



ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑΣ-ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑΣ-
ΦΥΤΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ

Φυτοχημική ανάλυση του φυτού
Indigofera hirsuta (Leguminosae) και
έλεγχοι Αντιοξειδωτικής Δράσης και
Αναστολής της ALR1, ALR2

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ
ΕΡΓΑΣΙΑ ΤΗΣ
ΦΑΡΜΑΚΟΠΟΙΟΥ-
ΧΗΜΙΚΟΥ ΚΑΡΑΚΟΥΣΗ
ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΧΡΙΣΤΙΝΑ

Επιβλέπων καθηγητής: Ευγένιος
Κοκκάλου Καθηγητής
Φαρμακογνωσίας

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ ΙΟΥΝΙΟΣ 2012

Ευχαριστίες

Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή κ.Κοκκάλου Ευγένιο για την υπόδειξη του θέματος της διατριβής μου, για την επιμέλεια και καθοδήγηση κατά τη διάρκεια της πραγματοποίησης της καθώς και για το άριστο κλίμα συνεργασίας που μου παρείχε. Τον ευχαριστώ ιδιαίτερα για την υπομονή του και επιμονή του που επέδειξε καθόλη την διάρκεια της φοίτησης μου.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα την Δρ. Γαβριέλη Χρυσή για την αμέριστη συμπαράσταση της, την συμβολή της στην διευκρίση των φασμάτων NMR και την επιμέλεια του κειμένου.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα του Δρ. Παναγιώτη Κεφάλα, Ερευνητή του Μ.Α.Ι.Χ. για την λήψη των φασμάτων LC-DAD-MS (ESI+), την Δρ. Μαρία Ζερβού για την λήψη των φασμάτων του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού και την Δρ. Ελένη Σιάπη για την λήψη των φασμάτων μάξης.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα την Καθηγήτρια κ. Χατζηπαύλου-Λίτινα Δήμητρα και την Λέκτορα κ. Λάζαρη Διαμάντω οι οποίοι συμμετείχαν στην εξεταστική επιτροπή και βοήθησαν με τις εύστοχες παρατηρήσεις τους.

Ευχαριστώ τους υποψήφιους διδάκτορες Μιχάλη Πλιούκα και Φίλιππο Τσατάλα, καθώς και την υποψήφια μεταπτυχιακή φοιτήτρια Χάιδω Μπακιοτζή για το άριστο κλίμα συνεργασίας και την σημαντική βοήθεια που μου παρείχαν. Ευχαριστώ επίσης την υποψήφια μεταπτυχιακή φοιτήτρια Μπεϊλεκτοΐδου Ν. Ξανθίππη για το άριστο κλίμα σύνεργασίας.

**Στους γονείς μου
και στον αδερφό μου
Αλέξανδρο**

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A.ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	6
1.1.Φυτά του γένους Indigofera	6
1.2. Το είδος Indigofera hirsuta	9
1.3. Ιστορικά στοιχεία	11
1.3.1.Εξαγωγή της χρωστικής Indigo	12
1.4. Περιγραφή των φυτών του γένους Indigofera	15
1.5. Χρήσεις του φυτού Indigofera hirsuta στην παραδοσιακή θεραπευτική	32
ΣΚΟΠΟΣ	33
2.Φλαβονοειδή	34
2.1. Βιοσύνθεση των φλαβονοειδών	39
2.2.Ρόλος των φλαβονοειδών στα φυτά	47
2.3.1. Φλαβονοειδή και αντιοξειδωτική δράση	47
2.3.2. Φλαβονοειδή και καρκίνος	56
2.3.3. Φλαβονοειδή και λοιμώξεις	59
2.3.3.1. Αντιμικροβιακή δράση	59
2.3.3.2. Αντιβακτηριακή δράση	59
2.3.3.3 Αντιμυκητιασική δράση	60
2.3.3.4. Αντιϊκή δράση	61
2.3.3.5. Αντιελκωτική δράση	62
3. Φαινολικές ενώσεις	63
B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	68
4. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ.	68
4.1. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας	68
4.2.Χρωματογραφία στήλης	69
4.3 Υγρή χρωματογραφία Υψηλής απόδοσης (HPLC)	69
4.4. Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού	69
4.5. Τεχνική LC-DAD-MS (ESI ⁺)	70
5. Πειραματική διαδικασία	70
5.1.Εκχύλιση της δρόγης	70
5.2.Χρωματογραφικός έλεγχος των εκχυλισμάτων	71
5.3.Κατανομές του μεθανολικού εκχυλίσματος	71
5.4. Χρωματογραφικός έλεγχος των στερεών υπολειμμάτων του εκχυλίσματος της μεθανόλης που προέκυψαν από τις κατανομές	71

5.5. Ποιοτική ανάλυση των εκχυλισμάτων με το σύστημα LC-DAD-MS (ESI ⁺)	77
5.5.1. Βουτανολικό κλάσμα	78
5.5.1.α. Τρισακχαρίτης της λουτεολίνης	79
5.5.1.β. Μονοσακχαρίτης της λουτεολίνης.....	83
5.5.2. Κλάσμα οξικού αιθυλεστέρα	87
5.5.2.α. Διγλυκοζίτης της ναριγγενίνης	88
5.5.2.β. Διγλυκοζίτης της απιγενίνης με πλευρική αλυσίδα	90
5.5.3. Αιθερικό κλάσμα	95
5.5.3.α. Εστέρας του κινικού οξέος με φερουλικό, κουμαρικό και καφεϊκό οξύ	96
5.5.3.β. Εστέρας του κινικού οξέος με δυο μόρια σιναπτικού οξέος και ενός μορίου καφεϊκού οξέος..... :	102
5.5.3.γ. Εστέρας του κινικού οξέος με δυο μόρια σιναπτικού οξέος και ενός μορίου καφεϊκού οξέος.....	114
5.6. Μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο του DPPH	121
5.7. Μέτρηση της αναστολής της αναγωγής της αλδόζης και της αναγωγής της αλδεΐδης	126
5.7.1. Σακχαρώδης διαβήτης.....	126
5.7.2. Αναγωγή της αλδόζης	131
5.7.3. Αναγωγή της αλδεΐδης.	134
5.7.4. Αναστολείς της αναγωγής της αλδόζης	135
5.7.4.α. Παραγωγα της υδαντοΐνης, κυκλικά ιμίδια	135
5.7.4.β. Παράγωγα του καρβοξυλικού οξέος.....	136
5.7.5. Αναστολείς της ALR2 που απομονώθηκαν από τη φύση	138
5.7.5.α. Φλαβονοειδή	138
5.7.5.β. Υδροξυκινναμωμικά οξέα	143
5.7.6. Έλεγχος αναστολής του ενζύμου αναγωγής της αλδόζης	144
5.7.7. Έλεγχος αναστολής του ενζύμου αναγωγής της αλδεΐδης	147
5.8. Απομόνωση ουσιών από το ίζημα του οξικού αιθυλεστέρα	153
5.9. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΦΑΣΜΑΤΩΝ	160
5.9.1. ΈΝΩΣΗ 1	160
5.9.2. ΈΝΩΣΗ 2	166
5.9.3. ΈΝΩΣΗ 3	178
5.9.4. ΈΝΩΣΗ 4	216
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	232
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	23

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Φυτά του γένους *Indigofera*

Τα φυτά του γένους *Indigofera* είναι δικοτυλήδωνα και έχουν τα εξής χαρακτηριστικά:

- Φέρουν πενταμερή κάλυκα και πενταμερή στεφάνη με πέταλα ανομοιόμορφα, από τα οποία το ένα ονομάζεται πέτασος, τα δύο πλευρικά ονομάζονται πτέρυγες και τα υπόλοιπα δύο αποτελούν την τρόπιδα. Τα πέταλα δηλαδή, είναι διαφορετικά σε μέγεθος και σχήμα και δημιουργούν μαζί με τα άλλα μέρη της στεφάνης ένα έντονο ζυγόμορφο άνθος.
- Οι στήμονες είναι 10, από τους οποίους οι εννέα συχνά συμφύονται και ο ένας παραμένει ελεύθερος.
- Φέρουν ένα καρπόφυλλο, που καταλήγει σε ύπερο και περικλείεται από την τρόπιδα.
- Είναι εντομογαμή φυτά και η παραπάνω κατασκευή του άνθους, που είναι του γενικού τύπου $K_{(5)}\Sigma_{(5)}A_{(9)+1}$ ή $A_{(10)}\Gamma_1$ εξυπηρετεί αυτόν τον τρόπο επικονίασης.
- Ο καρπός που σχηματίζεται από ένα καρπόφυλλο, είναι χαρακτηριστικός και ονομάζεται χέδρωπας (legumen), ανοίγει δε κατά την ξήρανση από την ραχιαία και κοιλιακή ραφή.
- Τα φύλλα είναι σύνθετα πτεροειδή, με πολλά φυλλάρια και περιτόλικτα.
(Μπαμπαλώνας –Κοκκινη 2004)



Στο γένος *Indigofera* απαντούν 700 είδη, είναι ποώδη φυτά κατά το μεγαλύτερο ποσοστό ενώ κάποια μπορεί να εξελιχθούν σε μικρά δέντρα που μπορούν να φτασουν σε ύψος τα 5 με 6 μέτρα. Στον **Πίνακα 1** αναφέρονται μερικά από τα είδη που απαντούν στο γένος *Indigofera*:

Πίνακας 1: είδη του γένους *Indigofera*

<i>Indigofera adenocarpa</i>	<i>Indigofera langebergensis</i>
<i>Indigofera adenoides</i>	<i>Indigofera laxeracemosa</i>
<i>Indigofera alopecuroides</i>	<i>Indigofera lespedezioides</i>
<i>Indigofera alpina</i>	<i>Indigofera leucotricha</i>
<i>Indigofera alternans</i>	<i>Indigofera lindheimeriana</i>
<i>Indigofera amblyantha</i>	<i>Indigofera linifolia</i>
<i>Indigofera argentea</i>	<i>Indigofera linnaei</i>
<i>Indigofera argentea</i>	<i>Indigofera litoralis</i>
<i>Indigofera angustata</i>	<i>Indigofera livingstoniana</i>
<i>Indigofera angustifolia</i>	<i>Indigofera longebarbata</i>
<i>Indigofera antunesiana</i>	<i>Indigofera longepedicellata</i>
<i>Indigofera aquae-nitensis</i>	<i>Indigofera longeracemosa</i>
<i>Indigofera arenophila</i>	<i>Indigofera lupatana</i>
<i>Indigofera argentea</i>	<i>Indigofera lyallii</i>
<i>Indigofera arrecta</i>	<i>Indigofera macrophylla</i>
<i>Indigofera articulata</i>	<i>Indigofera maritima</i>
<i>Indigofera aspalathoides</i>	<i>Indigofera marmorata</i>
<i>Indigofera asperan</i>	<i>Indigofera mauritanica</i>
<i>Indigofera asperifolia</i>	<i>Indigofera melanadenia</i>
<i>Indigofera astragalina</i>	<i>Indigofera meyeriana</i>
<i>Indigofera atriceps</i>	<i>Indigofera microcarpa</i>
<i>Indigofera atropurpurea</i>	<i>Indigofera mimosoides</i>
<i>Indigofera auricoma</i>	<i>Indigofera miniata</i>
<i>Indigofera australis</i>	<i>Indigofera mischocarpa</i>
<i>Indigofera bainesii</i>	<i>Indigofera mollicoma</i>
<i>Indigofera boviperma</i>	<i>Indigofera monantha</i>
<i>Indigofera brachynema</i>	<i>Indigofera nebrowniana</i>
<i>Indigofera brachydon</i>	<i>Indigofera nephrocarpoides</i>
<i>Indigofera brachystachya</i>	<i>Indigofera nigrescens</i>
<i>Indigofera brevicalyx</i>	<i>Indigofera nigromontana</i>
<i>Indigofera brevidens</i>	<i>Indigofera nummulariifolia</i>
<i>Indigofera brevipes</i>	<i>Indigofera oblongifolia</i>
<i>Indigofera bungeana</i>	<i>Indigofera omissa</i>
<i>Indigofera burchellii</i>	<i>Indigofera ormocarpoides</i>
<i>Indigofera candicans</i>	<i>Indigofera ovata</i>
<i>Indigofera candolleana</i>	<i>Indigofera oxalidea</i>
<i>Indigofera capillaris</i>	<i>Indigofera oxytropis</i>
<i>Indigofera carlesii</i>	<i>Indigofera oxytropoides</i>
<i>Indigofera caroliniana</i>	<i>Indigofera paniculata</i>
<i>Indigofera cassioides</i>	<i>Indigofera parkesii</i>
<i>Indigofera cecili</i>	<i>Indigofera parodiana</i>
<i>Indigofera charlierana</i>	<i>Indigofera pascuorum</i>
<i>Indigofera chuniana</i>	<i>Indigofera pendula</i>
<i>Indigofera circinella</i>	<i>Indigofera pilosa</i>
<i>Indigofera circinnata</i>	<i>Indigofera podophylla</i>
<i>Indigofera colutea</i>	<i>Indigofera poliotes</i>
<i>Indigofera comosa</i>	<i>Indigofera pongolana</i>
<i>Indigofera cooperi</i>	<i>Indigofera porrecta</i>

<i>Indigofera cordifolia</i>	<i>Indigofera potaninii</i>
<i>Indigofera cryptantha</i>	<i>Indigofera pratensis</i>
<i>Indigofera cuneata</i>	<i>Indigofera praticola</i>
<i>Indigofera cuneifolia</i>	<i>Indigofera pretoriana</i>
<i>Indigofera cylindracea</i>	<i>Indigofera procumbens</i>
<i>Indigofera cylindrica</i>	<i>Indigofera prostrata</i>
<i>Indigofera cytisoides</i>	<i>Indigofera pseudotinctoria</i>
<i>Indigofera daleoides</i>	<i>Indigofera psoraloides</i>
<i>Indigofera decora</i>	<i>Indigofera pulchra</i>
<i>Indigofera delagoaensis</i>	<i>Indigofera purpurea</i>
<i>Indigofera demissa</i>	<i>Indigofera rautanenii</i>
<i>Indigofera dendroides</i>	<i>Indigofera reducta</i>
<i>Indigofera denudata</i>	<i>Indigofera rehmannii</i>
<i>Indigofera dielsiana</i>	<i>Indigofera reticulata</i>
<i>Indigofera digitata</i>	<i>Indigofera rhynchocarpa</i>
<i>Indigofera dimidiata</i>	<i>Indigofera rhytidocarpa</i>
<i>Indigofera diphylla</i>	<i>Indigofera ripae</i>
<i>Indigofera disjuncta</i>	<i>Indigofera rostrata</i>
<i>Indigofera dosua</i>	<i>Indigofera rothii</i>
<i>Indigofera dregeana</i>	<i>Indigofera sabulicola</i>
<i>Indigofera dyeri</i>	<i>Indigofera sanguinea</i>
<i>Indigofera egens</i>	<i>Indigofera saxicola</i>
<i>Indigofera emarginella</i>	<i>Indigofera schimperi</i>
<i>Indigofera erecta</i>	<i>Indigofera secundiflora</i>
<i>Indigofera eriocarpa</i>	<i>Indigofera semitrijuga</i>
<i>Indigofera erythrogramma</i>	<i>Indigofera senegalensis</i>
<i>Indigofera evansiana</i>	<i>Indigofera sessiliflora</i>
<i>Indigofera eylesiana</i>	<i>Indigofera sessilifolia</i>
<i>Indigofera fanshawei</i>	<i>Indigofera setiflora</i>
<i>Indigofera filicaulis</i>	<i>Indigofera simplicifolia</i>
<i>Indigofera filifolia</i>	<i>Indigofera sokotrana</i>
<i>Indigofera filiformis</i>	<i>Indigofera sordida</i>
<i>Indigofera filipes</i>	<i>Indigofera sphaerocarpa</i>
<i>Indigofera flabellata</i>	<i>Indigofera spicata</i>
<i>Indigofera flavicans</i>	<i>Indigofera splendens</i>
<i>Indigofera foliosa</i>	<i>Indigofera stachyoides</i>
<i>Indigofera fortunei</i>	<i>Indigofera stenophylla</i>
<i>Indigofera frutescens</i>	<i>Indigofera strobilifera</i>
<i>Indigofera fulvopilosa</i>	<i>Indigofera suaveolens</i>
<i>Indigofera gairdnerae</i>	<i>Indigofera subcorymbosa</i>
<i>Indigofera galegoides</i>	<i>Indigofera subulifera</i>
<i>Indigofera garckeana</i>	<i>Indigofera suffruticosa</i>
<i>Indigofera glandulosa</i>	<i>Indigofera sulcata</i>
<i>Indigofera glaucescens</i>	<i>Indigofera swaziensis</i>
<i>Indigofera glomerata</i>	<i>Indigofera tenuis</i>
<i>Indigofera goetzei</i>	<i>Indigofera tenuissima</i>
<i>Indigofera griseoides</i>	<i>Indigofera tinctoria</i>
<i>Indigofera hamiltonii</i>	<i>Indigofera tomentosa</i>
<i>Indigofera hebeptala</i>	<i>Indigofera torulosa</i>
<i>Indigofera hedyantha</i>	<i>Indigofera trifoliata</i>

<i>Indigofera hendecaphylla</i>	<i>Indigofera tristis</i>
<i>Indigofera heterantha</i>	<i>Indigofera tristoides</i>
<i>Indigofera heterophylla</i>	<i>Indigofera trita</i>
<i>Indigofera heterotricha</i>	<i>Indigofera velutina</i>
<i>Indigofera heudelotii</i>	<i>Indigofera vicoides</i>
<i>Indigofera hewittii</i>	<i>Indigofera viscidissima</i>
<i>Indigofera hilaris</i>	<i>Indigofera vohemarensis</i>
<i>Indigofera himalayensis</i>	<i>Indigofera volkensis</i>
<i>Indigofera hirsuta</i>	<i>Indigofera wildiana</i>
<i>Indigofera hispida</i>	<i>Indigofera williamsonii</i>
<i>Indigofera hochstetteri</i>	<i>Indigofera woodii</i>
<i>Indigofera holubii</i>	<i>Indigofera zeyheri</i>
<i>Indigofera humifusa</i>	<i>Indigofera zollingeriana</i>
<i>Indigofera ichangensis</i>	
<i>Indigofera incana</i>	
<i>Indigofera ingrata</i>	
<i>Indigofera inhambanensis</i>	
<i>Indigofera kirilowii</i>	

Germplasm Resources Information Network

Κάποια από τα είδη θα σχολιαστούν στην συνέχεια ως προς τα συστατικά που περιέχουν και την δράση τους.

1.2 Το είδος *Indigofera hirsuta*

Το είδος *Indigofera hirsuta* εμφανίζει την εξής ταξονομία:

- ☐ Άθροισμα: *Magnoliophyta*
- ☐ Υποάθροισμα: *Magnoliophytina*
- ☐ Κλάση: *Magnoliopsida*
- ☐ Υποκλάση: *Rosidae*
- ☐ Τάξη: *Fabales*
- ☐ Οικογένεια: *Fabaceae* (*Leguminosae*)
- ☐ Γένος: *Indigofera*
- ☐ Είδος: *hirsuta*
- ☐ Υποείδος: *hirsuta*
- ☐ Κοινή ονομασία: *rough hairy indigo*



Πρόκειται για ένα φυτό μονοετές, ποώδες ή θαμνώδες που μπορεί να φτάσει τα 1,5 m σε ύψος. Ολόκληρο το φυτό καλύπτεται από εμφανείς τρίχες χρώματος καφέ. Τα κλαδιά είναι όρθια, φέρουν ραβδώσεις και στην ωρίμανσή τους γίνονται ξυλώδη. Τα φύλλα του είναι σύνθετα πτεροειδή και περιττόλκιτα. Τα παράφυλλα



Hooker, W.J., Companion to the Botanical magazine, vol. 2:t. 24 (1836-1837)

είναι τριγωνικά και έχουν μήκος 10-12 mm. Η ταξιανθία είναι βοτρυώδης, τα βράκτεια είναι ευθεία τριγωνικά και έχουν μήκος 4 mm. Ο μίσχος έχει μήκος 3 cm το κοτσάνι φτάνει τα 2 mm. Τα άνθη έχουν μήκος 6 mm, ο κάλυκας έχει μήκος 4 mm και φέρει



σκληρές καφέ τρίχες. Τα πέταλα έχουν χρώμα κόκκινο ή ρόζ και το πάνω μέρος του πετάλου είναι ελλειπτικό και μυτερό στις άκρες με διαστάσεις 4-5 mm× 2-2,5 mm.

Τα σέπαλα έχουν διαστάσεις 4-5 mm ×1,5 mm και εμφανίζουν μικρά τριχίδια στην επιφάνειά τους. Οι στήμονες είναι 10 από τους οποίους οι 9 συμφύονται και ο ένας παραμένει ελεύθερος. Η ανθοδόχη έχει μήκος 4,5 mm και η ωοθήκη εμφανίζεται να έχει λεπτά τριχίδια στην επιφάνειά της. Ο καρπός είναι χαρακτηριστικός ονομάζεται χέδρωπας με διαστάσεις 1-2 cm×1-2,5 mm και αυτός καλυμμένος από τριχίδια.



G. Byrne

Ανοίγει κατά την ξήρανση από την ραχιαία και κοιλιακή ραφή. ([Plant Resources of south-East Asia No 11:Auxilliary plants.](#))

1.3 Ιστορικά στοιχεία

Η ονομασία του γένους *Indigofera* προέρχεται από τη λέξη Indigo (ινδικό, λουλάκι) που στα σανσκριτικά είναι η λέξη για το σκούρο μπλε χρώμα. Το χρησιμοποιούσαν στην Ανατολή σαν βαφή και σαν θεραπευτικό μέσο και το οποίο απαντάται στην *Indigofera tinctoria* και στην *Indigofera*



suffruticosa. Η σπουδαιότητά του στο εμπόριο καταδεικνύεται από το συνώνυμό του στα σανσκριτικά "ο φίλος του εμπόρου". Η έναρξη της διακίνησής του ως εμπορικό αγαθό χρονολογείται από το 30 π.Χ. Αυτό που ο Διοσκουρίδης ονομάζει Indicon και ο Πλίνιος Indicum ήταν μια μπλε χρωστική με προέλευση από την Ινδία, το χρησιμοποιούσαν στη ζωγραφική και βαφική. Μετά από κωνιοποίηση, έδινε μια μαύρη σκόνη που σε επαφή με το νερό προέκυπτε μίγμα μπλε- μωβ χρώματος. Το Indigo θεωρείται η παλαιότερη βαφή της αρχαιότητας. Φαίνεται ότι χρησιμοποιήθηκε τουλάχιστον από το 3000 π.Χ και χαρακτηρίστηκε ως ο βασιλιάς των αρχαίων βαφών. Η χρωστική χρησιμοποιείτο για καλλωπιστικούς σκοπούς, σε θρησκευτικές τελετές και ως σύμβολο κοινωνικού και πολιτικού status σε όλα τα μήκη και πλάτη του τότε γνωστού κόσμου. Έδινε μπλε χρώμα μεγάλης αντοχής. Το βασικό βαφικό συστατικό είναι η ινδικοτίνη. Περιέχεται σε πολλά ινδικοφόρα δέντρα ή φυτά, όπως η γνωστή ευρωπαϊκή Ισάτις («κυανός»), που ήταν διαδεδομένη στην Ελλάδα αλλά και στη Δύση γενικότερα. Μετά από αιώνες χρήσεως στην Ανατολή, η βαφή διαδόθηκε στην Αίγυπτο, τη Συρία και αργότερα στην Ελλάδα, όπου θεωρήθηκε ανόργανη βαφή λόγω της κρυσταλλικής της εμφάνισης.

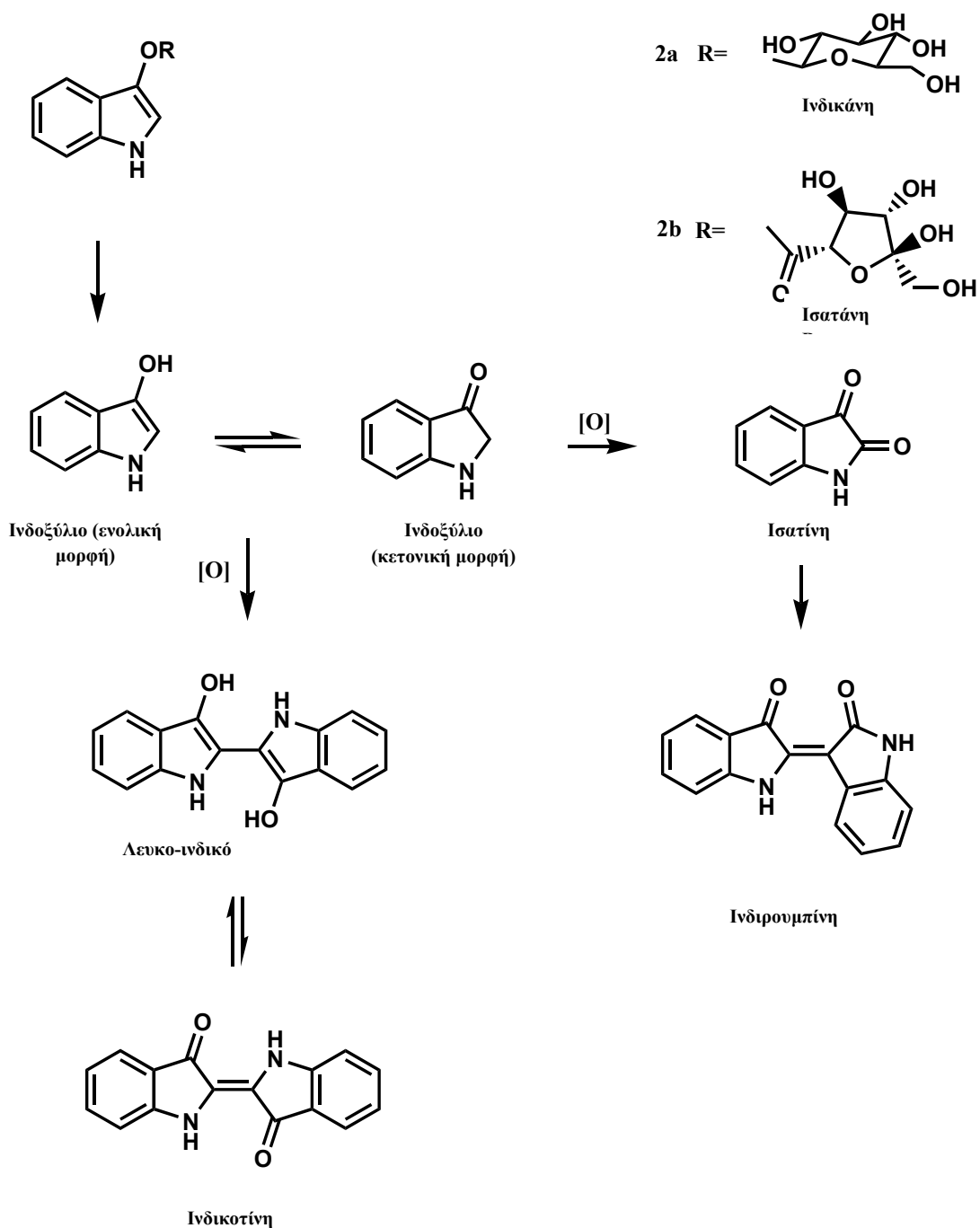
Στα αρχαία χρόνια θεωρούσαν το Indigo στυπτικό, και το χρησιμοποιούσαν σε έλκη και φλεγμονές καθώς επίσης και στον καθαρισμό και επούλωση πληγών. Οι πρώτοι Άραβες γιατροί το χρησιμοποίησαν υπό την ονομασία Nil. Τον 13^ο αιώνα, ο Μάρκο Πόλο περιγράφει τη διαδικασία της προετοιμασίας του Indigo για τη χρήση του ως βαφή. Το φυτό δεν ήταν γνωστό στην Ευρώπη μέχρι τα τέλη του 19^{ου} αιώνα. Τόσο οι Ινδοί όσο και οι Μωαμεθανοί θεωρούσαν ότι το φυτό κατείχε θεραπευτική δράση. Το συνταγογραφούσαν σε περιπτώσεις βήχα, λοιμώξεων των πνευμόνων και των νεφρών, διόγκωσης σπλήνα και ήπατος. Η εφαρμογή στο ομφαλό των παιδιών

θεωρείτο ότι ήταν ευεργετική σε παθήσεις του εντέρου, ενώ στο υπογάστριο βοηθητική της λειτουργίας της ουροδόχου κύστης. Τα φύλλα τα χρησιμοποιούσαν στη μορφή μορφή καταπλάσματος ή εμπλάστρου σε διάφορες δερματικές παθήσεις καθώς και σε έλκη και αιμορροΐδες. Εφαρμογή τους σε δαγκώματα και τσιμπήματα δηλητηριωδών εντόμων και ερπετών μετρίαζαν τον πόνο όπως επίσης και σε εγκαύματα. Το φυτό έχει εξαιρετική φήμη σε κάποιες περιοχές της Ινδίας ως προφυλακτικός παράγοντας ενάντια στην υδροφοβία ως σύμπτωμα της λύσσας. Ένα ποτήρι του κρασιού χυμός από τα φύλλα χορηγείται το πρωί, με ή χωρίς γάλα, για τρεις ημέρες, μετά από δάγκωμα σκύλου. Οι ασθενείς δεν εμφανίζουν ανεπιθύμητες ενέργειες πέραν του πονοκεφάλου. Με χορήγηση μεγαλύτερης δόσης δρα ως καθαρτικό. Επιπροσθέτως της συστηματικής χορήγησης, τα φύλλα εφαρμόζονται καθημερινά στη περιοχή του δαγκώματος υπό μορφή καταπλάσματος. Οι σπόροι των φυτών μετά από κονιοποίηση και εμβάπτιση σε αλκοολικό διάλυμα παρήγαγαν ένα βάμμα κατάλληλο για την καταπολέμηση των ψειρών. (<http://www.payer.de/amarakosa/amara206.htm>) Το 1897 η ποσότητα του Indigo που παραγόταν από φυτικές πηγές ανέρχονταν σε 19000 τόνους. Η ανάπτυξη της οργανικής χημείας οδήγησε στη συνθετική παραγωγή της χρωστικής που μείωσε αυτή την εξαγωγή του από τα φυτά σε 1000 τόνους το 1914 βαίνοντας με συνεχώς μειούμενο ρυθμό. Σήμερα φυτά του γένους Indigofera συνεχίζουν να έχουν ευρεία χρήση στη εξαγωγή χρωστικών για βαφή υφασμάτων με γνωστότερο όλων το denim για τη παραγωγή των blue jeans, ενώ οι συνεχείς έρευνες αποκαλύπτουν πλήθος συστατικών με πιθανή φαρμακολογική δράση.

1.3.1 Εξαγωγή της χρωστικής Indigo

Το χρωμοφόρο συστατικό του φυτού Indigofera tinctoria (True indigo) είναι η **ινδικοτίνη** η οποία βρίσκεται στα φύλλα και είναι παράγωγο του ινδολίου. Κατά την διάρκεια της ζύμωσης οι γλυκοζίτες του ινδολίου μετατρέπονται μέσω ενζυμικής υδρόλυσης σε ινδοξυλικό παράγωγο ενός ταυτομερούς μίγματος κετο- και ενολικής μορφής το οποίο οξειδώνεται από την επαφή του με τον αέρα πρώτα στο λευκο-ινδικό και τέλος στην ινδικοτίνη. Αυτή η λουλακί χρωστική στη συνέχεια συλλέγεται και χρησιμοποιείται ως βαφή. Ως παράπλευρη αντίδραση κατά τη διάρκεια της ζύμωσης είναι και η περαιτέρω οξείδωση του μίγματος της κετο- και ενολικής μορφής σε ισατίνη η οποία συμπυκνώνεται με ακόμη ένα μόριο ινδοξυλικού

παραγώγου για να δώσει την ινδουμπίνη μια κόκκινη χρωστική (Ferreira et al., 2004).



Η διαδικασία της εξαγωγής της χρωστικής περιλαμβάνει τα εξής στάδια:



Καλλιέργεια των φυτών



Ευλογή και τεμαχισμός



Indigo cake



Δεξαμενή και αναμικτήρας



Συμπίεση



Επιπλοισμός υγρού σε διάλυμα βακτηριακής καλλιέργειας



Προσθήκη νερού και βρασμός



Χρωστική



Ζύμωση



Ευλογή χρωστικής



Ανάδευση



Καθίζηση της χρωστικής

Αποστράγγιση νερού

1.4 Περιγραφή των φυτών του γένους *Indigofera*

Τα φυτά του γένους *Indigofera* έχουν ευρεία γεωγραφική εξάπλωση όντας γενικά ενδημικά των τροπικών και υποτροπικών περιοχών.

(http://zipcodezoo.com/Plants/I/Indigofera_hebepetala/Default.asp)

■ *Indigofera hirsuta* (Rough Hairy Indigo)

Γεωγραφική κατανομή: Αγκόλα, Αργεντινή,

Αυστραλία, Μπενίν, Βραζιλία, Μπουρουντί,

Καμερούν, Κεντροαφρικανική Δημοκρατία,

Κίνα, Νησιά Κόκος, Κολομβία, Κομόρες,

Κόστα Ρίκα, Εκουαδόρ, Σαλβαδόρ,

Ισημερινή Γουινέα, Γαλλική Γουιάνα,

Γκαμπόν, Γκάνα, Γουιάνα, Ονδούρα, Χονκ

Κονκ, Ινδία, Ινδονησία, Κένυα, Λιβερία, Μαδαγασκάρη, Μάλι, Μέξικο, Νικαράγουα,

Νίγηρας, Νιγηρία, Παπούα- Νέα Γουινέα, Παραγουάη, Περού, Φιλιππίνες, Σάο Τομέ

και Πρινσίπε, Σενεγάλη, Ισπανία, Σρι Λάνκα, Σουδάν, Σουρινάμ, Ταϊβάν, Τανζανία,

Ταϊλάνδη, Τόγκο, Ουγκάντα, Ηνωμένες Πολιτείες, Βενεζουέλα, Βιετνάμ, Ζάμπια,

Ζιμπάμπουε.



■ *Indigofera arrecta* (Bengal Indigo)

Γεωγραφική κατανομή: Αυστραλία, Μπενίν,

Μπουρουντί, Αιθιοπία, Γκάνα, Κένυα,

Μαδαγασκάρη, Μάλι, Νίγηρας, Νιγηρία,

Ρουάντα, Σομαλία, Νότια Αφρική, Τανζανία,

Ουγκάντα, Ζιμπάμπουε.



Φαρμακολογική δράση: Η βάση της αντιυπεργλυκαιμικής δράσης του φυτού εκτιμήθηκε χρησιμοποιώντας ποντίκια με φυσιολογικά επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα και ποντίκια με επαγόμενο διαβήτη από στρεπτοζοτοσίνη. Έγινε χορήγηση του αποξηραμένου εκχυλίσματος από του στόματος και ενδοπεριτοναϊκά. Το εκχύλισμα μείωσε τα επίπεδα γλυκόζης του αίματος στα φυσιολογικά ποντίκια σε νηστεία αλλά δεν παρεμπόδισε την αύξηση της γλυκόζης μετά από χορήγηση από του στόματος γλυκόζης σε αυτά τα ποντίκια. Το εκχύλισμα αύξησε τα επίπεδα της ινσουλίνης του πλάσματος. Στα διαβητικά ποντίκια η αύξηση της γλυκόζης του αίματος μετά από

χορήγηση γλυκόζης από του στόματος δεν επηρεάστηκε όταν το εκχύλισμα χορηγήθηκε 17 μέρες μετά την επαγωγή του διαβήτη. Όταν χορηγήθηκε 7 μέρες μετά την επαγωγή του διαβήτη η αύξηση της γλυκόζης του αίματος μειώθηκε σταθεροποιήθηκε μετά από 30 λεπτά. Τα αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι η *Indigofera arrecta* είναι ινσουλινοτροπικός παράγοντας που απαιτεί λειτουργικά β κύτταρα για να εμφανίσει φαρμακολογική δράση (Addy et al., 1992).

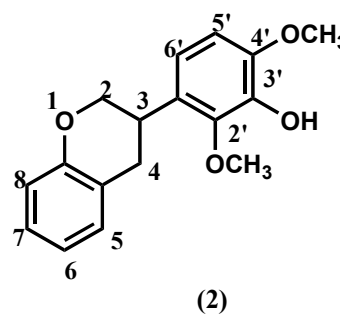
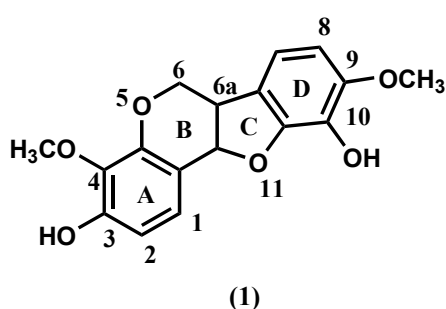
Χρήσεις: Στη παραδοσιακή θεραπευτική χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση της ελονοσίας (Stangeland et al., 2011), των στομαχικών διαταραχών (Muthee et al., 2011), καθώς και της αντιμετώπισης του διαβήτη χορηγούμενο από του στόματος (Addy et al., 1992).

■ *Indigofera aspalathoides* (Wiry Indigo)

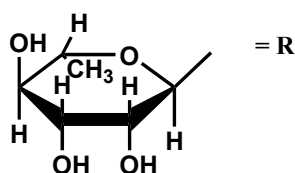
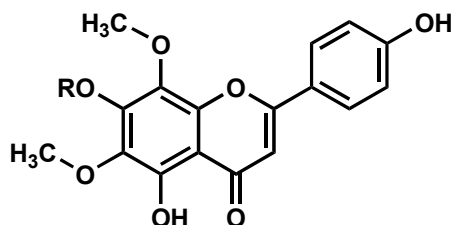
Γεωγραφική κατανομή: Ινδία



Συστατικά: Από το χλωροφορμιακό κλάσμα του φυτού απομονώθηκε ένα πτεροκαρπάνιο, το ινδικοκαρπάνιο (1) και ένα γνωστό ισοφλαβάνιο το μουκρονουλατολ (2).



Από το κλάσμα του οξικού αιθυλεστέρα που προήλθε από το αλκοολικό εκχύλισμα του βλαστού του φυτού απομονώθηκε ο 7-*O*-ραμνοζίτης της 5,4'-διυδροξυ 6,8-διμεθοξυ-φλαβόνης (3) (Rajkaroor et al., 2007).



(3)

Φαρμακολογική δράση: Το ινδικοκαρπάνιο έδειξε σημαντική ανασταλτική δράση έναντι της COX-1 και η *in vivo* αντιφλεγμονώδης δράση φάνηκε να είναι ανάλογη της Ιβουπροφαίνης (Selvam et al., 2004).

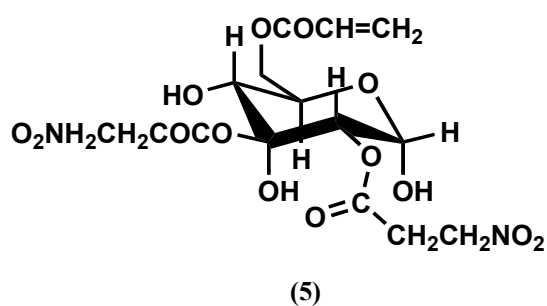
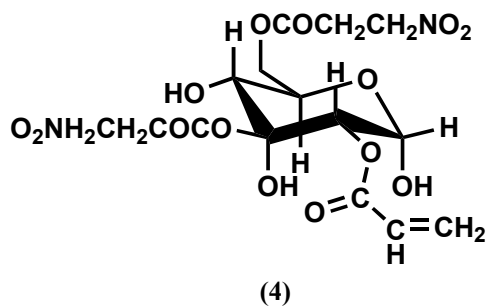
Χρήσεις: Χρησιμοποιείται στην παραδοσιακή ιατρική για την θεραπεία οιδημάτων, την γαστρική υπερέκκριση, την αντιμετώπιση του έλκους, τον πονόδοντο και την θεραπεία αποστημάτων. (Amala et al., 1982).

■ *Indigofera carlesii*

Γεωγραφική κατανομή: Ηνωμένες Πολιτείες, Κίνα.



Συστατικά: Από το κλάσμα του οξικού αιθυλεστέρα που προήλθε από το αιθανολικό εκχύλισμα της ρίζας του φυτού απομονώθηκαν οι εξής νιτρο-ενώσεις (Xin-Xin Zhang et al., 2006) 2-Ο-ακρυλ-3,6-δι-Ο-(3-νιτροπροπανουλο)-α-D-γλυκοπυρανοζίτης (4) και 6-Ο-ακρυλ-2,3-δι-Ο-(3-νιτροπροπανουλο)-α-D-γλυκοπυρανοζίτης (5)

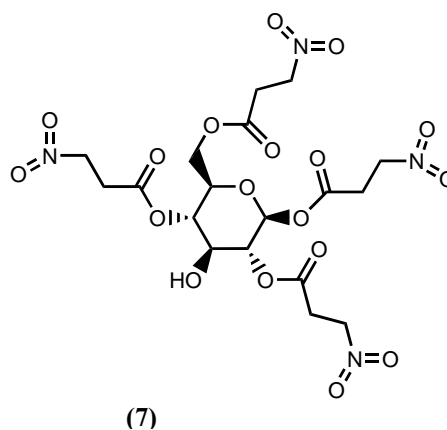
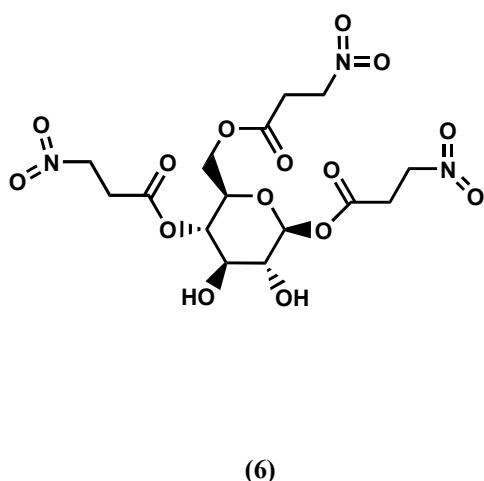


Χρήσεις: Στην παραδοσιακή κινέζικη ιατρική βρίσκει εφαρμογή στην ανακούφιση από τον πόνο και το πρήξιμο (Xiao 2002).

■ *Indigofera endecaphylla*

Γεωγραφική κατανομή: Ταιβάν, Χαβάη

Συστατικά: Από το ακετονικό εκχύλισμα των φύλλων και των βλαστών του φυτού απομονώθηκαν ενώσεις όπως το 3-νιτροπροπανοϊκό οξύ και οι ενδεκαφυλλίνες που είναι γλυκοζιτικοί πολυεστέρες του 3-νιτροπροπανοϊκού οξέος.



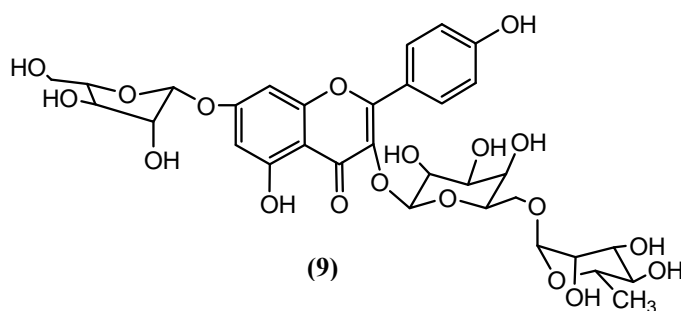
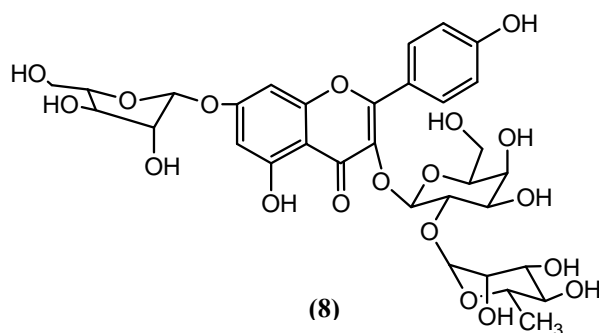
Χρήσεις: Αρχικά χρησιμοποιούνταν ως ζωοτροφή η οποία αποδείχτηκε ότι προκαλούσε οξεία τοξικότητα στα ζώα που τρέφονταν με τα φύλλα και τα κλαδιά του φυτού (Finnegan et al., 1965), (Anson R. Cooke, 1955).

■ *Indigofera hebeptala*

Γεωγραφική κατανομή: Ευρεία κατανομή σε τροπικές και υποτροπικές περιοχές με το επίκεντρο της κατανομής να βρίσκεται στη τροπική Αφρική.

Συστατικά: Από το βουτανολικό εκχύλισμα των ανθέων του φυτού

απομονώθηκαν δυο τριγλυκοζίτες της καιμφερόλης ο 7-*O*- α -L-αραβινοφουρανοζίτης 3-*O*- α -L-ραμνοπυρανοσυλ(1 \rightarrow 2)- β -D-γαλακτοπυρανοζίτης της καιμφερόλης (**8**) και ο 7-*O*- α -L-αραβινοφουρανοζίτης 3-*O*- α -L-ραμνοπυρανοσυλ(1 \rightarrow 6)- β -D-



γαλακτοπυρανοζίτης της καιμφερόλης (**9**) (Hasan et al., 1996) μαζί με τρεις άλλους γνωστούς γλυκοζίτες, τον 7-*O*- α -L-ραμνοπυρανοζίτη 3-*O*- α -L-αραβινοπυρανοζίτη της καιμφερόλης (Mabry et al., 1970) τον 7-*O*- α -L-αραβινοπυρανοζίτη 3-*O*- α -L-ραμνοπυρανοζίτης και τον 7-ραμνοζίτη της καιμφερόλης (Nielsen et al., 1993).

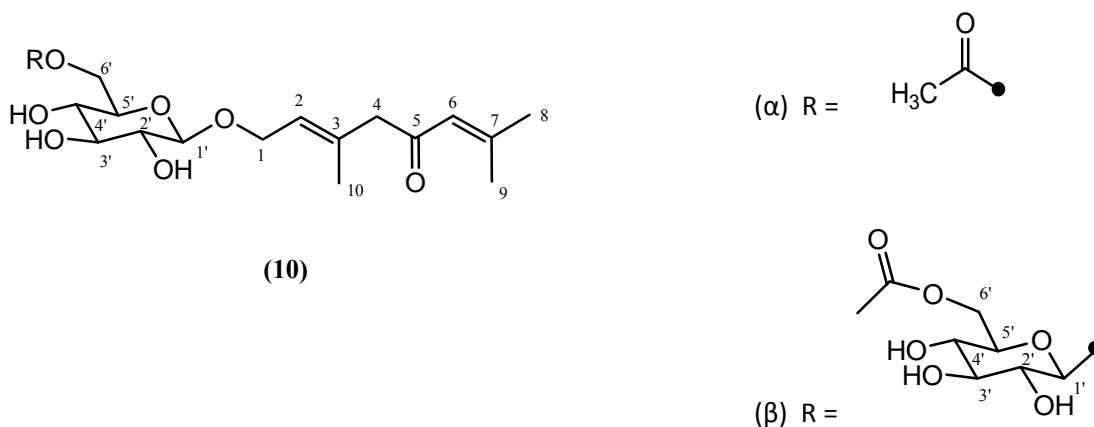
Από τα φύλλα του ίδιου του φυτού απομονώθηκε ο 7-αλλοζίτης της καιμφερόλης και 3,7-διαραβινοζίτης 7-αλλοζίτης της καιμφερόλης (Hasan et al., 1993).

■ *Indigofera heterantha* (Himalayan Indigo)

Γεωγραφική κατανομή: Βέλγιο, Ινδία, Ολλανδία, Πακιστάν, Ισπανία, Ηνωμένο Βασίλειο, Ηνωμένες Πολιτείες.



Συστατικά: Από το κλάσμα του οξικού αιθυλεστέρα του μεθανολικού εκχυλίσματος ολόκληρου του φυτού απομονώθηκαν οι εξής μονοτερπενικοί γλυκοζίτες **(10)** (Sajid et al., 2008).



(α) 1-*O*-β-*D*-6-*O*-ακετυλογλυκοπυρανοζίτης του 3,7-διμεθυλο-2(*E*),6-οκταδιεν-5-ενιου

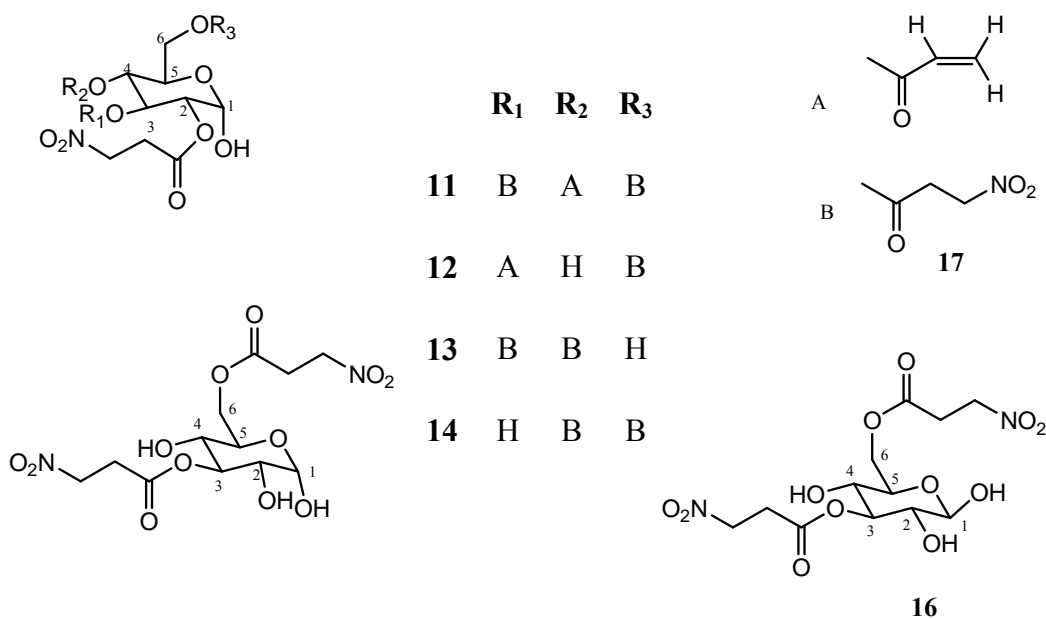
(β) 1-*O*-[β-*D*-6''-*O*-ακετυλγλυκοπυρανοσυλ (1'' → 6')-β-*D*-γλυκοπυρανοζίτης του 3,7-διμεθυλ-2(*E*), 6-οκταδιεν-5-ενιου

■ *Indigofera kirilowii* (Kirilow's Indigo)

Γεωγραφική κατανομή: Κίνα, Ιαπωνία, Καναδάς, Μέξικο, Ολλανδία, Ηνωμένες Πολιτείες



Συστατικά: Από το χλωροφορμιακό κλάσμα που προήλθε από το αιθανολικό εκχύλισμα της ρίζας του φυτού απομονώθηκαν οι εξής γλυκοζιτικοί εστέρες του 3-νιτροπροπανοϊκού οξέος η κυριλοουίνη C (**11**) και η κυριλοουίνη D (**12**) ενώ από το κλάσμα του οξικού αιθυλεστέρα προέκυψε η κυριλοουίνη E (**13**) η κυριλοουίνη F (**14**) η κυριλοουίνη G (**15**) και η κυριλοουίνη H (**16**) (Yan Fang et al., 2008).

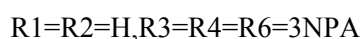
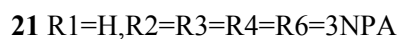
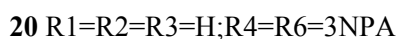
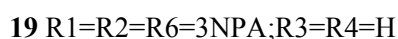
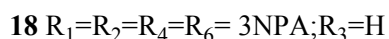
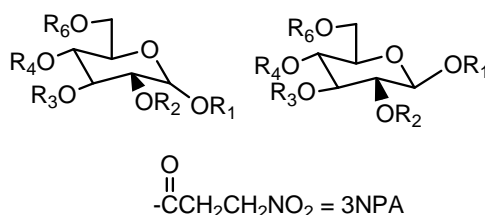


■ *Indigofera linnaei* (Birdsville Indigo)

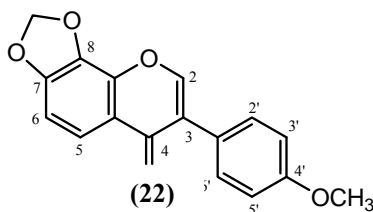
Γεωγραφική κατανομή: Αυστραλία, Κίνα, Ινδία, Ινδονησία, Παπούα- Νέα Γουινέα, Σρι Λάνκα, Ταϊλάνδη



Συστατικά: Από το χλωροφορμικό κλάσμα που προήλθε από το μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού απομονώθηκαν οι εξής νιτροπροπανούλο εστέρες. Η β-D-γλυκοπυρανόζη 1,2,4,6-τετρα-O-(3-νιτροπροπανούλ)- υπταγίνη (18), η β-D-γλυκοπυρανόζη 1,2,6-τρι-O-(3-νιτροπροπανούλ)- καρακίνη (19), η β-D-γλυκοπυρανόζη 4,6-δι-O-(3-νιτροπροπανούλ)- καρακίνη (20) και η α-D-γλυκοπυρανόζη 2,3,4,6-τετρα-O-(3-νιτροπροπανούλ)-α-D-γλυκοπυρανοζίτης (21).



Επιπλέον μια νέα ισοφλαβόνη, η 7,8-μεθυλενοδιοξυ-4'-μεθοξυ-ισοφλαβόνη απομονώθηκε από ολόκληρο το φυτό **(22)** (Rajendra Prasad και Chakradhar 2004).



Φαρμακολογική δράση: Η μελέτη του μεθανολικού εκχυλίσματος της *Indigofera linnaei* έδειξε *in vitro* τοξικότητα στις εξής καρκινικές σειρές ανθρωπίνων κυττάρων:

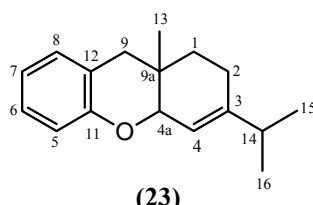
α) HeLa (καρκίνωμα του τραχήλου της μήτρας), β) Hep-2 (καρκίνωμα του λάρυγγα), γ) HepG-2 (ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα), δ) MCF-7 (καρκίνωμα του μαστού), ε) HT-29 (αδενοκαρκίνωμα του εντέρου) και στ) Vero και NIH3T3 (εμβρυονικοί ινοβλάστες ποντικού) ενώ δεν εμφανίστηκε καμία τοξικότητα σε κανονικά κύτταρα. Η χορήγηση του εκχυλίσματος σε ποντίκια από του στόματος, προκάλεσε δόσο-εξαρτώμενη αναστολή της ενδοπεριτονιακής αύξησης από ασκίτη από σάρκωμα του Ehrlich (EAC) και ασκίτη από λέμφωμα Dalton (DLA), αύξηση του μέσου όρου ζωής και προστατευτική δράση του αιμοποιητικού συστήματος. (Kumar et al., 2011).

■ *Indigofera longiracemosa* (Manga)

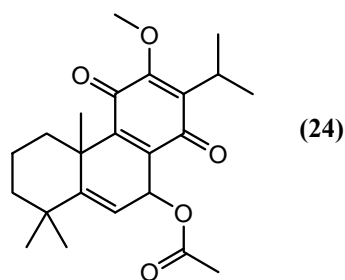
Γεωγραφική κατανομή: Κένυα, Κομόρες, Μαδαγασκάρη.



Συστατικά: Από το βλαστό του φυτού απομονώθηκε το 3-ισοπροπυλο-9α-μεθυλ-1,2,4a- τετραυδρόξυ ξανθένιο (**23**) (Thangadurai et al., 2001).



Ένα νέο διτερπενικό αβιετάνιο απομονώθηκε από το βλαστό του φυτού το Ιντιγκοφεραβιετάνιο (**24**) (Thangadurai et al., 2002).



Φαρμακολογική δράση: Τα εκχυλίσματα πετρελαϊκού αιθέρα, βενζολίου, χλωροφορμίου, οξικού αιθυλεστέρα και μεθανόλης από τη ρίζα του φυτού είχαν αντιελκωτική δράση σε ποντίκια (Thangadurai and Viswanathan 2000). Το ιντιγκοφεραβιετάνιο παρουσίασε αντιμικροβιακή δράση κατά των στελεχών *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris* και *Escherichia coli* (Thangadurai et al., 2002).

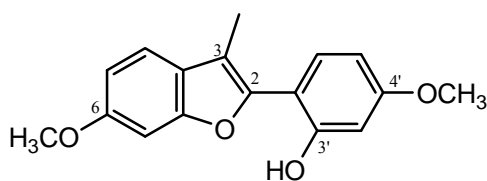
Χρήσεις: Στην ινδική παραδοσιακή ιατρική η ρίζα του φυτού χρησιμοποιείται ως αντίδοτο στο δάγκωμα των φιδιών.

■ *Indigofera microcarpa* (Tsilavondrivotra)

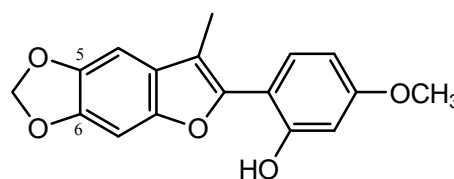
Γεωγραφική κατανομή: Αργεντινή, Μπενίν, Βολιβία, Βραζιλία, Μπουρκίνα Φάσο, Κούβα, Δομινικανή Δημοκρατία, Γαλλική Γουιάνα, Μαδαγασκάρη, Μέξικο, Παραγουάη, Περού, Σενεγάλη, Βενεζουέλα



Συστατικά: Από το μεθανολικό εκχύλισμα των φύλλων του φυτού απομονώθηκαν δύο 2-αρυλο-3-μεθυλοβενζο [b] φουράνια (24),(25) (De Moraes et al., 1988).



(24)



(25)

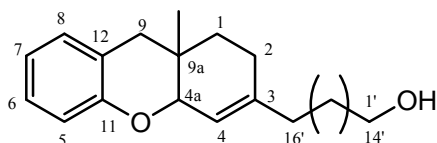
Φαρμακολογική δράση: Έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία ότι το μεθανολικό εκχύλισμα των φύλλων του φυτού παρουσιάζει έντονη αντιμικροβιακή δράση (De Moraes et al., 1991).

■ *Indigofera oblongifolia* (Ingitrala)

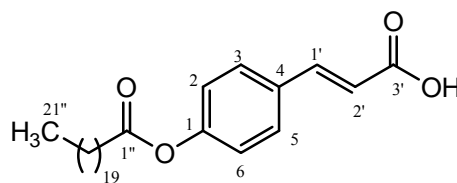
Γεωγραφική κατανομή: Αυστραλία, Βραζιλία, Καμερούν, Αίγυπτος, Ινδονησία, Μαδαγασκάρη, Μάλι, Μαυριτανία, Ομάν, Πακιστάν, Σαουδική Αραβία, Σενεγάλη, Σομαλία.



Συστατικά: Από το διχλωρομεθανολικό εκχύλισμα του φυτού απομονώθηκε η ιντιγκίνη (**26**), ένα αλκυλιωμένο ξανθένιο, το ιντιγοφερικό οξύ (**27**), το 3-υδροξυβενζοϊκό οξύ και η β-σιτοστερόλη. Η ιντιγκίνη και το ιντιγοφερικό οξύ έδειξαν αξιοσημείωτη δράση έναντι της λιποξυγενάσης ενώ το δεύτερο έδειξε μέτρια αναστολή του ενζύμου BChE (Sharif et al., 2005).



(26)



(27)

Φαρμακολογική δράση: Η παρουσία μικρών πεπτιδίων και πρωτεϊνών που απομονώθηκαν από τα φύλλα του φυτού έδειξαν αντιβακτηριακή δράση έναντι των *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Kl. pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* και *Bacillus subtilis* (Dahot, 1999). Παρατηρήθηκε ηπατοπροστατευτική δράση έναντι της τοξικότητας από CCl_4 σε επίμυες όπως έδειξε η μείωση των σηματοδοτικών ενζύμων στο πλάσμα, η μείωση των επιπέδων των TBARS και η αύξηση των επιπέδων της GSH και των SOD, CAT και GPx (Shahjahan et al., 2005).

Χρήση: Έχει αναφερθεί ότι τα φύλλα του φυτού βρίσκουν εφαρμογή στην παραδοσιακή ιατρική στις φλεγμονές του ουροποιητικού συστήματος, στην ουρολιθίαση, ως αντιβηχικό και στις φλεγμονές του δέρματος (Ali et al., 2001).

■ *Indigofera suffruticosa* (Small-Leaved Indigo)

Γεωγραφική κατανομή: Αντίλλες, Αργεντινή,

Αυστραλία, Μπελίτζε, Μπενίν, Βολιβία,

Βραζιλία, Μπουρκίνα Φάσο, Μπουρουντί,

Καμερούν, Καναδάς, Κεντροαφρικανική

Δημοκρατία, Κίνα, Κολομβία, Κομόρες,

Κόστα Ρίκα, Ακτή Ελεφαντοστού, Κούβα,

Τσεχία, Δομίνικα, Δομινικανή Δημοκρατία,

Ισημερινός, Ελ Σαλβαδόρ, Ισημερινή Γουινέα, Νησιά Φίτζι, Γαλλία, Γαλλική

Γουιάνα, Γκαμπόν, Γερμανία, Γκάνα, Γρενάδα, Γουατεμάλα, Γουιάνα, Αϊτή,

Ονδούρα, Ινδία, Ινδονησία, Τζαμάικα, Ιαπωνία, Λιβερία, Μαδαγασκάρη, Μαλαισία,

Μάλι, Μαρτινίκα, Μέξικο, Μοζαμβίκη, Ολλανδικές Αντίλλες, Νικαράγουα, Νίγηρας,

Νιγηρία, Ομάν, Παναμάς, Παπούα- Νέα Γουινέα, Παραγουάη, Περού, Φιλιππίνες,

Ρεϋνιόν, Σάο Τομέ και Πρινσίπε, Σενεγάλη, Σεϋχέλλες, Νότια Αφρική, Ισπανία, Σρι

Λάνκα, Σουηδία, Ταϊβάν, Τανζανία, Ταϊλάνδη, Τόγκο, Τρινιδάδ και Τομπάγκο,

Ουγκάντα, Ηνωμένες Πολιτείες, Ουρουγουάη, Βανουάτου, Βενεζουέλα.



Συστατικά: Από το κλάσμα του οξικού αιθυλεστέρα που προήλθε από τις υπέργειες

και υπόγειες ρίζες του φυτού απομονώθηκαν οι εξής νιτροπροπανούλο εστέρες

(Walmir et al., 2003) α -D-γλυκοκυρανοζίτης του 2,3,4,6-τετρακίς-O-[3-νιτροπροπανούλου εστέρα] ο οποίος είχε απομονωθεί για πρώτη φορά από τις ρίζες

και το βλαστό του ίδιου φυτού (28) (Garcez et al., 1989), (μίγμα ανωμερών α και β)

α -D-γλυκοκυρανοζίτης του 6-O-(3-νιτροπροπανούλο εστέρα) (29) οι οποίοι

απομονώθηκαν αρχικά από τους καρπούς του φυτού *Corynocarpus laevigatus* (Majak

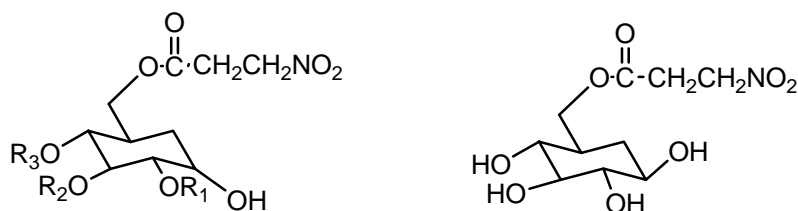
and Benn, 1994), 3-νιτροπροπανοϊκό οξύ το οποίο απομονώθηκε αρχικά από το

ακετονικό εκχύλισμα των φύλλων του φυτού *Indigofera endecaphylla* (30) (Finnegan

and Mueller 1965), α -D-γλυκοκυρανοζίτης του 6-O-(3-νιτροπροπανούλο εστέρα)

που απομονώθηκε για πρώτη φορά από τα υπέργεια τμήματα του φυτού *Coronilla*

varia (31) (Moyer et al., 1977)

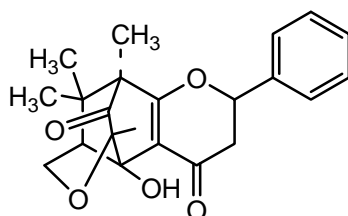


28 $R_1=R_2=R_3= -COCH_2CH_2NO_2$

29 $R_1=R_2=R_3=H$

30 $R_1=-COCH_2CH_2NO_2, R_2=R_3=H$

Από το εκχύλισμα με πετρελαϊκό αιθέρα ολοκλήρου του φυτού απομονώθηκε και ένα παράγωγο φλαβονόνης η λουισφισερόνη (**32**) (Dominguez et al., 1978).



31

■ *Indigofera tinctoria* (East Asian Indigo Plant)

Γεωγραφική κατανομή: Αντίλλες, Αυστραλία,

Μπελίζε, Μπενίν, Βραζιλία, Μπουρκίνα Φάσο,

Καμερούν, Κίνα, Κομόρες, Κόστα Ρίκα, Ακτή

Ελεφαντοστού, Κούβα, Τσεχία, Δομινικανή

Δημοκρατία, Ελ Σαλβαδόρ, Γαλλία, Γερμανία,

Γκάνα, Ινδία, Ινδονησία, Τζαμάϊκα, Ιαπωνία,

Κένυα, Μαδαγασκάρη, Μαλαισία, Μάλι,

Μαυρίκιος, Μέξικο, Ολλανδία, Ολλανδικές Αντίλλες, Νίγηρας, Νιγηρία, Παπούα-

Νέα Γουϊνέα, Παραγουάη, Περού, Φιλιππίνες, Σενεγάλη, Νότια Αφρική, Σρι Λάνκα,

Σουηδία, Τανζανία, Ταϊλάνδη, Τόγκο, ΗΠΑ.

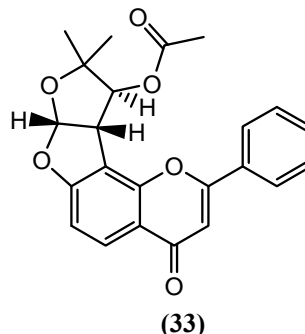
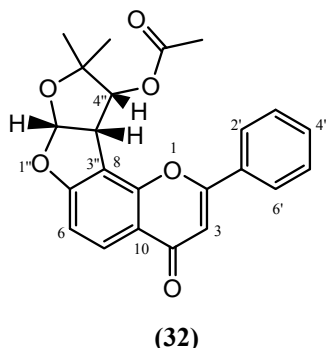


Συστατικά: Από το χλωροφορμιακό κλάσμα που προήλθε από το αιθανολικό

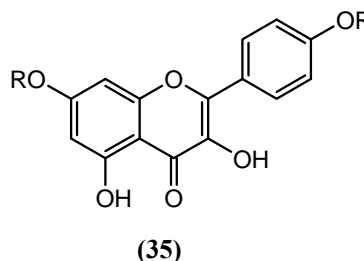
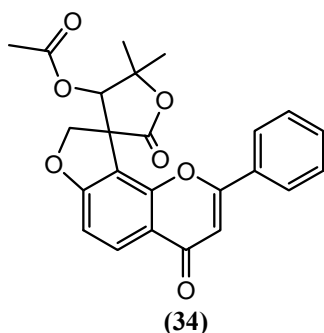
εκχύλισμα του υπέργειου τμήματος του φυτού απομονώθηκαν οι ενώσεις

ψευδοσεμιγλαβρίνη (**32**), σεμιγλαβρίνη (**33**), γλαβετεφρίνη (**34**) και ο 4',7-

διραμνοζίτης της καιμφερόλης (35) (Narender et al., 2006) Οι (32-34) απομονώθηκαν για πρώτη φορά από τις ρίζες του φυτού *Tephrosia purpurea* (Rao et al., 1984) ενώ η (35) απομονώθηκε από τα άνθη του φυτού *Crotalaria verrucosa*.



R = ραμνόζη



Από το εκχύλισμα του πετρελαϊκού αιθέρα του υπέργειου τμήματος του φυτού απομονώθηκε το *trans*-τετρακισ-15-ενοϊκό οξύ (TCA) συστατικό του βιολογικά ενεργού κλάσματος ιντιγκοτίνη (36) (Singh et al., 2006).



(36)

Φαρμακολογική δράση: Το αιθανολικό εκχύλισμα βρέθηκε να είναι αποτελεσματικό στην αντιμετώπιση επαγόμενων από πιλοκαρπίνη και λίθιο επιληπτικών σπασμών σε επίμυες (Asuntha et al., 2010). Το μεθανολικό εκχύλισμα έδειξε αξιοσημείωτη καθυστέρηση στην εμφάνιση τονικοκλονικών σπασμών επαγόμενων από πεντυλενοτετραζόλη σε επίμυες (Kumar et al., 2009). Μελετήθηκε το εκχύλισμα των φύλλων του φυτού ως προς την αντιβακτηριακή, αντιοξειδωτική και κυτοτοξική δράση. Η φυτοχημική ανάλυση του φυτού με GC-MS έδειξε την παρουσία φλαβονοειδών, σαπωνίνων, ταννινών, στεροειδών τερπενίων, φαινολών, και

ανθρακινονών. Το εκχύλισμα προκάλεσε αναστολή της ανάπτυξης των gram (+) βακτηριδίων *Bacillus pumilus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* αλλά δεν προκάλεσε αναστολή στα gram (-) βακτηρίδια *Escherichia coli* και *Pseudomonas aeruginosa*. Η αντιοξειδωτική δράση μελετήθηκε ως προς το πρότυπο ασκορβικό οξύ και ήταν ισχυρότερη. Το μεθανολικό εκχύλισμα των φύλλων του φυτού έδειξε κυτοτοξική δράση για την καρκινική σειρά κυττάρων NCI-H69 του καρκινώματος των πνευμόνων προκαλώντας απόπτωση *in vitro* (Renukadevi et al., 2011). Ανάλογη απόπτωση των κυττάρων προκλήθηκε από κλάσμα που περιείχε φλαβονοειδή σε καλλιέργεια της καρκινικής σειράς A549 (καρκίνωμα του πνεύμονα) (Kameswaran et al., 2008). Η κυτοτοξική αυτή δράση οφείλεται στην αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G₀/G₁. Το αιθανολικό εκχύλισμα του φυτού μελετήθηκε ως προς την αντιεπιληπτική δράση σε αρουραίους *Albino* επιδεικνύοντας σημαντική μείωση (Garbhapu et al., 2011). Η ικανότητα μείωσης του οξειδωτικού στρες μελετήθηκε σε ποντίκια ευαισθητοποιημένα με το β-αμυλοειδές πεπτίδιο (25-35) και βρέθηκε σημαντική μείωση στα επίπεδα των ενζύμων υπεροξειδική δυσμουτάση, καταλάση, υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και ρεδοουκτάση της γλουταθειόνης μετά από χορήγηση μεθανολικού εκχυλίσματος των φύλλων του φυτού. Σημαντική μείωση καταγράφηκε και στα επίπεδα της λιπιδικής υπεροξειδωσης. Βελτίωση εικόνας παρουσίασαν και οι νευρώνες του εγκεφάλου αφού μειώθηκαν τα επίπεδα νευροεκφύλισης (Balamurugan et al., 2010). Το κλάσμα του εκχυλίσματος του πετρελαϊκού αιθέρα των υπέργειων τμημάτων του φυτού, η ιντιγκτόνη παρουσίασε σημαντική δοσοεξαρτώμενη ηπατοπροστατευτική δράση ενάντια στην επαγόμενη από CCl₄ νέκρωση του ιστού του ήπατος σε ποντίκια. (Singh et al., 2001) (Niraikulam et al., 2009). Περαιτέρω έρευνα του εκχυλίσματος έφερε στο φως την ύπαρξη του trans-τετρακισ-15-ενοϊκού οξέος (TCA), συστατικού του βιοενεργού κλάσματος της ιντιγκτόνης. Η ένωση αυτή παρουσίασε σημαντική ηπατοπροστατευτική δράση ενάντι στην επαγόμενη από CCl₄ και παρακεταμόλη ηπατοτοξικότητα του ιστού του ήπατος σε ποντίκια. (Singh et al., 2006). Τα φουρανο-φλαβονοειδή που απομονώθηκαν από το αιθανολικό εκχύλισμα του υπέργειου τμήματος του φυτού, και συγκεκριμένα οι ουσίες (32) και (33) έδειξαν σαφή μείωση των τριγλυκεριδίων του πλάσματος, της συνολικής χοληστερόλης, της γλυκερόλης και των ελευθέρων λιπαρών οξέων. Η ουσία (34) έδειξε μέτρια αντιλιπιδαιμική δράση (Tadigoppula et al., 2006). Αναφέρθηκε ότι η ψευδοσεμιγλαβρίνη και η σεμιγλαβρίνη είναι ανταγωνιστές της συγκόλλησης των

αιμοπεταλίων διότι παρουσίασαν ανασταλτική δράση στην επαγόμενη από προσέλκυση των αιμοπεταλίων από το θρομβοξανομιμικό φάρμακο U46619 (Jonathan et al.,1990). Ο βλαστός και τα φύλλα της *Indigofera tinctoria* περιέχουν ροτενοειδή ντεγκουελίνη, δευδροντεγκουελίνη, ροτενόνη, τεφροζίνη και σουματρόλη. Το αιθανολικό και το χλωροφορμικό εκχύλισμα του φυτού μελετήθηκε ως προς την αντι-υπεργλυκαιμική δράση σε επαγόμενο διαβήτη από στρεπτοζοτοσίνη σε επίμυες, καθώς και ως προς την νεφροπροστατευτική τους δράση (Bangar et al., 2011). Το αιθανολικό εκχύλισμα του φυτού άσκησε περιφερική αναλγητική δράση στον επαγόμενο από οξικό οξύ κοιλιακό πόνο ποντικών η οποία μπορεί να αποδοθεί στην αναστολή της απελευθέρωσης των προσταγλανδινών (Kumar et al., 2009).

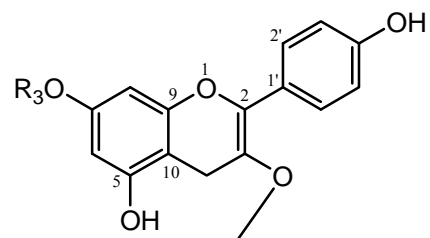
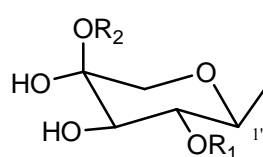
Χρήσεις: Η *Indigofera tinctoria* χρησιμοποιείται στην ινδική παραδοσιακή ιατρική για την αντιμετώπιση επιληπτικών διαταραχών, νευρικών διαταραχών και στη βρογχίτιδα. Τα εκχυλίσματά της χρησιμοποιούνται εκτενώς στην συμπτωματική αντιμετώπιση διαταραχών του ήπατος.

■ *Indigofera zollingeriana* (Zollinger's Indigo)

Γεωγραφική κατανομή: Κίνα, Ινδία, Ινδονησία, Λάος, Μαλαισία, Φιλιππίνες, Ταϊβάν, Ταϊλάνδη, Ηνωμένες Πολιτείες, Βανουάτου, Βιετνάμ,



Συστατικά: Από το βουτανολικό κλάσμα που προήλθε από το μεθανολικό εκχύλισμα των φύλλων του φυτού απομονώθηκαν οι εξής φλαβονοειδείς γλυκοζίτες. (Aya Hisaeda et al., 2011): 3-*O*-β-D-(2''-*O*-β-D-απιοφουρανοζυλ) γλυκοπυρανοζίτης 7-*O*-α-L-ραμνοπυρανοζίτης της Καιμφερόλης (37), 3-*O*-β-D-(2''-*O*-β-D-(2''-*O*-β-D-απιοφουρανοζυλ, 6''-*O*-α-L-ραμνοπυρανοζυλ) γλυκοπυρανοζίτης 7-*O*-α-L-ραμνοπυρανοζίτης της Καιμφερόλης (38), 7-*O*-ραμνοζίτης - 3-*O*-γλυκοζίτης της Καιμφερόλης (39) , 3-*O*-ρουτινοζίτης της Καιμφερόλης (40), 3-*O*-(2''-*O*-απιοφουρανοζυλ) ρουτινοζίτης της Καιμφερόλης (41), 7-*O*-ραμνοζίτης 3-*O*-ρουτινοζίτης της Καιμφερόλης (42).

	R₁	R₂	R₃
	Api	H	Rha
37	(1''')		(1''''')
	Api	Rha	Rha
38	(1''')	(1''''')	(1''''''')
39	H	H	Rha
40	H	Rha	H
41	Api	Rha	H
42	H	Rha	Rha

Rha: α-L-ραμνοπυρανοζυλο

Api: β-D-απιοφουρανοζυλο

Οι δύο πρώτες ενώσεις απομονώθηκαν για πρώτη φορά από το φυτό ενώ η **(39)** και **(40)** απομονώθηκε από τα φύλλα του *Delphinium formosum* (Seckin et al., 1998).

Χρήσεις: Η *Indigofera zollingeriana* χρησιμοποιείται ως λίπασμα.

1.5 Χρήσεις του φυτού *Indigofera hirsuta* στη παραδοσιακή θεραπευτική

Υπογλυκαιμική δράση

Παρακάτω αναφέρεται μια συνταγή που χρησιμοποιείται από τους κατοίκους της Κεντροαφρικανικής Δημοκρατίας οι οποίοι έχουν την τάση να εμφανίζουν γονιδιακό διαβήτη τύπου II όταν φτάσουν στο τεσσαρακοστό έτος της ηλικίας τους. Η χρήση αυτής της συνταγής έχει ως αποτέλεσμα την μείωση των επιπέδων του σακχάρου στο αίμα.

Συνταγή:

- ❖ αποξηραμένα φύλλα φυτών -*Indigofera hirsuta* (Mabo) 6,5 gr
-*Tephrosia humilis* (Yakoro) 3,4 gr
- ❖ βρασμός σε 200 ml νερό

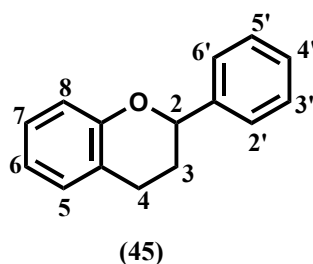
Χορήγηση: 200ml τρεις φορές την ημέρα για 7 μέρες, αιματολογικός έλεγχος

ΣΚΟΠΟΣ

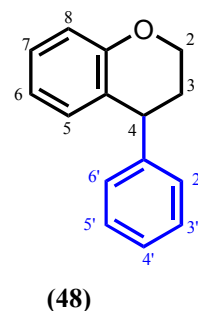
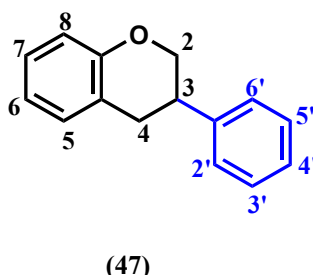
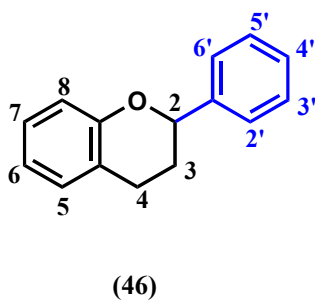
Ο σκοπός της έρευνας είναι η φυτοχημική ανάλυση του φυτού *Indigofera hirsuta* ούτως ώστε να αποδειχτεί η υπογλυκαιμική δράση που παρουσίασε σε κατοίκους της Κεντροαφρικανικής Δημοκρατίας οι οποίοι έπασχαν από γονιδικό διαβήτη τύπου II. Με την ανάλυση των εκχυλισμάτων της βουτανόλης, του οξικού αιθυλεστέρα, του αιθέρα και του υδατικού εκχυλίσματος μέσω της μεθόδου LC-DAD-MS (ESI+) και στη συνέχεια με την απομόνωση συστατικών των παραπάνω εκχυλισμάτων γίνεται η προσπάθεια να αποδειχτεί η εν λόγω υπογλυκαιμική δράση. Ο έλεγχος της αναστολής της αναγωγής της αλδόζης ALR2 και της αλδεϋδης ALR1 αποτελεί μια καλή ένδειξη ότι το φυτό παρουσιάζει μια πιθανή υπογλυκαιμική δράση δεδομένου ότι η αναστολή αυτών των δύο ενζύμων αποτελεί σημαντικό δείκτη πρόληψης των ανεπιθύμητων επιπλοκών του διαβήτη τύπου II. Ταυτόχρονα γίνεται προσπάθεια να αποδειχτεί η ύπαρξη αντιοξειδωτικής δράσης των παραπάνω εκχυλισμάτων.

2. Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι πολυφαινολικές ενώσεις ευρέως διαδεδομένες στα φυτά. Είναι υπεύθυνες για το χρώμα των καρπών και των ανθέων. Το όνομα φλαβονοειδές προέρχεται από το λατινικό *flavus* που σημαίνει ξανθός. Απαντούν σε όλα τα τμήματα του φυτού (φύλλα, άνθη, καρπούς, στελέχη, ρίζες). Ο βασικός δομικός σκελετός περιλαμβάνει δύο αρωματικούς δακτυλίους (Α και Β) οι οποίοι συνδέονται μέσω ενός ετεροκυκλικού πυρανικού δακτυλίου. Η χημική δομή των φλαβονοειδών βασίζεται σε έναν σκελετό 15 ατόμων άνθρακα, το **φαινυλβενζοπυράνιο (45)**.



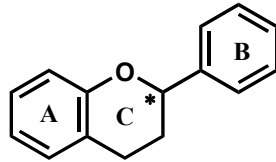
Ανάλογα με τη θέση σύνδεσης του φαινολικού δακτυλίου με το βενζοπυρανικό τμήμα διακρίνονται οι εξής τάξεις φλαβονοειδών: τα φλαβονοειδή (2-φαινυλοβενζοπυράνια) **(46)**, τα ισοφλαβονοειδή (3-φαινυλοβενζοπυράνια) **(47)** και τα νεοφλαβονοειδή (4-φαινυλοβενζοπυράνια) **(48)**.



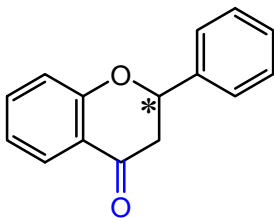
Οι τρεις αυτές τάξεις φλαβονοειδών προέρχονται από την ίδια πρόδρομη ένωση, μια χαλκόνη.

Φλαβονοειδή (2-φαιτυλοβενζοπυράνια)

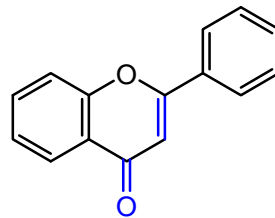
Τα φλαβονοειδή μπορούν να διακριθούν σε επιπλέον κατηγορίες ανάλογα με το βαθμό οξείδωσης και το βαθμό ακορεστότητας που παρουσιάζει ο ετεροκυκλικός C δακτύλιος.



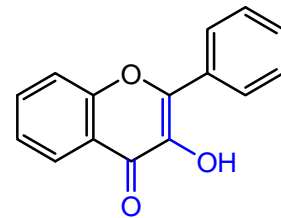
φλαβάνιο



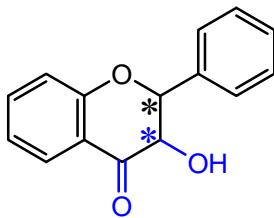
φλαβόνη



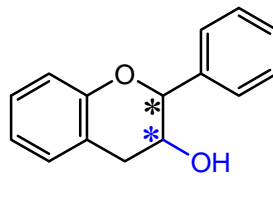
φλαβανόνη



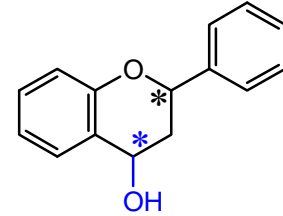
φλαβονόλη



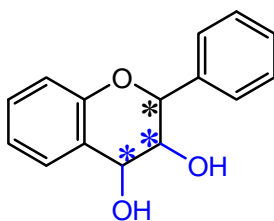
διυδροφλαβονόλη



φλαβαν-3-όλη



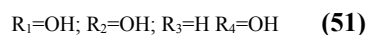
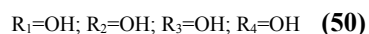
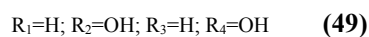
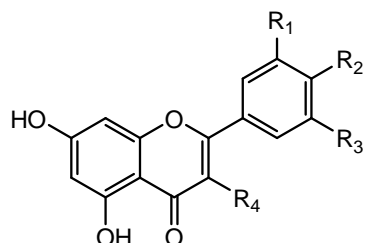
φλαβαν-4-όλη



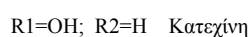
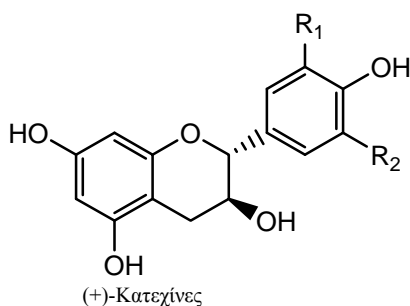
φλαβαν-3,4-διόλη

Οι πιο διαδεδομένες φλαβονόλες που απαντούν στα φυτά είναι η *κερκετίνη*, η *καιμφερόλη*, η *μυρικετίνη* και η *ισοραμνετίνη*. Ο γλυκοζιτικός δεσμός σχηματίζεται με

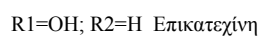
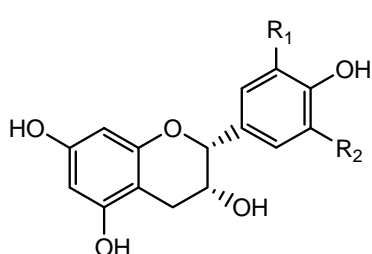
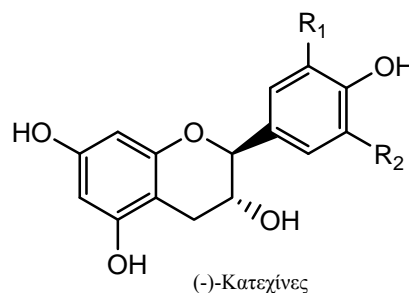
το υδροξύλιο της θέσης 3. Βρίσκονται με τη μορφή μονογλυκοζίτη και οι πιο διαδεδομένοι είναι οι 3-γλυκοζίτες της καιμφερόλης και της κερκετίνης καιμφερόλη **(49)**, μυρικετίνη **(50)**, κερκετίνη **(51)**, ισοραμετίνη **(52)**.



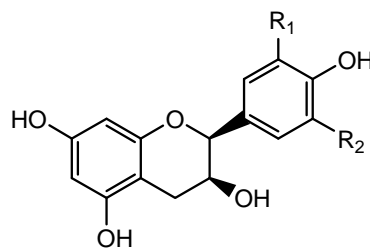
Οι φλαβάνες διακρίνονται φλαβαν-3-όλες ή κατεχίνες και σε φλαβαν-4-όλες ή λευκοανθοκυανιδίνες. Οι πρώτες είναι οι πιο διαδεδομένες στη φύση με δυο ασύμμετρα άτομα C στις θέσεις 2 και 3, παρουσιάζουν τέσσερις οπτικά ενεργές μορφές και δύο ρακεμικά μίγματα τις κατεχίνες **(53)** και τις επικατεχίνες **(54)**.



(53)

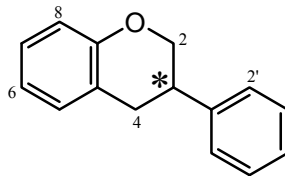


(54)

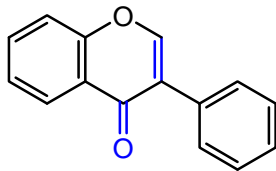


Ισοφλαβονοειδή (3-βενζοπυράνια)

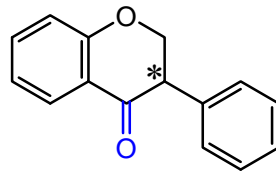
Τα ισοφλαβονοειδή αποτελούνται από τον σκελετό του 3-φαινυλοχρωμανίου ο οποίος προέρχεται από την 1,2 αρυλική μετάθεση. Η παρουσία τους στη φύση είναι περιορισμένη και φέρουν ποικίλους υποκαταστάτες στον δακτύλιο του 3-φαινυλοχρωμανίου όπως για παράδειγμα ετεροκυκλικούς δακτυλίους.



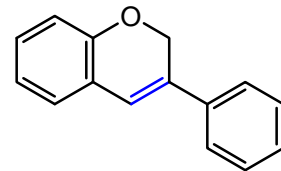
ισοφλαβάνιο



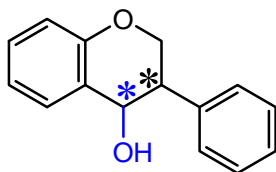
ισοφλαβόνη



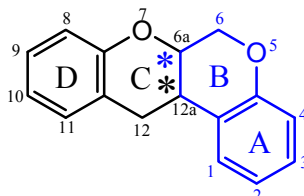
ισοφλαβανόνη



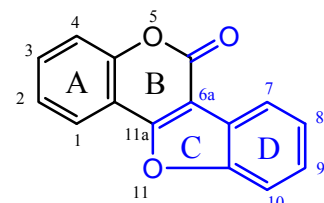
ισοφλαβ-3-ένιο



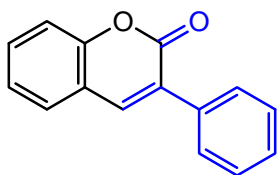
ισοφλαβανόλη



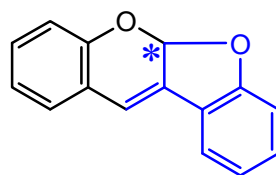
ροτενοειδές



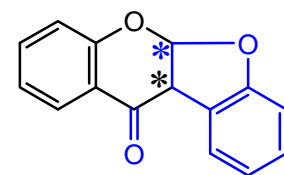
κουμεστάνιο



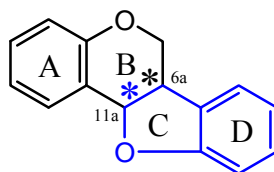
αρυλοκουμαρίνη



κουμαροχρωμένιο



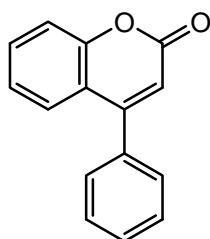
κουμαροχρωμόνη



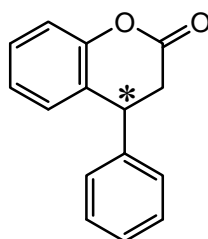
πτεροκαρπάνιο

Νεοφλαβονοειδή

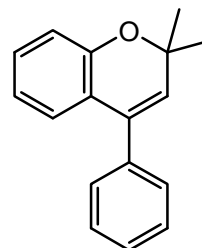
Τα νεοφλαβονοειδή είναι δομικά ανάλογα των φλαβονοειδών και ισοφλαβονοειδών και περιλαμβάνουν τις 4-αρυλοκουμαρίνες, τις 3,4 διϋδροκουμαρίνες και τα νεοφλαβένια.



4-αρυλοκουμαρίνη



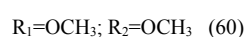
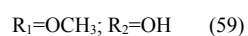
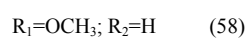
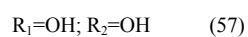
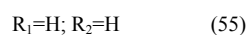
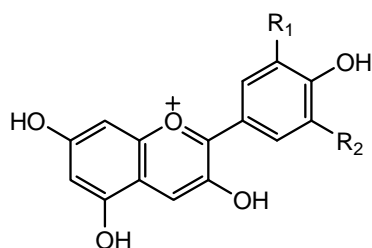
3,4-διϋδρο-4-αρυλοκουμαρίνη



νεοφλαβένιο

Ανθοκυανιδίνες

Χαρακτηρίζονται από ένα θετικό φορτίο στο O του ετεροκυκλικού δακτυλίου και από το γεγονός ότι όλα τα άτομα C είναι ακόρεστα. Το χρώμα των ανθέων και των καρπών αποδίδεται στην παρουσία αυτών των ενώσεων. Το χρώμα αυτό μπορεί να μεταβάλλεται ανάλογα με το pH. Οι πιο κοινές ανθοκυανιδίνες που απαντούν στα φυτά είναι η πελαργονιδίνη (55), η κυανιδίνη (56), η δελφινιδίνη (57), η πεονιδίνη (58), η πετουνιδίνη (59) και η μαλβιδίνη (60).

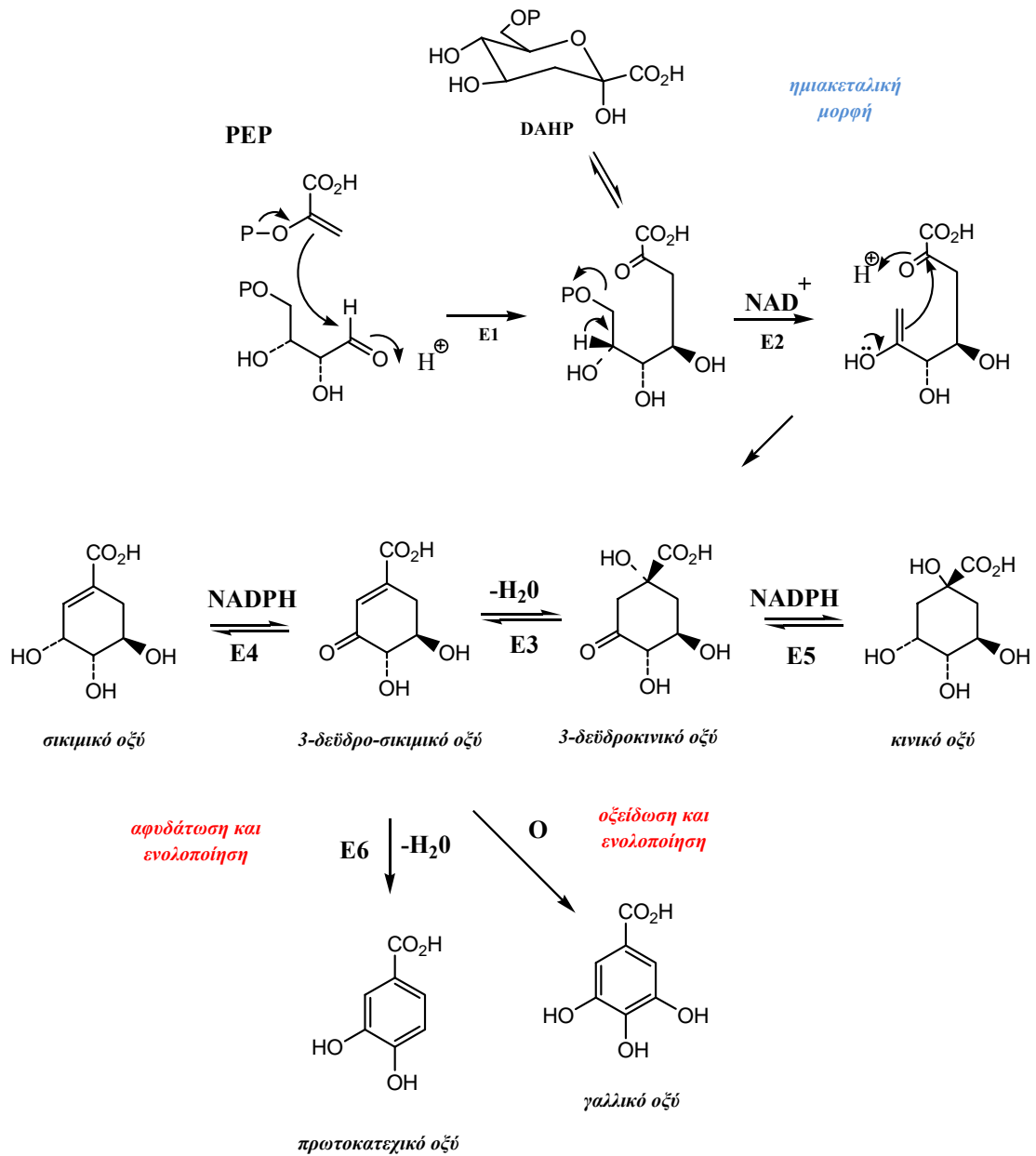


Στη φύση απαντούν υπό μορφή ανθοκυανών αφού οι ανθοκυανιδίνες συνδέονται με ένα ή περισσότερα σάκχαρα που τις καθιστούν σταθερότερες και περισσότερο διαλυτές στο νερό (Harborne, 1989). Η υδροξυλίωση του B δακτυλίου μειώνει τη σταθερότητα του μορίου, ενώ η μεθυλίωση την αυξάνει. Το σάκχαρο, το οποίο

εστεροποιείται με το άγλυκο τμήμα, είναι κυρίως η γλυκόζη, ενώ δεν αποκλείεται και η παρουσία άλλων σακχάρων όπως ραμνόζης, γαλακτόζης και αραβινόζης. Η εστεροποίηση αφορά όχι μόνο ένα υδροξύλιο, αλλά μπορεί να προκύψουν ανθοκυανιδίνες με την μορφή δι-και τρι-γλυκοζίτη. Οι γλυκοζίτες μπορούν έχουν ακόμη πολυπλοκότερη δομή αφού το μόριο του σακχάρου μπορεί να εστεροποιηθεί περαιτέρω με κάποιο φαινολικό οξύ για παράδειγμα το κουμαρικό οξύ.

2.1. Βιοσύνθεση των φλαβονοειδών

Ο βασικός ανθρακικός σκελετός των φλαβονοειδών προέρχεται από το συνδυασμό δυο μεταβολικών οδών, τη μεταβολική οδό του *σικιμικού οξέος* και την μεταβολική οδό του *μηλονικού οξέος*. Η πρώτη μεταβολική οδός ξεκινάει με την συμπύκνωση δύο μορίων: της **4-φωσφοερυθρόζης** που αποτελεί προϊόν της μεταβολικής οδού των φωσφοπεντοζών και του **φωσφοενολπυροσταφυλικού οξέος**, προϊόν της μεταβολικής οδού της γλυκόλυσης. Κατά την αλδολικού τύπου συμπύκνωση αυτών των δύο μορίων προκύπτει το 7-φωσφορο-3-δεοξυ-D-αραβινοεπτουλοσονικό οξύ (DAHP). Η αντίδραση καταλύεται από την συνθάση του DAHP με αποβολή ενός μορίου φωσφορικού οξέος. Ακολουθεί μια ενδομοριακή αλδολική συμπύκνωση με αποβολή ενός δευτέρου μορίου φωσφορικού οξέος, παρουσία ενός μορίου NAD^+ το οποίο οξειδώνει το ελεύθερο υδροξύλιο. Σχηματίζεται το πρώτο κυκλικό ενδιάμεσο το 3-δεϋδροξυ-κινικό οξύ με την βοήθεια του ενζύμου συνθάση του 3-δεϋδροξυ-κινικού οξέος. Το κυκλικό ενδιάμεσο μπορεί να αναχθεί περαιτέρω προς κιμικό οξύ. Το σικιμικό οξύ παράγεται από το 3-δεϋδρο-κινικό οξύ μέσω του 3-δεϋδρο-σικιμικού οξέος που προκύπτει από την αφυδάτωση του πρώτου με την βοήθεια της 3-δεϋδροκινάσης. Η τελική αντίδραση καταλύεται από την δεϋδρογονάση του σικιμικού οξέος.



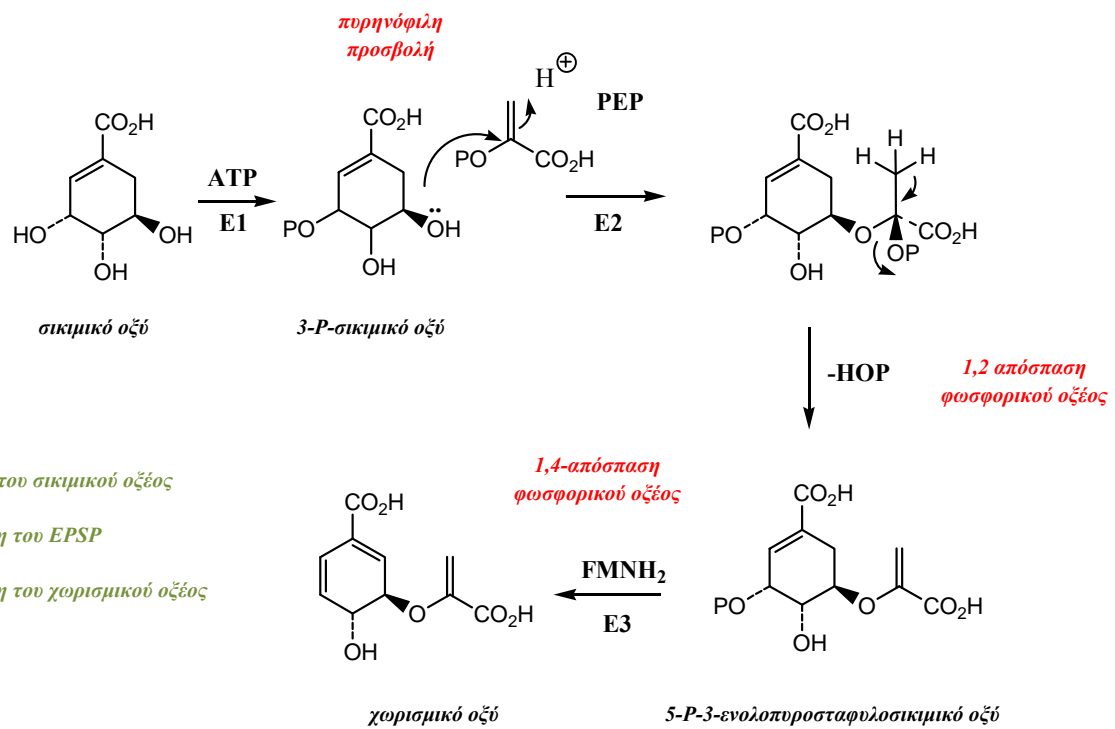
E1: DAHP συνθάση

E2: συνθάση του 3-δεϋδροκινικού οξέος

E3: 3-δεϋδροκινάση

E4: δεϋδρογενάση του κινικού οξέος

E5: δεϋδρατάση του 3 δεϋσικιμικού οξέος

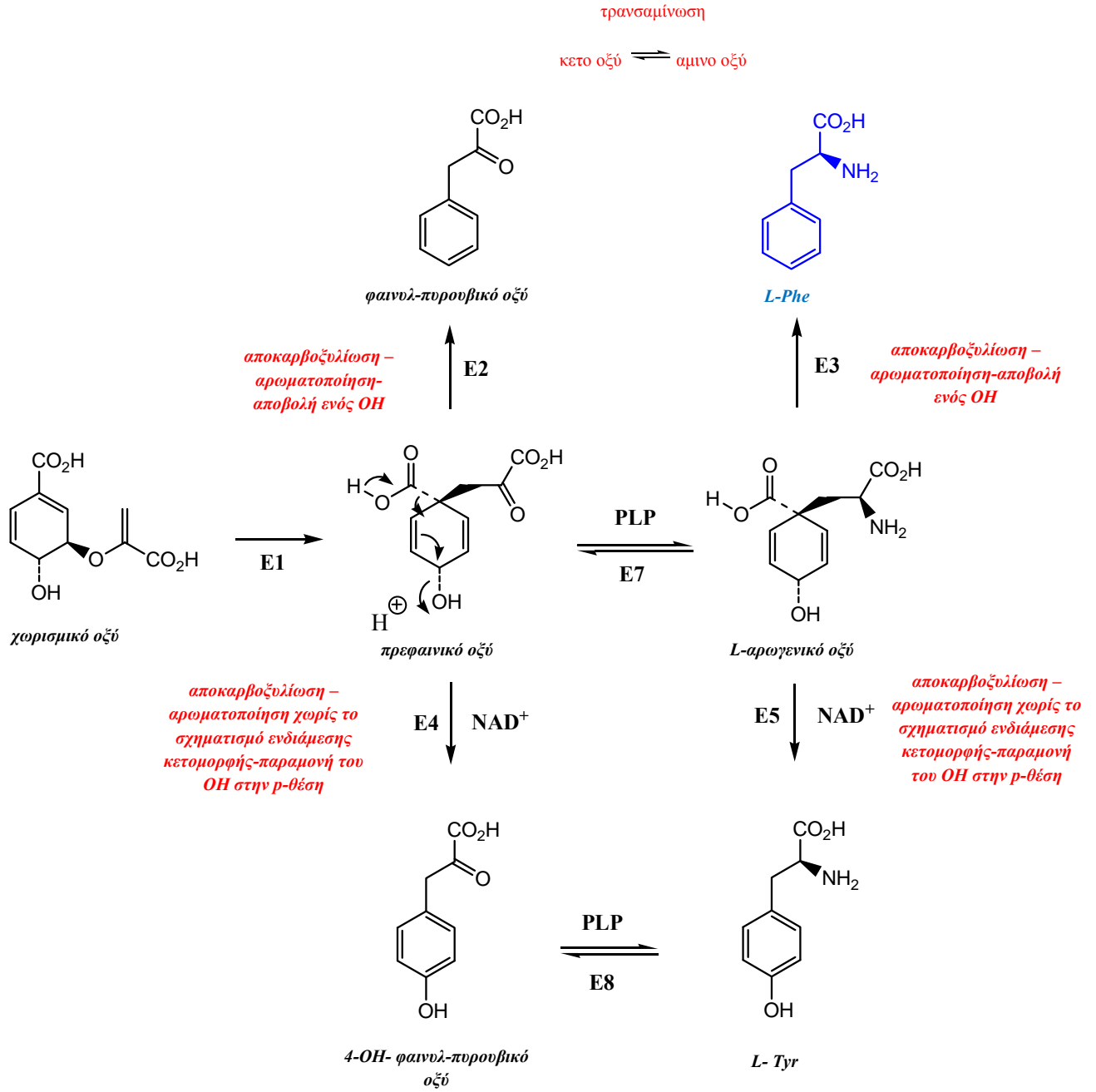


E1: κινάση του σικιμικού οξέος

E2: συνθάση του EPSP

E3: συνθάση του χωρισμικού οξέος

Μετά από μια σειρά αντιδράσεις, το σικιμικό οξύ μετατρέπεται σε χωρισμικό οξύ με την προσβολή ενός ακόμη μορίου φωσφοενολπυροσταφυλικού οξέος ως πλευρική αιθερική αλυσίδα. Αρχικά το σικιμικό οξύ μετατρέπεται σε 3-P-σικιμικό οξύ μέσω ATP-εξαρτώμενης φωσφορυλίωσης ενώ ακολουθεί αντίδραση προσθήκης-απόσπασης ενός μορίου φωσφοενολπυροσταφυλικού οξέος (PEP) που οδηγεί στο σχηματισμό του 5-P-3-ενολοπυροσταφυλοσικιμικού οξέος (EPSP). Αυτή η αντίδραση καταλύεται από την συνθάση του EPSP. Η μετατροπή του τελευταίου σε χωρισμικό οξύ γίνεται μέσω μηχανισμού 1,4 απόσπασης ενός μορίου φωσφορικού οξέος με τη βοήθεια του φλαβινομονονουκλεοτιδίου (FNM).



E1: μόντωση του χωρισμικού οξέος

E2: αφυδρατάση του πρεφαινικού οξέος

E3: αφυδρατάση του αρωγενικού οξέος

E4: αφυδρογονάση του πρεφαινικού οξέος

E5: αφυδρογονάση του αρωγενικού οξέος

E6: αμινοτρανσφεράση του πρεφαινικού οξέος

E7: αμινοτρανσφεράση του 4-OH-

φαινυλοπυροσταφυλικού οξέος

Το σικιμικό οξύ μετά από μια σειρά αντιδράσεων αποκαρβοξυλίωσης και τρανσαμίνωσης μετατρέπεται τελικά στο αμινοξύ φαινυλαλανίνη (Dewick M. Paul). Οι δακτύλιοι B και C προέρχονται από τη βιοχημική οδό του σικιμικού οξέος, από την φαινυλαλανίνη και το p-κουμαρικό οξύ. Ο δακτύλιος A προέρχεται από τρία μόρια μηλονυλο-CoA. Το τελευταίο προέρχεται από το ακετυλο-CoA και το CO₂ (μεταβολική οδός του μηλονικού οξέος). Η αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο καρβοξυλάση του ακετυλο-CoA (ACC). Το p-κουμαροϋλο-CoA προέρχεται από τη φαινυλαλανίνη μετά από μια σειρά αντιδράσεων (οδός του φαινυλοπροπανοϊκού οξέος). Από τη συμπύκνωση ενός μορίου p-κουμαροϋλο-CoA με τρία μόρια μαλονυλο-CoA σχηματίζεται η χαλκόνη της ναριγγενίνης η οποία μετατρέπεται εύκολα στην φλαβανόνη ναριγκενίνη. Το ένζυμο κλειδί σε αυτό το πρώτο στάδιο της βιοσύνθεσης των φλαβονοειδών αποδείχτηκε ότι είναι η συνθετάση της χαλκόνης (CHS) που καταλύει τη συμπύκνωση σε περισσότερα από ένα στάδια τριών μορίων οξικού οξέος που προέρχεται από το μαλονυλο-CoA παρουσία ενός ενεργοποιημένου παραγώγου του κινναμικού οξέος που δεν είναι άλλο από το p-κουμαροϋλο-CoA με συνέπεια το σχηματισμό της χαλκόνης 4,2',4',6'-τετρα-OH-χαλκόνης από την οποία θα προκύψουν μετέπειτα οι διαφορετικές δομές των φλαβονοειδών. Η συνθετάση της χαλκόνης (CHS) σε συνδυασμό με την NADPH- εξαρτώμενη ρεδουκτάση του πολυκετιδίου (PKR) καταλύει το σχηματισμό της 4,2',4'-3OH-χαλκόνης (6'-διοξυχαλκόνης = ισολικουιριτιγενίνης) και της αντίστοιχης 5-δεοξυ-φλαβανόνης (λικουιριτιγενίνη) πάντα με τη χρήση των μαλονυλο-CoA και p-κουμαροϋλο-CoA. Η τετραϋδροξυ-χαλκόνη και η 6'-δεοξυχαλκόνη αποτελούν πρόδρομα μόρια για την βιοσύνθεση των αουρονών. Στα επόμενα στάδια της βιοσύνθεσης οι χαλκόνες, οι φλαβανόνες, οι διϋδροφλαβονόλες και οι φλαβαν-3,4-διόλες δρουν ως πρόδρομες ουσίες για την βιοσύνθεση των ανθοκυανινών ενώ οι οδοί που οδηγούν στο σχηματισμό των φλαβονονών και φλαβονολών αποτελούν παρακλάδια των αρχικών σταδίων της βιοσύνθεσης των φλαβονοειδών. Η φλαβανόνη που προκύπτει από την στερεοεκλεκτική μετατροπή της χαλκόνης με τη βοήθεια του ενζύμου ισομεράση της χαλκόνης (CHI) αποτελεί ένα από τα βασικότερα σημεία διακλάδωσης στην πορεία της βιοσύνθεσης. Η ναριγγενίνη (5-OH-φλαβανόνη) λειτουργεί ως ενδιάμεσο στη βιοσύνθεση των ισοφλαβονονών, των φλαβονών, των διϋδροφλαβονολών και των φλαβαν-4-ολών. Η λικουιριτιγενίνη (5-δεοξυ-φλαβανόνη) λειτουργεί ως πρόδρομη ένωση στην βιοσύνθεση των ισοφλαβονονών ενώ παραμένει να αποδειχτεί η μετατροπή της σε άλλα 5-δεοξυ-φλαβονοειδή (φλαβονοειδή στα οποία λείπει το

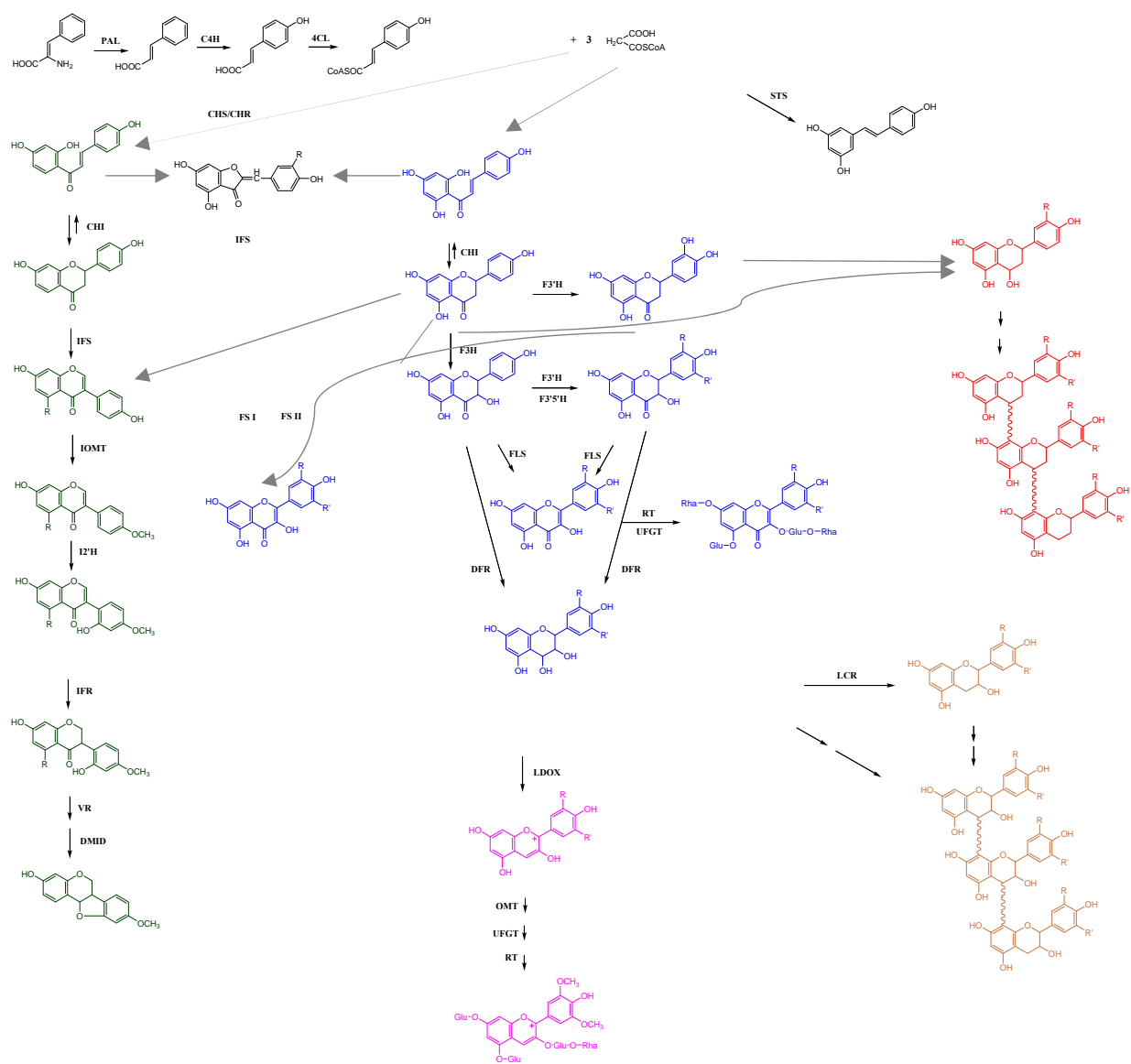
υδροξύλιο στον C5) και τα οποία είναι κοινά στο γένος Leguminosae. Ο σχηματισμός των ισοφλαβονονών μέσω της οξειδωτικής αναδιάταξης της φλαβανόνης περιλαμβάνει μια μετάθεση (shift) 2-3 της αρυλικής ομάδας. Η αντίδραση καταλύεται από την συνθάση της 2-υδροξυφλαβανόνης (IFS) με την βοήθεια μιας αφυδρατάσης που αποσπά ένα μόριο H_2O . Η IFS μπορεί να έχει ως υποστρώματα τις 5-OH-φλαβανόνες και τις 5-δεϋδροξυφλαβανόνες. Η γενιστεΐνη και η δαΐσδεΐνη με τη σειρά τους αποτελούν ενδιάμεσα στη βιοσύνθεση όλων των άλλων ισοφλαβονοϊδών συμπεριλαμβανομένου και των περοκαρπανίων. Η εισαγωγή ενός διπλού δεσμού μεταξύ του C2 και του C3 της φλαβανόνης οδηγεί στο σχηματισμό των φλαβονών, μια αντίδραση που καταλύεται από δυο διαφορετικού τύπου συνθετάσες: τις FSI και FSII, η πρώτη χρειάζεται ως συμπράγοντες το 2-οξυγλουταρικό οξύ, Fe^{2+} , και ασκορβικό οξύ ενώ η δεύτερη συνθάση χρειάζεται για να δράσει το συνένζυμο NADPH, και O_2 . Η υδροξυλίωση της φλαβανόνης στον C3 οδηγεί στο σχηματισμό των διϋδροφλαβονολών, μια αντίδραση που καταλύεται από την 3-υδροξυλάση της φλαβανόνης (FHT), που αναλογικά με την FNS I είναι μια εξαρτώμενη διοξυγενάση του 2-οξυγλουταρικού οξέος. Οι διϋδροφλαβονόλες είναι τα άμεσα υποστρώματα στη σύνθεση των φλαβονολών η οποία σύνθεση καταλύεται από μια συνθάση της φλαβονόλης (FLS) μαζί με ακόμη μία εξαρτώμενη διοξυγενάση του 2-οξυγλουταρικού οξέος και των φλαβαν-3,4-διολών (λευκοκυανιδίνες). Οι διϋδροφλαβονόλες είναι επίσης τα ενδιάμεσα μόρια στην βιοσύνθεση των κατεχινών (φλαβαν-3-ολών), των προανθοκυανιδινών (διμερή και ολιγομερή των φλαβαν-3-ολών) και των ανθοκυανιδινών. Η στερεοεκλεκτική αναγωγή στην θέση 4 των διϋδροφλαβονολών, καταλυόμενη από μια ρεδουκτάση της 4-διϋδροφλαβονόλης (DFR) με συνένζυμο το NADPH οδηγεί στο σχηματισμό των λευκοανθοκυανιδινών. Ένα ένζυμο ανάλογο με την DFR η ρεδουκτάση της 4-φλαβανόνης καταλύει NADPH-εξαρτώμενη αναγωγή του καρβονυλίου στη θέση 4 της φλαβανόνης με συνέπεια το σχηματισμό των φλαβαν-4-ολών, τύπος λευκοκυανιδινών, που αποτελούν τα άμεσα πρόδρομα μόρια της απιγενινιδίνης και της λουτεολιδίνης που είναι 3-δεοξυανθοκυανιδίνες. Οι λευκοανθοκυανιδίνες είναι τα άμεσα πρόδρομα μόρια στη σύνθεση των κατεχινών και των προανθοκυανιδινών. Οι κατεχίνες παράγονται μετά από αναγωγή στη θέση 4 της λευκοανθοκυανιδίνης η οποία καταλύεται από την ρεδουκτάση της 4-λευκοανθοκυανιδίνης (LAR). Υπάρχουν εν τέλει αποδείξεις ότι οι λευκοανθοκυανιδίνες είναι άμεσα πρόδρομα μόρια των ανθοκυανινών. Είναι πιθανόν πως κατά την αλληλουχία αυτών των αντιδράσεων, μια

δεοξυγενάση να δημιουργεί διπλό δεσμό μεταξύ του C2 και το C3 της λευκοανθοκυανιδίνης. Το προϊόν που προκύπτει είναι μια 2-φλαβεν-3,4-*cis*-διόλη η οποία μπορεί να υποστεί ισομερίωση προς ένα σταθερότερο θερμοδυναμικά προϊόν την 3-φλαβεν-2,3-διόλη η οποία χάνει αυθόρμητα ένα μόριο νερού δίνοντας έτσι την ανθοκυανιδίνη. Η γλυκοσυλίωση στη θέση 3 της ανθοκυανιδίνης θα πρέπει να είναι και το τελικό στάδιο της όλης βιοσυνθετικής διαδικασίας μια και οι ανθοκυανιδίνες είναι ασταθείς στις φυσιολογικές συνθήκες του φυτικού κυττάρου. Σε αυτήν την αλληλουχία ενζύμων θα πρέπει να προστεθούν και μια σειρά από άλλα ένζυμα τα οποία μπορούν να προκαλέσουν αλλαγές στο βασικό σκελετό των φλαβονοειδών, αντιδράσεις όπως υδροξυλίωση, γλυκοσυλίωση, ακυλίωση, οι οποίες έχουν σκοπό να προσδώσουν στα μόρια σταθερότητα και υδροφιλικότητα. Ενώ αντιδράσεις μεθυλίωσης και πρενυλίωσης προσδίδουν στα μόρια χαρακτήρα λιπόφιλο και δράση αντιμικροβιακή. Η προσθήκη υδροξυλίου στις θέσεις 3' και 5' καταλύεται από την 3'-υδροξυλάση των φλαβονοειδών (F3'H) και από την 3',5'-υδροξυλάση των φλαβονοειδών (F3',5'H) που χρησιμοποιούν τα φλαβονοειδή ως υπόστρωμα. Η μετέπειτα μεθυλίωση αυτών των υδροξυλίων καταλύεται από ειδικές μεθυλοτρανσφεράσες. Καταλήγοντας αξίζει να ειπωθεί ότι το p-κουμαροϋλο-CoA αντιπροσωπεύει το κύριο υπόστρωμα πάνω στο οποίο θα δράσει η CHS και θα προκύψουν τα 4'-υδροξυ-φλαβονοειδή.

Τα φλαβονοειδή μπορεί να είναι υδροξυλιωμένα στις θέσεις 3,5,7,3',4' και 5'. Μερικά από αυτά τα OH μπορεί να είναι είτε μεθυλιωμένα είτε ακετυλιωμένα είτε σουλφονυλιωμένα. Στην περίπτωση που είναι γλυκοζυλιωμένα, ο γλυκοζιτικός δεσμός βρίσκεται είτε στη θέση 3 είτε στη θέση 7. Τα σάκχαρα που απαντώνται είναι η L-ραμνόζη, η D-γλυκόζη, η γλυκοραμνόζη, η γαλακτόζη ή η αραβινόζη. Μπορεί να παρατηρηθεί και πρενυλίωση σε άτομο του αρωματικού δακτυλίου.

Παρακάτω απεικονίζεται η βιοσυνθετική οδός που ξεκινάει από την οδό του φαινυλοπροπανοϊκού οξέος και καταλήγει στη σύνθεση των φλαβονοειδών ([Winkel-Shirley, B. 2002](#)).

Σχ 1: Βιοσύνθεση των φλαβονοειδών



2.2. Ρόλος φλαβονοειδών στα φυτά

Τα φυτά έχουν πολλούς ρυθμιστικούς μεταβολίτες που ελέγχουν το χρώμα των ανθέων, τη γονιμοποίηση, την ωρίμανση των σπόρων, την ανάπτυξη καθώς και την αντιμετώπιση των συνθηκών του βιοτικού και του αβιοτικού στρες. Τα φλαβονοειδή παίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορα στάδια ανάπτυξης του φυτού καθώς και στην αντοχή του έναντι του περιβαλλοντικού στρες. Είναι εξαιρετικά ισχυροί αναστολείς των ενεργών ριζών οξυγόνου, αντιμαχόμενα διαρκώς τις συνθήκες της μολυσμένης ατμόσφαιρας. Αυτοί οι μεταβολίτες είναι αποτελεσματικοί στην αντιμετώπιση του στρες που προκαλείται από τη μεταβολή της θερμοκρασίας, και που οδηγεί στην καταστροφή των κυτταρικών μεμβρανών λόγω ψύχους, καθώς επίσης και των συνθηκών ξηρασίας και ασυνήθιστης αλατότητας. Τα φλαβονοειδή δρουν σαν μεταβιβαστές λαμβάνοντας προστατευτικά μέτρα έναντι μικροβιακών προσβολών. Επίσης είναι υπεύθυνα για τα μοναδικά χρώματα των ανθέων και καρπών τα οποία με τη σειρά τους είναι απαραίτητα για τη γονιμοποίηση και αναπαραγωγή. Συμπερασματικά, η σπουδαιότητα των φλαβονοειδών στη φυσιολογία των φυτών είναι κεφαλαιώδης και συνεχείς προσπάθειες καταβάλλονται για τη καλύτερη κατανόηση της βιοσύνθεσης και των μηχανισμών δράσεώς τους.

2.3. Φλαβονοειδή και δράσεις

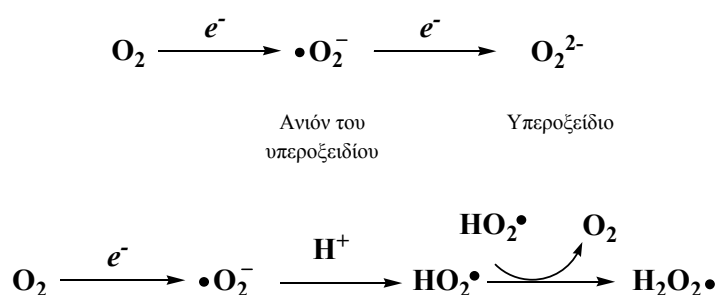
2.3.1. Φλαβονοειδή και αντιοξειδωτική δράση

Τα φλαβονοειδή και οι φαινολικές ενώσεις γενικότερα, αποτελούν φυσικούς παρεμποδιστές οξειδωσης, που δρουν αποτελεσματικά στην πρόληψη ασθενειών και στην αντιμετώπιση δυσμενών καταστάσεων που σχετίζονται με την δράση **ελευθέρων ριζών**.

Ελεύθερες ρίζες είναι άτομα ή μόρια που διαθέτουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στιβάδα ενός ατόμου π.χ. O, N, Cl (Perkins, 1994). Το φαινόμενο της οξειδωσης έχει ζωτική σημασία για την φυσιολογική λειτουργία των αερόβιων κυττάρων π.χ. την παραγωγή ενέργειας κατά την κυτταρική αναπνοή την καταστροφή ιών και παθογόνων βακτηρίων. Κατά τις αντιδράσεις μεταφοράς

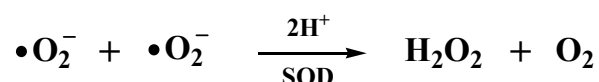
ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια, το μεταβολισμό ουσιών που μεταδίδουν νευρικά σήματα και την οξειδωση της αιμοσφαιρίνης, παράγονται ενεργά είδη οξυγόνου, αζώτου και χλωρίου (ROS, RNS, RCIS) οι οποίες δυνητικά μπορεί να βλάψουν όχι μόνο παθογόνα βακτήρια αλλά και φυσιολογικά κύτταρα (German and Dillard, 1998, Evans and Halliwell, 2001). Για την προστασία από την βλαβερή επίδραση των ROS, RNS και RCIS οι οργανισμοί διαθέτουν μηχανισμούς και συστήματα «ολικής αντιοξειδωτικής άμυνας» που βασίζονται σε δέσμευση αυτών των ενεργών ειδών, παρεμπόδιση του σχηματισμού τους, επιδιόρθωση των βλαβών ή και απόπτωση των κατεστραμμένων κυττάρων (protection against systematic infection) (German and Dillard, 1998). Τέτοια συστήματα μπορεί να είναι ενζυμικά ή μη ενζυμικά.

Το φαινόμενο της οξειδωσης έχει ζωτική σημασία για τη φυσιολογική λειτουργία των αερόβιων οργανισμών, αφού κατά την κυτταρική αναπνοή παράγεται η απαραίτητη ενέργεια που θα εξασφαλίσει τη ζωή του κυττάρου ή θα προστατεύσει το κύτταρο από ιούς και παθογόνα βακτήρια. Το μοριακό οξυγόνο είναι ένας ιδανικός τελικός δέκτης ηλεκτρονίων. Η υψηλή χημική συγγένειά του για ηλεκτρόνια, του προσδίδει μια θερμοδυναμικά μεγάλη κινητήρια δύναμη. Ωστόσο οι κίνδυνοι παραμονεύουν κατά την αναγωγή του οξυγόνου. Η μεταφορά τεσσάρων ηλεκτρονίων (e^-) οδηγεί σε ασφαλή προϊόντα που είναι δυο μόρια ύδατος, αλλά η μερική αναγωγή παράγει επικίνδυνες ενώσεις. Ιδιαίτερα η μεταφορά ενός e^- στο οξυγόνο σχηματίζει το ανιόν του σουπεροξειδίου, ενώ η μεταφορά δυο e^- οδηγεί σε υπεροξειδίο σύμφωνα με τις αντιδράσεις:



Οι ενώσεις αυτές και ιδιαίτερα τα προϊόντα αντιδράσεών τους με κυτταρικά συστατικά, μπορεί να αποβούν πολύ βλαβερά για τη λειτουργία του κυττάρου. Παρόλο που η οξειδάση του κυτοχρώματος *c* καθώς και άλλες πρωτεΐνες κατακρατούν τα ενδιάμεσα των αντιδράσεων που καταλύουν, αναπόφευκτα

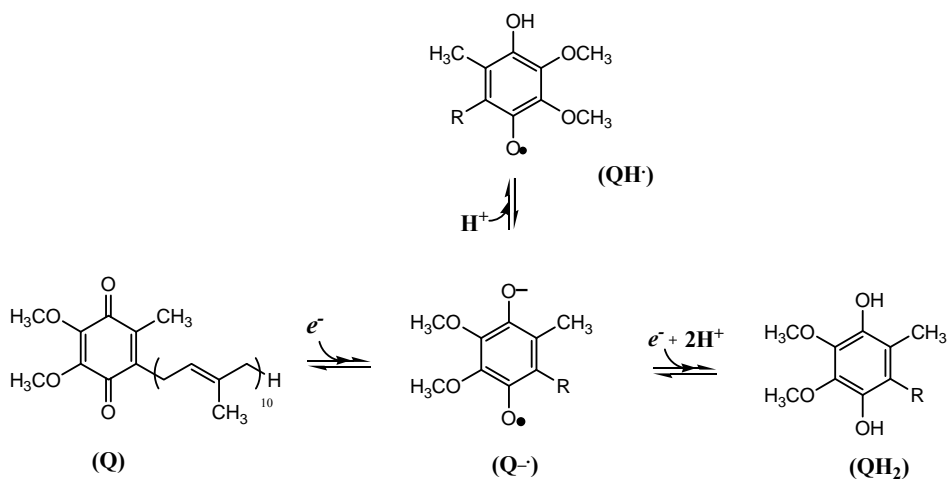
σχηματίζονται μικρές ποσότητες ανιόντος σουπεροξειδίου και υπεροξειδίου του υδρογόνου, καθώς και άλλες ρίζες που μπορούν να προκύψουν από τα τελευταία, όπως ρίζα υδροξυλίου ($\text{OH} \bullet$). Η ρίζα σουπεροξειδίου και η ρίζα υδροξυλίου, ονομάζονται *ενεργές ρίζες οξυγόνου ROS*. Τα ενεργά είδη εκτός από οξυγόνο μπορεί να περιέχουν άζωτο ή χλώριο οπότε ονομάζονται RNS και RCS αντίστοιχα, και μπορεί να προκύψουν και από το μεταβολισμό ουσιών που μεταδίδουν νευρικά σήματα, την οξείδωση της αιμοσφαιρίνης, κ.τ.λ. Ο οργανισμός όμως διαθέτει κυτταρικές στρατηγικές άμυνας μπροστά στην οξειδωτική βλάβη από ROS, RNS και RCS. Μία από αυτές είναι η *δισμουτάση του υπεροξειδίου* (superoxide dismutase) (SOD). Το ένζυμο αυτό εξουδετερώνει τις ρίζες του σουπεροξειδίου καταλύοντας την μετατροπή δύο ριζών οξυγόνου σε μοριακό οξυγόνο και υπεροξείδιο του υδρογόνου σύμφωνα με την αντίδραση:



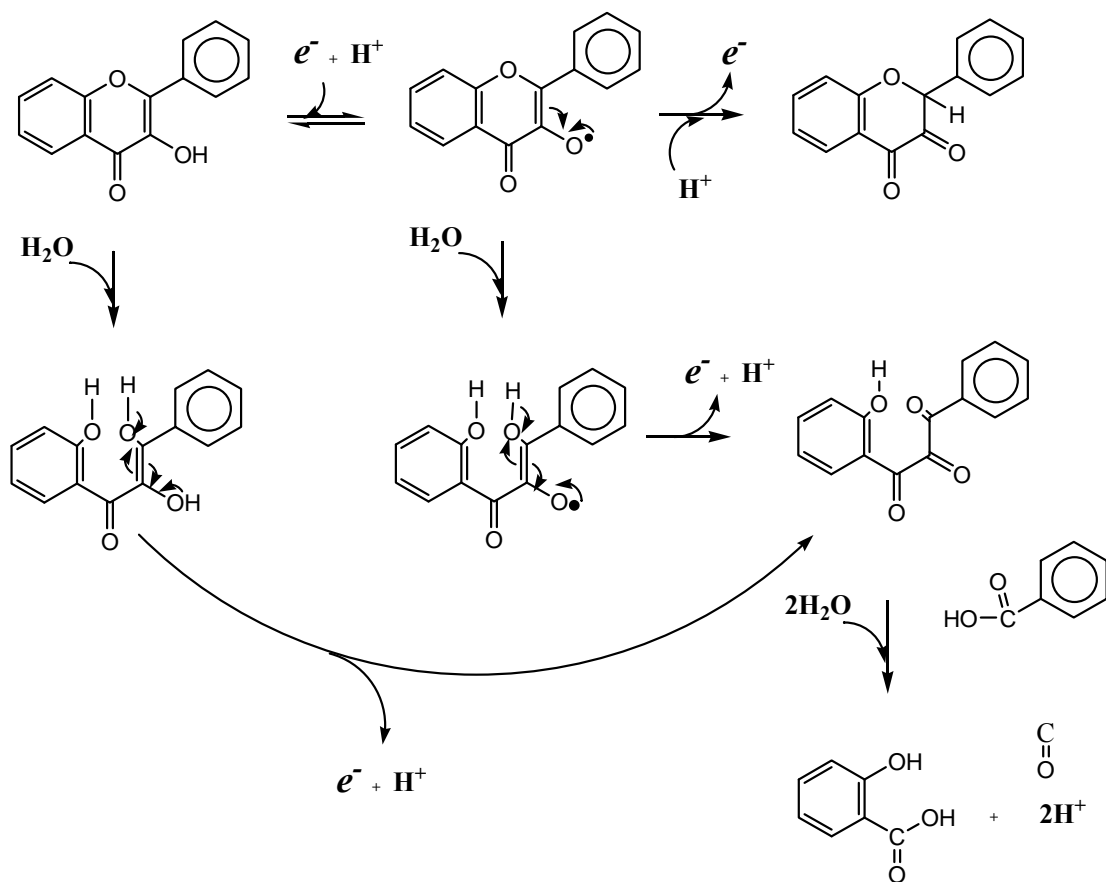
Η σημασία της αντίδρασης καταδεικνύεται από το γεγονός ότι οργανισμοί που στην εξέλιξη τους δεν απέκτησαν το ένζυμο αυτό, είναι περιορισμένοι να ζούνε σε αναερόβιες συνθήκες. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα υπάρχει διαφορετική δισμουτάση στα μιτοχόνδρια απ' ότι στο κυτταρόπλασμα.

Ένας άλλος μηχανισμός άμυνας είναι και η *ουβικινόνη* ή *συνένζυμο Q*, ένας από τους δύο μεταφορείς e^- στην αναπνευστική αλυσίδα. Η ουβικινόνη δεν εξουδετερώνει μονάχα ελεύθερες ρίζες αλλά συμπεριφέρεται και ως αναγωγικό, δυο ιδιότητες ταυτόσημες με αυτές των φλαβονοειδών. Τα e^- μεταφέρονται από το NADH στο O_2 μέσω μιας αλυσίδας τριών μεγάλων πρωτεϊνικών συμπλόκων τα οποία ονομάζονται *οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH-Q (Σύμπλοκο I)*, *οξειδοαναγωγή του ζεύγους Q-κυτοχρώματος c (Σύμπλοκο III)* και *οξειδάση του κυτοχρώματος c (Σύμπλοκο IV)*. Η *αναγωγή του ζεύγους ηλεκτρικού- Q (Σύμπλοκο II)* δεν αντλεί πρωτόνια. Το *συνένζυμο Q* είναι ένα παράγωγο κινόνης με μια μακριά ισοπρενοειδή αλυσίδα. Η συνηθέστερη μορφή στα θηλαστικά περιέχει 10 μονάδες ισοπρενίου (Q_{10}). Οι κινόνες υπάρχουν σε τρεις καταστάσεις οξείδωσης, στην πλήρως οξειδωμένη μορφή (Q), το *συνένζυμο Q* έχει δύο κετονικές ομάδες. Η προσθήκη ενός e^- και ενός H^+ οδηγεί στη μορφή της ημικινόνης ($\text{QH}\bullet$) η οποία μπορεί εύκολα να αποπρωτονιωθεί

σχηματίζοντας το ανιόν της ρίζας της ημικινόνης ($Q\cdot^-$). Η προσθήκη ενός δευτέρου H^+ οδηγεί στην ουβικινόλη (QH_2), την πλήρως ανηγμένη μορφή του συνεχζύμου Q.



Ουβικινόνη: σαρωτής ελευθέρων ριζών



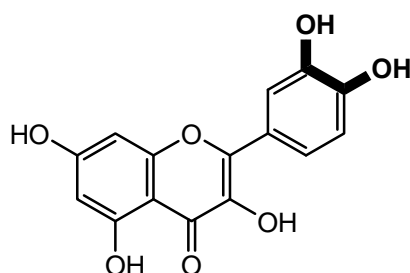
Φλαβονοειδή: σαρωτές ελευθέρων ριζών

Σε αυτά τα δυο σχήματα φαίνεται η ομοιότητα της δράσης των φλαβονοειδών με αυτή της ουβικινόνης, ως σαρωτές ελευθέρων ριζών. Τα φλαβονοειδή προστατεύουν τον οργανισμό με την ικανότητά τους να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες (Uma Devi et al., 1999; Re et al., 1999; Merati et al., 1992).

Ρόλος του B δακτυλίου

Σύμφωνα με τον (Bors et al., 1990) ο δακτύλιος B αποτελεί κύριο στόχο των ελευθέρων ριζών. Οι απαραίτητη προϋπόθεση που πρέπει να πληρεί αυτός ο δακτύλιος είναι η δομή της κατεχόλης (παρουσία δύο υδροξυ- ομάδων σε ο-θέση) η οποία και αποτελεί τον κύριο στόχο των ριζών στην περίπτωση φλαβονοειδών με 2,3 διπλό δεσμό (φλαβάν-3-όλες, φλαβανόνες). Η δομή της κατεχόλης προσφέρει μια

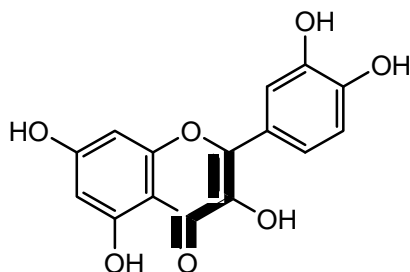
σταθερότητα στην αρυλική ρίζα που σχηματίζεται και συμμετέχει στον απεντοπισμό των ηλεκτρονίων.



Η παρουσία και τρίτης OH σε ο- θέση δεν οδηγεί στο ίδιο αποτέλεσμα το ίδιο συμβαίνει και στην περίπτωση που τα δύο OH βρίσκονται σε μ- θέση μεταξύ τους όπου παρατηρείται μείωση της δραστηρότητας.

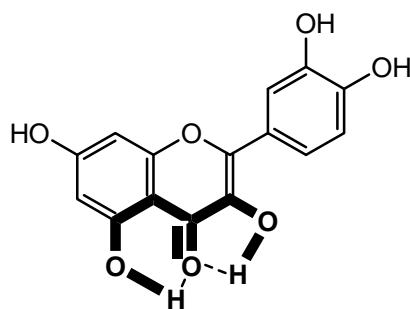
Ρόλος του C δακτυλίου

Ο 2,3 διπλός δεσμός που βρίσκεται σε συζυγία με το καρβονύλιο της θέσης 4 και που συμμετέχει στον απεντοπισμό των ηλεκτρονίων του δακτυλίου B,

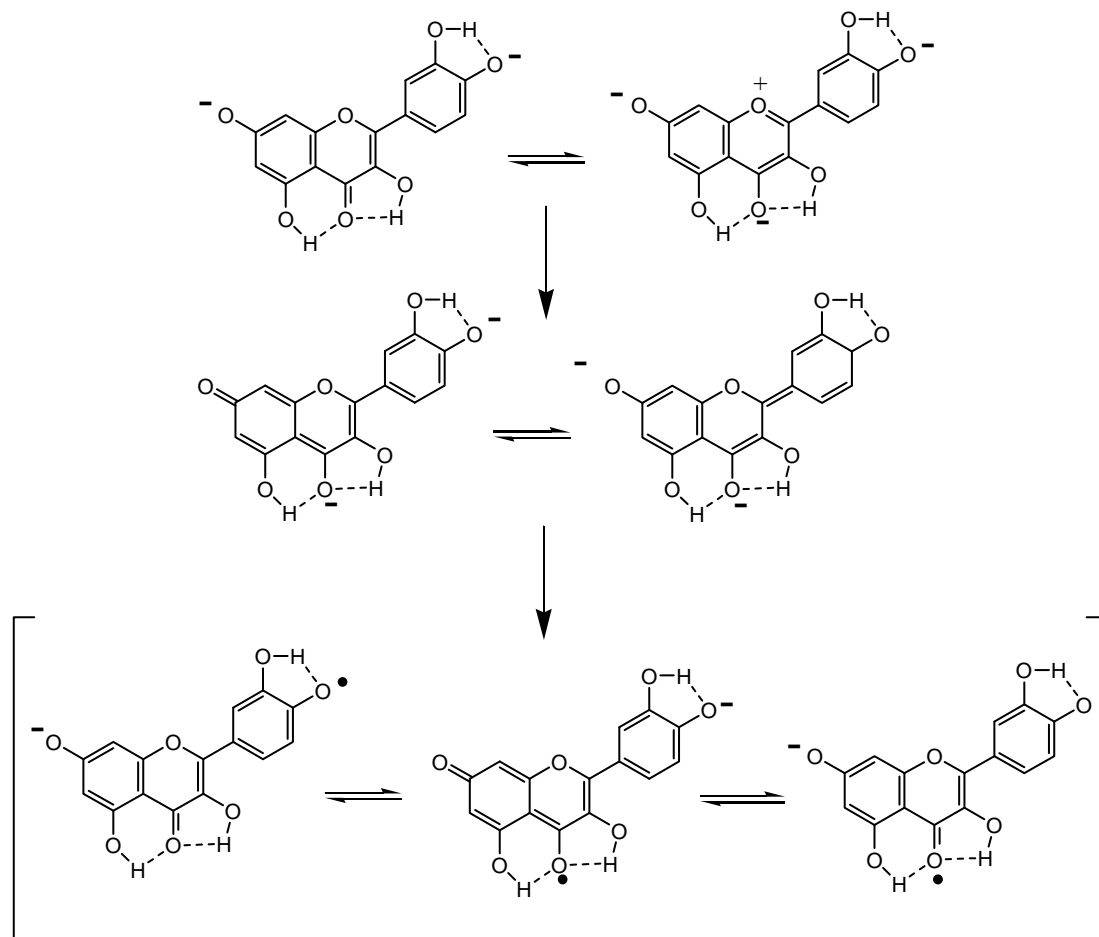


Ρόλος του A δακτυλίου

Η επιπλέον παρουσία των 3- και 5- OH έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της ικανότητας σάρωσης των ελευθέρων ριζών.



Παρακάτω φαίνεται το μόριο της κερκετίνης με τον απεντοπισμό της ρίζας στους τρεις δακτυλίους.

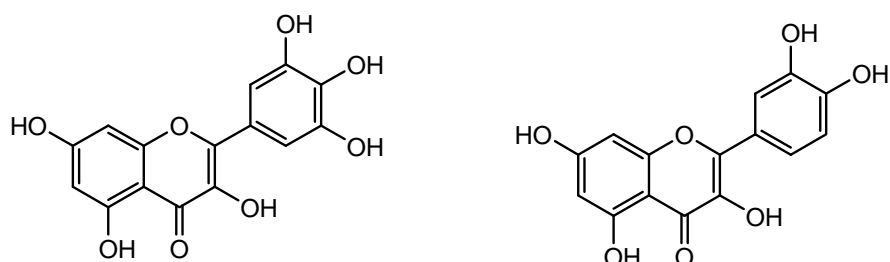


Συμπερασματικά προκύπτουν τα εξής

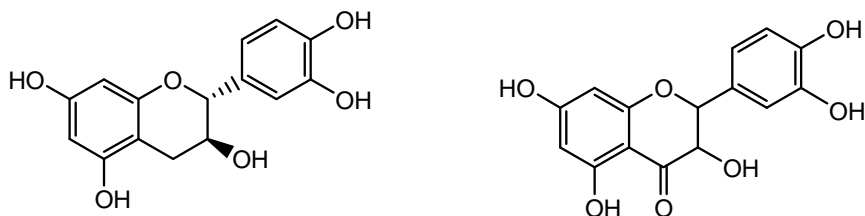
- α) η δομή της κατεχόλης στον Β δακτύλιο έχει την τάση να σταθεροποιήσει την ρίζα
- β) η συζυγία του Β δακτυλίου με το καρβονύλιο της θέσης 4 η οποία επιτρέπει τον απεντοπισμό της ρίζας από τον Β δακτύλιο
- γ) οι 3- και 5- OH ομάδες που συμβάλλουν στον απεντοπισμό της ρίζας από το καρβονύλιο σε και τους δύο υποκαταστάτες.

Ο συνδυασμός όλων αυτών των δομικών χαρακτηριστικών συμβάλλει στον εκτενέστερο απεντοπισμό της ρίζας και στη σταθεροποίηση της αρυλικής ρίζας (Silva et al., 2002).

Συγκεκριμένα, όταν σπάει ο δεσμός O-H με το σχηματισμό της ρίζας, σχηματίζεται ένας δεσμός H μεταξύ της ρίζας και του διπλανού OH που σταθεροποιεί τη ρίζα και την ενθαλπία ιονισμού του δεσμού O-H. Στην περίπτωση που ο δακτύλιος B έχει τη δομή της πυρογαλλόλης (3, '4, '5'-OH) ο δεσμός O-H του κεντρικού υδροξυλίου είναι ο πιο ασθενής λόγω της παρουσίας των δύο OH σε *ο*- θέση τα οποία μπορούν να σχηματίσουν δυο δεσμούς H με τη ρίζα. Σύμφωνα με αυτά η μυρικετίνη εμφανίζει μεγαλύτερη δραστηριότητα από την κερκετίνη.



Η φλαβανόλη κατεχίνη και η φλαβανόνη ταξιφολίνη οι οποίες έχουν τον ίδιο βαθμό υδροξυλίωσης, εμφάνισαν αντιοξειδωτική δράση παρόμοια αυτής της κερκετίνης.



Η κατεχίνη στερείται του καρβονυλίου στη θέση 4 καθώς και του διπλού δεσμού στη θέση 2,3 ενώ στην ταξιφολίνη παρατηρείται έλλειψη του διπλού δεσμού.

Η κερκετίνη, η ταξιφολίνη, η κατεχίνη με διαφορετικές βασικές δομές αλλά με τον ίδιο βαθμό υδροξυλίωσης σε κοινά άτομα άνθρακα (3,5,7,3',4'-OH) παρουσίασαν παρόμοια αντιοξειδωτική ικανότητα. Οι δομές αυτών των φλαβονοειδών είχαν ως κοινό χαρακτηριστικό την δομή της κατεχόλης στο B δακτύλιο (3',-4'-OH). Η καιμφερόλη (3,5,7,4'-OH) δεν χαρακτηρίζεται από την παρουσία της κατεχόλης παρόλα αυτά παρουσιάζει υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα γεγονός που μπορεί να αποδοθεί τόσο στην παρουσία του OH στη θέση 3 καθώς και του διπλού δεσμού στη θέση 2,3. Επομένως η δομή της κατεχόλης στο B δακτύλιο παίζει τον καθοριστικό

ρόλο αλλά στην περίπτωση που αυτή απουσιάζει τον ρόλο αναλαμβάνει η οξο ομάδα στη θέση 4 και ο διπλός δεσμός στη θέση 2,3.

Ρόλος της γλυκοσυλίωσης

Τα άγλυκα μόρια παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση έναντι των αντίστοιχων γλυκοσυλιωμένων μορίων (Ratty et al., 1999),(Gao et al.,1999) . Η αντιοξειδωτική δράση μειώνεται ακόμη περισσότερο όσο αυξάνεται ο βαθμός της γλυκοσυλίωσης. Επίσης σημαντικό ρόλο παίζει και η θέση της γλυκοσυλίωσης καθώς και η δομή του αντίστοιχου σακχάρου. Η γλυκοσυλίωση στην θέση 4 είναι πιο ευνοϊκή από την 3 και 7 θέση. Η C- γλυκοσυλίωση στο δακτύλιο A επίσης συμβάλλει στη μείωση της δραστηριότητας. Το γεγονός αυτό αποδίδεται στο ότι η O-γλυκοσυλίωση δεν επιτρέπει την επιπεδότητα του δακτυλίου B με το υπόλοιπο του μορίου με αποτέλεσμα να μην μπορεί να γίνει ο απεντοπισμός της ρίζας από το B δακτύλιο στο υπόλοιπο του μορίου. (Van Acker et al., 1996),(Bors et al., 1990).

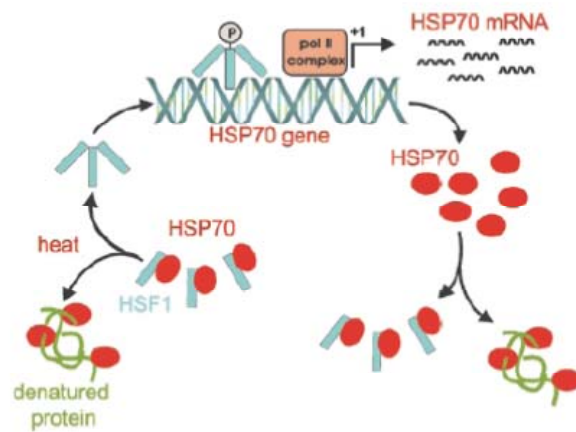
Ρόλος της O-μεθυλίωσης

Παρόμοια στην περίπτωση της μεθυλίωσης, στερεοχημικοί παράγοντες είναι αυτοί που καθορίζουν την μείωση της δραστηριότητας οι οποίοι προκαλούν αλλαγές στην επιπεδότητα του μορίου. Ο μεθυλίωση του B δακτυλίου επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό την αντιοξειδωτική δράση όπως φαίνεται στην περίπτωση της 4'Ο-μεθυλίωση της κερκετίνης καθώς και της 3',4'-διμεθυλαιθέρα της καιμφερόλης όπου η αντιοξειδωτική δράση μειώνεται στο μισό.

2.3.2. Φλαβουοειδή και καρκίνος

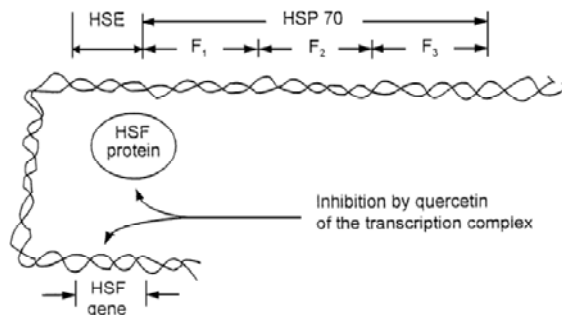
Πρωτεΐνες θερμικού shock (heat shock proteins, Hps)

Οι πρωτεΐνες θερμικού shock (Hps) αποτελούν μια οικογένεια πρωτεϊνών, οι οποίες προστατεύουν τα κύτταρα από περιβαλλοντικά ή παθοφυσιολογικά ερεθίσματα, ούτως ώστε να επιβιώνουν σε καταστάσεις ανάγκης και να επανακτούν τη φυσιολογική τους λειτουργικότητα. Εκτός από τα θερμικά ερεθίσματα, η σύνθεση των ειδικών παραγόντων ελέγχου μεταγραφής επί του θερμικού shock (HSF) επάγεται και από άλλα αίτια, όπως η ακτινοβολία, τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα, βαρέα μέταλλα κα. Ιογενείς ή μικροβιακές λοιμώξεις και καταστάσεις ανοξίας ή έλλειψης γλυκόζης διεγείρουν επίσης την παραγωγή των Hsp. Ορισμένες από τις πρωτεΐνες θερμικού shock σχετίζονται με την εμβρυϊκή ανάπτυξη και διαφοροποίηση και εκφράζονται επιλεκτικά σε διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου κάτω από την ρυθμιστική δράση ορμονών και αυξητικών παραγόντων. Οι πρωτεΐνες θερμικού shock ταξινομούνται σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος σε έξι ομάδες: *Hsp27*, *Hsp40*, *Hsp60*, *Hsp70*, *Hsp90* και *Hsp100*. Η ρύθμιση της μεταγραφής των γονιδίων των *Hsp* επιτυγχάνεται με τη βοήθεια των HSF οι οποίοι αλληλεπιδρούν με μια περιοχή ελέγχου μεταγραφής των γονιδίων των *HSP*, η οποία περιλαμβάνει πολλαπλά αντίγραφα της αλληλουχίας *AGAA*. Οι πρωτεΐνες Hsp διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανοσολογική απάντηση σε όγκους και εμπλέκονται στους προστατευτικούς μηχανισμούς των κυττάρων σε ισχαιμικές και φλεγμονώδεις καταστάσεις. Οι παράγοντες αυτοί βρίσκονται σε κατάσταση ηρεμίας υπό τη μορφή των μονομερών *HSF1* ή διμερών *HSF2* και υπό την επίδραση ερεθισμάτων θερμικού stress σχηματίζουν ενεργείς τριμερείς μορφές, οι οποίες μεταναστεύουν στον πυρήνα και υπερφωσφορυλιώνονται σε κατάλοιπα σερίνης. Με τη μορφή αυτή έχουν τη δυνατότητα να συνδέονται με τις θέσεις ελέγχου και να επάγουν τη σύνθεση των πρωτεϊνών *Hsp* όπως χαρακτηριστικά φαίνεται στο παρακάτω σχήμα:



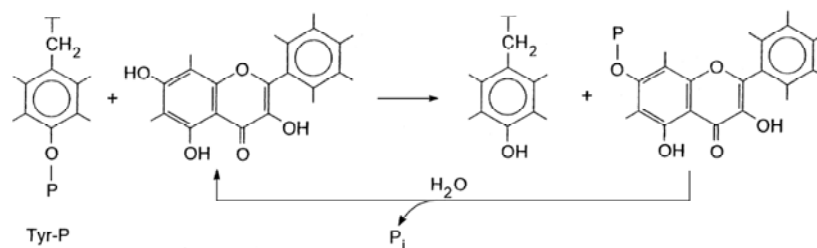
Σύνθεση των πρωτεϊνών Hsp

Η έκφραση των HSP γονιδίων μετά από την παρουσία δυσμενών παραγόντων μέσα στο κύτταρο δίνει την ευκαιρία σε αυτό να επιβιώσει ακόμη και κάτω από αυτές τις δύσκολες συνθήκες. Αντίθετη είναι η δράση που ασκεί η κερκετίνη και τα ανάλογα της που επάγουν την απόπτωση των κυττάρων αυτών. Ο μηχανισμός αναστολής της έκφρασης του γονιδίου από τη κερκετίνη δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως όμως έχει αποδειχτεί η ειδική αναστολή στην σύνθεση των *HSP mRNA* (Hosokawa et al., 1992). Η αναστολή γίνεται κατά τη διάρκεια της μεταγραφής διότι σε πειράματα που έχουν γίνει με κερκετίνη, φλαβόνη και γενιστεΐνη δεν φάνηκε να υπάρχει αναστολή της δράσης της RNA πολυμεράσης II (Nose, 1984; Ono et al., 1990; Simuth et al., 1986). Σε πειράματα που έγιναν με συγκεκριμένες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων που περιλαμβάνουν την αλληλουχία έναρξης (F1), την κεντρική αλληλουχία (F2) και την αλληλουχία τερματισμού (F3) του γονιδίου HSP-70 αποδείχτηκε ότι παρουσία Κερκετίνης τα κύτταρα δεν ήταν ικανά να εκφράσουν το γονίδιο σε αντίθεση με τα κύτταρα στα οποία είχε προηγηθεί θερμικό shock στους 43° C για 1h.



Αναστολή του συμπλόκου από τη κερκετίνη

Ογκογένεση είναι μια πολυσταδιακή διεργασία η οποία αρχίζει με την νεοπλασματική εξαλλαγή ή μεταμόρφωση που οφείλεται σε μία ή περισσότερες μεταλλάξεις λόγω δράσης γενοτοξικών ή επιγενετικών χημικών καρκινογόνων ή άλλων παραγόντων (φάση έναρξης, initiation phase). Τη φάση αυτή ακολουθεί η φάση προαγωγής (promotion), κατόπιν η φάση της ανάπτυξης και του πολλαπλασιασμού του νεοπλάσματος, η φάση της αγγειογένεσης και αιμάτωσης του όγκου και τέλος η μετάσταση. Τα σύστημα ελέγχου του κυτταρικού κύκλου βασίζεται στην κυκλική ενεργοποίηση πρωτεϊνικών κινασών. Οι αντιδράσεις φωσφορυλίωσης που ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο διενεργούνται από μια ειδική ομάδα πρωτεϊνικών κινασών δηλαδή ενζύμων που καταλύουν την μεταφορά μιας φωσφορικής ομάδας από το ATP στην πλευρική αλυσίδα ενός συγκεκριμένου αμινοξέος της πρωτεΐνης στόχου. Οι συνέπειες της φωσφορυλίωσης μπορούν να αναστραφούν γρήγορα με την αφαίρεση της φωσφορικής ομάδας (αποφωσφορυλίωση), μιας αντίδρασης που διεξάγεται από μια άλλη ομάδα ενζύμων, τις πρωτεϊνικές φωσφατάσες. Σημαντικό ρόλο στην παθογένεση του καρκίνου παίζει η ανώμαλη σηματοδότηση μέσω υποδοχέων που διασυνδέονται με ένζυμα. Οι υποδοχείς αυτής της κατηγορίας είναι υποδοχείς των οποίων η κυτταροπλασματική περιοχή λειτουργεί ως κινάση της τυροσίνης (tyrosine protein kinase) και φωσφορυλιώνει πλευρικές αλυσίδες τυροσίνης επιλεγμένων ενδοκυττάρων πρωτεϊνών. Για το λόγο αυτό αποκαλούνται *υποδοχείς με δραστικότητα κινάσης της τυροσίνης* (receptor tyrosine kinases). Στους υποδοχείς με δραστικότητα κινάσης της τυροσίνης περιλαμβάνονται οι περισσότεροι υποδοχείς των αυξητικών παραγόντων. Έχει αποδειχτεί ότι για την σειρά καρκινικών κυττάρων HELA το φλαβονοειδές κερκετίνη απομακρύνει την φωσφορική ομάδα από το υδροξύλιο του καταλοίπου τυροσίνης με αποτέλεσμα η αντλία Na^+/K^+ ATPάση να επανακτήσει τη φυσιολογική της λειτουργία, διώχνοντας έξω από το κύτταρο την περίσσια Na^+ . Η οξειδωτική φωσφορυλίωση ενεργοποιήθηκε και το pH στο εσωτερικό του κυττάρου επανήλθε στις φυσιολογικές τιμές (Suolinna et al., 1974, 1975; Spector et al., 1980a 190b). Ένας πιθανός μηχανισμός της αποφωσφορυλίωσης της τυροσίνης από την κερκετίνη είναι αυτός της υδρόλυσης με απελευθέρωσης ενός φωσφορικού ιόντος.



Μηχανισμός αποφωσφορυλίωσης της τυροσίνης από τη κερκετίνη

2.3.3. Φλαβονοειδή και λοιμώξεις

2.3.3.1. Αντιμικροβιακή δράση

Για αιώνες γινόταν χρήση παραδοσιακών συνταγών που περιείχαν φλαβονοειδή ως κύρια δραστικά συστατικά για την αντιμετώπιση πληθώρας ασθενειών. Ένα από τα πολλά παραδείγματα είναι η πρόπολη για την οποία υπάρχουν αναφορές σε κείμενα της Παλαιάς Διαθήκης ([The Bible, Jeremiah 8, verse 22](#); [Jeremiah 46, verse 22](#); [Jeremiah 46, verse 11](#); [Jeremiah 51, verse 8](#)). Το βάλσαμο αυτό χορηγούνταν από τον Ιπποκράτη για την αντιμετώπιση πληγών και εγκαυμάτων ([Fearnley 2001](#)). Οι αντιμικροβιακές ιδιότητες της πρόπολης αποδίδονται στο υψηλό ποσοστό φλαβονοειδών που περιέχονται και συγκεκριμένα στην γαλαγκίνη και την πινοσεμπρίνη ([Grange & Davey 1990](#)),([Bosio et al., 2000](#)),([Hegazi et al., 2000](#)), ([Pepeljnjak et al.,1982](#)) . Ένα άλλο παράδειγμα είναι το φυτό *Scutellaria baicalensis* το οποίο χρησιμοποιείτο στην Κίνα εδώ και χιλιάδες χρόνια για την αντιμετώπιση περιόδοντικών αποστημάτων και για την επούλωση πληγών της στοματικής κοιλότητας. Στο φλαβονοειδές βακαλεΐνη αποδίδονται οι αντιμικροβιακές δράσεις ([Tsao et al., 1982](#)).

2.3.3.2. Αντιβακτηριακή δράση

Τα πλούσια σε φλαβονοειδή εκχυλίσματα των φυτών *Hypericum* ([Dall' Agnol et al., 2003](#)), *Capsella*, *Chromolaena* ([El-Abyad et al., 1990](#)) έχουν αναφερθεί ότι έχουν αντιβακτηριακή δράση. Συγκεκριμένα έχει αναφερθεί η αντιβακτηριακή δράση της απιγενίνης ([Tarle et al., 1990](#)), ([Torrenegra et al., 1990](#)), ([Park et al., 1998](#)), της γαλαγκίνης ([Afolayan & Meyer 1997](#)) ([Cushnie et al., 2003](#)), της πινοσεμπρίνης ([Fukui et al., 1988](#)), ([Huffort & Lasswell 1978](#)), της ποντισρετίνης ([Bae et al.,1999](#)), ([Kim et al., 1999](#)), της γενκγαουανίνης ([Palacios et al., 1983](#)),([Aljancic et al., 1999](#)),

της σοφοροφλαβόνης G και των παραγώγων της (Tsuchiya et al., 1996),(Sakagami et al., 1998),(Sato et al., 1995),(Tsuchiya et al.,1994), της ναριγκίνης και της ναριγκενίνης (Tsuchiya et al 1996), (Ng TB et al., 1996), (Ramaswamy et al., 1972), της λουτεολίνης και του 7-ο-γλυκοζίτη της λουτεολίνης (Bashir et al., 1994), (Miski et al., 1983) της κερκετίνης, της 3-O-μεθυλοκερκετίνης και διαφόρων γλυκοζιτών της κερκετίνης (Rauha et al., 2000),(Waage et al.,1985), και τέλος της καιμφερόλης και των παραγώγων της (Rauha et al., 2000), (Khanna et al., 1980),(Ramaswamy et al., 1972), (Waage et al.,1985). Διάφορες ισοφλαβόνες (Osawa et al., 1992), ισοφλαβάνες (Li et. al., 1998), και φλαβονόλες (Kuroyanagi et al., 1999),(Simin et al.,2002) έχει αναφερθεί ότι παρουσιάζουν αντιβακτηριακή δράση.

2.3.3.3. Αντιμυκητιασική δράση

Ένα νέο ισοπρενυλιωμένο φλαβονοειδές που απομονώθηκε από το φυτό *Eysenhardtia texana* η 5,7,4'-τριϋδροξυ-8-μεθυλο-6-(3-μεθυλο-[2-βουτενυλο])-(2S)-φλαβανόνη έδειξε αντιμικροβιακή δράση έναντι της *Candida albicans* (Wachter et al., 1999). Το 7-υδροξυ-3',4'-(μεθυλενοδιοξυ)-φλαβάνιο που απομονώθηκε από το φυτό *Terminalia ballerica* έδειξε και αυτό ότι είχε αντιμικροβιακή δράση έναντι της *Candida albicans* (Valsaraj et al., 1997). Η 6,7,4'-τριϋδροξυ-3',5'-διμεθοξυφλαβόνη και η 5,5'-διϋδροξυ-8,2',4'-τριμεθοξυφλαβόνη μαζί με την 5,7,4'-τριϋδροξυ-3',5'-διμεθοξυφλαβόνη εμφάνισε αντιμικροβιακή δράση έναντι του *Aspergillus flavus* (Zheng et al., 1996), είδος μύκητα που προκαλεί εκτεταμένες λοιμώξεις σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα (Prescott et al., 1999). Η αποτελεσματικότητα της πρόπολης σε δερματοπάθειες και σε είδη *Candida* έχει αποδοθεί εν μέρει σε στο υψηλό ποσοστό φλαβονοειδών που περιέχει (Cafarchia et al., 1999). Η γαλαγκίνη που απαντά στην πρόπολη βρέθηκε να έχει δράση έναντι των: *Aspergillus tamarii*, *A.flavus*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Penicillium digitatum* και *Penicillium italicum* (Afolayan & Meyer 1997).

2.3.3.4. Αντιϊκή δράση

Έχει βρεθεί ότι τα φλαβονοειδή ασκούν προφυλακτική δράση έναντι στην είσοδο των ιών στον οργανισμό (Choi et al.,1999) (Uda et al.,1997; Thaisrivongs et al.,1996; Hagen et al.,1997; Tait et al.,1997). Ο μηχανισμός της αντιϊκής δράσης παραμένει αδιευκρίνιστος, όμως φαίνεται ότι οι PGs συμμετέχουν στην σύντηξη των μεμβρανών των ιών. Τα φλαβονοειδή είναι αναστολείς της σύνθεσης των PGs επομένως θα μπορούσε να υποτεθεί ότι αυτός είναι ένας τρόπος με τον οποίο εκδηλώνουν τη προστατευτική τους δράση απέναντι στους ιούς. (Nagai et al., 1995b; Carpenedo et al.,1969). Τα λυσοσώματα μπορούν να ενεργοποιηθούν και να οξειστούν μόνο από την λειτουργία της αντλίας πρωτονίων η οποία αναστέλλεται από τα φλαβονοειδή (Horisberg et al., 1991; Bertorello et al., 1991). Εάν τα νουκλεϊκά οξέα εισέλθουν στο κυτταρόπλασμα, είναι πολύ δύσκολο να αποφευχθεί η σύντηξη του ιϊκού DNA με το DNA του ξενιστή. Τα γονίδια του ιού τα οποία βρίσκονται εγκλωβισμένα μέσα στο πρωτεϊνικό καψίδιο είναι ακίνδυνα. Έχει βρεθεί ότι μερικά φλαβονοειδή όπως η κερκετίνη, αναστέλλουν την ανάστροφη τρανσκριπτάση RNA ιών (Ono et al., 1990; Wang et al., 1994; Wacker & Eilmes,1978;Vecknstedt & Pusztai, 1981; Amoras et al., 1992a, 1992b). Αυτή η ιδιότητα είναι επιθυμητή διότι οι αναστολείς αυτού του ενζύμου όπως οι αραβινοζίτες και η ακυκλοβίρη, εμφανίζουν τοξικότητα όχι μόνο απέναντι στα προσβεβλημένα από τον ιό κύτταρα αλλά και απέναντι στα υγιή. Ένα ακόμη πλεονέκτημα των φλαβονοειδών είναι ότι επάγουν την σύνθεση των ιντερφερονών (INF) (Veckenstedt et al., 1987; Wleklík et al., 1987). Οι INF αυξάνουν την ανθεκτικότητα της κυτταρικής μεμβράνης ενισχύοντας την έκκριση νουκλεασών που δρουν ενάντια στο ιϊκό γονιδίωμα.

Ένα πρόσφατο πεδίο έρευνας είναι και η ανασταλτική δράση των φλαβονοειδών έναντι του ιού της ανοσολογικής ανεπάρκειας HIV. *In vitro* μελέτες έχουν δείξει ότι το φλαβονοειδές βακαϊλίνη αναστέλλει την προσβολή και τον πολλαπλασιασμό του ιού HIV-1. Έχει αποδειχτεί η παρεμπόδιση της εισόδου του ιού μέσα στα κύτταρα που εκκρίνουν υποδοχείς των CD4 και χυμοκινών (Li et al., 2000) και ο ανταγωνισμός της ανάστροφης τρανσκριπτάσης (Li et al., 1993) από το φλαβονοειδές βακαϊλίνη. Το τελευταίο αυτό φλαβονοειδές (Ono et.al., 1990) μαζί με την ρομπουσταφλαβόνη και την χινοκιφλαβόνη (Lin et al., 1997) έδειξαν να έχουν ανασταλτική δράση έναντι της ανάστροφης τρανσκριπτάσης του HIV-1. Έχει επίσης αποδειχτεί ότι μερικά φλαβονοειδή όπως η απομεθυλωμένη γκαρντενίνη A και η

3,2'-διϋδροξυφλαβόνη αναστέλλουν την πρωτεΐνάση (Brinkworth et al., 1992) του HIV-1. Η ρομπινετίνη, η μυρικετίνη, η βακαϊλίνη, η κερκεταγενίνη (Fesen et al., 1994), ο 3-O-(2''-γαλλοϋλ)-α-L-αραβινοπυρανοζίτης της κερκετίνης (Kim et al., 1998) αναστέλλουν την ιντεγκράση του HIV-1 παρόλο που υπάρχουν απόψεις ότι η αναστολή της από την κερκεταγενίνη και την μυρικετίνη είναι μη ειδική (Ono et al., 1990). Έχει αναφερθεί επίσης ότι η χρυσίνη, η ακακετίνη και η απιγενίνη, προλαμβάνουν την ενεργοποίηση του ιού HIV-1 μέσω ενός μηχανισμού που πιθανώς σχετίζεται με τη μεταγραφή του ιού (Critchfield et al., 1996). Η χρυσίνη αποδείχθηκε ότι έχει υψηλό θεραπευτικό δείκτη ενάντι στον HIV-1 (Hu et al., 1994). Έχουν γίνει και πολλές αναφορές σχετικά με τη σχέση δομής δράσης των φλαβονοειδών και την ικανότητά τους να αναστέλλουν τον ιό HIV-1 (Lin et al., 1997), (Brinkworth et al., 1992), (Fesen et al., 1994), (Ono et al., 1990), (Hu et al., 1994). Σε κάποια έχει γίνει και αναφορά στο μηχανισμό δράσης (Brinkworth et al., 1992), (Fesen et al., 1994). Φλαβονοειδή όπως η κερκετίνη, η μορίνη, η ρουτίνη, η διϋδροκερκετίνη, η διϋδροφουσετίνη έχουν αντιϊκή δράση έναντι του ιού του έρπητα HSV. Έχουν αναφερθεί και πιθανοί μηχανισμοί δράσης όπως η αναστολή της πολυμεράσης του ιού και η σύνδεση στις πρωτεΐνες της κάψας (Selway et al., 1986).

2.3.3.5. Αντιελκωτική δράση

Το χλωροφορμιακό εκχύλισμα του φυτού *Cistus laurifolious* περιέχει ισοραμεντίνη (3-μεθυλαιθέρας της Κερκετίνης) η οποία εμφάνισε ισχυρή αντιελκωτική δράση (Osman et al., 2006). Η ρίζα της γλυκύρριζας περιέχει τα φλαβονοειδή γλυκυριζιδίνη και γλυκοϊσοφλαβόνη Β που ασκούν ανασταλτική δράση έναντι του πολλαπλασιασμού του *Helicobacter pylori in vitro*. Αυτά τα φλαβονοειδή έδειξαν ανασταλτική δράση σε ανθεκτικά στελέχη σε κλαριθρομυκίνη και αμοξυκιλλίνη (Fukai et al., 2002).

3. Φαινολικές ενώσεις

Οι φαινολικές ενώσεις είναι μια κατηγορία οργανικών ενώσεων που χαρακτηρίζονται από την παρουσία τουλάχιστον ενός αρωματικού δακτυλίου μόνο- ή πολύ- υποκατεστημένου με υδροξύλια (-OH). Τα υδροξύλια αυτά μπορεί να είναι ελεύθερα ή υποκατεστημένα υπό τη μορφή αιθέρα, εστέρα ή γλυκοζίτη. Μια γενική κατάταξη των κυριότερων κατηγοριών των φαινολικών ενώσεων λαμβάνει υπόψη τον ανθρακικό σκελετό ο οποίος είναι χαρακτηριστικός για κάθε κατηγορία φαινολικών.

Πίνακας 2: Κατάταξη φαινολικών ενώσεων που περιέχονται στα φυτά με βάση τον ανθρακικό σκελετό (Harborne, 1989).

Κατηγορίες φαινολικών ενώσεων	Δομή
Απλές φαινόλες, βενζοκινόνες	C ₆
Υδροξυβενζοϊκά οξέα	C ₆ -C ₁
Φαινυλοξικά οξέα	C ₆ -C ₂
Υδροξυκινναμωμικά οξέα (Φαινυλοπροπανοϊκά)	C ₆ -C ₃
Κουμαρίνες, ισοκουμαρίνες, χρωμόνες, χρωμένια	
Ναφθοκινόνες	C ₆ -C ₄
Ξανθένια	C ₆ -C ₁ -C ₆
Στιλβένια, ανθρακινόνες	C ₆ -C ₂ -C ₆
Φλαβονοειδή, Ισοφλαβονοειδή	C ₆ -C ₃ -C ₆
Λιγνάνια, νεολιγνάνια	(C ₆ -C ₃) ₆
Διφλαβονοειδή	(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂
Λιγνίνες	(C ₆ -C ₃) _n
Συμπυκνωμένες ταννίνες (Προανθοκυανιδίνες)	(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n

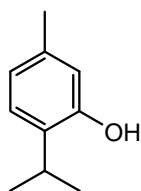
Με βάση το μοριακό τους βάρος οι φαινολικές ενώσεις μπορούν να καταταγούν σε ενώσεις χαμηλού, μεσαίου και υψηλού μοριακού βάρους:

Πίνακας 3: Κατάταξη φαινολικών ενώσεων με βάση το μοριακό τους βάρος

Κατηγορίες φαινολικών	Δομή	Μοριακό βάρος
Υδροξυβενζοϊκά οξέα	C_6-C_1	χαμηλό
Υδροξυκιναμμωμικά οξέα	C_6-C_3	
Φλαβονοειδή	$C_6-C_3-C_6$	μεσαίο
Ταννίνες υδρολυώμενες	$(C_6-C_1)_n$	υψηλό
Ταννίνες συμπυκνωμένες	$(C_6-C_3-C_6)_n$	

Απλές φαινολικές ενώσεις

Δομικά χαρακτηρίζονται από την παρουσία ενός βενζολικού δακτυλίου, και ως εκ τούτου αντιπροσωπεύουν τις πιο απλές φαινολικές ενώσεις που συναντώνται στη φύση. Απαντώνται κυρίως σε αιθέρια έλαια, με χαρακτηριστικό παράδειγμα την θυμόλη (40):

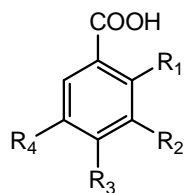


(40)

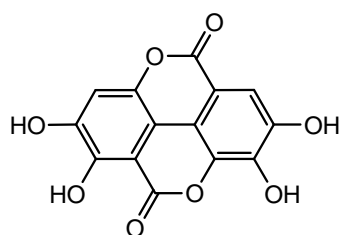
Υδροξυβενζοϊκά οξέα

Είναι παράγωγα του υδροξυβενζοϊκού οξέος με κυριότερους εκπροσώπους το γαλλικό, το βανιλλικό, το πρωτοκατεχικό οξύ, το γαλλικό και το συριγγικό οξύ (41).

Το γαλλικό οξύ είναι μαζί με το ελλαγικό **(42)** ο βασικός δομικός σκελετός των υδρολυόμενων ταννινών.



(41)

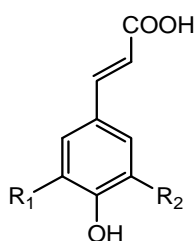


(42)

$R_1=H; R_2=R_3=R_4=OH$	γαλλικό οξύ
$R_1=R_2=R_4=H; R_3=OH$	p-υδροξυβενζοϊκό οξύ
$R_1=OH; R_2=R_3=R_4=H$	σαλικυλικό οξύ
$R_1=R_4=H; R_2=OCH_3; R_3=OH$	βανιλικό οξύ
$R_1=R_4=H; R_2=R_3=OH$	πρωτοκατεχικό οξύ
$R_1=H; R_2=R_4=OCH_3; R_3=OH$	συρριγικό οξύ

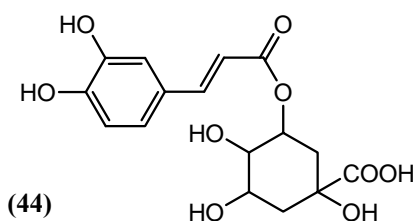
Υδροξυκινναμωμικά οξέα

Ανήκουν στην κατηγορία των φαινυλοπροπανοϊκών οξέων και είναι παράγωγα του p-κουμαρικού οξέος (p- υδροξυκινναμικού οξέος). Τέσσερις χαρακτηριστικές δομές με βασικό ανθρακικό σκελετό C₆-C₃ απαντούν στη φύση: το καφεϊκό, το κουμαρικό, το φερουλικό, και το σιναπικό οξύ. **(43)** Αυτά συνήθως απαντούν ελεύθερα ή σε μορφή εστέρων. Το χλωρογενικό οξύ **(44)** προέρχεται από την εστεροποίηση του καφεϊκού οξέος με το κινικό οξύ.



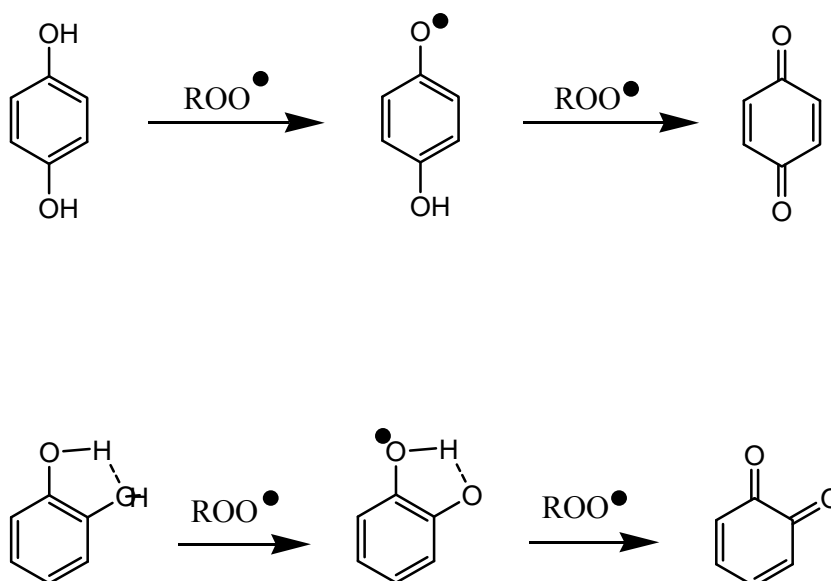
(43)

$R_1=R_2=H$	p-κουμαρικό οξύ
$R_1=OH; R_2=H$	καφεϊκό οξύ
$R_1=OCH_3; R_2=H$	φερουλικό οξύ
$R_1=R_2=OCH_3$	σιναπικό οξύ

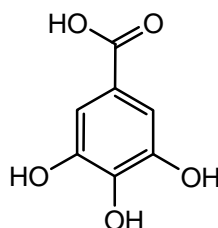
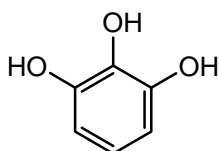


(44)

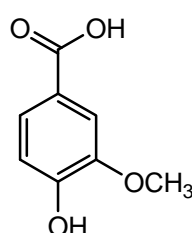
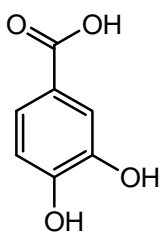
Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα παρουσιάζουν δομική ομολογία με τις απλές φαινόλες σημαντικότεροι εκπρόσωποι αυτών είναι οι απλές κινόνες *o*- και *p*-κινόνες οι οποίες εμφανίζουν ικανότητα σάρωσης των ελευθέρων ριζών. Βασικό δομικό χαρακτηριστικό είναι η παρουσία στο μόριο της φαινόλης ενός δεύτερου OH το οποίο να βρίσκεται σε *o*- ή *p*- θέση ως προς το άλλο OH. Στην περίπτωση που βρίσκεται σε *o*- θέση υπάρχει δυνατότητα σχηματισμού ενδομοριακού δεσμού H η οποία ευνοεί την σχάση του δεσμού O-H και συμβάλλει στην σταθεροποίηση της σχηματιζόμενης ημικινοειδούς ρίζας με δομές συντονισμού (Clifford et al., 2001). Η ημικινοειδής ρίζα μπορεί να οξειδωθεί αντιδρώντας με μια δεύτερη ρίζα (RO• ROO•) και αυτό έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό μιας σταθερής *o*- ή *p*- κινόνης.



Ιδιαίτερης σημασίας είναι η προσθήκη και τρίτου OH στη θέση *ο*- διότι στην περίπτωση φαινολών και υροξυβενζοϊκών οξέων η πυρογαλλόλη και το γαλλικό οξύ έχουν την μεγαλύτερη ικανότητα σάρωσης ελευθέρων ριζών. Η παρουσία OH σε *μ*-θέση δεν θεωρείται σημαντική διότι δεν υπάρχει η δυνατότητα σχηματισμού ιμικινοειδών μορφών (Shahidi and Wanasundara, 1992).



Στην περίπτωση που υπάρχει μεθύλιο σε *ο*- θέση ως προς το OH δεν υπάρχει η δυνατότητα διάσπασης του δεσμού O-H έτσι ώστε να δημιουργηθεί δεσμός H και να σταθεροποιηθεί η ρίζα μέσω της ημικινοειδούς μορφής. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το βανιλικό οξύ να είναι ασθενέστερος παρεμποδιστής οξείδωσης σε σχέση με το πρωτοκατεχικό οξύ. (Brand-Williams et al., 1995), (Cuvelier et al., 1992).



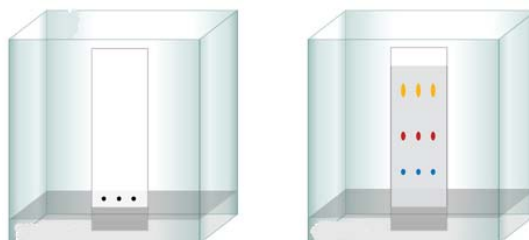
B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 Χρωματογραφία Λεπτής στιβάδας

Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν:

- ❖ Ατμοί πυκνής αμμωνίας
- ❖ Αντιδραστήριο Neu (naturstoff reagenz A), το οποίο παρασκευάζεται από τη διάλυση 1 g διφαινυλοβορικού αμινοαιθυλεστέρα σε 100 ml μεθανόλης

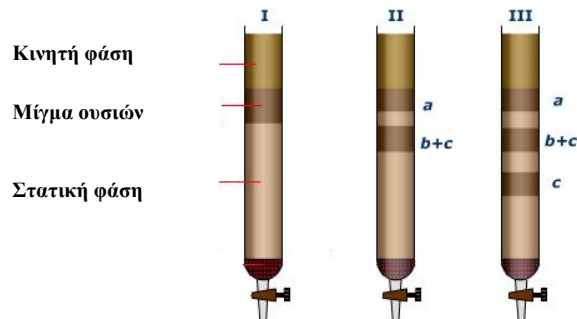


- ❖ Αντιδραστήριο θειικής βανιλίνης, το οποίο αποτελείται από διάλυμα θειικού οξέος 5% σε μεθανόλη και διάλυμα βανιλίνης 5% σε μεθανόλη. Αναμυγνύονται μεταξύ τους σε αναλογία 1:1, ακολουθεί ψεκασμός και θέρμανση του χρωματογραφήματος για 5 min στους 105° C.

Οι πλάκες που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη έρευνα είναι οι εξής:

- ❖ Πλάκες αλουμινίου με προσροφητικό υλικό την κυτταρίνη (cellulose), διαστάσεων 20x20 cm, πάχος στιβάδας 0,1 mm , χωρίς δείκτη φθορισμού στα 254 και 366 nm (Merck, Art.5552)
- ❖ Πλάκες αλουμινίου επικαλυμμένες με οξείδιο του πυριτίου διαστάσεων 20x20 cm, πάχος στιβάδας 0,1 mm, (Kieselgel 60 F254, Merck.Art.5554) και (Kieselgel 60, Merck.Art.5554)

4.2. Χρωματογραφία στήλης



- ❖ Πολυαμίδιο CC6 Macherey & Nagel 70-160 μm (πολυκαπρολακτάμη)
- ❖ Γέλη οξειδίου του πυριτίου 60H για χρωματογραφία στήλης (Kieselgel 60H, Merck, Art.7736)
- ❖ Γέλη οξειδίου του πυριτίου 60 για χρωματογραφία στήλης (Kieselgel 60, Merck, Art.9385)
- ❖ Sephadex LH-20 (υδροξυπροπυλιωμένη δεξτράνη) Pharmacia. Προ της χρήσης γίνεται διόγκωση του υλικού με το διάλυμα έκλουσης για 24h.

4.3. Υγρή χρωματογραφία Υψηλής απόδοσης (HPLC)

4.4. Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού

Τα φάσματα Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού ελήφθησαν σε φασματογράφο Varian 600 MHz και με διαλύτη CD_3OD . Οι χημικές μετατοπίσεις εκφράζονται σε δ (ppm) και οι σταθερές σύζευξης (J) σε Herz (Hz). Οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι ακόλουθες:

- ❖ COSY (Correlation spectroscopy)
- ❖ HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation)
- ❖ HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)

4.5. Τεχνική LC-DAD-MS (ESI+)

Τα φάσματα για τα crude extracts των εκχυλισμάτων του οξικού αιθυλεστέρα, της βουτανόλης, του αιθέρα και του νερού ελήφθησαν σε *Finnigan MAT spectra system P4000 pump* με *UV6000LP diode array* ανιχνευτή και *Finnigan AQA φασματοφωτόμετρο μάζας*. Η χρωματογραφική στήλη ήταν 125x2 mm *Superspher 100-4 RP-18 (Macherey-Nagel)*, με μέγεθος τεμαχιδίων 4 μm, ρυθμό έκλουσης 0.33ml/min και όγκο έγχυσης 5ml. Η καταγραφή έγινε στα 340, 290 και στα 365 nm, η θερμοκρασία για την MS-ESI (+) ανάλυση ήταν 450 °C και η τάση στον αναλυτή μάζας 20 και 80 eV. Οι διαλύτες έκλουσης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν μίγμα μεθανόλης και οξικού οξέος και η αναλογία τους αυξομειώνονταν κατά τη διάρκεια της χρωματογράφησης. Χρησιμοποιήθηκαν δύο προγράμματα α) το πρόγραμμα με μίγμα μεθανόλης-οξικού οξέος 2% και βαθμωτή έκλουση που περιγράφεται ως εξής: (A) AcOH 2% και (B) MeOH, 90% A στα 2 min και β) το πρόγραμμα με μίγμα μεθανόλης-οξικού οξέος 2,5% και βαθμωτή έκλουση: 90% (A) 0 min, 90% (A) 1 min, 0% (A) 16 min και 0% (A) 21 min, με το οποίο έγινε έλεγχος καθαρότητας των απομονωθέντων ουσιών.

5. Πειραματική διαδικασία

5.1. Εκχύλιση της δρόγης

Χρησιμοποιήθηκαν 250 gr του φυτού *Indigofera hirsuta* το οποίο συλλέχθηκε από την Κεντροαφρικανική Δημοκρατία.

Πραγματοποιήθηκε εκχύλιση σε συσκευή *Soxhlet* με τους παρακάτω διαλύτες:

- ❖ Πετρελαϊκός αιθέρας 40°-60° (p.a Carlo Erba)
- ❖ Διχλωρομεθάνιο (p.a Panreac)
- ❖ Μεθανόλη (p.a Merck)

Τα παραπάνω εκχυλίσματα συμπυκνώθηκαν υπό κενό μέχρι ξηρού και έδωσαν στερεά υπολείμματα βάρους 2,22gr 2,89 gr και 27,63 gr αντίστοιχα.

5.2. Χρωματογραφικός έλεγχος των εκχυλισμάτων

Ακολούθησε έλεγχος των τεσσάρων εκχυλισμάτων, με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας σε πλάκες κυτταρίνης και με διαλύτη ανάπτυξης: α) 15%HOAc, β) MeOH:HOAc:H₂O (50:45:5) και γ) EtOAc:HOAc:H₂O (80:20:40, οργανική φάση). Οι πλάκες παρατηρήθηκαν στο υπεριώδες φώς (254 και 366 nm) πριν και μετά την έκθεσή τους σε ατμούς αμμωνίας και τον ψεκασμό τους με αντιδραστήριο New. Φάνηκε ότι στο μεθανολικό εκχύλισμα συγκεντρώνονται κυρίως πολυφαινολικές ενώσεις γεγονός που μας οδήγησε στη μελέτη του συγκεκριμένου εκχυλίσματος.

5.3. Κατανομές του μεθανολικού εκχυλίσματος

Το ίζημα που προήλθε από την εκχύλιση της δρόγης με μεθανόλη στην συσκευή Soxhlet διαλύθηκε σε 1,5 lt απεσταγμένου νερού το οποίο είχε προηγουμένως θερμανθεί μέχρι το σημείο βρασμού. Ακολούθησε διήθηση "εν θερμώ", ψύξη και εκχύλιση με αιθέρα (p.a. Merck) συνολικού όγκου 2230ml. Το συνολικό αιθερικό εκχύλισμα συμπυκνώθηκε υπό κενό μέχρι ξηρού και παραλήφθηκε στερεό ίζημα σκούρου πράσινου χρώματος βάρους 0,7881g. Ακολούθησε εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα (p.a. Merck) συνολικού όγκου 3200 ml, μετά τη συμπύκνωση του οποίου ελήφθη ίζημα συνολικού βάρους 1,0922g, είχε χρώματος σκούρου καφέ-πράσινου, και έντονη οσμή συνολικού βάρους 1,0922g. Επιπροσθέτως πραγματοποιήθηκε εκχύλιση με βουτανόλη (1-Butanol PA) 99,5% συνολικού όγκου 4620ml. Παρελήφθη κολλώδες ίζημα λόγω της παρουσίας σακχάρων, χρώματος σκούρου καφέ με χαρακτηριστική οσμή και βάρος 7,6983g. Το υδατικό διάλυμα που παρέμεινε μετά τις κατανομές έδωσε στερεό υπόλειμμα βάρους 15,5535 gr. Ακολούθησε χρωματογραφικός έλεγχος των τεσσάρων υπολειμμάτων που προέκυψαν, σε πλάκες κυτταρίνης και διαλύτες ανάπτυξης 15%HOAc, EtOAc:AcOH:H₂O (80:20:40) και CH₂Cl₂:AcOH:H₂O (50:45:5). Οι πλάκες παρατηρήθηκαν στο υπεριώδες φώς (254 και 366 nm) πριν και μετά τον ψεκασμό με Neu και υπολογίστηκε το R_f των κηλίδων που σχηματίστηκαν.

5.4. Χρωματογραφικός έλεγχος των στερεών υπολλειμάτων του εκχυλίσματος της μεθανόλης που προέκυψαν από κατανομές.

Οξικός αιθυλεστέρας

AcOH 15%

Rf	Χρώμα κηλίδας	NH ₃	Neu
0,00	πορτοκαλί	πορτοκαλί	πορτοκαλί
0,11	κίτρινο	κίτρινο	κίτρινο
0,26	κίτρινο	πράσινο	πράσινο
0,37	πράσινο ανοιχτό	πράσινο ανοιχτό	πράσινο ανοιχτό
0,43	πράσινο	πράσινο	πράσινο
0,66	κίτρινο	πρασινοκίτρινο	πρασινοκίτρινο

EAW

Rf	Χρώμα κηλίδας	NH ₃	Neu
0,30	κίτρινο	πράσινο	πράσινο
0,47	πράσινο	πράσινο	πράσινο
0,58	πράσινο ανοιχτό	πράσινο ανοιχτό	πράσινο ανοιχτό
0,89	πορτοκαλί	πορτοκαλί	πορτοκαλί
0,75	κίτρινο ανοιχτό	κίτρινο ανοιχτό	κίτρινο ανοιχτό

CAW

Rf	Χρώμα κηλίδας	NH ₃	Neu
0,15	κίτρινο	κίτρινο	κίτρινο
0,89	πορτοκαλί	πορτοκαλί	πορτοκαλί

Βουτανόλη

AcOH 15%

Rf	Χρώμα κηλίδας	NH ₃	Neu
0,00	πορτοκαλί	πορτοκαλί	πορτοκαλί
0,06	κίτρινο	πορτοκαλί	πορτοκαλί
0,14	κίτρινο	πορτοκαλί	πορτοκαλί
0,26	κίτρινο	πράσινο	πράσινο
0,79	υποκίτρινο	υποκίτρινο	υποκίτρινο
0,80	κίτρινο	πορτοκαλί	πορτοκαλί

EAW

Rf	Χρώμα κηλίδας	NH ₃	Neu
0,17	κίτρινο	πράσινο	πράσινο
0,33	πράσινο ανοιχτό	πράσινο ανοιχτό	πράσινο ανοιχτό
0,39	πράσινο ανοιχτό	πράσινο ανοιχτό	πράσινο ανοιχτό
0,5	πράσινο ανοιχτό	πράσινο ανοιχτό	πράσινο ανοιχτό
0,47	υποκίτρινο	υποκίτρινο	υποκίτρινο
0,89	πορτοκαλί	πορτοκαλί	πορτοκαλί

CAW

Rf	Χρώμα κηλίδας	NH₃	Neu
0,1	κίτρινο	κίτρινο	κίτρινο
0,17	υποκίτρινο	υποκίτρινο	υποκίτρινο
0,15	κίτρινο	πράσινο	πράσινο

Αιθέρας**AcOH 15%**

Rf	Χρώμα κηλίδας	NH₃	Neu
0,01	καστανοκόκκινο	σκούρο καφέ	σκούρο καφέ
0,03	κίτρινο	πράσινο	πράσινο
0,04	γαλάζιο	γαλάζιο	γαλάζιο
0,06	γαλαζοπράσινο	γαλαζοπράσινο	γαλαζοπράσινο
0,37	πράσινο	πράσινο	πράσινο
0,43	γαλάζιο	γαλάζιο	γαλάζιο
0.48	γαλάζιο	σκούρο γαλάζιο	γαλάζιο

EAW

Rf	Χρώμα κηλίδας	NH₃	Neu
0,88	κίτρινο	πράσινο	πράσινο
0,96	πορτοκαλί	πορτοκαλί	πορτοκαλί

CAW

Rf	Χρώμα κηλίδας	NH₃	Neu
0,26	κίτρινο	πράσινο	πράσινο
0,67	γαλάζιο	γαλάζιο	γαλάζιο
0,74	γαλάζιο	γαλάζιο	γαλάζιο
0,8	γαλάζιο	γαλάζιο	γαλάζιο
0,91	πορτοκαλί	πορτοκαλί	πορτοκαλί

Νερό**AcOH 15%**

Rf	Χρώμα κηλίδας	NH₃	Neu
0,74	γαλάζιο	γαλάζιο	γαλάζιο
0,86	υποκίτρινο	υποκίτρινο	υποκίτρινο

EAW

Rf	Χρώμα κηλίδας	NH₃	Neu
0,1	γαλάζιο	γαλάζιο	γαλάζιο
0,17	πράσινο ανοιχτό	πράσινο ανοιχτό	πράσινο ανοιχτό
0,32	πράσινο ανοιχτό	πράσινο ανοιχτό	πράσινο ανοιχτό

CAW

Rf	Χρώμα κηλίδας	NH₃	Neu
0,44	κίτρινο	γαλάζιο	γαλάζιο
0,67	κίτρινο	πράσινο	πράσινο
0,29	πράσινο ανοιχτό	πράσινο ανοιχτό	πράσινο ανοιχτό

Συμπεράσματα

Οι παραπάνω πίνακες μας δίνουν μια γενική εικόνα για το περιεχόμενο των εκχυλισμάτων του φυτού. Στο εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα παρατηρούνται κηλίδες κίτρινου χρώματος με χαρακτηριστικό Rf που παραπέμπει στην ύπαρξη γλυκοζιτών με κάποια απο αυτά να βρίσκονται στη μορφή γλυκοζιτών. Στο εκχύλισμα της βουτανόλης εμφανίζονται κηλίδες κίτρινου και πορτοκαλί χρώματος με χαρακτηριστικό Rf που υποδηλώνει και σε αυτή την περίπτωση την ύπαρξη φλαβονοειδών. Στο εκχύλισμα του αιθέρα παρατηρείται η ύπαρξη γαλάζιων και πράσινων κηλίδων με χαρακτηριστικά μεγάλο Rf γεγονός που υποδηλώνει την ύπαρξη φαιολικών συστατικών. Το υδατικό εκχύλισμα χαρακτηρίζεται απο την παρουσία περιορισμένου αριθμού κηλίδων άλλοτε γαλάζιου χρώματος που υποδηλώνει την ύπαρξη φαιολικών ενώσεων και άλλοτε κίτρινου χρώματος που υποδηλώνει την παρουσία φλαβονοειδών.

5.5. Ποιοτική ανάλυση των εκχυλισμάτων με το σύστημα LC-DAD-MS (ESI+)

Οι συνθήκες της ανάλυσης ήταν οι εξής:

- *Finnigan MAT Spectra System P4000 pump*
- *UV6000LP diode array* ανιχνευτή
- *Finnigan AQA* φασματοφωτόμετρο μάζας
- Χρωματογραφική στήλη ήταν *125×2 mm Superspher 100-4 RP-18*

(Macherey-Nagel, 4 μm μέγεθος τεμαχιδίων) με ρυθμό ροής 0,33 ml/min

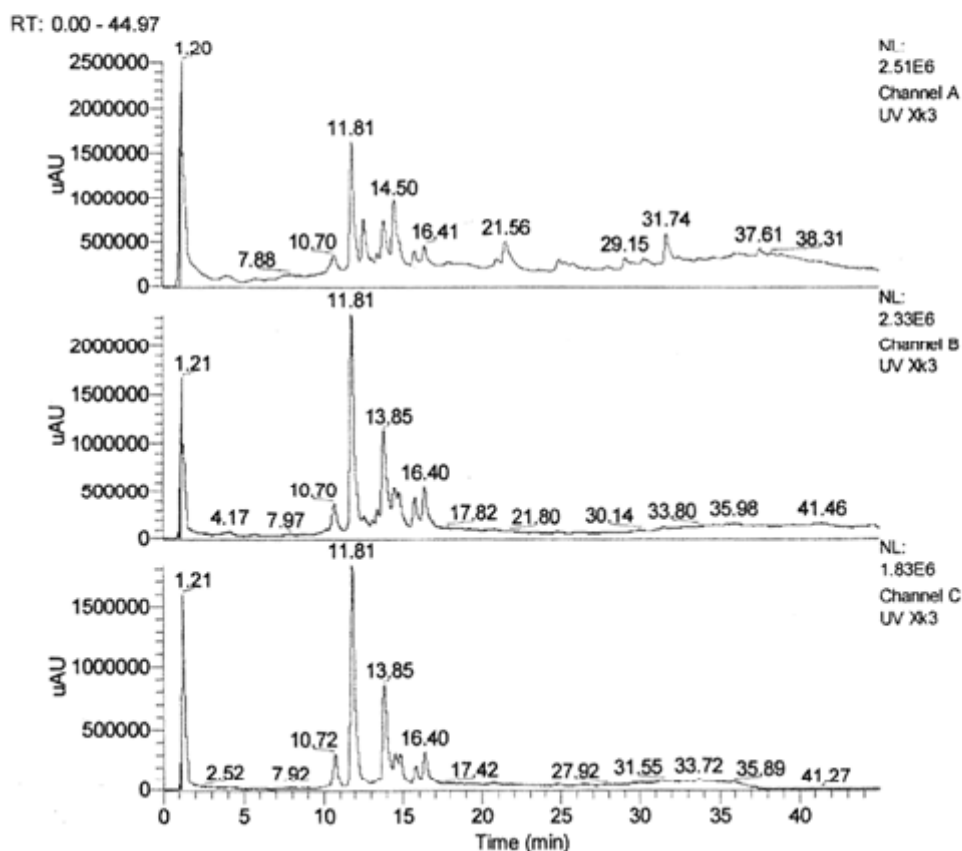
- Η θερμοκρασία για την ανάλυση MS-ESI(+) ήταν 45°C και η τάση **20 eV** και **80 eV** στον αναλυτή μάζας

5.5.1. Βουτανολικό κλάσμα

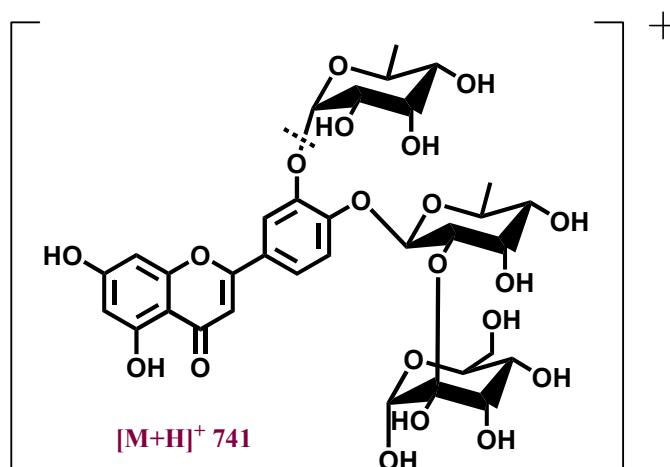
Παρακάτω παρατίθεται η ανάλυση του βουτανολικού εκχυλίσματος σε τρία διαφορετικά μήκη κύματος 290, 340, 365nm. Οι δύο ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν είχαν χρόνο κατακράτησης 11,81 και 13,85min.

Supersher 100-4, 4u, (125x2mm) RP18 Macherey Nagel, 0,33ml/min, 40⁰C, 290, 340, 365nm. MS: 4kV, 400⁰C (probe), 12 and 60 eV, 121-787 amu, 0,8 scans/sec.

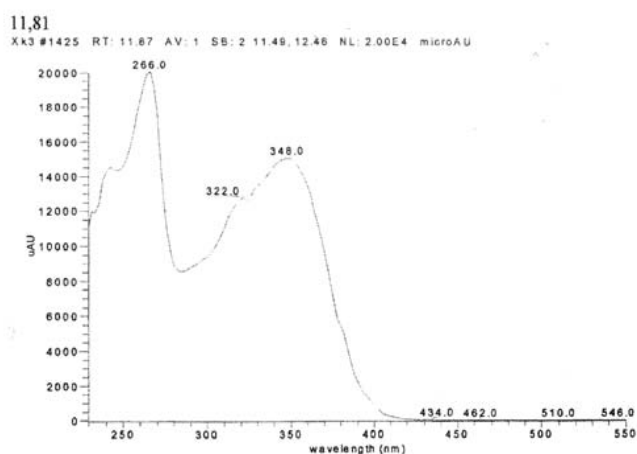
Time(min)	AcOH 2,5%	MeOH
0	90	10
2	90	10
37	100	0
42	100	0



5.5.1.α. Τρισακχαρίτης της λουτεολίνης

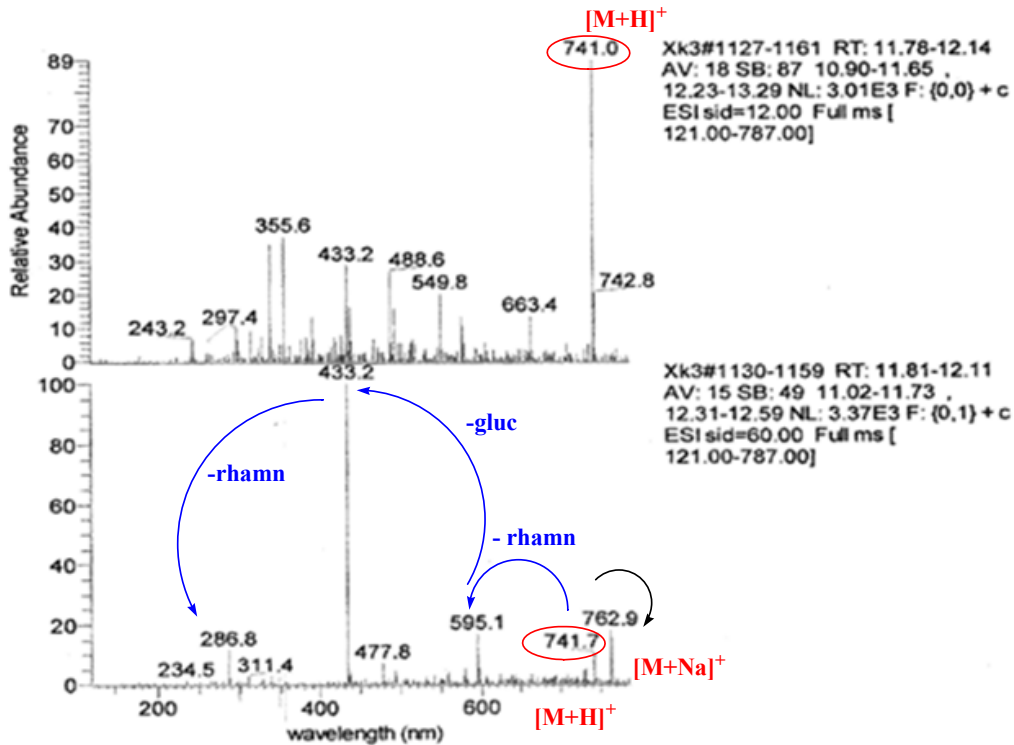


φάσμα UV-Vis

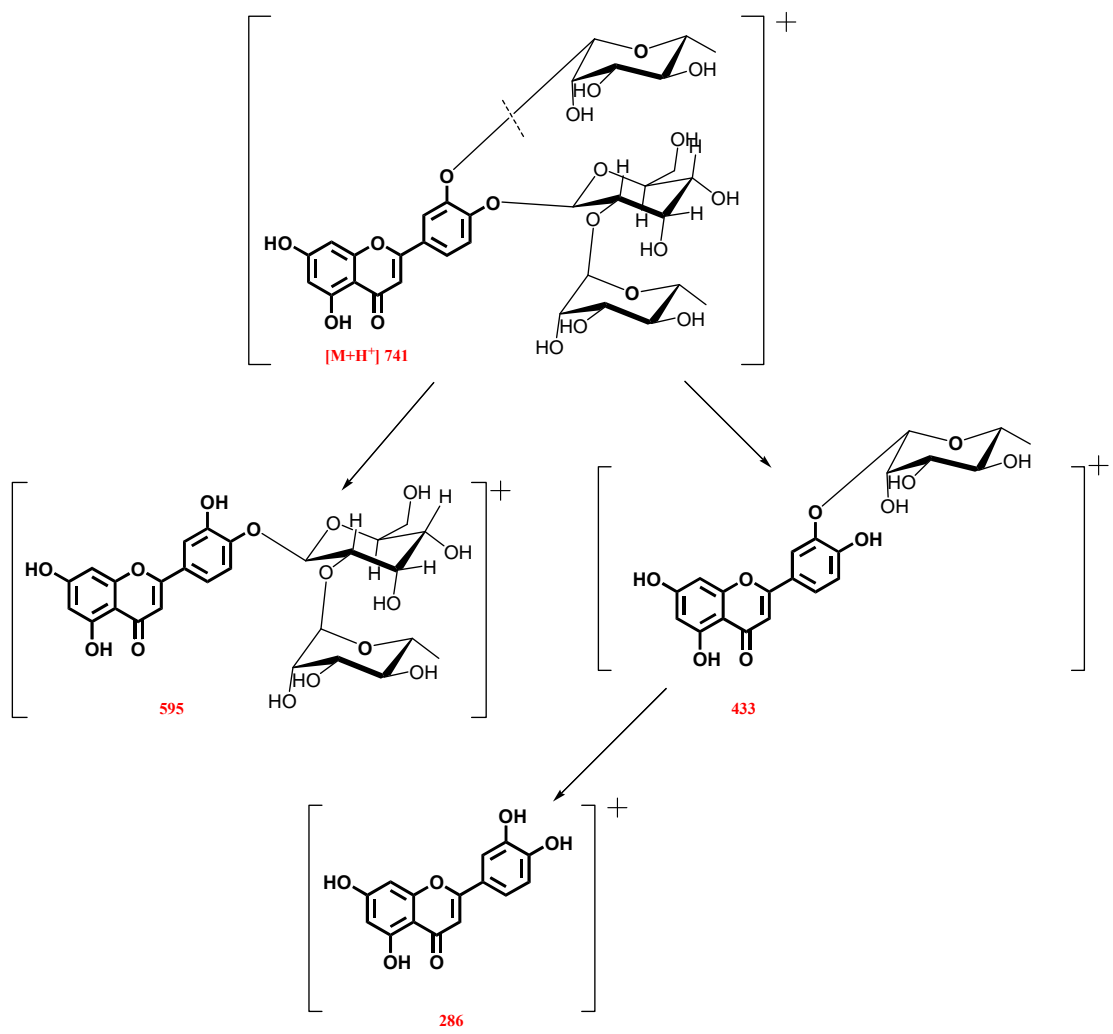


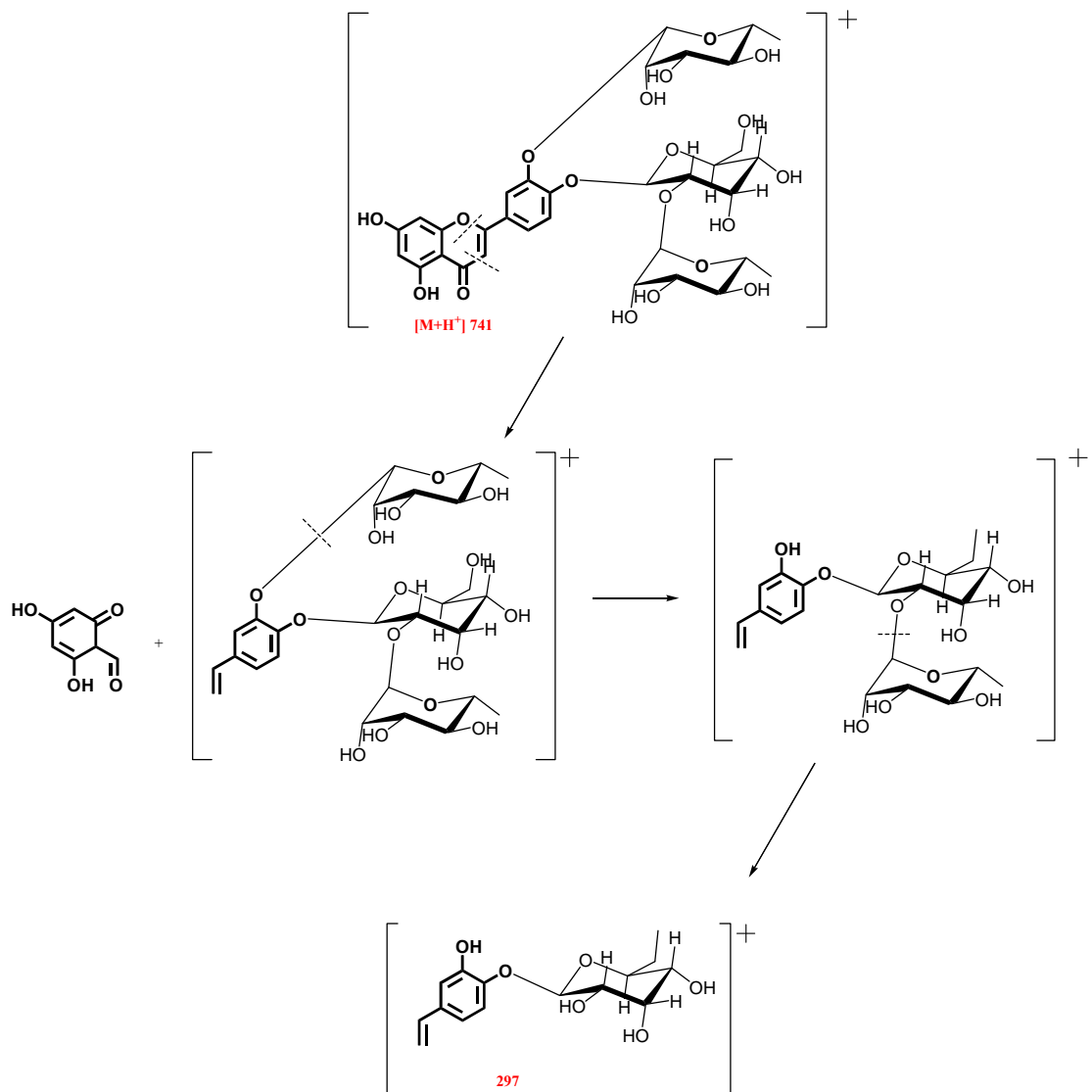
Το φάσμα υπεριώδους ορατού είναι χαρακτηριστικό φλαβόνης και συγκεκριμένα της λουτεολίνης. Η απορρόφηση στα 348 nm οφείλεται στο Β δακτύλιο και η απορρόφηση στα 266 nm οφείλεται στο βενζολικό δακτύλιο Α. Παρατηρείται μια μείωση της έντασης της απορρόφησης σε σχέση με το φάσμα υπεριώδους ορατού της λουτεολίνης γεγονός που καταδεικνύει ότι η γλυκοσυλίωση της φλαβόνης λαμβάνει χώρα στον Α δακτύλιο. Ο τρισακχαρίτης της λουτεολίνης έχει χρόνο κατακράτησης 11,81min.

φάσμα μάζας



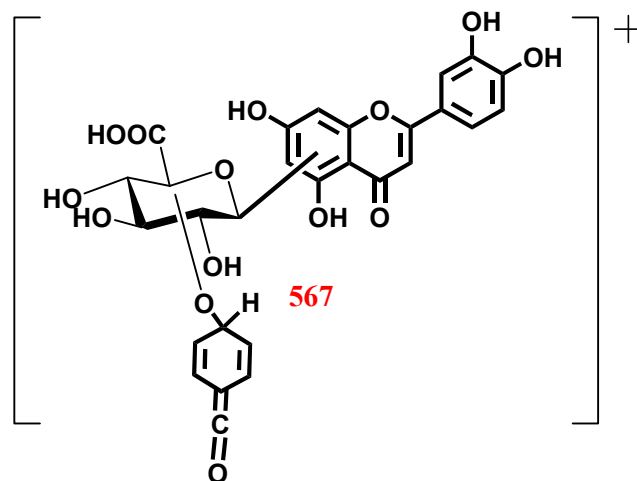
Από το φάσμα μάζας μπορεί να γίνει διάκριση στα εξής θραύσματα: Του μοριακού ιόντος $[M+H]^+$ 741 το οποίο είναι παρόν και στα 80eV αλλά και στα 20eV. Στα 20eV διακρίνεται επίσης και το θραύσμα που αντιπροσωπεύει την προσθήκη στο μοριακό ιόν του νατρίου $[M+Na]^+$ και είναι το 763. Στα 80eV διακρίνεται η σταδιακή απομάκρυνση των σακχάρων με το θραύσμα 595 να αντιπροσωπεύει το μόριο αμέσως μετά την απομάκρυνση της πρώτης ραμνόζης. Το θραύσμα 433 που εμφανίζεται και στα 80eV αλλά και στα 20eV προκύπτει αμέσως μετά την απομάκρυνση της γλυκόζης ενώ το θραύσμα 286 προκύπτει μετά την απομάκρυνση και της τελευταίας ραμνόζης έτσι ώστε να προκύψει το άγλυκο. Παρακάτω παρατίθεται ο μηχανισμός θραυσματοποίησης.



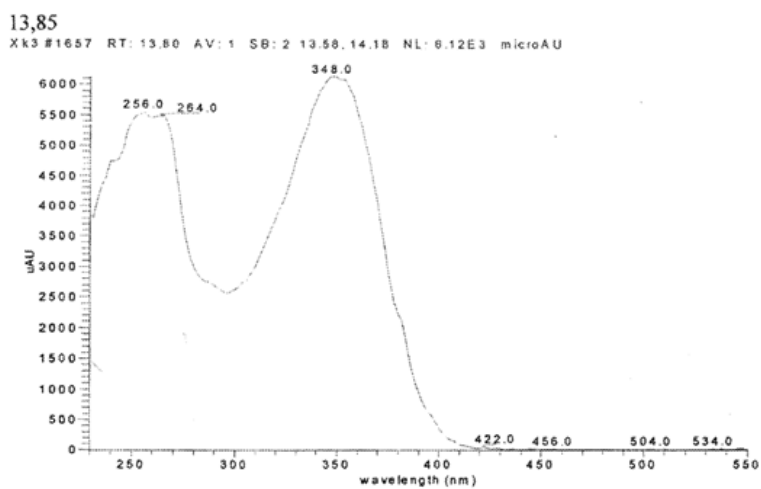


Το θραύσμα 297 είναι προϊόν της RDA αφού απομακρυνθούν οι δυο ραμνόζες και παραμένει η γλυκόζη. Η απόδειξη ότι τα δύο σάκχαρα είναι συνδεδεμένα στον άνθρακα 4' δίνεται από το θραύσμα 433 το οποίο προκύπτει από την RDA όπου τα δύο σάκχαρα είναι συνδεδεμένα με τον βενζολικό δακτύλιο Β.

5.5.1.β. Μονοσακχαρίτης της λουτεολίνης

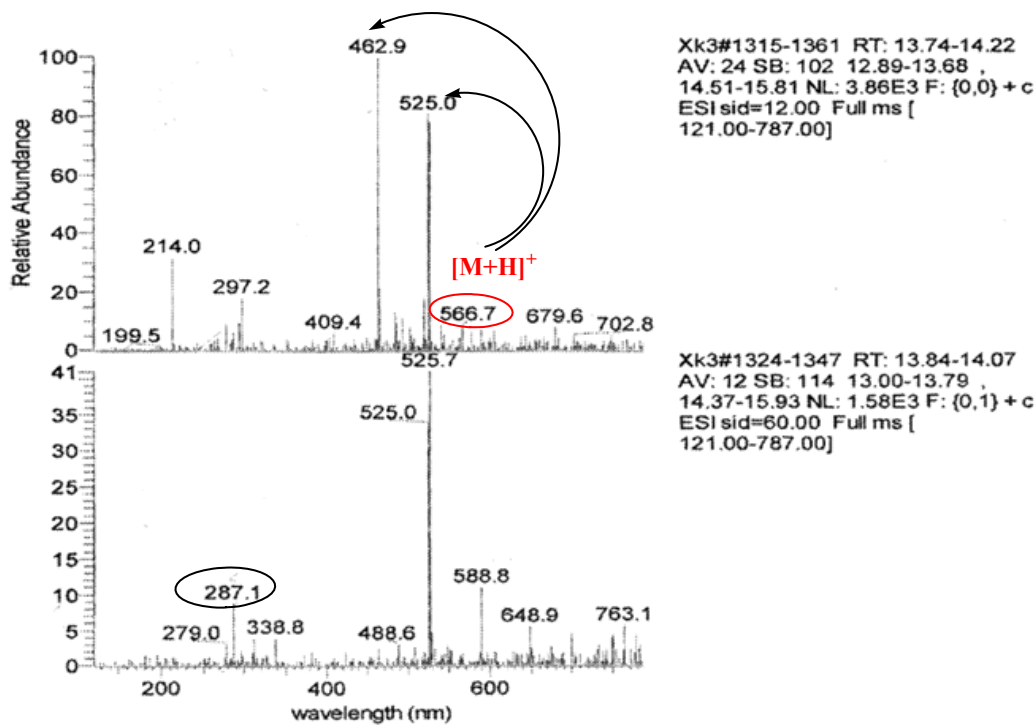


φάσμα UV-Vis

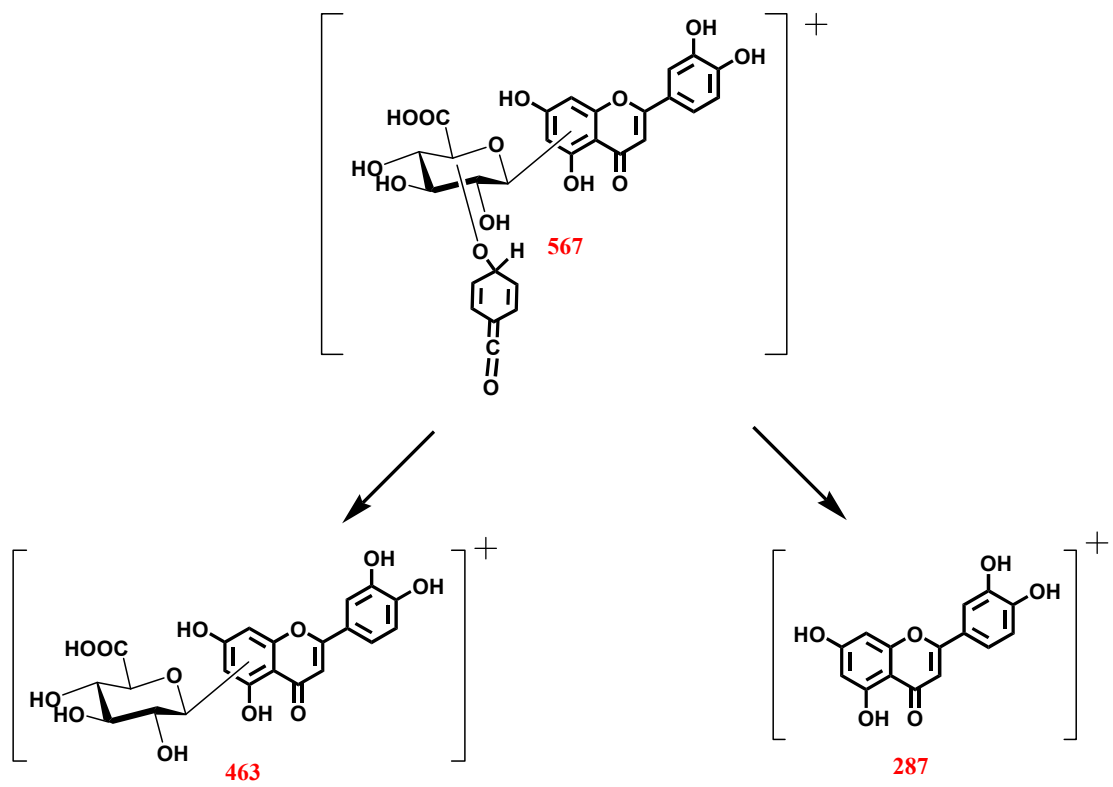


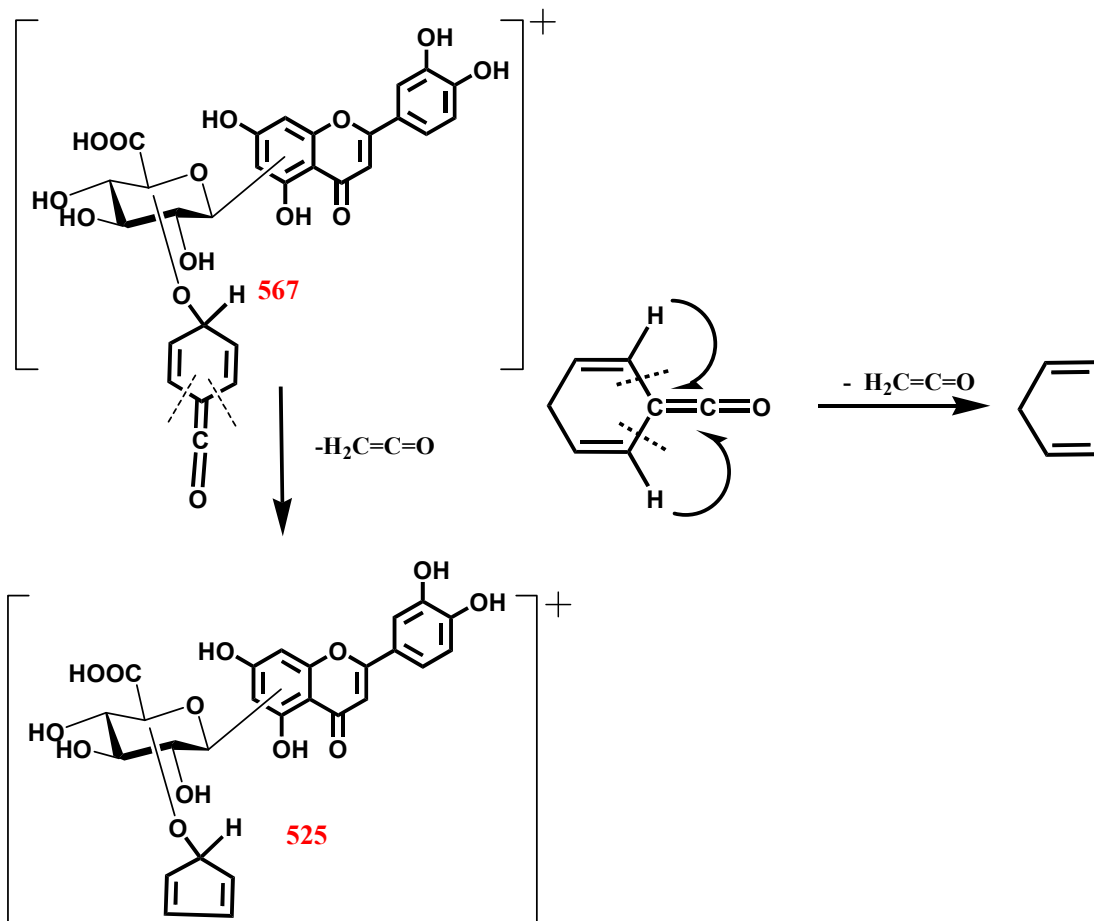
Το φάσμα υπεριώδους ορατού είναι χαρακτηριστικό φλαβόνης και συγκεκριμένα της λουτεολίνης με απορρόφηση στα 348nm που οφείλεται στο Β δακτύλιο και απορρόφηση στα 256 nm και στα 264 nm που οφείλεται στο βενζολικό δακτύλιο Α.

φάσμα μάζας



Από το φάσμα μάζας της ένωσης φαίνεται ότι προκειται για έναν μονοσακχαρίτη της λουτεολίνης και στη συγκεκριμένη περίπτωση ο μονοσακχαρίτης είναι το γλυκουρονικό οξύ που φέρει μια προσθετική κινουειδή ομάδα. Το μοριακό ιόν της ένωσης είναι το $[M+H]^+$ 567 και είναι ορατό στα 20 eV. Τα θραύσματα που περιγράφονται παρακάτω είναι αρχικά το $[M+H-κινουειδής\ ομάδα]^+$ 463 αυτό δηλαδή που προκύπτει μετά την αποχώρηση της κινουειδούς ομάδας και στη συνέχεια το θραύσμα του αγλύκου μετα την αποχώρηση του γλυκουρονικού οξέος $[M+H-κινουειδής\ ομάδα-γλυκουρονικό\ οξύ]^+$ 287. Η επιβεβαίωση ότι προκειται για την κινουειδή ομάδα δίνεται από το θραύσμα 525 το οποίο προκύπτει μετά την θραύση της κινουειδούς ομάδας και την απομακρυνση κετενικού τύπου ρίζας $H_2C=C=O$ με ομολυτική σχάση. Παρακάτω δίνεται ο μηχανισμός θραυσματοποίησης.



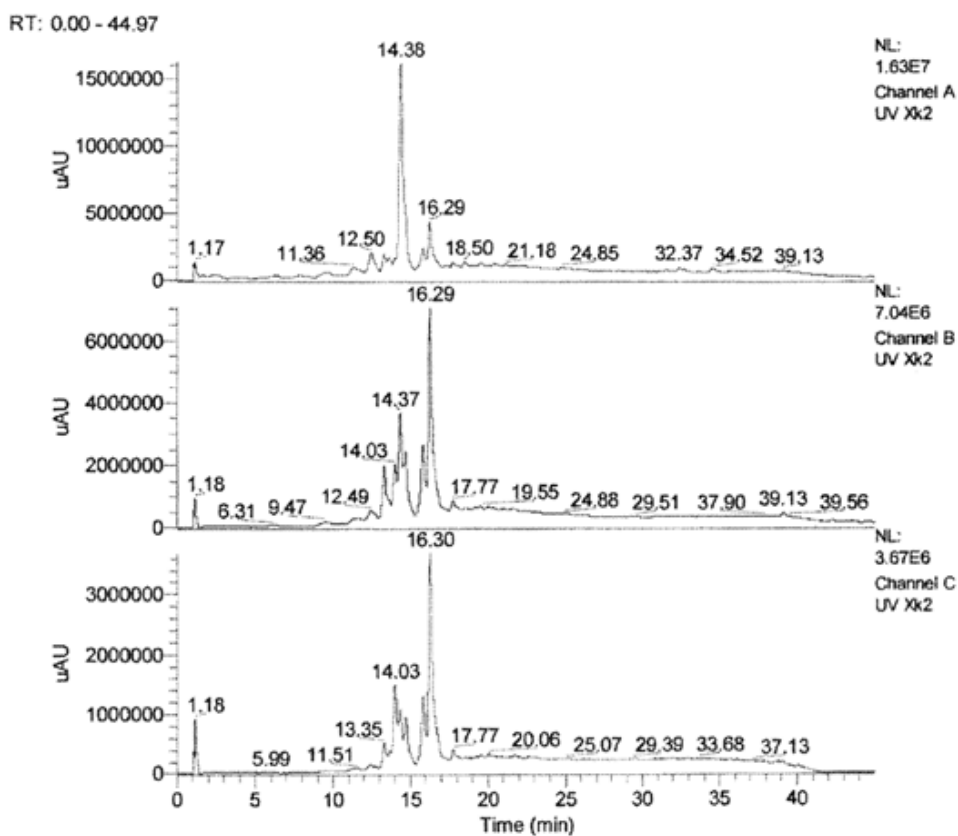


5.5.2. Κλάσμα οξικού αιθυλεστέρα

Παρακάτω παρατίθεται η ανάλυση του εκχυλίσματος του οξικού αιθυλεστέρα σε τρία διαφορετικά μήκη κύματος 290, 340, 365nm. Οι δύο ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν είχαν χρόνο κατακράτησης 14,38 και 16,29 min.

Supersher 100-4, 4u, (125x2mm) RP18 Macherey Nagel, 0,33ml/min, 40⁰C, 290, 340, 365nm. MS: 4kV, 400⁰C (probe), 12 and 60 eV, 121-787 amu, 0,8 scans/sec.

Time(min)	AcOH 2,5%	MeOH
0	90	10
2	90	10
37	100	0
42	100	0

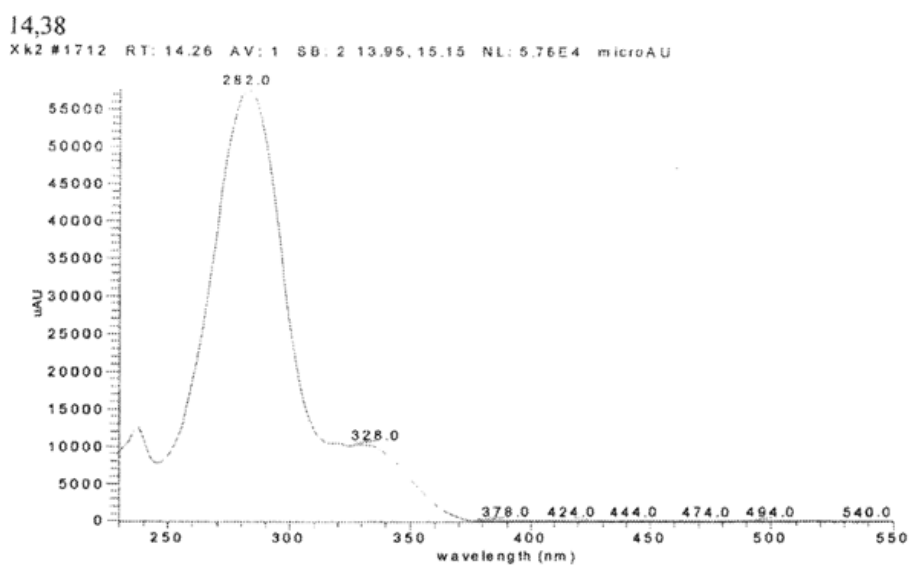


5.5.2.α. Διγλυκοζίτης της ναριγγενίνης

Χρόνος κατακράτησης 14,38

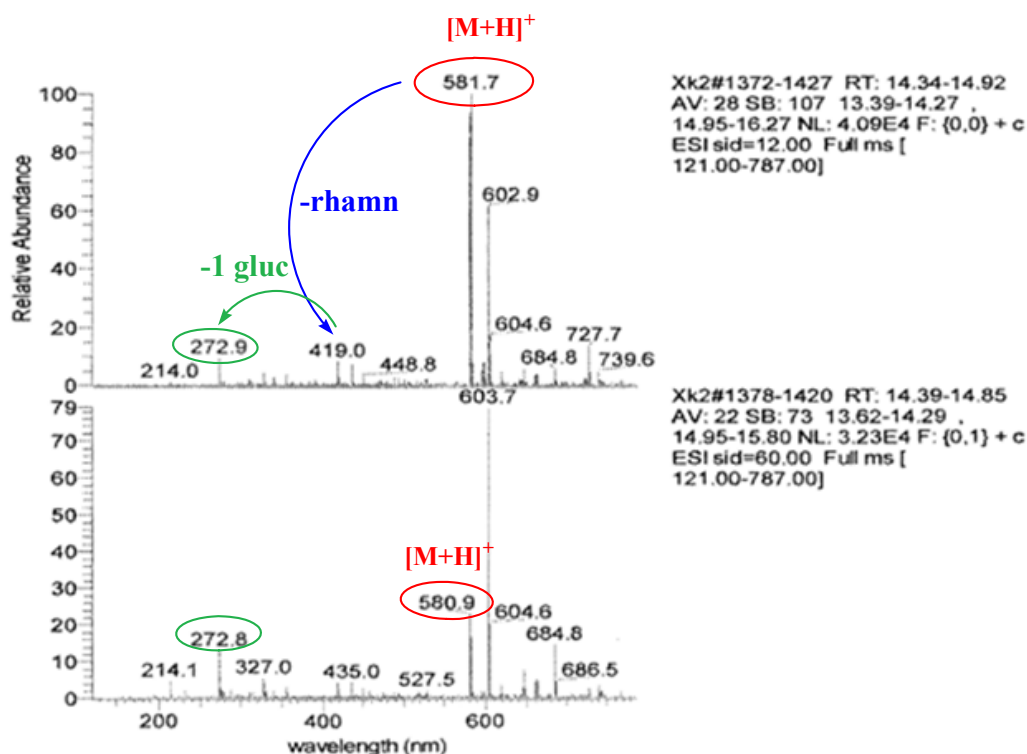
Ο χρόνος κατακράτησης από την στήλη για τον δισακχαρίτη της ναριγγενίνης είναι 14,38 min.

φάσμα UV-Vis

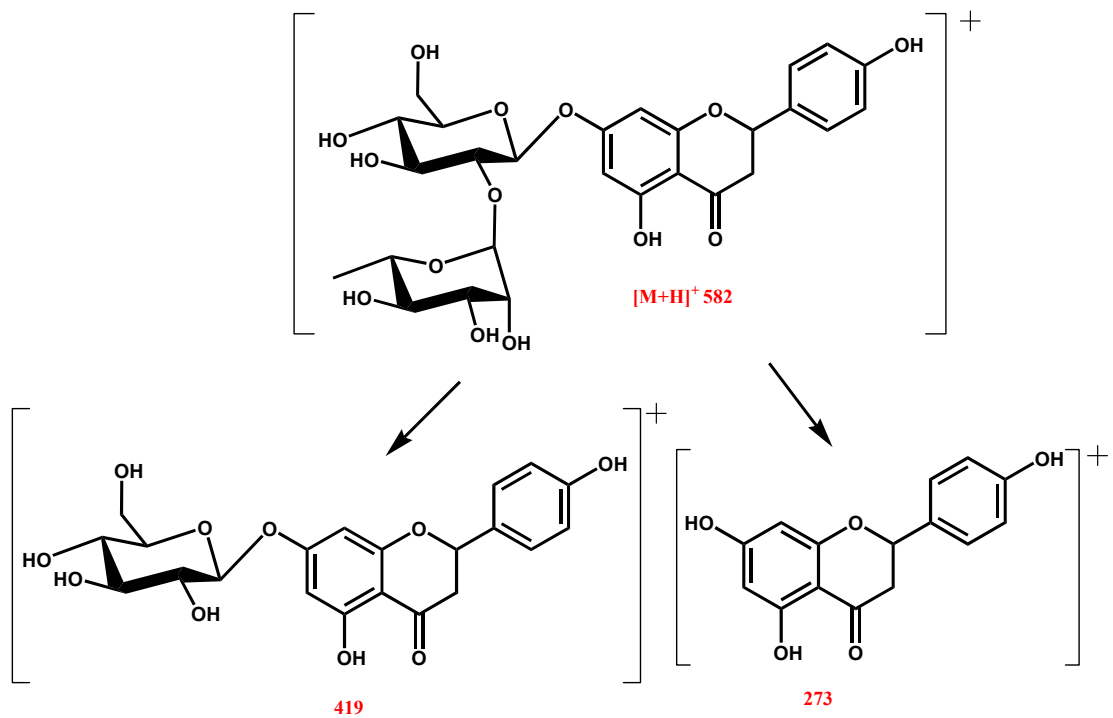


Πρόκειται για χαρακτηριστικό φάσμα φλαβονόνης με απορρόφηση στα 282 nm και την εμφάνιση του χαρακτηριστικού ώμου λόγω της έλλειψης συζυγίας μεταξύ του A και B δακτυλίου που οφείλεται στην απουσία του διπλού δεσμού μεταξύ του άνθρακα 2 και 3.

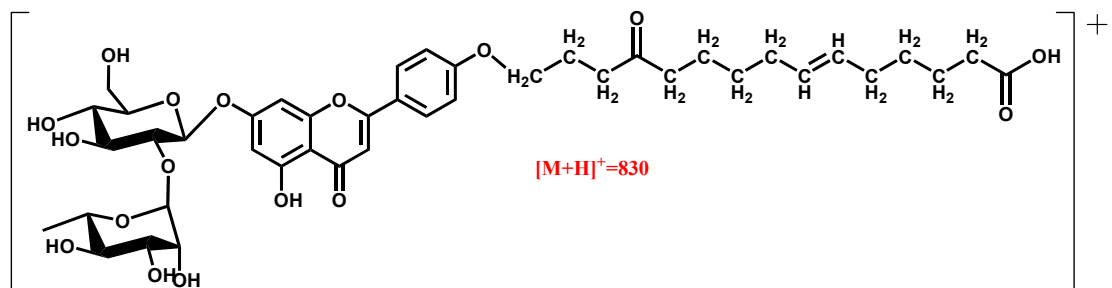
Φάσμα μάζας



Πρόκειται για έναν δισακχαρίτη της ναριγγενίνης στον οποίο η γλυκόζη είναι συνδεδεμένη στη θέση 7 του Α δακτυλίου ενώ είναι συνδεδεμένη με μια ραμνόζη. Η θέση σύνδεσης της ραμνόζης είναι 1''→2'' και αυτό έχει επιβεβαιωθεί από το φάσμα ¹H-NMR. Στο φάσμα μάζας διακρίνουμε το **μοριακό ιόν [M+H]⁺ 582** του δισακχαρίτη της ναριγκενίνης. Το **θραύσμα 419 [M+H-ραμνόζη]⁺** προκύπτει μετά την απομάκρυνση της ραμνόζης από το μοριακό ιόν. Ενώ μετά την απομάκρυνση της γλυκόζης προκύπτει το **θραύσμα 273** του αγλύκου της ναριγκενίνης **[M+H-ραμνόζη-γλυκόζη]⁺** το οποίο εμφανίζεται και στα και στα 80eV αλλά και στα 20eV. Η ύπαρξη του θραύσματος **685** υποδηλώνει την παρουσία μιας πλευρικής αλυσίδας η οποία είναι συνδεδεμένη....



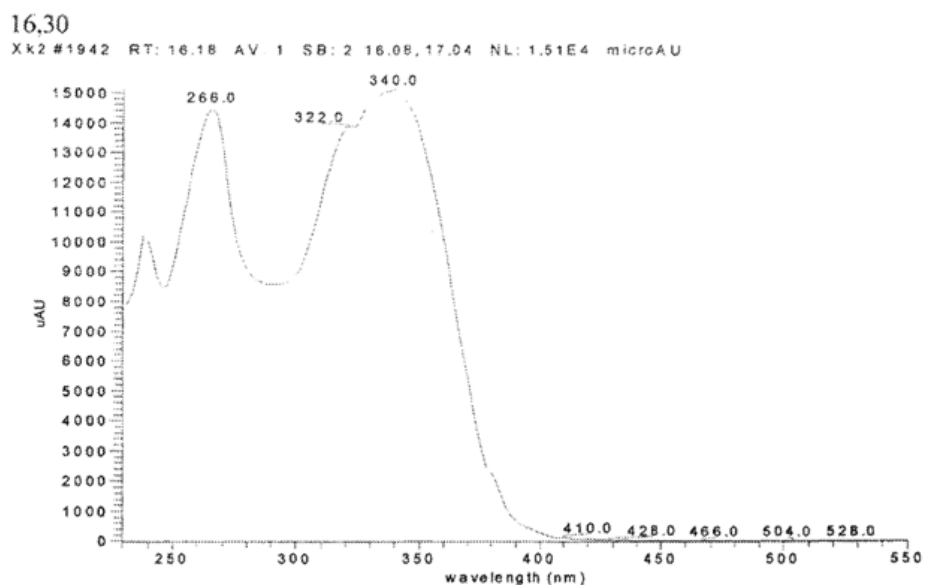
5.5.2.β. Διγλυκοζίτης της απιγενίνης με πλευρική αλυσίδα



Χρόνος κατακράτησης 16,30

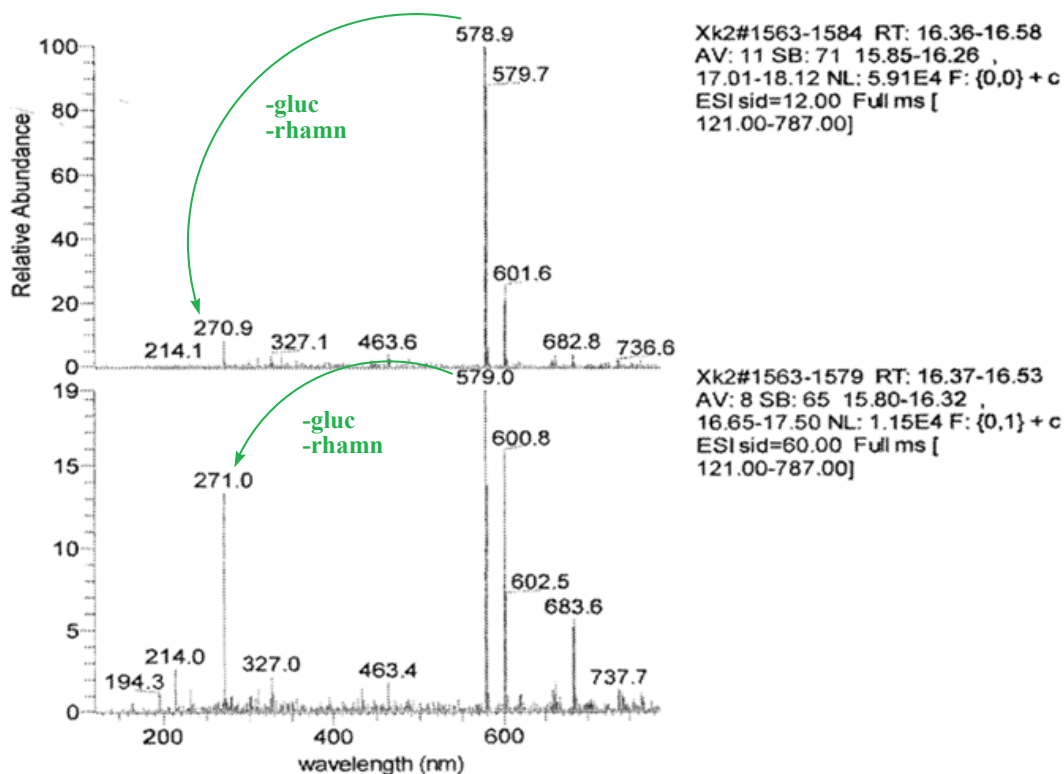
Ο χρόνος κατακράτησης από την στήλη για τον δισακχαρίτη της ναριγκενίνης είναι 16,30 min.

φάσμα UV-Vis



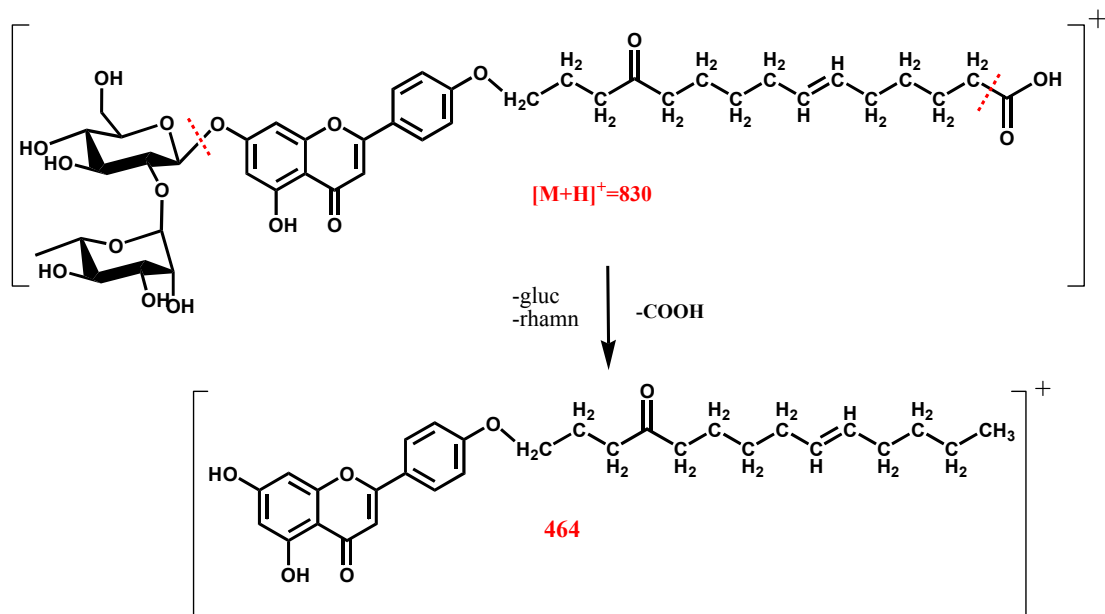
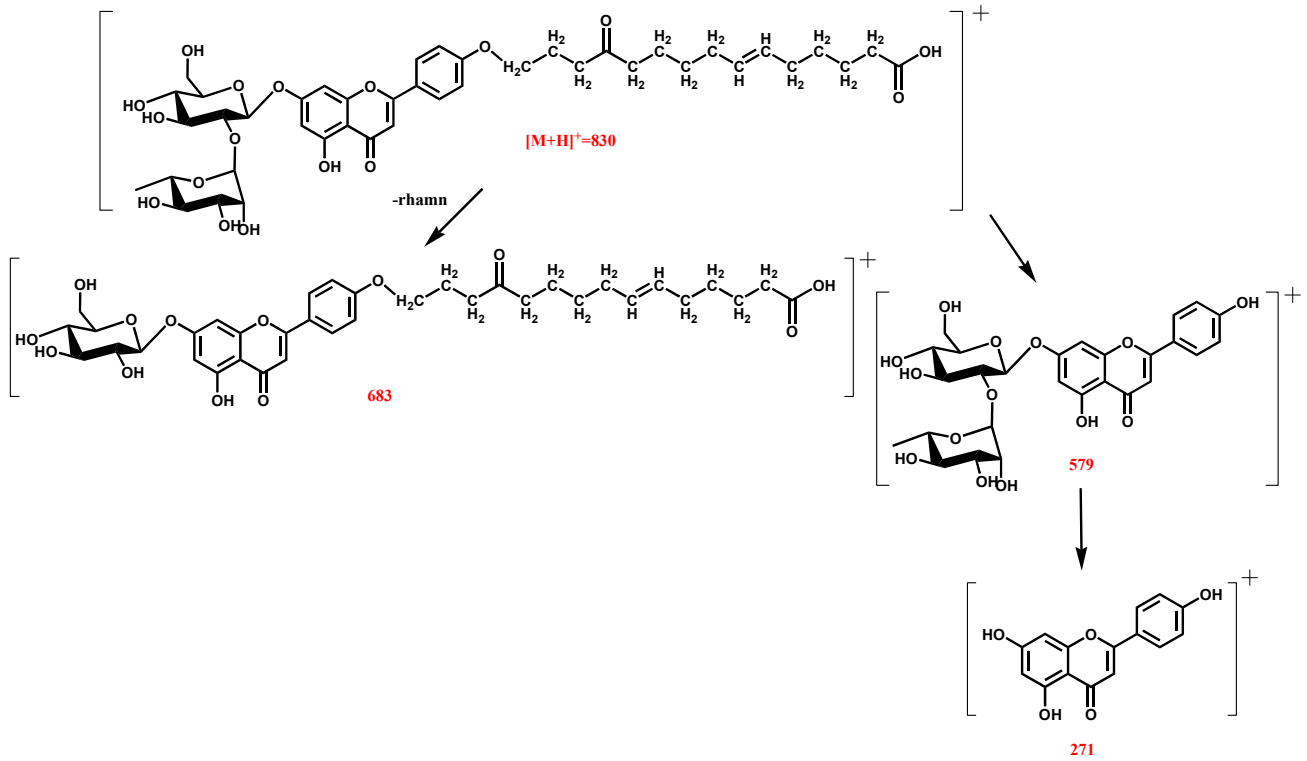
Το φάσμα υπεριώδους ορατού είναι χαρακτηριστικό φλαβόνης και συγκεκριμένα γλυκοζίτη της απιγενίνης με απορρόφηση στα 340 nm που οφείλεται στο Β δακτύλιο και την απορρόφηση στα 266 nm που οφείλεται στο βενζολικό δακτύλιο Α.

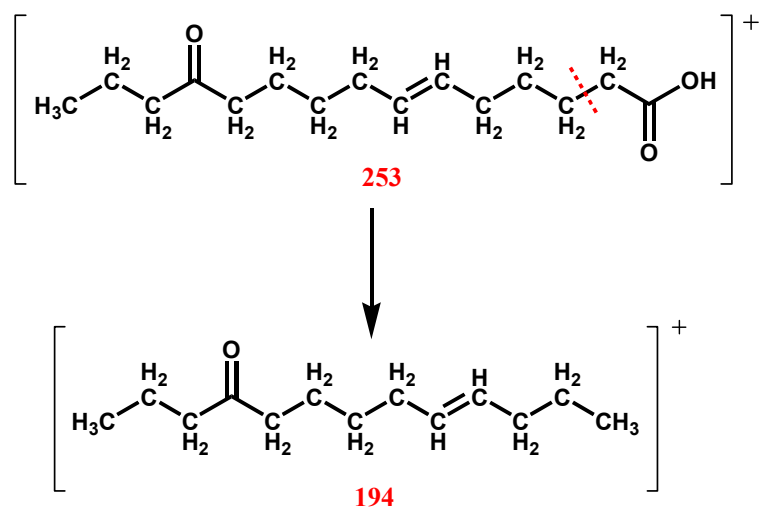
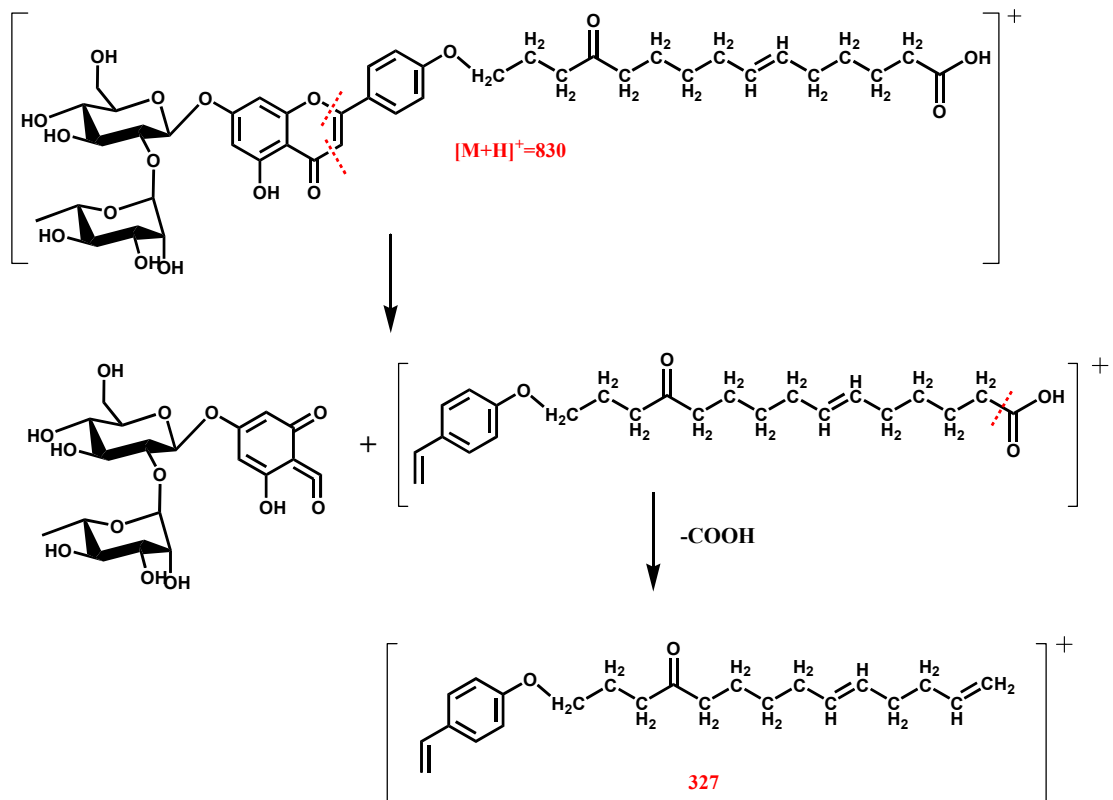
Φάσμα μάζας



Πρόκειται για έναν δισακχαρίτη της απιγενίνης που φέρει μια πλάγια ανθρακική αλυσίδα. Η θέση σύνδεσης της γλυκόζης είναι η θέση 7 του Α δακτυλίου ενώ είναι συνδεδεμένη και με μια ραμνόζη. Η θέση σύνδεσης της ραμνόζης είναι 1'''→2'' και αυτό έχει επιβεβαιωθεί από το φάσμα ¹H-NMR. Το μοριακό ιόν της ένωσης δεν είναι ορατό ούτε στα 80eV αλλά ούτε και στα 20eV. Στο φάσμα μάζας δεν είναι ορατό το μοριακό ιόν το οποίο είναι το **[M+H]⁺ 830** και αντιστοιχεί στον δισακχαρίτη της απιγενίνης με ανθρακική αλυσίδα. Είναι ορατό όμως το θραύσμα **683** που προκύπτει μετά την απομακρυνση από το μοριακό ιόν της ραμνόζης και είναι ορατό στα 80eV αλλά και στα 20eV. Ένα ακόμη θραύσμα που διακρίνεται στα 80eV αλλά και στα 20eV είναι αυτό που προκύπτει μετά την απομάκρυνση από το μοριακό ιόν και των δυο σακχάρων με παραμονή της ανθρακικής αλυσίδας και που είναι το **463**. Επίσης διακρίνεται το θραύσμα **579** του δισακχαρίτη της απιγενίνης ορατό στα 80eV αλλά και στα 20eV. Ενώ μετά την απομάκρυνση και των δυο σακχάρων προκύπτει το θραύσμα **271** του αγλύκου της απιγενίνης ορατό και αυτό στα 80eV αλλά και στα 20eV. Η επαλήθευση της σύνδεσης της ανθρακικής αλυσίδας στον άνθρακα 4' του Β δακτυλίου αποδεικνύεται από την παρουσία του θραύσματος **327** το οποίο είναι παρόν στα 80eV αλλά και στα 20eV και που αντιπροσωπεύει θραύσμα της ανθρακικής αλυσίδας με τμήμα του φλαβονοειδούς που προκύπτει από retro Diels-

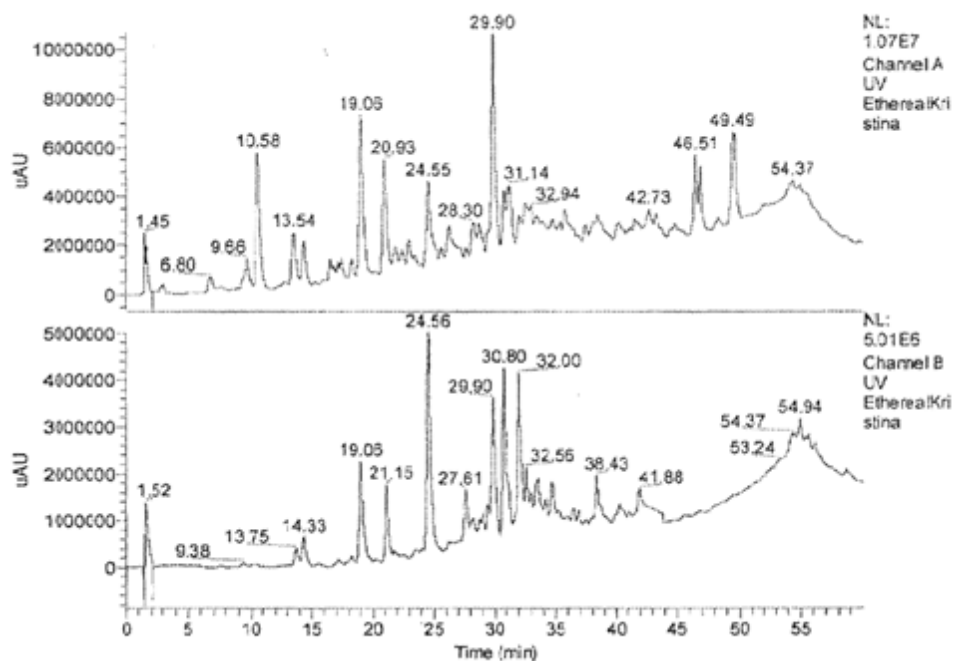
Alder. Ένα ακόμη θραύσμα που προκύπτει είναι και το **194** που αποτελεί τμήμα της ανθρακικής αλυσίδας.





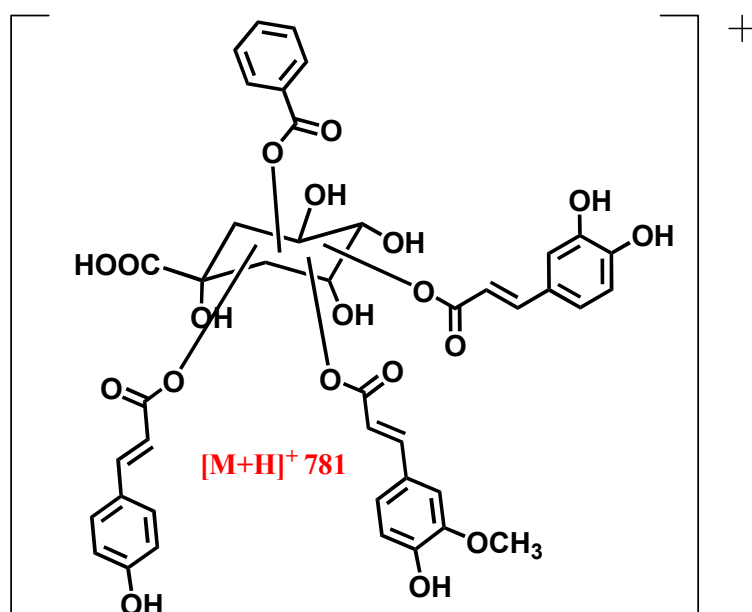
5.5.3. Αιθερικό κλάσμα

Παρακάτω παρατίθεται η ανάλυση του αιθερικού εκχυλίσματος με την έκλυση των συστατικών του.



5.5.3.a. Εστέρας του κινικού οξέος με φερουλικό, κουμαρικό και καφεϊκό οξύ

Η θέση σύνδεσης των υδροξυκινναμωμικών οξέων είναι αυθαίρετη μιας και δεν μπορεί να προσδιοριστεί η ακριβής θέση σύνδεσης αυτών στο μόριο του κινικού οξέος.

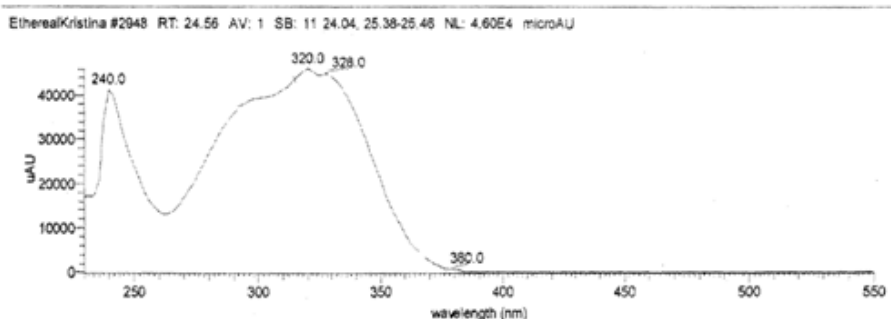


Πρόκειται για έναν εστέρα του κινικού οξέος στον οποίο είναι συνδεδεμένα υδροξυκινναμωμικά οξέα και συγκεκριμένα ένα μόριο καφεϊκού οξέος, ένα μόριο φερουλικού οξέος, ένα μόριο κουμαρικού οξέος και ένα βενζοϊκό οξύ.

Χρόνος κατακράτησης 24.56 min

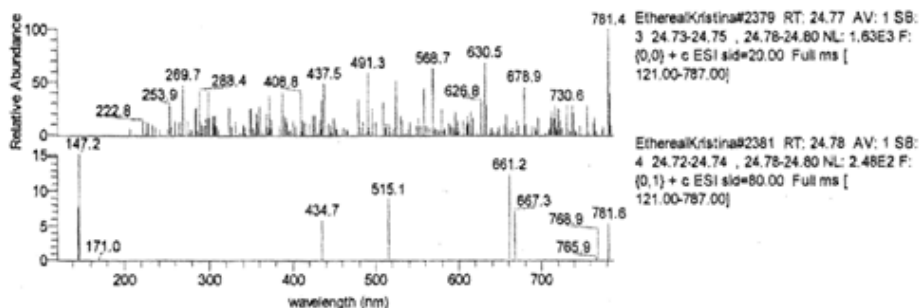
Ο χρόνος κατακράτησης της ένωσης αυτής από τη στήλη είναι 24.56 min

Φάσμα UV-Vis



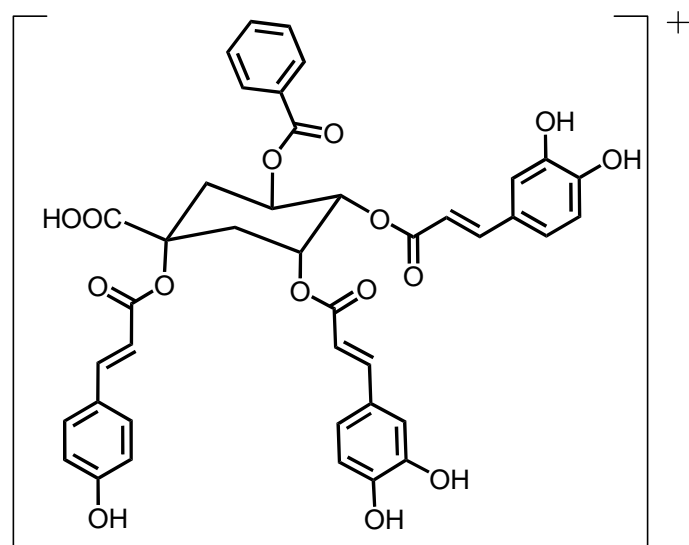
Το φάσμα απορρόφησης της ένωσης είναι χαρακτηριστικό για εστέρες του κινικού με υδροξυκινναμωμικά οξέα με δύο κορυφές στα 320 και 328 nm και έναν ώμο στα 295 nm (Sanchez-Rabaneda et al., 2003; Sanchez-Rabaneda et al., 2004).

Φάσμα μάζας

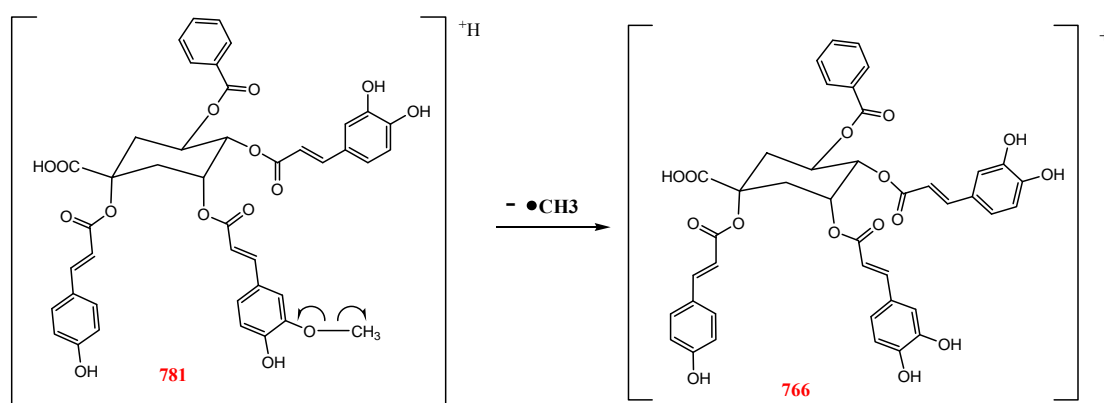


Το μοριακό ιόν της ένωσης είναι $[M+H]^+ = 781$ και εμφανίζεται και στα 20eV αλλά και στα 80eV .

Είναι ένας εστέρας του κινικού οξέος με υδροξυκινναμωμικά οξέα και συγκεκριμένα το κινικό οξύ είναι εστεροποιημένο με ένα μόριο καφεϊκού οξέος, ένα μόριο φεουλικού οξέος και ένα βενζοϊκό οξύ. Τα θραύσματα που προκύπτουν είναι τα εξής: Το **θραύσμα 766** προκύπτει από το μοριακό ιόν μετά την απομάκρυνση της μεθυλο ομάδας από το μόριο του φεουλικού οξέος.

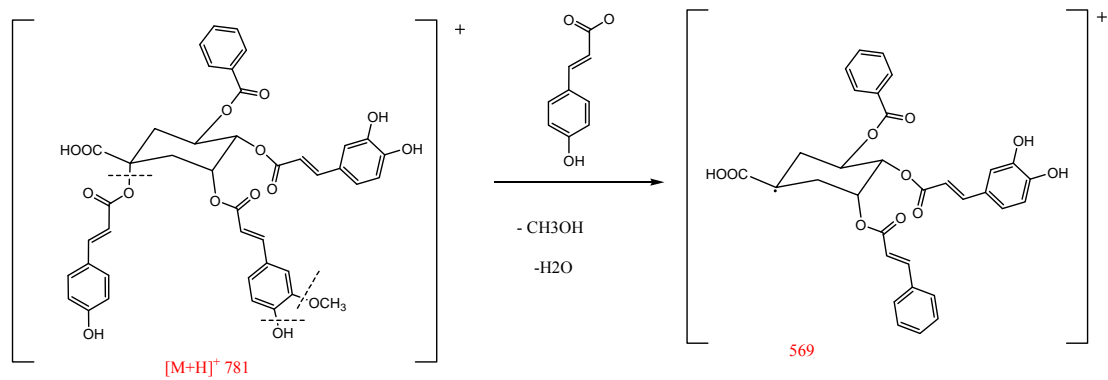


$[M+H-CH_3]^+ 766$

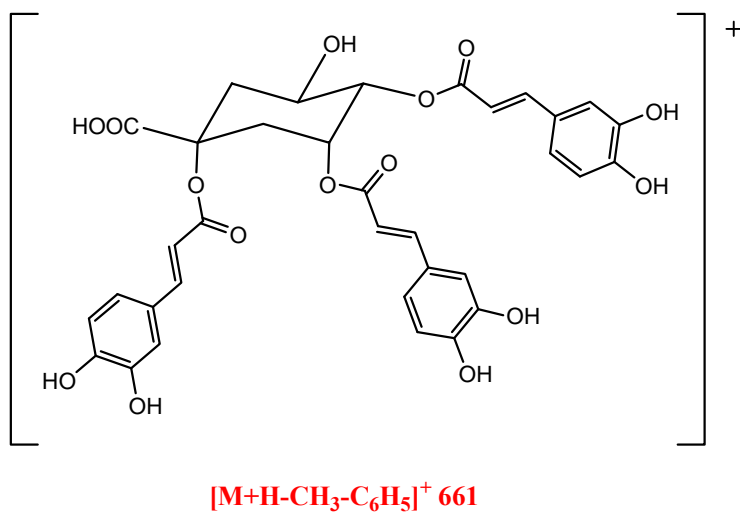


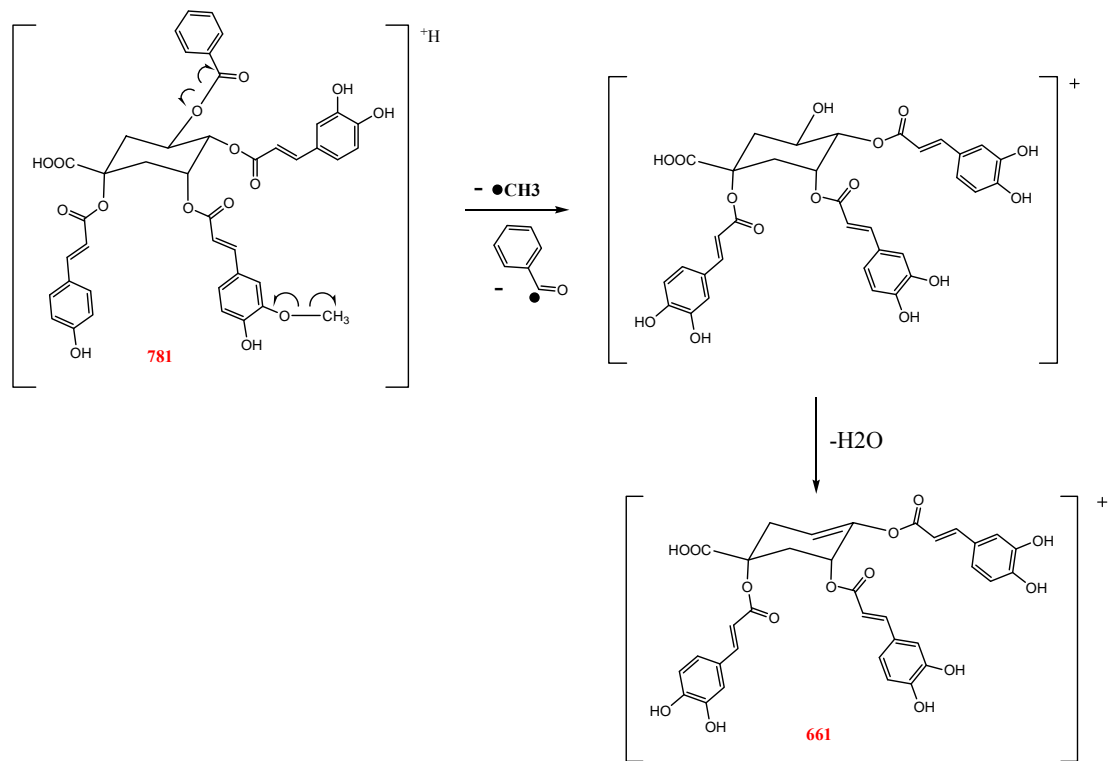
Παραπάνω περιγράφεται η απόσπαση του μεθυλίου με ομολυτική σχέση της μεθοξυομάδας του φεουλικού οξέος

Το **θραύσμα 569** $[M+H-H_2O-CH_2O-καφεϋλο]^+$ προκύπτει αμέσως μετά την απομάκρυνση μιας κουμαροϋλο ομάδας ενός μορίου μεθανόλης και ενός μορίου νερού από το μόριακό ιόν.



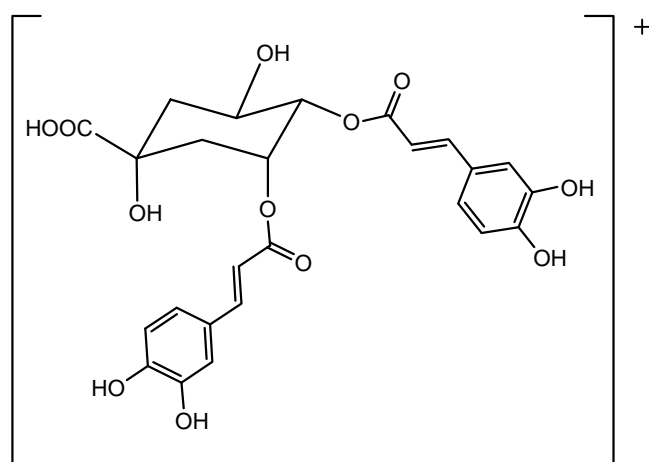
Το **θραύσμα 661** $[M+H-CH_3-C_6H_5]^+$ προκύπτει από το μοριακό ιόν μετά την απομάκρυνση του μεθυλίου από το μόριο του φερουλικού οξέος και της βενζυλικής ομάδας.



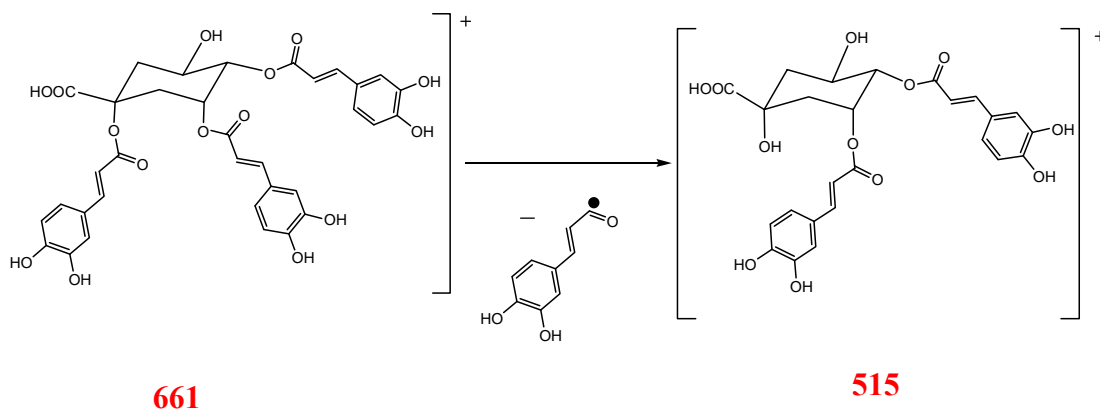


Στο παραπάνω σχήμα διακρίνεται η αποχώρηση με ομολυτική σχάση του μεθυλίου από το φερουλικό οξύ και της βενζυλικής ομάδας από το μοριακό ιόν.

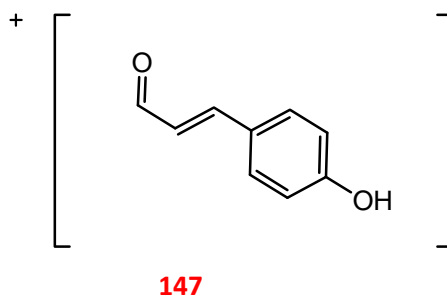
Το **θραύσμα 515** $[M+H-CH_3 -C_6H_5-καφεούλο]^+$ προκύπτει αμέσως μετά την απομάκρυνση της καφεούλο ομάδας και αντιστοιχεί στο κινικό οξύ συνδεδεμένο με δυο καφεούλο ομάδες.



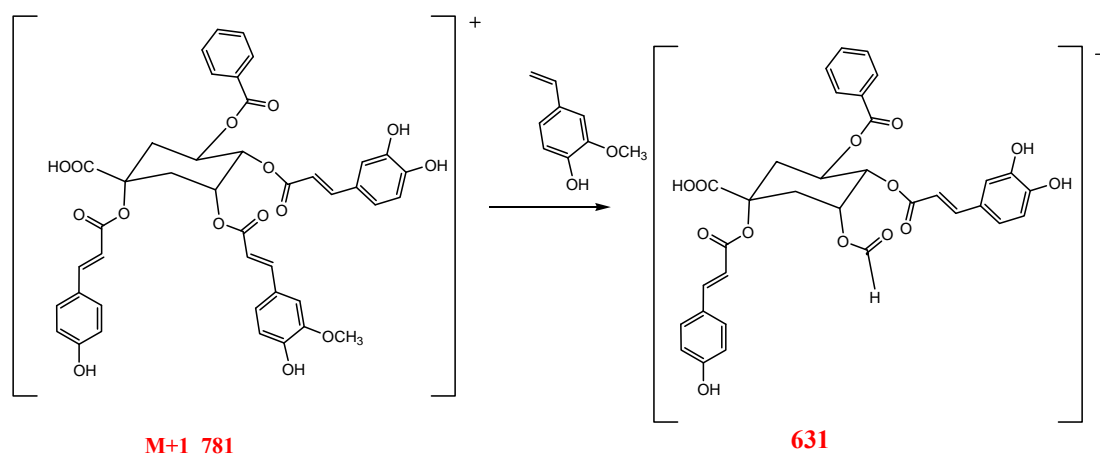
$[M+H-CH_3 -C_6H_5-καφεούλο]^+$ 515



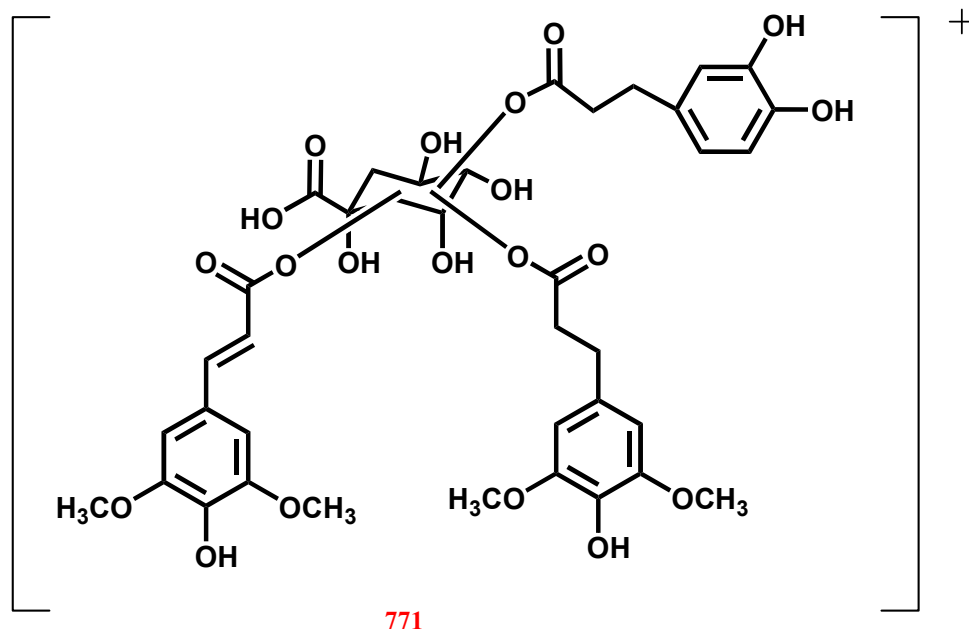
Στο παραπάνω σχήμα απεικονίζεται η απόσπαση της καφεόυλο ομάδας από το θραύσμα 661 για να δώσει το θραύσμα 515. Το **θραύσμα 147** αντιστοιχεί στην κουμαρόυλο ομάδα που προκύπτει μετά την απομάκρυνση ενός OH από την καφεόυλο ομάδα.



Το θραύσμα 631 προκύπτει αμεσως μετά την απομάκρυνση τμήματος της φερουλόυλο ομάδας από το μοριακό ιόν



5.5.3.β. Εστέρας του κινικού οξέος με δύο μόρια σιναπικού οξέος και ενός μορίου καφεϊκού οξέος

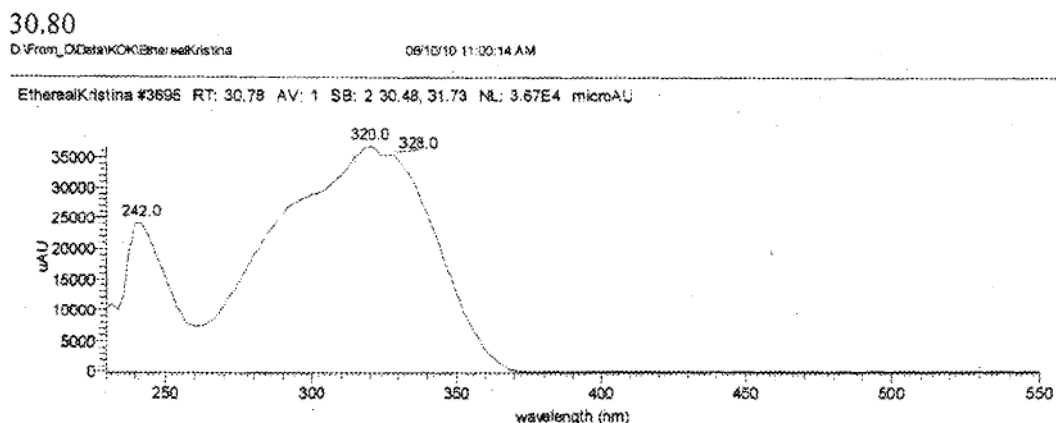


Πρόκειται για έναν εστέρα του κινικού οξέος που φέρει μια δεϋκαφεόυλο ομάδα, μια δεϋδροσυναπόϋλο ομάδα και μια συναπόϋλο ομάδα για τις οποίες δεν μπορούν να καθοριστούν οι θέσεις σύνδεσης. Το μόνο που μπορεί να αποδειχτεί είναι το υδροξύλιο του C-1 είναι ελεύθερο. Στους μηχανισμούς θραυσμάτωσης έχει δοθεί αυθαίρετα μια θέση σύνδεσης για τις υπολοιπες θέσεις του κινικού οξέος.

Χρόνος κατακράτησης 30,80

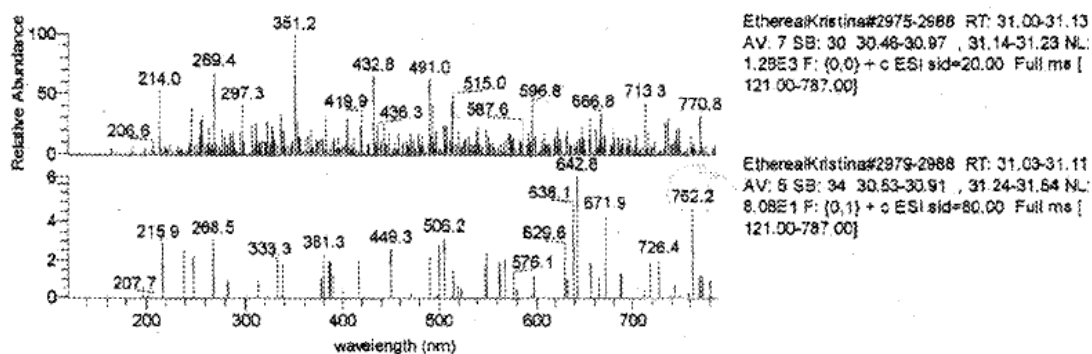
Ο χρόνος κατακράτησης της ένωσης αυτής από τη στήλη είναι 30,80 min.

φάσμα UV-Vis



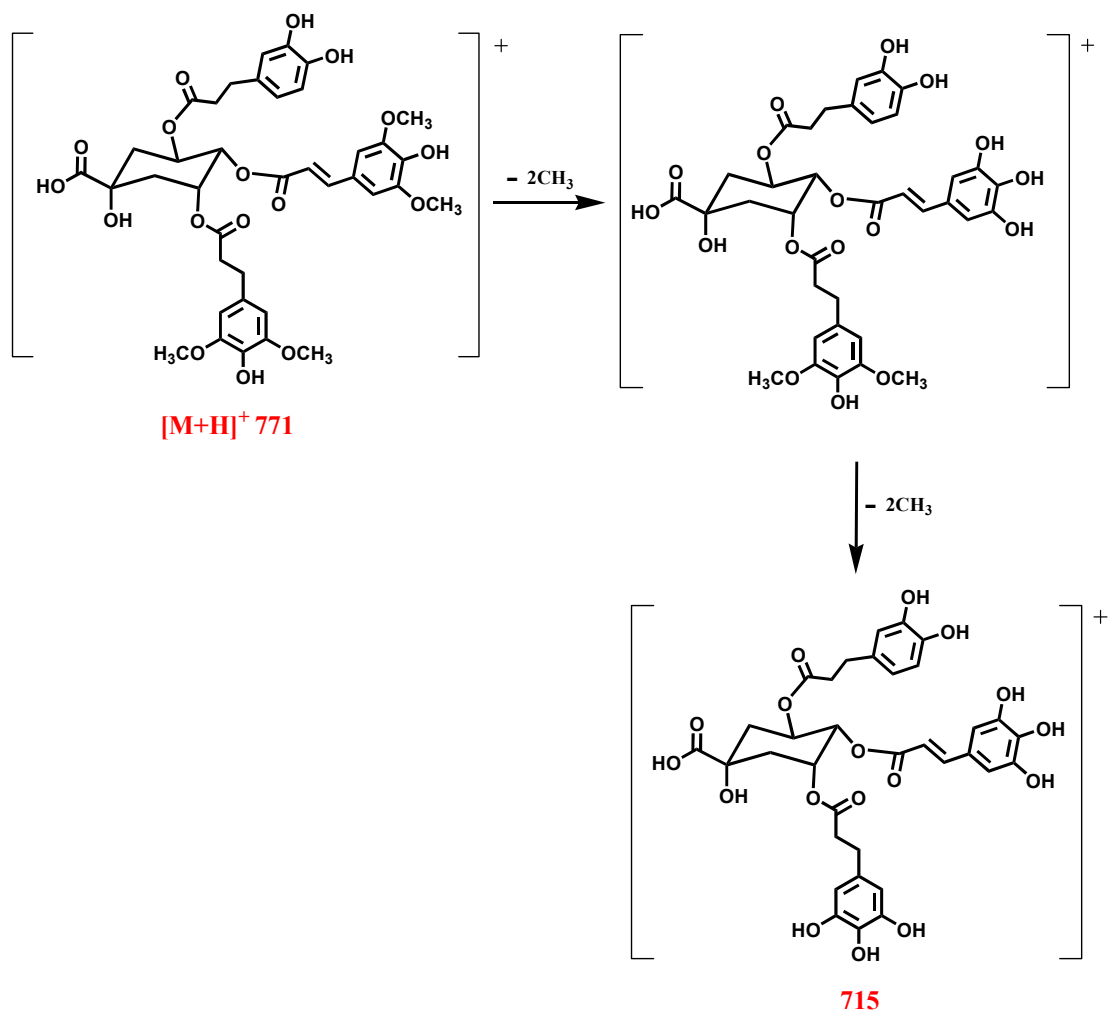
Το φάσμα απορρόφησης της ένωσης είναι χαρακτηριστικό για εστέρες του κινικού με υδροξυκινναμωμικά οξέα (Sanchez-Rabaneda et al.,2003; Sanchez-Rabaneda et al., 2004).

Φάσμα μάζας

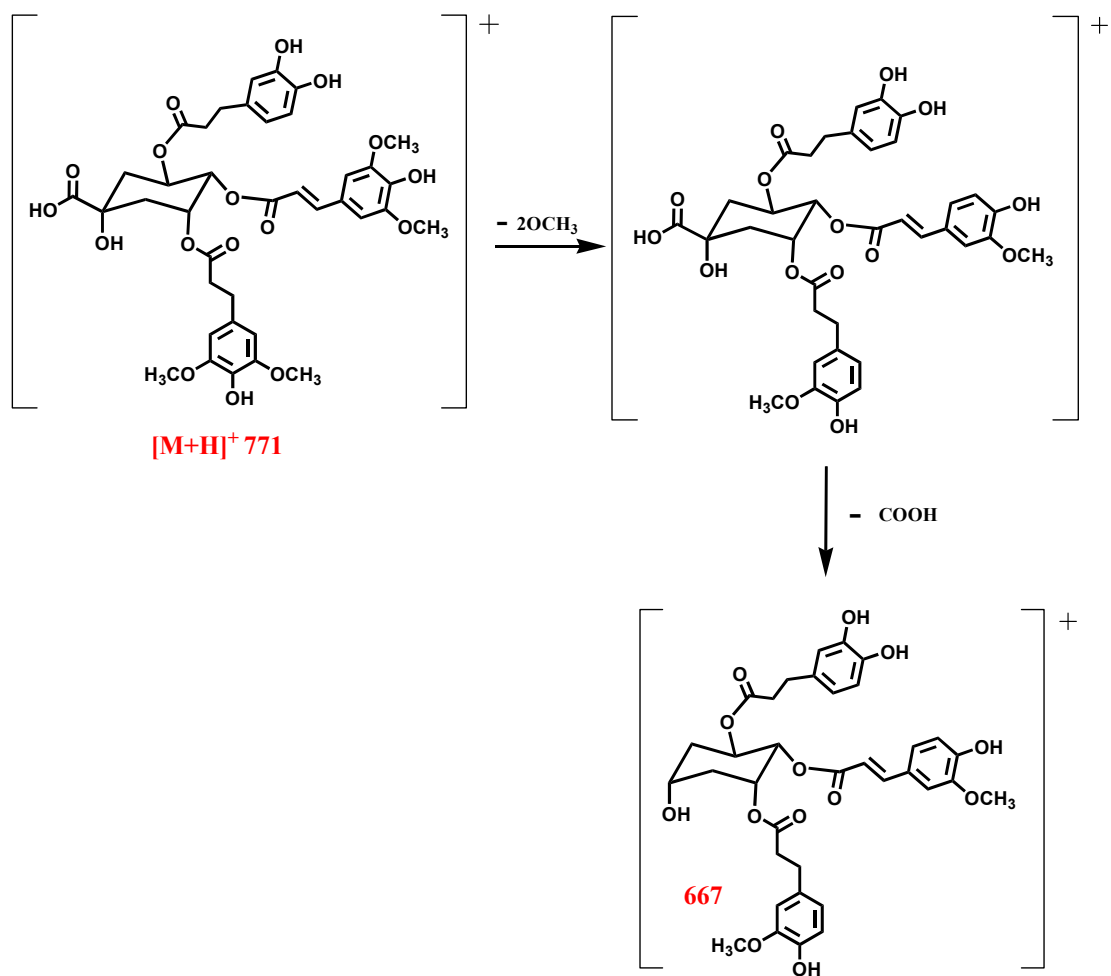


Το μοριακό ιόν της ένωσης είναι το $[M+H]^+ = 771$, το οποίο εμφανίζεται στα 20 eV. Στα 20 eV διακρίνονται τα εξής θραύσματα:

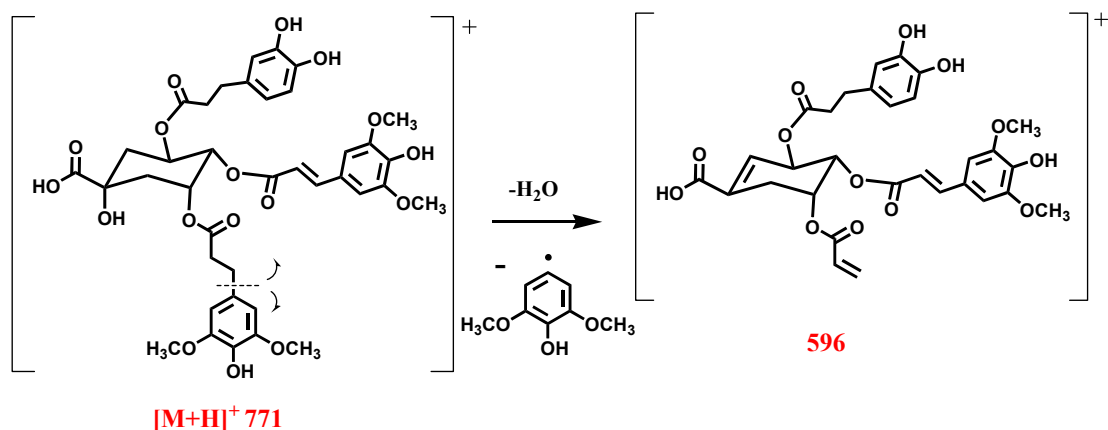
Το θραύσμα $715 [M+H- 4CH_3]^+$ που προκύπτει από την σταδιακή απόσπαση των τεσσάρων μεθυλίων από τις δυο συναποϋλο ομάδες.



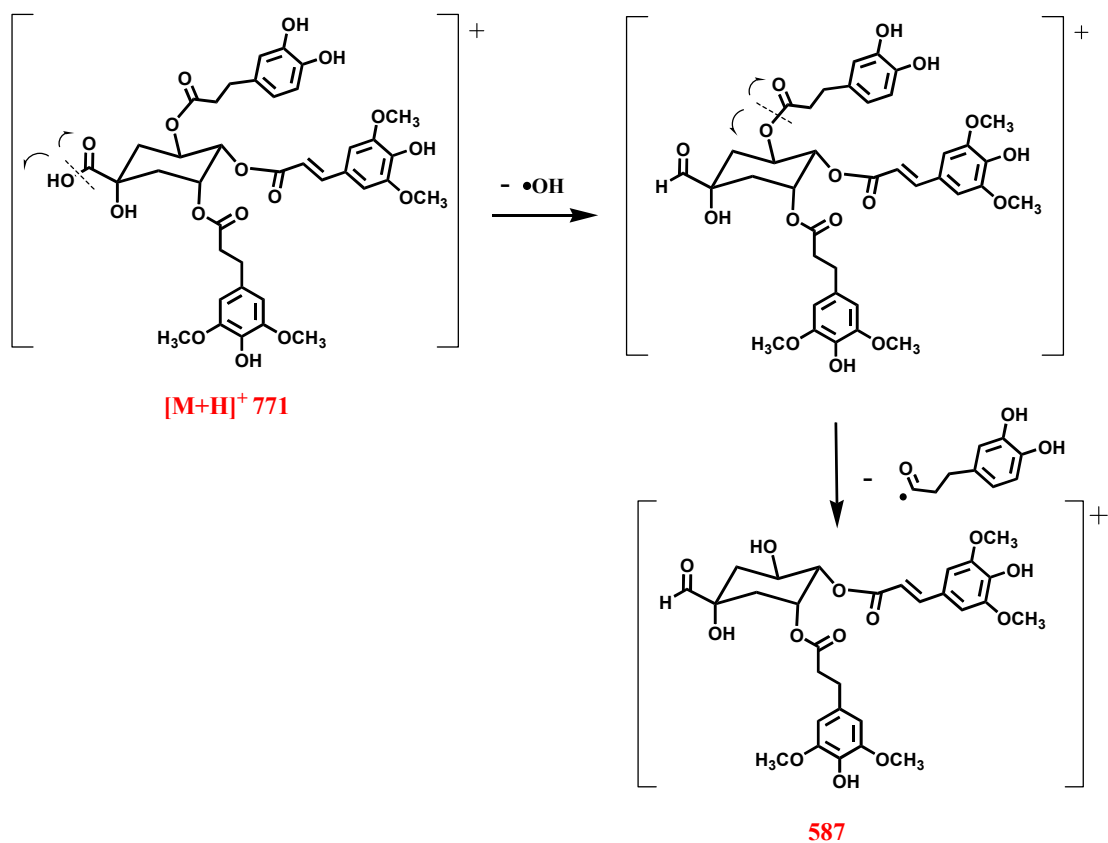
Το θραύσμα **667** προκύπτει από την απόσπαση δυο μεθοξυ ομάδων από τις συναπούλο ομάδες και στη συνέχεια από την απόσπαση της καρβοξυλο ομάδας από το μόριο του κινικού οξέος. Η απομάκρυνση των δύο μεθοξυ ομάδων μπορεί να γίνει είτε από τον μόριο της μιας συναπούλο ομάδας είτε της μιας δευδροσυναπούλο ομάδας.



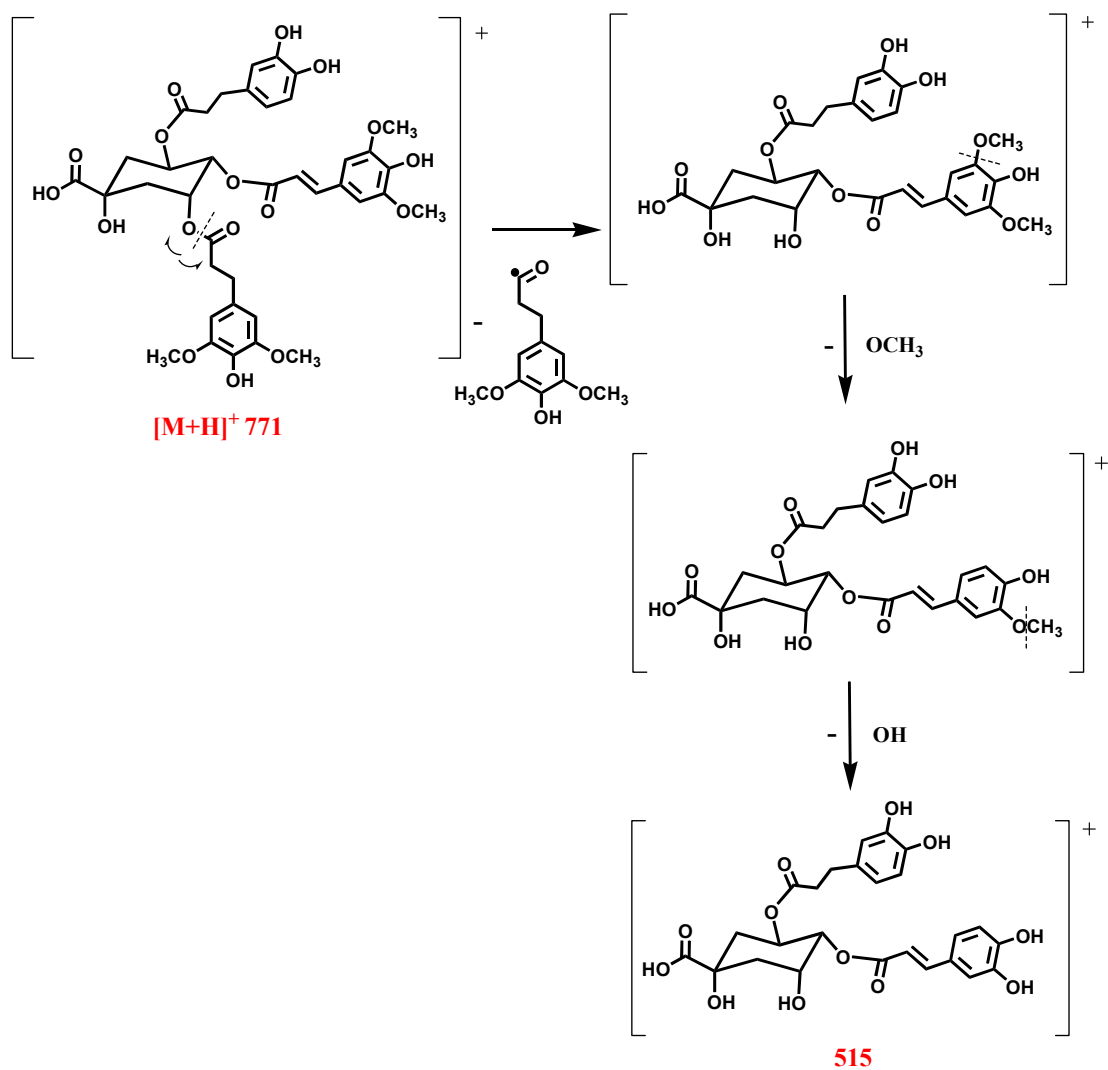
Το θραύσμα **596** προκύπτει από την απόσπαση του βενζολικού τμήματος μιας από τις δύο συναποϋλο ομάδες και ενός μορίου νερού γεγονός που αποδεικνύει ότι το OH του C-1 είναι ελεύθερο.



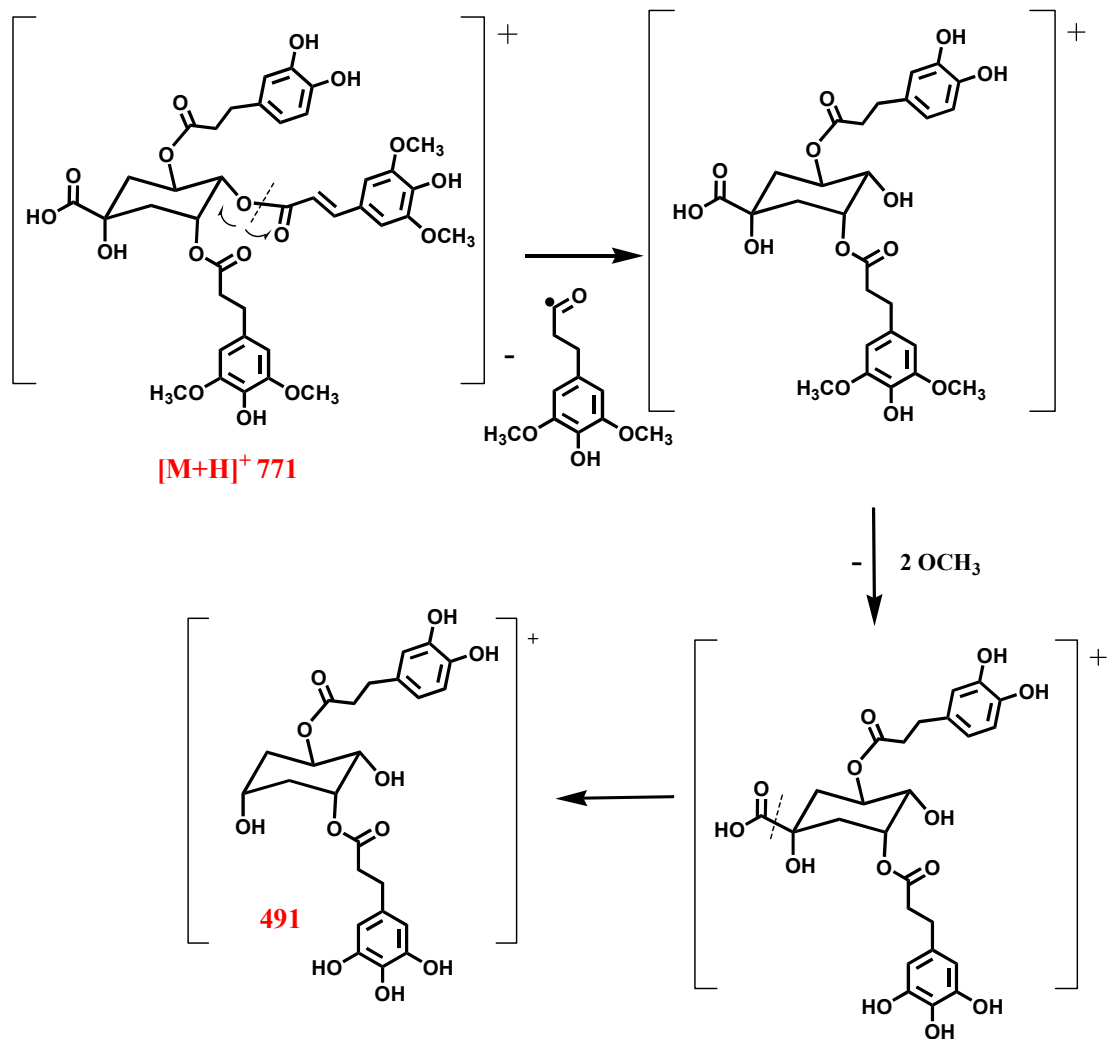
Η απόσπαση αρχικά του υδροξυλίου ως ρίζα από την καρβοξυλομάδα του κινικού οξέος και στη συνέχεια της καφεόυλομάδας δίνει το θραύσμα **587** όπως φαίνεται παρακάτω.



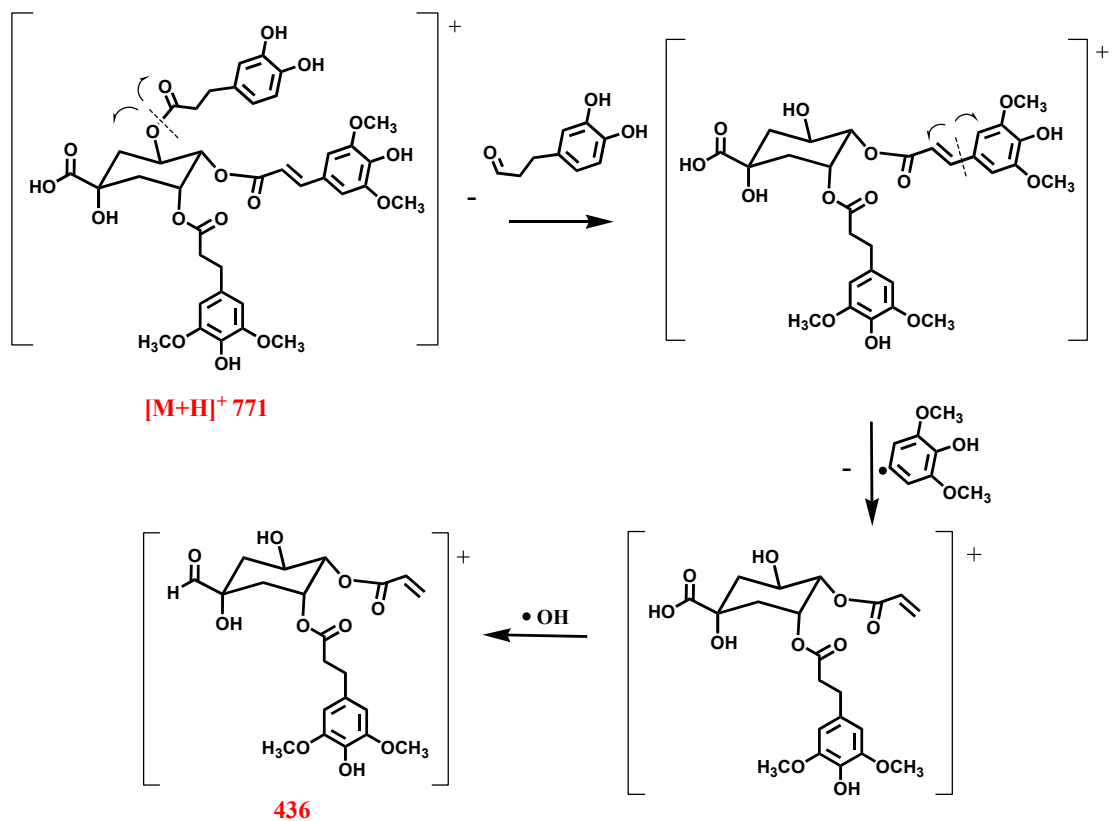
Το θραύσμα **515** προκύπτει από το μοριακό ιόν μετά την σταδιακή απομάκρυνση της δεϋδροσυναποϋλο ομάδας, μιας μεθοξυ ομάδας από την συναποϋλο ομάδα, και ενός μεθυλίου από την ίδια ομάδα. Αυτό το θραύσμα αντιστοιχεί στον εστέρα του κινικού οξέος με δύο καφεϊκά οξέα.



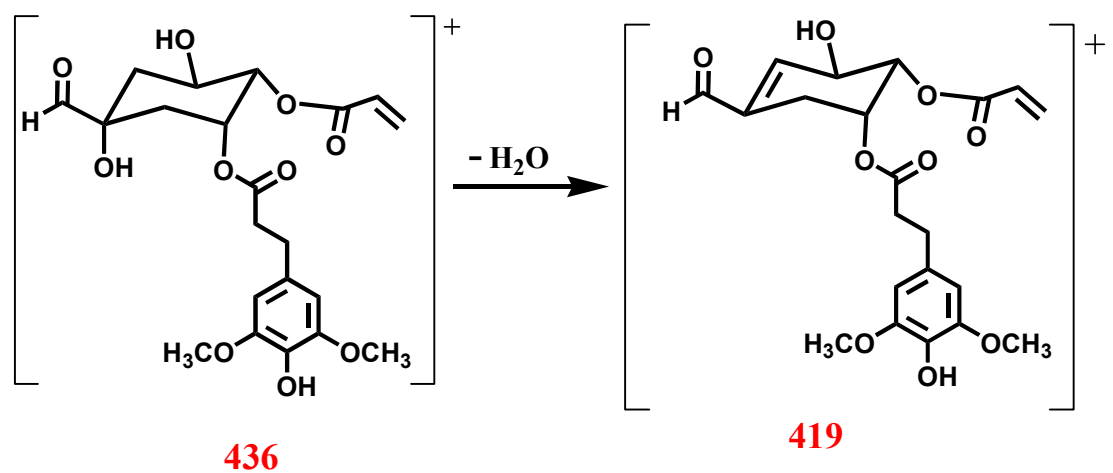
Το θραύσμα **491** προκύπτει από το μοριακό ιόν μετά την απομάκρυνση της δεϋδροσυναπούλο ομάδας, και δυο μεθοξυ ομάδων από την συναπούλο ομάδα.



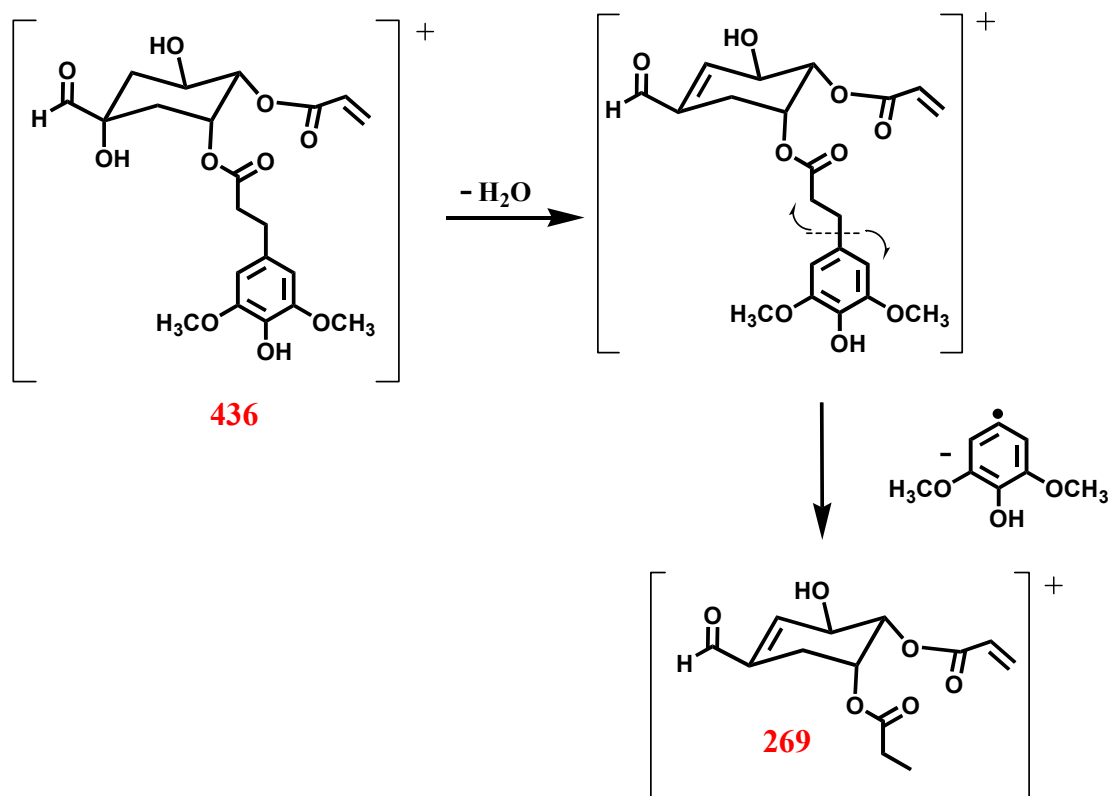
Το θραύσμα **436** προκύπτει από το μοριακό ιόν μετά την σταδιακή απόσπαση μιας καφέυλο ομάδας από το μοριακό ιόν, στη συνέχεια γίνεται απόσπαση μιας ρίζας OH από την καρβοξυλική ομάδα του κινικού οξέος και τέλος την απόσπαση του βενζολικού τμήματος της συναπούλο ομάδας.



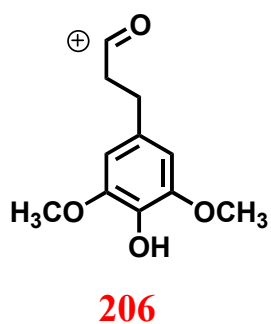
Το θραύσμα **419** προκύπτει από το θραύσμα **436** μετά την απόσπαση μιας ρίζας OH από την καρβοξυλομάδα του κινικού οξέος και μετά από απόσπαση ενός μορίου H₂O από το μόριο του κινικού οξέος.



Το θραύσμα **269** προκύπτει από το φάσμα **436** μετά την απομάκρυνση ενός μορίου νερού από το μόριο του κινικού οξέος και στη συνέχεια του βενζολικού τμήματος με της δεϋδροσυναπούλο ομάδας.

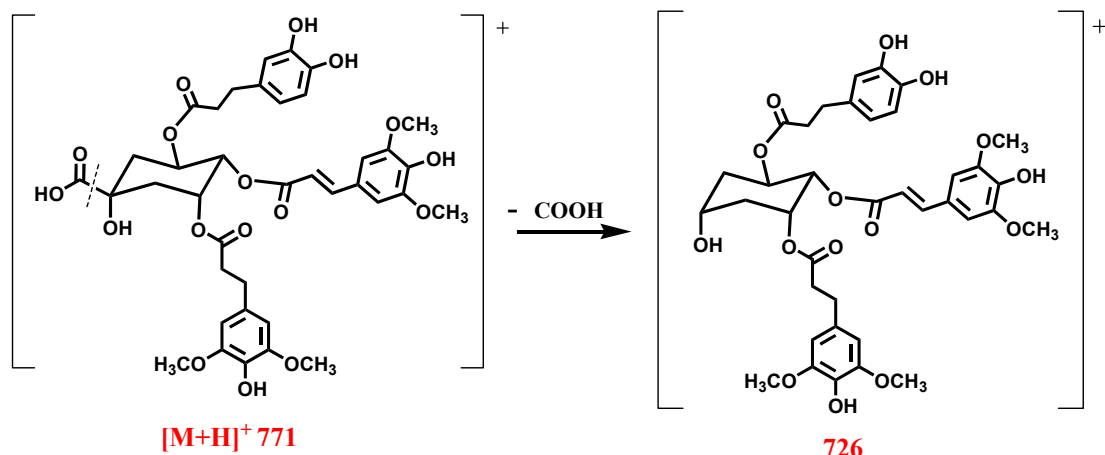


Ενώ το θραύσμα **206** που προκύπτει είναι το θραύσμα της συναπούλο ομάδας.

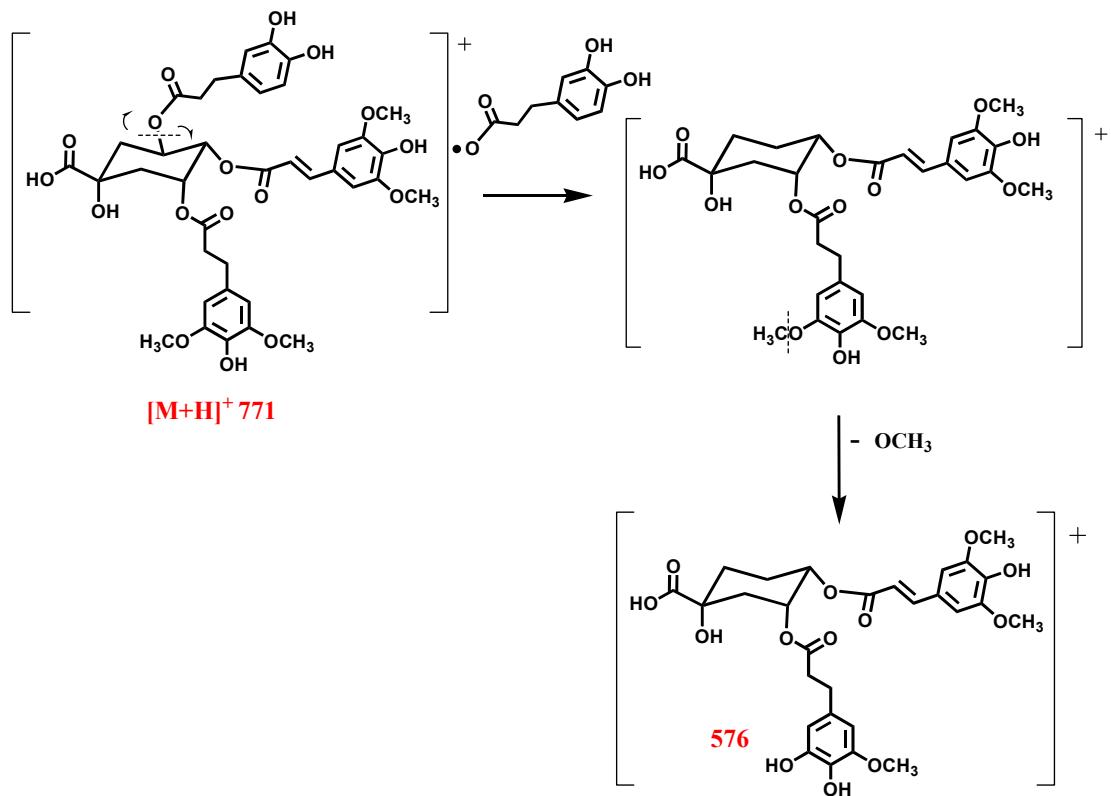


Στα 80 eV διακρίνονται τα εξής θραύσματα:

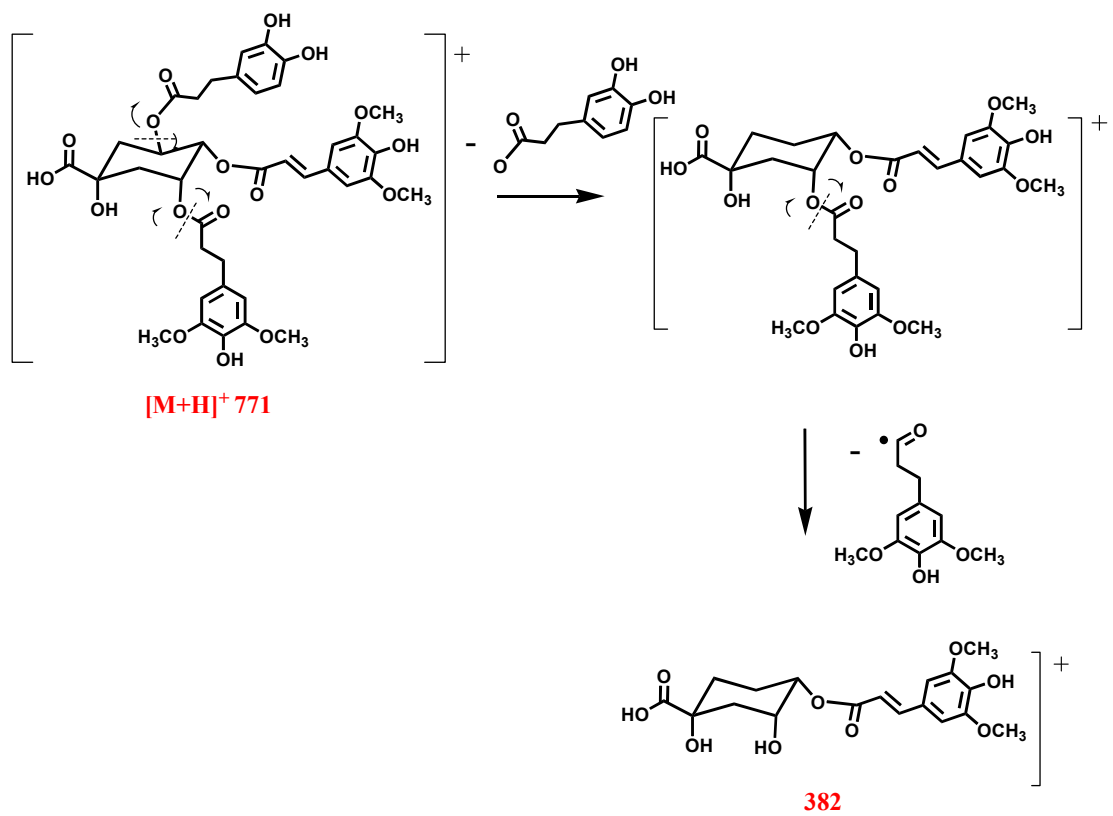
Το θραύσμα 726 προκύπτει από το μοριακό ιόν μετά την απομάκρυνση της καρβοξυλικής ομάδας του κινικού οξέως.



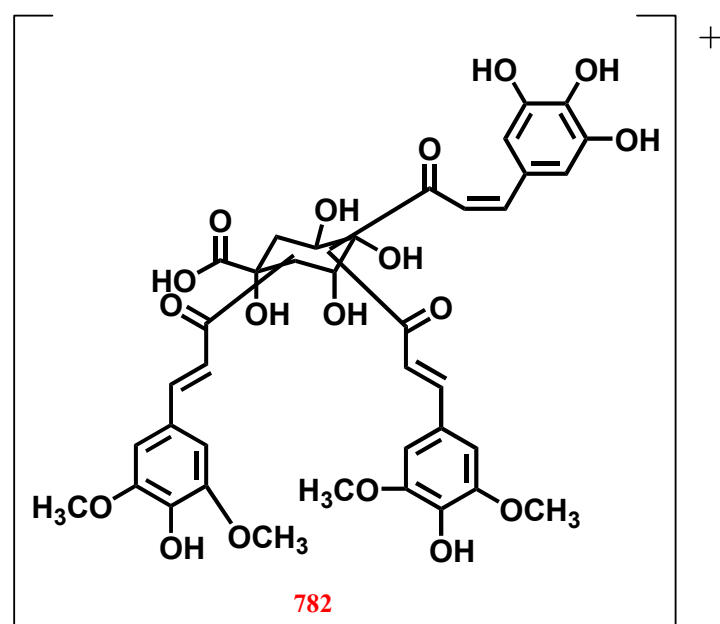
Το θραύσμα 576 προκύπτει από την απόσπαση της καφέυλο ομάδας από το μοριακό ιόν και στη συνέχεια την απόσπαση ενός μεθυλίου είτε από την δεϋδροσυναποϋλο ομάδα είτε από την συναποϋλο ομάδα.



Το θραύσμα **382** προκύπτει από το μοριακό ιόν εάν απομακρυνθεί η καφεόυλο και η δεϋδροσυναποϋλο ομάδα.



5.5.3.γ. Εστέρας του κινικού οξέος με δύο μόρια σιναπικού οξέος και ενός μορίου καφεϊκού οξέος

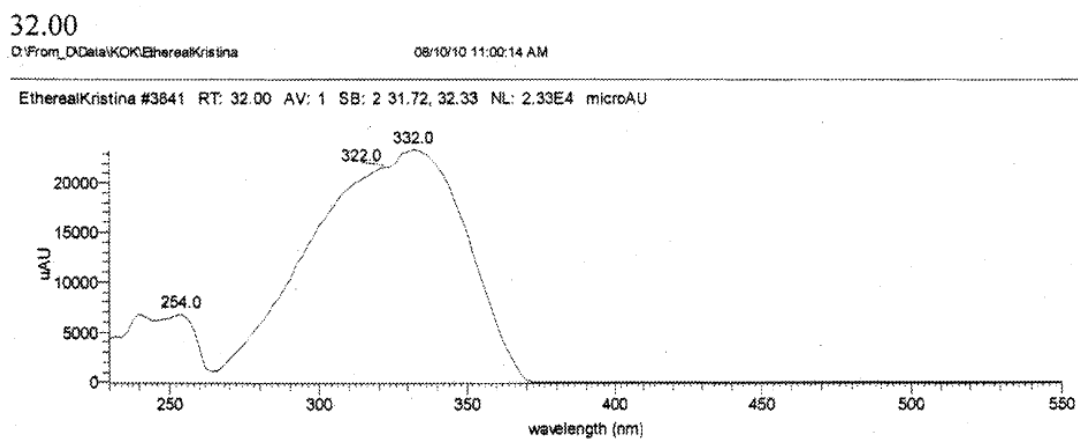


Πρόκειται για έναν εστέρα του κινικού οξέος που φέρει δυο συναπόυλο ομάδες και μια ομάδα του τριωδρόξυκινναμικού οξέος. Το μοριακό ιόν είναι το $[M+H]^+$ 782 και είναι ορατό στα 80 Ev.

Χρόνος κατακράτησης 32,00

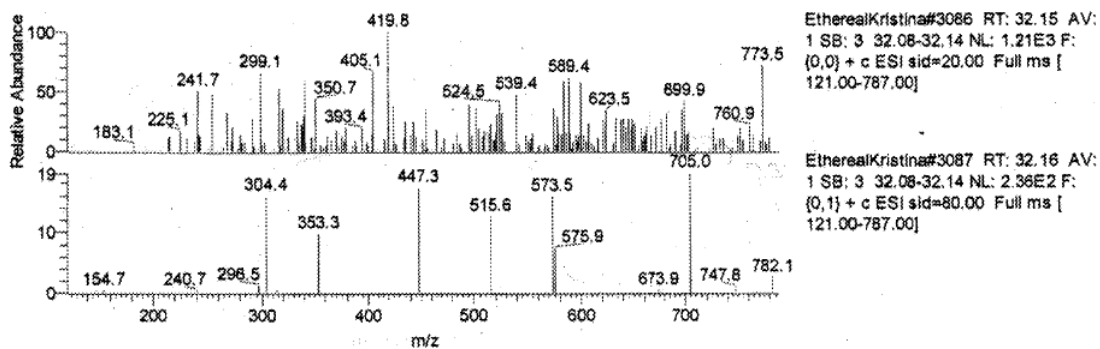
Ο χρόνος κατακράτησης της ένωσης αυτής από τη στήλη είναι 32,00 min.

φάσμα UV-Vis



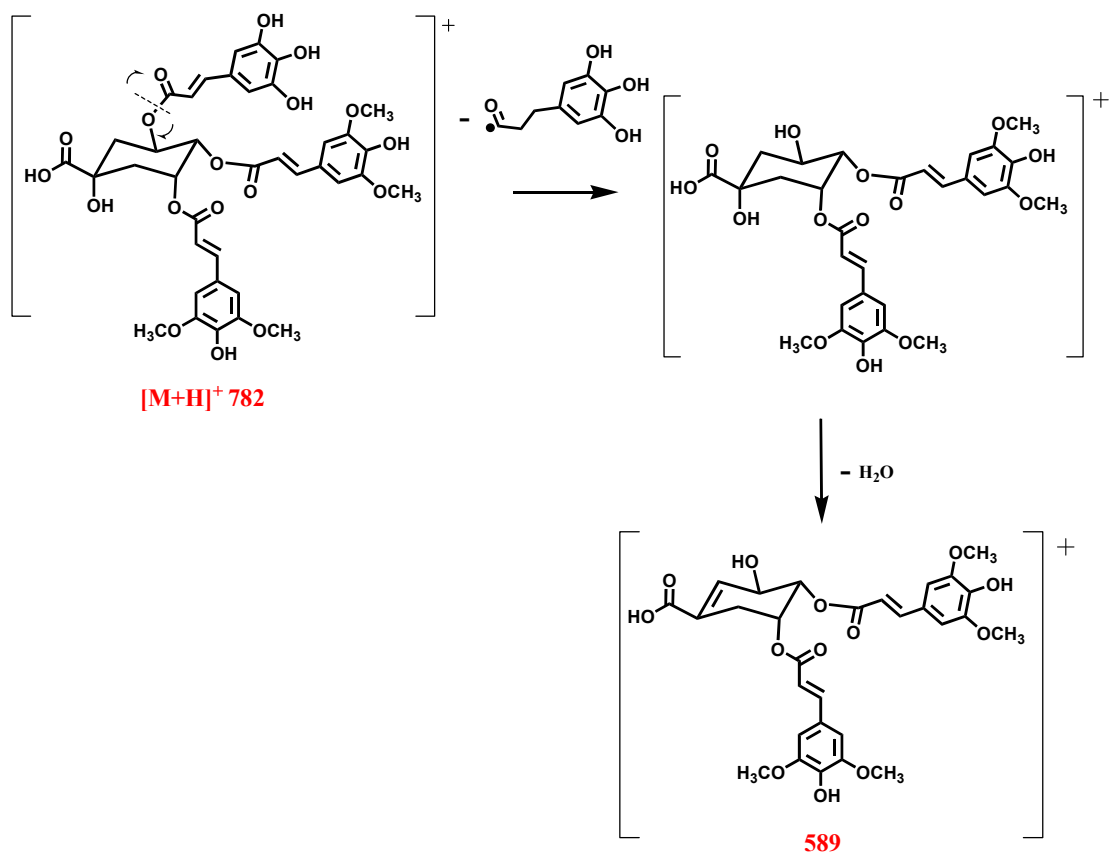
Το φάσμα απορρόφησης της ένωσης είναι χαρακτηριστικό για εστέρες του κινικού με υδροξυκιναμωμικά οξέα (Sanchez-Rabaneda et al.,2003; Sanchez-Rabaneda et al., 2004).

Φάσμα μάζας

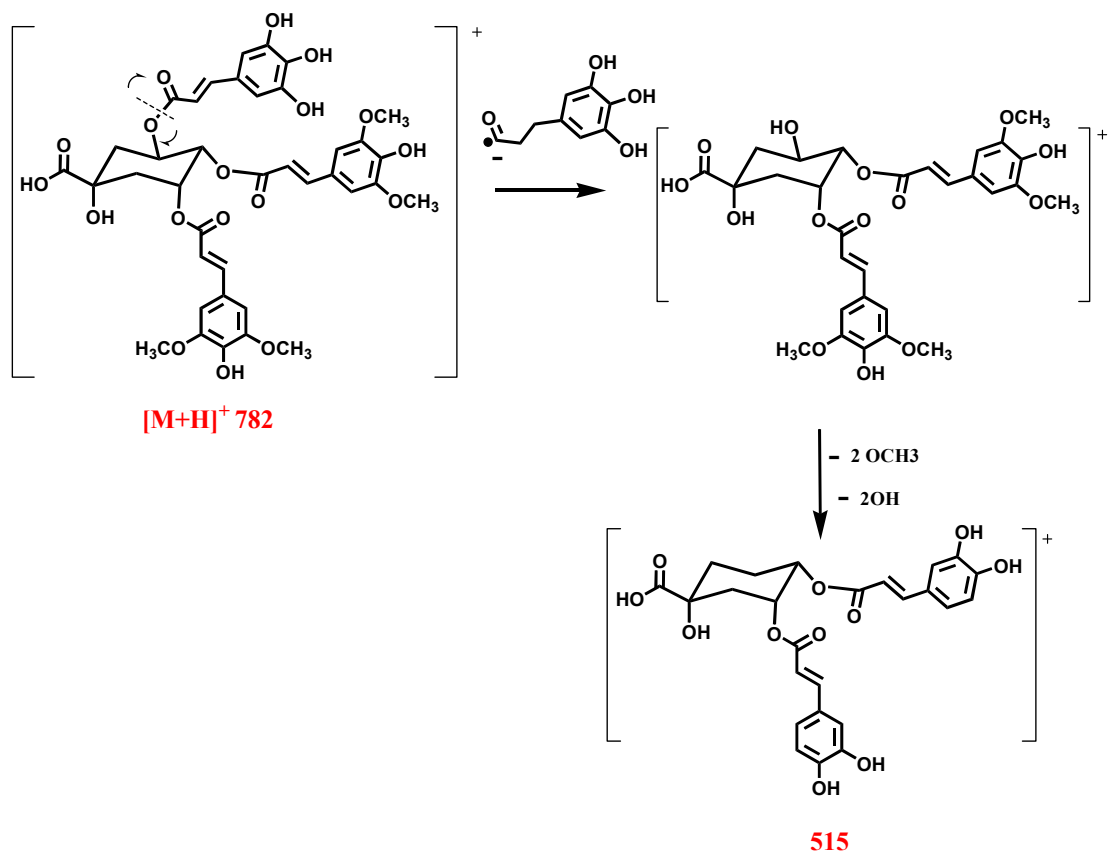


Το μοριακό ιόν της ένωσης είναι το $[M+H]^+ = 782$, το οποίο εμφανίζεται στα 20 eV. Στα 20 eV διακρίνονται τα εξής θραύσματα:

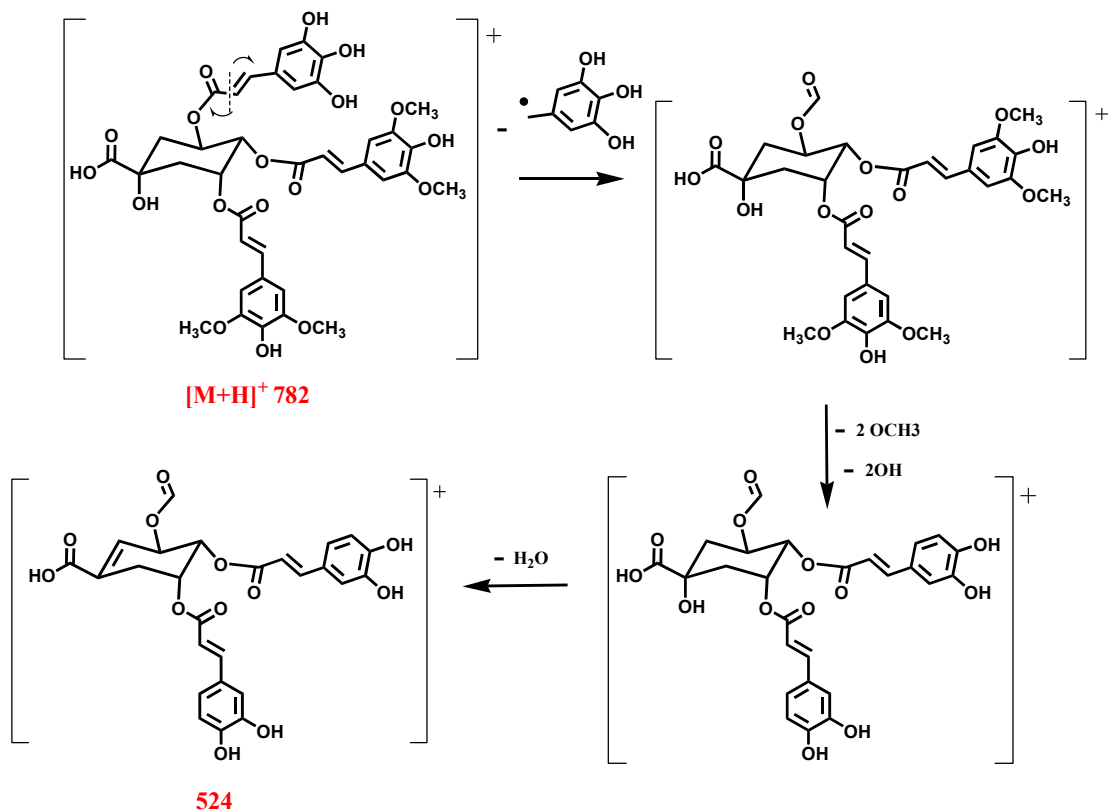
Το θραύσμα 589 προκύπτει από την απόσπαση της ομάδας του τριύδροξυκιναμωμικού οξέος και στη συνέχεια ενός μορίου νερού από το μόριο του κινικού οξέος.



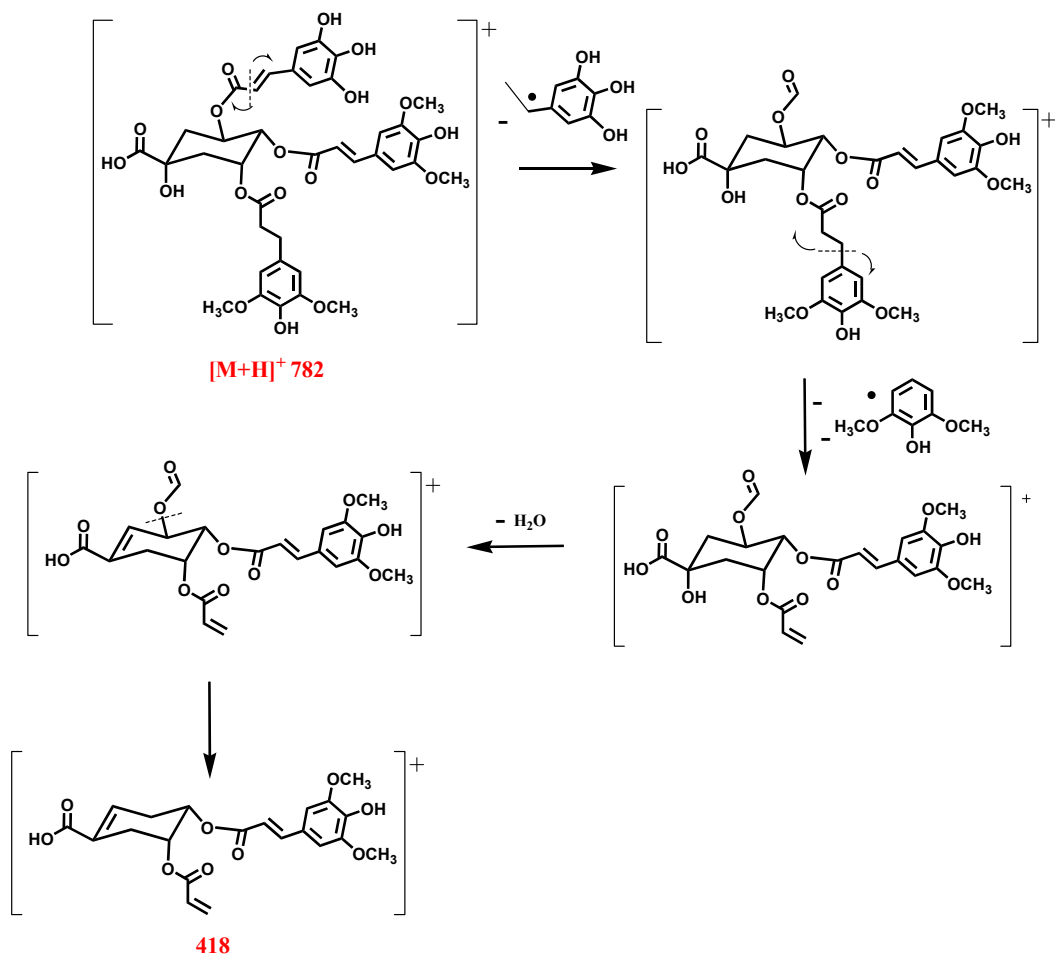
Το θραύσμα **515** προκύπτει μετά τη σταδιακή απομάκρυνση του τριύδροξυ κινναμωμικού οξέος , δυο μεθοξυ ομάδων και στη συνέχεια δυο υδροξυλίων από το μοριακό ιόν.



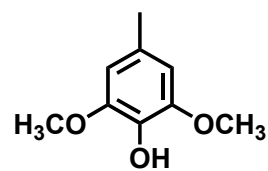
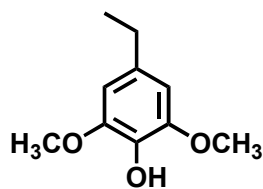
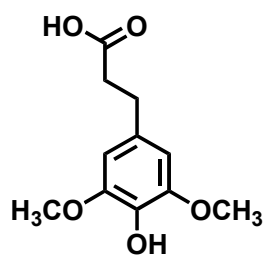
Το θραύσμα **524** προκύπτει από το μοριακό ιόν μετά την απομάκρυνση τμήματος του τριύδροξυ κινναμωμικού οξέος, δυο μεθοξυ ομάδων και στη συνέχεια δυο υδροξυλίων και τελική απόσπαση ενός μορίου νερού από το μόριο του κινικού οξέος.



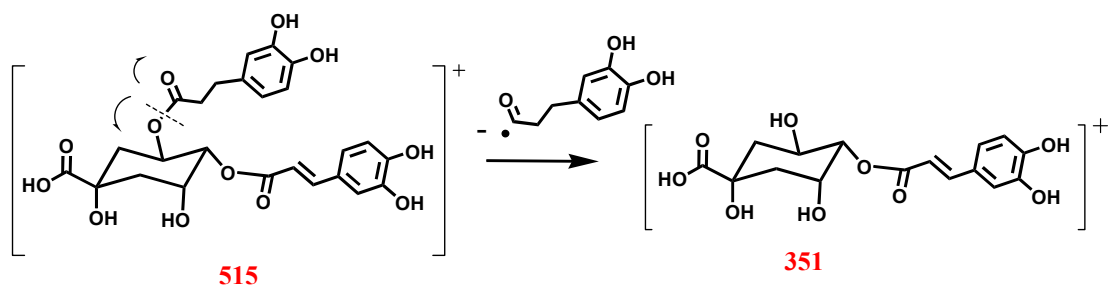
Το θραύσμα **418** προκύπτει αμέσως μετά την απομάκρυνση αρχικά της ομάδας του τριύδροξυ κινναμωμικού οξέος από το μοριακό ιόν, στη συνέχεια την απομάκρυνση του βενζολικού τμήματος της συναπόυλο ομάδας και τέλος την απομάκρυνση της καρβοξυλικής ομάδας από το μόριο του κινικού οξέος.



Επίσης μπορούν να προκύψουν και τα εξής μικρότερα θραύσματα είτε από το αρχικό μοριακό ιόν είτε από ενδιάμεσα στάδια:

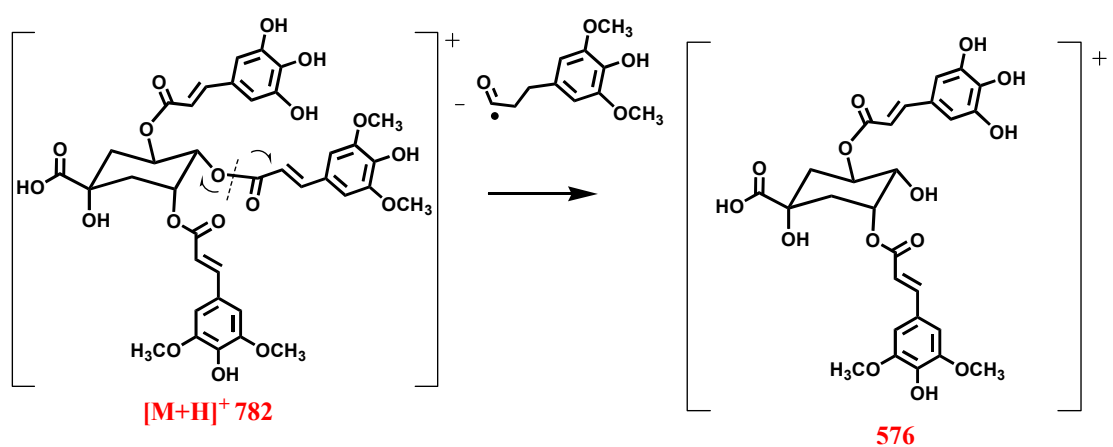


Καθώς και το **515** και το **351**

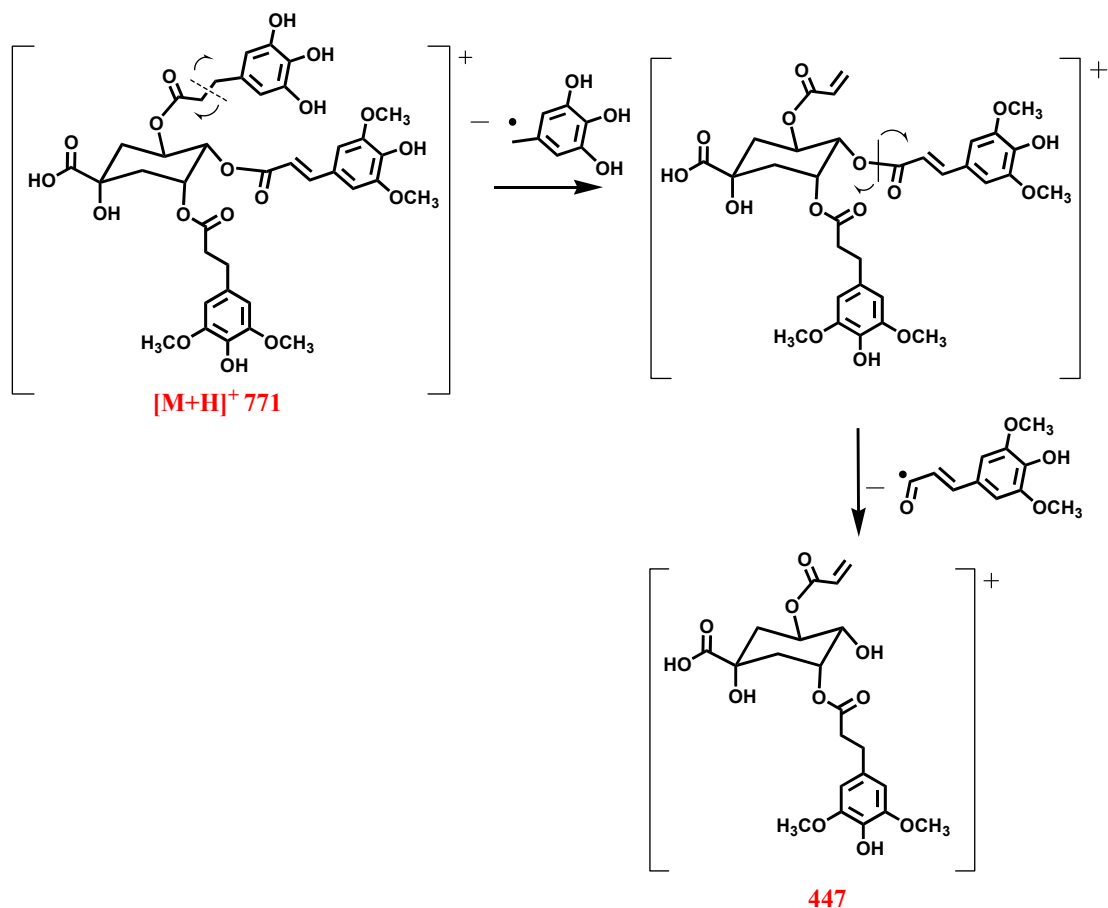


Στα 80 eV διακρίνονται τα εξής θραύσματα:

Το θραύσμα **576** που προκύπτει από το μοριακό ιόν με απόσπαση τμήματος της σιναπουλο ομάδας.



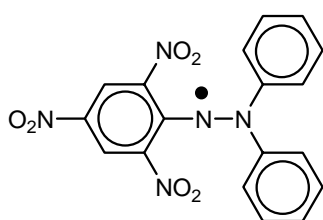
Το θραύσμα **447** προκύπτει από το μοριακό ιόν μετά την απόσπαση του βενζολικού τμήματος από το τριύδροξυ κινναμωμικό οξύ και ολόκληρης της συναπόυλο ομάδας.



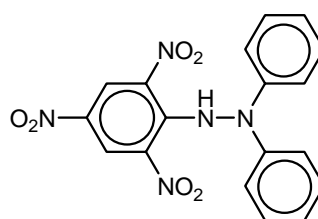
Μετά την απομάκρυνση της καρβοξυλικής ομάδας από το θραύσμα 447 προκύπτει το θραύσμα 407 το οποίο στη συνέχεια με την απομάκρυνση του τμήματος του τριύδροξυ κινναμωμικού οξέος που ήταν συνδεδεμένο με το κινικό οξύ και την απόσπαση δύο μορίων νερού από το μόριο του κινικού οξέος προκύπτει το θραύσμα 304.

5.6. Μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο του DPPH

Η μέθοδος για την μέτρηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων στηρίζεται στη χρήση της διφαινυλοπικρυλιδραζίνης (DPPH) που είναι μια από τις λίγες σταθερές ρίζες εμπορικά διαθέσιμες. Τα αντιοξειδωτικά που περιέχονται στο εκχύλισμα του φυτού δεσμεύουν αυτή τη σταθερή ρίζα με αποτέλεσμα το αρχικό διάλυμα κυανού χρώματος να αποχρωματίζεται. Η ελάττωση της απορρόφησης μετράται στα 515nm.

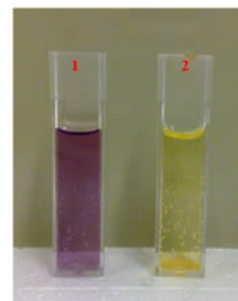
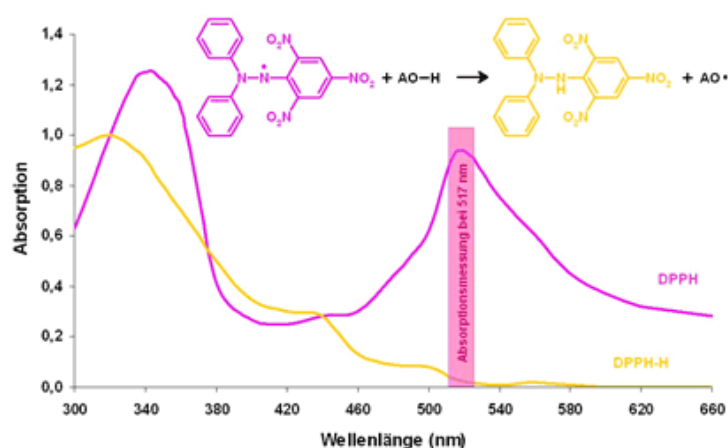


Διφαινυλοπικρυλιδραζύλιο



Διφαινυλοπικρυλιδραζίνη

Το διφαινυλοπικρυλιδραζύλιο είναι μια σταθερή ελεύθερη ρίζα λόγω του απεντοπισμού του μονήρους ζεύγους ηλεκτρονίου σε όλο το μόριο με αποτέλεσμα να μην διμερίζεται, όπως στην περίπτωση άλλων ριζών. Η ρίζα του DPPH[•] έχει βιολετί χρώμα λόγω του μονήρους e⁻ που εμφανίζει εκτεταμένη συζυγία. Όταν αντιδράσει με το άτομο του Ο ενός σαρωτή ελευθέρων ριζών ανάγεται προς την κίτρινη ένωση διφαινυλοπικρυλιδραζίνη.



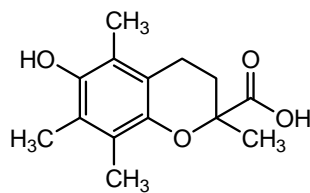
Η παράμετρος EC_{50} (efficient concentration value)

EC_{50} ονομάζεται η συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού που προκαλεί μείωση στην αρχική συγκέντρωση του DPPH κατά 50% και ορίζεται ως EC_{50} . Η αντιοξειδωτική ικανότητα ενός αντιοξειδωτικού (*Antiradical Efficiency, AE*) υπολογίζεται ως εξής: $AE=1/EC_{50}$ (Huang D et al., 2005). Το ποσοστό του DPPH που απομένει υπολογίζεται από τη σχέση: $\% DPPH_{rem} = 100 * [DPPH]_{rem}/[DPPH]_{rem}/[DPPH]_{T=0}$. Το $\% DPPH_{rem}$ είναι ανάλογο της συγκέντρωσης της αντιοξειδωτικής ουσίας.

Πειραματική διαδικασία

Για την μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων του φυτού παρασκευάστηκαν διαλύματα από το βουτανολικό, το αιθερικό κλάσμα, το κλάσμα του οξικού αιθυλεστέρα και του νερού σύμφωνα με τη παρακάτω διαδικασία:

1. Τα εκχυλίσματα της βουτανόλης, του οξικού αιθυλεστέρα, του αιθέρα και του νερού αραιώθηκαν με μεθανόλη. Έγιναν δοκιμές με διάφορες αραιώσεις ώστε να καταλήξουμε στις συγκεντρώσεις που έδιναν απορροφήσεις εντός των ορίων γραμμικότητας της καμπύλης αναφοράς.
2. Ακολούθησε ανάδευση με *Vortex* των διαλυμάτων.
3. Μέσα σε *Eppendorf* έγινε τοποθέτηση με πιπέτα ακριβείας 25 μl από τα αραιωμένα δείγματα. Ακολούθησε προσθήκη 975 μl DPPH 0,06 mM και ανάδευση στο *Vortex*.
4. Το δείγμα αφέθηκε να αντιδράσει για 30 min στο σκοτάδι.
5. Τοποθετήθηκαν τα δείγματα σε κυψελίδες και αμέσως ακολούθησε φωτομέτρηση στα 515 nm.
6. Παράλληλα κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς *Trolox* (ανάλογο της βιταμίνης E με ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH) και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ισοδύναμα *Trolox*.

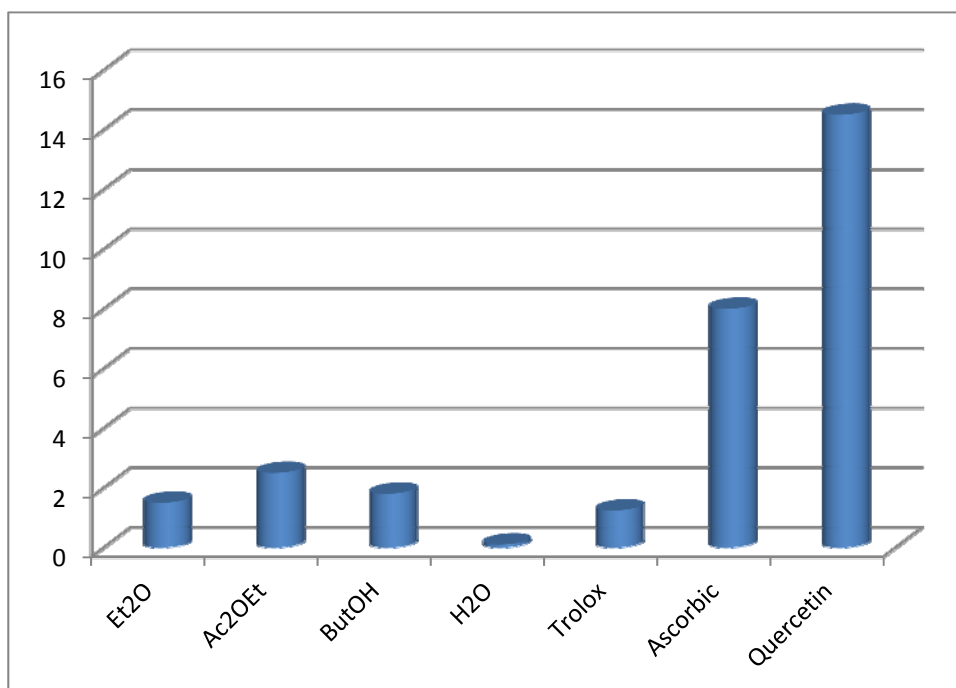


Trolox

Η μέτρηση των δεδομένων βασίστηκε στη μείωση της απορρόφησης των δειγμάτων κατά την αναγωγή του DPPH[•]. Το αντιδρών DPPH[•] υπολογίστηκε βάσει της συνάρτησης $A_{515\text{nm}} = 46,143x[\text{DPPH}^{\bullet} \times (\text{mg/ml εκχυλίσματος})] - 0,2914$ ($r^2 = 0,9978$). Το % ποσοστό του εναπομείναντος DPPH[•] μετά τη λήξη της αντίδρασης, υπολογίστηκε από τη σχέση : $\% \text{DPPH}^{\bullet}_{\text{rem}} = [\text{DPPH}^{\bullet}_{t=T}] / [\text{DPPH}^{\bullet}_{t=0}]$, όπου Tα είναι ο χρόνος για να ολοκληρωθεί η αντίδραση και να φτάσει σε πλατώ. Η ποσότητα του αντιοξειδωτικού (δείγματος) που απαιτείται για να μειώσει κατά το ήμισυ την αρχική συγκέντρωση του DPPH[•] αντιστοιχεί στο EC₅₀ του κάθε δείγματος. Η αντίστοιχη αντιοξειδωτική δύναμη εκφράζεται ως $AE=1/EC_{50}$ (*Antiradical Efficiency*). Παρακάτω παρουσιάζονται τα αριθμητικά αποτελέσματα των μετρήσεων καθώς και ένα ραβδόγραμμα για την καλύτερη σύγκριση των αντιοξειδωτικών ικανοτήτων των δειγμάτων του φυτού.

Σημείωση: Πριν εκτελεστεί η φωτομέτρηση έγινε μηδενισμός του φωτομέτρου με δυο τυφλά δείγματα. Στα τυφλά δείγματα τοποθετήθηκε μόνο μεθανόλη. Αφού μηδενίστηκε το φωτόμετρο, αφαιρέθηκε το μπροστινό τυφλό δείγμα και σε εκείνη τη θέση τοποθετήθηκε το δείγμα που έπρεπε να φωτομετρηθεί. Παράλληλα έγινε φωτομέτρηση του διαλύματος του DPPH[•] που χρησιμοποιήθηκε ως αντιδραστήριο των πειραμάτων.

Πειραματικά αποτελέσματα και συζήτηση



Διάγραμμα αντιοξειδωτική δύναμης των εκχυλισμάτων

Σύμφωνα με τη μέθοδο του DPPH η EC_{50} κυμάνθηκε από 0,4 μέχρι 10 mg ξηρού εκχυλίσματος / mg DPPH•. Η αντιοξειδωτική ικανότητα κάθε δείγματος (AE) ήταν με βάση την εξίσωση $AE=1/EC_{50}$ για το κλάσμα του διαιθυλαιθέρα $AE = 1,5$, για το κλάσμα του οξικού αιθυλεστέρα $AE= 2,5$, για το κλάσμα της βουτανόλης $AE= 1,8$ και του υδατικού εκχυλίσματος ήταν $AE=0,1$. Προκύπτει το συμπέρασμα ότι το κλάσμα του υδατικού εκχυλίσματος είχε την μικρότερη αντιοξειδωτική δράση ενώ το κλάσμα του οξικού αιθυλεστέρα είχε την μεγαλύτερη με αμέσως επόμενα τα κλάσματα της βουτανόλης και του διαιθυλαιθέρα. Όλα τα κλάσματα εκτός από εκείνο του υδατικού εκχυλίσματος είχαν αντιοξειδωτική ικανότητα μεγαλύτερη από το *Trolox* που χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπη ουσία αναφοράς. Ενώ εμφανίστηκε κατά πολύ μειωμένη η αντιοξειδωτική δράση όλων των εκχυλισμάτων σε σχέση με τα πρότυπα του ασκορβικού οξέος και της κερκετίνης. Συμπερασματικά προκύπτει ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα όλων των εκχυλισμάτων είναι χαμηλή σε σχέση με τα πρότυπα του ασκορβικού οξέος και της κερκετίνης.

Πίνακας 1

Αντιοξειδωτική ικανότητα όλων των εκχυλισμάτων

Κλάσμα	EC₅₀^A	sd EC₅₀	AE^B	EC₅₀^C Trolox	EC₅₀^D Κερκετίνης	EC₅₀^E Ασκορβικού οξέος
Διαιθυλαιθέρας	0,654	0,217	1,53	0,163	0,0063	0,109
Οξικός αιθυλεστέρας	0,394	0,245	2,54	0,466	0,238	0,31
Βουτανόλη	0,541	0,242	1,85	0,33	0,168	0,22
Νερό	7,143	1,568	0,14	0,016	0,008	0,01

Τα αποτελέσματα είναι \pm SD (n=3)

^A Efficient Concentration (mg αντιοξειδωτικού/ mg DPPH•): η ποσότητα του αντιοξειδωτικού που απαιτείται για να μειωθεί η αρχική συγκέντρωση του DPPH• κατά 50%

^B Antiradical efficiency: 1/EC₅₀

^C Trolox EC₅₀=0,096 mg Trolox/mg DPPH•

^D Κερκετίνη EC₅₀=0,096 mg Κερκετίνη/mg DPPH•

^E Ascorbic Acid EC₅₀=0,064mg Ascorbic Acid/ mg DPPH•

5.7. Μέτρηση της αναστολής της αναγωγής της αλδόξης και της αναγωγής της αλδεΐδης

5.7.1. Σακχαρώδης διαβήτης

Ο Σακχαρώδης διαβήτης είναι μια μεταβολική νόσος, η οποία χαρακτηρίζεται από αύξηση της συγκέντρωσης του σακχάρου στο αίμα (υπεργλυκαιμία) και διαταραχή του μεταβολισμού της γλυκόζης, είτε ως αποτέλεσμα ελαττωμένης έκκρισης ινσουλίνης είτε λόγω ελάττωσης της ευαισθησίας των κυττάρων- στόχων στην ινσουλίνη.

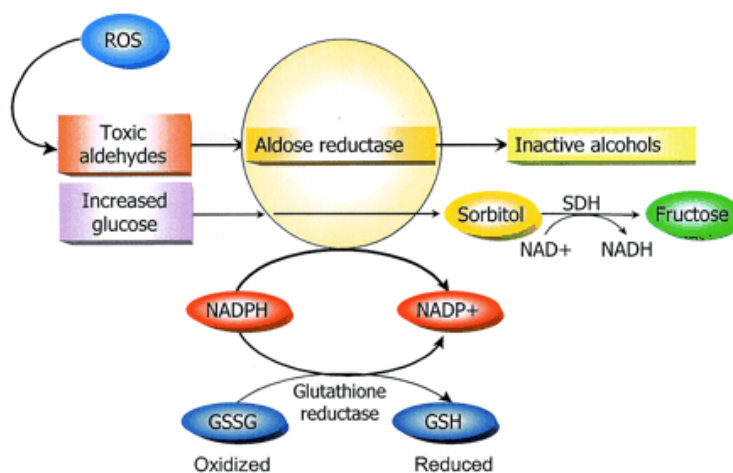
Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας αναγνωρίζει τρεις κύριους τύπους διαβήτη, τύπου I, τύπου II και διαβήτη της κήσης. Ο διαβήτης τύπου I (ινσουλινοεξαρτώμενος ή νεανικός διαβήτης), χαρακτηρίζεται από αυτοάνοση καταστροφή των β-κυττάρων του παγκρέατος, που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή ινσουλίνης, με αποτέλεσμα ολική έλλειψη ή ελάχιστη έκκριση ινσουλίνης. Ο τύπος αυτός αποτελεί την κυριότερη αιτία διαβήτη σε παιδιά, μπορεί όμως να προσβάλλει και τους ενήλικες. Υπολογίζεται ότι ποσοστό 5-10% του πληθυσμού πάσχει από διαβήτη τύπου I. Ο διαβήτης τύπου II (μη ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης), χαρακτηρίζεται από το συνδυασμό ελαττωμένης έκκρισης ινσουλίνης και ελαττωμένης ευαισθησίας των κυττάρων στη δράση της (φαινόμενο που ονομάζεται αντοχή στην ινσουλίνη). Στα πρώτα στάδια της νόσου, η ελαττωμένη ευαισθησία στη γλυκόζη είναι η κύρια διαταραχή, ενώ τα επίπεδα ινσουλίνης στο αίμα είναι αυξημένα. Ο ΣΔ II είναι η συχνότερη αιτία διαβήτη στους ενήλικες. Ο διαβήτης της κήσης είναι παρόμοιος με το ΣΔ II ως προς το ότι χαρακτηρίζεται από ταυτόχρονη ελαττωμένη έκκριση ινσουλίνης και ελαττωμένη ευαισθησία των κυττάρων. Εμφανίζεται κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης ([Diabetes care 2006](#)).

Πρόσφατη επιδημιολογική μελέτη για τον σακχαρώδη διαβήτη αναφέρει ότι το 2.8% (171 εκατομμύρια ασθενείς) του παγκόσμιου πληθυσμού έπασχε από τη νόσο το 2000 και το ποσοστό αυτό εκτιμάται πως θα φτάσει το 4,4% (366 εκατομμύρια ασθενείς) το 2030 ([Wild et al., 2004](#)) ([Alexiou et al., 2009](#)).

Ο διαβητικός ασθενής εκτός από τις οξείες επιπλοκές (διαβητική κετοοξείδωση και μη κετονική υπεροσμωτική κατάσταση) που σχετίζονται άμεσα με την έλλειψη

ινσουλίνης και τον αυξημένο κίνδυνο άνοιας, βρίσκεται αντιμέτωπος και με μακροπρόθεσμες επιπλοκές οι οποίες κατατάσσονται σε αγγειακές και σε μη αγγειακές. Οι αγγειακές επιπλοκές χωρίζονται σε *μικροαγγειακές* (μικροαγγειοπάθειες) όπως για παράδειγμα αμφιβληστροειδοπάθεια, νευροπάθεια και νεφροπάθεια και *μακροαγγειακές* (μακροαγγειοπάθειες) όπως στεφανιαία νόσος και περιφερική αγγειακή νόσος (Constantino et al., 1999). Σαν μη αγγειακές επιπλοκές αναφέρονται η καθυστερημένη κένωση στομάχου, οι δερματολογικές διαταραχές και η σεξουαλική δυσλειτουργία (Tripathi et al., 2006).

Ο συνδετικός κρίκος μεταξύ του διαβήτη και των μακροπροθέσμων επιπλοκών του είναι η υπεργλυκαιμία η οποία προκύπτει από την μη σωστή ρύθμιση της γλυκόζης (Rolo et al., 2006). Οι μηχανισμοί οι οποίοι εμπλέκονται στην παθογένεση των επιπλοκών του διαβήτη είναι η αυξημένη ροή της γλυκόζης διαμέσου της οδού των πολυολών με την μετατροπή τους σε σορβιτόλη, ο σχηματισμός τελικών προϊόντων γλυκοζυλίωσης των πρωτεϊνών (*advanced glycation end products, AGEs*), η ενεργοποίηση των κινασών των πρωτεϊνών επαγόμενων από την γλυκόζη και η παραγωγή ROS (Nishikawa et al., 2007), (De Vriese et al., 2000).

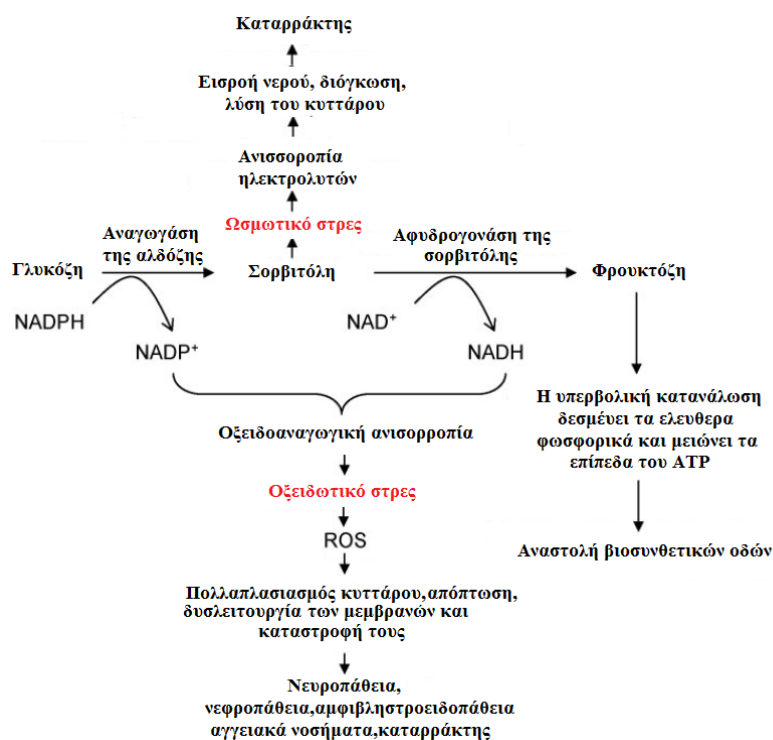


Η αυξημένη ροή της γλυκόζης μέσω της οδού των πολυολών προκαλεί καταστροφικές συνέπειες για τα κύτταρα όπως είναι α) το ωσμωτικό στρες, β) το οξειδωτικό στρες γ) το αναγωγικό στρες δ) το γλυκοζιτικό στρες και ε) το στρες των PKC:

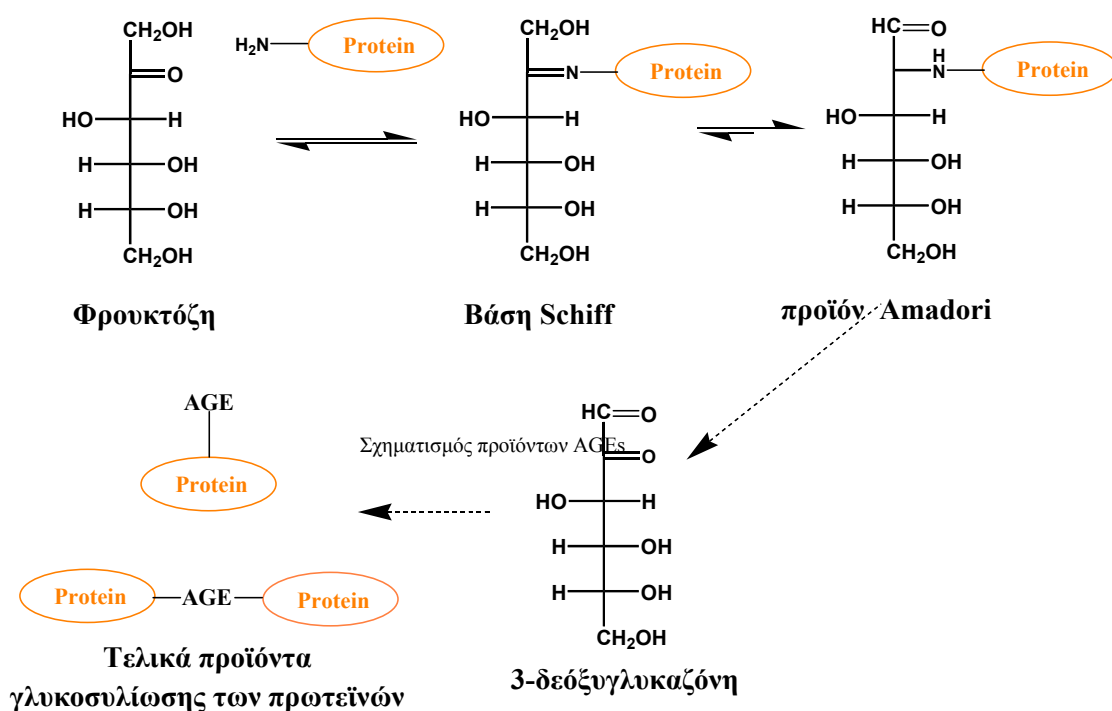
α) Το **ωσμωτικό στρες** προκαλείται από την ενδοκυττάρια αύξηση της σορβιτόλης, ένα υδρόφιλο μόριο που αδυνατεί να διέλθει από τις μεμβράνες του κυττάρου προκαλώντας ανισορροπία στα επίπεδα των ηλεκτρολυτών, είσοδο επιπλέον νερού στο κύτταρο, διόγκωση και λύση (Demopoulos et al., 2005), (Srivastava et al., 2005).

β) Το **οξειδωτικό στρες** πιστεύεται ότι προκαλείται από αξιοσημείωτη μείωση των επιπέδων του NADPH το οποίο χρησιμοποιείται από το κύτταρο σε βασικές μεταβολικές αναγωγικές διεργασίες όπως είναι για παράδειγμα το σύστημα της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (Vincent et al., 2004) που συμβάλλει στην εξουδετέρωση των ριζών του $O^{\cdot-}$. Η ικανότητα του κυττάρου να ανταπεξέλθει σε οξειδωτικά ερεθίσματα μειώνεται δραματικά. Το NADPH είναι ο συμπαράγοντας που χρησιμοποιείται στην καταλυτική αναγωγή της ALR2. Επιπλέον η συσσώρευση της σορβιτόλης και το σχετικό ωσμωτικό στρες μπορούν επίσης να οδηγήσουν σε οξειδωτικό στρες (Vincent et al., 2004).

γ) Το **αναγωγικό στρες** ή αλλιώς **ψευδοϋποξία** παρατηρείται λόγω της εξάντλησης των αποθεμάτων του NAD^+ κατά την οξείδωση της σορβιτόλης προς φρουκτόζη μέσω της SDH. Δηλαδή κατά την διάρκεια της υπεργλυκαιμίας η κατανάλωση του NADPH από την αναγωγή της αλδόζης κατά την μετατροπή της γλυκόζης σε σορβιτόλη και η κατανάλωση του NAD^+ κατά την οξείδωση της σορβιτόλης σε φρουκτόζη από το ένζυμο αφυδρογονάση της σορβιτόλης έχει ως αποτέλεσμα αρχικά την μείωση του κλάσματος $NADPH/NADP^+$ με αποτέλεσμα την εκδήλωση του **οξειδωτικού στρες** και στη συνέχεια την αύξηση του κλάσματος $NADH/NAD^+$ με αποτέλεσμα την εκδήλωση του **αναγωγικού στρες**.



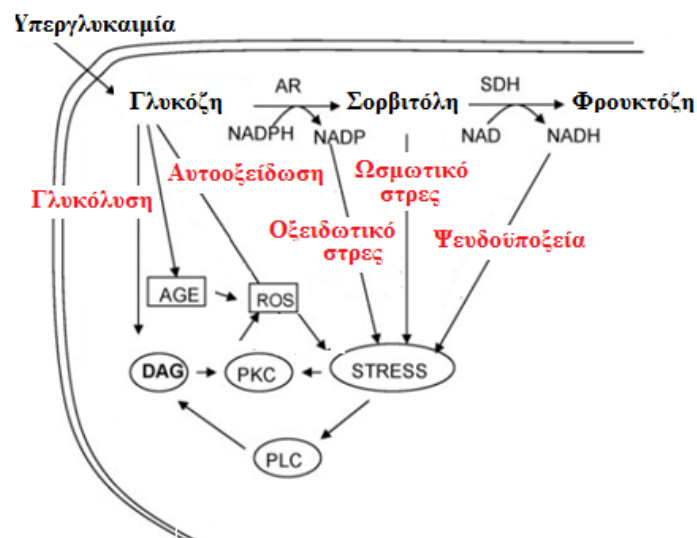
δ) Το *γλυκοζιτικό στρες* είναι μια διαδικασία η οποία σχετίζεται μερικώς με την είσοδο της γλυκόζης στην οδό των πολυολών. Η φρουκτόζη η οποία παράγεται μέσω της οδού των πολυολών μετατρέπεται μέσω της 3-φωσφοκινάσης σε 3-φωσφορική φρουκτόζη προκαλώντας έτσι τον σχηματισμό δικαρβονυλικών ενδιάμεσων όπως οι 3-δεοξυγλυκαζόνες (3-DG) από τις οποίες προκύπτουν τα τελικά προϊόντα γλυκοζυλίωσης των πρωτεϊνών (*advanced glycation end products AGEs*) (Yan et al., 2003). Επιπρόσθετα η φρουκτόζη λόγω της ιδιότητας να υιοθετεί την ανοιχτή διαμόρφωση, θεωρείται δραστικότερη της γλυκόζης με αποτέλεσμα να αντιδρά με ελεύθερες αμινομάδες πρωτεϊνών, οδηγώντας στη μη ενζυμική γλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών μέσω του σχηματισμού βάσεων του Schiff. Επιπρόσθετες ανακατατάξεις και στερεοχημικές μετατροπές οδηγούν σε αντιδράσεις Maillard από τις οποίες τελικά θα προκύψουν τα τελικά προϊόντα γλυκοζυλίωσης των πρωτεϊνών (Khalifah et al., 1999),(Vinson et al., 1996).



Ο σχηματισμός των τελευταίων προϊόντων και η αλληλεπίδρασή τους με ειδικούς AGE υποδοχείς της μεμβράνης προκαλεί την έναρξη της πορείας μεταγωγής σήματος (Vincent et al., 2004), λόγω της ενεργοποίησης πλειοτροπικών μεταγραφικών

παραγόντων όπως για παράδειγμα τον NF-kB με αποτέλεσμα την παραγωγή ROS και την έκφραση παθολογικών γονιδίων (Tripathi et al., 2006).

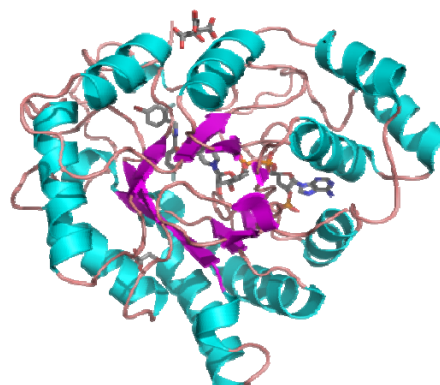
δ) Το στρες των PKC συνδέεται άμεσα με την παθογένεση των μακροπρόθεσμων επιπλοκών του διαβήτη. Το αυξημένο κλάσμα NADH:NAD⁺ λόγω της παρουσίας της SDH προκαλεί την αναγωγή της φωσφορικής διϋδροξυ-ακετόνης σε 3-φωσφορική γλυκερόλη η οποία είναι η πρόδρομος ένωση για την σύνθεση της διακυλογλυκερόλης (DAG) (Ramana et al., 2006). Τα αυξημένα επίπεδα της διακυλογλυκερόλης ενεργοποιούν διάφορες ισομορφές πρωτεϊνοκινασών (Ramana et al., 2004) με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των MAPKs κινασών οι οποίες με τη σειρά τους φωσφορυλιώνουν μεταγραφικούς παράγοντες οδηγώντας σε διαταραχή της γονιδιακής έκφρασης που μπορεί να οδηγήσει σε απόπτωση (Vincent et al., 2004).



Σύνοψη μηχανισμών πρόκλησης των διαφόρων ειδών στρες

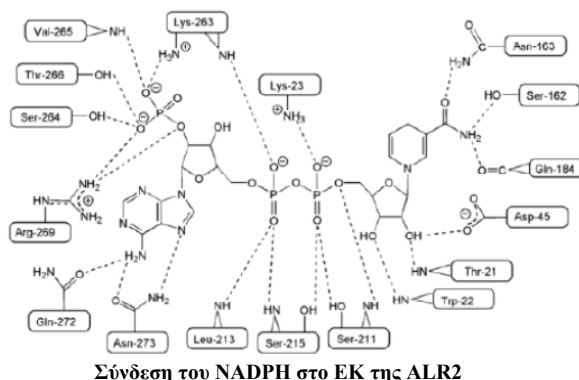
5.7.2. Αναγωγή της αλδόζης

Το ένζυμο αναγωγή της αλδόζης (*ALR2*) αποτελεί μέλος της οικογένειας των αλδο-κετο αναγωγασών (*aldo-keto reductases, AKRs*). Αποτελείται από 316 αμινοξέα (MB=36 KDa) και η πρωτοταγής της δομή προσδιορίστηκε για πρώτη φορά σε φακούς οφθαλμών βοοειδών (Schade et al., 1981) και επίμυων (Carper et al., 1988), (Nishimura et al., 1989).



Τεταρτοταγής δομή της αναγωγής της αλδόζης

Η τεταρτοταγής δομή της *ALR2* αποτελείται από ένα α/β πτυχωτό βαρέλι με πυρήνα 8 παράλληλων β -πτυχωτών ελασμάτων που συνδέονται με 8 περιφερειακά α-ελικοειδή τμήματα. Το ενεργό κέντρο του ενζύμου εντοπίζεται στο C-τελικό άκρο των β -πτυχωτών ελασμάτων (Borhani et al., 1992), (El-Kabbani et al., 1991), (Rondeau et al., 1992), (Wilson et al., 1992). Για την καταλυτική δράση της *ALR2* απαιτείται η παρουσία του συνενζύμου NADPH και συγκεκριμένα ο δακτύλιος του νικοτιναμιδίου ο οποίος συνδέεται στο κέντρο της κοιλότητας του ενεργού κέντρου. Η σύνδεση του NADPH πραγματοποιείται πριν την αλληλεπίδραση με το υπόστρωμα, το οποίο στην συνέχεια ανάγεται, και τελικά απελευθερώνεται το NADP^+ από το ενεργό κέντρο (Del Corso et al., 2008), (El-Kabbiani et al., 1998).

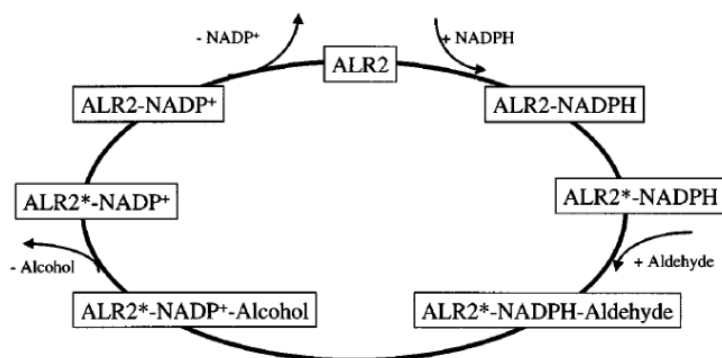


Σύνδεση του NADPH στο EK της ALR2

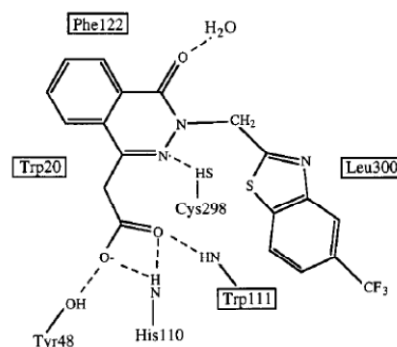
Η σύνδεση του NADPH επάγει μια πρώτη αλλαγή της διαμόρφωσης του ενζύμου η οποία συμβαίνει πριν από τη σύνδεση του υποστρώματος. Το NADPH συνδέεται στο καρβοξυτελικό άκρο του ενζύμου της εκτεταμένης διαμόρφωσης σχηματίζοντας συνολικά 19 δεσμούς

υδρογόνου και 3 γέφυρες άλατος με κατάλοιπα αμινοξέων σχηματίζοντας τη θέση πρόσδεσης του συμπαραγόνα. Στη συνέχεια η *ALR2* όπως η *ALR1*, μεταφέρει στερεοειδικά το 4-H του καταλοίπου της προλίνης της πολυπεπτιδικής αλυσίδας με τη μορφή ιόντος υδριδίου από τον C4 του δακτυλίου του νικοτιναμιδίου στον

καρβονυλικό άνθρακα του υποστρώματος. Το ενεργό κέντρο περιέχει το αμινοξύ τυροσίνη στη θέση 48 (Tyr48) ως δότη πρωτονίου κατά τη διάρκεια της αναγωγής της αλδεΐδης και το AA ιστιδίνη (His110), το οποίο είναι σημαντικό για τον προσανατολισμό του υποστρώματος. Μετά την αναγωγή της αλδεΐδης συμβαίνει μια δεύτερη αλλαγή στην διαμόρφωση του ενζύμου που σχετίζεται με την διάσταση του συμπλόκου ένζυμο-οξειδωμένο NADP⁺.



Ο καταλυτικός κύκλος της ALR2: Το ελεύθερο ένζυμο σε ένα πρώτο στάδιο προσδένει το NADPH, στη συνέχεια υφίσταται αλλαγή στη διαμόρφωση (ALR2-NADPH) → (ALR2*-NADPH). Το αλδεϊδικό υπόστρωμα προσδένεται στο ένζυμο σχηματίζοντας ένα τεταρτοταγές σύμπλοκο το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε αλκοολικό υπόστρωμα. Ακολουθεί η απελευθέρωση της αλκοόλης και το σύμπλοκο ενζύμου*-NADP⁺ οδηγείται σε αλλαγή της διαμόρφωσης (ALR2*-NADP⁺) → (ALR2-NADP⁺) που συνοδεύει την απελευθέρωση του NADP⁺.



Υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα κατάλοιπα των αμινοξέων της ALR2 και του Zopolrestat

Κρυσταλλογραφικές μελέτες του ενζύμου της ALR2, συμπλοκοποιημένου με τον αναστολέα Zopolrestat έδειξαν ότι ο τελευταίος συνδέεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου με την καρβοξυλική ομάδα να βρίσκεται κοντά στον C4 του νικοτιναμιδίου, σχηματίζοντας τρεις δεσμούς H με τα κατάλοιπα Tyr48, His110 και Trp111. Τα τελευταία κατάλοιπα σχηματίζουν ένα θετικά φορτισμένο σημείο πρόσδεσης με τον θετικά φορτισμένο δακτύλιο του νικοτιναμιδίου του οξειδωμένου συμπαραγόνα, το

οποίο αναγνωρίζει και προσδένει αρνητικά φορτισμένα μόρια αναστολέων όπως για παράδειγμα τα παράγωγα των καρβοξυλικών οξέων. Εκτός από τα πολικά κατάλοιπα Tyr48 και His110 το υπόλοιπο σημείο πρόσδεσης του συμπλόκου υποστρώματος-αναστολέα είναι εξαιρετικά υδρόφοβο αφού απαρτίζεται από κατάλοιπα Trp20, Trp79, Trp111, Phe122, Pro218, Trp219, Leu300 και Val47. Το Zopolrestat παρέχει έναν μεγάλο αριθμό υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων με τα πρωτεϊνικά κατάλοιπα κατά τον σχηματισμό του συμπλόκου με την ALR2.

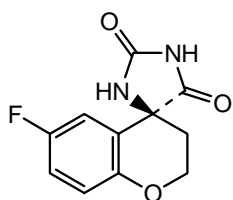
Η πρόσδεση του Zopolrestat προκαλεί μια αλλαγή στην διαμόρφωση του ενζύμου κοντά στο καρβοξυ- τελικό άκρο έτσι ώστε να προσδεθεί κατάλληλα ο αναστολέας. Ο βενζοθειαζολικός υποκαταστάτης του αναστολέα συνδέεται στην υδρόφοβη θήκη (στην οποία βρίσκονται τα κατάλοιπα της Trp111 και της Leu300) η οποία είναι κλειστή στην κρυσταλλική δομή του αποενζύμου και ανοίγει μετά από αλλαγή στη διαμόρφωση μιας θηλιάς που σχηματίζεται από τα κατάλοιπα 121-135 και μιας μικρής αλληλουχίας που αποτελείται από τα κατάλοιπα 298-303. Στην περίπτωση των φλαβονοειδών το 7-OH είναι απαραίτητο για την αναστολή της ALR2 λόγω σχηματισμού δεσμών H με τα κατάλοιπα Tyr48 και His110 (Constantino et al., 1999b). Η 2-βενζυλο υποκατάσταση λόγω της αρωματικής και λιπόφιλης φύσης καθώς και της ειδικής στερεοδιαμόρφωσης βρέθηκε να ταιριάζει στην υδρόφοβη θήκη του ενζύμου που περιέχει τα κατάλοιπα Trp111 και Leu300 (Urzumtzev et al., 1997). Το 4'-OH φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο διότι μπορεί να σχηματίσει δεσμό με το κατάλοιπο Thr113 (Rastelli et al., 2000).

5.7.3. Αναγωγή της αλδεΐδης

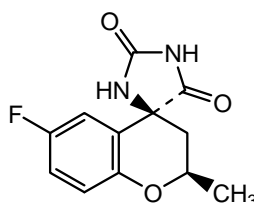
Στην ίδια οικογένεια των αλδο-κετο αναγωγασών ανήκει και η αναγωγή της αλδεΐδης η οποία είναι παρούσα σε όλους ιστούς και διαδραματίζει ρόλο αποτοξίνωσης του οργανισμού δεδομένου ότι παρουσιάζει εξειδίκευση για υποστρώματα τοξικών αλδεϋδών όπως 4-υδρόξυ-trans-2-ενεάλης (HNE), οι οποίες σχηματίζονται κατά την διάρκεια παθολογικών καταστάσεων που σχετίζονται με οξειδωτικό στρες, όπως η διαβητική υπεργλυκαιμία (Carper et al., 1989). Η ALR1 παρουσιάζει μεγαλύτερη συγγένεια για τις αρωματικές αλδεΐδες (El-Kabbani et al., 2007) παρά για τις αλειφατικές αλδεΐδες ενώ σύμφωνα με μία δημοσίευση ανάγει και τη γλυκόζη προς σορβιτόλη στο φλοιό των νεφρών (Sato 1992). Η δραστηριότητα αυτή της ALR1 φαίνεται πάντως να αποδυναμώνει την υπόθεση για εκλεκτικότητα των ARI στην αναγωγή της αλδόζης. Τα ένζυμα ALR1 και ALR2 εμφανίζουν σημαντική ομολογία (65% ομοιότητα όσον αφορά στη αλληλουχία των αμινοξέων) αλλά και στη τεταρτοταγή τους δομή (El-Kabbani et al., 1998)(Steuber et al., 2008). Και τα δύο ομόλογα ένζυμα παρουσιάζουν ένα α/β barrel μοτίβο, ενώ το ενεργό τους κέντρο αποτελείται από τρεις κοιλότητες (ανιονική, λιπόφιλη και κοιλότητα εκλεκτικότητας στο C-τελικό βρόχο του ενζύμου (Tete-Favier et al., 1997), στην κοιλότητα εκλεκτικότητας και στη επακόλουθη επαγωγίμη αλλαγή της διαμόρφωσης του ενεργού κέντρου, φαινόμενο που δεν παρατηρείται κατά την αλληλεπίδραση του προσδέματος με την ALR1.

5.7.4. Αναστολείς της αναγωγής της αλδόζης

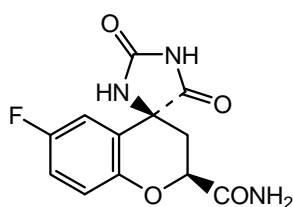
5.7.4.a. Παράγωγα της υδαντοΐνης, κυκλικά ιμίδια



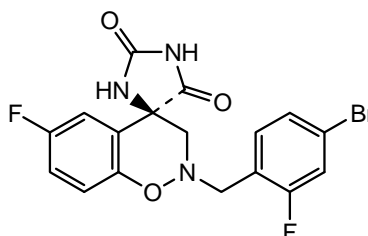
Sorbinil



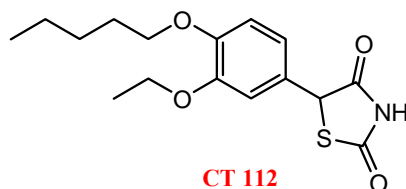
Methosorbiniil



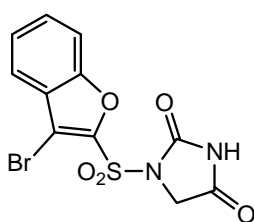
SNK 860



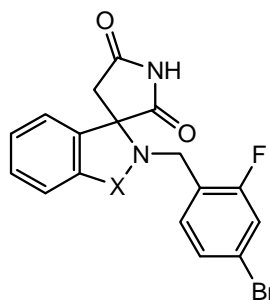
ARI 509



CT 112



M 16209



X = CO, SO₂

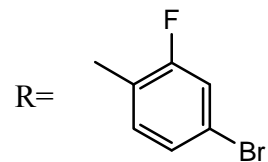
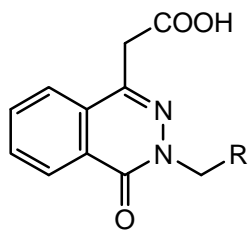
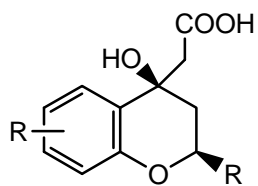
1

Μετά την ανακάλυψη του S(+) Sorbinil το 1978, ακολούθησε η σύνθεση διαφόρων παραγώγων με αυξημένη ισχύ. Δυστυχώς όμως οι *in vivo* μελέτες έδειξαν αντιδράσεις υπερευαισθησίας που οφείλονται πιθανά στον δακτύλιο της υδαντοΐνης. Η ανασταλτική δράση έναντι στην ALR2 οφείλεται στο εναντιομερές C-4S και στην

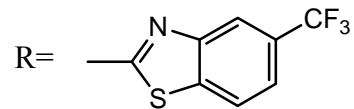
περίπτωση που υπάρχει υποκαταστάτης στη θέση 2 του δακτυλίου του χρωμανίου αυτός θα πρέπει να βρίσκεται σε θέση *cis* σε σχέση με τον δεσμό C-N του δακτυλίου της υδαντοΐνης όπως στην περίπτωση του αναστολέα *SNK 860* και *Methosorbiniol*. Το παράγωγο *SNK 860* αποδείχτηκε πως ήταν 10 φορές πιο ισχυρό από το *sorbiniol* (Mealy & Castaner 1996) και το *ARI 509* (Malamas et al., 1994a) το οποίο έδειξε *in vitro* εναντιοεκλεκτικότητα με το (+) εναντιομερές να είναι 100 φορές πιο ισχυρό από το (-) εναντιομερές, ενώ και τα δύο εναντιομερή παρουσίασαν την ίδια *in vivo* δραστηριότητα λόγω της ρακεμοποίησης που λαμβάνει χώρα (Malamas et al., 1994b). Ο λιπόφιλος χαρακτήρας αυτών των μορίων φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην αναστολή της συσσώρευσης των πολυολών στους φακούς των οφθαλμών των επίμυων, χωρίς όμως να μπορεί να ειπωθεί το ίδιο και για το ισχιακό νεύρο. Το *CT 112*, ένα 2,4 θειαζολιδινενδιονικό παράγωγο μπορεί να χαρακτηριστεί ως ένας δυ-ϊσοεστέρας της υδαντοΐνης. Το *M-16209* αποδείχτηκε ότι μπορεί να ελαττώσει την υπεργλυκαιμία σε επαγόμενο από στρεπτοζοτοσίνη διαβήτη σε ποντίκια προκαλώντας την έκκριση ινσουλίνης (Kato et al., 1991).

5.7.4.β. Παράγωγα του καρβοξυλικού οξέος

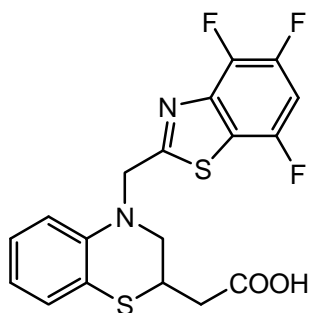
Στο παρόν στάδιο διάφορα παράγωγα καρβοξυλικών οξέων βρίσκονται υπό κλινικές μελέτες όπως για παράδειγμα το *AD5467*, το *Epalrestat*, το *WP921*, το *Zenarestat* και το *Zopolrestat* (Mealy & Castaner et al., 1996). Τα καλύτερα αποτελέσματα σημειώθηκαν με το *Zopolrestat* και άλλα ενεργά παράγωγα που χαρακτηρίζονται από την παρουσία του υποκαταστάτη του βενζοθειαζολίου. Τα ευρήματα αυτά οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι πρέπει να υπάρχει ένα σημείο πρόσδεσης στην ALR2 το οποίο έχει μεγάλη συγγένεια για το δακτύλιο του βενζοθειαζολίου (Mylari et al., 1992). Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώθηκε από την ανάλυση της κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου της ALR2 με το *Zopolrestat* (Wilson et al., 1993). Τα παράγωγα καρβοξυλικών οξέων παρουσιάζουν χαμηλή *in vivo* δραστηριότητα και χαμηλή σταθερά pKa που οφείλεται στην παρουσία της καρβοξυλικής ομάδας στο μόριο τους η οποία δίσταται σε φυσιολογικό pH με αποτέλεσμα να μην μπορούν να διέλθουν από τις κυτταρικές μεμβράνες.



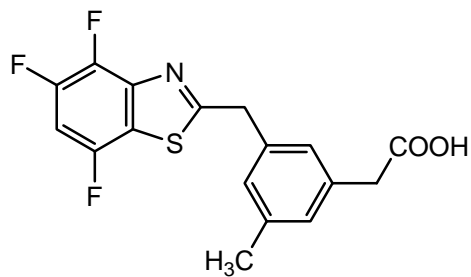
Ponalrestat



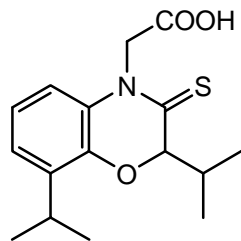
Zopolrestat



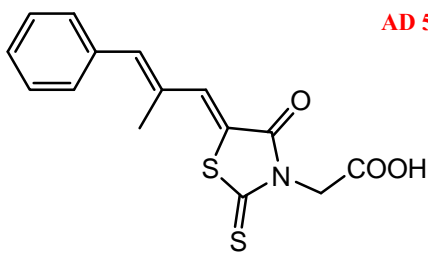
SG 210



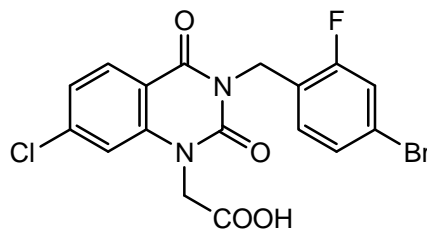
GP 1447



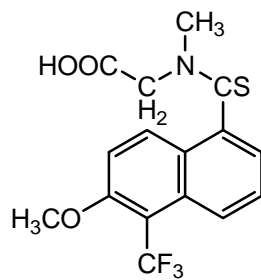
AD 5467



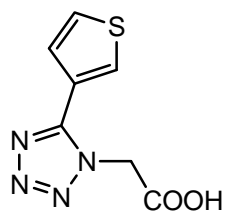
Epalrestat



Zenarestat



Tolrestat

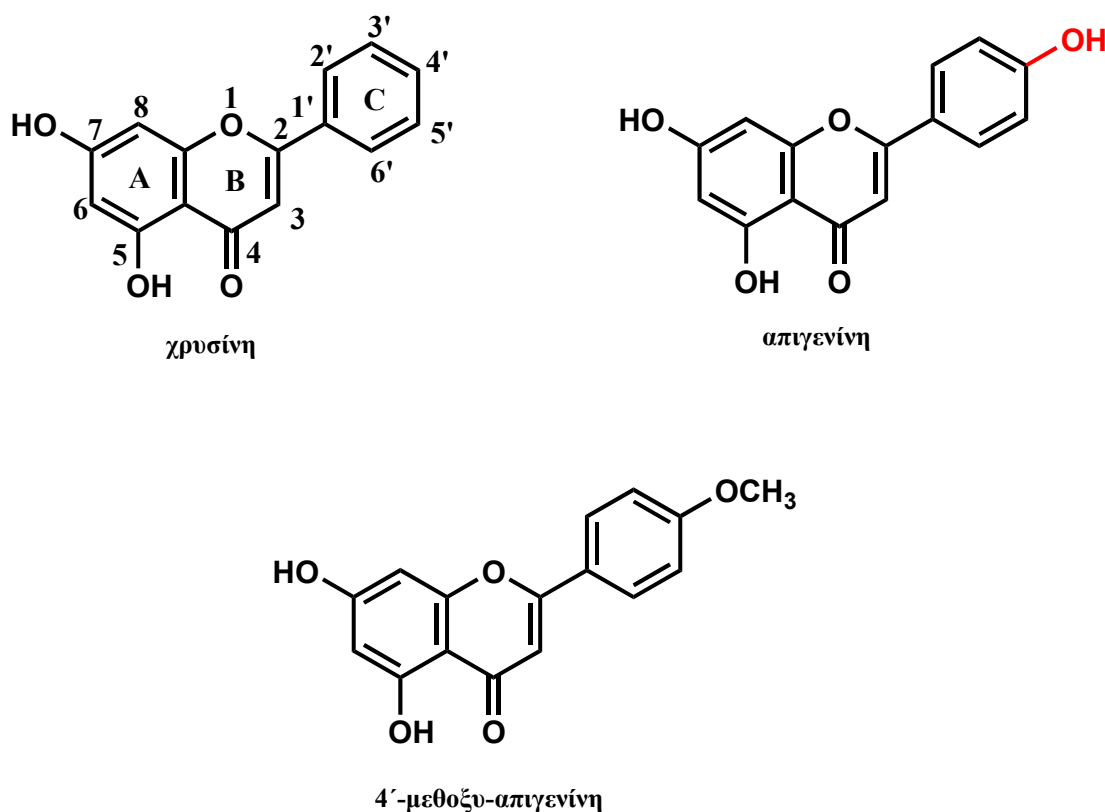


WP 921

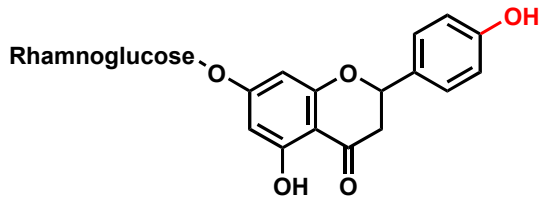
5.7.5. Αναστολείς της ALR2 που απομονώθηκαν από τη φύση

5.7.5.a. Φλαβονοειδή

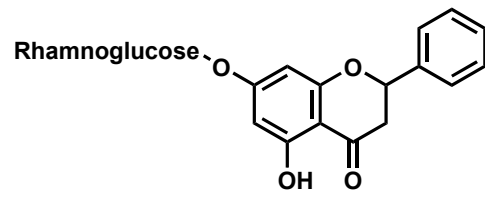
Το απλούστερο φλαβονοειδές που εξετάστηκε για την ικανότητά του να αναστείλει το ένζυμο της αναγωγάσης της αλδόζης ήταν η χρυσίνη. Η απιγενίνη φέρει ένα επιπλέον υδροξύλιο στη θέση την 4' στον δακτύλιο B γεγονός που σηματοδοτεί την αύξηση της ανασταλτικής δράσης. Όμως η μεθυλίωση αυτού του υδροξυλίου έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της ανασταλτικής δράσης στην περίπτωση της 4'-μεθοξυ-απιγενίνης.



Το ίδιο ισχύει στην περίπτωση της ναριγκίνης τον 7-O-ραμνογλυκοζίτη της 2,7,4'-τριυδροξυ-φλαβανόνης σε σχέση με τον σαρατονοζίτη (7-O-ραμνογλυκοζίτη της 5,7-διυδροξυ φλαβανόνης).

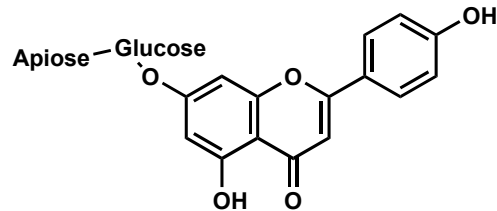


ναριγκίνη



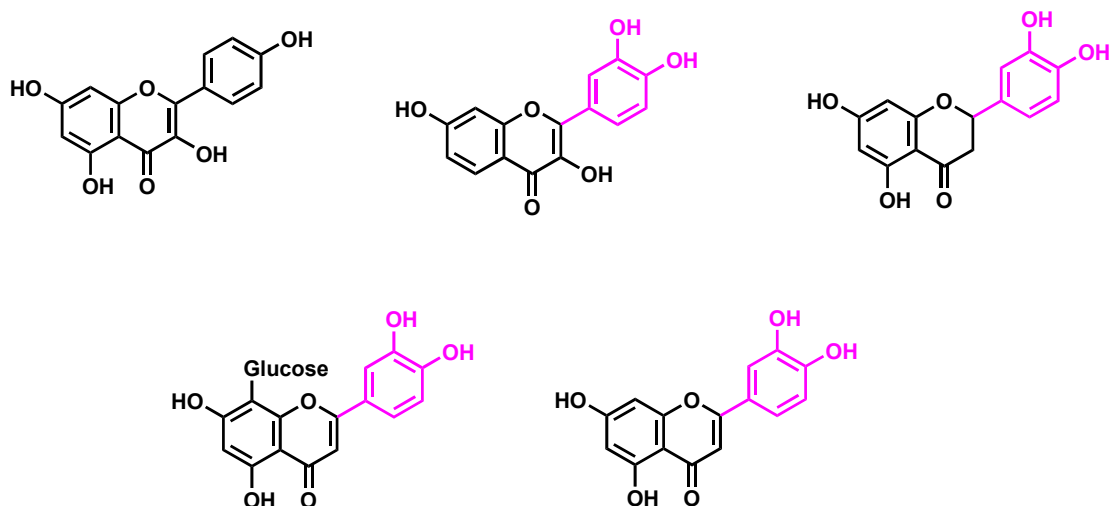
σαρατονοζίτης

Η γλυκοζυλίωση του 7-OH είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της δράσης, όπως φαίνεται στην περίπτωση της απίνης, τον 7-γλυκοζίτη της απιγενίνης ο οποίος είναι λιγότερο δραστήσιμος από την τελευταία.



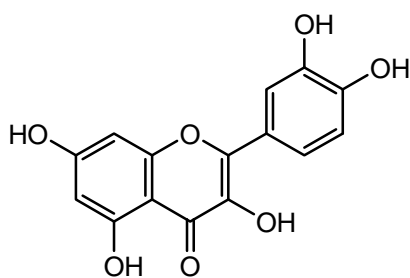
απίνη

Η φουσετίνη, η εριοδικτυόλη, η οριεντίνη και η λουτεολίνη είναι δραστηριότερες από την καιμφερόλη λόγω της παρουσίας της κατεχόλης στον δακτύλιο B η οποία οδηγεί στην βελτίωση της ανασταλτικής δράσης.

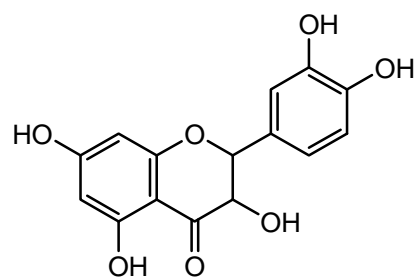


Η απώλεια του διπλού δεσμού μεταξύ του άνθρακα 2,3 οδηγεί σε απώλεια δράσης και αυτό φαίνεται στην περίπτωση της εριοδικτυόλης η οποία έχει λιγότερο ισχυρή δράση από την λουτεολίνη. Δεν μπορεί να εξαχθεί κάποιο συμπέρασμα για το τι επίδραση έχει η γλυκοζυλίωση στην ανασταλτική δράση του ενζύμου. Όμως από πειράματα έχει βγει το συμπέρασμα ότι η γλυκοζυλίωση του 3 υδροξυλίου και η C-γλυκοζυλίωση κυρίως του άνθρακα 8, δεν παίζουν κανένα ρόλο. Αυτό φαίνεται από το γεγονός ότι η δράση του 3-O-γλυκοζίτη της καιμφερόλης είναι παρόμοια με την δράση της καιμφερόλης, καθώς επίσης και του C-γλυκοζίτη της οριεντίνης είναι παρόμοια με αυτή της μη γλυκοζυλιωμένης λουτεολίνης.

Οι πιο αποτελεσματικοί αναστολείς της αναγωγής της αλδόξης είναι οι πενταϋδροξυ-φλαβόνες και όλα τα παράγωγα τους. Από τα άγλυκα η κερκετίνη βρέθηκε να είναι ο ισχυρότερος αναστολέας. Η φλαβανόνη της κερκετίνης (2,3-διϋδροκερκετίνη) ή αλλιώς ταξιφολίνη, ήταν λιγότερο δραστική από τη κερκετίνη, επιβεβαιώνοντας το γεγονός ότι η παρουσία του διπλού δεσμού μεταξύ των ατόμων άνθρακα 2,3 ισχυροποιεί την ανασταλτική δράση.

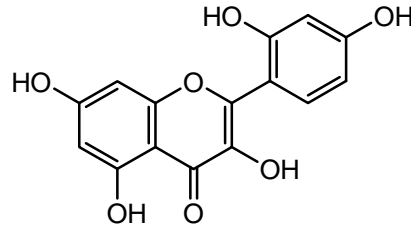


κερκετίνη



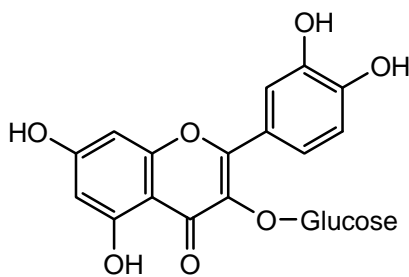
ταξιφολίνη

Όσον αφορά την δομή της κατεχόλης, και την θέση των υδροξυλίων πάνω στο δακτύλιο C, η μορίνη μια πενταϋδροξυ-φλαβόνη του τύπου της ρεσορκινόλης με τα δύο υδροξύλια σε θέση *μετα*, είναι κατά έναν μεγάλο βαθμό λιγότερο ισχυρή από την κερκετίνη όπου τα δύο υδροξύλια βρίσκονται σε θέση *ορθο* και μοιάζουν με το μόριο της κατεχόλης.

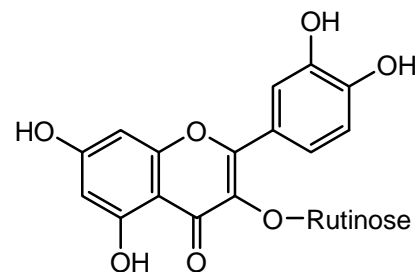


μορίνη

Εκτός από την παρουσία του διπλού δεσμού στην θέση 2,3 του B δακτυλίου και την σχετική θέση των υδροξυλίων στον δακτύλιο B, ένα άλλο σπουδαίο χαρακτηριστικό μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την ανασταλτική δράση και αυτό είναι η γλυκοζυλίωση. Σημαντική χαρακτηρίζεται όχι μόνο η θέση των υδροξυλίων που έχουν γλυκοζυλιωθεί, αλλά παίζει ρόλο και το είδος του σακχάρου. Η ρουτίνη (3-O-ρουτινοζίτης της κερκετίνης), στην οποία το 3-OH είναι γλυκοζυλιωμένο από τον δισακχαρίτη ρουτινόζη, ήταν κατά πολύ λιγότερο δραστική από το αντίστοιχο άγλυκο κερκετίνη. Από την άλλη πλευρά η ανασταλτική δράση της ισοκερσιτρίνης (3-O-γλυκοζίτης της κερκετίνης) και ο υπεροζίτης (3-O-γαλακτοζίτης της κερκετίνης) και οι γλυκοζίτες προερχόμενοι από τους μονοσακχαρίτες είχαν ανασταλτική δράση που δεν διέφερε σημαντικά από το μητρικό φλαβονοειδές.

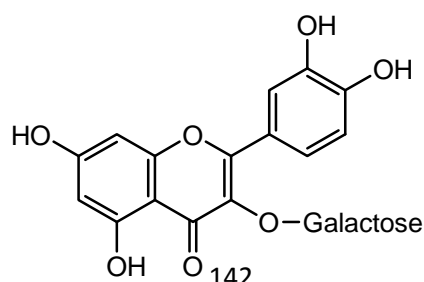


ισοκερσιτρίνη



ρουτίνη

υπεροζίτης



Τα συμπεράσματα που μπορούν να προκύψουν είναι τα εξής:

- ✘ Η παρουσία του καρβονυλίου στους αρωματικούς δακτυλίους δίνει την δυνατότητα σχηματισμού δεσμού υδρογόνου με τα κατάλοιπα της Tyr48 και της His110 στο ενεργό κέντρο του ενζύμου (Rastelli et al., 2002).
- ✘ Από την άλλη πλευρά η απουσία του υδροξυλίου στη θέση 4' μειώνει δραστικά την ανασταλτική δράση, και αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι υπάρχει αλληλεπίδραση με το κατάλοιπο της Thr113 όταν ο φαινολικός υποκαταστάτης βρίσκεται σωστή εφαρμογή μέσα στην υδρόφοβη θηλιά του ενεργού κέντρου του ενζύμου που σχηματίζεται από τα κατάλοιπα της Trp111 και της Leu300.
- ✘ Επίσης οι υδροξυ- και μεθοξυ- υποκαταστάτες στις θέσεις 5,6,7 και 8 παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανασταλτική δράση του ενζύμου.
- ✘ Όσον αφορά τις φλαβόνες, οι 2,3',4'-διυδροξυφλαβόνη, η 3',4',7-τριυδροξυφλαβόνη, η λουτεολίνη και ο 7-O-β-D-γλυκοκυρανοζίτης της λουτεολίνης είναι οι πιο ισχυροί αναστολείς της αναγωγής της αλδόζης.
- ✘ Η δράση των φλαβονών που δεν έχουν το 5-OH είναι παρόμοια με τη δράση των 5-OH φλαβονών. Για παράδειγμα η 7-υδροξυφλαβόνη έχει παρόμοια δράση με την χρυσίνη και η 4',7-διυδροξυφλαβόνη έχει παρόμοια δράση με την απιγενίνη.
- ✘ Η δράση των 7-O-γλυκοζυλο- φλαβονών είναι ασθενέστερη από τα άγλυκα. Για παράδειγμα ο 7-O-β-D-γλυκοκυρανοζίτης της απιγενίνης είναι λιγότερο δραστικός από την απιγενίνη και ο 7-O-β-D-γλυκοκυρανοζίτης της διοσμετίνης είναι λιγότερο δραστικός από την διοσμετίνη.
- ✘ Η ανασταλτική δράση των φλαβονών με δακτύλιο κατεχόλης στον Β δακτύλιο είναι ισχυρότερη από τα μονοϋδροξυλιωμένα παράγωγα, τα μονο ή διμεθυλιωμένα παράγωγα. Απαραίτητα στοιχεία για δράση των φλαβονών και των φλαβονολών είναι τα ακόλουθα: 1) ο Β δακτύλιος πρέπει να έχει τη δομή κατεχόλης 2) ο διπλός δεσμός 2-3 ενισχύει την δράση 3) οι ισοφλαβόνες και οι κατεχίνες εμφανίζουν λιγότερο ισχυρή ανασταλτική δράση από τις φλαβόνες 4) το OH στη θέση 5 δεν επηρεάζει την δραστικότητα 5) η 3-υδροξυλίωση και η 7-O-γλυκοζυλίωση μειώνουν τη δράση.

- ✦ οι φλαβόνες και οι φλαβονόλες που έχουν τον δακτύλιο της κατεχόλης εμφανίζουν ισχυρότερη δράση από αυτές που έχουν την δομή της πυρογαλλόλης (Matsuda et al., 2002).

5.7.5.β. Υδροξυκινναμωμικά οξέα

Τα απλά υδροξυκινναμωμικά οξέα έχουν ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι της αναγωγής της αλδεΐδης ALD2. Το φερουλικό οξύ έχει ασθενή ανασταλτική δράση έναντι της αλδόξης ALD1 (Yawadio et al., 2007) ενώ οι εστέρες του υδροξυκινναμωμικού οξέος έχουν ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι της αναγωγής της αλδεΐδης. Το σαλβιανολικό οξύ A και K το λιθοσπερμικό οξύ B και το και το ροσμαρινικό οξύ αναφέρεται ότι έχουν καλή ανασταλτική δράση έναντι της αναγωγής της αλδεΐδης ALD2 (Koukoulitsa et al., 2006; Du et al., 1995; Kasimou et al., 1998). Το χλωρογενικό οξύ (5-O-καφεύλο κινικό οξύ) και το 3,5-δικαφεύλο κινικό οξύ έδειξαν ανασταλτική δράση (Varma et al., 1976; Ravn et al., 1990; Terashima et al.;1990). Ένας από τους ισχυρότερους αναστολείς της αναγωγής της αλδεΐδης ALD2 ήταν το 4,5- δικαφεύλο κινικό οξύ (Logendra et al., 2006).

5.7.6. Έλεγχος αναστολής του ενζύμου αναγωγή της αλδόζης

Σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται από (Nikolaou & Demopoulos 2003) και (Nikolaou et al., 2004), παρασκευάζονται τα εξής διαλύματα:

- **Διάλυμα φωσφορικών 0,067M pH = 6,2**
 - Ζυγίστηκαν 0,947g άνυδρο Na_2HPO_4 (MW=141,98) ή 1,187g ένυδρο Na_2HPO_4 (MW=177,98), ακολούθησε αραιώση σε 100 ml H_2O και από αυτά ελήφθησαν 18,5 ml
 - Ζυγίστηκαν 0,908g άνυδρο KH_2PO_4 (MW=136,09), ακολούθησε αραιώση σε 100 ml H_2O και από αυτά ελήφθησαν 81,5 ml
- **Διάλυμα NADPH 0,104 mM (τετρανατριούχο άλας, MW=833,4)**
 - Διαλύθηκαν 6,91 mg NADPH σε 2,5ml buffer. Το διάλυμα έγινε την ημέρα του πειράματος και διατηρήθηκε σε πάγο.
- **Διάλυμα DL-γλυκερναλδεύδης 10 mM (MW=90,08)**
 - Διαλύθηκαν 49,54mg DL-γλυκερναλδεύδης σε 5ml buffer. Το διάλυμα έγινε την ημέρα του πειράματος και διατηρήθηκε σε πάγο.
- **Κορεσμένο διάλυμα $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$**
 - Αναδεύτηκαν 43,5g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ σε 56,5ml H_2O για τουλάχιστον 6h
- **Διάλυμα NaHCO_3 0,2M (MW=84,01)**
 - Διαλύθηκαν 1,68g NaHCO_3 σε 100ml H_2O
- **Διάλυμα της υπό εξέτασης ουσίας**
 - Για συγκέντρωση 10^{-4} M ζυγίστηκαν σε mg $3,19 \times 10^{-3} \times \text{MW}$ και διαλύθηκαν σε 1ml 0,2M NaHCO_3 ή 1ml 10% υδατικό διάλυμα DMSO (0,1ml DMSO + 0,9ml H_2O).
 - Για μίγματα εκχυλισμάτων φυτών με τελική περιεκτικότητα 50μg/ml ο όγκος που χρειάζεται είναι $V = x \cdot 10^3 / 1595$ όπου x=βάρος του μίγματος σε mg και V=όγκος του 10% υδατικού διαλύματος DMSO σε ml.

Προετοιμασία του ενζύμου της αναγωγάσης της αλδόζης

- ❖ Ομογενοποιήθηκαν 10 φακοί οφθαλμών επίμυων σε 5ml H₂O και ακολούθησε ψύξη.
- ❖ Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 10000 rpm/min στους 0°C
- ❖ Παραλήφθηκε το υπερκείμενο και αναμείχθηκε με το κορεσμένο διάλυμα (NH₄)₂SO₄ [αναλογία 4,5ml υπερκείμενο/ 3ml κορεσμένο διάλυμα (NH₄)₂SO₄]
- ❖ Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 10000 rpm/ min στους 0°C
- ❖ Ελήφθη το υπερκείμενο και διατηρήθηκε στους -80 °C για 24h.

Πείραμα με control

Έγινε ανάμειξη των εξής διαλυμάτων:

- Buffer 2,4 ml
- NADPH 100μl
- Ένζυμο 300μl
- Διάλυμα NaHCO₃ ή 10% DMSO 100μl

Ακολούθησε ανάμειξη 1ml από το παραπάνω μίγμα με 100μl buffer στην κυβελίδα αναφοράς και μηδενίστηκε το φασματοφωτόμετρο. Αμέσως μετά 1ml από το παραπάνω μίγμα αναμείχθηκε με 100μl DL-γλυκεραλδεύδης στην κυβελίδα μέτρησης και καταγράφηκε η έναρξη του χρόνου. Αφέθηκε το σύστημα να ισορροπήσει για 1min στους 30° C και ακολούθησε μέτρηση στα 340nm για 5' ανά 30''. Η ταχύτητα της αντίδρασης πρέπει να είναι περίπου 0,020μον/ λεπτό ή 0,010μον/ λεπτό.

Πείραμα με αναστολέα

Έγινε ανάμειξη των εξής διαλυμάτων:

- Buffer 2,4ml
- NADPH 100μl
- Ένζυμο 300μl
- Ουσία 100μl ή 90μl H₂O + 10μl ουσία σε DMSO

Ακολούθησε ανάμειξη 1ml από το παραπάνω μίγμα με 100μl buffer στην κυψελίδα αναφοράς και μηδενίστηκε το φασματοφωτόμετρο. Αμέσως μετά 1ml από το παραπάνω μίγμα αναμείχθηκε με 100μl DL-γλυκεραλδεύδης στην κυψελίδα μέτρησης και καταγράφηκε η έναρξη του χρόνου. Αφέθηκε το σύστημα να ισορροπήσει για 1min στους 30° C και ακολούθησε μέτρηση στα 340nm για 5' ανά 30''. Η ταχύτητα της αντίδρασης πρέπει να είναι περίπου 0,020μον/ λεπτό ή 0,010μον/ λεπτό.

Καταγράφηκε τελικά η % αναστολή του ενζύμου από τη σχέση:

$$\% \text{ αναστολή} = \frac{\text{ταχύτητα με control} - \text{ταχύτητα με αναστολέα}}{\text{ταχύτητα με control}} \times 100$$

Επειδή πρόκειται για μίγματα ουσιών και όχι για καθαρές ουσίες, τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ανασταλτικές δράσεις και αντιστοιχούν στο μέσο όρο τρεις διαφορετικές μετρήσεις με τυπική απόκλιση (SD)<10%. Η σορβινίλη θεωρήθηκε ως control με ικανότητα αναστολής του ενζύμου της αναγωγής της αλδόζης 45% σε συγκέντρωση 0,25Μμ (59μg/ml). Οι αναφερόμενες στην βιβλιογραφία τιμές για το IC₅₀ της σορβινίλης κυμαίνονται από 0,07 έως 0,9μM ([Zaher et al., 2002](#)).

5.7.7. Έλεγχος αναστολής του ενζύμου αναγωγή της αλδεΐδης

Σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται από (Nikolaou & Demopoulos 2003) και (Nikolaou et al., 2004), παρασκευάζονται τα εξής διαλύματα:

➤ **Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0,1 M pH =7,2**

Ζυγίστηκαν 3,402g άνυδρο KH_2PO_4 (MW=136,4), αραιώθηκαν σε 250 ml H_2O ml και 1 g NaOH (MW=39,99) τα οποία αραιώθηκαν σε 250ml H_2O . Τα 250 ml από το διάλυμα KH_2PO_4 0,1M και τα 174,5 ml 0,1M NaOH αραιώθηκαν ως τα 500 ml με νερό.

➤ **Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10mM pH =7,2**

Σε 50ml από το ρυθμιστικό διάλυμα 0,1M προστέθηκαν 450 ml H_2O .

➤ **Ρυθμιστικό διάλυμα S (10mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών + 2mM EDTA + 2mM 2-ME)**

Ζυγίστηκαν 202,2mg EDTA (δικάλιο άλας-MW=404,47) και 35,1 μl 2-ME (MW=78,13 , d=1,114 g/ml) και διαλύθηκαν σε 10 MW φωσφορικών pH =7,2.

➤ **Ρυθμιστικό διάλυμα S + σουκρόζη (10mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών + 0,25M σουκρόζη + 2mM EDTA + 2mM 2-ME)**

Ζυγίστηκαν 8,56g σουκρόζη (MW=342,3) και 80,9 mg EDTA (δικάλιο άλας-MW=404,47) και 17,5μl 2-ME (MW=78,13, d=1,114g/ml) και διέλυσε τα σε 100ml 10mM ρυθμιστικό διάλυμα φωφορικών pH =7,2.

➤ **Διάλυμα NADPH 3,6mM**

Διαλύθηκαν 7,5mg τετρανατριούχου άλατος MW=833,4 σε 2,5ml ρυθμιστικού. Το διάλυμα έγινε την ημέρα του πειράματος και διατηρήθηκε σε πάγο.

➤ **Διάλυμα γλυκουρονικού Na 600mM**

Διαλύθηκαν 140,5mg γλυκουρονικού Na (MW=234,14) 1ml ρυθμιστικό. Το διάλυμα έγινε την ημέρα του πειράματος και διατηρήθηκε σε πάγο.

➤ **Κορεσμένο διάλυμα $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$**

Αναδεύτηκαν 43,5g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ σε 56,5ml H_2O για τουλάχιστο 6h.

➤ **Διάλυμα NHCO_3 0,2M (MW=84,01)**

Διαλύθηκαν 1,68g NHCO_3 σε 100ml H_2O

➤ **Διάλυμα της υπό εξέτασης ουσίας**

Τα μίγματα εκχυλισμάτων φυτών με τελική περιεκτικότητα 50μg/ml

Προετοιμασία του ενζύμου της αναγωγής της αλδεΐδης

- Οι νεφροί λαμβάνονται από αρουραίους του ίδιου φύλου και περίπου 250g ώστε να μην είναι πολύ μεγάλοι σε ηλικία.
- Ζυγίστηκαν οι νεφροί και προστέθηκαν στο το διάλυμα S-buffer+σουκρόζη.
- Ομογενοποιήθηκαν για 1 λεπτό και η διαδικασία πραγματοποιείται με ενδιάμεση ψύξη.
- Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 10000rpm/20 min στους 0-4°C.
- Το υπερκείμενο παραλήφθηκε και αναμείχθηκε σιγά σιγά με ψυχρό κορεσμένο διάλυμα $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ [αναλογία 4,5 ml υπερκείμενο/3 ml κορεσμένο διάλυμα $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$] για την επίτευξη κορεσμού σε ποσοστό 40% και αφέθηκε σε ηρεμία για 15' και πάντα σε πάγο. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 10000rpm/20 min στους 0-4°C
- Το υπερκείμενο και αναμείχθηκε σιγά σιγά με ψυχρό κορεσμένο διάλυμα $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ για την επίτευξη κορεσμού σε ποσοστό 50% και αφέθηκε σε ηρεμία για 15' και σε πάγο.
- Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 10000rpm/20 min στους 0-4°C.
- Παραλήφθηκε το υπερκείμενο και αναμείχθηκε σιγά σιγά με ψυχρό κορεσμένο διάλυμα $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ για την επίτευξη κορεσμού σε ποσοστό 75 και αφέθηκε σε ηρεμία για 15' και σε πάγο.
- Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 10000rpm/20 min στους 0-4°C
- Έγινε απόχυση του υπερκείμενου και τα σωληνάκια αφέθηκαν με κλίση 45° ώστε να φύγει η υγρασία. Μετά από λίγο ζυγίστηκε και βρέθηκε το βάρος του pellet μετά από αφαίρεση του αρχικού βάρους τους.

- Ακολούθησε επαναδιαλύσ το pellet στην κατάλληλη ποσότητα S-buffer ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση του ενζύμου περίπου 20mg/ml.
- Προστέθηκε DEAE-52 resin [330mg/10ml] και αναδεύτηκε (σε ποτήρι ζέσης μέχρι να διαλυθούν οι κρύσταλλοι του DEAE-52). Προέκυψε αιώρημα το οποίο αφέθηκε σε ηρεμία για 15' με περιστασιακή ανάδευση .
- Ακολούθησε εκ νέου φυγοκέντρηση στις 10000rpm/20 min στους 0-4°C
- Παρελήφθη υπερκείμενο και διατηρήθηκε στους -80°C για το πολύ 1 μήνα.

Η καταλυόμενη από το ένζυμο αντίδραση αρχίζει με την προσθήκη του υποστρώματος και παρακολουθείται για χρονικό διάστημα 5 λεπτών, αφού έχει προηγηθεί η ισορροπία της αντίδρασης για 1 λεπτό. Η αναστολή ορίστηκε με παρόμοιο τρόπο όπως και στο πείραμα της αναγωγής της αλδόζης.

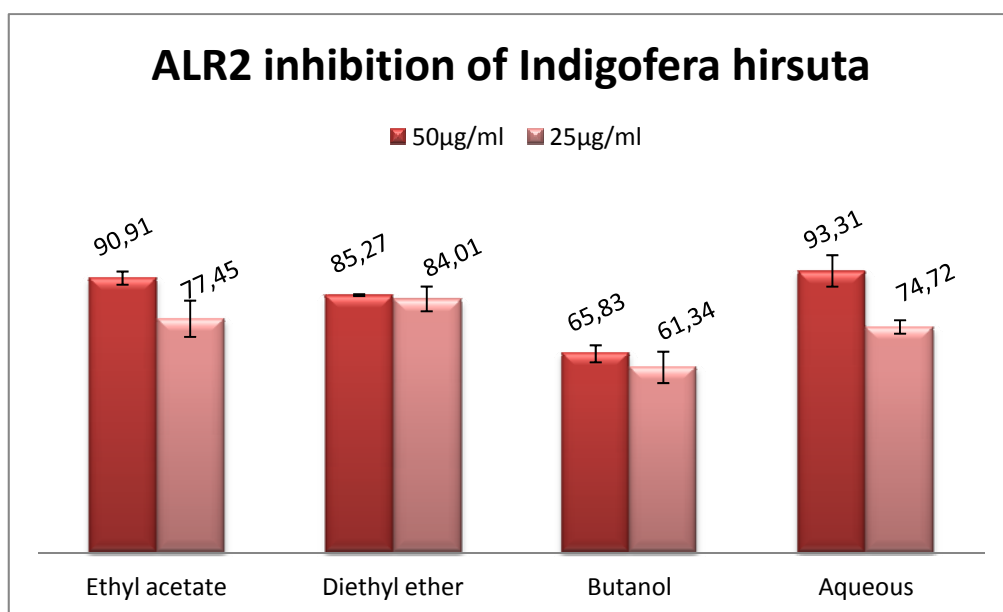
Καταγράφηκε τελικά η % αναστολή του ενζύμου από τη σχέση:

$$\% \text{ αναστολή} = \frac{\text{ταχύτητα με control} - \text{ταχύτητα με αναστολέα}}{\text{ταχύτητα με control}} \times 100$$

Αποτελέσματα και συζήτηση

Τα κλάσματα που εμφάνισαν την υψηλότερη ικανότητα αναστολής της ALR2 είναι του οξικού αιθυλεστέρα, του διαιθυλαιθέρα και του υδατικού εκχυλίσματος, η οποία κυμαίνεται από 85% έως 93% σε τελική συγκέντρωση 50μg/ml και από 75% έως 84% σε τελική συγκέντρωση 25 μg/ml. Τη μικρότερη ανασταλτική δράση εμφάνισε το κλάσμα της βουτανόλης με αναστολή 66% σε τελική συγκέντρωση 50μg/ml και 61% σε τελική συγκέντρωση 25μg/ml η οποία και στις δύο περιπτώσεις ήταν πάνω από 50%.

Indigofera hirsuta		ALR2 % inhibition			
		50µg/ml	St.Dev.	25µg/ml	St.Dev.
1	Ethyl acetate	90,91	2,20	77,45	6,01
3	Diethyl ether	85,27	0,32	84,01	4,09
4	Butanol	65,83	2,82	61,34	5,20
6	Aqueous	93,31	5,21	74,72	2,23

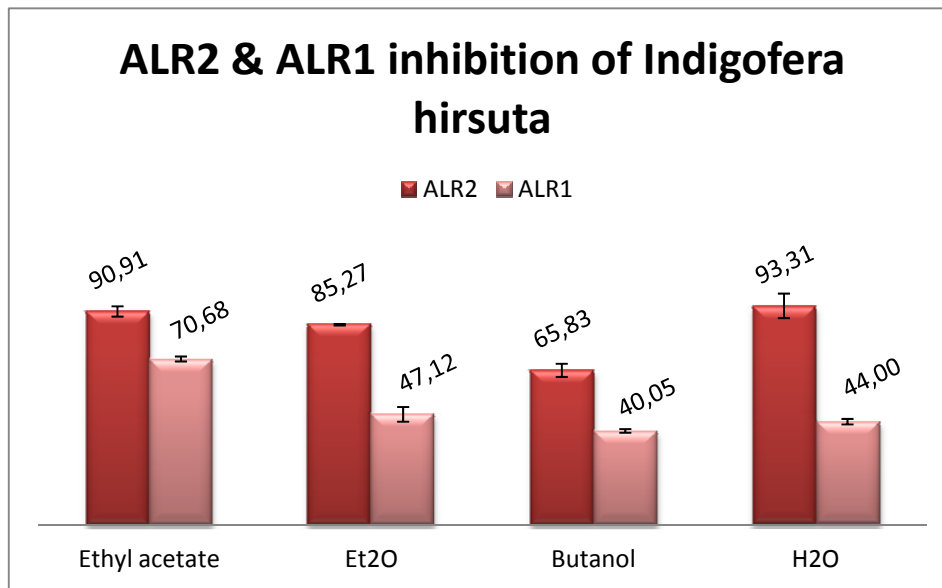


**Ικανότητα αναστολής του ενζύμου ALR2 σε συγκεντρώσεις
50µg/ml και 25 µg/ml**

Σύγκριση της αναστολής των ενζύμων ALR2 και ALR1

Παρακάτω παρατίθενται τα συγκριτικά αποτελέσματα της ικανότητας αναστολής και των δύο ενζύμων σε τελική συγκέντρωση 50µg/ml.

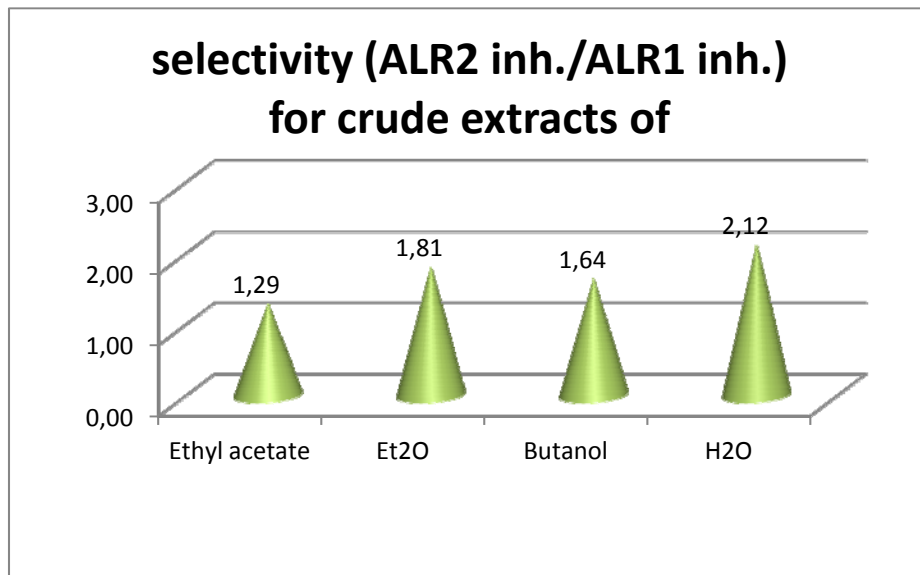
Indigofera hirsuta		inhibition at 50µg/ml				selectivity (ALR2 inh./ALR1 inh.)
		ALR2	St.Dev.	ALR1	St.Dev.	
1	Ethyl acetate	90,91	2,20	70,68	1,05	1,29
3	Et2O	85,27	0,32	47,12	3,14	1,81
4	Butanol	65,83	2,82	40,05	0,79	1,64
6	H2O	93,31	5,21	44,00	1,17	2,12



αναστολή των ενζύμων ALR2 και ALR1

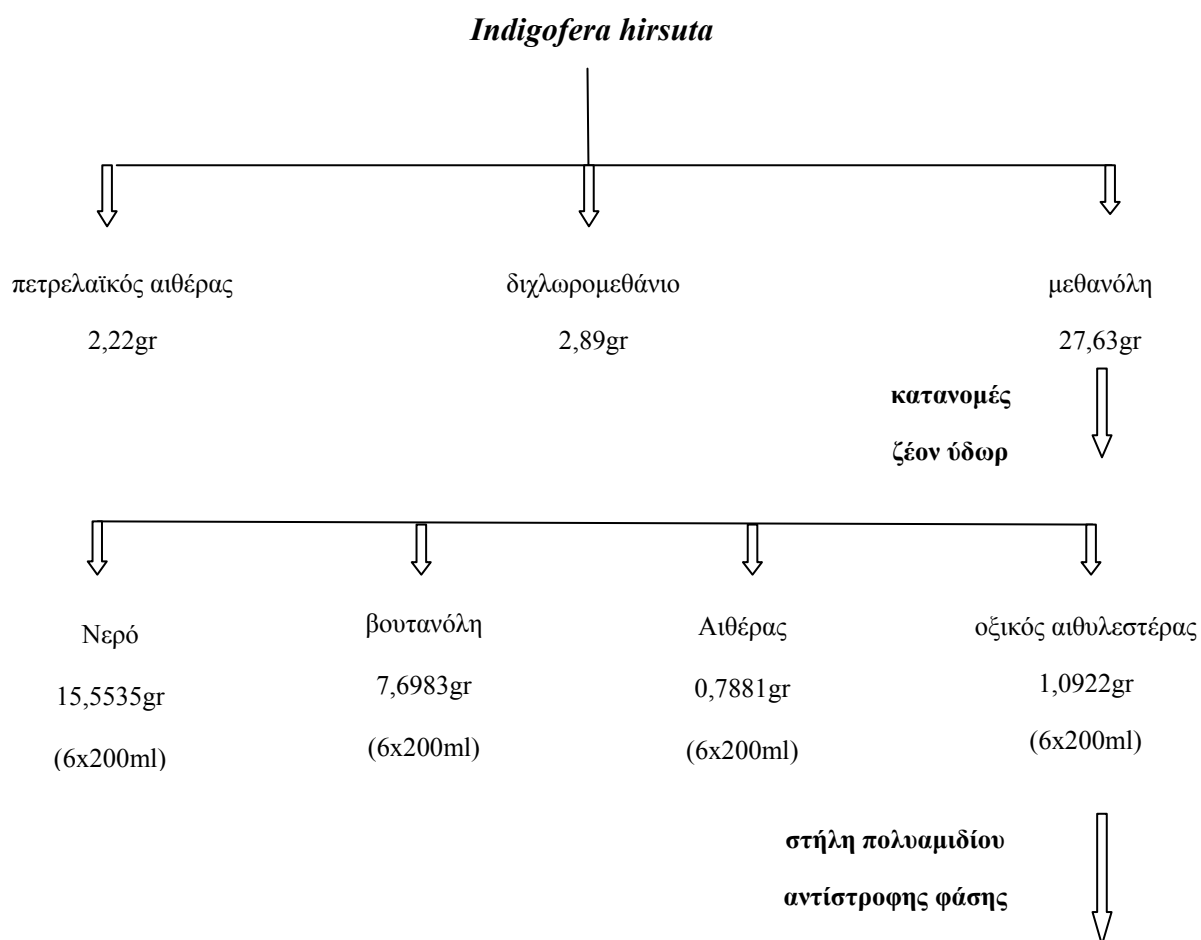
Όσο πιο μεγάλος είναι ο λόγος αναστολής ALR2/αναστολή ALR1 τόσο μεγαλύτερη είναι και η εκλεκτικότητα αφού αναστέλλεται περισσότερο το ένζυμο της ALR2 και λιγότερο το ένζυμο της ALR1. Τα εκχυλίσματα που εμφάνισαν την μεγαλύτερη εκλεκτικότητα ήταν το υδατικό, το βουτανολικό και του διαιθυλαιθέρα ενώ το κλάσμα του οξικού αιθυλεστέρα εμφάνισε τη μικρότερη εκλεκτικότητα δεδομένου ότι ο λόγος ήταν πολύ κοντά στο 1.

Στο παρακάτω διάγραμμα φαίνεται ο λόγος αναστολής των εκχυλισμάτων από το οποίο μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι το κλάσμα του οξικού αιθυλεστέρα εμφάνισε την μικρότερη εκλεκτικότητα αφού ο λόγος της αναστολής του ενζύμου της αναγωγής της αλδόζης προς την αναστολή της αναγωγής της αλδεΐδης είναι 1,29. Το κλάσμα της βουτανόλης επίσης εμφάνισε αναστολή 1,64 ενώ τα κλάσματα με την μεγαλύτερη εκλεκτικότητα ήταν εκείνα του διαιθυλαιθέρα και του υδατικού εκχυλίσματος.

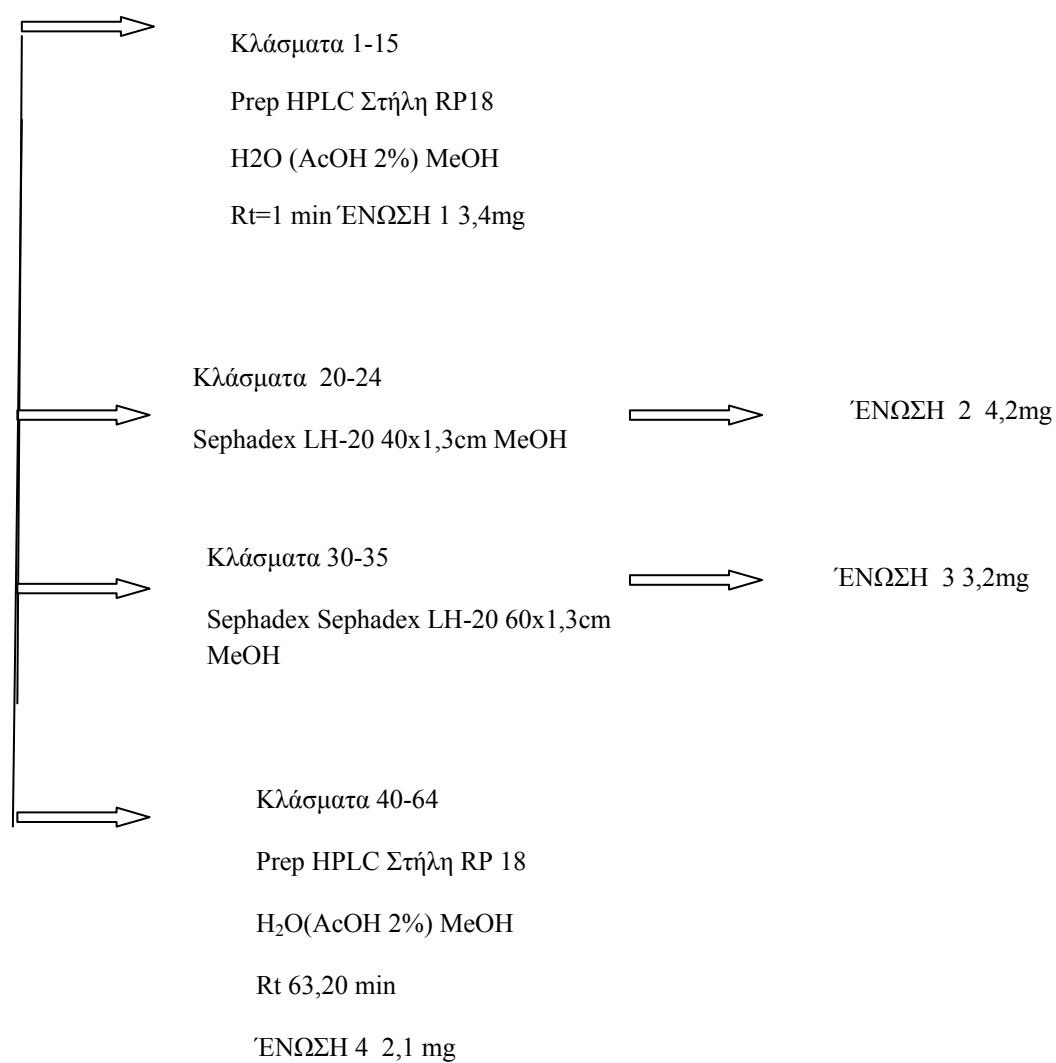


**Εκλεκτικότητα της αναστολή των
ενζύμων της ALR2 και της ALR1**

5.8. Απομόνωση ουσιών απο το ίζημα του οξικού αιθυλεστέρα



ΣΤΗΛΗ ΠΟΛΥΑΜΙΔΙΟΥ



Ο διαχωρισμός των ουσιών έγινε με την μέθοδο της χρωματογραφίας σε στήλη πολυαμιδίου του οποίου προηγήθηκε καθαρισμός σύμφωνα με την παρακάτω διαδικασία.

Η στήλη πολυαμιδίου είχε τα εξής χαρακτηριστικά:

Διαστάσεις στήλης: 40x3,5 cm

Στάτική φάση: πολυαμίδιο Macherey-Nagel, 70-160 μm

Κινητή φάση: $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{MeOH}$

Όγκος συλλεγόμενων κλασμάτων : 206

Το πολυαμίδιο σε μορφή σκόνης κατεργάστηκε με απεσταγμένο νερό και μίγμα νερού μεθανόλης για την απομάκρυνση των ολιγομερών του. Αρχικά δημιουργήθηκε αιώρημα πολυαμιδίου μέσα στο νερό υπό συνεχή ανάδευση. Στη συνέχεια αφέθηκε σε ηρεμία ώστε να γίνει καθίζηση της σκόνης, απομακρύνθηκε το υπερκείμενο νερό μαζί με τα ολιγομερή που παρέμεναν διαλυμένα. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε μέχρι το νερό να παραμείνει διαυγές μετά την αιώρηση. Κατόπιν τού έγινε χρήση μίγματος νερού μεθανόλης με αυξανόμενη την ποσοστιαία αναλογία της μεθανόλης στο νερό μέχρι το 100% της μεθανόλης. Επαναληφθηκε το αντίστροφο φτάνοντας στο 100% του νερού. Αμέσως μετά την διαδικασία ακολούθησε η πλήρωση της στήλης με το πολυαμίδιο σε μορφή αιωρήματος. Το ίζημα του οξικού αιθυλεστέρα διαλύθηκε σε μικρή ποσότητα μεθανόλης και στη συνέχεια ακολούθησε προπροσρόφηση στη σκόνη πολυαμιδίου, απομάκρυνση της μεθανόλης με θέρμανση και ταυτόχρονη ανάδευση. Ο οξικός αιθυλεστέρας προσροφημένος πλέον στο πολυαμίδιο τοποθετήθηκε στη στήλη και ξεκίνησε η έκλυση με διαλυτή νερό μέχρι το 100% της μεθανόλης. Η πορεία της έκλυσης ελέγχονταν περιοδικά με λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας, καθώς και με TLC, καθορίζοντας έτσι και την αλλαγή της σύστασης του διαλύτη. Παρακάτω τα κλάσματα που συλλέχθηκαν στην αντίστοιχη αναλογία του διαλύτη.

Κλάσματα	H₂O	ΜΕΟΗ
1-47	100	-
48-61	90	10
62-112	80	20
113-115	70	30
116-127	60	40
128-133	50	50
134-137	40	60
138-165	30	70
166-182	20	80
183-186	10	90
187-206	-	100

Ακολούθησε η συνένωση των κλασμάτων με βάση την εμφάνιση των κηλίδων στο υπεριώδες.

α/α	κλάσματα	βάρος
1	1-6	46,3 mg
2	7-11	15.1 mg
3	12-19	13,8 mg
4	20-22	16.9 mg
5	23-24	6,5 mg
6	25-26	3,8 mg
7	27-29	4,6 mg
8	30-34	7,3 mg
9	35-47	12,6 mg
10	48-56	1,8mg

<i>α/α</i>	<i>κλάσματα</i>	<i>βάρος</i>
1	1-6	46,3 mg
2	7-11	15.1 mg
3	12-19	13,8 mg
4	20-22	16.9 mg
5	23-24	6,5 mg
6	25-26	3,8 mg
7	27-29	4,6 mg
8	30-34	7,3 mg
9	35-47	12,6 mg
10	48-56	1,8mg

<i>α/α</i>	<i>κλάσματα</i>	<i>βάρος</i>
1	1-6	46,3 mg
2	7-11	15.1 mg
3	12-19	13,8 mg
4	20-22	16.9 mg
5	23-24	6,5 mg
6	25-26	3,8 mg
7	27-29	4,6 mg
8	30-34	7,3 mg
9	35-47	12,6 mg
10	48-56	1,8mg

Απομόνωσης της ένωσης 1

Ακολούθησε διαχωρισμός του κλάσματος 1 με HPLC κάνοντας χρήση παρασκευαστικής στήλης Rp-18 με πρόγραμμα βαθμωτής εκκλωσης ξεκινώντας με αναλογία 80-20% H₂O (AcOH 2%)-MeOH. Ο χρόνος κατακράτησης R_t από τη στήλη ήταν t = 1min.

Βάρος ουσίας 3,4 mg

Απομόνωση της ένωσης 2

Στα κλάσματα 17-21 εμφανίστηκε στην πλάκα χρωματογραφίας κηλίδα χρώματος πορτοκαλί φθορισμού στα 365nm η οποία παρέμεινε ίδια με την παρουσία αμμών καθώς και με τη χρήση New. Η ένωση 2 απομονώθηκε κατόπιν χρήσης Sephadex LH-20 40x1,3cm με διαλύτη MeOH Βάρος ουσίας 4,2 mg

Rf	CAW	EAW	AcOH 15%
	0,73	0,62	0,68

Απομόνωση της ένωσης 3

Στα κλάσματα 20-23 εμφανίστηκε στην πλάκα χρωματογραφίας κηλίδα κίτρινου ανοιχτού φθορισμού στα 365nm η οποία άλλαξε σε πράσινο με την παρουσία αμμών καθώς και με τη χρήση New. Η ένωση 2 απομονώθηκε κατόπιν χρήσης Sephadex LH-20 60x1,3cm με διαλύτη MeOH. Βάρος ουσίας 3,2 mg

Rf	CAW	EAW	AcOH 15%
	0,89	0,62	0,45

Απομόνωση της ένωσης 4

Στα κλάσματα 25-34 εμφανίστηκε στην πλάκα στην πλάκα χρωματογραφίας κηλίδα κίτρινου ανοιχτού φθορισμού στα 365nm η οποία άλλαξε σε πράσινο με την παρουσία αμμών καθώς και με τη χρήση New. Η απομόνωσή της έγινε με χρήση της HPLC κάνοντας χρήση παρασκευαστικής στήλης Rp-18 και με πρόγραμμα βαθμωτής εκκλωσης ξεκινώντας με αναλογία 80-20% H₂O (AcOH 2%)-

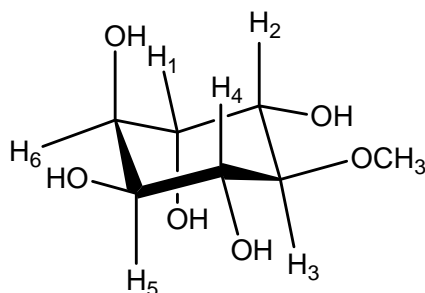
MeOH. Rt 63,20 min σε αναλογία διαλυτών 40:60 . Ακολούθησε επανακαθαρισμός με χρήση Sephadex LH-20 60x1,3cm με διαλύτη MeOH. Βάρος ουσίας 2,1 mg

Rf	CAW	EAW	AcOH 15%
	0,79	0,54	0,30

5.9. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΖΥΖΗΤΗΣΗ ΦΑΣΜΑΤΩΝ

Τα φάσματα Πυρηνικού Μαγνητικού συντονισμού (NMR) ελήφθησαν στα 600 MHz (Varian) σε διαλύτη MEOD.

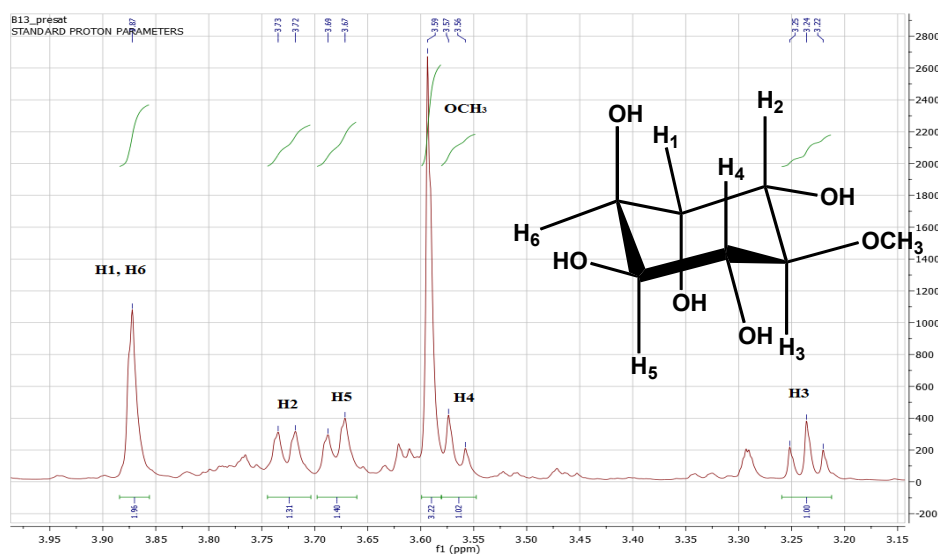
5.9.1 Ένωση 1: πιπιτόλη



Η πιπιτόλη ή 0-μεθυλο ινοσιτόλη είναι μία κυκλική πολυόλη και έχει βρεθεί ότι έχει αντιδιαβητική (Bates et al., 2000) (Kim et al., 2007), αντιμικροβιακή (Agnese et al., 2001) και αντιφλεγμονώδη δράση (Singh et al., 2001). Επιπλέον αποτελεί και χημειοταξονομικό δείκτη της οικογένειας Leguminosae (Farzana Panhwar, 2005).

Η διευκρίνιση της δομής της ένωσης 1 έγινε μετά από μελέτη των φασμάτων μάζης και NMR (^1H NMR, ^{13}C NMR, HSQC, HMBC, και COSY).

Φάσμα ^1H - NMR της ένωσης 1 (CD_3OD , 600 MHz)

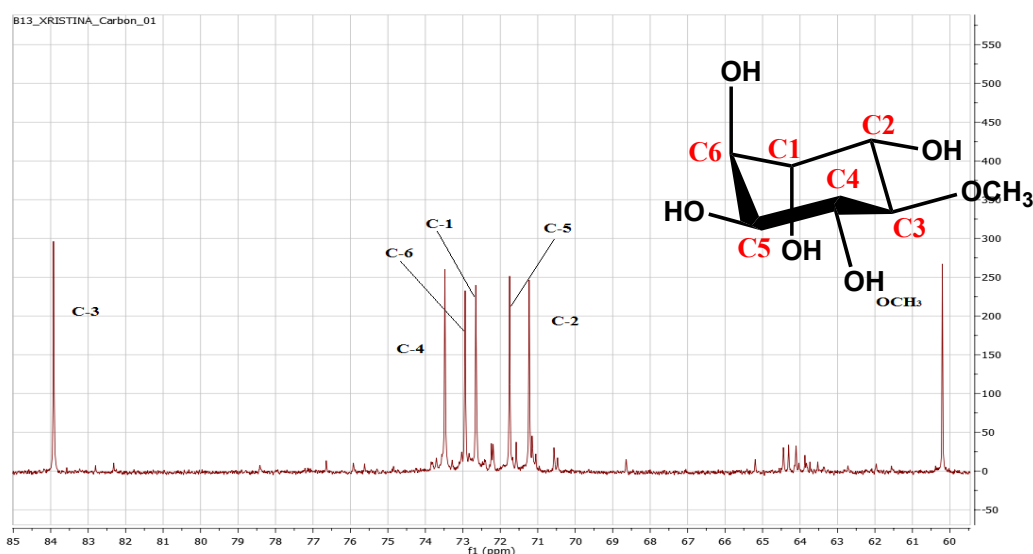


Η μελέτη των φασμάτων ^1H NMR και ^{13}C -NMR της ένωσης έδειξε σκελετό σακχάρου (εμφάνιση πρωτονίων από 3,25 έως 3,87 ppm και ανθράκων από 62 έως 87 ppm) με απουσία όμως ανωμερικού πρωτονίου ενδεικτικό της παρουσίας πολυόλης. Από το φάσμα ^{13}C -NMR προκύπτει ότι ο αριθμός των ατόμων άνθρακα της ένωσης είναι 7, ένας εκ των οποίων είναι OCH_3 . Το τελευταίο στο φάσμα ^1H NMR εμφανίζεται σαν μια απλή κορυφή τριών πρωτονίων σε δ_{H} 3,59 ppm. Επιπλέον στο ^1H NMR φαίνεται η παρουσία ακόμα έξι πρωτονίων. Έτσι δύο διπλώς-διπλές κορυφές, ενός πρωτονίου εκάστη, σε δ_{H} 3,73 ppm και δ_{H} 3,67 ppm με ($J=9,6$ Hz και $J=2$ Hz) υποστηρίζουν την παρουσία δύο ζευγών συστημάτων HaxHaxHeq . Η παρουσία δυο τριπλών κορυφών σε δ_{H} 3,57 ppm (επικαλυπτόμενη εν μέρει από την κορυφή του μεθοξυλίου) και 3,25 ppm, ενός πρωτονίου εκάστη, με σταθερά σύζευξης $J=9,6$ Hz υποστηρίζουν την παρουσία δυο ζευγών συστημάτων HaxHaxHax .

Πίνακας 1: ^1H -NMR ουσίας 1 (CD_3OD , 600 MHz)

Χημική μετατόπιση δ (ppm)	Αριθμός H	Πολλαπλότητα, J (Hz)	Ταυτοποίηση
3,87	2	s	H_1 και H_6
3,73	1	dd ($J=10,2\text{Hz}$)($J\sim 2\text{Hz}$)	H_2
3,67	1	dd ($J=10,2\text{Hz}$)($J\sim 2\text{Hz}$)	H_5
3,59	3	s	OCH_3
3,57	1	t ($J=9,6\text{Hz}$)	H_4
3,25	1	t ($J=9,6$ Hz)	H_3

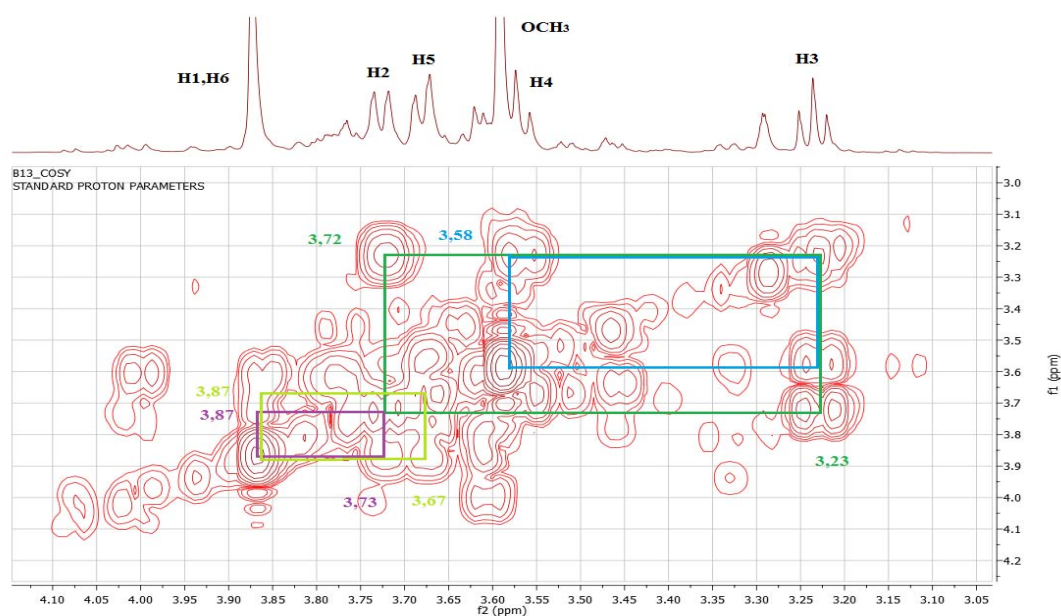
Φάσμα ^{13}C - NMR της ένωσης 1 (CD_3OD , 300 MHz)



Πίνακας 2: ^{13}C NMR ουσίας 1 (CD_3OD , 300 MHz)

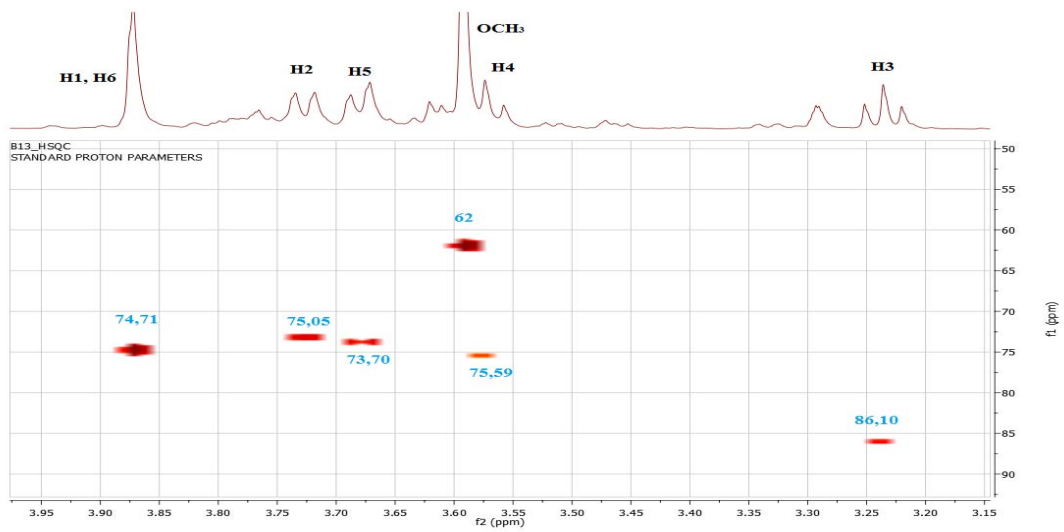
Χημική μετατόπιση δ (ppm)	Τύπος C	Ταυτοποίηση
72,57	CH	C-1
71,17	CH	C-2
83,95	CH	C-3
73,49	CH	C-4
71,77	CH	C-5
72,90	CH	C-6
60,18	CH_3	OCH_3

Φάσμα ^1H - ^1H COSY της ένωσης 1 (CD_3OD , 600 MHz)

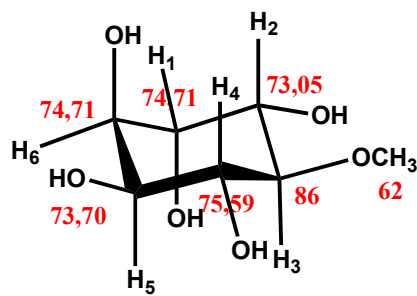


Από το φάσμα δύο διαστάσεων ^1H - ^1H COSY φαίνεται το πρωτόνιο **H-3** σε δ_{H} 3,23 ppm να σχάζεται με το πρωτόνιο **H-4** σε δ_{H} 3,58 ppm καθώς και με το πρωτόνιο **H-2** σε δ_{H} 3,72 ppm. Το πρωτόνιο **H-1** σε δ_{H} 3,87 ppm σχάζεται με το πρωτόνιο **H-2** σε δ_{H} 3,73 ppm ενώ το πρωτόνιο **H-6** σε δ_{H} 3,87 ppm σχάζεται με το πρωτόνιο **H-5** σε δ_{H} 3,67 ppm.

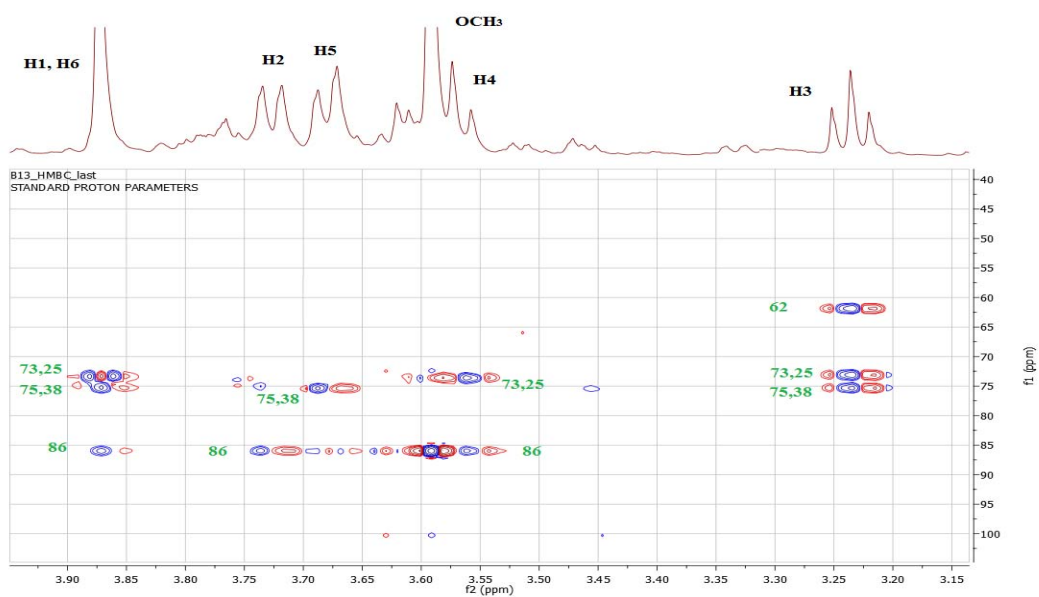
Φάσμα HSQC ουσίας1 (CD₃OD, 600MHz)



Ένωση 1: τα βασικά παρατηρούμενα σήματα στο φάσμα HSQC

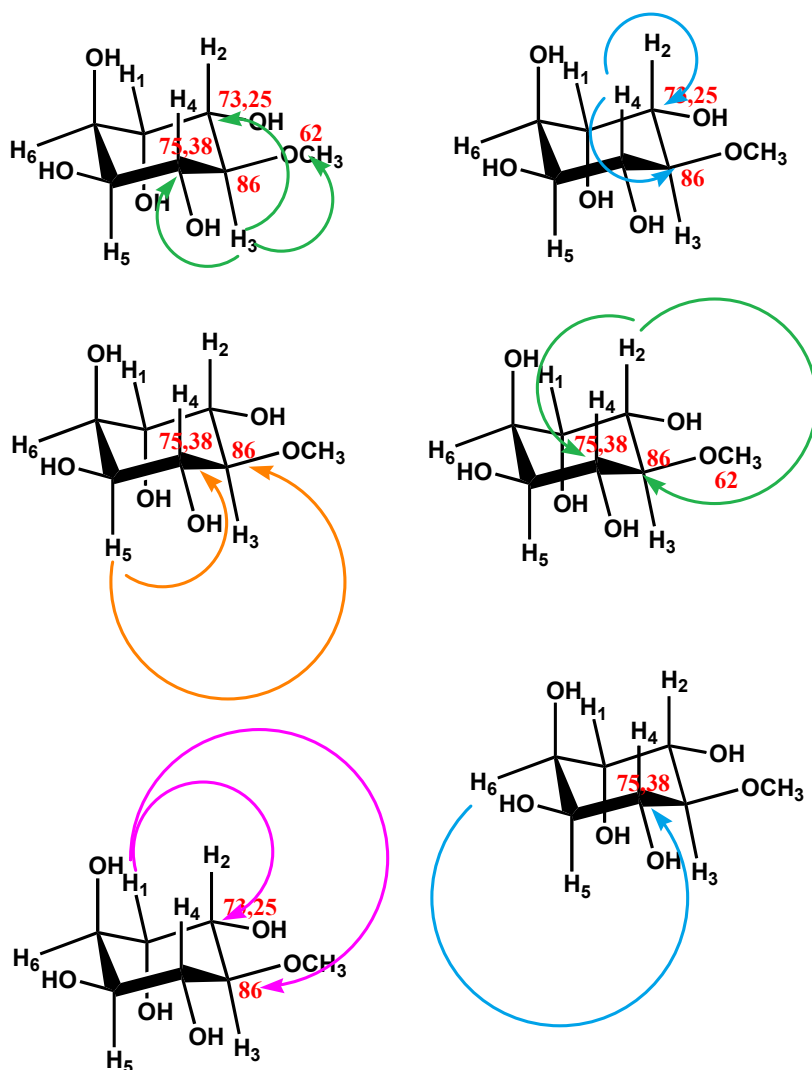


Φάσμα HMBC ουσίας1 (CD₃OD, 600MHz)



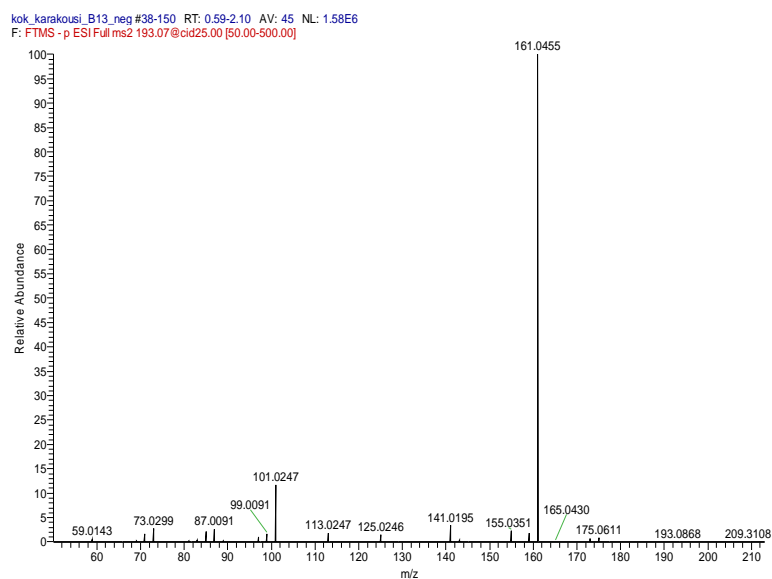
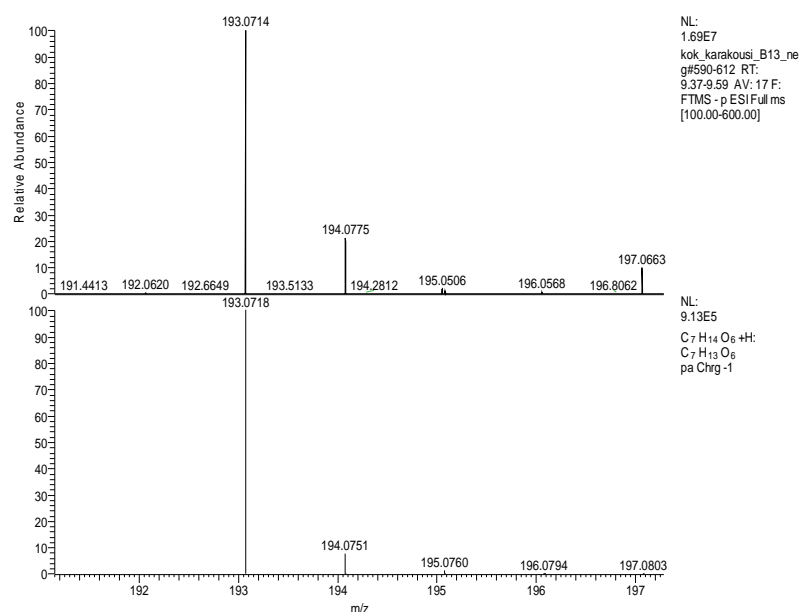
Στο φάσμα HMBC φαίνεται ότι υπάρχει πλήρης αντιστοίχιση με τους άνθρακες που εμφανίζονται στο φάσμα του ^{13}C -NMR και φαίνεται ότι δεν υπάρχει άνθρακας χωρίς πρωτόνιο.

τα βασικά παρατηρούμενα σήματα της πινιτόλης στο φάσμα HMBC

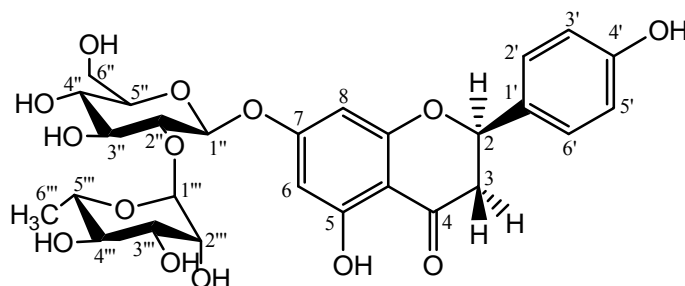


Η επιβεβαίωση ότι πρόκειται για την ένωση πινιτόλη δίνεται και από το φάσμα μάζης της ένωσης (HR-MS Thermo Scientific), όπου παρατηρείται το ιόν M-1 σε m/z 193,0714 (θεωρητικά υπολογιζόμενο 193,0796) και που αντιστοιχεί σε μοριακό τύπο C₇H₁₄O₆. Τέλος σύγκριση των δεδομένων της ένωσης με βιβλιογραφικά δεδομένα (Renuka et al.,2007) συνηγορεί ότι πρόκειται για την πινιτόλη.

T



5.9.2. Ένωση 2: Νεοεσπεριδοζίτης της ναριγγεινίνης - ναριγγίνη

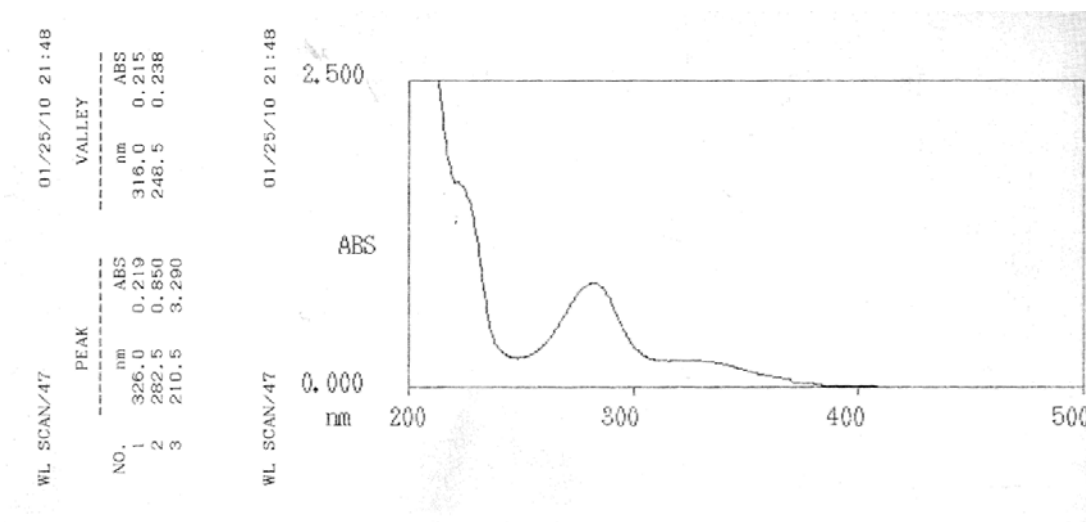


Από τα μέγιστα των κορυφών της ένωσης 2 σε μεθανόλη (267 και 334 nm) στο φάσμα υπεριώδους-ορατού, διαπιστώνεται ότι πρόκειται για φλαβανόνη. Σε αυτό συνηγορεί και το φάσμα NMR της ένωσης όπου παρατηρούνται τα παρακάτω: Στην αρωματική περιοχή του φάσματος $^1\text{H NMR}$, διαπιστώνεται η παρουσία συστήματος AA'BB' το οποίο αντιστοιχεί σε παρα-υποκατάσταση του B δακτυλίου. Έτσι μια διπλή κορυφή σε δ_H 7,30 ppm ($J=8,4$ Hz) αντιστοιχεί στα πρωτόνια **H2'** και **H6'** ενώ η διπλή κορυφή σε δ_H 6,80 ppm ($J=8,4$ Hz) αντιστοιχεί στα πρωτόνια **H3'** και **H5'**. Παρατηρούνται ακόμα στην αρωματική περιοχή δύο διπλές κορυφές του ενός πρωτονίου σε δ_H 6,16 ppm ($J=1,8$ Hz) και δ_H 6,14 ppm ($J=1,8$ Hz) που σχάζονται μεταξύ τους, υποδηλώνοντας μετα σύζευξη και αντιστοιχούν στα πρωτόνια **H8** και **H6** αντίστοιχα. Η διπλή κορυφή που αντιστοιχεί στο H6 εμφανίζεται σε υψηλότερες τιμές πεδίου σε σχέση με τη διπλή κορυφή που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H8 (Mabry et al., 1970). Οι κορυφές των πρωτονίων H8 και H6 είναι ελαφρώς αποθωρακισμένες και σε χαμηλότερες τιμές πεδίου σε σχέση με τη ναριγγεινίνη και αυτό υποδηλώνει την παρουσία σακχάρου στη θέση 7 (Mabry et al., 1970). Ο υποκαταστάτης στη θέση 4' του B δακτυλίου είναι OH, γιατί αφενός μεν, όπως θα δούμε παρακάτω, τα υπάρχοντα σάκχαρα είναι συνδεδεμένα στη θέση 7 του φλαβονοειδούς, αφετέρου δε, δεν παρατηρείται ύπαρξη πρωτονίων που να αποδίδονται σε άλλον υποκαταστάτη ($-\text{OCH}_3$, $-\text{OCOCH}_3$, $-\text{CH}_3$). Αυτό άλλωστε επιβεβαιώνεται και από την τιμή του άνθρακα της θέσεως 4' όπου εμφανίζεται αποθωρακισμένος σε δ_C 157,48 ppm, όπως προκύπτει από το φάσμα HMBC της ένωσης. Η χαρακτηριστική κορυφή του πρωτονίου H-2 του C δακτυλίου της φλαβανόνης εμφανίζεται σε δ_H 5,37 ppm σαν διπλή διπλών με σταθερές σύζευξης $J=12,6$ Hz και 2,6 Hz και βρίσκεται σε σύζευξη με τα πρωτόνια H-3a και H-3b με δ_H 3,16 ppm και δ_H 2,74 ppm αντίστοιχα.

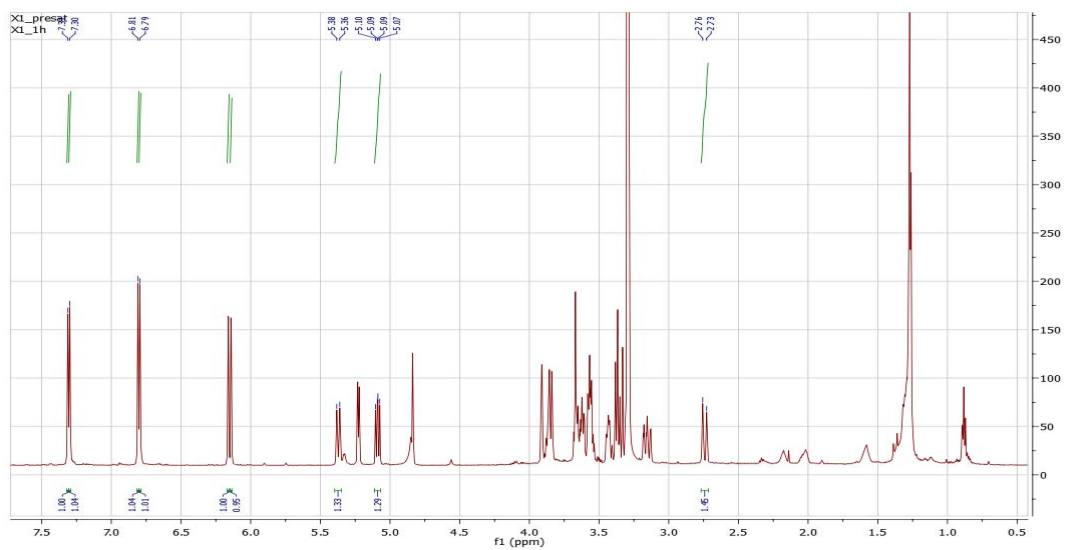
Στην κεντρική περιοχή του φάσματος ^1H NMR εμφανίζονται δύο ανωμερικά πρωτόνια ενδεικτικά της ύπαρξης δύο σακχάρων. Το ανωμερικό πρωτόνιο της γλυκόζης παρατηρείται σε δ_H 5,09 ppm με σταθερά σύζευξης $J=7,8$ Hz και το ανωμερικό της ραμνόζης σε δ_H 5,23 ppm με σταθερά σύζευξης $J=2$ Hz. Οι σταθερές σύζευξης των δύο σακχάρων είναι ενδεικτικές της β -διαμόρφωσης για τη γλυκόζη και α -διαμόρφωσης για τη ραμνόζη. Στον πίνακα 3 αναγράφονται οι τιμές των υπόλοιπων πρωτονίων των σακχάρων και οι σταθερές σύζευξης αυτών. Σύγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα συνηγορούν ότι τα σάκχαρα είναι γλυκόζη (Lindhorst 2004) και ραμνόζη (Andre de Bruyn 1975). Από το φάσμα HMBC της ένωσης, επιβεβαιώνεται η θέση σύνδεσης σακχάρου και συγκεκριμένα γλυκόζης, στη θέση 7, όπου εμφανίζεται από κοινού σήμα στα 164,83 ppm των πρωτονίων $\text{H}1''$ (ανωμερικό της γλυκόζης) με τα πρωτόνια $\text{H}6$ και $\text{H}8$ του φλαβονοειδούς και το οποίο αντιστοιχεί στον C-7. Τέλος σήμα του $\text{H}-2''$ της γλυκόζης με τον $\text{C}'''-1$ της ραμνόζης καθώς και σήμα του $\text{H}-1'''$ της ραμνόζης με τον C-2'' της γλυκόζης, συνηγορούν για σύνδεση $1''' \rightarrow 2''$ μεταξύ των δυο σακχάρων.

Σύγκριση των τιμών ^1H NMR και ^{13}C NMR της ένωσης 2 με τιμές που δίνονται στη βιβλιογραφία επιβεβαιώνει ότι η δομή της ένωσης είναι ο νεοεσπεριδοζίτης της ναριγγενίνης (Dalia Hamdan et al., 2011), (Maltese et al., 2007), (Almeida et al., 2012).

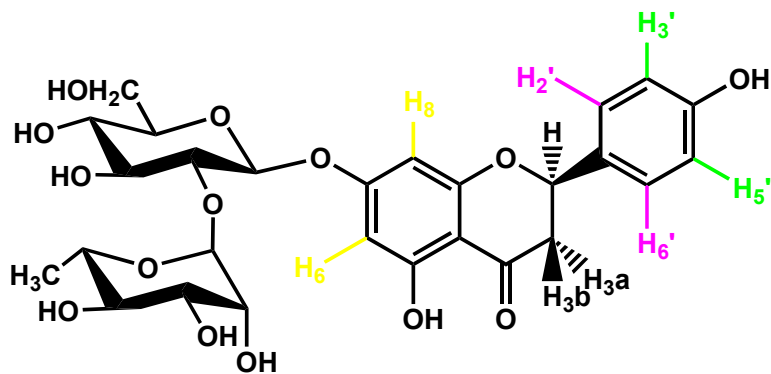
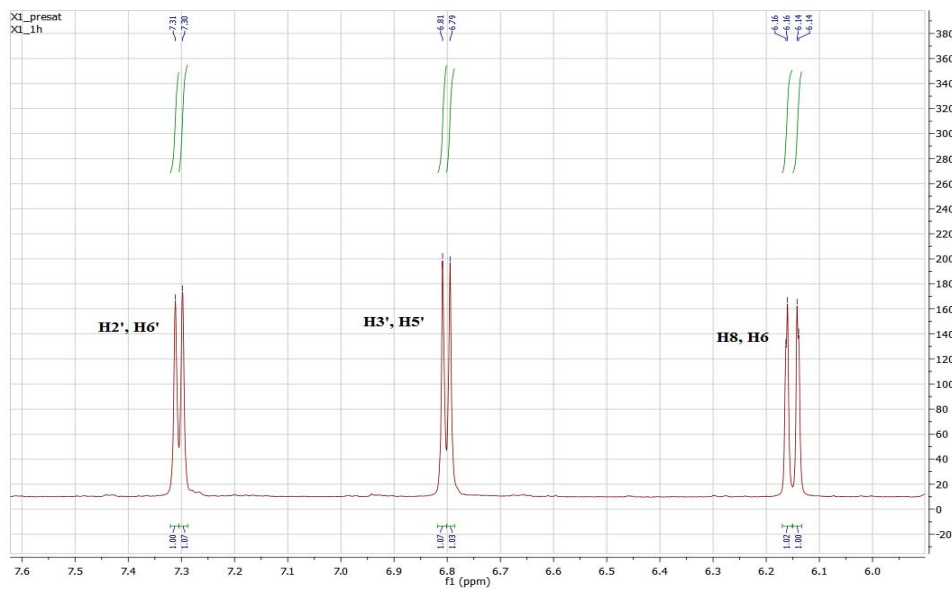
Φάσμα UV Ένωσης 2 σε MeOH



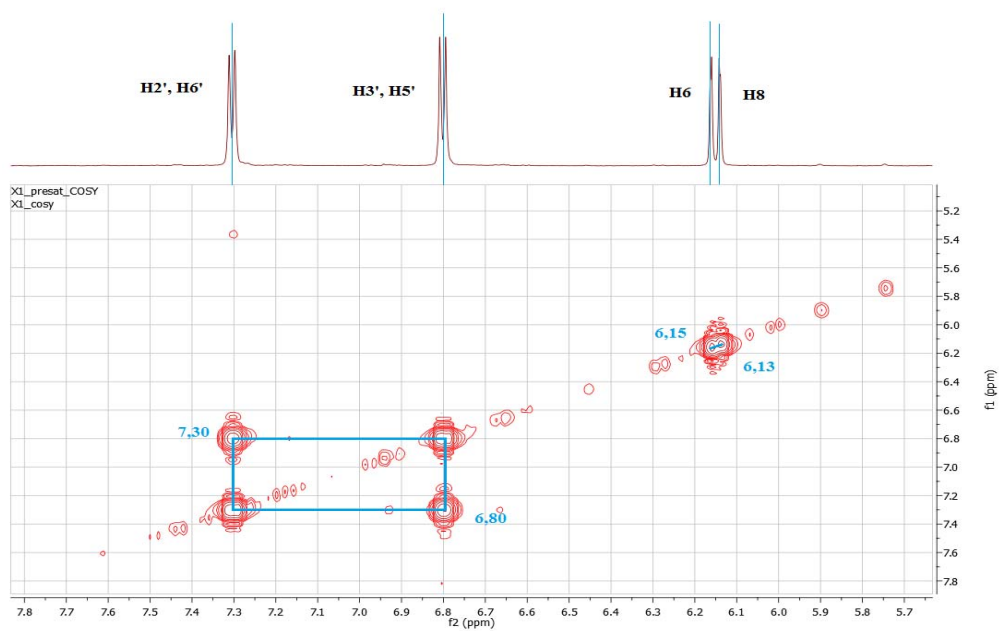
Φάσμα ¹H- NMR της Ένωσης 2 (CD₃OD, 600 MHz)



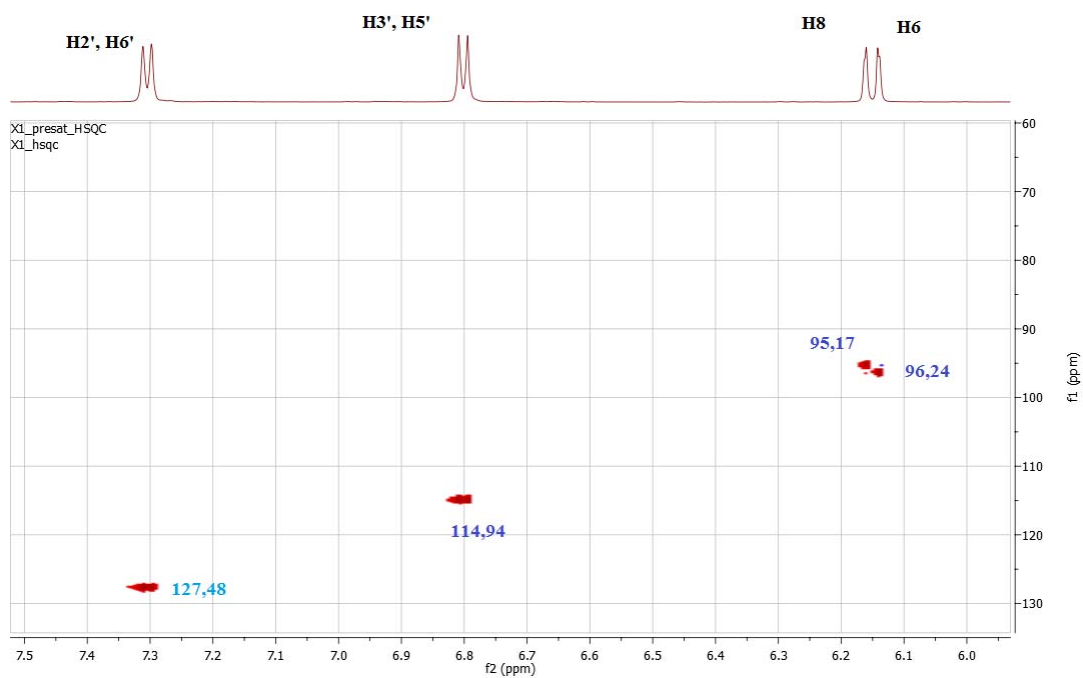
Φάσμα ¹H- NMR της Ένωσης 2 (CD₃OD, 600 MHz) αρωματική περιοχή



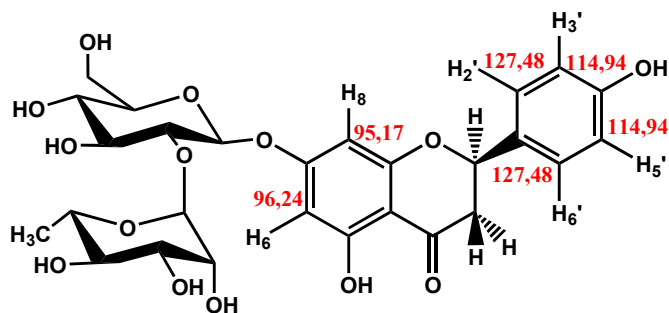
Φάσμα ^1H - ^1H COSY της Ένωσης 2 (CD_3OD , 600 MHz) Αρωματική περιοχή



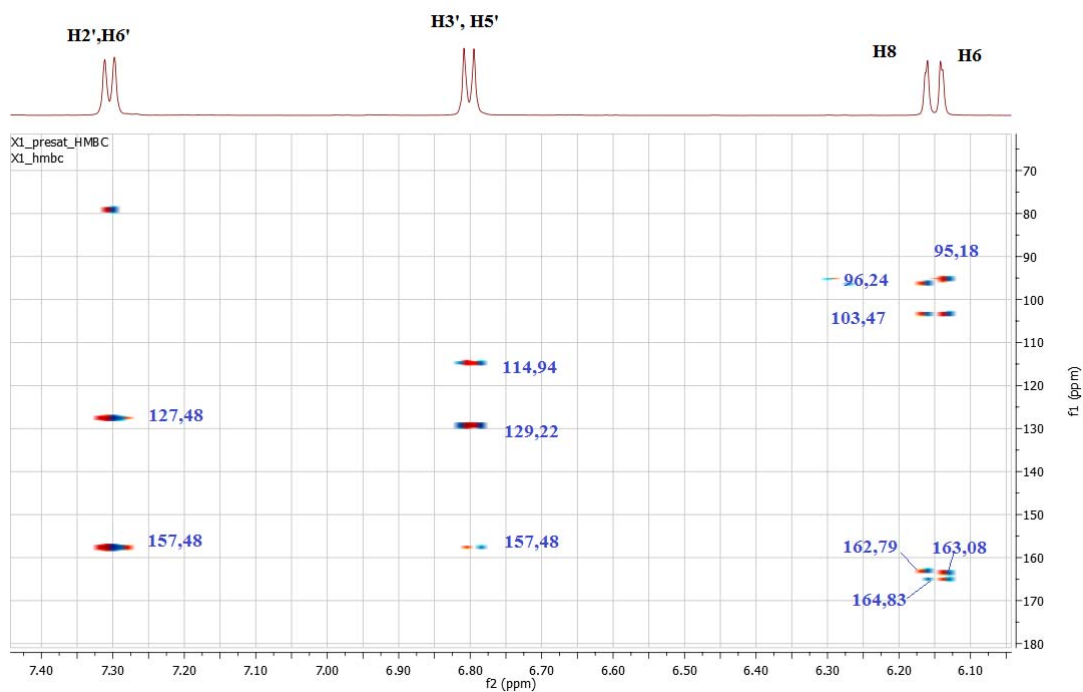
Φάσμα HSQC Ένωσης 2 (CD_3OD , 600MHz) αρωματική περιοχή



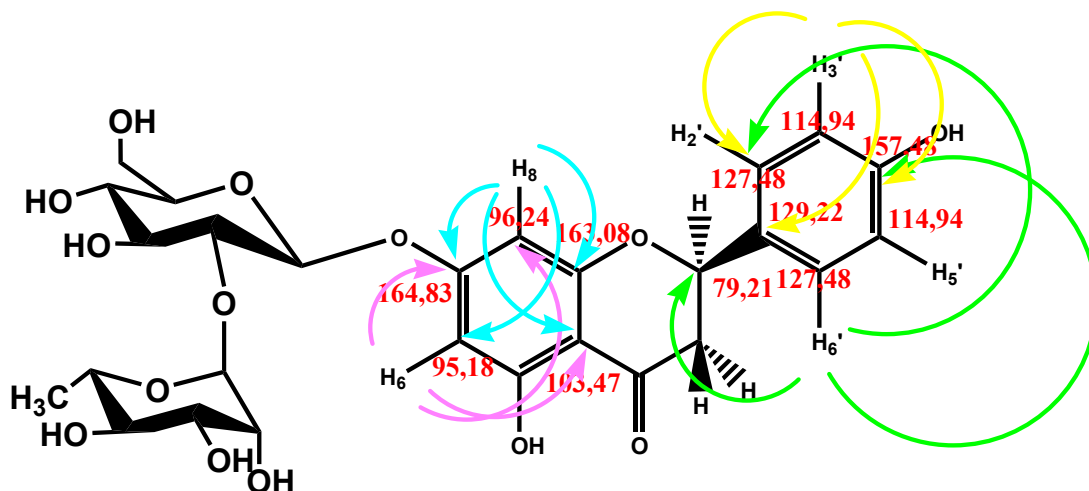
Τα βασικά παρατηρούμενα σήματα της Ένωσης 2 στο φάσμα HSQC στην περιοχή των αρωματικών



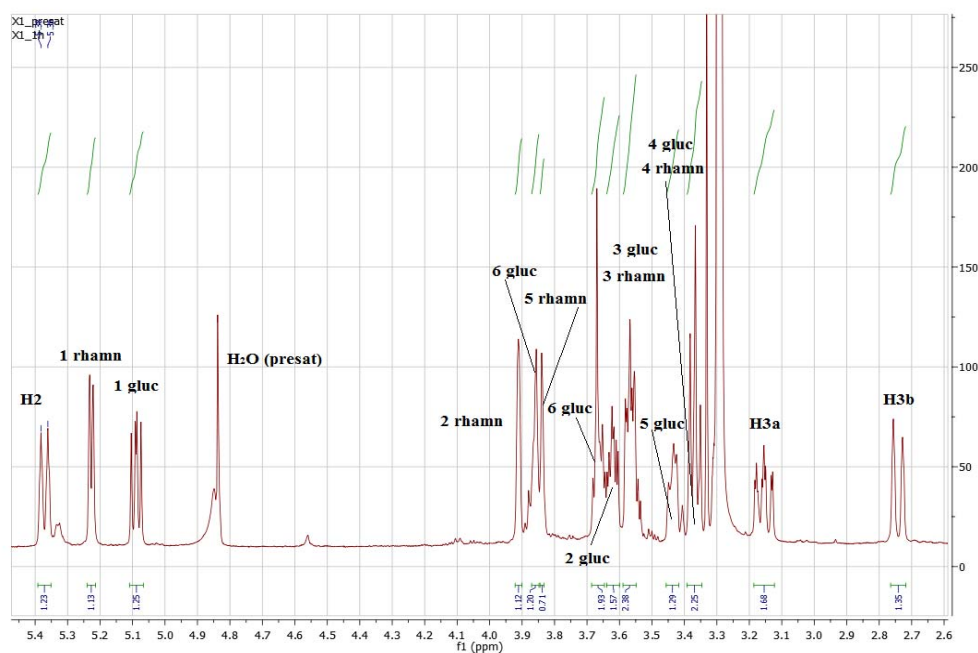
Φάσμα HMBC της Ένωσης 2 (CD₃OD, 600MHz) Αρωματική περιοχή



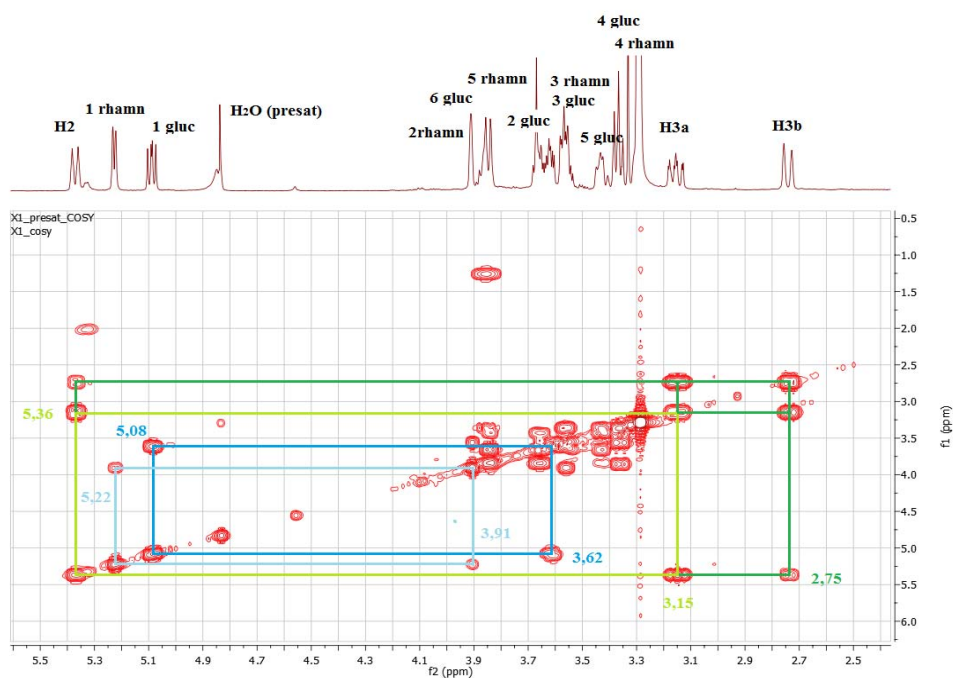
Τα βασικά παρατηρούμενα σήματα της Ένωσης 2 στο φάσμα HMBC στην περιοχή των αρωματικών



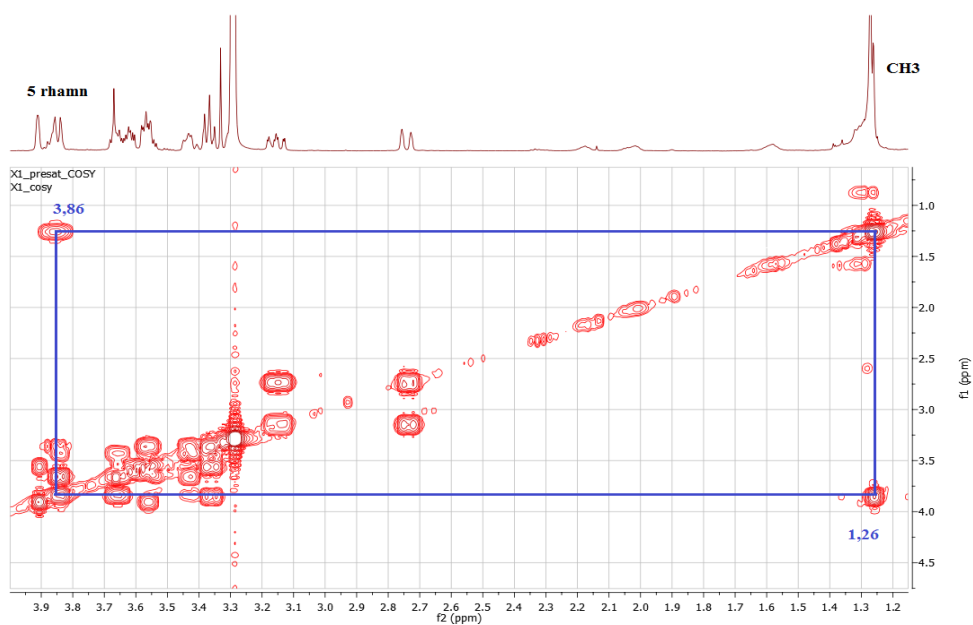
Φάσμα ¹H-NMR της Ένωσης 2 (CD₃OD, 600 MHz) περιοχή των σακχάρων



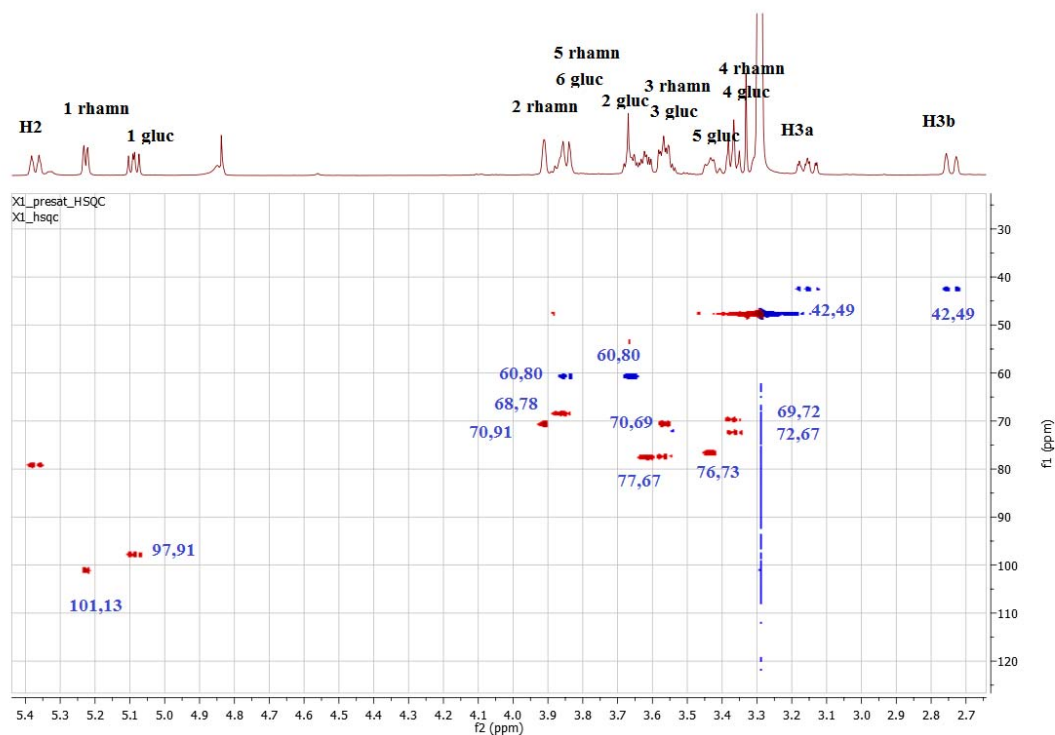
Φάσμα ^1H - ^1H COSY της Ένωσης 2 (CD_3OD , 600 MHz) περιοχή των σακχάρων



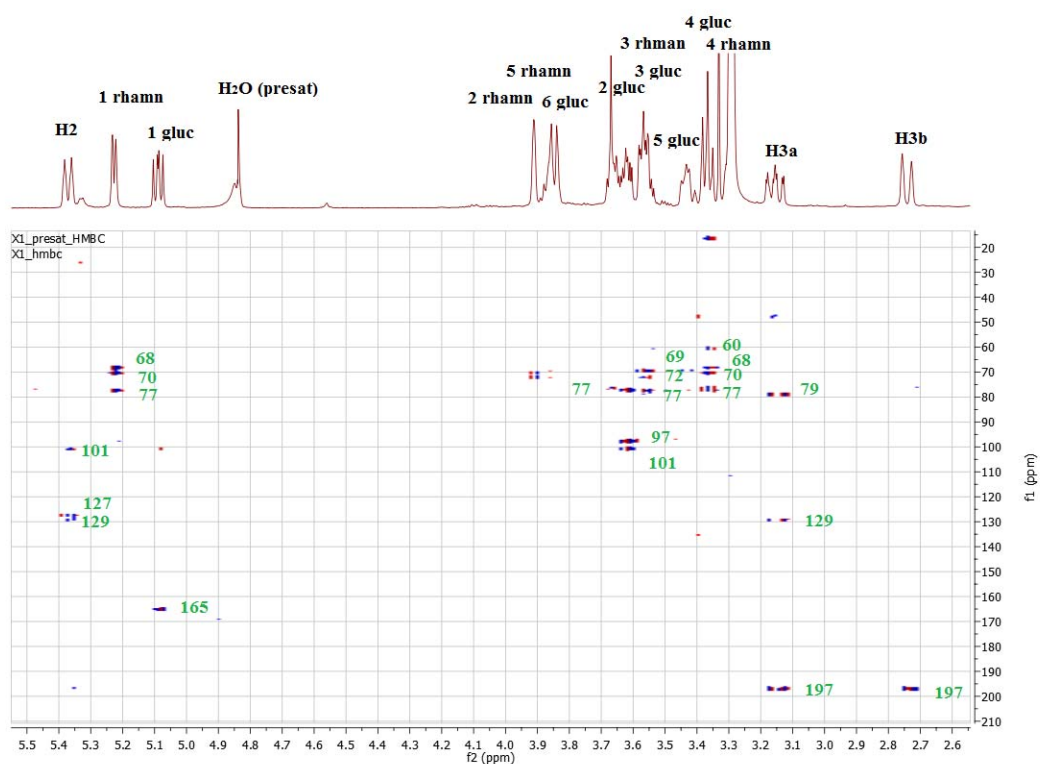
Φάσμα ^1H - ^1H COSY της Ένωσης 2 (CD_3OD , 600 MHz) περιοχή των σακχάρων



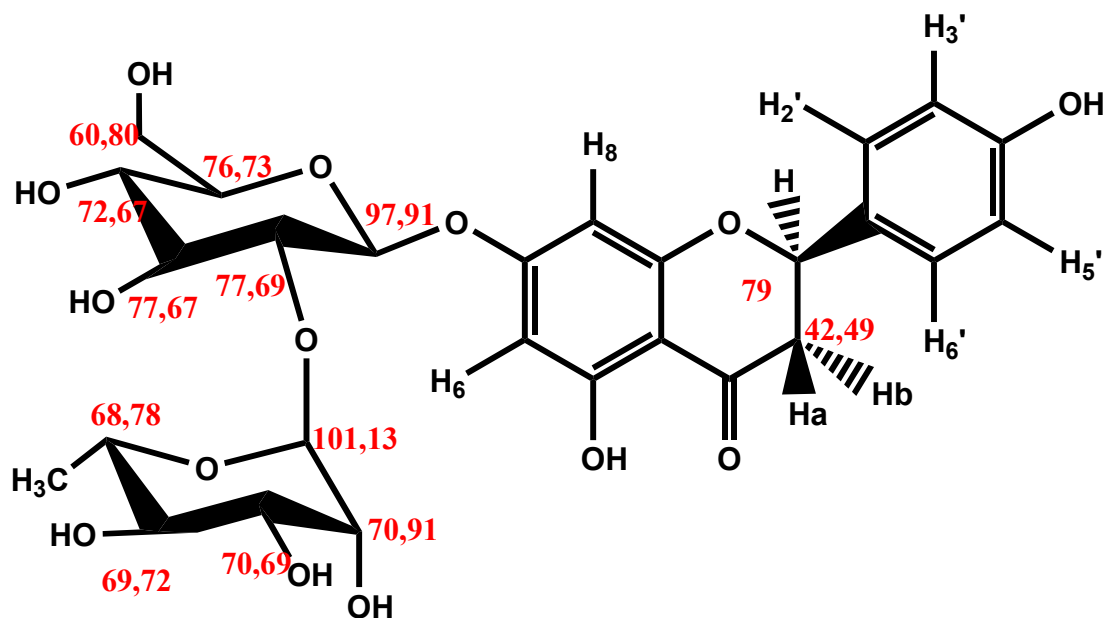
Φάσμα HSQC Ένωσης 2 (CD₃OD, 600MHz) περιοχή των σακχάρων



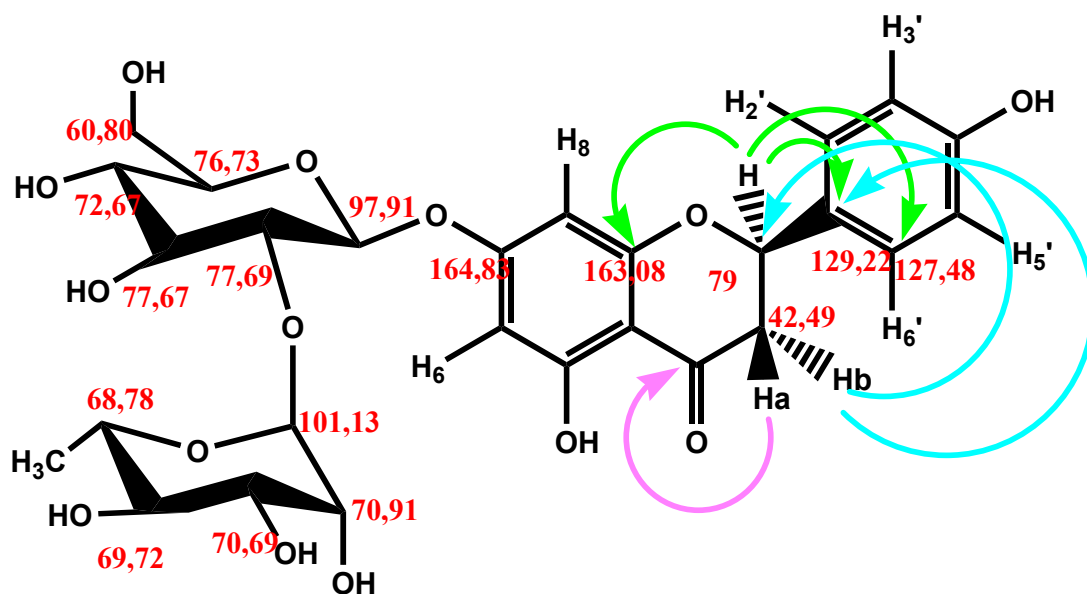
Φάσμα HMBC της Ένωσης 2 (CD₃OD, 600MHz). Περιοχή σακχάρων



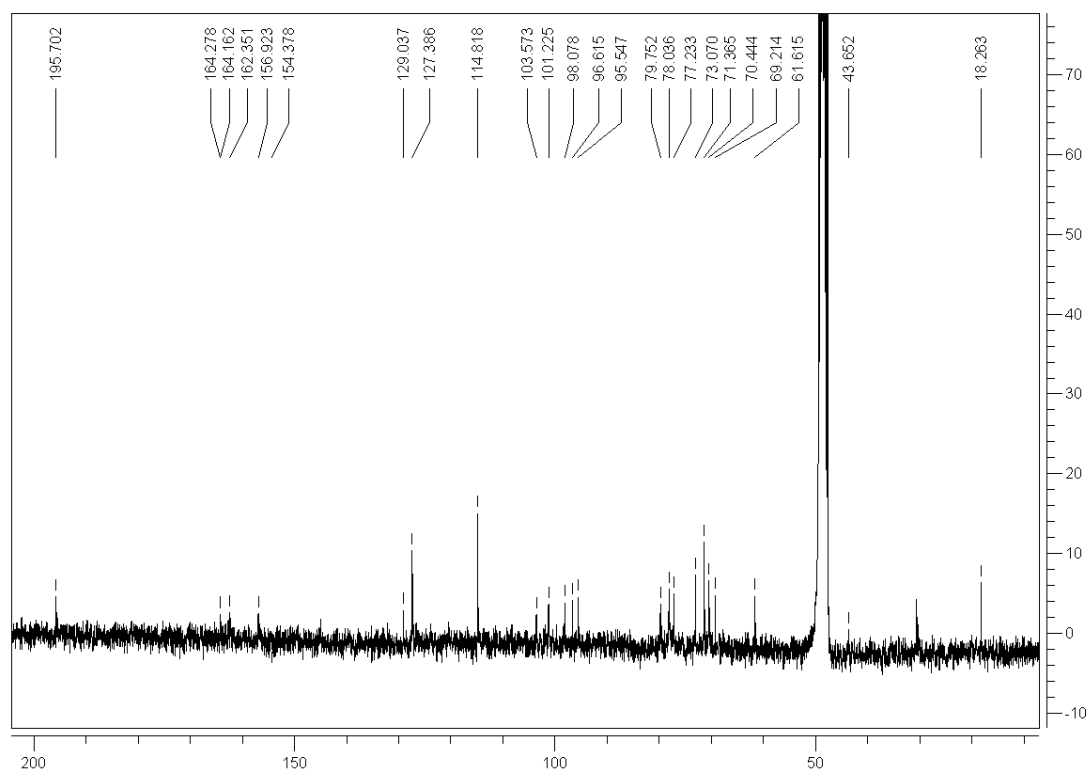
Τα βασικά παρατηρούμενα σήματα της Ένωσης 2 στο φάσμα HSQC στην περιοχή των σακχάρων



Τα βασικά παρατηρούμενα σήματα της Ένωσης 2 στο φάσμα HMBC στην περιοχή των σακχάρων



Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης 2



Πίνακας 3: ^1H -NMR ουσίας 2 (CD_3OD , 600 MHz)

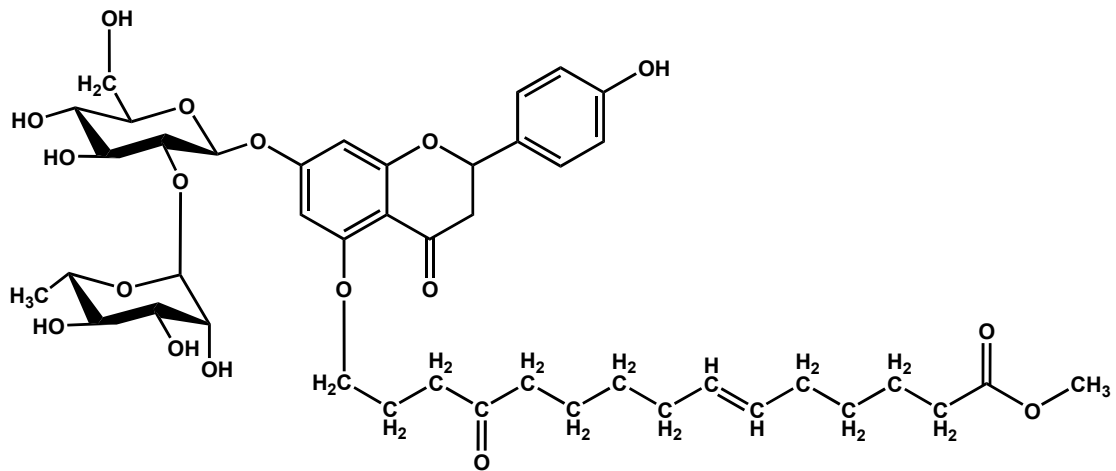
Χημική μετατόπιση δ (ppm)	Αριθμός H	Πολλαπλότητα, J (Hz)	Ταυτοποίηση
7,30	2	d (J=8,4 Hz)	H-2' και H-6'
6,80	2	d (J=8,4 Hz)	H-3' και H-5'
6,16	1	d (J=1,8 Hz)	H-8
6,14	1	d (J=1,8 Hz)	H-6
5,37	1	dd (J=12,6 Hz 2,6 Hz)	H-2
3,16	1	m	H3a
2,74	1	d (J=16,8 Hz 2,6 Hz)	H3b
Γλυκόζη			

5,09	1	d (J=7,8Hz)	H-1''
3,66	1	dd (J=8 Hz)(J=7 Hz)	H-2''
3,57	1	dd (J=10 Hz)(J=9 Hz)	H-3''
3,37	1	dd (J= 10 Hz)(J=9 Hz)	H-4''
3,43	1	m (J= 10 Hz)(J=6 Hz) (J= 2Hz)	H-5''
3,84 3,76	1	brdd (J= 11 Hz) (J= 2Hz) m	H-6''
Ραμνόζη			
5,23	1	d (J=2 Hz)	H-1'''
3,91	1	dd (J=3 Hz)(J= 2Hz)	H-2'''
3,58	1	dd (J=10 Hz) (J=3 Hz)	H-3'''
3,37	1	dd (J=10 Hz) (J= 10 Hz)	H-4'''
3,86	1	dd (J=10 Hz) (J= 6Hz)	H-5'''
1,26	1	d (J= 6 Hz)	H-6'''

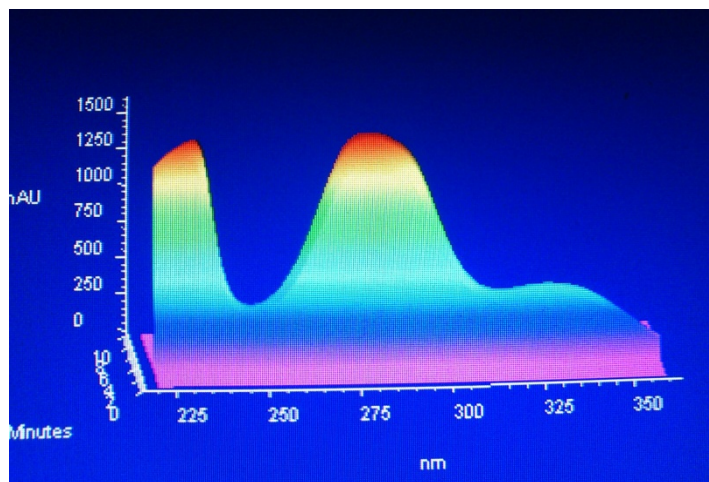
Πίνακας 4: ¹³CNMR ουσίας 2 (CD₃OD, 300 MHz)

Χημική μετατόπιση δ (ppm)	Τύπος C	Ταυτοποίηση
79,21	CH	CH-2
42,49	CH	CH ₂ -3
197,28	CH	C-4
163,08	CH	C-5
95,18	CH	CH-6
164,83	CH	C-7
96,24	CH	CH-8
162,79	C	C-9
103,47	C	C-10
129,22	C	C-1'
127,48	CH	CH-2', CH-6'
157,48	C	C-4'
114,94	CH	CH-3', CH-5'
Γλυκόζη		
97,91	CH	CH-1''
77,67	CH	CH-2''
77,67	CH	CH-3''
72,55	CH	CH-4''
76,73	CH	CH-5''
60,80	CH ₂	CH ₂ -6''
Ραμνόζη		
101,13	CH	CH-1'''
70,91	CH	CH-2'''
70,69	CH	CH-3'''
69,72	CH	CH-4'''
68,78	CH	CH-5'''
18,56	CH ₃	CH ₃ -6'''

5.9.3. Ένωση 3: Παράγωγο της ναριγγίνης με ανθρακική αλυσίδα



Φάσμα UV Ένωσης 3 σε MeOH



Από τα μέγιστα των κορυφών της ένωσης 3 σε μεθανόλη (267 και 334 nm) στο φάσμα υπεριώδους-ορατού, διαπιστώνεται ότι πρόκειται για φλαβανόνη, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τα φάσματα NMR της ένωσης όπου παρατηρούνται τα ακόλουθα:

Στην αρωματική περιοχή του φάσματος ^1H NMR παρατηρείται η παρουσία συστήματος AA'BB' το οποίο αντιστοιχεί σε παρα-υποκατάσταση του B δακτυλίου. Έτσι μια διπλή κορυφή σε δ_H 7,30 ppm ($J=8,4$ Hz) αντιστοιχεί στα πρωτόνια **H-2'** και **H6'** ενώ η διπλή κορυφή σε δ_H 6,80 ppm ($J=8,4$ Hz) αντιστοιχεί στα πρωτόνια **H3'** και **H5'**. Παρατηρούνται ακόμα στην αρωματική περιοχή δυο διπλές κορυφές του ενός πρωτονίου σε δ_H 6,16 ppm ($J=1,8$ Hz) και δ_H 6,14 ppm ($J=1,8$ Hz) που σχάζονται μεταξύ τους υποδηλώνοντας μετα σύζευξη των πρωτονίων **H8** και **H6** αντίστοιχα. Οι κορυφές των πρωτονίων H8 και H6 είναι ελαφρώς αποθωρακισμένες και σε χαμηλότερες τιμές πεδίου σε σχέση με την ναριγγενίνη και αυτό υποδηλώνει την παρουσία σακχάρου στη θέση 7 (Mabry et al., 1970). Το χαρακτηριστικό για τη φλαβανόνη πρωτόνιο **H2** εμφανίζεται σαν διπλή διπλών σε δ_H 5,37 ppm ($J= 12,6$ και $2,6$ Hz) ενώ το πρωτόνιο **H3a** εμφανίζεται σαν πολλαπλή σε δ_H 3,15 ppm και το **H3b** σαν διπλή διπλών στα 2,74 ppm ($J= 16,8$ και $2,6$ Hz). Η παρουσία δύο σακχάρων (γλυκόζης και ραμνόζης) φαίνεται από τα ανωμερικά πρωτόνια σε δ_H 5,07 ($J= 7,8$ Hz) και 5,23 ($J= 1,8$ Hz) ppm, ενώ οι σταθερές σύζευξης των δύο σακχάρων είναι ενδεικτικές της α -διαμόρφωσης για τη ραμνόζη και της β -διαμόρφωσης για τη γλυκόζη. Στον πίνακα 5 φαίνονται οι χημικές μετατοπίσεις και οι σταθερές σύζευξης των λοιπών πρωτονίων των δύο σακχάρων, όπως προκύπτουν από το φάσμα ^1H NMR και το δισδιάστατο φάσμα ^1H - ^1H -COSY και πιστοποιούν σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα ότι πρόκειται για γλυκόζη (Lindhorst 2004) και ραμνόζη (Andre de Bruyn 1975). Η γλυκόζη είναι συνδεδεμένη με το υδροξύλιο της θέσης 7 του φλαβονοειδούς, καθώς αυτό προκύπτει από το σήμα του ανωμερικού της γλυκόζης στα 167,53 ppm που εμφανίζεται στο φάσμα HMBC. Τα υπόλοιπα σήματα που αφορούν τον νεοεσπεριδοζίτη της ναριγγενίνης επιβεβαιώθηκαν βιβλιογραφικά (Kim et al.,2007),(Hamdan et al.,2011),(Maltese et al.,2007).

Εκτός από την παρουσία των δύο σακχάρων από τα φάσματα NMR της ένωσης παρατηρείται η ύπαρξη και επιπλέον πρωτονίων, που αποδίδονται σε αλειφατική αλυσίδα, συνδεδεμένη με το μόριο του φλαβονοειδούς, ενώ αυτό επιβεβαιώνεται και από το φάσμα μάζης της ένωσης.

Έτσι σε δ_H 5,3 ppm (δ_C 132,06 ppm) παρατηρείται μια πολλαπλή κορυφή, δύο πρωτονίων, ενδεικτική της ύπαρξης διπλού δεσμού, ενώ σε δ_H 4,03 ppm παρατηρείται κορυφή που αποδίδεται στο πρωτόνιο που συνδέεται μέσω του O με τη φλαβανόνη. Σε δ_H 3,63 (δ_C 53,25 ppm) εμφανίζεται μία απλή κορυφή τριών

πρωτονίων, που αποδίδεται στο μεθύλιο του εστέρα, ενώ τα δύο καρβονύλια φαίνονται από το φάσμα HMBC της ένωσης, όπου τα πρωτόνια i και l εμφανίζουν κοινό σήμα στα 184,05 ppm, ενώ τα πρωτόνια του μεθυλίου του εστέρα με τα πρωτόνια κ εμφανίζουν κοινό σήμα στα 176,60 ppm. Από το φάσμα ^1H - ^1H -COSY της ένωσης παρατηρούνται οι συζεύξεις των πρωτονίων της αλυσίδας, ενώ από το φάσμα HSQC διευκρινίζεται το είδος των πρωτονίων (CH, CH₂ ή CH₃). Η πλήρης επιβεβαίωση της δομής της ένωσης 3 έγινε με το φάσμα μάζας (HR-MS Thermo Scientific).

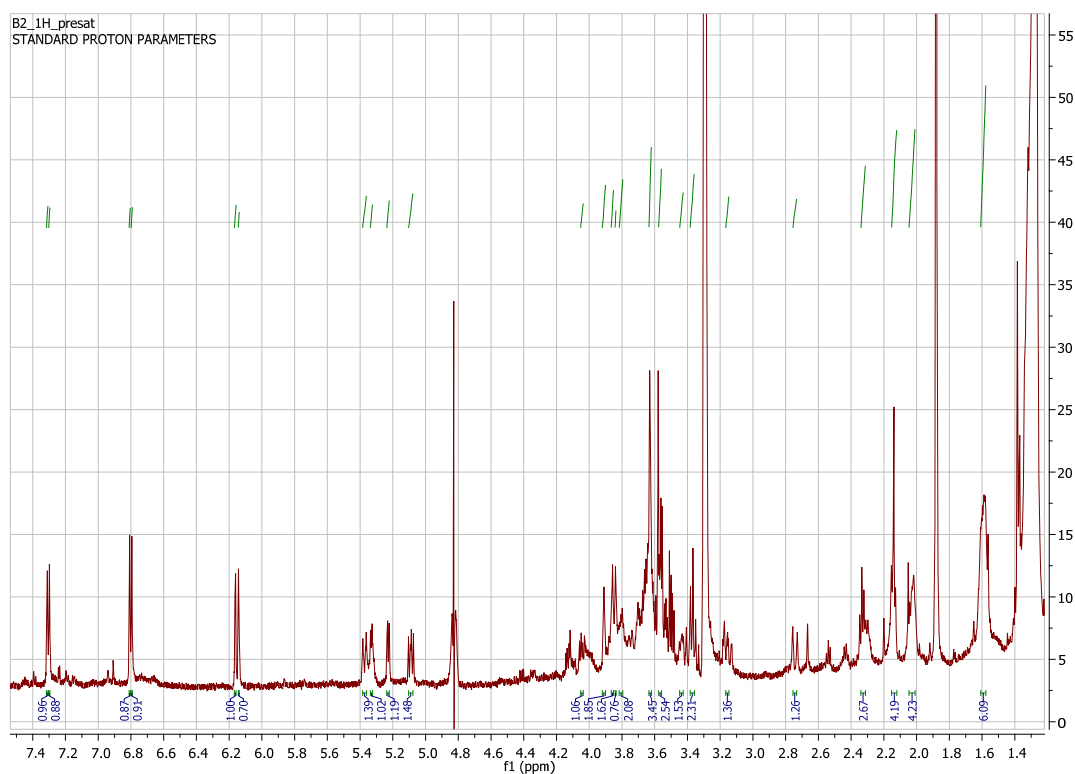
Στο φάσμα μάζας αρνητικού ιονισμού δεν εμφανίζεται το μοριακό ιόν της ένωσης, εμφανίζονται όμως θραύσματα που διευκρινίζουν τη δομή της. Στο σχήμα 4 δίνονται οι θραυσματώσεις της ένωσης 3. Η διάσπαση RDA βοήθησε στη διευκρίνιση της σύνδεσης της αλυσίδας με τον A δακτύλιο του φλαβονοειδούς, καθώς παρατηρούνται θραύσματα του A δακτυλίου με ολόκληρη ή μέρος της αλυσίδας. Η σύνδεση συγκεκριμένα γίνεται με το υδροξύλιο της θέσης 5 της φλαβανόνης, γιατί είναι το μόνο ελεύθερο (στο OH της θέσης 7 είναι συνδεδεμένα τα σάκχαρα). Το θραύσμα 417 προέρχεται από τον A δακτύλιο της ένωσης, μετά από RDA διάσπαση και απομάκρυνση των σακχάρων. Στο θραύσμα αυτό εμφανίζεται ολόκληρη η αλυσίδα. Άλλα σημαντικά θραύσματα είναι το m/z 579 (φλαβανόνη με τα δύο σάκχαρα), m/z 272 (φλαβανόνη), καθώς και τα θραύσματα m/z 613, 599, 585, 447 που προκύπτουν από την αρχική ένωση μετά από την απομάκρυνση της ραμνόζης και τμημάτων της αλυσίδας. Τα θραύσματα m/z 451, 422, 340 προκύπτουν μετά από την απομάκρυνση και των δύο σακχάρων, καθώς και τμημάτων της αλυσίδας. Τέλος τα θραύσματα m/z 461 και 359, προκύπτουν μετά από RDA διάσπαση του φλαβονοειδούς και αντιστοιχούν στον δακτύλιο A, με τα δύο σάκχαρα το πρώτο και με τμήμα της αλυσίδας το δεύτερο.

Στο φάσμα μάζας θετικού ιονισμού επίσης δεν εμφανίζεται το μοριακό ιόν της ένωσης, εμφανίζονται όμως θραύσματα που διευκρινίζουν τη δομή της. Στο σχήμα 5 δίνονται οι θραυσματώσεις της ένωσης 3. Η διάσπαση RDA βοήθησε και σε αυτήν την περίπτωση στη διευκρίνιση της σύνδεσης της αλυσίδας με τον A δακτύλιο του φλαβονοειδούς, καθώς παρατηρούνται θραύσματα του A δακτυλίου με ολόκληρη ή μέρος της αλυσίδας. Το θραύσμα 726 περιέχει ολόκληρη την ανθρακική αλυσίδα ενώ στη συνέχεια προκύπτουν τα θραύσματα 669, 638 και 625 με τη σταδιακή αποχώρηση τμημάτων της ανθρακικής αλυσίδας. Το θραύσμα 683 το οποίο περιέχει

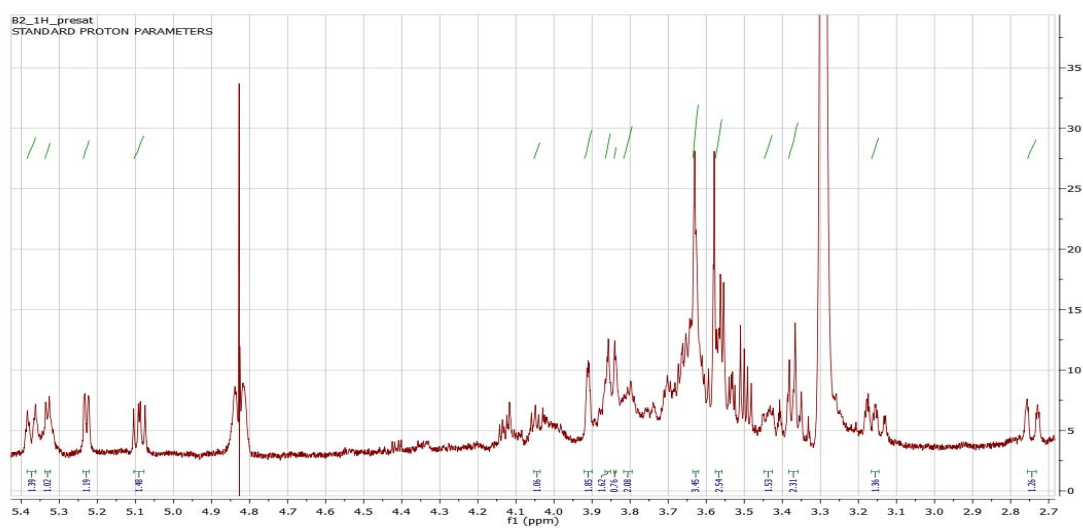
ολόκληρη την αλυσίδα προκύπτει από το 726 με απόσπαση ενός μορίου CO₂ ενώ τον 625 προκύπτει μετά την απομάκρυνση τμήματος της αλυσίδας. Με την απομάκρυνση της ομάδας C₂H₅O από τον αρχικό σκελετό του αγλύκου προκύπτει άλλο ένα παράγωγο από το οποίο προκύπτουν τα θραύσματα 607, 648, 703, 716 και 744 μετά την απομάκρυνση τμημάτων της αλυσίδας. Το θραύσμα 658 προκύπτει μετά την απόσπαση της ραμνόζης από το μόριο ενώ το θραύσμα 438 προκύπτει μετά την απομάκρυνση και της γλυκόζης. Ένα άλλο παράγωγο που προκύπτει μετά την απομάκρυνση ενός CO μετατρέπει τον δακτύλιο C σε φουρανικό και στη συνέχεια με την απομάκρυνση και των δύο σακχάρων με τμήματα από την ανθρακική αλυσίδα προκύπτουν τα θραύσματα 354 και 313. Ενώ η απομάκρυνση τμημάτων από την ανθρακική αλυσίδα με ταυτόχρονη παραμονή των δύο σακχάρων δίνει τα θραύσματα 703 και 677. Η απόσπαση ενός O από τον προηγούμενο παράγωγο οδηγεί σε ένα άλλο παράγωγο όπου ο δακτύλιος C έχει καταστεί τετραμελής και με την απομάκρυνση τμημάτων από την αλυσίδα προκύπτουν τα θραύσματα 620, 648, 605, 703, 743, 771. Η απομάκρυνση στη συνέχεια ενός CO από τον βενζολικό δακτύλιο B δίνει ένα παράγωγο από το οποίο με αποχώρηση τμημάτων της αλυσίδας δίνει τα θραύσματα 743 και 605 με διαφορετική δομή. Ένα άλλο είδος παραγώγου, το 783 προκύπτει αμέσως μετά την απομάκρυνση ολόκληρου του βενζολικού δακτυλίου το οποίο στη συνέχεια μετά την απομάκρυνση της ραμνόζης δίνει το θραύσμα 605 σε μια ακόμη διαφορετική δομή. Η απομάκρυνση τμημάτων της αλυσίδας με ταυτόχρονη διατήρηση των σακχάρων δίνει τα θραύσματα 693, 637, 677 και 739. Η απομάκρυνση και των δύο σακχάρων από το μοριακό ιόν με παραμονή ολόκληρης της ανθρακικής αλυσίδας δίνει το θραύσμα 381 ενώ εμφανίζεται και τμήμα της αλυσίδας που αντιστοιχεί στο θραύσμα 236. Η απόσπαση του B βενζολικού δακτυλίου με ένα μεθύλιο από το μοριακό ιόν δίνει το θραύσμα 740 και το θραύσμα 711 το οποίο προκύπτει από την απόσπαση μιας μέθοξυ ομάδας από την πλευρική αλυσίδα. Μετά από τον σχηματισμό λακτονικού δακτυλίου στη θέση του δακτυλίου C προκύπτει το θραύσμα 726 με διαφορετική δομή.

Η ένωση 3 είναι ένα νέο φυσικό προϊόν.

Φάσμα ^1H - NMR της Ένωσης 3 (CD_3OD , 600 MHz)

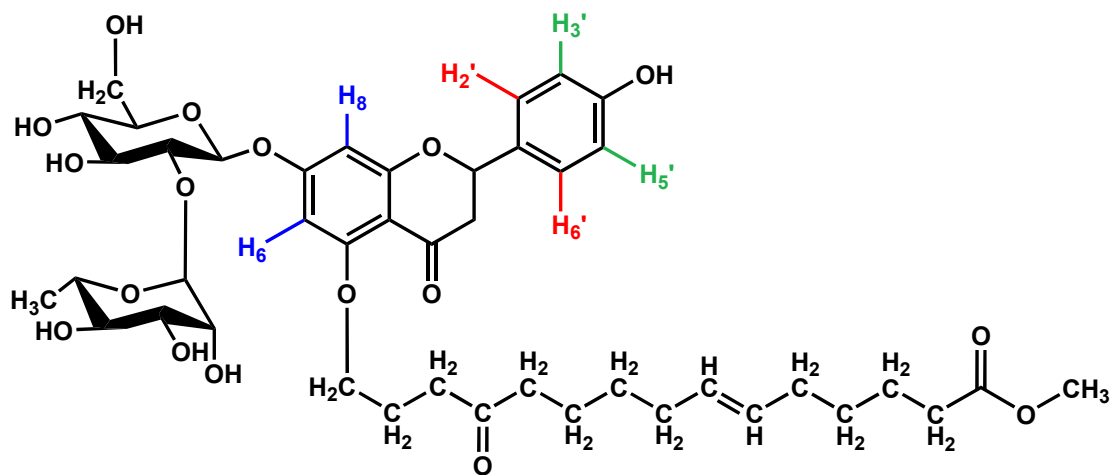
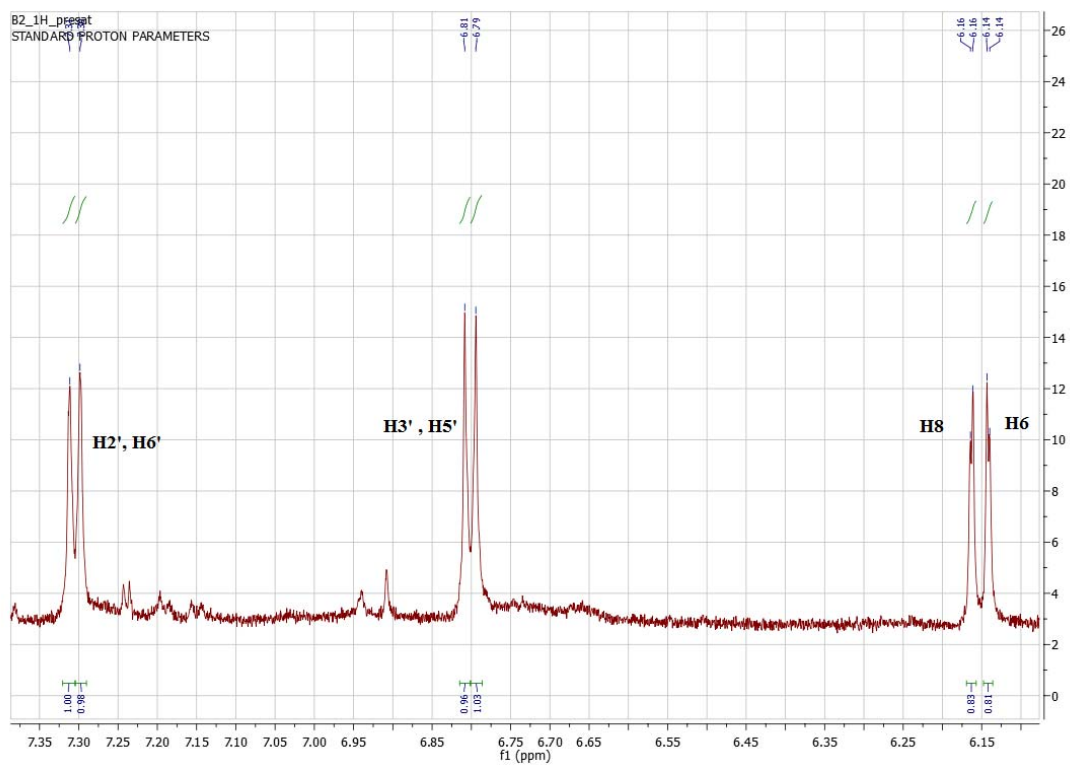


Φάσμα ^1H - NMR της Ένωσης 3 (CD_3OD , 600 MHz) περιοχή των σακχάρων

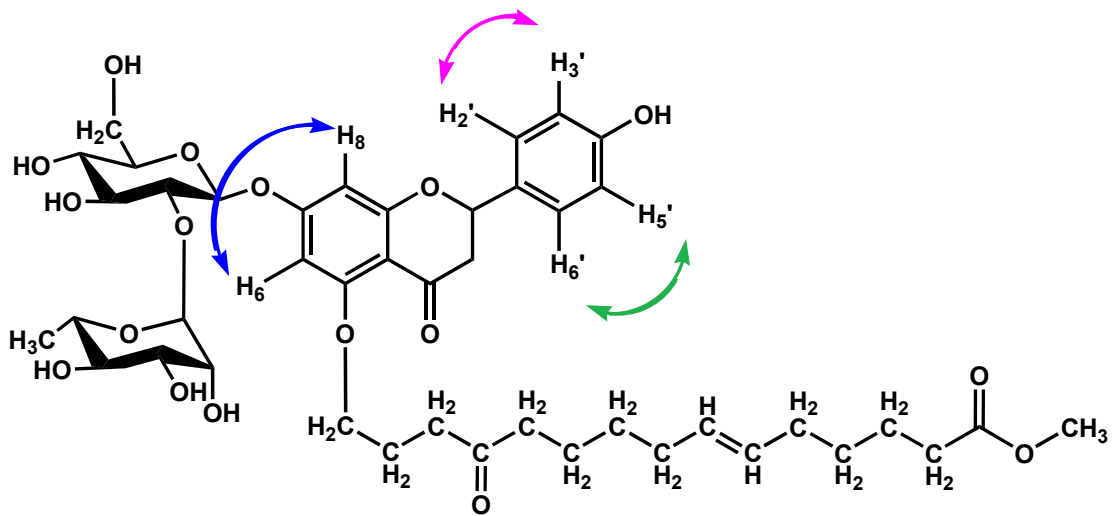
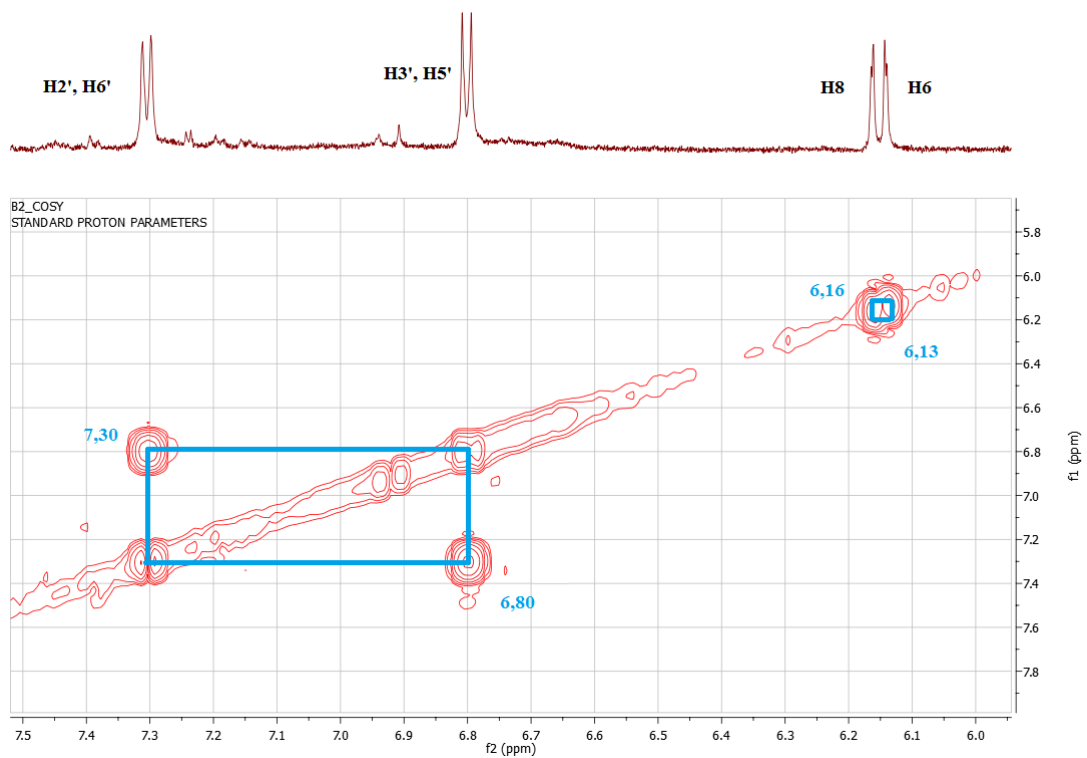


//

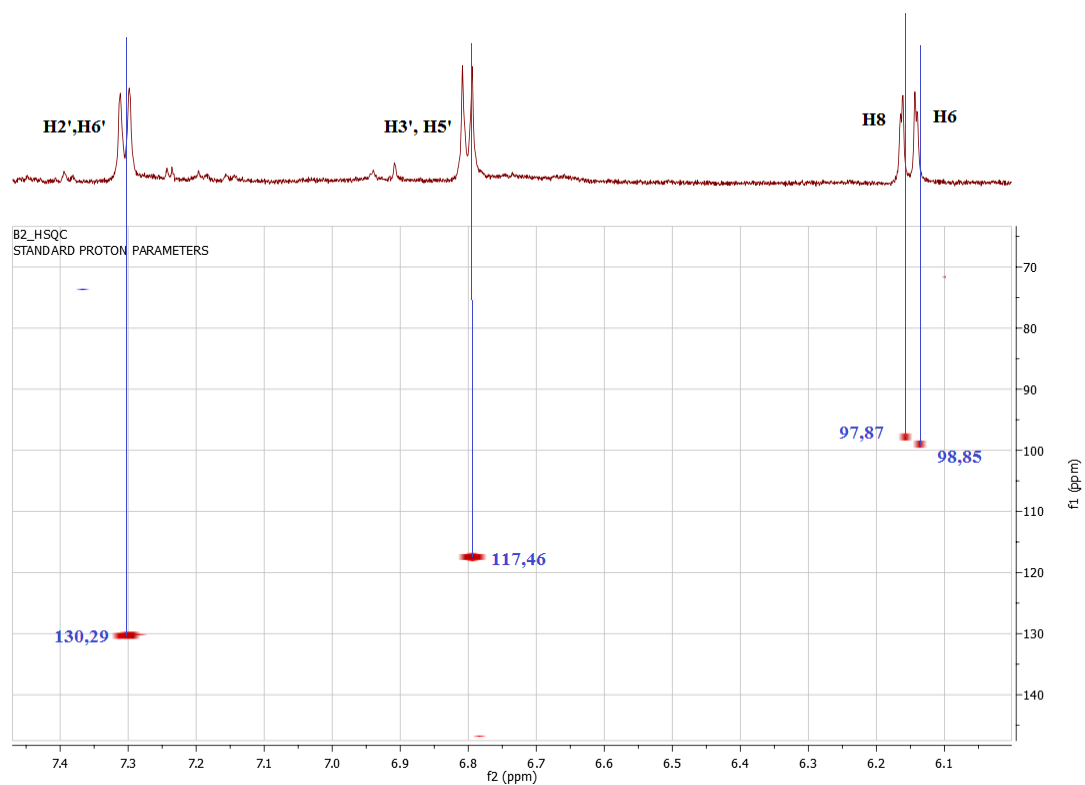
Φάσμα ^1H -NMR της Ένωσης 3 (CD_3OD , 600 MHz) αρωματική περιοχή



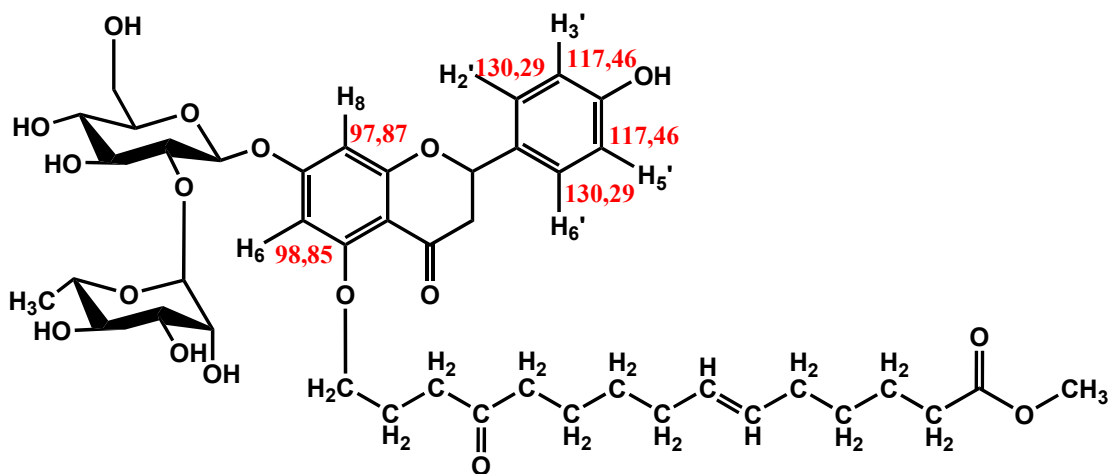
Φάσμα ^1H - ^1H COSY της Ένωσης 2 (CD_3OD , 600 MHz) Αρωματική περιοχή



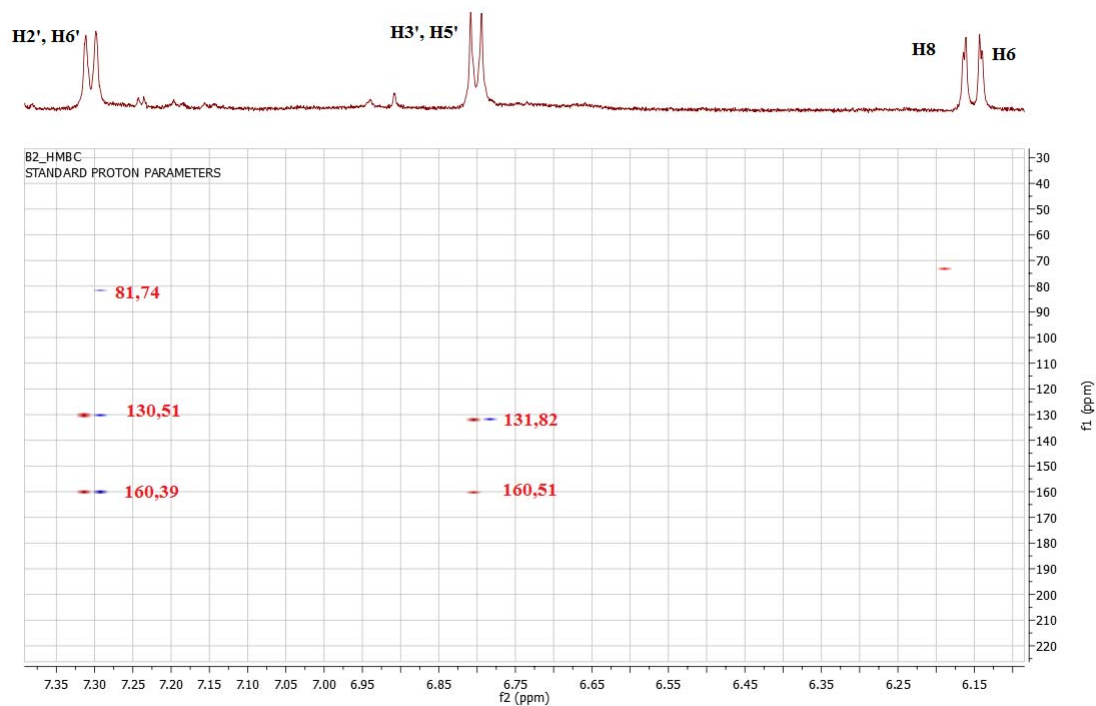
Φάσμα HSQC Ένωσης 3 (CD₃OD, 600MHz) αρωματική περιοχή



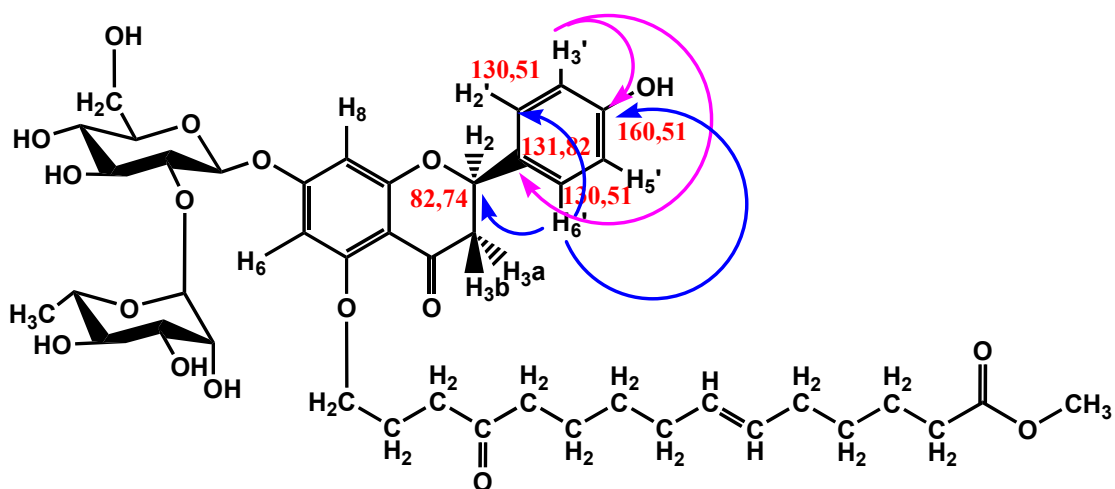
Τα βασικά παρατηρούμενα σήματα της Ένωσης 3 στο φάσμα HSQC στην περιοχή των αρωματικών



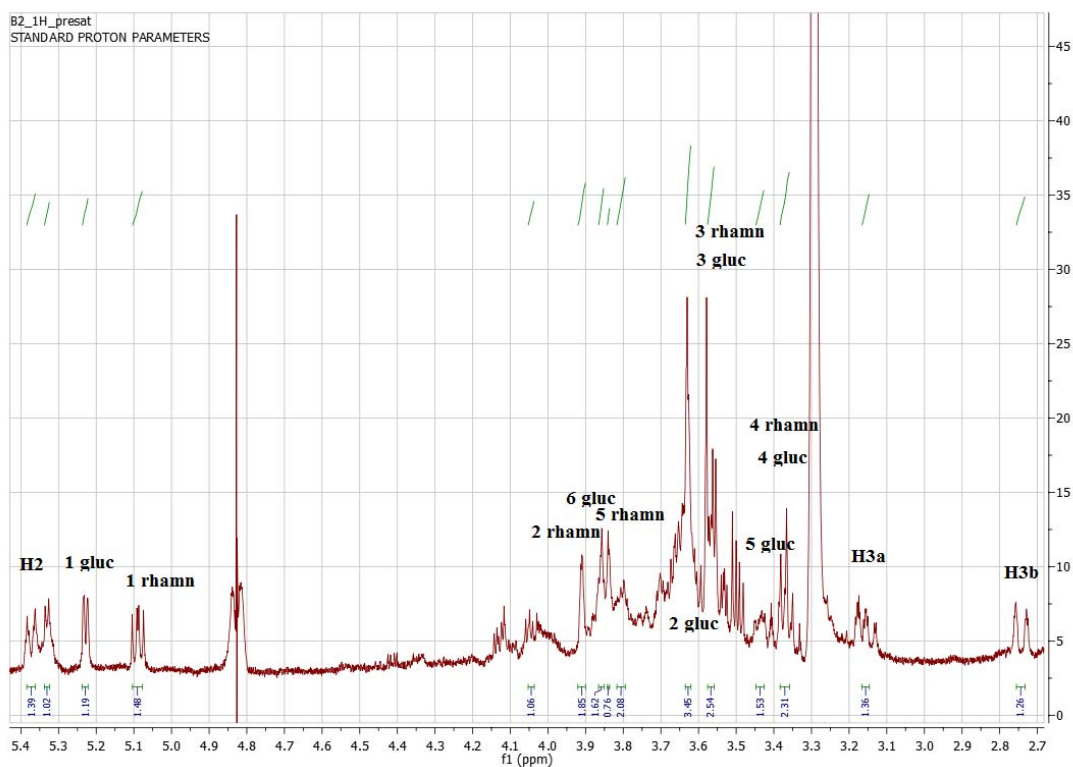
Φάσμα HMBC Ένωσης 3 (CD₃OD, 600MHz) στην αρωματική περιοχή



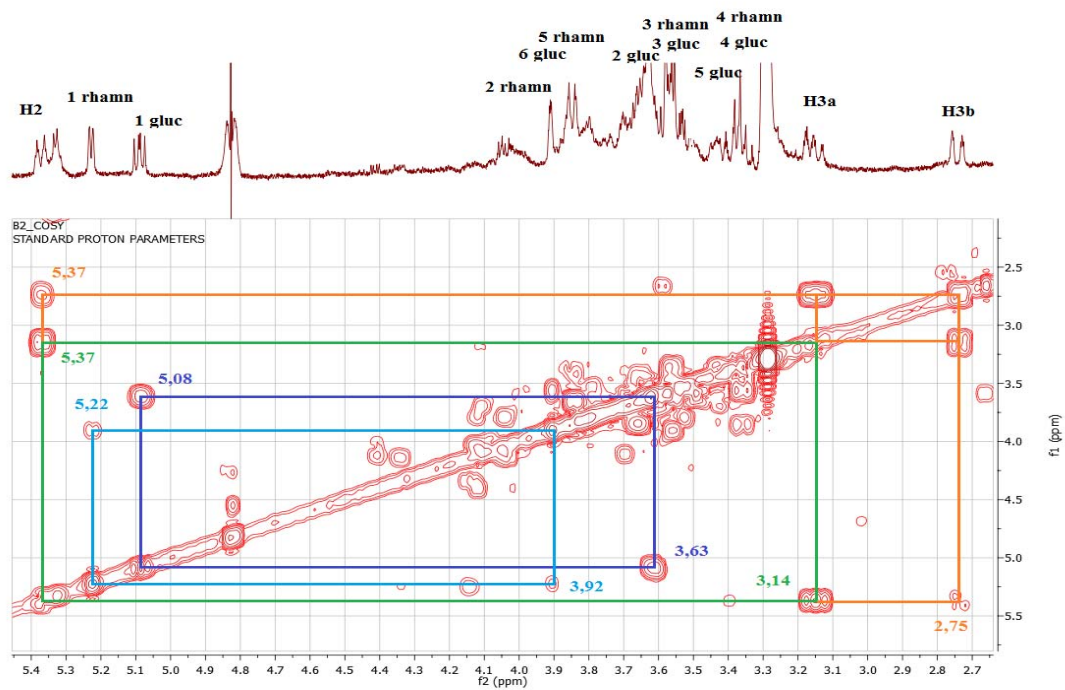
Τα βασικά παρατηρούμενα σήματα της Ένωσης 3 στο φάσμα HMBC στην περιοχή των αρωματικών

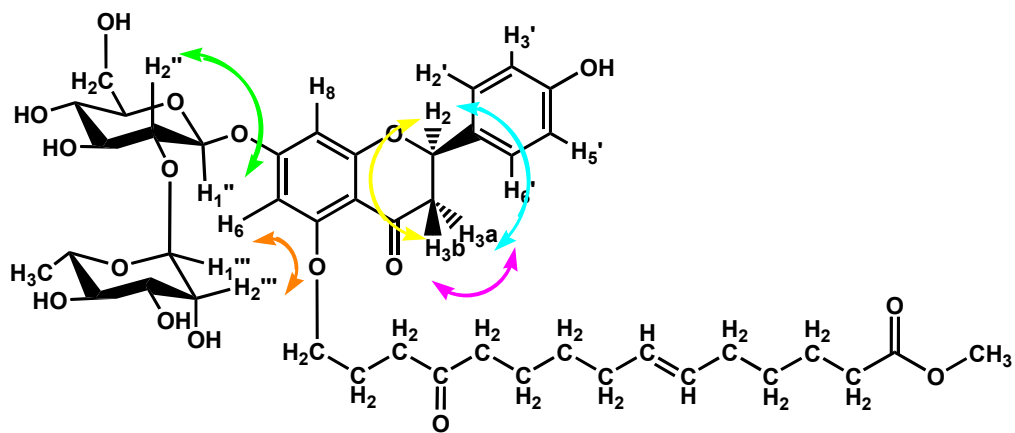


Φάσμα ^1H -NMR Ένωσης 3 (CD_3OD , 600MHz) περιοχή των σακχάρων

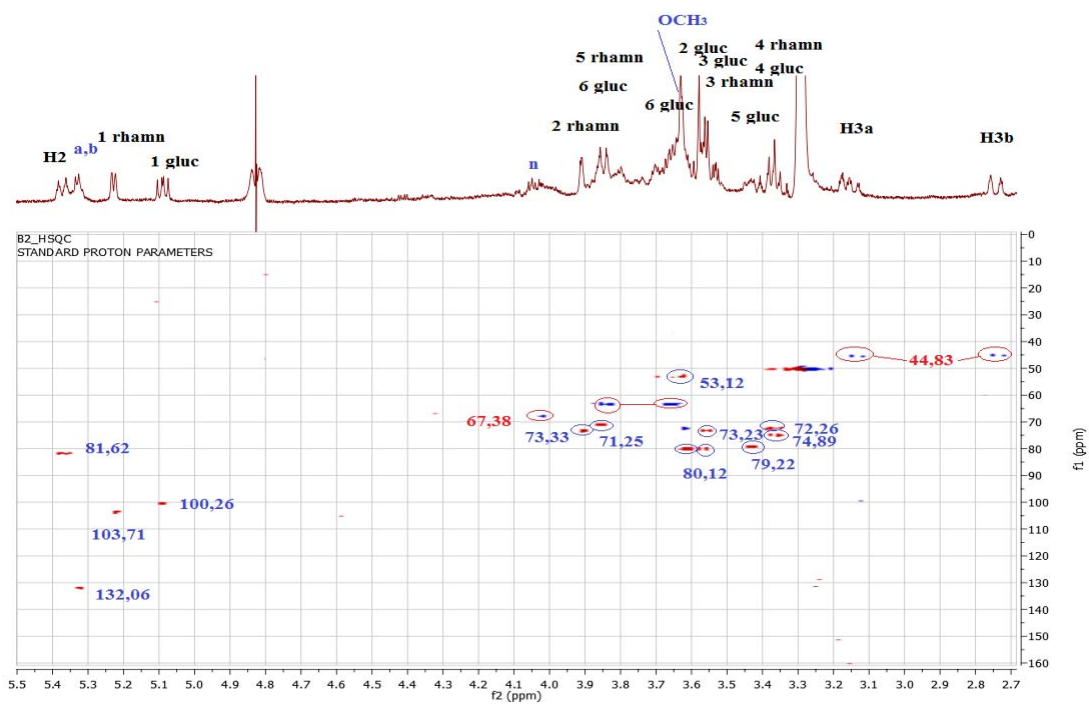


Φάσμα ^1H - ^1H COSY της Ένωσης 3 (CD_3OD , 600 MHz) περιοχή των σακχάρων

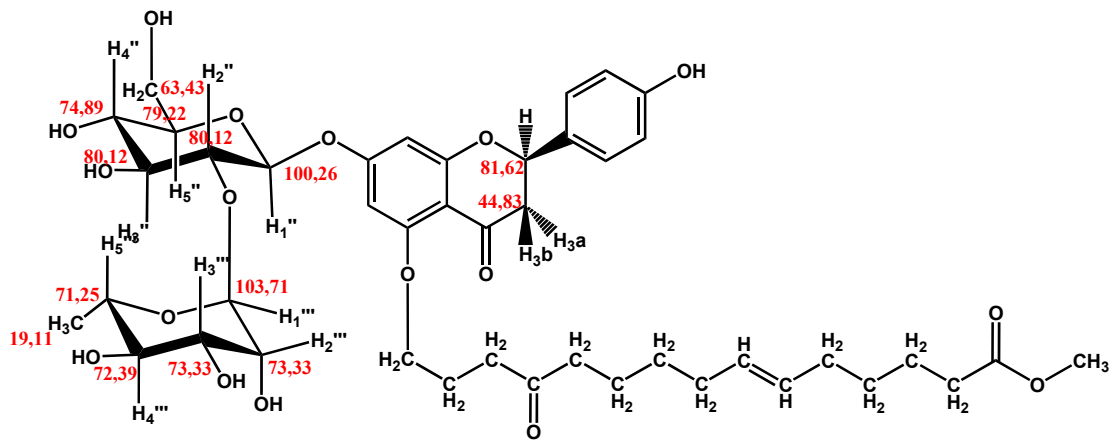




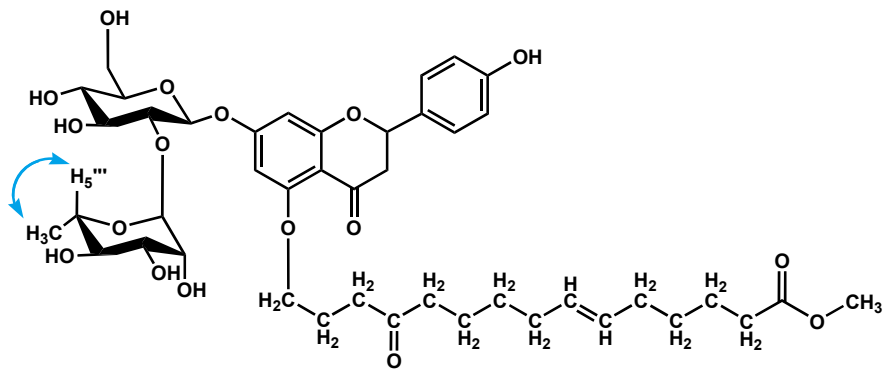
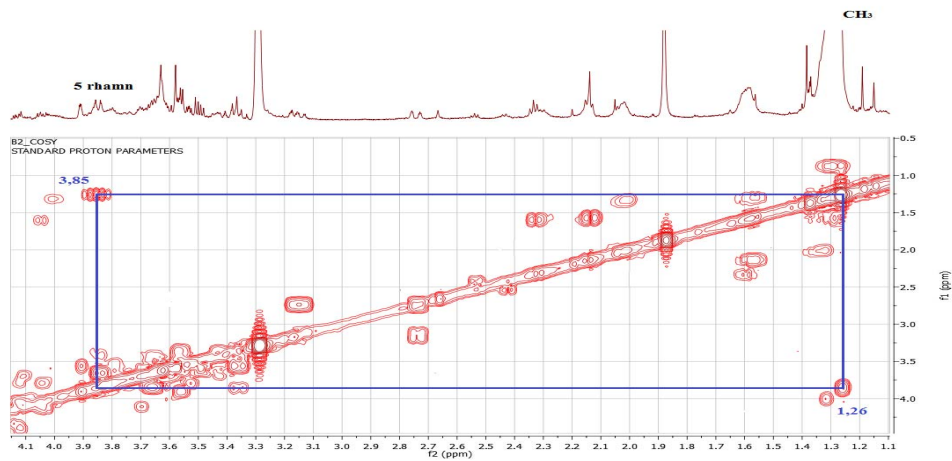
Φάσμα HSQC της Ένωσης 3 (CD₃OD, 600 MHz) περιοχή σακχάρων



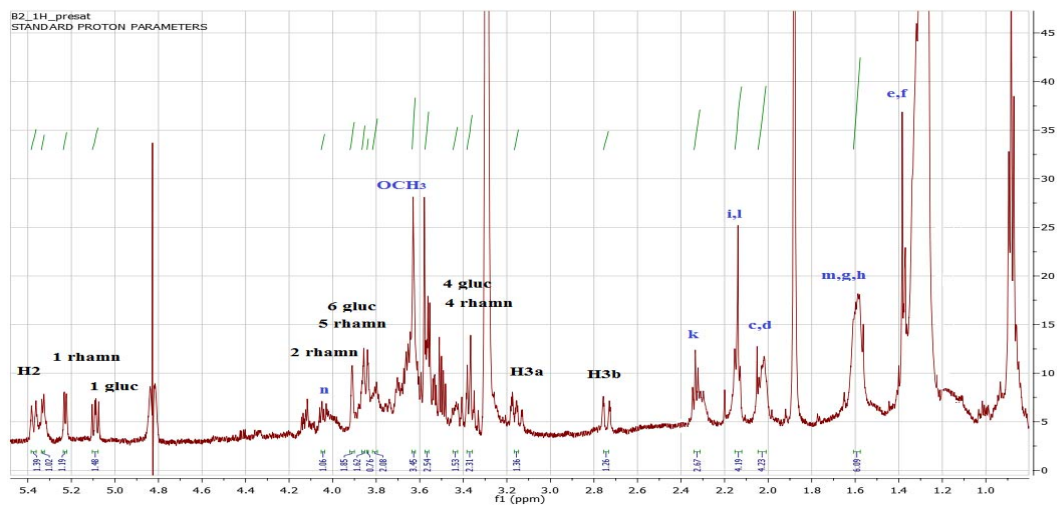
Ένωση 3: τα βασικά παρατηρούμενα σήματα στο φάσμα HSQC στην περιοχή των σακχάρων



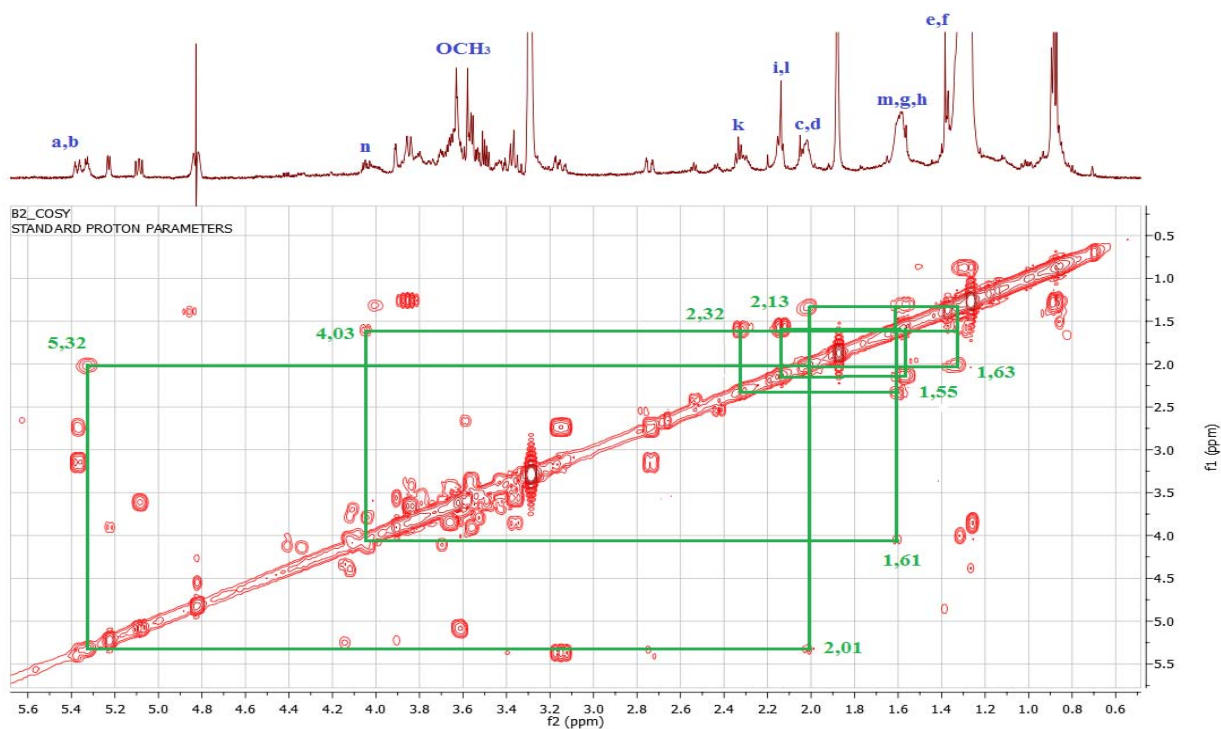
Φάσμα ^1H - ^1H COSY της Ένωσης 3 (CD_3OD , 600 MHz) περιοχή σακχάρων

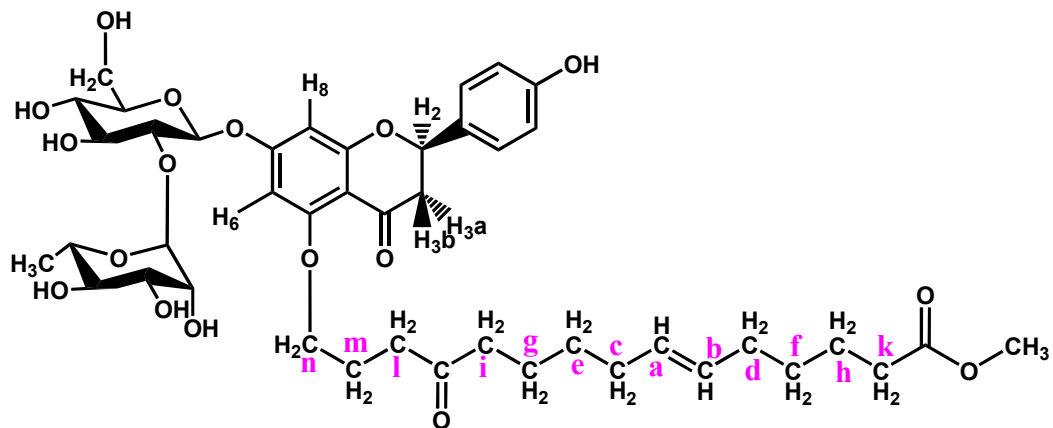


Φάσμα ^1H - NMR Ένωσης 3 (CD_3OD , 600MHz) περιοχή των σακχάρων και αλειφατικών

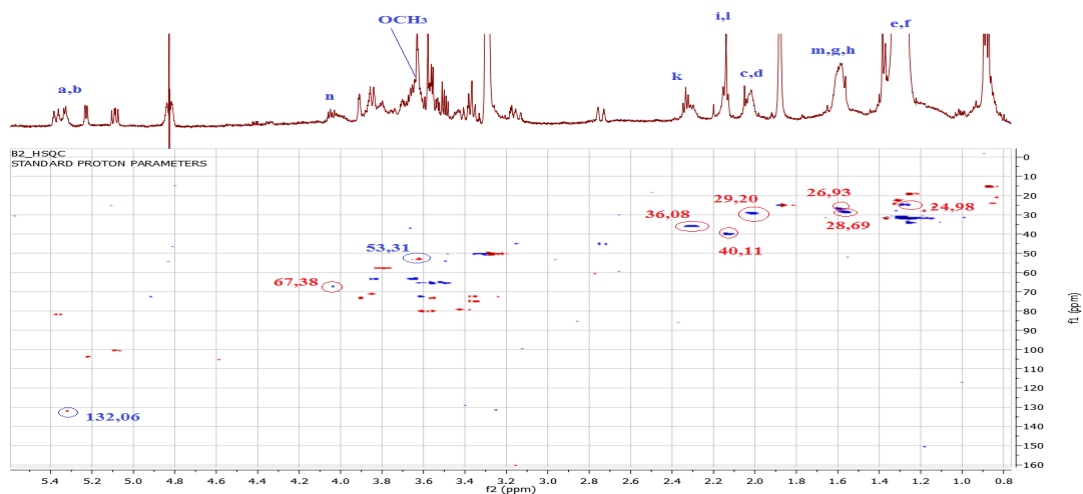
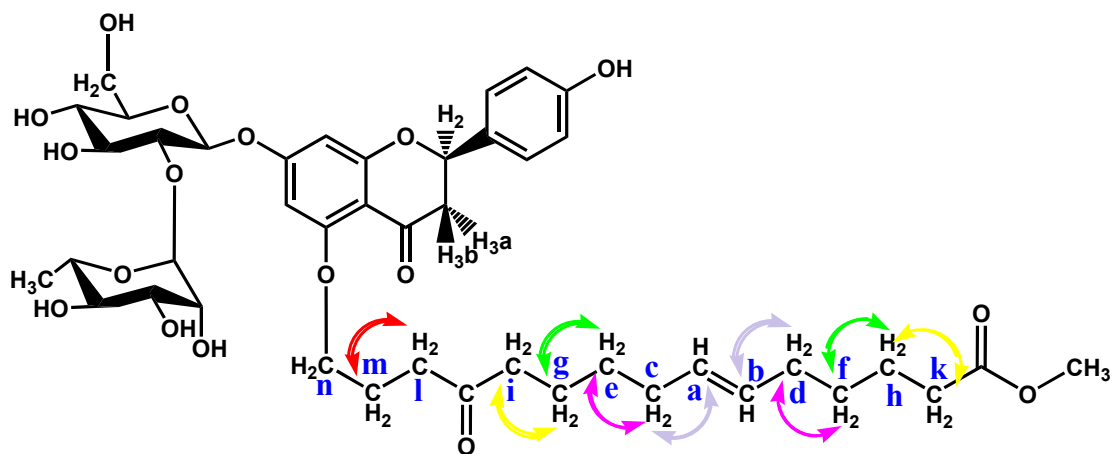


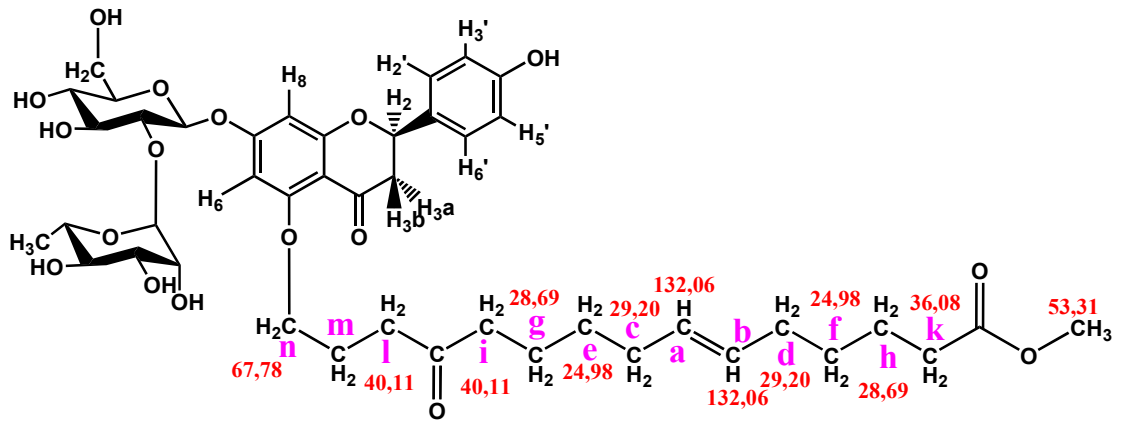
Φάσμα ^1H - ^1H COSY της Ένωσης 3 (CD_3OD , 600 MHz) περιοχή αρωματικών-αλειφατικών



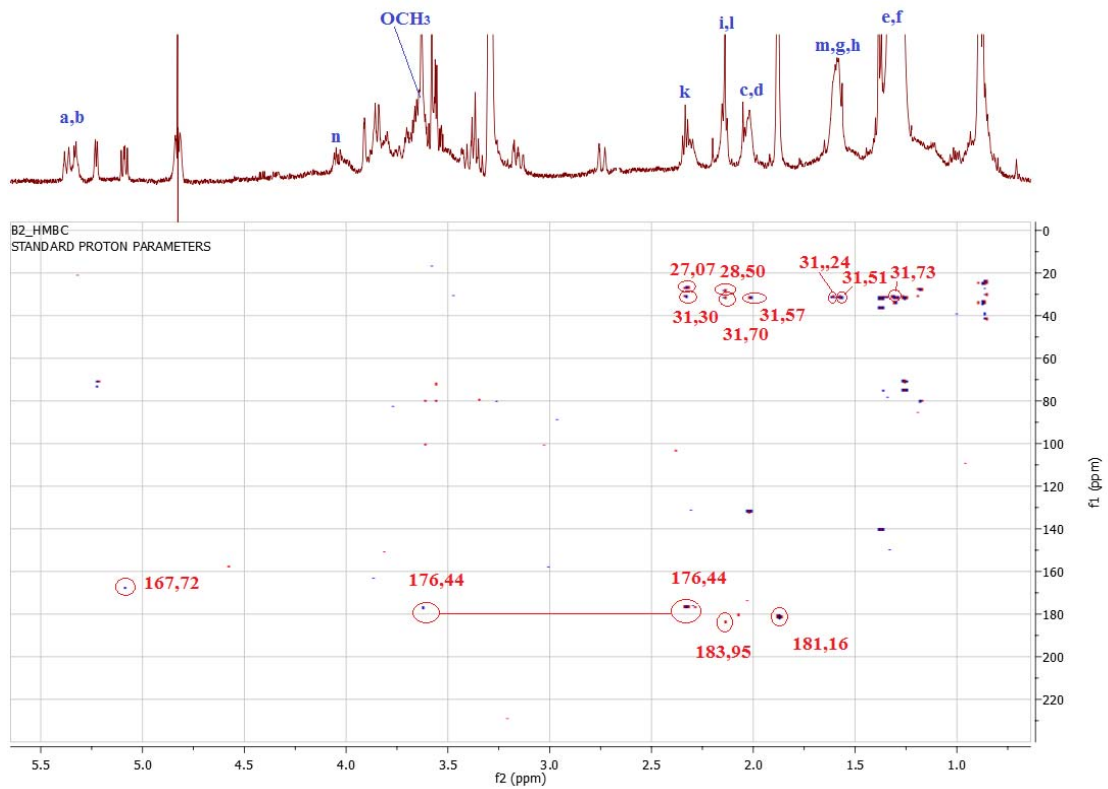


Ένωση 3: τα βασικά παρατηρούμενα σήματα στο φάσμα HSQC για την ανθρακική αλυσίδα

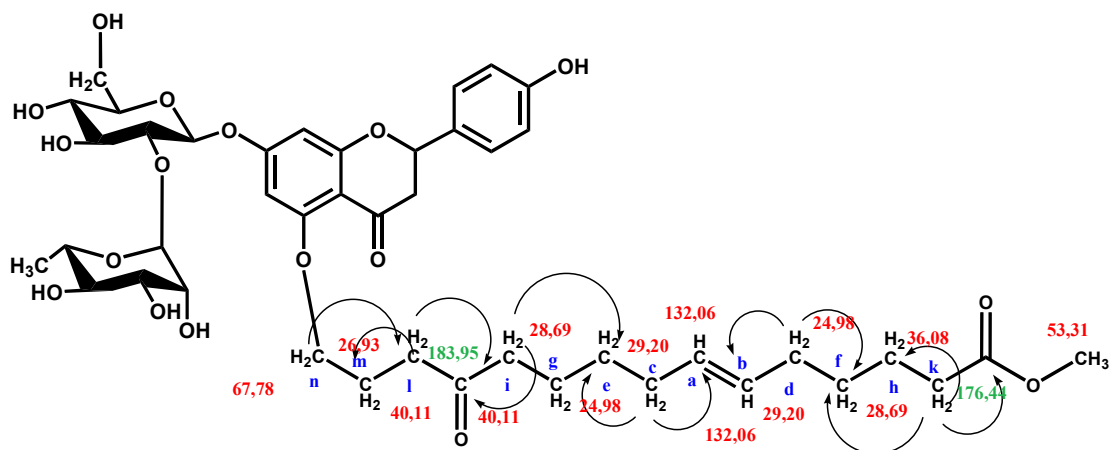




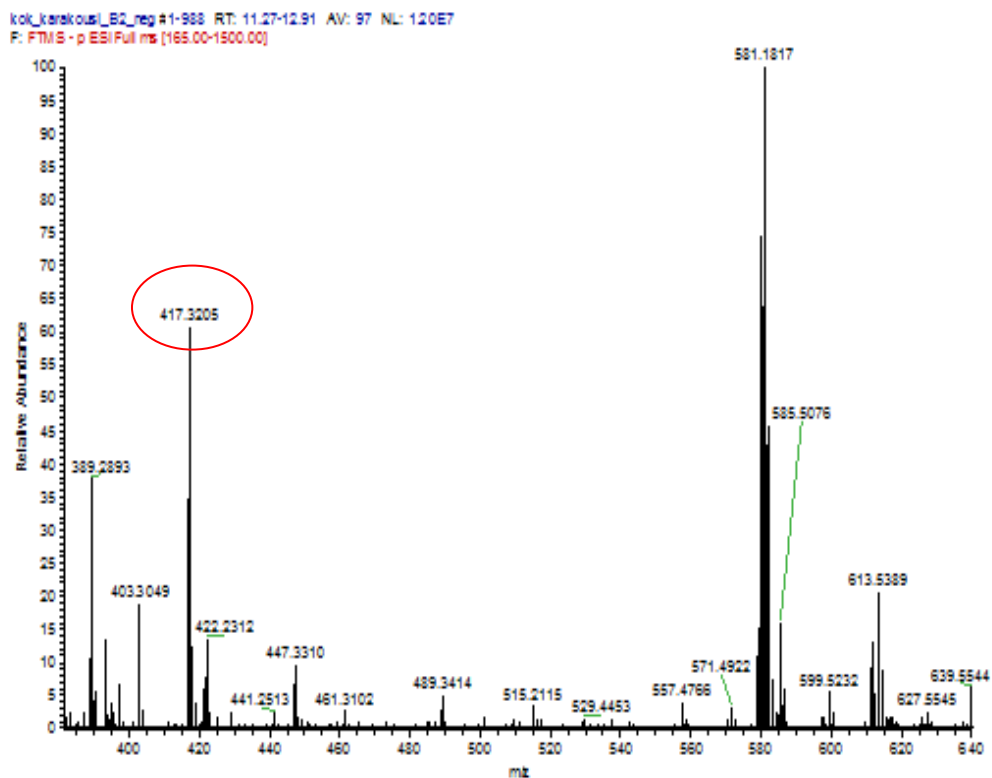
Φάσμα HMBC Ένωσης 3 (CD₃OD, 600MHz) περιοχή των αρωματικών-αλειφατικών

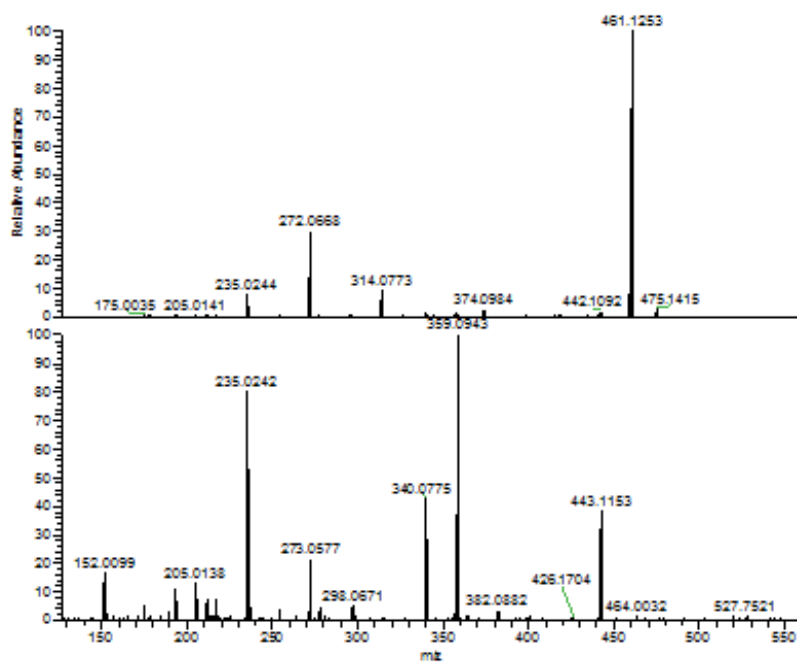


Ένωση 3: τα βασικά παρατηρούμενα σήματα στο φάσμα HMBC



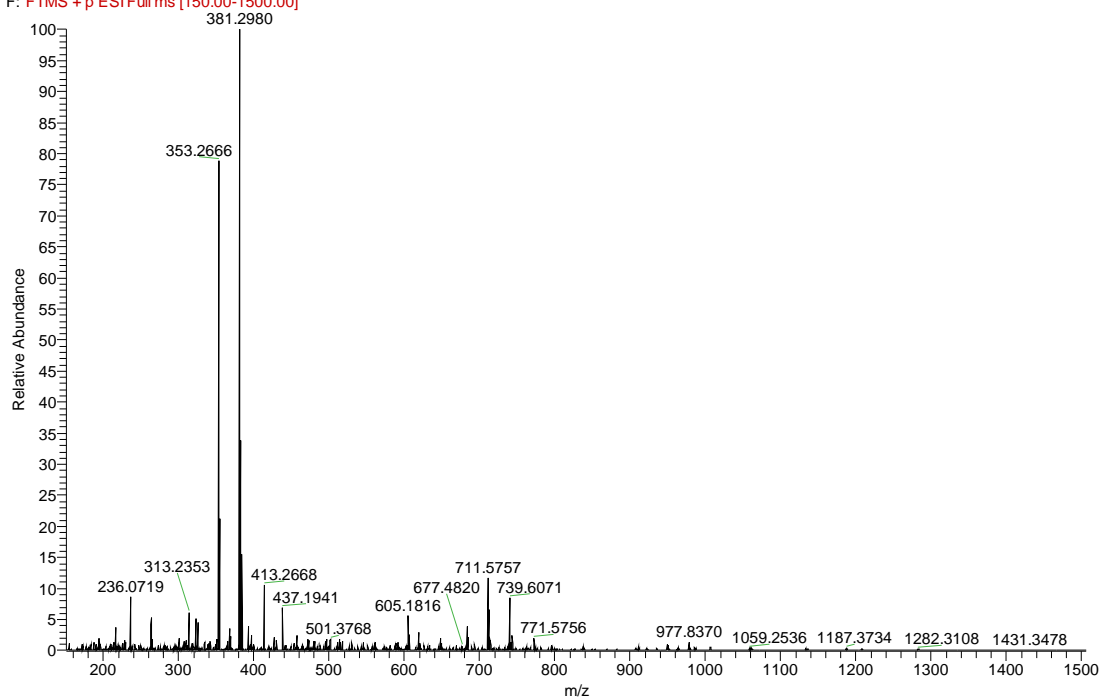
Φάσμα μάζας Ένωσης 3 Αρνητικός ιονισμός



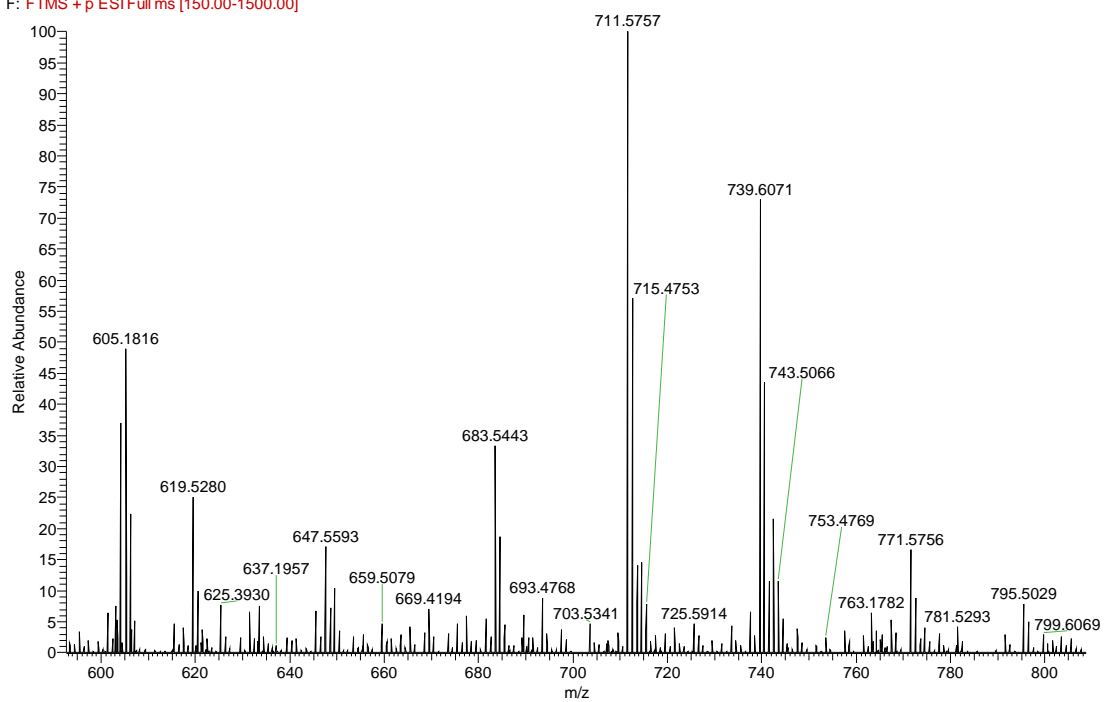


Φάσμα μάζας Ένωσης 3 Θετικός ιονισμός

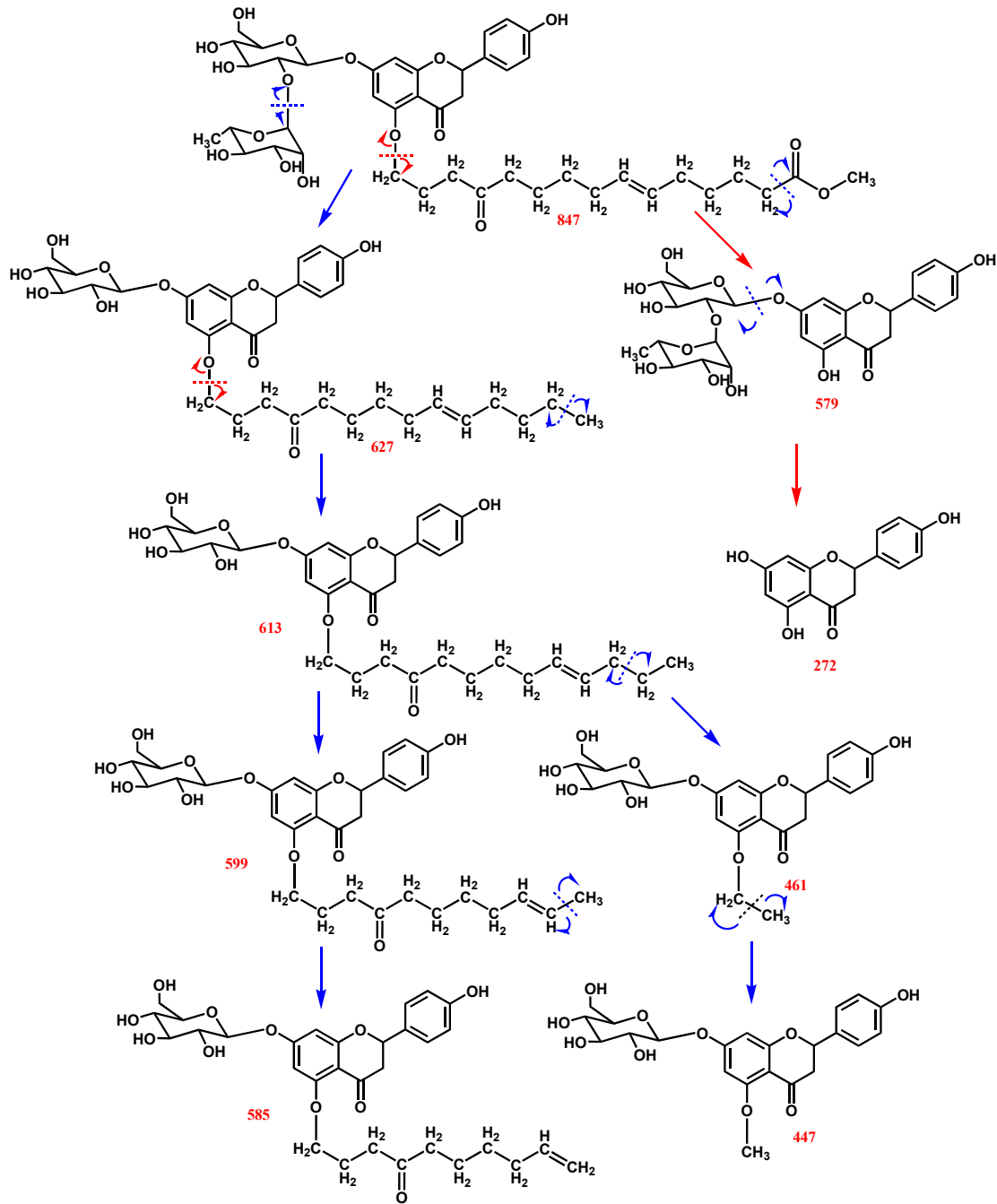
kok_karakousi_B2_poz #59-140 RT: 0.29-1.35 AV: 78 NL: 4.98E7
F: FTMS +p ESI Full ms [150.00-1500.00]

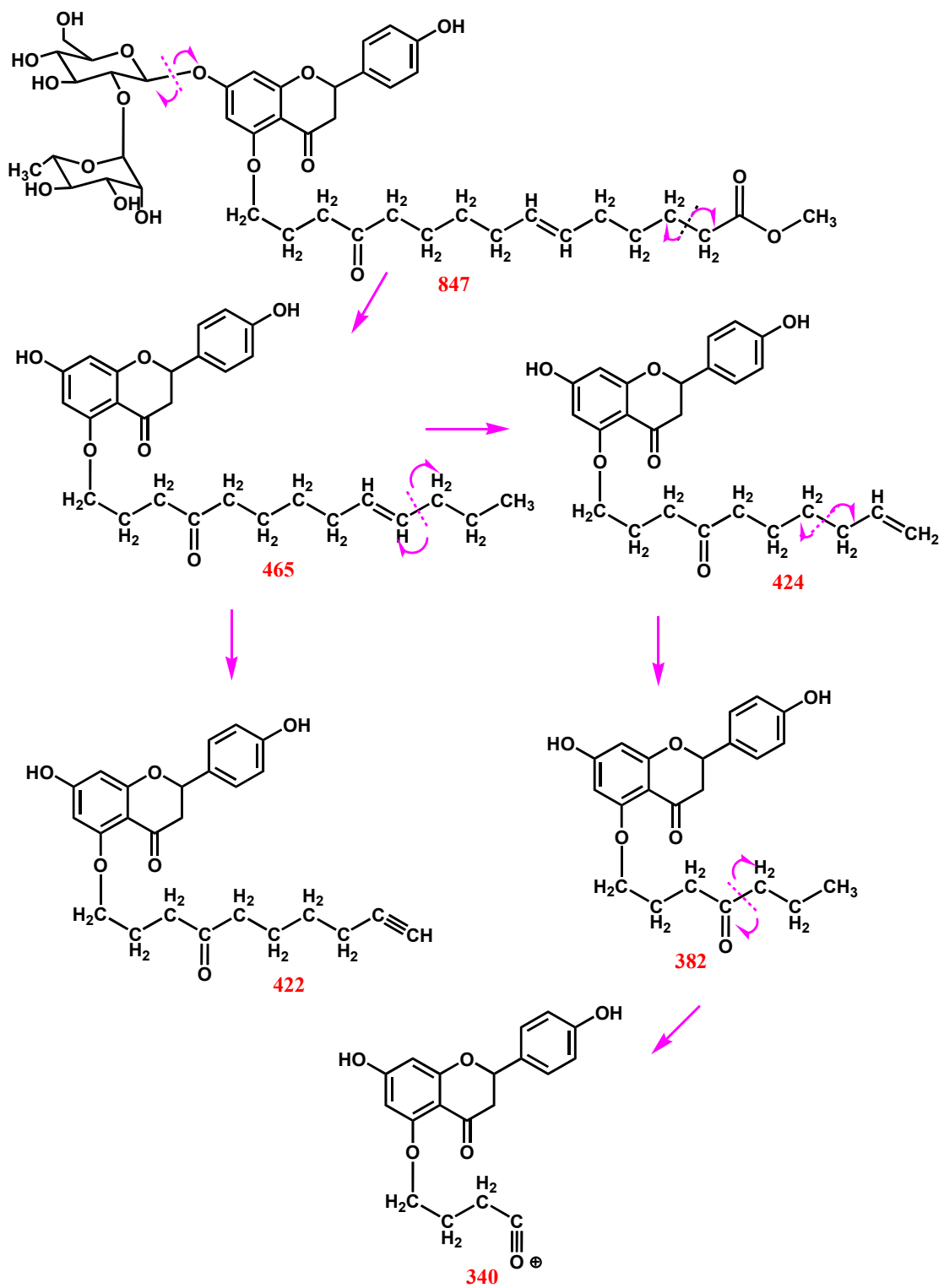


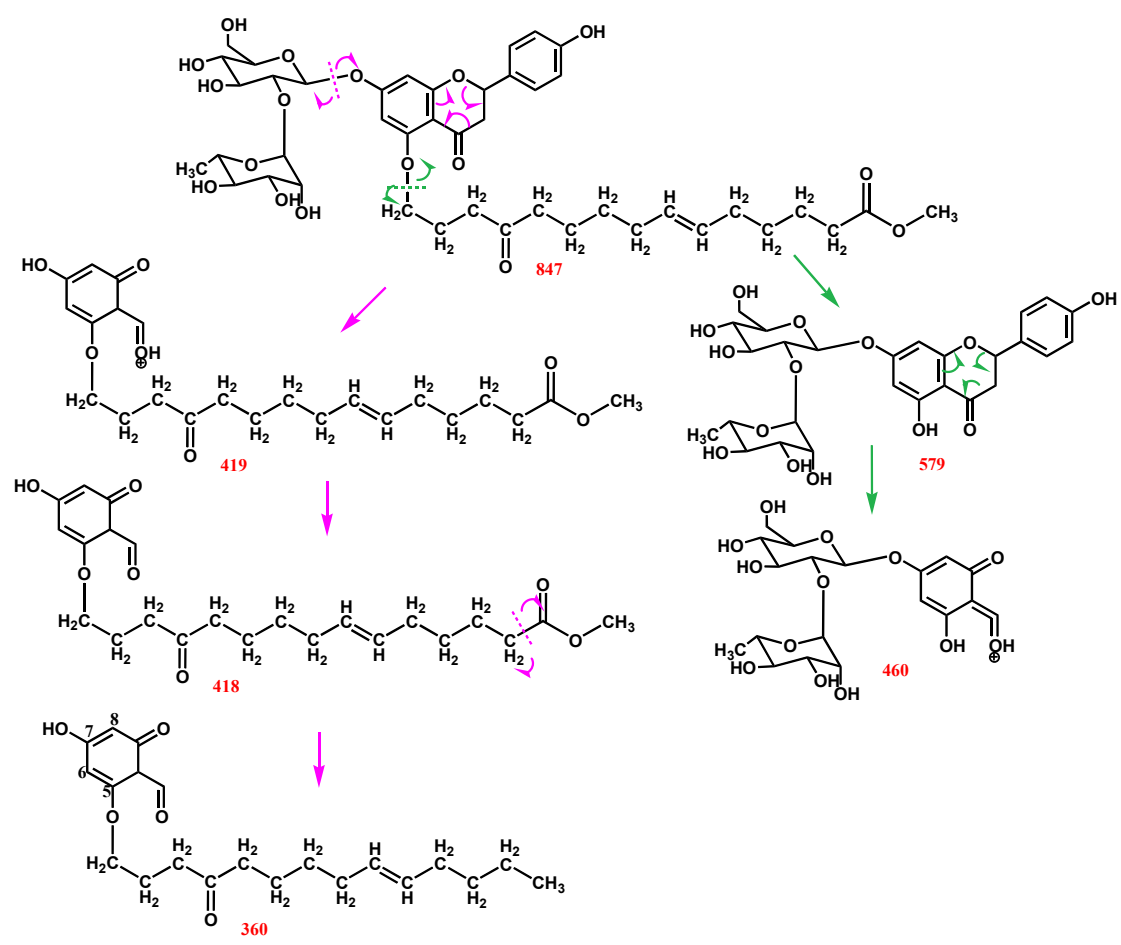
kok_karakousi_B2_poz #59-140 RT: 0.29-1.35 AV: 78 NL: 5.79E6
F: FTMS +p ESI Full ms [150.00-1500.00]

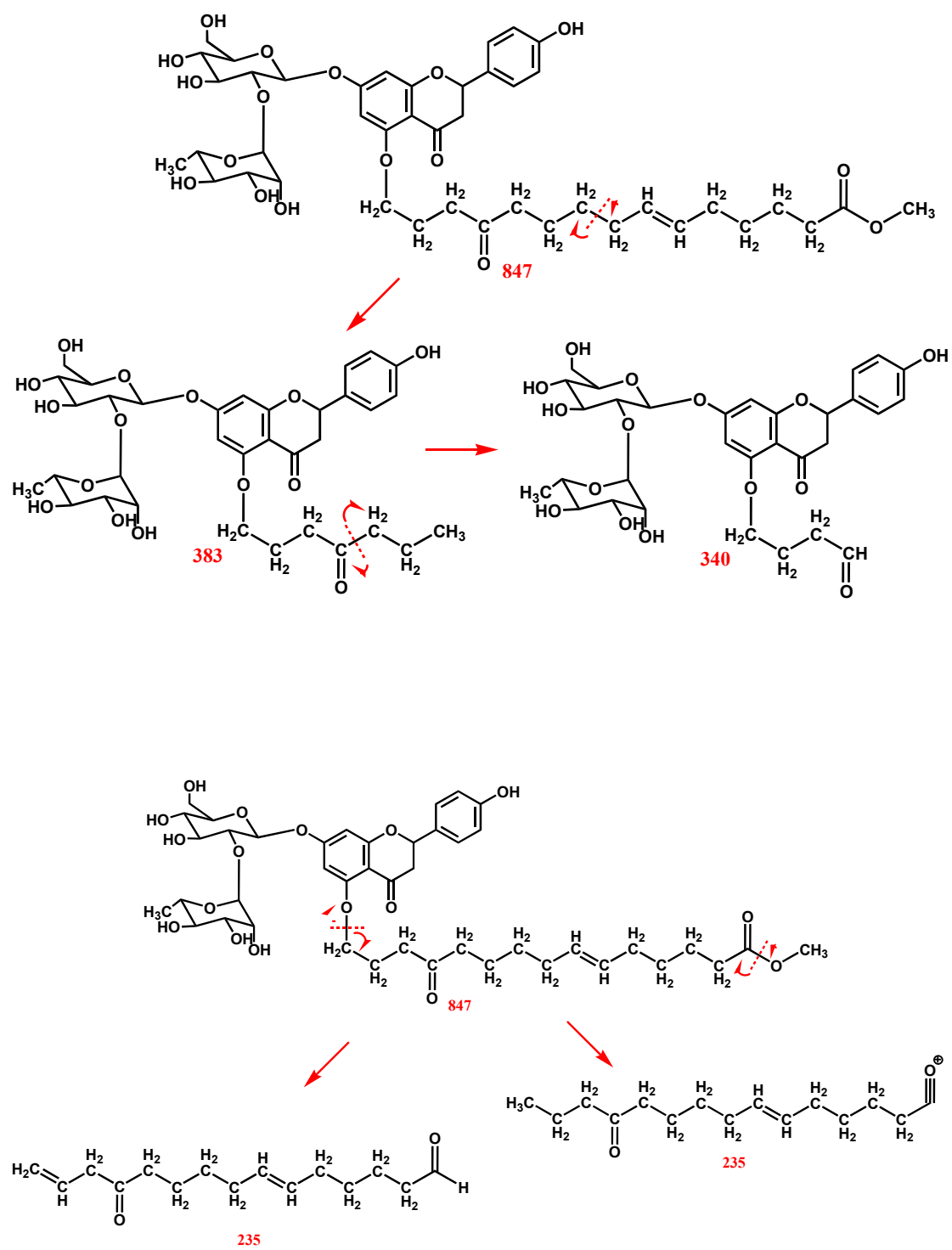


Σχήμα 4: Αρνητικός ιονισμός

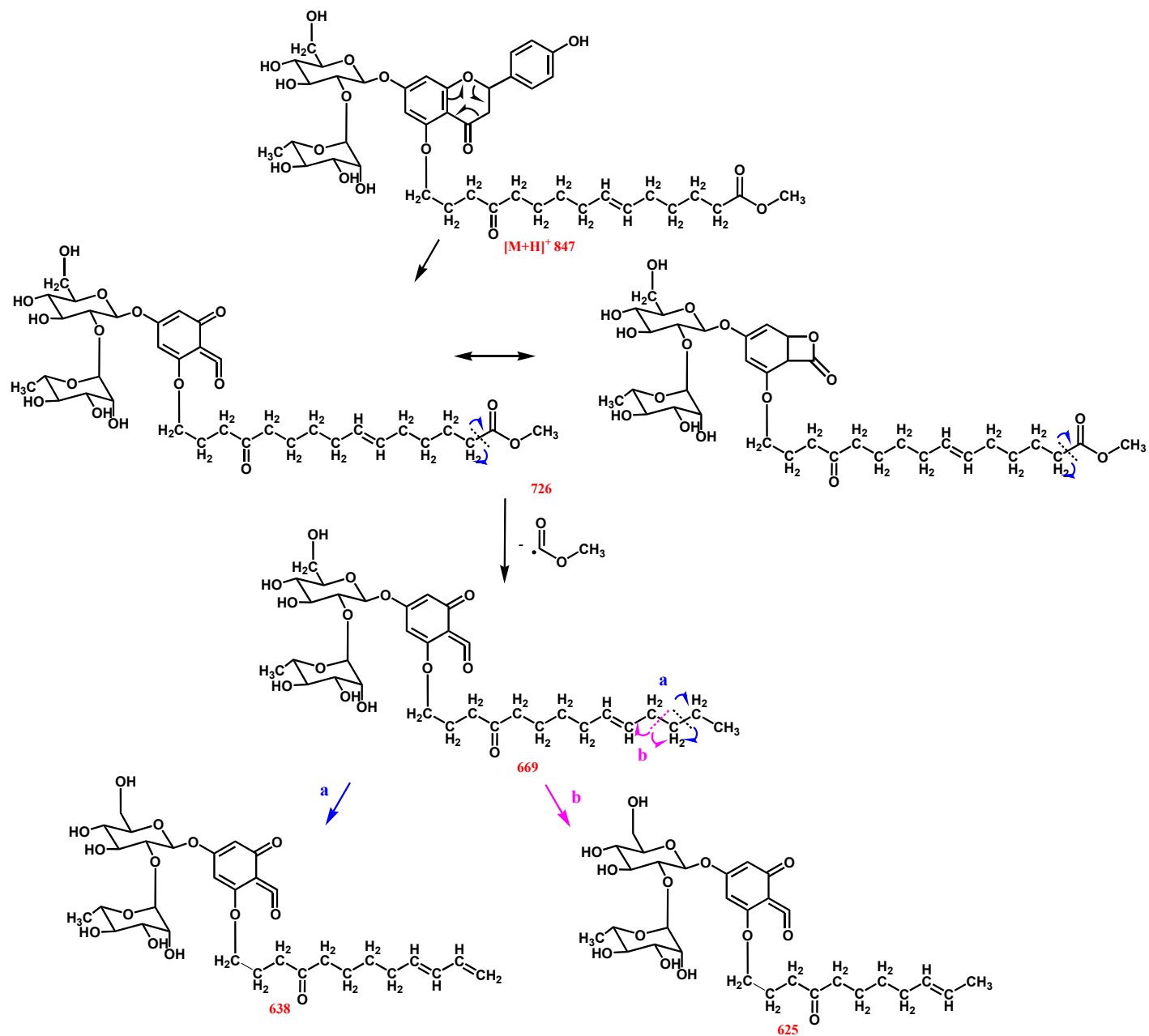


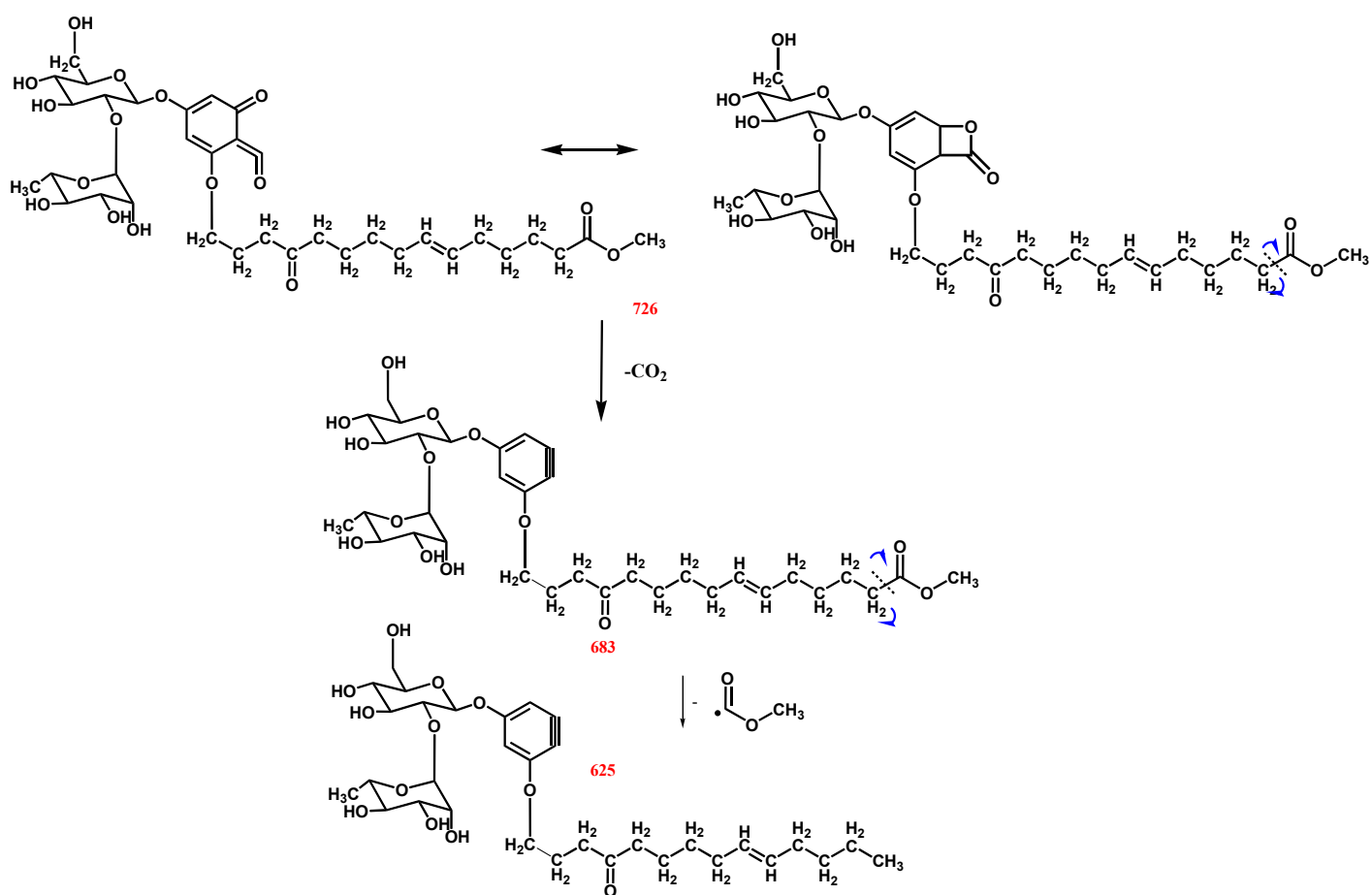


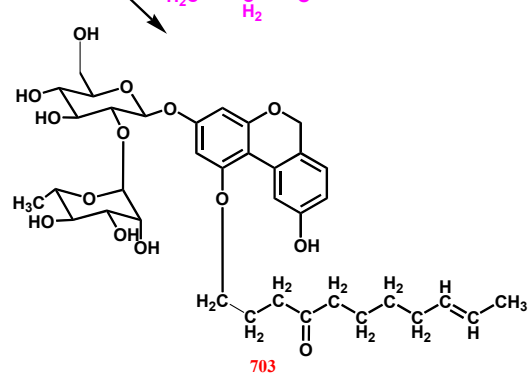
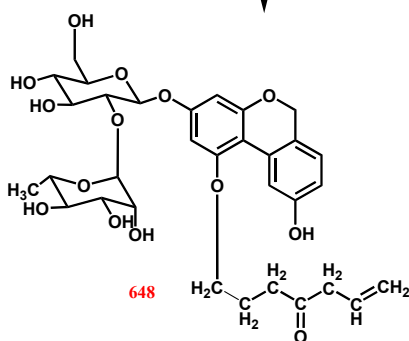
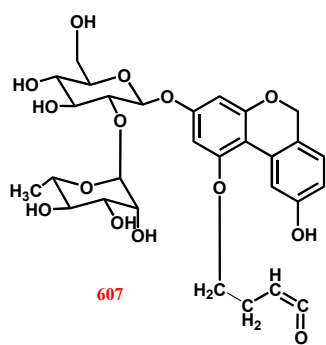
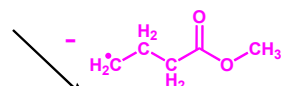
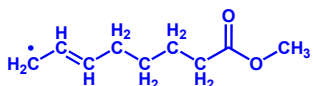
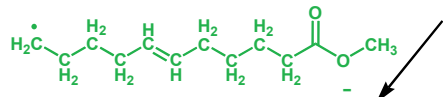
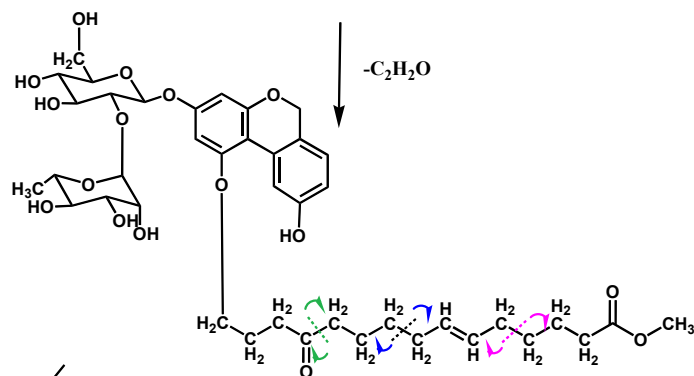
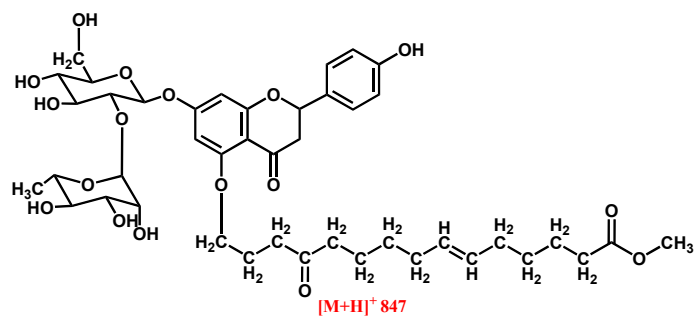


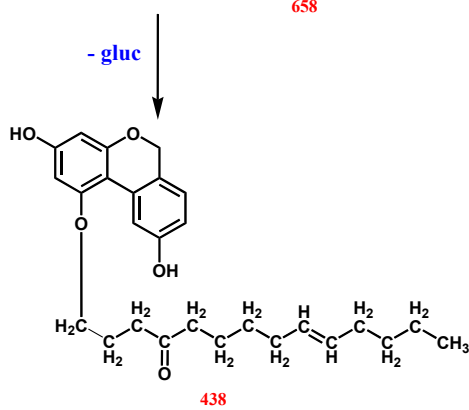
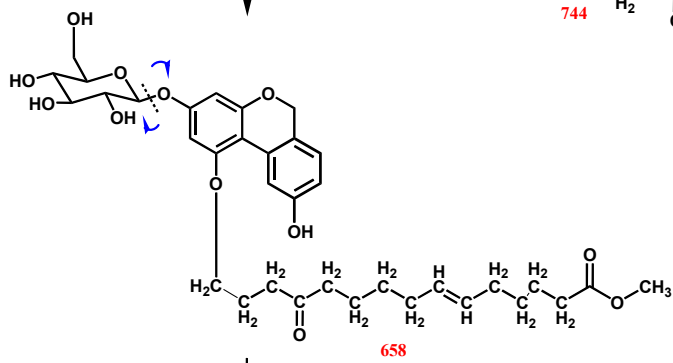
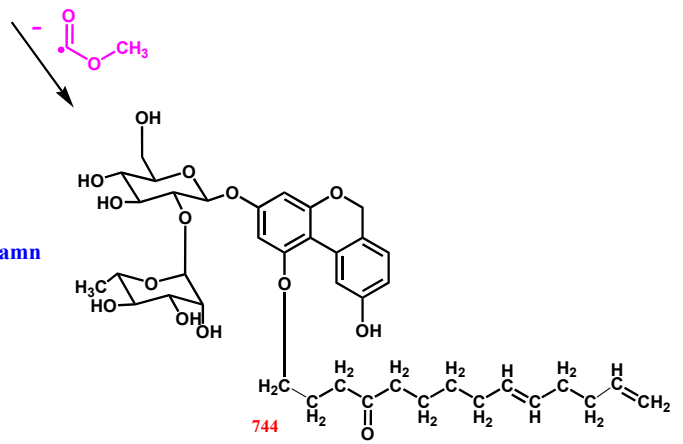
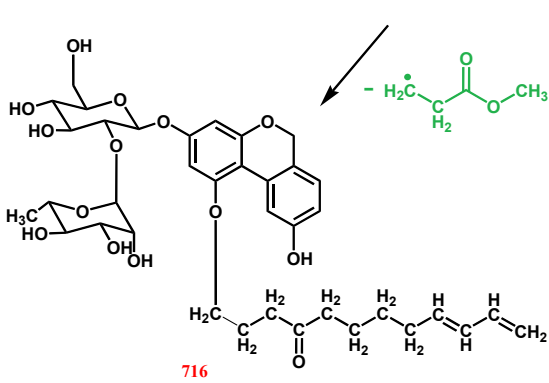
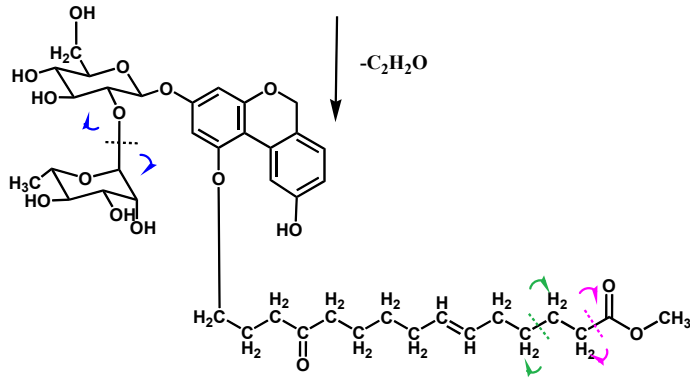
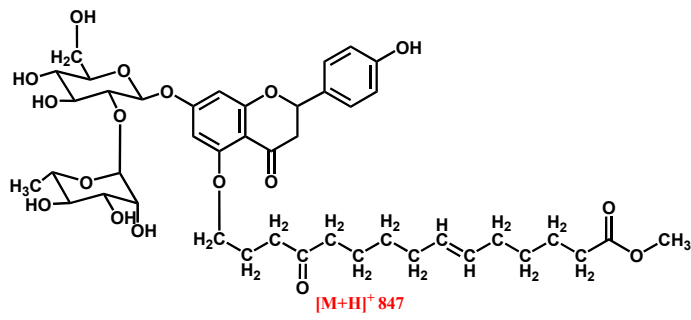


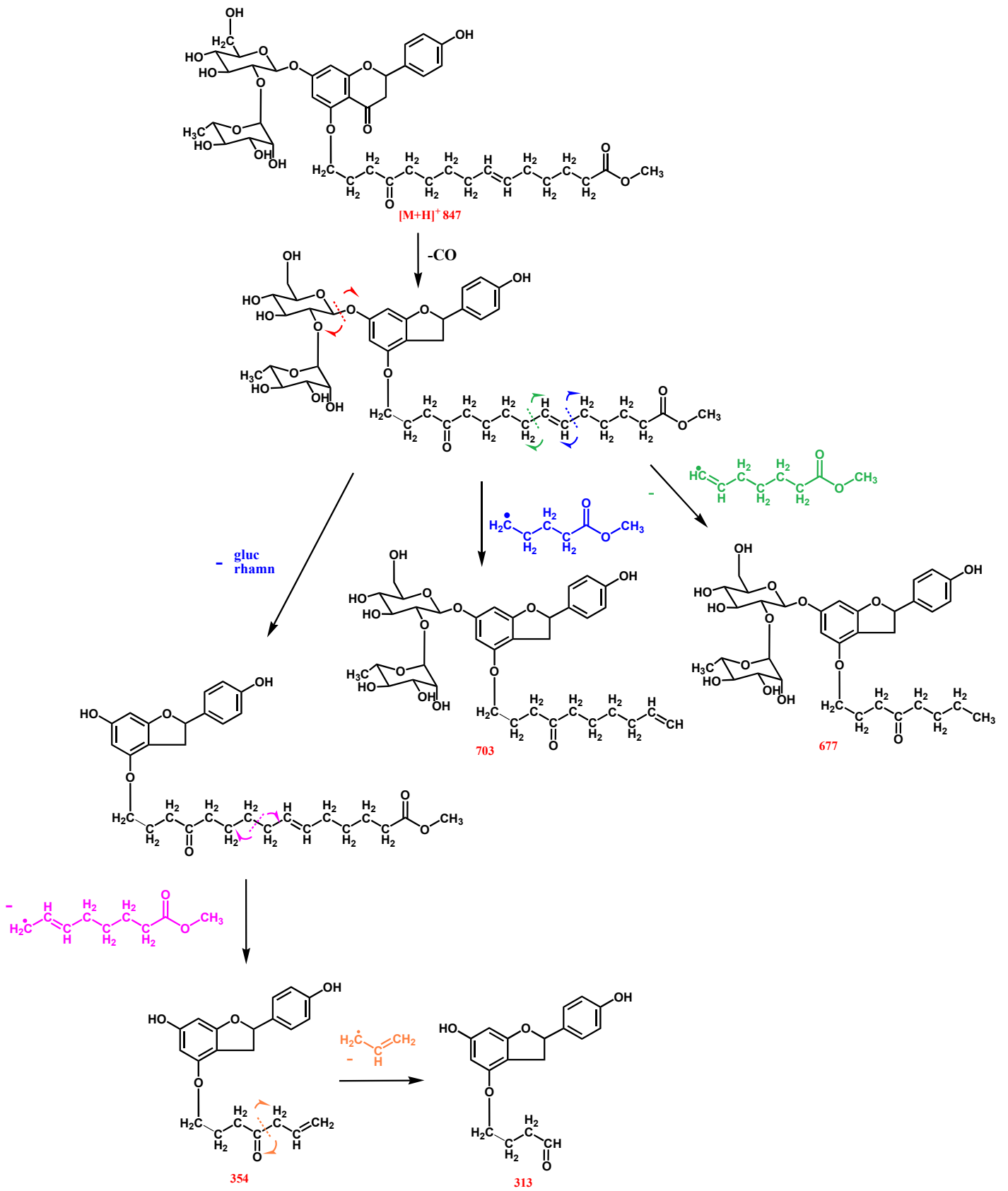
Σχήμα 5: Θετικός ιονισμός

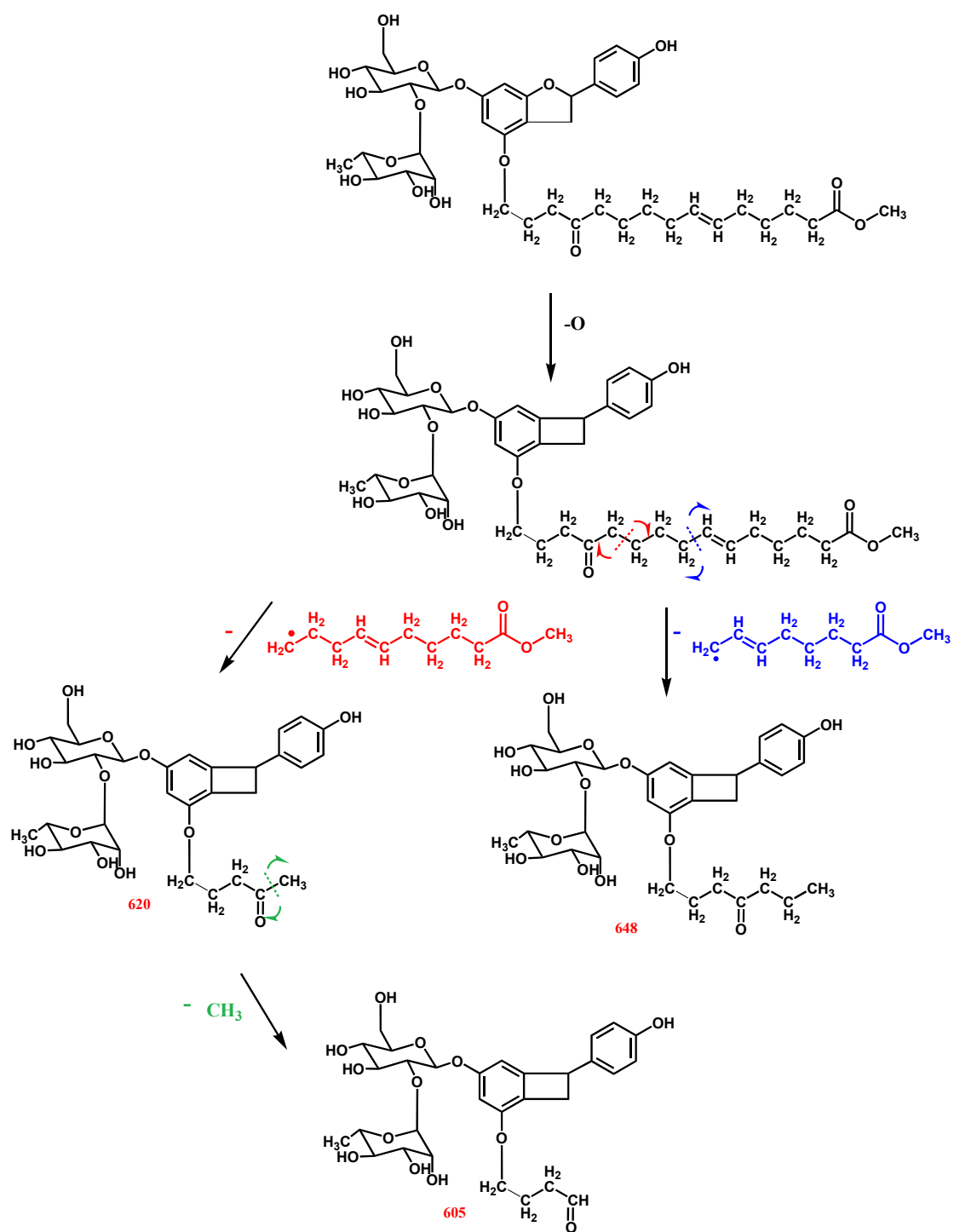


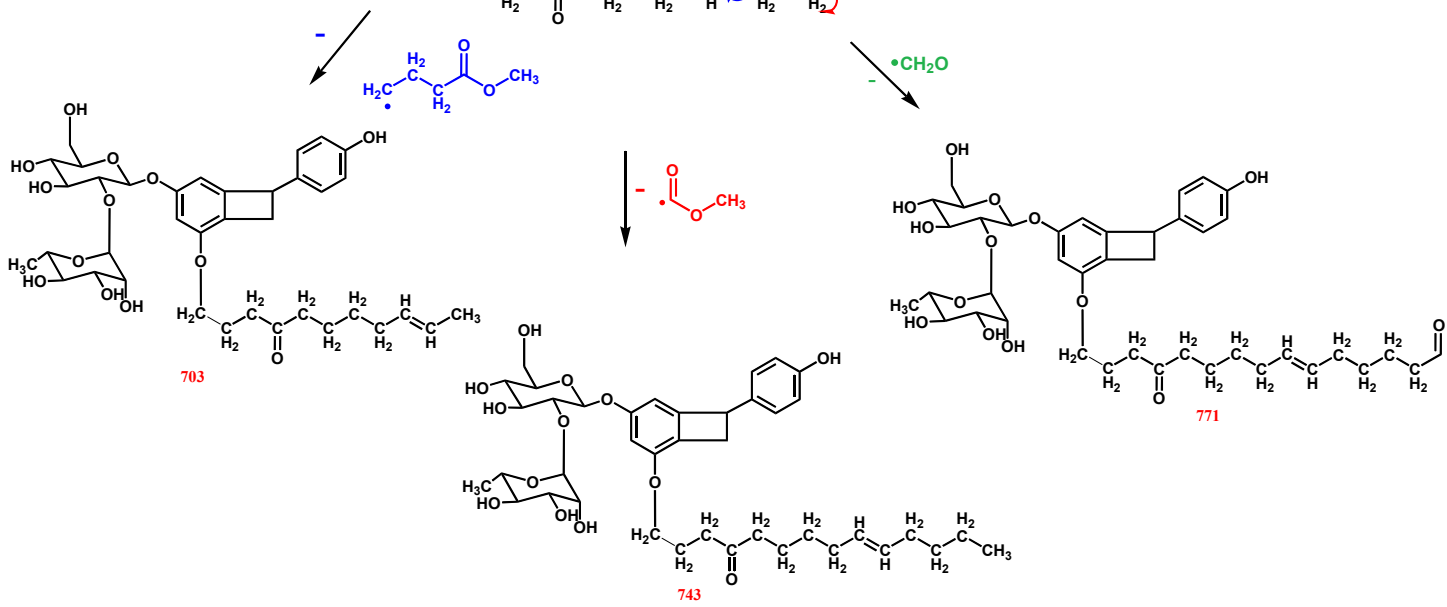
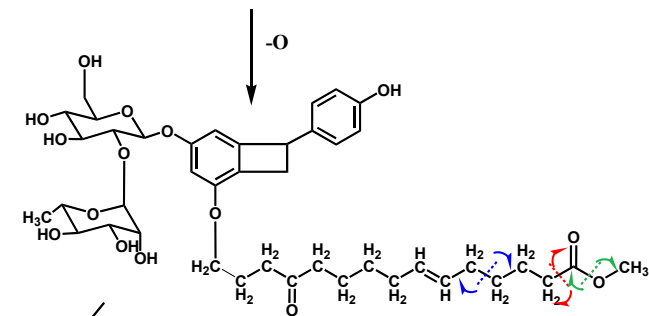
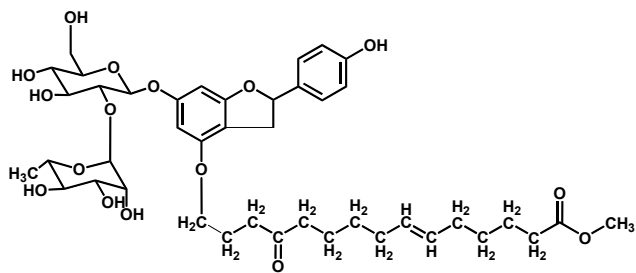


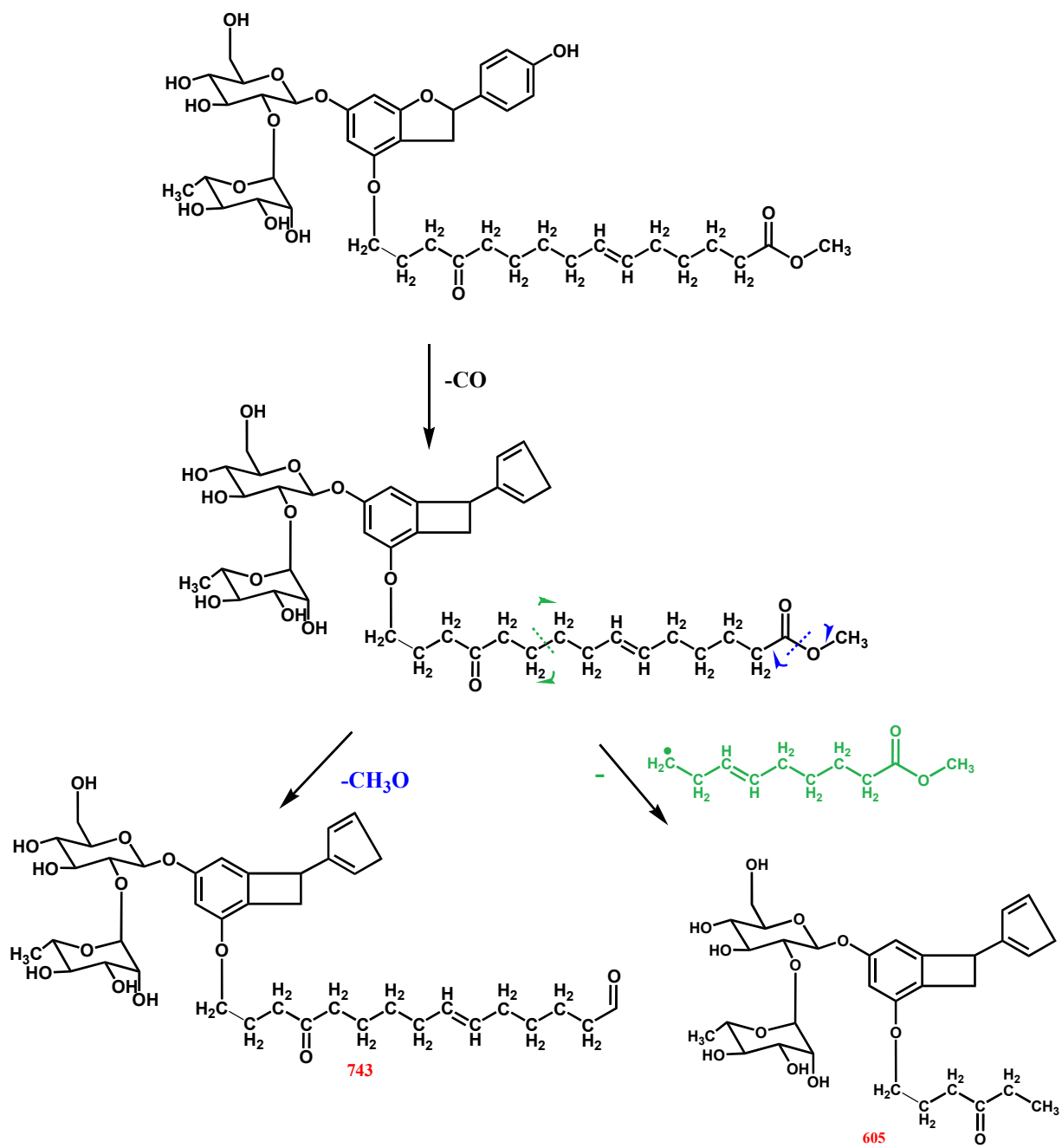


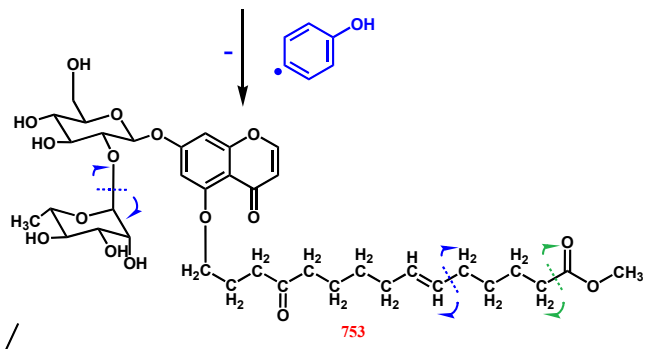
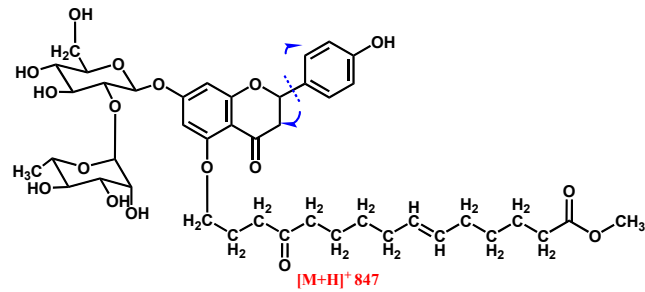




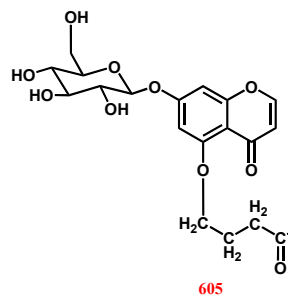
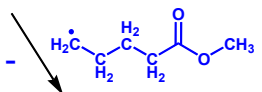
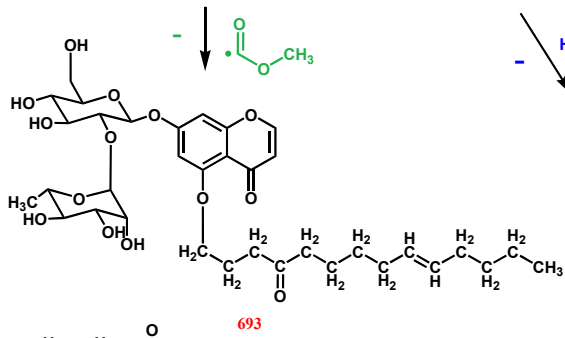


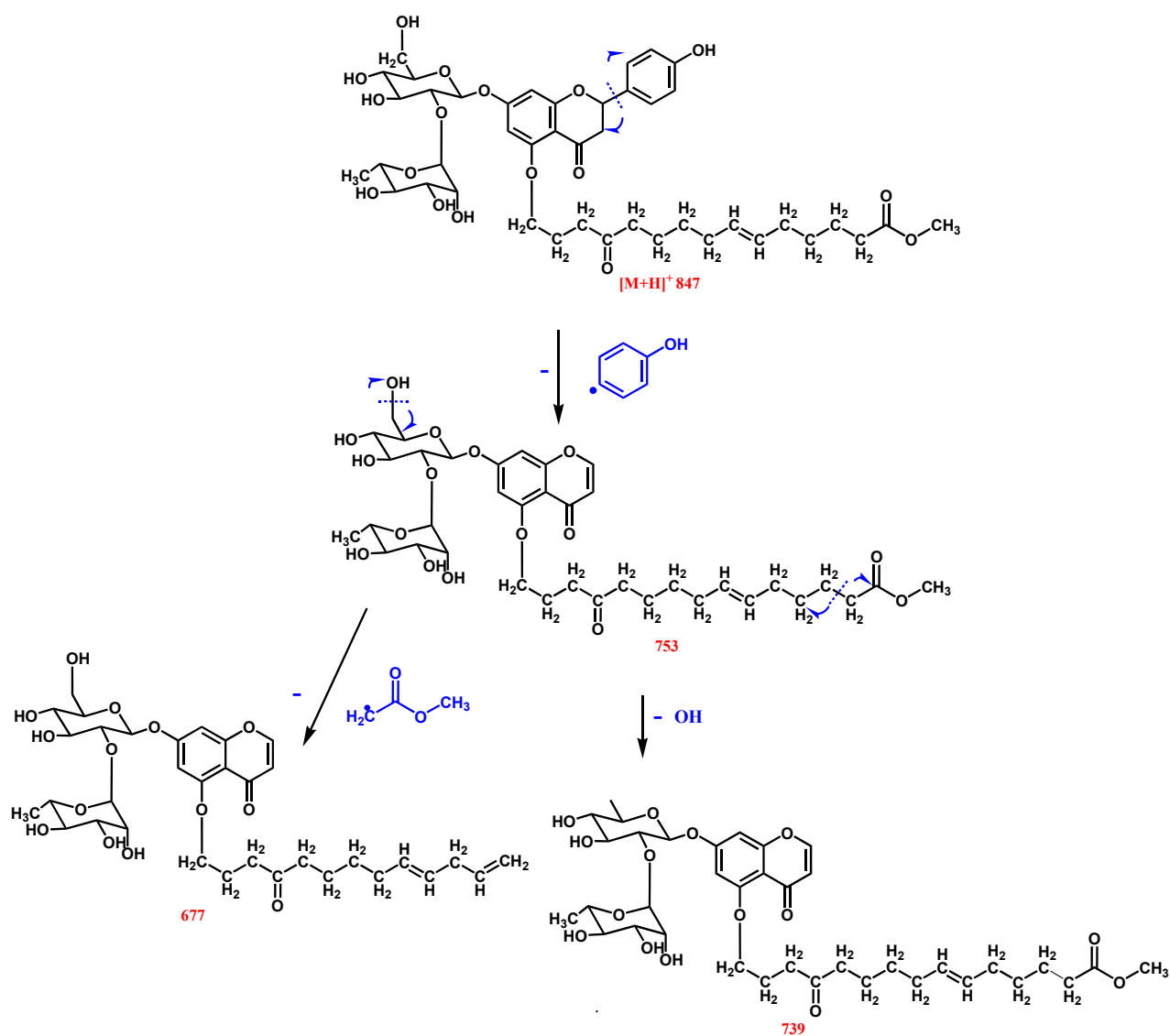


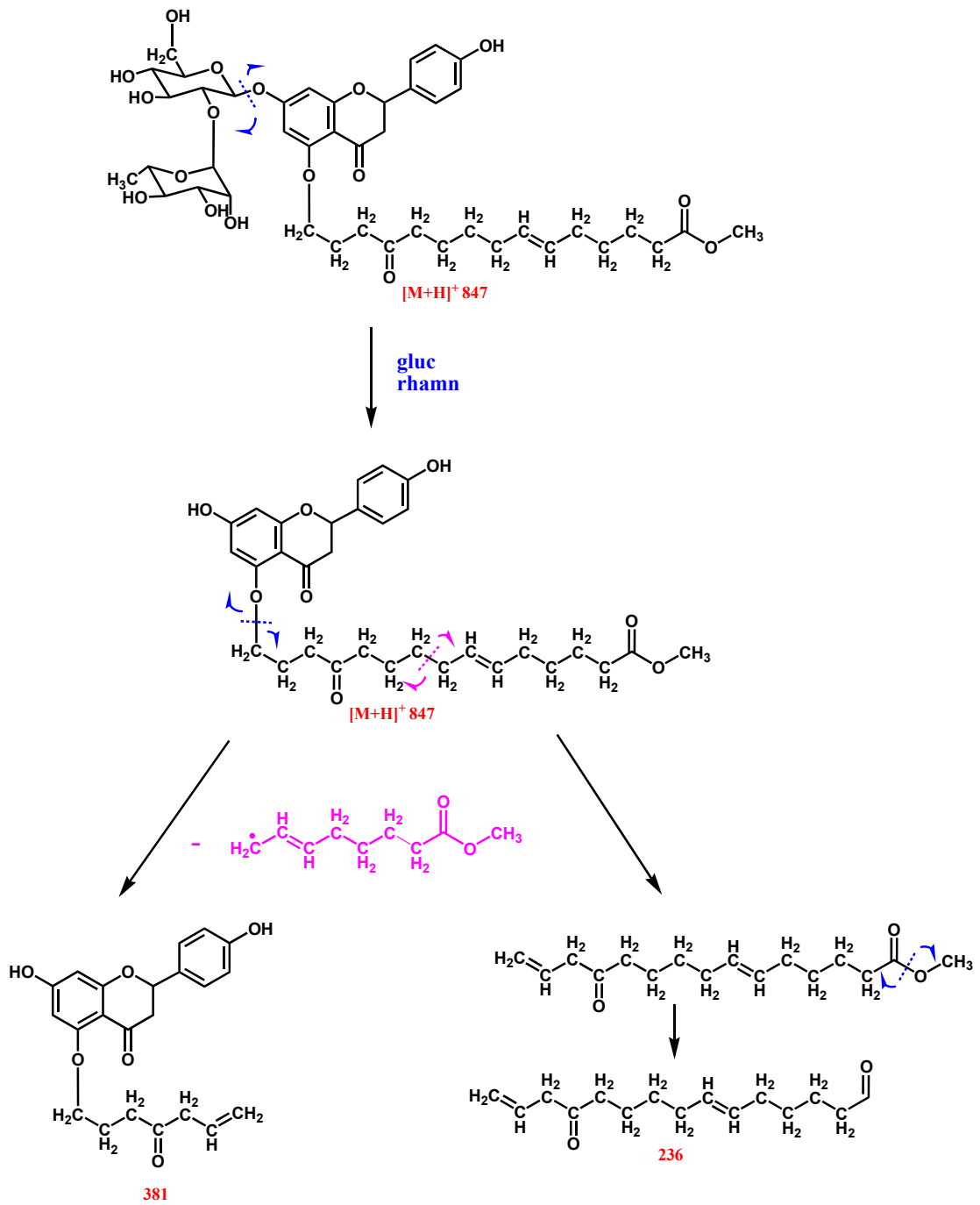


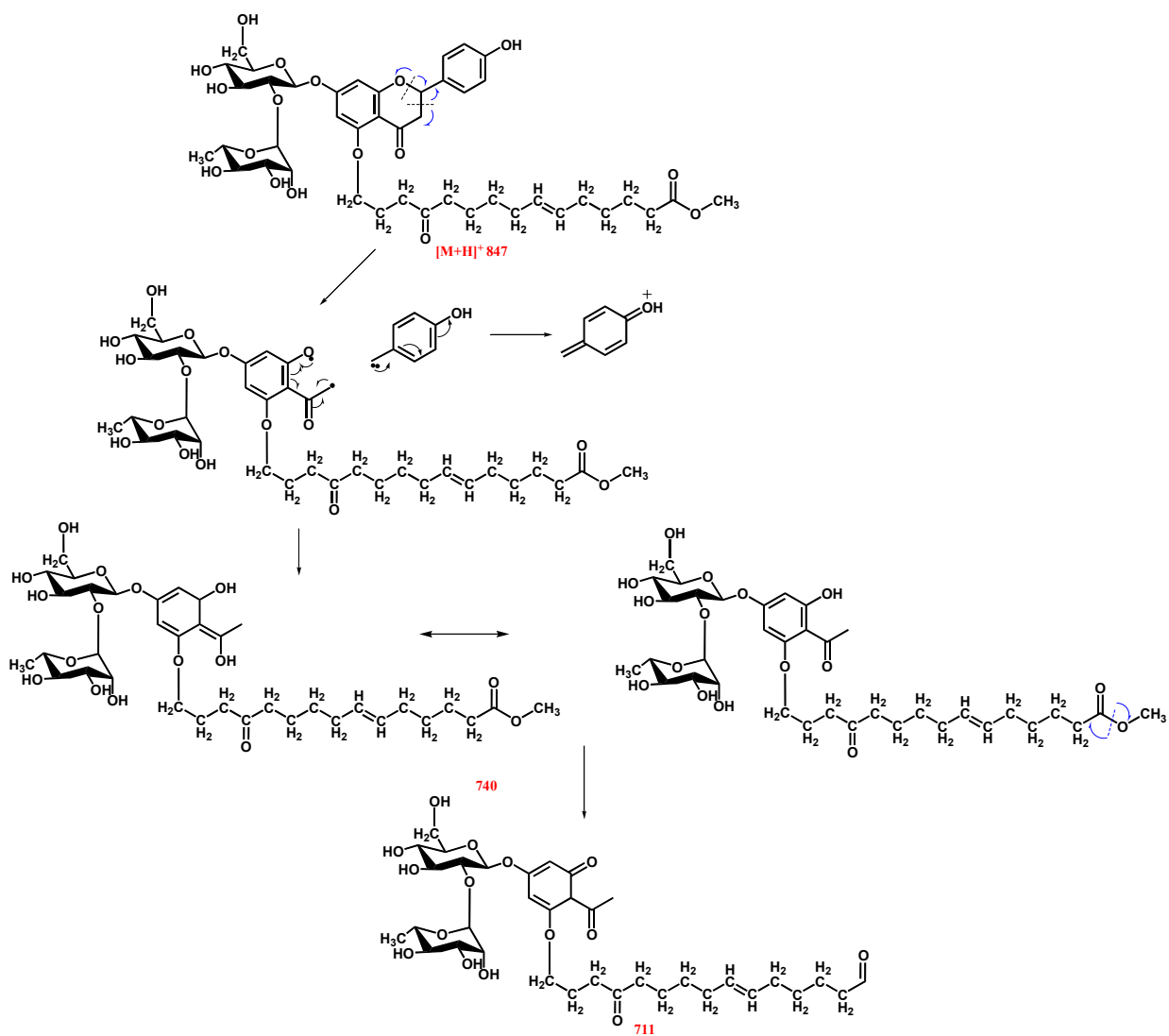


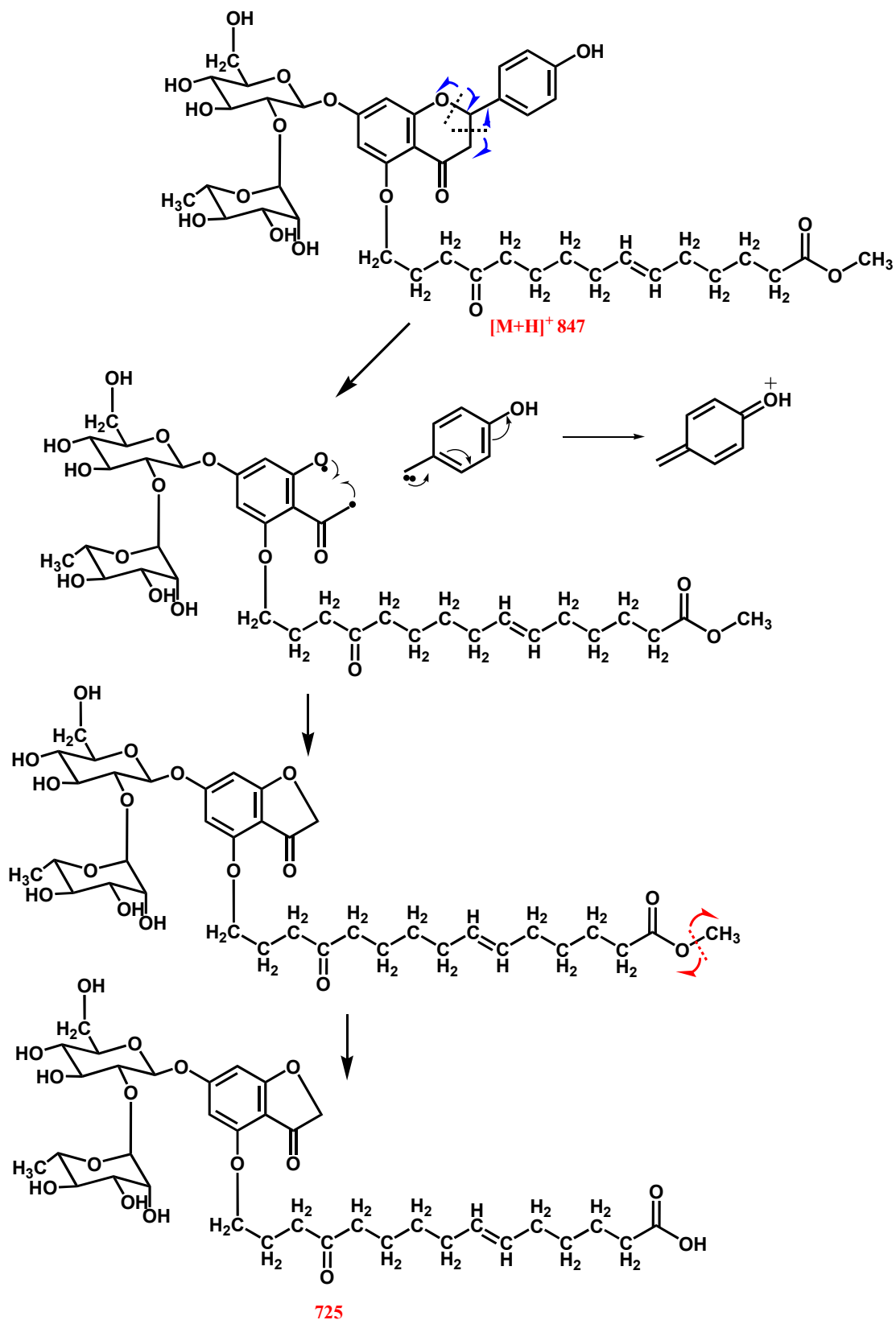
- rhamn











Πίνακας 5: ¹H-NMR ουσίας 3 (CD₃OD, 600 MHz)

Χημική μετατόπιση δ (ppm)	Αριθμός H	Πολλαπλότητα, J (Hz)	Ταυτοποίηση
7,30	2	d (J=8,4 Hz)	H-2' και H-6'
6,80	2	d (J=8,4 Hz)	H-3' και H-5'
6,16	1	d (J=1,8 Hz)	H-8
6,14	1	d (J=1,8 Hz)	H-6
5,37	1	dd (J=12,6 Hz 2,6 Hz)	H-2
3,15	1	m	H3a
2,74	1	d (J=16,8Hz 2,6 Hz)	H3b
Γλυκόζη			
5,07	1	d (J=7,8Hz)	H-1''
3,61	1	m	H-2''
3,56	1	m	H-3''
3,36	1	dd (J= 10 Hz)(J=9 Hz)	H-4''
3,36	1	m	H-5''
3,43 3,86	1	m	H-6''
Ραμνόζη			
5,23	1	d (J= 1,8 Hz)	H-1'''
3,91	1	m	H-2'''
3,57	1	m	H-3'''
3,36	1	dd (J=10 Hz) (J= 10 Hz)	H-4'''
3,83	1	m	H-5'''
3,84	1	m	H-6'''

Ανθρακική αλυσίδα			
5,37	2	m	a,b
2,01	2	m	c,d
1,36	2	m	e,f
2,32	1	m	k
4,03	1	m	n
1,60	3	m	m,g,h
2,13	2	m	i,l
3,62	3	s	OCH ₃

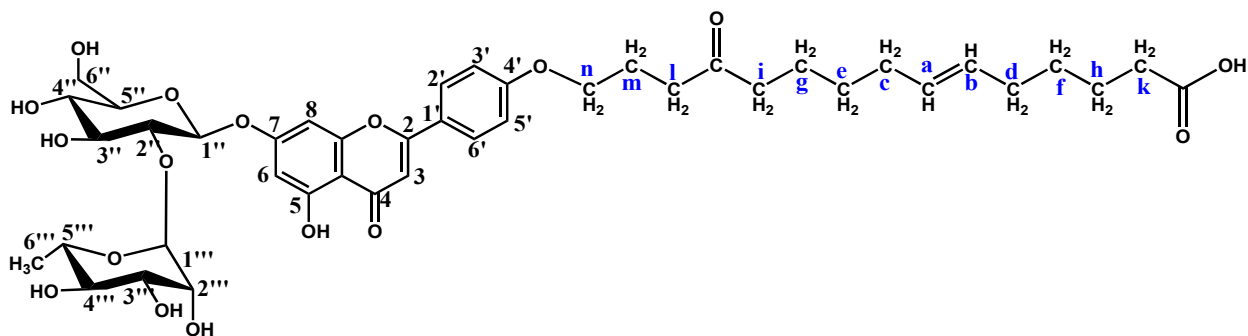
Πίνακας 6: ¹³CNMR ουσίας 3 (CD₃OD, 300 MHz)

Χημική μετατόπιση δ (ppm)	Τύπος C	Ταυτοποίηση
81,62	CH	CH-2
44,83	CH	CH ₂ -3
199,55	CH	C-4
-	CH	C-5
98,85	CH	CH-6
167,53	CH	C-7
97,87	CH	CH-8
-	C	C-9
-	C	C-10
132,07	C	C-1'
130,29	CH	CH-2', CH-6'
160,50	CH	C-4'
117,46	CH	CH-3', CH-5'
Γλυκόζη		
100,26	CH	CH-1''
80,12	CH	CH-2''
80,12	CH	CH-3''
74,89	CH	CH-4''

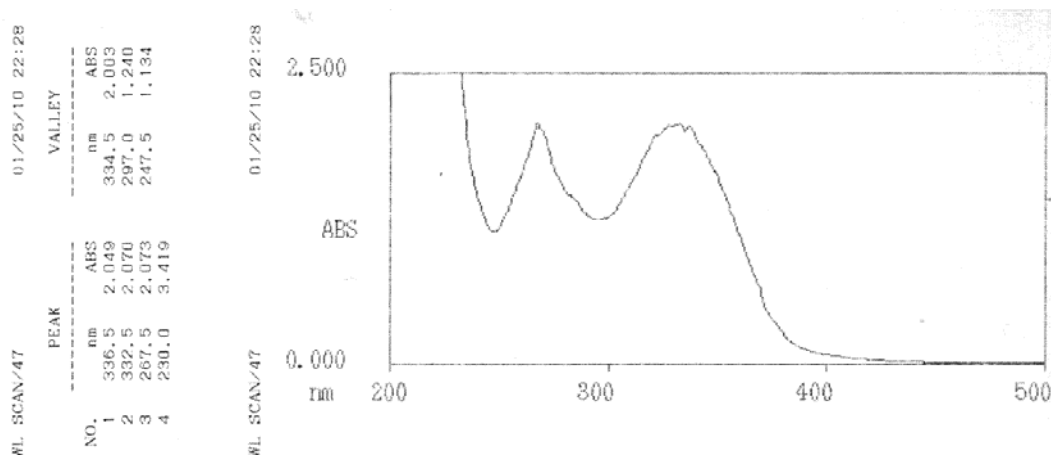
79,22	CH	CH-5''
63,43	CH ₂	CH ₂ -6''
Ραμνόςζη		
103,71	CH	CH-1'''
73,33	CH	CH-2'''
73,23	CH	CH-3'''
72,39	CH	CH-4'''
71,25	CH	CH-5'''
19,11	CH ₂	CH ₃ -6'''
Ανθρακική αλυσίδα		
132,06	2	a,b
29,20	2	c,d
	2	e,f
36,08	1	k
67,38	1	n
28,69	3	m,g,h
40,11	2	i,l
176,60	-	CO
53,31	CH ₃	CH ₃
184,05	-	CO
53,12	CH ₃	OCH ₃

Ένωσης 4

Παράγωγο της απιγενίνης με πλευρική αλυσίδα



Από τα μέγιστα των κορυφών της ουσίας σε μεθανόλη (267 και 334 nm) στο φάσμα υπεριώδους-ορατού φαίνεται ότι πρόκειται για φλαβόνη.



Η μελέτη του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ έδειξε ότι πρόκειται για γλυκοσυλιωμένη φλαβόνη με προσθετική αλυσίδα, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τα δισδιάστατα φάσματα NMR της ένωσης, όπου παρατηρούνται τα ακόλουθα:

Στην αρωματική περιοχή του φάσματος $^1\text{H NMR}$ παρατηρείται η παρουσία συστήματος AA'BB' το οποίο αντιστοιχεί σε παρα-υποκατάσταση του B δακτυλίου. Έτσι τα πρωτόνια **H2'** και **H6'** εμφανίζονται ως μια διπλή κορυφή σε δ_H 7,87 ppm (d, 2H) με σταθερά σύζευξης $J= 8,4$ Hz ενώ τα **H3'** και **H5'** εμφανίζονται ως μια διπλή κορυφή σε δ_H 6,91 ppm (d, 2H) με σταθερά σύζευξης $J= 8,4$ Hz. Παρατηρούνται ακόμα στην αρωματική περιοχή δυο διπλές κορυφές του ενός πρωτονίου σε δ_H 6,78 ppm ($J=1,2$ Hz) και δ_H 6,45 ppm ($J=1,2$ Hz) που σχάζονται μεταξύ τους υποδηλώνοντας μετα σύζευξη των πρωτονίων **H8** και **H6** αντίστοιχα. Οι κορυφές των

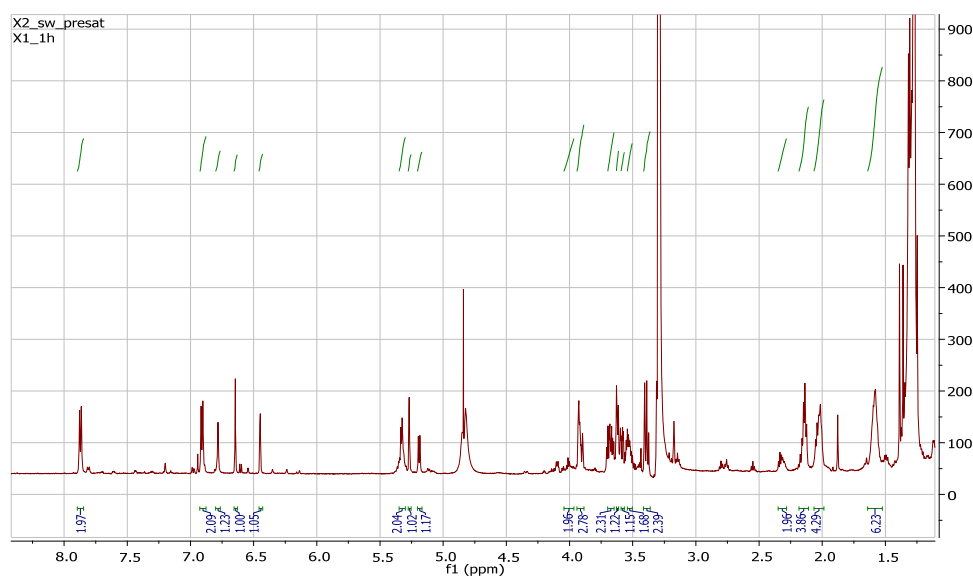
πρωτονίων H8 και H6 είναι ελαφρώς αποθωρακισμένες και σε χαμηλότερες τιμές πεδίου σε σχέση με την απιγενίνη και αυτό υποδηλώνει την παρουσία σακχάρου στη θέση 7 (Mabry et al., 1970). Το **H3** εμφανίζεται ως μια απλή κορυφή σε δ_H 6,65 ppm (s, 1H).

Στην περιοχή των σακχάρων εμφανίζονται δύο ανωμερικά πρωτόνια. Το ανωμερικό της ραμνόζης εμφανίζεται ως ευρέως απλή σε δ_H 5,27 ppm (brs, 1H) με δ_C 101,19 ppm, ενώ το ανωμερικό της γλυκόζης εμφανίζεται ως μια διπλή σε δ_H 5,19 ppm (d, 1H) με σταθερά σύζευξης $J=7,8$ Hz και $\delta_C=98,26$ ppm. Οι σταθερές σύζευξης των δύο σακχάρων είναι ενδεικτικές της α -διαμόρφωσης για τη ραμνόζη και της β -διαμόρφωσης για τη γλυκόζη. Σε δ_H 1,3 ppm εμφανίζονται τα πρωτόνια του μεθυλίου της ραμνόζης σαν διπλή με $J=6,2$ Hz και δ_C 20,12 ppm. Στον πίνακα 5 φαίνονται οι χημικές μετατοπίσεις και οι σταθερές σύζευξης των λοιπών πρωτονίων των δύο σακχάρων, όπως προκύπτουν από το φάσμα ^1H NMR και το δισδιάστατο φάσμα ^1H - ^1H -COSY και πιστοποιούν σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα ότι πρόκειται για γλυκόζη (Lindhorst 2004) και ραμνόζη (Andre de Bruyn 1975). Η γλυκόζη είναι συνδεδεμένη με το υδροξύλιο της θέσης 7 του φλαβονοειδούς, καθώς αυτό προκύπτει από το κοινό σήμα που εμφανίζουν στο φάσμα HMBC το ανωμερικού της γλυκόζης και τα πρωτόνια H-8 και H-6 στα 167,53 ppm. Η ραμνόζη είναι συνδεδεμένη με το υδροξύλιο της θέσης 2 της γλυκόζης (HMBC σήμα του πρωτονίου 2 της γλυκόζης σε δ_C 101 ppm που αντιστοιχεί στο ανωμερικό της ραμνόζης). Επιπλέον σε δ_H 5,3 ppm (δ_C 132 ppm) παρατηρείται μια πολλαπλή κορυφή, δύο πρωτονίων, ενδεικτική της ύπαρξης διπλού δεσμού, ενώ σε δ_H 4,01 ppm (δ_C 64,13 ppm) παρατηρείται κορυφή που αποδίδεται στο πρωτόνιο που συνδέεται μέσω O με τη φλαβόνη. Τα δύο καρβονύλια φαίνονται από το φάσμα HMBC της ένωσης, όπου τα πρωτόνια i και l εμφανίζουν κοινό σήμα στα 181,47 ppm, ενώ τα πρωτόνια κ εμφανίζουν σήμα στα 173,40 ppm. Από το φάσμα ^1H - ^1H -COSY της ένωσης παρατηρούνται οι συζεύξεις των πρωτονίων της αλυσίδας, ενώ από το φάσμα HSQC διευκρινίζεται το είδος των πρωτονίων (CH, CH₂ ή CH₃). Η πλήρης επιβεβαίωση της δομής της ένωσης 4 έγινε με το φάσμα μάζης. Στο φάσμα μάζης της ένωσης αυτής δεν παρατηρείται το μοριακό ιόν $[\text{M}+\text{H}]^+=830$, χαρακτηριστικά όμως θραύσματα μας βοηθούν στη διευκρίνιση της δομής της ένωσης. Έτσι το θραύσμα m/z 683 προέρχεται από το μοριακό ιόν με απομάκρυνση ενός μορίου ραμνόζης, ενώ το θραύσμα m/z 579 προκύπτει από το μοριακό ιόν μετά την απόσπαση ολόκληρης της αλυσίδας. Το

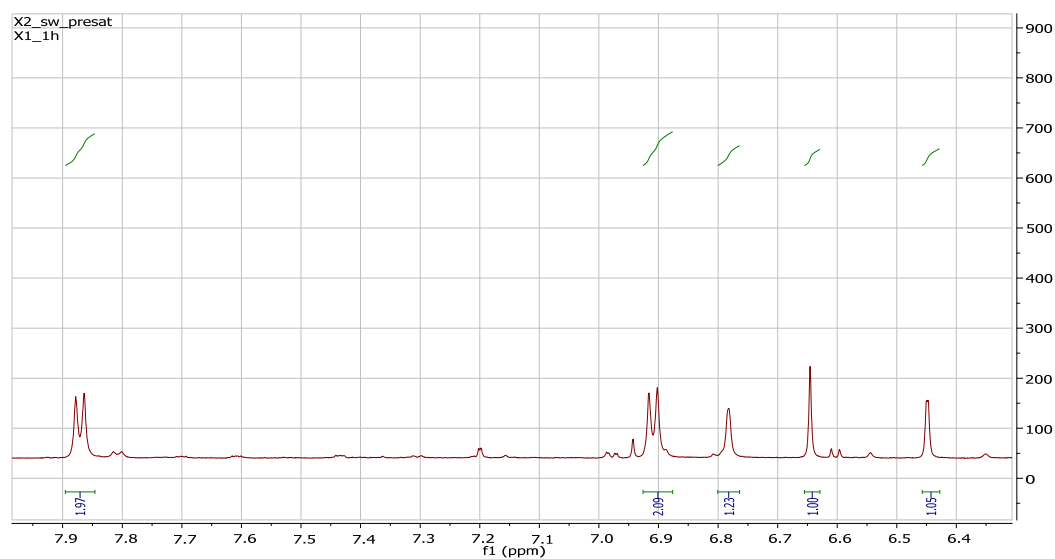
θραύσμα m/z 271 αντιστοιχεί στο μόριο του φλαβονοειδούς μετά από απόσπαση της αλυσίδας και των δύο σακχάρων. Μετά από RDA διάσπαση προκύπτει το θραύσμα 327 (θραύσμα του Β δακτυλίου με την αλυσίδα, από όπου αποσπάστηκε το τελικό καρβοξύλιο) Από το θραύσμα αυτό συμπεραίνουμε ότι η αλυσίδα είναι συνδεδεμένη στο 4' υδροξύλιο του Β δακτυλίου του φλαβονοειδούς.

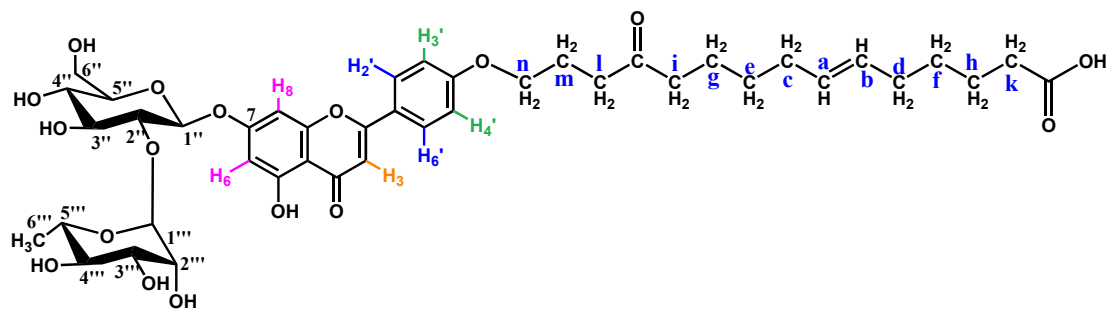
Η ένωση αυτή απομονώθηκε για πρώτη φορά.

Φάσμα ^1H - NMR της Ένωσης 4 (CD_3OD , 600 MHz)

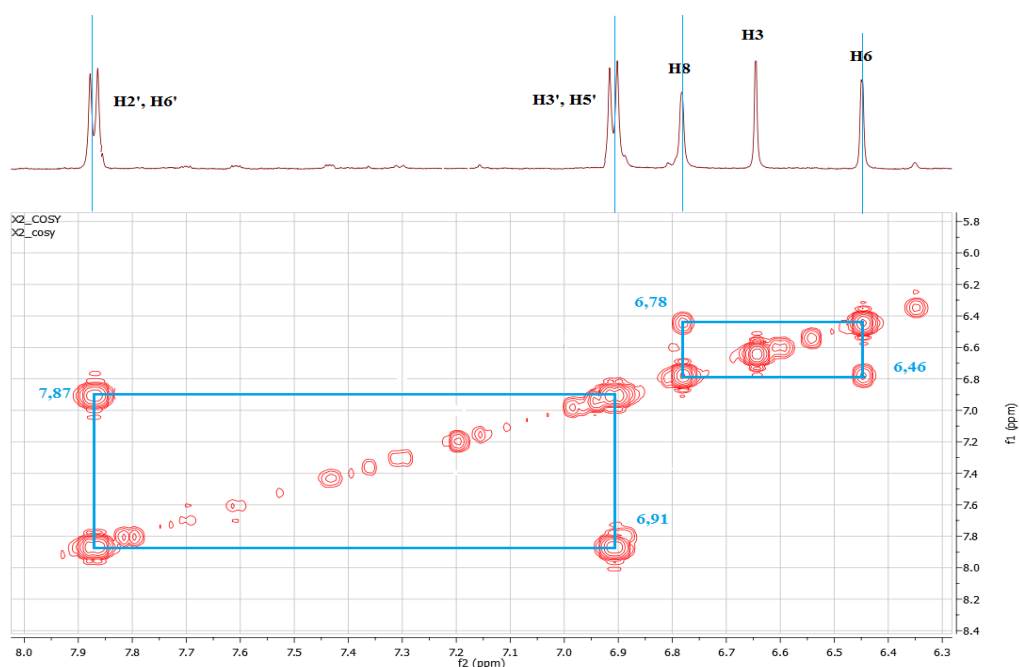


Φάσμα ^1H - NMR της Ένωσης 4 (CD_3OD , 600 MHz) αρωματική περιοχή

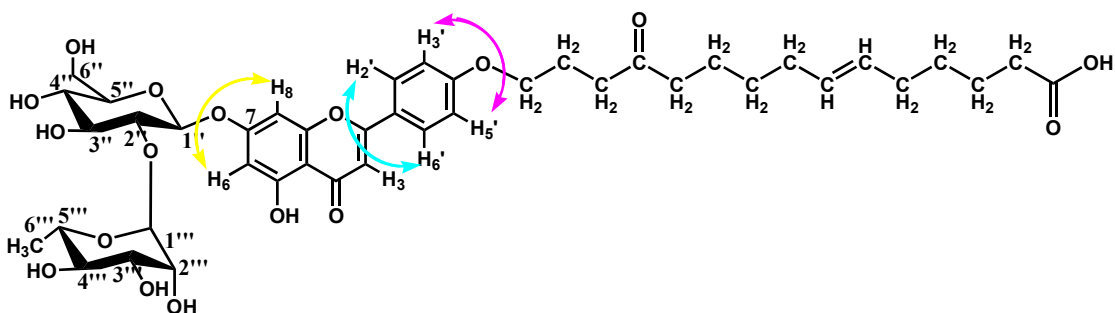




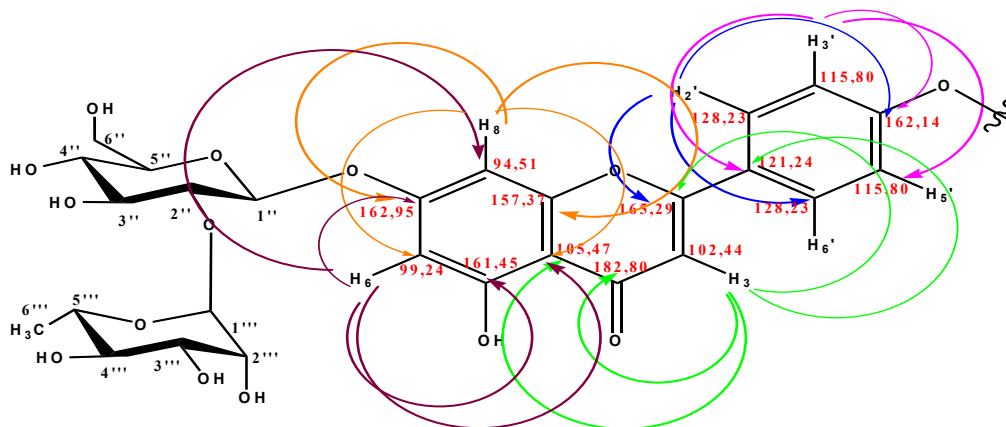
Φάσμα ^1H - ^1H COSY της Ένωσης 4 (CD_3OD , 600 MHz) περιοχή αρωματικών



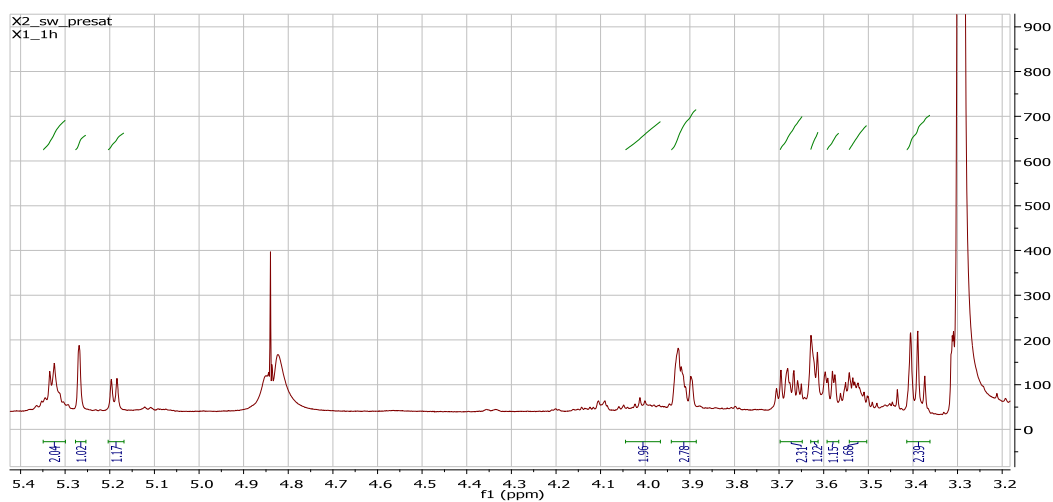
Οι παρατηρούμενες σχάσεις της Ένωσης 4 στο φάσμα COSY στην περιοχή των αρωματικών



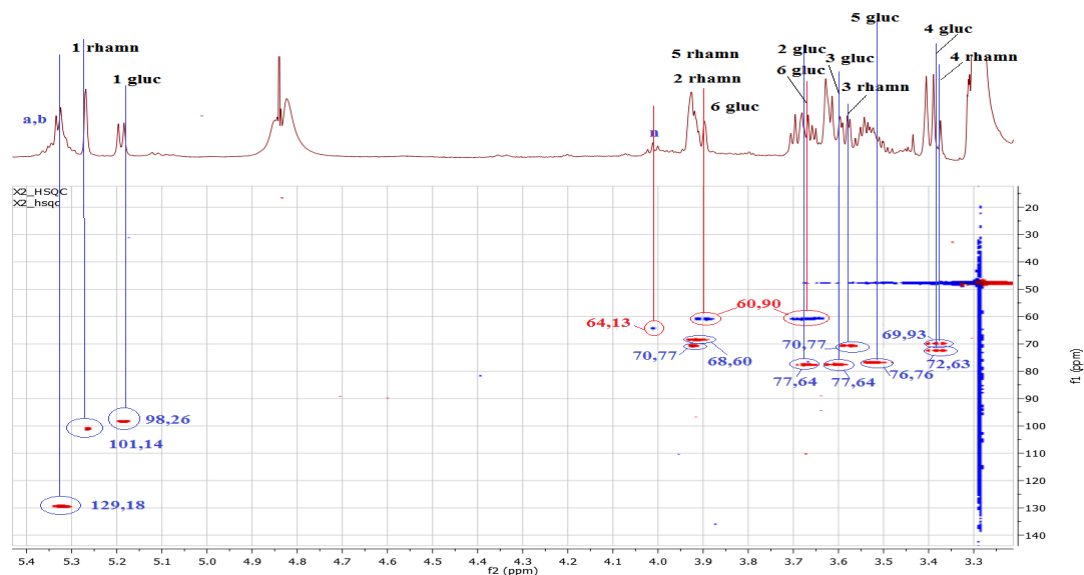
Τα βασικά παρατηρούμενα σήματα της Ένωσης 4 στο φάσμα HMBC στην περιοχή των αρωματικών



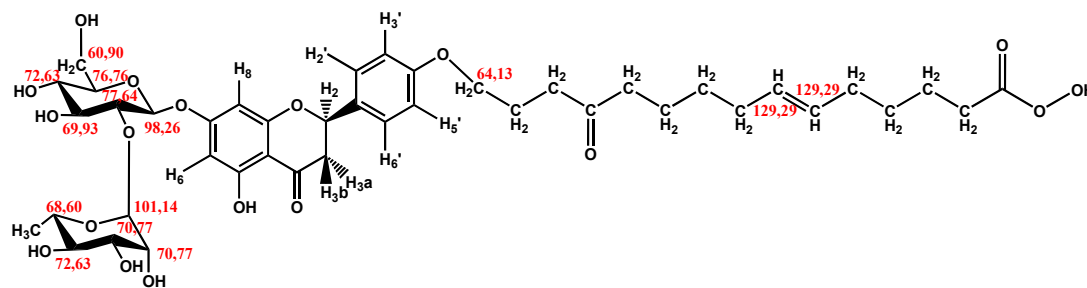
Φάσμα ^1H -NMR της Ένωσης 4 (CD_3OD , 600 MHz) περιοχή των σακχάρων



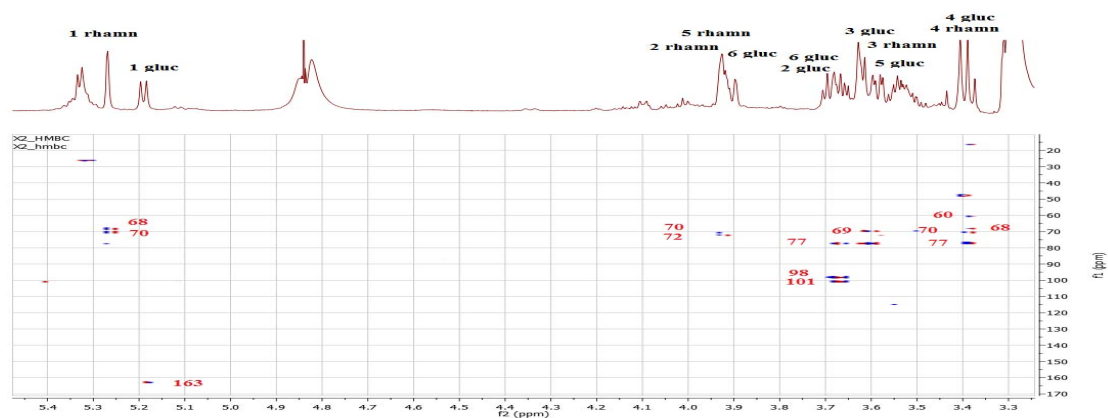
Φάσμα HSQC Ένωσης 4 (CD₃OD, 600MHz) περιοχή των σακχάρων



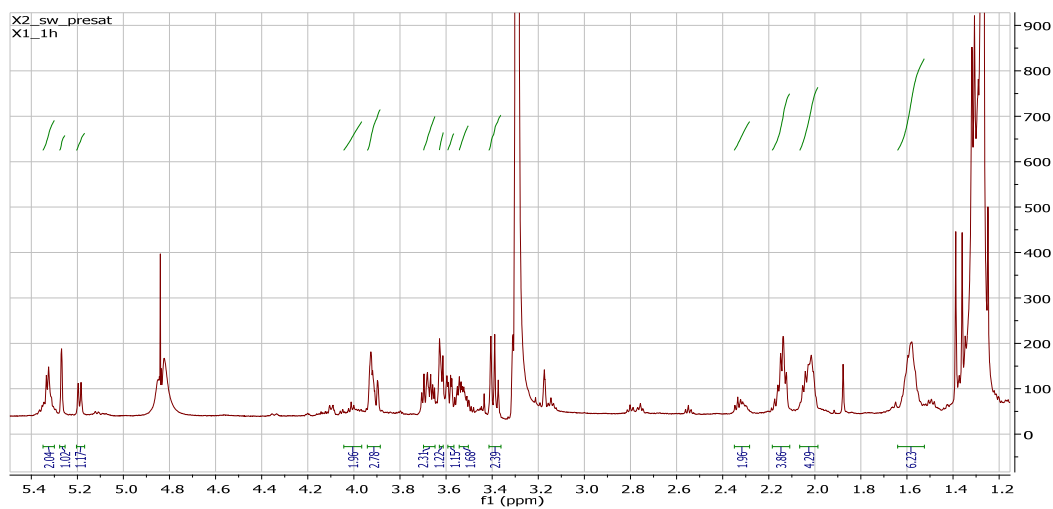
Τα βασικά παρατηρούμενα σήματα της Ένωσης 4 στο φάσμα HSQC στην περιοχή των σακχάρων



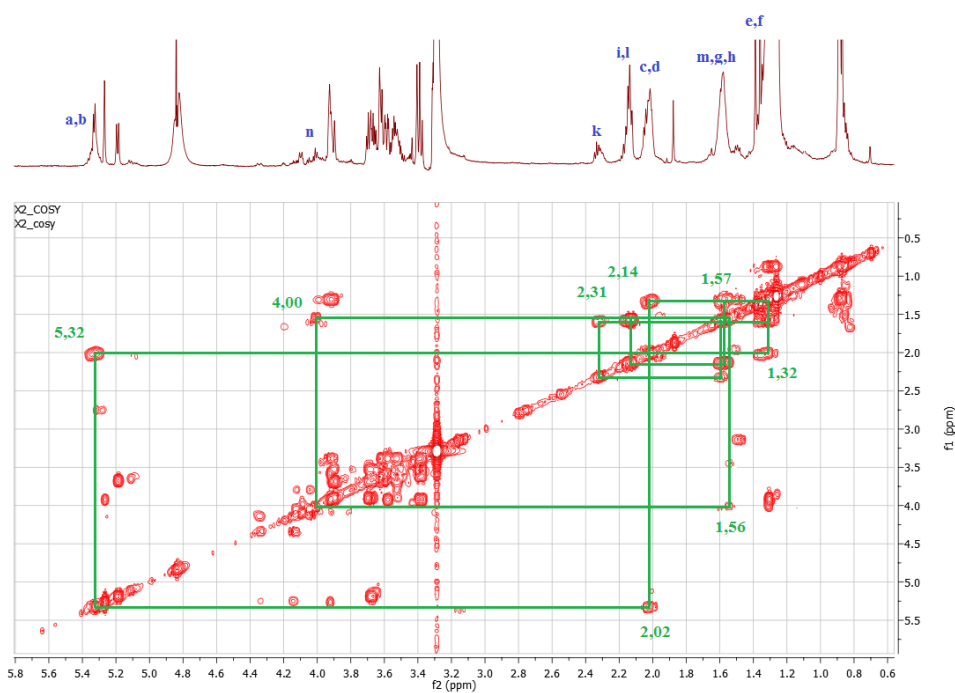
Φάσμα HMBC Ένωσης 4 (CD₃OD, 600MHz) περιοχή των σακχάρων



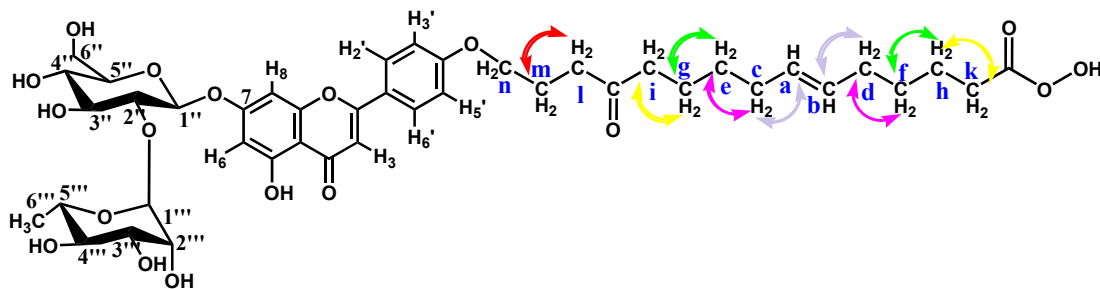
Φάσμα ¹H-NMR της Ένωσης 4 (CD₃OD, 600 MHz) περιοχή σακχάρων-αλειφατικών



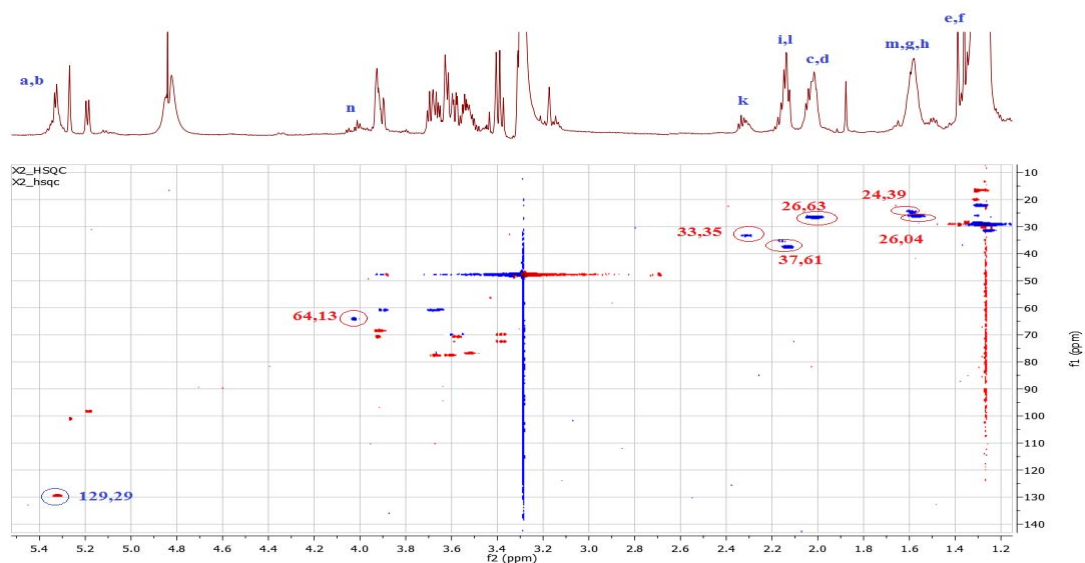
Φάσμα ^1H - ^1H COSY της Ένωσης 4 (CD_3OD , 600 MHz) περιοχή σακχάρων-αλειφατικών



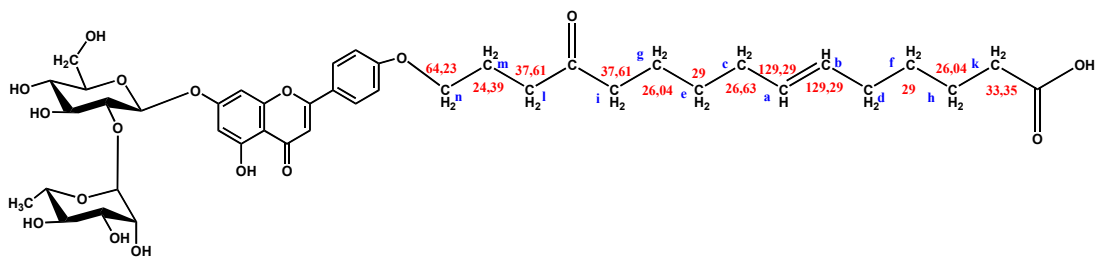
Οι βασικές παρατηρούμενες σχέσεις της Ένωσης 4 στο φάσμα COSY στην περιοχή των σακχάρων-αλειφατικών για την ανθρακική αλυσίδα



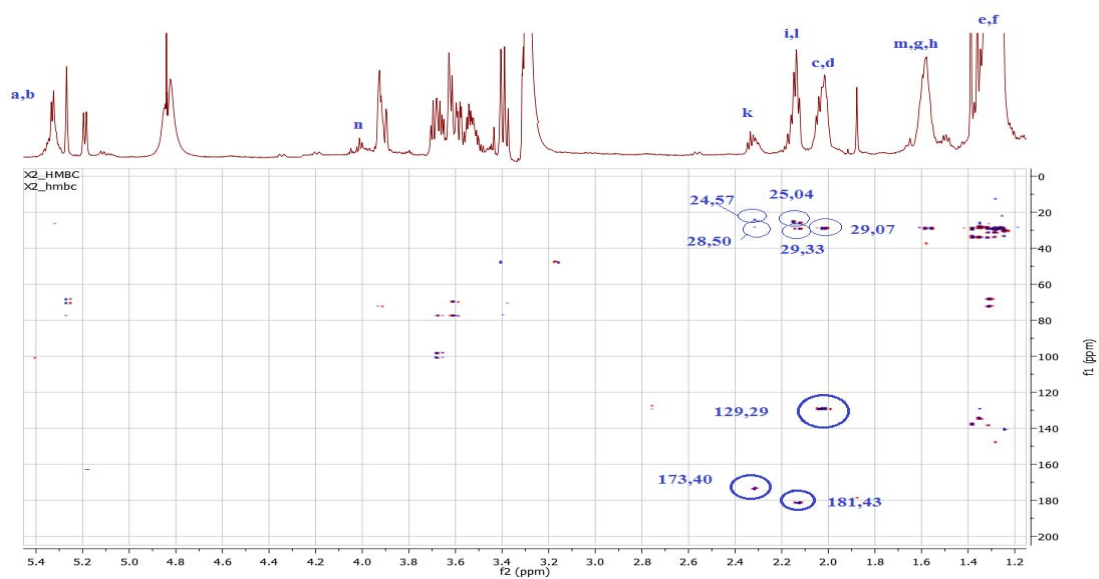
Φάσμα HSQC Ένωσης 4 (CD₃OD, 600MHz) περιοχή των αρωματικών-αλειφατικών



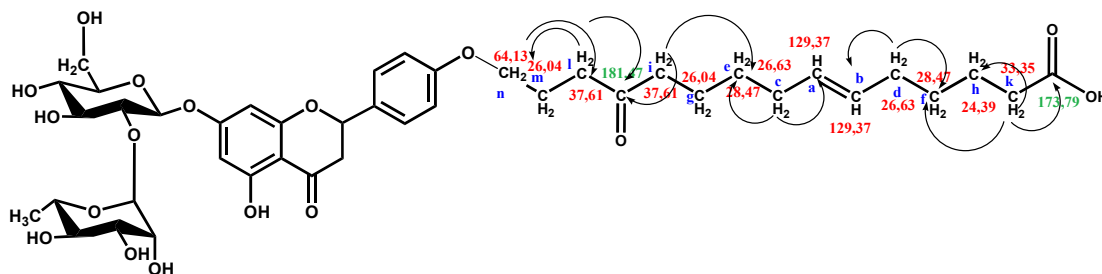
Βασικότερα παρατηρούμενα σήματα της Ένωσης 4 στο φάσμα HSQC



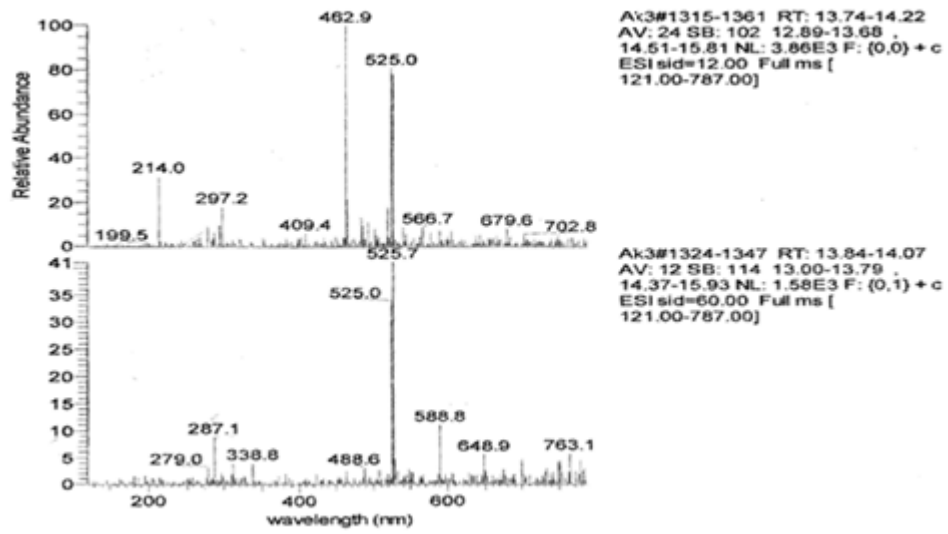
Φάσμα ΗΜΒC Ένωσης 4 (CD₃OD, 600MHz) περιοχή των σακχάρων-αλειφατικών



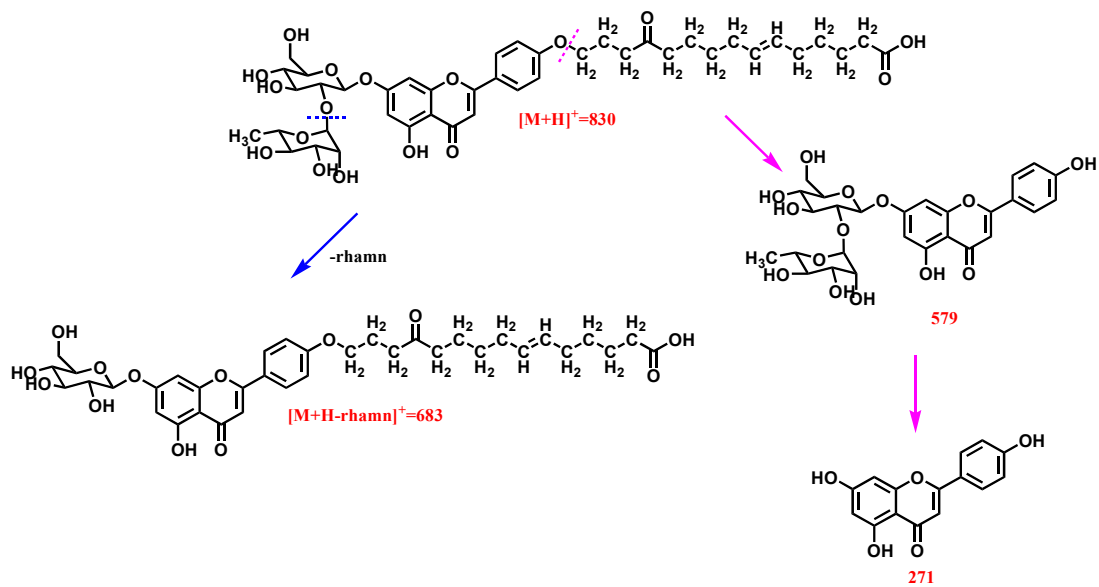
Ένωση 4 : τα βασικά παρατηρούμενα σήματα στο φάσμα ΗΜΒC

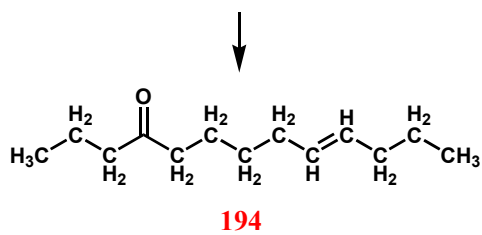
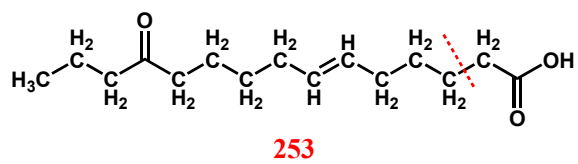
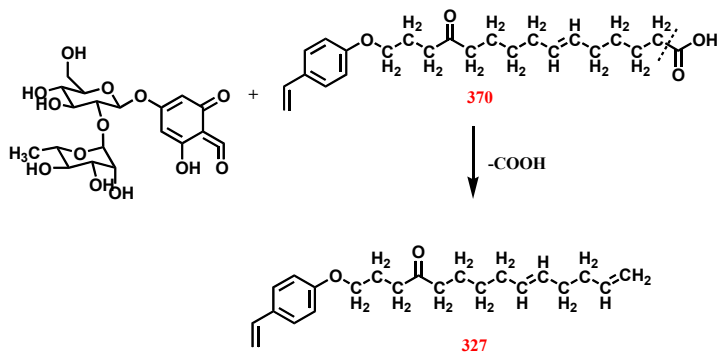
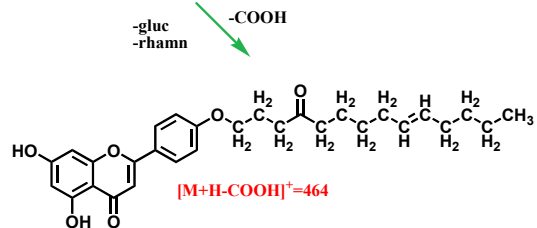
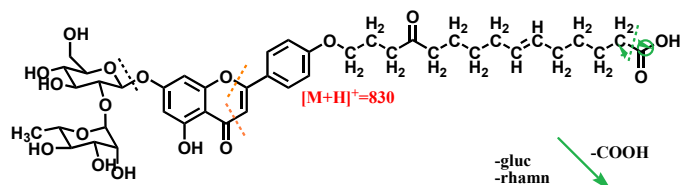


Φάσμα μάζας Ένωσης 4



Βασικά παρατηρούμενα θραύσματα της ένωσης 4 στο LC-DAD-(ESI)-MS





Πίνακας 7: ¹H-NMR Ένωσης 4 (CD₃OD, 600 MHz)

Χημική μετατόπιση δ (ppm)	Αριθμός Η	Πολλαπλότητα, J (Hz)	Ταυτοποίηση
7,87	2	Τύπου d (J=8,4 Hz)	H-2' και H-6'
6,91	2	Τύπου d (J=8,4 Hz)	H-3' και H-5'
6,78	1	d (J=1,2 Hz)	H-8
6,45	1	d (J=1,2 Hz)	H-6
6,65	1	s	H-3
Γλυκόζη			
5,19	1	d (J=7,8 Hz)	H-1''
3,67	1	m	H-2''
3,60	1	m	H-3''
3,38	1	t (J= 9 Hz)	H-4''
3,53	1	m	H-5''
3,90 και 3,67	2	m	H-6''
Ραμνόζη			
5,27	1	Τύπου s	H-1'''
3,92	1	m	H-2'''
3,58	1	dd (J=9,6Hz, 3 Hz)	H-3'''
3,38	1	t (J=9,6 Hz)	H-4'''
3,92	1	m	H-5'''
1,31	3	d (J=6 Hz)	H-6'''
Ανθρακική αλυσίδα			
5,37	2	d (J=12,6 Hz)	a,b
2,01	2		c,d
1,36	2		e,f
2,32	1		k
4,03	1		n
1,60	3		m,g,h
2,13	2		i,l

Πίνακας 8: ¹³CNMR Ένωσης 4 (CD₃OD, 300 MHz)

Χημική μετατόπιση δ (ppm)	Τύπος C	Ταυτοποίηση
165,29	CH	C-2
102,44	CH	C-3
182,80	CH	C-4
161,45	CH	C-5
99,62	CH	C-6
162,95	CH	C-7
94,50	CH	C-8
157,37	C	C-9
105,47	C	C-10
121,24	C	C-1'
128,23	CH	C-2', C-6'
162,14	C	C-4'
115,80	CH	C-3', C-5'
Γλυκόζη		
98,26	CH	C-1''
77,64	CH	C-2''
77,64	CH	C-3''
69,93	CH	C-4''
76,76	CH	C-5''
60,90	CH ₂	C-6''
Ραμνόζη		
101,19	CH	C-1'''
70,77	CH	C-2'''
70,67	CH	C-3'''
72,64	CH	C-4'''
68,72	CH	C-5'''
20,12	CH ₂	C-6'''
Ανθρακική αλυσίδα		

129,37	2	a,b
26,63	2	c,d
28,47	2	e,f
33,35	1	k
64,13	1	n
24,39 26,04	3	m,g,h
37,61	2	i,l
173,79	-	CO
181,47	-	CO

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη έγινε φυτοχημική ανάλυση του φυτού *indigofera hirsuta* της οικογένειας *Leguminosae* το οποίο χρησιμοποιείται από τους κατοίκους της Κεντροαφρικανικής Δημοκρατίας, οι οποίοι έχουν την τάση να εμφανίζουν γονιδιακό διαβήτη τύπου II όταν φτάσουν στο τεσσαρακοστό έτος της ηλικίας τους. Στην προσπάθεια να αποδειχτεί ότι το φυτό παρουσιάζει υπογλυκαιμική δράση κρίθηκε σκόπιμο να γίνει ανάλυση των εκχυλισμάτων της βουτανόλης, του οξικού αιθυλεστέρα, του αιθέρα και του υδατικού εκχυλίσματος. Η ταυτοποίηση των συγκεκριμένων εκχυλισμάτων έγινε με την μέθοδο LC-DAD-MS (ESI+) από την οποία διαπιστώθηκε η ύπαρξη φαινυλοπροπανοϊκών οξέων και μονο, δυ, τριγλυκοζιτών φλαβονών και φλαβονονών. Συγκεκριμένα ταυτοποιήθηκαν οι εξής ενώσεις στα αντίστοιχα εκχυλίσματα: Στο κλάσμα του οξικού αιθυλεστέρα διαπιστώθηκε η ύπαρξη ενός δισακχαρίτη της απιγενίνης με ανθρακική αλυσίδα και ενός δισακχαρίτη της ναριγγενίνης με πλευρική αλυσίδα. Στο κλάσμα της βουτανόλης διαπιστώθηκε η ύπαρξη ενός τρισακχαρίτη της λουτεολίνης και ενός μονοσακχαρίτη της λουτεολίνης που έφερε μια προσθετική ομάδα κινουειδούς μορφής. Στο κλάσμα του αιθέρα διαπιστώθηκε η ύπαρξη εστέρων κινικού οξέος με υδροξυκινναμωμικά οξέα και συγκεκριμένα καφεϊκό οξύ, τριυδροξυκινναμωμικό οξύ δεϋδροσιναπικό οξύ και σιναπικό οξύ. Η περαιτέρω ανάλυση με στήλη πολυαμιδίου του κλάσματος του οξικού αιθυλεστέρα οδήγησε στην ταυτοποίηση δυο γνωστών από τη βιβλιογραφία ενώσεων της πινιτόλης και του νεοεσπεριδοζίτη της ναριγγενίνης και τριών νέων φυτικών ενώσεων, δυο δισακχαριτών της απιγενίνης με ανθρακική αλυσίδα ως υποκαταστάτης του Β δακτυλίου και συγκεκριμένα της θέσης 4' και ενός δισακχαρίτη της ναριγγενίνης με ανθρακική αλυσίδα ως υποκαταστάτης στον ανθρακα 5 του δακτυλίου Α. Οι έλεγχοι της αναστολής της αναγωγής της αλδόζης ALR2 και της αλδεϋδης ALR1 εμφάνισαν υψηλό δείκτη δράσης. Αντιθέτως η αντιοξειδωτική δράση ήταν περιορισμένη. Η έρευνα συνεχίζεται με σκοπό την απομόνωση και διευκρίνιση της δομής περαιτέρω ουσιών προερχομένων από τα υπόλοιπα εκχυλίσματα που περιέχονται στο φυτό. Στόχος είναι η επιβεβαίωση της υπογλυκαιμικής δράσης τόσο στις ενώσεις που έχουν ταυτοποιηθεί όσο και σε άλλες ενώσεις που περιέχονται στα υπόλοιπα εκχυλίσματα και η απόδοση αυτής σε

συγκεκριμένα συστατικά, με περαιτέρω πειράματα σε ποντίκια, τόσο των εκχυλισμάτων όσο και των απομονωμένων ουσιών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Addy, M.E., Addo, P., Nyarko, A.K. (1992). Indigofera arrecta prevents the development of hyperglycaemia in the db/db mouse . *Phytotherapy Res* 6, 1, 25-28.
- Addy, M.E., Nyarko, A.K. (1988) Diabetic patients' response to oral administration of aqueous extract of Indigofera arrecta. *Phytotherapy Res* 2, 4, 192-195.
- Afolayan AJ, Meyer JJ. (1997) The antimicrobial activity of 3,5,7-trihydroxyflavone isolated from the shoots of Helichrysum aureonitens. *J Ethnopharmacol* 57:177-81.
- Agnese, A.M.; Perez, C.; Cabrera, J.L. (2001) Adesmia aegiceras:antimicrobial activity and chemical study. *Phytomedicine* 8, 5, 389-394.
- Ali, N.A.A., Jülich, W.-D., Kusnick, C., Lindequist, U. (2001) Screening of Yemeni medicinal plants for antibacterial and cytotoxic activities J. *Ethnopharmacology* 74, 2, Pages 173-179.
- Alston, T.A., Mela, L., Bright, H.J. (1977) 3-Nitropropionate, the toxic substance of Indigofera, is a suicide inactivator of succinate dehydrogenase *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74, 9, 3767-3771.
- Amala B.E., N. Ganga, R. Arivudainambi and G. Santhanam. (1982) *Indian J. Med. Res* 76 115–118.
- Amoras, M., Sauvager, F., Girre, L., & Cormier, M. (1992a). In vitro antiviral activity of propolis. *Apiologie* 23, 231-240.
- Amoras, M., Simoes, C. M., Girre, L., Sauvager, F., & Cormier, M. (1992b). Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity o propolis. *J Nat Prod* 55, 1732-1740.
- Anson R. Cooke (2004) The toxic constituent of Indigofera endecaphylla. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 55, 1, 1955, 114-120.

- Asuntha, G., Prasannaraju, Y., Prasad, K.V.S.R.G. (2010) Effect of ethanol extract of *Indigofera tinctoria* Linn (Fabaceae) on lithium/pilocarpine-induced status epilepticus and oxidative stress in wistar rats *Tropical J. Pharm. Res* 2, 149-156.
- Aurangzeb Hasan, I Ahmad, M A Khan, M I Chudhary (1996) Two flavonol triglycosides from flowers of *Indigofera hebeptala*. *Phytochemistry* 11, 43, 5,1115-8.
- Awadh N.A. Ali, W.-D Jülich, C Kusnick, U Lindequist (2001) Screening of Yemeni medicinal plants for antibacterial and cytotoxic activities *Journal of Ethnopharmacology* 74, 2,173-179.
- Aya Hisaeda, Katsuyoshi Matsunami, Hideaki Otsuka and Yoshio Takeda (2011) Acylated kaempferol glycosides from the flowers of *delphinium formosum* *J. Nat. Med* 65:360-363.
- Bae EA, Han MJ, Kim DH. (1999) In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of some flavonoids and their metabolites. *Planta Med* 65:442-3.
- Bates, S.H.; Jones, R.B.; Baily, C.J. (2000) Insulin-like effect of pinitol. *Br.J.Pharmacol.*,v.130, p.1944-1948.
- Balamurugan, G., Muralidharan, P. (2010) Effect of *indigofera tinctoria* on β -amyloid (25-35) mediated Alzheimer's disease in mice: Relationship to antioxidant activity *Bangladesh J. Pharmacol* 5,1, 51-56.
- Bangar, A.V., Saralaya, M.G. (2011) Anti-hyperglycaemic activity of ethanol extract and chloroform extract of *Indigofera tinctoria* leaves in streptozotocin induced diabetic mice (Family-Papilionaceae) *Res. J. Pharmaceutical, Biol. and Chem. Sci* 2, 1, 445-455.
- Barton G. Moyer, Philip E. Pfeffer, Jerry L. Moniot, Maurice Shamma, David L. Gustine (1977) Corollin, coronillin and coronarian: Three new 3-nitropropanoyl- β -glucopyranoses from *Coronilla varia* *Phytochem* 16, 3, 375-377.
- Bashir AK, Abdalla AA, Wasfi IA, Hassan ES, Amiri MH, Crabb TA.(1994) Flavonoids of *Limonium axillare*. *Int J Pharmacogn* 22:366-72.

- Bertorello, A. M., Aperia, A., Walaas, S. I., Nairn, A. C., & Greengard, P. (1991). Phosphorylation of the catalytic subunit of Na⁺/K⁺-ATPase inhibits the activity of the enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 11359-11362.
- Borhani D.W., Harter T.M., Petrash J.M. (1992) The crystal structure of the aldose reductase. NADPH binary complex. *J.Biol.Chem* 267, 24841-7.
- Bors, W., Heller, W., Michel, C., Saran, M. (1990) Flavonoids as antioxidants, determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol* 186, 343-355.
- Bosio K, Avanzini C, D'Avolio A, Ozino O, Savoia D. (2000) In vitro activity of própolis against *Streptococcus pyogenes*. *Lett Appl Microbiol* 31,174-7.
- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol* 28, 25-30.
- Brinkworth RI, Stoermer MJ, Fairlie DP. (1992) Flavones are inhibitors of HIV-1 proteinase. *Biochem Biophys Res Commun* 188:631-7.
- Cafarchia C, De Laurentis N, Milillo MA, Losacco V, Puccini V. (1999) Antifungal activity of Apulia region própolis. *Parassitologia* 41:587-90.
- Carpenedo, F., Bortignon, C., Bruni, A., & Santi, R. (1969). Effect of quercetin on membrane-linked activities. *Biochem Pharmacol* 18, 1495-1500.
- Carper, D., Nishimura C., Graham C., Wistow, G., Shinohara, T., Watanabe, K., Hayaishi, O., (1988). The primary structure of rat lens aldose reductases. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 29, 319.
- Carper, D.A.; Wistow, G.; Nishimura, C.; Graham, C.; Watanabe, K.; Fujii, Y.; Hayashi, H.; Hayaishi, O. (1989). A superfamily of NADPH-dependent reductases in eucaryotes and prokaryotes. *Exp. Eye Res*, 49, 377-388.
- Chiapetta, A. A., Mello, J.F., Maciel, G.M. (1982/83) *Revista do instituto de Antibioticos* 21,43
- Choi, S. U., Kim, K. H., Choi, E. J., Park, S. H., Lee, C. O., Jung, N. P., Yoon, S.K., & Ryu, S. Y. (1999). P-glycoprotein (Pgp) does not affect the cytotoxicity of flavonoids

- from *Sophora flavescens*, which also have no effects on Pgp action. *Anticancer Res* 19, 2035-2040.
- Chopra R.N., Nayar, S.L., Chopra, I.C., (1992). *Glossary of Indian Medicinal plants*, CSIR Publication, New Delhi 140.
- Christina, A.J.M., Jose, M.A., Heison Robert, S.J., Kothai, R., Chidambaranathan, N., Muthumani, P. (2003) Effect of *Indigofera aspalathoides* against Dalton's ascitic lymphoma *Fitoterapia* 74, 3, 280-283.
- Clifford, H. (2001). Sources of natural antioxidants, Oilseeds, nuts, cereals, legumes, animal products and microbial sources. In *Antioxidants in food*. Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M. (Eds), Woodhead Pbs. Ltd. Cambridge, UK, , Ch 3, pp.160-166.
- Constantino, L.; Rastelli, G.; Vianello, P.; Cignarella, G.; Barlocco, D. (1999). Diabetes complications and their potential prevention: Aldose reductases inhibition and other approaches. *Med. Res. Rev* 19, 3-23
- Critchfield JW, Butera ST, Folks TM. (1996) Inhibition of HIV activation in latently infected cells by flavonoid compounds. *AIDS Res Hum Retroviruses* 12:39-46.
- Cushnie TPT, Hamilton VES, Lamb AJ. (2003). Assessment of the antibacterial activity of selected flavonoids and consideration of discrepancies between previous reports. *Microbiol Res* 158:281-9.
- Cuvelier, M.E; Richard, H.; Berset, C. (1992) Comparison of activity of some acid phenols, Structure-activity relationship. *Biosci. Biotech. Biochem* 56, 324-325.
- Dalia Hamdan, Mahmout Zaki El-Readi, Ahmad Tahrani, Florian Herrmann, Dorothea Kanfmann, Nawal Farrang, Assem El-Shazly, Michael Wink. (2011) Chemical composition and biological activity of citrus jambhiri Lush. *Food Chemistry* 127, 2, 394-403.
- Dall' Agnol R, Ferraz A, Bernardi AP. (2003). Antimicrobial activity of some *Hypericum* species. *Phytomedicine* 10:511-6.

- Dahot. M.Umar (1999). Antibacterial and antifungal activity of small protein of *Indigofera oblongifolia* leaves *Journal of Ethnopharmacology*, 64, 3, 277-282.
- De Moraes e Souza, M.A., Bieber, L.W., Chiappeta, A.A., Maciel, G.M., De Mello, J.F., Delle Monache, F., Messana, (1988). Arylbenzofurans from *Indigofera microcarpa* *Phytochemistry* 27, 6, 1817-1819.
- De Moraes, M.A., Souza, E., Bieber, L.W., De Mello, J.F., Cavalcanti, M.S.B., Da Silva Filho, A.A., Do Nascimento, S.C. (1988). Antimicrobial activity of *Indigofera microcarpa* benzofurans *Fitoterapia* 62, 6, 514-516.
- De Vriese, A.S.; Verbeuren, T.J.; Van de Voorde, J.; Lameire, N.H.; Vanhoutte, P.M. (2000) Endothelial dysfunction in diabetes. *Br. J. Pharmacol* 130, 963-974.
- Del Corso A., Cappiello M., Mura U., (2008) From a dull enzyme to something else: facts and perspectives regarding aldose reductase. *Curr.Med.Chem* 15, 1452-61.
- Demopoulos, V.J.; Zaher, N.; Zika, Ch.; Anagnostou, K., Mamadou, E.; Alexiou, P.; Nicolaou, I. (2005). Compounds that combine aldose reductases inhibitory activity and ability to prevent the glycation (glycation and/or fructation) of proteins as putative pharmacotherapeutic agents. *Drug Design Reviews Online* 2, 293-304.
- Dewick .M. Paul Medicinal Products: A Biosynthetic Approach . Third Edition. Wiley.
- Dominguez, X.A., Martinez, C., Calero, A., Dominguez Jr., X.A., Hinojosa, M., Zamudio, A., Zabel, V., Smith, W.B., Watson, W.H. (1978) Louisfieserone, an unusual flavanone derivative from *Indigofera suffruticosa*, Mill. *Tetrahedron Letters* Volume 19, 5, , 429-432.
- Du G-H, Qiu Y, Tian Y-E, Zhang J-T (1995). Prevention of galactose –induced cataractogenesis in rats by salvianolic acid *A. Acta. Pharm.Sin* 30:561-566.
- El- Kabbani O., Podjiarny. (2007). Selectivity determinants of the aldose and aldehyde reductases inhibitor-binding sites. *Cell. Mol, Life Sci.*64 1970-1978.
- El-Abyad MS, Morsi NM, Zaki DA, Shaaban MT. (1990). Preliminary screening of some Egyptian weeds for antimicrobial activity. *Microbios*; 62:47-57.
- El-Kabbani O., Narayana S.V.L., Babu Y.S., Moore.K.M., Flynn T.G., Petrash J.M., Westbrook E.M., De Lucas L.J., Bugg C.E., (1991). Purification crystallization and

- preliminary chrysallographic analysis of porcine aldose reductases. *J. Mol.Biol.*218, 695-698.
- El-Kabbani O., Wilson D.K., Petrash M., Quioco F.A.(1998). Structural features of the aldose reductases inhibitor-binding sites. *Mol. Vis.* 4,19-26.
- Evans, P., Halliwell, B. (2001). Micronutrients, oxidant/antioxidant status *Brit.J Nutr* 85, S67-S74.
- Farzana Panhwar. (2005). Chemistry and biochemistry of Legume, with cultural activities in Sindh.
- Fearnley J. (2001) Bee propolis. London, UK: Souvenir Press Ltd.
- Fesen MR, Pommier Y, Leteurtre F, Hiroguchi S, Yung J, Kohn KW. (1994). Inhibition of HIV-1 integrase by flavones, caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and related compounds. *Biochem Pharmacol* 48:595-608.
- Finnegan R. A. and W. H. Muller (1965) Chemical examination of a toxic extract of *Indigofera endecaphylla*. The endecaphyllins *J.Pharm.Sci*, 54, 1136-1144.
- Fukai Toshio, Marumo Ai, Kaitou Kiyoshi, Kanda Toshihisa, Terada Sumio, Nomura Taro. (2002) Anti-Helicobacter pylori flavonoids from licorice extract. *Life Sciences* 71 1449-1463.
- Fukui H, Goto K, Tabata M. (1988). Two antimicrobial flavanones from the leaves of *Glycyrrhiza glabra*. *Chem Pharm Bull* (Tokyo) 36:4174-6.
- Gao Z., Huang K., Yang. X., Xu H., (1999). Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of *Scutellaria baicalensis* Georgi, *Biochim Biophys Acta* 472 643-650.
- Garbhapu, A., Yalavarthi, P., Koganti, P. (2011). Effect of ethanolic extract of *Indigofera tinctoria* on chemically-induced seizures and brain GABA levels in albino rats *Iranian J. of Basic Med. Sciences* 14 (4), pp. 318-326.
- Garcez, W. S.; Garcez, F. R.; Honda, N. K.; DaSilva, A. J. R. (1989) A nitropropanoyl-glucopyranoside from *Indigofera suffruticosa*, *Phytochemistry*, 28 1251-1252.

- German, B.J., Dillard, C.J. Phytochemicals and targets of chronic disease. In *Phytochemicals. A new paradigm*. Bidlack, W.R., Omaye, S.T., Meskin, M.S., Jahner, D. (Eds). Technomic Publishing Company, Inc. Pennsylvania, USA, (1998) , Ch.2. 13-14.
- Hagen, S. E., Prasad, J. V., Boyer, F. E., Domagala, J. M., Ellsworth, E. L., Gajda, C., Hamilton, H.W., Markoski, L. J., Steinbaugh, B. A., Tait, B. D., Lunney, E. A., Tummino, P. J., Ferguson, D., Hupe, D., Nouhan, C., Gracheck, S. J., Saunders, J. M., & VanderRoest, S. (1997). Synthesis of 5,6-dihydro-4-hydroxy-2-pyrone as HIV-1 protease inhibitors: the profound effect of polarity on antiviral activity. *J Med Chem* 40, 3707-3711.
- Hagen, S. E., Prasad, J. V., Boyer, F. E., Domagala, J.M., Ellsworth, E. L., Gajda, C., Hamilton, H. W., Markoski, L. J., Steinbaugh, B.A., Tait, B. D., Lunney, E. A., Tummino, P. J., Ferguson, D., Nouhan, C., Gracheck, S. J., Saunders, J. M., & VanderRoest, S. (1997). Synthesis of 5,6-dihydro-4-hydroxy-2-pyrone as HIV-1 protease inhibitors: the profound effect of polarity on antiviral activity. *J Med Chem* 40, 3707-3711.
- Hamdan Dalia, Mahmoud Zaki El-Readi, Ahmad Tahrani, Florian Herrmann, Dorothea Kanfmann, Nawal Farrang, Assem El-Shazly, Michael Wink. (2011) Chemical composition and biological activity of citrus jambhiri Lush. *Food Chemistry*, 127, 2, 394-403.
- Harborne J.B Dey P.M. (1989) *Methods in plant biochemistry/* series editors P.M. Dey and J.B Harborne
- Hasan, A., Ahmad, I., Khan, M.A., Chudhary, M.I. (1996) Two flavonol triglycosides from flowers of *Indigofera hebeptala*. *Phytochemistry* 43, 5, 1115-1118.
- Hasan, A., Farman, M. (1993). Constituents of *Indigofera hebeptala* leaves *Fitoterapia* 64, 5, 479.
- Hisaeda, Aya Matsunami, Katsuyoshi Otsuka, Hideaki Takeda, Yoshio (2001) Flavonol glycosides from the leaves of *Indigofera zollingeriana* *J of Natural Medicines*.
- Homans S. W. Oligosaccharide conformations: Application of NMR and energy calculations *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 22, (1), 55-81

- Horisberger, J.-D., Jannin, P., Reuben, M.A., Lasater, L. S., Chow, D. C., Forte, J. G., Sachs, G., Rossier, B. C., & Geering, K. (1991). The H⁺-ATPase β -subunit can act as a surrogate for the β -subunit of Na⁺/K⁺-pumps. *J Biol Chem* 266, 19131-19134.
- Hosokawa, N., Hirayoshi, K., Kudo, H., Takechi, H., Aoike, A., Kawai, K., & Nagata, K. (1992). Inhibition of the activation of heat shock factor in vivo and in vitro by flavonoids. *Mol Cell Biol* 12, 3490-3498.
- Hu CQ, Chen K, Shi Q, Kilkuskie RE, Cheng YC, Lee KH, (1994). Anti-AIDS agents, 10, Acacetin-7-O-beta-D-galactopyranoside, an anti-HIV principle from *Chrysanthemum morifolium* and a structure-activity correlation with some related flavonoids. *J Nat Prod*;57:42-51.
- Hufford CD, Lasswell WL. (1978). Antimicrobial activities of constituents of *Uvaria chamae*. *Lloydia*; 41:156-60.
- Jens K. Nielsen, Carl E. Olsen, Marianne K. Petersen (1993) Acylated flavonol glycosides from cabbage leaves *Phytochem* 34, 2, 539-544.
- Jolanda Nazuruk and Jan Gudej. (2000). Apigenin glycosides from the flowers of *Bellis Perennis* L. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research* 57, 2, 129-130.
- Jonathan L. T.; Gbeassor, M.; Che, C. T.; Fong, H. H.; Farnsworth, N. R.; Le Breton, G.C.; Venton, D. L. (1990). Pseudosemiglabrin, a Platelet Aggregation Inhibitor from *Tephrosia semiglabra* *J. Nat. Prod* 53, 1572.
- Kamal, R., Mangla, M.(1993) In vivo and in vitro investigations on rotenoids from *Indigofera tinctoria* and their bioefficacy against the larvae of *Anopheles stephensi* and adults of *Callosobruchus chinensis* *J. of Biosciences* 18 1, 93-101.
- Kameswaran T.R, Ramanibai R. (2008). Antiproliferative activity in flavonoids fraction or *Indigofera tinctoria* Linn. *Biological science* 5, 1-7.
- Kasimu R, Tanaka K, Tezuka Y, Gong Z-N, Li J-X, Basnet P, Namba, T, Kadota S (1998). Coparative study of seventeen *Salvia* Plants: aldose reductases inhibitory activity of water and MeOH extracts and LC-MS analysis of water extracts. *Chem Pharm. Bull*, 46: 500-504.
- Kat K, Murakami N, Hasegawa Y, Nakayama K, Ohta M, Mizota M, Yamaguchi K, Ishiguro I, Miwa I, Okuda J. *Diabetes* 1991;40 (Suppl1):A346

- Khalifah, R.G.; Baynes, J.W.; Hudson, E.G. (1999) Amadorins: Novel post-Amadori inhibitors of advanced glycation reactions. *Bioche. Biophys. Res. Commun.*, , 257, 251-258.
- Kim DH, Bae EA, Han MJ. (1999). Anti-Helicobacter pylori activity of the metabolites of poncirin from Poncirus trifoliata by human intestinal bacteria. *Biol Pharm Bull*; 22:422-44.
- Kim HJ, Woo ER, Shin CG, Park H. (1998). A new flavonol glycoside gallate ester from Acer okamotoanum and its inhibitory activity against human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) integrase. *J Nat Prod.* 61:145-8.
- Kim J. M.; Yoo, K.; Kim, J.; Seo, Y.; Ha, B.; Kho, J.; Shin, Y.; Chung, C. (2007) *Effect of pinitol on glucose metabolism and adipocytokines in uncontrolled type 2 diabetes. Diabetes Res Clin. Pract.*, no prelo.
- Kirtikar K.R. and Basu B.D. (1987). *Indian Medicinal Plants*, **2**, International book Distributor, Dehra Dun 710–711.
- Koukoulitsa Catherine, Zika Chariklia, Geromichalos, Vassilis J. Demopoulos and Skaltsa (2006). *Evaluation of aldose reductases inhibition and docking studies of some secondary metabolites, isolated from Origanum vulgare L. ssp. hirtum Bioorganic & Med. Chem.* 14 , 1653-1659.
- Kumar Raju Senthil, Balasubramanian Rajkapoor , Perumal Perumal (2011). Antitumor and Cytotoxic activities of methanol extract of Indigofera linnaei Ali. *Asian Pacific J Cancer Prev*, 12, 613-618.
- Kumar, S. A., Gandhimathi, R., Mohana Lakshmi, S., Rahul, N., Ashok Kumar, C.K. (2009). Evaluation of the antinociceptive properties from Indigofera tinctoria leaves extracts *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 1, 2, 31-37.
- Kuroyanagi M, Arakawa T, Hirayama Y, Hayashi T. (1999) Antibacterial and antiandrogen flavonoids from Sophora flavescens, *J Nat Prod*; 62:1595-9.
- Lee, J.S., Lee, C.M., Jeong, Y.I.; Jung, I. D., Kim, B.H., Seong, E.Y., Kim, J.I., Choi, I. W., Chung, H. Y., Park, Y.M. (2007a). D-Pinitol regulates Th1/Th2 balance via suppressing Th2 immune response in ovalbumin-induced asthma. *FEBS Lett.*, 581, 1, 57-64.

- Lee, J.S.; Jung, I. D.; Jeong, Y. I.; Lee, C. M.; Shin, Y. K.; Lee, S.Y.; Suh, D.S.; Yoon, M.S.; Lee, K. S.; Choi, Y. H.; Chung, H. Y.; Park, Y.M. (2007b). D- Pinitol inhibits Th1 polarization via suppression of dendritic cells. *Int. Immunopharmacol* 7, 6, 791-804.
- Li BQ, Fu T, Dongyan Y, Mikovits JA, Ruscetti FW, Wang JM. (2000). Flavonoid baicalin inhibits HIV-1 infection at the level of viral entry. *Biochem Biophys Res Commun* 276:534-8.
- Li BQ, Fu T, Yan YD, Baylor NW, Ruscetti FW, Wang JM. (1993). Inhibition of HIV infection by baicalin a flavonoid compound purified from Chinese herbal medicine. *Cell Mol Biol Res* 39:119-24.
- Li W, Asada Y, Yoshikawa T. (1998) Antimicrobial flavonoids from Glycyrrhiza gabra hairy Root cultures, *Planta Med* 64:746-7.
- Lin YM, Anderson H, Flavin MT. (1997). In vitro anti-HIV activity of biflavonoids isolated from Rhus succedanea and Garcinia multiflora. *J Nat Prod*; 60:884-8.
- Lindhorst Essentials of carbohydrate chemistry and biochemistry, 2nd edition, Wiley (2004).
- Logendra Sithes, Ribnicky David M., Yang Hui., Poulev Alexander, Ma Jun , Kennelly J.Edward Raskin Iiya (2006) Bioassay-guided isolation of aldose reductases inhibitors from Artemisia dracunculus *Phytochem* 67:1539-1546.
- Lü, M., Su, Y.-F., Gao, Y., Song, D.-B., Gao, X.-M., Zhang, B.-L. (2009). Chemical constituents in two species of Indigo fera Linn Chinese Traditional and Herbal Drugs 40, 3, 356-373.
- Mabry, T. J., Markham, K. R. and Thomas, M. B. (1970) The Systematic Identification of Flavonoids. Springer, Berlin.
- Μπαμπαλώνας Δ. Κοκκινη. (2004) Συστηματική Βοτανική Θεσσαλονικη.
- Majak, W., Benn, M. Additional esters of 3-nitropropanoic acid and glucose from fruit of the New Zealand karaka tree, *Corynocarpus laevigatus* Phytochemistry 35, 4, 1994, 901-903.
- Malamas MS, Hohman TC, Millen J.J *Med Chem* 1994;37:2043

- Malamas MS, Hohman TC. *Drugs Fut* 1994a; 442
- Maltese F, C Er Kelens, F.V.D Kooy, Y.H.Choi, R.Verporte (2007) Citrus limonoids Analysis, bioactivity and biomedical prospects. *J. of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 21, 8285-8285.
- Matsuda Hisashi, Toshio Morikawa, Iawo Toguchida, and Masayuki Yoshikawa. (2002). Structural requirements of flavonoids and Related Comounds for aldose Reductase Inhibitory Activity *Chem.Pharm.Bull.*50, 6, 788-795.
- Mealy N, Castaner J. (1996) SNK-860: symptomatic antidiabetic,aldose reductases inhibitor. *Drugs of the future* 21:261-265.
- Merati, G., Pasquali, P., Vergani, C., & Landi, L. (1992). Antioxidant activity of ubiquinone-3 in human low density lipoprotein. 16,1, 11-17.
- Michael C. Pirrung, Yong Rok Lee (1995) Total Synthesis and Absolute Configuration of Pseudosemiglabrin, a Platelet Aggregation Antagonist, and Its Diastereomer Semiglabrin *J. Am. Chem. Soc.* 117, 4814–4821
- Miski M, Ulubelen A, Johansson C, Mabry TJ. (1983). Antibacterial activity studies of flavonoids from *Salvia palaestina*. *J Nat Prod*;46:874-5.
- Morris, M.P., Pagán, C., Warmke, H.E. (1954). Hiptagenic acid, a toxic component of *Indigofera endecaphylla* *Science* 119, 3088, 322-323.
- Moyer, B.G., Pfeffer, P.E., Moniot, J.L., Shamma, M., Gustine, D.L. (1977). Corollin, coronillin and coronarian: Three new 3-nitropropanoyl-d-glucopyranoses from *Coronilla varia*. *Phytochemistry* 16, 3, 375-377.
- Muthee, J.K., Gakuya, D.W., Mbaria, J.M., Kareru, P.G., Mulei, C.M., Njonge, F.K. (2011). Ethnobotanical study of anthelmintic and other medicinal plants traditionally used in Loitoktok district of Kenya *Journal of Ethnopharmacology* 135, 1,26,, 15-21.
- Mylari BL, Zembrowski WJ, Beyer TA, Bordner J, Burdi DF, Bussolotti DL, Inskeep PB, Siegel TW. *J.Med Chem* 1992; 35:2169.
- Nagai, T., Suzuki, Y., Tomimori, T., & Yamada, H. (1995b). Antiviral activity of plant flavonoid, 5,7,4'-trihydroxy-8-methoxyflavone, from the roots of *Scutellaria baicalensis* against influenza A (H3N2) and B viruses. *Biol Pharm Bull* 18,295-299.

- Narender T, Khaliq, T Puri A, Chander, R (2006) Antidyslipidemic activity of furano-flavonoids isolated from *Indigofera tinctoria* *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 16,13, 3411-3414
- Ng TB, Ling JM, Wang ZT, Cai JN, Xu GJ, (1996). Examination of coumarins, flavonoids and polysaccharopeptide for antibacterial activity. *Gen Pharmacol*, 27:1237-40.
- Nicolaou, I.; Demopoulos, V.J. (2003). Substituted Pyrrol-1-ylacetic Acids that Combine Aldose Reductase Enzyme Inhibitory Activity and Ability To Prevent the Nonenzymatic Irreversible Modification of Proteins from Monosaccharides. *J. Med. Chem.*, 46:417.
- Nicolaou, I.; Zika, C.; Demopoulos, V.J. (2004). [1-(3,5-Difluoro-4-hydroxyphenyl)-1H-pyrrol-3-yl]phenylmethanone as a Bioisostere of a Carboxylic Acid Aldose Reductase Inhibitor. *J. Med. Chem* 47: 2706
- Niraikulam, A., Hyungdon, Y., Natarajan, V. (2009). Effect of *indigofera tinctoria* against carbon tetrachloride induced hepatic damage in albino rats *Res. J. Biotech* 4, 49-52.
- Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumara T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M (2000). Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 404:787-790.
- Nishikawa, T.; Kukidome, Sonoda K.; Fujisawa, K.; Matsuhisa, T.; Motoshima, Araki, E. (2007). Impact of mitochondrial ROS production on diabetic vascular complications *Diabetes Res. Clin. Pract* 77S, S41-S45.
- Nishimura C., Wistow G., Carper D. (1989). Rat lens aldose reductases: characterization of its primary structure, m RNA, and gene complexity. *Prog Clin Biol Res* 290, 211-20.
- Nishimura C.; Wistow G.; Carper D., (1989). Rat lens aldose reductases: characterization of its primary structure, mRna, and gene complexity. *Prog Clin Biol Res* 290, 211-20.

- Nose, K. (1984). Inhibition by flavonoids of RNA synthesis in permeable WI-38 cells and of transcription by RNA polymerase II. *Biochem Pharmacol* 33, 3823-3827.
- Nyarko, A.K., Sittie, A.A., Addy, M.E. (1993) The basis for the antihyperglycaemic activity of *Indigofera arrecta* in the rat *Phytotherapy Res.* 7, 1, 1-4.
- Ono K, Nakane H, Fukushima M, Chermann JC, Barre-Sinoussi F. (1990). Differential inhibitory effects of various flavonoids on the activities of reverse transcriptase and cellular DNA and RNA polymerases. *Eur J Biochem*;190:469-76.
- Ono, K., Nakane, H., Fukushima, M., Chermann, J. C., & Barre-Sinoussi, F. (1990). Differential inhibitory effects of various flavonoids on the activities of reverse transcriptase and cellular DNA and RNA polymerases. *Eur J Biochem* 190, 469-476. Erratum: *Eur J Biochem* 199, 769.
- Osawa K, Yasuda H, Maruyama T, Morita H, Takeya K, Itokawa H, (1992). Isoflavones from the heartwood of *Swartzia polyphylla* and their antibacterial activity against cariogenic bacteria. *Chem Pharm Bull* (Tokyo) 40:2970-4.
- Osman Ustun, Berrin Ozcelik, Yakut Akyon, Ufuk Abbasoglu, Erdem Yesilada. (2006) *Flavonoids with anti-Helicobacter pylori activity from Cistus laurifolius leaves.* *Journal of Ethnopharmacology* 108 457-461
- Ostlund, R. E.; Sherman, W.R. (1996) Pinitol and derivatives for the treatment of metabolic disorders. US5550166, 27
- Palacios P, Gutkind G, Rondina RV, de Torres R, Coussio JD. (1983). Genus *Baccharis*. II. Antimicrobial activity of *B. crispa* and *B. notoserjila*. *Planta Med* 49:128.
- Park YK, Ikegaki M. (1998). Preparation of water and ethanolic extracts of propolis and evaluation of the preparations. *Biosci Biotechnol Biochem* 62:2230-2.
- Pepeljnjak S, Jalsenjajak I, Maysinger D. (1982). Growth inhibition of *Bacillus subtilis* and composition of various propolis extracts. *Pharmazie* 37:864-5.
- Perkins, J.M. *Radical chemistry*. Ellis Horworth, UK, 1994, Ch.1. p.1, ch.3.pp.21-28.

- Philip E. Pfeffer, Kathleen M. Valentine, Barton G. Moyer, David L. Gustine (1979) Assessment of ¹³C-shift parameters in di- and tri-O-(3-nitropropanoyl)-D-Glucopyranoses *Carbohydrate Research* 73, 1, 1-8.
- Prescott LM, Harley JP, Klein DA. Microbiology. London. UK:WCB/McGraw-Hill: 1999.
- Rajendra Prasad Y and Chakradhar V (2004) A new isoflavone from *Indigofera linnaei*. *Indian J. Chem.*, , 43B, 1807-08.
- Raj Kapoor Balasubramanian, Muruges N Narayanan, Lalitha Kedalgovindaram and Krishna Devarakonda Rama (2007) Cytotoxic activity of flavone glycoside from the stem of *Indigofera aspalathoides* Vahl *J. Nat. Med* 61, 80-83
- Ramana, K.V.; Friedrich, B.; Tammali, R.; West, M.B.; Bhatnagar, A.; Srivastava, S.K. *Requirements of aldose reductases for the hyperglycaemic activation of protein kinase C and formation of diacylglycerol in vascular smooth muscle cells*. *Diabetes*, 2006, 54, 818-829.
- Ramana, K.V.; Friedrich, B.; Srivastava, S.; Bhatnagar, A.; Srivastava, S.K. Activation of nuclear factor- κ B by hyperglycemia in vascular smooth muscle cells is regulated by aldose reductases. *Diabetes*, 2004, 53, 2910-2920
- Ramaswamy AS, Jayaraman S, Sirsi M, Rao KH. *Antibacterial action of some naturally occurring citrus bioflavonoids*. *Indian J Exp Biol* 1972;10:72-3.
- Rao EV and Raju NR. 1984. 2 flavonoids from *Tephrosia purpurea*. *Phytochemistry*. 23(10): 2339-2342. Saleem M, Alam A, et al. 1999.
- Ratty A. K., Das N.P., *Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: structure-activity relationship*, *Biochem Med Metab Biol* 1988, 39 , 69-79.
- Rauha JP, Remes S, Heinonen M, et al. *Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds*. *Int J Food Microbiol* 2000;56:3-12.
- Ravn H, Nishibe S, Sasahara M, Xuebo L (1990) *Phenolic compounds from Plantago asiatica*. *Phytochem* 29:3627-3631

- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26, 1231-1237.
- Renuka Jain, Sheweta Jain, Archana Sharma, Hideyuki Ito, Tsutomu Hatano *Isolation of (+)-pinitol and other constituents from the root bark of Tamarindus indica Linn. J.Nat Med* (2007) 61:355-356, 2007
- Renukadevi, K.P., Suhani Sultana, S. Determination of antibacterial, antioxidant and cytotoxicity effect of *Indigofera tinctoria* on lung cancer cell line NCI-H69 (2011) *Int. J. Pharmacology*, 7 (3), 356-362
- Rolo AP, Palmeira CM. *Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. Toxicol Appl Pharmacol.* 2006 Apr 15;212(2):167-78. Epub 2006 Feb 20.
- Rondeau J.M., Tete-Biellmann J.F., Moras D., Novel *NADPH-binding domain revealed by the crystal structure of aldose reductases. Nature* 355, 469-72,1992.
- Rondeau J.M., Tete-Favier F., Podijarny A., Reymann J.M., P., Biellmann J.F., Moras D., *Novel NADPH-binding domain revealed by the crystal structure of aldose reductases. Nature* 355, 469-72,1992
- Sajid Mehmood, Aziz-Ur-Rahman, Zaheer Ahmad, Nighat Afza, Abdul Malik, Habib Ahmad and Muhammad Iqbal Choudhary (2008) *Monoterpene glycosides from Indigofera hetrantha* *Nat. Prod.Re*, 22, (13), 1189-1195.
- Sakagakami Y, Mimura M, Kajimura K, et al. Anti-MRSA activity of sophoroflavanone G and synergism with other antibacterial agents. *Lett Appl Microbiol* 1998;27:98-100.
- Saravana Kumar, A., Gandhimathi, R., Mohana Lakshmi, S., Rahul, N., Ashok Kumar, C.K. Evaluation of the antinociceptive properties from *Indigofera tinctoria* leaves extracts *J. Pharm. Sci. Res.* 2, 31-37, 2009
- Saravana Kumar, A., Madhan Mohan, E., Gandhimathi, R., Amudha, P. Study on the anti-seizure activity of methanolic extracts of *Indigofera Tinctoria* (L.) *Pharmacologyonline* 1, 1341-1351, 2009

- Sato M, Tsuchiya H, Takase I, Kureshiro H, Tanigaki S, Inuma M. Antibacterial activity of flavanone isolated from *Sophora exigua* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its combination with antibiotics. *Phytother Res* 1995;9:509-12.
- Sato S., Rat kidney *aldose reductases and aldehyde reductases and polyol production in rat kidney*, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 263, F799-F805,1992
- Schade S.Z., Lee S.M., Schlesinger D.H., Doughty C.C., *Primary structure of bovine lens aldose reductase*. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 20, 138, 1981.
- Seckin Özden, Nedime Dürüst, Kenjiro Toki, Norio Saito, Toshio Honda (1998) Acylated kaempferol glycosides from the flowers of *delphinium formosum* *Phytochemistry*, 49, (1), 241-245
- Selvam C. , Sanjay M. Jachak, R. Gnana Oli, Ramasamy Thilagavathi, Asit.K. Chakraborti and K.K. Bhutani (2004) *A new cyclooxygenase (COX) inhibitory pterocarpan from Indigofera aspalathoides: structure elucidation and determination of binding orientations in the active sites of the enzyme by molecular docking* *Tetrahedron Letters* 45, (22), 4311-4314
- Selvam, C., Jachak, S.M., Oli, R.G., Thilagavathi, R., Chakraborti, A.K., Bhutani, K.K. A new cyclooxygenase (COX) inhibitory pterocarpan from *Indigofera aspalathoides*: Structure elucidation and determination of binding orientations in the active sites of the enzyme by molecular docking *Tetrahedron Letters* 45, 22, 4311-4314, 2004
- Selway JWT. Antiviral activity of flavones and flavans. In: Cody V, Middleton E, Harborne JB, editors. *Plant flavonoids in biology and medicine: biochemical, pharmacological, and structure-activity relationships*. New York, NY: Alan R. Liss, Inc.; 1986.
- Senthil Kumar, R., Raj Kapoor, B., Perumal, P. Antitumor and cytotoxic activities of methanol extract of *Indigofera linnaei* Ali (2011) *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 12 (3), 613-618
- Shahidi, F., Wanasundara, J.P.D. *Phenolic Antioxidants*. *Crit. Rev. Food. Sci. Nut.* 1992, 32,67-103

- Shahjahan, M., Vani, G., Devi, C.S.S. Protective effect of *Indigofera oblongifolia* in CC14-induced hepatotoxicity *J. Med. Food* 8 2, 261-265, 2005
- Sharif, A., Ahmed, E., Malik, A., Riaz, N., Afza, N., Nawaz, S.A., Arshad, M., Choudhary, M.I. Lipooxygenase inhibitory constituents from *Indigofera oblongifolia* **Archives of Pharmacal Research** 28, 7, 761-764, 2005
- Simin K, Ali Z, Khaliq-Uz-Zaman SM, Ahmad VU. Structure and biological activity of a New rotenoid from *Pongamia pinnata*. *Nat Prod Lett* 2002;16:351-7
- Simuth, J., Trnovsky, J., & Jelokova, J. (1986). Inhibition of bacterial DNA-dependent RNA polymerases and restriction endonuclease by UV-absorbing components from propolis. *Pharmazie* 41, 131-132.
- Singh B, Chandan BK, Sharma N, Bhardwaj V, Satti NK, Gupta VN, Gupta BD, Suri KA, Suri OP. *Isolation, structure elucidation and in vivo hepatoprotective potential of trans-tetracos-15-enoic acid from Indigofera tinctoria Linn* *Phytother Res.* 2006 Oct;20(10):831-9
- Singh B., A. K. Saxena, B. K. Chandan, V. Bhardwaj, V. N. Gupta, O. P. Suri and S. S. Handa (2001) Hepatoprotective activity of indigtone—a bioactive fraction from *Indigofera tinctoria* Linn. *Phytother. Res.* 15, 294-297
- Singh, R.K.; Pandey, B.L.; Tripathi, M.; Pandey, V.B. *Anti-inflammatory effect of (+)-pinitol*. *Fitoterapia*, v.72, n.2, p.168-170, 2001.
- Sittie, A.A., Nyarko, A.K. *Indigofera arrecta*: Safety evaluation of an antidiabetic plant extract in non-diabetic human volunteers
- Spector, M., O'Neal, S., & Racker, E. (1980a). Reconstitution of the Na⁺K⁺ pump of Ehrlich ascites tumor and enhancement of efficiency by quercetin. *J Biol Chem* 255, 5504-5507.
- Spector, M., O'Neal, S., & Racker, E. (1980b). Phosphorylation of the beta subunit of Na⁺ K⁺-ATPase in Ehrlich ascites tumor by a membrane-bound protein kinase. *J Biol Chem* 255, 8370-8373.
- Srivastava, S.K.; Ramana, K.V.; Bhatnagar, A. (2005). Role of aldose reductases and oxidative damage in diabetes and the consequent potential for therapeutic options. *Endocr. Rev.*, 2005, 26, 380-392.

- Stangeland, T., Alele, P.E., Katuura, E., Lye, K.A. (2011). Plants used to treat malaria in Nyakayojo sub-county, western Uganda *Journal of Ethnopharmacology* 137, 1, 1, 154-166.
- Steuber H., Heine A., Podjarny A., Klebe. G. (2008). Merging the binding sites of aldose and aldehyde reductases for detection of inhibitor selectivity-determining features. *J. Mol. Biol.* 379, 991-1016.
- Su, Y., Li, C., Gao, Y., Di, L., Zhang, X., Guo, D. (2005) Acryloylated glucose 3-nitropropanoates from *Indigofera kirilowii* *J. Nat Prod* 68 (12), 1785-1786
- Tait, B. D., Hagen, S., Domagala, J., Ellsworth, E. L., Gajda, C., Hamilton, H. W., Prasad, J. V., Ferguson, D., Graham, N., Hupe, D., Nouhan, C., Tummino, P. J., Humblet, C., Lunney, E.A., Pavlovsky, A., Rubin, J., Gracheck, S. J., Baldwin, E. T., Bhat, T.N., Erickson, J. W., Gulnik, S. V., & Liu, B. (1997). 4-Hydroxy-5,6-dihydropyrones. 2. Potent non-peptide inhibitors of HIV protease. *J Med Chem* 40, 3781-3792.
- Terashima S, Shimizu M, Nkayama H, Ishikura M, Ueda Y., Imai K, Suzui A, Morita N (1990) Studies on aldose reductases inhibitors from medicinal plants of Sinfito. *Potentilla candicans*, and further synthesis of their related compounds. *Chem.Pharm.Bull.* 38:2733-2736.
- Tete-Favier A., F., Mitschler A., Barbanton J., Barth P., Urzhumtseva L., Biellmann J F., Podjarny A., Moras D. (1997) A “specificity” pocket inferred from the crystal structures of the complexes of aldose reductases with the pharmaceutically important inhibitors tolrestat and sorbinil. *Structure* 5, 601-12.
- Thaisrovongs, S., Romero, D. L., Tommasi, R. A., Janakiraman, M. N., Strohbach, J. W., Turner, S. R., Biles, C., Morge, R. R., Johnson, P. D., Aristoff, P.A., Tomich, P. K., Lynn, J. C., Morge, R. R., Johnson, P. D., Aristoff, P. A., Tomich, P. K., Lynn, J. C., Horng, M., Chong, K. T., Hinshaw, R. R., Howe, W. J., Finzel, B. C., & Watenpaugh, K. D. (1996). Structure-based design of HIV protease inhibitors: 5,6-dihydro-4-hydroxy-2-pyrones as effective, nonpeptidic inhibitors. *J Med Chem* 39, 4630-4642.
- Thangadurai, D., Viswanathan, M.B. (2000) Antiulcerogenic Activity of *Indigofera longiracemosa* *Indian J. Pharm. Sci.* 62 (4), 287-290.

- Thangadurai, D., Viswanathan, M.B., Ramesh, N. Indigoferabietone, a novel abietane diterpenoid from *Indigofera longiracemosa* with potential antituberculous and antibacterial activity *Pharmazie* 57, 10, 2002, 714-715.
- Thangadurai, N. Ramesh, M. B. Viswanathan, D. Xavier Prasad (2001) A novel xanthene from *Indigofera longiracemosa* stem *Fitoterapia*, 72, 1, 92-94.
- The Bible, Jeremiah 8, verse 22; Jeremiah 46, verse 11; Jeremiah 51, verse 8.
- Thiruvanmiyoor Ravichandran Kameswaran and Ravichandran Ramanibai (2008) The Antiproliferative Activity of Flavanoidal Fraction of *Indigofera tinctoria* is Through Cell Cycle Arrest and Apoptotic Pathway in A-549 Cells *J. Biol. Sci.* 8, 3, 577-583
- Torrenegra RD, Ricardo AA, Pedrozo JP, Fuentes OC. (1989) Flavonoids from *Gnaphalium gracile* H.B.K. *Int J Crude Drug Res*;27:22-4.
- Tripathi BK, Srivastava AK. (2006) Diabetes mellitus: complications and therapeutics *Med Sci Monit.* 12,7, RA130-47.
- Tsao TF, Newman MG, Kwok YY, Horikoshi AK. (1982) Effect of Chinese and western antimicrobial agents on selected oral bacteria. *J Dent Res* 61: 1103-6.
- Tsuchiya H, Sato M, Iinuma M, (1994) Inhibition of growth of cariogenic bacteria in vitro by plant flavanones. *Experientia*;50:846-9.
- Tsuchiya H, Sato M, Miyazaki T, Fujiara S, Tanigaki S, Ohyama M, Tanaka T Iinuma M. (1996). Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Ethnopharmacol*;50:27-34.
- Turk Z., S. Ljubic, N. Turk, B. Benko, (2001) Detection of autoantibodies against advanced glycation endproducts and AGE-immune complexes in serum of patients with diabetes mellitus, *Clin. Chim. Acta* 303 105-115.
- Uda, Y., Price, K. R., Williamson, G., & Rhodes, M, J. (1997). Induction of the anticarcinogenic marker enzyme, quinone reductases, in murine hepatoma cells in vitro by flavonoids. *Cancer Lett* 120, 213-216.

- Uma Devi, P., Ganasoundari, A., Rao, B.S., & Srinivasan, K. K. (1999). In vivo radioprotection by ocimum flavonoids: survival of mice. *Radiat Res* 151, 74-78.
- Urzumtsev A, Tete-Faver F, Mitschler A, Barbanton J, Barth P, Urzumtseva L, Biellmann J-F, Podjarny AD, Moras D Aspecificity pocket inferred from the crystal structures of the complexes of aldose reductases with pharmaceutically important inhibitors tolrestat and sorbinil *Structure*, **1997**, 5, 601-612.
- Valsaraj R, Pushpangadan P, Smitt UW, Adsersen A, Christensen B S, Sittie Archibald, Nyman U, Nielsen Claus, Olsenn C.E (1997) New anti-HIV-1, antimalarial, and antifungal compounds from Terminalia bellerica. *J Nat Prod* 60:739-42.
- Van Acker, S.; Den Berg, D.; Tromp, M.; Griffioen, D.; Bennekom, W.& Bast, A. (1996) Structural aspects of the antioxidant activity of flavonoids. *Free Rad. Biol. Med* 20: 331.
- Varma D. Shambhu and Kinoshita Jin H. (1976) Inhibition of lens aldose reductase by flavonoids- their possible role in the prevention of diabetic cataracts *Biochem. Pharmacol.* 25, 2505-2513.
- Veckenstedt, A., & Puszai, R. (1981). Mechanism of antiviral action of quercetin against cardiovirus infection in mice. *Antiviral Res* 1, 249-261.
- Veckenstedt, A., Guttner, J., & Beladi, I. (1987). Synergistic action of quercetin and murine alpha/beta interferon in the treatment of Mengo virus infection in mice. *Antiviral res* 7, 169-178.
- Ventakata E. Rao, N.Ranga Raju (1984) Two flavonoids from tephrosia purpurea *Phytochem*, 23, 10, 1984, 2339-2342.
- Vincent, A.M.; Russell, J.W.; Low, P.; Feldman, E.L. (2004) Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocr.Rev*, 25, 612-628.
- Vinson, J.A.; Howard III, T.B. (1996) Inhibitor of protein glycation and advanced glycation end products by ascorbic acid and other vitamins and nutrients. *J. Nutr. Biochem* 7, 659-663

- Waage SK, Hedin PA. (1985) Quercetin 3-O-galactosyl-(1-6)-glucoside, a compound from narrowleaf vetch with antibacterial activity. *Phytochemistry* 24:243-5.
- Wacher, A., & Eilmes, H.G. (1978). Antiviral activity of plant components. 1st communication: Flavonoids. (German). *Arzneimittelforschung* 28, 347-350.
- Wachter GA, Hoffmann JJ, Furbacher T, Blake ME, Timmermann BN. (1999) Antibacterial and antifungal flavanone from *Eysenhardtia texana*. *Phytochemistry* 52:1469-71.
- Walmir S. Garcez, Fernanda R. Garcez, Neli K. Honda, Antonio J.R. da Silva (1989) A nitropropanoyl-glucopyranoside from *Indigofera suffruticosa* *Phytochem* 28,4, 1251-1252.
- Walter Majak and Michael Benn (1994) Additional esters of 3-nitropropanoic acid and glucose from fruit of the New Zealand Karaka tree, *Corynocarpus laevigatus* *Phytochem* 35, 4, 901-903.
- Wang, P. F., & Zheng, R. L. (1992). Inhibitors of autoxidation of linoleic acid by flavonoids in micelles. *Chem Phys Lipids* 63,37-40.
- Wild, S., Roglic G. Green A., Sicree R., King H. (2004). Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 27, 1047-53.
- Wilson D.K., Bohren K.M., Gabbay K.H., Quijcho F.A. (1992). An Unlikely Sugar Substrate Site in the 1.65 Angstrom Structure of the Human Aldose Reductase Holoenzyme Implicated in Diabetic Complications. *Science* 257, 81-84.
- Wilson DK, Tarle I, Petrash JM, Quijcho FA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:9847.
- Winkel-Shirley B. (2001). Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology *Plant Physiology* 126 , 2 485-493.
- Wleklik, M., Zahorscha, R., & Luczak, M. (1987). Interferon-inducing activity of flavonoids. *Acta Microbiol Pol* 36, 151-154.
- Xiao PG. (2002) Modern Chinese materia medica [M]. Beijing: *Chemical Industry Press*.

- Xin-Xin Zhang, Zhen-Xia Zhang, Lei Chen, Yan-Fang Su (1984) Two flavonoids from tephrosia purpurea *Phytochem* 23, 10, 2339-2342.
- Xorge A. Dominguez, Carolina Martinez, Alvaro Calero, Xorge A. Dominguez Jr., Marianela Hinojosa, Angeles Zamudio, William H Watson and Volker Zabel. (1978). Mexican Medicinal Plants XXXI Chemical Components from Jinquelite Indigofera suffruticosa *J. Med. Plant. Res* 34, 172-175.
- Yan fang Su, Chunzheng Li, Yuan Gao, Lizhi Di, Xinxin Zhang, Dean Guo.(2005). Acryloylated glucose 3-nitropropanoates from Indigofera kirilowii *Journal of Natural Products* 68, 12, 1785-1786.
- Yan S. F.; Ramasamy, R.; Naka, Y.; Schmidt, A. M. (2003). Glycation, inflammation, and RAGE- A scaffold for the macrovascular complications of diabetes and beyond. *Circ. Res* 93, 1159-1169.
- Yasufumi Katagiri, Yasuyuki Hashidoko and Satoshi Tahara. (2002). Localization of Flavonoids in the Yellow Lupin Seedlings and Their UV-B-absorbing Potential. *Z. Naturforsch* 57c, 811-816.
- Yawadio Robert, Tanimori Shinji, Morita Naofumi (2007). Identification of phenolic compounds isolated from pigmented rices and their aldose reductases inhibitory activities *Food Chem.* 101, 1616-1625,
- Zaher N, Nicolaou I, Dimopoulos VJ (2002) Pyrrolylbenzothiazole derivatives as aldose reductases inhibitors. *J Enzym Inhib Med Chem* 17:131-135
- Zhan, T; Lou, H. (2007). Synthesis ofazole nucleoside analogues of D-pinitol as potential antitumor agents. *Carbohydr Res.*, v.342, n.6, p. 865-869.
- Zheng WF, Tan RX, Yang L, Liu ZL. (1996). Two flavones from Artemisia giraldii and their antimicrobial activity. *Planta Med*:62:160-2.