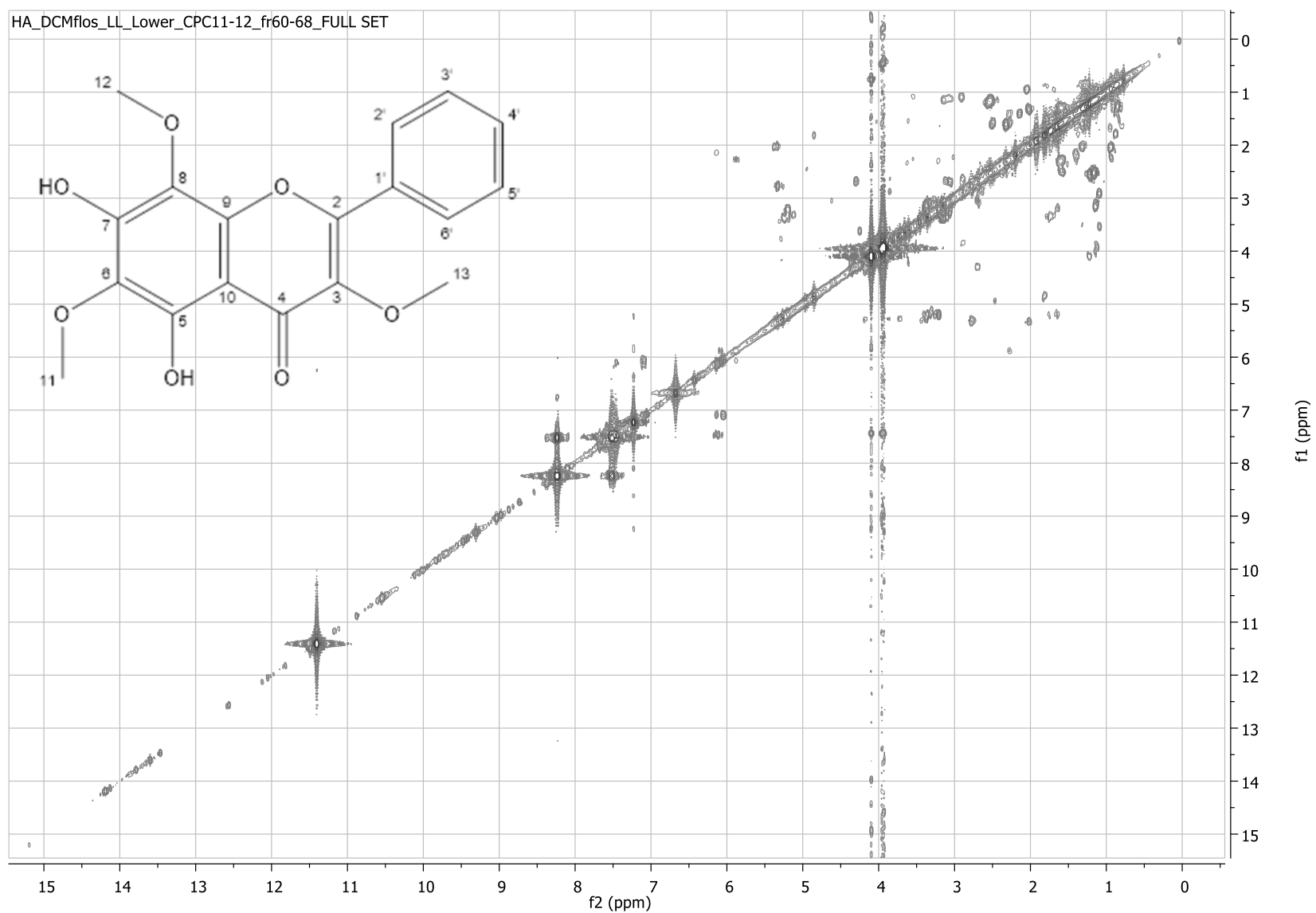
R ₁	R ₂	Μεταβολίτης [M-H] ⁻
		Heliarzanol (14)
		C ₂₇ H ₂₇ O ₇ (13)
		C ₂₇ H ₂₇ O ₈ (15)

Εικόνα Π5.1: Προτεινόμενο διάγραμμα θραυσματοποίησης σε αρνητικό ιονισμό των μεταβολιτών 13, 14, 15

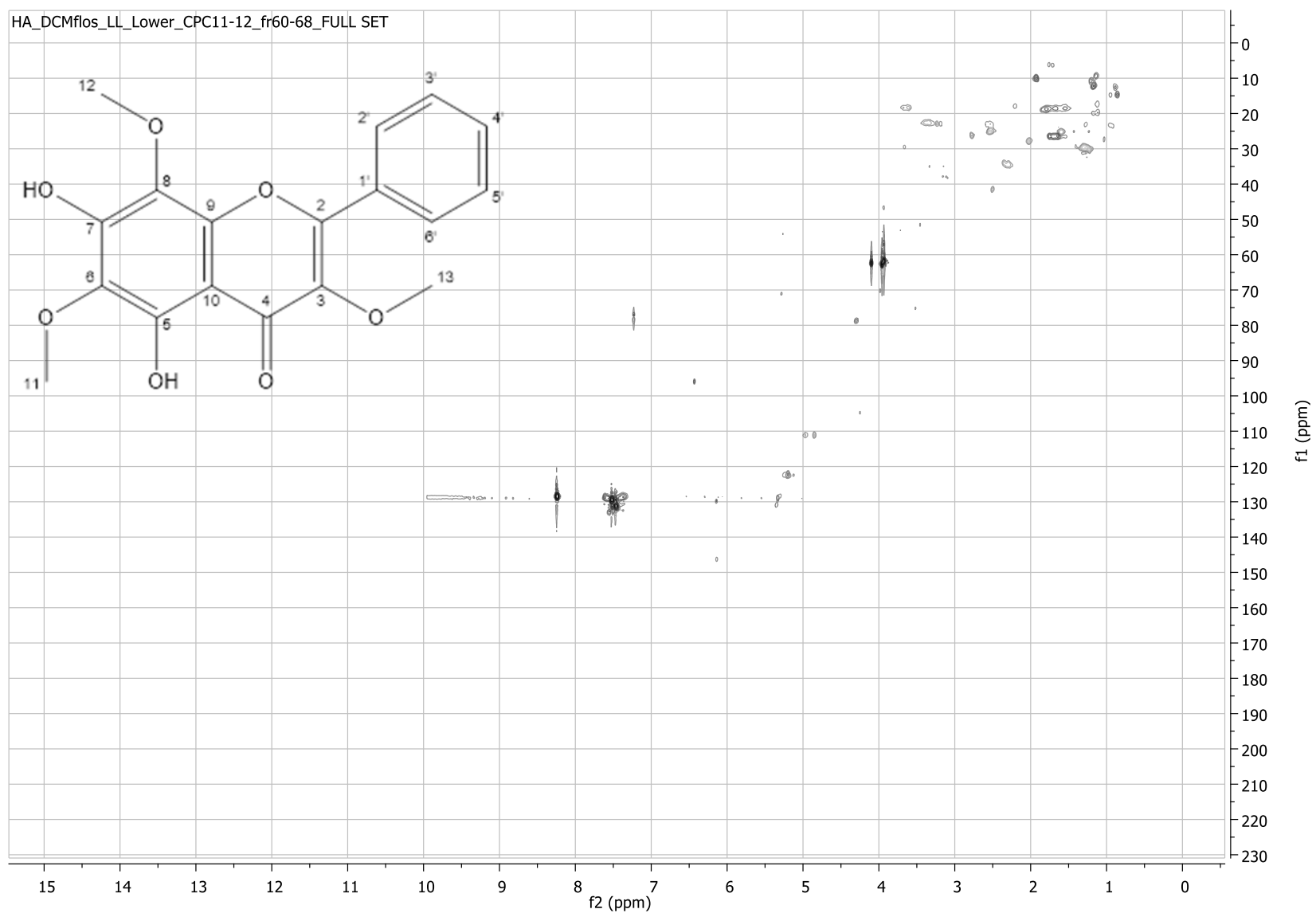
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



Εικόνα Π5.2: ¹H NMR φάσμα του μεταβολίτη **10**: 5,7-dihydroxy-3,6,8-trimethoxyflavone σε CDCl₃ (600MHz)



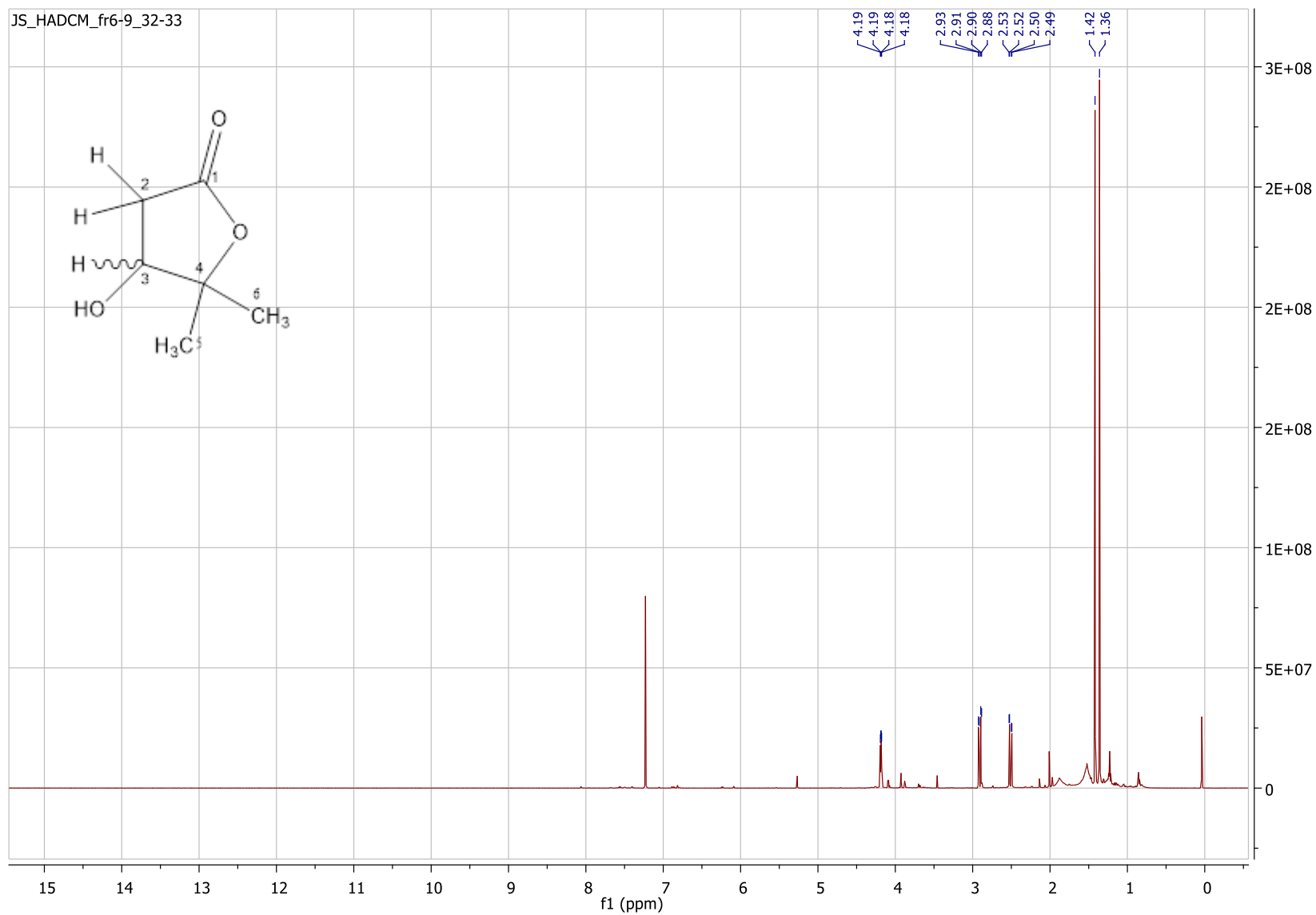
Εικόνα Π5.3: COSY NMR φάσμα του μεταβολίτη **10**: 5,7-dihydroxy-3,6,8-trimethoxyflavone σε CDCl_3 (600MHz)



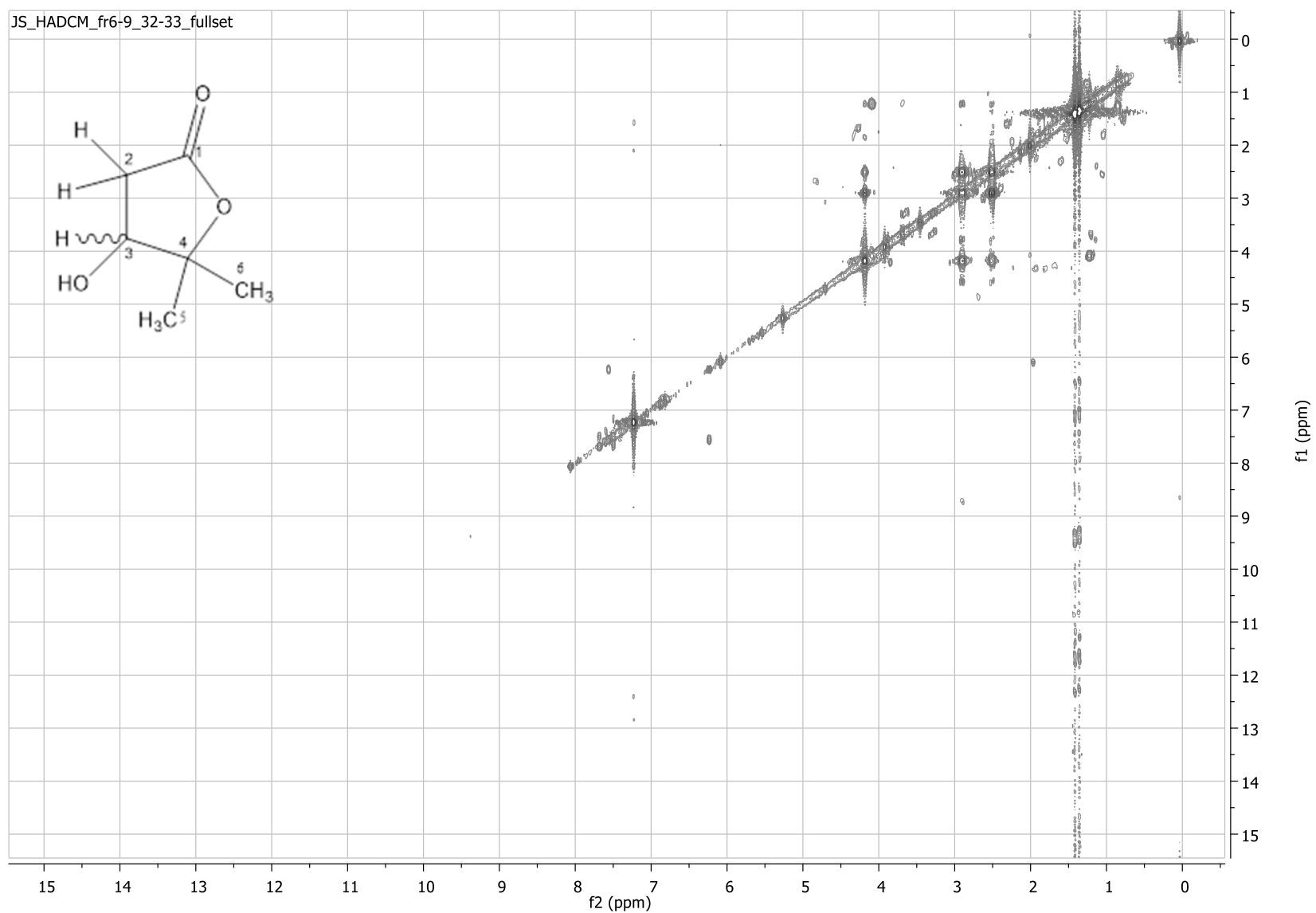
Εικόνα Π5.4: HSQC/DEPT NMR φάσμα του μεταβολίτη **10**: 5,7-dihydroxy-3,6,8-trimethoxyflavone σε CDCl_3 (600MHz)

390

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

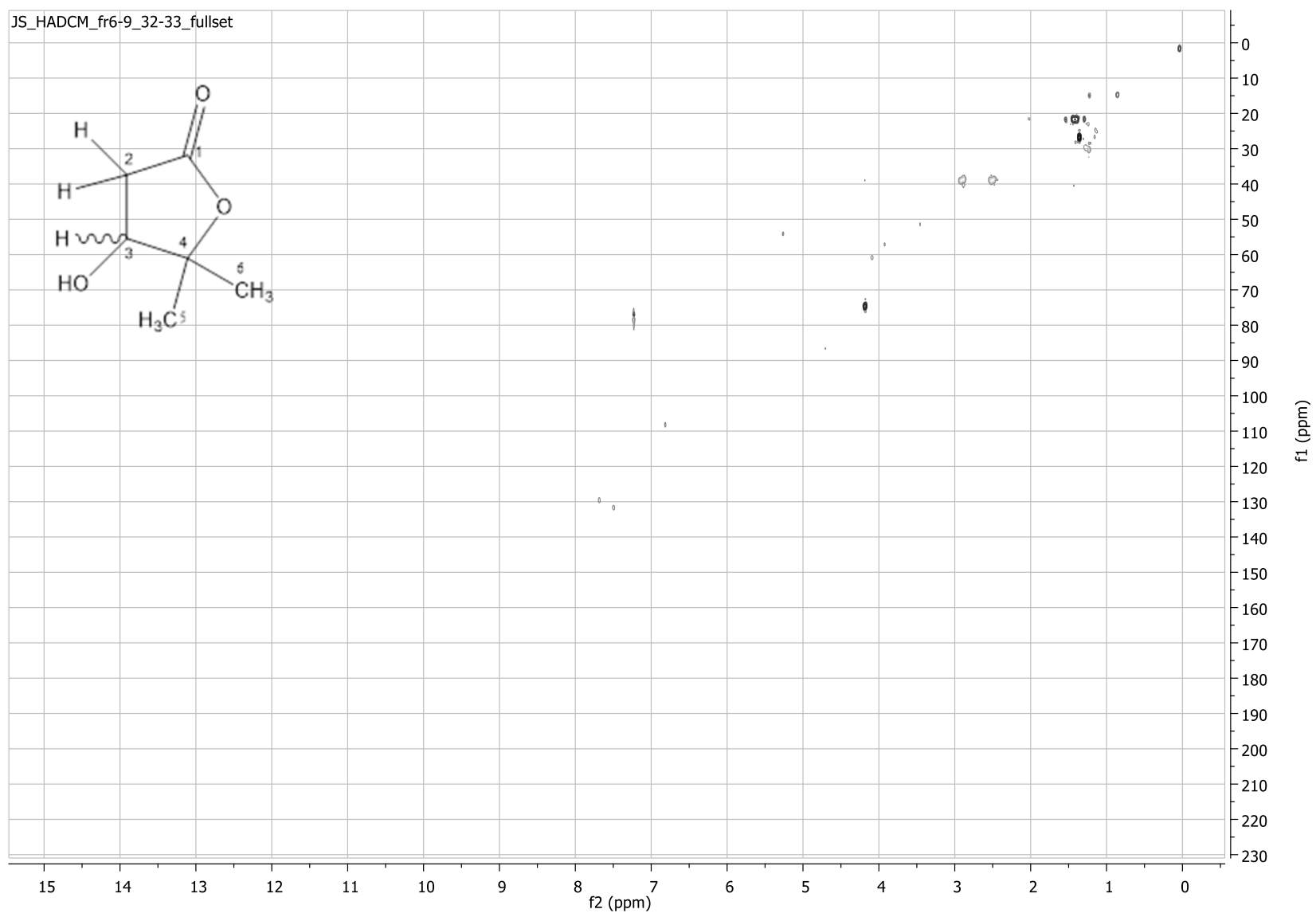


Εικόνα Π5.6: ¹H NMR φάσμα του μεταβολίτη **11**: 3-hydroxy-4,4-dimethyl-4-butyrolactone σε CDCl₃ (600MHz)

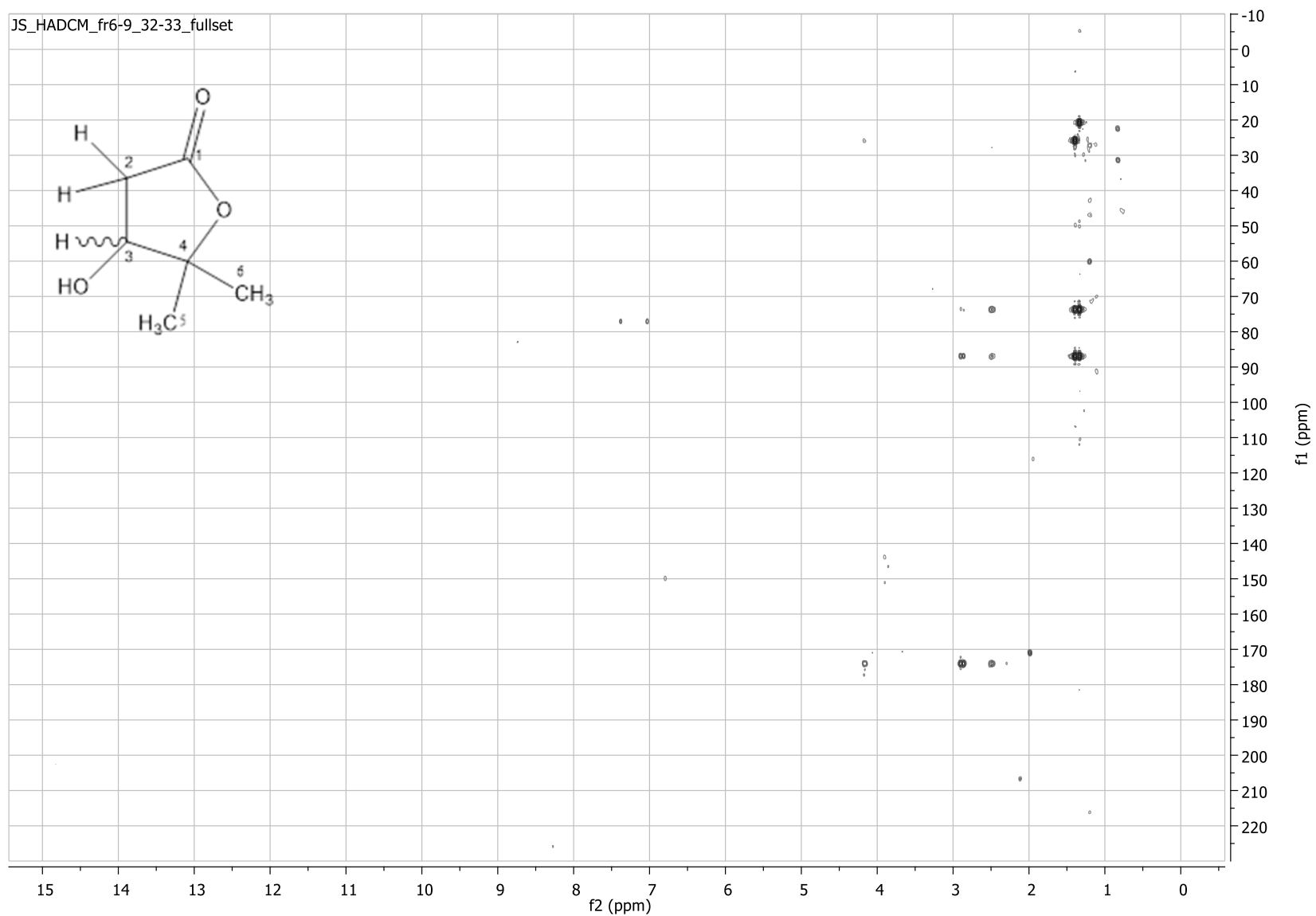


Εικόνα Π5.7: COSY NMR φάσμα του μεταβολίτη **11**: 3-hydroxy-4,4-dimethyl-4-butyrolactone σε CDCl₃ (600MHz)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

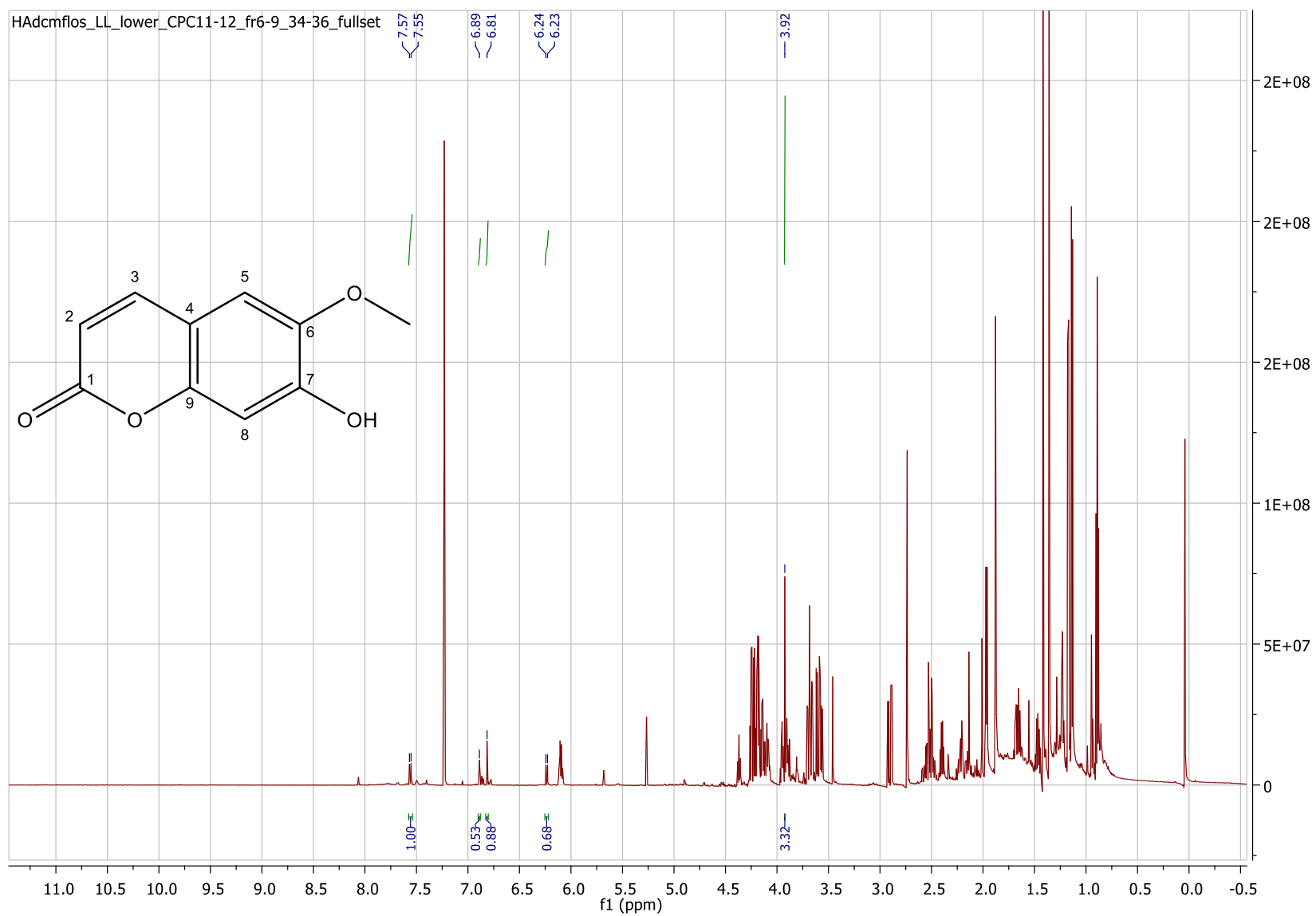


Εικόνα Π5.8: HSQC/DEPT NMR φάσμα του μεταβολίτη **11**: 3-hydroxy-4,4-dimethyl-4-butyrolactone σε CDCl_3 (600MHz)

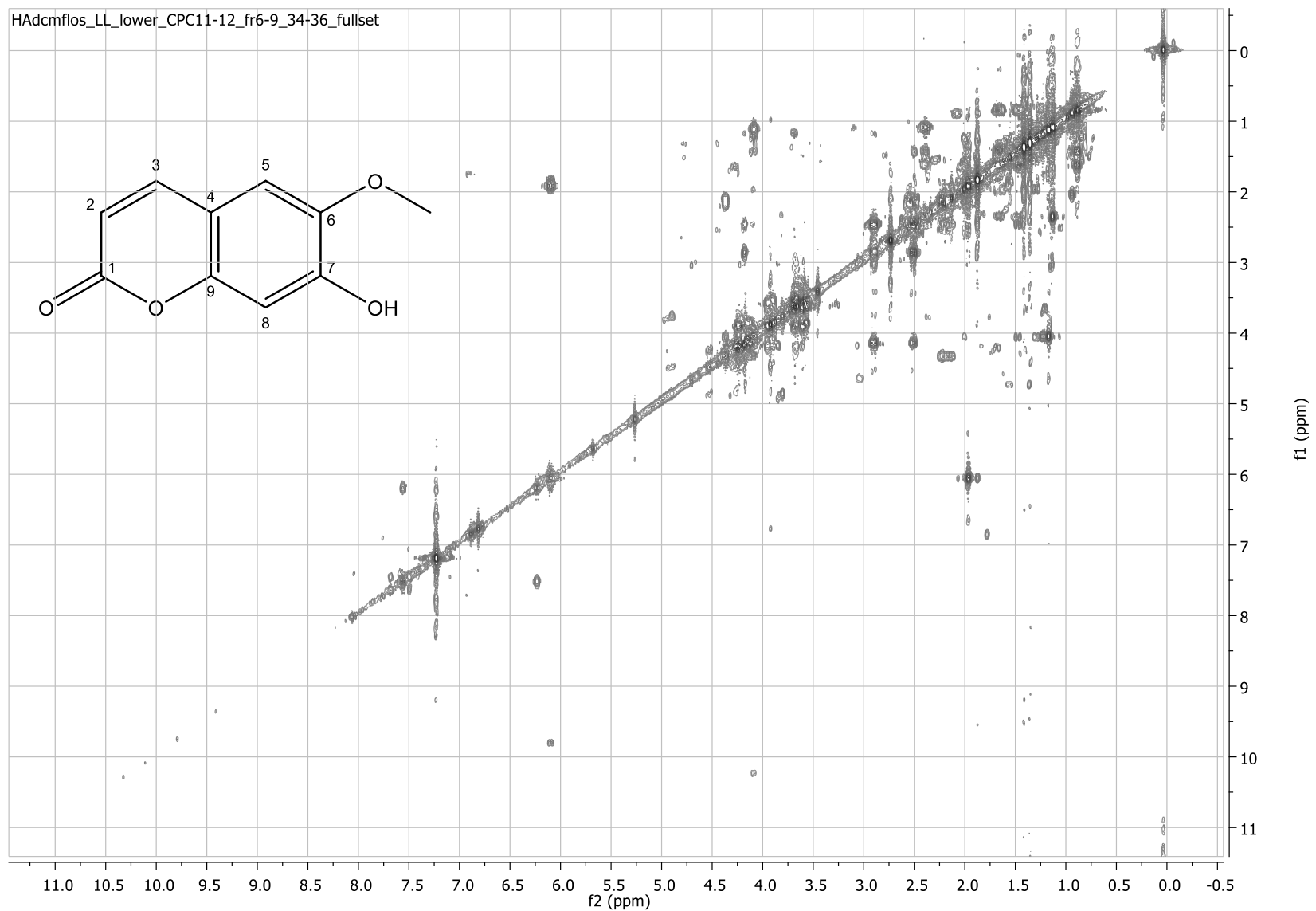


Εικόνα Π5.9: HMBC NMR φάσμα του μεταβολίτη **11**: 3-hydroxy-4,4-dimethyl-4-butyrolactone σε CDCl_3 (600MHz)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

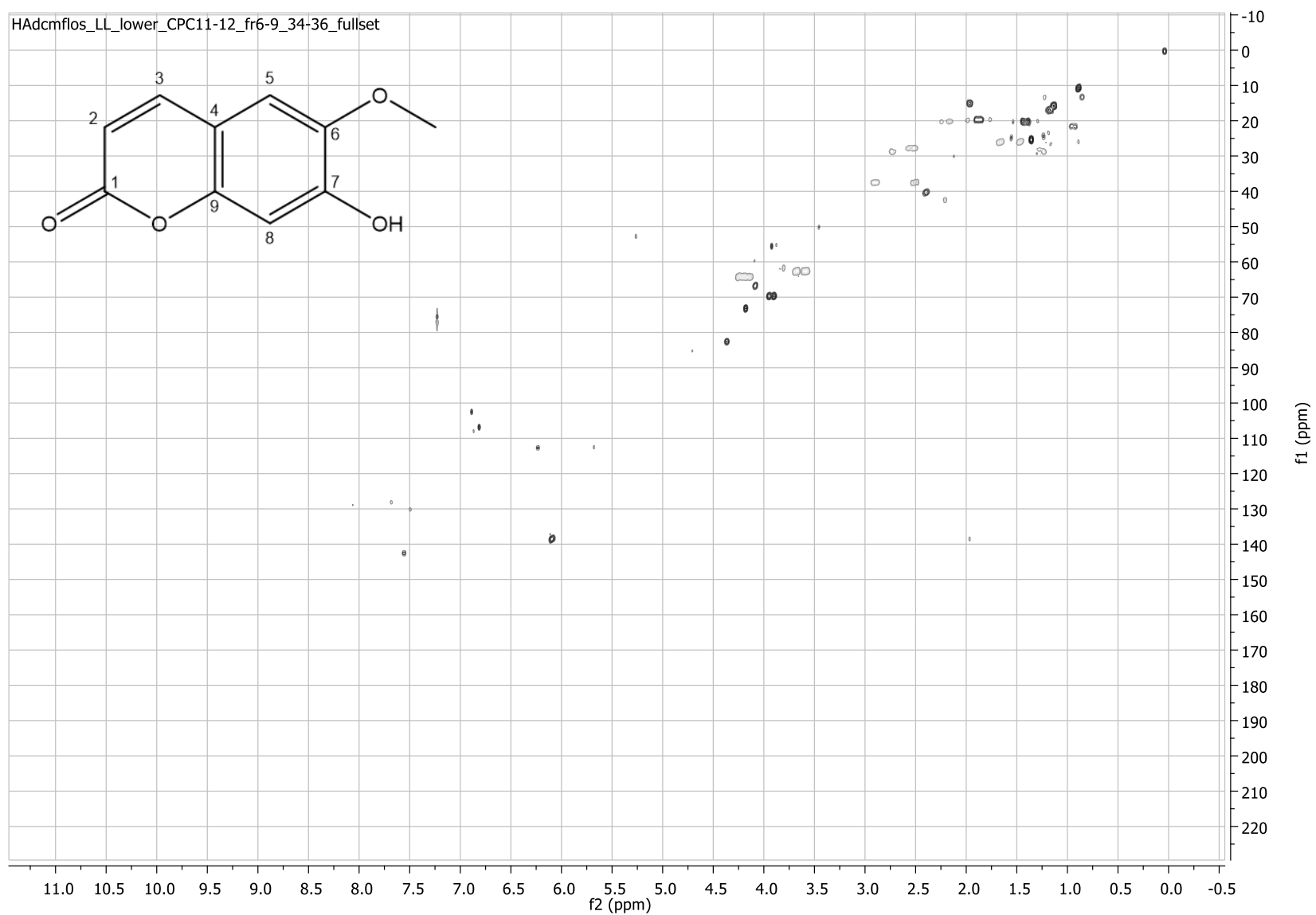


Εικόνα Π5.10: ^1H NMR φάσμα του μεταβολίτη **12**: scopoletin σε CDCl_3 (600MHz)

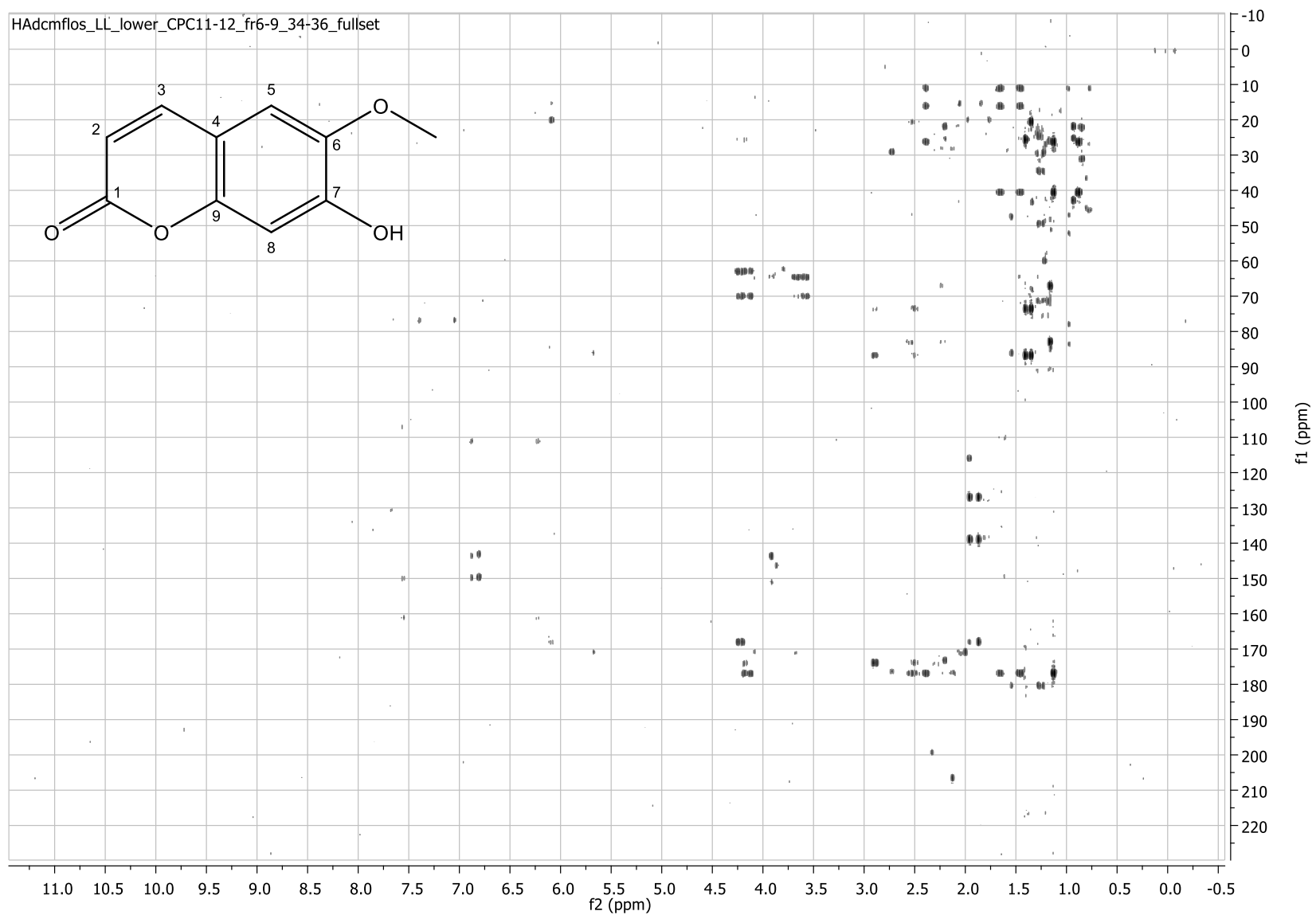


Εικόνα Π5.11: COSY NMR φάσμα του μεταβολίτη **12**: scopoletin σε CDCl_3 (600MHz)

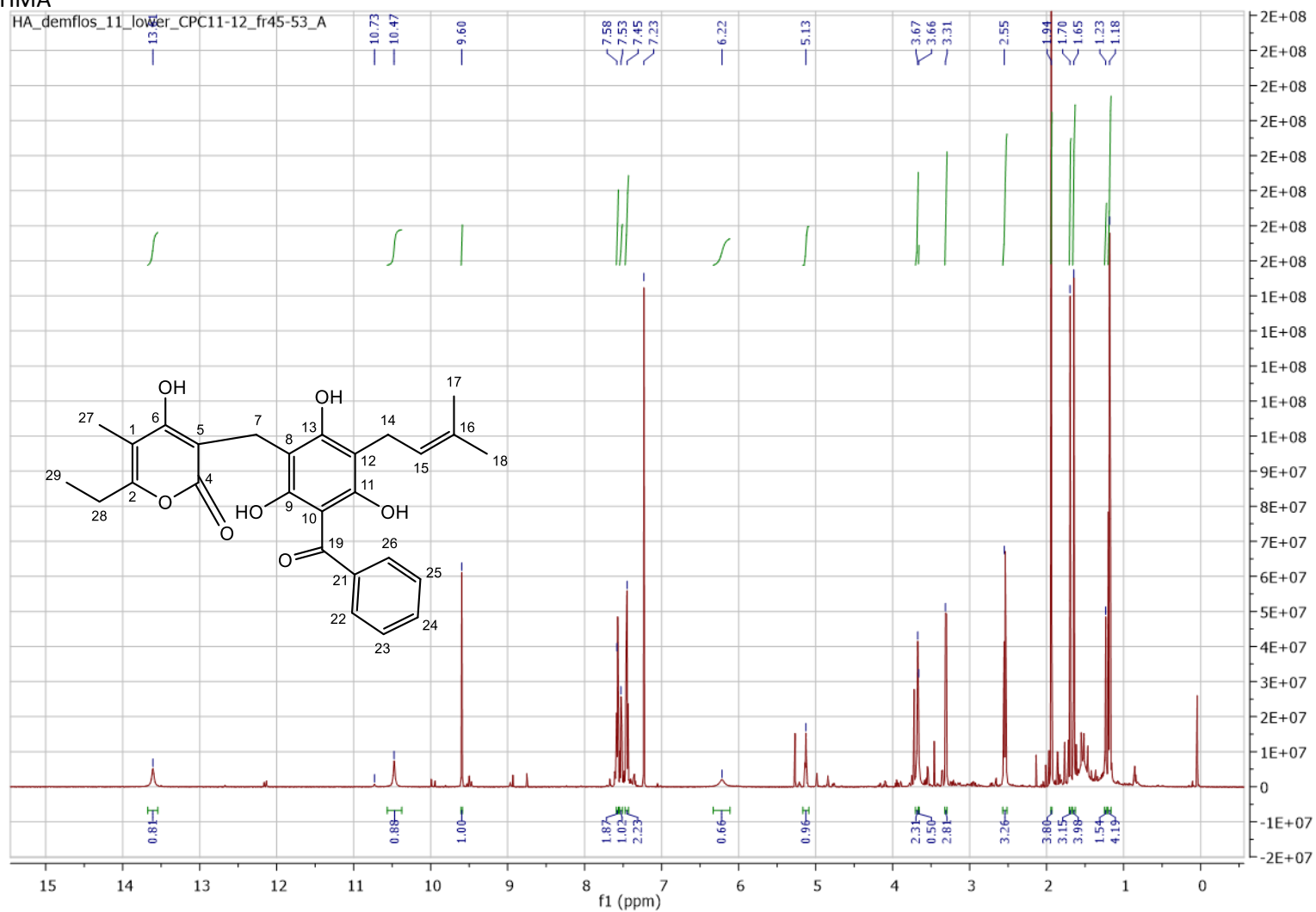
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



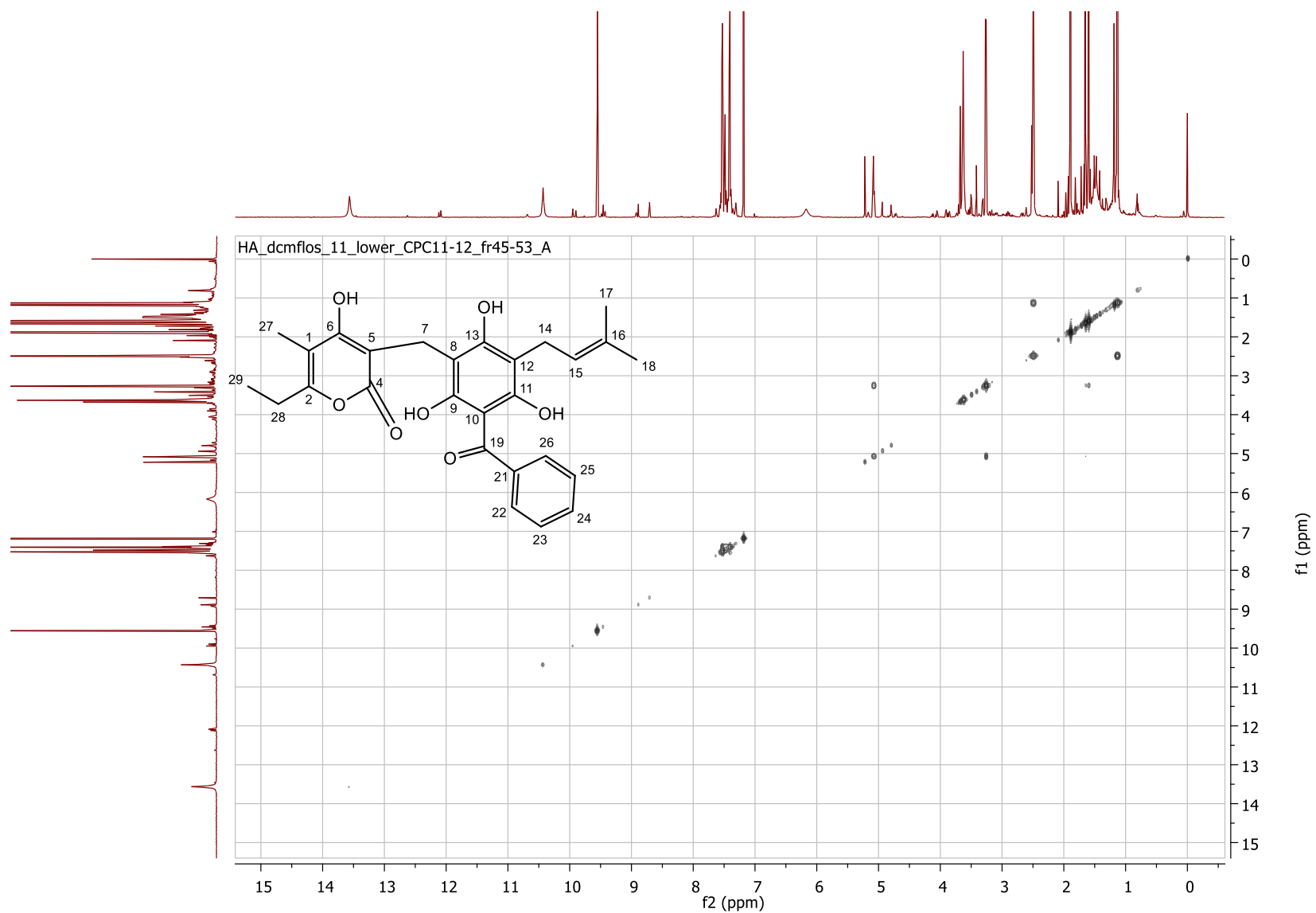
Εικόνα Π5.12: HSQC/DEPT NMR φάσμα του μεταβολίτη **12**: scopoletin σε CDCl_3 (600MHz)

Εικόνα Π5.13: HMBC NMR φάσμα του μεταβολίτη **12**: scopoletin σε $CDCl_3$ (600MHz)

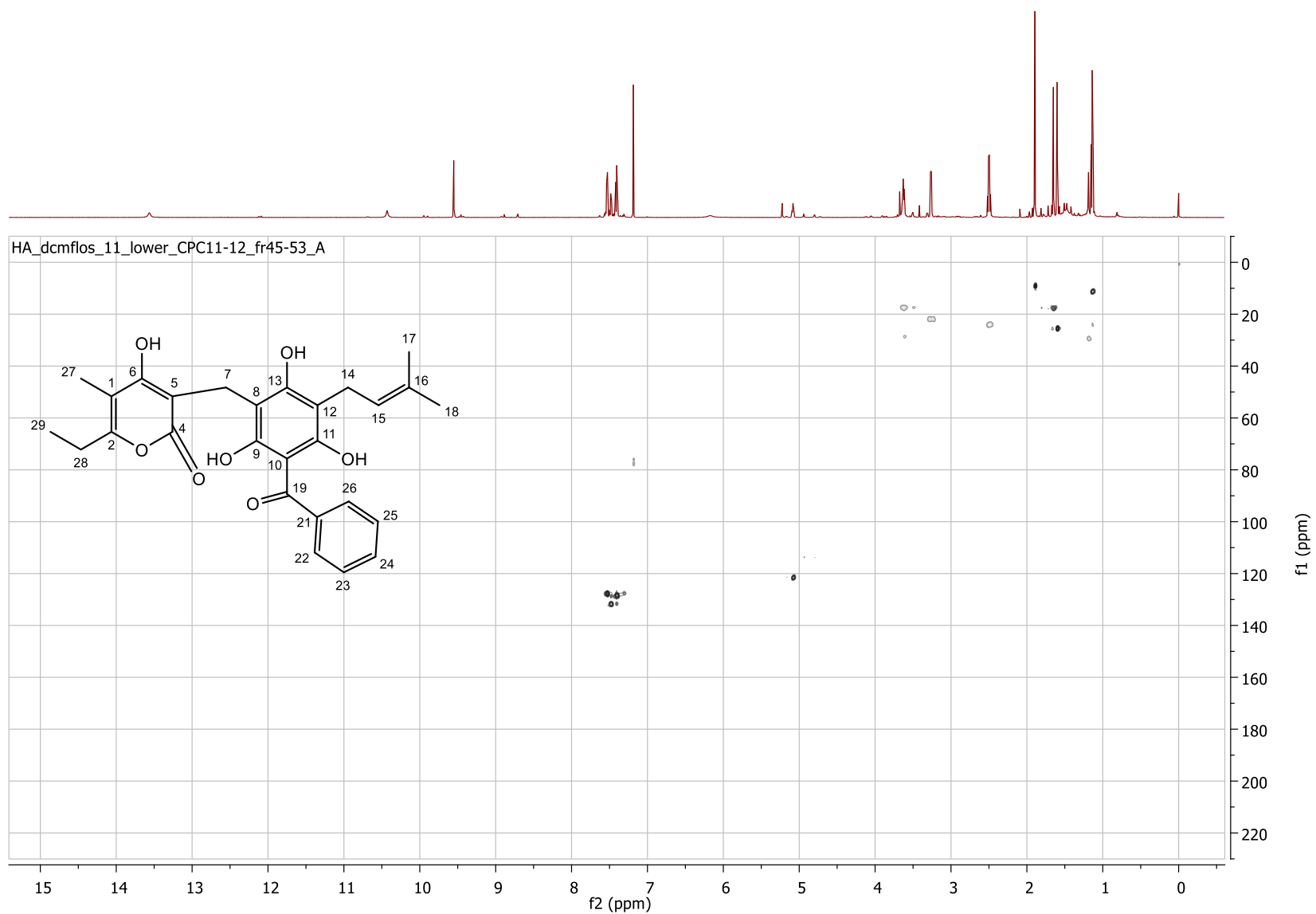
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



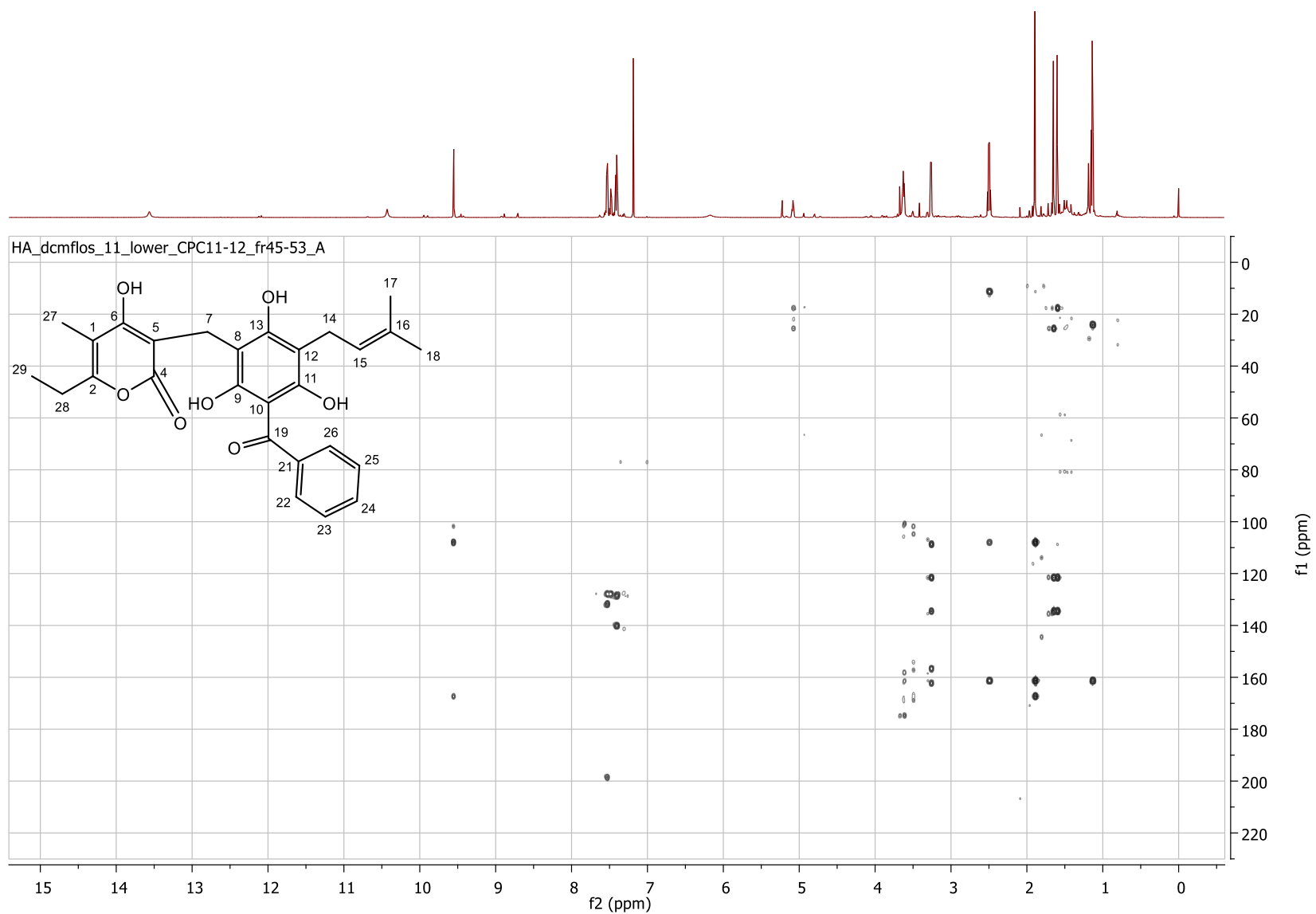
Εικόνα Π5.14: ¹H NMR φάσμα του μεταβολίτη **13**: 3-(3-benzoyl-2,4,6-trihydroxy-5-(3-methylbut-2-en-1-yl)benzyl)-6-ethyl-4-hydroxy-5-methyl-2H-pyran-2-one (C₂₇H₂₈O₇) σε CDCl₃ (600 MHz)



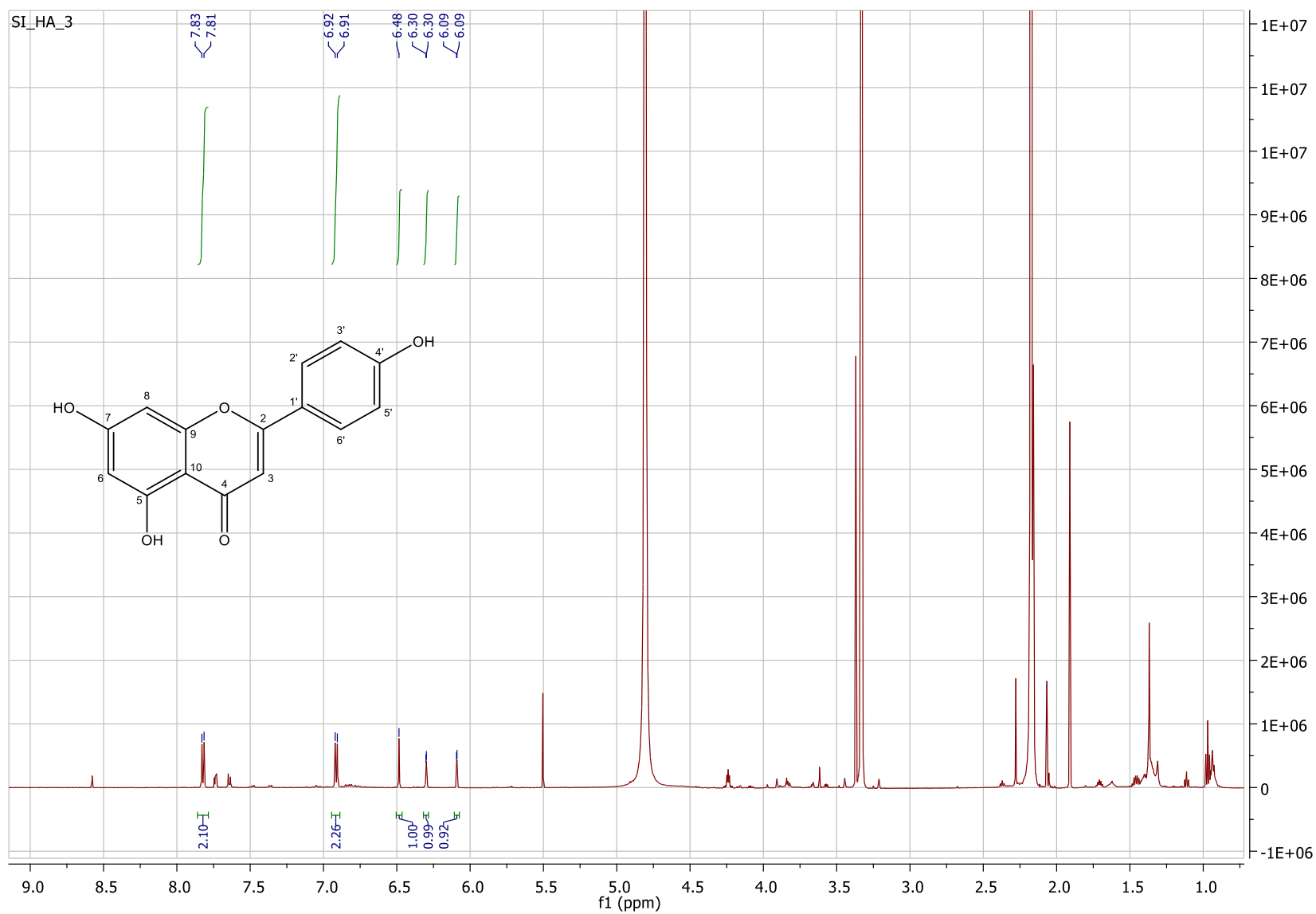
Εικόνα Π5.15: COSY NMR φάσμα του μεταβολίτη **13**: 3-(3-benzoyl-2,4,6-trihydroxy-5-(3-methylbut-2-en-1-yl)benzyl)-6-ethyl-4-hydroxy-5-methyl-2H-pyran-2-one ($C_{27}H_{28}O_7$) σε $CDCl_3$ (600 MHz)



Εικόνα Π5.16: HSQC/DEPT NMR φάσμα του μεταβολίτη **13**: 3-(3-benzoyl-2,4,6-trihydroxy-5-(3-methylbut-2-en-1-yl)benzyl)-6-ethyl-4-hydroxy-5-methyl-2H-pyran-2-one ($C_{27}H_{28}O_7$) σε $CDCl_3$ (600 MHz)

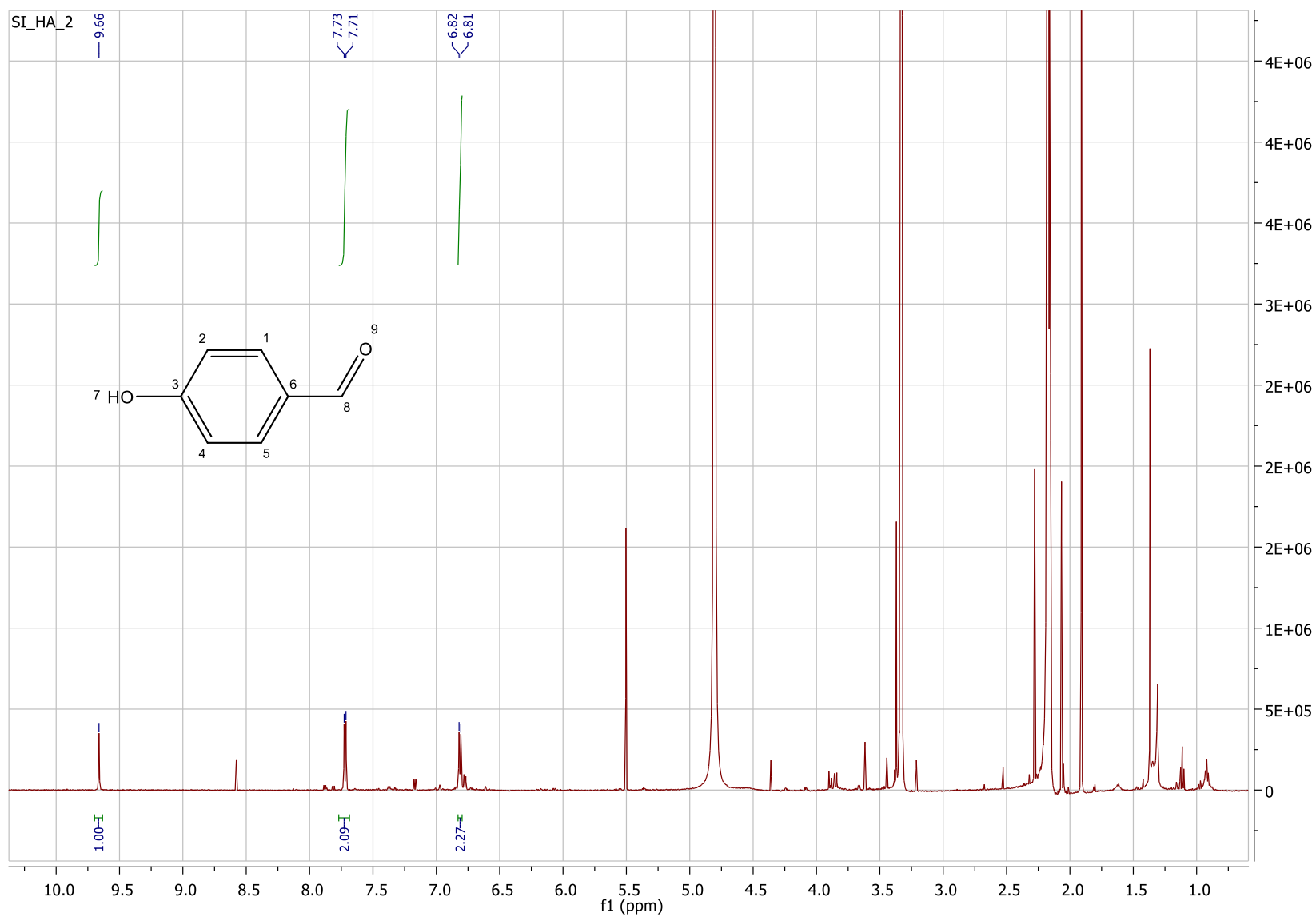


Εικόνα Π5.17: HMBC NMR φάσμα του μεταβολίτη **13**: 3-(3-benzoyl-2,4,6-trihydroxy-5-(3-methylbut-2-en-1-yl)benzyl)-6-ethyl-4-hydroxy-5-methyl-2H-pyran-2-one ($C_{27}H_{28}O_7$) σε $CDCl_3$ (600 MHz)

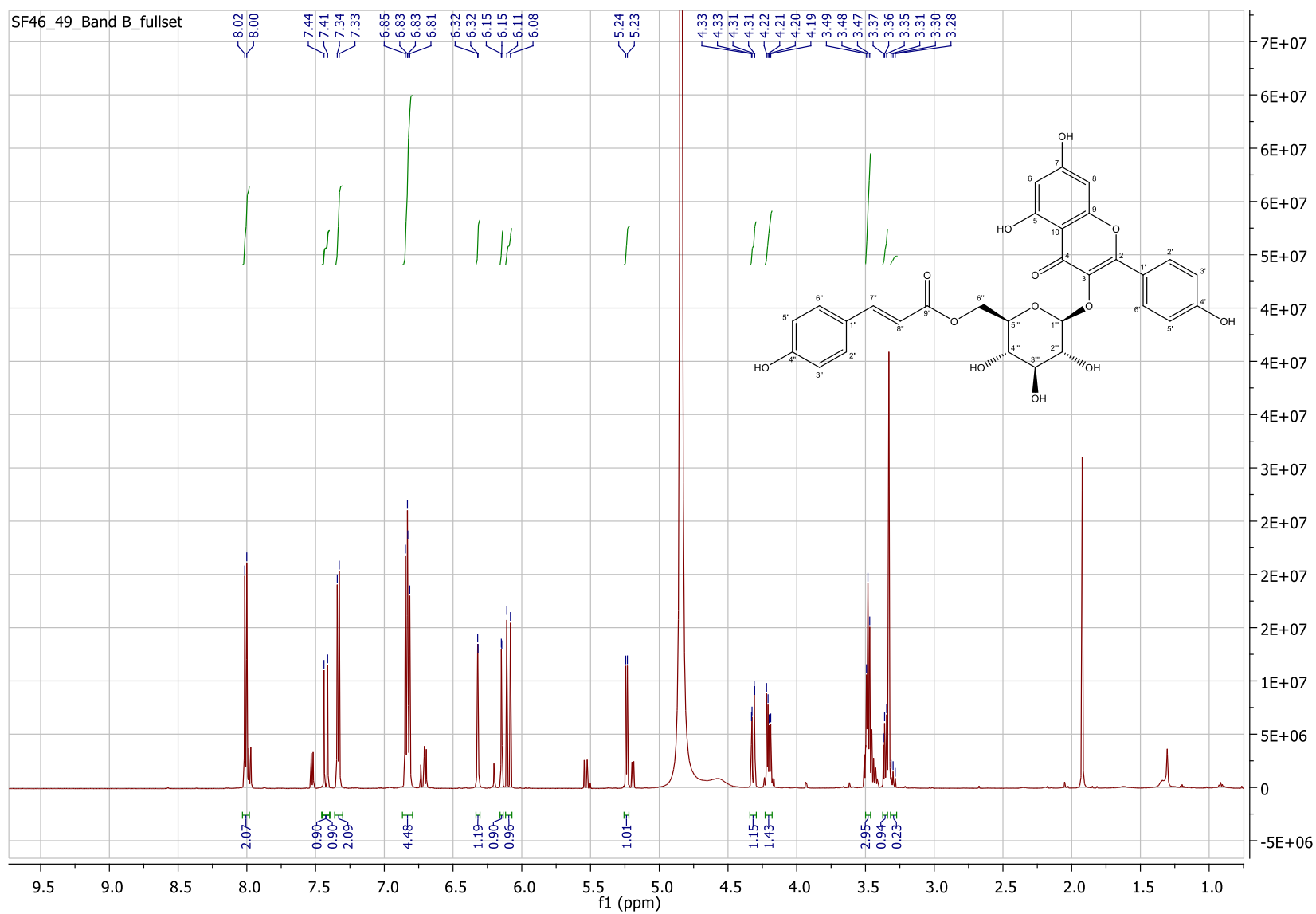


Εικόνα Π5.18: ^1H NMR φάσμα του μεταβολίτη 5: arigenin σε MeOD (600 MHz)

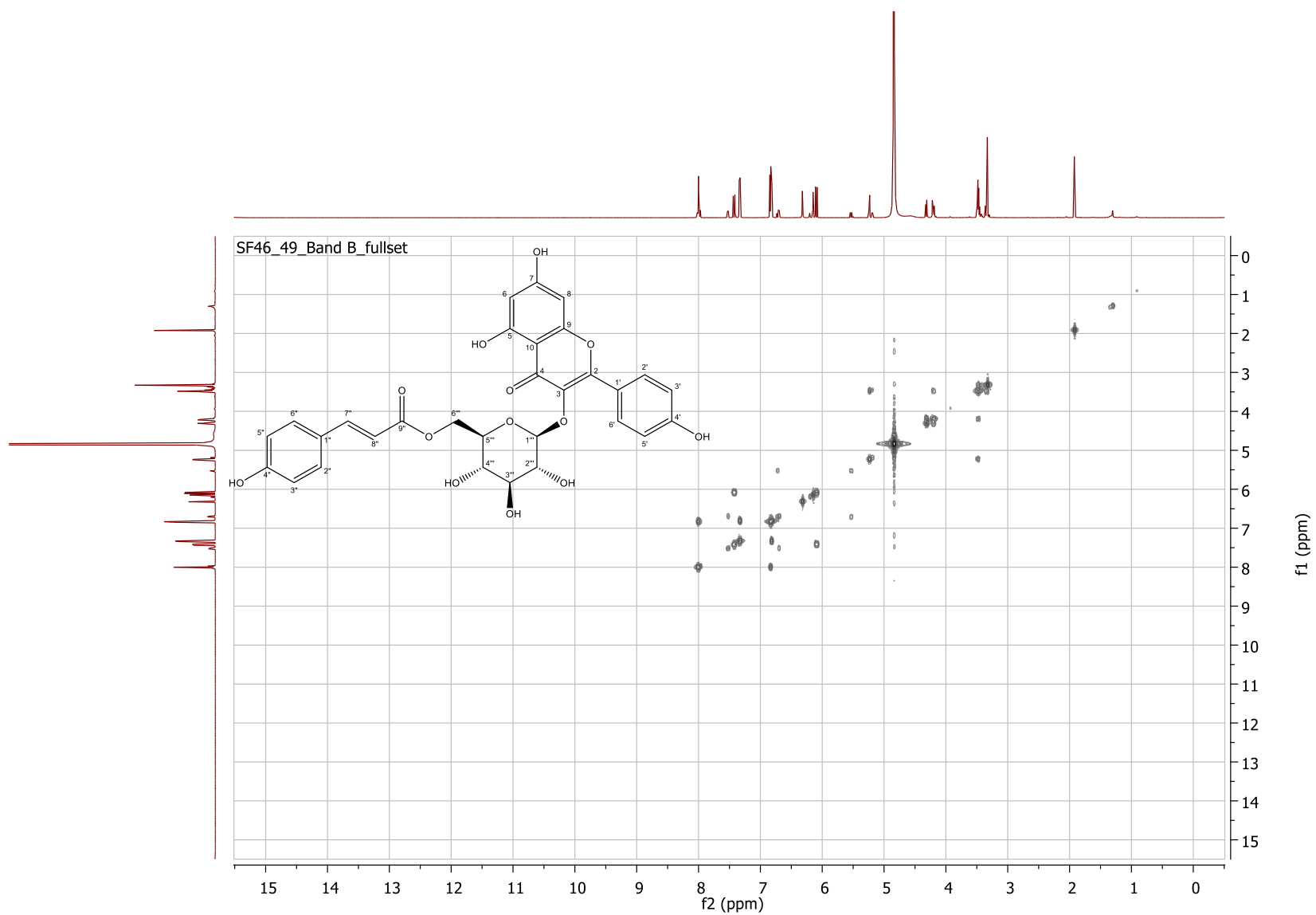
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



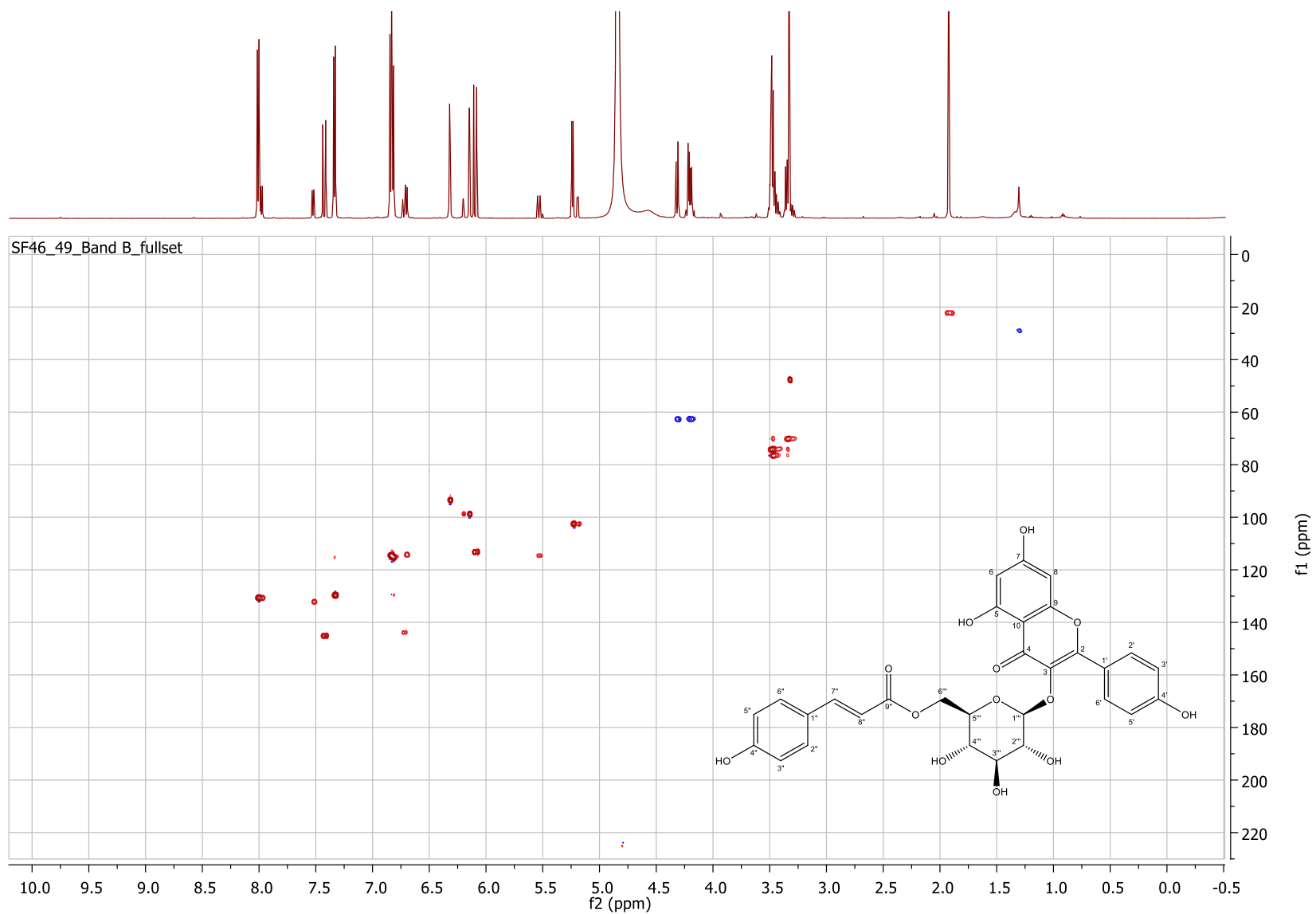
Εικόνα Π5.19: ^1H NMR φάσμα του μεταβολίτη 4: 4-hydroxybenzaldehyde σε MeOD (600 MHz)



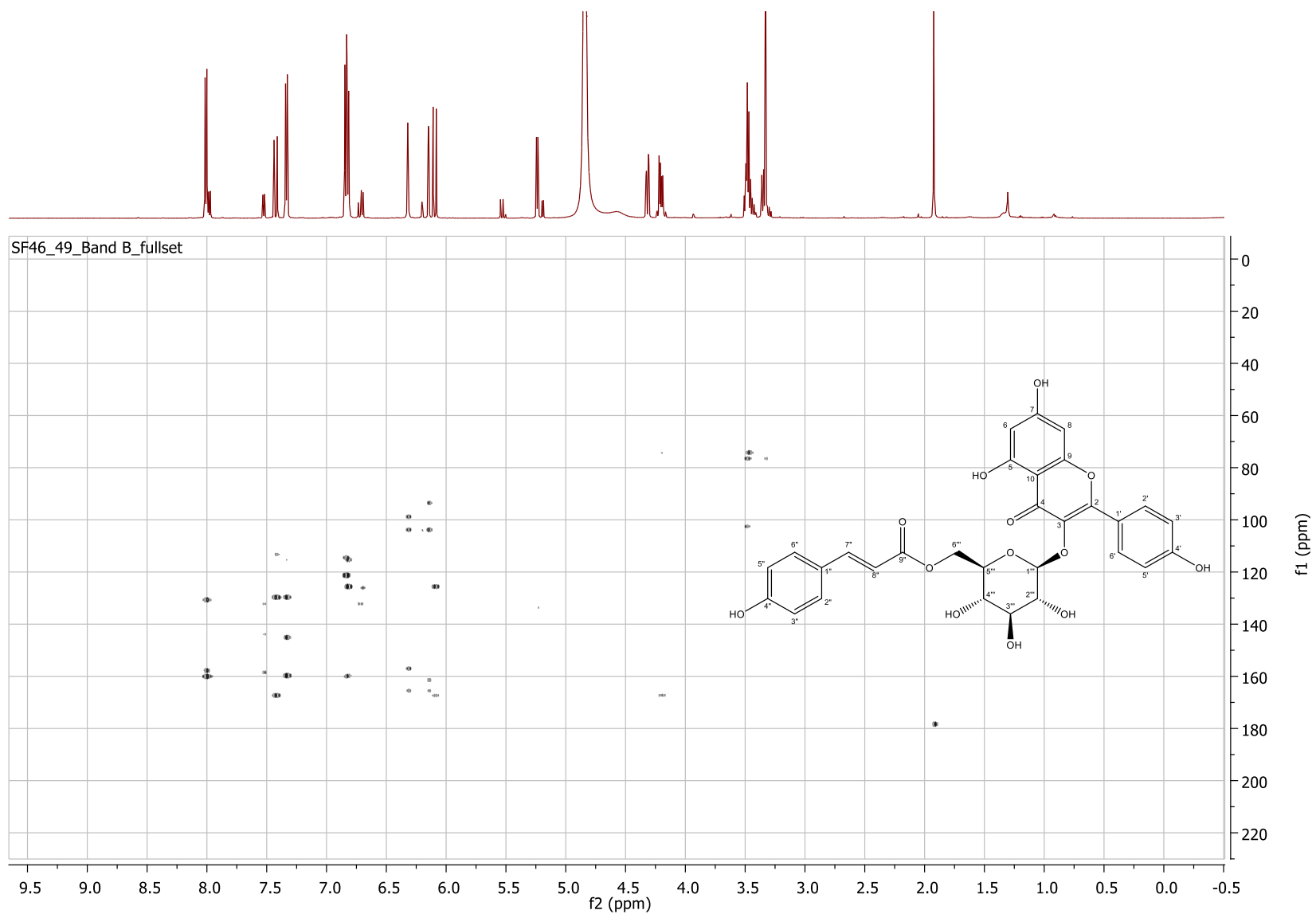
Εικόνα Π5.20: ^1H NMR φάσμα του μεταβολίτη 2: tiliroside σε MeOD (600 MHz)



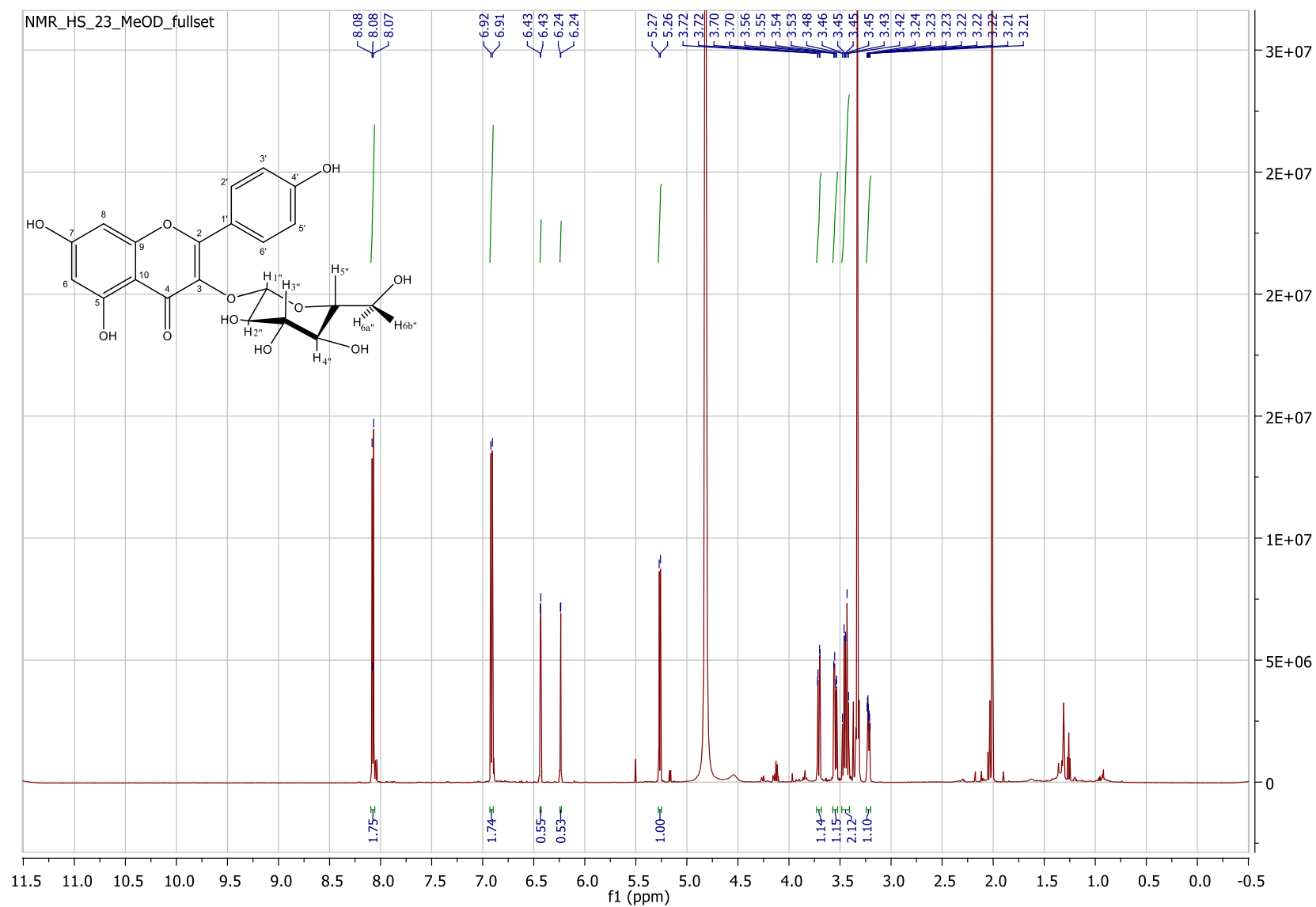
Εικόνα Π5.21: COSY NMR φάσμα του μεταβολίτη **2**: *tiliroside* σε MeOD (600 MHz)



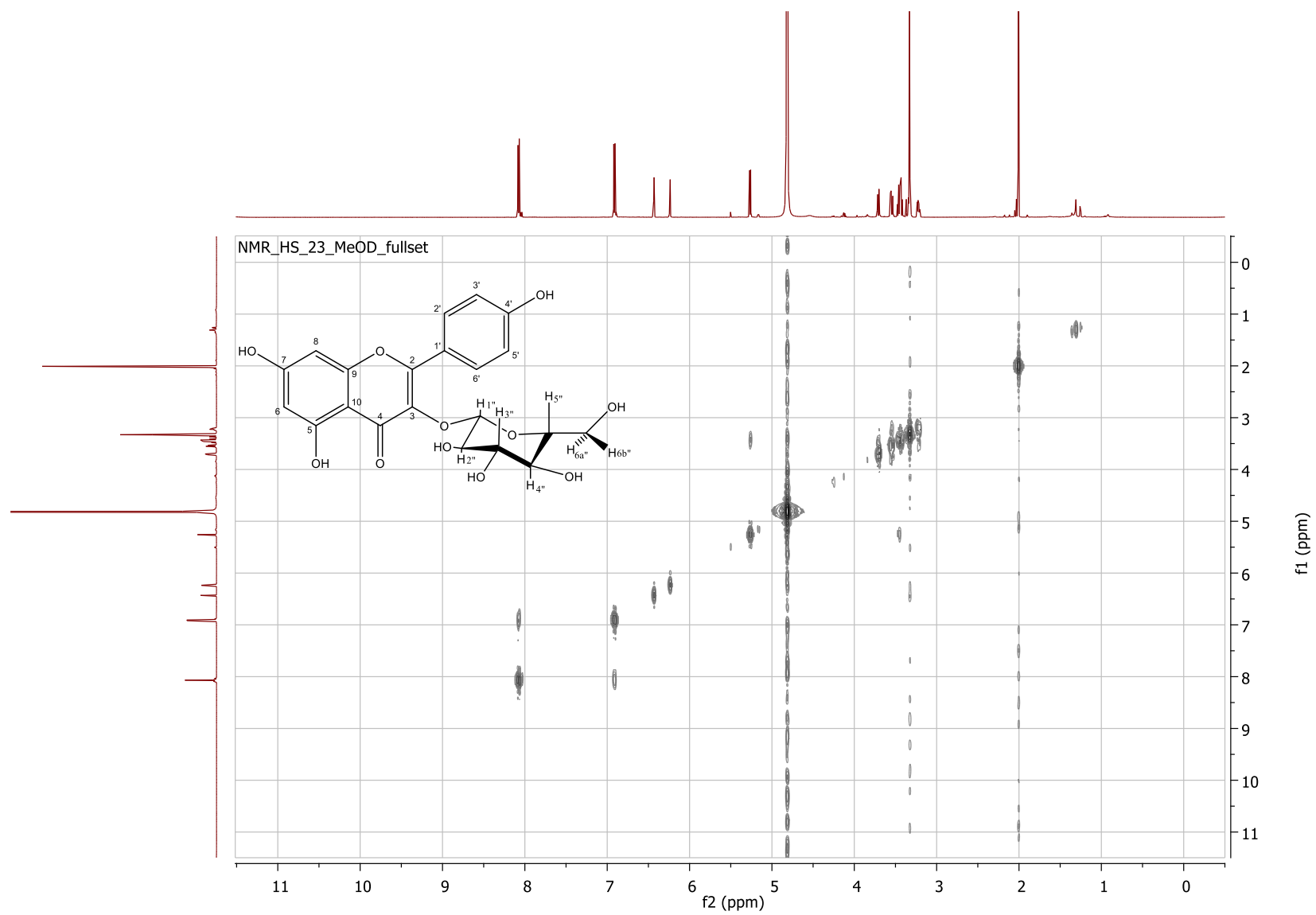
Εικόνα Π5.22: HSQC/DEPT NMR φάσμα του μεταβολίτη **2**: tiliroside σε MeOD (600 MHz)



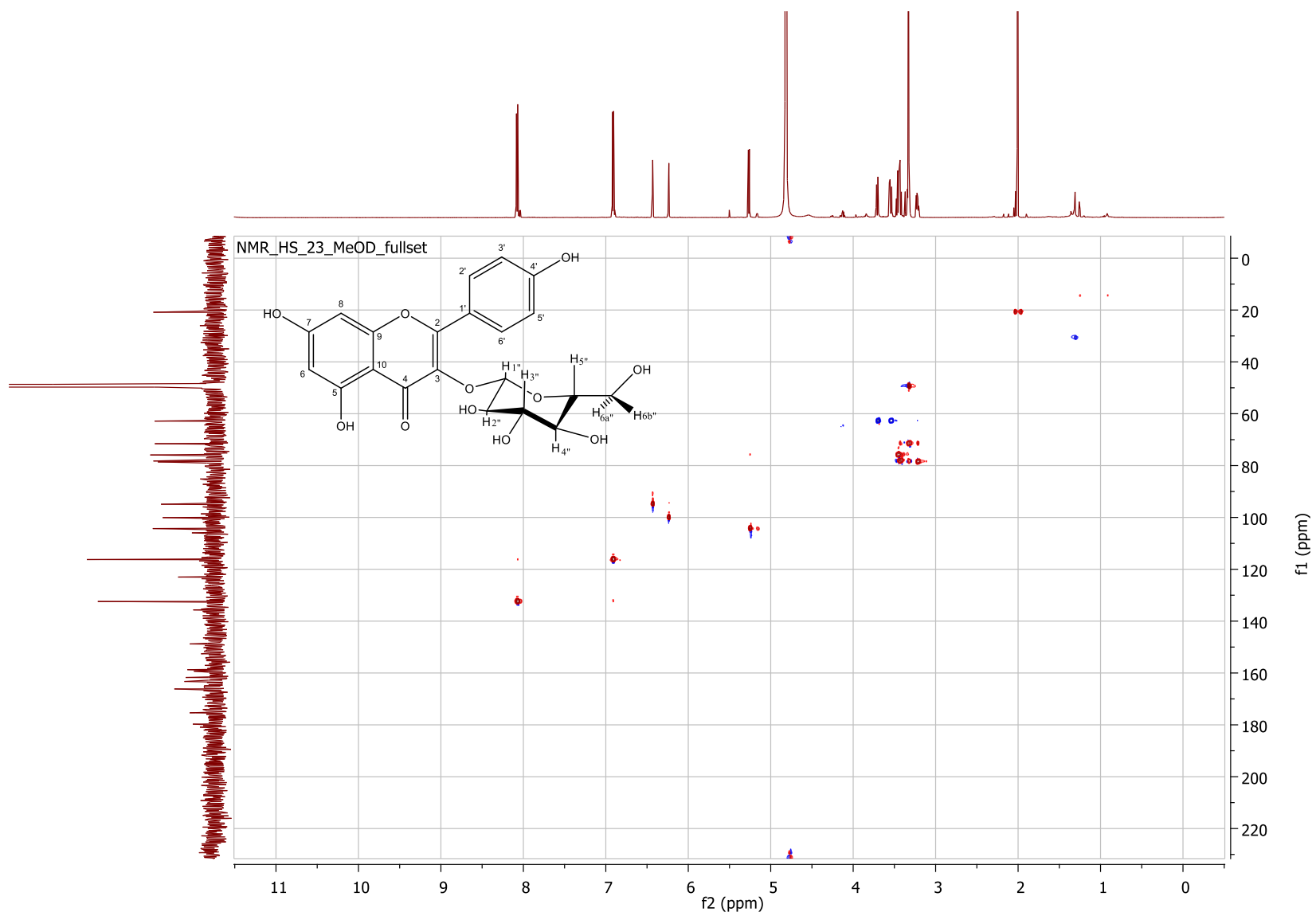
Εικόνα Π5.23: HMBC NMR φάσμα του μεταβολίτη 2: tiliroside σε CDCl_3 (600 MHz)



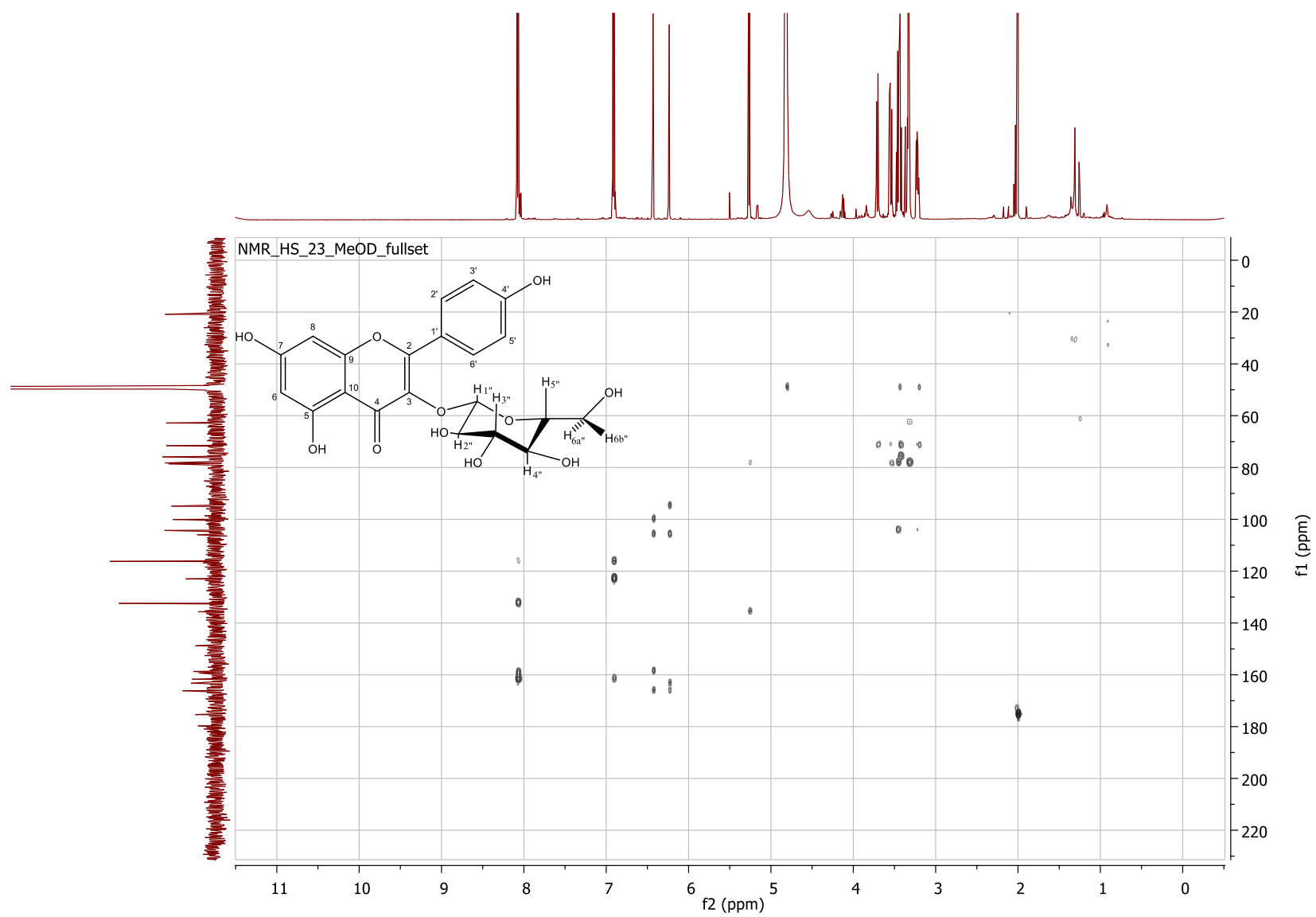
Εικόνα Π5.24: ^1H NMR φάσμα του μεταβολίτη **1**: astragalin σε MeOD (600 MHz)



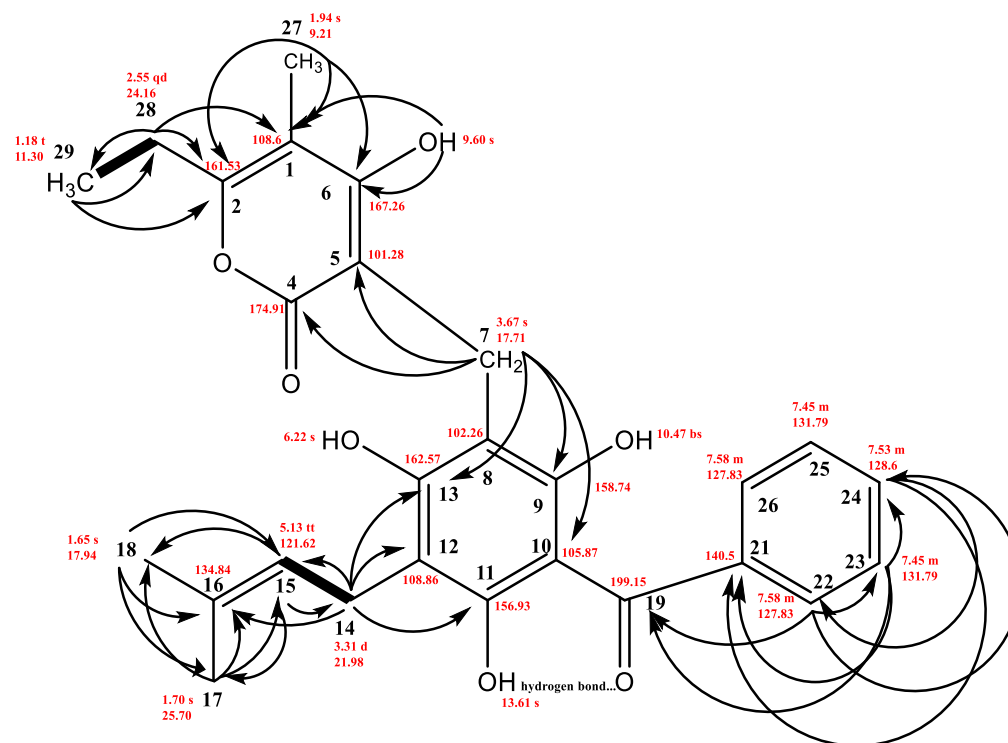
Εικόνα Π5.25: COSY NMR φάσμα του μεταβολίτη 1: astragalin σε MeOD (600 MHz)



Εικόνα Π5.26: HSQC/DEPT NMR φάσμα του μεταβολίτη 1: astragalol σε MeOD (600 MHz)



Εικόνα Π5.27: HMBC NMR φάσμα του μεταβολίτη **1**: astragalin σε $CDCl_3$ (600 MHz)



Εικόνα Π5.28: COSY, HMBC συσχετισμοί του μεταβολίτη **13** σε CDCl₃ (600 MHz)