# ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ



# ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΟΥ ΚΟΣΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΕ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΦΥΛΛΩΝ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ *DITTRICHIA VISCOSA*

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΡΑΠΟΥΣΗ ΜΑΡΙΝΑ [AM 1890]

Επιβλέπων Καθηγητής **ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ Ε. ΚΑΤΕΡΙΝΟΠΟΥΛΟΣ** 

Ηράκλειο, Ιούνιος 2018

## UNIVERSITY OF CRETE SCHOOL OF SCIENCE AND TECHNOLOGY DEPARTMENT OF CHEMISTRY



# ISOLATION AND IDENTIFICATION OF COSTIC ACID ANALOGS IN PLANT EXTRACTS OF *DITTRICHIA VISCOSA*

DIPLOMA DISSERTATION

RAPOUSI MARINA [RN 1890]

Supervisor: Professor Haralambos E. Katerinopoulos

Heraklion, June 2018

Στην οικογένεια μου...

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Στην πραγματοποίηση και ολοκλήρωση της πτυχιακής μου εργασίας συνετέλεσαν αρκετά άτομα, τα οποία θέλω να ευχαριστήσω.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης για την τεχνική υποστήριξη που μου παρείχε.

Βαθύτατες ευχαριστίες οφείλω στον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Χαράλαμπο Κατερινόπουλο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε παρέχοντας μου μια θέση στην ερευνητική του ομάδα, για τις πολύτιμες συμβουλές και την καθοδήγηση από την πρώτη στιγμή της συνεργασίας μας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ τον δόκτορα Στεφανάκη Μιχάλη, τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Σαμιωτάκη Χρύσα και τον δόκτορα Γιώργο Τσικαλά για το ενδιαφέρον, την πολύτιμη βοήθεια, τη στήριξη, την άψογη συνεργασία και το ευχάριστο κλίμα που δημιούργησαν στο εργαστήριο μας.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά τους γονείς καθώς και τα αγαπημένα μου αδέρφια για την ηθική συμπαράσταση και την οικονομική υποστήριξη που μου παρείχαν καθ'όλη την διάρκεια των σπουδών μου, αλλά και την ενθάρρυνση που μου έδειξαν όλα αυτά τα χρόνια ώστε να πετύχω τους στόχους μου.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

## 1.0 ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Abstract

## 2.0 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

- 2.1 Η Μέλισσα
- 2.2 Το παράσιτο Varroa destructor
- 2.3 Το φυτό Ακονιζά ή Dittrichia viscosa
- 2.4 Μορφολογία του Φυτού
- 2.5 Συστατικά του Φυτού
- 2.6 Το κοστικό οξύ
- 2.7 Φλαβονοειδή γένους Dittrichia

## 3.0 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

- 3.1. Τεχνικές ανάλυσης
- 3.1.1. Χρωματογραφικές Μέθοδοι
- 3.1.2. Φασματοσκοπικές Μέθοδοι
- 3.1.3 Μέθοδος εκχύλισης
- 3.2. Εκχύλιση φυτού
- 3.3. Χρωματογραφικός διαχωρισμός εκχυλισμάτων
- 4.0 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ
- 5.0 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ
- 6.0 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ
- 7.0 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΦΑΣΜΑΤΩΝ NMR, GC MS

#### 1.0 ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το φυτό Dittrichia viscosa περιέχει μια πληθώρα δευτερογενών μεταβολιτών, όπως φλαβονοειδή, τερπένια, σεσκιτερπενικές λακτόνες και σεσκιτερπενικά οξέα. Τα συστατικά των εκχυλισμάτων του φυτού και ιδιαίτερα το σεσκιτερπενικό οξύ, κοστικό οξύ είναι γνωστά για την ακαρεοκτόνο δράση τους. Στα πλαίσια περαιτέρω διερεύνησης των συστατικών του φυτού έγιναν προσπάθειες απομόνωσης και χαρακτηρισμού συστατικών του εκχυλίσματος με πιθανή βιολογική δραστικότητα.

Αρχικά, το φυτό συλλέχθηκε από την ευρύτερη περιοχή του Πανεπιστημίου Κρήτης και εκχυλίστηκε διαδοχικά με την συσκευή Soxhlet και με μίγμα (9:1) διαλυτών (PE/Acetone). Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε με την χρήση αποξηραμένου φυτού. Τα εκχυλίσματα υποβλήθηκαν σε χρωματογραφικό διαχωρισμό από όπου απομονώθηκαν τα συστατικά: μίγμα α/β-κοστικού οξέος, llicic acid και 7-O-methylaromandedrin-3-acetate. Η ταυτοποίηση των ενώσεων πραγματοποιήθηκε με την χρήση των τεχνικών NMR (1D/2D), GC-MS και LC-MS.

#### Abstact

The Dittrichia viscosa plant contains plenty of secondary metabolites, such as flavonoids, terpenes, sesquiterpene lactones and sesquiterpene acids. The components of plant extracts, especially sesquiterpenoic acid, costic acid, are known for their acaricidal activity. In the context of further investigation of the plant components, attempts were made to isolate and identificate components of the extract with potential biological activity.

Initially, the plant was harvested from the area of the University of Crete and extracted subsequently with Soxhlet and a mixture of 9: 1 solvents (PE / Acetone). The same process was carried out using a dried plant. The extracts were subjected to chromatographic separation. The components which were isolated are a mixture of  $\alpha/\beta$ -costic acid, Ilicic acid, and 7-O-methylaromanded rin-3-acetate. The identification of the compounds was carried out using NMR (1D / 2D), GC-MS and LC-MS techniques.

#### 2.0 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

#### 2.1 Η Μέλισσα

Η μέλισσα είναι έντομο που ανήκει στην τάξη υμενόπτερα και θεωρείται από οικονομικής άποψης το πιο σπουδαίο από όλα τα έντομα για τον άνθρωπο. Η μέλισσα ζει στη Γη τουλάχιστον 15 εκατομμύρια χρόνια και θεωρείται από τους πιο παλιούς κατοίκους της. Είναι από τα ελάχιστα είδη των εντόμων που ο άνθρωπος προσπάθησε να εκμεταλλευτεί για οικονομικούς λόγους.

Η μέλισσα μελιτοφόρος (Apis mellifera), όπως επίσημα λέγεται η μέλισσα, εμφανίζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον στην ποικιλομορφία ως προς τις φυλές της. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στην προσαρμογή σε διαφορετικές οικολογικές συνθήκες κατά τη διάρκεια των αιώνων στις περιοχές της Ευρώπης, της Ασίας και της Αφρικής.

Η κατάταξη των μελισσών βασίζεται τόσο σε μορφολογικά χαρακτηριστικά όσο και στην έκφραση της κοινωνικής ζωής τους. Τα παλαιότερα είδη μελισσών ζουν μοναχικά, όπως αυτά που ανήκουν στα γένη *Adrena* και *Megachile*. Σε ανώτερη βαθμίδα φυλογενετικής εξέλιξης ανήκουν οι ημικοινωνικές μορφές όπως αυτές που ανήκουν στο γένος *Bombus*. Τα πιο εξελιγμένα είδη μελισσών, ανήκουν στο γένος *Apis*.

Η μέλισσα Apis mellifera θεωρείται σχετικά νέο είδος και τα πολλά υποείδη της θεωρούνται ότι δημιουργήθηκαν κατά την Πλειστόκαινο. Η ονομασία της μέλισσας "mellifera" δηλώνει τη πρακτική της μέλισσας να συλλέγει νέκταρ και να παράγει πολύ μεγάλες ποσότητες μελιού. Στο γένος Apis ανήκουν 9 είδη:<sup>1</sup> Apis dorsata, Apis laboriosa, Apis binghami, Apis breviligula, Apis mellifera, Apis cerana, Apis koschevnikovi, Apis florea, Apis adreniformis. Τελευταία εντοπίστηκε και ένα νέο είδος, το "Apis nuluensis".<sup>2</sup>

Το είδος *Α. mellifera* χωρίζεται σε 27 υποείδη (φυλές), σύμφωνα με μορφομετρικά, βιογεωγραφικά κριτήρια και κριτήρια συμπεριφοράς.<sup>3,4,5,6</sup> Τα περισσότερα απ' αυτά τα χαρακτηριστικά έχουν γενετική βάση, άρα μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η γενετική ποικιλότητα των φυλών είναι μεγάλη. Ο μεγάλος αριθμός φυλών, οφείλεται ενδεχομένως στην απομόνωση των πληθυσμών σε διαφορετικό περιβάλλον.

8

Βάσει των μορφομετρικών χαρακτηριστικών<sup>7</sup> έχει γίνει κατηγοριοποίηση σε τρεις εξελικτικές σειρές (κλάδοι) με τις οποίες ομαδοποιούνται οι φυλές της *Α. mellifera*: τον κλάδο Α που συμπεριλαμβάνει υποείδη της Νότιας και Κεντρικής Αφρικής, τον κλάδο Μ που συμπεριλαμβάνει υποείδη της Βόρειας Ευρώπης, Ισπανίας, Πορτογαλίας και Βόρειας Αφρικής και τον κλάδο C που συμπεριλαμβάνει τα υποείδη της Ανατολικής Ευρώπης, Βόρειας Μεσογείου και της Μέσης Ανατολής. Στην Ελλάδα υπάρχουν οι φυλές *Α.m.adami* (Κρήτη-Ν. Αιγαίο), *Α.m.carnica* (Επτάνησα), *Α.m.macedonica* (Μακεδονία-Θράκη), *Α.m.cecropia* (Κεντρική και Ν. Ελλάδα) και στην Κύπρο η *Α.m.cypria*, σύμφωνα με στοιχεία της μορφομετρικής μελέτης του Ruttner<sup>3</sup>.

#### 2.2 Το παράσιτο Varroa destructor

Μία από τις κυριότερες ασθένειες του γόνου και των ενήλικων μελισσών είναι η **Βαρρόωση ή βαρρόαση ή βαρροϊκή ακαρίωση που προκαλείται από το** παράσιτο Varroa destructor.

Το παράσιτο Varroa destructor (Anderson & Trueman), είναι ένα εκτοπαράσιτο της μέλισσας, το οποίο για πρώτη φορά αναφέρθηκε το 1904 σε μία εργασία του Oudemans,<sup>8</sup> ως Varroa jacobsoni που εντοπίστηκε στο νησί Java, όπου παρασιτούσε στο είδος της μέλισσας *Apis cerana*. Η αναφορά αυτή πέρασε σχεδόν απαρατήρητη επειδή δεν προκαλούσε σημαντικές ζημιές στον ξενιστή της. Σε διάστημα όμως λιγότερο από 40 χρόνια μεταδόθηκε σχεδόν σε όλο τον κόσμο εκτός την Αυστραλία. Η βασική αιτία ήταν ότι την περίοδο που η ασθένεια ήταν ελάχιστα γνωστή, το διεθνές εμπόριο μελισσών διέσπειρε το άκαρι σ' όλο σχεδόν τον κόσμο. Το 2000 οι Anderson και Trueman, μετά από μελέτη του mtDNA και αλληλουχιών Co-I γονιδίων καθώς και σειρά απο μορφολογικούς χαρακτηρισμούς πολλών πληθυσμών της *V. Jacobsoni*, διέκριναν το παράσιτο σε δύο είδη: στο είδος *Varroa jacobsoni* s.s. που παρασιτεί στην μέλισσα *Apis cerana* F. στην περιοχή της Μαλαισίας-Ινδονησίας και στο είδος *Varroa destructor*, Anderson & Trueman, που παρασιτεί στην μέλισσα *A. cerana* στην κεντρική Ασία καθώς και στην μέλισσα *A. mellifera* L. σε όλες τις υπόλοιπες περιοχές πλην της Αυστραλίας.<sup>9</sup>

Ο βιολογικός κύκλος του παρασίτου Varroa destructor, Anderson & Trueman, εξελίσσεται στο σφραγισμένο γόνο, όπου η βαρρόα βρίσκει καταφύγιο

9

για την εναπόθεση των αυγών της, και ταυτόχρονα την κατάλληλη τροφή για την ανάπτυξη των ευαίσθητων ανώριμων σταδίων της.

Με την ολοκλήρωση της ανάπτυξής του γόνου, μαζί με τη νεαρή μέλισσα εξέρχονται από το κελί και οι νεαρές βαρρόα που έχουν συμπληρώσει την ανάπτυξή τους. Πολύ σύντομα μετεγκαθίστανται σε άλλες μέλισσες. Δείχνουν ιδιαίτερη προτίμηση στις τροφούς και τους κηφήνες και μόνο ένα ποσοστό μικρότερο του 1% παρασιτεί τις συλλέκτριες.

Οι μεμονωμένες μέλισσες που μολύνονται με βαρρόα βλάπτονται α) από την απώλεια αιμολέμφου,<sup>10</sup> και β) από την οπή που προκαλείται και επιτρέπει την δημιουργία μολύνσεων και ασθενειών. Στην αρχή της μόλυνσης και για ένα μεγάλο χρονικό διάστημα στη συνέχεια, δεν παρατηρείται κανένα σύμπτωμα, επειδή η αύξηση του πληθυσμού της βαρρόα αρχικά είναι αργή. Για να γίνει αντιληπτή, το ποσοστό μόλυνσης πρέπει να ξεπερνά το 15%-20%. Όταν το ποσοστό μόλυνσης φτάνει στο 30-40%, τα συμπτώματα γίνονται περισσότερο φανερά. Τα αποτελέσματα του παρασιτισμού περιλαμβάνουν από απώλεια βάρους, μέχρι την παραμόρφωση του ξενιστή (τσαλακωμένα φτερά, απουσία φτερών, ασύμμετρα πόδια κλπ).<sup>11,12,13</sup>

#### 2.3 Το φυτό Ακονιζά ή Dittrichia viscosa

Το φυτό Dittrichia viscosa (L.) W. Greuter (syn. Inula viscosa (L.) Aiton) ανήκει στην οικογένεια Asteraceae<sup>14</sup> (Inula viscosa: Ίνουλα η ιξώδης). Αναφέρεται στη λαϊκή ιατρική και βοτανολογία με τα κοινά ονόματα ακονιζιά ή ακονιζά, νεροκόνυζος, κονυζός, νεροκολλησιά, κολλητσαριά, ψίλιθρο και σκοτζάρι. Πιθανόν η *κόνυζα ή* άρρην του Θεόφραστου, καθώς και η *κόνυζα η μεγάλη* του Διοσκουρίδη να είναι η σημερινή ακονιζά. Είναι αειθαλής πολυετής θάμνος, ιξώδης-κολλώδης στην αφή και εύοσμος, όρθιος, πολύφυλλος και αποξυλωμένος στη βάση του. Φέρει φύλλα λογχοειδή ακέραια ή οδοντωτά και οξέα. Η πρακτική μελισσοκομεία της Κρήτης χρησιμοποιεί το φυτό Dittrichia viscosa ως παρασιτοκτόνο. Βέβαια η δράση του φυτού ήταν γνωστή από παλιά, όπου χρησιμοποιούταν ακόμα και μέσα στα σπίτια για να διώχνει διάφορα έντομα και παράσιτα.



Εικόνα 1.0 Dittrichia viscosa στην περίοδο άνθισης.

Απαντάται σε χέρσους, πετρώδεις τόπους σε όλη την Ελλάδα καθώς και στη Μεσογειακή Ευρώπη, Ασία και Αφρική.<sup>15</sup> Πρόκειται για θάμνο ιδιαίτερα επιθετικό στην κατάληψη διαταραγμένων, λόγω ανθρωπογενών δραστηριοτήτων, περιοχών με αποτέλεσμα η γεωγραφική εξάπλωση του φυτού να επεκτείνεται ταχύτατα, διότι οι υποβαθμισμένες αυτές περιοχές διευρύνονται.<sup>16</sup> Με περίοδο ανθοφορίας το φθινόπωρο, έχει λουλούδια με κίτρινο χρώμα. Λόγω της εποχής άνθισης του (Σεπτέμβριο-Οκτώβριο) είναι χρήσιμο στη μελισσοκομία αφού την εποχή αυτή αφενός η γύρη σπανίζει, αφετέρου είναι απαραίτητη για την εκτροφή του γόνου και την ανανέωση του πληθυσμού των μελισσιών.<sup>17</sup> Θεωρείται κατεξοχήν γυρεοδοτικό φυτό.

## 2.4 Μορφολογία του Φυτού

Η επιφάνεια του βλαστού και των φύλλων της *D. viscosa* είναι κολλώδης και ιξώδης, επειδή το φυτό εκκρίνει στην επιφάνειά του ένα πολύπλοκο μίγμα οργανικών ουσιών, κυρίως τερπενοειδών,<sup>18</sup> άγλυκων φλαβονοειδών και απλών φαινολικών.<sup>19</sup> Τα φύλλα και οι νεαροί βλαστοί του φυτού φέρουν άμισχες και έμμισχες αδενώδεις τρίχες, οι οποίες παραμένουν λειτουργικές καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής του φύλλου, από τα πρώτα στάδια του σχηματισμού του μέχρι την πλήρη ωρίμανσή του. Δεν είναι γνωστό εάν αυτοί οι δύο τύποι εκκρίνουν τις ίδιες ή διαφορετικές ουσίες. Στην τελευταία περίπτωση οι ουσίες μπορεί να έχουν και διαφορετική λειτουργία.<sup>20</sup> Και τα δύο είδη τριχών διαθέτουν μια αδενώδη κεφαλή, η οποία απαρτίζεται από τρεις τύπους κυττάρων: ένα ζεύγος κυττάρων της κορυφής, ένα ζεύγος κυττάρων κάτω από αυτό και τρία ζεύγη φωτοσυνθετικών κυττάρων. Όλα τα κύτταρα της κεφαλής εκκρίνουν λιπίδια, πολυσακχαρίτες και

λιπίδια εκκρίνονται μέσω πόρων που υπάρχουν στην εφυμενίδα, ενώ οι πολυσακχαρίτες συσσωρεύονται κάτω από την εφυμενίδα, η οποία αργότερα διαρρηγνύεται. Κατά συνέπεια το επιπλέον υλικό το οποίο παράγεται στη συνέχεια από τα εκκριτικά κύτταρα εκκρίνεται απευθείας στο εξωτερικό περιβάλλον.<sup>21</sup> Σε υποκυτταρικό επίπεδο, φαίνεται ότι στην εκκριτική λειτουργία συμμετέχουν το λείο και το αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο, τα πλαστίδια, τα μιτοχόνδρια και η συσκευή Golgi. Το έκκριμα αναφέρεται και ως μίγμα επιεφυμενιδικών συστατικών επειδή είναι ενσωματωμένο, σε μικρότερο ή μεγαλύτερο βαθμό, στο κηρώδες εφυμενιδικό υπόστρωμα. Το επιεφυμενιδικό έκκριμα του φυτού *D. viscosa* είναι κατά μεγάλο ποσοστό (περίπου 70%) υδατοδιαλυτό.<sup>22</sup> Το υλικό αυτό περιορίζει τις απώλειες του νερού από την εφυμενίδα και είναι ισχυρά αλληλοπαθητικό.<sup>23</sup>

#### 2.5 Συστατικά του Φυτού

Λόγω των φαρμακευτικών ιδιοτήτων που παρουσιάζουν τα συστατικά του επιεφυμενιδικού εκκρίματος του φυτού, έχουν γίνει προσπάθειες απομόνωσης και ταυτοποίησης των ουσιών αυτών από πολλές ερευνητικές ομάδες. Έχουν ανιχνευθεί φλαβονοειδή<sup>35</sup>, τερπένια- κυρίως σεσκιτερπενικές λακτόνες<sup>24,25</sup> και σεσκιτερπενικά οξέα, 34,26,27,28. Γενικά, γνωστά συστατικά που απομονώθηκαν από το φυτό D. Viscosa είναι τα ακόλουθα: 3β-hydroxyilicic acid, 3-(R)-hydroxy-epi-ilicic acid, 2αhydroxyilicic acid και 9β-hydroxy-2-oxoisocostic acid.<sup>29</sup> 3,3'-di-*O*-methylquercetin,<sup>30,31</sup> 3-O-acetylpadmatin,<sup>49</sup> 3-methylquercetin,<sup>49</sup> hispidulin,<sup>49</sup> nepetin,<sup>32</sup> 2desacetoxyxanthinin,<sup>33</sup> inuviscolide,<sup>51,34</sup> 2-oxoisocostic acid, <sup>35</sup> ilicic acid,<sup>36,37,38,39</sup> viscic acid, 54,55 glucoside,<sup>58</sup> β-sitosterol,<sup>40</sup> β-sitosteryl 3,7,4'-trimethoxy-5, 3'dihydroxyflavone<sup>41</sup> και 11α,13-dihydroinuviscolide <sup>42</sup>(Εικόνα 2.0). Ακόμη, έχουν απομονωθεί 10 τριτερπένια με τη μορφή ελεύθερων αλκοολών, ή εστέρων του οξικού οξέος ή λιπαρών οξέων, τα οποία είναι: dammaradienyl acetate, taraxasteryl acetate, pseudotaraxasteryl acetate, friedelin, 3-epifriedelinol, μίγμα από λιπαρούς εστέρες της faradiol, pseudotaraxasterol, taraxasterol, λιπαροί εστέρες της lupene-3β,16β-diol, 3β-monoacetate της τριτερπενικής διόλης και λιπαροί εστέρες της 2-(4hydroxyphenyl)- ethanol.<sup>43</sup>

12





Στα πλαίσια της προσπάθειας χρήσης φυτών από τη χλωρίδα της Κρήτης για την αντιμετώπιση ασθενειών, η ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου μας μελέτησε τη δράση των εκχυλισμάτων της *D.viscosa,* κατά της *V. destructor* και βρήκε ότι ένα συστατικό του φυτού είχε διακριτή δραστικότητα. Το συστατικό αυτό απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε ως σεσκιτερπενικό οξύ και συγκεκριμένα το κοστικό οξύ.<sup>44</sup>

Η *D. Viscosa* δεν είναι το μοναδικό φυτό που περιέχει κοστικό οξύ. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ως συστατικό και άλλων φυτών, όπως η *Nectandra citrifolia*, Rusby<sup>45</sup> η *Ferula communis* L<sup>46</sup> η *Laggera pterodonta* (DC.) Benth <sup>47</sup> η *Nectandra*  *membranacea* (Sw.) Griseb<sup>48</sup> και η *Stevia rebaudiana* Bertoni.<sup>49</sup> Απαντάται επίσης και στο άλλο υποείδος της *D. viscosa,* συγκεκριμένα στη *Dittrichia graveolens* (L.) Greuter.<sup>50</sup>

Εκτός του κοστικού οξέος, το οποίο αναφέρεται ως β-κοστικό οξύ, έχουν εντοπιστεί και χαρακτηριστεί τα α και γ ισομερή της ένωσης (Εικόνα 2.1).



Εικόνα 2.1 Δομή κοστικού οξέος και ισομερών του.

#### 2.7 Φλαβονοειδή γένους Dittrichia

Τα φλαβονοειδή είναι πολύ σημαντικές ενώσεις που παρουσιάζουν ενδιαφέρον λόγω των βιολογικών ιδιοτήτων τους, όπως αντικαρκινική, αντιφλεγμονώδης και αντιοξειδωτική δραστικότητα. Ακολούθως, η απομόνωση ενώσεων τύπου φλαβονοειδών από την *Inula spp.* δεν αποτελεί έκπληξη και πιθανότατα οι ενώσεις αυτές να είναι υπεύθυνες για ορισμένες ιδιότητες που αιτιολογούν τη χρήση τους στην παραδοσιακή ιατρική. Αρκετές φλαβανόνες και φλαβονόλες έχουν απομονωθεί από την *Dittrichia viscosa* μερικές από τις οποίες αναφέρονται να έχουν αντινεοπλασματικές, αντιδιαβητικές (antidiabetic) και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Αυτές οι ιδιότητες μπορούν επίσης να αιτιολογήσουν την ευρεία χρήση αυτού του φυτού σε διάφορες παραδοσιακές ιατρικές εφαρμογές<sup>51</sup>.

Το γένος *Dittrichia* περιλαμβάνει δύο είδη : *D. graveolens* και *D. viscosa*. Από το είδος *D. viscosa* έχουν απομονωθεί τα **φλαβονοειδή** : quercetin-7-methyl ether (rhamnetin), quercetin-3,3'-dimethyl ether, aromadendrin-7-methyl ether, apigenin, apigenin 7-methyl ether (genkwanin), 6-methoxyapigenin (hispidulin), luteolin και 6-hydroxyluteolin (Εικόνα 4), ενώ η 6-hydroxyapigenin (scutellarein) και η 6-hydroxyluteolin έχουν ταυτοποιηθεί από το είδος *D. graveolens* (Εικόνα 3).

Οι **φλαβονόνες** που απαντώνται στο είδος *D. viscosa* είναι: naringenin, naringenin 7-methyl ether (sakuranetin), eriodictyol και ο 7-methylether του (Εικόνα

4). Το είδος *D. graveolens* διαθέτει την φλαβονόνη naringenin 7-methyl ether (sakuranetin) (Εικόνα 4). Ακόμη οι ενώσεις: dihydrokaempferol (aromadendrin) και dihydroquercetin (taxifolin), οι 7-methyl αιθέρες τους και τα 3-acetates μαζί, έχουν αναφερθεί ως ενώσεις τόσο του *D. graveolens* και όσο και του *D. viscosa*. Από το φυτό *D. viscosa* τα φλαβονοειδή που συναντάμε σε μεγαλύτερο ποσοστό είναι : dihydroquercetin-4'-methyl ether 3-acetate, apigenin 7-methyl ether (genkwanin), 6methoxyapigenin (hispidulin), luteolin, and 6-hydroxyluteolin (Εικόνα 4). Το είδος *D. graveolens* περιέχει ως το επί πλείστον τα φλαβονοειδή 6-hydroxyapigenin (scutellarein) and 6-hydroxyluteolin (Εικόνα 3). <sup>52</sup>



Εικόνα 3. Δομές φλαβονοειδών του είδους Dittrichia graveolens.





eriodictyol



óн ö OH

OH

ОН

но

quercetin-3,3'-dimethyl ether

apigenin 7-methyl ether

ÓН

Ô

6-hydroxyluteolin

OH

OH

ОН

OH

OH HO ÓН Ô

6-methoxyapigenin



óн ö

apigenin

OH OH òн 0

eriodictyol 7-methylether

HO Ġн ö

naringenin



HO

HC

óн ö



luteolin



naringenin 7-methyl ether

OH

OH

OH

aromadendrin



aromadendrin 7-methyl ether - 3-acetate



ĠН ö aromadendrin 7-methyl ether

óн Ö

taxifolin 7-methyl ether



dihydroquercetin-4'-methyl ether 3-acetate



taxifolin 7-methyl ether - 3-acetate

taxifolin

Εικόνα 4. Δομές φλαβονοειδών του είδους Dittrichia viscosa.



#### 3.0 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

#### 3.1. Τεχνικές ανάλυσης

#### 3.1.1. Χρωματογραφικές Μεθόδοι

#### Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (Τ.L.C)

Η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας χρησιμοποιήθηκε εκτεταμένα, ως αναλυτική τεχνική, για έλεγχο και καθαρισμό συστατικών από τα εκχυλίσματα της ακονιζάς. Ως χρωματογραφικά μέσα χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα:

Γέλη οξειδίου του πυριτίου με δείκτη φθορισμού σε φύλλα αλουμινίου (20 × 20 cm). Πάχος στιβάδας 0.1 mm (Kieselgel F254, Merck, Art. 5554) (αναλυτική χρωματογραφία).

2. Γέλη οξειδίου του πυριτίου χωρίς δείκτη φθορισμού σε γυάλινες πλάκες (20 × 20 cm). Πάχος στιβάδας 0.25 mm (Merck, Art. 5721) (παρασκευαστική χρωματογραφία).

Οι πλάκες γέλης οξειδίου του πυριτίου αναπτύχθηκαν σε συστήματα οργανικώνδιαλυτών. 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 κηλίδων χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αντιδραστήρια: Αντιδραστήριο Neu (Naturstoffreagenz A), β-αμινοαιθυλεστέρας του διφαινυλοβορικού οξέος, διάλυμα 1% σε μεθανόλη<sup>53</sup>. Αντιδραστήριο θειϊκής βανιλλίνης (Διάλυμα Α: βανιλλίνη 5% σε μεθανόλη. Διάλυμα Β: π. H2SO4 5% σε μεθανόλη).<sup>54</sup> Ίσοι όγκοι αναμιγνύονται αμέσως πριν τον ψεκασμό και το χρωματογράφημα θερμαίνεται για 2 min στους 105 °C.

### Χρωματογραφία στήλης (C.C.)

Οι χρωματογραφικοί διαχωρισμοί στήλης πραγματοποιήθηκαν σε υάλινες στήλες διαφόρων διαστάσεων και ως διαχωριστικό υλικό χρησιμοποιήθηκε γέλη οξειδίου του πυριτίου 60 (Kieselgel 60), 230-400 mesh ASTM (Merck, Art. 9385).

17

#### 3.1.2. Φασματοσκοπικές Μεθόδοι

#### <u>Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (N.M.R.)</u>

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 (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, COSY, HMBC, HSQC, DEPT-135), τα οποία βαθμονομήθηκαν με χρήση δευτεριωμένου διαλύτη ως εσωτερικό πρότυπο. Για τη λήψη όλων των φασμάτων NMR χρησιμοποιήθηκαν ο δευτεριωμένος διαλύτης: CDCl<sub>3</sub>.

#### <u>Αέρια Χρωματογραφία (GC-MS)</u>

Η ανάλυση και ο προσδιορισμός των συστατικών έγινε με αέριο χρωματογράφο συζευγμένο με φασματογράφο μάζας. 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 μάζας ήταν τύπου Shimadzu GCMS–QP 5050 και η μέθοδος παραγωγής ιόντων ήταν ηλεκτρονιακός ιονισμός (Ε.Ι) ενέργειας 70 eV, ενώ ο αναλυτής μαζών ήταν τετράπολος. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε το αδρανές αέριο ήλιο (1.0 mL / min). 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 50 °C (5 min), η οποία αυξανόταν με ρυθμό 10 °C/ min μέχρι τους 280 °C (20 min). Ο συνολικός χρόνος της ανάλυσης ήταν 48 min. Οι συνθήκες του χρωματογράφου ήταν: θερμοκρασία εισαγωγής δείγματος 230 °C και θερμοκρασία ανίχνευσης 250 °C.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των συστατικών βασίστηκε στον ολικό αριθμό θραυσμάτων (total ion count) των μεταβολιτών, όπως αυτά ανιχνεύτηκαν από το φασματογράφο μάζας. 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 μάζας, με την βοήθεια των βιβλιοθηκών του προγράμματος.

18

#### Ειδική γωνία στροφής [α].

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.

3.1.3 Μέθοδος εκχύλισης

Για την εκχύλιση του φυτού χρησιμοποιήθηκε η τεχνική πολλαπλής εκχύλισης με την συσκευή Soxhlet, η οποία περιγράφεται παρακάτω.

Η εκχύλιση με τη συσκευή Soxhlet είναι μια μέθοδος συνεχούς- πολλαπλής εκχύλισης στερεού / υγρού. Η μέθοδος περιγράφεται για πρώτη φορά το 1879 και αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα της εκχύλισης των λιπιδίων από τα τρόφιμα. Σύμφωνα με την διαδικασία Soxhlet, το έλαιο και τα λιπαρά από στερεά υλικά, εκχυλίζονται από την επαναλαμβανόμενη έκπλυση (διήθηση) με οργανικό διαλύτη, συνήθως εξάνιο ή πετρελαϊκό αιθέρα υπό αναρροή σε μια ειδική γυάλινη συσκευή. Στην μέθοδο αυτή, το δείγμα ξηραίνεται, αλέθεται σε μικρά κομμάτια και τοποθετείται σε ένα πορώδες ηθμό κυτταρίνης (cellulose, size 22 mm × 80 mm or 43 mm x 123 mm (Supelco). Η συσκευή πολλαπλών εκχυλίσεων Soxhlet δεν περιορίζεται μόνο στην εκχύλιση λιπιδίων αλλά κάθε φορά που η επιθυμητή ένωση έχει περιορισμένη διαλυτότητα στον διαλύτη και οι προσμίξεις είναι αδιάλυτες στον ίδιο διαλύτη. Εάν η επιθυμητή ένωση έχει σημαντική διαλυτότητα σε ένα διαλύτη τότε μια απλή διήθηση μπορεί να διαχωρίσει την ένωση από τα αδιάλυτα



Εικόνα 3. Συσκεύη Soxhlet

## <u>Αρχές λειτουργίας συσκευής Soxhlet</u>

Το δείγμα που πρόκειται να εκχυλιστεί τοποθετείται εντός ηθμού (thimble) κυτταρίνης κατάλληλα κατασκευασμένο ώστε να συγκρατεί το δείγμα και να επιτρέπει στο υγρό - διαλύτη να περνά από αυτό. Έτσι, ο ηθμός που περιέχει το δείγμα προς εκχύλιση τοποθετείται εντός του θαλάμου εκχύλισης, ο οποίος βρίσκεται πάνω από την φιάλη που περιέχει τον διαλύτη και κάτω από τον ψυκτήρα (συμπυκνωτή ατμών). Ο διαλύτης θερμαίνεται υπό αναρροή και καθώς βράζει, εξατμίζεται και οι ατμοί του συμπυκνώνονται από τον ψυκτήρα (μετατροπή ατμών σε υγρό) επιστρέφοντας στον θάλαμο εκχύλισης, στον οποίο περιέχεται το δείγμα. Ο θάλαμος εκχύλισης είναι έτσι σχεδιασμένος, έτσι ώστε όταν ο διαλύτης που περιβάλλει το δείγμα υπερβεί ένα ορισμένο επίπεδο, υπερχειλίζει και επιστρέφει μέσω ενός βοηθητικού σωλήνα πίσω στην φιάλη βρασμού. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρις ότου όλα τα συστατικά από το στερεό του ηθμού να εκχυλιστούν στον οργανικό διαλύτη, δηλαδή πρόκειται για μια αυτόματη συσκευή εκχύλισης, η οποία μπορεί να διαρκέσει από ώρες μέχρι και ημέρες. Κατά την διάρκεια κάθε κύκλου, ένα τμήμα των μη πτητικών ενώσεων διαλύονται στον θερμό διαλύτη. Μετά από πολλούς κύκλους η επιθυμητή ένωση συγκεντρώνεται στην φιάλη απόσταξης. Μετά την εκχύλιση, ο διαλύτης απομακρύνεται συνήθως στον περιστροφικό αποστακτήρα κενού (ρότορα απόσταξης) καταλήγοντας στην εκχυλιζόμενη ένωση. Το αδιάλυτο τμήμα του στερεού εκχύλισης παραμένει στον ηθμό και συνήθως απορρίπτεται. Το πλεονέκτημα του συστήματος αυτού είναι ότι αντί να περνάνε πολλές μικρές ποσότητες θερμού διαλύτη μέσω του δείγματος, ανακυκλώνεται μόνο μία δόση διαλύτη. Άρα, επιτυγχάνεται με αυτό τον τρόπο εξοικονόμηση διαλύτη, χρόνου και χρημάτων<sup>55</sup>.

#### 3.2. Διαδικασία εκχύλισης του φυτού

Η συλλογή και κατεργασία της πρώτης ύλης – φυτού περιγράφεται παρακάτω. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν τρεις εκχυλίσεις του φυτού με διαφοροποιήσεις ως προς την φύση του φυτού, δηλαδή αποξηραμένο ή φρέσκο και την περίοδο συλλογής του φυτού. Οι εκχυλίσεις πραγματοποιήθηκαν χωρίς αλλαγή του πρωτόκολλου που ακολουθήθηκε ως προς τους διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν.

## Μέθοδος 1<sup>η</sup>

Αποξηραμένα φύλλα ακονιζάς εκχυλίστηκαν με αιθανόλη ακολουθώντας την εξής διαδικασία: σε σφαιρική φιάλη 2 L, τοποθετήθηκε 1 L αιθανόλη. Στην φιάλη προσαρμόστηκε συσκευή Soxhlet, με thimble (22 x 80 mm), στο οποίο τοποθετήθηκε δείγμα από κονιοποιημένα αποξηραμένα φύλλα ακονιζάς συνολικού βάρους 3.65 g. Η εκχύλιση με αιθανόλη υπό αναβρασμό διήρκησε 4 ώρες. Στην συνέχεια, απομακρύνθηκαν τόσο το εκχύλισμα όσο και ο χάρτινος ηθμός και αντικαταστάθηκαν με νέες ποσότητες (800 ml EtOH και 5.75 g). Μετά το πέρας 4 ωρών πραγματοποιήθηκε αλλαγή του thimble (4.95 g) με παράλληλη διατήρηση του διαλύτη στην σφαιρική και το σύστημα αφέθηκε για άλλες 4 ώρες υπό αναβρασμό. Η εκχύλιση έδωσε διαλύματα, τα οποία συνενώθηκαν και συμπυκνώθηκαν σε κενό, αποδίδοντας εκχύλισμα τελικού βάρους 3,50 g. Η απόδοση ήταν 24% σε βάρος συνολικού αποξηραμένου δείγματος (14,35 g). Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε δεύτερη εκχύλιση με 9 : 1 πετρελαϊκό αιθέρα / ακετόνη, συνολικού όγκου 200 mL. Συγκεκριμένα, στη σφαιρική φιάλη, η οποία περιείχε το εκχύλισμα, προστέθηκαν 20 mL ακετόνης και 180 mL πετρελαϊκού αιθέρα και το σύστημα αφέθηκε χωρίς θέρμανση σε 12-ωρη (overnight) ανάδευση. Το προκύπτον διάλυμα διηθήθηκε με την χρήση χάρτινου ηθμού. Το διήθημα συμπυκνώθηκε (1,73 g) και το ίζημα παραλήφθηκε (σε ακετόνη, αιθανόλη) και συμπυκνώθηκε (1,26 g).

#### Μέθοδος 2<sup>η</sup>

Φρέσκα φύλλα εκχυλίστηκαν με αιθανόλη ακολουθώντας την εξής διαδικασία: σε σφαιρική φιάλη 2 L, τοποθετήθηκε 1 L αιθανόλη. Στην φιάλη προσαρμόστηκε συσκευή Soxhlet, με thimble (43 x 123 mm), στο οποίο τοποθετήθηκε δείγμα από κονιοποιημένα φρέσκα φύλλα ακονιζάς συνολικού βάρους 21,77 g. Μετά από 4 ώρες υπό αναβρασμό, η εκχύλιση με αιθανόλη έδωσε εκχύλισμα, το οποίο συμπυκνώθηκε υπό κενό (3,12 g). Η απόδοση ήταν 14% σε βάρος δείγματος. Στην συνέχεια το εκχύλισμα υποβλήθηκε σε δεύτερη εκχύλιση υγρού- υγρού με 200 ml 9: 1 πετρελαϊκό αιθέρα / ακετόνη, με 12-ωρη ανάδευση (overnight), αφού είχε προηγηθεί απλή διήθηση του εκχυλίσματος. Το διάλυμα που προέκυψε διηθήθηκε εκ νέου. Το διήθημα συμπυκνώθηκε (1,00 g) και το ίζημα που παραλήφθηκε, διαλύθηκε (αιθανόλη), μεταφέρθηκε σε φιαλίδιο και συμπυκνώθηκε (1,60 g).

## Μέθοδος 2<sup>η</sup> Επανάληψη

Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε ξανά με νέες ποσότητες. Πιο αναλυτικά, 106,35 g φρέσκα φύλλα ακονιζάς κονιοποιήθηκαν και τοποθετήθηκαν εντός του thimble (43 x 123 mm). Στην σφαιρική φιάλη όπου προσαρμόστηκε η συσκευή Soxhlet τοποθετήθηκε 1 L αιθανόλης και το σύστημα αφέθηκε υπό αναβρασμό για 4 ώρες. Μετά το πέρας των 4 ωρών, προστέθηκαν 200 ml αιθανόλης και αφέθηκε ξανά για 4 ώρες υπό αναβρασμό. Αφού ολοκληρώθηκε η εκχύλιση, απομακρύνθηκε ο διαλύτης - εκχύλισμα και πραγματοποιήθηκε εκ νέου εκχύλιση του ίδιου ηθμού με 400 ml αιθανόλης για 4 ώρες υπό αναβρασμό. Η εξαντλητική εκχύλιση έδωσε εκχύλισμα, το οποίο διηθήθηκε και συμπυκνώθηκε υπό κενό (12,00 g). Η απόδοση ήταν 11% σε βάρος δείγματος. Ακολούθησε διπλή εκχύλιση του παραπάνω εκχυλίσματος με 400 ml 9: 1 πετρελαϊκό αιθέρα: ακετόνη κάθε φορά, με ανάδευση (overnight). Το προκύπτον διάλυμα διηθήθηκε δίνοντας διήθημα (3,20 g) και ίζημα (6,40 g). Το διήθημα υποβλήθηκε σε διαδικασία αποχρωματισμού με την ανάμειξη με ενεργό άνθρακα. Μετά την διαδικασία αποχρωματισμού, προέκυψε μερικώς αποχρωματισμένο διάλυμα συνολικού βάρους 2,00 g.



**Σχήμα 1.0** Πορεία εκχυλίσεων του φυτού *Dittrichia viscosa* με διαλύτες διαφορετικής πολικότητας.

### 3.3. Χρωματογραφικός διαχωρισμός εκχυλισμάτων

Το διήθημα από κάθε πορεία εκχύλισης υποβλήθηκε σε χρωματογραφικό διαχωρισμό όπως περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω και υποδεικνύονται τα κλάσματα από τα οποία απομονώθηκαν ενώσεις.

Το διήθημα **AKZ** (1,73 g) που προέκυψε από την πρώτη διαδικασία εκχύλισης, διαλύθηκε σε 5 mL διαλύματος 30 % EtO<sub>2</sub> / PE . Στήλη χρωματογραφίας flash, εσωτερικής διαμέτρου 3,5 cm, πληρώθηκε με SilicaGel 60 (0,040-0,063mm) σε ύψος 8 cm. Τα συστήματα διαλυτών βαθμιδωτής έκλουσης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν EtO<sub>2</sub> / PE στις εξής αναλογίες: 30%, 40%, 50%, 100% και MeOH / EtO<sub>2</sub> στις εξής αναλογίες : 10%, 20%, 50%, 100%. Χρησιμοποιήθηκαν 100 mL από το κάθε σύστημα εκτός από το πρώτο σύστημα (30% EtO<sub>2</sub> / PE) όπου χρησιμοποιήθηκαν 500 mL. Ελήφθησαν κλάσματα των 3 - 4 mL σε 313 δοκιμαστικούς σωλήνες οπότε συλλέχθηκαν τα περισσότερα διακριτά συστατικά. Ελήφθησαν δείγματα για ανάλυση TLC ανά 2, 5 και 10 δοκιμαστικούς σωλήνες, τα οποία αναπτύχθηκαν με διάλυμα 30% EtO<sub>2</sub> / PE για τα πρώτα 220 κλάσματα και 40% EtO<sub>2</sub> / PE για τα υπόλοιπα κλάσματα μέχρι τέλους. Για την ανάλυση TLC χρησιμοποιήθηκαν υάλινα πλακίδια επιστρωμένα με ξηροπηκτή διοξειδίου του πυριτίου (silicagel 60, F254S). Τα προϊόντα εμφανίσθηκαν με εμβάπτιση των πλακιδίων σε διάλυμα φωσφομολυβδαινικού οξέος σε αιθανόλη 3% και με θέρμανση. Σύμφωνα με την παραπάνω διαδικασία, τα κλάσματα κατηγοριοποιήθηκαν σε **23 ομάδες**, με τα R<sub>f</sub> να κυμαίνονται από 0,85 – 0,01.

Κλάσματα	Κωδικός	Αναλογία %	Βάρος (mg)
	ομάδας		
1-4	AKZ A		26
5-8	AKZ B		148
9	AKZ C		40
10-15	AKZ D		216
16-25	AKZ E		87
26-30	AKZ F		15
31-41	AKZ G		33
42-50	AKZ H	PE / EtO <sub>2</sub> : 70/30	23
51-55	AKZ I	,2 -,	11
56-65	AKZ K		9
66-106	AKZ L		33
107-126	AKZ M		120
127-145	AKZ N		9
146-171	AKZ O		140
172-216	AKZ P		260
217-268	AKZ Q	PE / EtO <sub>2</sub> : 70:30 / 60:40	59
269-279	AKZ R	PE / EtO <sub>2</sub> : 50:50 - EtO <sub>2</sub> : 100	36
280-283	AKZ S	EtO <sub>2</sub> / MeOH : 90:10	126
284-295	AKZ T	EtO <sub>2</sub> / MeOH : 90:10 / 80:20	299
296-302	AKZ U	EtO <sub>2</sub> / MeOH : 80:20 / 50:50	42
303-310	AKZ V	EtO <sub>2</sub> / MeOH : 50:50	52
311-313	AKZ W	MeOH : 100	40
14	AKZ WI	PE / EtO <sub>2</sub> : 70:30	28

Από τον παραπάνω χρωματογραφικό διαχωρισμό στήλης της ΑΚΖ προέκυψαν οι εξής 5 ομάδες : ΑΚΖ C, ΑΚΖ E, ΑΚΖ F, ΑΚΖ G, ΑΚΖ WI που περιείχαν κοστικό οξύ σαν μίγμα των α και β ισομερών με διαφορετικές αναλογίες και ποσοστού καθαρότητας.

Η συνολική ποσότητα των ομάδων αυτών ήταν 203 mg, δηλαδή το 12% του συνολικού διηθήματος είναι μίγμα ισομερών κοστικού οξέος. Οι ομάδες AKZ F και AKZ G αποτέλεσαν αντικείμενο περαιτέρω διαχωρισμών με σκοπό την απομόνωση κοστικού οξέος, ενώ η ομάδα AKZ Q για την απομόνωση παραγώγων του κοστικού οξέος.



**Σχήμα 2.0** Πορεία χρωματογραφικού διαχωρισμού εκχυλίσματος ΑΚΖ.

## Ομάδα ΑΚΖ – (FG)'

Οι ομάδες AKZ - F και AKZ - G αφού συνενώθηκαν, συμπυκνώθηκαν και διαλύθηκαν σε 1 mL διαλύματος 30 % EtO<sub>2</sub> / PE. Η συνολική ποσότητα (48 mg) φορτώθηκε σε χρωματογραφική στήλη flash. Ο διαλύτης έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν EtO<sub>2</sub> / PE στις εξής αναλογίες : 30%, 35%, 40%, 45%, 50% και το πληρωτικό υλικό SilicaGel 60 (0,040-0,063mm) ύψους 5 cm και εσωτερικής διαμέτρου 3,5 cm. Χρησιμοποιήθηκαν 50 mL (1-41), 50 ml ( 42-61) 35 mL (62-82), 30 mL (83-105), 30 mL (106-120) και 35 mL (121) αντίστοιχα από το κάθε σύστημα. Ελήφθησαν 121 κλάσματα των 1-2 mL και κατόπιν ελέγχου με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας συνενώθηκαν στις ακόλουθες **14 ομάδες**:

Κλάσματα	Κωδικός ομάδας	Αναλογία %	Βάρος (mg)
1-6	AKZ – (FG)'A	PE / EtO <sub>2</sub> : 70: 30	1
7-17	AKZ – (FG)'B		2
18-21	AKZ – (FG)'C		trace

22-28	AKZ – (FG)'D		6
29	AKZ – (FG)'E		trace
30-36	AKZ – (FG)'F		5
37-43	AKZ – (FG)'G	PE / EtO <sub>2</sub> : 70: 30 /	7
		65:35	
44-52	AKZ – (FG)'H	PE / EtO <sub>2</sub> : 65:35	7
53-55	AKZ – (FG)'I		2
56-71	AKZ – (FG)'K	PE / EtO <sub>2</sub> : 65:35 /	2
		60:40	
72-90	AKZ – (FG)' L	PE / EtO <sub>2</sub> : 60:40 / 55:	3
		45	
91-102	AKZ – (FG)' M	PE / EtO <sub>2</sub> : 55: 45	1
103- 120	AKZ – (FG)' N	PE / EtO <sub>2</sub> : 55: 45 /	1
		50:50	
121	AKZ – (FG)' O	EtO <sub>2</sub> 100	trace

Η ομάδα AKZ – (FG)'D (6 mg) αποτέλεσε αντικείμενο αναλυτικής μελέτης μέσω NMR και ταυτοποιήθηκε ως μίγμα ισομερών α και β κοστικού σε αναλογία 20 : 80.

### Ομάδα ΑΚΖ- Q

Η ομάδα AKZ-Q (45 mg) υποβλήθηκε σε χρωματογραφικό διαχωρισμό με σκοπό την απομόνωση παραγώγων της αρωμαδενδρίνης. Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν EtO<sub>2</sub> / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> στις παρακάτω αναλογίες : 4%, 5%, 10%, 20%,30%, 40%, 50%, 60%, 80% και 90% και το πληρωτικό υλικό SilicaGel 60 (0,040-0,063mm) ύψους 8,5 cm. Ακολούθησε έκπλυση με 100% EtO<sub>2</sub> και 100% MeOH. Χρησιμοποιήθηκαν 40-20 mL από κάθε σύστημα και συλλέχθηκαν 49 κλάσματα των 6 - 7 mL. Μετά τον έλεγχο με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας προέκυψαν οι ακόλουθες **9 ομάδες**:

Κλάσματα	Κωδικός ομάδας	Αναλογία %	Βάρος (mg)
1-6	AKZ- Q A	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> / EtO <sub>2</sub> : 96:4/ 95:5	3
7-9	AKZ- Q B	$CH_2Cl_2$ / EtO <sub>2</sub> 95:5	17
10-17	AKZ-QC	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> / EtO <sub>2</sub> 90:10	7
18-21	AKZ- Q D	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> / EtO <sub>2</sub> 80:20	2
22-30	AKZ- Q EF	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> / EtO <sub>2</sub> 80:20 / 70:30/	4
		60:40	
31-37	AKZ- Q G	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> / EtO <sub>2</sub> 60:40/ 50:50	2
38-43	AKZ- Q HI	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> / EtO <sub>2</sub> 40:60/ 20:80	1
44-48	AKZ- Q K	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> / EtO <sub>2</sub> 20:80/ 10:90-	trace
		EtO <sub>2</sub> :100	
49	AKZ-QL	100 MeOH	6

Οι ομάδες ΑΚΖ- Q Β και ΑΚΖ- Q C αποτέλεσαν αντικείμενο αναλυτικής μελέτης, μέσω NMR και οι ουσίες ταυτοποιήθηκαν.

Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε και για το διήθημα **DVN** (1,0 g) που προέκυψε από την δεύτερη διαδικασία εκχύλισης. Πιο αναλυτικά, όλη η ποσότητα διαλύθηκε σε 60 ml διαλύματος 50 / 50 PE / EtO<sub>2</sub> και φορτώθηκε σε στήλη χρωματογραφίας flash εσωτερικής διαμέτρου 3,5 cm,η οποία πληρώθηκε με SilicaGel 60 (0,040-0,063mm) σε ύψος 8,5 cm. Τα συστήματα διαλυτών βαθμιδωτής έκλουσης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν PE / EtO<sub>2</sub> στις εξής αναλογίες: 50%, 40%, 30%, 20%, 10%. Ακολούθησε έκπλυση της στήλης με 100% EtO<sub>2</sub> και 100% MeOH. Χρησιμοποιήθηκαν 100 mL, 150 mL, 100 mL, 200 mL, 150 mL, 100 mL και 150 mL, αντίστοιχα από το κάθε σύστημα. Ελήφθησαν κλάσματα των 4 - 5 mL σε 222 δοκιμαστικούς σωλήνες. Ελήφθησαν δείγματα για ανάλυση TLC ανά 2 δοκιμαστικούς σωλήνες, τα οποία αναπτύχθηκαν σε διάλυμα 100% EtO<sub>2</sub>. Σύμφωνα με την παραπάνω διαδικασία, τα κλάσματα κατηγοριοποιήθηκαν σε **15 ομάδες**, με βάση το R<sub>f</sub> το οποίο κυμαίνεται από 0,9 – 0,4.

Κλάσματα	Κωδικός ομάδας	Βάρος (mg)
1-20	DVN A	35
21-43	DVN B	200
44-63	DVN C	60
64-73	DVN D	11
74-108	DVN E	51
109-117	DVN F	20
118-132	DVN G	35
133	DVN H	4
134-148	DVN I	68
149-158	DVN K	63
159-172	DVN L	Crystal
165	DVN M	2
173-201	DVN N	42
202-214	DVN O	195
215-222	DVN P	64

Ο διαχωρισμός με χρωματογραφική στήλη της DVN έδωσε κύρια ομάδα, DVN B, DVN C και DVN D που περιείχαν μίγμα των α και β ισομερών του κοστικού οξέος συνολικού βάρους 271 mg, <u>δηλαδή το 27% από το συνολικό διήθημα είναι μίγμα</u> <u>ισομερών κοστικού οξέος.</u> Οι ομάδες DVN B, DVN C και DVN D, αποτέλεσαν αντικείμενο αναλυτικής μελέτης, μέσω αέριας χρωματογραφίας και NMR , όπου ταυτοποιήθηκαν μίγματα ισομερών α και β με ποσοστό αναλογίας α/ β : 30%, 20% και 15% αντίστοιχα. Η ομάδα DVN L έδωσε κρύσταλλο από τον οποίον ένα τμήμα χρησιμοποιήθηκε για την λήψη φάσματος <sup>1</sup>Η NMR, από το οποίο ταυτοποιήθηκε ως ilicic acid.



**Σχήμα 3.0** Πορεία χρωματογραφικού διαχωρισμού εκχυλίσματος DVN.

Αντίστοιχα, για το διήθημα της τρίτης διαδικασίας εκχύλισης **DVC** πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του αρχικού εκχυλίσματος σε στήλη flash χρωματογραφίας εσωτερικής διαμέτρου 3,5 cm, με πληρωτικό υλικό SilicaGel 60 (0,040-0,063mm) ύψους 8,0 cm. Τα συστήματα διαλυτών βαθμιδωτής έκλουσης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν EtO<sub>2</sub> / PE στις εξής αναλογίες: 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 50%. Η στήλη εκπλύθηκε με 100% EtO<sub>2</sub>. Χρησιμοποιήθηκαν 100 ml από το κάθε σύστημα. Ελήφθησαν κλάσματα των 5 - 6 mL σε 160 δοκιμαστικούς σωλήνες οπότε συλλέχθηκαν τα περισσότερα διακριτά συστατικά Ελήφθησαν δείγματα για ανάλυση TLC ανά 2 δοκιμαστικούς σωλήνες, τα οποία αναπτύχθηκαν σε διάλυμα 5% EtO<sub>2</sub> / PE για τα πρώτα 70 κλάσματα και με 30% EtO<sub>2</sub> / PE για τα υπόλοιπα μέχρι τέλους. Τα κλάσματα με βάση το R<sub>f</sub> το οποίο κυμαίνεται από 0,6 – 0,25 για τα κλάσματα 1-70 και 0,4 – 0,1 για τα κλάσματα 71 – 160, κατηγοριοποιήθηκαν σε **13 ομάδες** :

Κλάσματα	Κωδικός	Αναλογία %	Βάρος (mg )
	ομάδας		
1-8	DVC A	PE / EtO <sub>2</sub> : 95:5	52
9-44	DVC B	PE / EtO <sub>2</sub> : 95:5 / 90:10	71
45-75	DVC C	PE / EtO <sub>2</sub> : 90:10 / 85:15	101
76-89	DVC D	PE / EtO <sub>2</sub> : 80:20 / 75:25	300
90-98	DVC E	PE / EtO <sub>2</sub> : 75:25 / 70:30	82
99-103	DVC F	PE / EtO <sub>2</sub> : 70:30	49
104-112	DVC G	PE / EtO <sub>2</sub> : 65:35	6
113-122	DVC H	PE / EtO <sub>2</sub> : 65:35 / 60:40	43
123-128	DVC J	PE / EtO <sub>2</sub> : 60:40 / 50:50	28
129-142	DVC K	$PE / EtO_2 : 50:50 - EtO_2 :$	78
		100	
143-153	DVC L	EtO <sub>2</sub> : 100 - MeOH : 100	278
154-156	DVC M	MeOH : 100	69 / crystal
157-160	DVC N		466

Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός στήλης της DVC έδωσε 4 ομάδες : DVC C, DVC D, DVC E και DVC F, οι οποίες μετά από φασματοσκοπική μελέτη ταυτοποιήθηκαν ως μίγματα ισομερών του κοστικού οξέος σε διάφορα ποσοστά αναλογίας και σχετικής καθαρότητας. <u>Η συνολική ποσότητα κοστικού οξέος ήταν 532mg, δηλαδή 27%</u> κοστικό οξύ στο ολικό διήθημα. Η ομάδα συστατικών DVC M, μετά από μελέτη, ταυτοποιήθηκε ως ilicic acid. Η ομάδα DVC D αποτέλεσε αντικείμενο περαιτέρω διαχωρισμό.





## Ομάδα DVC- D

Η ομάδα DVC- D (300 mg) υποβλήθηκε σε χρωματογραφικό διαχωρισμό με διαλύτη έκλουσης 70 : 30 PE / EtO<sub>2</sub> και με πληρωτικό υλικό SilicaGel 60 (0,040-0,063mm) ύψους 5,0 cm Ελήφθησαν 36 κλάσματα των 13 mL. Κατόπιν ελέγχου με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας συνενώθηκαν στις ακόλουθες ομάδες:

Κλάσματα	Κωδικός ομάδας	Αναλογία %	Βάρος (mg )
1-10	DVC- D A	70 : 30 PE / EtO <sub>2</sub>	5
11-23	DVC- D B		240
24-30	DVC- D C		30
31-36	DVC- D D		18

Οι ομάδες DVC- D B, DVC- DC και DVC- DD μετά από φασματοσκοπική μελέτη με πείραμα <sup>1</sup>H NMR, ταυτοποιήθηκαν ως μίγματα α και β ισομερών του κοστικού οξέος σε αναλογία α / β: 30%,50 % και 30% αντίστοιχα. Η ομάδα DVC- DB αποτέλεσε αντικείμενο περαιτέρω διαχωρισμών.

## Ομάδα DVC- DB

Η ομάδα DVC- DB (230 mg) υποβλήθηκε σε χρωματογραφικό διαχωρισμό με διαλύτη έκλουσης 98:2 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ EtO<sub>2</sub> και με πληρωτικό υλικό SilicaGel 60 (0,040-0,063mm) ύψους 8,0 cm. Τα συστήματα διαλυτών βαθμιδωτής έκλουσης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν EtO<sub>2</sub>/ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> στις εξής αναλογίες: 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 30%. Η στήλη εκπλύθηκε με 100% EtO<sub>2</sub>. Χρησιμοποιήθηκαν 20 mL από το κάθε σύστημα εκτός για το πρώτο 2% EtO<sub>2</sub>/ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 50 mL. Ελήφθησαν 34 κλάσματα των 4 -5 mL. Κατόπιν ελέγχου με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας συνενώθηκαν στις ακόλουθες ομάδες:

Κλάσματα	Κωδικός ομάδας	Αναλογία %	Βάρος (mg )
1-3	DVC- DB A	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> / EtO <sub>2</sub> : 98:2 / 95:5	9
4-6	DVC- DB B		64
7-12	DVC- DB C		85
13-26	DVC- DB D	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> / EtO <sub>2</sub> : 98:2 / 95:5 /	41
		90:10	
27-34	DVC- DB E	$CH_2Cl_2$ / $EtO_2$ : 85:15 /	5
		80:20 / 70:30 - EtO <sub>2</sub> : 100	

Οι ομάδες DVC DBB, DVC DBC, DVC DBD και DVC DBE μελετήθηκαν και ταυτοποιήθηκαν μέσω πειραμάτων <sup>1</sup>Η NMR ως μίγματα α και β ισομερών του κοστικού οξέος αναλογίας α/ β ισομερούς 30% για τις δύο πρώτες ομάδες και 50% για την τρίτη.

#### 3.0 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Μετά από την μελέτη των κλασμάτων που συλλέχθηκαν από τους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς που πραγματοποιήθηκαν ταυτοποιήθηκαν με την χρήση των τεχνικών NMR και GC-MS/ LC-MS οι παρακάτω ενώσεις :

Μίγμα ισομερών α/ β κοστικό οξύ



**Σχήμα 5.** Δομές του άλφα- και βήτα-κοστικού οξέος

Η ταυτοποίηση πραγματοποιήθηκε κυρίως μέσω του πρωτονιακού φάσματος NMR. Από το <sup>1</sup>Η NMR εντοπίστηκαν τέσσερα βινυλικά πρωτόνια: στα 6,31 ppm και στα 5,68 ppm ως απλές κορυφές (br.s.), καθώς και στα 4,71 ppm και στα 4,41 ppm ως διπλές με μικρό σχάσιμο (d) (Εικ.6). Στα χαμηλότερα πεδία, παρουσιάζεται μία απλή κορυφή στα 0,75 ppm που αποδίδεται σε μία μεθυλική ομάδα (Εικ.7). Οι παραπάνω κορυφές αποδίδονται στο β- κοστικό οξύ σύμφωνα με την βιβλιογραφία Error: Reference source not found <sup>56Error: Reference source not foundError: Reference source not found</sup>. Πιο αναλυτικά, τα πρωτόνια H-13<sub>α</sub> και H- 13<sub>β</sub> εμφανίζονται στα 6,31ppm και 5,68 ppm, τα πρωτόνια H-15<sub>α</sub> και H-15<sub>β</sub> στα 4,71ppm και 5,68ppm και το 10-Me στα 0,74 ppm. Στα φάσματα μας ωστόσο εμφανίζεται μια ακόμη κορυφή στην βινυλική περιοχή και συγκεκριμένα στα 5,32 ppm (br.s.), η οποία αποδίδεται στο ολεφινικό πρωτόνιο Η-3 του α-κοστικού οξέος.<sup>57,58</sup> Ακόμη, η παρουσία της κορυφής στα 0,82 ppm, αποδίδεται στην μεθυλική ομάδα Η-15 του α - κοστικού οξέος και υποδεικνύει την ύπαρξη των δύο ισομερών σε μίγμα. Η ολοκλήρωση των κορυφών επιβεβαίωσε την ύπαρξη των δύο ισομερών αυτών καθώς οι κορυφές των πρωτονίων Η-13<sub>α</sub> και Η-13<sub>β</sub> συμπίπτουν και δίνουν μεγαλύτερη ολοκλήρωση από ένα πρωτόνιο που κανονικά θα έδιναν στην περίπτωση της ύπαρξης του ενός εκ των δύο ισομερών. Η ολοκλήρωση της κορυφής στα 5,32 ppm είναι ίση με την παραπάνω ολοκλήρωση

που δίνουν τα πρωτόνια H-13. Επομένως, μέσω των ολοκληρώσεων των κορυφών από το NMR καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι οι ομάδες που συλλέχθηκαν περιείχαν και τα δύο ισομερή σε διάφορα ποσοστά όπως φαίνονται στον αντίστοιχο πίνακα (Πίνακας 2).



**Εικόνα 4.** Φάσμα <sup>1</sup>Η στην ολεφινική περιοχή μίγματος α/β – κοστικού οξέος του δείγματος DVC DBB, όπου φαίνονται τα Η-13α,β, Η-15α,β του β - κοστικού και επιπλέον το Η-3 του α-κοστικού οξέος.



**Εικόνα 5.** Φάσμα <sup>1</sup>Η NMR σε χαμηλότερες χημικές μετατοπίσεις μίγματος α/β-κοστικού οξέος του δείγματος DVC DBB, όπου φαίνονται τα μεθύλια του α-κοστικού και β-κοστικού οξέος στα 0,82ppmκαι 0,74 ppm, αντίστοιχα. Το μεθύλιο του α-κοστικού στα 1,62 ppm δεν φαίνεται καθαρά καθώς αλληλεπικαλύπτεται από άλλες κορυφές.



**Εικόνα 6.**Φάσμα <sup>13</sup>C NMR μίγματος α/β- κοστικού οξέος του δείγματος DVN B.

Πίνακας 1. Φασματοσκοπικά δεδομένα βιβλιογραφίαςError: Reference source not found <sup>,Error: Reference</sup>
<sup>source not foundError: Reference source not found</sup> για τα α, β ισομερή του κοστικού οξέος.

Position	α-κοστικό δ(ppm)		β-κοστικό δ(ppm)	
	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	¹Н
1	37.8	1.36 m	37.0	2.3 m
				2.01 q
2	23.4	2.09 m	23.6	1.85 m
		1.96 m		1.52
3	121.1	5.32 brs	42.0	1.59 m
				1.34 m
4	134.8		150.7	
5	46.8	2.02 m	50.0	1.89 dd
6	40.1	1.27 q	30.1	1.66 m
		1.46 m		1.22 m
7	40.0	2.42 m	39.5	2.53 m
8	29.7	1.68 m	27.4	1.61 m
		1.56 m		1.46 m
9	27.4	1.86 m	41.2	1.59 m
		1.28 m		1.28 m
10	32.3		36.0	
11	145.1		145.4	
12	171.9		172.8	
13	125.4	6.32 s	124.9	6.32 s
		5.68 s		5.68 s
14	15.7	0.84 s	16.5	0.75 s
15	21.1	1.62 s	105.6	4.39 s
				4.71 s

Επομένως, τα μίγματα των δύο ισομερών του κοστικού οξέος απομονώθηκαν και από τις τρεις εκχυλίσεις. Συγκεκριμένα, από την ΑΚΖ οι ομάδες: AKZC, AKZE, AKZ (FG)'D και AKZ WI, από την DVN : DVN B, DVN C και DVN D και από την DVC : DVCC, DVCD, DVCE και οι περαιτέρω ομάδες που προέκυψαν από τον χρωματογραφικό διαχωρισμό της ομάδας DVCD, στις αναλογίες που αναφέρονται παρακάτω (Πίνακας 2). Οι αναλογίες προέκυψαν μέσω των ολοκληρώσεων από το φάσμα NMR, θεωρώντας ως ένα πρωτόνιο εκείνα του β – κοστικού, δηλαδή τα
πρωτόνια H-15<sub>α</sub> και H-15<sub>β</sub> στα 4,71ppm και 5,68ppm. Τα φάσματα των ομάδων αυτών παρατίθενται στο παράρτημα καθώς και τα χρωματογραφήματα GC-MS.

Εκχύλιση	Κωδικός ομάδας	Ποσοστό αναλογίας		
		$\alpha/\beta$ – costic acid		
AKZ	AKZ C	25%		
	AKZ E	20 %		
	AKZ WI	20%		
	AKZ (FG)' D	20%		
DVN	DVNB	30%		
	DVN C	20%		
	DVN D	15%		
DVC	DVCC	50%		
	DVC D	40%		
	DVC DB	30%		
	DVC DC	50%		
	DVC DD	30%		
	DVC DBB	33%		
	DVC DBC	30%		
	DVC DBD	50%		
	DVC DBE	35%		
	DVC E	30%		
	DVC F	20%		

**Πίνακας 2.** Ομάδες μιγμάτων ισομερών κοστικού οξέος που απομονώθηκαν και στα αντίστοιχα ποσοστά τους.

Παράλληλα πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις οπτικής στροφής για το μίγμα DVC DBB με διαλύτη MeOH στις παρακάτω συγκεντρώσεις. Με βάση τον τύπο: [a]=a\*100/I\*C,

Όπου a: η τιμή της οπτικής στροφής που αναγράφεται στο όργανο, l: το μήκος της κυψελίδας σε dm, C:η συγκέντρωση του δείγματος σε gr/100mL, υπολογίστηκε η τιμή της ειδικής στροφής. Δεδομένου ότι το δείγμα προς μελέτη ήταν μίγμα ισομερών αναμένουμε οπτική στροφή, η οποία να συμβαδίζει με τον τύπο: [a]<sub>mix</sub>= [a] <sub>a isomer</sub> \* x% + [a]<sub>b isomer</sub> \* (1-x)% . Ωστόσο, λόγω έλλειψης βιβλιογραφικών δεδομένων, δηλαδή τιμές οπτικής στροφής στην ίδια συγκέντρωση και στον ίδιο διαλύτη, δεν μπορέσαμε να ολοκληρώσουμε την σύγκριση και να καταλήξουμε σε συμπέρασμα <sup>59</sup>.

C g/100mL	α (Ένδειξη οργάνου)	[α]	
0,065	0	0	
0,13	0,01	15.38	
0,1625	0,01	12.31	
0,217	0,01	9.22	
0,325	0,023	16.92	
0,65	0,06	19.3	
1,3	0,25	38.02	



Ilicic acid



To ilicic acid έχει παρόμοιο δομικό σκελετό με εκείνο του κοστικού οξέος με την μόνη διαφορά ότι στον άνθρακα 4 υπάρχει ένα υδροξύλιο αντί για κάποιον ένδο ή έξω κυκλικό διπλό δεσμό. Το υδροξύλιο αυτό μπορεί να απομακρυνθεί και να δώσει τα ισομερή του κοστικού οξέος. Η ταυτοποίηση του πραγματοποιήθηκε κυρίως μέσω του πρωτονιακού φάσματος NMR. Από το φάσμα <sup>1</sup>Η παρατηρούμε μόνο δύο κορυφές στην ολεφινική περιοχή. Συγκεκριμένα, βινυλικά πρωτόνια: στα 6,24ppm και στα 5,60 ppm, τα οποία εμφανίζονται ως απλές κορυφές και αντιστοιχίζονται στα Η-13<sub>α</sub> και Η-13<sub>β</sub> (Εικ.9). Το γεγονός ότι δεν υπάρχουν άλλες κορυφές στην περιοχή 6,50 ppm - 8,50 ppm υποδηλώνει ότι στο μόριο μας δεν υπάρχει αρωματικότητα ή ενδεχομένως άλλος διπλός δεσμός. Ωστόσο, το φάσμα του γ- κοστικού οξέος είναι παρόμοιο με του ilicic<sup>60</sup>, διότι ο διπλός δεσμός στο γκοστικό δεν έχει κάποιο πρωτόνιο καθώς και οι δύο άνθρακες του διπλού δεσμού είναι τεταρτοταγείς. Επομένως, η επιβεβαίωση για το ποιά ένωση είχαμε απομονώσει πραγματοποιήθηκε συνδυαστικά με το φάσμα άνθρακα. Το γ- κοστικό έχει έναν παραπάνω τεταρτοταγή άνθρακα (C-5) από το ilicic. Άρα, αναμένουμε για το ilicic: 6 άνθρακες δευτεροταγείς, 5 άνθρακες τεταρτοταγείς και 4 άνθρακες πρωτοταγείς ή τριτοταγείς, γεγονός που επιβεβαιώνεται από το πείραμα NMR DEPT 135 (Εικ.11). Η ύπαρξη του διπλού δεσμού του γ - κοστικού θα έχει ως αποτέλεσμα την διαφοροποίηση στις χημικές μετατοπίσεις των υπόλοιπων πρωτονίων και εντονότερα εκείνων των μεθυλίων. Τα μεθύλια του γ-κοστικού οξέος<sup>61</sup> εντοπίζονται στα 1,06 ppm (H- 15) και 1,62 ppm (H-14) ενώ τα αντίστοιχα στο ilicic στα 0,70 ppmkai 1,07 ppm. Με βάση τα φασματοσκοπικά δεδομένα της βιβλιογραφίας επιβεβαιώθηκε ότι έχουμε απομονώσει το ilicic acid και όχι το γ- κοστικό οξύ, καθώς ταυτίζονται οι τιμές. Επιπλέον, από LC-MS το μοριακό βάρος της ένωσης βρέθηκε ίσο με 252 (Εικ 12).



**Εικόνα 7.** Ολικό φάσμα <sup>1</sup>Η NMR δείγματος DVCM, στο οποίο επισημαίνονται οι ολοκληρώσεις των κορυφών των πρωτονίων Η-13 (6,24ppm και 5,60 ppm)και των μεθύλιων Η-15 και Η-14 στα 0,88 ppm και 1,06ppm, αντίστοιχα.



Εικόνα 8.Φάσμα NMR<sup>13</sup>C δείγματος DVC M.



Εικόνα 9.Φάσμα NMR DEPT 135 δείγματος DVC Μ.



**Εικόνα 10.** LC – MS (full MS) ϑετικός ιοντισμός (M<sup>+</sup> + Na<sup>+</sup>, m/z=27)και 2M<sup>+</sup>+Na<sup>+</sup>=527) ilicic acid (δείγμα DVC M).

**Πίνακας 3.** Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR<sup>13</sup>C βιβλιογραφίας για γ-κοστικόError: Reference source not found και ilicic <sup>Error: Reference source not found καθώς και τα πειραματικά για το ilicic (DVC M<sup>13</sup> C και DEPT 135).</sup>

<sup>13</sup> С (бррт)						
position	γ-κοστικό	llicic	DVC M	DEPT 135 -DVCM		
1	40,2	42.54	43.49	CH <sub>2</sub>		
2	19,0	19.45	20.38	CH <sub>2</sub>		
3	33,1	44.23	44.79	CH <sub>2</sub>		
4	134,2	71.87	73.16	С		
5	125,2	54.19	55.06	СН		
6	31,4	26.92	27.37	CH <sub>2</sub>		
7	40,3	40.56	41.20	С		
8	28,0	26.11	26.99	CH <sub>2</sub>		
9	42,1	39.78	40.26	CH <sub>2</sub>		
10	34,4	34.23	34.95	С		
11	145,2	145.54	145.65	С		
12	173,0	169.66	171.83	С		
13	124,7	122.46	124.40	СН		
14	19,2	18.01	19.06	CH₃		
15	24,6	21.53	22.55	CH₃		

Παράγωγο αρωμανδρεδρίνης



Το παράγωγο της αρωμανδενρίνης (7-O-methylaromadendrin-3-acetate), που απομονώθηκε από την ομάδα AKZ QB και AKZ QC, ταυτοποιήθηκε μέσω πειραμάτων μονοδιάστατων φασμάτων NMR και φασμάτων δύο διαστάσεων, καθώς και μέσω LC-MS.

Από το φάσμα πρωτονίου, παρατηρούμε: στην αρωματική περιοχή 6 κορυφές με διπλή πολλαπλότητα, δύο απλές κορυφές, μία στα 3,8 ppm και η άλλη στα 2.0 ppm και μια απλή κορυφή στα 11,5 ppm (Εικ.13). Το φάσμα NMR <sup>13</sup>C (Εικ.14) μας έδωσε 18 σήματα εκ των οποίων 8 άνθρακες είναι τεταρτοταγείς ενώ οι υπόλοιποι άνθρακες πρωτοταγείς ή τριτοταγείς (Εικ.15). Από το φάσμα μάζας LC-MS βρέθηκε ότι η ένωση έχει μοριακό βάρος ίσο με 344 (Εικ.19). Η ταυτοποίηση της ένωσης ολοκληρώθηκε με τα φάσματα δύο διαστάσεων ομοπυρηνικής και ετεροπυρηνικής συσχέτισης (COSY, HSQC, HMBC) (Εικ.16, Εικ.17, Εικ.18). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα βρίσκονται σε πλήρη συμφωνία με τα βιβλιογραφικά.<sup>62</sup>



Εικόνα 11. Φάσμα NMR <sup>1</sup>Η AKZ QB.



**Εικόνα 12.** Φάσμα NMR<sup>13</sup> C AKZ QB



Εικόνα 13.Φάσμα NMR DEPT 135 AKZ QB (\* ο δευτεροταγής άνθρακας που φαίνεται στα φάσμα είναι του EtOAc)



Εικόνα 14. Φάσμα ομοπυρηνικής συσχέτισης Η-Η (COSY) δείγματος ΑΚΖ QB.



Εικόνα 15.Φάσμα ετεροπυρηνικής συσχέτισης (HMBC) δείγματος ΑΚΖ QB.



Εικόνα 16. Φάσμα ετεροπυρηνικής συσχέτισης (HSQC) δείγματος ΑΚΖ Q.

#	<sup>13</sup> C	нос	DEPT	δ <sup>1</sup> Η	L (H <sub>7</sub> )	COSV	нмвс
<u>π</u> 2	01 11			E 20	d I = 12	ц_2	
<u>_</u>	01.11	11-2		5.23	u, J – 12	5-11	11-2, 11-5
3	72.36	H-3	СН	5.83	d, J = 12	H-2	H-2, H-12
4	191.89	<u> </u>	С				H-3, H-2
5	164.11		С				H-6, H-5 (OH)
6	95.65	H-6	СН	6.11	d, J = 2.5		H-8 , H-5(OH)
7	168.52		С				H-6, H-8, H-13
8	94.69	H-8	СН	6.06	d, J = 2.5		H-6
9	162.27	<u> </u>	С				H-8
10	101.89		С				H-5(OH), H-6,H-8
1′	127.29		С				H-3'/ H-5', H-3,
2'	129.67	H-2'	СН	7.35	d, J = 8.5	H-3′,H-2	H-2 (weak), H-6'
3'	115.65	H-3'	СН	6.86	d, J = 8.5		H-2', H-5'
4'	156.70	+	С				H-2', H-3'
5′	115.65	H-5'	СН	6.86	d, J = 8.5		H-6', H-3'
6′	129.67	H-6'	СН	7.35	d, J = 8.5		H-2', H-2
11	169.48		С				H-3, H-12
12	20.36	H-12	CH3	2.03	S		H-12
13	55.85	H- 13	CH3	3.82	S		-
(OH)₅*				11.49	S		

Πίνακας 4. Φασματοσκοπικά δεδομένα AKZ QB

\*D<sub>2</sub>O exchangeable



Εικόνα. 17 Φάσμα μάζας (ESI-MS, αρνητικός ιονισμός) του μεταβολίτη ΑΚΖ QB.



Εικόνα 18. Θραυσματοποίηση του ΑΚΖ QB σε Φάσμα μάζας (ESI-MS, αρνητικός ιονισμός).

#### 5.0 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τα εκχυλίσματα της Dittrichia viscosa απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν τρία σεσκιτερπενικά οξέα και ένα παράγωγο φλαβονοειδών. Συγκεκριμένα, μίγμα των δύο ισομερών α/β κοστικού οξέος, llicic acid και 7-O-methylaromadendrin-3acetate. Μετά από μελέτη ορισμένων κλασμάτων των εκχυλισμάτων τόσο για το αποξηραμένο όσο και για φρέσκο φυτό καταλήξαμε στις εξής παρατηρήσεις:

- Μεγαλύτερο ποσοστό κοστικού οξέος βρέθηκε να υπάρχει στα εκχυλίσματα που προέκυψαν από την εκχύλιση του φρέσκου φυτού έναντι εκείνου που προέκυψε από αποξηραμένο φυτό. Πιο αναλυτικά, το 27% του διηθήματος από φρέσκο φυτό (από το ολικό εκχύλισμα που μελετήθηκε) ήταν κοστικό οξύ, ενώ η αντίστοιχη τιμή για το για το αποξηραμένο φυτό ήταν 11%. Τα ποσοστά αυτά βέβαια προέκυψαν με βάση τα κλάσματα τα οποία μελετήθηκαν, δηλαδή από τις ομάδες που, βάσει των TLC, βρισκόντουσαν σε παραπλήσιο RF με εκείνο του β-κοστικού οξέος. Επομένως, δεν μπορούμε να πούμε με πλήρη βεβαιότητα ότι το ποσοστά αυτά αντιπροσωπεύουν επακριβώς το σύνολο του εκχυλίσματος.
- Το πρόδρομο μόριο των ισομερών του κοστικού οξέος, ilicic acid, βρέθηκε και στα δύο εκχυλίσματα από φρέσκο φυτό, ενώ ενδεχομένως να μην υπάρχει στο αποξηραμένο φυτό. Ωστόσο, λόγω έλλειψης χρόνου δεν έγινε πλήρης μελέτη όλων κλασμάτων του αποξηραμένου φυτού, ώστε να ισχυριστούμε με βεβαιότητα πως το ilicic acid κατά την ξήρανση μετατράπηκε σε κάποιο από το ισομερή του κοστικού οξέος ή σε κάποιο άλλο παράγωγο του.
- Από τα μίγματα των δύο ισομερών (α και β) που απομονώθηκαν παρατηρήθηκε ότι σχεδόν πάντα το β-κοστικό οξύ βρισκόταν σε μεγαλύτερο ποσοστό από εκείνο του α-κοστικού οξέος. Ωστόσο, δεν επιτεύχθηκε ο διαχωρισμός των δύο αυτών των ισομερών με flash χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας ως πληρωτικό υλικό silica, μία μέθοδο η οποία συνήθως δίνει πολύ καλά αποτελέσματα διαχωρισμού ισομερών τερπενίων.

## 6.0 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

<sup>9</sup> Anderson, D. L.; Trueman, J. W. H. *Experimental and Applied Acarology* **2000**, *24*, 165–189.

<sup>10</sup> Chandler, D.; Sunderland, K. D.; Ball, B. V.; Davidson, G. *Biocontrol Science and Technology* **2001**, *11*, 429-448.

<sup>11</sup> Ball, B. V. International Bee Research Association. Cardiv, UK **1993**, pp. 9-16.

<sup>12</sup> Ball, B. V. *Pests & Diseases* **1994**, 569-576.

<sup>13</sup> Ball, B. V. International Bee Research Association, Cardiv, UK, **1994**, pp. 5-11.

<sup>14</sup> Stavrianakou, S.; Liakopoulos, G.; Karabourniotis, G. *Environmental and Experimental Botany* **2006**, *56*, 293-300.

<sup>15</sup> Καββάδας Δ. Σ. Εικονογραφημένον Βοτανικόν-Φυτολογικόν Λεξικόν. Τόμος Δ Εκδοτικός οίκος Γ. Π. Ξένου, Αθήνα, **1956**.

<sup>16</sup> Σταυριανάκου, Σ. Β. Παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν τη συσσώρευση δευτερογενών μεταβολιτών στα φύλλα του φυτού Dittrichia viscosa. Μεταπτυχιακή Εργασία. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών 2000.

<sup>17</sup> Χατζήνα, Φ.; Γούναρη, Σ.; Θρασυβούλου, Α.; Καλαπανίδα, Μ.; Τσέλιος, Δ. Τα μελιτογόνα έντομα της πεύκης. Πρακτικά του 1°<sup>0</sup> Επιστημονικού Συνεδρίου Μελισσοκομίας - Σηροτροφίας. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 29 Νοεμβρίου - 1 Δεκεμβρίου **2002**.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Otis, G. W. A Review of the Diversity of Species Within Apis. In: Diversity in the Genus Apis by Smith, D.R **1991**.

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Tingek, S.; Koeniger, N.; Koeniger, G. *Senckenbergiana Bio* **1996**, *76*, 115-119.

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> Ruttner, F. *Biogeography and Taxonomy of Honeybe.* Springer – Verlag, Berlin **1988**.

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> Ruttner, F. *Naturgeschichte der Honigbienen* Ehrenwirth Verlag, Münich, **1992**.

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup> Sheppard, W. S.; Arias, M. C.; Greech, A. Meixner, M. D. *Apidologie* **1997**, *28*, 287-293.

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup> Sheppard, W. S.; Meixner, M. D. *Apidologie* **2003**, *34*, 367-375.

<sup>&</sup>lt;sup>7</sup> Ruttner, F.; Tassencourt, L.; Louveaux, J. *Apidologie* **1978**, *9*, 363-381.

<sup>&</sup>lt;sup>8</sup> Oudemans, A. C. Leyden Museum **1904**, 24, 216-222.

<sup>&</sup>lt;sup>18</sup> Ceccherelli, P.; Curini, M.; Marcotullio, M. C.; Menghini, A. *Phytochemistry* **1985**, *24*, 2987-2989.

<sup>&</sup>lt;sup>19</sup> Wollenweber, E.; Mayer, K.; Roitman, J. N. Phytochemistry **1991**, 30, 2445-2446.

<sup>&</sup>lt;sup>20</sup> Werker, E.; Hallahan D. L.; Gray J. C. *Advances in Botanical Research* **2000**, *31*, 1-36.

<sup>&</sup>lt;sup>21</sup> Werker E.; Fahn A. *Botanical Gazette* **1981**, *142*, 461-476.

<sup>&</sup>lt;sup>22</sup> Stephanou, M.; Manetas, Y. Journal of Experimental Botany **1997**, 48, 1977-1985.

<sup>&</sup>lt;sup>23</sup> Stephanou, M.; Manetas, Y. Australian Journal of Plant Physiology **1995**, 22, 755-759.

<sup>&</sup>lt;sup>24</sup> Bohlmann, F.; Gupta, K. R. *Phytochemistry* **1982**, *21*, 1443-1445.

<sup>32</sup> Wollenweber, E.; Mayer, K.; Roitman, J. N. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 2445-2446.

<sup>36</sup> Ulubelen, A.; Öksüz, S.; Gören, N. *Phytochemistry* **1987**, *26*, 1223-1224.

<sup>37</sup> Ceccherelli, P.; Curini, M.; Marcotullio, M. C.; Menghini, A. *Phytochemistry* **1985**, *24*, 2987-2989.

<sup>39</sup> Fardella, G. *Fitoterapia* **1979**, *50*, 3-4.

<sup>40</sup> Al-Khalil, S.; Al-Eisawi, D.; Fisher, N. A. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1992**, *6*, 307-309.

<sup>41</sup> Kumari, G. N.; Rao, L. J. M.; Rao, N. S. P. *Proceedings of Indian Academy of Sciences* **1986**, *97*, 171.

<sup>42</sup> Jakupovic, J.; Schuster, A.; Bohlmann, F.; King, R. M.; Lander, N. S. *Phytochemistry* **1988**, *27*, 3181-3185.

<sup>43</sup> Grande, M.; Torres, P.; Piera, F.; Bellido, S. I. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 1826-1828.

<sup>44</sup> α) Katerinopoulos H. E.; Isaakidis D.; Sofou K. ; Spyros A. *Use of costic acid and other components from the plant Dittrichia viscosa (Greek: "Aconiza") and related species, as acaricide against Varroa destructor, the acari acting as parasite of the European honey bee*. Greek Patent, Gr 1006569, **2009**;

b) Katerinopoulos H. E.; Isaakidis D.; Sofou K.; Spyros A. Use of costic acid and other components from the plant Dittrichia viscosa (Greek: "Aconiza") and related species, as acaricide against Varroa destructor, the acari acting as parasite of the European honey bee. European Patent, EP 234632, **2015**.

<sup>45</sup> Garcez F. R. ; Garcez W. S. ; Hamerski L. *Quim. Nova,* **2010**, *33*, 1739-1742.

<sup>&</sup>lt;sup>25</sup> Maoz, M.; Kashman, Y.; Neeman, I. *Planta Medica* **1999**, *65*, 281-282.

<sup>&</sup>lt;sup>26</sup> Ulubelen, A.; Öksüz, S.; Gören, N. *Phytochemistry* **1987**, *26*, 1223-1224.

<sup>&</sup>lt;sup>27</sup> Ceccherelli, P.; Curini, M.; Marcotullio, M. C. *Journal of Natural Products* **1988**, *51*, 1006-1009.

<sup>&</sup>lt;sup>28</sup> Sanz, J. F.; Ferrando, C.; Marco, J. A. *Phytochemistry* **1991**, *33*, 3653-3655.

<sup>&</sup>lt;sup>29</sup> Abu Zarga, M. H.; Hamed, E. M.; Sabri, S. S.; Voelter, W.; Zeller, K-P. *Journal of Natural Products* **1998**, *61*, 798-800.

<sup>&</sup>lt;sup>30</sup> Chiappini, I.; Fardella, G.; Menghini, A.; Rossi, C. *Planta Medica* **1982**, *44*, 159-161.

<sup>&</sup>lt;sup>31</sup> Grande, M.; Piera, F.; Guenca, A.; Torres, P.; Bellido, I. S. *Planta Medica* **1985**, *51*, 414- 419.

<sup>&</sup>lt;sup>33</sup> Bohlmann, F.; Czerson, H.; Schöneweiâ, S. *Chemische Berichte* **1977**, *110*, 1330-1334.

<sup>&</sup>lt;sup>34</sup> Sanz, J. F.; Ferrando, C.; Marco, J. A. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 3653-3655.

<sup>&</sup>lt;sup>35</sup> Rustaiyan, A.; Jakupovic, J.; Chau-Thi, T. V.; Bohlmann, F.; Sadjadi, A. *Phytochemistry* **1987**, *26*, 2603-2606.

<sup>&</sup>lt;sup>38</sup> Öksüz, S.; Topcu, G. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 195-197.

<sup>&</sup>lt;sup>46</sup> Mamoci E. ; Cavoski I., Simeone V. ; Mondelli D. ;Al-Bitar L. ;Caboni P., *Molecules*, **2011**, *16*, 2609-2625.

<sup>&</sup>lt;sup>47</sup> Xiao Y.; Zheng Q.; Zhang Q.; Sun H.; Gueritte F.; Zhao Y., *Fitoterapia*, **2003**, *74*, *459*–463.

<sup>&</sup>lt;sup>48</sup> Wu X. ;Vogler B., *Natural Product Communications*, **2006**, *1*, 465-468.

<sup>&</sup>lt;sup>49</sup> Zdero C. ; Bohlmann F. ; King M.; *Phytochemistry*, **1988**, *27*, 2835 2842.

<sup>50</sup> Muhamad A., *Chem. Pharm. Bull.*, **2008**, *56*, 1535-1545.

<sup>51</sup>Seca, A. M. L.; Grigore, A.; Pinto, D. C. G. A.; Silva, A. M., *Journal of Ethnopharmacology*. **2014**, *154*, 286–310.

<sup>52</sup> Bohm B. A., Stuessy T.F., Flavonoids of the Sunflower Family (Asteraceae)-Springer, Vienna (2001)

<sup>53</sup> Neu, R. *Naturwissenchaften* **1957**, *44*, 181.

<sup>54</sup> Stahl, E. Thin-Layer Chromatography, Springer, Berlin-Heidelberg-N. York, **1969**.

<sup>55</sup> Harwood, L. M.; Moody, C. J. (13 Jun 1989). Experimental organic chemistry: Principles and Practice Wiley-Blackwell. Oxford, pp. 122–125. ISBN 0-632-02017-2.

<sup>56</sup> Blanc, M. C.; Bradesi, P.; Casanova, J. *Phytochemical Analysis* **2005**, *16*, 150–154.

<sup>57</sup> Andolfi, A.; Zermane, N.; Cimmino, A.; Avolio, F.; Boari, A.; Vurro, M.; Evidente, *Phytochemistry* **2013**, *86*, 112–120.

<sup>58</sup> Yonggan C.; Gang Z.; Lijun L.; Zhaoming X.; Yulin L., *Synthesis* **2001**, *9*, 1305–1307.

<sup>59</sup> Werner H.; Hiroaki C.; L. R. Tether, Journal of Organic Chemistry, **1966**, *31* (5), 1632–1634

<sup>60</sup> Oksuz S.; Topcu G, *Phytochemistry*, **1992**, *31*, 195-197.

<sup>61</sup> P. Ceccherelli, M.; Curini, M.C.; Marcotulli.; O. Rosati, *Tetrahedrom Letters*, **1990**, *21*, 3071–3074.

<sup>62</sup> Ayafor, J. F.; Connolly, J. D. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1, **1981**, 2563-2565

### 7.0 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΦΑΣΜΑΤΩΝ NMR, GC-MS

**Φάσμα 1Η-ΝΜR** <u>AKZ C</u>



**Φάσμα DEPT** <u>AKZ C</u>





Φάσμα 1Η-NMR <u>AKZ E</u>

**Φάσμα <sup>13</sup>C NMR** <u>AKZ E</u>















# **Φάσμα Η-Η COSY** <u>AKZ Q B</u>











**Φάσμα ΗΜΒC** <u>AKZ Q B</u>





## **Φάσμα <sup>13</sup>C NMR** <u>AKZ QC</u>



## **Φάσμα <sup>1</sup>Η-ΝΜR** <u>AKZ (FG)'D</u>









Φάσμα <sup>1</sup>Η-ΝΜR <u>DVN L</u>



**Φάσμα <sup>1</sup>Η-ΝΜR** <u>DVC C</u>













GC-MS







<u>AKZ E\_</u>T=22.434
























0-

4. T=23.584



131



















<u>AKZ FG' H</u>





<u>DVN C</u>

