

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ  
ΜΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ**



**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ  
ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΦΥΤΟ *Hypericum empetrifolium***

**ΣΑΜΙΩΤΑΚΗ ΧΡΥΣΟΥΛΑ**

**ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ  
ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ Ε. ΚΑΤΕΡΙΝΟΠΟΥΛΟΣ**

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ  
ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2019**

**UNIVERSITY OF CRETE  
DEPARTMENT OF CHEMISTRY**



**Master Thesis**

**ISOLATION AND IDENTIFICATION OF  
COMPONENTS FROM THE PLANT *Hypericum empetrifolium***

**SAMIOTAKI CHRYSOULA**

**MASTER THESIS SUPERVISOR  
HARALAMBOS E. KATERINOPOULOS**

**HERAKLION  
NOVEMBER 2019**

*Στην μνήμη του παππού μου, Μανώλη...*

## **Εξεταστική Επιτροπή**

**Χαράλαμπος Ε. Κατερινόπουλος (Επιβλέπων)**

*Καθηγητής, Τομέας Οργανικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης*

**Σπύρος Α. Περγαντής**

*Καθηγητής, Τομέας Αναλυτικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης*

**Απόστολος Σπύρος**

*Αναπληρωτής Καθηγητής, Τομέας Αναλυτικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης*

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Με την ολοκλήρωση της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστήμιο Κρήτης για την υλικοτεχνική υποστήριξη που μου παρείχε όλα αυτά τα χρόνια.

Ευχαριστώ θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου, τον κ. Χαράλαμπο Κατερινόπουλο, για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ στην ερευνητική του ομάδα τόσο σε προπτυχιακό επίπεδο όσο και μεταπτυχιακό επίπεδο. Η καθοδήγηση, η γνώση αλλά και η συνεχής στήριξη που μου παρείχε με βοήθησαν να μείνω αφοσιωμένη στο στόχο μου.

Επίσης, βαθύτατες ευχαριστίες οφείλω στους καθηγητές κ. Σ. Περγαντή και τον κ. Α. Σπύρο, οι οποίοι δέχτηκαν να είναι στην τριμελή μου επιτροπή και να αξιολογήσουν την εργασία μου. Ακόμα, ευχαριστώ τον Δρ. Κουβαράκη Α. (ΕΕΔΙΠ) και τον μεταπτυχιακό του φοιτητή Μαυρουδάκη Λεωνίδα, για την πολύτιμη βοήθειά τους στην λήψη των φασμάτων ESI-MS.

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω όλα τα μέλη του εργαστηρίου μου και κυρίως τον μεταδιδάκτορα Τσικαλά Γιώργο και την μεταπτυχιακή φοιτήτρια Χριστοφόρου Γεωργία για την συνεργασία, τις συμβουλές και το ευχάριστο κλίμα που υπήρξε στο εργαστήριο. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον μεταδιδάκτορα Στεφανάκη Μιχάλη, για την προθυμία, την καθοδήγηση και τις συμβουλές που μου παρείχε καθ' όλη την διάρκεια του μεταπτυχιακού μου.

Ευχαριστώ, επίσης, όλα τα μέλη του Τομέα Οργανικής Χημείας για το ευχάριστο κλίμα που υπήρξε όλον αυτόν τον καιρό και κυρίως τους μεταπτυχιακούς φοιτητές Μυρτολλάρη Καμέλα και Χατζούδη Απόστολο. Νιώθω ευγνώμων που είχα την τύχη σε αυτό το «ταξίδι» να αποκτήσω εκτός από δύο πολύ καλούς συνεργάτες και φίλους.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά όλη την οικογένειά μου και κυρίως του γονείς μου Σαμιωτάκη Μανόλη και Σαρρή Κατερίνα, για ό,τι μου έχουν προσφέρει μέχρι σήμερα. Χωρίς την στήριξή τους τίποτα από όσα είμαι και απ' όσα έχω καταφέρει μέχρι σήμερα δεν θα ήταν εφικτό.

## ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

### ΠΡΟΣΩΠΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Όνοματεπώνυμο: Σαμιωτάκη Χρυσούλα

Τόπος γέννησης: Ηράκλειο Κρήτης

Ημερομηνία γέννησης: 10/09/1994

Ηλεκτρονικό ταχυδρομείο: [xsamiotaki@outlook.com](mailto:xsamiotaki@outlook.com)

### ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

2017-Σήμερα	Μεταπτυχιακό δίπλωμα ειδίκευσης στον τομέα Απομόνωσης και Ταυτοποίησης Φυσικών Προϊόντων με Βιολογική Δραστικότητα. Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης. Επιβλέπων καθηγητής: Κατερινόπουλος Ε. Χαράλαμπος.
2012-2016	Πτυχίο Χημείας, Τμήμα Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης. Βαθμός πτυχίου: 7.36.
2016	Πτυχιακή εργασία με τίτλο: Απομόνωση και προσδιορισμός των πτητικών αρωματικών ενώσεων στο γλεύκος και τον οίνο της τοπικής ποικιλίας «Βιδιανό». Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης. Επιβλέπων καθηγητής: Κατερινόπουλος Ε. Χαράλαμπος.

### ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΗ-ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

02/2018-06/2018	Βοηθός προπτυχιακού εργαστηρίου Γενικής Χημείας II. Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.
09/2017-01/2018	Βοηθός προπτυχιακού εργαστηρίου Γενικής Χημείας II. Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.
06/2015-09/2015	Πρακτική άσκηση-Χημικός. Γενικό Χημείο του Κράτους, Ηράκλειο Κρήτης.

## ΠΡΟΣΘΕΤΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Συνέδρια	Συμμετοχή με προφορική εργασία με τίτλο: «Απομόνωση και χαρακτηρισμός δευτερογενών μεταβολιτών από το φυτό <i>Hypericum empetrifolium</i> . 20 <sup>ο</sup> Συνέδριο Μεταπτυχιακών Χημείας, 25-27/06/2018. Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.
Πιστοποιήσεις	ISO 9001:2015 Εσωτερικός Επιθεωρητής Συστημάτων Διαχείρισης Ποιότητας ISO 22000:2005 Βασικές Αρχές Συστημάτων Διαχείρισης Ασφάλειας Τροφίμων
Γλώσσες	Αγγλικά: Cambridge Lower, Michigan Lower Γερμανικά: Goethe-Zertifikat B2, Goethe-Zertifikat B1

# CURRICULUM VITAE

## PERSONAL INFORMATION

Name: Samiotaki Chrysoula

Birthplace: Heraklion, Crete

Birthdate: 10/09/1994

E-mail: xsamiotaki@outlook.com

## EDUCATION

- |              |  |
|--------------|--|
| 2017-Present | Master thesis in the field of Isolation and Identification of Natural Products with Biological Activity.<br>Department of Chemistry, University of Crete.<br>Academic supervisor: Prof. Katerinopoulos E. Haralambos.  |
| 2012-2016    | Bachelor of Science degree (BSc) in Chemistry.<br>Department of Chemistry, University of Crete.<br>Grade Point Average (GPA): 7.36.  |
| 2016         | Undergraduate diploma thesis with the title: Isolation and identification of volatile aromatic compounds in grape must and wine of local variety "Vidiano".<br>Department of Chemistry, University of Crete.<br>Academic supervisor: Prof. Katerinopoulos E. Haralambos. |

## ACADEMIC-LABORATORY EXPERIENCE

- |                 |   |
|-----------------|---|
| 02/2018-06/2018 | Teaching assistant in the undergraduate General Chemistry Laboratory II.<br>Department of Chemistry, University of Crete. |
| 09/2017-01/2018 | Teaching assistant in the undergraduate General Chemistry Laboratory I.<br>Department of Chemistry, University of Crete.  |
| 06/2015-09/2015 | Internship-Chemist.<br>General Chemistry Laboratory of the State, Heraklion, Crete.                                       |



## ADDITIONAL INFORMATIONS

Conferences	Poster presentation on: “Isolation and identification of secondary metabolites from the plant <i>Hypericum empetrifolium</i> ”. 20 <sup>th</sup> Chemistry Postgraduates Conference, 25-27/06/2018. Department of Chemistry, University of Crete.
Certifications	ISO 9001: 2015 Internal Quality Management System Inspector. ISO 22000: 2005 Basic Principles of Food Safety Management Systems.
Languages	English: Cambridge Lower, Michigan Lower German: Goethe-Zertifikat B2, Goethe-Zertifikat B1

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το είδος *Hypericum empetrifolium* (Clusiaceae) φύεται κυρίως στην Τουρκία και στην Ελλάδα. Στην Κρητική παραδοσιακή ιατρική χρησιμοποιείται από τον τοπικό πληθυσμό ως θεραπευτικό για την επούλωση πληγών, ως αντιοξειδωτικό και κατά της ασθένειας της ψωρίασης. Κυρίως η τελευταία του χρήση, κατέστησε το είδος ενδιαφέρον για την μελέτη ως προς το περιεχόμενο των δραστικών συστατικών του.

Δείγματα ανθέων και φύλλων του φυτού ξηράθηκαν και εκχυλίστηκαν διαδοχικά μέσω της διάταξης Soxhlet με εξάνιο, διχλωρομεθάνιο και μεθανόλη. Τα εκχυλίσματα υποβλήθηκαν σε περαιτέρω εκχυλίσεις και χρωματογραφία στήλης. Δεδομένου ότι το πολικό εκχύλισμα περιέχει εύρος ενώσεων υπεύθυνων για την θεραπευτική δράση του φυτού, πραγματοποιήθηκε επιπλέον επεξεργασία του μεθανολικού εκχυλίσματος, που υποβλήθηκε σε περαιτέρω εκχύλιση με διαλύτες: πετρελαϊκό αιθέρα, οξικό αιθυλεστέρα και βουτανόλη. Από τα πολικά αυτά εκχυλίσματα ταυτοποιήθηκαν με χρήση φασματοσκοπίας NMR και ανάλυσης με ESI-MS δευτερογενείς μεταβολίτες που ανήκουν στην κατηγορία των φαινολικών οξέων: τρία στερεοϊσομερή «γλωρογενικών οξέων» (5-O-καφεοϋλο-(-)-κινικό οξύ, 3-O-καφεοϋλο-(+)-κινικό οξύ και 5-O-καφεοϋλο-επι-κινικό οξύ) καθώς και ο μεθυλεστέρας 3-O-καφεοϋλο-(+)-κινικού οξέος. Απομονώθηκαν επίσης φλαβονοειδή συστατικά: υπεροσίδης, αβικουλαρίνη, γουαϊαβερίνη καθώς και το σικιμικό οξύ. Το 5-O-καφεοϋλο-επι-κινικό οξύ απομονώθηκε για πρώτη φορά από το γένος *Hypericum*, ενώ η γουαϊαβερίνη και ο μεθυλεστέρας του 3-O-καφεοϋλο-(+)-κινικού οξέος απομονώθηκαν για πρώτη φορά από το είδος *Hypericum empetrifolium*.

**Λέξεις κλειδιά:** *Hypericum empetrifolium*, δευτερογενείς μεταβολίτες, φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή.

## ABSTRACT

The species *Hypericum empetrifolium* (Clusiaceae) grows mostly in Turkey and Greece. It is used in traditional medicine by the locals as a therapeutic agent for wound healing, antioxidant and against psoriasis. Our research group opted to examine its ingredients and identify its biologically active components.

Aerial parts of the plant were collected during its blooming period, dried and extracted in a Soxhlet apparatus via the sequential use of increasing polarity: hexane, dichloromethane and methanol. The extracts were subjected to further extractions and column chromatography. Since the methanol extract contains the greater range of components used as therapeutic agents, the methanol extract residue was re-extracted with petroleum ether, ethyl acetate and n-butanol. Analysis of the polar extracts with NMR and ESI-MS techniques led to the identification of a number of phenolic acids, including three “chlorogenic acid” stereoisomers (5-O-caffeoyl(-)-quinic acid, 3-O-caffeoyl(+)-quinic acid and 5-O-caffeoyl-epi-quinic acid) and the methyl ester of 3-O-caffeoyl(+)-quinic acid. A second group of components contained the flavonoids hyperoside, avicularin, guaiaverin, as well as shikimic acid. 5-O-caffeoyl-epi-quinic acid was isolated from the genus *Hypericum* for the first time, while guaiaverin and methyl ester of 3-O-(+)-caffeoyl-quinic acid were isolated for the first time from the species of *Hypericum empetrifolium*.

**Keywords:** *Hypericum empetrifolium*, secondary metabolites, phenolic acids, flavonoids.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>5</b>
<b>1.1. Το Γένος <i>Hypericum</i> .....</b>	<b>6</b>
1.1.1. Χαρακτηριστικά του γένους <i>Hypericum</i> .....	6
1.1.2. Το όνομα <i>Hypericum</i> .....	6
1.1.3. Χρήση του <i>Hypericum</i> στην θεραπευτική .....	7
<b>1.2. Χημική σύσταση του γένους <i>Hypericum</i> .....</b>	<b>8</b>
1.2.1. Ναφθοδιανθρόνες.....	9
1.2.2. Φλωρογλουκινολικά παράγωγα .....	10
1.2.3. Φλαβονοειδή .....	11
1.2.4. Ξανθόνες .....	14
1.2.5. Ταννίνες και προκυανιδίνες .....	15
1.2.6. Φαινολικά οξέα και άλλες φαινολικές ενώσεις .....	15
1.2.7. Τερπένια και άλλα αλκάνια .....	16
<b>1.3. Ποικιλότητα δευτερογενών μεταβολιτών του γένους <i>Hypericum</i> .....</b>	<b>17</b>
<b>1.4. Φαρμακευτική δράση των συστατικών του γένους.....</b>	<b>17</b>
<b>1.5. <i>Hypericum empetrifolium</i> .....</b>	<b>20</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....</b>	<b>22</b>
<b>2.1. Τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν .....</b>	<b>23</b>
2.1.1. Χρωματογραφικές μέθοδοι .....	23
2.1.2. Φασματοσκοπικές μέθοδοι .....	24
<b>2.2. Γεωγραφική περιοχή μελέτης .....</b>	<b>25</b>
<b>2.3. Εκχύλιση των συστατικών από το φυτό.....</b>	<b>25</b>
<b>2.4. Χρωματογραφικός διαχωρισμός εκχυλισμάτων .....</b>	<b>27</b>
2.4.1. Διαχωρισμός συστατικών του εκχυλίσματος με CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> .....	27
2.4.2. Διαχωρισμός συστατικών του εκχυλίσματος με MeOH .....	32
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>43</b>
<b>3.1. Ταυτοποίηση συστατικών πολικού εκχυλίσματος .....</b>	<b>44</b>
3.1.1. Δευτερογενής μεταβολίτης: Υπεροσίδης .....	44
3.1.2. Δευτερογενείς μεταβολίτες: Αβικουλαρίνη και Γουαϊαβερίνη.....	51
3.1.3. Δευτερογενείς μεταβολίτες: n-χλωρογενικό οξύ και Επιχλωρογενικό οξύ .....	65
3.1.4. Δευτερογενής μεταβολίτης: 3-O-καφεοϋλο-(+)-κινικό οξύ.....	81

3.1.5. Δευτερογενής μεταβολίτης: Σικιμικό οξύ .....	87
3.1.6. Δευτερογενής μεταβολίτης: Μεθυλεστέρας 3-Ο-καφεοϋλο-(+)- κινικού οξέος.....	91
3.1.7. Δευτερογενής μεταβολίτης: 4-Ο-καφεοϋλο(-)-κινικό οξύ .....	93
<b>3.2. Συζήτηση αποτελεσμάτων .....</b>	<b>99</b>
<b>3.3. Συμπεράσματα.....</b>	<b>101</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ .....</b>	<b>103</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>117</b>

---

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

---

## 1.1. Το γένος *Hypericum*

### 1.1.1. Χαρακτηριστικά του γένους *Hypericum*

Το γένος *Hypericum* ανήκει στην οικογένεια Clusiaceae (γνωστή και ως Guttiferae) και στα είδη του ανήκουν πολυετείς πόες ή θάμνοι, δένδρα και βότανα. Τα περισσότερα εξ' αυτών αναγνωρίζονται από τα χαρακτηριστικά τους φύλλα, άνθη και καρπούς. Τα φύλλα τους έχουν ωοειδές σχήμα, φωτεινό πράσινο χρώμα, ο καρπός έχει τη μορφή καψιδίου, είναι συχνά ξηρός ενώ τα άνθη τους είναι πυκνά, έντονου κίτρινου χρώματος.

Το γένος *Hypericum* αποτελείται από περίπου 469 είδη που ταξινομούνται σε 36 Τμήματα (Sections) και έχει σχεδόν παγκόσμια εξάπλωση, δεδομένου ότι απαντάται σχεδόν σε όλα τα εύκρατα μέρη του κόσμου, αλλά έχει μόνο ένα είδος στη Νότια Αμερική και δύο είδη στην Αυστραλία και τη Νέα Ζηλανδία. Ωστόσο, απουσιάζει από περιοχές με ακραίες τιμές ξηρότητας και θερμοκρασίας, σπανίως φύεται σε νερά που δεν είναι πολύ ρηχά, και στις τροπικές περιοχές σχεδόν πάντα περιορίζεται σε υψηλά στρώματα. Αυτός είναι και ο λόγος που το γένος είναι δυσεύρετο σε ερήμους και πολικές περιοχές όπως η Ανταρκτική. Στην Ευρώπη αντιπροσωπεύεται από 36 είδη και υποείδη ενώ στην Ελλάδα φύονται περίπου 32 είδη και υποείδη του γένους αυτού, τα οποία ταξινομούνται σε 12 τμήματα.<sup>1,2,3,4</sup>

### 1.1.2. Το όνομα *Hypericum*

Το υπερικό είναι γνωστό από την αρχαιότητα ως φαρμακευτικό φυτό. Το όνομα *υπέρεικον* προήλθε από τους αρχαίους Έλληνες καθώς ήταν ένα από τα φυτά που κρεμούσαν πάνω από τα θρησκευτικά τους πρόσωπα για να αποτρέψουν το κακό (υπέρ-εικών). Το ακριβές είδος που χρησιμοποιήθηκε δεν είναι γνωστό με βεβαιότητα, αν και διάφοροι συγγραφείς έχουν προτείνει ότι ήταν το *H. empetrifolium* Wild ή το *H. triquetrifolium* Turra (*H. crispum* L.). Το όνομα αυτό έχει αναφερθεί και από τον Διοσκουρίδη, τον Γαληνό, τον Ιπποκράτη και τον Πλίνιο, με την πρώτη αναφορά του γένους με το όνομα αυτό να γίνεται τον 2<sup>ο</sup> αιώνα π.Χ. από τον Nikander (Alexipharmaca V, γραμμή 603):

τώ δ' ὅτε μὲν σμύρνης ὀδελοῦ πόρε διπλόον ἄχθος,  
ἄλλοτε δ' ὄρμίνιοι νέην χύσιν, ἄλλοτε κόψαις  
οὔρειν ὑπέρεικον, ὄθ' ὕσσῶπον ὀροδάμνους.

Σε άλλες περιοχές το φυτό αναφέρεται ως *fuga daemonum* που σημαίνει «κάνει τους δαίμονες να φύγουν». Η δύναμη του να απομακρύνει κανείς τα κακά πνεύματα ήταν ιδιαίτερος σημαντική εκείνη την εποχή αφού η παρουσία του κακού πιστευόταν ότι ήταν αρκετά έντονη, ιδίως στις 31 Οκτωβρίου (Halloween) και στις 23 Ιουνίου (παγανιστικός εορτασμός), όπου η διακόσμηση των σπιτιών και των θρησκευτικών εικόνων με το *Hypericum* γινόταν αρκετά σημαντική. Η μετέπειτα ονομασία του σε βότανο του Αγίου Ιωάννη (St. John's Wort) προέκυψε όταν ο παγανιστικός εορτασμός εκχριστιανίστηκε και αφιερώθηκε στον Άγιο Ιωάννη τον Βαπτιστή, στου οποίου τα γενέθλια (24 Ιουνίου) χρησιμοποιήθηκε το φυτό *Hypericum*. Σύμφωνα με την παράδοση το φυτό χρησιμοποιούνταν για να παραχθεί ένα ιερό έλαιο μέσω έγχυσης του φυτού σε ελαιόλαδο για κάποιες μέρες. Το λάδι αυτό αποκτούσε κόκκινο χρώμα, το οποίο συμβόλιζε το αίμα του αγίου. Η ονομασία St. John's Wort αναφέρεται, ακόμα και σήμερα, στο *H. perforatum* L., το οποίο είναι το πιο συνηθισμένο είδος σχεδόν σε όλη την Ευρώπη.<sup>5,1</sup>



Εικόνα 1.1. *Hypericum perforatum* L.

Άλλες κοινές ονομασίες του φυτού, οι οποίες αναφέρονται κυρίως στο *H. perforatum* αλλά και σε άλλα είδη του γένους είναι: σπαθόχορτο, βαλσαμόχορτο, χελωνόχορτο, λειχνόχορτο, περίκι και βότανο του Προδρόμου.

### 1.1.3. Χρήση του *Hypericum* στην θεραπευτική

Ο όρος «φυσικά προϊόντα» περιλαμβάνει ένα εξαιρετικά μεγάλο και ποικίλο φάσμα χημικών ενώσεων τα οποία παράγονται και απομονώνονται από βιολογικές πηγές. Το ενδιαφέρον του ανθρώπου για τα φυσικά προϊόντα υπάρχει εδώ και χιλιάδες χρόνια ενώ συνεχίζεται μέχρι σήμερα. Οι ενώσεις και τα εκχυλίσματα που προέρχονται από τα φυτά χρησιμοποιούνται ευρέως στην ιατρική, στην γεωργία, στα καλλυντικά και στα τρόφιμα. Ως εκ τούτου, η δυνατότητα πρόσβασης στα φυσικά προϊόντα, η κατανόηση της χρησιμότητάς τους αλλά και η ανάπτυξη εφαρμογών απομόνωσης τους θεωρείται αναγκαία στον τομέα των φυσικών προϊόντων. Τα φυτά, λοιπόν, έχουν την πιο μακρά ιστορία ως προς την χρήση τους για την πρόληψη και την θεραπεία διάφορων ασθενειών και παθήσεων.



Μεταξύ των φαρμακευτικών φυτών εξέχουσα θέση κατέχει το γένος *Hypericum*, το οποίο θεωρείται πολύτιμο από ιατρικής άποψης για πάνω από 2000 χρόνια. Το είδος που χρησιμοποιείται κυρίως στην θεραπευτική είναι το *H. perforatum* L., γνωστό και ως βότανο του Αγίου Ιωάννη (St. John's Wort). Στην αρχαία Ελλάδα, το είδος χρησιμοποιήθηκε για την θεραπεία πολλών παθήσεων, με κύρια χρήση του ως τονωτικό των νεύρων για τις διαταραχές στην διάθεση. Έλληνες ιατροί του πρώτου αιώνα, όπως ο Γαληνός, ο Πλίνιος, ο Διοσκουρίδης και ο Ιπποκράτης, συνέστησαν το είδος αυτό για διάφορες θεραπευτικές χρήσεις όπως αντιπυρετικές, αντισηπτικές, διουρητικές, ως αντίδοτο για δηλητηριώδη δαγκώματα, τα εγκαύματα, τον ίκτερο, για την θεραπεία των πληγών, για την θεραπεία των διαταραχών της εμμήνου ρύσεως και την θεραπεία για εντερικούς σκώληκες.

## 1.2. Χημική σύσταση του γένους *Hypericum*

Όπως αναφέρθηκε, το γένος *Hypericum* ανήκει στην οικογένεια Clusiaceae και περιλαμβάνει περίπου 469 είδη παγκοσμίως, τα οποία για την καλύτερη ταξινόμησή τους διαιρούνται σε 36 τμήματα. Για τον λόγο αυτό το *Hypericum* διαθέτει μεγάλη ποικιλία ως προς τις περιεχόμενες κατηγορίες συστατικών του. Το περιβάλλον ανάπτυξης, η περίοδος συλλογής, οι συνθήκες αποθήκευσης και επεξεργασίας του φυτού καθώς και άλλοι πολλοί παράγοντες επιδρούν σημαντικά στην χημική σύσταση του φυτού.

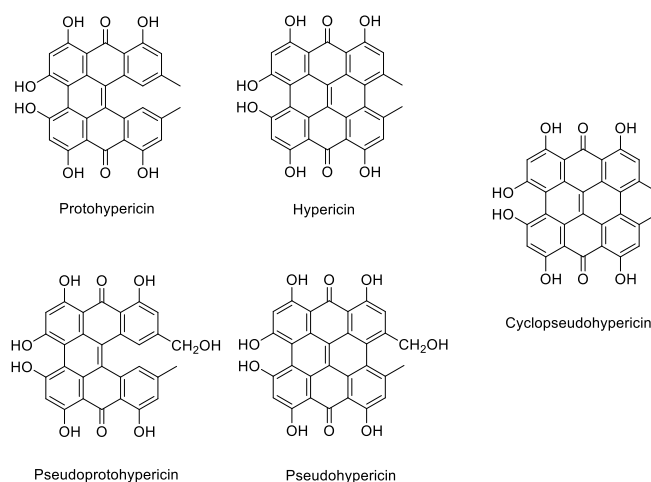
Η πιο γνωστή κατηγορία συστατικών του *Hypericum* είναι οι ναφθοδιανθρόνες, με την υπερικίνη και την ψευδοϋπερικίνη καθώς και τα πρόδρομα μόρια τους πρωτοϋπερικίνη και πρωτοψευδροϋπερικίνη να είναι από τις κύριες περιεχόμενες ενώσεις της κατηγορίας αυτής συστατικών. Αρκετά σημαντική κατηγορία συστατικών είναι οι προνυλιωμένες φλωρογλουκινόλες όπως η υπερφορίνη, η αντι-υπερφορίνη και τα οξυγονωμένα παράγωγά τους. Άλλες κατηγορίες συστατικών είναι οι ξανθόνες, τα φλαβονοειδή, τα διφλαβονοειδή, οι ταννίνες, οι προανθοκυανιδίνες και τα φαινολικά οξέα. Το αιθέριο έλαιο του *Hypericum perforatum* περιέχει υδρογονάνθρακες και τερπενοειδή. Από ιατρική άποψη το είδος *Hypericum perforatum* θεωρείται το πιο σημαντικό.

### 1.2.1. Ναφθοδιανθρόνες

Οι ναφθοδιανθρόνες είναι ενώσεις που περιέχονται μόνο σε ταχα του γένους *Hypericum* και *Fagopyrum* εντός του φυτικού βασιλείου. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν οι υπερικίνες, οι ψευδοϋπερικίνες, πρωτοϋπερικίνες, πρωτοψευδροϋπερικίνες καθώς και παράγωγα αυτών, τα οποία βρίσκονται σε μικρότερες συγκεντρώσεις.

Οι ναφθοδιανθρόνες προέρχονται από τον μεταβολισμό των ανθρακινονών με πρόδρομο μόριο την ανθρόνη της εμοδίνης. Αρχικά γίνεται η σύνθεση των πρωτοναφθοδιανθρονών, όπως είναι η πρωτοϋπερικίνη και η ψευδοϋπερικίνη, και μετά την έκθεση της δρόγης στην ηλιακή ακτινοβολία, προκύπτουν οι ναφθοδιανθρόνες. Τέλος, η κυκλοψευδοϋπερικίνη πιστεύεται ότι αποτελεί προϊόν οξείδωσης της ψευδοϋπερικίνης. Έτσι, η αναλογία μεταξύ πρωτοναφθοδιανθρονών και ναφθοδιανθρονών στα εκχυλίσματα του φυτού μπορεί να ποικίλει ανάλογα με το ποσοστό έκθεσης του φυτού στην ηλιακή ακτινοβολία.

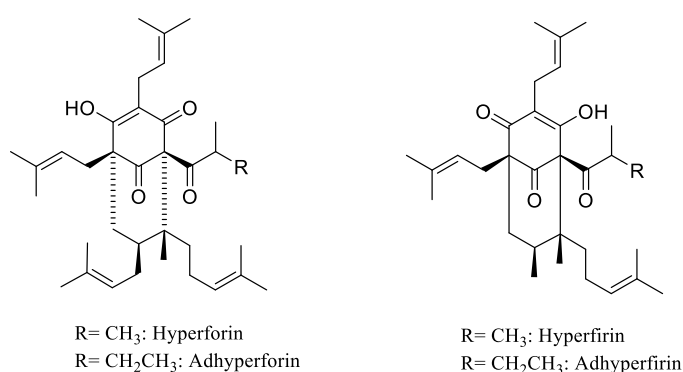
Οι δύο κύριες ναφθοδιανθρόνες που εντοπίζονται στο γένος *Hypericum* είναι η υπερικίνη και η ψευδοϋπερικίνη, οι οποίες συναντώνται συνήθως στα περισσότερα είδη του γένους *Hypericum* και σχεδόν πάντα παρόμοιες. Βέβαια τα ποσοστά συγκέντρωσης εξαρτώνται άμεσα, όπως προαναφέρθηκε, από το αναπτυξιακό στάδιο του φυτού, τις περιβαλλοντικές συνθήκες και την περίοδο της συλλογής. Ωστόσο, η ψευδοϋπερικίνη δεν εντοπίζεται στα είδη του γένους *H. hirsutum* και *H. empetrifolium*. Μέχρι σήμερα, το μόνο είδος που περιέχει μόνο ψευδοϋπερικίνη είναι το *H. formosissimum*<sup>6</sup>. Τέλος, η υπερικίνη είναι θεωρείται ευαίσθητη στο φως και έτσι οξειδώνεται εύκολα όταν περιέχεται σε όξινα και ουδέτερα διαλύματα και παράλληλα εκτίθεται στο ηλιακό φως.<sup>8</sup>



**Εικόνα 1.2.** Χημική δομή κυριότερων ναφθοδιανθρονών.

### 1.2.2. Φλωρογλουκινολικά παράγωγα

Η υπερφορίνη και αντι-υπερφορίνη αποτελούν τις κύριες φλωρογλουκινόλες του *H. perforatum* L., οι οποίες εντοπίζονται στα γόνιμα μέρη του φυτού, κυρίως στους καρπούς. Άλλα συστατικά σε αυτή την κατηγορία αποτελούν η υπερφιρίνη και αντι-υπερφιρίνη, τα οποία αποτελούν βιοσυνθετικά ενδιάμεσα της υπερφορίνης και της αντι-υπερφορίνης αντίστοιχα, ενώ η φουρουϊπερφορίνη αποτελεί προϊόν αποικοδόμησης της υπερφορίνης. Εκτός των παραπάνω, έχει εντοπιστεί πλήθος από φλωρογλουκινολικά παράγωγα στα διάφορα taxa του γένους *Hypericum*.



Εικόνα 1.3. Χημική δομή των κυριότερων φλωρογλουκινολών.

Οι πρώτες ενδείξεις για την ύπαρξη της υπερφορίνης στο γένος *Hypericum* προέκυψαν από την διαπίστωση ότι τα εκχυλίσματα ακετόνης από το είδος *H. perforatum* L. είχαν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση. Μάλιστα, τα εκχυλίσματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν εκτεταμένα στο παρελθόν για την θεραπεία λοιμώξεων. Η ομάδα του Gurevich,<sup>7</sup> κατάφερε να απομονώσει και να ταυτοποιήσει την υπερφορίνη ως το κύριο συστατικό στα εκχυλίσματα αυτά το οποίο και έχει υψηλή αντιβακτηριακή δράση. Επίσης, στο συγκεκριμένο είδος βρέθηκαν και άλλες ενώσεις με ιδιότητες παρόμοιες με αυτές της υπερφορίνης.

### Ιδιότητες της Υπερφορίνης

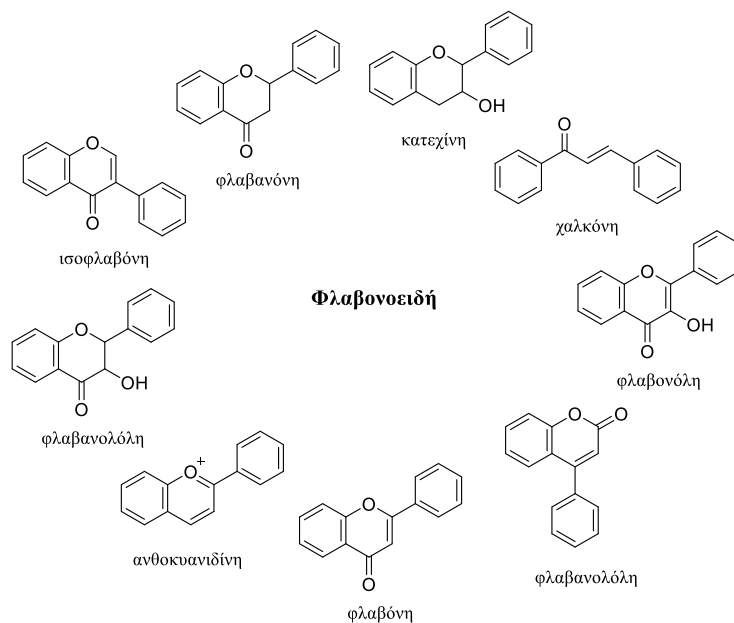
Η υπερφορίνη απαντάται σε πληθώρα ειδών του γένους και θεωρείται η βασικότερη φλωρογλουκινόλη του *H. perforatum*. Οι φλωρογλουκινόλες είναι λιπόφιλες ενώσεις, ευαίσθητες στην έκθεση στο φως και στις υψηλές θερμοκρασίες. Κατά συνέπεια, η υπερφορίνη είναι μία εξαιρετικά λιπόφιλη ένωση, διαλυτή σε οργανικούς διαλύτες, αλλά αδιάλυτη σε νερό. Σε διάλυμα είναι αρκετά ασταθής, κάτι που οφείλεται στους πολυάριθμους

διπλούς δεσμούς που μπορούν να αντιδράσουν με το οξυγόνο απλής κατάστασης (singlet oxygen) και να σχηματίσουν προϊόντα οξειδωσης. Έπειτα από έκθεση διαλύματος υπερφορίνης σε ηλιακό φως, βρέθηκαν πάνω από 13 πολικά προϊόντα απόσπασης.<sup>8</sup> Μάλιστα, η ένταση της ευαισθησίας της είναι τόση που παρατηρείται ακόμη και σε συνθήκες αποθήκευσης της ξηρής δρόγης ή του ξηρού εκχυλίσματος της δρόγης.<sup>9</sup> Ωστόσο, σε αιθανολικά εκχυλίσματα από αποξηραμένο φυτό η υπερφορίνη αποσυντίθεται μόλις σε λίγες μέρες, ενώ σε αιθανολικά εκχυλίσματα φρέσκου φυτού η υπερφορίνη παραμένει ανιχνεύσιμη για αρκετούς μήνες. Κάτι τέτοιο πιθανόν να οφείλεται σε διάφορους σταθεροποιητικούς παράγοντες οι οποίοι εκχυλίζονται από το φρέσκο φυτό μαζί με την υπερφορίνη. Οι Liu *et al.* μελετώντας την επίδραση του φωτός και του pH σε μεθανολικά εκχυλίσματα υπερίκου, διαπίστωσαν ότι μετά από 12 ώρες έκθεσης στο φως προκλήθηκε πλήρης αποικοδόμηση τόσο της υπερφορίνης όσο και της αντυπερφορίνης, με το pH να μην έχει καμία επίδραση σε αυτό.<sup>8</sup> Αντιθέτως, ελάχιστη αποικοδόμηση συμβαίνει μετά από 36 ώρες σε συνθήκες σκοταδιού. Ως προς την συλλογή και την ξήρανση του φυτού, εάν το *H. perforatum* συλλεχθεί και ξηρανθεί κατάλληλα η περιεκτικότητα της υπερφορίνης σε κάποια εκχυλίσματα μπορεί να φτάσει μέχρι και το 6%, ενώ σε παραδοσιακά διαλύματα του είδους αυτού ενδέχεται να απουσιάζει.

Εκτός από το *H. perforatum*, η υπερφορίνη έχει βρεθεί σε μικρό ποσοστό (0,05 έως 2,7 %) και σε άλλα είδη του υπερίκου όπως είναι τα *H. barbatum*, *H. richeri*, *H. maculatum*, *H. tetrapterum*, *H. rumeliacum*, *H. hirsutum*, *H. linarioides*, *H. Olympicum*.<sup>10</sup> Ενώ η υπερφορίνη και αντυπερφορίνη έχουν βρεθεί εκτός από το *H. perforatum* και στα *H. empetrifolium* και *H. Triquetrifolium*.<sup>11,12,13</sup>

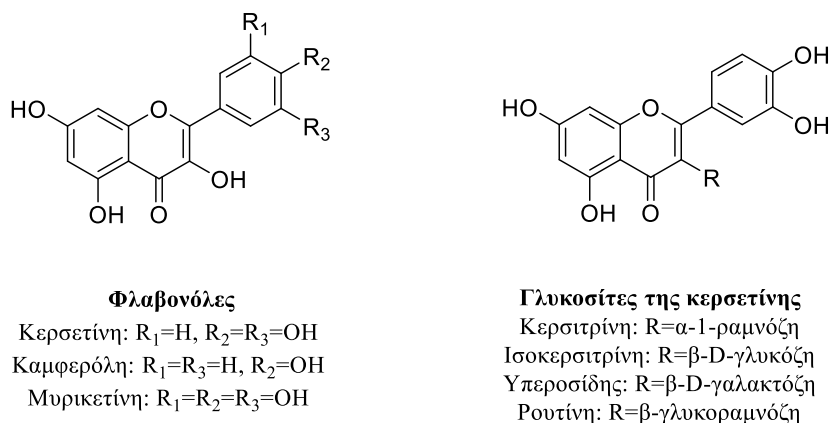
### 1.2.3. Φλαβονοειδή

Δομικά, τα φλαβονοειδή αποτελούνται από ένα σκελετό 15 ατόμων άνθρακα διατεταγμένα σε δύο αρωματικούς δακτυλίους (A και B) που συνδέονται μεταξύ τους με μία γέφυρα τριών ατόμων άνθρακα και από αυτή προκύπτει ένας ετεροκυκλικός πυρολικός δακτύλιος (C), (Εικόνα 1.4.). Οι διάφορες τροποποιήσεις στα μόρια των φλαβονοειδών είναι υπεύθυνες για την ποικιλότητά τους. Έτσι, περισσότερα από 8.000 φλαβονοειδή έχουν ταυτοποιηθεί. Κάποιες από τις βασικές υποομάδες των φλαβονοειδών είναι: ισοφλαβόνες, νεοφλαβονοειδή, φλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβανόνες, φλαβανονόλες, φλαβανόλες ή κατεχίνες, ανθοκυανίνες και χαλκόνες.



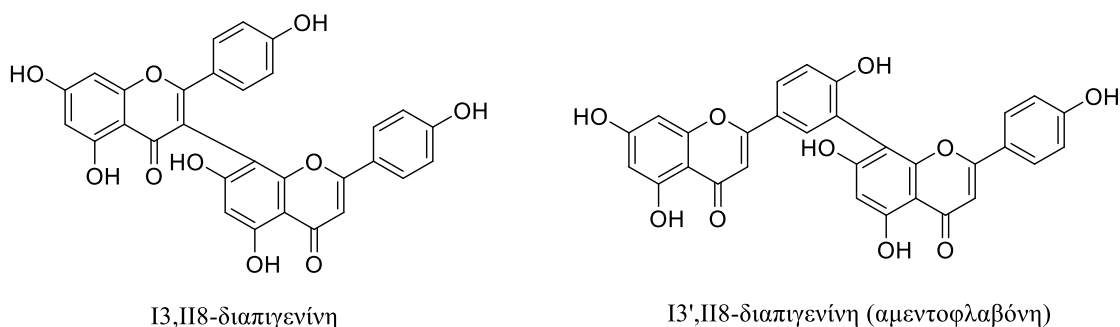
**Εικόνα 1.4.** Ταξινόμηση φλαβονοειδών

Τα φλαβονοειδή μπορούν να βρεθούν με μορφή άγλυκων, γλυκοζυλιωμένων, μεθυλιωμένων παραγώγων καθώς και ως διφλαβονοειδή. Επίσης, εντοπίζονται στη φύση και με την μορφή μέθυλο-αιθέρων και ακέτυλο-εστέρων. Η βασική τους δομή είναι η αγλυκόνη. Τα πιο γνωστά άγλυκα φλαβονοειδή είναι οι φλαβονόλες κερκετίνη, καμφερόλη, μυρικετίνη, διϋδροκερκετίνη και οι φλαβόνες λουτεολίνη, ενώ η κερκετίνη είναι το κύριο άγλυκο κομμάτι των περισσότερων γλυκοζυλιωμένων φλαβονολών, χωρίς αυτό να αποκλείει την ύπαρξη και άλλων γλυκοζυλιωμένων φλαβονοειδών όπως είναι η αστραγαλίνη (γλυκοζίτης της καμφερόλης) και οι γλυκοζίτες της λουτεολίνης και της απιγενίνης.<sup>14</sup> Όταν σχηματίζονται οι γλυκοζίτες, ο γλυκοζιτικός δεσμός βρίσκεται συνήθως στην θέση 3 ή 7 του υδατανθρακικού τμήματος και συνήθως αποτελείται από σάκχαρα όπως είναι η L-ραμνόζη, D-γλυκόζη, γαλακτόζη, γλυκοραμνόζη και αραβινόζη<sup>15,16,17</sup> (Εικόνα 1.5.).



**Εικόνα 1.5.** Δομές κυριότερων άγλυκων και γλυκοζυλιωμένων φλαβονολών του γένους *Hypericum*.

Τα πιο γνωστά διφλαβονοειδή εντοπίζονται κυρίως στο είδος *H. perforatum* και είναι οι διαπιγενίνες ( $C_{30}H_{18}O_{10}$ , Mr 538,47) Ι3,Π8-διαπιγενίνη και Ι3',Π8-διαπιγενίνη (αμεντοφλαβόνη) όπου περιέχονται στο συγκεκριμένο είδος σε ποσοστά από 0.01-0.5% (Εικόνα 1.6.). Ωστόσο, οι ενώσεις αυτές έχουν εντοπιστεί και σε άλλα είδη όπως είναι το *H. hirsutum*, *H. barbatum* and *H. montanum*.<sup>18</sup>

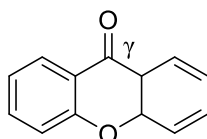


**Εικόνα 1.6.** Δομές διφλαβονοειδών του είδους *H. perforatum*.

Όσον αφορά στην παρουσία των φλαβονοειδών στα φυτά, φαίνεται να παρουσιάζουν ποικίλες βιολογικές ιδιότητες. Συντίθενται σε συγκεκριμένα σημεία του φυτού και είναι υπεύθυνα για το χρώμα και το άρωμα των ανθών, αλλά και στον καρπό προκειμένου να προσελκύσουν επικονιαστές και κατά συνέπεια να βοηθήσουν τη βλάστηση των σπορίων.<sup>19</sup> Επιπλέον, τα φλαβονοειδή προστατεύουν τα φυτά, δρουν ως φίλτρα υπεριώδους ακτινοβολίας<sup>20</sup> και λειτουργούν προστατευτικά στον παγετό και την ξηρασία.<sup>21</sup> Τα φλαβονοειδή συνδέονται με ένα ευρύ φάσμα θετικών επιδράσεων για την υγεία και είναι αναπόσπαστο στοιχείο εφαρμογών στη φαρμακευτική, την ιατρική και την κοσμετολογία. Αυτό αποδίδεται στις αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιμεταλλαξογόνες και αντικαρκινικές ιδιότητές τους. Οι επιθυμητές βιοχημικές και αντιοξειδωτικές αυτές επιδράσεις έχει διαπιστωθεί ότι σχετίζονται με διάφορες χρόνιες ασθένειες όπως ο καρκίνος, η νόσος Alzheimer, η αθηροσκλήρωση, κ.λπ.<sup>22</sup>

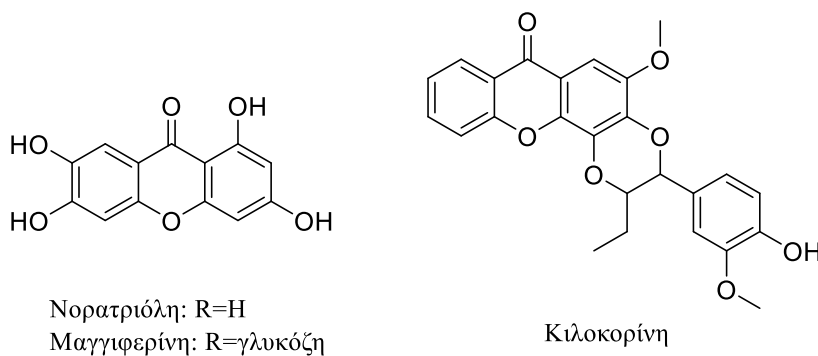
#### 1.2.4. Ξανθόνες

Οι ξανθόνες γενικά απαντώνται μόνο στις οικογένειες *Gentianaceae* και *Clusiaceae*, ενώ εμφανίζονται κυρίως στις ρίζες και λιγότερο στα εναέρια μέρη του φυτού. Οι απλές οξυγονωμένες ξανθόνες βρίσκονται και στις δύο οικογένειες, ενώ οι προνυλιωμένες ξανθόνες συνήθως απαντώνται στην *Clusiaceae*.<sup>23</sup> Δομικά είναι ετεροκυκλικές ενώσεις με δομή γ-διβενζοπυρόνης και ανήκουν στα φαινολικά οξέα. Προκύπτουν από τον μεταβολισμό του υδροξυβενζοϊκού οξέος μέσω της μεταβολικής οδού του σικιμικού και του οξικού οξέος.



Εικόνα 1.7. Βασικός σκελετός ξανθονών.

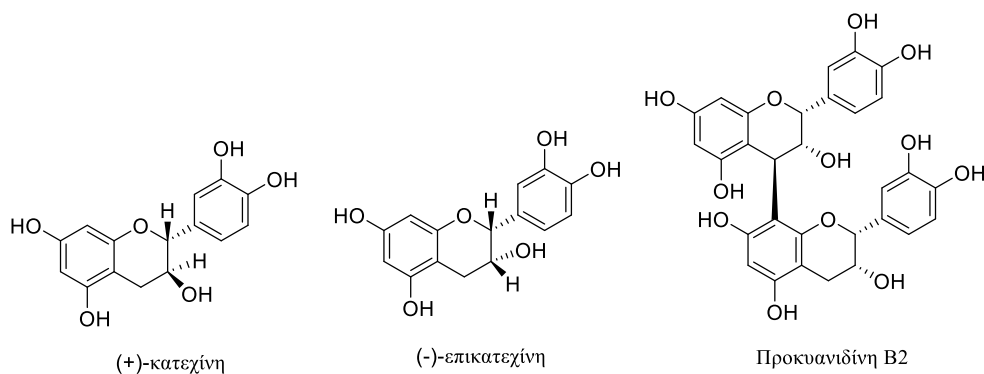
Πάνω από 150 διαφορετικές ξανθόνες έχουν απομονωθεί από τα είδη του γένους *Hypericum*. Κάποιες από τις κύριες ξανθόνες που έχουν απομονωθεί στο είδος *H. perforatum* είναι: 1,3,6,7-τετραϋδροξυξανθόνη (νορατριόλη), μαγγιφερίνη, ισομαγγιφερίνη και ξανθονολινοειδής κιλοκορίνη (Εικόνα 1.8.).



Εικόνα 1.8. Δομές κυριότερων ξανθονών του είδους *H. perforatum*.

### 1.2.5. Ταννίνες και προκυανιδίνες

Το ποσοστό των ταννινών στο είδος *H. perforatum* κυμαίνεται μεταξύ 2-4%, με το μέγιστο της συγκέντρωσης να είναι πριν την ανθοφορία.<sup>24,25</sup> Οι κυριότερες ταννίνες που έχουν απομονωθεί από εκχυλίσματα δρόγης του φυτού είναι η (+)-κατεχίνη, η (-)-επικατεχίνη (Εικόνα 1.9.) και η προκυανιδίνες A2, B1, B2, B3, B5, B7 και C1, με τις τελευταίες να έχουν βρεθεί σε υδατικά εκχυλίσματα του είδους.<sup>26</sup>



Εικόνα 1.9. Δομές κυριότερων ταννινών και προκυανιδινών του γένους *Hypericum*.

### 1.2.6. Φαινολικά οξέα και άλλες φαινολικές ενώσεις

Τα φαινολικά οξέα που έχουν βρεθεί σε μεγαλύτερο ποσοστό στα είδη του *Hypericum* είναι τα «χλωρογενικά οξέα» (κυρίως το 5-O-καφεοϋλο-(-)-κινικό οξύ) και το καφεϊκό οξύ. Άλλα καφεοϋλο-κινικά οξέα είναι το νεοχλωρογενικό οξύ (3-O-[E]-καφεοϋλο-(-)-κινικό οξύ), το κουμαρικό οξύ, το 3-O-[E]-4-κουμαροϋλο-κινικό οξύ, το 3-O-[Z]-4-κουμαροϋλο-κινικό οξύ και το κρύπτοχλωρογενικό οξύ (4-O-[E]-καφεοϋλο-(-)-κινικό οξύ) και το πρωτοκατεχοϊκό οξύ. Σύμφωνα με τους Upadhyay & Rao<sup>27</sup> έχουν βρεθεί πάνω από 70 διαφορετικές δομές καφεοϋλο-κινικών οξέων και δεδομένου ότι βρίσκονται στον καφέ, στα φρούτα και στα λαχανικά, είναι η πιο συχνή ομάδα φαινολικών που λαμβάνουμε μέσω της διατροφής μας.

Άλλα φαινολικά οξέα που έχουν απομονωθεί από το γένος *Hypericum* και δεν ανήκουν στην κατηγορία των καφεοϋλο-κινικών, είναι το φερουλικό, το προκατεχινικό, το γαλλικό, το ομοβανιλικό, το υδροβενζοϊκό, το βανιλικό και το ελλαγικό οξύ.<sup>28,29,30,31,32,33,34,35,36,37</sup>



Οι κουμαρίνες όπως είναι η σκοπολετίνη και η ουμπελιφερόνη έχουν ταυτοποιηθεί στα είδη *H. perforatum*, *H. elongatum*, *H. helianthemoides* και *H. Scabrum*.<sup>38</sup>

### 1.2.7. Τερπένια και αλκάνια

Τα είδη του γένους *Hypericum* περιέχουν αιθέριο έλαιο σε ποσοστό που κυμαίνεται στο 0.1 έως 1%, που κυρίως αποθηκεύεται σε ειδικούς ημιδιαφανείς αδένες στα φύλλα και τα άνθη του φυτού με τους βλαστούς να περιέχουν ελάχιστη έως και καθόλου ποσότητα αιθέριου ελαίου.

Το αιθέριο έλαιο του γένους *Hypericum* περιέχει αλειφατικές ενώσεις όπως το 2-μέθυλο-οκτάνιο, n-εννεάνιο, ίσοενδεκάνιο, n-δεκατετρανόλη, δωδεκανόλη, 3-μέθυλο-εννεάνιο καθώς και τερπενοειδή όπως το α-πινένιο, το β-πινένιο, η γερανιόλη, το λιμονένιο, η α-τερπινεόλη, το β-καρνοφυλλένιο, β-φαρνεσένιο, χουμουλένιο κ.α.

Το είδος και το ποσοστό του κάθε συστατικού εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το είδος, τις συνθήκες ανάπτυξής τους και από το μέρος του φυτού που έχει χρησιμοποιηθεί για την απόσταξη. Έτσι, όταν το αιθέριο έλαιο προέρχεται από τα φύλλα τότε είναι πλούσιο σε β-καρνοφυλλένιο και τα οξείδια του, ενώ τα άνθη είναι πλούσια σε δωδεκανόλη, σπατουλενόλη, βιριδιφλορόλη, καροτόλη και δεκατετρανόλη.<sup>39</sup> Μάλιστα, υπάρχουν είδη του *Hypericum* που δεν περιέχουν α-πινένιο και β-καρνοφυλλένιο (δύο από τα βασικότερα συστατικά του είδους) ενώ υπάρχουν έλαια από το ίδιο είδος με εντελώς διαφορετική ποιοτική και ποσοτική σύσταση.<sup>40,41</sup>

### 1.3. Ποικιλότητα δευτερογενών μεταβολιτών του γένους *Hypericum*

Το περιεχόμενο των δευτερογενών μεταβολιτών του γένους *Hypericum* δεν σχετίζεται μόνο με γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες, άλλα και με την περίοδο συλλογής, την διαδικασία ξήρανσης και αποθήκευσης του φυτού. Η επιλογή, λοιπόν, της κατάλληλης χρονικής περιόδου είναι σημαντική και διαφέρει ανάλογα με τον επιθυμητό δευτερογενή μεταβολίτη. Για παράδειγμα, τα φλαβονοειδή παρουσιάζουν μέγιστη συσσώρευση κατά την ανθοφορία ενώ η συγκέντρωση της υπερικίνης και της ψευδοϋπερικίνης φτάνει στο μέγιστο στα νεαρά άνθη ενώ σχεδόν μηδενίζεται κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του καρπού. Αντιθέτως, η ποσότητα της υπερφορίνης εξακολουθεί και αυξάνεται κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του καρπού.<sup>42,43,44,45</sup>

Σύμφωνα με τον Crockett και τους συνεργάτες του<sup>46</sup> υπάρχει μεγάλη ποικιλότητα ως προς το περιεχόμενο των δευτερογενών μεταβολιτών στις διάφορες ομάδες του είδους. Εξετάζοντας το περιεχόμενο σε υπερικίνη και υπερφορίνη σε 74 είδη *Hypericum* (περίπου 20% του συνόλου του γένους) τα οποία προέρχονταν από όλο τον κόσμο, βρέθηκε ότι οι ουσίες αυτές ήταν ανιχνεύσιμες μόνο σε λίγα είδη του γένους. Βέβαια, σε πιο πρόσφατες μελέτες από την ίδια ερευνητική ομάδα<sup>47</sup> βρέθηκαν όλο και περισσότερα είδη του γένους να περιέχουν αυτούς τους μεταβολίτες. Ωστόσο, παρόλο που υπάρχουν πάνω από 469 είδη του γένους αυτού, λίγα έχουν υψηλό ποσοστό σε υπερικίνη και υπερφορίνη.<sup>48</sup> Μάλιστα, σε κάποια είδη η υπερικίνη και η ψευδοϋπερικίνη είτε βρίσκεται σε αμελητέα ποσότητα είτε απουσιάζει εντελώς, ενώ σε άλλα όπως είναι το *H. empetrifolium* και το *H. hirsutum* εντοπίζεται μόνο η υπερικίνη.<sup>49,50</sup>

### 1.4. Φαρμακευτική δράση των συστατικών του γένους

Η παραδοσιακή χρήση του υπερικού περιλαμβάνει τη θεραπεία βακτηριακών λοιμώξεων, ασθενειών του αναπνευστικού συστήματος, πληγών στο δέρμα, του πεπτικού έλκους και των φλεγμονών. Παράλληλα, υπάρχουν αρκετές μελέτες που επικεντρώνονται στην αντικαρκινική, αντιοξειδωτική, αντικαταθλιπτική και νευροπροστατευτική δράση του εκχυλίσματος της δρόγης του φυτού. Όλες αυτές οι δράσεις αναφέρονται κυρίως στην χρήση του συνόλου του εκχυλίσματος του φυτού. Ωστόσο, αυτό δεν σημαίνει ότι δεν υπάρχουν μελέτες που να επικεντρώνονται στα επιμέρους συστατικά του φυτού που φαίνεται να εμφανίζουν αξιόλογη βιολογική δράση όπως είναι η υπερφορίνη, η αντι-υπερφορίνη, η υπερικίνη, η ψευδοϋπερικίνη, τα φλαβονοειδή κ.α.

Σύμφωνα με την παραδοσιακή ιατρική το έλαιο από το *Hypericum* χρησιμοποιείται για την επούλωση των πληγών και των εγκαυμάτων. Παράλληλα έχει αποδειχθεί η αντιμικροβιακή και αντιϊική του δράση. Πολλές αντιμικροβιακές και επουλωτικές δοκιμές έχουν πραγματοποιηθεί με εκχυλίσματα από διάφορα είδη του γένους *Hypericum*. Στην αντιμικροβιακή δράση του φυτού συμμετεχει τόσο η υπερφορίνη όσο και η υπερικίνη αλλά και τα φλαβονοειδή. Στη μελέτη του Nogueira και των συνεργατών του<sup>51</sup> όπου εξέτασαν την αντιβακτηριακή δράση 15 ειδών *Hypericum* ενάντια σε 2 Gram αρνητικά και 2 Gram θετικά βακτήρια, σε σύγκριση με τη δράση της υπερικίνης και ψευδοϋπερικίνης, παρατήρησαν πως πέρα από τα αιθανολικά εκχυλίσματα, δράση εμφάνισαν και οι ναφθοδιανθρόνες ενάντια σε όλα τα εξεταζόμενα στελέχη, όπως το *Staphylococcus aureus*<sup>52</sup> και *Streptococcus faecium* και *Corynebacterium diphtheria*.<sup>53</sup> Ορισμένα κλάσματα των εκχυλισμάτων από είδη *Hypericum* που περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις φλαβονοειδών, κατεχίνων και υπερικίνης εμφανίζουν αντιϊική δράση έναντι του ιού HIV, της ηπατίτιδας C, του έρπητα κ.α.<sup>54,55</sup>

Επί του παρόντος, από το σύνολο της επιστημονικής βιβλιογραφίας<sup>56,57</sup> είναι γενικώς αποδεκτό ότι τα σκευάσματα του υπερικού έχουν ένα καλό προφίλ αποτελεσματικότητας σε ασθενείς με ήπια έως μέτρια κατάθλιψη και υψηλή ανεκτικότητα. Η υπερφορίνη θεωρείται η κύρια υπεύθυνη ένωση για την αντικαταθλιπτική δράση του υπερικού.<sup>58,59</sup> Η μελέτη ωστόσο του Butterweck και των συνεργατών του<sup>60</sup> έδειξαν πως το εκχύλισμα ήταν εξίσου δραστικό ακόμα και όταν απομακρύνθηκαν η υπερφορίνη και η υπερικίνη, που σημαίνει πως υπάρχουν και άλλα μόρια που συμβάλλουν στην αντικαταθλιπτική δράση του υπερικού και μάλιστα πως δρουν συνεργατικά. Η αντικαταθλιπτική αυτή δράση φαίνεται να οφείλεται και σε αρκετά μεγάλο ποσοστό φλαβονοειδών που περιέχει (αυξάνουν την διαλυτότητα των ναφθοδιανθρονών σε υδατικά διαλύματα), όπου δρουν συνεργατικά με άλλες ενώσεις του υπερικού όπως οι ναφθοδιανθρόνες.

Τα φλαβονοειδή είναι ευρέως γνωστά για την αντιοξειδωτική τους δράση. Φυτοχημικές αναλύσεις σε αλκοολικά εκχυλίσματα *Hypericum perforatum* έδειξαν έντονη αντιοξειδωτική δράση για την οποία υπεύθυνα ήταν τα φλαβονοειδή.<sup>61,62</sup> Τέλος, σύμφωνα με την μελέτη του Agnol και των συνεργατών του<sup>63</sup> τα φλαβονοειδή φαίνεται πως συμβάλλουν στην αντιβακτηριακή δράση των φυτών του γένους *Hypericum* καθώς τα μεθανολικά εκχυλίσματα από τα δείγματα που εμφάνισαν δράση ήταν πλούσια σε φλαβονοειδή.

Άλλες δράσεις που φέρεται να έχει η υπερφορίνη είναι αντιβακτηριακή κατά Gram θετικών βακτηρίων σε υψηλές συγκεντρώσεις, αντιφλεγμονώδης,<sup>64</sup> κυτταροτοξική μέσω της επαγωγής της απόπτωσης σε καρκινικά κύτταρα, όπως λευχαιμικά κύτταρα, αλλά και ανασταλτική δράση της αγγειογένεσης *in vitro* αλλά και *in vivo*<sup>65</sup>.

Η υπερικίνη έχει μελετηθεί εκτενώς για την εφαρμογή της στη φωτοδυναμική θεραπεία, η οποία περιλαμβάνει την χορήγηση ενός μη τοξικού φαρμάκου (συστημικά, τοπικά, ενδοφλέβια) με στόχο την επιλεκτική καταστροφή παθολογικών ιστών, μέσω της ενεργοποίησης του υπό την επίδραση του φωτός (μήκος κύματος 620-690 nm ερυθρή περιοχή, συνήθως) και παρουσία οξυγόνου, αφού πρώτα το μόριο αυτό φτάσει στον ιστό-στόχο. Η ένωση που χορηγείται (φωτοευαίσθητη) προκαλεί τη δημιουργία ελεύθερων ριζών και άλλων μορίων υψηλής χημικής δραστηριότητας, ύστερα από μια σειρά φωτοχημικών αντιδράσεων. Το αποτέλεσμα είναι η εκλεκτική νέκρωση του παθολογικού ιστού με την ελάχιστη βλαπτική επίδραση στους περιβάλλοντες υγιείς ιστούς. Οι ναφθοδιανθρόνες παρουσιάζουν ισχυρή ικανότητα να παράγουν δραστικές μορφές οξυγόνου (reactive oxygen species-ROS), οδηγώντας τα κύτταρα σε απόπτωση (προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο), κάτι που τις κατατάσσει στις πιο ισχυρές φωτοευαίσθητοποιές «φυσικές» ενώσεις.

### **Φωτοτοξικότητα**

Η πιο γνωστή από τις πιθανές παρενέργειες των εκχυλισμάτων του *Hypericum* είναι η φωτοτοξικότητα που μπορεί να προκαλέσει η επίδραση του ηλιακού φωτός με τις υπερικίνες οι οποίες έχουν αναγνωριστεί ως το κύριο φωτοτοξικό συστατικό. Στην περίπτωση της τοξικότητας του *Hypericum*, η υπερικίνη απορροφάται από το έντερο και συγκεντρώνεται κοντά στο δέρμα. Όταν το δέρμα εκτίθεται στο φως του ήλιου, μια αλλεργική αντίδραση λαμβάνει χώρα. Απουσία του ηλιακού φωτός, η αντίδραση δεν θα προκύψει, και η ένωση δεν παρουσιάζει έτσι ιδιαίτερη τοξικότητα. Οι αντιδράσεις φωτοευαισθησίας είναι άμεσα εξαρτώμενες και από την δόση, έτσι απαιτούνται πολύ υψηλές ποσότητες για να εμφανιστούν τα συμπτώματα φωτοτοξικότητας μετά από έκθεση στον ήλιο. Τα συμπτώματα που εμφανίζονται είναι συνήθως δερματικά εξανθήματα, εγκαύματα και κνησμός. Μεταξύ των φλαβονοειδών που μελετήθηκαν, η κερκιτρίνη βρέθηκε να είναι κυτταροτοξική, η ρουτίνη επέδειξε απροσδόκητη φωτοτοξικότητα.

Όσον αφορά στην παραδοσιακή τοπική ιατρική στη Κρήτη, αναφέρεται ότι το έλαιο του βοτάνου χρησιμοποιείται από τους κατοίκους του νησιού για την επούλωση πληγών

αλλά και τη θεραπεία της ψωρίασης. Η κοινή θεραπευτική τακτική για την ασθένεια αυτή είναι η Φωτοδυναμική Θεραπεία η οποία αναφέρθηκε και παραπάνω. Η φωτοδυναμικά δραστική φυτική χρωστική ουσία υπερικίνη απορροφά το φως στις υπεριώδεις και ορατές περιοχές, οπότε γίνεται φωτοτοξική μέσω της παραγωγής δραστικών ειδών οξυγόνου. Παρ' όλα αυτά, οι φωτοδυναμικοί μηχανισμοί παίζουν και ένα θετικό ρόλο στη φωτοθεραπεία UVA (δηλ. μέσω ενδογενών φωτοευαισθητοποιητών) για τη θεραπεία δερματικών διαταραχών όπως έκζεμα και ψωρίαση. Το υπεριώδες φως είναι αποτελεσματικό στη θεραπεία φλεγμονωδών διαταραχών του δέρματος για την μείωση των κυττάρων του Langerhans από την επιδερμίδα ή για την ένδειξη ανασταλτικών επιδράσεων στην ολική διέγερση των επιδερμικών κυττάρων.

### 1.5. *Hypericum empetrifolium*

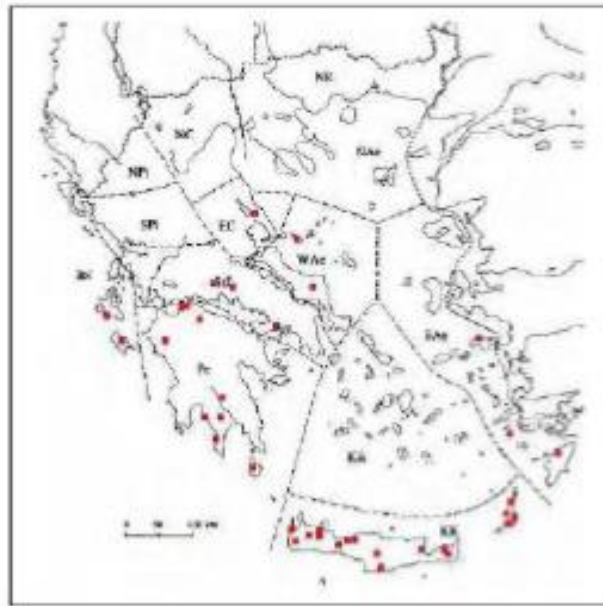
Στην Ελλάδα φύονται περίπου 32 είδη και υποείδη του γένους αυτού, τα οποία ταξινομούνται σε 12 τμήματα.<sup>1</sup> Ένα από τα μη συνηθισμένα είδη είναι το *H. empetrifolium*, το οποίο είναι ένας πολυετής θάμνος που φτάνει μέχρι και τα 60 εκατοστά σε ύψος, απαντάται σε ξηρές βραχώδεις περιοχές και σε χαμηλά έως μέσα υψόμετρα (0- 2000 μέτρα). Το *H. empetrifolium* φύεται στην Ελλάδα, την Βόρεια Αλβανία, τη Δυτική Τουρκία και τη Λιβύη. Στην Ελλάδα αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1802 και απαντάται στη Νότια Ηπειρωτική Ελλάδα, τα νησιά του Αιγαίου και την Κρήτη.<sup>3</sup>



Εικόνα 1.10. *Hypericum empetrifolium*.

Μεταξύ των διαφόρων ειδών του *Hypericum*, έχει αναφερθεί ότι το *H. empetrifolium* έχει υψηλή αντιοξειδωτική δράση λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε φλαβονοειδή και φαινόλες.<sup>66</sup> Έτσι, το *H. empetrifolium* έχει χρησιμοποιηθεί ως αντισηπτικό, καταπραϋντικό, για την επούλωση τραυμάτων και ως αντιβακτηριακό. *In vitro* και *in vivo* μελέτες που προέρχονται από εκχυλίσματα του *Hypericum empetrifolium* έχουν δείξει την αντιφλεγμονώδη δράση που έχει αναφερθεί στην παραδοσιακή ιατρική.<sup>67,68</sup> Επιπλέον, τα

εκχυλίσματα του *H. empetrifolium* περιέχουν σημαντικό ποσοστό από ακυλιωμένες φλορογλυκινόλες, οι οποίες σύμφωνα με πρόσφατη μελέτη είναι υπεύθυνες για την πιθανή αντι-πολλαπλασιαστική και κυτταροτοξική ιδιότητα των εκχυλισμάτων των φυτών του *Hypericum*.<sup>69,70</sup>



**Εικόνα 1.11.** Γεωγραφική εξάπλωση του *Hypericum empetrifolium* Wild ssp. *empetrifolium*.

---

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

---

## **2.1. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ**

### **2.1.1. Χρωματογραφικές Μέθοδοι**

#### **Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (T.L.C)**

1. Γέλη οξειδίου του πυριτίου με δείκτη φθορισμού σε φύλλα αλουμινίου (20 × 20 cm). Πάχος στοιβάδας 0.1 mm (Kieselgel F254, Merck, Art. 5554) (αναλυτική χρωματογραφία).
2. Κελλουλόζη χωρίς δείκτη φθορισμού σε φύλλα αλουμινίου (20 × 20 cm). Πάχος στοιβάδας 0.1 mm (Merck, Art. 5552) (αναλυτική χρωματογραφία).
3. Γέλη οξειδίου του πυριτίου με δείκτη φθορισμού σε γυάλινες πλάκες (20 × 20 cm). Μέτριας διαμέτρου πόροι 60 Å (Fluka Analytical, Art. 99571-25EA).

Οι πλάκες γέλης οξειδίου του πυριτίου αναπτύχθηκαν σε συστήματα οργανικών διαλυτών ενώ οι πλάκες κελλουλόζης αναπτύχθηκαν σε συστήματα οξικού οξέος:νερού (15% και 30%).

Μετά την ανάπτυξη τους σε κατάλληλο σύστημα διαλυτών, οι πλάκες ελέγχονταν σε λάμπα υπεριώδους φωτός (UV) στα 254 nm και 365 nm και οι κηλίδες ανιχνεύονταν ύστερα από ψεκασμό με το κατάλληλο αντιδραστήριο και θέρμανση της πλάκας στους 100 °C για περίπου 2 λεπτά.

Για την εμφάνιση των χρωματογραφημάτων πραγματοποιήθηκε εμβάπτιση των πλακιδίων στα εξής αντιδραστήρια:

1. Αντιδραστήριο θεϊκής βανιλίνης. (Διάλυμα A: βανιλίνη 5% σε μεθανόλη. Διάλυμα B: π. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5% σε μεθανόλη) για τα πλακίδια γέλης οξειδίου του πυριτίου επιστρωμένης σε φύλλα αλουμινίου. Ίσοι όγκοι αναμιγνύονται αμέσως πριν τον ψεκασμό και το χρωματογράφημα θερμαίνεται για 2 λεπτά στους 105 °C.
2. Αντιδραστήριο Neu (Naturstoffreagenz A), β-αμινοαιθυλεστέρας του διφαινυλοβορικού οξέος, διάλυμα 1% σε μεθανόλη για τα πλακίδια κελλουλόζης.
3. Αιθανολικό διάλυμα 7% φωσφομολυβδαινικού οξέος ακολουθούμενο από σύντομη θέρμανση σε θερμαντική πλάκα. Η εμφάνιση αυτή εφαρμόζεται για τα πλακίδια γέλης οξειδίου του πυριτίου επιστρωμένης σε γυάλινη πλάκα.

#### **Χρωματογραφία στήλης (C.C.)**

1. Sephadex LH-20 (Pharmacia) (γέλη υδροξυπροπυλιωμένης δεξτράνης) μέγεθος σωματιδίων 25-100 μm. Πριν από τη χρήση διογκώνεται με το διαλύτη έκλουσης για 24 ώρες. Η χρήση μαγνητικού αναδευτήρα δεν προτιμάται δεδομένου ότι υπάρχει κίνδυνος καταθρυμματισμού των κόκκων. Η ροή έκλουσης του διαλύτη ήταν φυσική.



2. Γέλη οξειδίου του πυριτίου 60 (Kieselgel 60), 230-400 mesh ASTM, για Flash χρωματογραφία στήλης (Merck, Art. 9385).

Η χρωματογραφία στήλης πραγματοποιήθηκε σε γυάλινες στήλες διαφόρων διαστάσεων.

### 2.1.2. Φασματοσκοπικές Μέθοδοι

#### Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

Για την λήψη των φασμάτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, ομοπυρηνικού και ετεροπυρηνικού συσχετισμού χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα φασματόμετρα:

- Bruker MSL 300 (300 MHz για  $^1\text{H}$  και 75 MHz για  $^{13}\text{C}$  NMR).
- Bruker FT-NMR AMX 500 (500 MHz για  $^1\text{H}$  και 125 MHz για  $^{13}\text{C}$  NMR).

Τα φάσματα λήφθηκαν με τη χρήση των παρακάτω δευτεριωμένων διαλυτών ως εσωτερικά πρότυπα:

- $\text{CDCl}_3$  (7.26 ppm για  $^1\text{H}$ -NMR και 77.16 ppm για  $^{13}\text{C}$ -NMR).
- $\text{CD}_3\text{OD}$  (3.31 ppm για  $^1\text{H}$ -NMR και 49.05 ppm για  $^{13}\text{C}$ -NMR).
- $\text{D}_2\text{O}$  (4.79 ppm για  $^1\text{H}$ -NMR).

Οι χημικές μετατοπίσεις εμφανίζονται σε  $\delta$  (ppm) και οι σταθερές σύζευξης (J) σε Hertz (Hz). Τα φάσματα NMR ανάλογα με τις ιδιότητες του δείγματος και τις ανάγκες για επιπλέον πληροφορίες λήφθηκαν με διάφορες παραμέτρους. Για τα φάσματα μίας διάστασης  $^1\text{H}$ -NMR που λήφθηκαν, χρησιμοποιήθηκαν είτε το πείραμα zg30 είτε το zgpr στο οποίο γίνεται καταστολή της κορυφής του νερού. Για τα φάσματα  $^{13}\text{C}$ -NMR λήφθηκαν τα πειράματα: zgpg30 και dept-135. Για τα φάσματα δύο διαστάσεων έγιναν τα εξής πειράματα: από το MSL300 λήφθηκαν τα cosygpprf (για COSY), hsqcetgp (για HSQC) και hmbcgrlpndqf (για HMBC) ενώ από το AMX500 τα cosygprf (για COSY), hmbcgrlpndqf (για HMBC), hsqcetgpsp (για HSQC) και noesygpph (για NOESY).

Τα δισδιάστατα πειράματα (2D NMR) που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

- DEPT-135 (Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer).
- HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence).
- COSY (Correlation Spectroscopy).
- HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation).
- NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy).

## Φασματομετρία Μάζας Ηλεκτροψεκασμού (ESI-MS)

Για τη λήψη φασμάτων, τα δείγματα αραιώθηκαν σε συγκεντρώσεις των 50 ppm και 250 ppm στον κατάλληλο διαλύτη.

Τα φάσματα μάζας πλήρους σάρωσης και MSn με ιοντισμό ηλεκτροψεκασμού καταγράφηκαν σε φασματόμετρο μάζας τετραπολικής παγίδας. LCQ Advantage (Thermo Fischer Scientific, San Jose, CA, USA). Τα φάσματα λήφθηκαν στο εύρος m/z 100-2000 τόσο στον θετικό όσο και στον αρνητικό ιοντισμό. Στον θετικό ιοντισμό χρησιμοποιήθηκαν οι εξής παράμετροι: Spray voltage = 4.5 kV, Nitrogen sheath gas flow rate = 45 (arbitrary units), Nitrogen auxiliary gas flow rate = 5 (arbitrary units), Ion transfer capillary temperature = 300 °C, Capillary voltage = 20 V, Tube lens offset voltage = 5 V. Για τον αρνητικό ιοντισμό χρησιμοποιήθηκαν οι εξής παράμετροι: Spray voltage = 4.5 kV, Nitrogen sheath gas flow rate = 45 (arbitrary units), Nitrogen auxiliary gas flow rate = 5 (arbitrary units), Ion transfer capillary temperature = 300 °C, Capillary voltage = -80 V, Tube lens offset voltage = -95 V. Στα φάσματα πλήρους σάρωσης ο μέγιστος χρόνος παγίδευσης ιόντων (maximum injection time) ορίστηκε στα 300 ms. Για τα φάσματα MSn ο μέγιστος χρόνος παγίδευσης ιόντων ήταν 200 ms ενώ το εύρος απομόνωσης m/z (isolation width) ήταν 2.0.

## Ειδική γωνία στροφής [α]<sub>D</sub>

Πολωσίμετρο KRUSS P3000 με χρήση κυβελίδων χωρητικότητας 1 ml με διαλύματα των ουσιών σε MeOH και EtOAc.

## 2.2. ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ ΜΕΛΕΤΗΣ

Το φυτό *Hypericum empetrifolium* συλλέχθηκε από τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Μυρσίνη Αρχοντάκη από το χωριό Χανδράς της Σητείας, (γεωγραφικό πλάτος φ= 35°5'24"B, γεωγραφικό μήκος λ= 26°6'36"A) τις πρώτες μέρες του Ιουλίου του 2012 και ξηράνθηκε σε ξηρό περιβάλλον απουσία φωτός σε διάστημα 15 ημερών. Τα δείγματα δρόγης αναγνωρίστηκαν από τον καθηγητή του Τμήματος Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης κ. Στ. Πυρίντζο και τα δείγματα, αφού ξηράνθηκαν, τοποθετήθηκαν στο Herbarium του Ιδρύματος.

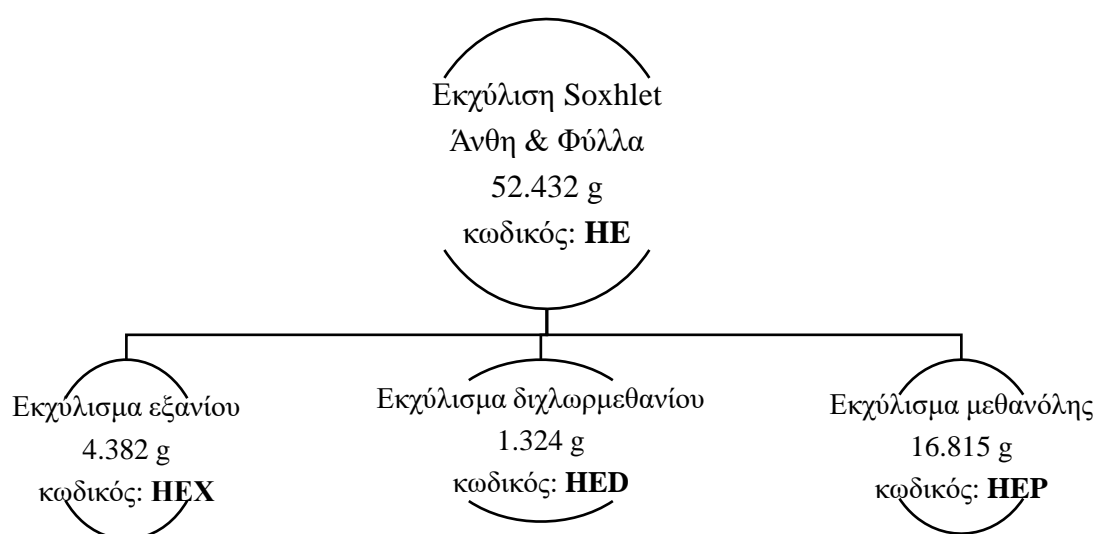
### 2.3. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΤΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΦΥΤΟ

Τα δείγματα δρόγης του φυτού (φύλλα και άνθη) κονιοποιήθηκαν και η εκχύλιση έγινε με τη χρήση της διάταξης Soxhlet. Στη διάταξη Soxhlet προστέθηκαν υάλινες σφαίρες βρασμού σε ικανό ύψος ώστε το thimble να βρίσκεται λίγο υψηλότερα από το σημείο ανακύκλωσης του διαλύτη. Μέσα στο thimble τοποθετήθηκε η ποσότητα του κονιοποιημένου φυτού. Στη Soxhlet εφαρμόσθηκε ψυκτήρας ύδατος. Η διαδικασία της εκχύλισης ολοκληρώθηκε με το πέρας 10 κύκλων του διαλύτη μέσα από το δείγμα. Το εκχύλισμα συλλέχθηκε και ο διαλύτης απομακρύνθηκε πλήρως σε περιστροφικό εξατμιστήρα υπό κενό (rotary evaporator). Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε με χρήση φιαλών των 3L που περιείχαν μερικές υάλινες σφαίρες βρασμού στις οποίες εισάχθηκαν 1.5L των παρακάτω διαλυτών διαφορετικής πολικότητας:

- **Εξάνιο (Hex)**. Η σφαιρική φιάλη τοποθετήθηκε σε θερμαντικό μανδύα που ρευματοδοτείται από ροοστάτη (ρύθμιση στα 80V).
- **Διχλωρομεθάνιο (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)**. Ρύθμιση του ροοστάτη στα 70V.
- **Μεθανόλη (MeOH)**. Ρύθμιση του ροοστάτη στα 80V.

Με τον τρόπο αυτό τα συστατικά του φυτού παραλήφθηκαν σε τρεις ομάδες διαχωρισμένες με βάση την πολικότητά τους: άπολες για το εκχύλισμα εξανίου, μεσαίας πολικότητας για το εκχύλισμα διχλωρομεθανίου και πολικές για το μεθανολικό εκχύλισμα.

Οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν και λήφθηκαν φαίνονται στο παρακάτω διάγραμμα:



**Διάγραμμα 2.1.** Διάγραμμα εκχύλισης συστατικών από το φυτό *H. empetrifolium* με διαλύτες διαφορετικής πολικότητας.

## 2.4. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ

### 2.4.1. Διαχωρισμός συστατικών του εκχυλίσματος CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (κωδικός HED)

Το διχλωρομεθανικό εκχύλισμα HED (2.184 g) υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης (C.C. 13 cm x 4.5 cm) επί γέλης πυριτίου (silica gel) με βαθμιδωτό σύστημα διαλυτών PE, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOAc και MeOH. Συλλέχθηκαν 324 κλάσματα μέσου όγκου περίπου 10 ml σε δοκιμαστικούς σωλήνες καθώς και κάποια σε κωνικές φιάλες. Ο έλεγχος των ουσιών και η ομαδοποίηση έγινε με βάση την ανάπτυξη τους σε πλακίδια T.L.C γέλης πυριτίου επιστρωμένη σε πλάκα αλουμινίου σε διάφορα συστήματα διαλυτών PE/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc και CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH.

Οι ομάδες που προέκυψαν είναι οι ακόλουθες:

<i>Όνομα ομάδας</i>	<i>% Αναλογία</i>	<i>Βάρος</i>
HED- <u>A</u>	PE:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 50:50	24 mg
HED- <u>C</u>	PE:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 50:50/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 100%	15 mg
HED- <u>D</u>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 100%/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :EtOAc 98:2	50 mg
HED- <u>E</u>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :EtOAc 98:2	23 mg
HED-fr. 47	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :EtOAc 97:3	1 mg
HED-fr. 48	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :EtOAc 97:3	1 mg
HED- <u>F</u>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :EtOAc 97:3	52 mg
HED- <u>G</u>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :EtOAc 97:3	112 mg
HED- <u>H</u>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :EtOAc 97:3/95:5	39 mg
HED- <u>I</u>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :EtOAc 95:5	346 mg
HED- <u>K</u>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :EtOAc 95:5/90:10	100 mg
HED- <u>L</u>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :EtOAc 90:10	56 mg
HED- <u>M</u>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :EtOAc 85:15	21 mg
HED- <u>N</u>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :EtOAc 85:15/80:20	51 mg
HED- <u>O</u>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :EtOAc 75:25	33 mg
HED- <u>P</u>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :EtOAc 75:25/70:30	87 mg
HED- <u>Q</u>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :EtOAc 60:40/50:50	124 mg
HED- <u>R</u>	EtOAc 100%/EtOAc:MeOH 50:50	170 mg
HED- <u>S</u>	EtOAc:MeOH 50:50/MeOH 100%	322 mg
HED- <u>T</u>	MeOH 100%	83 mg
HED- <u>U</u>	MeOH 100%	16 mg

Οι ομάδες HED-D, HED-G, HED-K και HED-I επιλέχθηκαν για επιπλέον επεξεργασία. Προκειμένου να βρεθεί το πλήθος των συστατικών που περιέχουν καθώς και το κατάλληλο σύστημα στο οποίο αυτά διαχωρίζονται, έγινε ανάπτυξη τους με χρωματογραφία λεπτής στιβάδος (T.L.C).

### **Ομάδα HED-D (50 mg)**

Για τον διαχωρισμό των συστατικών πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης (C.C. 12 cm x 1.5 cm) επί γέλης πυριτίου (silica gel) με βαθμιδωτό σύστημα μιγμάτων διαλυτών PE και Et<sub>2</sub>O. Συλλέχθηκαν 155 κλάσματα μέσου όγκου περίπου 5 ml σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Για την ομαδοποίηση των κλασμάτων ακολούθησε η ανάπτυξη τους σε πλακίδιο T.L.C επί γέλης πυριτίου σε διάφορα συστήματα διαλυτών PE/Et<sub>2</sub>O.

Οι ομάδες που προέκυψαν είναι οι ακόλουθες:

<i><b>Όνομα ομάδας</b></i>	<i><b>% Αναλογία</b></i>	<i><b>Βάρος</b></i>
HED-DA	PE 100%/PE:Et <sub>2</sub> O 99:1/98:2	1 mg
HED-DB	PE:Et <sub>2</sub> O 98:2/96:4	2 mg
HED-DC	PE:Et <sub>2</sub> O 96:4	2 mg
HED-DD	PE:Et <sub>2</sub> O 96:4/95:5	7 mg
HED-DE	PE:Et <sub>2</sub> O 95:5	5 mg
HED-DG	PE:Et <sub>2</sub> O 90:10	2 mg
HED-DH	PE:Et <sub>2</sub> O 90:10	3 mg
HED-DI	PE:Et <sub>2</sub> O 90:10	6 mg
HED-DK	PE:Et <sub>2</sub> O 87:13	3 mg
HED-DL	PE:Et <sub>2</sub> O 87:13/85:15/50:50	5 mg

### Ομάδα HED-G (100 mg)

Για τον διαχωρισμό των συστατικών πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης (C.C. 12 cm x 2 cm) επί γέλης πυριτίου (silica gel) με βαθμιδωτό σύστημα μιγμάτων διαλυτών PE, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> και EtOAc. Συλλέχθηκαν 173 κλάσματα μέσου όγκου περίπου 5 ml σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Για την ομαδοποίηση των κλασμάτων ακολούθησε η ανάπτυξη τους σε πλακίδιο T.L.C επί γέλης πυριτίου σε διάφορα συστήματα διαλυτών CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> και EtOAc.

Οι ομάδες που προέκυψαν είναι οι ακόλουθες:

<i>Όνομα ομάδας</i>	<i>% Αναλογία</i>	<i>Βάρος</i>
HED-G <u>A</u>	PE 100%/PE:EtOAc 50:50/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :EtOAc 98:2	5 mg
HED-G <u>B</u>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :EtOAc 98:2	12 mg
HED-G <u>CD</u>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :EtOAc 97:3	13 mg
HED-G <u>E</u>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :EtOAc 95:5/90:10	3 mg
HED-G <u>G</u>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :EtOAc 90:10	2 mg
HED-G <u>H</u>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :EtOAc 90:10/85:15	7 mg
HED-G <u>I</u>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :EtOAc 85:15	8 mg
HED-G <u>K</u>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :EtOAc 85:15/70:30	10 mg
HED-G <u>L</u>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :EtOAc 70:30	10 mg
HED-G <u>M</u>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :EtOAc 50:50/EtOAc 100%	12 mg

### **Ομάδα HED-K (100 mg)**

Για τον διαχωρισμό των συστατικών πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης (C.C. 12 cm x 2.5 cm) επί γέλης πυριτίου (silica gel) με βαθμιδωτό σύστημα μιγμάτων διαλυτών PE και EtOAc. Συλλέχθηκαν 121 κλάσματα μέσου όγκου περίπου 5 ml σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Για την ομαδοποίηση των κλασμάτων ακολούθησε η ανάπτυξη τους σε πλακίδιο T.L.C επί γέλης πυριτίου σε διάφορα συστήματα διαλυτών PE, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> και EtOAc.

Οι ομάδες που προέκυψαν είναι οι ακόλουθες:

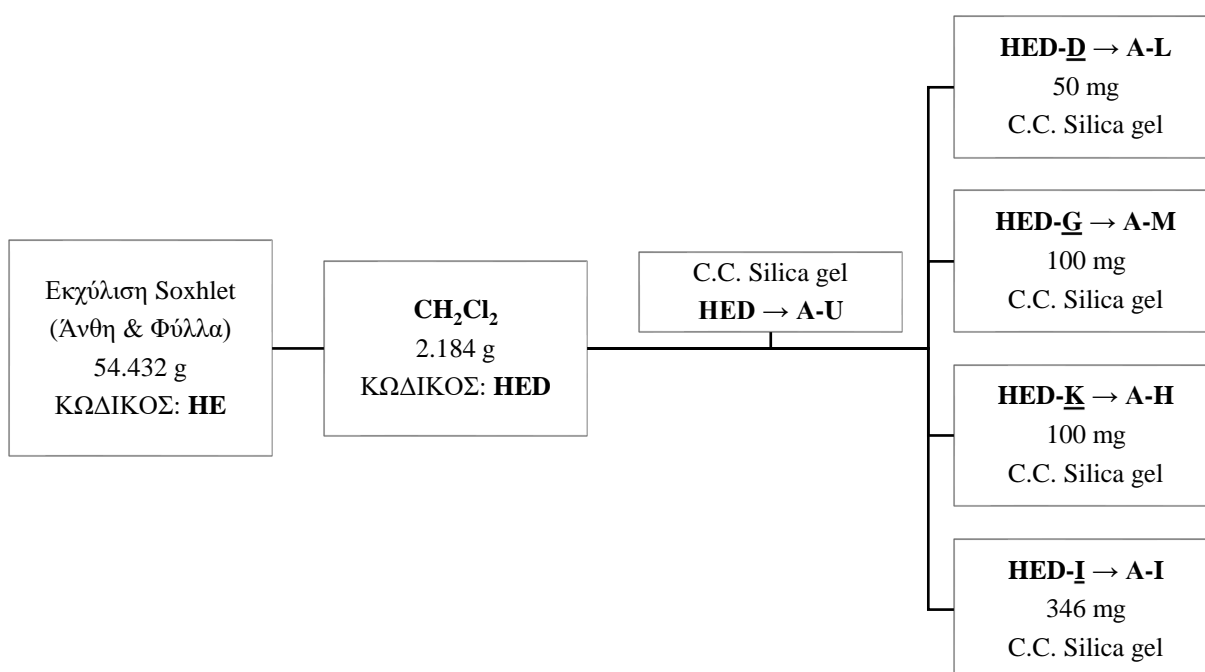
<i><b>Όνομα ομάδας</b></i>	<i><b>% Αναλογία</b></i>	<i><b>Βάρος</b></i>
HED- <u>KA</u>	PE:EtOAc 90:10	30 mg
HED- <u>KB</u>	PE:EtOAc 90:10/85:15	4 mg
HED- <u>KC</u>	PE:EtOAc 85:15/87:13	2 mg
HED- <u>KD</u>	PE:EtOAc 80:20	5 mg
HED- <u>KE</u>	PE:EtOAc 80:20/75:25	5 mg
HED- <u>KF</u>	PE:EtOAc 75:25/70:30	5 mg
HED- <u>KG</u>	PE:EtOAc 70:30	9 mg
HED- <u>KH</u>	PE:EtOAc 70:3/50:50	9 mg

### Ομάδα HED-I (346 mg)

Για τον διαχωρισμό των συστατικών πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης (C.C. cm x cm) επί γέλης πυριτίου (silica gel) με βαθμιδωτό σύστημα μιγμάτων διαλυτών PE και EtOAc. Συλλέχθηκαν κλάσματα μέσου όγκου περίπου 10ml σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Για την ομαδοποίηση των κλασμάτων ακολούθησε η ανάπτυξη τους σε πλακίδιο T.L.C επί γέλης πυριτίου σε διάφορα συστήματα διαλυτών PE, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> και EtOAc.

Οι ομάδες που προέκυψαν είναι οι ακόλουθες:

<i>Όνομα ομάδας</i>	<i>% Αναλογία</i>	<i>Βάρος</i>
HED- <u>IA</u>	PE:EtOAc 70:30	72 mg
HED- <u>IB</u>	PE:EtOAc 70:30	74 mg
HED- <u>IC</u>	PE:EtOAc 60:40	35 mg
HED- <u>ID</u>	PE:EtOAc 60:40	23 mg
HED- <u>IE</u>	PE:EtOAc 55:45	13mg
HED- <u>IF</u>	PE:EtOAc 55:45/50:50	17 mg
HED- <u>IG</u>	PE:EtOAc 50:50/40:60	31 mg
HED- <u>IH</u>	PE:EtOAc 25:75/10:90	18 mg
HED- <u>II</u>	MeOH:EtOAc 10:90/20:80	33 mg



Διάγραμμα 2.2. Διάγραμμα πορείας διαχωρισμού του διχλωρομεθανικού εκχυλίσματος (HED).



#### 2.4.2. Διαχωρισμός συστατικών του μεθανολικού εκχυλίσματος

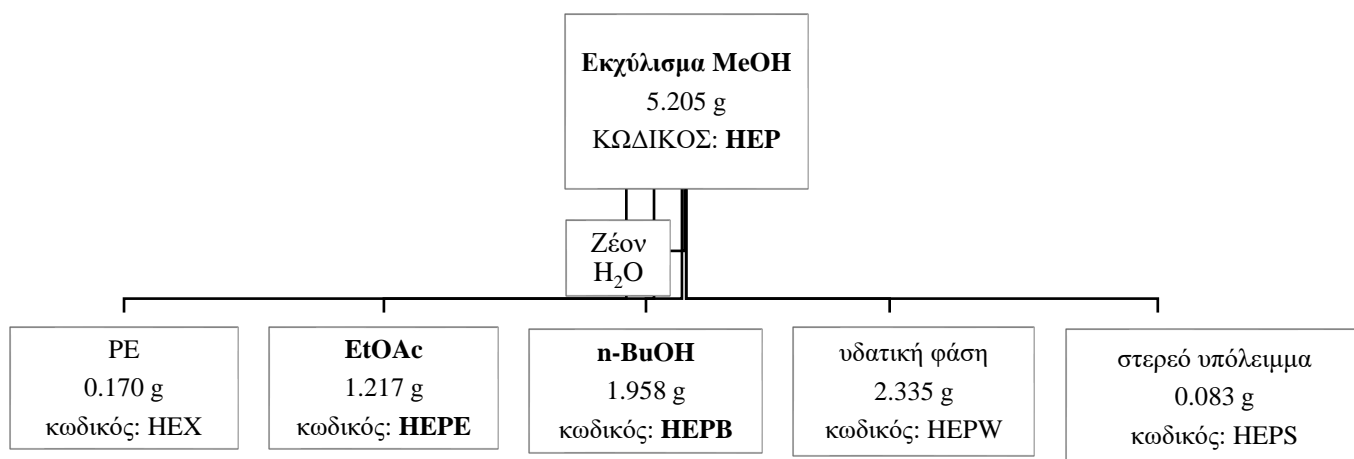
Το πολικό εκχύλισμα του βοτάνου περιέχει πολλά συστατικά που θα ήταν δύσκολο να διαχωριστούν απευθείας με χρωματογραφία στήλης. Έτσι έγινε ένας αρχικός διαχωρισμός σε υποομάδες με βάση την πολικότητα των συστατικών. Η επεξεργασία του εκχυλίσματος, λοιπόν, έγινε σύμφωνα με την μέθοδο Charaux – Paris.<sup>71</sup> Σε σφαιρική φιάλη με 5,205 g του δείγματος προστέθηκαν 250 ml ζέοντος ύδατος και το διάλυμα μεταφέρθηκε, μόλις κρύωσε, σε διαχωριστική χοάνη. Έπειτα, πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές εκχυλίσεις τους εξής διαλύτες:

- Πετρελαϊκό αιθέρα (PE)
- Οξικό αιθυλεστέρα (EtOAc)
- Βουτανόλη (n-BuOH)

Κατά την εκχύλιση με EtOAc σχηματίστηκαν στερεά υπολείμματα στη χοάνη τα οποία διαλύθηκαν με ακετόνη και φυλάχθηκαν σε ξεχωριστό φιαλίδιο. Μετά τη συλλογή των ομάδων, ο διαλύτης απομακρύνθηκε σε περιστροφικό εξατμιστήρα υπό κενό και με θέρμανση όπου κρίθηκε απαραίτητο. Για τον έλεγχο και την ομαδοποίηση των εκλούμενων κλασμάτων χρησιμοποιήθηκαν T.L.C. Έπειτα, τα εκχυλίσματα μεταφέρθηκαν σε προζυγισμένα vials, ξηράθηκαν και ζυγίστηκαν.

Τα εκχυλίσματα αναπτύχθηκαν σε πλακίδια T.L.C επιστρωμένα με γέλη πυριτίου σε διάφορα συστήματα διαλυτών. Οι διαλύτες ήταν πετρελαϊκός αιθέρας (P.E.), διχλωρομεθάνιο (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), οξικός αιθυλεστέρας (EtOAc) και μεθανόλη (MeOH). Λόγω του αριθμού και της πολικότητας των ουσιών όμως, κρίθηκε καταλληλότερη η ανάπτυξη των εκχυλισμάτων σε T.L.C κελουλόζης (cellulose matrix). Το σύστημα διαλυτών ανάπτυξης ήταν 15% οξικό οξύ σε νερό. Το ανεπτυγμένο πλακίδιο εξετάστηκε με λάμπα φθορισμού με εκπομπή ακτινοβολίας στα 366 nm. Επίσης, αναπτύχθηκε το ολικό εκχύλισμα μεθανόλης σε συστήματα διαλυτών ανάπτυξης 100% οξικό οξύ, 30% και 15% οξικό οξύ σε νερό. Από τα αποτελέσματα της ανάλυσης επιλέχθηκαν το εκχύλισμα με **οξικό αιθυλεστέρα (HEPE)** και με **βουτανόλη (HEPB)** για περαιτέρω διαχωρισμό και ανάλυση των συστατικών τους.

Οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν και λήφθηκαν φαίνονται στο παρακάτω διάγραμμα:



**Διάγραμμα 2.3.** Διάγραμμα πορείας διαχωρισμού μεθανολικού εκχυλίσματος HEP.

### Διαχωρισμός συστατικών του εκχυλίσματος n-BuOH (κωδικός HEPB)

Το n-BuOH εκχύλισμα HEPB (1.958 g) υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης επί γέλης πυριτίου (silica gel) με βαθμιδωτό σύστημα διαλυτών EtOAc:MeOH. Ο έλεγχος των ουσιών και η ομαδοποίηση έγινε με βάση την ανάπτυξη τους σε πλακίδια T.L.C γέλης πυριτίου επιστρωμένη σε γυάλινη πλάκα σε διάφορα συστήματα διαλυτών EtOAc/MeOH.

Οι ομάδες που προέκυψαν είναι οι ακόλουθες:

<i>Όνομα ομάδας</i>	<i>% Αναλογία</i>	<i>Βάρος</i>
-	EtOAc:MeOH 85:15	-
HEPB- <u>A</u>	EtOAc:MeOH 85:15	56 mg
HEPB- <u>B</u>	EtOAc:MeOH 85:15	75 mg
HEPB- <u>C</u>	EtOAc:MeOH 85:15	49 mg
HEPB- <u>D</u>	EtOAc:MeOH 85:15	122 mg
HEPB- <u>E</u>	EtOAc:MeOH 85:15	101 mg
HEPB- <u>F</u>	EtOAc:MeOH 85:15	28 mg
HEPB- <u>G</u>	EtOAc:MeOH 85:15 / 80:20	140 mg
HEPB- <u>H</u>	EtOAc:MeOH 80:20 / 75:25	73 mg
HEPB- <u>I</u>	EtOAc:MeOH 70:30	68 mg
HEPB- <u>K</u>	EtOAc:MeOH 70:30	104 mg
HEPB- <u>L</u>	EtOAc:MeOH 70:30 / 60:40	45 mg
HEPB- <u>M</u>	EtOAc:MeOH 60:40 / 50:50	36 mg
HEPB- <u>N</u>	MeOH 100%	15 mg

Από την ανωτέρω ομαδοποίηση αναπτύχθηκαν σε πλακίδιο T.L.C για περαιτέρω επεξεργασία οι ομάδες HEPB-D, HEPB-E, HEPB-F, HEPB-G. Αναπτύχθηκαν σε διάφορα συστήματα ανάπτυξης σε T.L.C επί γέλης πυριτίου (silica gel) επιστρωμένη σε γυάλινη πλάκα χρησιμοποιώντας ως διαλύτες MeOH, EtOAc και CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

### Ομάδα HEPB-D (122 mg)

Για τον διαχωρισμό των συστατικών πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης (C.C. 10,5 cm x 3 cm) επί γέλης πυριτίου (silica gel) σε σύστημα βαθμιδωτής έκλουσης μιγμάτων διαλυτών CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOAc και MeOH. Συλλέχθηκαν 109 κλάσματα μέσου όγκου περίπου 4 ml σε δοκιμαστικούς σωλήνες καθώς και 50 ml από την έκλυση με EtOAc:MeOH 10:90 και 100ml από το έκλυση με MeOH. Για την ομαδοποίηση των κλασμάτων ακολούθησε η ανάπτυξη τους σε πλακίδιο T.L.C επί γέλης πυριτίου και επί κελουλόζης σε διάφορα συστήματα διαλυτών MeOH/ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> και EAW (Ethyl acetate: Acetic acid: Water σε αναλογία 4: 1: 2).

Οι ομάδες που προέκυψαν είναι οι ακόλουθες:

<i><b>Όνομα ομάδας</b></i>	<i><b>% Αναλογία</b></i>	<i><b>Βάρος</b></i>
HEPB-DA	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH 95:5	4 mg
HEPB-DB	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH 95:5/90:10	2 mg
HEPB-DC	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH 90:10	5 mg
HEPB-DD	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH 80:20	43 mg
HEPB-DE	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH 70:30	4 mg
HEPB-DF	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH 60:40/50:50	16 mg
HEPB-DG	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH 50:50 – 20:80	20 mg
HEPB-DH	EtOAc:MeOH 90:10	6 mg
HEPB-DI	MeOH 100%	5 mg

Έπειτα από ανάπτυξη των τελικών ομάδων σε πλακίδιο T.L.C, η ομάδα HEPB-DE (4 mg), η οποία αποτελείται από ένα μόνο συστατικό, καθώς και η HEPB-DG (20 mg) αποτέλεσαν αντικείμενο αναλυτικής μελέτης με στόχο την εύρεση της δομής τους.

Οι ομάδες HEPB-F, HEPB-G επιλέχθηκαν για επιπλέον επεξεργασία. Προκειμένου να βρεθεί το πλήθος των συστατικών που περιέχουν καθώς και το κατάλληλο σύστημα στο οποίο αυτά διαχωρίζονται, έγινε ανάπτυξη τους με χρωματογραφία λεπτής στιβάδος (T.L.C). Χρησιμοποιήθηκαν πλακίδια με προσροφητικό υλικό silica gel επιστρωμένο σε γυάλινη πλάκα και σε φύλλα αλουμινίου και ως σύστημα ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκε BAW (n-Butanol : Acetic acid: Water με αναλογία 4 : 1 : 5), 15% Acetic acid/Water και 30% Acetic acid/Water.

Τελικά, οι ομάδες HEPB-F και HEPB-G συνενώθηκαν προς HEPB-FG'.

### Ομάδα HEPB-FG' (152.6 mg)

Για τον διαχωρισμό των συστατικών πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης (C.C. 85.5 cm x 3.5 cm) Sephadex LH-20 με διαλύτη έκλουσης MeOH 100%. Συλλέχθηκαν 196 κλάσματα μέσου όγκου περίπου 4 ml σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Για την ομαδοποίηση των κλασμάτων ακολούθησε η ανάπτυξη τους σε πλακίδιο T.L.C επί γέλης πυριτίου σε διάφορα συστήματα διαλυτών όπως: MeOH/ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, MeOH/EtOAc, EAW και BAW (n-BuOH: Acetic acid: Water σε αναλογία 4: 1: 5), αλλά και σε πλακίδιο T.L.C cellulose με σύστημα ανάπτυξης 30% οξικό οξύ σε νερό.

Οι ομάδες που προέκυψαν είναι οι ακόλουθες:

<i><b>Όνομα ομάδας</b></i>	<i><b>% Αναλογία</b></i>	<i><b>Βάρος</b></i>
HEPB-FG' <u>A</u>		5 mg
HEPB-FG' <u>B</u>		42 mg
HEPB-FG' <u>C</u>		10 mg
HEPB-FG' <u>D</u>		15 mg
HEPB-FG' <u>E</u>		11 mg
HEPB-FG' <u>F</u>		20 mg
HEPB-FG' <u>G</u>	MeOH 100%	15 mg
HEPB-FG' <u>H</u>		5 mg
HEPB-FG' <u>I</u>		4 mg
HEPB-FG' <u>J</u>		4 mg
HEPB-FG' <u>K</u>		2 mg
HEPB-FG' <u>L</u>		4 mg
HEPB-FG' <u>M</u>		4 mg
HEPB-FG' <u>N</u>		3 mg

Έπειτα από ανάπτυξη των τελικών κλασμάτων σε T.L.C, η ομάδα HEPB-FG'G (15 mg), η οποία αποτελείται από ένα μόνο συστατικό αποτέλεσε αντικείμενο αναλυτικής μελέτης με στόχο την διευκρίνιση της δομής της.

### Ομάδα HEPB-FG B (42.3 mg)

Για τον διαχωρισμό των συστατικών πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης (C.C. 8 cm x 2.5 cm) επί γέλης πυριτίου (silica gel) και με σύστημα βαθμιδωτής έκλουσης μιγμάτων διαλυτών EtOAc και MeOH. Συλλέχθηκαν 73 κλάσματα μέσου όγκου περίπου 4 ml σε δοκιμαστικούς σωλήνες καθώς και 50 ml από την έκπλυση με MeOH. Για την ομαδοποίηση των κλασμάτων ακολούθησε η ανάπτυξη τους σε πλακίδιο T.L.C επί γέλης πυριτίου σε διάφορα συστήματα διαλυτών MeOH/EtOAc, σε σύστημα EAW (Ethyl acetate: Acetic acid: Water σε αναλογία 4: 1: 2) καθώς και σε σύστημα BAW (n-BuOH:Acetic acid:Water σε αναλογία 4: 1: 5).

Οι ομάδες που προέκυψαν είναι οι ακόλουθες:

<i>Όνομα ομάδας</i>	<i>% Αναλογία</i>	<i>Βάρος</i>
HEPB-FG <u>BA</u>	EtOAc:MeOH 90:10	16 mg
HEPB-FG <u>BB</u>	EtOAc:MeOH 85:15	2 mg
HEPB-FG <u>BC</u>	EtOAc:MeOH 85:15	12 mg
HEPB-FG <u>BD</u>	EtOAc:MeOH 80:20 / 70:30	4 mg
HEPB-FG <u>BE</u>	EtOAc:MeOH 60:40 - 40:60	3 mg

### Ομάδα HEPB-E (100.5 mg)

Για τον διαχωρισμό των συστατικών πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης (C.C. 10.5 cm x 2.5 cm) επί γέλης πυριτίου (silica gel) και με σύστημα βαθμιδωτής έκλουσης μιγμάτων διαλυτών EtOAc και MeOH. Συλλέχθηκαν 177 κλάσματα μέσου όγκου περίπου 4 ml σε δοκιμαστικούς σωλήνες καθώς και 50 ml από την έκπλυση με MeOH. Για την ομαδοποίηση των κλασμάτων ακολούθησε η ανάπτυξη τους σε πλακίδιο T.L.C επί γέλης πυριτίου σε διάφορα συστήματα διαλυτών MeOH/EtOAc και σε σύστημα EAW (Ethyl acetate: Acetic acid: Water σε αναλογία 4: 1: 2).

Οι ομάδες που προέκυψαν είναι οι ακόλουθες:

<i>Όνομα ομάδας</i>	<i>% Αναλογία</i>	<i>Βάρος</i>
HEPB- <u>EA</u>	EtOAc:MeOH 95:5	5 mg
HEPB- <u>EB</u>	EtOAc:MeOH 95:5	8 mg
HEPB- <u>EC</u>	EtOAc:MeOH 95:5	10 mg
HEPB- <u>ED</u>	EtOAc:MeOH 90:10	10 mg
HEPB- <u>EE</u>	EtOAc:MeOH 85:15 – 60:40	16 mg
HEPB- <u>EF</u>	EtOAc:MeOH 40:60 / 30:70	15 mg
HEPB- <u>EG</u>	EtOAc:MeOH 20:80 / 10:90	32 mg

Έπειτα από ανάπτυξη των τελικών ομάδων σε πλακίδιο T.L.C, η ομάδα HEPB-EG ( 32 mg) αποτέλεσε αντικείμενο αναλυτικής μελέτης με στόχο την διευκρίνιση της δομής της.

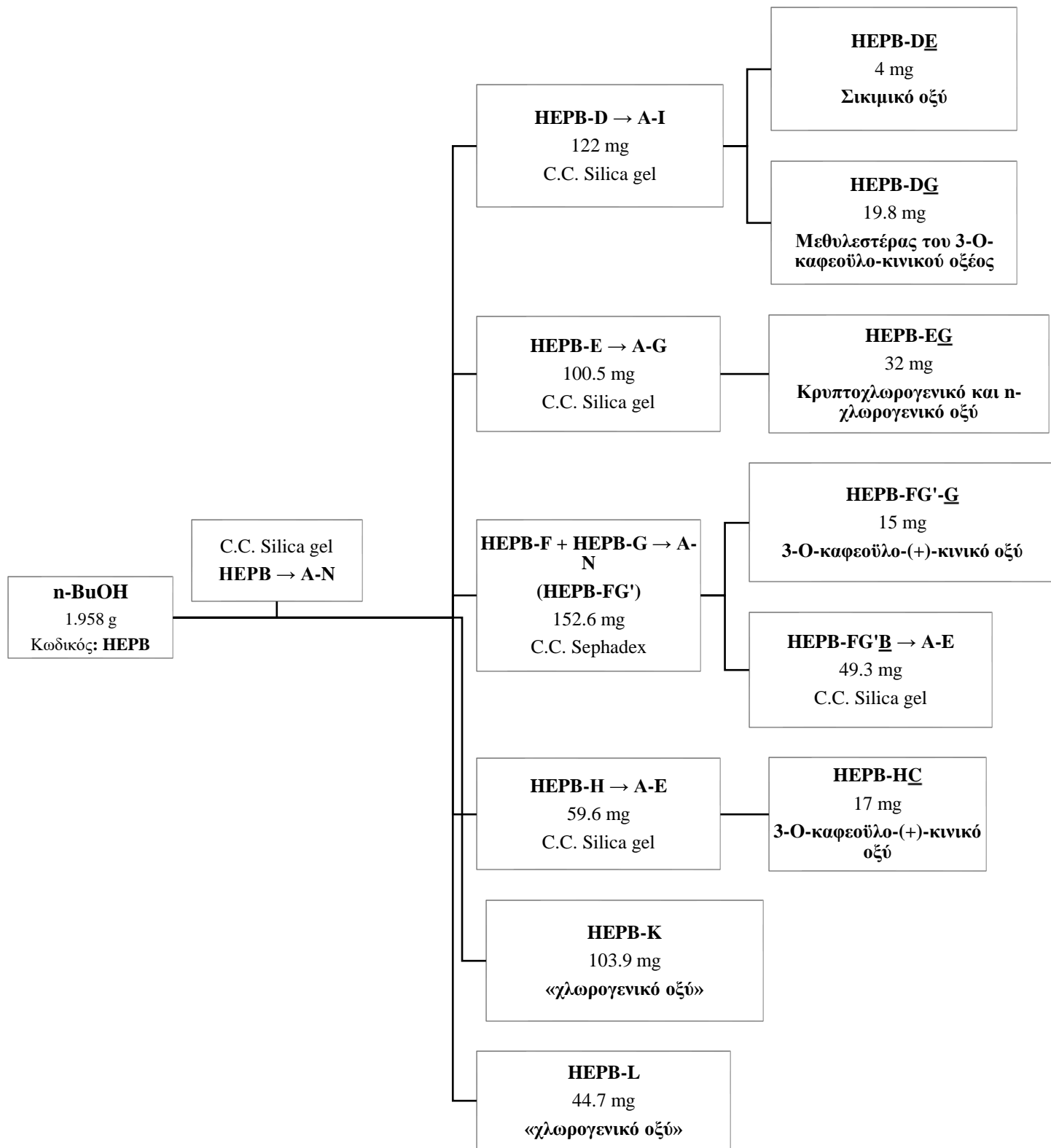
#### **Ομάδα HEPB-H (59.6 mg)**

Για τον διαχωρισμό των συστατικών πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης (C.C. 35 cm x 2 cm) Sephadex LH-20 με διαλύτη έκλουσης MeOH 100%. Συλλέχθηκαν 109 κλάσματα μέσου όγκου περίπου 5ml σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Για την ομαδοποίηση των κλασμάτων ακολούθησε η ανάπτυξη τους σε πλακίδιο T.L.C επί γέλης πυριτίου, επιστρωμένη σε αλουμίνιο, σε συστήματα διαλυτών BAW (n-BuOH: Acetic acid: Water σε αναλογία 4: 1: 5).

Οι ομάδες που προέκυψαν είναι οι ακόλουθες:

<i><b>Όνομα ομάδας</b></i>	<i><b>% Αναλογία</b></i>	<i><b>Βάρος</b></i>
HEPB-H <u>A</u>		14 mg
HEPB-H <u>B</u>		15 mg
HEPB-H <u>C</u>	MeOH 100%	17 mg
HEPB-H <u>D</u>		3 mg
HEPB-H <u>E</u>		6 mg

Έπειτα από ανάπτυξη των τελικών ομάδων σε πλακίδιο T.L.C, η ομάδα HEPB-HC (17 mg) αποτέλεσε αντικείμενο αναλυτικής μελέτης με στόχο την διευκρίνιση της δομής του.



**Διάγραμμα 2.4.** Διάγραμμα πορείας διαχωρισμού βουτανολικού κλάσματος (HEPB).



### Διαχωρισμός συστατικών του EtOAc εκχυλίσματος (HEPE)

Το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα HEPE (1.385 g) υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης επί γέλης πυριτίου silica gel με ισοκρατική έκλουση με σύστημα διαλυτών CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH. Ο έλεγχος των ουσιών και η ομαδοποίηση έγινε με βάση την ανάπτυξη τους σε πλακίδια T.L.C γέλης πυριτίου επιστρωμένη σε γυάλινη πλάκα.

Οι ομάδες που προέκυψαν είναι οι ακόλουθες:

<i>Όνομα ομάδας</i>	<i>% Αναλογία</i>	<i>Βάρος</i>
HEPE- <u>A</u>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH 85:15	880 mg
HEPE- <u>B</u>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH 85:15	101 mg
HEPE- <u>C</u>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH 85:15	102 mg
HEPE- <u>D</u>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH 85:15	15 mg
HEPE- <u>E</u>	MeOH 100%	153 mg

Οι παραπάνω ομάδες αναπτύχθηκαν σε πλακίδιο T.L.C επί γέλης πυριτίου (silica gel) επιστρωμένη σε πλάκα αλουμινίου σε διάφορα συστήματα ανάπτυξης διαλυτών MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O, MeOH/Et<sub>2</sub>O, EAW (Ethyl acetate: Acetic acid: Water σε αναλογία 4: 1: 2) καθώς και σε σύστημα BAW (n-BuOH:Acetic acid:Water σε αναλογία 4: 1: 5). Τελικά, οι ομάδες HEPE-B και HEPE-D συνενώθηκαν προς HEPE-BD'.

### Ομάδα HEPE-BD' (104 mg)

Για τον διαχωρισμό των συστατικών πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης (C.C. 12 cm x 2.5 cm) επί γέλης πυριτίου (silica gel) και σε σύστημα βαθμιδωτής έκλουσης μιγμάτων διαλυτών Hex, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> και MeOH. Συλλέχθηκαν 197 κλάσματα μέσου όγκου περίπου 5 ml σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Για την ομαδοποίηση των κλασμάτων ακολούθησε η ανάπτυξη τους σε πλακίδιο T.L.C επί γέλης πυριτίου επιστρωμένη σε πλάκα αλουμινίου σε διάφορα συστήματα διαλυτών Hex/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O και EAW (Ethyl acetate: Acetic acid: Water σε αναλογία 4:1:2).

Οι ομάδες που προέκυψαν είναι οι ακόλουθες:

<i>Όνομα ομάδας</i>	<i>% Αναλογία</i>	<i>Βάρος</i>
HEPE-BD' <u>A</u>	Hex 100% / Hex:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 50:50 / CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH:H <sub>2</sub> O 95:5:0.5/80:20:2	15 mg
HEPE-BD' <u>B</u>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH:H <sub>2</sub> O 80:20:2	3 mg
HEPE-BD' <u>C</u>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH:H <sub>2</sub> O 80:20:2 / 75:25:2.5	3 mg
HEPE-BD' <u>D</u>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH:H <sub>2</sub> O 80:20:2 / 75:25:2.5	10 mg
HEPE-BD' <u>E</u>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH:H <sub>2</sub> O 80:20:2 / 75:25:2.5	3 mg
HEPE-BD' <u>F</u>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH:H <sub>2</sub> O 70:30:3	14 mg
HEPE-BD' <u>G</u>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH:H <sub>2</sub> O 70:30:3	3 mg
HEPE-BD' <u>H</u>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH:H <sub>2</sub> O 70:30:3	7 mg
HEPE-BD' <u>I</u>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH:H <sub>2</sub> O 70:30:3 / 65:35:3.5	15 mg
HEPE-BD' <u>K</u>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH:H <sub>2</sub> O 70:30:3 / 65:35:3.5	7 mg
HEPE-BD' <u>L</u>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH:H <sub>2</sub> O 60:40:4	15 mg
HEPE-BD' <u>M</u>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH:H <sub>2</sub> O 55:45:4.5 / 50:50:5 MeOH 100%	5 mg

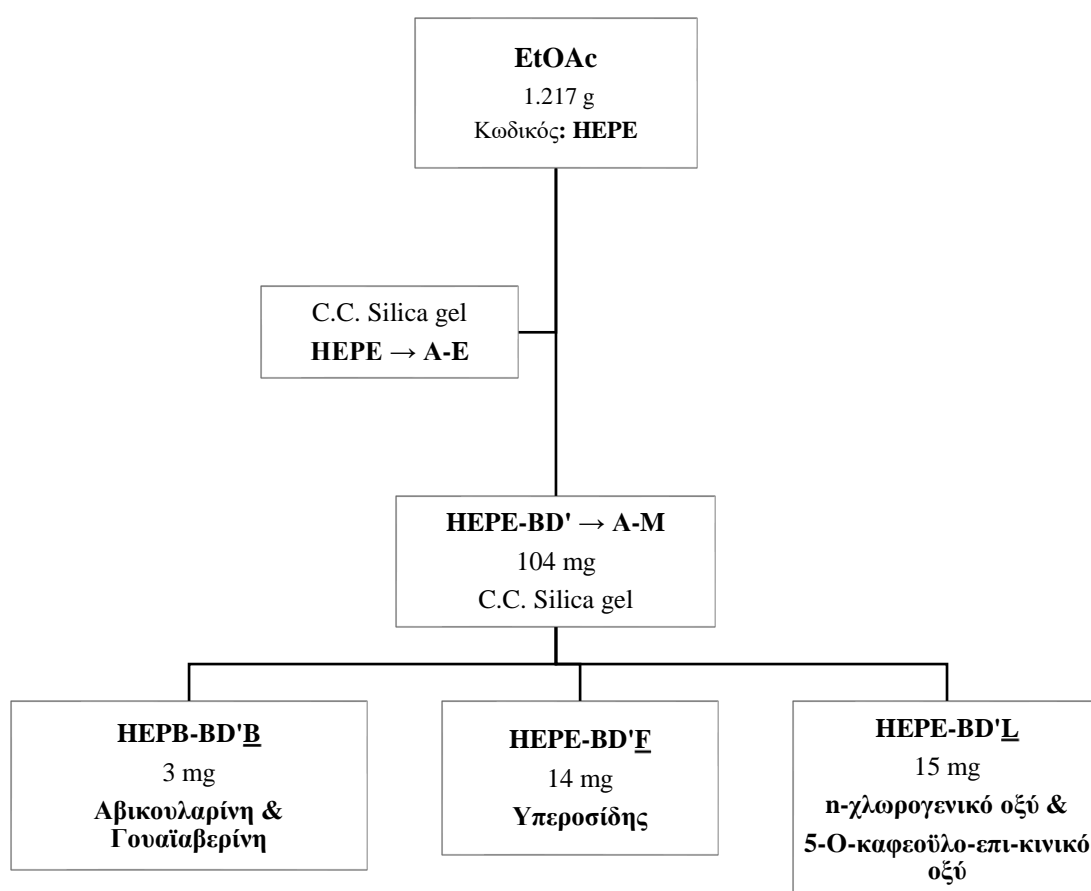
Έπειτα από ανάπτυξη των τελικών κλασμάτων σε T.L.C, οι ομάδες HEPE-BD' B (3 mg), HEPE-BD' F (14 mg) και HEPE-BD' L (15 mg) οι οποίες αποτελούνται από ένα μόνο συστατικό αποτέλεσαν αντικείμενο αναλυτικής μελέτης με στόχο την διευκρίνιση της δομής τους.

### Ομάδα HEPE-BD' A (22 mg)

Για τον διαχωρισμό των συστατικών πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης (C.C. 13 cm x 1 cm) επί γέλης πυριτίου (silica gel) και σε σύστημα βαθμιδωτής έκλουσης μιγμάτων διαλυτών PE, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> και MeOH. Συλλέχθηκαν 108 κλάσματα μέσου όγκου περίπου 1.5-2 ml σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Για την ομαδοποίηση των κλασμάτων ακολούθησε η ανάπτυξη τους σε πλακίδιο T.L.C επί γέλης πυριτίου επιστρωμένη σε πλάκα αλουμινίου σε διάφορα συστήματα διαλυτών CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH.

Οι ομάδες που προέκυψαν είναι οι ακόλουθες:

<b>Όνομα ομάδας</b>	<b>% Αναλογία</b>	<b>Βάρος</b>
HEPE-BD' <u>AA</u>	PE 100%	2 mg
HEPE-BD' <u>AB</u>	PE:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 50:50 / CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 100%	3 mg
HEPE-BD' <u>AC</u>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 100% / CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH 98:2 / 95:5 / 90:10	2 mg
HEPE-BD' <u>AD</u>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH 90:10 / 85:15	3 mg
HEPE-BD' <u>AE</u>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH 85:15 / 80:20 / 70:30	6 mg



Διάγραμμα 1.5. Διάγραμμα πορείας διαχωρισμού εκχυλίσματος οξικού αιθυλεστέρα HEPE.

---

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

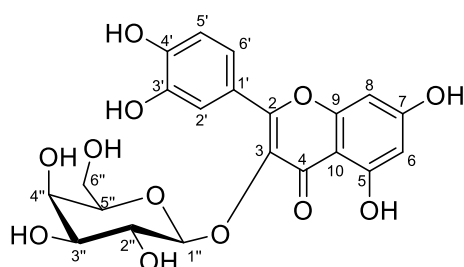
---

### 3.1. Ταυτοποίηση συστατικών πολικού εκχυλίσματος

#### 3.1.1. Δευτερογενής μεταβολίτης: Υπεροσίδης (1)

Ο υπεροσίδης (1) είναι ο 3-O-γαλακτοζίτης της κερκετίνης και απομονώνεται από τα πολικά εκχυλίσματα των φυτών. Στο *Hypericum empetrifolium* απομονώθηκε από την περαιτέρω εκχύλιση του μεθανολικού εκχυλίσματος των ανθέων και των φύλλων με EtOAc.

Ο υπεροσίδης ανήκει στην κατηγορία των φλαβονοειδών και αποτελείται από δύο τμήματα. Αυτό της κερκετίνης και αυτό του γαλακτοζίτη, ο οποίος συνδέεται με την θέση 3 της κερκετίνης. Στο φάσμα της ένωσης παρατηρούνται δύο τύποι σημάτων πρωτονίων: αρωματικά πρωτόνια (τμήμα κερκετίνης) και πρωτόνια του σακχάρου.



Υπεροσίδης (1)

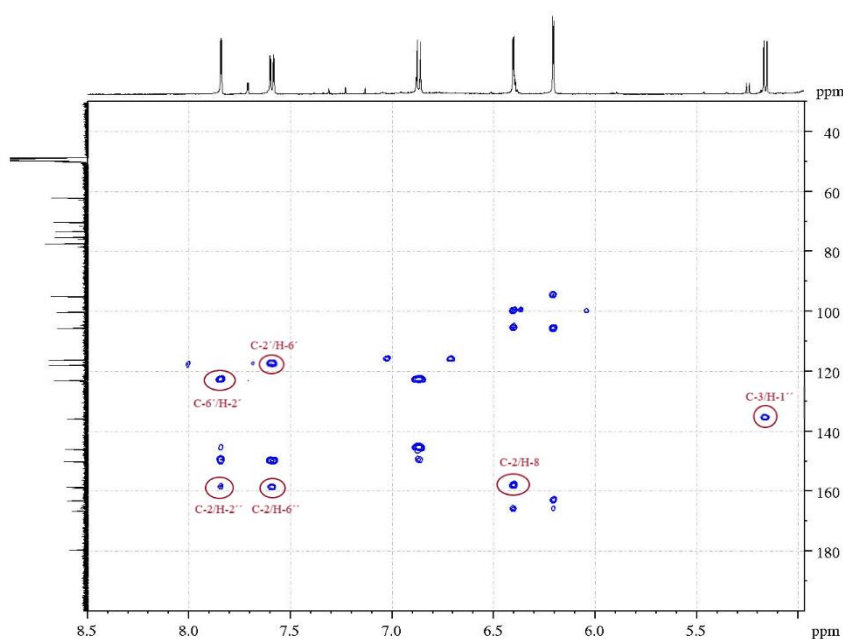
Η κερκετίνη ανήκει στην κατηγορία των φλαβονολών, οι οποίες ανήκουν σε μία μεγάλη οικογένεια ενώσεων που ονομάζονται φλαβονοειδή. Ο βασικός σκελετός μιας φλαβονόλης είναι μία φλαβόνη υποκατεστημένη στην 3 θέση της βενζοπυρόνης με μία ομάδα υδροξυλίου, καθιστώντας την έτσι μία 3-υδρόξυφλαβόνη.

Αρχικά, από τα φάσματα  $^{13}\text{C}$  και  $^1\text{H}$  NMR επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη 15 αρωματικών ανθράκων καθώς και 5 αρωματικών πρωτονίων, αντίστοιχα.

Τα δύο αρωματικά πρωτόνια του C-6 και C-8 της βενζοπυρόνης εμφανίζονται σαν μία διπλή (d) το καθένα, στα  $\delta_{\text{H}}$  6.20 ppm και  $\delta_{\text{H}}$  6.40 ppm, αντίστοιχα. Η πολλαπλότητα αυτή προκύπτει από την μακράς εμβέλειας σύζευξη  $^4J_{\text{H6-H8}}=2.00$  Hz των πρωτονίων του αρωματικού π-συστήματος, γνωστή και ως W-coupling. Η αλληλεπίδραση αυτή επιβεβαιώνεται και από τα φάσματα COSY και HMBC.

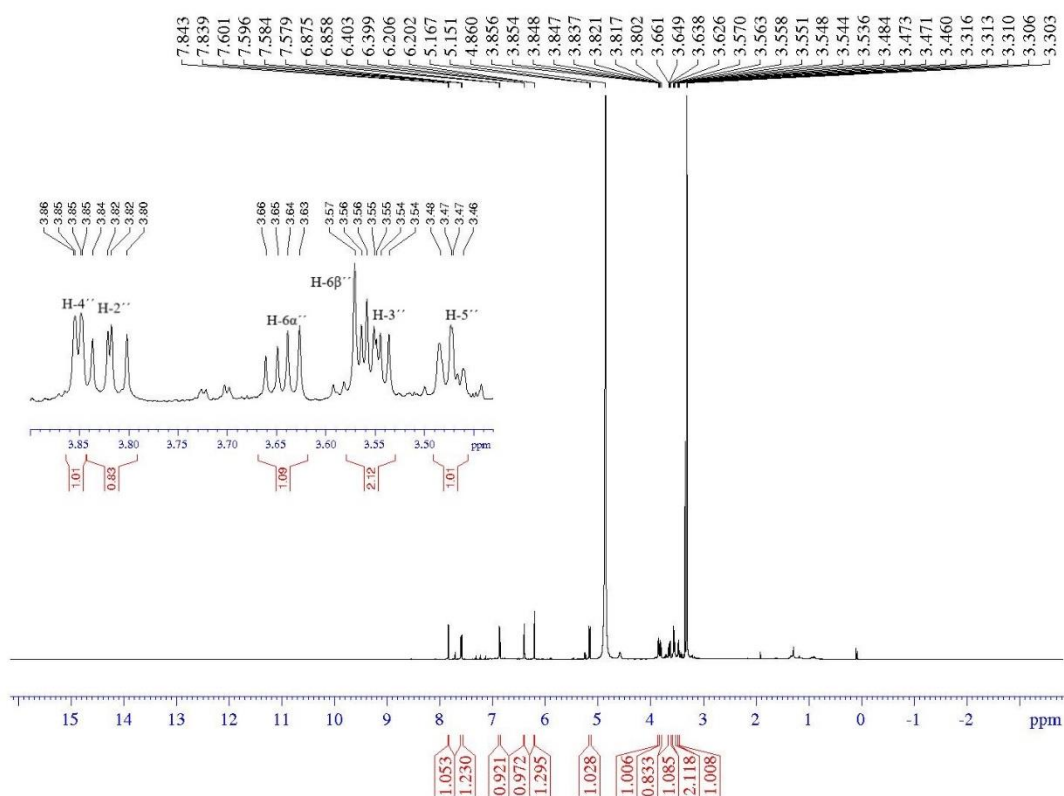
Τα H-2', H-5', H-6' του κατεχολικού τμήματος εμφανίζουν πολλαπλότητες αντίστοιχες με αυτές ενός συστήματος ABX. Η αλληλεπίδραση τους επιβεβαιώνεται και από το φάσμα COSY. Το H-6' ( $\delta_{\text{H}}$  7.60 ppm) εμφανίζεται ως μια διπλή της διπλής (dd) καθώς σχάζεται, λόγω του W-coupling, από τα H-2', H-5' με  $^4J_{\text{H2'-H6'(meta)}}=2.26$  Hz και  $^3J_{\text{H5'-$

$H_{6'(\text{ortho})}=8.52$  Hz. Τα  $H-2'$  (7.85ppm) και  $H-5'$  ( $\delta_H$  6.88 ppm) εμφανίζονται ως μία διπλή (d) το καθένα λόγω της σχάσης του από το  $H-6'$ . Η σύνδεση του κατεχολικού με αυτό του τμήματος της βενζοπυρόνης επιβεβαιώνεται μέσω του φάσματος HMBC (Εικόνα 3.1.) καθώς ο C-2 αλληλεπιδρά με τα  $H-2'$  και  $H-6'$ . Όσον αφορά το τμήμα του γαλακτοζίτη, η σύνδεσή του στην θέση 3 με το τμήμα της κερκετίνης επιβεβαιώθηκε μέσω του φάσματος HMBC, όπου ο C-3 ( $\delta_C$  135.8 ppm) αλληλεπιδρά με το ανωμερικό  $H-1''$  ( $\delta_H$  5.17 ppm). Το πρωτόνιο αυτό εμφανίζεται ως μία διπλή (d) καθώς σχάζεται από το  $H-2''$  ( $\delta_H$  3.83 ppm) με  $^3J_{H1''-H2''}=8.00$  Hz.



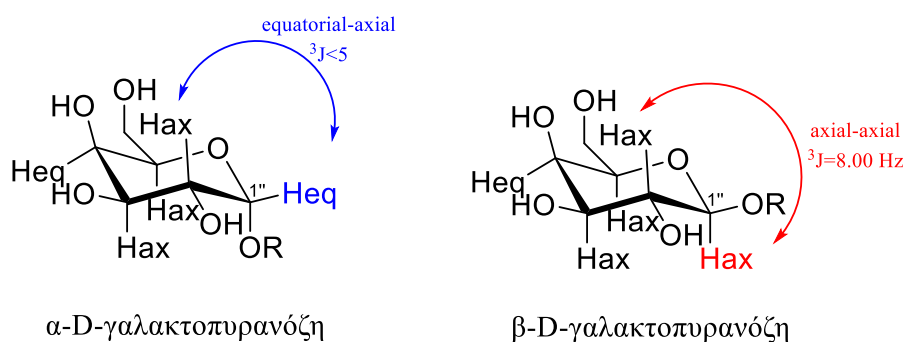
**Εικόνα 3.1.** Κυριότερες αλληλεπιδράσεις HMBC αρωματικής περιοχής για την ένωση (1).

Μέσω του φάσματος COSY φαίνεται η αλληλεπίδραση του H-2'' (δ<sub>H</sub> 3.83 ppm) με το H-1'' (δ<sub>H</sub> 5.17 ppm) και το H-3'' (δ<sub>H</sub> 3.55 ppm). Πιο συγκεκριμένα, το H-2'' εμφανίζει μία κορυφή διπλή της διπλής (dd) καθώς σχάζεται από αυτά τα δύο πρωτόνια. Παράλληλα, από το COSY και το HMBC φαίνονται οι αλληλεπιδράσεις του H-4'' με τα H-3'' και H-5'' καθώς και η αλληλεπίδραση των διαστερεοτοπικών H-6a'' (δ<sub>H</sub> 3.65 ppm) και H-6β'' (δ<sub>H</sub> 3.57 ppm) μεταξύ τους (geminal coupling) αλλά και με το H-5'' (δ<sub>H</sub> 3.47 ppm). Τα πρωτόνια εμφανίζονται ως μια dd με  $^2J_{H6a''-H6b''}=11$  Hz και  $^3J_{H6a/b''-H5''}=6$  Hz το καθένα (Εικόνα 3.2.), ενώ αντιστοιχούν στον ίδιο άνθρακα C-6 (δ<sub>C</sub> 61.93 ppm), οδηγώντας έτσι στο συμπέρασμα ότι ο γαλακτοζίτης έχει τη μορφή πυρανόζης. Αντίστοιχα, το H-5'' (δ<sub>H</sub> 3.47 ppm) εμφανίζεται ως μία διπλή της διπλής της διπλής (ddd), αφού σχάζεται από τα H-6'' και H-4'' (δ<sub>H</sub> 3.86 ppm), η οποία λόγω της αλληλεπικάλυψης των κορυφών φαίνεται στο φάσμα ως μία td.



Εικόνα 3.2. Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) Υπεροσίδης (1).

Ωστόσο υπάρχουν τέσσερα πιθανά διαστερομερή της πυρανοζιτικής μορφής της γαλακτόζης: α-D/α-L/β-D/β-L-γαλακτοπυρανόζη. Η εύρεση της απόλυτης στερεοδομής του σακχάρου έγινε μέσω των σταθερών σύζευξης και την καμπύλη Karplus, σύμφωνα με την οποία η σταθερά σύζευξης μεταξύ δύο γειτονικών πρωτονίων εξαρτάται από την δίεδρη γωνία φ η οποία σχηματίζεται από τα επίπεδα HCC' και HC'C. Έτσι, η διαμόρφωση των πρωτονίων μπορεί να καθορισθεί από τις τιμές της σταθεράς σύζευξης. Οι τιμές  $^3J_{H1''-H2''}=8.00$  Hz,  $^3J_{H2''-H3''}=9.70$  Hz είναι χαρακτηριστικές της anti θέσης των δύο αξονικών πρωτονίων. Αντίστοιχα, οι τιμές  $^3J_{H3''-H4''}=3.55$  Hz,  $^3J_{H4''-H5''}=0.8$  Hz είναι χαρακτηριστικές της gauche θέσης ενός αξονικού ως προς ένα ισημερινό πρωτόνιο. Με βάση τα παραπάνω και το Σχήμα 3.1. συμπεραίνεται ότι η δομή που αντιστοιχεί στο σάκχαρο είναι αυτή της β-D-γαλακτοπυρανόζης.



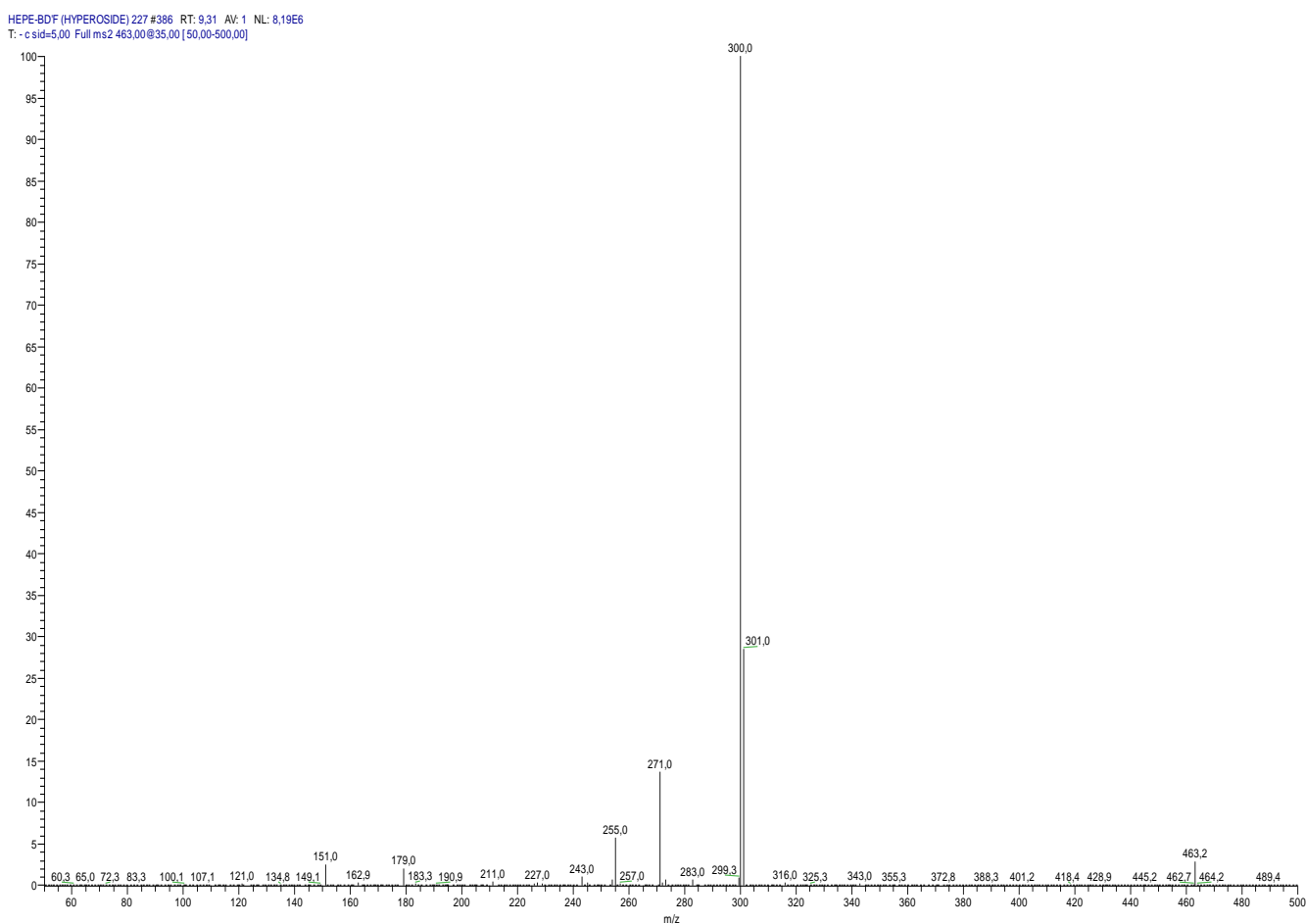
**Σχήμα 3.1.** Τα δύο από τα τέσσερα πιθανά διαστερομερή της γαλακτόζης που αφορούν την ανωμερικότητα. Με έντονο χρώμα και στις δύο περιπτώσεις επισημαίνεται το αποπροστατευμένο πρωτόνιο.



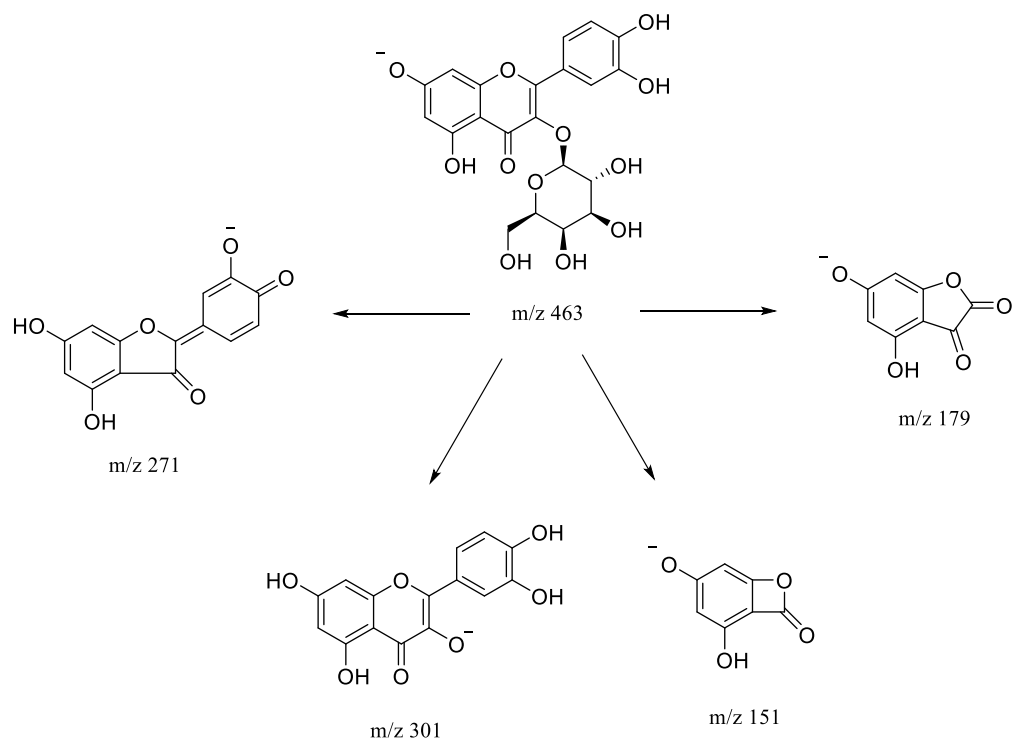
**Πίνακας 3.1.** Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR (500MHz, CD<sub>3</sub>OD) της ένωσης (1).

#	<sup>13</sup> C	DEPT-135	HSQC	δ <sup>1</sup> H	Πολλαπλότητα, (J Hz)	COSY	HMBC
<b>Τμήμα Φλαβόνης</b>							
4	179.51		-	-	-	-	-
7	166.45		-	-	-	-	H-8/H-6
5	163.01		-	-	-	-	H-8
9	158.76		-	-	-	-	H-8
2	158.49		-	-	-	-	H-2'/H-6'/H-8
4'	149.96		-	-	-	-	H-2'/H-6'/H-5' <sup>w</sup>
3'	145.83		-	-	-	-	H-2'/H-5'
3	135.76		-	-	-	-	H-1''
6'	122.98		H-6'	7.60 (1H)	dd, $J_1=8.52$ $J_2=2.26$	H-2''/H-5''	H-2'/H-5'
1'	122.93		-	-	-	-	-
2'	117.75		H-2'	7.85 (1H)	d, $J=2.00$	H-6''	H-6''
5'	116.08		H-5'	6.88 (1H)	d, $J=8.52$	H-6''	H-5''
10	105.58		-	-	-	-	H-8/H-6
6	100.01		H-6	6.21 (1H)	d, $J=2.00$	H-8	H-8
8	94.79		H-8	6.41 (1H)	d, $J=2.00$	H-6	H-6
<b>Τμήμα Σακχάρου</b>							
1''	105.41		H-1''	5.17 (1H)	d, $J=8.00$	H-2''	H-2''
5''	77.19		H-5''	3.47 (1H)	td, $J_1=6.14$ $J_2=0.80$	H-6β''/H-4	H-6''/H-3'' <sup>w</sup>
3''	75.09		H-3''	3.55 (1H)	dd, $J_1=9.70$ $J_2=3.50$	H-2''	H-4''/H-2''
2''	73.17		H-2''	3.83 (1H)	dd, $J_1=9.70$ $J_2=8.00$	H-1''/H-3''/H-4''	H-4''
4''	70.02		H-4''	3.86 (1H)	dd, $J_1=3.55$ $J_2=0.74$	H-3''/H-5	H-3''/H-5''
6''	61.93		H-6α'' H-6β''	3.65 (1H) 3.57 (1H)	dd, $J_1=11.00$ $J_2=6.00$ dd, $J_1=11.00$ $J_2=6.00$	H-6α''/H-5''	H-4''/H-5''

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε ανάλυση με ESI-MS σε αρνητικό ιοντισμό αρχικά με full scan από  $m/z$  50-500 όπου προέκυψε το μοριακό ιόν  $m/z = 463.2$  και έπειτα με επιπλέον θραυσματοποίηση της συγκεκριμένης κορυφής ( $MS^2$ ) προέκυψαν τα θραύσματα  $m/z$ : 300.1, 271.0, 255.0, 179.0 και 151.0. Στο Σχήμα 3.2. παρατίθεται η θραυσματοποίηση του υπεροσίδη.



**Εικόνα 3.3.** Φάσμα μάζας  $MS^2$  αρνητικού ιοντισμού από το ESI-MS για την ένωση (1).

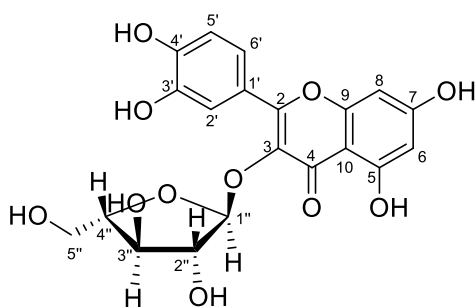


**Σχήμα 3.2.** Μηχανισμός θραυσματοποίησης ένωσης (1).

### 3.1.2. Δευτερογενείς μεταβολίτες: Αβικουλαρίνη (2) και Γουαϊαβερίνη (3)

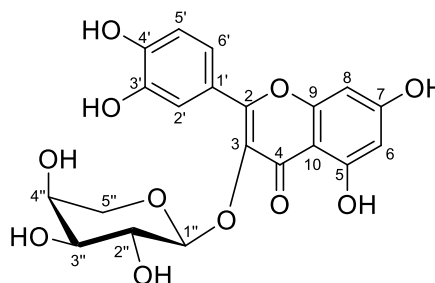
Η αβικουλαρίνη (2) και η γουαϊαβερίνη (3) είναι οι 3-O-αραβινοζίτες της κερκετίνης και απομονώνονται από τα πολικά εκχυλίσματα των φυτών. Στο *Hypericum empetrifolium* απομονώθηκαν ως μίγμα από την περαιτέρω εκχύλιση του μεθανολικού εκχυλίσματος των ανθέων και των φύλλων με EtOAc.

Οι μοριακές τους δομές είναι παρόμοιες αλλά τα φάσματα NMR διαφέρουν και μπορούν να ταυτοποιηθούν τα διαφορετικά σήματα. Η διαφοροποίηση των δύο ενώσεων βασίστηκε στο γεγονός ότι στο φάσμα  $^1\text{H}$  NMR παρατηρήθηκε μία αλληλουχία σημάτων η οποία είχε αρκετές ομοιότητες με αυτά του υπεροσίδη (κερκέτινο 3-O-β-D-γαλακτοζίτης). Παρατηρήθηκε ότι τα σήματα του  $^1\text{H}$  NMR εμφανίζονται διπλά (με διαφορές στη χημική μετατόπιση) στην αρωματική περιοχή, ενώ στην περιοχή των σημάτων που αντιστοιχούν στο σάκχαρο εμφανίζονται επιπλέον κορυφές. Πιο συγκεκριμένα, τα φάσματα  $^{13}\text{C}$  και  $^1\text{H}$  NMR έδειξαν την ύπαρξη σήματος 31 ανθράκων, από τους οποίους οι 20 αντιστοιχούν στην αρωματική περιοχή, και 22 πρωτονίων, με τα 10 πρωτόνια να είναι αρωματικά.



Κερκέτινο 3-O-α-L-αραβινοφουρανοζίτης  
(Αβικουλαρίνη)

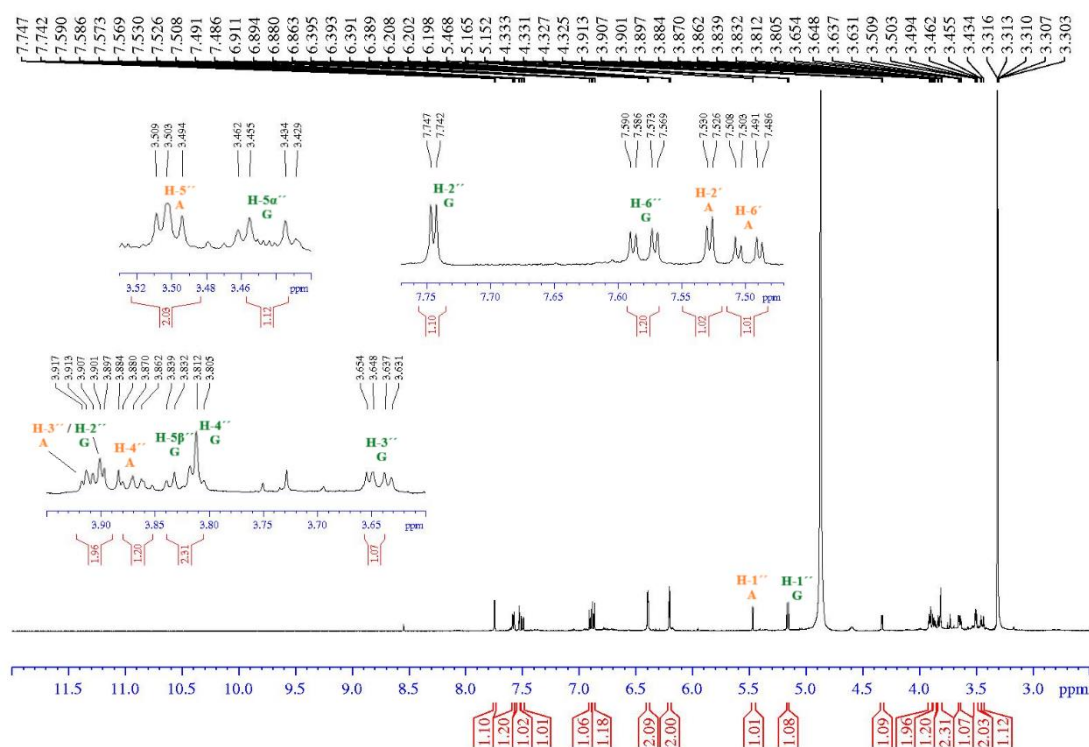
(2)



Κερκέτινο 3-O-α-L-αραβινοπυρανοζίτης  
(Γουαϊαβερίνη)

(3)

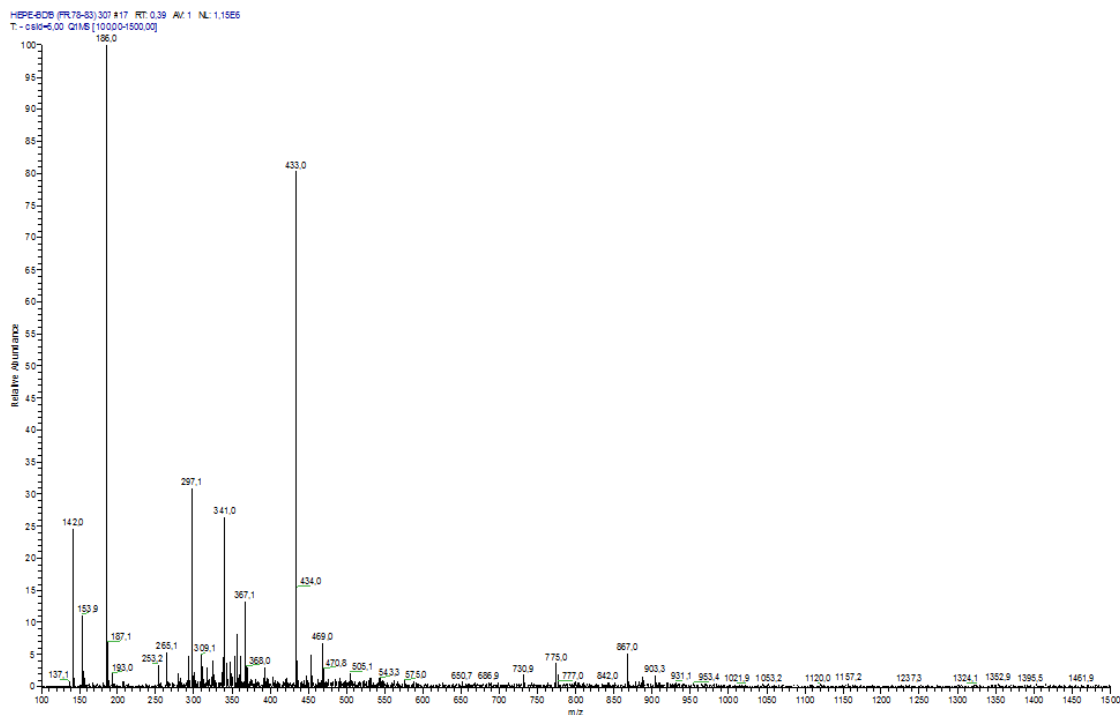
Όσον αφορά στην αρωματική περιοχή του φάσματος, η ανάλυση παραμένει ίδια με αυτή του υπεροσίδη (Εικόνα 3.4.). Το  $^1\text{H}$  NMR έδειξε τέσσερις μετα συζεύξεις αρωματικών πρωτονίων στα  $\delta_{\text{H}}$  6.21 (d,  $J=2.15$  Hz, H-6),  $\delta_{\text{H}}$  6.39 (d,  $J=2.00$  Hz, H-8) και  $\delta_{\text{H}}$  6.20 (d,  $J=2.10$  Hz, H-6),  $\delta_{\text{H}}$  6.40 (d,  $J=2.05$  Hz, H-8) γνωστές σαν W-coupling. Η αλληλεπίδραση μεταξύ των ζευγών πρωτονίων επιβεβαιώνεται και από τα φάσματα COSY και HMBC. Οι συζεύξεις μεταξύ των πρωτονίων στα  $\delta_{\text{H}}$  7.53 (H-2'),  $\delta_{\text{H}}$  7.50 (H-6'),  $\delta_{\text{H}}$  6.87 (H-5') και  $\delta_{\text{H}}$  7.74 (H-2'),  $\delta_{\text{H}}$  7.58 (H-6'),  $\delta_{\text{H}}$  6.90 (H-5') είναι χαρακτηριστικές ενός συστήματος ABX.



Εικόνα 3.4. Φάσμα  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) Αβικουλαρίνης (2) και Γουαϊαβερίνης (3).

Με αυτά τα δεδομένα, θα αναμενόταν μία δομή παρόμοια με αυτή του υπεροσίδη αλλά με μεγαλύτερο μοριακό βάρος. Ωστόσο, τα δεδομένα NMR δεν συμφωνούσαν με κάποια δομή δι-γλυκοζυλιωμένου φλαβονοειδούς Έτσι, με βάση και τα αποτελέσματα του φάσματος μάζας από το ESI-MS, το οποίο έδωσε ένα μοριακό βάρος  $m/z$  867 ( $2\text{M}-\text{H}^-$ ), με βασική θραυσματοποίηση  $\text{MS}^2$  το  $m/z$  433, (Εικόνα 3.5.) έγινε η υπόθεση ότι πρόκειται για μίγμα δύο ενώσεων τα οποία αποτελούν συντακτικά ισομερή. Έπειτα από ανάλυση των φασμάτων 1D, 2D και στη συνέχεια από βιβλιογραφική αναζήτηση διαπιστώθηκε ότι

πρόκειται όντως για μίγμα δύο ενώσεων. Οι ενώσεις αυτές έχουν σαν βασικό σκελετό την δομή της κερκετίνης, διαφέρουν όμως ως προς την δομή του σακχάρου, το οποίο βρέθηκε ότι είναι η αραβινόζη.

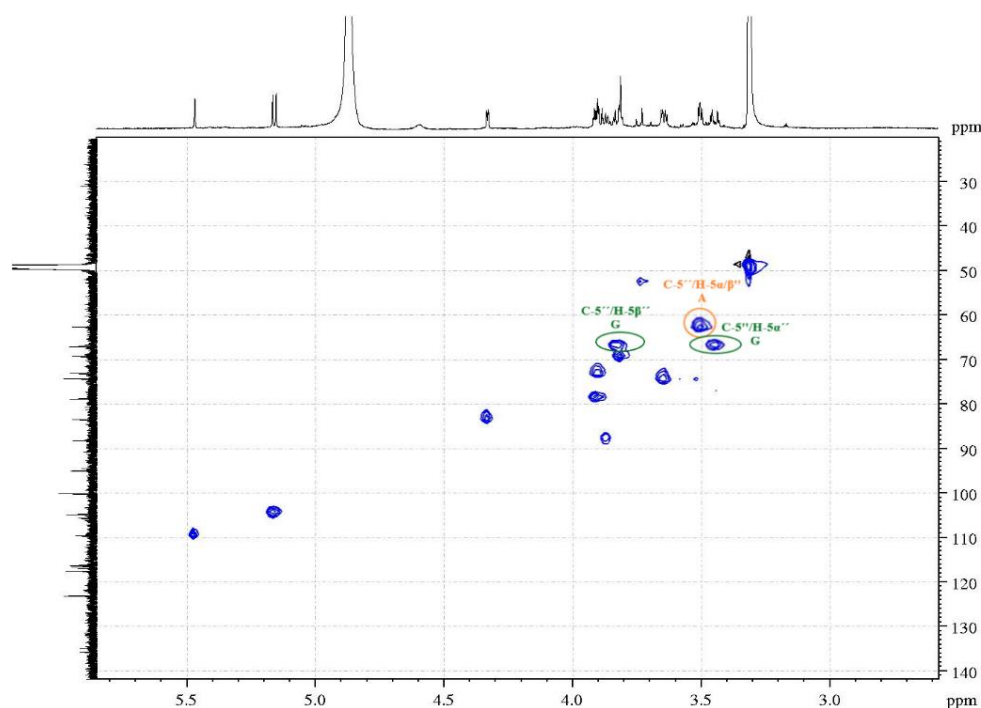


Εικόνα 3.5. Φάσμα μάζας MS<sup>1</sup> αρνητικού ιονισμού από το ESI-MS για το μίγμα των δύο ενώσεων.

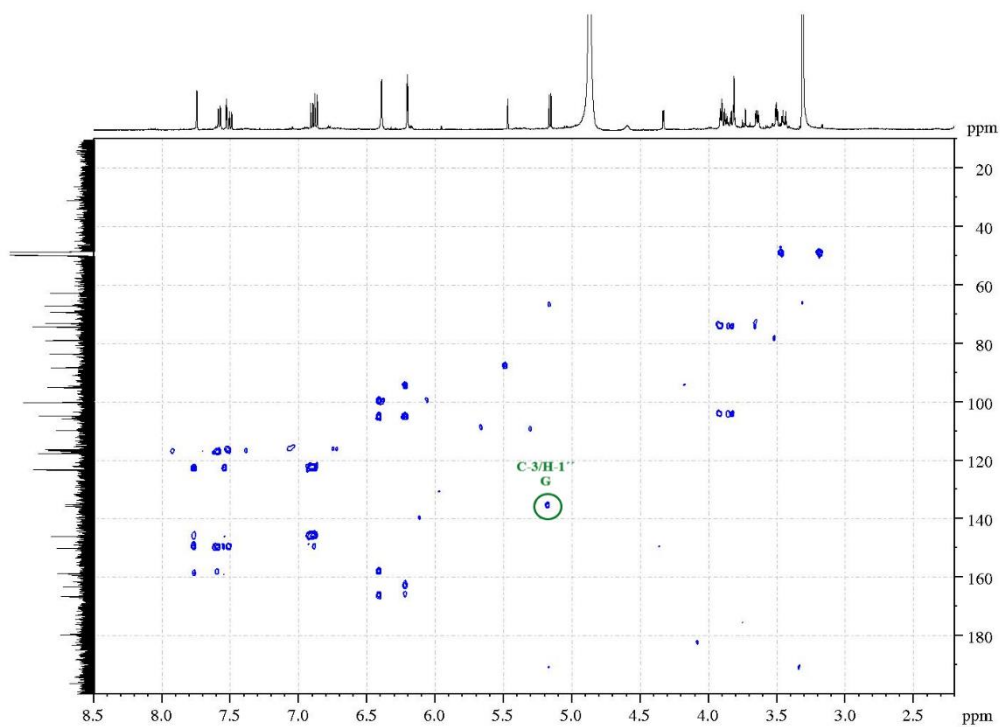
Όπως είναι γνωστό, οι αλδεΰδες μπορούν να αντιδράσουν με αλκοόλες και να σχηματίσουν ημιακετάλες. Το ίδιο συμβαίνει και στα σάκχαρα, όπου η αλδεΰδη και η αλκοόλη είναι μέρος του ίδιου μορίου οπότε ο σχηματισμός της ημιακετάλης γίνεται ενδομοριακά. Έτσι, στην αραβινόζη η αλδεΰδη στον C-1'' μπορεί είτε να αντιδράσει με το υδροξύλιο στον C-4'' και να σχηματίσει έναν πενταμελή δακτύλιο (φουρανοζιτικό) είτε με αυτόν στον C-5'' και να σχηματίσει ένα εξαμελή δακτύλιο (πυρανοζιτικό). Αποτέλεσμα και των δύο είναι να δημιουργηθεί έναν νέο στερεογονικό κέντρο στον C-1'' και κατά συνέπεια δύο διαστερομερή, τα οποία ονομάζονται ανωμερή (α και β). Με βάση τα παραπάνω, προκύπτει η ανάγκη να εξεταστεί εάν το σάκχαρο, δηλαδή η αραβινόζη, που συνδέεται με την κερκετίνη είναι αρχικά D ή L και έπειτα εάν είναι το α ή το β ανωμερές.

Γνωρίζοντας λοιπόν ότι το σάκχαρο είναι η αραβινόζη και ότι έχουμε μίγμα συντακτικών ισομερών υποθέτουμε ότι τα ισομερή αυτά είναι η φουρανοζιτική και η πυρανοζιτική μορφή του σακχάρου (Εικόνα 3.8.). Η επιβεβαίωση για το παραπάνω, προήλθε

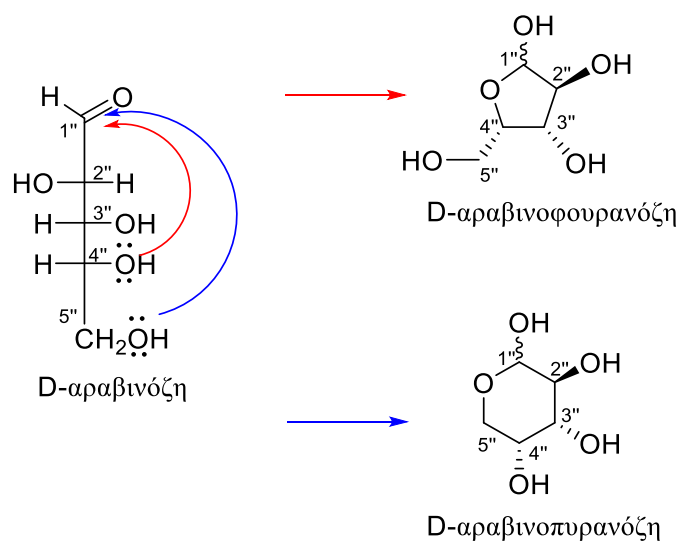
και από το φάσμα HSQC όπου υπάρχουν μόνο δύο δευτεροταγείς άνθρακες, ένας άνθρακας στα  $\delta_C$  66.99 ppm και ένας άνθρακας στα  $\delta_C$  62.59 ppm. Πιο συγκεκριμένα, με βάση το HSQC ο άνθρακας στα  $\delta_C$  66.99 ppm βλέπει δύο πρωτόνια με διαφορετικές μετατοπίσεις το καθένα, στα  $\delta_H$  3.83 ppm και στα  $\delta_H$  3.44 ppm, ενώ ο άνθρακας στα  $\delta_C$  62.59 ppm βλέπει και τα δύο πρωτόνια στα  $\delta_H$  3.50 ppm (Εικόνα 3.6.). Επιβεβαιώθηκε, λοιπόν, ότι ο άνθρακας C-5'' στα  $\delta_C$  66.99 ppm ανήκει στην *πυρανοζιτική μορφή* του σακχάρου, καθώς τα πρωτόνια αυτά διαφοροποιούνται αρκετά, κάτι που δεν ισχύει για τα πρωτόνια H-5'' στα 3.50 ppm αφού πρόκειται για την *φουρανοζιτική μορφή* του σακχάρου. Στη φουρανοζιτική δομή [αβικουλαρίνη (2)] τα μεθυλενικά πρωτόνια βρίσκονται έξω από τον δακτύλιο και έτσι δεν διαφοροποιούνται, αλλά δίνουν μία οξεία κορυφή στο  $^1H$  NMR. Με βάση τα παραπάνω και με την βοήθεια των δισδιάστατων φασμάτων NMR: COSY, HSQC, HMBC έγινε δυνατή η αντιστοίχιση των ανθράκων και των πρωτονίων της *πυρανοζιτικής* [γουαΐαβερίνη (3)] και της *φουρανοζιτικής* [αβικουλαρίνη (2)] μορφής της αραβινόζης. Επιπλέον, μέσω του φάσματος HMBC φαίνονται οι μακριάς εμβέλειας συσχετίσεις άνθρακα-πρωτονίου (Εικόνα 3.7.). Χαρακτηριστικά ο δεσμός του C-1'' ( $\delta_C$  104.7 ppm) του σακχάρου με το C-3 ( $\delta_C$  135.7 ppm) του τμήματος της κερκετίνης, πιστοποιείται από την εμφανή αλληλεπίδραση του C-3 με το ανωμερικό H-1'' ( $\delta_H$  5.16 ppm) στην γουαΐαβερίνη.



**Εικόνα 3.6.** Κυριότερες αλληλεπιδράσεις HSQC (500 MHz,  $CD_3OD$ ) αρωματικής περιοχής Αβικουλαρίνης (2) και Γουαΐαβερίνης (3).



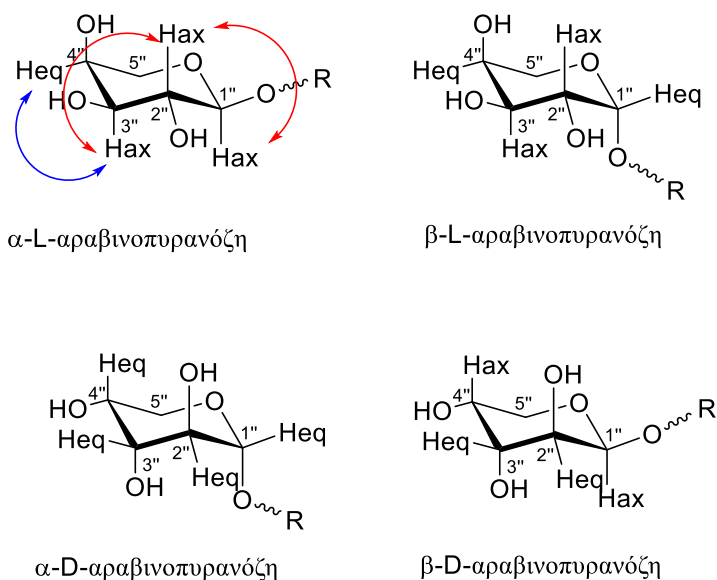
Εικόνα 3.7. Φάσμα HMBC (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) Αβικουλαρίνης (2) και Γουαϊαβερίνης (3).



Εικόνα 3.8. Φουρανοζιτική και Πυρανοζιτική μορφή της αραβινόζης.

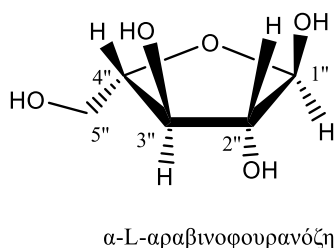


Με βάση τα παραπάνω, προέκυψε η ανάγκη να εξεταστεί εάν το σάκχαρο, δηλαδή η αραβινόζη, που συνδέεται με την κερκετίνη είναι αρχικά D ή L και έπειτα εάν είναι το α ή το β ανωμερές. Όσον αφορά την αραβινοπυρανόζη (**γουαϊαβερίνη**), η περίπτωση να είναι β ανωμερές και D σάκχαρο απορρίφθηκε καθώς παρατηρήθηκε ότι το ανωμερικό πρωτόνιο H-1'' (δ<sub>H</sub> 5.16 ppm) σχάζεται από το H-2'' (δ<sub>H</sub> 3.90 ppm) σε μία διπλή κορυφή με  $^3J_{H1''-H2''} = 6.55$  Hz. Σύμφωνα με την καμπύλη Karplus, μία τέτοια σχετικά μεγάλη τιμή σταθεράς σύζευξης είναι χαρακτηριστική μίας σχεδόν trans-διαξονικής θέσης δύο αξονικών πρωτονίων. Αντιστοίχως, η σταθερά σύζευξης μεταξύ των H-2'' (δ<sub>H</sub> 3.90 ppm) και H-3'' (δ<sub>H</sub> 3.64 ppm) είναι  $^3J_{H2''-H3''} = 8.30$  Hz υποδηλώνοντας καθαρά μία trans-διαξονική σχέση μεταξύ των αξονικών αυτών πρωτονίων, ενώ η σταθερά σύζευξης μεταξύ των H-3'' και H-4'' (δ<sub>H</sub> 3.81 ppm) είναι  $^3J_{H3''-H4''} = 3.15$  Hz υποδηλώνοντας μία αξονική-ισημερινή διαμόρφωση (Gauche). Με βάση, λοιπόν, τα παραπάνω η δομή που αποδόθηκε στο σάκχαρο είναι αυτή της α-L-αραβινοπυρανόζης (Βλέπε δεδομένα Πίνακα 3.4.). Σε κάθε άλλη περίπτωση διαστερομερούς δεν θα εμφανιζόταν αυτή η σχέση μεταξύ των πρωτονίων του σακχάρου (Εικόνα 3.9.).



**Εικόνα 3.9.** Τα τέσσερα πιθανά διαστερομερή της αραβινόζης που αφορούν την ανωμερικότητα και την D ή L στερεοχημεία.

Με αντίστοιχο τρόπο βρέθηκε και η δομή της φουρανοζιτικής μορφής του σακχάρου η οποία αντιστοιχεί στην α-L-αραβινοφουρανόζη (Βλέπε δεδομένα Πίνακα 3.5.).

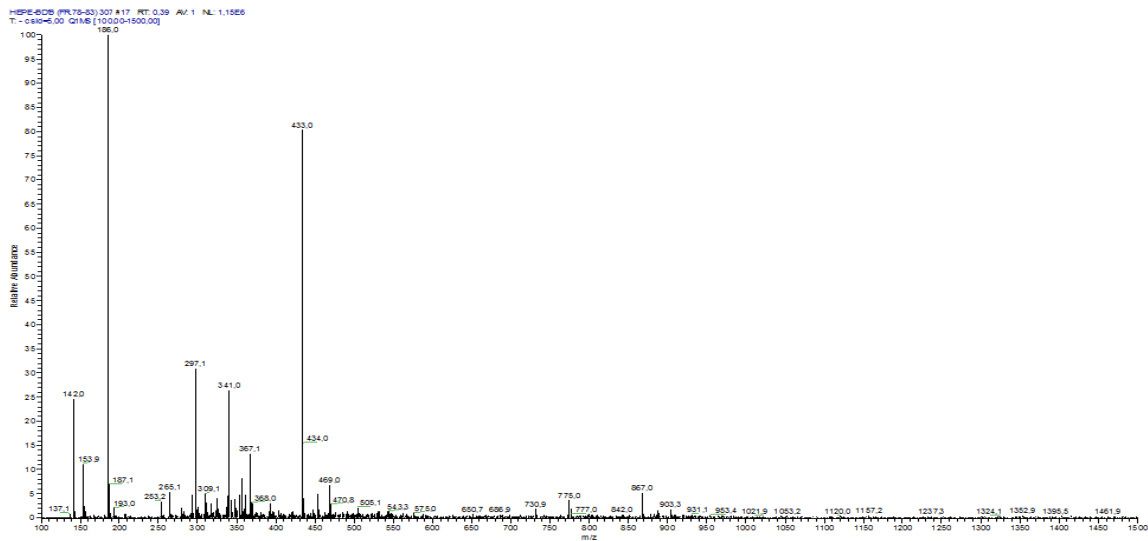


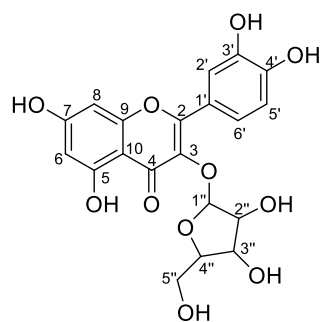
**Εικόνα 3.10.** Ανωμερικότητα και στερεοχημεία της αβικουλαρίνης.

Έπειτα από εκτεταμένη βιβλιογραφική αναζήτηση και σύγκριση των θεωρητικών τιμών μετατόπισης με αυτές των πειραματικών στα φάσματα  $^1\text{H}$  και  $^{13}\text{C}$  NMR βρέθηκε ότι οι ενώσεις αυτές είναι γνωστές ως αβικουλαρίνη (κερκέτινο-3-O-α-αραβινοφουρανοζίτης) και γουαϊαβερίνη (κερκέτινο-3-O-α-L-αραβινοφυρανοζίτης).

Ακολούθησε σύγκριση των δεδομένων μας με αυτά της φασματοσκοπίας NMR στην βιβλιογραφία. Από τις σχετικές δημοσιεύσεις, αναλυτική αναφορά σε δεδομένα NMR για την αβικουλαρίνη εμφανίστηκαν σε τέσσερις δημοσιεύσεις<sup>72,73,74,75</sup> (Πίνακας 3.2.). Η μία από αυτές απορρίφθηκε γιατί η σύγκριση με την βιβλιογραφία έδειξε ότι οι συγγραφείς χαρακτήρισαν λανθασμένα την ένωση ως αβικουλαρίνη, ενώ ήταν στην πραγματικότητα η γουαϊαβερίνη (βλέπε Πίνακα 3.2.). Στις υπόλοιπες υπάρχει στενή συσχέτιση των τιμών των φασμάτων πρωτονίου και άνθρακα όπως φαίνεται στους αντίστοιχους Πίνακες. Οι κύριες διαφοροποιήσεις εμφανίζονται στο φάσμα άνθρακα που αναφέρει η ερευνητική ομάδα του Yun Wei.<sup>74</sup> Οι διαφοροποιήσεις αυτές αναφέρονται κυρίως σε άνθρακες που φέρουν φαινορικά υδροξύλια, γιατί το φάσμα λήφθηκε σε διαφορετικό διαλύτη όπου πιθανά η έκταση των αλληλεπιδράσεων τύπου δεσμών υδρογόνου να είναι διαφορετική. Αντιστοίχως, αναλυτική αναφορά σε δεδομένα NMR για την γουαϊαβερίνη εμφανίστηκαν σε τέσσερις δημοσιεύσεις<sup>76,77,78,79</sup> (Πίνακας 3.3.). Και σε αυτή την περίπτωση, οι κύριες διαφοροποιήσεις σε τιμές μετατόπισης σε ένα από τα φάσματα άνθρακα πιθανόν να οφείλονται στο ότι το φάσμα λήφθηκε σε διαφορετικό (πολικό αλλά μη πρωτικό διαλύτη).<sup>80</sup>

Η ανάλυση με ESI-MS σε αρνητικό ιοντισμό πραγματοποιήθηκε αρχικά με full scan από  $m/z$  50-1500 όπου προέκυψε το μοριακό ιόν  $m/z = 867.0$  (διπλάσια μάζα της αβικουλαρίνης ή της γουαΐαβερίνης καθώς αποτελούν συντακτικά ισομερή<sup>81</sup>) ενώ φάνηκε και το  $m/z = 433.0$  που αντιστοιχεί στο μοριακό βάρος της κάθε ένωσης.





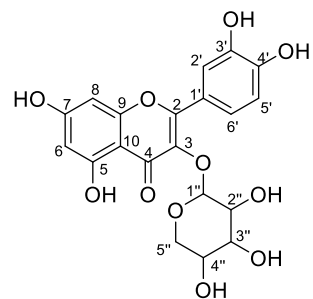
**Avicularin**

(Quercetin-3-O-arabinofuranoside)

	<i>HEPE-BD B</i> (fr.78-83) (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD)		<i>Phytotherapy Research 2011</i> (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) Guaijaverin (Λανθασμένος χαρακτηρισμός ένωσης)		<i>Natural Product Sciences 2016</i> (300 MHz, CD <sub>3</sub> OD)		<i>Journal of Chromatography A 2009</i> (600 MHz, CD <sub>3</sub> COCD <sub>3</sub> + D <sub>2</sub> O)		<i>Journal of Analytical Methods in Chemistry 2014</i> (CD <sub>3</sub> OD)	
#	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C (50 MHz)	<sup>1</sup> H (200 MHz)	<sup>13</sup> C (150 MHz)	<sup>1</sup> H (600 MHz)
4	179.49	-	179.5	-	178.6	-	179.4		180.09	
7	166.56	-	166.1	-	164.7	-	165.0		166.25	
5	163.09	-	163.1	-	161.7	-	169.2		163.19	
9	158.69	-	158.7	-	157.2	-	162.6		158.69	
2	158.50	-	158.4	-	157.9	-	157.9		159.44	
4'	150.02	-	149.9	-	148.5	-	149.1		149.96	
3'	146.04	-	145.9	-	144.9	-	145.7		146.47	
3	135.14	-	135.7	-	133.5	-	134.4		135.00	
6'	122.99	7.50 (1H) dd, J <sub>1</sub> =8.40 J <sub>2</sub> =2.10	123.1	7.63 (1H, dd, J = 8.0, 2.0)	121.7	7.53 (1H, s)	122.6	7.35 (1H)	123.20	7.49 (1H, dd, J =8.4, 1.8 Hz)
1'	122.94	-	122.9	-	121.6		122.3		123.09	

2'	116.49	7.53 (1H) d, J=2.10	117.5	7.51 (1H, d, J = 2.0)	115.4	7.52 (1H, d, J = 8.4 Hz)	116.2	7.47 (1H)	116.54	7.52 (1H, d, J = 1.8Hz)
5'	116.21	6.87 (1H) d, J=8.45	116.2	6.82 (1H, d, J = 8.0)	115.0	6.90 (1H, d, J = 8.4 Hz)	116.2	6.99 (1H)	116.54	6.90 (1H, d, J = 8.4Hz)
10	105.54	-	105.6		104.2		105.2		105.69	
6	100.07	6.20 (1H) d, J=2.15	99.9	6.19 (1H, d, J = 2.0) 6.19 (1H, d, J = 2.0)	98.5	6.21 (1H, s)	99.4	6.25 (1H)	99.95	6.20 (1H, d, J = 1.8 Hz)
8	94.91	6.39 (1H) d, J=2.00	94.7	6.39 (1H, d, J = 2.0)	93.4	6.40 (1H, s)	94.5	6.46 (1H)	94.84	6.38 (1H, d, J = 1.8 Hz)
1''	109.56	5.47 (1H) br s	104.5	5.28 (1H, d, J = 5.0)	108.1	5.47 (1H, s)	109.0	5.44 (1H, brs)	109.59	5.46 (1H, s)
3''	78.74	3.90 (1H) dd, J <sub>1</sub> =4.80 J <sub>2</sub> =2.31	72.9	3.21-3.62 (5H, m, Ara-H)	77.3	3.91 (1H, dd, J = 5.1, 2.7 Hz)	78.6	3.46-4.24 (5H)	78.76	3.89 (1H, dd, J =4.8, 2.4 Hz)
2''	83.36	4.33 (1H) dd, J <sub>1</sub> =2.95 J <sub>2</sub> =1.00	74.1		81.9	4.33 (1H, br d, J = 2.1 Hz)	82.1		83.41	4.32 (1H, d, J = 2.4 Hz)
4''	88.08	3.88 (1H) br d, J=4.62	66.9		86.6	3.87 (1H, br q J = 4.8 Hz)	89.2		88.10	3.861 (1H, m)
5''	62.59	3.50 (2H) br t, J <sub>1</sub> =4.13	69.1		61.1	3.50 (2H, m)	62.5		62.64	3.494 (2H, t, J =4.2 Hz)

Πίνακας 3.2. Σύγκριση δεδομένων φασματοσκοπίας NMR της αβικουλαρίνης με αυτά της βιβλιογραφίας.



**Guaijaverin**  
(Quercetin-3-O-arabinopyranoside)

#	<i>HEPE-BD B</i> (fr.78-83) (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD)		<i>Fitoterapia 2000</i> (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )		<i>J. Sep. Science 2002</i> (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD)		<i>Phytotherapy Research 1998</i> (CD <sub>3</sub> OD)		<i>Food Chemistry 2010</i> (CD <sub>3</sub> OD)	
	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C (50 MHz)	<sup>1</sup> H (200 MHz)	<sup>13</sup> C (100 MHz)	<sup>1</sup> H (400 MHz)
4	179.49	-	177.4	-	178.9	-	179.4	-	178.0	-
7	166.56	-	164.6	-	166.3	-	166.0	-	164.5	-
5	163.09	-	161.1	-	162.8	-	163.0	-	161.5	-
9	158.69	-	156.3	-	158.6	-	158.6	-	156.9	-
2	158.50	-	156.1	-	158.4	-	158.4	-	157.2	-
4'	150.02	-	148.6	-	149.8	-	149.9	-	148.5	-
3'	146.04	-	144.9	-	145.9	-	145.9	-	144.5	-
3	135.72	-	133.6	-	135.5	-	135.6	-	133.4	-
6'	123.15	7.58 (1H) dd, J <sub>1</sub> =8.50 J <sub>2</sub> =2.20	122.0	7.65 (dd, 8.5, 2.2 Hz)	122.7	7.58 (dd, 8.5, 2.1)	123.0	7.70 (dd, 9.0, 2.0)	134.2	7.55 (1H, dd, J = 2.4, 8.8 Hz)
1'	122.07	-	120.8	-	123.1	-	122.8	-	121.6	-
2'	117.47	7.74 (1H) d, J=2.15	115.6	7.50 (d, J 2.2 Hz)	117.3	7.75 (d, 2.1)	117.4	7.50 (d, 2.0)	114.7	7.73 (1H, dd, J = 2.4 Hz)
5'	116.82	6.90 (1H) d, J=8.35	115.3	6.83 (d, J 8.5 Hz)	116.0	6.88 (d,8.5)	116.1	6.80 (d, 9.0)	116.0	6.85 (1H, d, J = 8.8 Hz)

<b>10</b>	105.56	-	103.7	-	105.6	-	105.6	-	104.1	-
<b>6</b>	100.07	6.21 (1H) d, J=2.10	101.4	6.18 (d, J 1.7 Hz)	99.8	6.21 (d, 2.1)	99.8	6.10 (d, 2.0)	98.4	6.17 (1H, d, J = 2.0 Hz)
<b>8</b>	94.84	6.39 (1H) d, J=2.05	98.7	6.38 (d, J 1.7 Hz)	94.7	6.40 (d, 2.1)	94.6	6.30 (d, 2.0)	93.2	6.36 (1H, d, J = 2.0 Hz)
<b>1''</b>	104.70	5.16 (1H) d, J=6.55	93.5	5.27 (d, J 5.1 Hz)	104.4	5.17 (d, 6.6)	104.6	5.10 (d, 7.0)	103.2	5.14 (1H, d, J = 6.4 Hz)
<b>3''</b>	74.18	3.64 (1H) dd, J <sub>1</sub> =8.30 J <sub>2</sub> =3.15	71.6	3.52 (dd, J 7.1, 3.2 Hz)	74.0	3.65 (dd, 8.5, 3.2)	74.1	3.65 (dd, 8.5, 3.2)	71.4	3.63 (1H, dd, J = 3.2, 8.4 Hz)
<b>2''</b>	72.92	3.90 (1H) dd, J <sub>1</sub> =8.30 J <sub>2</sub> =6.55	70.7	3.76 (dd, J 5.1, 7.1 Hz)	72.7	3.91 (dd, 8.5, 6.6)	72.8	3.90 (dd, 7.0, 8.5)	72.7	3.43 (1H, dd, J = 3.2, 13.6 Hz)
<b>4''</b>	69.16 <sup>1</sup>	3.81 (1H) dd, J <sub>1</sub> =3.62 J <sub>2</sub> =3.15	66.0	3.22 (dd, J 2.0, 11.2 Hz) 3.60 (dd, J 5.2, 11.2 Hz)	69.0	3.82 [m (overlapped)]	66.9	3.75-3.86	65.5	3.81 (2H, dd, J = 3.6, 9.6 Hz)
<b>5''</b>	66.99 <sup>1</sup>	3.83 (1H) dd, J <sub>1</sub> =13.69 J <sub>2</sub> =3.62 3.44 (1H) dd, J <sub>1</sub> =13.69 J <sub>2</sub> =3.38	64.2	3.66 (ddd, J 3.2, 5.2, 2.0 Hz)	66.7	3.45 (dd, 13.5, 3.3) 3.83 [m (overlapped)]	69.1	3.75-3.86 3.42	67.7	3.88 (1H, dt, J = 1.6, 8.4 Hz)

**Πίνακας 3.3.** Σύγκριση δεδομένων φασματοσκοπίας NMR της γουαΐαβερίνης με αυτά της βιβλιογραφίας.

<sup>1</sup> Οι τιμές των ανθράκων 4'' και 5'' εμφανίζονται ανάστροφες. Οι τιμές των σταθερών σύζευξης επιβεβαιώνουν την δική μας ανάθεση.

<i>Αβικουλαρίνη (2)</i>							
#	<sup>13</sup> C	DEPT-135	HSQC	δ <sup>1</sup> H	Πολλαπλότητα, (J Hz)	COSY	HMBC
<b>Τμήμα Φλαβόνης</b>							
4	179.49	C	-	-	-	-	-
7	166.56	C	-	-	-	-	H-8/H-6
5	163.09	C	-	-	-	-	H-6
9	158.69	C	-	-	-	-	H-8
2	158.50	C	-	-	-	-	H-2'
4'	150.02	C	-	-	-	-	H-2'/H-6'/H-5' <sup>w</sup>
3'	146.04	C	-	-	-	-	H-2' <sup>w</sup> /H-5'
3	135.14	C	-	-	-	-	-
6'	122.99	CH	H-6'	7.50 (1H)	dd, J <sub>1</sub> =8.40 J <sub>2</sub> =2.10	H-2'/H-5'/H-6	H-2'/H-5'
1'	122.94	C	-	-	-	-	H-2'/H-5'
2'	116.49	CH	H-2'	7.53 (1H)	d, J=2.10	H-6'/H-6	H-6'
5'	116.21	CH	H-5'	6.87 (1H)	d, J=8.45	H-6'	H-6'
10	105.54	C	-	-	-	-	-
6	100.07	CH	H-6	6.20 (1H)	d, J=2.15	H-2'/H-8/H-6'	H-8
8	94.91	CH	H-8	6.39 (1H)	d, J=2.00	H-6	H-6
<b>Τμήμα Σακχάρου</b>							
1''	109.56	CH	H-1''	5.47 (1H)	br s	H-2''/H-3'' <sup>w</sup>	-
4''	88.08	CH	H-4''	3.88 (1H)	br d, J=4.62	H-3''/H-5''	H-1''
2''	83.36	CH	H-2''	4.33 (1H)	dd, J <sub>1</sub> =2.95 J <sub>2</sub> =1.00	H-1''/H-3''	-
3''	78.74	CH	H-3''	3.90 (1H)	dd, J <sub>1</sub> =4.80 J <sub>2</sub> =2.31	H-2''/H-4''	H-5''
5''	62.59	CH <sub>2</sub>	H-5	3.50 (2H)	br t, J=4.13	H-4''	-

**Πίνακας 3.4.** Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR (500MHz, CD<sub>3</sub>OD) της ένωσης (2).

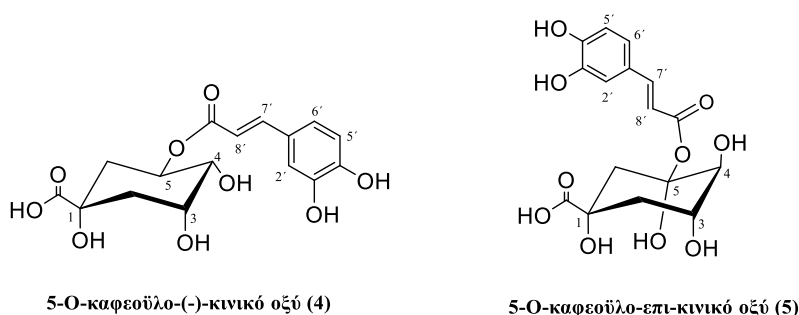


<i>Γουαϊαβερίνη(3)</i>							
#	<sup>13</sup> C	DEPT-135	HSQC	δ <sup>1</sup> H	Πολλαπλότητα, (J Hz)	COSY	HMBC
<b>Τμήμα Φλαβόνης</b>							
4	179.49	C	-	-	-	-	-
7	166.56	C	-	-	-	-	H-8/H-6
5	163.09	C	-	-	-	-	H-6
9	158.69	C	-	-	-	-	H-8
2	158.50	C	-	-	-	-	H-2'
4'	150.02	C	-	-	-	-	H-2'/H-6'/H-5' <sup>w</sup>
3'	146.04	C	-	-	-	-	H-2' <sup>w</sup> /H-5'
3	135.72	C	-	-	-	-	5.16
6'	123.15	CH	H-6'	7.58 (1H)	dd, J <sub>1</sub> =8.50 J <sub>2</sub> =2.20	H-2'/H-5'/H-8 <sup>w</sup> /H-	H-2'/H-5'
1'	122.07	C	-	-	-	-	H-2'/H-5'
2'	117.47	CH	H-2'	7.74 (1H)	d, J=2.15	H-6'/H-5' <sup>w</sup>	H-6'
5'	116.82	CH	H-5'	6.90 (1H)	d, J=8.35	H-2' <sup>w</sup> /H-6'	H-6'
10	105.56	C	-	-	-	-	-
6	100.07	CH	H-6	6.21 (1H)	d, J=2.10	H-8	H-8
8	94.84	CH	H-8	6.39 (1H)	d, J=2.05	H-6	H-6
<b>Τμήμα Σακχάρου</b>							
1''	104.70	CH	H-1''	5.16 (1H)	d, J=6.55	H-2''	H-8/H-6
3''	74.18	CH	H-3''	3.64 (1H)	dd, J <sub>1</sub> =8.30 J <sub>2</sub> =3.15	H-2''/H-5'' /H-4''	H-2''/H-5''/H- 4''/H-3''
2''	72.92	CH	H-2''	3.90 (1H)	dd, J <sub>1</sub> =8.30 J <sub>2</sub> =6.55	H-1''/H-4''	H-4''
4''	69.16	CH	H-4''	3.81 (1H)	dd, J <sub>1</sub> =3.62 J <sub>2</sub> =3.15	H-3''/H-5''	-
5''	66.99	CH <sub>2</sub>	H-5''	3.83(1H) 3.44 (1H)	dd, J <sub>1</sub> =13.69 J <sub>2</sub> =3.62 dd, J <sub>1</sub> =13.69 J <sub>2</sub> =3.38	H-1''/H-4''/H-5''	H-1''

**Πίνακας 3.5.** Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR (500MHz, CD<sub>3</sub>OD) της ένωσης (3).

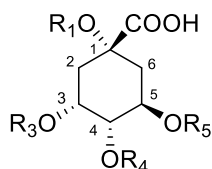
### 3.1.3. Δευτερογενείς μεταβολίτες: n-χλωρογενικό οξύ (4) και Επιχλωρογενικό οξύ (5)

Γενικά τα καφεοϋλοκινικά οξέα απομονώνονται από τα πολικά εκχυλίσματα των φυτών. Στο *Hypericum empetrifolium* το 5-O-καφεοϋλο(-)-κινικό οξύ (4) και το 5-O-καφεοϋλο-επι-κινικό οξύ (5) απομονώθηκαν από την περαιτέρω εκχύλιση του μεθανολικού εκχυλίσματος των ανθέων και των φύλλων με οξικό αιθυλεστέρα (EtOAc).



Τα καφεοϋλοκινικά οξέα ανήκουν στην κατηγορία των φαινολικών οξέων και αποτελούνται από δύο τμήματα. Αυτό του κινικού και αυτό του καφεϊκού οξέος, το οποίο μπορεί να συνδεθεί με το κινικό στις θέσεις όπου υπάρχει ελεύθερη υδροξυλομάδα (1,3,4 ή 5). Συνεπώς στο φάσμα της ένωσης παρατηρούνται δύο τύποι σημάτων πρωτονίων, ένας για τα αρωματικά/ολεφινικά του καφεϊκού και ένας για τα H-C-OR του κινικού.

Στο φάσμα  $^1\text{H}$  NMR παρατηρήθηκε μία αλληλουχία σημάτων η οποία είχε αρκετές ομοιότητες με τα χλωρογενικά οξέα που απαντώνται πιο συχνά στη βιβλιογραφία (Εικόνα 3.11.). Στο συγκεκριμένο δείγμα, ωστόσο, τα σήματα αυτά εμφανίζονται διπλά στην αρωματική/ολεφινική περιοχή. Ταυτόχρονα εμφανίζονται επιπλέον σήματα μαζί με ελαφρώς διαφορετικά μοτίβα κορυφών στην περιοχή των πρωτονίων του κινικού οξέος. Πιο συγκεκριμένα, τα φάσματα  $^{13}\text{C}$  και  $^1\text{H}$  NMR έδειξαν, αντίστοιχα, σήματα 26 ανθράκων, από τους οποίους οι 9 αντιστοιχούν στην αρωματική περιοχή και 24 πρωτονίων, με τα 8 πρωτόνια να είναι αρωματικά.



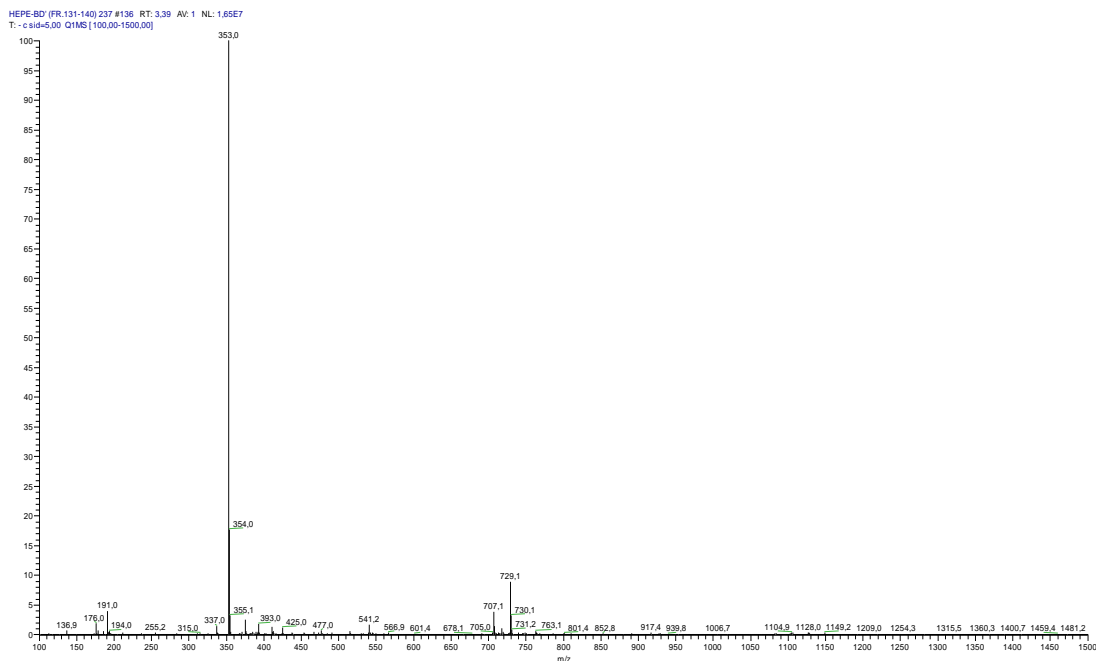
- (4):  $R_1 =$  caffeic acid,  $R_3, R_4, R_5 = \text{H}$
- (5):  $R_3 =$  caffeic acid,  $R_1, R_4, R_5 = \text{H}$  (neochlorogenic acid)
- (6):  $R_4 =$  caffeic acid  $R_1, R_3, R_5 = \text{H}$  (kryptochlorogenic acid)
- (7):  $R_5 =$  caffeic acid  $R_1, R_3, R_4 = \text{H}$  (n-chlorogenic acid)

Εικόνα 3.11. Δομές «χλωρογενικών οξέων» που συναντώνται συχνότερα στη βιβλιογραφία.

Όσον αφορά το τμήμα του καφεϊκού οξέος, το  $^1\text{H}$  NMR έδειξε δύο ζεύγη από διπλές κορυφές με σταθερές σύζευξης 15.9 Hz, ενδεικτικές των trans ολεφινικών πρωτονίων που βρίσκονται στα υδροξυκινναμικά οξέα σε  $\delta_{\text{H}}$  7.58 ppm/7.57 ppm (d,  $^3\text{J}_{\text{H}7'\text{H}8'/\text{H}7''\text{H}8''}=15.90/15.85$ , H-7'/H-7'') και  $\delta_{\text{H}}$  6.31 ppm/6.29 ppm (d,  $^3\text{J}_{\text{H}8'\text{H}7'/\text{H}8''\text{H}7''}=15.90/15.85$ , H-8'/H-8''). Είναι προφανές ότι πρόκειται για τα ολεφινικά πρωτόνια δύο παρόμοιων ενώσεων. Στην αρωματική περιοχή παρατηρήθηκαν συντονισμοί για δύο ABX συστήματα. Στο πρώτο σύστημα ανήκουν τα σήματα [ $\delta_{\text{H}}$  7.05 ppm (d,  $^3\text{J}_{\text{H}2'\text{H}6'}=2.00$  Hz, H-2') , 6.77 ppm (d,  $^3\text{J}_{\text{H}5'\text{H}6'}=8.10$  Hz, H-5') και 6.94 ppm (dd,  $^3\text{J}_{\text{H}6'\text{H}5'}=8.15$  Hz,  $^3\text{J}_{\text{H}6'\text{H}2'}=1.95$  Hz, H-6') και στο δεύτερο σύστημα ανήκουν τα σήματα  $\delta_{\text{H}}$  7.04 ppm (d,  $^3\text{J}_{\text{H}2''\text{H}6''}=2.00$  Hz, H-2'') , 6.76 ppm (d,  $^3\text{J}_{\text{H}5''\text{H}6''}=8.25$  Hz, H-5'') και 6.93 ppm (dd,  $^3\text{J}_{\text{H}6''\text{H}5''}=7.90$  Hz,  $^3\text{J}_{\text{H}6''\text{H}2''}=1.80$  Hz, H-6'')], τα οποία αποδόθηκαν σε δύο μονάδες 1,3,4 τρις υποκατεστημένων φαινυλίων. Το H-6' (6.94 ppm) εμφανίζεται ως μια διπλή της διπλής (dd) καθώς σχάζεται, λόγω του W-coupling, από τα H-2' (ortho σύζευξη), H-5' (meta σύζευξη). Από αυτές τις παρατηρήσεις προέκυψε το συμπέρασμα ότι υπάρχουν δύο μονάδες καφεϊκού οξέος. Οι αναθέσεις επιβεβαιώθηκαν περαιτέρω από την ανάλυση 2D NMR (HSQC, HMBC, COSY) (Πίνακας 3.7.).

Η παρουσία των τμημάτων του κινικού οξέος υποδείχθηκε από τους συντονισμούς στο  $^1\text{H}$  NMR δύο οξυμεθυνικών πρωτονίων στα  $\delta_{\text{H}}$  5.37 ppm και  $\delta_{\text{H}}$  5.42 ppm μαζί με τέσσερα ζεύγη από μεθυλινικά πρωτόνια στα  $\delta_{\text{H}}$  1.93-2.13 ppm (m), τα οποία είναι χαρακτηριστικά των μονάδων κινικού οξέος, όσον αφορά την μετατόπιση, πολλαπλότητα και σταθερά σύζευξης.

Με αυτά τα δεδομένα, θα αναμενόταν μία δομή με δύο καφεϊκά οξέα που συνδέονται με δύο μονάδες κινικού οξέος. Τα δεδομένα, όμως, του φάσματος μάζας από το ESI-MS (Εικόνα 3.12.), έδωσαν ένα μοριακό βάρος  $m/z$   $(\text{M}-\text{H})^-$  (353.0) το οποίο δεν ταιριάζει σε μοτίβο τέτοιου είδους (διμερούς) ένωσης. Ύστερα από συγκρίσεις των φασματοσκοπικών δεδομένων με τιμές της βιβλιογραφίας αλλά και συγγενών ενώσεων που έχουν απομονωθεί από την ερευνητική μας ομάδα, διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για μίγμα δύο ενώσεων. Θεωρήθηκε, λοιπόν, ότι οι ενώσεις αυτές έχουν σαν βασικό σκελετό την δομή του καφεϊκού οξέος, διαφέρουν όμως ως προς τον τρόπο σύνδεσης αυτού με το κινικό οξύ.

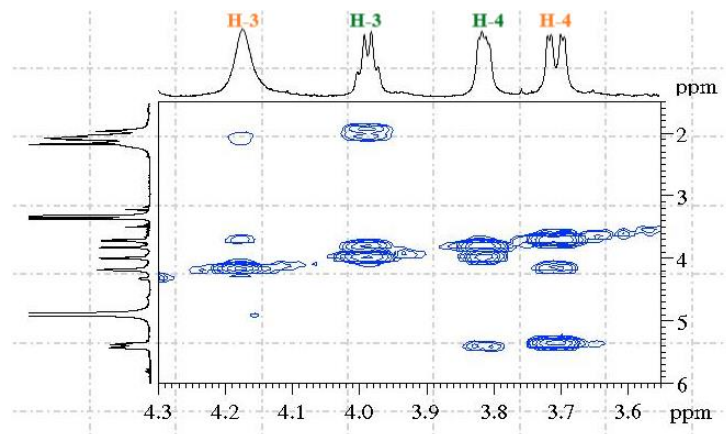


**Εικόνα 3.12.** Φάσμα μάζας MS1 αρνητικού ιονισμού από το ESI-MS για το μίγμα των δύο ενώσεων.

Γνωρίζοντας ότι το πιο κοινό φυσικώς απαντώμενο κινικό οξύ είναι το (-)-κινικό οξύ (L-κινικό οξύ) η έρευνα αρχικά περιορίστηκε στα πιο γνωστά στη βιβλιογραφία «χλωρογενικά οξέα» (Εικόνα 3.11.). Για το πρώτο συστατικό η δομή που αποδόθηκε είναι αυτή του **5-O-καφεοϋλο-(-)-κινικού οξέος**, γνωστού και ως **n-χλωρογενικό οξύ**.

Η ανάθεση των πρωτονίων του τμήματος του κινικού οξέος έγινε σε συνδυασμό με την ανάλυση H-H COSY, C-H HSQC και HMBC NMR αλλά και μέσω των σταθερών σύζευξης. Η σύνδεση του τμήματος του καφεϊκού οξέος με το κινικό στη θέση 5 συμπεραίνεται από τις συσχετίσεις HMBC του πρωτονίου που παρουσιάζει αυξημένη αποπροστασία στα  $\delta_H$  5.37 ppm, με τον εστερικό άνθρακα του καρβονυλίου C-9' επίσης αποπροστατευμένο, να δίνει σήμα στα  $\delta_C$  168.81 ppm, υποδηλώνοντας την ακυλίωση της υδροξυλομάδας.

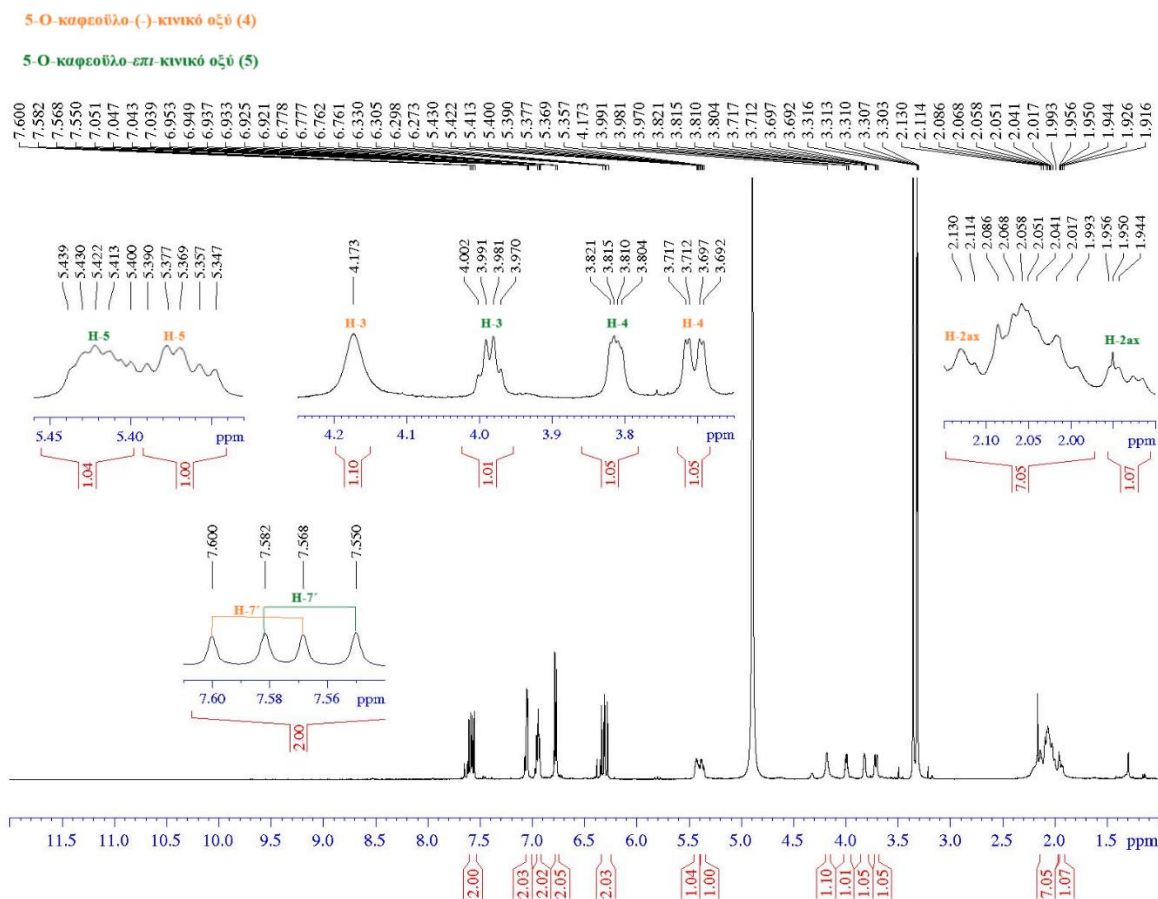
Η φασματοσκοπία ομοπυρηνικής σύζευξης (H,H) COSY (Εικόνα 3.13.) αποκάλυψε μία ισχυρή σύζευξη μεταξύ του μεθυνικού πρωτονίου στα 3.70 ppm και των μεθυνικών πρωτονίων στα  $\delta_H$  5.37 ppm και  $\delta_H$  4.17 ppm. Αυτό το μεθυνικό πρωτόνιο αποδόθηκε στον C-4 ( $\delta_C$  73.11 ppm) μιας και είναι το μόνο πρωτόνιο το οποίο σχάζεται σε μία διπλή της διπλής (dd) αλλά και που εμφανίζει μια ομοπυρηνική σύζευξη μόνο με αυτά τα πρωτόνια και όχι με τα μεθυλενικά H-2 και H-6 ( $\delta_H$  1.93-2.13 ppm) τα οποία δεν είναι γειτονικά.



**Εικόνα 3.13.** Κυριότερες αλληλεπιδράσεις COSY πρωτονίων τμήματος κινικού οξέος.

Η σταθερά σύζευξης  $^3J = 9.65$  Hz μεταξύ του **H-4** ( $\delta_H$  3.70 ppm) και του αποπροστατευμένου πρωτονίου στα  $\delta_H$  5.37 ppm υποδεικνύει, με βάση την καμπύλη Karplus, μια διαξονική διαμόρφωση των αντίστοιχων πρωτονίων. Το πρωτόνιο στα  $\delta_H$  4.17 ppm εμφανίζεται σαν μία διευρυμένη απλή κορυφή, πιθανώς διότι οι τιμές των σταθερών σύζευξης του κυμαίνονται σε παρόμοιες τιμές με αποτέλεσμα να μην διακρίνεται το μοτίβο της πολλαπλότητας. Η σταθερά σύζευξης του **H-4**  $^3J = 2.70$  Hz πρέπει να αντιστοιχεί στο πρωτόνιο στα  $\delta_H$  4.17 ppm, όμως επειδή όπως αναφέρθηκε σχάζεται σε μία br s δεν μπορεί να επιβεβαιωθεί. Η επιβεβαίωση προκύπτει από τα φάσματα 2D όπου το **H-4** ( $\delta_H$  3.70 ppm) δίνει πολύ ισχυρά σήματα με το αντίστοιχο πρωτόνιο ( $\delta_H$  4.17 ppm). Συμπερασματικά, μία τέτοια χαμηλή τιμή σταθερά σύζευξης αναφέρεται σε μία αξονική-ισημερινή σχέση μεταξύ των δύο πρωτονίων. Με βάση όλα τα παραπάνω δεδομένα, προκύπτει ότι τα H-4 και το πρωτόνιο στα 5.37 ppm βρίσκονται σε αξονική θέση ενώ το πρωτόνιο στα 4.17 ppm σε ισημερινή. Στην περιοχή 1.99-2.06 ppm εμφανίζονται έξι πρωτόνια, εκ των οποίων τα τρία αντιστοιχούν στο συγκεκριμένο συστατικό του μίγματος. Τα πρωτόνια αυτά διαφοροποιούνται μεταξύ τους ως διαστεροτοπικά (geminal, diastereotopic) κυρίως λόγω της ύπαρξης γειτονικού στερεογονικού κέντρου που είναι ο C-1 ( $\delta_C$  76.2 ppm). Στην περίπτωση μας, όπου έχουμε μίγμα καφεούλο-κινικών οξέων, τα πρωτόνια αυτά αλληλεπικαλύπτονται οπότε η εύρεση των σταθερών σύζευξης καθίσταται δύσκολη. Συχνά, κάποιο από τα πρωτόνια αυτά ξεχωρίζει για λόγους μαγνητικής ανισοτροπίας και δίνει διακριτές κορυφές στο  $^1H$  NMR. Ένα από αυτά είναι το πρωτόνιο στα  $\delta_H$  2.13 ppm και σχάζεται σε μία (όχι και τόσο ξεκάθαρη) διπλή της διπλής κορυφή (dd), με πιθανά  $^2J = 13.82$  Hz και  $^2J = 5.3$  Hz (Εικόνα 3.14.). Η ανάλυση των φασμάτων 2D και πρωτίστως του φάσματος COSY έδειξε ότι το πρωτόνιο στα  $\delta_H$  4.17 ppm δίνει έντονη σύζευξη με αυτό το

πρωτόνιο ( $\delta_H$  2.13 ppm). Μία σταθερά σύζευξης της τάξεως των 13.82 Hz αντιστοιχεί σε σχάσεις μεταξύ δύο geminal πρωτονίων, ενώ η σταθερά σύζευξης των 5.35 Hz είναι ενδεικτική μίας αξονικής-ισημερινής διαμόρφωσης (Gauche). Γνωρίζοντας από τα βιβλιογραφικά δεδομένα ότι στα 2.13 εμφανίζεται το H-2ax προκύπτει ότι το πρωτόνιο στα 4.17 ppm ανήκει στον C-3 και βρίσκεται σε ισημερινή θέση.



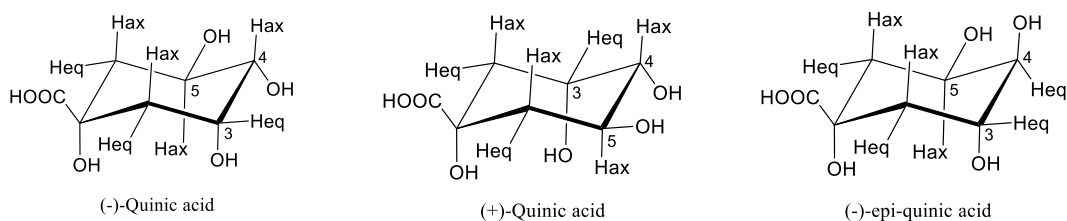
Εικόνα 3.14. Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) των ενώσεων (4) και (5).

Μετά την φασματοσκοπική ταυτοποίηση του συστατικού πραγματοποιήθηκε σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων με αυτά της βιβλιογραφίας καθώς και με αυτά πρότυπης ένωσης 5-O-καφεούλο(-)-κινικού οξέος (που ήταν εμπορικά διαθέσιμη) και επιβεβαιώθηκε η υπόθεση ότι πρόκειται για το **n-χλωρογενικό οξύ (4)** (5-O-καφεούλο(-)-κινικό οξύ).

Με ανάλογο τρόπο έγινε η ανάλυση του δεύτερου συστατικού του μίγματος. Τα δεδομένα του (εναπομείναντος) φάσματος  $^1\text{H NMR}$  συγκρίθηκαν αρχικά με αυτά της βιβλιογραφίας καθώς και με αυτά των ήδη απομονωμένων από την ερευνητική μας ομάδα «χλωρογενικών οξέων». Είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον το γεγονός ότι οι χημικές μετατοπίσεις, οι σταθερές σύζευξης αλλά και οι σχάσεις των μέχρι σήμερα απομονωθέντων «χλωρογενικών» διέφεραν αρκετά με αυτές του συγκεκριμένου συστατικού υποδηλώνοντας την παρουσία ενός νέου αναλόγου της ομάδας των χλωρογενικών οξέων.

Ελάχιστα βιβλιογραφικά δεδομένα υπάρχουν σχετικά με την απομόνωση από φυτά άλλων χλωρογενικών αναλόγων όπου ο εστερικός δεσμός γίνεται με κάποιο άλλο στερεοϊσομερές του κινικού οξέος πέρα από το (-)-κινικό οξύ. Μάλιστα, στο συγκεκριμένο είδος αλλά και σε όλη την οικογένεια *Hypericum* δεν υπάρχει κάποια σχετική δημοσίευση. Εντούτοις, υπάρχουν σαφείς αποδείξεις για την ύπαρξη, σε φυτικό υλικό, «χλωρογενικών οξέων» που φέρουν ως οξύ το ( $\pm$ )-επι-κινικό οξύ.<sup>82,83</sup>

Μετά από εκτενή βιβλιογραφική αναζήτηση διαπιστώθηκε ότι ίσως ο εστερικός δεσμός με το καφεϊκό οξύ δεν γίνεται μόνο με το (-)-κινικό οξύ αλλά και με διαφορετικά στερεοϊσομερή του. Γενικά, τα συντακτικά ισομερή του κινικού οξέος έχουν μελετηθεί διεξοδικά και οι 3 κύριες δομές που έχουν επιβεβαιωθεί είναι αυτές του (-)-quinic acid, (-)-epi-quinic acid και (+)-quinic acid.



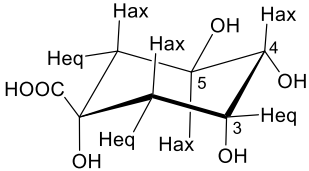
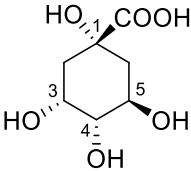
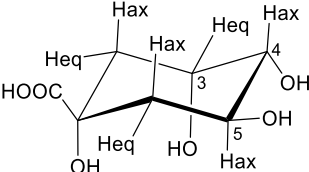
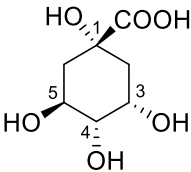
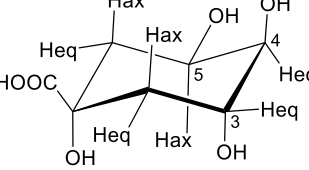
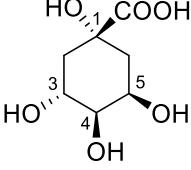
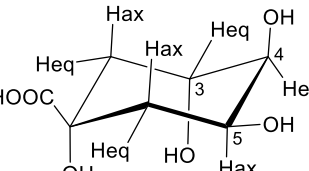
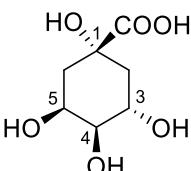
**Εικόνα 3.15.** Κύριες δομές συντακτικών ισομερών του κινικού οξέος σε μορφή ανάκλιντρου.

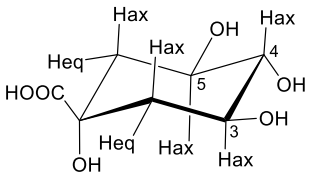
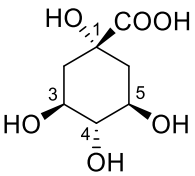
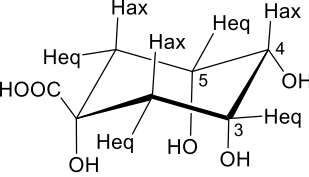
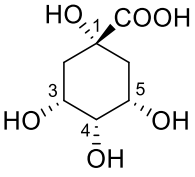
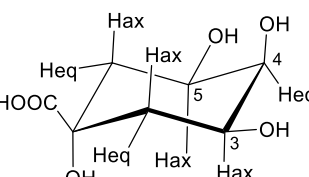
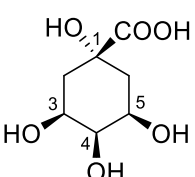
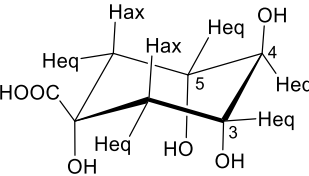
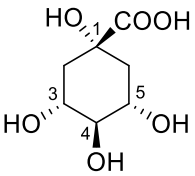
Ωστόσο, ο όρος «χλωρογενικά οξέα» περιλαμβάνει έναν μεγάλο αριθμό δομικά συγγενικών ενώσεων. Αυτές μπορούν να περιγραφούν καλύτερα ως ακυλο- παράγωγα των εναντιομερών και των διαστερομερών του κινικού οξέος. Ο όρος «κινικό οξύ» περιλαμβάνει δύο ζεύγη οπτικά ενεργών εναντιομερών [( $\pm$ )-quinic acid (1–2) and ( $\pm$ )-epi-quinic acid (3–4)] και τέσσερις διαστερομερείς, οπτικώς ανενεργές meso μορφές, [miso-

quinic (**5**), cis-quinic (**6**), neo-quinic (**7**) and scyllo-quinic (**8**)]. Κρίθηκε λοιπόν απαραίτητη η λεπτομερής ανάλυση (γωνιακή εξάρτηση στις σταθερές σύζευξης, πολλαπλότητες, χημική μετατόπιση, φάσματα 2D) του συστατικού προκειμένου να βρεθεί η στερεοδομή της μονάδας του κινικού οξέος και ο τρόπος σύνδεσης του με το καφεϊκό οξύ. (Πίνακας 3.5.).

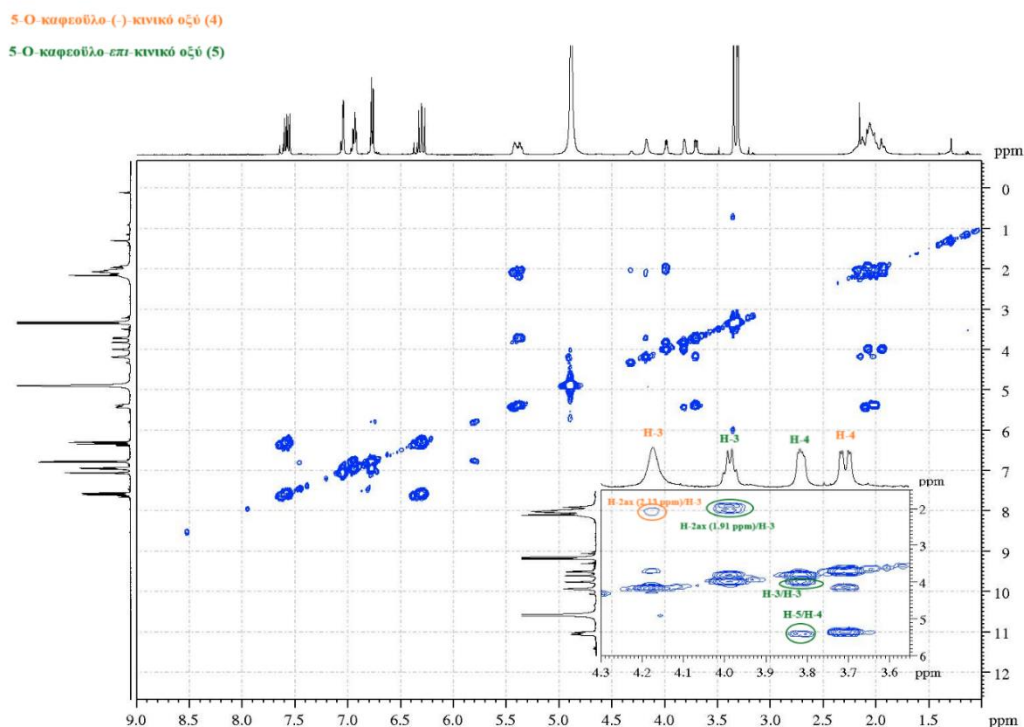


**Πίνακας 3.5.** Ονοματολογία για τη μονάδα του κινικού οξέος των ακυλο-κινικών οξέων, κοινώς γνωστά ως «χλωρογενικά οξέα».

ΙΣΟΜΕΡΗ	ΔΙΑΜΟΡΦΩΜΕΡΗ	2D ΔΟΜΕΣ
(1) 1L-(-)-quinic acid		
(2) 1D-(+)-quinic acid		
(3) 1L-(-)- <i>epi</i> -quinic acid		
(4) 1D-(+)- <i>epi</i> -quinic acid		

<p>(5) <i>Muco</i>-quinic acid</p>		
<p>(6) <i>Cis</i>-quinic acid</p>		
<p>(7) <i>Neo</i>-quinic acid</p>		
<p>(8) <i>Scyllo</i>-quinic acid</p>		

Η ανάλυση του τμήματος του καφεϊκού οξέος αναφέρθηκε στο πρώτο μέρος της ανάλυσης του μίγματος. Στο τμήμα του κινικού οξέος παρατηρήθηκαν παρόμοια μοτίβα κορυφών με αυτά της ένωσης 3-O-caffeoyl-quinic acid (6), με διακριτές όμως διαφορές τόσο στη χημική μετατόπιση όσο και στις σταθερές σύζευξης. Ο συντονισμός του αποπροστατευμένου οξυμεθυνικού πρωτονίου του κινικού οξέος στα  $\delta_{\text{H}}$  5.42 ppm υποδηλώνει την ακυλίωση της υδροξυλομάδας σε αυτή τη θέση. Η ακυλίωση αυτή επιβεβαιώνεται από τις συσχετίσεις HMBC όπου το  $\delta_{\text{H}}$  5.42 ppm δίνει σήμα με τον εστερικό άνθρακα του καρβονυλίου C-9'' στα  $\delta_{\text{C}}$  169.18 ppm. Το πρωτόνιο αυτό σχάζεται από τα γειτονικά μεθυλενικά πρωτόνια (παρέμενε η διευκρίνιση αν ήταν τα H-2 ή τα H-6) και ένα πρωτόνιο στα  $\delta_{\text{H}}$  3.81 ppm δίνοντας μία ddd (λόγω της αλληλοεπικάλυψης των κορυφών εμφανίζεται σαν μία br dd) με σταθερές σύζευξης 7.96 Hz, 4.58 Hz και 2.97 Hz. Το πρωτόνιο στα  $\delta_{\text{H}}$  3.81 ppm σχάζεται σε μία ξεκάθαρη διπλή της διπλής κορυφή (dd), με σταθερές σύζευξης 5.12 Hz και 2.97 Hz, ενώ η φασματοσκοπία ομοπυρηνικής σύζευξης (H,H) COSY αποκάλυψε μία ισχυρή σύζευξη μεταξύ αυτού του πρωτονίου και των πρωτονίων στα  $\delta_{\text{H}}$  5.42 ppm και  $\delta_{\text{H}}$  3.98 ppm. Οπότε, το μεθυνικό αυτό πρωτόνιο αντιστοιγήθηκε με τον C-4 ( $\delta_{\text{C}}$  73.11 ppm) μιας και είναι το μόνο πρωτόνιο το οποίο σχάζεται σε μία διπλή της διπλής αλλά και που δεν εμφανίζει ομοπυρηνική σύζευξη με τα μεθυλενικά H-2 ή H-6. Αυτή η υπόθεση επιβεβαιώθηκε περαιτέρω αφού παρατηρήθηκε ότι τα σήματα στα  $\delta_{\text{H}}$  5.42 ppm και  $\delta_{\text{H}}$  3.98 ppm εμφάνισαν, το καθένα, συζεύξεις αφενός μεν με δύο μεθυλενικά πρωτόνια αφετέρου δε με το H-4 (Εικόνα 3.16).



Εικόνα 3.16. Φάσμα COSY (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) των (4) και (5).

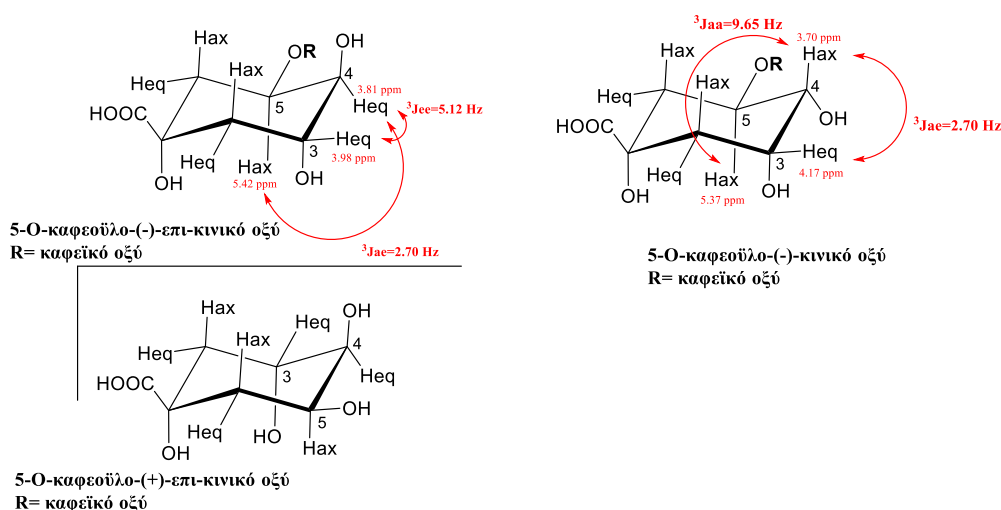
Η σταθερά σύζευξης  $^3J = 2.97$  Hz μεταξύ του H-4 ( $\delta_H$  3.81 ppm) και του αποπροστατευμένου πρωτονίου στα  $\delta_H$  5.42 ppm υποδεικνύει, με βάση την καμπύλη Karplus, μία αξονική-ισημερινή διαμόρφωση των αντίστοιχων πρωτονίων. Το πρωτόνιο στα  $\delta_H$  3.98 ppm εμφανίζεται σαν μία διπλή της τριπλής κορυφή (dt) με σταθερές σύζευξης 5.38 Hz και 5.12 Hz. Όπως αναφέρθηκε, το H-4 ( $\delta_H$  3.81 ppm) δίνει δεύτερη σταθερά σύζευξης  $^3J = 5.12$  Hz η οποία αντιστοιχεί στη σύζευξη με το πρωτόνιο στα  $\delta_H$  3.98 ppm. Επιλέον επιβεβαίωση της υπόθεσης αυτής έρχεται και από τα 2D φάσματα όπου τα δύο πρωτόνια αυτά έχουν ισχυρή συσχέτιση. Συμπερασματικά, μία τέτοια χαμηλή τιμή σταθερά σύζευξης ( $^3J = 5.12$ ) αναφέρεται σε μία αξονική-ισημερινή σχέση (Gauche) μεταξύ των δύο πρωτονίων. Όπως και στη προηγούμενη περίπτωση τα μεθυλениκά διαστεροτοπικά πρωτόνια (geminal), που εμφανίζονται στην περιοχή  $\delta_H$  1.91-2.13 ppm, αλληλεπικαλύπτονται λόγω της ύπαρξης γειτονικού στερεογονικού κέντρου που είναι ο C-1 ( $\delta_C$  76.2 ppm). Ωστόσο, το πρωτόνιο στα  $\delta_H$  1.91 σχάζεται σε μία σχετικά διακριτή διπλή της διπλής κορυφή (dd) με  $^2J = 14.00$  Hz και  $^3J = 5.38$  Hz η οποία στο φάσμα COSY δίνει έντονη σύζευξη μόνο με το πρωτόνιο στα  $\delta_H$  3.98 ppm. Η σταθερά σύζευξης της τάξεως των 14.00 Hz αντιστοιχεί σε σχέση μεταξύ δύο geminal πρωτονίων. Η σταθερά σύζευξης των

5.38 Hz είναι ενδεικτική μία αξονικής-ισημερινής διαμόρφωσης (Gauche). Επομένως, επιβεβαιώνεται η ισημερινή θέση του πρωτονίου στα  $\delta_{\text{H}}$  3.98 ppm και ταυτόχρονα συμπεραίνεται η αξονική θέση του μεθυλενικού πρωτονίου στα  $\delta_{\text{H}}$  1.91 ppm.

Με βάση όλα τα παραπάνω δεδομένα, προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

- I. Το αποπροστατευμένο πρωτόνιο στα  $\delta_{\text{H}}$  5.42 ppm βρίσκεται σε αξονική θέση.
- II. Το πρωτόνιο στα  $\delta_{\text{H}}$  3.81 ppm βρίσκεται σε ισημερινή θέση και αντιστοιχεί στον C-4 ( $\delta_{\text{C}}$  73.11 ppm).
- III. Το πρωτόνιο στα  $\delta_{\text{H}}$  3.98 ppm βρίσκεται σε ισημερινή θέση.

Σύμφωνα με την Εικόνα 3.17. και το συμπέρασμα (II), όλα τα στερεοϊσομερή όπου το η -OH στη θέση 4 βρίσκεται «προς τα κάτω» ή/και η -OH στη θέση 3 βρίσκονται «προς τα πάνω», δηλαδή οι δομές (1), (2), (5), (6) και (7) απορρίπτονται καθώς το H-4 και το H-3 θα ήταν και τα δύο σε αξονική θέση κάτι που δεν συμβαδίζει με τις τιμές των σταθερών σύζευξης. Η περίπτωση να είναι το (8) απορρίπτεται βάσει του συμπεράσματος (I) καθώς το H-5 θα ήταν σε ισημερινή θέση. Οπότε, το τμήμα του κινικού οξέος αντιστοιχεί είτε στο (+)-eri-quinic acid είτε στο (-)-eri-quinic acid. Μέσω των υπολογισμών που βασίζονται στην καμπύλη Karplus είναι δύσκολο να απαντηθεί με βεβαιότητα με ποιο από τα δύο εναντιομερή σχηματίζεται ο εστερικός δεσμός με το καφεϊκό οξύ. Συμπερασματικά, πρόκειται είτε για το **5-O-επι(-)-κινικό οξύ** είτε για το **5-O-επι(+)-κινικό οξύ (5)**.

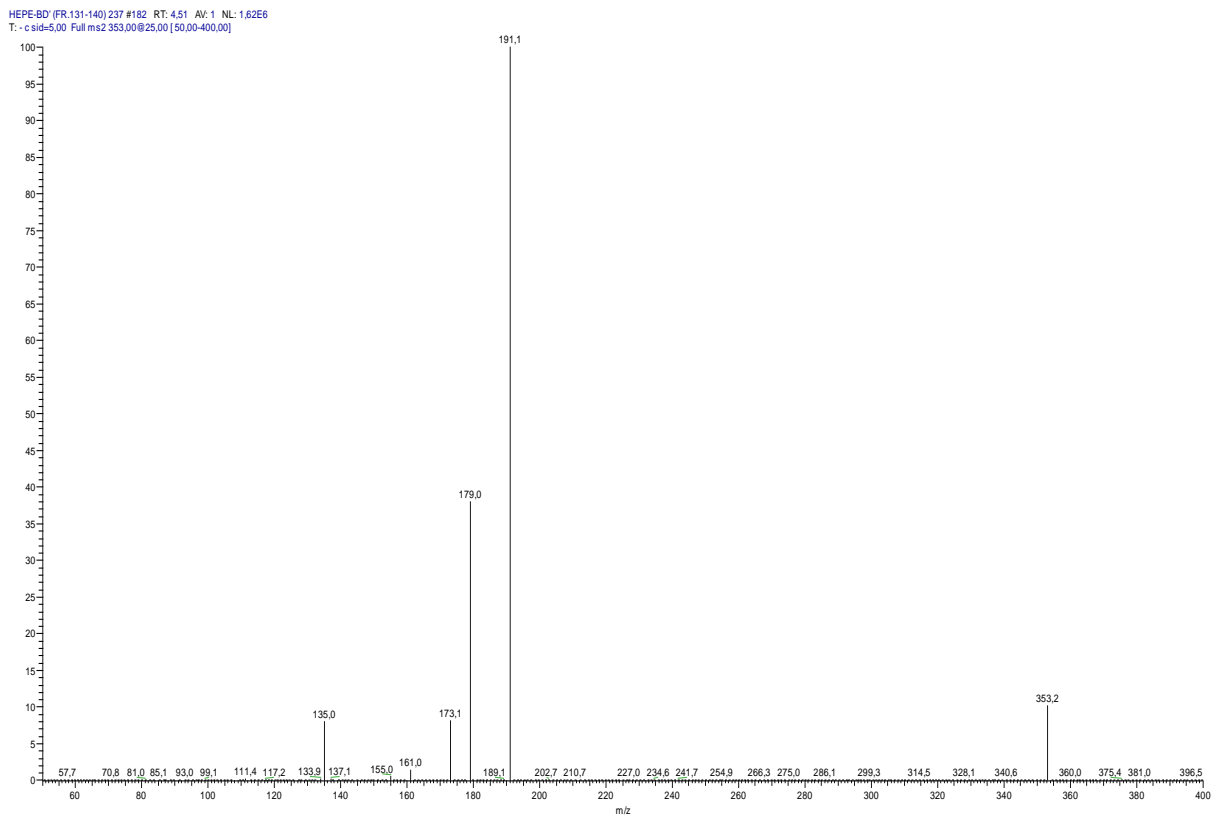
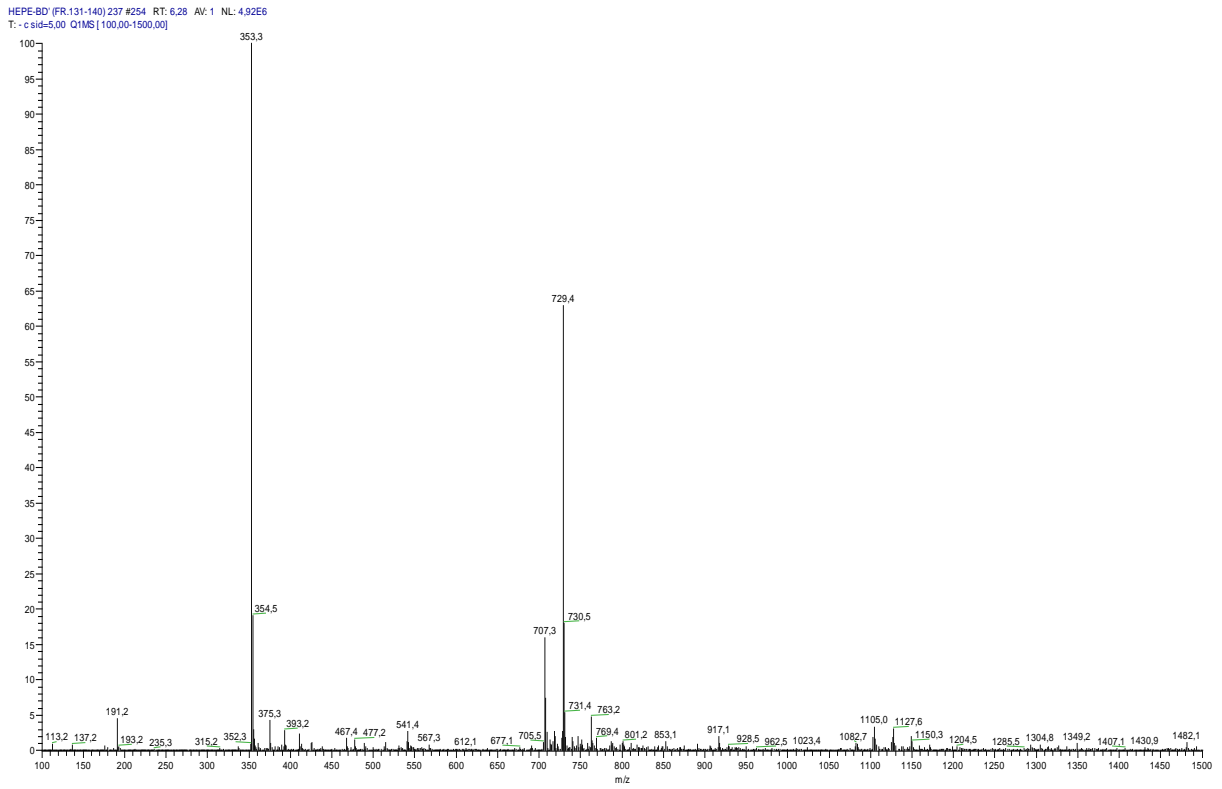


**Εικόνα 3.17.** Διαμορφώσεις ανάκλιντρον 5-O-καφεοϋλο(-)-κινικού οξέος (4), 5-O-καφεοϋλο-επι-(+)-κινικού και 5-O-καφεοϋλο-επι(-)-κινικού οξέος (5). Τα δύο εναντιομερή είναι συμμετρικά σε επίπεδο συμμετρίας που βρίσκεται μεταξύ τους.

5-O-καφεοϋλο(-)-κινικό οξύ							
#	<sup>13</sup> C	DEPT-135	HSQC	δ <sup>1</sup> H	Πολλαπλότητα, (J Hz)	COSY	HMBC
<b>Τμήμα Καφεϊκού οξέος</b>							
9'	168.81	C	-	-	-	-	H-7'/H-8'/H-5
4'	149.48	C	-	-	-	-	H-2'/H-6'/H-5'
7'	146.96	CH	H-7'	7.57	d, J=15.90 (1H)	H-8'	H-2'/H-6'/H-5'
3'	146.82	C	-	-	-	-	-
1'	127.99	C	-	-	-	-	H-7''/H-5'/H-8'
6'	122.97	CH	H-6'	6.93	dd, J <sub>1</sub> =7.90, J <sub>2</sub> =1.80 (1H)	H-5'	H-7'/H-2'/H-5'
5'	116.54	CH	H-5'	6.76	d, J=8.25 (1H)	H-2'/H-6'	-
8'	115.74	CH	H-8'	6.29	d, J=15.85 (1H)	H-7'	H-7'/H-6'/H-8'
2'	115.18	CH	H-2'	7.04	d, J=2.00 (1H)	H-5'	H-7'/H-6'/H-5'
<b>Τμήμα Κινικού οξέος</b>							
-COOH	182.18	C	-	-	-	-	-
1	76.20	C	-	-	-	-	H-2/H-6
2	38.62	CH <sub>2</sub>	H-2ax/H-2eq	2.13 1.99-2.09 (H-2eq)	dd, J <sub>1</sub> =13.82, J <sub>2</sub> =5.35 (1H) m	H-3/H-2eq	-
3	73.11	CH	H-3	4.17 (1H)	br s (1H)	H-4/H-2	H-4/H-2
4	74.80	CH	H-4	3.70 (1H)	dd, J <sub>1</sub> =9.65, J <sub>2</sub> =2.60 (1H)	H-5/H-3	H-3
5	72.39	CH	H-5	5.37 (1H)	ddd J <sub>1</sub> =9.65, J <sub>2</sub> =9.30, J <sub>3</sub> =5.30 (1H)	H-4/H-6	H-4/H-6
6	37.35	CH <sub>2</sub>	H-6ax/H-6eq	1.93-2.13 (2H)	dd, J <sub>1</sub> =14.00, J <sub>2</sub> =5.38 (1H) m	H-5	H-4

**Πίνακας 3.6.** Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR (500MHz, CD<sub>3</sub>OD) των (4) και (5).

5-O-καφεοϋλο-επι-(±)-κινικό οξύ							
#	<sup>13</sup> C	DEPT-135	HSQC	δ <sup>1</sup> H	Πολλαπλότητα, (J Hz)	COSY	HMBC
<b>Τμήμα Καφεϊκού οξέος</b>							
9'	169.18	C	-	-	-	-	H-7'/H-8'/H-5
4'	149.55	C	-	-	-	-	H-2'/H-6'/H-5'
7'	146.87	CH	H-7'	7.58	d, J=15.90 (1H)	H-8'	H-2'/H-6'/H-5'
3'	146.80	C	-	-	-	-	-
1'	127.86	CH	-	-	-	-	H-7' <sup>w</sup> /H-5'/H-8'
6'	122.95	CH	H-6'	6.94	dd, J <sub>1</sub> =7.90, J <sub>2</sub> =1.80 (1H)	H-5'	H-7'/H-2'/H-5'
5'	116.52	CH	H-5'	6.77	d, J=8.25 (1H)	H-2'/H-6'	-
8'	115.54	CH	H-8'	6.31	d, J=15.85 (1H)	H-7'	H-7'/H-6'/H-8'
2'	115.18	CH	H-2'	7.05	d, J=2.00 (1H)	H-5'	H-7'/H-6'/H-5'
<b>Τμήμα Κινικού οξέος</b>							
-COOH	182.23	C	-	-	-	-	-
1	76.20	C	-	-	-	-	H-2/H-6 / H-3
2	38.62	CH <sub>2</sub>	H-2ax/ H-2eq	1.91 (H-2ax) 1.99-2.09 (H-2eq)	dd, J <sub>1</sub> =14.00, J <sub>2</sub> =5.38 (1H) m	H-3/ H-2eq	-
3	70.20	CH	H-3	3.98 (1H)	dd, J <sub>1</sub> =5.38, J <sub>2</sub> =5.12 (1H)	H-4/ H-2	H-4
4	73.11	CH	H-4	3.81 (1H)	dd, J <sub>1</sub> =5.12, J <sub>2</sub> =2.97 (1H)	H-5/ H-3	H-3
5	72.39	CH	H-5	5.42 (1H)	ddd J <sub>1</sub> =7.96, J <sub>2</sub> =4.58, J <sub>2</sub> =2.97 (1H)	H-4/ H-6	H-3/ H-4/ H-6
6	40.45	CH <sub>2</sub>	H-6ax/ H-6eq	1.99-2.14 (2H)	m	H-5	H-4



Εικόνα 3.18. Φάσμα μάζας MS<sup>1</sup> (πάνω) και MS<sup>2</sup> (κάτω) αρνητικού ιονισμού από ESI-MS για τις ενώσεις (4) και (5).

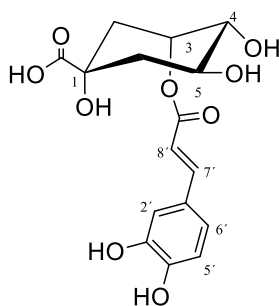


Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε ανάλυση με ESI-MS σε αρνητικό ιονισμό αρχικά με full scan από  $m/z$  100-1500 όπου προέκυψε το μοριακό ιόν  $m/z = 707.3$  (αντιστοιχεί στο διπλάσιο του MW) και έπειτα με επιπλέον θραυσματοποίηση της συγκεκριμένης κορυφής (MS/MS) προέκυψαν τα θραύσματα  $m/z$ : 353.2, 191.1, 179.0, 173.1 και 135.0. Η θραυσματοποίηση είναι ίδια με αυτή της ένωσης (6), (Εικόνα 3.22., Σελίδα 93).

### 3.1.4. Δευτερογενής μεταβολίτης: 3-O-καφεοϋλο-(+)-κινικό οξύ (6)

Το 3-O-καφεοϋλο-(+)-κινικό οξύ (6) είναι ο εστέρας του καφεϊκού και του κινικού οξέος και απομονώνεται από τα πολικά εκχυλίσματα των φυτών. Στο *Hypericum empetrifolium* απομονώθηκε από την περαιτέρω εκχύλιση του μεθανολικού εκχυλίσματος των ανθέων και των φύλλων με n-BuOH.

Ανήκει στην κατηγορία των φαινολικών οξέων και αποτελείται από δύο τμήματα. Αυτό του (+)-κινικού και αυτό του καφεϊκού οξέος, το οποίο συνδέεται στην θέση 3 με το κινικό. Στο φάσμα της ένωσης παρατηρούνται δύο τύποι σημάτων πρωτονίων, ένας για τα αρωματικά/ολεφινικά του καφεϊκού οξέος και ένας για τα πρωτόνια του κινικού.



3-O-καφεοϋλο-(+)-κινικό οξύ  
(6)

Αρχικά από τα φάσματα  $^{13}\text{C}$  και  $^1\text{H}$  NMR επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη 16 ατόμων άνθρακα από τους οποίους οι δύο είναι καρβονυλικοί σε  $\delta_{\text{C}}$  179.8 ppm για τον -COOH και  $\delta_{\text{C}}$  168.9 ppm για τον C-9'. Επιβεβαιώθηκε επίσης η ύπαρξη τριών αρωματικών πρωτονίων, δύο trans ολεφινικών πρωτονίων και 7 πρωτονίων του τύπου H-C-OR. Μέσω του φάσματος HSQC έγινε η αντιστοίχιση του κάθε άνθρακα με το (τα) πρωτόνιο(α) του.

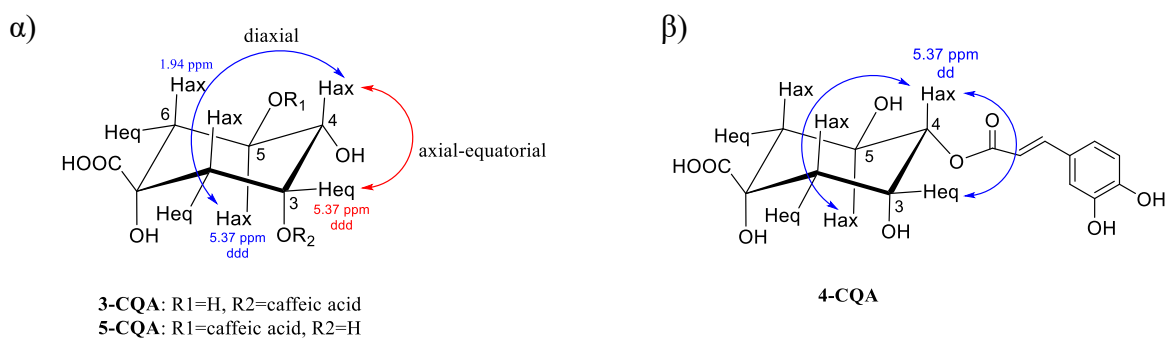
Όσον αφορά το τμήμα του καφεϊκού οξέος, από το φάσμα  $^1\text{H}$  NMR φαίνεται η χαρακτηριστική σχάση των trans ολεφινικών H-7' (7.58 ppm) και H-8' (6.31 ppm) τα οποία δίνουν μια διπλή (d) το καθένα με σταθερά σύζευξης  $^3J_{\text{H}7'\text{H}8'} = 15.88$  Hz. Τα τρία αρωματικά πρωτόνια H-2' ( $\delta_{\text{H}}$  7.05 ppm), H-5' ( $\delta_{\text{H}}$  6.77 ppm), H-6' ( $\delta_{\text{H}}$  6.94 ppm) εμφανίζουν πολλαπλότητες αντίστοιχες με αυτές ενός συστήματος ABX. Η αλληλεπίδραση τους επιβεβαιώνεται και από το φάσμα COSY. Το H-6' ( $\delta_{\text{H}}$  6.94 ppm) εμφανίζεται ως μια διπλή της διπλής (dd) καθώς σχάζεται, λόγω του W-coupling, από τα H-2', H-5' με  $^4J_{\text{H}2'-\text{H}6'(\text{meta})} = 2.10$  Hz και  $^3J_{\text{H}5'-\text{H}6'(\text{ortho})} = 8.28$  Hz. Τα H-2' ( $\delta_{\text{H}}$  7.05 ppm) και H-5' ( $\delta_{\text{H}}$  6.77 ppm) εμφανίζονται ως μία διπλή (d) το καθένα λόγω της σχάσης του από το H-6'.

Για το τμήμα του κινικού οξέος, η ανάθεση των H-3, H-4 και H-5 και κατά συνέπεια ο τρόπος σύνδεσης του καφεϊκού οξέος με το κινικό οξύ έγινε πρωτίστως με βάση την πολλαπλότητα και έπειτα με βάση την γωνιακή εξάρτηση της σταθεράς σύζευξης (εξίσωση Karplus). Αρχικά, μέσω του φάσματος HMBC επιβεβαιώνεται η σύνδεση του καφεϊκού οξέος με το κινικό καθώς ο C-9' ( $\delta_c$  168.9 ppm) αλληλεπιδρά με το πρωτόνιο στα  $\delta_H$  5.37 ppm (Βλέπε Παράρτημα, Εικόνα 3.47).

Γνωρίζοντας ότι το πρωτόνιο που είναι συνδεδεμένο με το τμήμα του καφεϊκού οξέος εμφανίζει αυξημένη αποπροστασία στα  $\delta_H$  5.37 ppm και δίνει μία br dd στο φάσμα που πιθανόν λόγω της αλληλοεπικάλυψης των κορυφών να αντιστοιχεί σε μια ddd, έγιναν οι παρακάτω υποθέσεις όσον αφορά την γωνιακή εξάρτηση:

- α) Το καφεϊκό να συνδέεται στη θέση 3 του κινικού.
- β) Το καφεϊκό να συνδέεται στη θέση 4 του κινικού.
- γ) Το καφεϊκό να συνδέεται στη θέση 5 του κινικού.

Οι διαμορφώσεις των μορίων για κάθε περίπτωση θα είναι οι παρακάτω:

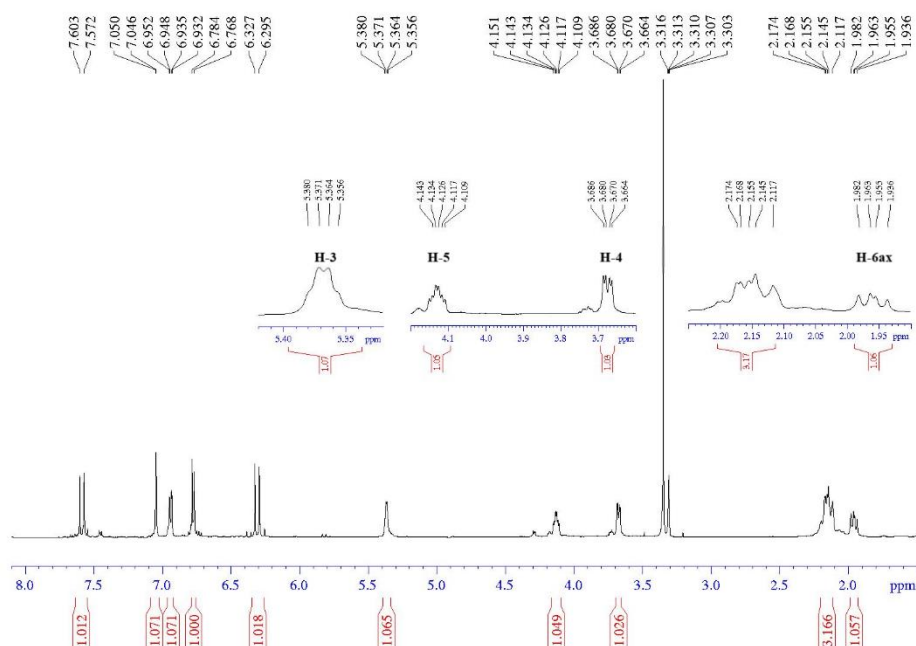


**Εικόνα 3.19.** Διαμορφώσεις του 3- ή 4- ή 5-O-καφεοϋλο(-)-κινικού οξέος.

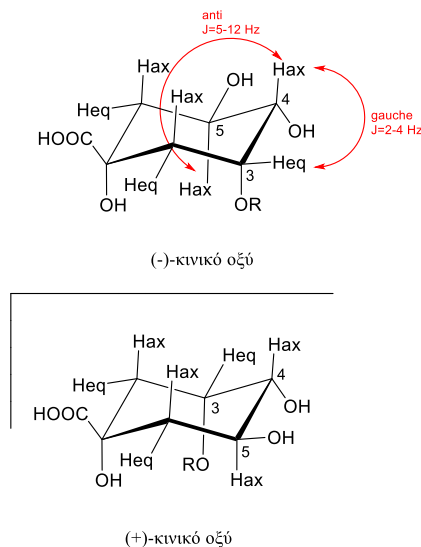
Επιπλέον, γνωρίζοντας ότι το κινικό οξύ αποτελείται από 8 στερεοϊσομερή (βλέπε ανάλυση 3.1.3.), πέρα από τη θέση σύνδεσης του καφεϊκού στο κινικό εξετάστηκαν και όλες οι διαμορφώσεις που μπορεί να υιοθετήσει το κινικό οξύ.

Η υπόθεση β) απορρίφθηκε εξ αρχής καθώς η σχέση για το  $\delta_H$  5.37 ppm θα έπρεπε να είναι μια ξεκάθαρη διπλή της διπλής (dd), κάτι το οποίο δεν ισχύει. Επιπλέον, οι πειραματικές μας τιμές δεν βρίσκονταν σε συμφωνία με αυτές της βιβλιογραφίας. Ωστόσο,

η αντιστοίχιση του H-4 στα  $\delta_H$  3.70 ppm ήταν σχετικά απλή καθώς είναι το μόνο πρωτόνιο που δίνει μια dd κορυφή αλλά και στο φάσμα COSY αλληλεπιδρά μόνο με τα πρωτόνια στα  $\delta_H$  5.37 ppm και  $\delta_H$  4.10 ppm. Οπότε, σύμφωνα με τις σταθερές σύζευξης του H-4 προέκυψαν κάποια συμπεράσματα σχετικά με τη θέση του πρωτονίου αλλά και των γειτονικών του. Το H-4, όπως προαναφέρθηκε, σχάζεται σε μία dd με  $^3J_1=8.06$  Hz,  $^3J_2=3.14$  Hz και ταυτόχρονα το πρωτόνιο στα  $\delta_H$  5.37 ppm σε μία dt με  $^3J_1=3.75$  Hz,  $^3J_2=3.14$  Hz. Έχοντας λοιπόν το H-4 μια αυξημένη τιμή σταθεράς σύζευξης, χαρακτηριστική της αντίθεσης των δύο αξονικών πρωτονίων, σημαίνει ότι βρίσκεται αναγκαστικά σε αξονική θέση. Αντιθέτως, για το πρωτόνιο  $\delta_H$  5.37 ppm παρατηρούνται σχετικά χαμηλές τιμές σταθεράς σύζευξης, οι οποίες είναι χαρακτηριστικές της gauche θέσης ενός αξονικού ως προς ένα ισημερινό πρωτόνιο. Έτσι, πρόκειται για πρωτόνιο που είναι σε ισημερινή θέση. Κατά συνέπεια, το πρωτόνιο  $\delta_H$  4.10 ppm πρέπει να βρίσκεται σε αξονική θέση, κάτι που επιβεβαιώνεται από τις σταθερές σύζευξης του (ddd,  $^3J_1=9.57$  Hz,  $^3J_2=7.90$  Hz  $^3J_3=4.10$  Hz). Με βάση τα παραπάνω και τον Πίνακα 3.5. (Βλέπε ανάλυση 3.1.3.) όπου φαίνονται όλα τα στερεοϊσομερή του κινικού οξέος, η διαμόρφωση του κινικού μπορεί να είναι είτε αυτή του (-)-κινικού οξέος είτε του (+)-κινικού οξέος.



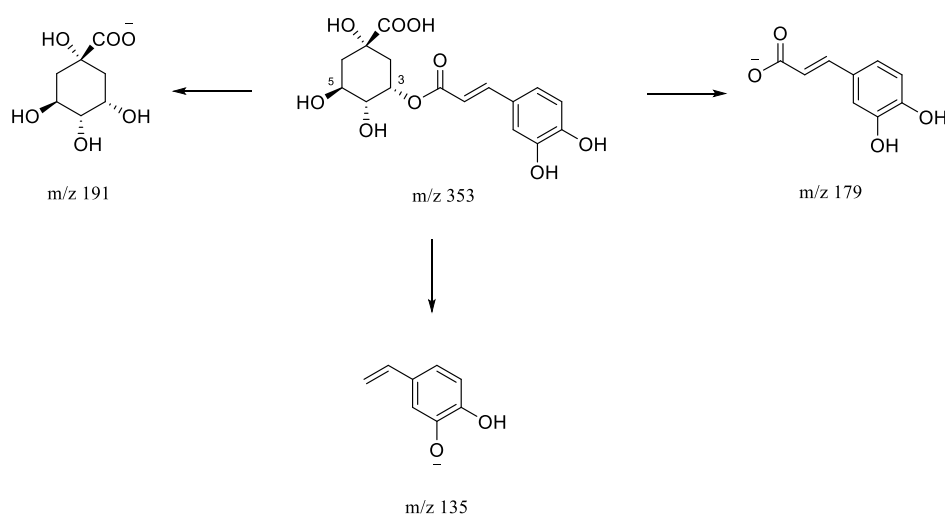
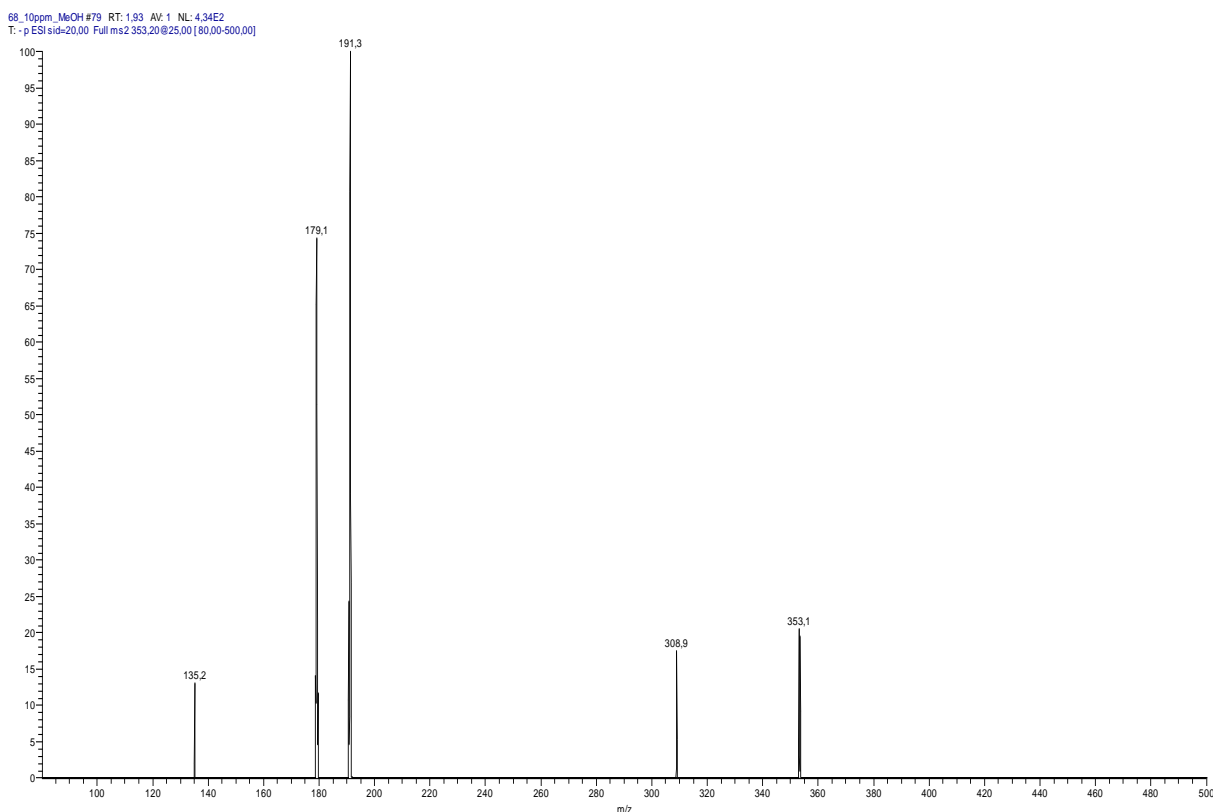
Εικόνα 3.20. Φάσμα  $^1H$  (500 MHz,  $CD_3OD$ ) 3-O-καφεοϋλο-(+)-κινικού οξέος (6).



**Εικόνα 3.21.** Διαμορφώσεις των δύο εναντιομερών κινικού οξέος σε μορφή ανάκλιντρου.

Τέλος, εξετάστηκαν και τα τέσσερα μεθυλενικά πρωτόνια, δύο H-2 και δύο H-6, τα οποία διαφοροποιούνται μεταξύ τους ως διαστερεοτοπικά (geminal, diastereotopic) κυρίως λόγω της ύπαρξης γειτονικού στερεογονικού κέντρου που είναι ο C-1 ( $\delta_C$  75.5 ppm). Στην περιοχή  $\delta_H$  2.07-2.16 ppm εμφανίζονται τρία πρωτόνια των οποίων οι κορυφές αλληλεπικαλύπτονται και αντιστοιχούν στα H-2ax, H-2eq, H-6eq. Το  $\delta_H$  1.94 ppm διαφοροποιείται για λόγους μαγνητικής ανισοτροπίας (βρίσκεται στον κώνο προστασίας) και εμφανίζεται ως μια διπλή της διπλής (dd). Οι σταθερές σύζευξης για το πρωτόνιο αυτό είναι  $^2J_{H6axH6eq} = 13.82$  Hz και  $^2J_{H5H6ax} = 9.57$  Hz. Μέσω του φάσματος COSY φάνηκε η αλληλεπίδραση του με το H-5 ( $\delta_H$  4.10 ppm) και H-6eq ( $\delta_H$  2.07-2.16 ppm). Αντίστοιχα, επισημάνθηκε η αλληλεπίδραση του H-3 ( $\delta_H$  5.37 ppm) με τα H-2ax, H-2eq (2.07-2.16ppm) και H-4 ( $\delta_H$  3.70 ppm). Έπειτα από μέτρηση της οπτικής στροφής της ένωσης παρατηρήθηκε μία τιμή  $[\alpha]_{589}^{27.8} = +66.1$  (c 0.11 σε MeOH). Ωστόσο, ήταν αδύνατο να διεξαχθεί κάποιο συμπέρασμα σχετικά με το ποιο από τα δύο εναντιομερή του κινικού οξέος αποτελείται η ένωση καθώς μια θετική τιμή οπτικής στροφής δεν σημαίνει απαραίτητα ότι πρόκειται για το (+)-κινικό οξύ. Έπειτα από εκτεταμένη βιβλιογραφική αναζήτηση βρέθηκε μόνο μία αναφορά για την οπτική στροφή του 3-O-καφεοϋλο-(-)-κινικού οξέος  $[\alpha]_D^{21} = +1.8''$  (c 0.6 σε MeOH).<sup>84</sup> Επομένως η δομή που προτάθηκε είναι η εναπομένουσα, δηλαδή αυτή του **3-O-καφεοϋλο-(+)-κινικού οξέος**.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε ανάλυση με ESI-MS σε αρνητικό ιοντισμό αρχικά με full scan από  $m/z$  50-400 όπου προέκυψε το μοριακό ιόν  $m/z = 353.2$  και έπειτα με επιπλέον θραυσματοποίηση της συγκεκριμένης κορυφής (MS/MS) προέκυψαν τα θραύσματα  $m/z$ : 191.1, 179.0, και 135.0. Στην Εικόνα 3.22. παρατίθεται η θραυσματοποίηση του 3-O-καφεοϋλο-(+)-κινικού οξέος (6).



**Εικόνα 3.22.** Φάσμα μάζας  $MS^1$  (πάνω) αρνητικού ιοντισμού από LC-MS και μηχανισμός θραυσματοποίησης ένωσης (6).

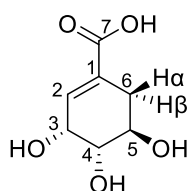
#	<sup>13</sup> C	DEPT-135	HSQC	δ <sup>1</sup> H	Πολλαπλότητα, (J Hz)	COSY	HMBC
<b>Τμήμα Καφεϊκού οξέος</b>							
9'	168.9	C	-	-	-	-	H-7'/H-8'/H-3
4'	149.4	C	-	-	-	-	H-2'/H-6'/H-5'
7'	146.8	CH	H-7'	7.58 (1H)	d, <i>J</i> <sub>1</sub> =15.88	H-8'	H-2'/H-6'/H-5'
3'	146.7	C	-	-	-	-	H-2'/H-6'/H-5'
1'	127.9	CH	-	-	-	-	H-7' <sup>w</sup> /H-5'/H-8'
6'	122.9	CH	H-6'	6.94 (1H)	dd, <i>J</i> <sub>1</sub> =8.28, <i>J</i> <sub>2</sub> =2.10	H-5'	H-7'/H-2'/H-5'
5'	116.4	CH	H-5'	6.77 (1H)	d, <i>J</i> =8.14	H-6'	H-6'
8'	115.8	CH	H-8'	6.31 (1H)	d, <i>J</i> =15.88	H-7'	-
2'	115.1	CH	H-2'	7.05 (1H)	d, <i>J</i> =2.04	-	H-7'/H-6'/H-5'
<b>Τμήμα Κινικού οξέος</b>							
-COOH	179.8	-	-	-	-	-	H-2/H-6
1	75.6	C	-	-	-	-	H-2/H-6eq/H-6ax
2	36.9	CH <sub>2</sub>	H-2ax/ H-2eq	2.07-2.16 (2H)	m	H-3	H-3, H-6ax
3	72.80	CH	H-3	5.37 (1H)	dt, <i>J</i> <sub>1</sub> =3.75, <i>J</i> <sub>2</sub> =3.14	H-4/ H-2	H-5/H-2/H-6ax
4	74.20	CH	H-4	3.70 (1H)	dd, <i>J</i> <sub>1</sub> =8.06, <i>J</i> <sub>2</sub> =3.14	H-5/ H-3	H-5/H-6ax
5	72.39	CH	H-5	4.10 (1H)	ddd <i>J</i> <sub>1</sub> =9.57, <i>J</i> <sub>2</sub> =7.90, <i>J</i> <sub>3</sub> =4.10	H-3/H-4/ H-6	H-4/ H-6
6	40.60	CH <sub>2</sub>	H-6ax H-6eq	1.94 2.07-2.16	dd, <i>J</i> <sub>1</sub> =13.82, <i>J</i> <sub>2</sub> =8.32 m	H-5/H-4	H-2/H-6eq/ax

**Πίνακας 3.7.** Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR (500MHz, CD<sub>3</sub>OD) του 3-Ο-καφεοϋλο-(+)-κινικού οξέος (6).

### 3.1.5. Δευτερογενής μεταβολίτης: Σικιμικό οξύ (7)

Το σικιμικό οξύ (7) απομονώνεται από τα πολικά εκχυλίσματα των φυτών. Στο *Hypericum empetrifolium* απομονώθηκε από την περαιτέρω εκχύλιση του μεθανολικού εκχυλίσματος των ανθέων και των φύλλων με n-BuOH.

Απαντάται συχνά στην ανιονική του μορφή και αποτελεί ένα σημαντικό βιοχημικό ενδιάμεσο των φυτών και των μικροοργανισμών. Πιο συγκεκριμένα, είναι το πρόδρομο μόριο για την βιοσύνθεση αρωματικών αμινοξέων όπως η φαινυλαλανίνη, η τυροσίνη και η τρυπτοφάνη, πολλών αλκαλοειδών και αρωματικών μεταβολιτών. Ωστόσο, παρόλο που είναι ένα ενδιάμεσο που υπάρχει στους περισσότερους αυτότροφους οργανισμούς γενικά βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις σε αυτά.



Σικιμικό οξύ  
(7)

Το σικιμικό οξύ είναι ένα καρβοξυλιωμένο κυκλοεξένιο το οποίο είναι υποκατεστημένο με υδροξυλομάδες στις θέσεις 3,4 και 5. Υπάρχουν πολλά ισομερή της ένωσης αυτής, ωστόσο, το στερεοϊσομερές που παρουσιάζει βιολογική δραστηριότητα είναι το 3R,4S,5R.

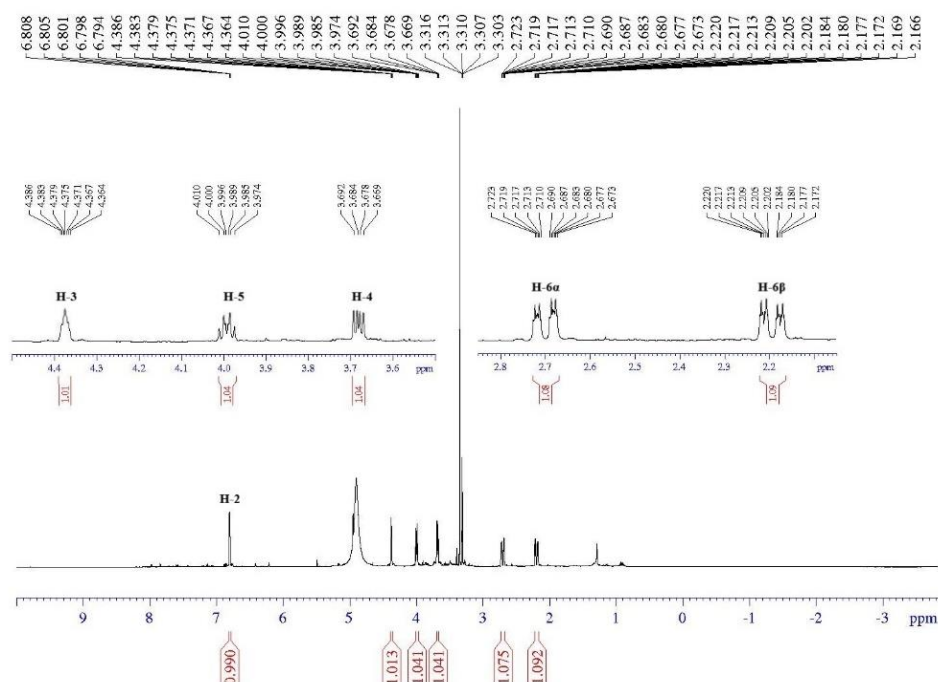
Η δομή του μορίου ταυτοποιήθηκε ύστερα από εκτεταμένη φασματοσκοπική ανάλυση με μονοδιάστατα (1D) και δισδιάστατα (2D) πειράματα NMR και κατόπιν επιβεβαιώθηκε με την λήψη φάσματος υγρής χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μάζας υψηλής ανάλυσης (ESI-MS).

Αρχικά, από τα φάσματα <sup>13</sup>C, <sup>1</sup>H επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη 7 ανθράκων και 6 πρωτονίων. Μέσω του φάσματος HSQC έγινε η αντιστοίχιση του κάθε άνθρακα με το πρωτόνιό του. Η ανάθεση των σημάτων του <sup>13</sup>C έγινε και με βάση το φάσμα DEPT-135, το οποίο δείχνει την ύπαρξη ενός μεθυλενικού, τεσσάρων μεθυλικών και δύο τεταρτοταγών ανθράκων (βλέπε Παράρτημα). Εκτός από τον καρβοξυλικό άνθρακα C-7 (δ<sub>C</sub> 170.2 ppm), ο οποίος εμφανίζεται σε χαμηλά πεδία, ο C-2 (δ<sub>C</sub> 138.9 ppm) είναι σε θέση β ως προς το καρβοξύλιο κάτι που δικαιολογεί το γεγονός ότι εμφανίζεται σε ακόμα



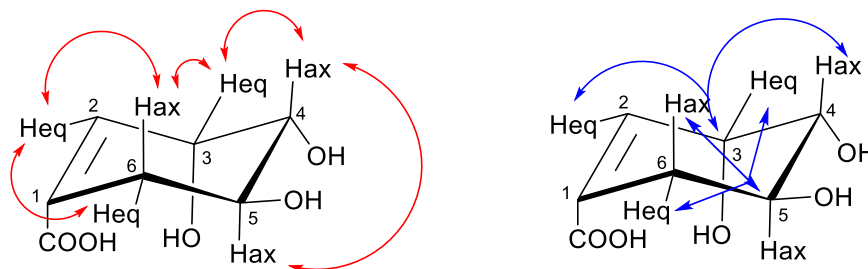
χαμηλότερο πεδίο απ' ότι εμφανίζεται ο τεταρτοταγής C-1 ( $\delta_C$  130.9 ppm). Τέλος, ο μεθυλενικός C-6 εμφανίζεται σε αρκετά υψηλά πεδία ( $\delta_C$  31.8 ppm).

Από το φάσμα  $^1\text{H}$  ήταν ορατό το σήμα του ολεφινικού H-2 ( $\delta_H$  6.80 ppm) όπου εμφανίζεται ως μια διπλής της διπλής της διπλής (ddd), η οποία λόγω της αλληλεπικάλυψης των κορυφών φαίνεται στο φάσμα ως μία διπλή της τριπλής κορυφή (dt). Η πολλαπλότητα αυτή προκύπτει από την σχάση του από το γειτονικό H-3 ( $\delta_H$  4.37 ppm) καθώς και από την αλληλική σχάση από τα διαστεροτοπικά H-6 $_\alpha$  ( $\delta_H$  2.71 ppm) και H-6 $_\beta$  ( $\delta_H$  2.21 ppm), με σταθερές σύζευξης  $^3J_{\text{H2-H3}}=3.56$  Hz και  $^4J_{\text{H2-H6}}=1.88$  Hz. Η αλληλεπίδραση αυτή επιβεβαιώνεται από τα φάσματα COSY και HMBC (Εικόνα 3.24), όπου ο ολεφινικός C-2 ( $\delta_C$  138.9 ppm) δίνει έντονο σήμα με τα H-6 $_\alpha$  και H-6 $_\beta$ . Το H-4 ( $\delta_H$  3.68 ppm) λόγω της σχάσης του από τα γειτονικά H-3, H-5 εμφανίζεται ως μια διπλής της διπλής (dd) με  $^3J_{\text{H3-H4}}=4.30$  Hz και  $^3J_{\text{H3-H5}}=7.40$  Hz. Αντίστοιχα, το H-5 ( $\delta_H$  3.99 ppm) εμφανίζεται ως μία διπλή της διπλής της διπλής (ddd), αφού σχάζεται από τα H-6 $_\alpha$  H-6 $_\beta$  και H-4, η οποία λόγω της αλληλεπικάλυψης των κορυφών φαίνεται στο φάσμα ως μία dt με  $^3J_{\text{H4-H5}}=7.40$  Hz και  $^3J_{\text{H5-H6}\alpha/\beta}=5.38$  Hz. Το αλληλικό H-3 ( $\delta_H$  4.37 ppm) σχάζεται από τα γειτονικά H-2, H-4 καθώς και από τα H-6, κάτι που επιβεβαιώνεται και από τα φάσματα COSY, HMBC. Παράλληλα, από το COSY και HMBC φαίνεται η αλληλεπίδραση των διαστεροτοπικών H-6 $_\alpha$  (2.71 ppm) και H-6 $_\beta$  (2.21 ppm) αφενός μεταξύ τους (geminal) και αφ' ετέρου με τα H-2 και H-5. Για το λόγο αυτό, κάθε διαστεροτοπικό πρωτόνιο σχάζεται σε μία διπλή της διπλής της τριπλής (ddt) με  $^2J_{\text{H6}\alpha\text{-H6}\beta}=18.13$  Hz,  $^3J_{\text{H5-H6}\alpha/\beta}=5.38$  Hz και  $^3J_{\text{H2-H6}\alpha/\beta}=1.88$  Hz.



Εικόνα 3.23. Φάσμα  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) Σικιμικού οξέος (7).

Η στερεοχημεία του μορίου όπως και με τις προηγούμενες ενώσεις ταυτοποιήθηκε σύμφωνα με τις σταθερές σύζευξης και την καμπύλη του Karplus.



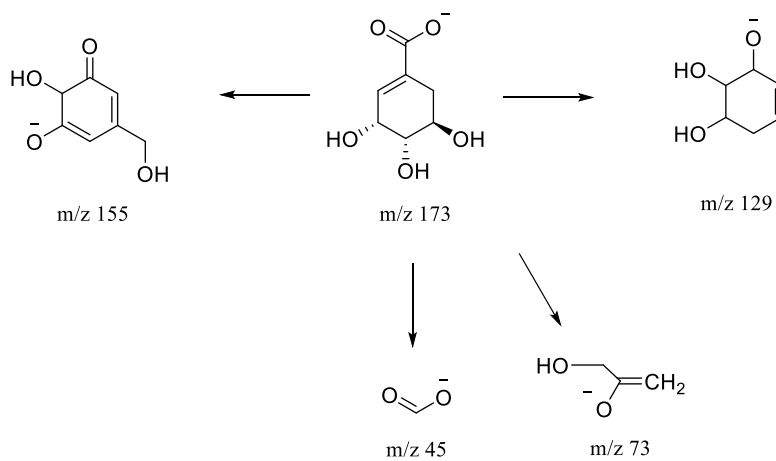
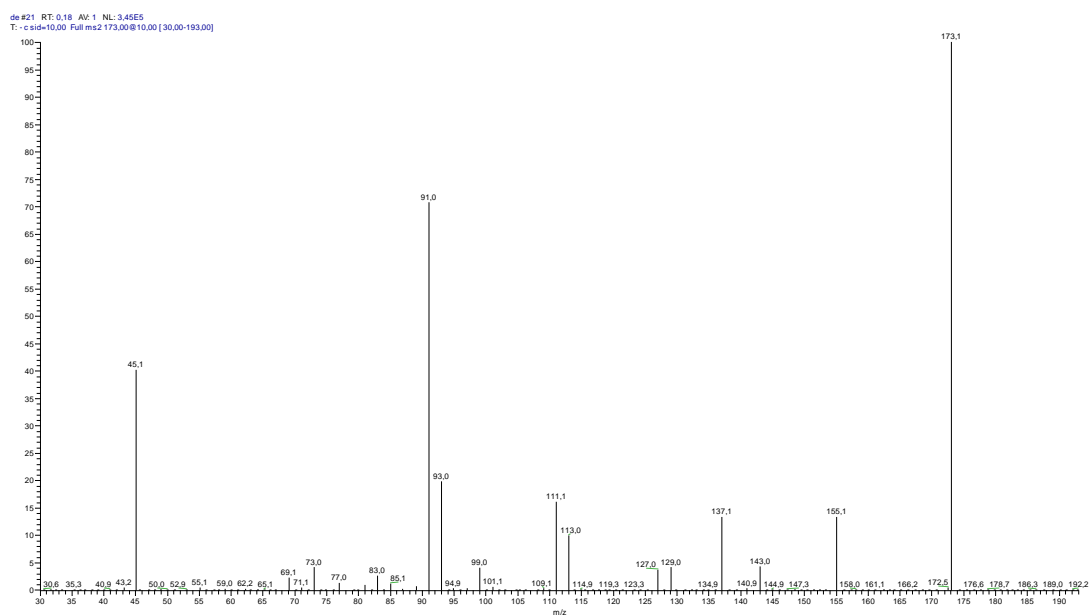
**Εικόνα 3.25.** Κυριότερες αλληλεπιδράσεις  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  που παρατηρούνται μέσω COSY (κόκκινο) και  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  μέσω HMBC (μπλε).

Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR της ένωσης συνοψίζονται στον Πίνακα 3.8. και η πιστότητα τους επιβεβαιώνεται από τα αντίστοιχα βιβλιογραφικά.<sup>85</sup>

**Πίνακας 3.8.** Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR (500MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) του Σικιμικού οξέος (7).

#	$^{13}\text{C}$	DEPT-135	HSQC	$\delta$ $^1\text{H}$	Πολλαπλότητα, (J Hz)	COSY	HMBC
1	130.9	C	-	-	-	-	H-2/H-3/H-5/ H-6 $_{\alpha}$ /H-6 $_{\beta}$
2	138.9	CH	H-2	6.80	dt, $J_1=3.56$ , $J_2=1.88$	H-3/H-6 $_{\alpha}$ / H-6 $_{\beta}$	H-3/H-4/ H-6 $_{\alpha}$ /H-6 $_{\beta}$
3	67.5	CH	H-3	4.37	(m) ddd, $J_1=5.59$ , $J_2=3.56$ , $J_3=1.88$	H-2/H-4, H-6 $_{\alpha}$ /H-6 $_{\beta}$	H-4/H-5
4	72.9	CH	H-4	3.68	dd, $J_1=7.40$ , $J_2=4.30$	H-3/H-5	H-2/H-5/ H-6 $_{\alpha}$ /H-6 $_{\beta}$
5	68.5	CH	H-5	3.99	(m) dt, $J_1=7.40$ , $J_2=5.38$	H-4/H-6 $_{\alpha}$ / H-6 $_{\beta}$	H-3/H-4/ H-6 $_{\alpha}$ /H-6 $_{\beta}$
6	31.8	CH <sub>2</sub>	H-6 $_{\alpha}$	2.71	ddt, $J_1=18.13$ , $J_2=5.38$ , $J_3=1.88$	H-2/H-3/H-5/ H-6 $_{\beta}$	H-2/H-4/ H-6 $_{\alpha}$ /H-6 $_{\beta}$
			H-6 $_{\beta}$	2.21	ddt, $J_1=18.13$ , $J_2=5.38$ , $J_3=1.88$	H-2/H-3/ H-5/H-6 $_{\alpha}$	
-COOH	170.2	C	-	-	-	-	H-2/H-6 $_{\alpha}$ /H-6 $_{\beta}$

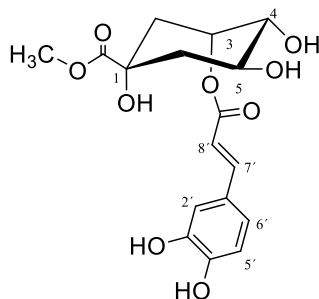
Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε ανάλυση με ESI-MS σε αρνητικό ιοντισμό αρχικά με full scan από  $m/z$  110-1000 όπου προέκυψε το μοριακό ιόν  $m/z = 173$  και έπειτα με επιπλέον θραυσματοποίηση της συγκεκριμένης κορυφής (MS/MS) προέκυψαν τα θραύσματα  $m/z$ : 155.1, 129.0, 111.1, 91.0 και 45.1. Στην Εικόνα 3.26. παρατίθεται η θραυσματοποίηση του σικιμικού οξέος.



**Εικόνα 3.26.** Φάσμα μάζας  $MS^2$  (πάνω) αρνητικού ιοντισμού από LC-MS και μηχανισμός θραυσματοποίησης ένωσης (7).

### 3.1.6. Δευτερογενής μεταβολίτης: Μεθυλεστέρας του 3-O-καφεοϋλο-(+)-κινικού οξέος (8)

Στο *Hypericum empetrifolium* απομονώθηκε από την περαιτέρω εκχύλιση του μεθανολικού εκχυλίσματος των ανθέων και των φύλλων με n-BuOH.



Μεθυλεστέρας 3-O-καφεοϋλο-κινικού οξέος  
(8)

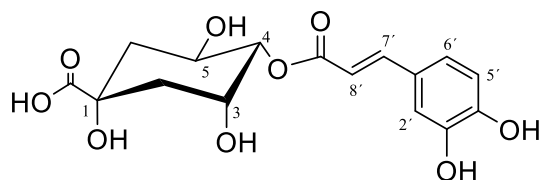
Από τα φάσματα  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$  επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη 17 ανθράκων και 15 πρωτονίων. Η ανάλυση της μονάδας του καφεϊκού οξέος είναι όμοια με τα «χλωρογενικά οξέα» που αναλύθηκαν παραπάνω. Η διαφορά υπάρχει στη μονάδα του κινικού οξέος όπου εμφανίζεται μία επιπλέον απλή (s) κορυφή στην περιοχή  $\delta_{\text{H}}=3.72$  ppm, με το πρωτόνιο να αντιστοιχεί, (με βάση το φάσμα HSQC), στον άνθρακα  $\delta_{\text{C}}=50.3$  ppm. Η ταυτοποίηση της απόλυτης στερεοδομής του κινικού οξέος έγινε μέσω σύγκρισης του φάσματος  $^1\text{H}$  με αυτά των ήδη ταυτοποιημένων «χλωρογενικών οξέων», εμφανίζοντας εν τέλει σημαντικές ομοιότητες με αυτό του 3-O-καφεοϋλο-κινικού οξέος. (συγκριτικός Πίνακας 3.9.).

**Πίνακας 3.9.** Συγκριτικός Πίνακας ένωσης (8) με την ήδη ταυτοποιημένη ένωση (6).

#	Μεθυλεστέρας 3-Ο-καφεοϋλο-(+)-κινικού οξέος (8) <i>HEPB-DG</i> (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD)		3-Ο-καφεοϋλο-(+)-κινικό οξύ (6) <i>HEPB-HC</i> (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD)	
	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H
<i>Τμήμα Καφεϊκού οξέος</i>				
9'	168.9	-	168.9	-
4'	149.3	-	149.4	-
7'	146.8	7.58	146.8	7.58
3'	146.6	-	146.7	-
1'	127.8	-	127.9	-
6'	122.9	6.93	122.9	6.94
5'	116.5	6.78	116.4	6.77
8'	115.7	6.31	115.8	6.31
2'	115.1	7.06	115.1	7.05
<i>Τμήμα Κινικού οξέος</i>				
-COOH	176.4	-	179.8	-
1	75.3	-	75.6	-
2	36.7	2.13-2.18	36.9	2.14
3	72.8	5.39	72.8	5.37
4	74.9	3.70	74.2	3.70
5	68.6	4.15	68.9	4.10
6	42.7	1.98	40.6	1.95
-OCH <sub>3</sub>	53.0	3.72 (s)	-	-

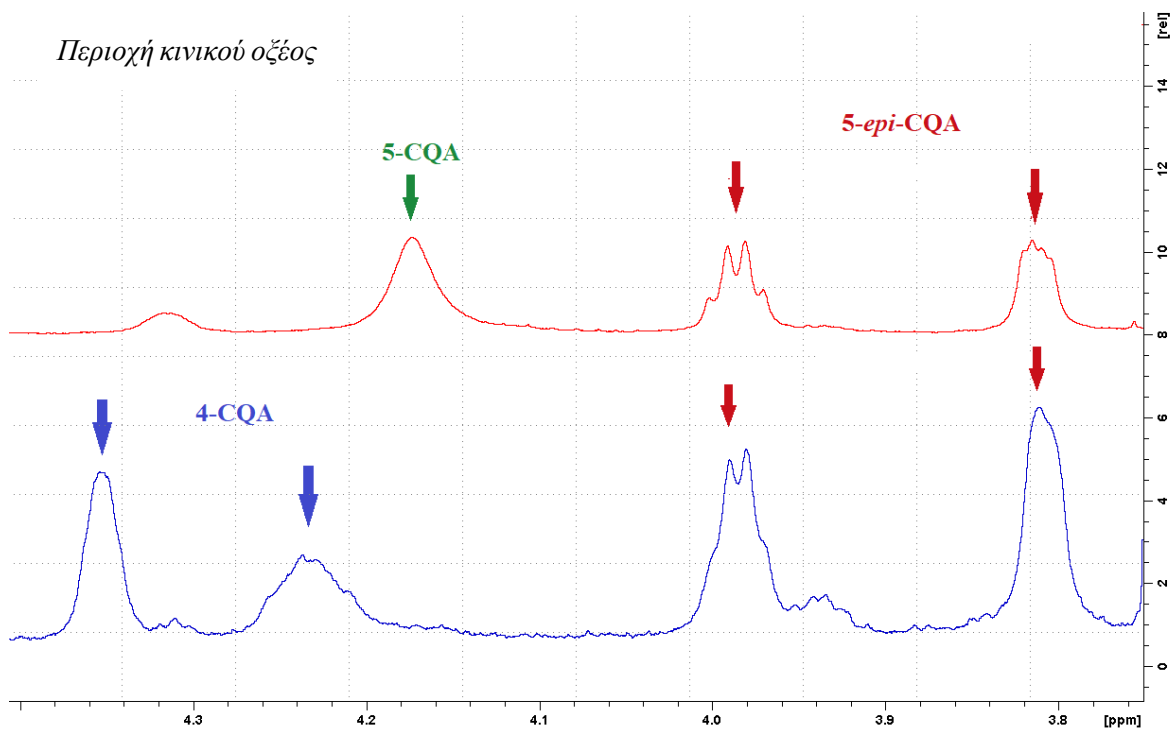
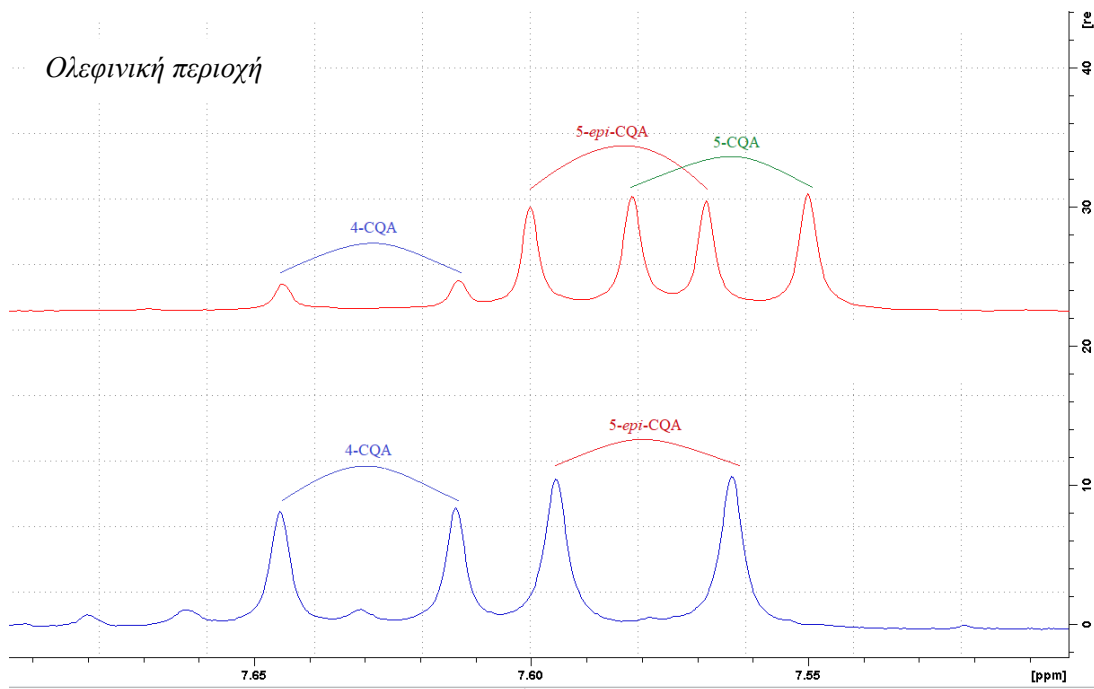
### 3.1.7. Δευτερογενής μεταβολίτης: 4-O-καφεοϋλο-(-)-κινικό οξύ (9)

Στο *Hypericum empetrifolium* η ένωση αυτή απομονώθηκε σε μορφή μίγματος με το 5-καφεοϋλο-επι-κινικό οξύ (5) από την περαιτέρω εκχύλιση του μεθανολικού εκχυλίσματος των ανθέων και των φύλλων με n-BuOH.



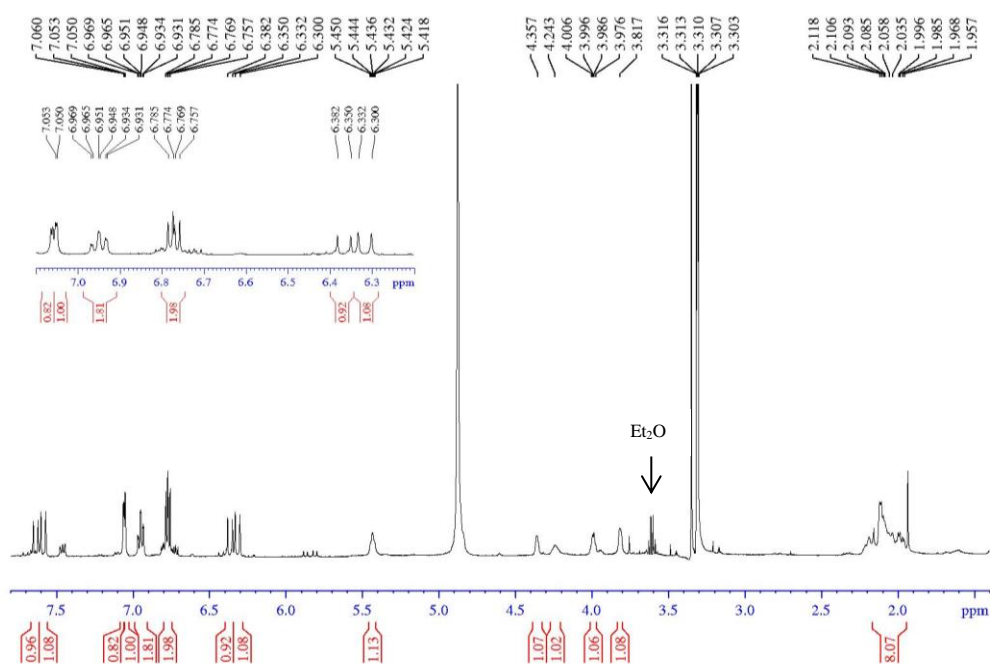
4-O-καφεοϋλο-(-)-κινικό οξύ (9)

Το 4-O-καφεοϋλο-(-)-κινικό οξύ, γνωστό και ως κρύπτοχλωρογενικό οξύ, είναι ένα από τα κύρια «χλωρογενικά οξέα» που έχουν μελετηθεί διεξοδικά στην βιβλιογραφία. Στο φάσμα  $^1\text{H}$  NMR παρατηρήθηκε μία αλληλουχία σημάτων η οποία είχε αρκετές ομοιότητες με τα χλωρογενικά οξέα που έχουν αναλυθεί παραπάνω. Και σε αυτή την περίπτωση, πρόκειται για μίγμα «χλωρογενικών» καθώς τα σήματα αυτά εμφανίζονται διπλά στην αρωματική/ολεφινική περιοχή. Ταυτόχρονα εμφανίζονται επιπλέον σήματα μαζί με ελαφρώς διαφορετικά μοτίβα κορυφών στην περιοχή των πρωτονίων του κινικού οξέος. Έπειτα από σύγκριση του φάσματος  $^1\text{H}$  με αυτά των ενώσεων (4) και (5), (Εικόνα 3.27.), προέκυψε ότι το ένα από τα δύο συστατικά είναι το 5-O-επι-καφεοϋλο-κινικό οξύ, το οποίο έχει αναλυθεί εκτενώς (Βλέπε 3.1.4.).



Εικόνα 3.26. Σύγκριση φασμάτων  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) ενώσεων (4), (5), (κόκκινο) με δείγμα ΗΕΡΒ-ΕΓ (μπλε).

Η ανάλυση του τμήματος του καφεϊκού οξέος και για τις δύο ενώσεις έχει αναφερθεί εκτενώς στο μέρος της ανάλυσης των υπόλοιπων «χλωρογενικών» που έχουν ταυτοποιηθεί.

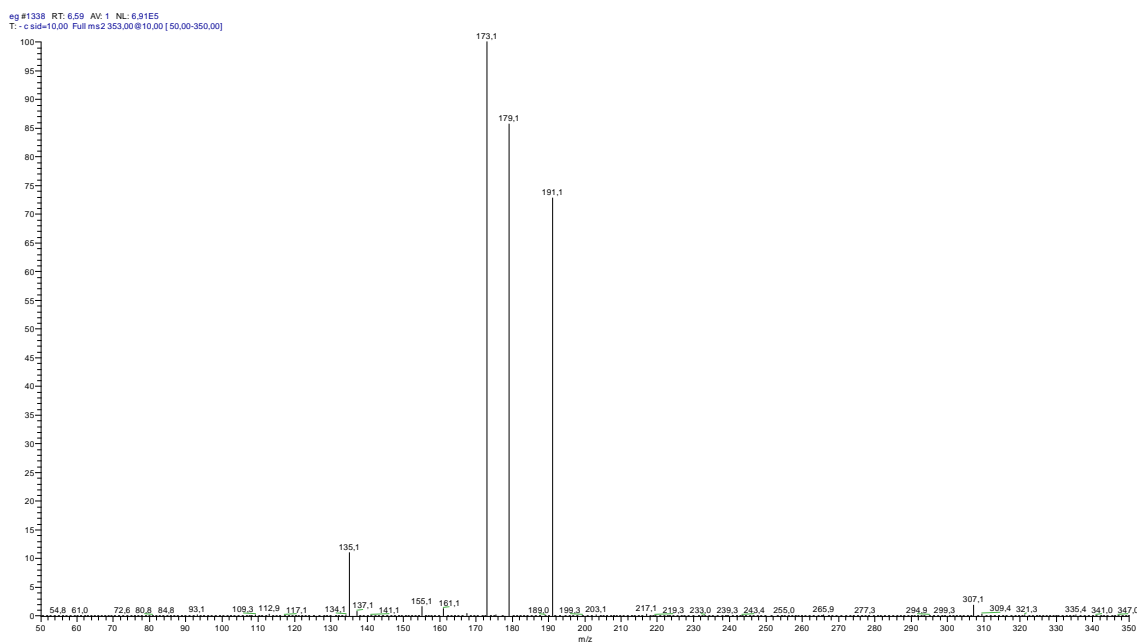


**Εικόνα 3.27.** Φάσμα <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) μίγματος 5-Ο-επι-κινικού οξέος (**5**) και κρυπτοχλωρογενικού οξέος (**9**).

Για το δεύτερο συστατικό παρατηρήθηκε ότι στην περιοχή του κινικού οξέος παρατηρείται μόνο ένα πρωτόνιο αποπροστατευμένο στα δ<sub>H</sub> 5.37 ppm το οποίο αντιστοιχεί στην ένωση (**5**), ενώ δεν παρατηρήθηκε κάποια άλλη κορυφή στην περιοχή αυτή. Μάλιστα, η χαρακτηριστική κορυφή του πρωτονίου H-4 η οποία είναι μία διπλή της διπλής φάνηκε να απουσιάζει από τα υψηλά πεδία. Έγινε λοιπόν η υπόθεση ότι η κορυφή αυτή ίσως βρίσκεται σε χαμηλότερα πεδία. Έπειτα από εκτεταμένη βιβλιογραφική αναζήτηση και σύγκριση των βιβλιογραφικών δεδομένων με αυτά της συγκεκριμένης ένωσης, παρατηρήθηκε ταύτιση όλων των υπόλοιπων κορυφών με αυτές του κρυπτοχλωρογενικού οξέος (4-Ο-καφεούλο(-)-κινικό οξύ), (Πίνακας 3.10.). Ωστόσο, η κορυφή του H-4, που είναι και το πιο αποπροστατευμένο πρωτόνιο, εμφανίζεται (σύμφωνα με την βιβλιογραφία) στα δ<sub>H</sub> 4.82 ppm, περιοχή όπου εμφανίζεται ισχυρά το σήμα της υγρασίας (δ<sub>H</sub> 4.87 ppm) καθώς η λήψη έγινε σε CD<sub>3</sub>OD, οπότε η κορυφή πιθανόν αλληλεπικαλύπτεται. Για το λόγο



αυτό, έγιναν προσπάθειες λήψης του φάσματος σε διαφορετικό διαλύτη, όμως η ένωση παρουσιάζει ελάχιστη διαλυτότητα σε διαλύτες λιγότερο πολικούς από την CD<sub>3</sub>OD ή D<sub>2</sub>O. Επιπλέον επιβεβαίωση της υπόθεσης αυτής προήλθε από τα δεδομένα του φάσματος από ESI-MS σε συνδυασμό με την βιβλιογραφία όπου έχουν γίνει αρκετές μελέτες διάκρισης ισομερών «χλωρογενικών οξέων» μέσω ανάλυσης ESI-MS. Σύμφωνα με τις μελέτες αυτές, το 4-O-CQA μπορεί εύκολα να διακριθεί από τα υπόλοιπα (3-O-CQA ή 5-O-CQA) με βάση το MS<sup>2</sup> όπου είναι το μόνο που παρουσιάζει την «αφυδατωμένη» κορυφή στα m/z 173 και μάλιστα μεγάλης έντασης, ενδεικτική της ακυλίωσης στη θέση 4 του κινικού, μαζί με μία κορυφή m/z 93.0. Στο φάσμα της ανάλυσης με ESI-MS που φαίνεται παρακάτω (Εικόνα 3.28.) σε αρνητικό ιοντισμό αρχικά με full scan από m/z 150-500 προέκυψε το μοριακό ιόν m/z = 353.0 και έπειτα με επιπλέον θραυσματοποίηση της συγκεκριμένης κορυφής (MS/MS) προέκυψαν τα θραύσματα m/z: 191.1, 179.1, 173.1 και 135.1.

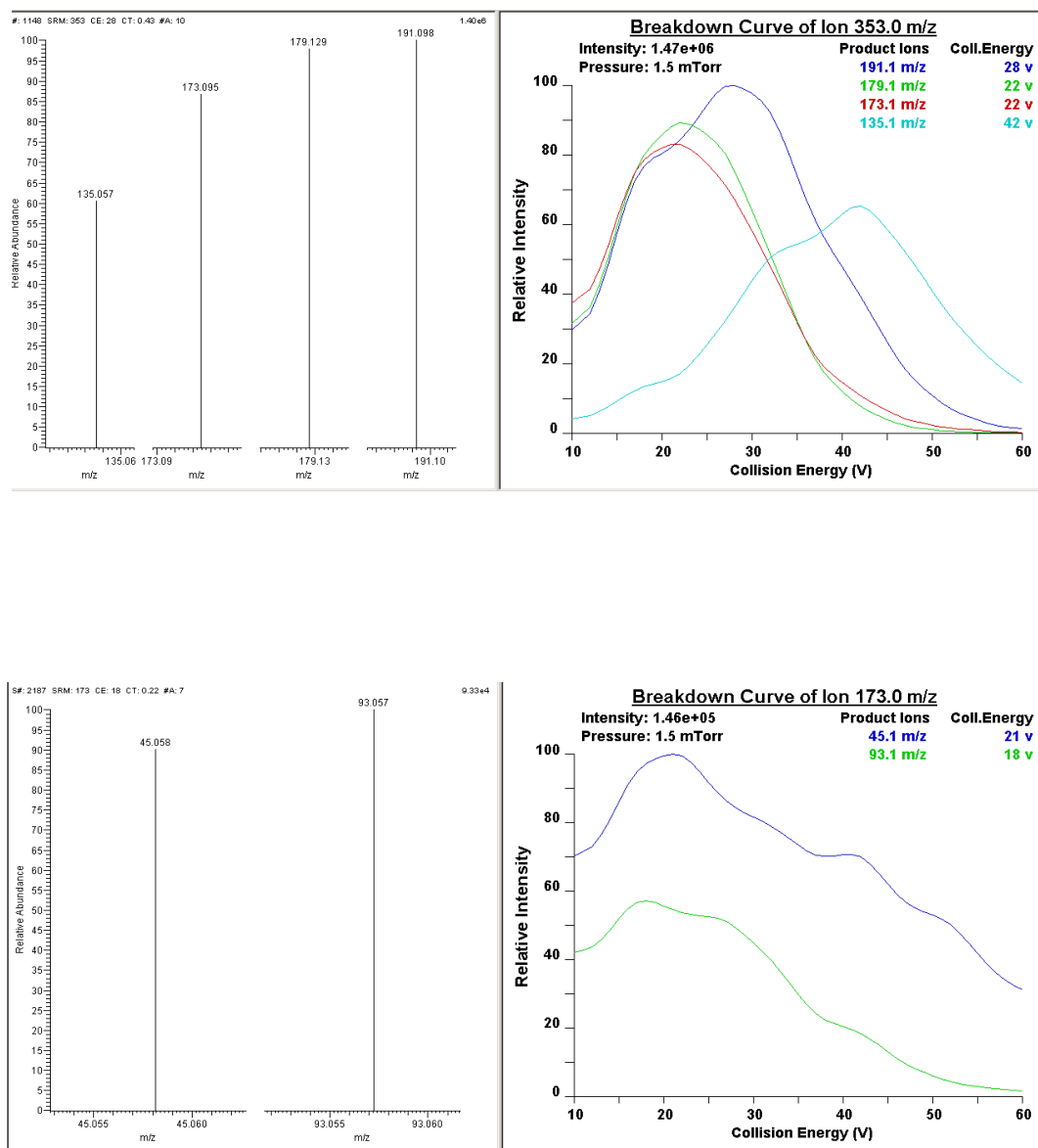


**Εικόνα 3.28.** Φάσμα μάζας MS<sup>2</sup> αρνητικού ιοντισμού από LC/MS ένωσης (5) και (9).

**Πίνακας 3.10.** Σύγκριση δεδομένων φασματοσκοπίας NMR του κρυπτοχλωρογενικού με αυτά της βιβλιογραφίας.

	<i>4-καφεοϋλο(-)-κινικό οξύ</i> (9) <i>HEPB-EG</i> (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD)	<i>Plants 2017</i> <sup>86</sup> (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD)	<i>Journal of Ethnopharmacology 2014</i> <sup>87</sup> (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD)	<i>J. Agric. Food Chem. 2000</i> <sup>88</sup> (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD)
#	<sup>1</sup> H	<sup>1</sup> H	<sup>1</sup> H	<sup>1</sup> H
9'	-	-	-	-
4'	-	-	-	-
7'	7.63 (1H, d, 15.9)	7.63 (1H, d, 15.9)	7.63 (1H, d, 15.9)	7.65 (1H, d, J = 16 Hz)
3'	-	-	-	-
1'	-	-	-	-
6'	6.95 (1H, dd, 1.95, 8.7)	6.97 (1H, dd, 1.4, 8.0)	6.95 (1H, br. d, J = 7.1 Hz)	6.96 (1H, dd, J = 2, 8 Hz)
5'	6.78 (1H, d, 8.05)	6.78 (1H, d, 8.0)	6.78 (d, J = 7.1 Hz)	6.76 (1H, d, J = 8 Hz)
8'	6.37 (1H, d, 15.9)	6.37 (1H, d, 15.9)	6.36 (1H, d, J = 15.9 Hz)	6.37 (1H, d, J = 16 Hz)
2'	7.06 (1H, d, 1.95)	7.06 (1H, d, 1.4)	7.06 (1H, br. S)	7.06 (1H, d, J = 2 Hz)
<b>-COOH</b>	-	-	-	-
<b>1</b>	-	-	-	-
<b>2</b>	2.01-2.18 (m)	1.98-2.23 (2H, m)	2.18 (1H, m, H-6a) 2.03 (1H, m, H-6b)	2.06 (1H, ddd, J = 3, 4, 14 Hz) 2.17 (1H, dd, J = 4, 14 Hz)
<b>3</b>	4.35 (br s)	4.29 (1H, brs)	4.30 (2H, m)	4.28 (1H, ddd, J = 3, 3, 4 Hz)
<b>4</b>	not identified	4.80 (1H, dd, 2.3, 9.0)	4.81 (1H, m)	4.79 (1H, dd, J = 3, 9 Hz)
<b>5</b>	4.21-4.27 (m)	4.27 (1H, ddd, 9.0, 9.0, 4.5)	4.30 (2H, m)	4.27 (1H, ddd, J = 4, 9, 11 Hz)
<b>6</b>	2.01-2.18 (m)	1.98-2.23 (2H, m)	2.18 (2H, m)	2.00 (1H, dd, J = 11, 13 Hz) 2.20 (1H, ddd, Jβ = 3, 5, 13 Hz)

Έπειτα από θραυσματοποίηση της κορυφής (MS<sup>3</sup>) m/z 173.1 προέκυψαν τα θραύσματα m/z: 93.0 και 45.0. Μάλιστα, η ένταση της «αφυδατωμένης» κορυφής είναι αρκετά υψηλή όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.29. Έτσι, έγινε δυνατός χαρακτηρισμός της ένωσης ως 4-O-καφεοϋλο(-)-κινικό οξύ (**9**).



Εικόνα 3.29. Καμπύλες διάσπασης ιόντων m/z 353.0 (πάνω) και m/z 173.0 (κάτω).

### 3.2. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

#### Βιοδραστικότητα των δευτερογενών μεταβολιτών 1-9

Το σικιμικό οξύ (SA) προέρχεται από το Ιαπωνικό λουλούδι shikimi (αστεροειδής γλυκάνισος) και απομονώθηκε για πρώτη φορά από το *I. religiosum* το 1885 ενώ τη δεκαετία του 1930, οι Fischer<sup>89,90</sup>, Freudenberg et al.<sup>91</sup>, και οι Karrer και Link<sup>92</sup> καθόρισαν τη σχετική και απόλυτη στερεοχημεία του (-) –shikimic acid. Αποτελεί το ενδιάμεσο «κλειδί» στην πορεία της βιοσύνθεσης αρωματικών αμινοξέων όπως η τυροσίνη και η φαινυλαλανίνη (shikimate pathway) στα φυτά, στα βακτήρια και στους μύκητες. Το SA χρησιμοποιείται σαν βασικό χημικό συστατικό σε διάφορες φαρμακευτικές και βιομηχανικές χρήσεις. Η σημαντικότερη χρήση του είναι ως υπόστρωμα χημικής σύνθεσης του φαρμάκου oseltamivir, εμπορικός γνωστός ως Tamiflu®, ενός αποτελεσματικού αναστολέα του ιού της γρίπης ανθρώπου H1N1 προέλευσης των χοίρων, των τύπων Α και Β του ιού της εποχικής γρίπης και του ιού της γρίπης των πτηνών H5N1. Η περιεκτικότητα του SA σε φυτικά είδη ποικίλει και εξαρτάται από το ρυθμό σύνθεσης των αρωματικών αμινοξέων. Οι καρποί του κινέζικου γλυκάνισου (*Illicium verum*) περιέχουν SA σε ποσοστό 17,14% σε ξηρό βάρος και αυτή είναι πλέον η κύρια πηγή εμπορικής παραγωγής της SA. Επιπλέον, όπως αποδεικνύεται από τις ελλείψεις Tamiflu® που ανακοίνωσε η Roche το 2005, μια κακή συγκομιδή μπορεί να οδηγήσει αναπόφευκτα σε μαζικές ελλείψεις στην παροχή φαρμάκων.<sup>93</sup> Επί του παρόντος, το μεγαλύτερο μέρος της παγκόσμιας ζήτησης για σικιμικό οξύ συναντάται μόνο από τα φρούτα του κινέζικου γλυκάνισου. Έτσι, γίνονται προσπάθειες για τη διερεύνηση εναλλακτικών πηγών σικιμικού οξέος για την ικανοποίηση των απαιτήσεων της παγκόσμιας αγοράς. Κατά καιρούς έχουν αναφερθεί και άλλες πηγές SA όπως είναι το *Illicium pachyphyllum* (16.21%), *Terminalia arjuna* (15.64%), *Pistacia lentiscus* (13.28%), *Ribes aureum* (12.68%), *Symphytum officinalis* (12.53%), *Actaea pachypoda* (12.21%) and *Alangium salvifolium* (11.7%) σε ξηρό βάρος. Πέρα από τη συγκεκριμένη χρήση, το SA είναι γνωστό ότι έχει διάφορες σημαντικές βιολογικές δράσεις για την ανθρώπινη υγεία όπως η αντι-φλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές, αντιβακτηριακές έναντι του *Staphylococcus aureus*, αντι-αιμοπεταλιακές καθώς και η πρόληψη εγκεφαλικής βλάβης μετά από ισχαιμία.<sup>94,95</sup>

Τα φαινολικά οξέα είναι μια υποομάδα φαινολικών ενώσεων που προέρχονται από το υδροξυβενζοϊκό οξύ και το υδροξυκιναμικό οξύ, απαντώνται στα φυτά και οι ενώσεις αυτές έχουν αντιοξειδωτικές, αντι-φλεγμονώδεις, αντικαταθλιπτικές και αντικαρκινικές

ιδιότητες.<sup>96</sup> Τα χλωρογενικά οξέα (CGAs) είναι εστέρες του διυδροκιναμικού οξέος και μπορούν να υποστούν βιοσύνθεση από την οδό του σικιμικού οξέος. Το κινικό οξύ είναι το κύριο τμήμα που απαντάται στα χλωρογενικά οξέα, ωστόσο υπάρχουν περιπτώσεις όπου η εστεροποίηση με το καφεϊκό οξύ γίνεται με τα στερεοϊσομερή του *epi*-κινικό οξύ και *muco*-κινικό οξύ. Έχει αποδειχθεί ότι σκευάσματα και αφεψήματα που περιέχουν «χλωρογενικά» σε μεγάλο ποσοστό (τσάι, καφές, πρόπολη) έχουν αντιδιαβητικές, αντιβιοτικές, νευροπροστατευτικές δράσεις καθώς και δράσεις έναντι της παχυσαρκίας. Επιπλέον, το νεοχλωρογενικό οξύ (3-CQA), το κρυπτοχλωρογενικό οξύ (4-CQA) και το χλωρογενικό οξύ (5-CQA) προστατεύουν από την οξειδωση του λινολεϊκού μεθυλεστέρα (Nakatani κ.ά., 2000).<sup>97</sup> Ο μεθυλεστέρας του χλωρογενικού οξέος είναι γνωστή αντιοξειδωτική ουσία και γενικώς για το χλωρογενικό οξύ και τα παράγωγά του έχουν αναφερθεί δεδομένα από *in vitro* μελέτες στοιχεία ότι είναι ισχυροί σαρωτές των ROS (reactive oxygen species). Τα χλωρογενικά οξέα έχουν την ικανότητα να σαρώνουν ανιόντα υπεροξειδίου ή ρίζες υδροξυλίου.<sup>98</sup>

Τα φλαβονοειδή είναι μια ποικίλη ομάδα φυτικών δευτερογενών μεταβολιτών, που είναι σχεδόν πανταχού παρόντες σε ανώτερα φυτά, συχνά σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις. Έχουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δραστηριοτήτων που προέρχονται κυρίως από την ικανότητά τους να δεσμεύονται με πρωτεΐνες. Γενικά, η πρόσληψη φλαβονοειδών έχει αποδειχθεί ότι προστατεύει από χρόνιες παθήσεις που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες, συμπεριλαμβανομένων των καρδιαγγειακών παθήσεων και του καρκίνου.<sup>99</sup> Στα είδη *Hypericum*, τα φλαβονοειδή είναι άφθονα, που αντιπροσωπεύουν 11% στα άνθη και 7% στα φύλλα του *H. Perforatum*.<sup>100</sup> Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία, ταυτοποιήθηκαν τρία φλαβονοειδή τα οποία αποτελούν γλυκοζυλιωμένα παράγωγα της κερκετίνης. Έχει αποδειχθεί ότι τα γλυκοσιδωμένα παράγωγά της κερκετίνης μπορούν να αναστείλουν πολλά βασικά ένζυμα, όπως φωσφολιπάση A2 και C, πρωτεΐνη της τυροσίνης, κινάσες, λιποξυγενάση, κυκλοοξυγονάση. Επομένως, παρουσιάζουν αντι-ισταμινική, αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη και αντι-καρκινογόνο δράση και μπορεί επίσης να βοηθούν να μειωθούν τα συμπτώματα της κόπωσης, κατάθλιψης, του άγχους, η στεφανιαία νόσος και οι καρδιακές παθήσεις.<sup>101</sup>

Ο κερκέτινο-3-O-β-D-γαλακτοπυρανοζίτης, γνωστός και ως *υπεροσίδης*, είναι ένα μία γλυκοζυλιωμένη φλαβονόλη που συναντάται κυρίως σε φυτά του γένους *Hypericum* και *Crataegus*. Διάφορες φαρμακολογικές έρευνες έχουν δείξει ότι ο υπεροσίδης έχει ποικίλες βιολογικές δράσεις όπως αντι-οξειδωτικές, αντι-υπεργλυκαιμικές, αντι-καρκινικές, αντι-

φλεγμονώδεις, αντι-πηκτικές καθώς και καρδιοπροστατευτικές.<sup>102</sup> Ο υπεροσίδης μπορεί, επιπλέον, να αναστείλει αποτελεσματικά τα μυκητιακά παθογόνα: *A. alternata*, *E. nigrum*, *P. guerinii*, *Drechslera sp.* και *F. avenaceum in vitro*.<sup>103</sup> Για την αβικουλαρίνη έχουν αναφερθεί ποικίλες βιολογικές ιδιότητες όπως αντιφλεγμονώδεις, αντι-αλλεργικές, αντιοξειδωτικές, ηπατοπροστατευτικές και αντικαρκινικές δράσεις. Επίσης, έχει αναφερθεί ότι προστατεύει τα καρδιομυοκύτταρα και τα ηπατοκύτταρα από την επαγόμενη από το οξειδωτικό στρες απόπτωση. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι η αβικουλαρίνη παίζει προστατευτικό ρόλο αναστέλλοντας τις ουρεάσες, οι οποίες είναι ιογενείς παράγοντες που εμπλέκονται στην παθογένεση πολλών κλινικών καταστάσεων όπως η πυελονεφρίτιδα και το ηπατικό κόμμα.<sup>104</sup>

### 3.2. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Αντικείμενο της παρούσας μελέτης υπήρξε η μελέτη των δευτερογενών μεταβολιτών του είδους *Hypericum empetrifolium*, ένα είδος, σε αντίθεση με το *H. perforatum L.*, για το οποίο υπάρχουν λίγες μελέτες που να αφορούν τη χημική του σύσταση.

Η μελέτη επικεντρώθηκε στο εκχύλισμα με μεθανόλη (πολικό), δεδομένου ότι βάσει βιβλιογραφίας περιέχει εύρος ενώσεων υπεύθυνων για την θεραπευτική δράση του φυτού. Παράλληλα, έγινε μελέτη του εκχυλίσματος με διχλωρομεθάνιο, από το οποίο δεν ταυτοποιήθηκε κάποια ένωση με τη χρήση NMR ή/και ESI-MS. Ωστόσο, μελέτη του συγκεκριμένου εκχυλίσματος έχει πραγματοποιηθεί σε παλαιότερη έρευνα από την εργαστηριακή μας ομάδα, όπου ταυτοποιήθηκαν με τη χρήση GC-MS τα συστατικά του εκχυλίσματος. Έτσι, η μελέτη του πολικού εκχυλίσματος του φυτού, οδήγησε στα εξής συμπεράσματα:

- Κύριο προϊόν του μεθανολικού εκχυλίσματος είναι το 3-O-καφεοϋλο-(+)-κινικό οξύ, καθώς απομονώθηκε και ταυτοποιήθηκε αρκετές φορές από διάφορα κλάσματα, κοινό συστατικό των φυτών της οικογενείας Clusiaceae, αλλά και πολλών άλλων οικογενειών.
- Εκτός από το η-χλωρογενικό οξύ (5-O-καφεοϋλο-(-)-κινικό οξύ), απομονώθηκαν τα στερεοϊσομερή αυτών: 3-O-καφεοϋλο-(+)-κινικό οξύ, 4-O-καφεοϋλο-(-)-κινικό οξύ και 5-O-καφεοϋλο-επι-κινικό οξύ, με το τελευταίο να απομονώνεται για πρώτη φορά από το συγκεκριμένο είδος αλλά και γένος. Παράλληλα ταυτοποιήθηκε ο μεθυλεστέρας του 3-O-καφεοϋλο-(+)-κινικού οξέος. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο μεθυλεστέρας του χλωρογενικού οξέος έχει ταυτοποιηθεί προηγουμένως και σε άλλα είδη του *Hypericum* (*H. monbretii*

*Sprach*<sup>105</sup>), ενώ ο μεθυλεστέρας του νεοχλωρογενικού οξέος (3-O-CQA) δεν έχει αναφερθεί μέχρι σήμερα.

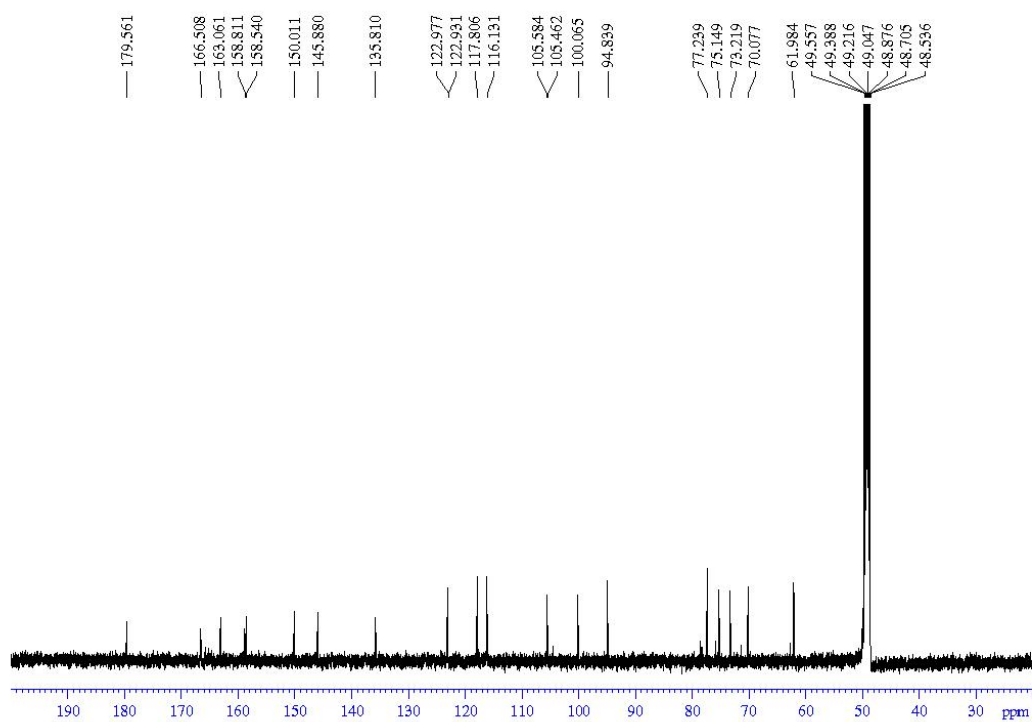
- Έπειτα από περαιτέρω εκχυλίσεις με οξικό αιθυλεστέρα του μεθανολικού εκχυλίσματος απομονώθηκαν τρία φλαβονοειδή: ο υπεροσίδης, η αβικουλαρίνη και η γουαϊαβερίνη, με τις δύο τελευταίες να αποτελούν συντακτικά ισομερή. Η γουαϊαβερίνη απομονώθηκε για πρώτη φορά από το είδος *H. empetrifolium*, ενώ έχουν γίνει δύο αναφορές για την παρουσία της γενικά στο γένος *Hypericum*.<sup>106,107</sup>

- Ανάμεσα στις ουσίες που απομονώθηκαν ανήκει και το σικιμικό οξύ, το οποίο βρίσκεται γενικά σε μικρές ποσότητες στο γένος, μιας και είναι πρόδρομο μόριο για την βιοσύνθεση αμινοξέων, ενώ απομονώθηκε για πρώτη φορά από το είδος *H. empetrifolium*.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

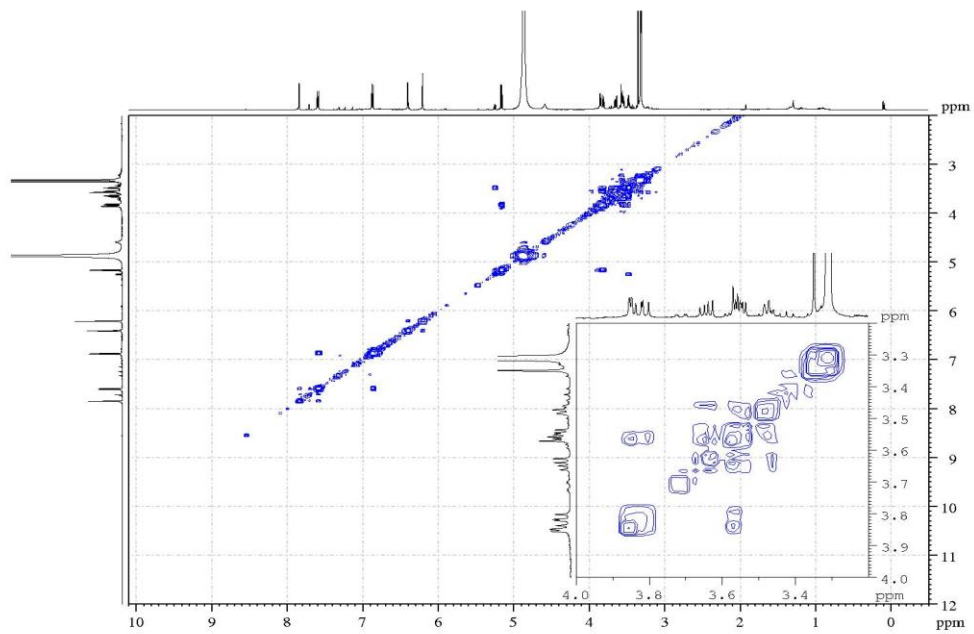
### ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΤΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ

#### Υπεροσίδης (1)

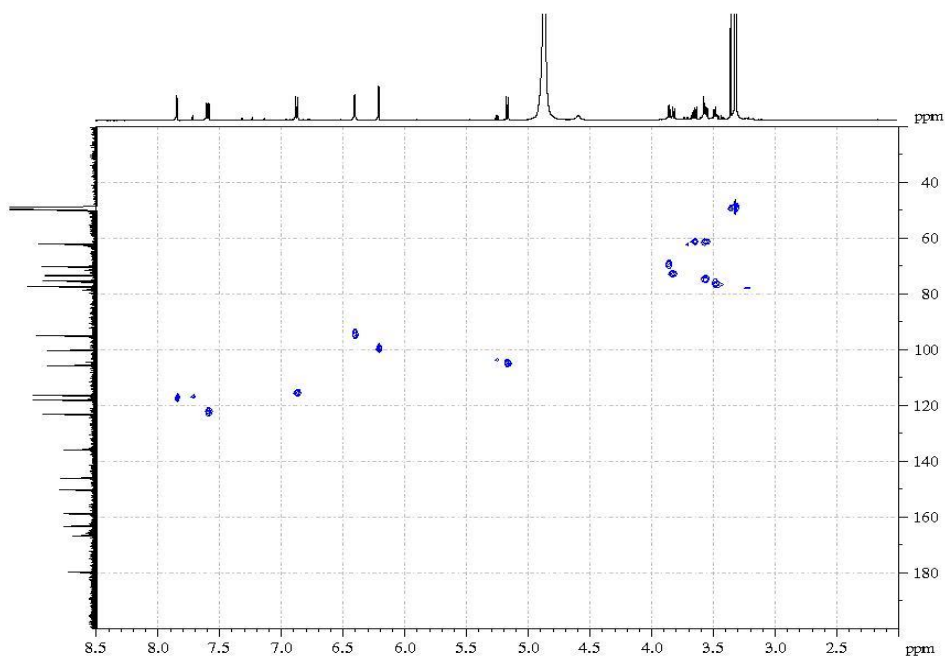


Εικόνα 3.30. Φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) Υπεροσίδης (1).

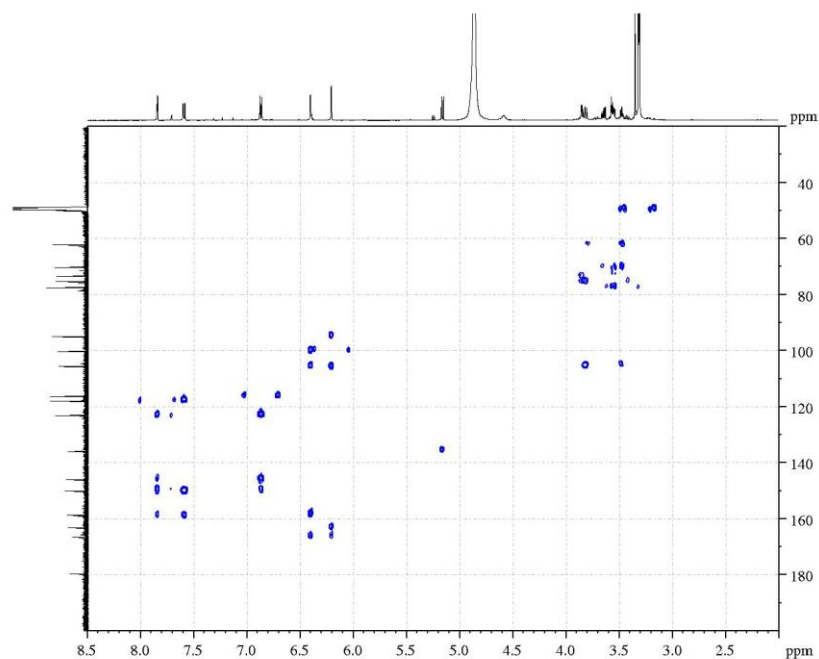




Εικόνα 3.31. Φάσμα COSY (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) Υπεροσίδη (1).

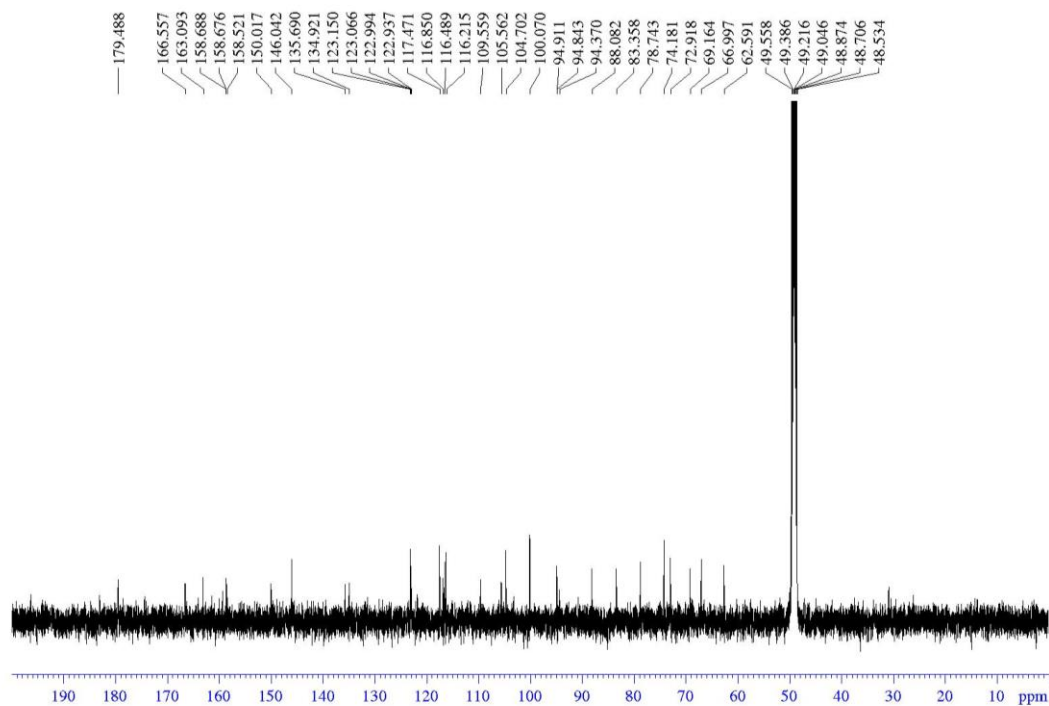


Εικόνα 3.32. Φάσμα HSQC (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) Υπεροσίδη (1).

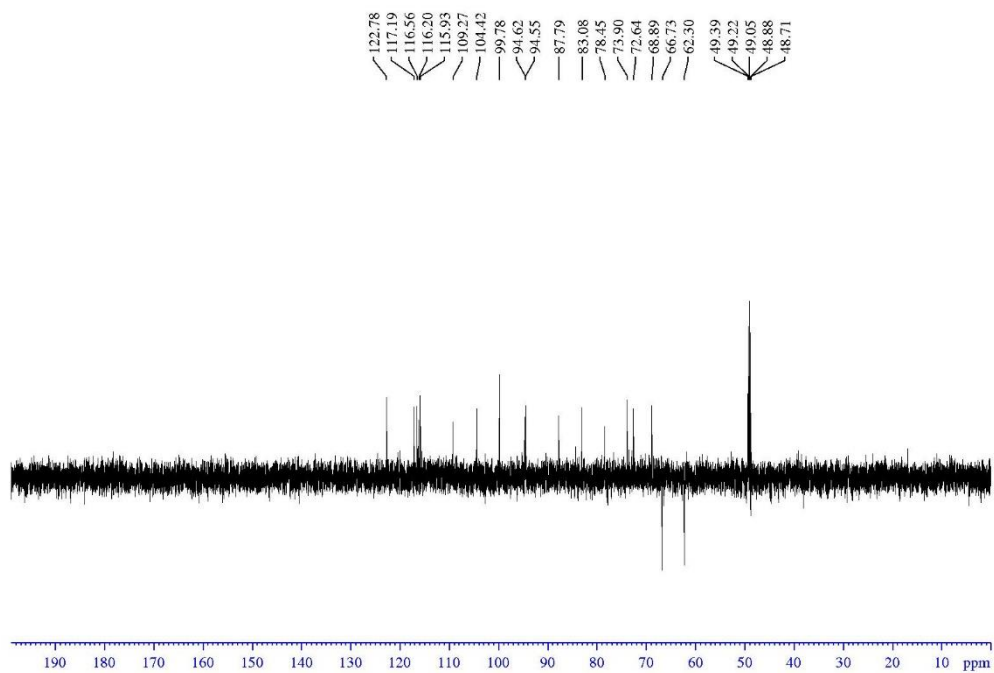


Εικόνα 3.33. Φάσμα HMBC (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) Υπεροσίδη (1)

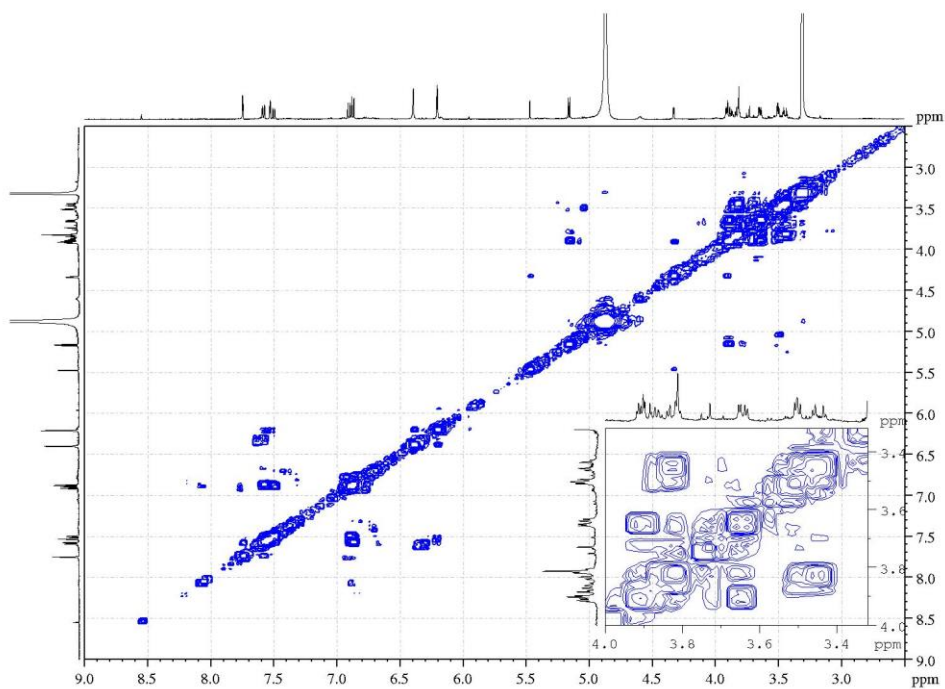
*Αβικουλαρίνη (2) & Γουαϊαβερίνη (3)*



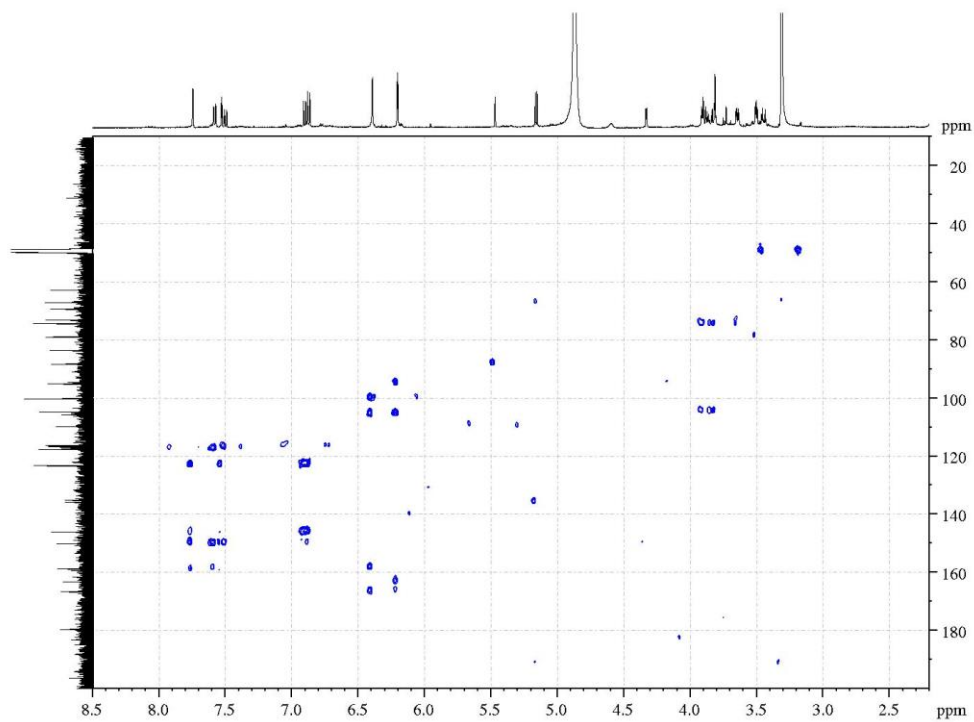
Εικόνα 3.34. Φάσμα <sup>13</sup>C NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) Αβικουλαρίνης (2) και Γουαϊαβερίνης (3).



Εικόνα 3.35. Φάσμα DEPT-135 (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) Αβικουλαρίνης (2) και Γουαϊαβερίνης (3).



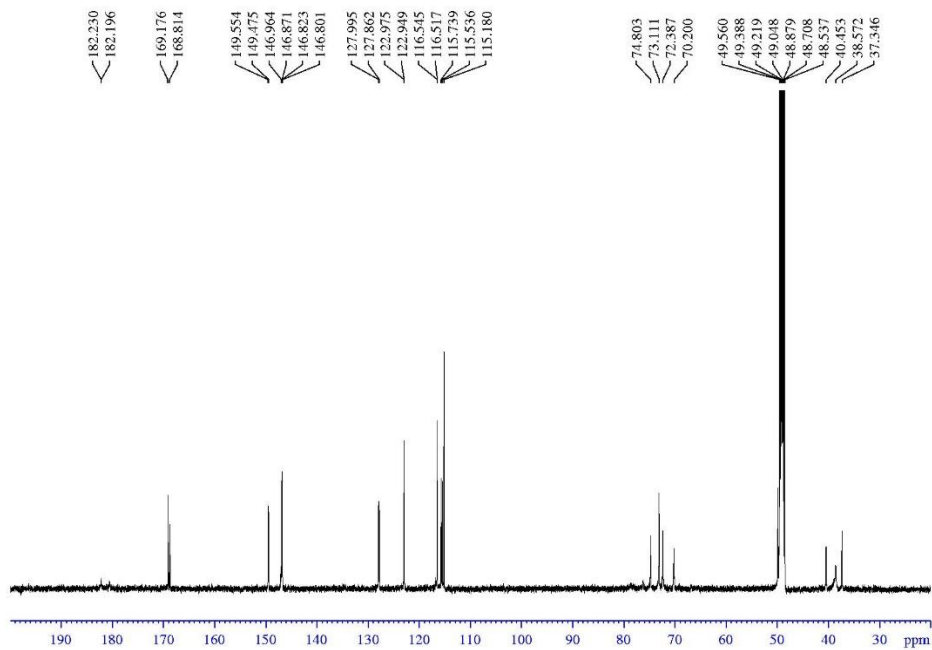
Εικόνα 3.36. Φάσμα COSY (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) Αβικουλαρίνης (2) και Γουαϊαβερίνης (3).



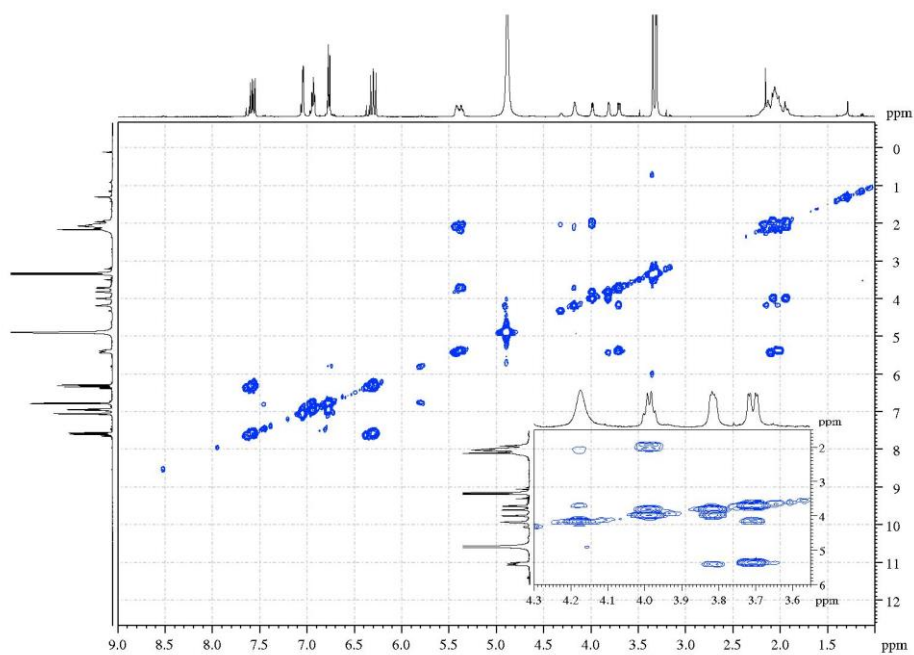
Εικόνα 3.37. Φάσμα HMBC (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) Αβικουλαρίνης (2) και Γουαϊαβερίνης (3).

*5-O-καφεοϋλο(-)-κινικό οξύ (4)*

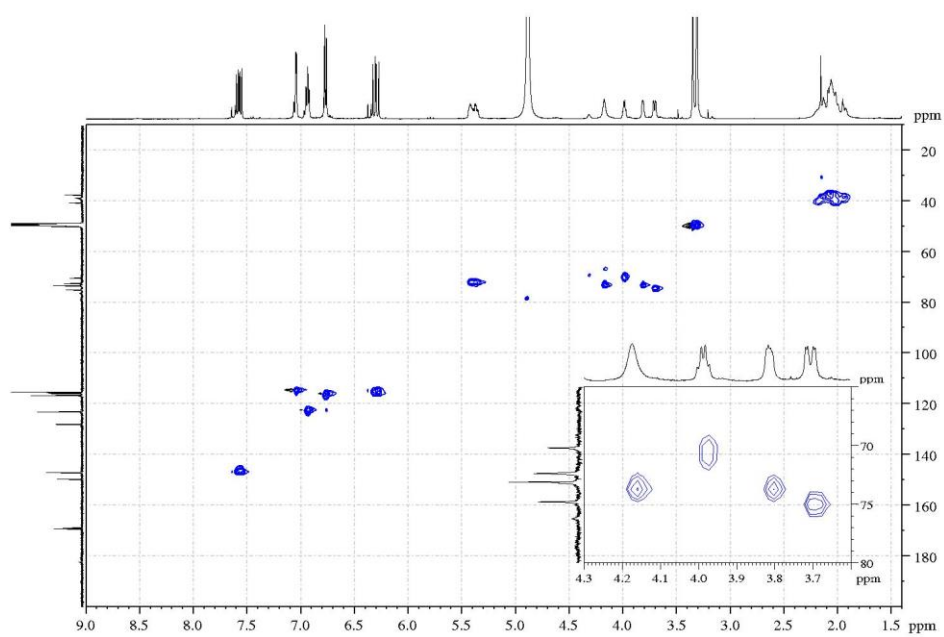
*5-O-καφεοϋλο-επι-κινικό οξύ (5)*



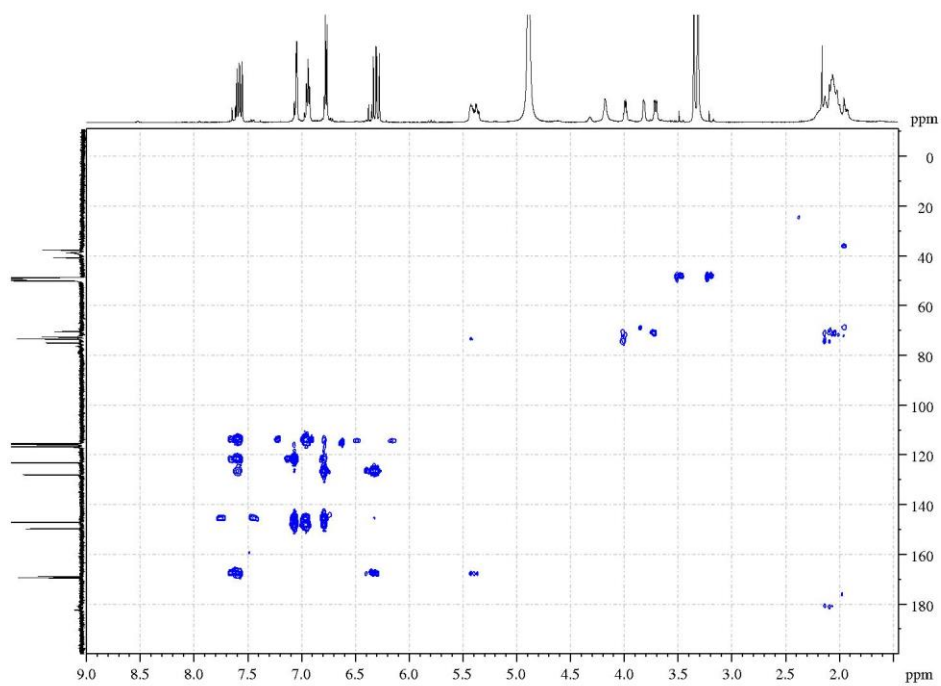
Εικόνα 3.38. Φάσμα <sup>13</sup>C NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) των (4) και (5).



Εικόνα 3.39. Φάσμα COSY (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) των (4) και (5).

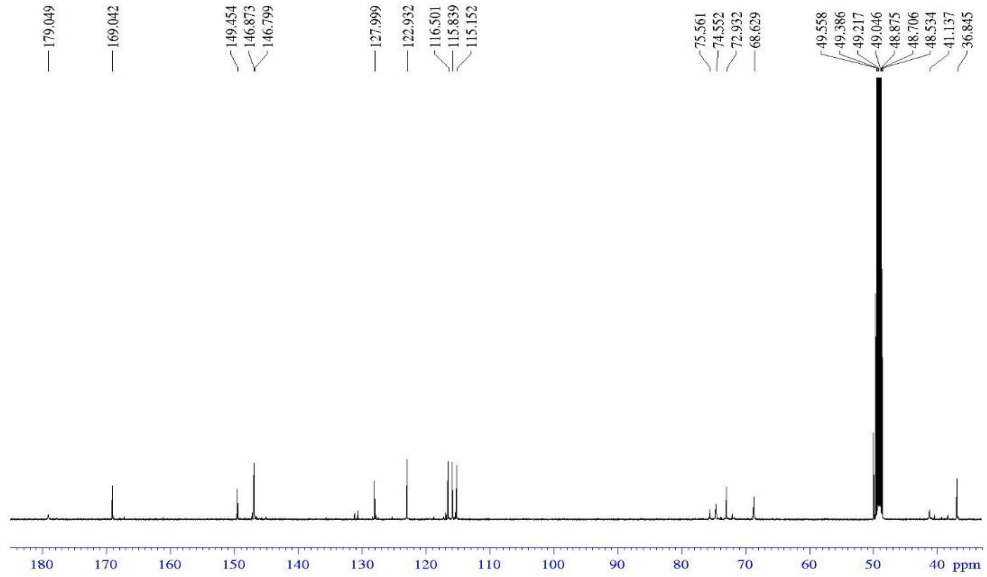


Εικόνα 3.40. Φάσμα HSQC (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) των (4) και (5).

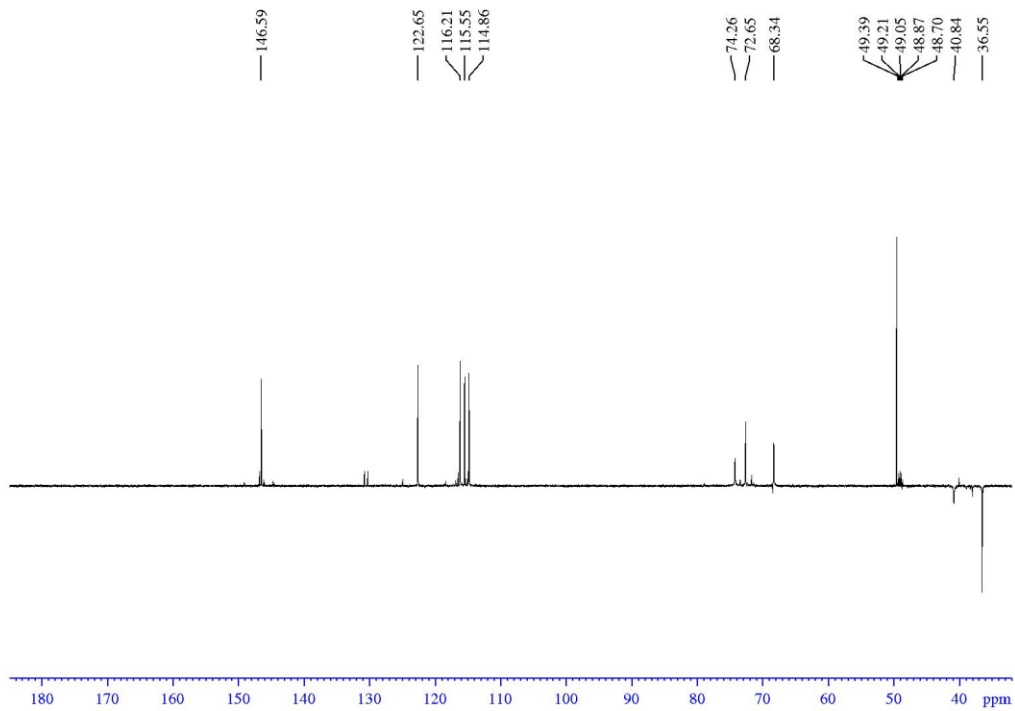


**Εικόνα 3.41.** Φάσμα HMBC (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) των (4) και (5).

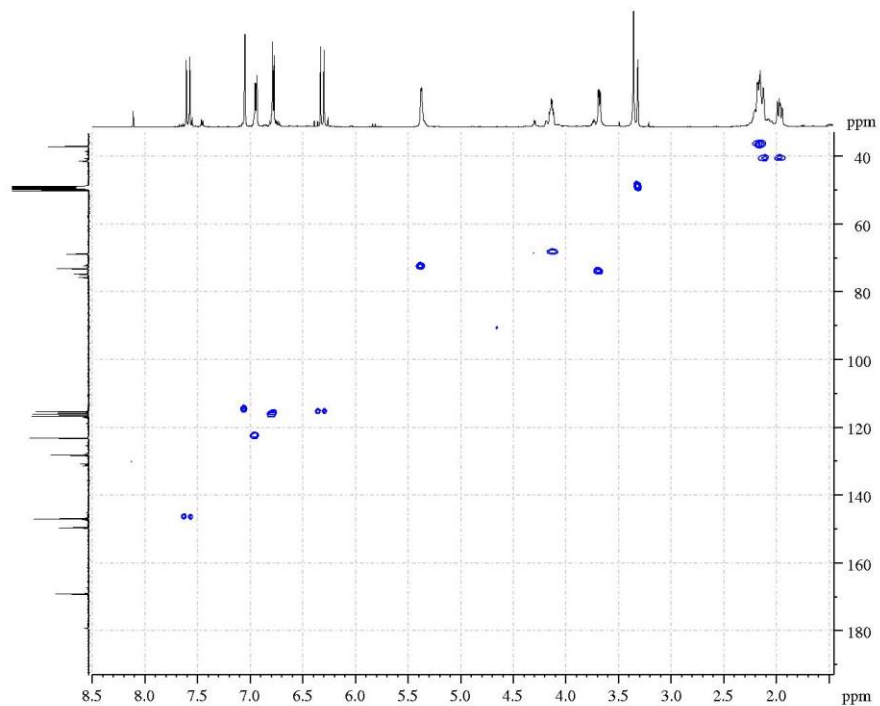
**3-O-καφεοϋλο-(+)-κινικό οξύ (6)**



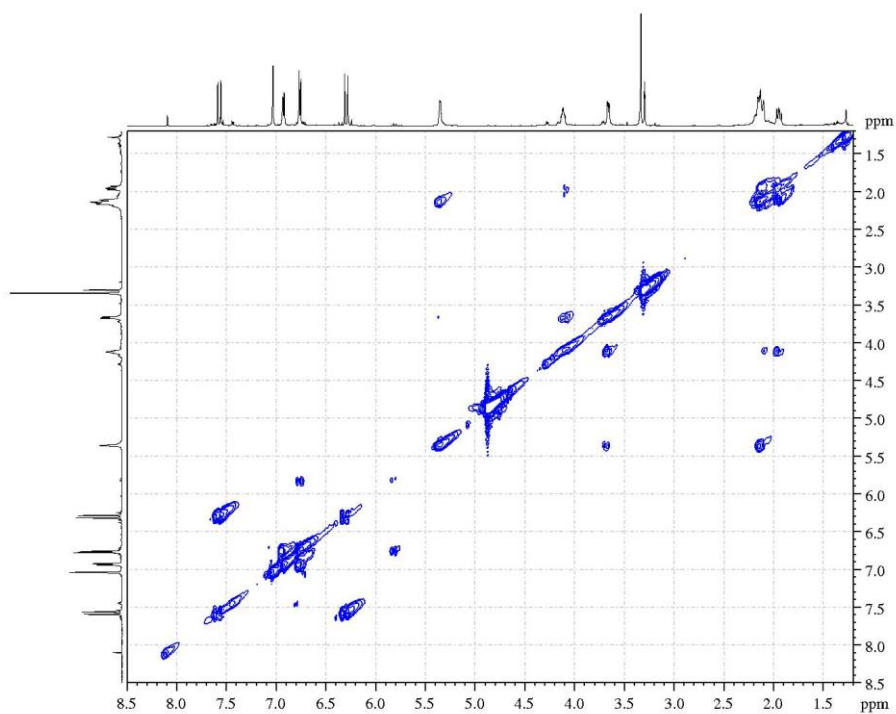
**Εικόνα 3.42.** Φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) 3-O-καφεοϋλο-(+)-κινικού οξέος (6).



**Εικόνα 3.43.** Φάσμα DEPT-135 (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) 3-O-καφεοϋλο-(+)-κινικού οξέος (6).

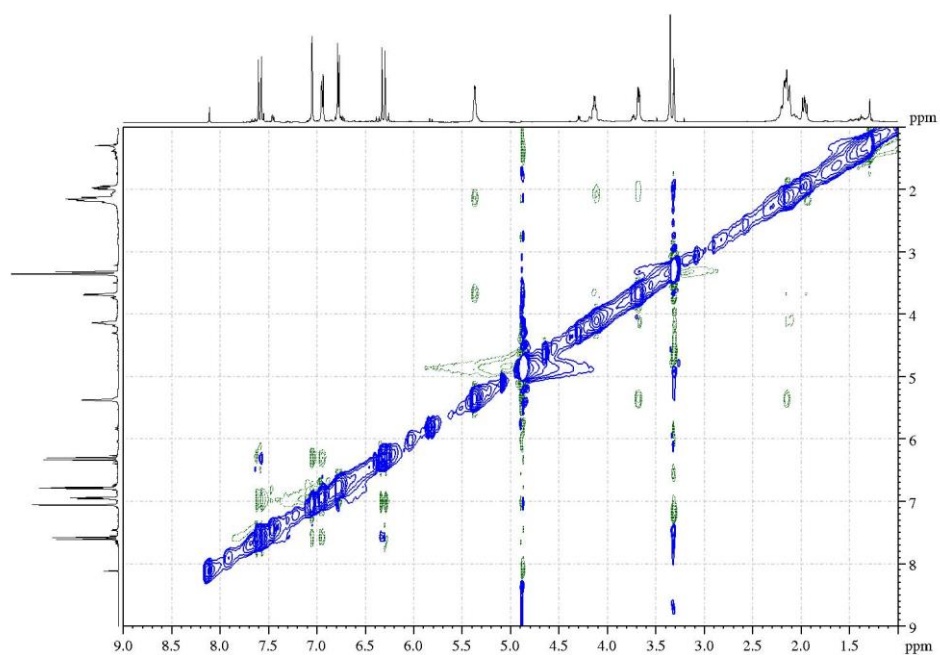


**Εικόνα 3.44.** Φάσμα HSQC (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) 3-Ο-καφεούλο-(+)-κινικού οξέος (**6**).

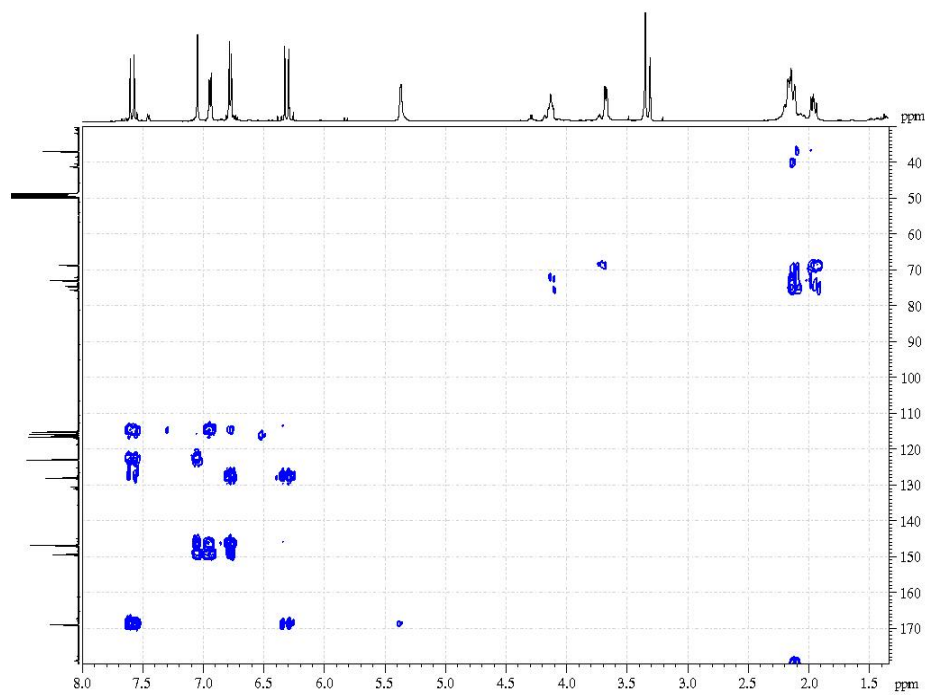


**Εικόνα 3.45.** Φάσμα COSY (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) 3-Ο-καφεούλο-(+)-κινικού οξέος (**6**).



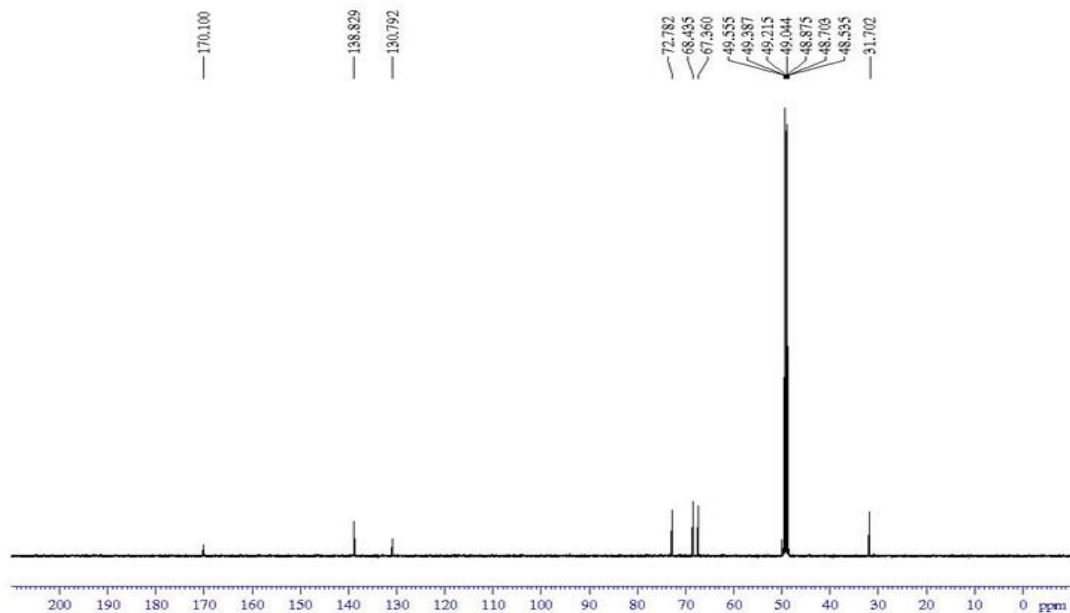


**Εικόνα 3.46.** Φάσμα NOESY (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) 3-Ο-καφεοϋλο-(+)-κινικού οξέος (**6**).

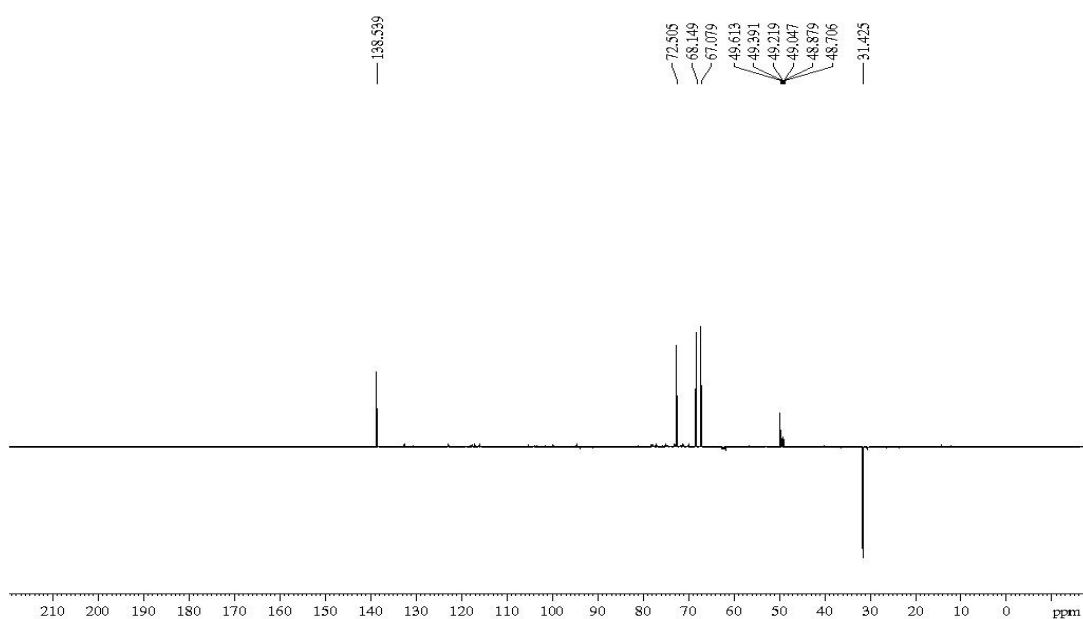


**Εικόνα 3.47.** Φάσμα HMBC (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) 3-Ο-καφεοϋλο-(+)-κινικού οξέος (**6**).

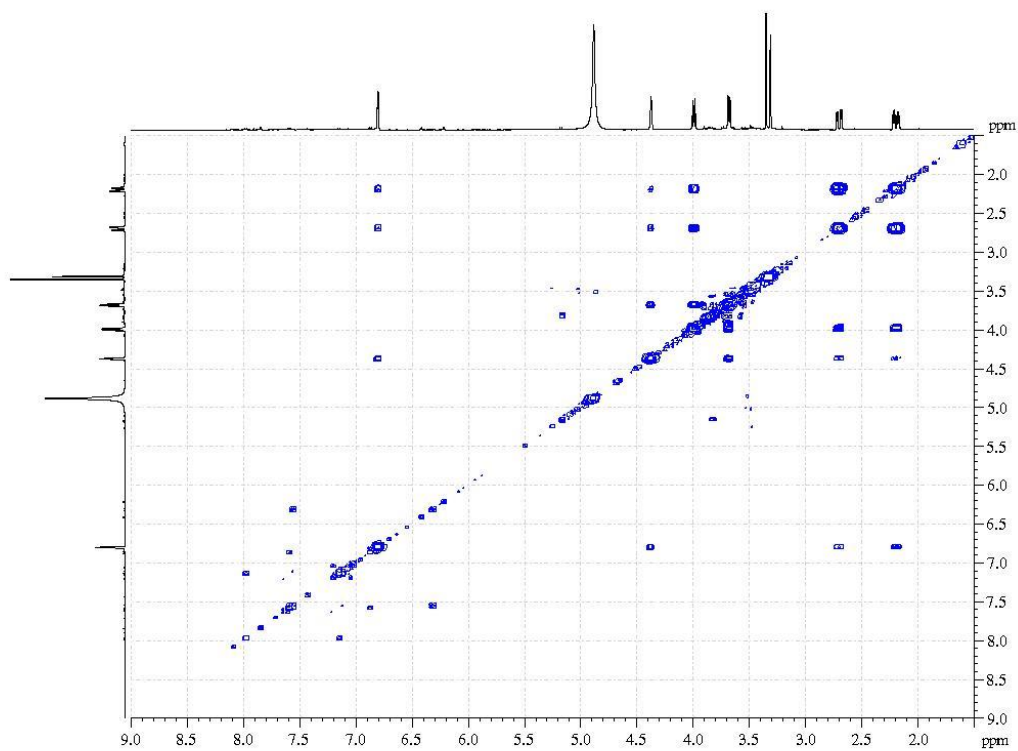
Σικιμικό οξύ (7)



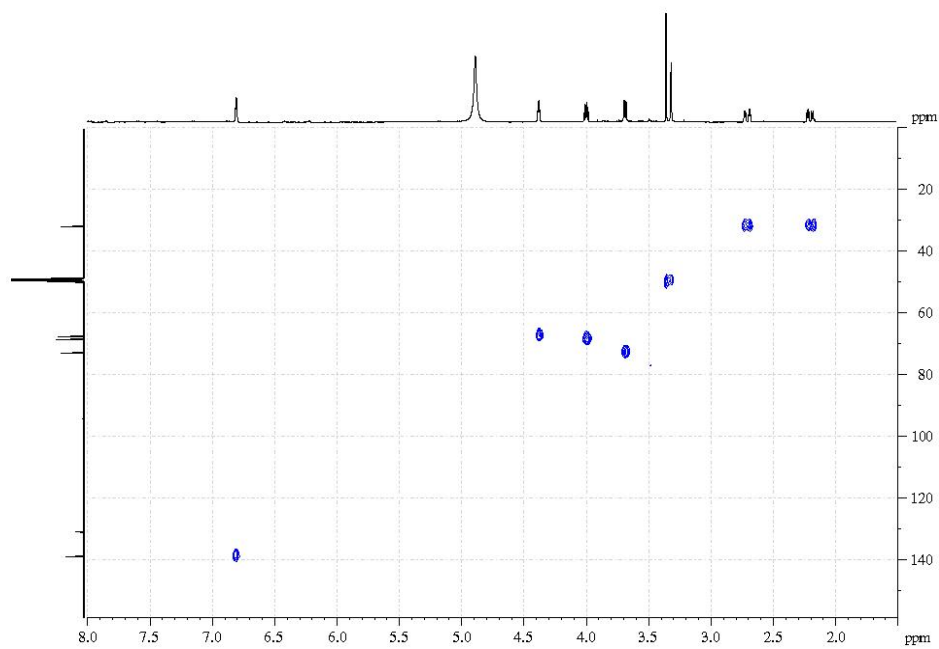
Εικόνα 3.48. Φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) Σικιμικού οξέος (7).



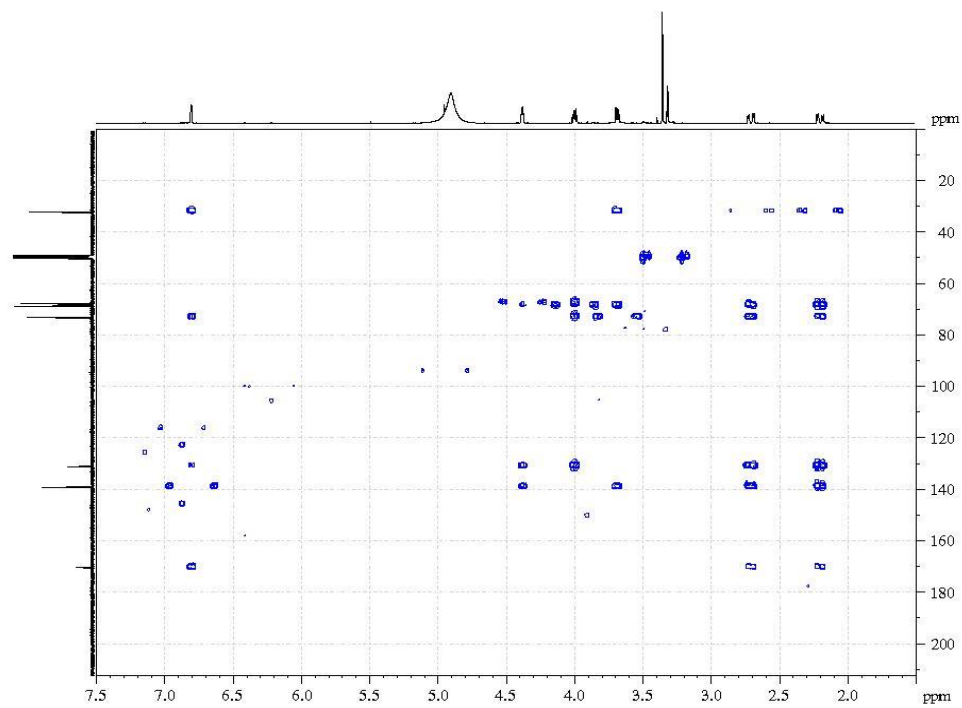
Εικόνα 3.49. Φάσμα DEPT-135 (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) Σικιμικού οξέος (7).



**Εικόνα 3.50.** Φάσμα COSY (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) Σικιμικού οξέος (7).

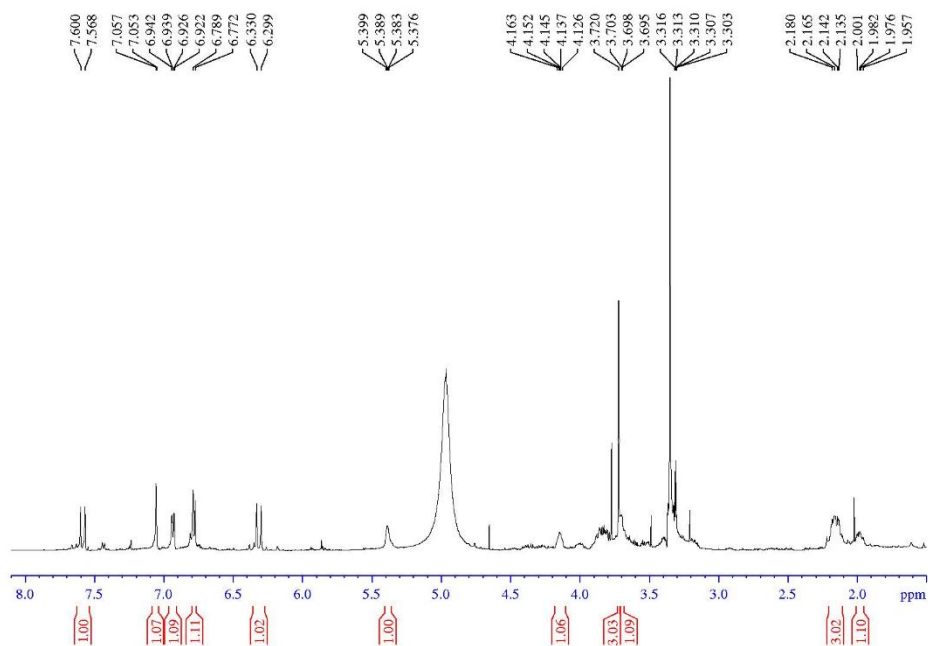


**Εικόνα 3.51.** Φάσμα HSQC (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) Σικιμικού οξέος (7).

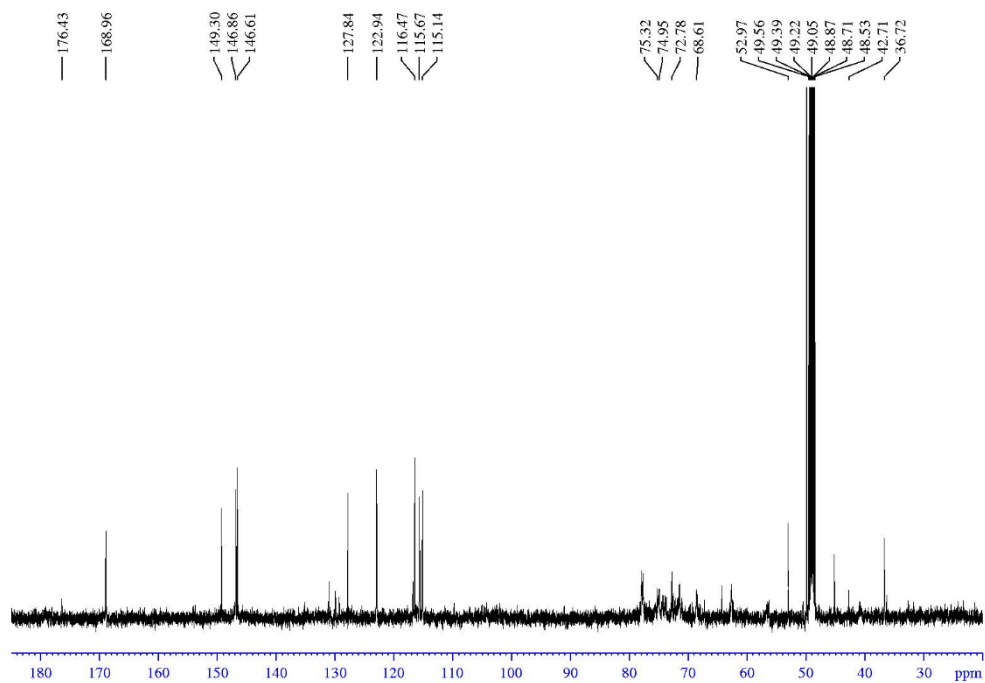


Εικόνα 3.52. Φάσμα HMBC (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) Σικμικού οξέος (7).

Μεθυλεστέρας- 3-Ο-καφεοϋλο-κινικού οξέος (8)



Εικόνα 3.53. Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) ένωσης (8).



Εικόνα 3.54. Φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) ένωσης (8).

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

- <sup>1</sup> Robson, N.; Strid, A. Hypericum. In: Strid, A. (Ed.), Mountain Flora of Greece. *Cambridge University Press, Cambridge* **1986**, *1*, 594-608.
- <sup>2</sup> Ernst, E. Hypericum: The Genus Hypericum (Medicinal and Aromatic Plants-Industrial Profiles); Vol. 31, Taylor & Francis, London, **2003**.
- <sup>3</sup> Robson, N. Studies in the Genus Hypericum L. (Guttiferae) 4. Section 7. Roscyna to 9. Hypericum sensu lato (part 1). *Bull. Br. Museum (Natural Hist.)* **2001**, *37*, 37–88.
- <sup>4</sup> Crockett, S.; Robson, N. Taxonomy and Chemotaxonomy of the Genus Hypericum. *Med. Aromat. Plant Sci. Biotechnol.* **2011**, *5*, 1–13.
- <sup>5</sup> Bennett J.; Brown C. Use of Herbal Remedies by Patients in a Health Maintenance Organization. *J. Am. Pharm. Assoc.* **2000**, *40*, 353-358.
- <sup>6</sup> Kitanov, G.M. Hypericin and pseudohypericin in some *Hypericum* species. *Biochem. Syst. Ecol.* **2001**, *29*, 171–178.
- <sup>7</sup> Gurevich, A.I.; Dobrynin, V.N.; Kolossov, M.N.; Popravko, S.A.; Ryabova, I.D.; Chernov, B.K.; Der- bentseva, N.A.; Aizenman, B.E.; Garagulya, A.D. Hyperforin, an antibiotic from *Hypericum perforatum* L. *Antibiotici (Moskow)* **1971**, *16*, 510–13.
- <sup>8</sup> Liu, F.; Pan, C.; Drumm, P.; Ang, C.Y.W. Liquid chromatography–mass spectrometry studies of St. John’s wort methanol extraction active constituents and their transformation *J. Pharmac. and Biomed. Anal.* **2005**, *37*, 303–312.
- <sup>9</sup> Beerhues, L. Hyperforin. *Phytochemistry* **2006**, *67*, 2201-2207.
- <sup>10</sup> Smelcerovic, A.; Piteller, M. Phytochemical analysis of nine *Hypericum* L. species from Serbia and the F.Y.R. Macedonia. *Pharmazie* **2006**, *61*(3), 251-2.

- 
- <sup>11</sup> Alali, F. Q.; Tawaha, K. Dereplication of bioactive constituents of the genus *hypericum* using LC-(+)-ESI-MS and LC-PDA techniques: *Hypericum triqueterifolium* as a case study. *Saudi Pharm. J.* **2009**, *17*, 269–274.
- <sup>12</sup> Alali, F. Q.; Tawaha, K.; Gharaibeh, M. LC-MS and LC-PDA Analysis of *Hypericum empetrifolium* and *Hypericum sinaicum* Z. *Naturforsch.* **2009**, *64 c*, 476 – 482.
- <sup>13</sup> Tatsis, E.C.; Boeren, S.; Exarchou, V.; Troganis, A.N.; Vervoort, J.; Gerothanassis, I.P. Identification of the major constituents of *Hypericum perforatum* by LC/SPE/NMR and/or LC/MS. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 383–393.
- <sup>14</sup> Klejdus B.; Kováčik J.; Babula P. PAL inhibitor evokes different responses in two *Hypericum* species. *Plant Physiol. Biochem.*, **2013**, *63*, 82-88.
- <sup>15</sup> Dorossiev, K. Determination of flavonoids in *Hypericum perforatum*. *Pharmazie* **1985**, *40*, 585–6.
- <sup>16</sup> Jürgenliemk, G.; Nahrstedt, J. Phenolic compounds from *Hypericum perforatum*. *Planta Med.* **2002**, *68*, 8891.
- <sup>17</sup> Middleton, E. The flavonoids. *Trends Pharmacol. Sci.* **1984**, *5*, 335- 338.
- <sup>18</sup> Berghöfer, R.; Hölzl, J. Biflavonoids in *Hypericum perforatum*; Part 1. Isolation of I3, II8-biapigenin. *Planta Med.* **1987**, *53*, 216–17.
- <sup>19</sup> Griesbach, R. J. Biochemistry and Genetics of Flower Color. *Plant Breed. Rev.* **2010**, *25*, 89–114.
- <sup>20</sup> Takahashi, A.; Ohnishi, T. The Significance of the Study about the Biological Effects of Solar Ultraviolet Radiation Using the Exposed Facility on the International Space Station. *Biol. Sci. Sp.* **2004**, *18*, 255-260.
- <sup>21</sup> Samanta, A.; Das, G.; Das, S. Roles of Flavonoids in Plants. *Pharm. Sci Tech.* **2011**, *6*, 12-35.

- 
- <sup>22</sup> Burak M.; Imen Y. Flavonoids and their antioxidant properties. *Turkiye Klin Tip Bil Derg* **1999**, *19*, (296–304).
- <sup>23</sup> Schmidt, W.; Abd El-Mawla; A.M.A.; Wolfender, J.L.; Hostettmann, K.; Beerhues, L. Xanthones in cell cultures of *Hypericum androsaemum*. *Planta Med.* **2000**, *66*, 380–381.
- <sup>24</sup> Brantner, A.; Kartnig, T.; Quehenberger, F. Vergleichende phytochemische untersuchungen an *Hypericum perforatum* L. and *Hypericum maculatum* Crantz. *Sci. Pharm.* **1994**, *62*, 261-276.
- <sup>25</sup> Saddiqe, Z.; Naeem, I.; Maimoona, A. A Review of the Antibacterial Activity of *Hypericum Perforatum* L. *Journal of Ethnopharmacol.* **2010**, *131*, 511-521.
- <sup>26</sup> Ploss, O.; Petereit, F.; Nahrstedt A. Procyanidins from the herb of *Hypericum perforatum*. *Pharmazie* **2001**, *56*, 509-511.
- <sup>27</sup> Upadhyay, R.; Mohan Rao, L. J. An Outlook on Chlorogenic Acids-Occurrence, Chemistry, Technology, and Biological Activities. *Crit. Rev. Food Sci.Nutr.* **2013**, *53*, 968-984.
- <sup>28</sup> Klejdus, B.; Kováčik, J.; Babula, P. PAL Inhibitor Evokes Different Responses in Two *Hypericum* Species. *Plant Physiol. Biochem.* **2013**, *63*, 82-88.
- <sup>29</sup> Kaliora, A. C.; Kogiannou, D. A. A.; Kefalas, P.; Papassideri, I. S.; Kalogeropoulos, N. Phenolic Profiles and Antioxidant and Anticarcinogenic Activities of Greek Herbal Infusions; Balancing Delight and Chemoprevention? *Food Chem.* **2014**, *142*, 233–241.
- <sup>30</sup> Kalogeropoulos, N.; Yannakopoulou, K.; Gioxari, A.; Chiou, A.; Makris, D.P. Polyphenol characterization and encapsulation in b-cyclodextrin of a flavonoid-rich *Hypericum perforatum* (St. John's wort) extract LWT. *Food Sci. Technol.* **2010**, *43*, 882–889.
- <sup>31</sup> Jurgenliemk, G.; Nahrstedt A. Phenolic compounds from *Hypericum perforatum*. *Planta Med.* **2002**, *68*(1), 88-91.



- 
- <sup>32</sup> Ferrari, F.; Pasqua, G.; Monacelli, B.; Cimino, P.; Botta, B. Xanthenes from Calli of *Hypericum Perforatum* Subsp. *Perforatum*. *Nat. Prod. Res.* **2005**, *19*(2), 171-176.
- <sup>33</sup> Fiamegos, Y.C.; Nanos, C.G.; Vervoort, J.; Stalikas, C.D. Analytical procedure for the in-vial derivatization—extraction of phenolic acids and flavonoids in methanolic and aqueous plant extracts followed by gas chromatography with mass-selective detection. *J. Chromatog. A* **2004**, *1041*, 11–18.
- <sup>34</sup> Kitanov, G.M. Biflavone, flavonol and xanthone glycosides from *Hypericum aucheri*. *Chem. Nat. Compd.* **1988**, *24*, 390-391.
- <sup>35</sup> El-Seedi, H.R.; Ringbom, T.; Torssell, K.; Bohlin, L. Constituents of *Hypericum laricifolium* and their cyclooxygenase (COX) enzyme activities. *Chem. Pharmaceut. Bull.* **2003**, *51*, 1439-1440.
- <sup>36</sup> Cirak, C.; Radusiene, J.; Janulis, V.; Ivanauskas, L. b. Secondary metabolites in *Hypericum perforatum*: variation among plant parts and phenological stages *Bot. Helv.* **2007**, *117*, 29–36.
- <sup>37</sup> Barnes, J.; Anderson, L.A.; Phillipson, J.D. St John's wort (*Hypericum perforatum* L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. *J.Pharm. Pharmacol.* **2001**, *53*, 583-600.
- <sup>38</sup> Kitanov, G.M. and Blinova, K.F. Modern state of the chemical study of species of the genus *Hypericum*. *Khim. Prirod. Soedin.* **1987**, 185–203.
- <sup>39</sup> Radusiene, J.; Judzentiene, A.; Bernotiene, G. Essential oil composition and variability of *Hypericum perforatum* L. growing in Lithuania. *Biochem. Syst. Ecol.* **2005**, *33*, 113–124.
- <sup>40</sup> Schwob, I.; Bessiere, J.M.; Masotti, V.; Viano, J. Changes in essential oil composition in Saint John's wort (*Hypericum perforatum* L.) aerial parts during its phenological cycle. *Biochem. Syst. Ecol.* **2004**, *32*, 735-745.

- 
- <sup>41</sup> Saroglou, V.; Marin, P. D.; Rancic, A.; Veljic, M.; Skaltsa, H. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of six *Hypericum* species from Serbia. *Biochem. Syst. Ecol.* **2007**, *35*,146-152.
- <sup>42</sup> Kosuth, J.; Koperdakova, J.; Tolonen, A.; Hohtola, A.; Cellarova, E. The content of hypericins and phloroglucinols in *Hypericum perforatum* L. seedlings at early stage of development. *Plant Sci.* **2003**, *165*, 515-521.
- <sup>43</sup> Bruni, R.; Sacchetti, G. Factors affecting polyphenol biosynthesis in wild and field grown St. John's wort *Hypericum perforatum* L. Hypericaceae/Guttiferae). *Molecules* **2009**, *14*, 682-725.
- <sup>44</sup> Pietta, P.; Gardana, C.; Pietta A. Comparative evaluation of St. John's Wort from different Italian regions. *Farmaco* **2001**, *56*, 491-496.
- <sup>45</sup> Tekelova, D.; Repcak, M.; Zemkova, E.; Toth, J. Quantitative changes in dianthrone, hyperforin and flavonoids content in the flower ontogenesis of *Hypericum perforatum*. *Planta Med.* **2000**, *66*, 778-780.
- <sup>46</sup> Crockett, S.L.; Schaneberg, B.; Khan I.A. Phytochemical profiling of new and old world *Hypericum* (St. John's wort) species. *Phytochem. Anal.* **2005**, *16*, 479-485.
- <sup>47</sup> Crockett, S.L.; Robson, N.K. Taxonomy and chemotaxonomy of the genus *Hypericum*. *Medical and Aromatic Plant Sci. Biotechnol.* **2011**, *5*(special Issue 1) 1-13.
- <sup>48</sup> Crockett, S.L.; Boevé, J.-L. Flavonoid glycosides and naphthodianthrone in the sawfly *Tenthredo zonula* and its host-plants, *Hypericum perforatum* and *H. hirsutum*. *J Chem Ecol.* **2011**, *37*, 943–952.
- <sup>49</sup> Bruni, R.; Sacchetti, G. Factors affecting polyphenol biosynthesis in wild and field grown St. John's wort (*Hypericum perforatum* L. Hypericaceae/Guttiferae). *Molecules* **2009**, *14*, 682-725.

---

<sup>50</sup> Kitanov, M.K. Hypericin and pseudohypericin in some *Hypericum* species. *Biochem. Syst. Ecol.* **2001**, *29*, 171-178.

<sup>51</sup> Russo, E.; Scicchitano, F.; Whalley, B. J.; Mazzitello, C.; Ciriaco, M.; Esposito, S.; Patanè, M.; Upton, R.; Pugliese, M.; Chimirri, S.; Mammì, M.; Palleria, C.; De Sarro, G. B. *Hypericum perforatum*: Pharmacokinetic, Mechanism of Action, Tolerability, and Clinical Drug–Drug Interactions. *Phytother. Res.* **2014**, *28*, 643-55.

<sup>52</sup> Schempp, C.; Pelz, K.; Wittmer, A.; Schopf, E.; Simon, J.C. Antibacterial activity of hyperforin from St John's wort, against multiresistant *Staphylococcus aureus* and gram-positive bacteria. *Lancet* **1999**, *353*, 2129.

<sup>53</sup> Brondz, I.; Greibrokk, T.; Groth, P. A.; Aasen, A. J. The relative stereochemistry of hyperforin. An antibiotic from *Hypericum perforatum* L. *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 1299-1300.

<sup>54</sup> Lavie, G.; Mazur, Y.; Lavie, D.; Meruelo, D. The chemical and biological properties of hypericin - a compound with a broad range of biological activities. *Med. Res. Rev.* **1995**, *15*, 111-119.

<sup>55</sup> Lopez-Bazzocchi, I.; Hudson, J.B.; Towers, G.H. 1991. Antiviral activity of the photoactive plant pigment hypericin. *Photochem. Photobiol.* **1991**, *54*, 95-98.

<sup>56</sup> Suzuki, O.; Katsumata, Y.; Oya, M.; Bladt, S.; Wagner H. Inhibition of monoamine oxidase by hypericin. *Planta Med.* **1984**, *50*, 272–274.

<sup>57</sup> Denke, A.; Schneider, W.; Elstner, F.F. Biochemical activities of extracts from *Hypericum perforatum* L. 2nd communication: Inhibition of metenkephaline and tyrosine dimerization. *Drug Res.* **1999**, *49*, 109–114.

<sup>58</sup> Beerhues, L. Hyperforin. *Phytochemistry* **2006**, *67*, 2201-2207.

<sup>59</sup> Muller, W. E. Current St John's wort research from mode of action to clinical efficacy. *Pharmacol Res.* **2003**, *47*, 101-109.

- 
- <sup>60</sup> Butterweck, V.; Christoffel, V.; Nahrstedt, A.; Petereit, F.; Spengler, B.; Winterhoff, H. Step by step removal of hyperforin and hypericin: activity profile of different *Hypericum* preparations in behavioral models. *Life Sci* **2003**, *73*, 627-639.
- <sup>61</sup> Silva, B.A.; Malva, J. O.; Dias, A.C.P. St John's wort (*Hypericum perforatum*) extracts and isolated phenolic compounds are effective antioxidants in several in vitro models of oxidative stress. *Food Chemistry* **2008**, *110*, 611-619.
- <sup>62</sup> Gioti, E.; Fiamegos, Y.; Skalkos, D.; Stalikas, C. Antioxidant activity and bioactive components of the aerial parts of *Hypericum perforatum* L. from Epirus, Greece. *Food Chem.* **2009**, *117*, 398-404.
- <sup>63</sup> Dall'Agnol, R.; Ferraz, A.; Bernardi, A. P.; Albring, D.; Nör, C.; Sarmiento, L.; Lamb, L.; Hass, M.; Von Poser, G. L.; Schapoval, E. E. S. Antimicrobial Activity of Some *Hypericum* Species. *Phytomedicine* **2003**, *10*, 511-516.
- <sup>64</sup> Schempp, C. M.; Winghofer, B.; Lüdtke, R.; Simon-Haarhaus, B.; Schöpf, E.; Simon, J. C. Topical Application of St John's Wort (*Hypericum Perforatum* L.) and of Its Metabolite Hyperforin Inhibits the Allostimulatory Capacity of Epidermal Cells. *Br. J. Dermatol.* **2000**, *142*, 979-984.
- <sup>65</sup> Martínez-Poveda, B.; Quesada, A. R.; Medina, M. Á. Hypericin in the Dark Inhibits Key Steps of Angiogenesis in Vitro. *Eur. J. Pharmacol.* **2005**, *516*, 97-103.
- <sup>66</sup> Trovato, A.; Raneri, E.; Kouladis, M.; Tzakou, O.; Taviano, M. F.; Galati, E. M. Anti-Inflammatory and Analgesic Activity of *Hypericum Empetrifolium* Wild. (Guttiferae). *Farmaco* **2001**, *56*, 455-457.
- <sup>67</sup> Meral, G.; Karabay; Ülkü, N. In Vitro Antibacterial Activities of Three *Hypericum* Species from West Anatolia. *Turkish Electron. J. Biotechnol. Spec. Issue* **2002**, *7*, 6-10.
- <sup>68</sup> Kitanov, M. G. Hypericin and pseudohypericin in some *Hypericum* species. *Biochem. System. Ecol.* **2001**, *29*, 171-178.

- 
- <sup>69</sup> Hashida, W.; Tanaka, N.; Kashiwada, Y.; Sekiya, M.; Ikeshiro, Y.; Takaishi, Y. Tomoeones A-H, Cytotoxic Phloroglucinol Derivatives from *Hypericum Ascyron*. *Phytochemistry* **2008**, *69*, 2225–2230.
- <sup>70</sup> Schmidt, S.; Jürgenliemk, G.; Skaltsa, H.; Heilmann, J. Phloroglucinol Derivatives from *Hypericum Empetrifolium* with Antiproliferative Activity on Endothelial Cells. *Phytochemistry* **2012**, *77*, 218–225.
- <sup>71</sup> Paris, R.; Nothis A. *Plant. Med. Phytother.* **1970**, *4*, 63.
- <sup>72</sup> Kim, S. M.; Kang, K.; Jho, E. H.; Jung, Y. J.; Nho, C. W.; Um, B. H.; Pan, C. H. Hepatoprotective Effect of Flavonoid Glycosides from *Lespedeza Cuneata* against Oxidative Stress Induced by Tert-Butyl Hydroperoxide. *Phytother. Res.* **2011**, *25* (7).
- <sup>73</sup> Shin, H.; Chung, H.; Park, B.; Lee, K. Y. Identification of Antioxidative Constituents from *Polygonum Aviculare* Using LC-MS Coupled with DPPH Assay. *Nat. Prod. Sci.* **2016**, *22* (1), 64–69.
- <sup>74</sup> Wei, Y.; Xie, Q.; Dong, W.; Ito, Y. Separation of Epigallocatechin and Flavonoids from *Hypericum Perforatum* L. by High-Speed Counter-Current Chromatography and Preparative High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216* (19), 4313–4318.
- <sup>75</sup> Lee, K. J.; Song, N.-Y.; Ma, J. Y. Isolation and Bioactivity Analysis of Salidroside from *Acer Tegmentosum* Using On-Line Screening HPLC-ABTS + Assay *J. Anal. Methods Chem.* **2014**, *29* (2), 124–130.
- <sup>76</sup> Fraisse, D.; Heitz, A.; Carnat, A.; Carnat, A. P.; Lamaison, J. L. Quercetin 3-Arabinopyranoside, a Major Flavonoid Compound from *Alchemilla Xanthochlora*. *Fitoterapia* **2000**, *71* (4), 463–464.
- <sup>77</sup> Schieber, A.; Hilt, P.; Beifuss, U.; Carle, R.; Foodstuff, S. P. Elution Order of Quercetin Glycosides from Apple Pomace Extracts on a New HPLC Stationary Phase with Hydrophilic Endcapping. *J. Sep. Sci.* **2002**, 361–364.

- 
- <sup>78</sup> Miranda, M. M. F. S.; Costa, S. S.; Wigg, M. D.; Simoni, I. C.; de Almeida, A. P.; Lagrota, M. H. C. Flavonol Monoglycosides Isolated from the Antiviral Fractions of *Persea Americana* (Lauraceae) Leaf Infusion. *Phytother. Res.* **1998**, *12* (8), 562–567.
- <sup>79</sup> Wang, H.; Du, Y. J.; Song, H. C.  $\alpha$ -Glucosidase and  $\alpha$ -Amylase Inhibitory Activities of Guava Leaves. *Food Chem.* **2010**, *123* (1), 6–13.
- <sup>80</sup> Fraisse, D.; Heitz, A.; Carnat, A.; Carnat, A. P.; Lamaison, J. L. Quercetin 3-Arabinopyranoside, a Major Flavonoid Compound from *Alchemilla Xanthochlora*. *Fitoterapia* **2000**, *71* (4), 463–464.
- <sup>81</sup> García-Bores, A. M.; Arciniegas-Arciniegas, A.; Reyna-Campos, A.; Céspedes-Acuña, C.; Avila-Suárez, B.; Alarcón-Enos, J.; Flores-Maya, S.; Espinosa-González, A. M.; de Vivar-Romo, A. R.; Pérez-Plasencia, C.; et al. Phytochemical Composition and Biological Activities of *Dyssodia Tagetiflora* Lag. *Chem. Biodivers.* **2018**, *15*.
- <sup>82</sup> Kim, H.; Lee, Y. S. Identification of New DicaFFEoylquinic Acids from *Chrysanthemum Morifolium* and Their Antioxidant Activities. *Planta Med.* **2005**, *71*, 871–876.
- <sup>83</sup> Wang, Y.; Wray, V.; Tsevegsuren, N.; Lin, W.; Proksch, P. Phenolic Compounds from the Mongolian Medicinal Plant *Scorzonera Radiata*. *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* **2012**, *67*, 135–143.
- <sup>84</sup> Haslam, E.; Makinson, G. K.; Naumann, M. O.; Cunningham, J. Synthesis and Properties of Some Hydroxycinnamoyl Esters of Quinic Acid. *J. Chem. Soc.* **1964**, 2137–2146.
- <sup>85</sup> Venditti, A.; Frezza, C.; Sciubba, F.; Foddai, S.; Serafini, M.; Bianco, A. Terpenoids and More Polar Compounds from the Male Cones of *Wollemia Nobilis*. *Chem. Biodivers.* **2017**, *14*.

---

<sup>86</sup> Liu, L.; Li, S.; Wan, C.; Chen, C.; Fan, S. Caffeoylquinic Acids from the Aerial Parts of *Chrysanthemum Coronarium* L. *Plants* **2017**, *6*, 10.

<sup>87</sup> Zhao, Y.; Geng, C.; Ma, Y.; Huang, X.; Chen, H.; Cao, T.; He, K.; Wang, H.; Zhang, X.; Chen, J. UFLC / MS-IT-TOF Guided Isolation of Anti-HBV Active Chlorogenic Acid Analogues from *Artemisia Capillaris* as a Traditional Chinese Herb for the Treatment of Hepatitis. *J. Ethnopharmacol.* **2014**, *156*, 147–154.

<sup>88</sup> Nakatani, N.; Kayano, S.; Kikuzaki, H.; Sumino, K.; Katagiri, K. Identification, Quantitative Determination, and Antioxidative Activities of Chlorogenic Acid Isomers in Prune (*Prunus Domestica* L.). *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 5512–5516.

<sup>89</sup> Fischer, H. O. L.; Dangschat, G. Quinic Acid and Derivatives. VII. Configuration of Shikimic Acid. *Helv. Chim. Acta* **1935**, *65*, 1009.

<sup>90</sup> Fischer, H. O. L.; Dangschat, G. Quinic acid and derivatives. IV. Degradation of quinic acid to citric acid. *Helv. Chim. Acta* **1934**, *17*, 1196.

<sup>91</sup> Freudenberg, K., Meisenheimer, H., Lane, J. T. and Plankenhorn, E., Die Konfiguration des tertiären Kohlenstoffatoms. III. *Liebigs Ann. Chem.*, **1940**, *543*, 162–171.

<sup>92</sup> Karrer, P. and Link, K. P., Zur Kenntnis der Acylderivate der Chinasäure. *Helv. Chim. Acta*, **1927**, *10*, 794–799.

<sup>93</sup> Borah, J. C. Shikimic Acid: A Highly Prospective Molecule in Pharmaceutical Industry. *Current Science*. **2015**, *109*, 1672-1679.

<sup>94</sup> Chang, Y. C.; Almy, E. A.; Blamer, G. A.; Gray, J. I.; Frost, J. W.; Strasburg, G. M. Antioxidant Activity of 3-Dehydroshikimic Acid in Liposomes, Emulsions, and Bulk Oil. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 2753–2757.

- 
- <sup>95</sup> Bai, J.; Wu, Y.; Liu, X.; Zhong, K.; Huang, Y.; Gao, H. Antibacterial Activity of Shikimic Acid from Pine Needles of *Cedrus Deodara* against *Staphylococcus Aureus* through Damage to Cell Membrane. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *158*, 408–415.
- <sup>96</sup> Vergara-Jimenez, M.; Almatrafi, M. M.; Fernandez, M. L. Bioactive Components in Moringa Oleifera Leaves Protect against Chronic Disease. *Antioxidants* **2017**, *6*, 91.
- <sup>97</sup> Park, H.-J. Chemistry and Pharmacological Action of Caffeoylquinic Acid Derivatives and Pharmaceutical Utilization of Chwinamul (Korean Mountainous Vegetable). *Arch. Pharm. Res.* **2010**, *33*, 1703-1720.
- <sup>98</sup> Morishita, H.; Ohnishi, M. Absorption, Metabolism and Biological Activities of Chlorogenic Acids and Related Compounds. *Stud. Nat. Prod. Chem.* **2001**, *25*, 919-953.
- <sup>99</sup> Pandey, K.B.; Rizvi, S.I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2009**, *2*, 270–278.
- <sup>100</sup> Dall’Agnol, R.; Ferraz, A.; Bernardi, A. P.; Albring, D.; Nör, C.; Sarmiento, L.; Lamb, L.; Hass, M.; Von Poser, G. L.; Schapoval, E. E. S. Antimicrobial Activity of Some Hypericum Species. *Phytomedicine* **2003**, *10*, 511-516.
- <sup>101</sup> Razavi, S. M.; Zahri, S.; Zarrini, G.; Nazemiyeh, H.; Mohammadi, S. Biological Activity of Quercetin-3-O-Glucoside, a Known Plant Flavonoid. *Bioorg. Khim.* **2009**, *35*, 376-378.
- <sup>102</sup> Ku, S. K.; Zhou, W.; Lee, W.; Han, M. S.; Na, M. K.; Bae, J. S. Anti-Inflammatory Effects of Hyperoside in Human Endothelial Cells and in Mice. *Inflammation* **2015**, *38*, 784-799.
- <sup>103</sup> C.M., S.; T., W.; S., H.; J.C., S. Topical Treatment of Atopic Dermatitis with St. John’s Wort Cream - A Randomized, Placebo Controlled, Double Blind Half-Side Comparison. *Phytomedicine* **2003**, *Supplement IV*, 31.
- <sup>104</sup> Vo, V. A.; Lee, J. W.; Chang, J. E.; Kim, J. Y.; Kim, N. H.; Lee, H. J.; Kim, S. S.; Chun, W.; Kwon, Y. S. Avicularin Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Response



---

by Suppressing ERK Phosphorylation in RAW 264.7 Macrophages. *Biomol. Ther.* **2012**, *20*, 532-537.

<sup>105</sup> Demirkiran, O.; Ahmad Mesaik, M.; Beynek, H.; Abbaskhan, A.; Iqbal Choudhary, M. Immunosuppressive Phenolic Constituents from *Hypericum Montbretii* Spach. *Rec. Nat. Prod.* **2013**, *7*, 210-219.

<sup>106</sup> Scotti, F.; Löbel, K.; Booker, A.; Heinrich, M. St. John's Wort (*Hypericum Perforatum*) Products – How Variable Is the Primary Material? *Front. Plant Sci.* **2019**, *9*, 1-12.

<sup>107</sup> Jürgenliemk, G.; Nahrstedt, A. Phenolic Compounds from *Hypericum Perforatum*. *Planta Med.* **2002**, *68*, 88-91.