

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΑΠΟ
ΤΟ ΦΥΤΟ *Phlomis × commixta* Rech. f. (*P. cretica* × *P. lanata*)**

ΣΤΕΦΑΝΑΚΗΣ Κ. ΜΙΧΑΗΛ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Χ. Ε. ΚΑΤΕΡΙΝΟΠΟΥΛΟΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2017

UNIVERSITY OF CRETE
SCHOOL OF SCIENCES & ENGINEERING
DEPARTMENT OF CHEMISTRY



DOCTORAL THESIS

**ISOLATION AND IDENTIFICATION OF COMPONENTS FROM
PLANT *Phlomis × commixta* Rech. f. (*P. cretica* × *P. lanata*)**

STEFANAKIS K. MICHALIS

Thesis Supervisor: Katerinopoulos E. Haralambos

HERAKLION 2017

Στην μνήμη της γιαγιάς μου

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κατερινόπουλος Ε. Χαράλαμπος (Επιβλέπων)

Καθηγητής, Τομέας Οργανικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Στεφάνου Ευριπίδης (Μέλος Συμβουλευτικής Επιτροπής)

Ομότιμος Καθηγητής, Τομέας Περιβαλλοντικής & Αναλυτικής Χημείας,
Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Βασιλικογιαννάκης Γεώργιος (Μέλος Συμβουλευτικής Επιτροπής)

Καθηγητής, Τομέας Οργανικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Στρατάκης Εμμανουήλ

Καθηγητής, Τομέας Οργανικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Σπύρος Απόστολος

Μόνιμος Επίκουρος Καθηγητής, Τομέας Περιβαλλοντικής & Αναλυτικής Χημείας,
Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Πυρίντσος Στέργιος

Αναπληρωτής Καθηγητής, Τομέας Βιολογίας Οργανισμών, Πληθυσμών,
Περιβάλλοντος & Θαλάσσιας Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Λάζαρη Διαμάντω

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τομέας Φαρμακογνωσίας - Φαρμακολογίας,
Τμήμα Φαρμακευτικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης



ΠΡΑΚΤΙΚΟ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΞΕΤΑΣΗ
ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Η Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή της Διδακτορικής Διατριβής του κ. Στεφανάκη Μιχαήλ, η οποία ορίσθηκε στην από 14/04/2016 συνεδρία της Γ.Σ.Ε.Σ., συνεδρίασε σήμερα Παρασκευή 03 Νοεμβρίου 2017 να εξετάσει τη διατριβή του υποψηφίου με τίτλο:

«Απομόνωση και Χαρακτηρισμός Συστατικών από το Φυτό *Phlomis x commixta* Rech. f. (*P. cretica* x *P. lanata*)»

Τα παρόντα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής εκφράζουν ομόφωνα την πλήρη ικανοποίησή τους για την υψηλή ποιότητα του περιεχομένου και της υποστήριξης της Διατριβής.

Τα Ερευνητικά αποτελέσματα της εργασίας του κ. Στεφανάκη Μιχαήλ είναι σημαντικά, πρωτότυπα και διευρύνουν το πεδίο της έρευνας στον Τομέα Οργανικής Χημείας.

Ως εκ τούτου η Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή προτείνει ομόφωνα την απονομή του Διδακτορικού Διπλώματος στον κύριο Στεφανάκη Μιχαήλ.

Τα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής για την Αξιολόγηση της Διδακτορικής Διατριβής του κυρίου Στεφανάκη Μιχαήλ:

- | | |
|--|--|
| 1. Κατερινόπουλος Χαράλαμπος (Επιβλέπων)
Καθηγητής
Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης | |
| 2. Στεφάνου Ευριπίδης
Ομότιμος Καθηγητής
Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης | |
| 3. Βασιλικογιαννάκης Γεώργιος
Καθηγητής
Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης | |
| 4. Στρατάκης Εμμανουήλ
Καθηγητής
Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης | |
| 5. Σπύρος Απόστολος
Μόνιμος Επίκουρος Καθηγητής
Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης | |
| 6. Λάζαρη Διαμάντω
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια
Τμήματος Φαρμακευτικής ΑΠΘ | |
| 7. Πυρίντσος Στέργιος
Αναπληρωτής Καθηγητής
Τμήματος Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης | |

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Στο πόνημα αυτό, ασχολήθηκα με την μελέτη των δευτερογενών μεταβολιτών από το φυτό *Phlomis* × *commixta* του οποίου, μετά από συνεχή διερεύνηση, προσπάθησα να ανακαλύψω τις ουσίες του. Μου αποκαλύφθηκαν άγνωστες, μέχρι εκείνη την στιγμή, ουσίες του φυτού και εντυπωσιάστηκα από την μυστηριώδη σύσταση της φύσης. Ίσως ανακάλυψα πολλές ή λίγες ουσίες. Είμαι σίγουρος, όμως, πως στην ανηφορική αυτή πορεία προς την ολοκλήρωση αυτού του πονήματος, βρήκα την καλύτερη ουσία, την «Αγάπη». Κρατώντας ως φυλαχτό την ουσία αυτή στην διαδρομή μου, είχα την τύχη να συνεργαστώ και να γνωρίσω πολλά πρόσωπα που βοήθησαν με ποικίλους τρόπους για να τελεσφορήσει η προσπάθειά μου αυτή.

Η Διδακτορική Διατριβή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Απομόνωσης Ανάλυσης και Σύνθεσης Φυσικών Προϊόντων στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης καθώς και σε συνεργασία με το εργαστήριο Φαρμακογνωσίας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης. Θα ήθελα να ευχαριστήσω το Τμήμα Χημείας, το οποίο με δέχθηκε και εξασφάλισε την κατάλληλη υλικοτεχνική υποδομή αλλά και το δημιουργικό περιβάλλον για την εκπόνηση της παρούσας διατριβής.

Το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στον επιβλέποντα Καθηγητή μου, τον κ. Χαράλαμπο Κατερινόπουλο, ο οποίος στάθηκε δίπλα μου σε όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών, ως Δάσκαλος και ως Άνθρωπος. Κατά τη διάρκεια της συνεργασίας μας, εκτίμησα όλες τις αρετές του Ανθρώπου και του Δασκάλου, την αγάπη, τη γνωστική επάρκεια, την μεταδοτικότητα αλλά και την ευγένεια και την προθυμία του. Του οφείλω ευγνωμοσύνη για την επιστημονική καθοδήγηση στην εργασία μου, την ενθάρρυνση σε ώρες απογοήτευσης, τις πολύτιμες συμβουλές του, την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου αλλά και την υπομονή του.

Επιπλέον, οφείλω να ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής τους Καθηγητές κ. Βασιλικογιαννάκη Γ., και τον ομότιμο Καθηγητή κ. Στεφάνου Ε., για την υποστήριξη τους και την ενθάρρυνση τους καθ' όλη την διάρκεια της πορείας αυτής. Επίσης ευχαριστώ και τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής που δέχθηκαν να κρίνουν και να αξιολογήσουν την παρούσα Διδακτορική Διατριβή, τους Καθηγητές: κ. Στρατάκη Ε., τον Αναπλ. Καθηγητή, κ. Σπύρο Α., καθώς και τον Αναπλ. Καθηγητή κ. Πυρίντσο Σ., για τις πολύτιμες συμβουλές τους

και την άψογη συνεργασία μας. Ιδιαίτερα ευχαριστήρια θα ήθελα να εκφράσω στην Αναπληρώτρια καθηγήτρια του τμήματος Φαρμακευτικής από το Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, την κ. Λάζαρη Διαμάντω, για την επιστημονική καθοδήγηση, την εμπιστοσύνη, τις πολύτιμες γνώσεις της και την φιλοξενία που μου παρείχε κατά την παραμονή μου στο εργαστήριο Φαρμακογνωσίας του Α.Π.Θ. Η προθυμία της να με βοηθήσει σε οποιοδήποτε πρόβλημα προέκυπτε κατά την εκπόνηση της διδακτορικής μου διατριβής απαιτεί ιδιαίτερη αναφορά εκ μέρους μου.

Ευχαριστώ, ακόμα, τον ομότιμο Καθηγητή κ. Ορφανόπουλο Μ. από το τμήμα Χημείας για την φιλοξενία στο εργαστήριο του και το εποικοδομητικό κλίμα συνεργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Αναπληρωτές Καθηγητές, από το Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, κ. Κοτσερίδη Γ., για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου και την τιμή που μου έκανε να συνεργαστώ μαζί του καθώς και τον κ. Αναστασόπουλο Η. από το ΤΕΙ Θεσσαλίας, για τις εύστοχες υποδείξεις του μέσα από τις ενδιαφέρουσες επιστημονικές συζητήσεις μαζί του.

Ευχαριστώ επίσης, τον Δρ. Κουβαράκη Α. (ΕΕΔΙΠ), τον Καθηγητή κ. Περγαντή Σ. και τον μεταπτυχιακό του φοιτητή Μαυρουδάκη Λ., για την άψογη συνεργασία κατά την λήψη των φασμάτων μαζών (ESI-MS), καθώς και την Δρ. Μάρα Π., για τη βοήθεια της σχετικά με τα τεχνικά προβλήματα NMR, ακόμα και μεταμεσονύκτια.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους προπτυχιακούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές και διδάκτορες του εργαστηρίου Απομόνωσης, Ανάλυσης και Σύνθεσης Φυσικών Προϊόντων με τους οποίους μοιράστηκα τη χαρά να είμαστε μέλη της ίδιας ομάδας. Τους ευχαριστώ πρωτίστως για την εποικοδομητική μας συνεργασία, για την ανοχή τους, την κατανόηση τους και το ευχάριστο κλίμα που μοιραστήκαμε μαζί μέσα στο εργαστήριο, αλλά κυρίως για τη φιλία τους, την οποία μου πρόσφεραν απλόχερα. Θα ήθελα να ευχαριστήσω προπάντων τους συνεργάτες Δρ. Τσικαλά Γ., ο οποίος ήταν πάντα πρόθυμος να λύσει απορίες μου. Την Δρ. Γεωργιλαδάκη Σ., την Δρ. Λαζανάκη Μ. και τους μεταπτυχιακούς φοιτητές Μελάκη Α., Φιλίππα Ι. και Σαμιωτάκη Χ. καθώς και τους Λαζάρου Π. (MSc.), Ρομπογιαννάκη Μ. (MSc.), Χριστοφόρου Γ. (MSc.), Αρχοντάκη Μ., Δαμασκηνάκη Φ., Μάνεση Μ. και την προπτυχιακή φοιτήτρια Πετρουλάκη Χ. Θα ήθελα να κάνω ιδιαίτερη αναφορά στην Δρ. Βουτσαδάκη Σ., η οποία ήταν παρούσα στα πρώτα μου βήματα στο εργαστήριο.

Η πειθαρχία και το οργανωτικό πνεύμα μέσα στο εργαστήριο, το οποίο με δίδαξε, θα επισημαίνεται πάντα στους νεότερους φοιτητές.

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω τα υπόλοιπα μέλη του τομέα της Οργανικής Χημείας: Τους Δρ. Βασιλικογιαννάκη Ε., Δρ. Κοτζαμπασάκη Β. και τους υποψήφιους διδάκτορες Μαλλιαρό Ν., Τριανταφυλλάκη Μ., Ιωάννου Γ. και Κυδωνάκη Μ. Επίσης, τους μεταπτυχιακούς φοιτητές Σαριδάκη Ι. και Μεταζά Ι. Είμαι ευγνώμων που γνώρισα, όμορφους ανθρώπους και επιστήμονες. Ο καθένας συνέβαλε με τον δικό του τρόπο στην αποπεράτωση της διδακτορικής διατριβής.

Ευχαριστώ, ακόμα, τα μέλη του εργαστηρίου του Καθηγητή κ. Κουτσολέλου Θ., από τον τομέα της Ανόργανης Χημείας για την βοήθεια τους στην φασματοσκοπία υπεριώδους ορατού καθώς και τα μέλη του εργαστηρίου του Καθηγητή κ. Τρικαλίτη Π., για την βοήθεια τους στη Κρυσταλλογραφία X-ray.

Ευχαριστώ, επίσης, τα μέλη του εργαστηρίου Οικολογίας και Διαχείρισης Χερσαίων Οικοσυστημάτων του Τμήματος Βιολογίας και κυριώς την υποψήφια διδάκτορα Georgescu L., για την βοήθεια της στην συλλογή και ταυτοποίηση του φυτικού υλικού.

Ευχαριστήρια, οφείλω και σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου Φαρμακογνωσίας του Α.Π.Θ., για το δημιουργικό χρόνο που μοιραστήκαμε, τους Dr. Hodaj E., Παπίτσα Χ. και τους μεταπτυχιακούς φοιτητές Ανδρεόπουλο Η., Νανούλη Μ. και Παπαγρηγορίου Θ.

Θερμά ευχαριστώ τους φίλους μου, ερευνητές Δρ. Κουριδάκη Α., Δρ. Νούτσια Δ. και τον υποψήφιο διδάκτορα Σοφιαδή Ε., που συμμερίστηκαν τις επιστημονικές και προσωπικές μου ανησυχίες σε κρίσιμα στάδια της διατριβής μου. Θα έχουν την ειλικρινή ευγνωμοσύνη μου για τον χρόνο που μου αφιέρωσαν αλλά και για τις ωραίες στιγμές που ζήσαμε και ζούμε όλα αυτά τα χρόνια.

Σημαντική και εποικοδομητική επίσης υπήρξε η βοήθεια των δικών μου ανθρώπων Αντώνη, Μαρία, Κατερίνα, Άλκηστη και Αντιγόνη, τους οποίους θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά. Θα ήθελα να τους εκφράσω τις εγκάρδιες ευχαριστίες μου για την αμέριστη βοήθεια και συμπαράσταση τους.

Λίγο πριν το τέλος, άφησα τους δύο πιο σημαντικούς ανθρώπους που με βοήθησαν σε αυτή τη διαδρομή της διδακτορικής διατριβής, τους γονείς μου, Κώστα και Βασιλική. Ελπίζω κάποια μέρα να ανταποδώσω τη διαρκή και αδιαπραγμάτευτη βοήθειά τους, πράγμα για το οποίο τους οφείλω απεριόριστη ευγνωμοσύνη αλλά και

για την αγάπη τους, που τόσο απλόχερα έχω πάρει. Χωρίς τους γονείς μου, η προσπάθεια μου αυτή δε θα είχε τελεσφορήσει. Θα ήταν μεγάλη παράλειψη να μην εκφράσω τις ευχαριστίες μου και στα αδέρφια μου Πελαγία, Καλλιόπη και Σωτήρη.

Τέλος, ευχαριστώ τη γιαγιά μου, Καλλιόπη, για την τύχη που είχα να νιώσω τη στήριξή της και την αγάπη της σε όλη μου την πορεία μέχρι εδώ. Όταν με έβλεπε να μαζεύω φυτά και να γεμίζω το σπίτι, πάντα με ρωτούσε «τι θα τα κάνεις παιδί μου όλα αυτά;» Ελπίζω τώρα να πήρε την απάντηση. Εκείνη μου έδινε τη δύναμη να παλεύω για τη ζωή και να μην εγκαταλείπω την προσπάθεια. Τώρα που εκείνη έχει φύγει από τη ζωή, νιώθω την υποχρέωση να της αφιερώσω το πόνημα αυτό.

Στεφανάκης Μιχάλης, Ηράκλειο, 2017

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Όνοματεπώνυμο: Στεφανάκης Μιχαήλ
Τόπος Γέννησης: Ηράκλειο Κρήτης
Ημερομηνία Γέννησης: 06 Φεβρουαρίου 1984
Ηλεκτρονικό Ταχυδρομείο: michstefanakis@yahoo.gr
Διεύθυνση Εργασίας: Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Χημείας
Πανεπιστημιούπολη Βουτών, Ηράκλειο 71003 Κρήτη
Τηλέφωνο Εργασίας: +30 2810 545042

ΣΠΟΥΔΕΣ

2012-2017: Υποψήφιος Διδάκτωρ, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.
2014-2015: Ανωτάτη Σχολή Παιδαγωγικής & Τεχνολογικής Εκπαίδευσης, Πιστοποιητικό Παιδαγωγικής και Διδακτικής Επάρκειας, Βαθμός: Άριστα.
2007-2010: Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης, Τεχνολογίες Προστασίας Περιβάλλοντος, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.
2002-2006: Πτυχίο Τεχνολογίας Γεωπονίας, Τμήμα Φυτικής Παραγωγής, Αλεξάνδρειο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Θεσσαλονίκης.

ΔΙΔΑΚΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

03/2017: Εκπαιδευτής, Αρωματικά & Φαρμακευτικά Φυτά, ΚΕΚ Ευρωπαϊκή Πρόοδος (12 ώρες).
10/2014-06/2017: Ωρομίσθιος Εκπαιδευτικός στο Ι.ΙΕΚ CRAFT, Ηράκλειο (1.092 ώρες).
10/2014-06/2016: Ωρομίσθιος Εκπαιδευτικός στο ΕΛΓΟ ΔΗΜΗΤΡΑ, ΕΠΑ.Σ. Κρήτης (378 ώρες).
03/2015-05/2015: Ίδρυμα Νεολαίας και Δια βίου Μάθησης, Δήμος Γόρτυνας, Τ. Ε. Αγ. Βαρβάρας, Αρχανών & Χάρακα, Εκπαιδευτής Ενηλίκων: Αρωματικά & Φαρμακευτικά Φυτά (75 ώρες).
11/2013-04/2014: ΕΛΓΟ ΔΗΜΗΤΡΑ, ΕΠΑ.Σ. Κρήτης, Υποστήριξη μέρους του εκπαιδευτικού έργου στον τομέα Γεωργικής Τεχνικής, της Εργαστηριακής υποστήριξης στις Θερμοκηπιακές Καλλιέργειες εντός θερμοκηπίου και των Αρωματικών Φαρμακευτικών Φυτών.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

07/2015-09/2015: Ερευνητική επίσκεψη και συνεργασία με το Αριστοτέλειο
06/2012-09/2012: Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Τμήμα Φαρμακευτικής, Τομέας Φαρμακογνωσίας, στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής, Επιστημονική υπεύθυνη: Αναπλ. Καθηγήτρια Διαμάντω Λάζαρη.
2012: Βοηθός στο προπτυχιακό εργαστήριο Βιοποικιλότητας-Φυτά, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης. (Εαρινό Εξάμηνο).
2012: Βοηθός στο προπτυχιακό εργαστήριο Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης. (Εαρινό Εξάμηνο).
2011: Βοηθός στο προπτυχιακό εργαστήριο Αρχές Αναλυτικής Χημείας,

- 2007-2010: Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης. (Εαρινό Εξάμηνο). Εκπόνηση ερευνητικής εργασίας στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης, Τμήμα Χημείας, Τομέας Οργανικής Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης. Συνεργασία με το Ελληνικό Κέντρο Θαλάσσιων Ερευνών (ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε), Ινστιτούτο Υδατοκαλλιεργειών, Κρήτης.
- 2009-2010: Βοηθός στα προπτυχιακά εργαστήρια Οργανικής Χημείας (I-II), Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης. (Εαρινό-Χειμερινό Εξάμηνο).
- 2008: Βοηθός στο προπτυχιακό εργαστήριο Αρχές Αναλυτικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης. (Εαρινό Εξάμηνο).
- 2005-2006: Επικουρικό έργο με ιδιωτικό συμφωνητικό (ωριαία αντιμισθία) στις θερμοκηπιακές εγκαταστάσεις Αρωματικών & Φαρμακευτικών Φυτών, Αλεξάνδρειο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Θεσσαλονίκης.
- 2006: Εκπόνηση ερευνητικής εργασίας στα πλαίσια των προπτυχιακών σπουδών, Εργαστήριο Γεωργίας, Αρωματικών και Φαρμακευτικών Φυτών, Τμήματος Φυτικής Παραγωγής, Α.Τ.Ε.Ι. Θεσσαλονίκης.
- 03/2006-09/2006: Ενασχόληση στο εργαστήριο Γεωργίας, Αρωματικών και Φαρμακευτικών Φυτών, Τμήμα Φυτικής Παραγωγής, Α.Τ.Ε.Ι. Θεσσαλονίκης. (Στα πλαίσια Πρακτικής Άσκησης-5 μήνες).

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

- 11/2012-04/2013: Δήμος Γόρτυνας, Δημοτική Ενότητα Αγίων Δέκα, (Σύμβαση 5 μηνών ως Γεωπόνος στα πλαίσια του Προγράμματος Σύμπραξη Παραγωγικών και Κοινωνικών Φορέων Ανάπτυξης, Απασχόλησης και Κοινωνικής Αλληλεγγύης Κρήτης).
- 03/2011-10/2011: Σχολή Εφέδρων Αξιωματικών Πεζικού, Λόχος Διοικήσεως. (Υπηρεσίες ως Γεωπόνος, στα πλαίσια της στρατιωτικής μου θητείας).
- 12/2010-01/2011: Περιφέρεια Κρήτης, Δ/ση Αγροτικής Οικονομίας & Κτηνιατρικής Περιφερειακής Ενότητας Ηρακλείου, Τμήμα Φυτικής Παραγωγής.
- 07/2008-01/2009: Οργανισμός Πληρωμών και Ελέγχου Κοινοτικών Ενισχύσεων
- 01/2007-03/2007: Προσανατολισμού και Εγγυήσεων (Ο.Π.Ε.Κ.Ε.Π.Ε), Περιφερειακή Δ/ση Κρήτης.
- 07/2007-11/2007: Νομαρχιακή Αυτοδιοίκηση Ηρακλείου, Δ/ση Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, Τομεάρχης Δακοκτονίας.
- 09/2006: Ένωση Αγροτικών Συνεταιρισμών Ηρακλείου, Τμήμα Πρωτογενούς Παραγωγής (Πρακτική Άσκηση).

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΕΣ

- 2007: Ηλεκτρονικοί Υπολογιστές: (Word, Excel, Outlook, Power Point), Πτυχίο: *Microsoft Office Specialist*.

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

Certificate of Competency in English, University of Michigan
Diplôme D'Etudes EN Langue Française - DELF A₄

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

ΜΟΝΟΓΡΑΦΙΕΣ

Στεφανάκης Μ. 2010. *Ανάλυση, μελέτη και βιολογική δραστικότητα δευτερογενών μεταβολιτών αρωματικών φυτών: Είδη του γένους *Origanum* και του γένους *Phlomis**". Μεταπτυχιακή Διατριβή, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστημίου Κρήτης. Επιβλέπων Κατερινόπουλος Ε. Χαράλαμπος, Καθηγητής.

Στεφανάκης Μ. 2006. *Η Βιοσύνθεση των αιθέριων ελαίων των αρωματικών φυτών, Ρίγανη, Φασκόμηλο, Δενδρολίβανο, Μελισσόχορτο, Μέντα, Δυόσμος, κατά τα διάφορα στάδια ανάπτυξης τους.* Πτυχιακή Διατριβή, Αλεξάνδρειο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Θεσσαλονίκης.

Ερευνητική εργασία με θέμα έρευνας "Μελέτη Αρωματικών Φυτών της Ελλάδας, Δημιουργία Τράπεζας δεδομένων, Οικονομοτεχνικές εφαρμογές". Επιβλέπουσα: Πάνου-Φιλοθέου Ελένη, Καθηγήτρια. Αποτελεί μέρος του Ερευνητικού Προγράμματος Αρχιμήδης υποέργο 2.2.24

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

Georgescu, L., **Stefanakis, M. K.**, Kokkini, S., Katerinopoulos, H. E., Pirintsos, S. Chemical and genetic characterization of *Phlomis* species and hybrids grown wild in Crete. *Phytochemistry*, **2016**, 122, 91-102.

Stefanakis, M. K., Anastasopoulos, E., Katerinopoulos, H. E. Makridis, P. Use of essential oils extracted from three *Origanum* species for disinfection of cultured rotifers (*Brachionus plicatilis*). *Aquaculture Research*, **2014**, 45, 1861-1866.

Stefanakis, M. K., Touloupakis, E., Anastasopoulos, E., Ghanotakis, D., Katerinopoulos, H. E., Makridis, P. Antibacterial Activity of Essential Oils from Plants of the Genus *Origanum*. *Food control*, **2013**, 34, 539-546.

ΠΡΑΚΤΙΚΑ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΔΙΕΘΝΩΝ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ

Papaioannou, C. I., **Stefanakis, M.**, Anastasopoulos, E., Makridis, P., Tsikalas, G., Zaragotas, D., Katerinopoulos, H. E, Papasotiropoulos, V. *Genetic diversity and analysis of antimicrobial properties of selected oregano clones for use in the aquaculture industry.* 20th Eucarpia General Congress, August 29-1 September 2016, Zurich, Switzerland. Book of Abstracts p. 326. (Προφορική Ανακοίνωση από Papasotiropoulo V.).

Tsiftoglou, St. O., Kalpourtzi, N. E., **Stefanakis, M.**, Lazari, M. D. *Phytochemical study of *Helleborus odorus* subsp. *cyclophyllus* (Ranunculaceae).* 9th Joint Natural Products Conference, July 24-27, 2016, Copenhagen, Denmark. (Αναρτημένη ανακοίνωση).

Papaioannou C., **Stefanakis, M.**, Anastasopoulos E., Makridis P., Tsikalas G., Zaragotas, D., Katerinopoulos, H. E., Papasotiropoulos V. *Molecular analysis of oregano clones selected for their antimicrobial activity in the aquaculture industry.*

2nd International Conference on Natural Products Utilization: from Plant to Pharmacy Shelf, October 14-17, 2015, Plovdiv, Bulgaria. Book of Abstracts p. 248. (Αναρτημένη ανακοίνωση).

Katerinopoulos, H. E., **Stefanakis, M.**, Makridis, P., Anastasopoulos, E. *Chemical components in essential oils from plants of the genus Origanum used in an alternative method for eliminating Bacterial action in aquacultures.* 19th European Symposium on Organic Chemistry, July 12-16, 2015, Lisbon, Portugal. Book of Abstracts p. 495. (Αναρτημένη ανακοίνωση).

Stefanakis, M., Lazari, D., Katerinopoulos, H. E. *Flavonoids and phenolic derivatives from the flowers of phlomis hybrid: Phlomis × commixta.* 8th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries, May 19-22, 2014, Durres, Albania. Book of Abstracts p. 152. (Αναρτημένη ανακοίνωση).

Stefanakis, M., Makridis, P., Anastasopoulos, E., Katerinopoulos, H. E. *An alternative method for disinfection of rotifers Brachionus plicatilis and gilthead seabream eggs Sparus aurata using essential oils from plants of the genus Origanum.* Global Aquaculture, securing our future, Aqua, September 1-5, 2012, Prague, Czech Republic. (Προφορική Ανακοίνωση από Makridis P.)

Stefanakis, M., Makridis, P., Anastasopoulos, E., Katerinopoulos, H. E. *An alternative method for disinfection of rotifers using essential oils from plants of the genus Origanum.* 17th European Symposium on Organic Chemistry, July 10-15, 2011, Hersonissos, Crete, Greece. Book of Abstracts p. 304. (Αναρτημένη ανακοίνωση).

Stefanakis, M., Makridis, P., Anastasopoulos, E., Katerinopoulos, H. E. *Antibacterial activity of essential oils from plants of the genus Origanum on the bacterial strains of the Vibrio group.* Trends in natural products research a Phytochemistry Society of Europe young scientists' meeting, June 12-15, 2011, Kolymvari, Crete, Greece. Book of Abstracts p. 206. (Αναρτημένη ανακοίνωση).

Stefanakis, M., Georgiladaki, S., Tsikalas, G., Katerinopoulos, H. E. *Isolation of Antioxidants from the Leaves of Different Subspecies of Olea Europaea.* Trends in natural products research a Phytochemistry Society of Europe young scientists' meeting, June 12-15, 2011, Kolymvari, Crete, Greece. Book of Abstracts p. 208. (Αναρτημένη ανακοίνωση).

Stefanakis, M., Katerinopoulos, H. E., Pirintsos, S. *Chemical Composition of the Essential oils of three Phlomis species.* Trends in natural products research a Phytochemistry Society of Europe young scientists' meeting, June 12-15, 2011, Kolymvari, Crete, Greece. Book of Abstracts p. 210. (Αναρτημένη ανακοίνωση).

ΠΡΑΚΤΙΚΑ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΕΘΝΙΚΩΝ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ

Δημητριάδης Κ., Μ. **Στεφανάκης Μ.**, Ζιώγα Ε., Λάζαρη Δ. *Μελέτη του αιθερίου ελαίου καλλιεργούμενων φυτών του είδους Achillea millefolium στην Κρήτη.* 28^ο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας της Επιστήμης των Οπωροκηπευτικών, 16-20 Οκτωβρίου 2017, Θεσσαλονίκη. (Αναρτημένη ανακοίνωση).

Τσικερδάνου Ε., Λαγογιάννης Γ., **Στεφανάκης Μ.**, Λάζαρη Δ. *Ανάλυση και σύγκριση της χημικής σύστασης αιθερίων ελαίων του φυτού *Origanum dictamnus* μεταξύ μίας βιοδυναμικής και μίας συμβατικής καλλιέργειας στο Ηράκλειο Κρήτης*. 15^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Βοτανικής Εταιρίας, 14-17 Σεπτεμβρίου 2017, Χανιά. (Αναρτημένη ανακοίνωση).

Παπαρηγορίου Θ., Λαγογιάννης Γ., **Στεφανάκης Μ.**, Λάζαρη Δ. *Μελέτη του αιθέριου ελαίου καλλιεργούμενων φυτών του είδους *Thymus vulgaris**. 22^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χημείας, 2-4 Δεκεμβρίου 2016, Θεσσαλονίκη. (Αναρτημένη ανακοίνωση).

Λαγογιάννης Γ., **Στεφανάκης Μ.**, Λάζαρη Δ. *Μελέτη του αιθέριου ελαίου καλλιεργούμενων φυτών του είδους *Origanum majorana* στην Κρήτη*. 22^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χημείας, 2-4 Δεκεμβρίου 2016, Θεσσαλονίκη. (Αναρτημένη ανακοίνωση).

Παπαϊωάννου Χ., **Στεφανάκης Μ.**, Αναστασόπουλος Η., Μακρίδης Π., Τσίκαλας Γ., Ζαραγκότας Δ., Κατερινόπουλος Χ., Παπασωτηρόπουλος Β. *Μοριακή ταυτοποίηση κλώνων ρίγανης επιλεγμένων με βάση την αντιμικροβιακή τους δράση στις υδατοκαλλιέργειες*. 16^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γενετικής Βελτίωσης Φυτών, 28-30 Σεπτεμβρίου 2016, Φλώρινα. (Αναρτημένη ανακοίνωση).

Μάνεση Μ., **Στεφανάκης Μ.**, Κατερινόπουλος Ε. Χ. *Εποχιακή διακύμανση των δευτερογενών μεταβολιτών του φυτού *Hyssopus officinalis**. 18^ο Συνέδριο Μεταπτυχιακών Φοιτητών Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης. 26-27 Μαρτίου, 2016, Ηράκλειο. (Αναρτημένη ανακοίνωση).

Τσιφτσόγλου, Ο., Καλπουρτζή, Ε., **Στεφανάκης Μ.**, Λάζαρη, Δ. *Μελέτη του φυτού *Helleborus odorus* subsp. *Cyclophyllus**. 2^ο Συνέδριο Φαρμακευτικών Επιστημών, 9-11 Οκτωβρίου 2014, Πάτρα. (Προφορική Ανακοίνωση από Τσιφτσόγλου, Ο.).

Σταυροπούλου Α., Μπαλιτζάκης Ι., Κασελάκη Α., **Στεφανάκης Μ.**, Magan Ν., Τζωρτζάκης Ν., Λουλακάκης Κ. *Επίδραση αιθέριου ελαίου από δίκταμο στην ανάπτυξη του μύκητα *B. cinerea* in vitro σε καρπούς μελιτζάνας*. 26^ο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Επιστήμης των Οπωροκηπευτικών, 15-18 Οκτωβρίου 2013, Καλαμάτα. (Αναρτημένη ανακοίνωση).

Τσιφτσόγλου Ο., Λάζαρη Δ., **Στεφανάκης Μ.**, Κοκκάλου Ε. *Μελέτη του φυτού *Alyssum alyssoides* της οικογενείας *Brassicaceae* (*Cruciferae*)*. 16^ο Πανελλήνιο Φαρμακευτικό Συνέδριο, 31 Μαΐου - 3 Ιουνίου 2013, Αθήνα. **Έπαινος**. (Αναρτημένη ανακοίνωση).

Πάνου-Φιλοθέου Ε., Λάζαρη Δ., Κουτίνας Ν., **Στεφανάκης Μ.**, Φιλοθέου Α., Λιανοπούλου Β. *Μελέτη αιθέριων ελαίων ειδών ευκαλύπτου σε συνθήκες καλλιέργειας*. 14^ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Επιστημονικής Εταιρείας Γενετικής Βελτίωσης Φυτών, 10-12 Οκτωβρίου 2012, Θεσσαλονίκη. Σελ. 388-392. (Αναρτημένη ανακοίνωση).

Πάνου-Φιλοθέου Ε., Λάζαρη Δ., **Στεφανάκης Μ.**, Φιλοθέου Α., Λιανοπούλου Β. *Διερεύνηση χημειότυπου ελληνικών πληθυσμών ρίγανης [*Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (Link) Ietswaart]*. 12^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Βοτανικής Εταιρίας, 29 Σεπτεμβρίου-2 Οκτωβρίου 2011, Ρέθυμνο. (Αναρτημένη ανακοίνωση).

Στεφανάκης Μ., Μακρίδης Π., Κωστοπούλου Β., Αναστασόπουλος Η., Κατερινόπουλος Ε. Χ. *Αξιολόγηση αιθέριων ελαίων φυτών του γένους *Origanum* στην απολύμανση τροχόζων.* 14^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιχθυολόγων, 6-9 Μαΐου 2010, Πειραιάς, Σελ. 241-244. (Αναρτημένη ανακοίνωση).

Στεφανάκης Μ., Μακρίδης Π., Αναστασόπουλος Η., Κατερινόπουλος Ε. Χ. *Η επίδραση των συστατικών του ριγανέλαιου (*Origanum vulgare* L.) στην ανάπτυξη του ζωοπλαγκτού στις υδατοκαλλιέργειες.* 2^ο Συνέδριο Μεταπτυχιακών Φοιτητών Ελλάδας-Κύπρου, 16-20 Σεπτεμβρίου 2009, Χανιά. (Αναρτημένη ανακοίνωση).

Στεφανάκης Μ., Δεμίρης Κ., Κοκκώνα Γ-Φ., Κατσαντώνη Δ., Φιλοθέου Α., Λιανοπούλου Β., Τερτιβανίδης Κ., Λάζαρη Δ., Πάνου-Φιλοθέου Ε. *Χρωματομετρική προσέγγιση της ποιότητας της δρόγης των αρωματικών φυτών.* 12^ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Επιστημονικής Εταιρείας Γενετικής Βελτίωσης Φυτών, 8-10 Οκτωβρίου 2008, Νάουσα, Σελ. 427-431. (Αναρτημένη ανακοίνωση).

Στεφανάκης Μ., Λιανοπούλου Β., Γάτσης Θ., Φιλοθέου Χ., Λάζαρη Δ., Πάνου-Φιλοθέου Ε. *Επίδραση της εποχής συγκομιδής στα αιθέρια έλαια αρωματικών φυτών της Οικογένειας *Lamiaceae*.* 23^ο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας της Επιστήμης των Οπωροκηπευτικών, 23-26 Οκτωβρίου 2007, Χανιά Κρήτης, τόμος 13, τεύχος Β', σελ. 673-676. (Προφορική ανακοίνωση από Στεφανάκη Μ.).

ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ ΣΕ ΗΜΕΡΙΔΕΣ

Στεφανάκης Μ. Φυτοχημική Μελέτη φυτών του γένους *Phlomis*. Ημερίδα Οργανικής Χημείας στη μνήμη της **Μαρίας Χατζημαρινάκη** Διδάκτορος Πανεπιστημίου Κρήτης, Τμήμα Χημείας, 23 Νοεμβρίου 2013, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης. (Προφορική Ανακοίνωση).

Στεφανάκης Μ., Τσικαλάς, Γ., Κατερινόπουλος Χ. Ε. Μακρίδης Π., Ζαραγκώτας Δ., Μπακρατσάς Δ., Αναστασόπουλος Η., Παπαϊωάννου Χ., Παπασωτηρόπουλος Β. *Μελέτη της Χρήσης Αποσταγμάτων Επιλεγμένων Φυτών Ρίγανης στη Διατροφή Ψαριών με Στόχο τη Μείωση του Μικροβιακού Φορτίου της Τροφής τους (Ζωοπλαγκτόν).* Ημερίδα Ερευνητικού Προγράμματος, ΑΡΧΙΜΗΔΗΣ ΙΙΙ-Ενίσχυση Ερευνητικών Ομάδων στο ΤΕΙ Λάρισας, 29 Νοεμβρίου 2013, ΤΕΙ Λάρισας. (Προφορική Ανακοίνωση από Η. Αναστασόπουλο).

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ

06/2014-09/2014:

Συμμετοχή στο ερευνητικό πρόγραμμα με τίτλο: "Isolation compounds with sweet taste and ellagic tannins from oak". Επιστημονικός υπεύθυνος: Κοτσερίδης Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

09/2012-09/2014:

Συμμετοχή στο ερευνητικό πρόγραμμα Αρχιμήδης ΙΙΙ: "Αξιοποίηση αιθέριων ελαίων στη συντήρηση νωπών γεωργικών προϊόντων της Κρήτης". Επιστημονικός υπεύθυνος: Λουλακάκης Κων/νος, Καθηγητής ΤΕΙ Κρήτης.

01/2012-12/2014:

Συμμετοχή στο ερευνητικό πρόγραμμα Αρχιμήδης ΙΙΙ: "Μελέτη της χρήσης αποσταγμάτων επιλεγμένων φυτών ρίγανης στη διατροφή ψαριών με στόχο την μείωση του μικροβιακού φορτίου της τροφής τους (ζωοπλαγκτόν)". Επιστημονικός υπεύθυνος: Αναστασόπουλος Ηλίας, Επίκουρος Καθηγητής ΤΕΙ Λάρισας.

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ SUMMER SCHOOLS – WORKSHOPS

- 8-19/07/2013: Θερινό Σχολείο στη "Βιολογική Αμπελοκαλλιέργεια & Οινολογία" διάρκειας 60 ωρών, Τ.Ε.Ι. Ιόνιων Νήσων - Τμήμα "Τεχνολογίας Βιολογικής Γεωργίας & Τροφίμων", Αργοστόλι.
- 26-28/06/ 2013: School "*Novel Agricultural Business on Medicinal & Aromatic Plants*" is organized by Agro-Know Technologies and APIVITA and is supported by I.S.L.E Network and the projects: Organic Lingua, Natural Europe, Herbal.Mednet and agINFRA, Heraklion, Crete, Greece.
- 6-19/07/2009: Synthesis and Retrosynthesis in the Chemistry of Natural Products, Department of Chemistry, University of Crete, ERASMUS Intensive Program - Summer School, Heraklion, Crete, Greece.

ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ- ΕΠΙΜΟΡΦΩΣΕΙΣ

ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ ΕΠΙΜΟΡΦΩΣΗ ΣΤΗΝ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΕΝΗΛΙΚΩΝ

- 12/2015: Εισηγητής σε προγράμματα ΛΑΕΚ-ΟΑΕΔ. Αρ. Μητρώου: 57927.
- 09/2015: Εκπαιδευτική επάρκεια στην εκπαίδευση Ενηλίκων της μη Τυπικής Εκπαίδευσης, Ε.Ο.Π.Π.Ε.Π., Αρ. Μητρώου: EB28557.
- 07/2015-08/2015: Εκπαίδευση Εκπαιδευτών και Ποιότητα στη Διά Βίου Μάθηση, ΙΜΕ ΓΣΕΕΕ, Συνολικής διάρκειας 70 ωρών, Ηράκλειο.
- 31/07/2015: Πιστοποιητικό στην Εκπαίδευση Ενηλίκων, Vellum Global Education Services.
- 13/06/2015-11/07/2015: Εκπαιδευτές Ενηλίκων, Ελληνικά Κέντρα Δια Βίου Μάθησης, Συνολικής διάρκειας 100 ωρών, Πειραιάς.
- 04/2015-06/2015: Εισαγωγή στην Εκπαίδευση Ενηλίκων, Ανοιχτό Ίδρυμα Εκπαίδευσης, Συνολικής διάρκεια 80 ώρες.
- 04/2013-05/2013: Εκπαίδευση Εκπαιδευτών για τα Κέντρα Διά Βίου Μάθησης, Ελληνικό Ανοικτό Πανεπιστήμιο, Συνολικής διάρκειας 37 ωρών.

ΚΡΙΤΗΣ ΣΕ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

Clinical Phytoscience (Springer Open)

CURRICULUM VITAE

PERSONAL INFORMATION

Name: Stefanakis Michalis
Place of Birth: Heraklio Crete
Date of Birth: 06 February 1984
E-mail: michstefanakis@yahoo.gr
Work Address: University of Crete, Chemistry Department,
Voutes Campus, Heraklio 71003 Crete
Work Phone: +30 2810 545042

EDUCATION

2012-2017: Ph.D Candidate, Chemistry Department, University of Crete.
2014-2015: School of Pedagogical & Technological Education, Pedagogy & Educational Attainment Certificate, Grade: Excellent.
2007-2010: M.Sc., Environmental Protection Technologies, Chemistry Department, University of Crete.
2002-2006: Bachelor of Agricultural Technology, Crop Production Department, Alexandreio Technological Educational Institute of Thessaloniki.

TEACHING EXPERIENCE

03/2017: Vocational Training Center "European Progress", Trainer, Aromatic & Medicinal Plants.
10/2014-06/2017: Hourly Paid Teacher in Private Vocational Training Institute "IEK Craft", Heraklio.
10/2014-06/2016: Hourly Paid Teacher in Greek Agricultural Organization DIMITRA, Vocational School of Crete.
03/2015-05/2015: Youth and Lifelong Learning Foundation, Municipality of Gortyna, Technological Education of Agia Varvara, Archanes & Charaka, Adult Educator: Aromatic & Medicinal Plants.
11/2013-04/2014: Greek Agricultural Organization DIMITRA, Vocational School of Crete, Support part of the educational work in the field of: Agricultural Techniques, Laboratory Support of greenhouse crops and Aromatic & Medicinal Plants.

LABORATORY EXPERIENCE

07/2015-09/2015: Research and Cooperation with Aristotle University of Thessaloniki,
06/2012-09/2012: Pharmaceutical Department, Pharmacognosy Sector, in the context of doctoral thesis, Scientific Instructor: Associate Professor Lazari Diamanto.
2012: Assistant in undergraduate laboratory of Biodiversity-Plants, Biology Department, University of Crete. (Spring Semester).
2012: Assistant in undergraduate laboratory of Biochemistry, Chemistry Department, University of Crete. (Spring Semester).
2011: Assistant in undergraduate laboratory of Analytical Chemistry,

- 2007-2010: Chemistry Department, University of Crete. (Spring Semester).
Elaboration of research project in the context of M.Sc. Program, Chemistry Department, Organic Chemistry Sector, University of Crete. Cooperation with the Hellenic Centre for Marine Research (HCMR), Aquaculture institute, Crete.
- 2009-2010: Assistant in undergraduate laboratory of Organic Chemistry Chemistry, Chemistry Department, University of Crete. (Winter-Spring Semester).
- 2008: Assistant in undergraduate laboratory of Analytical Chemistry, Chemistry Department, University of Crete. (Spring Semester).
- 2005-2006: Work hourly in green house facilities of Aromatic & Medicinal Plants, Alexandreio Technological Educational Institute of Thessaloniki.
- 2006: Research work in the context of undergraduate studies, Agriculture Laboratory, Aromatic & Medicinal Plants, Crop Production Department, Technological Educational Institute of Thessaloniki.
- 03/2006-09/2006: 5-month practice in Agriculture Laboratory, Aromatic & Medicinal Plants, Crop Production Department, Technological Educational Institute of Thessaloniki.

PROFESSIONAL ACTIVITY

- 11/2012-04/2013: Municipality of Gortyna, Agioi Deka, (5 month contract as an Agriculturist in the context of Partnership of Productive & Social Bodies for Development, Employment & Social Solidarity of Crete Program).
- 03/2011-10/2011: Infantry Officers Reservoir Facility, Office of Administration. (Service as an Agriculturist, during my military service)
- 12/2010-01/2011: Region of Crete, Department of Rural Economy & Veterinary Unity of Heraklion, Department of Crop Production.
- 07/2008-01/2009: Payments and Control Agency for Guidance and Guarantee
01/2007-03/2007: Community Aid (O.I.E.K.E.I.E), Regional Office of Crete.
- 07/2007-11/2007: Prefectural Administration of Heraklion, Rural Development and Food Directorate, Chief of Staff at the department of olive fruit fly treatment.
- 09/2006: Union of Agricultural Cooperatives of Heraklion, Department of Primary Production (Internship).

TECHNICAL SKILLS

- 2007: Computers: (Word, Excel, Outlook, Power Point), Certificate: *Microsoft Office Specialist*.

LANGUAGES

Certificate of Competency in English, University of Michigan
Diplôme D'Etudes EN Langue Française - DELF A₄

PUBLICATIONS

THESIS

Stefanakis M. 2010. *Isolation, Analysis and study of the biological activity of secondary metabolites of aromatic plants of the genus Origanum and of the genus Phlomis*". M.Sc Thesis, Chemistry Department, University of Crete. Scientific Instructor: Prof. H. E. Katerinopoulos.

Stefanakis M. 2006. *Biosynthesis of essential oils of aromatic plants, Oregano, Sage, Rosemary, Melissa, Mint, Peppermint during their various stages of development.* Bachelor Thesis, Alexandreio Technological Educational Institute of Thessaloniki.

SCIENTIFIC JOURNALS

Georgescu, L., **Stefanakis, M. K.**, Kokkini, S., Katerinopoulos, H. E., Pirintsos, S. Chemical and genetic characterization of *Phlomis* species and hybrids grown wild in Crete. *Phytochemistry*, **2016**, *122*, 91-102.,

Stefanakis, M. K., Anastasopoulos, E., Katerinopoulos, H. E. Makridis, P. Use of essential oils extracted from three *Origanum* species for disinfection of cultured rotifers (*Brachionus plicatilis*). *Aquaculture Research*, **2014**, *45*, 1861-1866.

Stefanakis, M. K., Touloupakis, E., Anastasopoulos, E., Ghanotakis, D., Katerinopoulos, H. E., Makridis, P. Antibacterial Activity of Essential Oils from Plants of the Genus *Origanum*. *Food control*, **2013**, *34*, 539-546.

PRESENTATIONS IN INTERNATIONAL CONFERENCES

Papaioannou, C. I., **Stefanakis, M.**, Anastasopoulos, E., Makridis, P., Tsikalas, G., Zaragotas, D., Katerinopoulos, H. E, Papatotiropoulos, V. *Genetic diversity and analysis of antimicrobial properties of selected oregano clones for use in the aquaculture industry.* 20th Eucarpia General Congress. August 29 - 1 September 2016, Zurich, Switzerland. Book of Abstracts p. 326. (Oral Presentation by Papatotiropoulos V.).

Tsiftoglou, St. O., Kalpourtzzi, N. E. **Stefanakis, M.**, Lazari, M. D. *Phytochemical study of Helleborus odorus subsp. cyclophyllus* (Ranunculaceae). 9th Joint Natural Products Conference, July 24-27, 2016, Copenhagen, Denmark. (Poster).

Papaioannou C., **Stefanakis, M.**, Anastasopoulos E., Makridis P., Tsikalas G., Zaragotas D. Katerinopoulos, H.E., Papatotiropoulos V. *Molecular analysis of oregano clones selected for their antimicrobial activity in the aquaculture industry.* 2nd International Conference on Natural Products Utilization: from Plant to Pharmacy Shelf, October 14-17, 2015, Plovdiv, Bulgaria. Book of Abstracts p. 248. (Poster).

Katerinopoulos, H. E., **Stefanakis, M.**, Makridis, P., Anastasopoulos, E. *Chemical components in essential oils from plants of the genus Origanum used in an alternative method for eliminating Bacterial action in aquacultures.* 19th European Symposium on Organic Chemistry, July 12-16, 2015, Lisbon, Portugal. Book of Abstracts p. 495. (Poster).

Stefanakis, M., Lazari, D., Katerinopoulos, H. E. *Flavonoids and phenolic*

derivatives from the flowers of phlomis hybrid: Phlomis × commixta. 8th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries, May 19-22, 2014, Durres, Albania. Book of Abstracts p. 152. (Poster).

Stefanakis, M., Makridis, P., Anastasopoulos, E., Katerinopoulos, H. E. *An alternative method for disinfection of rotifers Brachionus plicatilis and gilthead seabream eggs Sparus aurata using essential oils from plants of the genus Origanum*. Global Aquaculture, securing our future, Aqua. September 1- 5, 2012, Prague, Czech Republic. (Oral Presentation by Makridis P.)

Stefanakis, M., Makridis, P., Anastasopoulos, E., Katerinopoulos, H. E. *An alternative method for disinfection of rotifers using essential oils from plants of the genus Origanum*. 17th European Symposium on Organic Chemistry, July 10-15, 2011, Hersonissos, Crete, Greece. Book of Abstracts p. 304. (Poster).

Stefanakis, M., Makridis, P., Anastasopoulos, E., Katerinopoulos, H. E. *Antibacterial activity of essential oils from plants of the genus Origanum on the bacterial strains of the Vibrio group*. Trends in natural products research a Phytochemistry Society of Europe young scientists' meeting, June 12-15, 2011, Kolymvari, Crete, Greece. Book of Abstracts p. 206. (Poster).

Stefanakis, M., Georgiladaki, S., Tsikalas, G., Katerinopoulos, H. E. *Isolation of Antioxidants from the Leaves of Different Subspecies of Olea Europaea*. Trends in natural products research a Phytochemistry Society of Europe young scientists' meeting, June 12-15, 2011, Kolymvari, Crete, Greece. Book of Abstracts p. 208. (Poster).

Stefanakis, M., Katerinopoulos, H. E., Pirintsos, S. *Chemical Composition of the Essential oils of three Phlomis species*. Trends in natural products research a Phytochemistry Society of Europe young scientists' meeting, June 12-15, 2011, Kolymvari, Crete, Greece. Book of Abstracts p. 210. (Poster).

PRESENTATIONS IN NATIONAL CONFERENCES

Dimitriadis K., M. **Stefanakis M.**, Zioga E., Lazari D. *Analysis of essential oil of cultivated plants of the species Achillea millefolium in Crete*. 28th Scientific Congress of the Greek Company of Science in Fruit and Vegetable Plants, 16-20 October, 2017, Thessaloniki. (Poster).

Tsikerdanou E., Lagogiannis G., **Stefanakis M.**, Lazari D. *Analysis and comparison of the chemical compounds of the essential oils of Origanum dictamnus between a biodynamic and a conventional crop in Heraklion of Crete*. 15th National Hellenic Botanical Society Congress, 14-17 September 2017, Chania. (Poster).

Papagrigoriou Th., Lagogiannis G., **Stefanakis M.**, Lazari D. *Study of the essential oil of cultivated plants of the species Thymus vulgaris*. 22nd Panhellenic Chemistry Congress 2-4 December 2016, Thessaloniki. (Poster).

Lagogiannis G., **Stefanakis M.**, Lazari D. *Study of the essential oil of cultivated*

plants of the species Origanum majorana in Crete. 22nd Panhellenic Chemistry Congress 2-4 December 2016, Thessaloniki. (Poster).

Papaioannou Ch., **Stefanakis M.**, Anastasopoulos H., Makridis P., Tsikalas G., Zaragotas D., Katerinopoulos Ch., Papatotiropoulos B. *Molecular identification of oregano clones selected by their antimicrobial activity in aquaculture.* 16th Panhellenic Genetic Improvement of Plants Congress, 28-30 September 2016, Florina. (Poster).

Manesi M., **Stefanakis M.**, Katerinopoulos H. *Seasonal variation of the secondary metabolites of the plant Hyssopus officinalis.* 18th Conference of Postgraduate Students of Chemistry, University of Crete. 26-27 March, 2016, Heraklio. (Poster).

Tsiftoglou, O., Kalpourtzi, E., **Stefanakis M.**, Lazari D. *Study of the plant Helleborus odorus subsp. Cyclophyllus.* 2nd Pharmaceutical Sciences Congress, 9-11 October 2014, Patra. (Oral presentation by Tsiftoglou, O.).

Stavropoulou A., Baltzakis I., Kaselaki A., **Stefanakis M.**, Magan N., Tzortzakis N., Loulakakis K. *Effect of dittany essential oil on the growth of B. cinerea fungus in vitro on eggplant fruit.* 26th Hellenic Association of Fruits and Vegetables Congress, 15-18 October 2013, Kalamata. (Poster).

Tsiftoglou O., Lazari D., **Stefanakis M.**, Kokalou E. *Study of the plant Alyssum alyssoides of the family Brassicaceae (Cruciferae).* 16th Panhellenic Pharmaceutical Congress, 31 May - 3 June 2013, Athens. **Plaudit.** (Poster).

Panou-Filotheou E., Lazari D., Koutinas N., **Stefanakis M.**, Filotheou A., Lianopoulou V. *Study of essential oil of eucalyptus species in culture conditions.* 14th Panhellenic Conference of the Hellenic Scientific Society for Plant Genetics, 10-12 October 2012, Thessaloniki. Pages. 388-392. (Poster).

Panou-Filotheou E., Lazari D., **Stefanakis M.**, Filotheou A., Lianopoulou V. *Investigation of chemotype of Greek oregano populations [Origanum vulgare subsp. hirtum (Link) Ietswaart].* 12th National Hellenic Botanical Society Congress, 29 September - 2 October 2011, Rethimno. (Poster).

Stefanakis M., Makridis P., Kostopoulou V., Anastopoulos H., Katerinopoulos E. H. *Evaluation of essential oils of plants of the genus Origanum in the disinfection of rotifers.* 14th Panhellenic Conference of Ichthyologists, 6-9 May 2010, Piraeus, Pages: 241-244. (Poster).

Stefanakis M., Makridis P., Anastopoulos E., Katerinopoulos E. H. *Chemical composition of essential oils of oregano (Origanum sp.) on the development of zooplankton in aquaculture.* 2nd Greece-Cyprus, Postgraduate Student Conference, 16-20 September 2009, Chania. (Poster).

Stefanakis M., Demiris K., Kokoni G-F., Katsadoni D., Filotheou A., Lianopoulou V., Tertivanidis K., Lazari D., Panou-Filotheou E. *Colorimetric approach to the quality drug of aromatic plants.* 12th Panhellenic Congress of the Hellenic Society of Plant Genetics, 8-10 October, 2008, Naousa, Pages. 427-431. (Poster).

Stefanakis M., Lianopoulou V., Gatsis Th., Filotheou Ch., Lazari D., Panou-Filotheou E. *Effect of the crop harvesting season in the composition and quality of essential oils from aromatic plants of the Lamiaceae family*. 23rd Scientific Congress of the Greek Company of Science in Fruit and Vegetable Plants, 23-26 October, 2007, Chania Crete, volume 13, issue B', pages: 673-676. (Oral presentation Stefanakis M.).

PRESENTATIONS IN LOCAL MEETINGS

Stefanakis M. Phytochemical study of plants of the genus *Phlomis*. Organic Chemistry Meeting in memory of **Maria Chatzimarini** Doctor of University of Crete, Chemistry Department, 23 November 2013, Chemistry Department, University of Crete. (Oral Presentation).

Stefanakis M., Tsikalas, G., Katerinopoulos H.E. Makridis P., Bakratsas D., Anastasopoulos H. Papaioannou, C. I., Papisotiropoulos, V. *Study of the use of extracts of selected oregano plants in fish nutrition to reduce the microbial load of their feed (zooplankton)*. Meeting of the Research Program, ARCHIMEDES III-Research Groups' Enhancement in TEI of Larisa, 29 November 2013, TEI of Larisa. (Oral Presentation by H. Anastasopoulou).

PARTICIPATION IN RESEARCH PROJECTS

06/2014-09/2014:

"Isolation compounds with sweet taste and ellagic tannins from oak". Scientific Instructor: Assistant Professor, Kotseridis Georgios, Agriculture University of Crete.

09/2012-09/2014:

Archimedes III: "Deployment of essential oils for the preservation of fresh produce in Crete ". Scientific Instructor: Professor: Loulakakis Konstantinos, , TEI Crete.

01/2012-12/2014:

Archimedes III: "Study on the use of selected oregano plant extracts in fish diet (zooplakton) to reduce its microbial load". Scientific Instructor: Associate Professor Anastasopoulos Elias, TEI Larisas.

PARTICIPATION IN SUMMER SCHOOLS – WORKSHOPS

8-19/07/2013: Summer School in "Organic Viticulture & Oenology" Duration 60 hrs, T.E.I. Ionian Islands - Department of Food Technology, Argostoli.

26-28/06/2013: School "*Novel Agricultural Business on Medicinal & Aromatic Plants*" is organized by Agro-Know Technologies and APIVITA and is supported by I.S.L.E Network and the projects: Organic Lingua, Natural Europe, Herbal.Mednet and agINFRA, Heraklion, Crete, Greece.

6-19/07/2009: Synthesis and Retrosynthesis in the Chemistry of Natural Products, Department of Chemistry, University of Crete, ERASMUS Intensive Program - Summer School, Heraklion, Crete, Greece.

TRAINING- SEMINARS

TRAINING IN ADULT EDUCATION

- 12/2015: Originator in LAEK-OAED programs. Register No: 57927.
- 09/2015: Training Adequacy in adult training of non typical training, E.O.Π.Π.E.Π., Register No: EB28557.
- 07/2015-08/2015: Training Educators and Quality in Lifelong Learning, Duration 70 hrs, Heraklio.
- 31/07/2015: Certificate in Adult Training, Vellum Global Education Services.
- 13/06/2015-11/07/2015: Adult Educators, Greek Centers of Lifelong Learning, Duration 100 hrs, Piraeus.
- 04/2015-06/2015: Introduction in Adult Training, Open Educational Foundation, Duration 80 hrs.
- 04/2013-05/2013: Training Educators for Lifelong Learning Centers, Greek Open University, Duration 37 hrs.

REVIEWER IN SCIENTIFIC JOURNALS

Clinical Phytoscience (Springer Open)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα ερευνητική εργασία περιλαμβάνει την ανάλυση των συστατικών του υβριδίου *P. × commixta*, φυτού του γένους *Phlomis*. Ο υπό μελέτη οργανισμός διαχωρίστηκε σε άνθη, φύλλα και ρίζες. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες του φυτού παραλήφθηκαν δια μέσου εκχυλίσεων και απομονώθηκαν με διάφορες χρωματογραφικές τεχνικές όπως V.L.C., C.C., HPLC και ταυτοποιήθηκαν με φασματοσκοπικές μεθόδους UV/Vis, NMR, GC-MS και LC-MS.

Οι ενώσεις που χαρακτηρίστηκαν από τα **άνθη** ήταν α) τα φλαβονοειδή: ναρινγγενίνη, εριοδουκτιόλη, λουτεολίνη, απιγενινο-7-*O*- β -D-γλυκοζίτης, εριοδουκτιόλο-7-*O*- β -D-γλυκοζίτης, διοσμετινο-7-*O*- β -D-γλυκοζίτης, β) οι φαινυλοαιθανοειδείς γλυκοζίτες: βερμπασκοσίδης, μαρτινοσίδης, φορσουθοσίδης B, γ) η χρωμόνη: 5,7-διυδροξυχρωμόνη, δ) τα φαινολικά οξέα: καφεϊκό οξύ, *p*-υδροξυβενζοϊκό οξύ, χλωρογενικό οξύ, μεθυλεστέρας του χλωρογενικού οξέος, γαλλικό οξύ, *p*-κουμαρικό οξύ και ε) ο αλειφατικός υδρογονάνθρακας: εικοσ-1-ένιο.

Από τα **φύλλα** ταυτοποιήθηκαν, α) τα φλαβονοειδή: κερκετίνη, απιγενίνη, εσπεριτίνη, λουτεολινο-7-*O*- β -D-γλυκοζίτης, κερκετινο-3-*O*- β -D-γλυκοζίτης β) οι φαινυλοαιθανοειδείς γλυκοζίτες: εχινασκοσίδης, βερμπασκοσίδης, φορσουθοσίδης B, γ) το φαινολικό οξύ: βανιλικό οξύ και δ) ο γλυκοζίτης της αλλυλικής αλκοόλης, 3-*O*- β -D-απιοφουρανοζυλο-(1 \rightarrow 6)-*O*- β -D-γλυκοπυρανοζυλο-οκτ-1-εν-3-όλη που αποτελεί νέο φυσικό προϊόν.

Από τις **ρίζες** του φυτού απομονώθηκαν οι μεταβολίτες α) της κατηγορίας των φαινυλοαιθανοειδών γλυκοζιτών: αλλυσονοσίδης, βερμπασκοσίδης, φορσουθοσίδης B, β) τα στεροειδή: μπρασικαστερόλη και στιγμαστερόλη και γ) οι τυροσολικοί εστέρες: λιγνοσερικός εστέρας της τυροσόλης και ο παλμιτικός εστέρας του τυροσολικού μεθυλαιθέρα, ο οποίος απομονώθηκε για πρώτη φορά ως φυσικό προϊόν.

Παρά το γεγονός ότι τα είδη του γένους *Phlomis* ευδοκιμούν σχεδόν σε όλο τον κόσμο, η παρούσα εργασία είναι η πρώτη μελέτη συστατικών του υβριδίου *P. × commixta*. Το φαρμακευτικό προφίλ των συστατικών που απομονώθηκαν από το υβρίδιο είναι σε συμφωνία με τις εφαρμογές της λαϊκής ιατρικής όπως αναφέρονται στη βιβλιογραφία και είναι ενδεικτικό της δυνατότητας χρήσης του φυτού στη σύγχρονη φαρμακευτική.

Λέξεις κλειδιά: *P. × commixta*, *Phlomis*, Δευτερογενείς Μεταβολίτες, Φλαβονοειδή, Φαινυλοαιθανοειδείς γλυκοζίτες, Φαινολικά παράγωγα, Τυροσολικοί εστέρες, Στεροειδή.

ABSTRACT

The present research paper includes the analysis of the components of the *P. × commixta* hybrid, a plant of the genus *Phlomis*. The plant under study was separated into flowers, leaves and roots. The secondary metabolites of the plant were recovered via extractions, isolated by various chromatographic techniques such as V.L.C., C.C., HPLC, and identified by spectroscopic methods such as UV / Vis, NMR, GC-MS and LC-MS.

The compounds isolated from the flowers were a) flavonoids: naringenin, eriodyctiol, luteolin, apigenin-7-*O*- β -D-glucoside, eriodyctiol-7-*O*- β -D-glucoside, diosmentin-7-*O*- β -D-glucoside; b) phenylethanoic glycosides: martinocide, verbascoside, forsithoside B; c) a chromone: 5,7-dihydroxychromone; d) phenolic acids: caffeic acid, p-hydroxybenzoic acid, chlorogenic acid, chlorogenic acid methyl ester, gallic acid, p-coumaric acid and e) an aliphatic hydrocarbon: Docos-1-ene.

From the leaves were identified a) flavonoids: quercetin, apigenin, hesperetin, luteolin-7-*O*- β -D-glucoside, quercetine-3-*O*- β -D-glucoside; b) phenylethanoid glycosides: echinacoside, verbascoside, forcythoside B; c) a phenolic acid: vanillic acid and d) a glycoside of allylic alcohol: 3-*O*- β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)-*O*- β -D-glucopyranosyl-oct-1-ene-3-ol which was fully characterized as natural product for the first time.

From the roots of the plant were isolated a) metabolites of the phenylethanoid glycoside class: allysonoside, verbascoside, forsithoside B; b) steroids: brassicasterol and stigmasterol and c) tyrosol esters: tyrosol lignoserate and tyrosol methyl ether palmitate, the latter one being isolated as a natural product for the first time.

Although *Phlomis* species thrive almost all over the world, the present work is the first report on the ingredients of the *P. × commixta* hybrid. The pharmaceutical profile of the components isolated from the hybrid is in agreement with the folklore medicine applications reported in the literature, and is indicative of the potential use of the plant in contemporary medicine.

Keywords: *P. × commixta*, *Phlomis*, Secondary Metabolites, Flavonoids, Phenylethanoid Glycosides, Phenolic Derivatives, Tyrosol Esters, Steroids.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ.....	IV
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	VI
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ.....	X
CURRICULUM VITAE.....	XVII
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	1
ABSTRACT.....	2
<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ</u>	<u>15</u>
1.1. ΦΥΣΙΚΑ ΠΡΟΙΟΝΤΑ.....	16
1.2. ΒΟΤΑΝΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ.....	18
1.2.1. Το γένος <i>Phlomis</i> L.	18
1.2.2. Τα είδη του γένους <i>Phlomis</i> στην Κρήτη	19
1.2.3. Τα υβρίδια του γένους <i>Phlomis</i> στην Κρήτη.....	22
1.2.4. Βοτανική Κατάταξη.....	23
1.3. ΔΡΟΓΟΕΤΥΜΟΛΟΓΙΑ-ΔΡΟΙΣΤΟΡΙΑ.....	25
1.4. ΔΡΟΓΟΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑ	27
1.4.1. Λαϊκή Φυτοθεραπευτική.....	27
1.4.2. Φαρμακολογικές Ιδιότητες	31
1.5. ΧΗΜΕΙΑ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ.....	40
1.5.1. Μονοτερπένια.....	40
1.5.2. Διτερπένια.....	45
1.5.3. Τριτερπενοειδή	46
1.5.4. Φαινυλοαιθανοειδείς Γλυκοζίτες.....	51
1.5.5. Φλαβονοειδή.....	56
1.5.6. Λιγνάνια.....	62
1.5.7. Φαινυλοπροπανοειδή.....	63
1.5.8. Φαινυλοϊσοπρενοειδή	64
1.5.9. Φαινολικά Παράγωγα	64
1.5.10. Αζωτούχα Παράγωγα.....	66
1.5.11. Βενζυλικοί Αιθέρες Σακχάρων	66
1.5.12. Άλλα Συστατικά.....	67
1.6. Η ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ ΚΑΙ Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥΣ	68
1.7. ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	74

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....75

2.1. ΑΠΟΔΟΣΗ ΔΟΜΩΝ ΤΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΟΠΩΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΗΚΑΝ ΑΠΟ ΤΟ ΥΒΡΙΔΙΟ <i>P. × COMMIXTA</i>	76
2.2. ΦΑΙΝΥΛΟΑΙΘΑΝΟΕΙΔΕΙΣ ΓΛΥΚΟΖΙΤΕΣ.....	81
2.2.1. Μεταβολίτης: Βερμπασκοσίδης	81
2.2.2. Μεταβολίτης: Μαρτυνοσίδης	90
2.2.3. Μεταβολίτης: Φορσυθοσίδης Β.....	95
2.2.4. Μεταβολίτης: Αλυσσονοσίδης	101
2.2.5. Μεταβολίτης: Εχινakoσίδης	105
2.3. ΑΛΛΥΛΙΚΟΙ ΓΛΥΚΟΖΙΤΕΣ	111
2.3.1. Μεταβολίτης:	111
2.4. ΤΥΡΟΣΟΛΙΚΟΙ ΕΣΤΕΡΕΣ	121
2.4.1. Μεταβολίτης: Παλμιτικός εστέρας του τυροσολικού μεθυλαιθέρα	121
2.4.2. Μεταβολίτης: Λιγνοσερικός εστέρας της τυροσόλης.....	124
2.5. ΣΤΕΡΟΕΙΔΗ	127
2.5.1. Μεταβολίτης: Μπρασικαστερόλη.....	127
2.5.2. Μεταβολίτης: Στιγμαστερόλη.....	132
2.6. ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ.....	137
2.6.1. Μεταβολίτης: Ναρινγγενίνη	137
2.6.2. Μεταβολίτης: Εριοδικτυόλη	140
2.6.3. Μεταβολίτης: Εριοδικτυολο-7- <i>O</i> -β-D-γλυκοζίτης.....	142
2.6.4. Μεταβολίτης: Εσπερετίνη	145
2.6.5. Μεταβολίτης: Λουτεολίνη.....	149
2.6.6. Μεταβολίτης: Λουτεολινο-7- <i>O</i> -β-D-γλυκοζίτης.....	152
2.6.7. Μεταβολίτης: Κερκετίνη	155
2.6.8. Μεταβολίτης: Κερκετινο-3- <i>O</i> -β-D-γλυκοζίτης	158
2.6.9. Μεταβολίτης: Απιγενίνη.....	162
2.6.10. Μεταβολίτης: Απιγετινο-7- <i>O</i> -β-D-γλυκοζίτης	165
2.6.11. Μεταβολίτης: Διοσμετινο-7- <i>O</i> -β-D-γλυκοζίτης	168
2.7. ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΟΞΕΑ	171
2.7.1. Μεταβολίτης: Χλωρογενικό Οξύ.....	171
2.7.2. Μεταβολίτης: Μεθυλεστέρας του χλωρογενικού οξέος.....	175
2.7.3. Μεταβολίτης: Καφεϊκό οξύ	178
2.7.4. Μεταβολίτης: p-Κουμαρικό οξύ.....	180
2.7.5. Μεταβολίτης: Γαλλικό Οξύ	182

2.7.6. Μεταβολίτης: p-Υδροξυ-βενζοϊκό οξύ.....	184
2.7.7. Μεταβολίτης: Βανιλλικό Οξύ.....	186
2.8. ΧΡΩΜΟΝΗ.....	188
2.8.1. Μεταβολίτης: 5,7-Διυδροξυχρωμόνη.....	188
2.9. ΑΛΕΙΦΑΤΙΚΟΙ ΥΔΡΟΓΟΝΑΘΡΑΚΕΣ.....	190
2.9.1. Μεταβολίτης: Εικοσι-1-ένιο.....	190
2.10. ΠΤΗΤΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ.....	193
2.11. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	196
2.12. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	203
<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</u>	<u>204</u>
3.1. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ.....	205
3.1.1. Χρωματογραφικές Μέθοδοι.....	205
3.1.2. Φασματοσκοπικές Μέθοδοι.....	207
3.2. ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	210
3.3. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΔΡΟΓΗΣ.....	211
3.4. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΑΝΘΕΩΝ.....	213
3.5. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΦΥΛΛΩΝ.....	243
3.6. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΡΙΖΩΝ.	254
<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....</u>	<u>266</u>
4.1. ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ.....	267
4.2. ΦΑΙΝΥΛΟΑΙΘΑΝΟΕΙΔΕΙΣ ΓΛΥΚΟΖΙΤΕΣ.....	271
4.3. ΣΤΕΡΟΕΙΔΗ.....	276
4.4. ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΟΞΕΑ.....	280
4.5. ΧΡΩΜΟΝΕΣ.....	285
4.6. ΤΥΡΟΣΟΛΙΚΟΙ ΕΣΤΕΡΕΣ.....	288
4.7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΦΑΣΜΑΤΩΝ (ESI-MS, HR-MS).....	289
4.8. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ (GC-MS).....	305
4.9. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΦΑΣΜΑΤΩΝ (UV-VIS).....	308
4.10. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΦΑΣΜΑΤΩΝ (NMR 1D & 2D).....	315
<u>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</u>	<u>392</u>

ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ ΑΚΡΩΝΥΜΙΩΝ

°C	Degree Celsius
1D-NMR	One-dimensional NMR
2D-NMR	Two-dimensional NMR
br	Broad
Br.s	Broad singlet
BuOH	Butanol
BUL	Experimental code – Butanol Leaves
C.C.	Column Chromatography
CD ₃ OD	Deuterated methanol
CDCl ₃	Chloroform-deuterated
CEAL	Experimental code – EtOAc Leaves
CMX	Experimental code – EtOAc Flowers
COB	Experimental code – Butanol Flowers
COME	Experimental code – EtO ₂ Flowers
CORB	Experimental code – Butanol Roots
COSY	COrrrelation SpectroscopY
COX	Cyclooxygenase
d	doublet
dd	doublet of doublets
ddd	doublet of doublet of doublets
ddt	doublet of doublet of triplets
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
dt	doublets of triplet
Et ₂ O	Diethyl ether
EtOAc	Ethyl acetate
EI-MS	Electron Ionization-Mass Spectrometry
ESI-MS	Electrospray Ionization-Mass Spectrometry
g	gram
GC-MS	Gas chromatography-Mass spectrometry
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HR-MS	High-Resolution Mass spectrometry
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
Hz	Hertz

<i>J</i>	Coupling constant
LC-MS	Liquid chromatography-Mass spectrometry
m	Multiplet
m/z	Mass by charge
mg	milligram
MHz	Megahertz
min	Minute
ml	Millilitre
mm	Millimetre
MS	Mass Spectrometry
nm	Nanometre
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOE, nOE	Nuclear Overhauser Effect
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
<i>P.</i>	<i>Phlomis</i>
P.E.	Petroleum Ether
PEF	Experimental code – Petroleum ether Flowers
PER	Experimental code – Petroleum ether Roots
ppm	Parts-per million
PTLC	Preparative Thin-layer chromatography
q	quartet
ROS	Reactive Oxygen species
R.I.	Retention Indices
R.t.	Retention time
R _f	Retention factor
t	triplet
tdd	Triplet of doublet of doublets
T.L.C	Thin Layer Chromatography
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
UV	Ultraviolet
Vis	Visible
V.L.C	Vacuum liquid chromatography
λ _{max}	Wavelength of maximum absorption

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Πίνακας

1.1	Τα είδη του γένους <i>Phlomis</i> που απαντώνται στον ελλαδικό χώρο.....	18
1.2	Φαρμακευτικές χρήσεις των ειδών <i>Phlomis</i>	28
1.3	Ιριδοειδή που έχουν απομονωθεί από το γένος <i>Phlomis</i>	41
1.4	Άλλα μονοτερπένια που έχουν απομονωθεί από το γένος <i>Phlomis</i>	44
1.5	Διτερπένια που έχουν απομονωθεί από το γένος <i>Phlomis</i>	45
1.6	Τριτερπένια που έχουν απομονωθεί από το γένος <i>Phlomis</i>	47
1.7	Φαινυλοαιθανοειδείς γλυκοζίτες που έχουν απομονωθεί από το γένος <i>Phlomis</i>	51
1.8	Φλαβονοειδή που έχουν απομονωθεί από το γένος <i>Phlomis</i>	56
1.9	Λιγνάνια που έχουν απομονωθεί από το γένος <i>Phlomis</i>	62
1.10	Φαινυλοπροπανοειδή που έχουν απομονωθεί από το γένος <i>Phlomis</i>	63
1.11	Φαινυλοϊσοπρενυλοειδή που έχουν απομονωθεί από το γένος <i>Phlomis</i>	64
1.12	Φαινολικά παράγωγα που έχουν απομονωθεί από το γένος <i>Phlomis</i>	64
1.13	Αζωτούχα παράγωγα που έχουν απομονωθεί από το γένος <i>Phlomis</i>	66
1.14	Βενζυλικοί αιθέρες σακχάρων που έχουν απομονωθεί από το γένος <i>Phlomis</i>	67
1.15	Άλλα συστατικά που έχουν απομονωθεί από το γένος <i>Phlomis</i>	67

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Πίνακας

2.1	Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη 48a , (CD ₃ OD, 500 MHz)...	88
2.2	Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη 48g , (CD ₃ OD, 500 MHz)...	93
2.3	Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη 48c , (CD ₃ OD, 500 MHz)...	99
2.4	Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη 48b , (CD ₃ OD, 500 MHz)...	103
2.5	Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη 48t , (CD ₃ OD, 500 MHz)...	109
2.6	Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη 101 , (CD ₃ OD, 500 MHz)...	117
2.7	Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη 102 , (CDCl ₃ , 500 MHz)....	122
2.8	Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη 103 , (CDCl ₃ , 500 MHz)....	125
2.9	Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR, του μεταβολίτη 104 , (CDCl ₃ , 500 MHz)....	130
2.10	Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη 32b , (CDCl ₃ , 500 MHz)....	135
2.11	Φασματοσκοπικά δεδομένα UV του μεταβολίτη 63c	137
2.12	Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη 63c (CD ₃ OD, 500 MHz)....	139
2.13	Φασματοσκοπικά δεδομένα UV του μεταβολίτη 63f	142
2.14	Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη 63f , (CD ₃ OD, 500 MHz)....	144

2.15	Φασματοσκοπικά δεδομένα UV του μεταβολίτη 63b	145
2.16	Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη 63b , (CD ₃ OD, 500 MHz)...	147
2.17	Φασματοσκοπικά δεδομένα UV του μεταβολίτη 58a	149
2.18	Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη 58a , (CD ₃ OD, 500 MHz)...	150
2.19	Φασματοσκοπικά δεδομένα UV του μεταβολίτη 58b	152
2.20	Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη 58b , (CD ₃ OD, 500 MHz)...	154
2.21	Φασματοσκοπικά δεδομένα UV του μεταβολίτη 60c	155
2.22	Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη 60c , (CD ₃ OD, 500 MHz)...	157
2.23	Φασματοσκοπικά δεδομένα UV του μεταβολίτη 60b	159
2.24	Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη 60b , (CD ₃ OD, 500 MHz)...	160
2.25	Φασματοσκοπικά δεδομένα UV του μεταβολίτη 62a	162
2.26	Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη 62a , (CD ₃ OD, 500 MHz)...	163
2.27	Φασματοσκοπικά δεδομένα UV της ένωσης 62b	165
2.28	Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη 62b , (CD ₃ OD, 500 MHz)...	167
2.29	Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη 105 , (CD ₃ OD, 500 MHz)...	169
2.30	Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη 79 , (CD ₃ OD, 500 MHz)....	173
2.31	Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR, του μεταβολίτη 108 , (CD ₃ OD, 500 MHz)...	176
2.32	Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη 76 , (CD ₃ OD, 500 MHz)....	185
2.33	Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη 107 , (CDCl ₃ , 500 MHz).....	191
2.34	Πτητικά συστατικά του κλάσματος PER-A.....	193
2.35	Πτητικά συστατικά του κλάσματος PEF-A.....	194
2.36	Πτητικά συστατικά του κλάσματος PEF-L.....	195
2.37	Δευτερογενείς μεταβολίτες που απομονώθηκαν από το υβρίδιο <i>P. × commixta</i> .	200

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Σχήμα

2.1	Σχηματική πορεία χρωματογραφικού διαχωρισμού ανθέων.....	77
2.2	Σχηματική πορεία χρωματογραφικού διαχωρισμού του αιθερικού κλάσματος από τα άνθη.....	77
2.3	Σχηματική πορεία χρωματογραφικού διαχωρισμού του κλάσματος οξικού αιθυλεστέρα από τα άνθη.....	78
2.4	Σχηματική πορεία χρωματογραφικού διαχωρισμού του βουτανολικού κλάσματος από τα άνθη.....	78
2.5	Σχηματική πορεία χρωματογραφικού διαχωρισμού από τα φύλλα.....	79
2.6	Σχηματική πορεία χρωματογραφικού διαχωρισμού του κλάσματος οξικού αιθυλεστέρα από τα φύλλα.....	79
2.7	Σχηματική πορεία χρωματογραφικού διαχωρισμού του βουτανολικού κλάσματος από τα φύλλα.....	80
2.8	Σχηματική πορεία χρωματογραφικού διαχωρισμού από τις ρίζες.....	80
2.9	Φάσμα ¹ H NMR της ένωσης 48a	82
2.10	Οι διαμορφώσεις των β και α ανωμερών της D-γλυκόζης και οι αντίστοιχες διέδρες γωνίες H-1'' - H-2''.....	83
2.11	Οι διαμορφώσεις των α και β ανωμερών της L-ραμνόζης και οι αντίστοιχες διέδρες γωνίες H-1''' - H-2'''.....	83
2.12	Επιλεγμένες συσχετίσεις NOESY του μεταβολίτη 48a	84
2.13	Μεγέθυνση του φάσματος ¹ H-NMR στην περιοχή 2.70-4.50 ppm όπου εμφανίζονται τα πρωτόνια των σακχάρων του βερμπασκοσίδη 48a (500 MHz, CD ₃ OD).....	84
2.14	Επιλεγμένες συσχετίσεις COSY όπως παρατηρούνται με έντονη επισήμανση.....	85
2.15	Κύριες συσχετίσεις από το φάσμα HMBC του μεταβολίτη 48a	85
2.16	Τμήμα φάσματος ¹³ C-NMR του βερμπασκοσίδη (48a) (500 MHz, CD ₃ OD)...	86
2.17	Πορεία θραυσμάτωσης του βερμπασκοσίδη 48a	86
2.18	Σημαντικότερες αλληλεπιδράσεις COSY του μαρτυνοσίδη 48g (έντονη επισήμανση).....	91
2.19	Σημαντικότερες αλληλεπιδράσεις HMBC του μαρτυνοσίδη 48g	91
2.20	Σημαντικότερες αλληλεπιδράσεις NOESY του μαρτυνοσίδη 48g	91
2.21	Βασικότερες συσχετίσεις HMBC του μεταβολίτη 48c	97
2.22	Βασικότερες συσχετίσεις COSY (α) και NOESY (β) του μεταβολίτη 48c	97
2.23	Υποθετικό μονοπάτι θραυσμάτωσης της ένωσης 48b στο φάσμα μαζών.....	102

2.24	Βασικότερες αλληλεπιδράσεις HMBC του μεταβολίτη 48b	103
2.25	Προτεινόμενη θραυσμάτωση του μεταβολίτη 48t στο φάσμα μαζών.....	106
2.26	Φάσμα ¹ H-NMR του μεταβολίτη 48t	107
2.27	Κυριότερες αλληλεπιδράσεις από το φάσμα HMBC του μεταβολίτη 48t	108
2.28	Φάσμα μαζών του μεταβολίτη 101	111
2.29	Φάσμα ¹ H-NMR του μεταβολίτη 101 , (CD ₃ OD, 500 MHz).....	112
2.30	Φάσμα HSQC του μεταβολίτη 101 , (CD ₃ OD, 500 MHz). Στο ένθετο διακρίνεται η σύζευξη των H1 / C1 και H2 / C2.....	113
2.31	Φάσμα ¹³ C-NMR του μεταβολίτη 101 , (CD ₃ OD, 500 MHz).....	113
2.32	Φάσμα HMBC του μεταβολίτη 101 . Απεικονίζονται οι βασικότερες αλληλεπιδράσεις H→C, (CD ₃ OD, 500 MHz).....	114
2.33	Συγκριτικό φάσμα ¹³ C-NMR και DEPT 135 του μεταβολίτη 101 , (CD ₃ OD, 500 MHz).....	115
2.34	Πορεία θραυσμάτωσης της προτεινόμενης ένωσης 101 στο φάσμα μαζών.....	116
2.35	Κυριότερες συσχετίσεις COSY (α) NOESY (β) και TOCSY (γ) (διακρίνονται με έντονη επισήμανση) του μεταβολίτη 101	116
2.36	Βασικότερες συσχετίσεις COSY (διακρίνονται με έντονη επισήμανση) (α), και HMBC (β) του μεταβολίτη 102	122
2.37	Βασικότερες συσχετίσεις COSY (α), HMBC (β) για τον μεταβολίτη 103	125
2.38	Κυριότερες συσχετίσεις από το φάσμα HMBC για τον μεταβολίτη 104	129
2.39	Κυριότερες συσχετίσεις COSY (α) και HMBC (β) για την ένωση 32b	133
2.40	Πορεία θραυσμάτωσης της ναρινγγενίνης 63c στο φάσμα μαζών.....	139
2.41	¹ H-NMR του μίγματος των ενώσεων λουτεολίνη (58a) και εριοδικτυόλη (63a). Οι κορυφές με την αρίθμηση αντιστοιχούν στην ένωση 63a , ενώ οι υπόλοιπες στα 6.2-7.4 ppm στην ένωση 58a	141
2.42	Προτεινόμενη πορεία θραυσμάτωσης για τον μεταβολίτη 63f στο φάσμα μαζών.....	143
2.43	Προτεινόμενη πορεία θραυσμάτωσης για τον μεταβολίτη 63b στο φάσμα μαζών.....	146
2.44	Κυριότερες αλληλεπιδράσεις HMBC της ένωσης 63b	147
2.45	Προτεινόμενη πορεία θραυσμάτωσης για τον μεταβολίτη 58a στο φάσμα μαζών.....	151
2.46	Προτεινόμενη πορεία θραυσμάτωσης για τον μεταβολίτη 58b στο φάσμα μαζών.....	153
2.47	Αλληλεπιδράσεις COSY (α) (έντονη επισήμανση) και HMBC (β) για το 58b ..	153
2.48	Προτεινόμενη θραυσμάτωση του μεταβολίτη 60c στο φάσμα μαζών.....	157

2.49	Προτεινόμενη θραυσμάτωση του μεταβολίτη 60b στο φάσμα μαζών.....	158
2.50	Κυριότερη αλληλεπίδραση του φάσματος HMBC για τον μεταβολίτη 60b	160
2.51	Προτεινόμενη θραυσμάτωση του μεταβολίτη 79 στο φάσμα μαζών.....	171
2.52	Βασικότερες αλληλεπιδράσεις μέσω τεχνικών COSY, όπως παρατηρούνται με έντονη επισήμανση (α) και HMBC (β) για τον μεταβολίτη 79	172
2.52	Τυπική θραυσμάτωση του βανιλλικού οξέος στο φάσμα μαζών.....	186

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1	Πορεία εκχυλίσεων των τμημάτων του <i>P. × commixta</i> με τους διαλύτες αυξανόμενης πολικότητας.....	212
3.2	Αποδόσεις μεθανολικού υπολείμματος ανθέων.....	216
3.3	Χρωματογράφημα του κλάσματος CMX-DN. Διακρίνονται 6 κορυφές.....	229
3.4	Χρωματογράφημα του κλάσματος CMX-DN ₄ D. Διακρίνονται 10 κορυφές...	230
3.5	Χρωματογράφημα του κλάσματος CMX-DO. Διακρίνονται 17 κορυφές.....	231
3.6	Χρωματογράφημα του κλάσματος CMX-DV. Διακρίνονται 5 κορυφές.....	232
3.7	Χρωματογράφημα του κλάσματος CMX-EG. Διακρίνονται 2 κορυφές.....	233
3.8	Χρωματογράφημα του κλάσματος CMX-EI. Διακρίνονται 11 κορυφές.....	234
3.9	Χρωματογράφημα του κλάσματος COB-HD. Διακρίνονται 3 κορυφές.....	240
3.10	Χρωματογράφημα του κλάσματος COB-HE. Διακρίνονται 5 κορυφές.....	240
3.11	Χρωματογράφημα του κλάσματος COB-HF. Διακρίνονται 16 κορυφές.....	241
3.12	Αποδόσεις μεθανολικού υπολείμματος φύλλων.....	244
3.13	Χρωματογράφημα του κλάσματος CEAL-E. Διακρίνονται 10 κορυφές.....	246
3.14	Χρωματογράφημα του κλάσματος CEAL-IH. Διακρίνονται 16 κορυφές.....	248
3.15	Χρωματογράφημα του κλάσματος BUL-GH. Διακρίνονται 16 κορυφές.....	252
3.16	Κατανομές υγρού - υγρού αιθανολικού υπολείμματος από τις ρίζες.....	254
3.17	Χρωματογράφημα του κλάσματος PER-K. Διακρίνονται 13 κορυφές.....	256
3.18	Χρωματογράφημα του κλάσματος PER-M. Διακρίνονται 17 κορυφές.....	257
3.19	Χρωματογράφημα του κλάσματος CORE-I. Διακρίνονται 24 κορυφές.....	259
3.20	Χρωματογράφημα του κλάσματος CORE-M. Διακρίνονται 10 κορυφές.....	260
3.21	Χρωματογράφημα του κλάσματος CORB-DQ. Διακρίνονται 15 κορυφές....	262
3.22	Χρωματογράφημα του κλάσματος CORB-E. Διακρίνονται 6 κορυφές.....	263
3.23	Χρωματογράφημα του κλάσματος CORB-F. Διακρίνονται 6 κορυφές.....	264
3.24	Χρωματογράφημα του κλάσματος CORB-G. Διακρίνονται 9 κορυφές.....	265

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

4.1	Δομές διαφορετικών κατηγοριών флаβονοειδών, ισοφλαβονοειδών, νεοφλαβονοειδών και άλλων δευτερευόντων флаβονοειδών.....	267
4.2	Περίγραμμα της βιοσύνθεσης флаβονοειδών από τη φαινυλαλανίνη.....	268
4.3	Ταξινόμηση των φαινυλοαιθανοειδών γλυκοζιτών.....	271
4.4	Υποθετική οδός βιοσύνθεσης του βερμπασκοσίδη.....	273
4.5	Δομή χοληστερόλης και αντιπροσωπευτικές στερόλες και στανόλες.....	276
4.6	Βιοσύνθεση των κύριων φυτοστερολών μέσω του μεβαλονικού μονοπατιού.	277
4.7	Φαινολικά οξέα στα φυτά προερχόμενα από το κινναμμικό οξύ.....	281
4.8	Βιοσύνθεση φαινολικών οξέων μέσω του σικιμικού οξέος.....	282
4.9	Πυρήνας χρωμόνης και флаβονοειδή.....	285

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα		
1.1	Το φυτό <i>P. cretica</i> , φύλλα (αριστερά), ταξιανθία (δεξιά).....	19
1.2	Το φυτό <i>P. fruticosa</i>	20
1.3	Το φυτό <i>P. lanata</i>	21
1.4	Το υβρίδιο <i>P. × sieberi</i>	22
1.5	Το υβρίδιο <i>P. × cytherea</i> (αριστερά), ταξιανθία (δεξιά).....	23
1.6	Το υβρίδιο <i>P. × commixta</i> (αριστερά), ταξιανθία (δεξιά επάνω), φύλλα (δεξιά κάτω).....	24

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ΦΥΣΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ

Τα φυτά αναγνωρίζονται, από την αρχαιότητα, ως πλούσια πηγή φαρμάκων. Σε παγκόσμιο επίπεδο, υπάρχει η πεποίθηση ότι τα φυτικά φάρμακα είναι πιο ασφαλέστερα από τα συνθετικά. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας αναφέρει ότι το 80% του παγκόσμιου πληθυσμού εξαρτάται από ένα παραδοσιακό σύστημα ιατρικής, το οποίο περιλαμβάνει τη χρήση φυτικών εκχυλισμάτων ή των ενεργών συστατικών τους.^{1,2} Έτσι, τα βότανα έχουν καταλάβει ένα ξεχωριστό μέρος στη ζωή του ανθρώπου, από την πρωταρχική περίοδο της ζωής του μέχρι σήμερα, και έχουν γίνει εκτεταμένες έρευνες για την παροχή πληροφοριών σχετικά με τη φαρμακευτική χρήση φυτών και φυτικών προϊόντων.

Συγκεκριμένα, ο έλεγχος φυτών για βιολογική δραστηριότητα με θεραπευτικό δυναμικό έχει πραγματοποιηθεί από πολλούς ερευνητές παγκοσμίως. Ο ρόλος των τροφίμων στην ανθρώπινη διατροφή βασίζεται σε πρωτογενή προϊόντα φωτοσύνθεσης, δηλαδή σε υδατάνθρακες, πρωτεΐνες και τριγλυκερίδια (λίπη και έλαια). Στις περιπτώσεις φαρμάκων χρησιμοποιούνται τα φυτικά εκχυλίσματα, καθώς και τα δευτερογενή προϊόντα φυτικού μεταβολισμού, όπως τα αιθέρια έλαια φλαβονοειδή, τα αλκαλοειδή και τα τερπενοειδή.³ Έχουν εξαχθεί και χρησιμοποιούνται για μελέτες *in vivo* και *in vitro* από πολλά μέρη των φυτών, συμπεριλαμβανομένων των ανθέων, των φύλλων, των καρπών, των σπόρων, και του φλοιού.

Κατά τη διάρκεια του 19^{ου} αιώνα, οι εξελίξεις στη χημεία επέτρεψαν την ταυτοποίηση πολλών βιοδραστικών φυσικών προϊόντων, ανοίγοντας το δρόμο στην φαρμακευτική βιομηχανία. Το πρώτο φυσικά προερχόμενο καθαρό φάρμακο που κυκλοφόρησε στο εμπόριο ήταν η μορφίνη, που εξήχθη από το όπιο, από την H. E. Merck (Darmstadt, Γερμανία) το 1826. Στη συνέχεια έγιναν προσπάθειες για τη σύνθεση φυσικών προϊόντων για τη διευκόλυνση υψηλής ποιότητας και χαμηλού κόστους παραγωγής. Το πρώτο φυσικό προϊόν που θα παρασκευαστεί με τον τρόπο αυτό ήταν το σαλικυλικό οξύ, το οποίο παρήχθη εμπορικά από την Bayer το 1899.

Παρά τα πρώτα αυτά παραδείγματα και άλλες μετέπειτα επιτυχίες, η πλειονότητα της ποικιλομορφίας που βρίσκεται μέσα στο φυτικό βασίλειο παρέμεινε ανεκμετάλλευτη είτε λόγω προβλημάτων πρόσβασης και καθαρισμού των χημικών ενώσεων κατά την απομόνωση και ταυτοποίηση, είτε λόγω χαμηλής αφθονίας των ενώσεων στα φυτικά εκχυλίσματα.

Οι πρόοδοι στην γονιδιωματική και βιοπληροφορική οδηγούν σε μεγάλο βαθμό στην ανακάλυψη νέων οδών στα φυτικά φυσικά προϊόντα, ανοίγοντας τη δυνατότητα πρόσβασης σε νέα φάρμακα και σε άλλες πολύτιμες ενώσεις με την έκφραση αυτών των γονιδίων. Ο συνδυασμός της Οργανικής Χημείας και της Βιοτεχνολογίας δημιουργεί πρωτοφανείς ευκαιρίες για ανάγνωση, γραφή και τροποποίηση των χημικών πληροφοριών που καθορίζουν τη μεταβολική⁴ ποικιλομορφία των φυτών για φαρμακευτικές, γεωργικές και βιομηχανικές εφαρμογές.

Για να μπορέσουν τα φυσικά προϊόντα να επικρατήσουν ως φαρμακευτικές ουσίες στο απαιτητικό σύγχρονο περιβάλλον είναι απαραίτητο να εφαρμοσθούν νέες διαδικασίες οι οποίες θα υποδεικνύουν με σχετική ασφάλεια ήδη από το στάδιο της μελέτης του αρχικού εκχυλίσματος, αν ένας οργανισμός αξίζει να μελετηθεί περισσότερο. Αυτό το είδος των μεθόδων ονομάζεται "ταχεία αναγνώριση γνωστών μεταβολιτών" (Dereplication) και εξειδικεύεται σε διάφορες στρατηγικές όπως: μελέτη βάσης δεδομένων, σύζευξη κλασικών τεχνικών⁵ και η μεταβολομική.⁶

Το γένος *Phlomis* L. είναι ένα ευρέως διαδεδομένο φαρμακευτικό φυτό που περιέχει διάφορες βιοδραστικές ενώσεις⁷ και χρησιμοποιείται σε διάφορες χώρες τόσο ως φαγώσιμο όσο και για φαρμακευτικές χρήσεις στην θεραπεία διαφόρων παθήσεων.⁸ Σήμερα, ορισμένα είδη *Phlomis* καταναλώνονται ως αφέψημα από τους μεσογειακούς πληθυσμούς.⁹

1.2. ΒΟΤΑΝΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

1.2.1. Το γένος *Phlomis* L.

Το γένος *Phlomis* L. είναι από τα μεγαλύτερα γένη της υποοικογένειας Lamioideae (Lamiaceae), η οποία περιλαμβάνει περισσότερα από 100 είδη. Η Βορειοδυτική Αφρική, η Ευρώπη και η Ασία είναι ο κύριος χώρος όπου απαντάται το γένος αυτό, αλλά ακόμα στη νοτιοανατολική Ανατολία και το βορειοδυτικό Ιράκ έχουν εντοπιστεί κάποια είδη.¹⁰ Ο Moench το 1794 επισήμανε μορφολογικές διαφοροποιήσεις του γένους σε δύο διακριτά γένη *Phlomis* και *Phlomioides* και διαχώρισε το γένος σε δύο ομάδες που διακρίνονται από γενικές διαφορές, όπως για παράδειγμα το χρωμοσωμικό αριθμό (στην ομάδα *Phlomis* είναι γενικά $2n=20$ ενώ στην ομάδα *Phlomioides* είναι $2n=22$) και τη μορφή (είδη της ομάδας *Phlomis* είναι συνήθως θαμνώδη ή sub-shrubs, ενώ της ομάδα *Phlomioides* έχει κυρίως ποώδη φυτά).¹¹ Τα άνθη που απαντώνται και στις δύο αυτές ομάδες είναι άμισχα και διατάσσονται μασχαλιαία ακτινωτά, ενώ το κάτω χείλος του άνθους είναι τρίλοβο και ο μεσαίος λοβός ευρύτερος από τους άλλους δυο.¹² Οι καταγραφές του γένους *Phlomis*,¹³ στην Ευρώπη είναι 12, ενώ στην Ελλάδα το γένος εκπροσωπείται από 9 είδη (Πίνακας 1.1).

Πίνακας 1.1: Τα είδη του γένους *Phlomis* που απαντώνται στον ελλαδικό χώρο.⁹

Είδος	Διανομή
<i>P. cretica</i>	Κρήτη, και η ευρύτερη περιοχή του Αιγαίου
<i>P. floccosa</i>	Κάσος, Κάρπαθος, Τυνησία, Λιβύη, Αίγυπτος
<i>P. fruticosa</i>	Αυτοφυές στη Μεσογειακή Λεκάνη
<i>P. herba-venti</i>	Βουλγαρία, Γαλλία, Ελλάδα, Ισπανία, Ιταλία, Πρώην Γιουγκοσλαβία, Πορτογαλία, Ρουμανία, Σικελία, Δυτική Τουρκία
<i>P. lanata</i>	Ενδημικό της Κρήτης
<i>P. pichleri</i>	Ενδημικό της ομάδας της Καρπάθου
<i>P. pungens</i>	Ισπανία, Μαρόκο, Αλγερία, Τυνησία, Ισραήλ και Ιορδανία, Λίβανο και Συρία, Τουρκία, Αλβανία, Βουλγαρία, Ελλάδα, Πρώην Γιουγκοσλαβία, Ιράν, Ιράκ, Κριμαία.
<i>P. samia</i>	Ελλάδα, Τουρκία, Νότια Πρώην Γιουγκοσλαβία
<i>P. tuberosa</i>	Αυστρία, Βουλγαρία, Τσεχοσλοβακία, Γερμανία, Ελλάδα, Ουγγαρία, Πρώην Γιουγκοσλαβία, Ρουμανία.

Στην Κρήτη απαντώνται τρία είδη του γένους: το *Phlomis cretica* C. Preslin J. & C. Presl, το *Phlomis fruticosa* L. και το *Phlomis lanata* Willd.. Το *Phlomis* χαρακτηρίζεται ως δύσκολο γένος από ταξινομική άποψη, γιατί παρουσιάζει μια

υψηλή συχνότητα της υβριδοποίησης και διείδυσης μεταξύ των ειδών.¹⁴

Τα τρία είδη που απαντώνται στη νήσο Κρήτη υβριδίζονται ανά ζεύγη, παράγοντας τρία υβρίδια:

***P. × cytherea* Rech. f. (*P. cretica* × *P. fruticosa*)**

***P. × commixta* Rech. f. (*P. cretica* × *P. lanata*) και**

***P. × sieberi* Vierh. (*P. fruticosa* × *P. lanata*)**

που παρουσιάζουν ενδιάμεσους μορφολογικούς χαρακτήρες από τα γονικά τους είδη.

1.2.2. Τα είδη του γένους *Phlomis* στην Κρήτη^{12,15}

***P. cretica*:** Η διανομή του *P. cretica* (συνώνυμα *P. viscosa* Poir., *P. ferruginea* Boiss) περιλαμβάνει, εκτός από την Κρήτη, την Πελοπόννησο, τα Κύθηρα, τα νησιά του Ανατολικού Αιγαίου και τη Νοτιοδυτική Τουρκία.

Πρόκειται για θάμνο του οποίου το ύψος φτάνει τα 50 cm, καλύπτεται από εριώδες, αστεροειδές τρίχωμα και οι βλαστοί του είναι πολύκλαδοι. Τα μεγάλα φύλλα του (35-55 x 10-35 mm) είναι ευρέως ή στενά τριγωνικά, με βάση απότομα κομμένη έως καρδιάσχημη, σπάνια αποστρογγυλεμένη και μίσχους μήκους 15-25 mm. Τα μικρά φύλλα είναι 25-35 x 10 mm, συνήθως στενά τριγωνικά, με απότομα κομμένη έως αποστρογγυλεμένη βάση και μίσχους μήκους 5-10 mm.



Εικόνα 1.1: Το φυτό *P. cretica*, φύλλα (αριστερά), ταξιανθία (δεξιά).

Τα φύλλα έχουν έλασμα καναλιοειδές ή διπλωμένο κατά μήκος του κεντρικού νεύρου και χρώμα γκριζοπράσινο ή κιτρινοπράσινο στην άνω, λευκοπράσινο ή λευκοκίτρινο στην κάτω επιφάνεια (Εικόνα 1.1). Έχουν κράσπεδα με αμυδρή αμβλεία οδόντωση, επίπεδα ή ελαφρά κυματιστά. Η ταξιανθία έχει 1-2 ημισφαιρικούς

σπονδύλους, αποτελούμενους από (6) 15-30 άνθη. Κάθε σπόνδυλος έχει δύο βράκτια (25-30 x 10-20 mm), τα οποία είναι εύπτωτα μετά την άνθιση, έμμισχα, και παρόμοια με τα φύλλα. Περιβάλλοντα σε κάθε σπόνδυλο φύονται πολυάριθμα βρακτίδια μεγέθους 9-15 x 1-1.5 mm, τα οποία είναι γραμμοειδή-βελονοειδή και άμισχα. Ο κάλυκας είναι μήκους 10-15 mm, σωληνοειδής, απότομα κομμένος στο άνω τμήμα, με 5 βελονοειδείς, σχεδόν κάθετα προς το σωλήνα εκφυόμενους άμισχους οδόντες, μήκους περίπου 2 mm. Η στεφάνη είναι δίχειλη με ιδιαίτερα κυρτό άνω χείλος, έντονα κίτρινη, ενώ είναι συχνά λευκή στα κράσπεδα του κάτω χείλους. Τα σπέρματα είναι μήκους περίπου 5 mm, σε σχήμα περίπου τριγωνικής πυραμίδας με λεία επιφάνεια, χρώματος σκούρου καφέ.

***P. fruticosa*:** Το *P. fruticosa*, εν μέρει λόγω της χρήσης του ως καλλωπιστικό φυτό σε κάποιες χώρες, έχει την πιο ευρεία διανομή, αφού απαντάται σε όλο το εύρος της Μεσογειακής λεκάνης. Είναι θάμνος, ύψους έως 130 cm, με πυκνό, αστεροειδές τρίχωμα και πολύκλαδους βλαστούς.

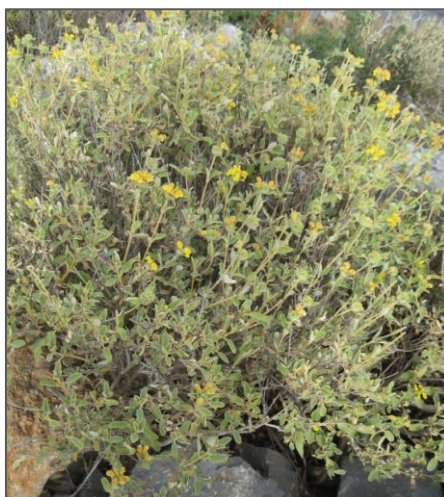


Εικόνα 1.2: Το φυτό *P. fruticosa*.

Τα φύλλα του είναι λογχοειδή, λογχοειδώς-ωοειδή ή ελλειψοειδή, με βάση στρογγυλεμένη, σπάνια απότομα κομμένη και μίσχους 10-15 mm (Εικόνα 1.2). Τα μεγάλα φύλλα του έχουν διαστάσεις 40-75 x 15-30 mm, ενώ τα μικρά έχουν διαστάσεις 15-40 x 8-15 mm. Το έλασμά τους είναι καναλιοειδές ή διπλωμένο κατά μήκος του κεντρικού νεύρου, και το χρώμα τους γκριζοπράσινο στην άνω, λευκοπράσινο ή λευκοκίτρινο στην κάτω επιφάνεια. Έχουν κράσπεδα ακέραια ή με αμυδρή αμβλεία οδόντωση, επίπεδα ή ελαφρά κυματιστά. Σχηματίζει ταξιανθία με 1-2 ημισφαιρικούς σπονδύλους, αποτελούμενους από (10-) 15-30 άνθη. Ανά σπόνδυλο φύονται δύο βράκτια μεγέθους 30-45 x 10-20 mm, τα οποία είναι εύπτωτα μετά την άνθιση, ωοειδή έως ελλειψοειδή, άμισχα και παρόμοια με τα φύλλα. Τον κάθε

σπόνδυλο περιβάλλον πολυάριθμα βρακτίδια διαστάσεων 10-20 x 3-6 mm, λογχοειδή, βλεφαριδωτά και άμισχα. Ο άμισχος, σωληνοειδής του κάλυκας (10-17 mm) είναι απότομα κομμένος στο άνω τμήμα, με 5 βελονοειδείς σχεδόν κάθετα προς το σωλήνα εκφυόμενους οδόντες μήκους περίπου 2 mm. Η στεφάνη είναι δίχειλη, με ιδιαίτερα κυρτό επάνω χείλος, έντονα κίτρινη και συχνά λευκή στα κράσπεδα του κάτω χείλους. Τα σπέρματα έχουν σχήμα περίπου τριγωνικής πυραμίδας μήκους 7 mm, λεία επιφάνεια και χρώμα σκούρο καφέ.

P. lanata: είναι είδος ενδημικό της Κρήτης. Στην Κρήτη, κυρίως στο δυτικό τμήμα του νησιού διανέμονται τα είδη *P. cretica* και *P. lanata*. Αντίθετα, στο κεντρικό και ανατολικό τμήμα του νησιού παρατηρούμε κυρίως το είδος *P. lanata*, ενώ παρατηρούνται παράλληλα και τρία σημεία παρουσίας στην Δυτική Κρήτη.



Εικόνα 1.3: Το φυτό *P. lanata*.

Μπορεί να φτάσει περίπου τα 55 cm, έχει πολύκλαδους βλαστούς, οι οποίοι είναι καλυμμένοι με πυκνό αστεροειδές τρίχωμα. Το σχήμα των φύλλων είναι ωοειδές, ελλειψοειδές που μπορεί να θεωρηθεί και κυκλικό, η βάση τους αποστρογγυλεμένη ή σφηνοειδής και οι διαστάσεις τους είναι 15-30 x 7-15 mm (στα μεγάλα) και 7-10(-15) x 5-7 mm (στα μικρά) (Εικόνα 1.3). Στην άνω επιφάνεια τα φύλλα εμφανίζουν γκριζοπράσινο ή κιτρινοπράσινο χρώμα, ενώ στην κάτω επιφάνεια λευκοπράσινο ή λευκοκίτρινο. Επιπλέον, εμφανίζουν κράσπεδα με αμυδρή, αμβλεία οδόντωση και οι μίσχοι τους είναι 5-10 mm. Το έλασμα είναι επίπεδο στα μεγάλα φύλλα, ενώ στα μικρά είναι διπλωμένο κατά μήκος του κεντρικού άξονα. Η ταξιανθία έχει 1-2 ημισφαιρικούς σπονδύλους, αποτελούμενους από (2-)6-8 άνθη. Σε κάθε σπόνδυλο φύονται δύο άμισχα βράκτια μεγέθους 10- x 7-10 mm, εύπτωτα μετά την

άνθιση, ωοειδή-ελλειψοειδή. Επιπλέον, ο κάλυκας είναι μήκους 10-14 mm άμισχος, σωληνοειδής, απότομα κομμένος στο άνω τμήμα, με 5 βελονοειδείς, σχεδόν κάθετα προς το σωλήνα εκφυόμενους οδόντες μήκους περίπου 1 mm. Παράλληλα, η στεφάνη είναι δίχειλη με ιδιαίτερα κυρτό επάνω χείλος, έντονα κίτρινη, λευκή στα κράσπεδα του κάτω χείλους, 20-23 mm. Τέλος, τα σπέρματα έχουν μήκος περίπου 7 mm, σχήμα περίπου τριγωνικής πυραμίδας, λεία επιφάνεια, και χρώμα σκούρο καφέ.

1.2.3. Τα υβρίδια του γένους *Phlomis* στην Κρήτη

P. × sieberi: Το υβρίδιο χαρακτηρίζεται από τους ενδιάμεσους μορφολογικούς χαρακτήρες των *P. fruticosa* και *P. lanata*.



Εικόνα 1.4: Το υβρίδιο *P. × sieberi*.

Τα φύλλα είναι λογχοειδή ελλειψοειδή με βάση αποστρογγυλεμένη (Εικόνα 1.4). Το πλάτος των σπονδύλων των ταξιανθιών είναι 20-25 mm. Τα βρακτίδια είναι στενά λογχοειδή ή αντιστρόφως λογχοειδή 11-13 mm.

P. × cytherea: Άτομα με χαρακτήρες ενδιάμεσους από τα είδη *P. cretica* και *P. fruticosa* έχουν περιγραφή ως *P. × cytherea* Rech. fil. Ο σχηματισμός των φύλλων αποτελείται από λογχοειδή-τριγωνικά φύλλα (Εικόνα 1.5). Η βάση είναι αποστρογγυλεμένη έως απότομα κομμένη. Χαρακτηρίζονται από πυκνό έως εριώδες τρίχωμα φύλλων. Τα βρακτίδια έχουν πλάτος 1.5-3 mm και είναι γραμμοειδή έως στενά λογχοειδή.



Εικόνα 1.5: Το υβρίδιο *P. × cytherea* (αριστερά), ταξιανθία (δεξιά).

P. × commixta: Το υβρίδιο φέρει τα ενδιάμεσα μορφολογικά χαρακτηριστικά των *P. cretica* και *P. lanata* όπως περιγράφηκαν παραπάνω. Τα φύλλα είναι ωσειδή-ελλειψοειδή, με απότομα κομμένη ή αποστρογγυλεμένη βάση. Το τρίχωμα των φύλλων είναι πυκνό ή εριώδες. Τα βρακτίδια είναι γραμμοειδή ή στενά λογχοειδή με μήκος 12-14 mm και πλάτος 1-3 mm. Το πλάτος των σπονδύλων των ταξιανθιών είναι 15-20 mm (Εικόνα 1.6).

1.2.4. Βοτανική Κατάταξη

Taxonomy (this taxon is included in): Regnum - Plantae

Divisio - Tracheophyta

Subdivisio - Spermatophytina

Class - Magnoliopsida

Superordo - Asteranae

Ordo - Lamiales

Familia - Lamiaceae Lindl.

Genus - Phlomis L.

Species - cretica C. Preslin J. & C. Presl, *lanata* Willd.

Hybrids - commixta



Εικόνα 1.6: Το υβρίδιο *P. × commixta* (αριστερά), ταξιανθία (δεξιά επάνω), φύλλα (δεξιά κάτω).

1.3. ΔΡΟΓΟΕΤΥΜΟΛΟΓΙΑ-ΔΡΟΙΣΤΟΡΙΑ

Το όνομα *Phlomis* ως προσδιοριστικό όνομα φυτού συναντάται στον ελληνικό χώρο από την αρχαιότητα.^{16,17} Ο F. Quer,¹⁸ αναφέρει ότι ο όρος φλόμος η *φλομής* προέρχεται από την ελληνική λέξη φλόξ, φωτιά, διότι τα φύλλα χρησίμευαν σαν φυτίλια σε λυχνάρια (φλομής λυχνίτης ή θρυαλλίς) και καύτρες κεριών.

Σύμφωνα με το λεξικό του J. Hofman¹⁹ για την ετυμολογία της λέξης φλόμου είναι ότι αυτή προέρχεται από τις σανσκριτικές ρίζες *Bhlo - (mo)* ή *Bhel* που σημαίνει φουσκώνω, εξογκώνομαι. Παράγωγες λέξεις με κοινή ρίζα απαιτούνται σε διάφορες γλώσσες όπως *flos* = άνθος, στη λατινική, *Bloust* = ανθίζω, στη μεσαιωνική γερμανική, *Blatt* = φύλλο, στη γερμανική, *Blosson* = ανθίζω, στη νέα αγγλική.

Στην Κρήτη φέρει το τοπωνύμιο αγκαραθία, από την αρχαία ελληνική λέξη κάρα = κεφαλή, το προθετικό (α) και την κατάληξη -θος έχουμε τον τύπο α-καρα-θος>αγκάραθος.

Επίσης, το φυτό είναι γνωστό στην Ελλάδα κατά τόπους με διάφορα λαϊκά ονόματα όπως, ασφάκα, σφάκα, αφάκα, φασκί, φλόμο, λιφασκιά, αλήφασκος, παππουλιά (Κάλυμνος), παππουδιά, μπουμπουλός, καλογρήτσα (Αρκαδία), γαϊδουρασφάκα, άγρια φλομής, πιπηλιά, μπαμπούλας κ.α. ενώ συναντούμε και ξένες ονομασίες: στα Αγγλικά: *Jerusalem sage*, στα Γαλλικά: *Phlomide*, στα Ιταλικά: *Flomide*, στα Γερμανικά *Brandkrant*, *Filzkrout*.

Συγκεκριμένες αναφορές απαντώνται στον Διοσκουρίδη^{20,21} και στον Θεόφραστο²² οι οποίοι περιγράφουν και κατατάσσουν το φυτό *P. fruticosa* L. φλομής ή θαμνώδης, σε μια ενιαία κατηγορία με το γενικό όνομα φλόμος. Με τον όρο αυτό περιγράφονται διάφορα είδη του γένους *Verbascum* από τους συγγραφείς, που αφορά χειλανθή των οποίων τα άνθη είναι τοποθετημένα σε πυκνούς και εριώδεις σπονδύλους ενώ με τον όρο φλομής αναφέρονται σε είδη τα οποία διακρίνονται για την ομοιότητα τους με το φλόμο όπως ή φλομής η αγρία ή χρυσοειδής.

Ο Διοσκουρίδης στο έργο του «Περί ύλης Ιατρικής» κάνει την ακόλουθη περιγραφή για τα διάφορα είδη του *Phlomis*:

«φλόμος· τὴν μὲν ἄνω τὰ τῶ διαφορὰν ἔχει διττὴν· ἢ μὲν γὰρ ἔστιν τις αὐτῆς λευκὴ ἢ δὲ μέλαινα, καὶ τῆς λευκῆς ἢ μὲν θήλεια ἢ δὲ ἄρρην. τῆς μὲν οὖν θηλείας τὰ φύλλα παραπλήσιά ἐστι κράμβη, δασύτερα δὲ πολλῶ καὶ πλατύτερα καὶ λευκά, ὑπωχρα, σπέρμα μέλαν· ρίζα δὲ μακρὰ, στρυφνὴ, πάχος ἔχουσα δακτύλου. Φύεται δὲ ἐν πεδίοις. Καὶ ἡ ἑτέρα, ἄρρην δὲ καλουμένη, λευκόφυλλος, ὑπομήκης δὲ καὶ στενοτέρα τοῖς

φύλλοις καὶ τῷ καυλῷ λεπτοτέρα. ἡ δὲ μέλαινα ὁμοία ταῖς λευκαῖς κατάπαντα, πλατυφυλλοτέρα μὲν τοι καὶ μελαν τέρα τοῖς φύλλοις ὑπάρχει. γίνεται καὶ ἡ λεγομένη ἀγρία, ῥάβδους ὑψηλὰς φέρουσα καὶ δενδρώδεις, φύλλα ἐλελισφάκῳ ὅμοια· ἔχει δὲ κύκλῳ περιταῖς ῥάβδοις ὥσπερ τὸ πράσιον ἄνθος μήλινον, χρυσοειδές. εἰσὶ δὲ καὶ φλομίδες διπλαῖ, δασεῖται, προσφυεῖς τῇ γῆ, στρογγύλα ἔχουσαι τὰ φύλλα, καὶ τρίτη φλομίς, ἡ καλουμένη λυχνίτις, ὑπὸ δὲ τινῶν θρυαλλίς, φυλλάρια τρία ἢ τέσσαρα ἢ καὶ πλείονα ἔχουσα, παχέα, δασέα, λιπαρά, εἰς ἐλλύχνια χρήσιμα».

Στον Γεννάδιο²³ αναφέρεται αυτολεξεί για το γένος: "Φλομίς (*Phlomis*, τ. Χειλανθών)· γ. περιλ. ὑπὲρ τα 70 εἶδη ἰθαγ. τῶν παραμ. χωρῶν καὶ τῆς ευκράτου Ἀσίας· φ. ποώδη πολυετή, φρυγανώδη καὶ θαμνώδη· πολλά κοσμητικά. Εἶδη τῆς ελλ. χλωρ. α') Φ. ἡ θαμνώδης (*P. fruticosa*, αγγλ. *Jerusalem Sage*), εἶδος κοινότατον πολλαχού τῆς Ἑλλάδος, κν. Δε ονομαζόμενον Γαιῖδουρασφάκα, Σφάκα, Ασφάκα, Αγκάθαρος ἢ Φλόμο· εἰς τὸ εἶδος τοῦτο αναφέρεται ἡ ἀγρία Φλομίς τοῦ Διοσκουρίδου. β') Φ. ἡ ἰζώδης (*P. viscosa*). γ') Φ. ἡ μαλλωτή (*P. lanata*). δ') Φ. ἡ νύσσουσα (*P. pungens* ἢ *herba-venti*). ε') Φ. ἡ σαμία (*P. samia*)· καὶ ς') Φ. ἡ σεληνιτιδόφυλλος (*P. lunariifolia*), ἡ κν. ἐν Ἀρκαδία Καλογρήτσα. Πάντα τὰ εἶδη ταῦτα καὶ ἰδίως τὸ πρῶτον, θεραπεύονται ἀλλαχού πρὸς κόσμον. Τὸ πρῶτον καὶ τὸ τρίτον εἶνε θαμνώδη, τὰ δὲ ἄλλα ποώδη πολυετή. Τὸ εἶδος τοῦ φυτοῦ *P. lanata* (ἢ μαλλωτή) «ἢ καλούμενη Λυχνίτις ὑπὸ δε τίνων θρυαλλίς ... εἰς ἐλλύχνια χρήσιμη», αναφέρεται ὡς βαλλωτή ἢ κρατηφόρος.

Επιπλέον, ὁ Διοσκουρίδης ἀναφέρει γιὰ τὶς φαρμακευτικὲς ιδιότητες τοῦ φυτοῦ, μεταξὺ ἄλλων: «ἢ δὲ χρυσοειδῆς τὰ ἄνθη τρίχας βάπτει καὶ ὅπου ἂν τε θῆσίλφας συνάγει. τὰ δὲ τῆς ἀγρίας φύλλα πυρκαύτων ἐστὶ κατάπλασμα».

Τὸ φυτό ἀγκάραθος ἢ ἀγκαραθιά, εἶναι ἓνας θάμνος παρόμοιος με τὴν φασκομηλιά γι' αὐτὸ πολλές φορές ὑπάρχει σύγχυση ἀνάμεσα σὲ αὐτὰ τὰ εἶδη. Στὸ ἰατρικὸ ἱστορικὸ ἔχουν καταγραφεῖ περιστατικὰ κατὰ τὰ ὁποῖα ὅταν ἐμπαινε στὸ μάτι, τὸ τρίχωμα τοῦ (σκόνη) προκαλοῦσε πόνο, δακρύρροια καὶ ἄλλα ενοχλήματα.

Ὡς πρὸς τὴν καλλιέργεια τοῦ φυτοῦ στὸ λεξικὸ τοῦ Καββάδα²⁴ ἀναγράφονται τὰ ἀκόλουθα: "Ευκόλου καλλιέργειας φυτὰ, πολλαπλασιαζόμενα διὰ σποράς, διαμοσχευμάτων, ἡ δὲ κονδυλόρριζος Φλομίς καὶ δια τῶν υπογείων κονδύλων τῆς".

1.4. ΔΡΟΓΟΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑ

1.4.1. Λαϊκή Φυτοθεραπευτική

Τα φυτά του γένους *Phlomis* αναφέρονται αρχικά από τον Διοσκουρίδη ως βότανα και χρησιμοποιούνται στην παραδοσιακή ιατρική για την θεραπεία διαφόρων παθήσεων όπως το διαβήτη, το γαστρικό έλκος, τις αιμορροΐδες, την φλεγμονή, την προστασία του ήπατος, των νεφρών, της καρδιάς, των οστών καθώς και την επούλωση των πληγών.⁸ Σήμερα, οι μεσογειακοί πληθυσμοί καταναλώνουν ορισμένα είδη *Phlomis* ως αφέψημα βοτάνων.¹⁴

Ένας μεγάλος αριθμός ειδών *Phlomis* ανά τον κόσμο, όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 1.2, έχουν τον ίδιο τρόπο χρήσης, ως αφέψημα για την αντιμετώπιση της θεραπείας του γαστρικών, κοιλιακών και εντερικών παθήσεων, αξιοποιώντας όλα τα μέρη του φυτού, όπως τα φύλλα (*P. cephalotes*, *P. aspera*), τα άνθη (*P. aspera*, *P. rotata*), τα σπέρματα (*P. cephalotes*) και τις ρίζες (*P. nepetaefolia*). Χρησιμοποιούνται με τη μορφή αφεψήματος, εγχύματος ή χυμού. Τα άνθη κάποιων ειδών λόγω της γλυκιάς τους γεύσης καταναλώνονται απευθείας (*P. purpurea* subsp. *purpurea*, *P. cephalotes*).

Μεγάλος είναι και ο αριθμός των ειδών που χρησιμοποιούνται ως φυτικό έγχυμα για τη θεραπεία γαστρεντερικών διαταραχών (*P. lycia*, *P. lychnitis*, *P. fruticosa*). Άλλα είδη χρησιμοποιούνται για την προστασία από διάφορες παθήσεις του ήπατος, των νεφρών, των φλεβών και των οστών (*P. purpurea*, *P. umbrosa*).

Επιπλέον, έχουν καταγραφεί χρήσεις για τον πυρετό, το βήχα και το κρυολόγημα, όπως τα *P. cephalotes* και *P. plukenettii*. Τα *P. bovei* subsp. *bovei* και *P. crinita* γίνονται πάστες και να χρησιμοποιηθούν ως κατάπλασμα ή γύψος για τη θεραπεία εγκαυμάτων και σε λοιμώξεις δέρματος και αλλεργιών.

Ωστόσο, τα ίδια είδη μπορεί να έχουν μεταβλητές χρήσεις από τη μια χώρα στην άλλη, όπως για παράδειγμα το είδος *P. fruticosa* που χρησιμοποιείται στην Ιταλία ως αντιβηχικό, επουλωτικό ή ως καρύκευμα στην μαγειρική, ως βελτιωτικό οσμής και γεύσης στα τρόφιμα,³⁶ ενώ στην Τουρκία και την Ελλάδα, χρησιμοποιείται στη θεραπεία του γαστρικού έλκους.⁸

Μερικά είδη έχουν ιδιαίτερες χρήσεις σε διάφορες χώρες. Για παράδειγμα, το τσάι με το όνομα "Zahraa" στη Συρία, είναι ένα πολύπλοκο μείγμα πολλών συστατικών φύλλων ή/και ανθέων από 6 έως 14 είδη, συμπεριλαμβανομένου και του

P. syriaca.⁵⁰ Στην Πορτογαλία το είδος *P. purpurea*, γνωστό και ως "Marioilas" έχει πάνω από 17 διαφορετικές ιατρικές χρήσεις. Χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση σε γαστρικού πόνους και ως αφέψημα ελαιολάδου για εντερικούς και αντισπασμωδικούς πόνους.⁴⁷ Στην Ισπανία, ονομάζεται "Matagallos" και χρησιμοποιείται συχνά για την αντιμετώπιση των προβλημάτων του προστάτη και του ήπατος.²⁵ Το είδος *P. lychitis*, που ονομάζεται "Candilera", χρησιμοποιείται συνήθως στην Ισπανία ως τσάι από βότανα, για τη θεραπεία του στομαχικών διαταραχών, του εντέρου και της κοιλιακής χώρας αλλά και ως τονωτικό, ηρεμιστικό και στυπτικό.⁴⁶ Στον Πίνακα 1.2 περιγράφονται οι κυριότερες φαρμακευτικές χρήσεις των ειδών *Phlomis*.

Πίνακας 1.2: Φαρμακευτικές χρήσεις των ειδών *Phlomis*.

Είδη <i>Phlomis</i>	Περιοχή	Χρήσεις - Λειτουργίες
<i>P. aspera</i> Will ²⁶	Μπαγκλαντές	Δερματικές παθήσεις (ψωρίαση), ρευματισμούς, βήχα, κρυολογήματα: Για τις δερματικές παθήσεις ο χυμός των φύλλων ενώ τα λουλούδια θερμαίνονται με λίγο μέλι και χρησιμοποιούνται για το κρυολόγημα στα παιδιά.
<i>P. angustissima</i> ²⁷	Τουρκία-Μιϋϋla	Ορεκτικό, διεγερτικό: Ως Τσάι
<i>P. aurea</i> Decne. ^{28, 29}	Αίγυπτος	Αντιδιαβητικό
<i>P. bourgei</i> Boiss ³⁰	Τουρκία-Isparta	Στομαχόπονος
<i>P. bovei</i> De Noé subsp. <i>bovei</i> ³¹	Αλγερία	Εγκαύματα
<i>P. bracteosa</i> Royle ex Benth. ³²	Βόρειοδυτικά Ιμαλίας	Στομαχικές διαταραχές: Μείγματα ξηρών δρογών από <i>Mentha longifolia</i> , <i>Heraclium thomsonii</i> , <i>Thymus linearis</i> και <i>Angelica glauca</i> σε ίση αναλογία (περίπου ένα κουτάλι) λαμβάνονται με ένα ποτήρι ζεστό νερό για θεραπείες του εντέρου.
<i>P. caucasica</i> Rech. f. ³³	Βορειοδυτικά του Ιράν	Αναλγητικό και για στομαχικές δυσλειτουργίες: Το Υπέργειο μέρος χρησιμοποιείται ως τσάι
<i>P. cephalotes</i> Roth ²⁶	Μπαγκλαντές	Διεγερτικό, επιδρωτικό, για δερματικές παθήσεις (ψωρίαση), κρυολόγημα: Τα φρέσκα φύλλα πολτοποιούνται και χρησιμοποιούνται για εξωτερική χρήση για την ψώρα. Τα λουλούδια χορηγούνται με τη μορφή σιροπιού ως φάρμακο για το βήχα και το κρυολόγημα.
<i>P. cephalotes</i> Roth ²⁶	Νεπάλ	Για την ελονοσία τον πυρετό, προβλήματα ουροδόχου κύστης, ρινορραγία: 4 κουταλάκια του γλυκού για την παρασκευή αφεψήματος, (λουλούδια, φύλλα που έχουν βράσει στο νερό για 15 λεπτά), 3 φορές την ημέρα, δίνονται για τον πυρετό λόγω ελονοσίας. Ο χυμός του φυτού δίνεται στην περίπτωση δυσλειτουργίας του ουροποιητικού. Αποξηραμένες ταξιανθίες οι οποίες καίγονται βραδέως εισπνέονται από τη μύτη για τη θεραπεία της ρινορραγίας.

Είδη <i>Phlomis</i>	Περιοχή	Χρήσεις - Λειτουργίες
<i>P. crinite</i> Cav. subsp. <i>crinite</i> ³⁴	Νεπάλ Πακιστάν Ισπανία	Εγκαύματα: Ως επάλειψη παρασκευάζεται με ψιλοκομμένα φύλλα και χρησιμοποιείται σαν επούλωτικό.
<i>P. crinite</i> Cav. subsp. <i>Mauritanica</i> Munby ⁸	Τυνησία Αλγερία	Πληγές, εγκαύματα: Τα αποξηραμένα φύλλα τοποθετούνται άμεσα στην πληγή ή στο έγκαυμα.
<i>P. fruticosa</i> L. ³⁵	Ιταλία	Αντιβηχικό
<i>P. fruticosa</i> L. ³⁶	Ιταλία	Μπαχαρικό: Σάλτσα για ζυμαρικά που παρασκευάζεται από το τηγάνισμα των φύλλων σε λίπος μπέικον, βούτυρο ή ελαιόλαδο.
<i>P. fruticosa</i> L. ³⁷	Ιταλία	Τα φύλλα χρησιμοποιούνται ως κατάπλασμα στις πληγές.
<i>P. fruticosa</i> L. ³⁸	Τουρκία-Muğla	Ως ορεκτικό, διεγερτικό, τονωτικό, για τους πόνους στο στομάχι και δυσπεψία: Οι ταξιανθίες και τα φύλλα χρησιμοποιούνται για την παρασκευή αφέψηματος.
<i>P. fruticosa</i> L. ³⁹	Ελλάδα	Καταπραΐνει τους πονεμένους μύες και τις αρθρώσεις. Μέσω των φύλλων χορηγούνται ως αφέψημα και οι σπόροι χρησιμοποιούνται τοπικά.
<i>P. fruticosa</i> L. ³⁸	Ελλάδα	Γαστρικά έλκη: Τα φύλλα εμβαπτίζονται σε νερό με μέλι ή κρασί και λαμβάνονται από το στόμα.
<i>P. grandiflora</i> H.S. Thompson var. <i>grandiflora</i> ⁴⁰	Τουρκία	Τονωτικό, ορεκτικό, διεγερτικό, θεραπεία του στομάχου διαταραχές: Ως αφέψημα.
<i>P. herba-venti</i> L. ⁴¹	Ισπανία-Jaén	Αντιδιαρριικά, ως καταπραΐντικό στους μυϊκούς πόνους: Μόνο οι κάλυκες χρησιμοποιούνται.
<i>P. linearis</i> Boiss & Bal. ⁴²	Τουρκία	Αρωματικό, διεγερτικό: Αφέψημα
<i>P. linifolia</i> Roth ⁸	Νεπάλ Danuwar	Πληγές, ελονοσία: Ο χυμός του φυτού: 3 κουταλάκια του γλυκού 2 φορές την ημέρα, σε περίπτωση της ελονοσίας. Πολτός του φυτού εφαρμόζεται σε πληγές.
<i>P. linifolia</i> Roth ²⁶	Μπαγκλαντές	Ορεκτικό, δάγκωμα φιδιού, πονοκεφάλους: Τα ψημένα φύλλα τρώγονται με αλάτι σε περίπτωση απώλειας της όρεξης και δαγκώματος φιδιού. Χυμός από τα φύλλα χορηγείται για πονοκεφάλους.
<i>P. lycia</i> D. Don ⁸	Τουρκία-Muğla	Ορεκτικό, διεγερτικό, τονωτικό, δυσπεψία: Αφέψημα (φύλλα και άνθη).
<i>P. lychnitis</i> L. ⁴³	Ισπανία-Campo de Calatrava	Επούλωτικό, αντιρευματικό, αναλγητικό, στυπτικό, αντιδιαρροϊκό, ορεκτικό, χωνευτικό: Ως αφέψημα όταν το φυτό είναι σε πλήρη ανθοφορία.
<i>P. lychnitis</i> L. ⁴³	Πορτογαλία-Arrabida	Πεπτικό γαστρεντερικό σύστημα, αναλγητικό, αντιφλεγμονώδες, σπασμολυτικό, σε νεφροπάθειες: Έγχυση φύλλων και ανθέων.
<i>P. nepetaefolia</i> L. ⁸	Ινδία	Εγκαύματα, σε δυσκολίες στο θηλασμό. Στάχτες από άνθη εφαρμόζονται σε εγκαύματα, μυκητιασική λοίμωξη, αναμειγνύοντας τις στάχτες των λουλουδιών με τυρόπηγμα. Οι ρίζες συνθλίβονται και τρίβονται στο στήθος όταν το γάλα δεν ρέει από τις θηλές.
<i>P. ocymifolia</i> Burm. f. ⁴⁴	Κένυα	Για το διαβήτη, την υπέρταση, αναιμία, εκζέματα και δερματικούς ερεθισμούς, καθαρτικό, εμμηναγωγό: Χρησιμοποιείται κυρίως ως υδατικό έγχυμα ή αφέψημα. Λαμβάνεται από το στόμα ή εφαρμόζεται εξωτερικά.

Είδη <i>Phlomis</i>	Περιοχή	Χρήσεις - Λειτουργίες
<i>P. orientalis</i> Boiss ⁴⁵	Ιράν	Αντιφλεγμονώδες: Χυμός του φυτού
<i>P. plukenetii</i> Roth ⁴¹	Νεπάλ	Για τον πυρετό, βήχα, και το κρυολόγημα: Χυμός του φυτού.
<i>P. purpurea</i> L. subsp. <i>purpurea</i> ⁴⁶	Ισπανία	Προστάτη, ήπαρ: Έγχυμα του υπέργειου μέρους του φυτού.
<i>P. purpurea</i> L. subsp. <i>purpurea</i> ⁴⁷	Πορτογαλία- Arrabida	Καρδιοτονωτικό, αντιδιαρροϊκό για το κοιλιακό, πεπτικό, γαστρικό και εντερικό άλγος, αντιφλεγμονώδες, εμετικό, για την πρόληψη του κρυολογήματος, τα νεφρά, αντισπασμωδικό, για την ουροδόχο κύστη, προβλήματα ηπατικής δράσης, τον προστάτη, για τα έλκη του στομάχου, για την γαστρίτιδα: Έγχυμα ή αφέψημα σε ελαιόλαδο.
<i>P. rotata</i> Benth. ex Hook. f. ⁴⁸	Θιβέτ	Όταν υπάρχει συσσώρευση ορού στο οστό, για δερματική χρήση, σε πληγές, στον πονοκέφαλο, πυρετό, βήχα, λοιμώξεις και κρυοπάγημα. Προωθεί την κυκλοφορία του αίματος. Αντιφλεγμονώδης δράση: Τα φύλλα και τα λουλούδια χρησιμοποιούνται για τα κατάγματα στα οστά, σε πληγές και κρυολογήματα
<i>P. spinidens</i> Nevski ⁴⁹	Ιαπωνία	Αντιαλλεργικό
<i>P. syriaca</i> Boiss ⁵⁰	Συρία	Διευκολύνει την πέψη και προάγει την καλή υγεία: Τσάι από βότανα: Zahraa είναι ένα μείγμα με 14 είδη όπως <i>Rosa damascene</i> Mill, <i>Zea mays</i> L, <i>P. syriaca</i> Boiss κ.ά.
<i>P. tuberosa</i> L. ⁵¹	Ιράν	Μαγειρική: Φύλλα στη σχάρα
<i>P. umbrosa</i> Turcz. Bull ⁸	Κορέα	Αιμοστατικό: Ενεργοποιεί την λειτουργία του εγκεφάλου, βοηθάει στην μνήμη. Αφέψημα 18 βοτάνων, μεταξύ αυτών τα φυτά <i>Dendrobium moniliforme</i> L., <i>P. umbrosa</i> και φρούτα.
<i>P. umbrosa</i> Turcz. Bull ⁵²	Κίνα	Αντιφλεγμονώδες: Για το κρύο χρησιμοποιείται το ρίζωμα, για την μείωση του οιδήματος, ως αιμοστατικό ως αντιφλεγμονώδες και για την αποτοξίνωση.
<i>P. younghusbandii</i> Mukerjee ⁵³	Θιβέτ	Αναπαραγωγή - βελτίωση της σεξουαλικής υγείας, για τον πυρετό και κρυολογήματα: Αφέψημα
<i>P. zeylanica</i> L. ²⁶	Μπαγκλαντές	Ψωριάσεις, δερματικές παθήσεις, πονοκέφαλο, κρύο και σε δάγκωμα φιδιού: Ως χυμός από ολόκληρο το φυτό χρησιμοποιείται στην ψώρα και στις δερματικές παθήσεις, στον πονοκέφαλο και το κρύωμα. Ο χυμός μόνο από τα φύλλα χορηγείται ως θεραπεία για το δάγκωμα φιδιού.

1.4.2. Φαρμακολογικές Ιδιότητες

Στα πλαίσια της ευρύτερης μελέτης του φαρμακολογικού προφίλ του γένους *Phlomis* προδιορίστηκαν οι φαρμακολογικές ιδιότητες των φυσικών προϊόντων του φυτού είτε στα μίγματα-εκχυλίσματά του, ή στα απομονωθέντα συστατικά του. Για το υπο μελέτη υβρίδιο δεν υπάρχει έως σήμερα καμία βιβλιογραφική αναφορά.

Αντιδιαβητικές Ιδιότητες

Διάφορα είδη του *Phlomis* χαρακτηρίζονται για τις αντιδιαβητικές τους ιδιότητες, όπως τα *P. aurea*,²⁸ *P. ocyimifolia* (μεθανολικό εκχύλισμα).⁴⁴ Η δραστηρότητα τους μπορεί να οφείλεται στην ικανότητα τους να προστατεύουν το ήπαρ και το πάγκρεας, μειώνοντας το οξειδωτικό στρες, στο διαβήτη, ή να διεγείρουν την παραγωγή ενζύμων που εμπλέκονται στον μεταβολισμό της γλυκόζης.⁸ Η ερευνητική ομάδα του Sarkhail (2007), αξιολόγησε την αντιυπεργλυκαιμική δραστηριότητα του *P. anisodonta* σε διαβητικούς επίμυες στους οποίους είχε ήδη χορηγηθεί στρεπτοζοτοκίνη (STZ) μετρώντας τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα, τα επίπεδα ινσουλίνης στον ορό του αίματος, την απώλεια σωματικού βάρους, την αντιοξειδωτική ικανότητα του με δοκιμή FRAP (ferric reducing antioxidant power), τη λιπιδική υπεροξείδωση (LPO) και τα αντιοξειδωτικά ηπατικά ένζυμα (υπεροξειδική δισμουτάση, καταλάση και υπεροξειδάση της γλουταθειόνης). Το αποτέλεσμα από το μεθανολικό εκχύλισμα πλούσιο σε τερπενοειδή, γλυκοζίτες ιριδοειδών, φλαβονοειδή, και συναφείς φαινολικές ενώσεις διαπιστώθηκε ότι είναι ευεργετικό στον έλεγχο του διαβήτη με μείωση της γλυκόζης του αίματος και αύξηση των επιπέδων της ινσουλίνης, αλλά και την καταπολέμηση του οξειδωτικού στρες με ενεργοποίηση των ηπατικών αντιοξειδωτικών ενζύμων.⁵⁴

Αναλγητικές και Αντιφλεγμονώδεις Δράσεις

Επιπλέον, διερευνήθηκαν μέσω *in vivo* πειραμάτων οι αναλγητικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες των φυτών σε ολικά οργανικά και υδατικά εκχυλίσματα (*P. caucasica*, *P. fruticosa*, *P. herba-venti*, *P. lychiti*, *P. olivieri*, *P. persica*, *P. lanceolata*).^{55,56} Γλυκοζίτες φαινυλοαιθανοειδών και ιριδοειδών που απομονώθηκαν από το γένος *Phlomis* εμφάνισαν αναλγητική και αντιφλεγμονώδη δράση αναστέλλοντας τη δράση του ενζύμου COX-2 και ελαττώνοντας την παραγωγή προσταγλανδινών. Οι μεταβολίτες ακτεοσίδης και φορσουθοσίδης Β έδειξαν ότι η

ανασταλτική τους δράση είναι υψηλότερη έναντι της COX-2 συγκριτικά με τη COX-1. Γλυκοζίτες ιριδοειδών όπως η λογανίνη εμφάνισαν αντιφλεγμονώδη δράση έναντι σε φλεγμονή ποδιού επίμυων στο οποίο προηγουμένως είχε χορηγηθεί παραγενεΐνη. Επίσης, κάποια ιριδοειδή εμφάνισαν αναλγητική δράση σε δοκιμές συστροφής (writhing test) σε επίμυες και αντιφλεγμονώδη δράση που σχετιζόταν με την αναστολή της COX-2. Τα ολικά εκχυλίσματα των ειδών *P. olivieri* και *P. anisodonta* εξετάστηκαν για την αναλγητική τους δράση μέσω δοκιμών συστροφής σε επίμυες και επέδειξαν υψηλή δραστηριότητα σε δόσεις 150 mg kg⁻¹ και *P. persica* σε δόση 100 mg kg⁻¹ συγκρινόμενων των αποτελεσμάτων με την ομάδα ελέγχου.⁵⁶ Οι ιδιότητες του *P. lanceolata* μελετήθηκαν επί του ολικού εκχυλίσματος και στα τέσσερα κλάσματα (διαιθυλαιθέρα, οξικού αιθυλεστέρα, n-βουτανόλης και νερό). Στην πραγματικότητα, στα 100 mg kg⁻¹ αυτά τα εκχυλίσματα επέδειξαν ανασταλτική επίδραση και στις δύο δοκιμές: α) φορμαλίνης και β) σε δοκιμασία συστολής που προκαλείται από οξικό οξύ.

Γαστροπροστατευτική δράση

Οι γαστροπροστατευτικές ιδιότητες του φυτού έχουν επιβεβαιωθεί μέσω των υδατικών εκχυλισμάτων τους (*P. grandiflora* και *P. crinita* subsp. *mauritanica*).^{57, 39} Η επιβεβαίωση της χρήσης του φυτού ως γαστροπροστατευτικό φάρμακο έγιναν μέσω πειραμάτων *in vivo*. Η προετοιμασία των εκχυλισμάτων έγινε σύμφωνα με τον παραδοσιακό τρόπο και δοκιμάστηκε σε επίμυες στους οποίους προηγουμένως είχε χορηγηθεί αιθανόλη. Την μεγαλύτερη γαστροπροστατευτική δράση εμφάνισαν τα εκχυλίσματα από τα είδη *P. grandiflora* και *Rosa canina*, αφού είχαν μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα σε σχέση με το φάρμακο αναφοράς, την μισοπροστόλη. Ιδιαίτερα, το φυτικό εκχύλισμα του είδους *P. grandiflora* εμφάνισε μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα από το εκχύλισμα του είδους *R. canina*, όπως και από μεθανολικά εκχυλίσματα.³⁹

Αγγειοπροστατευτική δράση

Μια άλλη φαρμακευτική δράση που ελέγχθηκε, ήταν η προστασία του αγγειακού συστήματος μέσω *in vitro* πειραμάτων. Αορτικοί δακτύλιοι που ελήφθησαν από πειραματόζωα (αρουραίους) επώαστηκαν σε κλάσμα ιριδοειδών το οποίο απομονώθηκε από τα υπέργεια τμήματα του φυτού *P. pungens* var. *pungens* για να ανασταλεί η έκκριση ακετυλοχολίνης μετά από ευαισθητοποίηση με ηλεκτρόλυση.

Το κλάσμα των ιριδοειδών αποδείχθηκε αποτελεσματικό, αν και το κυριότερο συστατικό του, ο λαμίδης, στερείται αυτής της δράσης η οποία μπορεί να εξηγηθεί λόγω συνέργειας άλλων συστατικών στο κλάσμα. Η ίδια δοκιμασία στο κλάσμα των φαινυλαιθανοϊκών γλυκοζιτών έδειξε ανασταλτική δράση επί της έκκρισης της ακετυλοχολίνης με τα κύρια συστατικά, φορσυθοσίδης Β και αλυσσονοσίδης, να παρουσιάζουν τη βασική ανασταλτική δράση.⁵⁸

Αντιαλλεργική δράση

Το *P. umbrosa* χρησιμοποιείται στη λαϊκή ιατρική για τη θεραπεία των εγκεφαλικών νεύρων και έχει αποδειχθεί ότι έχει αιμοστατικές ιδιότητες. Για το σκοπό αυτό αξιολογήθηκε η αντιφλεγμονώδης δράση του ριζικού συστήματος μέσω υδατικών εκχυλισμάτων προσδιορίζοντας τον έλεγχο της αναφυλαξίας σε *in vivo* πειράματα. Αναφέρεται πως συνέβαλε στην μείωση της παθητικής δερματικής αναφυλαξίας.⁵⁹

Κυτταροτοξική δράση

Οι αντικαρκινικές ιδιότητες αποτελούν έναν απ' τους βασικούς φαρμακευτικούς προσδιορισμούς του φυτού. Από το είδος *P. armeniaca* απομονώθηκαν δέκα γλυκοζιτικά συστατικά τα οποία εξετάστηκαν ως προς την κυτταροτοξική και κυτταροστατική δράση μέσω της μεθόδου χρήσης του 3-[4,5-διμεθυλοθειαζολο-2-υλ]-2,5-διφαινυλοτετράζολο βρωμιδίου (MTT).⁶⁰ Ανάμεσα σε αυτούς τους γλυκοζίτες, τα φαινυλοπροπανοειδή που έφεραν καφεϊκό οξύ (ή φαιναιθυλο-αλκοόλη ή φαινυλαιθανοϊκή ομάδα) βρέθηκαν να έχουν κυτταροτοξική και κυτταροστατική δράση ενάντια πολλών καρκινικών σειρών. Αποδείχτηκε, όμως, ότι η κυτταροτοξική και κυτταροστατική δράση των φαινυλοπροπανοειδών εξαρτάται κυρίως από το *o*-διυδρόξυ φαινολικό (κατεχολικό) σύστημα στη δομή τους, καθώς η μεθυλίωση τουλάχιστον σε μία από τις φαινολικές υδροξυλομάδες εξαφάνιζε τη δράση τους. Επιπλέον, σημαντική για τη δραστηριότητά τους είναι η θέση της γλυκοσυλίωσης και το είδος του σακχάρου. Ομοίως, οι χημικές ενώσεις από το είδος *P. brunneogaleata*, ακτεοσίδης, ισοακτεοσίδης, φορσυθοσίδης Β και 3-*O*-καφεόυλο κινικού οξέως του μεθυλενικού εστέρα, έδειξαν κυτταροτοξική δραστηριότητα σε κυτταρικές γραμμές L6.³⁹ Από το αιθανολικό εκχύλισμα της *P. viscosa* απομονώθηκαν 24 συστατικά τα οποία εξετάστηκαν για την κυτταροστατική τους

δράση σε τρεις καρκινικές σειρές. Οι φαινυλαιθανοϊκοί γλυκοζίτες εμφάνισαν ασθενή κυτταροστατική δράση σε αντίθεση με τα ιριδοειδή του εκχυλίσματος.⁶¹

Μια άλλη μελέτη σχεδιάστηκε για να διερευνήσει την κυτταροτοξική δράση του ολικού εκχυλίσματος (μεθανόλη 80%) από έξι είδη *Phlomis*, (*P. anisodonte*, *P. bruguieri*, *P. caucasica*, *P. olivieri*, *P. persica* και *P. kurdica*) έναντι τεσσάρων ανθρωπίνων καρκινικών κυτταρικών σειρών (HepG2, MCF7, HT29 και A549). Η *in vitro* κυτοτοξικότητα διαφορετικών συγκεντρώσεων (31.25-1000 µg/mL) των εκχυλισμάτων και των κλασμάτων που αξιολογήθηκαν με τη δοκιμασία MTT. Τα δεδομένα αποκάλυψαν ότι και τα έξι εκχυλίσματα επέδειξαν κυτταροτοξική δραστηριότητα έναντι τουλάχιστον μιας καρκινικής κυτταρικής σειράς. Συνολικά, τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης υποδεικνύουν ότι μεταξύ των επιλεγμένων φυτών, τα *P. kurdica*, *P. anisodonte* και *P. caucasica* είναι τα καλύτερα υποψήφια για περαιτέρω διερεύνηση των μηχανισμών κυτταροτοξικής δράσης και απομόνωσης των δραστικών ενώσεων.⁶²

Αντιμικροβιακή δράση

Τα φυτά του γένους *Phlomis* είναι πλούσια σε αιθέρια έλαια.^{14,8} Πράγματι, πολλές μελέτες έχουν αξιολογήσει την αντιβακτηριακή δραστηριότητα των αιθέριων ελαίων έναντι ενός μεγάλου φάσματος παθογόνων βακτηριακών στελεχών (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Staphylococcus aureus* και *Pseudomonas aeruginosa*).^{63,64} Αξιολογήθηκαν τα εκχυλίσματα μεθανόλης ορισμένων ειδών *Phlomis* (*P. bruguieri*, *P. herba-venti*, *P. olivieri*).⁶⁵ Τα αποτελέσματα κατά των *E. coli*, *K. pneumonia*, *S. aureus*, *S. sanguis* και *P. aeruginosa* έδειξαν ότι διαθέτουν αντιβακτηριακή δράση. Επιπλέον, αξιολογήθηκαν οι φαινυλαιθανοϊκοί γλυκοζίτες του αιθανολικού εκχυλίσματος *P. viscosa*. Οι βερμπασκοσίδης, ισοακτεοσίδης, φορσουθοσίδης Β, σαμιοσίδης και λευκοσεπτοσίδης Α εμφάνισαν πολύ ασθενή δράση έναντι των Gram (+) βακτηρίων.⁶¹

Μια ακόμη δοκιμή για τον έλεγχο της αντιμικροβιακής δράσης έγινε στα αιθέρια έλαια του *P. lanata* και του *P. fruticosa*. Το *P. fruticosa* εξετάστηκε έναντι επτά Gram (+) και Gram (-) βακτηρίων και επτά μυκήτων με τροποποιημένη μέθοδο διάχυσης. Η αποτελεσματικότητα του ελαίου κρίθηκε μέτρια.⁶³ Συγκεκριμένα, το έλαιο του *P. lanata* εξετάστηκε σε έξι βακτηριακά στελέχη και εμφάνισε μέτρια δραστηριότητα στα τέσσερα και ισχυρή έναντι των Gram (-) στελεχών *E. coli* και *P. aeruginosa* (MIC 3-6.5 mg/mL). Είναι αξιοσημείωτη η δράση του ίδιου ελαίου στα

τρία στελέχη μυκήτων που εξετάστηκαν (MIC 4.65-4.95 mg/mL).⁶⁴ Ένα ακόμη αιθέριο έλαιο που αξιολογήθηκε ήταν του *P. ferruginea*, το οποίο αξιολογήθηκε για την αντιμικροβιακή του δράση έναντι οχτώ τυχαία επιλεγμένων βακτηριακών στελεχών. Η δραστηριότητα του υπήρξε μέτρια και στοχευμένη κυρίως στα Gram (+) βακτήρια, ενώ πιθανώς να οφειλόταν σε συνεργιστική δράση των φαινολών και των μονοτερπενίων που συνυπήρχαν στο έλαιο.⁶⁶

Τα αιθέρια έλαια των *P. amanica* και *P. monocephala* εξετάστηκαν για την αντιμυκητιασική τους δράση με τη μέθοδο της βιοαυτοβιογραφικής ανάλυσης TLC⁴² και βρέθηκε ότι ένα διτερπένιο πιμαραδιενικού τύπου που περιέχουν είναι το δραστικό τους συστατικό εναντία στα στελέχη *Candida albicans* και *C. tropicalis* συγκρινόμενο με αντιμυκητιασικό παράγοντα αναφοράς. Τα αιθέρια έλαια των *P. fruticosa*, *P. cretica* και *P. samia* εξετάστηκαν *in vitro* για τις αντιμικροβιακές τους ιδιότητες σε δύο Gram (+) και τέσσερα Gram (-) βακτηριακά στελέχη και σε τρεις παθογόνους μύκητες του γένους *Candida*. Και τα τρία αιθέρια έλαια ήταν μετρίως δραστικά έναντι των έξι βακτηριακών στελεχών, ενώ είχαν ισχυρότερη δράση έναντι των παθογόνων μυκήτων (MIC 4.36-9.65 mg/mL). Επιπλέον, τα δείγματα των *P. fruticosa* και *P. cretica* εμφάνισαν γενικά καλύτερη αντιμικροβιακή δράση σε όλες τις δοκιμασίες (MIC 4.36-15.45 mg/mL) και ιδιαίτερα στους μύκητες (MIC 4.36-6.89 mg/mL) σε σχέση με το έλαιο *P. samia* το οποίο είχε γενικά ασθενέστερη δράση (MIC 6.43-20 mg/mL).⁶⁷

Μια ακόμα δράση που αξιολογήθηκε ήταν η αντιμυκητιακή δράση στα οργανικά εκχυλίσματα κυρίως μεθανόλης και αιθανόλης, αλλά και άπολων διαλυτών,⁶⁸ στα αιθέρια έλαια και στις απομονωμένες χημικές ενώσεις με κυριότερους εκπροσώπους τους σαμιοσίδη, φορσιθοσίδη Β, ακτεοσίδη, 3-Ο-καφεόυλο κινικού μεθυλεστέρα, λουτεολινο-7-Ο-β-D-γλυκοπυρανοζίτη, χρυσοερίλο-7-Ο-β-D-γλυκοπυρανοζίτη και ισοακτεοσίδη από διάφορα είδη όπως, *P. fruticosa*, *P. samia*, *P. lanata*, *P. cretica*, *P. olivieri*, *P. bruguierei*, *P. leucophracta*, *P. brunneogaleata* και *P. lychnitis*.⁶⁸ Τα εκχυλίσματα μεθανόλης του *P. bruguierei*, *P. herba-venti* και *P. olivieri* αναστέλλουν την ανάπτυξη του *Aspergillus niger*.⁶⁵ Το εκχύλισμα αιθανόλης των *P. fruticosa* έχει δραστηριότητα αντιμυκητιακή κατά των *A. ochraceus*, *Cladosporium caladosporioides* και *Phomopsis helianthi*.⁶³

Στα αιθέρια έλαια, κατά πλειοψηφία, η αντιμυκητιακή δραστηριότητα ελέγχθηκε έναντι διαφόρων ειδών *Candida*.⁸ Επιπλέον, η αντι-*Candida* δράση του αιθέριου ελαίου *P. lanata* αναστέλλει την ανάπτυξη των *Torulopsis glabrata*.⁶⁴

Αντιοξειδωτική δράση

Είναι γνωστό ότι οι ελεύθερες ρίζες εμπλέκονται σε πολλές διαταραχές, όπως νευροεκφυλιστικές ασθένειες, καρκίνο και AIDS. Τα αντιοξειδωτικά λόγω της δέσμευσης των ριζών, αποτελούν χρήσιμα εργαλεία για τη διαχείριση των ασθενειών αυτών. Η μέθοδος DPPH, ένας τρόπος ελέγχου των χημικών αντιδράσεων που εμπλέκουν ελεύθερες ρίζες, κυρίως έλεγχος αντιοξειδωτικής δράσης, είναι ένας ευαίσθητος τρόπος για να προσδιοριστεί η αντιοξειδωτική δράση των φυτικών εκχυλισμάτων.^{69,70} Λαμβάνοντας υπόψη τη σπουδαιότητα της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας, εξετάστηκε με τη μέθοδο αυτή το *P. bracteosa*. Το κλάσμα του οξικού αιθυλεστέρα έδειξε καθαρά την υψηλότερη δραστηριότητα (69.01%) σε σχέση με την αναστολή της καλλιέργειας με χλωροφόρμιο (57.09%).

Προσδιορίστηκε επίσης η αντιοξειδωτική δράση (*in vitro*) των οργανικών εκχυλισμάτων. Το μεθανολικό εκχύλισμα των *P. fruticosa* και *P. lanata* αποτρέπει την καταλυόμενη από τη βλεομυκίνη Fe, (II) υπεροξειδωση του αραχιδονικού οξέος.⁶⁴ Οι δύο κύριοι φαινυλαιθανοειδείς γλυκοζίτες φορσιθοσίδης Β και ακτεοσίδης, αλλά και ο σαμιοσίδης, αποκαλύφθηκαν ως ισχυρά αντιοξειδωτικά σε μελέτες που χρησιμοποιούν ως δείκτη την 2,2-διφαινυλο-1-πικριλυδραζυλική ρίζα (DPPH). Με την ίδια μέθοδο, μελετήθηκε η ικανότητα σάρωσης ελευθέρων ριζών έξι συστατικών που απομονώθηκαν από το μεθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του *P. syriaca* και *P. bourgaei*. Χρησιμοποιήθηκαν 32 ουσίες αναφοράς, η 3-*tert*-βουτυλο-4-υδροξυ-ανισόλη (BHA) και το ασκορβικό οξύ. Ο β-υδροξυ-ακτεοσίδης ήταν ο δραστηρότερος από τον ακτεοσίδη, τον λευκοσεπτοσίδη Α και το σαμιοσίδη στη συγκέντρωση των 200 μΜ. Το χλωρογενικό οξύ είχε την ισχυρότερη δράση σε όλες τις συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν.⁷¹

Το μεθανολικό εκχύλισμα της *P. lychnitis* μελετήθηκε για την ικανότητα του να προστατεύει τα κύτταρα από οξειδωτικό στρες. Το πείραμα διεξήχθη σε κύτταρα φαιοχρωμοκυττώματος ποντικού (PC12) με τη χρήση υπεροξειδίου του υδρογόνου ως τοξικού παράγοντα. Το εκχύλισμα προστάτευσε σημαντικά τα κύτταρα στη μέγιστη δόση. Ο μεταβολίτης ακτεοσίδης φάνηκε να έχει τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση από τα υπόλοιπα συστατικά του εκχυλίσματος.⁷² Ομοίως, εξετάστηκε στα ακετονικά και μεθανολικά εκχυλίσματα των φύλλων των *P. umbrosa* και *P. megalantha*. Η αντιοξειδωτική τους ικανότητα ήταν υψηλή. Το εκχύλισμα του φυτού *P. megalantha* αποδείχθηκε το δραστηρότερο. Μετά την απομόνωση 14 φαινολικών συστατικών από τα εκχυλίσματα, η μελέτη έδειξε ότι η πρωτοκατεχίνη και το

ροσμαρινικό οξύ ήταν τα συστατικά που συνέβαλαν περισσότερο στην εκδήλωση της αντιοξειδωτικής δράσης.⁷³

Επιπροσθέτως, το μεθανολικό εκχύλισμα του *P. lanata* εμφάνισε αντιοξειδωτική δράση παρόμοια με την α -τοκοφερόλη, ενώ το αντίστοιχο εκχύλισμα του *P. fruticosa* λίγο ασθενέστερη δράση.⁷⁴ Αντίστοιχα στο αιθανολικό εκχύλισμα του *P. viscosa* οι φαινυλαιθανοϊκοί γλυκοζίτες βερμπασκοσίδης, ισοακτεοσίδης, φορσουθοσίδης Β, μυρικοσίδης και σαμιοσίδης εμφάνισαν αντιοξειδωτική δράση παρόμοια με τη *dl*- α -τοκοφερόλη μετά από δοκιμασία με DPPH.⁶¹

Αντιπρωτοζωική δράση

Μελετήθηκαν 16 φαρμακευτικά φυτικά είδη ως προς την αντιπρωτοζωική δράση τους σε τέσσερα διαφορετικά είδη πρωτοζώων. Μελετήθηκε παράλληλα και η κυτταροτοξική τους δράση για τον καθορισμό της εκλεκτικότητά τους. Το διαλυτό σε CHCl_3 κλάσμα της *P. kurdica* ήταν το δραστικότερο έναντι του υπεύθυνου παρασίτου για τρυπανοσωμίαση *Trypanosoma brucei rhodesiense* (IC_{50} 2.7 $\mu\text{g/mL}$) και ακολούθησαν τα μεσαίας πολικότητας κλάσματα των *P. russeliana* και *P. leucophrata*, καθώς και το υδατικό εκχύλισμα του τελευταίου. Την υψηλότερη ανθελονοσιακή δράση ενάντια στο *Plasmodium falciparum* είχαν τα μεσαίας πολικότητας κλάσματα όλων των μελετηθέντων ειδών *Phlomis* (*P. kurdica* IC_{50} 1.5 $\mu\text{g/mL}$, *P. leucophrata* IC_{50} 1.6 $\mu\text{g/mL}$, *P. russeliana* IC_{50} 2.1 $\mu\text{g/mL}$).⁷⁵

Αρκετές ενώσεις που απομονώθηκαν από το *P. brunneogaleata* έδειξαν αντιπαρασιτική δραστηριότητα κατά *Leishmania donovani*, *Plasmodium falciparum* και *Trypanosoma brucei rhodesiense*. Τα συστατικά λουτεολινο-7-*O*- β -D-γλυκοκυρανοζίτης και χρυσοεριολο-7-*O*- β -D-γλυκοκυρανοζίτης βρέθηκε να έχουν τη κύρια ανθελονοσιακή δράση στο ολικό εκχύλισμα (IC_{50} 2.4 $\mu\text{g/mL}$ και IC_{50} 5.9 $\mu\text{g/mL}$, αντίστοιχα). Επίσης, εμφάνισαν αξιόλογη αντιλεϊσμμανιακή δράση (IC_{50} 1.1 $\mu\text{g/mL}$ και IC_{50} 4.1 $\mu\text{g/mL}$, αντίστοιχα). Εκτιμήθηκε η ανασταλτική ικανότητα των καθαρών μεταβολιτών ενάντια στην πλασμοδιακή ενοϋλο-ACP ρεδουκτάση (FabI), η οποία αποτελεί ρυθμιστή της συνθετάσης λιπαρών οξέων τύπου II (FAS II) στο *P. falciparum*. Ο λουτεολινο-7-*O*- β -D-γλυκοκυρανοζίτης εμφάνισε πολλά υποσχόμενη ανασταλτική ικανότητα (IC_{50} 10 $\mu\text{g/mL}$), ενώ φαίνεται να είναι το πρώτο φυσικό ανθελονοσιακό προϊόν που δρα εκλεκτικά στο ένζυμο FabI του πλασμώδιου.⁷⁶

Δράση κατά των μετα-εμμηνοπαυσιακών συμπτωμάτων

Ένα φυτικό προϊόν, μίγμα τιτλοδοτημένων εκχυλισμάτων των ειδών *Cynanchum wilfordii*, *P. umbrosa* και *Angelica gigas*, αποτέλεσε αντικείμενο κλινικής δοκιμασίας ως προς τη δραστηριότητά του έναντι των συμπτωμάτων πριν, κατά τη διάρκεια και μετά την εμμηνόπαυση. Πραγματοποιήθηκε, κλινική δοκιμασία, η οποία διήρκησε 12 εβδομάδες, ήταν διπλή-τυφλή και τυχαιοποιημένη, και συμμετείχαν σε αυτή 64 γυναίκες που βρίσκονταν πριν, κατά τη διάρκεια και μετά την εμμηνόπαυση. Συμπτώματα όπως παραισθησία, αϋπνία, νευρική κατάσταση, μελαγχολία, ναυτία, κούραση, ρευματικοί πόνοι και κοιλιακή ξηρότητα φάνηκαν να υποχωρούν σημαντικά στην ομάδα που λάμβανε το φυτικό προϊόν συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Το προϊόν αποδείχτηκε δραστικό έναντι των συμπτωμάτων που εμφανίζονται πριν, κατά τη διάρκεια και μετά την εμμηνόπαυση χωρίς να προκαλούν αύξηση σωματικού βάρους ή άλλες σημαντικές ανεπιθύμητες ενέργειες.⁷⁷

Αντιμεταλλαξιογόνος δράση

Το αιθέριο έλαιο και το ολικό εκχύλισμα της *P. fruticosa* εξετάστηκαν για αντιμεταλλαξιογόνο δράση με τη δοκιμασία αναστροφής δράσης του *Escherichia coli* K12 (*E. coli* K12 reversion assay). Ο αριθμός των αυτόματων και των UV-ευαίσθητοποιημένων με Arg⁺ αναστροφέων καθώς και η κυτταρική επιβίωση παρακολούθηθηκε παρουσία μη τοξικών συγκεντρώσεων του αιθερίου ελαίου. Αποκαλύφθηκε ότι ο αριθμός των UV-ευαίσθητοποιημένων αναστροφέων αυξήθηκε ελαφρώς με την παρουσία του ελαίου. Ακόμα, το αιθανολικό εκχύλισμα εμφάνισε σημαντική δράση στα βιώσιμα κύτταρα.⁷⁸

Επίδραση στη διαμήκη ανάπτυξη των οστών

Το μείγμα της εκχύλισης *Astragalus* HT042 είναι ένας συνδυασμός τριών τυποποιημένων βοτανικών εκχυλισμάτων από τη ρίζα *Astragalus membranaceus*, το στέλεχος *Eleutherococcus senticosus* και της ρίζας *P. umbrosa*. Έχει αναπτυχθεί για να προάγει την αύξηση ύψους σε παιδιά με μικρό ανάστημα. Το HT042 βρέθηκε ότι διεγείρει την αύξηση ύψους. Σε προκλινικές μελέτες, το HT042 έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει τον διαμήκη ρυθμό αύξησης των οστών μέσω πολλαπλασιασμού χονδροκυττάρων και υπερτροφίας στις πλάκες ανάπτυξης.^{79,80} Επιπλέον, σε αντίθεση με τα άλλα δύο βότανα, το *P. umbrosa* σε ζώα δεν είναι ακόμη καθιερωμένο. Οι τοξικολογικές μελέτες, μαζί με κλινικές ενδείξεις, ιστορικό εκτεταμένης χρήσης και

προηγούμενες μελέτες τοξικότητας, αποδεικνύουν την ασφάλεια του HT042 ως παράγοντα αύξησης του ύψους των παιδιών. του HT042 και των συνθετικών βοτάνων του όταν χορηγείται από του στόματος (5000 mg/kg).⁸¹

Ρύθμιση κυττάρων T ποντικών από πρωτεϊνικά εκχυλίσματα του *P.lanata*

In vitro πειράματα σε υπέργεια τμήματα του *P. lanata* επί ολικών κυττάρων σπλήνας ποντικού και ειδικών υποομάδων κυττάρων T εμφάνισαν ανοσοδιεγερτική και ανοσοκατασταλτική δραστηριότητα, επομένως η αμφίδρομη ανοσορυθμιστική δραστηριότητα δεν πρέπει πλέον να θεωρείται παράδοξη.⁸²

1.5. ΧΗΜΕΙΑ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ

Η έρευνα των συστατικών των ειδών του γένους *Phlomis* είναι ιδιαίτερα εκτεταμένη και αφορά κυρίως είδη τα οποία δεν φύονται στον Ελλαδικό χώρο. Το γένος *Phlomis* είναι ένα από τα πιο μελετημένα από άποψη χημειοταξινομίας.

Οι φυτοχημικές μελέτες στο γένος *Phlomis* έχουν οδηγήσει στην απομόνωση συστατικών όπως τα μονοτερπένια (κυρίως γλυκοζίτες ιριδοειδών), διτερπένια, πορ-τριτερπένια, φλαβονοειδή, λιγνάνια, φαινυλαιθανοϊκοί και βένζυλο-γλυκοζίτες καθώς και άλλων ουσιών. Ένα από τα χαρακτηριστικά του γένους *Phlomis* είναι η ικανότητά του να βιοσυνθέτει ιριδοειδείς γλυκοζίτες. Τα προϊόντα του τύπου αυτού είναι σημαντικοί χημειοταξινομικοί δείκτες και συμβάλλουν στη συστηματική ταξινόμηση των φυτών. Τα τελευταία χρόνια υπάρχουν αναφορές και για πτητικούς δευτερογενείς μεταβολίτες.¹⁴ Η παρούσα μελέτη επικεντρώθηκε στους μη πτητικούς δευτερογενείς μεταβολίτες του γένους.

Το σύνολο των ουσιών που έχουν απομονωθεί, αναφέρονται όπως στις βιβλιογραφικές πηγές και παρουσιάζεται συνοπτικά στους παρακάτω πίνακες (Πίνακες 1.3-1.15).

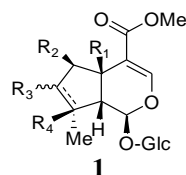
1.5.1. Μονοτερπένια

Τα ιριδοειδή είναι μονοτερπένια, με κοινό χαρακτηριστικό ένα κυκλοπεντα-(c)-πυρανικό σύστημα δακτυλίων. Απομονώνονται σε μεγάλο αριθμό οικογενειών, είτε ελεύθερα, ως άγλυκα, είτε συνήθως ως γλυκοζίτες.⁸³ Ένας σημαντικός αριθμός ιριδοειδών γλυκοζιτών έχουν απομονωθεί από το είδος *Phlomis*. Τα πιο συχνά απαντώμενα ιριδοειδή είναι ο μεθυλικός εστέρας του σινζισιδίου, (**1**, R₁ = H, R₂ = OH, R₃ = H, R₄ = OH) ο 8-Ο-ακετυλοσινζισιδίου μεθυλεστέρας (**1**, R₁ = H, R₂ = OH, R₃ = H, R₄ = AcO) και ο λαμίδης (**1**, R₁ = R₂ = H, R₃ = β-OH, R₄ = OH).

Οι γλυκοζίτες τους έχουν συνήθως ένα μόριο γλυκόζης ενωμένο στο οξυγόνο του C(1). Έχουν αναφερθεί περισσότερα από 40 ιριδοειδή στα φυτά του γένους *Phlomis* τα οποία ανάλογα με τη δομή τους χωρίζονται σε υποκατηγορίες:⁷⁸ ιριδοειδή με διπλό δεσμό ανάμεσα στους C(3) και C(4) και μεθοξυκαρβονυλομάδα στον C(4) όπως ο λαμίδης και ο υπολαμίδης που έχουν απομονωθεί από τα περισσότερα είδη (Πίνακας 1.3). Με επόξυ- ομάδα ανάμεσα στους C(7) και C(8) όπως ο σεσαμοσίδης,⁸⁴ με διπλό δεσμό να βρίσκεται ανάμεσα στους C-4 και C-5 (Δ^{4,5}). Ως

διγλυκοζίτες όπως ο γεντιοβιοσίδης που απομονώθηκε από το είδος *P. aurea*,⁹³ αλλά και με AcO ομάδα στον C(6') του μορίου της γλυκόζης από το *P. rigida* όπως ο φλοριζιδοσίδης A (phlorigidoside A).⁹⁵ Αρκετές νέες δομές ιριδοειδών έχουν απομονωθεί όπως η 3-επιφλομουρίνη, η φλομουρίνη και χαρακτηρίστηκαν από το είδος *P. aurea*.²⁹ Επιπλέον, στα είδη *P. longifolia* var. *longifolia*, *P. younghusbandii* και *P. tuberosa* μια δομή αναγνωρίστηκε ως η φλομιόλη.⁸⁵ Η φυτοχημική μελέτη στο αιθανολικό εκχύλισμα του εναέριου τμήματος του φυτού *P. likiangensis* και προκάλεσε την απομόνωση έξι νέων ιριδοειδών γλυκοζιτών, τους φλολοσίδες A-F.¹²⁰ (Πίνακας 1.3).

Πίνακας 1.3: Ιριδοειδή που έχουν απομονωθεί από το γένος *Phlomis*.



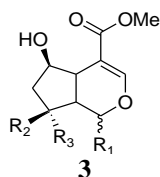
Είδος	Παράγωγο	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
<i>P. longifolia</i> var. <i>longifolia</i> ⁸⁵ <i>P. lunariifolia</i> ⁸⁶	5-Deoxypulchelloside I	H	OH	β -OH	H
<i>P. rigida</i> ⁹⁵	6- β -Hydroxyipolamide	OH	OH	H	OH
<i>P. rotata</i> ⁸⁷ <i>P. younghusbandii</i> ¹¹⁴ <i>P. mongolica</i> ⁸⁸ <i>P. tuberosa</i> ⁸⁹ <i>P. medicinalis</i> ⁹⁰ <i>P. umbrosa</i> ^{91, 92}	Phloyoside I (7-epiphlomiol)	OH	OH	α -OH	OH
<i>P. grandiflora</i> var. <i>grandiflora</i> ⁹³ <i>P. aurea</i> ^{93, 94}	8-Epiloganin	H	H	β -OH	H
<i>P. rigida</i> ⁹⁵ <i>P. spinidens</i> ⁹⁶ <i>P. medicinalis</i> ⁹⁰ <i>P. umbrosa</i> ^{91, 119} <i>P. younghusbandii</i> ^{84, 97, 115} <i>P. tuberosa</i> ¹²⁶	8-O-Acetylshanzhiside methyl ester	H	OH	H	AcO
<i>P. linearis</i> ⁹⁸ <i>P. aurea</i> ⁹³ <i>P. sintenisii</i> ⁹⁹ <i>P. angustissima</i> ¹⁰⁴ <i>P. lycia</i> ¹⁰⁸ <i>P. kotschyana</i> ¹⁷⁴	Auroside	OH	H	β -OH	H
<i>P. tuberosa</i> ^{100, 101, 89} <i>P. longifolia</i> var. <i>longifolia</i> ⁸⁵	Lamalbide	H	OH	β -OH	OH
<i>P. linearis</i> ⁹³ <i>P. armeniaca</i> ¹⁰² <i>P. aurea</i> ⁹³	Ipolamiide	OH	H	H	H

Είδος	Παράγωγο	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
<i>P. regelli</i> ¹⁰³ <i>P. brunneogaleata</i> ⁷⁶ <i>P. sintenisii</i> ⁹⁹ <i>P. thapsoides</i> ¹³² <i>P. viscosa</i> ¹¹⁰					
<i>P. rigida</i> ⁹⁵ <i>P. spinidens</i> ⁹⁶	Lamiridoside	H	H	β-OH	OH
<i>P. younghusbandii</i> ^{114, 115}	7,8-Dehydropenstemoside	OH	OH	H	H
	Penstemoside	OH	OH	H	OH
<i>P. rigida</i> ⁹⁵	Deoxypulcheloside I	H	OH	OH	H
<i>P. medicinalis</i> ⁹⁰	6-O-Acetylshanzhiside methyl ester	H	AcO	H	OH
<i>P. longifolia</i> var. <i>longifolia</i> ⁸⁵ <i>P. tuberosa</i> ^{89, 100, 101} <i>P. linearis</i> ⁹⁸ <i>P. aurea</i> ⁹³ <i>P. herba-ventis</i> ssp. <i>pungens</i> ¹⁰⁰ <i>P. angustissima</i> ¹⁰⁴ <i>P. pungens</i> var. <i>pungens</i> ¹⁰⁵ <i>P. physocalycoside</i> ¹⁰⁶ <i>P. regelli</i> ¹⁰⁷ <i>P. lycia</i> ¹⁰⁸ <i>P. persica</i> ^{99, 158} <i>P. integrifolia</i> ¹⁰⁹ <i>P. thapsoides</i> ¹³² <i>P. viscosa</i> ¹¹⁰ <i>P. kotschyana</i> ¹⁷⁴ <i>P. pungens</i> ¹¹¹	Lamiide	OH	H	β-OH	OH
<i>P. regeli</i> ^{107, 112, 113, 103}	Phlomoside A	OH	H	β-OH	H
	Phlomoside B	OH	H	β-AcO	AcO
	Phlomoside C	OH	H	β-BzO	AcO
	Phlomoside D	OH	H	β-BzO	AcO
<i>P. rigida</i> ⁹⁵	Phlorigidoside B (8-O-Acetyl-6-β-hydroxyipolamide)	OH	OH	H	AcO
<i>P. younghusbandii</i> ⁸⁴	Pulchelloside I	OH	OH	β-OH	H
<i>P. younghusbandii</i> ^{114,}	Phloyoside II	OH	OH	α-Cl	OH
<i>P. mongolica</i> ⁸⁸	Phloyoside III	OH	OH	β-Cl	OH
<i>P. longifolia</i> var. <i>longifolia</i> ⁸⁵ <i>P. younghusbandii</i> ¹¹⁵ <i>P. tuberosa</i> ¹²⁶	Phlomiol	OH	OH	β-OH	OH
<i>P. rotata</i> ⁸⁷ <i>P. younghusbandii</i> ^{114, 115} <i>P. spinidens</i> ⁹⁶ <i>P. longifolia</i> var. <i>longifolia</i> ⁸⁵ <i>P. tuberosa</i> ^{89, 100, 101, 126} <i>P. lunariifolia</i> ⁸⁶ <i>P. medicinalis</i> ⁹⁰ <i>P. umbrosa</i> ^{91, 92} <i>P. rigida</i> ⁹⁵	Shanzhiside methyl ester	H	OH	H	OH

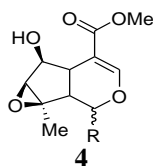
Glc: β-D-Γλυκοπυρανόζυλο-, Bz: Βενζόυλο-, Ac:Ακέτυλο-



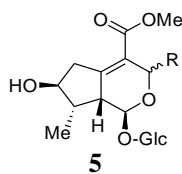
Είδος	Παράγωγο	R ₁	R ₂	R ₃
<i>P. tuberosa</i> ^{116, 100}	8- <i>O</i> -Acetylshanzhiside	β-OGlc	H	Ac
<i>P. rigida</i> ⁹⁵ <i>P. umbrosa</i> ^{117,119}	Shanzhigenin methyl ester	β-OH	Me	H
<i>P. umbrosa</i> ¹¹⁷	1-Epishanzhigenin methyl ester	α-OH	Me	H
	8- <i>O</i> -Acetylshanzhigenin methyl ester	β-OH	Me	Ac
	8- <i>O</i> -acetyl-1-epishanzhigenin methyl ester	α-OH	Me	Ac



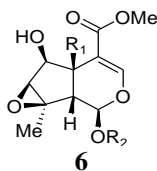
Είδος	Παράγωγο	R ₁	R ₂	R ₃
<i>P. umbrosa</i> ¹¹⁸	1α-hydroxy-dihydrocornin aglycone	β-OH	Me	H
<i>P. tuberosa</i> ¹²⁶	1β-hydroxy-dihydrocornin aglycone	α-OH	Me	H



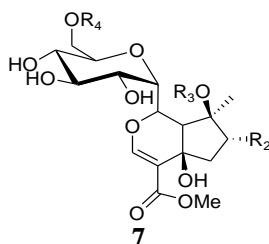
Είδος	Παράγωγο	R
<i>P. umbrosa</i> ^{118,130}	Lamiophlomiol A	β-OH
	Lamiophlomiol B	α-OH



Είδος	Παράγωγο	R
<i>P. aurea</i> ⁹³	3-Epiphlomurin	α-MeO
	Phlomurin	β-MeO

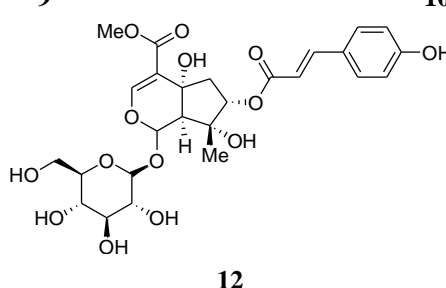
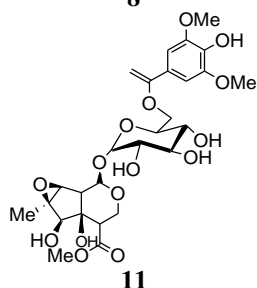
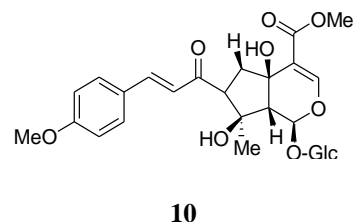
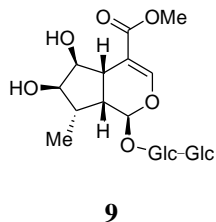
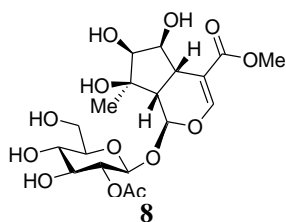


Είδος	Παράγωγο	R ₁	R ₂
<i>P. tuberosa</i> ^{100, 89} <i>P. younghusbandii</i> ^{114, 84, 115} <i>P. medicinalis</i> ⁹⁰ <i>P. umbrosa</i> ¹¹⁹	Sesamoside	OH	Glc
<i>P. rigida</i> ⁹⁵ <i>P. spinidens</i> ⁹⁶	Phlorigidoside C (5-deoxysesamoside)	H	Glc

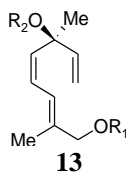


Είδος	Παράγωγο	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
<i>P. likiangensis</i> ¹²⁰	Phloloside A	H	H	COCH ₃	COOCH ₃
	Phloloside B	H	H	COCH ₃	COOCH ₂ CH ₃
	Phloloside C	H	H	H	COOCH ₃
	Phloloside D	H	H	H	COOCH ₂ CH ₃
	Phloloside E	OH	Cl	H	COOCH ₃
	Phloloside F	OH	Cl	H	COOCH ₂ CH ₃

No	Είδος	Παράγωγο
8	<i>P. rigida</i> ⁹⁵	Phlorigidoside A (2- <i>O</i> -acetylammiridoside)
9	<i>P. aurea</i> ⁹³	Phlomiside (Gentiobioside)
10	<i>P. rigida</i> ⁹⁵	Durantoside II
11	<i>P. umbrosa</i> ¹²¹	6''-Syringyl-sesamoside
12	<i>P. viscosa</i> ¹¹⁰	Lamiidoside



Πίνακας 1.4: Άλλα μονοτερπένια που έχουν απομονωθεί από το γένος *Phlomis*.

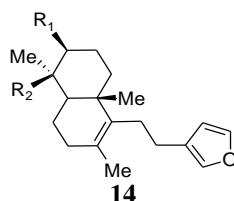


Είδος	Παράγωγο	R ₁	R ₂
<i>P. chimerae</i> Boiss ¹⁰²	Betulabuside A	β -D-Glc	H
<i>P. armeniaca</i> ¹⁰²	8-Hydroxylnaloyl 3- <i>O</i> - β -D glucopyranoside	H	β -D-Glc

1.5.2. Διτερπένια

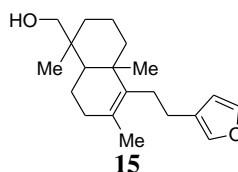
Τα διτερπένια συνιστούν μία μεγάλη ομάδα φυσικών προϊόντων. Από τα φυτά του γένους *Phlomis* έχουν αναφερθεί διτερπένια τύπου φουρανολαβδανικού τύπου (furanolabdane-type) αλλά και διτερπενικοί γλυκοζίτες, όπως ο φλομισοσίδης I (**14**, $R_1 = \text{OGlc}(2) \rightarrow \text{Rha}$, $R_2 = \text{Me}$) και οι φλομισοσίδες III και IV (**14**, $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{COOGlc}(2) \rightarrow \text{Xyl}$ και **14**, $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{COOGlc}(2) \rightarrow \text{Rha}$). Ο πρώτος έχει γλυκιά γεύση, ενώ οι άλλοι δύο δεν έχουν καθόλου. Επίσης, διτερπενικοί γλυκοζίτες πλεκτρανθινικού τύπου, όπως η σκουλπονεατίνη A και C που έχουν απομονωθεί από το φυτό *P. umbrosa* που φύεται στην Κίνα καθώς επίσης και το εντ-7α,16β,17-τριυδροξυκαουράνιο (*ent-7α,16β,17-trihydroxykaurane*), καουρανικού τύπου διτερπενικός γλυκοζίτης.¹²³ Η αμανικαδόλη, πιμαρανικού τύπου διτερπένιο, απομονώθηκε από το είδος *P. amantica*^{102, 78} (Πίνακας 1.5).

Πίνακας 1.5: Διτερπένια που έχουν απομονωθεί από το γένος *Phlomis*.

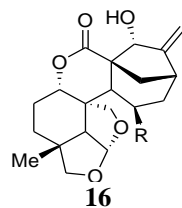


Είδος	Παράγωγο	R ₁	R ₂
<i>P. medicinalis</i> ¹²²	Baiyunol	OH	Me
	Baiyunoside	OGlc(2)→Xyl	Me
<i>P. younghusbandii</i> ¹¹⁴	Phlomisoside I	OGlc(2)→Rha	Me
<i>P. medicinalis</i> ¹²²	Phlomisoside II	OGlc(2)→Glc	Me
<i>P. younghusbandii</i> ¹¹⁴ <i>P. medicinalis</i> ¹²²	Phlomisoside III	H	COOGlc(2) →Xyl
<i>P. younghusbandii</i> ¹¹⁴	PhlomisosideIV	H	COOGlc(2) →Rha
<i>P. tuberosa</i> ¹²⁶	15,16-Eposy-8,13(16),14-labdatriene	H	H
<i>P. medicinalis</i> ¹²² <i>P. tuberosa</i> ¹²⁶	Phlomisioic acid	H	COOH
<i>P. medicinalis</i> ¹²²	PhlomisosideV	H	COOGlc

Όπου Xyl: ξυλόζη, Rha: ραμνόζη

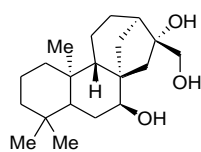


Είδος	Παράγωγο
<i>P. tuberosa</i> ¹²⁶	Phlomisol (15,16-Eposy-8,13(16),14-labdatrien-19-ol)

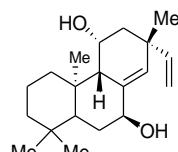


Είδος	Παράγωγο	R
<i>P. umbrosa</i> ^{123,130}	Sculponeatin A	H
	Sculponeatin C	OH

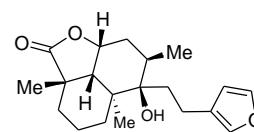
No	Είδος	Παράγωγο
17	<i>P. umbrosa</i> ^{123, 130}	ent-7α,16β,17-Trihydroxykaurane
18	<i>P. angustissima</i> ¹⁰⁴ <i>P. amanica Vierch</i> ¹²⁴ .	Amanicadol
19	<i>P. bracteosa</i> ¹²⁵	Marrubiin
20	<i>P. tuberosa</i> ¹²⁶	14-Hydroxyabieta-8,11,13-triene-11-carbaldehyde-18-oic-12-carboxy-13-(1-hydroxy-1-methylethyl)-lactone
21		14-Hydroxyabieta-8,11,13-triene-17-oic-12-carboxy-13-(1-hydroxy-1-methylethyl)-lactone
22		14,16-Dihydroxyabieta-8,11,13-triene-15,17-dioic acid



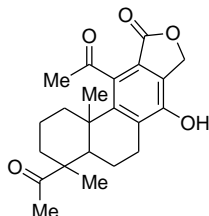
17



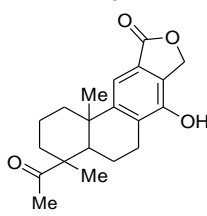
18



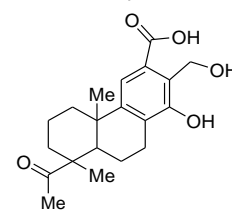
19



20



21

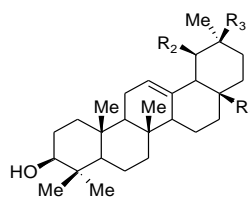


22

1.5.3. Τριτερπενοειδή

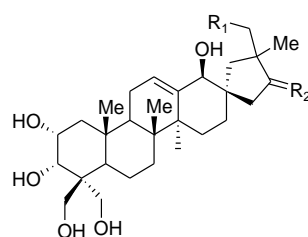
Τα τριτερπένια αποτελούν μια μεγάλη ομάδα φυσικών προϊόντων που προέρχονται από κυκλοποίηση του σκουαλενίου ή του 3-(S) εναντιομερούς του 2,3-εποξυ-2,3-διϋδροσκουαλενίου. Περισσότερα από 4000 τριτερπένια έχουν απομονωθεί και περισσότεροι από 40 δομικοί σκελετοί έχουν χαρακτηριστεί. Απαντώνται κυρίως ως *nor*-τριτερπένια,¹²⁷ όπως φαίνονται και στους παρακάτω Πίνακες 1.6. Κυρίως έχουν παραληφθεί από τις ρίζες των ειδών *P. bracteosa*, *P. umbrosa*, *P. cashmeriana* και *P. stewartii*.⁷⁸

Πίνακας 1.6: Τριτερπένια που έχουν απομονωθεί από το γένος *Phlomis*.



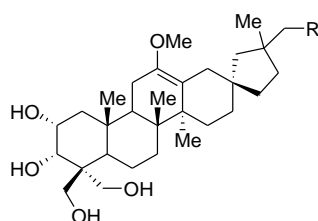
23

Είδος	Παράγωγο	R ₁	R ₂	R ₃
<i>P. bracteosa</i> ¹³⁸	β -Amyrin	Me	H	Me
	Ursolic acid	COOH	Me	H
<i>P. cashmeriana</i> ¹⁷² <i>P. stewartii</i> ¹²⁸ <i>P. bracteosa</i> ¹³⁸	Oleanolic acid	COOH	H	Me



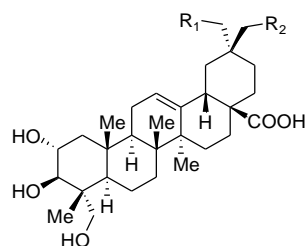
24

Είδος	Παράγωγο	R ₁	R ₂
<i>P. umbrosa</i> ^{123, 133}	(2 α , 3 α , 17R, 18 β)-19(18 \rightarrow 17)-abeo-28-norolean-12-ene-2, 3, 18, 23, 24-pentol	H	H, H
	(2 α , 3 α , 17R, 18b)-19(18 \rightarrow 17)-abeo-28-norolean-12-ene-2, 3, 18, 23, 24, 29-hexol	OH	H, H



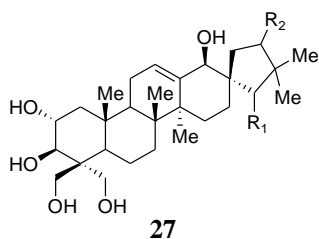
25

Είδος	Παράγωγο	R
<i>P. umbrosa</i> ¹²³	(2 α , 3 α , 12 α , 17R)-12-Methoxy-19(18 \rightarrow 17)-abeo-28 norolean-13(18)-ene-2, 3, 23, 24-tetrol	H
	(2 α , 3 α , 12 α , 17R)-12-Methoxy- 19(18 \rightarrow 17)-abeo-28-Norolean-13(18)-ene-2, 3, 23, 24, 29-pentol	OH

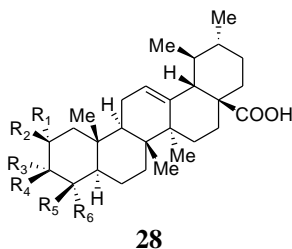


26

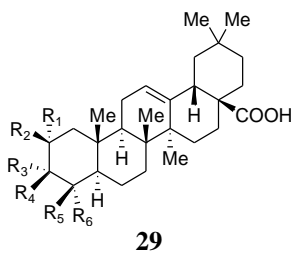
Είδος	Παράγωγο	R ₁	R ₂
<i>P. viscosa</i> ¹²⁹	Viscoside A	β -D-Glucopyranosyloxyl	H
	Viscoside B	H	β -D-Glucopyranosyloxyl



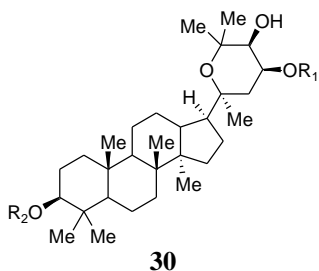
Είδος	Παράγωγο	R ₁	R ₂
<i>P. umbrosa</i> ¹³⁰	Phlomishexaol C	OH	H
	Phlomishexaol D	H	OH



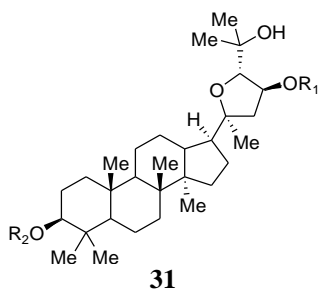
Είδος	Παράγωγο	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
<i>P. umbrosa</i> ^{130,131}	2α-Hydroxylursolic acid	OH	H	H	OH	H	H
	3α-Hydroxylursolic acid	H	H	H	H	H	Me
	Corosolic acid	OH	H	H	OH	Me	Me



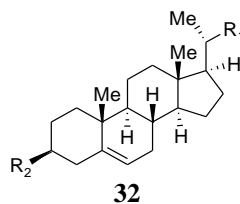
Είδος	Παράγωγο	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
<i>P. umbrosa</i> ^{130,131}	Maslinic acid	OH	H	H	OH	Me	Me
	Hederagenin	H	H	H	OH	Me	CH ₂ OH
	Arjunolic acid	OH	H	H	OH	Me	CH ₂ OH
	Belleric acid	OH	H	H	OH	CH ₂ OH	CH ₂ OH



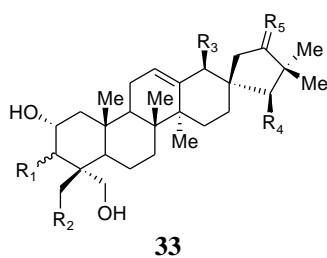
Είδος	Παράγωγο	R ₁	R ₂
<i>P. umbrosa</i> ¹¹⁸	Phlomisumbroside A	Glc	Glc (2→1)Rha



Είδος	Παράγωγο	R ₁	R ₂
<i>P. umbrosa</i> ¹³¹	Phlomisumbroside B	Glc	Glc (2→1)Rha



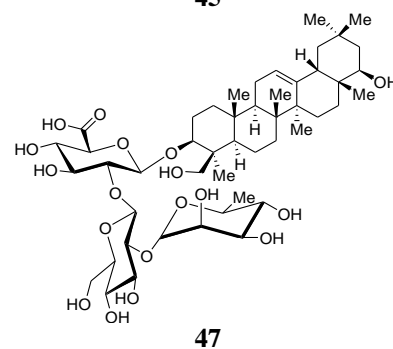
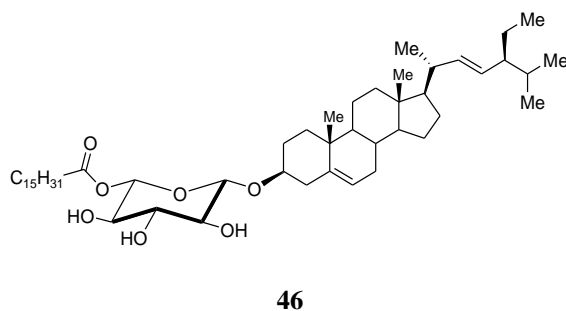
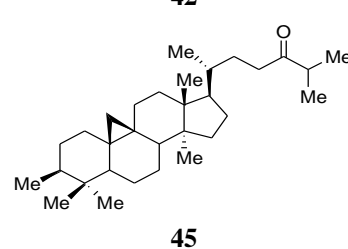
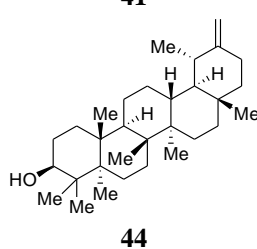
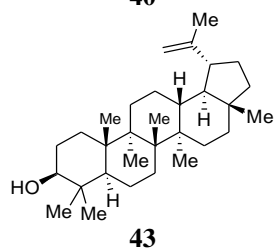
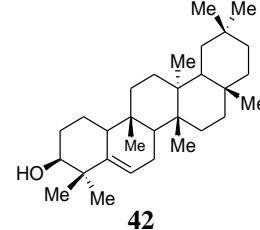
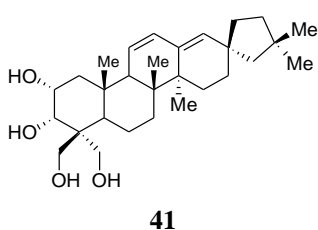
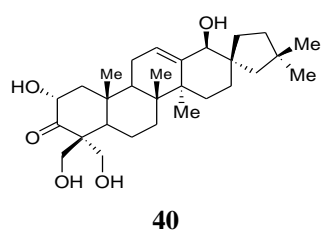
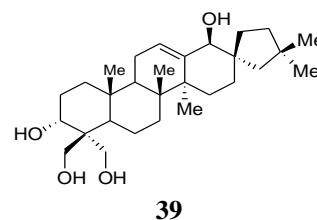
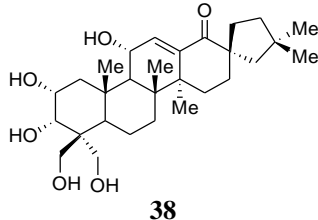
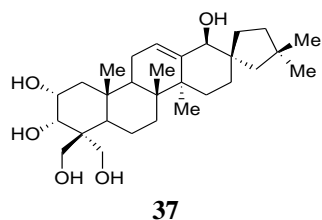
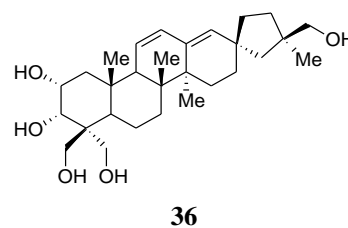
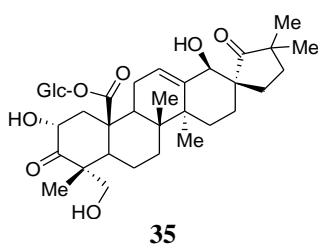
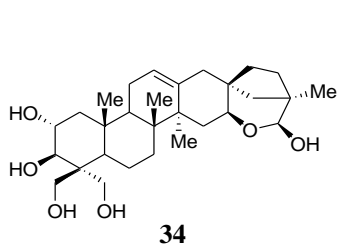
No	Είδος	Παράγωγο	R ₁	R ₂
32a	<i>P. bracteosa</i> ¹³⁸ <i>P. cashmeriana</i> ¹⁷²	β -Sitosterol		OH
32b	<i>P. bracteosa</i> ¹³⁸ <i>P. cashmeriana</i> ¹⁷²	Stigmasterol		OH
32c	<i>P. younghusbandii</i> ¹¹⁵ <i>P. thapsoides</i> ¹³²	Daucosterol		β -O-Glc
32d	<i>P. cashmeriana</i> ¹⁷²	Phlomisteriod		



Είδος	Παράγωγο	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
<i>P. umbrosa</i> ¹³³	Phlomisone	α -OH	OH	OH	H	O
	Phlomisetraol A	α -OH	H	OH	H	H, H
	Phlomisetraol B	β -OH	H	OH	H	H, H
	Phlomisetraol C	β -OH	OH	H	H	H, H
	Phlomisepentaol	β -OH	OH	OH	H	H, H
	Phlomishexaol A	α -OH	OH	OH	OH	H, H
	Phlomishexaol B	α -OH	OH	OH	H	α -OH, β -H

No	Είδος	Παράγωγο
34	<i>P. umbrosa</i> ¹³³	Phlomisin
35	<i>P. viscosa</i> ¹²⁹	Norviscoside
36	<i>P. stewartii</i> ¹³⁴	Notohamosin A

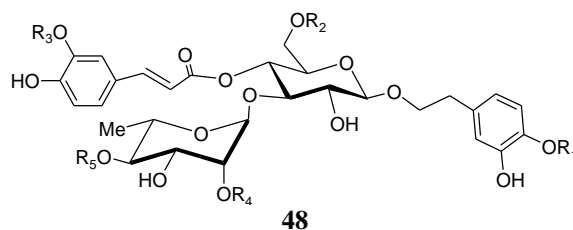
No	Είδος	Παράγωγο
37	<i>P. stewartii</i> ¹³⁶	Phlomisipurpentaolone
38	<i>P. purpurea</i> ¹³⁵	Phlomisipurpentaol
39	<i>P. stewartii</i> ¹³⁶	Stewertiisin A
40		Stewertiisin B
41		Stewertiisin C
42	<i>P. bracteosa</i> ¹³⁷ <i>P. cashmeriana</i> ¹⁷²	Glutinol
43	<i>P. bracteosa</i> ¹³⁷	Lupeol
44		Taraxasterol
45	<i>P. cashmeriana</i> ¹⁷²	3 β -hydroxycycloart-24-one
46	<i>P. bracteosa</i> ¹³⁸	Phlomiside
47		Azukisaponin V



1.5.4. Φαινυλοαιθανοειδείς Γλυκοζίτες

Το γένος *Phlomis* είναι πλούσιο σε φαινυλοαιθανοειδείς γλυκοζίτες και θεωρούνται χημειοταξονομικοί δείκτες στην οικογένεια *Lamiaceae*.¹³⁹ Χαρακτηρίζονται από την παρουσία ενός υδροξυ-φαινυλοαιθυλο-τμήματος συνδεδεμένου μέσω ενός γλυκοζιτικού δεσμού πάνω σε μία ομάδα σακχάρου, η οποία συνήθως είναι μία β-γλυκόζη. Οι 2-φαινυλοαιθανοϊκοί και οι βενζυλογλυκοζίτες απαντώνται με ποικίλους υποκαταστάτες και είναι μία σημαντική κατηγορία χημικών συστατικών του γένους. Τριάντα επτά ενώσεις, μεταξύ των οποίων ο ακτεοσίδης (48a) ο αλυσσονοσίδης (48b) και ο φορσυθοσίδης B (48c), απαντώνται πιο συχνά. Ακόμη, συστατικά με φερουλικό και 2-αιθοξυφαινυλο-τμήμα ενωμένο στο γλυκοζιτικό μέρος στον C(1') και C(4') αντίστοιχα, έχουν απομονωθεί από πολυάριθμα είδη του γένους *Phlomis*⁷⁸ (Πίνακας 1.7).

Πίνακας 1.7: Φαινυλοαιθανοειδείς γλυκοζίτες που έχουν απομονωθεί από το γένος *Phlomis*.

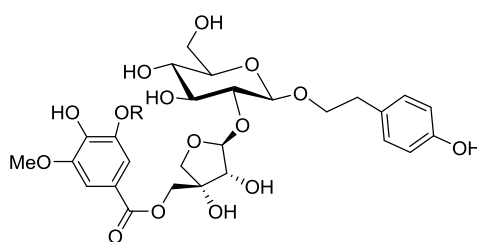


No	Είδος	Παράγωγο	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
48a	<i>P. armeniaca</i> ¹⁰²	Acteoside (verbascoside)	H	H	H	H	H
	<i>P. grandiflora</i> var. <i>grandiflora</i> ¹⁴⁰						
	<i>P. aurea</i> ⁹³						
	<i>P. longifolia</i> var. <i>longifolia</i> ⁸⁵						
	<i>P. tuberosa</i> ^{89, 101, 126}						
	<i>P. samia</i> ¹⁴¹						
	<i>P. physocalyx</i> ¹⁰⁶						
	<i>P. lunariifolia</i> ⁸⁶						
	<i>P. sintenisii</i> ⁹⁵						
	<i>P. brunneogaleata</i> ⁷⁶						
	<i>P. crinita</i> ¹⁴²						
	<i>P. umbrosa</i> ⁹¹						
	<i>P. lanceolata</i> ¹⁴³						
	<i>P. caucasica</i> ¹⁴⁴						
	<i>P. amanica</i> ¹²⁴						
	<i>P. monocephala</i> ¹⁷⁵						
	<i>P. sieheana</i> ¹⁴⁹						
<i>P. younghusbandii</i> ¹¹⁵							
<i>P. kurdica</i> ¹⁶⁴							
<i>P. lychnitis</i> ¹⁴⁵							

No	Είδος	Παράγωγο	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
	<i>P. oliveri</i> ¹⁵⁸ <i>P. viscosa</i> ¹¹⁰ <i>P. kotschyana</i> ¹⁷⁴						
48b	<i>P. pungens</i> var. <i>pengens</i> ¹⁰⁵ <i>P. umbrosa</i> ⁹¹ <i>P. angustissima</i> ¹⁰⁴ <i>P. lycia</i> ¹⁰⁸ <i>P. integrifolia</i> ¹⁰⁹ <i>P. younghusbandii</i> ¹¹⁵ <i>P. viscosa</i> ¹¹⁰	Alyssonoside	H	Api	Me	H	H
48c	<i>P. armeniaca</i> ¹⁰² <i>P. longifolia</i> var. <i>longifolia</i> ⁸⁵ <i>P. tuberosa</i> ^{89, 101, 126} <i>P. spinidens</i> ⁹⁶ <i>P. aurea</i> ⁹³ <i>P. pungens</i> var. <i>pengens</i> ¹⁰⁵ <i>P. physocalyx</i> ¹⁰⁶ <i>P. lunariifolia</i> ⁸⁶ <i>P. brunneogaleata</i> ⁷⁶ <i>P. caucasica</i> ¹⁴⁴ <i>P. lanceolata</i> ¹⁴³ <i>P. kurdica</i> ¹⁶⁴ <i>P. lychnitis</i> ¹⁴⁵ <i>P. viscosa</i> ¹¹⁰ <i>P. kotschyana</i> ¹⁷⁴ <i>P. pungens</i> ¹¹¹	Forsythoside B	H	Api	H	H	H
48d	<i>P. armeniaca</i> ¹⁰² <i>P. longifolia</i> var. <i>longifolia</i> ⁸⁵ <i>P. physocalyx</i> ¹⁰⁶ <i>P. tuberosa</i> ⁸⁹ <i>P. integrifolia</i> ¹⁰⁹ <i>P. syriaca</i> ¹⁴⁶ <i>P. viscosa</i> ¹¹⁰	Leucosceptoside A	H	H	Me	H	H
48e	<i>P. lycia</i> ¹⁰⁸ <i>P. kurdica</i> ¹⁶⁴ <i>P. viscosa</i> ¹¹⁰ <i>P. kotschyana</i> ¹⁷⁴ <i>P. pungens</i> ¹¹¹	Leucosceptoside B	Me	Api	Me	H	H
48f	<i>P. lunariifolia</i> ⁸⁶ <i>P. stewartii</i> ¹⁶⁰	Lunariifolioside	H	Api	H	H	Api
48g	<i>P. physocalyx</i> ¹⁰⁶ <i>P. sintenisii</i> ⁹⁵ <i>P. integrifolia</i> ¹⁰⁹ <i>P. viscosa</i> ¹¹⁰	Martynoside	Me	H	Me	H	H
48h	<i>P. linearis</i> ¹⁴⁷	Phlinoside A	H	H	H	Glc	H
48i	<i>P. linearis</i> ¹⁴⁷ <i>P. armeniaca</i> ¹⁰²	Phlinoside B	H	H	H	Xyl	H
48j	<i>P. linearis</i> ¹⁴⁷ <i>P. armeniaca</i> ¹⁰² <i>P. lanceolata</i> ¹⁴³	Phlinoside C	H	H	H	Rha	H
48k	<i>P. linearis</i> ¹⁴⁷	Phlinoside D	H	H	Me	Xyl	H
48l	<i>P. linearis</i> ¹⁴⁷	Phlinoside E	H	H	Me	Rha	H
48m	<i>P. angustissima</i> ¹⁰⁴	Phlinoside F	Me	Me	H	H	Xyl

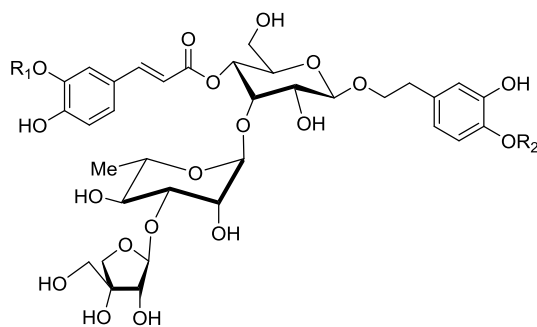
No	Είδος	Παράγωγο	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
48n	<i>P. physocalycoside</i> ¹⁰⁶	Physocalycoside	Me	Glc	Me	Rha	H
48o	<i>P. samia</i> ¹⁴¹ <i>P. umbrosa</i> ⁹¹ <i>P. angustissima</i> ¹⁰⁴ <i>P. syriaca</i> ¹⁴⁶ <i>P. viscosa</i> ¹¹⁰	Samioside	H	H	H	H	Api
48p	<i>P. integrifolia</i> ¹⁰⁹	4''-O-Acetylmartynoside	Me	H	Me	H	Ac
48q		Integrifoliosides A	Me	H	H	OH	Api
48r		Integrifoliosides B	Me	H	Me	OH	Api
48s	<i>P. kurdica</i> ¹⁶⁴	3,3'-dimethyl-lunariifolioside	Me	Api	Me	H	Api
48t	<i>P. brunneogaleata</i> ⁷⁶	Echinacoside	H	Glc	H	H	H

Api: απιόζη



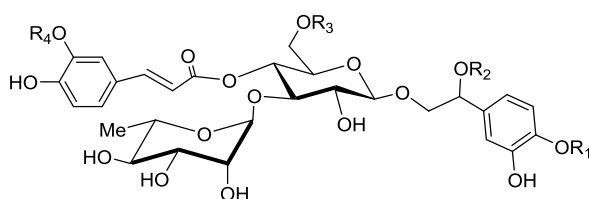
49

Είδος	Παράγωγο	R
<i>P. grandiflora</i> var. <i>grandiflora</i> ¹⁴⁰	Phlomisethanoside	H
<i>P. pungens</i> Willd. var. <i>pungens</i> ¹⁴⁸ <i>P. chimerae</i> Boiss ¹⁰²	Hattushoside	Me



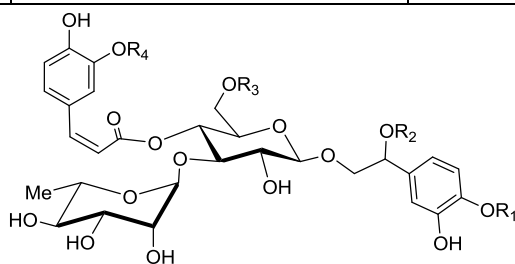
50

Είδος	Παράγωγο	R1	R2
<i>P. oppositiflora</i> ⁸⁹	Myricoside	H	H
	Oppositifloroside	Me	H
	Serratumoside A	Me	Me



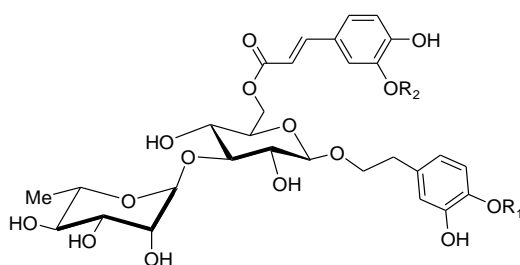
51

Είδος	Παράγωγο	R1	R2	R3	R4
<i>P. mongolica</i> ⁸⁸	Cistanoside B	Me	H	Glc	Me
<i>P. sieheana</i> ¹⁴⁹ <i>P. viscosa</i> ¹¹⁰	β -hydroxyacteoside	H	H	H	H



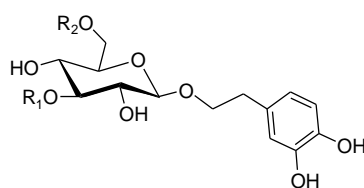
52

Είδος	Παράγωγο	R1	R2	R3	R4
<i>P. sieheana</i> ¹⁴⁹	<i>cis</i> -Acteoside	H	H	H	H



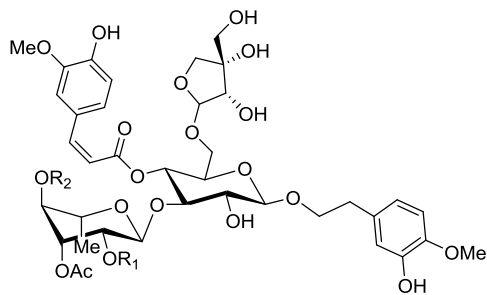
53

Είδος	Παράγωγο	R ₁	R ₂
<i>P. physocalyx</i> ¹⁰⁶	Isomartynoside	Me	Me
<i>P. brunneogaleata</i> ⁷⁶ <i>P. younghusbandii</i> ¹¹⁵ <i>P. tuberosa</i> ¹²⁶ <i>P. viscosa</i> ¹¹⁰ <i>P. kotschyana</i> ¹⁷⁴	Isoverbascoside	H	H



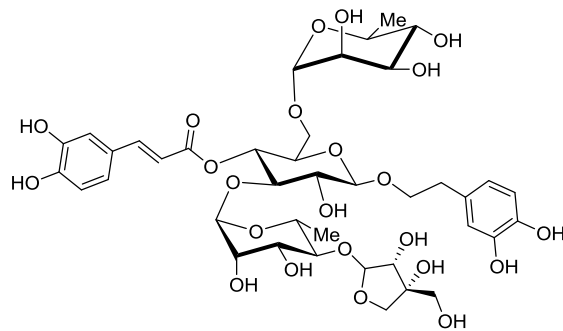
54

Είδος	Παράγωγο	R ₁	R ₂
<i>P. tuberosa</i> ⁸⁹ <i>P. umbrosa</i> ⁹¹ <i>P. viscosa</i> ¹¹⁰	Decaffeoyl acteoside	α -L-Rha	H
<i>P. umbrosa</i> ⁹¹	Calcelarioside B	H	caffeoyl



55

Είδος	Παράγωγο	R ₁	R ₂
<i>P. umbrosa</i> ^{91,130}	3'''-acetyl- <i>O</i> -betonyoside D	H	H
	2''',3'''-di-acetyl- <i>O</i> -betonyoside D	Ac	H
	3''',4'''-di-acetyl- <i>O</i> -betonyoside D	H	Ac



56

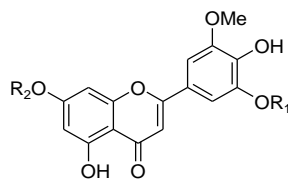
Είδος	Παράγωγο
<i>P. stewartii</i> ¹³⁶	Stewartiidise

1.5.5. Φλαβονοειδή

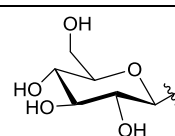
Τα φλαβονοειδή είναι τα κύρια συστατικά του φυτού. Από το γένος *Phlomis* έχουν απομονωθεί περισσότερα από 60 φλαβονοειδή. Η πλειοψηφία των φλαβονοειδών που αναγνωρίζονται στο γένος *Phlomis* είναι φλαβόνες ή φλαβονόλες. Η απιγενίνη, λουτεολίνη, καιμπερόλη, κερκετίνη, χρυσοεριόλη (Πίνακας 1.8) συναντώνται σε αφθονία σε πολλά είδη του γένους *Phlomis*, ελεύθερα και σε γλυκοζιτική μορφή (συνήθως στην 7- και 3- θέση). Η φλαβόνη, τρικινο-7-Ο-γλυκοζίτης η οποία έχει απομονωθεί από το *P. fruticosa* είναι μάλλον το πιο ασυνήθιστο στην οικογένεια Lamiaceae. Έχει αναφερθεί προηγουμένως στο γένος *Stachys*.¹⁵⁰ Αξιοσημείωτη είναι η αφθονία του γένους σε p-κουμαροϋλο- γλυκοζίδες των φλαβονοειδών.⁷⁸ Οι ενώσεις με p-κουμαροϋλο- γλυκοζίδιο φαίνεται να είναι ένα μοναδικό χαρακτηριστικό της υποοικογένειας Lamioideae. Έχουν καταγραφεί στα γένη *Anisomeles*, *Ballota*, *Galeopsis*, *Leonurus*, *Marrubium*, *Phlomis*, *Sideritis* και *Stachys*.^{8,150}

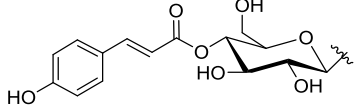
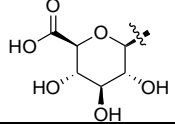
Πιο συχνά ανευρίσκονται οι p-κουμαροϋλο-γλυκοζίτες της απιγενίνης, αλλά αναφέρονται και της λουτεολίνης και της χρυσοεριόλης.¹⁵¹ Είναι ένα από τα λίγα γένη της οικογένειας Labiatae που βιοσυνθέτουν γλυκοζίτες της χρυσοεριόλης.¹⁵² Ως εκ τούτου, οι p-κουμαροϋλικοί εστέρες της 7-Ο-β-D-γλυκοζιτικής χρυσοεριόλης είναι χαρακτηριστικοί στα γένη *Phlomis*,^{155,156} *Ballota*,¹⁵³ *Marrubium*,¹⁵⁴ και σε κάποιο βαθμό στο *Stachys*.¹⁵⁰

Πίνακας 1.8: Φλαβονοειδή που έχουν απομονωθεί από το γένος *Phlomis*.

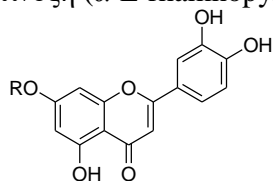


57

No	Είδος	Παράγωγο	R ₁	R ₂
57a	<i>P. floccosa</i> ¹⁵⁵ <i>P. fruticosa</i> ¹⁵⁷ <i>P. lychnitis</i> ¹⁵⁶ <i>P. samia</i> ¹⁴¹ <i>P. aurea</i> ¹⁵⁵	Chrysoeriol	H	H
57b	<i>P. aurea</i> ^{155,142} <i>P. floccosa</i> ¹⁵⁵ <i>P. lychnitis</i> ¹⁵⁶ <i>P. fruticosa</i> ¹⁵⁷	Chrysoeriol-7-O-β-glucoside	H	

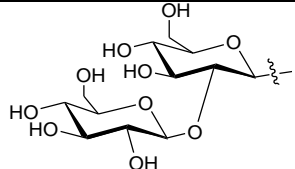
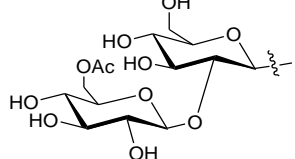
No	Είδος	Παράγωγο	R ₁	R ₂
	<i>P. caucasica</i> ¹⁴⁴ <i>P. oliveri</i> ¹⁵⁸ <i>P. persica</i> ¹⁵⁸ <i>P. integrifolia</i> ¹⁵⁹ <i>P. lunariifolia</i> ¹⁶⁰ <i>P. brunneogaleata</i> ¹⁶⁰			
57c	<i>P. stewartii</i> ¹³⁶	Phlomispentanol	H	
57d	<i>P. sintenisii</i> ⁹⁹	Chrysoeriol-7-O-β-D-allopyranosyl-(1→2)-β-D-glucopyranoside	H	β-D-All(1→2)-β-D-Glc
57e	<i>P. nisolii</i> ¹⁶¹	Chrysoeriol-7-(6''-β-D-apiofuranosyl)-β-D-glucopyranoside	H	β-D-Api(7→6'')-β-D-Glc
57f	<i>P. aurea</i> ¹⁵⁵ <i>P. floccosa</i> ¹⁵⁵ <i>P. caucasica</i> ¹⁴⁴	Chrysoeriol-7-O-β-rutinoside	H	Rutinoside
57g	<i>P. aurea</i> ¹⁵⁵ <i>P. floccosa</i> ¹⁵⁵ <i>P. lychnitis</i> ¹⁵⁶ <i>P. fruticosa</i> ¹⁵⁷	Chrysoeriol-7-O-β-p-coumaroyl glucoside	H	p-coumaroyl-Glc
57h	<i>P. fruticosa</i> ¹⁵⁷	Chryseriol-7-rhamnosyl glucoside	H	Rhamnosyl-Glc
57i	<i>P. lychnitis</i> ¹⁵⁶ <i>P. aurea</i> ¹⁴² <i>P. crinita</i> ¹⁵⁵ <i>P. persica</i> ¹⁵⁸ <i>P. fruticosa</i> ¹⁵⁷	Chrysoeriol-7-O-(3''-(E)-p-coumaroyl)-β-glucoside	H	7-O-β-(3''-trans-p-coumaroyl)-β-Glc
57j	<i>P. fruticosa</i> ¹⁵⁷	Chrysoeriol-7-O-(3''-(Z)-p-coumaroyl)-β-glucopyranoside	H	7-O-β-(3''-cis-p-coumaroyl)-β-Glc
57k	<i>P. fruticosa</i> ¹⁵⁷	Chrysoeriol-7-O-β-glucuronide	H	
57l	<i>P. fruticosa</i> ¹⁵⁷	Tricin-7-glucoside	Me	Glc

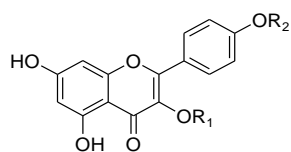
Rutinoside: Δισακχαρίτης ρουτινόζη (α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranose).



58

No	Είδος	Παράγωγο	R
58a	<i>P. pungens</i> ¹⁶² <i>P. lychnitis</i> ¹⁵⁶ <i>P. tuberosa</i> ^{163,126} <i>P. crinita</i> ¹⁴² <i>P. nissolii</i> ¹⁶¹ <i>P. umbrosa</i> ¹¹⁸	Luteolin	H

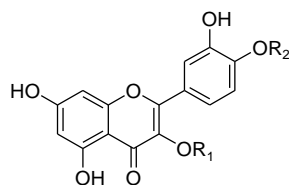
No	Είδος	Παράγωγο	R
58b	<i>P. aurea</i> ¹⁵⁵ <i>P. floccosa</i> ¹⁵⁵ <i>P. lychnitis</i> ¹⁵⁶ <i>P. tuberosa</i> ¹⁶³ <i>P. fruticosa</i> ¹⁵⁷ <i>P. purpurea</i> ¹⁵¹ <i>P. umbrosa</i> ¹¹⁸ <i>P. lunariifolia</i> ⁸⁶ <i>P. brunneogaleata</i> ⁷⁶ <i>P. crinita</i> ¹⁴² <i>P. younghusbandii</i> ¹¹⁵ <i>P. tuberosa</i> ¹⁶³ <i>P. aurea</i> ¹⁵⁵ <i>P. kurdica</i> ¹⁶⁴ <i>P. syriaca</i> ¹⁴⁶	Luteolin-7- <i>O</i> -β-glucoside	β-D-Glc
58c	<i>P. nisolii</i> ¹⁶¹ <i>P. kurdica</i> ¹⁶⁴	Luteolin-7- <i>O</i> -(6''- <i>O</i> -β-D-apiofuranosyl)-β-D-glucopyranoside	β-D-Api(6)-β-D-Glc
58d	<i>P. aurea</i> ¹⁵⁵ <i>P. floccosa</i> ¹⁵⁵	Luteolin-7-rutinoside	Rutinoside
58e	<i>P. lunariifolia</i> ⁸⁶	Luteolin-7- <i>O</i> -[4- <i>O</i> -acetyl-α-rhamnopyranosyl-(1→2)]-β-glucuronopyranoside	4- <i>O</i> -acetyl-α-Rha(6)-β-glucuronide
58f	<i>P. aurea</i> ¹⁵⁵ <i>P. floccosa</i> ¹⁵⁵	Luteolin-7- <i>O</i> -diglucoside	Diglucoside
58g	<i>P. fruticosa</i> ¹⁵⁷	Luteolin-7- <i>O</i> -rhamnosyl glucoside	Rha-Glc
58h	<i>P. aurea</i> ¹⁵⁵ <i>P. floccosa</i> ¹⁵⁵ <i>P. lychnitis</i> ¹⁵⁶ <i>P. fruticosa</i> ¹⁵⁷ <i>P. agraria</i> ¹⁶⁵ <i>P. purpurea</i> ¹⁵¹	Luteolin-7- <i>p</i> -coumaroyl glucoside	<i>p</i> -coumaroyl-Glc
58i	<i>P. tuberosa</i> ^{163, 166} <i>P. fruticosa</i> ¹⁵⁷	Luteolin-7- <i>O</i> -β-D-glucuronide	Glucuronide
58j		Luteolin-7- <i>O</i> -β-D-sophoroside	
58k	<i>P. kurdica</i> ¹⁶⁴	Linariifolioside	
58l	<i>P. cashmeriana</i> ¹⁷²	Luteolin-7-methyl ether	Me



59

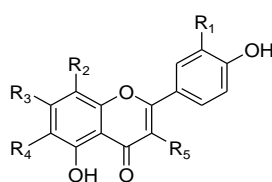
No	Είδος	Παράγωγο	R ₁	R ₂
59a	<i>P. spectabilis</i> ^{167, 168} <i>P. spinidens</i> ⁹⁶ <i>P. caucasica</i> ¹⁴⁴	Astragalin (Kaempferol-3-glucoside)	β -D-Glc	H
59b	<i>P. aurea</i> ⁹³	Kaempferol 3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside	β -D-Glc(6)- β -D-Glc	H
59c	<i>P. spectabilis</i> ¹⁶⁸ <i>P. stewartii</i> ¹⁶⁹	Tilioside	p-coumaroyl-Glc	H
59d	<i>P. spinidens</i> ⁹⁶	Phlomisflavoside B	β -D-Glc	β -D-Api
59e	<i>P. brachyodon</i> ¹⁷⁰	Kaempferol	H	H
59f	<i>P. brachyodon</i> ¹⁷⁰	Kaempferol 4'-methyl ether	H	Me
59g	<i>P. cashmeriana</i> ¹⁷²	Kaempferol 3-O-3'''-acetyl- α -L-arabinopyranosyl-(1''' \rightarrow 6''')- β -D-glucopyranosyl	3-Ac-Ara(6)- β -D-Glc	H

Ara: Αραβινόζη



60

No	Είδος	Παράγωγο	R ₁	R ₂
60a	<i>P. spinidens</i> ⁹⁶	Phlomisflavoside A	β -D-Glc	β -D-Api
60b	<i>P. aurea</i> ⁹⁴ <i>P. spinidens</i> ⁹⁶	Isoquercitrin	β -D-Glc	H
60c	<i>P. aurea</i> ⁹³ <i>P. bracteosa</i> ¹⁷⁷	Quercetin	H	H
60d	<i>P. tuberosa</i> ¹²⁶	Quercetin-3-O-rhamnoside	Rha	H
60e	<i>P. caucasica</i> ¹⁴⁴	Quercetin-3-O-rutinoside	rutinoside	H
60f	<i>P. caucasica</i> ¹⁴⁴	Rutin	β -D-Glc (6)- β -D-Glc	OH

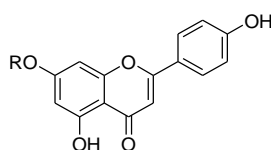


61

No	Είδος	Παράγωγο	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
61a	<i>P. aurea</i> ¹⁵⁵ <i>P. fruticosa</i> ¹⁵⁷ <i>P. floccosa</i> ¹⁵⁵	Vicenin-2	H	Glc	OH	Glc	H
61b	<i>P. lichnitys</i> ¹⁵⁶ <i>P. crinita</i> ¹⁴² <i>P. aurea</i> ¹⁵⁵	Luteolin-6,8-di-C- β -D-glucopyranoside	OH	Glc	OH	Glc	H
61c	<i>P. tuberosa</i> ¹⁷¹	Luteolin 8-C- β -D-glucopyranoside	OH	Glc	OH	H	H
61d	<i>P. kurdica</i> ¹⁶⁴	Jaceoside	OMe	H	Oglc	OMe	H
61e	<i>P. kurdica</i> ¹⁶⁴	Hispidulin 7-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -	H	H	Soph	OMe	H

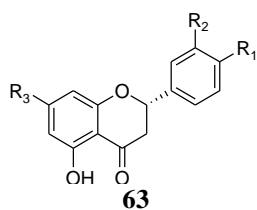
No	Είδος	Παράγωγο	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
		D-glucopyranoside					
61f	<i>P. aurea</i> ¹⁵⁵ <i>P. floccosa</i> ¹⁵⁵	Lucenin-2	OH	Glc	OH	Glc	H
61g	<i>P. kurdica</i> ¹⁶⁴	Nepetin- 7-O-β-D-glucopyranoside	OH	H	Oglc	OMe	H
61h	<i>P. aurea</i> ¹⁵⁵ <i>P. kurdica</i> ¹⁶⁴	Hispidulin-7-O-β-D- glucoside	H	H	Oglc	OMe	H
61i	<i>P. cashmeriana</i> ¹⁷²	Bitalgenin	OH	OH	OH	OH	H
61j	<i>P. bracteosa</i> ¹⁷⁷	5, 4'-Dihydroxy-3, 6, 7- trimethoxyflavone	H	H	OMe	OMe	OMe

Soph: β-D-glucopyranosyl-(1→2)-β-D-glucopyranoside

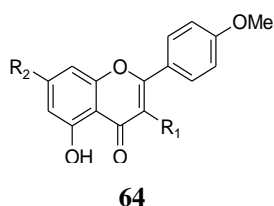


62

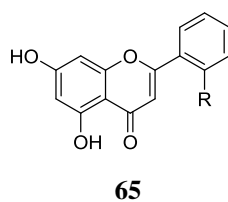
No	Είδος	Παράγωγο	R
62a	<i>P. lycia</i> ¹⁰⁸ <i>P. tuberosa</i> ¹⁶³ <i>P. samia</i> ¹⁴¹ <i>P. pungens</i> ¹⁶² <i>P. nissolii</i> ¹⁶¹ <i>P. lychnitis</i> ¹⁵⁶ <i>P. umbrosa</i> ¹¹⁸	Apigenin	H
62b	<i>P. aurea</i> ¹⁵⁵ <i>P. floccosa</i> ¹⁵⁵ <i>P. nissolii</i> ¹⁶¹ <i>P. lychnitis</i> ¹⁵⁶ <i>P. umbrosa</i> ¹¹⁸	Apigenin-7-O-β-D-glucoside	β-D-Glc
62c	<i>P. aurea</i> ¹⁵⁵ <i>P. floccosa</i> ¹⁵⁵	Apigenin-7-O-β-rutinoside	Rutinoside
62d	<i>P. aurea</i> ¹⁵⁵ <i>P. lychnitis</i> ¹⁵⁶ <i>P. floccosa</i> ¹⁵⁵	Apigenin-7-p-coumaroyl glucoside	p-coumaroyl-Glc
62e	<i>P. umbrosa</i> ¹¹⁸	Apigenin-7-O-β-D-glucuronide methyl ester	
62f	<i>P. umbrosa</i> ^{118, 173}	Apigenin-7-O-(6''-O-p-coumaroyl)-β-D-glucopyranoside	
62g	<i>P. pungens</i> ¹⁶²	Apigenin-7-methyl ether	Me



No	Είδος	Παράγωγο	R ₁	R ₂	R ₃
63a	<i>P. fruticosa</i> ¹⁵⁷ <i>P. nissolii</i> ¹⁶¹	Eriodictyol	OH	OH	OH
63b	<i>P. fruticosa</i> ¹⁵⁷	Hesperetin	H	OMe	OH
63c	<i>P. angustissima</i> ¹⁰⁴ <i>P. fruticosa</i> ¹⁵⁷ <i>P. aurea</i> ¹⁵⁵ <i>P. caucasica</i> ¹⁴⁴ <i>P. syriaca</i> ¹⁴⁶	Naringenin	OH	H	OH
63d		Naringenin-7- <i>O</i> -β-D-glucoside	OH	H	OGlc
63e	<i>P. aurea</i> ¹⁵⁵	Naringenin-7- <i>p</i> -coumaroyl glucoside	OH	H	<i>p</i> -coumaroyl-Glc
63f	<i>P. nissolii</i> ¹⁶¹	Eriodictyol-7- <i>O</i> -β-D-glucoside	OH	OH	OGlc



No	Είδος	Παράγωγο	R ₁	R ₂
64a	<i>P. aurea</i> ⁹³	Acacetin-7- <i>O</i> -β-glucopyranoside	H	OGlc
64b	<i>P. samia</i> ¹⁴¹	Ermanin	OMe	OH
64c	<i>P. spectabili</i> ¹⁶⁸	Kaempferol (7,4'-dimethyl ether)-3-glucoside	OGlc	OMe
64d	<i>P. tuberosa</i> ¹²⁶	Linarin (Acacetin-7- <i>O</i> -rutinoside)	H	Rutinoside
64e	<i>P. cashmeriana</i> ¹⁷²	Apigenin-7,4'-dimethyl ether	H	OMe



No	Είδος	Παράγωγο	R
65a	<i>P. bracteosa</i> ¹⁷⁷	Chrysin	H
65b		5,7,2'-trihydroxyflavone	OH

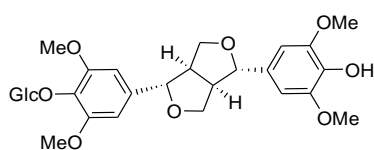
1.5.6. Λιγνάνια

Τα λιγνάνια είναι μια κατηγορία φυσικών προϊόντων με κοινό δομικό χαρακτηριστικό δύο μονάδες φαινυλοπροπανίου (C₆-C₃) συνδεδεμένες στα κεντρικά άτομα C της πλευρικής αλυσίδας, δηλαδή σύνδεση β-β' ή 8-8'. Μπορούν να θεωρηθούν ως ποικίλα υποκατεστημένα 1-(p-υδροξυφαινυλο)-1-προπένια σε διαφορετικές οξειδωμένες μορφές, που μπορούν να οδηγήσουν σε τέσσερις μεσομερείς μορφές. Από αυτές λαμβάνονται τα λιγνάνια με διμερισμό ή ανασυνδυασμό και με επαναπόκτηση του αρωματικού χαρακτήρα. Τα λιγνάνια έχουν σχεδόν πάντα υποκατεστημένους τους φαινολικούς δακτυλίους. Οι συνήθεις υποκαταστάτες των αρωματικών δακτυλίων είναι οι ομάδες: υδροξυ-, μεθοξυ-, μεθυλενοδιοξυ- και τα σάκχαρα.

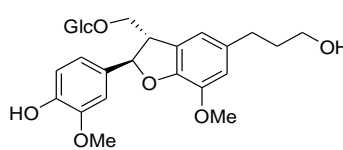
Τα λιγνάνια έχουν απομονωθεί από όλα τα μέρη των φυτών κυρίως από τα υπέργεια τμήματα των φυτών.^{109,93,174} Το λιγνάνιο **69**, umbroliside, απομονώθηκε από το ρίζωμα της *P. umbrosa*.⁷⁸

Πίνακας 1.9: Λιγνάνια που έχουν απομονωθεί από το γένος *Phlomis*.

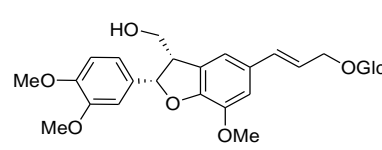
No	Είδος	Παράγωγο
66	<i>P. monocephala</i> ¹⁷⁵ <i>P. fruticosa</i> ¹⁵⁷ <i>P. amanica</i> Vierch ¹²⁴	Syringaresinol-4'-O-β-D-Glucopyranoside
67	<i>P. lycia</i> ¹⁰⁸ <i>P. chimerae</i> ¹⁰² <i>P. viscosa</i> ¹¹⁰	(-)-Dihydrodehydrodiconiferyl alcohol-9-O-β-D-glucopyranoside
68	<i>P. chimerae</i> ¹⁰² <i>P. viscosa</i> ¹¹⁰	(-)-4-O-Methyldehydrodiconiferyl alcohol-9-O-β-D-glucopyranoside
69	<i>P. umbrosa</i> ⁹¹	Umbroside
70	<i>P. aurea</i> ⁹³ <i>P. brunneogaleata</i> ⁷⁶ <i>P. kotschyana</i> ¹⁷⁴ <i>P. amanica</i> Vierch ¹²⁴	Liriodendrin
71	<i>P. viscosa</i> ¹¹⁰	(7S,8R)-8-O-4' neolignan-4-O-β-glucopyranoside
72	<i>P. viscosa</i> ¹¹⁰	Lariciresinol-4-O-β -glucopyranoside



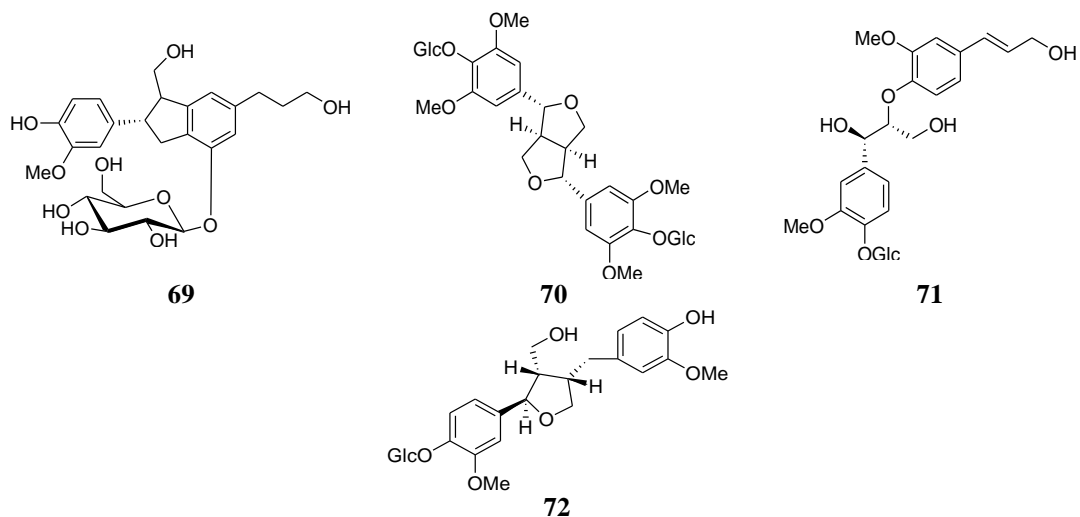
66



67



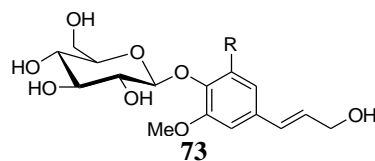
68



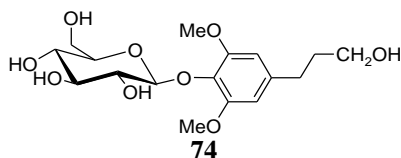
1.5.7. Φαινυλοπροπανοειδή

Ο όρος φαινυλοπροπανοειδή αναφέρεται σε οποιαδήποτε ένωση που φέρει αλυσίδα με 3 άτομα άνθρακα προσαρτημένη στο C-6 αρωματικό δακτύλιο (C6-C3 ενώσεις). Τα περισσότερα φαινυλοπροπανοειδή σχηματίζονται από κινναμωμικά ή p-κουμαρικά οξέα. Τρεις γλυκοζίτες μονομερών φαινυλοπροπανοειδών απομονώθηκαν από τρία είδη *Phlomis*: η συρινγκίνη, η κονιφερίνη, και η διϋδροσυριγγίνη.

Πίνακας 1.10: Φαινυλοπροπανοειδή που έχουν απομονωθεί από το γένος *Phlomis*.



No	Είδος	Παράγωγο	R
73a	<i>P. aurea</i> ⁹³ <i>P. carica</i> ⁹³ <i>P. amanica Vierch</i> ¹²⁴	Syringin	OMe
73b	<i>P. aurea</i> ⁹³ <i>P. carica</i> ⁹³	Coniferin	H

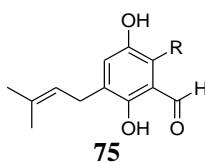


Είδος	Παράγωγο
<i>P. aurea</i> <i>P. carica</i> ⁹³	Dihydroxyringin

1.5.8. Φαινυλοϊσοπρενοειδή

Τα μόνα φαινυλοϊσοπρενοειδή που αναφέρονται στην διεθνή βιβλιογραφία για το γένος *Phlomis* είναι αυτά που φέρουν δομή υδροκινόνης με μια ομάδα αλδεϋδης και μια σχετικά μακρά αλειφατική αλυσίδα. Χαρακτηριστικό είναι το φυσικό προϊόν Flavoglaucin (**75a**) αλλά και τα ανάλογα του από το είδος *P. tuberosa* όπως παρατίθενται στον Πίνακα 1.11.

Πίνακας 1.11: Φαινυλοϊσοπρενυλοειδή που έχουν απομονωθεί από το γένος *Phlomis*.



No	Είδος	Παράγωγο	R
75a	<i>P. tuberosa</i> ¹²⁶	Flavoglaucin	
75b		Tetrahydroauroglaucin	
75c		Dihydroauroglaucin	

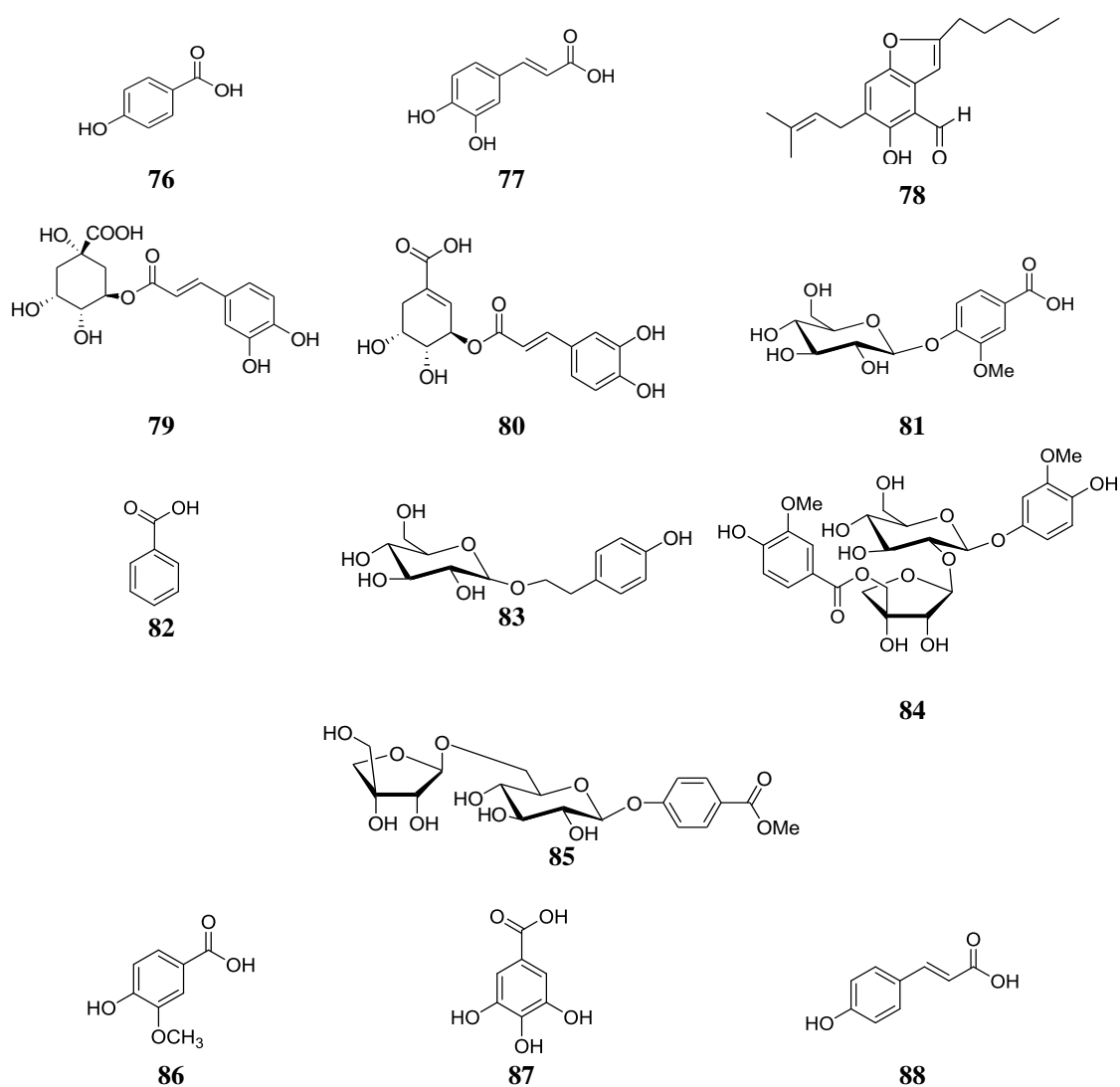
1.5.9. Φαινολικά Παράγωγα

Τα φαινολικά οξέα αποτελούν μια κατηγορία φυσικών προϊόντων με κοινό δομικό χαρακτηριστικό μία φαινολομάδα και τουλάχιστον μία καρβοξυλική ομάδα. Είναι ουσίες ευρέως διαδεδομένες στο φυτικό βασίλειο. Τα οξέα αυτά είναι συνήθως συζευγμένα με σάκχαρα ή υπό τη μορφή εστέρων, μέσω της καρβοξυλικής τους ομάδας, μπορούν όμως να απομονωθούν και ελεύθερα. Τα συστατικά που έχουν αναφερθεί βιβλιογραφικά απεικονίζονται στον παρακάτω Πίνακα 1.12, με το χλωρογενικό οξύ (**79**) να εμφανίζεται στα περισσότερα είδη.

Πίνακας 1.12: Φαινολικά παράγωγα που έχουν απομονωθεί από το γένος *Phlomis*.

No	Είδος	Παράγωγο
76	<i>P. stewartii</i> ¹³⁶ <i>P. bracteosa</i> ¹⁷⁷	p-Hydroxybenzoic acid
77	<i>P. stewartii</i> ¹⁷⁶ <i>P. lychnitis</i> ¹⁴⁵	Caffeic acid
78	<i>P. tuberosa</i> ¹²⁶	2-(2',3-Epoxy-1'-heptenyl)-6-hydroxy-5-(3'' methyl-2''-butenyl)benzaldehyde
79	<i>P. kurdica</i> ¹⁶⁴ <i>P. syriaca</i> ¹⁴⁶ <i>P. kotschyana</i> ¹⁷⁴ <i>P. amanica Vierch</i> ¹²⁴	Chlorogenic acid

80	<i>P. cashmeriana</i> ¹⁷²	3- <i>O</i> - <i>p</i> -Coumaroyl shikimic acid
81	<i>P. kurdica</i> ¹⁶⁴	Vanillic acid-4- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside
82	<i>P. bracteosa</i> ¹⁷⁷	Benzoic acid
83	<i>P. younghusbandii</i> ¹⁷⁸	Salidroside
84	<i>P. viscosa</i> ^{179,180}	Seguinose K
85	<i>P. kotschyana</i> ¹⁷⁴	4-hydroxyacetophenone-4- <i>O</i> -[6'- <i>O</i> - β -D-apiofuranosyl]- β -D-glucopyranoside
86	<i>P. umbrosa</i> <i>P. megalantha</i> ¹⁸¹	Vanillic acid
87	<i>P. umbrosa</i> <i>P. megalantha</i> ¹⁸¹	Gallic acid
88	<i>P. umbrosa</i> <i>P. megalantha</i> ¹⁸¹	<i>p</i> -Coumaric acid



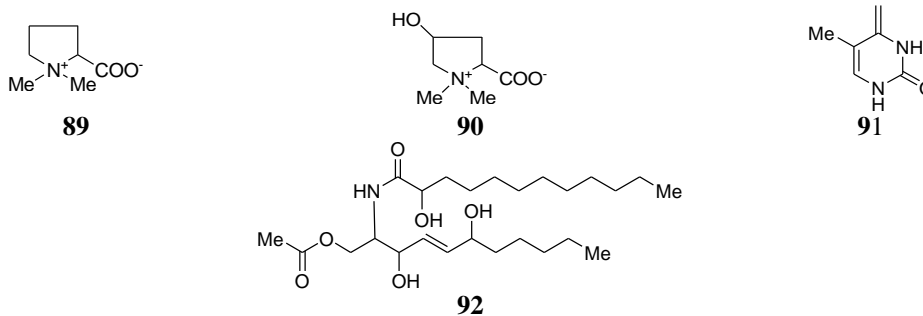
1.5.10. Αζωτούχα Παράγωγα

Τα αλκαλοειδή είναι οργανικές ενώσεις και αναφέρονται σε αζωτούχα παράγωγα φυσικής ή συνθετικής προέλευσης, με χημικές και φαρμακευτικές ιδιότητες της κατηγορίας αυτής. Με βάση τη βιογένεση, τα αλκαλοειδή ταξινομούνται ευρέως ως τα πραγματικά αλκαλοειδή και τα ψευδο-αλκαλοειδή. Η πλειονότητα των αλκαλοειδών προέρχεται από πρόδρομους οδούς α-αμινοξέων.

Με βάση τη χημική δομή, τα αλκαλοειδή ταξινομούνται ευρέως σε ετεροκυκλικά και μη ετεροκυκλικά αλκαλοειδή. Τα ετεροκυκλικά αλκαλοειδή είναι αυτά που περιέχουν ένα άτομο αζώτου στον ετεροκυκλικό δακτύλιο τους. Με βάση τον τύπο του δακτυλίου, ταξινομούνται περαιτέρω ως πυρρόλια, πυρρολιδίνες, πυριδίνες, πιπεριδίνες, κινολίνες, ισοκινολίνες, νορλουπινάνες και αλκαλοειδή ινδόλης. Τα μη-ετεροκυκλικά αλκαλοειδή ονομάζονται επίσης μερικές φορές πρωτο-αλκαλοειδή ή βιολογικές αμίνες. Είναι λιγότερο γνωστά στη φύση. Παραδείγματα αυτών περιλαμβάνουν την εφεδρίνη, την καθινόνη και την κολχικίνη.

Στα φυτά του γένους *Phlomis* μέχρι σήμερα έχουν αναφερθεί στην βιβλιογραφία τέσσερα αλκαλοειδή όπως φαίνονται στο Πίνακα 1.13.

Πίνακας 1.13: Αζωτούχα παράγωγα που έχουν απομονωθεί από το γένος *Phlomis*.



No	Είδος	Παράγωγο
89	<i>P. fruticosa</i> ¹⁵⁷	Proline Betaine
90		Hydroxyproline Betaine(s)
91	<i>P. bracteosa</i> ¹⁷⁷	Thymine
92	<i>P. cashmeriana</i> ¹⁸²	Phlomisamide

1.5.11. Βενζυλικοί Αιθέρες Σακχάρων

Από τα είδη *P. grandiflora* var. *grandiflora* και *P. aurea* απομονώθηκαν δυο βενζυλικοί αιθέρες σακάρων όπως παρατίθενται στον Πίνακα 1.14.

Πίνακας 1.14: Βενζυλικοί αιθέρες σακχάρων που έχουν απομονωθεί από το γένος *Phlomis*.



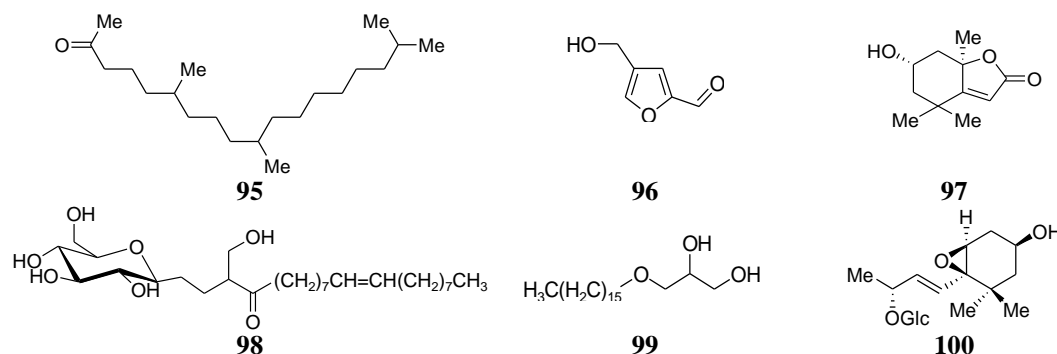
No	Είδος	Παράγωγο
93	<i>P. grandiflora</i> var. <i>grandiflora</i> ¹⁴⁰ <i>P. aurea</i> ²⁹	Benzyl alcohol- <i>O</i> - β -xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -glucopyranoside
94	<i>P. grandiflora</i> var. <i>grandiflora</i> ¹⁴⁰	Benzyl alcohol- <i>O</i> - β -D-glucoside

1.5.12. Άλλα Συστατικά

Αυτά τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.15, υποδηλώνουν ότι έχουν απομονωθεί και άλλα συστατικά όπως το λολιολίδιο (**97**) που είναι μια α -ακόρεστη γ -λακτόνη και έχει ένα τρις-υποκατεστημένο διπλό δεσμό και μια δευτεροταγή μη-αλλυλική υδροξυλομάδα. Χαρακτηριστικό επίσης είναι το φυσικό προϊόν φλομουροσίδης (**100**) που έχει αναφερθεί από τέσσερα είδη του *Phlomis*.

Πίνακας 1.15: Άλλα συστατικά που έχουν απομονωθεί από το γένος *Phlomis*.

No	Είδος	Παράγωγο
95	<i>P. thapsoides</i> ¹³²	6,10,17-Trimethyl-2-octadecanone
96	<i>P. umbrosa</i> ¹⁸³	4-(Hydroxymethyl)-2-furaldehyde
97	<i>P. umbrosa</i> ¹⁸⁴	Loliolide
98		1- <i>O</i> -Gluco-2- <i>O</i> -gadoleicglyceride
99	<i>P. bracteosa</i> ¹⁷⁷	1- <i>O</i> -Palmityl- <i>rac</i> -glycerol
100	<i>P. aurea</i> ⁹³ <i>P. lunariifolia</i> ⁸⁶ <i>P. spinidens</i> ⁹⁶	Phlomuroside



1.6. Η ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ ΚΑΙ Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥΣ

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες υπάρχουν σε όλα τα ανώτερα φυτά, συνήθως σε υψηλή δομική ποικιλότητα. Κατά κανόνα, μια μοναδική ομάδα από δευτερογενείς μεταβολίτες κυριαρχεί εντός μιας δεδομένης ταξινομικής κατηγορίας. Μερικές κύριες ενώσεις συχνά συνοδεύονται από πολλά παράγωγα και δευτερεύοντα συστατικά. Οι μεταβολίτες μπορεί να αλλάζουν με τρόπο συγκεκριμένο για τους ιστούς και τα όργανα τους. Συχνά παρατηρούνται διαφορές μεταξύ των αναπτυξιακών σταδίων, μεταξύ των ατόμων και των πληθυσμών. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες μπορεί να είναι παρόντες στο φυτό σε ενεργή κατάσταση ή ως "προφάρμακα" που ενεργοποιούνται μετά από τραυματισμό ή μόλυνση και λειτουργούν ως "φυτοαλεξίνες".¹⁸⁵

Πάνω από 100 χρόνια πριν, ο Ernst Stahl (Jena, Γερμανία) είχε συγκεντρώσει πειραματικά δεδομένα που έδειχναν ότι οι δευτερογενείς μεταβολίτες χρησιμεύουν ως αμυντικές ενώσεις έναντι σαλιγκαριών και άλλων φυτοφάγων.¹⁸⁵ Η αντίστοιχη αμυντική υπόθεση δεν έγινε αποδεκτή την εποχή εκείνη, επειδή οι περισσότεροι δεν ήταν πεπεισμένοι για την εξέλιξη και τις προσαρμοστικές εξηγήσεις. Προτίμησαν την απλούστερη ερμηνεία ότι οι δευτερογενείς μεταβολίτες ήταν απόβλητα του πρωτογενούς μεταβολισμού και ότι η δομική ποικιλομορφία θα αντανάκλούσε μόνο ένα παιχνίδι της φύσης.

Επομένως, επικρατούσε η άποψη ότι πολλά από τα συστατικά αυτά είναι προϊόντα του μεταβολισμού και συνεπώς άχρηστα υλικά. Το γεγονός ότι τα προϊόντα αυτά συγκεντρώνονται κατ' εξοχήν στα χυμοτόπια, σε συνδυασμό με την απουσία αποτελεσματικού απεκκριτικού συστήματος στα φυτά, εδραίωσε την άποψη ότι πρόκειται μάλλον για άχρηστα προϊόντα. Τέτοια προϊόντα που δεν είναι αναγκαία και απαραίτητα για την κανονική αύξηση και ανάπτυξη ενός φυτού αναφέρονται ως δευτερογενή ή φυσικά προϊόντα, η προέλευση των οποίων δεν ακολουθεί τους πρωτογενείς μεταβολικούς δρόμους που είναι όλοι όμοιοι για όλα τα φυτά.¹⁸⁶

Κατά την διάρκεια του βιολογικού τους κύκλου τα φυτά εκτίθενται πολλές φορές σε αντίξοες συνθήκες, οι οποίες επηρεάζουν δυσμενώς την ανάπτυξη αλλά και την ίδια τους την επιβίωση. Οι αβιοτικές καταπονήσεις προκαλούνται από ένα πλεόνασμα ή μια έλλειψη ενός πόρου στο φυσικό ή χημικό περιβάλλον, ενώ οι

βιοτικές προκαλούνται από άλλους οργανισμούς. Τα φυτά αντιδρούν στην ύπαρξη ενός ή περισσοτέρων παραγόντων καταπόνησης μέσω κατάλληλων μηχανισμών οι οποίοι τους επιτρέπουν να επιβιώσουν.¹⁸⁷

Σήμερα, οι προσαρμοστικές θεωρίες καλούνται εκ νέου για να εξηγήσουν την ύπαρξη και την ποικιλομορφία των δευτερογενών μεταβολιτών. Τα φυτά δεν μπορούν να ξεφύγουν όταν δέχονται επίθεση από σαλιγκάρια, έντομα ή φυτοφάγα, ούτε μπορούν να βασίζονται σε ένα ανοσοποιητικό σύστημα όταν προκαλούνται από ένα πολύ μεγάλο αριθμό επίδοξων εχθρών, όπως βακτήρια, ιοί μύκητες, νηματώδεις και ακάρεα.^{188,189} Τα φυτά έπρεπε να αναπτύξουν στρατηγικές επιβίωσης και έχουν αναπτύξει αμυντικές χημικές ουσίες για να αποτρέψουν, να εμποδίσουν ή να σκοτώσουν τους εχθρούς τους με τα οποία θωρακίζουν τα φυτικά τους κύτταρα. Η σκληρή επιδερμίδα και το περίδερμα, για παράδειγμα, σε συνδυασμό με τα αγκάθια, τις νυσούσες τρίχες και τα ανθεκτικά δερματώδη φύλλα βοηθούν ώστε, εκτός από τον περιορισμό της διαπνοής, τα φυτά να μη βοσκούνται από φυτοφάγα ζώα, ενώ ταυτόχρονα αποτελούν φραγμούς στην είσοδο βακτηρίων και μυκήτων. Επομένως τα δευτερογενή προϊόντα συμβάλλουν αποφασιστικά στην προστασία της επιφάνειας και την άμυνα των φυτών έναντι των ποικίλων εχθρών τους.

Ένας μεγάλος αριθμός πειραματικών στοιχείων υποστηρίζει την άποψη ότι πολλά αλκαλοειδή, κυανογόνα γλυκοζίδια, γλυκοσινολάτες, τερπένια, σαπωνίνες, ταννίνες, ανθρακινόνες και πολυακετυλένια είναι αλληλοχημικά. Αντιπροσωπεύουν προσαρμοστικά χαρακτηριστικά τα οποία διαφοροποιούνται κατά τη διάρκεια της εξέλιξης με φυσική επιλογή, προκειμένου να προστατευθούν από ιούς, βακτήρια, μύκητες, ανταγωνιστικά φυτά και κυρίως κατά των φυτοφάγων.¹⁸⁵

Ο ρόλος των δευτερογενών μεταβολιτών στην άμυνα μπορεί να επιτελείται μέσω της αποτροπής, αντιτροφικής δράσης, τοξικότητας ή μπορεί να αποτελούν τα πρόδρομα μόρια για άλλα αμυντικά συστήματα.¹⁹⁰ Η συχνή τους αναφορά ως αμυντικών ουσιών, έχει οδηγήσει στην υποβάθμιση άλλων σημαντικών ρόλων, όπως η συμβολή τους στην αναπαραγωγή, εγκαθίδρυση συμβιωτικών σχέσεων καθώς και τον ανταγωνισμό με τα γειτονικά φυτά.^{187,188}

Η ικανότητα ανταγωνισμού και επιβίωσης των φυτών επηρεάζεται πολύ από τις οικολογικές λειτουργίες των δευτερογενών μεταβολιτών που τα ίδια παράγουν. Επίσης, ο δευτερογενής μεταβολισμός σχετίζεται και με την γεωργία. Οι ίδιες αμυντικές ενώσεις που αυξάνουν την προσαρμοστικότητα των φυτών, προφυλάσσοντας τα από τους επίδοξους εχθρούς, μπορούν να τα καταστήσουν

ακατάλληλα για την διατροφή του ανθρώπου.¹⁸⁸

Η ικανότητα κάθε φυτού να παράγει μεταβολίτες ακολουθεί ένα ιδιαίτερο πρότυπο στο χώρο και στο χρόνο. Ο πρωτογενής μεταβολισμός δεν παρουσιάζει ουσιαστικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των ανώτερων φυτών, οι δευτερογενείς μεταβολίτες κάθε φυτικού είδους εμφανίζουν ένα ιδιαίτερο φυτοχημικό πρότυπο. Το είδος των μεταβολιτών, σε συνδυασμό με τις μορφολογικές και ανατομικές ιδιαιτερότητες, διαμορφώνουν κατά κανόνα την ταυτότητα κάθε φυτικού είδους.¹⁹¹

Η ισχυροποίηση των κυτταρικών τοιχωμάτων με **λιγνίνη** αποτελεί χαρακτηριστικό μηχανισμό θεμελιώδους άμυνας. Αποτελεί το αφθονότερο προϊόν του δευτερογενούς μεταβολισμού, αφομοιώνοντας ετησίως το 15-20% του άνθρακα από τα ανώτερα φυτά, ο οποίος ενσωματώνεται στο πολυμερές αυτό. Η λιγνίνη των γυμνόσπερμων αποτελεί το προϊόν πολυμερισμού κυρίως της κωνιφερυλικής αλκοόλης και σε μικρότερα ποσοστά της κουμαρικής αλκοόλης, ενώ στα αγγειόσπερμα της κωνιφερυλικής και συναπικής αλκοόλης σε αναλογία 1:1.¹⁸⁷

Στα φυτά, τα **ιριδοειδή** εντοπίζονται κυρίως ως ιριδοειδείς γλυκοζίτες. Αρχικά απομονώθηκαν στα μέσα του 1800 από τη ρίζα του *Rubia tinctorum*¹⁹² και ονομάστηκαν σύμφωνα με την ομοιότητά τους της δομής και της βιοσυνθετικής προέλευσης, διότι θεωρήθηκαν παράγωγα ορισμένων μεταβολιτών (ιριδομυρμηκίνη, ιριδολακτόνη, ιριδοδιάλη), που είχαν απομονωθεί στα μυρμήγκια του γένους *Iridomyrmex*.^{193,194}

Τα ιριδοειδή, λόγω της κατανομής και της ποικιλομορφίας τους έχουν θεωρηθεί ως καλοί ταξινομικοί δείκτες.¹⁸⁵ Τα φυτά που παράγουν ιριδοειδή έχουν χρησιμοποιηθεί στη λαϊκή ιατρική για τη θεραπεία πολλών ασθενειών όπως παρασίτων, φλεγμονών, διαβήτη και άλλων.^{195,196} Λόγω των αποδεδειγμένων ή δυνητικών φαρμακολογικών τους ιδιοτήτων, ο αριθμός των μελετών αυτών των μορίων αυξάνεται γρήγορα. Τα ιριδοειδή φαίνεται να συσσωρεύονται στα φυτά προστατευτικά έναντι διαφόρων φυτοφάγων και παθογόνων ζώων, παρουσιάζοντας αντιβακτηριακές¹⁹⁷ και αντιμυκητιακές δράσεις.^{197,198}

Έχει δειχθεί ότι μία β-γλυκοσιδάση από τα φύλλα του *Ligustrum obtusifolium* μετατρέπει το τμήμα του σεκοϊριδοειδούς γλυκοζίτη της ελαιοπαΐνης σε μια δομή τύπου γλουταραλδεϋδης που μοιάζει με ισχυρή μετουσιωτική πρωτεΐνη με δραστηριότητες αλκυλίωσης λυσίνης.¹⁹⁹

Πρόσφατα προτάθηκε ότι οι ιριδοειδείς γλυκοζίτες διαδραματίζουν ρόλο κατά τη διάρκεια του οξειδωτικού στρες, όπως παρατηρήθηκε κατά τις συνθήκες ξηρασίας

με αποτέλεσμα να αυξάνεται η συσσώρευση των ιριδοειδών γλυκοζιτών (*Scrophularia ningpoensis*).²⁰⁰

Τα ιριδοειδή μπορούν να λειτουργήσουν ως διεγέρτες ωστοκίας και διεγερτικά διατροφή¹⁹⁷ τόσο για τα ενήλικα έντομα όσο και για τις προνύμφες. Τα συνθετικά ιριδοειδή μπορούν να αποτελέσουν μέρος του αμυντικού χημικού οπλοστασίου των εντόμων και μπορούν επίσης να χρησιμεύσουν ως ένα καλά ρυθμισμένο σήμα φερομόνης φύλου, όπως παρατηρήθηκε σε ορισμένα είδη αφίδων.²⁰¹

Τα **τερπενοειδή** αποτελούν τη μεγαλύτερη ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών. Ορισμένα τερπένια έχουν καλά αναγνωρισμένες λειτουργίες στην αύξηση και στην ανάπτυξη των φυτών και για το λόγο αυτό μπορεί να θεωρηθούν μάλλον πρωτογενείς παρά δευτερογενείς μεταβολίτες.¹⁸⁸ Σημαντικές ομάδες αποτελούν οι φυτικές ορμόνες, όπως τα διτερπένια οι γιββερελλίνες, και τα τριτερπένια τα βρασσινοστεροειδή που συμμετέχουν σε λειτουργίες που ρυθμίζουν την αύξηση.^{188,202} Οι στερόλες, παράγωγα των τριτερπενίων, είναι απαραίτητα συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών τις οποίες σταθεροποιούν, αλληλεπιδρώντας με τα φωσφολιπίδια. Τα καροτενοειδή, που συμμετέχουν στη φωτοσύνθεση και προστατεύουν τους φωτοσυνθετικούς ιστούς από την φωτοοξειδωση.¹⁸⁸ Τα πιο πολλά τερπένια όμως είναι δευτερογενείς μεταβολίτες και θεωρείται ότι παίζουν ρόλο στην άμυνα των φυτών.

Τα τερπενοειδή προστατεύουν πολλά φυτά από τους φυτοφάγους οργανισμούς δρώντας ως τοξίνες. Συμμετέχουν ενεργά στο φυτικό βασίλειο και στην άμυνα τους. Στα κωνοφόρα, συσσωρεύονται μονοτερπένια στους ρητινοφόρους αγωγούς που βρίσκονται στις βελόνες, στους βλαστούς και στον κορμό των δέντρων. Αυτές οι ενώσεις είναι τοξικές για πολυάριθμα έντομα που είναι σημαντικοί εχθροί των κωνοφόρων, έχοντας δράση ως αντιτροφική και αντιμυκητιασική.²⁰³ Πολλά φυτά περιέχουν μείγματα πτητικών μονοτερπενίων και σεσκιτερπενίων, τα αιθέρια έλαια. Τα αιθέρια έλαια έχουν πολύ γνωστές εντομοαπωθητικές ιδιότητες.

Μια άλλη μεγάλη κατηγορία από ενώσεις που παράγουν τα φυτά ως δευτερογενή προϊόντα είναι οι φαινολικές ενώσεις. Οι φυτικές φαινολικές ενώσεις είναι μια χημικά ετερογενής ομάδα περίπου 10.000 ξεχωριστών ενώσεων με ποικίλους ρόλους στα φυτά. Πολλές συμβάλουν στην άμυνα έναντι φυτοφάγων και παθογόνων οργανισμών. Άλλες λαμβάνουν μέρος στην μηχανική υποστήριξη, στην προσέλκυση των επικονιαστών και στην διασπορά των καρπών, στην απορρόφηση της επιβλαβούς υπεριώδους ακτινοβολίας ή στη μείωση της αύξησης γειτονικών ανταγωνιστικών φυτών.^{188,204}

Πολλές απλές **φαινολικές ενώσεις** στα φυτά (καφεϊκό οξύ, φερουλικό οξύ) έχουν σημαντικούς αμυντικούς ρόλους έναντι φυτοφάγων εντόμων και μυκήτων.²⁰⁵ Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει η φωτοτοξικότητα ορισμένων κουμαρινών, οι φουρανοκουμαρίνες²⁰⁶ που φέρουν δακτύλιο φουρανίου. Οι ενώσεις αυτές δεν είναι τοξικές εάν δεν ενεργοποιηθούν στο φως. Οι ενεργοποιημένες φωτοκουμαρίνες μπορεί να εισχωρούν στη διπλή έλικα του DNA και να σχηματίζουν δεσμούς με τις πυριμιδινικές βάσεις, εμποδίζοντας τη μεταγραφή οδηγώντας στο θάνατο του κυττάρου. Η απελευθέρωση φαινολικών ενώσεων στο έδαφος από τα φυτά μπορεί να περιορίσει την ανάπτυξη άλλων φυτών.²⁰⁷ Συχνά αναφέρεται ότι τα απλά φαινυλοπροπανοειδή και τα παράγωγα του βενζοϊκού οξέος παρουσιάζουν αλληλοπαθητική δράση. Ενώσεις όπως το καφεϊκό και το φερουλικό οξύ βρίσκονται στο έδαφος σε σημαντικές ποσότητες αναστέλλοντας τη βλάστηση και την αύξηση πολλών φυτών.²⁰⁸

Τα **φλαβονοειδή** είναι μια από τις μεγαλύτερες κατηγορίες φαινολικών ενώσεων. Οι έγχρωμες χρωστικές των φυτών παρέχουν οπτικά σήματα που βοηθούν στην προσέλκυση των επικονιαστών συνεισφέροντας στην γονιμοποίηση των ανθέων και διασπορέων των σπερμάτων.²⁰⁹ Τα φλαβονοειδή περιλαμβάνουν ένα εύρος έγχρωμων ενώσεων. Η πιο διαδεδομένη ομάδα είναι η ανθοκυανίνες, στις οποίες οφείλονται τα περισσότερα ερυθρά και κυανά χρώματα που παρατηρούνται στους καρπούς και στα άνθη. Το χρώμα των ανθοκυανινών επηρεάζεται από τον αριθμό των υδροξυλίων και μεθυλομάδων στον δακτύλιο B, από την παρουσία εστεροποιημένων αρωματικών οξέων στον κύριο σκελετό και το pH του χυμοτοπίου στο οποίο αποθηκεύονται οι ανθοκυανίνες.¹⁸⁸ Μπορεί να βρίσκονται σε υπερ-μοριακά σύμπλοκα όπου σχηματίζουν χηλικές ενώσεις με μεταλλικά ιόντα και συμμετέχουν φλαβόνες.²¹⁰

Άλλες δυο ομάδες φλαβονοειδών που βρίσκονται σε άνθη είναι οι φλαβόνες και οι φλαβονόλες, που πιθανόν λειτουργούν ως προσελκυστικά οπτικά σήματα για τα έντομα όπως οι μέλισσες. Οι φλαβονόλες στα άνθη συχνά σχηματίζουν συμμετρικά επαναλαμβανόμενα σχέδια με ραβδώσεις, που θεωρούνται ως οδηγοί νέκταρος και είναι ορατά για τα έντομα βοηθώντας στον προσδιορισμό της θέσης της γύρης και του νέκταρος.²¹¹ Εκτός από τα άνθη, οι φλαβόνες και οι φλαβονόλες βρίσκονται και στα φύλλα όλων των πράσινων φυτών. Προστατεύουν τα κύτταρα από υψηλά επίπεδα UV-B ακτινοβολίας, επειδή συσσωρεύονται στα επιδερμικά στρώματα των φύλλων και των βλαστών και απορροφούν έντονα στην περιοχή της

UV-B ακτινοβολίας, ενώ επιτρέπουν τη διέλευση της ορατής ακτινοβολίας.^{187,188,212} Η UV-B ακτινοβολία επάγει μεταλλάξεις στο DNA καθώς και οξειδωτική καταπόνηση. Η τοξικότητα των φαινολικών ενώσεων αποδίδεται στην τάση τους να οξειδώνονται σε κινόνες που συνδέονται ομοιοπολικά με τις πρωτεΐνες, περιορίζοντας έτσι τη βιοδιαθεσιμότητα τους ως θρεπτικά συστατικά.²¹³

Άλλες λειτουργίες των φλαβονοειδών είναι πως όταν εκκρίνονται στο έδαφος από τις ρίζες των ψυχανθών, μεσολαβούν στην αλληλεπίδραση μεταξύ ψυχανθών και αζωτοδεσμευτικών συμβιωτικών βακτηρίων.^{187,188} Μπορούν επίσης να παίξουν ρυθμιστικό ρόλο στην ανάπτυξη των φυτών ως διαμορφωτές της πολικής μεταφοράς της αυξίνης.²¹⁴

1.7. ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή έχει ως στόχο να αποκαλύψει την αξία των φυτών που από καιρό θεωρούνται ως "άχρηστα φυτά" ή ζιζάνια από τον τοπικό πληθυσμό αγροτών και ως εκ τούτου παραμελούνται από εμπορική άποψη. Το γένος που έχει επιλεγεί είναι το *Phlomis*, άφθονο στην Ελλάδα και ιδιαίτερα στην Κρήτη.

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε το υβρίδιο *P. × commixta* που εντοπίζεται σε συγκεκριμένες περιοχές του νησιού, και αποτελεί διασταύρωση των ειδών (*P. cretica* x *P. lanata*). Τα φυτά του γένους βρίσκουν ποικιλία χρήσεων στην λαϊκή θεραπευτική και τα βιβλιογραφικά δεδομένα δείχνουν ότι διαθέτουν ένα πλούσιο φορτίο βιοδραστικών ουσιών.

Στην επιλογή του συγκεκριμένου φυτού συνέβαλε το γεγονός ότι ως ερευνητική ομάδα μελετήσαμε το χημικό προφίλ του υβριδίου πρώτη φορά ως προς τα πτητικά του συστατικά του (αιθέρια έλαια) και λαμβάνοντας υπόψη ότι ούτε οι μη πτητικές του χημικές ουσίες έχουν αναφερθεί, θελήσαμε να περιγράψουμε μια ολοκληρωμένη χημική ταξινόμηση του συγκεκριμένου φυτικού οργανισμού.

Η επιλογή του *P. × commixta* βασίστηκε στο γεγονός ότι αποτελεί υβρίδιο δυο ειδών από τα οποία το ένα (*P. cretica*) απαντάται κυρίως στη Κρήτη και το δεύτερο (*P. lanata*) είναι ενδημικό της Κρήτης, οπότε αναμένεται πως η ανάλυση των συστατικών θα αναδείξει ενώσεις με φαρμακευτικές ιδιότητες που παραπέμπουν στην Κρητική λαϊκή ιατρική.

Η παρούσα διατριβή έχει ως αντικείμενο:

- την απομόνωση και τον προσδιορισμό της δομής των δευτερογενών μεταβολιτών από το φυτό και
- την εκτίμηση της πιθανής βιολογικής δράσης για την φαρμακευτική δραστηριότητα των εκχυλισμάτων τους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

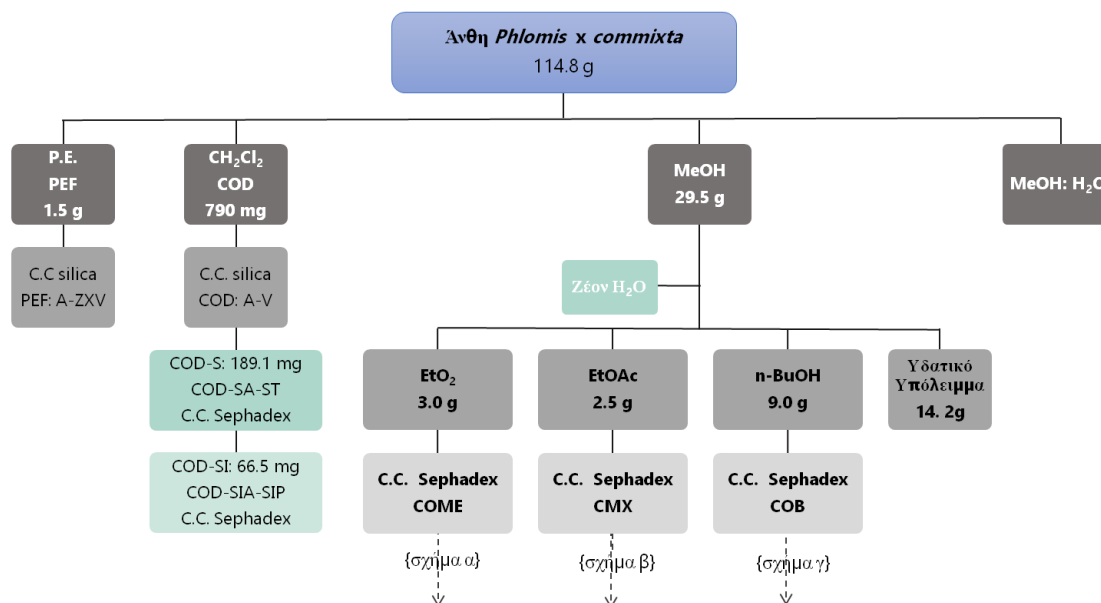
2.1. Απόδοση δομών των μεταβολιτών όπως χαρακτηρίστηκαν από το υβρίδιο *P. × commixta*

Στο κεφάλαιο που ακολουθεί παρουσιάζονται τα φασματοσκοπικά δεδομένα των ενώσεων που απομονώθηκαν, ταυτοποιήθηκαν και αναλύονται πλήρως οι πορείες καθορισμού των δομών τους. Δεν αναφέρονται τα φασματοσκοπικά δεδομένα μεταβολιτών που δεν έχουν χαρακτηριστεί πλήρως.

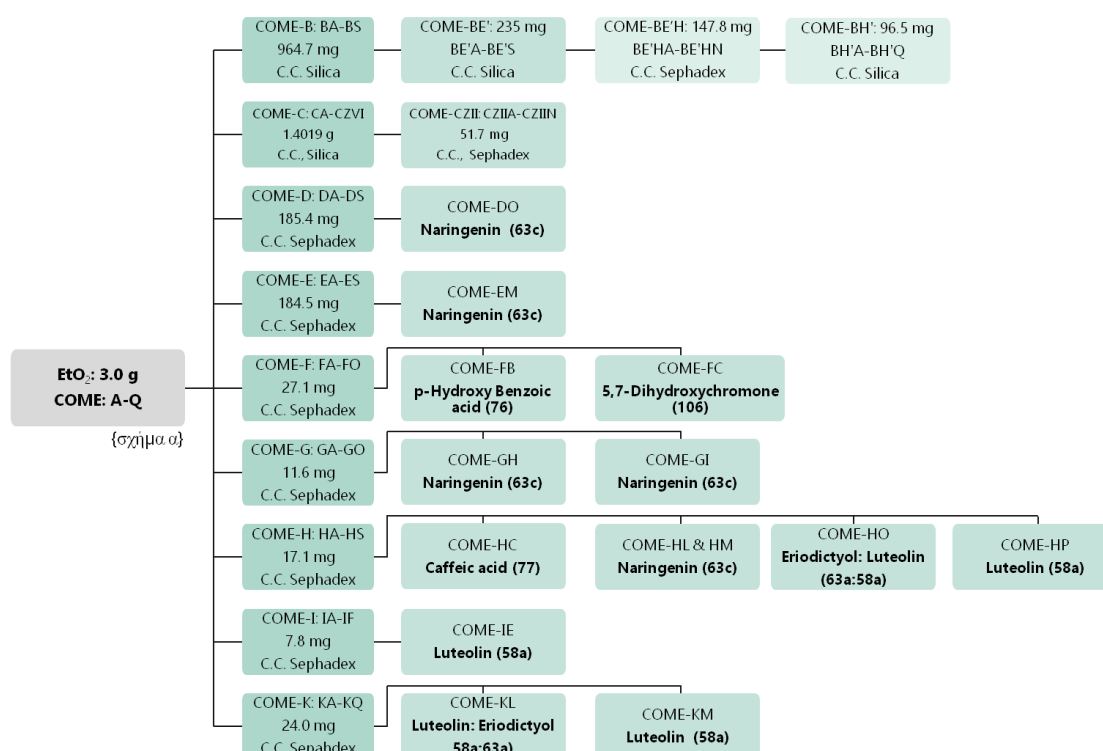
Η απόδοση της δομής των μεταβολιτών επιτεύχθηκε μετά από μελέτη των φασματοσκοπικών δεδομένων με πειράματα NMR (1D και 2D, ομο και ετεροπυρηνικής συσχέτισης), LC/MS, HRMS, GC/MS και UV-vis, των οποίων οι αναλύσεις αναπτύσσονται στη συνέχεια.

Σε αυτή την ενότητα αναφέρονται οι μεταβολίτες όπως ομαδοποιήθηκαν ανάλογα την χημεία τους. Ταξινομήθηκαν ως εξής: i) φαινυλοαιθανοειδείς γλυκοζίτες, ii) γλυκοζίτες της αλλυλικής αλκοόλης, iii) τυροσολικοί εστέρες, iv) στεροειδή, v) φλαβονοειδή, vi) φαινολικά οξέα, vii) χρωμόνες και viii) αλειφατικοί υδρογονάνθρακες. Στο τέλος παρουσιάζονται συστατικά που ταυτοποιήθηκαν με αέρια χρωματογραφία και δεδομένα των φασμάτων NMR που υποστηρίζουν την ταυτοποίησή τους.

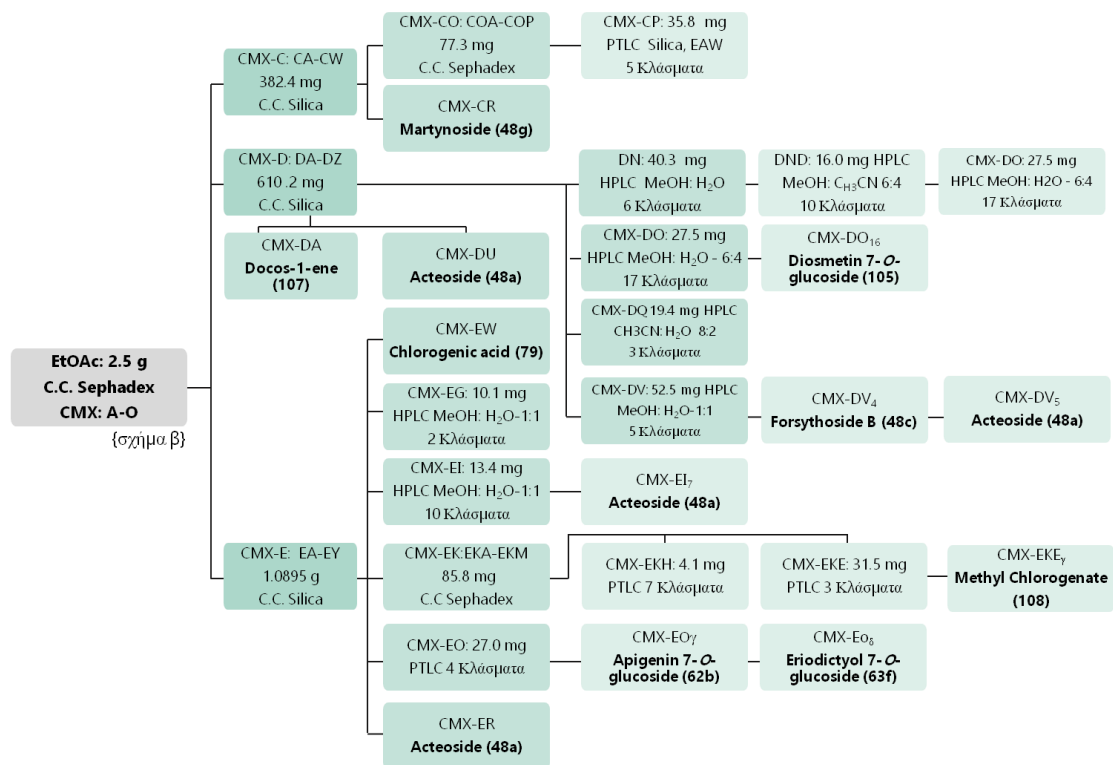
Για να γίνει αντιληπτό το πώς παραλήφθηκαν και το πώς στη συνέχεια απομονώθηκαν τα συστατικά, μια λεπτομερής διαδικασία διαχωρισμού απεικονίζεται στα ακόλουθα Σχήματα 2.1-2.8.



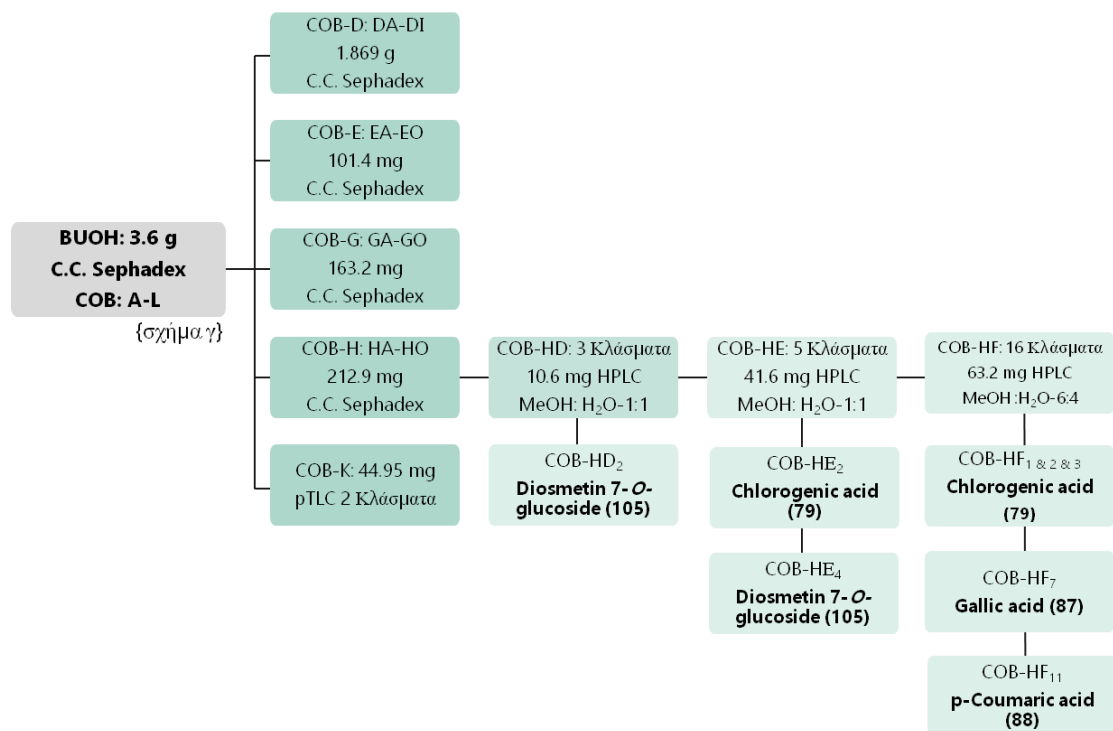
Σχήμα 2.1: Σχηματική πορεία χρωματογραφικού διαχωρισμού. Τα άνθη εκχυλίστηκαν με Soxhlet διαδοχικά με διαλύτες αυξανόμενης πολικότητας. Τα κλάσματα PEF και COD επεξεργάστηκαν περαιτέρω με C.C., ενώ το στερεό υπόλειμμα της MeOH εκχυλίστηκε εξαντλητικά με τους διαλύτες όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.1 και τα κλάσματα που προέκυψαν αναλύονται στα Σχήματα 2.2-2.4.



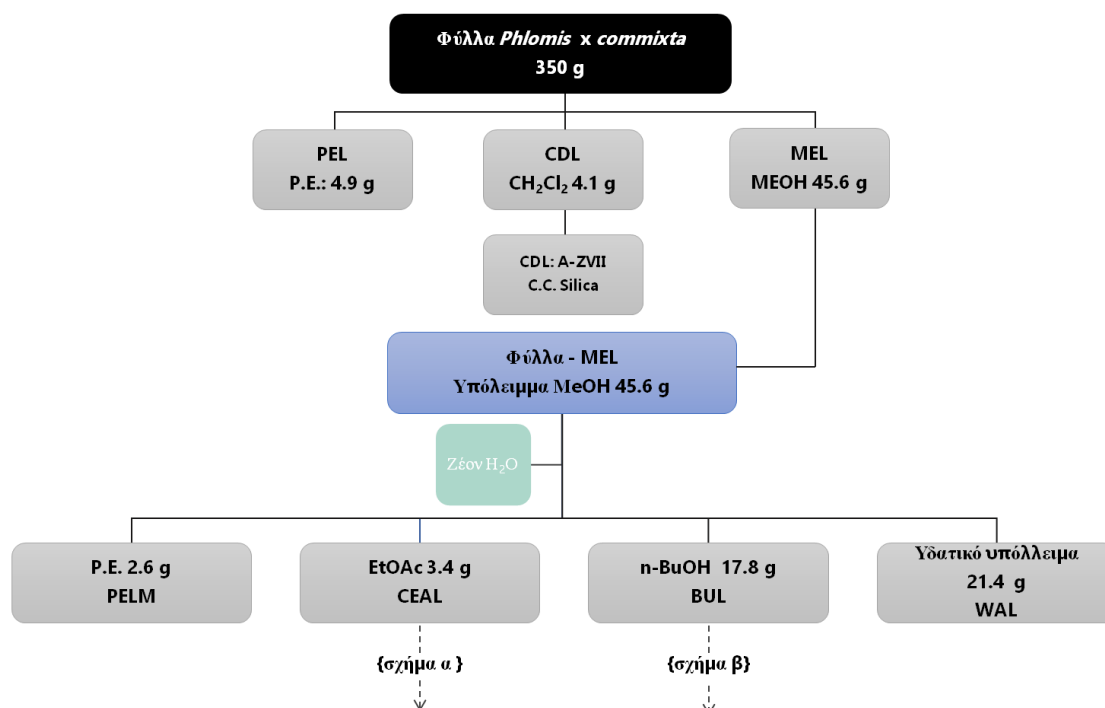
Σχήμα 2.2: Σχηματική πορεία χρωματογραφικού διαχωρισμού του αιθερικού κλάσματος από τα άνθη. Μέσω αλληπάλληλων C.C. Sephadex LH-20 παραλήφθηκαν οι ενώσεις που απεικονίζονται στο σχήμα.



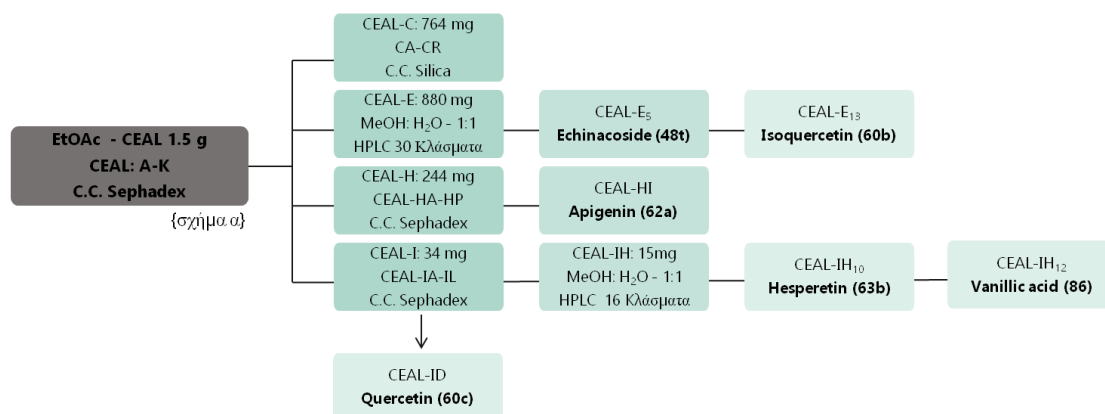
Σχήμα 2.3: Σχηματική πορεία χρωματογραφικού διαχωρισμού του κλάσματος οξικού αιθυλεστέρα από τα άνθη. Μέσω αλληπάλληλων C.C. Sephadex LH-20, Silica, HPLC και PTLC παραλήφθηκαν οι ενώσεις που απεικονίζονται στο σχήμα.



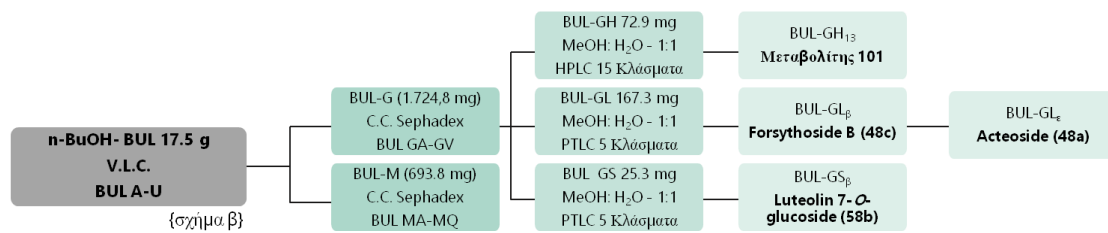
Σχήμα 2.4: Σχηματική πορεία χρωματογραφικού διαχωρισμού του βουτανολικού κλάσματος από τα άνθη. Μέσω αλληπάλληλων C.C. Sephadex LH-20 και HPLC παραλήφθηκαν οι ενώσεις που απεικονίζονται στο παραπάνω σχήμα.



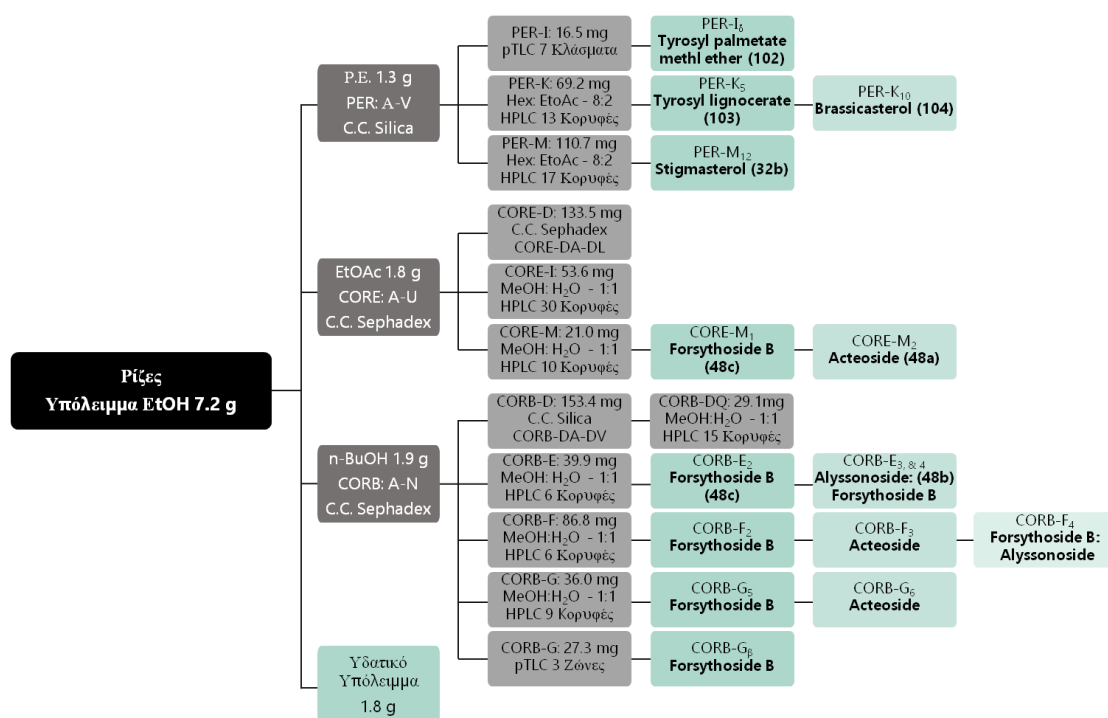
Σχήμα 2.5: Σχηματική πορεία χρωματογραφικού διαχωρισμού από τα φύλλα. Εκχυλίστηκαν με ψυχρή εκχύλιση με τους διαλύτες P.E., CH₂Cl₂ και MeOH. Το υπόλειμμα της MeOH εκχυλίστηκε περαιτέρω με τους διαλύτες P.E. EtOAc και BuOH. Τα κλάσματα CEAL και BUL αναλύονται στα Σχήματα 2.6-2.7.



Σχήμα 2.6: Σχηματική πορεία χρωματογραφικού διαχωρισμού του κλάσματος οξικού αιθυλεστέρα από τα φύλλα. Μέσω αλληπάλληλων C.C. Sephadex LH-20, Silica και HPLC ταυτοποιήθηκαν οι ενώσεις που απεικονίζονται στο σχήμα.



Σχήμα 2.7: Σχηματική πορεία χρωματογραφικού διαχωρισμού του βουτανολικού κλάσματος από τα φύλλα. Αρχικά κλασματώθηκε μέσω V.L.C. και κατόπιν αλληπάλληλων C.C. Sephadex LH-20, PTLC και HPLC ταυτοποιήθηκαν οι ενώσεις που απεικονίζονται στο παραπάνω σχήμα.

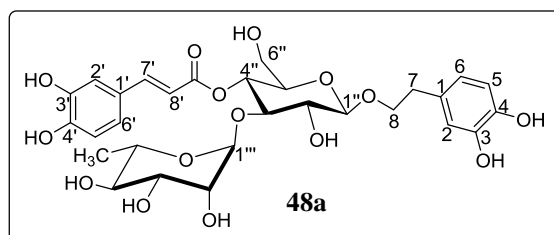


Σχήμα 2.8: Σχηματική πορεία χρωματογραφικού διαχωρισμού από τις ρίζες. Αρχικά οι ρίζες εκχυλίστηκαν με EtOH. Κατόπιν το EtOH υπόλειμμα εκχυλίστηκε περαιτέρω με διαλύτες αυξανόμενης πολικότητας (P.E. EtOAc και BuOH). Στην συνέχεια με αλληπάλληλες C.C. Silica ή Sephadex LH-20, PTLC και HPLC διαχωρίστηκαν και ταυτοποιήθηκαν οι μεταβολίτες όπως φαίνονται στο σχήμα.

2.2. ΦΑΙΝΥΛΟΑΙΘΑΝΟΕΙΔΕΙΣ ΓΛΥΚΟΖΙΤΕΣ

2.2.1. Μεταβολίτης: Βερμπασκοσίδη

[(2*R*, 3*R*, 4*R*, 5*R*, 6*R*)-6-[2-(3, 4-Διϋδροξυφαινυλο) αιθοξυ]-5-υδροξυ-2-(υδροξυμεθυλο)-4-[(2*S*, 3*R*, 4*R*, 5*R*, 6*S*)- 3,4,5-τριυδροξυ-6-μεθυλοξάν-2-υλο]οξυοξάν-3-υλο] εστέρα του (*E*)-3-(3,4-διϋδροξυφαινυλο)προπ-2-ενοϊκού οξέος.



Απομόνωση Μεταβολίτη

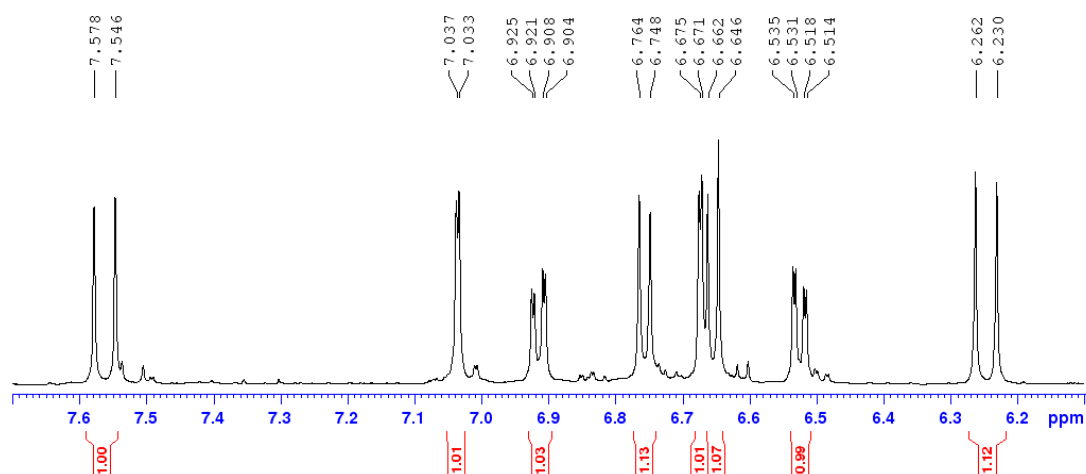
Αποτελεί ένα από τα κύρια συστατικά του φυτού κατανεμημένο σε όλα τα τμήματα του. Απομονώθηκε σε μορφή πορτοκαλόχρωμου ελαίου από το κλάσμα εκχύλισης οξικού αιθυλεστέρα των **ανθέων** με χρήση χρωματογραφίας στήλης (C.C.) επί γέλης πυριτίας (SiO₂) και εντοπίστηκε στα κλάσματα CMX-DU (265.5 mg) και CMX-ER (556,6 mg). Μέσω HPLC στο κλάσμα CMX-DV₅ (1.1 mg) και CMX-EI₇ (0.8 mg), αλλά και στις **ρίζες** σε κλάσματα του οξικού αιθυλεστέρα του αιθανολικού εκχυλίσματος των ριζών, μετά από HPLC: (CORE-M₂, 4.6 mg) και στο βουτανολικό κλάσμα μετά από HPLC, (CORB-G₆, 4.2 mg και CORB-F₃, 2.2 mg). Τέλος, ταυτοποιήθηκε και στα **φύλλα** μετά από PTLC, (BUL-GIε, 33.1 mg) από το βουτανολικό κλάσμα του μεθανολικού εκχυλίσματος. Για τις αρχικές ποσότητες κάθε κλάσματος βλέπε στο πειραματικό μέρος.

Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός

Ταυτοποιήθηκε με φάσματα 1D, 2D NMR σε συνδυασμό με το φάσμα μαζών της ένωσης που χαρακτηρίστηκε ως βερμπασκοσίδη ή ακτεοσίδη.

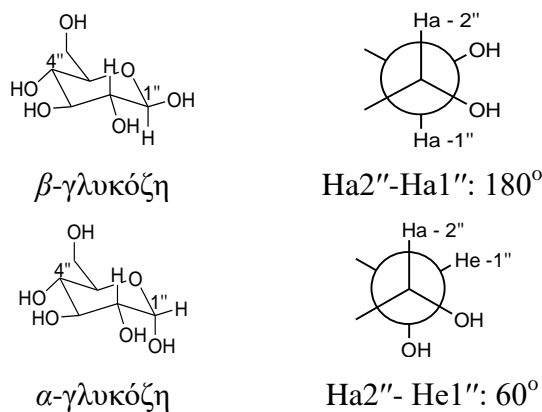
Η δομή του βερμπασκοσίδη αποτελείται από μία ομάδα καφεϊκού οξέος και ένα τμήμα διυδροξυ-φαινυλαιθυλικής αλκοόλης με σακχαρίτες, συγκεκριμένα τη γλυκόζη και τη ραμνόζη. Όλα τα 1D και 2D NMR δεδομένα παρατίθενται στον Πίνακα 2.1. Τα αρωματικά πρωτόνια από το φάσμα ¹H-NMR τόσο του καφεϊκού οξέος όσο και της ortho-διυδροξυφαινυλαιθυλο- ομάδας εμφανίζονται στην

αρωματική περιοχή του φάσματος (συστήματα ABX) σε δ 6.1-7.7 ppm, όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.9. Τα σήματα των H-2 (6.69 ppm) και H-5 (6.67 ppm) εμφανίζονται ως μια διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης $J = 2.0$ και 8.0 Hz αντιστοίχως ενώ το σήμα του H-6 ως μια διπλή της διπλής με σταθερές σύζευξης $J_1 = 8.0$ και $J_2 = 2.0$ Hz. Αν και τα σήματα των αρωματικών πρωτονίων από το καφεϊκό οξύ και τη διυδροξυφαινυλαιθυλο- ομάδα ήταν παρόμοια, τα αρωματικά πρωτόνια του καφεουλο- τμήματος εμφανίστηκαν σε ελαφρώς χαμηλότερα πεδία λόγω του συζευγμένου διπλού δεσμού της πλευρικής αλυσίδας. Σύμφωνα με το φάσμα ^1H - ^1H COSY, υπάρχουν συσχετίσεις μεταξύ των βινυλικών πρωτονίων H-7' και H-8' της χαρακτηριστικής ομάδας του καφεϊκού οξέος με $J_{\text{trans}} = 16.0$ Hz. Αυτό επιβεβαιώνεται και από το φάσμα HMBC. Σε υψηλότερα πεδία εμφανίζονται τα πρωτόνια του φαινυλοαιθυλο- τμήματος. Στο φάσμα HMBC τα πρωτόνια αυτά δίνουν σήμα με ένα μεθυlenικό άνθρακα σε δ 36.4, που αντιστοιχεί στον άνθρακα C-7. Τα πρωτόνια των θέσεων 7 και 8 έχουν χαρακτηριστική τιμή στο φάσμα NMR και αποτελούν βασικά σήματα των φαινυλοαιθανοειδών γλυκοζιτών.



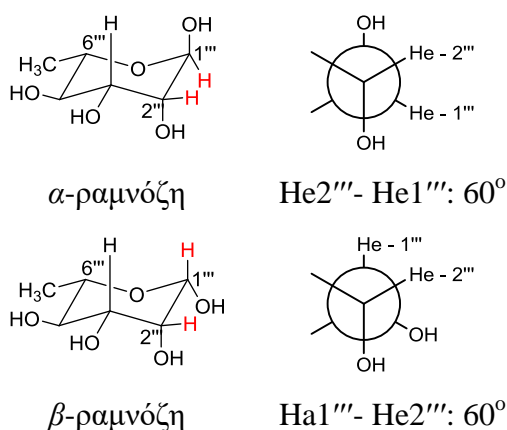
Σχήμα 2.9: Φάσμα ^1H NMR της ένωσης **48a**. Τμήμα φάσματος στην αρωματική περιοχή (6.1-7.7 ppm), (500 MHz, CD_3OD).

Η μετατόπιση του πρωτονίου H-4'' της γλυκόζης σε χαμηλότερα πεδία, έντονα αποθωρακισμένα σε δ 4.94 ppm οφείλεται στη σύζευξη με το καφεϊκό οξύ. Το ανωμερικό πρωτόνιο H-1'' της γλυκόζης εμφανίζεται ως μια διπλή κορυφή σε δ 4.38 ppm με γειτονική σύζευξη $J = 7.8$ Hz που υποδεικνύει αξονική αλληλεπίδραση. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.10, το σύστημα των αξονικών δεσμών, σχηματίζει διεδρη γωνία 180° μεταξύ H-1''-C1 - C2-H-2''. Επομένως, η διαμόρφωση του H-1'' της γλυκόζης αντιστοιχεί στο β -ανωμερές.

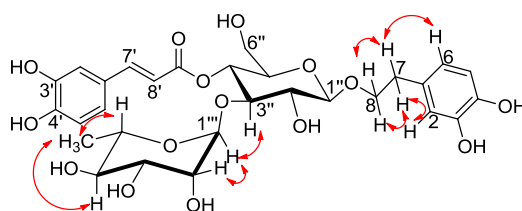


Σχήμα 2.10: Οι διαμορφώσεις των β και α ανωμερών της D-γλυκόζης και οι αντίστοιχες διεδρες γωνίες H-1'' - H-2''.^{215,216}

Τα πρωτόνια του μεθυλίου της ραμνόζης εμφανίζουν διακριτό σήμα στην αλειφατική περιοχή σε δ 1.09 ppm ως διπλή ενώ το ανωμερικό πρωτόνιο (H-1''') συντονίζεται σε δ 5.18 ppm ως ευρεία διπλή κορυφή με μια μικρή σταθερά σύζευξης (1.5 Hz). Σύμφωνα με την εξίσωση Karplus, μια μικρή γειτονική σταθερά σύζευξης μεταξύ των H-1''' και H-2''' αντιστοιχεί σε μια μεταξύ τους διεδρη γωνία περίπου 60° . Τόσο το α - όσο και το β -ανωμερές της ραμνόζης θα έδινε μια μικρή σταθερά σύζευξης όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.11. Ωστόσο, το φάσμα NOESY, έδειξε ότι το ανωμερικό πρωτόνιο της ραμνόζης είναι κοντά στο χώρο τόσο ως προς το H-3''' όσο και ως προς το H-2''', αλλά δεν αλληλεπιδρά στο χώρο με το H-3''' και βάσει της δομής του μορίου, η απουσία αυτής της αλληλεπίδρασης υποδηλώνει ότι η ραμνόζη σχηματίζει γλυκοζιτικό δεσμό μέσω του α -ανωμερικού υδροξυλίου (Σχήματα 2.11 και 2.12).

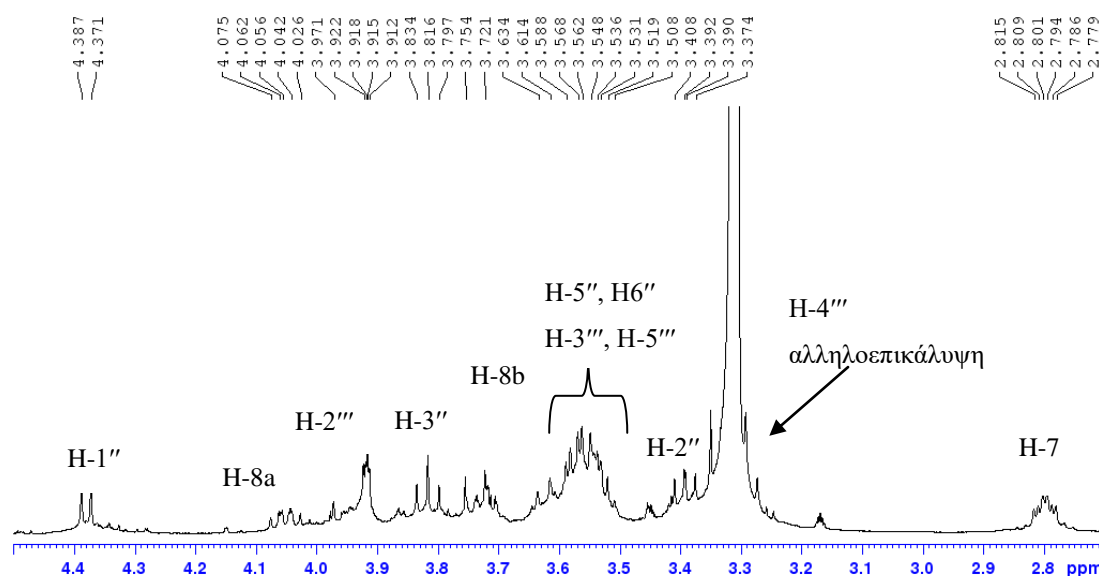


Σχήμα 2.11: Οι διαμορφώσεις των α και β ανωμερών της L-ραμνόζης και οι αντίστοιχες διεδρες γωνίες H-1''' - H-2'''.



Σχήμα 2.12: Επιλεγμένες συσχετίσεις NOESY του μεταβολίτη **48a**.

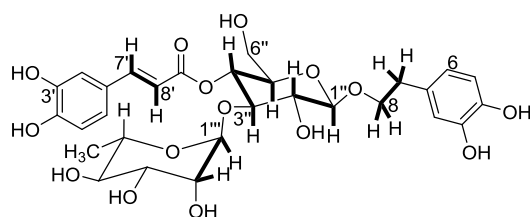
Το σύστημα σύζευξης των H-2''' και H-3''' είναι χαρακτηριστικό της ραμνόζης και επίσης χαρακτηριστική είναι η σχάση του μεθυλίου με το H-5''' ως διπλή κορυφή. Το H-2''' φέρει προσανατολισμό ως β-ισημερινό και συντονίζεται σε δ 3.92 ως μια διπλή της διπλής κορυφή ($J_1 = 3.1$, $J_2 = 1.6$ Hz). Όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.13, οι κορυφές που εμφανίζονται σε δ 3.57 (H-3''') και 3.52 (H-5''') είναι αλληλοεπικαλυπτόμενες με τα πρωτόνια H-5'' και H-6'' της γλυκόζης αντίστοιχα.



Σχήμα 2.13: Μεγέθυνση του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ στην περιοχή 2.70-4.50 ppm όπου εμφανίζονται τα πρωτόνια των σακχάρων του βερμπασκοσίδη **48a** (500 MHz, CD_3OD).

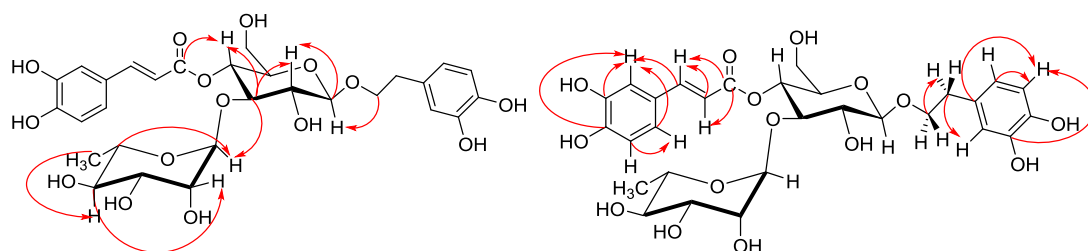
Από την συσχέτιση του ανωμερικού πρωτονίου της ραμνόζης στο φάσμα COSY (Σχήμα 2.14) παρατηρήσαμε αλληλεπίδραση με το H-2''' σε δ 3.92 ppm. Αντίστοιχα το ανωμερικό πρωτόνιο της γλυκόζης συσχετίζεται με την κορυφή σε δ 3.39 ppm (H-2''). Το H-4'' αλληλεπιδρά με δύο απορροφήσεις σε δ 3.81 ppm (H-3'')

και δ 3.54 ppm (H-5''). Επομένως, η τριπλή κορυφή στο δ 3.81 ppm αντιστοιχεί στο H-3''. Το πρωτόνιο, H-7 σε δ 2.79 ppm σχετίζεται με τις δυο απορροφήσεις του H-8, σε δ 3.73 ppm, και δ 4.04 ppm. Αυτά τα δύο πρωτόνια του H-8 συσχετίζονται το ένα με το άλλο όπως φαίνεται στο COSY. Επιπλέον, το φάσμα HSQC έδειξε ένα σήμα C σε δ 71.9 ppm που αλληλεπιδρά με τα σήματα του H-8. Επίσης από το HSQC παρατηρήσαμε, επιπλέον δύο διαστερεοτοπικά πρωτόνια (H-6'') με διαφορετικές χημικές μετατοπίσεις που ανήκουν στην ομάδα μεθυλενίου της γλυκόζης και συσχετίζονται με τον άνθρακα στα 62.2 ppm.



Σχήμα 2.14: Επιλεγμένες συσχετίσεις COSY όπως παρατηρούνται με έντονη επισήμανση.

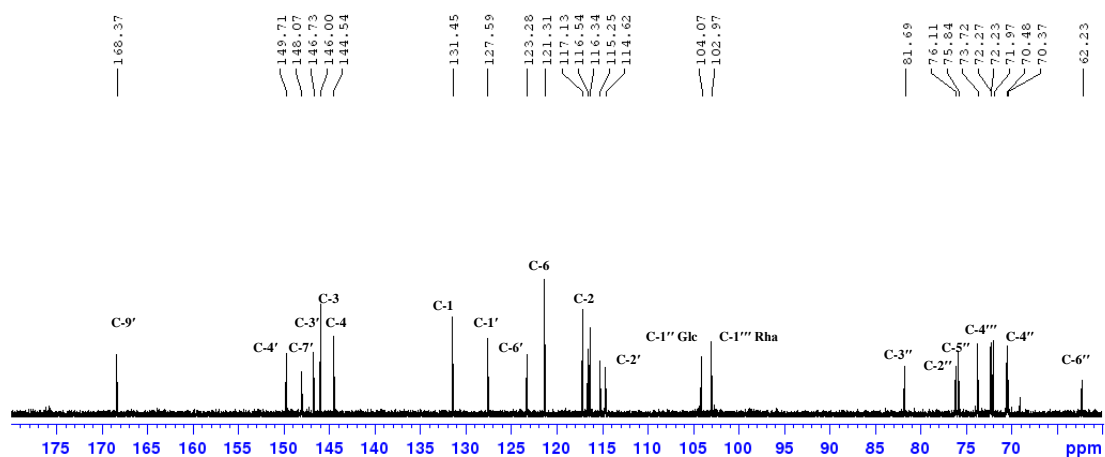
Οι χημικές μετατοπίσεις του άνθρακα μπορούν να ανατεθούν από τα φάσματα HSQC και HMBC (Σχήμα 2.15). Το φάσμα του $^{13}\text{C-NMR}$ έδειξε 29 σήματα άνθρακα με τρία σήματα CH_2 και έξι σήματα τεταρτοταγούς άνθρακα (Σχήμα 2.16). Τρία τεταρτοταγή άτομα άνθρακα ανήκαν στη διυδροξυφαιναιθυλο ομάδα, (C-1, C-3 και C-4) όπως επιβεβαιώνεται και από το HMBC. Στο φάσμα HMBC, το H-7 συσχετίζεται με τέσσερα σήματα σε δ 131.4 ppm, 121.3 ppm, 117.1 ppm, και 71.9 ppm, συνεπώς, ο τεταρτοταγής άνθρακας C-1 πρέπει να δίνει σήμα σε δ 131.4 ppm. Ο C-3 δίνει σήμα σε δ 146.0 ppm και εμφανίζει μια ασθενή συσχέτιση στο HMBC με το πρωτόνιο H-6.



Σχήμα 2.15: Κύριες συσχετίσεις από το φάσμα HMBC του μεταβολίτη **48a**.

Τα άλλα τεταρτοταγή σήματα άνθρακα εμφανίστηκαν σε δ 127.6 ppm, 146.7 ppm, 149.7 ppm, και 168.4 ppm και ανήκουν στην ομάδα του καφεϊκού οξέος. Επίσης από το HMBC συσχετίστηκε ένα σήμα στο δ 168.4 ppm με τα τρία πρωτόνια H-7', H-8'

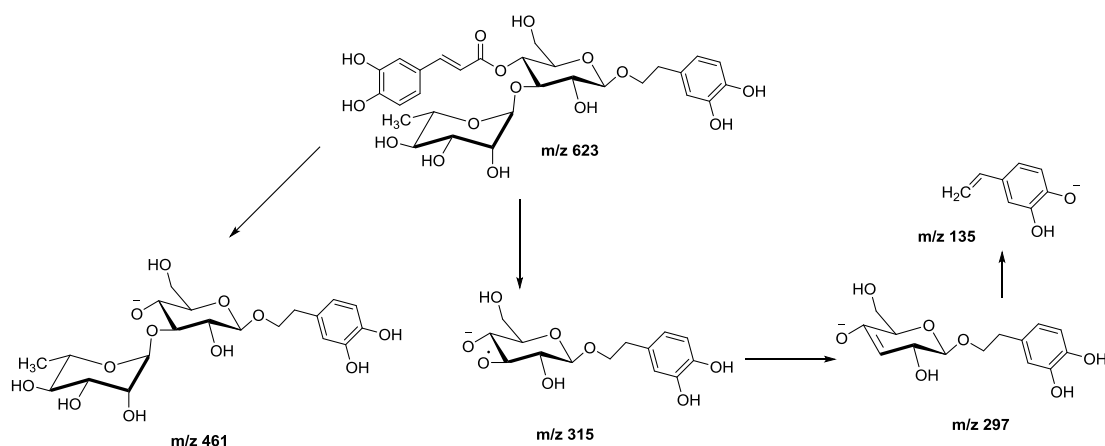
και H-4'', αναθέτοντας τον συγκεκριμένο συντονισμό στον άνθρακα του καρβονυλίου. Επίσης, το σήμα του C-1' στο δ 127.6 ppm έχει ισχυρή συσχέτιση με τα H-7', H-8', H-5'.



Σχήμα 2.16: Τμήμα φάσματος ^{13}C -NMR του βερμπασκοσίδη (**48a**) (500 MHz, CD_3OD).

Η ταυτοποίηση του συστατικού επιβεβαιώθηκε με σύγκριση φασμάτων NMR αντίστοιχων πειραματικών δεδομένων από προηγούμενες αναφορές.^{217,218,219}

Το ιόν της ένωσης (ESI-MS, αρνητικός ιονισμός) έδωσε το μητρικό ιόν $[\text{M}-\text{H}]^-$ $m/z = 623$, την απώλεια της ομάδας του καφεϊκού οξέος $m/z = 461$ που ακολουθήθηκε από τα ιόντα θραυσμάτωσης που αντιστοιχούν σε διαδοχικές απώλειες της ομάδας της ραμνόζης ($m/z = 315$ $[\text{M}-\text{H}-\text{caf}-\text{rham}]^-$), της απώλειας ύδατος από το θραύσμα $m/z = 297$ $[\text{M}-\text{H}-\text{caf}-\text{rham}-\text{H}_2\text{O}]^-$ και τελικά την απόσπαση του μορίου της γλυκόζης από το τελευταίο θραύσμα ($m/z = 135$ $[\text{M}-\text{H}-\text{caf}-\text{rham}-\text{glc}]^-$).



Σχήμα 2.17: Πορεία θραυσμάτωσης του βερμπασκοσίδη **48a**.

Ο βερμπασκοσίδης είναι ένας από τους πλέον διαδεδομένους φαινυλοαιθανοειδείς γλυκοζίτες. Απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1963 από το φυτό *Verbascum sinuatum*, Scrophulariaceae, από όπου πήρε το όνομα βερμπασκοσίδης.²²⁰

Μέχρι σήμερα, ο βερμπασκοσίδης έχει απομονωθεί κυρίως στο είδος *Verbascum*,²²¹ αλλά έχει επίσης βρεθεί σε περισσότερα από 200 είδη φυτών που ανήκουν σε 23 οικογένειες.^{222,223,224} Εκτός από την τάξη Lamiales απομονώθηκε και ταυτοποιήθηκε από την τάξη Asterales, την τάξη Cucurbitales, την τάξη Magnoliales.^{223,225} Στην οικογένεια Lamiaceae, έχει απομονωθεί από διάφορα γένη όπως: *Lamium*, *Marrubium*, *Scutellaria*, *Sideritis* και *Stachys*.²²⁶

Στο γένος *Phlomis*²²⁶ έχει απομονωθεί από τα είδη: *P. armeniaca*, *P. grandiflora* var. *grandiflora*, *P. aurea*, *P. longifolia* var. *longifolia*, *P. tuberosa*, *P. samia*, *P. physocalyx*, *P. lunariifolia*, *P. sintenisii*, *P. brunneogaleata*, *P. crinita*, *P. umbrosa*, *P. lanceolata*, *P. caucasica*, *P. amanica*, *P. carica*, *P. kotschyana*, *P. monocephala*, *P. sieheana*. Στο υβρίδιο είναι η πρώτη φορά που απαντάται αυτός ο μεταβολίτης.

Ο βερμπασκοσίδης χαρακτηρίζεται από μεγάλη βιολογική δραστηριότητα συμπεριλαμβανομένων των αντιοξειδωτικών,^{227,228,229} αντιφλεγμονωδών,^{230,231} ηπατοπροστατευτικών,²³² νευροπροστατευτικών,²³³ ανοσορυθμιστικών,²³⁴ αντικαρκινικών²³⁵ ιδιοτήτων και κατά της επίδρασης της νεφρίτιδας^{236,237}

Πίνακας 2.1: Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **48a**, (CD₃OD, 500 MHz).

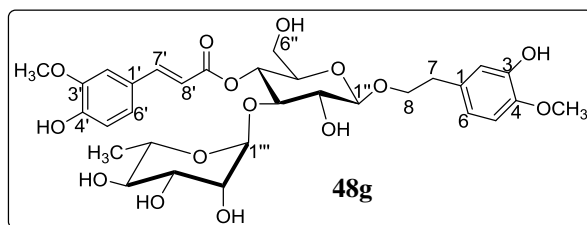
#	¹³ C	HSQC	DEPT-135	δ ¹ H	Πολλαπλότητα, (J, Hz)	COSY	NOESY	HMBC
Φαινυλοαίθυλο- ομάδα								
1	131.4	-	C	-	-	-	-	H-5, H-7, H-8a, H-8b
2	117.1	H-2	CH	6.69	d, J = 2.0 Hz, 1H	H-6	H-7	H-6, H-7
3	146.0		C	-	-	-	-	H-5
4	144.5		C	-	-	-	-	H-2, H-6
5	117.2	H-5	CH	6.67	d, J = 8.0Hz, 1H	H-6	-	-
6	121.3	H-6	CH	6.56	dd, J ₁ = 8.0, J ₂ = 2.0 Hz, 1H	H-2, H-5	-	H-2, H-5, H-7
7	36.4	H-7	CH ₂	2.79	ddt, J ₁ = 3.5, J ₂ = 7.3, J ₃ = 14.0 Hz, 2H	H-8a, H-8b	H-2, H-6, H-8a, H-8b	H-8, H-2, H-6
8	71.9	H-8a	CH ₂	4.04	m, 1H	H-7, H-8b	H-8	H-7, H-1''
		H-8b		3.73	m, 1H	H-7, H-8a	H-7	H-7, H-1''
Καφεόλο- ομάδα								
1'	127.6	-	C	-	-	-	-	H-5', H-7', H-8'
2'	114.6	H-2'	CH	7.05	d, J = 2.0 Hz, 1H	H-6'	-	H-6', H-7'
3'	146.7	-	C	-	-	-	-	H-2', H-5'
4'	149.7	-	C	-	-	-	-	H-2', H-5', H-6'
5'	116.5	H-5'	CH	6.78	d, J = 8.1 Hz, 1H	H-6'	-	H-6', H-7'
6'	123.3	H-6'	CH	6.95	dd, J ₁ = 8.3, J ₂ = 2.0 Hz, 1H	H-2', H-5'	-	H-2', H-5', H-7'
7'	148.0	H-7'	CH	7.59	d, J = 16.0 Hz, 1H	H-8'	H-8'	H-2', H-6'
8'	114.6	H-8'	CH	6.28	d, J = 16.0 Hz, 1H	H-7'	H-7'	H-7'
9'	168.4	-	C=O	-	-	-	-	H-7', H-8', H-4''
β-D-Γλυκόζη								
1''	104.0	H-1''	CH	4.38	d, J = 7.8 Hz, 1H	H-2''	H-2''	H-2'', H-8b
2''	76.1	H-2''	CH	3.39	dd, J ₁ = 9.0, J ₂ = 8.0 Hz, 1H	H-1'', H-3''	-	H-3'', H-4'', H-5''
3''	81.7	H-3''	CH	3.81	t, J = 9.3 Hz, 1H	H-4''	H-1'''	H-2'', H-4'', H-1'''
4''	70.5	H-4''	CH	4.94	t, J = 9.8 Hz, 1H	H-3'', *H-5''	-	H-3'', H-5'', H-1'''
5''	75.8	H-4''	CH	3.54	m, 1H	H-4'', H-6''	-	H-3'', H-4''
6''	62.2	H-6a''	CH ₂	3.63	d, J = 10.0 Hz, 1H	*H-5'', H-6b''	-	H-4''
		H-6b''		3.51	d, J = 10.0 Hz, 1H	*H-5'', H-6a''	-	H-4''
α-L-Ραμνόζη								
1'''	103.0	H-1'''	CH	5.18	d, J = 1.5 Hz, 1H	H-2'''	H-3'', H-2'''	H-3''
2'''	72.3	H-2'''	CH	3.92	dd, J ₁ = 3.1, J ₂ = 1.6 Hz, 1H	H-1'''	H-1'''	H-1''', *H-4'''

#	¹³ C	HSQC	DEPT-135	δ ¹ H	Πολλαπλότητα, (J, Hz)	COSY	NOESY	HMBC
3'''	72.2	H-3'''	CH	3.57	dd, J ₁ = 3.5, J ₂ = 9.6 Hz, 1H	H-4''', *H-5'''	H-5'''	H-1''', *H-4'''
4'''	73.7	H-4'''	CH	*3.28	d, J = 9.6 Hz, 1H	*H-5'''	H-6'''	H-2''', H-5'''
5'''	70.3	H-5'''	CH	*3.52	m, 1H	*H-4''', *H-6'''	H-6'''	H-1''', H-6'''
6'''	18.4	H-6'''	CH ₃	1.09	d, J = 6.2 Hz, 3H	*H-5'''	H-4''', *H-5'''	H-4'''

*unclear due to overlapping

2.2.2. Μεταβολίτης: Μαρτυνοσίδης

[(2*R*,3*R*,4*R*, 5*R*, 6*R*)-5-Υδροξυ-6[2-(3-υδροξυ-4-μεθοξυφαινυλο) αιθοξυ]-2-(υδροξυμεθυλο)-4-[(2*S*, 3*R*, 4*R*, 5*R*, 6*S*)-3,4,5-τριυδροξυ-6-μεθυλοξαν-2-υλο]οξυοξάν-3-υλο] εστέρας του (*E*)-3-(4-υδροξυ-3-μεθοξυφαινυλο)προπ-2-ενοϊκού οξέος.



Απομόνωση Μεταβολίτη

Απομονώθηκε με μορφή ελαίου από το κλάσμα του οξικού αιθυλεστέρα του μεθανολικού εκχυλίσματος των ανθέων με χρωματογραφία στήλης (C.C., 382.4 mg) επί γέλης πυριτίας και εντοπίστηκε στο κλάσμα CMX-CR (13.5 mg).

Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός

Από τα φάσματα ^1H και ^{13}C NMR της ένωσης του μαρτυνοσίδη (**48g**) διαπιστώσαμε ότι τα φάσματα έχουν παρόμοια σήματα με το **48a** εκτός από δυο ξεχωριστά σήματα στο φάσμα ^1H NMR. Σε δ 3.81 και 3.89 ppm εμφανίζονται δύο απλές κορυφές που η καθεμία αντιστοιχεί σε τρία πρωτόνια, που συσχετίζονται στο HSQC με τα αντίστοιχα σήματα ^{13}C σε δ 56.5 και 56.6 ppm. Συνεπώς, αυτή η ένωση είναι παράγωγο του βερμπασκοσίδη υποκατεστημένο με δύο μεθοξυ- ομάδες.

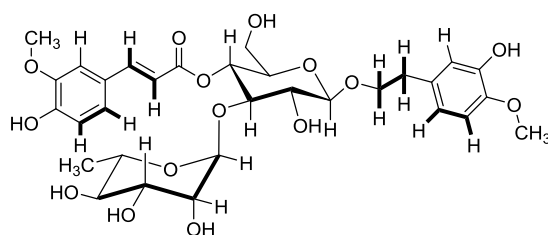
Στο φάσμα πρωτονίου ^1H -NMR, επίσης, παρατηρούνται χαρακτηριστικά τα σήματα του ανωμερικού πρωτονίου της ραμνόσης σε δ 5.19 (d, $J = 2.0$ Hz) και της γλυκόζης δ 4.37, (d, $J = 8.0$ Hz) ως διπλές κορυφές. Στα φάσματα HMBC και NOESY δεν υπήρξε συσχέτιση μεταξύ των δύο μεθοξυ-ομάδων γεγονός που υποδηλώνει την υποκατάσταση σε διαφορετικούς αρωματικούς δακτυλίους. Παρακάτω στα Σχήματα 2.18 -2.20 παρουσιάζονται οι σημαντικότερες συσχετίσεις της ένωσης.

Στο HMBC η απλή κορυφή σε δ 3.81 ppm ($-\text{OCH}_3$) συσχετίστηκε με τους ^{13}C στα 147.5 ppm (C-3) και 147.6 ppm (C-4). Επίσης εμφανίστηκε στο NOESY μια συσχέτιση με τη διπλή κορυφή σε δ 7.19 ppm (H-5).

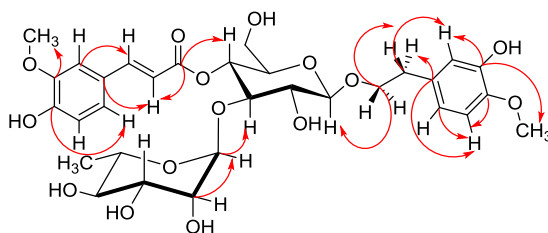
Αντίστοιχα, η άλλη απλή κορυφή σε δ 3.89 ppm στο NOESY συσχετίστηκε με το ^1H σε δ 7.20 ppm (H-2') της φερουλόυλο ομάδας.

Σύγκριση των φασμάτων του μαρτυνοσίδη και του βερμπασκοσίδη δείχνει ότι στο πρώτο, λόγω της υποκατάστασης με μεθοξυ- ομάδες, τόσο ο C-5 (της διυδροξυφαινυλαιθυλομάδας) όσο και ο C-2' (της καφεοϋλο- ομάδας) εμφανίζονται σε δ 112.9 ppm και 111.8 ppm αντίστοιχα, σε σύγκριση με τον βερμπασκοσίδη, όπου οι αντίστοιχοι άνθρακες εμφανίζονται σε δ 117.2 ppm (C-5) και 114.62 ppm (C-2').

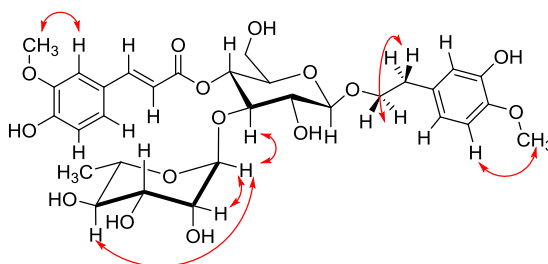
Οι φασματοσκοπικές ενδείξεις για τις συνδέσεις των σακχάρων και τις διαμορφώσεις τους στο μόριο του μαρτυνοσίδη είναι οι αντίστοιχες με αυτές που περιγράφονται παραπάνω στον βερμπασκοσίδη (**48a**).



Σχήμα 2.18: Σημαντικότερες αλληλεπιδράσεις COSY του μαρτυνοσίδη **48g** (έντονη επισήμανση).



Σχήμα 2.19: Σημαντικότερες αλληλεπιδράσεις HMBC του μαρτυνοσίδη **48g**.



Σχήμα 2.20: Σημαντικότερες αλληλεπιδράσεις NOESY του μαρτυνοσίδη **48g**.

Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα του μαρτυνοσίδη παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.2. Η ταυτοποίηση του συστατικού που απομονώθηκε επιβεβαιώθηκε με τη σύγκριση φασματοσκοπικών δεδομένων από προηγούμενες αναφορές.²³⁸

Ο μεταβολίτης απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1978 από το φυτό *Martynia louisiana* (Martyniaceae) και ονομάστηκε ως μαρτυνοσίδη.²³⁹ Έχει απομονωθεί και ταυτοποιηθεί σε πολλά είδη διαφόρων οικογενειών όπως Verbenaceae, Acanthaceae,

Buddlejaceae, Bignoniaceae, Pedaliaceae, Scrophulariaceae και Plantaginaceae.^{240,241,242,243} Στο γένος *Phlomis* έχει απομονωθεί στα είδη *P. physocalyx*, *P. linearis*, *P. sintenisii*, *P. integrifolia* και *P. viscosa*, ενώ στο υβρίδιο απομονώθηκε για πρώτη φορά. Στην ίδια οικογένεια (Lamiaceae), εκτός από το *Phlomis*, απαντώνται ενδεικτικά και στα είδη: *Leonotis nepetefolia*, *Scutellaria salviifolia*, *Galeopsis pubescens*, *Sideritis perfoliata* και *Marrubium vulgare*, *M. alysson*, *M. cylleneum*, *M. Velutinum*.^{244,245,246}

Ο μαρτυνοσίδης χαρακτηρίζεται από ισχυρή βιολογική δραστηριότητα συμπεριλαμβανομένης της αντιοξειδωτικής.²⁴⁷ Ελέγχθηκε για την αγχολυτική,²⁴³ αντιπεργλυκαιμική δράση, την αντιπολλαπλασιαστική δραστηριότητα στον ανθρώπινο γαστρικό καρκίνωμα (MGC-803)²⁴⁸ και για την ανθελονοσιακή δράση.²⁴⁹

Πίνακας 2.2: Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **48g**, (500 MHz, CD₃OD).

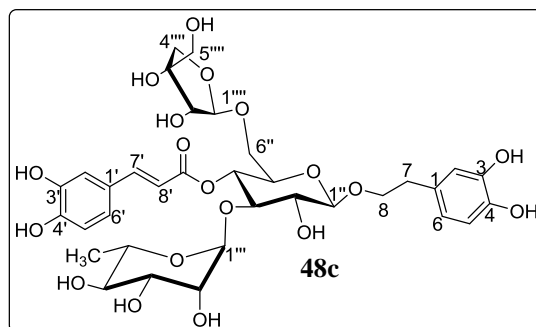
#	¹³ C	HSQC	DEPT 135	δ ¹ H	Πολλαπλότητα, (J, Hz)	COSY	NOESY	HMBC
Φαινυλοαίθυλο- ομάδα								
1	132.9	-	C	-	-	-	-	H-5, H-7
2	117.1	H-2	CH	6.74	d, J = 2.0 Hz, 1H	-	-	H-7
3	147.5	-	C	-	-	-	-	H-2, H-5, H-6, 4-OCH ₃
4	147.6	-	C	-	-	-	-	H-2, H-5, H-6, 4-OCH ₃
5	112.9	H-5	CH	7.19	d, J = 6.6 Hz, 1H	H-6	H-6, 4-OCH ₃	-
6	121.2	H-6	CH	6.69	dd, J ₁ = 8.0, J ₂ = 2.1 Hz, 1H	H-5	H-5	H-2, H-5, H-7
7	36.6	H-7	CH ₂	2.81	m, 2H	H-8a, H-8b	H-8a, H-8b	H-2
8	72.4	H-8a	CH ₂	4.03	m, 1 H	H-7, H-8b	H-7, H-8b	H-1'', H-7
		H-8b		3.75	m, 1 H	H-7, H-8a	H-7, H-8a	
Φερουλόυλο- ομάδα								
1'	127.7	-	C	-	-	-	-	H-5', H-8'
2'	111.8	H-2'	CH	7.20	d, J = 2.0 Hz, 1H	-	3'-OCH ₃	H-6', H- 7'
3'	149.4	-	C	-	-	-	-	H-2', H- 5', 3'-OCH ₃
4'	150.8	-	C	-	-	-	-	H-2', H- 5', H-6'
5'	116.5	H-5'	CH	6.84	d, J = 7.2 Hz, 1H	H-6'	H-6'	-
6'	124.4	H-6'	CH	7.09	dd, J ₁ = 8.3, J ₂ = 2.0 Hz, 1H	H-5'	H-5'	H-2'
7'	147.4	H-7'	CH	7.66	d, J = 16.0 Hz, 1H	H-8'	H-8'	H-2', H-6'
8'	115.2	H-8'	CH	6.37	d, J = 16.0 Hz, 1H	H-7'	H-7'	-
9'	168.2	-	C=O	-	-	-	-	H-7', H-8', H-4''
β-D-Γλοκόζη								
1''	104.3	H-1''	CH	4.37	d, J = 8.0 Hz, 1H	H-2''	-	H-2''
2''	76.2	H-2''	CH	3.38	dd, J ₁ = 9.2, J ₂ = 7.8 Hz, 1H	H-1''	-	H-3''
3''	80.6	H-3''	CH	3.80*	m, 1H*	H-4''*	-	H-2', H-1'''
4''	70.4	H-4''	CH	4.92	*	H-3''	-	H-3', H-1'''
5''	75.1	H-5''	CH	3.53	m, 1H*	-	-	H-3', H-4''
6''	62.4	H-6a''	CH ₂	3.64	m, 1H*	H-6b''	*	-
		H-6b''		3.53	m, 1H*	H-6a''	*	-
α-L-Ραμνόζη								
1'''	103.0	H-1'''	CH	5.19	d, J = 2.0 Hz, 1H	-	*H-3'', H-4'''	*H-3''
2'''	72.3	H-2'''	CH	3.91	dd, J ₁ = 5.5, J ₂ = 2.5 Hz, 1H	H-1'''	H-1'''	H-1'''

#	¹³ C	HSQC	DEPT 135	δ ¹ H	Πολλαπλότητα, (J, Hz)	COSY	NOESY	HMBC
3'''	72.0	H-3'''	CH	3.56	m, 1H*	-	-	-
4'''	73.7	H-4'''	CH	3.29	m, 1H*	-	-	H-6'''
5'''	70.9	H-5'''	CH	3.57	m, 1H*	-	-	H-6'''
6'''	18.4	H-6'''	CH ₃	1.09	d, J = 6.2 Hz, 3H	H-5'''	H-5'''	H-4'''
4-OCH ₃	56.5	4-OCH ₃	CH ₃	3.81	s, 3H	-	-	-
3'-OCH ₃	56.5	3'-OCH ₃	CH ₃	3.89	s, 3H	-	-	-

* unclear due to overlapping

2.2.3. Μεταβολίτης: Φορσυθοσίδης Β

4-(*E*)-*O*-D-Απιο-β-D-φουρανόζυλο-(1→6)-*O*-α-L-ραμνοπυρανοζυλο-(1→3)-β-D-γλυκοπυρανοζίτης-2-(3,4,διϋδροξυφαινυλο) αίθυλο εστέρας του [3-(3,4-διϋδροξυφαινυλο)-2-προπανοϊκού οξέος].



Απομόνωση Μεταβολίτη

Ο μεταβολίτης απομονώθηκε υπό μορφή ελαίου φαιού χρώματος. Εντοπίστηκε στα φύλλα, στα άνθη και στις ρίζες του φυτού. Στους διαχωρισμούς που ακολούθησαν προσδιορίστηκε στα ακόλουθα κλάσματα: α) στα φύλλα, κλάσμα βουτανόλης, (Bul-GLβ, 34.6 mg) με διαχωρισμό PTLC β) στα άνθη, (CMX-DV₄, 5.3 mg) μέσω HPLC, γ) στις ρίζες στο κλάσμα βουτανόλης, CORB-E₂ (9.5 mg), CORB-F₂ (40.6 mg), CORB-G₅ (8.0 mg) μετά από διαχωρισμό HPLC και CORB-Gβ (6.9 mg) μετά από PTLC. Τέλος ταυτοποιήθηκε και στο κλάσμα του οξικού αιθυλεστέρα από τις ρίζες με διαχωρισμό HPLC, CORE-M₁ (10.5 mg). Για τις αρχικές ποσότητες κάθε κλάσματος βλέπε στο πειραματικό μέρος.

Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων NMR (1D, 2D) και του φάσματος μαζών οδήγησε στον μοριακό τύπο C₃₄H₄₄O₁₉. Το φάσμα μαζών (ESI-MS) παρουσίασε ισχυρό [M-H]⁻ θραύσμα στα $m/z = 755.5$. Το θυγατρικό θραύσμα του ψευδομοριακού ιόντος σε $m/z = 755.5$ της ένωσης **48c**, έδειξε ένα έντονο ιόν σε $m/z = 593.7$ που αντιστοιχεί στην απώλεια της χαρακτηριστικής καφεούλο-ομάδας. Μέσω της επακόλουθης θραυμάτωσης αυτού του ιόντος MS³, ήταν δυνατόν να ληφθεί ένα ιόν σε $m/z = 461.5$ που προκύπτει από την απώλεια της μονάδας πεντόξης (απιόζη) μετά την απώλεια της καφεούλο-μονάδας. Επίσης προσδιορίστηκε και ένα θραύσμα σε $m/z = 447.5$ που προκύπτει από την απώλεια μίας μονάδας δεοξυεξόζης (ραμνόζη) μετά την απώλεια της καφεούλο-μονάδας.

Τα φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης φαίνονται στον Πίνακα 2.3. Οι συσχετίσεις έδειξαν ότι η ένωση **48c** είναι ένα ανάλογο των ενώσεων **48a** και **48g** με τρία τμήματα σακχάρου. Οι χημικές μετατοπίσεις συσχετίστηκαν με εκείνες του **48a** και ήταν παρόμοιες εκτός από ένα σύνολο πρόσθετων σημάτων που προκύπτουν από το σάκχαρο της β-απιόζης. Η παρουσία της απιόζης συνάγεται από τις χημικές μετατοπίσεις των σημάτων στα φάσματα ¹³C-NMR και DEPT-135 σε δ 111.1 (C-1'''), 78.1 (C-2'''), 80.6 (C-3'''), 75.1 (C-4''') και 65.7 (C-5'''). Η απιόζη συνδέεται με το C-6'' της γλυκοπυρανόζης γεγονός το οποίο προκαλεί μετατόπιση του συντονισμού του C-6'' σε δ 68.5 (χαμηλότερα πεδία συγκριτικά με τον βερμπασκοσίδη). Οι συσχετίσεις επιβεβαιώθηκαν από τα 2D φάσματα COSY, HSQC και HMBC.

Από την μελέτη του φάσματος ¹H-NMR, αρχικά παρατηρούνται έξι αρωματικά πρωτόνια, ως δύο συστήματα ABX σε δ 6.28-7.06 που ανήκουν στα τμήματα του άγλυκου και δύο πρωτόνια *trans* ολεφινικά ως σύστημα AB σε δ 6.28 και 7.60 (d, *J* = 15.7 Hz) που ανήκουν στο τμήμα του καφεϊκού οξέος. Επιπροσθέτως, παρατηρείται ένα βενζυλικό μεθυλένιο -CH₂ σε δ 2.80 ppm της αρωματικής πλευρικής αλυσίδας (H-7) και δυο μη ισοδύναμα διαστερεοτοπικά πρωτόνια σε τιμές δ 3.72 και 4.00 ppm (H-8), εμφανίζοντας τις χημικές μετατοπίσεις της πλευρικής αλυσίδας της φαιναιθυλομάδας όπως αναφέρθηκε στην ένωση **48a**.

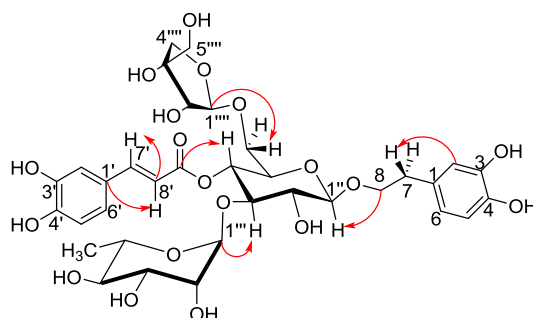
Επιπλέον, τρεις διπλές κορυφές ανωμερικών πρωτονίων έδειξαν τη τρισακχαριδική δομή της ένωσης. Αναγνωρίστηκαν τα τρία ανωμερικά πρωτόνια με δ 5.18 (d, *J* = 1.2 Hz, H-1''') της α-L-ραμνόζης που συνδέεται με την γλυκόζη, στα 4.90 (d, *J* = 2.2 Hz, H-1''') της β-D-απιόζης και στα 4.37 (d, *J* = 8.0 Hz, H-1'') της β-D-γλυκόζης που αλληλεπιδρούν με τους αντίστοιχους ανωμερικούς άνθρακες 103.1 (C-1'''), 111.1 (C-1'''), 104.3 (C-1''). Η παρουσία της ραμνόζης επιβεβαιώθηκε από τη διπλή κορυφή σε δ 1.08 του μεθυλίου H-6'''. Όπως, παρατηρήθηκε τόσο από το φάσμα ¹H-NMR όσο και από το HSQC, τα πρωτόνια της απιόζης στη θέση H-5'''' εμφανίζονται ως μία απλή κορυφή σε δ 3.54, δεδομένου ότι δεν έχουν γειτονικά πρωτόνια, ενώ τα πρωτόνια της θέσης H-4'''' ως διαστερεοτοπικά και εντός του δακτυλίου, εμφανίζονται χωριστά σε δ 3.91 και 3.73 ppm.

Η θέση ακυλίωσης από το καφεϊκό οξύ στο C-4 του μόριου της γλυκόζης έγινε αντιληπτή από το φάσμα ¹H-NMR, διότι το H-4'' εμφανίζεται αρκετά αποθωρακισμένο (δ 4.94, t, *J* = 9.4 Hz).

Αυτό που χαρακτηρίζει το φάσμα ¹H-NMR για την κατηγορία των

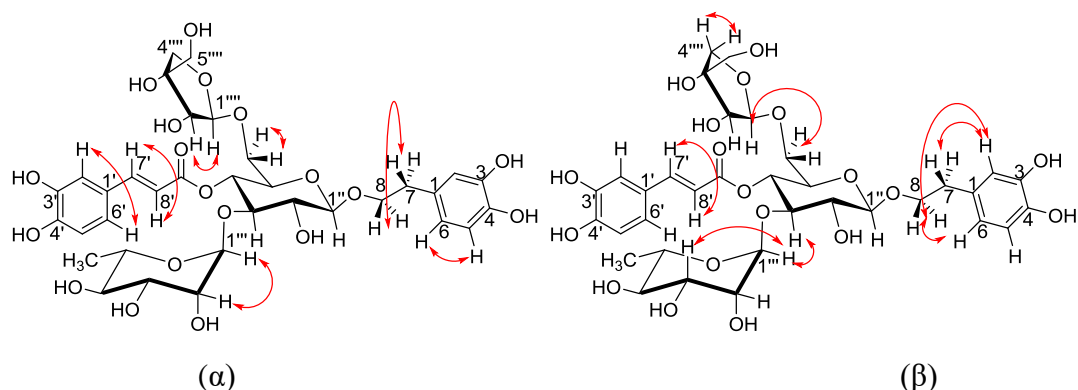
φαινυλοαιθανοειδών γλυκοζιτών είναι η χαρακτηριστική κορυφή των πρωτονίων H-7 περίπου σε δ 2.80.

Οι συντονισμοί μεταξύ του τμήματος ακυλίου, γλυκόζης, ραμνόζης και απιόζης διαπιστώθηκαν μέσω του HMBC όπου παρατηρήθηκαν οι συσχετίσεις μεταξύ των ακόλουθων πρωτονίων και ανθράκων: το ανωμερικό πρωτόνιο της ραμνόζης H-1''' συσχετίζεται με τον άνθρακα C-3'' της γλυκόζης, τα οποία υποδεικνύουν την σύνδεση όπως ραμνόζης 1''' \rightarrow 3'' με τη γλυκόζη. Επίσης, το ανωμερικό πρωτόνιο της γλυκόζης H-1'' συσχετίζεται με τον C-8 (72.1 ppm) και φαίνεται η θέση σύνδεσης με την φαιναιθυλο- ομάδα. Επιπλέον το H-4'' συνδέεται με τον άνθρακα του καρβοξυλίου της καφεοϋλο-ομάδας (C-9'). Μια σημαντική συσχέτιση είναι αυτή του C-6'' με το ανωμερικό πρωτόνιο της απιόζης H-1''''', όπως απεικονίζεται στο Σχήμα 2.21.



Σχήμα 2.21: Βασικότερες συσχετίσεις HMBC του μεταβολίτη **48c**.

Οι παραπάνω παρατηρήσεις επιβεβαιώνονται και από τα φάσματα NOESY και COSY, όπως απεικονίζεται στο Σχήμα 2.22.



Σχήμα 2.22: Βασικότερες συσχετίσεις COSY (α) και NOESY (β) του μεταβολίτη **48c**.

Με βάση τα παραπάνω και σύμφωνα με την βιβλιογραφία²⁵⁰ όλα τα δεδομένα

αντιστοιχούν με την ένωση **48c**, ως ο φορσυθοσίδης B.

Ο μεταβολίτης **48c** αναφέρεται ως ένας από τα κοινά συστατικά του γένους. Έχει ταυτοποιηθεί από 16 διαφορετικά είδη (βλ. Δρογοχημεία). Απομονώθηκε για πρώτη φορά από το φυτό *Forsythia koreana* (Oleaceae),²⁵¹ και πήρε το όνομα φορσυθοσίδης B. Συναντάται κυρίως στις οικογένειες Oleaceae (*Syringa reticulata*),²⁵² Lamiaceae (*Phlomis* sp., *Marrubium* sp., *Callicarpa* sp.),²⁵³ Scrophulariaceae (*Verbascum* sp.)²⁵⁴

Οι ενώσεις αυτής της κατηγορίας έχουν ευρύ φάσμα φαρμακολογικών δραστηριοτήτων, χαμηλότερη τοξικότητα και καλά χαρακτηριστικά ασφαλείας. Εκτεταμένες έρευνες έχουν αναδείξει θετικά αντιοξειδωτικά και αντιβακτηριακά αποτελέσματα. Έχει υπογραμμιστεί από διάφορους ερευνητές ότι ο μεταβολίτης **48c** εξασθενίζει την λιπώδη υπεροξειδωση μειώνοντας την επαγόμενη από λιποπρωτεΐνη έκκριση ενδοθηλίνης-1 μέσω αναστολής της δραστηριότητας COX-2 στα ενδοθηλιακά κύτταρα.^{143,254,255}

Πίνακας 2.3: Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **48c**, (CD₃OD, 500 MHz).

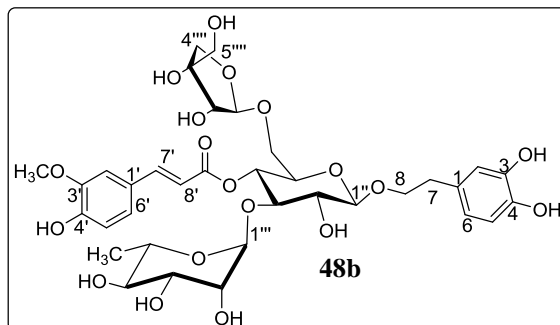
#	¹³ C	HSQC	DEPT-135	δ ¹ H	Πολλαπλότητα, (J, Hz)	COSY	NOESY	HMBC
Φαινυλοαιθύλιο- ομάδα								
1	131.4	-	C	-	-	-	-	H-5, H-7, H-8a, H-8b
2	117.1	H-2	CH	6.70	d, J = 2.0 Hz, 1H	H-6	H-7, H-8a, H-8b	H-6, H-7
3	146.1	-	C	-	-	-	-	H-2, H-5, H-6
4	144.7	-	C	-	-	-	-	H-2, H-6
5	116.5	H-5	CH	6.68	d, J = 8.0 Hz, 1H	H-6	-	H-6
6	121.3	H-6	CH	6.57	dd, J ₁ = 8.0 Hz, J ₂ = 2.0 Hz, 1H	H-2, H-5	H-7, H-8a, H-8b	H-2, H-5
7	36.6	H-7	CH ₂	2.80	m, 2H	H-8a, H-8b	H-2, H-6, H-8a, H-8b	H-6, H-2, H-8a, H-8b
8	72.1	H-8a	CH ₂	4.00	m, 1H	H-7, H-8b	H-2, H-6, H-7, H-8b	H-1'', H-7
		H-8b		3.72	m, 1H	H-7, H-8a	H-2, H-6, H-7, H-8a	H-1'', H-7
Καφεόυλιο- ομάδα								
1'	127.6	-	C	-	-	-	-	H-5', H-7', H-8'
2'	114.7	H-2'	CH	7.06	d, J = 2.0 Hz, 1H	H-6'	-	-
3'	146.8	-	C	-	-	-	-	H-2', H-5'
4'	149.8	-	C	-	-	-	-	H-2', H-5', H-6'
5'	117.2	H-5'	CH	6.78	d, J = 8.2 Hz, 1H	H-6'-	-	H-6'
6'	123.3	H-6'	CH	6.96	dd, J ₁ = 8.2 Hz, J ₂ = 2.0 Hz, 1H	H-5', H-2'	-	H-2', H-7'
7'	148.1	H-7'	CH	7.60	d, J = 15.7 Hz, 1H	H-8', H-6'	H-8'	H-2', H-6'
8'	115.2	H-8'	CH	6.28	d, J = 15.7 Hz, 1H	H-7'-	H-7'	H-6', H-7'
9'	168.2	-	C=O	-	-	-	-	H-7', H-8', H-4''
β-D-Γλοκόζη								
1''	104.3	H-1''	CH	4.37	d, J = 7.9 Hz, 1H	H-2'',	H-2''	H-8a, H-2'', H-5''
2''	76.2	H-2''	CH	3.38	dd, J ₁ = 8.9 Hz, J ₂ = 8.2 Hz, 1H	H-1'', H-3''	H-1''	H-3''
3''	81.7	H-3''	CH	3.80	t, J = 9.3 Hz, 1H	H-2'', H-4''	H-1'''	H-1''', H-2'', H-4''
4''	70.5	H-4''	CH	4.94	t, J = 9.4 Hz, 1H	H-3''	-	H-1''', H-3''
5''	75.1	H-5''	CH	3.73	m, 1H overlap	H-4'', H-6b''	-	H-4''
6''	68.5	H-6a''	CH ₂	3.74	m, 1H	H-5'', H-6b''	-	H-4'', H-1''''
		H-6b''		3.48	dd, J ₁ = 11.6 Hz, J ₂ = 6.42 Hz, 1H	H-5'', H-6a''	H-1''''	H-4'', H-1''''
α-L-Ραμνόζη								
1'''	103.1	H-1'''	CH	5.18	d, J = 1.5 Hz, 1H	H-2'''	H-3'', H-4''	H-3''
2'''	72.4	H-2'''	CH	3.91	m, 1H	H-1''', H-3'''	H-1''', H-3''	-

#	¹³ C	HSQC	DEPT-135	δ ¹ H	Πολυπλοκότητα, (J, Hz)	COSY	NOESY	HMBC
3'''	72.3	H-3'''	CH	3.55	dd, J ₁ = 9.35 Hz, J ₂ = 3.4 Hz, 1H	H-2''', H-4'''		-
4'''	73.8	H-4'''	CH	3.29	*d, J = 9.4 Hz, 1H	H-3''', H-5'''	H-6'''	H-5''', H-6'''
5'''	70.9	H-5'''	CH	3.56	*m, 1H	H-4''', H-6'''	H-6'''	H-1''', H-6''', H-3'''
6'''	18.5	H-6'''	CH ₃	1.08	d, J = 6.3 Hz, 3H	H-5'''	H-3''', H-5'''	H-4'''
β-D-Απιόζη								
1''''	111.1	H-1''''	CH	4.90	d, J = 2.2 Hz, 1H	H-4b''', H-2''''	H-6b'', H-4b''', H-2''''	H-2''', H-4b''', H-6a'', H-6b''
2''''	78.1	H-2''''	CH	3.86	d, J = 2.2 Hz, 1H	H-1''''	H-1''''	H-5''', H-4b''''
3''''	80.6	-	C	-	-	-	-	H-4b''''
4''''	75.1	H-4a''''	CH ₂	3.91	br d, J = 9.6 Hz, 1H	H-4b''', H-5''''	H-4b''''	H-5''''
		H-4b''''		3.73	d, J = 3.4 Hz, 1H	H-4a''', H-5''''	H-4a''''	H-5''''
5''''	65.7	H-5''''	CH ₂	3.54	br.s, 2H	H-4a''', H-4b''''	H-2''''	H-4a''', H-2''''

* unclear due to overlapping

2.2.4. Μεταβολίτης: Αλυσσονοσίδης

[2-(3,4-Διυδροξυφαινυλο)αιθυλο-*O*-[α -L-ραμνοπυρανοσυλο-(1''' \rightarrow 3'')]-*O*-[β -D-απιοφουρανοσυλο-(1 \rightarrow 6)]-(4''-*O*-*E*-φερουλόυλο)- β -D-γλυκοπυρανοζίτης]



Απομόνωση Μεταβολίτη

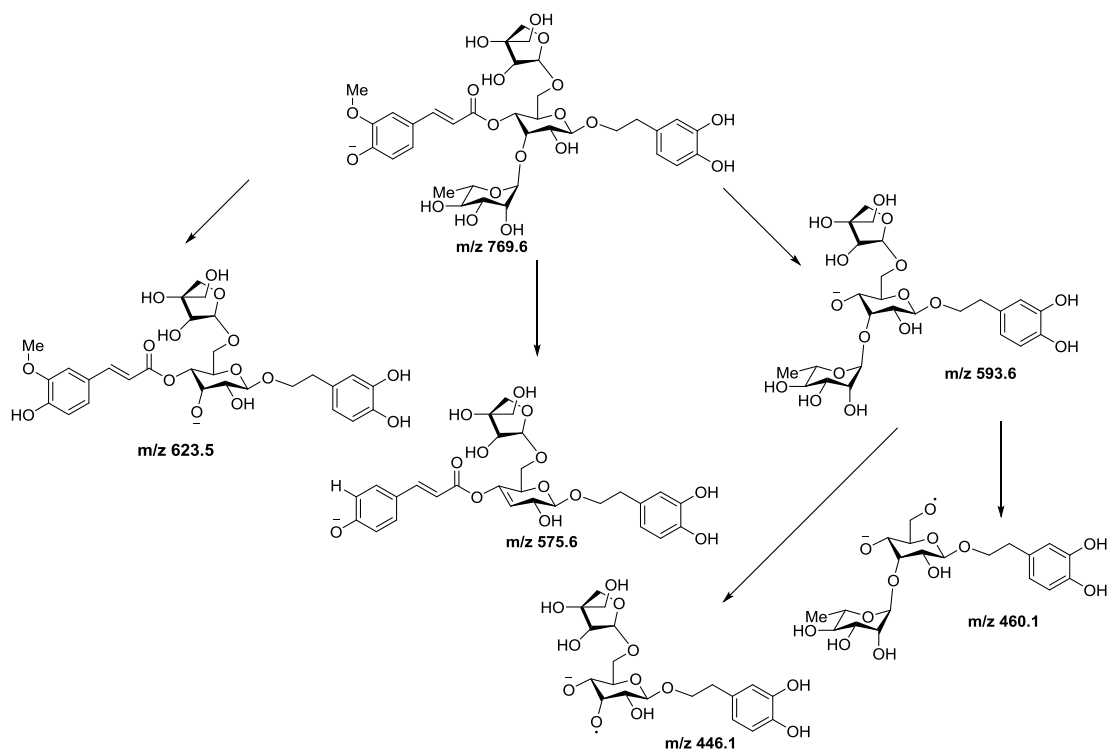
Ο μεταβολίτης απομονώθηκε υπό μορφή ελαίου καφέ χρώματος. Εντοπίστηκε στις ρίζες του φυτού. Στους διαχωρισμούς που ακολούθησαν με HPLC προσδιορίστηκε στα κλάσματα βουτανόλης CORB-E₃ (1.6 mg), CORB-E₄ (1.8 mg) και CORB-F₄ (1.8 mg).

Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων οδήγησε στην ταυτοποίηση της ένωσης. Από το φάσμα ¹H-NMR αρχικά θεωρήσαμε ότι πρόκειται για την ένωση **48c**. Προσεκτικότερη μελέτη του φάσματος αποκάλυψε ότι είναι σε πρόσμιξη με την ένωση **48c** σε αναλογία 1:0.6.

Το ιόν που παρατηρήθηκε στο φάσμα μαζών (ESI-MS, αρνητικός ιονισμός) της ένωσης **48b**, ήταν ισχυρό με $m/z = 769.6$ και συσχετίστηκε με το αποπρωτονιωμένο μοριακό ιόν. Το θραύσμα που παρατηρήθηκε σε $m/z = 593.6$ οφείλεται στην απώλεια της ακυλομάδας (μονάδα φερουλοϋλίου). Σε MS³ παρατηρήθηκαν ιόντα θραυσμάτωσης σε $m/z = 461.5$ [MH⁻176 (φερουλοϋλο) -132 (απιόζη)], $m/z = 447.1$ [MH⁻-176-146 (ραμνόζη)] και 315.0 [M⁻-132-146] παρόμοια με την ένωση **48c**, λόγω της απώλειας της πεντόζης, της δεσοξυεξόζης, της πεντόζης και της δεοξυεξόζης από το μητρικό ιόν, αντίστοιχα όπως απεικονίζεται στο παρακάτω Σχήμα 2.23.

Αντίστοιχα βιβλιογραφικά δεδομένα²⁵⁶ ταυτίζονται με τα φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης **48b** που απομονώσαμε.

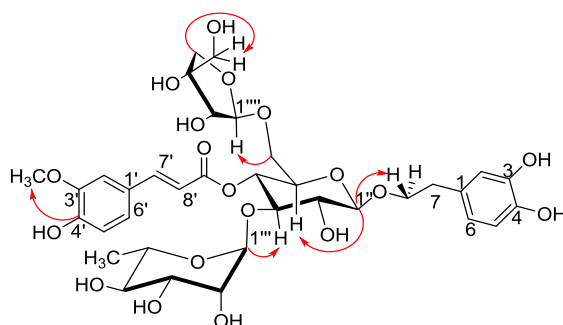


Σχήμα. 2.23: Υποθετικό μονοπάτι θραυσμάτωσης της ένωσης **48b** στο φάσμα μαζών.

Το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ παρουσίαζε αρκετές ομοιότητες με τον μεταβολίτη **48c**. Η ειδοποιός διαφορά είναι η ύπαρξη μιας $-\text{OCH}_3$ ομάδας στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ με δ 3.89 (H10'). Η ύπαρξη της $-\text{OCH}_3$ ομάδας επιβεβαιώθηκε περαιτέρω με πείραμα nOe, όπου συγκεκριμένα ακτινοβολώντας το πρωτόνιο στα 7.21 ppm (H-2'), μόνο η κορυφή στα 3.89 ppm ($-\text{OCH}_3$) εμφάνισε αύξηση σήματος.

Τα φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.4. Τα φάσματα ^1H και ^{13}C NMR αναλύθηκαν εκτενώς με τη βοήθεια των τεχνικών COSY, HSQC και HMBC. Το $^1\text{H-NMR}$ παρουσίασε σήματα πρωτονίων που είναι χαρακτηριστικές μιας *E*-φερουλοϋλο-ομάδας που δείχνει τρία αρωματικά πρωτόνια δ 7.21 (d, $J = 1.8$ Hz), 7.09 (dd, $J_1 = 8.0$, $J_2 = 2.0$ Hz), 6.81 (d, $J = 8.0$ Hz) ως σύστημα ABX και δύο *trans* ολεφινικά πρωτόνια ως σύστημα AB δ 7.65, 6.37 (d, $J = 16.0$ Hz). Το 3,4-διυδροξυφαινυλαίθυλο σύστημα δείχνει τρία αρωματικά πρωτόνια και δύο μη ισοδύναμα πρωτόνια της πλευρικής αλυσίδας του άγλυκου. Ομοίως, τρία σήματα μπορούν να αποδοθούν σε ανωμερικά πρωτόνια υποδεικνύουν την παρουσία τριών τμημάτων σακχάρου: μιας γλυκόζης που συνδέεται με τον ανωμερικό άνθρακα της απιόζης (H-1''') μέσω του C-6'' με τον αντίστοιχο ανωμερικό άνθρακα της ραμνόζης μέσω του C-3''' και με την αιθυλική αλυσίδα μέσω του C-1''. Το φερουλόυλο τμήμα συνδέεται στον C-4'' του μορίου της γλυκόζης. Από το φάσμα HMBC επιβεβαιώθηκε

η αλληλεπίδραση H και C για την σύνδεση της -OCH₃ με τον C-3', όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.24. Οι υπόλοιπες αλληλεπιδράσεις είναι αντίστοιχες με αυτές στην ένωση **48c**.



Σχήμα 2.24: Βασικότερες αλληλεπιδράσεις HMBC του μεταβολίτη **48b**.

Πίνακας 2.4: Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **48b**, (CD₃OD, 500 MHz).

#	¹³ C	HSQC	δ ¹ H	Πολλαπλότητα, (J Hz)	COSY	HMBC
Φαινυλοαίθυλο- ομάδα						
1	131.4	-	-	-	-	H-5, H-7, H-8a, H-8b
2	117.1	H-2	6.70	d, J = 2.1 Hz, 1H	H-6	H-6, H-7
3	146.8	-	-	-	-	H-2, H-6, H-5
4	144.7	-	-	-	-	H-2, H-6
5	116.9	H-5	6.68	d, J = 8.0 Hz, 1H	H-6	H-6
6	116.7	H-6	6.57	dd, J ₁ = 8.0 Hz, J ₂ = 2.0 Hz, 1H	H-2, H-5	H-2, H-5
7	36.9	H-7	2.80	ddt, J ₁ = 11.3, J ₂ = 7.2, J ₃ = 4.1 Hz, 2H	H-8a, H-8b	H-6, H-2, H-8a, H-8b
8	72.8	H-8a	4.00	m, 1H	H-7, H-8b	H-1'', H-7
		H-8b	3.72	m, 1H	H-7, H-8a	H-1'', H-7
Φερουλόυλο- ομάδα						
1'	127.6	-	-	-	-	H-5', H-7', H-8'
2'	112.4	H-2'	7.21	d, J = 1.8 Hz, 1H	H-6'	
3'	146.1	-	-	-	-	H-2', H-5'
4'	149.8	-	-	-	-	H-2', H-5', H-6', H-10'
5'	116.6	H-5'	6.81	d, J = 8.0 Hz, 1H	H-6'	H-6'
6'	124.8	H-6'	7.09	dd, J ₁ = 8.0 Hz, J ₂ = 2.0 Hz, 1H	H-5'	H-2', H-7'
7'	148.2	H-7'	7.65	d, J = 16.0 Hz, 1H	H-8'	H-2', H-6'
8'	115.1	H-8'	6.37	d, J = 16.0 Hz, 1H	H-7'	H-6', H-7'
9'	168.2	-	-	-	-	H-7', H-8', H-4''
10'	56.7	H-10'	3.89	s, 3H	H-2'	-
β-D-Γλυκόζη						
1''	104.3	H-1''	4.37	d, J = 7.9 Hz, 1H	H-2''	H-8a, H-5'', H-2''
2''	76.2	H-2''	3.38	dd, J ₁ = 9.0 Hz, J ₂ = 8.0 Hz, 1H	H-1'', H-3''	H-3''
3''	81.7	H-3''	3.80	t, J = 9.0 Hz, 1H	H-2'', H-4''	H-1''', H-2'', H-4''
4''	70.5	H-4''	4.94	t, 9.8 Hz, 1H	H-3'', H-5''	H-1''', H-3''
5''	75.1	H-5''	3.72	d, J = 9.5 Hz, 1H	H-4'', H-6b''	H-4''
6''	68.5	H-6a''	3.75	m, 1H	H-5'', H-6b''	H-4'', H-1''''
		H-6b''	3.48	br.d, J = 5.2 Hz, 1H	H-5'', H-6a''	H-4'', H-1''''

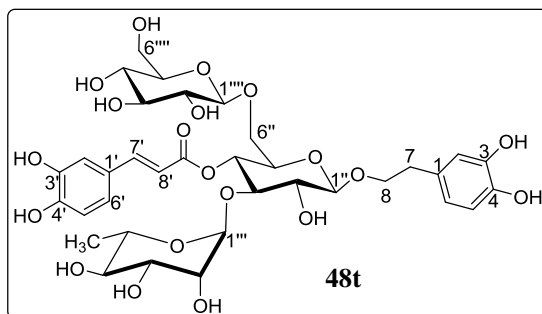
#	¹³ C	HSQC	δ ¹ H	Πολλαπλότητα, (J Hz)	COSY	HMBC
α-L-Ραμνόζη						
1'''	103.1	H-1'''	5.19	d, J = 1.67 Hz, 1H	H-2'''	H-3'''
2'''	72.4	H-2'''	3.90	m, 1H	H-1''', H-3'''	-
3'''	72.3	H-3'''	3.55	m, 1H	H-2''', H-4'''	-
4'''	73.8	H-4'''	3.28	dd, J ₁ = 9.1 Hz, J ₂ = 1.4 Hz, 1H	H-3''', H-5'''	H-5''', H-6'''
5'''	70.9	H-5'''	3.56	* overlap	H-4''', H-6'''	H-1''', H-6''', H-3'''
6'''	18.5	H-6'''	1.09	d, J = 6.0 Hz, 3H	H-5'''	H-4'''
β-D-Απιόζη						
1''''	111.1	H-1''''	4.90	d, J = 2.2 Hz, 1H	H-2''''	H-2''''', H-4b''''', H-6a''', H-6b'''
2''''	78.1	H-2''''	3.86	d, J = 2.1 Hz, 1H	H-1''''	H-5''''', H-4b''''
3''''	80.6	-	-	-	-	H-4b''''
4''''	75.1	H-4a''''	3.92	d, J = 9.4 Hz, 1H	H-4b''''', H-5''''	H-5''''
		H-4b''''	3.73	d, J = 9.5 Hz, 1H	H-4a''''', H-5''''	H-5''''
5''''	65.7	H-5''''	3.53	brs, 2H	H-4a''''', H-4b''''	H-4a''''', H-2''''

†Οι συσχετίσεις έγιναν με την βοήθεια HMBC και HSQC. Οι τεταρτοταγείς δεν παρατηρήθηκαν και εμφανίζονται οι τιμές τις βιβλιογραφίας.*unclear due to overlapping

Ο μεταβολίτης **48b** έχει απομονωθεί από τα φυτά του είδους *P. pungens* var. *pungens*, *P. umbrosa*, *P. angustissima*, *P. lycia*, *P. integrifolia*, *P. younghusbandii* και *P. viscosa*. Στην βιβλιογραφία αναφέρεται πρώτη φορά από το φυτό *Marrubium alysson* (Lamiaceae).²⁵⁷ Απαντάται σε πολλά είδη κυρίως της οικογένειας Lamiaceae (*Callicarpa* sp., *Marrubium* sp., *Phlomis* sp., *Ballota nigra*).^{253,258,259} Έχει μελετηθεί για την αντιοξειδωτική και αντιβακτηριακή του δράση αλλά και για την αναστολή της τυροσινάσης.²⁵⁹

2.2.5. Μεταβολίτης: Εχινakoσίδης

[(2*R*, 3*R*, 4*R*, 5*R*, 6*R*)-6-[2-(3, 4-Διυδροξυφαινυλο) αιθοξυ]-5-υδροξυ-2-[[[(2*R*, 3*R*, 4*S*, 5*S*, 6*R*)-3, 4, 5-τριυδροξυ-6-(υδροξυμεθυλ)οξαν-2-υλο] οξυμέθυλο]-4-[[[(2*S*, 3*R*, 4*R*, 5*R*, 6*S*)-3, 4, 5-τριυδροξυ-6-μεθυλοξαν-2-υλο]οξυοξάν-3-υλο] εστέρας του (*E*)-3-(3, 4-διυδροξυφαινυλο) προπ-2-ενοϊκού οξέος.



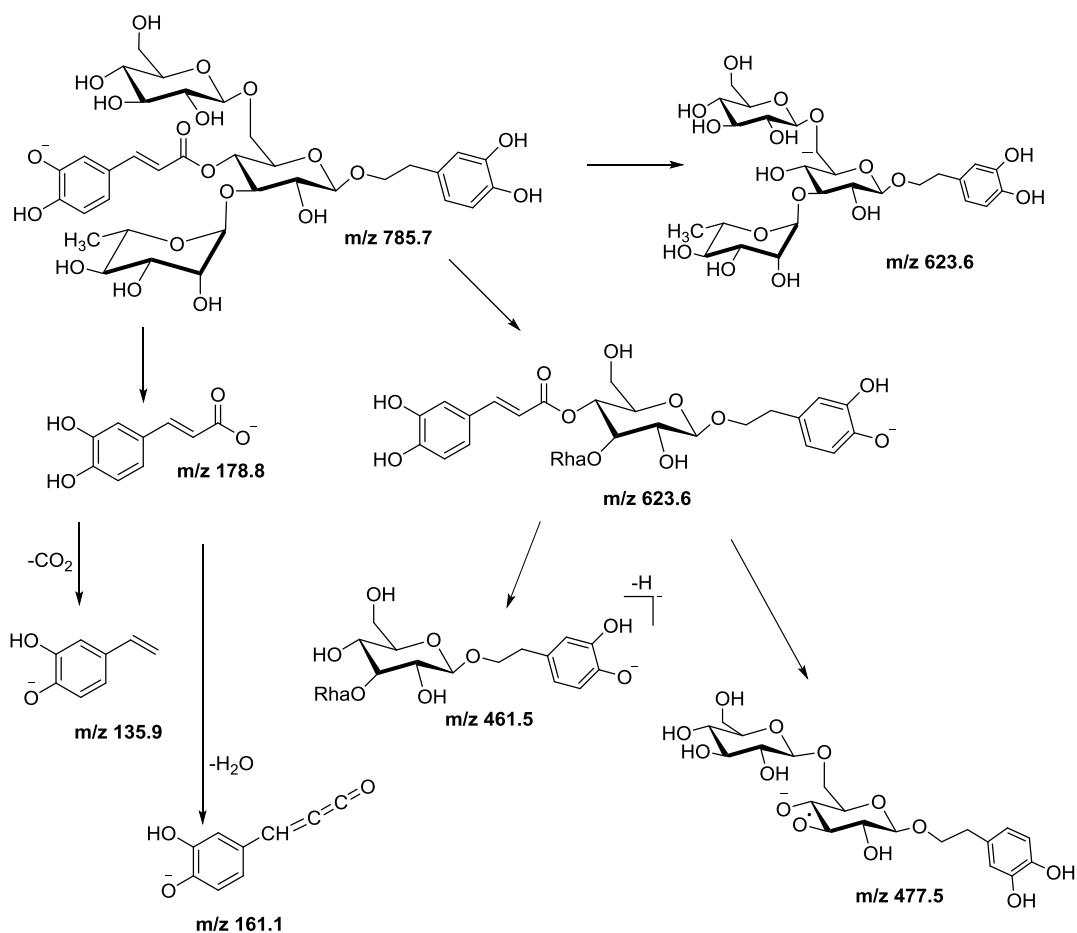
Απομόνωση Μεταβολίτη

Ο μεταβολίτης παραλήφθηκε από το κλάσμα CEAL-E₅ σε μορφή κόνεως υποκίτρινου χρώματος, 11.9 mg, μετά από διαχωρισμούς με HPLC. Συμπεριλαμβανόταν στο εκχύλισμα των φύλλων μετά από τις εκχυλίσεις με οξικό αιθυλεστέρα.

Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων NMR (1D, 2D) και του φάσματος μαζών οδήγησε στον μοριακό τύπο C₃₅H₄₆O₂₀.

Το φάσμα μαζών (ESI-MS, αρνητικός ιονισμός) παρουσίασε ισχυρό [M-H]⁻ θραύσμα στα *m/z* = 785.6. Με θραυσμάτωση MS/MS από το μητρικό ιόν [M-H]⁻ δημιουργήθηκε το βασικό ιόν με *m/z* = 623.6 το οποίο μπορεί να αποδοθεί είτε στην απώλεια ενός τμήματος γλυκόζης ή καφεϊκού οξέος από το αποπρωτονιωμένο μοριακό ιόν.²⁶⁰ Περαιτέρω θραυσμάτωση από το ιόν σε *m/z* = 623.6 [M-H]⁻ δίνει θραύσμα με *m/z* = 461.5 που μπορεί να αποδοθεί σε απώλεια τμήματος καφεϊκού οξέος. Το ιόν με *m/z* = 161.1 που παρατηρείται αποδίδεται σε απώλεια H₂O από ένα υπόλειμμα τμήματος καφεϊκού οξέος που εμφανίζεται στα *m/z* = 179. Επίσης, τα φάσματα μέσω MS/MS του ιόντος [M-2H]²⁻ έδειξαν δύο κύρια ιόντα στα *m/z* 178.8 και 135.9 που αντιστοιχούν σε ένα υπόλειμμα τμήματος καφεϊκού οξέος με απώλεια του μορίου CO₂. Στο Σχήμα 2.25 απεικονίζεται η προτεινόμενη πορεία θραυσμάτωσης του μεταβολίτη **48t**. Σε σύγκριση του φάσματος μαζών με βιβλιογραφικές πηγές²⁶¹ είναι σε συμφωνία με τα αντίστοιχα δικά μας δεδομένα.



Σχήμα 2.25: Προτεινόμενη θραυσμάτωση του μεταβολίτη **48t** στο φάσμα μαζών.

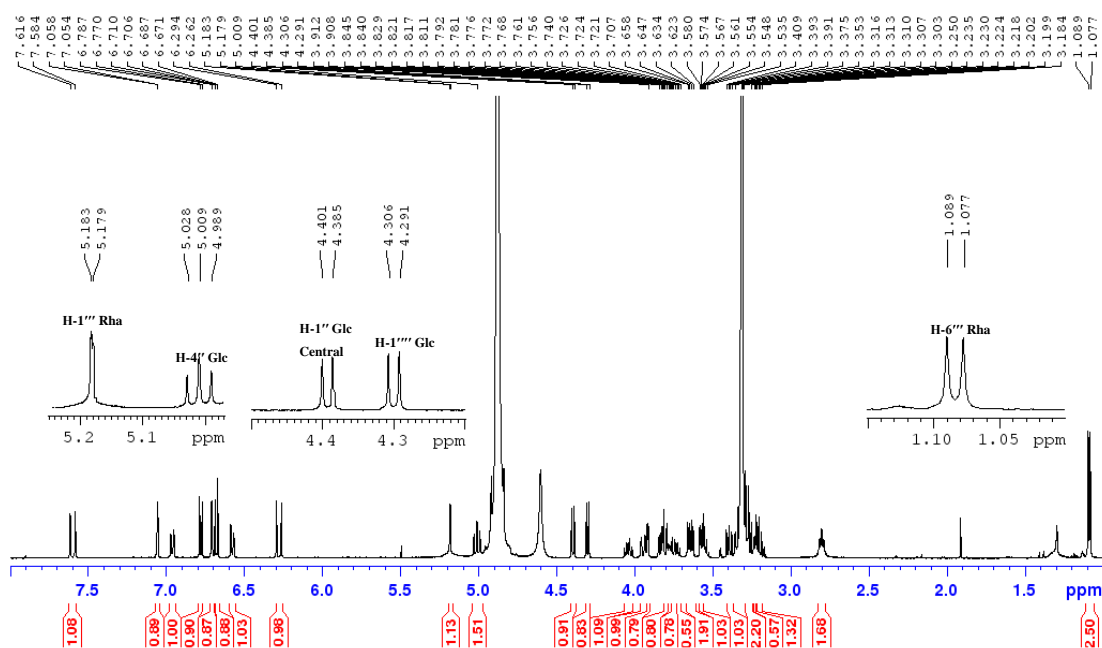
Παράλληλα, το φάσμα $^1\text{H-NMR}$, έδειξε μια ομοιότητα στην αρωματική περιοχή με τις ενώσεις **48a**, **48b**, **48g** και **48c** υποδηλώνοντας την παρουσία του *trans*-καφεϊκού οξέος και του 3,4-διυδροξυ φαινυλαίθυλου τμήματος.

Όμως αυτό που το διαφοροποιεί από τις πιθανές ισομερείς ενώσεις ήταν η ύπαρξη τριών ανωμερικών πρωτονίων ως διπλές κορυφές με δ 5.18 ($J = 1.7$ Hz), 4.39 ($J = 8.0$ Hz), 4.29 ($J = 7.8$ Hz). Από το φάσμα HSQC φαίνεται τα ανωμερικά αυτά πρωτόνια αλληλεπιδρούν με τους άνθρακες σε δ 103.1, 104.3 και 104.7, αντίστοιχα. Το φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ ήταν παρόμοιο με εκείνο της ένωσης **48c**, εκτός από έξι σήματα άνθρακα, λόγω της παρουσίας της ομάδας της γλυκόζης. Ο άνθρακας του μεθυλενίου C-6''' της τερματικής γλυκόζης (62.6 ppm) αλληλεπιδρά, όπως φαίνεται από το φάσμα HSQC, με τα πρωτόνια που απορροφούν σε δ 3.83 και 3.63.

Το κεντρικό μόριο της γλυκόζης συνδέεται μέσω γλυκοζιτικού δεσμού (H-1'', δ 4.39) με το φαινυλοαιθύλο τμήμα. Το μόριο είναι επιπλέον τριωποκατεστημένο στις θέσεις 3'', 4'' και 6''. Πρόκειται για β -γλυκόζη όπως προκύπτει από την σταθερά

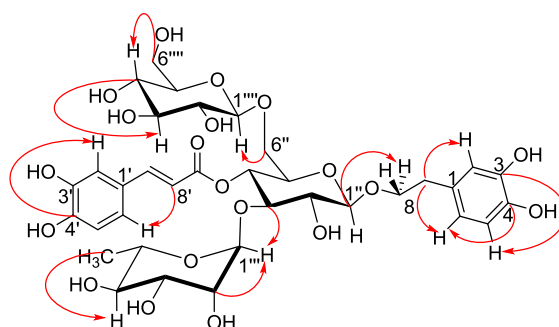
σύζευξης των H-1'' και H-2''. Το πρωτόνιο της θέσης H-4'' (t, $J = 9.6$ Hz) δηλώνει ότι πρόκειται για την θέση ακυλίωσης της γλυκόζης με το καφεϊκό οξύ όπως προκύπτει και από τις αλληλεπιδράσεις με το φάσμα HMBC. Τα πρωτόνια της θέσης H-6'' εμφανίζονται απομακρυσμένα και αποθωρακισμένα σε σχέση με τα αντίστοιχα πρωτόνια της ένωσης **48c** λόγω της γλυκοζιτικής σύζευξης της δεύτερης γλυκόζης. Αυτό γίνεται αντιληπτό και από το φάσμα HMBC όπου ο αντίστοιχος μεθυλενικός άνθρακας εμφανίζεται αποθωρακισμένος σε δ 69.4.

Το σάκχαρο της α -ραμνόςης στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ γίνεται αντιληπτό τόσο από το ανωμερικό πρωτόνιο H-1''' (δ 5.18 ppm) όσο και από την χαρακτηριστική διπλή κορυφή σε δ 1.08 ppm που αντιστοιχεί στα πρωτόνια του μεθυλίου (H-6'''). Το σημείο της σύνδεσης με την κεντρική γλυκόζη είναι ο C-3 όπως φαίνεται στο φάσμα HMBC όπου ο C-3'' της γλυκόζης συσχετίζεται με το ανωμερικό πρωτόνιο (H-1''') της ραμνόςης (Σχήμα 2.26).



Σχήμα 2.26: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του μεταβολίτη **48t**.

Ο μεταβολίτης αυτός χαρακτηρίστηκε ως η ένωση εχινακοσίδης, γεγονός που επιβεβαιώθηκε με τη σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων NMR με προηγούμενες βιβλιογραφικές αναφορές.^{262,263,264}



Σχήμα 2.27: Κυριότερες αλληλεπιδράσεις από το φάσμα HMBC του μεταβολίτη **48t**.

Ο μεταβολίτης **48t** στα φυτά του γένους *Phlomis* έχει απομονωθεί από το είδος *P. Brunneogaleata*. Είναι η δεύτερη φορά που απομονώνεται αυτό το φυσικό προϊόν στα φυτά του γένους *Phlomis*. Παρόλα αυτά πρώτη φορά ο μεταβολίτης χρονολογείται το 1950, όταν απομονώθηκε από τις ρίζες του φυτού *Echinacea angustifolia* (Asteraceae), όπου προέρχεται και το όνομα του.²⁶⁵ Αναφέρεται σε αρκετές οικογένειες φυτών που βιοσυνθέτουν φαινυλοαιθανοειδείς γλυκοζίτες, εκτός από τις Lamiaceae, στις Oleaceae, Orobanchaceae, Magnoliaceae και Scrophulariaceae.^{266,267,268} Χαρακτηρίζεται από φαρμακολογικές ιδιότητες αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις.²⁶⁹

Πίνακας 2.5: Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **48t**, (CD₃OD, 500 MHz).

#	¹³ C	HSQC	DEPT-135	δ ¹ H	Πολλαπλότητα, (J, Hz)	COSY	NOESY	HMBC
Φαινυλοαιθύλιο- ομάδα								
1	131.5	-	C	-	-	-	-	H-5, H-7, H-8
2	117.2	H-2	CH	6.70	d, J = 2.0 Hz, 1H	H-6	H-7	H-6, H-7
3	146.1	-	C	-	-	-	-	H-5
4	144.7	-	C	-	-	-	-	H-2, H-6
5	116.5	H-5	CH	6.67	d, J = 8.0 Hz, 1H	H-6	-	H-6, H-7
6	121.3	H-6	CH	6.57	dd, J ₁ = 8.0 Hz, J ₂ = 2.0 Hz, 1H	H-2	-	H-2, H-7
7	36.6	H-7	CH ₂	2.79	dt J = 7.2, J ₂ = 2.5 Hz, 1H	H-8a, H-8b	H-2, H-6, H-8a, H-8b	H-2, H-6, H-8a, H-8b
8	72.0	H-8a	CH ₂	4.03	m, 1H	H-7, H-8b	H-8	H-7, H-1''
		H-8b		3.73	m, 1H	H-7, H-8a	H-7	
Καφεόυλιο- ομάδα								
1'	127.6	-	C	-	-	-	-	H-5', H-7'
2'	115.2	H-2'	CH	7.06	d, J = 2.0 Hz, 1H	H-6'	-	H-6', H-8'
3'	146.9	-	C	-	-	-	-	H-2', H-5'
4'	149.9	-	C	-	-	-	-	H-2', H-5', H-6'
5'	116.3	H-5'	CH	6.77	d, J = 8.0 Hz, 1H	H-6'	-	H-6'
6'	123.3	H-6'	CH	6.96	dd, J ₁ = 8.35 Hz, J ₂ = 2.1 Hz, 1H	H-2, H-5'	-	H-2', H-8'
7'	114.7	H-7'	CH	7.60	d, J = 15.9 Hz, 1H	H-8'	H-8'	H-6', H-8'
8'	148.3	H-8'	CH	6.27	d, J = 15.9 Hz, 1H	H-7'	H-7'	H-2', H-6'
9'	168.5	-	C=O	-	-	-	-	H-4'', H-7', H-8'
Κεντρική β-D-Γλυκόζη								
1''	104.3	H-1''	CH	4.39	d, J = 8.0 Hz, 1H	H-2''	H-2''	H-8a, H-8b, H-2''
2''	76.2	H-2''	CH	3.39	dd, J ₁ = 9.17 Hz, J ₂ = 8.0 Hz, 1H	H-1'', H-3''	-	H-3''
3''	81.7	H-3''	CH	3.80	t, J = 9.2 Hz, 1H	H-2'', H-4''	H-1'''	H-2'', H-4'', H-1'''
4''	70.5	H-4''	CH	5.00	t J = 9.6 Hz, 1H	H-3''	-	H-5'', H-3'', H-1'''
5''	74.8	H-5''	CH	3.77	dd, J ₁ = 9.1 Hz, J ₂ = 2.3 Hz, 1H	H-4'', H-6a''	-	H-4'', H-6b''
6''	69.4	H-6a''	CH ₂	3.94	dd, J ₁ = 11.5 Hz, J ₂ = 2.0 Hz, 1H	H-5'', H-6b''	-	H-1''''
		H-6b''		3.63	d, J ₁ = 12.0 Hz, 1H	H-5'', H-6a''	-	
α-L-Ραμνόζη								
1'''	103.1	H-1'''	CH	5.18	d, J = 1.7 Hz, 1H	H-2'''	H-2''', H-3'''	H-2''', H-3''', H-5'''
2'''	72.4	H-2'''	CH	3.91	dd, J ₁ = 3.2 Hz, J ₂ = 1.7 Hz, 1H	H-1'''	H-1'''	H-1''', H-3'''

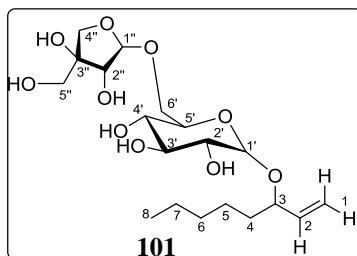
#	¹³ C	HSQC	DEPT-135	δ ¹ H	Πολλαπλότητα, (J, Hz)	COSY	NOESY	HMBC
3'''	72.4	H-3'''	CH	3.57	dd, J ₁ = 9.6 Hz, J ₂ = 3.2 Hz, 1H	H-4''', H-2'''	H-5'''	H-1''', H-2''', H-4'''
4'''	73.8	H-4'''	CH	3.28	d, J = 9.5 Hz, 1H	H-3'''	H-6'''	H-2''', H-3''', H-6'''
5'''	70.6	H-5'''	CH	3.56	dd, J ₁ = 9.6 Hz, J ₂ = 6.2 Hz, 1H	H-4''', H-6'''	H-6'''	H-1''', H-4''', H-6'''
6'''	18.4	H-6'''	CH ₃	1.08	d, J = 6.0 Hz, 3H	H-5'''	H-4''', H-5'''	H-4'''
Τερματική β-D-Γλυκόζη								
1''''	104.7	H-1''''	CH	4.29	d, J = 7.8 Hz, 1H	H-2''''	H-2'''' H-6a'', H-6b''	H-6a'', H-6b'', H-2''''
2''''	75.1	H-2''''	CH	3.20	dd, J ₁ = 9.1 Hz, J ₂ = 7.8 Hz, 1H	H-1''''	H-1''''	H-6b'', H-3''''
3''''	77.8	H-3''''	CH	3.22	t, J = 16.1 Hz, 1H	n.o. *overlap	*overlap	H-2''''
4''''	71.5	H-4''''	CH	3.26	m, 1H	n.o. overlap	overlap	H-3''''
5''''	77.9	H-5''''	CH	3.34	m, 1H	n.o. overlap	overlap	H-4''''
6''''	62.6	H-6a''''	CH ₂	3.82	m, 1H	H-6b''''	H-6b''''	H-4''''
		H-6b''''		3.65	d, J = 5.2 Hz, 1H	H-6a''''	H-6a''''	

*unclear due to overlapping, n.o.: not observed

2.3. ΑΛΛΥΛΙΚΟΙ ΓΛΥΚΟΖΙΤΕΣ

2.3.1. Μεταβολίτης:

3-O-β-(3R)-D-απιοφουρανοζυλο-(1→6)-O-β-D-γλυκοπυρανοζυλο-(3S)-οκτ-1-εν-3-όλη

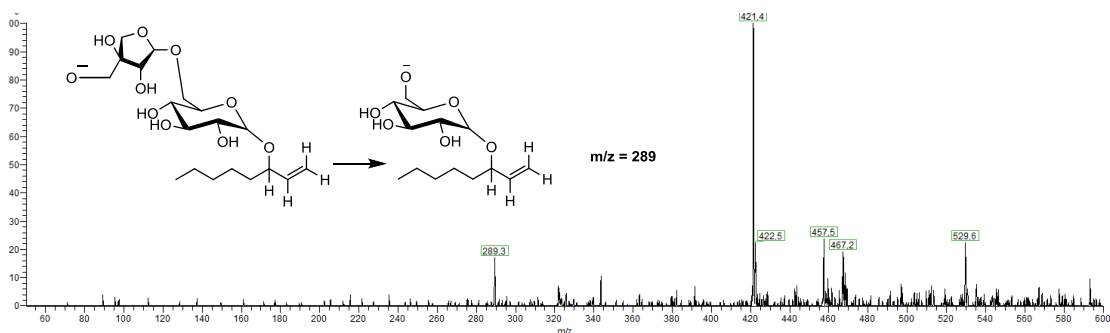


Απομόνωση Μεταβολίτη

Ο μεταβολίτης **101** παραλήφθηκε μετά από διαχωρισμό από το βουτανολικό εκχύλισμα των φύλλων (BUL-17.5 g) όπου υποβλήθηκε σε V.L.C. Από την χρωματογραφία επιλέχθηκε το κλάσμα BUL-G (1.726 g) που διαχωρίστηκε με σύστημα διαλυτών EtOAc:MeOH:H₂O/80:20:2.0. Περαιτέρω η ομάδα BUL-GH (104.5mg) επεξεργάστηκε με C.C., Sephadex LH-20 και παραλήφθηκε καθαρή η ένωση με διαχωρισμό HPLC (BUL-GH₁₃, 4.7 mg) ως άχρωμο υπόλειμμα.

Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός

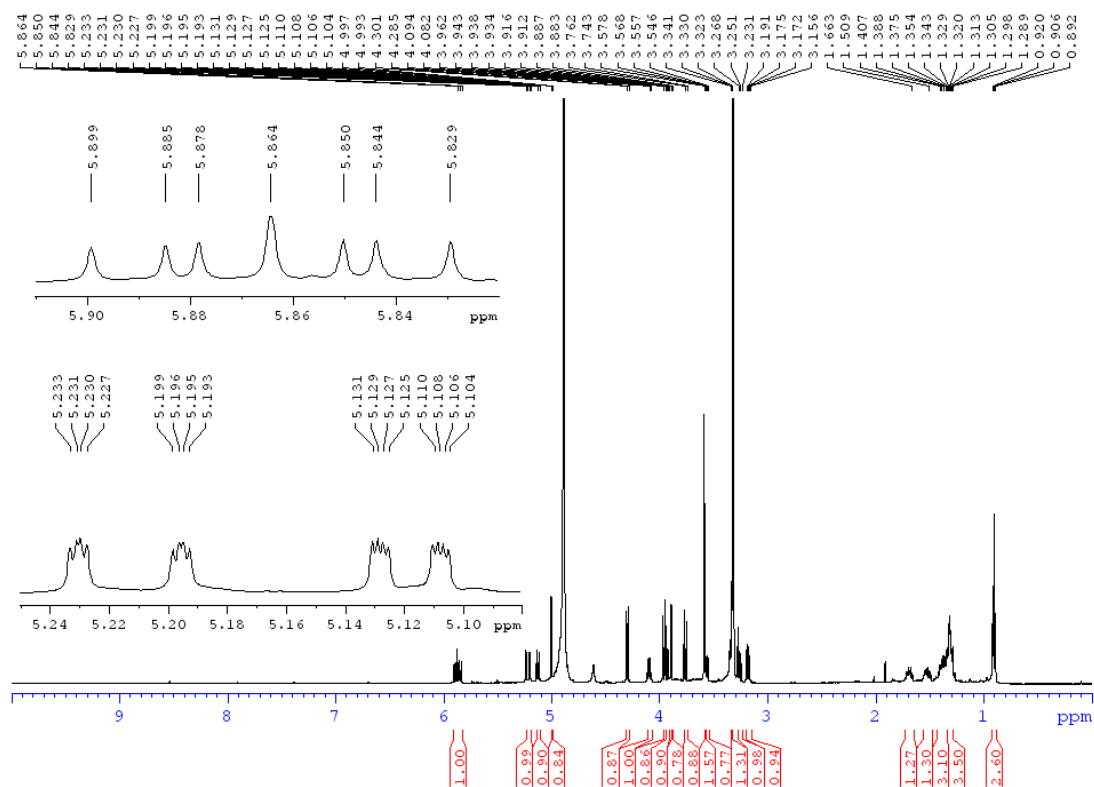
Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων NMR και του φάσματος μαζών υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRMS) οδήγησε στον μοριακό τύπο C₁₉H₃₄O₁₀ με μοριακό ιόν στα $m/z = 445.2044$ [M+HNa]⁺, (θεωρ. C₁₉H₃₄NaO₁₀ Exact Mass: 445.2050) για τον μεταβολίτη **101**. Παράλληλα, το φάσμα μαζών (ESI-MS, αρνητικός ιονισμός) παρουσίασε σαν βασική κορυφή το θραύσμα $m/z = 421.4$ [M-H]⁻. Χαρακτηριστική είναι η διάσπαση του γλυκοζιτικού O-δεσμού $m/z = 131.0$ της απιόξης που δίνει θραύσμα $m/z = 289.3$ [M-Apio-H]⁻.



Σχήμα 2.28: Φάσμα μαζών του μεταβολίτη **101**.

Κατόπιν έγινε ανάλυση των δεδομένων, των ομοπυρηνικών 1D NMR και ετεροπυρηνικών πειραμάτων 2D NMR. Το πιο χαρακτηριστικό σύστημα στο φάσμα πρωτονίου της ένωσης είναι αυτό των geminal (βινυλικών) πρωτονίων του ακραίου διπλού δεσμού τα οποία εμφανίζονται σε δ 5.21 και 5.11 ppm (Σχήμα 2.29).

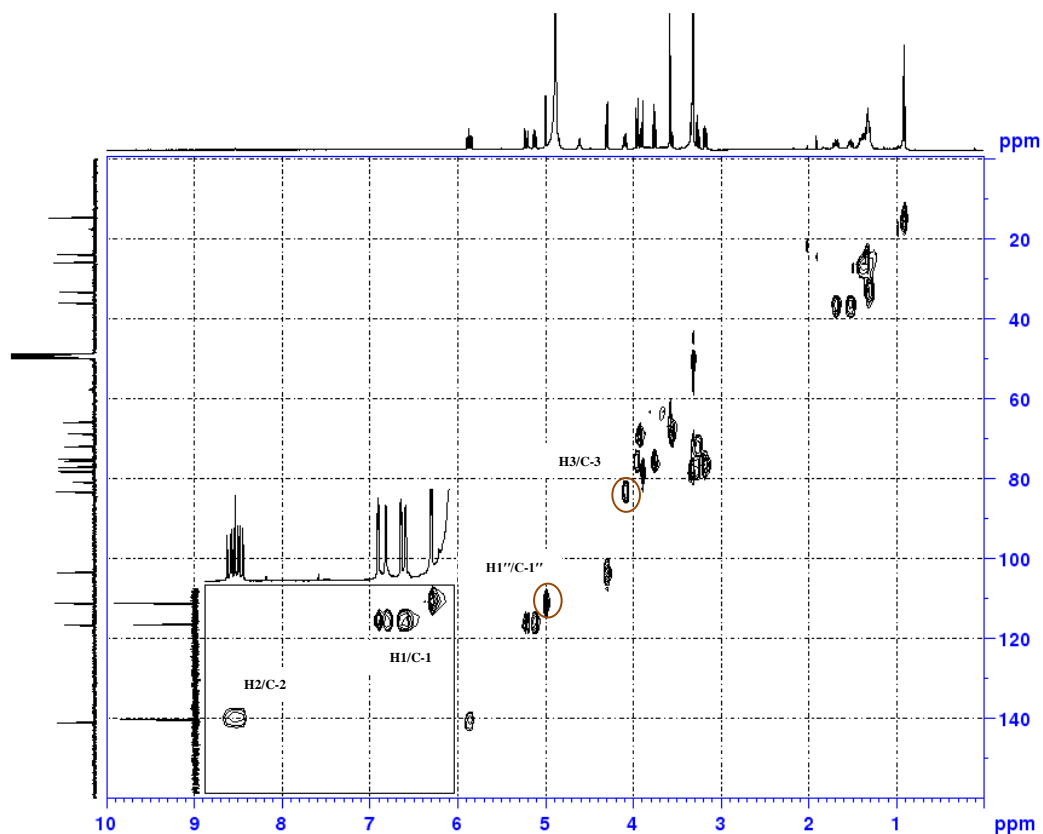
Το φάσμα HSQC επιβεβαίωσε την παρατήρηση συνδέοντας τα δύο πρωτόνια με τον δευτεροταγή ολεφινικό άνθρακα στα 116.3 ppm όπως φαίνεται παρακάτω στο Σχήμα 2.30. Η κορυφή στα 5.21 ppm εμφανίζεται σαν σύστημα ddd με *trans*-vicinal coupling $J_1 = 17.4$ Hz, allylic coupling $J_2 = 1.7$ Hz και geminal coupling $J_3 = 1.1$ Hz.



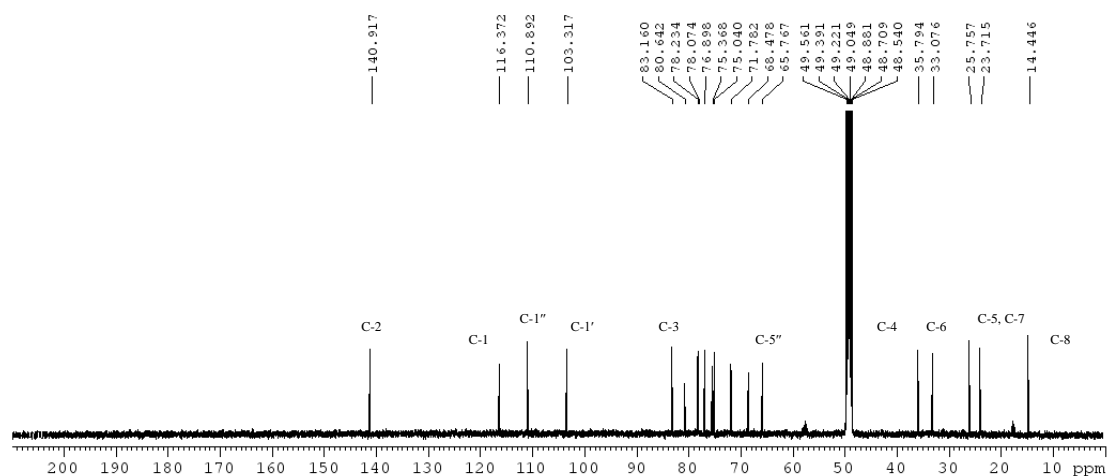
Σχήμα 2.29: Φάσμα ¹H-NMR του μεταβολίτη **101**, (CD₃OD, 500 MHz).

Η κορυφή στα 5.11 ppm εμφανίζεται επίσης σαν σύστημα ddd με *cis*-vicinal coupling $J_1 = 10.4$ Hz, allylic coupling $J_2 = 1.7$ Hz και geminal coupling $J_3 = 0.9$ Hz. Ο ολεφινικός άνθρακας C-2 εμφανίζεται στα 140.9 ppm με το αντίστοιχο πρωτόνιο στα 5.86 ppm. Το πρωτόνιο αυτό έχει επίσης το σύστημα ddd με *trans*-vicinal coupling $J_1 = 17.4$ Hz, *cis*-vicinal coupling $J_2 = 10.4$ Hz και μία τυπική τιμή $J_3 = 7.1$ Hz με το αλληλικό πρωτόνιο. Η υψηλή τιμή συντονισμού στην κλίμακα δ τόσο του αλληλικού πρωτονίου H₃ όσο και του *τριτοταγούς* αλληλικού άνθρακα C-3 (4.08 και 83.1 ppm, αντίστοιχα) είναι ενδεικτικά του γεγονότος ότι ο άνθρακας όπως είναι συνδεδεμένος με ετεροάτομο, στην πραγματικότητα με το επιμερικό οξυγόνο του

γλυκοζίτη, όπως θα αποδειχθεί παρακάτω. Το αλλυλικό πρωτόνιο είναι σε θέση «κλειδί» για την ταυτοποίηση του μορίου δεδομένου ότι αλληλεπιδρά μέσω του φάσματος HMBC (Σχήμα 2.32) τόσο με τους ολεφινικούς άνθρακες C-1 και C-2 όσο και με τους γειτονικούς αλειφατικούς δευτεροταγείς άνθρακες C-4 και C-5 με δ 35.8 και 25.7 ppm, αντίστοιχα.



Σχήμα 2.30: Φάσμα HSQC του μεταβολίτη **101**, (CD_3OD , 500 MHz). Στο ένθετο διακρίνεται η σύζευξη των H1 / C1 και H2 / C2.

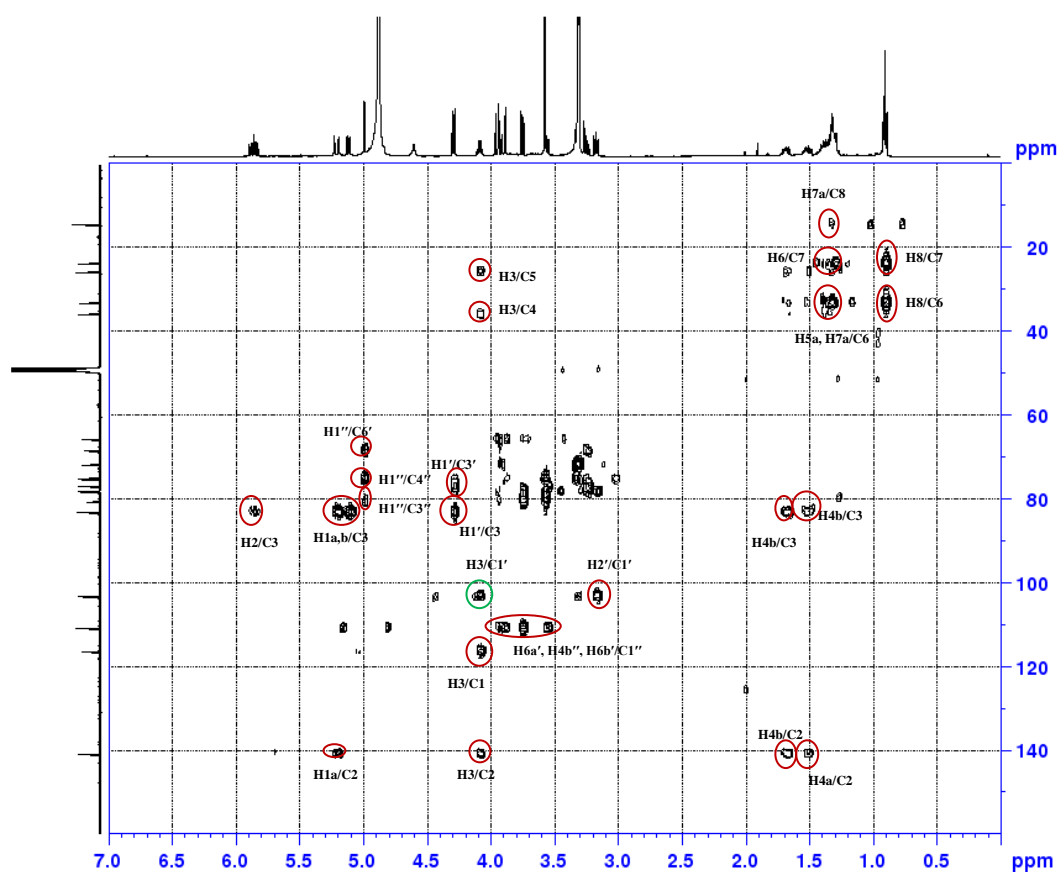


Σχήμα 2.31: Φάσμα ^{13}C -NMR του μεταβολίτη **101**, (CD_3OD , 500 MHz).

Ο γλυκοζιτικός δεσμός μεταξύ της β-γλυκόζης και του C-3 επιβεβαιώνεται διττά: α) από την αλληλεπίδραση (HMBC) μεταξύ του ανωμερικού πρωτονίου H-1' (δ 4.29 ppm) της γλυκόζης και του C-3 και β) από την αλληλεπίδραση (HMBC) H-3 (δ 4.08 ppm) της αλκοόλης και του C-1' (δ 103.3) της γλυκόζης.

Η αλληλουχία των ανθράκων και των αντίστοιχων πρωτονίων στο μόριο της γλυκόζης είναι ευκρινής και μπορεί να επιβεβαιωθεί από τα δεδομένα των φασμάτων COSY, HMBC, HSQC, NOESY και TOCSY του ακόλουθου Πίνακα 2.6, καθώς και από τις σταθερές σύζευξης των πρωτονίων (J) στο πρωτονιακό φάσμα, πολλές από τις οποίες είναι ευδιάκριτες.

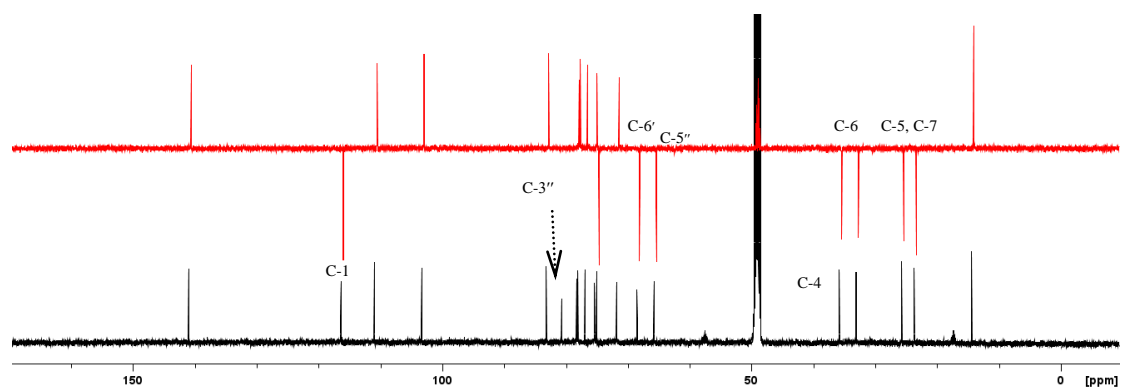
Η ιδιομορφία της δομής του μορίου της **απιόζης** επιτρέπει τον προσδιορισμό της αλληλουχίας των ανθράκων και των πρωτονίων στο μόριο. Το ανωμερικό πρωτόνιο H-1'' εμφανίζεται στα δ 4.99 ppm και συνδέεται (HSQC) με τον ανωμερικό άνθρακα που συντονίζεται στα 110.8 ppm.



Σχήμα 2.32: Φάσμα HMBC του μεταβολίτη **101**. Απεικονίζονται οι βασικότερες αλληλεπιδράσεις H→C, (CD₃OD, 500 MHz).

Ο γλυκοζιτικός δεσμός με τον C6' της γλυκόζης επιβεβαιώνεται από α) την αλληλεπίδραση NOESY (βλ. παράρτημα) του H-1'' της απιόζης με τα H-6' της γλυκόζης (3.56/3.92 ppm), β) την αλληλεπίδραση του H-1'' με τον C-6' (68.4 ppm) στο φάσμα HMBC και γ) την αλληλεπίδραση των H-6' της γλυκόζης με τον επιμερικό άνθρακα της απιόζης C-1'' δ 110.8 ppm στο ίδιο φάσμα.

Το επιμερικό πρωτόνιο H1'' της απιόζης δίνει σήμα στα 4.99 ppm το οποίο σχάζεται σε διπλή με $J = 2.5$ Hz, λόγω της παρουσίας του γειτονικού πρωτονίου H-2'' το οποίο εμφανίζεται στα 3.88 ppm σαν διπλή απορρόφηση με $J = 2.5$ Hz. Ο άνθρακας C-3'' στα 80.6 ppm αναγνωρίζεται εύκολα από τα φάσματα άνθρακα δεδομένου ότι είναι ο μοναδικός τεταρτοταγής άνθρακας στο μόριο και συνεπώς δεν εμφανίζεται στο DEPT-135. Ο C4'' (75.0 ppm) είναι επίσης εύκολα αναγνωρίσιμος. Ο άνθρακας αυτός είναι δευτεροταγής (DEPT-135) (Σχήμα 2.33) και φέρει δύο πρωτόνια στα 3.75 και 3.95 ppm τα οποία είναι διαστεροτοπικά δεδομένου ότι ο C3'' αποτελεί στερεογονικό κέντρο. Τα πρωτόνια αυτά σχάζονται μόνο μεταξύ τους με μία αναμενόμενη σταθερά σύζευξης $J = 9.6$ Hz.

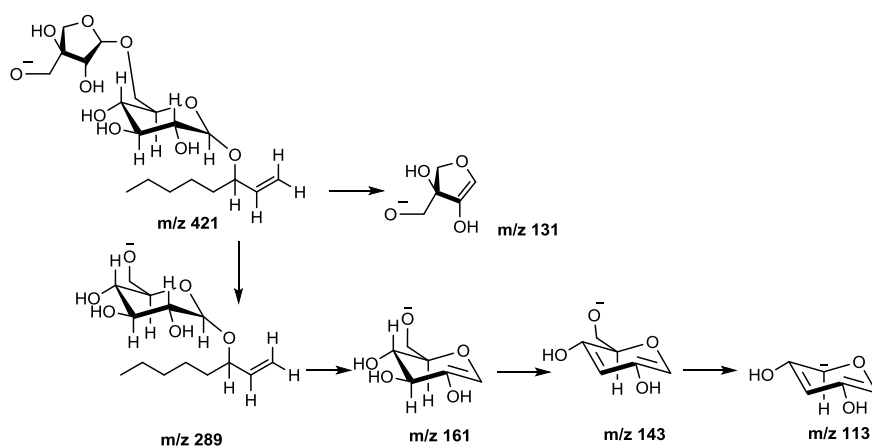


Σχήμα 2.33: Συγκριτικό φάσμα ^{13}C -NMR και DEPT 135 του μεταβολίτη **101**, (CD_3OD , 500 MHz).

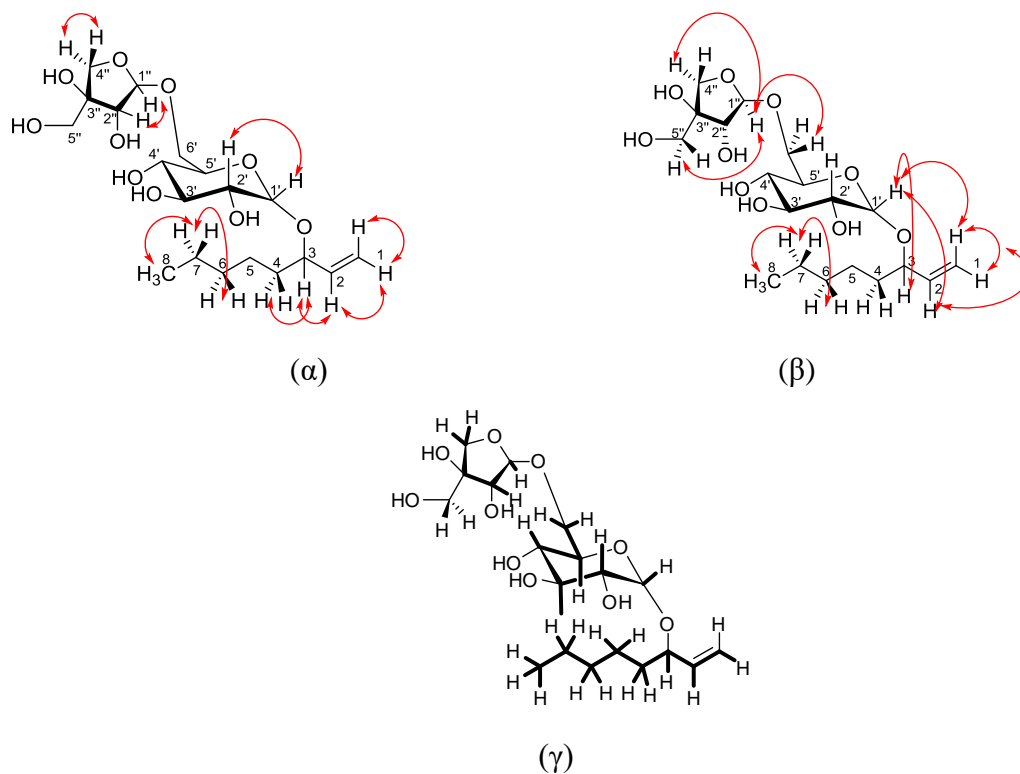
Χαρακτηριστική είναι και η εμφάνιση του C5'' ο οποίος συντονίζεται στα 65.7 ppm και φέρει δύο πρωτόνια στα 3.57 ppm τα οποία εμφανίζονται σαν απλή παρά το γεγονός της γειτνίασης με τον τεταρτοταγή C3''.

Η φασματομετρία μαζών (EI-MS) έδωσε θραύσματα αρνητικού ιονισμού τα οποία μπορούν να ερμηνευθούν με τη διαδικασία θραυσμάτωσης που αναλύεται στο Σχήμα 2.34.

Η ειδική στροφή του μορίου προσδιορίστηκε ως $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -42^\circ$ ($c = 2.0$, CH_3OH).



Σχήμα 2.34: Πορεία θραυσμάτωσης της προτεινόμενης ένωσης **101** στο φάσμα μαζών.



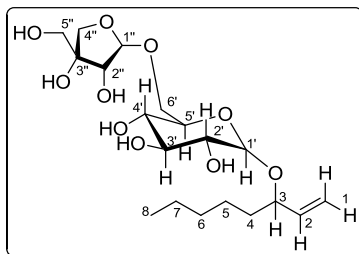
Σχήμα 2.35: Κυριότερες συσχετίσεις COSY (α) NOESY (β) και TOCSY (γ) (διακρίνονται με έντονη επισήμανση) του μεταβολίτη **101**.

Πίνακας 2.6: Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **101**, (CD₃OD, 500 MHz).

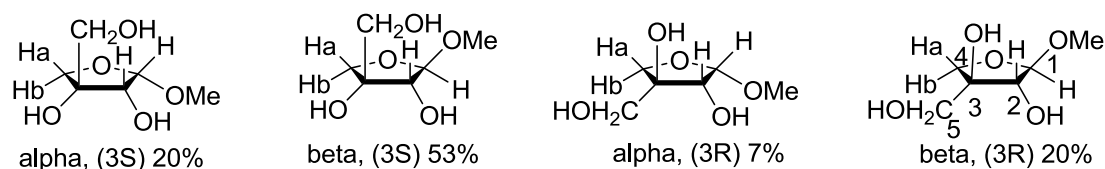
#	¹³ C	HSQC	DEPT 135	δ ¹ H	Πολλαπλότητα, (J, Hz)	COSY	TOCSY	NOESY	HMBC
Αλλυλικό-τμήμα									
1	116.3	H-1a	CH ₂	5.21	ddd, $J_1 = 17.4, J_2 = 1.7, J_3 = 1.1$ Hz, 1H	H-1b, H-2	H-2, H-3, H-4a, H-4b, H-5a, H-5b, H-6, H-7a, H-7b	H-1b, H-2, H-3, H-4a, H-4b, H-5a, H-5b, H-1'	H-3
		H-1b		5.11	ddd, $J_1 = 10.4, J_2 = 1.7, J_3 = 0.9$ Hz, 1H	H-1a, H-2	H-2, H-3, H-4a, H-4b, H-5a, H-5b, H-6, H-7a, H-7b	H-1a, H-2	
2	140.9	H-2	CH	5.86	ddd, $J_1 = 17.4, J_2 = 10.4, J_3 = 7.1$ Hz, 1H	H-1a, H-1b, H-3	H-1a, H-1b, H-3, H-4a, H-4b, H-5a, H-5b, H-6, H-7a, H-7b	H-1a, H-1b, H-3, H-1'	H-1a, H-3, H-4a, H-4b
3	83.1	H-3	CH	4.08	dd, $J_1 = 13.1, J_2 = 7.1$ Hz, 1H	H-2, H-4a, H-4b	H-1a, H-1b, H-2, H-4a, H-4b, H-5a, H-5b, H-6, H-7a, Hb, H-8	H-1a, H-2, H-4a, H-4b, H-5a, H-5b, H-1'	H-1a, H-1b, H-2, H-4a, H-4b, H-1'
4	35.8	H-4a	CH ₂	1.51	m, 1H	H-3, H-4b, H-5a	H-1a, H-1b, H-2, H-3, H-4b, H-5b, H-5b, H-6, H-7a, H-7b, H-8	H-2, H-3, H-4b, H-5b, H-1'	H-3
		H-4b		1.68	dd, $J_1 = 10.2, J_2 = 5.9$ Hz, 1H	H-3, H-4a, H-5a, H-5b	H-1a, H-1b, H-2, H-3, H-4a, H-5a, H-5b, H-6, H-7a, H-7b, H-8	H-2, H-3, H-4a, H-5b, H-1'	
5	25.7	H-5a	CH ₂	1.39	m, 1H	H-4a, H-4b	H-1a, H-1b, H-2, H-3, H-4a, H-4b, H-5b, H-6, H-7a, H-7b, H-8	H-3, H-4b, H-7	H-3
		H-5b		1.32	m, 1H	H-4b	H-1a, H-1b, H-2, H-3, H-4a, H-4b, H-5a, H-6, H-7a, H-7b, H-8	H-3, H-4a, H-4b	
6	33.1	H-6	CH ₂	1.31	m, 2H	H-5a	H-1a, H-1b, H-2, H-3, H-4a, H-4b, H-5a, H-5b, H-7a, H-7b, H-8	H-3, H-4a, H-4b	H-5b, H-7a, H- 8
7	23.7	H-7a	CH ₂	1.33	m, 1H	H-6, H-8	H-1a, H-1b, H-2, H-3, H-4a, H-4b, H-5a, H-5b, H-6, H-7b, H-8	H-7b, H-8	H-6, H-7a, H-8
		H-7b		1.37	m, 1H	H-6, H-8	H-1a, H-1b, H-2, H-3, H-4a, H-4b, -5a, H-5b, H-6, H-7a, H-8	H-7a, H-8	
8	14.4	H-8	CH ₃	0.90	t, $J = 7.0$ Hz, 3H	H-7a, H- 7b	H-3, H-4a, H-4b, 5a, H-5b, H-6, H-7a, H-7b	H-7a, H-7b	H-7a
β-D-Γλυκόζη									
1'	103.3	H-1'	CH	4.29	d, $J = 7.8$ Hz, 1H	H-2'	H-2', H-3a', H-3b', H-4', H-5', H-6a'	H-3, H-2', H-3', H-4'	H-3, H-2', H- 3', H-4a, H-4b, H-2
2'	75.3	H-2'	CH	3.17	dd, $J_1 = 7.8, J_2 = 4.2$, 1H	H-1'	H-1', H-3a', H-3b', H-4', H-5',	H-1', H-3a', H-3b'	H-1'

#	¹³ C	HSQC	DEPT 135	δ ¹ H	Πολλαπλότητα, (J, Hz)	COSY	TOCSY	NOESY	HMBC
							H-6a'		
3'	76.8	H-3'	CH	3.34	m, 1H	H-2', H-4'	H-1', H-2', H-4', H-5', H-6a', H-6b'	H-1', H-6a', H-6b'	H-1', H-4'
4'	71.7	H-4'	CH	3.25	dd, J ₁ = 8.7, J ₂ = 1.0 Hz, 1H	H-5'	H-1', H-2', H-3a', H-3b', H-5', H-6a', H-6b'	H-1', H-2', H-6a', H-6b'	H-3', H-5'
5'	78.2	H-5'	CH	3.33	m, 1H	H-4', H-6a'	H-1', H-2', H-3b', H-3b', H-4', H-6a', H-6b'	H-1', H-6a', H-6b'	H-2', H-4a', H-5'
6'	68.4	H-6a'	CH ₂	3.56	dd, J ₁ = 11.2, J ₂ = 5.2 Hz, 1H	H-6b'	H-4', H-5', H-6b'	H-1'', H-6b'	H-4'
		H-6b'		3.92	dd, J ₁ = 11.2, J ₂ = 1.8 Hz, 1H	H-6a', H-1''	H-5'	H-3', H-5', H-6a', H-1''	H-1''
β-D-Απιόζη									
1''	110.8	H-1''	CH	4.99	d, J = 2.5 Hz, 1H	H-2''	H-2''	H-5', H-6a', H-6b', H-2'', H-4b'', H-5''	H-6a', H-6b', H-2'', H-4b''
2''	78.0	H-2''	CH	3.88	d, J = 2.5 Hz, 1H	H-1''	H-1''	H-6a', H-1'', H-4a''	H-4b'', H-5''
3''	80.6	H-3''	C	-	-	-	-	-	H-1'', H-4b'', H-5''
4''	75.0	H-4a''	CH ₂	3.95	d, J = 9.6 Hz, 1H	H-4b''	H-4b''	H-6a', H-1'', H-4b'', H-5''	H-1''
		H-4b''		3.75	d, J = 9.6 Hz, 1H	H-4a''	H-4a''	H-5''	H-5''
5''	65.7	H-5''	CH ₂	3.57	br.s, 2H	-	-	H-4', H-1'', H-4b''	H-2'', H-4a''

Βιβλιογραφική ανασκόπηση σχετικά με τη συγκεκριμένη δομή έδειξε μια αρχική αναφορά με φασματοσκοπικά δεδομένα τα οποία αναφέρονται στην δομή της 3-O- β -D-απιοφουρανοζυλο-(1 \rightarrow 6)-O- β -D-γλυκοπυρανοζυλο-(3S)-οκτ-1-εν-3-όλης από το φυτό *Clerodendranthus spicatus* (Labiatae).²⁷⁰



Τα δεδομένα των φασμάτων NMR ταυτίζονται σε μεγάλο μέρος με αυτά που αναφέρθηκαν από την ομάδα μας. Υπήρχε όμως μία μικρή αλλά διακριτή διαφορά στις τιμές του ^{13}C NMR για το μόριο της απιόζης. Αυτό το οποίο μας κίνησε το ενδιαφέρον ήταν ότι οι συγγραφείς, για να υποστηρίξουν πως το μόριο περιείχε μία ομάδα β -απιόζης, έδωσαν δεδομένα από μία διαφορετική ένωση που περιείχε μεν απιοζίτη αλλά οι τιμές του ^{13}C NMR που παρουσίασαν ήταν οι τιμές που παρατηρήσαμε εμείς και όχι οι δικές τους.²⁷¹ Δεδομένου ότι υπήρχαν αρκετά αδιευκρίνιστα δεδομένα στις αναφορές σχετικά με την συγκεκριμένη ένωση²⁷² έγινε μία πιο λεπτομερής μελέτη της χημείας των γλυκοζιτών της απιόζης. Βιβλιογραφικά δεδομένα αναφέρουν ότι αντίδραση της μεθανόλης με απιόζη δίνει τέσσερεις συνολικά γλυκοζίτες όπως παρουσιάζονται κατωτέρω με δύο από αυτούς να είναι α και δύο β . Το δεύτερο σημείο διαφοροποίησης της δομής των γλυκοζιτών είναι η απόλυτη στερεοχημεία του στερεογονικού κέντρου C-3 με δύο από τις δομές να υιοθετούν την (R) δομή και οι άλλες δύο την (S).



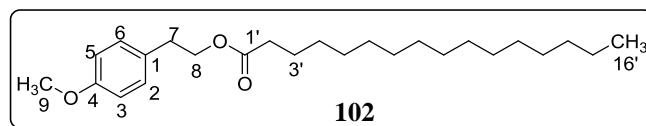
Η διευκρίνιση της δομής της απιόζης μπορεί να γίνει με βάση το φάσμα NOESY όπου φαίνονται οι αλληλεπιδράσεις των πρωτονίων στο χώρο. Πράγματι, μελέτη του φάσματος έδειξε ότι το H1'' αλληλεπιδρά ισχυρά με τα πρωτόνια H5'' και το πρωτόνιο H4b'' τα οποία βρίσκονται προς την «κάτω πλευρά» στη δομή beta (3R). Η

υπόθεση αυτή ενισχύθηκε από τα δεδομένα NOESY όπου παρατηρήθηκε επιπλέον η αλληλεπίδραση των πρωτονίων H5'' με το πρωτόνιο H4b'' καθώς και η απουσία αλληλεπίδρασης μεταξύ των πρωτονίων H4a'' και H1'' τα οποία «βρίσκονται σε αντίθετες πλευρές του μορίου» στη δομή beta (3*R*). Είναι λοιπόν πολύ πιθανό ότι η σωστή δομή του μορίου που απομονώθηκε από την ομάδα μας να είναι η 3-*O*-β-(3*R*)-*D*-απιοφουρανοζυλο-(1→6)-*O*-β-*D*-γλυκοκυρανοζυλο-(3*S*)-οκτ-1-εν-3-όλη. Η μικρή διαφορά στην ειδική στροφή της ένωσης $[\alpha]_D = -42^\circ$ σε σχέση με αυτή της βιβλιογραφίας $[\alpha]_D = -34^\circ$, είναι πιθανότατα αναμενόμενη δεδομένης της μικρής διαφοράς στη δομή των δύο μορίων.

2.4. ΤΥΡΟΣΟΛΙΚΟΙ ΕΣΤΕΡΕΣ

2.4.1. Μεταβολίτης: Παλμιτικός εστέρας του τυροσολικού μεθυλαιθέρα

[4-methoxyphenethyl palmitate]



Απομόνωση Μεταβολίτη

Απομονώθηκε από τις ρίζες του φυτού στο κλάσμα του πετρελαϊκού αιθέρα μέσω διαχωρισμών με PTLC στο κλάσμα PER-I₈ (3.0 mg), υπό μορφή υποκίτρινου ελαίου.

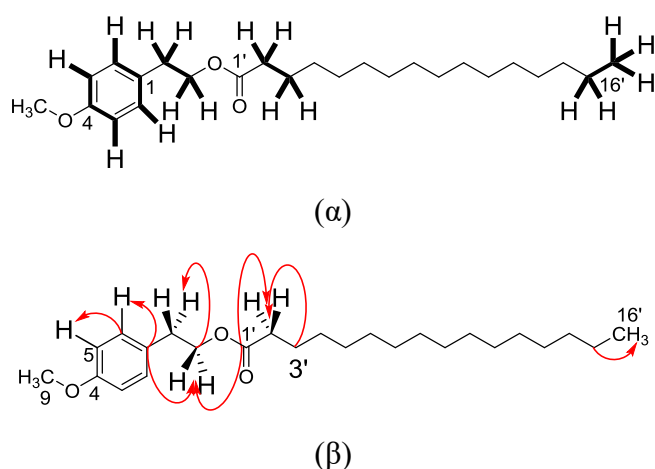
Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων NMR και του φάσματος μαζών υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRMS) οδήγησε στον μοριακό τύπο C₂₅H₄₂O₃ με μοριακό ιόν στα $m/z = 413.2666$ [M+HNa]⁺, (θεωρ. C₂₅H₄₂NaO₃ Exact Mass: 413.3026) για τον μεταβολίτη **102**. Παράλληλα το φάσμα μαζών (ESI-MS, θετικός ιονισμός), επιβεβαίωσε το μοριακό ιόν $m/z = 413.2$ [M+Na]⁺.

Σε περιοχές χαμηλού πεδίου δύο ζεύγη ortho-συζευγμένων αρωματικών πρωτονίων με κορυφές σε δ 7.08 ($J = 8.6$ Hz, H-2 / H-6) και 6.76 ($J = 8.6$ Hz, H-3 / H-5), οι οποίες είναι χαρακτηριστικές ενός AB συστήματος, υποδηλώνουν την παρουσία ενός 1,4-διυποκατεστημένου αρωματικού δακτυλίου. Επίσης, παρατηρείται μια τριπλή κορυφή στα 4.23 ppm ($J = 7.0$ Hz) για τα υδρογόνα του αιθερικού άνθρακα (C-8) τα οποία σχάζονται λόγω σύζευξης με τα γειτονικά βενζυλικά υδρογόνα του C-7, που συντονίζονται στα 2.86 ppm με σταθερά σύζευξης $J = 7.0$ Hz. Χαρακτηριστικές κορυφές στο φάσμα είναι η απλή κορυφή που αντιστοιχεί στο μεθυλαιθέρα της τυροσόλης (C-9) δ 3.48 και η τριπλή κορυφή με δ 2.27 που αντιστοιχεί στα μεθυλενικά πρωτόνια του C-2' που σχάζονται από τα γειτονικά υδρογόνα (H-3') της πλευρικής αλυσίδας με σταθερά σύζευξης $J = 7.3$ Hz. Μια ευρεία απλή σε δ 1.25 ppm ολοκληρώνει για 22 πρωτόνια που αντιστοιχούν στην παρουσία τμήματος αλειφατικής αλυσίδας που περιλαμβάνει 11 μεθυλένια και η τριπλή κορυφή με δ 0.87 ppm αντιστοιχεί στο τερματικό μεθύλιο της αλειφατικής αλυσίδας το οποίο σχάζεται από τα πρωτόνια του γειτονικού άνθρακα (C-15') με

σταθερά σύζευξης $J = 7.2$ Hz.

Στο φάσμα του άνθρακα, η κορυφή στα 173.9 ppm επιβεβαίωσε την παρουσία του καρβονυλικού άνθρακα C-1', ενώ η κορυφή στα 154.2 ppm που αντιστοιχεί στον τεταρτοταγή C-4 είναι ιδιαίτερα δυσδιάκριτη και φαίνεται μόνο από το συσχετισμό του HMBC. Με συνδυασμό των τεχνικών φασματοσκοπίας NMR, HMBC (Σχήμα 2.36) και HSQC γίνεται αντιληπτό ότι η κορυφή στα 115.2 ppm αντιστοιχεί στους C-3/C-5, αφού αλληλεπιδρούν μόνο με τα πρωτόνια του AB συστήματος, και η κορυφή στα 130.0 ppm αντιστοιχεί στους C-2/C-6, ενώ ο άνθρακας στα 50.9 ppm (C-9) αντιστοιχεί στο μεθύλιο του αιθέρα της τυροσόλης. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης παρουσιάζονται στον παρακάτω Πίνακα 2.7.



Σχήμα 2.36: Βασικότερες συσχετίσεις COSY (διακρίνονται με έντονη επισήμανση) (α), και HMBC (β) του μεταβολίτη **102**.

Πίνακας 2.7: Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **102**, (CDCl₃, 500 MHz).

#	¹³ C	HSQC	δ ¹ H	Πολλαπλότητα, (J, Hz)	COSY	HMBC
1	130.1*	-	-	-	-	H-2/H-6, H-7, H-8
2/6	130.0	H-2/H-6	7.08	d, J = 8.6 Hz, 2H	H-3/H-5	H-4, H-3/H-5
3/5	115.2	H-3/H-5	6.76	d, J = 8.6 Hz, 2H	H-2/H-6	-
4	154.2*	-	-	-	-	H-2/H-6
7	34.3	H-7	2.86	t, J = 7.0 Hz, 2H	H-8	H-8
8	64.9	H-8	4.23	t, J = 7.0 Hz, 2H	H-7	H-7
9	50.9	H-9	3.48	s, 3H	-	-
1'	173.9	-	-	-	-	H-8, H-2'
2'	34.2	H-2'	2.27	t, J = 7.3 Hz, 2H	H-3'	-
3'	24.9	H-3'	1.60-1.57	m, 2H	H-2'	H-2'
4'-13'	29.7	H-4'/H-13'	1.25	br.s, 20H	-	-
14'	31.9	H-14'	1.25	br.s, 2H	-	H-16'
15'	22.6	H-15'	1.29-1.25	m, 2H	H-16'	H-16'
16'	14.1	H-16'	0.87	t, J = 7.2 Hz, 3H	H-15'	-

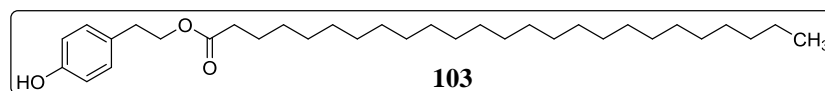
* Οι συσχετίσεις από τα φάσματα HMBC και HSQC.

Ο μεταβολίτης **102**, αναφέρεται για πρώτη φορά στο υβρίδιο και στο γένος *Phlomis*. Βιβλιογραφική ανασκόπηση σχετικά με τη συγκεκριμένη δομή έδειξε μια αναφορά της ερευνητικής ομάδα του Gargouri²⁷³ που ανέφερε συνθετικές προσεγγίσεις παραγώγων λιπόφιλων εστέρων της τυροσόλης. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR της συνθετικής ένωσης ήταν παρόμοια με αυτά που αναφέρθηκαν από την ομάδα μας. Ως εκ τούτου, ο μεταβολίτης **102** είναι η πρώτη που αναφέρεται από απομόνωση φυτικού οργανισμού.

Η ίδια ομάδα διερεύνησε την βακτηριοκτόνο δράση της τυροσόλης και των συνθετικών εστέρων έναντι Gram (+) και Gram (-) βακτηριδίων. Η αντιβακτηριακή δράση ελέγχθηκε με μέθοδο διάχυσης. Εξετάστηκε η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) έναντι των υπό εξέταση μικροοργανισμών καθώς και η αντιλεϊσμανιασική τους δράση κατά των παρασίτων *Leishmania major* και *L. infantum*.

2.4.2. Μεταβολίτης: Λιγνοσερικός εστέρας της τυροσόλης

[2-(4'-Διυδροξυφαινυλο)-αιθυλο λιγνοστερικός εστέρας]



Απομόνωση Μεταβολίτη

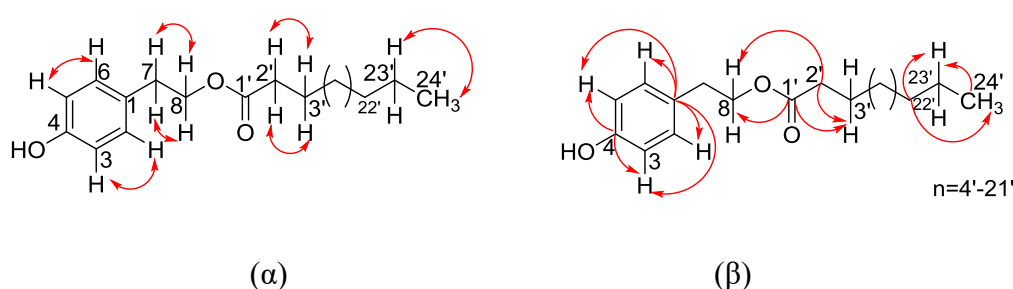
Από τις ρίζες του φυτού στο κλάσμα του P.E., απομονώθηκε ο παρακάτω μεταβολίτης στο κλάσμα PER-K₅ μέσω διαχωρισμού με HPLC, σε μορφή άχρωμου διάφανου ελαίου (6.0 mg).

Φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός

Ο μεταβολίτης ταυτοποιήθηκε με χρήση φασματοσκοπίας 1D και 2D NMR, σε συνδυασμό και με τα δεδομένα από το φάσμα μαζών (ESI-MS) της ένωσης. Ερμηνεύοντας το φάσμα μαζών σε αρνητικό ιονισμό, παρατηρήσαμε ένα ισχυρό μοριακό ιόν $m/z = 487.4$ $[M-H]^-$.

Η αλληλουχία σημάτων στο φάσμα ¹H-NMR παρουσίασε αρκετές ομοιότητες με τον μεταβολίτη **102**, γεγονός το οποίο υποδεικνυε πως πρόκειται για ανάλογο ενός εστέρα της τυροσόλης (βλ. παράρτημα). Το φάσμα ¹H-NMR παρουσίασε σε περιοχές χαμηλού πεδίου δύο ζεύγη ortho-συζευγμένων αρωματικών πρωτονίων με κορυφές σε δ 7.07 ($J = 8.5$ Hz, H-2) και 6.76 ($J = 8.5$ Hz, H-3), οι οποίες είναι χαρακτηριστικές ενός AB συστήματος, υποδηλώνοντας την παρουσία ενός 1,4-δυποκατεστημένου αρωματικού δακτυλίου. Επίσης, παρατηρείται μια τριπλή κορυφή στα 4.23 ppm ($J = 7.1$ Hz) για τα υδρογόνα του αιθερικού άνθρακα (C-8) τα οποία σχάζονται λόγω σύζευξης με τα γειτονικά βενζυλικά υδρογόνα του C-7, που απορροφούν στα 2.86 ppm με σταθερά σύζευξης $J = 7.1$ Hz. Χαρακτηριστική είναι η τριπλή κορυφή με δ 2.28 που αντιστοιχεί μεθυλενικά πρωτόνια του C-2' και σχάζονται από τα γειτονικά υδρογόνα (H-3') της πλευρικής αλυσίδας με σταθερά σύζευξης $J = 7.5$ Hz. Μια ευρεία απλή σε δ 1.25 ppm ολοκληρώνει για 36 πρωτόνια που αντιστοιχούν στην παρουσία τμήματος αλειφατικής αλυσίδας που περιλαμβάνει 18 μεθυλένια και τέλος η τριπλή κορυφή σε δ 0.88 ppm αντιστοιχεί στο τερματικό μεθύλιο της αλειφατικής αλυσίδας το οποίο σχάζεται από τα πρωτόνια του γειτονικού άνθρακα (C-23') με σταθερά σύζευξης $J = 7.2$ Hz.

Στο φάσμα του άνθρακα, η κορυφή στα 173.9 ppm επιβεβαίωσε την παρουσία του καρβονυλικού άνθρακα C-1', ενώ η κορυφή στα 154.2 ppm αντιστοιχεί στον τεταρτοταγή στο C-4. Με συνδυασμό των τεχνικών φασματοσκοπίας NMR, HMBC (Σχήμα 2.37) και HSQC γίνεται αντιληπτό ότι η κορυφή στα 115.2 ppm αντιστοιχεί στους C-3/5, αφού αλληλεπιδρούν μόνο με τα πρωτόνια του AB συστήματος. Από το φάσμα DEPT-135 γίνεται αντιληπτό ότι στην περιοχή 20-35 ppm απορροφούν οι δευτεροταγείς άνθρακες της αλειφατικής αλυσίδας και η κορυφή στα 14.1 ppm αντιστοιχεί στον τερματικό άνθρακα της αλυσίδας. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης παρουσιάζονται στον παρακάτω Πίνακα 2.8.



Σχήμα 2.37: Βασικότερες συσχετίσεις COSY (α), HMBC (β) για τον μεταβολίτη **103**.

Πίνακας 2.8: Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **103**, (CDCl₃, 500 MHz).

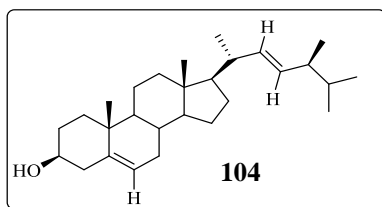
#	¹³ C	HSQC	DEPT 135	δ ¹ H	Πολλαπλότητα, (J, Hz)	COSY	HMBC
1	129.9	-	C	-	-	-	H-2/H-6 H-3/H-5
2/6	130.0	H-2/H-6	CH	7.07	d, J = 8.5 Hz, 2H	H-3/H-5	H-3/H-5, H-7, H-8
3/5	115.2	H-3/H-5	CH	6.76	d, J = 8.5 Hz, 2H	H-2/H-6	H-2/H-6
4	154.2	-	C	-	-	-	H-2/H-6 H-3/H-5
7	34.3	H-7	CH ₂	2.86	t, J = 7.1 Hz, 2H	H-8	H-2/H-6
8	64.9	H-8	CH ₂	4.23	t, J = 7.1 Hz, 2H	H-7	H-7
1'	173.9	-	C	-	-	-	H-8, H-2', H-3'
2'	34.2	H-2'	CH ₂	2.28	t, J = 7.5 Hz, 2H	H-3'	H-8, H-3'
3'	24.9	H-3'	CH ₂	1.59	dt, J ₁ = 7.5, J ₂ = 7.0 Hz, 2H	H-2'	H-2'
4'-21'	29.6	H-4'/H-21'	(CH ₂) ₁₈	1.25	br.s, 36H	-	-
22'	31.9	H-22'	CH ₂	1.25	m, 2H	-	H-23', H-24'
23'	22.6	H-23'	CH ₂	1.29	brq, J = 7.2 Hz, 2H	H-24'	H-24'
24'	14.1	H-24'	CH ₃	0.88	t, J = 7.2 Hz, 3H	H-23'	H-23'

Ο μεταβολίτης **103** απομονώθηκε πρώτη φορά από τον φλοιό του φυτού *Buddleja cordata* susp. *cordata* της οικογένειας Loganiaceae.²⁷⁴ Τόσο στο γένος

Phlomis όσο και στο υβρίδιο απομονώνεται για πρώτη φορά. Επομένως, είναι η δεύτερη φορά που αναφέρεται ο συγκεκριμένος μεταβολίτης στην διεθνή Βιβλιογραφία. Η ένωση **103**, σύμφωνα με την βιβλιογραφία, επέδειξε μέτρια αντιβακτηριακή δραστικότητα έναντι του *Mycobacterium tuberculosis* (MIC = 64 μg / ml).

2.5. ΣΤΕΡΟΕΙΔΗ

2.5.1. Μεταβολίτης: Μπρασικαστερόλη



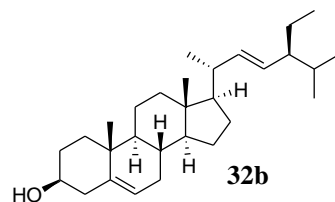
Απομόνωση Μεταβολίτη

Παραλήφθηκε μετά από την εκχύλιση του υπόγειου τμήματος του φυτού, σε ένα από τα κλάσματα του πετρελαϊκού αιθέρα, υπό μορφή διάφανων κρυστάλλων μετά από διαχωρισμό με HPLC ως PER-K₁₀, (12.3 mg).

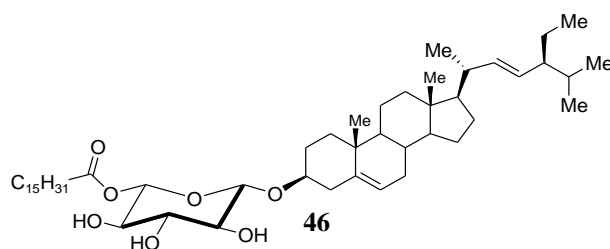
Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός

Το φάσμα μαζών της ένωσης (ESI-MS, θετικός ιονισμός) έδωσε μοριακό βάρος $m/z = 398$. Το προφίλ του φάσματος ¹H-NMR υποδεικνύει την δομή ενός στεροειδούς (βλ. παράρτημα). Στο φάσμα μαζών, πλην του μητρικού ιόντος επικρατούν το $m/z = 300$ [M-C₇H₁₅]⁺, απώλεια της πλευρικής αλυσίδας και κατόπιν ενός μεθυλίου ($m/z = 257$) καθώς και ένα τρικυκλικό ($m/z = 215$) και ένα δικυκλικό ($m/z = 189$) θραύσμα του σκελετού της στερόλης.

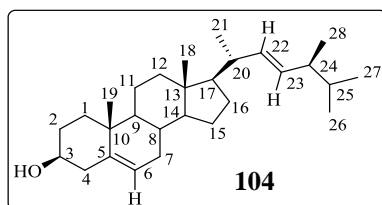
Η αλληλουχία σημάτων στο φάσμα ¹H-NMR με δ 5.35 και 3.51 ppm είναι τυπική για γ , δ -ακόρεστες στερόλες. Η χαρακτηριστική αυτή ομάδα επιβεβαιώθηκε από τη γνωστή αλληλουχία σημάτων στα δ 140.7 (C-5), 121.7 (C-6) και 71.8 ppm (C-3) στο ¹³C NMR. Η ύπαρξη ενός δεύτερου, δι-υποκατεστημένου διπλού δεσμού επιβεβαιώθηκε από την ύπαρξη των σημάτων σε δ 129.3 και 138.3 ppm καθώς και 5.01 και 5.15 ppm στα φάσματα άνθρακα και πρωτονίου αντίστοιχα. Τα σήματα αντιστοιχούν στους άνθρακες και τα πρωτόνια των θέσεων C-22 και C-23. Με μοριακό τύπο C₂₈H₄₆O η στερόλη παρουσιάζει βαθμό ακορεστότητας 6 και δεδομένου ότι το μόριο φέρει δύο διπλούς δεσμούς, οι υπόλοιποι τέσσερις βαθμοί ακορεστότητας καλύπτονται από ένα τετρακυκλικό σύστημα, πιθανότατα αυτό των τυπικών στεροειδών. Η πλέον κοινή δομή δι-ακόρεστων στερολών είναι όπως αυτή της στιγμαστερόλης:



Το μοριακό βάρος της στιγμαστερόλης (**32b**) είναι 412, γεγονός που σημαίνει ότι πιθανότατα είναι ποι-στιγμαστερόλη δηλαδή μία ένωση με ένα άνθρακα λιγότερο. Το προτεινόμενο σύστημα στερόλης είναι πολύ παρόμοιο δομικά με το γνωστό στο είδος *Phlomis* συστατικό phlomicide:



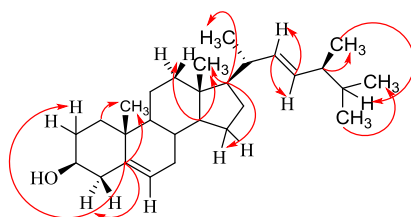
Κατά συνέπεια υπάρχει μεγάλη πιθανότητα η εν λόγω ένωση να είναι το άγλυκο του phlomicide δηλαδή το γνωστό στεροειδές μπρασικαστερόλη (**104**) [24-μεθυλοχολεστα-5, 22-διεν-3β-όλη] ή κάποιο ισομερές της.



Η ένωση εμπεριέχει έξι μεθυλομάδες: δύο από αυτές εμφανίζονται ως απλές απορροφήσεις στα δ 0.67 και 1.01 στο πρωτονιακό φάσμα και αντιστοιχούν στα μεθύλια των θέσεων 18 και 19. Το φάσμα HSQC δείχνει αντιστοιχίσεις μεταξύ των ανθράκων στα δ 11.9 και 21.1 ppm αντίστοιχα. Οι τέσσερις μεθυλομάδες εμφανίζονται ως διπλές σε δ 0.68 ($J = 8.9$ Hz), 0.79 ($J = 7.0$ Hz), 0.82 ($J = 7.0$ Hz) και 0.91 ($J = 6.5$ Hz) και αντιστοιχούν στις θέσεις 28, 27, 26 και 21 της ένωσης. Στο φάσμα ^{13}C NMR στις θέσεις αυτές οι άνθρακες συντονίζονται στα 11.8, 18.80, 21.1, 18.7 ppm, αντίστοιχα.

Το γεγονός ότι, μέσω του φάσματος COSY, το πρωτόνιο του C-6 (5.35 ppm) αλληλεπιδρά ισχυρά με τα πρωτόνια στα 1.53, 1.97 ppm τοποθετεί τα πρωτόνια αυτά στον C-7. Επίσης, μια αλληλεπίδραση με το πρωτόνιο σε δ 2.23 τοποθετεί το

πρωτόνιο αυτό στη θέση 4 (H-4, δ 42.3 ppm). Ο άνθρακας C-4 στο φάσμα HSQC αλληλεπιδρά και με το 2^ο πρωτόνιο του στα δ 2.28. Επίσης, μας επιβεβαίωσε ότι το πρωτόνιο σε δ 5.15, (dd, $J_1 = 15.7$, $J_2 = 8.6$ Hz, δ_C 138.3) που είναι συζευγμένο με το πρωτόνιο σε δ 5.01 (dd, $J_1 = 15.7$, $J_2 = 8.6$ Hz, δ_C 129.3), ανήκουν σε ένα *trans* υποκατεστημένο διπλό δεσμό. Τα πρωτόνια του C-4 αλληλεπιδρούν μέσω του φάσματος HMBC (Σχήμα 2.38) με τους άνθρακες C-5 (δ 140.7) και C-6 (δ 121.7). Το πρωτόνιο του C-6 (δ 5.35) αλληλεπιδρά με τα πρωτόνια του C-7 (δ 1.97 και 1.53) καθώς και με τα πρωτόνια του C-4 (δ 2.28 και 2.23) όπως διαπιστώθηκε μέσω του φάσματος COSY. Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων με αυτών της βιβλιογραφίας^{275,276} οδήγησε στην διαπίστωση ότι πρόκειται για το γνωστό στεροειδές μπρασικαστερόλη.



Σχήμα 2.38: Κυριότερες συσχετίσεις από το φάσμα HMBC για τον μεταβολίτη **104**.

Οι φυτοστερόλες εμφανίζονται σε πολλά φυτικά τρόφιμα, καρπούς, σπόρους, λαχανικά και βρώσιμα έλαια. Περισσότερες από 250 φυτοστερόλες έχουν εντοπιστεί σε βοτανικές πηγές, με την β -σιτοστερόλη να είναι η πιο συχνά αναφερθείσα.

Ο μεταβολίτης **104** απομονώθηκε για πρώτη φορά από το έλαιο του είδους *Brassica napus* (Brassicaceae) από τους Windaus και Welsch, το 1909.²⁷⁷ Έκτοτε απομονώθηκε και από άλλα είδη της ίδιας οικογένειας όπως το είδος *Brassica juncea*.²⁷⁸ Συναντάται στις οικογένειες Fabaceae (*Vicia* sp., *Helianthus* sp.),^{279,280} Acanthaceae (*Odontonema Strictum*),²⁸¹ Lamiaceae (*Perilla frutescens*), Solanaceae (*Solanum dulcamara*).²⁸² Έχει απομονωθεί από τους μύκηκες *Hendemonula toruloidecz* και *Scytalidium hydinum*²⁸³ καθώς και στο είδος γυμνοσάλιαγκα (*Phylum Mollusca*).²⁸⁴ Η φυτική στερολική ένωση **104** έχει αξιολογηθεί ως βιοδείκτης στη νόσο Alzheimer, δεδομένου ότι η δυσλειτουργία του εγκεφαλονωτιαίου υγρού-αμφιβληστροειδούς φραγμού συνδέεται με νευροεκφυλιστικές διαταραχές, δηλ. με τη νόσο Alzheimer.²⁸⁵

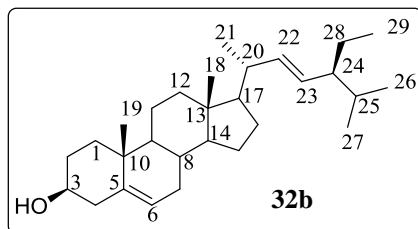
Πίνακας 2.9: Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **104**, (CDCl₃, 500 MHz).

#	¹³ C	HSQC	DEPT-135	δ ¹ H	Πολλαπλότητα, (J Hz)	COSY	HMBC
1	37.2	H-1a	CH ₂	1.86	m, 1H	H-1b	H-19
		H-1b		1.09	m, 1H	H-1a	
2	31.9	H-2a	CH ₂	1.84	m, 1H	H-1b, H-2b	H-4a
		H-2b		1.52	m, 1H	H-2a	
3	71.8	H-3	CH	3.51	m, 1H	H-2b, H-4a, H-4b	H-2a, H-2b, H-4a
4	42.3	H-4a	CH ₂	2.28	dd, J ₁ = 5.3 Hz, J ₂ = 2.2 Hz, 1H	H-3	H-2a, H-6
		H-4b		2.24	dd, J ₁ = 5.0 Hz, J ₂ = 2.1 Hz, 1H	H-3	
5	140.7	-	C	-	-	-	H-2a, H-2b, H-4a, H-4b, H-19
6	121.7	H-6	CH	5.35	br.d, J = 5.3 Hz, 1H	H-4b, H-7a, H-7b	H-4a, H-4b, H-7a, H-7b
7	31.9	H-7a	CH ₂	1.97	m, 1H	H-6, H-7b	H-6, H-8
		H-7b		1.53	m, 1H	H-7a	
8	31.6	H-8	CH	1.48	m, 1H	H-7a	H-6, H-7
9	50.1	H-9	CH	0.93	m, 1H	H-8	H-19
10	36.4	-	C	-	-	-	H-4a, H-6, H-9, H-19
11	21.2	H-11	CH ₂	1.50	m, 2H	H-9, H-12	H-9
12	40.6	H-12a	CH ₂	2.00	m, 1H	H-11, H-12b	H-18, H-19
		H-12b		1.18	m, 1H	H-12a	
13	42.2	-	C	-	-	-	H-18
14	56.7	H-14	CH	1.00	m, 1H	H-8, H-15	H-12, H-18
15	24.3	H-15a	CH ₂	1.56	m, 1H	H-14, H-16a	-
		H-15b		1.04	m, 1H	H-16a	
16	28.2	H-16a	CH ₂	1.83	m, 1H	H-15a, H-16b, H-17	-
		H-16b		1.25	m, 1H	H-16a	
17	56.0	H-17	CH	1.10	m, 1H	H-16a	H-15b, H-18, H-21
18	11.9	H-18	CH ₃	0.67	s, 3H	-	H-17
19	21.1	H-19	CH ₃	1.01	s, 3H	-	-
20	39.8	H-20	CH	2.03	m, 1H	-	H-17, H-18
21	18.7	H-21	CH ₃	0.91	d, J = 6.5, 3H	-	H-17
22	129.3	H-22	CH	5.01	dd, J ₁ = 15.7, J ₂ = 8.6 Hz, 1H	H-23	H-23
23	138.3	H-23	CH	5.15	dd, J ₁ = 15.7, J ₂ = 8.6 Hz, 1H	H-22, H-20	H-22
24	39.8	H-24	CH	1.99	ddq, J ₁ = 7.8, J ₂ = 5.1, J ₃ = 2.2 Hz, 1H	H-23	H-28

#	¹³ C	HSQC	DEPT-135	δ ¹ H	Πολλαπλότητα, (J Hz)	COSY	HMBC
25	33.9	H-25	CH	1.31	m, 1H	-	H-26, H-27
26	21.1	H-26	CH ₃	0.82	d, J = 7.0 Hz, 3H	-	H-27
27	18.8	H-27	CH ₃	0.79	d, J = 7.0 Hz, 3H	-	H-25, H-26
28	11.8	H-28	CH ₃	0.68	d, J = 8.9 Hz, 3H	-	H-25

2.5.2. Μεταβολιτης: Στιγμαστερόλη

(3*S*, 8*S*, 9*S*, 10*R*, 13*R*, 14*S*, 17*R*)-17-[(*E*,2*R*,5*S*)-5-αιθυλο-6-μεθυλεπτ-3-εν-2-υλο]-10,13-διμεθυλο-2, 3, 4, 7, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 16, 17-δωδεκαϋδρο-1*H*-κυκλοπενταν [α] φαινανθρεν-3-όλη.



Απομόνωση Μεταβολίτη

Παραλήφθηκε μετά από την εκχύλιση του υπόγειου τμήματος του φυτού με EtOH. Περαιτέρω εκχυλίσεις με διαλύτη έκλουσης P.E., απομονώθηκε υπό μορφή διάφανου ιζήματος μετά από διαχωρισμό HPLC στο κλάσμα PER-M₁₂, 19.0 mg.

Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός

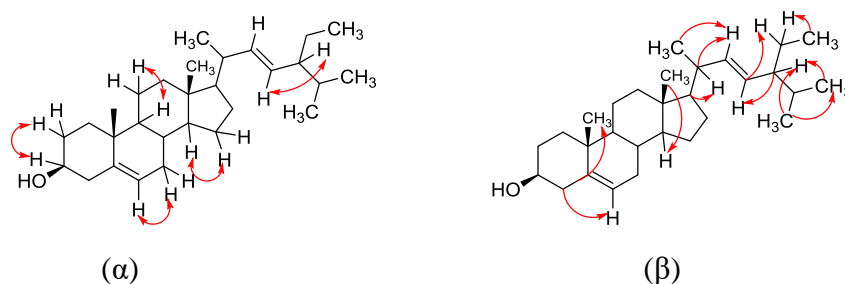
Το φάσμα μαζών της ένωσης (ESI-MS, θετικός ιονισμός) έδωσε μοριακό βάρος 413.2 m/z $[M+H]^+$, δηλαδή διαφορά ενός επιπλέον μεθυλίου από τον μεταβολίτη **104**. Συγκρίνοντας τα δεδομένα της ένωσης **104** με τα δεδομένα από τον μεταβολίτη **32b**, το προφίλ του ¹H-NMR υποδεικνύει την δομή ενός στεροειδούς, της κατηγορίας δι-ακόρεστων στερολών (Βλ. παράρτημα). Στο φάσμα ¹H-NMR, το πρωτόνιο H-3 εμφανίζεται ως πολλαπλή κορυφή σε δ 3.52, ενδεικτικό ως μεθινικό πρωτόνιο και ένα πρωτόνιο να εμφανίζεται σε δ 5.34 που αντιπροσωπεύει το πρωτόνιο του ενδοκυκλικού διπλού δεσμού H-6. Δύο ολεφινικά πρωτόνια εμφανίζονται σε δ 5.14 (dd, $J_1 = 15.5$, $J_2 = 8.7$ Hz) H-22 και δ 5.01 (dd, $J_1 = 15.5$, $J_2 = 8.7$ Hz) H-23. Αυτό επιβεβαιώνεται και από το φάσμα COSY που έδειξε ότι το πρωτόνιο H-22, είναι συζευγμένο με το πρωτόνιο H-23 με σταθερά σύζευξης $J = 15.5$ Hz, υποδηλώνοντας ότι ανήκουν σε ένα *trans* υποκατεστημένο διπλό δεσμό. Επίσης συσχετίσεις παρατηρήθηκαν μεταξύ του ολεφινικού πρωτονίου H-23 και του μεθινικού πρωτονίου σε δ 1.52 (H-24)

Χαρακτηριστική στο φάσμα είναι η παρουσία έξι κορυφών μεθυλίου. Το φάσμα εμφανίζει δύο απλές κορυφές μεθυλίων στα δ 1.00 και δ 0.69 που μπορούν να αποδοθούν στα H-19 και H-18 αντιστοίχως. Επιπλέον, οι δύο διπλές κορυφές σε δ 0.84 (d, $J = 6.4$ Hz) και 0.79 (d, $J = 6.4$ Hz) ανήκουν στις δύο μεθυλομάδες στα H-26

και H-27 και η διπλή κορυφή σε δ 1.02 (d, $J = 6.7$ Hz) αντιστοιχεί στο H-21. Επίσης, η κορυφή στα 0.81 ppm, (t, $J = 7.4$ Hz) θα μπορούσε να αποδοθεί στο μεθύλιο του H-29.

Αρκετά ευδιάκριτα είναι τα δύο σήματα (dd) σε δ 2.24 και 2.28 που αντιστοιχούν στα μεθυλινικά πρωτόνια της θέσης H-4. Τα πρωτόνια του C-4 αντιστοιχούν στον άνθρακα στα 42.3 ppm και αλληλεπιδρούν μέσω του φάσματος HMBC με τον C-6 (121.7 ppm).

Το φάσμα ^{13}C NMR έδειξε 26 σήματα για τον σκελετό των 29 ανθράκων του στεροειδούς. Από το φάσμα DEPT-135 διακρίνονται έξι σήματα που θα μπορούσαν να αποδοθούν σε μεθύλια, 11 σε μεθυλένια, εννέα σήματα που αποδίδονται σε μεθινικούς άνθρακες και τρία σε τεταρτοταγή άτομα άνθρακα. Το σημαντικό σήμα του φάσματος άνθρακα είναι αυτό του C-3 -συνδεδεμένου με μια ομάδα υδροξυλίου- που εμφανίζεται σε δ 71.8, όπως προέκυψε από το φάσμα του HSQC. Ο ενδοκυκλικός διπλός δεσμός άνθρακα-άνθρακα του μεταβολίτη αντιστοιχείται από δύο σήματα στα δ 121.7 και 140.7 των C-6 και C-5. Οι εξωκυκλικοί ολεφινικοί άνθρακες εμφανίζονται στα δ 138.3 και 129.2 (C-22 και C-23). Οι τιμές ^1H και ^{13}C NMR για όλα τα πρωτόνια και τους άνθρακες καθορίστηκαν με βάση τις συσχετίσεις COSY, NOESY, HSQC και HMBC και δίνονται στον Πίνακα 2.10. Τα παραπάνω φασματικά δεδομένα υποστηρίχθηκαν από τις συσχετίσεις COSY και HMBC όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.39.



Σχήμα 2.39: Κυριότερες συσχετίσεις COSY (α) και HMBC (β) για την ένωση **32b**.

Οι τιμές των φασματοσκοπικών δεδομένων NMR βρίσκονται σε συμφωνία με τα βιβλιογραφικά δεδομένα^{286,287} που ταυτοποιούν τον μεταβολίτη **32b** ως το γνωστό στεροειδές στιγμαστερόλη.

Από την βιβλιογραφική ανασκόπηση για το γένος *Phlomis*, η στιγμαστερόλη απομονώνεται για πρώτη φορά στο υβρίδιο ενώ έχει απομονωθεί στα είδη *P. bracteosa* και *P. cashmeriana*. Ο μεταβολίτης **32b** απομονώθηκε για πρώτη φορά στο

είδος *Physostigma venenosum* (Fabaceae) το 1906 από τους Adolf Wind Form και A. Hauth.²⁸⁸ Στην πορεία ταυτοποιήθηκε από διάφορες οικογένειες όπως Euphorbiaceae (*Croton sublyratus*),²⁸⁹ Moraceae (*Ficus hirta*),²⁹⁰ Asteraceae (*Eclipta alba* (L.) Hassk),^{291,292} Caryophyllaceae (*Gypsophila oldhamiana*),²⁹³ Myrtaceae (*Eucalyptus globulus*),²⁹⁴ Araliaceae (*Aralia cordata*),²⁹⁵ Lardizabalaceae (*Akebia quinata*),²⁹⁶ Apiaceae (*Heracleum rapula*).²⁹⁷

Η στιγμαστερόλη έχει μελετηθεί για την βιολογική της δραστηριότητα όπως την αντιστεοαρθρική, αντιϋπερχοληστεραιμική, την κυτταροτοξική, αντικαρκινική, υπογλυκαιμική, αντιμυκητιασική, αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη και για την δράση της στο ΚΝΣ.^{298, 299, 300} Ενεργεί ως πρόδρομος ουσία στην σύνθεση της προγεστερόνης και δρα ως ενδιάμεσο στη βιοσύνθεση των ανδρογόνων, των οιστρογόνων, των κορτικοειδών³⁰¹ και στη σύνθεση της βιταμίνης D₃.³⁰²

Πίνακας 2.10: Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **32b**, (CDCl₃, 500 MHz).

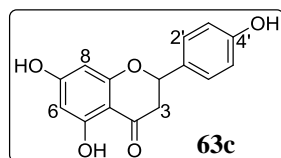
#	¹³ C	HSQC	DEPT-135	δ ¹ H	Πολλαπλότητα, (J, Hz)	COSY	NOESY	HMBC
1	37.2	H-1a	CH ₂	1.07	m, 1H	H-1b, H-2a	H-1b, H-2a	H-19
		H-1b		1.83	m, 1H	H-1a	H-1a	
2	31.6	H-2a	CH ₂	1.84	t, J = 4.1 Hz, 1H	H-1a, H-3	H-1a	H-3, H-4a, H-4b
		H-2b		1.97	m, 1H	-	-	
3	71.8	H-3	CH	3.52	tdd, J ₁ = 11.1, J ₂ = 5.2, J ₃ = 4.6 Hz, 1H	H2a, H-4a	H-2a, H-4a, H-4b	H-4a, H-4b, H-1b
4	42.3	H-4a	CH ₂	2.24	dd, J ₁ = 13.3, J ₂ = 2.3 Hz, 1H	H-3	-	H-6
		H-4b		2.28	dd, J ₁ = 13.3, J ₂ = 2.3 Hz, 1H	H-3	H-6	
5	140.7	-	C	-	-	-	-	H-4a, H-4b, H-7a, H-8, H-19
6	121.7	H-6	CH	5.34	m, 1H	H4a, H7b	H-4b, H-7b, H-8	H-4a, H-4b, H-8
7	31.6	H-7a	CH ₂	1.52	m, 1H	H-8	H-8	H-4b
		H-7b		1.97	m, 1H	H-8	H-14, H-12b, H-8	
8	31.8	H-8	CH	1.52-1.50	m, 1H	H-7a, H-7b, H-9	H-7a, H-7b	H-9
9	50.1	H-9	CH	0.94	m 1H	H-8	H-8	H-12a, H-14
10	36.5	-	C	-	-	-	-	H-2, H-4, H-6, H-19
11	21.1	H-11	CH ₂	1.49-1.51	m, 2H	H-9, H-12a	H-12a	H-9
12	39.7	H-12a	CH ₂	1.99-2.01	m, 1H	H-11, H-12b	H-12b, H-18	H-14, H-18
		H-12b		1.17-1.19	m, 1H	H-11, H-12a	H-12a	
13	42.1	-	C	-	-	-	-	H-18
14	56.8	H-14	CH	1.01	br. d, J = 2.0 Hz, 1H	H-8, H-15a	H-15	H-12a, H-18
15	24.3	H-15a	CH ₂	1.55	m, 1H	H-14	H-14	H-16b
		H-15b		1.06	m, 1H	-	H-14	
16	28.9	H-16a	CH ₂	1.24-1.28	m, 1H	H-16b, H-17	H-16b	H-17
		H-16b		1.69	ddt, J ₁ = 13.9, J ₂ = 5.7, J ₃ = 3.5, 1H	H-16a	H-16a	
17	55.9	H-17	CH	1.13-1.15	m, 1H	H-20	H-20	H-12, H-18, H-16, H-20, H-21
18	12.0	H-18	CH ₃	0.69	s, 3H	-	H-11, H-12, H-21	H-12a, H-14
19	19.4	H-19	CH ₃	1.00	s, 3H	-	-	H-20
20	40.5	H-20	CH	1.13-1.15	m, 1H	H-21	H-17	H-21, H-22
21	21.1	H-21	CH ₃	1.02	d, J = 6.7 Hz, 3H	-	H-24	H-22
22	138.3	H-22	CH	5.14	dd, J ₁ = 15.5, J ₂ = 8.7 Hz, 1H	H-23	H-21, H-24, H-28b, H-29	H-20, H-21, H-23
23	129.2	H-23	CH	5.01	dd, J ₁ = 15.5, J ₂ = 8.7 Hz, 1H	H-22, H-24	H-21, H-24, H-28b, H-29	H-22, H-24, H-28a, H-28b H-26 H-27
24	51.2	H-24	CH	1.52	m, 1H	H-23, H-25, H-28	H-29, H-21 H-25	H-22, H-23, H-26, H-27

#	¹³ C	HSQC	DEPT-135	δ ¹ H	Πολλαπλότητα, (J, Hz)	COSY	NOESY	HMBC
25	31.9	H-25	CH	1.44	m, 1H	H-24	-	H-26, H-28a, H-24
26	21.2	H-26	CH ₃	0.84	d, J = 6.4 Hz, 3H	-	H-24	H-24, H-27
27	19.0	H-27	CH ₃	0.79	d, J = 6.4 Hz, 3H	-	H-24, H-28, H-29	H-24, H-26
28	25.4	H-28a	CH ₂	1.41	m, 1H	H-24, H-28b, H-29	H-28b	H-24, H-29
		H-28b		1.16	m, 1H	H-28a, H-29	H-27	
29	12.2	H-29	CH ₃	0.81	t, J = 7.4 Hz, 3H	H-28a, H-28b	H-24	H-28b

2.6. ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ

2.6.1. Μεταβολίτης: Ναριγγενίνη

[5,7-Δυδροξυ-2-(4-υδροξυφαινυλο)χρωμαν-4-όνη]



Απομόνωση Μεταβολίτη

Ο μεταβολίτης απομονώθηκε από τα άνθη του κλάσματος με EtO₂ του φυτού υπό μορφή ιζήματος κίτρινου χρώματος. Κατά την διάρκεια των διαχωρισμών η ένωση αυτή ανιχνεύτηκε και ταυτοποιήθηκε μετά από χρωματογραφία C.C., Sephadex LH-20, στα κλάσματα: COME-DO (4.3 mg), COME-GH (2.5 mg), COME-GI (1.1 mg), COME-HL (1.2 mg), COME-EM (10.0 mg) και COME-HM (1.0 mg). Για τις αρχικές ποσότητες κάθε κλάσματος βλέπε στο πειραματικό μέρος.

Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων NMR, το φάσμα μαζών (ESI-MS, αρνητικός ιονισμός) και το φάσμα UV-vis, συνέβαλαν στον προσδιορισμό της δομής ως ναριγγενίνη. Από την μελέτη της χρωματογραφικής συμπεριφοράς, παρατηρήθηκε σε πλάκα κελλουλόζης μια σκοτεινή κηλίδα, σε κινητή φάση AcOH 15% με R_f = 0.44, ένδειξη ότι πρόκειται για γενίνη. Κατά τον ψεκάσμο με το αντιδραστήριο Neu η κηλίδα έγινε κίτρινη, ένδειξη ότι η θέση 4'-OH είναι ελεύθερη. Σε σύστημα ανάπτυξης Partridge εμφανίστηκε κηλίδα με R_f = 0.94.

Η λήψη φασμάτων UV εμφάνισε τις απορροφήσεις που παρουσιάζονται στον παρακάτω Πίνακα 2.11.

Πίνακας 2.11: Φασματοσκοπικά δεδομένα UV του μεταβολίτη **63c**.

Διάλυμα	Απορρόφηση II		Απορρόφηση I	
	λ _{max} II	Δλ (nm) από την τιμή διαλ. MeOH	λ _{max} I	Δλ (nm) από την τιμή διαλ. MeOH
MeOH	291		327 sh	
MeONa	323	+32	Διάσπαση	-
AlCl ₃	310	+19	370	+43
AlCl ₃ /HCl	309	+18	376	+49
NaOAc	323	+32	Διάσπαση	-
NaOAc/H ₃ BO ₃	290	-1	328 sh	+1

Το φάσμα UV της ναριγγενίνης σε MeOH εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση (λ_{\max}) στα 291 nm (κορυφή II) και ώμο στα 327 nm (κορυφή I), απορροφήσεις τυπικές για φλαβανόνες.³⁰³ Λόγω της βαθυχρωμικής μετατόπισης κατά 32 nm που παρατηρείται κατόπιν προσθήκης MeONa συμπεραίνεται ότι υπάρχει ελεύθερο υδροξύλιο στις θέσεις 5 και 7 τα οποία μπορούν να αποπρωτονιωθούν με την παρουσία βάσης σύμφωνα με τη βιβλιογραφία των φλαβανονών.³⁰³ Η παρουσία του ελεύθερου υδροξυλίου της θέσης 7 επιβεβαιώθηκε και από τη βαθυχρωμική μετατόπιση κατά 32 nm της κορυφής II σε σχέση με την ανάλογη κορυφή του μεθανολικού διαλύματος κατά την προσθήκη NaOAc (η βιβλιογραφική τιμή είναι +34 nm).³⁰³ Επίσης το ελεύθερο υδροξύλιο της θέσης 5 επιβεβαιώθηκε από τη βαθυχρωμική μετατόπιση της κορυφής II κατά 18 nm παρουσία AlCl_3/HCl . Η ύπαρξη υψοχρωμικής μετατόπισης της κορυφής II μόνο κατά 1.0 nm παρουσία NaOAc/ H_3BO_3 , σε σχέση με την ανάλογη κορυφή του μεθανολικού διαλύματος υποδηλώνει την απουσία *o*-OH στον δακτύλιο A με συνέπεια την αδυναμία σχηματισμού συμπλόκου.³⁰³

Με βάση το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ η ένωση παραπέμπει σε φλαβανόνη (Πίνακας 2.12). Τα σήματα των ισοδύναμων πρωτονίων H-2'/H-6' και H-3'/H-5' εμφανίζονται ως διπλές κορυφές σε δ 7.31 ($J = 8.4$ Hz) και 6.81 ($J = 8.4$ Hz) αντίστοιχα. Το σήμα του πρωτονίου H-6 εμφανίζεται ως μια διπλή κορυφή σε δ 5.89 ($J = 2.1$ Hz), ενώ του πρωτονίου H-8 εμφανίζεται και αυτό ως μια διπλή κορυφή σε δ 5.87 ppm ($J = 2.1$ Hz). Η απορρόφηση του πρωτονίου H-2 εμφανίζεται ως διπλή της διπλής κορυφή σε δ 5.32 ($J_1 = 12.9$, $J_2 = 3.0$ Hz) και τέλος, τα σήματα των διαστερεοτοπικών πρωτονίων H-3axial και H-3eq εμφανίζονται ως δύο χαρακτηριστικές κορυφές διπλή της διπλής, σε δ 3.10 ($J_1 = 17.1$, $J_2 = 12.9$ και Hz) και 2.68 ($J_1 = 17.1$ και $J_2 = 3.0$ Hz), αντίστοιχα.

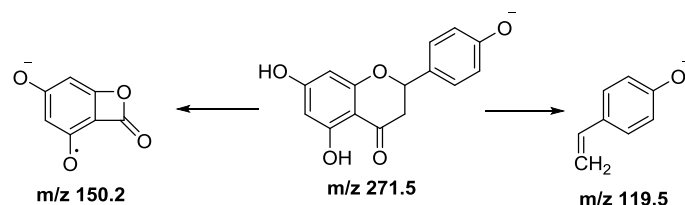
Αντίστοιχα, στο φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$, στα 197.7 ppm εμφανίζεται η κορυφή του άνθρακα C-4 του καρβονυλίου και από τα 168.6 έως τα 159.0 ppm εμφανίζονται οι τεταρτοταγείς άνθρακες του μορίου. Οι αρωματικοί τριτοταγείς άνθρακες συντονίζονται στην περιοχή 131.1 έως 96.2 ppm. Στα 80.5 ppm παρατηρείται η κορυφή του οξυγονωμένου αλειφατικού άνθρακα C-2, ενώ ο αλειφατικός άνθρακας C-3 συντονίζεται στα 44.1 ppm.

Τα φασματοσκοπικά πειραματικά δεδομένα, συμφωνούν με τα δεδομένα της βιβλιογραφικής έρευνας ότι πρόκειται για την φλαβανόνη ναριγγενίνη.³⁰⁴

Πίνακας 2.12: Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **63c** (CD₃OD, 500 MHz).

#	¹³ C	δ ¹ H	Πολλαπλότητα, J (Hz)
2	80.5	5.32	dd, J ₁ = 12.9, J ₂ = 3.0 Hz, 1H
3 _{ax}	44.1	3.10	dd, J ₁ = 17.1, J ₂ = 12.9 Hz, 1H
3 _{eq}		2.68	dd, J ₁ = 17.1, J ₂ = 3.0 Hz, 1H
4	197.7	-	-
5	168.6	-	-
6	97.1	5.89	d, J = 2.1 Hz, 1H
7	164.9	-	-
8	96.2	5.87	d, J = 2.1 Hz, 1H
9	165.5	-	-
10	103.3	-	-
1'	131.1	-	-
2'/6'	129.0	7.31	d, J = 8.4 Hz, 2H
3'/5'	116.3	6.81	d, J = 8.4 Hz, 2H
4'	159.0	-	-

Τα παραπάνω συμπεράσματα βρίσκονται σε πλήρη συμφωνία με το φάσμα μαζών (ESI-MS, αρνητικός ιονισμός) της ουσίας (Σχήμα 2.40), όπου παρατηρείται το μοριακό ιόν $m/z = 271.5$ [M-H]⁻ και αντιστοιχεί στον μοριακό τύπο C₁₅H₁₂O₅. Η ένωση **63c** έδωσε ως χαρακτηριστικό ιόν το αποπρωτονιωμένο ιόν και τα ιόντα θραυσμάτωσης $m/z = 150.2$ και $m/z = 119.5$, αποτέλεσμα διάσπασης του ετεροκυκλικού δακτυλίου.



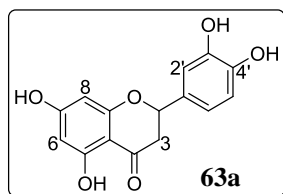
Σχήμα 2.40: Πορεία θραυσμάτωσης της ναρινγενίνης **63c** στο φάσμα μαζών.

Ο μεταβολίτης συναντάται σε φυτικά είδη πληθώρας οικογενειών, όπως είναι οι οικογένειες Rutaceae (*Citrus* spp.), Asteraceae, Rosaceae και Fabaceae.³⁴⁵ Έχει απομονωθεί από τα είδη *Phlomis*: *P. angustissima*, *P. fruticosa*, *P. aurea*, *P. caucasica*, και *P. syriaca* (Βλ. Εισαγωγή-Δρογοχημεία).

Φέρεται να έχει αντιβακτηριακή, αντιφλεγμονώδη, καρκινοπροστατευτική, αντι-ηπατοτοξική, ανισπασμωδική και αντιελκωτική δράση. Επιπλέον αναστέλλει την δικαρβοξυλάση της ιστιδίνης, την έκκριση σεροτονίνης, την συγκόλληση αιμοπεταλίων και επάγει τη γονιδιακή έκφραση φυματίων στο *Rhizobium* sp.³⁴⁵ Η ναρινγενίνη έχει αναφερθεί να έχει καλή αντιοξειδωτική δράση.³⁰⁵

2.6.2. Μεταβολίτης: Εριοδικτυόλη

[(2*S*)-2-(3,4-Δυδροξυφαινυλο)-5,7-διυδροξυ-4-χρωμανόνη]



Απομόνωση Μεταβολίτη

Οι ουσίες λουτεολίνη **58a** και εριοδικτυόλη **63a** απομονώθηκαν ως μίγμα, σε αναλογία 2:1, με την μορφή κίτρινης κόνεως. Η απομόνωση της καθαρής λουτεολίνης (βλέπε ακολούθως) και η υψηλή διακριτικότητα των σημάτων των δύο ουσιών μας έδωσε τη δυνατότητα πλήρους ταυτοποίησης της ένωσης από το μίγμα. Το προϊόν προήλθε από το κλάσμα εκχύλισης του EtO₂ των ανθέων, με χρωματογραφία στήλης (C.C., Sephadex LH-20) στα κλάσματα COME-HO (1.7 mg) και COME-KL (7.6 mg).

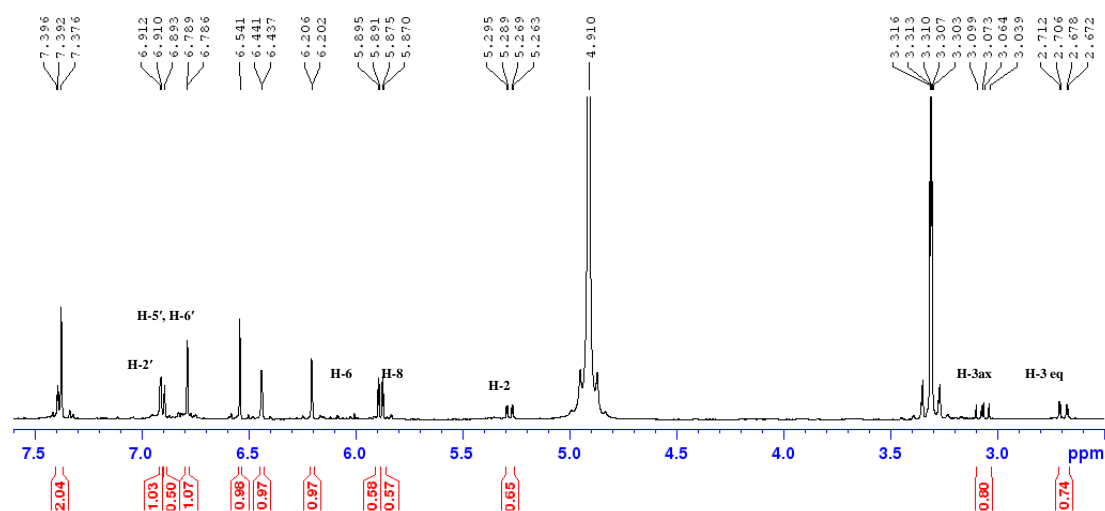
Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων NMR και του φάσματος μαζών (EI-MS, αρνητικός ιονισμός), βοήθησαν στην ταυτοποίηση της ένωσης. Το φάσμα μαζών παρουσίασε ισχυρά θραύσματα στα $m/z = 285.7$ για την ένωση **58a** και $m/z = 287.4$ για την **63a**, αντίστοιχα.

Από τη μελέτη της χρωματογραφικής συμπεριφοράς του μεταβολίτη, κατά την ανάπτυξή του σε πλάκα κελλουλόζης σε κινητή φάση AcOH 15% εμφανίστηκε μία σκοτεινή κηλίδα στα 365 nm αλλά μετά από έκθεση στο φως ημέρας για 24 h έγινε κόκκινη, ένδειξη ύπαρξης φλαβονόνης³⁰⁶ με χαμηλή τιμή $R_f = 0.26$. Η υπόθεση επιβεβαιώθηκε και από την υψηλή τιμή $R_f = 0.81$, στο διαλύτη Partridge.

Με βάση το φάσμα ¹H-NMR (Σχήμα 2.41) το σήμα των πρωτονίων H-6 εμφανίζεται ως διπλή κορυφή σε δ 5.87, πολύ κοντά στο πρωτόνιο H-8, που δίνει επίσης διπλή κορυφή σε δ 5.89. Το σήμα του πρωτονίου H-2' εμφανίζεται ως μια διευρυμένη διπλή κορυφή (br.s) σε δ 6.91, ενώ τα σήματα των πρωτονίων H-5' και H-6' εμφανίζονται επίσης ως διευρυμένες απλές κορυφές σε δ 6.77 και 6.81. Το σήμα του βενζυλικού πρωτονίου H-2 αντιστοιχεί σε διπλή της διπλής κορυφή σε δ 5.28 και τέλος οι απορροφήσεις των διαστερεοτοπικών πρωτονίων H-3_{ax} και H-3_{eq} εμφανίζονται ως διπλή της διπλής κορυφές σε δ 3.06 και δ 2.69, αντίστοιχα.

Οι τιμές $J = 12.8$ είναι χαρακτηριστικές σταθερές σύζευξης για πρωτόνια αξονικά διευθετημένα σε άκαμπτο κυκλικό σύστημα (δίεδρη γωνία 180°). Η τιμή $J = 17.2$ Hz αποδίδεται σε πρωτόνια που βρίσκονται στον ίδιο άνθρακα σε άκαμπτο κυκλικό σύστημα. Τα δεδομένα αυτά συμφωνούν με την ύπαρξη των τριών πρωτονίων στους άνθρακες C-2 και C-3. Κατόπιν βιβλιογραφικής έρευνας και σύγκρισης των φασματοσκοπικών και χρωματογραφικών δεδομένων με τη βιβλιογραφία, ο μεταβολίτης ταυτοποιήθηκε ως η φλαβανόνη, εριοδικτυόλη.³⁰⁷



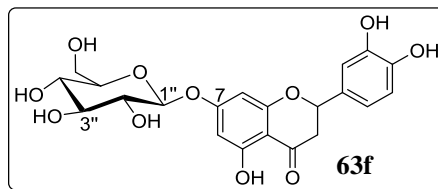
Σχήμα 2.41: ¹H-NMR του μίγματος των ενώσεων λουτεολίνη (**58a**) και εριοδικτυόλη (**63a**). Οι κορυφές με την αριθμηση αντιστοιχούν στην ένωση **63a**, ενώ οι υπόλοιπες στα 6.2-7.4 ppm στην ένωση **58a**.

Τα φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη **63a** είναι: ¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz), δ : 6.91 (*brd*, $J = 1.5$, 1H, H-2'), 6.77 (*d*, $J = 1.5$ Hz, 1H, H-5'), 6.81 (*m*, 1H, H-6') 5.89 (*d*, $J = 2.1$ Hz, 1H, H-8), 5.87 (*d*, $J = 2.1$ Hz, 1H, H-6), 5.28 (*dd*, $J_1 = 13.0$, $J_2 = 3.0$ Hz, 1H, H-2), 3.06 (*dd*, $J_1 = 17.2$, $J_2 = 12.8$ Hz, 1H, H_{ax}-3), 2.69 (*dd*, $J_1=17.2$, $J_2=3.1$ Hz, 1H, H_{eq}-3).

Η εριοδικτυόλη απαντάται σε μεγάλο εύρος οικογενειών, όπως σε είδη του γένους *Eriodictyon* της οικογένειας Hydrophyllaceae.³⁴⁵ Στο γένος *Phlomis* έχει απομονωθεί από το *P. fruticosa*⁸ και το *P. nisolii*.¹⁶¹ Η εριοδικτυόλη εμφανίζει αντιβακτηριακή δράση και αναστέλλει την ανάπτυξη των προνυμφών του *Heliothis zea*.³⁴⁵ Επιπλέον έχει αντιτροφική και αποχρεμπτική δράση, ενώ έχει προστατευτική δράση κατά του καρκίνου. Επίσης έχει αναφερθεί πως έχει καλή αντιοξειδωτική δράση, ενώ παρουσία Cu²⁺ εμφανίζει ασθενή προοξειδωτική δράση.³⁰⁵

2.6.3. Μεταβολίτης: Εριοδικτυολο-7-*O*-β-*D*-γλυκοζίτης

[2-(3,4-Δυδροξυφαινυλ)-5-υδροξυ-7-[(2*R*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,4,5-τριυδροξυ-6-(υδροξυμεθυλ)οξαν-2-υλ]οξυ-2,3-διυδροχρωμεν-4-όνη]



Απομόνωση Μεταβολίτη

Παραλήφθηκε μετά από διαχωρισμούς από το κλάσμα του EtOAc των ανθέων. Πιο συγκεκριμένα διαχωρίστηκε μέσω PTLC κελουλόζης σε διαλύτη έκλουσης AcOH 30% και απομονώθηκε ως καθαρή ουσία από το κλάσμα CMX-EO (30.7 mg) σε μορφή κίτρινου ιζήματος στο κλάσμα CMX-EO₈ (16.6 mg).

Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός

Από τον συνδυασμό των φασματοσκοπικών δεδομένων NMR, το φάσμα μαζών (ESI-MS) και από το UV-vis, προσδιορίστηκε η δομή ως ο εριοδικτυολο-7-*O*-β-*D*-γλυκοζίτης. Από την μελέτη της χρωματογραφικής συμπεριφοράς εμφανίστηκε μία σκοτεινή κηλίδα στα 365 nm που μετά από έκθεση στο φως ημέρας για 24 h έγινε κόκκινη, ένδειξη για την ύπαρξη φλαβανόνης με το R_f του μεταβολίτη στους διαλύτες Partidge (R_f 0.54) και AcOH 15% (R_f 0.26) και με βάση τα φασμάτα UV-vis, αντιληφθήκαμε πως πρόκειται για μια φλαβανόνη.

Η λήψη φασμάτων UV εμφάνισε τις απορροφήσεις που παρουσιάζονται στον παρακάτω Πίνακα 2.13.

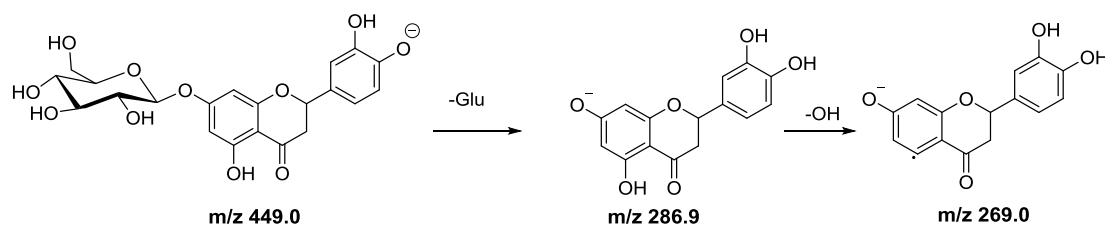
Πίνακας 2.13: Φασματοσκοπικά δεδομένα UV του μεταβολίτη **63f**.

Διάλυμα	Απορρόφηση II		Δλ (nm)	Απορρόφηση I	Δλ (nm)
	Π _β	λ max Π _α	από την τιμή διαλ. MeOH	λ max I	από την τιμή διαλ. MeOH
MeOH	-	284		324	
MeONa	285	327	+43	Διάσπαση	-
AlCl ₃	-	306	+22	385	+61
AlCl ₃ /HCl	-	307	+23	380	+56
NaOAc	-	285	+1	326	+2
NaOAc/H ₃ BO ₃	-	285	+1	326	+2

Το φάσμα UV σε MeOH εμφάνισε μέγιστη απορρόφηση (λ_{max}) στα 324 nm

(κορυφή I) τυπική για φλαβονόνες. Η παρουσία του ελεύθερου 5-OH πιστοποιείται με την βαθυχρωμική μετατόπιση κατά 23 nm του $\lambda_{\max II_a}$ παρουσία $AlCl_3/HCl$. Η βαθυχρωμική μετατόπιση της κορυφής II προσθήκη $NaOAc/H_3BO_3$ σε σχέση με την ανάλογη κορυφή του μεθανολικού διαλύματος είναι 1 nm και υποδηλώνει την απουσία ορθο-υποκατάστασης στον Α δακτύλιο. Η απουσία μετατόπισης μεγίστου της κορυφής IIa παρουσία $NaOAc$ υποδεικνύει την δέσμευση του υδροξυλίου στη θέση 7 του Α δακτυλίου, προφανώς από το γλυκοζίτη.

Παράλληλα το φάσμα μαζών (ESI-MS, αρνητικός ιονισμός) παρουσίασε ισχυρό θραύσμα $[M-H]^-$ στα $m/z = 449.0$. Επίσης, εμφανίζεται (ως συνήθως) και θραύσμα διπλάσιου $m/z = 899.0$ $[2M-H]^-$. Η διάσπαση του μοριακού ιόντος έδωσε ένα $m/z = 286.9$ θυγατρικό θραύσμα στο φάσμα MS^2 , υποδεικνύοντας την παρουσία μιας πλευρικής ομάδας γλυκόζης. Άλλα ιόντα που σημειώνονται στα φάσματα MS^2 ήταν το θραύσμα $m/z = 269.0$, όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.42.



Σχήμα 2.42: Προτεινόμενη πορεία θραυσμάτωσης για τον μεταβολίτη **63f** στο φάσμα μαζών.

Η αλληλουχία σημάτων στο φάσμα ^1H-NMR επιβεβαίωσε ότι η ουσία ανήκει στην κατηγορία των φλαβονονών. Το 1H NMR έδειξε πέντε απορροφήσεις στην περιοχή του αρωματικού πρωτονίου και την διπλή κορυφή πρωτονίου της β -ανωμερικής γλυκόζης σε δ 4.97 ppm.

Στο φάσμα ^{13}C εμφανίστηκαν 21 σήματα με οκτώ σήματα τεταρτοταγούς άνθρακα και δυο σήματα μεθυλενίων. Στα φάσματα COSY και HMBC οι συσχετίσεις έδειξαν δύο ομάδες αρωματικών πρωτονίων σε διαφορετικούς δακτύλιους, τυπικό σύστημα του σκελετού φλαβονοειδούς με το AB σύστημα των H-6 & H-8 στον δακτύλιο 1^ο και το ABX σύστημα στον δακτύλιο 2^ο. Από το φάσμα HMBC αποκαλύπτεται το H-1'' της β -ανωμερικής γλυκόζης που συσχετίζεται με τον C-7 καθορίζοντας την σύνδεση της γλυκόζης στο άγλυκο του μορίου. Οι αναθέσεις των δεδομένων από τα φάσματα NMR που παρατίθενται στον Πίνακα 2.14 συγκρίθηκαν με αντίστοιχες μελέτες^{308,309} και ταυτίζονται στον μεταβολίτη **63f**.

Πίνακας 2.14: Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **63f**, (CD₃OD, 500 MHz).

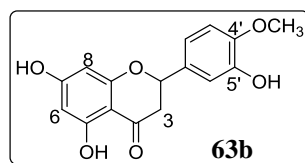
#	¹³ C	HSQC	δ ¹ H	Πολλαπλότητα, (J, Hz)	COSY	HMBC
Αγλυκο τμήμα Φλαβανόνης						
2	80.7	H-2	5.33	dt, J ₁ = 12.8, J ₂ = 3.2 Hz, 1H	H-3 _{ax} , H-3 _{eq}	H-3 _{ax} , H-2', H-6'
3	44.1	H-3 _{ax}	3.13	dd, J ₁ = 17.3, J ₂ = 12.8 Hz, 1H	H-3 _{eq}	-
		H-3 _{eq}	2.75	dd, J ₁ = 17.3, J ₂ = 3.1 Hz, 1H		
4	198.8	-	-	-	-	H-2, H-3 _{ax} , H-3 _{eq}
5	164.6	-	-	-	-	H-6, H-8
6	98.0	H-6	6.18	dd, J ₁ = 2.2, J ₂ = 1.3 Hz, 1H	-	H-8
7	167.0	-	-	-	-	H-1''
8	97.0	H-8	6.21	dd, J ₁ = 2.2, J ₂ = 1.3 Hz, 1H	-	H-6
9	n.o.	-	-	-	-	-
10	101.2	-	-	-	-	-
1'	131.7	-	-	-	-	H-2, H-6'
2'	114.8	H-2'	6.92	d, J = 1.7 Hz, 1H	H-6'	H-2, H-6'
3'	146.6	-	-	-	-	H-2', H-5'
4'	147.0	-	-	-	-	H-2'
5'	116.3	H-5'	6.78	d, J = 8.0 Hz, 1H	H-6'	-
6'	119.3	H-6'	6.80	dd, J ₁ = 8.0, J ₂ = 1.7 Hz 1H	H-2', H-5'	H-2, H-2'
β-D-Γλυκόζη						
1''	101.2	H-1''	4.97	d, J = 7.3 Hz, 1H	H-2''	H-2''
2''	74.7	H-2''	3.44	dd, J ₁ = 7.8, J ₂ = 6.2 Hz, 1H	H-1''	H-5''
3''	77.8	H-3''	3.40	m, 1H	H-4''	H-2'', H-4''
4''	71.2	H-4''	3.39	dd, J ₁ = 9.6, J ₂ = 7.3 Hz, 1H	H-3''	H-5''
5''	78.3	H-5''	3.46	m, 1H	H-6a'', H-6b''	H-2'', H-4''
6''	62.4	H-6a''	3.88	dt, J ₁ = 12.2, J ₂ = 2.2 Hz, 1H	H-5'', H-6b''	H-4''
		H-6b''	3.69	dd, J ₁ = 12.2, J ₂ = 3.2 Hz, 1H	H-5'', H-6a''	

n.o. not observed

Ο μεταβολίτης **63f** είναι η δεύτερη φορά που απομονώνεται στο γένος *Phlomis*. Είχε απομονωθεί στο είδος *P. nissolii*. Συγκαταλέγεται μεταξύ των ισχυρότερων φλαβονοειδών ως σαρωτής ελεύθερων ριζών. Βρέθηκε στις οικογένειες Lamiaceae (*Dracocephalum rupestre*, *Thymus* sp., *Mentha* sp.),^{310,311} Plumbaginaceae (*Limonium aureum*),³¹² Fabaceae (*Astragalus corniculatus*),³¹³ Balsaminaceae (*Impatiens glandulifera* Royle),³¹⁴ Solanaceae (*Petunia hybrida*)³¹⁵ και από το φυστικέλαιο Anacardiaceae (*Pistacia vera* L. cv. Uzun)³¹⁶ με ισχυρή αντιοξειδωτική και κυτταροπροστατευτική δράση. Από τα αμύγδαλα (*Prunus dulcis*, Rosaceae) με αντιοξειδωτική και αντιβακτηριακή δυναμική (κυρίως στα Gram (-) αρνητικά βακτηρίδια).³¹⁷ Επίσης, έχει προσδιοριστεί η δράση του ως νέου ενεργοποιητή Nrf2, προστατεύοντας τον εγκέφαλο από ισχαιμική βλάβη.³¹⁸

2.6.4. Μεταβολίτης: Εσπερετίνη

[(*S*)-2,3-Διυδρο-5,7-διυδροξυ-2-(3-υδροξυ-4-μεθοξυφαινυλο)-4*H*-1-βενζοπυραν-4 όνη]



Απομόνωση Μεταβολίτη

Ο μεταβολίτης απομονώθηκε από τα φύλλα στο κλάσμα του EtOAc μέσω διαχωρισμών HPLC από το κλάσμα CEAL-IH, 15.0 mg. Παραλήφθηκε στο κλάσμα CEAL-IH₁₀ (1.2 mg) υπό μορφή ιζήματος κίτρινου χρώματος.

Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός

Από τον συνδυασμό των φασματοσκοπικών δεδομένων NMR, το φάσμα μαζών (ESI-MS, αρνητικός ιονισμός) και από το UV-vis, προσδιορίστηκε η δομή του μεταβολίτη **63b**. Η λήψη φασμάτων UV-vis εμφάνισε τις απορροφήσεις που παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.15

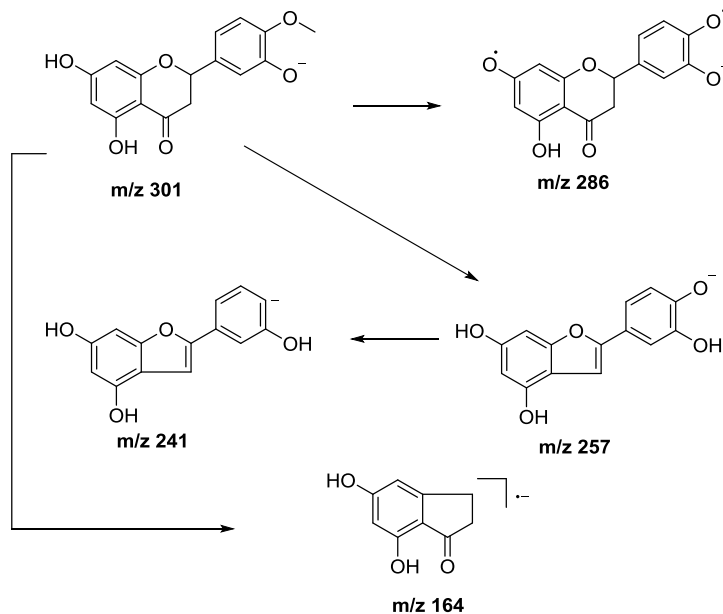
Πίνακας 2.15: Φασματοσκοπικά δεδομένα UV του μεταβολίτη **63b**.

Διάλυμα	Απορρόφηση II		Απορρόφηση I	
	λ_{\max} II	$\Delta\lambda$ (nm) από την τιμή διαλ. MeOH	λ_{\max} I	$\Delta\lambda$ (nm) από την τιμή διαλ. MeOH
MeOH	288		328	
MeONa	244	+44	323	-5
AlCl ₃	310	+22	376	+48
AlCl ₃ /HCl	310	+22	368	+40
NaOAc	287	+1	323	-5
NaOAc/H ₃ BO ₃	289	-1	330	+2

Το μεθανολικό διάλυμα της ένωσης εμφάνισε μέγιστη απορρόφηση (λ_{\max}) στα 288 nm (κορυφή II) και στα 328 nm (κορυφή I), απορροφήσεις τυπικές για φλαβονόνες. Η υποχρωμική μετατόπιση της κορυφής I με την προσθήκη MeONa δείχνει ότι 4'-OH είναι δεσμευμένο. Προσθήκη AlCl₃/HCl προκαλεί μία αναμενόμενη βαθοχρωμική μετατόπιση στο μέγιστο της κορυφής II γεγονός το οποίο επιβεβαιώνει την παρουσία υδροξυλικής ομάδας στη θέση 5. Η παρουσία ή απουσία του κατεχολικού συστήματος στον B δακτύλιο με τη χρήση του ίδιου αντιδραστηρίου δεν είναι δυνατή λόγω της απουσίας συζυγίας μεταξύ των δύο αρωματικών συστημάτων.

Ο μοριακός τύπος του μεταβολίτη είναι C₁₆H₁₄O₆ σύμφωνα το φάσμα μαζών.

Το ESI-MS (αρνητικός ιονισμός) έδειξε μητρικό ιόν σε $m/z = 301.5$ $[M-H]^-$. Η διάσπαση του μοριακού ιόντος έδωσε ένα $m/z = 286.3$ και θυγατρικό θραύσμα $m/z = 258.3$ στο φάσμα MS^2 . Άλλα ιόντα που σημειώνονται στα φάσματα MS^3 ήταν το θραύσμα $m/z = 240.5$, 174.4 και 164.3 $[M-H]^-$, όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.43



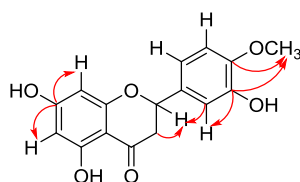
Σχήμα 2.43: Προτεινόμενη πορεία θραυσμάτωσης για τον μεταβολίτη **63b** στο φάσμα μαζών.

Με βάση το φάσμα 1H -NMR η ένωση παραπέμπει σε φλαβανόνη. Το 1H NMR έδειξε σήματα σε δ 2.71 (dd, $J_1 = 17.1$, $J_2 = 3.0$ Hz) υποδεικνύοντας τη σύζευξη του πρωτονίου $H-3_{ax}$ με τα $H-3_{eq}$ και $H-2$. Το σήμα που παρατηρήθηκε σε δ 5.31 (dd, $J_1 = 12.7$, $J_2 = 3.0$ Hz) ανήκει στο $H-2$, το οποίο συζεύγνυται με τα $H-3_{ax-eq}$. Το $H-6$ συντονίζεται σε δ 5.88 (d, $J = 2.3$ Hz) και συζεύγνυται με το $H-8$ με σύζευξη meta. (Πίνακας 2.16). Το σήμα που εμφανίζεται σε δ 5.90 ως διπλή κορυφή και συζεύγνυται με το $H-6$ και αντιστοιχεί στο $H-8$.

Το φάσμα ^{13}C NMR επιβεβαίωσε την παρουσία 16 ατόμων άνθρακα που περιλαμβάνουν ένα μεθοξύλιο, ένα μεθυλένιο, πέντε μεθινικούς και οκτώ τεταρτοταγείς άνθρακες. Στα 197.6 ppm εμφανίζεται η κορυφή του άνθρακα C-4 του καρβονυλίου και από τα 165.5 έως τα 149.4 ppm εμφανίζονται οι τεταρτοταγείς άνθρακες του μορίου. Ο αρωματικός τριτοταγής άνθρακας συντονίζεται στα 133.2 (C-1'). Στα 80.3 ppm παρατηρείται η κορυφή του C-2 οξυγονωμένου αλειφατικού άνθρακα, ενώ ο C-3 αλειφατικός άνθρακας συντονίζεται στα 44.1 ppm. Από το φάσμα HMBC αποκαλύπτεται ότι ο C-4' συσχετίζεται με τα πρωτόνια του

μεθοξυλίου καθορίζοντας την σύνδεση του μεθυλίου στο μόριο.

Τα φασματοσκοπικά πειραματικά δεδομένα, συμφωνούν με τα δεδομένα της βιβλιογραφικής έρευνας ότι πρόκειται για την φλαβανόνη εσπερετίνη.^{319,320}



Σχήμα 2.44: Κυριότερες αλληλεπιδράσεις HMBC της ένωσης **63b**.

Πίνακας 2.16: Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **63b**, (CD₃OD, 500 MHz).

#	¹³ C	HSQC	δ ¹ H	Πολλαπλότητα, (J, Hz)	HMBC
2	80.3	H-2	5.31	dd, J ₁ = 12.7, J ₂ = 3.0 Hz, 1H	H-3 _{eq} , H-2', H-6'
3	44.1	H-3 _{ax}	2.71	dd, J ₁ = 17.1, J ₂ = 3.0 Hz, 1H	H-2
		H-3 _{eq}	3.06	dd, J ₁ = 17.1, J ₂ = 12.7 Hz, 1H	
4	197.6	-	-	-	H-2, H-3 _{ax} , H-3 _{eq} , H-8
5	164.8	-	-	-	H-8
6	97.1	H-6	5.88	d, J = 2.3 Hz, 1H	H-8
7	168.4	-	-	-	H-6, H-8
8	96.2	H-8	5.90	d, J = 2.3 Hz, 1H	H-6
9	165.5	-	-	-	H-6
10	103.4	-	-	-	H-3 _{ax} , H-6, H-8
1'	133.2	-	-	-	H-3 _{ax} , H-3 _{eq} , H-2'
2'	114.6	H-2'	6.95	d, J = 2.0 Hz, 1H	H-2, H-2', H-6'
3'	147.8	-	-	-	H-5'
4'	149.4	-	-	-	H-2', H-6', 4'-OCH ₃
5'	112.6	H-5'	6.93	d, J ₁ = 8.3 Hz, 1H	H-6', 4'-OCH ₃
6'	119.3	H-6'	6.91	dd, J ₁ = 8.3, J ₂ = 2.0 Hz, 1H	H-2, H-5', H-2'
4'-OCH ₃	56.5	4'-OCH ₃	3.86	s, 3H	-

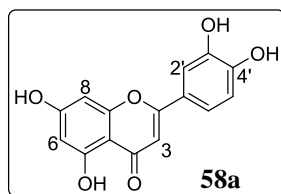
Το φυσικό προϊόν **63b** στο γένος *Phlomis* έχει απομονωθεί στο είδος *P. fruticosa*. Είναι η δεύτερη φορά που αναφέρεται στο γένος. Αναφέρεται για πρώτη φορά το 1828 από τον Γάλλο χημικό Lebreton, που απομονώθηκε από το μεσοκάρπιο των εσπεριδοειδών.³²¹ Απαντάται σε άφθονες ποσότητες στα εσπεριδοειδή, *Citrus* sp. (Rutaceae). Επίσης την συναντάμε στις οικογένειες Lamiaceae (*Origanum* sp., *Thymus* sp., *Clinopodium* sp.),^{322,323} Apiaceae (*Ferulago carduchorum*), Fabaceae (*Cyclopia genistoides*)³²⁴ και Euphorbiaceae (*Mallotus paniculatus*).³²⁵

Θεωρείται ότι συμβάλει σημαντικά στην πρόληψη του καρκίνου.³²⁶ Έχει διάφορες φαρμακολογικές δράσεις, όπως αντιφλεγμονώδη, αντιοξειδωτική, αντιυπερτασική και αντι-αθηρογόνο.³²⁷ Μπορεί επίσης να έχει προστατευτική δράση κατά της καρδιακής αναδιαμόρφωσης, της πνευμονικής και ηπατικής ίνωσης.³²⁸

Πολλοί ερευνητές επικεντρώνονται στη βελτίωση της βιοδιαθεσιμότητάς του μέσω διαφόρων προσεγγίσεων, συμπεριλαμβανομένων των καινοτόμων συστημάτων χορήγησης φαρμάκων, χρησιμοποιώντας ως σύστημα χορήγησης τη βοήθεια διάφορων βιοϋλικών όπως τα βιοαποικοδομήσιμα νανοσωματίδια (NPs).³²⁷

2.6.5. Μεταβολίτης: Λουτεολίνη

[2-(3,4-Διυδροξυφαινυλο)-5,7-διυδροξυ-4-χρωμενόνη]



Απομόνωση Μεταβολίτη

Το προϊόν προήλθε από το κλάσμα εκχύλισης του EtO₂ των ανθέων, μέσω χρωματογραφία στήλης (C.C., Sephadex LH-20, MeOH). Ο μεταβολίτης απομονώθηκε από τα κλάσματα COME-HP (1.7 mg), COME-IE (3.2 mg) και COME-KM (1.0 mg). Για τις αρχικές ποσότητες κάθε κλάσματος βλέπε στο πειραματικό μέρος.

Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός

Η ταυτοποίηση του μεταβολίτη έγινε βάσει της χρωματογραφικής συμπεριφοράς και με σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων NMR, UV-vis, LC/MS και με τα αντίστοιχα δεδομένα της βιβλιογραφίας.

Από τη μελέτη της χρωματογραφικής συμπεριφοράς του μεταβολίτη παρατηρήθηκαν τα εξής: Κατά την ανάπτυξή του σε πλάκα κελουλόζης με κινητή φάση AcOH 15% εμφανίστηκε στα 365 nm μια σκοτεινή κηλίδα με πολύ χαμηλή τιμή R_f = 0.06, ένδειξη ότι πρόκειται περί γενίνης. Μετά από ψεκασμό της πλάκας με το αντιδραστήριο Neu η κηλίδα έγινε κίτρινη, χαρακτηριστικό για παράγωγα της λουτεολίνης. Στο διαλύτη Partridge εμφάνισε υψηλή τιμή R_f = 0.80.

Η λήψη φασμάτων UV εμφάνισε τις απορροφήσεις που παρουσιάζονται στον παρακάτω Πίνακα 2.17.

Πίνακας 2.17: Φασματοσκοπικά δεδομένα UV του μεταβολίτη **58a**.

Διάλυμα	Απορρόφηση II		Δλ (nm)	Απορρόφηση I		Δλ (nm) από
	λ _{max} II _β	II _α	από την τιμή διαλ. MeOH	I _β	λ _{max} I _α	την τιμή διαλ. MeOH
MeOH	253	267	291 sh	347	-	-
MeONa	-	266	+13	329 sh	401	+54
AlCl ₃	-	274	+21	326 sh	424	+77
AlCl ₃ /HCl	263 sh	276	+23	363	386	+39
NaOAc	-	269	+15	323 sh	394	+47
NaOAc/H ₃ BO ₃	-	262	+9	374	426 sh	+26

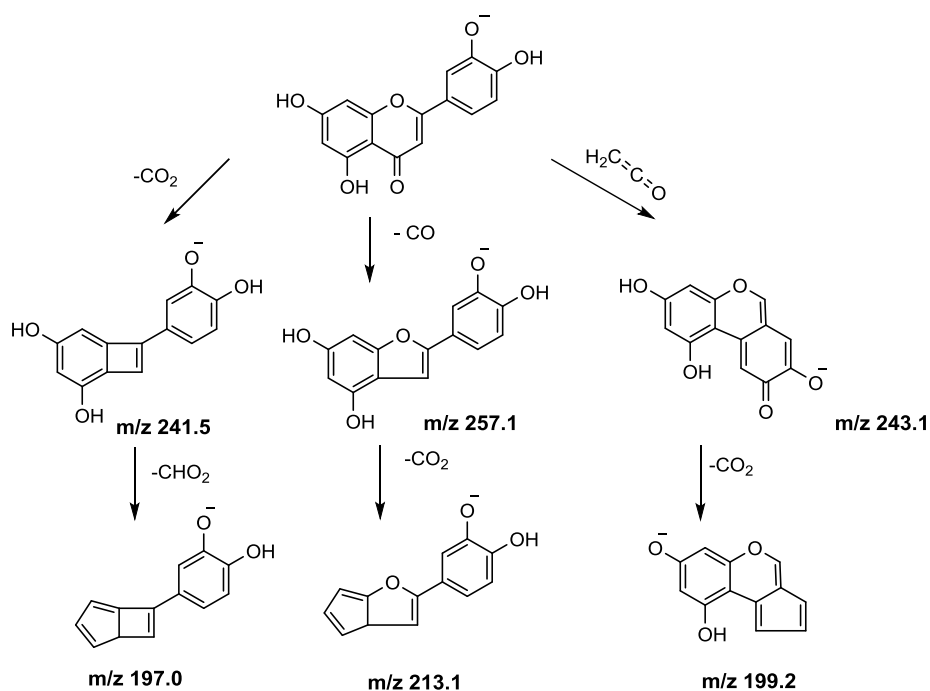
Το μεθανολικό διάλυμα εμφάνισε απορροφήσεις σύμφωνες με εκείνες της βιβλιογραφίας για τις φλαβόνες.³⁰⁶ Το -OH της θέσης 4' είναι ελεύθερο, δεδομένου ότι παρατηρείται βαθυχρωμική μετατόπιση κατά 53 nm της κορυφής Ia χωρίς ελάττωση της εντάσεως³⁰³ της κατόπιν προσθήκης MeONa. Η βαθυχρωμική μετατόπιση κατά 77 nm της κορυφής Ia μετά από προσθήκη AlCl₃ οφείλεται στο σχηματισμό σταθερού συμπλόκου με επίδραση HCl. Το σύμπλοκο αυτό σχηματίζεται από την κετονομάδα της θέσης 4 με το -OH της θέσης 5. Η παρουσία συστήματος ο-OH στον Β δακτύλιο επιβεβαιώνεται από την βαθυχρωμική μετατόπιση της κορυφής Ia παρουσία NaOAc/H₃BO₃ (26 nm) (βιβλιογραφική τιμή 21 nm)³⁰³ σε σχέση με την ανάλογη κορυφή του μεθανολικού. Η ύπαρξη ελεύθερου 7-OH επιβεβαιώθηκε από τη βαθυχρωμική μετατόπιση της κορυφής II_a κατά 15 nm σε σύγκριση με το μεθανολικό διάλυμα κατόπιν προσθήκης NaOAc (βιβλιογραφική τιμή 16 nm).

Με βάση το φάσμα ¹H-NMR, στην περιοχή των αρωματικών πρωτονίων του φάσματος εμφανίζονται πρωτόνια του συστήματος ABX στον Β δακτύλιο του μεταβολίτη (Πίνακας 2.18), δηλαδή μια διπλή της διπλής κορυφή σε δ 7.39 ($J_1 = 8.5$, $J_2 = 2.5$ Hz), που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο Η-6' λόγω ortho-σύζευξης με το Η-5' και meta-σύζευξης με το Η-2', μία ευρεία απλή σε δ 7.37 που αντιστοιχεί στο Η-2' και μια διπλή κορυφή σε δ 6.90 ($J = 8.5$ Hz) που αντιστοιχεί στα πρωτόνια Η-5'. Δύο διπλές κορυφές σε δ 6.20 ($J = 2.0$ Hz) και 6.43 ($J = 2.0$ Hz) αντιστοιχούν στα πρωτόνια Η-6 και Η-8, καθώς και μία απλή κορυφή σε δ 6.53 αντιστοιχεί στο πρωτόνιο Η-3. Στο φάσμα ¹³C-NMR εμφανίζεται στα 183.85 ppm η κορυφή C-4 του ακόρεστου καρβονυλικού άνθρακα.

Πίνακας 2.18: Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **58a**, (CD₃OD, 500 MHz).

#	¹³ C	δ ¹ H	Πολλαπλότητα, (J, Hz)
2	166.6	-	-
3	103.8	6.53	s, 1H
4	183.8	-	-
5	163.2	-	-
6	100.3	6.20	d, $J = 2.0$, 1H
7	166.3	-	-
8	95.1	6.43	d, $J = 2.0$, 1H
9	159.4	-	-
10	105.1	-	-
1'	120.3	-	-
2'	114.1	7.37	d, $J = 2.5$, 1H
3'	147.1	-	-
4'	151.1	-	-
5'	116.8	6.90	d, $J = 8.5$, 1H
6'	123.6	7.39	dd, $J_1 = 8.5$, $J_2 = 2.5$, 1H

Τα παραπάνω συμπεράσματα βρίσκονται σε πλήρη συμφωνία με το φάσμα μαζών (ESI-MS, αρνητικός ιονισμός) της ουσίας **58a**, όπου παρατηρείται το μοριακό ιόν $m/z = 285.1$ $[M-H]^-$ και αντιστοιχεί σε μοριακό τύπο $C_{15}H_{10}O_6$.



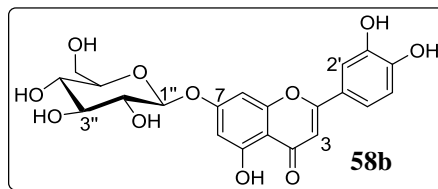
Σχήμα 2.45: Προτεινόμενη πορεία θραυσμάτωσης για τον μεταβολίτη **58a** στο φάσμα μαζών.³²⁹

Ο μεταβολίτης **58a** απομονώθηκε πρώτη φορά από το φυτό *Reseda luteola* (Resedaceae). Έκτοτε έχει απομονωθεί από διάφορες οικογένειες όπως Asteraceae, Juncaceae, Pteridaceae, Malvaceae, Simaroubaceae, Araceae, Fabaceae, Scrophulariaceae, Apiaceae και Lamiaceae.³⁴⁵ Στο γένος *Phlomis* έχει απομονωθεί στα είδη *P. pungens*, *P. lychnitis*, *P. tuberosa*, *P. crinite*, *P. nissolii* και *P. umbrosa*.

Η λουτεολίνη σε ελεύθερη μορφή εμφανίζει ποικίλες βιολογικές δράσεις όπως αντιτροφική, αντιοξειδωτική,³⁰⁵ αντισταμινική, αντιφλεγμονώδης, αντιβηχική, προστατευτική κατά του καρκίνου, χολερετική, διουρητική και ανασταλτική της ξανθινοξειδάσης.

2.6.6. Μεταβολίτης: Λουτεολινο-7-*O*-β-D-γλυκοζίτης

[2-(3,4-Δυδροξυφαινυλ)-5-υδροξυ-7-[(2*S*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,4,5-τριυδροξυ-6-(υδροξυμεθυλ)οξαν-2-υλ]οξυχρωμεν-4-όνη]



Απομόνωση Μεταβολίτη

Η ένωση απομονώθηκε από το κλάσμα της εκχύλισης με *n*-BuOH στα φύλλα (BUL-GS 25.3 mg) και κατόπιν διαχωρισμού με PTLC-κελλουλόζης, ταυτοποιήθηκε ως ο λουτεολινο-7-*O*-β-D-γλυκοζίτης (BUL-GSβ, 6.3 mg).

Φασματοσκοπική Ανάλυση

Από τα φασματοσκοπικά δεδομένα του UV-vis (Πίνακας 2.19), του φάσματος μαζών και του NMR μας οδήγησαν στην ταυτοποίηση της ένωσης ως η **58b**. Το φάσμα μαζών (αρνητικός ιονισμός) έδωσε μοριακή μάζα $m/z = 447.4$ $[M-H]^-$ που αντιστοιχεί στον μοριακό τύπο $C_{21}H_{20}O_{11}$. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα NMR παρατίθενται στον Πίνακα 2.20.

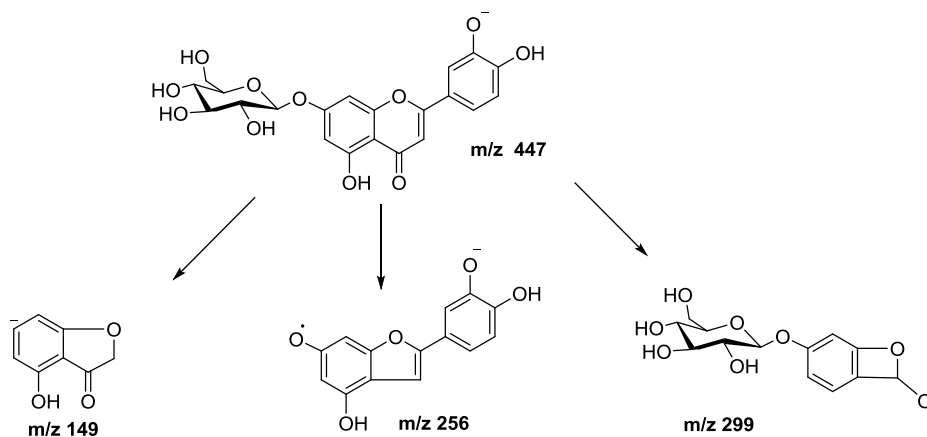
Πίνακας 2.19: Φασματοσκοπικά δεδομένα UV του μεταβολίτη **58b**.

Διάλυμα	Απορρόφηση II		Δλ (nm) από την τιμή διαλ. MeOH	Απορρόφηση I		Δλ (nm) από την τιμή διαλ. MeOH
	λ_{\max} II _β	II _α		I _β	λ_{\max} I _α	
MeOH	256	267 sh		349		
MeONa	-	265 sh	-	402	+53	
AlCl ₃	273	297 sh	+17	333	426	
AlCl ₃ /HCl	270	292 sh	+14	362	387	
NaOAc	259	267	+3	405	+56	
NaOAc/H ₃ BO ₃	261	-	+5	370	+21	

Το φάσμα UV του λουτεολινο-7-*O*-β-D-γλυκοζίτης σε MeOH εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση (λ_{\max}) στα 349 nm (Απορρόφηση I_α, βιβλιογραφική τιμή 348 nm)³⁰³ τυπικές για φλαβόνες. Λόγω της βαθυχρωμικής μετατόπισης κατά 53-56 nm που παρατηρείται κατόπιν προσθήκης MeONa και NaOAc συμπεραίνεται ότι υπάρχει ελεύθερο υδροξύλιο στη θέση 5 το οποίο μπορεί να αποπρωτονιωθεί παρουσία βάσης σύμφωνα με τη βιβλιογραφία. Επίσης το ελεύθερο υδροξύλιο της θέσης 5 επιβεβαιώθηκε από τη βαθυχρωμική μετατόπιση της απορρόφησης II κατά 14 nm

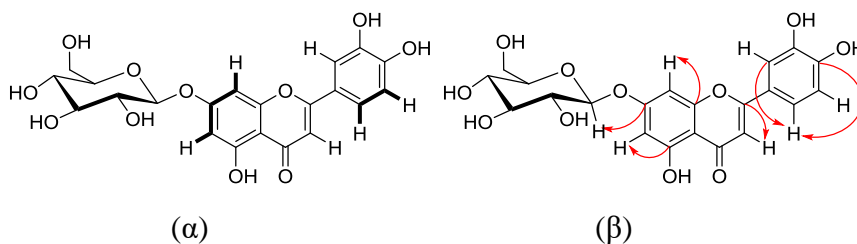
παρουσία AlCl_3/HCl . Η ύπαρξη βαθυχρωμικής μετατόπισης της απορρόφησης I_a κατά 21 nm παρουσία $\text{NaOAc}/\text{H}_3\text{BO}_3$, σε σχέση με την ανάλογη απορρόφηση του μεθανολικού διαλύματος (βιβλιογραφική τιμή 24 nm)³⁰³ υποδηλώνει την παρουσία *o*-OH στον δακτύλιο A (ομάδα κατεχόλης).

Το φάσμα μαζών ESI-MS (αρνητικός ιονισμός) έδωσε τα αναμενόμενα αποτελέσματα για φλαβόνες, θραύσματα με απόσπαση CO και CO_2 (Σχήμα 2.46).



Σχήμα 2.46: Προτεινόμενη πορεία θραυσμάτωσης για τον μεταβολίτη **58b** στο φάσμα μαζών.

Το φάσμα ^1H NMR έδειξε έξι σήματα στην περιοχή των αρωματικών πρωτονίων με την συνηθισμένη διπλή κορυφή πρωτονίου β -ανωμερικής γλυκόζης σε δ 5.07 ppm. Στο φάσμα ^{13}C NMR υπάρχουν 21 σήματα εκ των οποίων τα εννέα οφείλονται σε τεταρτοταγείς άνθρακες και υπάρχει μόνο ένα σήμα μεθυλενίου. Τα φάσματα COSY και HMBC έδειξαν συσχετίσεις δύο ομάδων αρωματικών πρωτονίων σε ξεχωριστό δακτύλιο, τυπικό σύστημα του σκελετού φλαβονοειδούς (Σχήμα 2.47).



Σχήμα 2.47: Αλληλεπιδράσεις COSY (α) (έντονη επισήμανση) και HMBC (β) για το **58b**.

Τρία σήματα πρωτονίων, δ 6.88 ppm (d), 7.39 ppm (d), 7.41 ppm (dd), παρατηρούνται στο ίδιο σύστημα δακτυλίων από τους συσχετισμούς των ετεροπυρηνικών φασμάτων. Αποτελούν το σύστημα ABX του κατεχολικού

δακτυλίου. Μια διπλή κορυφή σε δ 6.50 ppm ($J = 2.1$ Hz) και ένα σήμα διπλής κορυφής σε δ 6.80 ppm ($J = 2.1$ Hz), ανάδειξε την meta-σχέση των πρωτονίων H-6 και H-8 της χρωμονόνης, όπως επιβεβαιώθηκε από το φάσμα COSY. Από το φάσμα HMBC αποκαλύπτεται ότι το H1'' της β -ανωμερικής γλυκόζης συσχετίζεται με τον C-7 καθορίζοντας έτσι την σύνδεση της γλυκόζης στο άγλυκο του μορίου. Οι αναθέσεις δεδομένων που παρατίθενται συγκρίθηκαν με αυτές από προηγούμενες μελέτες.³³⁰

Πίνακας 2.20: Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **58b**, (CD₃OD, 500 MHz).

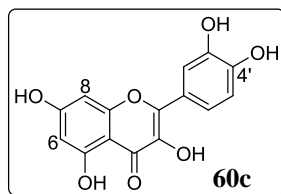
#	¹³ C	HSQC	$\delta^1\text{H}$	Πολλαπλότητα, (J, Hz)	COSY	HMBC
Άγλυκο τμήμα Φλαβόνης						
2	167.2	-	-	-	-	H-3
3	103.8	H-3	6.59	s, 1H	-	-
4	184.1	-	-	-	-	H-3
5	164.8	-	-	-	-	H-6, H-8
6	101.1	H-6	6.50	d, $J = 2.1$ Hz, 1H	H-8	H-8
7	164.8	-	-	-	-	H-1''
8	96.1	H-8	6.80	d, $J = 2.1$ Hz, 1H	H-6	H-6
9	159.0	-	-	-	-	H-8
10	107.1	-	-	-	-	H-8, H-6, H-3
1'	123.1	-	-	-	-	-
2'	113.9	H-2'	7.39	d, $J = 2.35$ Hz, 1H	H-6'	H-6'
3'	147.8	-	-	-	-	H-5'
4'	152.1	-	-	-	-	H-2', H-6'
5'	116.9	H-5'	6.88	d, $J = 8.3$ Hz, 1H	H-6'	-
6'	120.7	H-6'	7.41	dd, $J_1 = 8.3, J_2 = 2.3$ Hz, 1H	H-2', H-5'	H-2'
β-D-Γλυκόζη						
1''	101.8	H-1''	5.07	d, $J = 7.5$ Hz, 1H	H-2''	H-2''
2''	74.7	H-2''	3.49	t, $J = 3.5$ Hz, 1H	H-1''	H-4''
3''	71.3	H-3''	3.41	m, 1H	H-2'', H-4''	-
4''	78.5	H-4''	3.50	m, (overlap*), 1H	H-3''	-
5''	77.9	H-5''	3.56	m, 1H	H-4'', H-6b''	H-3'', H-4''
6''	62.5	H-6a''	3.93	dd, $J_1 = 12.3, J_2 = 2.3$ Hz, 1H	H-5'', H-6b''	-
		H-6b''	3.72	dd, $J_1 = 12.3, J_2 = 5.8$ Hz, 1H	H-5'', H-6a''	

*unclear due to overlapping

Αποτελεί ένα από τα πιο κοινά φλαβονοειδή του γένους *Phlomis*. Σε περισσότερα από 15 είδη έχει απομονωθεί (Βλ. Δρογοχημεία) ο μεταβολίτης **58b**, ενώ απαντάται ευρέως σε πολλά φυτικά ήδη. Ενδεικτικά αναφέρουμε τις σημαντικότερες οικογένειες όπως, Lamiaceae (*Salvia* sp.), Asteraceae (*Dendranthema morifolium*, *Taraxacum officinale*)^{330,331} Fabaceae (*Trifolium* sp.), Apiaceae (*Daucus carota*).³⁹⁶ Συμβάλει αποτελεσματικά ως αντιοξειδωτικό,³³¹ ρυθμίζει τα επίπεδα χοληστερόλης, θεωρείται υπογλυκαιμικό, αντιυπερτασικό, διουρητικό, και δραστικό σε περιπτώσεις κατάθλιψης, παχυσαρκίας και κόπωσης.³³²

2.6.7. Μεταβολίτης: Κερκετίνη

[2-(3,4-Διυδροξυφαινυλ)-3,5,7-τριυδροξυ-4*H*-χρωμεν-4-όνη]



Απομόνωση Μεταβολίτη

Η ένωση απομονώθηκε από το κλάσμα του EtOAc στο υπόλειμμα των φύλλων και κατόπιν διαχωρισμού με C.C., (Sephhadex LH-20, MeOH, 138.0 mg) παραλήφθηκε στο κλάσμα (CEAL-ID, 3.0 mg).

Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός

Η ταυτοποίηση του μεταβολίτη έγινε βάσει της χρωματογραφικής του συμπεριφοράς σε συνδυασμό των φασματοσκοπικών δεδομένων NMR και UV-vis που επιβεβαίωσαν ότι ο μεταβολίτης έχει δομή φλαβονοειδούς.

Από τη μελέτη της χρωματογραφικής συμπεριφοράς του μεταβολίτη κατά την ανάπτυξή του σε πλάκα κελλουλόζης με κινητή φάση AcOH 15% εμφανίστηκε μία κίτρινη κηλίδα στα 365 nm με τιμή $R_f = 0.02$, ένδειξη ότι πρόκειται περί γενίνης. Μετά από ψεκασμό της με το αντιδραστήριο Neu, η κηλίδα έγινε έντονα πορτοκαλί, ύπαρξη παραγώγου κερκετίνης.

Η λήψη φασμάτων UV εμφάνισε τις απορροφήσεις που παρατίθενται στον Πίνακα 2.21.

Πίνακας 2.21: Φασματοσκοπικά δεδομένα UV του μεταβολίτη **60c**.

Διάλυμα	Απορρόφηση II		Δλ (nm)	Απορρόφηση I		Δλ (nm)
	$\lambda_{\max} \text{II}_\beta$	II_α	από την τιμή διαλ. MeOH	I_β	$\lambda_{\max} \text{I}_\alpha$	από την τιμή διαλ. MeOH
MeOH	256	303 sh		-	371	
MeONa	242	279	+14	326	420	+49
AlCl ₃	270	-	+14	335	451	+80
AlCl ₃ /HCl	265	302 sh	+9	361	430	+59
NaOAc	272	-	+19	323	393	+22
NaOAc/H ₃ BO ₃	260	293	+4	-	386	+15

Το μεθανολικό διάλυμα του μεταβολίτη **60c** εμφάνίζει απορροφήσεις (371 nm) σύμφωνες με εκείνες της βιβλιογραφίας για τις φλαβονόλες.³³³ Με την προσθήκη MeONa επιβεβαιώνεται ότι το υδροξύλιο της θέσης 3 είναι ελεύθερο. Η βαθυχρωμική

μετατόπιση του φάσματος AlCl_3/HCl κατά 59 nm (βιβλιογραφική τιμή 58 nm)³⁰³ συγκριτικά με το φάσμα AlCl_3 αποτέλεσε ένδειξη ύπαρξης δύο *όρθο*-OH στο δακτύλιο B. Η ύπαρξη της κατεχολικής ομάδας στο δακτύλιο B επιπλέον επιβεβαιώνεται κατόπιν προσθήκης NaOAc και H_3BO_3 , αφού εμφανίζει βαθυχρωμική μετατόπιση κατά 15 nm (βιβλιογραφική τιμή 17 nm)³⁰³ συγκριτικά με το μεθανολικό φάσμα. Τέλος, η βαθυχρωμική μετατόπιση κατά 16 nm ύστερα από την προσθήκη NaOAc αποτελεί ένδειξη ύπαρξης ελεύθερου υδροξυλίου στη θέση 7.³³³

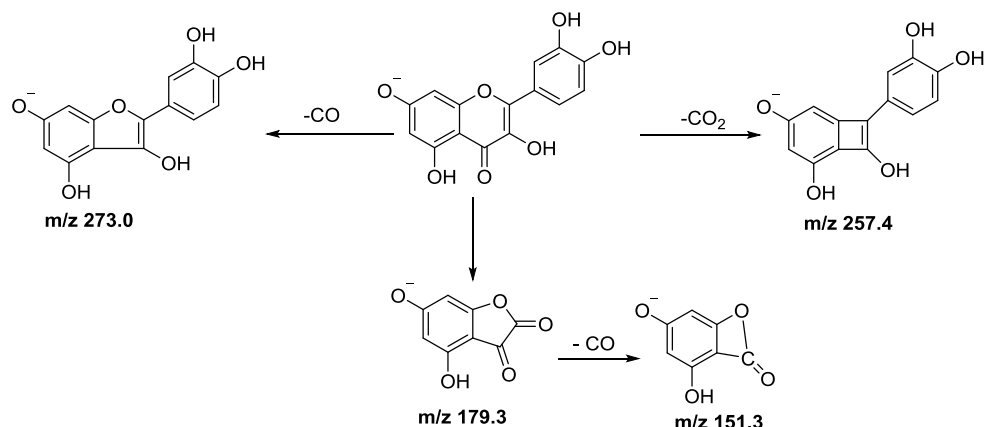
Τα φάσματα ^1H και ^{13}C -NMR της ένωσης εμφανίζουν συντονισμούς αρωματικών συστημάτων. Οι απορροφήσεις του φάσματος ^{13}C -NMR αναγνωρίστηκαν με τη βοήθεια του HSQC, επιβεβαιώνοντας την παρουσία 15 σημάτων αρωματικών ανθράκων.

Το φάσμα ^1H -NMR παρέπεμπε σε φλαβονόλη. Η αρωματική περιοχή παρουσιάζει ένα σύστημα ABX με δ 7.73 (H-2'), 7.63 (H-6') και 6.88 (H-5') εξαιτίας της 3', 4' διωποκατάστασης του δακτυλίου B. Φαίνονται οι χαρακτηριστικές κορυφές των αρωματικών πρωτονίων H-6 και H-8 στα 6.18 και 6.39 ppm αντίστοιχα, όπου εμφανίζουν από μία διπλή κορυφή με κοινό $J = 2.1$ Hz ενδεικτικού της *meta* θέσης τους. Τα πρωτόνια των θέσεων 2', 5' και 6' φαίνεται ότι ανήκουν στον ίδιο αρωματικό δακτύλιο.

Στο φάσμα COSY εμφανίζεται η αλληλεπίδραση λόγω της γειννίαςσης των H-5' και H-6', ενώ το H-2' εμφανίζεται ως διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης $J_{\text{meta}} = 2.1$ Hz να υποδηλώνει *meta* σχέση με το H-6'. Το H-6' εμφανίζεται ως διπλή της διπλής έχοντας την ίδια σταθερά σύζευξης με το H-5', χαρακτηριστική για *ortho*-αρωματικά πρωτόνια Η θέση της σύνδεσης του δακτυλίου B με τον δακτύλιο C επιβεβαιώνεται μέσω του HMBC όπου το H-6' του B δακτυλίου αλληλεπιδρά με τον C-2 του δακτυλίου C.

Το φάσμα μαζών αρνητικού ιονισμού της ένωσης έδωσε ως βασικό μοριακό ιόν $[\text{M}-\text{H}]^-$ $m/z = 301$, συμβατή με τον μοριακό τύπο $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$. Έπειτα από στοχευόμενο MS/MS στο συγκεκριμένο ιόν, προέκυψαν οι θραυσματώσεις $m/z = 273, 257, 179$ και 151. Στο Σχήμα 2.48 παρατίθεται η θραυσματοποίηση της κερκετίνης που αντιστοιχούν στα θραύσματα αυτά.

Συγκρίνοντας τα φασματοσκοπικά μας δεδομένα NMR (Πίνακας 2.22) με τα αντίστοιχα της βιβλιογραφίας, επιβεβαιώνουν ότι η δομή της ένωσης είναι η κερκετίνη.³³⁴



Σχήμα 2.48: Προτεινόμενη θραυσμάτωση του μεταβολίτη **60c** στο φάσμα μαζών.

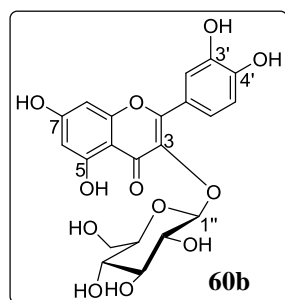
Πίνακας 2.22: Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **60c**, (CD_3OD , 500 MHz).

#	^{13}C	HSQC	Dept 135	δ^1H	Πολλαπλότητα, (J, Hz)	COSY	HMBC
2	148.1	-	C	-	-	-	H-2', H-6'
3	137.3	-	C	-	-	-	-
4	177.4	-	C	-	-	-	-
5	162.5	-	C	-	-	-	H-6
6	99.3	H-6	CH	6.18	d, $J = 2.1$ Hz	H-8	H-8
7	165.6	-	C	-	-	-	H-6, H-8
8	94.4	H-8	CH	6.39	d, $J = 2.1$ Hz	H-6	H-6
9	158.2	-	C	-	-	-	H-8
10	104.5	-	C	-	-	-	H-6, H-8
1'	124.1	-	C	-	-	-	H-5'
2'	116.0	H-2'	CH	7.73	d, $J = 2.1$ Hz	H-6'	H-6', H-5'
3'	146.2	-	C	-	-	-	H-2', H-5'
4'	148.8	-	C	-	-	-	H-2', H-6', H-5'
5'	116.2	H-5'	CH	6.88	d, $J = 8.7$ Hz	H-6'	H-6'
6'	121.7	H-6'	CH	7.63	dd, $J_1 = 8.7, J_2 = 2.1$ Hz	H-5'	H-2'

Στο γένος *Phlomis* έχει απομονωθεί από τα είδη *P. aurea* και *P. bracteosa*. Ο μεταβολίτης **60c** αποτελεί φλαβονοειδές πολύ συχνά απαντώμενο σε πλήθος φυτικών οικογενειών, όπως τις Asteraceae, Passifloraceae, Rhamnaceae, Solanaceae, Euphorbiaceae.^{345,405} Αναφέρεται ότι αναστέλλει τη δράση πολλών ενζύμων, όπως της αλδοζορεδουκτάσης, λιποξυγενάσης και ξανθοξειδάσης. Έχει αντιαλλεργική, αντιοξειδωτική, αντιλιποϋπεροξειδική, ηπατοπροστατευτική, αντιφλεγμονώδη, αντισταμινική, αντιλευκοτριενική, σπασμολυτική, αγγειοδιασταλτική, αντιθρομβωτική, προστατευτική των τριχοειδών αγγείων, κυτταροτοξική, αντικαρκινική, αλληλοχημική, αντιτροφική, ανασταλτική της ανάπτυξης των προνυμφών, βακτηριοκτόνο και αντική δράση.^{335,336,345,347,405}

2.6.8. Μεταβολίτης: Κερκετινο-3-*O*-β-D-γλυκοζίτης

[2-(3,4-Διυδροξυφαινυλ)-5,7-διυδροξυ-3-[(2*S*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,4,5-τριυδροξυ-6-(υδροξυμεθυλ)οξά-2-υλ]οξυχρωμεν-4-όνη], (Ισοκερκιτρίνη).



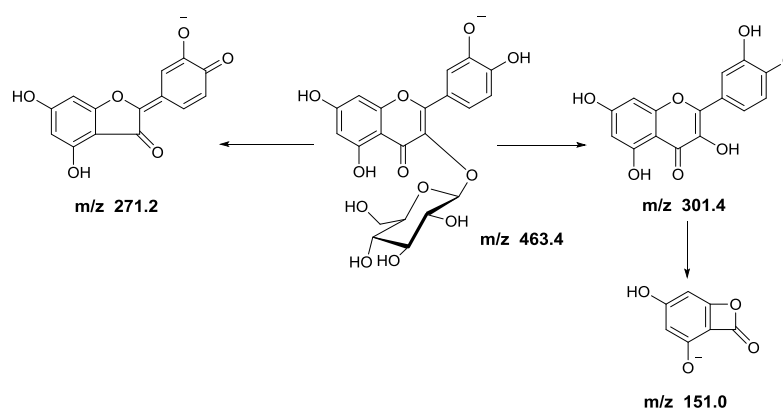
Απομόνωση Μεταβολίτη

Το προϊόν προήλθε από τα φύλλα στο κλάσμα εκχύλισης με EtOAc. Κατόπιν διαχωρισμών μέσω HPLC στο κλάσμα CEAL-E (88.0 mg) απομονώθηκε το κλάσμα CEAL-E₁₃ (13.7 mg) και ταυτοποιήθηκε ως το κερκετινο-3-*O*-β-D-γλυκοζίτης.

Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων NMR του φάσματος μαζών καθώς και του UV-vis συνέβαλλαν στον πλήρη χαρακτηρισμό της ένωσης **60b**.

Το φάσμα μαζών ESI-MS (αρνητικός ιονισμός) εμφάνισε μοριακό θραύσμα [M-H]⁻ στα $m/z = 463.4$ και (ως συνήθως) το διμερές του θραύσματος στα 927.2, συμβατό με τον μοριακό τύπο C₂₁H₂₀O₁₂ (Σχήμα 2.49). Εμφανές είναι το θραύσμα $m/z = 300.3$ να αποτελεί τη χαρακτηριστική κορυφή του αποπρωτονιωμένου άγλυκου ριζικού ιόντος [quercetin-H]⁻, που σχηματίζεται από την ομολυτική διάσπαση του *O*-γλυκοζιτικού δεσμού και έχει προταθεί ως το ενδεικτικό θραύσμα της ένωσης. Το φάσμα ESI-MS που αναλύθηκε συμφωνεί με αντίστοιχες μελέτες της ένωσης σε άλλα φυτικά είδη.^{337,338}



Σχήμα. 2.49: Πορεία θραυσμάτωσης του μεταβολίτη **60b** στο φάσμα μαζών.

Από την μελέτη της χρωματογραφικής συμπεριφοράς του μεταβολίτη παρατηρήθηκε ότι κατά την ανάπτυξη του στην πλάκα κελλουλόζης με κινητή φάση AcOH 15% εμφάνισε στα 365 nm μία σκοτεινή ιώδης κηλίδα με τιμή $R_f = 0.55$, υποδεικνύοντας την πολική συμπεριφορά του μορίου.

Η λήψη φασμάτων UV εμφάνισε τις απορροφήσεις που παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.23.

Πίνακας 2.23: Φασματοσκοπικά δεδομένα UV του μεταβολίτη **60b**.

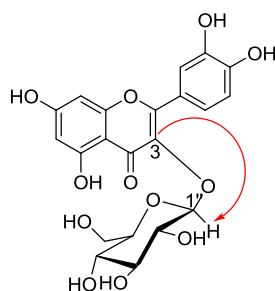
Διάλυμα	Απορρόφηση II		Δλ (nm)	Απορρόφηση I		Δλ (nm)
	λ max I_{β}	I_{α}	από την τιμή διαλ. MeOH	I_{β}	λ max I_{α}	από την τιμή διαλ. MeOH
MeOH	256	266 sh		300 sh	359	
MeONa	272	-	+16	329	410	+51
AlCl ₃	273	-	+17	300	427	+68
AlCl ₃ /HCl	269	300.01 sh	+13	362	402	+43
NaOAc	273	-	+17	323 sh	400	+41
NaOAc/H ₃ BO ₃	262	-	+6	293 sh	379	+20

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως οι βαθυχρωμικές μετατοπίσεις κατά την προσθήκη MeOH, AcONa & AlCl₃/HCl πιστοποιούν αντίστοιχα την ύπαρξη ελευθέρων υδροξυλίων στις θέσεις 5 και 7 και την ύπαρξη του συστήματος 7-OH και καρβονυλίου στη θέση 4. Αντίστοιχα, παρόμοια μετατόπιση παρουσία NaOAc/H₃BO₃ επιβεβαιώνει το κατεχολικό σύστημα στο δεύτερο αρωματικό δακτύλιο. Από την τιμή της απορρόφησης της κορυφής I του μεθανολικού διαλύματος (359 nm) συμπεραίνεται ότι η ουσία ανήκει στις φλαβονόλες. Με την προσθήκη MeONa παρατηρείται βαθυχρωμική μετατόπιση κατά +51 nm της κορυφής I_{α} , η οποία θα πρέπει να αποδοθεί στο ελεύθερο υδροξύλιο της θέσεως 4'. Η βαθυχρωμική μετατόπιση κατά +43 nm της I_{α} κορυφής μετά την προσθήκη AlCl₃, οφείλεται στο σχηματισμό συμπλόκου, το οποίο μετά την προσθήκη HCl διαλύεται μερικώς, υποδηλώνοντας την παρουσία συστήματος δύο ortho-OH στον B δακτύλιο. Αυτό επιβεβαιώνεται και μετά την προσθήκη NaOAc/H₃BO₃. Το -OH της θέσης 7 είναι ελεύθερο, διότι στο φάσμα με NaOAc παρατηρείται βαθυχρωμική μετατόπιση της κορυφής II κατά 17 nm.

Αντίστοιχα, από το φάσμα ¹H-NMR συμπεραίνεται ότι ο μεταβολίτης ανήκει στην ομάδα των φλαβονολών. Τα πρωτόνια H-6', H-5' και H-2' εμφανίζουν την κλασική συστοιχία πολλαπλών κορυφών ενός συστήματος ABX. Το H-6' εμφανίζει ortho/meta coupling (dd, $J_1 = 8.5$, $J_2 = 2.2$ Hz) στα 7.59 ppm και το H-5' ortho ($J =$

8.5 Hz) σε δ 6.87 ppm ενώ το H-6'-H-2' (*meta*-coupling d, $J = 2.2$ Hz) εμφανίστηκε στα 7.70 ppm. Επιπλέον, το ανωμερικό πρωτόνιο H-1'' εμφανίζεται σε δ 5.25 (d, $J = 7.5$). Οι συσχετίσεις από το φάσμα COSY στην περιοχή με δ 3.34-3.71 του πρωτονιακού φάσματος αποκάλυψε τους συντονισμούς των πρωτονίων του σακχάρου (H-2'', H-3'', H-4'', H-5'', H-6''). Οι αντίστοιχοι άνθρακες ταυτοποιήθηκαν από τις συσχετίσεις στο φάσμα HSQC. Με τη βοήθεια από το φάσμα του ^{13}C διαπιστώσαμε την ύπαρξη 15 αρωματικών ανθράκων και παράλληλα με το φάσμα HMBC, επιβεβαιώνεται η συσχέτιση μεταξύ του C-3 της κερκετίνης με το H-1'' της γλυκόζης λόγω του γλυκοζιτικού δεσμού (Σχήμα 2.50). Με βάση τα πειραματικά φασματοσκοπικά δεδομένα του NMR και συγκρίνοντας με την βιβλιογραφία, ταυτίζονται με τα δικά μας για τη δομή που απομονώσαμε ως κερκετινο 3-*O*- β -D-γλυκοζίτη.³³⁹

Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα NMR παρουσιάζονται στον παρακάτω Πίνακα 2.24.



Σχήμα 2.50: Κυριότερη αλληλεπίδραση του φάσματος HMBC για τον μεταβολίτη **60b**.

Πίνακας 2.24: Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **60b**, (CD_3OD , 500 MHz).

#	^{13}C	HSQC	$\delta^1\text{H}$	Πολλαπλότητα, (J, Hz)	COSY	HMBC
Αγλυκο τμήμα Φλαβονόλης						
2	159.0	-	-	-	-	-
3	135.6	-	-	-	-	H-1''
4	179.5	-	-	-	-	-
5	163.1	-	-	-	-	-
6	99.9	H-6	6.20	d, $J = 2.0$ Hz, 1H	H-8	H-8
7	166.2	-	-	-	-	-
8	94.7	H-8	6.39	d, $J = 2.0$ Hz, 1H	H-6	H-6
9	158.5	-	-	-	-	-
10	105.7	-	-	-	-	-
1'	123.2	-	-	-	-	-
2'	117.5	H-2'	7.70	d, $J = 2.2$ Hz, 1H	H-6'	H-6'
3'	145.9	-	-	-	-	-
4'	149.9	-	-	-	-	-

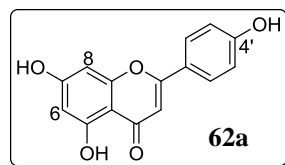
#	¹³ C	HSQC	δ ¹ H	Πολλαπλότητα, (J, Hz)	COSY	HMBC
5'	116.0	H-5'	6.87	d, J = 8.5 Hz, 1H	H-6'	H-6'
6'	123.1	H-6'	7.59	dd, J ₁ = 8.5, J ₂ = 2.2 Hz, 1H	H-5'	H-2', H-5'
β-D-Γλυκόζη						
1''	104.3	H-1''	5.25	d, J = 7.5 Hz, 1H	H-2''	H-2''
2''	75.7	H-2''	3.48	dd, J ₁ = 9.2, J ₂ = 7.5 Hz, 1H	H-1''	H-3''
3''	78.1	H-3''	3.42	t, J = 8.8 Hz, 1H	H-2'', H-4''	H-2'', H-4''
4''	71.2	H-4''	3.34	t, J = 8.8 Hz, 1H	H-3'', H-5''	H-3''
5''	78.5	H-5''	3.21	ddd J ₁ = 9.5 Hz, J ₂ = 5.4, J ₃ = 2.4 Hz, 1H	H-6b''	H-2'', H-4''
6''	62.6	H-6a''	3.71	dd, J ₁ = 11.9, J ₂ = 2.4 Hz, 1H	H-5'', H-6b''	H-4''
		H-6b''	3.57	dd, J ₁ = 11.9, J ₂ = 2.4 Hz, 1H	H-5'', H-6a''	

Είναι το πιο γνωστό δευτερογενές προϊόν ευρέως διαδεδομένο στην πλειοψηφία των φυτικών οικογενειών. Η φλαβονόλη **60b** έχει ανιχνευτεί σε περισσότερες από 20 οικογένειες φυτών όπως: Lamiaceae, Asteraceae, Bromeliaceae, Crassulaceae, Salicaceae, Primulaceae, Saxifragaceae, Umbelliferae, Thelypteridaceae και Onagraceae.³⁴⁵ Η πρώτη αναφορά βρέθηκε στο βαμβάκι *Gossypium herbaceum* (Malvaceae). Στο γένος *Phlomis* συναντάται μόνο στα είδη *P. spinidens* και *P. aurea*.

Υψηλή συγκέντρωση από τον μεταβολίτη **60b** υπάρχει στα μήλα, στο τσάι, στα κρεμμύδια και στο κραταιγό (*Cratagus sp.*, Rosaceae). Επιπλέον αποτελεί ένα από τα βασικά συστατικά της πρόπολης.³⁴⁰ Έχει αποδειχθεί ότι τα γλυκοζιλιωμένα παράγωγα της κερκετίνης μπορούν να αναστείλουν πολλά βασικά ένζυμα, όπως τη φωσφολιπάση A2 και C, την πρωτεΐνη της τυροσίνης, τη λιποξυγενάση και τη κυκλοοξυγονάση. Επίσης, παρουσιάζει αντι-ισταμινική, αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη και αντικαρκινογόνο δράση, συμβάλει στην βελτίωση των συμπτωμάτων της κόπωσης, της κατάθλιψης, του άγχους καθώς αναστείλει τη στεφανιαία νόσο και τις καρδιακές παθήσεις.^{341,342}

2.6.9. Μεταβολίτης: Απιγενίνη

[5,7-Δυδροξυ-2-(4-υδροξυφαινυλ)-4H-1-βενζοπυραν-4-όνη]



Απομόνωση Μεταβολίτη

Η ένωση απομονώθηκε από το υπόλειμμα του EtOAc των φύλλων μέσω διαχωρισμού από το κλάσμα CEAL-H (244.0 mg) με C.C., Sephadex LH-20. Ο μεταβολίτης παραλήφθηκε σε καθαρή μορφή στο κλάσμα CEAL-HI (4.0 mg) υπό μορφή κίτρινης κόνεως.

Φασματοσκοπική Ανάλυση

Η ταυτοποίηση του μεταβολίτη έγινε βάσει της χρωματογραφικής συμπεριφοράς σε συνδυασμό των φασματοσκοπικών δεδομένων NMR, του φάσματος μαζών (ESI-MS) και του φάσματος UV-vis αντίστοιχα, τα οποία επιβεβαιώνουν ότι ο μεταβολίτης έχει δομή φλαβονοειδούς.

Από τη μελέτη της χρωματογραφικής συμπεριφοράς του μεταβολίτη παρατηρείται ότι κατά την ανάπτυξη του σε πλάκα κελλουλόζης με κινητή φάση AcOH 15% εμφανίζει μία σκοτεινή ιώδης κηλίδα με πολύ χαμηλή τιμή $R_f = 0.05$, ένδειξη ότι πρόκειται περί γενίνης. Μετά από ψεκασμό με το αντιδραστήριο Neu, η κηλίδα πήρε χρώμα πράσινο-κίτρινο. Μετά από την έκθεση της πλάκας στο φως της ημέρας για 24 h η κηλίδα έγινε ερυθρωπή, χαρακτηριστική για παράγωγα απιγενίνης.³⁰³

Πίνακας 2.25: Φασματοσκοπικά δεδομένα UV του μεταβολίτη **62a**.

Διάλυμα	Απορρόφηση II		Δλ (nm)	Απορρόφηση I		Δλ (nm)
	λ_{\max} IIβ	IIα	από την τιμή διαλ. MeOH	Iβ	λ_{\max} Iα	από την τιμή διαλ. MeOH
MeOH	268	298 sh		-	335	
MeONa	272	-	+4	325 sh	390	+55
AlCl ₃	275	302	+7	347	383	+48
AlCl ₃ /HCl	276	300	+8	344	383	+48
NaOAc	274	306.04	+6	-	379	+44
NaOAc/H ₃ BO ₃	268	311 sh	-	341	-	+6

Οι απορροφήσεις του μεθανολικού διαλύματος του μεταβολίτη **62a** (Πίνακας

2.25) ήταν σύμφωνες με εκείνες της βιβλιογραφίας για την κατηγορία των φλαβονών.³³³ Η βαθυχρωμική μετατόπιση 55 nm (βιβλιογραφική τιμή 56 nm)³⁰³ κατά την προσθήκη NaOMe αποτέλεσε ένδειξη ύπαρξης ελεύθερου 4'-OH. Η βαθυχρωμική μετατόπιση κατά 48 nm της κορυφής Ia μετά την προσθήκη AlCl₃ (βιβλιογραφική τιμή 45 nm)³⁰³ οφείλεται στο σχηματισμό συμπλόκου, το οποίο παραμένει σταθερό και μετά την προσθήκη HCl. Το σύμπλοκο σχηματίζεται από την κετονομάδα της θέσης 4 με το 5-OH. Το γεγονός ότι κατά την προσθήκη AlCl₃/HCl το σύμπλοκο δεν διαλύεται υποδεικνύει την απουσία *ο*-διυδροόξυ συστήματος στον Β δακτύλιο. Η απουσία του *ο*-διυδροόξυ συστήματος στον Β δακτύλιο επιπλέον επιβεβαιώθηκε από την βαθυχρωμική μετατόπιση κατά 6 nm μετά την προσθήκη NaOAc+H₃BO₃. Τέλος, κατά την προσθήκη NaOAc υπήρξε βαθυχρωμική μετατόπιση κατά 6 nm (βιβλιογραφική τιμή 7 nm),³⁰³ η οποία αποτέλεσε ένδειξη ύπαρξης ελεύθερου υδροξυλίου στη θέση 7.

Το φάσμα μαζών έδειξε το μητρικό ιόν [M-H]⁻ *m/z* = 269.5. Τα δεδομένα του φάσματος μαζών της ένωσης **62a** υποστηρίχθηκαν περαιτέρω από τα φασματικά δεδομένα NMR. Το φάσμα ¹H NMR έδειξε την παρουσία δύο *meta*-συζευγμένων αρωματικών πρωτονίων λόγω της παρουσίας διπλών κορυφών σε δ 6.21 και 6.46 (*J* = 2.1 Hz) που αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-6 και H-8. Δύο ζεύγη διπλών κορυφών σε δ 6.93 και 7.84 (*J* = 8.7 Hz) για τα πρωτόνια H-3' / H-5' και H-2' / H-6' του δακτυλίου Β και η απλή κορυφή σε δ 6.60 που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-3 είναι χαρακτηριστικές απορροφήσεις για μία 5,7,4'-τριυδροξυφλαβόνη. Οι συντονισμοί των ανθράκων συσχετίστηκαν και προσδιορίστηκαν με τα πρωτόνια μέσω πειραμάτων HSQC και HMBC όπως παρατίθενται στον Πίνακα 2.26. Η δομή διευκρινίστηκε περαιτέρω από τις συσχετίσεις στα φάσματα COSY. Η βιβλιογραφία επιβεβαίωσε ότι τα φασματικά δεδομένα της ένωσης ταυτιζόταν με την 4',5,7-τριυδροξυφλαβόνη, γνωστή ως απιγενίνη.^{343,344}

Πίνακας 2.26: Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **62a**, (CD₃OD, 500 MHz).

#	¹³ C	HSQC	δ ¹ H	Πολλαπλότητα, (<i>J</i> , Hz)	COSY	HMBC
2	166.3	-		-	-	H-3, H-2'/H-6'
3	103.8	H-3	6.60	s, 1H	-	-
4	183.9					H-3
5	163.2					H-6
6	100.2	H-6	6.21	d, <i>J</i> = 2.1 Hz, 1H	H-8, H-3	H-8
7	166.1					H-2'/H-6, H-3, H-8
8	95.1	H-8	6.46	d, <i>J</i> = 2.1 Hz, 1H	H-6, H-3	H-6

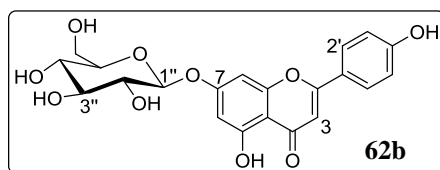
#	¹³ C	HSQC	δ ¹ H	Πολλαπλότητα, (J, Hz)	COSY	HMBC
9	159.4	-		-	-	H-8
10	105.3	-		-	-	H-3, H-6, H-8
1'	123.3	-		-	-	H-3, H-3'/H-5'
2'/6'	129.5	H-2'/H-6'	7.84	d, J = 8.7 Hz, 2H	H-3'/H-5'	H-2'/H-6'
3'/5'	117.0	H-3'/H-5'	6.93	d, J = 8.7 Hz, 2H	H-2'/H-6'	H-3'/H-5'
4'	162.8	-		-	-	H-2'/H-6, H-3'/H-5'

Ο μεταβολίτης **62a** όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή (βλ. Δρογοχημεία) έχει απομονωθεί από 7 είδη του γένους *Phlomis*. Η φλαβόνη **62a** έχει αναφερθεί και σε άλλα είδη της οικογένειας Lamiaceae (*Salvia* sp., *Scutellaria* sp.)³⁴⁵ καθώς έχει απομονωθεί και από την ρητίνη των φύλλων *Larrea* sp. (Zygophyllaceae).³⁴⁵ Είναι ένα φυσικό προϊόν που απαντάται σε μια ποικιλία φρούτων, λαχανικών, φαρμακευτικών φυτών, όπως τα πορτοκάλια, το σκόρδο, την πρόπολη. Το ποσό του είναι ιδιαίτερα υψηλό στον μαϊντανό και το σέλινο.³⁴⁶

Τα τρέχοντα στοιχεία της βιβλιογραφίας δείχνουν ότι η φλαβόνη **62a** έχει πολλές θετικές επιδράσεις, συμπεριλαμβανομένης της αντικαρκινικής, της προστασίας των βιολογικών οργάνων (καρδιά: ανακούφιση της πειραματικής αυτοάνοσης μυοκαρδίτιδας,³⁴⁷ εγκέφαλο, ήπαρ και πνεύμονες), της υπότασης, της υπογλυκαιμίας, της μείωσης λιπιδίων, της αντιφλεγμονώδους δράσης, της αντιοστεοπόρωσης και της ανοσοποιητικής ρύθμισης μέσω της υγειονομικής περίθαλψης σε τρόφιμα πλούσια σε απιγενίνη. Η αντιοξειδωτική δράση είναι μια κοινή ιδιότητα των φαινολικών μεταβολιτών. Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι υψηλή δόση απιγενίνης μπορεί να προκαλέσει την ηπατοτοξικότητα, εξακολουθούν να απαιτούνται μελλοντικές μελέτες για την αντιμετώπιση της ασφάλειάς της.³⁴⁸

2.6.10. Μεταβολίτης: Απιγενινο-7-Ο-β-D-γλυκοζίτης

[5-Υδροξυ-2-(4-υδροξυφαινυλ)-7-[(3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,4,5-τριυδροξυ-6-(υδροξυμέθυλ)οξα-2-υλο]οξυχρωμεν-4-όνη]



Απομόνωση Μεταβολίτη

Παραλήφθηκε κατά την διάρκεια επεξεργασίας των κλασμάτων των ανθέων μέσου του EtOAc. Η ένωση απομονώθηκε με τη χρήση PTLC κελλουλόζης στο κλάσμα CMX-EO (30.7 mg) όπου συλλέχθηκε καθαρή στο κλάσμα CMX-EOγ, 1.0 mg υπό μορφή κίτρινης κόνεως.

Φασματοσκοπική Ανάλυση

Από τη μελέτη της χρωματογραφικής συμπεριφοράς του μεταβολίτη παρατηρείται ότι κατά την ανάπτυξη του σε πλάκα κελλουλόζης με κινητή φάση AcOH 15% εμφάνισε τιμή $R_f = 0.53$, ενδεικτική της πολικής συμπεριφοράς του μορίου. Στα φάσματα UV-vis εμφανίζονται οι απορροφήσεις που παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.27, όπου από την τιμή απορρόφησης της κορυφής στα 335 nm του μεθανολικού διαλύματος, διαπιστώνουμε ότι η ουσία ανήκει στις φλαβόνες.

Πίνακας 2.27: Φασματοσκοπικά δεδομένα UV της ένωσης **62b**.

Διάλυμα	Κορυφή II	Δλ (nm) από την τιμή διαλ. MeOH	Κορυφή I	Δλ (nm) από την τιμή διαλ. MeOH
	λ_{\max} II	Ιβ		λ_{\max} Ια
MeOH	268			335
MeONa	268	-		388
AlCl ₃	276	+8	346	381
AlCl ₃ /HCl	275	+7		380
NaOAc	267	-1		386
NaOAc/H ₃ BO ₃	270	+2		340

Από τις απορροφήσεις του μεθανολικού διαλύματος (335 nm), (βιβλιογραφική τιμή 333 nm)³⁰³ διαπιστώνεται ότι ο μεταβολίτης ανήκει στις φλαβόνες. Το 4'-OH είναι ελεύθερο γεγονός που επαληθεύεται από την βαθυχρωμική μετατόπιση Δλ = 53 nm της κορυφής Ια με την προσθήκη MeONa. Η εμφάνιση μιας νέας ζώνης στα 381 nm που παρατηρείται με το αντιδραστήριο AlCl₃ αποκαλύπτει μια βαθυχρωμική

μετατόπιση που επάγεται από ένα OH στη θέση 5, η προσθήκη HCl δεν παρουσιάζει σημαντική διαφορά (απουσία της μετατόπισης του υποχρώματος), γεγονός που επιβεβαιώνει την παρουσία μίας μόνο υδροξυλομάδας στον δακτύλιο B.

Το φάσμα υπεριώδους ακτινοβολίας που λαμβάνεται με NaOAc δεν προκαλεί βαθυχρωμική μετατόπιση της κορυφής II σε σύγκριση με το φάσμα που καταγράφεται σε MeOH, πράγμα που σημαίνει ότι δεν υπάρχει ελεύθερη υδροξυλομάδα στη θέση 7. Το 7-OH είναι δεσμευμένο επειδή παρατηρείται υψιχρωμική μετατόπιση μόνο κατά 1 nm της κορυφής II μετά από την προσθήκη NaOAc. Η βαθυχρωμική μετατόπιση μετά από προσθήκη AlCl₃ οφείλεται στο σχηματισμό συμπλόκου ανάμεσα στο 5-OH και της κετονομάδας το οποίο παραμένει σταθερό μετά την προσθήκη HCl.

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων 1D και του 2D NMR πειραμάτων καθώς και του φάσματος μαζών (LC/MS) οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για δομή φλαβονοειδούς. Το φάσμα μαζών υπέδειξε ότι η ένωση έχει ένα άτομο οξυγόνου λιγότερο από την ένωση **58b**. Ο μοριακός τύπος προσδιορίστηκε ως C₂₁H₂₀O₁₀, όπως επιβεβαιώθηκε από το φάσμα μαζών αρνητικού ιονισμού (ESI-MS) $m/z = 431.4 [M-H]^-$ και $m/z = 268.1$. Το δεύτερο θραύσμα προέρχεται από διάσπαση του γλυκοζιτικού δεσμού και απομάκρυνση του μονοσακχαρίτη, (απώλεια του m/z 162 της εξόζης).

Το φάσμα ¹H NMR έδειξε παρόμοιο προφίλ με το φάσμα της ένωσης **58b** το οποίο περιείχε μια ομάδα μονοσακχαριτικών σημάτων και ορισμένα σήματα στην αρωματική περιοχή (Πίνακας 2.28). Πιο συγκεκριμένα, παρατηρούνται δύο διπλές κορυφές ισοδύναμων πρωτονίων για τα πρωτόνια H-2' - H-6' και H-3' - H-5' που συζεύγονται μεταξύ τους με σταθερές σύζευξης 8.7 Hz καθώς και δύο διπλές κορυφές με $J = 2.2$ Hz για τα πρωτόνια H-8 και H-6. Το φάσμα ¹³C NMR έδειξε 19 σήματα συμπεριλαμβανομένων δύο ισχυρών σημάτων σε δ 117.2 ppm (C-3' και C-5') και 129.7 ppm (C-2' και C-6').

Τα αποτελέσματα μας συγκρίθηκαν με αντίστοιχα φασματοσκοπικά δεδομένα που συνηγορούν στην ένωση απιγενινο-7-O-β-D-γλυκοζίτης.³⁴⁹

Ο μεταβολίτης **62b**, έχει αναφερθεί σε 5 είδη του γένους *Phlomis*. Απαντάται στην ακυλιωμένη του μορφή σε φυτά πολλών οικογενειών. Ενδεικτικά αναφέρουμε Lamiaceae (*Mentha* sp., *Teucrium* sp., *Scutellaria* sp.),³⁵⁰ Asteraceae (*Martiacaria* sp., *Cynara* sp., *Achillea* sp.)³⁵¹ Apiaceae, Fabaceae, Lycopodiaceae, Pteridaceae και Equisetaceae.³⁵²

Πίνακας 2.28: Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **62b**, (CD₃OD, 500 MHz).

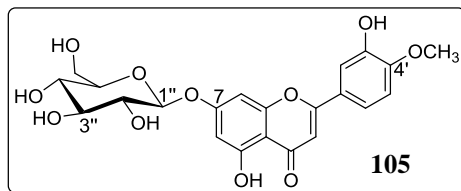
#	¹³ C	HSQC	δ ¹ H	Πολλαπλότητα, (J, Hz)	COSY	HMBC
Αγλυκο τμήμα Φλαβόνης						
2	166.8	-	-	-	H-2', H-6'	-
3	104.0	H-3	6.67	s, 1H	-	-
4	184.1	-	-	-	-	-
5	159.0	-	-	-	-	-
6	101.2	H-6	6.50	d, J = 2.2 Hz, 1H	H-8	-
7	164.9†	-	-	-	-	H-6
8	96.2†	H-8	6.83	d, J = 2.2 Hz, 1H	H-6	-
9	162.8	-	-	-	-	H-6
10	107.1	-	-	-	-	H-6, H-3
1'	123.1	-	-	-	-	H-3, H-3', H-5'
2'/ 6'	129.7	H-2', H-6'	7.89	d, J = 8.7 Hz, 2H	H-3', H-5'	-
3'/ 5'	117.2	H-3', H-5'	6.93	d, J = 8.7 Hz, 2H	H-2', H-6'	-
4'	162.9†	-	-	-	-	H-2', H-6', H-3', H-5'
β-D-Γλυκόζη						
1''	101.6	H-1''	5.07	d, J = 7.5 Hz, 1H	H-2'', H-3''	-
2''	74.7		3.50	m, 1H	*	-
3''	77.9		3.42	m, 1H	*	-
4''	71.3		3.49	m, (overlap), 1H	*	-
5''	78.4		3.56	m, 1H	*	-
6''	62.6	6a''	3.71	dd, J ₁ = 12.1, J ₂ = 2.2 Hz, 1H	6b''	-
		6b''	3.93	dd, J ₁ = 12.1, J ₂ = 6.0 Hz, 1H	6a''	

† Η συσχέτιση έγινε από τα φάσμα HSQC, HMBC. * Unclear due to overlapping.

Η δράση του απιγενινο-7-*O*-β-D-γλυκοζίτη αποδίδεται στη μορφή της γενίνης ως απιγενίνη. Ωστόσο μελέτες έδειξαν, την δράση της ως αντιμυκητιασικό (*Candida* sp.), μέσω προσδιορισμού της διαπερατότητας μεμβράνης και μέτρησης της αναστολής δραστικών οξειδωτικών ειδών και της αναστολής του ενζύμου CYP51. Η κυτταροτοξική επίδραση του **62b** αξιολογήθηκε και σε κύτταρα καρκίνου του παχέος εντέρου HCT116 με τη μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων, του ρυθμού απόπτωσης και της έκφρασης των γονιδίων που σχετίζονται με τον καρκίνο του παχέος εντέρου.³⁵³

2.6.11. Μεταβολίτης: Διοσμετινο-7-*O*-β-D-γλυκοζίτης

[5-Υδροξυ-2-(3-υδροξυ-4-μεθοξυφαινυλο)-7-[(2*S*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,4,5-τριυδροξυ-6-(υδροξυμεθυλ)οξαν-2-υλ]οξυχρωμεν-4-όνη]



Απομόνωση Μεταβολίτη

Παραλήφθηκε μετά από τις εκχυλίσεις κυρίως στα κλάσματα της *n*-BuOH και σε ένα κλάσμα του EtOAc των ανθέων. Απομονώθηκε μετά από διαχωρισμούς με HPLC υπό μορφή κίτρινου ιζήματος και ταυτοποιήθηκε στα κλάσματα COB-HD₂ (4.3 mg), COB-HE₄ (9.8 mg) και CMX-DO₁₆ (1.1 mg). Για τις αρχικές ποσότητες κάθε κλάσματος βλέπε στο πειραματικό μέρος.

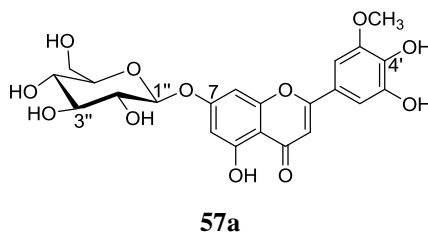
Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός

Ο μεταβολίτης ταυτοποιήθηκε με χρήση φασματοσκοπίας 1D και 2D NMR, σε συνδυασμό με τα δεδομένα από το φάσμα μαζών (ESI-MS) της ένωσης **105**. Ερμηνεύοντας το φάσμα μαζών στον αρνητικό ιονισμό, παρατηρήσαμε ένα ισχυρό μοριακό ιόν $m/z = 461.2$ [M-H]⁻. Περεταίρω θραυσμάτωση του μητρικού ιόντος (MS²) έδωσε το θραύσμα $m/z = 299.0$ (άγλυκο τμήμα).

Η ανάλυση των φασματοσκοπικών δεδομένων NMR εμφανίζεται στον Πίνακα. 2.29. Προσπαθώντας να ερμηνεύσουμε και να ταυτοποιήσουμε τον μεταβολίτη **105**, από το φάσμα ¹H-NMR, έγινε αντιληπτό πως πρόκειται για φλαβονοειδές τύπου φλαβόνης σε γλυκοζυλιωμένη μορφή. Χαρακτηριστική κορυφή στο φάσμα ¹H-NMR ήταν σε δ 3.97 (-OCH₃) η απορρόφηση της μεθόξυ ομάδας. Στην αρωματική περιοχή εμφανίζονται οι τυπικές απορροφήσεις για τα πρωτόνια του δακτυλίου B, τα οποία σχηματίζουν σύστημα ABX, υποδηλώνοντας την ύπαρξη υποκαταστάτη στη θέση 4' του δακτυλίου B. Αυτό, επιβεβαιώνεται και από το φάσμα HMBC, όπου διακρίνεται η αλληλεπίδραση του C-4' με το μεθύλιο της μεθοξυομάδας με το πρωτόνιο του (H-4' OCH₃). Επιπλέον σε δ 7.52 (d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), δ 7.56 (dd, $J_1 = 8.3$, $J_2 = 2.0$ Hz, H-6') και δ 6.94 ($J = 8.3$ Hz, H-5') εμφανίστηκαν οι απορροφήσεις του B δακτυλίου. Σε χαμηλότερα πεδία βρίσκονται τα πρωτόνια της

θέσεως H-3 (s, 6.70), καθώς και τα πρωτόνια H-8 και H-6 του δακτυλίου A ως δύο διπλές κορυφές σε δ 6.86 ($J = 2.3$ Hz) και 6.50 ($J = 2.3$ Hz), αντίστοιχα. Στην περιοχή δ 3.0-4.0 ppm αντιστοιχούν τα πρωτόνια του σακχάρου της β -γλυκόζης με θέση ακυλίωσης να είναι πάλι η θέση 7 του φλαβονοειδούς, όπως προκύπτει από τις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων H-6 και H-8. Τα πρωτόνια αυτά είναι ελαφρώς αποθωρακισμένα όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Οι απορροφήσεις των ανθράκων είναι παρόμοιες με τα αντίστοιχα γλυκοζυλιωμένα φυσικά προϊόντα για τη θέση C-7 όπως σε ανάλογα που αναφέρθηκαν (**63f**, **58b**, **62b**) με την μόνη διαφορά την παρουσία του C-4'-OCH₃ σε δ 56.7 ppm.

Κατόπιν βιβλιογραφικής ανασκόπησης τα δεδομένα έρχονται σε συμφωνία για τον μεταβολίτη **105**, ως διοσμετινο-7-*O*- β -D-γλυκοζίτης.³⁵⁴ Αυτό που ισχυροποιεί την θέση ότι η ένωση δεν είναι ο χρυσοεριολο-7-*O*- β -D-γλυκοζίτης (**57a**)^{71,158} είναι η έντονη θωράκιση του H-3 που εμφανίζεται σε δ 6.70 και όχι σε δ 6.90-6.95 λόγω της παρουσίας της μεθόξυ-ομάδας σε para- θέση. Το θετικό φαινόμενο συντονισμού της para- μεθόξυ ομάδας είναι γνωστό και δίνει την δυνατότητα ηλεκτρονικού εμπλουτισμού της θέσης 3-στο μόριο.



Πίνακας 2.29: Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **105**, (CD₃OD, 500 MHz).

#	¹³ C	HSQC	δ^1 H	Πολλαπλότητα, (J, Hz)	COSY	HMBC
Αγλυκο τμήμα Φλαβόνης						
2	164.8	-	-	-	-	H-3, H-2', H-6'
3	104.5	H-3	6.70	s, 1H	-	-
4	184.4	-	-	-	-	-
5	159.2	-	-	-	-	H-8
6	101.3	6	6.50	d, $J = 2.3$ Hz, 1H	H-6	H-8
7	168.8	-	-	-	-	-
8	96.2†	8	6.86	d, $J = 2.3$ Hz, 1H	H-8	H-6
9	156.7†	-	-	-	-	H-8
10	104.5	-	-	-	-	-
1'	123.4	-	-	-	-	H-2'
2'	110.9	2'	7.52	d, $J = 2.0$ Hz, 1H	H-6'	H-6'
3'	147.8	-	-	-	-	-
4'	150.9†	-	-	-	-	H-2', H-5', H-4' OCH ₃
5'	116.9	-	6.94	d, $J = 8.3$ Hz, 1H	H-6'	-

#	¹³ C	HSQC	$\delta^1\text{H}$	Πολλαπλότητα, (J, Hz)	COSY	HMBC
6'	122.1	6'	7.56	dd, $J_1 = 8.3, J_2 = 2.0$ Hz, 1H	H-2', H-5'	H-2'
4' -OCH ₃	56.7	H-4' OCH ₃	3.97	s, 3H		-
β-D-Γλυκόζη						
1''	101.6†	1''	5.08	br.d $J = 7.5$ Hz, 1H	H-2''	-
2''	74.8	2''	3.50	t, $J = 3.5$ Hz, 1H	H-1''	H-4''
3''	71.3	3''	3.40	m, 1H	H-2''	-
4''	78.4	4''	3.49	m, (overlap*), 1H	H-3'', H-5''	H-2''
5''	77.9	5''	3.56	m, 1H	H-4'', H-6a''	H-4'', H-3''
6''	62.5	6a''	3.71	dd, $J_1 = 12.2, J_2 = 6.0$ Hz, 1H	H-5'', H-6b''	-
		6b''	3.93	dd, $J_1 = 12.2, J_2 = 2.2$ Hz, 1H	H-6a''	-

†Συσχετίσεις από τα φάσματα HSQC, HMBC, *unclear due to overlapping.

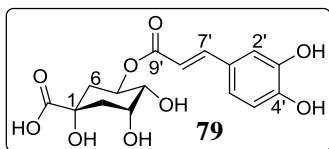
Δεν έχει αναφερθεί ξανά στα φυτά του γένους *Phomis*, ο μεταβολίτης **105** ωστόσο το συναντάμε σε άλλα είδη της ίδιας οικογένειας όπως *Origanum syriacum*, *Dracocephalum tanguticum* Maxim, *Dracocephalum moldavica* L. και *Mentha* sp.^{310,311} Ως συνήθως απαντάται στις οικογένειες Caprifoliaceae,³⁵⁵ Asteraceae.³⁵⁶ Ταυτοποιήθηκε και σε θαλάσσια φύκια της οικογένειας Zosteraceae (*Zostera marina* και *Z. nana*).³⁵⁷

Σε μελέτες σχετικά με την δράση του μεταβολίτη **105** χαρακτηρίζεται ως ουσία ηπατοπροστατευτική, κυτταροτοξική³⁵⁸ και δραστική στην θεραπεία του ίκτερου.³⁵⁹ Διαφορετικά ανθρώπινα εντερικά βακτηρίδια απομονώθηκαν και υποβλήθηκαν σε διαλογή για την ικανότητά τους να μετασχηματίζουν τον διοσμεινο-7-*O*- β -D-γλυκοζίτη. Εντοπίστηκε, ένα Gram (-) αναερόβιο βακτήριο, ικανό να τον μεταβολίζει.³⁶⁰

2.7. ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΟΞΕΑ

2.7.1. Μεταβολίτης: Χλωρογενικό Οξύ

[(1*S*,3*R*,4*R*,5*R*)-3-[(2*E*)-3-(3,4-Δυδροξυφαινυλ)προπ-2-ενοϋλ]οξυ]-1,4,5-τριυδροξυ)κυκλοεξακαρβοξυλικό οξύ]



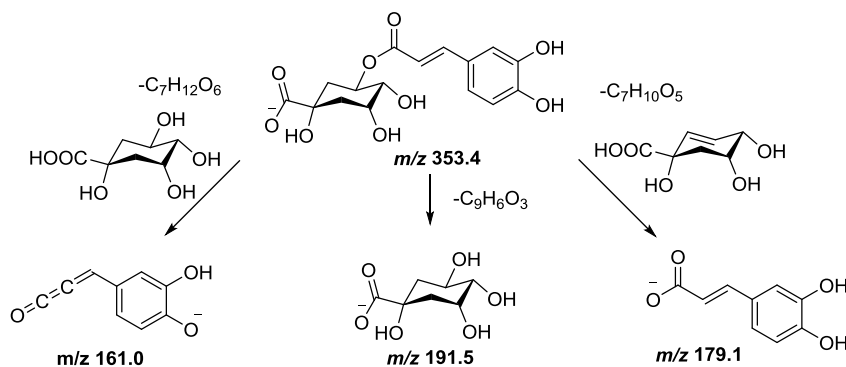
Απομόνωση Μεταβολίτη

Η ένωση προσδιορίστηκε στα άνθη, μετά από κατανομές υγρού-υγρού του μεθανολικού εκχυλίσματος, τόσο σε κλάσματα του EtOAc όσο και της n-BuOH, όπως περιγράφεται αναλυτικά στο πειραματικό μέρος. Αρχικά απομονώθηκε με C.C., επί γέλης πυριτίας, στο κλάσμα CMX-EW (5.7 mg) και μέσω διαχωρισμών HPLC στα κλάσμα COB-HF₁ (3.0 mg), COB-HF₂ (18.7 mg), COB-HF₃ (15.6 mg) και COB-HE₂ (2.5 mg), με την μορφή κόνεως.

Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός

Ο μεταβολίτης ταυτοποιήθηκε κατόπιν φασματοσκοπικής μελέτης των φασμάτων ¹H-NMR και ¹³C-NMR και των αντίστοιχων δισδιάστατων πειραμάτων (2D-NMR) καθώς και του φάσματος μαζών. Η χρωματογραφική μελέτη του μεταβολίτη έδειξε R_f = 0.64 σε διαλύτη Partridge και 0.68 σε AcOH-15%.

Το φάσμα μαζών έδωσε μητρικό ιόν $m/z = 353.4$ [M-H]⁻. Με θραυσμάτωση στο μητρικό ιόν (MS/MS) προέκυψαν τα θραύσματα $m/z = 191, 179, 173, 161$ [M-H]⁻ τα οποία ερμηνεύονται όπως φαίνεται στο παρακάτω Σχήμα 2.51. Τα δεδομένα είναι σε συμφωνία με την βιβλιογραφία.^{361,362}

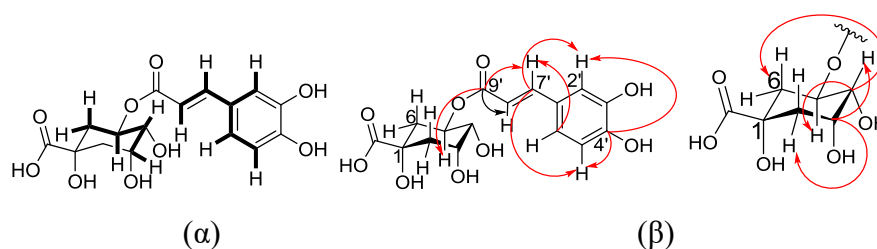


Σχήμα 2.51: Πορεία θραυσμάτωσης του μεταβολίτη 79 στο φάσμα μαζών.

Από την μελέτη του φάσματος $^1\text{H-NMR}$, στην αρωματική περιοχή αναγνωρίζονται οι απορροφήσεις της καφεόυλο- ομάδας, αλλά και της ομάδας του κινικού οξέος. Το φάσμα $^{13}\text{C NMR}$ έδειξε την παρουσία 16 ατόμων άνθρακα συμπεριλαμβανομένων δύο καρβονυλικών ομάδων σε δ 180.8 και 169.1, που αντιστοιχούν στους άνθρακες C-7 και C-9'. Η καφεόυλο- ομάδα μπορεί εναλλακτικά να συνδεθεί με τον άνθρακα 3, 4 ή 5 του κινικού οξέος. Οι χημικές μετατοπίσεις για τους C-3 και C-5 είναι 73.1 και 72.6 ppm, αντίστοιχα. Από το φάσμα HMBC του μεταβολίτη υπάρχει σύζευξη του H-5 (δ 5.37, m) με τον C-9' (Σχήμα 2.52), υποδεικνύοντας ότι η μονάδα του καφεϊκού οξέος συνδέεται με το C-5 γεγονός που επιβεβαιώνει και το πρωτονιακό φάσμα.

Το φάσμα $^1\text{H NMR}$ εμφανίζει τρία αρωματικά πρωτόνια σε δ 6.93 (H-6'), 6.76 (H-5') και δ 7.04 (H-2') ενός ABX συστήματος, επιβεβαιώνοντας την παρουσία ενός τρι-υποκατεστημένου αρωματικού δακτυλίου. Επίσης, οι δυο διπλές κορυφές σε δ 7.56 (d, $J = 16.0$ Hz, H-7') και 6.29 (d, $J = 16.0$ Hz, H-8'), υποδηλώνουν την παρουσία *trans*-δι-υποκατεστημένου τμήματος στο μόριο του καφεϊκού οξέος. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα παρατίθενται στον Πίνακα 2.30.

Οι άνθρακες των δύο μεθυλενίων εμφανίζονται σε δ 39.1 (C-2) και 40.6 (C-6), αντίστοιχα, γεγονός που υποδηλώνει ότι έχουν παρεμφερές χημικό περιβάλλον. Τα δεδομένα είναι σε συμφωνία με αντίστοιχες μελέτες για την ένωσης **79**.^{363,364}



Σχήμα 2.52: Βασικότερες αλληλεπιδράσεις μέσω τεχνικών COSY, όπως παρατηρούνται με έντονη επισήμανση (α) και HMBC (β).

Ο μεταβολίτης **79**, έχει αναφερθεί προηγουμένως στα είδη του γένους *Phlomis* όπως *P. kurdica*, *P. syriaca*, *P. kotschyana* και *P. amanica* Vierch. Εκτός από τα φυτά της οικογένειας Lamiaceae, έχει απομονωθεί σε φυτά διαφόρων οικογενειών όπως: Asteraceae, Apiaceae, Brassicaceae, Ericaceae, Malaceae, Rosaceae, Solanaceae και Saxifragaceae.³⁶⁵

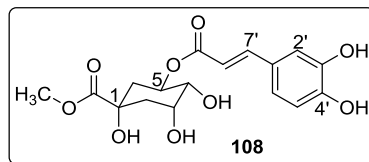
Πίνακας 2.30: Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **79**, (CD₃OD, 500 MHz).

#	¹³ C	DEPT 135	HSQC	δ ¹ H	Πολλαπλότητα, (J, Hz)	COSY	HMBC
Κινικό- τμήμα							
1	77.8	C	-	-	-	-	-
2	39.1	CH ₂	H-2 _{eq}	1.99	dd, J ₁ = 15.0, J ₂ = 3.2 Hz, 1H	H-3, H-5, H-2ax	-
			H-2 _{ax}	2.10	m, 1H	H-3, H-5, H-2eq	
3	73.1	CH	H-3	4.15	br.s, 1H	H-2ax, H-4, H-2eq	H4, H-2ax, H-2eq
4	75.2	CH	H-4	3.69	dd, J ₁ = 9.8, J ₂ = 3.2 Hz, 1H	H-3, H-5	H-2ax, H-2eq, H5, H-6ax, H-6eq
5	72.6	CH	H-5	5.37	td, J ₁ = 15.0 J ₂ = 10.0, J ₃ = 5.0 Hz, 1H	H-4, H-6ax, H-6eq	H-4, H-6
6	40.6	CH ₂	H-6 _{eq}	2.15	dd, J ₁ = 14.8, J ₂ = 3.0 Hz, 1H	H-6ax, H-5	-
			H-6 _{ax}	2.01	d, J = 12.0 Hz, 1H	H-6eq, H-5	
7	180.8	C=O	-	-	-	-	-
Καφεύλο-τμήμα							
1'	127.8	C	-	-	-	-	H-5', H-7', H-8'
2'	115.1	CH	H-2'	7.04	d, J = 2.0 Hz, 1H	H-6'	H-6', H-7'
3'	146.8	C	-	-	-	-	-
4'	149.5	C	-	-	-	-	H-2', H-5', H-6'
5'	116.5	CH	H-5'	6.76	d, J = 8.3 Hz, 1H	H-6'	H-6'
6'	122.9	CH	H-6'	6.93	dd, J ₁ = 8.3, J ₂ = 2.0 Hz, 1H	H-5', H-7'	H-2', H-7'
7'	146.9	CH	H-7'	7.56	d, J = 16.0 Hz, 1H	H-8'	H-2', H-5', H-6'
8'	115.5	CH	H-8'	6.29	d, J = 16.0 Hz, 1H	H-7'	H-6', H-7'
9'	169.1	C=O	-	-	-	-	H-5, H-7', H-8'

Μεταβολίτες τύπου **79**, (μονο- και δι-ακυλο κινικά οξέα, με καφεϊκό, φερουλικό και p-κουμαρικό οξύ ως κύριες ακυλιωτικές ομάδες) θεωρούνται ως φυσικά αντιοξειδωτικά ευρέως διαδεδομένα στο φυτικό βασίλειο.³⁶⁶ Επίσης, αποτελεί έναν ισχυρό αντιφλεγμονώδη παράγοντα και ένα από τα κύρια φαινολικά φυτοχημικά συστατικά που περιέχονται στα σπέρματα του πράσινου καφέ (*Coffea robusta*), τα οποία αποτελούν το 7-9% του βάρους του σε σχέση με το είδος *C. arabica*.³⁶⁷ Παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της ευρείας του έκτασης στο φάσμα πιθανών ωφελειών για την υγεία, συμπεριλαμβανομένων των αντιδιαβητικών, αντικαρκινογόνων και αντιβακτηριακών επιδράσεων.³⁶⁸ Χαμηλότερο περιεχόμενο του μεταβολίτη **79** έχει ανιχνευθεί στις πατάτες, στις ντομάτες, στα μήλα, στα αχλάδια και στις μελιτζάνες.³⁶⁹

2.7.2. Μεταβολίτης: Μεθυλεστέρας του γλωρογενικού οξέος

[Μεθυλ(1*S*,3*R*,4*R*,5*R*)-3-[(*E*)-3-(3,4-διδροξυφαινυλ)προπ-2-ενούλ]οξυ-1,4,5-τριδροξυ) κυκλοεξαν-1-καρβοξυλικός]



Απομόνωση Μεταβολίτη

Ο μεταβολίτης διαχωρίστηκε με PTLC κελλουλόζης (CMX-EKE 46.0 mg) και παραλήφθηκε στο κλάσμα (CMX-EKEγ 14.3 mg) από τα άνθη μετά από τις κατανομές υγρού-υγρού του μεθανολικού εκχυλίσματος σε κλάσμα του EtOAc υπό μορφή ελαίου καφέ χρώματος.

Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός

Ο μεταβολίτης ταυτοποιήθηκε κατόπιν φασματοσκοπικής μελέτης των φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$ και των αντίστοιχων δισδιάστατων πειραμάτων 2D-NMR καθώς και του φάσματος μαζών. Με βάση το πρωτονιακό φάσμα NMR διαπιστώσαμε ότι πρόκειται για έναν μεταβολίτη σε πρόσμιξη με άλλες, πιθανότατα δομικά συγγενείς ενώσεις. Στην ταυτοποίηση συνέβαλαν τα δεδομένα από τα φάσματα μαζών του μεταβολίτη **108**, δίνοντας το αναμενόμενο ιόν τόσο σε θετικό ιονισμό $[\text{M}+\text{Na}]^+$ $m/z = 391.4$ όσο και στον αρνητικό ιονισμό $[\text{M}-\text{H}]^-$ $m/z = 367.3$ γεγονός που μας παρέπεμπε σε πιθανά μεθυλιωμένα ισομερή του γλωρογενικού οξέος. Η πιθανή δομή που προτείνουμε για τον μεταβολίτη **108** είναι ο μεθυλεστέρας του γλωρογενικού οξέως.

Από το φάσμα μαζών (ESI-MS) μέσω της θραυσμάτωσης του ιόντος στα 367.3, προκύπτουν τα θραύσματα $m/z = 179.1$ (απώλεια του καφεούλο τμήματος) και $m/z = 132.9$ (απώλεια του μεθυλιωμένου κινικού τμήματος).

Το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ παρουσίασε διακριτά σήματα σε δ 7.52 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, C-7') και 6.22 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, C-8') για τα *trans* ολεφινικά πρωτόνια. Στην αρωματική περιοχή των πρωτονίων εμφανίστηκε το σύστημα ABX σε δ 7.05 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 6.95 (1H, dd, $J_1 = 8.2$ Hz, $J_2 = 2.0$ Hz, H-6') και 6.79 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5'). Παρατηρήθηκαν ορισμένα πρόσθετα σήματα σε υψηλότερα πεδία που αντιστοιχούν στα πρωτόνια του κινικού οξέος με τρία σήματα μεθινικών πρωτονίων

σε δ 5.28 (1H, td, $J_1 = 12.3$ Hz, $J_2 = 7.8$ Hz, $J_3 = 4.2$ Hz, H-5), 4.30 (1H, dt, $J_1 = 6.5$ Hz, $J_2 = 4.8$ Hz, H-3) και 3.73 (1H, dd, $J_1 = 7.5$ Hz, $J_2 = 3.1$ Hz, H-4). Επίσης, χαρακτηριστική είναι η κορυφή σε δ 3.68 που ολοκληρώνει για 3H και αντιστοιχεί στον μεθυλεστέρα. Το γεγονός ότι το πρωτόνιο της θέσης 5 του κινικού οξέος είναι ιδιαίτερα αποπροστατευμένο μαγνητικά (δ 5.28 ppm) και συζεύγνυται με τρία μαγνητικώς διαφοροποιημένα πρωτόνια (td) οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η καφεόυλο ομάδα είναι συνδεδεμένη με το υδροξύλιο του C-5 του κινικού οξέος το οποίο υιοθετεί ισημερινή διαμόρφωση.³⁷⁰ Μέσω της τεχνικής HMBC για την ένωση **108**, προέκυψε ότι υπάρχουν συσχετισμοί μεταξύ καρβονυλικού άνθρακα του μεθυλεστέρα και των μεθυλενικών πρωτονίων H-2 και H-6. Επίσης, στο ίδιο φάσμα παρατηρήθηκε συσχετισμός μεταξύ του H-5 και του άνθρακα του καρβοξυλίου του καφεϊκού οξέος.

Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα NMR της ένωσης παρατίθενται στον παρακάτω Πίνακα 2.31.

Πίνακας 2.31: Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **108**, (CD₃OD, 500 MHz).

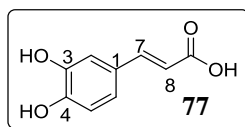
#	¹³ C	DEPT ¹³ C	HSQC	H	Πολλαπλότητα (J, Hz)	COSY	HMBC
Κινικό- τμήμα							
1	75.9	C	-	-	-	-	H-2, H-5, H-6
2	38.1	CH ₂	H-2a	2.20	m, 1H	H-3	H-4
			H-2b	2.21	dd, $J_1 = 13.7$, $J_2 = 3.8$ Hz, 1H		
3	70.6	CH	H-3	4.30	dt, $J_1 = 6.5$, $J_2 = 4.8$ Hz, 1H	H-2	H-6a
4	72.4	CH	H-4	3.73	dd, $J_1 = 7.5$ Hz, $J_2 = 3.1$ Hz, 1H	H-3, H-5	H-5
5	72.1	CH	H-5	5.28	td, $J_1 = 12.3$ Hz, $J_2 = 7.8$ Hz, $J_3 = 4.2$ Hz, 1H	H-4	H-4
6	38.9	CH ₂	H-6a	2.01	dd, $J_1 = 12.8$, $J_2 = 6.4$ Hz, 1H	H-5	-
			H-6b	2.13	dd, $J_1 = 13.2$, $J_2 = 7.9$ Hz, 1H		-
7	175.5	C=O	-	-	-	-	-
8	53.1	OCH ₃	H-8	3.68	s, 3H	-	-
Καφεόυλο- τμήμα							
1'	127.7	C	-	-	-	-	H-5', H-7', H-8'
2'	115.1	CH	H-2'	7.05	d, $J = 2.0$ Hz, 1H	H-6'	H-6', H-7'
3'	146.8	C	-	-	-	-	H-2', H-5', H-6'
4'	149.5	C	-	-	-	-	H-2', H-5', H-6'
5'	116.5	CH	H-5'	6.79	d, $J = 8.2$ Hz, 1H	H-6'	-
6'	123.0	CH	H-6'	6.95	dd, $J_1 = 8.2$, $J_2 = 2.0$ Hz, 1H	H-2', H-5'	H-2', H-5', H-7'
7'	147.3	CH	H-7'	7.52	d, $J = 16.0$ Hz, 1H	H-8'	H-6'
8'	115.2	CH	H-8'	6.22	d, $J = 16.0$ Hz, 1H	H-7'	H-7', H-6'
9'	168.4	C=O	-	-	-	-	H-5, H-7'

Ο Μεθυλεστέρας του χλωρογενικού οξέος (**108**), απομονώνεται για πρώτη

φορά στο γένος *Phlomis*. Μέσω του *Adina rubella* (Rubiaceae) αξιολογήθηκαν οι αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις καθώς και η αναστολή της 5α-αναγωγής του μεθυλεστέρα του χλωρογενικού οξέος ως πιθανού θεραπευτικού παράγοντα για την καλοήγη υπερτροφία του προστάτη (BPH).³⁷¹ Επίσης, εντοπίστηκε στις οικογένειες Clusiaceae (*Hypericum empetrifolium*), Saururaceae (*Houttuynia cordata*)³⁷² Polygonaceae (*Polygonum amplexicaule* var. *sinense*),³⁷³ Asteraceae (*Moquiniastrum polymorphum* subsp. *floccosum*),³⁷⁴ Hydrangeaceae (*Hydrangea serrata* Seringe var *Thunbergii* Sugimoto),³⁷⁵ και στα άνθη του *Bombax ceiba* L., Bombacaceae.³⁷⁶

2.7.3. Μεταβολίτης: Καφεϊκό οξύ

[3-(3,4-Δυδροξυφαινυλο)-2-προπενοϊκό οξύ]



Απομόνωση Μεταβολίτη

Το προϊόν προήλθε από το κλάσμα του EtO₂ των ανθέων του φυτού μέσω C.C., Sephadex LH-20 (COME-H, 17.1 mg). Η ουσία απομονώθηκε ως κόνις υποκίτρινου χρώματος (COME-HC, 0.7 mg.).

Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός

Από τη μελέτη της χρωματογραφικής του συμπεριφοράς παρατηρήθηκε κατά την ανάπτυξή του σε πλάκα κελλουλόζης με κινητή φάση AcOH 15% να εμφανίζει μία σκοτεινή κηλίδα στα 365 nm με χαμηλή τιμή R_f = 0.37.

Το καφεϊκό οξύ αναγνωρίστηκε από το φάσμα ¹H-NMR. Το πρωτονιακό φάσμα έδειξε 5 σήματα στην αρωματική περιοχή. Στην περιοχή των ολεφινικών πρωτονίων υπάρχουν δύο διακριτά σήματα ενδεικτικά μιας *trans* διαμόρφωσης σε δ 6.23 ppm (H-8) και 7.51 ppm (H-7) με σταθερά σύζευξης 16.0 Hz. Επίσης, Παρατηρούνται τα σήματα του ABX συστήματος των πρωτονίων του αρωματικού δακτυλίου σε δ 7.02 (H-2) ως μία διπλή κορυφή, σε δ 6.91 (H-6) και σε δ 6.76 (H-5).

Τα φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη **77** είναι: ¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ 7.02 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H-2), 6.76 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-5), 6.91 (dd, *J*₁ = 8.0, *J*₂ = 2.0 Hz, 1H, H-6), 7.51 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, H-7), 6.23 (d, *J* = 16.0Hz, 1H, H-8).

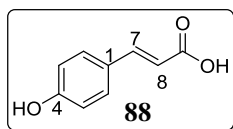
Τα σήματα από το φάσμα ¹H-NMR είναι σε πλήρη συμφωνία με τα αντίστοιχα της βιβλιογραφίας.³⁷⁷

Ο μεταβολίτης **77** αναφέρεται για 3^η φορά στο γένος *Phlomis*. Προηγουμένως ταυτοποιήθηκε στα είδη *P. lychnitis* και *P. stewartii*. Έχει χαρακτηριστεί σε πολλά είδη των οικογένειων Lamiaceae, Asteraceae Myrtaceae, Salviniaceae, και Carpifoliaceae.³⁷⁸ Έχει απομονωθεί και από τον μύκητα της οικογένειας Hymenochaetaceae.³⁷⁹ Το καφεϊκό οξύ έχει αποδειχθεί ότι παρουσιάζει ανοσορρυθμιστική, αντιφλεγμονώδη δράση ότι δρα ως προστατευτικό α-τοκοφερόλης σε λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας (LDL). Επιπλέον έχει αξιολογηθεί ως καλό

υποστρώματα πολυφαινολικών οξειδάσεων και υπό ορισμένες συνθήκες μπορεί να υποστεί οξείδωση σε φυτικούς ιστούς ή προϊόντα φυτικής προέλευσης.³⁸⁰ Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες του καφεϊκού οξέος σε βιολογικά συστήματα έχει αναδειχθεί εκτενώς. Ως αντιοξειδωτικά, αυτές οι ενώσεις εμποδίζουν την παραγωγή δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS), που προκαλούν κυτταρικές βλάβες που σχετίζονται με την ανάπτυξη αρκετών ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου. Η λιποφιλικότητα του διευκολύνει την είσοδό του στα κύτταρα και συνεπώς, συμβάλλει στην αντικαρκινική του δραστηριότητα.³⁸¹

2.7.4. Μεταβολίτης: p-Κουμαρικό οξύ

[(*E*)-3-(4-Υδροξυφαινυλο)-2-προπenoϊκό οξύ]



Απομόνωση Μεταβολίτη

Ο μεταβολίτης **88**, προήλθε από το κλάσμα της n-BuOH του μεθανολικού εκχυλίσματος των ανθέων. Συλλέξαμε τον μεταβολίτη με HPLC, επεξεργάζοντας το κλάσμα COB-HF (63.2 mg). Απομονώθηκε στη συνέχεια των διαχωρισμών στο κλάσμα COB-HF₁₁, (2.8 mg).

Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός

Από το φάσμα ¹H NMR διαπιστώθηκε η ύπαρξη προσμίξεων. Η ένωση λήφθηκε καθαρή ύστερα από κατεργασία με NaHCO₃ και οξίνιση με 3N HCl.

Στο φάσμα ¹H-NMR παρατηρούνται δυο διπλές κορυφές στην περιοχή των αρωματικών πρωτονίων (AB σύστημα, με σταθερά σχάσης $J = 8.7$ Hz) οι οποίες υποδηλώνουν την παρουσία para δι-υποκατεστημένου βενζολίου. Επιπλέον, η παρουσία δυο διπλών κορυφών στα 7.52 και 6.29 ppm υποδηλώνουν την ύπαρξη δυο βινυλικών πρωτονίων τα οποία έχουν *trans* στερεοχημεία αφού η σταθερά σχάσης είναι $J_{7-8} = 16.0$ Hz. Η ύπαρξη αυτών των δυο απορροφήσεων σε περιοχές χαμηλού πεδίου πέρα των συνηθισμένων περιοχών απορρόφησης βινυλικών πρωτονίων, φανερώνει ότι ο διπλός δεσμός C-C βρίσκεται σε συζυγία με μια καρβονυλική ομάδα. Από το φάσμα ¹³C NMR παρατηρούνται 7 σήματα σε περιοχές χαμηλού πεδίου και μάλιστα ο συντονισμός στα 171.1 ppm επιβεβαιώνει την παρουσία του καρβονυλικού άνθρακα.

Το φάσμα μαζών (ESI-MS, αρνητικός ιονισμός) έδωσε χαρακτηριστικό θραύσμα στα $m/z = 163.3$ [M-H]⁻. Τα δεδομένα αυτά βρίσκονται σε απόλυτη ταύτιση με βιβλιογραφικές αναφορές.³⁸²

Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη, *trans*-p-κουμαρικό οξύ: ¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ: 7.52 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H, H-7), 7.42 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H-2/6), 6.80 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H-3/5), 6.29 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H, H-8). ¹³C-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ: 171.1 (C-9), 161.2 (C-4), 146.6 (C-7), 131.1 (C-2, 6),

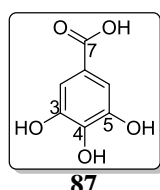
127.3 (C-1), 116.8 (C-3, 5), 115.7 (C-8).

Το φυσικό προϊόν **88**, σε αντίστοιχες φυτοχημικές μελέτες βρέθηκε στα είδη *P. umbrosa* και *P. megalantha*. Επισημαίνουμε ορισμένες οικογένειες που έχει απομονωθεί όπως Poaceae (*Zea mays*),³⁸³ Pinaceae (*Abies* sp.), Plantaginaceae (*Lagotis brevituba*), Lamiaceae (*Prunella* sp.), Myrtaceae (*Eucalyptus* sp.), Fabaceae (*Lotus* sp.) και Rosaceae (*Malus* sp.).^{384,385} Εκτεταμένες έρευνες έχουν δείξει ότι το p-κουμαρικό οξύ παρουσιάζει διάφορες βιοδραστικές δράσεις, περιλαμβανομένων των αντιοξειδωτικών, αντιμεταλλαξιογόνων, αντι-ελκωτικών, αντιαιμοπεταλιακών και αντικαρκινικών δράσεων μειώνοντας τον σχηματισμό καρκινογόνων νιτροζαμινών.³⁸⁶ Επιπλέον εμφανίζουν δράση κατά της μετριαστικής αθηροσκλήρωσης προκαλούμενη βλάβη στους οφθαλμικούς ιστούς, τον τραυματισμό των νευρώνων, του άγχους, της ουρικής αρθρίτιδας και διαβήτη τύπου II.

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι υψηλές βιολογικές δραστηριότητές τους και η χαμηλή απορρόφηση τους.³⁸⁷ Το p-κουμαρικό οξύ εντοπίζεται σε μια μεγάλη ποικιλία εδάδιμων φυτών, όπως φιστίκια, φασόλια, ντομάτες, καρότα, σκόρδα και στους κόκκους κριθαριού.³⁸⁸

2.7.5. Μεταβολίτης: Γαλλικό Οξύ

[3,4,5-Τριυδροξύ βενζοϊκό οξύ]



Απομόνωση Μεταβολίτη

Απομονώθηκε από το κλάσμα της n-BuOH του μεθανολικού εκχυλίσματος των ανθέων. Κατόπιν αρχικών διεργασιών με C.C. και εν συνεχεία με διαχωρισμούς HPLC παραλάβαμε τον μεταβολίτη **87**, από το κλάσμα COB-HF (63.2 mg) και συλλέχθηκε στο κλάσμα COB-HF₇, (1.0 mg).

Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός

Στο φάσμα ¹H NMR παρατηρείται μία απλή απορρόφηση στα 7.1 ppm η οποία αντιστοιχεί, στα 2 ισοδύναμα πρωτόνια του αρωματικού δακτυλίου σε θέση ορθο ως όπως την καρβοξυλομάδα. Στο φάσμα ¹³C NMR παρατηρούνται 5 απορροφήσεις σε περιοχή χαμηλού πεδίου. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα αυτά, συγκρίθηκαν με αντίστοιχα της βιβλιογραφίας.³⁸⁹

Τα φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη **87**: ¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz), δ: 7.1 (s, 2H, H-2 / H-6). ¹³C NMR (500 MHz, CD₃OD), δ: 171.2 (C-7) 146.4 (C-3 / C-5), 139.4 (C-4), 123.1 (C-1) 110.3 (C-2 / C-6).

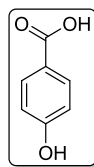
Ο μεταβολίτης **87** από το γένος *Phlomis* έχει αναφερθεί ως φυτοχημικό συστατικό στα είδη *P. umbrosa* και *P. megalantha*. Ορισμένες οικογένειες που απαντάται είναι: Meliaceae (*Toona* sp.), Elaeagnaceae (*Elaeagnus* sp.),³⁹⁰ Euphorbiaceae (*Chrozophora tinctori*),³⁹¹ Oleaceae (*Forsythia* sp.), Clusiaceae (*Allanblackia floribunda*), Phyllanthaceae (*Bridelia micrantha*), Fabaceae (*Caesalpinia sappan*), Vitaceae (*Vitis vinifera*) και Myrtaceae (*Syzygium cordatum*).³⁹²

Το γαλλικό οξύ είναι μία από τις απλούστερες βιοφαινόλες που βρέθηκαν σε πολλά φυτά, όπως στα σπέρματα σταφυλιού, μαύρου και πράσινου τσαγιού. Εμφανίζει αντιοξειδωτική δράση με την ικανότητα να εξουδετερώνει τις βλαπτικές επιδράσεις των ελευθέρων ριζών στους ιστούς και επομένως πιστεύεται ότι το γαλλικό οξύ προστατεύει από τον καρκίνο, την αρτηριοσκλήρωση, τις καρδιακές

παθήσεις.³⁹³ Το γαλλικό οξύ έχει αποδειχθεί ότι διαθέτει αντιμικροβιακή δραστικότητα κατά παθογόνων ανθρώπινων οργανισμών (*Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium acolans*) και σε παθογόνα φυτά (*Erwinia carotovora*).³⁹⁴ *In vitro* μελέτες έδειξαν ότι το γαλλικό οξύ αναστέλλει αποτελεσματικά τον σχηματισμό ινιδίου αμυλοειδούς ινσουλίνης μεταβάλλοντας τη μετατροπή της α-έλικας/β-φύλλου η οποία γενικά προκαλείται κατά τη διάρκεια του σχηματισμού ινιδίων ινσουλίνης.³⁹⁵

2.7.6. Μεταβολίτης: p-Υδροξυ-βενζοϊκό οξύ

[4-Υδροξυβενζοϊκό οξύ]



76

Απομόνωση Μεταβολίτη

Απομονώθηκε από τα άνθη του φυτού, στο κλάσμα του EtO₂. Μετά από C.C. στο κλάσμα COME-F (27.1 mg) παραλήφθηκε στην ποσότητα 5.8 mg στο κλάσμα COME-FB υπό μορφή καφέ κόνεως.

Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός

Από τον συνδυασμό των φασματοσκοπικών δεδομένων NMR και το φάσμα μαζών (ESI-MS, αρνητικός ιονισμός) ήταν φανερό πως το κύριο θραύσμα $m/z = 136.9$ αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν $[M-H]^-$ του μεταβολίτη C₇H₆O₃. Κατά την ανάλυση του φάσματος ¹H-NMR, διαπιστώθηκε η παρουσία προσμίξεων. Το φάσμα ¹H NMR της ουσίας δίνει σήματα που αντιστοιχούν σε 4 πρωτόνια τύπου A₂B₂ (para-υποκατάσταση) για τον αρωματικό δακτύλιο του φαινολικού οξέος, όπου ο υπό μελέτη μεταβολίτης, παρουσιάζει δύο διπλές κορυφές σε δ 6.80 (2H, $J = 8.7$, H-3 / H-5) και δ 7.87 (2H, $J = 8.7$ H-2 / H-6), που η κάθε μία ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια επιβεβαιώνοντας την παρουσία του para-δι-υποκατεστημένο βενζολικού δακτυλίου.

Το φάσμα ¹³C-NMR της ένωσης εμφανίζει συνολικά πέντε απορροφήσεις με ένα σήμα σε δ 170.4, να αντιστοιχεί στον άνθρακα του καρβοξυλίου. Τα άλλα τέσσερα σήματα σε δ 123.1, δ 133.0, δ 116.0 και δ 163.2 των ανθράκων αποδίδονται στους C-1, C-2/C-6, C-3/C-5 και C-4 αντιστοίχως. Με βάση τη φασματοσκοπική ανάλυση και την σύγκριση με την βιβλιογραφία³⁹⁶ η ένωση ταυτοποιείται ως 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ. Από τα φάσμα 2D, επιβεβαιώθηκαν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτονίων από το COSY για τα σήματα H-2 / H-6, με τα H-3 / H-5. Αντίστοιχα στο φάσμα HMBC εμφανίζονται οι αλληλεπιδράσεις των πρωτονίων H-2 / H-6 με τους άνθρακες, C-4, και C-7 αντίστοιχα. Παρόμοια ο C-1 δίνει σήματα με τα πρωτόνια H-3 και H-5. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης παρατίθενται στον παρακάτω Πίνακα 2.32.

Ο μεταβολίτης **76**, έχει απομονωθεί στα είδη *P. bracteosa* και *P. stewartii*.

Εκτός από τα είδη του γένους *Phlomis* απαντάται και σε πολλά φαρμακευτικά είδη της οικογένειας Lamiaceae όπως (*Mellisa* sp., *Mentha* sp., *Origanum* sp., *Salvia* sp., *Sideritis* sp.). Επίσης, ταυτοποιήθηκε στις οικογένειες Apiaceae (*Daucus carota*),³⁹⁶ Araceae (*Elaeis guineensis*, *Roystonea regia*), Vitaceae (*Vitis vinifera*) και Fabaceae (*Pterocarpus santalinus*). Έχει απομονωθεί και σε μύδια *Mespilus germanica*.³⁹⁷

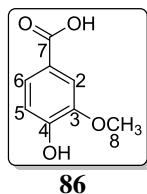
Πίνακας 2.32: Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **76**, (CD₃OD, 500 MHz).

#	¹³ C	HSQC	δ ¹ H	Πολλαπλότητα, (J, Hz)	COSY	HMBC
1	123.1	-	-	-	-	H3, H5
2/6	133.0	H-2, H-6	7.87	d, J = 8.7, 2H	H-3, H-5	-
3/5	116.0	H-3, H-5	6.80	d, J = 8.7, 2H	H-2, H-6	-
4	163.2	-	-	-	-	H2, H6
7	170.4	-	-	-	-	H2, H6

Η βιβλιογραφική έρευνα αποκάλυψε τις βιολογικές ιδιότητες του μεταβολίτη **76**, όπως χαρακτηριστικά τις αντιμικροβιακές, αντιμυκητιασικές, αντισηπτικές, αντιμεταλλακτικές, αντιοιστρογονικές, υπογλυκαιμικές, αντιπλεγμονώδεις, αντι-αιμοπεταλιακές συσσωματώσεις, νηματωδοκτόνο δράσεις, αντι-ιικές και αντιοξειδωτικές. Το p-υδροξυ βενζοϊκό οξύ έχει επίδραση διέγερσης σε πράσινα άλγη του γλυκού νερού *Raphidocelis subcapitata*.^{397,398,399} Αναφέρεται επίσης ότι χρησιμοποιείται ως συντηρητικό σε πολλά φάρμακα, στα καλλυντικά και φαρμακευτικά προϊόντα, στα τρόφιμα και στα ποτά.³⁹⁹

2.7.7. Μεταβολίτης: Βανιλικό Οξύ

[4-Υδροξυ-3-μεθοξυβενζοϊκό οξύ]

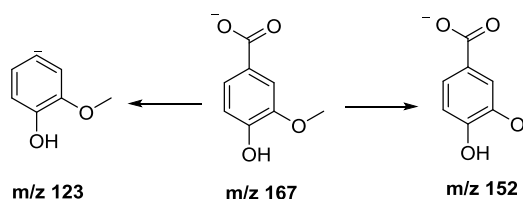


Απομόνωση Μεταβολίτη

Απομονώθηκε στα φύλλα του φυτού, από το κλάσμα του EtOAc. Μέσω διαχωρισμού HPLC στο κλάσμα CEAL-IH (15.0 mg) παραλήφθηκε ο μεταβολίτης **86**, σε ποσότητα 1.0 mg στο κλάσμα (CEAL-IH₁₂) υπό μορφή ιζήματος.

Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός

Ο μεταβολίτης ταυτοποιήθηκε μετά από συνδυασμό φασματοσκοπικών δεδομένων. Το φάσμα μαζών (ESI-MS, αρνητικός ιονισμός) έδειξε μοριακό ιόν [M-H]⁻ με $m/z = 167$.



Σχήμα 2.53: Τυπική θραυσμάτωση του βανιλικού οξέος στο φάσμα μαζών.

Από το φάσμα ¹H-NMR, στην περιοχή των αρωματικών πρωτονίων παρατηρείται μια απορρόφηση 7.55 ppm και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο του C-6. Η απορρόφηση αυτή σχάζεται σε διπλή της διπλής λόγω σύζευξης του H-6 με το H-5 ($J_{5-6} = 8.7$ Hz) και με το H-2 ($J_{6-2} = 2.0$ Hz). Η διπλή απορρόφηση στα 7.54 ppm αντιστοιχεί στο πρωτόνιο του C-2, αφού έχει σταθερά σύζευξης $J = 2.0$ Hz και επομένως υποδηλώνει την αλληλεπίδραση του (meta) με το πρωτόνιο του C-6. Η διπλή κορυφή, με σταθερά σχάσης $J = 8.7$ Hz στα 6.87 ppm αντιστοιχεί στο πρωτόνιο του C-5 (ortho σχάση με το πρωτόνιο του C-6). Η απλή απορρόφηση στα 3.89 ppm αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της μεθοξυ ομάδας.

Στο φάσμα ¹³C NMR παρατηρούνται 8 διαφορετικές απορροφήσεις αφού το βανυλικό οξύ είναι μη συμμετρικό. Στα 168.6 ppm συντονίζεται ο καρβονυλικός άνθρακας και στα 56.4 ppm η μεθοξυ- ομάδα. Η απόδοση των σημάτων στο φάσμα του άνθρακα επιβεβαιώθηκε με σύγκριση των βιβλιογραφικών δεδομένων⁴⁰⁰ με αυτά

των φασματοσκοπικών δικών μας δεδομένων.

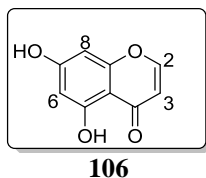
Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR της ένωσης **86**: $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 500 MHz) δ 7.54 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H-2), 7.55 (dd, $J_1 = 8.7$, $J_2 = 2.0$ Hz, 1H, H-6), 6.84 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H-5), 3.89 (s, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD): δ 170.1 (COOH), 152.7 (C-3), 148.7 (C-4), 125.3 (C-6), 123.1 (C-1), 115.9 (C-2), 113.8 (C-5), 56.4 (C-8, OCH_3).

Ο μεταβολίτης **86** στο γένος *Phlomis* έχει αναφερθεί στα είδη *P. umbrosa* και *P. megalantha*. Είναι ευρέως διαδεδομένος μεταβολίτης και κατανέμεται σε πλήθος οικογενειών όπως Apiaceae (*Angelica sinensis*), Rutaceae⁴⁰¹ (*Fagara tessmannii* Engl), Asteraceae^{402,403} (*Taraxacum coreanum*), Betulaceae⁴⁰⁴ (*Alnus crispa*), Bignoniaceae (*Paratecoma koraiensis*), Elegendaceae (*Eleagnus pungens*), Rosaceae (*R. canina*), Ericaceae (*Erica austarlis*), Malvaceae (*Gossypium mexicanum*), Meliaceae (*Melia azedarach*), Scrophulariaceae (*Picrorhiza kurroa*) και Araliaceae (*Panax ginseng*).⁴⁰⁵

Εμφανίζει ανθελμινθικές ιδιότητες, ενώ αναστέλλει ή αναστρέφει τη δρεπάνωση των ερυθροκυττάρων στη δρεπανοκυτταρική αναιμία. Σε *in vitro* πειράματα παρουσιάζει αντιφλεγμονώδη δράση.⁴⁰⁵ Επίσης, έχουν αναφερθεί δράσεις του βανυλλικού οξέως όπως αντιοξειδωτικές, αντισηπτικές βακτηριοκτόνες και δράσεις όπως προστατευτική κατά του καρκίνου, χολερετική και υπακτική δράση.⁴⁰¹

2.8. ΧΡΩΜΟΝΗ

2.8.1. Μεταβολίτης: 5,7-Διυδροξυχρωμόνη



Απομόνωση Μεταβολίτη

Ο μεταβολίτης απομονώθηκε από το μεθανολικό κλάσμα της εκχύλισης των ανθέων με EtO₂ και μέσω C.C., Sephadex LH-20 παραλήφθηκε από το κλάσμα COME-F (27.1 mg) όπου ταυτοποιήθηκε ως 5,7-διυδροξυ χρωμόνη (COME-FC, 1.2 mg).

Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός

Η ένωση αυτή ταυτοποιήθηκε με χρήση της φασματοσκοπίας ¹H NMR και σύγκριση των δεδομένων με αυτά από βιβλιογραφικές αναφορές.⁴⁰⁶ Συγκεκριμένα παρατηρείται μια διπλή κορυφή στα 7.96 ppm με σταθερά σχάσης $J = 6.0$ Hz και η οποία αντιστοιχεί στο βινυλικό πρωτόνιο H-2. Η διπλή κορυφή στα 6.18 ppm με σταθερά σχάσης $J_{2-3} = 6.0$ Hz αντιστοιχεί στο βινυλικό πρωτόνιο H-3. Οι διπλές απορροφήσεις στα 6.19 και 6.32 ppm αντιστοιχούν στα H-6/H-8 τα οποία συζεύγονται με μια σταθερά σχάσης $J_{6-8} = 2.0$ Hz. Η δομή επιβεβαιώθηκε και από το φάσμα μαζών (ESI-MS) δίνοντας μοριακό θραύσμα $m/z = 176.9$ [M-H]⁻.

Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα NMR της ένωσης **106**: ¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz), δ : 7.96 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H, H-2), 6.18 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H, H-3), 6.19 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H-6), 6.32 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H-8).

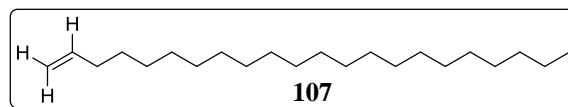
Ο μεταβολίτης **106**, απομονώνεται για πρώτη φορά στο γένος *Phlomis*. Στην φύση απομονώθηκε από τις οικογένειες Lamiaceae⁴⁰⁷ (*Vitex negundo* var. *Cannabifolia*), Asteraceae (*Erigeron annuus* L. Pres.),⁴⁰⁸ Fabaceae στους φλοιούς φιστικιών (*Arachis hypogaea* L.), στο είδος *Crotalaria sessiliflora* L.,⁴⁰⁹ Apiaceae (*Cnidium monnieri*),⁴¹⁰ Oleaceae (*Osmanthus fragrans*),⁴¹¹ και σε νούφαρα (*Euryale ferox*, Nymphaeaceae).⁴¹²

Το νευροπροστατευτικό αποτέλεσμα της 5,7-διυδροξυχρωμόνης μέσω της οδού σηματοδότησης Nrf2/ARE έχει προταθεί ως μια νέα πιθανή θεραπευτική

στρατηγική για νευροεκφυλιστική ασθένεια.⁴¹³ Ο μεταβολίτης **106** έχει μελετηθεί για τις αντιδιαβητικές τους ιδιότητες σε φρούτα του είδους *Daphniphyllum macropodum* (Daphniphyllaceae).⁴¹⁴

2.9. ΑΛΕΙΦΑΤΙΚΟΙ ΥΔΡΟΓΟΝΑΘΡΑΚΕΣ

2.9.1. Μεταβολίτης: Εικοσι-1-ένιο



Απομόνωση Μεταβολίτη

Ο μεταβολίτης παραλήφθηκε με διαχωρισμό χρωματογραφίας στήλης ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα. Απομονώθηκε από το υπόλειμμα του EtOAc των ανθέων (610.2 mg) στο κλάσμα CMX-DA (3.5 mg).

Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων NMR και του φάσματος μαζών υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRMS) οδήγησε στον μοριακό τύπο C₂₂H₄₄. Παράλληλα το φάσμα μαζών (ESI-MS, θετικός ιονισμός), υπέδειξε το ιόν $m/z = 639.0$ [2M+Na]⁺. Παρουσία 1% φορμικού οξέος στο διαλύτη το ESI-MS ανέδειξε το ιόν $m/z = 663.6$ [2M+ formic acid]⁺. Στο φάσμα μαζών υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRMS) παρατηρήσαμε ισχυρό ιόν στα 663.4542 γεγονός που υποστηρίζει την εμφάνιση του διμερούς [2M+ formic acid]⁺ (θεωρ. C₄₅H₉₀O₂: 662.6941).

Κατόπιν ανάλυσης των δεδομένων, NMR (1D και 2D) παρατηρήθηκε το χαρακτηριστικό σύστημα στο φάσμα πρωτονίου αυτό των geminal πρωτονίων του ακραίου διπλού δεσμού τα οποία εμφανίζονται σε δ 4.99 (ddd, $J_1 = 17.0$, $J_2 = 3.5$, $J_3 = 1.5$ Hz, 1H) και 4.92 (ddd, $J_1 = 10.0$, $J_2 = 3.5$, $J_3 = 1.5$ Hz, 1H). Το σήμα σε δ 5.81 ως διπλή της διπλής της τριπλής (ddt, $J_1 = 17.0$, $J_2 = 10.0$, $J_3 = 5.0$ Hz, 1H) αντιστοιχεί προφανώς στο βινυλικό H-2. Μια ευρεία απλή με δ 1.25 ppm που ολοκληρώνει για 30 πρωτόνια αντιστοιχεί στην παρουσία τμήματος αλειφατικής αλυσίδας και περιλαμβάνει 15 μεθυλένια ενώ η τριπλή κορυφή με δ 0.88 ppm αντιστοιχεί στο τερματικό μεθύλιο της αλειφατικής αλυσίδας το οποίο σχάζεται από τα πρωτόνια του γειτονικού άνθρακα (C-21) με σταθερά σύζευξης $J = 7.0$ Hz.

Χαρακτηριστικές είναι αντίστοιχα οι κορυφές στο φάσμα του άνθρακα για τον C-1 (114.0 ppm) και τον C-2 (139.2 ppm), υποδεικνύοντας την παρουσία του διπλού δεσμού C-1 / C-2, γεγονός που επιβεβαιώθηκε και από το φάσμα HSQC. Από το

φάσμα DEPT-135 γίνεται αντιληπτό ότι στην περιοχή 22-33 ppm απορροφούν οι δευτεροταγείς άνθρακες της αλειφατικής αλυσίδας και η κορυφή στα 14.1 ppm αντιστοιχεί στον τερματικό άνθρακα της αλυσίδας. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.33

Πίνακας 2.33: Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **107**, (CDCl₃, 500 MHz).

#	¹³ C	HSQC	DEPT 135	¹ H	Πολλαπλότητα (J, Hz)	COSY	HMBC
1	114.0	H-1a	CH ₂	4.99	ddd, J ₁ = 17.0, J ₂ = 3.5, J ₃ = 1.5 Hz, 1H	H-2	H-3
		H-1b		4.92	ddd, J ₁ = 10.0, J ₂ = 3.5, J ₃ = 1.5 Hz, 1H	H-2	
2	139.2	H-2	CH	5.81	ddt, J ₁ = 17.0, J ₂ = 10.0, J ₃ = 5.0 Hz, 1H	H-3, H-1a, H1b	H-3
3	33.8	H-3	CH ₂	2.04	tdd, J ₁ = 14.5, J ₂ = 8.0, J ₃ = 1.5 Hz, 2H	H-2	H-1a, H-1b, H-2
4-18	29.7	H-4/18	(CH ₂) ₁₅	1.25	br.s. 30H	-	-
19	29.1	H-19	CH ₂	1.37	q, J = 7.1 Hz, 2H	-	-
20	31.9	H-20	CH ₂	1.29	m, 2H	-	H-21, H-22
21	22.6	H-21	CH ₂	1.31	br. q, J = 7.0 Hz, 2H	H-22	H-22
22	14.1	H-22	CH ₃	0.88	t, J = 7.0 Hz, 3H	H-21	H-21

Ο μεταβολίτης **107**, δεν έχει αναφερθεί ούτε στο υβρίδιο αλλά ούτε και στο γένος *Phomis*. Έπειτα από βιβλιογραφική ανασκόπηση ο μεταβολίτης έχει ταυτοποιηθεί είτε σε αιθέρια έλαια ή σε εκχυλίσματα διαλυτών με EtOH, EtOAc όπως και στη δική μας περίπτωση. Με την χρήση της αέριας χρωματογραφίας ο μεταβολίτης **107** ταυτοποιήθηκε στα είδη της Πασχαλίας, *Azadirachta indica* (Meliaceae),⁴¹⁵ στο κριθάρι *Hordeum vulgare*, Poaceae (1.98%),⁴¹⁶ στο *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae)⁴¹⁷ και στο σανδαλόξυλο (3.52%) Santalaceae (*Santalum album*).⁴¹⁸ Η συνεργιστική δράση με τα συστατικά του σανδαλόξυλου μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως κορυφαίο καλλυντικό προϊόν για τη φροντίδα του δέρματος.⁴¹⁸

Επίσης, μεταξύ άλλων συστατικών ο μεταβολίτης **107** αποτελεί ένα από τα συστατικά στο *Amritamehari churnam*, φάρμακο φυτικής προέλευσης για τον διαβήτη, την απώλεια βάρους και σε διαταραχές της ουροδόχου κύστης.⁴¹⁹ Οι βελόνες της πεύκης *Pinus morrisonicola*, (Pinaceae) έχουν χρησιμοποιηθεί ως λαϊκό φάρμακο για τις αντιυπερτασικές και λιπιδαιμικές επιδράσεις τους. Στο αιθέριο έλαιο της πεύκης ταυτοποιήθηκε το **107** σε ποσοστό 5.2% (με την μέθοδο SFE).⁴²⁰

Τα πτητικά συστατικά του κρίνου *Liliur* sp., (Liliaceae)⁴²¹ αναλύθηκαν με υδροαπόσταξη και περιείχαν τον μεταβολίτη **107** σε ποσοστό 8.04 %. Το φυτό *Sarcostemma viminalis* (Asclepiadaceae) πλούσιο σε λιπαρά οξέα και υδρογονάνθρακες χρησιμοποιείται παραδοσιακά με διαφορετική φαρμακευτική χρήση στην Ινδία.⁴²² Τα φύλλα μπαμπού *Phyllostachys pubescens* (Poaceae) έχουν χρησιμοποιηθεί για να θεραπεύσουν μερικές ασθένειες στην κινεζική λαϊκή ιατρική για μεγάλο χρονικό διάστημα που εμπεριέχουν και τον μεταβολίτη **107**.⁴²³

2.10. ΠΗΗΤΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ

Από το κλάσμα του εκχυλίσματος των ριζών το οποίο διαχωρίστηκε με χρήση P.E. ως διαλύτη έκλουσης, απομονώθηκε ένα μίγμα πτητικών ουσιών (**PER-A**) το οποίο κατ' αρχήν αναλύθηκε με GC/MS. Τα αποτελέσματα αναφέρονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 2.34: Συστατικά του κλάσματος PER-A.

No	Συστατικά	Ret. Time	R.I.	%
1	1-Undecene	23.178	1099	2.33
2	3-Tridecene, (Z)	29.476	1314	9.61
3	3-Tetradecene, (Z)	39.776	1764	6.85
4	1-Tetradecene	46.122	1915	2.99
5	1-Hexadecene	50.737	2116	1.05
6	Docosane	62.817	2709	6.62
7	Nonacosane	67.113	3072	45.52
8	Triacontane	73.240	3229	24.33
	Σύνολο (%)			96.20

R.I (Retention indices) πειραματικό, σε στήλη SBP-5

Τα αρχικά αυτά αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν περαιτέρω από τα φάσματα ^1H NMR, ^{13}C NMR και DEPT 135.

Η δομή του 1-ενδεκενίου επιβεβαιώθηκε από την παρουσία συντονισμών στα δ 4.97, 5.02 (gem-βινυλικά) και 5.8 ppm (βινυλικό) στο φάσμα ^1H NMR τα οποία ανήκουν σε άνθρακες με δ 135.0 (C-2) και 114.9 (C-1) ppm όπως επιβεβαιώνεται από τα φάσματα ^{13}C NMR και DEPT 135.

Η δομή του (Z)-δεκατρι-3-ενίου επιβεβαιώθηκε από την παρουσία συντονισμών στα δ 5.42 (dt, $J_1 = 7.0$ Hz, $J_2 = 2.5$ Hz βινυλικά) στο φάσμα ^1H NMR τα οποία ανήκουν σε άνθρακες με 14.7 (πρωτοταγής ομοαλλυλικός), 28.0 (δευτεροταγής αλλυλικός) και 22.7 (δευτεροταγής αλλυλικός) ppm όπως επιβεβαιώνεται από τα φάσματα ^{13}C NMR και DEPT-135.

Η δομή του (Z)-δεκατετρ-3-ενίου επιβεβαιώθηκε από την παρουσία παρόμοιων συντονισμών με αυτούς του (Z)-δεκατρια-3-ενίου καθώς και το μοριακό του βάρος από το φάσμα μαζών (GC/MS).

Η δομή του 1-δεκατετρενίου επιβεβαιώθηκε από την παρουσία παρόμοιων συντονισμών με αυτούς του 1-ενδεκενίου καθώς και το μοριακό του βάρος από το φάσμα μαζών (GC/MS).

Από το κλάσμα του εκχυλίσματος των ανθέων το οποίο διαχωρίστηκε με χρήση P.E. ως διαλύτη έκλουσης, απομονώθηκε ένα πτητικό μίγμα (PEF-A) το οποίο κατ' αρχήν αναλύθηκε με GC/MS. Τα αποτελέσματα αναφέρονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 2.35: Συστατικά του κλάσματος PEF-A.

No	Συστατικά	Ret. Time	R.I.	%
1	Triacosane	52.806	2221	5.16
2	Hexacosane	56.382	2449	3.88
3	Eicosane,7-hexyl	59.635	2682	14.26
4	Heptacosane	60.739	2602	2.48
5	Octacosane	61.135	2623	1.96
6	Triacotane	62.827	2709	28.91
7	Pentatriacontane	67.040	3077	29.21
8	Hexatriacontane	73.125	3233	11.25
	Σύνολο (%)			97.11

R.I (Retention indices) πειραματικό, σε στήλη SBP-5

Το φάσμα ^1H NMR του μίγματος εμφανίζει την χαρακτηριστική ισχυρή κορυφή του συνόλου των μεθυλενικών πρωτονίων στα δ 1.26 και την τριπλή $J = 6.5$ Hz της ακραίας μεθυλομάδας. Στο φάσμα ^{13}C NMR εμφανίζονται οι C-1, C-2, C-3, C-4 στα δ 14.1, 22.7, 31.9 και 29.4 ppm αντίστοιχα, ενώ οι υπόλοιποι άνθρακες της αλυσίδας εμφανίζονται στα 29.7 ppm.

Το 7-εξυλοεικοσάνιο εμφανίζει ασθενή σήματα στο φάσμα ^{13}C NMR στα δ 37.1 (C-7, τριτοταγής άνθρακας), 36.7 (οι τρεις συνδεδεμένοι με τον C-7 δευτεροταγείς άνθρακες) και 27.2 ppm (υπόλοιποι δευτεροταγείς άνθρακες).

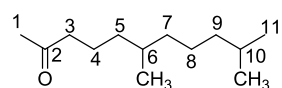
Από το κλάσμα του εκχυλίσματος των ανθέων (PEF-L) το οποίο επίσης διαχωρίστηκε με χρήση P.E. ως διαλύτη έκλουσης, απομονώθηκε ένα πτητικό μίγμα το οποίο κατ' αρχήν αναλύθηκε με GC/MS. Τα αποτελέσματα αναφέρονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 2.36: Συστατικά του κλάσματος PEF-L.

No	Συστατικά	Ret. Time	R.I.	%
1	Hexahydropseudoionone (6,10-Dimethylundecan-2-one)	41.747	1890	58.24
2	2-Tridecenal, (E)	46.308	2108	6.31
3	1-Tetradecene	46.863	2185	14.26
4	9,12-Octadecadienoic acid, methyl ester, (E,E)	48.565	2212	2.37
	Σύνολο (%)			81.18

R.I (Retention indices) πειραματικό, σε στήλη SBP-5

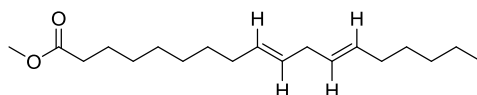
Όσον αφορά στη 6,10-διμέθυλοενδεκαν-2-όνη, στο φάσμα ^1H NMR του μίγματος εμφανίζεται η χαρακτηριστική ισχυρή απλή κορυφή της α -μέθυλο κετόνης στα δ 2.04 ppm και τα αντίστοιχα μεθυλενικά πρωτόνια στα 2.34 (t, $J = 7.5$) και επίσης την διπλή δ 0.86 (d, $J = 6.5$ Hz) των ακραίων μεθυλομάδων. Στο φάσμα ^{13}C NMR εμφανίζονται οι αντίστοιχοι άνθρακες στα δ 29.7, 44.1, και 23.4 ppm (ισχυρή) αντίστοιχα, ενώ η C-6 μεθυλομάδα εμφανίζεται στα 22.6 ppm. Το σήμα πρωτονίου της ομάδας αυτής εμφανίζεται στα 0.86 (d, $J = 6.6$ Hz).



Η αλδεϋδική ομάδα της 2-δεκατριενάλης δίνει ένα πολύ ασθενές σήμα στα δ 9.76 ppm, ενώ τα ολεφινικά πρωτόνια δίνουν ασθενή σήματα στα δ 6.13 και 6.63 ppm.

Το 1-δεκατετρένιο εμφανίζει τα σήματα που αναφέρθηκαν ανωτέρω.

Ο (*E,E*)-9,12-δεκαοκταδιενικός μεθυλεστέρας δίνει μία πολύ χαρακτηριστική πολλαπλή στα 5.30-5.40 πολύ χαρακτηριστική για το 1,4-διενικό σύστημα της ένωσης. Η δις-αλλυλική μεθυλενομάδα εμφανίζει συντονισμό στα 2.60 ppm (dd, $J_1 = J_2 = 7.0$ Hz). Η εστερική μεθυλομάδα δίνει μία ευδιάκριτη απλή κορυφή στα 3.66 ppm. Στο φάσμα ^{13}C NMR ο καρβονυλικός άνθρακας εμφανίζεται στ 173.6 ppm, ο δις-αλλυλικός στα 37.4 ppm και οι βινυλικοί στα 125.0 και 135.0 ppm.



2.11. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η διδακτορική αυτή διατριβή αποτέλεσε την πρώτη χημική μελέτη για το υβρίδιο *P. × commixta*. Ως εκ τούτου τα φυσικά προϊόντα που απομονώθηκαν, αναφέρονται για πρώτη φορά ως συστατικά του φυτού. Μέσω των εκχυλισμάτων από τα μέρη του φυτού (άνθη, φύλλα, ρίζες) πραγματοποιήθηκαν **58** τελικές απομονώσεις σε συνολικά **30** φυσικά προϊόντα. Τα φυσικά προϊόντα που απομονώθηκαν συνοπτικά παρουσιάζονται στο παρακάτω Πίνακα 2.37.

Απομονώθηκαν δυο τυροσολικοί εστέρες (**102**, **103**), ένας γλυκοζίτης της αλλυλικής αλκοόλης (**101**) και πέντε δευτερογενείς μεταβολίτες που ανήκουν στην κατηγορία των φαινυλοαιθανοειδών γλυκοζιτών (**48a**, **48b**, **48c**, **48g**, **48t**). Επιπλέον, χαρακτηρίστηκαν 11 φλαβονοειδή (**58a**, **58b**, **60a**, **60b**, **62a**, **62b**, **63a**, **63b**, **63c**, **63f**, **105**), δυο στεροειδή (**32b**, **104**), επτά φαινολικά παράγωγα (**76**, **77**, **79**, **86-88**, **108**), μια χρωμόνη (**106**) και ένας αλειφατικός υδρογονάνθρακας (**107**).

Τόσο στα άνθη, στα φύλλα όσο και στις ρίζες του φυτού οι μεταβολίτες **48a** και **48c** ήταν κοινά δευτερογενή προϊόντα σε όλο το φυτό.

Από το μεθανολικό κλάσμα των ανθέων, στο υπόλειμμα του Et₂O (COME) απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν κυρίως παράγωγα φλαβονοειδών και σε μικρότερη αναλογία φαινολικά παράγωγα. Αντίθετα, στο υπόλειμμα του EtOAc (CMX) βρέθηκαν γλυκοζυλιόμενα παράγωγα μεταβολιτών τόσο φαινυλοαιθανοειδών γλυκοζιτών όσο και γλυκοζίτες φλαβονοειδών. Ομοίως, στο υπόλειμμα της n-BuOH (COB) περιέχονταν γλυκοζίτες φλαβονοειδών και φαινολικά παράγωγα.

Αντίστοιχα αποτελέσματα έδωσε και η ανάλυση στο μεθανολικό κλάσμα των φύλλων. Στο υπόλειμμα του EtOAc (CEAL) συναντήσαμε ποικιλία συστατικών φλαβονοειδή, φαινυλοαιθανοειδείς γλυκοζίτες και φαινολικά παράγωγα. Εν αντιθέσει, στο υπόλειμμα της n-BuOH (BUL) περιέχονταν γλυκοζυλιόμενα φυσικά προϊόντα.

Τέλος, κατά την επεξεργασία του ριζικού συστήματος, το κλάσμα του πετρελαϊκού αιθέρα (PER) περιείχε στεροειδή και τυροσολικούς εστέρες, ενώ στα κλάσματα του EtOAc και της n-BuOH (CORE/CORB) τα εκχυλίσματα περιείχαν φαινυλοαιθανοειδείς γλυκοζίτες.

Ο μεταβολίτης **101** αποτελεί νέο φυσικό προϊόν που η σχετική στερεοχημεία του διευκρινίστηκε για πρώτη φορά. Επιπλέον, για πρώτη φορά τόσο στο υβρίδιο και

στο είδος όσο και στο γένος απομονώθηκαν φυσικά προϊόντα τυροσολικών εστέρων (**102**, **103**). Η ένωση **102** απομονώνεται για πρώτη φορά από φυτικό οργανισμό, ενώ η ένωση **103** έχει αναφερθεί μόνο μία φορά στη διεθνή βιβλιογραφία. Η **103** απομονώνεται για πρώτη φορά από το είδος και δεν έχει αναφερθεί στο γένος μέχρι σήμερα, ενώ αναφέρεται και πρώτη φορά για τα φυτά της οικογένειας Lamiales. Επιπλέον, συμπληρώθηκαν πειραματικά φασματοσκοπικά δεδομένα για το φυσικό προϊόν **103**. Τα τυροσολικά παράγωγα είναι ενώσεις που προκύπτουν από μεταβολικές διαδικασίες που λαμβάνουν μέρος στο υπό εξέταση φυτό, οπότε η παρουσία τους δεν αποτελεί εξαίρεση.

Στο υβρίδιο *P. × commixta* απομονώθηκε πληθώρα φαινυλαιθανοειδών γλυκοζιτών, συνολικά 20 παράγωγα. Οι μεταβολίτες αυτοί χαρακτηρίζουν το είδος *Phlomis*, όπως αναφέραμε στην δρογοχημεία του φυτού.

Μια άλλη εκτεταμένη κατηγορία ήταν τα φλαβονοειδή με τον μεταβολίτη **105** να απαντάται για πρώτη φορά τόσο στο είδος όσο και στο γένος. Ανιχνεύθηκαν συνολικά 19 φορές στα εκχυλίσματα του φυτού (άνθη/φύλλα). Οι φλαβονόνες χαρακτήρισαν το υβρίδιο, ενώ όσον αφορά στο γένος, οι ουσίες **63b** και **63f** απομονώνονται για δεύτερη φορά, με την **63b** να έχει αναφερθεί προηγουμένως στο *P. fruticosa*, το είδος που φύεται στην νήσο Κρήτη.

Η παρουσία των φαινολικών οξέων επιβεβαιώθηκε βάση της δρογοχημείας του γένους με κύριο εκπρόσωπο τον μεταβολίτη **79**. Ο μεταβολίτης **108** συναντάται για πρώτη φορά τόσο στο είδος όσο και στο γένος.

Αξίζει να σημειωθεί η παρουσία των μεταβολιτών **106** και **107** που ανιχνεύθηκαν για πρώτη φορά στο γένος. Στην παρούσα διατριβή η ουσία **107** χαρακτηρίστηκε πλήρως με φασματοσκοπικά δεδομένα NMR, ενώ μέχρι σήμερα έχει χαρακτηριστεί μόνο με την χρήση GC-MS.

Τέλος μια μεγάλη κατηγορία δευτερογένων μεταβολιτών στο γένος *Phlomis* ήταν τα στεροειδή, όπου απομονώσαμε για πρώτη φορά στο γένος το γνωστό στεροειδές **104**.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα μας με αντίστοιχες μελέτες, διαπιστώσαμε πως οι δευτερογενείς μεταβολίτες που απομονώθηκαν από το υβρίδιο *P. × commixta* μπορούν να δικαιολογήσουν την χρήση των φυτών *P. cretica* και *P. lanata* από τους κατοίκους της νήσου ως θεραπευτικό. Ένα ευρύτατα διαδεδομένο παλιό κρητικό στιχούργημα για το γνωστό «σαρανταβότανο» αναφέρει την αγκαραθιά ως ένα από τα συστατικά του σκευάσματος το οποίο προτείνεται ως αναλγητικό. Πιθανότατα

λόγω ομοιότητας μεταξύ των τριών ειδών αλλά και των υβριδίων που απαντώνται στη Κρήτη, οι περισσότερες πληροφορίες που αντλήθηκαν από τον τοπικό πληθυσμό αναφέρονται στην χρήση του φυτού ως θεραπευτικό για το είδος *P. fruticosa*. Το είδος αυτό χρησιμοποιείται για στην θεραπεία του γαστρικού έλκους και ως καταπραϋντικό σε μυικούς πόνους, και σε πόνους στις αρθρώσεις. Σύμφωνα με τους δευτερογενείς μεταβολίτες που απομονώθηκαν, οι αναλγητικές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις μπορούν να αποδοθούν στο είδος *P. fruticosa* λόγω της παρουσίας των φαινυλοαιθανοειδών γλυκοζιτών που αναστέλλουν τη δράση του ενζύμου COX-2.

Τα είδη *P. fruticosa*, *P. lanata* και *P. cretica* είναι επίσης πλούσια σε αιθέρια έλαια γεγονός που δικαιολογεί την αντιμικροβιακή τους δράση. Οι μεταβολίτες (*P. lanata*) ακτεοσίδης, φορσυθοσίδης Β, λουτεολινο-7-Ο-β-D-γλυκοζίτης έχουν μελετηθεί ως προς την αντιμυκητιασική τους δράση. Η αντιοξειδωτική δράση (*P. lanata*) ελέγχθηκε για τους μεταβολίτες φορσυθοσίδη και ακτεοσίδη. Αντίστοιχα το *P. fruticosa* εξετάστηκε και ως προς την αντιμεταλλαξιογόνο δράση του.

Μελετώντας τα φυσικά προϊόντα που απομονώσαμε διαπιστώνουμε πως οι φαινυλοαιθανοειδείς γλυκοζίτες (μεταβολίτες: **48a**, **48b**, **48c**, **48g**, **48t**) παρουσιάζουν κοινές δράσεις λόγω της ομοιότητας των χημικών δομών τους, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από μεγάλη βιολογική δραστηριότητα συμπεριλαμβανομένων των αντιοξειδωτικών, αντιφλεγμονωδών και αντιβακτηριακών δράσεων.

Οι τυροσολικοί εστέρες (μεταβολίτες **102** και **103**) χαρακτηρίζονται από την αντιμικροβιακή τους ικανότητα. Η δράση αυτή επιβεβαιώθηκε και από τους μεταβολίτες των φλαβονοειδών που απομονώθηκαν (**58a**, **58b**, **60b**, **60c**, **62a**, **62b**, **63a**, **63b**, **63c**, **63f**, **105**) και εμφανίζουν ως κοινές δράσεις τις ακόλουθες: αντιοξειδωτική, αντιβακτηριακή, αντιφλεγμονώδη και την προστατευτική δράση κατά του καρκίνου.

Ισχυρή παρουσία είχαν και τα φαινολικά οξέα στο υβρίδιο (**76**, **77**, **79**, **86**, **87**, **88**, **108**). Είναι ευρέως διαδεδομένα στο φυτικό βασίλειο ως βιοφαινόλες και εμφανίζουν μεταξύ τους κοινές δράσεις. Παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της ευρείας έκτασης του φάσματος των πιθανών ωφελειών για την υγεία, συμπεριλαμβανομένης της αντιδιαβητικής, και αντιοξειδωτικής δράσης τους λόγω της ικανότητας τους να εξουδετερώνουν τις βλαπτικές επιδράσεις των ελευθέρων ριζών στους ιστούς. Επομένως πιστεύεται ότι μας προστατεύουν από τον καρκίνο και τις καρδιακές παθήσεις. Διαθέτουν επίσης, αντιμικροβιακή και αντιφλεγμονώδη δραστηριότητα. Αναφέρεται ότι αρκετά φαινολικά παράγωγα χρησιμοποιούνται ως

συντηρητικά σε πολλά φάρμακα, στα καλλυντικά, σε φαρμακευτικά προϊόντα, καθώς και στα τρόφιμα και στα ποτά.

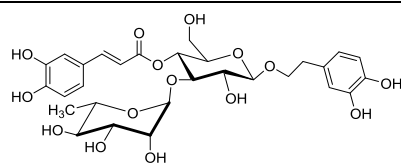
Οι φυτικές στερόλες (**104, 32b**) αξιολογούνται ως βιοδείκτες στη νόσο Alzheimer, δεδομένου ότι η δυσλειτουργία του εγκεφαλονωτιαίου υγρού-αμφιβληστροειδούς φραγμού συνδέεται με νευροεκφυλιστικές διαταραχές. Συμβάλλουν επίσης ως αντιοστεοαρθρικές, αντιϋπερχοληστεραιμικές, αντικαρκινικές, υπογλυκαιμικές, αντιμυκητιασικές, αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ενώσεις καθώς και μέσω της δράση τους στο ΚΝΣ.

Τέλος, τα δευτερογενή προϊόντα **106** έχουν μελετηθεί ως μέσα για μία νέα πιθανή θεραπευτική στρατηγική για τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες αλλά και για τις αντιδιαβητικές τους ιδιότητες, ενώ το προϊόν **107** συμβάλει στην απώλεια του βάρους και των διαταραχών στην ουροδόχο κύστη, αλλά παρουσιάζει επιπλέον, και αντιϋπερτασικές και λιπιδαιμικές επιδράσεις.

Όλα τα παραπάνω επιβεβαιώνονται από τα βιβλιογραφικά δεδομένα όπως αναφέρθηκαν στην εισαγωγή-φαρμακολογικές ιδιότητες (Κεφ 1.4.2) για τα φυτά του γένους *Phlomis*.

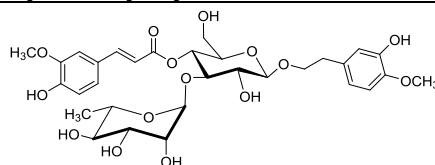
Πίνακας 2.37: Δευτερογενείς μεταβολίτες που απομονώθηκαν από το υβρίδιο *P. × commixta*.

Φαινυλοαιθανοειδείς Γλυκοζίτες



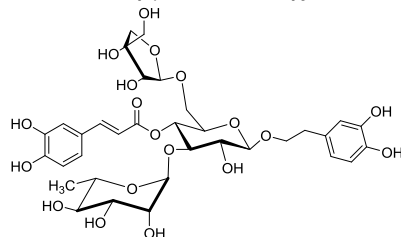
48a

Βερμπασκοσίδης



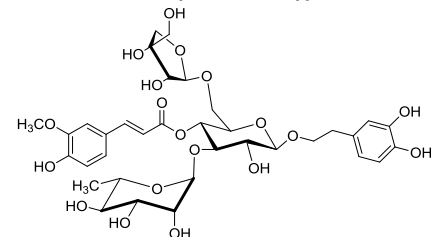
48g

Μαρτυνοσίδης



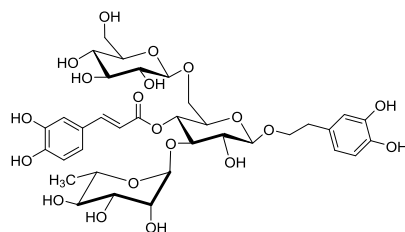
48c

Φορσυθοσίδης Β



48b

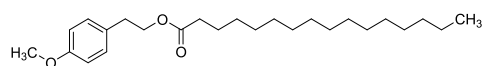
Αλυσσονοσίδης



48t

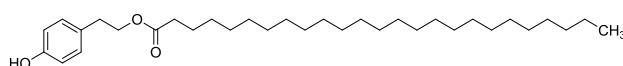
Εχινασκοσίδης

Τυροσολικοί Εστέρες



102

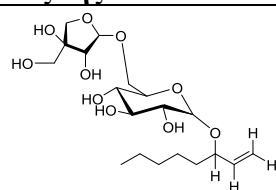
Παλμιτικός Εστέρας του τυροσολικού μεθυλαιθέρα



103

Λιγνοστερικός εστέρας της τυροσόλης

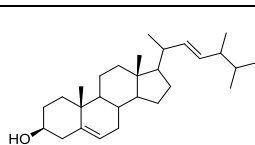
Γλυκοζίτης άλκυλο αλκοόλης



101

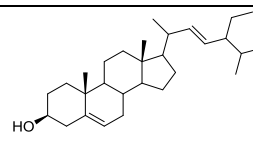
3-*O*-β-D-απιοφουρανοζυλο-(1→6)-*O*-β-D-γλυκοπυρανοζυλο-οκτ-1-εν-3-όλη

Στεροειδή



104

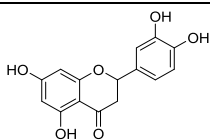
Μπρασικαστερόλη



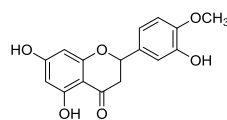
32b

Στιγμαστερόλη

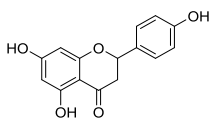
Φλαβονοειδή - Φλαβανόνες

**63a**

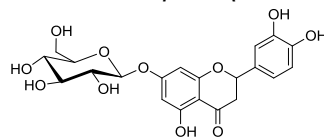
Εριοδικτιόλη

**63b**

Εσπερετίνη

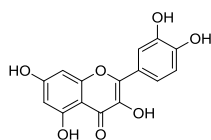
**63c**

Ναρινγγενίνη

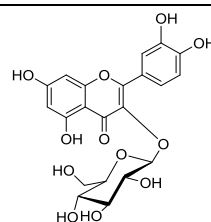
**63f**

Εριοδικτιολο-7-Ο-β-D-γλυκοζίτης

Φλαβονοειδή - Φλαβονόλες

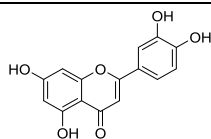
**60c**

Κερκετίνη

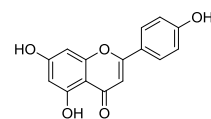
**60b**

Κερκετινο-3-Ο-β-D-γλυκοζίτης

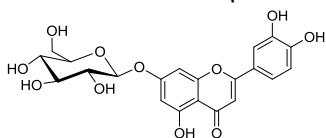
Φλαβονοειδή - Φλαβόνες

**58a**

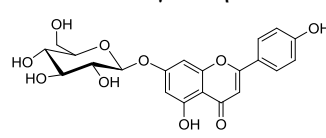
Λουτεολίνη

**62a**

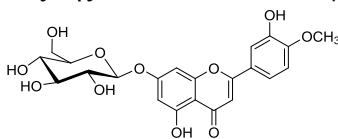
Απιγενίνη

**58b**

Λουτεολινο-7-Ο-β-D γλυκοζίτης

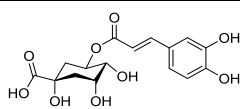
**62b**

Απιγετινο-7-Ο-β-D-γλυκοζίτης

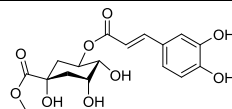
**105**

Διοσμετινο-7-Ο-β-D-γλυκοζίτης

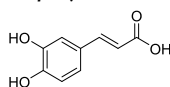
Φαινολικά Οξέα

**79**

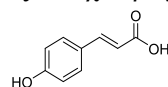
Χλωρογενικό Οξύ

**108**

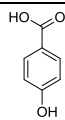
Μεθυλγαλλικό οξύ

**77**

Καφεϊκό οξύ

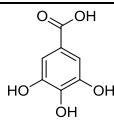
**88**

p-κουμαρικό οξύ



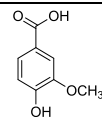
76

p-υδροξυ βενζοϊκό οξύ



87

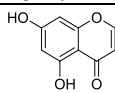
Γαλλικό οξύ



86

Βαννιλικό οξύ

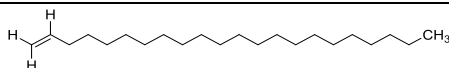
Χρωμόνη



106

5,7-δυδροξυ χρωμόνη

Αλειφατικοί υδρογονάθρακες

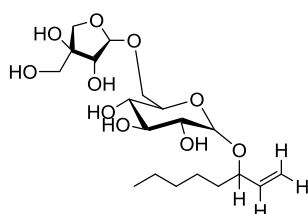


107

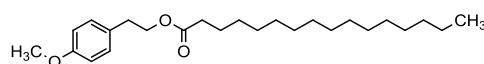
Εικοσι-1-ένιο

2.12. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Για **1^η** φορά απομονώνονται φυσικά προϊόντα από το υβρίδιο *P. × commixta*.
- Πραγματοποιήθηκαν **58** τελικές απομονώσεις σε συνολικά **30** φυσικά προϊόντα.
- Χαρακτηρίστηκαν 2 φυσικά προϊόντα για **πρώτη** φορά:

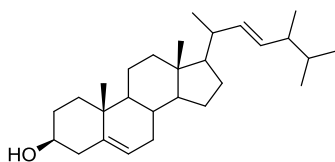


101

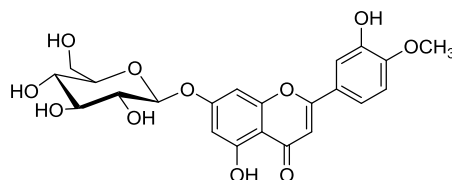


102

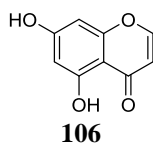
- Οι μεταβολίτες 104-108 απομονώθηκαν για **πρώτη** φορά στο γένος *Phlomis*



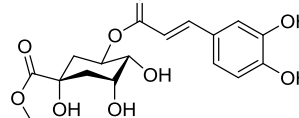
104



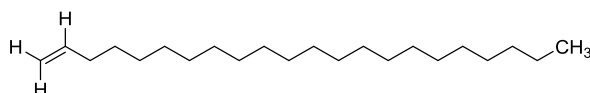
105



106



108



107

- Οι τυροσολικοί εστέρες απαντώνται για **πρώτη** φορά στο γένος *Phlomis* και στην οικογένεια Lamiaceae.
- Το φαρμακευτικό προφίλ των συστατικών που απομονώθηκαν από το υβρίδιο είναι σε συμφωνία με τις εφαρμογές της λαϊκής ιατρικής όπως αναφέρονται στη βιβλιογραφία και είναι ενδεικτικό της δυνατότητας χρήσης του φυτού στη σύγχρονη φαρμακευτική.
- Ο αριθμός και η ποικιλία των συστατικών που έχουν απομονωθεί μέχρι σήμερα, η προοπτική της σταδιακής απομόνωσης και άλλων συστατικών, σε συνδυασμό με τις φαρμακευτικές ιδιότητες που έχουν εντοπιστεί, αποτελούν δεδομένα πολλά υποσχόμενα για την ενδεχόμενη φαρμακευτική εκμετάλλευση του φυτού στα πλαίσια της προστιθέμενης αξίας στις καλλιεργητικές δραστηριότητες του τοπικού πληθυσμού.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ

3.1.1. Χρωματογραφικές Μέθοδοι

Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (T.L.C)

Η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας χρησιμοποιήθηκε εκτεταμένα, ως αναλυτική τεχνική, για έλεγχο και καθαρισμό συστατικών από τα εκχυλίσματα της δρόγης. Ως χρωματογραφικά μέσα χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα:

1. Γέλη οξειδίου πυριτίας με δείκτη φθορισμού σε φύλλα αλουμινίου (20 × 20 cm). Πάχος στοιβάδας 0.1 mm (Kieselgel F₂₅₄, Merck, Art. 5554) (αναλυτική χρωματογραφία).
2. Γέλη οξειδίου πυριτίας χωρίς δείκτη φθορισμού σε γυάλινες πλάκες (20 × 20 cm). Πάχος στοιβάδας 0.25 mm (Merck, Art. 5721) (παρασκευαστική χρωματογραφία).
3. Κελλουλόζη χωρίς δείκτη φθορισμού σε φύλλα αλουμινίου (20 × 20 cm). Πάχος στοιβάδας 0.1 mm (Merck, Art. 5552) (αναλυτική χρωματογραφία).
4. Κελλουλόζη χωρίς δείκτη φθορισμού σε γυάλινες πλάκες (20 × 20 cm). Πάχος στοιβάδας 0.1 mm (Merck, Art. 5716) (παρασκευαστική χρωματογραφία).

Οι πλάκες γέλης οξειδίου της πυριτίας αναπτύχθηκαν σε συστήματα οργανικών διαλυτών ενώ οι πλάκες κελλουλόζης αναπτύχθηκαν ως επί το πλείστον σε συστήματα οξικού οξέος:νερού (15% και 30%).

Μετά την ανάπτυξη τους σε κατάλληλο σύστημα διαλυτών, οι πλάκες ελέγχονταν σε λάμπα υπεριώδους φωτός (UV) στα 254 nm και 365 nm και οι κηλίδες ανιχνεύονταν ύστερα από ψεκασμό με το κατάλληλο αντιδραστήριο και θέρμανση της πλάκας στους 100 °C για περίπου 2 min.

Για την εμφάνιση των χρωματογραφημάτων χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αντιδραστήρια:

Αντιδραστήριο Neu (Naturstoffreagenz A), β-αμινοαιθυλεστέρας του διφαινυλοβορικού οξέος, διάλυμα 1% σε μεθανόλη.⁴²⁴

Αντιδραστήριο θειϊκής βανιλίνης.⁴²⁵ (Διάλυμα A: βανιλίνη 5% σε μεθανόλη. Διάλυμα B: π. H₂SO₄ 5% σε μεθανόλη). Ίσοι όγκοι αναμιγνύονται αμέσως πριν τον ψεκασμό και το χρωματογράφημα θερμαίνεται για 2 min στους 105 °C.

Partridge. Διαλύτης ανάπτυξης (αναλογίες κατ' όγκο). n-BuOH-ACOH-H₂O (4:1:5)

Χρωματογραφία στήλης (C.C.)

Οι χρωματογραφικοί διαχωρισμοί στήλης πραγματοποιήθηκαν σε υάλινες στήλες διαφόρων διαστάσεων και ως διαχωριστικό υλικό χρησιμοποιήθηκε:

Sephadex LH-20 (Pharmacia) (γέλη υδροξυπροπυλιωμένης δεξτράνης) μέγεθος τεμαχιδίων 25-100 μm . Πριν από τη χρήση διογκώνεται με το διαλύτη έκλουσης για 24 ώρες. Η χρήση μαγνητικού αναδευτήρα δεν προτιμάται δεδομένου ότι υπάρχει κίνδυνος καταθρυματισμού των κόκκων. Η ροή έκλουσης του διαλύτη ήταν φυσική.

Γέλη οξειδίου πυριτίας 60 (Kieselgel 60), 230-400 mesh ASTM (Merck, Art. 9385).

Χρωματογραφία στήλης υπό κενό (V.L.C)⁴²⁶

Οι χρωματογραφικοί διαχωρισμοί στήλης υπό κενό πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας υλικό πλήρωσης γέλη οξειδίου πυριτίας 60H (<55 μm) (Kieselgel 60H, Merck, Art. 7736). Λόγω του εξαιρετικά μικρού μεγέθους των κόκκων, ο ρυθμός έκλουσης είναι βραδύς και αντιμετωπίστηκε με εφαρμογή κενού.

Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (H.P.L.C.)

Χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθοι χρωματογράφοι:

Waters Spherisorb 10 μm , ODS1 C ₁₈ (250 mm x 10 mm i.d.)	HPLC Lab Alliance Series III, Shodex, RI Detector
MZ Analysentechik Kromasil, 5 μm , C ₁₈ (250 mm x 5 mm i.d.)	HPLC Hewlett Packard, Series 1100 DAD Detector
Nova_Pak [®] silica 6 μm , 7.8 x 300 column waters made in USA	HPLC Lab Alliance Series III, Shodex, RI Detector

Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκαν μίγματα MeOH:H₂O, CH₃CN:MeOH, για την στήλη C₁₈, και το σύστημα διαλυτών Hex:EtOAc για την άπολη στήλη, σε διάφορες αναλογίες και με ταχύτητα ροής από 1.0-1.5 ml/min. **Περιεκτικότητα των προς μελέτη κλασμάτων: 7 mg/ml.**

3.1.2. Φασματοσκοπικές Μέθοδοι

Φασματοσκοπία Υπεριώδους - Ορατού (UV-Vis)

Τα φάσματα υπεριώδους-ορατού καταγράφηκαν σε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους Hitachi U-2000, 1212301-06 και UV-1700 Shimadzu Pharmaspect με κυψελίδα πάχους 1 cm.

Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (N.M.R.)

Τα πειράματα μαγνητικού συντονισμού μίας διάστασης (1D-NMR) όπως και τα δισδιάστατα πειράματα (2D-NMR) ομοπυρηνικού και ετεροπυρηνικού συσχετισμού πραγματοποιήθηκαν σε φασματόμετρα Bruker MSL 300 και AMX 500 (^1H , ^{13}C , COSY, HMBC, HSQC, NOESY, TOCSY, DEPT-135), τα οποία βαθμονομήθηκαν με χρήση δευτεριωμένου διαλύτη ως εσωτερικό πρότυπο. Για τη λήψη όλων των φασμάτων NMR χρησιμοποιήθηκαν οι δευτεριωμένοι διαλύτες: CDCl_3 και CD_3OD . Οι χημικές μετατοπίσεις των σημάτων από τα φάσματα ^1H και ^{13}C NMR αναφέρονται ως προς τις κορυφές των δευτεριωμένων διαλυτών CDCl_3 (δ_{H} 7.26, δ_{C} 77.0) και CD_3OD (δ_{H} 3.31 δ_{C} 49.05).

Φασματομετρία Μαζών Ηλεκτροψεκασμού (ESI - MS)

Τα φάσματα μαζών πλήρους σάρωσης και MS^n με ιοντισμό ηλεκτροψεκασμού καταγράφηκαν σε φασματόμετρο μαζών τετραπολικής παγίδας. LCQ Advantage (Thermo Fischer Scientific, San Jose, CA, USA). Τα φάσματα λήφθηκαν στο εύρος m/z 100-2000 τόσο στον θετικό όσο και στον αρνητικό ιοντισμό. Στον θετικό ιοντισμό χρησιμοποιήθηκαν οι εξής παράμετροι: Spray voltage = 4.5 kV, Nitrogen sheath gas flow rate = 45 (arbitrary units), Nitrogen auxiliary gas flow rate = 5 (arbitrary units), Ion transfer capillary temperature = 300 °C, Capillary voltage = 20 V, Tube lens offset voltage = 5 V. Για τον αρνητικό ιοντισμό χρησιμοποιήθηκαν οι εξής παράμετροι: Spray voltage = 4.5 kV, Nitrogen sheath gas flow rate = 45 (arbitrary units), Nitrogen auxiliary gas flow rate = 5 (arbitrary units), Ion transfer capillary temperature = 300 °C, Capillary voltage = -80 V, Tube lens offset voltage = -95 V. Στα φάσματα πλήρους σάρωσης ο μέγιστος χρόνος παγίδευσης ιόντων (maximum injection time) ορίστηκε στα 300 ms. Για τα φάσματα

MSⁿ ο μέγιστος χρόνος παγίδευσης ιόντων ήταν 200 ms ενώ το εύρος απομόνωσης m/z (isolation width) ήταν 2.0.

Τα φάσματα υψηλής ανάλυσης φασματομετρίας μάζας (HRMS) ελήφθησαν σε φασματόμετρο μάζας Agilent, το οποίο έφερε ανιχνευτή χρόνου πτήσεως (TOF), με χρήση της μεθόδου ιονισμού από ηλεκτρικό πεδίο με ψεκασμό (ESI).

Ειδική γωνία στροφής [α]_D

Η οπτική στροφική ικανότητα των ασύμμετρων ενώσεων μετρήθηκε σε ένα Polarimeter KRUSS P3000 με χρήση κυψελίδων χωρητικότητας 10 ml (1 x 100 mm glass tube with middle funnel) και διαλύτες όπως αναφέρονται στο πειραματικό μέρος.

Αέρια Χρωματογραφία (GC-MS)

Η ανάλυση και ο προσδιορισμός των συστατικών έγινε με αέριο χρωματογράφο συζευγμένο με φασματογράφο μαζών. Ο αέριος χρωματογράφος (Shimadzu GC-17A), ήταν ενωμένος με μία τριχοειδή άπολη στήλη (στατική φάση 5% supelco, SBP-5, διαστάσεων 30m × 0,25 mm × 0,25 μm film thickness). Ο φασματογράφος μαζών ήταν τύπου Shimadzu GCMS-QP 5050 και η μέθοδος παραγωγής ιόντων ήταν ηλεκτρονιακός ιονισμός (E.I) ενέργειας 70 eV, ενώ ο αναλυτής μαζών ήταν τετράπολος. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε το αδρανές αέριο ήλιο (1.0 mL min⁻¹). Ο ενέσιμος όγκος ήταν 1 μL. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της θερμοπρογραμματιζόμενης χρωματογραφίας.

Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που ακολουθήθηκε ήταν το ακόλουθο: Αρχική θερμοκρασία 40 °C (2 min), η οποία αυξανόταν με ρυθμό 2 °C/ min μέχρι τους 50 °C (2 min), εν συνεχεία με ρυθμό 10 °C/ min έφτανε τους 150 °C (5 min), και με ρυθμό 5 °C/ min έφτανε τους 280 °C (20 min). Ο συνολικός χρόνος της ανάλυσης ήταν 70 min. Οι συνθήκες του χρωματογράφου ήταν: θερμοκρασία εισαγωγής δείγματος 230 °C και θερμοκρασία ανιχνευτή 250 °C.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των συστατικών βασίστηκε στον ολικό αριθμό θραυσμάτων (total ion count) των μεταβολιτών, όπως αυτά ανιχνεύτηκαν από το φασματογράφο μαζών. Η ταυτοποίηση των χημικών συστατικών έγινε με βάση το χρόνο κατακράτησης κάθε συστατικού (Retention Time) σε σχέση με τους χρόνους παρακράτησης και τη μελέτη των φασμάτων μαζών, με την βοήθεια των βιβλιοθηκών

NIST21, NIST107 και PMW_TOX2 και των δεδομένων της βιβλιογραφίας (Adams, 2007)⁴²⁷ καθώς και με τον υπολογισμό των συντελεστών R.I. (Retention Indices) σύμφωνα με την εργασία των Van den Dool & Kratz (1963).⁴²⁸

3.2. ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ ΜΕΛΕΤΗΣ

Ως περιοχή μελέτης επιλέχθηκε η Κρήτη, το πέμπτο μεγαλύτερο νησί της Μεσογειακής Λεκάνης και το μεγαλύτερο της Ελλάδας. Οι κυριότεροι τύποι ενδιαιτημάτων στο νησί είναι τα φρύγανα, τα δάση Ελιάς και Χαρουπιάς στα χαμηλά και μεσαία υψόμετρα, ενώ στα υψηλά επικρατούν τα δάση κυπαρίσσου και Ορεινά, Μεσογειακά χέρσα εδάφη με ακανθώδεις θάμνους.

Το φυτικό υλικό που μελετήθηκε στην παρούσα διατριβή ήταν το υβρίδιο *Phlomis x commixta*. Η συλλογή πραγματοποιήθηκε τον Απρίλιο 2012, από την περιοχή της Τυλίσου Ηρακλείου (35°18'42.7''β, 25°01'07.12'). Ο χώρος δειγματοληψίας βρίσκεται σε δημόσια έκταση. Η περιοχή δειγματοληψίας δεν είναι εθνικό πάρκο ή προστατευόμενη περιοχή και η δειγματοληψία δεν περιείχε απειλούμενα και προστατευόμενα είδη. Το εξεταζόμενο είδος δεν προστατεύεται από το εθνικό δίκαιο ή τη νομοθεσία της Ε.Ε. Είναι διασταυρούμενο με ένα ενδημικό είδος της Κρήτης, αλλά δεν απειλείται, καθώς είναι ευρέως διαδεδομένο και κοινό στο κεντρικό και ανατολικό τμήμα του νησιού.

Σε συνεργασία με το Εργαστήριο Οικολογίας Φυτών και Διαχείρισης Χερσαίων Οικοσυστημάτων του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης, πραγματοποιήθηκε η ταυτοποίηση του φυτού. Μετά τη συλλογή το φυτό ξηράθηκε σε δροσερό και σκιερό χώρο επί 20 ημέρες σε θερμοκρασία δωματίου. Αποξηραμένα δείγματα φυτών έχουν κατατεθεί και αποθηκευτεί στο *herbarium* του Ιδρύματος.

3.3. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΔΡΟΓΗΣ

Για την πληρέστερη διερεύνηση των συστατικών του υπό μελέτη φυτού, ο οργανισμός κατανεμήθηκε στα εξής μέρη, άνθη, φύλλα και ρίζες, τα οποία μελετήθηκαν ξεχωριστά. Χρησιμοποιήθηκαν αποξηραμένα τμήματα του φυτού αδρομερώς κονιοποιημένα 114.8 g ανθέων, 350.0 g φύλλων, και 862.5 g ριζών.

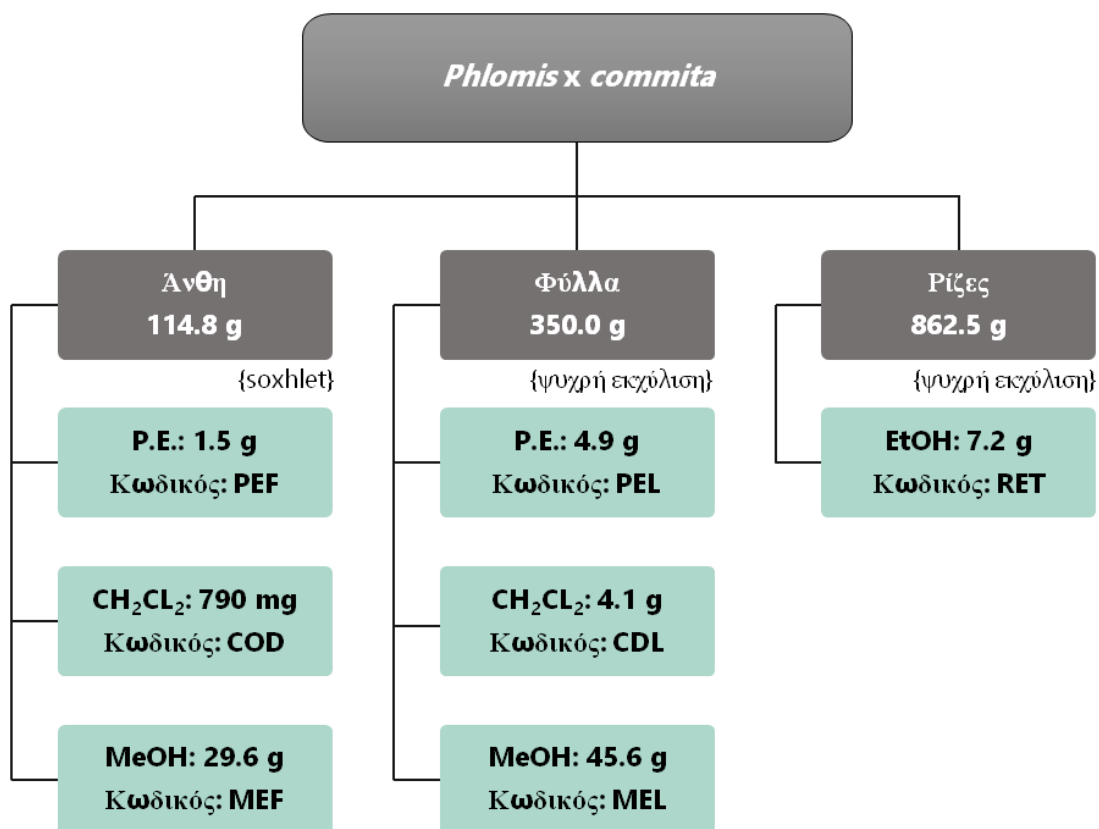
Τα άνθη εκχυλίστηκαν εξαντλητικά σε συσκευή Soxhlet, διαδοχικά με τους παρακάτω διαλύτες: P.E., CH₂Cl₂, MeOH και MeOH:H₂O (80:20) σε θερμοκρασία 80-100°C. Στη συσκευή Soxhlet προσαρμόστηκε, πορώδες *thimble* 43 cm × 123 cm (Whatman Schleicher & Schuell) μιας χρήσεως στο οποίο τοποθετήθηκε δείγμα από τα κονιορτοποιημένα άνθη. Ο διαλύτης υποβλήθηκε σε επαναρροή μέσω του *thimble*. Η διαδικασία εκχύλισης διήρκεσε 10 ημέρες. Η απόδοση επί του αποξηραμένου δείγματος ανθέων ήταν κατά βάρος 60.6 %. Τα εκχυλίσματα που προέκυψαν από την παραπάνω διαδικασία, έδωσαν στερεά υπόλειμμα όπως παρατηρείται στο Σχήμα 3.1.

Τα φύλλα τοποθετήθηκαν σε σκουρόχρωμα υάλινα δοχεία και εκχυλίστηκαν εξαντλητικά εν ψυχρώ με διαλύτες διαδοχικά αυξανόμενης πολικότητας: P.E., CH₂Cl₂, και MeOH σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C). Η δρόγη παρέμεινε εμβαπτισμένη στον διαλύτη για έξι ημέρες, ενώ δεχόταν περιοδική ανατάραξη. Ο κάθε διαλύτης ανανεωνόταν τρεις φορές. Το εκχύλισμα που προέκυπτε από την παραπάνω διαδικασία, έδινε στερεό υπόλειμμα (Σχήμα 3.1).

Το ριζικό σύστημα του φυτού εκχυλίστηκε, εν ψυχρώ, με EtOH για έξι ημέρες, υπό περιοδική ανατάραξη. Από το εκχύλισμα προέκυψε στερεό υπόλειμμα βάρους 7.2 g.

Τα εκχυλίσματα που περιείχαν ουσίες του ενδιαφέροντος μας, υποβλήθηκαν σε περαιτέρω κατεργασία. Για το σκοπό αυτό δώθηκε κατά την επεξεργασία τους ένας κωδικός, όπως απεικονίζεται παρακάτω στο Σχήμα 3.1. Όλα τα λαμβανόμενα εκχυλίσματα διηθήθηκαν και στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε διαδικασία εξάτμισης χαμηλής θερμοκρασίας (συνήθως 40 °C) σε περιστροφική συσκευή αποστάξεως υπό κενό. Τα εκχυλίσματα διατηρήθηκαν υπό κενό, σε ξηραντήρα που περιείχε γέλη πυριτικού οξέος με δείκτη υγρασίας, καθώς και οξείδιο του ασβεστίου.

Κατόπιν το κάθε ένα από τα παραπάνω εκχυλίσματα υποβλήθηκαν σε διαχωρισμούς για την παραλαβή των χημικών συστατικών, όπως αναλύεται παρακάτω για κάθε ένα τμήμα του φυτού με όλα τα στάδια του ξεχωριστά.



Σχήμα 3.1: Πορεία εκχυλίσεων των τμημάτων του *P. × commixta* με τους διαλύτες αυξανόμενης πολικότητας.

3.4. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΑΝΘΕΩΝ

ΥΠΟΛΕΙΜΜΑ ΠΕΤΡΕΛΑΪΚΟΥ ΑΙΘΕΡΑ (PE) - PEF (1.5 g)

Το πετρελαϊκό υπόλειμμα (PEF- 1.5g) υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης (C.C, 13.0 cm x 3.0 cm) επί γέλης πυριτίας με διαλύτες έκλουσης μίγματα διαλυτών Hexane, CH₂Cl₂, EtOAc και MeOH αυξανόμενης πολικότητας. Ελήφθησαν 196 κλάσματα μέσου όγκου 40 mL, τα οποία κατόπιν ελέγχθηκαν με αναλυτική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) και συνενώθηκαν στις ακόλουθες ομάδες:

Κλάσματα	Κωδικός	Αναλογία %	Ποσότητες
1	PEF-A	Hex 100%	223.4 mg
2	PEF-B	Hex:CH ₂ Cl ₂ 80:20	14.3 mg
3-6	PEF-C		7.8 mg
7-9	PEF-D		14.3 mg
10	PEF-E		4.4 mg
11	PEF-F		15.5 mg
12	PER-G		Hex:CH ₂ Cl ₂ 50:50
13	PEF-H	11.0 mg	
14-17	PEF-I	127.5 mg	
18-20	PEF-J	37.0 mg	
21-22	PEF-K	21.8 mg	
23-25	PEF-L	Hex:CH ₂ Cl ₂ 50:50 - CH ₂ Cl ₂ 100%	
26-27	PEF-M	CH ₂ Cl ₂ 100%	15.5 mg
28-29	PEF-N		38.9 mg
30-31	PEF-O		64.9 mg
32-33	PEF-P		37.4 mg
34-35	PEF-Q		17.1 mg
36-38	PEF-R		CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 99:1
39-41	PEF-S	77.8 mg	
42-47	PEF-T	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 99:1/98:2	40.6 mg
48-56	PEF-U	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 98:2	24.4 mg
57-61	PEF-V	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 95:5	9.4 mg
62-71	PEF-W	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 95:5/90:10	29.5 mg
72-80	PEF-X	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 90:10	53.7 mg
81-87	PEF-Y	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 90:10/85:15	21.8 mg
88-94	PEF-Z	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 85:15	23.6 mg
95-97	PEF-ZI	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 85:15/80:20	11.2 mg
98-109	PEF-ZII	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 80:20/75:25	54.7 mg
110-116	PEF-ZIII	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 75:25	19.9 mg
117-127	PEF-ZIV	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 75:25/70:30	34.0 mg
128-137	PEF-ZV	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 70:30/65:35	24.6 mg
138-140	PEF-ZVI	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 65:35	7.2 mg
141-146	PEF-ZVII		14.1 mg
147-157	PEF-ZVIII	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 65:35/60:40	22.5 mg
158-178	PEF-ZIX	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 60:40/50:50	44.0 mg
179-189	PEF-ZX	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 50:50- EtOAc 100%	22.8 mg

Κλάσματα	Κωδικός	Αναλογία %	Ποσότητες
190	PEF-ZXI	EtOAc 100%	8.3 mg
191-192	PEF-ZXII		18.1 mg
193	PEF-ZXIII	EtOAc:MeOH 50:50	21.9 mg
194-195	PEF-ZXIV		36.4 mg
196	PEF-ZXV	MeOH 100%	39.4 mg

Τα κλάσματα **PEF-A** και **PEF-L** αποτέλεσαν αντικείμενο αναλυτικής μελέτης, μέσω αέριας χρωματογραφίας και οι ουσίες ταυτοποιήθηκαν.

ΥΠΟΛΕΙΜΜΑ ΔΙΧΛΩΡΟΜΕΘΑΝΙΟΥ (CH₂Cl₂) - COD (720 mg)

Το διχλωρομεθανικό υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης (C.C, 9.5 cm x 3.5 cm) επί γέλης πυριτίας με διαλύτες έκλουσης μίγματα διαλυτών Hex, CH₂Cl₂, EtOAc και MeOH αυξανόμενης πολικότητας. Ελήφθησαν 150 κλάσματα μέσου όγκου 30 mL, τα οποία κατόπιν ελέγχου με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας συνενώθηκαν στις ακόλουθες ομάδες:

Κλάσματα	Κωδικός	Αναλογία %	Ποσότητες
1	COD-A	Hex 100%	5.2 mg
2	COD-B	Hex:CH ₂ Cl ₂ 50:50	9.3 mg
3	COD-C		9.8 mg
4-5	COD-D	CH ₂ Cl ₂ 100%	6.2 mg
6	COD-E		14.3 mg
7	COD-F		13.5 mg
8-15	COD-G	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 95:5	78.7 mg
16-19	COD-H		31.0 mg
20-42	COD-I	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 95:5/85:15	52.3 mg
43-50	COD-J	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 85:15/80:20	9.1 mg
51-59	COD-K	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 80:20/75:25	8.5 mg
60-67	COD-L	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 75:25/70:30	12.9 mg
68-98	COD-M	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 70:30/55:45	65.4 mg
99-103	COD-N	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 55:45	7.5 mg
104-120	COD-O	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 55:45/50:50	33.9 mg
121-131	COD-P	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 50:50 -EtOAc 100%	8.4 mg
132-136	COD-Q	EtOAc 100% - EtOAc:MeOH 50:50	24.3 mg
137-138	COD-R	EtOAc:MeOH 50:50	11.0 mg
139-144	COD-S		192.8 mg
145-146	COD-T		34.5 mg
147-148	COD-U		13.7 mg
149-150	COD-V		EtOAc:MeOH 50:50 - MeOH 100%

Το κλάσμα COD-S αποτέλεσε αντικείμενο περαιτέρω διαχωρισμών.

Κλάσμα COD-S (192.8 mg)

Υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης Sephadex LH-20 (50.0 cm × 2.0 cm) με διαλύτη έκλουσης MeOH 100%. Ελήφθησαν 1 κλάσμα 30 mL, 1 κλάσμα 10 mL, 266 κλάσματα 0.5 mL (1-266) και έξι κλάσματα 10 mL (267-272). Κατόπιν ελέγχου με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας συνενώθηκαν στις ακόλουθες ομάδες:

Κλάσματα	Κωδικός	Ποσότητες
1-18	COD-SA	1.6 mg
19-50	COD-SB	6.1 mg
51-70	COD-SC	6.9 mg
71-95	COD-SD	17.7 mg
96-109	COD-SE	9.4 mg
110-116	COD-SF	6.4 mg
117-131	COD-SG	22.4 mg
132-138	COD-SH	10.1 mg
139-150	COD-SI	66.5 mg
151-159	COD-SK	17.3 mg
160-170	COD-SL	6.3 mg
171-186	COD-SM	4.3 mg
187-218	COD-SN	6.0 mg
219-238	COD-SO	2.0 mg
239-248	COD-SP	0.6 mg
249-256	COD-SQ	0.7 mg
257-264	COD-SR	0.7 mg
265-267	COD-SS	1.1 mg
268-272	COD-ST	1.1 mg

Ομάδα COD-SI (66.5 mg)

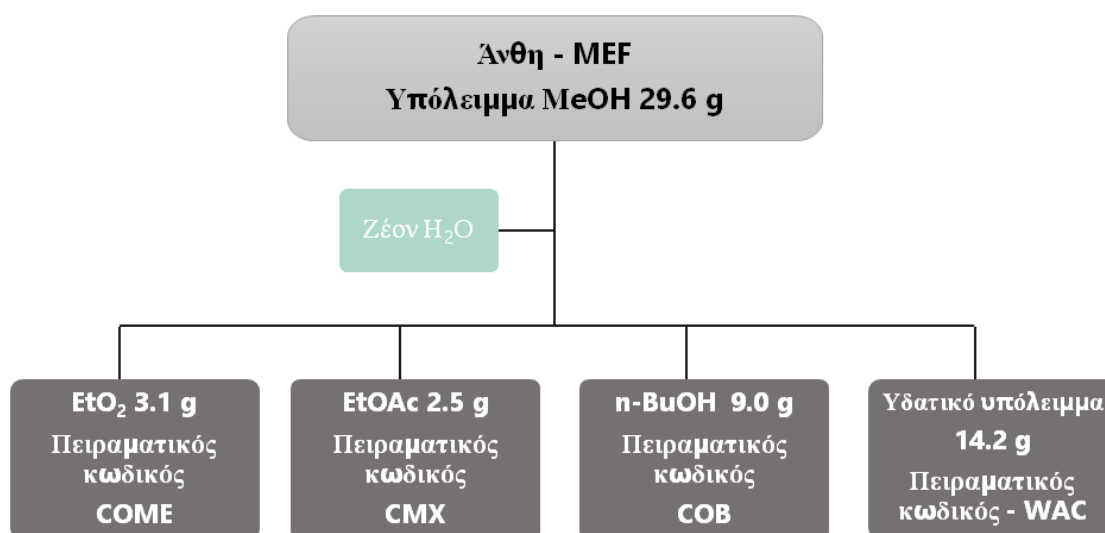
Υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης Sephadex LH-20 (55.0 cm x 2.0 cm) με διαλύτη έκλουσης MeOH 100%. Ελήφθησαν κλάσματα, δέκα των 5 mL (1-10), 145 κλάσματα 0.5 mL (11-156) και 4 κλάσματα των 30 mL (157-160). Κατόπιν ελέγχου με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) συνενώθηκαν στις ακόλουθες ομάδες:

Ομάδες	Κωδικός	Ποσότητες	Ομάδες	Κωδικός	Ποσότητες
1-10	COD-SIB	0.4 mg	61-69	COD-SII	0.8 mg
11-17	COD-SIC	0.4 mg	70-112	COD-SIK	46.7 mg
18-22	COD-SID	0.2 mg	113-122	COD-SIL	5.9 mg
23-30	COD-SIE	0.3 mg	123-132	COD-SIM	1.3 mg
31-38	COD-SIF	0.3 mg	153-156	COD-SIO	1.1 mg
39-50	COD-SIG	0.4 mg	157-160	COD-SIP	2.3 mg
51-60	COD-SIH	0.5 mg			

ΕΚΧΥΛΙΣΕΙΣ ΥΓΡΟΥ/ΥΓΡΟΥ

ΥΠΟΛΕΙΜΜΑ ΜΕΘΑΝΟΛΙΚΟΥ (MeOH) - MEF (29.6 g)

Το MeOH υπόλειμμα (29.6 g) από τα άνθη, υποβλήθηκε σε περαιτέρω κατεργασία με την μέθοδο *Charaux-Paris*.⁴²⁹ Στο υπόλειμμα προστέθηκε ζέον ύδωρ και αμέσως ακολούθησε διήθηση από βύσμα βάμβακα. Το υδατικό διάλυμα μεταφέρθηκε σε διαχωριστική χοάνη όπου εκχυλίστηκε διαδοχικά με διαιθυλαιθέρα (Et₂O), EtOAc και n-BuOH σε θερμοκρασία δωματίου. Οι ποσότητες που προέκυψαν από τις παραπάνω εκχυλίσεις έδωσαν στερεά υπολείμματα όπως φαίνονται στο παρακάτω Σχήμα 3.2. Για τον έλεγχο και την ομαδοποίηση των εκλούμενων κλασμάτων χρησιμοποιήθηκαν TLC. Έπειτα, τα εκχυλίσματα μεταφέρθηκαν σε προζυγισμένα δοχεία, ξηράθηκαν και ζυγίστηκαν.



Σχήμα 3.2: Αποδόσεις μεθανολικού υπολείμματος ανθέων.

ΑΙΘΕΡΙΚΟ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑ Et₂O: COME (3.1 g)

Υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης (C.C, 40.0 cm x 4.0 cm) επί Sephadex LH-20, με σύστημα έκλουσης CH₂Cl₂:MeOH (1:1). Ελήφθησαν 384 κλάσματα μέσου όγκου: για τα κλάσματα 1-19, 5 mL, για τα 20-330, 3 mL και για τα 331-384, 10 mL, τα οποία κατόπιν ελέγχου με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) συνενώθηκαν στις ακόλουθες ομάδες:

Κλάσματα	Κωδικός	Ποσότητες
1-21	COME-A	172.4 mg
20-42	COME-B	964.7 mg
43-72	COME-C	1,401.9 mg
73-84	COME-D	184.5 mg
85-98	COME-E	111.2 mg
99-107	COME-F	27.1 mg
108-115	COME-G	12.8 mg
116-126	COME-H	17.1 mg
127-132	COME-I	7.8 mg
133-157	COME-K	24.0 mg
158-179	COME-L	11.6 mg
180-204	COME-M	6.7 mg
205-211	COME-N	1.3 mg
212-233	COME-O	3.8 mg
234-248	COME-P	2.8 mg
249-384	COME-Q	13.7 mg

Τα κλάσματα COME-B, COME-C, COME-D, COME-E, COME-F, COME-G, COME-H, COME-I, COME-K, αποτέλεσαν αντικείμενο αναλυτικής μελέτης με αποτέλεσμα την απομόνωση έξι ουσιών.

Κλάσμα COME-B (964.7 mg)

Υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης (C.C, 12.0 cm x 3.5cm) επί γέλης πυριτίας με σύστημα έκλουσης μίγματα διαλυτών Hex, CH₂Cl₂, EtOAc και MeOH αυξανόμενης πολικότητας. Ελήφθησαν 143 κλάσματα μέσου όγκου 30 mL, τα οποία κατόπιν ελέγχου με TLC συνενώθηκαν στις ακόλουθες ομάδες:

Κλάσματα	Κωδικός	Αναλογία %	Ποσότητες
1-3	COME-BA	Hex 100% - He:CH ₂ Cl ₂ 1:1	11.3 mg
4-5	COME-BB	CH ₂ Cl ₂ 100%	6.4 mg
6-8	COME-BC		13.5mg
9-10	COME-BD	CH ₂ Cl ₂ 100% - CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 98:2	6.8 mg
11-15	COME-BE	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 98:2	196.3 mg
16-17	COME-BF		38.7 mg
18-20	COME-BG	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 96:4	32.7 mg
21-25	COME-BH	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 96:4 - CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 94:6	23.5 mg
26-36	COME-BI	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 94:6 - CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 92:8	21.1 mg
37-47	COME-BK	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 92:8 - CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 90:10	18.0 mg
48-67	COME-BL	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 90:10 - CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 75:25	33.9 mg
68-80	COME-BM	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 75:25 - CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 65:35	39.4 mg
81-90	COME-BN	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 65:35 - CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 60:40	39.9 mg
91-102	COME-BO	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 60:40 - CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 40:60	34.0 mg
103-115	COME-BP	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 40:60 - CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 20:80	39.7 mg
116-129	COME-BQ	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 20:80 - EtOAc 100%	70.6 mg
130-138	COME-BR	EtOAc:MeOH 95:5 - EtOAc:MeOH 80:20	161.7 mg
139-143	COME-BS	EtOAc:MeOH 50:50 - MeOH 100%	185.5mg

Τα κλάσματα COME-BE (196.3 mg) και COME-BF (38.7 mg) συνενώθηκαν σε μια ομάδα την COME-BE'.

Ομάδα COME-BE' (235.0 mg)

Υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης (C.C, 13.0 cm x 2.0 cm) επί γέλης πυριτίας με υγρό έκλουσης μίγματα διαλυτών Hex, CH₂Cl₂, EtOAc και MeOH αυξανόμενης πολικότητας. Ελήφθησαν 83 κλάσματα μέσου όγκου 30 mL, τα οποία κατόπιν ελέγχου (TLC) συνενώθηκαν στις ακόλουθες ομάδες:

Ομάδες	Κωδικός	Αναλογίες %	Ποσότητες
1'	COME-BE'-A	Hex 100%	0.8 mg
1-2	COME-BE'-B	Hex:CH ₂ Cl ₂ 1:1	0.4mg
3	COME-BE'-C	Hex:CH ₂ Cl ₂ 1:1	1.3mg
4	COME-BE'-D	Hex:CH ₂ Cl ₂ 20:80	2.1mg
5	COME-BE'-E		2.4mg
6	COME-BE'-F		0.8mg
7	COME-BE'-G		14.7 mg
8-11	COME-BE'-H	CH ₂ Cl ₂ 100%	147.8mg
12-16	COME-BE'-I	CH ₂ Cl ₂ 100% - CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 99:1	16.9mg
17-27	COME-BE'-K	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 99:1 - CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 94:6	7.5mg
28-39	COME-BE'-L	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 94:6 -CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 85:15	11.7mg
40-48	COME-BE'-M	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 80:20 -CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 70:30	18.9mg
49-60	COME-BE'-N	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc70:30 -CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 50:50	10.3mg
61-63	COME-BE'-O	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc50:50 -CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 40:60	2.2mg
64-68	COME-BE'-P	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 40:60 -CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 20:80	4.5mg
69-72	COME-BE'-Q	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 20:80 - EtOAc 100%	3.8mg
73-79	COME-BE'-R	EtOAc:MeOH 90:10 -EtOAc:MeOH 80:20	14.0 mg
80-83	COME-BE'-S	EtOAc:MeOH80:20 -MeOH 100%.	12.3 mg

Ομάδα COME-BE'H (147.8 mg)

Υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης Sephadex LH-20 (40.0 cm × 2.0 cm) με διαλύτη έκλουσης MeOH 100%. Ελήφθησαν 1 κλάσμα 20 mL, 89 κλάσματα 0.5 mL (2-91), 113 κλάσματα 2 mL (92-205) και 7 κλάσματα των 15 mL (206-213). Κατόπιν ελέγχου με TLC συνενώθηκαν στις ακόλουθες ομάδες:

Ομάδες	Κωδικός	Ποσότητες
1	COME-BE'HA	0.3 mg
2-15	COME-BE'HB	8.2 mg
16-33	COME-BE'HC	3.1 mg
34-55	COME-BE'HD	7.5 mg
56-86	COME-BE'HE	21.6 mg
87-109	COME-BE'HF	48.6 mg
110-118	COME-BE'HG	7.0 mg
119-152	COME-BE'HH	22.4 mg

Ομάδες	Κωδικός	Ποσότητες
153-176	COME-BE'HI	6.2 mg
177-190	COME-BE'HK	2.4 mg
191-198	COME-BE'HL	2.1 mg
199-212	COME-BE'HM	2.2 mg
213	COME-BE'HN	1.5 mg

Τα κλάσματα COME-BH (23.5 mg), COME-BI (21.1 mg), COME-BK (18.0 mg) και COME-BL (33.9 mg) συνενώθηκαν σε μια την COME-BH'.

Ομάδα COME-BH' (96.5 mg)

Υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία στήλης (C.C, 12.0 cm x 2.0 cm) επί γέλης πυριτίας με υγρό έκλουσης μίγματα διαλυτών Hex, CH₂Cl₂ και MeOH αυξανόμενης πολικότητας. Ελήφθησαν 95 κλάσματα μέσου όγκου 30 mL, τα οποία κατόπιν ελέγχου με TLC συνενώθηκαν στις ακόλουθες ομάδες:

Ομάδες	Κωδικός	Αναλογία %	Ποσότητες
1-5	COME-BH'-A	Hex 100% - He:CH ₂ Cl ₂ 80:20	3.9 mg
6-7	COME-BH'-B	Hex:CH ₂ Cl ₂ 80:20 - He:CH ₂ Cl ₂ 70:30	2.5mg
8	COME-BH'-C	Hex:CH ₂ Cl ₂ 70:30	0.1mg
9-13	COME-BH'-D	Hex:CH ₂ Cl ₂ 70:30 - He:CH ₂ Cl ₂ 60:40	0.4mg
14-20	COME-BH'-E	Hex:CH ₂ Cl ₂ 60:40 - He:CH ₂ Cl ₂ 50:50	20.7 mg
21-24	COME-BH'-F	Hex:CH ₂ Cl ₂ 50:50	8.1 mg
25-30	COME-BH'-G	CH ₂ Cl ₂ 100% -CH ₂ Cl ₂ :MeOH 99.5:0.5	10.2 mg
31-39	COME-BH'-H	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 99.5:0.5 -CH ₂ Cl ₂ :MeOH 98.5:1.5	2.5 mg
40-42	COME-BH'-I	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 98.5:1.5	7.2 mg
43-47	COME-BH'-K	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 98:2	14.5 mg
48-53	COME-BH'-L	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 98:2 -CH ₂ Cl ₂ :MeOH 97:3	11.7 mg
54-60	COME-BH'-M	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 97:3 -CH ₂ Cl ₂ :MeOH 96:4	4.8 mg
61-72	COME-BH'-N	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 96:4 -CH ₂ Cl ₂ :MeOH 93:7	6.4 mg
73-78	COME-BH'-O	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 93:7 -CH ₂ Cl ₂ :MeOH 91:9	2.2 mg
79-90	COME-BH'-P	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 91:9 -CH ₂ Cl ₂ :MeOH 80:20	5.7 mg
91-95	COME-BH'-Q	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 50:50 -MeOH 100%	5.1 mg

Κλάσμα COME-C (1.4019 g)

Υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης (C.C, 12.0 cm x 3.5 cm) επί γέλης πυριτίας με υγρό έκλουσης μίγματα διαλυτών Hex, CH₂Cl₂, EtOAc και MeOH αυξανόμενης πολικότητας. Ελήφθησαν 152 κλάσματα μέσου όγκου 30 mL, τα οποία κατόπιν ελέγχου με TLC συνενώθηκαν στις ακόλουθες ομάδες:

Κλάσματα	Κωδικός	Αναλογία %	Ποσότητες
1	COME-CA	Hex 100%	2.5 mg
2	COME-CB	Hex:CH ₂ Cl ₂ 1:1	11.0 mg
3-4	COME-CC		65.5 mg
5	COME-CD		17.0 mg
6	COME-CE		23.9 mg
7	COME-CF	CH ₂ Cl ₂ 100%	14.4 mg
8	COME-CG	CH ₂ Cl ₂ 100%	6.7 mg
9	COME-CH		36.7 mg
10	COME-CI		40.4 mg
11	COME-CK		9.3 mg
12	COME-CL	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 98:2	6.8 mg
13	COME-CM		6.5 mg
14	COME-CN		35.7 mg
15-24	COME-CO	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 98:2 -CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 96:4	305.5 mg
25-29	COME-CP	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 94:6	15.1 mg,
30-40	COME-CQ	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 94:6 - CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 90:10	22.7 mg
41-45	COME-CR	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 90:10	8.6 mg
46-50	COME-CS	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 85:15	70 mg
51-60	COME-CT	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 85:15 - CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 75:25	23.8 mg
61-71	COME-CU	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 75:25 - CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 70:30	27.5 mg
72-76	COME-CV	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 70:30 - CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 65:35	16.1 mg
77-90	COME-CX	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 65:35 - CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 50:50	53.7 mg
91-98	COME-CY	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 50:50 - CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 40:60	38.1 mg
99-107	COME-CZ	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 40:60 - CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 30:70	62.7 mg
108-117	COME-CZI	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 30:70 - CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 10:90	45.3 mg
118-129	COME-CZII	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 10:90 - EtOAc 100%	101.8 mg
130-135	COME-CZIII	EtOAc:MeOH 95:5 - EtOAc:MeOH 90:10	95.2 mg
136-139	COME-CZIV	EtOAc:MeOH 80:20	54.2 mg
140-147	COME-CZV	EtOAc:MeOH 70:30 - EtOAc:MeOH 50:50	129.7 mg
148-152	COME-CZVI	MeOH 100%	66.1 mg

Ομάδα COME-CZII (101.8mg)

Από τα 101.8 mg τα 51.7 mg διαλύθηκαν στη MeOH, ενώ τα 50.1 mg καθίζαναν ως ίζημα. Η υπερκείμενη φάση υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης (C.C, 55.0 cm x 3.0 cm) επί Sephadex LH-20, με υγρό έκλουσης MeOH. Ελήφθησαν 391 κλάσματα μέσου όγκου: από 1-5, 2 mL, 6-390, 1 mL, και το 391, 200 mL, τα οποία κατόπιν ελέγχου με TLC συνενώθηκαν στις ακόλουθες ομάδες:

Κλάσματα	Κωδικός	Ποσότητες
1-60	COME-CZII-A	3.4mg
61-77	COME-CZII-B	5.2mg
78-93	COME-CZII-C	6.2mg
94-158	COME-CZII-D	22.5 mg
159-173	COME-CZII-E	2.2 mg
174-203	COME-CZII-F	2.9 mg
204-233	COME-CZII-G	1.4 mg

Κλάσματα	Κωδικός	Ποσότητες
234-263	COME-CZII-H	1.1 mg
264-276	COME-CZII-I	0.6 mg
277-293	COME-CZII-K	2.2 mg
294-356	COME-CZII-L	75.7mg
357-390	COME-CZIIM	1.3 mg
391	COME-CZIIN	2.1 mg

Κλάσμα COME-D (184.5 mg)

Υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης (C.C, 80.0 cm x 2.0 cm) επί Sephadex LH-20, με σύστημα έκλουσης CH₂Cl₂:MeOH (1:2). Ελήφθησαν 380 κλάσματα μέσου όγκου: για τα 1-360: 1 mL, και για τα 361-380: 3mL τα οποία κατόπιν ελέγχου με TLC συνενώθηκαν στις ακόλουθες ομάδες:

Κλάσματα	Κωδικός	Ποσότητες
1-55	COME-DA	1.0 mg
56-99	COME-DB	6.6 mg
100-120	COME-DC	12.1 mg
121-145	COME-DD	22.7 mg
146-150	COME-DE	3.0 mg
151-169	COME-DF	11.7 mg
170-180	COME-DG	12.1 mg
181-189	COME-DH	6.2 mg
190-203	COME-DI	6.0 mg
204-228	COME-DK	19.9 mg
229-244	COME-DL	37.9 mg
245-260	COME-DM	26.7 mg
261-284	COME-DN	12.4 mg
285-305	COME-DO	4.3 mg
306-333	COME-DP	2.4 mg
334-350	COME-DQ	0.9 mg
351-365	COME-DR	0.9 mg
366-380	COME-DS	2.8 mg

Το κλάσματα COME-DO (4.3 mg) κατόπιν φασματοσκοπικής μελέτης ταυτοποιήθηκε ως **ναρινγγενίνη** (μεταβολίτης **63c**).

Κλάσμα COME-E (184.5mg)

Υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης (C.C, 78.0 cm x 2.0 cm) επί Sephadex LH-20, με σύστημα έκλουσης CH₂Cl₂:MeOH (1:2). Ελήφθησαν 450 κλάσματα μέσου όγκου: ένα αρχικό κλάσμα 50 mL, για τα 1-360: 1mL, για τα 361-435: 0.5 mL, και για τα κλάσματα 436-450: 1 mL και ένα τελικό 400 mL, τα οποία κατόπιν ελέγχου με TLC συνενώθηκαν στις ακόλουθες ομάδες:

Κλάσματα	Κωδικός	Ποσότητες
1'	COME-EA	1.0 mg
1-90	COME-EB	2.9 mg
91-109	COME-EC	2.0 mg
110-129	COME-ED	2.6 mg
130-159	COME-EE	4.6 mg
160-169	COME-EF	1.5 mg
170-194	COME-EG	4.0 mg
195-202	COME-EH	0.8 mg
203-233	COME-EI	10.8 mg
234-265	COME-EK	42.7 mg
266-300	COME-EL	22.7 mg
301-329	COME-EM	10.0 mg
330-365	COME-EN	2.3 mg
366-389	COME-EO	0.9 mg
390-402	COME-EP	0.6 mg
403-430	COME-EQ	1.3 mg
431-450	COME-ER	0.4 mg
451	COME-ES	3.1mg

Το κλάσμα COME-EM (10.0 mg) κατόπιν φασματοσκοπικής μελέτης ταυτοποιήθηκε ως **ναρινγγενίνη** (μεταβολίτης **63c**).

Κλάσμα COME-F (27.1 mg)

Υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης (C.C, 70.0 cm x 2.0 cm) επί Sephadex LH-20, με διαλύτη έκλουσης MeOH. Ελήφθησαν ένα αρχικό κλάσμα 100 mL και 315 κλάσματα μέσου όγκου: για τα 1-12: 5 mL, για τα 13-300: 1 mL, για τα 301-315: 5 mL και ένα τελικό κλάσμα 150 mL, τα οποία κατόπιν ελέγχου με TLC συνενώθηκαν στις ακόλουθες ομάδες:

Κλάσματα	Κωδικός	Ποσότητες
1'	COME-FA	2.8 mg
1-12	COME-FB	5.8 mg
13-26	COME-FC	1.2 mg
27-45	COME-FD	1.1 mg
46-66	COME-FE	1.6 mg
67-84	COME-FF	4.9 mg
85-99	COME-FG	3.4 mg
100-138	COME-FH	4.1 mg
139-158	COME-FI	1.8 mg
159-230	COME-FK	2.2 mg
231-300	COME-FL	1.8 mg
301-315	COME-FM	1.3 mg
316	COME-FN	1.9 mg
317	COME-FO	1.8 mg

Τα κλάσματα COME-FB (5.8 mg) και COME-FC (1.2 mg) περιείχαν από μια ένωση. Κατόπιν φασματοσκοπικής μελέτης ταυτοποιήθηκαν ως: **p-υδροξυ βενζοϊκό οξύ** (μεταβολίτης **76**) και **5,7-διυδροξυχρωμόνη** (μεταβολίτης **106**) αντίστοιχα.

Κλάσμα COME-G (11.6 mg)

Υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης (C.C, 70.0 cm x 2.0 cm) επί Sephadex LH-20, με διαλύτη έκλουσης MeOH. Ελήφθησαν ένα αρχικό κλάσμα 140 mL, και 300 κλάσματα μέσου όγκου: για τα 1-5: 5 mL, για τα 6-300: 1mL και ένα τελικό 300 mL, τα οποία κατόπιν ελέγχου με TLC συνενώθηκαν στις ακόλουθες ομάδες:

Κλάσματα	Κωδικός	Ποσότητες
1'	COME-GA	3.7 mg
1-4	COME-GB	1.2 mg
5-19	COME-GC	1.2 mg
20-47	COME-GD	1.1 mg
48-55	COME-GE	0.2 mg
56-79	COME-GF	0.6 mg
80-93	COME-GG	2.7 mg
94-119	COME-GH	2.5 mg
120-125	COME-GI	1.1 mg
126-146	COME-GK	1.0 mg
147-167	COME-GL	1.0 mg
168-240	COME-GM	2.5 mg
241-300	COME-GN	1.8 mg
301	COME-GO	0.8 mg

Τα κλάσματα COME-GH (2.5 mg) και COME-GI (1.1 mg) περιείχαν την ίδια ένωση η οποία κατόπιν φασματοσκοπικής μελέτης ταυτοποιήθηκε ως: **ναρινγγενίνη** (μεταβολίτης **63c**).

Κλάσμα COME-H (17.1 mg)

Υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης (C.C, 70.0 cm x 2.0 cm) επί Sephadex LH-20, με διαλύτη έκλουσης MeOH. Ελήφθησαν αρχικό κλάσμα, 180 mL και 281 κλάσματα μέσου όγκου: για τα 1-280: 1mL, και το 281: 300 mL, τα οποία κατόπιν ελέγχου με TLC συνενώθηκαν στις ακόλουθες ομάδες:

Κλάσματα	Κωδικός	Ποσότητες
1'	COME-HA	7.0 mg
1-5	COME-HB	0.4 mg
6-14	COME-HC	0.7 mg

Κλάσματα	Κωδικός	Ποσότητες
15-20	COME-HD	0.3 mg
21-30	COME-HE	0.8 mg
31-39	COME-HF	0.5 mg
40-53	COME-HG	0.6 mg
54-62	COME-HH	0.3 mg
63-71	COME-HI	0.9 mg
72-84	COME-HK	0.2 mg
85-96	COME-HL	1.2 mg
97-102	COME-HM	1.0 mg
103-121	COME-HN	1.0 mg
122-151	COME-HO	1.7 mg
152-179	COME-HP	1.7 mg
180-267	COME-HQ	3.6 mg
268-280	COME-HR	0.3 mg
281	COME-HS	1.4 mg

Το κλάσμα COME-HC (0.7 mg) περιείχε μία ένωση η οποία κατόπιν φασματοσκοπικής μελέτης ταυτοποιήθηκε ως **καφεϊκό οξύ** (μεταβολίτης **77**), το κλάσμα COME-HL (1.2 mg) περιείχε **ναρινγγενίνη** (μεταβολίτης **63c**), το κλάσμα COME-HM (1.0 mg) επίσης **ναρινγγενίνη** (μεταβολίτης **63c**), το κλάσμα COME-HO (1.7 mg) περιείχε **μίγμα εριοδικτυόλης:λουτεολίνης** (μεταβολίτης **63a:58a**), και το κλάσμα COME-HP (1.7 mg) περιείχε καθαρή **λουτεολίνη** (μεταβολίτης **58a**).

Κλάσμα COME-I (7.8 mg)

Υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης (C.C, 80.0 cm x 2.0 cm) επί Sephadex LH-20, με σύστημα έκλουσης CH₂Cl₂:MeOH (1:2). Ελήφθησαν 370 κλάσματα μέσου όγκου: για τα 1-30, 2 mL, για τα 31-249, 1 mL, για τα 250-330, 0.5 mL και για τα 331-370, 2 mL, τα οποία κατόπιν ελέγχου με TLC συνενώθηκαν στις ακόλουθες ομάδες:

Κλάσματα	Κωδικός	Ποσότητες
1-179	COME-IA	3.4 mg
180-219	COME-IB	1.9 mg
220-238	COME-IC	0.7 mg
239-267	COME-ID	1.8 mg
268-316	COME-IE	3.2 mg
317-338	COME-IF	0.9 mg
339-362	COME-IG	1.7 mg
363-370	COME-IH	2.2 mg

Το κλάσματα COME-IE (3.2 mg) κατόπιν φασματοσκοπικής μελέτης ταυτοποιήθηκε ως: **λουτεολίνη** (μεταβολίτης **58a**).

COME-K (24.0 mg)

Υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης (C.C, 80.0 cm x 2.0 cm) επί Sephadex LH-20, με σύστημα έκλουσης CH₂Cl₂:MeOH (1:2). Ελήφθησαν 451 κλάσματα μέσου όγκου 1 mL, τα οποία κατόπιν ελέγχου με TLC συνενώθηκαν στις ακόλουθες ομάδες:

Κλάσματα	Κωδικός	Ποσότητες
1-90	COME-KA	2.0 mg
91-100	COME-KB	0.2 mg
101-161	COME-KC	3.1 mg
162-185	COME-KD	1.0 mg
186-195	COME-KE	0.2 mg
196-234	COME-KF	2.0 mg
235-259	COME-KG	0.9 mg
260-280	COME-KH	2.1 mg
281-294	COME-KI	1.3 mg
295-309	COME-KK	1.5 mg
310-336	COME-KL	7.5 mg
337-341	COME-KM	1.0 mg
342-390	COME-KN	3.1 mg
391-406	COME-KO	1.0 mg
407-447	COME-KP	1.2 mg
448-451	COME-KQ	2.9 mg

Το κλάσμα COME-KL (7.5 mg) κατόπιν φασματοσκοπικής μελέτης ταυτοποιήθηκε ως μίγμα λουτεολίνης:εριοδικτυόλης (2:1) (μεταβολίτης **58a:63a**), ενώ το κλάσμα COME-KM (1.0 mg) ως λουτεολίνη (μεταβολίτης **58a**).

ΥΠΟΛΕΙΜΜΑ EtOAc: CMX (2.5 g)

Υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης (C.C, 40.0 cm x 4.0 cm) επί Sephadex LH-20, με σύστημα έκλουσης CH₂Cl₂:MeOH (1:1). Ελήφθησαν 510 κλάσματα μέσου όγκου: για τα 1-20: 5 mL, για τα 21-90: 4 mL, για τα 91-260: 2 mL, για τα 261-471: 5 mL και για τα 472-510: 10 mL τα οποία κατόπιν ελέγχου με TLC συνενώθηκαν στις ακόλουθες ομάδες:

Κλάσματα	Κωδικός	Ποσότητες
1-30	CMX-A	37.1 mg
31-42	CMX-B	187.3 mg
43-57	CMX-C	382.4 mg
58-69	CMX-D	610.2 mg
70-102	CMX-E	1,089.5 mg
103-120	CMX-F	10.9 mg
121-135	CMX-G	6.2 mg
136-162	CMX-H	8.3 mg
163-234	CMX-I	15.1 mg
235-288	CMX-K	63.6 mg
289-295	CMX-L	1.3 mg
296-327	CMX-M	3.0 mg
328-362	CMX-N	1.8 mg
363-510	CMX-O	18.1 mg

Τα κλάσματα CMX-C, CMX-D, CMX-E, επεξεργάστηκαν περαιτέρω και οδήγησαν σε απομονώσεις οκτώ ουσιών.

Κλάσμα CMX-C (382.4 mg)

Υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης (C.C, 12.0 cm x 3.5 cm) επί γέλης πυριτίας με συστήματα έκλουσης μίγματα διαλυτών Hex, CH₂Cl₂, MeOH και H₂O αυξανόμενης πολικότητας. Ελήφθησαν 98 κλάσματα μέσου όγκου 30 mL, τα οποία κατόπιν ελέγχου με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) συνενώθηκαν στις ακόλουθες ομάδες:

Κλάσματα	Κωδικός	Αναλογία %	Ποσότητες
1-3	CMX-CA	Hex 100% - He:CH ₂ Cl ₂ 1:1	23.3 mg
4	CMX-CB	Hex:CH ₂ Cl ₂ 1:1	1.2 mg
5-6	CMX-CC		2.4 mg
7	CMX-CD		1.6 mg
8-9	CMX-CE	Hex:CH ₂ Cl ₂ 1:1 - CH ₂ Cl ₂ 100%	4.0 mg
10-11	CMX-CF	CH ₂ Cl ₂ 100%	4.1 mg
12-15	CMX-CG		12.8 mg
16-17	CMX-CH		4.4 mg
18-27	CMX-CI	CH ₂ Cl ₂ 100% - CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O 95:5:0.5	3.6 mg

Κλάσματα	Κωδικός	Αναλογία %	Ποσότητες
28-29	CMX-CK	CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O 95:5:0.5 - CH ₂ Cl ₂ :MeOH: H ₂ O 90:10:1	9.9 mg
30-33	CMX-CL	CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O 90:10:1	10.0 mg
34-39	CMX-CM	CH ₂ Cl ₂ :MeOH: H ₂ O 90:10:1 - CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O 85:15:1.5	19.0 mg
40-41	CMX-CN	CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O 85:15:1.5	11.5 mg
42-45	CMX-CO	CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O 85:15:1.5 - CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O 80:20:2	77.3 mg
46-48	CMX-CP	CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O 80:20:2	35.8 mg
49-53	CMX-CQ	CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O 80:20:2 - CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O 75:25:2.5	35.5 mg
54-55	CMX-CR	CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O 75:25:2.5	13.5 mg
56-63	CMX-CS	CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O 75:25:2.5 - CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O 70:30:3	31.3 mg
64-67	CMX-CT	CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O 70:30:3	16.6 mg
68-74	CMX-CU	CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O 65:35:3.5	16.4 mg
75-80	CMX-CV	CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O 60:40:4	6.8 mg
81-90	CMX-CX	CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O 60:40:4 - CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O 55:45:4.5	8.2 mg
91-98	CMX-CW	CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O 50:50:5 – MeOH 100%	11.8mg

Το κλάσμα CMX-CR (13.5 mg) κατόπιν φασματοσκοπικής μελέτης ταυτοποιήθηκε ως μια καθαρή ουσία: **μαρτυνοσίδης** (μεταβολίτης **48g**).

Ομάδα CMX-CO (77.3 mg)

Η ομάδα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης Sephadex LH-20 (52.0 cm x 2.0 cm) με διαλύτη έκλουσης MeOH 100%. Ελήφθησαν 3 κλάσματα των 50 mL, 5 κλάσματα των 2.5 mL (1-6), 183 κλάσματα των 1 mL (7-190), 19 κλάσματα των 5 mL (191-210) και 1 κλάσματα των 60 mL (211). Κατόπιν ελέγχου με TLC συνενώθηκαν στις ακόλουθες ομάδες:

Κλάσματα	Κωδικός	Ποσότητες
1'-3'	CMX-COA	0.8 mg
1-7	CMX-COB	1.1 mg
8-12	CMX-COC	0.4 mg
13-29	CMX-COD	1.9 mg
30-48	CMX-COE	5.0 mg
49-59	CMX-COF	2.0 mg
60-70	CMX-COG	6.5 mg
71-89	CMX-COH	6.4 mg
90-99	CMX-COI	4.9 mg
100-119	CMX-COK	29.6 mg
120-126	CMX-COL	7.2 mg
127-150	CMX-COM	2.8 mg
151-162	CMX-CON	1.2 mg
163-210	CMX-COO	5.9 mg
211	CMX-COP	0.3 mg

Ομάδα CMX-CP (35.8 mg)

Υποβλήθηκε σε παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (PTLC) επί γέλης οξειδίου της πυριτίας με δείκτη φθορισμού (υάλινες πλάκες 20 cm x 20 cm), και κινητή φάση EtOAc:AcOH:H₂O σε αναλογία 1:4:8. Κατόπιν εμφάνιση των πλακών με θεϊκή βανιλίνη κόπηκαν 5 ζώνες.

Ομάδες - Ζώνες	R _f	Ποσότητες
CMX-CP α	0.39	10.4 mg
CMX-CP β	0.48	9.1 mg
CMX-CP γ	0.55	13.5 mg
CMX-CP δ	0.65	14.7 mg
CMX-CP ϵ	0.85	22.0 mg

Κλάσμα CMX-D (610.2 mg)

Υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης (C.C, 13.5 cm x 3.5 cm) επί γέλης πυριτίας (Merck, Art. 9385) με συστήματα έκλουσης μίγματα διαλυτών Hex, CH₂Cl₂, MeOH και H₂O αυξανόμενης πολικότητας. Ελήφθησαν 93 κλάσματα μέσου όγκου 30 mL, τα οποία κατόπιν ελέγχου με TLC συνενώθηκαν στις ακόλουθες ομάδες:

Κλάσματα	Κωδικός	Αναλογία %	Ποσότητες
1-4	CMX-DA	Hex 100% - He:CH ₂ Cl ₂ 50:50	3.5 mg
5	CMX-DB	Hex:CH ₂ Cl ₂ 50:50	0.6 mg
6-7	CMX-DC		1.4 mg
8	CMX-DD		0.9 mg
9	CMX-DE		1.2 mg
10-11	CMX-DF	CH ₂ Cl ₂ 100%	2.0 mg
12-13	CMX-DG		0.8 mg
14-15	CMX-DH		0.8 mg
16-23	CMX-DI		4.0 mg
24-29	CMX-DK	CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O 95:5:0.5 – CH ₂ Cl ₂ :MeOH: H ₂ O 90:10:1	2.5 mg
30-32	CMX-DL	CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O 90:10:1	12.5 mg
33-35	CMX-DM		10.8 mg
36-38	CMX-DN	CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O 85:15:1.5	40.3 mg
39-40	CMX-DO		27.9 mg
41-44	CMX-DP	CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O 85:15:1.5 - CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O 80:20:2	60.4 mg
45-46	CMX-DQ	CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O 80:20:2	19.4 mg
47-49	CMX-DR		22.5 mg
50-51	CMX-DS	CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O 75:25:2.5	10.8 mg
52-54	CMX-DT		25.1 mg
55-65	CMX-DU	CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O 75:25:2.5 - CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O 65:35:3.5	265.6 mg
66-73	CMX-DV	CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O 65:35:3.5 - CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O 60:40:4	52.5 mg

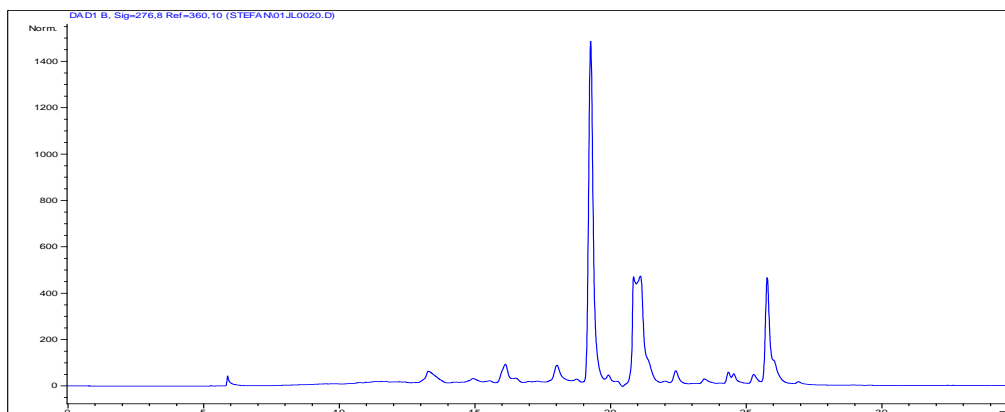
Κλάσματα	Κωδικός	Αναλογία %	Ποσότητες
74-83	COME-DW	CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O 60:40:4 – CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O 55:45:4.5	18.5 mg
84	CMX-DX	CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O 55:45:4.5	1.5 mg
85-90	COME-DY	CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O 55:45:4.5 - CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O 50:50:5	5.1 mg
91-93	CMX-DZ	CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O 50:50:5 - MeOH 100%	14.1 mg

Το κλάσμα CMX-DA (3.5 mg) περιείχε μια ένωση η οποία κατόπιν φασματοσκοπικής μελέτης ταυτοποιήθηκε ως: **εικοσι-1-ένιο** (μεταβολίτης **107**) και το κλάσμα CMX-DU (265.6 mg) περιείχε το μεταβολίτης **48a** που αντιστοιχούσε στον **βερμπασκοσίδη**.

Ομάδα CMX-DN (40.3 mg)

Υποβλήθηκε σε HPLC με σύστημα έκλουσης MeOH:H₂O και με ταχύτητα ροής 2.0 ml/min. Όπως αναφέρθηκε στην πειραματική διαδικασία κάθε δείγμα είχε συγκέντρωση 7mg/mL. Παραλήφθηκαν κλάσματα που αντιστοιχούσαν σε 6 κορυφές. Παρακάτω, φαίνονται οι ποσότητες και οι χρόνοι έκλουσης (Rt) των ουσιών.

Κορυφές	Retention time (min)	Ποσότητες
CMX-DN ₁ - A	15.70	0.3 mg
CMX-DN ₂ - B	17.70	0.2 mg
CMX-DN ₃ - C	18.90	3.0 mg
CMX-DN ₄ - D	20.70	16.0 mg
CMX-DN ₅ - E	22.10	0.2 mg
CMX-DN ₆ - F	25.60	2.0 mg

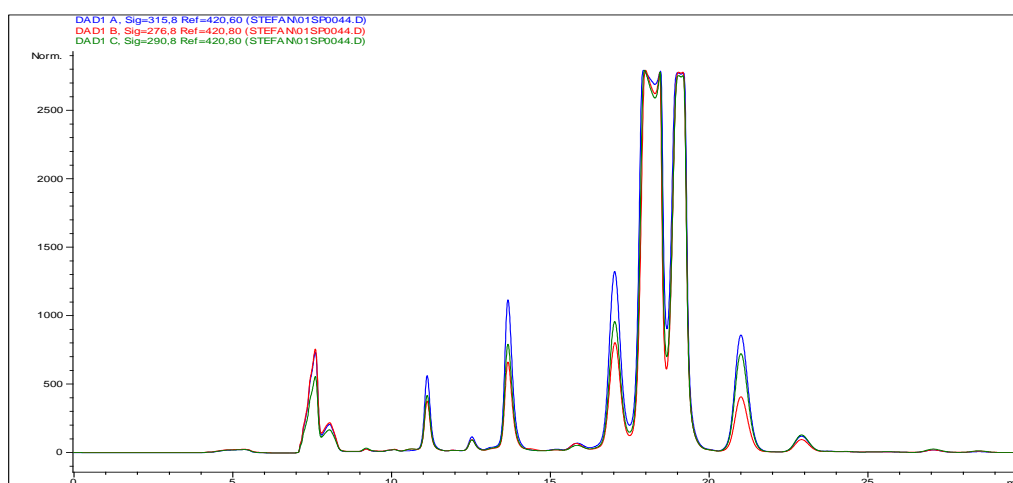


Σχήμα 3.3: Χρωματογράφημα (HPLC) του κλάσματος CMX-DN. Διακρίνονται 6 κορυφές.

Ομάδα CMX-DN₄D (16.0 mg)

Υποβλήθηκε σε HPLC με σύστημα έκλουσης H₂O:CH₃CN 6:4 και με ταχύτητα ροής 2.0 ml/min. Έγιναν 20 επαναληπτικές ενέσεις των 0.8 mg/mL, κάθε μια από τις οποίες είχε διάρκεια 42 min και παραλήφθηκαν κλάσματα που αντιστοιχούσαν σε 10 κορυφές. Παρακάτω δίνονται τα βάρη και οι χρόνοι έκλουσης (Rt) των ουσιών.

Κορυφές	Retention time (min)	Ποσότητες
CMX-DND ₁	7.20	1.0 mg
CMX-DND ₂	7.80	1.0 mg
CMX-DND ₃	12.40	0.5 mg
CMX-DND ₄	13.20	0.5 mg
CMX-DND ₅	14.80	0.2 mg
CMX-DND ₆	16.60	1.0 mg
CMX-DND ₇	19.20	0.3 mg
CMX-DND ₈	19.90	0.4 mg
CMX-DND ₉	21.70	3.0 mg
CMX-DND ₁₀	24.40	1.0 mg

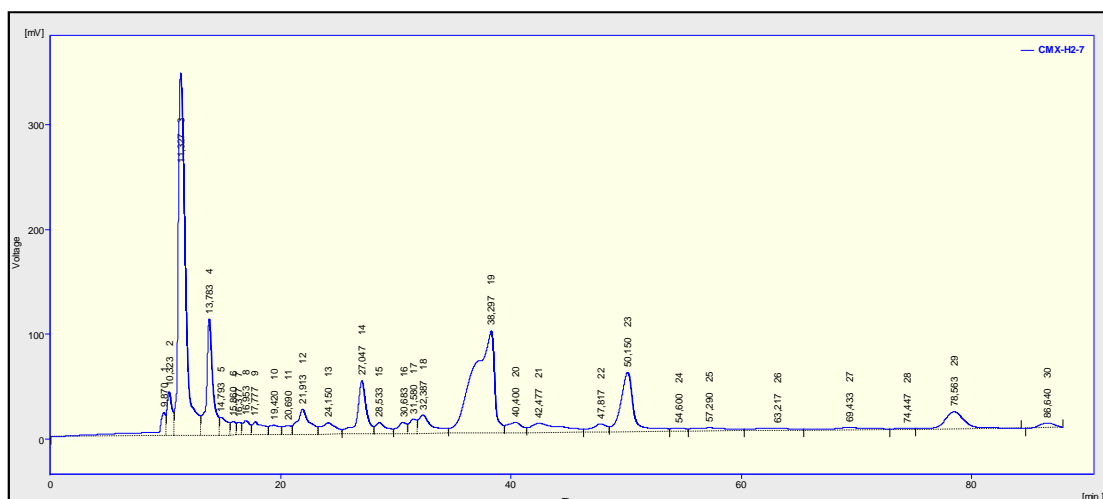


Σχήμα 3.4: Χρωματογράφημα (HPLC) του κλάσματος CMX-DN₄D. Διακρίνονται 10 κορυφές.

Ομάδα CMX-DO (27.9 mg)

Υποβλήθηκε σε HPLC με σύστημα έκλουσης MeOH:H₂O 6:4 και με ταχύτητα ροής 1.0 ml/min. Έγιναν 7 επαναληπτικές ενέσεις, κάθε μια από τις οποίες είχε διάρκεια 86.00 min και παραλήφθηκαν κλάσματα που αντιστοιχούσαν σε 17 κορυφές. Παρακάτω δίνονται τα βάρη και οι χρόνοι έκλουσης (Rt) των ουσιών.

Κορυφές	Retention time (min)	Ποσότητες
CMX-DO ₁	10.323	0.6 mg
CMX-DO ₂	11.327	1.6 mg
CMX-DO ₃	13.783	1.3 mg
CMX-DO ₄	16.953	1.5 mg
CMX-DO ₅	21.913	0.5 mg
CMX-DO ₆	24.150	0.4 mg
CMX-DO ₇	27.047	0.7 mg
CMX-DO ₈	30.683	0.5 mg
CMX-DO ₉	32.387	0.7 mg
CMX-DO ₁₀	35.087	1.2 mg
CMX-DO ₁₁	38.297	1.7 mg
CMX-DO ₁₂	40.400	0.2 mg
CMX-DO ₁₃	42.477	0.9 mg
CMX-DO ₁₄	47.817	0.1 mg
CMX-DO ₁₅	50.150	1.0 mg
CMX-DO ₁₆	78.563	1.1 mg
CMX-DO ₁₇	86.640	0.6 mg



Σχήμα 3.5: Χρωματογράφημα (HPLC) του κλάσματος CMX-DO. Διακρίνονται 17 κορυφές.

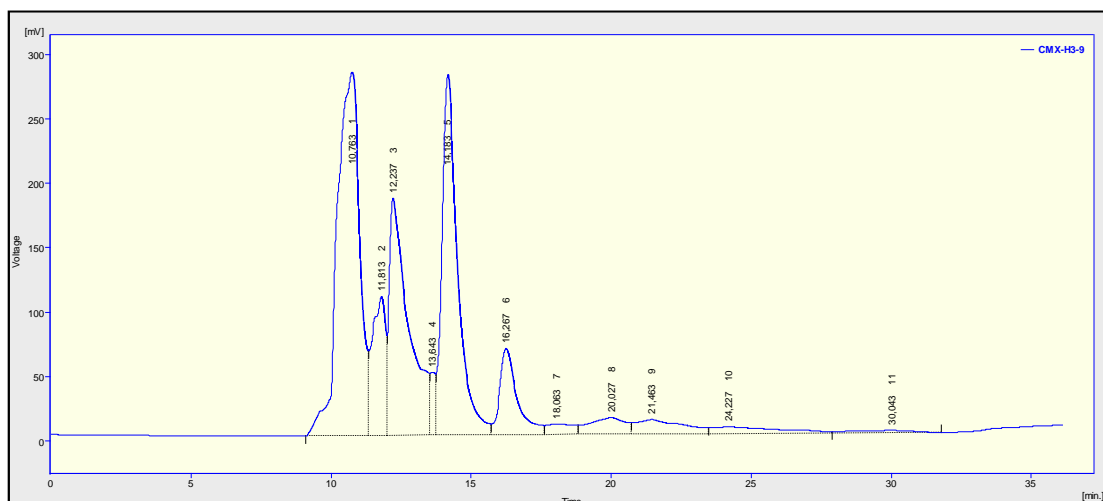
Το κλάσμα CMX-DO₁₆ (1.1 mg) περιείχε μια ένωση η οποία κατόπιν φασματοσκοπικής μελέτης ταυτοποιήθηκε ως: **διοσμετινο7-O-β-D-γλυκοζίτης (μεταβολίτης 105)**.

Ομάδα CMX-DV (52.5 mg)

Υποβλήθηκε σε HPLC με διαλύτη έκλουσης MeOH:H₂O 1:1 (ισοκρατικά) και με ταχύτητα ροής 1.0 ml/min. Έγιναν 14 επαναληπτικές ενέσεις με διάρκεια 45 min

και παραλήφθηκαν κλάσματα που αντιστοιχούσαν σε 5 κορυφές. Παρακάτω δίνονται τα βάρη και οι χρόνοι έκλουσης (Rt) των ουσιών.

Κορυφές	Retention time (min)	Ποσότητες
CMX-DV ₁	10.763	7.5 mg
CMX-DV ₂	11.813	2.6 mg
CMX-DV ₃	12.237	3.3 mg
CMX-DV ₄	14.183	5.3 mg
CMX-DV ₅	16.267	1.1 mg



Σχήμα 3.6: Χρωματογράφημα (HPLC) του κλάσματος CMX-DV. Διακρίνονται 5 κορυφές.

Κλάσμα CMX-E (1.0895 g)

Υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης (C.C, 13.5 cm x 3.5 cm) επί γέλης πυριτίας με συστήματα έκλουσης μίγματα διαλυτών Hex, CH₂Cl₂, MeOH και H₂O αυξανόμενης πολικότητας. Ελήφθησαν 90 κλάσματα μέσου όγκου 30 mL, τα οποία κατόπιν ελέγχου με TLC συνενώθηκαν στις ακόλουθες ομάδες:

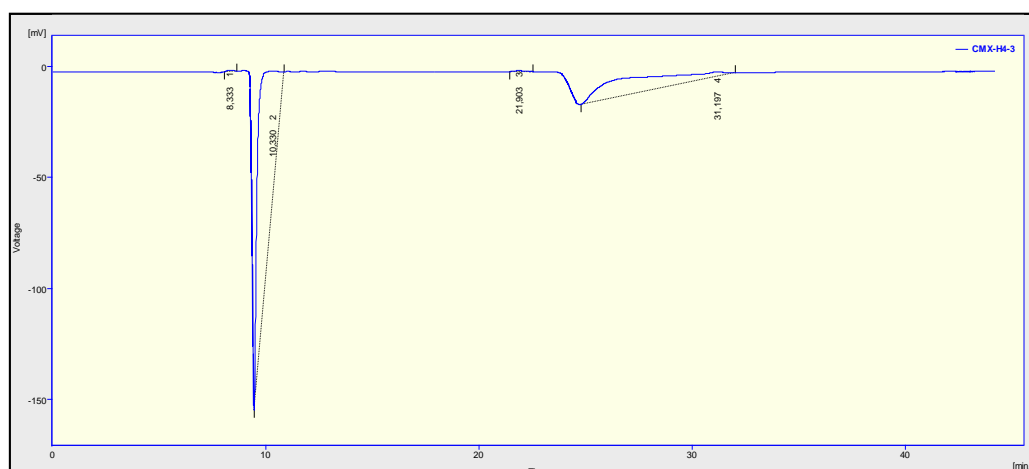
Κλάσματα	Κωδικός	Αναλογία%	Ποσότητες
1-5	CMX-EA	Hex 100% - He:CH ₂ Cl ₂ 50:50	0.9 mg
6-10	CMX-EB	Hex:CH ₂ Cl ₂ 50:50 - CH ₂ Cl ₂ 100%	0.5 mg
11-20	CMX-EC	CH ₂ Cl ₂ 100%-CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O 95:5:0.5	1.6 mg
21-22	CMX-ED	CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O 95:5:0.5 - CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O 90:10:1	0.3 mg
23	CMX-EE	CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O 90:10:1	3.0 mg
24-25	CMX-EF		2.9 mg
26-27	CMX-EG		10.1 mg
28-30	CMX-EH		CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O 90:10:1 - CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O 85:15:1.5
31	CMX-EI	CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O 85:15:1.5	13.4 mg
32-35	CMX-EK		85.8 mg
36-38	CMX-EL		CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O 85:15:1.5 - CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O

Κλάσματα	Κωδικός	Αναλογία%	Ποσότητες
		80:20:2	
39-41	CMX-EM	CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O 80:20:2	35.8 mg
42	CMX-EN		9.6 mg
43-45	CMX-EO	CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O 80:20:2 - CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O 75:25:2.5	30.7 mg
46	CMX-EP	CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O 75:25:2.5	9.5 mg
47-48	CMX-EQ		34.6 mg
49-55	CMX-ER	CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O 75:25:2,5 - CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O 70:30:3	556.6 mg
56-57	CMX-ES	CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O 70:30:3	36.0 mg
58-60	CMX-ET	CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O 65:35:3.5	2.0 mg
61-63	CMX-EU		21.3 mg
64-68	CMX-EV	CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O 65:35:3.5 - CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O 60:40:4	48.4 mg
69	CMX-EW	CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O 60:40:4	5.7 mg
70-71	CMX-EX		9.2 mg
72-90	CMX-EY	CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O 55:45:4.5 - MeOH 100%	63.0 mg

Τα κλάσματα CMX-ER (556.6 mg) και COME-EW (5.7 mg) περιείχαν από μία ένωση. Κατόπιν φασματοσκοπικής μελέτης ταυτοποιήθηκαν ως: **βερμπασκοσίδης (μεταβολιτής 48a)** και **χλωρογενικό οξύ (μεταβολιτής 79)** αντίστοιχα.

Κλάσμα CMX-EG (10.1 mg)

Υποβλήθηκε σε HPLC, με διαλύτη έκλουσης MeOH:H₂O 1:1 και με ταχύτητα ροής 1.2 ml/min. Έγιναν 2 επαναληπτικές ενέσεις κάθε μια από τις οποίες είχε διάρκεια 40 min και παραλήφθηκαν κλάσματα που αντιστοιχούσαν σε 2 κορυφές: CMX-EG₁ (10.330 min, 0.5 mg) και CMX-EG₂ (21.903 min, 0.6 mg).

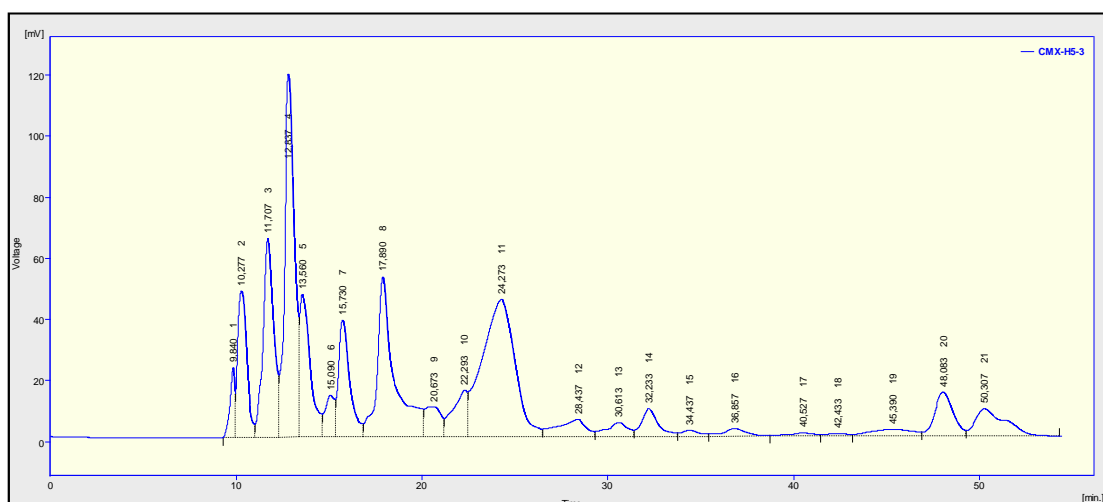


Σχήμα 3.7: Χρωματογράφημα (HPLC) του κλάσματος CMX-EG. Διακρίνονται 2 κορυφές.

Κλάσμα CMX-EI (13.4 mg)

Υποβλήθηκε σε HPLC με διαλύτη έκλουσης MeOH:H₂O 1:1 και με ταχύτητα ροής 1.0 ml/min. Έγιναν 3 επαναληπτικές ενέσεις κάθε μια από τις οποίες είχε διάρκεια 55 min και παραλήφθηκαν κλάσματα που αντιστοιχούσαν σε 11 κορυφές. Παρακάτω δίνονται τα βάρη και οι χρόνοι έκλουσης (Rt) των ουσιών.

Κορυφές	Retention time (min)	Ποσότητες
CMX-EI ₁	10.277	0.4 mg
CMX-EI ₂	11.707	0.2 mg
CMX-EI ₃	12.837	1.1 mg
CMX-EI ₄	13.560	3.4 mg
CMX-EI ₅	15.730	0.8 mg
CMX-EI ₆	17.890	1.5 mg
CMX-EI ₇	24.273	2.0 mg
CMX-EI ₈	32.233	0.8 mg
CMX-EI ₉	36.857	0.5 mg
CMX-EI ₁₀	48.083	4.3 mg
CMX-EI ₁₁	50.307	0.3 mg



Σχήμα 3.8: Χρωματογράφημα (HPLC) του κλάσματος CMX-EI. Διακρίνονται 11 κορυφές.

Ομάδα CMX-EK (85.8 mg)

Υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης Sephadex LH-20 (52.0 cm x 2.0 cm) με διαλύτη έκλουσης MeOH 100%. Ελήφθησαν 3 κλάσματα 200 mL, 5 κλάσματα 5mL (1-5), άλλα 79 κλάσματα 0.5 mL (6-85), 14 κλάσματα 2 mL (86-100), 19

κλάσματα του 1 mL (101-120), 24 κλάσματα των 3 mL (121-145), 29 κλάσματα των 2 mL (211-240), 5 κλάσματα των 5 mL (146-150) και 4 κλάσματα των 30 mL (151-154). Κατόπιν ελέγχου με TLC συνενώθηκαν στις ακόλουθες ομάδες:

Κλάσματα	Κωδικός	Ποσότητες
1'	CMX-EKA	1.5 mg
2'-3'/1-12	CMX-EKB	2.0 mg
13-29	CMX-EKC	1.3 mg
30-38	CMX-EKD	1.3 mg
39-82	CMX-EKE	46.0 mg
83-89	CMX-EKF	6.4 mg
90-104	CMX-EKG	11.9 mg
105-123	CMX-EKH	4.1 mg
124-140	CMX-EKI	8.8 mg
141-146	CMX-EKK	1.9 mg
147-150	CMX-EKL	0.7 mg
151-154	CMX-EKM	1.0 mg

Ομάδα CMX-EKE (46.0 mg)

Μέρος από το κλάσμα CMX-EKE (31.5 mg) υποβλήθηκε σε παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (PTLC). Αναπτύχθηκαν σε κελουλόζη (υάλινες πλάκες 20.0 cm x 20.0 cm) με κινητή φάση AcOH 30%. Κατόπιν εμφάνισης των πλακών με αντιδραστήριο Neu κόπηκαν 3 ζώνες με τα εξής δεδομένα:

Ομάδες - Ζώνες	R _f	Ποσότητα
CMX-EKE _α	0.46	9.5 mg
CMX-EKE _β	0.62	2.5 mg
CMX-EKE _γ	0.87	14.3 mg

Τα κλάσματα CMX-EKE_γ (14.3 mg) περιείχε μία ένωση οι οποία κατόπιν φασματοσκοπικής μελέτης ταυτοποιήθηκε ως: **μεθυλεστέρας του χλωρογενικού οξέος** (μεταβολίτης **108**).

Ομάδα CMX-EKH (4.1 mg)

Υποβλήθηκε σε παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (PTLC). Αναπτύχθηκαν σε κελουλόζη (υάλινες πλάκες 20.0 cm x 20.0 cm) με κινητή φάση AcOH 30%. Κατόπιν εμφάνισης των πλακών με αντιδραστήριο Neu κόπηκαν 7 ζώνες με τα εξής δεδομένα:

Ομάδες - Ζώνες	R _f	Ποσότητες
CMX-EKH _α	0.12	0.8 mg
CMX-EKH _β	0.41	2.5 mg

Ομάδες - Ζώνες	R _f	Ποσότητες
CMX-EKHγ	0.50	0.6 mg
CMX-EKHδ	0.54	0.2 mg
CMX-EKHε	0.73	0.2 mg
CMX-EKHστ	0.80	0.2 mg
CMX-EKHζ	0.85	0.5 mg

Κλάσμα CMX-EO (30.7 mg)

Υποβλήθηκε σε παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (PTLC). Αναπτύχθηκαν σε κελουλόζη (υάλινες πλάκες 20.0 cm x 20.0 cm) με κινητή φάση AcOH 30%. Κατόπιν εμφάνισης των πλακών με αντιδραστήριο Neu κόπηκαν 4 ζώνες με τα εξής δεδομένα:

Ομάδες - Ζώνες	R _f	Ποσότητες
CMX-EOα	0.09	1.0 mg
CMX-EOβ	0.21	1.2 mg
CMX-EOγ	0.28	1.0 mg
CMX-EOδ	0.69	16.6 mg

Τα κλάσματα CMX-EOγ (1.0 mg) και CMX-EOδ (16.6 mg) περιείχαν από μία ένωση η κάθε μια από τις οποίες κατόπιν φασματοσκοπικής μελέτης ταυτοποιήθηκαν ως: **απιγενινο-7-O-β-D-γλυκοζίτης** (μεταβολίτης **62b**) και **εριοδυκτυλο-7-O-β-D-γλυκοζίτης** (μεταβολίτης **63f**).

ΥΠΟΛΕΙΜΜΑ n-BuOH: COB (9.0 g)

Μέρος από το βουτανολικό υπόλειμμα (3.562 g) υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης (C.C, 44.0 cm x 4.0 cm) επί Sephadex LH-20, με διαλύτη έκλουσης MeOH 100%. Ελήφθησαν 1 κλάσμα 20 mL, 399 κλάσματα 1 mL (1-400), άλλα 14 κλάσματα των 3 mL (401-415) και 5 τελευταία κλάσματα των 50 mL (416-420) τα οποία κατόπιν ελέγχου με TLC συνενώθηκαν στις ακόλουθες ομάδες:

Κλάσματα	Κωδικός	Ποσότητες
1-48	COB-A	39.1mg
49-79	COB-B	24.82 mg
80-124	COB-C	2,038.0 mg
125-185	COB-D	1,869.0 mg
186-205	COB-E	101.4 mg
206-220	COB-F	39.2 mg
221-260	COB-G	163.2 mg
261-360	COB-H	341.0 mg
361-385	COB-I	19.0 mg
386-399	COB-K	51.35 mg
400-420	COB-L	7.7 mg

Τα κλάσματα COB-D, COB-E, COB-G, COB-H και COB-K, αποτέλεσαν αντικείμενο αναλυτικής μελέτης, όπου απομονωθήκαν τέσσερις ουσίες.

Κλάσμα COB-D (1.869 mg)

Υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης (C.C, 48.0 cm x 4.0 cm) επί Sephadex LH-20, με διαλύτη έκλουσης MeOH 100%. Ελήφθησαν: 1 κλάσμα 250 mL, 60 κλάσματα 3 mL (1-61), άλλα 85 κλάσματα του 1 mL (62-147), 32 κλάσματα των 2 mL (148-180), 14 κλάσματα των 10 mL (181-195) και 1 τελευταίο κλάσμα των 250 mL (196), τα οποία κατόπιν ελέγχου με TLC συνενώθηκαν στις ακόλουθες ομάδες:

Κλάσματα	Κωδικός	Ποσότητες
1'	COB-DA	41.0 mg
1-3	COB-DB	16.0 mg
14-36	COB-DC	95.0 mg
37-81	COB-DD	898.0 mg
82-128	COB-DE	708.0 mg
129-144	COB-DF	52.0 mg
145-180	COB-DG	30.0 mg
181-195	COB-DH	5.0 mg
196	COB-DI	3.0 mg

Κλάσμα COB-E (101.4 mg)

Υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης Sephadex LH-20 (40.0 cm x 2.0 cm) με διαλύτη έκλουσης MeOH 100%. Ελήφθησαν 2 κλάσματα 60 mL, 5 κλάσματα 10 mL (1-5), 7 κλάσματα 2 mL (6-12), 197 κλάσματα 0.5 mL (13-210), 14 κλάσματα των 2 mL (211-225) και 1 κλάσμα των 50 mL (226). Κατόπιν ελέγχου με TLC συνενώθηκαν στις ακόλουθες ομάδες:

Κλάσματα	Κωδικός	Ποσότητες
1'	COB-EA	1.0 mg
2'	COB-EB	0.4 mg
1-3	COB-EC	1.0 mg
4	COB-ED	0.3 mg
5-7	COB-EE	0.6 mg
8-12	COB-EF	1.1 mg
13-30	COB-EG	9.9 mg
31-70	COB-EH	50.2 mg
71-75	COB-EI	2.7 mg
76-98	COB-EK	6.8 mg
99-149	COB-EL	8.7 mg
150-172	COB-EM	1.6 mg
173-198	COB-EN	1.6 mg
199-228	COB-EO	1.9 mg

Κλάσμα COB-G (163.2 mg)

Υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης Sephadex LH-20 (40.0 cm x 2.0 cm) με διαλύτη έκλουσης MeOH 100%. Ελήφθησαν 1 αρχικό κλάσμα 60 mL, 5 κλάσματα των 7 mL (2-6), 37 κλάσματα των 2 mL (7-44), 124 κλάσματα των 0.5 mL (45-169), 4 κλάσματα των 3 mL (170-174) και 7 κλάσματα των 15 mL (175-181). Κατόπιν ελέγχου με TLC συνενώθηκαν στις ακόλουθες ομάδες:

Κλάσματα	Κωδικός	Ποσότητες
1-12	COB-GA	10.2 mg
13-23	COB-GB	19.4 mg
24-36	COB-GC	25.5 mg
37-46	COB-GD	21.2 mg
47-56	COB-GE	10.8 mg
57-66	COB-GF	5.4 mg
67-84	COB-GG	6.7 mg
85-91	COB-GH	2.0 mg
92-118	COB-GI	6.0 mg
119-144	COB-GK	6.8 mg
145-164	COB-GL	5.2 mg
165-169	COB-GM	1.3 mg
170-180	COB-GN	2.3 mg
181	COB-GO	2.1 mg

Κλάσμα COB-H (341.0 mg)

Μέρος από το κλάσμα COB-H (212.9 mg), υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης Sephadex LH-20 (52.0 cm x 2.0 cm) με διαλύτη έκλουσης MeOH 100%. Ελήφθησαν 3 κλάσματα 50 mL, 5 κλάσματα 6 mL (1-5), άλλα 5 κλάσματα 3 mL (6-10), 13 κλάσματα 2 mL (11-24), 95 κλάσματα του 1 mL (25-120), 89 κλάσματα του 0.5 mL (121-210), 29 κλάσματα των 2 mL (211-240) και 1 τελευταίο κλάσμα των 50 mL (241). Κατόπιν ελέγχου με TLC συνενώθηκαν στις ακόλουθες ομάδες:

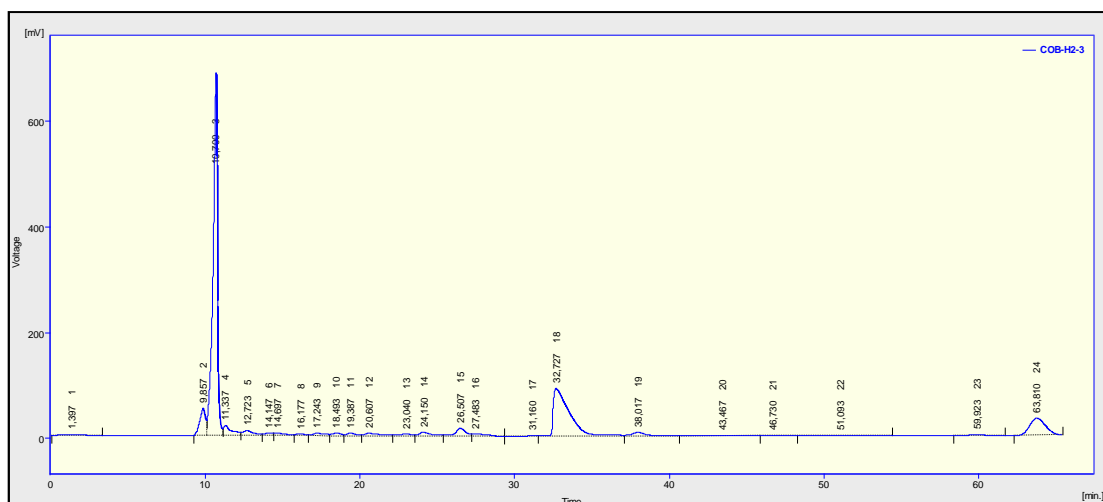
Κλάσματα	Κωδικός	Ποσότητες
1'-2'	COB-HA	1.5 mg
3'	COB-HB	3.8 mg
1-4	COB-HC	4.2 mg
5-12	COB-HD	10.6 mg
13-46	COB-HE	41.6 mg
47-79	COB-HF	63.2 mg
80-106	COB-HG	24.5 mg
107-120	COB-HH	8.5 mg
121-134	COB-HI	4.8 mg
135-146	COB-HK	4.4 mg
147-156	COB-HL	4.7 mg
157-210	COB-HM	12.9 mg
211-240	COB-HN	5.5 mg
241	COB-HO	1.4 mg

Ομάδα COB-HD (10.6 mg)

Υποβλήθηκε σε HPLC με διαλύτη έκλουσης MeOH:H₂O 1:1 και με ταχύτητα ροής 1.0 ml/min. Έγιναν 3 επαναληπτικές ενέσεις και κάθε μια από τις οποίες είχε διάρκεια 65 min. Παραλήφθηκαν κλάσματα που αντιστοιχούν σε 3 κορυφές. Παρακάτω δίνονται τα βάρη και οι χρόνοι έκλουσης (Rt) των ουσιών.

Κορυφές	Retention time (min)	Ποσότητες
COB-HD ₁	10.70	1.4 mg
COB-HD ₂	32.72	4.3 mg
COB-HD ₃	63.81	0.2 mg

Τα κλάσματα COB-HD₂ (4.3 mg) περιείχε μία ένωση οι οποία κατόπιν φασματοσκοπικής μελέτης ταυτοποιήθηκε ως: **διοσμετινο-7-O-β-D-γλυκοζίτης** (μεταβολίτης **105**).

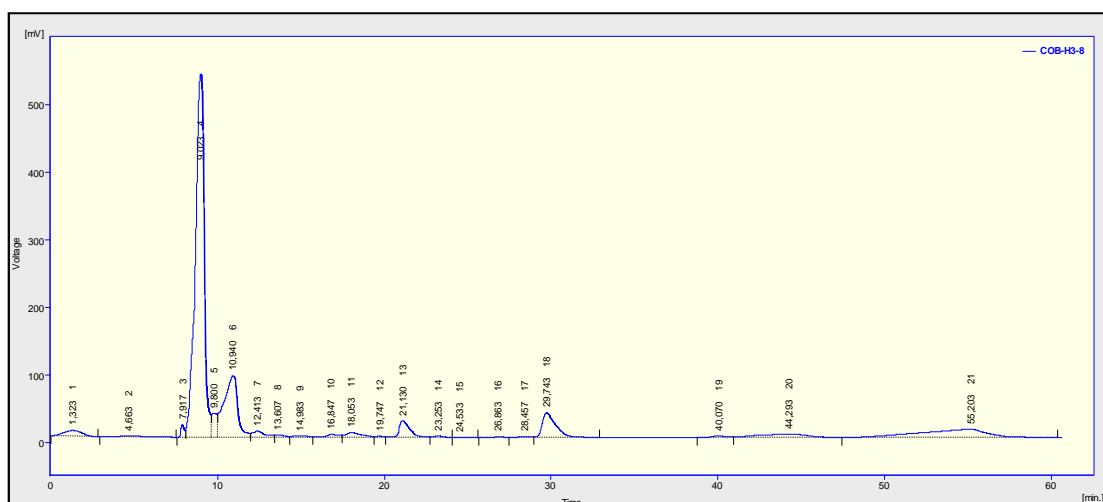


Σχήμα 3.9: Χρωματογράφημα (HPLC) του κλάσματος COB-HD. Διακρίνονται 3 κορυφές.

Ομάδα COB-HE (41.6 mg)

Το κλάσμα COB-HE (41.6 mg) υποβλήθηκε σε HPLC με διαλύτη έκλουσης MeOH:H₂O 1:1 και με ταχύτητα ροής 1.2 ml/min. Έγιναν 11 επαναληπτικές ενέσεις κάθε μια από τις οποίες είχε διάρκεια 68 min και παραλήφθηκαν κλάσματα που αντιστοιχούν σε 5 κορυφές. Παρακάτω δίνονται τα βάρη και οι χρόνοι έκλουσης (Rt) των ουσιών.

Κορυφές	Retention time (min)	Ποσότητες
COB-HE ₁	9.023	9.3 mg
COB-HE ₂	10.940	2.5 mg
COB-HE ₃	21.130	0.5 mg
COB-HE ₄	29.743	9.8 mg
COB-HE ₅	55.203	0.1 mg



Σχήμα 3.10: Χρωματογράφημα (HPLC) του κλάσματος COB-HE. Διακρίνονται 5 κορυφές.

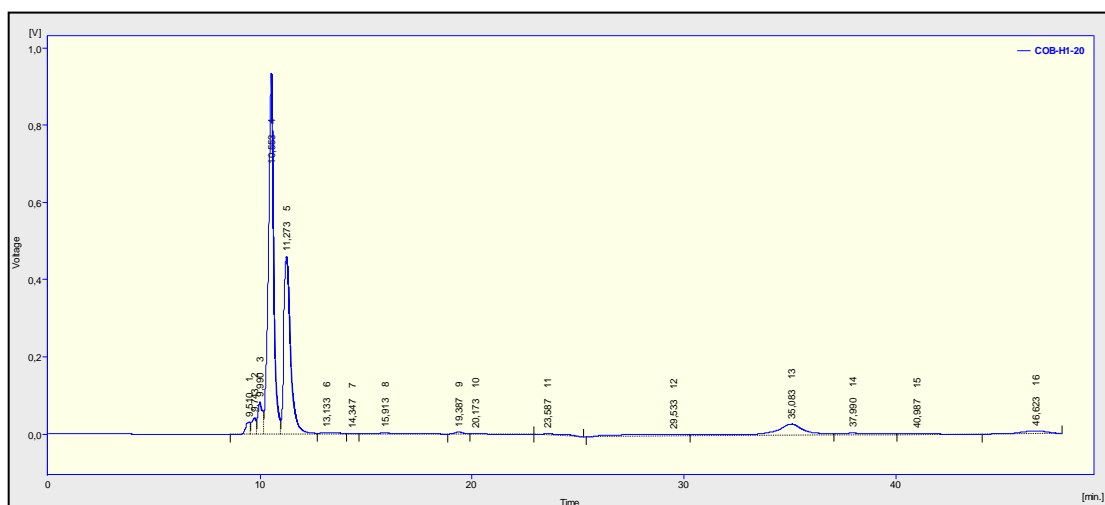
Τα κλάσματα COB-HE₂ (2.5 mg) και COB-HE₄ (9.8 mg), περιείχαν από μία ένωση η οποία κατόπιν φασματοσκοπικής μελέτης ταυτοποιήθηκαν ως: **χλωρογενικό οξύ** (μεταβολίτης **79**) και **διοσμετινο-7-O-β-D-γλυκοζίτης** (μεταβολίτης **105**).

Κλάσμα COB-HF (63.2 mg)

Υποβλήθηκε σε HPLC με διαλύτη έκλυσης MeOH:H₂O 6:4 και με ταχύτητα ροής 1.0 ml/min. Έγιναν 20 επαναληπτικές ενέσεις με διάρκεια 50 min. Παραλήφθηκαν κλάσματα που αντιστοιχούν σε 16 κορυφές. Παρακάτω δίνονται τα βάρη και οι χρόνοι έκλυσης (Rt) των ουσιών.

Κορυφές	Retention time (min)	Ποσότητες	Κορυφές	Retention time (min)	Ποσότητες
COB-HF ₁	9.510	0.8 mg	COB-HF ₉	19.387	0.4 mg
COB-HF ₂	9.743	0.9 mg	COB-HF ₁₀	20.173	0.1 mg
COB-HF ₃	9.990	3.0 mg	COB-HF ₁₁	23.587	2.8 mg
COB-HF ₄	10.553	18.8 mg	COB-HF ₁₂	29.533	0.4 mg
COB-HF ₅	11.273	15.6 mg	COB-HF ₁₃	35.083	0.4 mg
COB-HF ₆	13.133	0.5 mg	COB-HF ₁₄	37.990	0.1 mg
COB-HF ₇	14.347	1.0 mg	COB-HF ₁₅	40.987	0.7 mg
COB-HF ₈	15.913	0.1 mg	COB-HF ₁₆	46.623	1.4 mg

Τα κλάσματα COB-HF₁ (3.0 mg), το COB-HF₂ (18.7 mg) και COB-HF₃ (15.6 mg), περιείχαν μία ένωση η οποία κατόπιν φασματοσκοπικής μελέτης ταυτοποιήθηκε ως: **χλωρογενικό οξύ** (μεταβολίτης **79**), ενώ τα κλάσματα COB-HF₇ (1.0 mg) και COB-HF₁₁ (2.8 mg) ταυτοποιήθηκαν ως **γαλλικό οξύ** (μεταβολίτης **87**) και **p-κουμαρικό οξύ** (μεταβολίτης **88**) αντίστοιχα.



Σχήμα 3.11: Χρωματογράφημα (HPLC) του κλάσματος COB-HF. Διακρίνονται 16 κορυφές.

Κλάσμα COB-K (51.35 mg)

Μέρος από το κλάσμα COB-K (44.95 mg) υποβλήθηκε σε παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (PTLC). Αναπτύχθηκαν σε κελουλόζη (υάλινες πλάκες 20.0 cm x 20.0 cm) με κινητή φάση EtOAc/AcOH/H₂O σε αναλογία 1:4:8. Κατόπιν εμφάνισης των πλακών με αντιδραστήριο Neu, κόπηκαν 2 ζώνες με τα εξής δεδομένα:

Ομάδες - Ζώνες	R_f	Ποσότητες
COB-K _α	0.09	2.3 mg
COB-K _β	0.45	2.5 mg

3.5. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΦΥΛΛΩΝ

ΥΠΟΛΕΙΜΜΑ CH₂Cl₂: CDL (4.1 g)

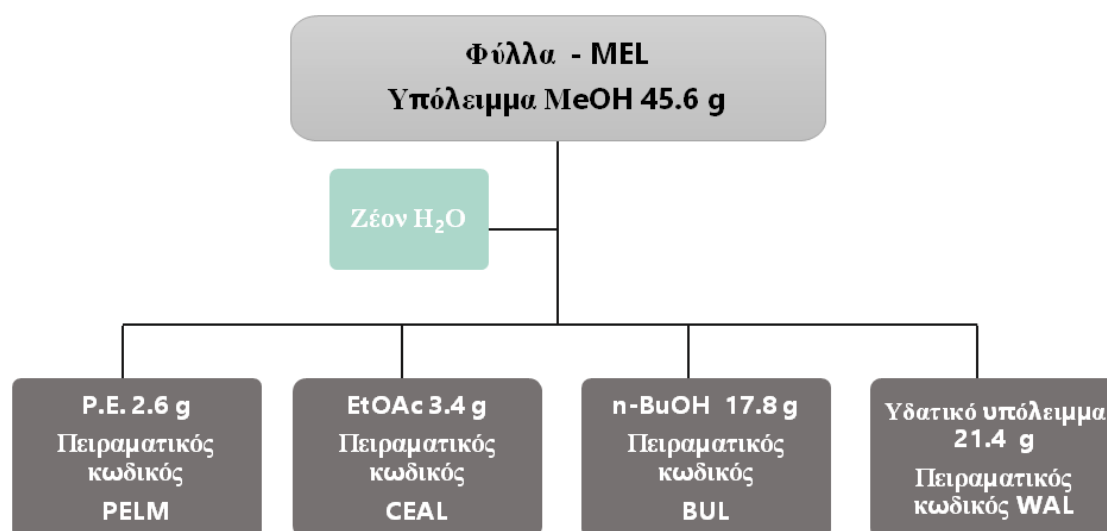
Μέρος από το διχλωρομεθανικό εκχύλισμα (2.549 g) υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης (C.C, 17.0 cm x 4.5 cm) επί γέλης πυριτίας με διαλύτες έκλουσης μίγματα διαλυτών Hex, CH₂Cl₂ και EtOAc αυξανόμενης πολικότητας. Στο εκχύλισμα δόθηκε ο πειραματικός κωδικός **CDL**. Ελήφθησαν 308 κλάσματα μέσου όγκου 30 mL, τα οποία κατόπιν ελέγχου με TLC συνενώθηκαν στις παρακάτω ομάδες.

Κλάσματα	Κωδικός	Αναλογία %	Ποσότητες
1	CDL-A	Hex 100%	160.0 mg
2	CDL-B	Hex:CH ₂ Cl ₂ 50:50	10.0 mg
3-9	CDL-C		6.0 mg
10	CDL-D	He:CH ₂ Cl ₂ 50:50	1.0 mg
11	CDL-E	CH ₂ Cl ₂ 100%	5.0 mg
12-13	CDL-F		11.0 mg
14	CDL-G		11.0 mg
15-16	CDL-H		20.0 mg
17-26	CDL-I		72.0 mg
27-35	CDL-K	CH ₂ Cl ₂ 100% - CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 95:5	51.0 mg
36-44	CDL-L	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 95:5	22.0 mg
45-58	CDL-M		36.0 mg
59	CDL-N		3.0 mg
60-62	CDL-O	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 95:5/90:10	35.0 mg
63-68	CDL-P		156.0 mg
69-72	CDL-Q		99.0 mg
73-76	CDL-R		135.0 mg
77-80	CDL-S		161.0 mg
81-96	CDL-T	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 85:15	339.0 mg
97-100	CDL-U		21.0 mg
101-106	CDL-V	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 80:20	15.0 mg
107-122	CDL-X		21.0 mg
123-146	CDL-Y	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 80:20/75:25	23.0 mg
147-156	CDL-Z	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 75:25/70:30	11.0 mg
157-182	CDL-ZI	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 70:30/65:35	26.0 mg
183-241	CDL-ZII	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 65:35/50:50	56.0 mg
242-292	CDL-ZIII	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 50:50/EtOAc 100%	81.0 mg
293-304	CDL-ZIV	EtOAc 100%/EtOAc:MeOH 50:50	597.0 mg
305-308	CDL-ZV	EtOAc:MeOH 50:50	71.0 mg
309	CDL-ZVI	MeOH 100%	9.0 mg
310	CDL-ZVII		54.0 mg

ΕΚΧΥΛΙΣΕΙΣ ΥΓΡΟΥ/ΥΓΡΟΥ

ΥΠΟΛΛΕΙΜΑ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΦΑΣΗΣ MeOH

Το μεθανολικό υπόλειμμα από τα φύλλα (45.6 g) υποβλήθηκε στην πειραματική διαδικασία με τη μέθοδο *Charaux-Paris*. Στο υπόλειμμα προστέθηκε ζέον ύδωρ και αμέσως μετά έγινε διήθηση από βύσμα βάμβακα. Το υδατικό εκχύλισμα μεταφέρθηκε σε διαχωριστική χοάνη όπου εκχυλίστηκε διαδοχικά με P.E, EtOAc και n-BuOH. Έπειτα, τα εκχυλίσματα μεταφέρθηκαν σε προζυγισμένα δοχεία, ξηράθηκαν και ζυγίστηκαν όπως φαίνεται στο παρακάτω Σχήμα 3.12.



Σχήμα 3.12: Αποδόσεις μεθανολικού υπολείμματος φύλλων.

ΠΟΡΕΙΑ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ ΜΕΘΑΝΟΛΙΚΟΥ ΥΠΟΛΛΕΙΜΑΤΟΣ ΦΥΛΛΩΝ

ΥΠΟΛΕΙΜΜΑ EtOAc: CEAL (3.4 g)

Ένα μέρος από το κλάσμα του EtOAc (1.508 g) υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης Sephadex LH-20 (25.0 cm x 4.0 cm) με διαλύτη έκλυσης MeOH 100%. Ελήφθησαν 180 κλάσματα μέσου όγκου περίπου 5-6 mL. Κατόπιν ελέγχου με TLC συνενώθηκαν στις ακόλουθες ομάδες:

Κλάσματα	Κωδικός	Ποσότητες
1-3	CEAL-A	4.0 mg
4-20	CEAL-B	143.0 mg
21-50	CEAL-C	764.0 mg
51-64	CEAL-D	168.0 mg

Κλάσματα	Κωδικός	Ποσότητες
65-74	CEAL-E	88.0 mg
75-94	CEAL-F	76.0 mg
95-96	CEAL-G	3.0 mg
97-120	CEAL-H	244.0 mg
121-129	CEAL-I	138.0 mg
130-152	CEAL-J	75.0 mg
153-177	CEAL-K	35.0 mg

Τα κλάσματα CEAL-C, E, H, και I, επιλέχθηκαν για περαιτέρω διαχωρισμούς, όπως αναλύεται παρακάτω με αποτέλεσμα την απομόνωση έξι ουσιών.

Κλάσμα CEAL-C (764.0 mg)

Μέρος από το κλάσμα CEAL-C (559.0 mg) υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης (C.C, 13.0 cm x 3.5 cm) επί γέλης πυριτίας με διαλύτες έκλουσης μίγματα διαλυτών Hex, CH₂Cl₂ και MeOH αυξανόμενης πολικότητας. Ελήφθησαν 204 κλάσματα μέσου όγκου 30 mL, τα οποία κατόπιν ελέγχου με TLC συνενώθηκαν στις ακόλουθες ομάδες:

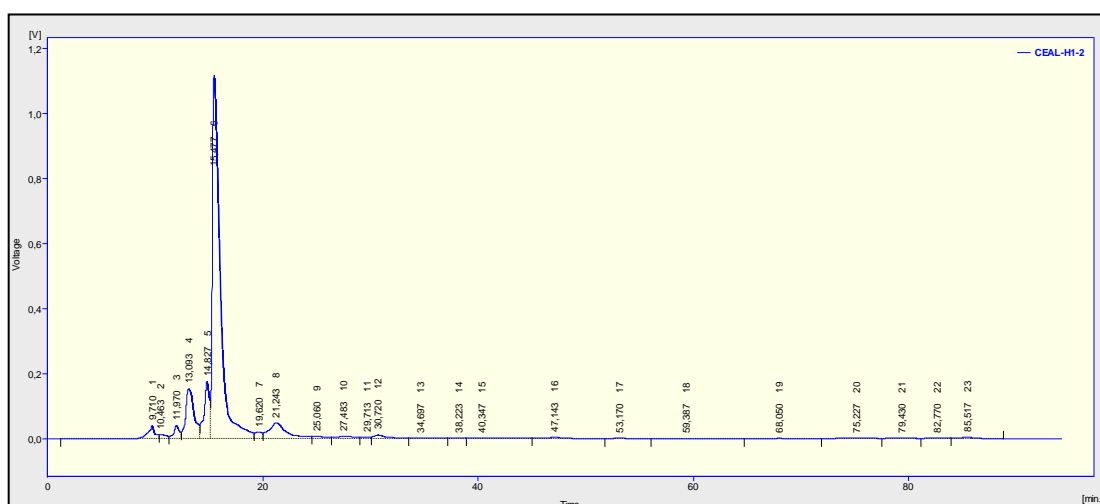
Κλάσματα	Κωδικός	Αναλογία %	Ποσότητες
1-20	CEAL-CA	Hex 100% - Hex: CH ₂ Cl ₂ 50:50	9.0 mg
21-30	CEAL-CB	CH ₂ Cl ₂ 100%	4.0 mg
31-32	CEAL-CC		1.0 mg
33-34	CEAL-CD	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 95:5	1.0 mg
35-37	CEAL-CE		5.0 mg
38-55	CEAL-CF	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 95:5/90:10	91.0 mg
56-76	CEAL-CG	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 90:10/85:15	123.0 mg
77-84	CEAL-CH	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 85:15/80:20	95.0 mg
85-99	CEAL-CI	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 80:20/75:25	63.0 mg
100-112	CEAL-CK	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 75:25	65.0 mg
113-122	CEAL-CL	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 75:25/70:30	24.0 mg
123-134	CEAL-CM	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 70:30/65:35	20.0 mg
135-153	CEAL-CN	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 65:35/60:40	20.0 mg
154-169	CEAL-CO	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 60:40/55:45	14.0 mg
170-180	CEAL-CP	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 55:45	3.0 mg
181-203	CEAL-CQ	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 50:50	16.0 mg
201-204	CEAL-CR	MeOH 100%	53.0 mg

Κλάσμα CEAL-E (88.0 mg)

Ποσότητα 50.2 mg από το κλάσμα CEAL-E υποβλήθηκε σε HPLC με διαλύτη έκλουσης MeOH:H₂O 1:1 και με ταχύτητα ροής 1.0 ml/min. Έγιναν 12 επαναληπτικές ενέσεις κάθε μια από τις οποίες είχε διάρκεια 85.00 min και

παραλήφθηκαν 20 κλάσματα που αντιστοιχούν σε 10 κορυφές. Παρακάτω δίνονται τα βάρη και οι χρόνοι έκλουσης (Rt) των ουσιών.

Κλάσματα	Retention time (min)	Ποσότητες	Κλάσματα	Retention time (min)	Ποσότητες
CEAL-E ₁	9.710	0.8 mg	CEAL-E ₁₁	34.697	0.4 mg
CEAL-E ₂	10.463	0.6 mg	CEAL-E ₁₂	38.233	0.2 mg
CEAL-E ₃	11.970	2.3 mg	CEAL-E ₁₃	40.347	13.7 mg
CEAL-E ₄	13.093	1.7 mg	CEAL-E ₁₄	47.143	0.7 mg
CEAL-E ₅	15.487	11.9 mg	CEAL-E ₁₅	52.353	trace
CEAL-E ₆	21.243	2.8 mg	CEAL-E ₁₆	53.170	0.9 mg
CEAL-E ₇	25.060	1.6 mg	CEAL-E ₁₇	59.387	0.6 mg
CEAL-E ₈	27.483	1.0 mg	CEAL-E ₁₈	68.050	9.1 mg
CEAL-E ₉	29.483	0.6 mg	CEAL-E ₁₉	82.770	0.7 mg
CEAL-E ₁₀	30.720	0.3 mg	CEAL-E ₂₀	85.517	0.8 mg



Σχήμα 3.13: Χρωματογράφημα (HPLC) του κλάσματος CEAL-E. Διακρίνονται 10 κορυφές.

Τα κλάσματα CEAL-E₅ (11.9 mg) και το CEAL-E₁₃ (13.7 mg) περιείχαν από μία ένωση η οποία κατόπιν φασματοσκοπικής μελέτης ταυτοποιήθηκαν ως: **εχινακοσίδης** (μεταβολίτης **48t**) και ως **κερκετινο 3-O-β-D-γλυκοζίτης** (μεταβολίτης **60b**) αντίστοιχα.

Κλάσμα CEAL-H (244.0 mg)

Ένα μέρος από το κλάσμα CEAL-H (98.0 mg) υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης Sephadex LH-20 (45.0 cm x 2.0 cm) με διαλύτη έκλουσης MeOH 100%. Ελήφθησαν τα ακόλουθα κλάσματα: 1 κλάσμα, 350 mL, 12 κλάσματα

των 12 mL (1-12), 37 κλάσματα περίπου 8 mL (13-50), 34 κλάσματα 5 mL (51-85), 9 κλάσματα 10 mL (86-94), 25 κλάσματα των 3 mL (95-111), 50 κλάσματα των 5 mL (112-162) και τέλος 3 κλάσματα των 100 mL (163-165). Κατόπιν ελέγχου με TLC συνενώθηκαν στις ακόλουθες ομάδες:

Κλάσματα	Κωδικός	Ποσότητες
1'	CEAL-HA	6.0 mg
1-24	CEAL-HB	4.0 mg
25-45	CEAL-HC	7.0 mg
46-50	CEAL-HD	1.0 mg
51-55	CEAL-HE	2.0 mg
56-69	CEAL-HF	4.0 mg
70-74	CEAL-HG	1.0 mg
75-80	CEAL-HH	1.0 mg
81-82	CEAL-HI	4.0 mg
83-90	CEAL-HK	3.0 mg
91-115	CEAL-HL	53.0 mg
116-131	CEAL-HM	35.0 mg
132-146	CEAL-HN	14.0 mg
147-159	CEAL-HO	2.0 mg
160-165	CEAL-HP	1.0 mg

Τα κλάσματα CEAL-HI (4.0 mg) περιείχε μία ένωση η οποία κατόπιν φασματοσκοπικής μελέτης ταυτοποιήθηκε ως: **απιγενίνη** (μεταβολίτης **62a**).

Κλάσμα CEAL-I (138.0 mg)

Ένα μέρος από το κλάσμα CEAL-I (34.0 mg) υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης Sephadex LH-20 (47.0 cm x 2.0 cm) με διαλύτη έκλουσης MeOH 100%. Ελήφθησαν συνολικά 80 κλάσματα των 5 mL. Κατόπιν ελέγχου με χρωματογραφία TLC συνενώθηκαν στις ακόλουθες ομάδες:

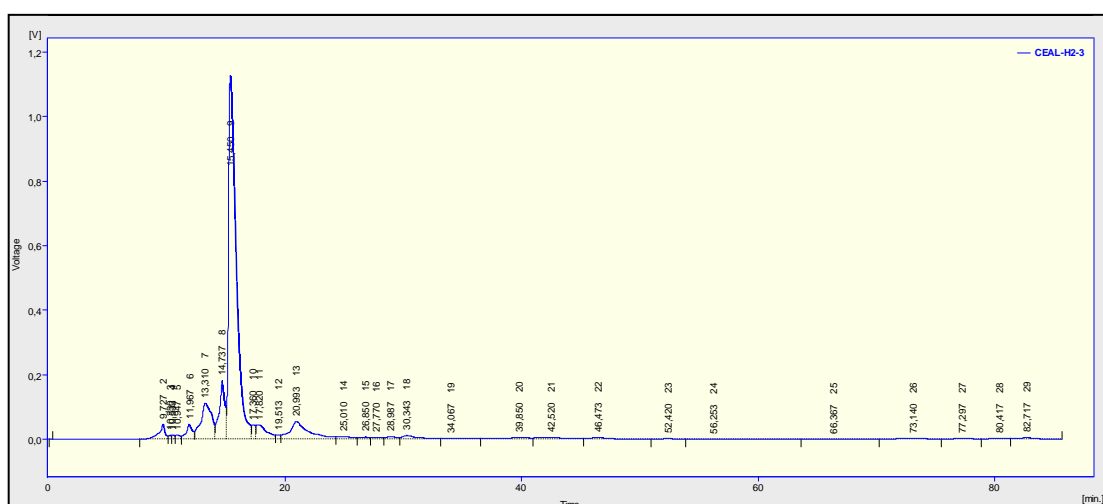
Κλάσματα	Κωδικός	Ποσότητες
1-11	CEAL-IA	5.0 mg
12-28	CEAL-IB	2.0 mg
29-35	CEAL-IC	1.0 mg
36-38	CEAL-ID	3.0 mg
39-45	CEAL-IE	1.0 mg
46-58	CEAL-IF	1.0 mg
59-63	CEAL-IG	1.0 mg
64-71	CEAL-IH	15.0 mg
72-73	CEAL-II	3.0 mg
74-75	CEAL-IK	1.0 mg
76-80	CEAL-IL	1.0 mg

Τα κλάσματα CEAL-ID (3.0 mg) περιείχε μία ένωση η οποία κατόπιν φασματοσκοπικής μελέτης ταυτοποιήθηκε ως: **κερκετίνη** (μεταβολίτης **60c**).

Ομάδα CEAL-IH (15.0 mg)

Υποβλήθηκε σε HPLC με διαλύτη έκλουσης MeOH:H₂O 1:1 και με ταχύτητα ροής 1.0 ml/min. Έγιναν 3 επαναληπτικές ενέσεις κάθε μια από τις οποίες είχε διάρκεια 104.0 min και παραλήφθηκαν κλάσματα που αντιστοιχούν σε 16 κορυφές. Παρακάτω δίνονται τα βάρη και οι χρόνοι έκλουσης (Rt) των ουσιών.

Ομάδες-Κορυφές	Retention time (min)	Ποσότητες
CEAL-IH ₁	9.727	0.2 mg
CEAL-IH ₂	11.967	0.2 mg
CEAL-IH ₃	13.310	0.3 mg
CEAL-IH ₄	14.737	0.3 mg
CEAL-IH ₅	15.450	1.0 mg
CEAL-IH ₆	20.993	0.1 mg
CEAL-IH ₇	25.010	0.5 mg
CEAL-IH ₈	30.343	0.4 mg
CEAL-IH ₉	34.067	4.0 mg
CEAL-IH ₁₀	46.473	1.2 mg
CEAL-IH ₁₁	56.253	0.2 mg
CEAL-IH ₁₂	66.367	1.0 mg
CEAL-IH ₁₃	73.140	0.3 mg
CEAL-IH ₁₄	77.927	0.3 mg
CEAL-IH ₁₅	80.417	0.8 mg
CEAL-IH ₁₆	82.717	0.8 mg



Σχήμα 3.14: Χρωματογράφημα (HPLC) του κλάσματος CEAL-IH. Διακρίνονται 16 κορυφές.

Τα κλάσματα CEAL-IH₁₀ (1.2 mg) και το CEAL-IH₁₂ (1.0 mg) περιείχαν από μία ένωση η οποία κατόπιν φασματοσκοπικής μελέτης ταυτοποιήθηκαν ως: **εσπερετίνη** (μεταβολίτης **63b**) και ως **βανιλλικό οξύ** (μεταβολίτης **86**) αντίστοιχα.

ΥΠΟΛΕΙΜΑ n-BuOH: BUL (17.8 g)

Το βουτανολικό υπόλειμμα από τα φύλλα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης υπό κενό (V.L.C., 10.0 cm x 7.0 cm) επί γέλης πυριτίας (Merck, Art 9385), με υγρό έκλουσης μίγματα διαλυτών αυξανόμενης πολικότητας: από 100% P.E. προς MeOH:H₂O 50:50%.

Αναλογίες %	Σύστημα κινητής φάσεως	Ποσότητες	Κωδικός Δείγματος
100%	P.E.	19.4 mg	BUL-A
50:50	PE:EtOAc	3.3 mg	BUL-B
100%	EtOAc	85.0 mg	BUL-C
95:5:0.5	EtOAc: MeOH:H ₂ O	128.9 mg	BUL-D
90:10:1.0		51.0 mg	BUL-E
85:15:1.5		319.8 mg	BUL-F
80:20:2.0		1.726 g	BUL-G
75:25:2.5		2.850 g	BUL-H
70:30:3.0		1.367 g	BUL-I
65:35:3.5		1.001 g	BUL-K
60:40:4.0		1.083 g	BUL-L
55:45:4.5		693.8 mg	BUL-M
50:50:5.0		580.8 mg	BUL-N
50:50:5.0		430.9 mg	BUL-O
100%		MeOH	245.5 mg
		397.4 mg	BUL-Q
90:10	MeOH:H ₂ O	403.1 mg	BUL-R
80:20		443.6 mg	BUL-S
50:50	MeOH:H ₂ O	220.4 mg	BUL-T
		238.2 mg	BUL-U

Τα κλάσματα BUL-G και BUL-M, αποτέλεσαν αντικείμενο αναλυτικής μελέτης που απομονώθηκαν τέσσερις μεταβολίτες.

Κλάσμα BUL-G (1.726 g)

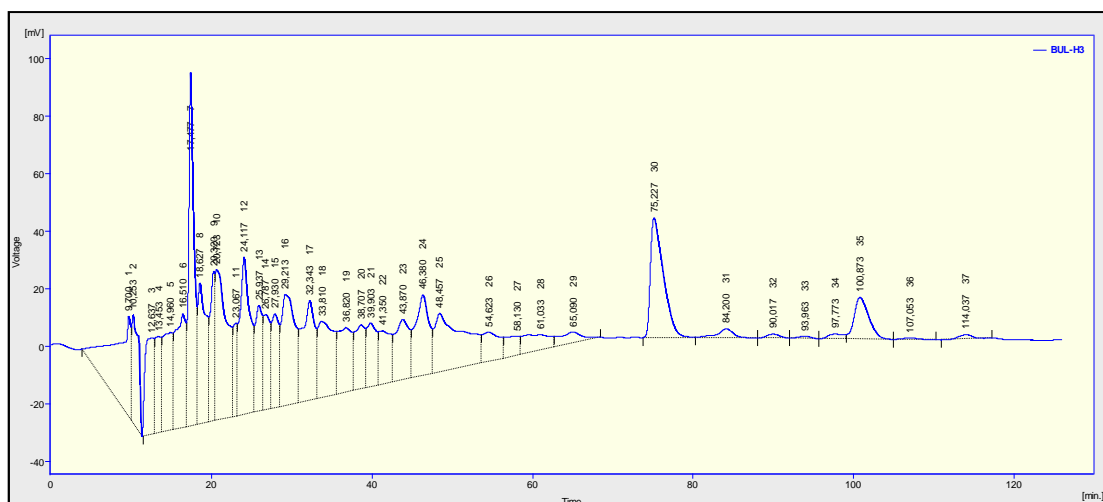
Το κλάσμα BUL-G υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης (C.C, 67.0 cm x 4.0 cm) επί Sephadex LH-20, με διαλύτη έκλουσης MeOH 100%. Ελήφθησαν 1 κλάσμα περίπου 100 mL, 2 κλάσματα περίπου 50 mL (2-3), άλλα 2 κλάσματα των 9 mL (4-5), στην συνέχεια λήφθηκαν 163 κλάσματα των 5 mL (6-169), 40 κλάσματα των 3-4 mL (170-210), 21 κλάσματα των 8 mL (211-232), 8 κλάσματα των 50 mL (233-241) και 1 τελευταίο κλάσμα 200 mL (242) τα οποία κατόπιν ελέγχου με TLC συνενώθηκαν στις ακόλουθες ομάδες:

Κλάσματα	Κωδικός	Ποσότητες
1-3	BUL-GA	2.5 mg
4-21	BUL-GB	4.6 mg
22-34	BUL-GC	6.4 mg
35-46	BUL-GD	19.9 mg
47-50	BUL-GE	10.9 mg
51-56	BUL-GF	27.5 mg
57-63	BUL-GG	71.2 mg
64-70	BUL-GH	104.5 mg
71-80	BUL-GI	147.8 mg
81-98	BUL-GK	328.5 mg
99-126	BUL-GL	973.7 mg
127-138	BUL-GM	72.1 mg
139-146	BUL-GN	13.3 mg
147-152	BUL-GO	10.6 mg
153-160	BUL-GP	15.7 mg
161-178	BUL-GQ	15.5 mg
179-189	BUL-GR	8.6 mg
190-214	BUL-GS	9.3 mg
215-232	BUL-GT	3.6 mg
233-235	BUL-GU	1.7 mg
236-241	BUL-GV	3.9 mg

Ομάδα BUL-GH (104.5 mg)

Ποσότητα από το κλάσμα BUL-GH (72.9 mg) υποβλήθηκε σε HPLC με διαλύτη έκλουσης MeOH:H₂O 1:1 και με ταχύτητα ροής 1.0 ml/min. Έγιναν 17 επαναληπτικές ενέσεις κάθε μια από τις οποίες είχε διάρκεια 70.0 min και παραλήφθηκαν κλάσματα που αντιστοιχούν σε 16 κορυφές. Παρακάτω δίνονται τα βάρη και οι χρόνοι έκλουσης (Rt) των ουσιών.

Κλάσματα	Retention time (min)	Ποσότητες
BUL-GH ₁	9.700	1.3 mg
BUL-GH ₂	12.637	0.9 mg
BUL-GH ₃	16.510	6.0 mg
BUL-GH ₄	17.477	5.9 mg
BUL-GH ₅	20.323	2.9 mg
BUL-GH ₆	24.117	3.8 mg
BUL-GH ₇	29.213	5.9 mg
BUL-GH ₈	23.424	4.4 mg
BUL-GH ₉	25.931	1.8 mg
BUL-GH ₁₀	27.930	2.6 mg
BUL-GH ₁₁	29.213	22.8 mg
BUL-GH ₁₂	33.810	1.5 mg
BUL-GH ₁₃	46.380	4.7 mg
BUL-GH ₁₄	48.457	2.9 mg
BUL-GH ₁₅	75.227	2.4 mg
BUL-GH ₁₆	100.873	1.5 mg



Σχήμα 3.15: Χρωματογράφημα (HPLC) του κλάσματος BUL-GH. Διακρίνονται 16 κορυφές.

Το κλάσμα BUL-GH₁₃ (4.7 mg) περιείχε μια ένωση η οποία κατόπιν φασματοσκοπικής μελέτης ταυτοποιήθηκαν ως: **3-O-β-D-απιοφουρανοζυλο-(1→6)-O-β-D-γλυκοπυρανοζυλο-οκτ-1-εν-3-όλη** (μεταβολίτης **101**).

Ομάδα BUL-GL (973.7 mg)

Μέρος του BUL-GL υποβλήθηκε (167.3 mg) σε παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (PTLC) επί γέλης πυριτίας (γυάλινες πλάκες 20.0 cm x 20.0 cm), με διαλύτη έκλουσης EtOAc: ACOH: H₂O (1:4:8). Αφαιρέθηκαν 5 ζώνες οι οποίες εκχυλίστηκαν με MeOH και κατόπιν διηθήθηκαν. Ο διαλύτης απομακρύνθηκε εν κενώ δίνοντας τα ακόλουθα δείγματα:

Ομάδες-Ζώνες	R _f	Ποσότητες
BUL-GL _α	0.10	8.6 mg
BUL-GL _β	0.31	34.6 mg
BUL-GL _γ	0.36	5.7 mg
BUL-GL _δ	0.42	7.0 mg
BUL-GL _ε	0.55	38.3 mg

Το κλάσμα BUL-GL_β (34.6 mg) κατόπιν φασματοσκοπικής μελέτης ταυτοποιήθηκε ως: **φοσθοσίδης Β** (μεταβολίτης **48c**), ενώ αντίστοιχα το κλάσμα BUL-GL_ε (38.6 mg) χαρακτηρίστηκε ως **βερμπασκοσίδης** (μεταβολίτης **48a**).

Κλάσμα BUL-GS (25.3 mg)

Υποβλήθηκε σε παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (PTLC) επί κελλουλόζης (γυάλινες πλάκες 20.0 cm x 20.0 cm), με διαλύτη έκλουσης EtOAc/AcOH/H₂O (1:4:8). Αφαιρέθηκαν 5 ζώνες οι οποίες εκχυλίστηκαν με μεθανόλη και κατόπιν διηθήθηκαν. Ο διαλύτης απομακρύνθηκε εν κενώ δίνοντας τα ακόλουθα δείγματα:

Ομάδες-Ζώνες	R _f	Ποσότητες
BUL-GSα	0.18	0.5 mg
BUL-GSβ	0.34	6.3 mg
BUL-GSγ	0.43	0.7 mg
BUL-GSδ	0.51	1.3 mg
BUL-GSε	0.97	1.4 mg

Το κλάσμα BUL-GSβ (6.3 mg) κατόπιν φασματοσκοπικής μελέτης ταυτοποιήθηκε ως: **λουτεολινο-7-O-β-D-γλυκοζίτης** (μεταβολίτης **58b**).

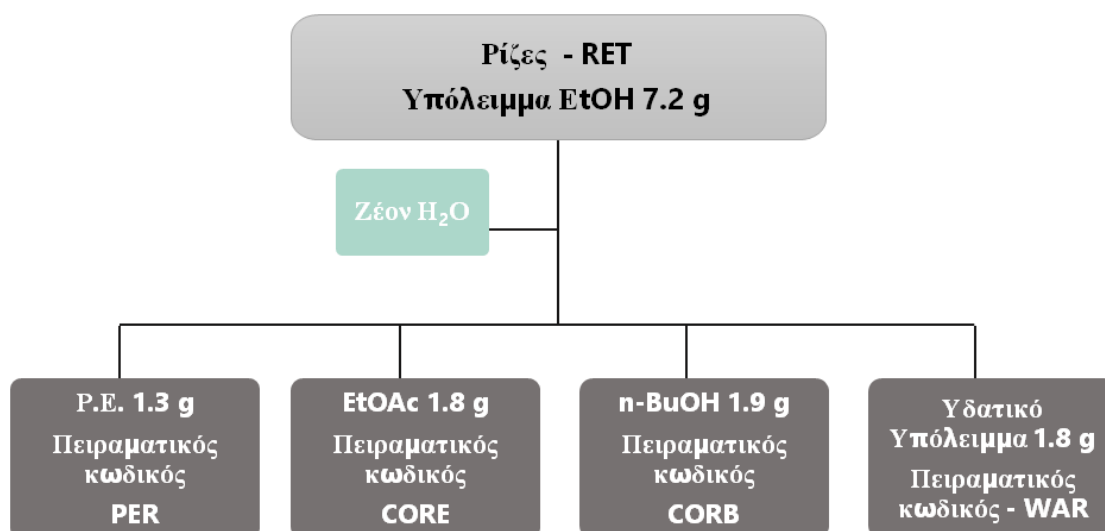
Κλάσμα BUL-M (693.8 mg)

Μέρος από το κλάσμα BUL-M (674.7 mg) υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης (C.C, 67.0 cm x 4.0 cm) επί Sephadex LH-20, με διαλύτη έκλουσης MeOH 100% - MeOH-H₂O 90:10-80:20%. Ελήφθησαν 1 κλάσμα περίπου 100 mL (1'-2') άλλα 3 κλάσματα των 9 mL (1-3), στην συνέχεια λήφθηκαν 56 κλάσματα των 5-7 mL (4-60), 18 κλάσματα των 9 mL (61-79), 40 κλάσματα των 10-12 mL (80-120), 35 κλάσματα των 20 mL (121-156), 10 κλάσματα των 20 mL με MeOH-H₂O 90:10 (157-167), άλλα 2 κλάσματα των 100 mL με MeOH-H₂O 80:20 (168-170) και 3 τελευταία κλάσματα 200 mL (171-173) τα οποία κατόπιν ελέγχου με TLC συνενώθηκαν στις ακόλουθες ομάδες:

Κλάσματα	Κωδικός	Ποσότητες	Κλάσματα	Κωδικός	Ποσότητες
1'- 2'	BUL-MA	1.4 mg	70-83	BUL-MI	37.8 mg
1-16	BUL-MB	10.7 mg	84-101	BUL-MK	87.9 mg
17-30	BUL-MC	90.8 mg	102-112	BUL-ML	43.2 mg
31-37	BUL-MD	63.9 mg	113-119	BUL-MM	28.4 mg
38-44	BUL-ME	90.9 mg	120-130	BUL-MN	42.8 mg
45-50	BUL-MF	44.1 mg	131-140	BUL-MO	9.5 mg
51-60	BUL-MG	31.7 mg	141-150	BUL-MP	4.5 mg
61-69	BUL-MH	48.2 mg	151-173	BUL-MQ	10.8 mg

3.6. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΡΙΖΩΝ

Από το υπόγειο μέρος του φυτού προέκυψε στερεό υπόλειμμα από εκχύλιση με αιθανόλη, βάρους 7.194 g. Στο υπόλειμμα προστέθηκε 1L ζέον ύδωρ και αμέσως ακολούθησε διήθηση μέσω βύσματος βάμβακα. Το υδατικό διάλυμα μεταφέρθηκε σε διαχωριστική χοάνη όπου εκχυλίστηκε σε θερμοκρασία δωματίου διαδοχικά με P.E., EtOAc και n-BuOH. Οι ποσότητες που προέκυψαν από την παραπάνω διαδικασία παρουσιάζονται στο ακόλουθο Σχήμα 3.16.



Σχήμα 3.16: Κατανομές υγρού - υγρού αιθανολικού υπολείμματος από τις ρίζες.

ΥΠΟΛΕΙΜΜΑ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΦΑΣΗΣ P.E. - PER (1.3 g)

Το πετρελαϊκό υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης (C.C, 12.5 cm x 3.5 cm) επί γέλης πυριτίας με διαλύτες έκλουσης μίγματα διαλυτών P.E., CH₂Cl₂, EtOAc και MeOH αυξανόμενης πολικότητας. Ελήφθησαν 130 κλάσματα μέσου όγκου 30 mL, τα οποία κατόπιν ελέγχου με TLC συνενώθηκαν στις ακόλουθες ομάδες:

Κλάσματα	Κωδικός	Αναλογία %	Ποσότητες
1	PER-A	PE 100%	33.4 mg
2-5	PER-B	PE:CH ₂ Cl ₂ 80:20	7.4 mg
6-7	PER-C		4.9 mg
8	PER-D		7.3 mg
9-10	PER-E		49.7 mg
11-12	PER-F	PE:CH ₂ Cl ₂ 50:50	25.9 mg
13-16	PER-G	PE:CH ₂ Cl ₂ 50:50 –CH ₂ Cl ₂ 100%	14.7 mg

Κλάσματα	Κωδικός	Αναλογία %	Ποσότητες
17-20	PER-H	CH ₂ Cl ₂ 100%	141.2 mg
21	PER-I	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 99:1	16.5 mg
22-25	PER-K		97.2 mg
26-31	PER-L	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 99:1/98:2	100.3 mg
32-38	PER-M	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 98:2/95:5	110.7 mg
39-43	PER-N	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 90:10	58.4 mg
44-52	PER-O	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 85:15/80:20	82.0 mg
53-78	PER-P	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 80:20/65:35	98.5 mg
79-94	PER-Q	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 65:35/55:45	26.7 mg
95-112	PER-R	CH ₂ Cl ₂ :EtOAc 55:45 - EtOAc 100%	43.3 mg
113-120	PER-S	EtOAc:MeOH50:50	87.8 mg
121-124	PER-T		45.6 mg
125-129	PER-U		19.6 mg
130	PER-V	MeOH100%	17.1 mg

Τα κλάσματα PER-A, PER-I, PER-K, PER-M, αποτέλεσαν αντικείμενο αναλυτικής μελέτης και επεξεργασίας για την ταυτοποίηση ουσιών, όπως χαρακτηρίστηκαν τέσσερις μεταβολίτες.

Κλάσμα PER-I (16.5 mg)

Υποβλήθηκε σε παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (PTLC) επί γέλης πυριτίας (υάλινες πλάκες 20 cm x 20 cm, Merck), με διαλύτη έκλουσης CH₂Cl₂:EtOAc 98:2. Αφαιρέθηκαν 7 ζώνες όπου διηθήθηκαν και ο διαλύτης απομακρύνθηκε εν κενώ δίνοντας τα ακόλουθα κλάσματα.

Ομάδες-Ζώνες	R _f	Ποσότητες
PER-Iα	0.41	0.7 mg
PER-Iβ	0.45	1.0 mg
PER-Iγ	0.51	1.4 mg
PER-Iδ	0.56	3.0 mg
PER-Iε	0.68	1.2 mg
PER-Iζ	0.73	1.1 mg
PER-Iη	0.70	2.0 mg

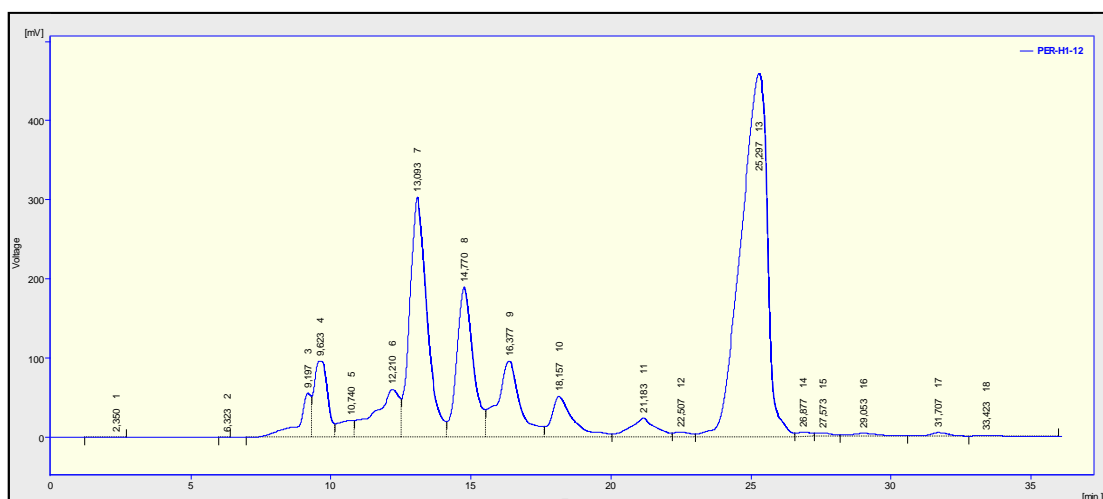
Το κλάσμα PER-I_δ (3.0 mg) περιείχε μια ένωση, η οποία κατόπιν φασματοσκοπικής μελέτης ταυτοποιήθηκε ως: **παλμιτικός εστέρας του τυροσολικού μεθυλαιθέρα** (μεταβολίτης **102**).

Κλάσμα PER-K (92.7 mg)

Από το κλάσμα PER-K, ένα μέρος (69.2 mg) υποβλήθηκε σε HPLC με σύστημα έκλουσης Hex:EtOAc/8:2 και με ταχύτητα ροής 1.0 ml/min. Έγιναν 18 επαναληπτικές ενέσεις κάθε μια από τις οποίες είχε διάρκεια 35 min και

παραλήφθηκαν κλάσματα που αντιστοιχούν σε 13 κορυφές. Παρακάτω δίνονται τα βάρη και οι χρόνοι έκλουσης (Rt) των ουσιών.

Κλάσματα	Retention time (min)	Ποσότητες
PER-K ₁	2.350	0.4 mg
PER-K ₂	6.323	<i>trace</i>
PER-K ₃	9.197	0.1 mg
PER-K ₄	9.623	0.9 mg
PER-K ₅	12.210	6.0 mg
PER-K ₆	13.093	3.8 mg
PER-K ₇	14.770	2.3 mg
PER-K ₈	16.377	1.0 mg
PER-K ₉	18.157	0.5 mg
PER-K ₁₀	25.297	12.3 mg
PER-K ₁₁	26.877	0.1 mg
PER-K ₁₂	29.053	0.4 mg
PER-K ₁₃	31.707	0.2 mg



Σχήμα 3.17: Χρωματογράφημα (HPLC) του κλάσματος PER-K. Διακρίνονται 13 κορυφές.

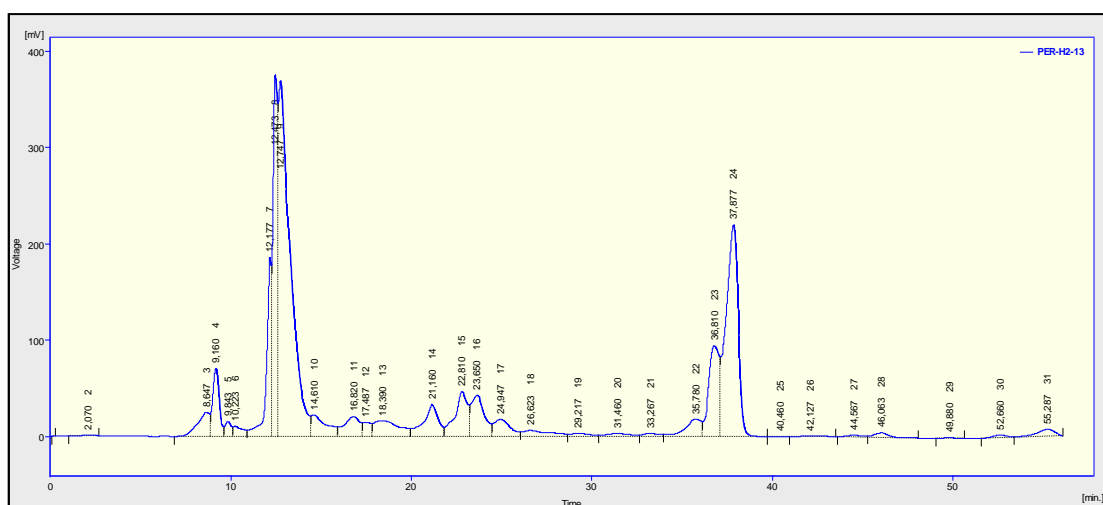
Από την HPLC, τα κλάσματα PER-K₅ (6.0 mg) περιείχε μία ένωση, η οποία κατόπιν φασματοσκοπικής μελέτης ταυτοποιήθηκε ως: **λιγνοστερικός εστέρας της τυροσόλης** (μεταβολίτης **103**) και το κλάσμα PER-K₁₀ (12.3 mg) ταυτοποιήθηκε ως: **μπρασικαστερόλη** (μεταβολίτης **104**).

Κλάσμα PER-M (110.7 mg)

Από το κλάσμα PER-M, ένα μέρος (60.2 mg) υποβλήθηκε σε HPLC με σύστημα έκλουσης Hex:EtOAc/8:2 και με ταχύτητα ροής 1.0 ml/min. Έγιναν 15 επαναληπτικές ενέσεις των και κάθε μια από τις οποίες είχε διάρκεια 56 min.

Παραλήφθηκαν κλάσματα που αντιστοιχούν σε 17 κορυφές. Παρακάτω δίνονται τα βάρη και οι χρόνοι έκλουσης (Rt) των ουσιών.

Κλάσματα	Retention time (min)	Ποσότητες
PER-M ₁	8.647	0.7 mg
PER-M ₂	9.160	1.3 mg
PER-M ₃	9.843	0.3 mg
PER-M ₄	12.177	2.0 mg
PER-M ₅	12.473	11.5 mg
PER-M ₆	12.747	17.6 mg
PER-M ₇	14.610	1.0 mg
PER-M ₈	16.820	0.9 mg
PER-M ₉	18.390	0.7 mg
PER-M ₁₀	21.160	1.1 mg
PER-M ₁₁	22.810	1.0 mg
PER-M ₁₂	23.650	1.0 mg
PER-M ₁₃	24.947	0.5 mg
PER-M ₁₄	35.780	2.0 mg
PER-M ₁₅	36.810	2.1 mg
PER-M ₁₆	37.877	9.5 mg
PER-M ₁₇	55.287	0.5 mg



Σχήμα 3.18: Χρωματογράφημα (HPLC) του κλάσματος PER-M. Διακρίνονται 17 κορυφές.

Από την HPLC, τα κλάσματα PER-M₁₂ (19.0 mg) περιείχε μία ένωση, η οποία κατόπιν φασματοσκοπικής μελέτης ταυτοποιήθηκε ως: **στιγμαστερόλη** (μεταβολίτης **32b**).

ΥΠΟΛΕΙΜΜΑ EtOAc: CORE (1.8 g)

Το υπόλειμμα από τις ρίζες του EtOAc υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης Sephadex LH-20 (38.0 cm x 3.5 cm) με διαλύτη έκλουσης MeOH 100%. Ελήφθησαν 1 κλάσμα 20 mL, 4 κλάσματα των 10 mL (2-5), 226 κλάσματα των 2 mL (6-232), 7 κλάσματα των 5 mL (233-240), 24 κλάσματα των 3 mL (241-265), 5 κλάσματα των 8 mL (266-270) και άλλα 5 κλάσματα των 30 mL (271-275). Κατόπιν ελέγχου με TLC συνενώθηκαν στις ακόλουθες ομάδες:

Κλάσματα	Κωδικός	Ποσότητα	Κλάσματα	Κωδικός	Ποσότητα
1-17	CORE-A	9.0 mg	119-132	CORE-L	169.3 mg
18-30	CORE-B	16.6 mg	133-139	CORE-M	78.6 mg
31-39	CORE-C	20.5 mg	140-152	CORE-N	165.6 mg
40-61	CORE-D	133.5 mg	153-166	CORE-O	185.0 mg
62-68	CORE-E	56.2 mg	167-180	CORE-P	55.5 mg
69-79	CORE-F	101.3 mg	181-199	CORE-Q	29.4 mg
80-86	CORE-G	95.2 mg	200-218	CORE-R	104.8 mg
87-99	CORE-H	179.5 mg	219-240	CORE-S	14.8 mg
100-106	CORE-I	96.0 mg	241-270	CORE-T	3.7 mg
107-118	CORE-K	164.9 mg	271-275	CORE-U	4.4 mg

Τα κλάσματα CORE-D, CORE-I, CORE-M, αποτέλεσαν αντικείμενο αναλυτικής μελέτης και επεξεργασίας για την ταυτοποίηση ουσιών.

Κλάσμα CORE-D (133.5 mg)

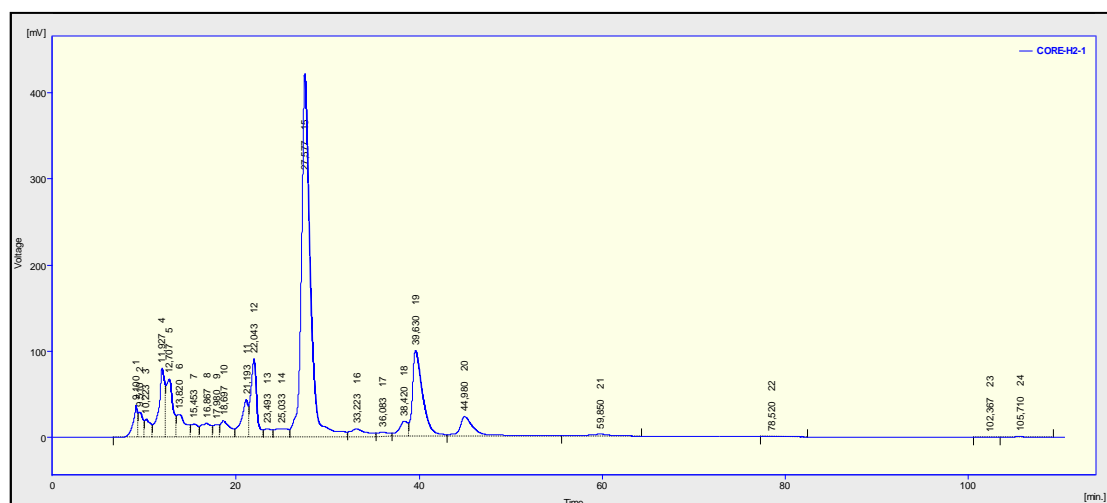
Το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης Sephadex LH-20 (50.0 cm x 2.0 cm) με διαλύτη έκλουσης MeOH 100%. Ελήφθησαν 4 κλάσματα 3 mL (1-4), 72 κλάσματα του 1 mL (5-77), 42 κλάσματα των 3 mL (78-120) και 1 κλάσμα των 100 mL (121). Κατόπιν ελέγχου με TLC συνενώθηκαν στις ακόλουθες ομάδες:

Κλάσματα	Κωδικός	Ποσότητες
1-4	CORE-DA	0.7 mg
5-15	CORE-DB	3.1 mg
16-25	CORE-DC	3.6 mg
26-39	CORE-DD	16.6 mg
40-59	CORE-DE	71.8 mg
60-70	CORE-DF	19.3 mg
71-80	CORE-DG	6.4 mg
81-89	CORE-DH	5.0 mg
90-100	CORE-DI	4.2 mg
101-120	CORE-DK	2.1 mg
121	CORE-DL	2.7 mg

Κλάσμα CORE-I (96.0 mg)

Ποσότητα 53.6 mg από το κλάσμα CORE-I υποβλήθηκε σε HPLC με διαλύτη έκλουσης MeOH:H₂O 1:1 και με ταχύτητα ροής 1.0 ml/min. Έγιναν 13 ενέσεις, κάθε μια από τις οποίες είχε διάρκεια 130 min και παραλήφθηκαν κλάσματα που αντιστοιχούν σε 24 κορυφές. Παρακάτω δίνονται τα βάρη και οι χρόνοι έκλουσης (Rt) των κορυφών.

Κλάσματα	Retention time (min)	Ποσότητες	Κλάσματα	Retention time (min)	Ποσότητες
CORE-I ₁	9.100	0.5 mg	CORE-I ₁₃	24.493	0.6 mg
CORE-I ₂	9.510	0.4 mg	CORE-I ₁₄	25.033	0.6 mg
CORE-I ₃	10.223	0.3mg	CORE-I ₁₅	27.517	24.5 mg
CORE-I ₄	11.927	1.0 mg	CORE-I ₁₆	33.223	1.3 mg
CORE-I ₅	12.707	1.0 mg	CORE-I ₁₇	36.083	0.3 mg
CORE-I ₆	13.820	0.5 mg	CORE-I ₁₈	38.420	0.9 mg
CORE-I ₇	15.453	0.8 mg	CORE-I ₁₉	39.630	2.2 mg
CORE-I ₈	16.867	0.6 mg	CORE-I ₂₀	44.980	1.8 mg
CORE-I ₉	17.980	0.7 mg	CORE-I ₂₁	59.850	1.0 mg
CORE-I ₁₀	18.697	0.4 mg	CORE-I ₂₂	78.520	0.4 mg
CORE-I ₁₁	21.193	1.0 mg	CORE-I ₂₃	102.367	0.6 mg
CORE-I ₁₂	22.043	1.4 mg	CORE-I ₂₄	105.710	0.8 mg

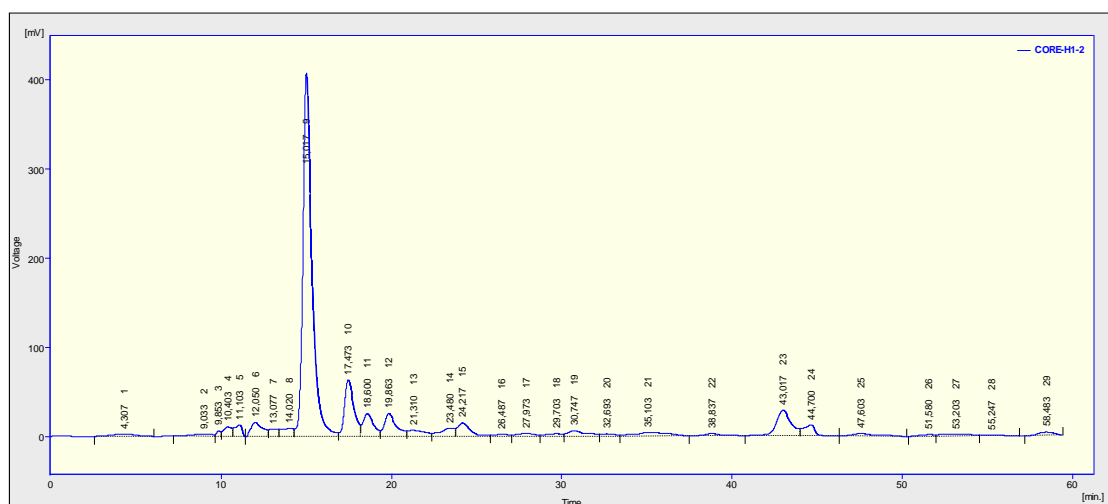


Σχήμα 3.19: Χρωματογράφημα (HPLC) του κλάσματος CORE-I. Διακρίνονται 24 κορυφές.

Κλάσμα CORE-M (78.6 mg)

Ποσότητα 21.0 mg από το κλάσμα CORE-M υποβλήθηκε σε HPLC με διαλύτη έκλουσης MeOH:H₂O 1:1 και με ταχύτητα ροής 1.0 ml/min. Έγιναν 17 επαναληπτικές ενέσεις κάθε μια από τις οποίες είχε διάρκεια 63 min και παραλήφθηκαν κλάσματα που αντιστοιχούν σε 10 κορυφές. Παρακάτω δίνονται τα βάρη και οι χρόνοι έκλουσης (Rt) των ουσιών.

Κλάσματα	Retention time (min)	Ποσότητες	Κλάσματα	Retention time (min)	Ποσότητες
CORE-M ₁	15.017	10.5 mg	CORE-M ₆	30.747	0.9 mg
CORE-M ₂	17.473	4.6 mg	CORE-M ₇	43.017	0.8 mg
CORE-M ₃	18.600	1.4 mg	CORE-M ₈	44.700	1.3 mg
CORE-M ₄	19.863	1.2 mg	CORE-M ₉	47.603	1.3 mg
CORE-M ₅	24.217	1.8 mg	CORE-M ₁₀	58.463	1.1 mg



Σχήμα 3.20: Χρωματογράφημα (HPLC) του κλάσματος CORE-M. Διακρίνονται 10 κορυφές.

Από την HPLC που ακολούθησε, τα κλάσματα CORE-M₁ (10.5 mg) περιείχε μία ένωση, η οποία κατόπιν φασματοσκοπικής μελέτης ταυτοποιήθηκε ως: **φορσυθοσίδης B** (μεταβολίτης **48c**) και το κλάσμα CORE-M₂ (4.6 mg) ταυτοποιήθηκε ως: **βερμπασκοσίδης** (μεταβολίτης **48a**).

ΥΠΟΛΕΙΜΜΑ n-BuOH: CORB (1.9 g)

Το βουτανολικό υπόλειμμα από τις ρίζες υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης Sephadex LH-20 (48.0 cm x 3.5 cm) με διαλύτη έκλουσης MeOH 100%. Ελήφθησαν συνολικά 222 κλάσματα ως εξής: 2 κλάσματα των 30 mL, 3 κλάσματα 10 mL (3-5), 56 κλάσματα των 3 mL (6-62), 6 κλάσματα των 2 mL (63-68), 91 κλάσματα των 0.5 mL (69-160), 57 κλάσματα του 1 mL (161-218) και άλλα 4 κλάσματα των 30 mL (219-222). Κατόπιν ελέγχου με TLC συνενώθηκαν στις ακόλουθες ομάδες:

Κλάσματα	Κωδικός	Ποσότητες
1-2	CORB-A	3.9 mg
3-56	CORB-B	60.9 mg
57-72	CORB-C	180.1 mg
73-91	CORB-D	153.4 mg
92-114	CORB-E	587.4 mg
115-142	CORB-F	555.5 mg
143-156	CORB-G	78.5 mg
157-184	CORB-H	50.7 mg
185-199	CORB-I	14.0 mg
200-204	CORB-K	5.4 mg
205-210	CORB-L	4.2 mg
211-219	CORB-M	3.2 mg
220	CORB-N	0.7 mg
221	CORB-O	0.8 mg
222	CORB-N	1.9 mg

Τα κλάσματα CORB-D, CORB-E, CORB-F και CORB-G, επιλέχθηκαν για να επεξεργαστούν πιο διεξοδικά ως προς την παραλαβή ουσιών.

Κλάσμα CORB-D (153.4 mg)

Υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης (12.5 cm x 3.5 cm) επί γέλης πυριτίας, με διαλύτες έκλουσης μίγματα διαλυτών P.E., EtOAc, MeOH και H₂O, αυξανόμενης πολικότητας. Ελήφθησαν 138 κλάσματα μέσου όγκου 30 mL, τα οποία κατόπιν ελέγχου με TLC συνενώθηκαν στις ακόλουθες ομάδες:

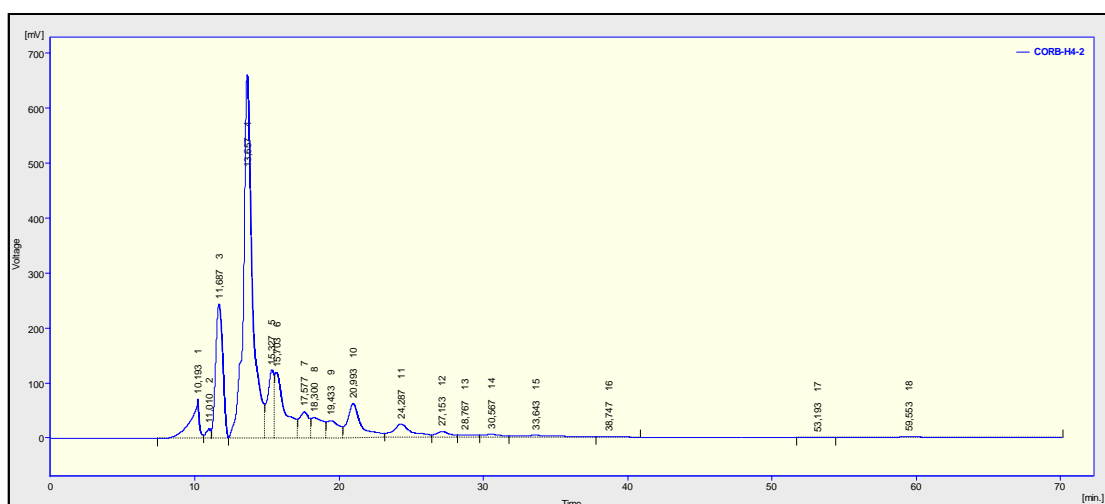
Κλάσματα	Κωδικός	Αναλογία %	Ποσότητες
1	CORB-DA	PE 100%	36.6 mg
2	CORB-DB	PE:EtOAc 80:20	0.4 mg
3	CORB-DC		0.2 mg
4	CORB-DD		1.1 mg
5	CORB-DE		1.6 mg
6-8	CORB-DF		PE:EtOAc 80:20 - PE:EtOAc 50:50
9-11	CORB-DG	PE:EtOAc 50:50	1.2 mg
12-19	CORB-DH	PE:EtOAc 50:50 - EtOAc 100%	2.6 mg

Κλάσματα	Κωδικός	Αναλογία %	Ποσότητες
20-24	CORB-DI	EtOAc 100%	1.6 mg
25-31	CORB-DK	EtOAc 100% - EtOAc:MeOH 98:2	2.0 mg
32-40	CORB-DL	EtOAc:MeOH 98:2 - EtOAc:MeOH:H ₂ O 95:5:0.5	2.8 mg
41-48	CORB-DM	EtOAc:MeOH:H ₂ O 95:5:0.5 / 90:10:1.0	5.0 mg
49-53	CORB-DN	EtOAc:MeOH:H ₂ O 90:10:1.0	60.0 mg
54-59	CORB-DO	EtOAc:MeOH:H ₂ O 90:10:1.0 / 85:15:1.5	15.3 mg
60-63	CORB-DP	EtOAc:MeOH:H ₂ O 85:15:1.5	15.1 mg
64-70	CORB-DQ	EtOAc:MeOH:H ₂ O 85:15:1.5 / 80:20:2.0	29.1 mg
71-84	CORB-DR	EtOAc:MeOH:H ₂ O 80:20:2.0 / 75:25:2.5	43.4 mg
85-96	CORB-DS	EtOAc:MeOH:H ₂ O 75:25:2.5 / 70:30:3.0	11.8 mg
97-130	CORB-DT	EtOAc:MeOH:H ₂ O 70:30:3.0 / 50:50:5.0	26.0 mg
131-137	CORB-DU	MeOH 100 %	13.8 mg
138	CORB-DV	MeOH:H ₂ O 50:50	2.2 mg

Ομάδα CORB-DQ (29.1 mg)

Ποσότητα 21.6 mg από το κλάσμα CORB-DQ υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με διαλύτη έκλουσης MeOH:H₂O 1:1 και με ταχύτητα ροής 1.0 ml/min. Έγιναν 5 επαναληπτικές ενέσεις με κάθε μια από τις οποίες είχε διάρκεια 60 min και παραλήφθηκαν κλάσματα που αντιστοιχούν σε 15 κορυφές. Παρακάτω δίνονται τα βάρη και οι χρόνοι έκλουσης (Rt) των ουσιών.

Ομάδες - Κορυφές	Ret. time (min)	Ποσότητες	Ομάδες - Κορυφές	Ret. time (min)	Ποσότητες
CORB-DQ ₁	10.193	0.8 mg	CORB-DQ ₈	19.433	0.7 mg
CORB-DQ ₂	11.010	1.9 mg	CORB-DQ ₉	24.287	0.9 mg
CORB-DQ ₃	13.557	8.2 mg	CORB-DQ ₁₀	27.153	0.8mg
CORB-DQ ₄	15.327	0.7 mg	CORB-DQ ₁₁	28.717	0.4 mg
CORB-DQ ₅	15.703	1.4 mg	CORB-DQ ₁₂	30.567	0.3 mg
CORB-DQ ₆	15.577	0.9 mg	CORB-DQ ₁₄	33.643	0.5 mg
CORB-DQ ₇	18.300	0.9 mg	CORB-DQ ₁₅	53.747	0.5 mg

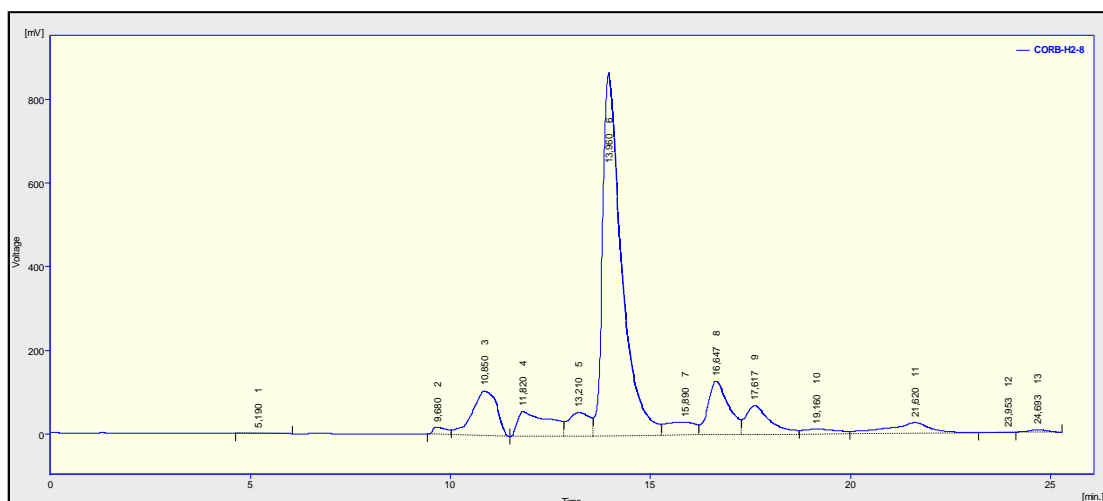


Σχήμα 3.21: Χρωματογράφημα (HPLC) του κλάσματος CORB-DQ. Διακρίνονται 15 κορυφές

Κλάσμα CORB-E (587.4 mg)

Από το κλάσμα CORB-E, ένα μέρος (39.9 mg) υποβλήθηκε σε HPLC με σύστημα έκλουσης MeOH:H₂O 1:1 και με ταχύτητα ροής 1.0ml/min. Έγιναν 11 επαναληπτικές ενέσεις κάθε μια από τις οποίες είχε διάρκεια 26 min και παραλήφθηκαν κλάσματα που αντιστοιχούν σε 6 κορυφές. Παρακάτω δίνονται τα βάρη και οι χρόνοι έκλουσης (Rt) των ουσιών.

Κλάσματα	Retention time (min)	Ποσότητες
CORB-E ₁	10.850	1.5 mg
CORB-E ₂	13.960	9.5 mg
CORB-E ₃	15.890	1.6 mg
CORB-E ₄	16.647	1.8 mg
CORB-E ₅	17.617	1.0 mg
CORB-E ₆	24.693	0.4 mg



Σχήμα 3.22: Χρωματογράφημα (HPLC) του κλάσματος CORB-E. Διακρίνονται 6 κορυφές.

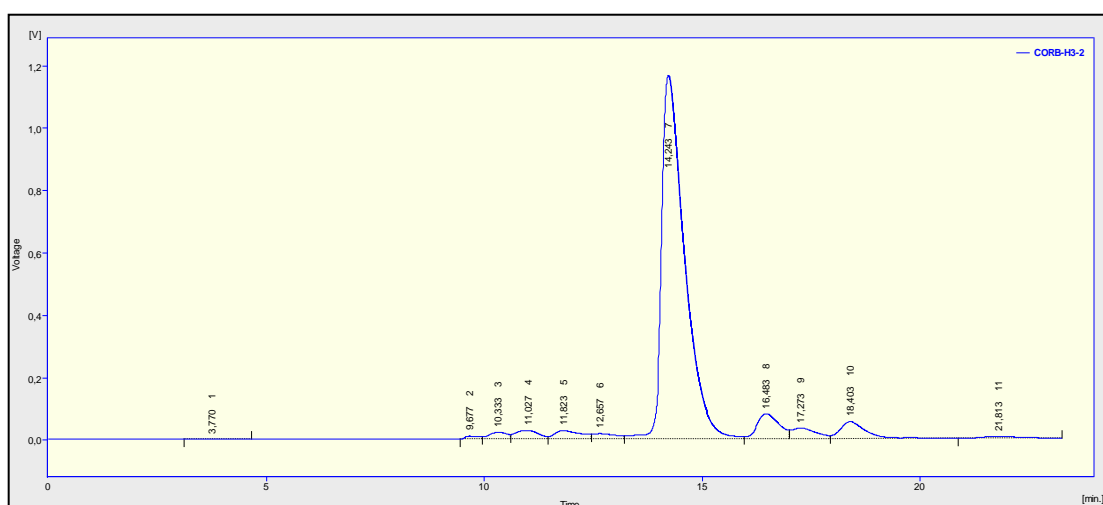
Από την HPLC που ακολούθησε, τα κλάσματα CORB-E₂ (9.5 mg) περιείχε μία ένωση, η οποία κατόπιν φασματοσκοπικής μελέτης ταυτοποιήθηκε ως: **φορσυθοσίδης B** (μεταβολίτης **48c**) και τα κλάσματα CORB-E₃ (1.6 mg), CORB-E₄ (1.8 mg) ταυτοποιήθηκε ως μείγμα των ενώσεων **αλυσσονοσίδης:φορσυθοσίδης B** (μεταβολίτης **48b:48c**).

Κλάσμα CORB-F (555.5 mg)

Από το κλάσμα CORB-F, ένα μέρος (86.8 mg) υποβλήθηκε σε HPLC με σύστημα έκλουσης MeOH:H₂O 1:1 και με ταχύτητα ροής 1.0 ml/min. Έγιναν 22

επαναληπτικές ενέσεις για κάθε μια από τις οποίες είχε διάρκεια 25 min και παραλήφθηκαν κλάσματα που αντιστοιχούν σε 6 κορυφές. Παρακάτω δίνονται τα βάρη και οι χρόνοι έκλουσης (Rt) των ουσιών.

Κλάσματα	Retention time (min)	Ποσότητες
CORB-F ₁	12.657	4.1 mg
CORB-F ₂	14.243	40.6 mg
CORB-F ₃	16.483	2.2 mg
CORB-F ₄	17.273	1.8 mg
CORB-F ₅	18.403	2.7 mg
CORB-F ₆	21.813	1.1 mg



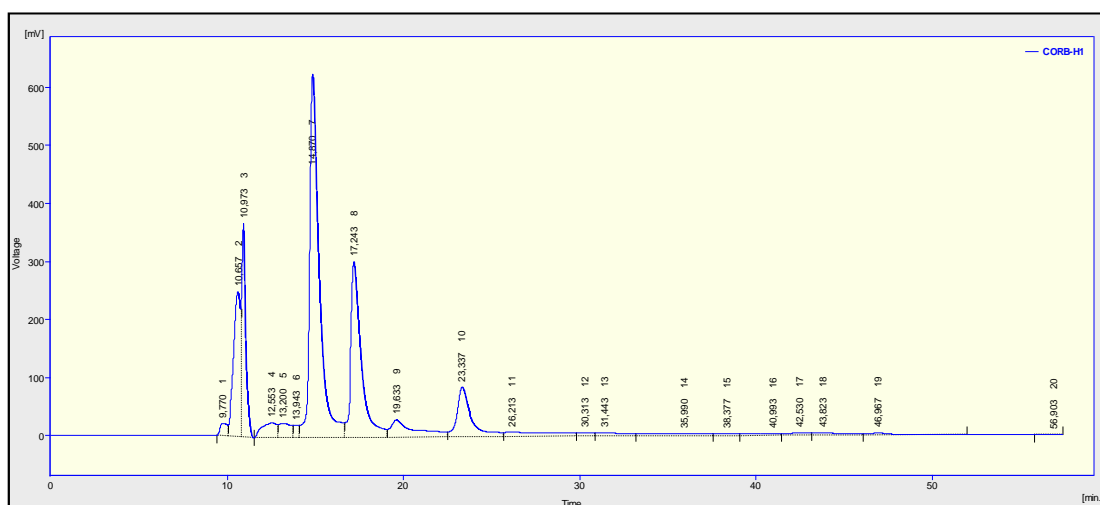
Σχήμα 3.23: Χρωματογράφημα (HPLC) του κλάσματος CORB-F. Διακρίνονται 6 κορυφές.

Το κλάσμα CORB-F₂ (40.6 mg) κατόπιν φασματοσκοπικής μελέτης ταυτοποιήθηκε ως: **φορσινοσίδης B** (μεταβολίτης **48c**), που αποτελεί το κύριο συστατικό του κλάσματος, ενώ τα κλάσματα CORB-F₃ (2.2 mg) και CORB-F₄ (1.8 mg) χαρακτηρίστηκαν ακολούθως ως: **βερμπασκοσίδης** (μεταβολίτης **48a**) και μείγμα των ενώσεων **φορσυθοσίδης B:αλυσσονοσίδης** (μεταβολίτης **48c:48b**).

Κλάσμα CORB-G (78.5 mg)

Από το κλάσμα CORB-G ελήφθησαν μόνο τα 36.0 mg και υποβλήθηκαν σε HPLC με σύστημα έκλουσης MeOH:H₂O 1:1 και με ταχύτητα ροής 1.0 ml/min. Έγιναν 10 επαναληπτικές ενέσεις, κάθε μια από τις οποίες είχε διάρκεια 25 min και παραλήφθηκαν κλάσματα που αντιστοιχούν σε 9 κορυφές. Παρακάτω δίνονται τα βάρη και οι χρόνοι έκλουσης (Rt) των ουσιών.

Κλάσματα	Retention time (min)	Ποσότητες
CORB-G ₁	9.770	0.6 mg
CORB-G ₂	10.657	1.6 mg
CORB-G ₃	10.973	3.2 mg
CORB-G ₄	13.943	0.8 mg
CORB-G ₅	14.870	8.0 mg
CORB-G ₆	17.243	1.1 mg
CORB-G ₇	19.633	4.2 mg
CORB-G ₈	23.337	1.0 mg
CORB-G ₉	26.213	1.9 mg



Σχήμα 3.24: Χρωματογράφημα (HPLC) του κλάσματος CORB-G. Διακρίνονται 9 κορυφές.

Τα κλάσματα CORB-G₅ (8.0 mg) και CORB-G₆ (1.1 mg) κατόπιν φασματοσκοπικής μελέτης ταυτοποιήθηκαν ως: **φορσινοσίδης Β** (μεταβολίτης **48c**), και **βερμπασκοσίδης** (μεταβολίτης **48a**), αντίστοιχα.

Μία δεύτερη ποσότητα από το κλάσμα CORB-G υποβλήθηκε και σε παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (PTLC). Τα 27.3 mg αναπτύχθηκαν σε κελουλόζη (γυάλινες πλάκες 20.0 cm x 20.0 cm) με κινητή φάση EtOAc/AcOH/H₂O (1:4:8). Κατόπιν εμφάνισης των πλακών με το αντιδραστήριο Neu, κόπηκαν 3 ζώνες όπου διηθήθηκαν και ο διαλύτης απομακρύνθηκε εν κενώ δίνοντας τα ακόλουθα κλάσματα.

Ομάδες-Ζώνες	R _f	Ποσότητες
CORB-G _α	0.18	1.1 mg
CORB-G _β	0.32	6.9 mg
CORB-G _γ	0.51	8.6 mg

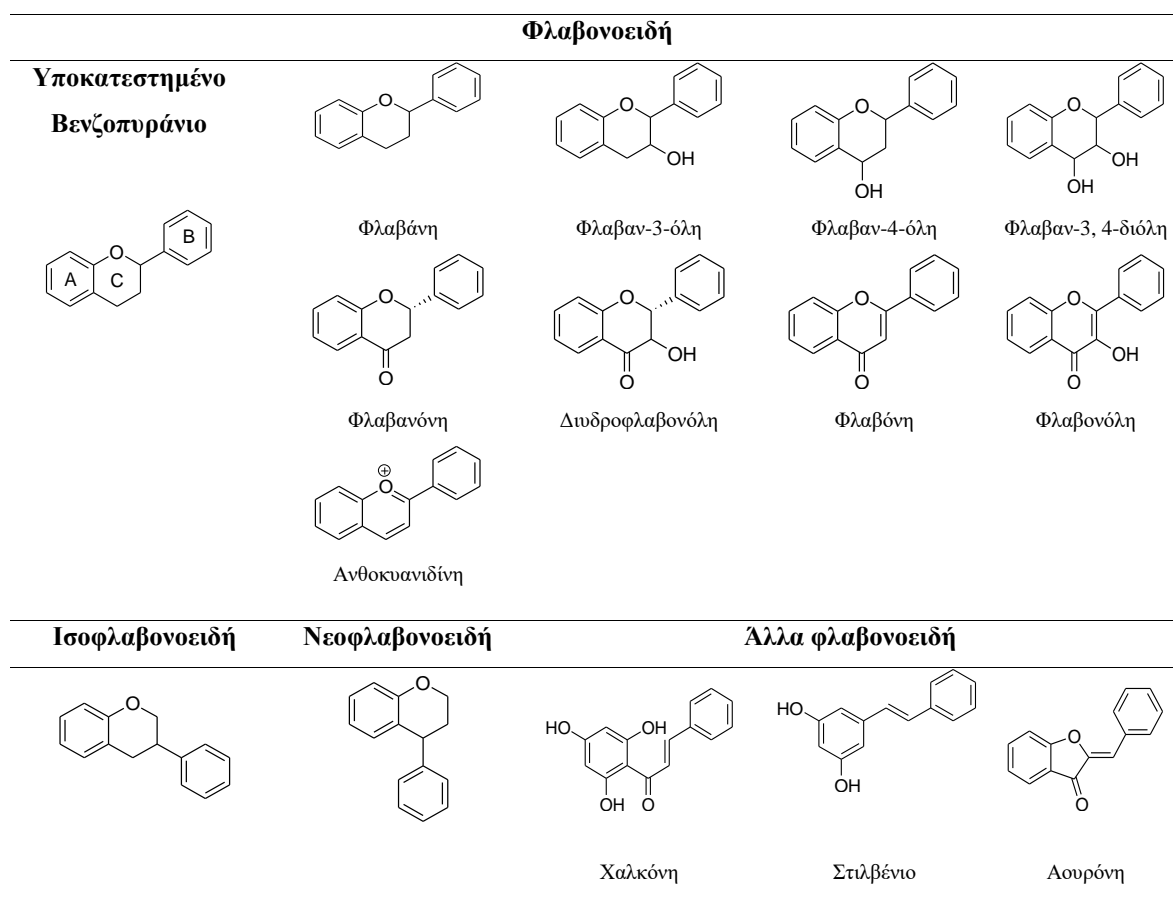
Ομοίως, παραλάβαμε τον μεταβολίτη **48c** στο κλάσμα CORB-G_β.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

4.1. ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ

Τα φλαβονοειδή είναι μία από τις μεγαλύτερες ομάδες πολυφαινολικών φυτικών χρωστικών δευτερογενών μεταβολιτών που αφθονούν στο φυτικό βασίλειο και αποτελούν τα δραστικά συστατικά πολλών φαρμάκων φυτικής προέλευσης. Βρίσκονται σε διάφορα μέρη των φυτών (καρπούς, φύλλα, άνθη, ρίζες).

Δομικά, έχουν τον ανθρακικό σκελετό C₆-C₃-C₆. Τα φλαβονοειδή είναι φαινολικές ενώσεις, οι οποίες δομικά θεωρούνται παράγωγα της βενζο-γ-πυρόνης.⁴³⁰ Η θέση της σύνδεσης του Β-δακτυλίου με τον δακτύλιο C χρησιμοποιείται για να ταξινομηθούν τα μόρια αυτά, σε τρεις διαφορετικές κατηγορίες (C-15): φλαβονοειδή, ισοφλαβονοειδή και νεοφλαβονοειδή (Σχήμα 4.1). Με βάση το βαθμό οξείδωσης και κορεσμού στον δακτύλιο C με την παρουσία πρόσθετων δακτυλίων, τα φλαβονοειδή χωρίζονται σε οκτώ διαφορετικές υποκατηγορίες.

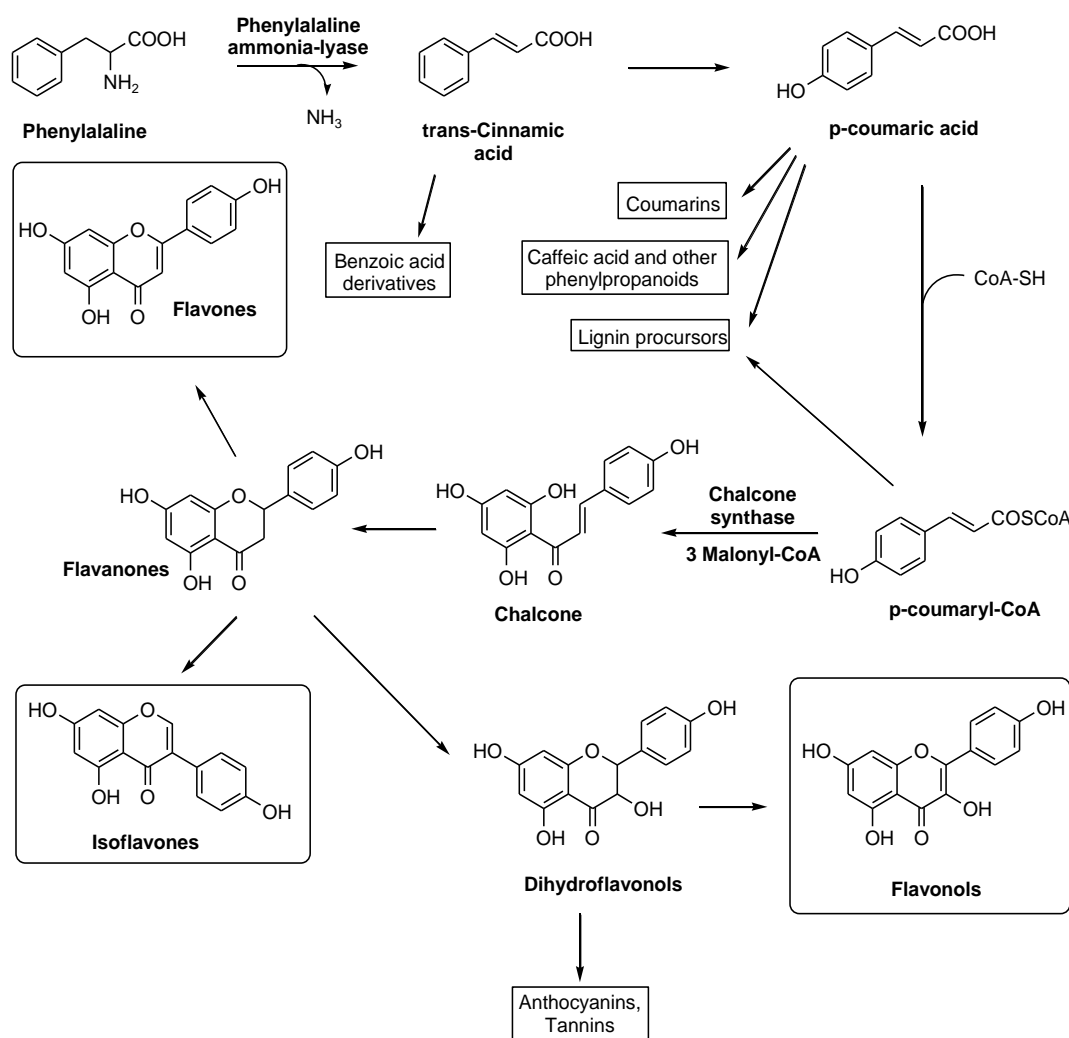


Σχήμα 4.1: Δομές διαφορετικών κατηγοριών φλαβονοειδών, ισοφλαβονοειδών, νεοφλαβονοειδών και άλλων δευτερευόντων φλαβονοειδών.

Τα ισοφλαβονοειδή περιέχουν επίσης αρκετές διαφορετικές υποκατηγορίες

και τα νεοφλαβονοειδή περιλαμβάνουν μόνο τρεις ομάδες. Ομοίως δευτερογενείς μεταβολίτες που περιέχουν παρόμοιο σκελετό άνθρακα είναι οι χαλκόνες, τα στυλβένια οι αυρόνες και θεωρούνται δευτερεύοντα φλαβονοειδή.^{431,432}

Τα φλαβονοειδή βιοσυντίθενται στο κυτταρόπλασμα του ενδοπλασματικού δικτύου με τη δράση διαφόρων συμπλεγμάτων βιοσυνθετικών ενζύμων. Όλες αυτές οι ομάδες ενώσεων προέρχονται από το βιοσυνθετικό μονοπάτι των φαινυλοπροπανοειδών χρησιμοποιώντας τρία μόρια μηλονυλο-CoA και ένα μόριο φαινυλοπροπανοΐλο-CoA.



Σχήμα 4.2: Περίγραμμα της βιοσύνθεσης φλαβονοειδών από τη φαινυλαλανίνη.

Εκτός από τα δευτερεύοντα φλαβονοειδή, όλα τα άλλα βιοσυντίθενται μέσω μιας κοινής χαρακτηριστικής ομάδας, της χαλκόνης. Διαφορετικές κατηγορίες ενζύμων (ισομεράση, υδροξυλάση, οξειδοαναγωγή, ένζυμα όπως γλυκοζυλοτρανσφεράσες, μεθυλοτρανσφεράσες, ακυλοτρανσφεράσες) δρουν σε αυτό

το δομικό πυρήνα για να διαφοροποιήσουν αυτά τα μόρια στα περισσότερα από 8000 γνωστά флаβονοειδή^{432,433} και περίπου τα 2000 γνωστά ισοφλαβονοειδή.⁴³⁴

Τα флаβονοειδή συντίθενται μέσω της μεταβολικής οδού φαινυλοπροπανοειδούς στην οποία χρησιμοποιείται το αμινοξύ φαινυλαλανίνη για την παραγωγή του 4-κουμαροϋλο-CoA, αποδίδοντας τον σκελετό των флаβονοειδών. Κατά μήκος αυτής της οδού σχηματίζονται έξι υποομάδες флаβονοειδών με διακριτά δομικά μοτίβα. Φλαβονόλες, флаβόνες, ισοφλαβόνες, флаβανόνες, флаβανόλες και ανθοκυανιδίνες. Οι δομικές παραλλαγές στις διάφορες κατηγορίες флаβονοειδών εξηγούν τις παρατηρούμενες διαφορές στη βιοδραστικότητα αυτών των σχετικών ενώσεων (Σχήμα 4.2). Σε ορισμένα στάδια της βιοσύνθεσης τους συνδέονται και σάκχαρα στο σκελετό των ενώσεων μέσω γλυκόζυλο-τρανφερασών. Τα σάκχαρα μπορεί να υποστούν ακυλίωση μέσω άκυλο τρανφερασών. Με ειδικά ένζυμα, τις μέθυλο τρανφεράσες πραγματοποιείται η μετατροπή της μέθοξυ ομάδας σε υδροξυλομάδα.⁴³⁵

Η Σημασία των Φλαβονοειδών στην Ανθρώπινη υγεία

Όπως αναφέρεται στην εισαγωγή τα флаβονοειδή στα φυτά δρουν ενάντια σε διάφορες βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις, όπως η υπεριώδης ακτινοβολία, και οι μικροβιακές μολύνσεις.⁴³⁶ Η εκτεταμένη κατανομή των флаβονοειδών και η σχετικά χαμηλή τοξικότητα σε σύγκριση με άλλες δραστικές ενώσεις φυτών σημαίνουν ότι οι άνθρωποι μπορούν να καταναλώσουν με ασφάλεια σημαντικές ποσότητες флаβονοειδών στη διατροφή τους. Διαδραματίζουν καθοριστικού ρόλο στην πρόληψη της εμφάνισης διαφόρων ασθενειών.

Για παράδειγμα, τα флаβονοειδή αποσβένουν τις ελεύθερες ρίζες όπως (ROS) και τα δραστικά είδη του αζώτου (RNS) στο σώμα παρεμποδίζοντας την καταστροφή και την εξάπλωση των ελεύθερων ριζών μέσω των χηλικών συμπλόκων που σχηματίζουν με μέταλλα.⁴³⁷ Τα είδη των ελεύθερων ριζών μπορούν να προκαλούν καρδιαγγειακές ασθένειες και νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως η νόσος Parkinson και η νόσος του Alzheimer. Επιπλέον, μελέτες διαπίστωσαν ότι τα флаβονοειδή συμβάλουν στην πρόληψη και εμφάνιση καρκίνων και διαβήτη.^{432, 438}

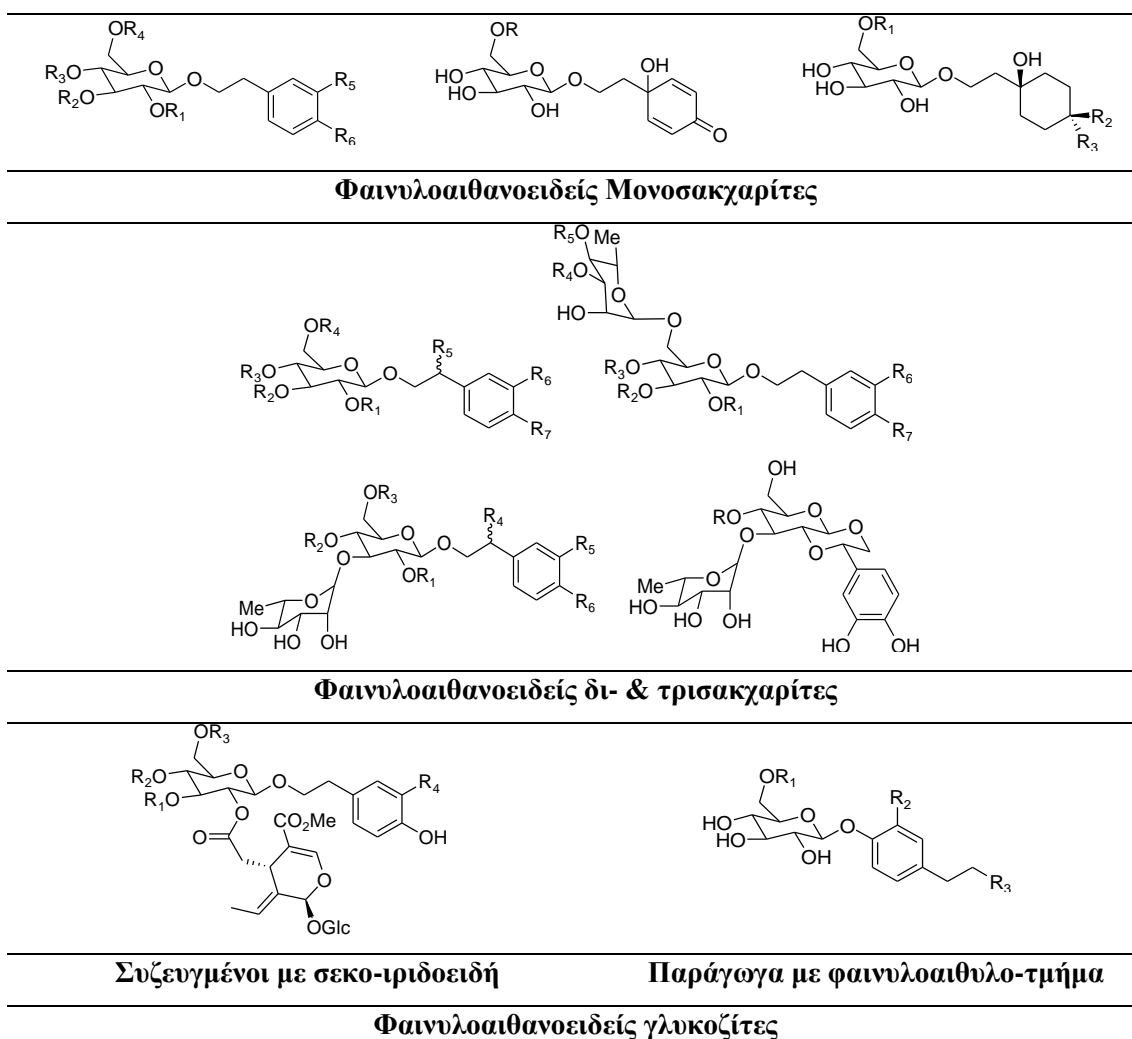
Οι αντιβακτηριακές δραστηριότητες των флаβονοειδών προσελκύουν την προσοχή των ερευνητών για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων ή βοηθητικών ουσιών.⁴³⁹

με αποτέλεσμα, πολλές έρευνες να επικεντρώνονται στην παραγωγή φυσικών και νέων φλαβονοειδών παραγώγων, χρησιμοποιώντας ανασυνδυασμένους μικροοργανισμούς μέσω διαφόρων μεθόδων μεταβολισμού, πρωτεϊνικής μηχανικής και συνθετικής βιολογίας.⁴³²

Τα φυσικώς απαντώμενα, καθώς και τα συνθετικά παράγωγα φλαβονοειδών έχει διαπιστωθεί ότι έχουν πολλές φαρμακευτικές χρήσεις. Πολλά φλαβονοειδή και τα παράγωγά τους, τόσο φυσικά όσο και συνθετικά, έχουν μελετηθεί ως πιθανοί φαρμακευτικοί παράγοντες σε ανθρώπινες παθήσεις συμπεριλαμβανομένης της ελονοσίας και του ιού HIV.⁴⁴⁰ Οι ενώσεις των φλαβονοειδών έχουν μελετηθεί για τις αντικαρκινικές (Quercetin, Kaempferol, Apigenin, Genistein),⁴⁴¹ αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (Hesperedin, Rhamnetin, Fisetin, Naringin, Luteolin, Kaempferol, Afzelin).^{432,442} Επιπλέον αναφέρονται δράσεις όπως η καρδιοπροστατευτική (Hesperedin, Resveratrol),^{443,444} νευροπροστατευτική (Hesperedin, Resveratrol),⁴⁴⁴ κατά της νόσου Alzheimer (Silibinin, Fisetin),⁴³² της νόσου του Πάρκινσον (7,8-dihydro-xyflavone), αντική (Apigenin),⁴³² αναπνευστική (Hesperedin, Kaempferol-3-O-rhamnoside),⁴⁴⁵ αντιδιαβητική (Kaempferitrin, Resveratrol) και αντιγηραντική (Chrysin, Resveratrol).⁴⁴⁶ Τέλος, τα φλαβονοειδή και ειδικότερα τα ισοφλαβονοειδή παρουσιάζουν οιστρογόνο δράση (Genistein).

4.2. ΦΑΙΝΥΛΟΑΙΘΑΝΟΕΙΔΕΙΣ ΓΛΥΚΟΖΙΤΕΣ

Οι φαινυλαιθανοειδείς γλυκοζίτες είναι μια ομάδα φυσικών προϊόντων ευρέως διανεμημένων στο φυτικό βασίλειο, τα περισσότερα από τα οποία έχουν απομονωθεί από φαρμακευτικά φυτά και αποτελούν σημαντικούς ταξινομικούς δείκτες.¹⁷² Η συγκέντρωσή τους στο φυτό δεν είναι συγκεκριμένη στα φυτικά όργανα και ιστούς.



Rx: (E)/(Z) caffeoyl, cinnamoyl, coumaroyl, feruloyl, vanilloyl, dimethylcaffeoyl, methylcoumaroyl;
Sugar moieties: Allopyranose, Apiofuranose, Arabinopyranose, Galactopyranose, Glucopyranose, Rhamnopyranose, Xylopyranose, Lyxopyranose.

Σχήμα 4.3: Ταξινόμηση των φαινυλαιθανοειδών γλυκοζιτών.

Έχουν απομονωθεί από τις ρίζες των φυτών, τον φλοιό, τα φύλλα, τα άνθη, καθώς και από ιστούς.⁴⁴⁷ Οι πιο ευρέως μελετημένες οικογένειες είναι οι Scrophulariaceae, Oleaceae, Plantaginaceae, Lamiaceae και Orobanchaceae.⁴⁴⁸ Από

το 2008 έως σήμερα έχουν απομονωθεί και εντοπιστεί περισσότερα από 100 επιπλέον νέα φαινυλοαιθανοειδή παράγωγα.^{450,449}

Δομικά, χαρακτηρίζονται από την σύνδεση τμημάτων καφεϊκού οξέος και υδροξυφαινυλαιθυλίου μέσω μιας μονάδας β -γλυκοκυρανόζης με εστερικούς και γλυκοζιτικούς δεσμούς αντίστοιχα. Στο κεντρικό τμήμα της γλυκόζης (C-3 ή C-6) μπορεί να συζευχθούν και άλλα ήδη σακχάρων όπως η αλόζη, η αραβινόζη, η απιόζη, η γαλακτόζη, η λυξόζη, η ραμνόζη και η ξυλόζη.⁴⁵⁰

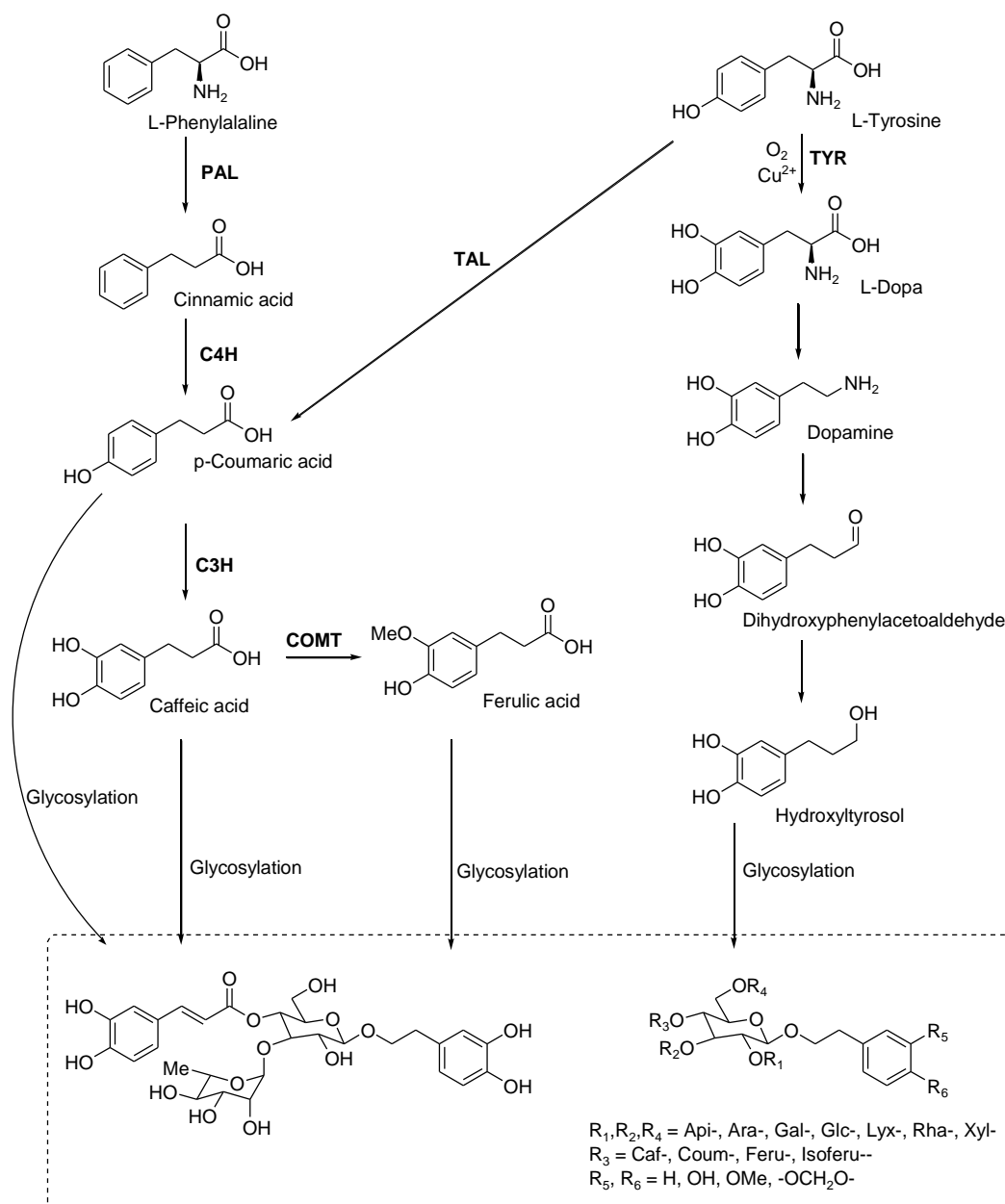
Οι θέσεις 3 και 4 του αρωματικού δακτυλίου μπορεί να είναι υποκατεστημένες με υδρόξυ ή μεθόξυ- ομάδες. Όλες οι ομάδες -OH στα σάκχαρα και τα αρωματικά οξέα (π.χ. καφεϊκό οξύ, κουμαρικό οξύ, κινναμικό οξύ, φερουλικό οξύ και ισοφερρουλικό οξύ)^{448,450} μπορούν να συνδεθούν με άλλα σάκχαρα ή φαινυλαιθυλο- υποκατάστατες ή να είναι συνενωμένα με άλλες ομάδες που σχηματίζουν διαφορετικές μονάδες, όπως 1,4-διοξόνες, p-υδροξυκινονο-ομάδα, σεκοριδοειδή (Σχήμα 4.3).⁴⁴⁸

Εφόσον τα περισσότερα από αυτά περιέχουν το καφεϊκό οξύ ως το άκυλο-τμήμα, μπορούν να χαρακτηριστούν ως γλυκοζιτικοί εστέρες του καφεϊκού οξέως, φαινυλοπροπανοϊκοί γλυκοζίτες ή καφεόυλο φαινυλαιθανοϊκοί γλυκοζίτες. Ο πιο διαδεδομένος φαινυλοαιθανοειδής γλυκοσίδη είναι ο βερμπασκοσίδη.

Αρχικές μελέτες για την βιοσύνθεση του βερμπασκοσίδη πραγματοποιήθηκαν με την χρήση ισοτοπικά επισημασμένου θρεπτικού υλικού σε αποικίες κυτταρικών εναιωρημάτων σε πασχαλιά (*Syringa vulgaris*), υποδεικνύοντας ότι η καφεόυλο-ομάδα του βερμπασκοσίδη προέρχεται από την L- φαινυλαλανίνη (Σχήμα 4.4). Ωστόσο το τμήμα της 3,4-διυδροξυ-φαινυλαιθανόλης βρέθηκε ότι προήλθε από την L- τυροσίνη.⁴⁵¹ Μια δεύτερη προσέγγιση, με ισοτοπικά επισημασμένο θρεπτικό υλικό χρησιμοποιώντας κύτταρα από την ελιά (*Olea europaea*), επιβεβαίωσε ότι το τμήμα της υδροξυτυροσόλης του βερμπασκοσίδη βιοσυντίθεται από την τυροσίνη δια μέσου της ντοπαμίνης. Αντίστοιχα το καφεόυλο-τμήμα του βερμπασκοσίδη βιοσυντίθεται από την φαινυλαλανίνη μέσω του μονοπατιού του κινναμικού οξέος. Η ντοπαμίνη, προσαρμόζεται στον βερμπασκοσίδη μέσω οξείδωσης στην αντίστοιχη αλδεΐδη, με αναγωγή σε αλκοόλη και τέλος με β -γλυκοζιλίωση.⁴⁵²

Καλλιέργειες με L-φαινυλαλανίνη, L-τυροσίνη, οξικό νάτριο και φαινυλοξικό οξύ σε κατάλληλες συγκεντρώσεις βελτίωσαν την παραγωγή φαινυλαιθανοειδών γλυκοζιτών στις αποικίες των κυττάρων του *Cistanche deserticola*. Η καλλιέργεια με

L-φαινυλαλανίνη απέδωσε την μεγαλύτερη βελτίωση παραγωγής,⁴⁵³ γεγονός το οποίο τόνισε την σημασία της L-φαινυλαλανίνης και του ενζύμου PAL στην βιογένεση των φαινυλοαιθανοειδών γλυκοζιτών.



Σχήμα 4.4: Υποθετική οδός βιοσύνθεσης του βερμπασκοσίδη.

(C3H, Cinnamate-3-hydroxylase; C4H, Cinnamate-3-hydroxylase; COMT, Caffeic acid *O*-methyltransferase; DOPA, L-3,4-Dihydroxyphenylalanine (L-3-Hydroxytyrosine); DOPA Dc, DOPA decarboxylase; PAL, Phenylalanin ammonialyase; TAL, Tyrosin ammonialyase; TYP, Tyrosinase).

Λαμβάνοντας υπόψη, την βιβλιογραφία^{453,454,455} και το γενικό μονοπάτι των φαινυλοαιθανοειδών γλυκοζιτών του βερμπασκοσίδη προτάθηκε ένα υποθετικό μονοπάτι βιοσύνθεσης τους. Στα φυτά, οι φαινυλοαιθανοειδής γλυκοζίτες συνήθως συνυπάρχουν με τα σάκχαρα, με αλκοόλες σακχάρων, ιριδοειδή και λιγνάνια

συζευγμένα με σάκχαρα που δρουν ως βιολογικά ενεργά συστατικά. Λόγω της κοινής παρουσίας των φαινολοιθανοειδών γλυκοζιτών στα φυτά, συνέβαλαν ως χημειοταξινομικοί δείκτες για τη διαφοροποίηση των ειδών. Αξιοποιήθηκαν ως χημικά προφίλ σε συνδυασμό με άλλους μεταβολίτες για την αξιολόγηση των φυλογενετικών σχέσεων σε ομάδες ειδών.¹⁷²

Η Σημασία των Φαινολοιθανοειδών Γλυκοζιτών στην Ανθρώπινη Υγεία

Η εξαιρετική δραστηριότητα των φαινολοιθανοειδών γλυκοζιτών στις διάφορες ασθένειες αποδεικνύει τη σημασία τους στην έρευνα στην φαρμακευτική χημεία. Τα περισσότερα φαινολοιθανοειδή γλυκοζίδια προέρχονται από φαρμακευτικά φυτά που παραδοσιακά χρησιμοποιούνται για διαταραχές του ήπατος, τον πυρετό, το άσθμα, τον ίκτερο και φλεγμονώδεις-ανοσολογικές, νευροεξαρτώμενες ασθένειες, οι οποίες προσελκύουν τους χημικούς προς την απομόνωση και την ανακάλυψη των πιθανών κλινικών εφαρμογών τους.⁴⁵⁶

Οι καθαρές ενώσεις και τα φυτικά εκχυλίσματα πλούσια σε φαινολοιθανοειδείς γλυκοζίτες έχουν αξιολογηθεί για πολλαπλές ιατρικές δράσεις *in vitro* και *in vivo*.

Οι φαρμακολογική δραστηριότητα των φαινολοιθανοειδών γλυκοζιτών, επικεντρώνεται κυρίως στην ηπατοπροστατευτική,^{450,456} αντιοξειδωτική⁴⁵⁷ δραστηριότητα, την κυτταροτοξικότητα,⁴⁵⁸ την αντιφλεγμονώδη⁴⁵⁹ και την ανασταλτική δράση στην α -γλυκοσιδάση.⁴⁶⁰ Η φτωχή διαπερατότητα μέσω της εντερικής επιθηλιακής μεμβράνης, η υδρόλυση από ένζυμα στον γαστρεντερικό σωλήνα και η αλληλεπίδραση με τα εμπλουτισμένα εντερικά βακτήρια είναι οι τρεις πιθανοί λόγοι για την φτωχή βιοδιαθεσιμότητα των φαινολοιθανοειδών γλυκοζιτών. Οι μεταβολικές μελέτες έδειξαν ότι δρουν ως προφάρμακα λόγω του ότι ήταν εύκολα υδρολύσιμα και κυρίως μεταβολίσιμα σε προϊόντα αποικοδόμησης.⁴⁵⁰

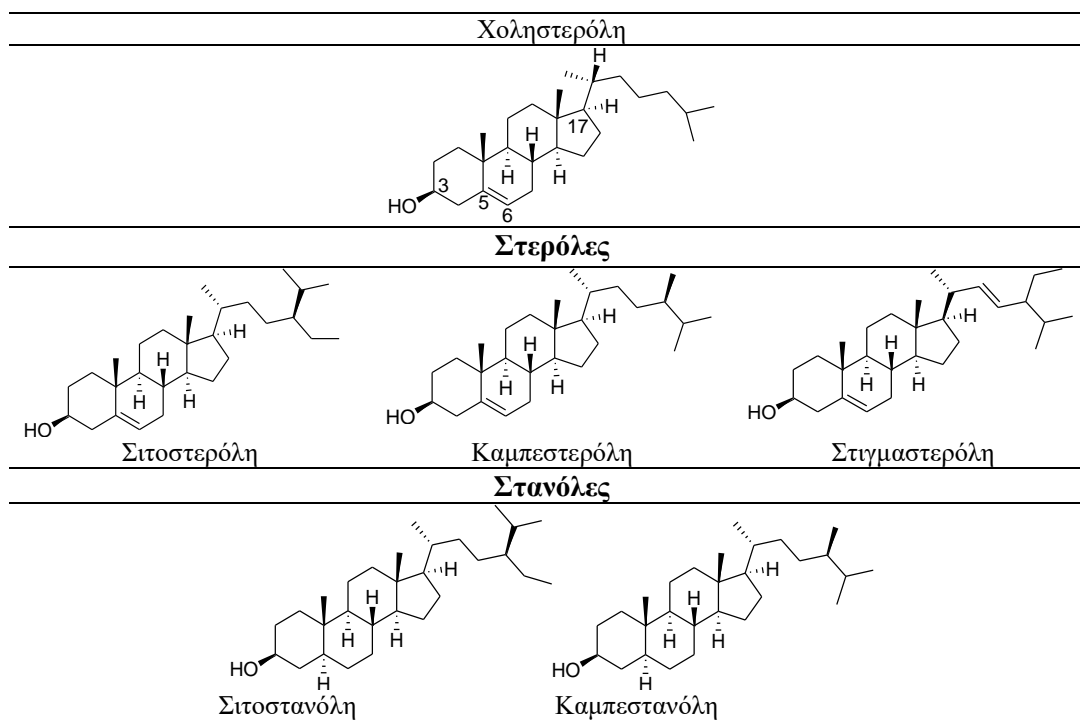
Μελετήθηκε η αντιοξειδωτική⁴⁶¹ ικανότητα των φαινολοιθανοειδών γλυκοζιτών (acteoside, orsythoside B, leucosceptoside B, poliumoside B, plantamajoside, desrhamnosyl, calceorioside B, lianqiaoxinoside B, nuomioside A, και isonuomioside A). Τα αντιοξειδωτικά αποτελέσματα αυτών των ενώσεων συσχετίστηκαν με τον αριθμό των ελεύθερων φαινολικών υδροξυλικών ομάδων με τη μορφή της 3,4-διυδροξυ- ομάδας (κατεχόλης) στην δομή τους, γεγονός που εξηγεί την

ομοιότητα των αντιοξειδωτικών τους δραστηριοτήτων. Η μετατροπή των ομάδων υδροξυλίου σε μεθυλαιθέρες, οδηγεί σε δραματική μείωση της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας.⁴⁵⁶ Η παρουσία των σακχάρων επηρεάζει έμμεσα την αντιοξειδωτική συμπεριφορά των ενώσεων επεμβαίνοντας στη λιποφιλικότητα τους, ενώ η τροποποίηση της γλυκοζιτικής αλυσίδας είναι μηδαμινής σημασίας για την εκδήλωση της αντιοξειδωτικής δράσης.⁴⁶² Άλλες δράσεις που αξιολογήθηκαν ήταν η αντιβακτηριδιακή,⁴⁶³ ανοσορρυθμιστική,⁴⁶⁴ αντι-HIV,⁴⁶⁵ νευροπροστατευτική.⁴⁶⁶ Τέτοιες δραστηριότητες καθιστούν αυτές τις ενώσεις πολύτιμες και ελπιδοφόρες φαρμακευτικές ουσίες.

4.3. ΣΤΕΡΟΕΙΔΗ

Οι στερόλες αποτελούν σημαντικά δομικά συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών και των ανώτερων οργανισμών. Η πρώτη στερόλη που βρέθηκε στους ζωικούς οργανισμούς ήταν η χοληστερόλη. Ανάλογα της χοληστερόλης στο φυτικό βασίλειο, ως τάξη, αποτελούν οι φυτοστερόλες. Οι φυτοστερόλες είναι στερόλες ή στανόλες που βρίσκονται στα φυτά. Ανήκουν στην οικογένεια των τριτερπενίων και διαφέρουν από τη χοληστερόλη σε μια ομάδα μεθυλίου ή αιθυλίου στο C-24. Οι φυτικές στανόλες, από την άλλη πλευρά, είναι η κορεσμένη μορφή των φυτικών στερολών.

Δομικά όλες φέρουν ένα στεροειδή πυρήνα (υπερυδρο-1,2-κυκλοπεντανοφαινανθρένιο), μια 3β-υδροξυλομάδα και ένα διπλό δεσμό μεταξύ των ατόμων C-5 και C-6. Οι κύριες διαφορές, συνίστανται στην αντικατάσταση της πλευρικής αλυσίδας και/ή στην ακορεστότητα τους. Τα φυτοστεροειδή βρίσκονται είτε σε ελεύθερη ή συζευγμένη μορφή ως λιπαροί-ακυλο-εστέρες, υδροξυκιναμικοί εστέρες, γλυκοζυλιομένοι, ή ακυλιωμένοι γλυκοζίτες.⁴⁶⁷

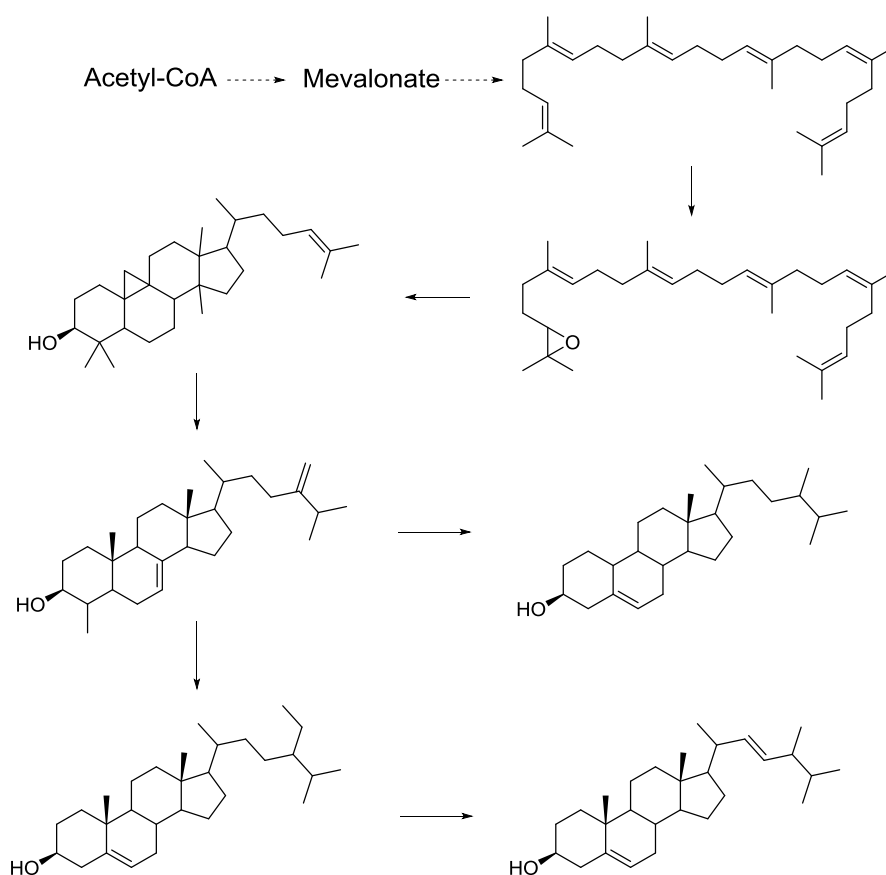


Σχήμα 4.5: Δομή χοληστερόλης και αντιπροσωπευτικές στερόλες και στανόλες.

Τα στεροειδή που απαντώνται σε αφθονία είναι η β-σιτοστερόλη (24a ethylcholesterol) που αποτελεί το 50-65%, η καμπεστερόλη (24a methylcholesterol)

10-40% και η στιγμαστερόλη (Δ^{22} , 24a ethylcholesterol) 0-35%.⁴⁶⁸ Οι δύο στανόλες, η β -σιτοστανόλη και η καμπεστανόλη είναι οι πιο συνηθισμένες. (Σχήμα 4.5). Οι χημικές διαφορές μεταξύ των κοινών 4-δεσμεθυλο στερολών οφείλονται στον αριθμό ατόμων άνθρακα, στην αλυσίδα διακλάδωσης C-17 (είτε 8 ή 10) και στην παρουσία ή απουσία ενός διπλού δεσμού σε συγκεκριμένη θέση.

Οι φυτοστερόλες είναι υποπροϊόντα βιοσύνθεσης ισοπrenoειδών μέσω του σκουαλενίου από το ακετυλο-συνένζυμο CoA (Σχήμα 4.6). Η σύνθεσή του είναι πολύπλοκη και περιλαμβάνει περισσότερα από 30 ένζυμα και καταλυόμενες αντιδράσεις όπως η βιοσύνθεση της χοληστερόλης εντός του φυτού στις κυτταρικές μεμβράνες.⁴⁶⁹



Σχήμα 4.6: Βιοσύνθεση των κύριων φυτοστερολών μέσω του μεβαλονικού μονοπατιού.

Η κύρια λειτουργία των φυτικών στερολών/στανολών είναι η σταθεροποίηση των φυτικών μεμβρανών. Χρησιμοποιούν ως πρόδρομες ουσίες στη σύνθεση στεροειδών σαπωνινών, αλκαλοειδών και άλλων στεροειδών.⁴⁷⁰ Τα φυτικά έλαια θεωρούνται σημαντικές πηγές σε φυτοστερόλες. Άλλες καλές διαιτητικές πηγές περιλαμβάνουν τα όσπρια, οι σπόροι φυτών και τα δημητριακά.⁴⁷¹ Εκτιμάται ότι η

πρόσληψη σε φυτοστερόλες κυμαίνεται από 150 mg ημερησίως σε δίαιτες δυτικού τύπου έως 500 mg ημερησίως σε δίαιτες πλούσιες σε φυτικές διατροφικές συνήθειες.⁴⁷² Η ικανότητα τόσο των φυτικών στερολών όσο και των στανολών στη μείωση της χοληστερόλης στο αίμα είναι αποδεδειγμένη.⁴⁷³

Μόρια στερόλης ενσωματώνονται στις μεμβράνες των φυτών. Από μελέτες σε απομονωμένες μεμβράνες έχει αποδειχθεί ότι η πλευρική αλυσίδα εκτείνεται στον υδρόφοβο πυρήνα και αλληλεπιδρά με λιπαρές ακυλο- αλυσίδες φωσφολιπιδίων ενώ το ελεύθερο 3β- υδροξύλιο βλέπει στην υδατική φάση. Οι φυτικές στερόλες δρουν στις μεμβράνες περιορίζοντας την κίνηση των λιπαρών αλυσίδων των φωσφολιπιδίων.⁴⁷⁴ Οι στερόλες παίζουν επίσης ρόλο στην κυτταρική διαφοροποίηση και στον πολλαπλασιασμό. Η συσσώρευσή τους σε σπόρους και έλαια είναι πιθανόν να παράγει μια δεξαμενή για την ανάπτυξη νέων κυττάρων και βλαστών. Η ενεργή σύνθεση στερόλης εμφανίζεται μετά τη βλάστηση του σπόρου και στη συνέχεια μειώνεται σταδιακά καθώς ο σπόρος ωριμάζει.⁴⁷⁴ Οι ρόλοι των στερουλικών εστέρων επίσης περιλαμβάνουν την αποθήκευση και τη μεταφορά.

Η Σημασία των Φυτικών Στερολών στην Ανθρώπινη Υγεία

Η αυξημένη συγκέντρωση της χοληστερόλης στο πλάσμα θεωρείται μία από τους σημαντικότερους παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη της στεφανιαίας νόσου.⁴⁷⁰ Η ικανότητα τόσο των φυτικών στερολών όσο και των στανολών για τη μείωση της χοληστερόλης στο αίμα επιβεβαίωσαν την αποτελεσματικότητά τους ως παράγοντες στη μείωση της χοληστερόλης στους ανθρώπους. Μεγάλος αριθμός μελετών απέδειξε την υποχοληστερολαιμική ικανότητα των φυτικών στερολών.⁴⁷⁵

Μελέτες έχουν δείξει ότι αυτές φυτοστερόλες μπορεί να είναι σε θέση να προλαμβάνουν ασθένειες όπως παθήσεις του ήπατος,⁴⁷² ο καρκίνος, ο διαβήτης, οι φλεγμονώδεις και οι ανοσολογικές διαταραχές.^{475,476} Έχει υποστηριχθεί ότι η διατροφή που είναι πλούσια σε φυτοστερόλες μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο καρκίνου κατά 20%.⁴⁶⁹ Ο συνδυασμός των φυτικών στερολών σε συνδυασμό με άλλες βιοδραστικές ενώσεις, φάρμακα ή θεραπείες φαίνεται πολλά υποσχόμενος. Ως εκ τούτου, η ενσωμάτωση των φυτικών στερολών σε λειτουργικά τρόφιμα ή προϊόντα θρεπτικών ουσιών μπορεί να έχει σχετικό ενδιαφέρον όχι μόνο για να μειώσει τον κίνδυνο καρδιαγγειακών νόσων, αλλά και για την πρόληψη της ανάπτυξης πολλών άλλων ασθενειών.^{470,477}

Έχει προταθεί ότι σε ορισμένες περιπτώσεις, οι φυτόστερόλες αυξάνουν την HDL-χοληστερόλη, μειώνοντας τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων και μειώνοντας την αναλογία απολιποπρωτεΐνης Β / απολιποπρωτεΐνης Α1.⁴⁷⁸ Ένα άλλο ευεργετικό αποτέλεσμα τους βασίζεται στην ικανότητά τους να μειώνουν τη συγκέντρωση τριγλυκεριδίων στον ορό αίματος.^{467,470} Επίσης, μπορούν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στη βελτίωση της παχυσαρκίας ή τις διαταραχές των διαβητικών.⁴⁷⁵ Η ομάδα του Misawa, *et al.*⁴⁷⁹ ανέφερε ότι σε πειράματα που περιλάμβαναν από του στόματος χορήγηση δύο τύπων αντιδιαβητικών φυτοστερολών που απομονώθηκαν από την *Aloe vera* (λοφαινόλη και κυκλοαρτενόλη) εμφανίστηκε βελτίωση στην υπεργλυκαιμία στους διαβητικούς αρουραίους Zucker.^{470,479}

4.4. ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΟΞΕΑ

Τα φαινολικά οξέα είναι μια υποκατηγορία της ευρύτερης ομάδας των φαινολικών ενώσεων. Ανευρίσκονται στα περισσότερα φυτά ως εστέρες ή γλυκοζίτες συζευγμένα με άλλες φυτικές ενώσεις όπως τα φλαβονοειδή, αλκοόλες, υδροξυλιπαρά οξέα, στερόλες και γλυκοζίτες. Ο ρόλος των φαινολικών οξέων στα φυτά, σχετίζεται με διάφορες λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένης της πρόσληψης θρεπτικών συστατικών, της πρωτεϊνικής σύνθεσης και της φωτοσύνθεσης.⁴⁸⁰

Τα φαινολικά οξέα (φαινολοκαρβοξυλικά οξέα) είναι φαινόλες που φέρουν ένα φαινολικό δακτύλιο και τουλάχιστον μία λειτουργική ομάδα καρβοξυλικού οξέος. Ανάλογα με τις μονάδες άνθρακα της πλευρικής αλυσίδας που συνδέονται με τον φαινολικό δακτύλιο, τα φαινολικά οξέα μπορούν να διαιρεθούν σε C₆-C₃, C₆-C₂ και C₆-C₁ ενώσεις, με σημαντικότερο τον C₆-C₃ (προερχόμενο από το υδροξυκιναμικό οξύ) και το C₆-C₁ (ενώσεις με δομή υδροξυβενζοϊκού οξέος). Αν και ο βασικός σκελετός παραμένει ο ίδιος, τα φαινολικά οξέα διαφέρουν ως προς τον αριθμό και τη θέση των υδροξυλίων στον αρωματικό δακτυλίο.

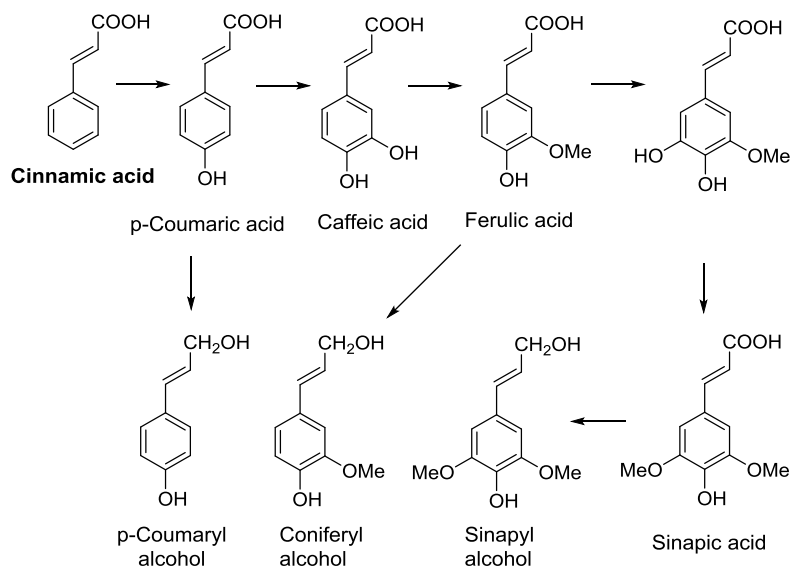
Οι παραλλαγές στις δομές των μεμονωμένων υδροξυβενζοϊκών οξέων βρίσκονται στις υδροξυλιώσεις και μεθυλιώσεις του αρωματικού δακτυλίου. Συχνά σχηματίζονται τέσσερα οξέα: το p-υδροξυβενζοϊκό, το βανιλλικό, το συριγγικό και το πρωτοκατεχικό οξύ. Μπορεί να βρίσκονται σε διαλυτή μορφή συζευγμένα με σάκχαρα ή οργανικά οξέα.⁴⁸⁰

Τα υδροξυκιναμωμικά οξέα περιλαμβάνουν, το p-κουμαρικό, το καφεϊκό, το σιναπικό, το φεουλικό οξύ και τα εστεροποιημένα/αιθεροποιημένα συζυγή οξέα όπως το χλωρογενικό οξύ. Οι χημικές δομές αυτών των ενώσεων απεικονίζονται στο Σχήμα 4.7. Το υδροξυκιναμωμικό οξύ που εμφανίζεται συχνότερα στη φύση είναι το χλωρογενικό οξύ (5-O-καφεοϋλοκινικό οξύ), το οποίο είναι καφεϊκό οξύ εστεροποιημένο με κινικό οξύ.

Η πλειονότητα των φαινολικών οξέων συνδέονται μέσω δεσμών εστέρα, αιθέρα ή ακετάλης είτε σε δομικά συστατικά του φυτού (κυτταρίνη, πρωτεΐνες, λιγνίνη) είτε σε πολυφαινόλες, ή μικρότερα οργανικά μόρια (γλυκόζη, κινίνη, ή τρυγικά οξέα) ή άλλα φυσικά προϊόντα (τερπένια).^{481,482}

Πολλά φαινολικά οξέα όπως τα κινναμικά και τα παράγωγα του βενζοϊκού οξέος υπάρχουν σε πολλά φυτά και τρόφιμα (φρούτα, λαχανικά και σπόρους).⁴⁸³

Ωστόσο, υπάρχει μόνο ένα μικρό κλάσμα σε ελεύθερη μορφή οξέος. Λόγω της παρουσίας τους σε φυτικές τροφές, ο άνθρωπος καταναλώνει φαινολικά οξέα σε καθημερινή βάση. Το εκτιμώμενο εύρος κατανάλωσης είναι 25 mg έως 1 g την ημέρα ανάλογα με τη διατροφή (φρούτα, λαχανικά, δημητριακά, τσάι, καφέδες, μπαχαρικά κ.λπ.). Τα φαινολικά οξέα έχουν αποτελέσει αντικείμενο μεγάλου αριθμού χημικών, βιολογικών, γεωργικών και ιατρικών μελετών.⁴⁸⁴

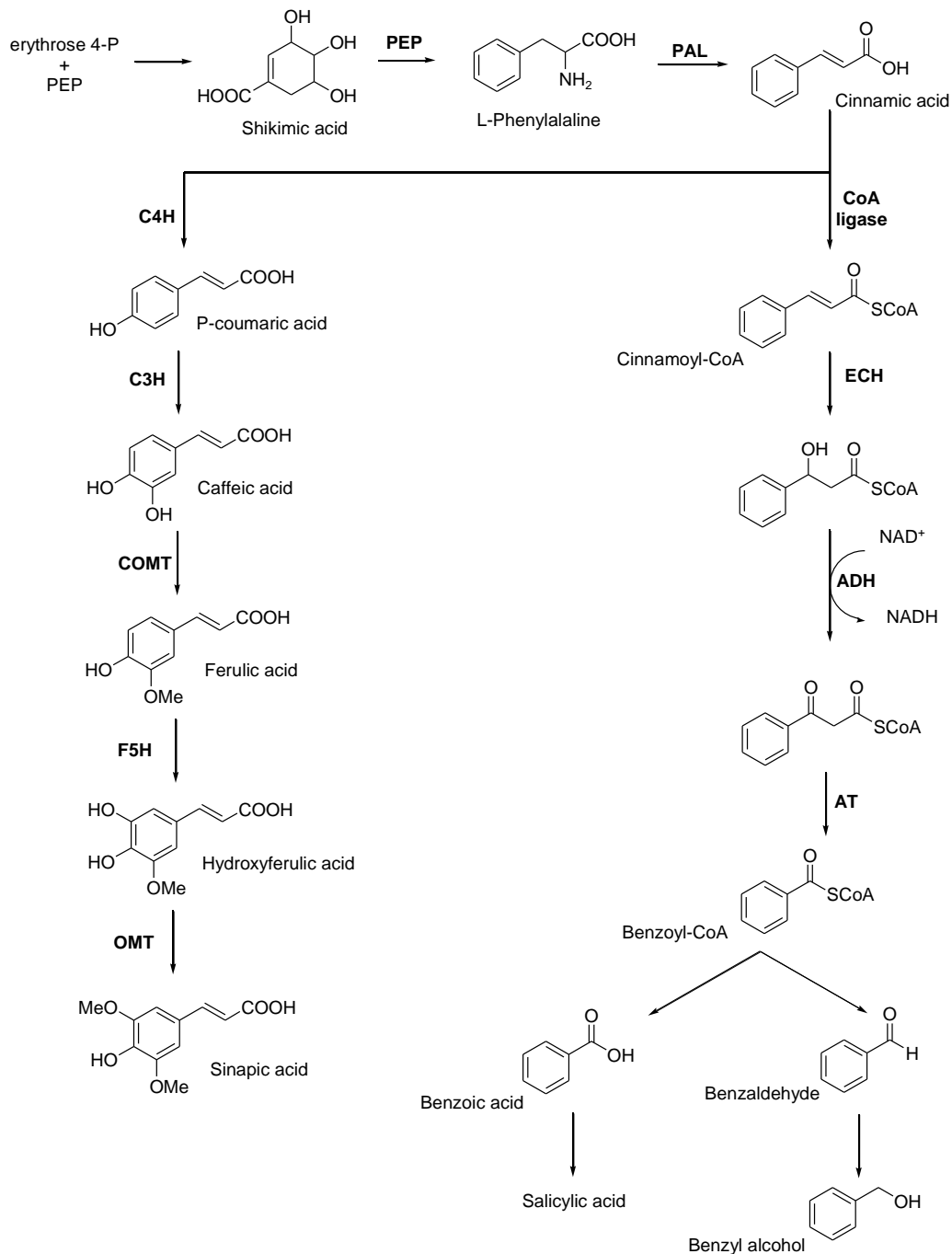


Σχήμα 4.7: Φαινολικά οξέα στα φυτά προερχόμενα από το κινναμικό οξύ.

Τα φαινολικά οξέα βιοσυνθετικά προέρχονται από την οδό του σικιμικού οξέος. (Σχήμα 4.8). Ο σχηματισμός υδροξυκινναμικών οξέων προερχόμενων από το p-κουμαρικό οξύ απαιτεί δύο τύπους αντιδράσεων: υδροξυλίωση και μεθυλίωση. Η οδός φαινυλαλανίνης/υδροξυκινναμωμικού ορίζεται ως ο γενικός μεταβολισμός των φαινυλοπροπανοειδών, που περιλαμβάνει τις κορυφαίες αντιδράσεις από την L-φαινυλαλανίνη σε υδροξυκινναμικά και τις ενεργοποιημένες μορφές τους.⁴⁸³

Τα φαινολικά οξέα παρουσιάζουν επίσης, αντιβακτηριακή δράση και συμμετέχουν στην αναστολή της εκβλάστησης των σπόρων και των φυτών. Η παραγωγή τους από τα φυτά έχει συνδεθεί με τη χημική άμυνα έναντι παθογόνων παραγόντων, αλλά και φαινόμενα αλλοπάθειας. Μπορούν να καθορίσουν τις ροές ανόργανων και οργανικών θρεπτικών ουσιών στο έδαφος, επηρεάζοντας έτσι τους ρυθμούς αποσύνθεσης και τον κύκλο θρεπτικών ουσιών. Είτε η βιοτική είτε η αβιοτική καταπόνηση ή ο συνδυασμός και των δύο, αυξάνει τη παραγωγή φαινολικών ενώσεων. Διαφορετικά είδη στρες μπορεί να επηρεάσουν διαφορετικά μέρη της

συστημικής επίκτητης ανοχής και μπορεί να καθορίσει είτε την παραγωγή τζασμονικού οξέος (jasmonic acid) ή του σαλικυλικού μεθυλεστέρα ή περισσότερες από μία ενώσεις σε διαφορετικά φυτικά είδη.⁴⁸⁰ Τα απλά φαινολικά οξέα σηματοδοτούν μόρια που εμπλέκονται σε αλληλεπιδράσεις φυτών-μικροβίων. Ο σαλικυλικός μεθυλεστέρας συντίθεται στην περιοχή της πρωτογενούς λοίμωξης και προστατεύει το φυτό από την εξάπλωση της μόλυνσης από μια πιθανή προσβολή από τον εχθρό.^{480,485}



Σχήμα 4.8: Βιοσύνθεση φαινολικών οξέων μέσω του σικιμικού οξέος.

Η αντιοξειδωτική δράση των φυτών οφείλεται στην περιεκτικότητα σε φαινολικά οξέα, ιδιαίτερα στο καφεϊκό και p-κουμαρικό. Η μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση του καφεϊκού οξέος σε σχέση με το p-κουμαρικό οξύ προέρχεται από τη θέση 3,4 της διϋδροξυλίωσης στον φαινολικό δακτύλιο.⁴⁸⁶ Τα φαινολικά οξέα συμπεριφέρονται ως αντιοξειδωτικά λόγω της δραστηριότητας του τμήματος της φαινόλης (υποκαταστάτης υδροξυλίου) στον αρωματικό δακτύλιο. Το καφεϊκό οξύ αναμένεται να έχει υψηλότερη αντιοξειδωτική δραστηριότητα λόγω της πρόσθετης σύζευξης με την ακόρεστη πλευρική αλυσίδα, η οποία θα μπορούσε να διευκολύνει τον απεντοπισμό των ηλεκτρονίων, μέσω συντονισμού, μεταξύ του αρωματικού δακτυλίου και της ακόρεστης ομάδας.⁴⁸⁰

Η Σημασία των φυτικών Φαινολικών οξέων στην Ανθρώπινη Υγεία

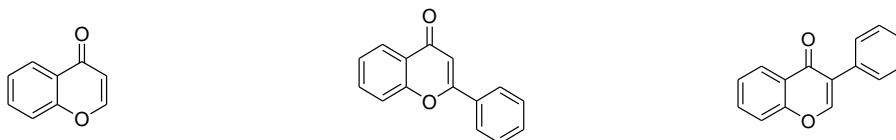
Η βιβλιογραφία παρέχει πληροφορίες που συσχετίζουν μια διατροφή πλούσια σε φαινολικά οξέα με τη διατήρηση της υγείας και την πρόληψη των ασθενειών. Το υψηλό αντιοξειδωτικό περιεχόμενο σε φρούτα και λαχανικά αναστέλλει τις οξειδωτικές βλάβες και προλαμβάνει ή δρα θεραπευτικά σε ασθένειες όπως στεφανιαία νόσος, καρδιακές παθήσεις, εγκεφαλικά επεισόδια και τον καρκίνο.^{480,487} Ορισμένα τρόφιμα ταξινομούνται ακόμη και ως λειτουργικά τρόφιμα, λόγω των καθιερωμένων προστατευτικών τους επιδράσεων στην ανθρώπινη υγεία. Το καφεϊκό οξύ, ένα από τα άφθονα φυσικά κινναμωμικά οξέα είναι γνωστό ότι εμποδίζει επιλεκτικά τη βιοσύνθεση των λευκοτριενίων, τα συστατικά που εμπλέκονται σε ανοσορυθμιστικές ασθένειες, άσθμα και αλλεργικές αντιδράσεις.⁴⁸⁰

Μια ακόμη δράση των φαινολικών οξέων που έχει αναφερθεί είναι ότι ασκούν αντιβακτηριακή δράση. Τα φαινολικά οξέα μεταξύ άλλων (φερουλικό, ισοβανιλικό, p-υδροξυκινναμικό, συριγγικό, καφεϊκό, γεντιανικό, πρωκατεχικό, p-κουμαρικό, βανιλλικό και p-υδροξυβενζοϊκό οξύ), απομονωμένα από διαφορετικές φυτικές πηγές, έχουν επιδείξει ισχυρές αντιβακτηριακές δραστηριότητες ως αποτέλεσμα μεταβολής της κυτταροπλασματικής μεμβράνης.⁴⁸⁰ Το καφεϊκό οξύ και ορισμένοι από τους εστέρες του μπορεί να έχουν αντικαρκινική δράση.⁴⁸⁸ Επίσης, το καφεϊκό οξύ, αναστέλλει την παραγωγή αφλατοξίνης του *Aspergillus flavus* παρεμποδίζοντας την ανάπτυξη των μυκήτων και παρουσιάζει βακτηριοκτόνο δράση έναντι του *P. aeruginosa* και *S. aureus*.⁴⁸⁰ Παράγωγα καφεϊκού οξέος (dicaffeoylquinic and

dicafeoyltartaric acids) έχουν βρεθεί ότι είναι ισχυροί και επιλεκτικοί αναστολείς του ιού HIV.⁴⁸⁹ Το γαλλικό οξύ μπορεί να μειώσει τα αλλεργικά συμπτώματα ενεργώντας ως αντισταμινικό.⁴⁹⁰

4.5. ΧΡΩΜΟΝΕΣ

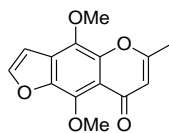
Οι χρωμόνες είναι δευτερογενείς μεταβολίτες που διανέμονται ευρέως στο φυτικό βασίλειο. Η λέξη χρωμόνη προέρχεται από την λέξη χρώμα, το οποίο επισημαίνει ότι πολλά παράγωγα χρωμόνης μπορούν να παρουσιάζουν ποικιλία χρωμάτων.⁴⁹¹ Οι χρωμόνες είναι ετεροκυκλικές ενώσεις που περιέχουν οξυγόνο στο σύστημα της βενζο-γ-πυρόνης που είναι η χρωμόνη (1,4-βενζοπυρόνη ή μητρική ένωση). Το σύστημα δακτυλίου της χρωμόνης αποτελεί τον πυρήνα αρκετών φλαβονοειδών, όπως φλαβόνες και ισοφλαβόνες (Σχήμα 4.9). Η χρωμόνη αποτελεί το κύριο φαρμακοφόρο πολλών μορίων με σημαντική βιολογική και φαρμακευτική δράση, είτε αυτά συντίθενται από τη φύση είτε στο εργαστήριο, ως ενδιάμεσες ενώσεις για τη σύνθεση πολυάριθμων ετερόκυκλων ενώσεων.



Σχήμα 4.9: Πυρήνας χρωμόνης και φλαβονοειδή.

Η δομική ποικιλομορφία που βρέθηκε στην οικογένεια των χρωμονών οδήγησε στην κατηγοριοποίησή τους: σε απλές χρωμόνες και συντηγμένες (πυρανο- και φουρανο- χρωμόνες).⁴⁹¹ Οι απλές **χρωμόνες** από μόνες τους αποτελούν μια μεγάλη κατηγορία ενώσεων που έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον για μεγάλο χρονικό διάστημα, από βιοσυνθετική ή συνθετική άποψη λόγω του ενδιαφέροντος στη λαϊκή ιατρική και του εύρους της βιολογικής τους δραστηριότητας.

Από τις πλέον γνωστές ενώσεις με χρωμονικό πυρήνα είναι η χελλίνη, η οποία απομονώθηκε από το αιγυπτιακό φυτό ψευδοπάπυρο (*Ammi visnaga*) και παρουσιάζει δραστηριότητα κατά της βρογχίτιδας.⁵⁰¹



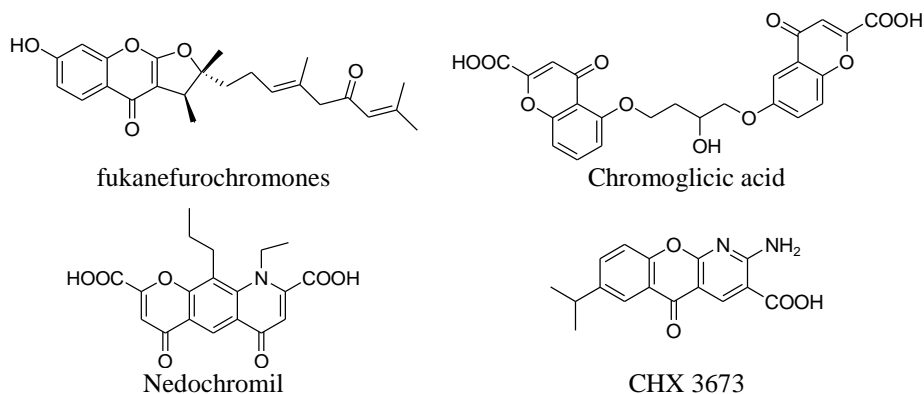
Χελλίνη

Οι χρωμόνες ως φυσικά προϊόντα έχουν αναφερθεί από αρκετές οικογένειες όπως: Asteraceae (*Tussilago farfara*),⁴⁹² Piperaceae (*Peperomia sui*),⁴⁹³ Fabaceae (*Maackia amurensis*),⁴⁹⁴ Hydrocharitaceae (*Stratiotes aloides*),⁴⁹⁵ Meliaceae (*Dysoxylum* sp.),⁴⁹¹ Leguminoseae (*Cassia petersiana*),⁴⁹¹ Chaetomiaceae

(*Chaetomium* sp.),⁴⁹⁶ Nyctaginaceae (*Pisonia* sp.),⁴⁹⁷ Myrtaceae (*Eucalyptus maiden*),⁴⁹⁸ Rosaceae (*Cydonia obloga*),⁴⁹⁹ Thymelaeaceae (*Aquilaria* sp.),⁵⁰⁰ Gentianaceae (*Halenia elliptica*), Asphodelaceae (*Asphodelus tenuifolius*), Annonaceae (*Dennettia tripetala*),⁵⁰¹ Burseraceae (*Commiphora socotrana*),⁵⁰² Lauraceae (*Ocotea corymbosa*),^{491,501} Bignoniaceae (*Tabebuia heptaphylla*),⁵⁰¹ Labiatae (*Leucas inflata*),⁵⁰¹ Cupressaceae (*Chamaecyparis pisifera*), Herpotrichiellaceae (*Exophiala* sp.),⁵⁰³ Rhizophoraceae (*Rhizophora mucronata*),⁴⁹¹ Selaginellaceae (*Selaginella uncinata*),⁵⁰¹ Rutaceae (*Spathelia excels*),⁴⁹¹ Ophiocordycipitaceae (*Tolypocladium extinguens*),⁵⁰¹ Simaroubaceae (*Harrisonia perforate*)⁵⁰¹ αλλά και από θαλάσσιους μύκητες *Penicillium* sp. και *Altenaria* sp.⁵⁰⁴

Ωστόσο, λίγες γλυκοζυλιωμένες χρωμόνες έχουν απομονωθεί από τις παρακάτω οικογένειες: Aloaceae (*Aloe* sp.),⁵⁰⁵ Ranunculaceae (*Eranthis cilicica*),⁵⁰⁶ Hypericaceae (*Hypericum* sp.),⁴⁹¹ Rubiaceae (*Knoxia corymbosa*),⁵⁰¹ Ericaceae (*Rhododendron spinuliferum*),⁵⁰⁷ Apiaceae (*Cnidium monnieri*),⁵⁰⁸ Polygonaceae (*Polygonum capitatum*).⁵⁰⁹

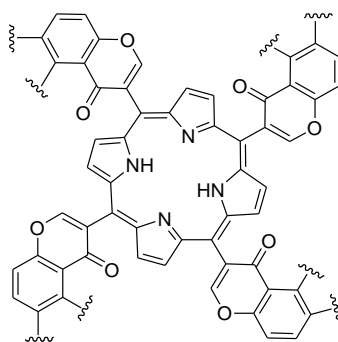
Φαίνεται ότι οι χρωμόνες και τα παράγωγά τους έχουν τεράστια σημασία στη φαρμακευτική χημεία. Τα χρωμονικά σεσκιτερπένια (*Ferula fukanensis*-Umbelliferae), εμφανίζουν αντιφλεγμονώδες ιδιότητες, όπως το χρωμογλυκικό οξύ, δράση κατά της αλλεργικής ρινίτιδας και του άσθματος, το nedochromil κατά του άσθματος και η ένωση CHX 3673, ως αντιαλλεργικό, αντιασθματικό και τοπικό αντιφλεγμονώδες.⁵¹⁰



Γενικότερα, τα χρωμονικά παράγωγα δρουν ως αναστολείς της τυροσίνης και της πρωτεϊνικής κινάσης C και εμφανίζονται ως αντικοί, αντιφυματικοί και αντιπερτασικοί παράγοντες.⁴⁹¹ Επίσης, δρουν στους βενζοδιαζεπινικούς υποδοχείς και στα ένζυμα λιποξυγενάση και κυκλοξυγενάση.⁴⁹¹ Αναπτύχθηκαν ως

χημειοπαραγωγικοί παράγοντες του καρκίνου, με πλούσιες αντιμεταστατικές ιδιότητες,⁵¹¹ για την θεραπεία του HIV και ως αντιμικροβιακά.⁵⁰¹ Εξετάστηκε, επίσης η αντιφλεγμονώδης δραστηριότητα αλλά και δράσεις που σχετίζονται με το κεντρικό νευρικό σύστημα και την παχυσαρκία.⁴⁹¹ Ωστόσο, έχει αναφερθεί η εφαρμογή των χρωμονών ως αντιδιαβητικά και ως καρδιαγγειακά.⁵¹² Ορισμένες χρωμόνες εμφανίζουν δράση στην θεραπεία της κυστικής ίνωσης με ενεργοποίηση του ρυθμιστή της διαπερατότητας της διεπιφάνειας των μεμβρανών.⁵⁰¹

Σημαντικής βιολογικής δραστηριότητας θεωρούνται επίσης τα πορφυρινικά παράγωγα που έχουν στο μόριο τους την χρωμόνη, όπως η ακόλουθη ένωση. Ο πορφυρινικός δακτύλιος είναι από τους πλέον γνωστούς στην φύση τόσο στο φυτικό βασίλειο κυρίως ως χλωροφύλλη, όσο και στο ζωικό στο δακτύλιο της αίμης στο κυτόχρωμα P450, αλλά και σε άλλα ενεργά συστήματα του κυττάρου με βιολογική σημασία.⁵¹³



Στη βιβλιογραφία συναντώνται παραδείγματα χρωμονικών παραγώγων σε ενώσεις συναρμογής (ligands) σε σύμπλοκα που παρεμβαίνουν ανάμεσα στην διπλή έλικα του DNA καθιστώντας τα πολύ σημαντικά λόγω της αντικαρκινικής τους δράσης.⁵¹⁴

4.6. ΤΥΡΟΣΟΛΙΚΟΙ ΕΣΤΕΡΕΣ

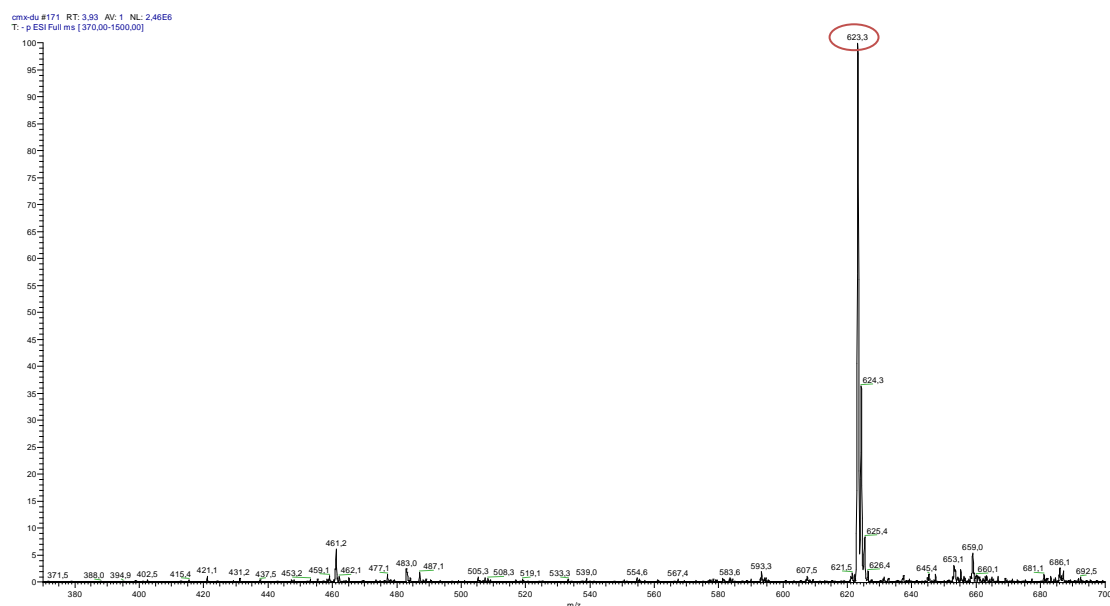
Παρ' ότι η χημεία και η φαρμακολογία της τυροσόλης και υδρόξυ τυροσόλης είναι ιδιαίτερα εκτεταμένη, οι μελέτες των εστέρων τους με λιπαρά οξέα είναι περιορισμένες και περιλαμβάνουν *in vitro* πειράματα συνθετικών εστέρων.⁵¹⁵ Γενικά πιστεύεται ότι οι τυροσυλικοί εστέρες των λιπαρών οξέων εμφανίζουν επίσης ιδιότητες επιφανειοδραστικών ουσιών, γεγονός το οποίο αυξάνει την δραστηκότητά τους σαν αντιοξειδωτικά και έχουν γίνει μελέτες με σκοπό την επαλήθευση της υπόθεσης αυτής με θετικά αποτελέσματα.⁵¹⁶

Παράγωγα τυροσολικών εστέρων φυτικής προέλευσης έχουν απομονωθεί από τα άνθη *Ligustrum ovalifolium*,⁵¹⁷ από τον φλοιό του *Buddleja cordata* και από τους καρπούς της ελιάς,⁵¹⁸ αντίστοιχα.

4.7. Παράρτημα Φασμάτων (ESI-MS, HRMS)

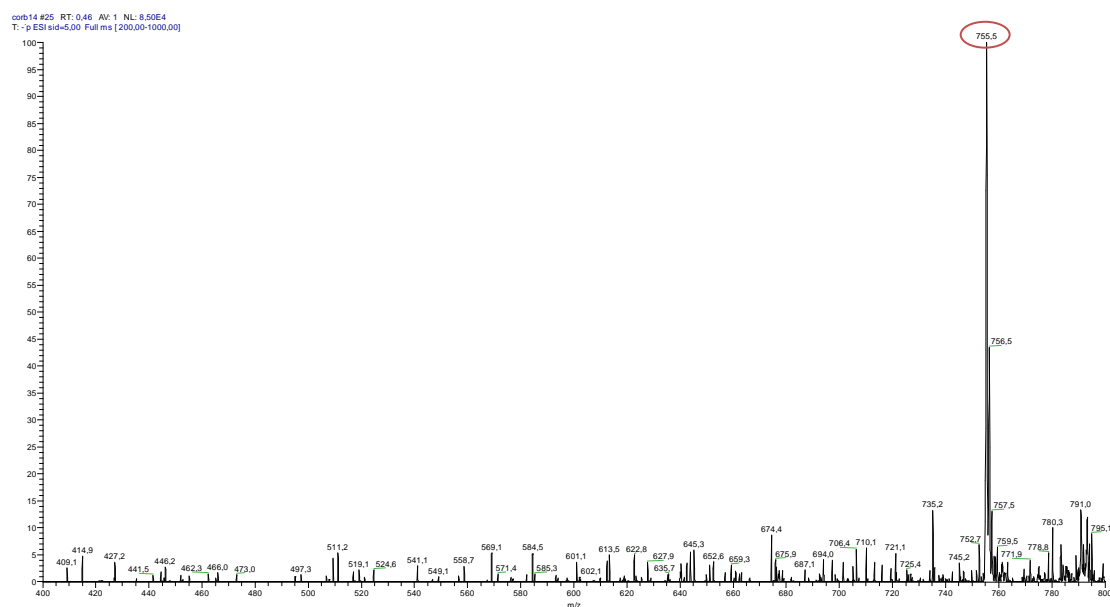
Τα φάσματα μαζών παραθέτονται με την σειρά που αναφέρθηκαν στο Κεφάλαιο 2.

Φάσμα μαζών (ESI-MS, αρνητικός ιονισμός) μεταβολίτη **48a**, Βερμπασκοσίδης



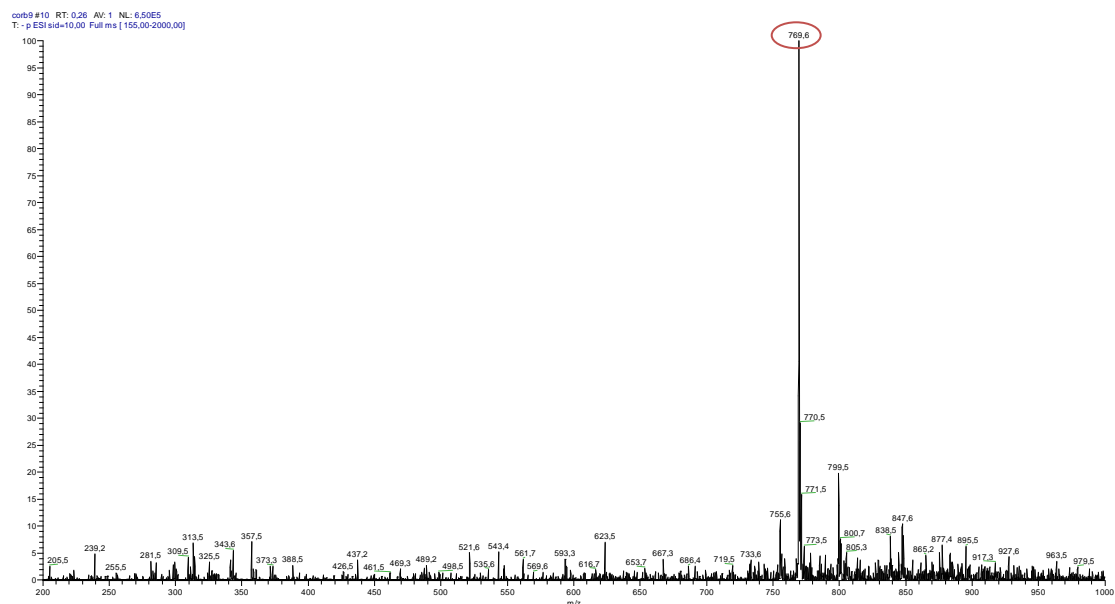
Full mass, (370-1500 m/z). $[M-H]^-$: m/z 623.3 (100), 461.2 (5), MS^2 (623.3 \rightarrow 461.2 (100)), MS^3 (461.2 \rightarrow 314.9 (100), 134.9 (80), 160.1 (31), 297.1 (20)). Mass range: 370-700 m/z .

Φάσμα μαζών (ESI-MS, αρνητικός ιονισμός) μεταβολίτη **48c**, Φορσυθοσίδης B



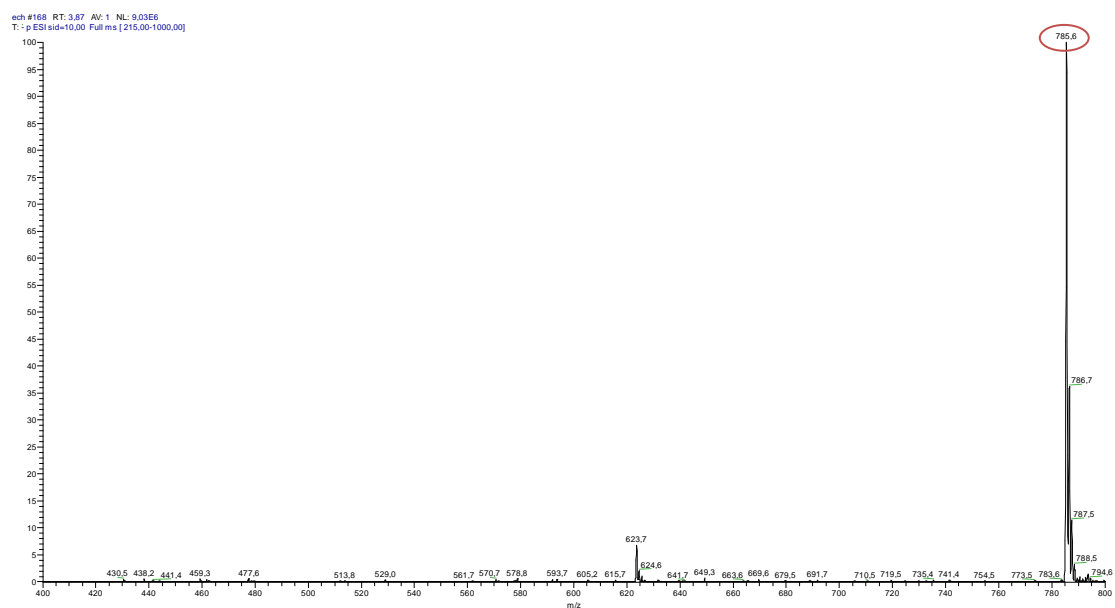
Full mass, (200-1000 m/z). $[M-H]^-$: m/z 755.5 (100). MS^2 (755.5 \rightarrow 593.4 (100)), MS^3 (593.4 \rightarrow 461.1 (100), 447.0 (92), 314.7 (65), 274.0 (40)). Mass range: 400-800 m/z .

Φάσμα μαζών (ESI-MS, αρνητικός ιονισμός) μεταβολίτη **48b**, Αλυσσονοσίδης



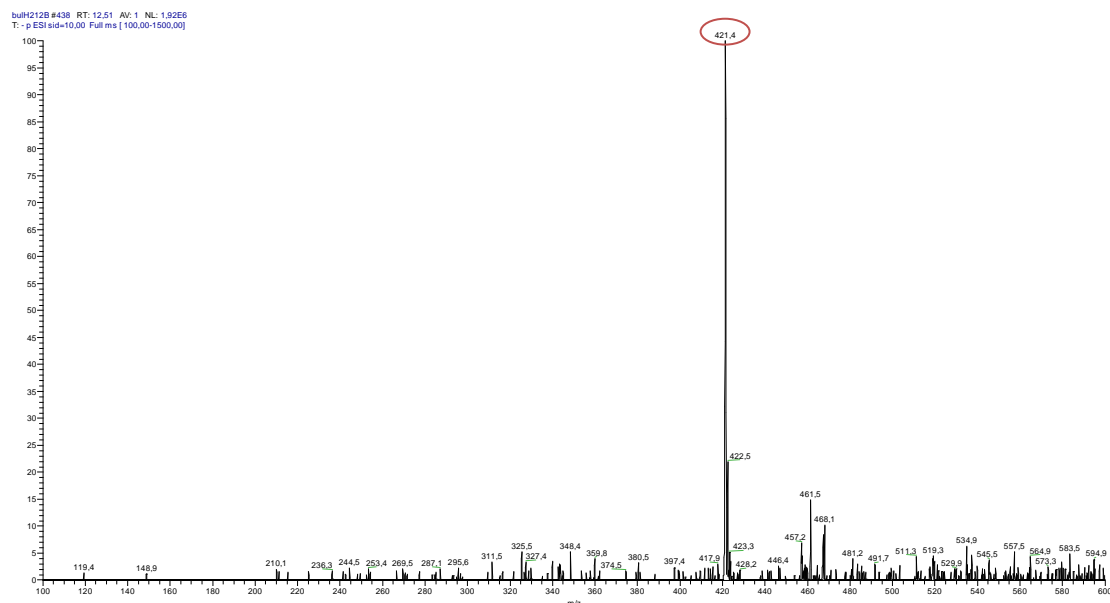
Full mass, (155-2000 m/z). $[M-H]^-$: m/z 769.6 (100), MS^2 (769.6 \rightarrow 593.6 (100), 575.6 (40)), MS^3 (593.6 \rightarrow 447.4 (100), 461.5 (72)). Mass range: 200-1000 m/z .

Φάσμα μαζών (ESI-MS, αρνητικός ιονισμός) μεταβολίτη **48t**, Εχθνακοσίδης



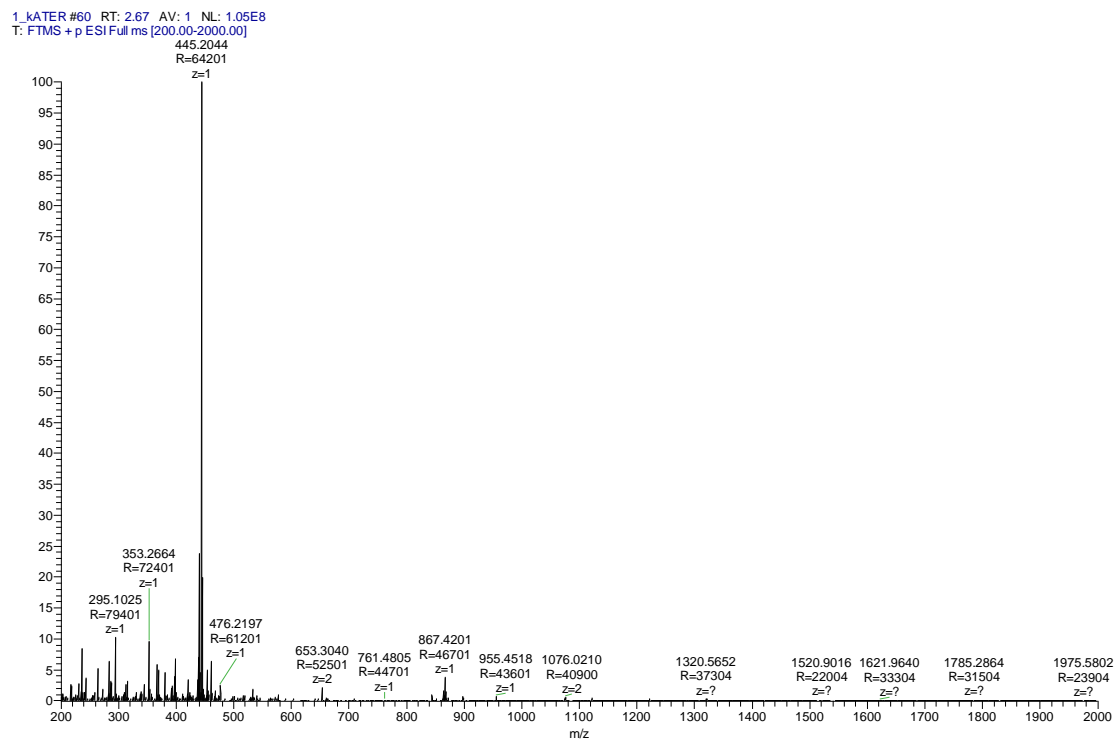
Full mass, (215-1000 m/z). $[M-H]^-$: m/z 785.6 (100), 623.7 (8), MS^2 (785.6 \rightarrow 623.6 (100)), MS^3 (623.6 \rightarrow 461.5 (100), 477.0 (95), 443.8 (12), 315.3 (10), 244.6 (5)), MS^4 (477.0 \rightarrow 315.7 (100), 135.2 (40) 161.1 (32), 179.2 (20), 221.3 (18)). Mass range: 400-800 m/z .

Φάσμα μαζών (ESI-MS, αρνητικός ιονισμός) μεταβολίτη **101**, 3-O-β-D-απιοφουρανοζυλο-(1→6)-O-β-D-γλυκοκυρανόζυλο-οκτ-1-εν-3-όλη



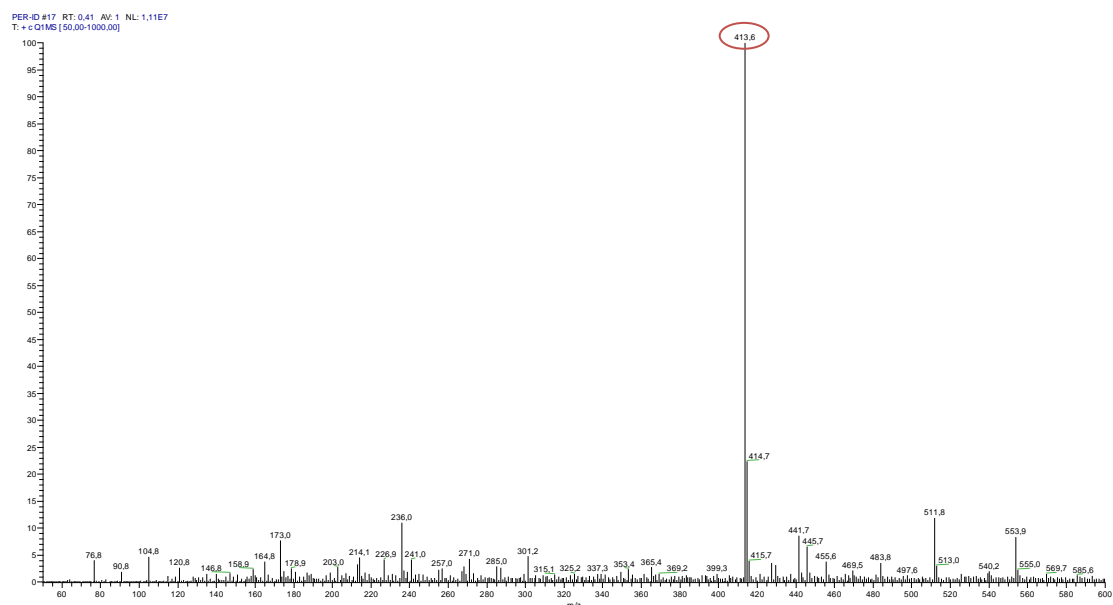
Full mass, (100-1500 m/z). $[M-H]^-$: m/z 421.4 (100), MS^2 (421.4→289.3 (100), 161.1 (29), 130.9 (8)), MS^3 (289.3→161.3 (100)), MS^4 (161.3→142.6 (100), 73.3 (84)).
Mass range: 100-600 m/z .

Φάσμα μαζών (HRMS, θετικός ιονισμός) μεταβολίτη **101**



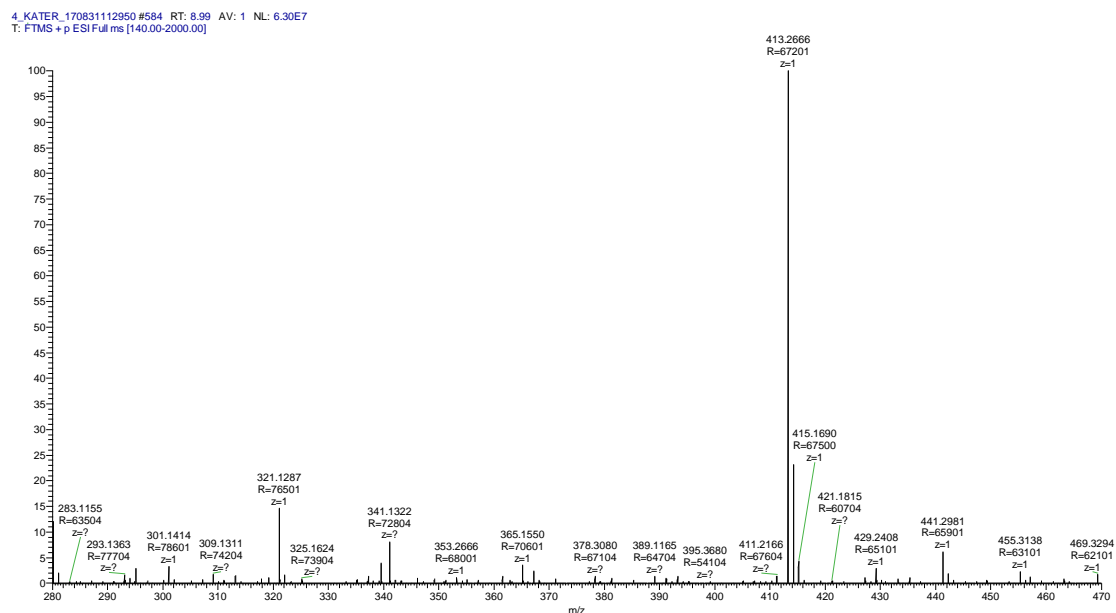
Full mass, (200-2000 m/z). $[M+Na]^+$: m/z 445.2044 (100)

Φάσμα μαζών (ESI-MS, θετικός ιονισμός) μεταβολίτη **102**, Παλμιτικός εστέρας του τυροσολικού μεθυλαιθέρα



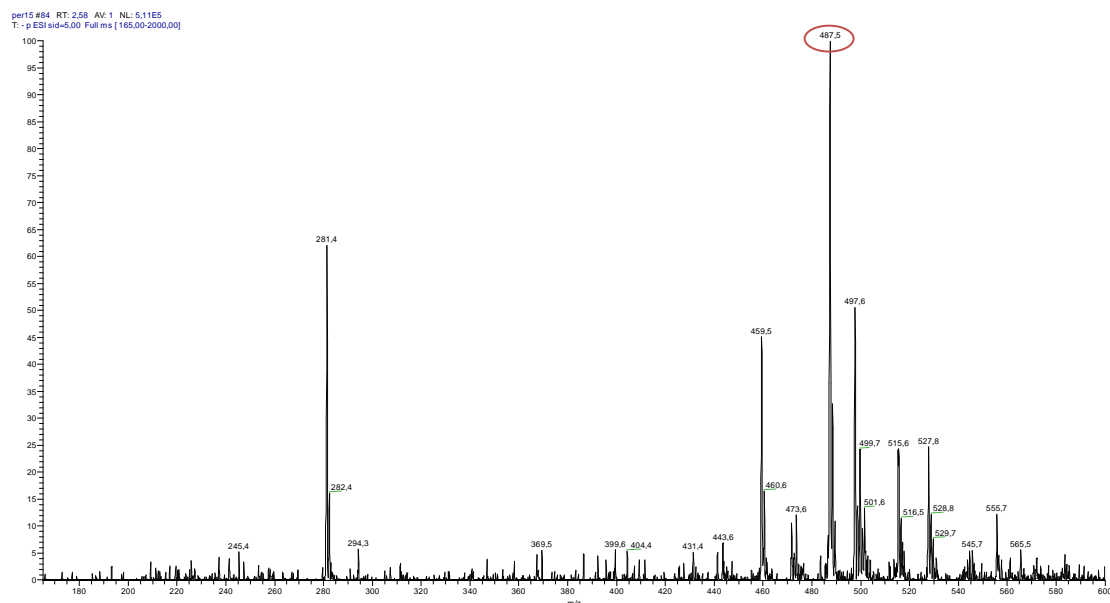
Full mass, (50-1000 m/z). $[M+Na]^+$: m/z 413.6 (100), MS^2 (413.6 \rightarrow 189.0 (100), 165.1 (90), 241.2 (38), 170 (35), 301.1 (30)). Mass range: 80-600 m/z .

Φάσμα μαζών (HRMS, θετικός ιονισμός) μεταβολίτη **102**



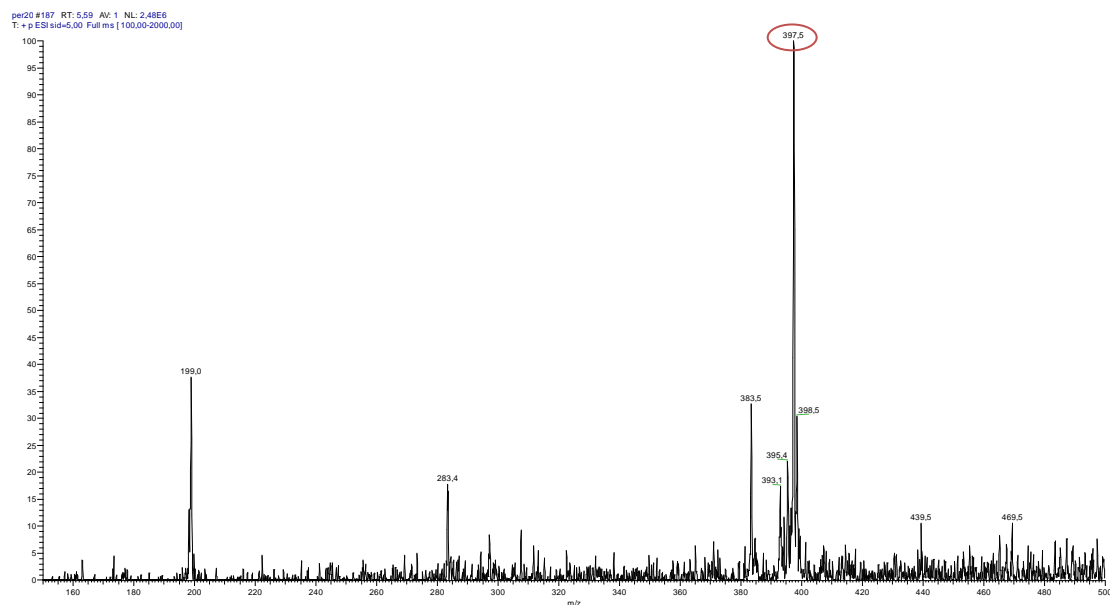
Full mass, (140-2000 m/z). $[M+ Na]^+$: m/z 413.2666 (100). Mass range: 280-470 m/z .

Φάσμα μαζών (ESI-MS, αρνητικός ιονισμός) μεταβολίτη **103**, Λιγνοστερικός εστέρας της τυροσόλης



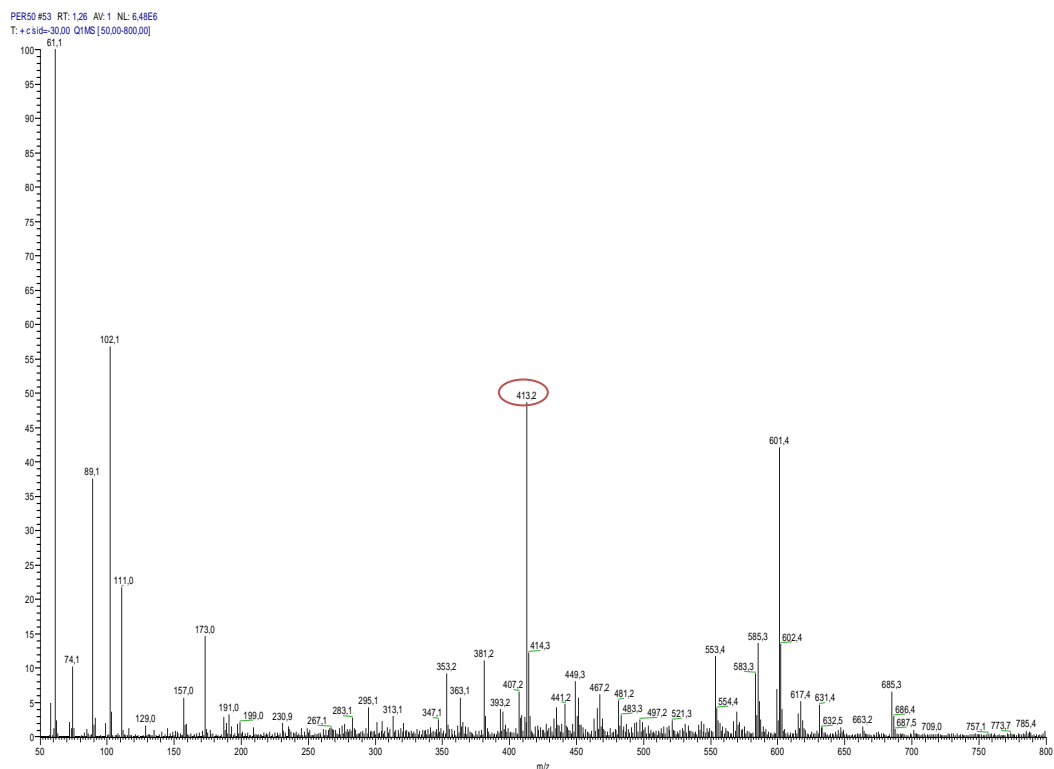
Full mass, (165-2000 m/z). $[M-H]^-$: m/z 487.5 (100), 281.4 (65), MS^2 (487.5 \rightarrow 485.8 (100), 367.6 (60), 281.4 (50)). Mass range: 165-600 m/z .

Φάσμα μαζών (ESI-MS, θετικός ιονισμός) μεταβολίτη **104**, Μπρασικαστερόλη



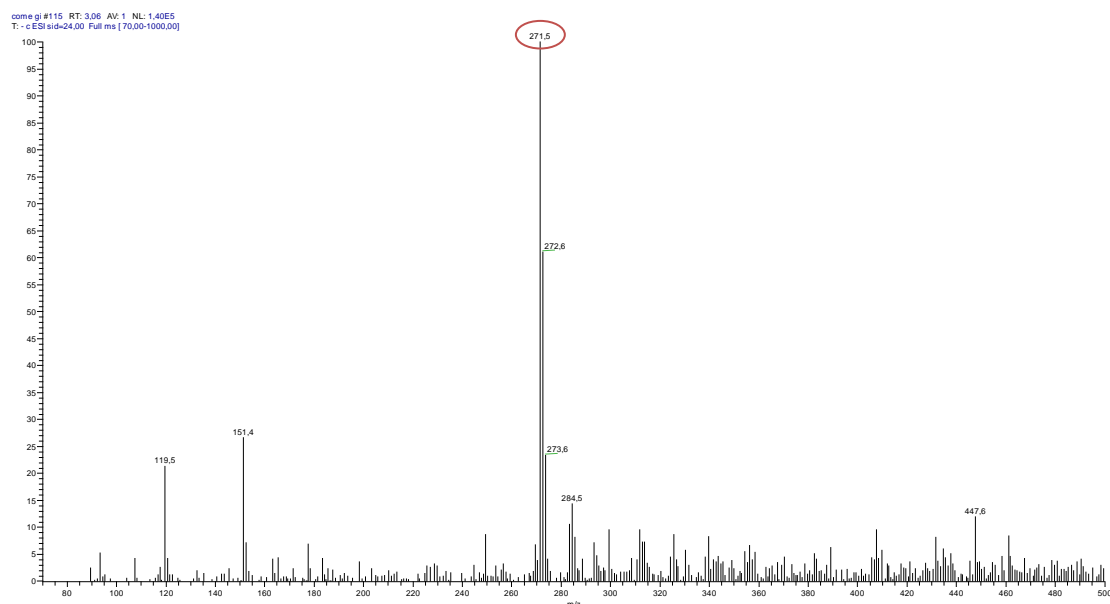
Full mass, (100-2000 m/z). $[M+H]^+$: m/z 397.5 (100), 199.0 (38), 383.5 (35), 283.4 (20), MS^2 (397.5 \rightarrow 257.3 (100), 189.3 (93), 215 (90), 299.5 (80)). Mass range: 200-1000 m/z .

Φάσμα μαζών (ESI-MS, θετικός ιονισμός) του μεταβολίτη **32b**, Στιγμαστερόλη



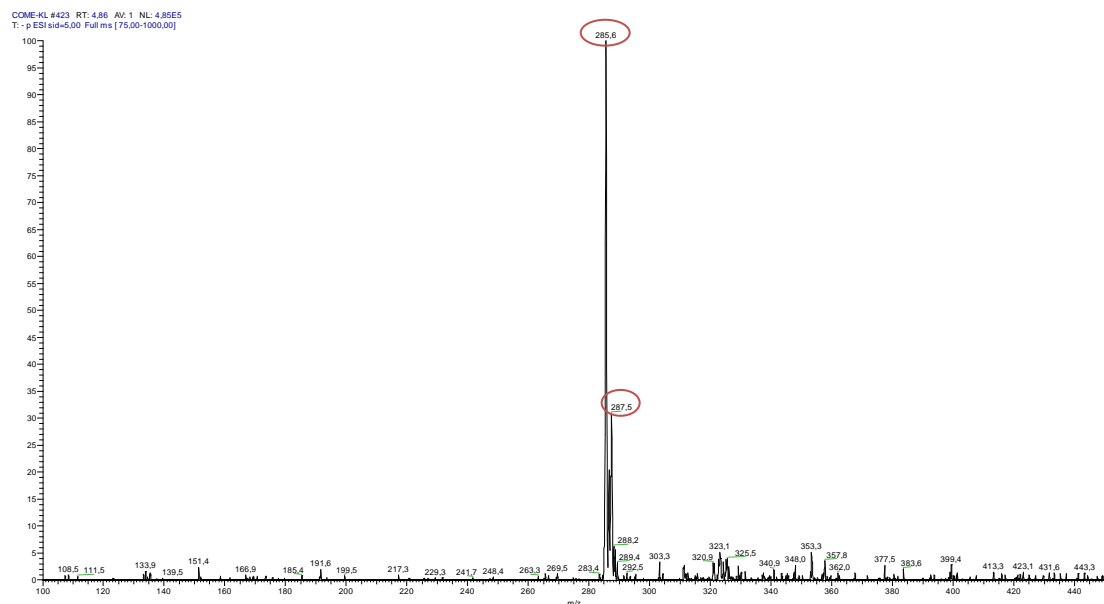
Full mass, (50-800 m/z). $[M+H]^+$: m/z 413.2 (50), 102 (55), 89 (38), 61 (100).

Φάσμα μαζών (ESI-MS, αρνητικός ιονισμός) μεταβολίτη **63c**, Ναρινγγενίνη



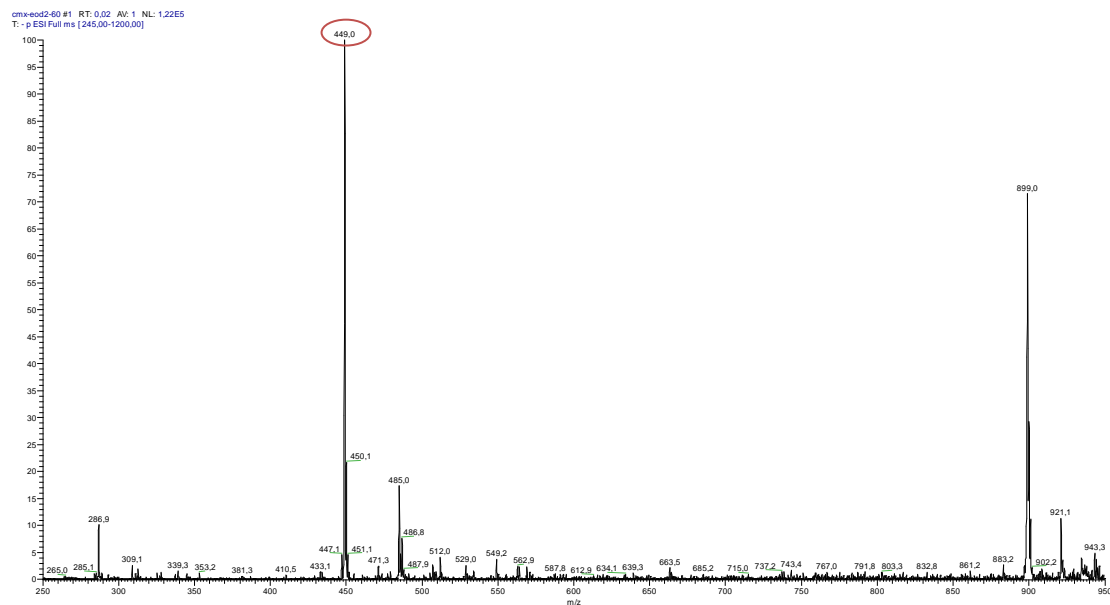
Full mass, (70-1000 m/z). $[M-H]^-$: m/z 271.5 (100), 151.4 (28), 119.5 (23). Mass range: 70-500 m/z .

Φάσμα μαζών (ESI-MS, αρνητικός ιονισμός) μεταβολίτη **63a**, Εριοδικτυόλη



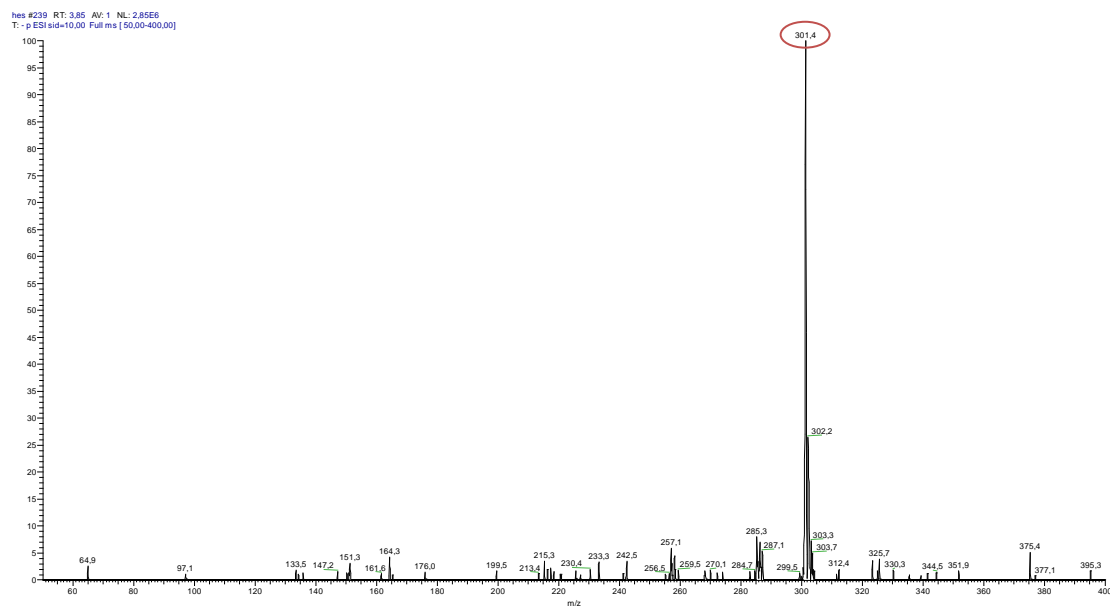
Full mass, (75-1000 m/z). $[M-H]^-$: m/z 285.6 (100) για την **58a**, 287.5 (33) για την **63a**. Mass range: 100-440 m/z . Πρόσμιξη με την **58a**.

Φάσμα μαζών (ESI-MS, αρνητικός ιονισμός) μεταβολίτη **63f**, Εριοδουκτιολο-7-*O*- β -D-γλυκοζίτης



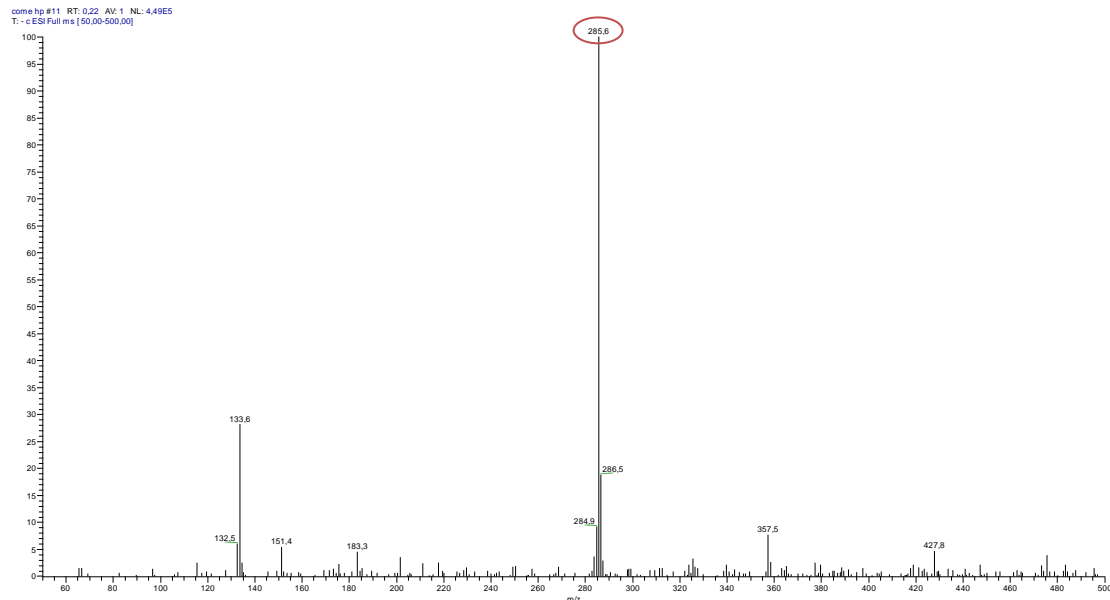
Full mass, (245-1200 m/z). $[M-H]^-$: m/z 449.0 (100), 899.0 (75) $[2M-H]^-$, 286.9 (10), MS^2 (449.0 \rightarrow 286.9 (100), 269.0 (10)). Mass range: 245-950 m/z .

Φάσμα μαζών (ESI-MS, αρνητικός ιονισμός) μεταβολίτη **63b**, Εσπερετίνη



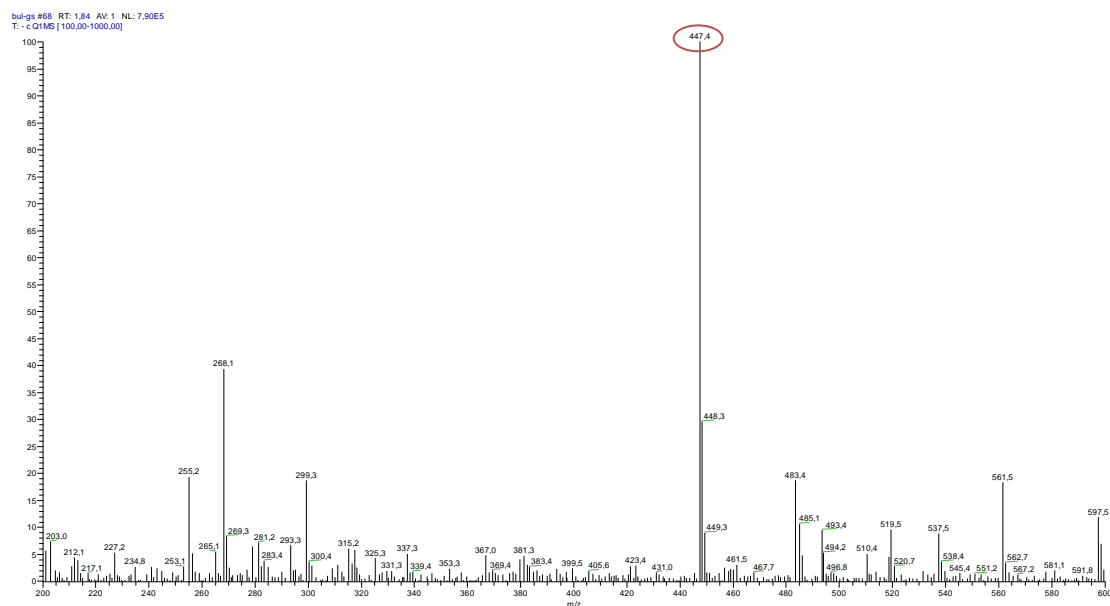
Full mass, (50-400 m/z). $[M-H]^-$: m/z 301.4 (100), MS^2 (301.4 \rightarrow 286.4 (100), 257.4 (60), 242.4 (81), 199.6 (10), 125.4 (19)), MS^3 (286.4 \rightarrow 258.3 (100), 242.4 (93), 199.3 (30), 164.3 (12)), MS^4 (258.3 \rightarrow 215.6 (100), 201.5 (49), 174.3 (47)).

Φάσμα μαζών (ESI-MS, αρνητικός ιονισμός) μεταβολίτη **58a**, Λουτεολίνη

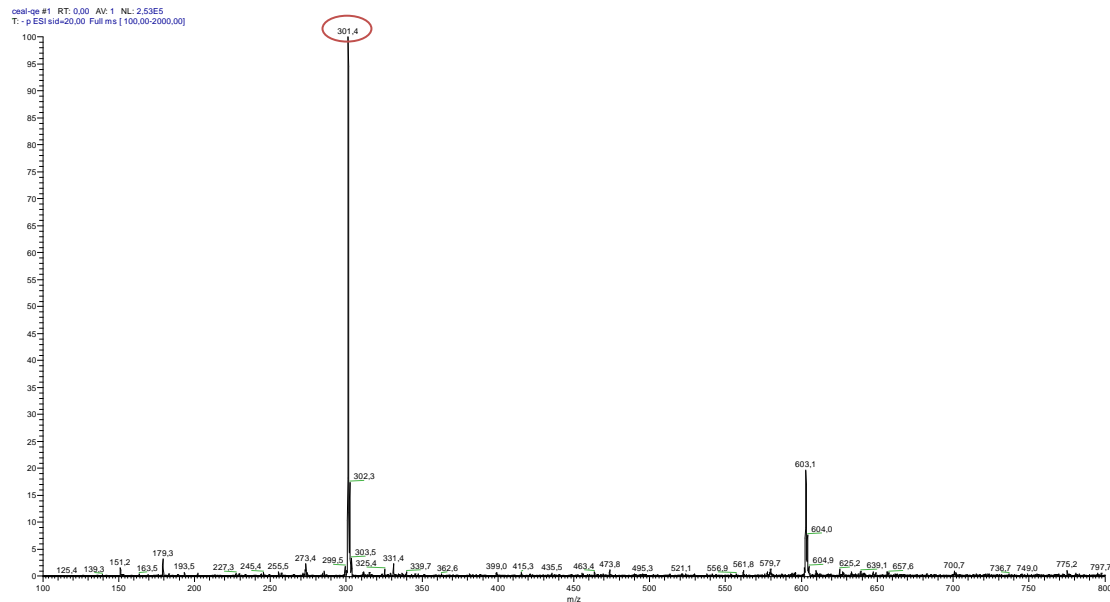


Full mass, (50-500 m/z). $[M-H]^-$: m/z 285.6 (100), MS^2 (285.6 \rightarrow 241.5 (100), 243.1 (60), 257.1 (28), 213.1 (27), 197.0 (16), 119.2 (81)).

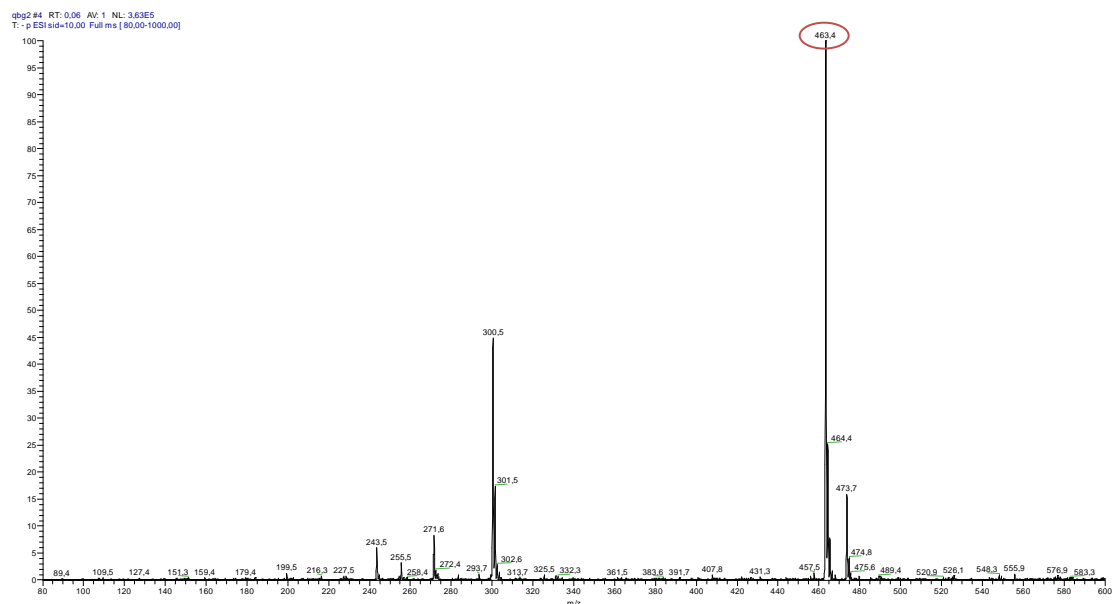
Φάσμα μαζών (ESI-MS, αρνητικός ιονισμός) μεταβολίτη **58b**, Λουτεολινο-7-*O*-β-D-γλυκοζίτης



Φάσμα μαζών (ESI-MS, αρνητικός ιονισμός) μεταβολίτη **60c**, Κερκετίνη

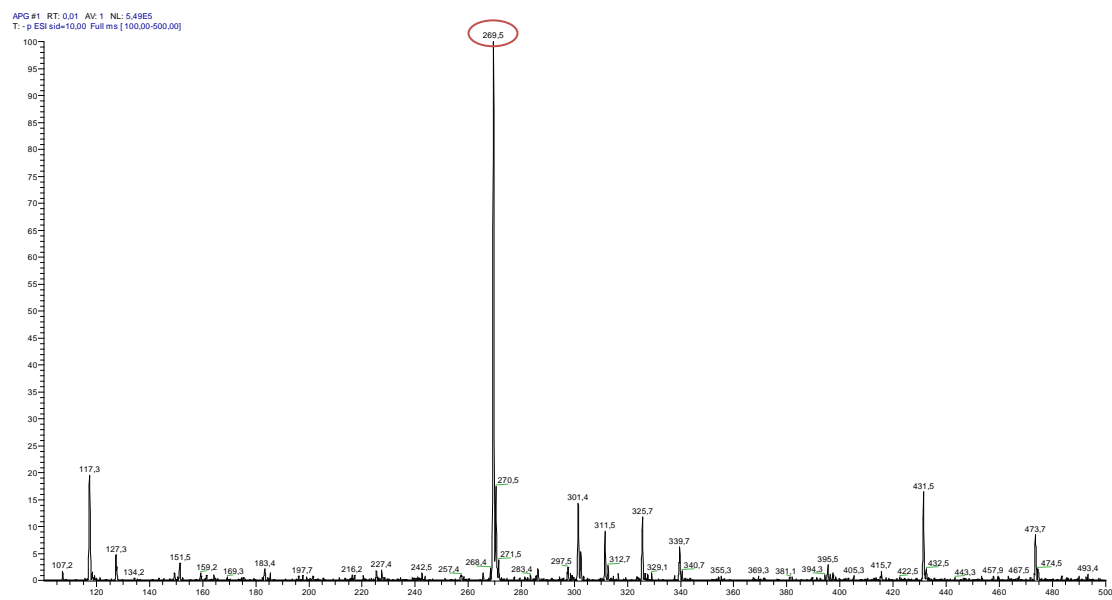


Φάσμα μαζών (ESI-MS, αρνητικός ιονισμός) μεταβολίτη **60b**, Ισοκερκετίνη



Full mass, (80-1000 m/z). $[M-H]^-$: m/z 463.4 (100), 300.5 (45), 271.6 (8), MS^2 (463.4 \rightarrow 301.4 (100), 179.4 (30), 151.3 (11)), MS^2 (300.5 \rightarrow 271.6 (100), 255.5 (45), 179.4 (20)). Mass range: 80-600 m/z .

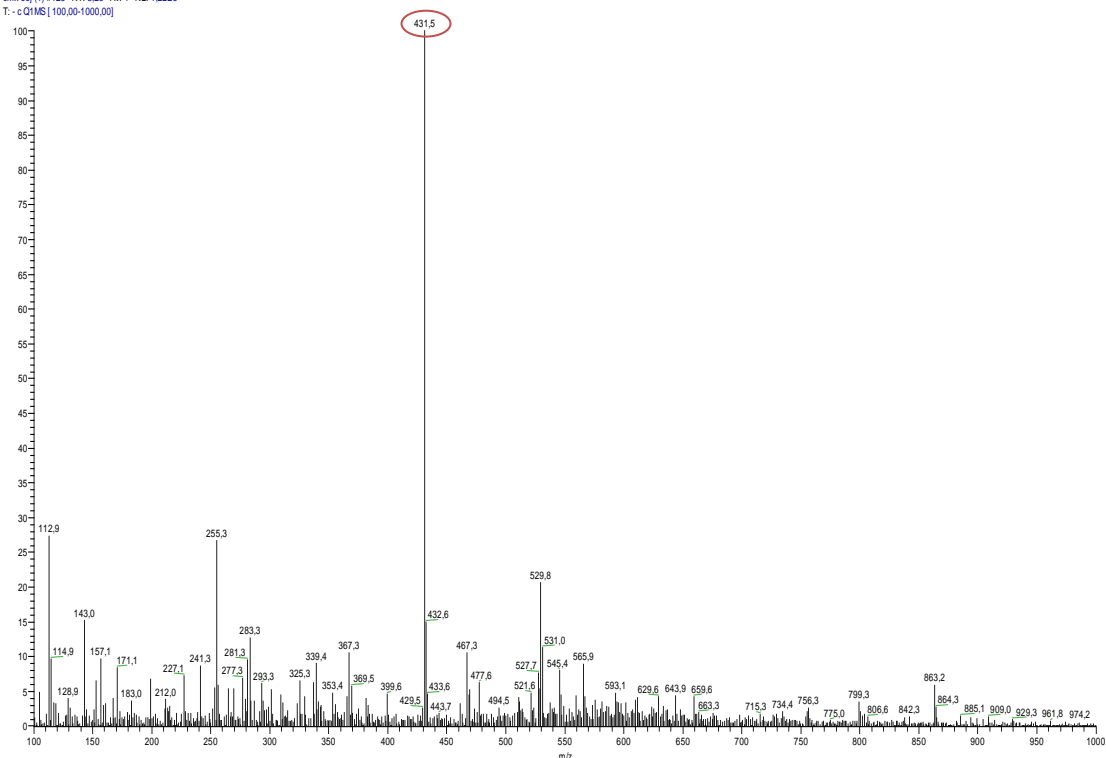
Φάσμα μαζών (ESI-MS, αρνητικός ιονισμός) μεταβολίτη **62a**, Απιγενίνη



Full mass, (100-500 m/z). $[M-H]^-$: m/z 269.5 (100), 117.3 (20), MS^2 (269.5 \rightarrow 225.4 (100), 149.2 (39), 201.5 (31), 151.3 (20)), MS^3 (225.4 \rightarrow 183.7 (100), 197.8 (92)), MS^4 (201.5 \rightarrow 159.2 (100), 202.6 (50), 117.3 (32)).

Φάσμα μαζών (ESI-MS, αρνητικός ιονισμός) μεταβολίτη **62b**, Απιγενινο-7-*O*-β-D-γλυκοζίτης

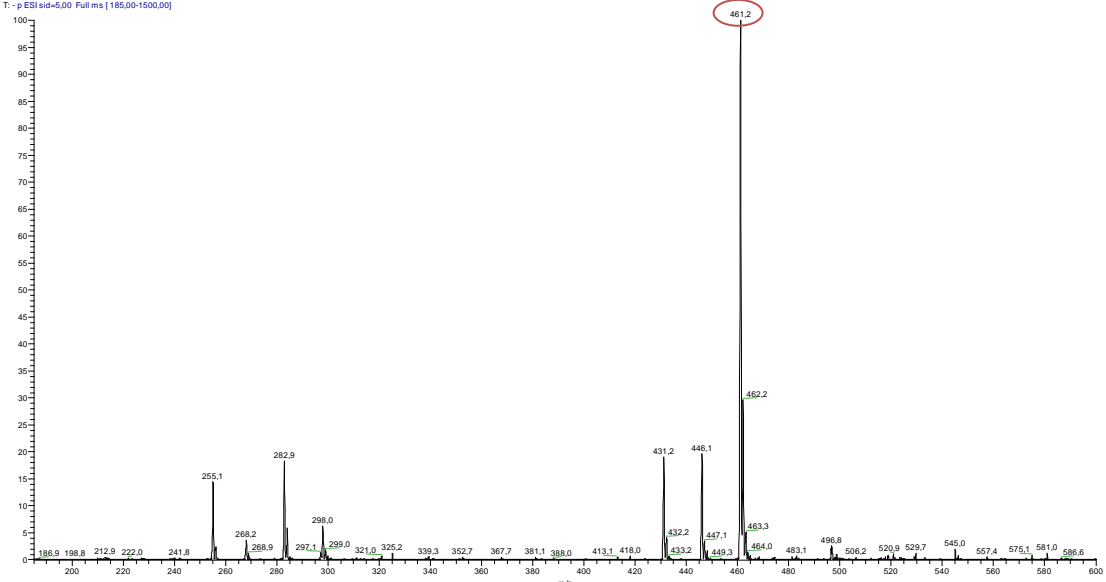
0111-04 (1) #125 RT: 3.25 Av: 1 NL: 1.22E6
T: -0 CHMS [100.00-1000.00]



Full mass, (100-1000 m/z). $[M-H]^-$: m/z 431.5 (100), 112.9 (28), 255.3 (27), MS^2 (431.5 \rightarrow 268.1 (100), 162.1 (60)). Mass range: 100-1000 m/z .

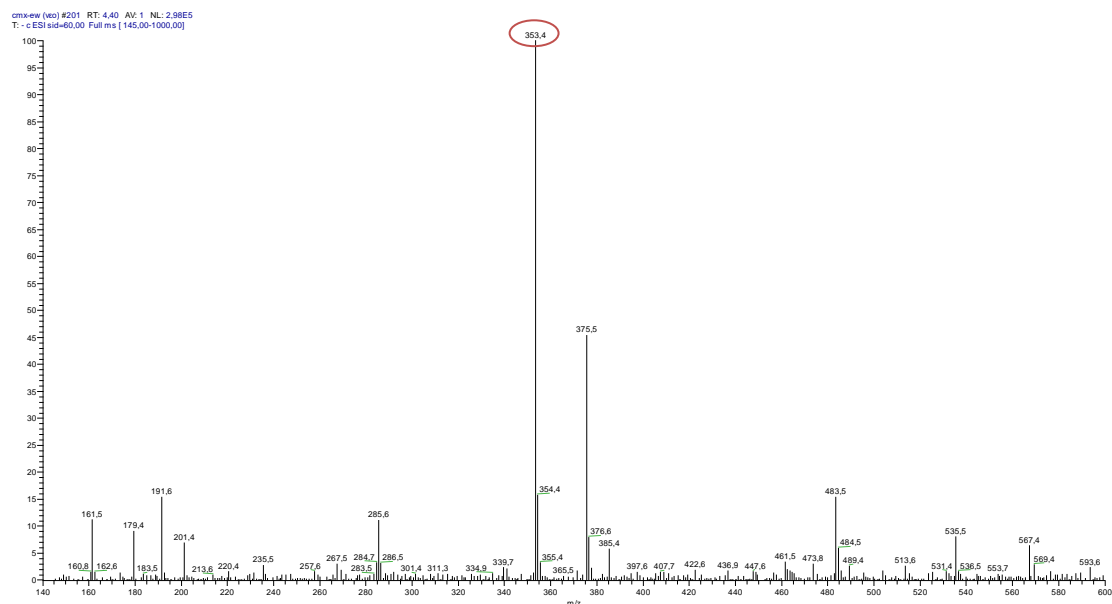
Φάσμα μαζών (ESI-MS, αρνητικός ιονισμός) μεταβολίτη **103**, Διοσμεινο-7-*O*-β-D-γλυκοζίτης

0052-49 RT: 0.18 Av: 1 NL: 9.66E5
T: -0 ESI-H4-5.00 Full ms [185.00-1500.00]



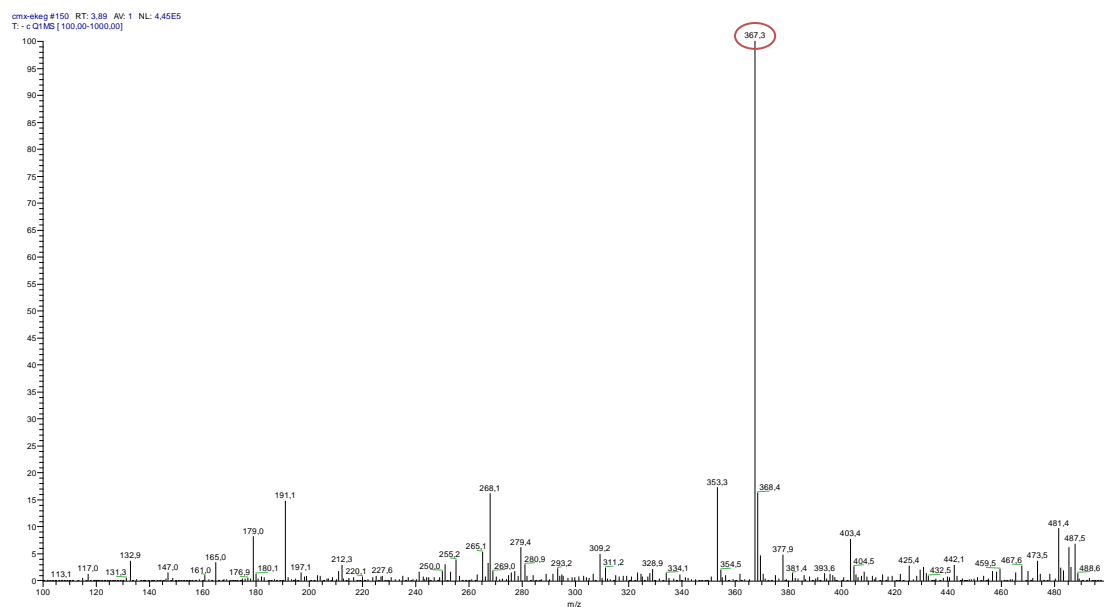
Full mass, (185-1500 m/z). $[M-H]^-$: m/z 461.2 (100), 446.1 (21), 431.2 (20), 282.9 (20), 255.1 (15), MS^2 (461.2 \rightarrow 299.1 (100), 446.1 (60)), MS^3 (446.1 \rightarrow 312.9 (100), 299.0 (100) 282.9 (100)), MS^4 (299.0 \rightarrow 284.1 (100), 255.1 (100), 243.3 (60), 187 (30)). Mass range: 185-600 m/z .

Φάσμα μαζών (ESI-MS, αρνητικός ιονισμός) μεταβολίτη **79**, Χλωρογενικό οξύ



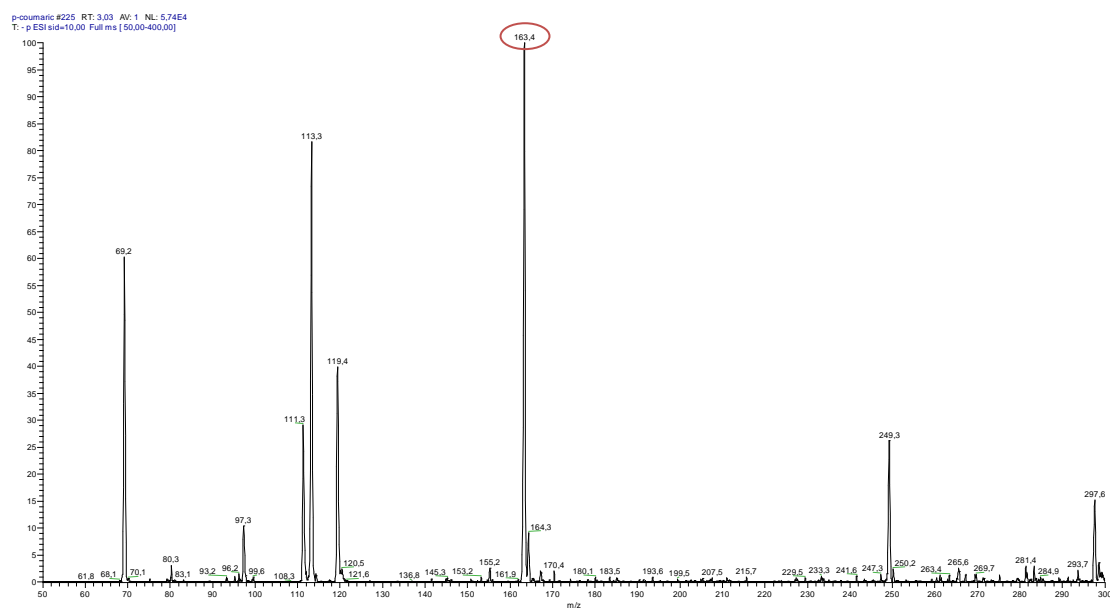
Full mass, (145-1000 m/z). $[M-H]^-$: m/z 353.4 (100), 191.5 (17), 285.6 (14), 161.5 (12), 179.4 (9), MS^2 (353.4 \rightarrow 191.5 (72), 285.6 (65)). Mass range: 145-600 m/z .

Φάσμα μαζών (ESI-MS, αρνητικός ιονισμός) μεταβολίτη **108**, Μεθυλεστέρας του χλωρογενικού οξέος



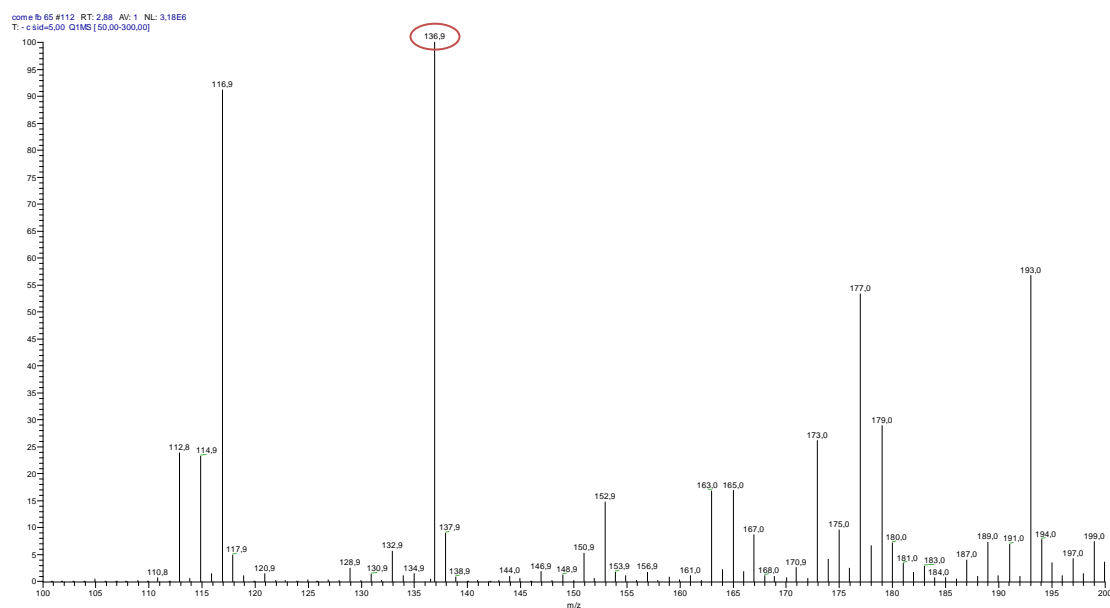
Full mass, (100-1000 m/z). $[M-H]^-$: m/z 367.3 (100), 268.1 (15), 191.1 (15), MS^2 (367.3 \rightarrow 179.1 (100), 132.9 (55), 161.0 (35), 116.9 (30)). Mass range: 100-500 m/z .

Φάσμα μαζών (ESI-MS, αρνητικός ιονισμός) μεταβολίτη **88**, p-Κουμαρικό οξύ



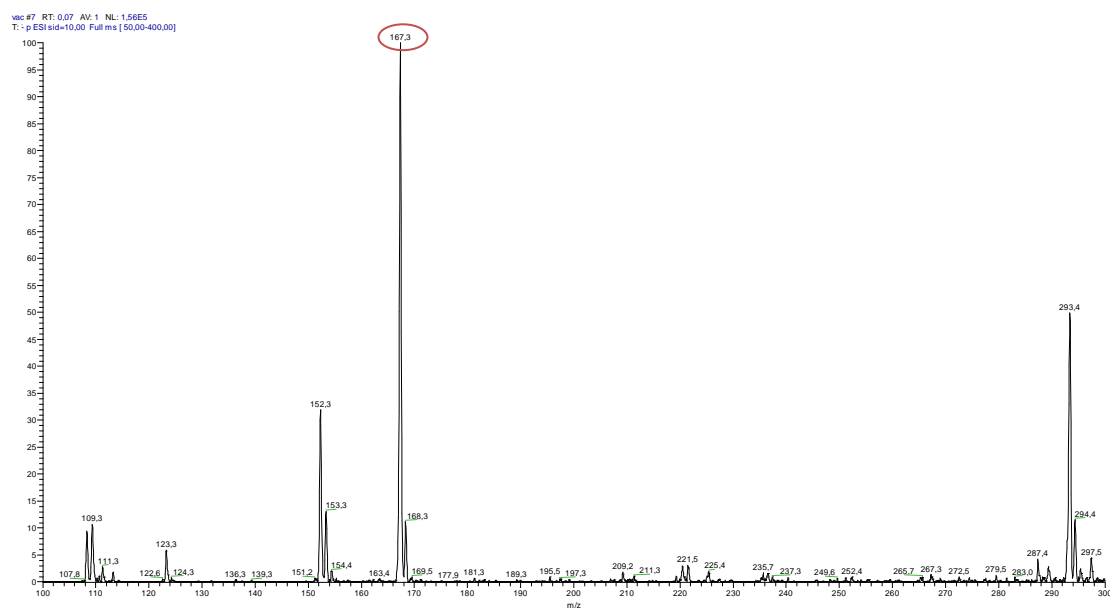
Full mass, (50-400 m/z). $[M-H]^-$: m/z 163.4 (100), 113.3 (85), 69.2 (60), 119.4 (40), 111.3 (29), MS^2 (163.4 \rightarrow 119.4 (100)). Mass range: 50-300 m/z .

Φάσμα μαζών (ESI-MS, αρνητικός ιονισμός) μεταβολίτη **76**, p-Υδροξύ Βενζοϊκό οξύ



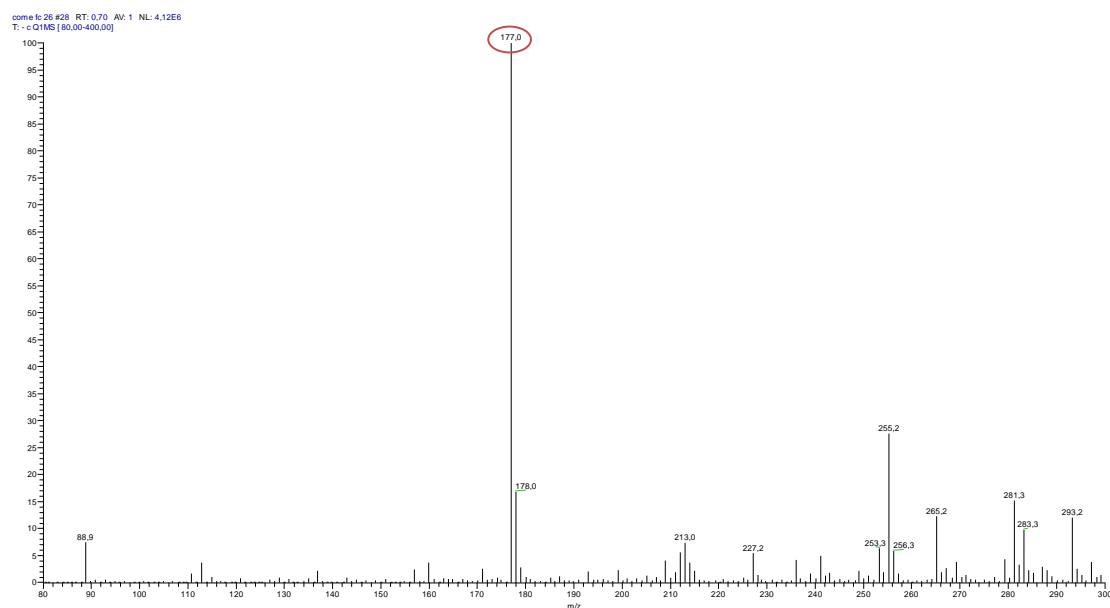
Full mass, (50-300 m/z). $[M-H]^-$: m/z 136.9 (100), MS^2 (136.9 \rightarrow 93.3 (100), 65.1 (10)). Mass range: 100-200 m/z .

Φάσμα μαζών (ESI-MS, αρνητικός ιονισμός) μεταβολίτη **86**, Βανιλικό οξύ



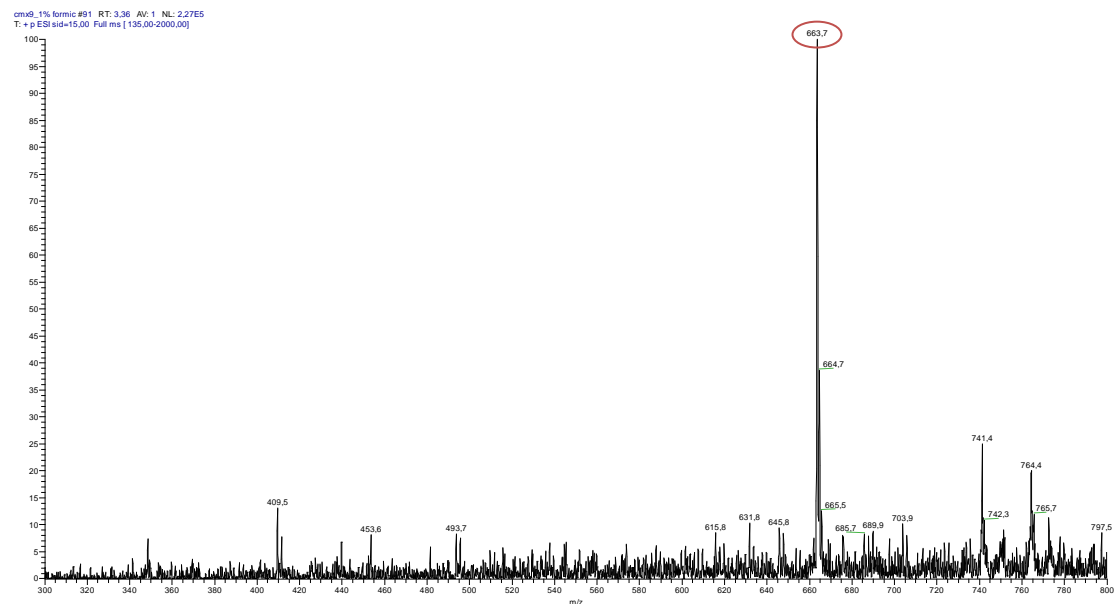
Full mass, (50-400 m/z). $[M-H]^-$: m/z 167.3 (100), 152.3 (32), 109.3 (11), MS^2 (152.3 \rightarrow 123.3 (100), 152.3 (35)). Mass range: 100-300 m/z .

Φάσμα μαζών (ESI-MS, αρνητικός ιονισμός) μεταβολίτη **106**, 5,7-Διυδροξυχρωμόνη



Full mass, (80-400 m/z). $[M-H]^-$: m/z 177.0, MS^2 (177.0 \rightarrow 91.0 (100), 133 (80), 63 (72)). Mass range: 80-300 m/z .

Φάσμα μαζών (ESI-MS) μεταβολίτη **107**, Εικοσι-1-ένιο

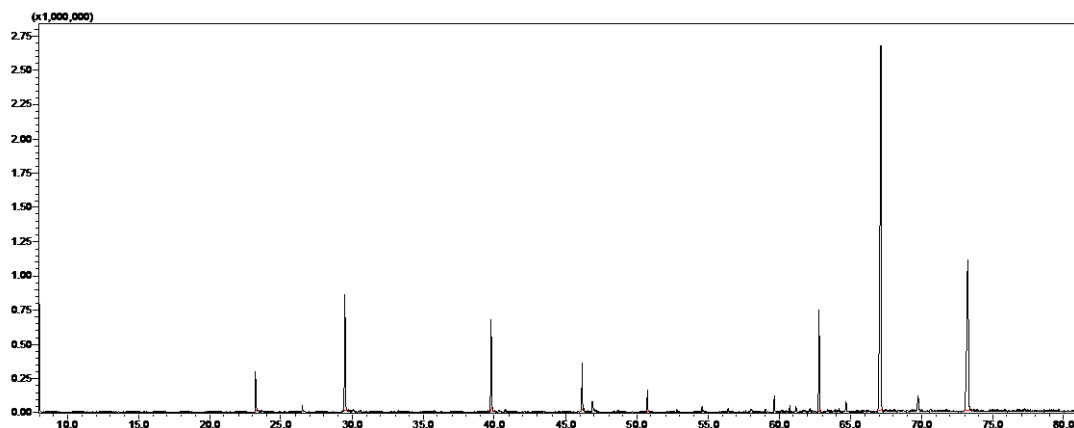


Full mass, (135-2000 m/z). $[2M+\text{formic acid}]^+$: m/z 663.7 (100), 551.3 (20), 409.5 (14). Mass range: 300-800 m/z .

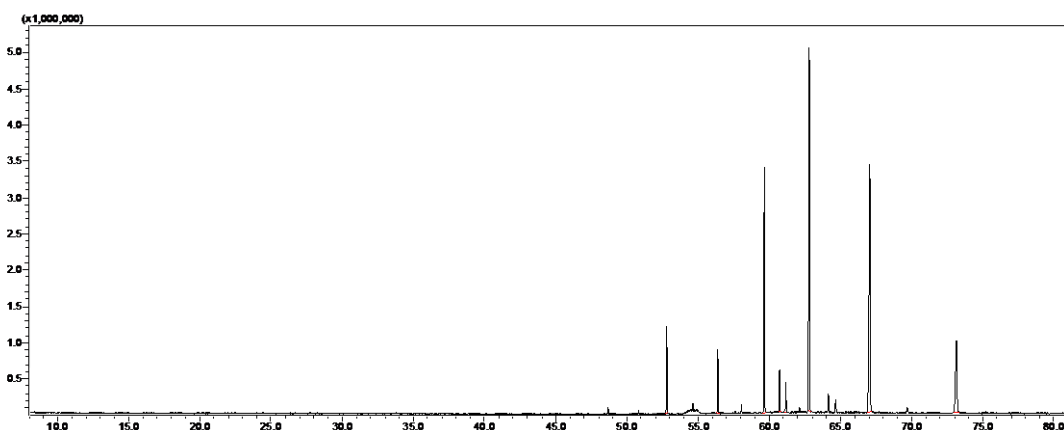
4.8. Παράρτημα Χρωματογραφημάτων (GC-MS)

Παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα των πτητικών συστατικών από τα τρία κλάσματα.

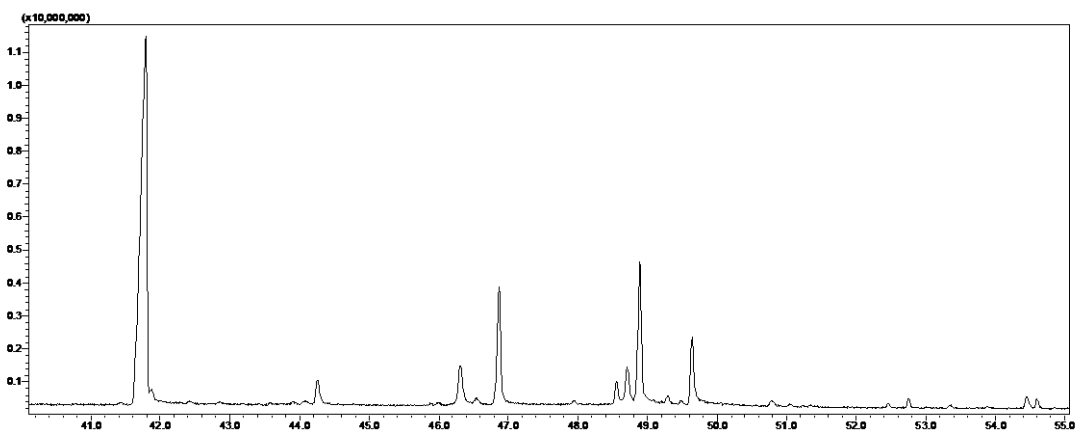
GC-MS του κλάσματος PER-A (Ριζικό σύστημα φυτού)



GC-MS του κλάσματος PEF-A (Άνθη φυτού)



GC-MS του κλάσματος PEF-L (Άνθη φυτού)

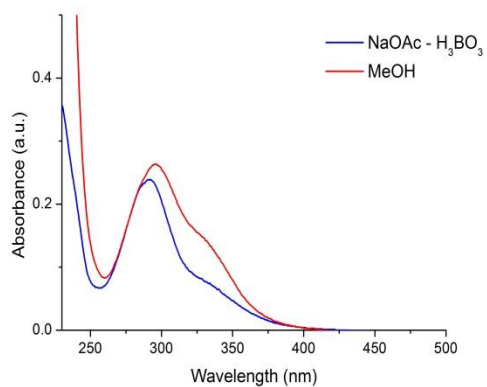
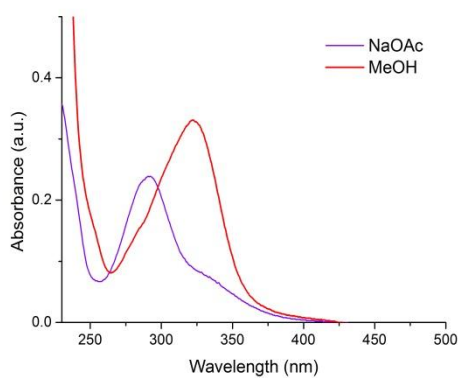
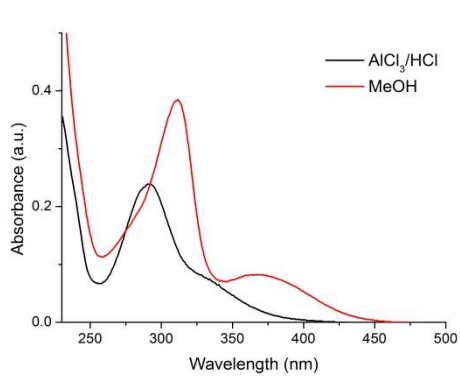
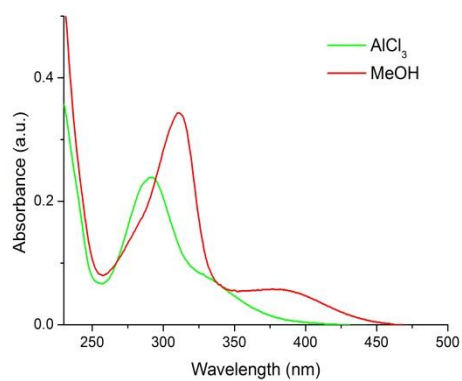
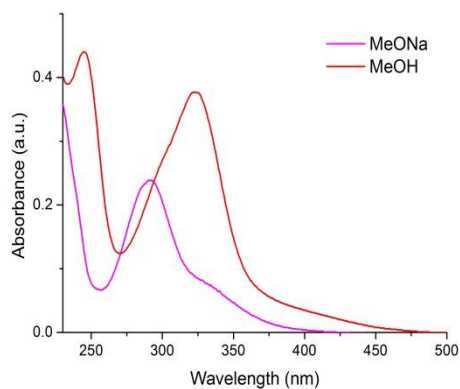
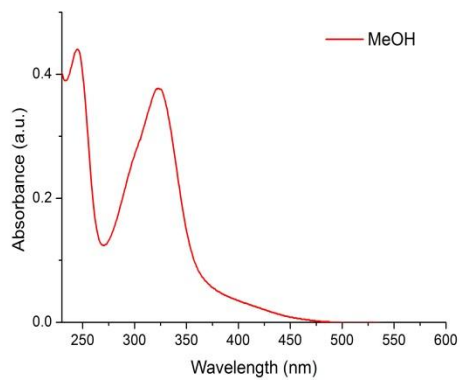
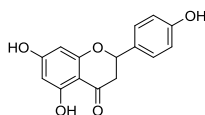


4.9. Παράρτημα Φασμάτων (UV-vis)

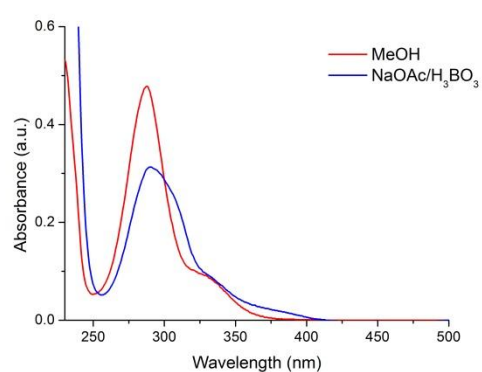
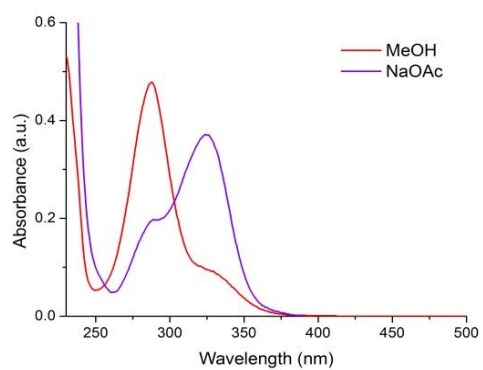
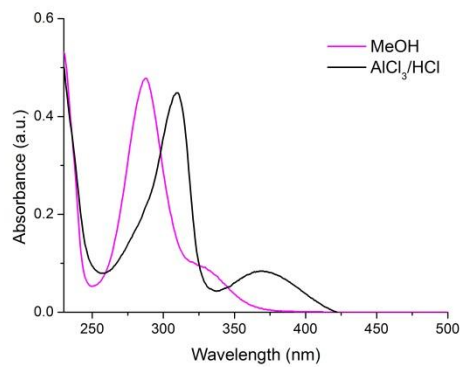
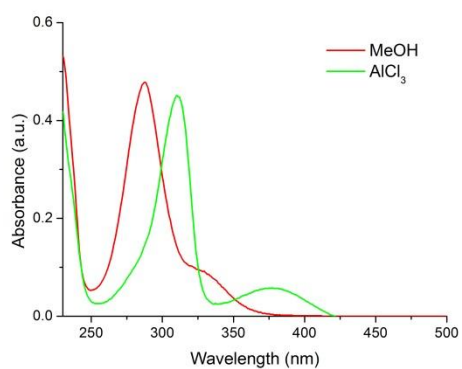
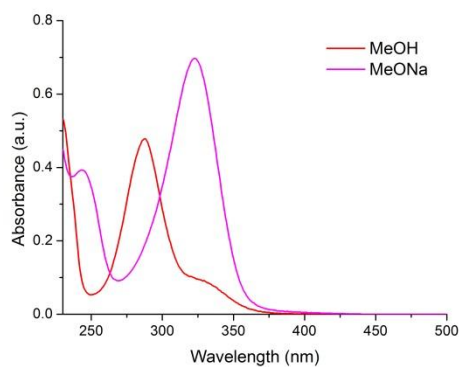
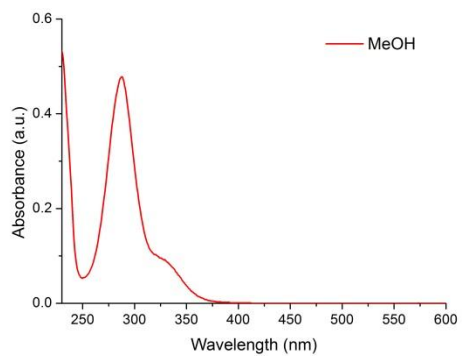
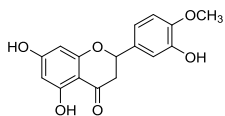
Τα φάσματα υπεριώδους ορατού λήφθηκαν για την κατηγορία των φλαβονοειδών και παραθέτονται με την σειρά που αναφέρθηκαν στο Κεφάλαιο 2. Στο παράρτημα παρουσιάζονται τα αντιπροσωπευτικά φάσματα των μεταβολιτών.

Για κάθε φάσμα UV-vis φαίνεται το διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε και η απορρόφηση του σε σύγκριση με τον διαλύτη της MeOH.

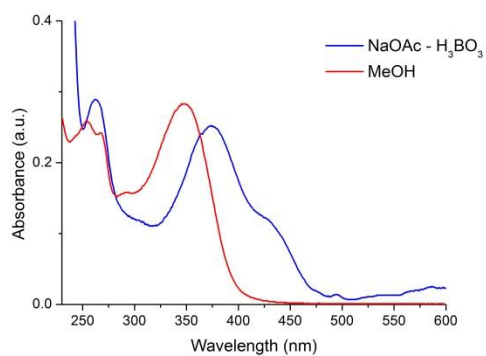
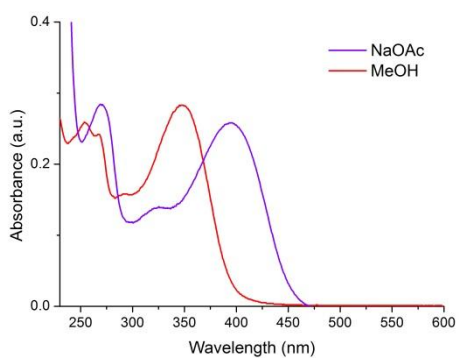
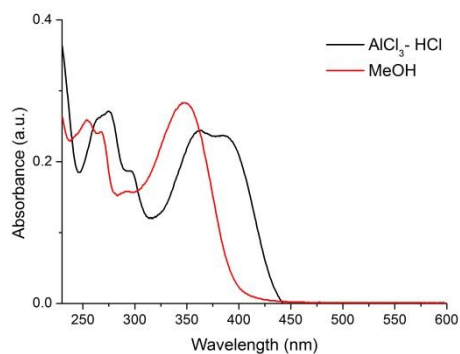
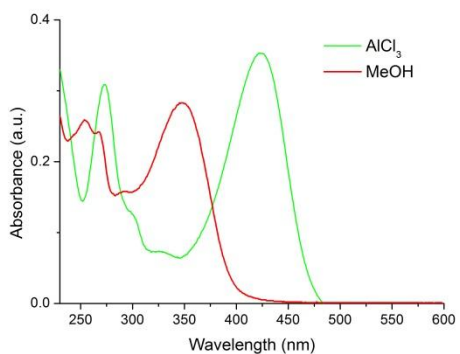
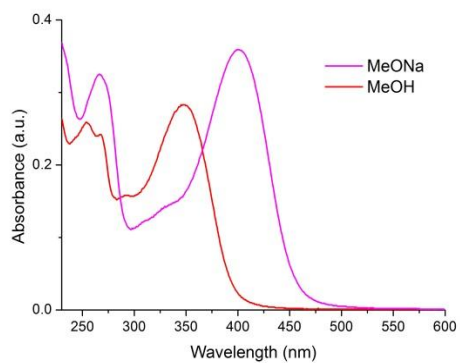
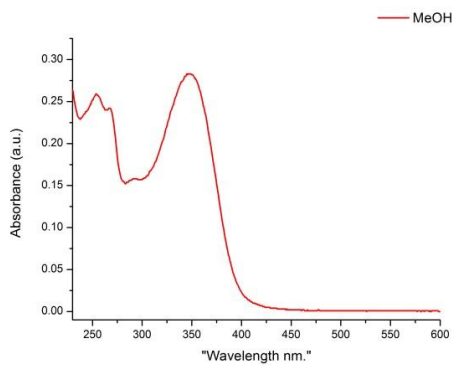
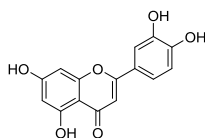
Μεταβολίτης: Ναριγγενίνη (63b)



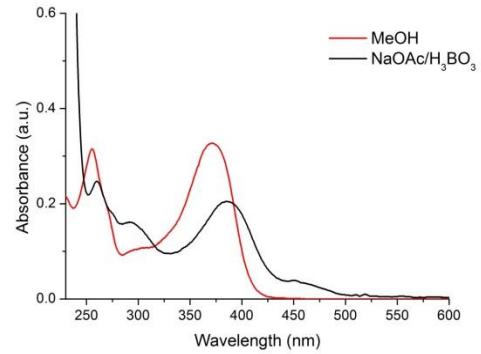
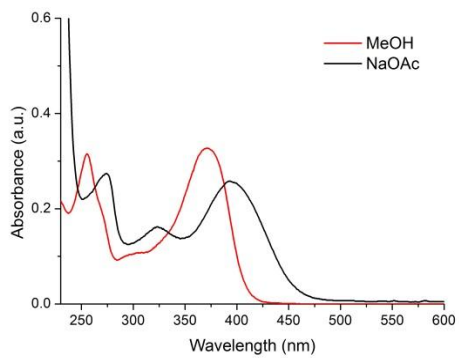
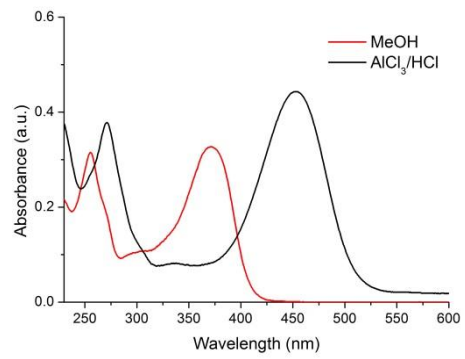
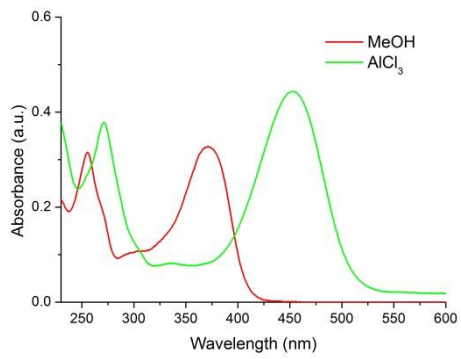
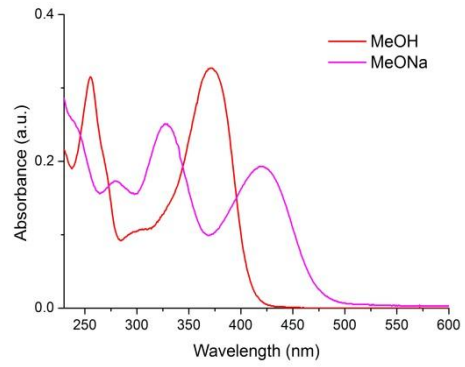
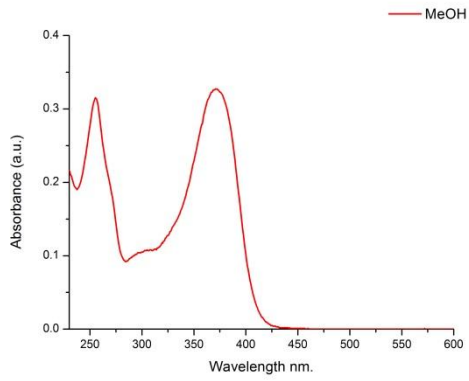
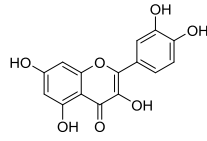
Μεταβολίτης: Εσπερετίνη (63b)



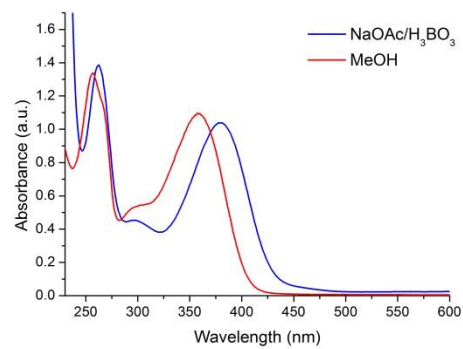
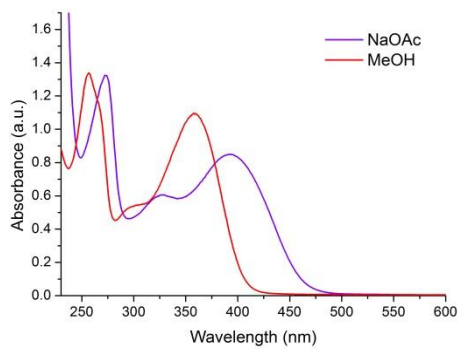
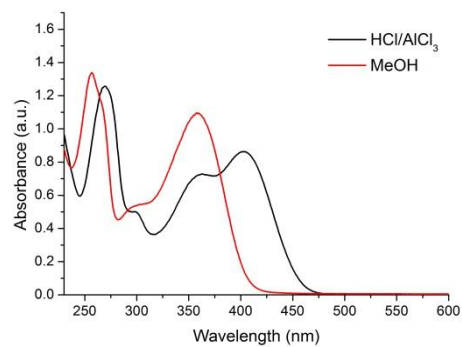
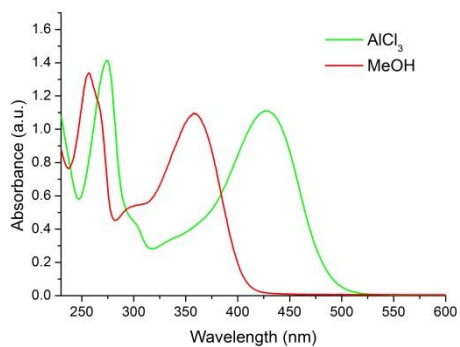
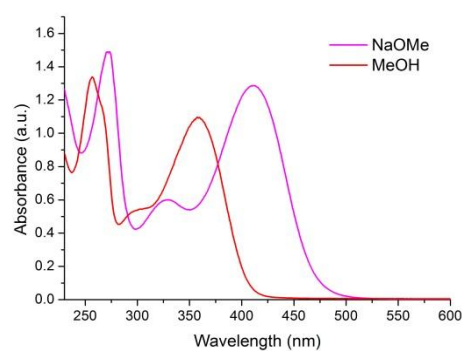
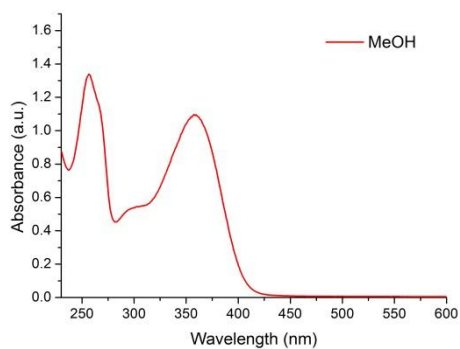
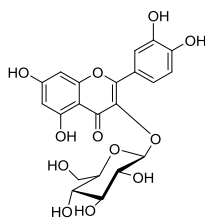
Μεταβολίτης: Λουτεολίνη (58a)



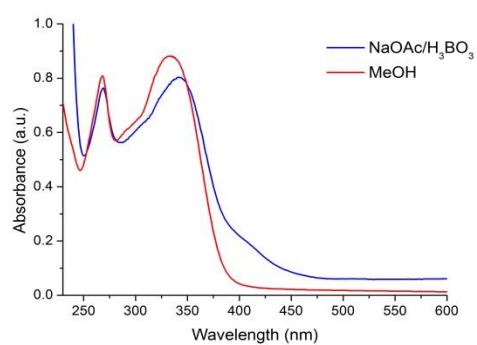
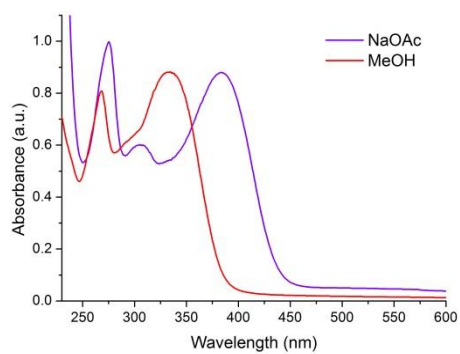
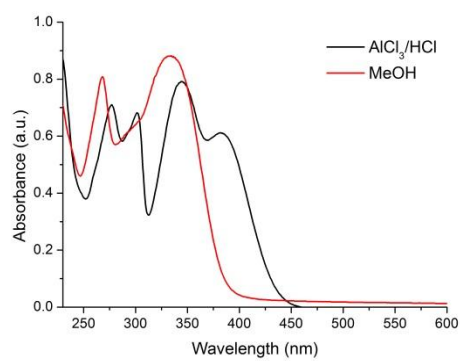
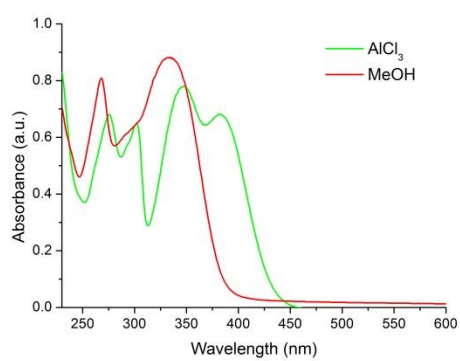
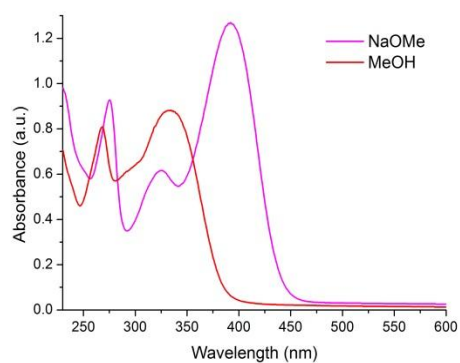
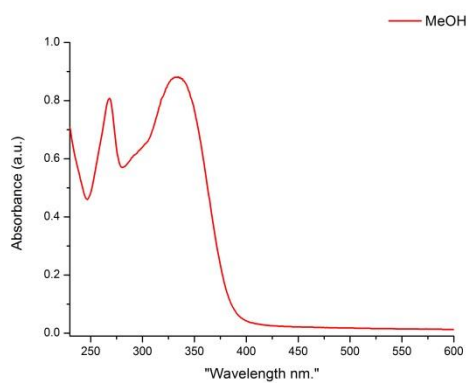
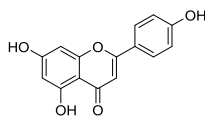
Μεταβολίτης: Κερκετίνη (60c)



Μεταβολίτης: Κερκετινο-3-*O*-β-D-γλυκοζίτη (60b)



Μεταβολίτης: Απιγενίνη (62a)

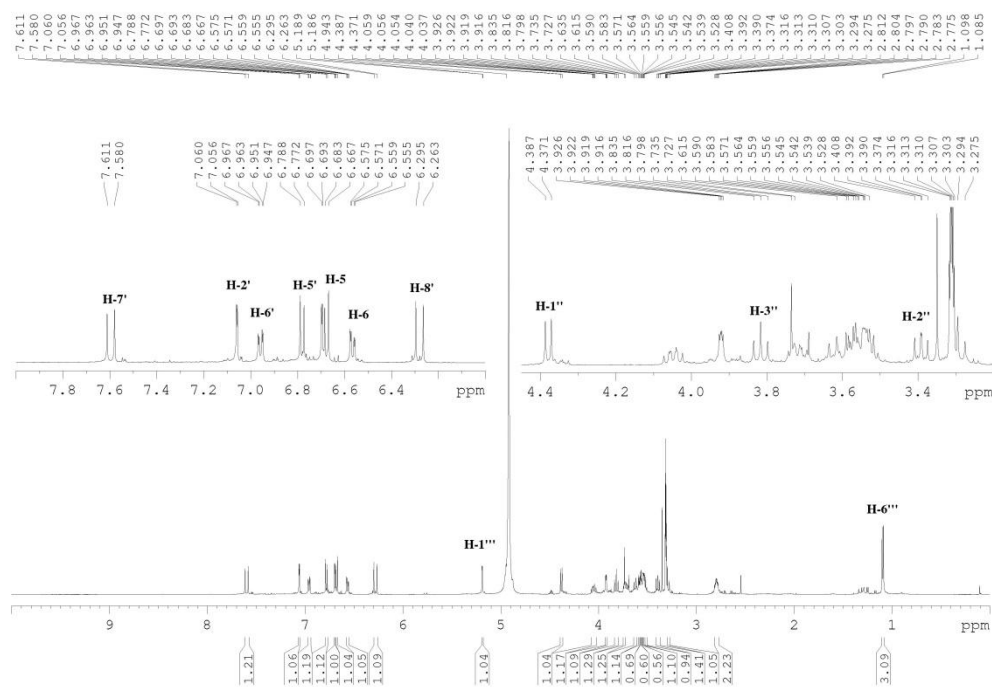
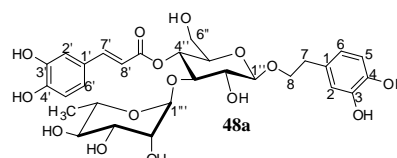


4.10. Παράρτημα Φασμάτων (NMR 1D & 2D)

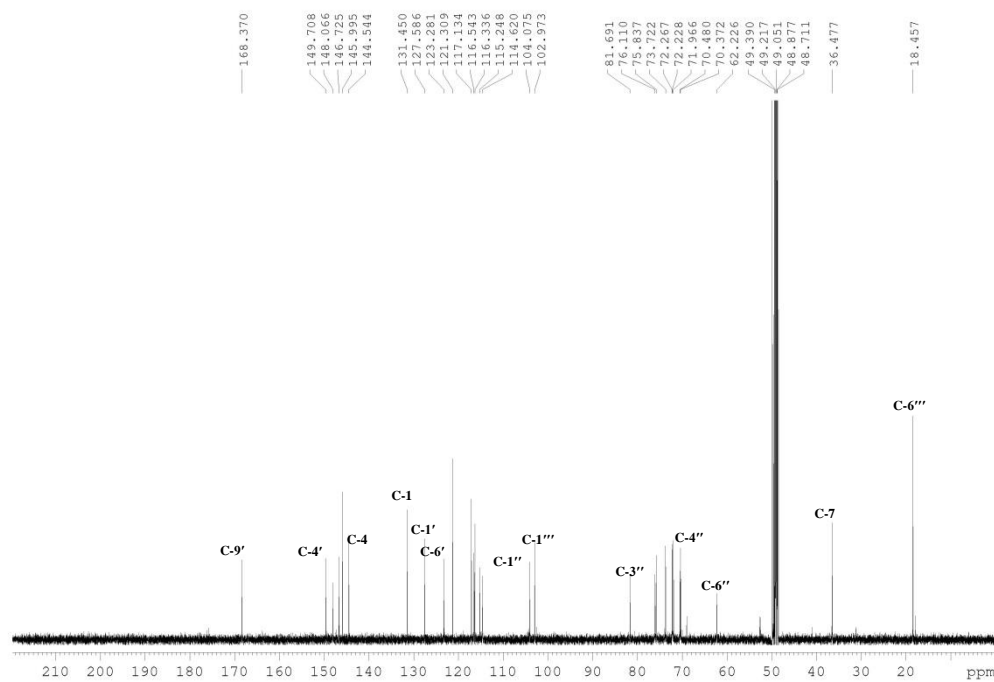
Τα φάσματα NMR παραθέτονται με την σειρά που αναφέρθηκαν στο Κεφάλαιο 2.

Φάσματα μεταβολίτη: Βερμπασκοσίδης

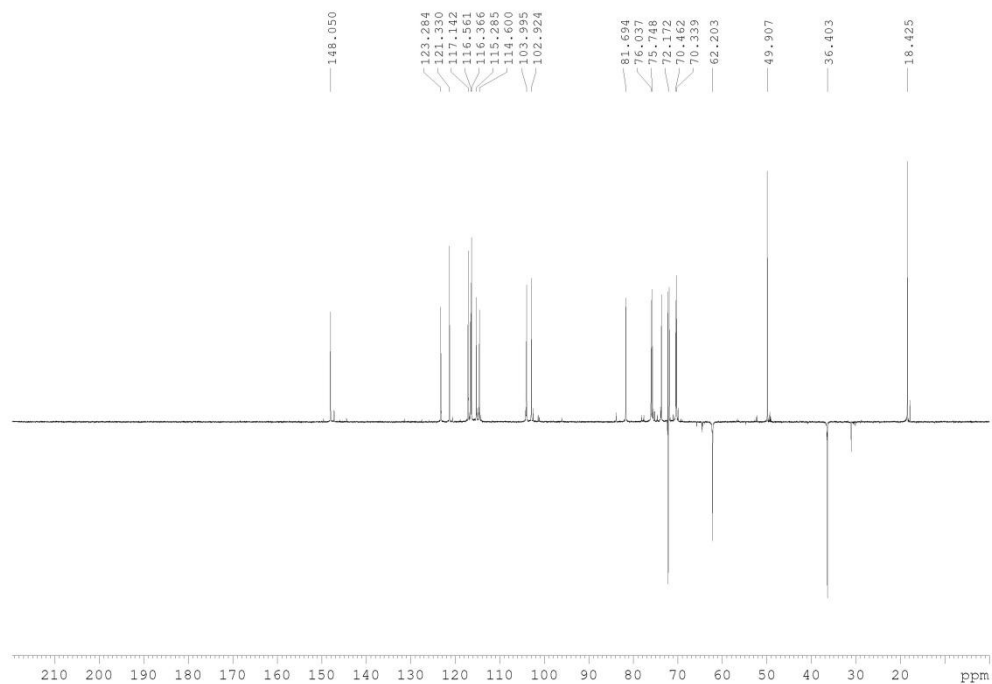
¹H NMR, 48a, (500 MHz, CD₃OD)



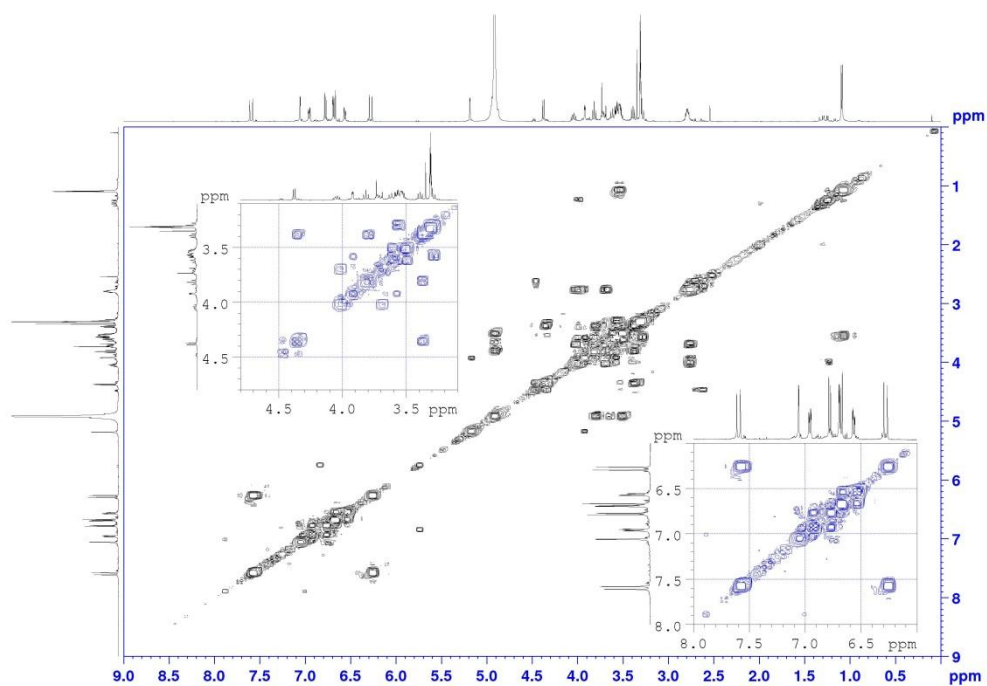
¹³C NMR, 48a, (500 MHz, CD₃OD)



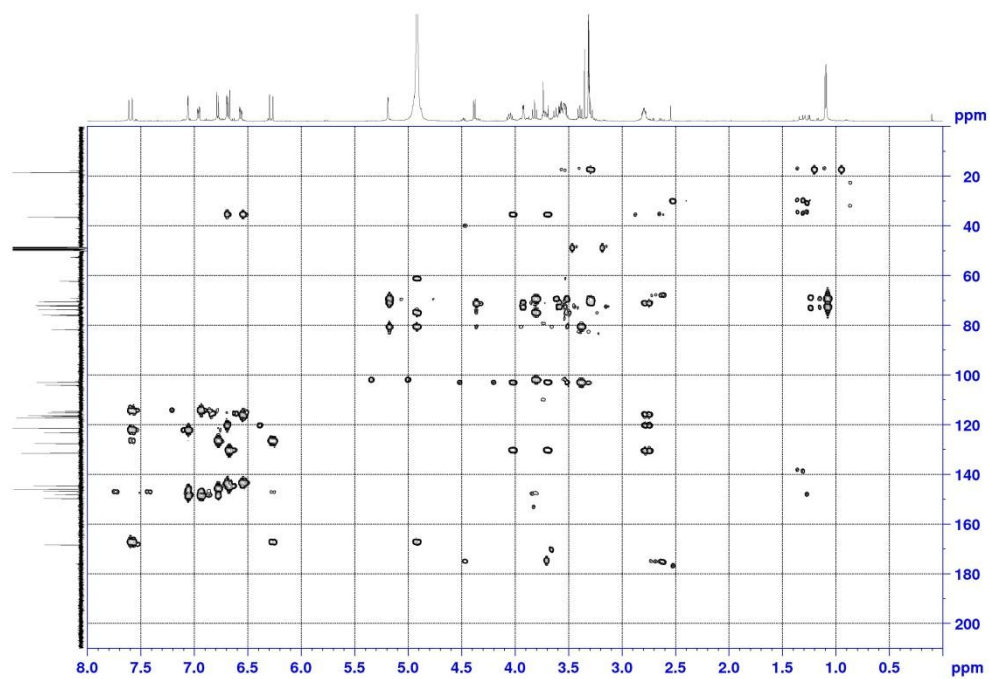
DEPT 135-NMR, **48a**, (500 MHz, CD₃OD)



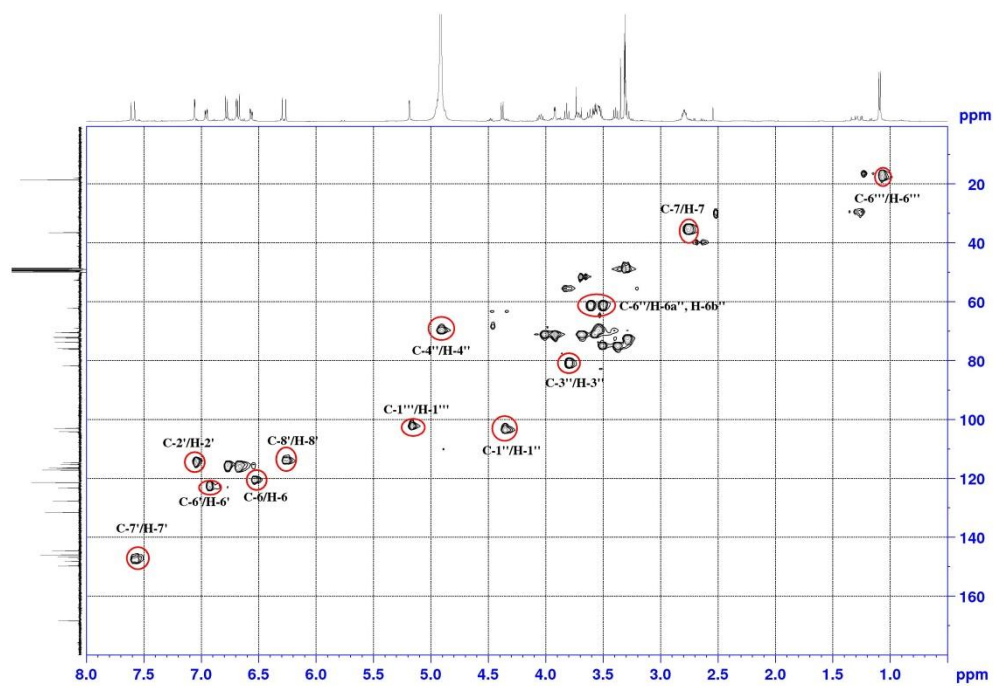
COSY-NMR, **48a**, (500 MHz, CD₃OD)



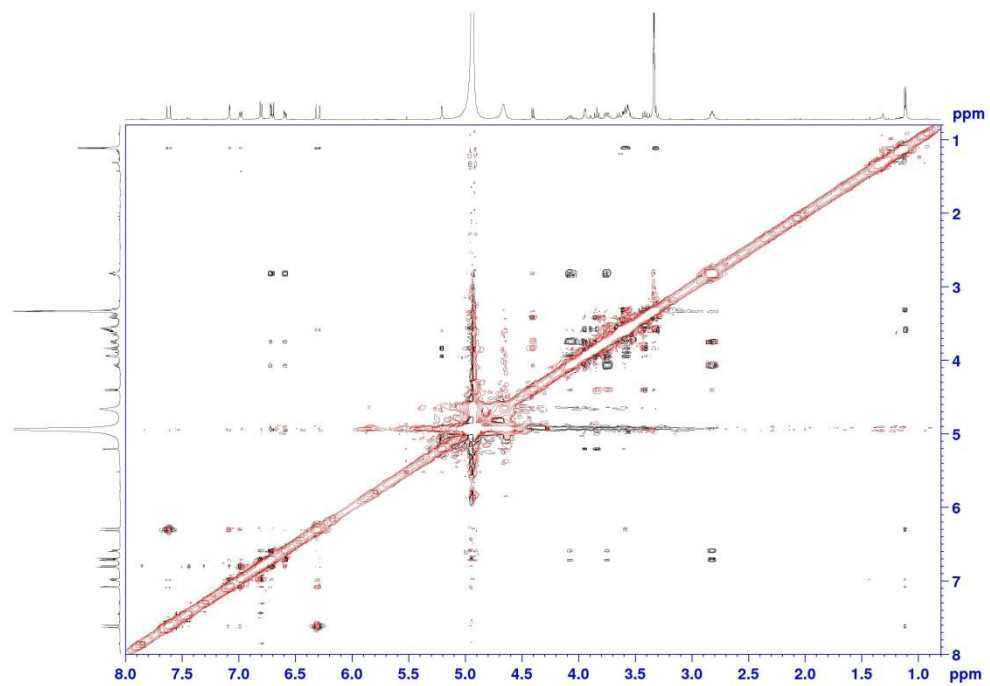
HMBC-NMR, **48a**, (500 MHz, CD₃OD)



HSQC-NMR, **48a**, (500 MHz, CD₃OD)

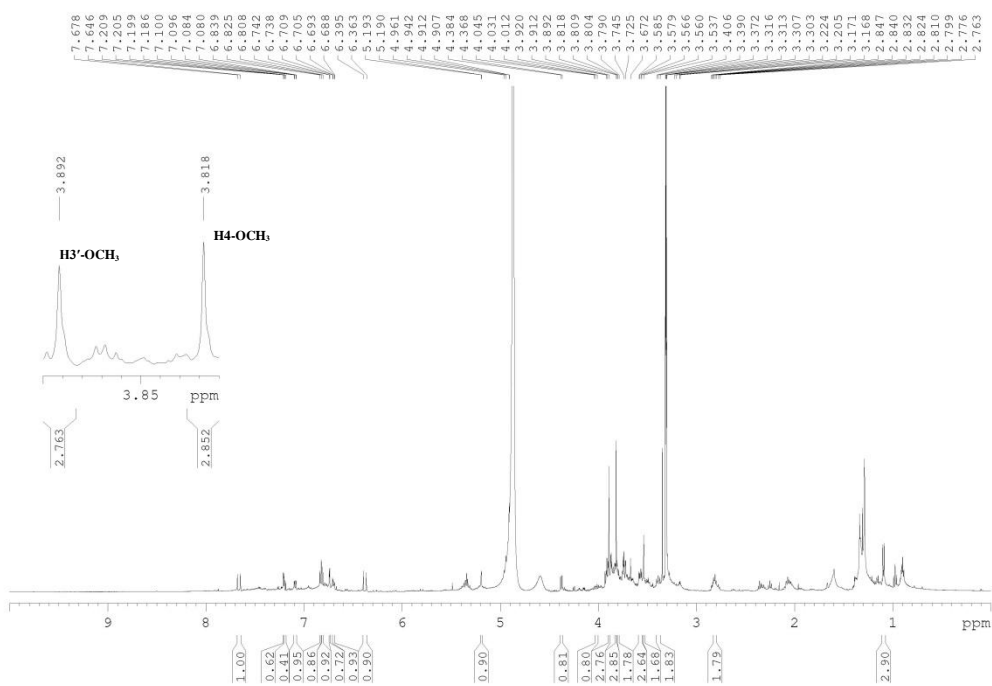
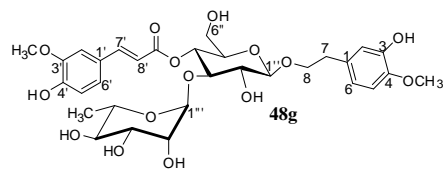


NOESY-NMR, **48a**, (500 MHz, CD₃OD)

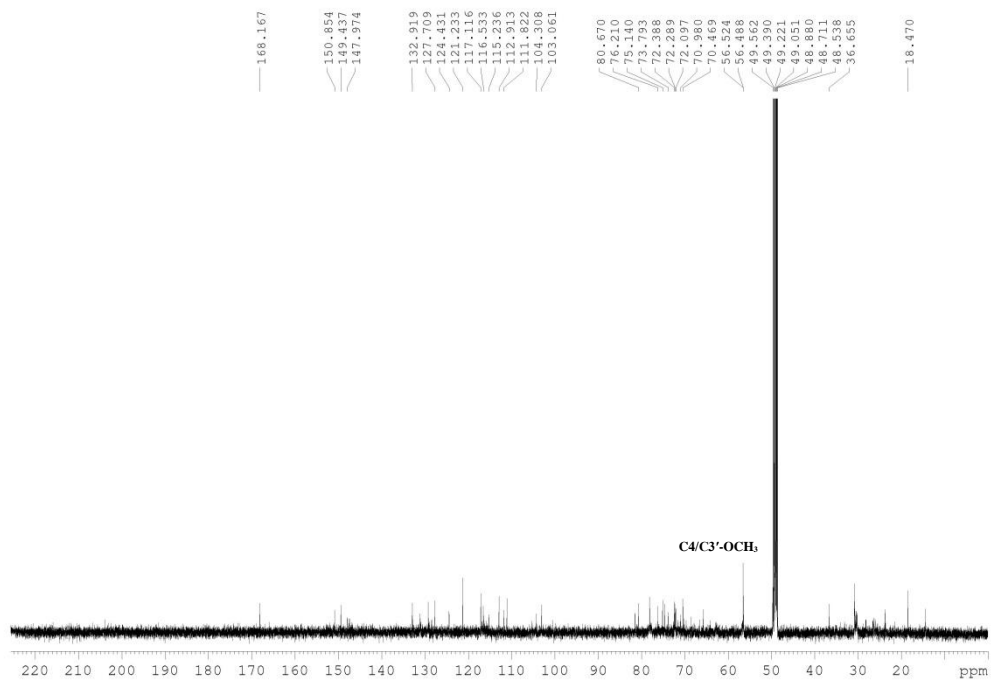


Φάσματα μεταβολίτη: **Μαρτυνοσίδης**

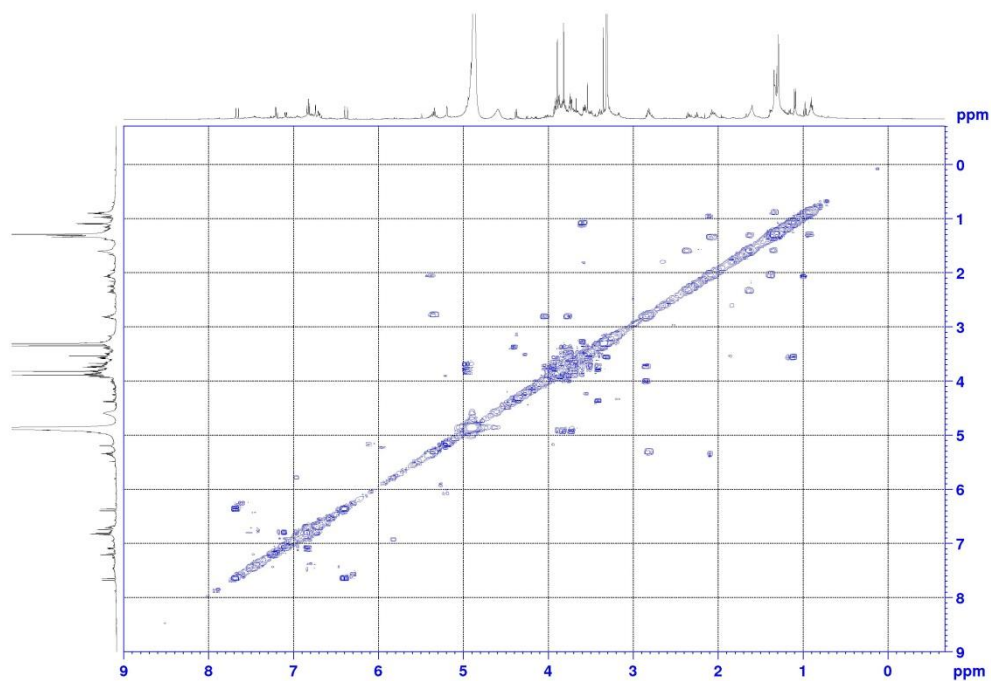
^1H NMR, **48g**, (500 MHz, CD_3OD)



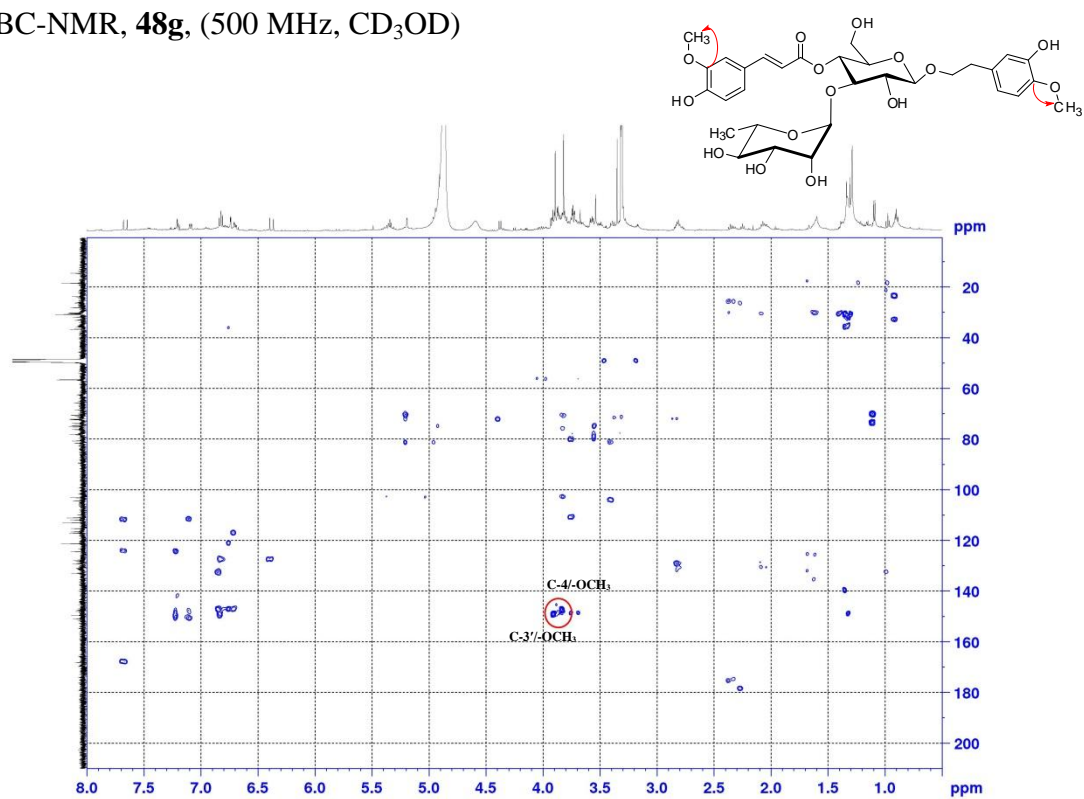
^{13}C NMR, **48g**, (500 MHz, CD_3OD)



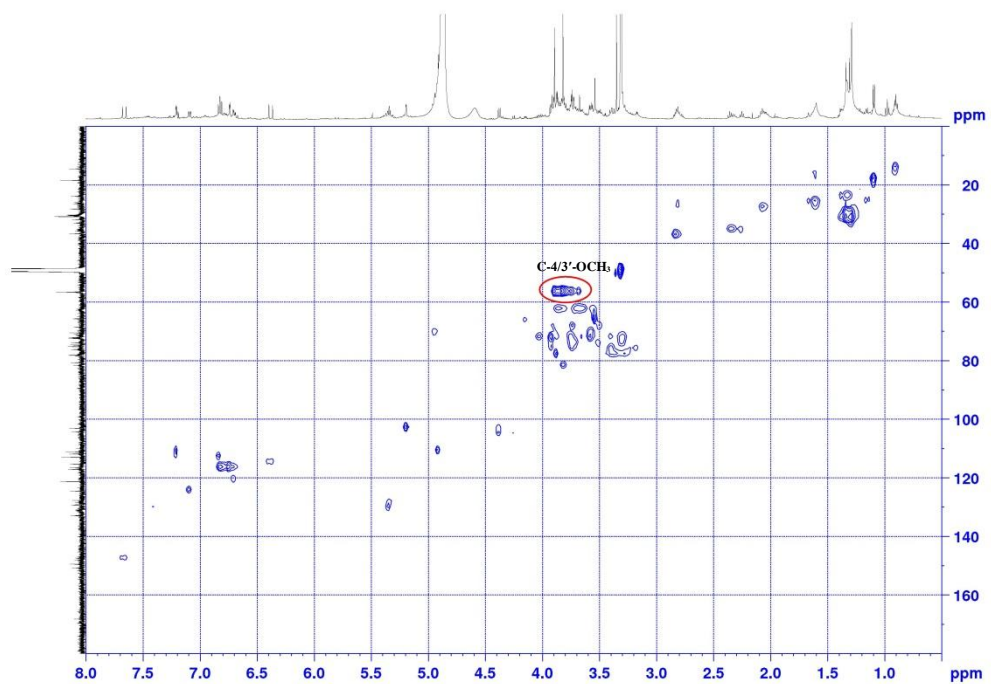
COSY-NMR, **48g**, (500 MHz, CD₃OD)



HMBC-NMR, **48g**, (500 MHz, CD₃OD)

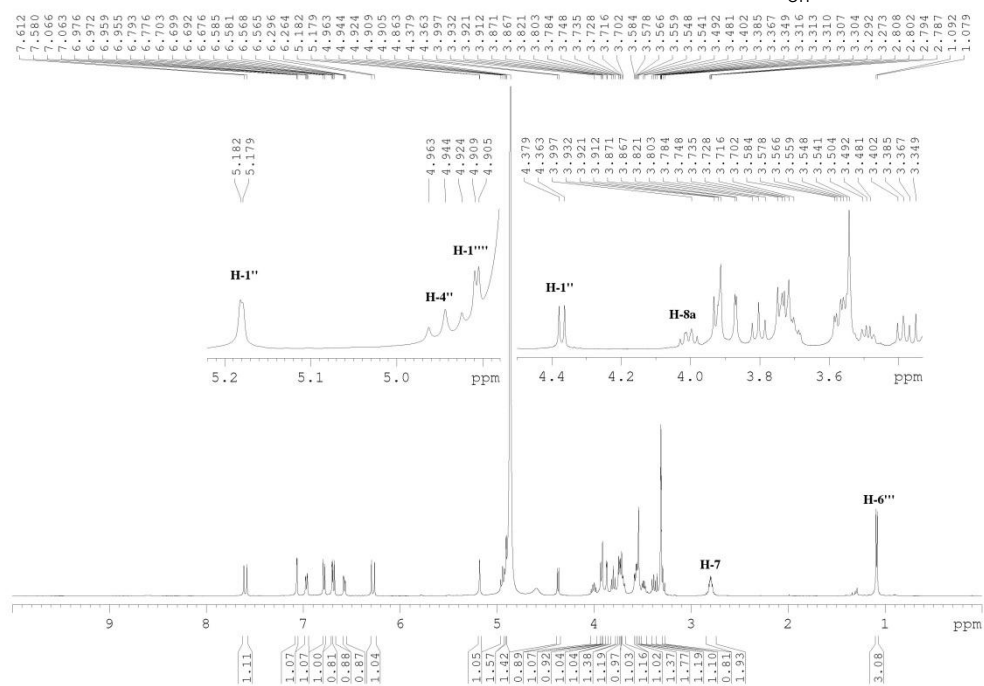
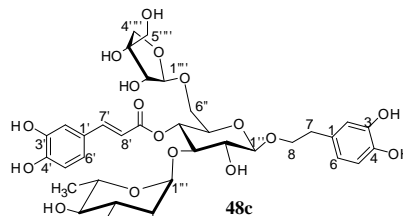


HSQC-NMR, 48g, (500 MHz, CD₃OD)

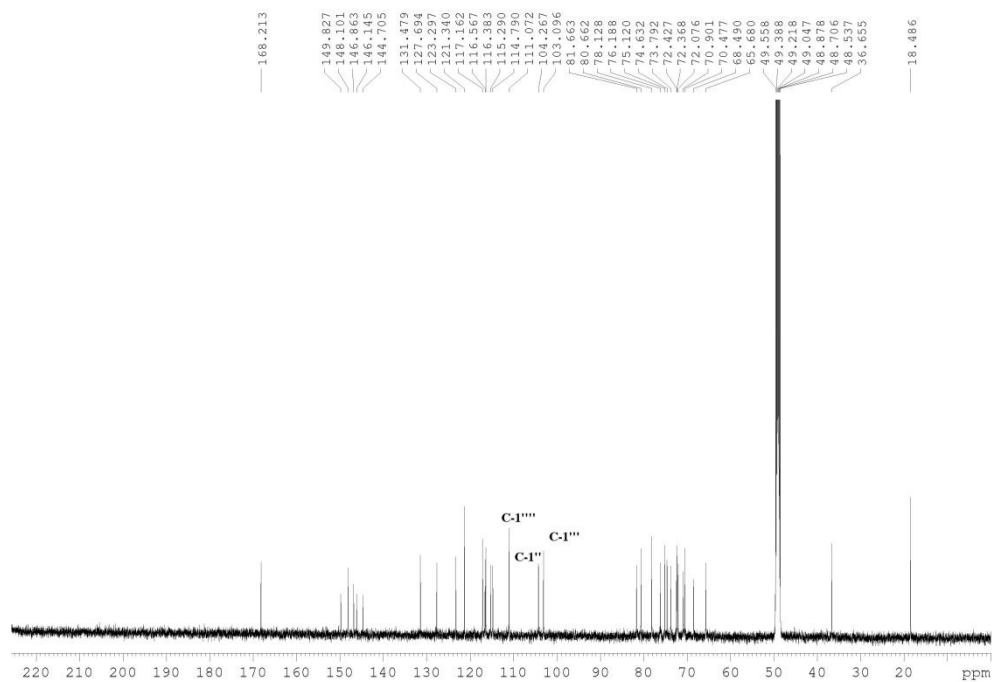


Φάσματα μεταβολίτη: **Φορσυθοσίδης Β**

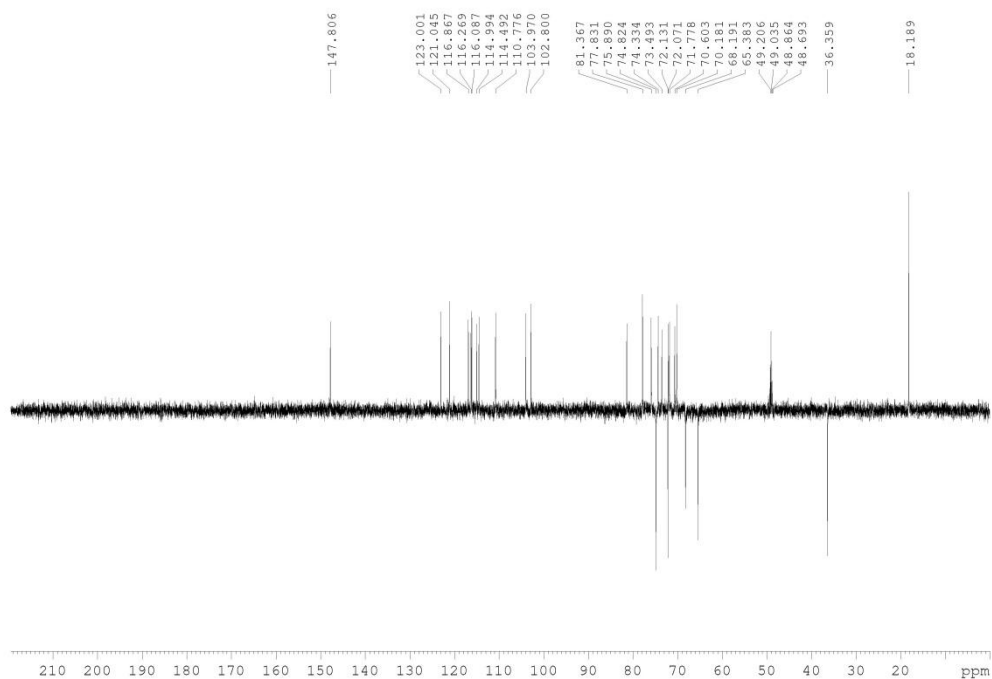
^1H NMR, **48c**, (500 MHz, CD_3OD)



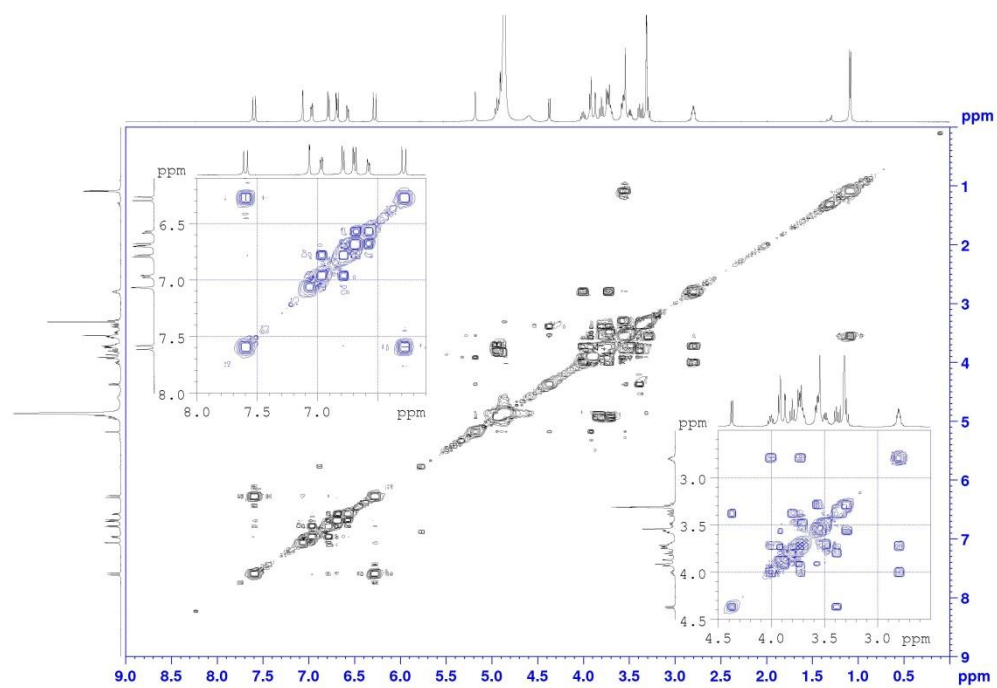
^{13}C NMR, **48c**, (500 MHz, CD_3OD)



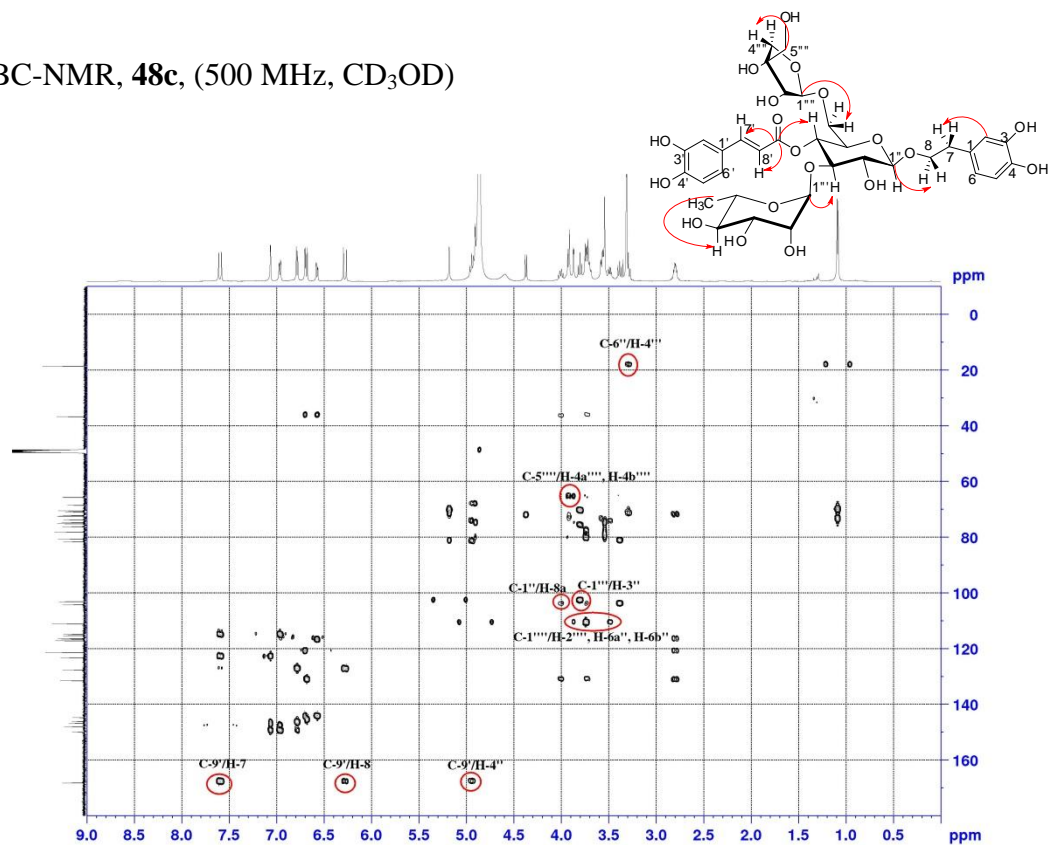
DEPT 135-NMR, **48c**, (500 MHz, CD₃OD)



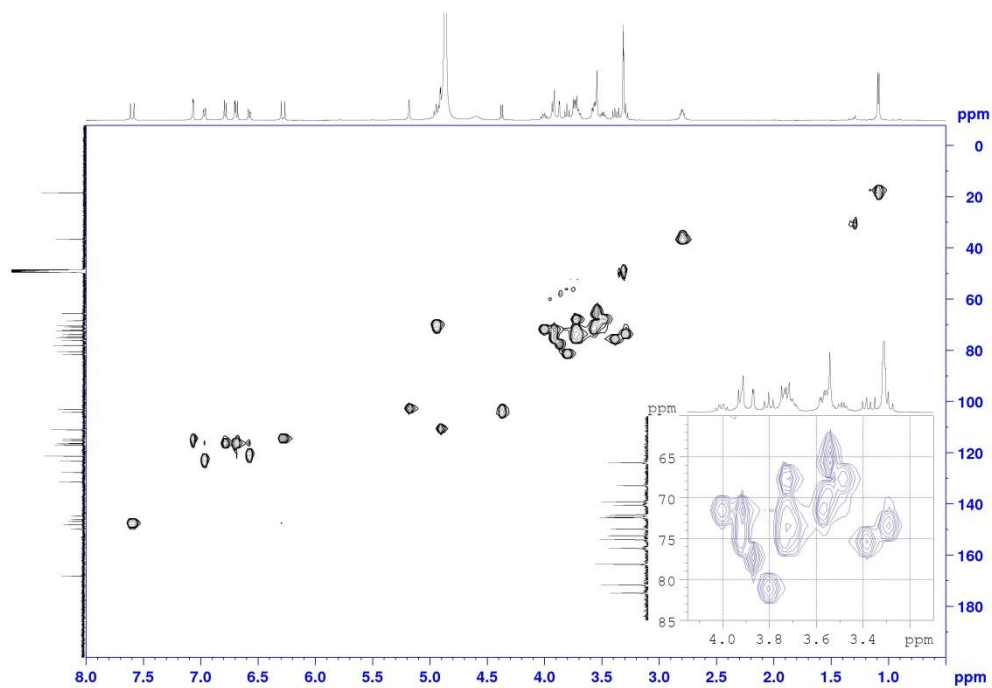
COSY-NMR, **48c**, (500 MHz, CD₃OD)



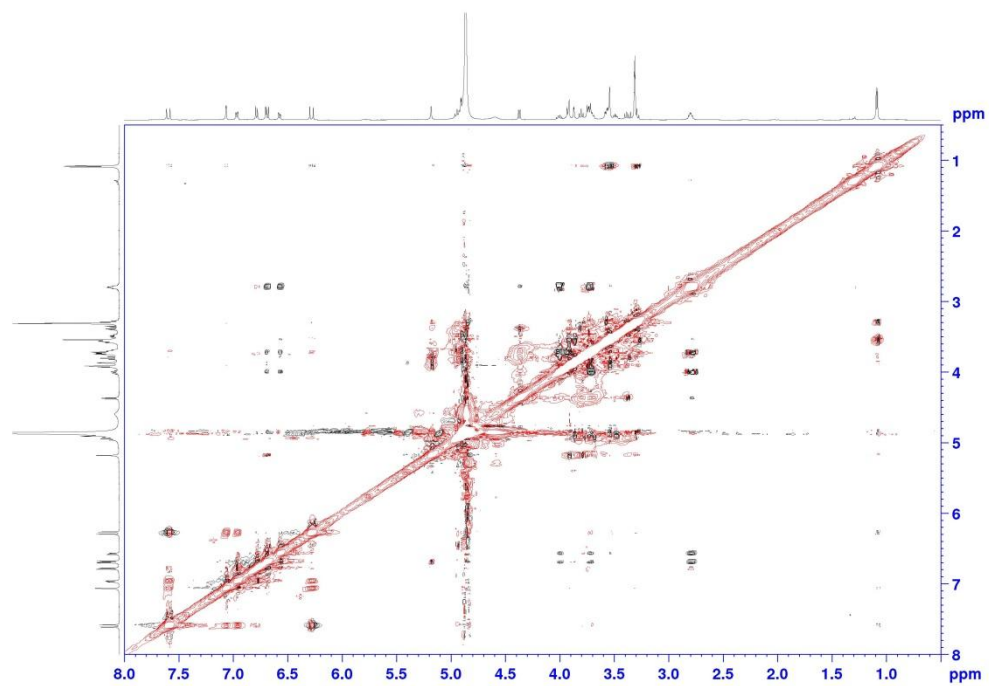
HMBC-NMR, **48c**, (500 MHz, CD₃OD)



HSQC-NMR, **48c**, (500 MHz, CD₃OD)

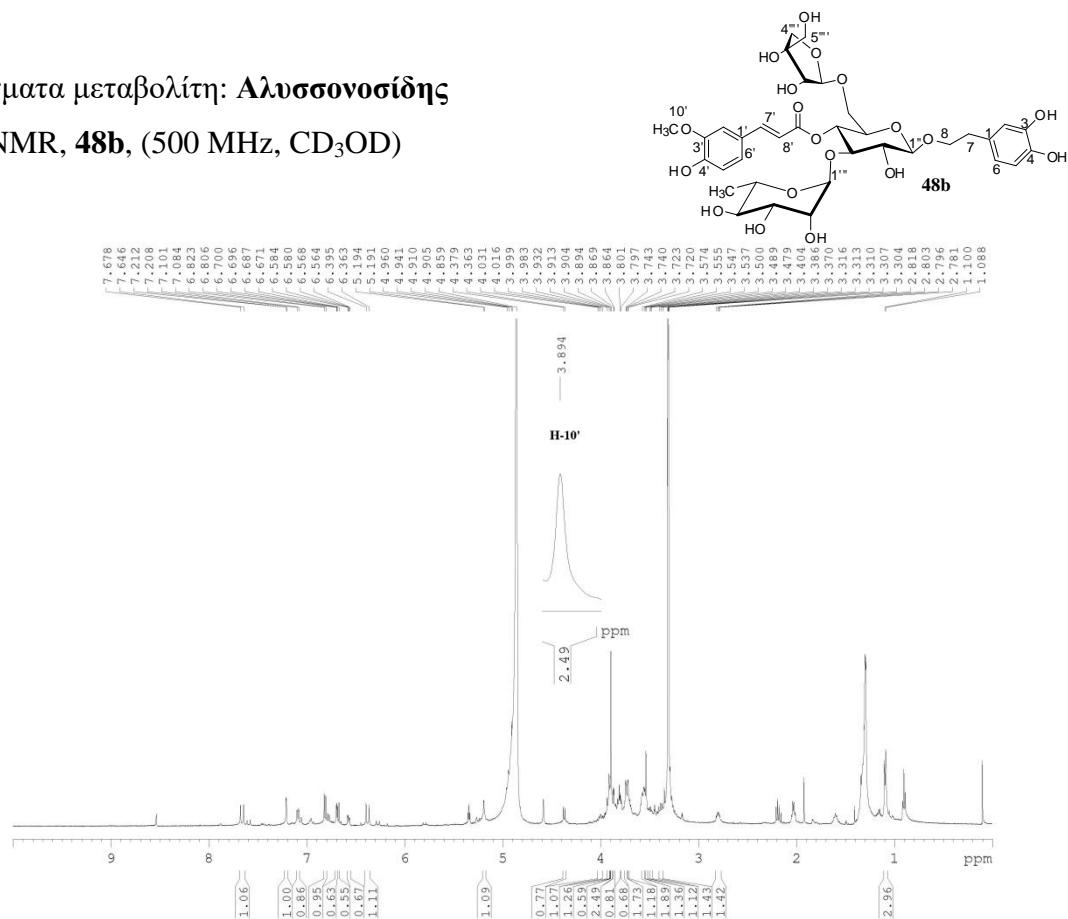


NOESY-NMR, **48c**, (500 MHz, CD₃OD)



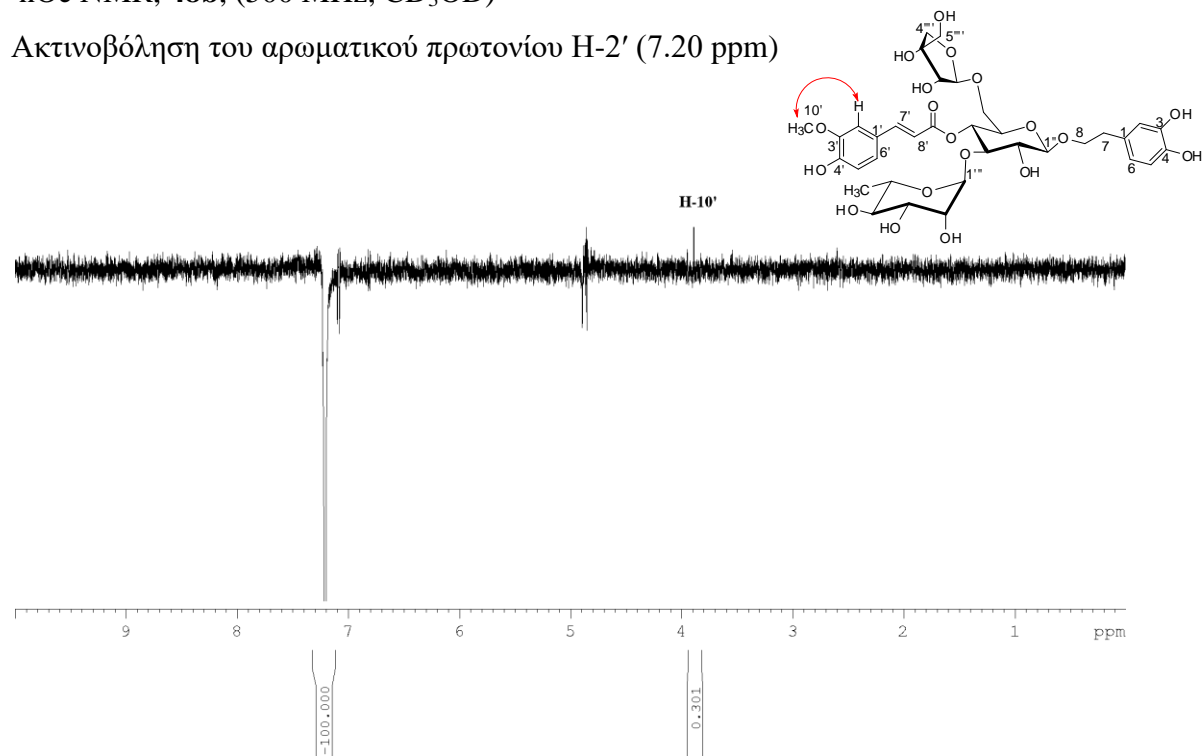
Φάσματα μεταβολίτη: **Αλυσσονοσίδης**

^1H NMR, **48b**, (500 MHz, CD_3OD)

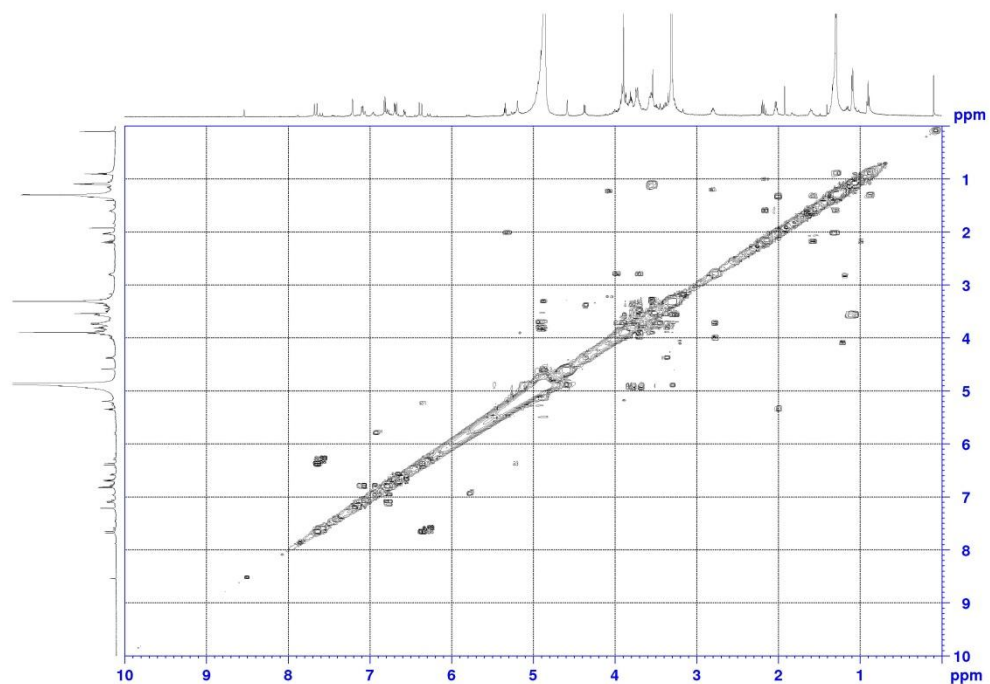


ρOe NMR, **48b**, (500 MHz, CD_3OD)

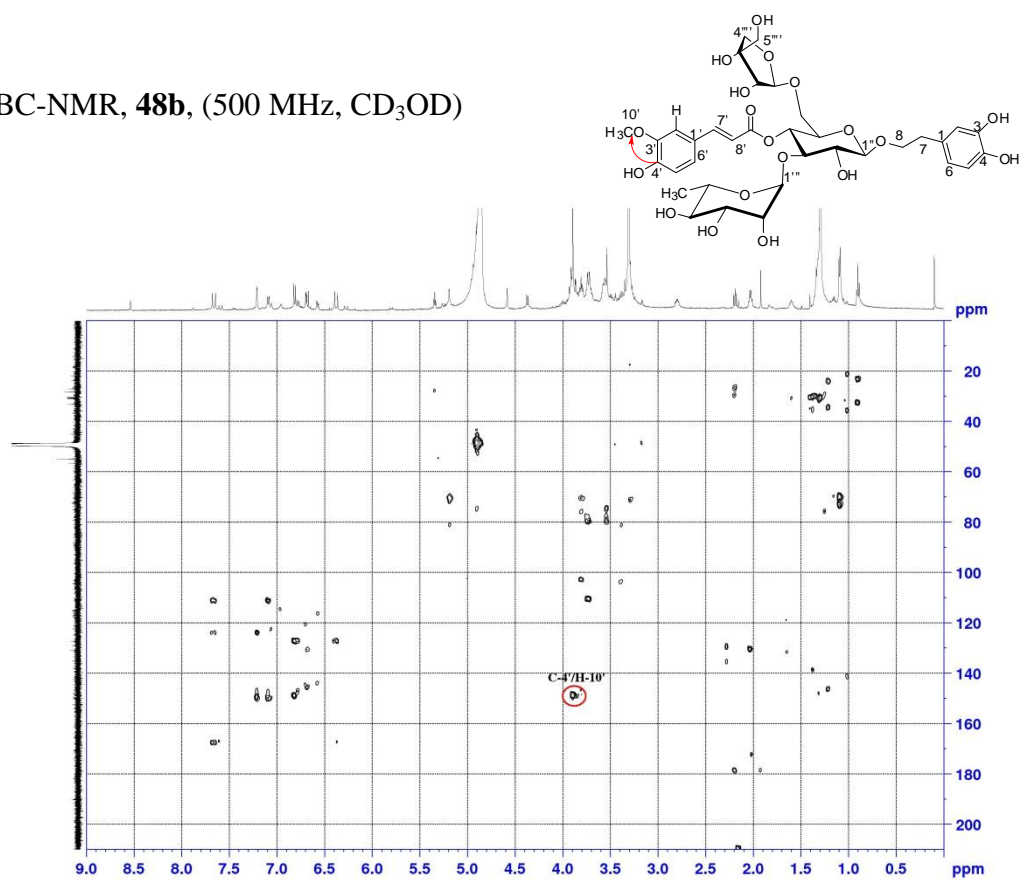
Ακτινοβολήση του αρωματικού πρωτονίου H-2' (7.20 ppm)



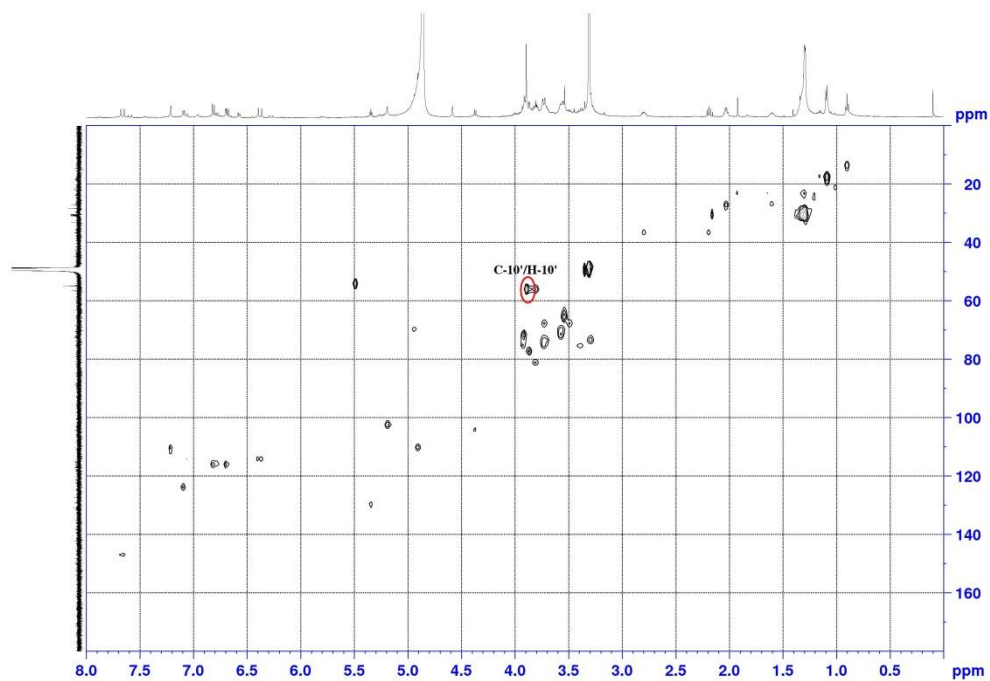
COSY-NMR, **48b**, (500 MHz, CD₃OD)



HMBC-NMR, **48b**, (500 MHz, CD₃OD)

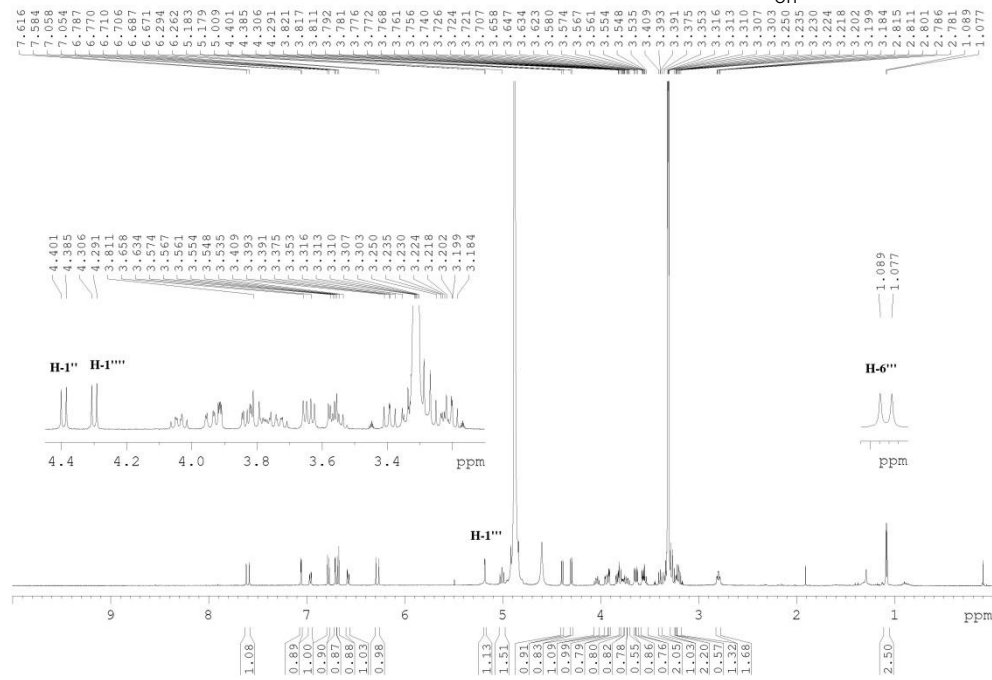
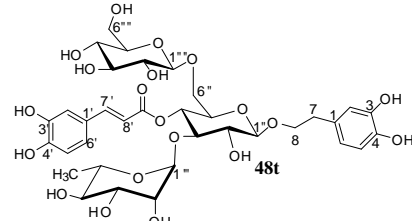


HSQC-NMR, **48b**, (500 MHz, CD₃OD)

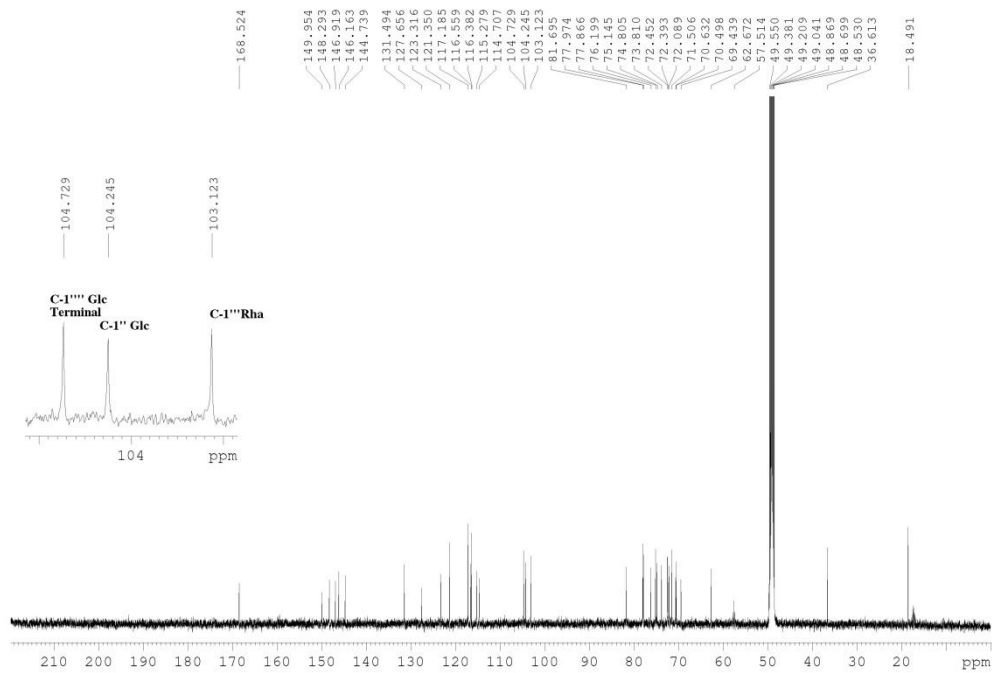


Φάσματα μεταβολίτη: **Εχινικοσίδης**

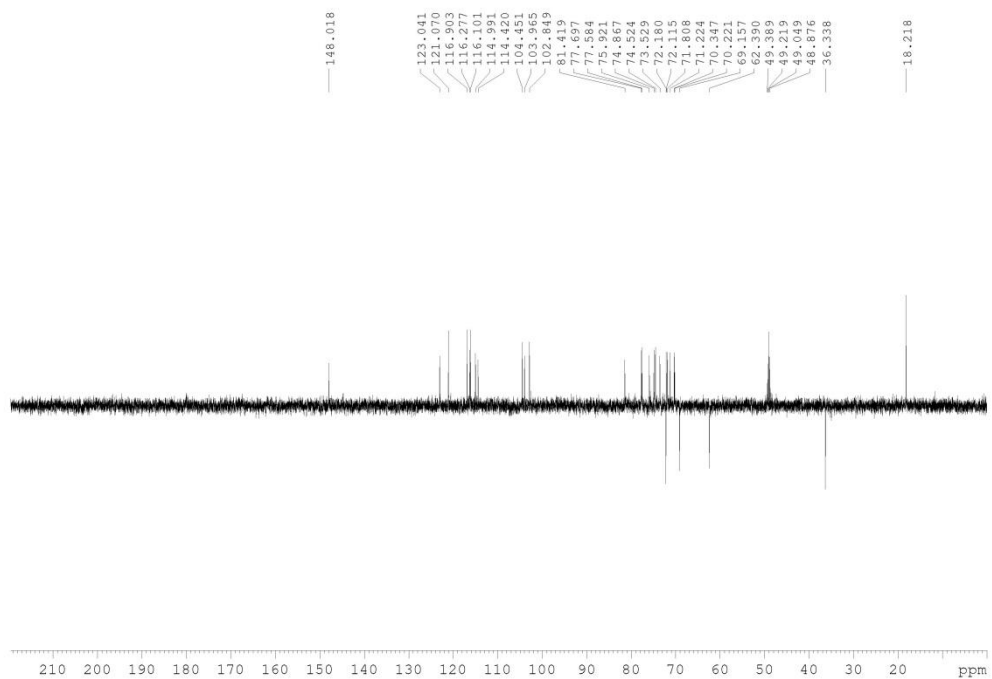
^1H NMR, **48t**, (500 MHz, CD_3OD)



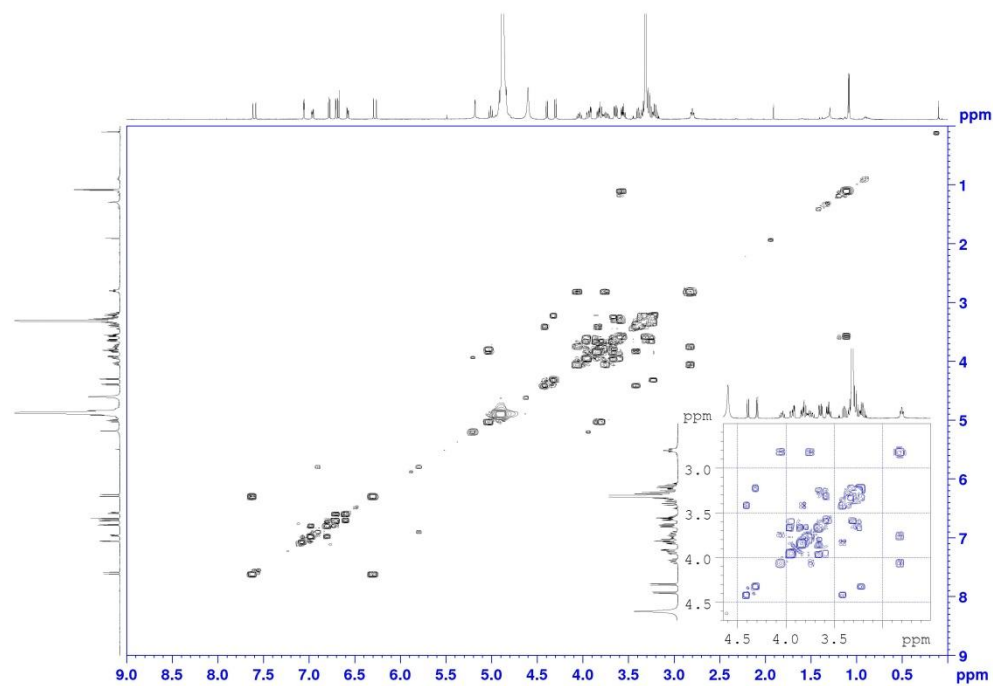
^{13}C NMR, **48t**, (500 MHz, CD_3OD)



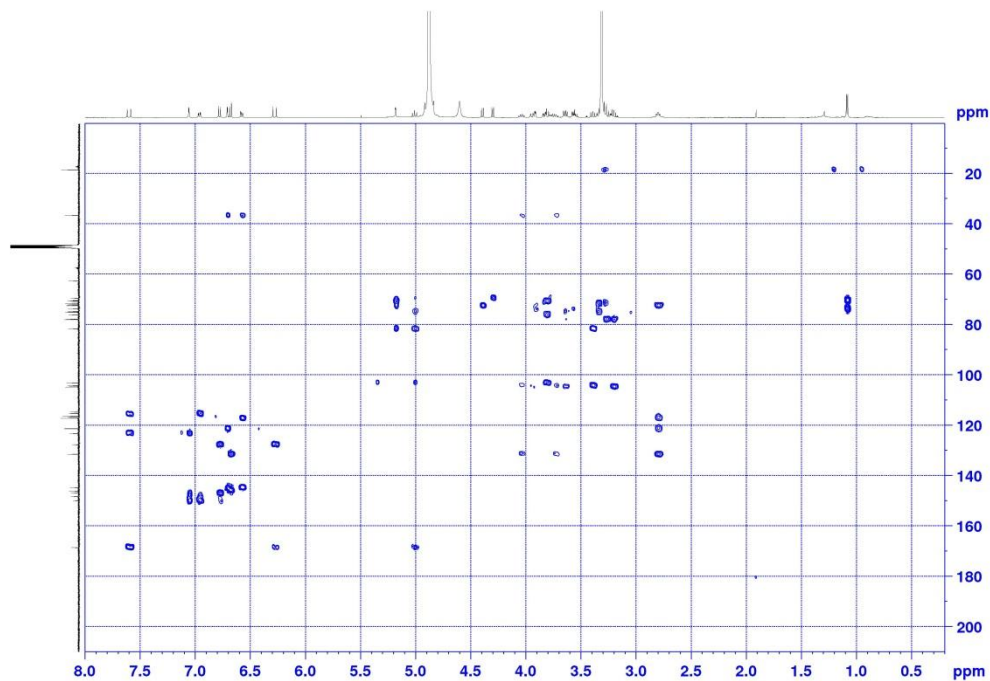
DEPT 135-NMR, **48t**, (500 MHz, CD₃OD)



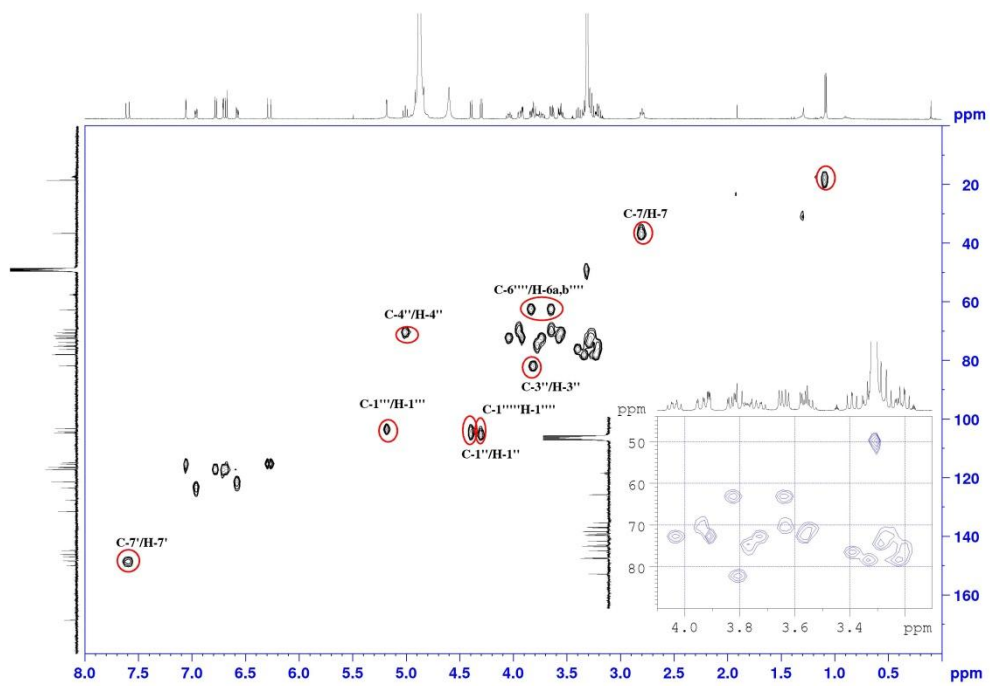
COSY-NMR, **48t**, (500 MHz, CD₃OD)



HMBC-NMR, **48t**, (500 MHz, CD₃OD)



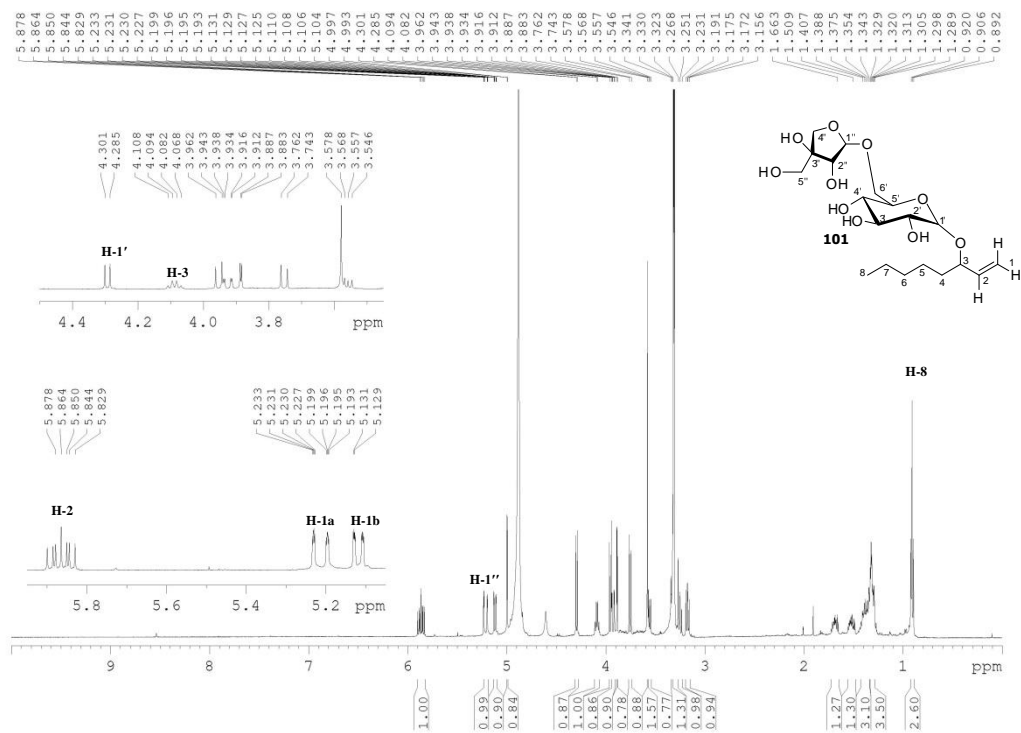
HSQC-NMR, **48t**, (500 MHz, CD₃OD)



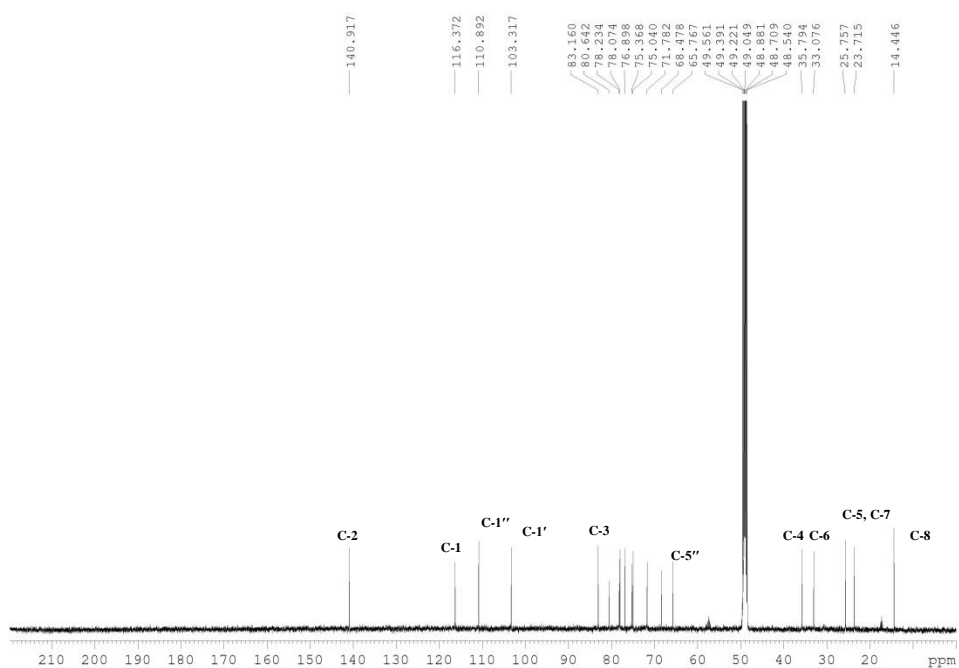
Φάσματα μεταβολίτη:

3-O-β-(3R)-D-απιοφουρανοζυλο-(1→6)-O-β-D-γλυκοπυρανόζυλο-(3S)-οκτ-1-εν-3-όλη

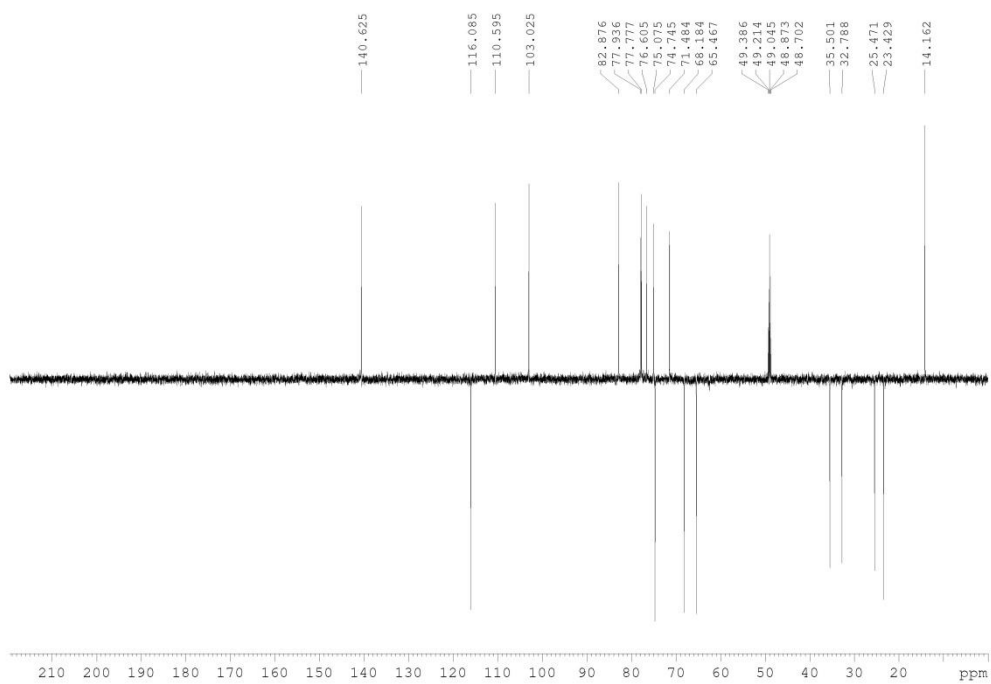
¹H NMR, **101**, (500 MHz, CD₃OD)



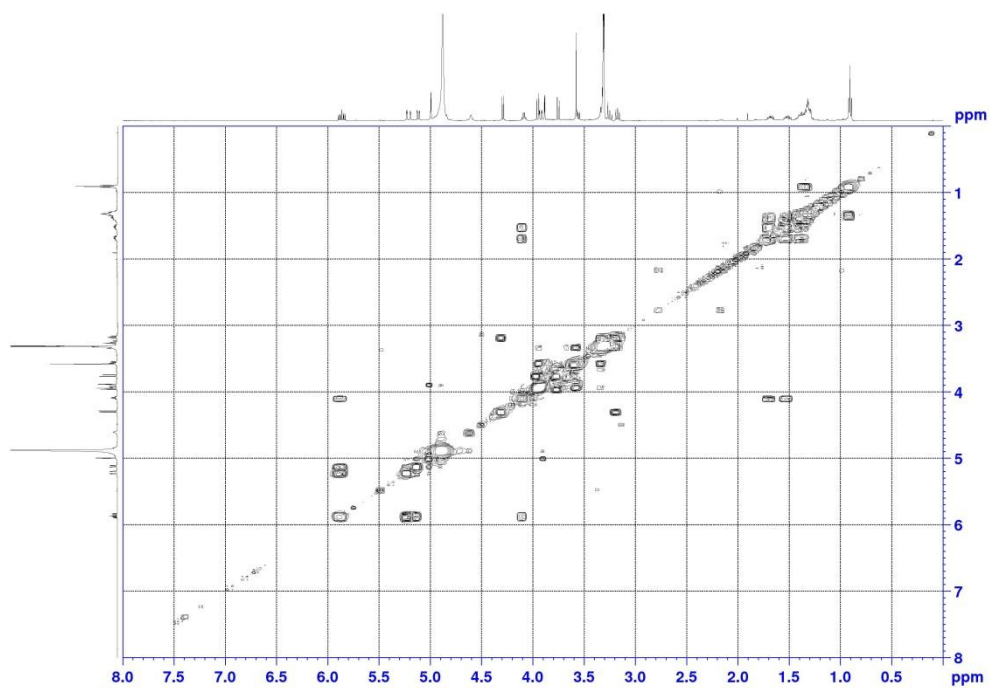
¹³C-NMR, **101**, (500 MHz, CD₃OD)



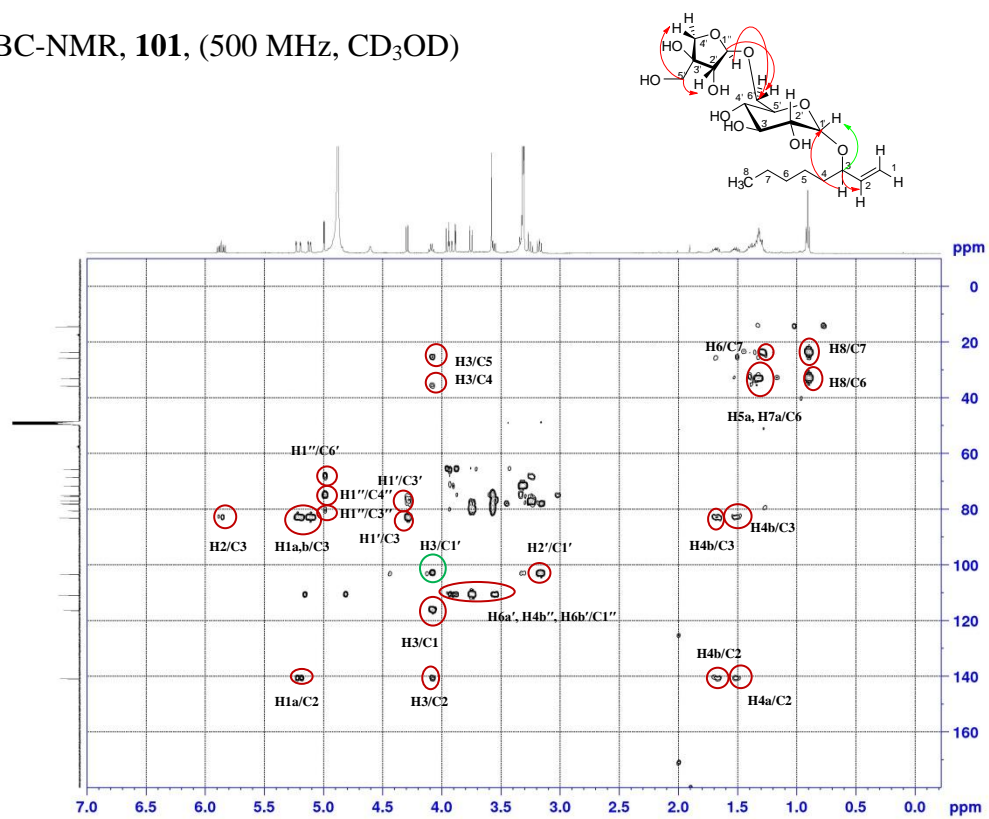
DEPT 135-NMR, **101**, (500 MHz, CD₃OD)



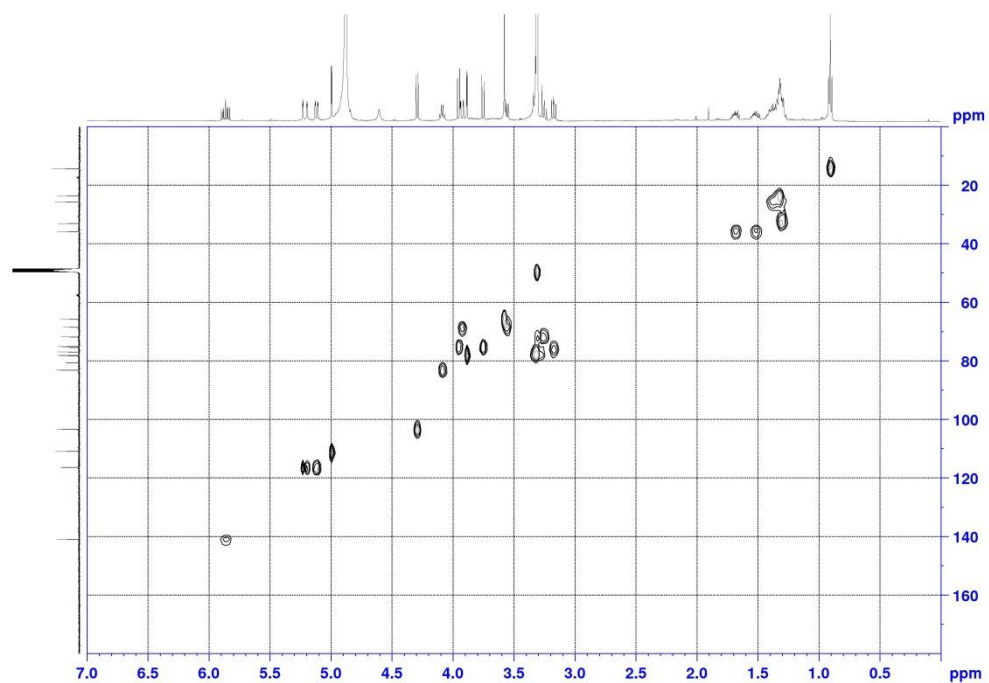
COSY-NMR, **101**, (500 MHz, CD₃OD)



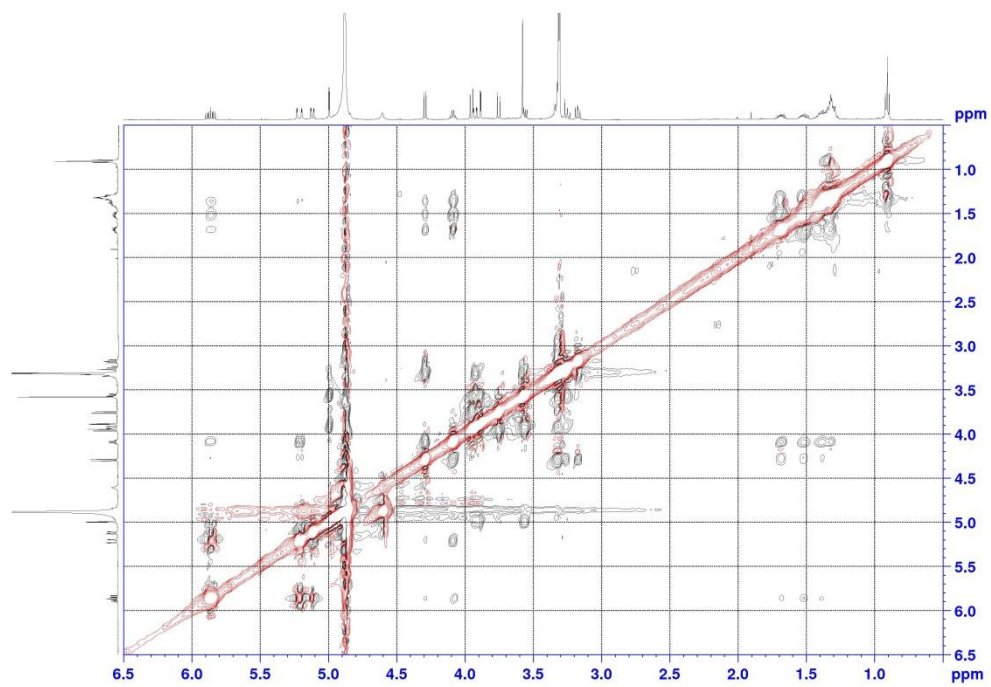
HMBC-NMR, **101**, (500 MHz, CD₃OD)



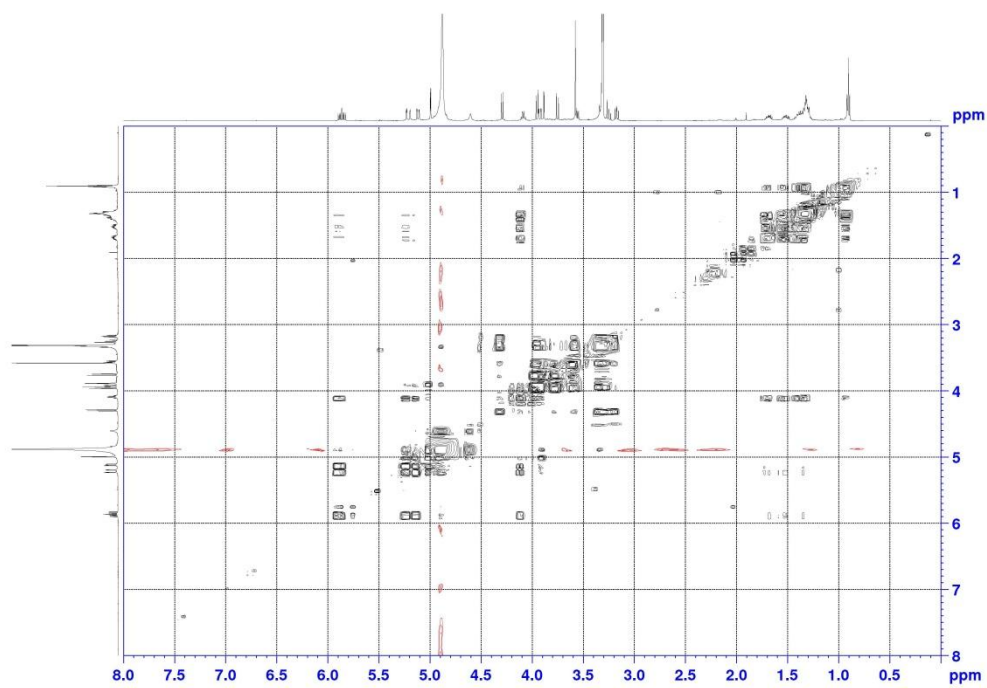
HSQC-NMR, **101**, (500 MHz, CD₃OD)



NOESY-NMR, **101**, (500 MHz, CD₃OD)

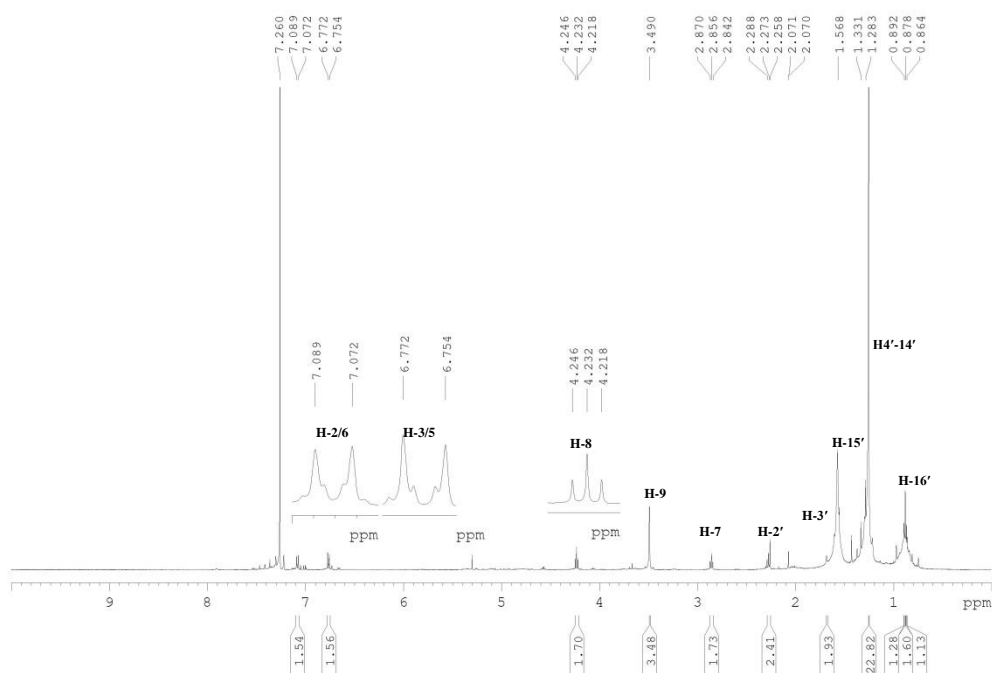
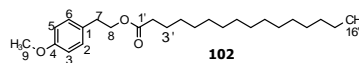


TOCSY-NMR, **101**, (500 MHz, CD₃OD)

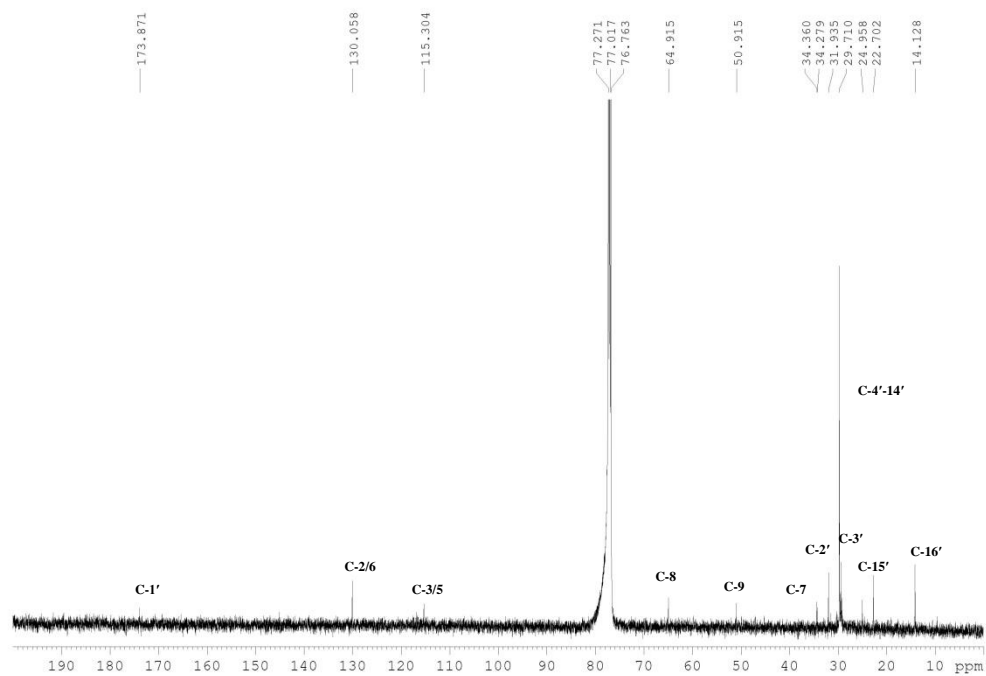


Φάσματα μεταβολίτη: Παλμιτικός εστέρας του τυροσολικού μεθυλαιθέρα

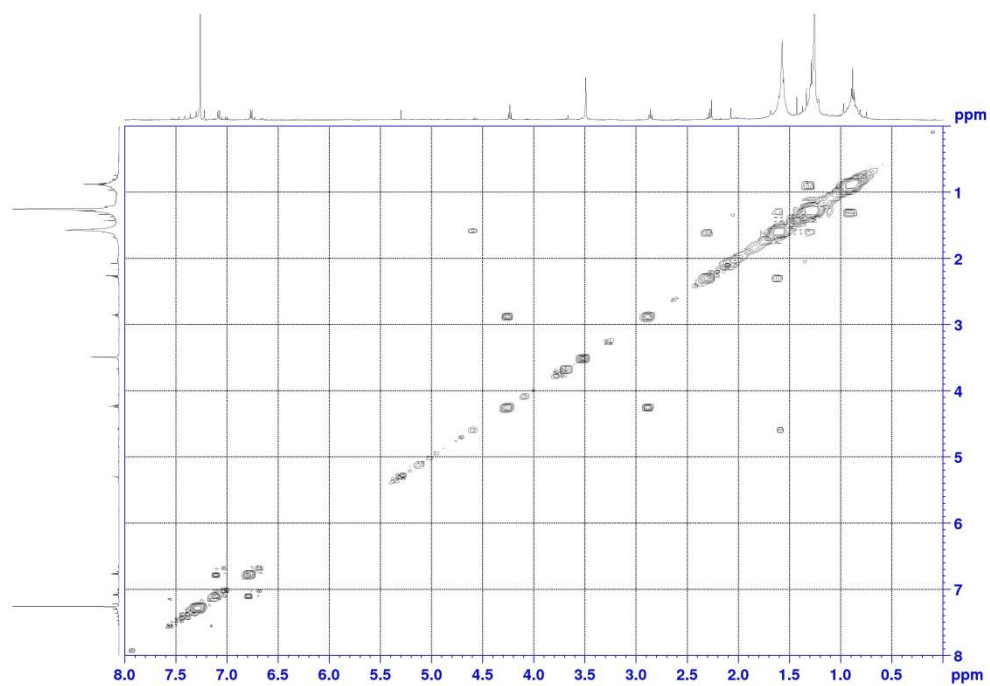
^1H NMR, **102**, (500 MHz, CDCl_3)



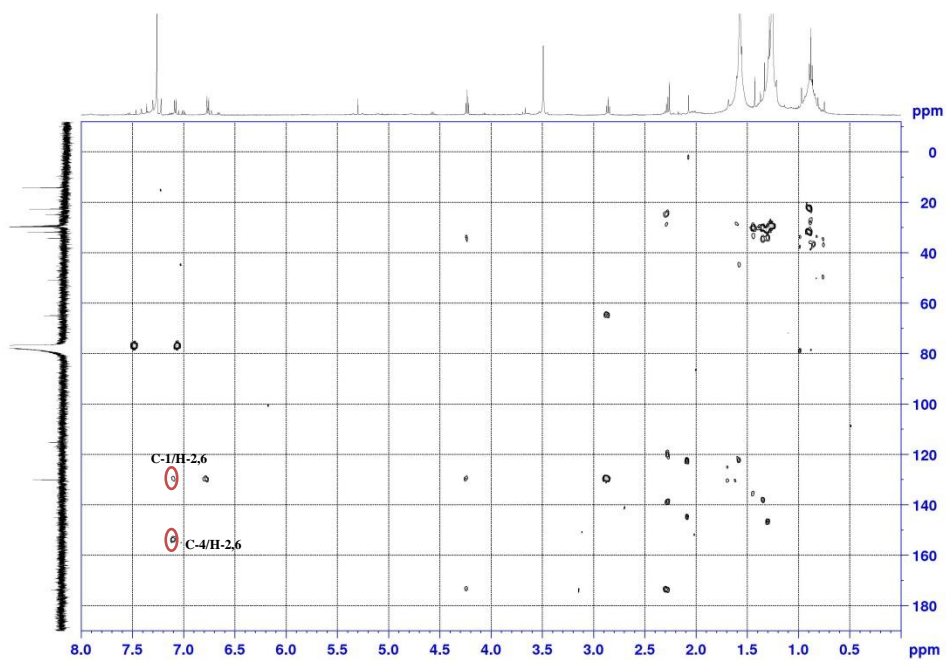
^{13}C -NMR, **102**, (500 MHz, CDCl_3)



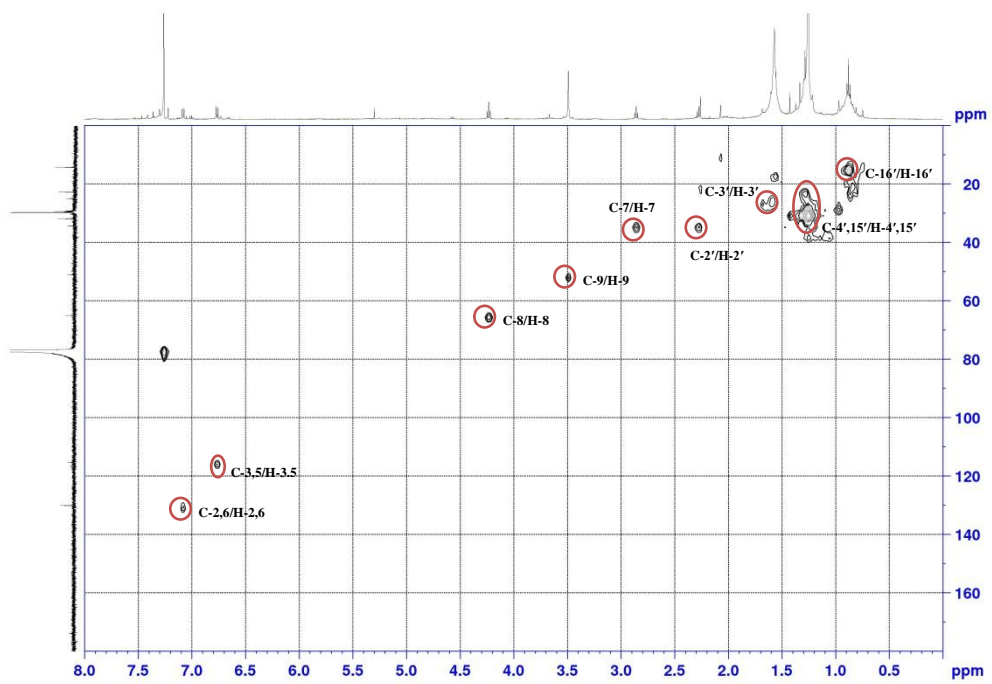
COSY-NMR, **102**, (500 MHz, CDCl₃)



HMBC-NMR, (500 MHz, CDCl₃)

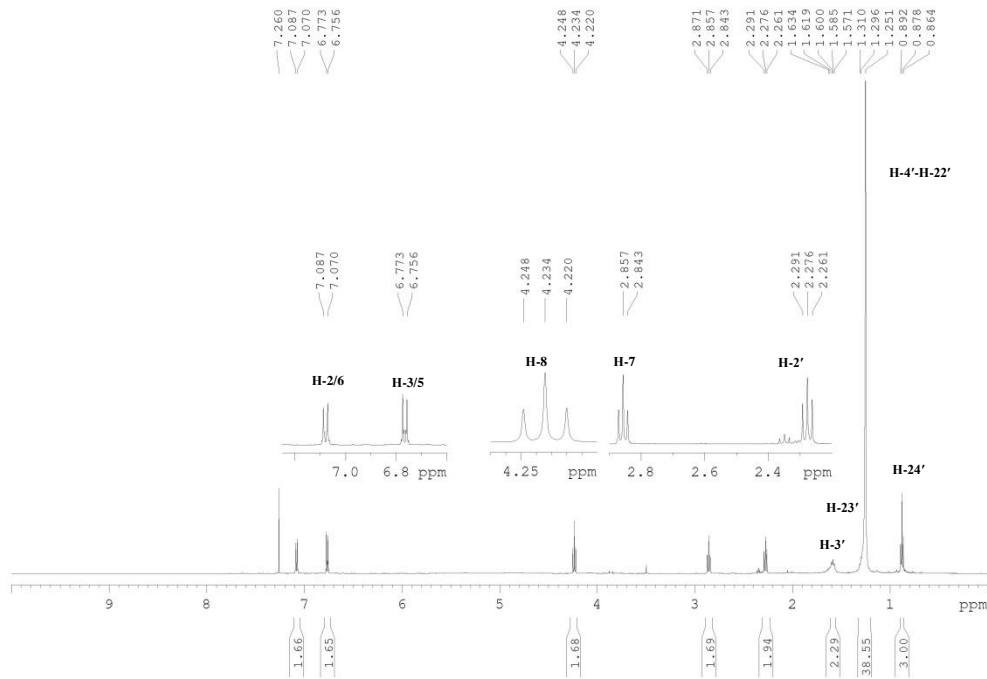
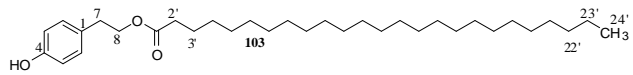


HSQC-NMR, **102**, (500 MHz, CDCl₃)

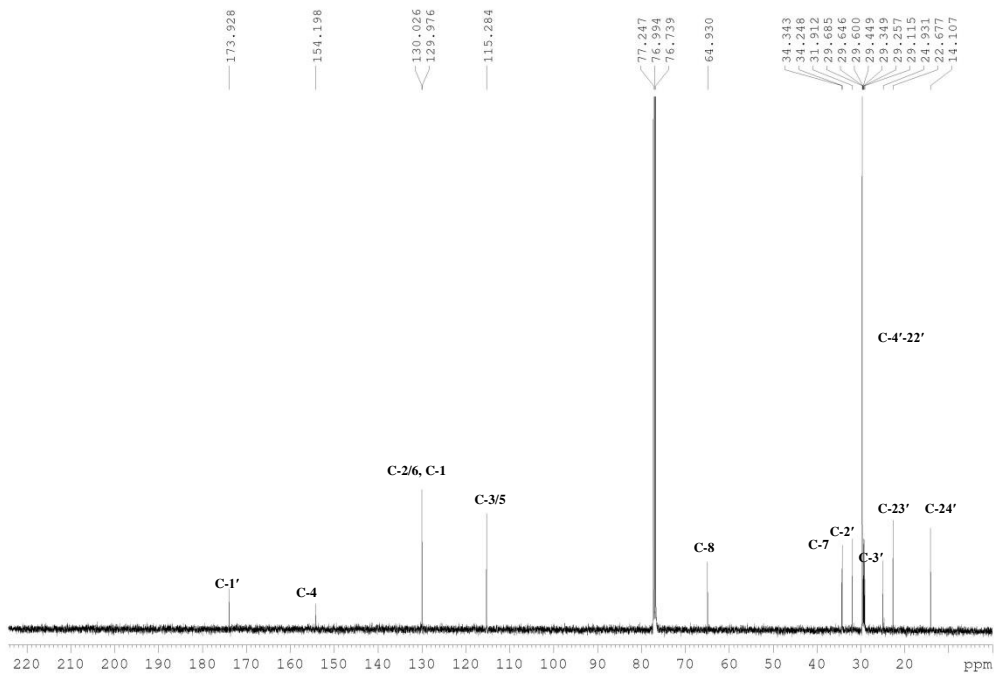


Φάσματα μεταβολίτη: Λιγνοστερικός εστέρας της τυροσόλης

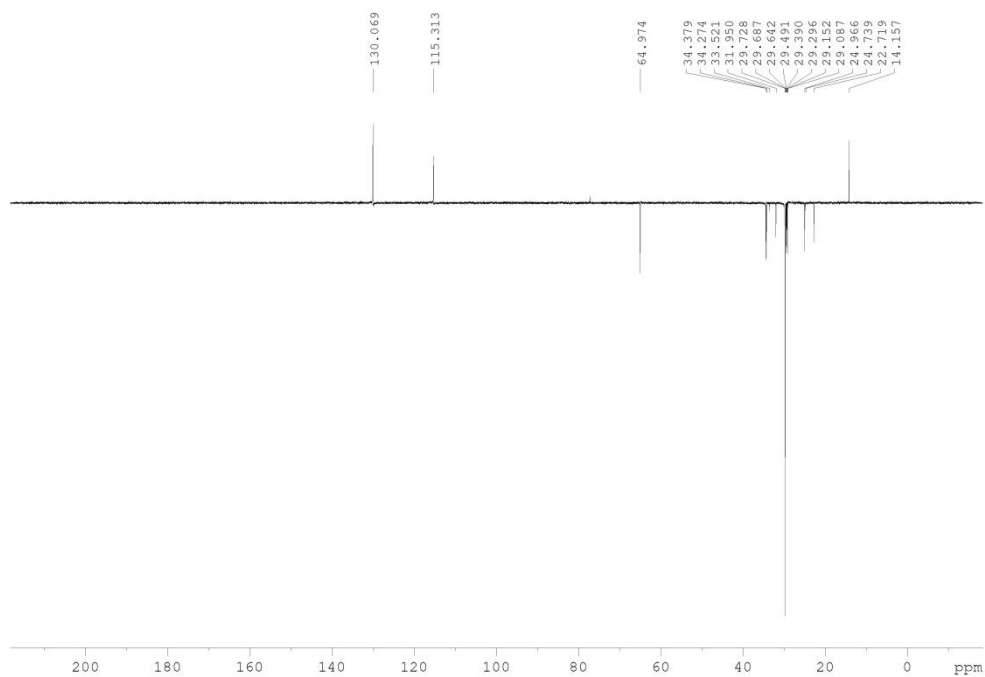
^1H -NMR, **103**, (500 MHz, CDCl_3)



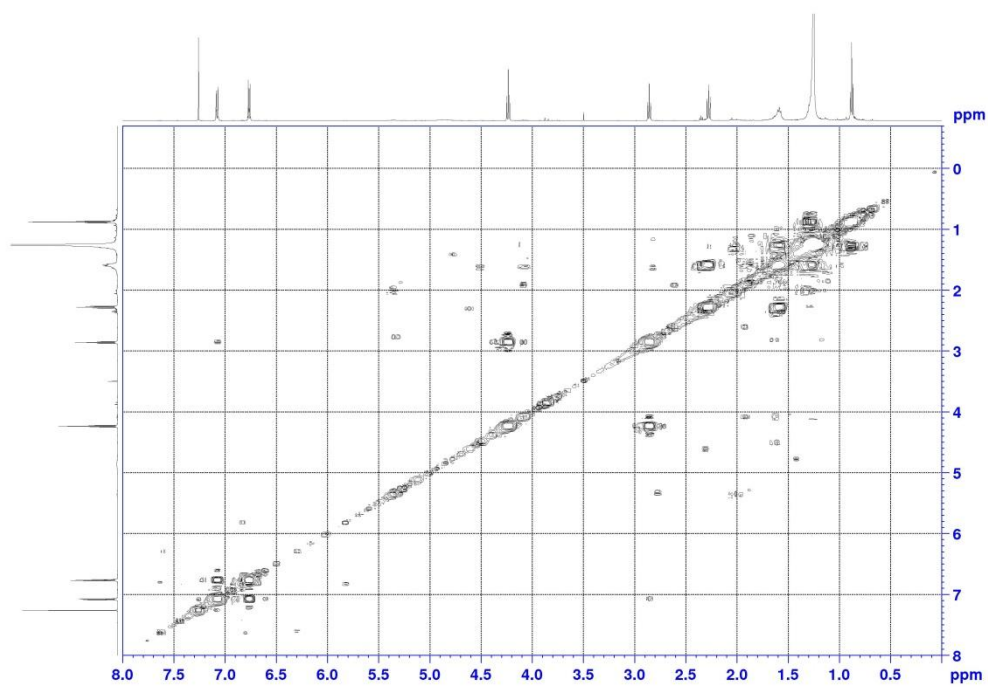
^{13}C -NMR, **103**, (500 MHz, CDCl_3)



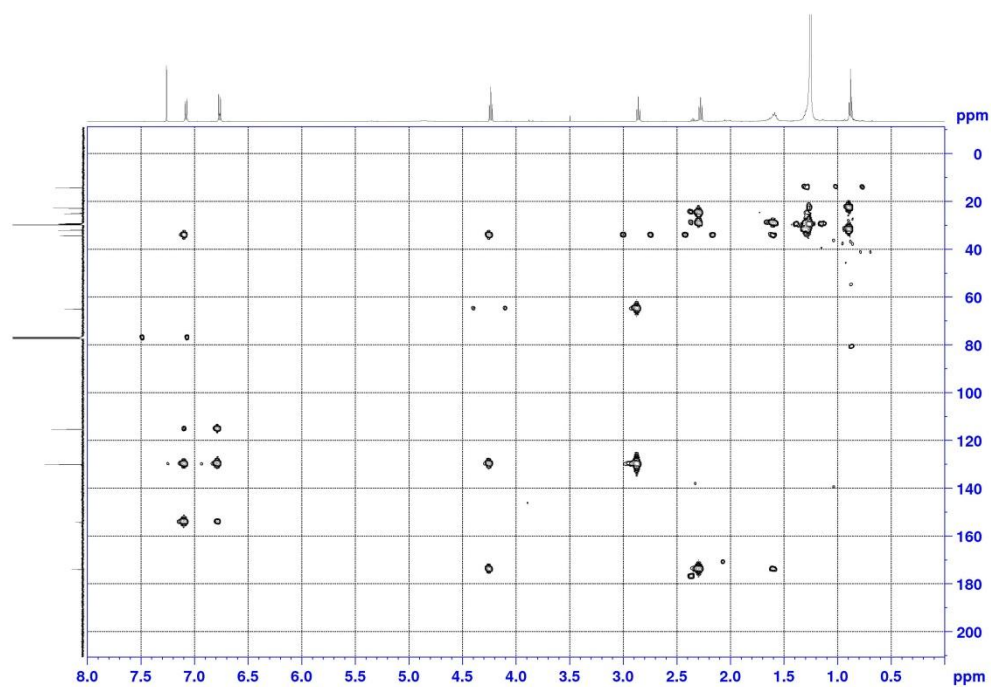
DEPT 135-NMR, **103**, (500 MHz, CDCl₃)



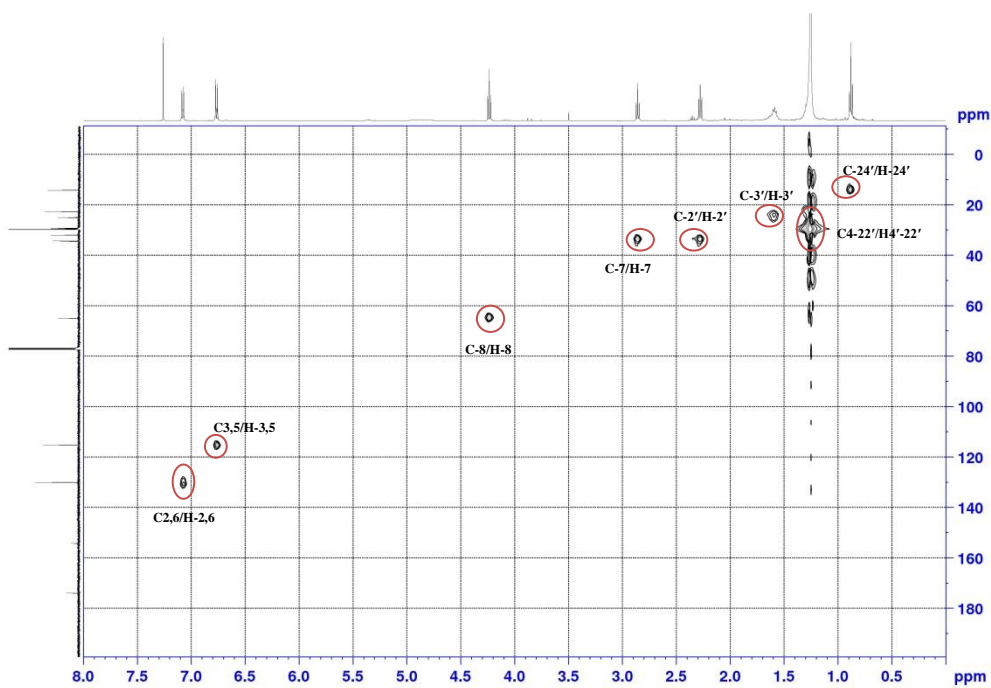
COSY-NMR, **103**, (500 MHz, CDCl₃)



HMBC-NMR, **103**, (500 MHz, CDCl₃)

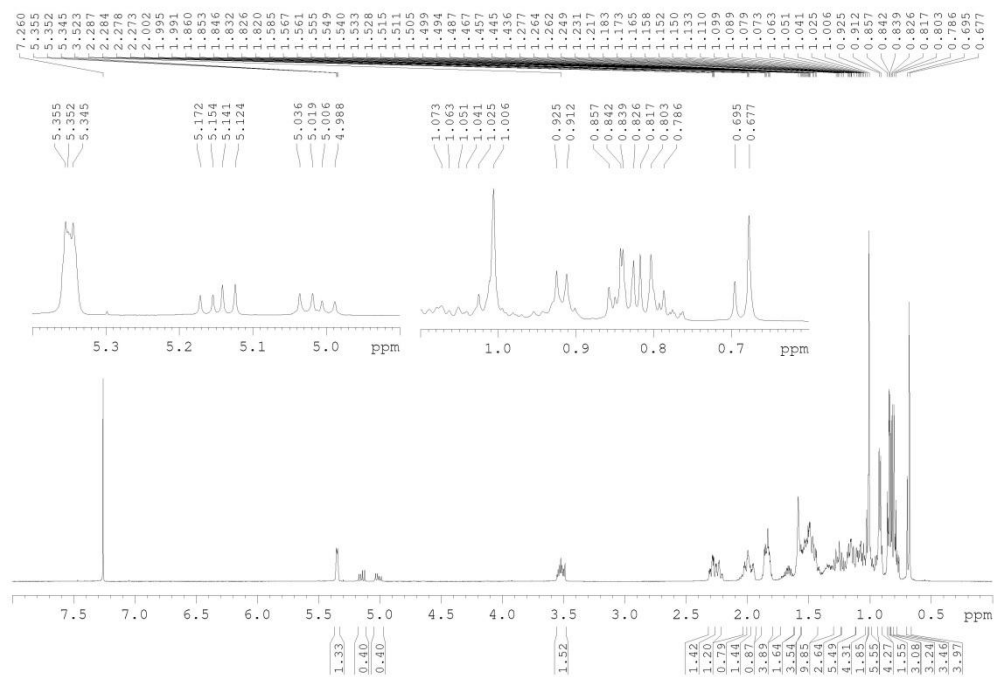
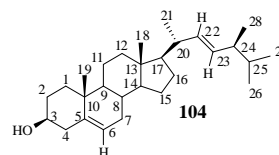


HSQC-NMR, **103**, (500 MHz, CDCl₃)

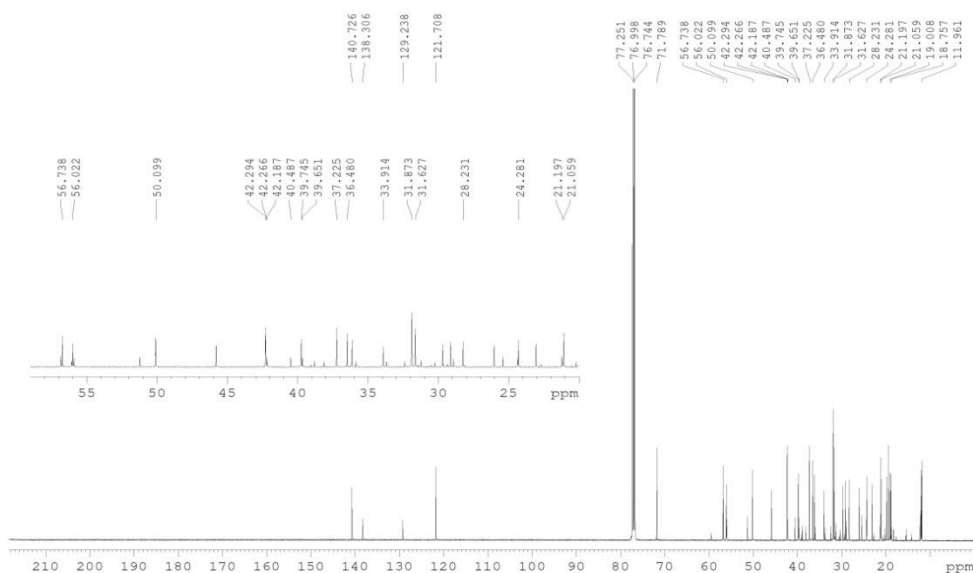


Φάσματα μεταβολίτη: Μπρασικαστερόλη

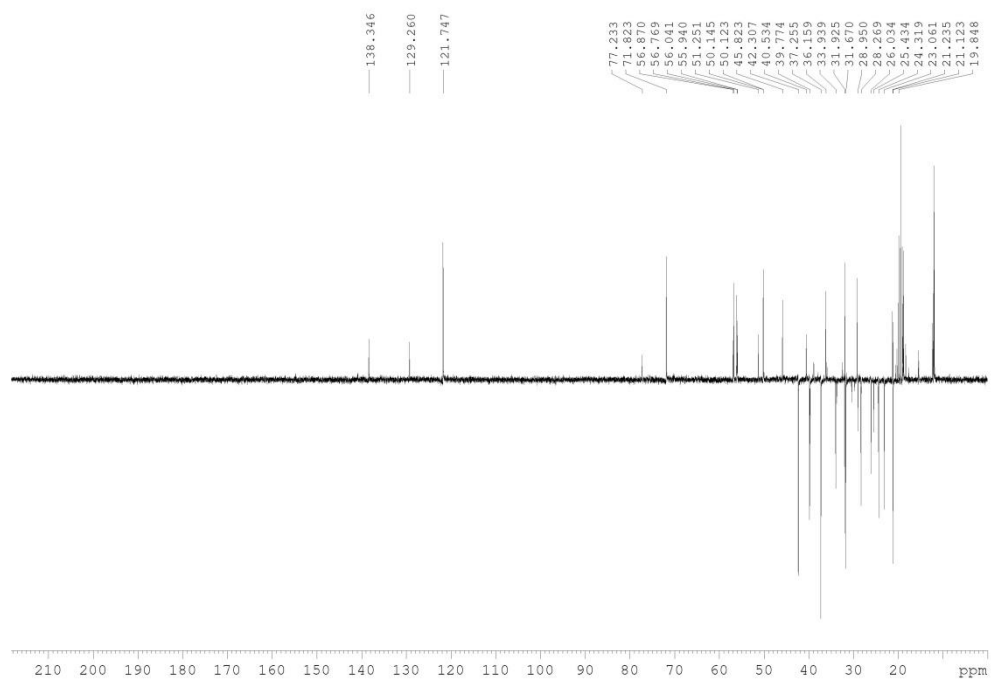
^1H NMR, **104**, (500 MHz, CDCl_3)



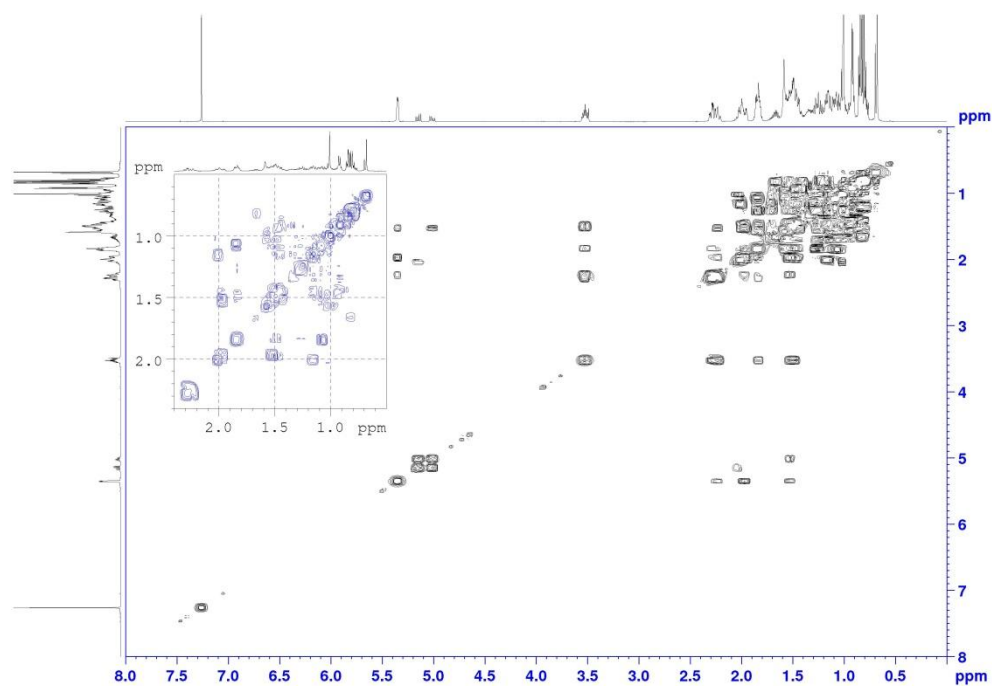
^{13}C NMR, **104**, (500 MHz, CDCl_3)



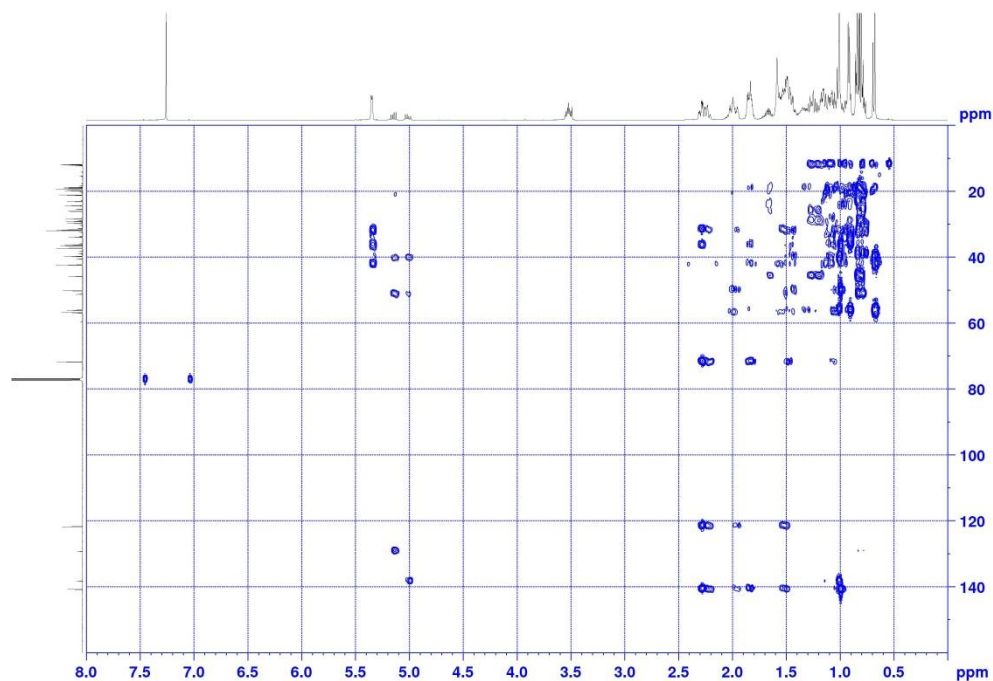
DEPT 135-NMR, **104**, (500 MHz, CDCl₃)



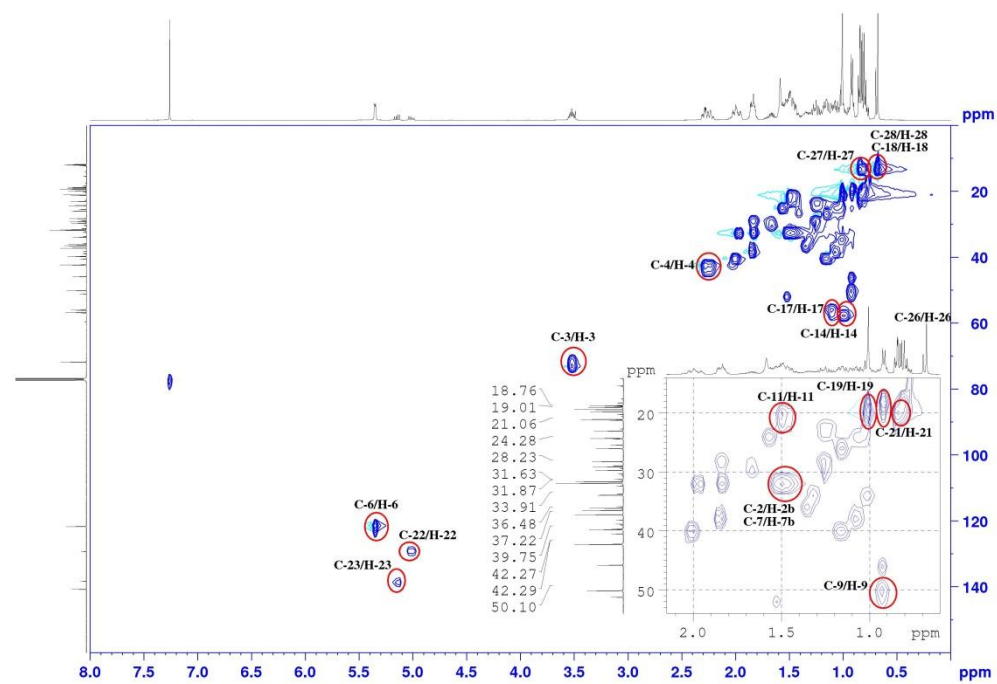
COSY-NMR, **104**, (500 MHz, CDCl₃)



HMBC-NMR, **104**, (500 MHz, CDCl₃)

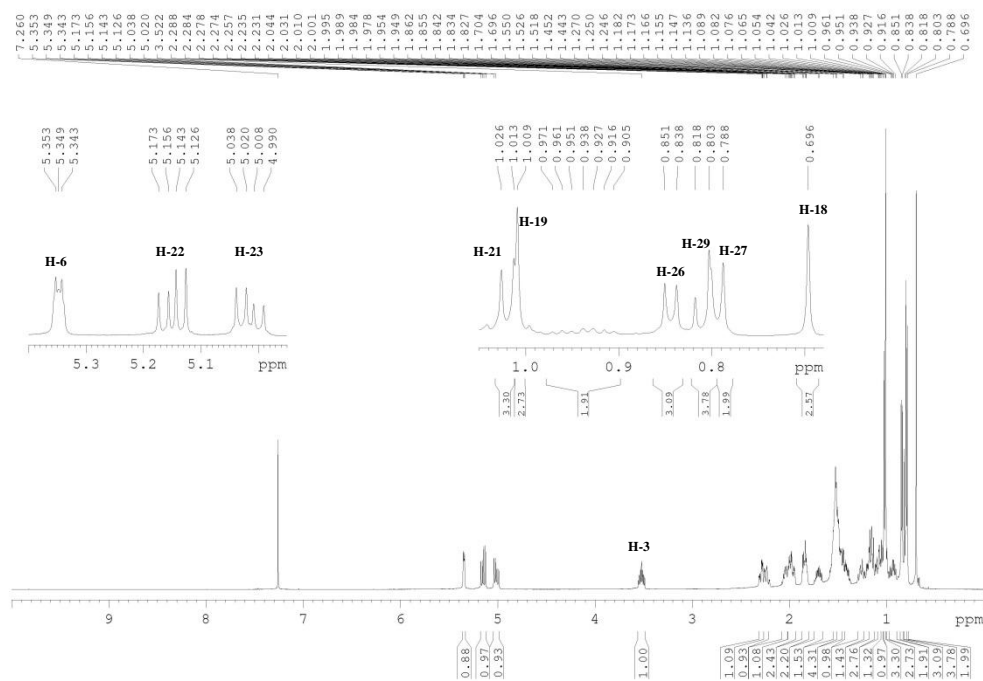
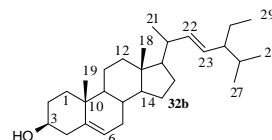


HSQC-NMR, **104**, (500 MHz, CDCl₃)

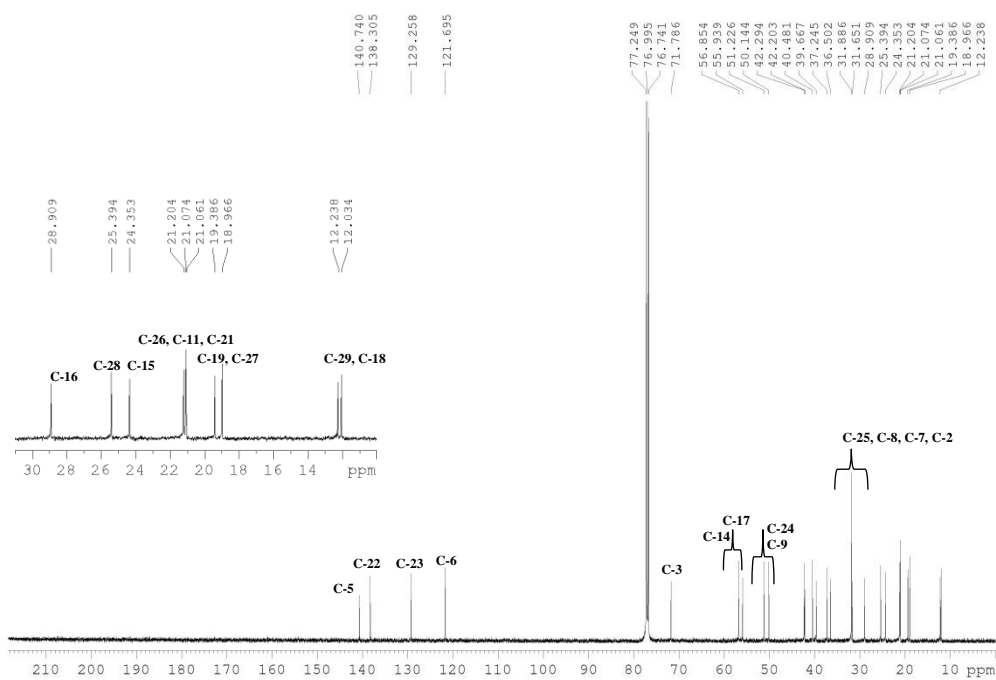


Φάσματα μεταβολίτη: Στιγμαστερόλη

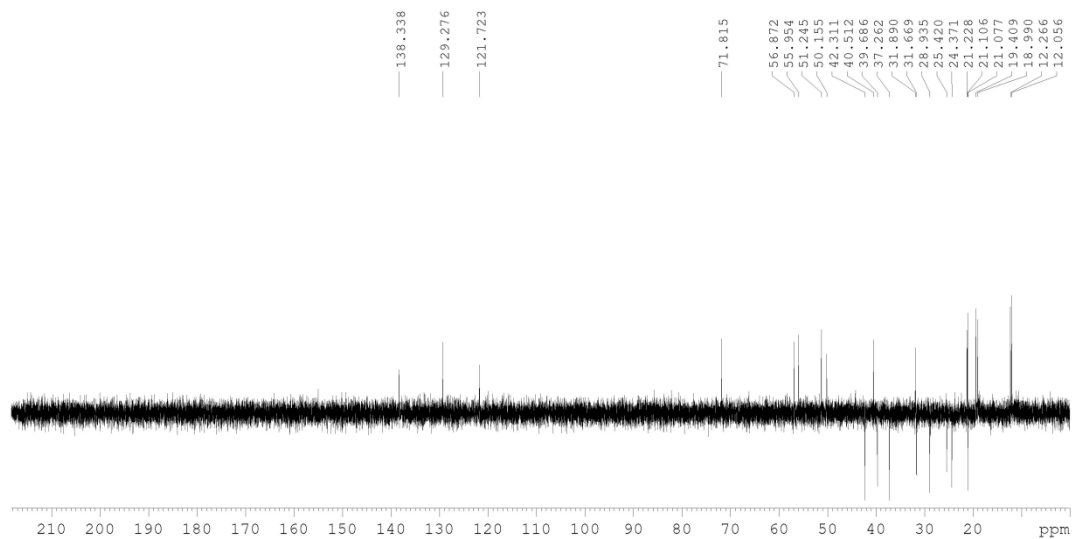
^1H NMR, **32b**, (500 MHz, CDCl_3)



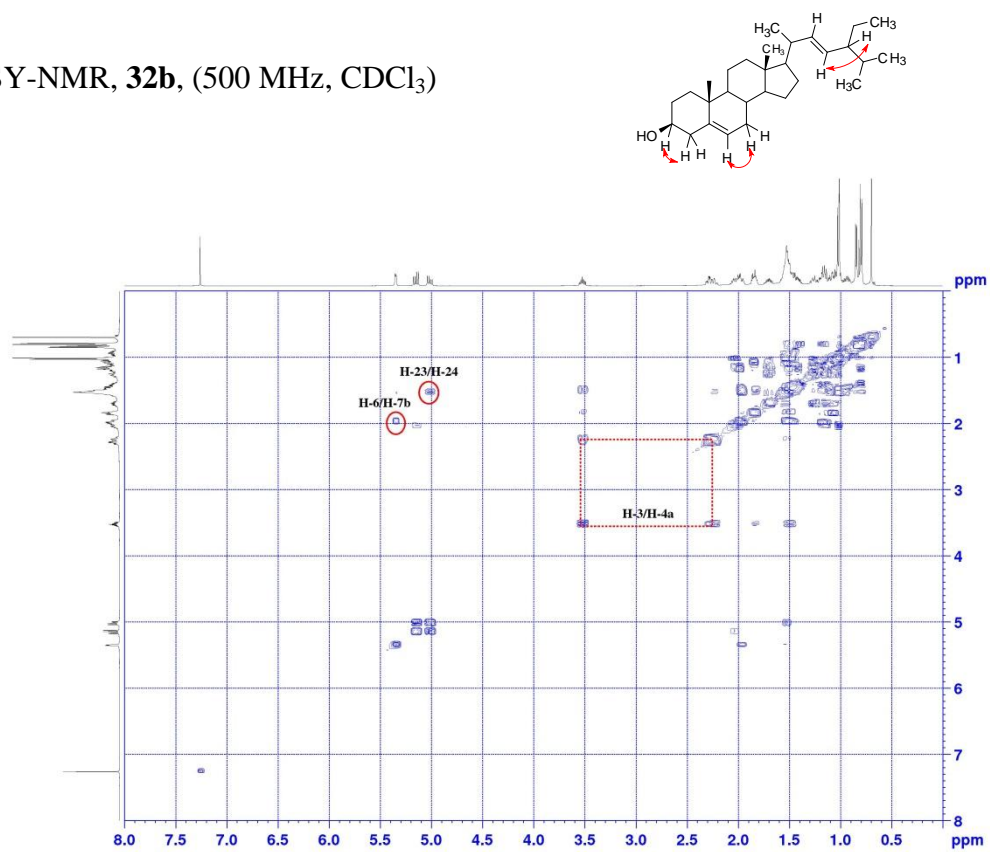
^{13}C -NMR, **32b**, (500 MHz, CDCl_3)



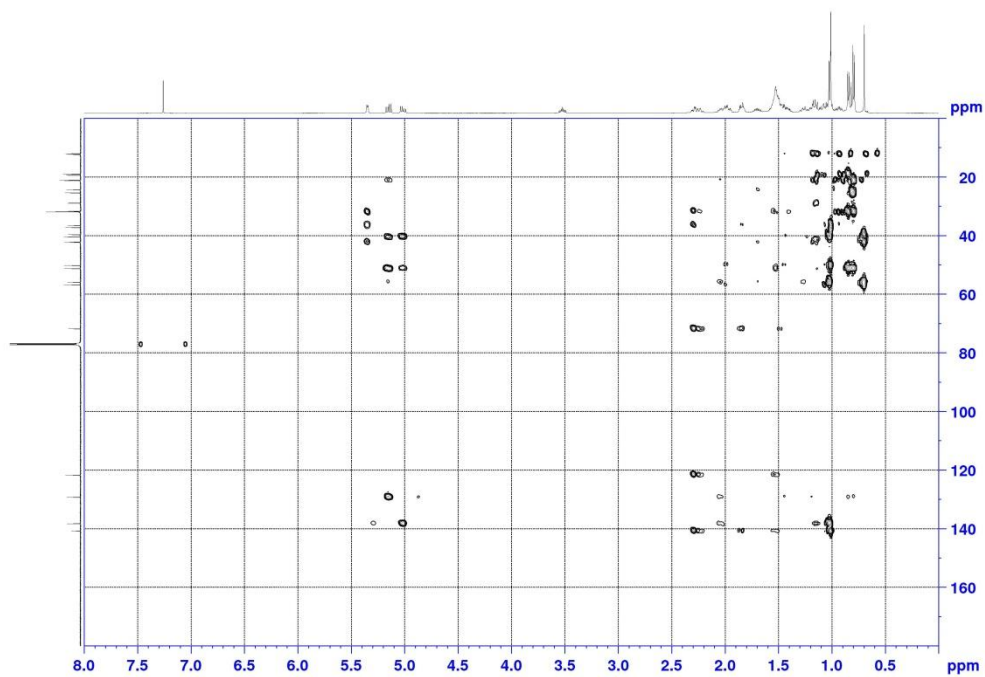
DEPT 135-NMR, **32b**, (500 MHz, CDCl₃)



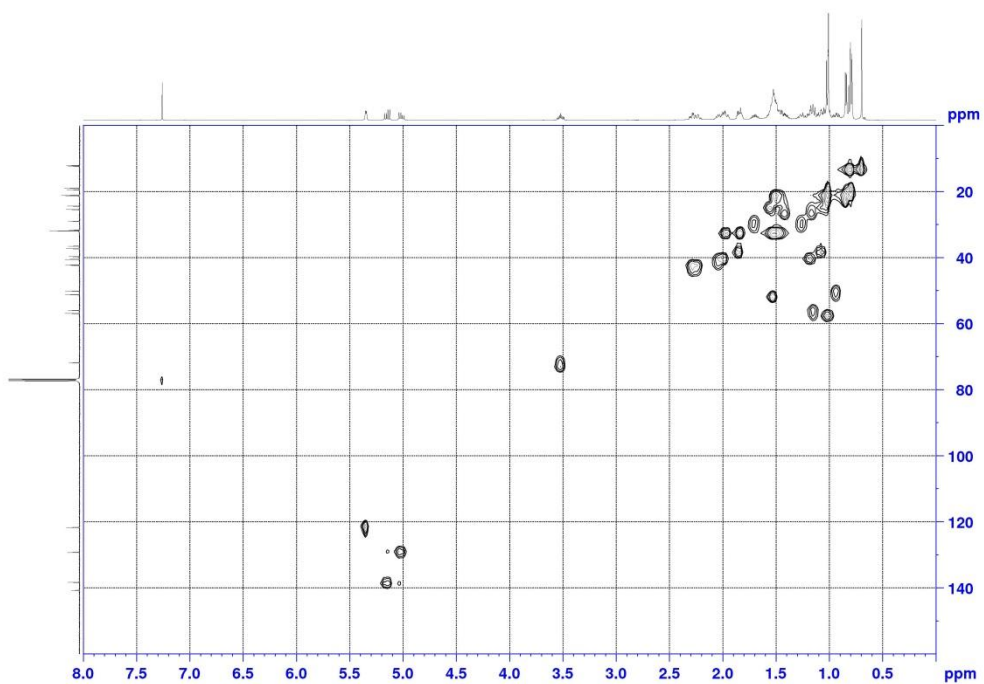
COSY-NMR, **32b**, (500 MHz, CDCl₃)



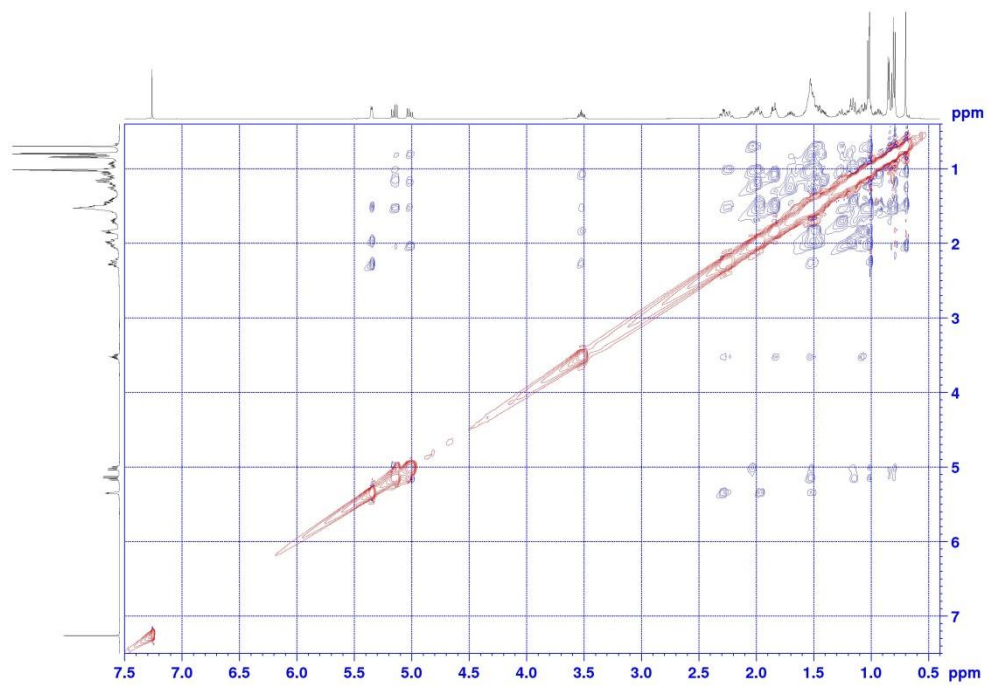
HMBC-NMR, **32b**, (500 MHz, CDCl₃)



HSQC-NMR, **32b**, (500 MHz, CDCl₃)

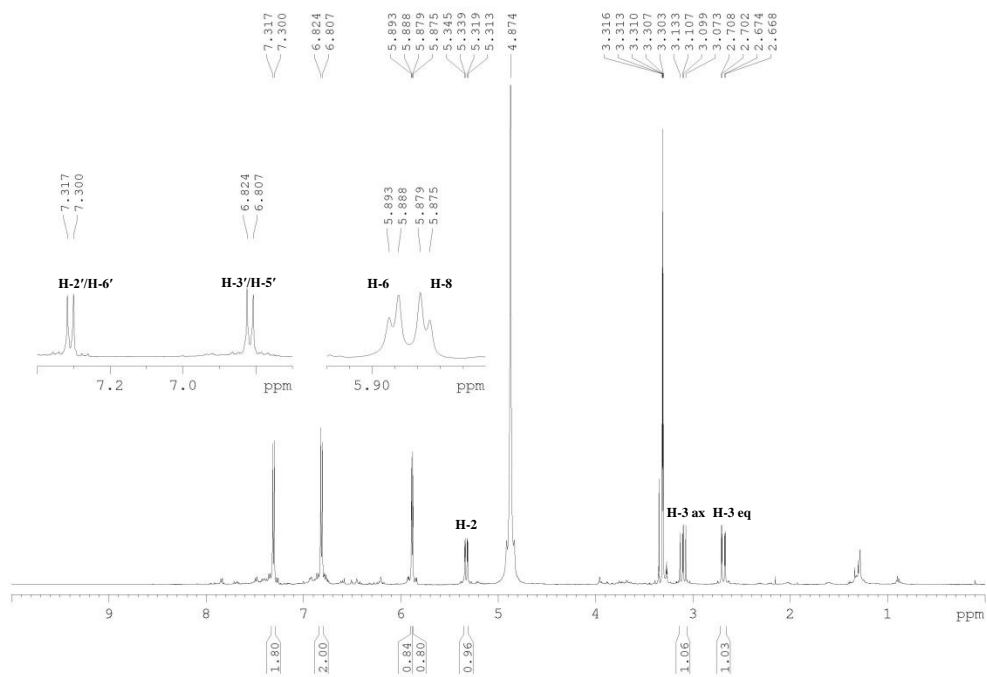
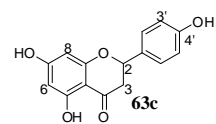


NOESY-NMR, **32b**, (500 MHz, CDCl₃)

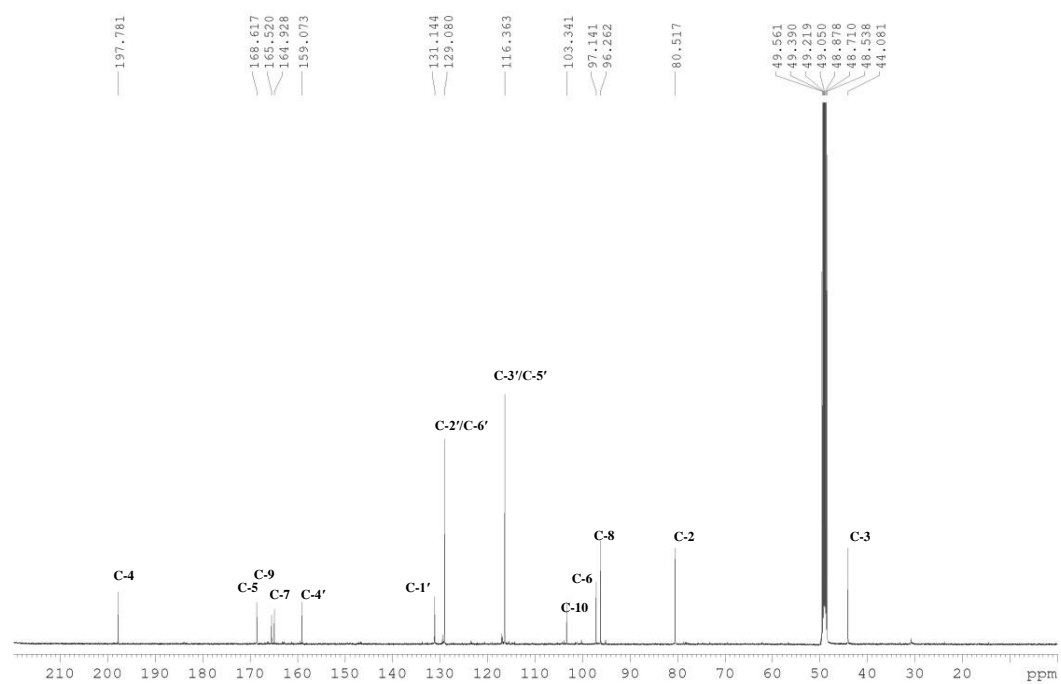


Φάσματα μεταβολίτη: **Ναριγγενίνη**

^1H NMR, **63c**, (500 MHz, CD_3OD)

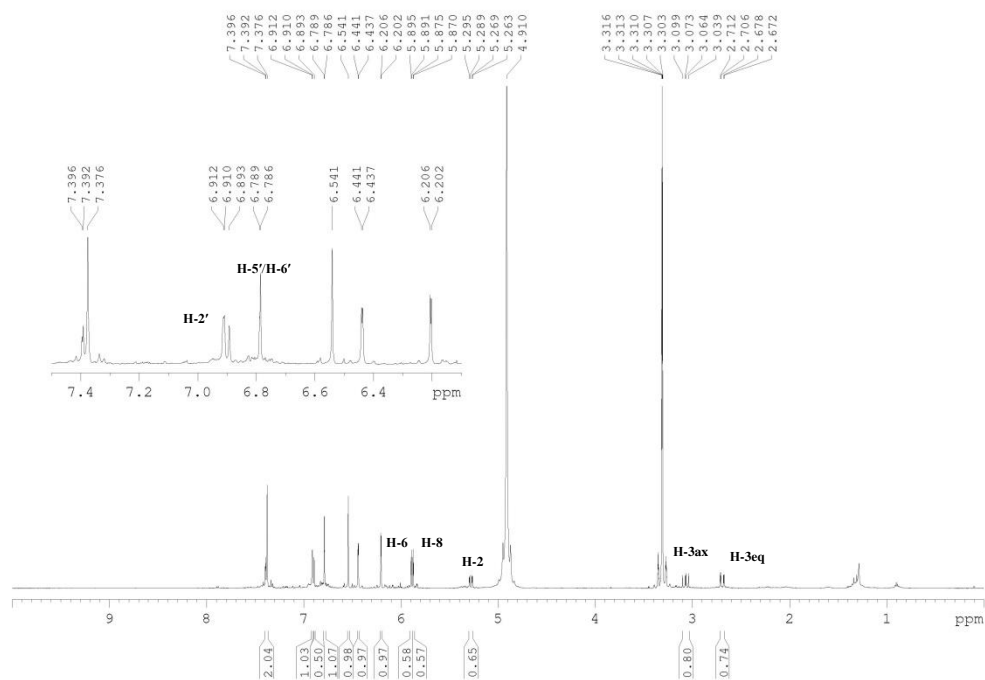
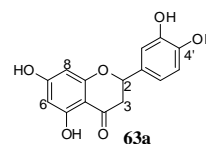


^{13}C -NMR, **63c**, (500 MHz, CD_3OD)



Φάσμα μεταβολίτη: Εριοδικτυόλη

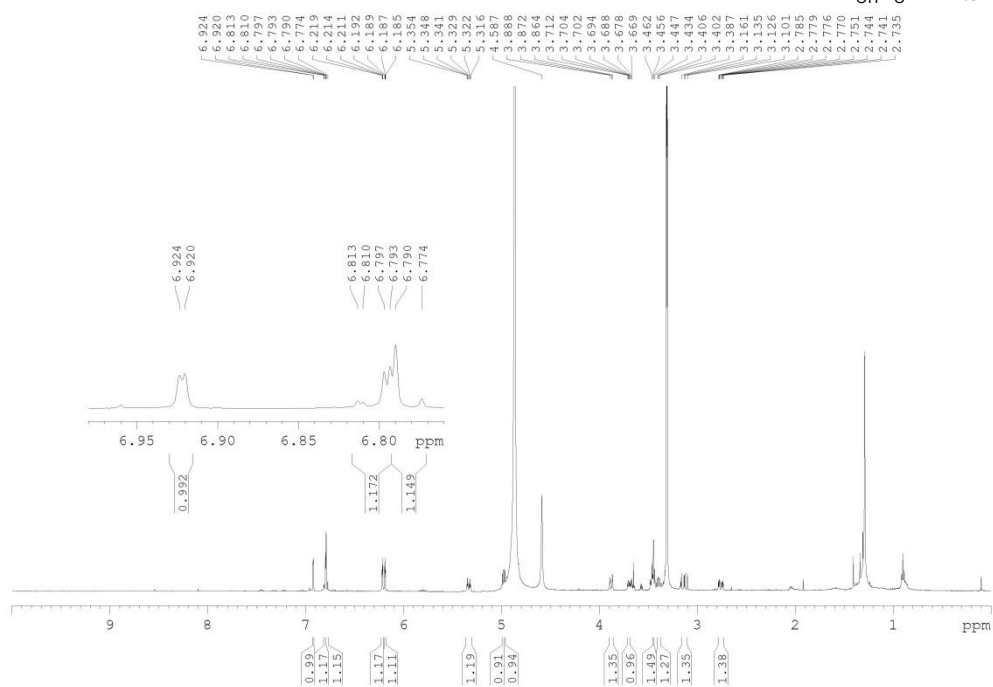
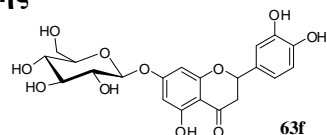
^1H NMR, **63a**, (500 MHz, CD_3OD)



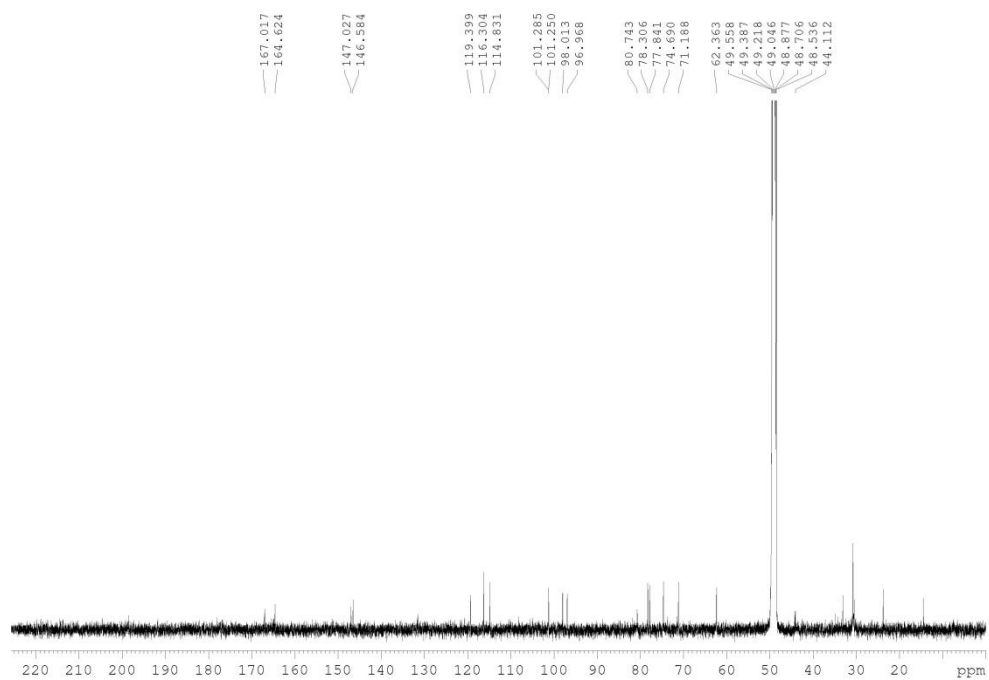
^1H -NMR του μίγματος των ενώσεων λουτεολίνη (**58a**) και εριοδικτυόλη (**63a**). Οι κορυφές με την αρίθμηση αντιστοιχούν στην ένωση **63a**, ενώ οι υπόλοιπες στα 6.2-7.4 ppm αντιστοιχούν στην ένωση **58a**.

Φάσματα μεταβολίτη: **Εριοδουκτιολο-7-*O*-β-D-γλυκοζίτης**

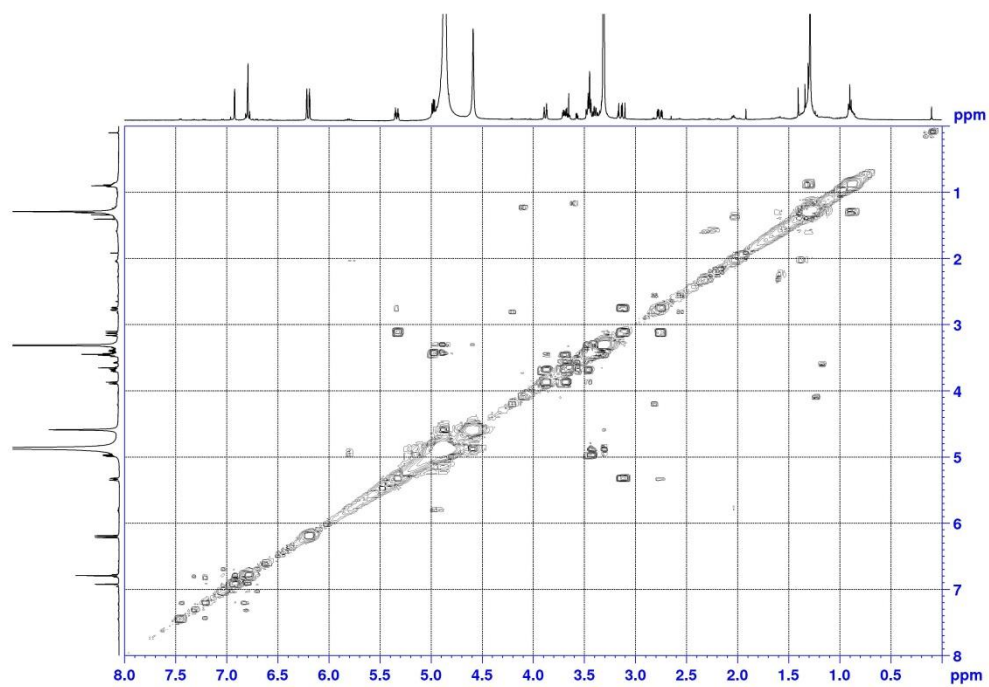
^1H NMR, **63f**, (500 MHz, CD_3OD)



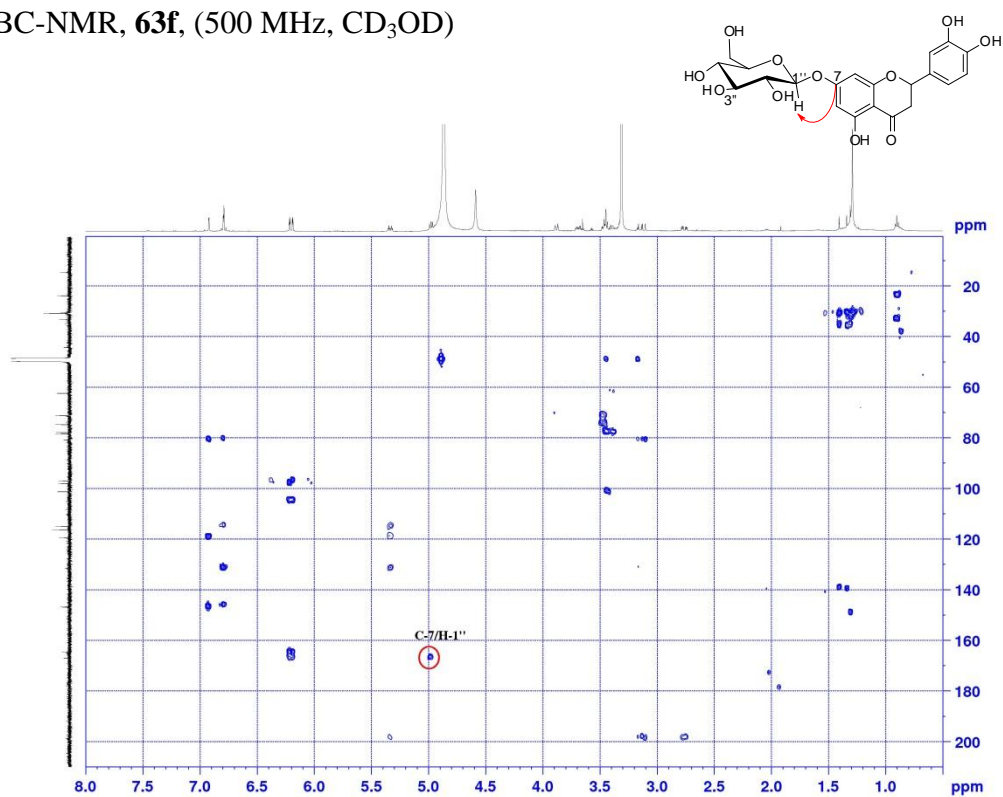
^{13}C NMR, **63f**, (500 MHz, CD_3OD)



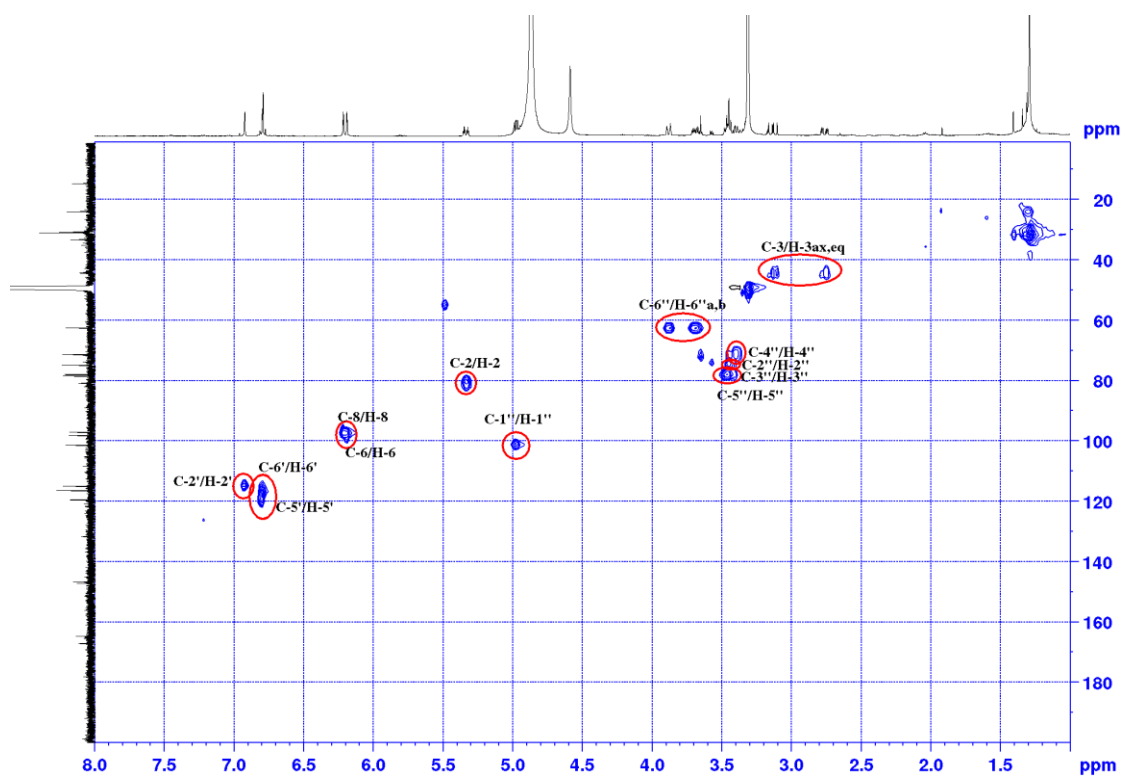
COSY-NMR, **63f**, (500 MHz, CD₃OD)



HMBC-NMR, **63f**, (500 MHz, CD₃OD)

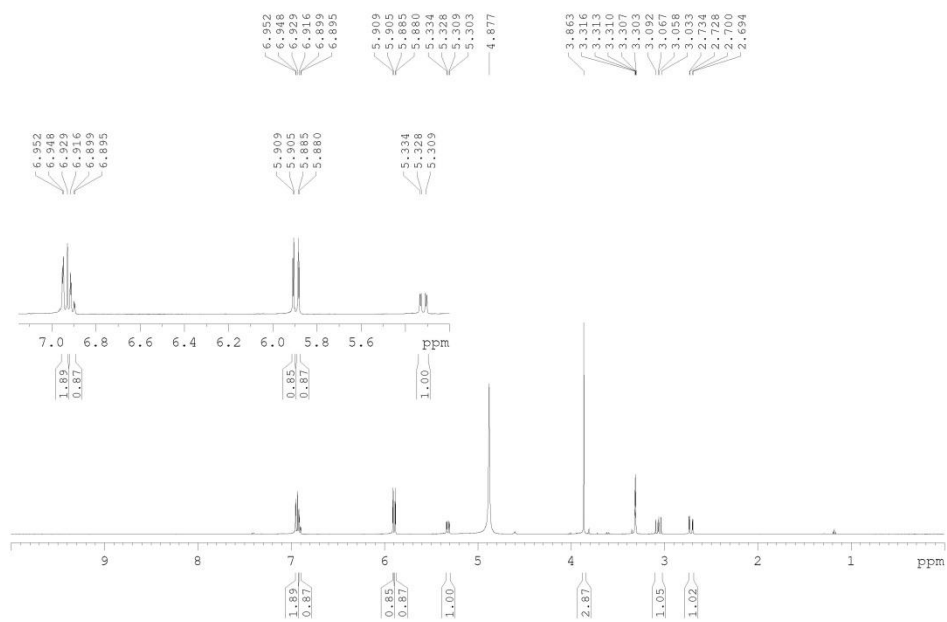
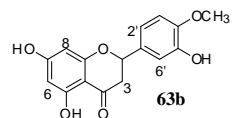


HSQC-NMR, **63f**, (500 MHz, CD₃OD)

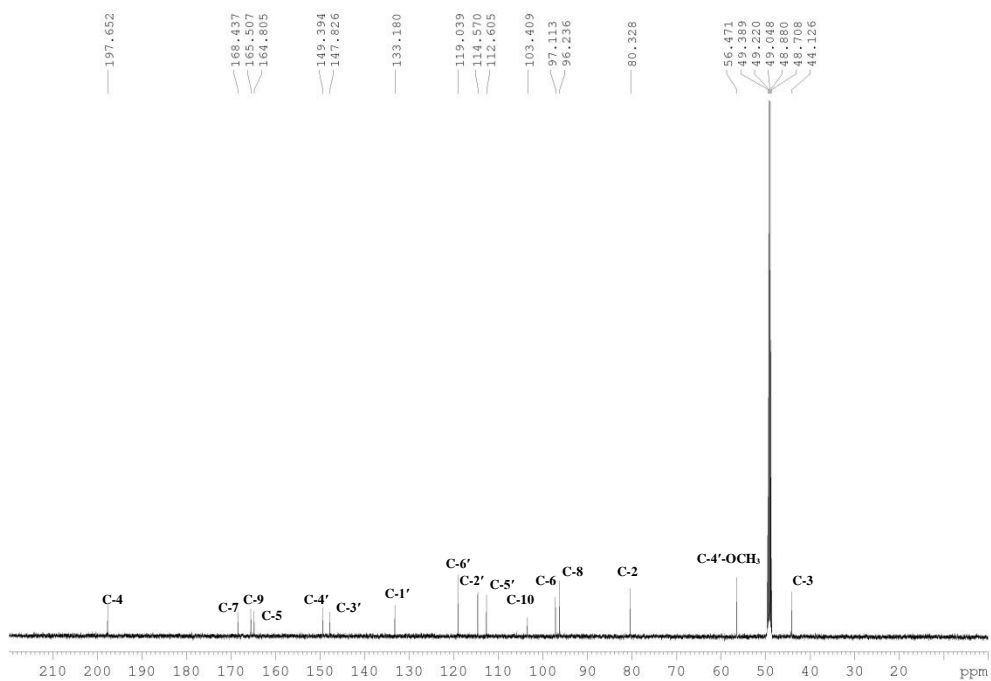


Φάσματα μεταβολίτη: **Εσπερετίνη**

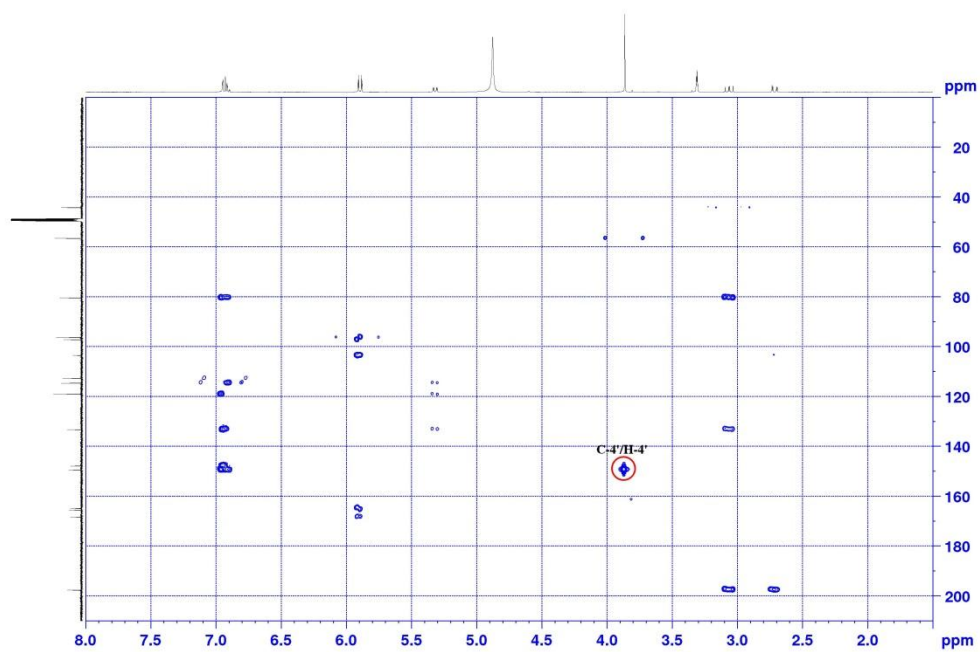
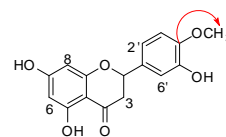
^1H NMR, **63b**, (500 MHz, CD_3OD)



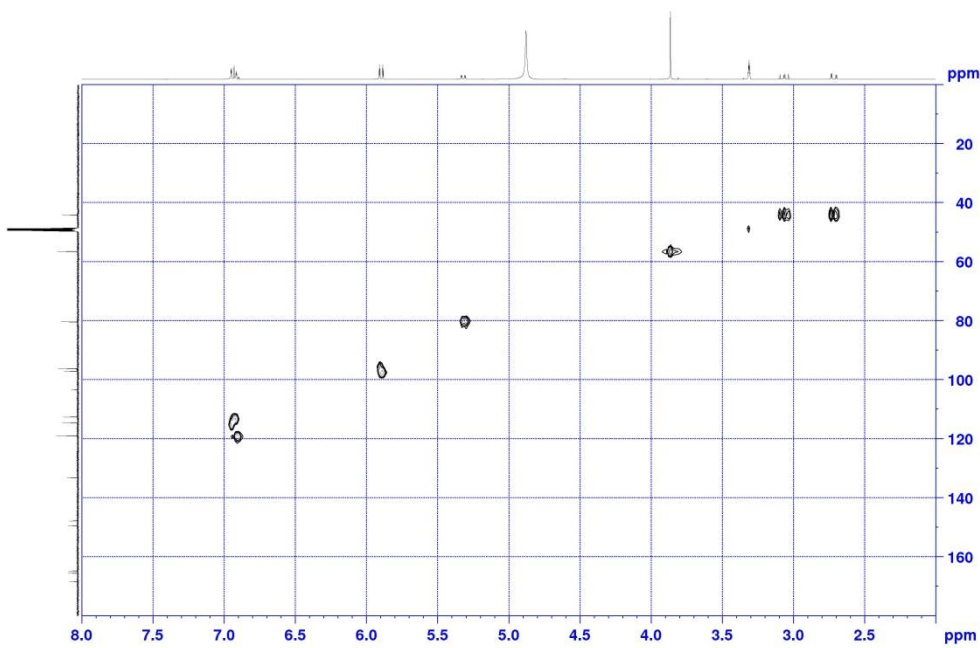
^{13}C -NMR, **63b**, (500 MHz, CD_3OD)



HMBC-NMR, **63b**, (500 MHz, CD₃OD)

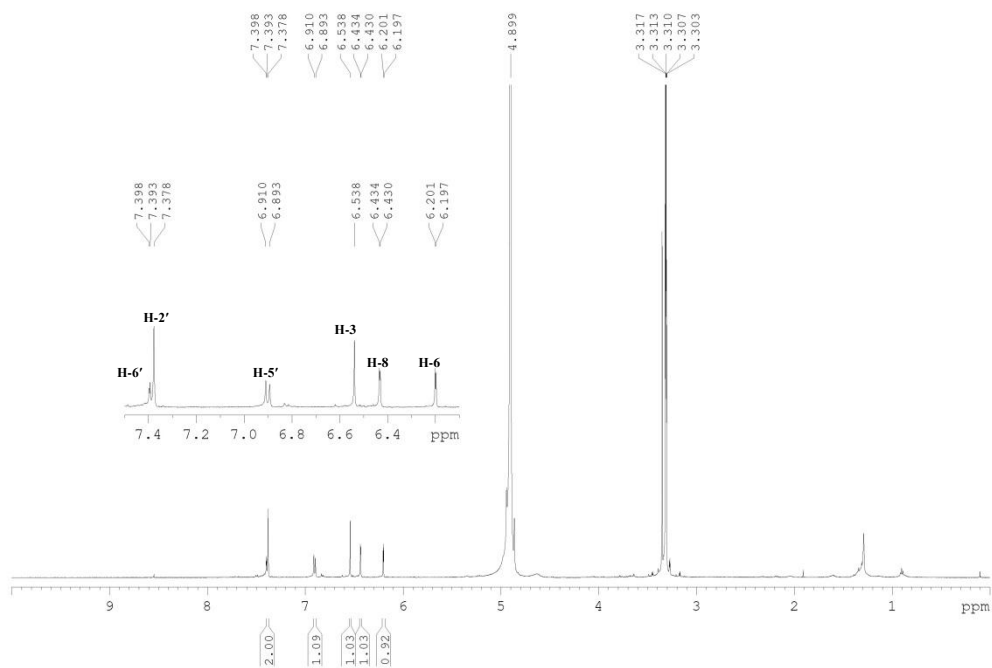
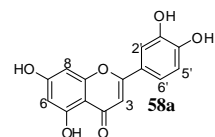


HSQC-NMR, **63b**, (500 MHz, CD₃OD)

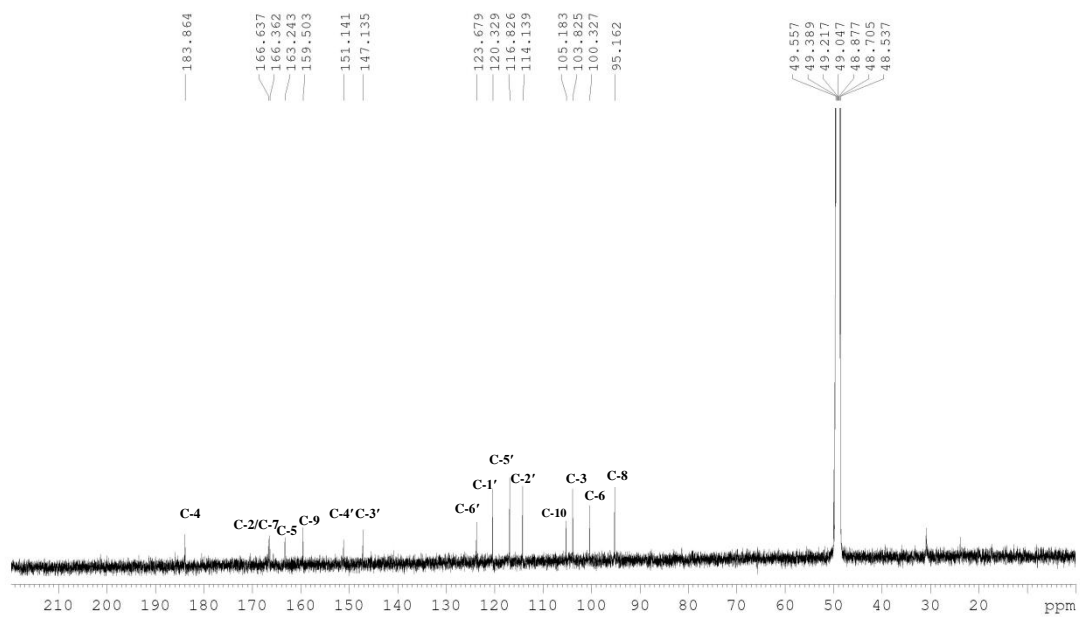


Φάσματα μεταβολίτη: Λουτεολίνη

^1H NMR, **58a**, (500 MHz, CD_3OD)

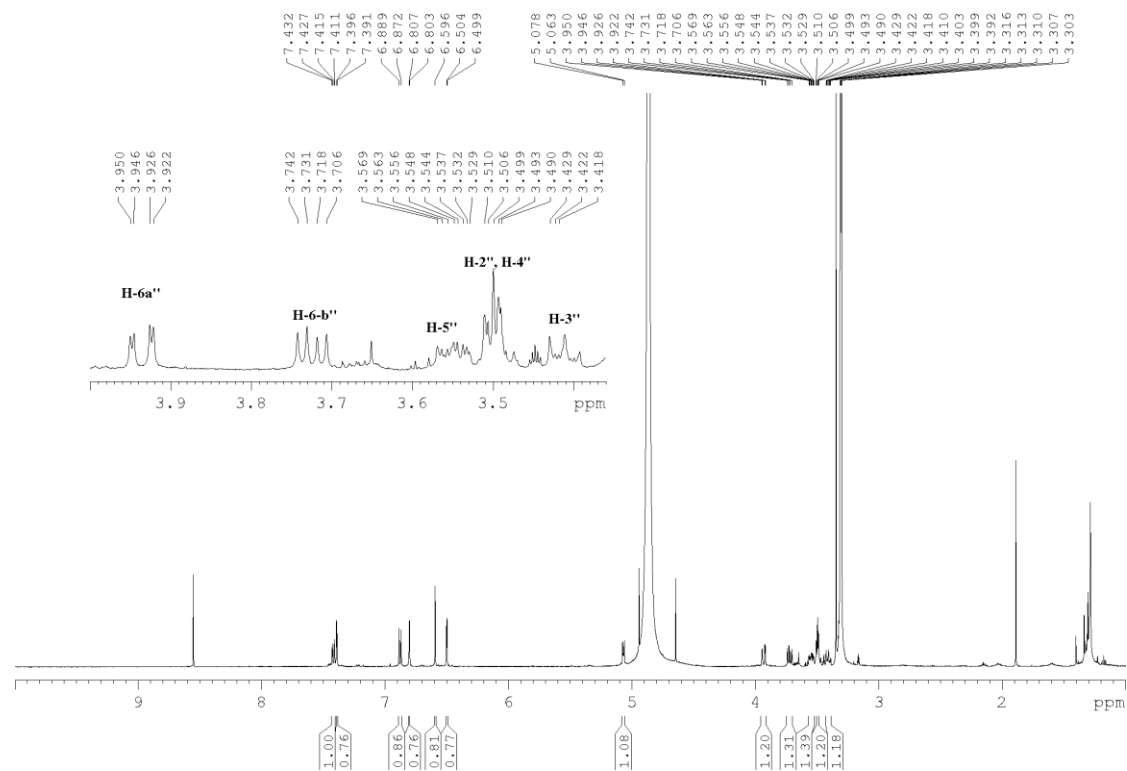
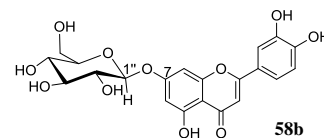


^{13}C -NMR, **58a**, (500 MHz, CD_3OD)

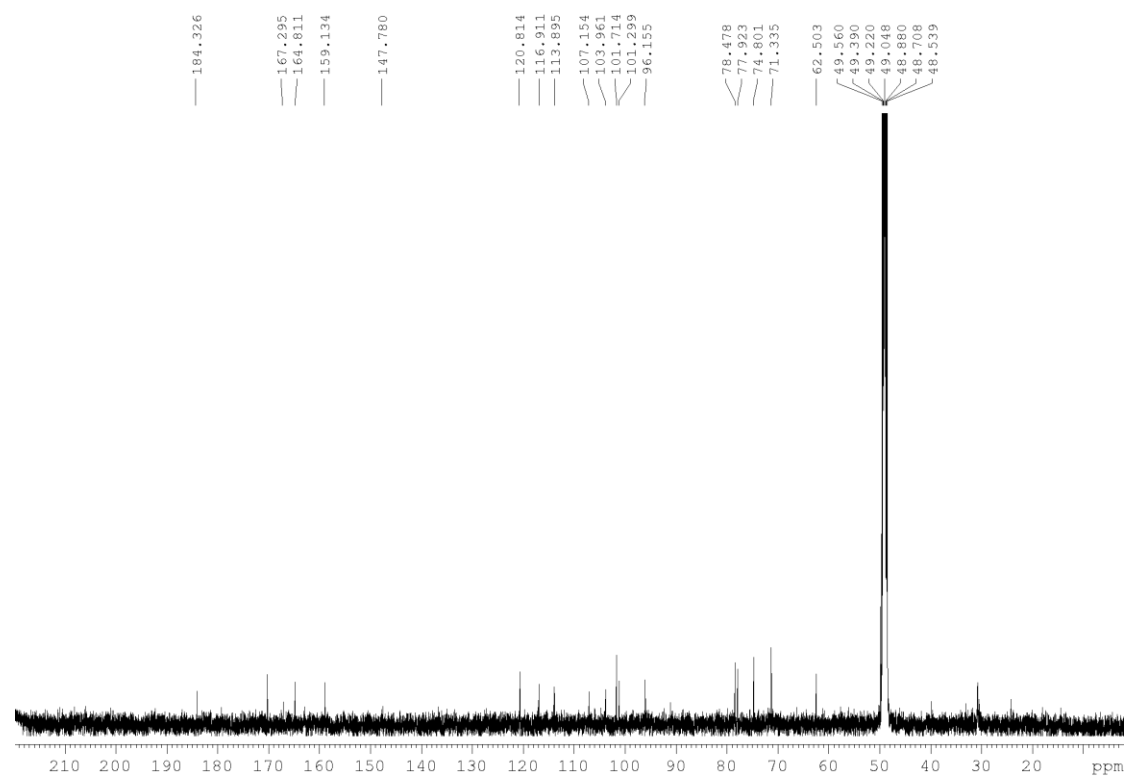


Φάσματα μεταβολίτη: Λουτεολινο-7-*O*-β-D-γλυκοζίτης

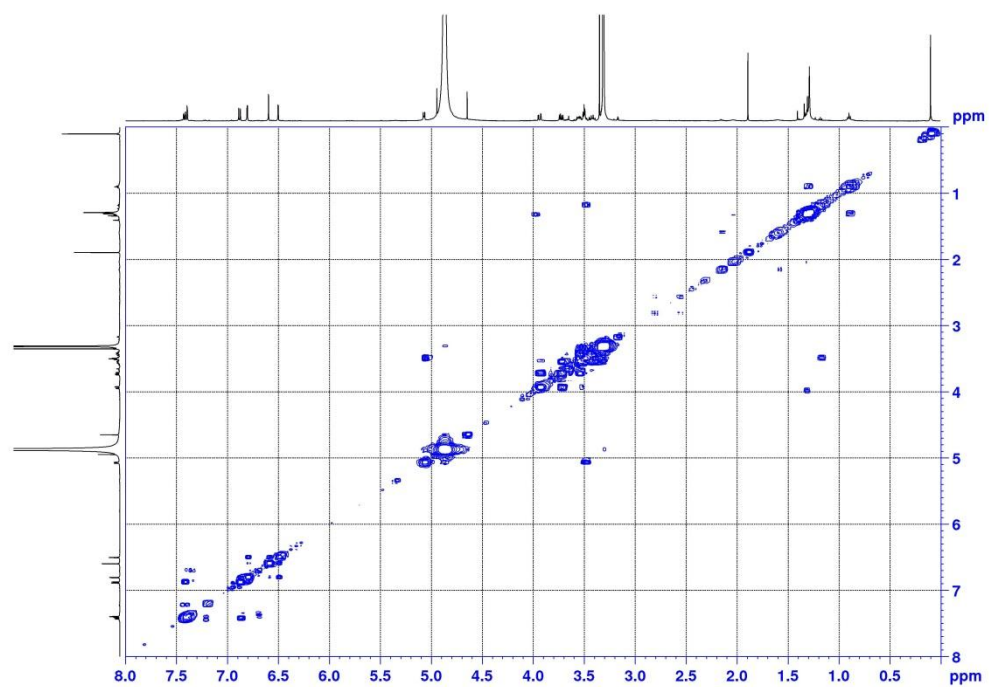
^1H NMR, **58b**, (500 MHz, CD_3OD)



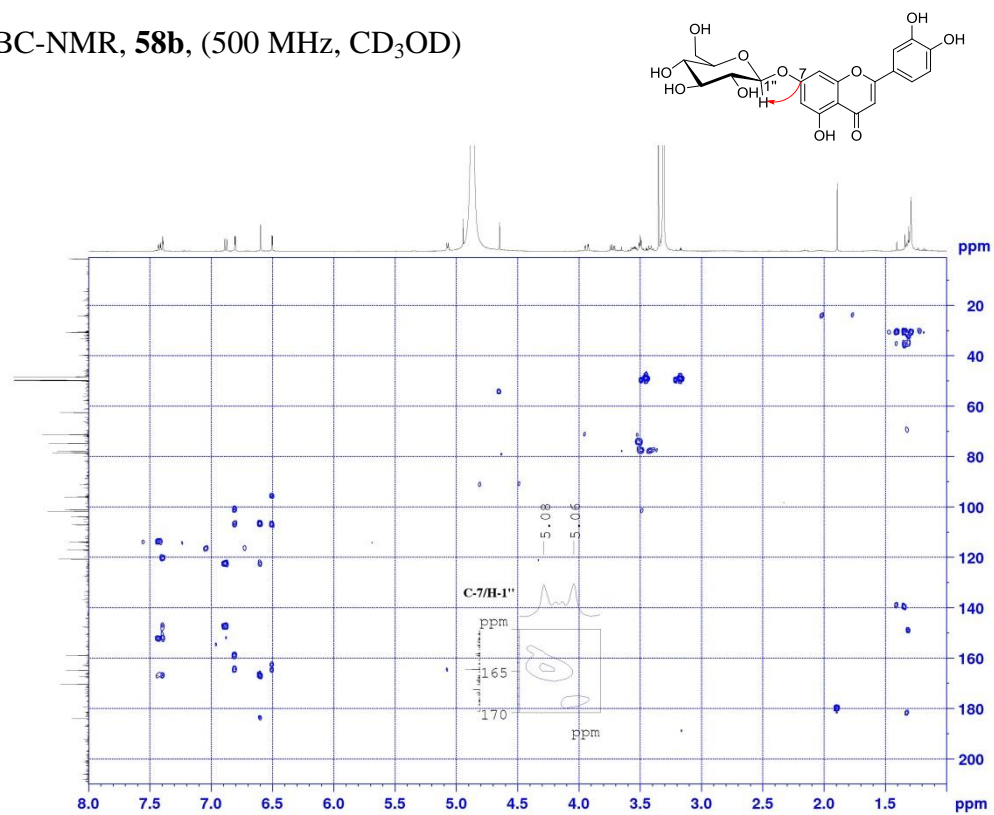
^{13}C NMR, **58b**, (500 MHz, CD_3OD)



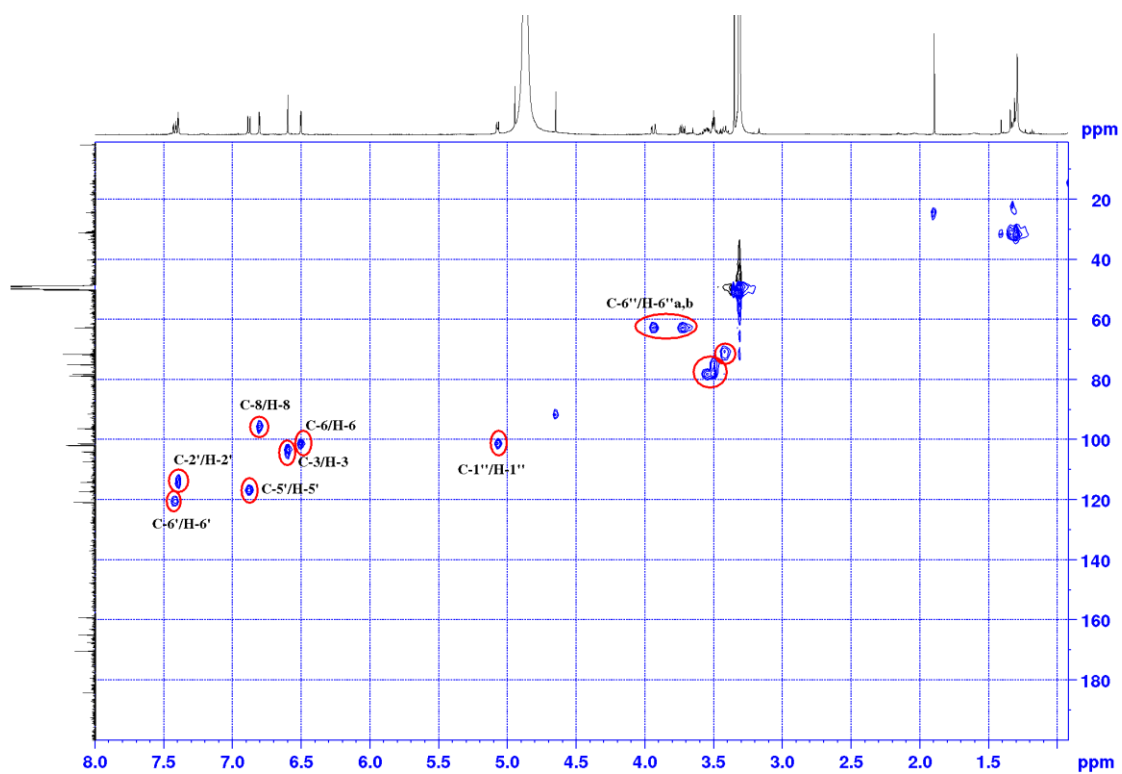
COSY-NMR, **58b**, (500 MHz, CD₃OD)



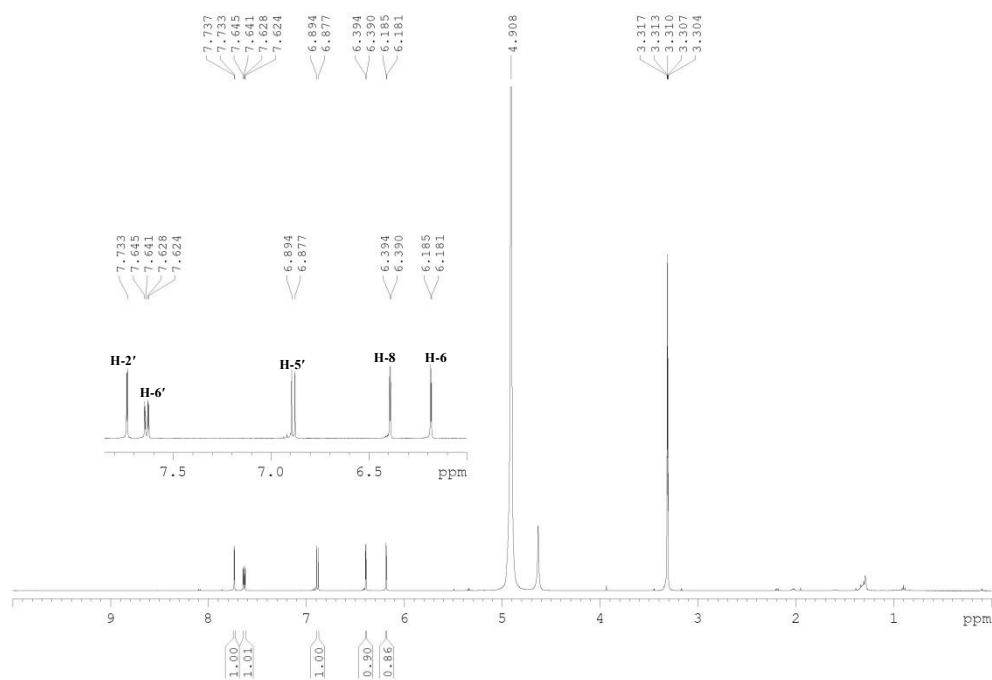
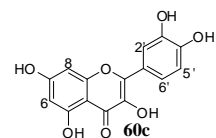
HMBC-NMR, **58b**, (500 MHz, CD₃OD)



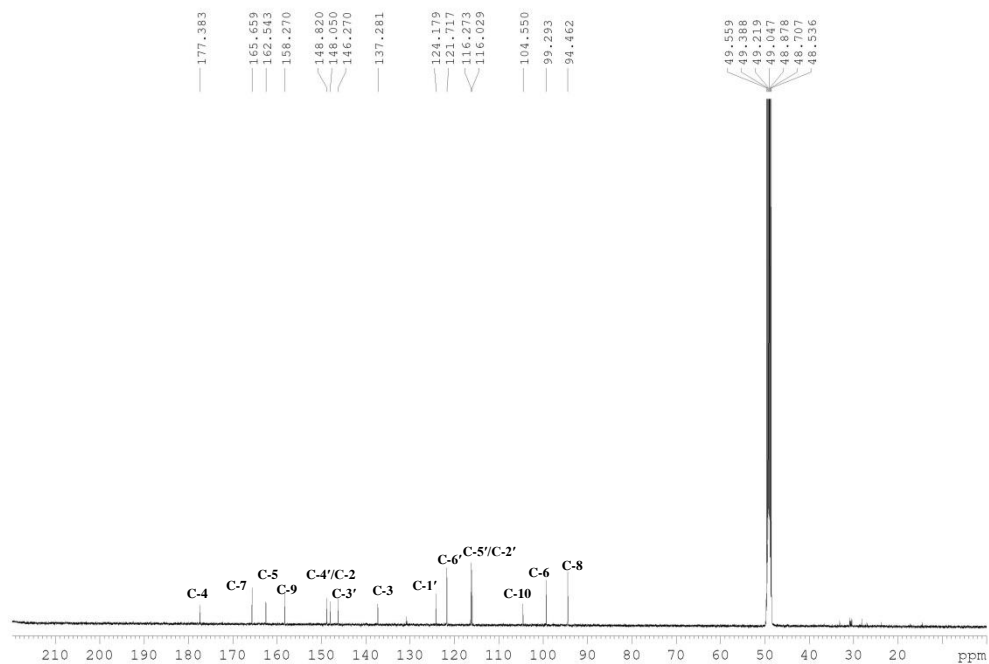
HSQC-NMR, **58b**, (500 MHz, CD₃OD)



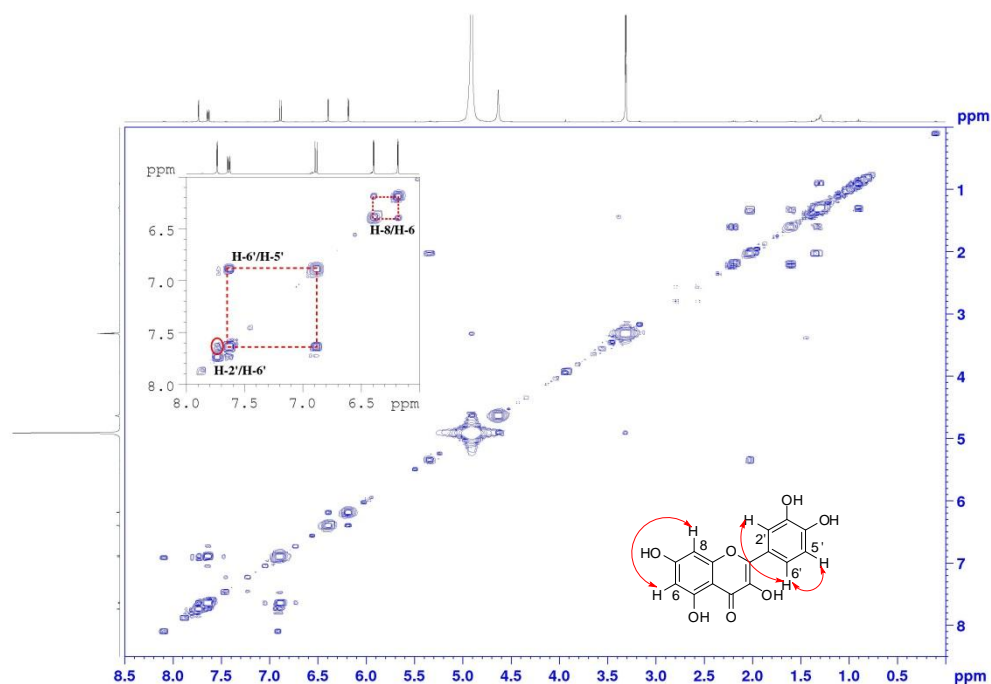
Φάσματα μεταβολίτη: **Κερκετίνη**
 ^1H NMR, **60c**, (500 MHz, CD_3OD)



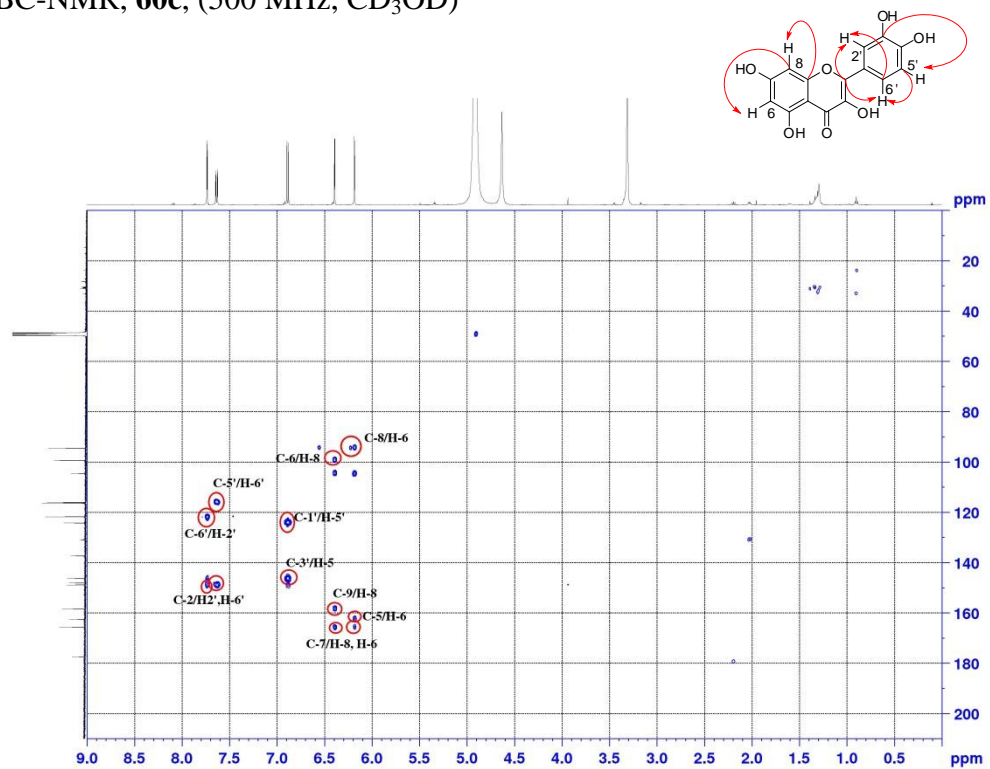
^{13}C -NMR, **60c**, (500 MHz, CD_3OD)



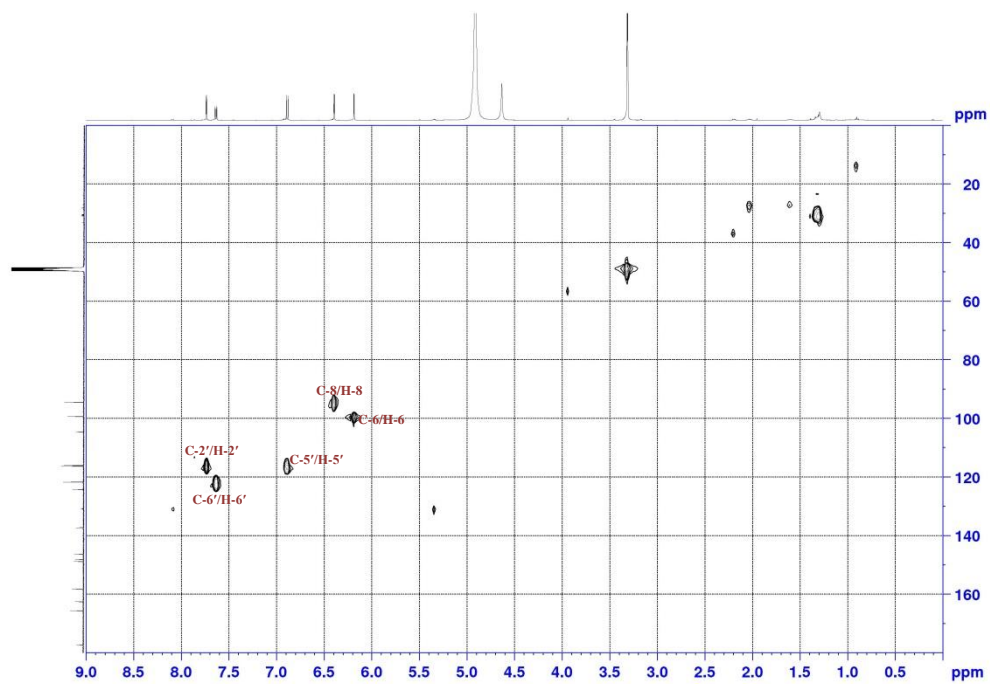
COSY-NMR, **60c**, (500 MHz, CD₃OD)



HMBC-NMR, **60c**, (500 MHz, CD₃OD)

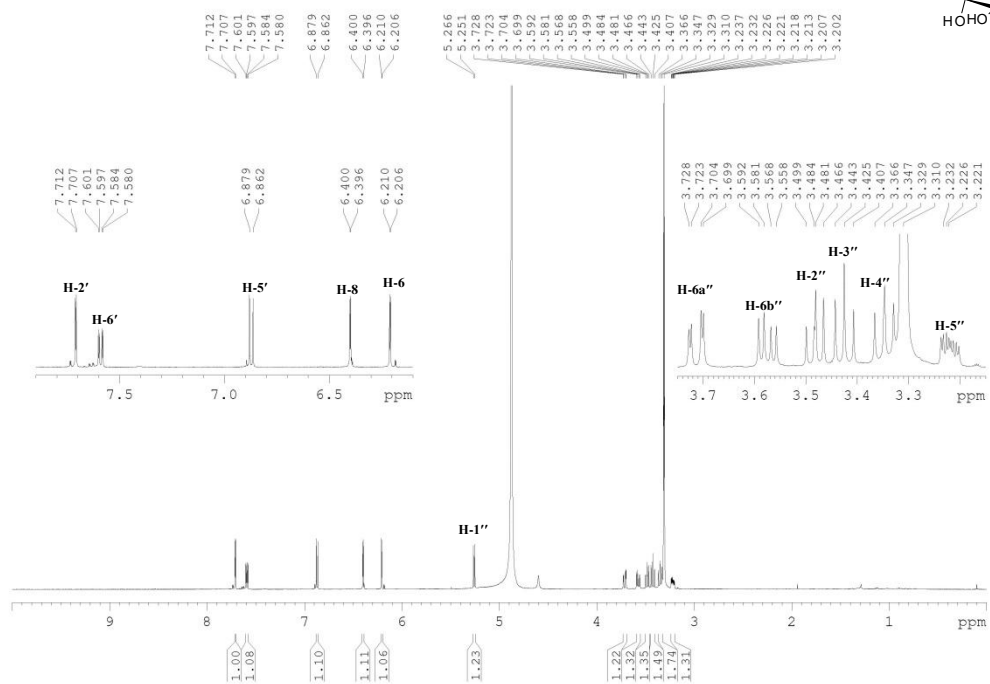
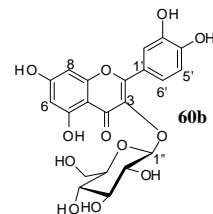


HSQC-NMR, **60c**, (500 MHz, CD₃OD)

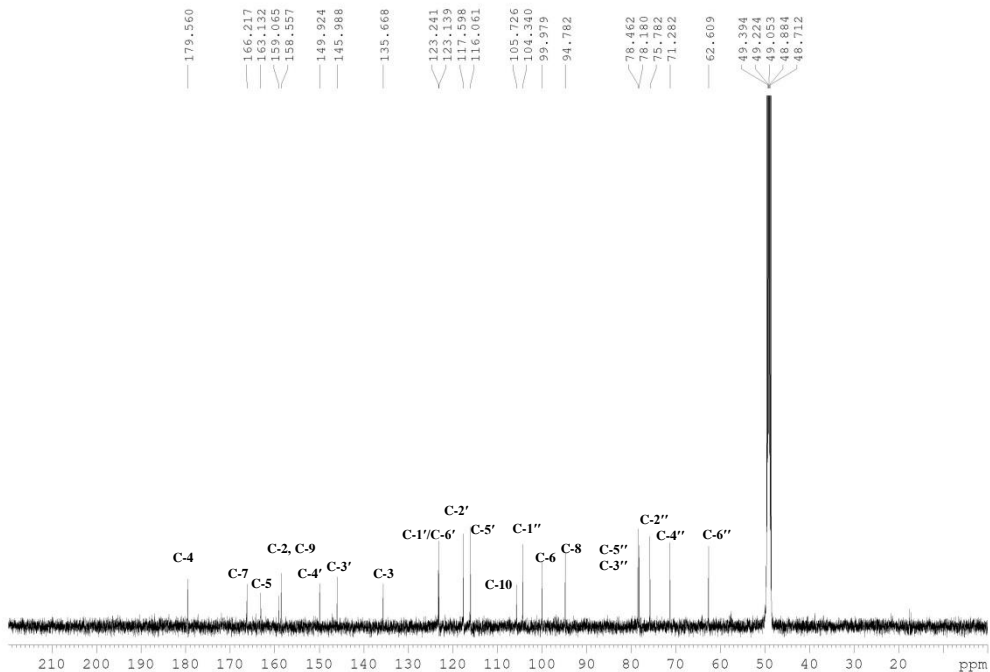


Φάσματα μεταβολίτη: **Κερκετινο-3-O-β-D-γλυκοζίτης**

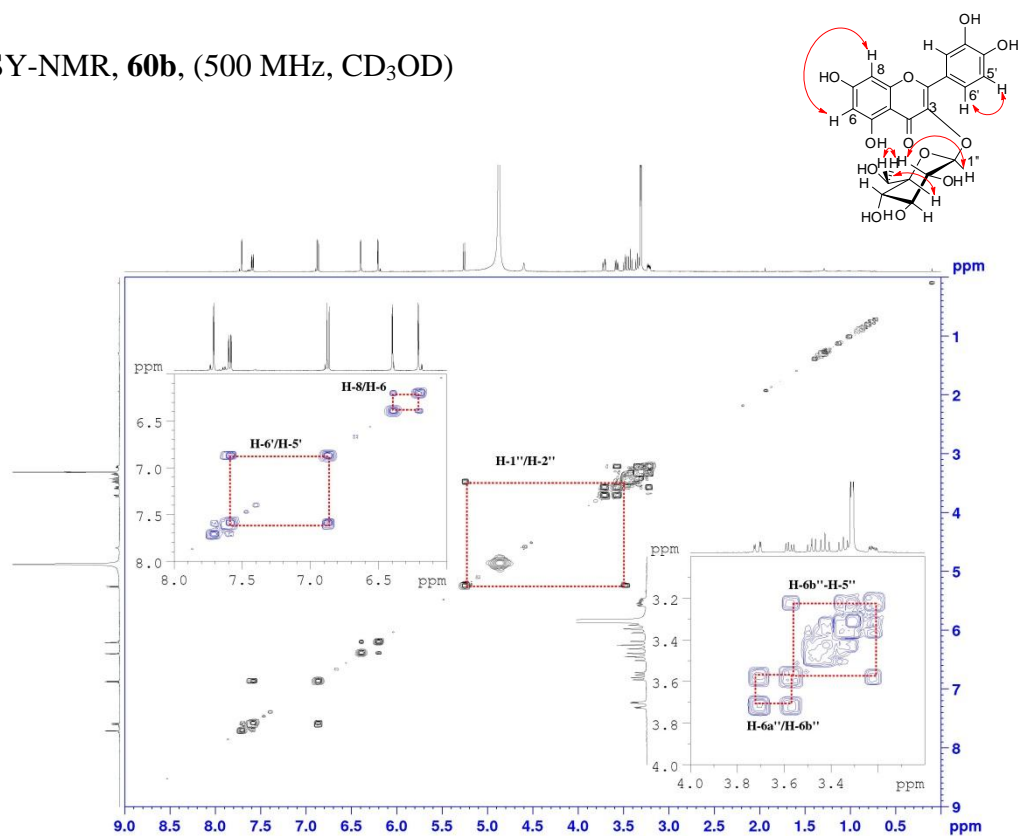
^1H NMR, **60b**, (500 MHz, CD_3OD)



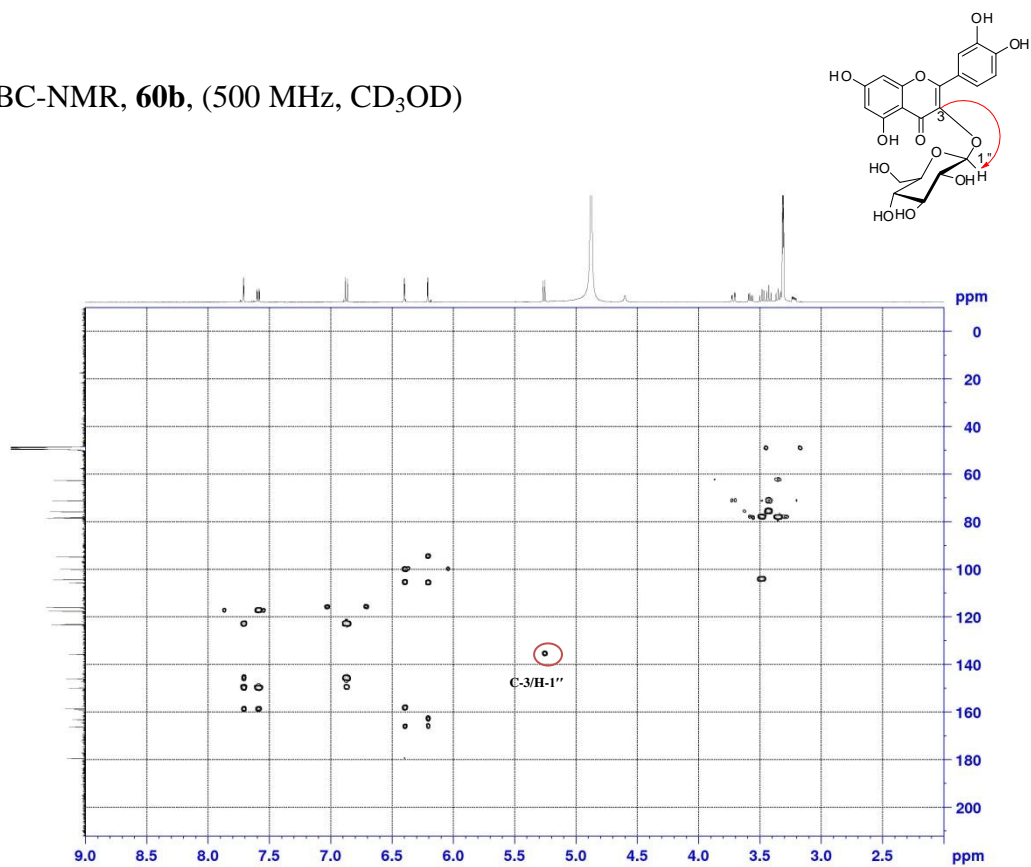
^{13}C -NMR, **60b**, (500 MHz, CD_3OD)



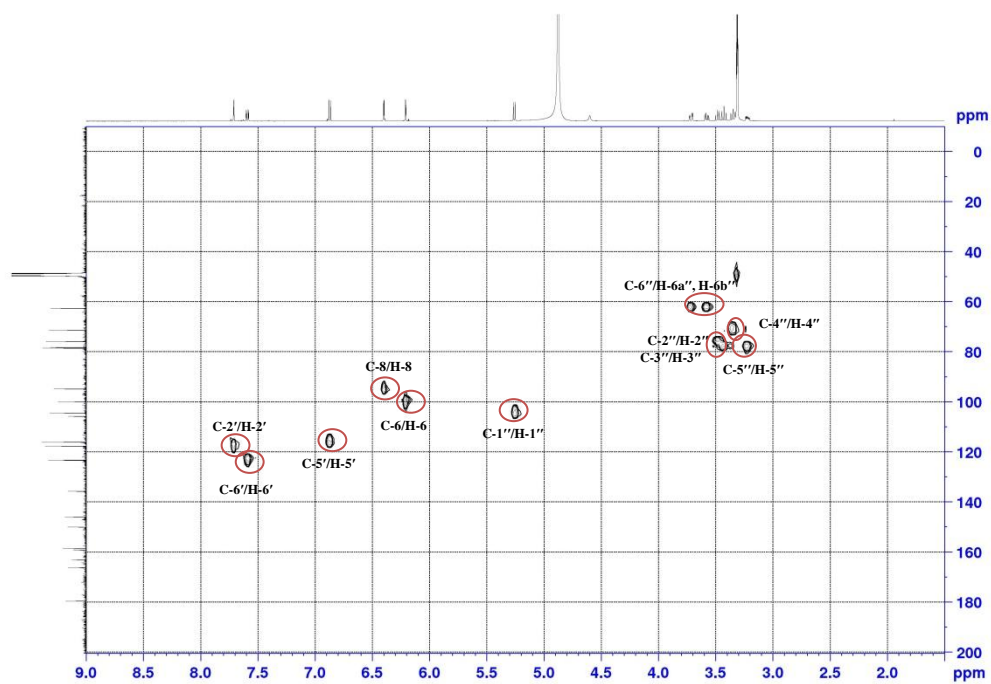
COSY-NMR, **60b**, (500 MHz, CD₃OD)



HMBC-NMR, **60b**, (500 MHz, CD₃OD)

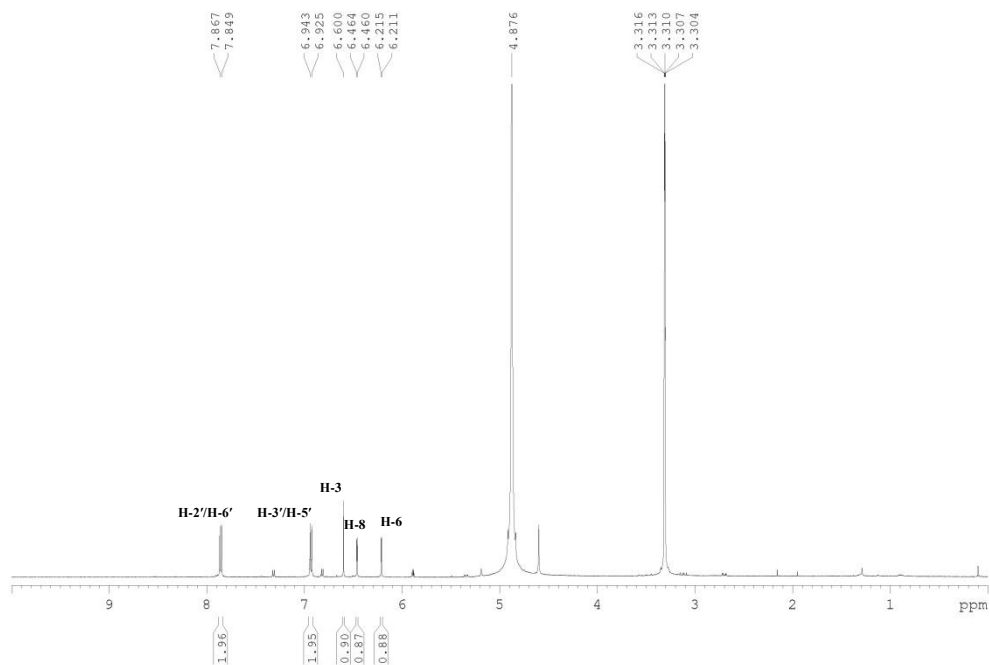
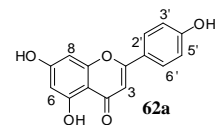


HSQC-NMR, **60b**, (500 MHz, CD₃OD)

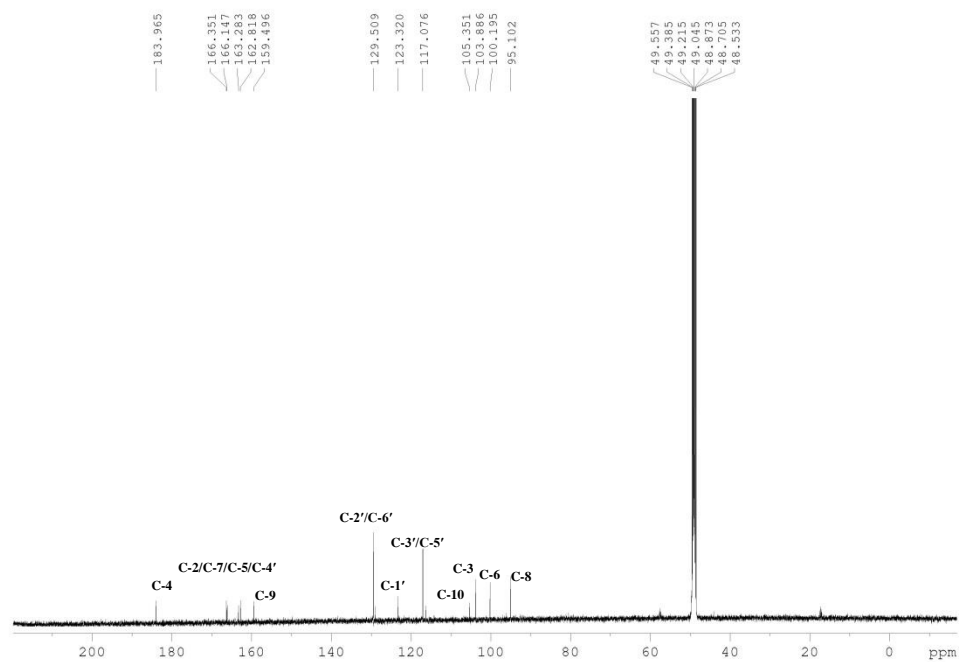


Φάσματα μεταβολίτη: **Απιγενίνη**

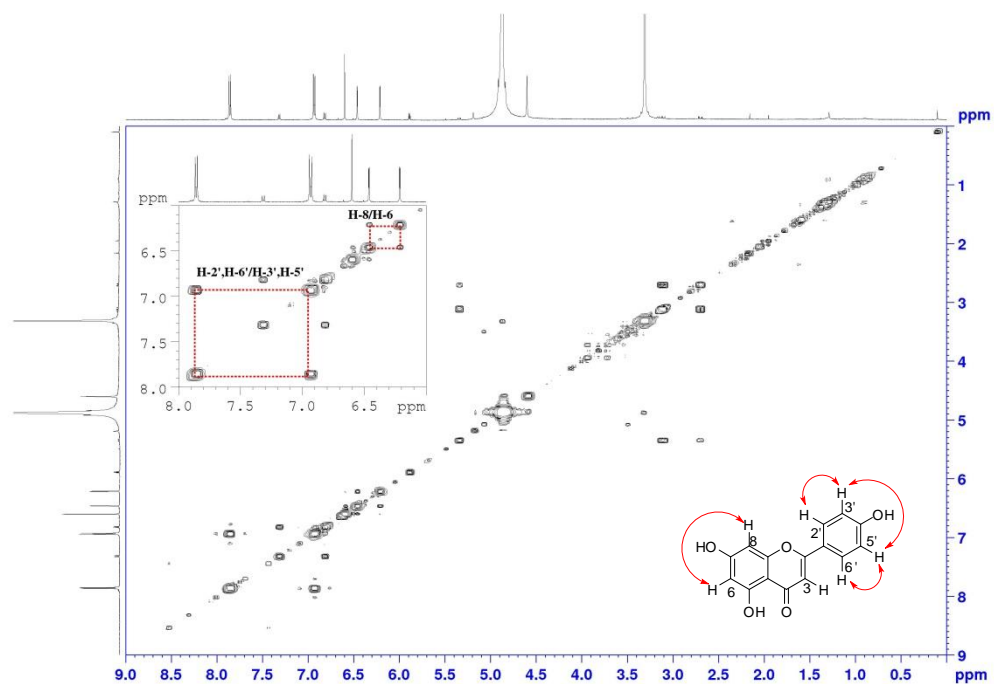
^1H NMR, **62a**, (500 MHz, CD_3OD)



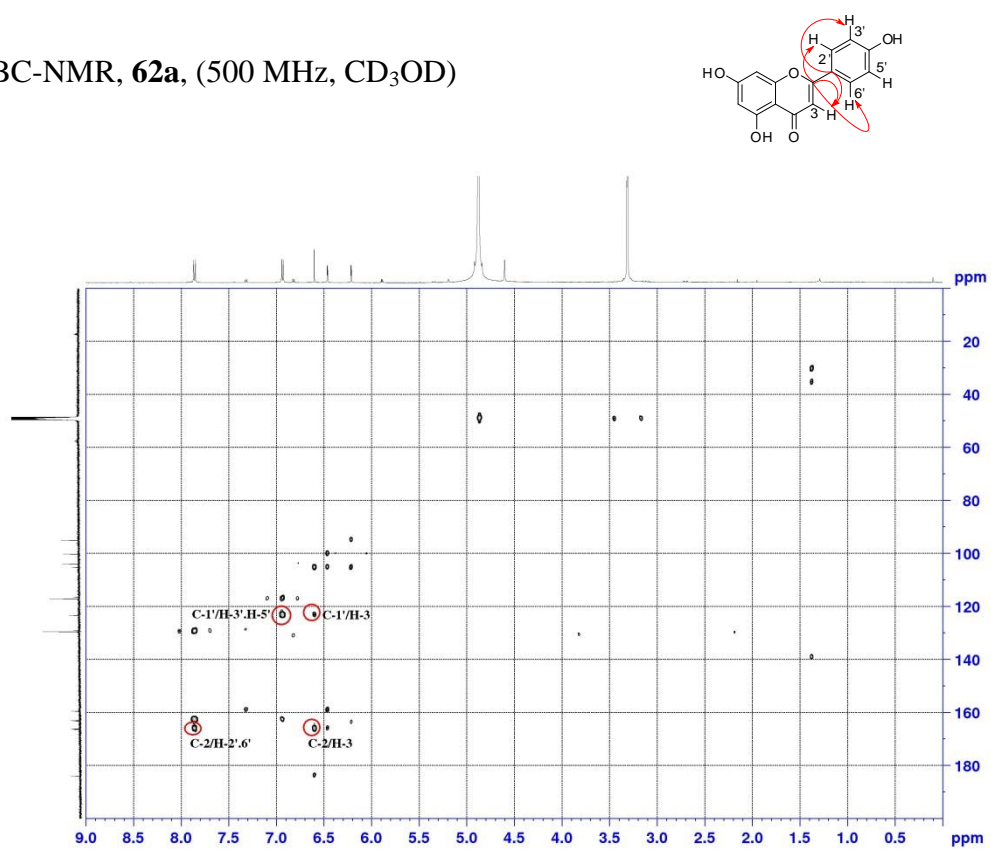
^{13}C -NMR, **62a**, (500 MHz, CD_3OD)



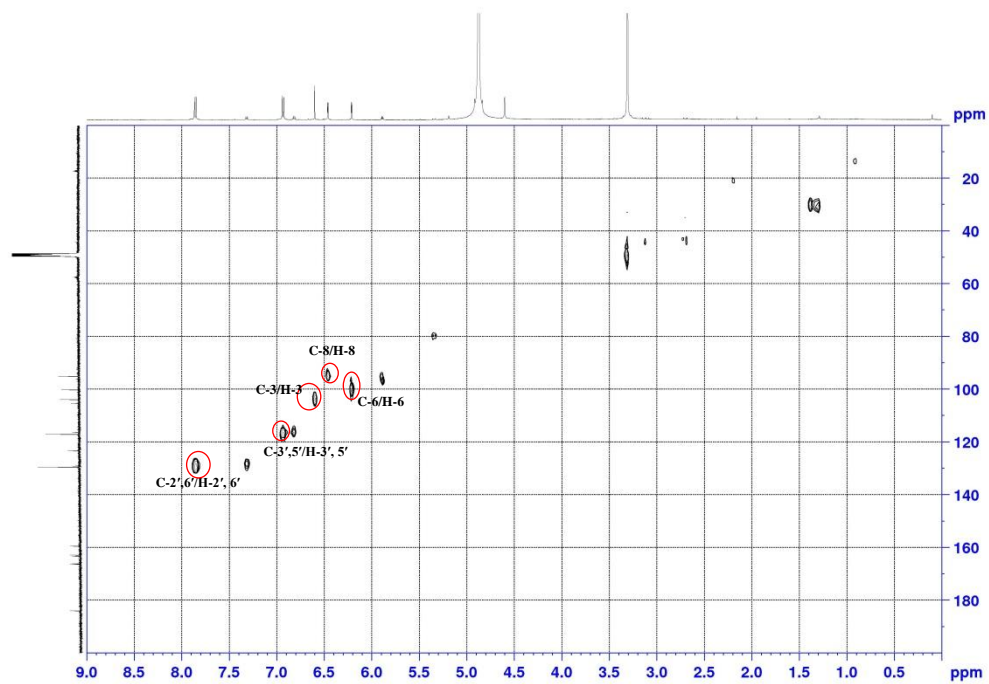
COSY-NMR, **62a**, (500 MHz, CD₃OD)



HMBC-NMR, **62a**, (500 MHz, CD₃OD)

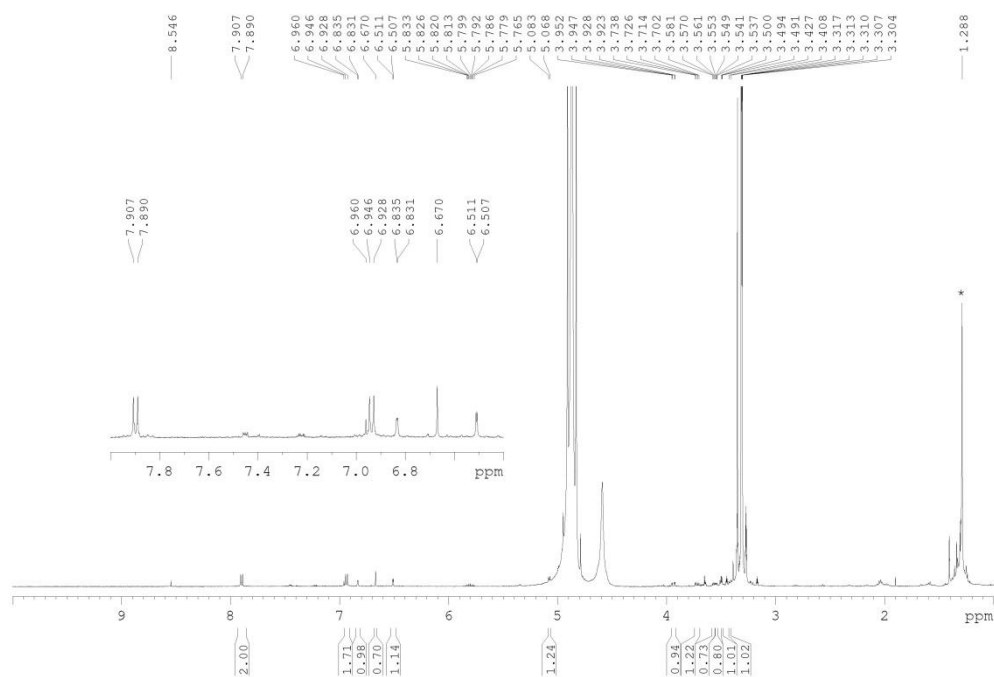
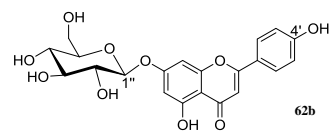


HSQC-NMR, **62a**, (500 MHz, CD₃OD)



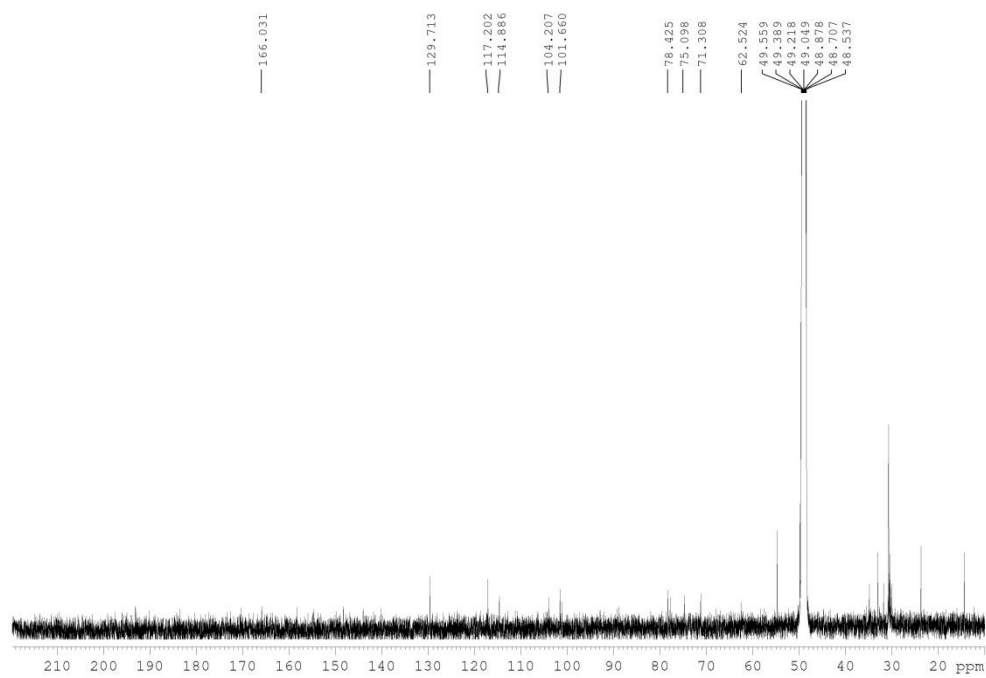
Φάσμα μεταβολίτη: **Απιγενινο-7-O-β-D-γλυκοζίτης**

^1H NMR, **62b**, (500 MHz, CD_3OD)

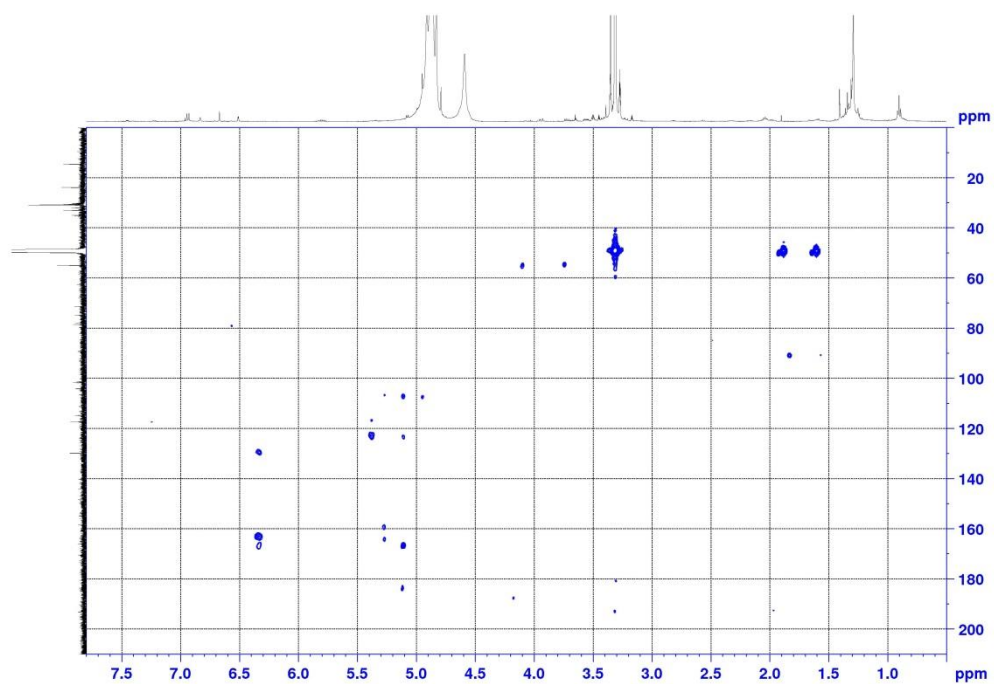


* δ 1.28 ppm grease

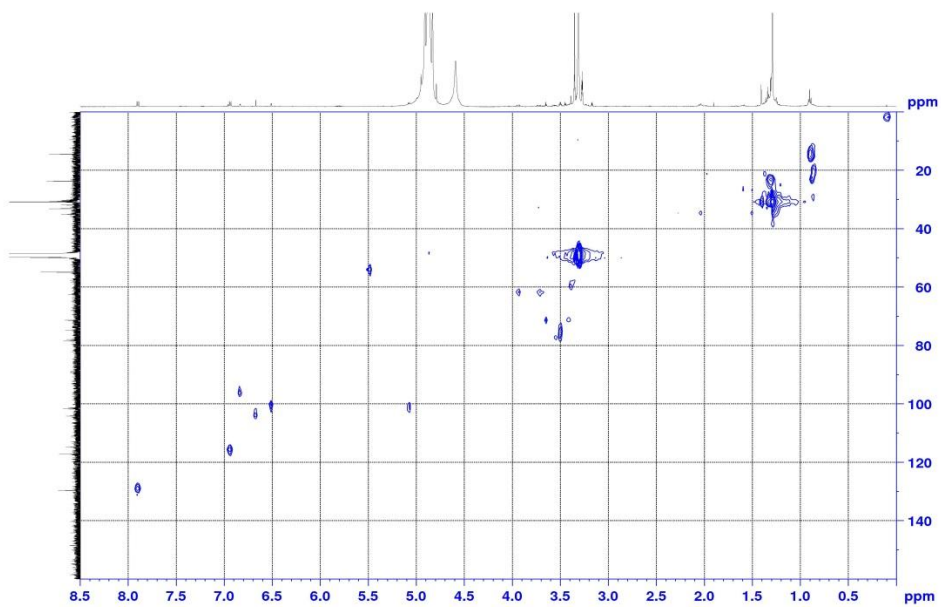
^{13}C NMR, **62b**, (500 MHz, CD_3OD)



HMBC-NMR, **62b**, (500 MHz, CD₃OD)

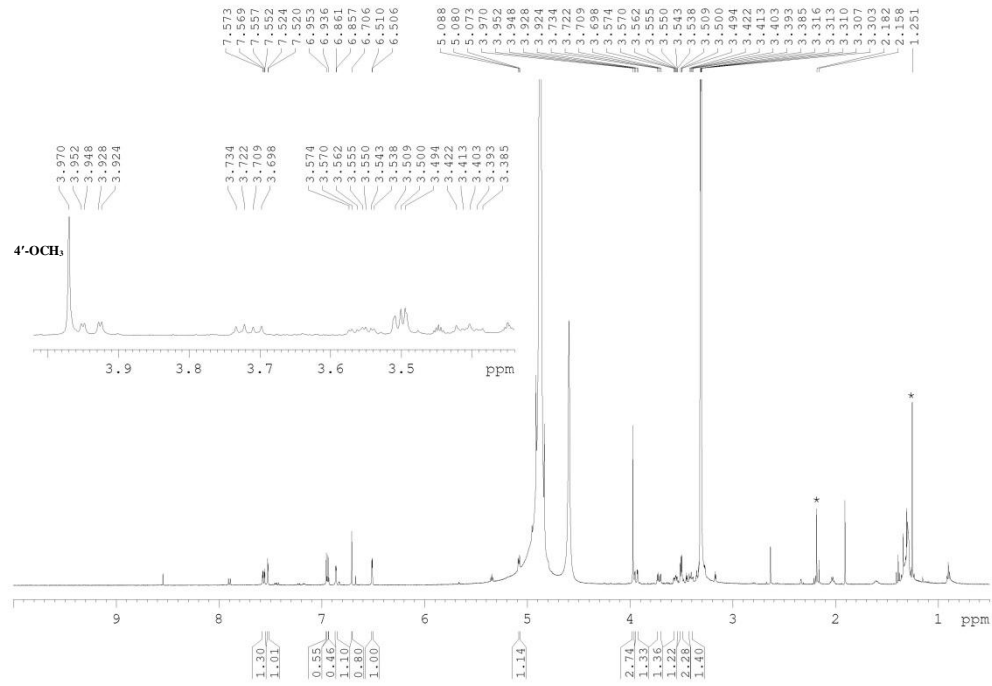
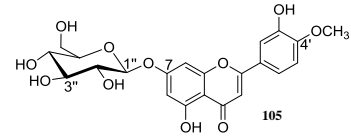


HSQC-NMR, **62b**, (500 MHz, CD₃OD)



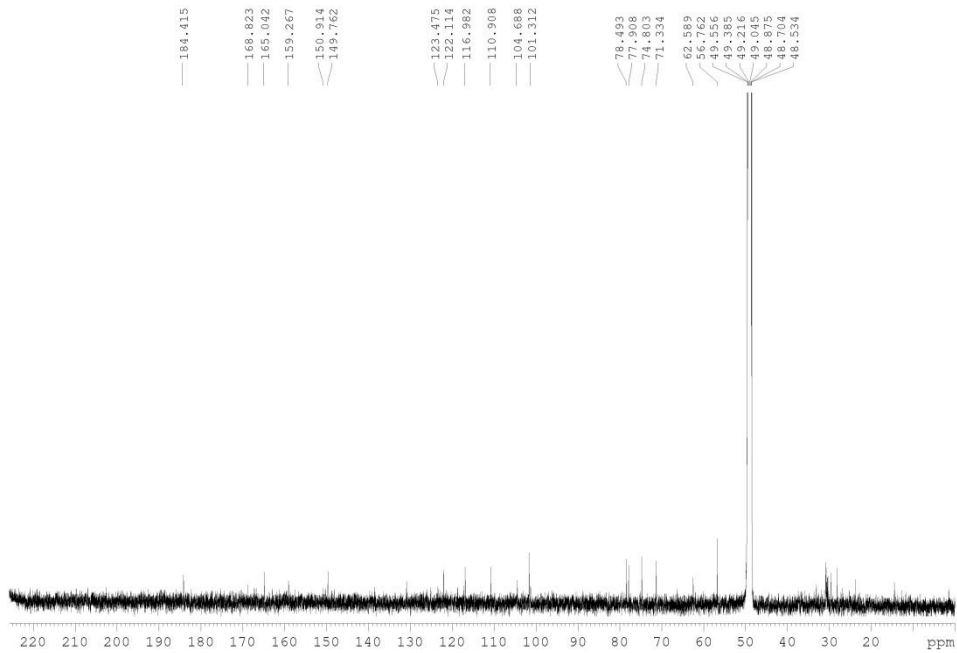
Φάσματα μεταβολίτη: Διοσμέτινο-7-*O*-β-D-γλυκοζιτης

¹H NMR, **105**, (500 MHz, CD₃OD)

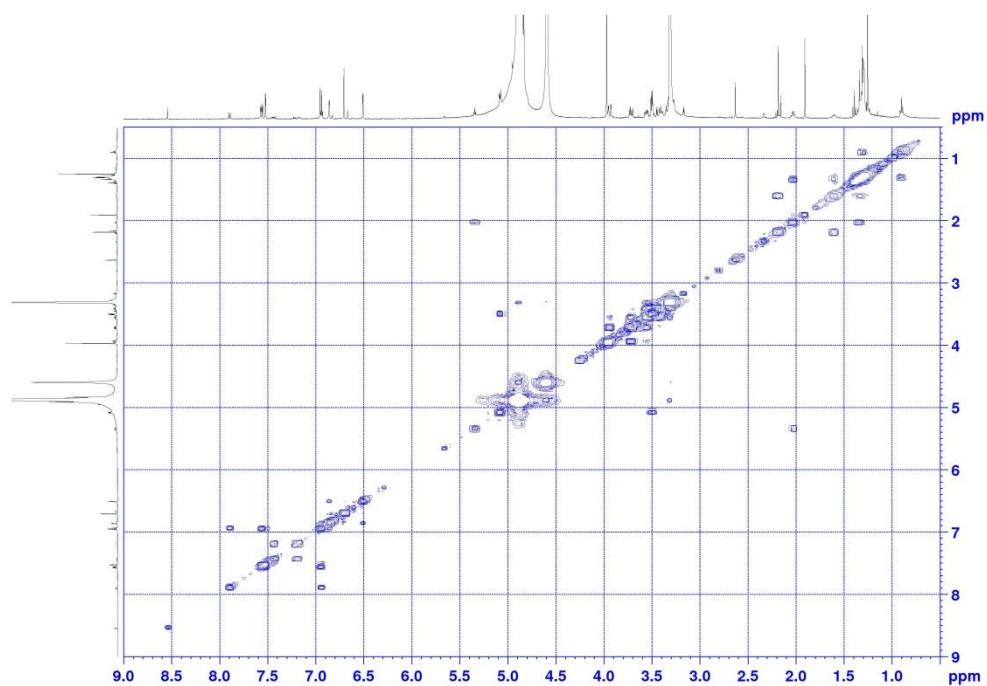


*δ 1.25 ppm grease, 2.15 ppm acetone

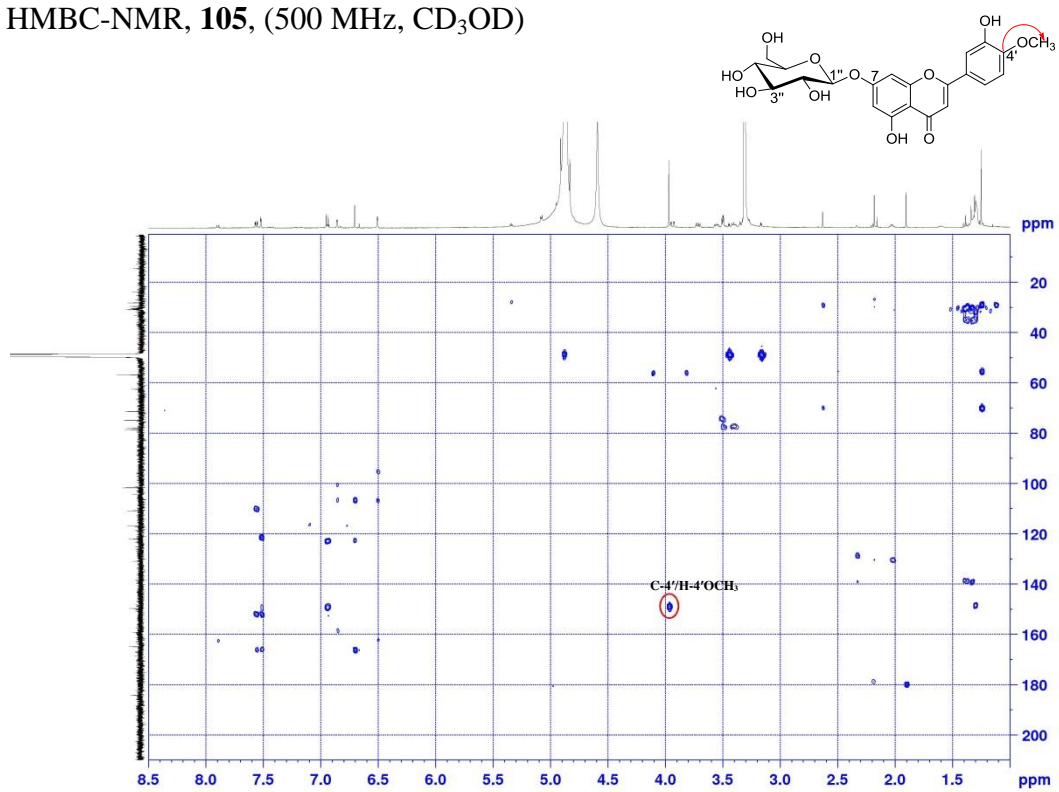
¹³C NMR, **105**, (500 MHz, CD₃OD)



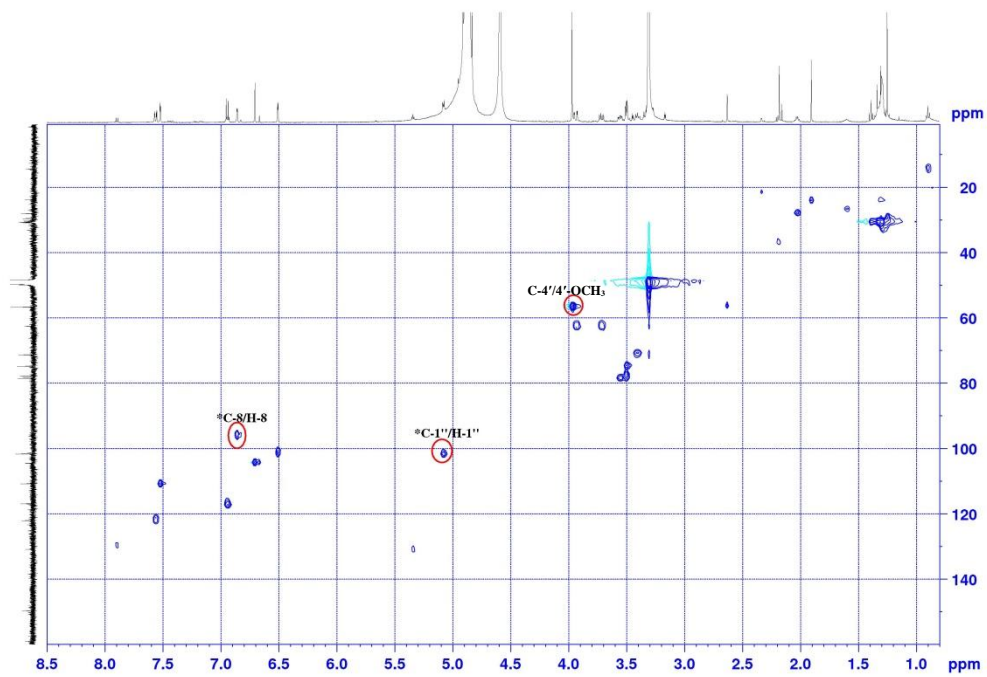
COSY-NMR, **105**, (500 MHz, CD₃OD)



HMBC-NMR, **105**, (500 MHz, CD₃OD)



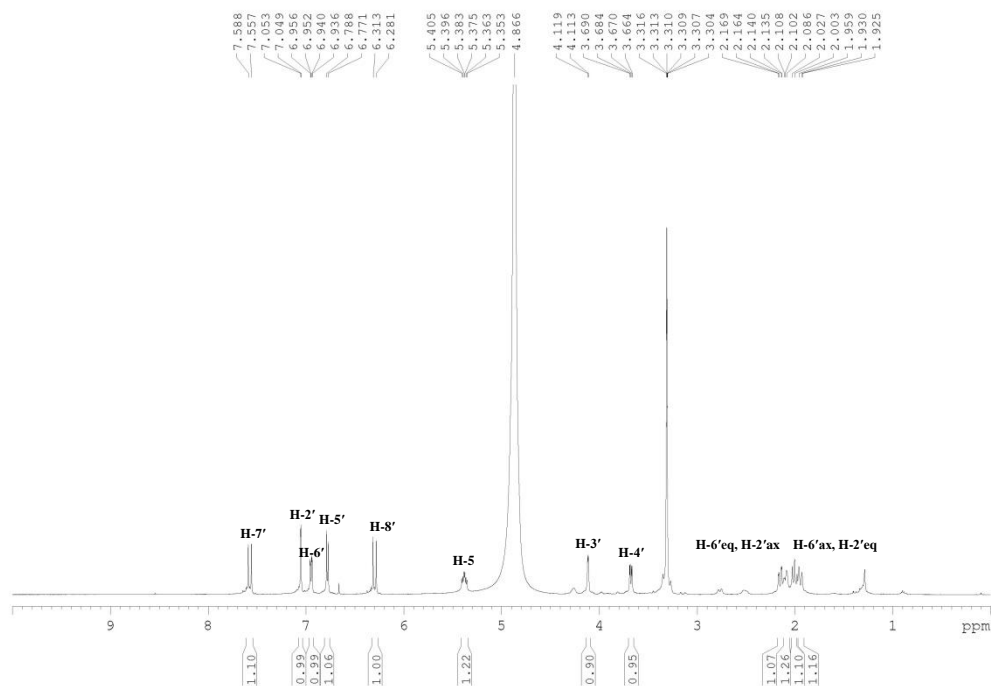
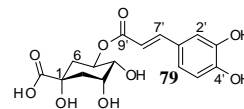
HSQC-NMR, **105**, (500 MHz, CD₃OD)



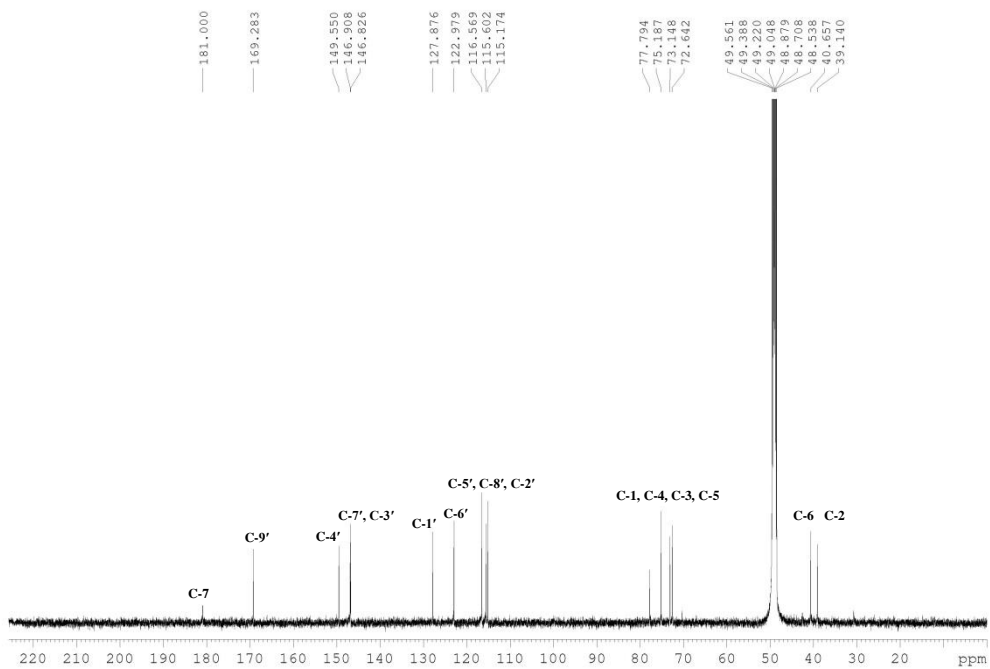
*Οι άνθρακες που αποδόθηκαν από το φάσμα HSQC.

Φάσματα μεταβολίτη: Χλωρογενικό οξύ

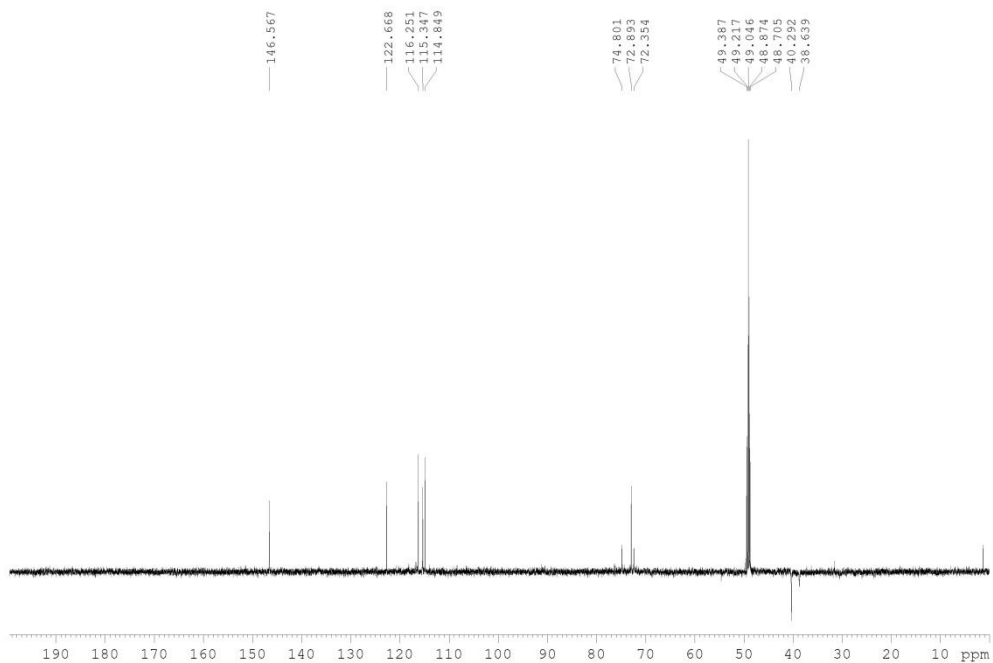
^1H NMR, **79**, (500 MHz, CD_3OD)



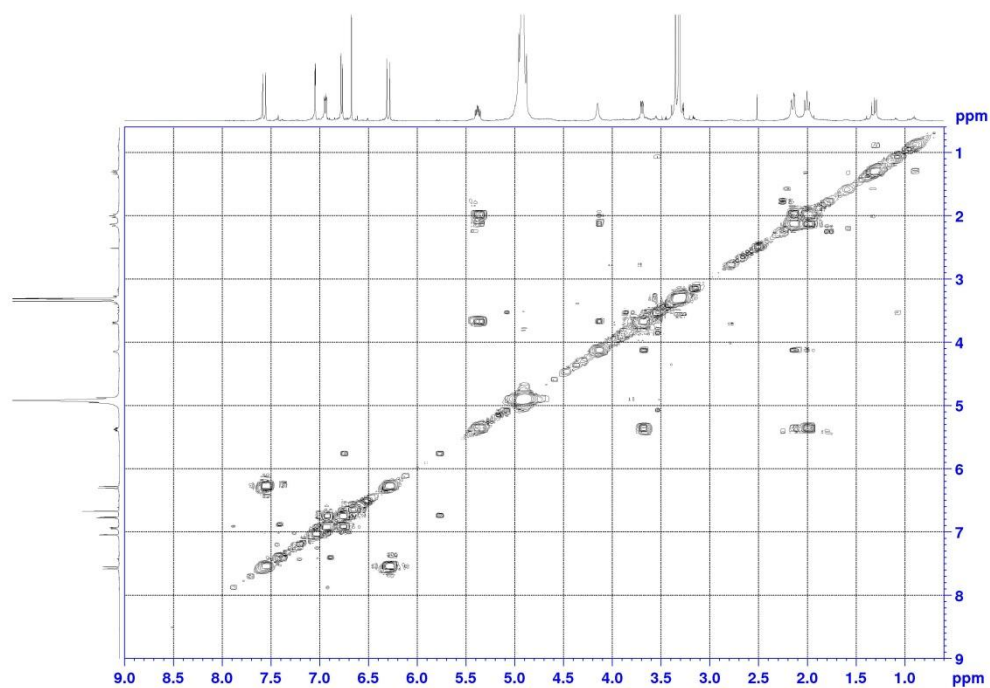
^{13}C NMR, **79**, (500 MHz, CD_3OD)



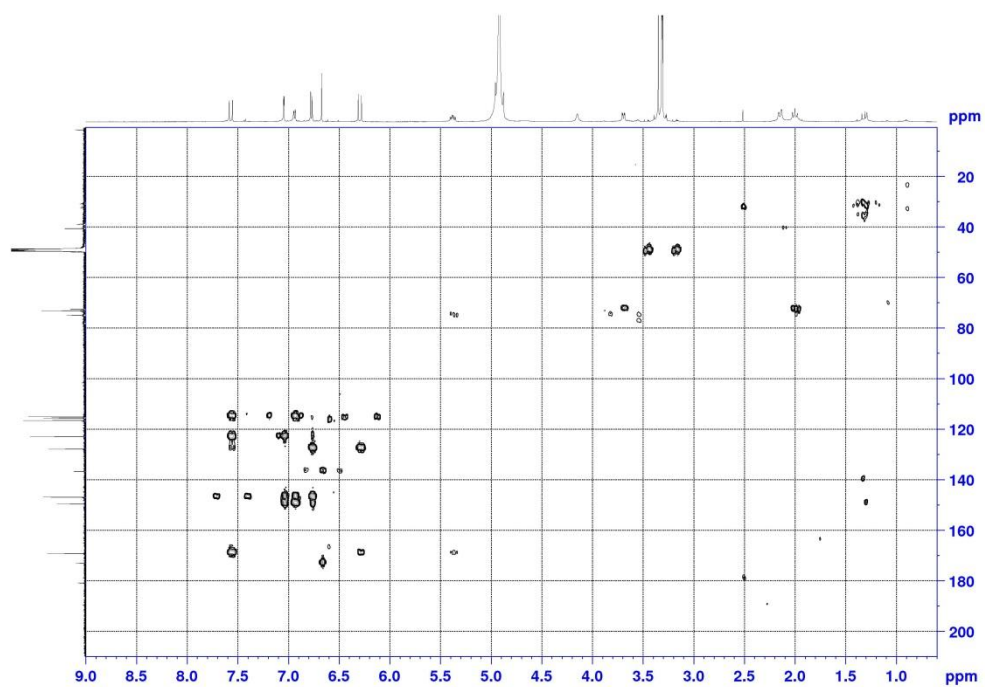
DEPT 135-NMR, **79**, (500 MHz, CD₃OD)



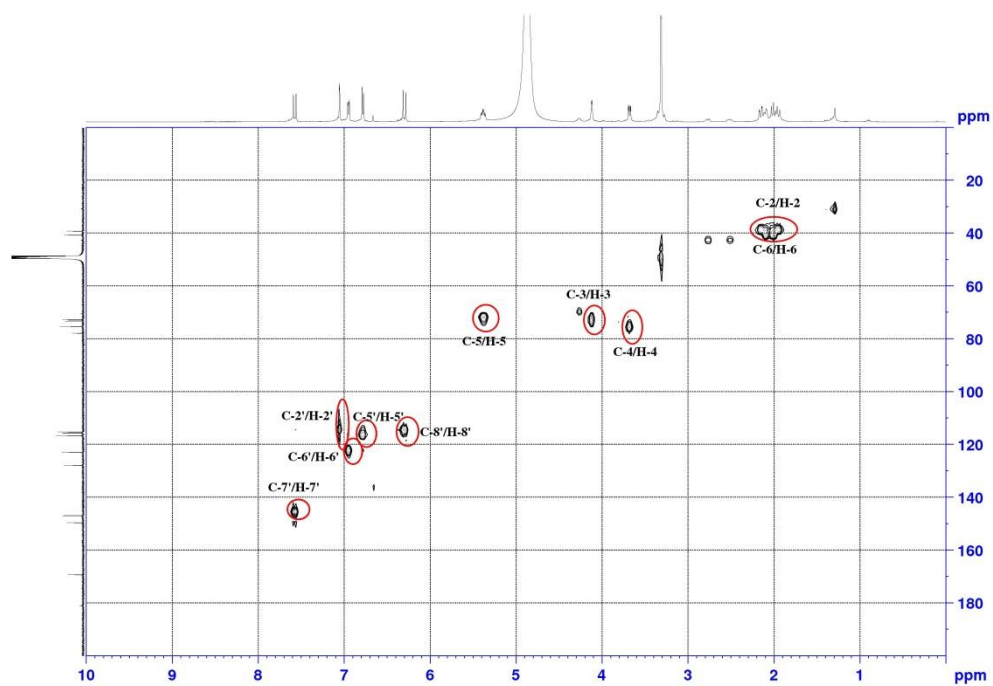
COSY-NMR, **79**, (500 MHz, CD₃OD)



HMBC-NMR, **79**, (500 MHz, CD₃OD)

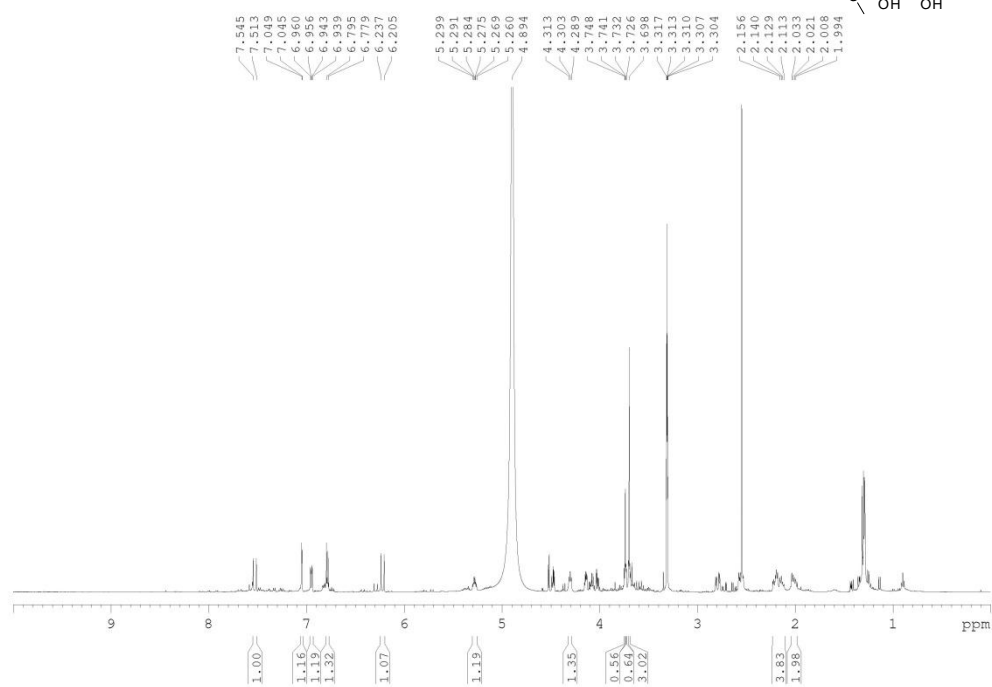
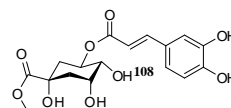


HSQC-NMR, **79**, (500 MHz, CD₃OD)



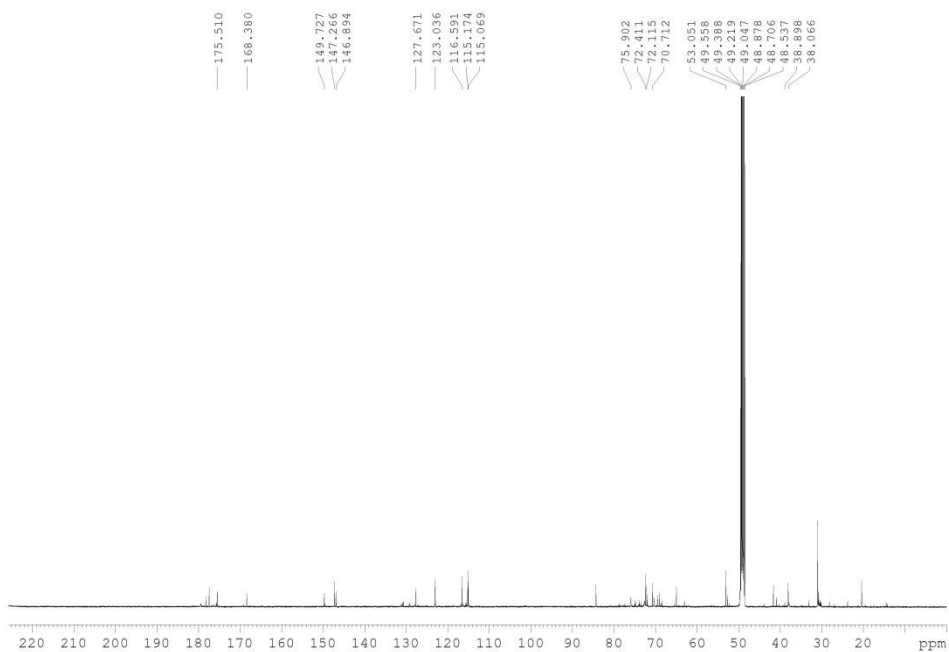
Φάσματα μεταβολίτη: **Μεθυλεστέρας του γλωρογενικού οξέος**

^1H NMR, **108**, (500 MHz, CD_3OD)

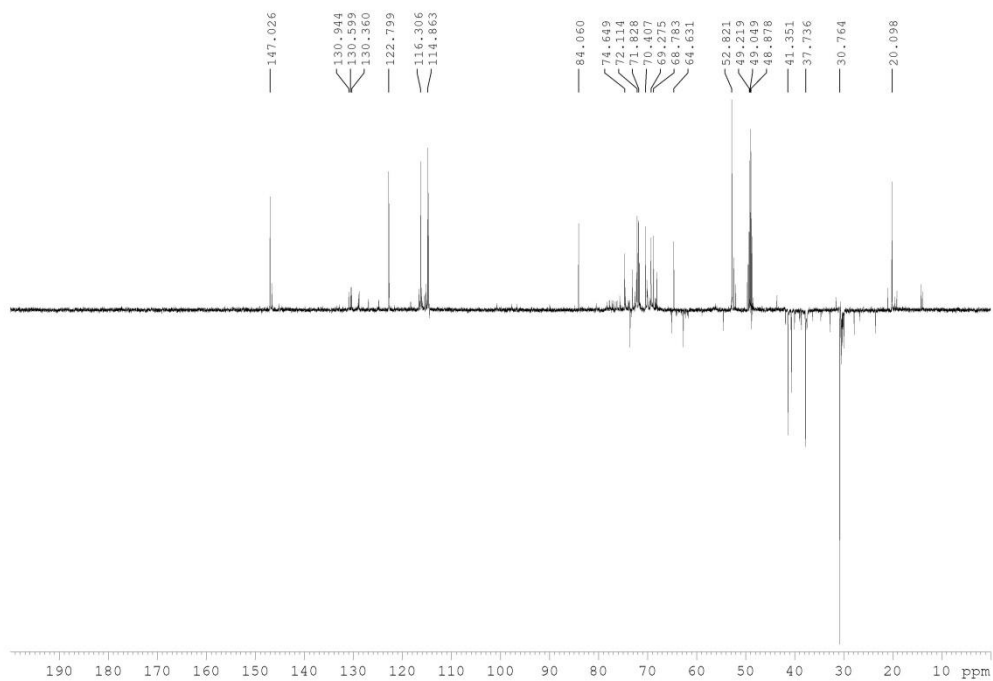


Οι κορυφές που ολοκληρώθηκαν αντιστοιχούν στην ένωση **108**.

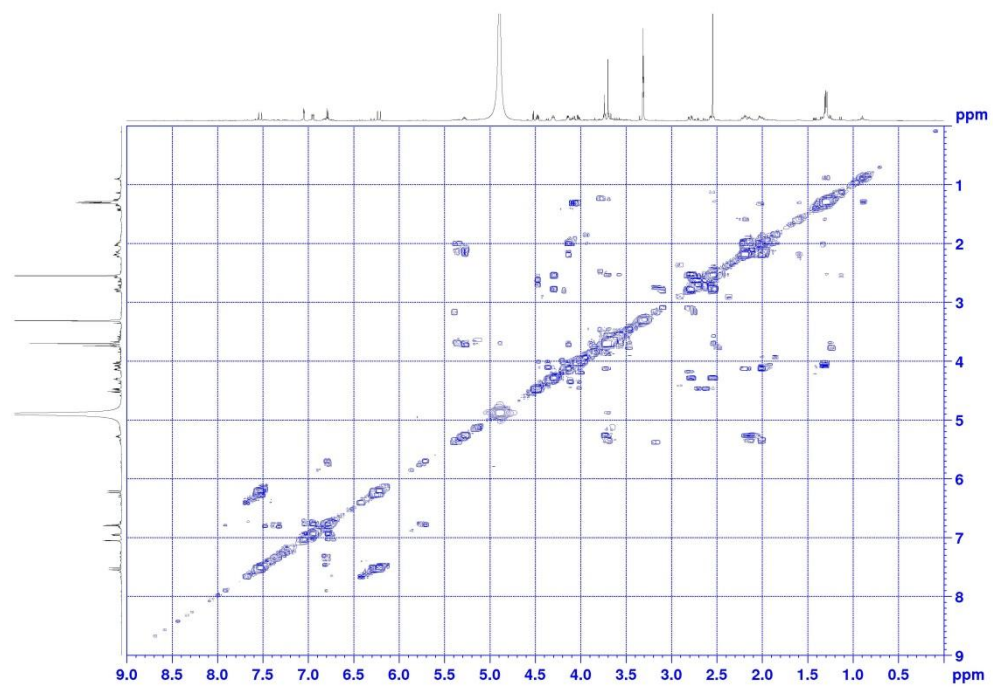
^{13}C NMR, **108**, (500 MHz, CD_3OD)



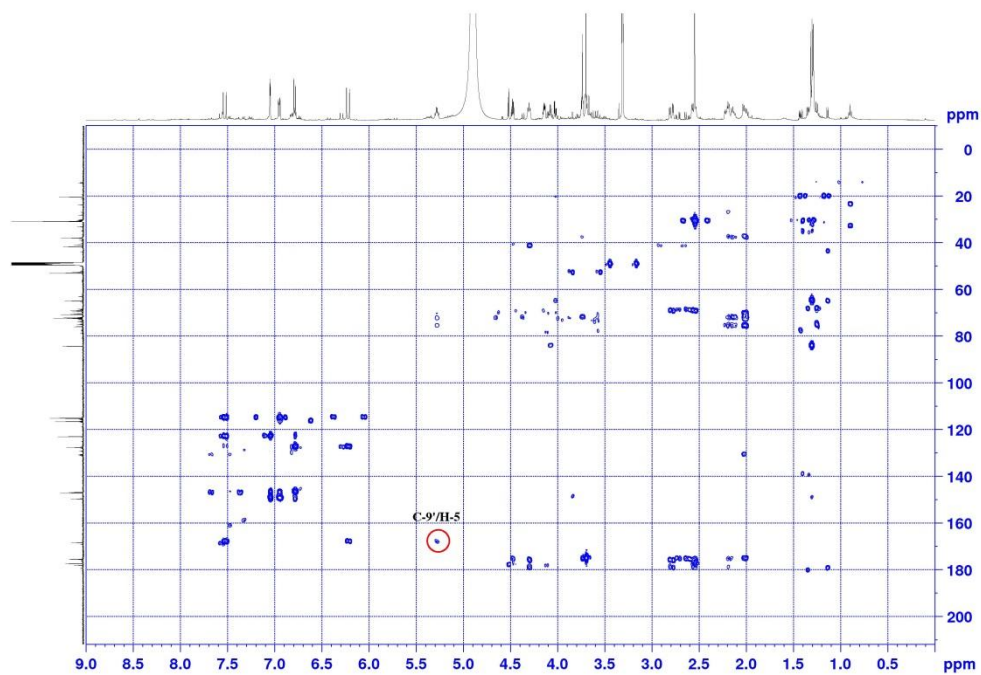
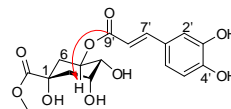
DEPT 135-NMR, **108**, (500 MHz, CD₃OD)



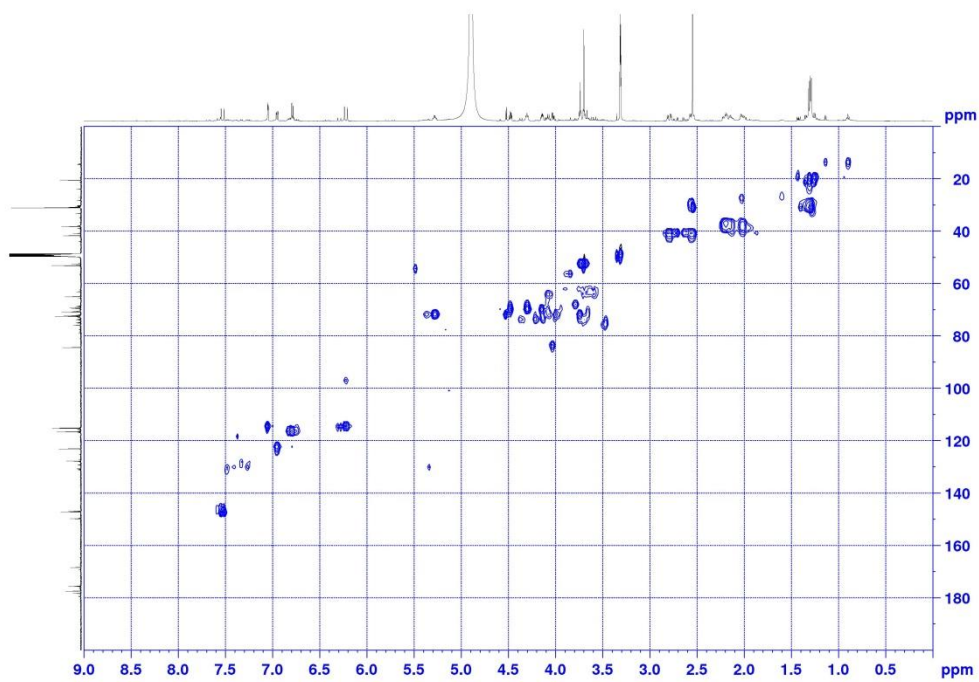
COSY-NMR, **108**, (500 MHz, CD₃OD)



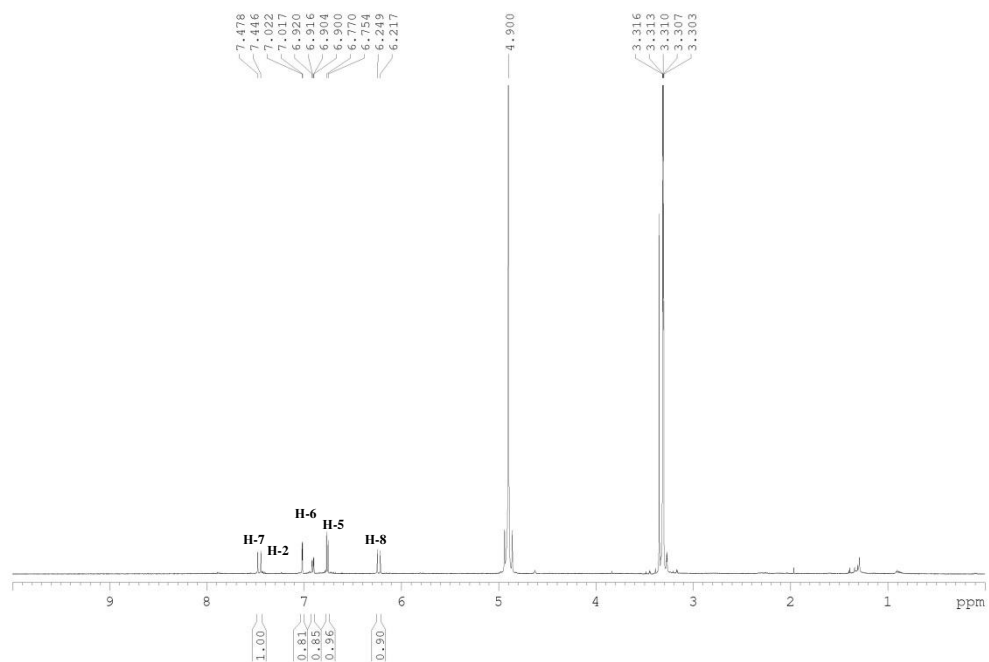
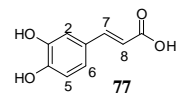
HMBC-NMR, **108**, (500 MHz, CD₃OD)



HSQC-NMR, **108**, (500 MHz, CD₃OD)

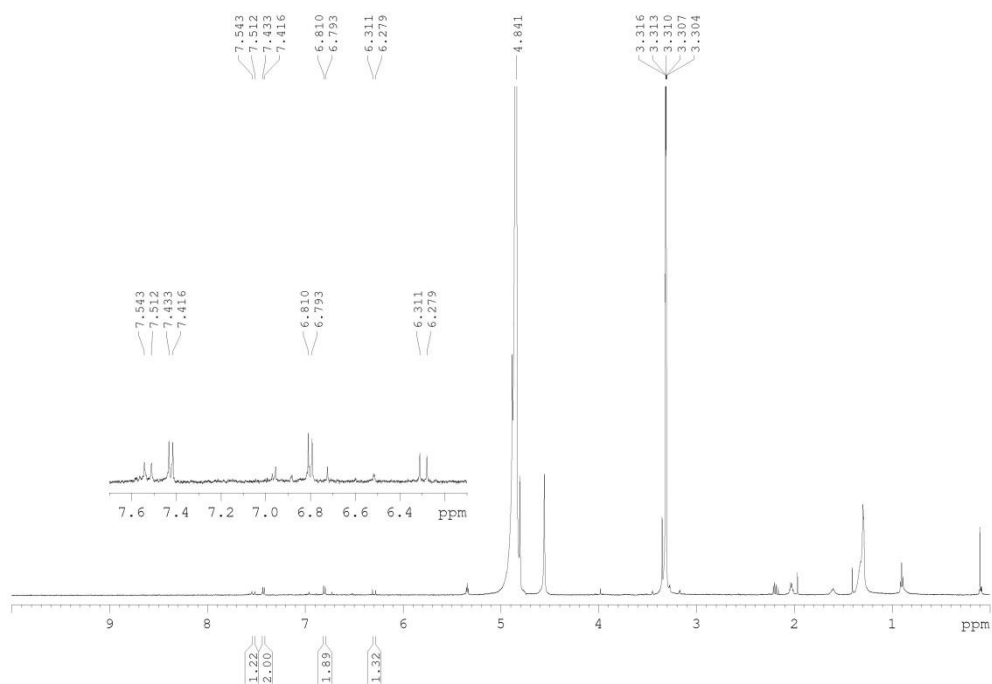
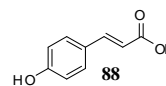


Φάσμα μεταβολίτη: **Καφεϊκό οξύ**
 ^1H NMR, **77**, (500 MHz, CD_3OD)

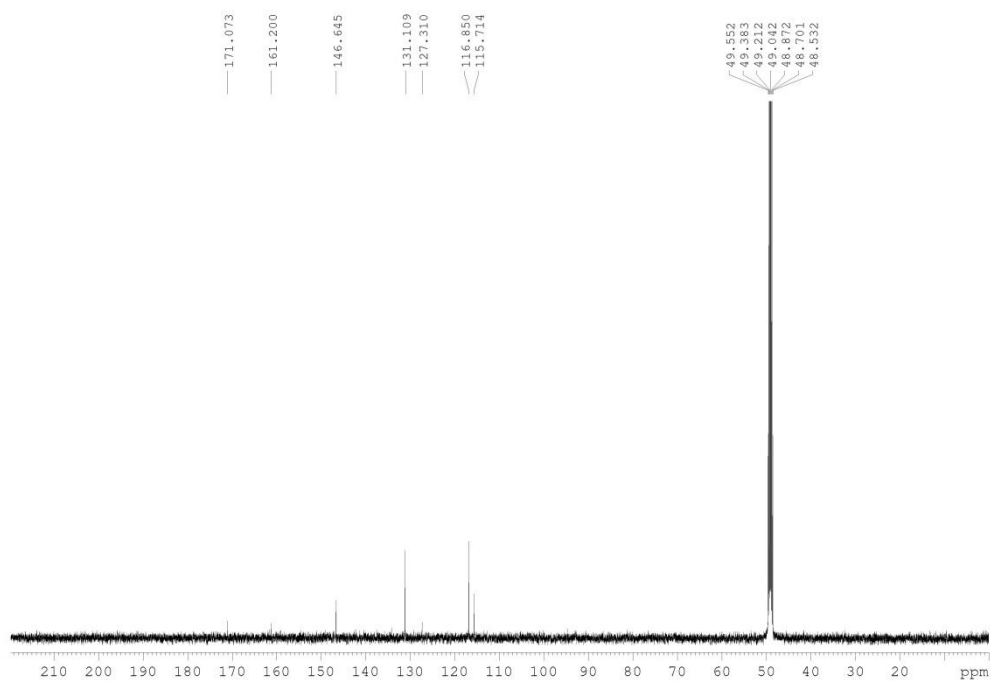


Φάσματα μεταβολίτη: **p**-Κουμαρικό οξύ

^1H NMR, **88**, (500 MHz, CD_3OD)

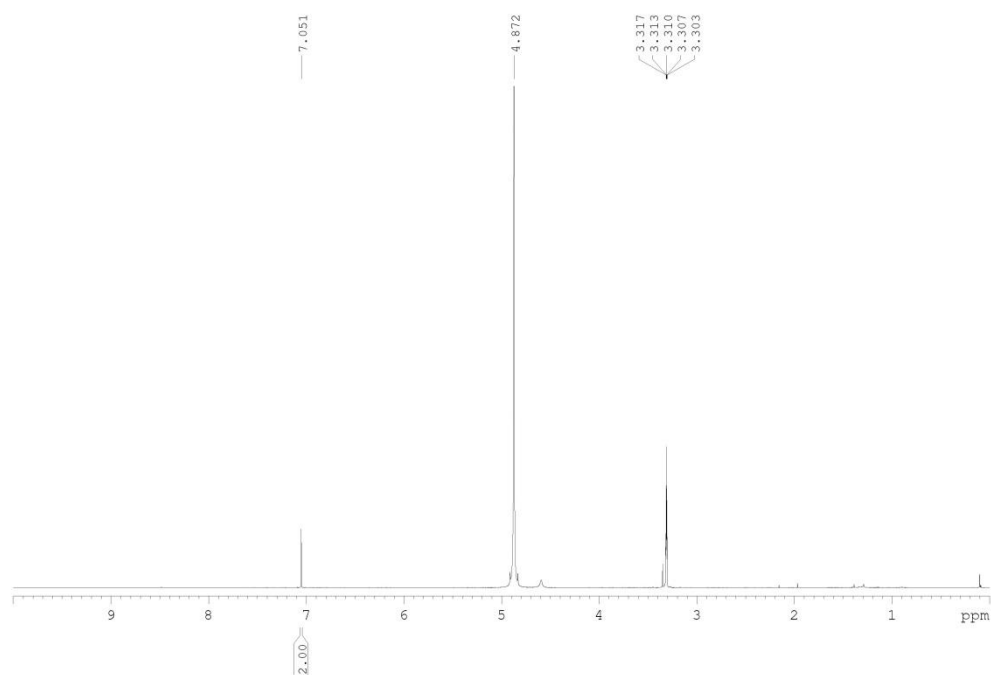
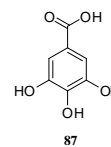


^{13}C NMR, **88**, (500 MHz, CD_3OD)

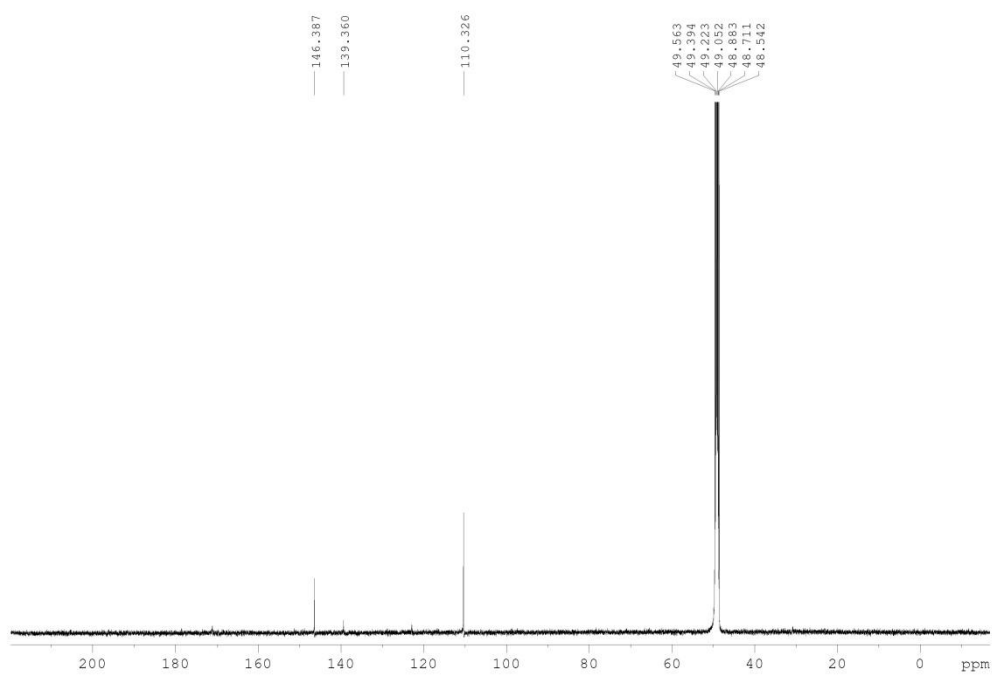


Φάσματα μεταβολίτη: Γαλλικό οξύ

^1H NMR, **87**, (500 MHz, CD_3OD)

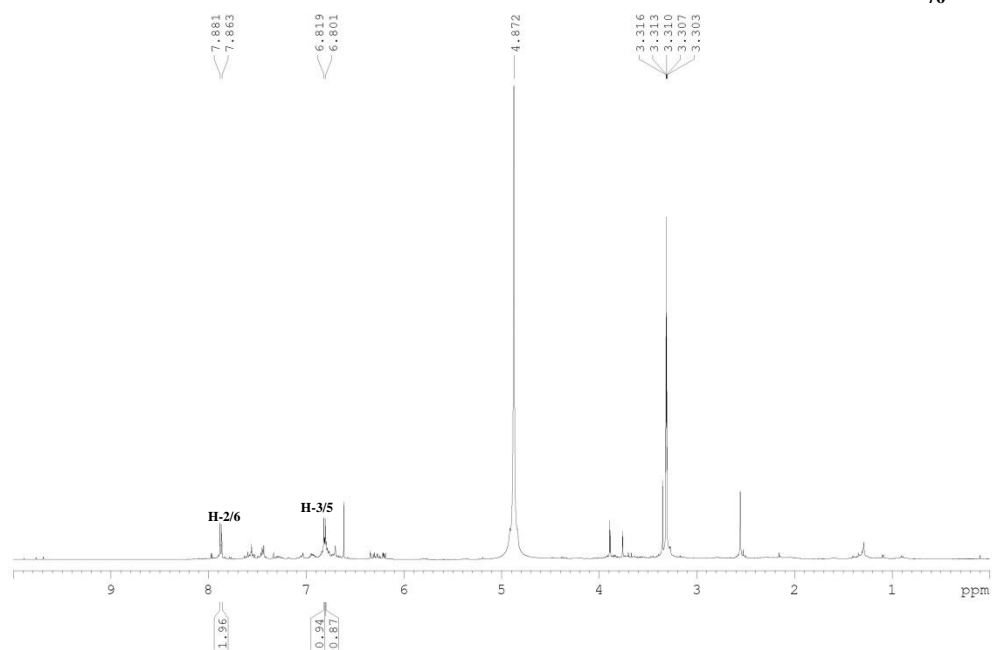
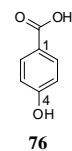


^{13}C NMR, **87**, (500 MHz, CD_3OD)

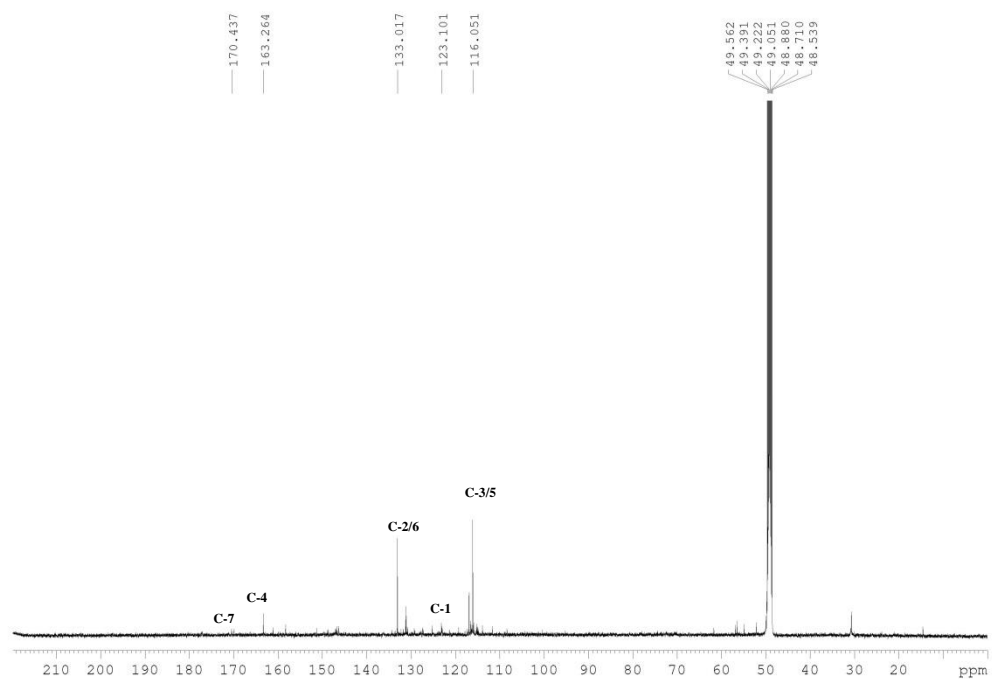


Φάσματα μεταβολίτη: **p-Υδροξύ βενζοϊκό οξύ**

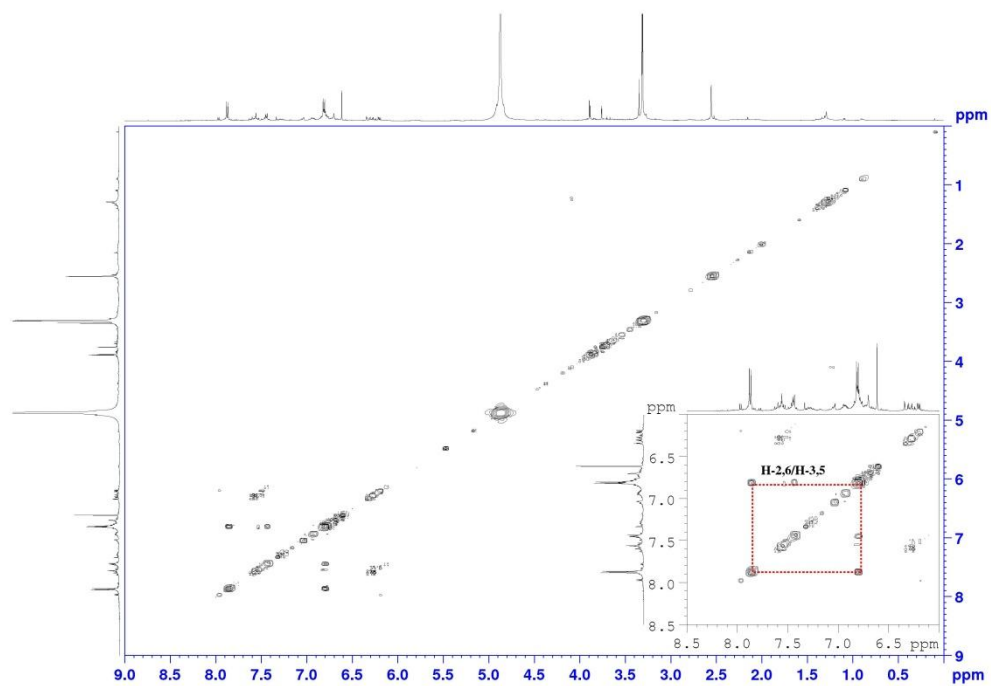
^1H NMR, **76**, (500 MHz, CD_3OD)



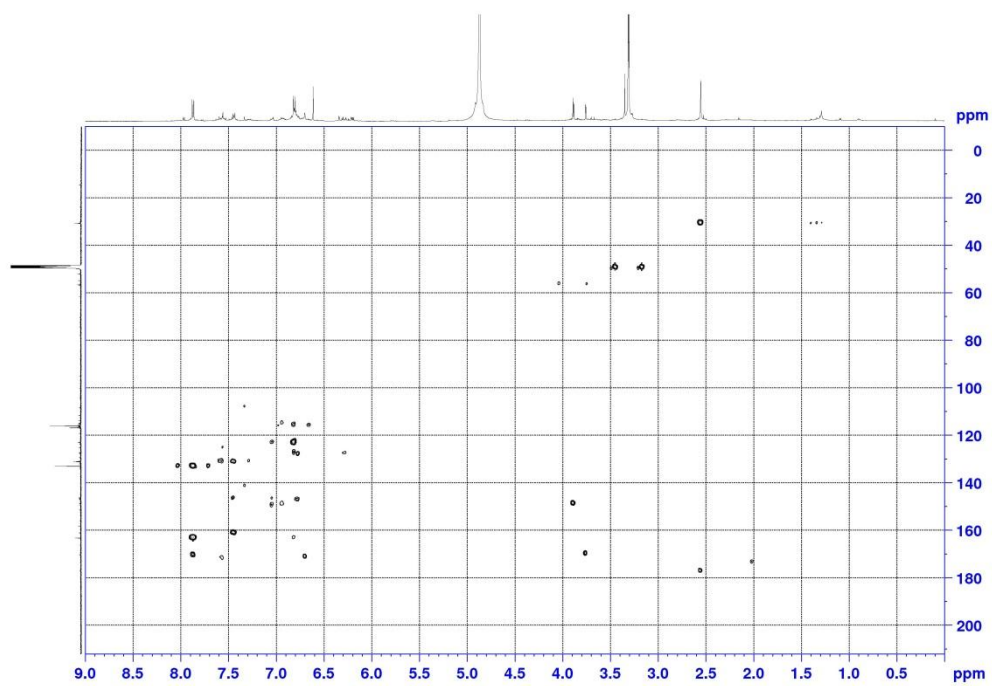
^{13}C -NMR, **76**, (500 MHz, CD_3OD)



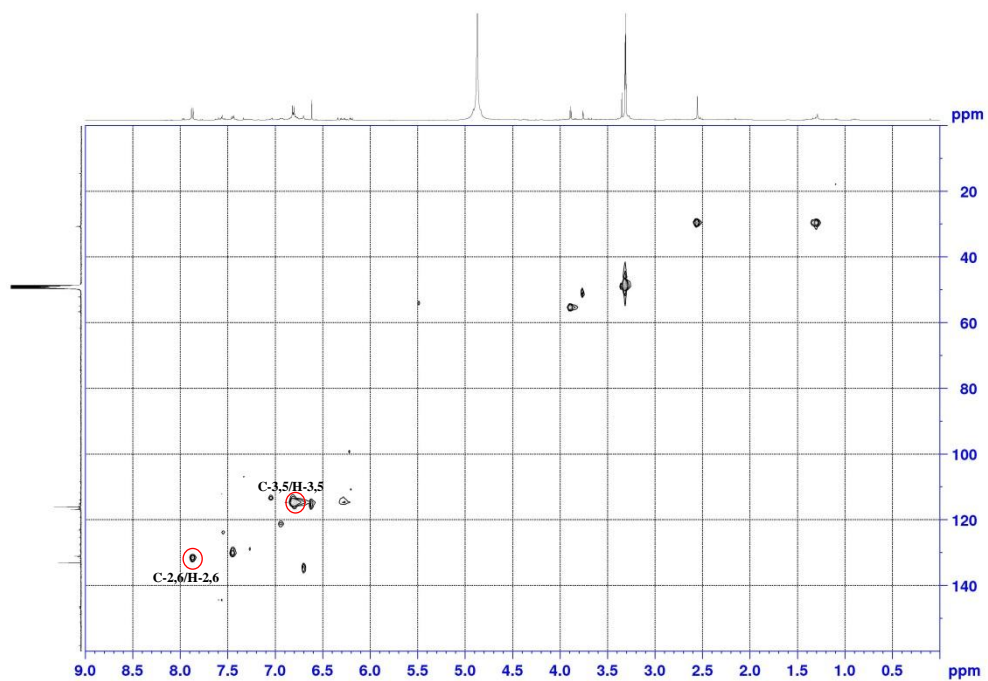
COSY-NMR, **76**, (500 MHz, CD₃OD)



HMBC-NMR, **76**, (500 MHz, CD₃OD)

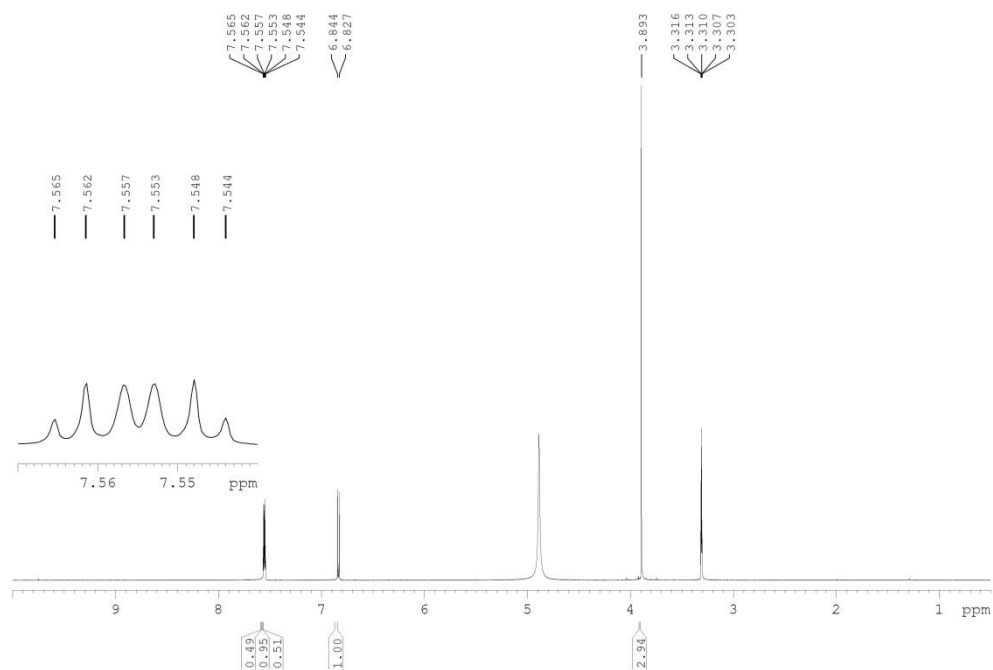
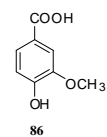


HSQC-NMR, **76**, (500 MHz, CD₃OD)

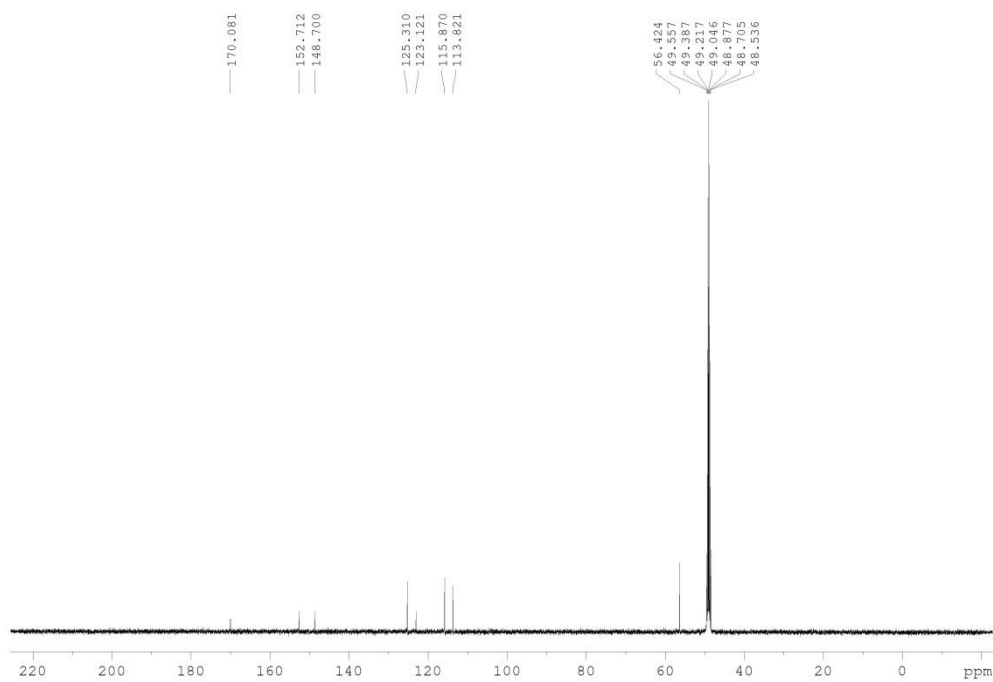


Φάσματα μεταβολίτη: **Βανιλλικό οξύ**

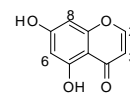
^1H NMR, **86**, (500 MHz, CD_3OD)



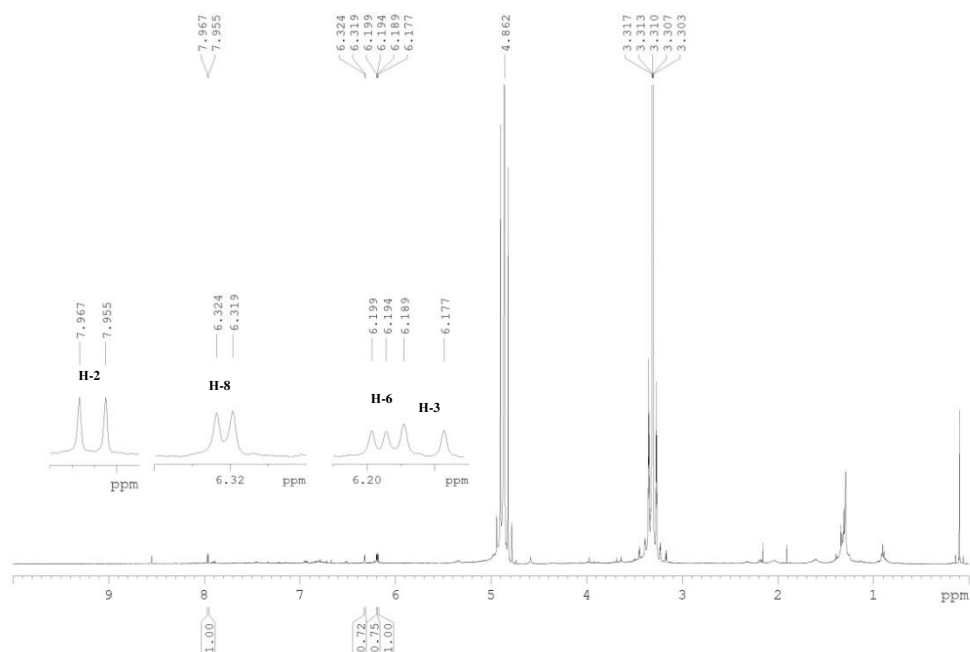
^{13}C NMR, **86**, (500 MHz, CD_3OD)



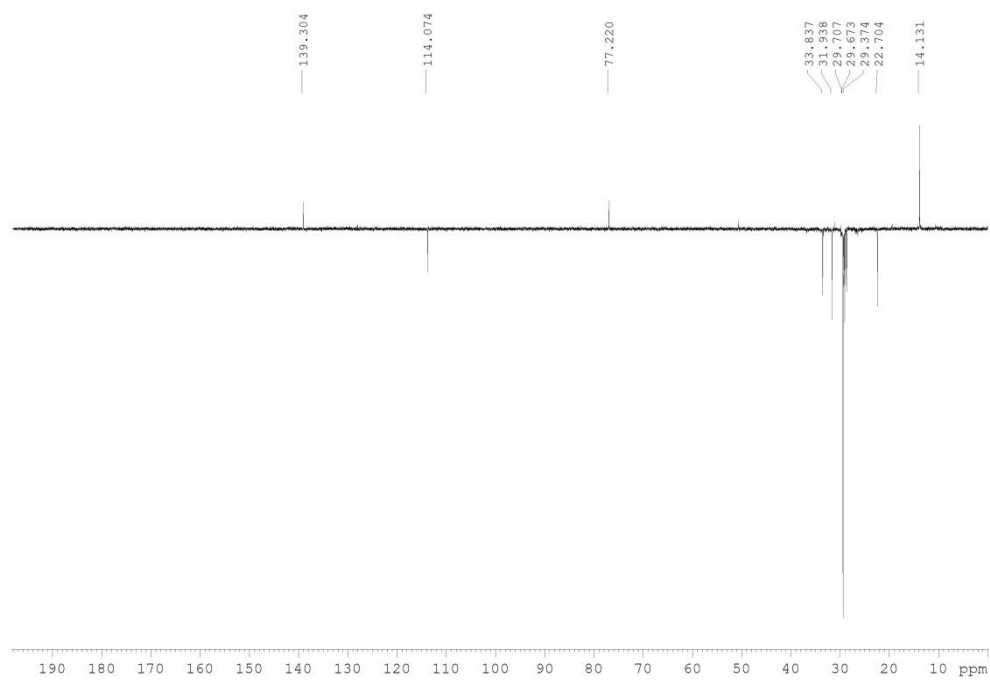
Φάσμα μεταβολίτη: **5,7-Διυδροξυχρωμόνη**
 ^1H NMR, **106**, (500 MHz, CD_3OD)



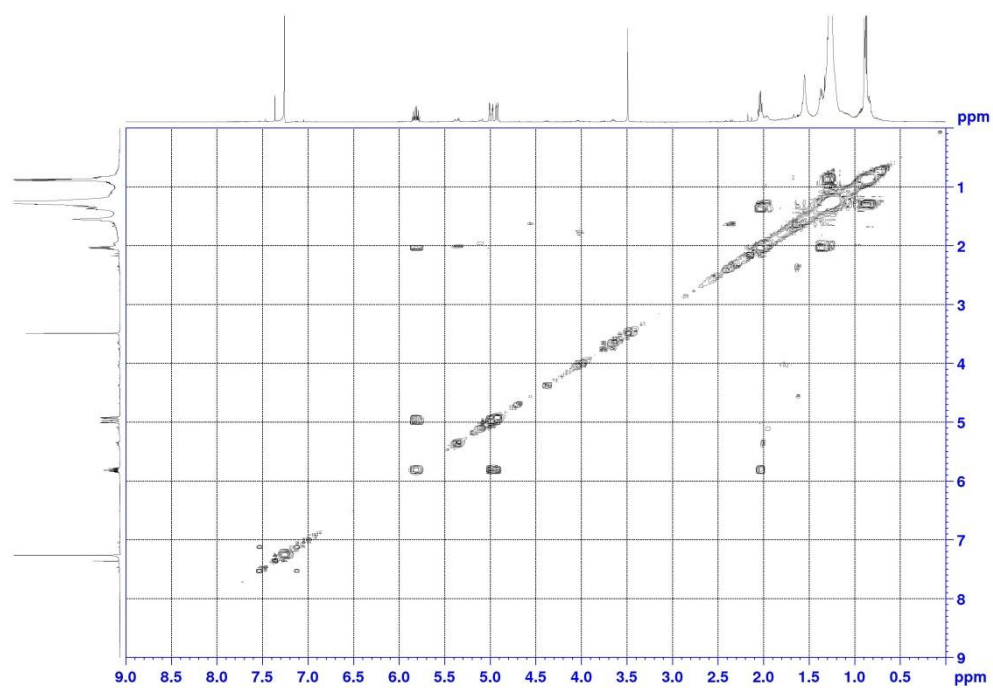
106



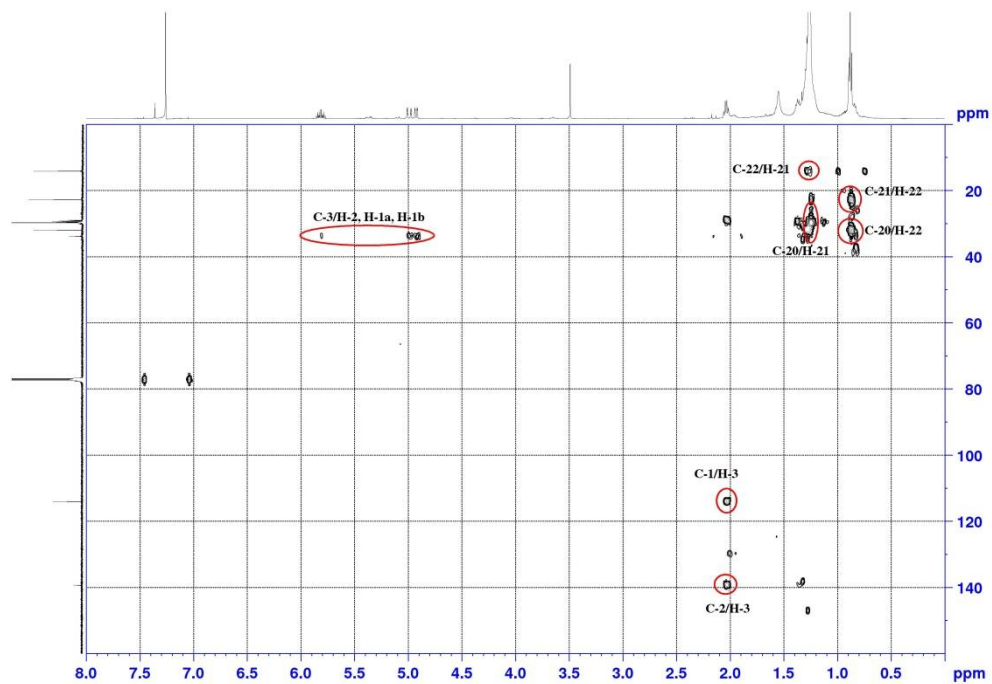
DEPT 135-NMR, **107**, (500 MHz, CD₃OD)



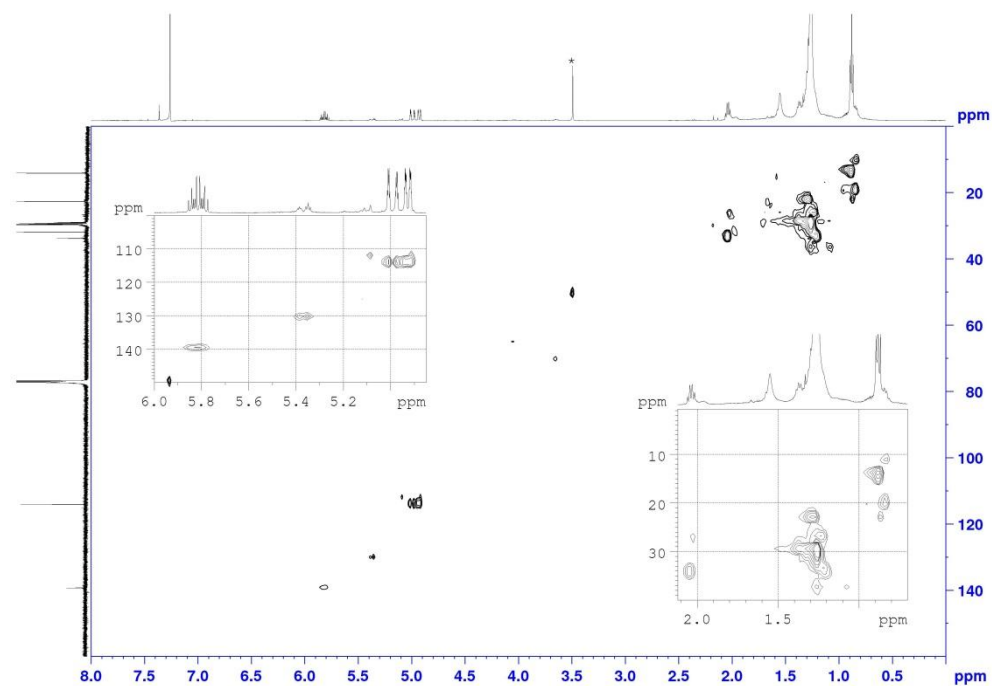
COSY-NMR, **107**, (500 MHz, CD₃OD)



HMBC-NMR, **107**, (500 MHz, CD₃OD)



HSQC-NMR, **107**, (500 MHz, CD₃OD)



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

-
- ¹ Chung, I.-M.; Rajakumar, G.; Lee, J.-H.; Kim, S.-H.; Thiruvengadam, M; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *101*, 5247.
- ² Roopan, S. M.; Elango, G. *Ind Crop Prod.* **2015**, *67*, 130.
- ³ Thiruvengadam, M.; Praveen, N.; Kim, E. H.; Kim, S. H.; Chung, I. M. *Protoplasma* **2014**, *251*, 555.
- ⁴ Owen, C.; Patron, N. J.; Huang, A.; Osbourn, A. *Curr Opin Chem Biol* **2017**, *40*, 24.
- ⁵ Urban, S.; Separovic, F. *Front. Drug Des. Discov.* **2005**, *1*, 113.
- ⁶ Rochfort, S. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 1813.
- ⁷ Ko, M.-J.; Lee, J.-H.; Nam, H.-H.; Chung, M.-S. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2017**, *42*, 1.
- ⁸ Amor, I. L-B.; Boubaker, J.; Sgaier, M. B.; Skandrani, I.; Bhour, W.; Neffati, A.; Kilani, S.; Bouhlel, I.; Ghedira, K.; Chekir-Ghedira, L. *J. Ethnopharmacol.* **2009**, *125*, 183.
- ⁹ Μπαριωτάκης, Μ. Ενδημισμός και υβριδισμός στα μεσογειακά οικοσυστήματα: παρατηρούμενα και αναμενόμενα χωρικά πρότυπα του γένους *Phlomis*. Μεταπτυχιακή Διατριβή, Αρχαία Πανεπιστημίου Κρήτης, Ηράκλειο, **2007**.
- ¹⁰ Mathiensen, C.; Scheen, A. C.; Lindqvist, C. *Kew Bull.* **2011**, *66*, 84.
- ¹¹ Moench, C. *Methodus plantarum horti botanici et agri Marburgensis: a staminum situ describendi.* 619, Marburgi Cattorum, (Marburg), **1794**.
- ¹² Μπαριωτάκης Μ. Ζητήματα Θώκου στη Διερεύνηση Προτύπων Υβριδισμού. Διδακτορική Διατριβή, Αρχαία Πανεπιστημίου Κρήτης, Ηράκλειο, **2015**.
- ¹³ Basta, A.; Tzakou, O.; Couladis, M. *Flavour Frag. J.* **2006**, *21*, 795.
- ¹⁴ Georgescu, L.; Stefanakis, K. M.; Kokkini, S.; Katerinopoulos, E. H.; Pirintsos, A. S. *Phytochemistry* **2016**, *122*, 91.
- ¹⁵ Καρούσου, Ρ. Ταξινομική προσέγγιση της οικογένειας Labiatae στην Κρήτη, εξάπλωση, χωρολογία και αιθέρια έλαια. Διδακτορική Διατριβή, Αρχαία Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, **1995**.
- ¹⁶ Qunther, R. *The Greek Herbal of Dioscorides*, Hafner, New York, p. 500, **1952**.
- ¹⁷ Dioscorides Penadios, *De materia Medica* IV 103, p. 257, Max Wellman, Ed. Berlin, **1958**.
- ¹⁸ Quer, P. F. *Plantas medicinales, El Dioscorides renovados*, Peninsula, Barcelona, p. 699, **1962**.
- ¹⁹ Hofman J. *Ετυμολογικό λεξικό των Ελληνικών (εξελληνισμένο υπό Ν. Παπανικολάου, München, 1950)*.
- ²⁰ Dioscurides Penadios Anazarbeus, *De material medica*, II, p. 595, Lipsae, **1829**.
- ²¹ Carnoy A., *Dictionnaire étymologique des noms grecs de plantes.* (Bibliothèque du Muséon. Vol. 46). Publications Universitaires, Louvain. p. 215, **1959**.
- ²² Theophrasti Eresii, *Opera quae supersunt omnia*, Fr. Wimmer, Paris, 1866, Republ. Minerva, Frankfurt an Main, p. 153, **1964**.
- ²³ Γενναδίου, Π. *Λεξικόν Φυτολογικόν*, Β έκδοσης, Τόμος Β, Εκδόσεις Μ. Χ Γκιούρδα, Αθήνα, σελ. 930, **1959**.

-
- ²⁴ Καββαδάς Δ. Σ., *Βοτανικόν-Φυτολογικόν Λεξικόν*, Τόμος Η', 4124-4127, Αθήνα, **1956**.
- ²⁵ González-Tejero, M. R.; Molero-Mesa, J.; Casares-Porcel, M.; Lirola, M. J. M. *J Ethnopharmacol* **1995**, *45*, 157.
- ²⁶ Khanam, M.; Abul-Hassan, M. D. *Bangladesh J. Plant Taxon.* **2005**, *12*, 1.
- ²⁷ Ertuğ, F. *Turk J Bot.* **2004**, *28*, 161.
- ²⁸ Khafagi, I. K.; Dewedar, A. *J Ethnopharmacol* **2000**, *71*, 365.
- ²⁹ Kamel, S. M.; Khaled, M. M.; Hashim, A. H.; Kazuhiro, O.; Ryoji, K.; Kazuo Y. *Phytochemistry* **2000**, *55*, 353.
- ³⁰ Diğrak, M.; Alma, M.H.; İlçim, I.; Şen, S. *Pharm Biol.* **1999**, *37*, 216.
- ³¹ Liolios, C.; Laouer, H.; Boulaacheb, N.; Gortzi, O.; Chinou, I. *Molecules.* **2007**, *12*, 772.
- ³² Shing, K.N.; Lal, B. *J Ethnopharmacol* **2008**, *115*, 147.
- ³³ Lotfipour, F.; Nazemiyeh, H.; Fathi-Azad, F.; Garaei, N.; Arami, S.; Talat, S.; Sadegpour, F.; Hasanpour, R. *Iran J Basic Med Sci.* **2008**, *11*, 80.
- ³⁴ González-Tejero, M.R.; Molero-Mesa, J.; Casares-Porcel, M.; Lirola, M. J. M. *J Ethnopharmacol* **1995**, *45*, 157.
- ³⁵ Guarrera, P. M.; Lucia, L. M. *J Ethnobiol Ethnomed.* **2007**, *3*, 23.
- ³⁶ Lentini, F.; Venza, F. *J Ethnobiol Ethnomed.* **2007**, *3*, 15.
- ³⁷ Soković, M. D.; Marin, P. D.; Simić, D.; Kenžević-Vukčević, J.; Vajas, V., Petrović, S. *Pharm Biol.* **2002**, *40*, 311.
- ³⁸ Sarac, N.; Ugur, A. *Eurasia J Biosci.* **2007**, *4*, 28.
- ³⁹ Gürbüz, I.; Üstün, O.; Yesilada, E.; Sezik, E.; Kutsal, O. *J Ethnopharmacol* **2003**, *88*, 93.
- ⁴⁰ Demirci, F.; Guven, K.; Demirci, B.; Dadandi, M. Y.; Baser, K. H. C. *Food Control* **2008**, *19*, 1159.
- ⁴¹ Khalilzadeh, M. A.; Tajbakhsh, M.; Rineh, A. *J. Essent Oil Res.* **2008**, *20*, 46.
- ⁴² Demirci, B.; Dabandi, M.Y.; Paper, D. H.; Franz, G.; Baser, K. H. Z. *Naturforsch. C. Bio. Sci.* **2003**, *58*, 826.
- ⁴³ Pardo de Santayana, M.; Blanco, E.; Morales, R. *J Ethnopharmacol* **2005**, *98*, 1.
- ⁴⁴ Habtemariam, S.; Gray, A. I.; Waterman, P.G. *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 1570.
- ⁴⁵ Mojab, F.; Kamalinejad, M.; Ghaderi, N.; Vahidipour, H. R. *Iran J Pharm Res.* **2003**, *2*, 77.
- ⁴⁶ Tardio, J.; Padro-De-Santayana, M.; Morales, R. *Bot. J. Linn. Soc.* **2006**, *152*, 27.
- ⁴⁷ Novais, M. H.; Santos, I.; Mendes, S.; Pinto-Gomes, C. *J Ethnopharmacol* **2004**, *93*, 183.
- ⁴⁸ Zhang, C. Z.; Li, C.; Feng, S. I.; Shi, J. G. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 4156.
- ⁴⁹ Takeda, Y.; Isai, N.; Masuda, T.; Honda, J.; Takaishi, Y.; Ito, M.; Otsuka, H.; Ashurmetov, A. O.; Khodzhimatov, K. O. *Chem. Pharm. Bull.* **2001**, *49*, 1039.

-
- ⁵⁰ Carmona, M. D.; Lorach, R.; Obon, C.; Rivera, D., *J Ethnopharmacol* **2005**, *102*, 344.
- ⁵¹ Naghibi, F.; Mosaddegh, M.; Motamed, S. M.; Ghorbani, A. *Iran J Pharm Res.* **2005**, *2*, 63.
- ⁵² Liu, P.; Takaishi, Y.; Duan, H. Q. *Chin. Chem. Lett.* **2007**, *18*, 155.
- ⁵³ Law, W.; Salick, J. *Biodivers. Conserv.* **2007**, *16*, 1747.
- ⁵⁴ Sarkhail, P.; Rahmanipour, S.; Fadyevatan, S.; Mohammadirad, A.; Dehghan, G.; Amin, G.; Shafiee, A.; Abdollahi, M. *Pharm Res.* **2007**, *56*, 261.
- ⁵⁵ Mohajer, M.; Sarkhail, P.; Hajarolasvadi, N.; Zamani, M. J.; Khorasani, R.; Shafiee, A.; Amin, G.; Abdollahi, M. *Int. J. Pharm.* **2005**, *2*, 50.
- ⁵⁶ Sarkhail, P.; Abdollahi, M.; Shafiee, A. *Pharmacol Res.* **2003**, *48*, 263.
- ⁵⁷ Amor, I. L.-B.; Skandrani, I.; Boubaker, J.; Sghaer, M. B.; Neffati, A.; Bhourri, W.; Bouhleb, I.; Chouchane, N.; Kilani, S.; Guedon, E.; Ghoul, M.; Ghedira, K.; Chekir-Ghedira, L. *Drug Chem. Toxicol.* **2009**, *32*, 38.
- ⁵⁸ Ismailoglu, U. B.; Saracoğlu, I.; Harput, Ü. Ş.; Sahin- Erdemli, I. *J Ethnopharmacol* **2002**, *79*, 193.
- ⁵⁹ Shin, T. Y.; Lee, J. K. *Immunopharm. Immunot.* **2003**, *25*, 73.
- ⁶⁰ Saracoğlu, I.; Inoue, M.; Calis, I.; Ogihara, Y. *Biol. Pharm. Bull.* **1995**, *18*, 1396.
- ⁶¹ Calis, I.; Kirmizibekmez, H.; Ersoz, T.; Dönmez, A. A.; Gotfredsen, C. H.; Jensen, S. R. *Z. Naturforsch.* **2005**, *60* (b), 1295.
- ⁶² Sarkhail, P.; Sahranavard, S.; Nikan, M.; Gafari, S.; Eslami-Tehrani, B. *J. Appl. Pharm. Sci.* **2017**, *7*, 180.
- ⁶³ Ristić, M. D.; Duletić-Laušević, S.; Knežević-Vukčević, J.; Marin, P. D.; Simić, D.; Vukojević, J.; Janačković, P.; Vajs, V. *Phytother. Res.* **2000**, *14*, 267.
- ⁶⁴ Couladis, M.; Tanimanidis, A.; Tzakou, O.; Chinou, I. B.; Harvala, C. *Planta Med.* **2000**, *66*, 670.
- ⁶⁵ Morteza-Semnani, K.; Saeedi, M.; Mahdavi, M.; Rahimi, F. *Pharm. Biol.* **2006**, *44*, 426.
- ⁶⁶ Li, C.; Zhang, C. Z. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **2000**, *25*, 35.
- ⁶⁷ Aligiannis, N.; Kalpoutzakis, E.; Kyriakopoulou, I.; Mitaku, S.; Chinou, I. B. *Flavour Fragr. J.* **2004**, *19*, 320.
- ⁶⁸ López, V.; Akerreta, S.; Casanova, E.; Garcia-Mina, J. M.; Cavero, R. Y.; Calvo, M. I. *Plant Foods Hum Nutr.* **2007**, *62*, 151.
- ⁶⁹ Koleva, I. I.; Van Beek T. A.; Linssen, J. P. H.; De Groot, A.; Evstatieva, L. N. *Phytochem. Anal.* **2002**, *13*, 8.
- ⁷⁰ Ko, M.-J.; Lee, J. H.; Nam, H. H.; Chung, M. S. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, **2017**, *42*, 1.
- ⁷¹ Harput, U. S.; Çaliş, I.; Saracoğlu, I.; Dönmez, A. A.; Nagatsu, A. *Turk. J. Chem.* **2006**, *30*, 383.
- ⁷² López, V.; Jäger, A. K.; Akerreta, S.; Cavero, R. Y.; Calvo, M. I. *Plant Food Hum Nutr* **2010**, *65*, 179.
- ⁷³ Zhang, Y.; Wong, Z. Z. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2008**, *47*, 213.

-
- ⁷⁴ Couladis, M.; Tzakou, O.; Verykokidou, E.; Harvala, C. *Phytother. Res.* **2003**, *17*, 194.
- ⁷⁵ Tasdemir, D.; Brun, R.; Perozzo, R.; Dönmez, A. A. *Phytother. Res.* **2005**, *19*, 162.
- ⁷⁶ Kirmizibekmez, H.; Çalış, I.; Perozzo, R.; Brun, R.; Dönmez, A. A.; Linden, A.; Rüedi, P.; Taşdemir, D. *Planta Med.* **2004**, *70*, 691.
- ⁷⁷ Chang, A.; Kwang, B. Y.; Yi, K.; Kim, J. S. *Phytother Res.* **2012**, *26*, 510.
- ⁷⁸ Li, M. X.; Shang, X. F.; Jia, Z. P.; Zhang, R. X. *Chem. Biodivers.* **2010**, *7*, 283.
- ⁷⁹ Kim, J. Y.; Song, M.; Lee, D.; Song, J.; Park, S.W.; Park, J.; Park, S.; Choi, H. Y.; Kim, H. *Molecules* **2013**, *18*, 1327.
- ⁸⁰ Kim, M. Y.; Park, Y.; Pandit, N. R.; Kim, J.; Song, M.; Park, J.; Choi, H.Y.; Kim, H. *J. Med. Food* **2010**, *13*, 1376.
- ⁸¹ Song, J., Lee, D., Min, B., Bae, J. C.; Chang, G.T., Kim, H. *Phytomedicine* **2017**, *32*, 59.
- ⁸² Karali, D.; Georgescu, L.; Pirintsos, S.; Athanassakis, I. *Pharm Biol* **2016**, *54*, 207.
- ⁸³ El-Naggar, L. J.; Beal, J. L. *J. Nat. Prod.* **1980**, *43*, 649.
- ⁸⁴ Gao, Y. L.; Lin, R. C.; Wang, G. L.; Zhao, H. R.; Ciren, B. *Zhong Yao Cai.* **2007**, *30*, 1239.
- ⁸⁵ Ersöz, T.; Schöhly, W.; Popov, S.; Handjieva, N.; Sticher, O. *Nat. Prod. Lett.* **2001**, *15*, 345.
- ⁸⁶ Çalış, I.; Kirmizibekmez, H. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 2619.
- ⁸⁷ Zhang, C. Z.; Li, C.; Feng, S. I.; Shi, J. G. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 4156.
- ⁸⁸ Li, C.; Zhang, C. Z. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* **2000**, *25*, 35.
- ⁸⁹ Çalış, I.; Kirmizibekmez, H.; Ersöz, T.; Dönmez, A. A.; Gotfredsen, C. H.; Jensen, S. R. *Z. Naturforsch. B Chem. Sci.* **2005**, *60*, 1295.
- ⁹⁰ Yu, Z. X.; Wang, G. L.; Bianba, C.; Lin, R. C. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* **2006**, *31*, 656.
- ⁹¹ Liu, P.; Yao, Z.; Li, H.Q. Duan, H. Q. *Helv. Chim. Acta.* **2007**, *90*, 601.
- ⁹² Liu, P.; Takaishi, Y.; Duan, H. Q. *Chin. Chem. Lett.* **2007**, *18*, 155.
- ⁹³ Kamel, M. S.; Mohamed, K. M.; Hassanean, H. A.; Ohtani, K.; Kasai, R.; Yamasaki, K. *Phytochemistry* **2000**, *55*, 353.
- ⁹⁴ Aboutabl, E. A.; Meselhy, M.R.; Afifi, M. S. *Pharmazie.* **2002**, *57*, 646.
- ⁹⁵ Takeda, Y.; Matsumura, H.; Masuda, T.; Honda, G.; Otsukac, H.; Takaishi, Y.; Sezik, E.; Yesilada E. *Phytochemistry* **2000**, *53*, 931.
- ⁹⁶ Takeda, Y.; Isai, N.; Masuda, T.; Honda, G.; Takaishi, Y.; Ito, M.; Otsuka, H.; Ashurmetov, O. A.; Khodzimatov, O. K. *Chem. Pharm. Bull.* **2001**, *49*, 1039.
- ⁹⁷ Li, M.; Zhang, C.; Wei, L.; Fan, P.; Zhang, Q.; Jia, Z. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* **2001**, *36*, 594.
- ⁹⁸ Çalış, I.; Başaran, A. A.; Saracoğlu, I.; Sticher, O.; Rüedi, P. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 3073.

-
- ⁹⁹ Çalış, I.; Kirmizibekmez, H.; Ersöz, T.; Saracoğlu, I.; Dönmez, A. A.; Mitova, M.; Handjieva, N.; Popov, S. *Acta Pharma. Sci.* **2002**, *44*, 195.
- ¹⁰⁰ Alipieva, K. I.; Jensen, S. R.; Franzyk, H.; Handjieva, N. V.; Evstatieva, L. N. *Z. Naturforsch. C Bio. Sci.* **2000**, *55*, 137.
- ¹⁰¹ Ersöz, T.; Ivancheva, S.; Akbay, P.; Sticher, O.; Çalış, I. *Z. Naturforsch. C Bio. Sci.* **2001**, *56*, 695.
- ¹⁰² Saracoğlu, I.; Inoue, M.; Çalış, I.; Ogiwara, Y. *Biol. Pharm. Bull.* **1995**, *18*, 1396.
- ¹⁰³ Maksudov, M. S.; Maksimov, E. S.; Saatov, Z.; Abdullaev, N. D. *Chem. Nat. Compd.* **1996**, *32*, 539.
- ¹⁰⁴ Yalçın, F. N.; Ersöz, T.; Bedir, E.; Şahpaz, S.; Bailleul, F.; Khan, I. A.; Dönmez, A. A.; Çalış, I. *Turk J Chem.* **2005**, *29*, 417.
- ¹⁰⁵ Ismailoglu, U.B.; Saracoğlu, I.; Harput, Ü. Ş.; Sahin-Erdemli, I. *J Ethnopharmacol* **2002**, *79*, 193.
- ¹⁰⁶ Ersöz, T.; Alipieva, K. I.; Yalçın, F. N.; Akbay, P.; Handjieva, N.; Dönmez, A. A.; Popov, S.; Çalış, I. *Z. Naturforsch. C Bio. Sci.* **2003**, *58*, 471.
- ¹⁰⁷ Maksudov, M. S.; Maksimov, E. S.; Umarova, R. U.; Saatov, Z.; Abdullaev, N. D. *Chem. Nat. Compd.* **1996**, *32*, 36.
- ¹⁰⁸ Saracoğlu, I.; Harput, Ü. Ş.; Çalış, I. *Turk. J. Chem.* **2002**, *26*, 133.
- ¹⁰⁹ Saracoğlu, I.; Varel, M.; Hada, J.; Hada, N.; Takeda, T.; Dönmez, A. A.; Çalış, I. *Z. Naturforsch. C Bio. Sci.* **2003**, *58*, 820.
- ¹¹⁰ Çalış, I.; Kirmizibekmez, H.; Beutier, A. J.; Dönmez, A. A.; Yalçın, F. N.; Kiliç, E.; Özalp, M.; Rüedi, R.; Taşdemir, D. *Turk J Chem.* **2005**, *29*, 417.
- ¹¹¹ Saracoglu, I.; Suleimanov, T.; Shukurova, A.; Dogan, Z. *Chem. Nat. Compd.* **2017**, *53*, 576.
- ¹¹² Maksudov, M. S.; Maksimov, E. S.; Umarova, R. U.; Saatov, Z.; Abdullaev, N. D. *Chem. Nat. Compd.* **1995**, *31*, 200.
- ¹¹³ Maksudov, M. S.; Maksimov, E. S.; Saatov, Z.; Abdullaev, N. D. *Chem. Nat. Compd.* **1996**, *32*, 542.
- ¹¹⁴ Kasai, R.; Katagiri, M.; Ohtani, K.; Yamasaki, K.; Yang, C. R.; Tanaka, O. *Phytochemistry* **1994**, *36*, 968.
- ¹¹⁵ Li, M-X.; Huang, J.; Zhang, C.; Jia, Z-P.; Fan, P-C.; Wei, L-L.; Zhang, Q-L.; Zhang, R-X. *Chem. Nat. Compd.* **2011**, *47*, 848.
- ¹¹⁶ Ersöz, T.; Saracoğlu, I.; Taşdemir, D.; Kirmizibekmez, H.; Dönmez, A. A.; Irelan, C. M.; Çalış, I. *Z. Naturforsch. C Bio. Sci.* **2002**, *57*, 221.
- ¹¹⁷ Guo, S. J.; Gao, L. M.; Cheng, D. L. *Pharmazie* **2001**, *56*, 178.
- ¹¹⁸ Ding, M. M.; Yan, F. L.; Tan, J.; Bai, Y. X.; Wang, X.; Yang, Y. X. *Nat. Prod. Res.* **2014**, *28*, 18.
- ¹¹⁹ Lee, D.; Kim, Y-S.; Song, J.; Kim, H. S.; Lee, H. J.; Guo, H.; Kim, H. *Molecules* **2016**, *21*, 461.
- ¹²⁰ Li, X.-H.; Li, X.-H.; Yao, Q.; Lu, L.-H.; Li, Y. B.; Wu, D., S.; Fu, D. H.; Mei, S.-X.; Cui, T.; Wang, J.-K.; Zhu, Z.-Y. *Tetrahedron Lett.* **2017**, *58*, 112.
- ¹²¹ Liu, P.; Yao, Z.; Zhang, W.; Takaishi, Y.; Duan, H. Q. *Chem. Pharm. Bull.* **2008**, *56*, 951.

-
- ¹²² Katagiri, M.; Ohtani, K.; Kasai, R.; Yamasaki, K.; Yang, C. R.; Tanaka, O. *Phytochemistry* **1991**, *35*, 439.
- ¹²³ Liu, P.; Deng, R.; Yin, W.; Duan, W. *Chem.Nat. Comp.* **2010**, *46*, 566.
- ¹²⁴ Yalçın, F. N.; Ersöz, T.; Bedir, E., Dönmez, A. A.; Stavri, M.; Zloh, M.; Gibbons, S.; Çalış, I. Z. *Naturforsch. B Chem. Sci.* **2006**, *61*, 1433.
- ¹²⁵ Khan, A. U.; Ullah, R.; Khan, A.; Mustafa, M. R.; Hussain, J.; Murugan D. D.; Hadi, A. H. B. A. *Clin. Exp. Hypertens.* **2012**, *34*, 132.
- ¹²⁶ Yang, Y.; Gu, L.; Xiao, Y.; Liu, Q.; Hu, H.; Wang, Z.; Chen, K. *PLoS ONE* *10*(2): e0116922. doi:10.1371/journal.pone.0116922
- ¹²⁷ Kumar, R.; Satesh, B.; Kalla, A. K.; Dhar, K. L. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 2797.
- ¹²⁸ Mousa, O.; Vuorela, P.; Kiviranta, J.; Wahab, S. A.; Hiltohen, R.; Vuorela, H.; *J Ethnopharmacol* **1994**, *41*, 71.
- ¹²⁹ Çalış, I.; Kırmızıbekmez, H.; Taşdemir, D.; Riiedi, P. *Helv. Chim. Acta.* **2004**, *87*, 611.
- ¹³⁰ Deng, R. X.; Duan, W. L.; Liu, P.; Yang, Y. L.; Yin, W. P. *J Asian Nat Prod Res.* **2011**, *13*, 230.
- ¹³¹ Liu, P.; Deng, R.; Yin, W.; Duan, W. *Chem. Nat. Compd.* **2010**, *46*, 566.
- ¹³² Sobeh, M.; Mamadaliyeva, N. Z.; Mohamed, T.; Krstin, S.; Youssef, F. S; Ashour, M. L.; Azimova, S. S.; Wink, M. *Med Chem Res.* **2016**, *25*, 2304.
- ¹³³ Liu, P.; Yao, Z.; Zhang, W.; Takaishi, Y.; Duan, H.-Q. *Chem. Pharm. Bull.* **2008**, *56*, 951.
- ¹³⁴ Luo, Y.; Feng, C.; Tian, Y.; Li, B.; Zhanga, G.; *Tetrahedron.* **2003**, *59*, 8227.
- ¹³⁵ Mateus, M. C.; Neves, D.; Dacunha, B.; Laczko, E.; Maia, C.; Teixeira, R.; Cravador, A. *Phytochemistry* **2016**, *131*, 158.
- ¹³⁶ Jabeen, B.; Riaz, N.; Saleem, M., Naveed, M. A.; Ashraf, M.; Alam, U.; Rafiq, H. M.; Tareen, R. B.; Jabbar, A. *Phytochemistry* **2013**, *96*, 443.
- ¹³⁷ Hussain, J.; Ullah, R.; Khan, A.; Khan, F. U.; Muhammad, Z.; Shah, M. R.; *Nat Prod Commun.* **2011**, *6*, 171.
- ¹³⁸ Ullah, R.; Ullah, Z.; Hussain, I.; Ahmad, S. *Arabian J. Chem.* **2017**, *10*, 1303.
- ¹³⁹ Grayer, R. J.; Kok, R. P. J.; *Biochem. Syst. Ecol.* **1998**, *26*, 729.
- ¹⁴⁰ Takeda, Y.; Kinugawa, M.; Masuda, T.; Honda, G.; Otsukac, H.; Sezick, E.; Yesilada E. *Phytochemistry* **1999**, *51*, 323.
- ¹⁴¹ Kyriakopoulou, I.; Magiatis, P.; Skaltsounis, A. L.; Aligiannis, N.; Harvala, C. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 1095.
- ¹⁴² Kabouche, A.; Kabouche, Z.; Seguin, E.; Tillequin, F.; Bruneau, C. A. *Biochem Syst Ecol.* **2005**, *33*, 813.
- ¹⁴³ Nazemiyeh, H.; Rahman, M. M.; Gibbons, S.; Nahar, L.; Delazar, A.; Ghahramani, M.A.; Talebpoor, H.; Sarker, S. D. *J Nat Med.* **2008**, *62*, 91.

-
- ¹⁴⁴ Delazar, A.; Sabzevari, A.; Mojarrab, M.; Nazemiyeh, H.; Esnaashari, S.; Nahar, L.; Razavi, S.M.; Sarker, S. D. *J Nat Med.* **2008**, *62*, 464.
- ¹⁴⁵ López, V.; Jäger, A. K.; Akerreta, S.; Cavero, R.Y.; Calvo, M. I.; *Plant Foods Hum Nutr.* **2010**, *65*, 179.
- ¹⁴⁶ Harput, Ü. Ş.; Çalış, I.; Saracoğlu, I.; Dönmez, A. A.; Nagatsu, A. *Turk J Chem.* **2006**, *30*, 383.
- ¹⁴⁷ Çalış, I.; Başaran, A. A.; Saracoğlu, I.; Sticher, O.; Rüedi, P. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 1253.
- ¹⁴⁸ Saracoğlu, I.; Kojima, K.; Harput, Ü. Ş.; Ogihara, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **1998**, *46*, 726.
- ¹⁴⁹ Ersöz, T.; Harput, Ü. Ş.; Çalış, I.; Dönmez, A. A. *Turk J Chem.* **2002**, *26*, 1.
- ¹⁵⁰ Marin, P. D.; Grayer, R. J.; Grujic-Jovanovic, S.; Kite, G. C.; Veitch, N. C. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 1247.
- ¹⁵¹ Tomás-Barberán, F. A.; Gil, M. I.; Ferreres, F.; Tomás-Lorente, F. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 3097.
- ¹⁵² Azizian, Z.; Cutler, D. F. *Bot. J. Linn. Soc.* **1982**, *85*, 249.
- ¹⁵³ Sahpaz, S.; Skaltsounis, A. L.; Bailleul, F. *Biochem. Syst. Ecol.* **2002**, *30*, 601.
- ¹⁵⁴ Karioti, A.; Skaltsa, H.; Heilmann, J.; Sticher, O. *Phytochemistry* **2003**, *64*, 655.
- ¹⁵⁵ El-Negoumy, S. I.; Abdalla, M. F.; Saleh, Nabil A. M. *Phytochemistry* **1986**, *25*, 772.
- ¹⁵⁶ Tomas, F.; Nieto, J. L.; Barberan, F. A. T.; Ferreres, F. *Phytochemistry* **1986**, *25*, 1253.
- ¹⁵⁷ Marin, P. D.; Veitch, N. C.; Grayer, R. J.; Kite, G. C.; Soković, M.; Janačković, P. *Biochem Syst Ecol.* **2007**, *35*, 462.
- ¹⁵⁸ Sarkhail, P.; Monsef-Esfehani, H. R.; Amin, G.; Surmaghi, M. H. S.; Shafiee, A. *DARU*, **2006**, *14*, 115.
- ¹⁵⁹ Saracoğlu, I.; Varel, M.; Çalış, I.; Dönmez, A. A. *Turk J Chem.* **2003**, *27*, 739.
- ¹⁶⁰ Çalış, I.; Kirmizibekmez, H. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 2619.
- ¹⁶¹ Bucar, F.; Ninov, S.; Ionkova, I.; Kartnig, T.; Schubert-Zsilavec, M.; Asenov, I.; Konuklugil, B. *Phytochemistry* **1998**, *48*, 573.
- ¹⁶² Nedonoskova, N. A.; Kompantsev, V. A.; Dzhumyrko, S. F.; Samokish, I. I. *Chem. Nat. Compd.* **1974**, *5*, 664.
- ¹⁶³ Khokhrina, T. A.; Peshkova, V. A.; Glyzin, V. I. *Chem. Nat. Compd.* **1975**, *9*, 769.
- ¹⁶⁴ Bader, A.; Tuccinardi, T.; Granchi, C.; Granchi, C.; Martinelli, A.; Macchia, M.; Minutolo, F.; De Tommasi, N.; Braca, A. *Phytochemistry* **2015**, *116*, 262.
- ¹⁶⁵ Khokhrina, T. A.; Peshkova, V. A.; Shergina, N. I. *Chem. Nat. Compd.* **1978**, *6*, 686.
- ¹⁶⁶ Glyzin, V. I.; Peshkova, V. A.; Khokhrina, T. A. *Chem. Nat. Compd.* **1972**, *8*, 785.
- ¹⁶⁷ Kumar, R.; Bhan, S.; Kalla, A. K.; Dhar, K. L. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 2191.
- ¹⁶⁸ Kumar, R.; Bhan, S.; Kalla, A. K.; Dhar, K. L. *Phytochemistry* **1985**, *24*, 1124.

-
- ¹⁶⁹ Kaouadji, M. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 2295
- ¹⁷⁰ Al-Khalil, S.; Al-Douri, N.; Nidhal, A. *Alex J Pharm Sci* **1997**, *11*, 33.
- ¹⁷¹ Vavilova, N. K.; Gella, I. V. *Chem. Nat. Compd.* **1973**, *9*, 147.
- ¹⁷² Hussain, J.; Bukhar, N.; Hussain, H.; Naseem, B.; Naeem, A.; Green, I. R. *Rec. Nat. Prod.* **2010**, *4*, 242.
- ¹⁷³ Lin, M.; Li, S. Z. *Acta Pharm Sinica* **1993**, *28*, 437.
- ¹⁷⁴ Harput, Ü. Ş.; Saracoğlu, I.; Çaliş I.; Dönmez, A. A.; Nagatsu, A. *Turk. J. Chem.* **2004**, *28*, 767.
- ¹⁷⁵ Yalçin, F. N.; Ersöz, T.; Akbay, P.; Çaliş, I.; Dönmez, A. A.; Sticher, O. *Turk J Chem.* **2003**, *27*, 295.
- ¹⁷⁶ Olennikov, D. N., Tankhaeva, L. M., Partilkaev, V. V., Rokhin, A. V., *Braz. J. Pharmacol.* **2012**, *22*, 490.
- ¹⁷⁷ Ullah, R. *Life Sci.*, **2013**, *10*, 969.
- ¹⁷⁸ Fan, K.; Wang, P.; Zhang, X. L.; Hao, S. H.; Huang, S.; Wang, J. Q. *Zhong Yao Cai*, **2010**, *33*, 1884.
- ¹⁷⁹ Zhong, X.-N.; Otsuka, H.; Ide, T.; Hirata, E.; Takeda, Y. *Phytochemistry*.**1999**, *52*, 923.
- ¹⁸⁰ Çalis, I.; Kirmizibekmez, H.; Beutler, J.; Dönmez, A. A.; Yalçin, F.N.; Kiliç, E. Özalp, M.; Rüedi, P.; Tasdemir, D. *Turk J Chem.* **2005**, *29*, 71.
- ¹⁸¹ Zhang, Y.; Wang, Z.-Z. *C. R. Biol.* **2009**, *332*, 816.
- ¹⁸² Hussain, J.; Bukhari, N.; Hussain, H.; Haider, S.; Hassan, Z. *Helv. Chim. Acta.* **2010**, *93*, 1428.
- ¹⁸³ Li, C.; Zhang, H. *J. Chin. Mat. Med.* **2000**, *25*, 35.
- ¹⁸⁴ Wang, X.-L.; Yu, K.-B.; Peng, S.-L. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* **2008**, *33*, 1415.
- ¹⁸⁵ Wink, M. *Phytochemistry* **2003**, *64*, 3.
- ¹⁸⁶ Καρατάγλης, Σ. Σ. Φυσιολογία Φυτών. Εκδόσεις Art of text. Θεσσαλονίκη, **1994**.
- ¹⁸⁷ Καραμπουρνιώτης, Γ. Α.; Λιακόπουλος, Γ.; Νικολακόπουλος, Δ. Φυσιολογία καταπονήσεων των φυτών - Οι λειτουργίες των φυτών κάτω από αντίξοες συνθήκες. Εκδόσεις έμβρυο. Αθήνα, **2012**.
- ¹⁸⁸ Taiz, L.; Zeiger, E.; Moller, I. M.; Murphy, A. *Plant Physiology and Development*. 6th Edition, Sinauer Associates, Sunderland. **2015**.
- ¹⁸⁹ Macías, F. A.; Galindo, J. L.G.; Galindo, J. C. G. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 2917.
- ¹⁹⁰ Bannet, R. N.; Wallsgrove, R. N. *New Phyto.* **1994**, *127*, 617.
- ¹⁹¹ Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, Α. Κ. Φυσιολογία Φυτών από το μόριο στο περιβάλλον. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 2012.
- ¹⁹² Schunck, E. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1848**, *66*, 174.
- ¹⁹³ Bowers, M. D.; Rosenthal, G. A.; Berenbaum, M. *Iridoid glycosides*, Academic Press, Orlando, FL, **1991**.

-
- ¹⁹⁴ Cavill, G.; Ford, D.; Locksley, H. *Aust. J. Chem.* **1956**, *9*, 288.
- ¹⁹⁵ Viljoen, A.; Mncwangi, N.; Vermaak, I. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 2104.
- ¹⁹⁶ Dinda, B.; Debnath, S. *Monoterpenes: Iridoids in Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*, K. G. Ramawat and J. M. Merillon eds. (Berlin: Springer) **2013**.
- ¹⁹⁷ Ilc, T.; Parage, C.; Boachon, B.; Navrot, N.; Werck-Reichhart, D. *Front. Plant Sci.*, **2016**, *7*, 509.
- ¹⁹⁸ Biere, A.; Marak, H. B.; van Damme, J. M. *Oecol.* **2004**, *140*, 430.
- ¹⁹⁹ Konno, K.; Hirayama, C.; Yasui, H.; Nakamura, M. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, *96*, 9159.
- ²⁰⁰ Wang, D.; Du, F.; Liu, H.; Liang, Z. *J. Med. Plants Res.* **2010**, *4*, 2691.
- ²⁰¹ Stewart-Jones, A.; Dewhurst, S. Y.; Durrant, L.; Fitzgerald, J. D.; Hardie, J.; Hooper, A. M.; Pickett, J. A.; Poppy, G. M. *J. Exp. Biol.* **2007**, *210*, 4335.
- ²⁰² Pichersky, E.; Raguso, R. A. *New Phytol* **2016**, DOI: 10.1111/nph.14178
- ²⁰³ Raffa, K. F. *J. Chem. Ecol.* **2014**, *40*, 1.
- ²⁰⁴ Abbas, M.; Saeed, F.; Anjum, F. M.; Afzaal, M.; Tufail, T.; Bashir, M. S.; Ishtiaq, A.; Hussain, S., Suleria, H.A.R. *Int J Food Prop* **2017**, *20*, 1689.
- ²⁰⁵ Usha Rani, P.; Pratyusha, S. *J. Asia Pac. Entomol.* **2013**, *16*, 131.
- ²⁰⁶ Kasperkiewicz, K.; Erkiert-Polguj, A.; Budzisz, E. *Lett Drug Des Discov* **2016**, *13*, 465.
- ²⁰⁷ Fonseca, J. C.; Barbosa, M. A.; Silva, I. C. A.; Duarte-Almeida, J. M.; Castro, A. H. F.; Dos Santos Lima, L. A. R. *S. Afr. J. Bot.* **2017**, *111*, 336.
- ²⁰⁸ Wang, H. B.; He, H. B.; Ye, C. Y.; Lu, J. C.; Chen, R. S.; Liu, C. H.; Guo, X. K.; Lin, W. X. *Allelopathy J.* **2010**, *25*, 239.
- ²⁰⁹ Harborne, J. B.; Whilliams, C. A. *Phytochemistry* **2000**, *55*, 481.
- ²¹⁰ Yasarawan, N.; Thipyapong, K.; Ruangpornvisuti, V. *J. Mol. Struct.* **2016**, *1107*, 278.
- ²¹¹ Lunau, K. *Plant Syst Evol.* **1992**, *183*, 51.
- ²¹² Dillon, F. M.; Chludil, H. D.; Zavala, J. A. *Phytochemistry* **2017**, *141*, 27.
- ²¹³ Appel, H. M. *J. Chem Ecol.* **1993**, *19*, 1521.
- ²¹⁴ Buer, C. S.; Imin, N.; Djordjevic, M. A. *J Integr Plant Biol.* **2010**, *52*, 98.
- ²¹⁵ Dewick, P. M. *Medicinal Natural Products; A Biosynthetic Approach*, Third ed. A John Wiley and Sons London, pp 137-310, **2009**.
- ²¹⁶ Rungsimakan, S. Phytochemical and biological activity studies on *Salvia viridis* L. Ph.D. Thesis archives of University of Bath, Department of Pharmacy and Pharmacology, **2011**.
- ²¹⁷ Andary, C.; Wylde, R.; Laffite, C.; Privat, G.; Winternitz, F. *Phytochemistry* **1982**, *21*, 1123.
- ²¹⁸ Owen, R.W.; Haubner, R.; Mier, W.; Giacosa, A.; Hull, W. E.; Spiegelhalder, B.; Bartsch, H. *Food Chem. Toxicol.* **2003**, *41*, 703.

-
- ²¹⁹ Li, L.; Tsao, R.; Liu, Z.; Liu, S.; Yang, R.; Young, J. C.; Zhu, H.; Deng, Z.; Xie, M.; Fu, Z. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1063*, 161.
- ²²⁰ Scarpati, M. L.; Monache, D. *Ann Chim* **1963**, *53*, 360.
- ²²¹ Alipieva, K. I.; Orhan, I. E.; Cankaya, I. I. T.; Kostadinova, E. P.; Georgiev, M. I. *Phytochem Rev.* **2014**, *13*, 417.
- ²²² Deepak, M.; Umashankar, D. C.; Handa, S. S. *Indian Drugs* **1999**, *36*, 336.
- ²²³ Schlauer, J.; Budzianowski, J.; Kukulczanka, K.; Ratajczak, L. *Acta Soc Bot Pol.* **2004**, *73*, 12.
- ²²⁴ Taskova, R. M.; Gotfredsen, C. H.; Jensen, S. R. *Phytochemistry* **2005**, *66*, 1441.
- ²²⁵ Alipieva, K.; Korkina, L.; Orhan, I. E.; Georgiev, M. I. *Biotechnol. Adv.* **2014**, *32*, 1066.
- ²²⁶ He, J.; Hu, X. P.; Zeng, Y.; Li, Y.; Wu, H. Q.; Qiu, R. Z.; Ma, W. J.; Li, T.; Li, C. Y.; He, Z. D. *J Asian Nat Prod Res* **2011**, *13*, 449.
- ²²⁷ Jiang, J.; W. Chin. *Tradit. Herb. Drugs.* **2004**, *35*, 356.
- ²²⁸ Wang, H. Q.; Xu, Y. X.; Yan, J.; Zhao, X. Y.; Sun, X. B.; Zhang, Y. P.; Guo, J. C.; Zhu, C. Q.; *Brain Res.* **2009**, *1283*, 139.
- ²²⁹ Chiou, W. F.; Lin, L. C.; Chen, C. F. *J. Pharm. Pharmacol.* **2004**, *56*, 743.
- ²³⁰ Lee, J. H.; Lee, J. Y.; Kang, H. S.; Jeong, C. H.; Moon, H.; Whang, W. K.; Kim, C. J.; Sim, S. S. *Arch. Pharm. Res.* **2006**, *29*, 508.
- ²³¹ He, J.; Hu, X. P.; Zeng, Y.; Li, Y.; Wu, H. Q.; Qiu, R. Z.; Ma, W. J.; Li, T.; Li, C. Y.; He, Z. D. *J Asian Nat Prod Res.* **2011**, *13*, 449.
- ²³² Zhao, J.; Liu, T.; Ma, L.; Yan, M.; Zhao, Y.; Gu, Z. Y.; Huang, Y. *Planta Med.* **2009**, *75*, 1463.
- ²³³ Gao, Y.; Pu, X. P. *Chin. Pharmacol. Bull.* **2007**, *23*, 161.
- ²³⁴ Hayashi, K.; Nagamatsu, T.; Ito, M.; Hattori, T.; Suzuki, Y. *Jpn. J. Pharmacol.* **1994**, *66*, 47.
- ²³⁵ Sun, W. D.; Chen, F.; Sun, Y.; Yangzhou, J. *Univ.* **2008**, *29*, 33.
- ²³⁶ Hayashi, K.; Nagamatsu T.; Ito, M.; Hattori, T.; Suzuki, Y. *Jpn. J. Pharmacol.* **1996**, *70*, 157.
- ²³⁷ Kostyuk, V. A.; Potapovich, A. I.; Lulli, D.; Stancato, A.; De Luca, C.; Pastore, S.; Korkina, L. *Curr Med Chem.* **2013**, *20*, 870.
- ²³⁸ Zhou, B. N.; Brian, D. B.; Glenn, A.; Hofmann, M. R.; Mattern, R.; Johnson, K.; Kingston, D. G. I. *J Nat Prod.* **1998**, *61*, 1410.
- ²³⁹ Sasaki, H.; Tagushi, H.; Endo, T.; Yosioka, I.; Higashiyama, K.; Otomasu, H. *Chem. Pharm. Bull.* **1978**, *26*, 2111.
- ²⁴⁰ Krauze-Baranowska, M. *Acta Pol. Pharm.* **2000**, *57*, 65.
- ²⁴¹ Abougazar H.; Bedir, E.; Khan, I. A.; Çalis, I. *Planta Med.* **2003**, *69*, 814.
- ²⁴² Gafner, S.; Wolfender, J. L.; Nianga, M.; Hostettmann, K. *Phytochemistry* **1997**, *44*, 687.

-
- ²⁴³ English, M.; Pinheiro, M. M. G.; Sardella, T. B.; O'Sullivan, L.; Boylan, F. *Curr Top Pharmacol* **2014**, *18*, 93.
- ²⁴⁴ Lee, J. W.; Bae, J. J.; Kwak, J. H. *Korean J Pharmacogn* **2016**, *47*, 301.
- ²⁴⁵ Çalış, I.; Hosny, M.; Khalifa, T.; Rüedi, P. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 3624.
- ²⁴⁶ Takeda, T.; Narukawa, Y.; Hada, N. *Chem. Pharm. Bull.* **1999**, *47*, 284.
- ²⁴⁷ Miao, J.; Wang, W.; Yao, S.; Navaratnam, S.; Parsons, B. J. *Free Radic Res* **2003**, *37*, 829.
- ²⁴⁸ Xiang, Y.; Jing, Z.; Haixia, W.; Ruitao, Y.; Huaixiu, W.; Zenggen, L.; Lijuan, M.; Yiping, W., Yanduo, T. *Phytother Res* **2017**, DOI:10.1002/ptr.5875.
- ²⁴⁹ Madani Mousavi, S. N.; Delazar, A.; Nazemiyeh, H.; Khodaie, L. *Iran J Pharm Res* **2015**, *14*, 215.
- ²⁵⁰ Saracoğlu, I.; Harput, Ü. Ş.; Çalış, I.; Ogihara, Y. *Turk J Chem* **2002**, *26*, 133.
- ²⁵¹ Endo, K.; Takahashi, K.; Abe, T.; Hikino, H. *Heterocycles* **1982**, *19*, 261.
- ²⁵² Mac Hida, K.; Ohkawa, N.; Ohsawa, A.; Kikuchi, M. *J Nat Med* **2009**, *63*, 192.
- ²⁵³ Hu, X.; Li, L.; Yang, Y.F.; Huang, C.Y.; Huang, G. L. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **2014**, *39*, 1630.
- ²⁵⁴ Tatli, I. I.; Akdemir, Z. S.; Yesilada, E.; Kupeli, E. *Z. Naturforsch. C Bio. Sci.* **2008**, *63*, 196.
- ²⁵⁵ Tandogan, B.; Guvenc, A.; Calis, I.; Ulsu, N. N. *Int. J. Chem. Kinet.* **2013**, *45*, 574.
- ²⁵⁶ Kirmizibekmez, H.; Montoro, P.; Piacente, S.; Dönmez, A.; Çalış, I. *Phytochem Anal* **2005**, *16*, 1.
- ²⁵⁷ Çalış, I.; Hosny, M.; Khalifa, T.; Rüedi, P. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 3624.
- ²⁵⁸ Didry, N.; Seidel, V.; Dubreuil, L.; Tillequin, F.; Bailleul, F. *J Ethnopharmacol* **1999**, *67*, 197.
- ²⁵⁹ Karioti, A.; Protopappa, A.; Megoulas, N.; Skaltsa, H. *Bioorganic Med. Chem.* **2007**, *15*, 2708.
- ²⁶⁰ Wang, Y.; Hao, H.; Wang, G.; Tu, P.; Jiang, Y.; Liang, Y.; Dai, L.; Yang, H.; Lai, L.; Zheng, C.; Wang, Q.; Cui, N.; Liu, Y. *Talanta*, **2009**, *80*, 572.
- ²⁶¹ Pellati, F.; Orlandini, G.; Benvenuti, S. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1242*, 58.
- ²⁶² Wang, Yu-Jie; Zhou, Si-Min; Xu, Gang; Gao, Yu-Qi; *Molecules* **2015**, *20*, 8060.
- ²⁶³ Porter, E. A.; Kite, G. C.; Veitch, N. C.; Geoghegan, I. A.; Larsson, S.; Simmonds, M. S. J. *Phytochemistry* **2015**, *117*, 185.
- ²⁶⁴ Cheminat, A.; Zawatzky, R.; Becker, H.; Brouillard, R.; *Phytochemistry* **1988**, *27*, 2787.
- ²⁶⁵ Stoll, A.; Renz, J.; Brack, A. *Helv. Chim. Acta* **1950**, *33*, 1877.
- ²⁶⁶ You, S. P.; Ma, L.; Zhao, J.; Zhang, S. L.; Liu, T. *Molecules* **2016**, *21*, 102.
- ²⁶⁷ Gousiadou, C.; Kokubun, T.; Martins, J.; Gotfredsen, C. H.; Jensen, S. R. *Phytochemistry* **2015**, *115*, 171.
- ²⁶⁸ Zhang, B. B.; Shi, K.; Liao, Z. X.; Dai, Y.; Zou, Z. H. *Fitoterapia* **2011**, *82*, 854.
- ²⁶⁹ Czerwińska, M. E.; Granica, S.; Kiss, A. K. *Planta Med.* **2013**, *79*, 924.

-
- ²⁷⁰ Zou, J.; Zhu, Y. D.; Zhao, W. M. *J.Asian Nat. Prod. Res.* **2008**, *10*, 603.
- ²⁷¹ Yang, H. K.; Sung, S. H.; Kim, Y.C. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 101.
- ²⁷² Ho, C.-W.; Lin, R.-D.; Lee T.-H.; Lin, C.-H.; Wen, C.-L.; Tseng, Y.-T. Lee, M.-H. *Botan. Stud.* **2013**, *54*, 51.
- ²⁷³ Aissa, I.; Sghair, R.; Bouaziz, M.; Laouini, D.; Sayadi, S.; Gargouri, Y. *Lipids Health Dis* **2012**, *11*, 13.
- ²⁷⁴ Acevedo, L.; Martinez, E.; Castaneda, P.; Franzblau, S.; Timmermann, B. N.; Linares, E.; Bye, R.; Mata, R. **2000**, *Plant Med.* *66*, 257.
- ²⁷⁵ Sun, Y., Lin, Y., Cao, X., Xiang, L., Qi, J. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 21660.
- ²⁷⁶ Lee, J. W.; Lee, D. Y.; Cho, J. G.; Baek, N. I.; Lee, Y. H. *J Appl Biol Chem.* **2010**, *53*, 207.
- ²⁷⁷ Windaus, A.; Welsch, A. *Ber.* **1909**, *42*, 612.
- ²⁷⁸ Matsumoto, T.; Shimizu, N.; Shigemoto, T.; Itoh, T. I.; Nishioka, A. *Phytochemistry* **1983**, *22*, 789.
- ²⁷⁹ Evidente, A.; Cimmino, A.; Fernández-Aparicio, M.; Rubiales, D.; Andolfi, A.; Melck, D. *Pest Manag Sci* **2011**, *67*, 1015.
- ²⁸⁰ Matsumoto, T.; Nakagawa, M.; Itoh, T. *Phytochemistry* **1984**, *23*, 921.
- ²⁸¹ Luhata, Lokadi, P.; Munkombwe, Namboole, M. *JIPBS*, **2015**, *2*, 88.
- ²⁸² Eckart, E. *Solanaceae and Convolvulaceae: Secondary Metabolites/Biosynthesis, Chemotaxonomy, Biological and Economic Significance (A Handbook)* Springer-Verlag, Berlin, **2008**.
- ²⁸³ Howell, S. A.; Moore, M. K.; Mallett, A. I.; Noble, W. C. *J Gen Microbiol* **1990**, *136*, 241.
- ²⁸⁴ Zhu, N.; Dai, X.; Lin, D. S.; Connor, W. E. *Lipids* **1994**, *29*, 869.
- ²⁸⁵ Howell, S. A.; Moore, M. K.; Mallet, A. I.; Noble, W. C. *J Gen Microbiol.* **1990**, *136*, 241.
- ²⁸⁶ Yahya1, M. A. A.; Yaacob; W. A.; Nazlina, I. *MJAS* **2011**, *15*, 22.
- ²⁸⁷ Khatun, M.; Billah, M.; Quader, M. A. *Dhaka Univ. J. Sci.* **2012**, *60*, 5.
- ²⁸⁸ Windaus .A; Hauth A: (Reports of the German Chemical Society) *Berich. Deutsc. Chem. Gesellsch.* **1907**, *39*, 4378.
- ²⁸⁹ De-Eknamkul, W.; Potduang, B. *Phytochemistry* **2003**, *62*, 389.
- ²⁹⁰ Li, C.; Bu, P. B.; Yue, D. K.; Sun, Y. F. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **2006**, *31*, 131.
- ²⁹¹ Zhang, M.; Chen, Y. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **1996**, *21*,480.
- ²⁹² Han, Y.; Xia, C.; Cheng, X.; Xiang. R.; Liu, H.; Yan, Q.; Xu, D. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **1998**, *23*, 680.
- ²⁹³ Yang, S.; Zhong, Y.; Luo, H.; Ding, X.; Zuo, C. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **1999**, *24*, 680.
- ²⁹⁴ Yang, X. W.; Guo, Q. M. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **2007**, *32*, 496.
- ²⁹⁵ Peng, T.; Dong, X.; Deng, Y.; Tu, Y.; Li, X. *Zhong Yao Cai* **2005**, *28*, 996.

-
- ²⁹⁶ Liu, G.; Zheng, J.; Yu, Z.; Zhang, J.; Lin, R. *Zhong Yao Cai* **2005**, *28*, 1060.
- ²⁹⁷ Luu, Y. Y.; Li, L.; Zhang, C.; Xiao, Y. Q. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **2006**, *31*, 667.
- ²⁹⁸ Panda, S.; Jafri, M.; Kar, A.; Meheta, B. K. *Fitoterapia* **2009**, *80*, 123.
- ²⁹⁹ Pal, D. K.; Nandi, M. *Acta Pol Pharm* **2005**, *62*, 355.
- ³⁰⁰ Jae-Chul, L.; Jong, H. P.; Milos, B.; Alexander, K.; Yeong-Hwan, H.; Byung-Soo K.; Lee, S. Il.; Lee, D. U. *Chem. Pharm. Bull.* **2005**, *53*, 561.
- ³⁰¹ Sundararaman, P.; Djerassi, C. *J Org Chem* **1977**, *42*, 3633.
- ³⁰² Kametani, T.; Furuyama, H.; *Med Res Rev* **1987**, *7*, 147.
- ³⁰³ Mabry, T. J.; Markham, K. R.; Thomas, M. B. *The Systematic Identification of Flavonoids* Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, New York, **1970**.
- ³⁰⁴ Markham, K. R.; Geiger, H. ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy of flavonoids and their glycosides in hexadeuterodimethylsulfoxide. In *The Flavonoids: Advances in Research 1986*, J. B. Harborne, ed: Chapman and Hill, London **1994**.
- ³⁰⁵ Cao, G.; Sofic, E.; Prior, R. L. *Free Radic Biol Med* **1997**, *22*, 749.
- ³⁰⁶ Grayer R. J. Flavonoids. In *Preparative Chromatography Techniques: Applications in Natural Product Isolation*, Springer-Verlag, Berlin, 295, **1986**.
- ³⁰⁷ Huang, Y. H.; Zeng, W. M.; Li, G. Y.; Liu, G. Q.; Zhao, D. D.; Wang, J.; Zhang, Y. L. *Molecules* **2014**, *19*, 507.
- ³⁰⁸ Ragab, E. A.; Hosny, M.; Kadry, H. A.; Ammar, H. A. *J. Nat. Prod.* **2010**, *3*, 35.
- ³⁰⁹ Vieira, M. N.; Winterhalter, P.; Jerz, G. *Phytochem. Anal.* **2016**, *27*, 116.
- ³¹⁰ Hu, Q.; Zhang, D. D.; Wang, L.; Lou, H.; Ren, D. *Food Chem Toxicol* **2012**, *50*, 1927.
- ³¹¹ Areias, F. M.; Valentão, P.; Andrade, P. B.; Ferreres, F.; Seabra, R. M. *Food Chem* **2001**, *73*, 307.
- ³¹² Geng, D.; Chi, X.; Dong, Q.; Hu, F. *Ind Crops Prod* **2015**, *67*, 492.
- ³¹³ Krasteva, I.; Nikolov, S. *Quim. Nova* **2008**, *31*, 59.
- ³¹⁴ Vieira, M. N.; Winterhalter, P.; Jerz, G. *Phytochem. Anal.* **2016**, *27*, 116.
- ³¹⁵ Schram, A. W.; Jonsson, L. M. V.; De Vlaming, P. *Z. Naturforsch. C Bio. Sci.* **1983**, *38*, 342.
- ³¹⁶ Sonmezdag, A. S.; Kelebek, H.; Selli, S. *Food Chem* **2018**, *240*, 24.
- ³¹⁷ Smeriglio, A.; Mandalari, G.; Bisignano, C.; Filocamo, A.; Baarrega, D.; Bellocco, E.; Trombetta, D. *Ind Crops Prod* **2016**, *83*, 283.
- ³¹⁸ Jing, X.; Ren, D.; Wei, X.; Shi, H.; Zhang, X.; Prerez, G. R.; Lou, H.; Lou, H. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2013**, *273*, 672.
- ³¹⁹ Maltese, F.; Erkelens, C.; Kooy, F.V. D.; Choi, Y. H.; Verpoorte, R. *Food Chem.* **2009**, *116*, 575.
- ³²⁰ Lee, N. K.; Choi, S. H.; Park, S. H.; Park, E. K.; Kim, D. H. *Pharmacology* **2004**, *71*, 174.

-
- ³²¹ Lewinsohn, E.; Britsch, L.; Mazur, Y.; Gressel, J. *Plant Physiol.* **1989**, *91*, 323.
- ³²² Erenler, R.; Sen, O.; Aksit, H.; Dermitras, I.; Yaglioglu, A. S.; Elmastas, M.; Telci, I. *J Sci Food Agric* **2016**, *96*, 822.
- ³²³ Ramchoun, M.; Sellam, K.; Harnafi, H.; Alem, C.; Benlyas, M.; Khallouki, F., Amrani, S. *Asian Pac J Trop Biomed* **2015**, *5*, 93.
- ³²⁴ Roza, O.; Martins, A.; Hohmann, J.; Lai W. C.; Eloff, J. N.; Chang, F. R.; Csupor, D. *Planta Med.* **2016**, *82*, 1274.
- ³²⁵ Xu, L. Y.; Li, Z. L.; Cai, Z. C.; Qian, S. H. *Zhong Cao Yao* **2013**, *44*, 2798.
- ³²⁶ Gil-Izquierdo, A.; Gil, M. I.; Ferreres, F.; Tomás-Barberán, F. A. *J Agric Food Chem*, **2001**, *49*, 1035.
- ³²⁷ Krishnan, G.; Subramaniyan, J.; Chengalvarayan Subramani, P.; Muralidharan, B.; Thiruvengadam, D. *Asian J Pharm* **2017**, *12*, 442.
- ³²⁸ Wang, H. W.; Shi, L.; Xu, Y. P.; Qin, X. Y.; Wang, Q. Z. *Exp Ther Med* **2017**, *14*, 3713.
- ³²⁹ Fabre, N.; Rustan, I.; Hoffmann, E.; Quetin-Leclercq, J. *J Am Soc Mass Spectrom.* **2001**, *12*, 707.
- ³³⁰ Lin, L. C.; Pai, Y. F.; Tsai, T. H.; *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 7700.
- ³³¹ Hu, C.; Kitts, D. D. *Mol Cell Biochem.* **2004**, *265*, 107.
- ³³² Hu, O.; Young, T.; Hsiong, C.; Chang, W.; Smith, T.; Ho, T. *New low side effect Pharmaceutical composition containing Antituberculosis Drugs*, Patent US2014/38921 A1, **2014**.
- ³³³ Markham, K. R. *Techniques of flavonoid identification* Academic Press, London; New York **1982**.
- ³³⁴ Güvenalp, Z.; Ömür, Demirezer, L. *Turk J Chem* **2005**, *29*, 169.
- ³³⁵ Qiu, D.; Guo, J.; Yu, H.; Yan, J.; Yang, S.; Li, X.; Zhang, Y.; Sun, J.; Cong, J.; He, S.; Wei, D.; Qin, J. C. *Food Chem* **2018**, *241*, 182.
- ³³⁶ Terao, J. *Biochem Pharmacol* **2017**, *139*, 15.
- ³³⁷ Felipe, D. F.; Brambilla, L. Z. S.; Porto, C.; Pilau, E. J.; Cortez, D. A. G.; *Molecules* **2014**, *19*, 15720.
- ³³⁸ Gouveia, S.; Castilho, P. C. *Food Chem.* **2011**, *129*, 333.
- ³³⁹ Nowak, S.; Wolbiś, M. *Acta Pol Pharm* **2002**, *59*, 275.
- ³⁴⁰ Zheng, Y. Z.; Deng, G.; Liang, Q.; Chen, D. F.; Guo, R.; Lai, R. C. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 7543.
- ³⁴¹ Wolfram, S.; Block, M.; Ader, P.; *J. Nutr* **2002**, *132*, 630.
- ³⁴² Razavi, S. M.; Zahri, S.; Zarrini, G.; Nazemiyeh, H.; Mohammadi, S. *Russ. J. Bioorganic Chem.* **2009**, *35*, 376.
- ³⁴³ Tayfen, E.; Sebnem, H.; Iclal, S.; Ihsan, C.; Yukio, O. *Turk. J. Chem.* **2002**, *26*, 581.
- ³⁴⁴ Fairouz, M.; Amar, Z.; Narimane, S.; Ahmed, T.; Salah, R. *Rec. Nat. Prod.* **2010**, *4*, 91.
- ³⁴⁵ Harborne, J. B.; Baxter, H. *The Handbook of Natural Flavonoids*, John Wiley and Sons Ltd.,

Chichester, **1999**.

- ³⁴⁶ Tsanova-Savova, S.; Ribarova, F. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **2013**, *63*, 173.
- ³⁴⁷ Javadi, B.; Sahebkar, A. *Pharmacol. Res.* **2017**, *124*, 34.
- ³⁴⁸ Zhou, X.; Wang, F.; Zhou, R.; Song, X.; Xie, M. *J. Food Biochem.* **2017**, *41* (4), e12376.
- ³⁴⁹ Peng, H. Y.; Zhang, X. H.; Xu, J. Z. *J Zhejiang Univ Sci B* **2016**, *17*, 447.
- ³⁵⁰ Barberan, F. A. T.; Gil, M. I.; Tomas, F.; Ferreres, F.; Arques, A. *J. Nat. Prod.* **1985**, *48*, 859.
- ³⁵¹ Svehlíková, V.; Bennett, R. N.; Mellon, F. A.; Needs, P. W.; Piacente, S.; Kroon, P. A.; Bao, Y. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 2323.
- ³⁵² Ali, F.; Rahul, Naz, F.; Jyoti, S.; Siddique, Y. H. *Int J Food Prop* **2017**, *20*, 1197.
- ³⁵³ Smiljkovic, M.; Stanisavljevic, D.; Stojkovic, D.; Petrovic, I.; Vicentic, M. J.; Popovic, J.; Grdadolnik, S. G.; Markovic, D.; Sanković-Babić, S.; Glamoclija, J.; Stevanovic, M.; Sokovic, M. *EXCLI J.* **2017**, *16*, 795.
- ³⁵⁴ Kim, Y. C.; Higuchi, R.; Kitamura, Y.; Komori, T. *Liebigs Ann. Chem.* **1991**, *1991*, 1285.
- ³⁵⁵ Son, K. H.; Kim, J. S.; Kang, S. S.; Kim, H. P.; Chang, H. W. *Korean J Pharmacogn* **1994**, *25*, 24.
- ³⁵⁶ Asen, S.; Stewart, R. N.; Norris, K. H. *Phytochemistry* **1975**, *14*, 1443.
- ³⁵⁷ Milkova, T.; Petkova, R.; Christov, R.; Popova, S.; Dimitrova-Konaklieva, S. *Botanica Marina* **1995**, *38*, 99.
- ³⁵⁸ El-Desouky, S. K.; Ibrahim, L. F.; Kawashty, S. A.; Kim, O. K.; Kim, Y. K. *Z. Naturforsch. B Chem. Sci.* **2009**, *64*, 447.
- ³⁵⁹ Wang, S.; Li, X.; Niu, Y.; Liu, Y.; Zhu, Y.; Lu, X.; Fan, X.; Zhang, X.; Wang, Y. *J Sep Sci* **2016**, *39*, 3690.
- ³⁶⁰ Zhao, M.; Du, L.; Tao, J.; Qian, D.; Shang, Er-Xin; Jiang, S.; Guo, J.; Su, S.-L.; Duan, J. A. *J Agric Food Chem* **2014**, *62*, 11441.
- ³⁶¹ Willems, J. L.; Khamis, M. M.; Mohammed Saeid, W.; Purves, R. W.; Katselis, G.; Low, N. H.; El-Aneel, A. *Anal. Chim. Acta* **2016**, *933*, 164.
- ³⁶² Esatbeyoglu, T.; Rodríguez-Werner, M.; Winterhalter, P. *Eur Food Res Technol* **2017**, *243*, 1261.
- ³⁶³ Pukalskas, A.; Venskutonis, P. R.; Dijkgraaf, I.; van Beek, T. A. *Food Chem.* **2010**, *122*, 804.
- ³⁶⁴ Suárez-Quiroz, M. L.; Alonso Campos, A.; Valerio Alfaro, G.; González-Ríos, O.; Villeneuve, P.; Figueroa-Espinoza, M. C. *J. Food Comp. Anal.* **2014**, *33*, 55.
- ³⁶⁵ Mølgaard, P.; Ravn, H. *Phytochemistry* **1988**, *27*, 2411.
- ³⁶⁶ Clifford, M. N. *J. Sci. Food Agric.* **1999**, *79*, 362.
- ³⁶⁷ George, S. E.; Ramalakshmi, K.; Mohan, Rao, L. *J. Crit Rev Food Sci Nutr* **2008**, *48*, 464.
- ³⁶⁸ Tajik, N.; Tajik, M.; Mack, I.; Enck, P. *Eur J Nutr* **2017**, *56*, 2215.
- ³⁶⁹ Clifford, M. N. *J Sci Food Agric* **1999**, *79*, 362.

-
- ³⁷⁰ Dayema, T.; Ikawa, T.; Kitagawa, S.; Nishibe, S. *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, *35*, 1785.
- ³⁷¹ Yin, J.; Heo, J. H.; Hwang, Y. J.; Le, T. T.; Lee, M. W. *Molecules* **2016**, *21*, 887.
- ³⁷² Xu, G.; Li, Z.; Wang, Q.; Tan, J.; Shi, G.; Qi, W.; Li, D., Wang, Y. *Zhong Guo Yao Ke Da Xue* **2016**, *47*, 294.
- ³⁷³ Xiang, M.; Hu, Y.; He, F.; Liu, X. *Zhong Yao Cai* **2015**, *38*, 1872.
- ³⁷⁴ Strapasson, R. L. B.; Rüdiger, A. L., Burrow, R. A.; Barison, A.; Stefanello, M. E. A. *Nat Prod Commun* **2014**, *9*, 1541.
- ³⁷⁵ Yagi, A.; Washida, Y.; Takata, N.; Nishioka, I. *Chem. Pharm. Bull* **1972**, *20*, 1755.
- ³⁷⁶ Joshi, K. R.; Devkota, H. P.; Yahara, S. *Nat Prod Commun* **2013**, *8*, 583.
- ³⁷⁷ Frezza, C.; Venditti, A.; Rossi, G.; Serafini, I.; Pitorri, M.; Ciccóla, A.; Foddai, S.; Bianco, A.; Serafini, M. *Biochem. Syst. Ecol.* **2017**, *74*, 63.
- ³⁷⁸ Pu, G.; Zhou, B.; Xiang, F. *Biologia (Pl)* **2017**, *72*, 608.
- ³⁷⁹ Lee, Y. S.; Kang, Y. H.; Jung, J. Y.; Lee, S.; Ohuchi, K.; Shin, K. H.; Kang, Il-Jun; Park, J. H. Y.; Shin, K. H.; Lim S. S. *Biol Pharm Bull* **2008**, *31*, 1968.
- ³⁸⁰ Gülçin, I. *Toxicology* **2006**, *217*, 213.
- ³⁸¹ Damasceno, S. S.; Dantas, B. B.; Ribeiro-Filho, J.; Araújo, D. A. M.; Da Costa, J. G. M. *Curr Pharm Des* **2017**, *23*, 3015.
- ³⁸² Ralph, J.; Hatfield, R. D.; Quideau, S.; Helm, R. F.; Grabber, J. H.; Jung, H. J. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 9448.
- ³⁸³ Vazquez -Olivo, G.; López-Martínez, L. X.; Contreras-Angulo, L.; Heredia, J. B. *Waste Biomass Valorization* **2017**, *1*. Article in press.
- ³⁸⁴ Fortes, G. A. C.; Da Silva, A. J. R.; Ferri, P. H.; Santos, S. C. *Rec Nat Prod* **2015**, *9*, 292.
- ³⁸⁵ Dasgupta, N.; Muthukumar, S. P.; Murthy, P. S. R. *J. Med. Plant* **2016**, *10*, 181.
- ³⁸⁶ Karthikeyan, R.; Devadasu, C.; Srinivasa Babu, P. *Int. J. Anal. Chem.* **2015**, doi: 10.1155/2015/201386.
- ³⁸⁷ Pei, K.; Ou, J.; Huang, J.; Ou, S. *J. Sci. Food Agric.* **2016**, *96*, 2952.
- ³⁸⁸ Gálvez, M. C.; Barroso, C. G.; Pérez-Bustamante, J. A. **1994**, *199*, 29.
- ³⁸⁹ Kamatham, S.; Kumar, N.; Gudipalli, P. *Tox. Rep.*, **2015**, *2*, 520.
- ³⁹⁰ Abri, A.; Maleki, M. *Iran. chem. commun.* **2016**, *4*, 146.
- ³⁹¹ Oke Altuntas, F.; Ipekcioglu, S.; Sahin Yaglioglu, A.; Behcet, L.; Demirtas, I. *Pharm. Biol.* **2017**, *55*, 966.
- ³⁹² Wang, H. F.; Provan, G. J.; Helliwell, K. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2003**, *33*, 539.
- ³⁹³ Omar, S. H. *Biomed Pharmacother* **2017**, *89*, 396.

-
- ³⁹⁴ Fogliani B.; Raharivelomanana, P.; Bianchini, J. P.; Madjebi, S. B.; Hnawia, R. *Phytochemistry* **2005**, *66*, 241.
- ³⁹⁵ Jayamani, J.; Shanmugam, G. *Eur J Med Chem* **2014**, *85*, 352.
- ³⁹⁶ Sircar, D.; Mitra, A. *J. Plant Physiol.* **2009**, *166*, 1370.
- ³⁹⁷ Khadem, S.; Marles, R. *J. Molecules* **2010**, *15*, 7985.
- ³⁹⁸ Kamaya, Y.; Tsuboi, S.; Takada, T.; Suzuki, K. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2006**, *51*, 537.
- ³⁹⁹ Manuja, R.; Sachdeva, S.; Jain, A.; Chaudhary, J. *Int. J Pharm Sci Rev Res* **2013**, *22*, 109.
- ⁴⁰⁰ Chang, S.W.; Kim, K. H.; Lee, I. K.; Choi, S. U.; Ryu, S. Y.; Lee, K. R. *Nat. Prod. Res.* **2009**, *15*, 234.
- ⁴⁰¹ Ouattara, B.; Jansen, O.; Angenot, L.; Guissou, P.; Frédérick, F. P.; Tits, M. *Phytomedicine* **2009**, *16*, 125.
- ⁴⁰² Ezzat, M. I.; Ezzat, S. M.; El Deeb, K. S.; El Fishawy, A. M. *Nat Prod Res* **2017**, *31*, 1325.
- ⁴⁰³ Mo, E. J.; Ahn, J. H.; Jo, Y. H.; Kim, S. B.; Hwang, B. Y.; Lee, M. K. *Molecules* **2017**, *22*, 134.
- ⁴⁰⁴ Vogel, C. S.; Dawson, J. O. *Soil Biol Biochem* **1986**, *18*, 227.
- ⁴⁰⁵ Harborne, J. B.; Baxter, H. *Phytochemical dictionary a handbook of bioactive compounds from plants*, Taylor and Francis, London, **1993**.
- ⁴⁰⁶ Spencer, G. F. *Org. Prep. Proc. Int.* **1991**, *23*, 390.
- ⁴⁰⁷ Li, Y.-T., Pang, D.-R., Zhu, Z.-X.; Tu, P.-F., Li, J. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **2016**, *41*, 4197.
- ⁴⁰⁸ Song, K.; Zheng, X. K.; Zhang, J. K.; Zou, Z.-M.; Feng, W.-S. *Chin. Pharm. J.* **2016**, *51*, 1462.
- ⁴⁰⁹ Fan, C. M.; Chou, G. X.; Zhu, E. Y. *Yao Xue Xue Bao* **2016**, *51*, 775.
- ⁴¹⁰ Duan, X. H.; Zhang, Y. Z.; He, P.; Ma, Z. M.; Pei, L. *Zhong Cao Yao* **2015**, *46*, 310.
- ⁴¹¹ Yin, W.; Song, Z.; Liu, J.; Zhang, G. *Zhong Yao Cai* **2015**, *40*, 679.
- ⁴¹² Sun, H.; Zhang, Y.; Xie, X.; Che, Y. *Zhong Yao Cai* **2014**, *37*, 2019.
- ⁴¹³ Kim, D.-W.; Lee, K.-T.; Kwon, J.; Lee, H. J.; Lee, D.; Mar, W. *Life Sci.* **2015**, *130*, 25.
- ⁴¹⁴ Koo, H. J.; Kwak, J. H.; Kang, S. C. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2014**, *78*, 1392.
- ⁴¹⁵ Siddiqui, S.; Faizi, S.; Siddiqui, B. S.; Ghiasuddin, S. *J. Nat. Prod.* **1992**, *55*, 303.
- ⁴¹⁶ Muñoz, O.; Argandoña, V. H.; Corcuera, L. J. *Z. Naturforsch. C Bio. Sci.* **1998**, *53*, 811.
- ⁴¹⁷ Mahalakshmi, R.; Eganathan, P.; Parida, A. K. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **2013**, *5(SUPPL.4)*, 655.
- ⁴¹⁸ Ma, Q. Z.; Peng, W. X.; Zhang, D. Q.; Zhang, N. N.; Wang, W. W. 2nd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering, iCBBE **2008**.
- ⁴¹⁹ Edel Queen, Z.; Rao, M. R. K.; Anthony, J.; Prabhu, K.; Johnson, W. M. S.; Shanthi Balasubramanian, B.; Sundaram, L.; Dinakar, S. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res* **2016**, *39*, 169.

-
- ⁴²⁰ Cheng, M. C.; Chang, W. H.; Chen, C. W.; Li, W. W.; Tseng, C. Y.; Song, T. Y. *Molecules* **2015**, *20*, 19051.
- ⁴²¹ Wang, X.; Yu, Y.; Guo, S. *Asian. J. Chem.* **2014**, *26*, 1974.
- ⁴²² Girme, A. S.; Bhalke, R. D.; Nirmal, S. A.; Chavan, M. J. *Orient Pharm Exp Med* **2014**, *14*, 279.
- ⁴²³ Zhang, Z.-F.; Zhou, X.-Y.; Peng, W.-X.; Zhang, X.; Wu, F.-J. International Conference on Management and Service Science, MASS, 24-26 Aug. **2010**.
- ⁴²⁴ Neu, R. *Naturwissenschaften* **1957**, *44*, 181.
- ⁴²⁵ Stahl, E. *Thin-Layer Chromatography*, Springer, Berlin-Heidelberg-N. York, **1969**.
- ⁴²⁶ Coll, J. C.; Bowden, B. F. *J. Nat. Prod.* **1986**, *49*, 934.
- ⁴²⁷ Adams, R. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*; 4th Ed.; Allured Books: Carol Stream. **2007**.
- ⁴²⁸ Van Den Dool, H.; Dec. Kratz, P. *J. Chromatogr. A.* **1963**, *11*, 463.
- ⁴²⁹ Paris, R.; Nothis A. *Plant. Med. Phytother.* **1970**, *4*, 63.
- ⁴³⁰ Brodowska, K. M. *Eur. J. Biol. Res.* **2017**, *7*, 108.
- ⁴³¹ Ravishankar, D.; Rajora, A. K.; Greco, F.; Osborn, H. M. I. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2013**, *45*, 2821.
- ⁴³² Pandey, R. P.; Parajuli, P.; Koffas, M. A. G.; Sohng, J. K. *Biotechnol. Adv.* **2016**, *34*, 634.
- ⁴³³ Veitch, N. C.; Grayer, R. J. *Nat. Prod. Rep.* **2011**, *28*, 1626.
- ⁴³⁴ Veitch, N. C. *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 417.
- ⁴³⁵ Ferrer, J.-L.; Austin, M. B.; Stewart Jr. C.; Noel, J. P. *Plant Physiol. Biochem.* **2008**, *46*, 356.
- ⁴³⁶ Treutter, D. *Environ. Chem. Lett.* **2006**, *4*, 147.
- ⁴³⁷ Heim, K. E.; Tagliaferro, A. R.; Bobilya, D. J. *J. Nutr. Biochem.* **2002**, *13*, 572.
- ⁴³⁸ Xiao, J. B.; Tundis, R. *J. Pharm. Pharmacol.* **2013**, *65*, 1679.
- ⁴³⁹ Moghaddam, E.; Teoh, B. T.; Sam, S. S.; Lani, R.; Hassandarvish, P.; Chik, Z.; Yueh, A.; Abubakar, S.; Zandi, K. *Sci. Rep.* **2014**, *26*, 5452.
- ⁴⁴⁰ Oluwafeyisetan, A.; Olubunmi, A.; Peter, O. *Curr. HIV Res.* **2016**, *14*, 506.
- ⁴⁴¹ Song, M.; Tian, X.; Lu, M.; Zhang, X.; Ma, K.; Lv, Z.; Wang, Z.; Hu, Y.; Xun, C.; Zang, Z.; Wang, S. *Int. J. Oncol.* **2015**, *46*, 1131.
- ⁴⁴² Jnawali, H. N.; Lee, E.; Jeong, K. W.; Shin, A.; Heo, Y. S.; Kim, Y. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 258.
- ⁴⁴³ Elavarasan, J.; Velusamy, P.; Ganesan, T.; Ramakrishnan, S. K.; Rajasekaran, D.; Periandavan, K. *J. Pharm. Pharmacol.* **2012**, *64*, 1472.
- ⁴⁴⁴ Catalgol, B.; Batirel, S.; Taga, Y.; Ozer, N. K. *Front. Pharmacol.* **2012**, *3*, 141.

-
- ⁴⁴⁵ Chung, M. J.; Pandey, R. P.; Choi, J. W.; Sohng, J. K.; Choi, D. J.; Park, Y. I. *Int. Immunopharmacol.* **2015**, *25*, 302.
- ⁴⁴⁶ Souza, L. C.; Antunes, M. S.; Filho, C. B.; Del Fabbro, L.; de Gomes, M. G.; Goes, A. T. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2015**, *134*, 22.
- ⁴⁴⁷ Piątczak, E.; Kuźma, L.; Skala, E.; Żebrowska, M.; Balcerczak, E.; Balcerczak, E.; Wysokińska, H. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **2015**, *122*, 259.
- ⁴⁴⁸ Jimenez, C., Riguera, R. *Nat. Prod. Rep.* **1994**, *11*, 591.
- ⁴⁴⁹ Fu, G. M.; Pang, H. H.; Wong, Y. H. *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15*, 2592.
- ⁴⁵⁰ Xue, Z.; Yang, B. *Molecules* **2016**, *21*, 991.
- ⁴⁵¹ Ellis, B. Production *Phytochemistry* **1983**, *22*, 1941.
- ⁴⁵² Saimaru, H.; Orihara, Y. *J. Nat. Med.* **2010**, *64*, 139.
- ⁴⁵³ Hu, G. S.; Jia, J. M. Kim, D. H. *Chin. J. Nat. Med.* **2014**, *12*, 367.
- ⁴⁵⁴ Wu, A. Z.; Zhai, Y. J.; Zhao, Z. X.; Zhang, C. X.; Lin, C. Z.; Zhu, C. C. *Fitoterapia* **2013**, *84*, 237.
- ⁴⁵⁵ Vogt, T. *Mol. Plant* **2010**, *3*, 2.
- ⁴⁵⁶ Govil J. N., Pathak, M., (Eds) *Recent Progress in Medicinal Plants: Phytotherapeutics II*. Studium Press, New Delhi, V. 43, **2016**.
- ⁴⁵⁷ Georgiev, M. I.; Alipieva, K.; Orhan, I. E. *Phytother. Res.* **2012**, *26*, 313.
- ⁴⁵⁸ Kuang, R.; Sun, Y. G.; Yuan, W.; Lei, L.; Zheng, X. X. *Planta Med.* **2009**, *75*, 1499.
- ⁴⁵⁹ Chen, C. H.; Song, T. Y.; Liang, Y. C.; Hu, M. L. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 8852.
- ⁴⁶⁰ Kim, J. K.; Lee, Y. S.; Kim, S. H.; Bae, Y. S.; Lim, S. S.; Im, J. K. K.; Ee, S. L.; Im, H. K.; Ae, S. B.; Im, S. S. L. *Biol. Pharm. Bull.* **2011**, *34*, 160.
- ⁴⁶¹ Harput, Ü. Ş.; Genc, Y.; Saracoglu, I. *Food Chem. Toxicol.* **2012**, *50*, 1554.
- ⁴⁶² Heilmann, J.; Çalis, I.; Kirmizibekmez, H.; Schühly, W.; Harput, Ü. Ş.; Sticher, O. *Planta Med.* **2000**, *66*, 746.
- ⁴⁶³ Qu, H.; Zhang, Y.; Chai, X.; Sun, W. *Bioorg. Chem.* **2012**, *40*, 87.
- ⁴⁶⁴ Prescott, T. A. K.; Veitch, N. C.; Simmonds, M. S. J. *J. Ethnopharmacol.* **2011**, *137*, 1306.
- ⁴⁶⁵ Zhou, X. L.; Wen, Q. W.; Lin, X.; Zhang, S. J.; Li, Y. X.; Guo, Y. J.; Huang, R. B. *Arch. Pharm. Res.* **2014**, *37*, 600.
- ⁴⁶⁶ Si, C. L.; Shen, T.; Jiang, Y. Y.; Wu, L.; Yu, G. J.; Ren, X. D.; Xu, G. H.; Hu, W. C. *Food Chem. Toxicol.* **2013**, *59*, 145.
- ⁴⁶⁷ Santas, J.; Codony, R.; Rafecas, M., Natural Products in *Natural Products*. K.G. Ramawat J.M. Mérillon (eds.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg **2013**.
- ⁴⁶⁸ Scholz, B.; Guth, S.; Engel, K. H.; Steinberg, P. *Mol. Nutr. Food Res.* **2015**, *59*, 1339.

-
- ⁴⁶⁹ Shahzad, N.; Khan, W.; Md, S.; Ali, A.; Saluja, S. S.; Sharma, S.; Al-Allaff, F. A.; Abduljaleelf, Z.; Ibrahima, I. A.A.; Abdel-Wahab, A. F.; Afify, M. A.; Al-Ghamdi, S. S. *Biomed. Pharmacother.* **2017**, *88*, 786.
- ⁴⁷⁰ Bacchetti, T.; Masciangelo, S.; Bicchiega, V.; Bertoli, E.; Ferretti, G. *Mediterr J Nutr Metab* **2011**, *4*, 165.
- ⁴⁷¹ Ryan, E.; Galvin, K.; O'Connor, T. P.; Maguire, A. R.; O'Brien, N. M. *Hum Nutr* **2007**, *62*, 85.
- ⁴⁷² MacKay, D. S.; Jones, P. J. H. *Eur J Lipid Sci Technol* **2011**, *113*, 1427.
- ⁴⁷³ Rysz, J.; Franczyk, B.; Olszewski, R.; Banach, M.; Gluba-Brzózka, A. *Curr. Pharm. Des.* **2017**, *23*, 2488.
- ⁴⁷⁴ Piironen, V.; Lindsay, D. G.; Miettinen, T. A.; Toivo, J.; Lampi, A.-M. *J Sci Food Agric* **2000**, *80*, 939.
- ⁴⁷⁵ Choudhary, S. P.; Tran, L. S. *Curr Med Chem* **2011**, *18*, 4557.
- ⁴⁷⁶ Bradford, P. G.; Awad, A. B. *Mol Nutr Food Res* **2007**, *51*, 161.
- ⁴⁷⁷ Quílez, J., Rafecas, M., Brufau, G., Garcia-Lord, P.; Megías, I.; Bulló, M.; Ruiz, J. A.; Salas-Salvadó, J. *J Nutr* **2003**, *133*, 3103.
- ⁴⁷⁸ Derdemezis, C. S.; Filippatos, T. D.; Mikhailidis, D. P.; Elisaf, M. S. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* **2010**, *15*, 120.
- ⁴⁷⁹ Misawa, E.; Tanaka, M.; Nomaguchi, K.; Yamada, M.; Toida, T.; Takase, M.; Iwatsuki, K.; Kawada, T. *Obes Res Clin Pract* **2008**, *2*, 239.
- ⁴⁸⁰ Goleniowski, M.; Bonfill, M.; Cusido, R.; Palazón, J./ (eds.), *Phenolic Acids in Natural Products*, K.G. Ramawat, J.M. Mérillon Eds. Springer-Verlag Berlin Heidelberg **2013**.
- ⁴⁸¹ Andreasen, M. F.; Christensen, L.P.; Meyer, A. S.; Hansen, A. *J Agric Food Chem* **2000**, *48*, 2837.
- ⁴⁸² Lam, T. B. T.; Kadoya, K.; Liyama, K. *Phytochemistry* **2001**, *57*, 987.
- ⁴⁸³ Shahidi, F.; Naczk, M. *Phenolics in food and nutraceuticals: sources, applications and health effects*. CRC Press, Boca Raton, **2004**.
- ⁴⁸⁴ Verpoorte, R.; Contin, A.; Memelink, J. *Phytochem Rev* **2002**, *1*, 13.
- ⁴⁸⁵ Mandal, S. M.; Chakraborty, D.; Dey, S. *Plant Signal Behav* **2010**, *5*, 359.
- ⁴⁸⁶ Katalinic, V.; Milos, M.; Kulisic, T.; Jukic, M. *Food Chem* **2006**, *94*, 550.
- ⁴⁸⁷ Tan, S. C. *Proc Nutr Soc Aust* **2000**, *24*, 183.
- ⁴⁸⁸ Olthof, M. R.; Hollman, P. C. H.; Katan, M. B. *J Nutr* **2001**, *131*, 66.
- ⁴⁸⁹ Falsaperla, M.; Morgiabi, G.; Tartaronec, A.; Arditoc, R.; Romano, G. *Eur Urol* **2005**, *47*, 449.
- ⁴⁹⁰ Maggi-Capeyron, M. F.; Ceballos, P.; Cristol, J. P.; Delbosc, S.; Le Doucen, C.; Pons, M.; Leger, C. L.; Descomps, B. *J Agric Food Chem* **2001**, *49*, 5646.
- ⁴⁹¹ Gaspar, A.; Matos, M. J.; Garrido, J.; Uriarte, E.; Borges, F. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 4960.
- ⁴⁹² Wu, D.; Zhang, M.; Zhang, C.; Wang, Z. *Biochem. Syst. Ecol.* **2008**, *36*, 219.

-
- ⁴⁹³ Cheng, M.-J.; Chen, I.-S. *J. Chil. Chem. Soc.* **2008**, *53*, 1539.
- ⁴⁹⁴ Li, X.; Li, J.; Wang, D.; Wang, W.; Cui, Z. *Asian J. Tradit. Med.* **2009**, *4*, 98.
- ⁴⁹⁵ Conrad, J. R.; Förster-Fromme, B.; Constantin, M.-A.; Ondrus, V.; Mika, S.; Mert-Balci, F.; Klaiber, I.; Pfannstiel, J.; Möller, W.; Rösner, H.; Förster-Fromme, K.; Beifuss, U. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 835.
- ⁴⁹⁶ Li, L. M.; Zou, Q.; Li, G. Y. *Chin. Chem. Lett.* **2010**, *21*, 1203.
- ⁴⁹⁷ Wu, M.-C.; Peng, C.-F.; Chen, I.-S.; Tsai, I.-L. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 976.
- ⁴⁹⁸ Tian, L.-W.; Xu, M.; Li, Y.; Li, X.-Y.; Wang, D.; Zhu, H.-T.; Yang, C.-R.; Zhang, Y.-J. *Chem. Biodiversity* **2012**, *9*, 123.
- ⁴⁹⁹ Ghopur, H.; Usmanova, S. K.; Ayupbek, A.; Aisa, H. *Chem. Nat. Compd.* **2012**, *48*, 562.
- ⁵⁰⁰ Chen, D.; Xu, Z.; Chai, X.; Zeng, K.; Jia, Y.; Bi, D.; Ma, Z.; Tu, P. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, *27*, 5389.
- ⁵⁰¹ Sharma, S. K.; Kumar, S.; Chand, K.; Kathuria, A.; Gupta, A.; Jain, R. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 3825.
- ⁵⁰² Teles, H. L.; Silva, G. H.; Castro-Gamboa, I.; Da Silva Bolzani, V.; Pereira, J. O.; Costa-Neto, C. M.; Haddad, R.; Eberlin, M. N.; Young, M. C. M.; Araujo, A. R. *Phytochemistry* **2005**, *66*, 2363.
- ⁵⁰³ Hussain, H.; Krohn, K.; Draeger, S.; Schulz, B. *Heterocycles* **2007**, *74*, 331.
- ⁵⁰⁴ Königs, P.; Rinker, B.; Maus, L.; Nieger, M.; Rheinheimer, J.; Waldvogel, S. R. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 2064.
- ⁵⁰⁵ Wu, X.; Yin, S.; Zhong, J.; Ding, W.; Wan, J.; Xie, Z. *Fitoterapia* **2012**, *83*, 1706.
- ⁵⁰⁶ Kuroda, M.; Uchida, S.; Watanabe, K.; Mimaki, Y. *Phytochemistry* **2009**, *70*, 288.
- ⁵⁰⁷ Chen, G.; Jin, H. Z.; Li, X. F.; Zhang, Q.; Shen, Y. H.; Yan, S. K.; Zhang, W. D. *Arch. Pharm. Res.* **2008**, *31*, 970.
- ⁵⁰⁸ Kim, S. B.; Ahn, J. H.; Han, S.-B.; Hwang, B. Y.; Kim, S. Y.; Lee, M. K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 6267.
- ⁵⁰⁹ Li, X.; Yu, M.; Meng, D.; Li, Z.; Zhang, L. *Fitoterapia*, **2007**, *78*, 506.
- ⁵¹⁰ Motai, T.; Kitanaka, S. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 1732.
- ⁵¹¹ Huang, W.; Ding, Y.; Miao, Y.; Liu, M. Z.; Li, Y.; Yang, G. F. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *9*, 3687.
- ⁵¹² Ceylan-Ünlüsoy, M.; Verspohl, E. J.; Ertan, R. J. *Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2010**, *25*, 784.
- ⁵¹³ Kumar, V. N.; Reddy, Y. T.; Narasimhareddy, P.; Rajithaa, B.; Clercq, E. D. *ARKIVOC* **2006**, *XV*, 181.
- ⁵¹⁴ Oi G. F.; Yang, Z. Y.; Qin, D. D. *Chem Pharm Bull* **2009**, *1*, 69.
- ⁵¹⁵ Nikolaiivits, E.; Norra, G. F.; Voutsas, E.; Topakas, E. *J. Mol. Catal. B: Enzym* **2016**, *129*, 29.
- ⁵¹⁶ Lucas, R.; Comelles, F.; Alcantara, D.; Maldonado, O. S.; Curcuroze, M.; Parra, J. L.; Morales, J. C. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 802.

⁵¹⁷ Yamaguchi, T.; Machida, K.; Kikuchi, M. *Annu Rep Tohoku Coll Pharm* **1995**, *42*,105.

⁵¹⁸ Bianco, A.; Melchioni, C.; Ramunno, A.; Romeo, G.; Uccella, N. *Nat Prod Res* **2004**, *18*, 29.