

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ
ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ *HYPERICUM HIRCINUM***

ΧΑΡΙΤΩΜΕΝΗ Δ. ΑΓΓΕΛΗ

**ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ Ε. ΚΑΤΕΡΙΝΟΠΟΥΛΟΣ**

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ
ΙΟΥΛΙΟΣ 2020**

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το γένος *Hypericum* απαντάται με 40 είδη και υποείδη στις 13 διαφορετικές φυτογεωγραφικές περιοχές της Ελλάδας. Στην παραδοσιακή ιατρική χρησιμοποιείται από τον τοπικό πληθυσμό ως θεραπευτικό για την επούλωση πληγών, ως αντιοξειδωτικό, αντιμικροβιακό και αντιπαρασιτικό. Το είδος *Hypericum hircinum* φύεται κυρίως σε περιοχές της Κρήτης και αποτελεί ένα από τα λιγότερο μελετημένα είδη του γένους.

Δείγματα φύλλων του φυτού ξηράθηκαν και εκχυλίστηκαν διαδοχικά μέσω της διάταξης Soxhlet με πετρελαϊκό αιθέρα, διχλωρομεθάνιο και μεθανόλη. Τα εκχυλίσματα υποβλήθηκαν σε περαιτέρω εκχυλίσεις και χρωματογραφίες στήλης. Δεδομένου ότι το πολικό εκχύλισμα περιέχει εύρος ενώσεων υπεύθυνων για την θεραπευτική δράση του φυτού, πραγματοποιήθηκε επιπλέον κατεργασία του μεθανολικού εκχυλίσματος, που υποβλήθηκε σε εκχυλίσεις υγρού με διαλύτες: διαιθυλαιθέρα, οξικό αιθυλεστέρα και βουτανόλη. Σε αντίθεση τα άνθη του φυτού εκχυλίστηκαν με ψυχρή εκχύλιση με διαλύτη αιθανόλη. Με τη χρήση φασματοσκοπίας NMR και ανάλυσης με ESI-MS, ταυτοποιήθηκαν δευτερογενείς μεταβολίτες που ανήκουν στην κατηγορία των φλαβονοειδών: υπεροσίδης, αβικουλαρίνη καθώς και άλλα παράγωγα κερκετίνης.

Πίνακας περιεχομένων

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	4
1.1. Το γένος <i>Hypericum</i>	5
1.1.1 Χαρακτηριστικά του γένους <i>Hypericum</i>	5
1.1.2. Το όνομα <i>Hypericum</i>	5
1.1.3. Χρήση του <i>Hypericum</i> στην θεραπευτική	6
1.1.4. Η χημική σύσταση του γένους <i>Hypericum</i>	6
1.1.5. Ποικιλότητα δευτερογενών μεταβολιτών του γένους <i>Hypericum</i>	8
1.2. <i>Hypericum hircinum</i>	9
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 : ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	12
2.1.1. Χρωματογραφικές Μέθοδοι	13
2.1.2. Φασματοσκοπικές Μέθοδοι	14
2.2. Εκχύλιση των συστατικών του φυτού.....	15
2.2.1. Ψυχρή εκχύλιση.....	16
2.2.2 Θερμή εκχύλιση με διάταξη Soxhlet	17
2.2.3. Εκχύλιση υγρού-υγρού στο μεθανολικό εκχύλισμα	18
2.3. Χρωματογραφικός διαχωρισμός εκχυλισμάτων	20
2.3.1. Διαχωρισμός συστατικών του εκχυλίσματος οξικού αιθυλεστέρα (κωδικός HMEA)	20
2.3.2. Διαχωρισμός συστατικών κλασμάτων HMEA-JG'D και HMEA-JG'E με PTLC (Preparative Thin Layer Chromatography).	23
2.3.3. Διαχωρισμός συστατικών του εκχυλίσματος αιθανόλης, ψυχρής εκχύλισης των ανθών (κωδικός HEτα).....	25
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	27
3.1 Ταυτοποίηση συστατικών πολικού εκχυλίσματος	28
3.1.1. Δευτερογενής μεταβολίτης: Υπεροσίδης (1).....	28
3.1.2. Δευτερογενής μεταβολίτης: Αβικουλαρίνη (2)	31
3.1.3. Δευτερογενής μεταβολίτης: Παράγωγο κερκετίνης (3).	34
3.1.3. Δευτερογενής μεταβολίτης: Ένωση (4).	36
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	39
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	40
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	43

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Το γένος *Hypericum*

1.1.1 Χαρακτηριστικά του γένους *Hypericum*

Το γένος *Hypericum* είναι ένα από τα πιο εκτεταμένα της οικογένειας Hypericaceae, και ανήκει στην υποκατηγορία Clusiaceae (γνωστή και ως Guttiferae). Φύεται σε περιοχές της Ευρώπης, της Ασίας, της Βόρειας Αμερικής καθώς και της Βόρειας Αφρικής. Το γένος *Hypericum* περιλαμβάνει 485 είδη (taxa), τα οποία ταξινομούνται σε 36 τμήματα (sections). Στην Ευρώπη το γένος αντιπροσωπεύεται από 61 είδη. Στην Ελλάδα απαντώνται 40 είδη και υποείδη, τα οποία διακρίνονται σε 13 τμήματα. Από αυτά 12 είναι ελληνικά ενδημικά ενώ τα υπόλοιπα 28 έχουν ευρύτερη γεωγραφική εξάπλωση.

Το γένος αντιπροσωπεύεται κυρίως από πόες και θάμνους, κυρίως πολυετείς. Χαρακτηριστικά αυτών των φυτών είναι τα φύλλα, τα άνθη και οι καρποί. Τα φύλλα έχουν ωοειδές σχήμα, φωτεινό πράσινο χρώμα, ο καρπός έχει τη μορφή καψιδίου, είναι συχνά ξηρός και όχι σαρκώδης, ενώ τα ερμαφρόδιτα άνθη τους είναι πυκνά, έντονου κίτρινου χρώματος. Τα φύλλα του φυτού, καλύπτονται από ένα στρώμα ελαιωδών αδένων που αποτελούνται από άχρωμα έλαια και ρητίνες. Οι αδένες αυτοί ανάλογα με τη μορφή και τη διάταξή τους στα φύλλα, αποτελούν το βασικότερο ταξινομικό κριτήριο για τη διάταξη των διαφόρων taxa του γένους.^{1,6}

1.1.2. Το όνομα *Hypericum*

Το υπερικό είναι γνωστό από την αρχαιότητα ως φαρμακευτικό φυτό. Το όνομα *ύπερ-εικόν* προήλθε από τους αρχαίους Έλληνες καθώς ήταν ένα από τα φυτά που κρεμούσαν πάνω από τα θρησκευτικά τους πρόσωπα για να αποτρέψουν το κακό (ύπερ-εικών). Σε άλλες περιοχές το φυτό αναφέρεται ως *fuga daemonum* που σημαίνει «κάνει τους δαίμονες να φύγουν». Η πεποίθηση αυτή ήταν ιδιαίτερα έντονη και ημερομηνίες όπως 31 Οκτωβρίου (Halloween) και 23 Ιουνίου (παγανιστικός εορτασμός), η διακόσμηση των σπιτιών και των θρησκευτικών εικόνων με το *Hypericum* ήταν 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*.^{2,3} Άλλες κοινές ονομασίες του φυτού είναι: σπαθόχορτο, βαλσαμόχορτο, χελωνόχορτο, λειχνόχορτο, περίκι και βότανο του Προδρόμου.¹²

1.1.3. Χρήση του *Hypericum* στην θεραπευτική

Σύγχρονες μελέτες σε είδη του γένους *Hypericum*, καθώς επίσης και η παραδοσιακή ιατρική έχουν οδηγήσει σε μία σειρά παρατηρήσεων και αποτελεσμάτων, τα οποία αποδεικνύουν τη σημαντική βιολογική δραστηριότητα των εκχυλισμάτων του γένους και τα οφέλη τους στην φαρμακευτική. Οι δράσεις των φυτών, αναφέρονται στη χρήση του ολικού εκχυλίσματος και ορισμένες φορές στο έλαιο αυτού. Πολλά είδη του γένους *Hypericum*, έχουν αναφερθεί για την αντιμικροβιακή, αντιφλεγμονώδη, αντιπαρασιτική και γενικότερα για την καταπραϋντική δράση τους. Σύμφωνα με την παραδοσιακή ιατρική το έλαιο φυτών του γένους *Hypericum* χρησιμοποιούνται για την επούλωση των πληγών και των εγκαυμάτων. Επίσης καταπραϋνουν από γαστρεντερικές ενοχλήσεις, και παρουσιάζουν αντιβακτηριακή και αντιοξειδωτική δράση. Ωστόσο η χημική σύσταση του αιθέριου ελαίου κάθε είδους μεταβάλλεται ανάλογα με τις συνθήκες που επικρατούν στο περιβάλλον όπου φύεται το φυτό.

Γενικότερα η θεραπευτική δράση των ειδών του γένους *Hypericum*, αποδίδεται στη χημική τους σύσταση και πιο συγκεκριμένα σε ορισμένες από τις σημαντικότερες κατηγορίες ενώσεων όπως αυτές των ναφθοδιανθρονών, των φλωρογλουκινολικών παραγώγων και των πολυφαινολών. **Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.**^{4,12}

1.1.4. Η χημική σύσταση του γένους *Hypericum*

Το γένος *Hypericum* παρουσιάζει μεγάλη ποικιλομορφία ως προς τις κατηγορίες ενώσεων που περιέχονται σε αυτό. Η χημική σύσταση των φυτών, επηρεάζεται σημαντικά από την γεωγραφική περιοχή όπου φύονται, συνεπώς και το κλίμα, την περίοδο συλλογής, καθώς επίσης και τις συνθήκες αποθήκευσης και επεξεργασίας τους.¹

Οι **ναφθοδιανθρόνες** αποτελούν μια κατηγορία ενώσεων που συναντώνται στα εναέρια μέρη των φυτών, που συνίσταται από τις σημαντικότερες ενώσεις που απαντώνται στο γένος *Hypericum*. Αυτές είναι, η υπερικίνη και η ψευδοϋπερικίνη καθώς και τα πρόδρομα μόρια τους, πρωτοϋπερικίνη και πρωτοψευδροϋπερικίνη. Αυτή η κατηγορία ενώσεων, με πρωταγωνιστή την υπερικίνη έχουν αντιμικροβιακές, αντιφλεγμονώδεις, αντικαταθλιπτικές και αντικαρκινικές δράσεις. Συγκεκριμένα η υπερικίνη μπορεί να δράσει ως ένας φυσικός φωτοευαισθητοποιητής με εφαρμογή στην φωτοδυναμική θεραπεία (PDT). Αυτού του είδους η θεραπεία, απαιτεί την

ύπαρξη ενός φωτοευαίσθητοποιητή, μοριακού οξυγόνου και τέλος την επίδραση κατάλληλης ακτινοβολίας (μήκος κύματος 620-690 nm). Αποτελεί μία μη επεμβατική μέθοδο, η οποία εφαρμόζεται σε πολλές περιπτώσεις για την καταστροφή καρκινικών κυττάρων. Η φωτοευαίσθητη ένωση, στη συγκεκριμένη περίπτωση η υπερικίνη, μετά από μία σειρά φωτοχημικών αντιδράσεων σχηματίζει δραστικές μορφές οξυγόνου, όπως οι ελεύθερες ρίζες. Αυτές επάγουν τον κυτταρικό θάνατο, κάτι το οποίο εφαρμόζεται για την καταστροφή των παθολογικών ιστών.

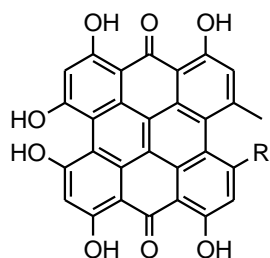
Μία άλλη κατηγορία βιοδραστικών χημικών ενώσεων, είναι τα **φλωρογλουκινολικά παράγωγα**, που συναντώνται στα γόνιμα μέρη των φυτών, κυρίως στους καρπούς. Ενώσεις όπως η υπερφορίνη και η αντι-υπερφορίνη είναι οι κύριες που απαρτίζουν αυτήν την κατηγορία. Το ενδιαφέρον για αυτές τις ενώσεις αυξήθηκε λόγω της αντιμικροβιακής, κυτταροτοξικής και αντικαταθλιπτικής δράσης τους.

Τέλος οι **πολυφαινόλες** αποτελούν μία από τις μεγαλύτερες κατηγορίες ενώσεων, με ιδιαίτερη ποικιλομορφία, η οποία εξαρτάται από το είδος του φυτού, καθώς επίσης και την δρόγη που μελετάται κάθε φορά. Στις πολυφαινόλες, συγκαταλέγονται τα **φλαβονοειδή**, τα οποία είναι ενώσεις που αποτελούνται από έναν σταθερό σκελετό 15 ατόμων άνθρακα, που εμπεριέχονται σε δύο αρωματικούς δακτυλίους και έναν ετεροκυκλικό πυρολικό δακτύλιο.

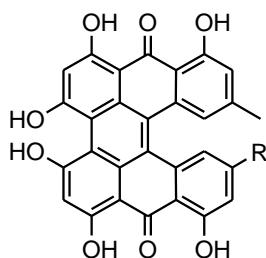
Τα φλαβονοειδή συντίθενται σε συγκεκριμένα σημεία του φυτού και είναι υπεύθυνα για το χρώμα και το άρωμα των ανθέων, αλλά και στον καρπό προκειμένου να προσελκύσουν επικονιαστές και κατά συνέπεια να βοηθήσουν τη βλάστηση των σπορίων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η κατεχίνη. Τα φλαβονοειδή μπορούν να βρεθούν με μορφή άγλυκων, γλυκοζυλιωμένων, μεθυλιωμένων παραγώγων καθώς και ως διφλαβονοειδή. Τα πιο γνωστά είναι οι διαπιγενίνες, με τις σημαντικότερες να είναι η 13,Π8-διαπιγενίνη και 13',Π8-διαπιγενίνη (αμεντοφλαβόνη). 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.λ.π.⁵ Ακόμη, στις φαινολικές ενώσεις συμπεριλαμβάνονται και τα **φαινολικά οξέα**, με τα χλωρογενικά οξέα όπως το 5-O-

καφεοϋλο-(-)-κινικό οξύ και το καφεϊκό οξύ, να απαντώνται σε μεγαλύτερο ποσοστό στο γένος *Hypericum*.^{4,12}

Naphthodianthrones

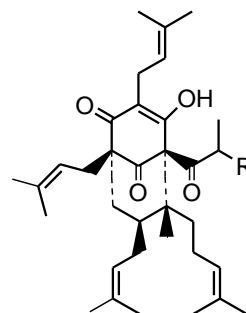


R= CH₃ Hypericin
R= CH₂OH Pseudohypericin



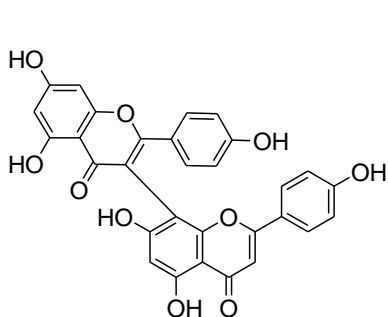
R= CH₃ Protohypericin
R= CH₂OH Pseudoprotopericin

Phloroglucinols

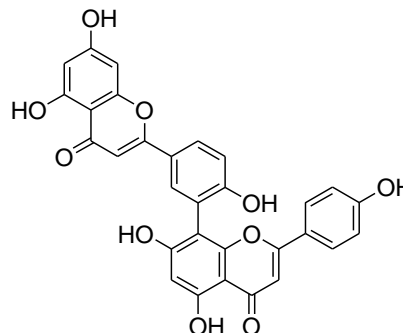


R= CH₃ Hyperforin
R=CH₂CH₃ Adhyperforin

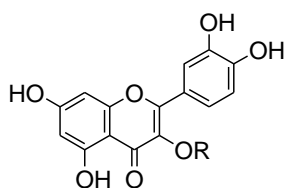
Polyphenols



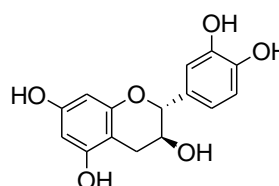
Biapigenin



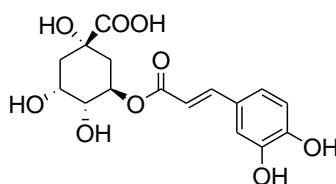
Amentoflavone



Quercetin (R=H)
Quercetin derivatives
(R=rutinose, rhamnose, galactose, glucose, arabinose)



Catechin



3-O-caffeoylquinic acid

Εικόνα 1.1 : Χαρακτηριστικές κατηγορίες ενώσεων του γένους *Hypericum*. 1.1.5.

Ποικιλότητα δευτερογενών μεταβολιτών του γένους *Hypericum*

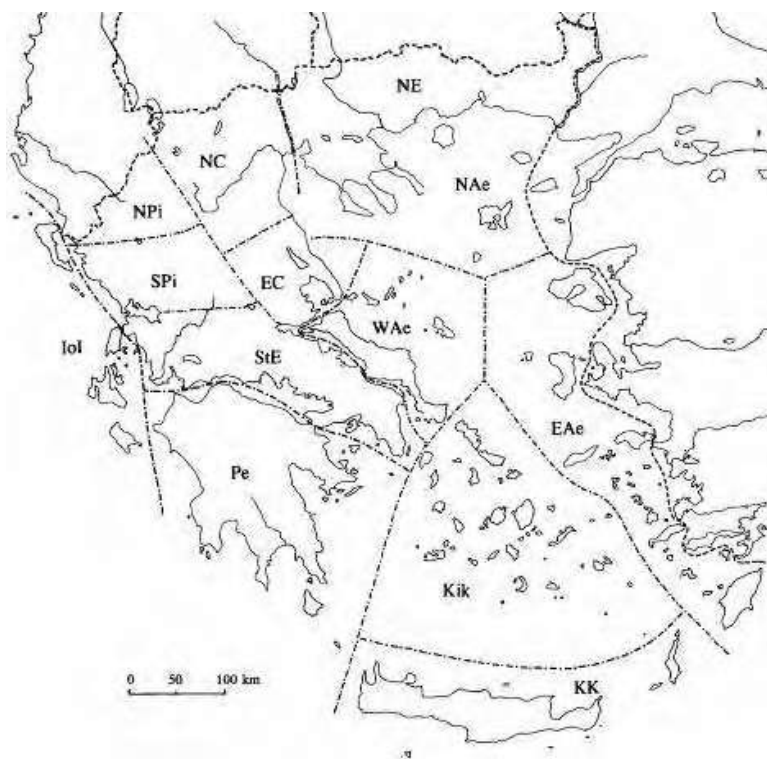
Το περιεχόμενο των δευτερογενών μεταβολιτών του γένους *Hypericum* δεν σχετίζεται μόνο με γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες, άλλα και με την περίοδο συλλογής, την διαδικασία ξήρανσης και αποθήκευσης του φυτού. Η επιλογή, λοιπόν, της κατάλληλης χρονικής περιόδου είναι σημαντική και διαφέρει ανάλογα 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.^{6,7,8,9,12}

1.2. *Hypericum hircinum*

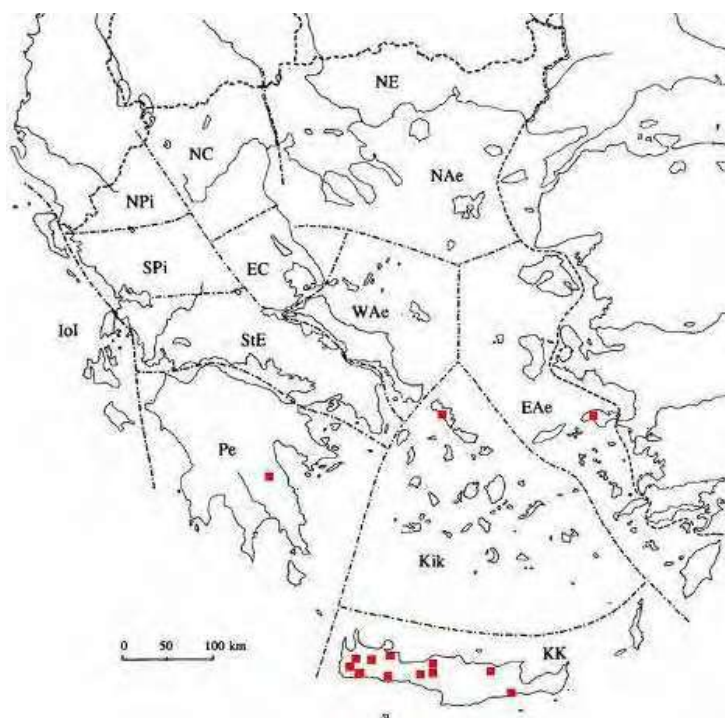
Στην Ελλάδα απαντώνται 40 είδη και υποείδη του γένους *Hypericum*, τα οποία κατανέμονται στις 13 φυτογεωγραφικές της περιοχές (Εικόνα 1.2.). Οι περιοχές αυτές είναι οι ακόλουθες, όπως αυτές ορίζονται από τη “ Flora Hellenica ”(1997). Συγκεκριμένα, **NE**: βόρεια-ανατολική, **NC**: βόρεια-κεντρική, **NPi**: βόρεια Πίνδος, **SPi**: νότια Πίνδος, **EC**: ανατολική-κεντρική, **Ste**: Στερεά Ελλάδα, **Pe**: Πελοπόννησος, **IoI**: Ιόνια νησιά, **WAe**: νησιά δυτικού Αιγαίου, **NAe**: νησιά βόρειου Αιγαίου, **E Ae**: νησιά ανατολικού Αιγαίου, **Kik**: Κυκλάδες και **KK**: Κρήτη-Κάρπαθος.

Το *H. hircinum* είναι ένα θαμνώδες φυτό χωρίς τρίχωμα και χωρίς μαύρους αδένες στα ωοειδή φύλλα του. Ο καρπός είναι αρκετά σαρκώδης στην αρχή, αργότερα διαρρηγνύομενος. Το *H.hircinum* γνωστό και ως "Goat St. John's Wort", λόγω της ιδιαίτερης μυρωδιάς των φύλλων του, φύτεται σε σκιερές περιοχές με συνθήκες υψηλής υγρασίας. Στην παραδοσιακή ιατρική βρίσκει εφαρμογή μέχρι και σήμερα στην αντιμετώπιση κρυολογήματος, του πονόλαιμου και του βήχα. Η γεωγραφική του εξάπλωση στην Ελλάδα, περιορίζεται κυρίως σε περιοχές της Κρήτης και σε ορισμένα νησιά του ανατολικού Αιγαίου και των Κυκλάδων (Εικόνες 1.3, 1.4).

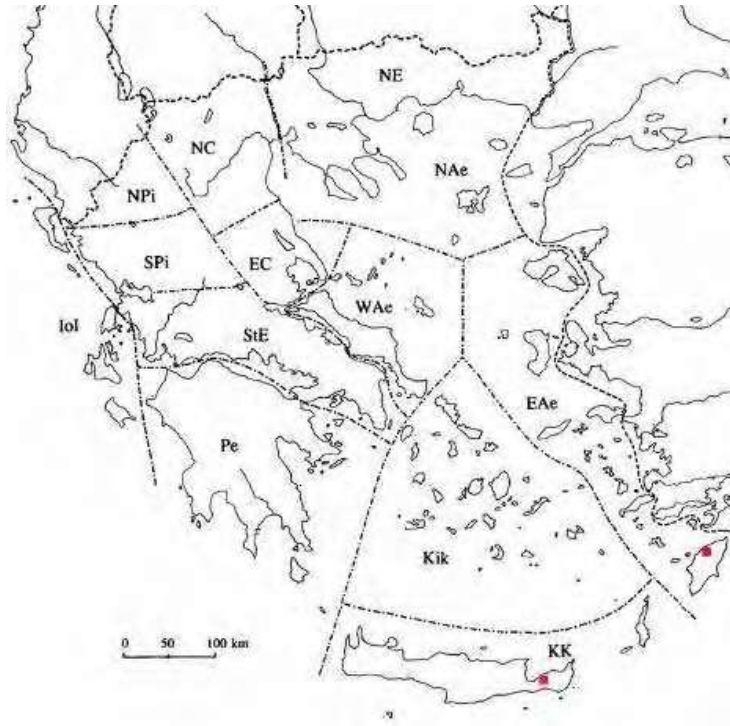
Το *H. hircinum* είναι ένα από τα λιγότερο μελετημένα είδη του γένους, ωστόσο τα τελευταία χρόνια έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον των επιστημόνων. Συγκριμένα, μελέτες στο πολικό εκχύλισμα, εναέριων τμημάτων του φυτού έδειξαν ότι διαθέτει αντιοξειδωτική δράση.



Εικόνα 1.2. Φυτογεωγραφικές περιοχές της Ελλάδας σύμφωνα με τη Flora Hellenica.¹⁰



Εικόνα 1.3. Γεωγραφική εξάπλωση του *H. hircinum* L. ssp. *Albimontanum*.¹⁰



Εικόνα 1.4. Γεωγραφική εξάπλωση του *H. hircinum* L. ssp. *majus*.¹⁰

Επίσης πειράματα σε ποντίκια, με το μεθανολικό εκχύλισμα, το οποίο είναι πλούσιο σε κερκετίνη, οδήγησαν σε μείωση της κινητικής δραστηριότητας και αναστολή της μονοαμινοξειδάσης *in vitro*. Σχετικά με το αιθέριο έλαιο του *H. hircinum* υπάρχουν ελάχιστα στοιχεία που αφορούν την θεραπευτική του δραστηριότητα. Ωστόσο, ορισμένες μελέτες έδειξαν αντικαρκινική δράση του ελαίου, κάτι το οποίο, όπως προτείνεται, με περαιτέρω πειράματα θα μπορούσε να βρει εφαρμογή στην αντιμετώπιση του γλοιοβλαστώματος και του μελανώματος.^{1,10,1112}

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 : ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1. Τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν

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).

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 θειϊκής βανιλίνης. (Διάλυμα A: βανιλίνη 5% σε μεθανόλη. Διάλυμα B: π. H₂SO₄ 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-αμινοαιθυλεστεράς του διφαινυλοβορικού οξέος, διάλυμα 5% σε μεθανόλη για τα πλακίδια κελλουλόζης.

Χρωματογραφία στήλης (C.C.)

1. Sephadex LH-20 (Pharmacia) (γέλη υδροξυπροπυλωμένης 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 καταθρυματισμού των κόκκων. Η ροή έκλουσης του διαλύτη ήταν φυσική, λόγω βαρύτητας.

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 FT-NMR AMX 500 (500 MHz για ^1H και 125 MHz για ^{13}C NMR).

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

- CDCl_3 (7.26 ppm για ^1H -NMR και 77.16 ppm για ^{13}C -NMR).
- CD_3OD (3.31 ppm για ^1H -NMR και 49.05 ppm για ^{13}C -NMR).

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).

Φασματομετρία Μάζας Ηλεκτροψεκασμού (ESI-MS)

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

Τα φάσματα μάζας πλήρους σάρωσης και MSn με ιοντισμό ηλεκτροψεκασμού καταγράφηκαν σε φασματομέτρο 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.

2.2. Εκχύλιση των συστατικών του φυτού

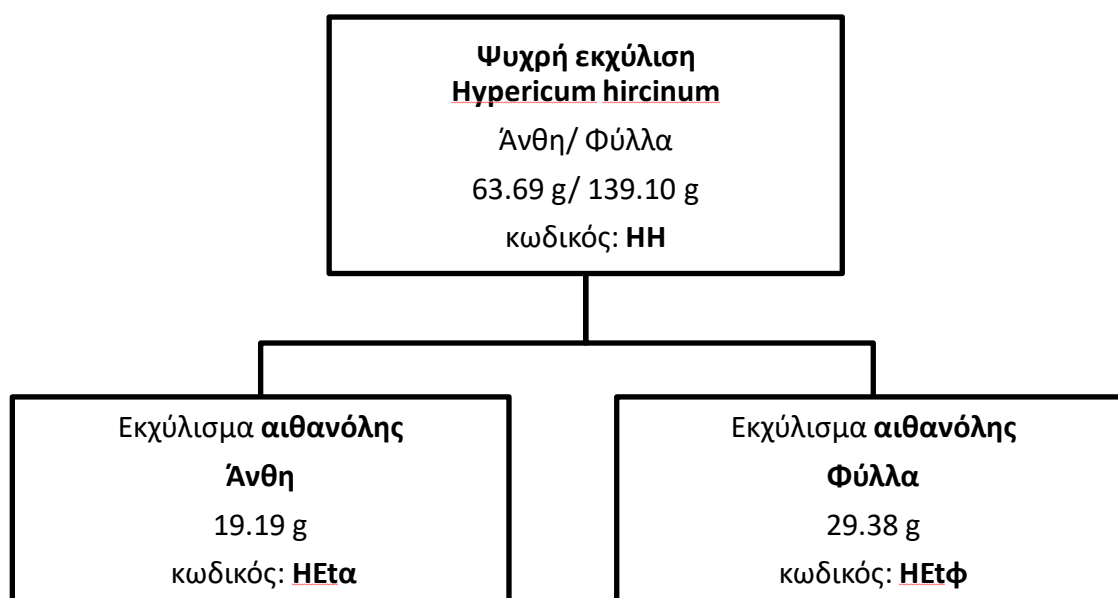
Το φυτό συλλέχτηκε σε διαφορετικές περιόδους, με αποτέλεσμα η δρόγη να βρίσκεται σε διαφορετικά στάδια ωρίμανσης. Όπως φαίνεται στην εικόνα 2.1, τα στάδια ωρίμανσης στα οποία συλλέχτηκε το φυτό είναι, με φύλλα και μπουμπούκι, με φύλλα και άνθη σε διαφορετικό στάδιο άνθησης και τέλος με ώριμες ωοθήκες χωρίς φύλλα. Διαχωρίστηκαν τα **φύλλα** από τους βλαστούς του φυτού όταν ήταν σε πλήρη άνθιση (δείγμα A) και **φύλλα** και **κάψες**, από βλαστούς του φυτού πριν και μετά την άνθιση (δείγμα B). Επιπλέον, δρόγη αποτέλεσαν τα κίτρινα **άνθη** του φυτού (δείγμα Γ). Τα δείγματα δρόγης A και B του φυτού κονιοποιήθηκαν. Στη συνέχεια το δείγμα B εκχυλίστηκε με τη χρήση της διάταξης Soxhlet, ενώ τα A και Γ εκχυλίστηκαν ξεχωριστά με ψυχρή εκχύλιση σε αιθανόλη.



Εικόνα 2.1: Διάφορα στάδια ωρίμανσης του φυτού *Hypericum hircinum*.

2.2.1. Ψυχρή εκχύλιση

Για τη διαδικασία της ψυχρής εκχύλισης, σε δοχείο με πάμα των τριών λίτρων, προστέθηκαν 63,69 g άνθη (δείγμα Γ) με 1,3Lt αιθανόλης, ενώ σε ένα δεύτερο δοχείο 139,10 g φύλλα (δείγμα Α) με 1Lt αιθανόλης. Τα δοχεία καλύφθηκαν και φυλάχθηκαν σε σκιερό μέρος για αποφυγή φωτοχημικών αντιδράσεων. Μετά το πέρας επτά ημερών ο διαλύτης εκχυλίστηκε και από τα δύο δοχεία διηθήθηκε και συμπυκνώθηκε ως ξηρού στους 40°C. Στη συνέχεια στο δείγμα Γ, προστέθηκαν επιπλέον 1,1Lt αιθανόλης και στο δείγμα Α, 0,5Lt αυτής. Μετά την πάροδο 7 ημερών, και αυτή η δόση του διαλύτη συλλέχτηκε και συμπυκνώθηκε. Τα συμπυκνώματα που προέκυψαν συνενώθηκαν. Κατά τη διάρκεια των δύο εβδομάδων τα δοχεία ανακινούνται.



Διάγραμμα 2.1: Σχηματική περιγραφή των εκχυλίσεων, ψυχρής εκχύλισης .

2.2.2 Θερμή εκχύλιση με διάταξη Soxhlet

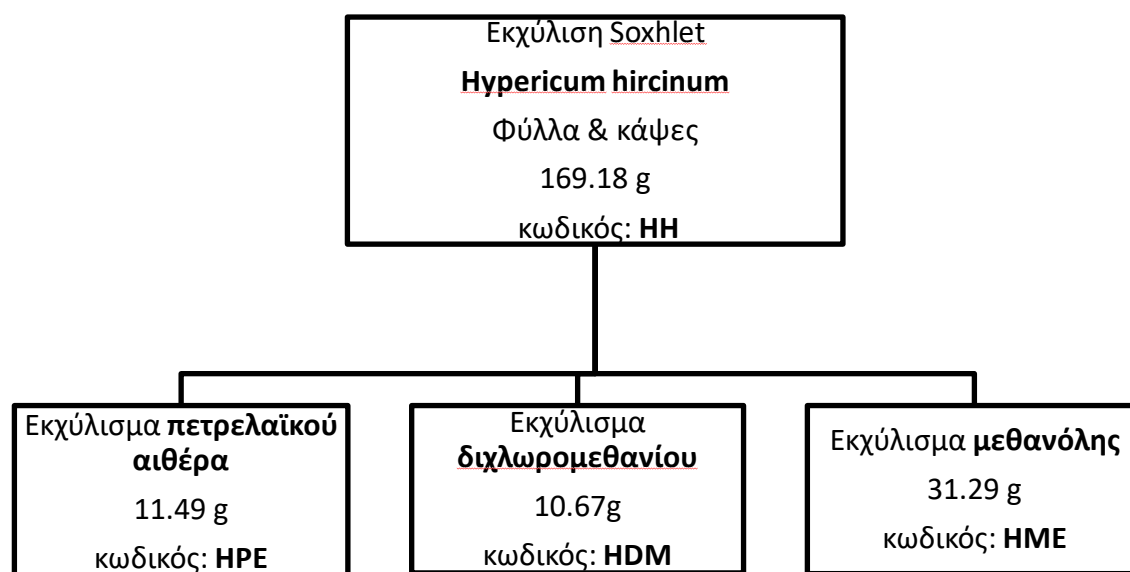
Στη διάταξη Soxhlet προστέθηκαν υάλινες σφαίρες βρασμού σε ικανό ύψος ώστε το thimble να βρίσκεται λίγο υψηλότερα από το σημείο ανακύκλωσης του διαλύτη. Μέσα στο thimble τοποθετήθηκε η ποσότητα του κονιοποιημένου φυτού. Στη Soxhlet εφαρμόσθηκε ψυκτήρας ύδατος. Η διαδικασία της θερμής εκχύλισης πραγματοποιήθηκε για τη συγκεκριμένη ποσότητα του δείγματος Β σε τρία στάδια, και κάθε στάδιο ολοκληρώθηκε με το πέρας κατά μέσο όρο 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 του ενός λίτρου (1L) στις οποίες εισήχθησαν σε κάθε στάδιο 600ml των παρακάτω διαλυτών διαφορετικής πολικότητας. Στη συνέχεια η σφαιρική φιάλη τοποθετήθηκε στον κατάλληλο θερμαντικό μανδύα που ρευματοδοτείται από ροοστάτη (ρύθμιση στα 80V).

Διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για την θερμή εκχύλιση :

- Πετρελαϊκός αιθέρας (**PE**).
- Διχλωρομεθάνιο (**DCM**).
- Μεθανόλη (**MeOH**).

Ο βρασμός κάθε διαλύτη δεν πρέπει να γίνεται βίαια.

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



Διάγραμμα 2.2: Σχηματική περιγραφή των εκχυλίσεων θερμής εκχύλισης, με διάταξη Soxhlet .

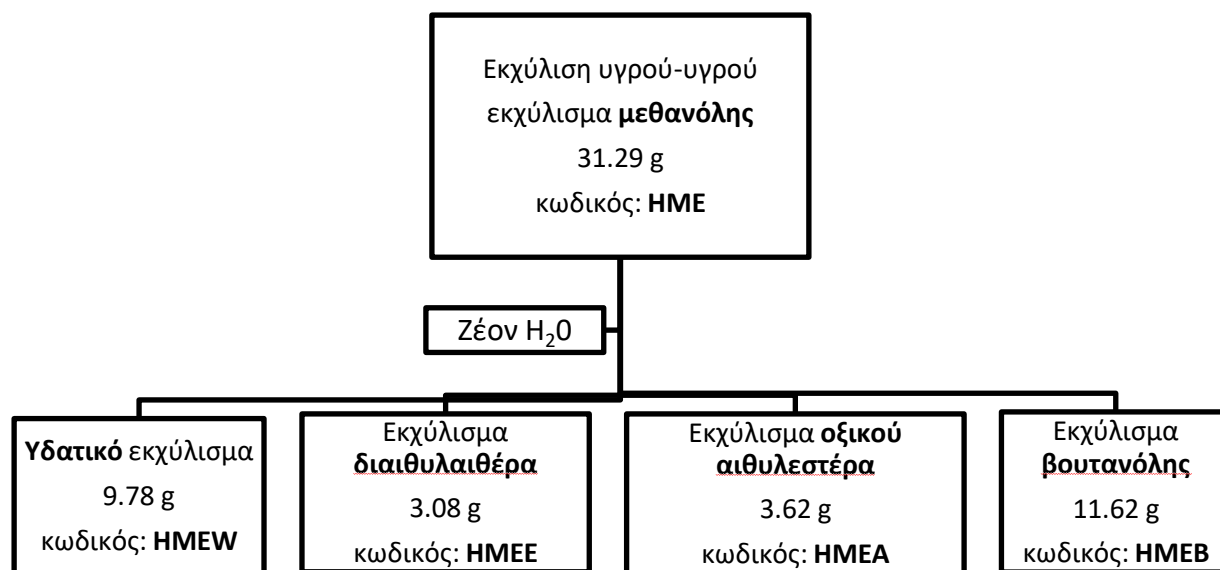
2.2.3. Εκχύλιση υγρού-υγρού στο μεθανολικό εκχύλισμα

Το μεθανολικό εκχύλισμα (κωδικός HME), περιέχει μεγάλο αριθμό πολικών ενώσεων, οι οποίες είναι πολύ δύσκολο να διαχωριστούν απευθείας με χρωματογραφική στήλη, έτσι πραγματοποιήθηκε εκχύλιση υγρού-υγρού. Η διαδικασία αυτή διαχώρισε τα συστατικά σε υποομάδες με βάση την πολικότητά τους. Η επεξεργασία του εκχυλίσματος, έγινε σύμφωνα με την μέθοδο Charaux – Paris¹³. Σε μία σφαιρική φιάλη ενός λίτρου που περιείχε το εκχύλισμα, προστέθηκαν 400 ml ζέοντος νερού (60°C). Το περιεχόμενο της φιάλης αναδεύτηκε έως ότου το κολλώδες προϊόν απομακρύνθηκε από τα τοιχώματα. Για τη διαδικασία αυτή αξιοποιήθηκαν και οι υπέρηχοι. Στη συνέχεια και αφού η θερμοκρασία έπεσε αρκετά, η υδατική φάση προστέθηκε σε μία διαχωριστική χωάνη. Στη χωάνη προστέθηκαν 0,2 Lt διαιθυλαιθέρα (Et₂O) και ανακινήθηκαν με προσοχή, μέχρι η αιθερική φάση να αποκτήσει έντονο πράσινο χρώμα. Στη συνέχεια συλλέχτηκε και η διαδικασία επαναλήφθηκε μέχρι η αιθερική φάση να είναι όσο το δυνατόν περισσότερο αποχρωματισμένη. Συνολικά καταναλώθηκαν 0,8Lt διαλύτη. Στην υδατική φάση που

απέμεινε στη χωάνη, προστέθηκαν 0,25 Lt οξικού αιθυλεστέρα και ακολούθησε η παραπάνω διαδικασία άλλες δύο φορές. Ως τελικός διαλύτης εκχύλισης χρησιμοποιήθηκε κανονική βουτανόλη (n-butanol) 0,25 Lt, συνολικά τρεις φορές.

Μετά τη συλλογή των ομάδων, ο διαλύτης απομακρύνθηκε σε περιστροφικό εξατμιστήρα υπό κενό και με θέρμανση όπου κρίθηκε απαραίτητο. 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 διχλωρομεθάνιο (CH_2Cl_2), οξικός αιθυλεστέρας (EtOAc) και μεθανόλη (MeOH). Λόγω της πολικότητας των ουσιών, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, κρίθηκε καταλληλότερη η ανάπτυξη των εκχυλισμάτων σε T.L.C κελουλόζης (cellulose matrix). Το σύστημα διαλυτών ανάπτυξης ήταν 15% και 30% οξικό οξύ σε νερό. Το ανεπτυγμένο πλακίδιο εξετάστηκε με λάμπα φθορισμού με εκπομπή ακτινοβολίας στα 366 nm. Από τα αποτελέσματα της ανάλυσης επιλέχθηκαν το εκχύλισμα με **οξικό αιθυλεστέρα (HMEA)** για περαιτέρω διαχωρισμό και ανάλυση των συστατικών τους.



Διάγραμμα 2.3: Σχηματική περιγραφή της περαιτέρω εκχύλισης υγρού –υγρού του μεθανολικού εκχυλίσματος (HME).

2.3. Χρωματογραφικός διαχωρισμός εκχυλισμάτων

2.3.1. Διαχωρισμός συστατικών του εκχυλίσματος οξικού αιθυλεστέρα (κωδικός ΗΜΕΑ)

Το εκχύλισμα ΗΜΕΑ (730 mg) υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης (C.C. 22 cm x 4.5 cm) Sephadex LH-20 με διαλύτη έκλουσης MeOH 100%. Συλλέχθηκαν 271 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 κελουλόζης (cellulose matrix) σε διάφορα συστήματα διαλυτών, όπως 15%,30% οξικό οξύ σε νερό και ένα σύστημα ΕΑW (Ethyl acetate: Acetic acid: Water σε αναλογία 4:1:2).

Οι ομάδες που προέκυψαν είναι οι ακόλουθες:

Όνομα ομάδας	%Αναλογία	Βάρος (mg)
ΗΜΕΑ-A	MeOH 100%	7
ΗΜΕΑ-B	MeOH 100%	8
ΗΜΕΑ-C	MeOH 100%	23
ΗΜΕΑ-D	MeOH 100%	49
ΗΜΕΑ-E	MeOH 100%	55
ΗΜΕΑ-F	MeOH 100%	24
ΗΜΕΑ-G	MeOH 100%	67
ΗΜΕΑ-H	MeOH 100%	51
ΗΜΕΑ-I	MeOH 100%	72
ΗΜΕΑ-J	MeOH 100%	286
ΗΜΕΑ-K	MeOH 100%	5
ΗΜΕΑ-L	MeOH 100%	5
ΗΜΕΑ-M	MeOH 100%	20
ΗΜΕΑ-N	MeOH 100%	15
ΗΜΕΑ-O	MeOH 100%	3
ΗΜΕΑ-P	MeOH 100%	14
ΗΜΕΑ-Q	MeOH 100%	2
ΗΜΕΑ-R	MeOH 100%	5
ΗΜΕΑ-S	MeOH 100%	2
ΗΜΕΑ-T	MeOH 100%	Trace
ΗΜΕΑ-U	MeOH 100%	Trace
ΗΜΕΑ-V	MeOH 100%	Trace
ΗΜΕΑ-W	MeOH 100%	5
ΗΜΕΑ-X	MeOH 100%	1
ΗΜΕΑ-Y	MeOH 100%	Trace
ΗΜΕΑ-Z	MeOH 100%	8

Η ομάδα ΗΜΕΑ-J επιλέχθηκε για επιπλέον επεξεργασία. Προκειμένου να βρεθεί το πλήθος των συστατικών που περιέχει καθώς και το κατάλληλο σύστημα στο οποίο

αυτά διαχωρίζονται καλύτερα, έγινε δοκιμαστικά ανάπτυξη της, με χρωματογραφία λεπτής στιβάδος (T.L.C) με γέλη πυριτίου σε διάφορα συστήματα διαλυτών, CH₂Cl₂:MeOH, EtOAc:MeOH, EtOAc:CH₂Cl₂.

Ομάδα HMEA-J (286 mg)

Για τον διαχωρισμό των συστατικών αυτής της υποομάδας πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης (C.C. 14.5 cm x 3.0 cm) επί γέλης πυριτίου (silica gel) με βαθμιδωτό σύστημα μιγμάτων διαλυτών PE, CH₂Cl₂, EtOAc, και MeOH. Συλλέχθηκαν 200 κλάσματα μέσου όγκου περίπου 6 ml σε δοκιμαστικούς σωλήνες, καθώς και ορισμένα (200 ml) σε κωνικές φιάλες. Για την ομαδοποίηση των κλασμάτων ακολούθησε η ανάπτυξη τους σε πλακίδιο T.L.C επί γέλης πυριτίου με συστήματα διαλυτών EtOAc:MeOH, και T.L.C κελουλόζης (cellulose matrix) με διαλύτες 15%, 30% οξικό οξύ σε νερό και με σύστημα EAW (Ethyl acetate: Acetic acid: Water σε αναλογία 4:1:2).

Οι ομάδες που προέκυψαν είναι οι ακόλουθες:

Όνομα ομάδας	%Αναλογία	Βάρος (mg)
HMEA –J1	PE 100%	1
HMEA –J2	PE:CH ₂ Cl ₂ 80:20	Trace
HMEA –J3	PE:EtOAc 50:50	2
HMEA –J4	EtOAc 100%	1
HMEA –JA	EtOAc 100%	19
HMEA –JB	EtOAc 100%	5
HMEA –JC	EtOAc:MeOH 98:2	11
HMEA –JD	EtOAc:MeOH 98:2	8
HMEA –JE	EtOAc:MeOH 98:2	2
HMEA –JF	EtOAc:MeOH 98:2	3
HMEA –JG	EtOAc:MeOH 98:2	} 51
HMEA –JH	EtOAc:MeOH 95:5	
HMEA –JI	EtOAc:MeOH 95:5	
HMEA –JK	EtOAc:MeOH 90:10	33
HMEA –JL	EtOAc:MeOH 90:10	53
HMEA –JM	EtOAc:MeOH 85:15	2
HMEA –JN	EtOAc:MeOH 85:15	15
HMEA –JO	EtOAc:MeOH 85:15/80:20/75:25	8
HMEA –JP	EtOAc:MeOH 75:25/70:30/60:40	11

HMEA –JQ	EtOAc:MeOH 60:40/50:50	22
HMEA –JR	MeOH 100%	3
HMEA –JS	MeOH 100%	5
HMEA –JT	MeOH 100%	6
HMEA –JU	MeOH 100%	17
HMEA –JV	MeOH 100%	3
HMEA –JW	MeOH 100%	5
HMEA –JX	MeOH 100%	2
HMEA –JY	MeOH 100%	1

Έπειτα από ανάπτυξη των τελικών κλασμάτων σε T.L.C, οι ομάδες HMEA-JM (2 mg) και HMEA-JK (33 mg), οποίες αποτελούνται από ένα μόνο συστατικό, αποτέλεσαν αντικείμενο αναλυτικής μελέτης με στόχο την διευκρίνιση της δομής τους. Κατόπιν φασματοσκοπικής μελέτης, ¹H NMR, η ένωση ήταν κοινή και ταυτοποιήθηκε ως **Υπεροσίδης (1)**.

Για τις ομάδες HMEA-JG, HMEA-JH, HMEA-JI, πραγματοποιήθηκε δοκιμαστικά χρωματογραφία λεπτής στιβάδος (T.L.C) σε πλακίδια κελουλόζης (cellulose matrix) με σύστημα διαλυτών, 15% και 30% οξικό οξύ σε νερό. Οι τρεις ομάδες συνενώθηκαν και η νέα ομάδα που προέκυψε, **HMEA-JG'** επιλέχθηκε για επιπλέον επεξεργασία.

Ομάδα HMEA-JG' (51 mg)

Το εκχύλισμα HMEA-JG' υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης (C.C. 39.5 cm x 3.0 cm) Sephadex LH-20 με διαλύτη έκλουσης MeOH 100%. Συλλέχθηκαν 173 κλάσματα μέσου όγκου, από 2-10 ml περίπου, σε δοκιμαστικούς σωλήνες καθώς και κάποια σε κωνικές φιάλες(50 ml). Ο έλεγχος των ουσιών και η ομαδοποίηση έγινε με βάση την ανάπτυξη τους σε πλακίδια T.L.C κελουλόζης (cellulose matrix) σε συστήματα διαλυτών, όπως 15% και 30% οξικό οξύ σε νερό.

Οι ομάδες που προέκυψαν είναι οι ακόλουθες:

Όνομα ομάδας	%Αναλογία	Βάρος (mg)
HMEA-JG'A	MeOH 100%	3
HMEA-JG'B	MeOH 100%	1
HMEA-JG'C	MeOH 100%	2
HMEA-JG'D	MeOH 100%	27
HMEA-JG'E	MeOH 100%	21
HMEA-JG'F	MeOH 100%	15
HMEA-JG'H	MeOH 100%	7
HMEA-JG'I	MeOH 100%	Trace

HMEA-JG'2	MeOH 100%	Trace
-----------	-----------	-------

Έπειτα από ανάπτυξη των τελικών κλασμάτων σε T.L.C, η ομάδα HMEA-JG'F (15 mg), η οποία αποτελείται από ένα μόνο συστατικό, αποτέλεσε αντικείμενο αναλυτικής μελέτης με στόχο την διεκρίνιση της δομής του. Κατόπιν φασματοσκοπικής μελέτης με ^1H NMR, ^{13}C NMR και φασματομετρία μάζας η ένωση ταυτοποιήθηκε ως **Αβικουλαρίνη (2)**.

2.3.2. Διαχωρισμός συστατικών κλασμάτων HMEA-JG'D και HMEA-JG'E με PTLC (Preparative Thin Layer Chromatography).

Πραγματοποιήθηκαν δοκιμαστικά T.L.C κελουλόζης σε ορισμένα κλάσματα της κολώνας HMEA –JG' και επιλέχθηκαν οι ομάδες HMEA-JG'D (27mg) και HMEA-JG'E (21mg) για διαχωρισμό με παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (PTLC). Αναπτύχθηκαν σε κελουλόζη (υάλινες πλάκες 20.0 cm x 20.0 cm) με κινητή φάση AcOH 30%. Χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 4 πλάκες και κατόπιν εμφάνισης των πλακών με αντιδραστήριο Neu κόπηκαν οι ζώνες. Για την πλάκα 1, 2 και 3(μόνο ορισμένες μπάντες), οι ζώνες που προέκυψαν, είχαν το ίδιο R_f όπως επίσης και χρώμα, για τον λόγο αυτό συνενώθηκαν. Οι ποσότητες όπως και R_f δίνονται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 1

Ομάδες –Ζώνες	R_f	Ποσότητες (mg)	Χρώμα ζώνης
HMEA-JG'D a	0.07	5	Κίτρινο
HMEA-JG'D b	0.13	1	Κυανό
HMEA-JG'D c	0.51	3	Πορτοκαλί
HMEA-JG'D d	0.72	15	Κόκκινο

Μετά την ανάπτυξη της πλάκας 3, παρατηρήθηκε μία διχρωμία και διαφοροποίηση στα R_f σε ορισμένα σημεία. Για τον λόγο αυτό από την πλάκα 3 απομονώθηκαν συνολικά 5 ζώνες, 3 εκ των οποίων όπως ήδη αναφέρθηκε συνενώθηκαν με τα κλάσματα του πίνακα 1. Οι άλλες 2 ζώνες συλλέχθηκαν ξεχωριστά και φαίνονται στον πίνακα 2.

Πίνακας 2

Ομάδες –Ζώνες	R_f	Ποσότητες (mg)	Χρώμα ζώνης
---------------	-------	----------------	-------------

HMEA-JG'ED c'	0.4	1	Πορτοκαλί με διχρωμία
HMEA-JG'ED e'	0.52	3	Πορτοκαλί με διχρωμία

Από την πλάκα 4 προέκυψαν 4 ζώνες, οι οποίες λόγω διαφορών στα R_f απομονώθηκαν ξεχωριστά από όλες τις άλλες. Φαίνονται στον πίνακα 3.

Πίνακας 3

Ομάδες – Ζώνες	R_f	Ποσότητες (mg)	Χρώμα ζώνης
HMEA-JG'E a'	0.09	14	κίτρινο
HMEA-JG'E b'	0.21	1	κυανό
HMEA-JG'E h'	0.49	6	πορτοκαλί
HMEA-JG'E d'	0.78	15	κόκκινο

Η ομάδα HMEA-JG'EDc' (1 mg), βρέθηκε να περιέχει ένα συστατικό, του οποίου το φάσμα $^1\text{H NMR}$ ήταν πανομοιότυπο με αυτό της ένωσης **Αβικουλαρίνη (2)**. Επίσης η ομάδα HMEA-JG'Dc, προσδιορίστηκε ως **παράγωγο κερκετίνης (3)**. Τέλος, η ομάδα HMEA-JG'D d, βρέθηκε να περιέχει επίσης ένα **συστατικό (4)** του οποίου η δομή δεν προσδιορίστηκε πλήρως.

2.3.3. Διαχωρισμός συστατικών του εκχυλίσματος αιθανόλης, ψυχρής εκχύλισης των ανθών (κωδικός ΗΕτα).

Το εκχύλισμα ΗΕτα (1.587g), υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης (C.C. 17.0 cm x 3.5 cm) επί γέλης πυριτίου (silica gel) με ισοκρατικό σύστημα διαλυτών PE:AC, καθώς επίσης και MeOH προς το πέρας της κολώνας. Συλλέχθηκαν 306 κλάσματα όγκου περίπου 10 ml, σε δοκιμαστικούς σωλήνες, καθώς και ορισμένα κλάσματα (150ml και 300ml) σε κωνικές φιάλες. Για την ομαδοποίηση των κλασμάτων ακολούθησε η ανάπτυξη τους σε πλακίδιο T.L.C επί γέλης πυριτίου με συστήματα διαλυτών PE:AC και EtOAc:MeOH. Επίσης αναπτύχθηκαν T.L.C κελουλόζης (cellulose matrix) με διαλύτη 30% οξικό οξύ σε νερό.

Οι ομάδες που προέκυψαν είναι οι ακόλουθες:

Όνομα ομάδας	%Αναλογία	Βάρος (mg)
ΗΕτα-1	PE 100%	1
ΗΕτα-2	PE:AC 99:1	1
ΗΕτα-3	PE:AC 98:2	1
ΗΕτα-4	PE:AC 95:5	Trace
ΗΕτα-A	PE:AC 93:7	4
ΗΕτα-B	PE:AC 93:7/90:10	19
ΗΕτα-C	PE:AC 90:10	128
ΗΕτα-D	PE:AC 85:15/80:20	140
ΗΕτα-E	PE:AC 80:20	56
ΗΕτα-F	PE:AC 80:20	36
ΗΕτα-G	PE:AC 80:20/75:25	79
ΗΕτα-H	PE:AC 75:25	16
ΗΕτα-I	PE:AC 75:25/70:30	33
ΗΕτα-K	PE:AC 70:30/65:35	58
ΗΕτα-L	PE:AC 65:35/60:40	27
ΗΕτα-M	PE:AC 60:40	26
ΗΕτα-N	PE:AC 55:45	17
ΗΕτα-O	PE:AC 55:45/50:50/40:60	22
ΗΕτα-P	PE:AC 40:60	7
ΗΕτα-Q	PE:AC 40:60	4
ΗΕτα-R	PE:AC 30:70	20
ΗΕτα-S	PE:AC 30:70/20:80/15:85	38
ΗΕτα-T	PE:AC 15:85/10:90	19
ΗΕτα-U	PE:AC 10:90	13
ΗΕτα-V	PE:AC 10:90/ AC 100%	26
ΗΕτα-W	AC 100%/ AC: MeOH 50:50	59
ΗΕτα-X	PE:MeOH 50:50	207
ΗΕτα-fraction 299	AC:MeOH 50:50	3
ΗΕτα-Y	MeOH 100%	57

Η ομάδα HEta-W επιλέχθηκε για επιπλέον επεξεργασία. Προκειμένου να βρεθεί το πλήθος των συστατικών που περιέχει καθώς και το κατάλληλο σύστημα στο οποίο αυτά διαχωρίζονται καλύτερα, έγινε δοκιμαστικά ανάπτυξη της, σε χρωματογραφία λεπτής στιβάδος (T.L.C) με γέλη πυριτίου σε σύστημα διαλυτών EtOAc:MeOH.

Ομάδα HEta-W (59 mg)

Για τον διαχωρισμό των συστατικών αυτής της υποομάδας πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης (C.C. 13.0 cm x 3.0 cm) επί γέλης πυριτίου (silica gel), αρχικά με μείγμα διαλυτών EtOAc:Et₂O 70:30 και στη συνέχεια με ισοκρατικό σύστημα διαλυτών EtOAc:MeOH. Συλλέχθηκαν 124 κλάσματα μέσου όγκου, περίπου 7 ml σε δοκιμαστικούς σωλήνες, καθώς και ορισμένα (100 ml) σε κωνικές φιάλες. Για την ομαδοποίηση των κλασμάτων ακολούθησε η ανάπτυξη τους σε πλακίδιο T.L.C επί γέλης πυριτίου με συστήματα διαλυτών EtOAc:MeOH.

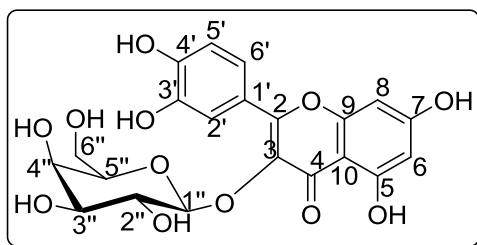
Οι ομάδες που προέκυψαν είναι οι ακόλουθες:

Όνομα ομάδας	%Αναλογία	Βάρος (mg)
HEta-W1	EtOAc:Et ₂ O 70:30	Trace
HEta-WA	EtOAc:Et ₂ O 70:30	6
HEta-WB	EtOAc:Et ₂ O 70:30	5
HEta-WC	EtOAc:Et ₂ O 70:30	1
HEta-WD	EtOAc:Et ₂ O 70:30/ EtOAc 100%/ EtOAc:MeOH 98:2	7
HEta-WE	EtOAc:MeOH 95:5	1
HEta-WF	EtOAc:MeOH 95:5/85:15	13
HEta-WG	EtOAc:MeOH 85:15/70:30/60:40	23
HEta-WH	EtOAc:MeOH 60:40/50:50/40:60/15:80	18
HEta-W2	MeOH 100%	5

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Ταυτοποίηση συστατικών πολικού εκχυλίσματος

3.1.1. Δευτερογενής μεταβολίτης: Υπεροσίδης (1)

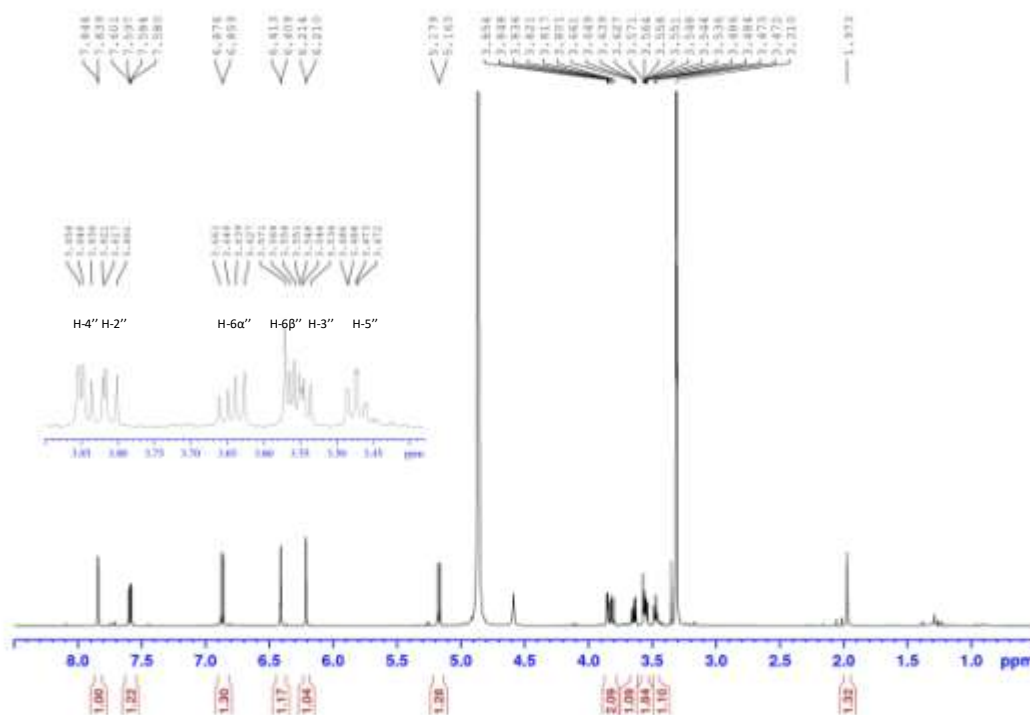


Υπεροσίδης (1)

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

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.

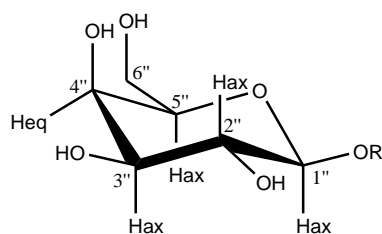
Η κερκετίνη ανήκει στην κατηγορία των φλαβονολών, οι οποίες ανήκουν σε μία μεγάλη οικογένεια ενώσεων που ονομάζονται φλαβονοειδή. Ο βασικός σκελετός μιας φλαβονόλης είναι μία φλαβόνη υποκατεστημένη στην 3 θέση της βενζοπυρόνης με μία ομάδα υδροξυλίου, καθιστώντας την έτσι μία 3-υδροξυφλαβόνη. Η ταυτοποίηση της ένωσης πραγματοποιήθηκε με σύγκριση του φάσματος $^1\text{H NMR}$ με αυτά της βιβλιογραφίας. Τα δύο αρωματικά πρωτόνια του C-6 και C-8 της βενζοπυρόνης εμφανίζονται σαν μία διπλή (d) το καθένα, στα δ_{H} 6.20 ppm και δ_{H} 6.40 ppm, αντίστοιχα. Η πολλαπλότητα αυτή προκύπτει από την μακράς εμβέλειας σύζευξη, με $^4J_{\text{H6-H8}}=2.00$ Hz, γνωστή και ως W-coupling. Τα H-2', H-5', H-6' του κατεχολικού τμήματος εμφανίζουν πολλαπλότητες αντίστοιχες με αυτές ενός συστήματος ABX. Το H-6' (δ_{H} 7.58 ppm) εμφανίζεται ως μια διπλή της διπλής (dd) καθώς σχάζεται, από τα H-5', H-2' με $^3J_{\text{H5'-H6' (ortho)}}=8.50$ Hz και $^4J_{\text{H2'-H6' (meta)}}=2.00$ Hz. Τα H-2' (δ_{H} 7.83 ppm) και H-5' (δ_{H} 6.86 ppm) εμφανίζονται το καθένα ως μία διπλή (d) λόγω της σχάσης από το H-6'.



Εικόνα 3.1: Φάσμα ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) Υπεροσίδης (1).

Όσον αφορά το τμήμα του σακχάρου, τον γαλακτοζίτη, στο φάσμα εμφανίζονται 6 σήματα πρωτονίων και ένα επιπλέον για το ανωμερικό πρωτόνιο H-1'' με δ_{H} 5.16 ppm. Το πρωτόνιο αυτό εμφανίζεται ως μία διπλή (d) καθώς σχάζεται από το H-2'' (δ_{H} 3.81 ppm) με $^3\text{J}_{\text{H1''-H2''}}=8.00$ Hz. Στη συνέχεια το H-2'' (δ_{H} 3.83 ppm) αλληλεπιδρά με το H-1'' (δ_{H} 5.16 ppm) και το H-3'' (δ_{H} 3.54 ppm). Πιο συγκεκριμένα, το H-2'' εμφανίζει μία κορυφή διπλή της διπλής (dd) καθώς σχάζεται από αυτά τα δύο πρωτόνια. Το πρωτόνιο H-4'' δ_{H} 3.85 ppm, σχάζεται από τα H-3'' και H-5'' και εμφανίζεται ως μία διπλή της διπλής (dd) με μικρή σχάση. Αντίστοιχα, το H-5'' (δ_{H} 3.47 ppm) εμφανίζεται ως μία διπλή της διπλής της διπλής (ddd), αφού σχάζεται από τα H-4'' (δ_{H} 3.85 ppm) και H-6'', η οποία λόγω της αλληλεπικάλυψης των κορυφών φαίνεται στο φάσμα ως μία td. Τέλος τα πρωτόνια H-6'' είναι διαστερεοτοπικά λόγω της ύπαρξης στερεογονικού κέντρου (ανωμερικός άνθρακας) και geminal καθώς βρίσκονται πάνω στον ίδιο άνθρακα. Επομένως τα H-6a'' (δ_{H} 3.64 ppm) και H-6b'' (δ_{H} 3.56 ppm) αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και με το H-5'' (δ_{H} 3.47 ppm). Έτσι το κάθε ένα εμφανίζεται ως μία διπλή της διπλής (dd) με $^2\text{J}_{\text{H6a''-H6b''}}=11$ Hz και $^3\text{J}_{\text{H6a/b''-H5''}}=6$ Hz το καθένα (Εικόνα 3.1).

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 ${}^3J_{H3''-H4''}=3.50$ Hz, ${}^3J_{H4''-H5''}=1.0$ Hz είναι χαρακτηριστικές της gauche θέσης ενός αξονικού ως προς ένα ισημερινό πρωτόνιο. Με βάση αυτές τις τιμές σταθεράς σύζευξης, συμπεραίνεται ότι η δομή που αντιστοιχεί στο σάκχαρο είναι αυτή της β-D-γαλακτοπυρανόζης (Σχήμα 3.1).

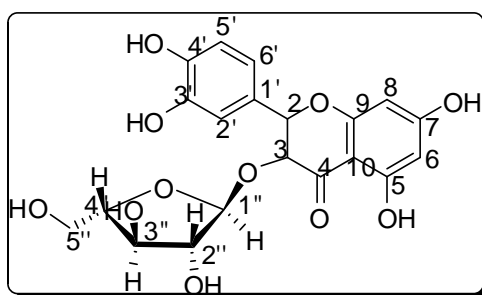


Σχήμα 3.1: β-D-γαλακτοπυρανόζη

Πίνακας 3.1. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR (500MHz, CD3OD) της ένωσης (1).

#	δ ${}^1\text{H}$	Πολλαπλότητα, (J Hz)
Τμήμα Φλαβονόλης		
6'	7.58 (1H)	dd, $J_1=8.50$, $J_2=2.00$
2'	7.83 (1H)	d, $J=2.00$
5'	6.86 (1H)	d, $J=8.50$
6	6.20 (1H)	d, $J=2.00$
8	6.40 (1H)	d, $J=2.00$
Τμήμα Σακχάρου		
1''	5.16 (1H)	d, $J=8.00$
2''	3.83 (1H)	dd, $J_1=9.70$, $J_2=8.00$
3''	3.54 (1H)	dd, $J_1=9.70$, $J_2=3.50$
4''	3.85 (1H)	dd, $J_1=3.00$, $J_2=1.00$
5''	3.47 (1H)	td, $J_1=6.50$, $J_2=1.00$
6''	3.64 (1H)	dd, $J_1=11.00$, $J_2=6.00$
	3.56 (1H)	dd, $J_1=11.00$, $J_2=6.00$

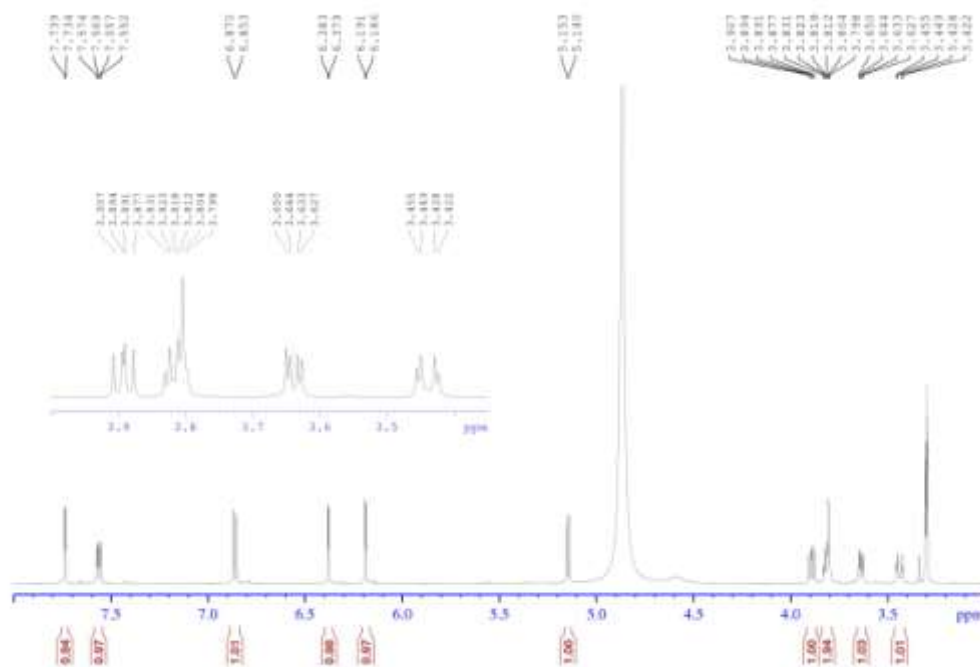
3.1.2. Δευτερογενής μεταβολίτης: Αβικουλαρίνη (2)



Αβικουλαρίνη (2)

Η αβικουλαρίνη (2) είναι ο 3-Ο-αραβινοζίτης της κερκετίνης και απομονώνεται από τα πολικά εκχυλίσματα των φυτών. Στο *Hypericum hircinum* απομονώθηκε από την περαιτέρω εκχύλιση του μεθανολικού εκχυλίσματος (HME) των φύλλων και των ωθηκών με EtOAc (HMEA).

Η αβικουλαρίνη ανήκει στην κατηγορία των φλαβονοειδών και αποτελείται από δύο τμήματα. Αυτό της κερκετίνης και αυτό του αραβινοζίτη, 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.



Εικόνα 3.2: Φάσμα ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) Αβικουλαρίνη (2).

Η ταυτοποίηση της ένωσης πραγματοποιήθηκε με τα φάσματα ^1H NMR και ^{13}C . Για το άγλυκο κομμάτι, αυτό της κερκετίνης, παρουσιάστηκαν ομοιότητες με τον υπεροσίδη(1). Συγκεκριμένα τα δύο αρωματικά πρωτόνια του C-6 και C-8 της βενζοπυρόνης εμφανίζονται σαν μία διπλή (d) το καθένα, στα δ_{H} 6.18 ppm και δ_{H} 6.38 ppm, αντίστοιχα. Η πολλαπλότητα αυτή προκύπτει από την μακράς εμβέλειας σύζευξη, με $^4J_{\text{H6-H8}}=2.10$ Hz, γνωστή και ως W-coupling. Τα H-2', H-5', H-6' του κατεχολικού τμήματος εμφανίζουν πολλαπλότητες αντίστοιχες με αυτές ενός συστήματος ABX. Το H-6' (δ_{H} 7.57 ppm) εμφανίζεται ως μια διπλή της διπλής (dd) καθώς σχάζεται, από τα H-5', H-2' με $^3J_{\text{H5'-H6' (ortho)}}=8.47$ Hz και $^4J_{\text{H2'-H6' (meta)}}=2.20$ Hz. Τα H-2' (δ_{H} 7.73 ppm) και H-5' (δ_{H} 6.86 ppm) εμφανίζονται το καθένα ως μία διπλή (d) λόγω της σχάσης από το H-6'.

Όσον αφορά το τμήμα του σακχάρου, τον αραβινοζίτη, στο φάσμα εμφανίζονται 5 σήματα πρωτονίων και ένα επιπλέον για το ανωμερικό πρωτόνιο H-1'', με δ_{H} 5.14 ppm. Το πρωτόνιο αυτό εμφανίζεται ως μία διπλή (d) καθώς σχάζεται από το H-2'' (δ_{H} 3.89 ppm) με $^3J_{\text{H1''-H2''}}=6.60$ Hz. Στη συνέχεια το H-2'' (δ_{H} 3.89 ppm) αλληλεπιδρά με το H-1'' (δ_{H} 5.14 ppm) και το H-3'' (δ_{H} 3.63 ppm). Πιο συγκεκριμένα, το H-2'' εμφανίζει μία κορυφή διπλή της διπλής (dd) καθώς σχάζεται από αυτά τα δύο πρωτόνια. Το πρωτόνιο H-3'' δ_{H} 3.63 ppm σχάζεται από το H-2'' (δ_{H} 3.89 ppm) και από το H-4'' (δ_{H} 3.43 ppm), και εμφανίζεται ως μία διπλή της διπλής (dd). Η σταθερά σύζευξης μεταξύ των H-2'' και H-3'' είναι $^3J_{\text{H2''-H3''}} = 8.40$ Hz υποδηλώνοντας καθαρά μία trans-διαξονική σχέση μεταξύ των αξονικών αυτών πρωτονίων, ενώ η σταθερά σύζευξης μεταξύ των H-3'' και H-4'' είναι $^3J_{\text{H3''-H4''}}=3.20$ Hz υποδηλώνοντας μία αξονική-ισημερινή διαμόρφωση (Gauche). Το πρωτόνιο H-4'' δ_{H} 3.43 ppm σχάζεται από τα H-5'', με ένα μεγάλο $^3J_{\text{H4''-H5''}}=13.50$ Hz και από το H-3'' με $^3J_{\text{H4''-H3''}}=3.20$ Hz, και εμφανίζεται ως μία διπλή της διπλής (dd). Τέλος τα πρωτόνια H-5α'' και H-5β'' είναι geminal, καθώς βρίσκονται πάνω στον ίδιο άνθρακα, και σχάζονται μεταξύ τους λόγω της ύπαρξης στερεογονικού κέντρου στον άνθρακα C1'' το οποίο τα καθιστά διαστερομερή. Έτσι η κορυφή που εμφανίζεται σε δ_{H} 3.81 ppm έχει ολοκλήρωση 2 και εμφανίζει πολλαπλή σχάση.

ECL-MS (αβικουλαρίνη, negative ion mode): m/z 433.1 [M-H]⁻

Πίνακας 3.2. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR (500MHz, CD₃OD) της ένωσης (2).

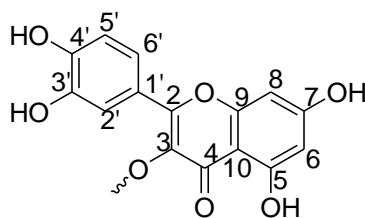
#	¹³ C	δ ¹ H	Πολλαπλότητα, (J Hz)
Τμήμα Φλαβονόλης			
6'	121.47	7.57 (1H)	dd, $J_1=8.47, J_2=2.20$
2'	114.77	7.73 (1H)	d, $J=2.50$
5'	116.06	6.86 (1H)	d, $J=8.50$
6	98.50	6.18 (1H)	d, $J=2.10$
8	93.33	6.38 (1H)	d, $J=2.10$
1'	121.63	-	-
3'	144.56	-	-
4'	148.55	-	-
2	157.00	-	-
3	134.24	-	-
4	178.05	-	-
10	103.25	-	-
9	157.28	-	-
5	161.61	-	-
7	164.70	-	-
Τμήμα Σακχάρου			
1''	104.20	5.14 (1H)	d, $J=6.60$
2''	71.48	3.89 (1H)	dd, $J_1=8.40, J_2=6.60$
3''	67.72	3.63 (1H)	dd, $J_1=8.40, J_2=3.20$
4''	72.73	3.43 (1H)	dd, $J_1=13.50, J_2=3.20$
5''	65.57	3.81 (2H)	m

3.1.3. Δευτερογενής μεταβολίτης: Παράγωγο κερκετίνης (3).

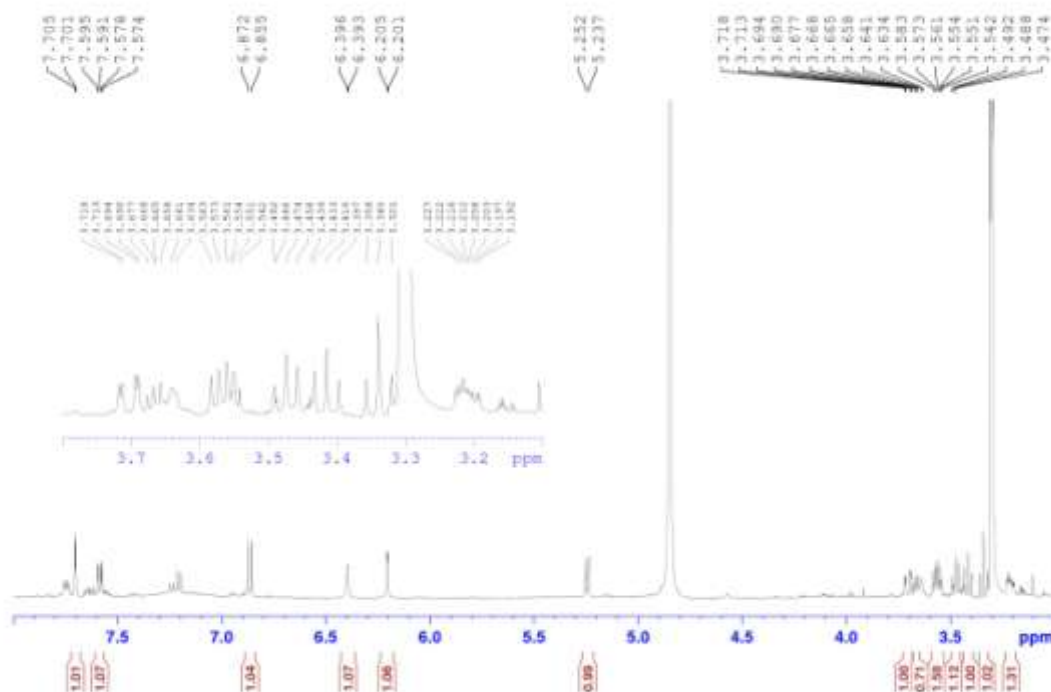
Η ένωση αυτή (3) απομονώθηκε από το *Hypericum hircinum*, με παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (PTLC), του πολικού εκχυλίσματος των φύλλων και των ωθηκών, με EtOAc (HMEA). Το άγλυκο τμήμα της κερκετίνης, ταυτοποιήθηκε σύμφωνα με τις κορυφές που εμφανίζονται στην περιοχή των αρωματικών πρωτονίων, στο πρωτονιακό φάσμα $^1\text{H NMR}$.

Συγκεκριμένα τα δύο αρωματικά πρωτόνια του C-6 και C-8 της βενζοπυρόνης εμφανίζονται σαν μία διπλή (d) το καθένα, στα δ_{H} 6.20 ppm και δ_{H} 6.39 ppm, αντίστοιχα. Η πολλαπλότητα αυτή προκύπτει από την μακράς εμβέλειας σύζευξη, με $^4J_{\text{H6-H8}}=2.00$ Hz, γνωστή και ως W-coupling. Τα H-2', H-5', H-6' του κατεχολικού τμήματος εμφανίζουν πολλαπλότητες αντίστοιχες με αυτές ενός συστήματος ABX. Το H-6' (δ_{H} 7.58 ppm) εμφανίζεται ως μια διπλή της διπλής (dd) καθώς σχάζεται, από τα H-5', H-2' με $^3J_{\text{H5'-H6' (ortho)}}=8.50$ Hz και $^4J_{\text{H2'-H6' (meta)}}=2.00$ Hz. Τα H-2' (δ_{H} 7.70 ppm) και H-5' (δ_{H} 6.86 ppm) εμφανίζονται το καθένα ως μία διπλή (d) λόγω της σχάσης από το H-6'. Το ανωμερικό πρωτόνιο H-1'', εμφανίζεται σχετικά αποπροστατευμένο, ως μια διπλή κορυφή (d), με δ_{H} 5.24 ppm.

Το τμήμα του σακχάρου φαίνεται να περιλαμβάνει 7 πρωτόνια, ωστόσο δεν ταυτοποιήθηκε λόγω ανεπαρκών δεδομένων.



Τμήμα κερκετίνης – Παράγωγο κερκετίνης (3)



Εικόνα 3.3: Φάσμα ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) παράγωγο Κερκετίνης (3).

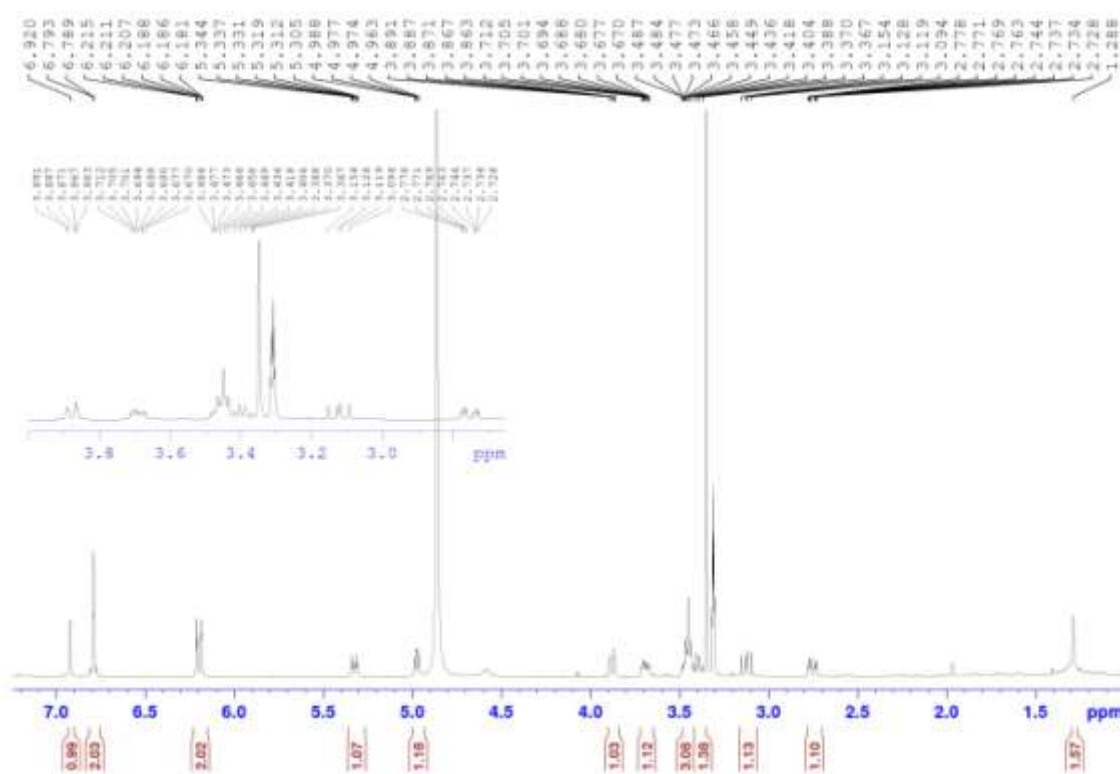
Πίνακας 3.3. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR (500MHz, CD_3OD) της ένωσης (3).

#	δ ^1H	Πολλαπλότητα, (J Hz)
Τμήμα Φλαβονόλης		
6'	7.58 (1H)	dd, $J_1=8.50$, $J_2=2.50$
2'	7.70(1H)	d, $J=2.50$
5'	6.86(1H)	d, $J=8.50$
6	6.20(1H)	d, $J=2.00$
8	6.39 (1H)	d, $J=2.00$
Τμήμα Σακχάρου		
1''	5.24(1H) ανωμερικό	d, $J=7.50$

3.1.3. Δευτερογενής μεταβολίτης: Ένωση (4).

Η ένωση 4, απομονώθηκε από το *Hypericum hircinum*, επίσης με παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (PTLC), του πολικού εκχυλίσματος των φύλλων και των ωθηκών, με EtOAc (HMEA).

Το μόριο φαίνεται να περιέχει 6 αρωματικά πρωτόνια, τα οποία σύμφωνα με περαιτέρω ανάλυση 2D NMR, (φάσμα COSY), δεν σχάζονται μεταξύ τους. Επίσης η ένωση περιέχει καρβονύλιο, κάτι το οποίο επιβεβαιώνεται από την κορυφή στα 198.52 ppm στο φάσμα ^{13}C . Στον πίνακα 3.4, που ακολουθεί, δίνονται οι αλληλεπιδράσεις των ατόμων H και C, καθώς επίσης και οι σταθερές σύζευξης, όπως αυτές προέκυψαν από την ανάλυση 2D NMR (HSQC, HMBC, COSY).



Εικόνα 3.4: Φάσμα ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) Ένωσης (4).

Πίνακας 3.4. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR (500MHz, CD₃OD) της ένωσης (4).

¹³ C	DEPT-135	HSQC	δ ¹ H	Πολλαπλότητα, (J Hz)	COZY	HMBC
198.52	C	-	-	-	-	3.12 ppm 2.76 ppm
167.02 166.90	C	-	-	-	-	6.21 ppm 6.18 ppm 4.97 ppm
164.90 164.80	C	-	-	-	-	6.21 ppm 6.18 ppm
164.50	C	-	-	-	-	-
146.95	C	-	-	-	-	6.92 ppm
146.50	C	-	-	-	-	6.78 ppm
131.49 131.44	C	-	-	-	-	6.92 ppm (ασθενές) 6.78 ppm
104.89 104.90	C	-	-	-	-	6.21 ppm 6.18 ppm
119.34 119.31	CH	6.78 ppm	6.78 (1H)	b.singlet	-	6.92 ppm
116.2	CH	6.78 ppm	6.78 (1H)	b.singlet	-	6.78 ppm
114.8 114.7	CH	6.92 ppm	6.92 (1H)	b.singlet	-	6.78 ppm

101.1 101.2	CH	4.97 ppm	4.97 (1H)	dd, $J_1=7.24, J_2=5.21$	3.44 ppm	3.44 ppm br
97.9	CH	6.21 ppm	6.21 (1H)	dt	-	6.21 ppm
96.9	CH	6.18 ppm	6.18 (1H)	b.singlet	-	6.18 ppm
80.7, 80.6	CH	-	-	-	-	6.92 ppm, 6.78 ppm
78.2 77.8	CH	5.31 ppm	5.31 (1H)	dt, $J_1=12.70, J_2=3.33$	2.75 ppm 3.12 ppm	4.97 ppm, 3.44 ppm 3.88 ppm, 3.39 ppm 3.71 ppm
74.6	CH	3.44 ppm	3.44 (2H)	t, $J=7.14$	4.97 ppm 3.39 ppm 3.68 ppm	3.44 strong
71.1	CH	3.39 ppm	3.39 (1H)	-	3.44 ppm	3.88 ppm, 3.71 ppm weak, 3.44 ppm strong
62.3	CH ₂ ↓	3.87 ppm	3.87 (1H)	dt, $J_1=12.37, J_2=2.10$	3.44 ppm 3.68 ppm	3.44 ppm 3.39 ppm
		3.68 ppm	3.68 (1H)	dq, $J_1=12.23, J_2=5.37, J_3=3.72$	3.44 ppm 3.87 ppm	
44.00 44.16	CH ₂ ↓	3.12 ppm	3.12 (1H)	dd, $J_1=17.42, J_2=12.79$	2.75 ppm 5.32 ppm	3.12 ppm
		2.75 ppm	2.75 (1H)	dq, $J_1=17.04, J_2=4.27, J_3=2.04$	3.12 ppm 5.32 ppm	

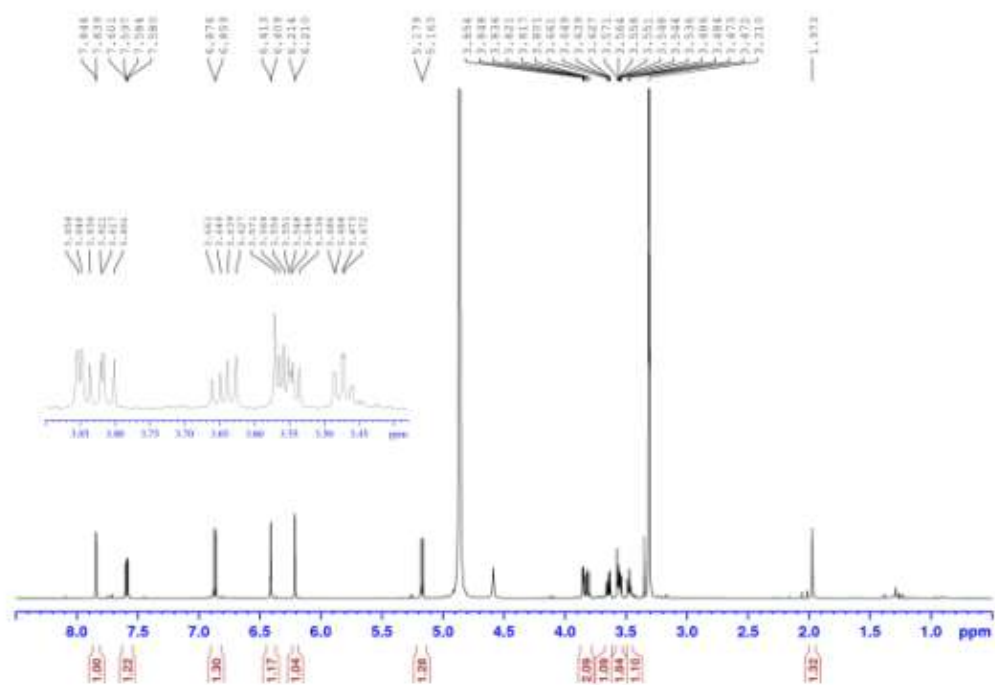
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Αντικείμενο της παρούσας μελέτης υπήρξε η μελέτη των δευτερογενών μεταβολιτών του είδους *Hypericum hircinum*, ένα είδος του γένους *Hypericum*, με ελάχιστες αναφορές σε επιστημονικές μελέτες, που όμως τα τελευταία χρόνια προσελκύει το ενδιαφέρον των ερευνητών. Η μελέτη επικεντρώθηκε στα πολικά εκχυλίσματα, τα οποία σύμφωνα με τη βιβλιογραφία περιέχουν πλήθος ενώσεων.
- Συγκεκριμένα έγινε μελέτη του μεθανολικού και του αιθανολικού (ψυχρή εκχύλιση) εκχυλίσματος, των φύλλων και των άνθεων αντίστοιχα.
- Απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν οι δευτερογενείς μεταβολίτες Υπεροσίδης (1) και Αβικουλαρίνη (2) και άλλα παράγωγα κερκετίνης (3-4), και εντοπίστηκαν σε έναν μεγάλο αριθμό κλασμάτων, καθώς αποτελούν πολύ κοινά συστατικά ολόκληρου του γένους *Hypericum*.
- Από τη μελέτη αυτή, δεν απομονώθηκαν ναφθοδιανθρόνες και φλορογλουκινόλες, χωρίς αυτό να συνεπάγεται η απουσία των ενώσεων αυτών από το φυτό. Επίσης μεγάλος αριθμός ενώσεων, της χημικής σύστασης του φυτού, είναι θερμοευαίσθητες και φωτοευαίσθητες, οι οποίες μετά από την έκθεση των εκχυλισμάτων σε φως, οξυγόνο ή υψηλές θερμοκρασίες διασπώνται.
- Πειραματικά σχετικά με την χρωματογραφική ανάλυση και την ταυτοποίηση των ενώσεων με ^1H NMR, παρατηρήθηκε ότι οι πολικές ενώσεις με πολλά υδροξύλια, διαχωρίζονται πιο αποτελεσματικά σε στήλη Sephadex, από ότι σε στήλη με silica gel.

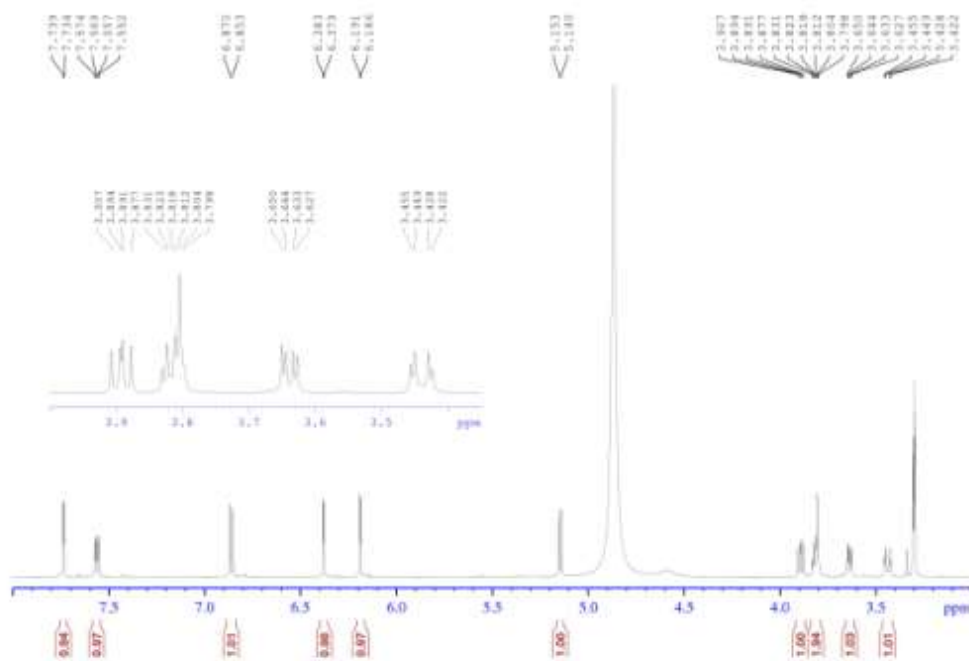
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΤΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ

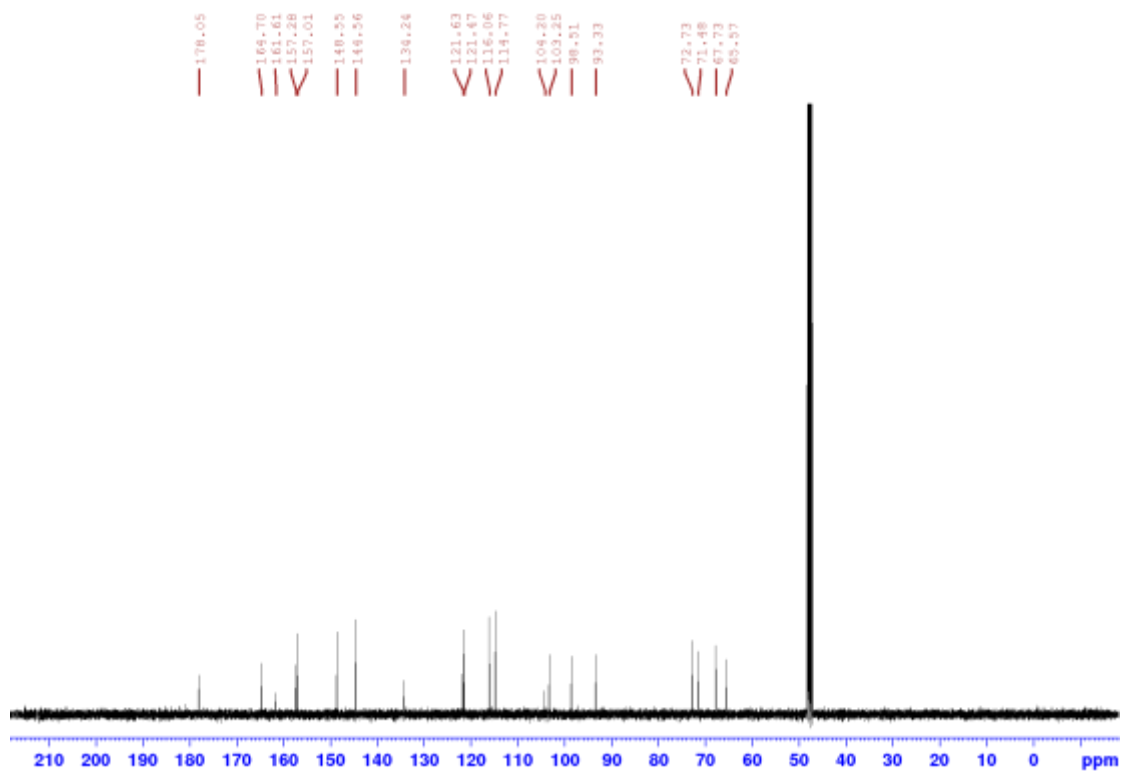
Φάσμα ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) Υπεροσίδη (1)



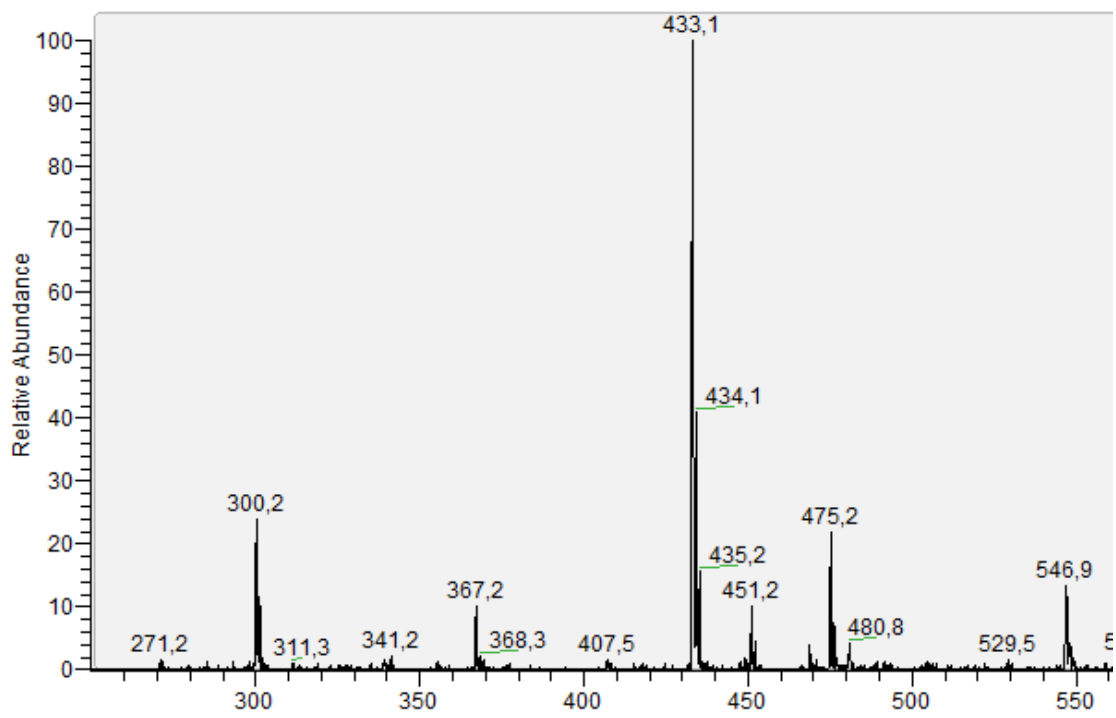
Φάσμα ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) Αβικουλαρίνη (2).



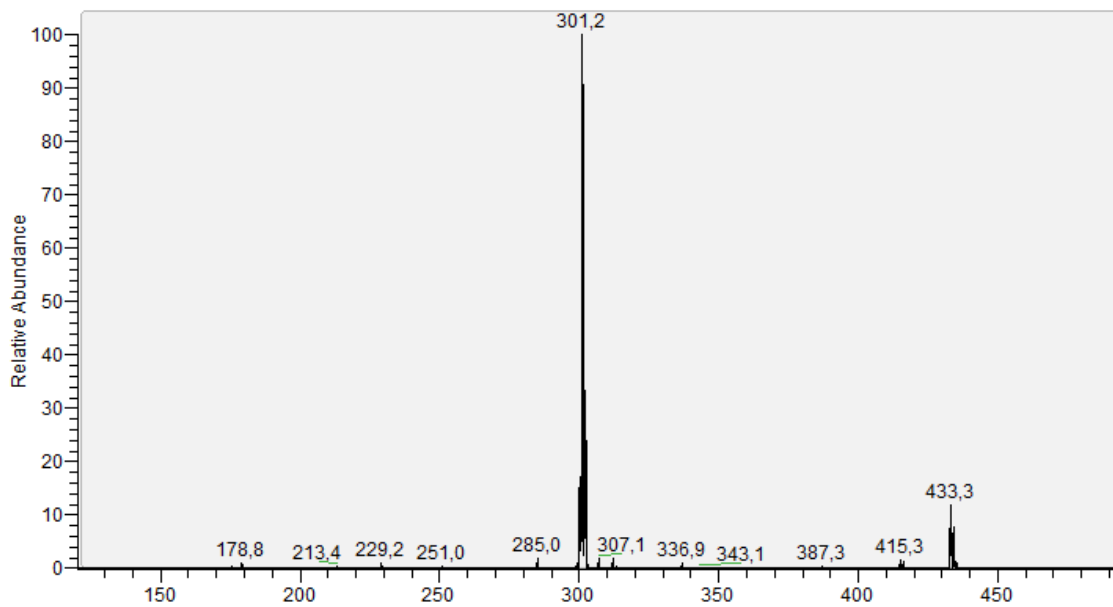
Φάσμα ^{13}C NMR (500 MHz, CD_3OD) Αβικουλαρίνη (2).



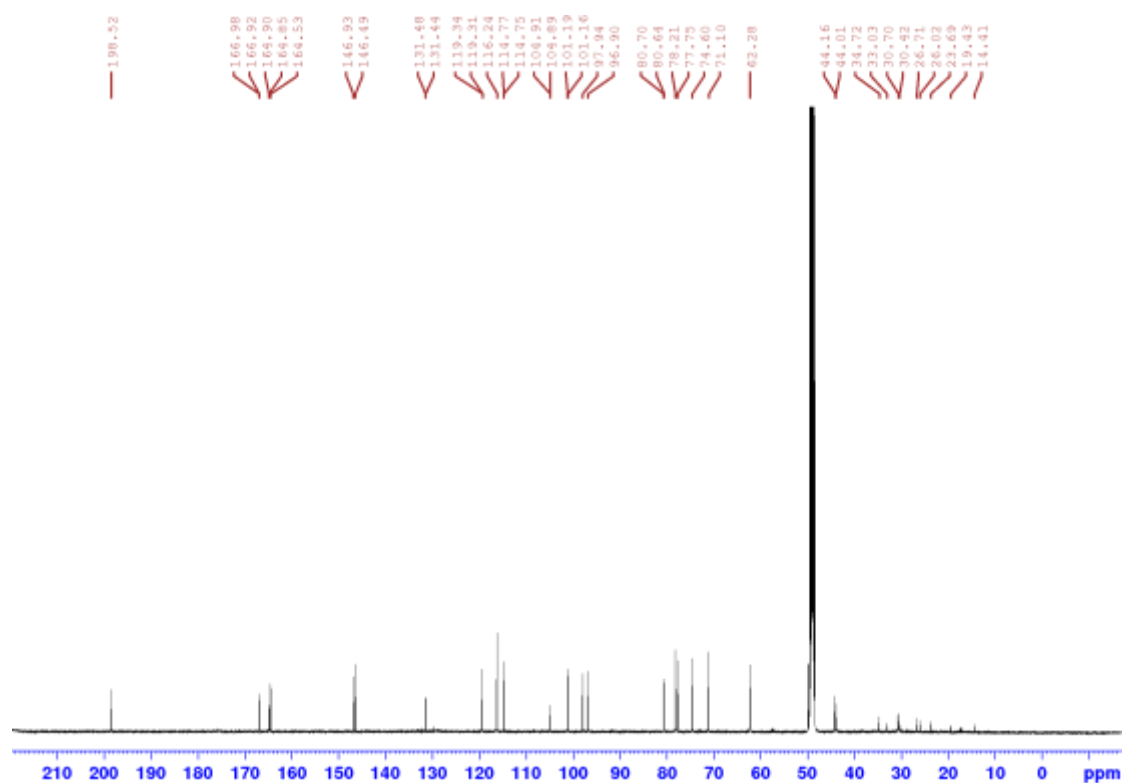
Φάσμα μάζας αρνητικού ιονισμού Αβικουλαρίνης (2).



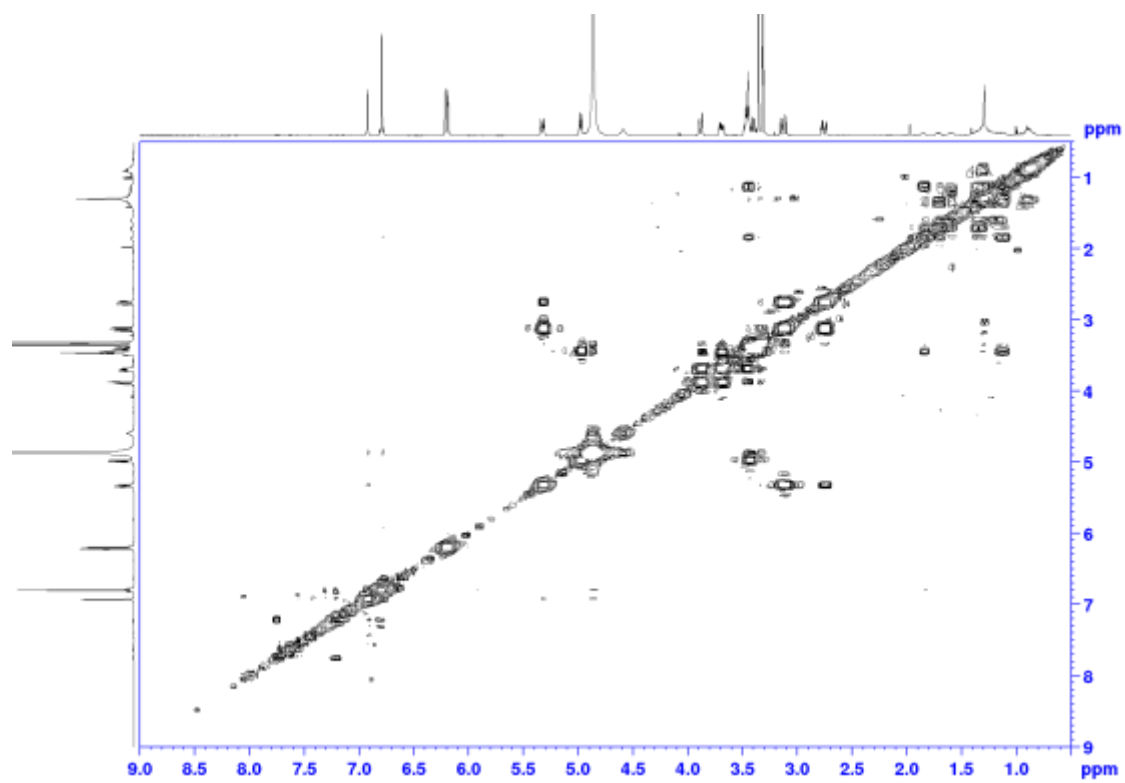
Φάσμα μάζας MS² αρνητικού ιονισμού Αβικουλαρίνης (2).



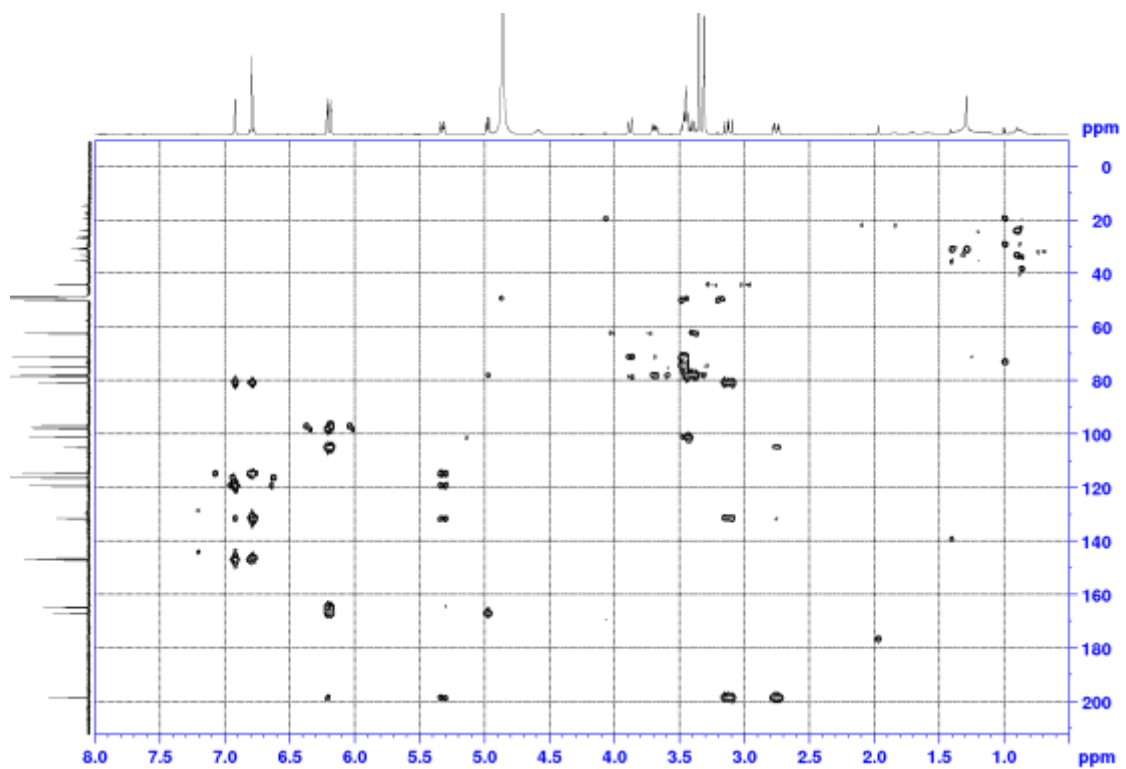
Φάσμα ^{13}C NMR (500 MHz, CD_3OD) Ένωσης (4).



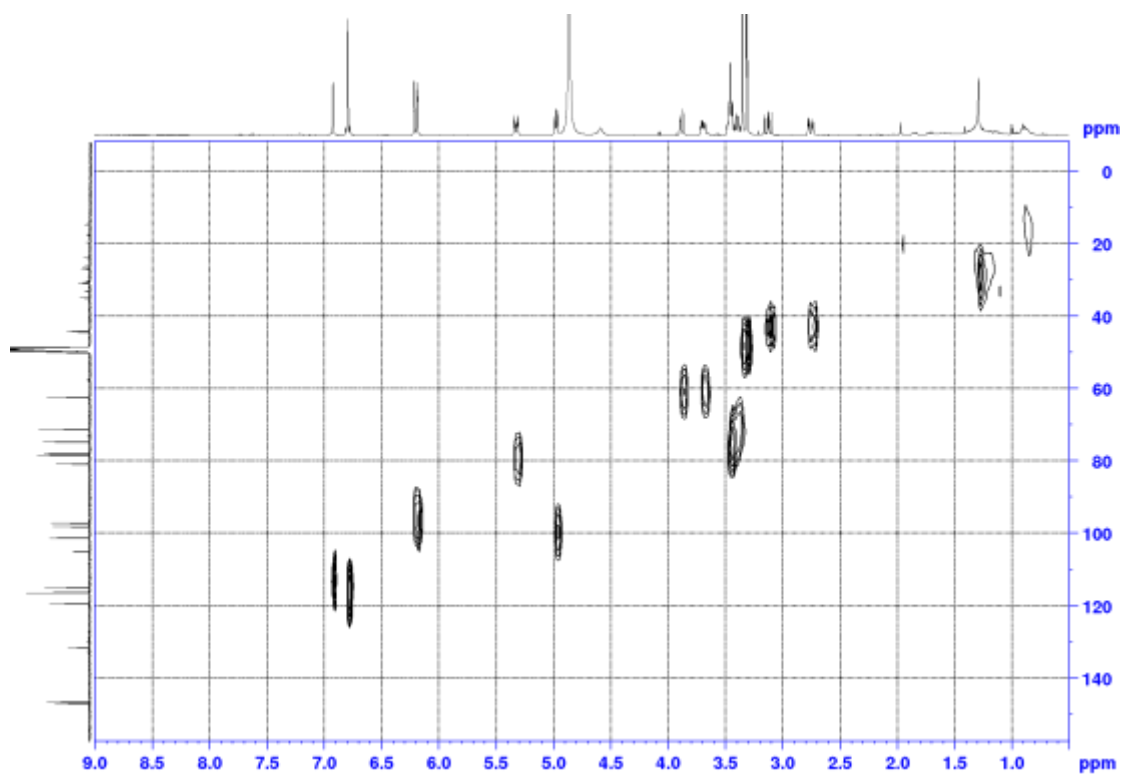
Φάσμα COSY (500 MHz, CD_3OD) Ένωση (4).



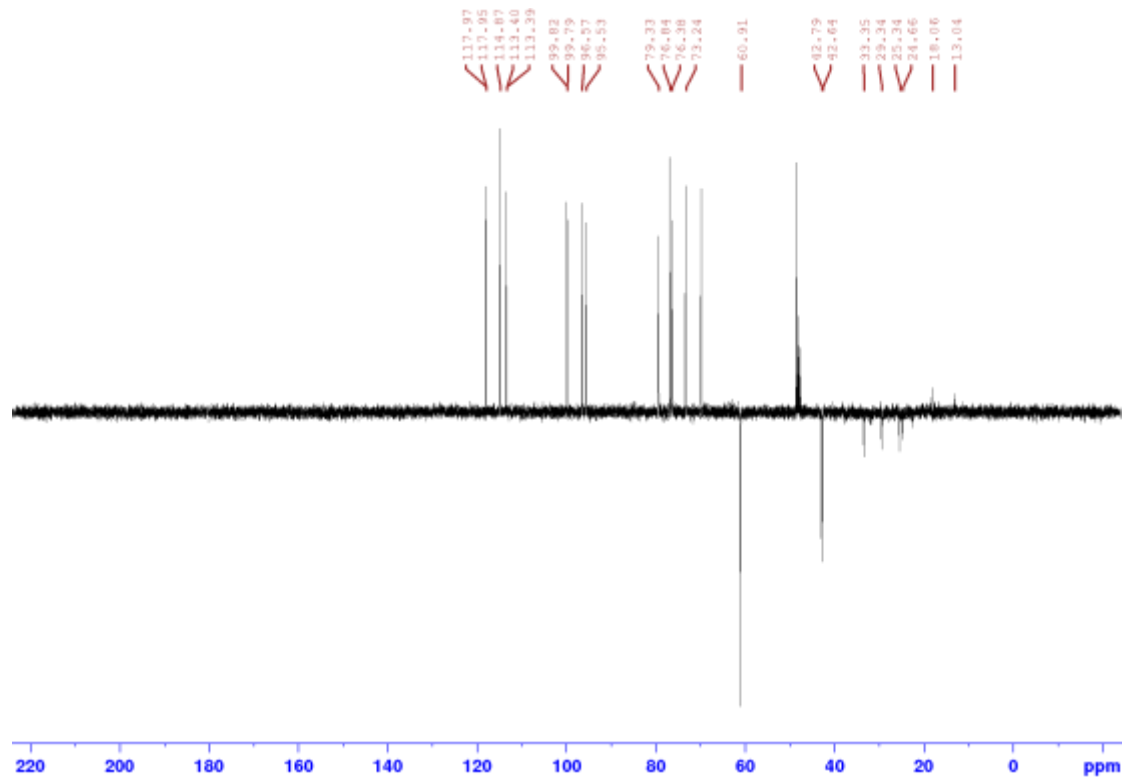
Φάσμα HMBC (500 MHz, CD3OD) Ένωση (4).



Φάσμα HSQC (500 MHz, CD3OD) Ένωση (4).



Φάσμα DEPT-135 (500 MHz, CD₃OD) Ένωση (4).



BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ¹ Rouis, Z.; Elaissi, A.; Nabil Ben Salem Abid.; Mohamed Ali Lassoued.; Pier Luigi Cioni.; Flamini, G.; Aouni, M.; Chemical Composition and Intraspecific Variability of the Essential Oils of Five Populations of *Hypericum triquetrifolium* Turra Growing in North Tunisia, *Chem. Biodivers*, **2012**, *9*, 1-10.
- ² Robson, N.; Strid, A.; *Hypericum*. In: Strid, A. (Ed.), *Mountain Flora of Greece*, Cambridge University Press, Cambridge, **1986**, *1*, 594-608.
- ³ Bennett, J.; Brown, C.; Use of Herbal Remedies by Patients in a Health Maintenance Organization, *J. Am. Pharm. Assoc.* **2000**, *40*, 353-358.
- ⁴ Napoli, E.; Siracusa, L.; Ruberto, G.; Carrubba, A.; Lazzara, S.; Speciale, A.; Cimino, F.; Saija, A.; Cristani, M.; Phytochemical profiles, phototoxic and antioxidant properties of eleven *Hypericum* species - A comparative study, *Phytochemistry*, **2018**, *152*, 162-173.
- ⁵ Burak, M.; Imen, Y.; Flavonoids and their antioxidant properties, *Turkiye Klin Tip Bil Derg*, **1999**, *19*, 296-304.
- ⁶ 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.
- ⁷ 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.
- ⁸ Pietta, P.; Gardana, C.; Pietta A.; Comparative evaluation of St. John's Wort from different Italian regions, *Farmaco*, **2001**, *56*, 491-496.
- ⁹ Tekelova, D.; Repcak, M.; Zemkova, E.; Toth, J.; Quantitative changes in dianthrones, hyperforin and flavonoids content in the flower ontogenesis of *Hypericum perforatum*, *Planta Med*, **2000**, *66*, 778-780.
- ¹⁰ Πυλαρά, Α.; Καρατζά, Ε.; Ιατρού, Γ.; Το γένος *Hypericum* L. στην Ελλάδα, Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Βιολογίας Φυτών, Πανεπιστήμιο Πατρών, 26500 Πάτρα.
- ¹¹ Quassinti, L.; Lupidi, G.; Maggi, F.; Sagratini, G.; Papa, F.; Vittori, S.; Bianco, A.; Bramucci, M.; Antioxidant and antiproliferative activity of *Hypericum hircinum* L. subsp. *majus* (Aiton) N. Robson essential oil, *Natural Product Research, Formerly Natural Product Letters*, **2013**, *27*, 862-868.
- ¹² Σαμιωτάκη, Χ.; Απομόνωση και χαρακτηρισμός δευτερογενών μεταβολιτών από το φυτό *Hypericum empetrifolium*, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, **2019**, 1-135.
- ¹³ Paris, R.; Nothis A.; Plants of New Calendonia II. Plants with toxic polyphenol derivatives include *Cleistanthus stipitatus* leaves, *Plant. Med. Phytother*, **1970**, *4*, 63-74.