ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΛΑΝΤΟΛΑΚΤΟΝΗΣ ΚΑΙ ΙΣΟΑΛΑΝΤΟΛΑΚΤΟΝΗΣ ΩΣ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΟΥ ΦΥΤΟ *Inula Helenium*

ΚΑΛΛΙΒΡΕΤΑΚΗ ΜΑΡΙΑ

ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΓΑΝΩΤΑΚΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

Οκτώβριος 2023

Περίληψη

Το γένος *Inula*, μέλος της οικογένειας Asteraceae χρησιμοποιείται ανά τους αιώνες σε όλο τον κόσμο για την θεραπεία ασθενειών, αποτελεί μέρος της παραδοσιακής ιατρικής διαφόρων λαών και η αξιοποίηση και μελέτη του συνεχίζεται και στην σύγχρονη εποχή. Οι ευεργετικές ιδιότητες των ειδών αυτού του γένους οφείλονται στους δευτερογενείς μεταβολίτες που περιέχονται σε αυτά, οι οποίοι είναι κυρίως ποικιλία σεσκιτερπενικών λακτονών. Πιο συγκεκριμένα, το ενδιαφέρον προς το είδος *Inula helenium* είναι αποτέλεσμα των αντιφλεγμονωδών αντικαρκινικών αντιβακτηριακών και αντιμικροβιακών ιδιοτήτων που διαθέτει.

Στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε σε αποξηραμένες ρίζες του είδους *Inula helenium* εκχύλιση στερεού-υγρού πρώτα σε διαλύτη μεθανόλη και στη συνέχεια σε διαλύτη εξάνιο. Στο εκχύλισμα πραγματοποιήθηκαν χρωματογραφικές στήλες σε πληρωτικό υλικό SiO_2 (Silica) και για πιο εξειδικευμένο διαχωρισμό σε γέλη οξειδίου του αργιλίου (Al_2O_3) εμπλουτισμένη με $AgNO_3$. Τέλος, με την χρήση των μεθόδων φασματοσκοπίας NMR και GC-MS ταυτοποιήθηκαν οι απομονωμένοι δευτερογενείς μεταβολίτες 8-hydroxyl-eudesma-5,11(13)-dien-12-oic acid-lactone γνωστός και ως αλαντολακτόνη, 8-beta-hydroxyeudesma-4(14),11(13)-dien-12-oic acidgamma-lactone, γνωστός και ως ισοαλαντολακτόνη και ο 8-beta-hydroxy-4-alpha H-eudesm-5-en-12-oic acid gamma-lactone, γνωστός και ως δίυδρο-αλαντολακτόνη(**3**).

Περιεχόμενα

Περίληψη 2
Το γένος *Inula* 5
Το γένος *Inula* στην ιατρική 5
Βιοδραστικότητα δευτερογενών μεταβολιτών που απομονώθηκαν από το *Inula* 5
Προέλευση και ρόλος των δευτερογενών μεταβολιτών στα φυτά 5
Δευτερογενείς μεταβολίτες στο γένος *Inula* 6
Ευδεσμανολίδια (*Eudesmanolides*) 7
Γουαϊανολίδια (*Guaianolides*) 7
Ψευδογουαϊανολίδια (*Pseudoguaianolides*) 8
Γερμανοκρανολίδια (*Germacranolides*) 8
Ξανθανολίδια (*Xanthanolides*) 9
Διμερή σεσκιτερπένια 9
Φλαβονοειδή 10
Τοξικότητα του γένους *Inula* 11
Περιορισμοί της αξιοποίησης φυτών του γένους *Inula* 11
Inula Helenium 11
Χαρακτηριστικά του *Inula Helenium* 12
Καλλιέργεια 12
Βιοκατανομή ανά τον κόσμο 12
Προέλευση του ονόματος 13
Διαχρονικές χρήσεις 13
Γενικές Μέθοδοι 15
Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (T.L.C.) 15
Χρωματογραφία στήλης (*C.C.*) 15
Φασματοσκοπικές Μέθοδοι 16
Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) 16
Αέρια Χρωματογραφία –Φασματομετρία Μάζας (GC-MS) 16
Γεωγραφική Περιοχή Μελέτης 16
Εκχύλιση των συστατικών από το φυτό 17
Χρωματογραφικός Διαχωρισμός Εκχυλίσματος 17
Ταυτοποίηση απομονωμένων ενώσεων 23
Συμπεράσματα 32
Βιβλιογραφία 43

Εισαγωγή

Το γένος *Inula*

Το γένος *Inula* ανήκει στην οικογένεια Compositae (Asteraceae). Το γένος αυτό περιλαμβάνει περισσότερα από 100 είδη, τα οποία φύονται κυρίως στις Μεσογειακές περιοχές της Αφρικής, της Ασίας και της Ευρώπης.

Το *Inula* εμφανίζεται κυρίως ως βότανο (αυτοφυές φυτό σε άγονες ή καλλιεργημένες περιοχές), έχει κίτρινα άνθη και τα φύλλα του εναλλάσσονται στον άξονα του στελέχους του, ενώ σπανιότερα συναντάται ως θάμνος (ξυλώδες φυτό χωρίς κεντρικό κορμό). Τα φυτά που ανήκουν σε αυτό το είδος διακρίνονται κυρίως λόγω της πυκνής επίπεδης συστάδας μικρών λουλουδιών, την παρουσία ή απουσία τριχών στα μεμονωμένα άνθη στα κεφάλια των Asteraceae, τα ρητινώδη κανάλια και την μορφολογία της κυψέλης. Ωστόσο, δεν υπάρχει κάποιος μορφολογικός χαρακτήρας να είναι παρών σε όλα τα φυτά αυτού του γένους.

Τα είδη του *Inula* παρουσιάζουν βιολογική δραστικότητα, η οποία οφείλεται στους δευτερογενείς μεταβολίτες που περιέχουν και πιθανόν κυρίως στην πληθώρα σεσκιτερπενίων.[2,4,5]

Το γένος *Inula* στην ιατρική

Παλαιότερα οι άνθρωποι στηρίζονταν αποκλειστικά στα φυτά για να θεραπεύουν τις προκύπτουσες ασθένειες. Με το πέρασμα των χρόνων τα φυτά εξακολουθούν να διατηρούν τον ρόλο τους στην ιατρική, παρά την ύπαρξη των συνθετικών φαρμάκων, καθώς επιφέρουν λιγότερες παρενέργειες στον ανθρώπινο οργανισμό.

Διαχρονική είναι η χρήση λοιπόν των φυτών *Inula* για την αντιμετώπιση ασθενειών λόγω της αποτελεσματικότητας τους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η Κίνα, όπου παλαιότερα ο ρόλος των φυτών του *Inula* ήταν η θεραπεία της βρογχίτιδας, του διαβήτη και των εντερικών ελκών. Στην παραδοσιακή της ιατρική ήταν διαδεδομένο το φυτό *Inula japonica* Thunb, καθώς τόσο οι ρίζες όσο και τα φύλλα του χρησιμοποιούνταν για την αντιμετώπιση τραυματισμών από μαχαίρι και για τον βήχα. Ωστόσο, στην Κίνα φυτά αυτού του γένους έχουν εισαχθεί στην φαρμακοβιομηχανία καθώς παρουσιάζουν αποχρεμπτικές, αντιβηχικές, εφιδρωτικές, αντιεμετικές και βακτηριοκτόνες ιδιότητες.

Συγκεκριμένα, το *Inula racemosa* χρησιμοποιούταν στην παραδοσιακή ιατρική της Ινδίας ως αποχρεμπτικό και βρογχοδιασταλτικό, αλλά και κατά της φυματίωσης και των τοπικών δερματικών παθήσεων. Το *Inula confertiflora* χρησιμοποιούταν στην Αιθιοπία για την θεραπεία δερματικών παθήσεων από ιούς, πληγές και εκζεματώδεις βλάβες. Στην αρχαία Αίγυπτο με το *Inula conyza* απωθούσαν τους ψύλλους.[1,13]

Βιοδραστικότητα δευτερογενών μεταβολιτών που απομονώθηκαν από το *Inula*

Προέλευση και ρόλος των δευτερογενών μεταβολιτών στα φυτά

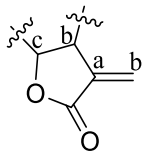
Τα φυτά παράγουν ουσίες, τους δευτερογενείς μεταβολίτες, έτσι ώστε να είναι ανταγωνιστικά στο περιβάλλον τους, με τις επιδράσεις τους να μην περιορίζονται μόνο στο ίδιο το φυτό, αλλά και σε άλλους ζωντανούς οργανισμούς. Στους

δευτερογενείς μεταβολίτες αποδίδονται διαδικασίες όπως η άνθηση, η καρπόδεση και η αποκοπή, η πολυετής ανάπτυξη ή η φυλλοβόλα συμπεριφορά. Επιπλέον, διακρίνονται για τις αντιμικροβιακές τους ιδιότητες.

Οι δράσεις των δευτερογενών μεταβολιτών έχουν κεντρίσει το ενδιαφέρον για την χρήση τους στην σύνθεση φαρμάκων. Ένας από τους τρόπους για την θεραπεία νόσων αποτελεί η ανάπτυξη νέων προϊόντων μέσω της αναζήτησης νέων δευτερογενών μεταβολιτών σε φυτά.[3]

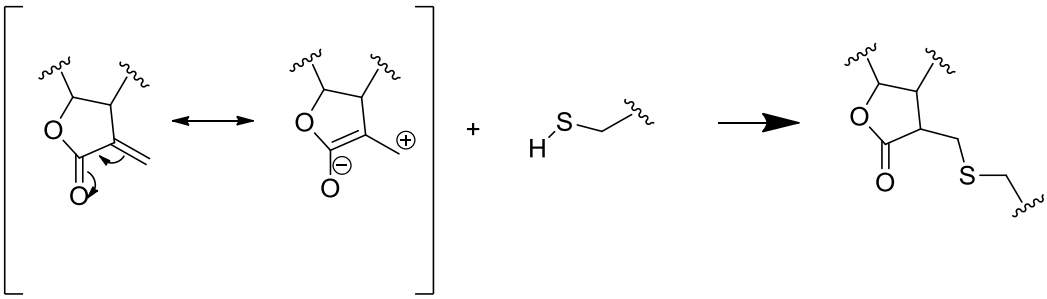
Δευτερογενείς μεταβολίτες στο γένος *Inula*

Στο γένος *Inula* έχουν βρεθεί περίπου 400 δευτερογενείς μεταβολίτες. Σε μεγαλύτερο βαθμό στο γένος αυτό εντοπίζονται κυκλικά σεσκιτερπένια, πιο συγκεκριμένα σεσκιτερπενικές λακτόνες. Τα σεσκιτερπένια δημιουργούνται από τις πρόδρομες ενώσεις διφωσφορικό ισοπεντενύλιο (IPP) και διφωσφορικό διμεθυλαλλύλιο (DMAPP) και έχουν μοριακό τύπο $C_{15}H_{24}$. Ο ανθρακικός σκελετός μπορεί να περιλαμβάνει α,β –ακόρεστες καρβονυλικές δομές, όπως οι λακτόνες που είναι αποτέλεσμα βιοχημικών τροποποιήσεων, οξείδωσης.[2,4,6]



Εικόνα 1: α-μεθύλενο-γ-λακτόνη, χαρακτηριστική δομική μονάδα στις σεσκιτερπενικές λακτόνες της *Inula*.

Η βιοδραστικότητα των σεσκιτερπενίων έχει παρατηρηθεί να περιλαμβάνει δράση κατά του καρκίνου, των φλεγμονών και των βακτηρίων, με επακόλουθο να ενθαρρύνουν την χρήση τους ως ενώσεις οδηγοί (lead compounds) για την δημιουργία κάποιου φαρμάκου. Τα σεσκιτερπένια με α,β-ακόρεστα καρβονύλια μπορούν να αντιδράσουν με βιολογικά πυρηνόφιλα κατά *Michael*.



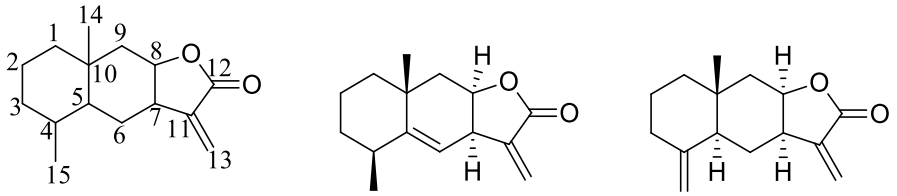
Εικόνα 2: Αντίδραση *Michael* μεταξύ α-μεθύλενο-γ-λακτόνη και σουλφυδριλομάδας

Παράγοντες που επηρεάζουν την δράση των σεσκιτερπενίων είναι η δομή της εκάστοτε ένωσης, η συγκέντρωση της και ο οργανισμός στον οποίο απευθύνεται.

Πιο συγκεκριμένα, η ηλεκτρονιόφιλη α-μεθύλενο-γ-λακτόνη μπορεί να αντιδράσει με τις πυρηνόφιλες σουλφυδριλικές ομάδες των πρωτεϊνών-στόχων και αυτό να συμβάλλει στην κυτταροτοξικότητα και την αντιφλεγμονώδη δράση. Η κυτταροτοξικότητα είναι αποτέλεσμα του μη ειδικού μηχανισμού δράσης των σεσκιτερπενίιων.[6,7]

Ευδεσμανολίδια (*Eudesmanolides*)

Τα ευδεσμανολίδια αποτελούν την κύρια ομάδα δευτεροταγών μεταβολιτών του *Inula* και αποτελούνται από σεσκιτερπενικές λακτόνες.



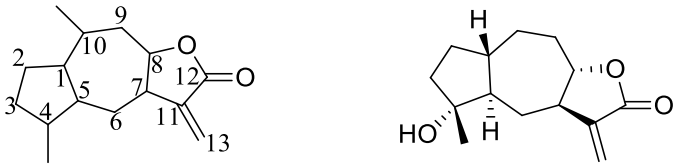
Εικόνα 3: Αριστερά απεικονίζεται η γενική μορφή των ευδεσμανολιδίων, στο κέντρο είναι η δομή της αλαντολακτόνης και δεξιά αυτή της ισοαλαντολακτόνης.

Εικόνα 4: Γενική μορφή ευδεσμανολιδίων, αριστερά ο δακτύλιος λακτόνης είναι προσαρτημένος στους C_7 και C_8, ενώ δεξιά η λακτόνη βρίσκεται στους C_6 και C_7.

Τα ευδεσμανολίδια διαφέρουν ως προς την διαμόρφωση των στερεογονικών τους κέντρων, αλλά και ως προς τον τρόπο οξείδωσης τους. Αυτές οι ενώσεις παρουσιάζουν αντικαρκινικές, αντιφλεγμονώδεις και αντιβακτηριδιακές ιδιότητες. Η πιο γνωστή ένωση σε αυτήν την ομάδα είναι η αλαντολακτόνη, η οποία πιστεύεται ότι προκαλεί εξ επαφής αλλεργική δερματίτιδα.[1,2]

Γουαϊανολίδια (*Guaianolides*)

Τα γουαϊανολίδια είναι σεσκιτερπενικές λακτόνες και πιστεύεται ότι η βιολογική δραστικότητα των φυτών *Inula* οφείλεται σε αυτά.



Εικόνα 5: Αριστερά απεικονίζεται η γενική μορφή των γουαϊανολιδίων και δεξιά το *inuviscolide*

Η ένωση *inuviscolide* που έχει απομονωθεί από είδη *Inula* παρουσιάζει αντιφλεγμονώδη δράση. Όταν ένας οργανισμός έρχεται αντιμέτωπος με κάποια

προσβολή όπως μικρόβια, ιούς ή φάρμακα, τότε παράγονται κυτοκίνες που απελευθερώνονται στο περιφερειακό αίμα και προκαλούνται φλεγμονές. Το *inuviscolide* δρα αναστέλλοντας την έκφραση του συστατικού NFκB, το οποίο συμβάλλει στην παραγωγή των φλεγμονών .[1,12]

Ψευδογουαϊανολίδια (*Pseudoguaianolides*)

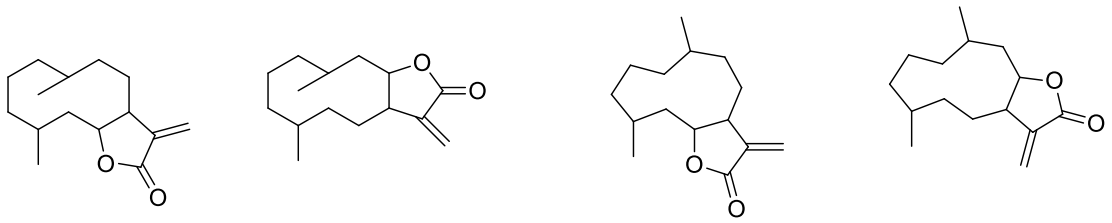
Τα ψευδογουαϊανολίδια είναι και αυτά σεσκιτερπενικές λακτόνες. Διαφέρουν με τα γουαϊανολίδια, καθώς τα ψευδογουαϊανολίδια φέρουν την μέθυλο-ομάδα στον C_5 και όχι στον C_4. Οι ενώσεις αυτές συναντώνται συχνά στο γένος *Inula*.

Εικόνα 6:Αριστερά απεικονίζεται η γενική μορφή των ψευδογουαϊανολιδίων και δεξιά η ένωση bigelovin.

Το bigelovin απομονώθηκε από τα φύλλα και τα λουλούδια του *Inulahelianthus-aquatica* και βρέθηκε ότι αναστέλλει σημαντικά την ανάπτυξη αρκετών σειρών καρκινικών κυττάρων.[1]

Γερμανοκρανολίδια (*Germacranolides*)

Τα γερμανοκρανολίδια ανήκουν και αυτά στις σεσκιτερπενικές λακτόνες.

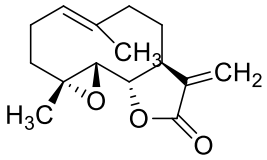


Εικόνα 7: Γενικές μορφές των γερμανοκρανολιδίων που διαφέρουν ως προς την διευθέτηση της μεθυλομάδας στον χώρο και την θέση όπου είναι προσαρτημένος ο δακτύλιος της λακτόνης.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτής της ομάδας ενώσεων και υψίστης σπουδαιότητας αποτελεί η ένωση *parthenolide*, η οποία εμφανίζει υψηλή κυτταροτοξικότητα, με αποτέλεσμα να έχει εισαχθεί σε κλινικές δοκιμές για την δράση της ως αντικαρκινικός παράγοντας. Πιο συγκεκριμένα, αυτή η ένωση παρεμβάλλεται στο μονοπάτι NF-κB, μονοπάτι μεταγραφικού παράγοντα που ελέγχει τα πολλαπλασιαστικά, τα αντι-αποπτωτικά και προφλεγμονώδη γονίδια, και έτσι στο parthenolide αποδίδεται αντικαρκινική και αντιφλεγμονώδης δράση.

Πιο συγκεκριμένα, το parthenolide απομονωνόμενο από το φυτό *Tanacetumparthenium*, δοκιμάστηκε σε κλινικές μελέτες για την θεραπεία της ημικρανίας και έδειξε θετικά αποτελέσματα και πλέον είναι εμπορικά διαθέσιμο σε

δισκία. Επίσης, σε κλινική μελέτη με χορήγηση parthenolide διαπιστώθηκε θεραπευτική δράση κατά του καρκίνου του προστάτη και καρκίνου του στήθους. Άλλες μελέτες έδειξαν ότι ενισχύει την απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα στο συκώτι, στο στήθος, στο παχύ έντερο, στον τράχηλο της μήτρας, στο πάγκρεας και στα λευκοκύτταρα. Επίσης, διαπιστώθηκε ότι θεράπευσε το γλοιοβλάστωμα επιταχύνοντας την απόπτωση κυττάρων μέσω της κασπάσης 3/7 και χωρίς να επηρεαστεί η δραστικότητα του NF-κB.

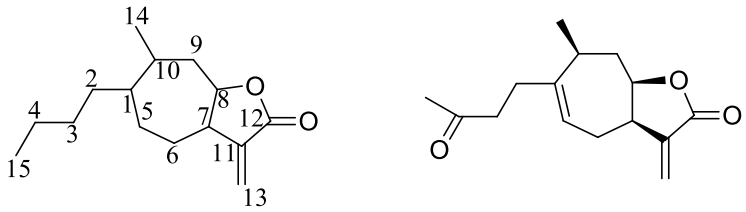


Εικόνα 8: Η δομή του parthenolide

Παρά την ύπαρξη γερμανοκρανολιδίων στα φυτά του γένους *Inula*, μόνο αυτά από το *Inula Britannica* έχουν αναφερθεί στην παραδοσιακή ιατρική για την αντιμετώπιση όγκων.[1,6,19,20]

Ξανθανολίδια (*Xanthanolides*)

Τα ξανθανολίδια αποτελούν και αυτά μία ακόμα κατηγορία σεσκιτερπενικών λακτονών. Η βιοσύνθεση τους πραγματοποιείται με διάνοιξη του δακτυλίου στον σκελετό του γουαϊανίου (*guaiane*) στους C_4/C_5.

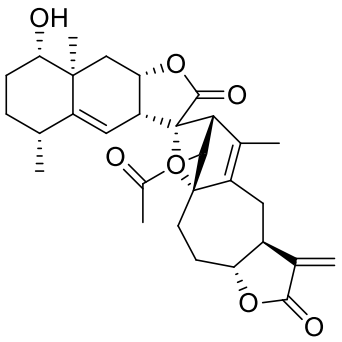


Εικόνα 9: Αριστερά απεικονίζεται η γενική μορφή των ξανθολιδίων και δεξιά η δομή του *tomentosin.*

Το *tomentosin*, το οποίο είναι γνωστό και ως *xanthalomgin*, είναι το πιο συνηθισμένο ξανθανολίδιο στα είδη του *Inula*. Τα ξανθανολίδια δεν φημίζονται για την βιοδραστικότητα τους, ωστόσο παράγωγα του *tomentosin* απομονωμένα από το *Inula hupehensis* έδειξαν ικανοποιητικά αποτελέσματα έναντι ορισμένων μακροφάγων. Επιπλέον, το *tomentosin* παρουσιάζει την ίδια αντιφλεγμονώδη δράση με το *inuviscolide*.[1,12]

Διμερή σεσκιτερπένια

Τα διμερή σεσκιτερπένια αποτελούν σύνθετες δομές.



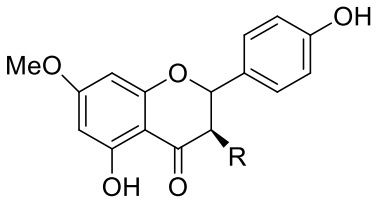
Εικόνα 10: Μορφή του διμερούς σεσκιτερπενίου *Japonica A*

Η απομόνωση τους έγινε πρόσφατα από το φυτό *Inula japonica*. Ωστόσο, τα διμερή σεσκιτερπένια παρουσιάζουν μέτρια αντιφλεγμονώδη δράση. Η ένωση *Japonica A* αποτελεί πιθανή ένωση οδηγό (lead compound) για αντιφλεγμονώδη δράση καθώς σύμφωνα με έρευνα στοχεύει εκλεκτικά τον στόχο TNF-α και παρεμποδίζει τον υποδοχέα TNFR1, αναστέλλοντας έτσι τα προφλεγμονώδη σήματα.[1,13]

Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι χημικά υδροξυλιωμένες φαινόλες, αρωματικές, όπου οι διπλοί δεσμοί στον αρωματικό βενζολικό δακτύλιο απορροφούν την υπεριώδη ακτινοβολία. Τροποποιήσεις στον δακτύλιο μετατοπίζουν την απορρόφηση σε μεγαλύτερα μήκη κύματος στην περιοχή του ορατού, με αποτέλεσμα τα διάφορα χρώματα στα φυτά.

Πρόκειται για σημαντικές ενώσεις λόγω των βιοδραστικών ιδιοτήτων τους ως αντικαρκινικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιδιαβητικές και αντιοξειδωτικές ενώσεις. Πιο συγκεκριμένα, η αντικαρκινική αλλά και αντιβιοτική συμπεριφορά παρατηρείται μέσω μηχανισμών που διακόπτουν τον κυτταρικό κύκλο ή μειώνουν την ρύθμιση της μεταλλαγμένης p53 ή αναστέλλουν την κινάση τυροσίνης.



[1]R=H
[2]R=OH
[3]R=AcO

Εικόνα 11:Δομές φλαβονοειδών που απομονώθηκαν από είδη του *Inula*,(1):*sakuranetin*, (2) *7-O-methylaromadendrin*, (3) *3-acetyl-7-O-methylaromadendrin*

Οι φλαβόνες που απεικονίζονται στην Εικόνα 11 επιδρούν σε εστίες φλεγμονής αλλά και σε ένζυμα που συμμετέχουν στον μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος. Η ένωση (2) *7-O-methylaromadendrin* έχει βρεθεί ότι βελτιώνει την ικανότητα πρόσληψης

γλυκόζης αλλά και την αντίσταση στην ινσουλίνη *in vitro*. Μάλιστα, τα φλαβονοειδή είναι από τις πιο ενεργές ενώσεις σύμφωνα με μελέτη που διεξήχθη για την αντικαταθλιπτική δράση υδατικού αλκοολικού εκχυλίσματος προερχόμενο από τα άνθη του φυτού *Inula japonica*.[1,2,3,4]

Τοξικότητα του γένους *Inula*

Από τα σεσκιτερπενοειδή που έχουν απομονωθεί από φυτά του γένους *Inula*, περίπου 396 από αυτά έχουν ισχυρή *in vitro* κυτταροτοξικότητα, ενώ πιστεύεται πιθανόν ότι η *in vivo* δράση τους σχετίζεται με τις αναστολές της νεοαγγειογένεσης, της μετάπτωσης και της απόπτωσης όγκου.

Τα φυτά του γένους *Inula*, λόγω των σεσκιτερπενικών λακτονών όπως η αλαντολακτόνη και η ισοαλαντολακτόνη, έχει διαπιστωθεί ότι επιφέρουν δερματικές παθήσεις εξ επαφής. Πρωταρχική πηγή αυτών αποτελεί το *Inula helenium*, το οποίο είναι υπεύθυνο για υψηλότερου βαθμού ανοσολογικές αποκρίσεις, όπως εξανθήματα πολύμορφου ερυθήματος. Ωστόσο, η χαμηλή τοξικότητα των ριζών του *Inula racemosa* το καθιστούν χρήσιμο για κλινικές καταστάσεις.

Τα φυτά του *Inula* δεν είναι τοξικά μόνο ως προς τον άνθρωπο, αλλά μπορεί να επιφέρουν αρνητικές επιδράσεις και σε άλλα φυτά. Εκχύλισμα από τα φύλλα του *Inula viscosa* επιφέρουν επαγόμενες κυτταρογενετικές αλλοιώσεις και κυτταρικό θάνατο στις ρίζες του *Allium cepa*.[1,6]

Περιορισμοί της αξιοποίησης φυτών του γένους *Inula*

Στο γένος *Inula* αναφέρονται ότι ανήκουν περισσότερα από 590 φυτά, ωστόσο μόνο 112 από αυτά έχουν αποδεκτή ονομασία στην βάση δεδομένων της λίστας των φυτών (*The Plant List database*). Αυτό δημιουργεί σύγχυση καθώς διάφορες έρευνες μπορεί να αναφέρονται στο ίδιο φυτό του γένους με διαφορετική ονομασία. Πέρα από την ονομασία, μερικές φορές παραλείπεται και το μέρος του φυτού από το οποίο εκχυλίστηκαν οι εκάστοτε ουσίες, το οποίο αποτελεί μία ακόμα ασάφεια.

Όσο αφορά το επίπεδο για την αξιοποίηση τους ως δραστικές ενώσεις σε φάρμακα, είναι απαραίτητος ο φαρμακοκινητικός τους έλεγχος, καθώς λόγω κατανομής και μεταβολισμού στον οργανισμό η *in vitro* αποτελεσματικότητα δεν εγγυάται την *in vivo* αποτελεσματικότητα. Αν και οι λακτόνες σεσκιτερπενίου αποτελούν υποσχόμενες ενώσεις για φάρμακα, κάποιες από αυτές παρουσιάζουν χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα, διότι έχουν περιορισμένη διαλυτότητα και διαπερατότητα, αλλά και υψηλή συγγένεια για τις πρωτεΐνες του πλάσματος.[1,6]

Inula Helenium

Το φυτό *Inula helenium* ή αλλιώς *elecampane* ανήκει στο γένος *Inula*. Πρόκειται για ένα ποώδες πολυετές φυτό, ιθαγενές στη δυτική και κεντρική Ασία, ωστόσο εντοπίζεται σε όλη την Ευρώπη και στην Βρετανία από την Εποχή του Χαλκού. Σημαντικό χαρακτηριστικό του είναι η υψηλή αντιοξειδωτική του δράση λόγω της πληθώρας των φλαβονοειδών που περιέχει, και κυρίως την ισοκερκιτρίνη.[2,8]

Χαρακτηριστικά του *Inula Helenium*

Το στέλεχος του φυτού *Inula helenium* είναι όρθιο, άκαμπτο και τριχωτό, φτάνει σε ύψος έως και τα 2.5 μέτρα. Στο στέλεχος προεκβάλλονται ωοειδή φύλλα χωρίς μίσχο, αλλά και βασικά φύλλα με μίσχο τα οποία μπορεί να έχουν μεγάλο μέγεθος με προεξέχοντα μεσαία φύλλα. Τα λουλούδια στην κορυφή του στελέχους έχουν κίτρινο χρώμα και σχηματίζουν χαλαρές συστάδες. Πρόκειται για ένα ανθεκτικό στο κρύο φυτό με βαθιές ρίζες στο έδαφος και ευδοκιμεί σε ορεινές περιοχές.[9,10]

Εικόνα 12: *Inula helenium, elecampane*

Καλλιέργεια

Η ανθοφορία του *Inula helenium* γίνεται κατά τους μήνες Ιούνιο με Οκτώβριο. Η ρίζα του φυτού έχει εξογκώματα, τα οποία επιτρέπουν στην απόσπαση τμήματος της και στην απευθείας φύτευση του. Αυτό καθιστά την διάδοση του πιο αποτελεσματική και δεν απαιτείται η σπορά του. Η ανάπτυξη του ευνοείται σε ύψη 1500-3000 μέτρα, καθώς έχει χαμηλές απαιτήσεις για τροφή και αυτό το καθιστά καλλιεργήσιμο τόσο σε καλλιεργημένες περιοχές όσο και σε ακαλλιέργητες.

Το *Inula helenium* αποτελεί αντικείμενο μελέτης, και μία από τις έρευνες που διεξήχθη είναι η επίδραση του ύψους του υπολειπόμενου στελέχους στην ανάπτυξη και αποδοτικότητα αξιοποίησης του νερού. Κατά την περίοδο της ανάπτυξης του φυτού, το φυτό κόπηκε ώστε το εναπομένον στέλεχος να έχει διάφορα ύψη. Αυτή η έρευνα απέδειξε ότι όταν το εναπομένον στέλεχος έχει ύψος 25 εκατοστά, τότε καταναλώνει την μικρότερη ποσότητα νερού, η ρίζα του έχει την καλύτερη μορφή (μήκος, διάμετρος και ξηρό βάρος ρίζας ανά φυτό) και τέλος έχει την υψηλότερη περιεκτικότητα σε αλαντολακτόνη. Επομένως, με αυτή τη μέθοδο ενισχύεται η ποιότητα του φυτού. [9,10]

Βιοκατανομή ανά τον κόσμο

Το *Inula helenium* συναντάται κυρίως στη Βόρεια Αμερική, ενώ ευδοκιμεί και στην ανατολική Ασία και στην Ευρώπη. Ωστόσο, σύμφωνα με έκθεση της *IUCN* (Διεθνής ένωση προστασίας της φύσης), η ποσότητα αυτού του φυτού στην ανατολική Ευρώπη είναι αισθητά μειωμένη λόγω της συλλογής του για ιατρικούς σκοπούς.[7,8]

Προέλευση του ονόματος

Στις αρχές του 5ου αιώνα ,το φυτό *Inula helenium* ήταν γνωστό ως *Inula campana,* όπου στα λατινικά *inula/enula* είναι το λουλούδι και *campana* το χωράφι. Κατά τον μεσαίωνα αναφέροταν ως *Enula* και *Elecampana*. Σύμφωνα με άλλες πηγές, φημίζεται ότι το όνομα *Inula hellenium* (*elecampane*) προέρχεται από την Ελένη της Τροίας κατά την αρπαγή της από τον Πάρη και οι δύο εκδοχές είναι ότι είτε στο σημείο που έπεσαν τα δάκρυα της άνθισε το συγκεκριμένο φυτό είτε το κρατούσε μαζί της κατά την αρπαγή της.[14,15,16]

Διαχρονικές χρήσεις

Σύμφωνα με την παραδοσιακή ιατρική, η ρίζα του *Inula helenium* μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αντιμετώπιση διαφόρων παθήσεων, οι οποίες αφορούν το αναπνευστικό σύστημα (βρογχίτιδα, φυματίωση),το γαστρεντερικό σύστημα (έμετος, διάρροια, κοιλιακό άλγος), παθήσεις του κυκλοφορικού συστήματος, πεπτικές διαταραχές, καθώς και μολυσματικές ή παρασιτικές ασθένειες.

Η χρήση των ριζών γίνεται είτε εξωτερικά για την αντιμετώπιση τραυματισμών, δερματικών παθήσεων και ρευματικού πόνου είτε πόσιμο ως αφέψημα για την ενίσχυση του πεπτικού και αναπνευστικού συστήματος. Επίσης, σύμφωνα με τον Διοσκουρίδη και τον Πλίνιο, το *Inula helenium* ενισχύει την ροή των ούρων και της εμμήνου ρύσεως, καταπραΰνει τον πόνο στο ισχίο. Ο Πλίνιος πρότεινε την χρήση της ρίζας σε ένα αρωματικό κρασί ως καταπραϋντικό για τον βήχα, ενώ ο Διοσκουρίδης πρότεινε μουσκεμένο κρασί με το *Inula helenium* για το στομάχι. Ευρεία χρήση αυτών των ριζών γίνεται στην Κίνα ως θεραπεία στην διάρροια, στον πυρετό, στη δυσπεψία και στην χρόνια εντερογαστρίτιδα.[8,9]

Πειραματικό Μέρος

Γενικές Μέθοδοι

Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (T.L.C.)

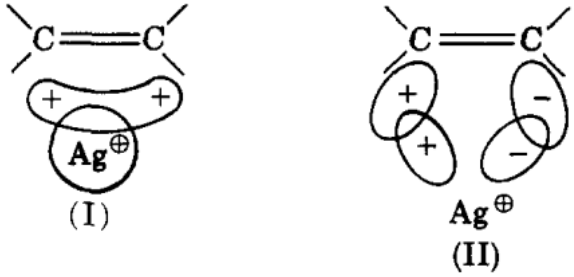
- Γέλη οξειδίου του πυριτίου σε φύλλα αλουμινίου (20 × 20 cm), επικαλυμμένη με δείκτη φθορισμού F254. Πάχος στιβάδας 0.1 mm (Kieselgel 60 F254, Merck, Art. 105554)
- Γέλη οξειδίου του πυριτίου σε γυάλινες πλάκες (20 × 20 cm), επικαλυμμένη με δείκτη φθορισμού F254 και με μέση διάμετρο πόρων 60 Å (Sigma – Aldrich, Art . 99571- 25EA).

Τα πλακίδια με την γέλη αναπτύσσονται σε σύστημα διαλυτών πετρελαικού αιθέρα (PE): οξικού αιθυλεστέρα (EA) 5:1. Στη συνέχεια, τοποθετούνται σε λάμπα UV στα 254nm και 365nmγια να ελέγχονται ως προς την εμφάνιση κηλίδων λόγω των ενώσεων. Τα γυάλινα πλακίδια βάφονται με διάλυμα φωσφομολυβδαινικού οξέος.[18] Τα αλουμινένια πλακίδια εμβαπτίζονται σε διάλυμα θειικής βανιλίνης, το οποίο παρασκευάζεται κάθε φορά πριν την χρήση με την ανάμειξη ίσων ποσοτήτων διαλυμάτων Α και Β τα οποία φυλάσσονται στο ψυγείο, όπου διάλυμα Α: βανιλίνη 5% διαλυμένη σε μεθανόλη και διάλυμα Β: πυκνό H_2SO_4 διαλυμένο σε μεθανόλη. Τέλος, τα πλακίδια και των δύο ειδών θερμαίνονται σε θερμαντική πλάκα, στους 100ºC έως ότου εμφανιστούν οι κηλίδες χρωματισμένες ανάλογα με την ουσία που εμφανίζεται.

Χρωματογραφία στήλης (C.C.)

- Γέλη οξειδίου του πυριτίου, υψηλής καθαρότητας, μέγεθος πόρων 60 Å, μέγεθος σωματιδίων 35-75 μm, 220-440 *mesh*, για *Flash* χρωματογραφία στήλης (*Merck, Art.* 9385)
- Γέλη οξειδίου του αργιλίου, βασική, μέγεθος πόρων 58 Å, επιφάνειας 155 m^2/g, 150 *mesh*, εμποτισμένη με νιτρικό άργυρο 12%.

Στην χρωματογραφία με νιτρικό άργυρο, η *Alumina* (Al_2O_3) συζευγνύεται με άργυρο (Ag^+) . Αυτό γίνεται με την δημιουργία ενός αντιστρεπτού συμπλόκου μεταφοράς φορτίου ανάμεσα σε κάποιον ολεφινικό δεσμό και ενός ιόντος αργύρου. Ειδικότερα, σχηματίζεται ένας σ δεσμός μεταξύ των ηλεκτρονίων στα δεσμικά π_{2p} τροχιακά του διπλού δεσμού με τα μη κατειλημμένα τροχιακά 5*s* και 5*p* του Ag^+(I) και ένας π δεσμός επαναφοράς ανάμεσα στα κατειλημμένα 4*d* τροχιακά του Ag^+ και στα μη κατειλημμένα αντιδεσμικά π^*_{2p} τροχιακά του διπλού δεσμού (II). Η ισχύς των σχηματιζόμενων αντιστρεπτών συμπλόκων εξαρτάται από την διαθεσιμότητα των ηλεκτρονίων στα κατειλημμένα τροχιακά και από την δυνατότητα στερεοχημικής επικαλύψης των τροχιακών . Έτσι, σε αυτού του είδους την στήλη πραγματοποιείται διαχωρισμός των ενώσεων με ολεφινικό δεσμό και κλασματοποίηση αυτών σύμφωνα με τον αριθμό των διπλών δεσμών, την γεωμετρία τους και την θέση τους.[17,18]



Εικόνα 13: οι δεσμοί (I) και (II) που σχηματίζονται μεταξύ ολεφινικού δεσμού και ιόντων αργύρου

Ειδικότερα, ο εξωτερικός διπλός δεσμός στους C_4-C_{15} της ισοαλαντολακτόνης είναι στερεοχημικά πιο προσβάσιμος για προσβολή από αυτόν στους C_5-C_6 στην αλαντολακτόνη, με αποτέλεσμα η ισοαλαντολακτόνη να δεσμεύεται πιο ισχυρά στην στήλη. Με την έκλουση αυτών των ενώσεων με το κατάλληλο σύστημα διαλυτών, η αλαντολακτόνη εκλούεται πρώτη από την στήλη και στην συνέχεια εκλούεται η ισχυρότερα δεσμευμένη ισοαλαντολακτόνη.

Για την δημιουργία στήλης με $AgNO_3$ πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι τα 40g $AgNO_3$ απαιτούν για την διάλυση τους 20ml νερό και 350ml MeOH. Αυτό το μίγμα προστίθεται στο πληρωτικό υλικό, στην συγκεκριμένη περίπτωση στην Alumina (Al_2O_3) και στην συνέχεια για την σύζευξη πρέπει να τοποθετηθεί σε φούρνο στους 90° C περίπου για μία μέρα.

Φασματοσκοπικές Μέθοδοι

Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

Για την λήψη των φασμάτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού χρησιμοποιήθηκε το φασματόμετρο Brucker FT-NMR AMX 500,όπου το ^1H συντονίζεται στα 300 MHz ενώ ο ^{13}C στα 125 MHz. Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις ομοπυρηνικής σχάσης ^1H και ^{13}C και ετεροπυρηνικής σχάσης HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence), COSY (Correlation Spectroscopy) και HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)

Αέρια Χρωματογραφία –Φασματομετρία Μάζας (GC-MS)

Για την μελέτη και ταυτοποίηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε αέριος χρωματογράφος τύπου Shimadzu Nexis GC-2030 , ο οποίος διαθέτει τριχοειδή στήλη MEGA-5 HT (30m × 0.25 mm διάμετρο × 0.25 πάχος) και είναι συζευγμένος με φασματόμετρο μάζας Shimadzu GCMS-QP 2020NX . Τα χρωματογραφήματα που λήφθηκαν επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα GCMS solution της εταιρίας Shimadzu, και οι ενώσεις ταυτοποιήθηκαν με βάση τα φάσματα μάζας τους τα οποία συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα της βιβλιογραφίας,

Γεωγραφική Περιοχή Μελέτης

Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν ρίζες του φυτού *Inula Helenium*(Elecampane root) σέρβικης προέλευσης αγορασμένο από την εταιρεία

Dictamus, Genuine Cretan Herbs. Οι ρίζες βρίσκονται σε μορφή αποξηραμένη και τεμαχισμένη.

Εκχύλιση των συστατικών από το φυτό

Η ποσότητα της ρίζας που εκχυλίστηκε ζυγίστηκε σε ζυγό 2 δεκαδικών ψηφίων και προσδιορίστηκε στα 242.00g. Στη συνέχεια, η αυτή η ποσότητα κονιορτοποιήθηκε σε μπλέντερ, ώστε να αποκτήσει όσο το δυνατόν γίνεται μορφή σκόνης. Η ρίζα εισήχθη σε κωνική φιάλη μαζί με τον πρώτο διαλύτη εκχύλισης, την μεθανόλη (MeOH), σε αναλογία ρίζα(g) : MeOH 1:2.5, επομένως προστέθηκαν 606 ml MeOH. Η κωνική φιάλη υπό κλειστό στόμιο αφέθηκε υπό ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα σε θερμοκρασία δωματίου για 2 μέρες.

Μετά από 2 μέρες, το εκχύλισμα διηθήθηκε σε χωνί Buchner με διπλό χάρτινο ηθμό και στη συνέχεια επαναδιηθήθηκε και με χωνί Duran, ώστε το πορτοκαλί χρώματος διήθημα να είναι όσο το δυνατόν πιο διαυγές. Το διήθημα αυτό εισάγεται σε σφαιρική φιάλη και τοποθετείται σε περιστροφικό εξατμιστήρα (rotary evaporator) στους 33°C για συμπύκνωση έως ότου απομακρυνθεί πλήρως η MeOH. Το μεθανολικό εκχύλισμα συλλέγεται και αποθηκεύεται.

Στη συνέχεια, το συμπυκνωμένο μεθανολικό διήθημα εκχυλίζεται σε διαλύτη εξάνιο (C_6H_{14}) ίδιας ποσότητας με αυτήν του διαλύτη MeOH που χρησιμοποιήθηκε, δηλαδή 606 ml, σε κωνική φιάλη με κλειστό στόμιο, υπό ανάδευση με μαγνήτη σε θερμοκρασία δωματίου για 2 μέρες.

Μετά από 2 μέρες, το εκχύλισμα αυτό απομονώθηκε πραγματοποιώντας με τον ίδιο τρόπο διήθηση και συμπύκνωση. Αυτό το διήθημα αποτελεί το εκχύλισμα του εξανίου, ενώ το ίζημα που παραμένει στην φιάλη είναι το εκχύλισμα μεθανόλης, κολλώδες με πορτοκαλοκαφέ χρώμα. Το διήθημα εξανίου συμπυκνώνεται στους 33°C στον περιστροφικό εξατμιστήρα.

Συνολικά συλλέχθηκαν από τα 242.00g ρίζας 18.00g εκχύλισμα μεθανόλης ΙΗΜ (ή ΙΜ) και 7.42g εκχύλισμα εξανίου ΙΗΜΗ (ή ΙΗ).

Χρωματογραφικός Διαχωρισμός Εκχυλίσματος

Οι ζητούμενες προς απομόνωση ενώσεις αλαντολακτόνη και ισοαλαντολακτόνη είναι ενδιάμεσης πολικότητας ενώσεις, επομένως χρειάζεται να απομακρυνθούν οι υψηλής και χαμηλής πολικότητας ενώσεις στο εκχύλισμα εξανίου, στο οποίο έχουν κατανεμηθεί, και να πραγματοποιηθεί διαχωρισμός στο εναπομένων εκχύλισμα.

Σύμφωνα με την ανάλυση χρωματογραφίας λεπτής στιβάδος T.L.C. επί γέλης πυριτίου επιστρωμένης σε πλάκα αλουμινίου που είχε πραγματοποιηθεί στο εργαστήριο διαπιστώθηκε ότι οι υπό μελέτη ενώσεις σε σύστημα PE: EA διαχωρίζονται καλύτερα.

1.Πραγματοποίηση χρωματογραφίας στήλης στο δείγμα ΙΗ ποσότητας 4.22g.

Για τον διαχωρισμό των ενώσεων πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης με διαστάσεις 8cm× 7.5cm, πληρωτικό υλικό SiO_2 (Silica) με υγρή μέθοδο πλήρωσης με PE : EA 9:1. Στην κολώνα πραγματοποιείται βαθμιδωτή έκλουση με συστήματα διαλυτών PE, EA και MeOH. Συλλέχθηκαν 120 κλάσματα μέσου όγκου 5 ml σε δοκιμαστικούς σωλήνες κατά την έκλουση με τα διάφορα συστήματα διαλυτών PE:EA. Τα κλάσματα αυτά ομαδοποιήθηκαν με βάση τα αποτελέσματα από την ανάπτυξη τους σε χρωματογραφία λεπτής στιβάδος T.L.C. επί γέλης πυριτίου επιστρωμένης σε πλάκα αλουμινίου σε σύστημα PE:EA 5:1.

Προέκυψαν οι εξής ομάδες:

Ομάδα	Σύστημα Διαλυτών	Βάρος
IH-A	PE:EA 85:15 PE:EA 80:20	41mg
IH-B	PE:EA 80:20 PE:EA 70:30	80mg
IH-C	PE:EA 70:30 PE:EA 65:35 PE:EA 60:40	3.97g
IH-D	PE:EA 60:40 PE:EA 50:50	19mg
IH-E	EA 100%	31mg
IH-F	MeOH 100%	32mg

Με βάση την ανάπτυξη των κλασμάτων σε χρωματογραφία λεπτής στιβάδος T.L.C. επί γέλης πυριτίου επιστρωμένης σε πλάκα αλουμινίου και γνωρίζοντας τον παράγοντα κατακράτησης R_f της αλαντολακτόνης και της ισοαλαντολακτόνης, αυτές οι ενώσεις βρίσκονται στην ομάδα IH-C.

2.Πραγματοποίηση χρωματογραφίας στήλης στο δείγμα IH-C ποσότητας 3.97g.

Για τον διαχωρισμό των ενώσεων πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης με διαστάσεις 7.2cm× 5.0cm, πληρωτικό υλικό SiO_2 (Silica) με υγρή μέθοδο πλήρωσης με PE : EA 9:1. Στην κολώνα πραγματοποιείται βαθμιδωτή έκλουση με συστήματα διαλυτών PE, EA και MeOH. Συλλέχθηκαν 107 κλάσματα μέσου όγκου 3 ml σε δοκιμαστικούς σωλήνες κατά την έκλουση με τα διάφορα συστήματα διαλυτών PE:EA. Τα κλάσματα αυτά ομαδοποιήθηκαν με βάση τα αποτελέσματα από την ανάπτυξη τους σε χρωματογραφία λεπτής στιβάδος T.L.C. επί γέλης πυριτίου επιστρωμένης σε πλάκα αλουμινίου σε σύστημα PE:EA 5:1 και λήψη φασμάτων GC-MS σε επιλεγμένα κλάσματα.

Ομάδα	Σύστημα Διαλυτών	Βάρος
IH-CA	PE:EA 9:1	58mg
IH-CB	PE:EA 9:1 PE:EA 5:1	2.094g
IH-CC	PE:EA5:1	530mg
IH-CD	PE:EA 50:50	230mg
IH-CE	EA 100%	186mg

Με βάση την ανάπτυξη των κλασμάτων σε χρωματογραφία λεπτής στιβάδος T.L.C. επί γέλης πυριτίου επιστρωμένης σε πλάκα αλουμινίου και γνωρίζοντας το παράγοντα κατακράτησης R_f της αλαντολακτόνης και της ισοαλαντολακτόνης, αυτές οι ενώσεις βρίσκονται στην ομάδα IH-CB.

3.Πραγματοποίηση χρωματογραφικής στήλης στο δείγμα IH-CB ποσότητας 2.094g.

Για τον διαχωρισμό των ενώσεων πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης με διαστάσεις 7.1cm× 4.5cm, πληρωτικό υλικό SiO_2 (Silica) με υγρή μέθοδο πλήρωσης με PE : EA 9:1. Στην κολώνα πραγματοποιείται βαθμιδωτή έκλουση με συστήματα διαλυτών PE, EA και MeOH. Συλλέχθηκαν 353 κλάσματα μέσου όγκου 1 ml σε δοκιμαστικούς σωλήνες κατά την έκλουση με τα διάφορα συστήματα διαλυτών PE:EA. Τα κλάσματα αυτά ομαδοποιήθηκαν με βάση τα αποτελέσματα από την ανάπτυξη τους σε χρωματογραφία λεπτής στιβάδος T.L.C. επί γέλης πυριτίου επιστρωμένης σε πλάκα αλουμινίου σε σύστημα PE:EA 5:1 και λήψη φασμάτων GC-MS σε επιλεγμένα κλάσματα.

Ομάδα	Σύστημα Διαλυτών	Βάρος
IH-CB(A)	PE:EA 7:1	173mg
IH-CB(B)	PE:EA 7:1	398mg
IH-CB(C)	PE:EA7:1 PE:EA5:1	1.175g
IH-CB(D)	PE:EA 5:1 PE:EA 75:25	231mg
IH-CB(E)	PE:EA 6:4	13mg

Με βάση την ανάπτυξη των κλασμάτων σε χρωματογραφία λεπτής στιβάδος T.L.C. επί γέλης πυριτίου επιστρωμένης σε πλάκα αλουμινίου και γνωρίζοντας το παράγοντα κατακράτησης R_f της αλαντολακτόνης και της ισοαλαντολακτόνης, αυτές οι ενώσεις βρίσκονται στην ομάδα IH-CB (C).

4.Πραγματοποίηση χρωματογραφίας στήλης από το δείγμα IH-CB(C) ποσότητας 203mg- δείγμα IH_1.

Σε αυτό το στάδιο, σύμφωνα με τα δείγματα από τα οποία λήφθηκαν φάσματα GC-MS από την κολώνα του δείγματος IH-(CB) προέκυψε ότι στην ομάδα IH-CB(C) υπάρχουν σε υψηλό ποσοστό οι ενώσεις αλαντολακτόνη και ισοαλαντολακτόνη. Επομένως, η συγκεκριμένη κολώνα που θα πραγματοποιηθεί θα περιέχει Alumina συζευγμένη με άργυρο (Ag^+) .

Για τον διαχωρισμό των ενώσεων πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης με διαστάσεις 7.1cm× 3.0cm, πληρωτικό υλικό Alumina (Al_2O_3) με 11.99% $AgNO_3$ με υγρή μέθοδο πλήρωσης με PE : EA 9:1. Στην κολώνα πραγματοποιείται βαθμιδωτή έκλουση με συστήματα διαλυτών PE, EA και MeOH. Συλλέχθηκαν 409 κλάσματα μέσου όγκου 1 ml σε δοκιμαστικούς σωλήνες κατά την έκλουση με τα διάφορα συστήματα διαλυτών PE:EA. Τα κλάσματα αυτά ομαδοποιήθηκαν με βάση τα αποτελέσματα από την ανάπτυξη τους σε χρωματογραφία λεπτής στιβάδος T.L.C. επί γέλης πυριτίου επιστρωμένης σε πλάκα αλουμινίου σε σύστημα PE:EA 5:1 και λήψη φασμάτων GC-MS σε επιλεγμένα κλάσματα.

Ομάδα	Σύστημα Διαλυτών	Βάρος
IH1-A	PE:EA 7:1 PE:EA 5:1	21mg
IH1-B	PE:EA 7:1	8mg
IH1-C	**PE:EA5:1**	**60mg**
IH1-D	PE:EA 5:1- 7:3	<1mg
IH1-E	PE:EA7:3	<1mg
IH1-F	PE:EA 7:3	7mg
IH1-G	**PE:EA 7:3**	**77mg**
IH1-H	PE:EA 7:3	9mg
IH1-I	100% EA	12mg
IH1-J	100% MeOH	3mg

5.Πραγματοποίηση χρωματογραφικής στήλης στο δείγμα HEH-F ποσότητας 154mg.

Στο συγκεκριμένο δείγμα, σύμφωνα με φάσματα GC-MS που λήφθηκαν, διαπιστώθηκε ότι σε αυτό βρίσκονται σε υψηλό ποσοστό οι ενώσεις αλαντολακτόνη και ισοαλαντολακτόνη. Επομένως, η συγκεκριμένη κολώνα που θα πραγματοποιηθεί θα περιέχει Alumina συζευγμένη με άργυρο (Ag^+) .

Για τον διαχωρισμό των ενώσεων πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης με διαστάσεις 7.0cm× 3.0cm, πληρωτικό υλικό Alumina (Al_2O_3) με 10.00% $AgNO_3$ με

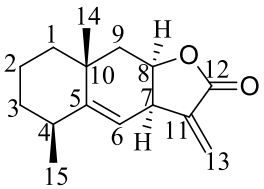
υγρή μέθοδο πλήρωσης με PE : EA 9:1. Στην κολώνα πραγματοποιείται βαθμιδωτή έκλουση με συστήματα διαλυτών PE και EA. Συλλέχθηκαν 268 κλάσματα μέσου όγκου 1 ml σε δοκιμαστικούς σωλήνες κατά την έκλουση με τα διάφορα συστήματα διαλυτών PE:EA. Τα κλάσματα αυτά ομαδοποιήθηκαν με βάση τα αποτελέσματα από την ανάπτυξη τους σε χρωματογραφία λεπτής στιβάδος T.L.C. επί γέλης πυριτίου επιστρωμένης σε πλάκα αλουμινίου σε σύστημα PE:EA 5:1 και λήψη φασμάτων GC-MS σε επιλεγμένα κλάσματα.

Ομάδα	Σύστημα Διαλυτών	Βάρος
HEH-FA	PE:EA 5:1	4mg
HEH-FB	PE:EA 5:1	14mg
HEH-FC	**PE:EA 5:1**	**1mg**
HEH-FD	PE:EA 5:1	29mg
HEH-FE	PE:EA 5:1	6mg
HEH-FF	PE:EA 5:1	22mg
HEH-FG	PE:EA 5:1	16mg
HEH-FH	PE:EA 5:1	6mg
HEH-FI	100% EA	27g

Αποτελέσματα

Ταυτοποίηση απομονωμένων ενώσεων

Ο πρώτος δευτερογενής μεταβολίτης που απομονώθηκε από το *Inula helenium* είναι ο 8-hydroxyl-eudesma-5,11(13)-dien-12-oic acid-lactone, ο οποίος είναι γνωστός με την ονομασία αλαντολακτόνη. Η αλαντολακτόνη είναι μία σεσκιτερπενική λακτόνη και πιο συγκεκριμένα ένα ευδεσμανολίδιο. Η δομή της αποτελείται από ένα τρικυκλικό σεσκιτερπένιο που έχει προκύψει από τρεις μονάδες ισοπρενίου, στις θέσεις 4 και 10 από μία εξωκυκλική μέθυλο-ομάδα, μεταξύ των θέσεων 5 και 6 υπάρχει ένας ολεφινικός δεσμός και τέλος στις θέσεις 11,12 και 13 σχηματίζεται μία α-μεθύλενο-γ-λακτόνη.



Σύμφωνα με τα φάσματα NMR η αλαντολακτόνη ταυτοποιείται ως εξής:

Τα δύο υδρογόνα στην θέση 13 στο φάσμα ^{1}H εντοπίζονται στα 6.19ppm (H-13α) ως μία διπλή κορυφή (d) και στα 5.61ppm (H-13β) ως μία διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης λόγω της δίδυμης σχάσης (germinal coupling) $^{2}J_{H\text{-}13\alpha/H\text{-}13\beta}$ =1.77Hz. Τόσο στο φάσμα COSY όσο και στο HMBC επιβεβαιώνεται η αλληλεπίδραση τους μόνο με το H-7.

Το H-7 εντοπίζεται στα 3.57ppm ως μία πολλαπλή κορυφή (m) λόγω της αλληλεπικάλυψης των κορυφών που προκύπτουν από τις διάφορες αλληλεπιδράσεις. Η πολλαπλότητα αυτή επιβεβαιώνεται από το φάσμα COSY, καθώς το H-7 αλληλεπιδρά με τα H-13 και H-6 (δ=5.14ppm) και H-8 (δ=4.81ppm), ενώ οι αλληλεπιδράσεις με τα H-13 και H-6 επιβεβαιώνεται και από το φάσμα HMBC. Επίσης, στο φάσμα HMBC δίνεται ότι το H-7 αλληλεπιδρά με τους C-11(δ_c=139.83ppm), C-12(δ_c=170.42ppm) και C-13(δ_c=121.62pm), επομένως η λακτόνη συνδέεται στον δακτύλιο του κυκλοεξενίου μέσω του C-7. Επιπλέον, σύμφωνα με το HMBC τα H-13 αλληλεπιδρούν με τους C-11 και C-12 και έτσι επιβεβαιώνεται η σύνδεση της μεθύλενο-ομάδας στον C-11.

Το H-8 παρατηρείται στα 4.81ppm ως μία κορυφή διπλή της τριπλής (dt). Η διπλή σχάση οφείλεται στην αλληλεπίδραση με το H-7 με $^{3}J_{H\text{-}8/H\text{-}7}$ =6.41Hz, ενώ η τριπλή σχάση οφείλεται στην αλληλεπίδραση με τα 2 διαστερεοτοπικά H-9 με $^{3}J_{H\text{-}8/H\text{-}9}$ =3.20Hz, σχάσεις που επιβεβαιώνονται και από το φάσμα COSY. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις επιβεβαιώνουν ότι ο C-8 αποτελεί το δεύτερο σημείο σύνδεσης της λακτόνης με τον δακτύλιο του κυκλοεξενίου.

Τα δύο διαστερεοτοπικά H-9 εμφανίζονται στα 2.10ppm (H-9α) και στα 1.52ppm (H-9β). Το H-9α είναι μία κορυφή διπλή της διπλής (dd) λόγω της δίδυμης

αλληλεπίδρασης με το H-9β με $^{2}J_{H\text{-}9\alpha/H\text{-}9\beta}$ =14.95Hz και αυτής με το H-8 με $^{3}J_{H\text{-}9\alpha/H\text{-}8}$ =2.75Hz, οι οποίες επιβεβαιώνονται και από το φάσμα COSY. Το H-9β εμφανίζει πολλαπλή κορυφή (m) λόγω των αλληλεπιδράσεων με τα H-8 και H-9α που επιβεβαιώνονται από το φάσμα COSY.

Το H-6 παρατηρείται στα 5.14ppm ως μία διπλή κορυφή λόγω της αλληλεπίδρασης με το H-7 με $^{3}J_{H6\text{-}H7}$ =4.00Hz, η οποία επιβεβαιώνεται από το COSY.

Τα τρία H-14 εμφανίζονται στα 1.19ppm ως μία απλή κορυφή (s) και σύμφωνα με το φάσματα COSY αλληλεπιδρούν με τους C-1(δ_c=41.71ppm), C-2(δ_c=32.70ppm) και C-3(δ_c=16.73ppm), ενώ στο HMBC παρατηρείται η αλληλεπίδραση τους με τους C-5(δ_c=149.10ppm), C-9(δ_c=42.65ppm), C-1, C-4(δ_c=37.58ppm) και τον C-2, επομένως η μέθυλο-ομάδα στον C-14 συνδέεται στον C-10(δ_c=32.65ppm), ο οποίος αποτελεί το κοινό σημείο στους δύο δακτυλίους 6 ατόμων, καθώς σύμφωνα με το HMBC αλληλεπιδρά με τα H-6, H-8, H-9, H-4, H-2, H-1 και H-14.

Ο C-5 σύμφωνα με το HMBC αλληλεπιδρά με τα H-7, H-4, H-14, H-15, H-9 και H-1, επομένως αποτελεί το δεύτερο σημείο σύνδεσης μεταξύ των δακτυλίων 6 ατόμων.

Τα τρία H-15 εντοπίζονται στα 1.09ppm ως μία διπλή κορυφή η οποία οφείλεται στην αλληλεπίδραση με το H-4 με σταθερά σύζευξης $^{3}J_{H15/H3}$ =7.58Hz, αλληλεπίδραση που επιβεβαιώνεται και από το φάσμα COSY. Ακόμα, σύμφωνα με το φάσμα HMBC τα H-14 αλληλεπιδρούν με τους C-2, C-3, C-4, C-5 και C-14, αυτό επιβεβαιώνει την σύνδεση της μέθυλο-ομάδας του C-15 με τον C-4.

Το H-4 εμφανίζεται στα 2.45ppm ως μία πολλαπλή κορυφή (m), καθώς σύμφωνα με το COSY αλληλεπιδρά με τα H-2 και H-15.

Τα δύο διαστερεοτοπικά H-3 εμφανίζονται στα 1.43ppm (H-3α) και 1.81ppm (H-3β) ως πολλαπλές (m) κορυφές οφειλόμενες σε αλληλεπιδράσεις δίδυμης σχάσης, αλλά και με τα H-1, H-2 και H-15 σύμφωνα με το φάσμα COSY.

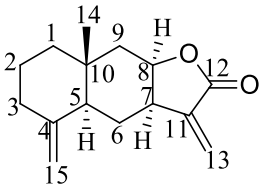
Τα δύο H-2 βρίσκονται στην περιοχή χημικών μετατοπίσεων 1.52-1.60 χωρίς να είναι εύκολος ο ακριβής προσδιορισμός της μετατόπισης τους λόγω της ευρείας πολλαπλής κορυφής τους. Τα φάσματα COSY και HMBC επιβεβαιώνουν ότι είναι τα H-2 λόγω αλληλεπιδράσεων με τα H-1, H-3, H-4 και H-14.

Τέλος ,τα δύο διαστερεοτοπικά H-1 παρατηρούνται στα 1.13ppm (H-1α) και 1.52-1.60ppm (H-1β). Το H-1α εμφανίζεται ως μία διπλή της διπλής κορυφή (dd) λόγω αλληλεπιδράσεων με το H-1β με $^{2}J_{H\text{-}1\alpha/H\text{-}1\beta}$ =14.95Hz και με τα H-2 με $^{3}J_{H1\beta/H2}$ =3.60Hz, ενώ το H-1β ως μία πολλαπλή κορυφή. Στο H-1β δεν είναι δυνατό να προσδιοριστεί με ακρίβεια η χημική του μετατόπιση λόγω αλληλεπικάλυψης των κορυφών, ωστόσο επιβεβαιώνεται από το φάσμα COSY καθώς αλληλεπιδρά με τα H-1α, H-2, H-3 και H-14.[21,22,23]

#	^{13}C (ppm)	HSQC	^{1}H (ppm)	Πολλαπλότητα, J(Hz)	COSY	HMBC
1	41.71	H-1α	1.13(1H)	dd,J_1=14.95,J_2=3.60	H-1β/H-2/H-14/H-3	H-2/H-14
		H-1β	1.52-1.60(1H)	m	H-1α/H-2/H-14/H-3	
2	32.70	H-2	1.52-1.60(2H)	m	H-3/H-4/H-14/H-1	H-4/H-3/H-1/H-14/H-15
3	16.73	H-3α	1.43(1H)	m	H-3β/H-15/H-1/H-2	H-4/H-15/H-2/H-1
		H-3β	1.81(1H)	m	H-3α/H-15/H-1/H-2	
4	37.58	H-4	2.45(1H)	m	H-15/H-2	H-6/H-1/H-2/H-14/H-15
5	149.10	H-5	-	-	-	H-7/H-4/H-14/H-15/H-9/H-1
6	118.76	H-6	5.14(1H)	d, J=4.00	H-7	H-13/H-8/H-7/H-4
7	39.48	H-7	3.57(1H)	m	H-13/H-6/H-8	H-13/H-9α/H-6
8	76.42	H-8	4.81(1H)	dt,J_1=6.41,J_2=3.20	H-7/H-9	H-6/H-9α
9	42.65	H-9α	2.10(1H)	dd, J_1=14.95,J_2=2.75	H-9β/H-8	H-14
		H-9β	1.52(1H)	m	H-9α/H-8	
10	32.65	H-10	-	-	-	H-6/H-8/H-9/H-4/H-2/H-1/H-14
11	139.83	H-11	-	-	-	H-13/H-6/H-7
12	170.42	H-12	-	-	-	H-13/H-7
13	121.62	H-13α	6.19(1H)	d, J=1.77	H-7	H-7
		H-13β	5.61(1H)	d, J=1.77	H-7	
14	28.55	H-14	1.19(3H)	s	H-1/H-2/H-3	H-9/H-2/H-1/H-15
15	22.52	H-15	1.09(3H)	d, J_1=7.58	H-4/H-3	H-4/H-2/H-6

Πίνακας 1: Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR (500MHz, $CDCl_3$) της αλαντολακτόνης.

Ο δεύτερος δευτερογενής μεταβολίτης που απομονώθηκε από το *Inula helenium* είναι το 5α,H-Eudesma-4(15),11(13)-dien-12,8β-olide ή αλλιώς ισοαλαντολακτόνη. Ομοίως με την αλαντολακτόνη, και η ισοαλαντολακτόνη είναι μία σεσκιτερπενική λακτόνη που ανήκει στην κατηγορία των ευδεσμανολιδίων. Η δομή της αποτελείται από ένα τρικυκλικό σεσκιτερπένιο που έχει προκύψει από τρεις μονάδες ισοπρενίου, στην θέση 4 υπάρχει μία εξωκυκλική μεθύλενο-ομάδα ενώ στη θέση 10 υπάρχει μία εξωκυκλική μέθυλο-ομάδα. Τέλος, στις θέσεις 11, 12 και 13 υπάρχει μία α-μεθύλενο-γ-λακτόνη.



Σύμφωνα με τα φάσματα NMR που λήφθηκαν:

Τα δύο μη ισοδύναμα υδρογόνα στη θέση 13 στο φάσμα ^{1}H εντοπίζονται στα 6.12ppm (H-13α) ως μία διπλή κορυφή (d) και στα 5.58ppm (H-13β) ως μία διπλή κορυφή (d), αυτές οι πολλαπλότητες οφείλονται στη μεταξύ τους δίδυμη σχάση με σταθερά σύζευξης $^{2}J_{H\text{-}13\alpha/H\text{-}13\beta}$ =0.98Hz. Αυτή η αλληλεπίδραση επιβεβαιώνεται και από το φάσμα COSY. Σύμφωνα με το φάσμα HMBC ,τα H-13 αλληλεπιδρούν με τους C-6(δ_c=27.46ppm), C-7(δ_c=40.52ppm), C-11(δ_c=142.21 ppm) και C-12(δ_c=170.59ppm) και ο C-13(δ_c=120.00ppm) αλληλεπιδρά μόνο με το H-7, έτσι επιβεβαιώνεται ότι ο C-13 ενώνεται με τον δακτύλιο της λακτόνης μέσω του C-11.

Το H-7 παρατηρείται στα 2.96ppm ως μία διπλή της διπλής της διπλής κορυφή (ddd) λόγω αλληλεπιδράσεων με τα H-8(4.49ppm) με $^{3}J_{H\text{-}7/H\text{-}8}$ =11.96Hz, H-6α(1.38ppm) με $^{3}J_{H\text{-}7/H\text{-}6\alpha}$ =6.54Hz και H-6β(1.73ppm) με $^{3}J_{H\text{-}7/H\text{-}6\beta}$ =5.47Hz, οι οποίες επιβεβαιώνονται και από το φάσμα COSY. Σύμφωνα με το φάσμα HMBC το H-7 αλληλεπιδρά με του C-12, C-13και C-8(δ_c=76.78ppm) και έτσι επιβεβαιώνεται η σύνδεση της λακτόνης με το κυκλοεξανικό δακτύλιο μέσω του C-7.

Το H-8 έχει κορυφή εμφανίζεται στα 4.49ppm ως τριπλή της διπλής κορυφή (td) λόγω αλληλεπιδράσεων με τα δύο H-9 με $^{3}J_{H\text{-}8/H\text{-}9}$ =4.94Hz και με το H-7 με $^{3}J_{H\text{-}8/H\text{-}7}$ =1.58Hz, οι οποίες επιβεβαιώνονται και από το φάσμα COSY. Σύμφωνα με το φάσμα HMBC ο C-8 αλληλεπιδρά με τα H-13, H-7, H-6($\delta_{H6\alpha}$= 1.38ppm και $\delta_{H6\beta}$= 1.73ppm) και H-9α(δ_H= 2.19ppm) και έτσι επιβεβαιώνεται ότι ο C-8 αποτελεί το δεύτερο σημείο σύνδεσης της λακτόνης με τον κυκλοεξανικό δακτύλιο.

Τα δύο διαστερεοτοπικά H-9 εμφανίζονται στα 2.19ppm (H-9α) και στα 1.49ppm (H-9β). Το H-9α σχηματίζει κορυφή διπλή της διπλής (dd) λόγω της δίδυμης σχάσης με το H-9β με $^{2}J_{H\text{-}9\alpha/H\text{-}9\beta}$ =15.60Hz και λόγω της αλληλεπίδρασης με το H-8 με $^{3}J_{H\text{-}9\alpha/H\text{-}8}$ =1.66Hz. Το H-9β ομοίως έχει διπλή της διπλής κορυφή (dd) λόγω της δίδυμης σχάσης με το H-9α και λόγω της αλληλεπίδρασης με το H-8 με $^{3}J_{H\text{-}9b/H\text{-}8}$=4.72Hz. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις επιβεβαιώνονται και με το φάσμα COSY.

Τα διαστερεοτοπικά Η-6 εμφανίζονται στα 1.38ppm (Η-6α) και στα 1.73ppm (Η-6β). Το Η-6α έχει μορφή κορυφής διπλή της τριπλής (dt) λόγω της δίδυμης σχάσης με το Η-6β με $^{2}J_{H-6\alpha/H-6\beta}$ =13.88Hz και λόγω της αλληλεπίδρασης με τα Η-7 και Η-5 ^{3}J =12.36Hz. Το Η-6β έχει διπλή της διπλής της διπλής κορυφή (ddd) λόγω της δίδυμης σχάσης $^{2}J_{H-6\alpha/H-6\beta}$ =13.99Hz και αλληλεπιδράσεων με τα Η-7 με $^{3}J_{H-6\beta/H-7}$= 7.08Hz και με το Η-5 με $^{3}J_{H-6\beta/H-7}$= 2.67Hz ,οι οποίες επιβεβαιώνονται από τα φάσματα COSY και HMBC αντίστοιχα.

Το Η-5 εμφανίζεται στα 1.84ppm ως διευρυμένη διπλή κορυφή (br d) και οφείλεται στην σχάση από το Η-6α με $^{3}JH_{-5/H-6\alpha}$= 12.65Hz, η οποία επιβεβαιώνεται από το COSY και το HMBC. Η κορυφή είναι διευρυμένη καθώς προκαλείται και σχάση από τα Η-15 ($\delta_{H15\alpha}$= 4.76ppm και $\delta_{H15\beta}$= 4.43ppm). Σύμφωνα με το άσμα HMBC το Η-5 αλληλεπιδρά με τους C-4 (δ_c=148.94ppm), C-15 (δ_c=106.59ppm), C-10 (δ_c=34.26ppm), C-6 και C-14 (δ_c=17.64ppm), επομένως ο C-5 αποτελεί το σημείο σύνδεσης των 2 κυκλοεξανικών δακτυλίων.

Τα τρία Η-14 εντοπίζονται στα 0.82ppm ως μία απλή κορυφή (s) , σύμφωνα με το φάσμα COSY τα Η-14 αλληλεπιδρούν μόνο με το Η-9β, ενώ σύμφωνα με το φάσμα HMBC τα Η-14 αλληλεπιδρούν με τους C-10, C-9(δ_c=41.36ppm), C-1(δ_c=42.18ppm) και C-15, επομένως η μέθυλο-ομάδα του C-14 συνδέεται στον C-10.

Τα διαστερεοτοπικά Η-15 εντοπίζονται στα 4.76ppm (Η-15α) και στα 4.43ppm(Η-15β) και έχουν τετραπλή (q) κορυφή, η δίδυμη σχάση τους έχει $^{2}J_{H-15\alpha/H15\beta}$ =1.52Hz. Σύμφωνα με το φάσμα COSY η πολλαπλότητα της κορυφής του Η-15α προκύπτει από αλληλεπιδράσεις με τα Η-15β, Η-5 και Η-3, ενώ στο Η-15β οφείλονται στην σχάση από τα Η-15α, Η-5, Η-3 και Η-6β. Επίσης, σύμφωνα με το HMBC ο C-15 αλληλεπιδρά μόνο με τα Η-3 και Η-5, άρα από αυτά προκύπτει ότι ο C-15 συνδέεται με τον κυκλοεξανικό δακτύλιο μέσω του C-4.

Τα δύο διαστερεοτοπικά Η-3 εμφανίζονται στα 2.00ppm (Η-3α) και 2.33ppm (Η-3β). Το Η-3α εμφανίζεται ως κορυφή τριπλή της διπλής (td) λόγω της δίδυμης σχάσης με το Η-3β με $^{2}J_{H-3\alpha/H-3\beta}$= 12.82Hz και της αλληλεπίδρασης με τα Η-2 με $^{3}J_{H-3\alpha/H-2}$ =5.81Hz. Το Η-3β εμφανίζεται ως πολλαπλή κορυφή (m) λόγω αλληλεπιδράσεων με τα Η-3α, Η-2 και Η-1β όπως επιβεβαιώνονται από το COSY.

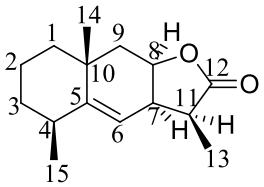
Τα δύο Η-2 βρίσκονται στην περιοχή χημικών μετατοπίσεων 1.55-1.58 χωρίς να είναι εύκολος ο ακριβής προσδιορισμός της μετατόπισης τους λόγω της αλληλεπικάλυψης των κορυφών. Τα φάσματα COSY και HMBC επιβεβαιώνουν ότι είναι τα Η-2 λόγω αλληλεπιδράσεων με τα Η-1 και Η-3.

Τέλος ,τα δύο διαστερεοτοπικά Η-1 παρατηρούνται στα 1.24(Η-1α) και στα 1.54ppm (Η-1β). Το Η-1α εμφανίζεται ως τριπλή της διπλής κορυφή (td) λόγω της δίδυμης σχάσης με το Η-1β με $^{2}J_{H-1\alpha/H-1\beta}$ =13.85Hz και λόγω αλληλεπίδρασης με το Η-2 με $^{3}J_{H-1\alpha/H-2}$ =12.40Hz, οι οποίες επιβεβαιώνονται από το COSY. Το Η-1β εμφανίζεται ως πολλαπλή κορυφή (m) λόγω αλληλεπιδράσεων με τα Η-1α και Η-2 σύμφωνα με το COSY.[21,22,23]

#	^{13}C (ppm)	HSQC	^{1}H (ppm)	Πολλαπλότητα, J(Hz)	COSY	HMBC
1	42.18	H-1α	1.24(1H)	td, J_1=13.85,J_2=12.40	H-1β/H-2	H-2/H-14/H-3/H-9β
		H-1β	1.54(1H)	m	H-1α/H-2	
2	22.67	H-2	1.55-1.58(2H)	m	H-1/H-3	H-3/H-15α/H-1α
3	36.80	H-3α	2.00(1H)	dt, J_1=12.82, J_2=5.47	H-3β/H-2/H-15	H-15/H-2/H-1
		H-3β	2.33(1H)	m	H-3α/H-2/H-1β	
4	148.94	H-4	-	-	-	H-15/H-3/H-5/H-2/H-6/H-9α
5	46.20	H-5	1.84(1H)	br.d, J_1=12.65	H-6α/H-15	H-15/H-3/H-6/H-2/H-14/H-9α
6	27.46	H-6α	1.38(1H)	dt, J_1=13.88, J_2=5.81	H-6β/H-7/H-5	H-8/H-7/H-5/H-13
		H-β	1.73(1H)	ddd, J_1=13.99, J_2=7.08, J_3=2.67	H-6α/H-7	
7	40.52	H-7	2.96(1H)	ddd, J_1=11.96, J_2=6.54, J_3=5.47	H-8/H-6/H-13	H-13/H-6/H-9α
8	76.78	H-8	4.49(1H)	td, J_1=4.94,J_2=1.58	H-7/H-9	H-13/H-7/H-6/H-9α
9	41.36	H-9α	2.19(1H)	dd, J_1=15.60, J_2=1.66	H-9β/H-8	H-1/H-14
		H-9β	1.49(1H)	dd, J_1=15.60, J_2=4.72	H-9α/H-8/H-14	
10	34.26	H-10	-	-	-	H-8/H-9/H-5/H-6/H-14/H-1
11	142.21	H-11	-	-	-	H-13/H-7/H-9α/H-6α
12	170.59	H-12	-	-	-	H-13/H-7
13	120.0	H-13α	6.12(1H)	d, J=0.98	H-13β/H-7	H-7
		H-13β	5.58(1H)	d, J=0.98	H-13α/H-7	
14	17.64	H-14	0.83(3H)	s	H-9β	H-9/H-5/H-1
15	106.59	H-15α	4.76(1H)	q, J=1.52	H-15β/H-5/H-3	H-3/H-5
		H-15β	4.43(1H)	q, J=1.52	H-15α/H-5/H-3/H-6β	

Πίνακας 2: Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR (500MHz, $CDCl_3$) της ισοαλαντολακτόνης.

Ο τρίτος δευτερογενής μεταβολίτης που απομονώθηκε από το *Inula helenium* είναι ο 8-beta-hydroxy-4-alpha H-Eudesm-5-en-12-oic acid gamma-lactone, γνωστός και ως δίυδρο-αλαντολακτόνη(**3**). Πρόκειται για μία ακόμα σεσκιτερπενική λακτόνη που ανήκει στην κατηγορία των ευδεσμανολιδίων. Η δομή της ομοιάζει εξαιρετικά με αυτή της αλαντολακτόνης, με μοναδική εξαίρεση την απώλεια του διπλού δεσμού μεταξύ των C-11 και C-13 και την ύπαρξη ενός επιπλέον υδρογόνου στον C-13, που τον μετατρέπει σε μέθυλο-ομάδα.



Σύμφωνα με τα φάσματα NMR που λήφθηκαν:

Τα H-13 εμφανίζονται στα 1.22ppm ως μία διπλή κορυφή (d) που προκύπτει λόγω αλληλεπιδράσεων με τα H-11 με σταθερά σύζευξης $^{3}J_{H\text{-}13/H\text{-}11}$= 7.31Hz όπως επιβεβαιώνεται και από το φάσμα COSY. Σύμφωνα με το φάσμα HMBC ο C-13 (δ_c=10.69ppm) αλληλεπιδρά μόνο με το H-11(δ_H=2.88ppm), ενώ τα H-13 αλληλεπιδρούν με τους C-12(δ_c=179.21ppm), C-7 (δ_c=38.77ppm) και C-11(δ_c=40.36ppm), επομένως αποδεικνύεται ότι ο C-13 συνδέεται στον δακτύλιο της λακτόνης μέσω της άμεσης σύνδεσης του με τον C-11.

Το H-11 εντοπίζεται στα 2.88ppm ως μία διπλή της τετραπλής κορυφή (dq) λόγω αλληλεπιδράσεων με τα H-7 με $^{3}J_{H\text{-}11/H\text{-}7}$=8.67Hz και με το H-13 με $^{3}J_{H\text{-}11/H\text{-}13}$= 7.31Hz, οι οποίες επιβεβαιώνονται και από το φάσμα COSY. Σύμφωνα με το φάσμα HMBC, το H-11 αλληλεπιδρά με τους C-12, C-7 και C-13.

Το H-7 εντοπίζεται 3.03ppm ως μία διπλή της διπλής της διπλής κορυφή (ddd) . Η πολλαπλότητα αυτή οφείλεται σε αλληλεπιδράσεις με το H-11 με $^{3}J_{H\text{-}7/H\text{-}11}$=8.78Hz, με το H-8 με $^{3}J_{H\text{-}7/H\text{-}8}$=5.63Hz και με το H-6 με $^{3}J_{H\text{-}7/H\text{-}6}$=3.25Hz, οι οποίες επιβεβαιώνονται και από το φάσμα COSY. Σύμφωνα με το HMBC, το H-7 αλληλεπιδρά με τους C-12, C-11, C-5(δ_c=150.64ppm) και C-6(δ_c=115.55ppm) και έτσι επιβεβαιώνεται η σύνδεση του δακτυλίου της λακτόνης με τον κυκλοεξενικό δακτύλιο μέσω του C-7.

Το H-8 εντοπίζεται στα 4.74ppm ως μία διπλή της τριπλής κορυφή (dt) που προκύπτει από αλληλεπιδράσεις με το H-7 με $^{3}J_{H\text{-}8.H\text{-}7}$=5.50Hz και από τα H-9 με $^{3}J_{H\text{-}8/H\text{-}9}$=2.75Hz, οι οποίες επιβεβαιώνονται και από το φάσμα COSY και από αυτό προκύπτει ότι ο C-8(δ_c=76.93ppm) αποτελεί το δεύτερο σημείο σύνδεσης του δακτυλίου της λακτόνης με τον κυκλοεξενικό δακτύλιο.

Τα διαστερεοτοπικά H-9 εντοπίζονται στα 2.11ppm(H-9α) και στα 1.52ppm(H-9β). Και τα δύο εμφανίζονται ως διπλή της διπλής κορυφής (dd). Στο H-9α η πολλαπλότητα οφείλεται λόγω της δίδυμης σχάσης με το H-9β και δίνεται $^{2}J_{H\text{-}9\alpha/H\text{-}}$

$_{9\beta}$=14.73Hz, ενώ με βάση την κορυφή του H-9β προσδιορίζεται ως $^{2}J_{H-9\alpha/H-9\beta}$=15.03Hz. Επίσης, η αλληλεπίδραση του H-8 προκαλεί σχάση στις κορυφές των H-9 με $^{3}J_{H-9\alpha/H-8}$=3.21Hz και $^{3}J_{H-9\beta/H-8}$=2.43Hz. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις επιβεβαιώνονται και από το φάσμα COSY.

Το H-6 εντοπίζεται στα 5.17ppm ως μία διπλή κορυφή (d) λόγω σχάσης από το H-7 με $^{3}J_{H-6/H-7}$= 3.30Hz, η οποία επιβεβαιώνεται και από το φάσμα COSY

Τα τρία H-14 εμφανίζονται στα 1.24ppm ως μία απλή κορυφή (s), καθώς από το φάσμα COSY δεν φαίνεται κάποια αλληλεπίδραση. . Σύμφωνα με το HMBC ο C-14(δ_c=28.72ppm) αλληλεπιδρά μόνο με τα H-9, ενώ τα H-14 αλληλεπιδρούν με τους C-5, C-1(δ_c=42.26ppm) και C-10(δ_c=33.06ppm), άρα επιβεβαιώνεται η σύνδεση του C-14 με τον C-10. Επίσης, σύμφωνα με το HMBC ο C-10 αλληλεπιδρά με τα H-6, H-8, H-9 και H-14, άρα επιβεβαιώνεται ότι ο C-10 αποτελεί το σημείο σύνδεσης των 2 δακτυλίων 6 ατόμων.

Τα H-15 εμφανίζονται στα 1.13ppm ως διπλή κορυφή (d) λόγω αλληλεπιδράσεων με το H-4 με $^{3}J_{H15-H4}$=7.59Hz, όπως επιβεβαιώνεται από το φάσμα COSY. Επιπλέον, σύμφωνα με το HMBC ο C-15(δ_c=23.04ppm) αλληλεπιδρά μόνο με το H-4 και έτσι αποδεικνύεται η άμεση σύνδεση του C-15 με τον C-4(δ_c=38.53ppm).

Ο C-5 σύμφωνα με το HMBC αλληλεπιδρά με τα H-7, H-4, H-9α, H-1α, H-15 και H-14 και έτσι προκύπτει ότι ο C-5 αποτελεί το δεύτερο σημείο σύνδεσης μεταξύ των δακτυλίων 6 ατόμων.

Το H-4 εντοπίζεται στα 2.49ppm ως μία πολλαπλή κορυφή (m). Η πολλαπλότητα αυτή οφείλεται σε αλληλεπιδράσεις με τα H-15 και H-3 όπως επιβεβαιώνεται και από το COSY.

Τα διαστερεοτοπικά H-3 εμφανίζονται στα 1.57ppm ως πολλαπλή κορυφή (m) λόγω αλληλεπιδράσεων με τα H-4, H-2β και H-2α, όπως επιβεβαιώνεται και από το φάσμα COSY.

Τα H-2 εμφανίζονται στα 1.43ppm (H-2α) και στα 1.83ppm (H-2β). Το H-2α εμφανίζεται ως διπλή της πενταπλής κορυφή (dquintet) λόγω της δίδυμης σχάσης με το H-2β με $^{2}J_{H-2\alpha/H-2\beta}$= 13.8Hz και αλληλεπίδρασης με τα H-3 με $^{3}J_{H-3/H-2\alpha}$=3.56Hz, οι οποίες επιβεβαιώνονται από το φάσμα COSY. Το H-2β εμφανίζεται ως πολλαπλή κορυφή (m) λόγω αλληλεπιδράσεων με τα H-2α και H-3, σύμφωνα και με το COSY.

Τέλος, τα διαστερεοτοπικά H-1 εμφανίζονται στα 1.60ppm (H-1α) και στα 1.11ppm (H-1β). Το H-1α εμφανίζεται ως πολλαπλή κορυφή (m) λόγω αλληλεπιδράσεων με τα H-1 και H-2, ενώ το H-1β εμφανίζεται ως διπλή της διπλής κορυφή (dd) λόγω της δίδυμης σχάσης με $^{2}J_{H-1\beta/H-1\alpha}$=12.3Hz και αλληλεπιδράσεων με τα H-2 με $^{3}J_{H-1/H-2}$=3.96Hz.

#	^{13}C (ppm)	HSQC	^{1}H (ppm)	Πολλαπλότητα, J(Hz)	COSY	HMBC
1	42.26	H-1α	1.60(1H)	m	H-1β/H-1α/H-2α/H-2β	H-14/H-9β
		H-1β	1.11(1H)	dd, J_1=12.30, J_2=3.96		
2	16.88	H-2α	1.14(1H)	dquintet, J_1=13.80, J_2=3.56	H-2β/H-3	H-4/H-3/H-9β
		H-2β	1.83(1H)	m	H-3/H-2α	
3	32.92	H-3	1.57(2H)	m	H-4/ H-2α/H-2β	H-1α/H-15/H-4
4	38.53	H-4	2.49(1H)	m	H-15/H-3	H-6/H-15/H-3
5	150.64	H-5	-	-	-	H-7/H-4/H-9α/H-1α/H-15/H-14
6	115.55	H-6	5.17(1H)	d, J=3.30	H-7	H-8/H-7/H-4/H-11
7	38.77	H-7	3.03(1H)	ddd, J_1=8.78, J_2=5.63, J_3=3.25	H-6/H-8/H-11	H-11/H-9α/H-13
8	76.93	H-8	4.74(1H)	dt, J_1=5.50, J_2=2.75	H-7/H-9α/H-9β	H-6/H-9α
9	42.94	H-9α	2.11(1H)	dd, J_1=14.73, J_2=3.21	H-8	H-14
		H-9β	1.52(1H)	dd, J_1=15.03, J_2=2.43	H-8	
10	33.06	H-10	-	-	-	H-6/H-8/H-9α/H-9β/H-14
11	40.36	H-11	2.88(1H)	dq, J_1=8.67, J_2=7.31	H-13/H-7	H-7/H-13/H-6
12	179.21	H-12	-	-	-	H-13/H-11/H-7
13	10.69	H-13	1.22(3H)	d, J=7.31	H-11	H-11
14	28.72	H-4	1.24(3H)	s	-	H-9α/H-9β
15	23.04	H-15	1.13(3H)	d, J=7.59	H-4	H-4

Πίνακας 3: Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR (500MHz, $CDCl_3$) της δίυδρο-αλαντολακτόνης.

Συμπεράσματα

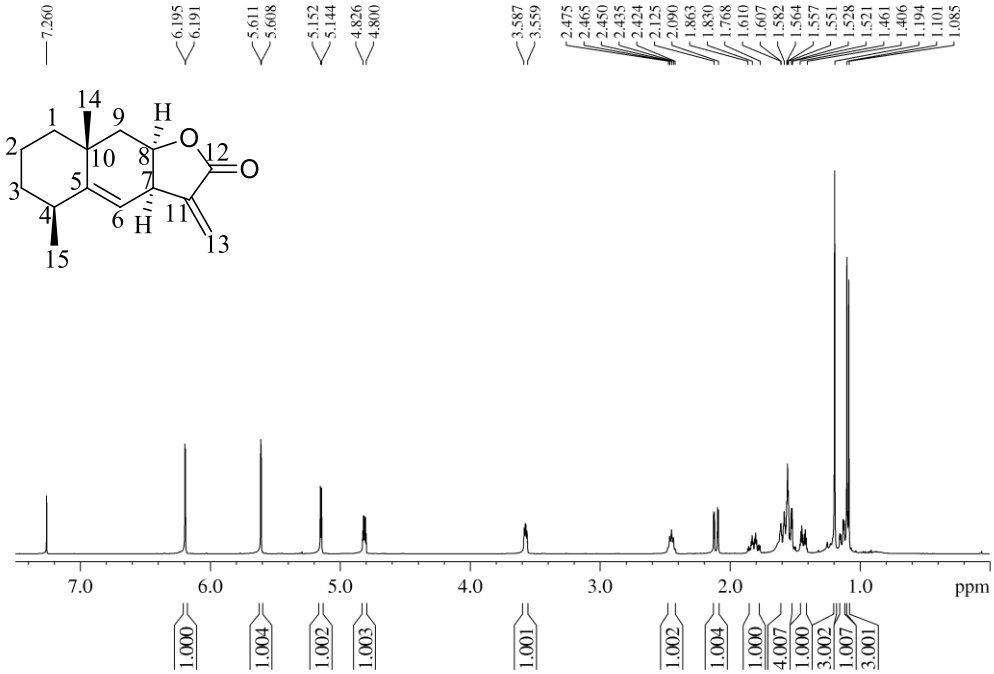
Η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία διεξήχθη με σκοπό την απομόνωση των δευτερογενών μεταβολιτών αλαντολακτόνη και ισοαλαντολακτόνη από το φυτό *Inula helenium.* Αυτοί οι μεταβολίτες εμφανίζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της φαρμακολογικής τους αποτελεσματικότητας που έχει παρατηρηθεί σε διάφορες μελέτες.

Για τον σκοπό αυτό, αποξηραμένες ρίζες από το φυτό *Inula helenium* εκχυλίστηκαν αρχικά στον πολικό διαλύτη μεθανόλη και στη συνέχεια το μεθανολικό εκχύλισμα εκχυλίστηκε στον άπολο διαλύτη εξάνιο. Ο διαχωρισμός τους επετεύχθη με την πραγματοποίηση χρωματογραφίας στήλης σε γέλη οξειδίου του αργιλίου (Al_2O_3) εμπλουτισμένη με νιτρικό άργυρο ($AgNO_3$). Η αλαντολακτόνη συλλέχθηκε κατά την έκλουση με μίγμα PE:EA 5:1, η ισοαλαντολακτόνη συλλέχθηκε κατά την έκλουση με PE:EA 7:3. Επιπλέον, από κατά την διάρκεια του χρωματογραφικού διαχωρισμού απομονώθηκε και ένας τρίτος δευτερογενής μεταβολίτης, η δίυδρο-αλαντολακτόνη κατά την έκλουση με PE:EA 5:1.

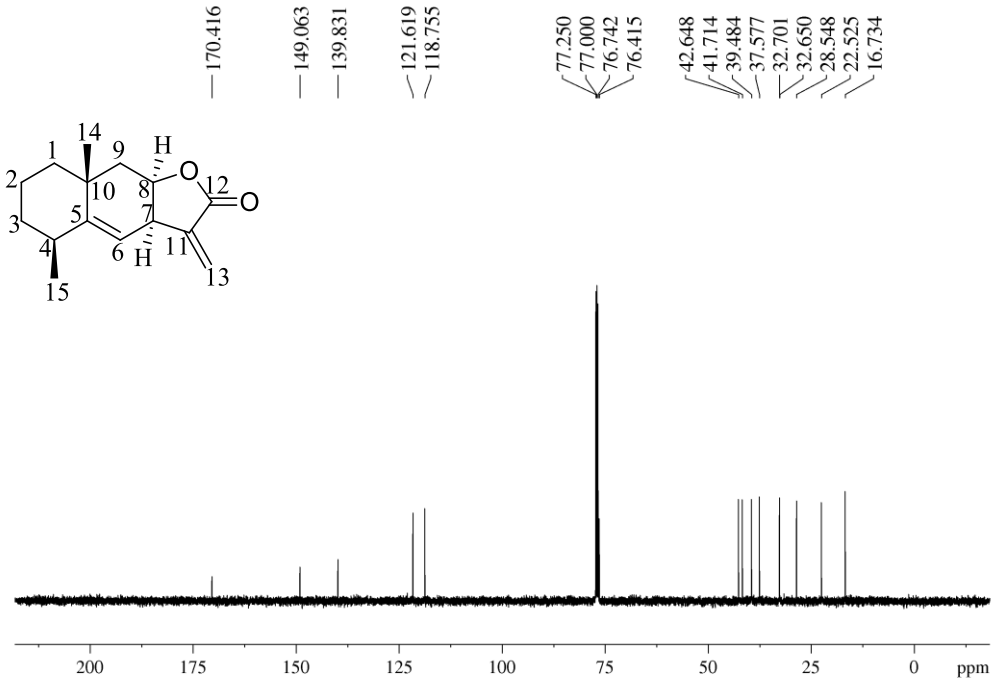
Η χρήση του νιτρικού αργύρου κατά τον χρωματογραφικό διαχωρισμό βελτίωσε την αποτελεσματικότητα απομόνωσης καθαρής αλαντολακτόνης και ισοαλαντολακτόνης, καθώς αυτές οι ενώσεις είναι ισομερή και δομικά διαφέρουν μόνο ως προς την θέση ενός διπλού δεσμού στο μόριο, στην αλαντολακτόνη αυτός βρίσκεται μεταξύ των C5-C6 ενώ στην ισοαλαντολακτόνη μεταξύ των C4-C15. Επίσης, ο τρίτος δευτερογενής μεταβολίτης που απομονώθηκε διαφέρει ως προς την αλαντολακτόνη μόνο ως προς την απουσία ενός διπλού δεσμού και την αντικατάσταση μίας μεθύλενο-ομάδας στον C-11 από μία μέθυλο-ομάδα.

Τέλος, στην συγκεκριμένη πτυχιακή έγινε μελέτη των φασματοσκοπικών δεδομένων NMR των ενώσεων που απομονώθηκαν και με αυτή την μέθοδο προσδιορίστηκε και η δομή της δίυδρο-αλαντολακτόνης(**3**).

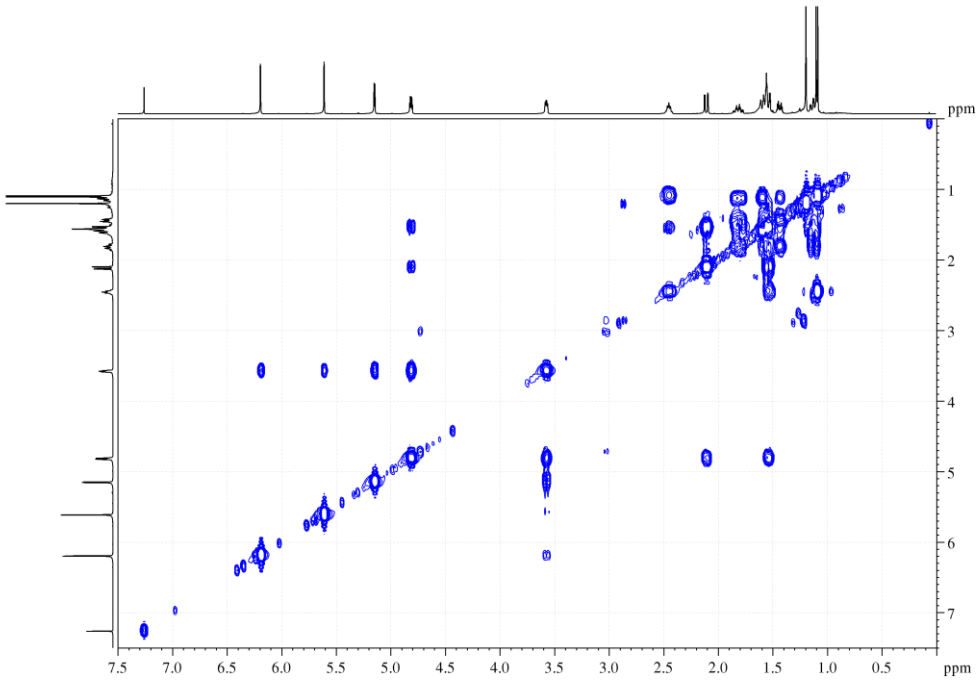
Παράρτημα



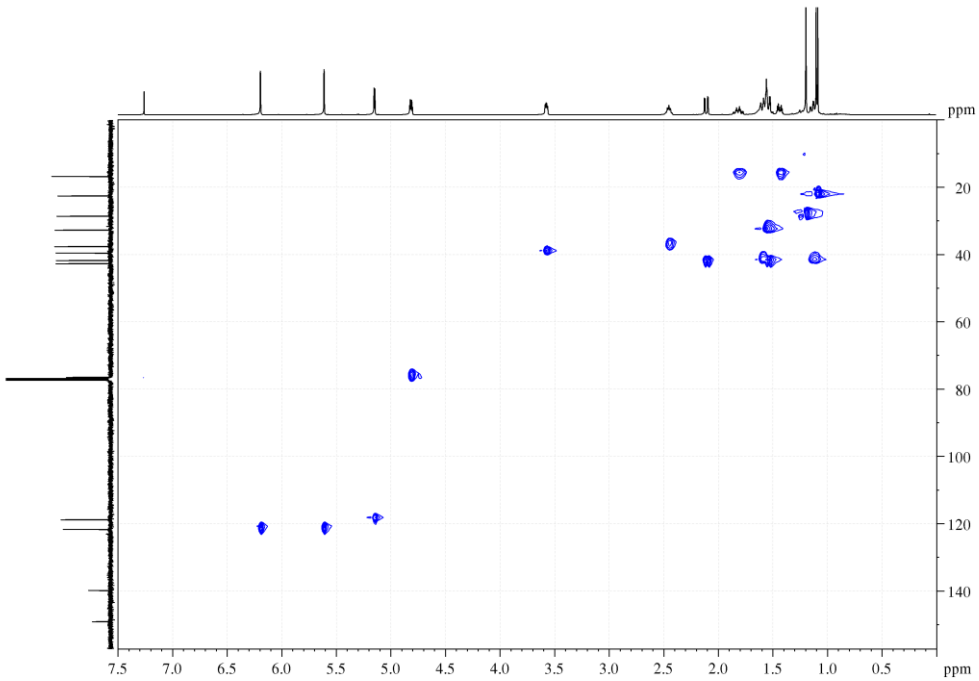
Εικόνα 14: Φάσμα ^{1}H NMR (500MHz, $CDCl_3$) της αλαντολακτόνης.



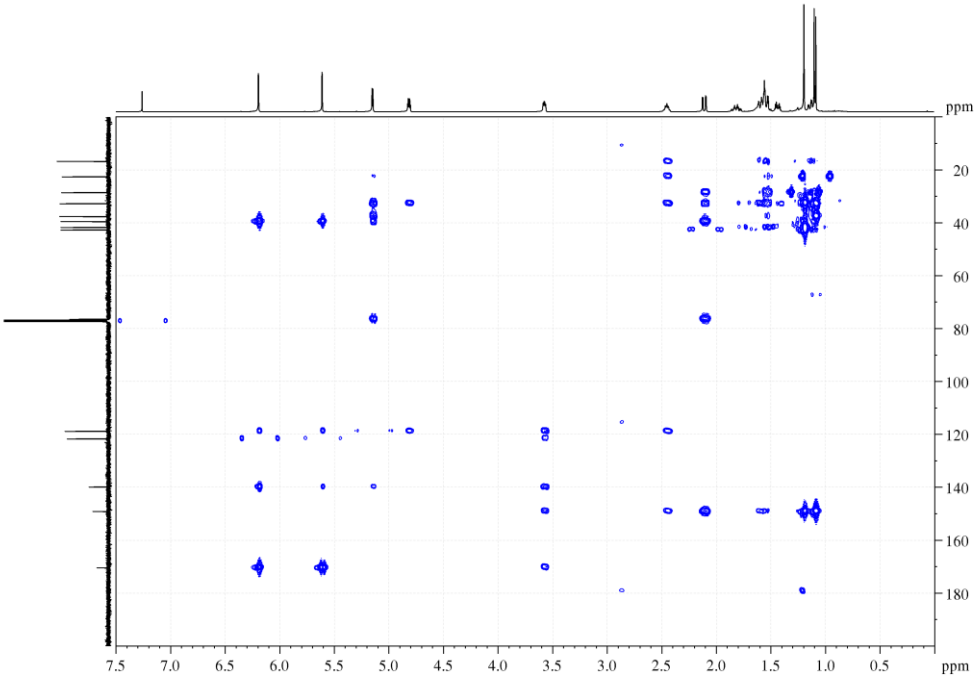
Εικόνα 15: Φάσμα ^{13}C NMR (500MHz, $CDCl_3$) της αλαντολακτόνης.



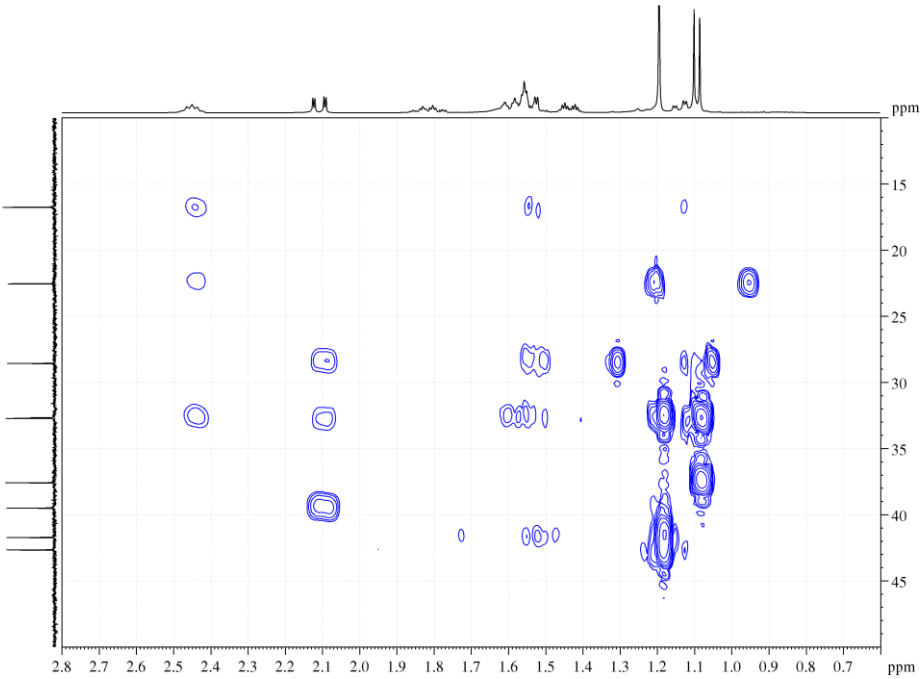
Εικόνα 16: Φάσμα COSY (500MHz, $CDCl_3$) της αλαντολακτόνης.



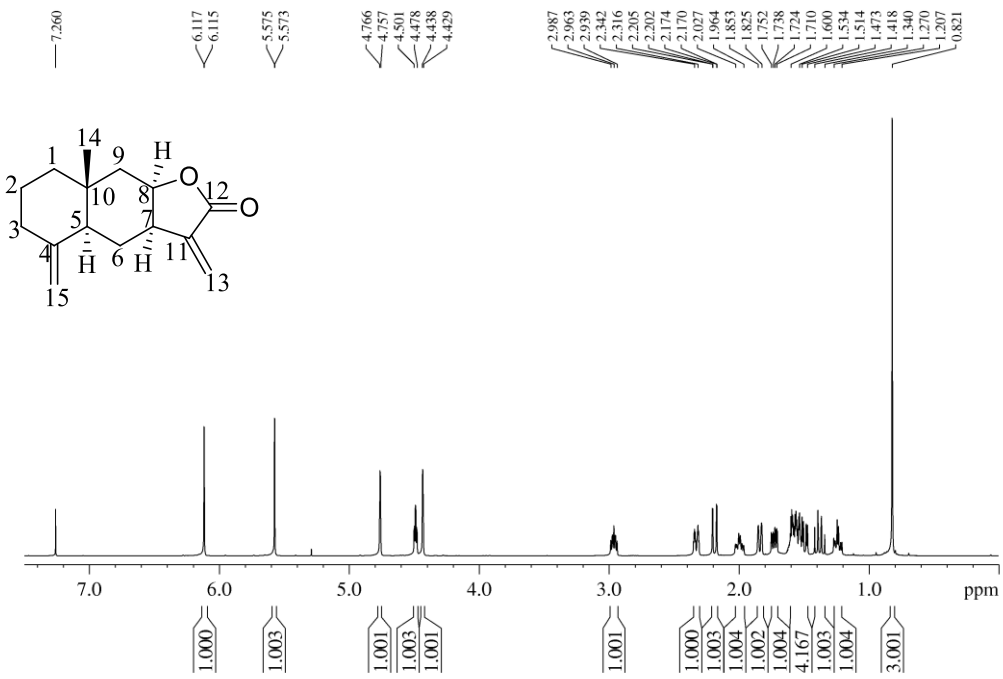
Εικόνα 17: Φάσμα HSQC (500MHz, $CDCl_3$) της αλαντολακτόνης.



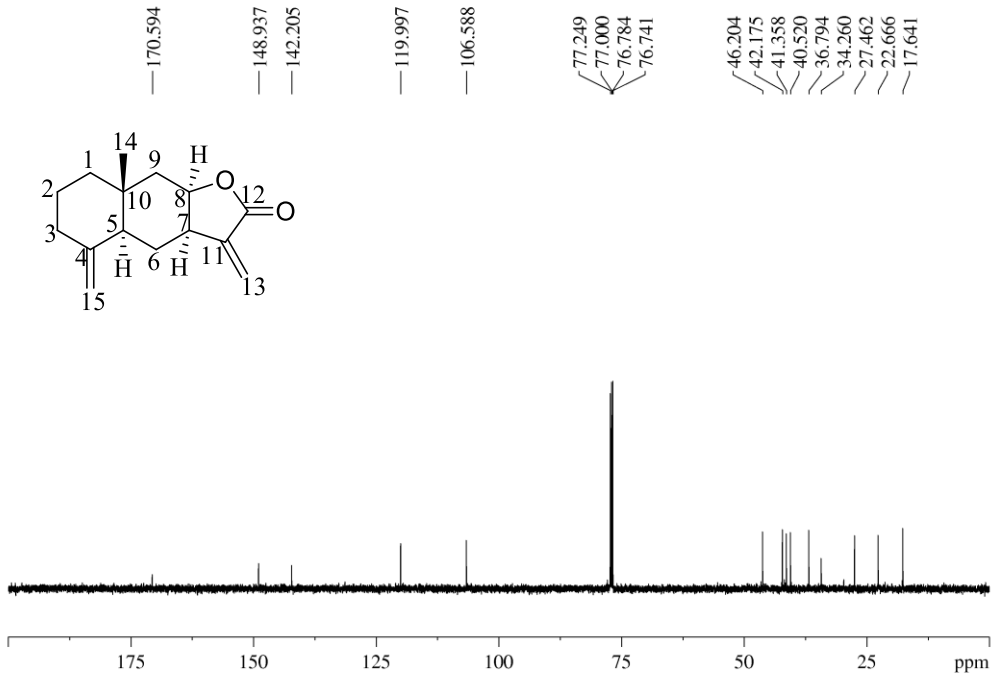
Εικόνα 18: Φάσμα HMBC (500MHz, $CDCl_3$) της αλαντολακτόνης.



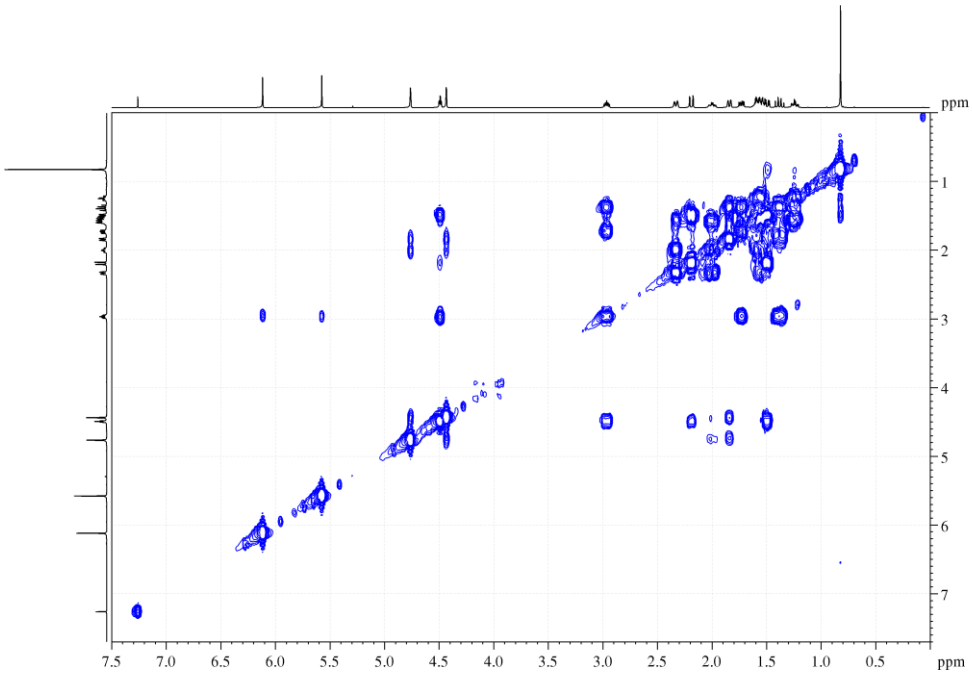
Εικόνα 19: Φάσμα HMBC (500MHz, $CDCl_3$) της αλαντολακτόνης με εστίαση στα χαμηλότερα ppm.



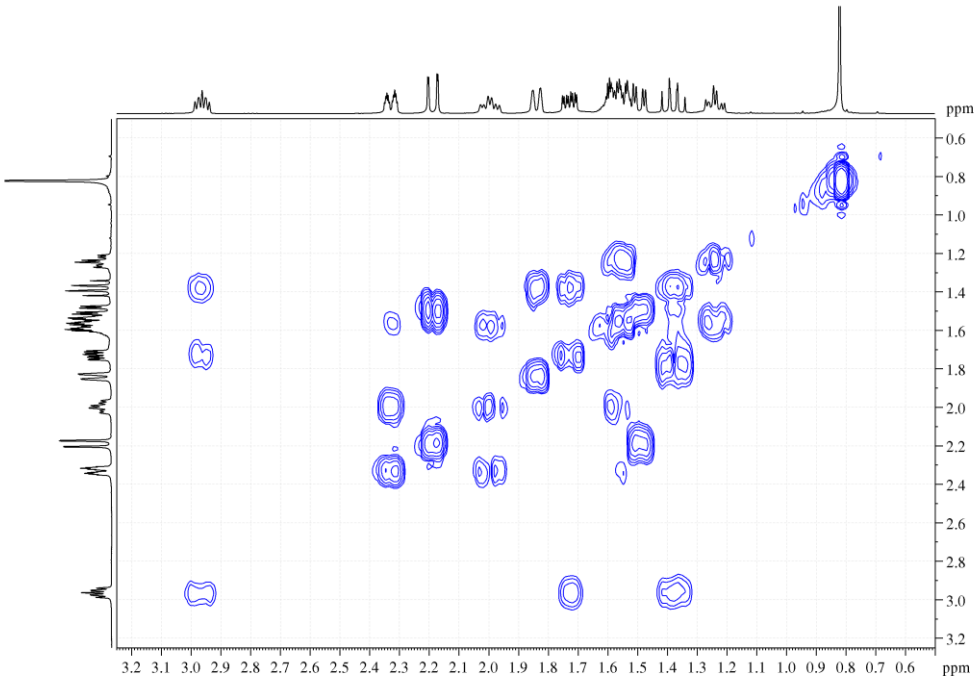
Εικόνα 20: Φάσμα ^{1}H NMR (500MHz, $CDCl_3$) της ισοαλαντολακτόνης.



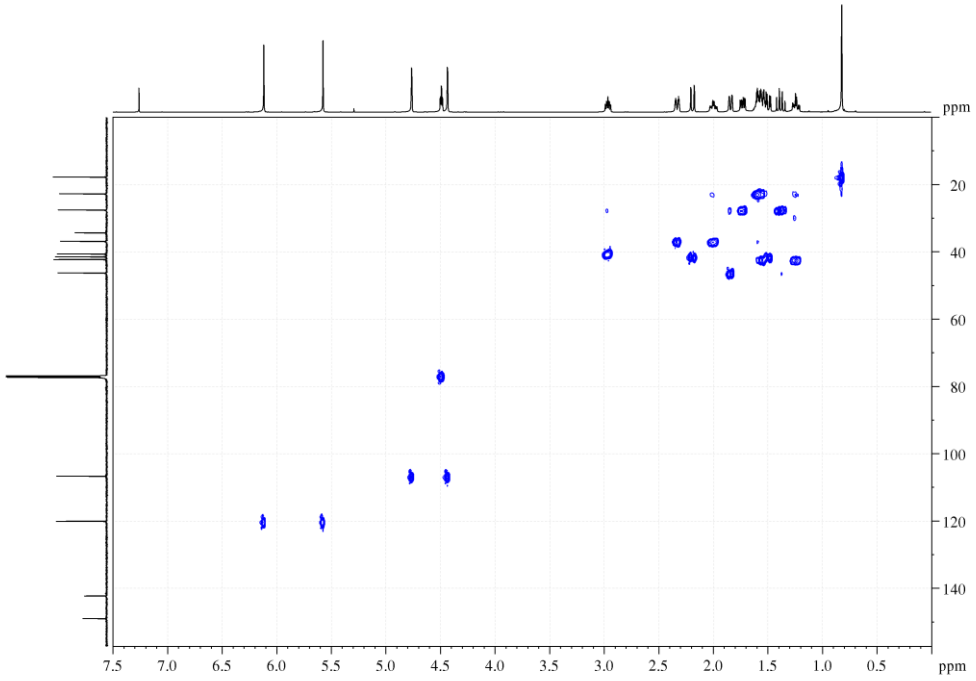
Εικόνα 21: Φάσμα ^{13}C NMR (500MHz, $CDCl_3$) της ισοαλαντολακτόνης.



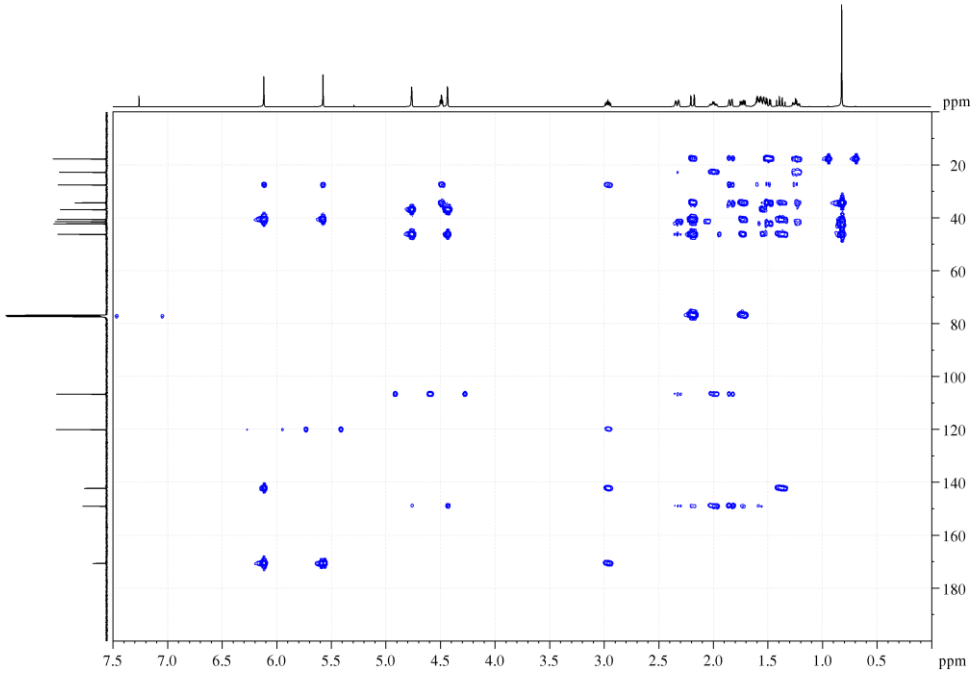
Εικόνα 22: Φάσμα COSY (500MHz, $CDCl_3$) της ισοαλαντολακτόνης.



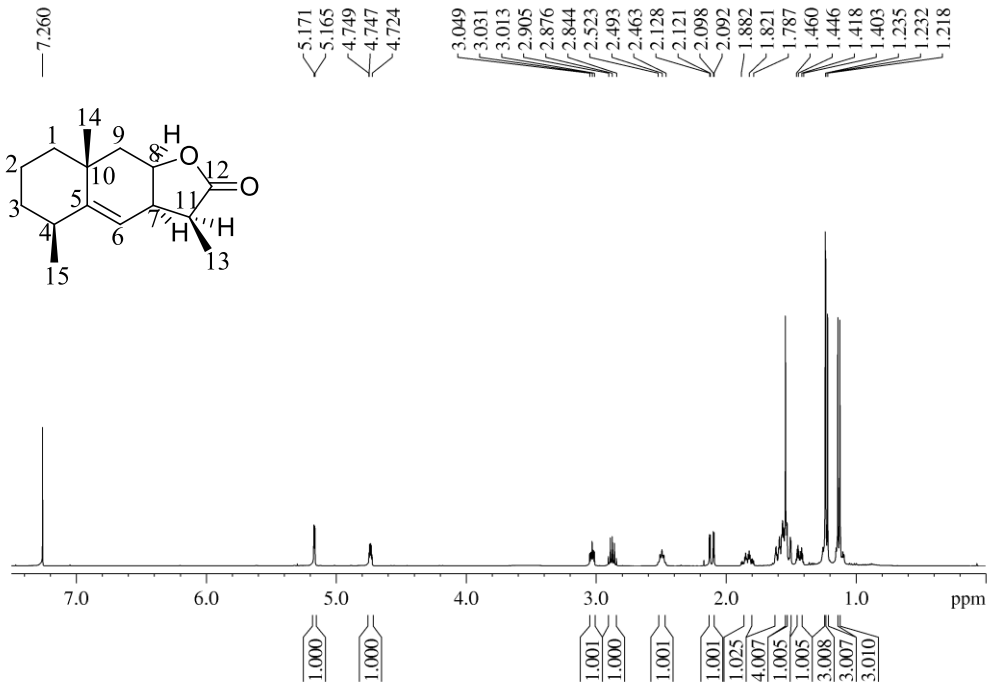
Εικόνα 23: Φάσμα COSY (500MHz, $CDCl_3$) της ισοαλαντολακτόνης με εστίαση στην περιοχή των χαμηλότερων ppm.



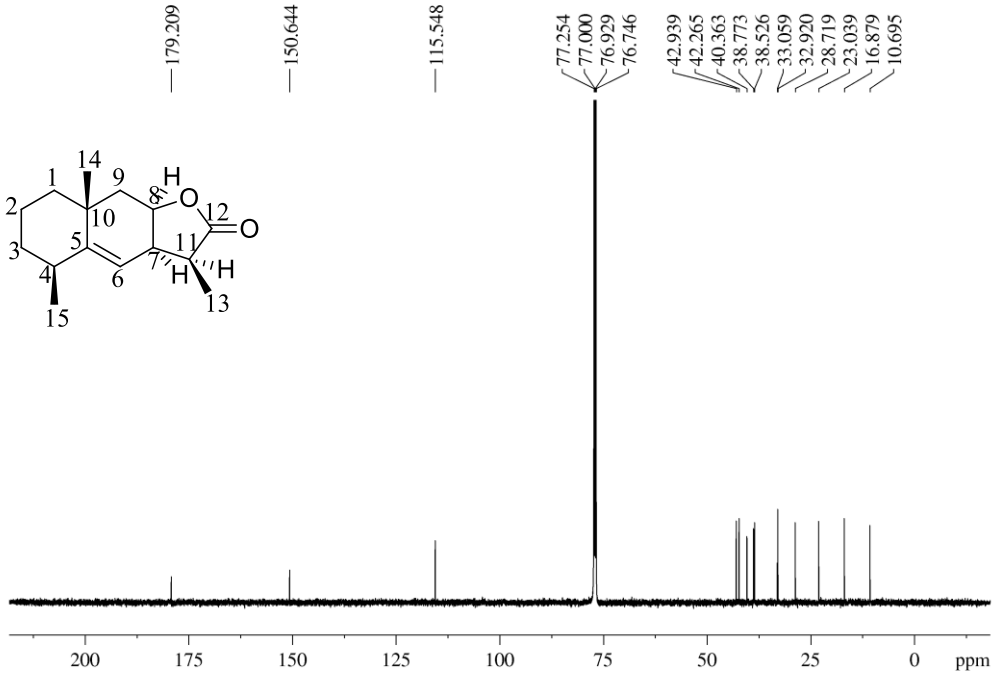
Εικόνα 24: Φάσμα HSQC (500MHz, $CDCl_3$) της ισοαλαντολακτόνης.



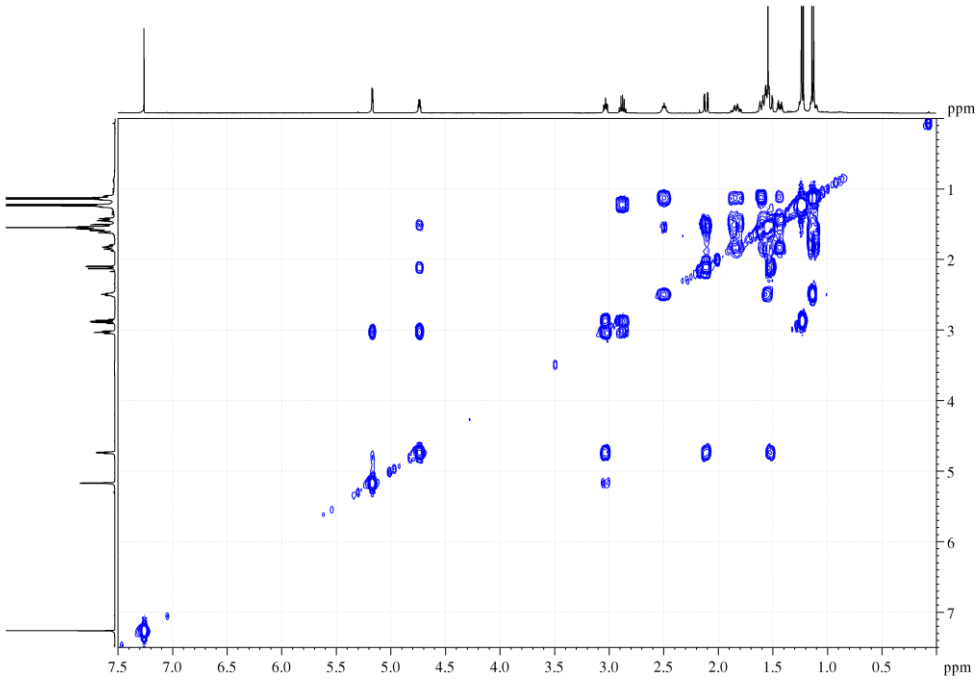
Εικόνα 25: Φάσμα HMBC (500MHz, $CDCl_3$) της ισοαλαντολακτόνης.



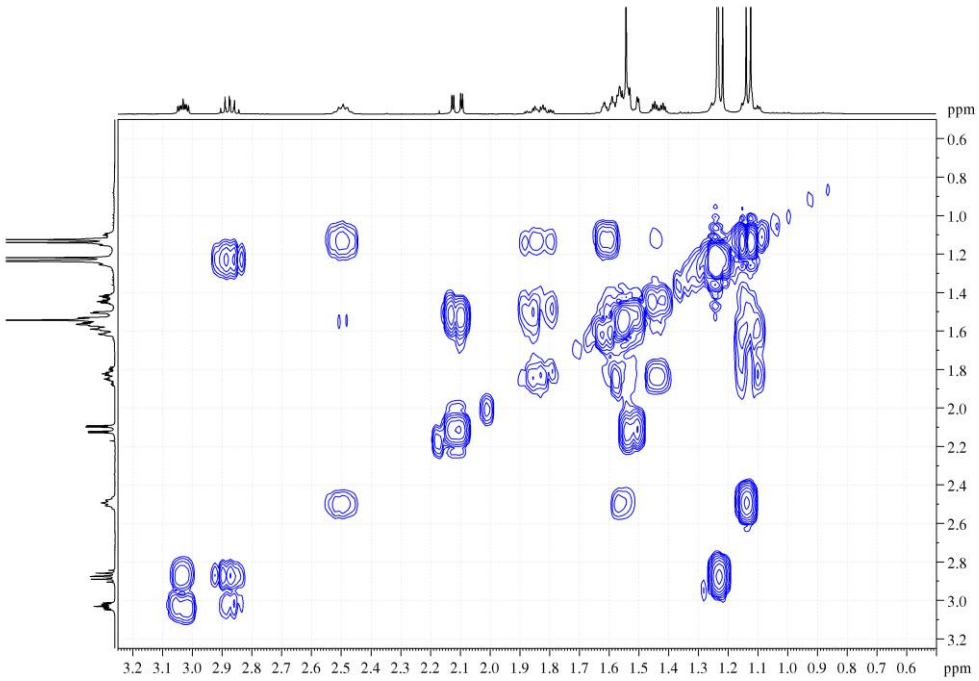
Εικόνα 26: Φάσμα ^{1}H NMR (500MHz, $CDCl_3$) της διύδροαλαντολακτόνης(**3**).



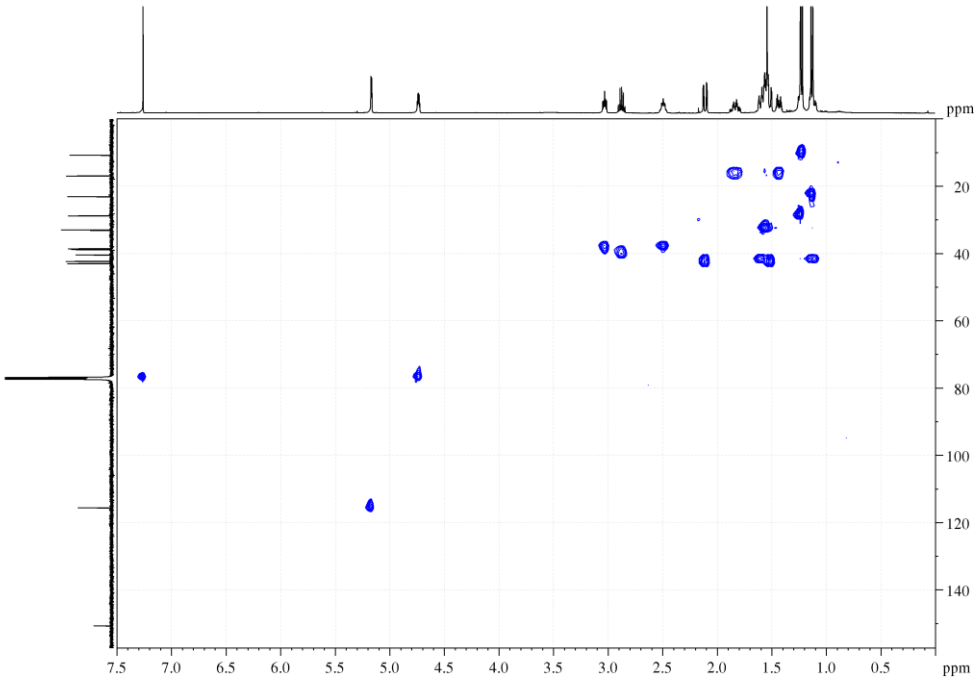
Εικόνα 27: Φάσμα ^{13}C NMR (500MHz, $CDCl_3$) της διύδροαλαντολακτόνης(**3**).



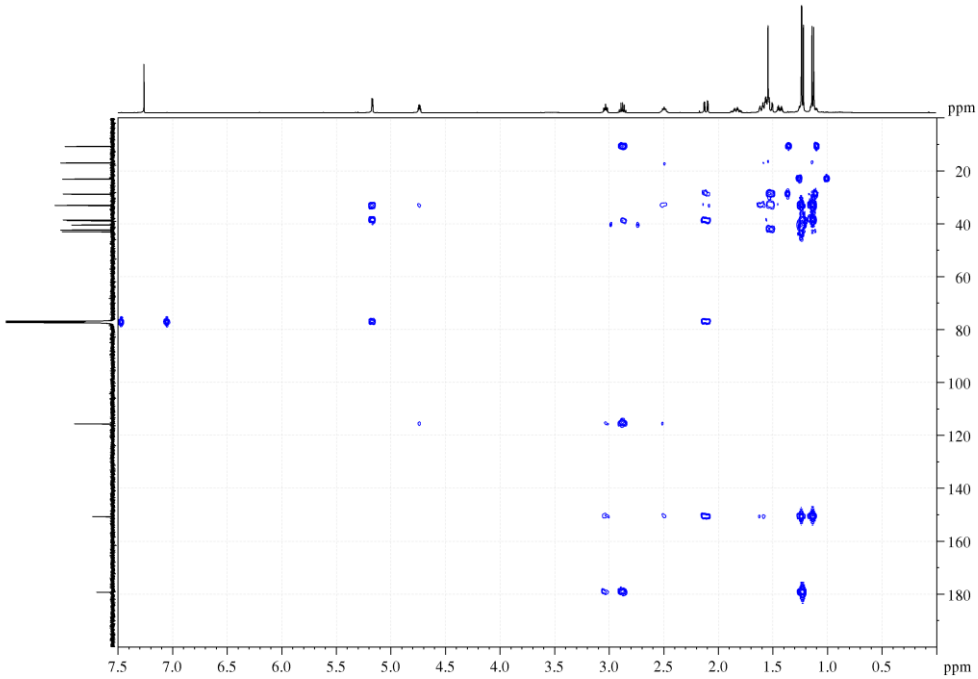
Εικόνα 28: Φάσμα COSY (500MHz, $CDCl_3$) της διύδροαλαντολακτόνης (**3**).



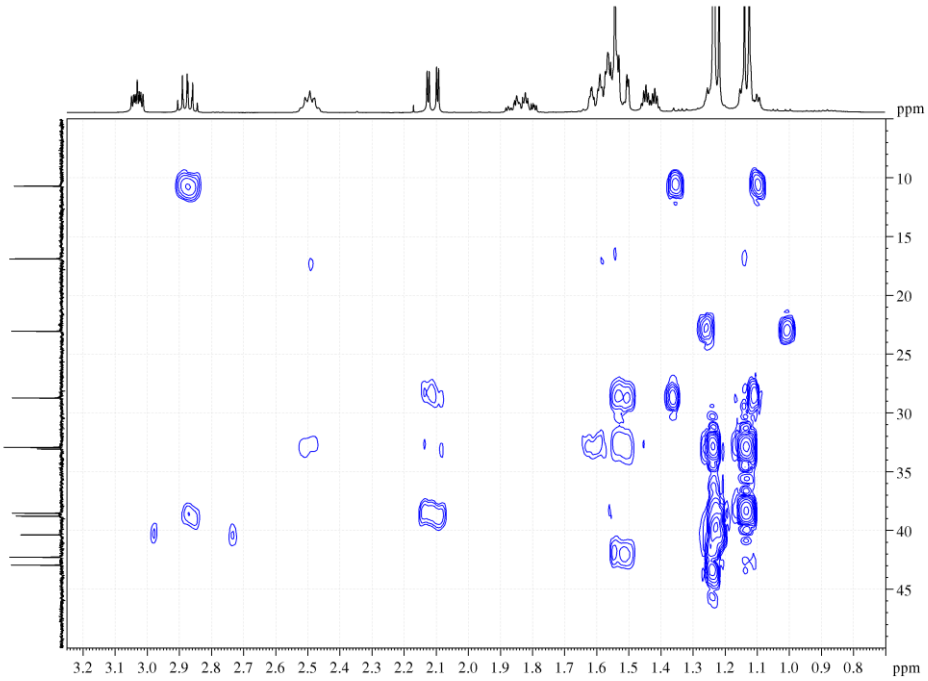
Εικόνα 29: Φάσμα COSY (500MHz, $CDCl_3$) της διύδροαλαντολακτόνης(**3**) με εστίαση στα χαμηλότερα ppm.



Εικόνα 30: Φάσμα HSQC (500MHz, $CDCl_3$) της διύδροαλαντολακτόνης(**3**).



Εικόνα 31: Φάσμα HMBC (500MHz, $CDCl_3$) της διύδροαλαντολακτόνης(**3**).



Εικόνα 32: Φάσμα HMBC (500MHz, $CDCl_3$) της διύδροαλαντολακτόνης(**3**) με εστίαση στα χαμηλότερα ppm.

Βιβλιογραφία

[1] Seca, A. M. L., Grigore, A., Pinto, D. C. G. A. & Silva, A. M. S. The genus *Inula* and their metabolites: From ethnopharmacological to medicinal uses. *J. Ethnopharmacol.***154**, 286–310 (2014).

[2]Seca, A. M. L.,Pinto D.C.G.A.& Silva, A. M. S.Metabolomic Profile of the Genus Inula.*Chemistry & Biodiversity*.**12**,859-906 (2015).

[3]Teoh E.S. Secondary Metabolites of Plants. Medical Orchids of Asia.PMC COVID-19 Collection_.59-73 (2015)

[4]Butala, S., Suvarna, V., Mallya, R., & Khan, T. An insight into cytotoxic activity of flavonoids and sesquiterpenoids from selected plants of Asteraceae species. *Chemical Biology & Drug Design*, **98**, 1116– 1130. (2021).

[5]Karanović, D., Zorić, L., Zlatković, B. and Luković, J. Leaf and stem anatomy and micromorphology of four Inuleae (Compositae) genera, with notes on their taxonomic significance. *Nordic Journal of Botany*, **2022**,1-22,(2022).

[6]Matos, M. S., Anastácio, J. D., & Nunes Dos Santos, C. (2021). Sesquiterpene Lactones: Promising Natural Compounds to Fight Inflammation. *Pharmaceutics*, ***13*(7)**, 991,(2021).

[7]Xiaoqin Zheng, Zi Wu, Jie Xu, Xinxin Zhang, Yijun Tu, Jiachuan Lei, Ruiying Yuan, Haitao Cheng, Qiang Wang, Jianqing Yu,Bioactive sesquiterpenes from *Inula helenium*, *Bioorganic Chemistry*,**114**,(2021).

[8]Buza, V., Niculae, M., Hanganu, D., Pall, E., Burtescu, R. F., Olah, N., Ștefănuț, L. C. Biological activities and chemical profile of gentiana asclepiadea and inula helenium ethanolic extracts. *Molecules*, ***27*(11),** 3560(2022).

[9]Tobyn, G., Denham, A. & Whitelegg, M. *The western herbal tradition: 2000 years of medicinal plant knowledge*. *The Western Herbal Tradition: 2000 years of medicinal plant knowledge*,Churchill Livingstone, London, (2010).

[10]Lingfa Ma, Shuling He, Fenrui Li, Jingjun Yang, Yuwei Chang, Kentian Zhao, Ningyu Liu,Effect of remained stem height on yield, quality of *Inula helenium* L. and on soil water content,*Saudi Journal of Biological Sciences*,**25**(6),1208-1211,(2018).

[11]Sulborska,A.,Weryszko-Chmielewska, E., Anatomy and ultrastructure of floral nectar of *Inula Helenium* L. (Astaraceae),*Acta societatis botanicorum poloniae*,**76**(3),201-207,(2007).

[12]Abrham, G., Dovrat, S., Bessler, H., Grossman, S., Uri, N.& Bergman, M. Inhibition of inflammatory cytokine secretion by plant-derived compounds inuviscolide and tomentosin: The role of NFkB b and stat1. *Open Pharmacol. J.***4**, 36–44 (2010).

[13]Qin, J. J., Jin, H. Z., Fu, J. J., Hu, X. J., Wang, Y., Yan, S. K.& Zhang, W. D. Japonicones A-D, bioactive dimeric sesquiterpenes from *Inula japonica* Thunb. *Bioorganic Med. Chem. Lett.***19**, 710–713 (2009).

[14]*Inula helenium* - Plant Finder (missouribotanicalgarden.org)(accessed on 31/7/2023).

[15]https://trueloveseeds.com/products/elecampane-1#:~:text=Elecampane%20(Inula%20helenium)%20was%20named,wild%20now%20in%20North%20America(accessed on 31/7/2023).

[16]https://www.dimensionsvariable.org/elecampane.html#:~:text=We%20can%20trace%20the%20etymology,literally%20translated%20as%2C%20field%20elecampane(accessed on 31/7/2023).

[17]Nikolova-Damyanova, B., Christie, W. W., & Herslof, B. Mechanistic aspects of fatty acid retention in silver ion chromatography. *Journal of chromatography A.***749,** 47-54 (1996).

[18]L.J. Morris, Separations of lipids by silver ion chromatography, *Journal of Lipid Research*, **7**, 717-732(1966).

[19]Andersen, K. N., Bejeck, B.E., Parthenolide induces apoptosis in glioblastomas without affecting NF-κB, *J Pharmacol Sci*, **106** , 318-320 (2008).

[20]Curry, E.A., Murry, D.J., Yoder, C. *et al.* Phase I dose escalation trial of feverfew with standardized doses of parthenolide in patients with cancer. *Invest New Drugs*, **22**, 299–305 (2004).

[21]Klochkov, S., Afanas'eva, S., Pushin, A., Acidic isomerization of alatolactone derivatives, *Chemistry of Natural Compounds*, **42(4)**, 400-406, (2006)

[22]Gokbulut, A., Sarer, E., Isolation and quantification of alantolactone/ isoalantolactone from roots of Inula helenium subsp. Turcoracemosa, *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, **10(3)**, 447-457, (2013)

[23]Raafat, K., Darra, N.E., Saleh, F.A., Rajha, H.N., Optimization of Infrared-assisted Extraction of Bioactive Lactones from Saussurea lappa L. and their Effects against Gestational Diabetes, *Pharmacognosy Magazine*, **15(61)**, 208-218, (2019)