

ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑΣ-ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΛΙΟΥΚΑΣ Η. ΜΙΧΑΗΛ
ΠΤΥΧΙΟΥΧΟΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

**Φυτοχημική ανάλυση του *Tephrosia humilis* της οικ. FABACEAE,
με έλεγχο αντιοξειδωτικής δράσης in vitro και αναστολή της
αναγωγάσης της αλδόζης**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2013

ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΠΛΙΟΥΚΑΣ Η. ΜΙΧΑΗΛ
ΠΤΥΧΙΟΥΧΟΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

**Φυτοχημική ανάλυση του *Tephrosia humilis* της οικ. FABACEAE,
με έλεγχο αντιοξειδωτικής δράσης in vitro και αναστολή της
αναγωγάσης της αλδόζης**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας- Χημείας Φυσικών
Προϊόντων, του Τομέα Φαρμακογνωσίας – Φαρμακολογίας, του
Τμήματος Φαρμακευτικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Καθηγητής Ευγένιος Κοκκάλου, Επιβλέπων Καθηγητής
Καθηγητής Βασίλειος Ρούσσης, Μέλος συμβουλευτικής επιτροπής
Καθηγητής Λέανδρος Σκαλτσούνης, Μέλος συμβουλευτικής επιτροπής
Καθηγητής Βασίλειος Δημόπουλος, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσ/νίκης
Καθηγητής Παύλος Κορδοπάτης, Πανεπιστήμιο Πατρών
Καθηγήτρια Δήμητρα Χατζηπαύλου-Λίτινα, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσ/νίκης
Επικ. Καθηγήτρια Διαμάντω Λάζαρη, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσ/νίκης

*Στους γονείς μου,
Ηλία και Χριστίνα*

Πρόλογος

Η παρούσα διδακτορική διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας-Χημείας Φυσικών Προϊόντων του Τομέα Φαρμακογνωσίας-Φαρμακολογίας, του Τμήματος Φαρμακευτικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.

Ευχαριστώ εγκάρδια τον Καθηγητή Ευγένιο Κοκκάλου, επιβλέποντα της παρούσας διδακτορικής διατριβής για την υπόδειξη του θέματος, την ουσιώδη και ανεκτίμητη συμβολή του σε όλα τα στάδια εκτέλεσης αυτής και για τη δυνατότητα που μου έδωσε να ασχοληθώ με το αντικείμενο της Φαρμακογνωσίας.

Ευχαριστώ θερμά τους Καθηγητές Λεάνδρο Σκαλτσούνη (Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών) και Βασίλειο Ρούσση (Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών), μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για τις εποικοδομητικές παρατηρήσεις και συμβουλές σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Επίκ. Καθηγήτρια Φαρμακογνωσίας Α.Π.Θ. Διαμάντω Λάζαρη για τις πολύτιμες συμβουλές της και την συμπαράσταση που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή Φαρμακευτικής Χημείας Α.Π.Θ. Βασίλειο Δημόπουλο για τη συνεργασία στην εκτίμηση αναστολής του ενζύμου αναγωγή της αλδόζης και αλδεΐδης και την Καθηγήτρια Φαρμακευτικής Χημείας Α.Π.Θ. Δήμητρα Χατζηπαύλου-Λίτινα για την εκτίμηση της ανασταλτικής δράσης επί της λιποξυγονάσης φυτικής προέλευσης.

Ευχαριστώ ιδιαίτερω τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής που αποτελείται από τους Καθηγητές κ.κ. Ε.Κοκκάλου, Λ.Σκαλτσούνη, Β.Ρούσση, Β.Δημόπουλο, Δ.Χατζηπαύλου-Λίτινα, Π.Κορδοπάτη και την Επίκ. Καθηγήτρια Δ.Λάζαρη για την αξιολόγηση της διδακτορικής διατριβής.

Αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω ιδιαίτερω θερμά την Δρ. Χρυσή Γαβριέλη, μέλος του εργαστηρίου Φαρμακογνωσίας για την πολύτιμη καθοδήγηση, ειλικρινή συμπαράσταση και καίρια βοήθειά της από τα πρώτα βήματα, έως και το πέρας της εκπόνησης της παρούσας διατριβής.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον ερευνητή του Μεσογειακού Αγρονομικού Ινστιτούτου Χανίων, Δρ. Παναγιώτη Κεφάλα, για την λήψη των φασμάτων με την τεχνική LC-DAD-MS.

Πολλές ευχαριστίες στην ερευνήτρια του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών, Δρ. Μαρία Ζερβού, για την λήψη των φασμάτων Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού, καθώς και για τις εποικοδομητικές και εύστοχες συζητήσεις μας.

Ευχαριστώ τον Καθηγητή Χημείας Α.Π.Θ. Κωνσταντίνο Φυτιάνο, την Επίκ.Καθηγήτρια Φαρμακευτικής Τεχνολογίας Α.Π.Θ. Αικατερίνη Μαρκοπούλου και την ερευνήτρια του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών, Δρ. Ελένη Σιάπη για τη λήψη των φασμάτων μάζης.

Πολλές ευχαριστίες στις Δρ.Πολυξένη Αλεξίου, Δρ. Χατζοπούλου Μαρία και την M.Sc. Λαζανάκη Μαρία για τη συμμετοχή τους στα πειράματα αξιολόγησης της δράσης αναστολής της αναγωγής της αλδόζης και στη λήψη φασμάτων Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού, αντίστοιχα

Θερμές ευχαριστίες σε όλα τα παιδιά του εργαστηρίου της Φαρμακογνωσίας που πέρασαν όλα αυτά τα χρόνια από εκεί, σε όσους φίλους κατάφεραν να κάνουν υπομονή και άντεξαν να παραμείνουν δίπλα μου το διάστημα αυτό, και στους πολύ κοντινούς μου ανθρώπους για την εμπύχωση και την ιδιαίτερα σημαντική βοήθεια που μου προσέφεραν.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω ειλικρινά από τα βάθη της ψυχής μου, τους γονείς μου που, με τη βοήθεια του Θεού, με στήριξαν και μου συμπαραστάθηκαν και δίχως αυτούς δεν θα τα είχα καταφέρει.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
ABSTRACT	3
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	5
<i>Βοτανική κατάταξη του φυτού Tephrosia</i>	5
<i>Το είδος T. humilis</i>	7
Βοτανικά χαρακτηριστικά	7
Το φυτό και η παράδοση	8
Φαρμακολογικές ιδιότητες που έχουν βρεθεί σε διάφορα είδη του γένους Tephrosia	9
Βιβλιογραφικές αναφορές για τη σύσταση διαφόρων ειδών του γένους Tephrosia	12
ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ.....	32
Φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά των φλαβονοειδών.....	38
Φλαβονόλες.....	39
Φλαβανόνες.....	39
Ισοφλαβόνες.....	41
Ροτενοειδή.....	44
Πτεροκαρπάνια.....	45
Κουμεστάνια.....	46
Λιγνάνια.....	46
Άλλες χημικές δομές (Σεσκιτερπένια και τριτερπένια).....	47
<i>Ρόλος των φλαβονοειδών στα φυτά και η βιολογική τους δράση σε ζωικούς οργανισμούς</i>	48
Αντιαθηρωματική δράση.....	49
Αντιφλεγμονώδης δράση.....	50
Αντικαρκινική δράση.....	51
Αντιθρομβωτική δράση.....	52
Αντιική δράση.....	53
<i>Αντιοξειδωτική/προοξειδωτική δράση των φλαβονοειδών</i>	54
Απευθείας σάρωση των ενεργών μορφών οξυγόνου.....	55
Ενεργοποίηση αντιοξειδωτικών ενζύμων.....	57
Δημιουργία χηλικού συμπλόκου με μέταλλα.....	57
Μείωση των ριζών α-τοκοφερόλης.....	58
Αναστολή οξειδασών.....	59
Μείωση του οξειδωτικού stress από νιτρικά οξείδια.....	59
Αύξηση των επιπέδων του ουρικού οξέως.....	60
Μετατροπή της προοξειδωτικής ικανότητας άλλων αντιοξειδωτικών μικρού μοριακού βάρους.....	61
Ως προοξειδωτικά.....	61
ΚΥΚΛΟΞΥΛΑΙΘΑΝΟΕΙΔΗ.....	65
<i>Κυκλοξυλαιθανοειδή</i>	65
ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ.....	69
<i>Ελεύθερες Ρίζες</i>	69
<i>Οξυγόνο και ελεύθερες ρίζες</i>	71
Η τοξικότητα του οξυγόνου.....	72
<i>Σημαντικές ενεργές μορφές οξυγόνου</i>	73
Οξυγόνο αυξημένης ενέργειας.....	73
Ιόν Ρίζας Υπεροξειδίου.....	73
Υπεροξειδικό ανιόν $O_2^{\bullet -}$	74
Υπεροξείδιο του Υδρογόνου H_2O_2	74
Ρίζες Υδροξυλίου HO^{\bullet}	75
Υδροϋπεροξείδιο HO_2^{\bullet}	77

Ρίζα Μονοξειδίου του Αζώτου (NO [•])	77
Μοριακοί μηχανισμοί προσβολής και τοξικότητας από ελεύθερες ρίζες	78
Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί άμυνας	81
ΛΙΠΟΞΥΓΟΝΑΣΗ	85
Αναστολείς λιποξυγονασών.....	86
Βιολογικός ρόλος των LOX.....	89
Λιποξυγονάση και προϊόντα της.....	90
IN VITRO ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ.....	94
Δοκιμή σάρωσης ελευθέρων ριζών με τη χρήση της μεθόδου DPPH	94
Η μέθοδος της χημειοφωταύγειας της Λουμινόλης, επαγόμενης από το σύμπλοκο Co(II)-EDTA	96
Δοκιμή TEAC.....	98
Δοκιμή FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).....	100
Δοκιμή ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)	100
Η δοκιμή του θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBA).....	102
Δοκιμή BCBT (β-carotene bleaching test)	103
Ο ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΤΥΠΟΥ II ΚΑΙ Η ΑΝΑΓΩΓΑΣΗ ΤΗΣ ΑΛΔΟΖΗΣ(ALR2)	105
Διαβήτης	105
Αναγωγή της Αλδόζης(ALR2)	107
Δομή ALR2.....	108
Λειτουργία ALR2.....	109
Αναγωγή της αλδεϋδης (ALR1).....	114
Αναστολείς της αναγωγής της αλδόζης.....	116
ΣΚΟΠΟΣ	123
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	124
Α. Διαλύτες και επιπλέον υλικά για τη βιολογική αποτίμηση	124
Β. Χρωματογραφικές μέθοδοι για την απομόνωση και έλεγχο των περιεχόμενων ουσιών	125
Β1. Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας.....	125
Β2. Χρωματογραφία στήλης	126
Β3. Υγρή Χρωματογραφία Μέσης Πίεσης	126
Β4. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης.....	127
Γ. Φασματοσκοπικές μέθοδοι.....	127
Γ1. Φασματοφωτομετρία Υπεριώδους- Ορατού.....	127
Γ2. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού	127
Γ3. Φασματοσκοπία μάζης.....	128
Γ4. LC-DAD-MS (ESI+)	128
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	130
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	130
Η διαδικασία της εκχύλισης.....	130
Χρωματογραφικός διαχωρισμός των εκχυλισμάτων.....	132
1.ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ ΔΙΧΛΩΡΟΜΕΘΑΝΙΟΥ	135
2.ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ ΜΕΘΑΝΟΛΗΣ	138
2.1.Κατανομή Διαιθυλαιθέρα (T.D.Ether)	138
2.2. Κατανομή Οξικού Αιθυλεστέρα (T.E.A.)	143
2.3. Κατανομή Βουτανόλης (T.Buta.)	153
2.4. Υδατική Κατανομή (Terh. Υδατικό).....	161
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ LC-DAD-MS (ESI+) ΑΝΑΛΥΣΗ	163
Κατανομή ζέοντος ύδατος μεθανολικού εκχυλίσματος - προ κατανομών (Terh.-H ₂ O)	166
Ένωση 1.....	167

Ένωση 2.....	168
<i>Κατανομή Διαιθυλαιθέρα (T.D.Ether).....</i>	<i>171</i>
Ένωση 3.....	172
Ένωση 4.....	173
Ένωση 5.....	174
Ένωση 6.....	176
Ένωση 7.....	178
Ένωση 8.....	180
<i>Κατανομή οξικού αιθυλεστέρα(T.E.A.).....</i>	<i>183</i>
Ένωση 9.....	184
Ένωση 10.....	186
Ένωση 11.....	188
Ένωση 12.....	190
Ένωση 13.....	192
Ένωση 14.....	194
Ένωση 15.....	196
Ένωση 16.....	198
<i>Κατανομή υπολείμματος οξικού αιθυλεστέρα (T.E.A. Res).....</i>	<i>201</i>
Ένωση 17.....	202
Ένωση 18.....	204
Ένωση 19.....	206
Ένωση 20.....	208
Ένωση 21.....	209
<i>Αδιάλυτο ίζημα ηθμού (Tερh-Ηθμού).....</i>	<i>212</i>
Ένωση 22.....	213
Ένωση 23.....	215
Ενώσεις 24 & 25.....	217
<i>Κατανομή Βουτανόλης(T.Buta.).....</i>	<i>221</i>
Ένωση 26.....	222
Ένωση 27.....	224
Ένωση 28.....	226
Ένωση 29.....	227
Ένωση 30.....	229
ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΙΣ ΟΥΣΙΩΝ.....	232
ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ ΔΙΧΛΩΡΟΜΕΘΑΝΙΟΥ.....	233
Ένωση 1.....	233
Ένωση 2.....	240
ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΔΙΑΙΘΥΛΑΙΘΕΡΑ.....	247
Ένωση 3.....	247
Ενώσεις 4 & 5.....	257
ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΟΞΙΚΟΥ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑ.....	273
Ένωση 6.....	273
Ένωση 7.....	283
Ένωση 8.....	293
Ένωση 9.....	296
Ένωση 10.....	305
ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΒΟΥΤΑΝΟΛΗΣ.....	309
Ένωση 11.....	309
Ένωση 12.....	319

Ουσία M61	330
Ουσία M32	333
Ένωση 13.....	335
IN VITRO ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΥΝΑΜΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΤΗΣ ΑΝΑΓΩΓΑΣΗΣ ΤΗΣ ΑΛΔΟΖΗΣ (ALR2)	345
<i>Ικανότητα σάρωσης ελευθέρων ριζών των διαφόρων κατανομών του μεθανολικού εκχυλίσματος του T.humilis με τη χρήση της μεθόδου DPPH</i>	345
Κατανομή διαιθυλαιθέρα	348
Κατανομή οξικού αιθυλεστέρα	351
Κατανομή υπολείμματος οξικού αιθυλεστέρα	352
Κατανομή βουτανόλης.....	354
Υδατική κατανομή.....	356
Μεθανολικό εκχύλισμα (προ κατανομών-crude)	357
<i>Ικανότητα σάρωσης ελευθέρων ριζών των διαφόρων κατανομών του μεθανολικού εκχυλίσματος του T.humilis με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας της Λουμινόλης, επαγόμενης από το σύμπλοκο Co(II)-EDTA</i> 361	
Κατανομή διαιθυλαιθέρα	362
Κατανομή οξικού αιθυλεστέρα	364
Κατανομή υπολείμματος οξικού αιθυλεστέρα	366
Κατανομή βουτανόλης.....	368
Υδατική κατανομή.....	370
Μεθανολικό εκχύλισμα(crude-προ κατανομών)	372
<i>In vitro μελέτη της ικανότητας αναστολής της αναγωγής της αλδόζης (ALR2)</i>	376
<i>Εκτίμηση της ικανότητας αναστολής του ενζύμου αναγωγής της αλδόζης (ALR2)</i>	378
Κατανομή διαιθυλαιθέρα	378
Κατανομή οξικού αιθυλεστέρα.....	380
Κατανομή υπολείμματος οξικού αιθυλεστέρα	382
Κατανομή βουτανόλης.....	384
Υδατική κατανομή.....	386
Εκχύλισμα διχλωρομεθανίου.....	388
<i>In vitro μελέτη της ικανότητας αναστολής της αναγωγής της αλδεΐδης (ALR1)</i>	391
<i>Εκτίμηση της ικανότητας αναστολής του ενζύμου αναγωγής των αλδεϊδών (ALR1) και προσδιορισμός της εκλεκτικότητας με το ομόλογο ένζυμο αναγωγής της αλδόζης(ALR2)</i>	393
Κατανομή διαιθυλαιθέρα	393
Κατανομή οξικού αιθυλεστέρα.....	394
Κατανομή υπολείμματος οξικού αιθυλεστέρα	395
Κατανομή βουτανόλης.....	396
Υδατική κατανομή.....	397
Εκχύλισμα διχλωρομεθανίου.....	398
<i>Ανασταλτική δράση επί της λιποξυγονάσης φυτικής προέλευσης</i>	402
Κατανομή διαιθυλαιθέρα	403
Κατανομή οξικού αιθυλεστέρα.....	404
Κατανομή υπολείμματος οξικού αιθυλεστέρα	404
Κατανομή βουτανόλης.....	404
Υδατική Κατανομή.....	404
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	407
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	411

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το γένος *Tephrosia* (Fabaceae) περιλαμβάνει περί τα 400 είδη θάμνων, που ενδημούν σε τροπικές και υποτροπικές περιοχές. Από τη χρήση του φυτού στη λαϊκή θεραπευτική από τοπικούς πληθυσμούς, τα περισσότερα είδη του γένους *Tephrosia* φαίνεται να διαθέτουν υπογλυκαιμικές, εντομοκτόνες, ιχθυοκτόνες, αντιελκωτικές, ηπατοπροστατευτικές και αντικαρκινικές ιδιότητες με την ξηρά δρόγη να είναι αποτελεσματική ως καθαρτικό, ανθελμινθικό και διουρητικό. Από τη φυτοχημική ανάλυση του φυτού προέκυψε η ύπαρξη χαλκονών, φλαβονών, φλαβονών, ισοφλαβονών, κουμεστονών, πτεροκαρπανίων και ροτενοϊδών ως δευτερογενών μεταβολιτών. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε ανάλυση του φαινολικού περιεχομένου του υπέργειου τμήματος του φυτού *Tephrosia humilis* (Fabaceae), έλεγχος διαφόρων εκχυλισμάτων σχετικά με την αντιοξειδωτική ικανότητα (δοκιμή ρίζας DPPH·, χημειοφωταύγεια της λουμινόλης και αναστολή της λιποξυγονάσης φυτικής προέλευσης), καθώς και έλεγχος αναστολής του ενζύμου αναγωγή της αλδόζης σε σύγκριση με την αναστολή του ενζύμου αναγωγή της αλδεΰδης. Το ένζυμο αναγωγή της αλδόζης είναι υπεύθυνο για την εκδήλωση των δευτερογενών επιπλοκών σε διαβητικούς τύπου II, όπου συγχρόνως έχουμε και γένεση ελευθέρων ριζών (κυτταρικό οξειδωτικό στρες).

Το φυτικό υλικό εκχυλίστηκε εξαντλητικά με πετρελαϊκό αιθέρα, διχλωρομεθάνιο και μεθανόλη, διαδοχικά. Το ξηρό υπόλειμμα του μεθανολικού εκχυλίσματος διαλύθηκε σε ζέον ύδωρ, διηθηθήκε και ακολούθησε κατανομή με τους ακόλουθους διαλύτες αυξανόμενης πολικότητας: διαιθυλαιθέρα, οξικό αιθυλεστέρα και βουτανόλη. Η εναπομείνασα υδατική φάση συλλέχθηκε και αυτή.

Η φυτοχημική ανάλυση των αρχικών εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε σε σύστημα LC-DAD-MS (ESI+). Παράλληλα πραγματοποιήθηκε, σε παρασκευαστικό επίπεδο, προσπάθεια απομόνωσης των κυρίων συστατικών με διάφορες τεχνικές [υγρή χρωματογραφία στήλης (CC), υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC), χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC)].

Από την φυτοχημική ανάλυση ανιχνεύθηκαν συνολικά 95 ενώσεις εκ των οποίων 65 απομονώθηκαν με χρωματογραφικές τεχνικές και 30 αναλύθηκαν με την

τεχνική του LC-DAD-MS. 13 από τις συνολικά 65, ταυτοποιήθηκαν με όλα τα φασματοσκοπικά τους στοιχεία, 38 με τα φάσματα UV-Vis κατά Mabry (1970) ενώ δεν κατέστη δυνατή η διευκρίνιση σε 14 ενώσεις. Εκτιμήθηκε η δομή σε 29 ενώσεις από τις 30 με την τεχνική του LC-DAD-MS, ενώ δεν κατέστη δυνατή η διευκρίνιση σε μία εξ αυτών.

Από τον αντιοξειδωτικό έλεγχο με όλες τις τεχνικές αξιολόγησης, προέκυψε η ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα της κατανομής του οξικού αιθυλεστέρα, συγκριτικά με τις ουσίες αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν. Σύμφωνα με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας της λουμινόλης όλα τα κλάσματα, πλην οξικού αιθυλεστέρα, εμφάνισαν χαμηλή ικανότητα σάρωσης ελευθέρων ριζών, ενώ με τα αποτελέσματα της μεθόδου με τη χρήση DPPH, αποδείχθηκε ότι οι κατανομές του οξικού αιθυλεστέρα, της βουτανόλης και του υπολείμματος του οξικού αιθυλεστέρα αποτελούν ισχυρούς σαρωτές ελευθέρων ριζών. Σχετικά με την αναστολή της λιποξυγονάσης, οι κατανομές του οξικού αιθυλεστέρα και του υπολείμματος του οξικού αιθυλεστέρα, αποδείχθηκαν οι πιο ισχυροί αναστολείς του ενζύμου. Όσον αφορά την αναστολή της αναγωγής της αλδόζης, όλες οι κατανομές, πλην της υδατικής, ήταν ισχυροί αναστολείς του ενζύμου, με τα κλάσματα της βουτανόλης και του οξικού αιθυλεστέρα να υπερβαίνουν το 75%.

Η παρούσα εργασία είναι η πρώτη φυτοχημική μελέτη του φαινολικού περιεχομένου του υπέργειου τμήματος του φυτού *Tephrosia humilis*, καθώς και η πρώτη *in vitro* ένδειξη καλής αντιοξειδωτικής ικανότητας και με παράλληλη αναστολή της αναγωγής της αλδόζης.

ABSTRACT

Tephrosia ssp. (Fabaceae) genus contains about 400 species of shrubs indigenous in tropical and sub-tropical regions. Because of the use of the plant in traditional remedies by the natives in these areas, most *Tephrosia* species seem to possess hypoglycemic, insecticidal, fish-poisoning, antiulcer, hepatoprotective and anticancer properties and the dried herb is effective as a laxative, anthelmintic and diuretic [3]. The phytochemical investigation of this plant provided chalcones, flavanones, flavones, isoflavones, coumestones, pterocarpanes and rotenoids as secondary metabolites. In the present research work the aerial parts of *Tephrosia humilis* (Fabaceae) were tested about their phenolic content, the antioxidant potential (DPPH·, luminol chemiluminescence and LOX tests) and their ability to inhibit the aldose reductase enzyme (ALR2) in comparison with the inhibition of the aldehyde reductase enzyme (ALR1). The ALR2 enzyme is postulated to be associated with the development of the long term (type II) diabetic complications, where also cellular oxidative stress is implied.

The plant material was exhaustively extracted with petroleum ether, dichloromethane and methanol consecutively. The dry remaining of the methanolic extract (44,68g) was dissolved in hot water, filtrated and partitioned with the following solvents of increasing polarity: diethyl ether, ethyl acetate and butanol. Finally the remaining aqueous extract was collected.

The phytochemical analysis of the initial extracts was realized at an LC-DAD-MS (ESI+) system. Furthermore, there has been an effort for the isolation and clarification of the major compounds with preparative techniques [Column Chromatography (CC), High Pressure Liquid Chromatography (HPLC), Thin Layer Chromatography (TLC)].

Phytochemical analysis resulted to the detection of 95 compounds, 65 of which have been isolated with chromatographic techniques and 30 have been analyzed by the LC-DAD-MS analysis. The structure of the 13, out of the first 65, have been fully elucidated, 38 were estimated by means of their UV-Vis spectra (Mabry et al.,

1970), and the rest 14 could not be elucidated. 29 of the next 30 were estimated from the LC-DAD-MS analysis and only one of them could not be elucidated.

Antioxidant results according to all tests proved the strong antioxidant capacity of the ethyl acetate fraction in comparison to the standards used. According to the CL test, all fractions, except for the ethyl acetate fraction, showed low hydroxyl radical scavenging ability, and the DPPH· test results proved that the ethyl acetate, the *n*-butanolic and the ethyl acetate residue fractions are effective radical scavengers. As for the inhibition of the lipoxygenase, the fractions of the ethyl acetate and its residue, proved to be the strongest inhibitors of the enzyme. As about the ALR2 inhibition, all fractions, except the aqueous, were strong inhibitors of the enzyme, with the *n*-butanolic and the ethyl acetate fractions to inhibit the enzyme above 75%.

This research work is the first phytochemical study of the phenolic content of the aerial parts of *Tephrosia humilis*, as well as the first scientific establishment of the good *in vitro* antioxidant capacity of *Tephrosia humilis* extracts, and specifically of the ethyl acetate fraction, and its strong inhibitory activity against ALR2 enzyme. All this information may be useful for the promotion of use of *Tephrosia humilis* as a natural antioxidant in food and medicinal products and can be an answer to the continual demand for new natural antioxidants. Moreover, the inhibition of ALR2 of the aerial parts of *Tephrosia humilis*, validated the use of the plant for medicinal purposes, especially its potential against the long term diabetic complications.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Βοτανική κατάταξη του φυτού *Tephrosia*

ΒΟΤΑΝΙΚΗ ΚΑΤΑΤΑΞΗ	
Domain(Κατηγορία)	Eukaryota
Kingdom(Βασίλειο)	Plantae
Subkingdom(Υποβασίλειο)	Viridaeplantae
Phylum-Divisio(Κατηγορία-Διαίρεση)	Magnoliophyta
Subphylum(Υποκατηγορία)	Euphylllophytina
Infraphylum(Υπερκλάση)	Radiatopses
Class(Κατηγορία)	Magnoliopsida
Subclass(Υποκλάση)	Rosidae
Superorder(Υπερ-τάξη)	Fabanae
Order(Τάξη)	Fabales
Family(Οικογένεια)	Fabaceae
Subfamily(Υποοικογένεια)	Faboidae
Tribe(Φυλή)	Tephrosieae
Genus(Γένος)	<i>Tephrosia</i>
Species(Είδος)	<i>humilis</i>
Specific epithet	<i>humilis</i> - Guill. & Perr.

Το γένος περιλαμβάνει θάμνους με ίσια ή λογχοειδή φύλλα κατ'εναλλαγή, με πολυάριθμα αγγεία. Φέρει βράκτεα (σχηματισμοί που προσομοιάζουν με φύλλα, στη βάση των ανθέων) και στήμονες, αλλά όχι βρακτεόλια. Τα άνθη εμφανίζονται σε ζεύγη ή σε δεσμίδες ομοειδών, συνήθως σε βότρες στα ακραία τμήματα του φυτού, με άμισχες, σφαιρικού σχήματος ωοθήκες. Το περικάρπιο του καρπού είναι λείο, γραμμικό και συμπιεσμένο, με σπέρματα νεφροειδούς έως σφαιρικού σχήματος. Οι εύθραυστες ρίζες υπόλευκου χρώματος με μήκος 50-60cm είναι κυρτές και όχι ιδιαίτεως διακλαδιζόμενες, έχοντας μια πικάντικη οσμή με ελαφρώς γλυκιά, στυπτική γεύση που καταλήγει σε μια ήπια αίσθηση οξύτητας στο στόμα. Η περίοδος ανθοφορίας των περισσότερων ειδών είναι η άνοιξη και το καλοκαίρι, με αποκορύφωμα τους μήνες Ιούνιο και Ιούλιο (Pienaar B.J., 1993; online sources).

Στο γένος *Tephrosia* εντάσσονται περί τα 300 είδη παγκοσμίως που ευδοκимуούν σε τροπικές και υποτροπικές περιοχές μέσης θερμοκρασίας 12-27°C, με θαμνώδη βλάστηση που προσομοιάζει με σαβάνα και σε υψόμετρο έως 2000m. Ευδοκимуούν ιδιαιτέρως σε όξινο υπέδαφος, εμπλουτίζοντας το έδαφος μέσω της δημιουργίας εξογκωμάτων με βακτήρια που συνθέτουν άζωτο. Είναι ανθεκτικά σε ξηρασία και ισχυρούς ανέμους αλλά και στη φωτιά, λόγω του μεγάλου μήκους της ρίζας τους. Τα πρώτα είδη του γένους φαίνεται ότι ευδοκимуούσαν αρχικά σε περιοχές της Αφρικής και στη συνέχεια εισήχθησαν σε περιοχές της τροπικής Αμερικής και της νότιας και νοτιοανατολικής Ασίας σαν φυτό συγκράτησης νερού και για λίπασμα. Από ιστορικά στοιχεία της εποχής, φέρεται ότι πρωτοεμφανίστηκε στην Ιάβα το 1908 και με την ονομασία «το κορδόνι του Διαβόλου» (*Devil's shoestring*). Σήμερα ευδοκิมεί ως γηγενές φυτό σε Αγκόλα, Μπενίν, Μποτσουάνα, Μπουρκίνα Φάσο, Μπουρούντι, Καμερούν, Τσαντ, Κομόρες, Κονγκό, Ακτή Ελεφαντοστού, Τζιμπουτί, Αίγυπτο, Γουινέα, Ερυθραία, Αιθιοπία, Γκαμπόν, Γκάνα, Κένυα, Λεσότο, Λιβερία, Μαδαγασκάρη, Μαλάουι, Μαυριτανία, Μάλι, Μοζαμβίκη, Ναμίμπια, Νίγηρα, Σεϋχέλλες, Σιέρα Λεόνε, Σομαλία, Νότιο Αφρική, Σουδάν, Ζουαζηλάνδη, Τανζανία, Τόγκο, Ζάμπια, Ζανζιβάρη και Ζιμπάμπουε, ενώ έχει εισαχθεί πλέον σε Αφγανιστάν, Αργεντινή, Μπαγκλαντές, Μπουτάν, Βολιβία, Βραζιλία, Μπρουνέι, Χιλή, Κολομβία, Εκουαδόρ, Γουατεμάλα, Ονδούρα, Ινδία, Ινδονησία, Λάος, Μαλαισία, Μεξικό, Μιανμάρ, Νεπάλ, Νικαράγουα, Πακιστάν, Παναμά, Παραγουάη, Περού, Φιλιππίνες, Σρι Λάνκα, Σουρινάμ, Ταϊλάνδη, Ουρουγουάη, Βενεζουέλα και Βιετνάμ.

Το είδος *T.humilis*



Βοτανικά χαρακτηριστικά

Θάμνος ύψους 0.5-1m που ευδοκιμεί σε τροπικές και υποτροπικές περιοχές της Αφρικής, και συγκεκριμένα σε περιοχές της Κεντρικής Αφρικανικής Δημοκρατίας με υψόμετρο 610m και της Αιθιοπίας με υψόμετρο 730m.

Ετήσιος κεντρικός κορμός, ύψους άνω των 30cm, διακλαδιζόμενος από τη βάση, με τα λεπτά και ελαφρώς γκριζου χρώματος κλαδιά να ορθώνονται προς τα πάνω. Ο μίσχος είναι άνω των 2.5cm., με ραχιαίο τμήμα άξονα ανθοφορίας 5-8cm, και φύλλα κατ'εναλλαγή σε ζεύγη των 4 ή των 5, μήκους 2.5-4cm και πλάτους 0.5cm. Τα φύλλα έχουν λεία άνω επιφάνεια και ελαφρά γκριζου χρώματος κάτω επιφάνεια και καταλήγουν σε στρογγυλά άκρα. Υπάρχουν άμισχοι βότρες απέναντι από τα φύλλα, συχνά με 6-12 άνθη. Τα φύλλα που έχουν μήκος 1cm και βρίσκονται στο μάτι του φυτού, είναι ίσια καταλήγοντας σε λεπτό άκρο. Η ερυθρού χρώματος στεφάνη του άνθους συναντάται σε βάθος 1.5cm στον κάλυκα και έχει πλάτος 1cm. Το μήκους 4-5cm περικάρπιο είναι γραμμικό με ελαφρά κλίση προς τα επάνω και φέρει 12-14 σπέρματα.

Το φυτό και η παράδοση

Παρασκευή Συνταγής

Αναμειγνύουμε 6.5gr Μάβο (Indigofera hirsuta) και 3.4gr Υάκθορο (Tephrosia humilis) σε 200ml νερού.

Αναδεύουμε, θερμαίνουμε το μείγμα και βράζουμε για 15-20 λεπτά.

Αφήνουμε το μείγμα να κρυώσει μέχρι να πάρει τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος και στη συνέχεια διηθούμε.

Το διήθημα είναι έτοιμο για βιολογική και θεραπευτική χρήση.

Το αφρέφημα θα έχει κιτρινωπό προς καφέ χρώμα, θα είναι άγευστο (γεύση νερού) και άοσμο.

Το φυτό παίρνει την ονομασία του από την ελληνική λέξη τέφρες (tephros), που σημαίνει «χρώμα στάχτης»-προσδιορίζοντας με αυτόν τον τρόπο το γκριζο χρώμα που συνήθως έχουν τα φύλλα του και από τη λέξη humilis που ετυμολογικά προέρχεται από τη λατινική λέξη "humus", που σημαίνει έδαφος, χώμα-χαρακτηρίζοντας το σχετικά χαμηλό ύψος του θάμνου, που έτσι όπως αναπτύσσεται φαίνεται να ακουμπάει συνεχώς στο έδαφος. Σε περιοχές της Ασίας γύρω από το Νεπάλ, είναι γνωστό ως «χου-κατά-ιξ» (hu-kata-yx), ενώ στη γλώσσα σουαχίλι ως «κιμπάατζι» (kibaazi).

Βρίσκει ευρεία εφαρμογή στη λαϊκή θεραπευτική. Σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές, το φυτό καταναλώνεται ως χωνευτικό, έχει ανθελμινθικές και αντιπυρετικές ιδιότητες, δράση κατά της λέπρας, του έλκους, του άσθματος, του καρκίνου, σε νόσους του ήπατος, της σπλήνας, της καρδιάς και του αίματος. Απαντάται σε αναφορές που σχετίζονται με την Ayurveda και ως "Sarwa wranvisharaka", δηλαδή ότι έχει την ιδιότητα να θεραπεύει πάσα νόσο. Ντόπιοι πληθυσμοί της Αφρικής χορηγούν αφέψημα από τις ρίζες του φυτού σε περιπτώσεις δυσπεψίας, διάρροιας, ρευματισμών, άσθματος και σε προβλήματα της ουροδόχου κύστης, ενώ με τη ρίζα πολλοί λευκαίνουν και τα δόντια τους, ισχυριζόμενοι ότι με αυτόν τον τρόπο ανακουφίζονται από τον πονόδοντο και μειώνονται οι αιμορραγίες των ούλων. Μερικές γυναίκες το καταναλώνουν για να προκαλέσουν αποβολή του εμβρύου που κυοφορούν, ενώ βρίσκει εφαρμογή και ως καθαρτικό για τη δυσκοιλιότητα και ως παράγοντας που συμβάλλει στην πρόκληση εμέτου.

Σε περιοχές της Λατινικής Αμερικής, η ρίζα και μόνο του φυτού θεωρείται αποτελεσματική θεραπεία κατά της σύφιλης, με τους μάγους γιατρούς σε κάποιες φυλές να το χορηγούν και ως ένα ήπιο διεγερτικό τονωτικό με χρήση και κατά ορισμένων περιπτώσεων τυφοειδούς πυρετού. Πολλοί επίσης στις περιοχές αυτές εμβαπτίζουν τα βέλη και τα καμάκια τους σε πολτό από τα φύλλα του φυτού ως δηλητήριο, ενώ η σκόνη από τριμμένα, ξερά φύλλα βρίσκει εφαρμογή και κατά της φθειρίασης και της ψώρας (Despande S.S. et al., 2003; Bashir A.K. et al., 1992; Kole R.K. et al., 1992; Sarin J.P.S. et al., 1976; Ramamurthy S.M. et al., 1993; online sources).

Φαρμακολογικές ιδιότητες που έχουν βρεθεί σε διάφορα είδη του γένους *Tephrosia*

Οι αντικαρκινικές ιδιότητες που αποδίδονται στο φυτό φαίνεται να οφείλονται σε ενώσεις που έχουν απομονωθεί από αυτό, όπως για παράδειγμα σε έναν γλυκοζίτη φλαβονόλης από το *T.candida* που εμφανίζει εξαιρετική δράση κατά του καρκίνου του φάρυγγα στον άνθρωπο (Sarin J.P.S. et al., 1976), σε ενώσεις του τύπου των 2-φαιnyλο-4H-βενζοπυραν-4-ονών που αποτελούν γνωστούς παράγοντες που μειώνουν την ανάπτυξη του καρκίνου (Huang M.T. et al., 1983; Nixon J.E. et al., 1984), στην τεφρορίνη Α του *T.purpurea* που έχει την τάση να επάγει την αναγωγή της κινόνης καθώς και σε ισοφλαβόνες του ίδιου είδους (Chang L.C. et al., 2000; Chang L.C. et al., 1997). Άλλες τέτοιες ουσίες είναι η καντιρόνη (Parmar V.S. et al., 1987) και η καλοφιόνη Α από το χλωροφορμικό εκχύλισμα του *T.calophylla* που φάνηκε να έχει δύο φορές μεγαλύτερη δραστηριότητα συγκριτικά με την ουσία-αναφορά που χρησιμοποιήθηκε για να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη ή μη, αντικαρκινικής δράσης (Ganapaty S. et al., 2009), καθώς και η πληθώρα αντιοξειδωτικών (Saleem M. et al., 2001). Ακόμη έχουν απομονωθεί και ουσίες από εκχυλίσματα πετρελαϊκού αιθέρα και οξικού αιθυλεστέρα του γένους *Tephrosia*, που βρέθηκε ότι επάγουν την δραστηριοποίηση της αναγωγής της κινόνης σε καλλιέργειες κυττάρων ηπατώματος επίμυος Hepa-1c1c7, καθιστώντας ορισμένες εξ αυτών πιθανώς σημαντικούς χημειοθεραπευτικούς παράγοντες στη μάχη κατά του καρκίνου (Chang L.C. et al., 1997; Prochaska H.J. et al., 1988). Η επαγωγή ενζύμων της Φάσης II, όπως η αναγωγή της κινόνης αποτελεί σημαντικό

μηχανισμό στην προστασία κατά της καρκινογένεσης (Gerhauser C. et al., 1997). Ενώσεις όπως η χρυσοεριόλη που απομονώθηκε από το *T.toxicaria* (Jang D.S. et al., 2003) αποδείχτηκε ότι εμποδίζει το μεταβολισμό του καρκινογόνου παράγοντα βενζο-α-πυρενίου σε καλλιέργειες εμβρυικών κυττάρων επίμυος (Liu Y.L. et al., 1992), ενώ από το ίδιο είδος ένα ροτενοειδές και μια φλαβανόνη αποτελούν εξίσου πιθανούς αντικαρκινικούς παράγοντες επάγοντας τη δράση της αναγωγάσης της κινόνης (Jang D.S. et al., 2003). Η απομόνωση του βετουλινικού οξέος από το *T.calophylla* ενισχύει το αντικαρκινικό δυναμικό του φυτού, διότι αυτό το πεντακυκλικό τριτερπένιο διαθέτει την ιδιότητα να εμποδίζει τη δράση της τοποϊσομεράσης και με αυτό τον τρόπο να θεωρείται ένας σημαντικός αντικαρκινικός παράγοντας, πλέον των αντιρετροϊκών, ανθελονοσιακών και αντιφλεγμονωδών ιδιοτήτων του. Μάλιστα, στο βετουλινικό οξύ έχουν αποδοθεί ιδιότητες που σχετίζονται με τη δράση του κατά του ιού HIV (Chichewicz R.H. et al., 2004; Chowdhury A.R. et al., 2002; Ganguly A. et al., 2007; Rajendran P. et al., 2008).

Ανθελμινθικές, αντιμυκητιακές και εντομοκτόνες ιδιότητες συσχετίστηκαν με ενώσεις που ανήκουν στην κατηγορία των πτεροκαρπανίων, όπως η τεφροκαρπίνη (Ingham J.L. et al., 1982), η χιλντεκαρπίνη (Lwande W. et al., 1987) και σε ροτενοειδή του γένους (Andrei C.C. et al., 1997), ενώ φλαβόνες και φλαβανόνες που απομονώθηκαν από το φυτό και φέρουν μια πλευρική αλυσίδα πρενυλίου στον C-8 του A δακτυλίου του φλαβονοειδούς έχουν δράση κατά του ιού του δάγκειου πυρετού, στο επίπεδο της παρεμπόδισης της αντιγραφής του γενετικού του υλικού, όταν εισέλθει σε ένα κύτταρο. Κρίνεται εξαιρετικής σημασίας το γεγονός ότι παρόμοια φλαβονοειδή δίχως την πλευρική αλυσίδα πρενυλίου στον C-8 δεν εμφανίζουν την προαναφερθείσα δράση (Sanchez I. et al., 2000).

Μάλιστα κλάσμα του βουτανολικού εκχυλίσματος του είδους *T.purpurea* αποδείχτηκε ότι έχει δράση κατά της λεισμανίασης σε *in vitro* πειράματα. Εμφανίστηκε δράση στο επίπεδο των μακροφάγων-αμαστιγωτών, αλλά όχι στο προμαστιγωτό στάδιο του παρασίτου της λεισμανίασης. Η χρήση του φυτού κατά του παρασίτου αποδίδεται στη συνεργιστική δράση των διαφόρων χημικών ενώσεων στο συνολικό βουτανολικό εκχύλισμα, δίχως μέχρι στιγμής να έχουν ταυτοποιηθεί ποια ακριβώς είναι τα συστατικά εκείνα που προσδίδουν στο φυτό την ειδική αυτή δράση (Sharma P. et al., 2003). Το φυτό φαίνεται να έχει και αντιπλασμοδική δράση όπως

αποδείχτηκε με πειράματα στο συνολικό ακατέργαστο υλικό του *T.elata* (Muiva L.M. et al., 2009).

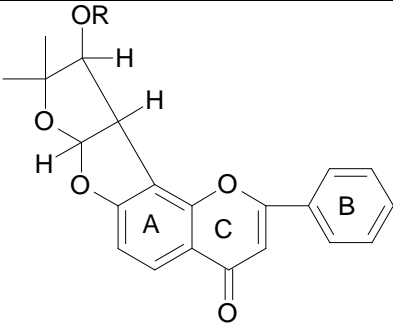
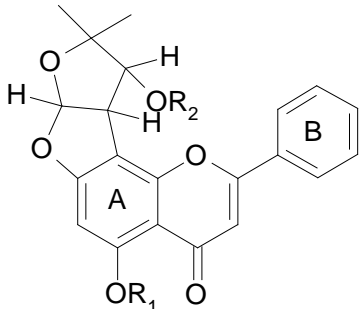
Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στο αιθανολικό εκχύλισμα του ίδιου είδους έχουν επιβεβαιώσει τη σημαντική υπογλυκαιμική και την κατά της λιπιδικής υπεροξειδωσης-δράση του φυτού, προσδίδοντας με αυτόν τον τρόπο και αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Η υπογλυκαιμική δράση πιθανόν να οφείλεται στο ότι προκαλεί την έκκριση ινσουλίνης, δίχως ωστόσο να έχουν αποδειχθεί ποιες ακριβώς χημικές ενώσεις του φυτού είναι οι υπεύθυνες για αυτή (Pavana P. et al., 2007). Από φυτοχημικές αναλύσεις προκύπτει ότι εκχυλίσματα από μέρη διαφόρων ειδών του γένους *Tephrosia*, εμφανίζουν σημαντική αντιοξειδωτική δράση, όπως αξιολογήθηκαν με μεθόδους μέτρησης της αντιοξειδωτικής δράσης ABTS, DPPH, FRAP, ORAC (Nile S.H. et al., 2011, Patwekar F.I. et al., 2010, Pavana P. et al., 2009, Bhaskar Rao D. et al., 2007). Μάλιστα, σε μερικές μελέτες εμφανίστηκε ότι το αιθανολικό εκχύλισμα έχει μεγαλύτερο αντιοξειδωτικό δυναμικό σε σχέση με το υδατικό αφέψημα που χορηγείται στη λαϊκή θεραπευτική (Patel A. et al., 2010). Η αντιοξειδωτική ικανότητα ποικίλλει ανά είδος φυτού και ανά περιοχή, μετά από μελέτες που αποδίδουν σε ορισμένα είδη *Tephrosia* (*T.cinerea*, *T.purpurea* linn) πολύ χαμηλή δράση ως σαρωτές ελευθέρων ριζών (Argoti J.C. et al., 2011; Soni K. et al., 2003). Θα πρέπει να αναφερθεί και η σημαντική ηπατοπροστατευτική δράση που εμφάνισε το μεθανολικό εκχύλισμα των ριζών του *T.calophylla* (Adinarayana K. et al., 2011), καθώς και τα υπέργεια τμήματα του *T.purpurea* συγκριτικά με την σιλυμαρίνη, ουσία αναφοράς, δίχως όμως να γίνει εφικτή η αντιστοίχιση της δράσης αυτής με συγκεκριμένες χημικές δομές που περιέχονται σε εκχυλίσματα των φυτών (Khatrī A. et al., 2009). Ακόμη, οι αποδιδόμενες από τη λαϊκή θεραπευτική αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες του γένους, επιβεβαιώθηκαν από πειράματα που έγιναν στο αιθανολικό εκχύλισμα των ριζών του *T.falciformis* (Kumar K. et al., 2007) και του *T.purpurea* (Shenoy S. et al., 2010). Μία ακόμη περίπτωση που δικαιολογεί τη χρήση φυτών του γένους στη λαϊκή θεραπευτική, αυτή τη φορά κατά του έλκους δωδεκαδακτύλου, είναι τα αποτελέσματα έρευνας που επιβεβαιώνουν τη χρησιμότητα του *T.purpurea* κατά του ελικοβακτηρίου του πυλωρού, ακόμα και σε όξινο pH, δηλαδή σε συνθήκες που προσομοιάζουν με το περιβάλλον του στομάχου (Chinniah A. et al., 2009).

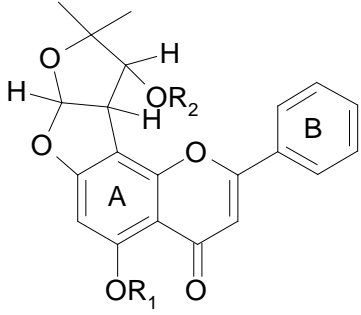
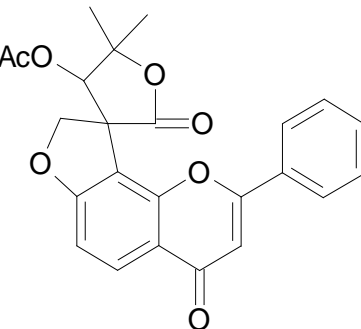
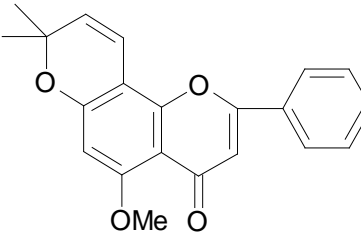
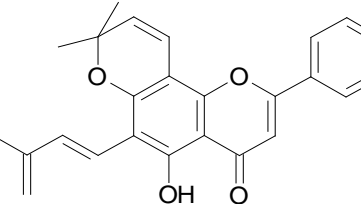
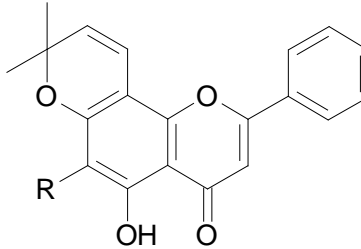
Βιβλιογραφικές αναφορές για τη σύσταση διαφόρων ειδών του γένους *Tephrosia*

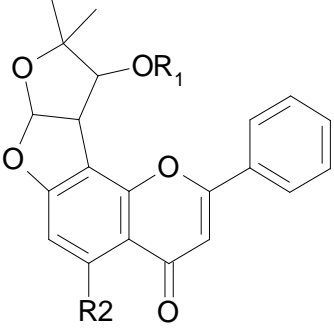
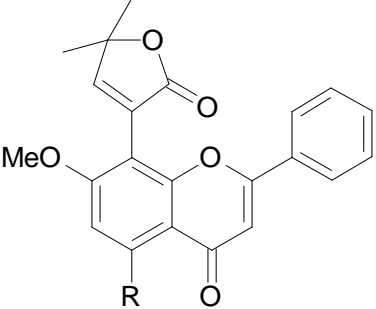
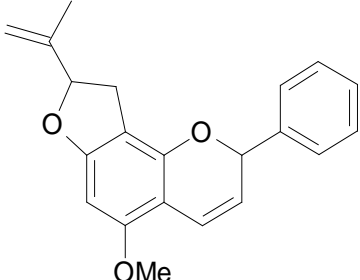
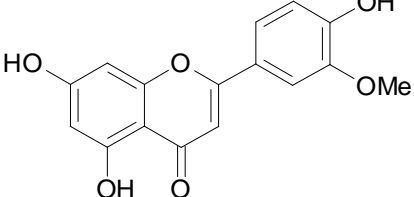
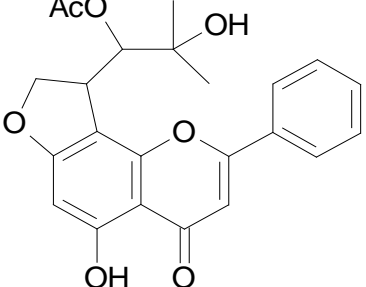
Για το είδος *Tephrosia humilis* δεν υπάρχουν αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία, όσον αφορά τη σύσταση ή τις φαρμακολογικές του ιδιότητες. Ωστόσο υπάρχουν σχετικές αναφορές για τα άλλα είδη του γένους, ορισμένες από τις οποίες παρουσιάζουν εξαιρετικό ενδιαφέρον. Η μεγάλη πλειοψηφία των ενώσεων που εμφανίζονται, ανήκουν στην κατηγορία των φλαβονοειδών (φλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβανόνες, χαλκόνες, ισοφλαβόνες, πτεροκαρπάνια, ροτενοειδή, κουμεστάνια), ενώ έχουν απομονωθεί και μερικά τερπένια (τριτερπένια, σεσκιτερπένια) και ένα λιγνάνιο.

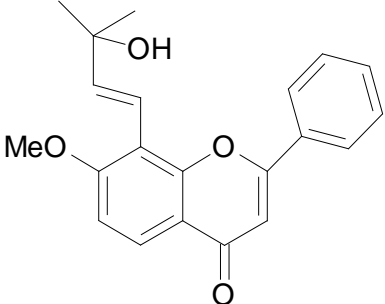
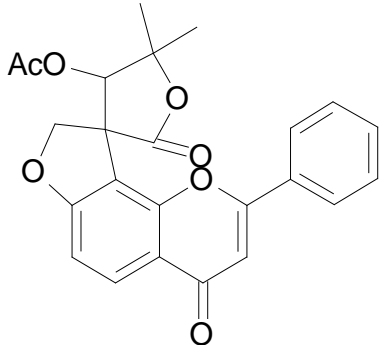
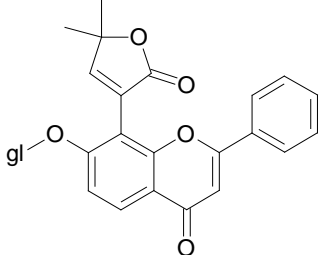
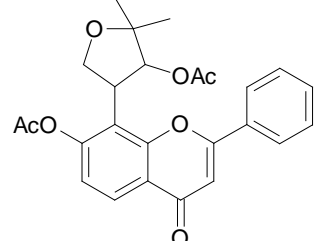
Ακολουθως δίδονται οι δομές που απομονώθηκαν από διάφορα είδη *Tephrosia*:

Φλαβόνες

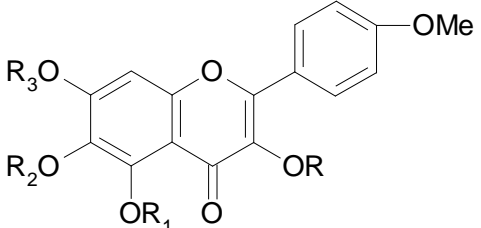
 <p>R: =H ή COCH₃</p>	<p>Σεμιγκλαμπρινόλη ή Σεμιγκλαμπρίνη</p>	<p><i>T.semiglabra</i></p>	<p>(Smalberger T.M. et al., 1973)</p>
 <p>R₁: =Me & R₂=H ή Ac</p>	<p>Μουλτιγιουγκινόλη ή Μουλτιγιουγκίνη</p>	<p><i>T.multijuga</i></p>	<p>(Vleggaar R et al,1975)</p>

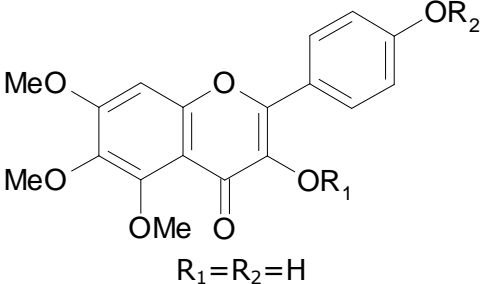
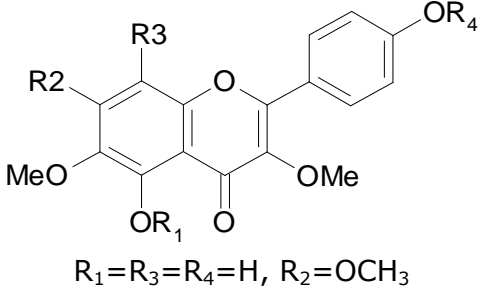
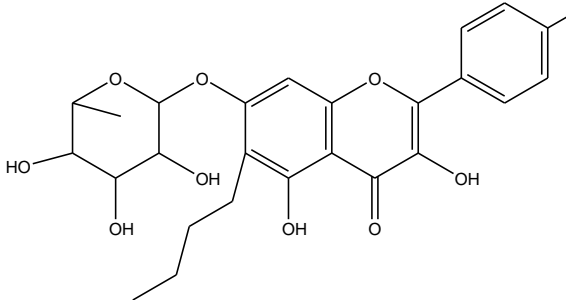
 <p> $R_1 = \text{Me}$ & $R_2 = \text{Ac}$ </p>	Απολλινεανίνη	<i>T. multijuga</i>	(Hisham A. et al., 2006)
	Γκλαμπρατεφρίνη	<i>T. semiglabra</i>	(Vleggaar R. et al., 1978)
	Καντινίνη	<i>T. candida</i>	(Chibber S.S. et al., 1981)
	Φουλβινερβίνη Β	<i>T. fulvinervis</i>	(Venkata Rao et al, 1985)
 <p> $R = -\text{CH}(\text{Me})-\text{CH}(\text{Me})-\text{C}(\text{Me})_2\text{OH}$ </p>	Φουλβινερβίνη C	<i>T. fulvinervis</i>	(Venkataratnam G. et al., 1986)

 <p>Enantiomultigugonin structure: A chromone core with a 2-phenyl group, a 4-OR₁ group, and a 6-R₂ group. The chromone ring has a carbonyl group at position 4 and a double bond between positions 2 and 3. The 2-position is substituted with a phenyl ring. The 4-position is substituted with an OR₁ group. The 6-position is substituted with an R₂ group. The chromone ring is fused to a furan ring at positions 5 and 6. The furan ring has a methyl group at position 2 and an OR₁ group at position 3.</p> <p>R₁=Ac, R₂=OMe</p>	Εναντιομουλτιγιογκίνη	<i>T.viciodes</i>	(Gomez Garibay F., et al., 1992)
 <p>Choukerianin structure: A chromone core with a 2-phenyl group, a 4-methoxy group, and a 6-R group. The chromone ring has a carbonyl group at position 4 and a double bond between positions 2 and 3. The 2-position is substituted with a phenyl ring. The 4-position is substituted with a methoxy group. The 6-position is substituted with an R group. The chromone ring is fused to a furan ring at positions 5 and 6. The furan ring has a methyl group at position 2 and a carbonyl group at position 3.</p> <p>R=OMe</p>	Χουκεριανίνη	<i>T.hookeriana</i>	(Prabhakar P. et al., 1996)
 <p>Amphotin structure: A chromone core with a 2-phenyl group, a 4-methoxy group, and a 6-isopropenyl group. The chromone ring has a carbonyl group at position 4 and a double bond between positions 2 and 3. The 2-position is substituted with a phenyl ring. The 4-position is substituted with a methoxy group. The 6-position is substituted with an isopropenyl group. The chromone ring is fused to a furan ring at positions 5 and 6. The furan ring has a methyl group at position 2 and a carbonyl group at position 3.</p> <p>OMe</p>	Αμποτίνη	<i>T.crassifolia</i>	(Gomez Garibay F. et al., 1999)
 <p>Chrysoeriol structure: A chromone core with a 2-phenyl group, a 4-methoxy group, and a 6-hydroxy group. The chromone ring has a carbonyl group at position 4 and a double bond between positions 2 and 3. The 2-position is substituted with a phenyl ring. The 4-position is substituted with a methoxy group. The 6-position is substituted with a hydroxy group. The chromone ring is fused to a furan ring at positions 5 and 6. The furan ring has a methyl group at position 2 and a carbonyl group at position 3.</p> <p>OH, OMe</p>	Χρυσσεριόλη	<i>T.toxicaria</i>	(Jang D.S. et al., 2003)
 <p>5-hydroxyteluroapollinin structure: A chromone core with a 2-phenyl group, a 4-methoxy group, and a 6-hydroxy group. The chromone ring has a carbonyl group at position 4 and a double bond between positions 2 and 3. The 2-position is substituted with a phenyl ring. The 4-position is substituted with a methoxy group. The 6-position is substituted with a hydroxy group. The chromone ring is fused to a furan ring at positions 5 and 6. The furan ring has a methyl group at position 2 and a carbonyl group at position 3. The furan ring is substituted with an acetoxy group and a hydroxy group at position 3.</p> <p>AcO, OH</p> <p>5-υδροξυτεφροσπολλίνη F</p>	5-υδροξυτεφροσπολλίνη F	<i>T.apollinea</i>	(Khalafallah A.K. et al., 2009)

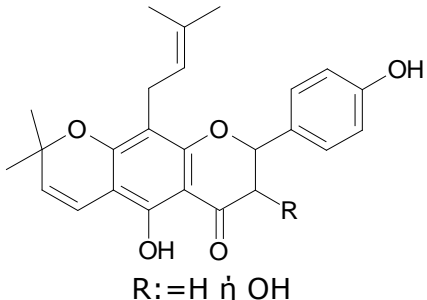
	Λανκεολατινή-A	<i>T.apollinea</i>	(Khalafallah A.K. et al., 2009)
	Ισοκλαμπρατεφρίνη	<i>T.purpurea</i>	(Hegazy M.-E.F. et al., 2009)
	Διμεθυλαπολλινίνη 7-O-β-D- γλυκοπυρανοζίτης	<i>T.cinerea</i>	(Maldini M. et al., 2011)
	Τερπουρινφλαβόνη	<i>T.purpurea</i>	(Juma W.P. et al., 2011)

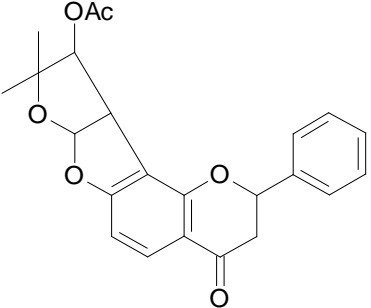
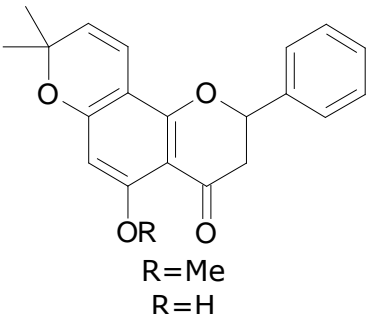
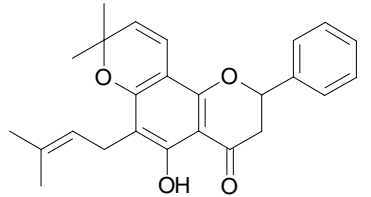
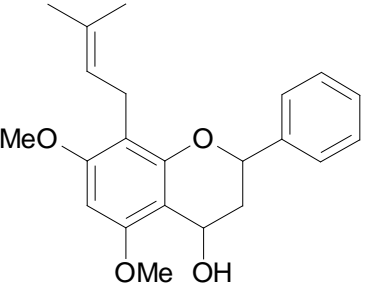
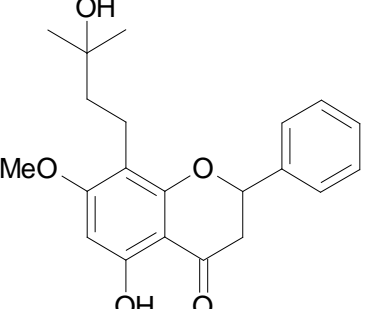
Φλαβονόλες

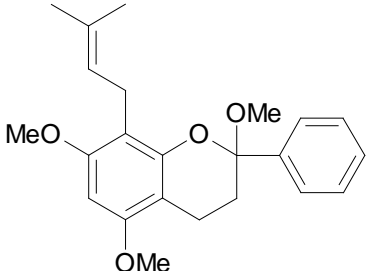
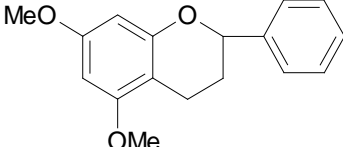
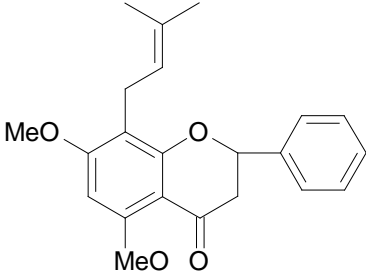
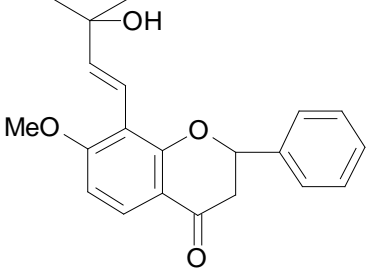
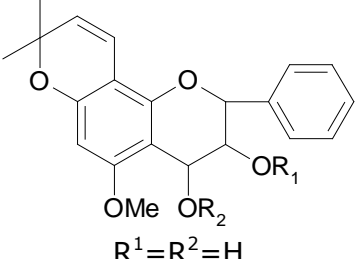
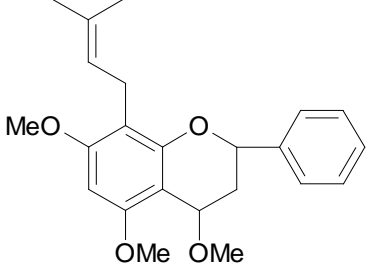
	6-υδροξυκαιμπερόλη 4'-μεθυλαιθερας- διραμνοζίτης	<i>T.candida</i>	(Sarin et al., 1976)
---	--	------------------	----------------------

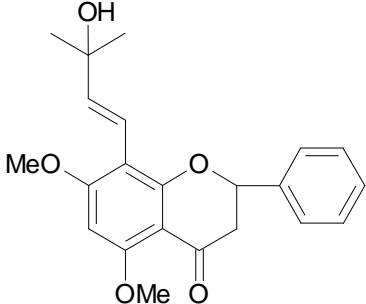
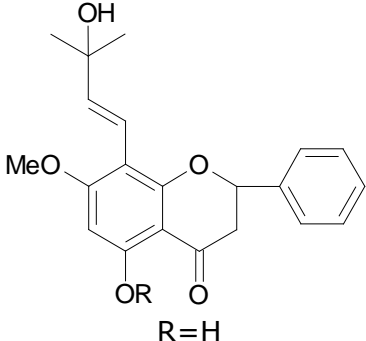
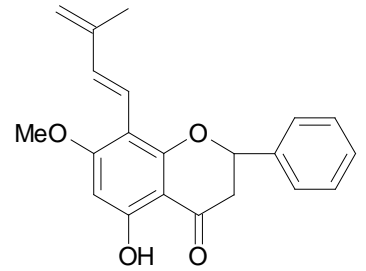
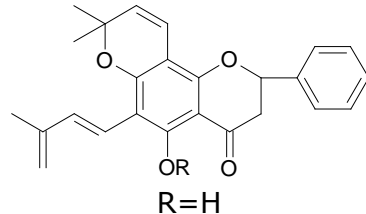
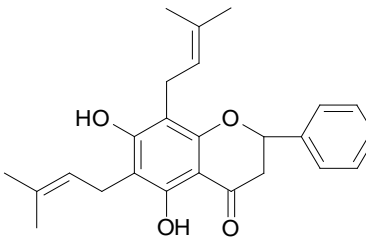
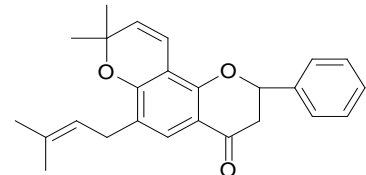
<p style="text-align: center;">$R=R_3=R_{ha} \ \& \ R_1=R_2=H$</p>  <p style="text-align: center;">$R_1=R_2=H$</p>	<p>3,4'-διυδροξυ-5,6,7-τριμεθοξυφλαβόνη</p>	<p><i>T.candida</i></p>	<p>(Dutt S.K. et al., 1983)</p>
 <p style="text-align: center;">$R_1=R_3=R_4=H, \ R_2=OCH_3$</p>	<p>Πεντουλετινή</p>	<p><i>T.candida</i></p>	<p>(Parmar V.S. et al., 1987)</p>
	<p>Παράγωγο καιμπερόλη-7-O-(ραμνοζυλ)-γλυκοζίτη</p>	<p><i>T.purpurea</i></p>	<p>(Sumalatha B.V. et al., 2012)</p>

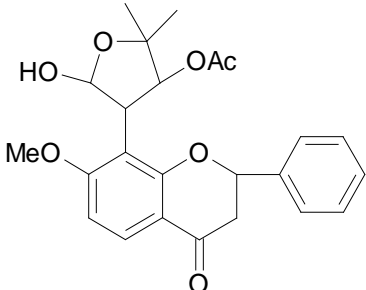
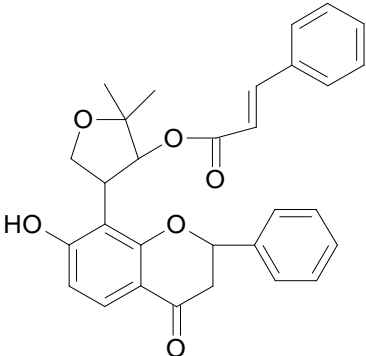
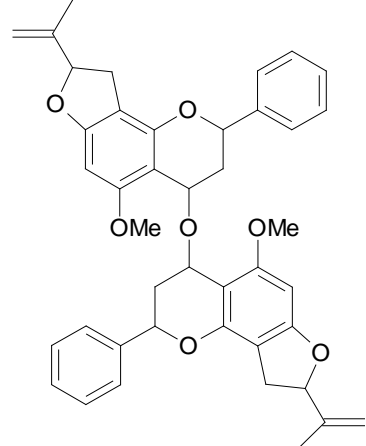
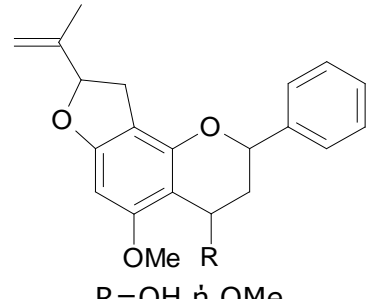
Φλαβανόνες

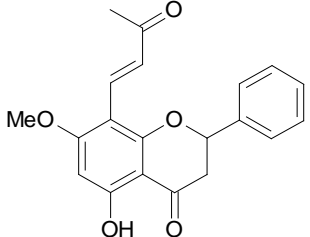
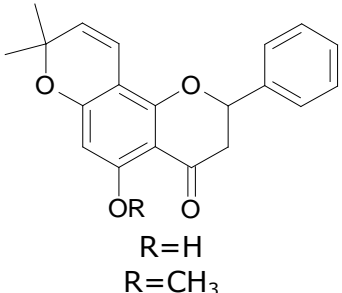
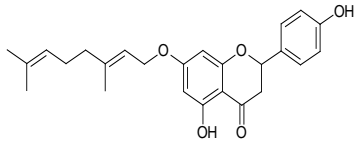
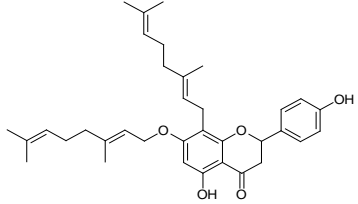
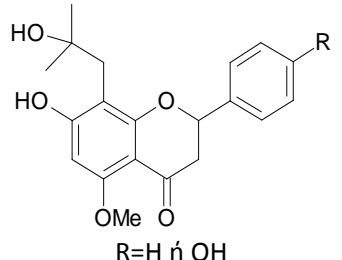
 <p style="text-align: center;">$R: =H \ \acute{\eta} \ OH$</p>	<p>Λουπινοφολίνη 'H Λουπινοφολινόλη</p>	<p><i>T.lupinifolia</i></p>	<p>(Smalberger T.M. et al., 1974)</p>
---	---	-----------------------------	---------------------------------------

	<p>Πουρπουρίνη</p>	<p><i>T.purpurea</i></p>	<p>(Gupta R.K. et al., 1980)</p>
 <p>R=Me R=H</p>	<p>Μιξτεκακίνη - Μεθυλαιθέρας της Ομποβατίνης</p>	<p><i>T.woodii</i></p>	<p>(Dominguez, X.A et al., 1983) (Andrei C.C. et al., 2000)</p>
	<p>Φουλβινερβίνη Α</p>	<p><i>T.fulvinervis</i></p>	<p>(Venkata Rao et al., 1985)</p>
	<p>Τεφρογουατσίνη Α</p>	<p><i>T.madrensis</i></p>	<p>(Gomez F. et al., 1985)</p>
	<p>Νινετίνη</p>	<p><i>T.watsoniana</i></p>	<p>(Gomez F. et al., 1985)</p>

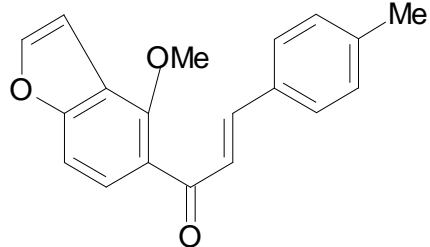
	Τεφρογουασίνη D	<i>T. madrensis</i>	(Gomez F. et al., 1985)
	Τεφρογουασίνη E	<i>T. watsoniana</i>	(Gomez F. et al., 1985)
	Καντιρόνη	<i>T. candida</i>	(Roy M., et al., 1986)
	Φαλσιφορμίνη	<i>T. falciformis</i>	(Khan H.A. et al., 1986)
 <p>$R^1 = R^2 = H$</p>	Κβερκετόλη A	<i>T. quercetorum</i>	(Gomez Garibay F. et al., 1988)
	Κβερκετόλη B	<i>T. quercetorum</i>	(Gomez Garibay F. et al., 1988)

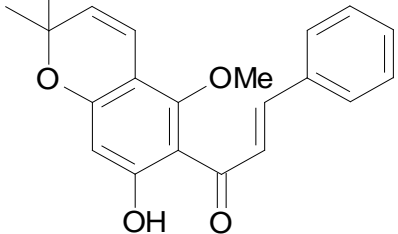
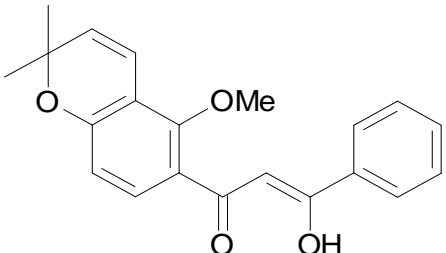
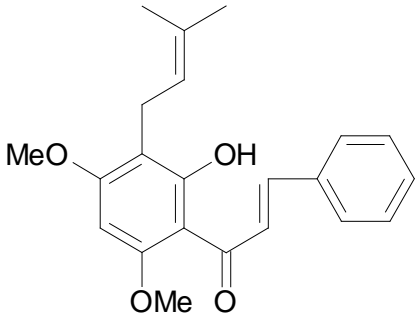
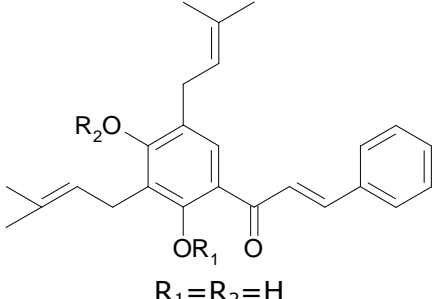
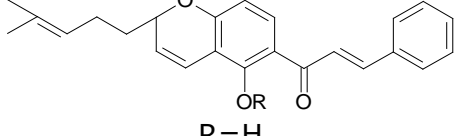
	Κβερκετόλη C	<i>T. quercetorum</i>	(Gomez Garibay F. et al., 1988)
	Τεφρολεοκαρπίνη Α	<i>T. leiocarpa</i>	(Gomez Garibay F., et al., 1991)
	Τεφρολεοκαρπίνη Β	<i>T. leiocarpa</i>	(Gomez Garibay F., et al., 1991)
	Σπινοφλαβανόνη Α	<i>T. spinosa</i>	(Venkata Rao E. et al., 1993)
	Σπινοφλαβανόνη Β	<i>T. spinosa</i>	(Venkata Rao E. et al., 1993)
	Μαξιμαφλαβανόνη Α	<i>T. maxima</i>	(Venkata Rao E. et al., 1994)

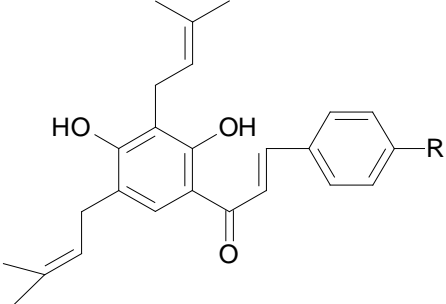
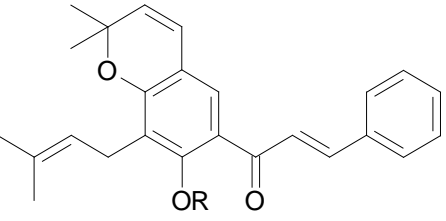
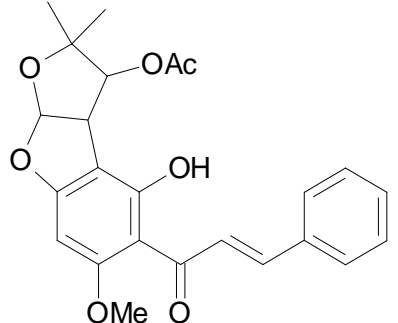
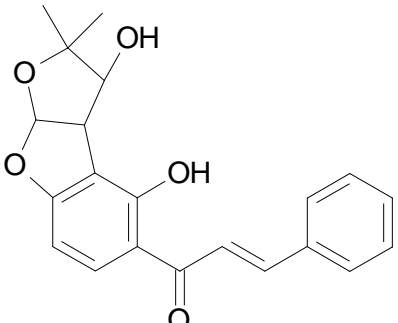
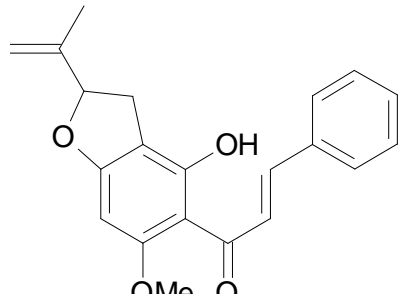
	<p>(+)-Τεφρορίνη Α</p>	<p><i>T.purpurea</i></p>	<p>(Chang L.C. et al., 2000)</p>
	<p>(+)-Τεφρορίνη Β</p>	<p><i>T.purpurea</i></p>	<p>(Chang L.C. et al., 2000)</p>
	<p>Κρασιφολίνη Α</p>	<p><i>T.crassifolia</i></p>	<p>(Gomez Garibay F. et al., 1999)</p>
 <p>R=OH ή OMe</p>	<p>Χιλντγκαρντόλη Α 'Η Μεθυλοχιλντγκαρντόλη Α</p>	<p><i>T.crassifolia</i></p>	<p>(Gomez Garibay F. et al., 1999)</p>

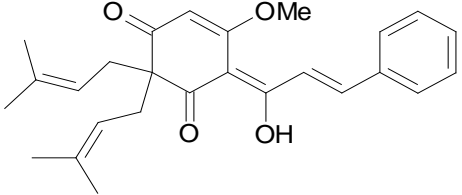
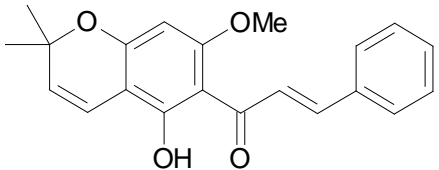
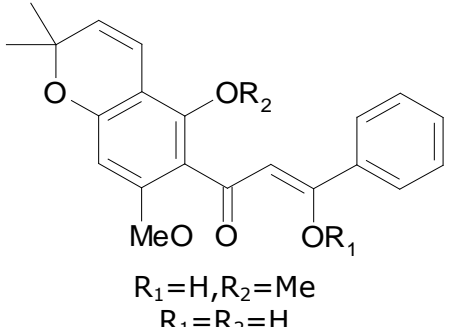
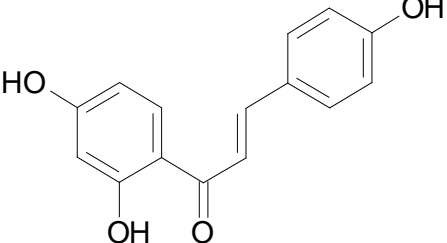
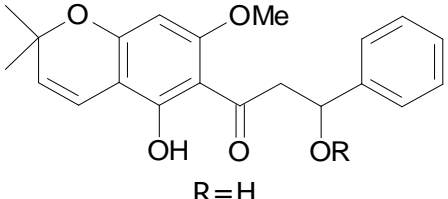
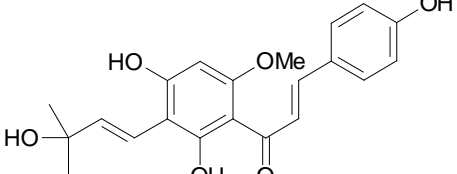
	<p>(2S)-5-υδροξυ-7-μεθοξυ-8-[(E)-3-οξο-1-βουτενυλ]φλαβανόνη</p>	<p><i>T.toxicaria</i></p>	<p>(Jang D.S. et al., 2003)</p>
 <p>R=H R=CH₃</p>	<p>Ομποβατίνη και Μεθυλαιθέρας της Ομποβατίνης, αντίστοιχα</p>	<p><i>T.elata</i></p>	<p>(Muiva L.M. et al., 2009)</p>
	<p>(2S)-5,4'-διυδροξυ-7-Ο-[(E)-3,7-διμεθυλο-2,6-οκταδιενυλο]φλαβανόνη</p>	<p><i>T.villosa</i></p>	<p>(Madhusudhana J. et al., 2010)</p>
	<p>(2S)-5,4'-διυδροξυ-7-Ο-[(E)-3,7-διμεθυλο-2,6-οκτα-διενυλ]-8-С-[(E)-3,7-διμεθυλο-2,6-οκταδιενυλ]φλαβανόνη</p>	<p><i>T.villosa</i></p>	<p>(Madhusudhana J. et al., 2010)</p>
 <p>R=H ή OH</p>	<p>Τεφροκαντινίνη Α ή Τεφροκαντινίνη Β</p>	<p><i>T.candida</i></p>	<p>(Hegazy M.-E.F. et al., 2011)</p>

Χαλκόνες

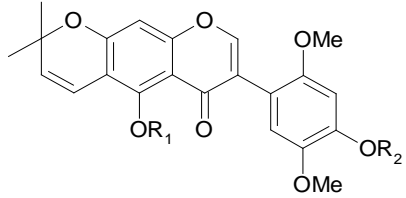
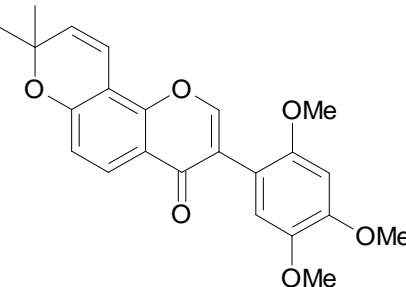
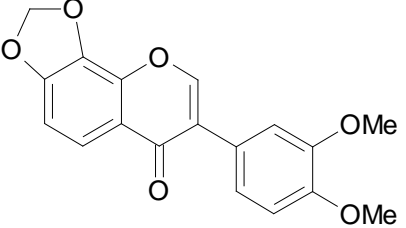
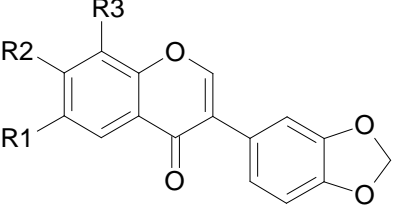
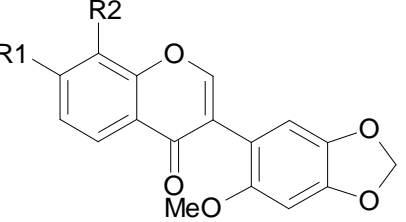
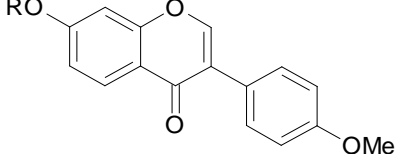
	<p>Πουρπουριτενίνη</p>	<p><i>T.purpurea</i></p>	<p>(Sinha B. et al., 1982)</p>
---	------------------------	--------------------------	--------------------------------

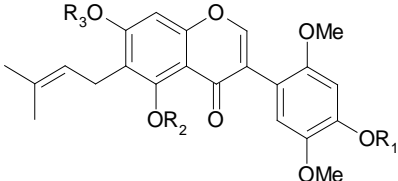
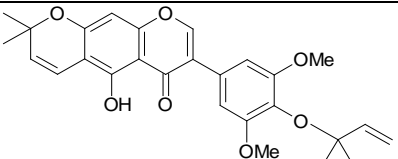
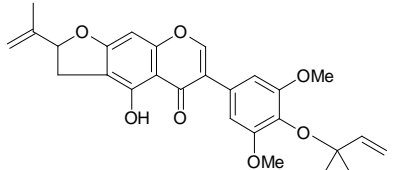
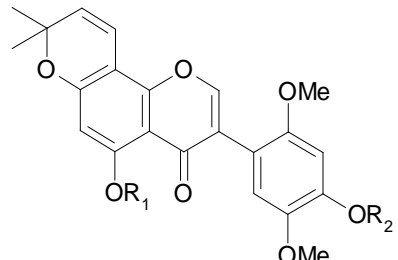
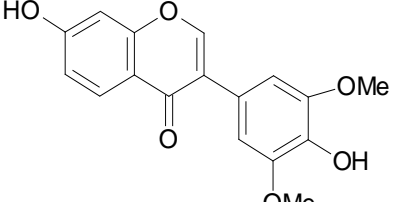
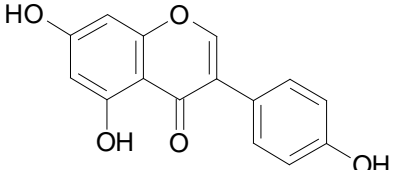
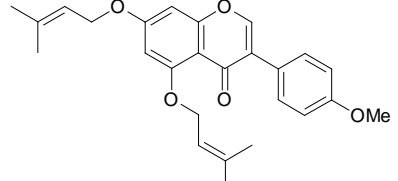
	Οαξακακίνη	<i>T. woodii</i>	(Dominguez X.A. et al., 1983)
	Πουρπουρενόνη	<i>T. purpurea</i>	(Venkata Rao et al., 1984, (10))
	Οβαλιχαλκόνη	<i>T. candida</i>	(Roy M. et al., 1986)
 <p>$R_1=R_2=H$</p>	Σπινοχαλκόνη Α	<i>T. spinosa</i>	(Venkata Rao E. et al., 1992)
 <p>$R=H$</p>	Σπινοχαλκόνη Β	<i>T. spinosa</i>	(Venkata Rao E. et al., 1992)

 <p style="text-align: center;">R=H</p>	<p>(E)-1-(2,4-διυδροξυ-3,5-δισ(3-μεθυλβουτ-2-ενυλ)φαινυλ)-3-φαινυλπροπ-2-εν-1-όνη</p>	<p><i>T.spinosa</i></p>	<p>(Sharma V.N. et al., 1992)</p>
 <p style="text-align: center;">R=H</p>	<p>Σπινοχαλκόνη C</p>	<p><i>T.spinosa</i></p>	<p>(Venkata Rao E. et al., 1993)</p>
	<p>(+)-Τεφροπουρπουρίνη</p>	<p><i>T.purpurea</i></p>	<p>(Chang L.C. et al., 1997)</p>
	<p>(+)-Τεφροσόνη</p>	<p><i>T.purpurea</i></p>	<p>(Chang L.C. et al., 2000)</p>
	<p>Κρασσιχαλκόνη</p>	<p><i>T.crassifolia</i></p>	<p>(Gomez Garibay F. et al., 1999)</p>

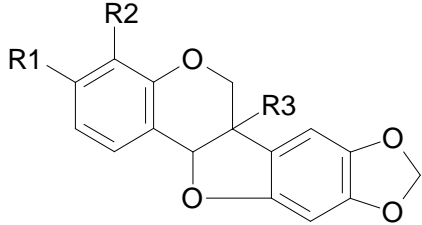
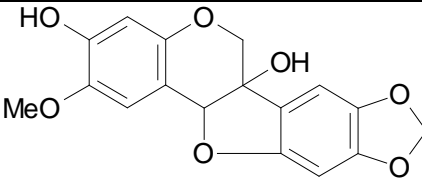
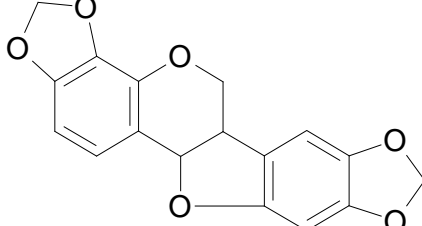
	Τουνικαταχαλκόνη	<i>T.tunicata</i>	(Andrei C.C. et al., 2000)
	Ομποβαταχαλκόνη	<i>T.tunicata</i>	(Andrei C.C. et al., 2000)
 <p style="text-align: center;"> $R_1=H, R_2=Me$ $R_1=R_2=H$ </p>	Πρεκανσόνη Β και Διμεθυλπρεκανσόνη Α, αντίστοιχα	<i>T.aequilata</i>	(Camele G. et al., 1980) (Tarus P.K. et al., 2002)
	Ισολικριτιγενίνη	<i>T.toxicaria</i>	(Jang D.S. et al., 2003)
 <p style="text-align: center;">$R=H$</p>	(S)-ελαταδιυδροχαλκόνη	<i>T.elata</i>	(Muiva L.M. et al., 2009)
	Καντιταχαλκόνη	<i>T.candida</i>	(Hegazy M.-E.F. et al., 2011)

Ισοφλαβόνες

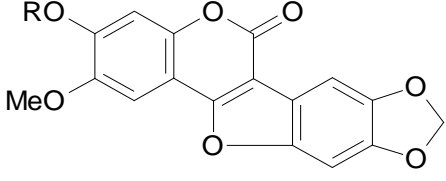
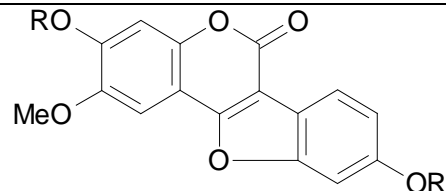
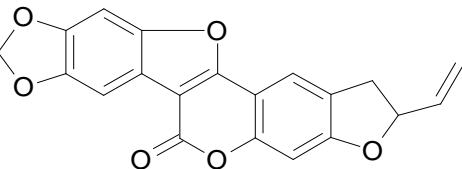
 <p>$R_1=R_2=H$</p>	Ελονγκατίνη	<i>T.elongata</i>	(Smalberger T.M. et al., 1975)
	Μπαρμπιγερόνη	<i>T.barbigera</i>	(Vilain, C., 1980)
	Μαξιμαΐσοφλαβόνη Α	<i>T.maxima</i>	(Venkata Rao et al., 1984, (7))
 <p>$R^1=H, R^2=OH, R^3=OMe$</p>	Μαξιμαΐσοφλαβόνη Ε	<i>T.maxima</i>	(Venkata Rao et al., 1984, (7))
 <p>$R^1=OH, R^2=H \text{ ή } OH$</p>	Μαξιμαΐσοφλαβόνη F και Μαξιμαΐσοφλαβόνη G αντίστοιχα	<i>T.maxima</i>	(Venkata Rao et al., 1984(7))
 <p>$R=-CH_2-CH=C(CH_3)_2$</p>	Μαξιμαΐσοφλαβόνη J	<i>T.maxima</i>	(Sree R.M.M. et al, 1985)

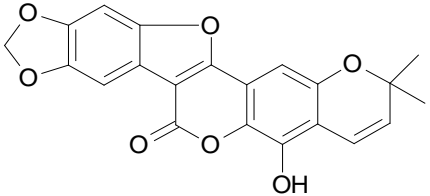
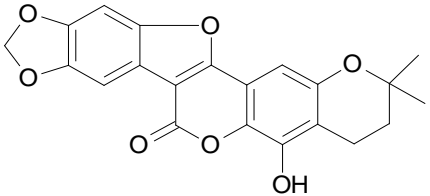
 <p style="text-align: center;">$R^1=R^2=R^3=H$</p>	Βιριντιφλορίνη	<i>T. viridiflora</i>	(Gomez F. et al., 1985)
	Πουμιλαΐσοφλαβόνη Α	<i>T. pumila</i>	(Dagne E. et al., 1988)
	Πουμιλαΐσοφλαβόνη Β	<i>T. pumila</i>	(Dagne E. et al., 1988)
 <p style="text-align: center;">$R_1=R_2=H$</p>	4'-διμεθυλτοξικαρόλη	<i>T. polyphylla</i>	(Dagne E. et al., 1992)
	7,4'-διυδροξυ-3',5'-διμεθοξυϊσοφλαβόνη	<i>T. purpurea</i>	(Chang L.C. et al., 1997)
	Γενιστεΐνη	<i>T. toxicaria</i>	(Jang D.S. et al., 2003)
	5,7-δι-Ο-πρενυλβιοχανίνη Α	<i>T. tinctoria</i>	(Khalivull a S.I. et al., 2008)

Πτεροκαρπάνια

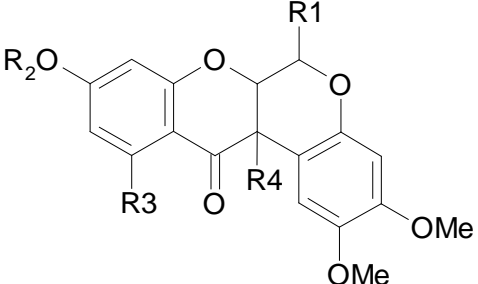
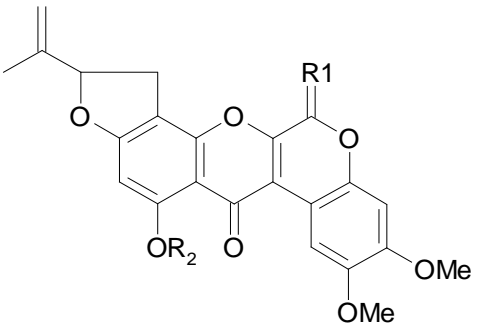
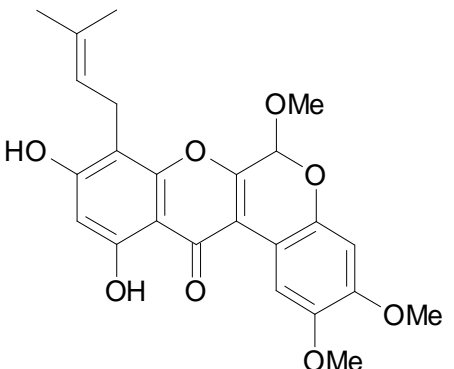
 <p>R1=OMe, R2=H, R3=OH</p>	Τεφροκαρπίνη	<i>T. bidwilli</i>	(Ingham J.L. et al., 1982)
	Χιλντεκαρπίνη	<i>T. hildebrandtii</i>	(Lwande W., et al., 1987)
	3,4:8,9- διμεθυλενοδιοξυπτεροκαρπίνη	<i>T. aequilata</i>	(Tarus P.K. et al., 2002)

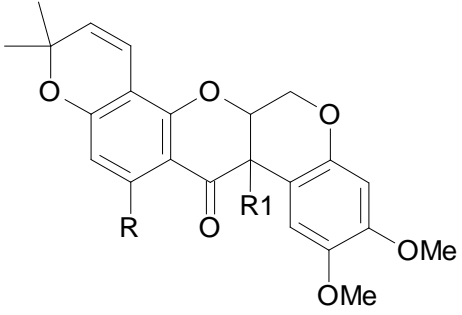
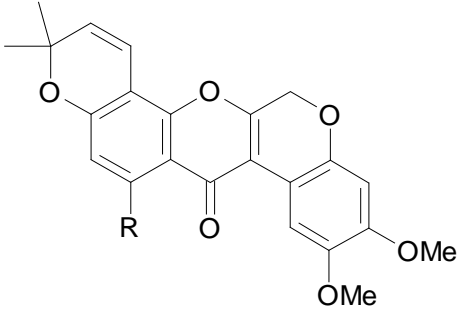
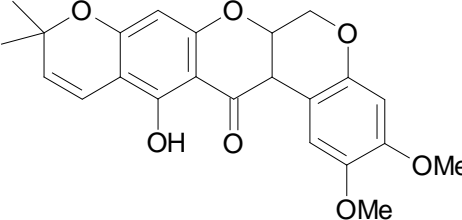
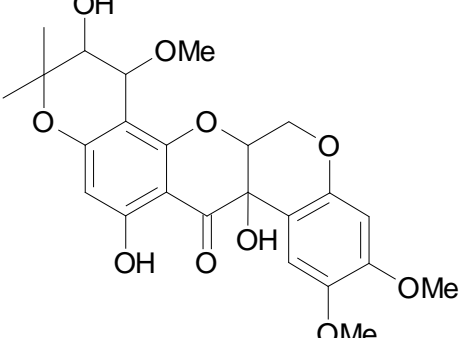
Κουμειστάνια

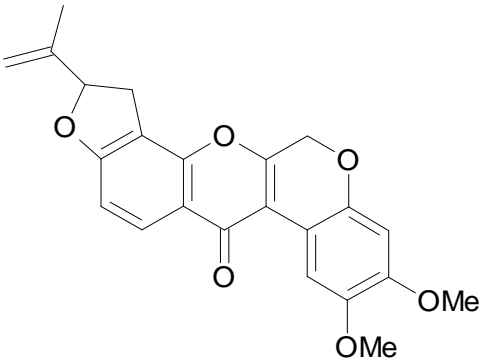
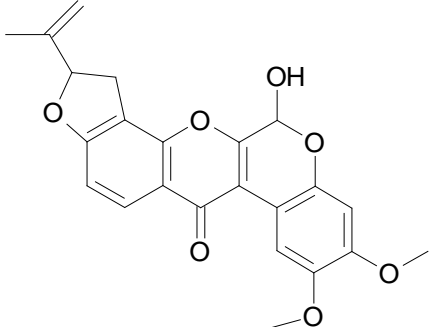
 <p>R=H</p>	Τεφροσόλη	<i>T. villosa</i>	(Pulla Rao et al., 1980)
 <p>R=H</p>	2-μεθοξυ-3,9- διυδροξικουμειστάνη	<i>T. hamiltonii</i>	(Rajani P., et al., 1988)
	Τεφκαλοστάνη Β	<i>T. calophylla</i>	(Ganapaty S. et al., 2009)

	Τεφκαλοστάνη C	<i>T.calophylla</i>	(Ganapaty S. et al., 2009)
	Τεφκαλοστάνη D	<i>T.calophylla</i>	(Ganapaty S. et al., 2009)

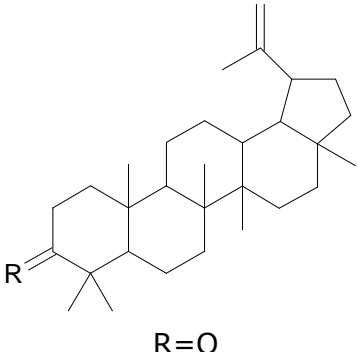
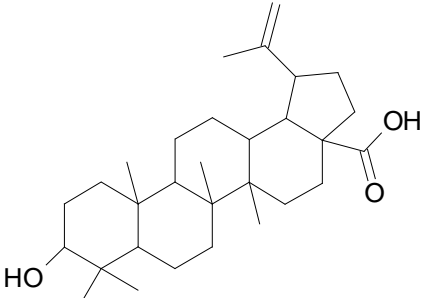
Ροτενοειδή

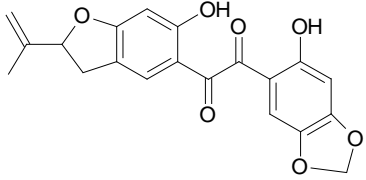
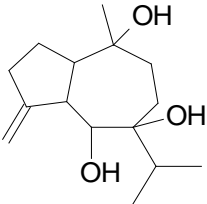
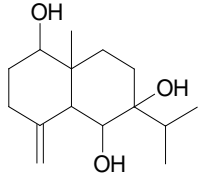
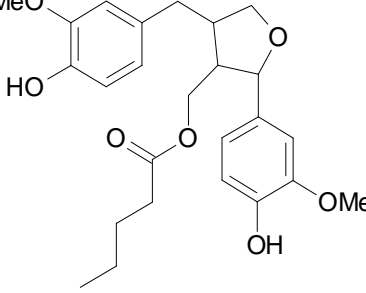
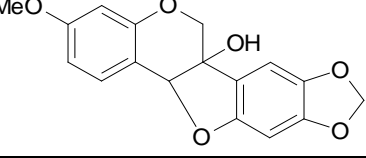
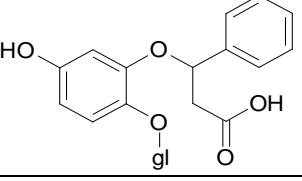
 <p>$R_2=Me, R_3=OH, R_4=H, R_1=OH \text{ ή } OAc$</p>	Διυδροστεμονάλη Και 6-ακετοξυδιυδροστεμονάλη ή αντίστοιχα	<i>T.pentafylla</i>	(Dagne E. et al., 1989)
 <p>$R^1=OH, H \text{ } R^2=H$</p>	12α-διυδρο-6-υδροξυσουματρόλη	<i>T.villosa</i>	(Prashant A. et al., 1993)
	6α, 12α-διυδρο-2,3,6-τριμεθοξυ-8-(3',3'διμεθυλαλλυλ)-9,11-διυδροξυροτενόνη	<i>T.villosa</i>	(Prashant A. et al., 1993)

 <p>R=R1=H / R=H,R=OH / R=OH, R1=H(α-τοξικαρόλη)/R=R1=OH</p>	<p>Ντεγκελίνη, α-τοξικαρόλη, Τεφροσίνη, 12α-υδροξυ-α- τοξικαρόλη αντίστοιχα</p>	<p><i>T.candida</i></p>	<p>(Andrei C.C. et al.,1997)</p>
 <p>R= H ή OH</p>	<p>6α, 12α- δεϋδροξυτεγκελίνη ή 6α,12α-δεϋδρο-α- τοξικαρόλη</p>	<p><i>T.candida</i></p>	<p>(Andrei C.C. et al.,1997)</p>
	<p>12α-υδροξυ-β- τοξικαρόλη</p>	<p><i>T.candida</i></p>	<p>(Andrei C.C. et al.,1997)</p>
	<p>4',5'-διυδρο-11,5'- διυδροξυ-4'- μεθοξυτεφροσίνη</p>	<p><i>T.toxicaria</i></p>	<p>(Jang D.S. et al., 2003)</p>

	<p>6a, 12a- δεϋδροροτενόνη</p>	<p><i>T.egregia</i></p>	<p>(Arriaga A.M.C. et al., 2009)</p>
	<p>Αμορφολόνη</p>	<p><i>T.candida</i></p>	<p>(Kole K.K., 1992)</p>

Άλλα

 <p>R=O</p>	<p>Λουπενόνη- τριτερπένιο</p>	<p><i>T.villosa</i></p>	<p>(Prashant A. et al.,1993)</p>
	<p>Βετουλινικό οξύ- τριτερπένιο</p>	<p><i>T.calophylla</i></p>	<p>(Subramanyam R. et al., 2009)</p>

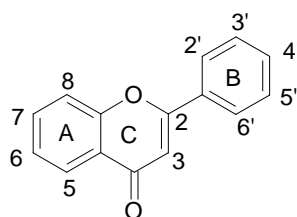
	Καλοφιόνη Α	<i>T.calophylla</i>	(Ganapaty S. et al., 2009)
	(1β,6α,10α)-guaia-4(15)-ene-6,7,10-triol Σεσκιτερπένιο (Γουαϊανένιο)	<i>T.vogelii</i>	(Wei H.-H. et al., 2009)
	1β-hydroxy-6,7α-dihydroxyeudesm-4(15)-ene (eudesmane-type sesquiterpene)	<i>T.candida</i>	(Hegazy M.-E.F. et al., 2011)
	Εστέρας της λαρυσιρεσινόλης (Λιγνάνιο)	<i>T.vogelii</i>	(Wei H.-H. et al., 2009)
	Πισατίνη (Φυτοαλεξίνη)	<i>T.candida</i>	(Hegazy M.-E.F. et al., 2011)
	Σινεροζίτης Α	<i>T.cinerea</i>	(Maldini M. et al., 2011)

ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ

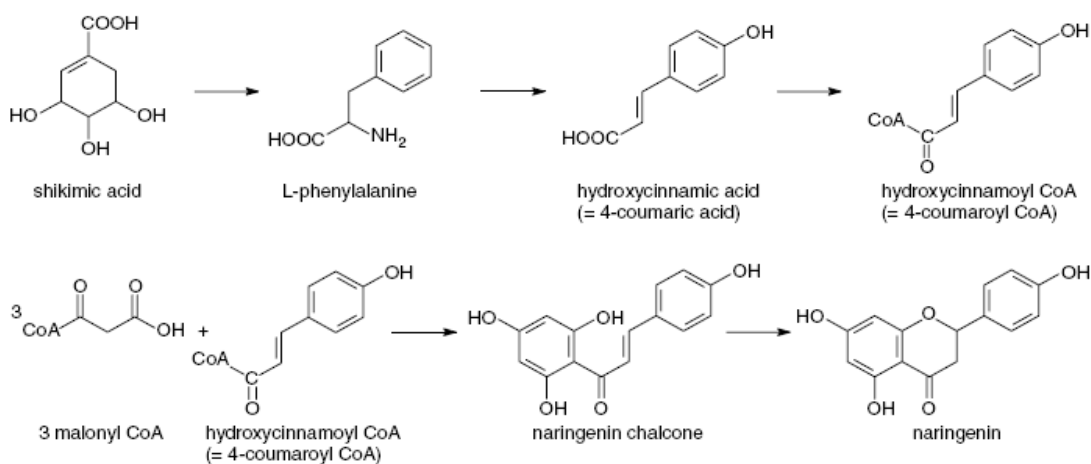
Μέχρι πριν 60 χρόνια περίπου, οι πληροφορίες σχετικά με τους μηχανισμούς δράσης των φλαβονοειδών ήταν εξαιρετικά περιορισμένες. Ωστόσο ήταν γνωστό εδώ και αιώνες ότι προϊόντα φυτικής προέλευσης δύνανται να χρησιμοποιηθούν σε ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δραστηριοτήτων (Robak J. et al., 1996). Όσπου το 1930, απομονώθηκαν νέες χημικές ενώσεις από τα πορτοκάλια οι οποίες θεωρήθηκαν ότι ανήκουν στην κατηγορία των βιταμινών. Όταν όμως αποδείχτηκε ότι αυτές οι ουσίες ήταν τα φλαβονοειδή, μία νέα σελίδα άνοιξε στην έρευνα για την απομόνωση των διαφόρων φλαβονοειδών και την κατανόηση των μηχανισμών δράσης τους.

Πάνω από 4000 φλαβονοειδή έχουν απομονωθεί, πολλά από τα οποία ευθύνονται για το χρώμα των λουλουδιών, των φρούτων και των φύλλων (De Groot et al., 1998). Η έρευνα πάνω στα φλαβονοειδή ενισχύθηκε με την παρατήρηση του φαινομένου του «γαλλικού παράδοξου», το γεγονός δηλαδή της υψηλής κατανάλωσης λιπαρών και κόκκινου κρασιού, με τα χαμηλά επίπεδα θνησιμότητας που οφείλονται σε καρδιολογικά προβλήματα. Τα φλαβονοειδή που περιέχονται στο κόκκινο κρασί είναι υπεύθυνα, τουλάχιστον εν μέρει, για το φαινόμενο αυτό, αφού ουσίες όπως η ρεσβερατρόλη, η κβερκετίνη, η επικατεχίνη και οι ανθοκυάνες αποδείχθηκαν αποτελεσματικοί αναστολείς της οξειδωσης της LDL, μειώνοντας κατά αυτόν τον τρόπο τον κίνδυνο για καρδιοαγγειακές παθήσεις (Formica J.V. et al., 1995).

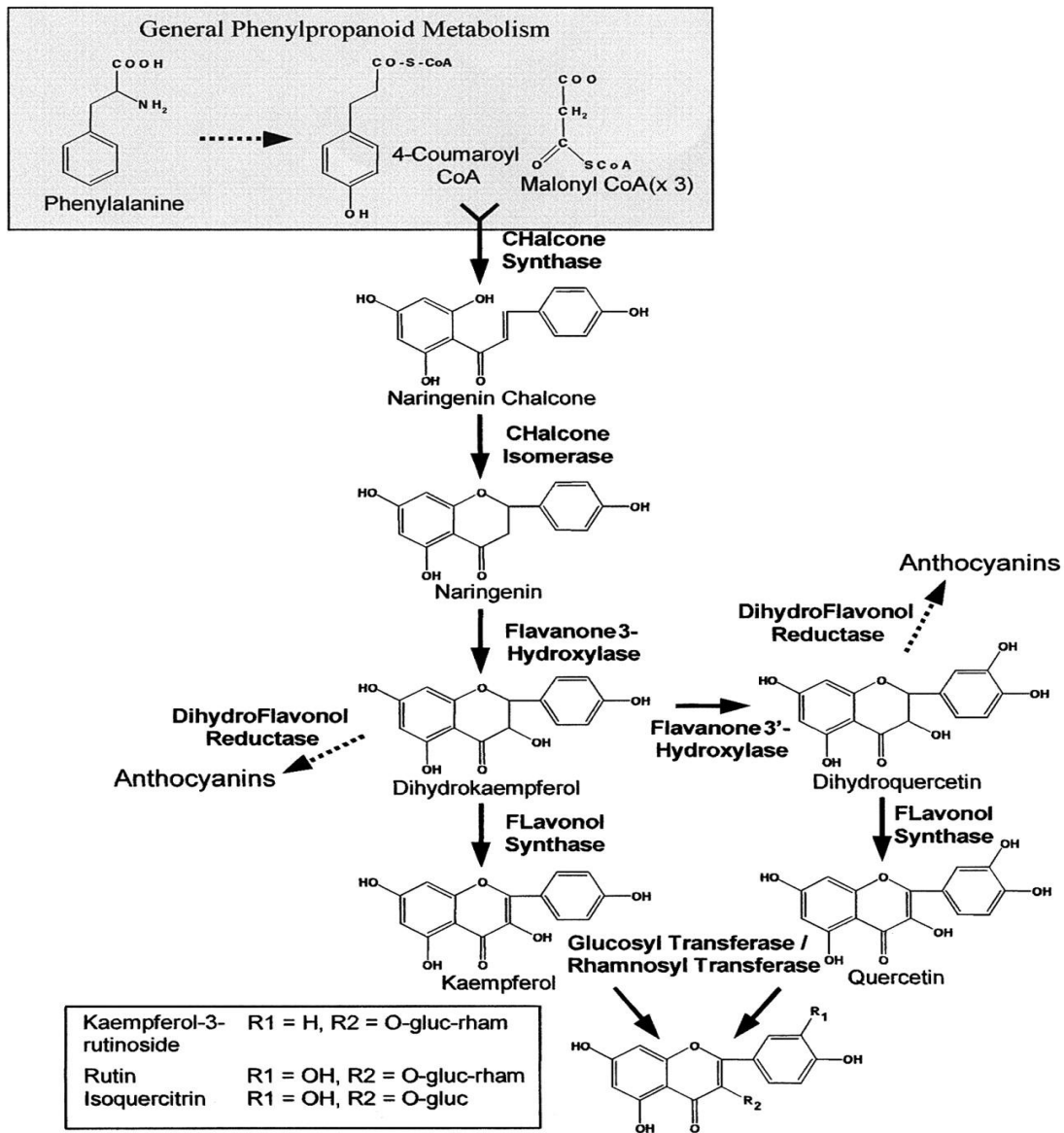
Τα φλαβονοειδή είναι δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών. Είναι μικρού μοριακού βάρους ενώσεις που αποτελούνται από 15 άτομα άνθρακα με σχηματισμό $C_6-C_3-C_6$ και συνίστανται από ένα πυρήνα 2-φαιnyλο-βενζο-γ-πυρανίου, δηλαδή από ένα σύστημα με δύο βενζολικούς (A και B) δακτυλίους, συνδεδεμένους μέσω ενός ετεροκυκλικού οξυγονούχου (C) δακτυλίου πυρανίου.



Η βιοσύνθεση των φλαβονοειδών γίνεται μέσω συνδυασμού των οδών του σικιμικού και του ακυλοπολυμηλονικού. Ο αρωματικός δακτύλιος A προκύπτει από το μονοπάτι του μηλονικού, ενώ ο δακτύλιος B προέρχεται από την φαιτυλαλανίνη, μέσω της οδού του σικιμικού (Merken H.M. et al., 2000). Όλα τα φλαβονοειδή έχουν κοινό βιοσυνθετικό δρόμο και ως εκ τούτου έχουν τον ίδιο βασικό σκελετό. Προέρχονται από τη συσσωμάτωση τριών μορίων του συνενζύμου του μηλονικού οξέος (δακτύλιος A) και ενός του p-κουμαρικού (δακτύλιος B), οπότε μετά από κυκλοποίηση σχηματίζεται ο πυρανικός δακτύλιος. Το προϊόν της αντίδρασης είναι η χαλκόνη (4,2',4',6'- τετραϋδροχαλκόνη). Η κυκλοποίηση της χαλκόνης καταλύεται από το ένζυμο ισομεράση της χαλκόνης, το οποίο επάγει το στερεοεκλεκτικό κλείσιμο του κύκλου, οδηγώντας στο σχηματισμό της (2-S) φλαβανόνης.

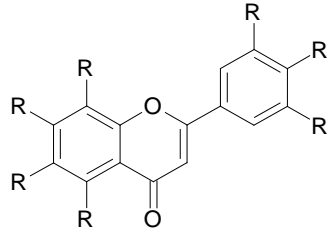
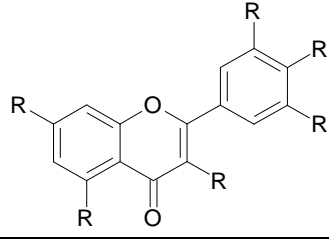
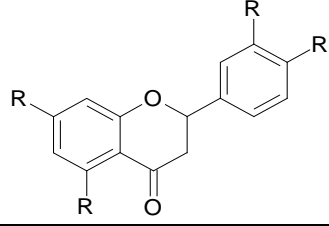
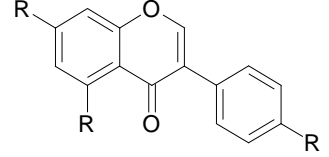
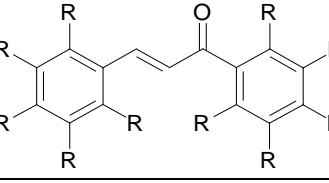


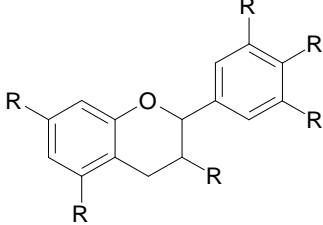
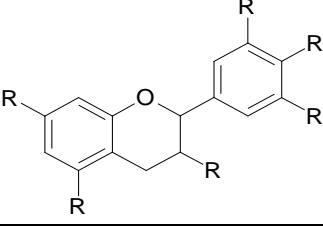
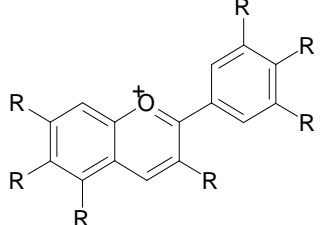
Οι φλαβανόνες μπορούν να μετατραπούν είτε σε φλαβόνες, είτε σε ισοφλαβόνες. Το επόμενο ένζυμο, η 3-υδροξυλάση της φλαβανόνης καταλύει τη μετατροπή της ναριγγενίνης σε διϋδροκαιμφερόλη και της εριοδικτυόλης σε διϋδροκβερκετίνη. Το ένζυμο συνθετάση της φλαβονόλης μετατρέπει την διϋδροκαιμφερόλη σε καιμφερόλη. Οι υδροξυλιώσεις μπορούν να συμβούν σε όλα τα στάδια οξειδωσης του σκελετού των φλαβονοειδών.



Ανάλογα με τον βαθμό οξειδωσης του δακτυλίου C, το επίπεδο υδροξυλίωσης του πυρήνα και των υποκαταστατών του άνθρακα 3, τα φλαβονοειδή μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε διάφορες υποομάδες: φλαβόνες, ισοφλαβόνες, φλαβανονόλες, φλαβονόλες, φλαβανόνες, ανθοκυάνες, προανθοκυανιδίνες, χαλκόνες, χρωμόνες (Hollman P.C.H. et al., 1999), από τις οποίες, οι φλαβόνες και οι φλαβονόλες είναι οι πιο συχνά εμφανιζόμενες, αλλά και αυτές με την μεγαλύτερη ποικιλομορφία (Harborne J.B. et al, 1999). Για παράδειγμα, οι φλαβονόλες

διαφέρουν από τις φλαβανόνες σε ένα υδροξύλιο στον άνθρακα 3 και από την ύπαρξη ενός διπλού δεσμού μεταξύ του άνθρακα 2 και 3. Οι ανθοκυανιδίνες διαφέρουν από όλα τα υπόλοιπα φλαβονοειδή επειδή διαθέτουν ένα φορτισμένο άτομο οξυγόνου στον δακτύλιο C. Από την άλλη πλευρά, ο δακτύλιος C είναι ανοικτός στις χαλκόνες. Υποκαταστάτες στους δακτυλίους A και B δημιουργούν διαφορετικά παράγωγα φλαβονοειδών (Pietta P.G., 2000) και μπορούν να περιλαμβάνουν αλκυλιώσεις, γλυκοσυλιώσεις, σουλφονυλιώσεις κ.α. (Balasundram N. et al., 2006).

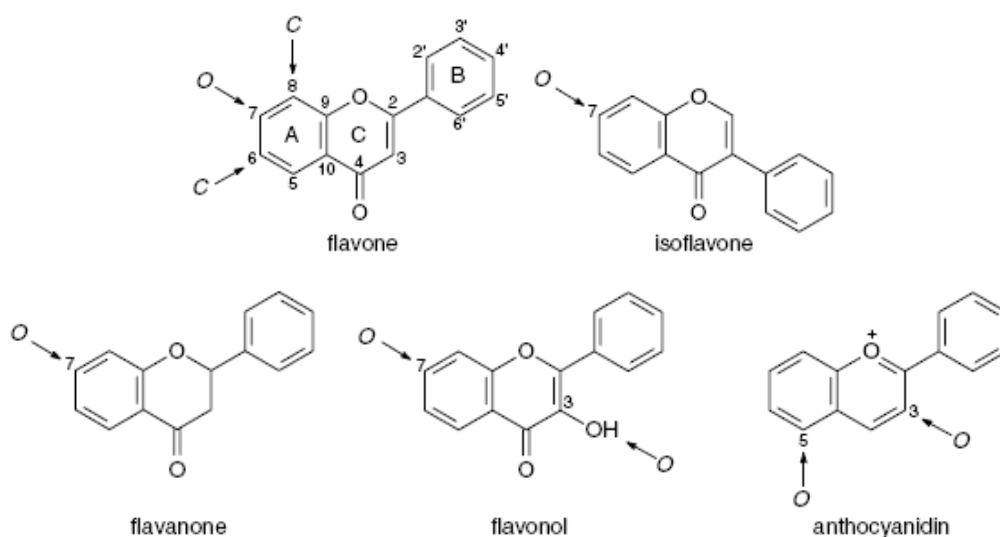
Κατηγορίες Φλαβονοειδών	Βασικές Χημικές Δομές
Φλαβόνες	
Φλαβονόλες	
Φλαβανόνες	
Ισοφλαβόνες	
Χαλκόνες	

Κατεχίνες	
Προανθοκυανιδίνες	
Ανθοκυανιδίνες	

R = -OCH₃, -OH, γλυκόζη, ραμνόζη, ραμνογλυκόζη, ρουτινοζίτης, γαλακτοζίτης ή νεοεσπεριδοζίτης

Τα φλαβονοειδή μπορούν να εμφανίζονται είτε ως άγλυκα, είτε με τη γλυκοσυλιωμένη τους μορφή (Stobiecki M. et al., 1999; He X.-G., 2000) όπου είναι συνδεδεμένα με σάκχαρα, όπως D-γλυκόζη, L-ραμνόζη, γαλακτόζη και αραβινόζη (Harborne J.B., 1986; Harborne J.B. 1988; Hodnick W.F. et al., 1988). Η γλυκοσυλίωση καθιστά το φλαβονοειδές λιγότερο ενεργό, περισσότερο πολικό και άρα περισσότερο υδατοδιαλυτό, έτσι ώστε να προστατεύονται καλύτερα τα φλαβονοειδή εντός των κυτταρικών χυμοτοπιών (Cuyckens F. et al., 2003; Justesen U. et al., 1998). Στους O-γλυκοζίτες των φλαβονοειδών, ένα ή περισσότερα υδροξύλια του αγλύκου συνδέονται με το σάκχαρο μέσω ενός, μη ανθεκτικού στα οξέα, δεσμού C-O. Οποιοδήποτε υδροξύλιο μπορεί να γλυκοσυλιωθεί, ωστόσο ορισμένες θέσεις φαίνονται να προτιμώνται, όπως για παράδειγμα το 7-OH στις φλαβόνες, στις φλαβανόνες και στις ισοφλαβόνες, το 3-OH και το 7-OH στις φλαβονόλες και στις φλαβανόλες, και το 3-OH και το 5-OH στις ανθοκυανιδίνες (Cuyckens F. et al., 2003; Iwashina T., 2000; Robards K. & Antlovich M., 1997). Λιγότερο συχνά η γλυκοσυλίωση μπορεί να εμφανιστεί με απευθείας σύνδεση του

σακχάρου στο φλαβονοειδές μέσω ενός δεσμού C-C, ανθεκτικού στα οξέα, σχηματίζοντας C-γλυκοζίτες (Cuyckens F. et al., 2003; Cavaliere C. et al., 2005; Robards K. et al., 1997).



Δισακχαρίτες και ακόμη μεγαλύτεροι πολυσακχαρίτες εμφανίζονται να συνδέονται με τα φλαβονοειδή, με τις πλέον συχνά εμφανιζόμενες να είναι η ρουτινόζη (6-O-α-L-ραμνοσυλ-D-γλυκόζη) και η νεοεσπεριδόζη (2-O-α-L-ραμνοσυλ-D-γλυκόζη) (Robards K. & Antlovich M., 1997). Ενίοτε συμβαίνει και ακυλίωση των γλυκοζιτών που προκύπτουν με τη συμμετοχή συνήθως του οξικού, φερρουλικού, μηλονικού, σιναπικού, *p*-κουμαρικού ή καφεϊκού οξέος (Cuyckens F. et al., 2003; Cavaliere C. et al., 2007; Robards K. & Antlovich M., 1997).

Παρά τις ολοένα και αυξανόμενες ενδείξεις για την αντιοξειδωτική ικανότητα των φλαβονοειδών *in vitro*, πολύ λίγα είναι γνωστά για την αποτελεσματικότητά τους *in vivo*, λόγω της περιορισμένης-έως σήμερα-γνώσης μας για τη βιοδιαθεσιμότητά τους στους ανθρώπους. Μόλις πρόσφατα αποδείχθηκε ότι τα φλαβονοειδή που λαμβάνουμε μέσω της διατροφής μας δεν απορροφώνται σε τέτοιο βαθμό που να μπορεί να θεωρηθεί ότι έχουν αντιοξειδωτική αποτελεσματικότητα στους ανθρώπους, αφού το ποσοστό αυτών που απορροφώνται είναι πολύ μικρό συγκριτικά με το συνολικό ποσοστό που λαμβάνεται αρχικά μέσω της τροφής. Κατά τη διάρκεια της απορρόφησης από τον εντερικό σωλήνα, φλαβόνες, φλαβονόλες, ισοφλαβόνες και κατεχίνες μετατρέπονται μερικώς σε γλυκουρονίδια και σε θειικούς

εστέρες. Στη συνέχεια τα φλαβονοειδή που απορροφώνται, μεταβολίζονται από τα ένζυμα του ήπατος και μετατρέπονται σε πιο πολικά παράγωγα που, είτε αποβάλλονται μέσω των ούρων, είτε επιστρέφουν στο δωδεκαδάκτυλο μέσω της χοληδόχου κύστεως. Ωστόσο το μεγαλύτερο ποσοστό των φλαβονοειδών που λαμβάνονται με την τροφή δεν απορροφώνται και αποδομούνται από βακτήρια της χλωρίδας του εντέρου. Τα βακτηριακά ένζυμα συμμετέχουν στην υδρόλυση, στο 'άνοιγμα' του ετεροκυκλικού οξυγονούχου δακτυλίου, στην αφυδάτωση και αποκαρβοξυλίωση. Πλήθος φαινολικών οξέων παράγονται, ανάλογα με τη δομή του φλαβονοειδούς (Pietta P.G. et al., 1997). Αυτά τα φαινολικά οξέα μπορούν να επαναπροσληφθούν και να υποστούν νέες μετατροπές και να εισέλθουν ξανά στην κυκλοφορία. Αυτή η προοπτική που υπάρχει είναι ιδιαίτερα σημαντική για την αντιοξειδωτική ικανότητα των φλαβονοειδών, διότι αυτά τα φαινολικά οξέα αντιστοιχούν σε ένα μεγάλο ποσοστό με τα φλαβονοειδή που προσλαμβάνονται (30%-60%) και διότι λόγω της δομής κατεχόλης που έχουν, διαθέτουν την ικανότητα σάρωσης ελευθέρων ριζών όπως και οι πρόδρομές τους ουσίες (Merfort I. et al., 1996).

Φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά των φλαβονοειδών

Οι περισσότερες φλαβόνες και φλαβονόλες εμφανίζουν δύο κύριες ζώνες απορρόφησης στην περιοχή του υπεριώδους/ορατού (Mabry T.J. et al., 1970; Markham K.R. et al., 1989). Η ζώνη I εμφανίζεται στην περιοχή 320-385nm και αντιπροσωπεύει την απορρόφηση του δακτυλίου B του φλαβονοειδούς, ενώ η ζώνη II εμφανίζεται στην περιοχή 250-285nm και αντιπροσωπεύει την απορρόφηση του A δακτυλίου. Θεωρητικά, αύξηση του αριθμού των υδροξυλίων και στους δύο δακτυλίους προκαλεί βαθυχρωμική μετατόπιση στις αντίστοιχες ζώνες. Η απουσία του υδροξυλίου της θέσης 3 στις φλαβόνες, μετατοπίζει υψιχρωμικά την απορρόφηση της ζώνης I κατά 20-30nm σε σχέση με τις αντίστοιχες φλαβονόλες. Αυτό συμβαίνει γιατί η παρουσία του υδροξυλίου αυτής της θέσης επεκτείνει τη συζυγία του B δακτυλίου προκαλώντας έτσι την απορρόφηση της ζώνης I σε μεγαλύτερα μήκη κύματος.

Οι φλαβανόνες και φλαβανόλες έχουν έναν κορεσμένο ετεροκυκλικό C δακτύλιο και αυτή η έλλειψη σύζευξης μεταξύ των δακτυλίων A και B, σε αντίθεση

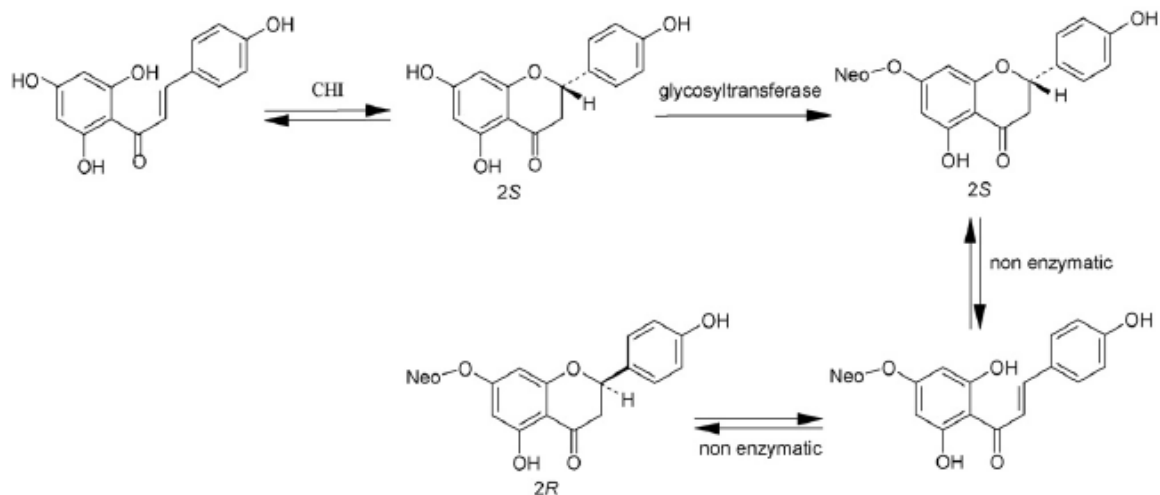
με τις φλαβόνες και φλαβονόλες, έχει σαν αποτέλεσμα την καθολική διαφοροποίηση στην απορρόφηση UV, καθώς και μειωμένη αντιοξειδωτική δύναμη. Η απορρόφησή τους χαρακτηρίζεται από ένα μέγιστο (ζώνη II) στα 270-285nm, ενώ η ζώνη I εμφανίζεται μόνο σαν ένας ώμος περίπου στα 325nm (Mabry T.J. et al, 1970).

Φλαβονόλες

Οι φλαβονόλες είναι φλαβόνες με ένα OH στην θέση 3. Αποτελούν ενώσεις που είναι ευρύτατα διαδεδομένες στα φυτά και συνήθως εμφανίζονται στα φύλλα και στα υπέργεια μέρη του φυτού, ενώ ίχνη τους απαντώνται στα υπόγεια τμήματα. Περί τα 450 είδη φλαβονολών έχουν βρεθεί μέχρι σήμερα με τη μορφή του αγλύκου, ενώ τα τέσσερα από αυτά (κβερκετίνη, καιμφερόλη, μυρικετίνη και ισοραμνετίνη) εμφανίζονται συχνά στα φρούτα (Robards K. et al., 1997). Η πλειοψηφία των φλαβονολών βρίσκονται με τη μορφή Ο-γλυκοζιτών και πολύ σπάνια ως C-γλυκοζίτες. Περίπου 900 φλαβονολο-Ο-γλυκοζίτες έχουν αναφερθεί, κυρίως ως 3-, 7-, 4'-γλυκοζίτες σε διάφορους συνδυασμούς, ενώ οι 5-Ο-γλυκοζίτες είναι σπανιότεροι. Τα σάκχαρα συνήθως είναι η γλυκόζη, συχνά η γαλακτόζη και η ραμνόζη και μερικές φορές ξυλόζη, αραβινόζη και γλυκουρονικό οξύ.

Φλαβανόνες

Οι φλαβανόνες χαρακτηρίζονται από την απουσία διπλού δεσμού μεταξύ των θέσεων 2 και 3. Βιογενετικά στο φυτικό βασίλειο, οι χαλκόνες αποτελούν πρόδρομες ενώσεις των φλαβανονών, οι οποίες εμφανίζονται ως (2S)-ισομερή με κέντρο τον C-2, εξαιτίας της εξαιρετικά στερεοεκλεκτικής ενζυματικής αντίδρασης. Σε αυτήν την αντίδραση, το ένζυμο ισομεράση της χαλκόνης καταλύει την κυκλοποίηση της χαλκόνης με αναλογία 100.000:1, υπέρ της σύνθεσης του (2S)-ισομερούς έναντι του (2R)-ισομερούς (Jez J.M. et al., 2000). Επιμέρους στάδια γλυκοσυλίωσης που καταλύονται από γλυκοσυλοτρανσφεράσες, συνθέτουν φλαβανογλυκοζίτες. Μάλιστα, σύμφωνα με μελέτη σε καρπούς γκρέιπφρουτ, προέκυψε ότι κατά τη διάρκεια ωρίμανσής τους, η 2S-ναριγγίνη υπόκειται σε μη ενζυματική ρακεμοποίηση στον C-2 μέσω διάνοιξης του δακτυλίου, προκύπτοντας τελικώς μίγμα και των δύο C-2 διαστερομερών, με αναλογία που αγγίζει το 3:2 υπέρ του 2-S έναντι του 2-R (Funari C.S. et al., 2011; Maltese F. et al., 2009; Caccamese S. et al., 2010).



Βιοσύνθεση ναριγγίνης και ο μη ενζυματικός επιμερισμός αυτής (Caccamese S. et al., 2010)

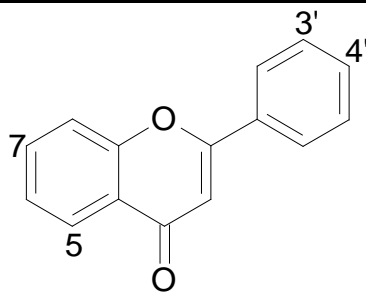
Αν και δεν βρίσκονται σε τόση αφθονία όσο οι υπόλοιπες κατηγορίες των φλαβονοειδών, πολλές φλαβανόνες εμφανίζουν εξαιρετικά ενδιαφέρουσα δράση. Η ναριγγενίνη είναι μια φλαβανόνη σε αφθονία στο κίτρο, με αντιοξειδωτική δράση (Scalbert A., 1991), ισχυρή οιστρογονική δράση *in vitro* (Manthey J.A. et al., 2002) και δράση κατά του πολλαπλασιασμού των κυττάρων (Wang W. et al., 1999) και με το πρενυλιωμένο παράγωγο της ναριγγενίνης (8-πρενυλ-ναριγγενίνη) να είναι ακόμη πιο ισχυρό φυτοοιστρογόνο (Miksicek R.J., 1993). Οι περισσότερες δημοσιεύσεις για τη ναριγγενίνη σχετίζονται με τον ρόλο της στην αλληλεπίδραση φαρμάκου και γκρέιπφρουτ (Fuhr U., 1998; Bailey D.G. et al., 2000). Έχει επιβεβαιωθεί η σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης στο πλάσμα, φαρμάκων που μεταβολίζονται από το CYP3A4, όταν αυτά χορηγούνται παράλληλα με τη λήψη χυμού από γκρέιπφρουτ (Dresser G.K. et al., 2000; Lilja J.J. et al., 2000), με τη ναριγγενίνη να σχετίζεται με την αλληλεπίδραση αυτή (Ghosal A. et al., 1996). Το μέλι και η πρόπολη περιέχουν πινοσεμπρίνη και πινομπασκίνη και διάφορες άλλες φλαβανόνες. Το μεθυλιωμένο παράγωγο της πινοσεμπρίνης καλείται πινοστροβίνη και φέρεται να είναι ικανός επαγωγέας της αναγωγάσης της κινόνης (Milligan S.R. et al., 1999). Η ναριγγενίνη και η εσπεριτίνη έχει αναφερθεί ότι ρυθμίζουν την έκκριση της απολιποπρωτεΐνης Β σε κύτταρα HepG2, πιθανώς μέσω της αναστολής της σύνθεσης του εστέρα της χοληστερόλης (Borradaile N.M. et al., 1999)

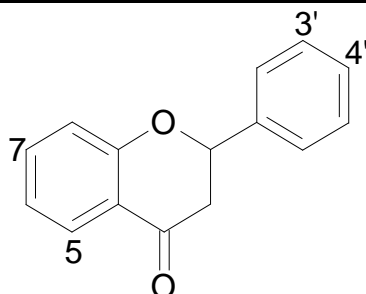
Οι γλυκοζίτες των φλαβονολών εμφανίζονται ως ρουτινοζίτες (6-O-α-L-ραμνοζυλο-D-γλυκοζίτες) και νεοεσπεριδοζίτες (2-O-α-L-ραμνοζυλο-D-γλυκοζίτες), κυρίως στο κίτρο. Στο λεμόνι, στο γλυκολέμονο (lime), στο μανταρίνι και στο πορτοκάλι περιέχονται ρουτινοζίτες, ενώ στο γκρέιπφρουτ νεοεσπεριδοζίτες, κυρίως ναριγγενίνη.

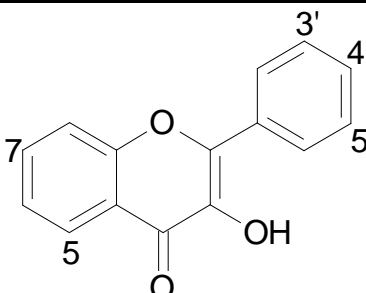
Ισοφλαβόνες

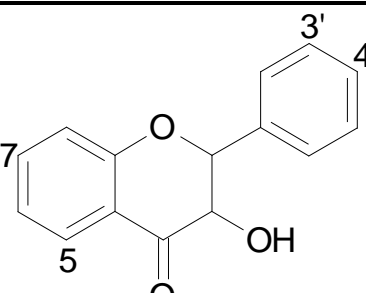
Στις ισοφλαβόνες ο Β-δακτύλιος συνδέεται στη θέση 3, αντί της θέσης 2 που είναι στα υπόλοιπα φλαβονοειδή, με τα 900 περίπου άγλυκα ισοφλαβονών που βρέθηκαν μέχρι στιγμής στη φύση, να διαχωρίζονται σε 14 κατηγορίες και σε 23 υποκατηγορίες (Robards K. et al., 1997). Οι ισοφλαβόνες βρίσκονται σε αφθονία ιδίως στην οικογένεια *Fabaceae* και ειδικά στα φασόλια σόγιας και στους κιτρινόχρωμους καρπούς της *Glycine max* (L.) (Robards K. et al., 1997). Ειδικότερα, οι ισοφλαβόνες στη σόγια ανήκουν στην κατηγορία των φυτοοιστρογόνων, λόγω της ισχνής οιστρογονικής τους δράσης με πιθανή προστατευτική δράση έναντι ορμονοεξαρτώμενων νόσων, λόγω της παρόμοιας δομής τους με τη β-οιστραδιόλη (Klejdus B. et al., 2007). Έχει καθιερωθεί ότι οι ισοφλαβόνες στη σόγια χωρίζονται σε τρεις ομάδες, ανάλογα με το άγλυκο, σε νταϊντζεΐνη, γενιστεΐνη και γλυκίτεϊνη (glycitein) και η κάθε ομάδα σε τέσσερις υποκατηγορίες: Ο-μηλονυλο-β-γλυκοζίτες, Ο-ακετυλο-β-γλυκοζίτες, β-γλυκοζίτες και άγλυκα (Kurzer M.S., 2000; Gu L. et al., 2001).

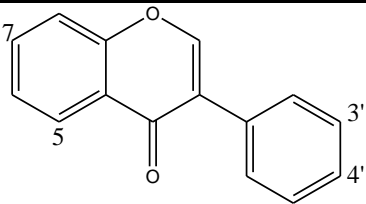
Ομάδα	Χημική Ένωση	Πηγή Τροφίμων
Φλαβόνες	Απιγενίνη Χρυσίνη Καιμφερόλη Λουτεολίνη Μυρικετίνη Ρουτίνη Σιμπελίνη Κβερκετίνη	Φλούδα Μήλου Μούρα Μπρόκολο Σέλινο Φλούδες Φρούτων Βακκίνια (Φίγγι) Σταφύλια Μαρούλι Ελιές Κρεμμύδια Μαϊντανός
Φλαβανόνες	Φισετίνη Εσπεριτίνη Ναριγγίνη Ναριγγενίνη Ταξιφολίνη	Εσπεριδοειδή Φρούτα Φλούδες Εσπεριδοειδών
Κατεχίνες	Κατεχίνη Επικατεχίνη Επιγαλλοκατεχίνη	Κόκκινο Κρασί Τσάι
Ανθοκυανίνες	Κυανιδίνη Δελφινιδίνη Μαλβιδίνη Πελαργονιδίνη Πεονιδίνη Πετουνιδίνη	Μούρα Κεράσια Σταφύλια Βατόμουρα Κόκκινα Σταφύλια Κόκκινο κρασί Φράουλες Τσάι Φλούδες Φρούτων με σκουρόχρωμες χρωστικές ουσίες

 <p style="text-align: center;">Φλαβόνες</p>				
	5	7	3'	4'
Λουτεολίνη	OH	OH	OH	OH
Απιγενίνη	OH	OH		OH
Χρυσίνη	OH	OH		

				
<i>Φλαβανόνες</i>				
	5	7	3'	4'
Εσπεριτίνη	OH	OH	OH	OCH ₃
Ναριγγενίνη	OH	OH		OH

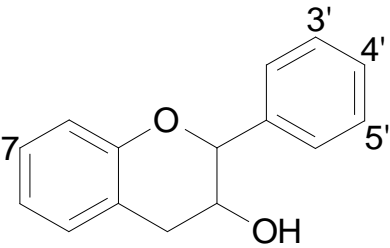
					
<i>Φλαβονόλες</i>					
	5	7	3'	4'	5'
Κβερκετίνη	OH	OH	OH	OH	
Καιμφερόλη	OH	OH		OH	
Γκαλανγκίνη	OH	OH			
Φισετίνη		OH	OH	OH	
Μυρικετίνη	OH	OH	OH	OH	OH

				
<i>Διυδροφλαβονόλη</i>				
	5	7	3'	4'
Ταξιφολίνη	OH	OH	OH	OH



Ισοφλαβόνες

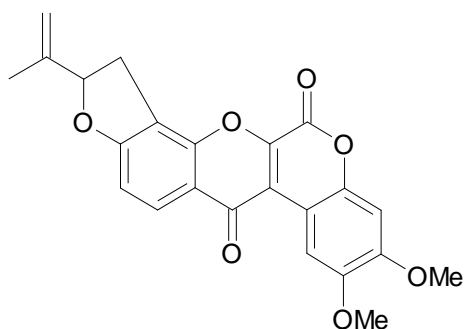
	5	7	4'
Γενιστεΐνη	OH	OH	OH
Γενιστίνη	OH	O-glc	OH
Νταϊντζεΐνη		OH	OH
Νταϊντζίνη		O-glc	OH
Μπιοχανίνη Α	OH	OH	OCH ₃
Φορμονονετίνη		OH	OCH ₃



Φλαβαν-3-όλες

	3	5	7	3'	4'	5'
(+)-Κατεχίνη	β -OH	OH	OH	OH	OH	
(-)-επικατεχίνη	α -OH	OH	OH	OH	OH	
(-)-επιγαλλοκατεχίνη	α -OH	OH	OH	OH	OH	OH

Ροτενοειδή

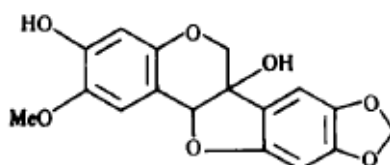


Ροτενόνη

Τα ροτενοειδή αποτελούνται από τέσσερις δακτυλίους, οι οποίοι φανερώνουν τη σχέση που έχουν με την C₁₅ δομή της ισοφλαβόνης, ενώ ο πέμπτος ετεροκυκλικός δακτύλιος στα αριστερά εμφανίζεται σε ορισμένα μόνο ροτενοειδή. Τα ροτενοειδή συνήθως βρίσκονται σε μεγάλη συγκέντρωση στα εξωτερικά, επιφανειακά μέρη των

υπογείων τμημάτων των φυτών. Η ροτενόνη, το πρώτο ροτενοειδές που απομονώθηκε, χρησιμοποιούνταν ως εντομοκτόνο, ακόμα και πριν από την εμφάνιση των οργανοσυνθετικών εντομοκτόνων, αλλά και για τη νάρκωση των ψαριών. Έχουν ενδιαφέρουσες βιολογικές ιδιότητες, όπως για παράδειγμα η αναστολή της σύνθεσης μικροσωληνίσκων (σύστημα από ευκαρυωτικά κύτταρα που λαμβάνουν μέρος σε διάφορες λειτουργίες, π.χ. μετακινήσεις χρωμοσωμάτων) από τουμπουλίνη (πρωτεΐνη με μοριακό βάρος πάνω από 100.000 και αποτελείται από δύο ενώσεις την Α και Β τουμπουλίνη), και αντικαρκινικές ιδιότητες (Li L. et al., 1993; Konoshima T. et al., 1993; Ravanel P. et al., 1984).

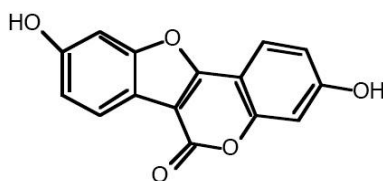
Πτεροκαρπάνια



Χιλντεκαρπίνη

Τα πτεροκαρπάνια αποτελούν μια μεγάλη ομάδα φυσικών παραγώγων ισοφλαβόνης και παίζουν σπουδαίο ρόλο ως φυτοαλεξίνες, που το κύριο δομικό χαρακτηριστικό τους έγκειται στην παρουσία ενός τετρακυκλικού συστήματος βενζοφουρανο-βενζοπυρανο-δακτυλίων. Εμφανίζουν αντιμυκητιασική, αντιβακτηριακή και αντιφλεγμονώδη δράση. Την τελευταία εικοσαετία παρουσιάστηκαν αρκετές έρευνες που επιβεβαιώνουν την αντικαρκινική δράση των πτεροκαρπανίων, την δράση τους κατά του ιού HIV, καθώς και την αναστολή του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης (Selvam C. et al., 2004; Chaudhuri S.K. et al., 1995; Engler T.A. et al., 1993; Engler T.A. et al., 1996; Jimenez-Gonzalez L. et al., 2008; Schafer W. et al., 1993).

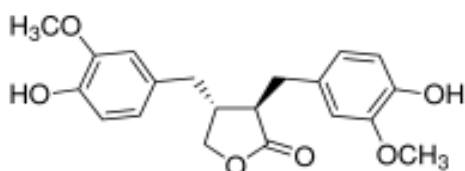
Κουμεστάνια



Κουμεστρόλη

Ανήκει στην ευρύτερη οικογένεια των ισοφλαβονών και εκτός του ονόματος κουμεστάνια, απαντάται και ως κουμεστονές και κουμαρονοκουμαρίνες, όρος που προτάθηκε για πρώτη φορά από τον Ollis W.D. στο βιβλίο *Recent Advances in Phytochemistry* (Vol. I, pp.328, Appleton-Century-Crofts, New York, 1968). Για τη βιοσύνθεσή τους, τα 6α,11α-δεϋδροπεροκαρπάνια θεωρούνται ως οι πιο πιθανές ενδιάμεσες ενώσεις τους. Η πιο γνωστή ένωση της κατηγορίας αυτής είναι η κουμεστρόλη (coumestrol), η οποία μιμείται τη βιολογική δράση των οιστρογόνων καταλαμβάνοντας τις θέσεις υποδοχής των ενζύμων αρωματάση και δεϋδρογονάση των υδροξυστεροειδών, ένζυμα που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση των στεροειδών. Έχουν οιστρογονικές ιδιότητες και λόγω της δομικής ομοιότητάς τους με την οιστραδιόλη, έχει προταθεί ότι εμφανίζουν τη δράση τους καθώς καταλαμβάνουν τους υποδοχείς των οιστρογόνων, δρώντας είτε οιστρογονικά (συνεργιστικά) είτε αντιστρογονικά (ανταγωνιστικά), ανάλογα με τα προϋπάρχοντα επίπεδα των οιστρογόνων και με τους τύπους των υποδοχέων (α ή β) (Darbarwar M. et al., 1974; de Oliveira A.B. et al., 1971; Perrin D.R. et al., 1969; Mueller S.O. et al., 2004; Kinjo J. et al., 2004; Blomquist C.H. et al., 2005).

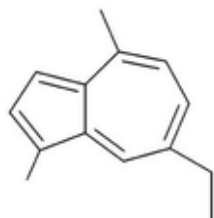
Λιγνάνια



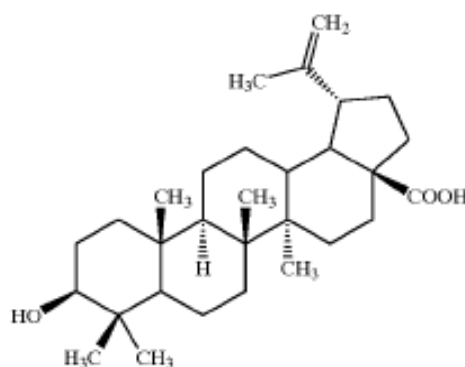
Ματαϊρεσινόλη (πρόδρομη ένωση ποδοφυλλοτοξίνης)

Τα λιγνάνια αποτελούν μια ομάδα από φαινολικά φυτικά παράγωγα των οποίων η δομή σχηματίζεται από την ένωση δυο κινναμικών οξέων ή παραγώγων τους και με μοριακό βάρος που προσεγγίζει αυτό των στεροειδών οιστρογόνων. Πρόδρομες ουσίες τους στα φυτά εμφανίζονται συζευγμένες με σάκχαρα. Έχουν την ικανότητα να συνδέονται με τους υποδοχείς των οιστρογόνων και να διαθέτουν και αντικαρκινική δράση, ιδιαίτερα κατά του καρκίνου του στήθους. Έχει αποδειχθεί ότι έχουν κυτταροτοξικές και αντιμυτωτικές ιδιότητες, αν και χρησιμοποιούνται μόνο ημισυνθετικά παράγωγα της ποδοφυλλοτοξίνης, καθώς επίσης και αντιιικές και μυκητοκτόνες ιδιότητες (Hirano T. et al., 1990; Adlercreutz H. et al., 1986; Markkanen T. et al., 1981; MacRae W.D. et al., 1984).

Άλλες χημικές δομές (Σεσκιτερπένια και τριτερπένια)



δικυκλικό σεσκιτερπένιο(χαμαζουλένιο)



Πεντακυκλικό τριτερπένιο(βετουλινικό οξύ)

Τα τερπένια αποτελούνται από ενότητες ισοπρενίου $[\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2]$ και ανάλογα με τον αριθμό των μονάδων αυτών διαιρούνται σε κατηγορίες: μονοτερπένια, σεσκιτερπένια, διτερπένια, τριτερπένια, τετρατερπένια κλπ. Η σύνθεσή τους προέρχεται από τη συμπύκνωση του πυροφωσφορικού ισοπεντενυλίου με το ισομερές πυροφωσφορικό διμεθυλαλλύλιο, σχηματίζοντας το πυροφωσφορικό γερανύλιο. Μετά από προσθήκη σε αυτό ενός πυροφωσφορικού ισοπεντενυλίου, προκύπτει το πυροφωσφορικό φαρνεσύλιο, πρόδρομη ένωση για τα σεσκιτερπένια (C_{15}), μεγάλος αριθμός των οποίων είναι συστατικά των αιθερίων ελαίων και επομένως διαθέτουν τις γενικότερες φαρμακολογικές ιδιότητες των αιθερίων ελαίων (αποχρεμπτικά, διουρητικά, εμμηναγωγά, στομαχικά, χολαγωγά, χολερετικά,

ανθελμινθικά, αντισηπτικά, αντιφλογιστικά, αντιμικροβιακά, τονωτικά). Από την άλλη πλευρά τα τριτερπένια διαιρούνται σε τέσσερις ομάδες (τετρακυκλικά και πεντακυκλικά τερπένια, τα στεροειδή, τις σαπωνίνες και τους καρδιακούς γλυκοζίτες) έχοντας τις φαρμακολογικές ιδιότητες που χαρακτηρίζουν την καθεμιά ξεχωριστά.

Ρόλος των φλαβονοειδών στα φυτά και η βιολογική τους δράση σε ζωικούς οργανισμούς

Αρχικά η έρευνα πάνω στην ρόλο των φλαβονοειδών, επικεντρώθηκε στην αλληλεπίδρασή τους με τους μικροοργανισμούς που παρασιτούν σε ένα φυτό και στα ζώα που τρέφονται από τα φυτά (Robards K. et al., 1997).

Στις παλαιότερες βιβλιογραφικές αναφορές γίνεται μνεία στη σχέση των φλαβονοειδών με την αντίσταση των φυτών απέναντι στις «ασθένειες» τους. Τα φυτά παράγουν συγκεκριμένες χημικές ουσίες τη στιγμή της μόλυνσής τους από τους μικροοργανισμούς, που σκοπό έχουν να τους απομακρύνουν και ονομάζονται «φυτοαλεξίνες». Τα φλαβονοειδή αναφέρονται ως φυτοαλεξίνες σε ορισμένα φυτά. Η πλειοψηφία των φλαβονοειδών-φυτοαλεξίνες απομονώνονται από υπόγεια τμήματα του φυτού όπως για παράδειγμα τις ρίζες, τα ριζώματα και τους υπόγειους καρπούς (Iwashina T., 2003; Cook N.C. et al., 1996).

Ένας από τους πλέον σημαντικούς ρόλους τους στα φυτά αποτελεί το γεγονός ότι λειτουργούν ως ένα φίλτρο υπεριώδους ακτινοβολίας και αυτό προκύπτει από το ότι βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα φλαβονοειδών σε φυτά που εκτέθηκαν σε ισχυρή υπεριώδη ακτινοβολία (Cook N.C. et al., 1996).

Επίσης μερικά φλαβονοειδή όπως είναι γνωστό προάγουν την παραγωγή αζώτου από βακτήρια (*Rhizobium*, *Azorhizobium* και *Bradyrhizobium*) σε ορισμένα φυτά, ιδιαίτερα στα φυτά της οικογένειας Leguminosae (Bassam B.J. et al., 1988; Firmin J.L. et al., 1986; Zaat S.A.J. et al., 1989).

Όσον αφορά τη σχέση τους με τους ζωικούς οργανισμούς, το πλέον χαρακτηριστικό τους γνώρισμα αποτελεί η ικανότητά τους να δρουν ως αντιοξειδωτικά. Η ρίζα OH[•] θεωρείται ως μια από τις πιο δραστικές ρίζες. Έχει πολύ μικρό χρόνο ημιζωής (περί τα 10⁻⁹s) και πολύ μεγάλη δραστικότητα. Ρίζες υπεροξειδίου αντιδρούν με υπεροξειδία του υδρογόνου και έτσι σχηματίζονται οι

ακόμη πιο τοξικές ρίζες υδροξυλίου. Η αντίδραση αυτή που καλείται αντίδραση Fenton, καταλύεται από τον σίδηρο και μπορεί να παρεμποδιστεί από την κβερκετίνη, που έχει την ικανότητα να δεσμεύει και να παγιδεύει το σίδηρο (Ferrali M. et al., 1997). Μεταβατικά μέταλλα όπως ο χαλκός, το μαγγάνιο, το κοβάλτιο, είναι ικανά να συμμετέχουν σε τέτοιου είδους αντιδράσεις, όταν δεν συνδέονται με πρωτεΐνες, και να προκαλέσουν τη συσσώρευση ελευθέρων ριζών και την απαρχή διαδικασιών καταστροφής βιομορίων. Τα φλαβονοειδή με τα πολλαπλά υδροξύλια και το καρβονύλιο στη θέση 4 του δακτυλίου C, απομακρύνουν τα μέταλλα, αλλάζοντας το οξειδοαναγωγικό δυναμικό τους, καθιστώντας τα ανενεργά, υπερτερώντας έναντι των συνθετικών σαρωτών ελευθέρων ριζών, διότι σε αυτά υπεισέρχονται και ζητήματα τοξικότητας. Ωστόσο, η αντιοξειδωτική δράση των φλαβονοειδών περιγράφεται αναλυτικότερα παρακάτω.

Αντιδράσεις Fenton συντελούνται και στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες του νευρικού συστήματος, όπου ο μεταβολισμός της ντοπαμίνης παράγει μια ποσότητα υπεροξειδίων του υδρογόνου. Η συσσώρευση ελευθέρων ριζών στους νευρώνες αυτούς αναγνωρίζεται ως ο κύριος αιτιολογικός παράγοντας της νόσου Parkinson (Schulz J.B. et al., 2000).

Ακόμη μία ενδιαφέρουσα επίδραση των φλαβονοειδών στα ενζυμικά συστήματα αποτελεί η αναστολή του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος (Ferrandiz M.L. et al., 1991). Αυτό το χαρακτηριστικό προσδίδει στα φλαβονοειδή αντιφλεγμονώδεις και αντιθρομβωτικές ιδιότητες διότι η απελευθέρωση του αραχιδονικού οξέος αποτελεί το εναρκτήριο σημείο για μια γενική φλεγμονώδη αντίδραση του οργανισμού. Μάλιστα τα ουδετερόφιλα που περιέχουν λιποξυγονάση παράγουν χημειοτακτικούς παράγοντες από το αραχιδονικό οξύ και προκαλούν την απελευθέρωση κυτοκινών.

Ακόμη έχει αποδειχθεί ότι τα φλαβονοειδή διαθέτουν αντιαλλεργικές και ηπατοπροστατευτικές ιδιότητες (Di Carlo G. et al., 1993; Kim H.P. et al., 1998).

Αντιαθηρωματική δράση

Λόγω της αντιοξειδωτικής δράσης τους, τα φλαβονοειδή επιδρούν και στο καρδιαγγειακό σύστημα. Οι ρίζες οξυγόνου μπορούν να οξειδώνουν λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας (LDLs) που προκαλούν βλάβη στο ενδοθήλιο και προάγουν την

αθηροσκλήρωση. Έτσι, εμποδίζουν την οξειδωτική μετατροπή των LDL από τα μακροφάγα, κυρίως με το να εμποδίζουν την δημιουργία υδροϋπεροξειδίων που συντελείται στην λιπιδική υπεροξείδωση, προστατεύοντας την α-τοκοφερόλη. Επιδημιολογικές μελέτες απέδειξαν ότι η πρόσληψη φλαβονοειδών μέσω της τροφής μειώνει τη θνησιμότητα από παθήσεις των στεφανιαίων καθώς και από καρδιακή ανακοπή (Hertog M.G.L. et al., 1995; Hertog M.G.L. et al., 1993; Arai Y. et al., 2000).

Αντιφλεγμονώδης δράση

Ορισμένες φαινολικές ενώσεις, και ιδιαίτερα η κβερκετίνη (Robak J. et al., 1996) αποδείχθηκε ότι αναστέλλει τη δράση της κυκλοξυγενάσης και της 5-λιποξυγονάσης, ένζυμα που παίζουν σπουδαίο ρόλο στη φλεγμονή (Ferrandiz M.L. et al., 1996, Laughton M.J. et al., 1991; Ferrandiz M.L. 1990). Η αναστολή αυτή της δράσης τους, μειώνει την απελευθέρωση του αραχιδονικού οξέος που ευθύνεται για την έναρξη μιας γενικής φλεγμονώδους αντίδρασης (Yoshimoto T. et al., 1983) και τη μικρότερη συγκέντρωση ενδοϋπεροξειδίων, προσταγλανδινών, προστακυκλίνης και θρομβοξανίων από τη μια πλευρά και υδροϋπεροξυοξέων και λευκοτριενίων από την άλλη, αντίστοιχα. Αυτή ακριβώς η δράση επιβεβαιώνεται από τη μείωση έκκρισης της ισταμίνης που ως γνωστόν εμφανίζεται στα πρώτα στάδια της φλεγμονώδους αντίδρασης. Μια ακόμη ιδιότητα των φλαβονοειδών είναι η ικανότητά τους να εμποδίζουν τη βιοσύνθεση των εικοσανοειδών (Formica J.V. 1995; Damas J. et al., 1985). Τα εικοσανοειδή, όπως οι προσταγλανδίνες, εμπλέκονται σε πλήθος ανοσολογικών αντιδράσεων και αποτελούν τα τελικά προϊόντα των μονοπατιών της κυκλοξυγενάσης και της λιποξυγονάσης (Moroney M.-A. et al., 1988). Επίσης, τα φλαβονοειδή εμποδίζουν τη δράση της μεμβρανικής κινάσης της τυροσίνης (Formica J.V. 1995), που συμμετέχει σε πολλές λειτουργίες, όπως για παράδειγμα στην κατάλυση ενζύμων, στη μεταφορά διαμέσου μεμβρανών, στη μετατροπή των σημάτων για την παραγωγή ορμονών και παραγόντων ανάπτυξης, καθώς και στην ενεργειακή μεταφορά που απαιτείται για τη σύνθεση του ATP. Ένας ισχυρός αντιφλεγμονώδης παράγοντας με δομή φλαβονοειδούς, αποτελεί η διοσμίνη η οποία μειώνει το σχηματισμό οιδήματος και παρεμποδίζει τη σύνθεση προσταγλανδίνης E2 (78.5%), προσταγλανδίνης F2 (45.2%) και θρομβοξανίνης B2 (59.5%). Ενδοφλέβια

έγχυση διοσμίνης μειώνει την υπεργλυκαιμία που προκαλείται από έγχυση αλλοξάνης σε επίμυες και η δράση της αυτή αποδίδεται στην ικανότητά της να σαρώνει τις ενεργές ρίζες οξυγόνου (Jean T. et al., 1994).

Αντικαρκινική δράση

Οι ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS) μπορούν να προκαλέσουν καταστροφή του DNA και έτσι να υπάρξουν μεταλλάξεις. Εάν αυτές οι αλλαγές συμβούν σε «κρίσιμα» γονίδια, όπως για παράδειγμα σε ογκογονίδια ή σε ογκοκατασταλτικά γονίδια, μπορεί να προκληθεί μίτωση, αυξάνοντας με αυτόν τον τρόπο την πιθανότητα το κατεστραμμένο πλέον DNA να οδηγηθεί σε μεταλλάξεις. Έχει διαπιστωθεί ότι τα φλαβονοειδή, ως αντιοξειδωτικά, μπορούν να παρεμποδίσουν την καρκινογένεση (De Stefani E. et al., 1999). Μερικά φλαβονοειδή, όπως η απιγενίνη, η λουτεολίνη και η φουσετίνη, έχουν χαρακτηριστεί ως πιθανοί παράγοντες που παρεμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (Fotsis T. et al., 1997), όπου σε *in vitro* πειράματα διαπιστώθηκε η αποτελεσματικότητά τους σε λευχαιμίες του μυελού (Larocca L.M. et al., 1990), σε καρκίνους του γαστρεντερικού συστήματος (Yoshida M. et al., 1990), σε καρκίνο των ωοθηκών (Scambia G. et al., 1990) και σε καρκίνο του προστάτη (Peterson G. et al., 1993). Η δράση αυτή φαίνεται να οφείλεται στην ανασταλτική δράση επί των τοποϊσομερασών I και II, ενζύμων που παίζουν πρωτεύοντα ρόλο στην αντιγραφή του DNA και γενικά στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Μάλιστα σε μια μεγάλη κλινική έρευνα αποδείχθηκε ότι υπάρχει μια αντιστρόφως ανάλογη σχέση μεταξύ της πρόσληψης φλαβονοειδών και της πιθανότητας ανάπτυξης καρκίνου των πνευμόνων (Knekt P. et al., 1997). Το φαινόμενο αυτό αποδόθηκε κυρίως στην κβερκετίνη, διότι αποτελούσε αναλογικά το 95% της συνολικής πρόσληψης φλαβονοειδών, ενώ μια άλλη έρευνα οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η κβερκετίνη και η απιγενίνη παρεμπόδισαν την ανάπτυξη μελανώματος και επηρέασαν τη δυναμική ενός άκρως επιθετικού και μεταστατικού τύπου καρκίνου (Caltagirone S. et al., 2000). Τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής έρχονται να προσδώσουν νέα δυναμική και προοπτικές γύρω από θεραπείες σχετικές με μεταστατικού τύπου καρκίνους. Μάλιστα, οι φλαβονόλες κβερκετίνη, καιμφερόλη και γκαλανγκίνη (galangin) καθώς και η φλαβόνη απιγενίνη προκαλούν την αναστολή ενζύμων του κυτοχρώματος P450 της οικογένειας CYP1A, τα οποία παίζουν σπουδαίο ρόλο στην ενεργοποίηση

ενός πλήθους 'ύποπτων' καρκινογόνων για τον ανθρώπινο οργανισμό, όπως οι πολυκυκλικοί υδρογονάνθρακες και οι ετεροκυκλικές αμίνες. Αξίζει να σημειωθεί ότι η κβερκετίνη με τη ναρινγκίνη προέκυψε ότι αναστέλλουν το CYP3A4, που θεωρείται το πιο διαδεδομένο P450-ένζυμο στο ήπαρ που μεταβολίζει έναν σημαντικό αριθμό φαρμακομορίων, αλλά και σχετίζεται και με την καρκινογένεση (Lautraite S. et al., 2002; Ciolino H.P. et al., 1999; Muto S. et al., 2001; Ho P.-C. et al., 2001).

Ακόμη εικάζεται ότι τα φλαβονοειδή δύνανται να παρεμποδίσουν και την αγγειογένεση (Fotsis T. et al., 1997). Σε φυσιολογικές συνθήκες η αγγειογένεση αποτελεί μια αυστηρά ελεγχόμενη διαδικασία του ανθρώπινου οργανισμού, η οποία ρυθμίζεται από μια πληθώρα ενδογενών αγγειογενών και αγγειοστατικών παραγόντων. Η διαδικασία αυτή ενεργοποιείται σε περιπτώσεις επούλωσης κάποιας πληγής, ενώ σε παθολογικές καταστάσεις η μη ελεγχόμενη αγγειογένεση οδηγεί σε καρκίνο (Fan T.-P.D. et al., 1995). Οι αναστολείς της αγγειογένεσης μπορούν να παρεμβληθούν σε διάφορα σημεία της διαδικασίας αυτής, όπως για παράδειγμα στον πολλαπλασιασμό και στη μεταφορά των κυττάρων του ενδοθηλίου. Μεταξύ αυτών των αναστολέων, τα φλαβονοειδή φαίνονται να παίζουν έναν πολύ σπουδαίο ρόλο, αν και ο μηχανισμός δράσης τους δεν είναι ακόμα απολύτως σαφής (Fotsis T. et al., 1997; Paper D.H., 1998). Ένας πιθανός μηχανισμός δράσης μπορεί να αποτελεί η αναστολή της δράσης των πρωτεϊνικών κινασών (Oikawa T. et al., 1992). Τα ένζυμα αυτά έχουν ενοχοποιηθεί διότι παίζουν σπουδαίο ρόλο στη γενετική μεταλλαγή σημάτων που εμπλέκονται με τη διαδικασία της αγγειογένεσης.

Αντιθρομβωτική δράση

Η συγκόλληση των αιμοπεταλίων μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης αλλά και στον απευθείας σχηματισμό αιμοπεταλιακού θρόμβου με φυσικό επακόλουθο την εμβολή στις αρτηρίες που έχουν υποστεί στένωση. Τα αιμοπετάλια που επικάθονται στο ενδοθήλιο των αγγείων παράγουν λιπιδικά υπεροξειδία και ελεύθερες ρίζες οξυγόνου. Ορισμένα φλαβονοειδή, όπως η κβερκετίνη, η καιμφερόλη και η μυρικετίνη, έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλουν τη συγκόλληση των αιμοπεταλίων σε μαϊμούδες και σε σκυλιά (Lou F. et al., 1989). Οι φλαβονόλες είναι ιδιαίτερες αντιθρομβωτικές διότι σαρώνουν τις ελεύθερες ρίζες, διατηρώντας σε φυσιολογικά επίπεδα την ενδοθηλιακή προστακυκλίνη και το

μονοξειδίο του αζώτου (Gryglewski R.J. et al., 1987). Μια μελέτη απέδειξε ότι τα φλαβονοειδή αποτελούν ισχυρούς αντιθρομβωτικούς παράγοντες *in vitro* και *in vivo* διότι παρεμποδίζουν τα μονοπάτια της κυκλοξυγενάσης και της φωσφολιπάσης (Alcaraz M.J. et al., 1987). Είναι γνωστό ότι το αραχιδονικό οξύ που απελευθερώνεται σε φλεγμονώδεις καταστάσεις, μεταβολίζεται από τα αιμοπετάλια, σχηματίζοντας προσταγλανδίνη, ενδοϋπεροξειδία και θρομβοξάνη A₂, οδηγώντας στην επακόλουθη συγκόλληση των αιμοπεταλίων (Tzeng S.-H. et al., 1991). Η κύρια επίδραση των φλαβονοειδών κατά της συγκόλλησης αυτής φαίνεται να είναι η αναστολή της σύνθεσης της θρομβοξάνης A₂ καθώς και το ότι επηρεάζουν το μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος. Μερικά φλαβονοειδή μάλιστα εμποδίζουν την κυκλοξυγενάση, μερικά την λιποξυγονάση και μερικά και τα δύο ένζυμα (Landolfi R. et al., 1984). Σε *in vitro* μελέτες αποδείχθηκε ότι τα φλαβονοειδή προσκολλώνται στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων και για το λόγο αυτό θεωρούνται ότι έχουν μια συσσωρευτική δράση με το πέρασμα του χρόνου (Van Wauwe J. et al., 1983). Ορισμένοι ερευνητές συνδέουν την αύξηση του αγγειακού τόνου που παρατηρήθηκε σε κλινικές μελέτες με πρόσληψη φλαβονοειδών, με την αναστολή της επαναπρόσληψης αμίνης, αφού τα φλαβονοειδή δρουν ως ανταγωνιστές των μεταφορέων αμίνης στο πλάσμα (Sher E. et al., 1992), ενώ η αγγειοδιασταλτική δράση τους οφείλεται στην αναστολή της πρωτεϊνικής κινάσης C.

Αντιική δράση

Έχει δημοσιευθεί ότι μερικοί ιοί επηρεάζονται από τα φλαβονοειδή, όπως για παράδειγμα ο απλός ερπητοϊός, ο πολυπύρηνος ιός συγκυτίου του αναπνευστικού συστήματος, ο ιός της παραϊνφλουέντζας και αδενοϊοί (Wang H.-K. et al., 1998). Μάλιστα έχει αναφερθεί ότι η κβερκετίνη και η εσπεριδίνη εμφανίζουν δράση και κατά της μόλυνσης που προκαλεί ο ιός, αλλά και κατά του πολλαπλασιασμού του, ενώ η ναριγγίνη που υπάρχει σε μεγάλη ποσότητα στο γκρέιπφρουτ, δεν έχει δράση (Kaul T.N. et al., 1985). Τα φλαβονοειδή μπορούν και παρεμβαίνουν σε διάφορα στάδια του κύκλου πολλαπλασιασμού των ιών, ενώ μερικά προσπαθούν να περιορίσουν την δυνατότητα μόλυνσής τους. Οι περισσότερες μελέτες που διενεργήθηκαν ήταν *in vitro*, ενώ πολύ λίγα στοιχεία υπάρχουν από κλινικές μελέτες. Πρέπει να σημειωθεί ότι από τις μελέτες αυτές φαίνεται να έχουν πιο αποτελεσματική

και ισχυρή αντιιική δράση όταν βρίσκονται γλυκοσυλιωμένοι, παρά με τη μορφή του αγλύκου τους (Bae E.-A. et al., 2000). Λόγω της παγκόσμιας εξάπλωσης του ιού HIV από τη δεκαετία του '80, οι μελέτες σχετικά με την αντιιική δράση των φλαβονοειδών επικεντρώθηκαν κυρίως έναντι του παραπάνω ιού. Πολλά φυσικά προϊόντα παρεμβαίνουν σε διάφορα στάδια του κύκλου πολλαπλασιασμού των ιών, αν και η πλειοψηφία των μελετών που έχουν γίνει, έδωσε ιδιαίτερη βαρύτητα στην αναστολή της δράσης της αντίστροφης μεταγραφάσης, και της DNA-πολυμεράσης (Ng T.B. et al., 1997). Όπως προαναφέρθηκε, οι περισσότερες μελέτες διενεργήθηκαν *in vitro* και για το λόγο αυτό δεν μπορούν ακόμη να βγουν ασφαλή συμπεράσματα σχετικά με τις επιπτώσεις των φλαβονοειδών στη θεραπευτική αγωγή ασθενών με τον ιό HIV (Vlietinck A.J. et al., 1998). Πάντως, είναι πιθανό ότι στη φύση θα υπάρχει κάποιο φλαβονοειδές που θα έχει τη σωστή δομή και τη φαρμακοκινητική δράση που θα το καθιστά ικανό αντιιικό παράγοντα και μάλιστα καλύτερο από τα ήδη υπάρχοντα συνθετικά φάρμακα.

Αντιοξειδωτική/προοξειδωτική δράση των φλαβονοειδών

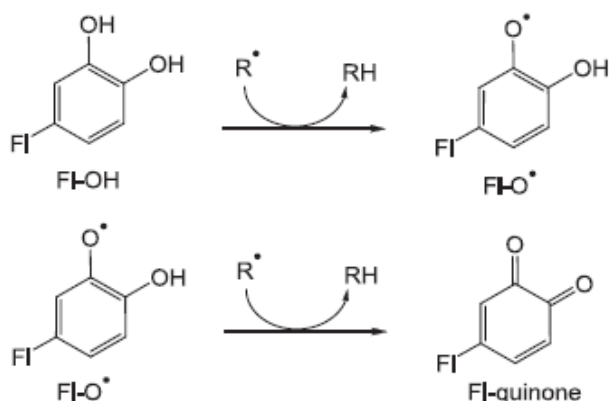
Τα φλαβονοειδή εμποδίζουν τις ελεύθερες ρίζες με τους παρακάτω μηχανισμούς:

- Απευθείας σάρωση των ενεργών μορφών οξυγόνου
- Ενεργοποίηση αντιοξειδωτικών ενζύμων (Nijveldt R.J. et al., 2001)
- Δημιουργία χηλικού συμπλόκου με μέταλλα (Ferrali M. et al., 1997)
- Μείωση των ριζών α-τοκοφερόλης (Hirano M. et al., 2001; Heim K.E. et al., 2002)
- Αναστολή οξειδασών (Heim K.E. et al., 2002; Cos P. et al., 1998)
- Μείωση του οξειδωτικού stress από νιτρικά οξείδια (van Acker S.A.B.E. et al., 1995)
- Αύξηση των επιπέδων του ουρικού οξέως (Lotito S.B. et al., 2006)
- Μετατροπή της αντιοξειδωτικής ικανότητας άλλων αντιοξειδωτικών μικρού μοριακού βάρους (Yeh S.-L. et al., 2005)

Απευθείας σάρωση των ενεργών μορφών οξυγόνου

Λόγω του χαμηλότερου οξειδοαναγωγικού δυναμικού μπορούν να αλληλεπιδρούν με ελεύθερες ρίζες και να παρεμποδίζουν τη λιπιδική υπεροξειδωση (Cos P. et al., 2001), μία από τις πλέον σημαντικές επιδράσεις των ελευθέρων ριζών που οδηγεί στην καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης και εν τέλει στον κυτταρικό θάνατο, δρώντας ως σαρωτές ελευθέρων ριζών (μηχανισμός 1 & 2).

Η μοριακή βάση του μηχανισμού 1 σχετίζεται με τη μεταφορά ατόμου υδρογόνου, ενώ ο μηχανισμός 2 με την απλή μεταφορά ηλεκτρονίου. Οι ρίζες καθίστανται ανενεργές σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση, όπου το R[·] είναι η ελεύθερη ρίζα και το FI-O[·] είναι η ρίζα φλαβονοειδούς, η οποία μπορεί να αντιδράσει και με μια επιπλέον ρίζα και να μετασχηματιστεί σε σταθερή δομή κινόνης (Pietta P.-G., 2000).



Στο μηχανισμό 1 το αντιοξειδωτικό, ArOH, αντιδρά με την ελεύθερη ρίζα, R, μεταφέροντας σε αυτήν ένα άτομο υδρογόνου με την ομολυτική σχάση του δεσμού O-H:



Τα προϊόντα της αντίδρασης είναι το αβλαβές RH και η ρίζα ArO[·]. Ακόμα και αν έχουμε τον σχηματισμό μιας νέας ρίζας, αυτή είναι λιγότερο ενεργή συγκριτικά με την R[·], διότι είναι πιο σταθερή.

Ο μηχανισμός 2 συνίσταται στη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου στη ρίζα R[·]:



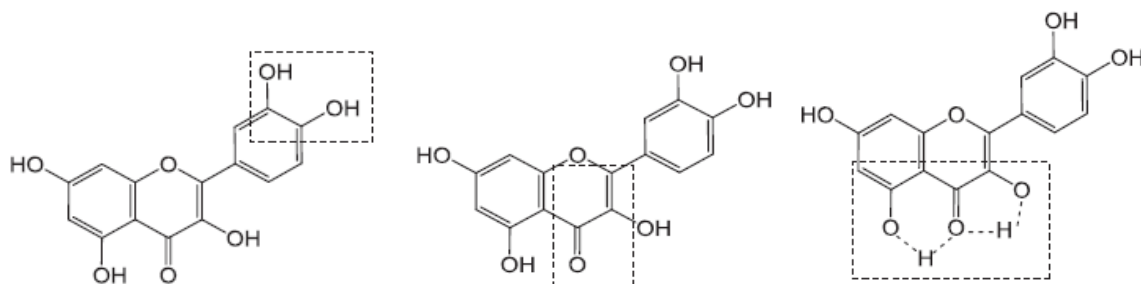
Το ανιόν R^- είναι ενεργειακά πιο σταθερό με άρτιο αριθμό ηλεκτρονίων, ενώ η κατιονική ρίζα $ArOH^+$ είναι λιγότερο ενεργή ρίζα.

Ειδικότερα, οι ArO^- και $ArOH^+$ είναι αρωματικές δομές στις οποίες το ηλεκτρόνιο που προήλθε από τις ελεύθερες ρίζες, μπορεί να κατανέμεται σε όλο το μόριο, καθιστώντας τη ρίζα πιο σταθερή (Leopoldini M. et al., 2004a; Leopoldini M. et al., 2004b; Leopoldini M. et al., 2004c; Wright J.S. et al., 2001). Στον μηχανισμό 1 η ενθαλπία σχάσης του φαινολικού δεσμού O-H είναι μια σημαντική παράμετρος της αντιοξειδωτικής δράσης. Όσο χαμηλότερη είναι η ενθαλπία σχάσης, τόσο ευκολότερη είναι η σχάση του φαινολικού δεσμού O-H και άρα η αντίδραση με τις ελεύθερες ρίζες. Στον μηχανισμό 2 το δυναμικό ιονισμού είναι η πιο σημαντική παράμετρος της ικανότητας σάρωσης ελευθέρων ριζών. Όσο πιο χαμηλό είναι το δυναμικό αυτό, τόσο πιο εύκολη είναι η απομάκρυνση του ηλεκτρονίου και η αντίδραση με τις ελεύθερες ρίζες.

Η δομή και ο αριθμός των υδροξυλίων επηρεάζουν τον μηχανισμό της αντιοξειδωτικής δράσης (Heim K.E. et al., 2002). Η δομή του Β δακτυλίου φέρεται να έχει τη μεγαλύτερη επίδραση στο συγκεκριμένο μηχανισμό (Burda S. et al., 2001), ενώ οι υποκαταστάτες των δακτυλίων Α και C έχουν μικρή επιρροή σε αυτόν (Taubert D. et al., 2003; Amic D. et al., 2007). Η *in vitro* αντιοξειδωτική δράση μπορεί να αυξηθεί με τον πολυμερισμό φλαβονοειδών μονομερών, με τα πολυμερή της κατεχίνης να είναι εξαιρετικά *in vitro* αντιοξειδωτικά εξαιτίας του μεγάλου αριθμού των υδροξυλίων στο μόριό τους (Lotito S.B. et al., 2000), ενώ μειώνεται με τη γλυκοσιλίωση σε σχέση με τα άγλυκά τους (Rice Evans C.A. et al., 1996; Amic D. et al., 2010; Cavia Saiz M. et al., 2010; Kahkonen M.P. et al., 2003; Mishra B. et al., 2003).

Συμπερασματικά η αντιοξειδωτική δράση των φλαβονοειδών βελτιώνεται από την ύπαρξη υδροξυλίων στον Β δακτύλιο και από την ύπαρξη διπλού δεσμού μεταξύ του άνθρακα 2 και 3 του C δακτυλίου, ενώ το υδροξύλιο στην 7 θέση του Α δακτυλίου δεν φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά την αντιοξειδωτική δράση. Αυτή ακριβώς η γενική δομή κατεχίνης στο Β δακτύλιο καθώς και η ύπαρξη υδροξυλίου στη θέση 3 του C δακτυλίου, φαίνονται να βελτιώνουν την αντιοξειδωτική ικανότητα του φλαβονοειδούς (Ohkatsu Y. et al., 2010), προσφέροντας μεγαλύτερη σταθερότητα στη σύνδεσή τους με τις ελεύθερες ρίζες αλλά και συμμετέχοντας στη

μεταφορά των ηλεκτρονίων στο επίπεδο του Β δακτυλίου. Ακόμη, η ταυτόχρονη συνύπαρξη και του 3 και του 5 υδροξυλίου, μεγιστοποιεί την ικανότητα του φλαβονοειδούς να δρα ως σαρωτής ελευθέρων ριζών.



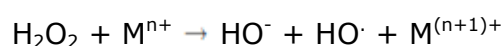
Ενεργοποίηση αντιοξειδωτικών ενζύμων

Τα φλαβονοειδή μπορούν να προάγουν τη σύνθεση ενζύμων της φάσης II που δρουν και ως αντιοξειδωτικά (πχ NAD(P)H-αναγωγή της κινόνης, S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης, UDP-γλυκουρονοσυλο-τρανσφεράση) και τα οποία είναι τα κύρια ένζυμα άμυνας κατά του οξειδωτικού stress. Η ρύθμιση της έκφρασης των κατάλληλων γονιδίων επιτυγχάνεται μέσω ενός ηλεκτρονιόφιλου στοιχείου απόκρισης, το οποίο είναι η ρυθμιστική αλληλουχία γονιδίων που κωδικοποιούν την έκφραση των ενζύμων της φάσης II (Zhu M. et al., 2001; Nerland D.E., 2007). Ωστόσο έχουν σημειωθεί και κάποιες αντιφατικές παρατηρήσεις σε αυτό το πεδίο, όπως για παράδειγμα ότι η δράση της S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης ενισχύθηκε σημαντικά από την απιγενίνη, τη γενιστεΐνη και την τανγκερετίνη σε καρδιά επίμοος, αλλά όχι στο κόλον και στο ήπαρ, καθώς και το ότι στα ερυθροκύτταρα η δράση των ενζύμων υπεροξειδίου της καταλάσης, αναγωγή της γλουταθειόνης και υπεροξειδάση της γλουταθειόνης μειώθηκε σημαντικά από τα φλαβονοειδή κβερκετίνη, γενιστεΐνη και χρυσίνη, ενώ για το υπεροξειδίου της δισμουτάσης η δράση του μειώθηκε μόνο από τη γενιστεΐνη (Breinholt V. et al., 1999).

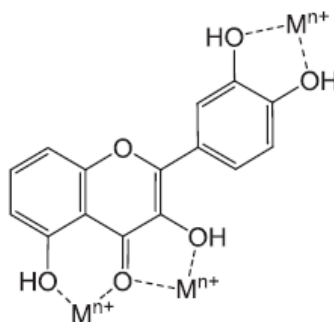
Δημιουργία χηλικού συμπλόκου με μέταλλα

Ο μηχανισμός αυτός έγκειται στη δυνατότητα που έχουν τα φλαβονοειδή να παγιδεύουν μέταλλα πχ. σίδηρο και χαλκό, δημιουργώντας με αυτά σταθερά

προϊόντα και παράλληλα παρεμποδίζοντάς τα να συμμετέχουν σε αντιδράσεις που θα δημιουργούσαν ελεύθερες ρίζες (Brown J.E. et al., 1998; van Acker S.A.B.E. et al., 1996). Μερικά μέταλλα αντιδρούν μέσω των αντιδράσεων Fenton με υπεροξειδία του υδρογόνου, από τα οποία σχηματίζονται οι άκρως επικίνδυνες ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS) OH· :



Οι δομικές περιοχές του μορίου που συμβάλουν στη δράση αυτή είναι η δομή κατεχόλης του δακτυλίου B, το υδροξύλιο της θέσης 3 και η 4-οξο-ομάδα του ετεροκυκλικού δακτυλίου C, και η 4-οξο-ομάδα με το υδροξύλιο της 5 θέσης.



Η δομή κατεχόλης του δακτυλίου B αποτελεί τον μεγαλύτερο καθοριστικό παράγοντα δέσμευσης με τη μορφή συμπλόκου για το χαλκό (Brown J.E. et al., 1998) και η κβερκετίνη είναι γνωστή για την ικανότητά της να δεσμεύει το σίδηρο. Η κβερκετίνη και η μορίνη αποδείχθηκε ότι δημιουργούν σύμπλοκο με το κάδμιο (Cd II) και επέδειξαν ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα σε *in vitro* μελέτες, με θειώδη υδατοδιαλυτά τους παράγωγα, τα οποία μπορούν να αποτελέσουν πιθανά αντίδοτα χαμηλής τοξικότητας σε δηλητηριάσεις από κάδμιο (Koracz M. et al., 2003; Szelag A. et al., 2003; Chlebda E. et al., 2010).

Μείωση των ριζών α-τοκοφερόλης

Η α-τοκοφερόλη αντιπροσωπεύει το κύριο αντιοξειδωτικό στις κυτταρικές μεμβράνες και στις λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας (LDL), διότι τις προστατεύουν από καταστροφή λόγω οξειδωτικών φαινομένων. Τα φλαβονοειδή προτάθηκε ότι δρουν ως δότες υδρογόνου στις ρίζες α-τοκοφερρυλίου που αποτελούν πιθανό προοξειδωτικό παράγοντα (Hirano M. et al., 2001). Επιπλέον, με

την αλληλεπίδραση με τις ρίζες αυτές καθυστερούν και την οξειδωση των LDLs. Φλαβονοειδή (καιμφερόλη, μορίνη, μυρικετίνη και κβερκετίνη) επέδειξαν προστατευτική δράση έναντι της μείωσης των αποθεμάτων της α-τοκοφερόλης στις LDLs, με την κβερκετίνη και τη μορίνη να είναι λιγότερο αποτελεσματικές (Zhu Q.Y. et al., 2000).

Αναστολή οξειδασών

Τα φλαβονοειδή παρεμποδίζουν τη δράση ενζύμων που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή υπεροξειδίων ($O_2^{\cdot-}$), όπως η οξειδάση της ξανθίνης (Hanasaki Y. et al., 1994) και η πρωτεϊνική κινάση C (Ursini F. et al., 1994). Η οξειδάση της ξανθίνης που εμφανίζεται σε καταστάσεις ισχαιμίας, είναι ο τύπος του ενζύμου δεϋδρογονάση της ξανθίνης που υπάρχει σε φυσιολογικές συνθήκες. Και τα δύο ένζυμα σχετίζονται με το μεταβολισμό της ξανθίνης σε ουρικό οξύ. Ωστόσο σε καταστάσεις ισχαιμίας η οξειδάση της ξανθίνης αντιδρά με το μοριακό οξυγόνο απελευθερώνοντας ελεύθερες ρίζες υπεροξειδίου. Τουλάχιστον δύο φλαβονοειδή, η κβερκετίνη και η σιλιβίνη εμποδίζουν τη δράση της οξειδάσης της ξανθίνης (Nijveldt R.J. et al., 2001; Shoskes D.A, 1998; Chang W.-S. et al., 1993; Iio M. et al., 1986), με την λουτεολίνη να αποτελεί τον πιο ισχυρό αναστολέα της δράσης της, όπως προέκυψε ύστερα από μελέτες δομής-δράσης (Cos P. et al., 1998).

Φλαβονοειδή εμφάνισαν δράση κατά της κυκλοοξυγενάσης, της λιποξυγονάσης και της οξειδάσης του NADH (Brown J.E. et al., 1998; Korkina L.G. et al., 1997). Η αναστολή της πρωτεϊνικής κινάσης C φαίνεται να σχετίζεται με την αναστολή της οξειδάσης του NADPH από την κβερκετίνη (Ursini F. et al., 1994). Πιθανοί αναστολείς της πρωτεϊνικής κινάσης C (πχ. φυσετίνη, κβερκετίνη, λουτεολίνη) θα πρέπει να διαθέτουν δομή φλαβόνης με ελεύθερα υδροξύλια στις θέσεις 3', 4' και 7 (Ferriola P.C. et al., 1989).

Μείωση του οξειδωτικού stress από νιτρικά οξείδια

Το μονοξειδίο του αζώτου (NO) που παράγεται από κύτταρα διαφόρων ειδών, μεταξύ των οποίων τα μακροφάγα και τα κύτταρα του ενδοθηλίου, είναι σημαντικό για τη διαστολή των αγγείων, αλλά σε υψηλή συγκέντρωση μπορεί να οδηγήσει σε οξειδωτικές καταστάσεις (Shutenko Z. et al., 1999; Huk I. et al., 1998). Το NO

παράγεται από την οξειδωση της L-αργινίνης με τη βοήθεια συνθασών του NO (NOS). Ο τρόπος με τον οποίο τα φλαβονοειδή παρεμβαίνουν στην υπερπαραγωγή NO και τη δράση των NOS, δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί, ωστόσο υποστηρίζεται ότι είτε λειτουργούν με τη συνήθη αντιοξειδωτική τους δράση ως σαρωτές ελευθέρων ριζών (van Acker S.A.B.E. et al., 1995), είτε ως μόρια-σήματα που εμποδίζουν την υπερέκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν τις συνθάσες των NO. Τα οξειδία του αζώτου σχηματίζουν σε συνδυασμό με τις ελεύθερες ρίζες υπεροξειδίου, το πολύ βλαβερό ανιόν ONOO⁻ που οξειδώνει λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας (LDLs) με επακόλουθο την καταστροφή του κυττάρου. Οι δομικές απαιτήσεις των φλαβονοειδών για αυτή τους τη δράση είναι η παρουσία διπλού δεσμού μεταξύ C2-C3, η 4-κετο-ομάδα και υδροξύλια στις θέσεις 3, 5 και 4'. Η δράση τους μάλιστα αυξάνεται με τη μεθυλίωση των άνω υδροξυλίων, ενώ μειώνεται με τη γλυκοσυλίωση. Επομένως η απιγενίνη, η διοσμετίνη και η λουτεολίνη αποτελούν τις πλέον κατάλληλες φλαβόνες για αυτόν τον μηχανισμό, με τη σιλιβίνη να έχει αναφερθεί ότι εμποδίζει τη δράση του μονοξειδίου του αζώτου με δράση ανάλογη της δόσης (Matsuda H. et al., 2003; Olszanecki R. et al., 2002; Kim H.K. et al., 1999; Byung H.K. et al., 2005; Dehmlow C. et al., 1996).

Αύξηση των επιπέδων του ουρικού οξέως

Σύμφωνα με μια μελέτη, η σημαντική αύξηση του αντιοξειδωτικού δυναμικού που εμφανίζεται στο πλάσμα του αίματος έπειτα από την κατανάλωση τροφών πλούσιων σε φλαβονοειδή δεν αποδίδεται στα φλαβονοειδή τα ίδια, αλλά στην αύξηση των επιπέδων του ουρικού οξέος που παρατηρείται και είναι ένας από τους κύριους παράγοντες που καθορίζουν το αντιοξειδωτικό δυναμικό του πλάσματος (Lotito S.B. et al., 2006). Ο μηχανισμός ωστόσο που επιτυγχάνεται αυτό παραμένει ασαφής και με το γεγονός ότι αυξημένα επίπεδα εστέρων ουρικού οξέος κρίνονται ότι ενδεχομένως συμβάλλουν στην εμφάνιση ορισμένων ασθενειών, το αντιοξειδωτικό κέρδος κρίνεται μάλλον ασύμφορο σε αυτήν την περίπτωση.

Μετατροπή της προοξειδωτικής ικανότητας άλλων αντιοξειδωτικών μικρού μοριακού βάρους

Πολλοί ερευνητές περιέγραψαν την προοξειδωτική ικανότητα του β-καροτενίου κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες (ακτινοβόληση με UVA) και πρότειναν ότι η συνύπαρξή του με ένα αντιοξειδωτικό ενδεχομένως να εξαλείφει τη δράση αυτή (Obermuller-Jevic U.C. et al., 1999; Offord E.A. et al., 2002). Σε μια μελέτη παρουσιάστηκαν τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την αλληλεπίδραση του β-καροτενίου με τη ναριγγίνη, τη ρουτίνη και τη κβερκετίνη, σχετικά με τις βλάβες που προκαλούνται στο DNA, έπειτα από την ακτινοβόληση με UVA σε εμβρυικά κύτταρα συνεκτικού ιστού επίμυος. Όταν το κάθε φλαβονοειδές ξεχωριστά συνδυαζόταν με το β-καροτένιο, η προκαλούμενη από το UVA βλάβη στο DNA περιοριζόταν σημαντικά με αυξανόμενη επίδραση κατά τη σειρά κβερκετίνη, ρουτίνη, ναριγγίνη, αποδεικνύοντας με αυτόν τον τρόπο ότι τα φλαβονοειδή αυτά 'αυξάνουν' τα επίπεδα ασφαλείας από το β-καροτένιο (Yeh S.-L. et al., 2005).

Ως προοξειδωτικά

Πολλές δημοσιεύσεις συσχετίζουν την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των ενώσεων με τη μέτρηση του αναγωγικού 'δυναμικού' τους, καθώς και με την συγκέντρωσή τους. Μεταξύ αυτών, οι Simic και συνεργάτες (Simic A. et al., 2007; Kokkalou E., 2010) που ερεύνησαν την αντιοξειδωτική/προοξειδωτική συμπεριφορά σε έναν αριθμό φυσικών φαινολικών ενώσεων. Από αυτή τη μελέτη προέκυψε ότι ενώσεις με χαμηλό 'οξειδωτικό' δυναμικό (E_{pa} μικρότερο του 0.45) εμφάνισαν αντιοξειδωτική δράση, ενώ ενώσεις με υψηλές τιμές E_{pa} (>0.45) έδρασαν ως προοξειδωτικά.

Ενώσεις	Τιμές Fra	Λιπιδική Υπεροξειδωση (% αναστολή)*
Σαλικυλικό οξύ	0.94	-12.1±1.8
<i>m</i> -υδροξυ-βενζοϊκό οξύ	0.83	+10.1±3.0
<i>p</i> -υδροξυ-βενζοϊκό οξύ	0.87	-11.4±2.0
Πρωτοκατεχικό οξύ	0.41	+15.5±0.3
Βανιλλικό οξύ	0.73	-12.5±1.1
Συριγγικό οξύ	0.49	-5.4±1.1
<i>o</i> -κουμαρικό οξύ	0.75	-13.0±1.0
<i>m</i> -κουμαρικό οξύ	0.78	-10.6±1.1
<i>p</i> -κουμαρικό οξύ	0.67	-23.3±3.1
Καφεϊκό οξύ	0.45	+11.2±2.2
Κβερκετίνη	0.10	+67.8±2.0
Ρουτίνη	0.23	+10.0±3.6

*τιμές με την ένδειξη(-) αντιστοιχούν σε % προοξειδωτική δράση

Από τον παραπάνω πίνακα τιμών προκύπτει ότι από τις δώδεκα εξεταζόμενες ενώσεις, μόνο οι τέσσερις εμφάνισαν αντιοξειδωτική δράση στις πειραματικές συνθήκες που ακολουθήθηκαν, ενώ όλες οι υπόλοιπες έδρασαν ως προοξειδωτικά.

Τα φλαβονοειδή, παρόλο που καλούνται αντιοξειδωτικά, μπορούν να δράσουν κάτω από ορισμένες συνθήκες ως προοξειδωτικά και επομένως να συμβάλλουν στην οξείδωση άλλων στοιχείων. Η προοξειδωτική δράση εμφανίζει μια συσχέτιση, αναλογική με τον αριθμό των υδροξυλίων του φλαβονοειδούς (Cao G. et al., 1997). Μονο- και δι-υδροξυφλαβονοειδή δεν εμφάνισαν προοξειδωτική δράση, ενώ η ύπαρξη πολλαπλών υδροξυλίων, ιδιαίτερα στο δακτύλιο B αύξησε την παραγωγή ριζών υδροξυλίου μέσω αντιδράσεων Fenton (Heim K.E. et al., 2002; Hanasaki Y. et al., 1994). Υπάρχουν και ενδείξεις ότι ο διπλός δεσμός μεταξύ C2 και C3 καθώς και η 4-κετο-ομάδα στις φλαβόνες, συμβάλλουν στη σύνθεση ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) παρουσία δισθενούς χαλκού και οξυγόνου (Sun C. et al., 2010). Μάλιστα η προοξειδωτική δράση των φλαβονοειδών φαίνεται να είναι δοσοεξαρτώμενη γιατί, ενώ σε χαμηλές συγκεντρώσεις υπάρχει μια γραμμική συσχέτιση μεταξύ δόσεως και αντιοξειδωτικού αποτελέσματος, σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις υπάρχουν αποκλίσεις από τη γραμμική συσχέτιση. Δηλαδή, η αντιοξειδωτική «αποτελεσματικότητα» μειώνεται με την χορήγηση μεγαλύτερων «αντιοξειδωτικών»

συγκεντρώσεων. Ειδικότερα, η δράση ορισμένων φαινολικών αντιοξειδωτικών δεν αυξάνει γραμμικά με την αύξηση της συγκέντρωσης, αλλά σε αρκετά μεγάλες συγκεντρώσεις αυτά οξειδώνονται και δρουν σαν προοξειδωτικοί παράγοντες με ακριβώς αντίθετα αποτελέσματα. Μάλιστα, σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε προέκυψε ότι η παραγωγή υπεροξειδικών ανιόντων και παραγώγων της λιπιδικής υπεροξειδωσης αυξάνεται, όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της ναριγγίνης, εσπεριτίνης, ναριγγενίνης και μορίνης, με την κβερκετίνη να εμφανίζει την πιο σημαντική προοξειδωτική δράση (Yen G.-C. et al., 2003).

Τα τελικά προϊόντα της παγίδευσης των ROS από τα φλαβονοειδή είναι ρίζες φλαβονοειδών (FI-O[•]) και μπορούν να υποστούν περαιτέρω οξείδωση, δίνοντας μεταξύ άλλων και τις σταθερές κινόνες των φλαβονοειδών. Αυτές μπορούν να 'σταθεροποιηθούν' περαιτέρω μέσω της σύζευξής τους με πυρηνόφιλα, όπως η γλουταθειόνη, η κυστεΐνη και νουκλεϊκά οξέα (Hernandez I. et al., 2009; Bayrakceken F. et al., 2003; Awad H.M. et al., 2002; Torres J.L. et al., 2005; Kanakis C.D. et al., 2005). Αυτή ακριβώς η αντίδραση είναι υπεύθυνη για τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των φλαβονοειδών (Pietta P.-G., 2000; McCord J.M. et al., 1995). Οι προοξειδωτικές ιδιότητες της ναριγγενίνης, ναριγγίνης και απιγενίνης αποδόθηκαν μέσω μιας έρευνας, στο γεγονός ότι όταν βρίσκονται ως ρίζες μπορούν να οξειδώσουν το NADH με επακόλουθο αποτέλεσμα την εκτεταμένη λήψη οξυγόνου και τη σύνθεση O₂⁻ (Galati G. et al., 1999; Chan T. et al., 1999; Galati G. et al., 2002). Μία ακόμη αντίδραση που σχετίζεται με τις ανεπιθύμητες αντιοξειδωτικές ιδιότητες των φλαβονοειδών είναι η αλληλεπίδραση των ριζών των φλαβονοειδών (FI-O[•]) με οξυγόνο, παρουσία υψηλών επιπέδων μεταβατικών μετάλλων, με αποτέλεσμα τη δημιουργία κινονών και O₂⁻ (Pietta P.-G., 2000; Amic D. et al., 2001). Μια άλλη πηγή ριζών φλαβονοειδών θα μπορούσε να είναι και η αυτοοξείδωση. Σε έρευνα που διενεργήθηκε (Canada A.T. et al., 1990), προέκυψε ότι το ποσοστό της αυτοοξείδωσης για την κβερκετίνη και τη μυρικετίνη συσχετίζεται άμεσα με το pH, όπου σε φυσιολογικές τιμές pH δεν ανιχνεύθηκε αυτοοξείδωση, ενώ με την προσθήκη σιδήρου ή και με την επιπλέον προσθήκη υπεροξειδίου της δισμουτάσης, η αυτοοξείδωση αυξήθηκε. Μάλιστα παρατηρήθηκε και αυτοοξείδωση της κβερκετίνης με παράλληλη ραγδαία συσσώρευση H₂O₂ παρουσία ιόντων χαλκού

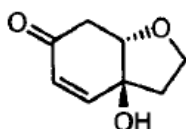
σε ουδέτερο pH (Hajji H.E. et al., 2006). Αντιθέτως, ούτε η καιμφερόλη, ούτε η ρουτίνη εμφάνισαν κάποια ιδιότητα αυτοοξειδωσης.

Τέλος, εναλλακτικοί μηχανισμοί της προοξειδωτικής ικανότητας των φλαβονοειδών μπορούν να περιλαμβάνουν την πληθώρα των υπεροξειδασών που συμμετέχουν στην οξείδωση των πολυφαινολών, καθώς και το ότι υπάρχουν φλαβονοειδή που επηρεάζουν αρνητικά την απορρόφηση αντιοξειδωτικών μικρού μοριακού βάρους, πχ η απορρόφηση της λουτεολίνης επηρεάζεται αρνητικά από τη ναριγγενίνη (Reboul E. et al., 2007).

ΚΥΚΛΟΞΥΛΑΙΘΑΝΟΕΙΔΗ

Κυκλοεξυλαιθανοειδή

Ο όρος κυκλοεξυλαιθανοειδή άρχισε να εμφανίζεται και να συνιστά ξεχωριστή κατηγορία χημικών δομών, με την απομόνωση της πλέον χαρακτηριστικής ένωσης αυτής της ομάδας, την ρενγκουλόνη.

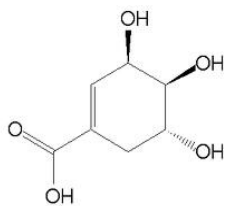


Ρενγκουλόνη

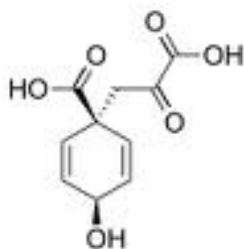
Η βενζοφουρανόνη ρενγκουλόνη απομονώθηκε ταυτόχρονα από δύο ερευνητικές ομάδες το 1984. Οι Endo και συνεργάτες (Endo K. et al., 1984) ονόμασαν την ουσία ρενγκουλόνη διότι απομονώθηκε από τους καρπούς του φυτού *Forsythia suspensa* που κατονομάζεται 'rengyo' στην ανατολίτικη λαϊκή θεραπευτική και χρησιμοποιείται για τις αντιφλεγμονώδεις, διουρητικές και αντιβακτηριακές ιδιότητες που της προσδίδουν. Σχεδόν ταυτόχρονα Ιταλοί ερευνητές (Messana I. et al., 1984) απομόνωσαν την ίδια ουσία, την οποία ονόμασαν χαλεριντόνη από τα φύλλα του φυτού *Halleria lucida*, ένα φυτό με 'μαγικές' ιδιότητες που χρησιμοποιείται στη λαϊκή θεραπευτική χωρών της νότιας Αφρικής. Στη διεθνή βιβλιογραφία επικράτησε η ονομασία ρενγκουλόνη, η οποία απομονώθηκε στη συνέχεια και από άλλα φυτά (Llera L.D. et al., 1984; Kuwajima H. et al., 1993; Hase T. et al., 1995; Limiroli R. et al., 1996). Επιπροσθέτως, σε μια ακόμη δημοσίευση από ερευνητική ομάδα της Κίνας εμφανίζεται μια απομονωμένη ένωση που έχει ταυτόσημη δομή με την ρενγκουλόνη και παρόμοια στερεοχημεία με αυτήν. Η ουσία αυτή που απομονώνεται από το *Clerodendrum indicum*, ονομάζεται κλεροϊντισίνη F και φαίνεται να διαφέρει από τη ρενγκουλόνη μόνο στο ότι αυτή είναι οπτικά ενεργή ένωση (Tian J. et al., 1997).

Η παρουσία κυκλοεξυλαιθανοειδών, όπως οι κυκλοεξανόνες, σε φυτά διαφόρων οικογενειών (Cornaceae, Scrophulariaceae, Bignoniaceae, Compositae) υποδηλώνει ότι οι ενώσεις αυτές, ενδεχομένως, να μην αποτελούν εξειδικευμένους δευτερογενείς

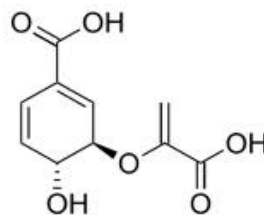
μεταβολίτες, αλλά στοιχεία πρωτογενούς μεταβολισμού που συνδέονται με το μονοπάτι του σικιμικού-πρεφενικού-χορισμικού οξέος, λόγω και της δομικής ομοιότητάς τους με το πρεφαινικό οξύ (Messana I. et al., 1984).



Σικιμικό οξύ

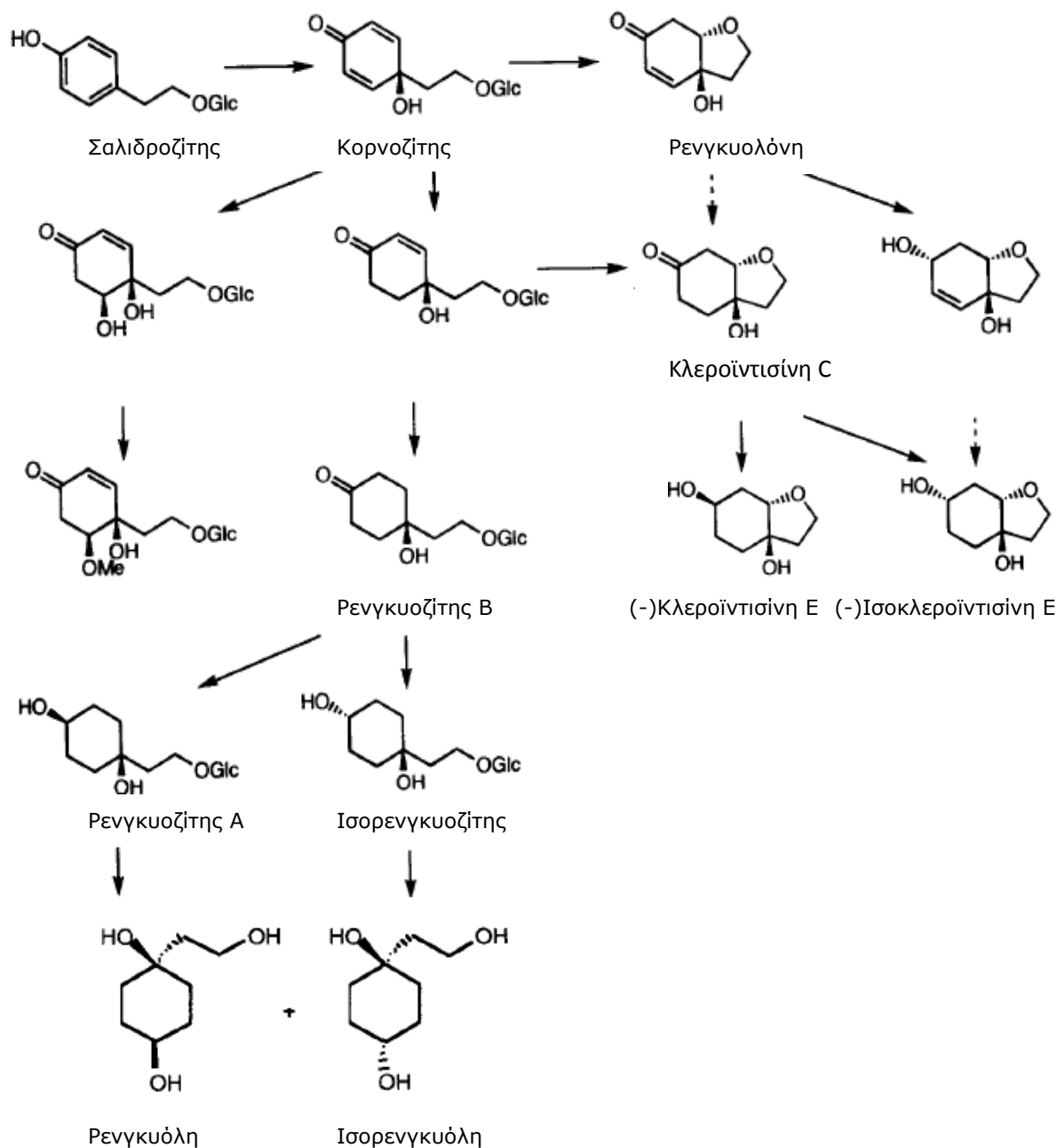


Πρεφαινικό οξύ



Χορισμικό οξύ

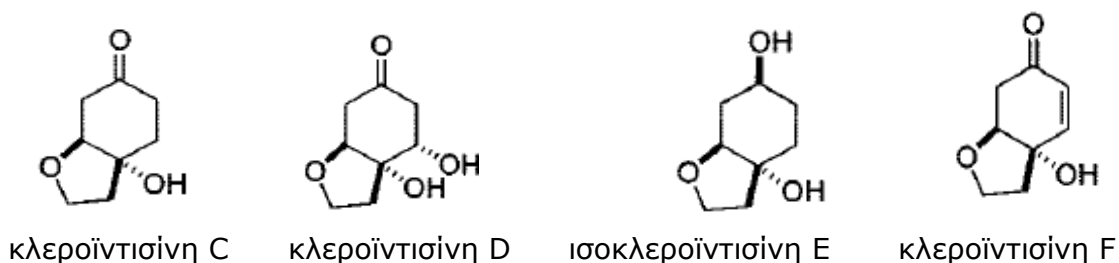
Η βιβλιογραφία είναι περιορισμένη είτε διότι οι ενώσεις της κατηγορίας αυτής θεωρούνται όχι και τόσο συνηθισμένα φυσικά προϊόντα, είτε διότι μερικοί τα ενσωματώνουν σε ευρύτερες κατηγορίες χημικών ενώσεων, όπως για παράδειγμα παράγωγα φαινυλοπροπανοειδών ή φαινυλαιθανοειδών γλυκοζιτών, είτε ως παράγωγα 4-υδροξυ-κυκλοεξανονών. Τα ασυνήθιστα λοιπόν κυκλοεξυλαιθανοειδή πιθανότατα προέρχονται από τα φαινυλοπροπανοειδή μέσω του μεταβολικού βιοσυνθετικού μονοπατιού του σικιμικού οξέως, με πρόδρομες ουσίες το σαλιδροζίτη και τον κορνοζίτη (Endo K. et al., 1984; Sheya K. et al., 1989; Endo K. et al., 1989; Hase T. et al., 1995).



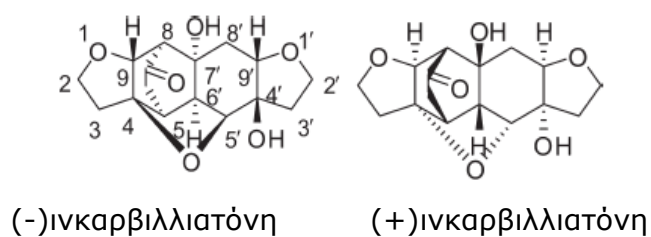
Πιθανό βιοσυνθετικό μονοπάτι κυκλοεξυλαιθανοειδών (Hase D. et al., 1995)

Σύμφωνα με τα μέχρι τώρα πειραματικά αποτελέσματα, ορισμένα κυκλοεξυλαιθανοειδή φαίνονται να έχουν δράση κατά ορισμένων τύπων καρκίνου. Μεταξύ αυτών η ρενγκουολώνη για την οποία έχουν κατοχυρωθεί τρεις ιαπωνικές πατέντες προς ανάπτυξη φαρμακευτικών σκευασμάτων που στηρίζονται στις

αντικαρκινικές ιδιότητες της ίδιας, καθώς και των εστέρων αυτής (Nishino C. et al., 1989a; Nishino C. et al., 1989b; Nagakura A. et al., 1990), ισχυρισμός που ενισχύεται από το γεγονός ότι εμφανίστηκε να έχει δράση κατά λευχαιμικών σειρών κυττάρων (Nishino C. et al., 1988). Ένα ακόμη τέτοιο κυκλοεξυλαιθανοειδές, αποτελεί και η κλεροϊντισίνη C που απομονώθηκε από το φυτό *Clerodendrum indicum* και η οποία εμφανίζει σημαντική αντικαρκινική δράση, προσελκύοντας το ενδιαφέρον για τη χημική σύνθεση της ίδιας και παραγώγων της (Chen J. et al., 2001; Wenderski T.A. et al., 2009).



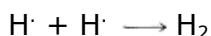
Σε πρόσφατες μελέτες απομονώθηκαν κυκλοεξυλαιθανοειδή με πιθανή αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση, όπως τα εναντιομερή (+) και (-) ινκαρβιλιατόνη από το φυτό *Incarvillea younghusbandii*, η οποία αποδείχθηκε ότι αναστέλλει την παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (NO) από τα μακροφάγα (Gao Y.-P. et al., 2012).



ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ

Ελεύθερες Ρίζες

Τα ηλεκτρόνια στα άτομα και στα μόρια καταλαμβάνουν συγκεκριμένες περιοχές καθώς κινούνται, οι οποίες ονομάζονται τροχιακά. Σε κάθε τροχιακό μπορούν να βρίσκονται έως και δύο ηλεκτρόνια. Για παράδειγμα τα δύο ηλεκτρόνια που σχηματίζουν έναν ομοιοπολικό δεσμό καταλαμβάνουν το ίδιο-μοριακό-τροχιακό, αλλά με διαφορετική μαγνητική ροπή. Στις περισσότερες οργανικές ενώσεις, η ύπαρξη των ηλεκτρονίων σθένους κατά ζεύγη επιτρέπει στις μαγνητικές ροπές τους να έχουν αντίθετη κατεύθυνση και έτσι να μην αλληλεπιδρούν με το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο. Όμως, μερικές οργανικές ενώσεις έχουν διαφορετική δομή ώστε να ανήκουν σε ομάδα ενώσεων που χαρακτηρίζονται σαν "ελεύθερες ρίζες", ενώσεις που υφίστανται ανεξάρτητες, και που στο μόριό τους υπάρχει ένα ή περισσότερα "ασύζευκτα ηλεκτρόνια". Το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο καταλαμβάνει μόνο του ένα ατομικό ή μοριακό τροχιακό. Η παρουσία του αδέσμευτου ηλεκτρονίου επιτρέπει στις ελεύθερες ρίζες να έλκονται από μαγνητικά πεδία και αυτό τις καθιστά τις περισσότερες φορές έντονα δραστικές. Εάν δύο ρίζες βρεθούν μαζί, συνδέουν τα ασύζευκτα ηλεκτρόνιά τους προς σχηματισμό ομοιοπολικού δεσμού. Η απλούστερη ελεύθερη ρίζα που συναντάται είτε σε χημικό είτε σε βιολογικό περιβάλλον είναι αυτή του ατομικού υδρογόνου ($\cdot\text{H}$), που έχει μόνο ένα αδέσμευτο ηλεκτρόνιο και που με μεγάλη ευκολία συνδέεται με ένα όμοιο του για να συντεθεί το διατομικό μόριο του υδρογόνου.



Οι ρίζες σχηματίζονται είτε με την απώλεια ενός ηλεκτρονίου ($\text{X} \longrightarrow \text{e}^- + \text{X}^+$), είτε με την πρόσληψη ενός ηλεκτρονίου ($\text{Y} + \text{e}^- \longrightarrow \text{Y}^-$). Οι παραγόμενες ελεύθερες ρίζες έχουν γενικά εξαιρετικά μικρή διάρκεια ζωής, π.χ. 10^{-3} sec και καταλήγουν είτε σε διμερή, είτε αντιδρούν με διαφορετικές ρίζες, είτε αρχίζουν ή συμμετέχουν σε αυτοσυντηρούμενες αλυσιδωτές αντιδράσεις. Λίγες μόνο από αυτές είναι σταθερότερες και διαρκούν μακρό χρόνο σε θερμοκρασία δωματίου. Ακόμα

υπάρχουν "ελεύθερες ρίζες-ιόντα", δηλαδή ελεύθερες ρίζες που ταυτόχρονα έχουν θετικό ή αρνητικό φορτίο.

Τις τελευταίες δυο δεκαετίες έχει υπάρξει ένα αυξημένο ενδιαφέρον σχετικά με τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, γνωστές και ως ROS (Reactive Oxygen Species). Οι ROS δημιουργούνται μέσω ακτινοβόλησης με υπεριώδη ακτινοβολία, με ακτίνες Χ και Γάμμα, και είναι προϊόντα αντιδράσεων που συμμετέχουν μέταλλα. Επιπροσθέτως, παράγονται από ουδετερόφιλα και μακροφάγα κατά τη φλεγμονή, είναι παραπροϊόντα αντιδράσεων μεταφοράς ηλεκτρονίων από τα μιτοχόνδρια, και θεωρούνται ως στοιχεία που μολύνουν την ατμόσφαιρα (Cadenas E., 1989). Όταν για παράδειγμα ακτινοβοληθεί ένας ιστός με ακτίνες γάμμα, το μεγαλύτερο μέρος της ενέργειας απορροφάται από το νερό που υπάρχει στα κύτταρα και αυτό προκαλεί τη σχάση του μορίου του νερού, αφήνοντας ένα ηλεκτρόνιο στο υδρογόνο και ένα στο οξυγόνο, δημιουργώντας δύο ρίζες.



Οι ελεύθερες ρίζες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και εξέλιξη των βιολογικών συστημάτων καθώς συμμετέχουν στη μεταφορά σημάτων στα κύτταρα, στην μεταγραφή των γονιδίων, κ.α. Εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία συγκεκριμένων νοσημάτων όπως τα φλεγμονώδη και νευροεκφυλιστικά, όπου σε υψηλές συγκεντρώσεις οι ROS συμβάλλουν σημαντικά στην καταστροφή της δομής των κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των λιπιδίων, των μεμβρανών, των πρωτεϊνών και των νουκλεϊνικών οξέων. Έτσι, πολλές φορές η πρόκληση μεταλλάξεων σε ογκογονίδια, η ανάπτυξη καρκίνου, καθώς και ασθένειες που σχετίζονται με την κυτταρική γήρανση, όπως η αρτηριοσκλήρυνση και η αρθρίτιδα, αποδίδονται σ'αυτές (Poli G. et al., 2004; Zheng M. et al., 2000; Lander H.M., 1997).

Η δημιουργία των ROS σχετίζεται με τα μιτοχόνδρια, το μεταβολισμό του κυτοχρώματος P450, τα υπεροξειδωμάτα και την έναρξη φλεγμονώδους αντίδρασης (Innue M. et al., 2003). Ως γνωστόν τα μιτοχόνδρια παράγουν σημαντικές ποσότητες υπεροξειδίου του υδρογόνου, αλλά εκτός από τα μιτοχόνδρια, σημαντική πηγή υπεροξειδίου του υδρογόνου είναι και η οξειδάση της ξανθίνης, ένα εξαιρετικά ασταθές ένζυμο που απαντάται σε πολλά είδη (από βακτήρια έως τον άνθρωπο) και

εντός διαφόρων ιστών στα θηλαστικά (Li C.Y. et al., 2002). Άλλες 'ενδογενείς' πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών αποτελούν τα ουδετερόφιλα, τα εωσινόφιλα και τα μακροφάγα. Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα προκαλούν μια αύξηση στην πρόσληψη οξυγόνου η οποία έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή πλήθους ROS, συμπεριλαμβανομένων των οποίων το υπεροξειδίο του υδρογόνου, το μονοξειδίο του αζώτου και το ανιόν υπεροξειδίου (Conner E.M. et al., 1996). Επιπροσθέτως, τα μικροσωμάτια, τα υπεροξεισωμάτια και το κυτόχρωμα P450 εμφανίζονται ως πηγές ROS. Τα μικροσωμάτια εμφανίζονται υπεύθυνα για το 80% του H_2O_2 που συγκεντρώνεται *in vivo* σε περιοχές υπεροξείας, ενώ για τα υπεροξεισωμάτια είναι γνωστό ότι παράγουν και αυτά H_2O_2 , αλλά όχι $O_2^{\cdot-}$ σε φυσιολογικές συνθήκες (Gurta M.P. et al., 1997). Οι ROS μπορούν να δημιουργηθούν και από εξωγενείς παράγοντες, όπως για παράδειγμα μη γενοτοξικά καρκινογόνα που μπορούν να προκαλέσουν άμεσα τη δημιουργία ROS, είτε έμμεσα να προάγουν το σχηματισμό τους στα κύτταρα. Έχει παρατηρηθεί η επαγωγή οξειδωτικού stress από την έκθεση σε διάφορα ξеноβιοτικά, όπως για παράδειγμα οι χλωριωμένες ενώσεις, τα ιόντα μετάλλων, η ακτινοβολία και τα βαρβιτουρικά. Για παράδειγμα η 2-βουτυλοξαιθανόλη είναι γνωστό ότι προάγει το σχηματισμό ROS εμμέσως προκαλώντας καρκίνο στα ποντίκια (Klaunig J.E. et al., 1997).

Οξυγόνο και ελεύθερες ρίζες

Περίπου το 85-90% του οξυγόνου που προσλαμβάνεται από τους οργανισμούς χρησιμοποιείται στα μιτοχόνδρια, τα οργανίδια του κυττάρου που αποτελούν την κύρια πηγή παραγωγής ATP (τριφωσφορική αδενοσίνη) σε όλα τα θηλαστικά. Πηγή της ενέργειας είναι η τροφή, η οποία οξειδώνεται. Τα προϊόντα διάσπασης των τροφών χάνουν ηλεκτρόνια που προσλαμβάνονται από μεταφορείς ηλεκτρονίων. Η σύζευξη της οξειδωσης στην αναπνευστική αλυσίδα με τη φωσφορυλίωση του ADP αποτελεί πηγή ενέργειας για τη διατήρηση της ζωής. Στις περισσότερες των περιπτώσεων το χρησιμοποιούμενο οξυγόνο στα βιολογικά συστήματα ανάγεται με τη διαδικασία μεταφοράς ηλεκτρονίων προς τον σχηματισμό νερού από την οξειδάση του κυτοχρώματος. Οξυγόνο επίσης καταναλίσκεται από το ενζυμικό σύστημα της

υπερ-οικογένειας του κυτοχρώματος P450 (cytochrome P450: CYP), ένα σύστημα που εμπλέκεται και στο μεταβολισμό των φαρμάκων. Ο κύριος ρόλος του τελευταίου είναι η απομάκρυνση των λιπόφιλων, στο φυσιολογικό pH, φαρμάκων και άλλων ξενοβιοτικών από τον οργανισμό. Στο σύστημα P450 χρησιμοποιείται οξυγόνο για τις βιομετατροπές των ουσιών προς οξειδωμένα μεταβολικά προϊόντα και νερό, σε δύο διαδοχικές αναγωγές κάθε φορά ενός ηλεκτρονίου (Halliwell B. et al., 1998).

Η τοξικότητα του οξυγόνου

Το διατομικό μόριο του οξυγόνου (O_2) διαθέτει δύο αδέσμευτα ηλεκτρόνια, κάθε ένα σε διαφορετικό π αντιδεσμικό τροχιακό. Αυτά τα δύο ηλεκτρόνια έχουν τον ίδιο κβαντικό αριθμό, έχουν δηλαδή παράλληλα spin. Αυτή η κατάσταση είναι και η πλέον σταθερή, ενώ το O_2 μπορεί να δράσει σαν οξειδωτικός παράγοντας. Παρόλα αυτά, αν το O_2 «επιχειρήσει» να οξειδώσει κάποιο άλλο άτομο ή μόριο λαμβάνοντας ένα ζεύγος ηλεκτρονίων από αυτό, αυτά τα δύο ηλεκτρόνια θα πρέπει να έχουν αντιπαράλληλο spin, έτσι ώστε να προσαρμοστούν στις κενές θέσεις των π τροχιακών (αρχή Pauli). Η συγκεκριμένη κατάσταση είναι αυξημένης ενέργειας και επιβάλλει λοιπόν έναν περιορισμό στην μεταφορά των ηλεκτρονίων, υποχρεώνοντας το O_2 να δέχεται τα ηλεκτρόνιά του ένα-ένα κάθε φορά, δικαιολογώντας ταυτόχρονα γιατί μπορεί να αντιδράσει το συγκεκριμένο μόριο έστω και ασθενώς με μη ρίζες μορίων, αλλά και γιατί αυτό δικαιολογεί το γεγονός του σχηματισμού ελεύθερων ριζών. Θερμοδυναμικά πάντως, το οξυγόνο 'επιθυμεί' να προσλάβει επιπλέον ηλεκτρόνια (δύο ανά άτομο, τέσσερα ανά μόριο), έτσι ώστε να σχηματίσει μόρια νερού που έχουν ακόμα πιο μικρή ελεύθερη ενέργεια (McCord J.M., 2000; Gilbert D.L., 1981). Θεωρητικά, οι πολύπλοκες οργανικές ενώσεις του ανθρώπινου σώματος θα έπρεπε να αντιδρούν και να καταστρέφονται από το O_2 της ατμόσφαιρας, αλλά αυτός ο περιορισμός του spin, καθώς και άλλοι παράγοντες, αναιρούν ή καθυστερούν αυτή τη διαδικασία.

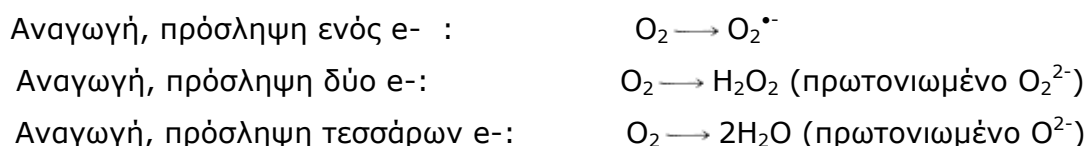
Σημαντικές ενεργές μορφές οξυγόνου

Οξυγόνο αυξημένης ενέργειας

Η πιο δραστική μορφή του O_2 είναι αυτή που σχηματίζεται με εισροή ενέργειας. Σύμφωνα με τον ορισμό της ελεύθερης ρίζας, αυτή δεν αποτελεί ριζικό σύστημα, αφού δεν υπάρχει αδέσμευτο ηλεκτρόνιο, όμως είναι μορφή με πολύ υψηλότερη οξειδωτική ικανότητα από το οξυγόνο λόγω κατάστασης αυξημένης ενέργειας που υποχρεώνει τα δύο ηλεκτρόνια του π τροχιακού να καταλάβουν αντιπαράλληλα spin (Halliwell B. et al., 1998).

Ιόν Ρίζας Υπεροξειδίου

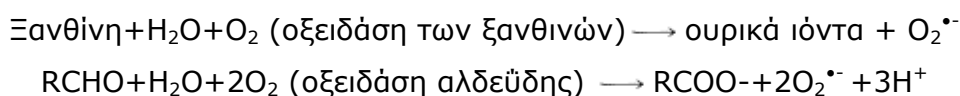
Αν ένα ηλεκτρόνιο προστίθεται στην κατάσταση ηρεμίας του μορίου του O_2 , τότε αυτό θα πρέπει να καταλάβει ένα από τα π αντιδεσμικά τροχιακά. Το προϊόν είναι η υπεροξειδική ρίζα $O_2^{\cdot-}$. Με προσθήκη ενός ακόμα ηλεκτρονίου στο $O_2^{\cdot-}$ προκύπτει το υπεροξειδικό ιόν O_2^{2-} που και πάλι δεν θεωρείται ρίζα. Εφόσον τα επιπλέον ηλεκτρόνια στα $O_2^{\cdot-}$ και O_2^{2-} εισέρχονται σε αντιδεσμικά τροχιακά, η ισχύς του δεσμού O-O μειώνεται. Στο O_2 της βασικής κατάστασης τα άτομα συνδέονται αποτελεσματικά μέσω δύο ομοιοπολικών δεσμών, όμως στην περίπτωση του $O_2^{\cdot-}$ και του O_2^{2-} οι δεσμοί είναι σαφώς ασθενέστεροι. Η εισροή άλλων δύο ηλεκτρονίων στο μόριο O_2^{2-} καταλήγει σε διάλυση του δεσμού και δημιουργία $2O^{2-}$. Συνήθως, στα βιολογικά συστήματα το προϊόν αναγωγής του O_2 με δύο ηλεκτρόνια είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου και με τέσσερα ηλεκτρόνια το νερό (Halliwell B. et al., 1998). Συνοπτικά:



Μπορεί να απενεργοποιεί απευθείας ορισμένα ένζυμα, όπως για παράδειγμα το σύμπλοκο της δεϋδρογονάσης του NADH των μιτοχονδρίων in vitro (Zhang Y. et al., 1990).

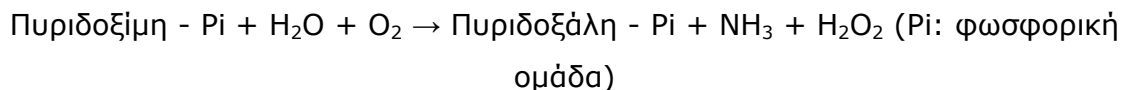
Υπεροξειδικό ανιόν $O_2^{\bullet-}$

Το υπεροξειδικό ανιόν σχηματίζεται κυρίως σε βιολογικά συστήματα μέσω αναγωγής ενός ηλεκτρονίου του οξυγόνου τριπλής κατάστασης με τη συμμετοχή ενζύμων, της οξειδάσης των ξανθινών και της οξειδάσης της αλδεΐδης. Η οξειδάση των ξανθινών παράγεται από την αφυδρογονάση της ξανθίνης (Halliwell B. et al., 1998).

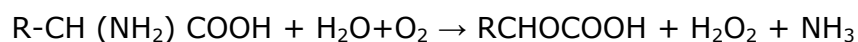


Υπεροξειδίο του Υδρογόνου H_2O_2

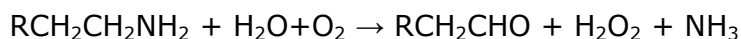
Σε αντίθεση με το $O_2^{\bullet-}$, το H_2O_2 μπορεί να διαχέεται μέσω των μεμβρανών, όμως δεν θεωρείται ρίζα διότι δεν έχει ασύζευκτο ηλεκτρόνιο. Το υπεροξειδίο του υδρογόνου παράγεται με τη δράση των υπεροξειδασών στο ήπαρ και στον εγκέφαλο. Οι οξειδάσεις φέρουν φλαβινοσυνένζυμα (FMN, FAD).



Οξειδάσες των αμινοξέων που βρίσκονται στο ΚΝΣ μετατρέπουν τα αμινοξέα σε κετο-οξέα με ταυτόχρονο σχηματισμό H_2O_2 :



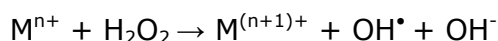
Η σημαντικότερη οξειδάση του ΚΝΣ είναι η οικογένεια των MAO (μονοαμινοξειδασών) που καταλύουν την παρακάτω αντίδραση:



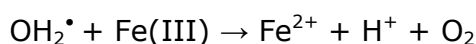
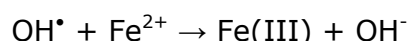
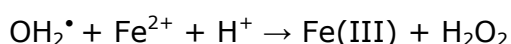
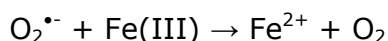
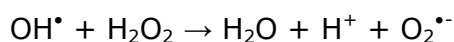
Το υπεροξειδίο είναι εξαιρετικά τοξικό για τα κύτταρα, αφού μπορεί να προκαλέσει καταστροφή στο DNA, χάλαση της κυτταρικής μεμβράνης με απελευθέρωση ιόντων Ca^{2+} εντός κυττάρου, ενεργοποιώντας με αυτόν τον τρόπο εκείνες τις πρωτεάσες και νουκλεάσες που εξαρτώνται από το Ca^{2+} (Halliwell B. et al., 1991).

Ρίζες Υδροξυλίου HO·

Η HO· θεωρείται η περισσότερο δραστική μορφή του οξυγόνου με ημιπερίοδο ζωής σε υδατικό περιβάλλον, λιγότερο από 1ns. Μπορεί να σχηματιστεί με διάφορους τρόπους. Η ιονίζουσα ακτινοβολία προκαλεί την αποσύνθεση του H₂O με αποτέλεσμα τον σχηματισμό HO· και ατόμων υδρογόνου, αλλά μπορεί να προέλθει και από φωτολυτική αποσύνθεση αλκυλοδροξυπεροξειδίων. Η πλειοψηφία των ριζών HO· σχηματίζεται από το H₂O₂ εφόσον δεν διασπαστεί ("αποτοξινωθεί") από το ένζυμο καταλάση μετά από αναγωγή ενός ηλεκτρονίου με κατάλυση του H₂O₂ με τη βοήθεια ιόντων μεταβατικών μετάλλων (Αντίδραση Fenton):



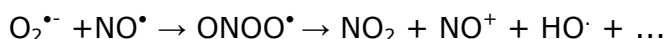
όπου $M^{n+} = Cu^+, Fe^{2+}, Ti^{3+}, Co^{2+}$ με πιο πιθανά να είναι ο χαλκός και ο σίδηρος (Pastor N. et al., 2000; Liochev S.I. et al., 2002; Platenic J. et al., 2001). Ο Fenton πρώτος περιέγραψε τη οξείδωση του ταρταρικού οξέος μέσω αυτού του συστήματος το 1876. Η αντίδραση Fenton εμπλέκει διάφορα οξειδωτικά συστήματα (Halliwell B. et al., 1998):



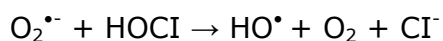
Παρόλο που η αντίδραση Fenton είναι γνωστό ότι συμβαίνει *in vitro*, η αποτελεσματικότητά της κάτω από φυσιολογικές συνθήκες δεν είναι ξεκάθαρη και δεν μπορεί να εξασφαλιστεί η συμμετοχή αξιόλογου ποσοστού σιδήρου, διότι μεγάλο μέρος αυτού είναι δεσμευμένο από τις πρωτεΐνες του οργανισμού. Ωστόσο, κάτω από 'ειδικές' συνθήκες, όπως για παράδειγμα στην β-θαλασσαιμία, στην αιμοδιάλυση και στην αιμοχρωμάτωση, ο οργανισμός έχει περισσότερο σίδηρο από το κανονικό και άρα τα ποσοστά του διαθέσιμου ελεύθερου σιδήρου για την αντίδραση Fenton είναι αυξημένα (Kakhlion O. et al., 2002). Η διάσπαση του ομοιοπολικού δεσμού O-O του

H₂O₂ μπορεί επίσης να συμβεί και λόγω υπερϊώδους ακτινοβολίας, που καταλήγει στην παραγωγή δύο OH[•].

Ρίζες υδροξυλίου μπορούν να δημιουργηθούν και μέσω της αντίδρασης O₂^{•-} με NO[•] (Carr A.C. et al., 2000)

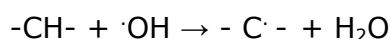


και μέσω της αντίδρασης O₂^{•-} με υποχλωριώδες οξύ. Το υποχλωριώδες οξύ παράγεται από μυελοϋπεροξειδάσες και δεν είναι ρίζα διότι δεν έχει ασύζευκτα ηλεκτρόνια (Folkes L.K et al., 1995):

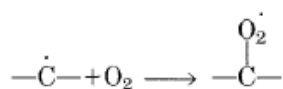


Η HO[•] καταστρέφει σχεδόν κάθε μόριο που συναντά μέσα στα ζώντα κύτταρα και έχει την ικανότητα να ενώνεται με νουκλεοτίδια στις δύο έλικες του DNA και να προκαλεί ρήξη των αλυσίδων, γεγονός που οδηγεί σε κυτταροτοξικότητα, σε μεταλλαξιογένεση και καρκινογένεση, αλλά και σε χημικές μετατροπές της δεοξυριβόζης και των βάσεων πουρίνης και πυριμιδίνης.

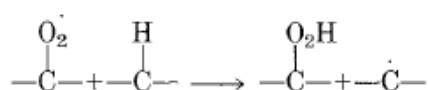
Επιπρόσθετα, αυτό το είδος θεωρείται ότι προκαλεί την έναρξη της διαδικασίας της λιπιδικής υπεροξειδωσης αποσπώντας άτομα υδρογόνου από ακόρεστα λιπαρά οξέα. Απόσπαση ενός ατόμου υδρογόνου δημιουργεί ρίζα εντοπισμένη σε άνθρακα λιπαρού οξέος



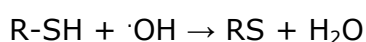
που αυτή με τη σειρά της αντιδρά με το O₂ για να δημιουργήσει ρίζες υπεροξειδίου



και στη συνέχεια αυτές μπορούν να επιτεθούν στις πρωτεΐνες των μεμβρανών ή να προσλάβουν κάποιο υδρογόνο από γειτονικό λιπαρό οξύ



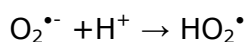
και έτσι να ξεκινήσει μια αλληλουχία αλυσιδωτών αντιδράσεων που θα μετατρέψει πολλά λιπαρά οξέα σε λιπιδικά υδροϋπεροξειδία, τα οποία επηρεάζουν σημαντικά τη συνοχή και τη λειτουργικότητα της μεμβράνης, οδηγώντας στη δομική και λειτουργική αποδιοργάνωσή της. Αυτά μπορούν ακόμη να αποσυντεθούν και να παράγουν μια σειρά από εξαιρετικά κυτταροτοξικά παράγωγα, μεταξύ των οποίων είναι και οι αλδεΐδες (Klaunig J.E. et al., 2004). Το OH· μπορεί και να δεσμεύσει άτομα υδρογόνου από διάφορα βιολογικά μόρια, μεταξύ των οποίων και οι θειόλες.



Η ρίζα που προκύπτει έχει ενδιαφέρουσες χημικές ιδιότητες, διότι μπορεί να συνδυαστεί με το οξυγόνο και να δημιουργηθούν ρίζες του τύπου RSO· και RSO₂· που είναι επιβλαβείς για βιολογικά μόρια (Sevilla M.D. et al., 1989; Monig J. et al, 1987).

Υδροϋπεροξειδίο HO₂·

Το ιόν ρίζας υπεροξειδίου σε όξινο περιβάλλον δίνει το πολύ τοξικό υδροϋπεροξειδίο:



Ενδεχομένως, το πιο ενδιαφέρον χαρακτηριστικό των υδροϋπεροξειδίων να αποτελεί η ποικιλομορφία στον τρόπο με τον οποίο συμμετέχει στις βιολογικές αντιδράσεις. Η επιβεβαίωση της ύπαρξης και το μέγεθος της λιπιδικής υπεροξειδωσης συχνά παρατίθενται ως απόδειξη της συμμετοχής αντιδράσεων με υδροϋπεροξειδία στην ανθρώπινη τοξικολογία και σε νόσους, καθώς εμπλέκονται στο 'σπάσιμο' της αλυσίδας του DNA, στη μετατροπή των πρωτεϊνών και στο ότι δρουν συνεργιστικά με άλλες ρίζες και υπεροξειδία στην καταστροφή του DNA (Gutteridge J.M.C., 1995).

Ρίζα Μονοξειδίου του Αζώτου (NO·)

Η ρίζα του μονοξειδίου του αζώτου (NO·) αποτελεί μια συχνά εμφανιζόμενη ρίζα με ασυνήθιστες ιδιότητες, τέτοιες που το 1992 να ανακηρυχθεί ως «μόριο του έτους» στο περιοδικό Science (Koshland Jr.D.E., 1992). Έχει ένα ασύζευκτο

ηλεκτρόνιο στο $2p_{\gamma}^*$ αντιδεσμικό τροχιακό-και άρα θεωρείται ρίζα-, με χρόνο ημιζωής λίγα μόλις δευτερόλεπτα σε υδατικό περιβάλλον (Chiuieh C.C., 1999). Δημιουργείται στους ιστούς από συγκεκριμένες συνθέσεις για το μονοξειδίο του αζώτου (NOSs) και λόγω του ότι είναι διαλυτό σε υδατικό αλλά και σε λιπόφιλο περιβάλλον, μπορεί να διαχέεται εύκολα μέσω του κυτοπλάσματος και των κυτταρικών μεμβρανών (Ghafourifar P. et al., 2005). Συμμετέχει σε πλήθος κυτταρικών διαδικασιών που ρυθμίζουν σημαντικές λειτουργίες οργάνων. Το NO το οποίο παράγεται φυσιολογικά από τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων είναι απαραίτητο για τη ρύθμιση της χάλασης των μυϊκών κυττάρων και συνεπώς του αγγειακού τόνου (αγγειοχάλαση-αγγειοσύσπαση), τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων, την προσκόλληση των λευκοκυττάρων, την αγγειογένεση και τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων, όπως και σε μηχανισμούς άμυνας και ρύθμισης του ανοσοποιητικού συστήματος του οργανισμού. Επίσης λειτουργεί ως νευροδιαβιβαστής και ως διαμεσολαβητής μεταφοράς μηνυμάτων στο ανοσοποιητικό σύστημα (Archer S., 1993; Alderton W.K. et al., 2001; Bergenti L et al., 1999; Forstermann U. et al., 1998; Ignarro L.G. et al., 1999).

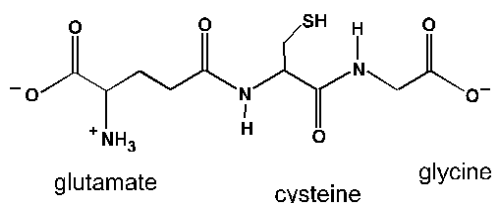
Μοριακοί μηχανισμοί προσβολής και τοξικότητας από ελεύθερες ρίζες

Οι ελεύθερες ρίζες προκύπτουν μέσα από μια πληθώρα μονοπατιών και γεγονότων. Υπολογίζεται ότι κάθε ένα ανθρώπινο κύτταρο εκτίθεται σε περίπου 1.5×10^5 οξειδωτικές επιθέσεις την ημέρα από ρίζες υδροξυλίου και άλλες ελεύθερες ρίζες (Beckman K.B. et al., 1997). Υπό κανονικές φυσιολογικές συνθήκες, στον οργανισμό υπάρχουν δυο ομάδες αμοιβαία αντιτιθεμένων διαδικασιών, μία προ-οξειδωτική και μια αντι-οξειδωτική, που βρίσκονται σε ισορροπία. Η διαταραχή της ισορροπίας "προοξειδωτική-αντιοξειδωτική" στον οργανισμό, προς όφελος της προ-οξειδωτικής αποτελεί κατάσταση που χαρακτηρίζεται ως "οξειδωτικό stress". Αυτή η ανισορροπία προκαλεί την παραγωγή υπεροξειδίων και ελευθέρων ριζών που καταστρέφουν κυτταρικές πρωτεΐνες, λιπίδια και DNA. Το οξειδωτικό stress έχει σαν επακόλουθο το βιολογικό stress που εκδηλώνεται με αδυναμία απόκρισης του οργανισμού σε κάθε ερέθισμα και απαίτηση ενέργειας. Οι συνέπειες, καθώς και η

προστασία από τη δράση ελευθέρων ριζών ή και την πρόληψη του οξειδωτικού stress αποτελούν το αντικείμενο δραστηρίας και έντονης επιστημονικής έρευνας τα τελευταία χρόνια.

Είναι γνωστό ότι ελεύθερες ρίζες μπορούν όχι μόνο να επιτεθούν στο DNA του πυρήνα του κυττάρου αλλά και σε άλλα κυτταρικά οργανίδια όπως για παράδειγμα τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα των φωσφολιπιδίων, τα οποία είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στην οξείδωση (Esterbauer H. et al., 1991; Marnett L.J., 1999). Ο μηχανισμός της λιπιδικής υπεροξειδωσης, που προτάθηκε πριν από περίπου τρεις δεκαετίες αναφέρθηκε παραπάνω και περιλαμβάνει τρία κυρίως στάδια, την έναρξη, τον πολλαπλασιασμό και τη λήξη (Bucher R.J. et al., 1983; Pinchuk I. et al., 1998; Kohen R. et al., 2002). Η υπεροξειδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων των βιολογικών μεμβρανών, που εκκινεί με την απόσπαση ενός αλλυλικού υδρογόνου, ελαττώνει τη ρευστότητα των μεμβρανών, σημαντική ιδιότητα για τη φυσιολογική τους λειτουργία. Επιπλέον, ο σχηματισμός υδροϋπεροξειδίων σε υδρόφοβες περιοχές φωσφολιπιδίων οδηγεί στη δημιουργία υδρόφιλων κέντρων, και ως εκ τούτου τροποποιούνται οι αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών – ligands. Από τη στιγμή που δημιουργούνται οι ρίζες υπεροξειδίου ($\text{ROO}\cdot$), μπορούν να μετασχηματιστούν σε ενδοϋπεροξειδία με τελικό προϊόν της όλης διαδικασίας να είναι η μηλονυλοδιαλδεΐδη που είναι μεταλλαξιογόνος σε βακτηριακά κύτταρα και σε κύτταρα θηλαστικών, καρκινογόνος σε ποντίκια και έχει την ικανότητα να γεφυρώνει μακρά ευρισκόμενες περιοχές ενός πολυπεπτιδίου ή δύο διαφορετικών πεπτιδίων μετά από αντίδραση των καρβονυλίων της με ελεύθερες πρωτοταγείς αμινομάδες, ασκώντας έτσι την κυτοτοξική της δράση. Ενεργές μορφές οξυγόνου και πολλά ενδιάμεσα και τελικά προϊόντα της λιπιδικής υπεροξειδωσης αλληλεπιδρούν με λειτουργικές σουλφυδρυλο-(HS)-ομάδες, μεταξύ των οποίων και η γλουταθειόνη (GSH), αδρανοποιώντας ένα κύριο αμυντικό σύστημα αποτοξίνωσης ελευθέρων ριζών του οργανισμού (Chance B. et al., 1979).

glutathione (GSH)

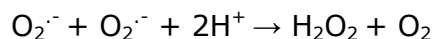


Αλλά και έκθεση κυττάρων σε συνθήκες οξειδωτικού stress προκαλεί αντίστοιχα καταστροφή του DNA με επακόλουθη ενεργοποίηση πολυσυνθετάσης, η οποία πολυμερίζει κομμάτια ADP-ριβόζης από το NAD^+ και οδηγεί σε έλλειψη των κυτταρικών αποθεμάτων NAD^+ . Ακόμη προκαλείται μείωση της ποσότητας του ATP και αύξηση των ενδοκυτταρικών ελευθέρων ιόντων Ca^{2+} , με παράλληλη ενεργοποίηση των πρωτεασών που σχετίζονται με το Ca^{2+} , οι οποίες προκαλούν φαινόμενα σχηματισμού 'φούσκας' (bleb) στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των κυττάρων, με αυτήν την αύξηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου να είναι βλαβερή για τους νευρόνες (Orrenius S. et al., 1989).

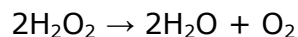
Ενώ οι ROS είναι περισσότερο γνωστές για την καταστροφή που επιφέρουν στα κύτταρα, παίζουν και έναν σπουδαίο εποικοδομητικό ρόλο σε διάφορες πτυχές της λειτουργίας του κυττάρου και στην ενδοκυτταρική μεταφορά μηνυμάτων (Palmer H.J. et al., 1997). Οι ROS εμπλέκονται στην έκφραση ενός αριθμού γονιδίων και μεταβολικών μονοπατιών, και ανάλογα με την συγκέντρωσή τους μπορούν ενδεχομένως να έχουν μια θετική (πολλαπλασιασμός) ή αρνητική (παρεμπόδιση περαιτέρω πολλαπλασιασμού ή ελεγχόμενος κυτταρικός θάνατος) κυτταρική απόκριση. Μικρές συγκεντρώσεις ριζών υπεροξειδίου ή υπεροξειδίου του υδρογόνου μπορούν να προάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, με τις ROS να παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο ως διαμεσολαβητές μηνυμάτων (Thannickal V.J. et al., 2000; Bredt D.S. et al., 1994). Άλλες ιδιότητες των ROS είναι ότι επηρεάζουν τα επίπεδα της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης ασβεστίου με επακόλουθο αποτέλεσμα την ενεργοποίηση κινασών όπως π.χ. της πρωτεϊνικής κινάσης C, τη φωσφορυλίωση πρωτεϊνών και την ενεργοποίηση ορισμένων μεταγραφικών παραγόντων, όπως το NF- κ B -σχετίζεται με γονίδια για τη διαφοροποίηση και ανάπτυξη του κυττάρου- και παράγοντες της οικογένειας AP—σχετίζεται με την παρεμπόδιση παραγόντων που προάγουν την εμφάνιση καρκίνου- (Storz P., 2005). Επιπροσθέτως οι ROS και τα ιόντα μετάλλων εμποδίζουν τη δράση φωσφοροσερινο/θρεονινο-, φωσφοτυροσινο- και φωσφολιπιδο-φωσφατασών, πιθανότατα αλληλεπιδρώντας με σουλφυδρυλομάδες τους οξειδώνοντας τις, σχηματίζοντας δισουλφιδικούς δεσμούς (Thannickal V.J. et al., 2000; Poli G. et al., 2004).

Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί άμυνας

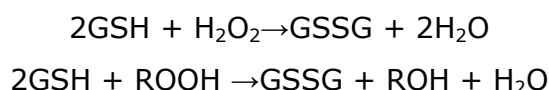
Η δομική κατασκευή του κυττάρου είναι τέτοια που απομονώνει τις ελεύθερες ρίζες από τα μόρια που αυτές προσβάλλουν, με την οξειδάση του κυτοχρώματος των μιτοχονδρίων να είναι αυτή που καταναλώνει το μεγαλύτερο διαθέσιμο μοριακό οξυγόνο έτσι ώστε να μην περισσεύει επαρκής ποσότητα για να μετατραπεί σε ελεύθερες ρίζες. Ωστόσο το κύτταρο διαθέτει επιπλέον αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς άμυνας. Ένα τέτοιο, καλό αντιοξειδωτικό θα πρέπει να περιλαμβάνει πολλές παραμέτρους. Καταρχήν, θα πρέπει να εξειδικεύεται στο να καταστέλλει την ελεύθερη ρίζα, να παγιδεύει τα ιόντα των μετάλλων και να μπορεί να συνεργάζεται με άλλα αντιοξειδωτικά. Επιπροσθέτως, να απορροφάται πλήρως, εμφανίζοντας μια ικανοποιητική συγκέντρωση στους ιστούς, διαθέτοντας υδρόφιλες και λιπόφιλες ιδιότητες για να διαχέεται από τις μεμβράνες, καθώς και να έχει μια θετική επίδραση στην έκφραση απαραίτητων γονιδίων. Μερικά από τα πιο αποτελεσματικά αντιοξειδωτικά ένζυμα είναι η υπεροξειδική δισμουτάση, η οποία εμφανίζεται στο κυτταρόπλασμα περιέχοντας σίδηρο ή ψευδάργυρο και στα μιτοχόνδρια περιέχοντας μαγνήσιο, και δρα καταλυτικά στη μετατροπή του $O_2^{\cdot-}$ σε O_2 και στο λιγότερο δραστικό H_2O_2

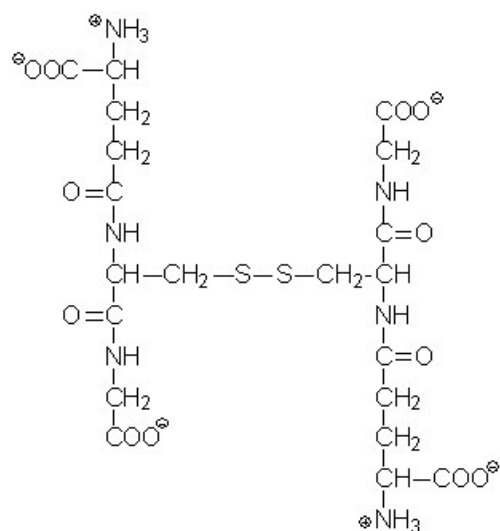


και η καταλάση που εμφανίζεται σε κύτταρα φυτών, ζώων και αερόβιων βακτηρίων και συμβάλλει στη μετατροπή του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό και μοριακό οξυγόνο (Mates J.M. et al., 1999; McCord M.J. et al., 1969).



Ένα ακόμη αντιοξειδωτικό αυτής της κατηγορίας αποτελεί και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης που προσθέτει δύο ηλεκτρόνια σε υπεροξειδία του τύπου ROOH ή στο H_2O_2 , συνεργαζόμενη με το τριπεπτίδιο γλουταθειόνη που υπάρχει σε υψηλή συγκέντρωση στα κύτταρα, οξειδώνοντάς τη (Mates J.M. et al., 1999).



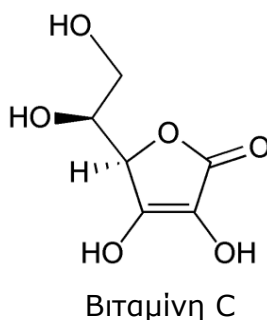


GSSG

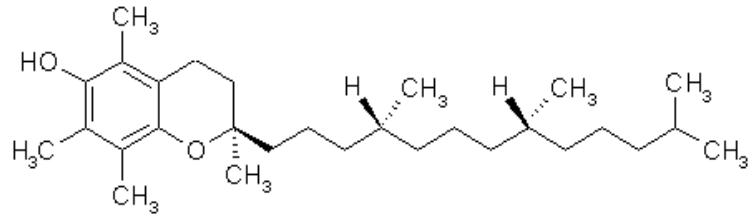
Και η ίδια η γλουταθειόνη όμως αποτελεί από μόνη της ένα πολυλειτουργικό, ενδοκυτταρικό, μη ενζυματικό αντιοξειδωτικό. Η οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης είναι το δισουλφίδιο της γλουταθειόνης, η οποία συσσωρεύεται μέσα στα κύτταρα, με το λόγο της γλουταθειόνης προς το δισουλφίδιό της, να αποτελεί μια πολύ καλή μονάδα μέτρησης του οξειδωτικού stress στους οργανισμούς. Οι κύριες προστατευτικές δράσεις της γλουταθειόνης έναντι του οξειδωτικού stress είναι ότι η γλουταθειόνη: i) αποτελεί έναν συμπαράγοντα ενζύμων που δρουν κατά του οξειδωτικού stress πχ.τρανσφεράση της γλουταθειόνης, υπεροξειδάση της γλουταθειόνης κ.α. ii) συμμετέχει στη μεταφορά των αμινοξέων μέσω της μεμβράνης του πλάσματος iii) δεσμεύει ρίζες υδροξυλίου iv) αναγεννά δύο από τα πλέον σημαντικά αντιοξειδωτικά, τη βιταμίνη C και τη βιταμίνη E (Masella R. et al., 2005; Hwank C. et al., 1992).

Η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ) είναι ένα πολύ ισχυρό αντιοξειδωτικό που δρα σε υδρόφιλα τμήματα του οργανισμού, όπως στους πνεύμονες και στο φακό του ματιού. Η βιταμίνη C συνεργάζεται με τη βιταμίνη E για να αναγεννηθεί η α-τοκοφερόλη, από τις ρίζες της α-τοκοφερόλης που έχουν προηγουμένως δημιουργηθεί. Έχει διαπιστωθεί ότι προστατεύει τις μεμβράνες των κυττάρων από την οξείδωση και μειώνει την πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου στο στομάχι, πιθανότατα λόγω της ανασταλτικής της δράσης στη δημιουργία νιτρωδο-παραγώγων

παρεμβαίνοντας στην αντίδραση μεταξύ νιτριδίων και αμινομάδων (Kojro S., 2004; Carr A. et al., 1999; Retsky K.L. et al., 1999; Knekt P. et al., 1991).



Η βιταμίνη E είναι μια λιπόφιλη βιταμίνη που υφίσταται σε οκτώ διαφορετικές στερεοχημικές δομές με την α- και δ-τοκοφερόλη να είναι οι πιο δραστικές μορφές, κύρια δράση των οποίων είναι η προστασία από τη λιπιδική υπεροξειδωση. Όπως προαναφέρθηκε, συνδυάζεται με την υδρόφιλη βιταμίνη C, συμμετέχοντας σε μια κυκλική διαδικασία κατά την οποία η α-τοκοφερόλη μετατρέπεται σε ρίζα α-τοκοφερόλης με την μεταφορά ενός ασταθούς ηλεκτρονίου από την υδροξυλομάδα που φέρει, στη ρίζα του λιπαρού οξέος που προϋπάρχει και στη συνέχεια η ρίζα της α-τοκοφερόλης ανάγεται στην αρχική της μορφή από τη βιταμίνη C. Η ρίζα της α-τοκοφερόλης ως υδατοδιαλυτή μεταφέρεται στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης ή στο υδρόφιλο κυτταρόπλασμα. Η προστατευτική δράση της βιταμίνης E θεωρείται ότι είναι η αποτροπή του σχηματισμού ελευθέρων ριζών και η ενεργοποίηση ενδονουκλεασών. Εμφανίζει προοξειδωτική δράση, σε ήπιες συνθήκες οξειδωσης *in vitro*, για τη λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας (LDL). Η άποψη που διατυπώνεται είναι ότι τα επίπεδα του οξειδωτικού stress και η συγκέντρωση άλλων συνυπαρχόντων αντιοξειδωτικών, όπως το ασκορβικό οξύ, ικανών να αναγεννούν την α-τοκοφερόλη στο οξειδωμένο τμήμα της λιποπρωτεΐνης, είναι καθοριστικοί παράγοντες της αντιοξειδωτικής ή προοξειδωτικής δράσης της α-τοκοφερόλης στο πλάσμα και στην LDL, καθότι, σύμφωνα με νεότερες απόψεις, δεν πρέπει να γίνεται συγχορήγηση, εξαιτίας της προοξειδωτικής δράσης της C- σε συνδυασμό με δοσοεξαρτώμενες αντιρρήσεις (Pryor W.A., 2000; Kojro S., 2004). Άλλοι παράγοντες που έχουν την ιδιότητα να σαρώνουν ελεύθερες ρίζες όπως οι παραπάνω ουσίες η κυστεΐνη, διάφορα φλαβονοειδή, οι κατεχόλες, η βιταμίνη A και τα καροτενοειδή (Halliwell B. et al., 1998).



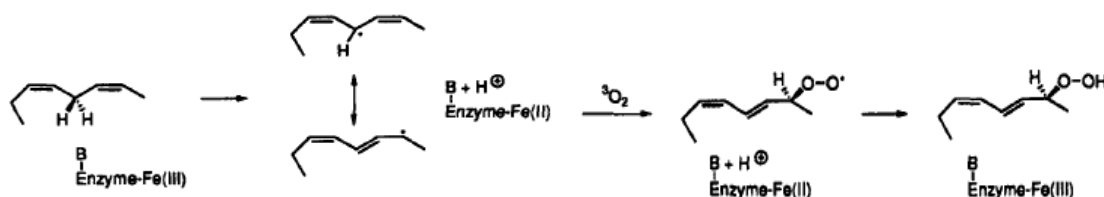
α-τοκοφερόλη

Σε αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς άμυνας από το οξειδωτικό stress και τις ελεύθερες ρίζες συμπεριλαμβάνονται πρωτεΐνες που προστατεύουν τα βιομόρια από την οξείδωση, π.χ. πρωτεΐνες θερμικού σοκ (heat shock proteins) καθώς και αυτές που ελαχιστοποιούν τη διαθεσιμότητα των προ-οξειδωτικών παραγόντων (π.χ. ιόντων Fe, ιόντων Cu). Τέτοιες είναι οι τρανσφερρίνες, μεταλλοθειονίνες κ.α. Σ' αυτή την κατηγορία συμπεριλαμβάνονται και οι πρωτεΐνες που οξειδώνουν ιόντα Fe, όπως οι σερουλοπλασμίνες, τα επίπεδα της οποίας αυξάνονται σημαντικά κατά τη διάρκεια φλεγμονωδών αντιδράσεων, οξειδώνοντας το δισθενή σίδηρο σε τρισθενή, χωρίς την απελευθέρωση ελευθέρων ριζών οξυγόνου (Chance B. et al., 1979; Gajhede M. et al., 1997; Yeh J.I. et al., 1996).

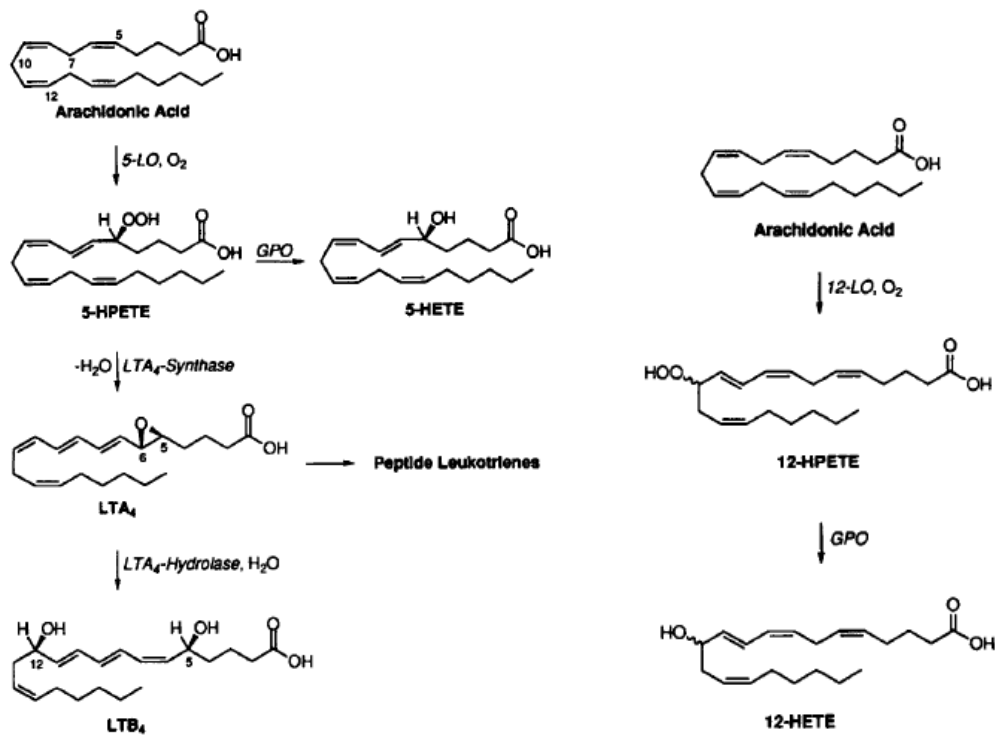
ΛΙΠΟΞΥΓΟΝΑΣΗ

Πολλοί -μη πράσινοι-ιστοί φυτών, όπως οι βολβοί, τα φρούτα και οι καρποί περιέχουν ένζυμα λιποξυγονάσης (LOX) (Mack A.J. et al., 1987). Οι λιποξυγονάσες (EC 1.13.11.12) είναι διοξυγενάσες που φέρουν σίδηρο και καταλύουν την απευθείας αντίδραση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs-PolyUnsaturated Fatty Acids), με οξυγόνο, προς δημιουργία 13- και 9-υδροπεροξειδίων.

Οι λιποξυγονάσες περιέχουν ένα ιόν σιδήρου (μη τύπου αίμης) ανά μόριο και ξεκινούν τη δράση τους με την απόσπαση ενός ατόμου υδρογόνου από ένα λιπαρό οξύ στερεοεκλεκτικά. Η δράση των λιποξυγονασών στα PUFAs μπορεί να προκαλέσει μια 'συν-οξειδωση' και με άλλα προϊόντα πχ.θειόλες, καροτενοειδή και χλωροφύλλες. Αρχικά λοιπόν, το ένζυμο [Fe(III)-enzyme] αποσπά ένα υδρογόνο από το υπόστρωμα και προκύπτει η ρίζα του υποστρώματος, ένα πρωτόνιο και το ένζυμο [Fe(II)-enzyme]. Η ρίζα αυτή αντιδρά με μοριακό οξυγόνο και σχηματίζεται ρίζα υπεροξειδίου, η οποία στη συνέχεια δέχεται ένα ηλεκτρόνιο από το ένζυμο [Fe(II)-enzyme] και ένα πρωτόνιο, προκαλώντας τη δημιουργία υπεροξειδίου και την αναγέννηση του ενζύμου [Fe(III)-enzyme] (Nelson M.J. et al., 1990; Petersson L. et al., 1987; Chamulitrat W. et al., 1989; Feiters M.C. et al., 1985; Pergola C. et al., 2010; Halliwell B. Et al., 1998).



Οι LOXs κατηγοριοποιούνται περαιτέρω σε 5-, 8-, 9-, 11-, 12- και 15- λιποξυγονάσες ανάλογα με τη θέση που εισήχθη το οξυγόνο στο αραχιδονικό, καθώς και από το υπόστρωμα (Rapoport S.M. et al., 1978).

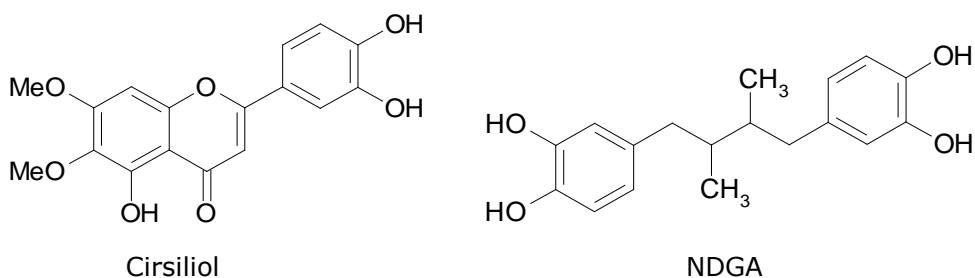


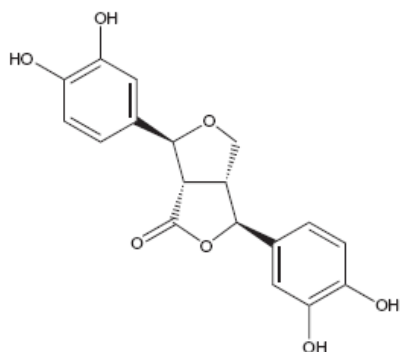
Μεταβολισμός του αραχιδονικού οξέος από την 5- και από την 12-λιποξυγονάση

Αναστολείς λιποξυγονασών

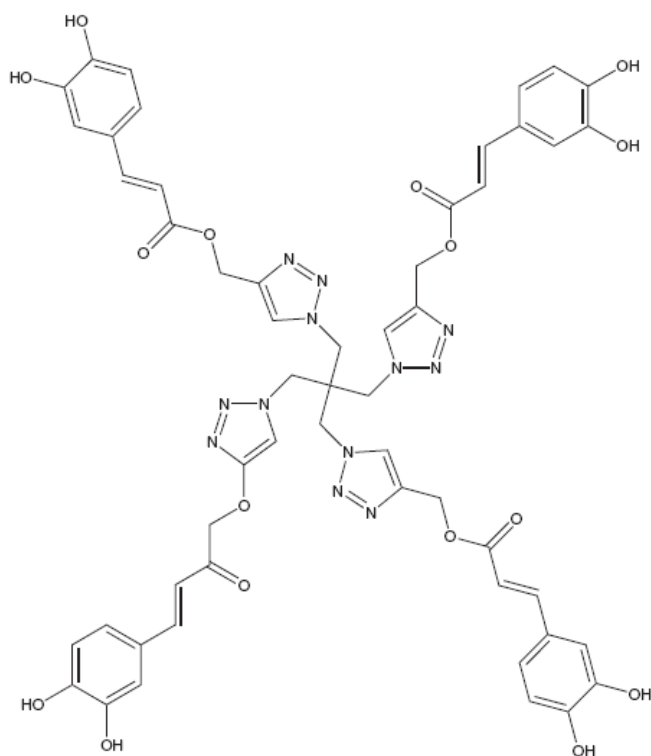
Συμπερασματικά, φαίνεται ότι η δράση της λιποξυγονάσης προκαλεί τη δημιουργία ριζών υπεροξειδίου, οι οποίες στη συνέχεια ανάγονται σε υδροϋπεροξειδία, αλλά μπορούν και να αλληλεπιδράσουν με άλλα υποστρώματα και να προκαλέσουν βλάβη, αφού οι ενώσεις που δημιουργούνται μπορούν να αποτελέσουν 'εν δυνάμει' πηγές ελευθέρων ριζών. Γι'αυτό εξάλλου τα φλαβονοειδή μπορούν ενδεχομένως να δράσουν και ως αναστολείς των λιποξυγονασών, διότι δρουν αντιοξειδωτικά ως σαρωτές ελευθέρων ριζών. Μάλιστα, τα δομικά στοιχεία που θα πρέπει να διαθέτει ένα τέτοιο φλαβονοειδές είναι η παρουσία ο-διυδροξυομάδων στους δακτυλίους A και B, η 4-κετο-ομάδα και ο 2,3 διπλός δεσμός, ενώ η ύπαρξη υδροξυλομάδας στη θέση 3 μειώνει την ανασταλτική του δράση, αν και η δράση των όποιων τέτοιων αντιοξειδωτικών εξαρτάται και από τον καθένα τύπο του LOX ξεχωριστά. Από φλαβονοειδή που μελετήθηκαν, η κβερκετίνη, η απιγενίνη, η λουτεολίνη και η κισιλιόλη ήταν μεταξύ των ισχυρότερων αναστολέων της

λιποξυγονάσης-5 (EC 1.13.11.14). Από τις πλέον χαρακτηριστικές ενώσεις μεταξύ των φαινολικών φυσικών προϊόντων, ήταν το νορδιυδρογουαϊραρτικό οξύ (NDGA) που έχει χρησιμοποιηθεί και ως ουσία αναφορά στη σύγκριση με αναστολείς της λιποξυγονάσης. Πρόσφατες έρευνες αναφέρουν ότι παράγωγα φαινολικών οξέων έχουν καταχωρηθεί ως πατέντες για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων, όπως για παράδειγμα η (+)-3,4,3',4'-τετραϋδροξυ-9,7'α-εποξυλιγνανο-7^α,9'-λακτόνη η οποία αναστέλλει τις 5- και 15-λιποξυγονάσες, καθώς και τριμερή ή τετραμερή καφεοϋλοπαράγωγα όπως αυτό που δίνεται σχηματικά παρακάτω (Doiron J. et al., 2009), που αναστέλλουν την 5-LOX. Ακόμη, από μελέτες που πραγματοποιήθηκαν, φαίνεται να υπάρχει σχέση μεταξύ της αναστολής της λιποξυγονάσης με την ικανότητα των αναστολέων να ανάγουν τον Fe³⁺ στο ενεργό κέντρο της LOX, στη φυσιολογική-μη ενεργή κατάσταση του Fe²⁺. Μειονεκτήματα των ανωτέρω αποτελούν η χαμηλή *per os* βιοδιαθεσιμότητα, η χαμηλή εκλεκτικότητα σε ορισμένους τύπους λιποξυγονάσης (πχ.5-LOX) και οι εκτεταμένες παρενέργειες (σχηματισμός μεθαιμογλοβίνης), λόγω της αλληλεπίδρασης τους με άλλα βιολογικά συστήματα και της συμμετοχής τους στην παραγωγή ελευθέρων ριζών (Zhou B. et al., 2005; Robinson D.S. et al., 1995; Noguchi N. et al., 2002; Sadik C.D. et al., 2003; Werz O., 2007; Kemal C. et al., 1987; Van Der Zee J. et al., 1989; Yoshimoto T. et al., 1983; Tappel A.L. et al., 1953; Ford-Hutchinson A.W. et al., 1994; McMillan R.M. et al., 1992; Pergola C. et al., 2010; Halliwell B. Et al., 1998).





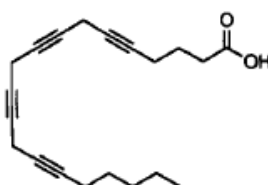
(+)-3,4,3',4'-τετραϋδροϋ-9,7'α-εποξυλιγνανο-7α,9'-λακτόνη



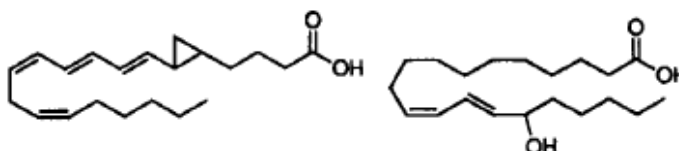
τετραμερές καφεϋλοπαράγωγο

Η τρίτη κατηγορία αναστολέων της λιποξυγονάσης που απαρτίζεται από υποστρώματα που προσομοιάζουν με το αραχιδονικό οξύ, όπως το 5,8,11,14-εικοσατετραϊνικό οξύ, και ανταγωνίζονται με αυτό για να καταλάβουν το ενεργό κέντρο του ενζύμου, καθώς και από προϊόντα-παράγωγα, παρόμοια με τα LTA₄, 5-ΗΕΤΕ και 15-ΗΕΤΕ, που όμως δεν έχουν τη δράση που εμφανίζουν τα τελευταία και καταφέρνουν να αναστέλλουν τη δράση τους. Ωστόσο η τρίτη αυτή κατηγορία

ενώσεων φαίνεται να έχει περιορισμένη χρήση για την ανάπτυξη φαρμάκων, λόγω της σχετικά μικρής *in vitro* δράσης τους (Haviv F. et al., 1987; Corey E.J. et al., 1983; Hamberg M. et al., 1974; Downing D.T. et al., 1970; Arai Y. et al., 1983)



Εικοσατετραϊνικό οξύ



Προϊόντα-ανάλογα των LTA₄ και 15-HETE

Βιολογικός ρόλος των LOX

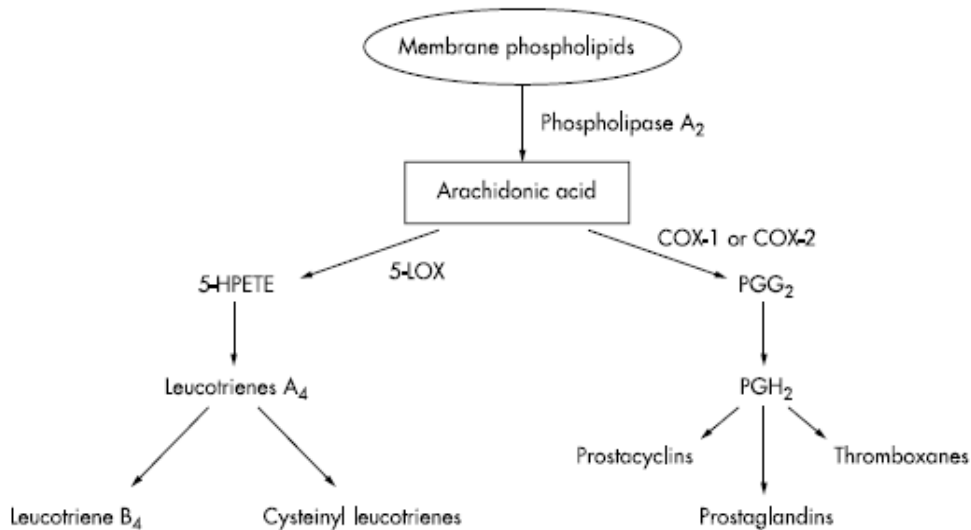
Οι LOXs και τα προϊόντα τους φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και μετάσταση του καρκίνου, ενώ φαίνεται να σχετίζονται με το άσθμα και με διαταραχές του ανοσοποιητικού. Ειδικότερα, παρατηρήθηκε υψηλή έκφραση της λιποξυγονάσης-5 στον προστάτη, στον πνεύμονα, στο κόλον, στο στήθος καθώς και σε άλλες καρκινικές σειρές κυττάρων. Προσφάτως αποδείχθηκε ότι η λιποξυγονάση-5 αποτελεί έναν σημαντικό ρυθμιστικό παράγοντα σε καρκινικά εμβρυικά κύτταρα χρόνιας μυελοειδούς λευχαιμίας, με την αναστολή του ενζύμου σε επίμυες μέσω της παρεμπόδισης της έκφρασης του γονιδίου *Allox5*, να λειτουργεί ευεργετικά στην αντικαρκινική θεραπεία. Μάλιστα, αναστολέας του ίδιου τύπου λιποξυγονάσης παρεμπόδισε την καρκινογένεση σε πνεύμονες επιμύων που τους χορηγήθηκε καρκινογόνος αγωγή, ενισχύοντας με αυτόν τον τρόπο την πεποίθηση ότι η αναστολή του μονοπατιού της λιποξυγονάσης-5 ενδεχομένως να κρίνεται σημαντική για την αντιμετώπιση του καρκίνου (Nie D. et al., 2001; Anderson K.M. et al., 1998; Avis I.M. et al., 1996; Wang D. et al., 2010; Chen Y. et al., 2009; Rioux N. et al., 1998; Schneider I. et al., 2005). Επιπροσθέτως, τα προϊόντα των 12- και 15-

λιποξυγονασών εμπλέκονται και στην ανάπτυξη της ψωρίασης, της αθηροσκλήρωσης, της ρευματοειδούς αρθρίτιδας και της επιληψίας. Οι μεταβολίτες του μονοπατιού της 12-λιποξυγονάσης (EC 1.13.11.31) θεωρούνται ότι συμβάλλουν εν μέρει και στην παθογένεση της ψωρίασης, διότι ενώ υπό φυσιολογικές συνθήκες στην επιδερμίδα συντίθεται κυρίως το 12(S)-HETE, στην ψωρίαση συναντάται το εναντιομερές του, το 12(R)-HETE, το οποίο προέρχεται από την 12(R)-λιποξυγονάση που ανήκει στην οικογένεια των λιποξυγονασών των θηλαστικών που έχουν την ικανότητα να συνθέτουν το R-στερεοϊσομερές του HETE. Επομένως αναστολείς της 12-λιποξυγονάσης μπορούν πιθανώς να συμβάλλουν στη θεραπεία της ψωρίασης. Όσον αφορά την αθηροσκλήρωση, από *in vitro* μελέτες προκύπτει ότι η 12-λιποξυγονάση σχετίζεται με αυτήν, γιατί έχει την ικανότητα να οξειδώνει εστεροποιημένα λιπαρά οξέα σε λιποπρωτεΐνες (LDL) και βιολογικές μεμβράνες, με τα προϊόντα της αντίδρασης αυτής να έχουν ζωτικής σημασίας ρόλο στα πρώτα στάδια της αθηροσκλήρωσης (Yoshimoto T. et al., 2002; Muller K. et al., 2002; Duxin S. et al., 1998; Muller K., 1994; Cornicelli J.A. et al., 1999; Dailey L.A. et al., 1999; Pergola C. et al., 2010; Halliwell B. Et al., 1998).

Λιποξυγονάση και προϊόντα της

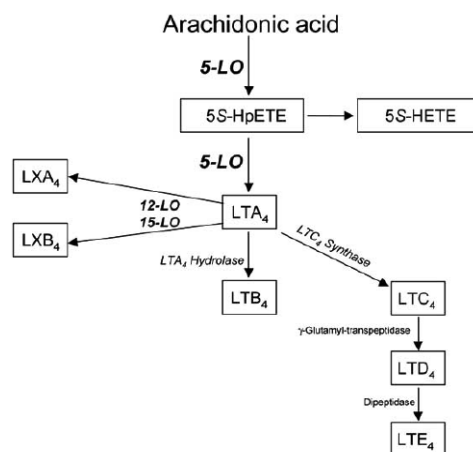
Οι προσταγλανδίνες και τα λευκοτριένια συνιστούν μια μεγάλη και σύνθετη οικογένεια από βιολογικώς ενεργά λιπίδια που προέρχονται από τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα με την εισαγωγή μοριακού οξυγόνου, με σημαντικές δράσεις στον οργανισμό, συμμετέχοντας στη ρύθμιση ενός πλήθους φυσιολογικών διεργασιών και με ρόλο κλειδί στο σχηματισμό φλεγμονής (Weissmann G., 1992; Samuelsson B., 1983; Jampilek J. et al., 2006). Οι προσταγλανδίνες και τα λευκοτριένια καθώς και παρόμοιες κατηγορίες ενώσεων όπως οι θρομβοξάνες και άλλα υδροξυ-λιπαρά οξέα, συχνά αναφέρονται ως εικοσανοειδή διότι συντίθενται από τα PUFAs, έχουν 20 άτομα άνθρακα, και δρουν τοπικά ως ορμόνες. Η πιο σημαντική πρόδρομος ένωση είναι το αραχιδονικό οξύ (Fiorucci S. et al., 2001; Charlier C. et al., 2003). Το αραχιδονικό οξύ δεν μπορεί να συντεθεί *de novo* στα κύτταρα των θηλαστικών και

για το λόγο αυτό θα πρέπει να λαμβάνεται μέσω της τροφής ή μέσω της μετατροπής του λινολεϊκού οξέος σε αυτό.



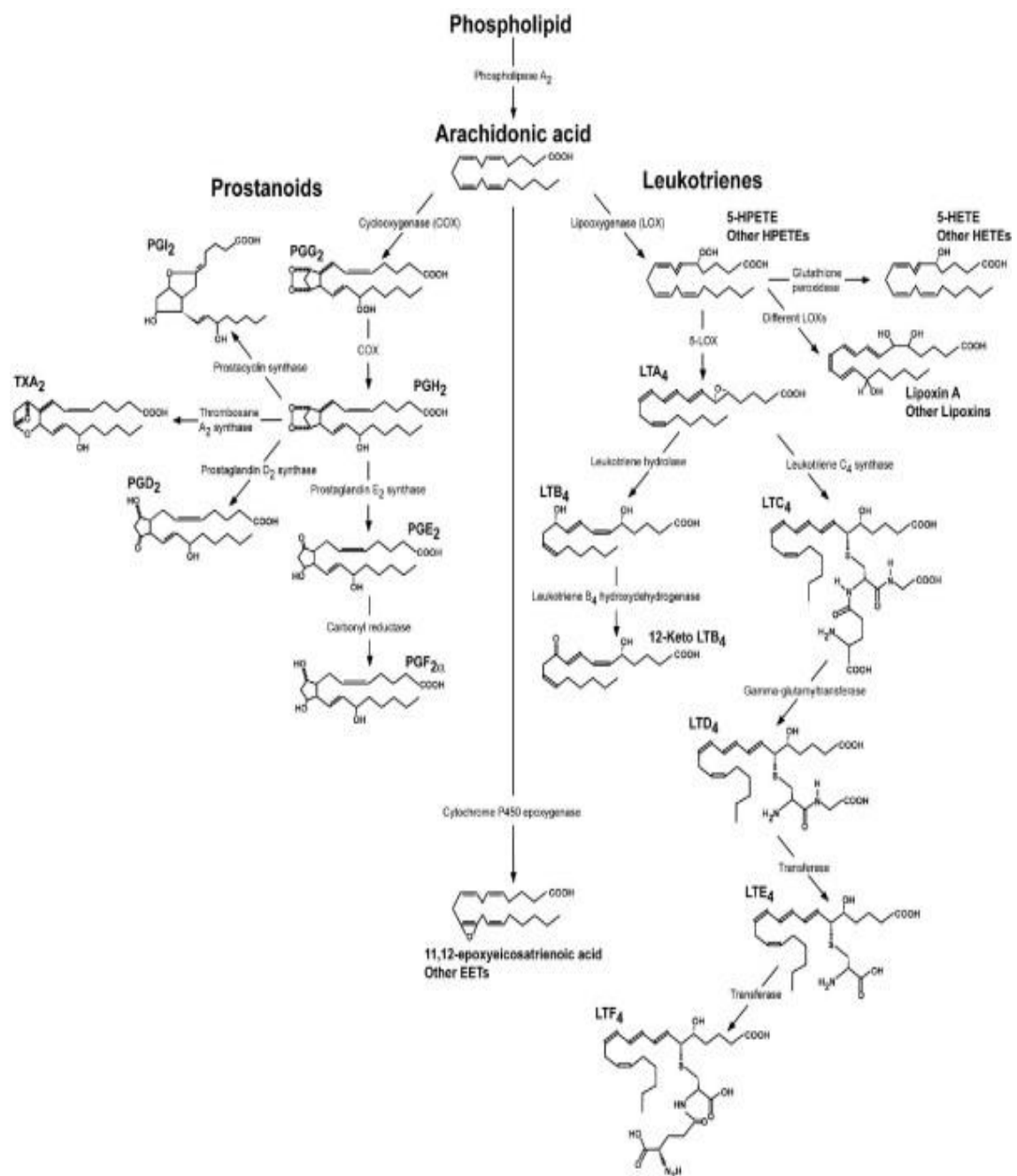
Προϊόντα μεταβολισμού αραχιδονικού οξέος (Martel-Pelletier J. et al., 2003)

Πάνω στο αραχιδονικό οξύ επιδρά και η λιποξυγονάση των αιμοπεταλίων για να σχηματίσει 12-υδροπεροξυ-5,8,11,14-εικοσατετραονικό οξύ (12-HPETE), το οποίο είναι ασταθές και μπορεί να αναχθεί *in vivo* σε 12-υδρόξυ-παράγωγο (12-HETE) (Fiorucci S. et al., 2001; Charlier C. et al., 2003). Η αναγωγή αυτή φαίνεται να επιτυγχάνεται από υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης των αιμοπεταλίων, παρουσία γλουταθειόνης. Τα παράγωγα του 12-HPETE αποτελούν πρόδρομες ουσίες ενός πλήθους χημικών ενώσεων με σημαντική βιολογική δράση, που είναι γνωστές ως λευκοτριένια.



Μεταβολικό μονοπάτι της 5-λιποξυγονάσης

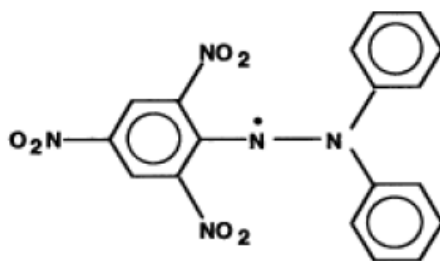
Τα λευκοτριένια διαφέρουν δομικά από τις προσταγλανδίνες και τη θρομβοξάνη, διότι δεν φέρουν δακτύλιο κυκλοπεντανίου, ενώ έχουν δομή τριενίου, δηλαδή τρεις διπλούς δεσμούς που χωρίζεται ο καθένας μεταξύ τους από απλούς δεσμούς ενώ διακρίνονται και αυτά σε διάφορους τύπους, εμφανίζοντας σημαντικές δράσεις και βιολογικές ιδιότητες. Υπάρχουν λευκοτριένια (LTB₄) που αποτελούν ισχυρούς χημειοτακτικούς παράγοντες για τα ουδετερόφιλα, προάγοντας με αυτό τον τρόπο τη συνάθροιση και συσσώρευσή τους. Μάλιστα, και τα ίδια τα ουδετερόφιλα παράγουν LTB₄, ελκύοντας ολοένα και περισσότερα στο σημείο της φλεγμονής, προκαλώντας το φαινόμενο της 'αναπνευστικής έκρηξης' (respiratory burst). Τα λευκοτριένια αυτού του τύπου (LTB₄) αποτελούν και τα μόρια-διαμεσολαβητές στην πρόκληση φλεγμονής και περίσφιξης των βρόγχων σε καταστάσεις αλλεργικού άσθματος. Επιπροσθέτως, υπάρχουν λευκοτριένια (LTC₄, LTD₄) που αυξάνουν τη διαπερατότητα των αγγείων, ενώ υψηλά επίπεδα αυτών έχουν παρατηρηθεί σε περιπτώσεις ψωρίασης, αλλεργικής ρινίτιδας και ρευματοειδούς αρθρίτιδας. Κλινικές μελέτες επιβεβαιώνουν τη θεραπευτική αξία της αντιλευκοτριενικής αγωγής στο άσθμα, ωστόσο τα αποτελέσματα από θεραπεία με αναστολή της βιοσύνθεσης των λευκοτριενίων σε καταστάσεις ψωρίασης και αρθρίτιδας δεν είναι ιδιαίτερος ενθαρρυντικά (Samuelsson B., 1983; Jampilek J. et al., 2006; Steinhilber D., 1999).



Ένζυμα και προϊόντα μεταβολισμού αραχιδονικού οξέος

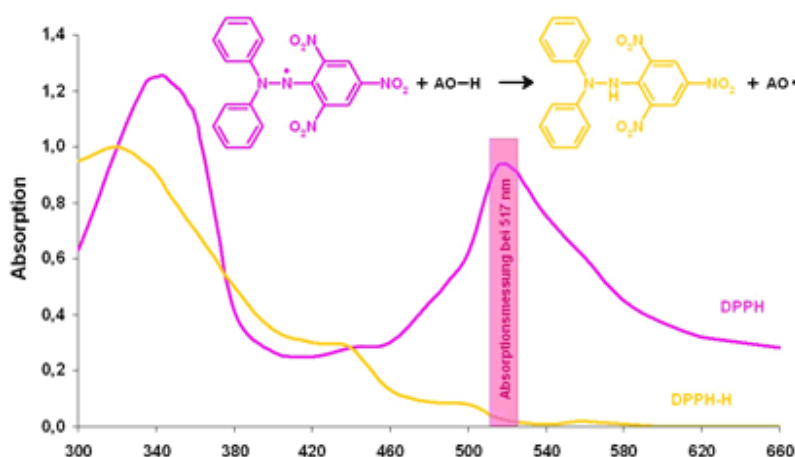
IN VITRO ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ

Δοκιμή σάρωσης ελευθέρων ριζών με τη χρήση της μεθόδου DPPH

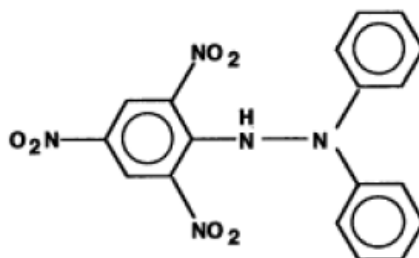


1,1 διφαινυλο-2-πικρυλ-υδραζυλίο(DPPH)

Το μόριο του 1,1 διφαινυλο-2-πικρυλ-υδραζυλίου (α,α-diphenyl-β-picrylhydrazyl, DPPH), χαρακτηρίζεται ως μια σταθερή, ελεύθερη ρίζα, της οποίας το επιπλέον ηλεκτρόνιο είναι απεντοπισμένο μέσα στο π-ηλεκτρονιακό σύστημα των τριών φαινολικών δακτυλίων, καλύπτοντας όλο το μόριο, με αποτέλεσμα να μην διμερίζεται όπως συνήθως συμβαίνει με τις περισσότερες ελεύθερες ρίζες. Αυτό του προσδίδει και ένα βαθύ, ιώδες χρώμα που χαρακτηρίζεται από μια κορυφή απορρόφησης στα 517nm σε αιθανολικό διάλυμα.



Όταν ένα διάλυμα με DPPH αναμιχθεί με μια ένωση που μπορεί να προσφέρει άτομο υδρογόνου, προκύπτει η ανηγμένη μορφή του DPPH, η 1,1διφαινυλο-2-πικρυλ-υδραζίνη και συντελείται απώλεια του ιώδους χρώματος και εμφάνιση ενός ωχρού κίτρινου λόγω της πικρυλ-ομάδας.



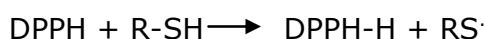
1,1διφαινυλο-2-πικρυλ-υδραζίνη(DPPH-H)

Η αντίδραση που προκύπτει είναι η ακόλουθη, όπου A-H το μόριο-δότης υδρογόνου, και η οποία προσομοιάζει τις αντιδράσεις που συντελούνται κατά τη λιπιδική υπεροξειδωση:

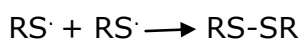


Από τη βιβλιογραφία, είναι γνωστό ότι τα φλαβονοειδή αλληλεπιδρούν με τη σταθερή ρίζα DPPH, εκδηλώνοντας αντιοξειδωτική δράση, η οποία οφείλεται σε επιμέρους ειδικά δομικά χαρακτηριστικά τους, αλλά και στη γενική δομή (φαινολικά υδροξύλια, συνδυασμός φαινολικών υδροξυλίων με καρβονυλικές ομάδες). Όπως επίσης προαναφέρθηκε, η αντιοξειδωτική δράση φλαβονοειδών οφείλεται και στο συνδυασμό διπλού δεσμού των C-2 και C-3 με το υδροξύλιο στη θέση 5, για τα φλαβονοειδή εκείνα με ένα ή καθόλου υδροξύλια στο B δακτύλιο.

Η δοκιμή σάρωσης ελευθέρων ριζών με τη χρήση της μεθόδου DPPH περιγράφηκε πρώτα από τον από τον Blois το 1958 που αργότερα τροποποιήθηκε με μικρές αλλαγές από πλήθος ερευνητών(Blois M.S., 1958). Σε αυτήν την πρώτη αναφορά, χρησιμοποιήθηκε ως αντιοξειδωτικό το θειολο-αμινοξύ, κυστεΐνη. Επομένως η αντίδραση που πραγματοποιείται αρχικά είναι η:



όπου R-SH η κυστεΐνη, η οποία στη συνέχεια με τη μορφή της ρίζας R-S \cdot , αντιδρά με όμοιά της, προκύπτοντας η παρακάτω αντίδραση:



Σε αυτήν την πρωτότυπη μέθοδο, ο συνιστώμενος χρόνος αντίδρασης ήταν τα τριάντα λεπτά. Ωστόσο, σε πρωτόκολλα που ακολούθησαν, η τάση που προτιμήθηκε ήταν ότι η αντίδραση θα πρέπει να ολοκληρώνεται, δίνοντας ένα plateau, διότι ο

βαθμός ολοκλήρωσης τη αντίδρασης ποικίλλει μεταξύ των διαφόρων αντιοξειδωτικών ενώσεων που μελετώνται.

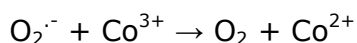
Η μέθοδος παρουσιάζει τα πλεονεκτήματα ότι χρησιμοποιεί μια σταθερή, διαλυτή στη μεθανόλη και εμπορικά διαθέσιμη ελεύθερη ρίζα, με απλή διαδικασία, επαναλαμβανόμενη, που τα αποτελέσματά της μπορούν εύκολα να συγκριθούν με άλλες μεθόδους μέτρησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας που αναφέρονται παρακάτω (Villano D. et al., 2007; Cotelle N. et al., 1996; Koleva I.I. et al., 2003; Arnous A. et al., 2001).

Η μέθοδος της χημειοφωταύγειας της Λουμινόλης, επαγόμενη από το σύμπλοκο Co(II)-EDTA

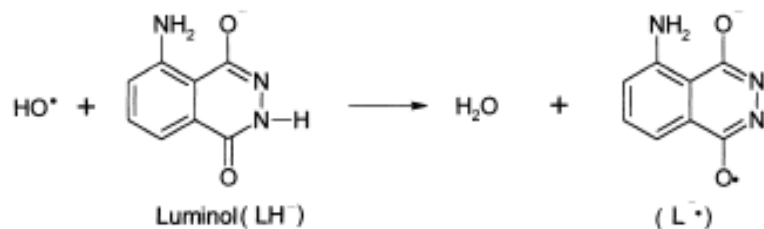
Η μέθοδος της χημειοφωταύγειας έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε πρωτόκολλα για την καταγραφή ελευθέρων ριζών. Η δημιουργία ριζών οξυγόνου ($O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot}) προκαλεί την εκπομπή φωτός, το οποίο μπορεί να καταγραφεί από τα λουμινόμετρα. Η ένταση του παραγόμενου μπορεί να ενισχυθεί με την προσθήκη της λουμινόλης ως μορίου-ανιχνευτή, η οποία αντιδρά με υδροϋπεροξειδία.



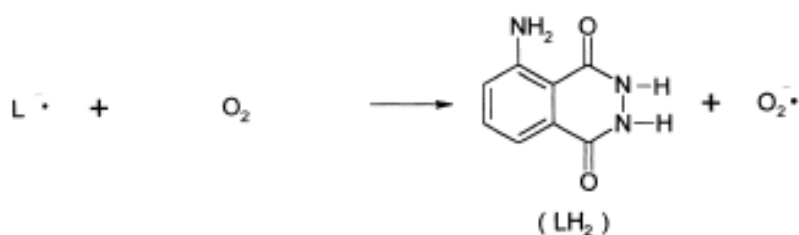
Το κοβάλτιο(II) που συμπλοκοποιείται με το αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ (EDTA), καταλύει το σχηματισμό ριζών υδροξυλίου μέσω της αντίδρασης Fenton, δημιουργώντας ελεύθερες ρίζες από το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Το σύμπλοκο Co(II)-EDTA συνοδεύει πολλά μεταλλικά ιόντα και τα διατηρεί σε μια ριζική-δραστική μορφή μέσα σε διαλύματα. Αυτές οι ενεργές μορφές του οξυγόνου που σχηματίζονται με τη βοήθεια του συμπλόκου κοβαλτίου, αντιδρούν με τη λουμινόλη προς παραγωγή φωτός (430nm).



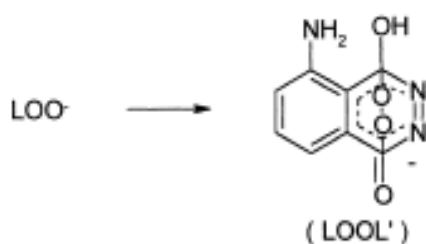
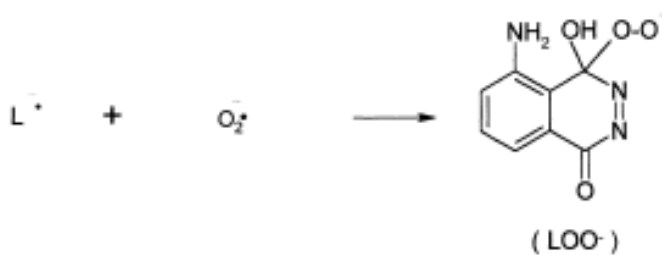
Πιο αναλυτικά, η λουμινόλη (LH^{\cdot}) σε βασικό pH αντιδρά με τις ρίζες υδροξυλίου προς σχηματισμό ύδατος και ρίζας διαζαμικινόνης (L^{\cdot}).



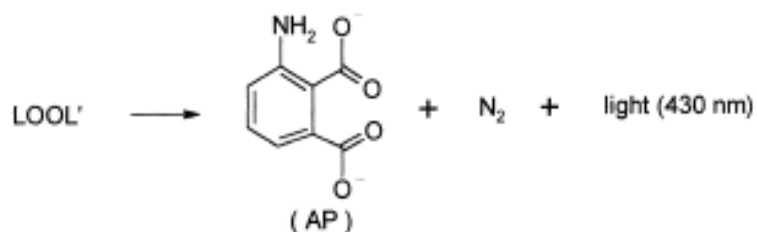
Η ρίζα διαζαμικινόνης ανάγει το O_2 σε υπεροξειδικό ανιόν ($\text{O}_2^{\bullet-}$), οξειδωμένη σε 5-αμινο-υφενθαλαζίνη-1,4-διόνη (5-aminohyphenthalazine-1,4-dione) (LH_2).



Η L^\bullet και το $\text{O}_2^{\bullet-}$ σχηματίζουν το υδροϋπεροξειδικό ανιόν LOO^- , το οποίο μετασχηματίζεται σε ενδοϋπεροξειδίο



Τέλος, το ενδοϋπεροξειδίο 'αποσυντίθεται' παράγοντας αμινοφθαλικό (AP) και N_2 , προκαλώντας την εκπομπή φωτός όπως προαναφέρθηκε.

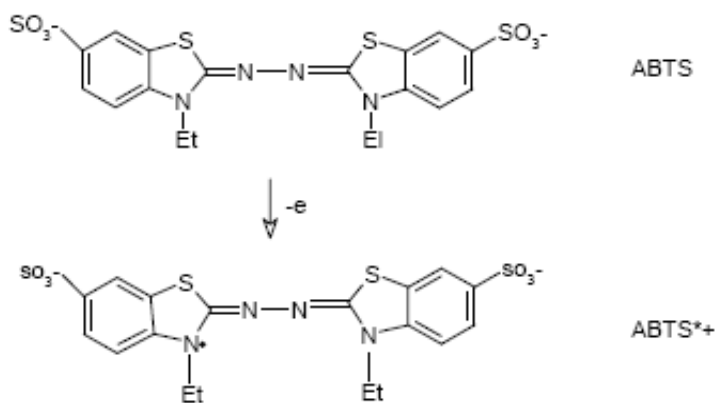


Η προσθήκη σαρωτών ελευθέρων ριζών έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση της έντασης της χημειοφωταύγειας της λουμινόλης, καθιστώντας εφικτή την αποτίμηση της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας.

Πρόκειται για μια ιδιαίτερα ευαίσθητη μέθοδο, λόγω του ότι έχουμε τη δημιουργία ελευθέρων ριζών και καταγραφή της εκπομπής φωτός που προκαλούν και χρησιμοποιείται ευρέως μαζί με τη μέθοδο σάρωσης της ρίζας DPPH (Parejo I. et al., 2000, Parejo I. et al., 2000b, Yildiz I. et al., 1998, Yildiz I. et al., 1998b).

Δοκιμή TEAC(Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)/**ABTS και DMPD**

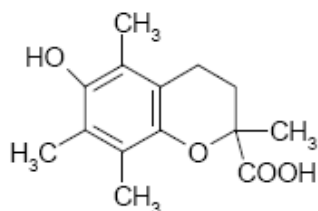
Η δημιουργία της κατιονικής ρίζας του ABTS [2,2 αζινο-δισ(3-αιθυλοβενζοθειαζολίνη-6-σουλφονικό οξύ)] αποτελεί τη βάση για την ανάπτυξη αυτής της φασματοφωτομετρικής μεθόδου. Το ABTS με την οξειδωση μετατρέπεται στην κατιονική ρίζα $ABTS^{\cdot+}$, που είναι ανθεκτική, έχει μπλε/πράσινο χρώμα και ανιχνεύεται φασματοφωτομετρικά, διότι το $ABTS^{\cdot+}$ έχει χαρακτηριστική απορρόφηση στην περιοχή του υπέρυθρου στα 645, 734 και 815nm.



Δημιουργία της κατιονικής ρίζας $ABTS^{\cdot+}$

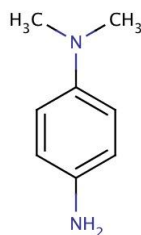
Ο αποχρωματισμός που υφίσταται η ρίζα από τα αντιοξειδωτικά αποτελεί έναν έμμεσο τρόπο ελέγχου της αντιοξειδωτικής ικανότητας ενώσεων σε λιπόφιλα και υδρόφιλα συστήματα, λαμβάνοντας υπόψιν σε αυτήν, την επίδραση της συγκέντρωσης του αντιοξειδωτικού και τη διάρκεια της αναστολής της απορρόφησης της κατιονικής ρίζας. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιείται το τρόλοξ (Trolox) με την

αντιοξειδωτική δράση να ορίζεται με ισοδύναμες μονάδες τρόλοξ (TEAC/mg). Μαζί με τη δοκιμή σάρωσης ελευθέρων ριζών με χρήση της μεθόδου DPPH, αποτελούν τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους ελέγχου της αντιοξειδωτικής δράσης.



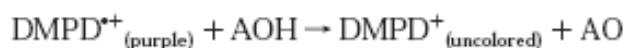
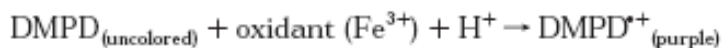
Τρόλοξ (Trolox)

Μια αντίστοιχη προσέγγιση ακολουθείται και στη δοκιμή με *N,N*-διμεθυλ-*p*-φαινυλενδιαμίνη (*N,N*-dimethyl-*p*-phenylenediamine) (DMPD), όπου σε χαμηλό pH και σε κατάλληλο χημικό περιβάλλον, ενεργοποιείται το DMPD, σχηματίζοντας την κατιονική ρίζα DMPD^+ , ιώδους χρωματισμού, που ανιχνεύεται στα 505nm.



DMPD

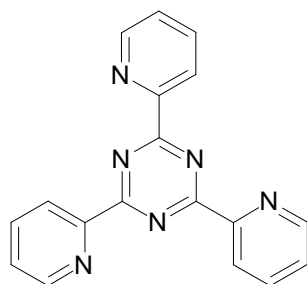
Και σε αυτήν την περίπτωση, η ύπαρξη αντιοξειδωτικού που μπορεί να προσφέρει άτομο υδρογόνου στη DMPD^+ , προκαλεί τον αποχρωματισμό του ο οποίος μετράται και υπολογίζεται εμμέσως η δραστηριότητα του αντιοξειδωτικού.



Η αντίδραση είναι σύντομη, αφού διαρκεί λιγότερο από 10min και το τελικό της σημείο που είναι σταθερό, λαμβάνεται ως μέτρο της αντιοξειδωτικής ικανότητας του υπό εξέταση δείγματος (Rice Evans C. et al., 1994; Rice Evans C. et al., 1996; Re R. et al., 1999; Miller N.J. et al., 1993; Miller N.J. et al., 1996; Fogliano V. et al., 1999).

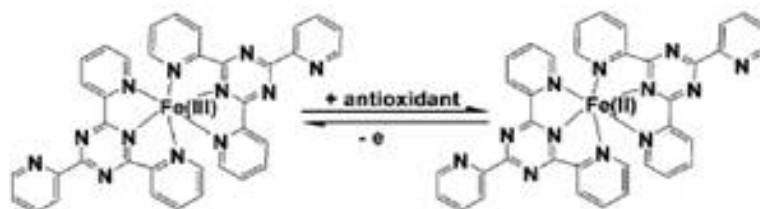
Δοκιμή FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

Η δοκιμή αυτή χρησιμοποιείται πολύ συχνά για την εκτίμηση των αντιοξειδωτικών συστατικών στις πολυφαινόλες που λαμβάνονται με τις διάφορες τροφές. Δίνει επαναλήψιμα αποτελέσματα σε σύντομο χρονικό διάστημα και αποτελεί μια μέθοδο με αποτελέσματα ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών στα υδατικά διαλύματα. Είναι φθηνή ως προς την εφαρμογή της και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται παρασκευάζονται εύκολα.



TPTZ

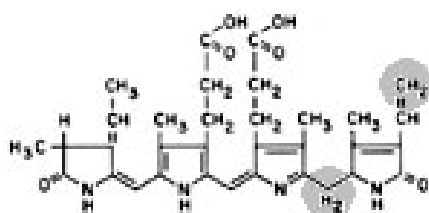
Στηρίζεται στην αναγωγή ενός τρισθενούς σιδηρούχου συμπλόκου τρι-πυριδυλο-τριαζίνης $[Fe(III)-(TPTZ)_2]$ σε δισθενές σιδηρούχο σύμπλοκο τρι-πυριδυλο-τριαζίνης $[Fe(II)-(TPTZ)_2]$ από κάποιο αντιοξειδωτικό, συνήθως σε χαμηλό pH. Το δεύτερο σύμπλοκο έχει χαρακτηριστικό μπλε χρώμα με μέγιστο απορρόφησης στα 593nm που ανιχνεύεται φασματοφωτομετρικά πολύ εύκολα (Benzie I.F.F. et al., 1996; Benzie I.F.F. et al., 1999; Halvorsen B.L. et al., 2002)



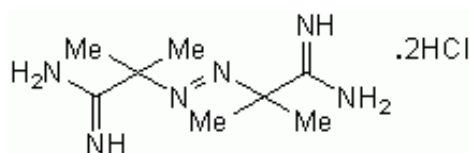
Μηχανισμός δοκιμής FRAP

Δοκιμή ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

Συνήθως χρησιμοποιείται βητα-φυκοερυθρίνη (B-PE) ως πρωτεϊνικό υπόστρωμα που οξειδώνεται και 2,2'-αζα-δισ-(2-αμιδινοπροπαν)-διυδροχλωρίδιο (AAPH) ως πηγή ριζών υπεροξειδίου ή ένα σύστημα Cu^{2+} - H_2O_2 ως πηγή υδροξυλικών ριζών.

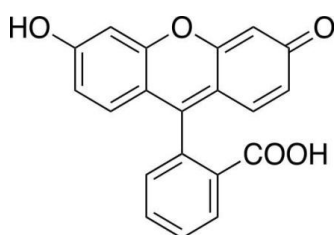


beta-phycoerythrin



AAPH

Η μείωση του φθορισμού της B-PE είναι η ένδειξη του μεγέθους της φθοράς που έχει υποστεί από την αντίδρασή της με τις ρίζες υπεροξειδίου. Η μέτρηση του επιπέδου της προστασίας που προσφέρει το αντιοξειδωτικό, μετράται από το εμβαδό της επιφάνειας κάτω από την καμπύλη μείωσης φθορισμού του υποστρώματος (AUC-Area Under Curve) και συγκρίνεται με την αντίστοιχη επιφάνεια στην καμπύλη που προκύπτει δίχως την προσθήκη αντιοξειδωτικού. Η δοκιμή ORAC λαμβάνει υπόψιν τον χρόνο που απαιτείται και το βαθμό αναστολής της μείωσης της έντασης φθορισμού, καθώς η αντίδραση οδηγείται προς την ολοκλήρωσή της. Η B-PE είναι φωτοευαίσθητη και μετά από σύντομη έκθεση στο φως αποχρωματίζεται, προκαλώντας μείωση των επιπέδων φθορισμού της ακόμη και χωρίς την προσθήκη AAPH, με αποτέλεσμα τις εσφαλμένες μετρήσεις. Ακόμη, έχει παρατηρηθεί ότι η B-PE αντιδρά με τις πολυφαινόλες λόγω της μη-ειδικής θέσης σύνδεσης. Λόγω του ότι η διαδικασία που ακολουθούνταν ήταν χρονοβόρα, σε νέα τροποποιημένα πρωτόκολλα αναζητήθηκαν άλλα υποστρώματα που θα μπορούσαν να αντικαταστήσουν τη B-PE. Από τα πλέον χρησιμοποιούμενα είναι η φλουορεσκεΐνη ως υπόστρωμα, σταθερότερο της B-PE (Cao G. et al., 1993; Cao G. et al., 1995; Ou B. et al., 2001; Huang D. et al., 2002; Silva E.M. et al., 2006)



Fluorescein

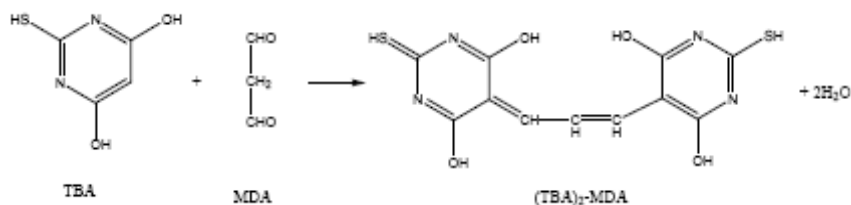
Η δοκιμή του θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBA)

Αυτή η δοκιμή είναι μία από τις παλαιότερες και η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για τη μέτρηση της υπεροξειδωσής των λιπαρών οξέων, των μεμβρανών και των τροφίμων.

Στα βιολογικά συστήματα η δραστική μηλονική-διαλδεΰδη (MDA) λαμβάνει μέρος στις αλληλεπιδράσεις του DNA με τις πρωτεΐνες καθώς και στις φθορές των ηπατικών κυττάρων. Η λιπιδική υπεροξειδωση μπορεί να οριστεί ως η οξειδωτική «παρακμή» των πολυακόρεστων λιπών. Η εκκίνηση μιας αλυσίδας αντιδράσεων υπεροξειδωσης σε μια μεμβράνη ή στα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα γίνεται λόγω της απόσπασης ενός ατόμου υδρογόνου από το διπλό δεσμό των λιπαρών οξέων. Η ελεύθερη ρίζα τείνει να σταθεροποιηθεί με μια μοριακή αναδιοργάνωση και να παράγει ένα συζυγιακό διένιο, το οποίο εύκολα αντιδρά με μοριακό οξυγόνο με αποτέλεσμα το σχηματισμό μιας υπεροξειδικής ρίζας. Αυτές οι υπεροξειδικές ρίζες μπορούν να αποσπάσουν ένα άτομο υδρογόνου από ένα άλλο μόριο και να δώσουν ένα λιπιδικό υδροϋπεροξείδιο (R-OOH). Μια πιθανή κατάληξη των υπεροξειδικών ριζών είναι να σχηματίσουν κυκλικά υπεροξείδια. Αυτά τα κυκλικά υπεροξείδια, τα λιπιδικά υπεροξείδια, καθώς και τα κυκλικά ενδοϋπεροξείδια, μετατρέπονται σε αλδεΰδες συμπεριλαμβανομένης και της μηλονυλο-διαλδεΰδης MDA.

Η MDA είναι το κύριο προϊόν της λιπιδικής υπεροξειδωσης και χρησιμοποιείται για τη μελέτη της εξέλιξης της λιπιδικής υπεροξειδωσης και σε *in vivo* πειράματα. Αυτά τα μικρά ποσά της «ελεύθερης» MDA που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της υπεροξειδωσης των περισσότερων συστημάτων, μπορούν να αντιδράσουν με

θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA) και να δώσουν ένα προϊόν έντονου ροζ χρώματος (TBA)₂-MDA:

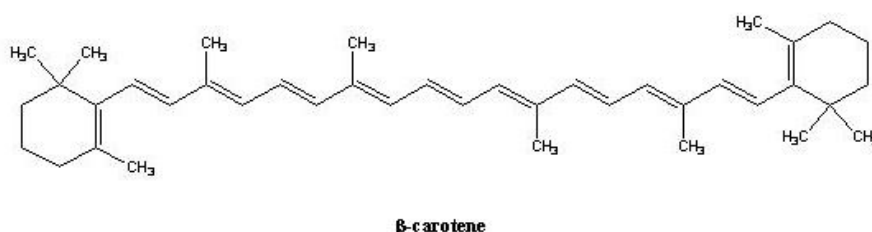


Στο σχηματισμό αυτού του προϊόντος με το έντονο ροζ χρώμα στηρίζεται αυτή η μέθοδος. Σε όξινο διάλυμα το προϊόν απορροφά στα 532nm και φθορίζει στα 553nm.

Τα πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι ότι είναι πολύ απλή στη χρήση, (απλά θερμαίνουμε το υπό έλεγχο υλικό μαζί με το TBA σε όξινο περιβάλλον και σχηματίζεται ένα ευκρινές ροζ χρώμα που μετριέται εύκολα φασματοφωτομετρικά στα 532 nm), και ότι έχει εφαρμογή πάνω σε βιολογικό υλικό (Ohkawa H. et al., 1979; Maulik G. et al., 1997).

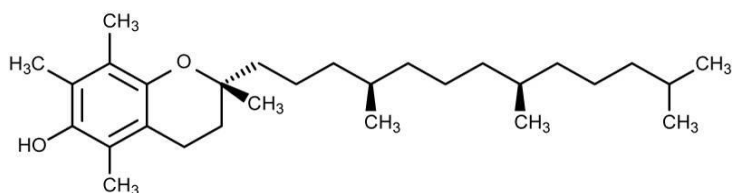
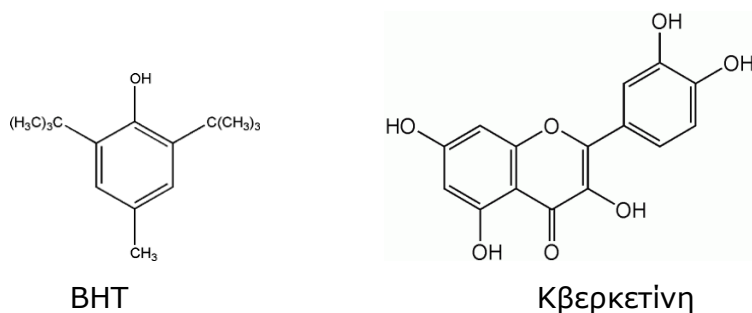
Δοκιμή BCBT (β-carotene bleaching test)

Το πρωτόκολλο της μεθόδου BCBT αναπτύχθηκε αρχικά από τον Miller (1971) και στηρίζεται στην απώλεια του κίτρινου χρώματος του β-καροτενίου λόγω της αντίδρασης του με τις ρίζες που δημιουργούνται από την οξειδωση του λινολεϊκού οξέος.



Ο αποχρωματισμός του β-καροτενίου, που προσδιορίζεται από τη μείωση της αρχικής απορρόφησης στα 470nm, μειώνεται παρουσία αντιοξειδωτικών. Ως ουσίες

αναφοράς χρησιμοποιούνται συνήθως η κβερκετίνη, η α-τοκοφερόλη και το βουτυλο-υδροξυ-τολουόλιο (BHT).



Α-τοκοφερόλη

Η μέθοδος, αν και είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη και δεν απαιτεί χρήση εξειδικευμένων οργάνων, βρίσκει εφαρμογή κυρίως για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας λιπόφιλων αντιοξειδωτικών, λόγω της άπολης φύσης του β-καροτενίου και του σχηματισμού γαλακτώματος κατά τη μελέτη πολικών ουσιών, στοιχείο που περιορίζει το εύρος πεδίου εφαρμογής της δοκιμής αυτής (Koleva I.I. et al., 2002; Miller H.M. et al., 1971).

Έλεγχος της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της αναστολής της δράσης της λιποξυγονάσης φυτικής προέλευσης

Η μέθοδος αυτή, η οποία τα τελευταία χρόνια βρίσκει ολοένα και μεγαλύτερη εφαρμογή, θα περιγραφεί παρακάτω, αφού ήταν μία από τις μεθόδους που χρησιμοποιήθηκε.

Ο ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΤΥΠΟΥ ΙΙ ΚΑΙ Η ΑΝΑΓΩΓΑΣΗ ΤΗΣ ΑΛΔΟΖΗΣ(ALR2)

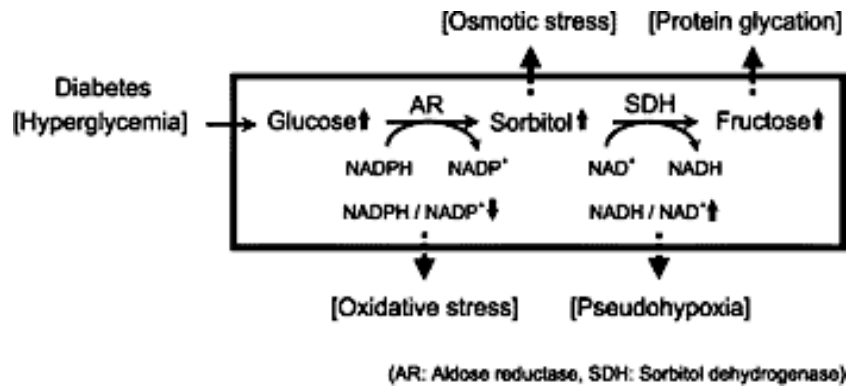
Διαβήτης

Ο διαβήτης (diabetes mellitus) θεωρείται ως μια από τις πιο σοβαρές μη μεταδιδόμενες ασθένειες παγκοσμίως από τον οποίο πάσχουν πάνω από 100 εκατομμύρια άνθρωποι και θεωρείται ως μία από τις πέντε πιο συχνές αιτίες θανάτου στον κόσμο. Μάλιστα, για τα άτομα που γεννήθηκαν το 2000, εκτιμάται ότι η πιθανότητα να αναπτύξουν διαβήτη κάποια στιγμή στη ζωή τους, αγγίζει το 36%. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) αναφέρει ότι οι ασθενείς με διαβήτη θα ξεπεράσουν τα 300 εκατομμύρια έως το 2025 (Narayan K.M.V. et al., 2003; Pradeepa R. Et al., 2002; Zimmet P.Z., 1999).

Αποτελεί μεταβολική διαταραχή και χαρακτηρίζεται από υπεργλυκαιμία και ανεπάρκεια έκκρισης ή δράσης της ινσουλίνης. Στους διαβητικούς η γλυκόζη εκτρέπεται προς μεταβολισμό μέσω του μονοπατιού των πολυολών και μετατρέπεται σε σορβιτόλη από την αναγωγή της αλδόζης και στη συνέχεια σε φρουκτόζη από την δεϋδρογονάση της σορβιτόλης. Αυτή η 'εκτροπή' κρίνεται επιβλαβής διότι η ενεργοποίηση της αναγωγής της αλδόζης έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων του NADPH, η οποία προκαλεί τη μειωμένη αναγέννηση της γλουταθειόνης που αποτελεί έναν προστατευτικό παράγοντα από το οξειδωτικό stress. Επιπροσθέτως τα μειωμένα επίπεδα του NADPH οδηγούν σε αυξημένα επίπεδα 12-υδροπεροξυεικοσατετραονικού οξέος (12-HPETE, 12-hydroperoxyeicosatetraonic acid), τα οποία δεν δύνανται να μεταβολιστούν στο λιγότερο τοξικό 12-υδροξυεικοσατετραονικού (12-HETE, 12-hydroxyeicosatetraenonic) από την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (Brownlee M., 2001; Funk C.D., 1996). Η υπεργλυκαιμία προάγει και τη λιπιδική υπεροξειδωση της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL), με αποτέλεσμα των σχηματισμό ελευθέρων ριζών. Οι επιπλοκές του διαβήτη αντανακλούν μια διαδικασία υπεραγωγής υπεροξειδίων μέσω της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων των μιτοχονδρίων, που προκύπτει ως αποτέλεσμα της υπεργλυκαιμίας, και προκαλεί δυσλειτουργία στα β κύτταρα του παγκρέατος και τελικά διαβήτη τύπου 2 (Tsai E.C. et al., 1994; Kawamura M. et al., 1994, Brownlee

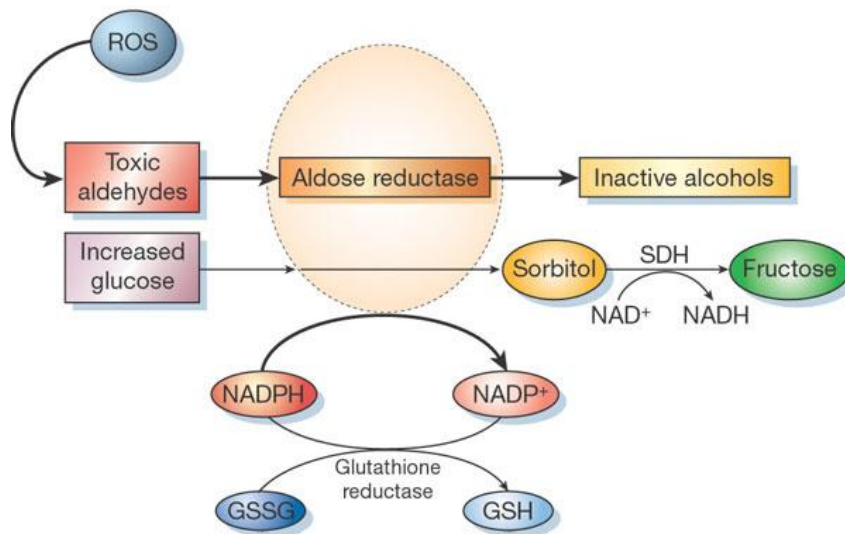
M., 2003). Σε μη διαβητικούς ασθενείς, πολλά είναι τα στοιχεία που συνδέουν την ενεργοποίηση της ALR2 με τη συσσώρευση των τελικών προϊόντων της γλυκοσυλίωσης (AGEs), με μια σειρά άλλων παθολογικών καταστάσεων, όπως η νόσος του Alzheimer, καθιστώντας την αναστολή της ALR2 ελκυστικό στόχο για πιθανές θεραπευτικές προσεγγίσεις στα διαβητικά άτομα (Kikuchi S. et al., 2003).

Παρόλο που το χαρακτηριστικό σύμπτωμα του διαβήτη είναι η υπεργλυκαιμία, η παθοφυσιολογία του διαβήτη επάγεται από ενεργές μορφές οξυγόνου, η παρουσία των οποίων τροποποιεί τη φυσιολογική ενεργοποίηση συγκεκριμένων βιοχημικών οδών ενδοκυτταρικά. Έτσι, οι χρόνιες επιπλοκές του διαβήτη σχετίζονται με τη δυσλειτουργία των οδών αυτών που τελικά οδηγεί σε προϊόντα μεταβολισμού αποδιοργανώνοντας βασικές κυτταρικές διαδικασίες. Οι μηχανισμοί με τους οποίους ο διαβήτης διαταράσσει τη σταθερότητα του κυττάρου, σχετίζονται με τη σύνθεση τελικών προϊόντων γλυκοσυλίωσης, την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C, την υπερδραστηριοποίηση της 12/15-λιποξυγονάσης και την αυξημένη ροή στο μονοπάτι των πολυολών. Τα τελικά προϊόντα γλυκοσυλίωσης προκαλούν μεταβολές στη δομή των πρωτεϊνών, προάγουν την εμφάνιση φλεγμονής και οξειδωτικού stress σε διάφορα κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των μακροφάγων και των κυττάρων του ενδοθηλίου (Haffner S.M., 2000; Natarajan R. Et al., 2004; Gleissner C.A. et al., 2007; Brownlee M., 2001). Παρομοίως, ενεργοποίηση των ενζύμων της οικογένειας της πρωτεϊνικής κινάσης C οδηγεί σε δυσλειτουργίες του ενδοθηλίου με την ενεργοποίηση της οξειδάσης του NADPH, με την αύξηση της διαπερατότητας των αγγείων και με την εμφάνιση θρόμβωσης, διότι αυξάνει τα επίπεδα του αναστολέα ενεργοποίησης πλασμινογόνου (PAI-1) (Williams M.D. et al., 2007). Από κλινικές μελέτες προέκυψε ότι ο διαβήτης σχετίζεται με την ανάπτυξη καρκίνου, με τη σχέση αυτή να είναι συνεργιστική σε ορισμένους τύπους καρκίνου (πχ. ήπατος), ενώ να μην εμφανίζεται αλληλεξάρτηση με ορισμένους άλλους τύπους (πχ. προστάτη). Ωστόσο, σύμφωνα με πρόσφατη, ομόφωνη, κοινή ανακοίνωση της *American Diabetes Association* και της *American Cancer Society*, προκύπτει ότι είναι ακόμα ασαφές εάν αυτή η σχέση είναι άμεση, λόγω της υπεργλυκαιμίας, ή έμμεση, λόγω του ότι ο διαβήτης θεωρείται ένδειξη αντίστασης στην ινσουλίνη και υπερινσουλιαιμίας-παράγοντες που μεταβάλλουν την ενδεχόμενη πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου (Sheshasai S.R.K. et al., 2011; Giovannucci E. et al., 2010).



Αναγωγή της Αλδόζης(ΑLR2)

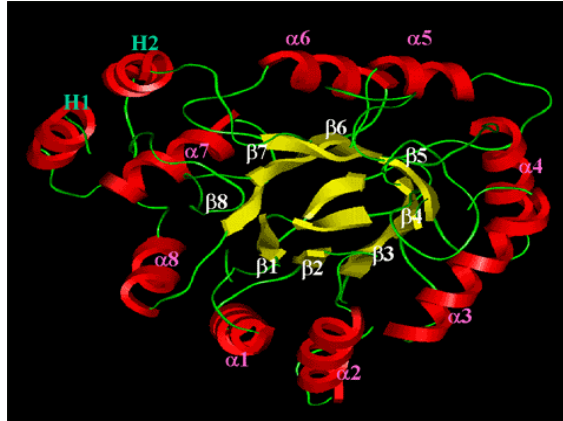
Η αναγωγή της αλδόζης [EC.1.1.1.21, alditol:NAD(P)⁺ 1-oxidoreductase] είναι ένα ένζυμο, υπεύθυνο για την μετατροπή της γλυκόζης σε σορβιτόλη στο μεταβολικό μονοπάτι της πολυόλης. Ένας εκτεταμένος αριθμός μελετών τις προηγούμενες δεκαετίες υποδεικνύουν τη συμμετοχή της στην παθοφυσιολογία των επιπλοκών που προκαλεί ο διαβήτης, καθώς το ένζυμο αυτό είναι ζωτικής σημασίας για τον μεταβολισμό της γλυκόζης. Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η ALR2 δεν μπορεί να περιορίζεται στο μεταβολισμό της γλυκόζης, αλλά συμμετέχει στην αναγωγή ενός πλήθους άλλων στοιχείων συμπεριλαμβανομένων των οποίων είναι οι αλδεΐδες που προκύπτουν από τη λιπιδική υπεροξειδωση και τα γλουταθειονοπαράγωγά τους, τα φωσφολιπίδια, οι αλδόζες και τα στεροειδή.



Επιπροσθέτως, αποτελεί μια πρωτεΐνη οξειδωτικής ανταπόκρισης, διότι εκφράζεται ιδιαίτερα σε καταστάσεις οξειδωτικού stress, σε παράγοντες ανάπτυξης και σε κυτοκίνες. Ωστόσο, θα μπορούσε να σημειωθεί ότι η αναγωγή των αλδεϋδών και των γλουταθειονοπαραγώγων τους μπορεί να ενέχει και μια μορφή 'φυσιολογικού' μηχανισμού σε συνθήκες οξειδωτικού stress και όταν όλοι οι υπόλοιποι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί έχουν κορεστεί. Κάτω λοιπόν από αυτές τις συνθήκες η ALR2, με την αναγωγή αυτών των ενώσεων που προάγουν την καταστροφή του DNA και το σχηματισμό ελευθέρων ριζών, μπορεί να τις απομακρύνει, αποτοξινώνοντας τον οργανισμό από τα κατεξοχήν τελικά προϊόντα της λιπιδικής υπεροξειδωσης (Srivastava S.K. et al., 2005; Srivastava S. et al., 2001; Srivastava S. et al., 2002; Wermuth B. et al., 1983; Matsuura K. et al., 1996; Petrash J.M. et al., 1997; Horvath J.J. et al., 1992; Chakrabarti S. et al., 1991; Boon P.J.M. et al., 1999).

Δομή ALR2

Η ALR2 ανήκει στην υπεροικογένεια των αλδο-κετο-αναγωγασών, αποτελείται από 316 αμινοξέα και η αλληλουχία των αμινοξέων της προσδιορίστηκε για πρώτη φορά στο φακό των ματιών επιμύων. Από μελέτες κρυσταλλογραφικής δομής προκύπτει ότι το ένζυμο εμφανίζει μια β/α βαρέλι τριτοταγή δομή (barrel motif), αποτελούμενη από 8 παράλληλα β-πτυχωτά ελάσματα που συνδέονται με 8 περιφερειακές έλικες, όπου ένα μικρό τμήμα των β-ελασμάτων καλύπτει την N-τερματική απόληξη, καθώς και την C-τερματική προέκταση. Το ενεργό κέντρο του ενζύμου εντοπίζεται στο C-ακραίο τμήμα του μορίου, και πιο συγκεκριμένα στο ένα άκρο του β/α μοτίβου όπου τα C-τελικά άκρα των β-πτυχωτών ελασμάτων συνδέονται με τα N-τελικά άκρα των α-ελικοειδών τμημάτων, με σκοπό την καλύτερη αλληλεπίδρασή του με το NADPH, ένα συνένζυμο που απαιτείται για να εκδηλώσει τη δράση της η αναγωγή της αλδόζης.



β/α βαρέλι (barrel motif) με πυρήνα 8 παράλληλων β-πτυχωτών ελασμάτων (κίτρινο) που συνδέονται με 8 περιφερειακές α-έλικες (κόκκινο), (Perelman School of Medicine, http://www.med.upenn.edu/akr/akr_graphic.shtml)

Σύμφωνα μάλιστα με πρόσφατη μελέτη, κρίνεται ότι αυτό ακριβώς το ενεργό κέντρο του ενζύμου σε συνδυασμό με την κατανομή του ηλεκτρικού φορτίου του ligand, είναι ο κρίσιμος παράγοντας που συμβάλλει στην αναγνώριση του υποστρώματος από το ένζυμο και την αποτελεσματικότητα της σύνδεσής του με αυτό (Fournier B. et al., 2009; Carper D.A. et al., 1989).



Aldose reductase complex with NADP (green) and 2-hydroxy-phenylacetic acid (pink) (pdb 2IN2)

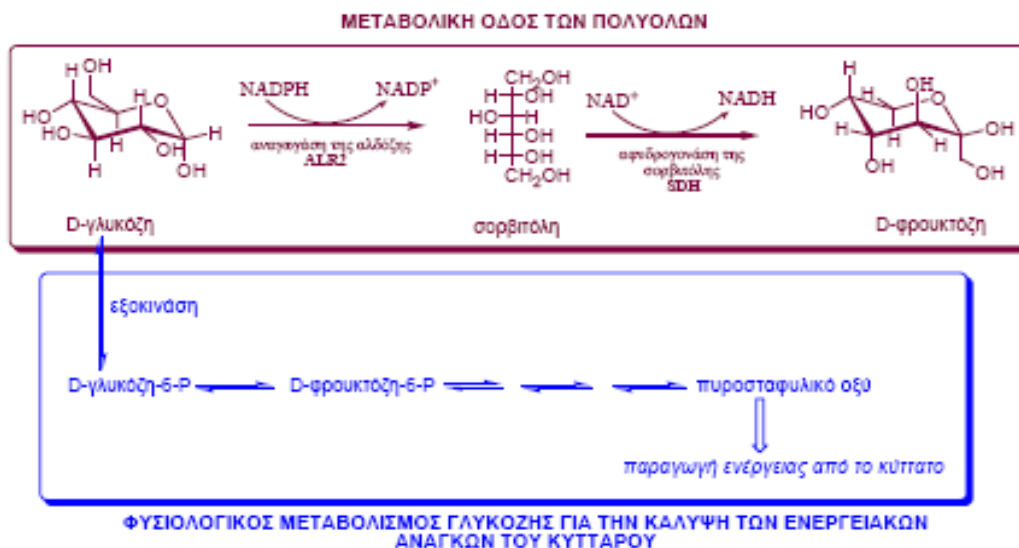
Αναγωγή της αλδόζης (Borhani W.D. et al., 1992)

Λειτουργία ALR2

Αρχικά η ALR2 θεωρήθηκε ότι είναι το ένζυμο που αποτελεί την κύρια πηγή ενέργειας για τα σπερματικά κύτταρα με το να μετατρέπει την γλυκόζη του αίματος σε φρουκτόζη στα σπερματικά κυστίδια (Hers H.G., 1956). Τέσσερα χρόνια αργότερα διαπιστώθηκε η συσσώρευση υψηλών συγκεντρώσεων σορβιτόλης και γαλακτικόλης σε φακούς επιμύων κατά την καταρακτογένεση λόγω σακχάρου (van Heyningen R,

1959). Βάσει των παρατηρήσεων αυτών προτάθηκε ότι η συγκέντρωση πολυολών στους φακούς, οδηγεί σε αύξηση της ωσμωτικής πίεσης ενδοκυτταρικά με αποτέλεσμα την πρόσληψη επιπλέον ιόντων Na^+ και στην απώλεια ιόντων K^+ (Kinoshita J.H. et al., 1981).

Σε φυσιολογικές καταστάσεις, το μεγαλύτερο μέρος της γλυκόζης των κυττάρων φωσφορυλιώνεται σε 6-P-γλυκόζη από την εξοκινάση (6-φωσφοροτρανσφεράση της D-εξόζης) και μόνο ένα μικρό μέρος, της τάξης κάτω του 3%, περνά στο μεταβολικό σύστημα των πολυολών για να μετατραπεί από την ALR2 σε σορβιτόλη. Αυτό συμβαίνει λόγω της μικρής σχέσης της αναγωγάσης της αλδόζης με τη γλυκόζη και της υψηλότερης έλξης της εξοκινάσης προς την γλυκόζη.



Ωστόσο σε καταστάσεις που υπάρχει κορεσμός της εξοκινάσης λόγω υπερβολικής ποσότητας γλυκόζης, όπως συμβαίνει δηλαδή στον διαβήτη, το ένζυμο ALR2 παρουσία NADPH , μετατρέπει τη γλυκόζη σε σορβιτόλη σε ποσοστό άνω του 30%, η οποία στη συνέχεια μεταβολίζεται με βραδύτερο ρυθμό προς φρουκτόζη με τη βοήθεια του ενζύμου δεϋδρογονάση της σορβιτόλης, με παράλληλη αναγωγή του NAD^+ . Η κινητική του μηχανισμού κατάλυσης της ALR2 διεκπεριώνεται από μια αλληλουχία γεγονότων που ξεκινούν με τη σύνδεση του συνενζύμου NADPH που προηγείται της σύνδεσης του αλδεϋδικού υποστρώματος, στη συνέχεια πραγματοποιείται η αναγωγή του υποστρώματος στην αντίστοιχη αλκοόλη, ακολουθεί η απελευθέρωση της αλκοόλης από το ενεργό κέντρο και τερματίζεται η

διαδικασία της κατάλυσης με την απελευθέρωση του οξειδωμένου συνενζύμου NADP⁺ (Del Corso A. et al., 2008). Επιπρόσθετα, με την γλυκόζη και σορβιτόλη, η μυοϊνοσιτόλη είναι ακόμα ένα σημαντικό σάκχαρο που επηρεάζεται από τις μεταβολές ενεργοποίησης της μεταβολικής οδού των πολυολών. Η μυοϊνοσιτόλη αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα διατήρησης της ομοιόστασης και της ανάπτυξης των ανθρώπινων ιστών. Σε καταστάσεις υπεργλυκαιμίας, καθώς τα επίπεδα της γλυκόζης και της σορβιτόλης αυξάνονται, τα επίπεδα της μυοϊνοσιτόλης μειώνονται. Έλλειψή της είναι δυνατό να περιορίσει τη σύνθεση και την ανακύκλωση των φωσφοϊνοσιτιδίων και να επηρεάσει τη μορφογένεση και την κυτταρογένεση (Greene D.A. et al., 1992).

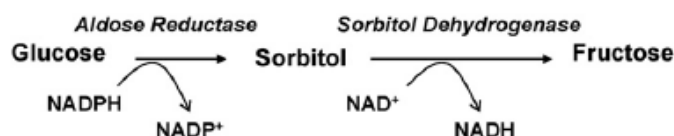
Έχει αποδειχθεί ότι η οξείδωση της σορβιτόλης που καταλύεται από τη δεϋδρογονάση της σορβιτόλης αυξάνει τον λόγο του NADH προς το NAD⁺, με αποτέλεσμα την αύξηση της αναλογίας γαλακτικού προς πυροσταφυλικό, τη μη σάρωση ελευθέρων ριζών-επομένως τη μη προστασία των κυττάρων από φαινόμενα οξειδωτικού stress-, και την εμφάνιση ψευδοϋποξίας με μειωμένη γλυκόλυση και παραγωγή ATP (Williamson J.R. et al., 1993). Η ψευδοϋποξία πυροδοτεί μια σειρά από βιοχημικές αλλαγές στο κύτταρο που μπορούν να αποτελέσουν τη βάση για πολλές από τις αρχικές λειτουργικές αλλαγές που παρατηρούνται στον διαβήτη, όπως η αυξημένη παραγωγή του αγγειακού ενδοθηλιακού παράγοντα ανάπτυξης, μεταβολές στη διαπερατότητα της αλβουμίνης και της ροής του αίματος στα αγγεία, της ταχύτητας μετάδοσης νευρικών ώσεων και της νεφρικής υπερδιήθησης. Από τη στιγμή που παράγεται η σορβιτόλη, δεν μπορεί να υπάρξει διάχυσή της-λόγω της πολικότητάς της- μέσω των κυτταρικών μεμβρανών και αυτή η συσσώρευσή της να συμβάλει στην εισροή ύδατος για λόγους ωσμωτικούς και σημαντική κυτταρική βλάβη. Ακόμη παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα των τελικών προϊόντων γλυκοσυλίωσης λόγω αυξημένης συγκέντρωσης φρουκτόζης, καθώς και φαινόμενα οξειδωτικού stress που αποδίδονται κυρίως στην υπερκατανάλωση των αποθεμάτων σε NADPH, που είναι απαραίτητο για την αναγέννηση της γλουταθειόνης (Brownlee M., 2001). Με αυτή την αύξηση του οξειδωτικού stress ενδοκυτταρικά, τα τελικά προϊόντα γλυκοσυλίωσης ενεργοποιούν τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κB, ο οποίος προωθεί τη μεταγραφή όλων εκείνων των γονιδίων που σχετίζονται με αυτόν (κυτοκίνες κατά τη φλεγμονή, αναπτυξιακοί παράγοντες κ.α.) (Mohamed A.K. et al.,

1999). Μάλιστα, αυτά τα τελικά προϊόντα γλυκοσυλίωσης φαίνεται να σχετίζονται με τη γένεση πολλών από τις μη αντιστρεπτές επιπλοκές του διαβήτη, όπως τη διαστολή του κυτταρικού τοιχώματος, την κυτταρική υπερτροφία, την υπερπλασία και τα αγγειακά προβλήματα (Munch G. et al., 1997). Από την άλλη πλευρά όμως, γίνεται αναφορά ότι σε ορισμένους ιστούς, η συσσώρευση της σορβιτόλης λόγω της αυξημένης δραστηριότητας της ALR2 σε καταστάσεις υπεργλυκαιμίας, δεν είναι τέτοιας έκτασης ώστε να προκληθεί ωσμωτικό stress, αλλά ούτε μπορεί να είναι και η κύρια αιτία της καταρακτογένεσης (Srivastava S.K. et al., 2005; Ansari N.H. et al., 1994; Ansari N.H. et al., 1990; Srivastava S.K. et al., 1988).

Λόγω της ικανότητας της ALR2 να ανάγει τη γλυκόζη, συμμετέχει και σε άλλα μεταβολικά μονοπάτια. Για παράδειγμα, η ALR2 συμμετέχει στη ρύθμιση της οσμωτικής πίεσης στα νεφρά και στη δημιουργία φρουκτόζης σε σπερματικά κυστίδια (Burg M.B., 1988; Burg M.B., 1995; Hers H.G., 1956).

Αξιοσημείωτο κρίνεται και το γεγονός ότι υπάρχουν αναφορές που δηλώνουν ότι υπάρχει υπερέκφραση και αυξημένη δραστηριότητα της ALR2 σε μορφές καρκίνων σε διάφορους τύπους ιστών όπως για παράδειγμα του ήπατος, του στήθους, των ωοθηκών και στο κόλον (Lee K.W.Y. et al., 2001; Saraswat M. et al., 2006). Αυτό συμβαίνει διότι η ALR2 φαίνεται να ενεργοποιεί εκείνα τα μονοπάτια που ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων που είναι απαραίτητα για την επιβίωση και ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων καθώς και των παραγόντων συγκόλλησής τους (Ramana K.V. et al., 2004; Ramana K.V. et al., 2004b).

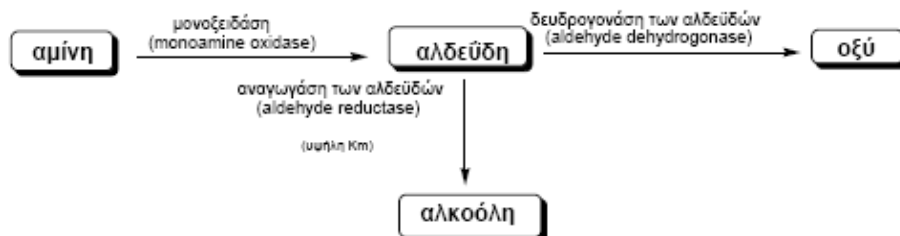
Όσον αφορά τη διαβητική νευροπάθεια με την οποία σχετίζεται η ALR2, ο μηχανισμός δράσης της δεν είναι ακόμη απολύτως σαφής, ωστόσο δύο φέρονται ως οι επικρατέστεροι. Ο ένας σχετίζεται με το μονοπάτι της πολυόλης και ο δεύτερος με την αύξηση των τελικών γλυκοσυλιωμένων προϊόντων. Σε καταστάσεις υπεργλυκαιμίας το μονοπάτι της πολυόλης εμφανίζει αυξημένη δραστηριότητα με την αναγωγή της γλυκόζης σε σορβιτόλη μέσω του ενζύμου αναγωγής της αλδόζης και με τη συμμετοχή του συμπαραγόντα νικοτινάμιδο αδενόσινο φωσφορικό δινουκλεοτίδιο (NADPH).



Αυτή η αναγωγή οδηγεί σε αυξημένη συγκέντρωση σορβιτόλης στα κύτταρα με αποτέλεσμα να προκαλείται βλάβη σε αυτά και στα όργανα του οργανισμού. Επιπροσθέτως, εκτεταμένη συσσώρευση σορβιτόλης έχει σαν αποτέλεσμα την μείωση της μυοϊνοσιτόλης στα περιφερειακά νεύρα, με παράλληλη μείωση της δράσης της αντλίας αδενοσινο-τριφωσφατάσης νατρίου-καλίου (Na^+, K^+ -ΑΤΡάσης) που είναι απαραίτητη για τη μεταφορά των νευρικών σημάτων. Εξαιτίας αυτής της αυξημένης δραστηριότητας του μονοπατιού της πολυόλης και της υπερχρησιμοποίησης του NADPH από το ένζυμο αναγωγή της αλδόζης, επηρεάζεται ένας μεγάλος αριθμός επιπλέον ομοιοστατικών μηχανισμών. Η έλλειψη των αποθεμάτων του NADPH οδηγεί σε μειωμένη συγκέντρωση μονοξειδίου του αζώτου, σε μείωση της παραγωγής γλουταθειόνης στον οργανισμό και σε ενεργοποίηση πρωτεϊνικών κινασών (Nishikawa T. et al., 2000). Αυτή η μείωση στη συγκέντρωση του μονοξειδίου του αζώτου οδηγεί σε μείωση της αγγειοδιαστολής και επομένως σε ανωμαλίες του κυκλοφορικού συστήματος, ενώ η μείωση της παραγωγής γλουταθειόνης έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση των ελευθέρων ριζών οξυγόνου που οδηγεί σε βλάβες στη λειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων (Oyama T. et al., 2006; Oka M. et al., 2001). Ακόμη, λόγω της μείωσης της δράσης της αντλίας Na^+, K^+ -ΑΤΡάσης, προκαλείται συσσώρευση ιόντων νατρίου ενδοκυτταρικά και αύξηση των ιόντων ασβεστίου στο κυτόπλασμα, με αποτέλεσμα να παρουσιάζονται φαινόμενα υπέρτασης (Ohara T. et al., 1991). Από την άλλη πλευρά έχουμε και αύξηση των αποθεμάτων του νικοτινάμιδο-αδενοσινοδινουκλεοτιδίου (NADH), το οποίο μπορεί να προκαλέσει την αύξηση της σύνθεσης της διακυλογλυκερόλης (DAG) από φωσφορική διυδροξυακετόνη (Thomas T.P. et al., 1994). Τα επίπεδα της DAG μπορούν επίσης να αυξηθούν και από τη φωσφολιπάση C που θα ενεργοποιούνταν από το stress. Η DAG είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση πολλών ενώσεων που ανήκουν στην οικογένεια των πρωτεϊνικών κινασών C και που συντελούν στον πολλαπλασιασμό κυττάρων σε συνθήκες που υπάρχει περίσσεια γλυκόζης (Derubertis F.R. et al., 1994; Koya D. et al., 1998; Graier W.F. et al., 1995).

Αναγωγή της αλδεΐδης (ALR1)

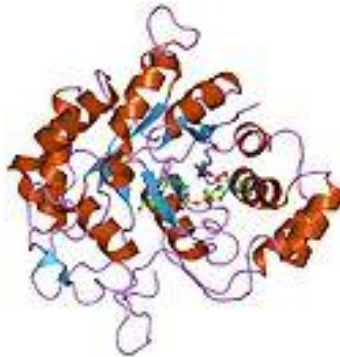
Ένα ακόμη μέλος στην οικογένεια των αλδο-κετο-αναγωγασών που ανήκει η αναγωγή της αλδόζης, είναι και η αναγωγή της αλδεΐδης (ALR1, EC 1.1.1.2, alcohol:NADP⁺ oxidoreductase) στην οποία αποδίδεται μέρος της ευθύνης για την αποτυχία των αναστολέων της αναγωγής της αλδόζης, διότι αναστέλλουν όπως πιστεύεται την αναγωγή της αλδεΐδης. Η αναγωγή της αλδεΐδης υπάρχει σε πολλούς ιστούς και έχει αποτοξινωτικές ιδιότητες, διότι διαθέτει εκλεκτικότητα όταν συνδέεται με τοξικές αλδεΐδες που προέρχονται από παθολογικές καταστάσεις, όπως το οξειδωτικό stress λόγω υπεργλυκαιμίας, λόγω οξειδωτικής αποικοδόμησης λιπαρών οξέων, αμινοξέων και υδρογονανθράκων. Η ALR1 καταλύει την αναγωγή αρωματικών και αλειφατικών αλδεϋδών και μεταξύ των άλλων μεταβολίζει ενδογενείς αλδεΐδες, που είναι προϊόντα μεταβολισμού των ενδογενών αμινών από την μονοοξειδάση και που δρουν ως νευροδιαβιβαστές και σχετίζονται με τις λειτουργίες του ύπνου και της ρύθμισης της θερμοκρασίας του σώματος.



Η αναγωγή της αλδεΐδης και η αναγωγή της αλδόζης είναι δομικά ομόλογες και εμφανίζουν την ίδια αλληλουχία αμινοξέων που ξεπερνά σε ποσοστό το 60%, με την πλειοψηφία των δομικών διαφορών μεταξύ τους να εντοπίζεται στο C-τελικό άκρο του ενζύμου. Αυτή είναι εξάλλου και η περιοχή που είναι υπεύθυνη για την εκλεκτικότητα προς το κατάλληλο υπόστρωμα για τα δύο αυτά ένζυμα. Πιο συγκεκριμένα, οι πιο αξιοσημείωτες διαφορές μεταξύ των δύο αναγωγασών περιλαμβάνουν την αντικατάσταση στο C-τελικό άκρο των Ala299, Leu300, Leu301, Ser302 και Cys303 στην αναγωγή της αλδόζης από τις Val300, Pro301, Met302, Arg312 και Asp313 στην αναγωγή της αλδεΐδης, που επιτρέπει στην τελευταία την εισαγωγή δέκα αμινοξέων μεταξύ των Met 302 και Arg 312 που δεν συνεισφέρει άμεσα στο σχηματισμό της διαμόρφωσης της θέσης σύνδεσης, αλλά στη δυναμική της ισχύος σύνδεσης με το υπόστρωμα. Μάλιστα, και στα δύο ένζυμα η θέση

σύνδεσης με το υπόστρωμα-συμπαράγοντα αποτελείται από δύο υποθύλακες, όπου ο πλέον σημαντικά καταλυτικός από τους δύο διαφέρει στο ότι στη μεν αναγωγή της αλδόζης φέρει τις πλευρικές αλυσίδες Tyr48, His110 και Trp111 , ενώ στην αναγωγή της αλδεΐδης τις Tyr50, His113 και Trp114.

Μελέτες που έγιναν με κρυσταλλογραφικές, βιοχημικές και μοριακές τεχνικές απέδειξαν ότι οι πιο γνωστοί αναστολείς της αναγωγής της αλδόζης, αναστέλλουν και την αναγωγή της αλδεΐδης λόγω των ενεργών κέντρων των δύο ενζύμων που φέρουν κοινά χαρακτηριστικά στον τρόπο με τον οποίο συζεύγνυνται με το υπόστρωμα αλλά και τον αναστολέα. Οι αναστολείς αυτοί επηρεάζουν την ικανότητα της αναγωγής των αλδεΐδων να αποτοξινώσουν δραστικά ενεργές αλδεΐδες όπως η μεθυλογλυοξάλη ή η 3-δεοξυ-γλυκοσόνη, η συσσώρευση των οποίων προάγει το οξειδωτικό stress, τη γήρανση, την απόπτωση και την αθηροσκλήρωση, και οι οποίες έχουν συσχετιστεί άμεσα με τον σχηματισμό τελικών προϊόντων γλυκοσυλίωσης (AGEs, Advanced Glycosylation End-products) σε συνθήκες υπεργλυκαιμίας. Καθοριστική θεωρείται επίσης, η συμμετοχή της ALR1 στον καταβολισμό της μυοϊνοσιτόλης στους νεφρούς. Επομένως η αναστολή της αναγωγής της αλδεΐδης είναι μια αιτία για τις ανεπιθύμητες παρενέργειες που εμφανίζουν οι μέχρι τώρα αναστολείς της αναγωγής της αλδόζης, διότι η αναστολή της θα εξέθετε τον οργανισμό σε οξειδωτικό στρες με όλα τα δυσμενή του επακόλουθα. Ωστόσο, θα πρέπει να σημειωθεί ότι, η απουσία *in vivo* πειραματικών δεδομένων που να αποδεικνύουν τον αναντικατάστατο ρόλο της ALR1 στον καταβολισμό των AGEs εγείρει ερωτήματα για την σημαντικότητα της εκλεκτικότητας των υπό σχεδιασμό αναστολέων της αναγωγής της αλδόζης (El-Kabbani O. Et al., 2005; El-Kabbani O. Et al., 1998; Barski O.A. et al., 1996; Carper D.A. et al., 1989; Davydov V.V. et al., 2004; Sato S. et al., 1990; Barski O.A., 1995; Jay D. et al., 2006; Chang T. et al., 2005; Oya T. et al., 1999; Urzhumtsev A. et al., 1997; Podjarny A. et al., 2004; El-Kabbani O. Et al., 1997; Hamada et al., 1996; Barski et al., 2008).



Αναγωγή της αλδεύδης

Αναστολείς της αναγωγής της αλδόζης

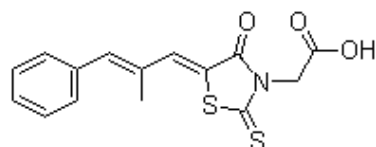
Βάσει των εκτεταμένων πειραματικών αποτελεσμάτων που έχουν προκύψει σχετικά με το γεγονός ότι η αναστολή της δράσης της ALR2 παρεμποδίζει ή αναστέλλει τις βλάβες που προκαλούνται από καταστάσεις υπεργλυκαιμίας λόγω διαβήτη, έχει αναφερθεί ότι η ALR2 εμπλέκεται σε δευτερογενείς επιπλοκές του διαβήτη όπως η καταρακτογένεση, η ρετινοπάθεια, η νεφροπάθεια, η νευροπάθεια και η μικροαγγειοπάθεια (Srivastava S.K. et al., 2005; Oates P.J., 2008; Alexiou P. et al., 2009). Τα παραπάνω επιβεβαιώνονται από μελέτες που δηλώνουν ότι η αναστολή της ALR2 μπορεί να αποτελεί μια σημαντική προσέγγιση για την πρόληψη ή/και τη θεραπεία από φλεγμονές του οφθαλμού, όπως η φλεγμονή της ίριδας, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε τύφλωση και σε καρδιομυοπάθεια λόγω ενδοτοξινών. Μάλιστα, η αναστολή της ALR2 μπορεί να μετριάσει τις επιπλοκές μιας φλεγμονώδους αντίδρασης μειώνοντας την παραγωγή και τοξικότητα των κυτοκινών (Yadav U.C.S. et al., 2007; Ramana K.V. et al., 2006). Όπως αναφέρθηκε, αυξημένη ροή γλυκόζης λόγω της ALR2 θα μπορούσε να προκαλέσει φαινόμενα ωσμωτικού και οξειδωτικού stress, τα οποία στη συνέχεια μπορούν να προκαλέσουν μια αλυσίδα μεταβολικών μετατροπών που έχουν σαν αποτέλεσμα τη δυσλειτουργία των ιστών, τις αλλαγές στη μεταφορά ενδοκυτταρικών μηνυμάτων και τον εκτεταμένο κυτταρικό θάνατο, άρα η αναστολή της δράσης του ενζύμου μπορεί να δράσει προφυλακτικά για όλα τα παραπάνω φαινόμενα. Σε έρευνα που έχει διενεργηθεί αποδείχθηκε, *in vitro* και σε μοσχεύματα ιστών επιμύων, ότι με την

αναστολή του ενζύμου παρεμποδίζεται η ανάπτυξη καρκίνου στο κόλον, και από τη στιγμή που η αναγωγή της αλδόζης υπερεκφράζεται σε μερικούς τύπους καρκίνου, προκύπτει το συμπέρασμα ότι οι αναστολείς του ενζύμου μπορούν ενδεχομένως να δράσουν συνεργιστικά και ως χημειοθεραπευτικά (Tamali R. et al., 2006; Tamali R. et al., 2009).

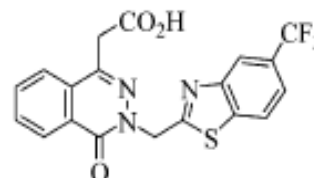
Με αυτό το σκεπτικό και λόγω όλων των ανωτέρων, δόθηκε ιδιαίτερη βαρύτητα στην κατανόηση της δομής και της λειτουργίας της ALR2 καθώς και στην ανάπτυξη αποτελεσματικών αναστολέων της δράσης της ALR2 (ARIs-Aldose Reductase Inhibitors), πολλοί από τους οποίους είναι στο στάδιο των κλινικών δοκιμών, με εξαίρεση τον αναστολέα επαλρεστάτη (epalrestat) που διατίθεται ήδη προς χρήση στην Ιαπωνία (Alexiou P. et al., 2009). Αντίθετα, το φάρμακο τολρεστάτη (tolrestat) το οποίο αναπτύχθηκε το 1989, αποσύρθηκε το 1996 κυρίως λόγω της μικρής αποτελεσματικότητάς του, όπως και η ζοπολρεστάτη (zorolrestat) και η ζεναρεστάτη (zenarestat) που αποσύρθηκαν και αυτά από τις κλινικές δοκιμές (Mylari B.L. et al., 1991). Η πρώτη επιτυχημένη απόπειρα κατά των διαβητικών επιπλοκών επετεύχθη με τη χρήση τετραμεθυλενογλουταρικού οξέος (TMG) που εμπόδιζε τη δημιουργία καταρακτογέννεσης, όταν χορηγήθηκε με ενδοφθάλμια ένεση σε κουνέλια (Kinoshita J.H. et al., 1968). Ιδιαίτερη σημασία δίνεται πλέον στα φλαβονοειδή που μπορούν να αποτελέσουν πιθανούς φυσικούς ARIs (Varma S.D. et al., 1975). Μελέτες δομής-δράσης για ARIs έδειξαν ότι η παρουσία ενός όξινου τμήματος στο μόριο του αναστολέα (καρβοξυλομάδα ή κυκλικό ιμίδιο) είναι εξαιρετικά σημαντική για την αναστολή της ALR2. Στις κρυσταλλικές δομές των συμπλόκων αναστολής της ALR2 φάνηκε πως τα ηλεκτρωνητικά (αρνητικά φορτισμένα) καρβοξύλια ή κυκλικά ιμίδια συμμετέχουν σε δεσμούς υδρογόνου με τα αμινοξέα τυροσίνη της θέσης 48 (Tyr48), ιστιδίνη της θέσης 110 (His110) και τρυπτοφάνη της θέσης 111 (Trp111) του ενεργού κέντρου του ενζύμου και παράλληλα δίνουν ισχυρές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις (ετεροπολικούς δεσμούς) με τον θετικά φορτισμένο νικοτιναμιδικό δακτύλιο του NADP⁺. Ένα ακόμα κοινό δομικό στοιχείο που έχουν πολλοί ARIs είναι η παρουσία ενός ή περισσοτέρων αρωματικών ομάδων που ενώνονται με τη λιπόφιλη περιοχή του ενζύμου (Lee Y.S. et al., 1998; Malamas M.S. et al., 1991; Bruno G. et al., 2002).

Οι μέχρι τώρα ARIs μπορούν να χωριστούν σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με τα δομικά χαρακτηριστικά τους, και πιο συγκεκριμένα, στα παράγωγα των καρβοξυλικών οξέων, στα παράγωγα της υδαντοΐνης και σε άλλα παράγωγα. Στην πρώτη κατηγορία οι αναστολείς εμφανίζουν μικρή δράση *in vivo* λόγω της χαμηλής διαπερατότητάς τους μέσω των ιστών, ιδιότητα που αποδίδεται στις μικρές τιμές pK_a , με αποτέλεσμα να ιονίζονται στο φυσιολογικό pH του αίματος. Σύμφωνα μάλιστα με *in vitro* αποτελέσματα η ύπαρξη υποκαταστατών στο βενζολικό δακτύλιο αυξάνει τη δράση του μορίου, με τους πλέον γνωστούς αναστολείς αυτής της κατηγορίας να είναι η τολρεστάτη, η επαλρεστάτη και η ζοπολρεστάτη. Η ανάπτυξη αναστολέων της δεύτερης κατηγορίας προσήλθε από την ανάγκη να βρεθούν κατάλληλα μόρια που δεν θα διέθεταν το πρόβλημα της ανεπαρκούς φαρμακοκινητικής που εμφάνιζαν οι αναστολείς-παράγωγα καρβοξυλικών οξέων. Οι αναστολείς-παράγωγα υδαντοΐνης εμφανίζουν υψηλότερες τιμές pK_a σε σχέση με τα καρβοξυλικά οξέα και επομένως καλύτερη φαρμακοκινητική σε σχέση με τα καρβοξυλικά οξέα, με τα πιο μελετημένα μόρια αυτής της κατηγορίας να είναι η φινταλρεστάτη (fidalrestat) και η σορβινίλη (sorbinil). Αποτελέσματα μελέτης για τη σορβινίλη σε ασθενείς με διαβητική νευροπάθεια επιβεβαίωσαν την αποτελεσματικότητά της έναντι μορφολογικών ενδείξεων εκφυλισμού νευρώνων, με παράλληλη μείωση των επιπέδων σορβιτόλης στα νευρικά κύτταρα και αύξηση της ταχύτητας μεταφοράς νευρικών σημάτων. Ωστόσο, και αυτή η προοπτική έχει μειονεκτήματα λόγω της τοξικότητας των υδαντοϊνών, που εκδηλώνεται με την εμφάνιση επιδερμικών εξανθημάτων και υπερευαισθησία ή τοξικότητα του ήπατος, στοιχεία που κατέστησαν τους αναστολείς αυτής της κατηγορίας 'ανεπιθύμητους' για τη παραγωγή φαρμάκων. Οπότε η έρευνα για την ανάπτυξη νέων ARIs επικεντρώνεται σε άλλες κατηγορίες χημικών ενώσεων που δεν μπορούν να περιλαμβάνουν στο μόριό τους ούτε απλά καρβοξυλικά οξέα, αλλά ούτε και παράγωγα υδαντοΐνης. Ενδεικτικά αναφέρονται τα παράγωγα σπιροϊμιδίων (spiroimide) μιναλρεστάτη (minalrestat) και ρανιρεστάτη (ranirestat), με τη ρανιρεστάτη που ανήκει στην κατηγορία των σικινιμιδίων (succinimide), να είναι μία από τις τελευταίες χημικές ενώσεις που έχουν συντεθεί και να βρίσκεται στη φάση III των κλινικών δοκιμών στις Η.Π.Α. (Mylari B.L. et al., 2005; Bruno G. et al., 2002; Pau A. et al., 2004; Sima A.A.F. et al., 1988).

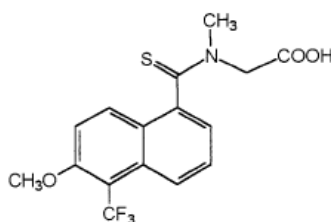
Αναστολείς παράγωγα καρβοξυλικού οξέος



Epalrestat

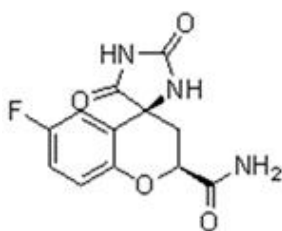


Zopolrestat

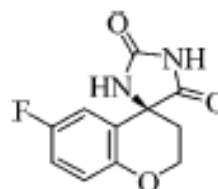


Tolrestat

Αναστολείς παράγωγα υδαντοΐνης

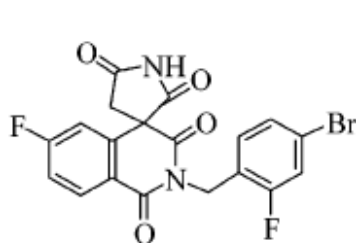


Fidalrestat

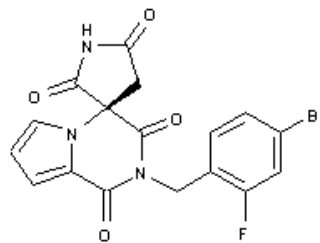


Sorbinil

Αναστολείς παράγωγα άλλων χημικών δομών



Minalrestat



Ranirestat

Τα φλαβονοειδή είναι γενικώς μια κατηγορία φυσικών ενώσεων που έχουν αναλυθεί διεξοδικά ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν την ALR2, με πολλές συγκριτικές μελέτες δομής-δράσης, καθώς και με μελέτες κινητικής και

εκλεκτικότητας ως προς το συγκεκριμένο ένζυμο. Τα αποτελέσματα δεν είναι αρκετά σαφή ώστε να μπορούν να προκύψουν κάποιοι κανόνες σχετικά με τις χημικές δομές με ενισχυμένη δράση ή εκλεκτικότητα. Παρόλα αυτά, συμπερασματικά, προκύπτει πως η δομή της φλαβόνης είναι περισσότερο αποτελεσματική από αυτή της φλαβανόνης και οι φλαβονόλες είναι ισχυρότερες από τις φλαβόνες, καθώς το όξινο υδροξύλιο παίζει σημαντικό ρόλο στην αναστολή του ενζύμου. Η παρουσία υδροξυλίων ιδιαίτερα στον C δακτύλιο (φλαβονόλες), αυξάνει την ανασταλτική δράση των ουσιών. Η αιθεροποίηση σε κάποιο φαινολικό υδροξύλιο μειώνει τη δράση, με το υδροξύλιο στη θέση 7 να παίζει επίσης πολύ σημαντικό ρόλο και η απουσία του σχεδόν να μηδενίζει την ικανότητα αναστολής του ενζύμου. Η γλυκοσυλίωση ή μεθυλίωση στον A δακτύλιο και ιδιαίτερα στην 7-OH ομάδα μειώνει τη δράση, αλλά οι μονογλυκοζίτες αναστέλλουν τη δράση του ενζύμου σαφώς ισχυρότερα από τους διγλυκοζίτες. Πάντως, η 3-O-γλυκοσυλίωση με *L*-σάκχαρα φαίνεται ότι αυξάνει τη δράση του αναστολέα στις φλαβονόλες, ενώ η γλυκοσυλίωση στην 3 θέση με *D*-γλυκόζη και *D*-γαλακτόζη δεν επιφέρει καμία αλλαγή στο αποτέλεσμα. Αυτό προφανώς οφείλεται στις στερεοχημικές παρεμποδίσεις που προκαλεί το σάκχαρο με συγκεκριμένη στερεοϊσομέρεια (Costantino L. et al., 1999; Varma S.D., 1986).

Η κβερκετίνη είναι ένα από τα φλαβονοειδή που έχουν μελετηθεί εκτενώς και μάλιστα, σε πολλές δοκιμές ελέγχου νέων ουσιών ως προς την ικανότητα αναστολής της ALR2, χρησιμοποιείται σαν μάρτυρας μαζί με την σορβινίλη. Μάλιστα, η 3-O-μεθυλιωμένη κβερκετίνη, εμφανίζεται εξαιρετικά αποτελεσματική ως προς την αναστολή της λειτουργίας του ενζύμου, με δράση αντίστοιχη με αυτή του φαρμάκου *epalrestat*. Επιπροσθέτως, μεταξύ της λουτεολίνης και της απιγενίνης, αποδείχθηκε πιο αποτελεσματική η λουτεολίνη (Enomoto S. et al., 2004; Shin K.H. et al., 1995).

Για να υπάρξουν τα μέγιστα οφέλη από την αναστολή της ALR2, θα πρέπει και οι αναστολείς του ενζύμου να είναι όσο το δυνατόν πιο εκλεκτικοί, διότι οι μέχρι τώρα αναστολείς αν και προσκολλώνται στο ένζυμο, εμφανίζουν υψηλά επίπεδα μη εκλεκτικής τοξικότητας. Ακόμη, λόγω της απουσίας λεπτομερέστατων φαρμακοκινητικών μελετών, καθίσταται ασαφές αν η δόση των αναστολέων της ALR2 που χρησιμοποιούνται κατά τις κλινικές μελέτες είναι επαρκής για να εκδηλώσουν τη δράση τους με απτά αποτελέσματα στην αναστολή του ενζύμου. Θα

πρέπει να σημειωθεί ότι, όπως προαναφέρθηκε, σε συνθήκες υπεργλυκαιμίας παρατηρείται υπερέκφραση της ALR2 καθώς και ενεργοποίησή της, ενώ δεν έχει παρατηρηθεί ανάλογη συμπεριφορά για τις συγγενείς αλδο-κετο-αναγωγάσες. Επομένως, ακόμη και ενώσεις με μικρό σχετικά δείκτη εκλεκτικότητας θεωρείται ότι θα αναστέλλουν περισσότερο την ALR2 λόγω μεγαλύτερης διαθεσιμότητας. Ωστόσο, πιο σημαντικό κρίνεται το γεγονός ότι θα πρέπει να συντεθούν ακόμη πιο εκλεκτικοί ARIs που θα εμποδίζουν την ικανότητα του ενζύμου να ανάγει τη γλυκόζη και τα γλουταθειονοπαράγωγά της, δίχως να επηρεάζει την επίδρασή της στην αναγωγή των αλδεϋδών. Αυτό καθίσταται εφικτό από το γεγονός ότι έχουν διενεργηθεί μελέτες δομής-δράσης που υποδεικνύουν ότι στο ενεργό κέντρο του ενζύμου υπάρχουν ξεχωριστές περιοχές που συνδέονται με τις αλδεϋδες, τελείως διαφορετικές από τα σημεία σύνδεσής της με τα γλουταθειονοπαράγωγα της γλυκόζης (Ramana K.V. et al., 2000; Dexit B.L. et al., 2000). Θα πρέπει ακόμη να ληφθεί υπόψη και το ότι η ALR2 μπορεί να εμφανίσει τρεις διαφορετικές διαμορφώσεις του πρωτεϊνικού της μορίου και άρα τρεις διαφορετικές διαμορφώσεις του ενεργού κέντρου του ενζύμου, στοιχείο που δημιουργεί επιπλέον δυσκολίες στην εξεύρεση και δημιουργία κατάλληλων αναστολέων (Sotriffer C.A. et al., 2004).

Παρά τις αρχικές προσδοκίες, τα αποτελέσματα των κλινικών δοκιμών με ARIs ήταν απογοητευτικά, διότι η πλειοψηφία αυτών απέδειξε ότι επέφεραν πολύ μικρή βελτίωση σε σχέση με τις πολλαπλές παρενέργειές τους. Ωστόσο, παρά τα αρνητικά αποτελέσματα, δεν θα πρέπει να εγκαταληφθεί η προοπτική της θεραπείας με αναστολείς της αναγωγάσης της αλδόζης, διότι οι περισσότερες κλινικές δοκιμές πραγματοποιήθηκαν στηριζόμενες στις ελλιπείς πληροφορίες που υπάρχουν σχετικά με το ένζυμο, καθώς και στο ότι περιορίστηκαν στην λειτουργία του ως αναγωγάση της γλυκόζης και μόνο. Επιπροσθέτως, οι κλινικές εξετάσεις που διενεργήθηκαν, σχεδιάστηκαν κατά τέτοιο τρόπο που να λαμβάνεται υπόψη μόνο η επίδραση των αναστολέων αυτών σε καταστάσεις διαβητικής νευροπάθειας, αποκλείοντας ένα ευρύ φάσμα άλλων διεργασιών στις οποίες λαμβάνει μέρος το ένζυμο ALR2, όπως για παράδειγμα τη συμμετοχή του στο σχηματισμό φλεγμονής, στη σάρωση ελευθέρων ριζών, στο γενικότερο μεταβολισμό της γλυκόζης και στην ανάπτυξη. Καταλήγοντας, θα πρέπει να σημειωθεί ότι η εκλεκτικότητα ενός αναστολέα πρέπει να θεωρείται ως επιθυμητό χαρακτηριστικό, αλλά πριν την απόρριψη οδηγών ενώσεων λόγω μικρού

δείκτη εκλεκτικότητας απαιτείται περαιτέρω μελέτη για την πρακτική συνεισφορά των αλδοκετοαναγωγασών σε αντιοξειδωτικούς και άλλους φυσιολογικούς μηχανισμούς.

ΣΚΟΠΟΣ

Το αντικείμενο της παρούσας διδακτορικής διατριβής εντάσσεται στην επιστημονική περιοχή των φυσικών προϊόντων με στόχο την φυτοχημική ανάλυση των υπέργειων τμημάτων του φυτού *Tephrosia humilis* (απομόνωση και δομικός χαρακτηρισμός των κύριων περιεχομένων ενώσεων), καθότι χρησιμοποιείται ως υπογλυκαιμικός παράγοντας στη λαϊκή θεραπευτική. Παρά την ευρεία χρήση του με την υπερπληθώρα εφαρμογών και δράσεων που αποδίδονται στο γένος *Tephrosia*, στο συγκεκριμένο είδος αποδίδονται υπογλυκαιμικές ιδιότητες, και όπως παρατίθεται παραπάνω, γίνεται ευρεία χρήση αφεψημάτων του είδους αυτού σε συνδυασμό με το *Indigofera hirsuta* ως υπογλυκαιμικό παράγοντα. Καμία φυτοχημική μελέτη δεν υπάρχει μέχρι τώρα, από όσο γνωρίζουμε, για το συγκεκριμένο είδος στην κατηγορία των ενώσεων που ελέγχθηκαν. Σημειωτέον εδώ ότι φαίνεται ότι μεγάλο μέρος του πληθυσμού της Κεντροαφρικανικής Δημοκρατίας εμφανίζει διαβήτη τύπου II και παραδοσιακά χρησιμοποιούν τη συνταγή που παρατίθεται παραπάνω.

Με σκοπό να ελεγχθούν οι ιδιότητες που παραδοσιακά αποδίδονται στο φυτό, εκχυλίσματα της δρόγης δοκιμάστηκαν με τρεις διαφορετικές μεταξύ των, μεθόδους μέτρησης αντιοξειδωτικής ικανότητας, καθώς επίσης και για την ικανότητα αναστολής της αναγωγάσης της αλδόζης και της αναγωγάσης της αλδεΰδης, δύο ενζύμων που εμπλέκονται στην εκδήλωση των δευτερογενών επιπλοκών σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου (II), όπου συγχρόνως έχουμε και γένεση ελευθέρων ριζών.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

A. Διαλύτες και επιπλέον υλικά για τη βιολογική αποτίμηση

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι ακόλουθοι:

- Πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C Panreac, PA 13.1315
- Διχλωρομεθάνιο Panreac, PA 13.1254 και Carlo Erba (PA), UN1593
- Μεθανόλη, Carlo Erba (PA), UN1230
- Διαιθυλαιθέρας, Carlo Erba (PA), No 447534
- Οξικός αιθυλεστέρας, Merck Art.9623
- κ-Βουτανόλη, Carlo Erba (PA), UN1120
- n-Εξάνιο

Για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο του DPPH· και της επαγόμενης χημειοφωταύγειας της λουμινόλης, χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αντιδραστήρια:

- DPPH· , Sigma-Aldrich
- Λουμινόλη, Alfa Aesar
- Υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2), Panreac
- EDTA, Panreac
- Κοβάλτιο ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$), Riedel-de Haen
- Βορικό ρυθμιστικό διάλυμα (0.05M, προσαρμοσμένο σε pH 9 με NaOH 1M)

ενώ τα απαιτούμενα αντιδραστήρια για το πείραμα αναστολής της ALR2 και ALR1:

- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 0.067M (pH=6.2)
- S-ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (10mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων + 2mM EDTA + 2mM 2-μερκαπτοαιθανόλη)
- S-ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων + σουκρόζη (10mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων + 2mM EDTA + 2.5mM 2-μερκαπτοαιθανόλη + 0.25M σουκρόζη)
- Διάλυμα NaDPH 0.104mM (τετρανάτριο-άλας, MW=833.4)
- Διάλυμα DL-γλυκεραλδεΐδης 10mM (MW=90.08)
- Διάλυμα του μετά νατρίου άλατος του γλυκουρονικού οξέος 600mM

- Κορεσμένο διάλυμα $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- Διάλυμα NaHCO_3 0.2M (MW=84.01)
- Φακοί (για ALR2) και νεφροί (για ALR1) από επίμυες Fischer-344 (αρσενικά και θηλυκά)
- Διαιθυλαμινοαιθυλο-κελουλόζη (DEAE-cellulose).

Τέλος τα αντιδραστήρια (Sigma-Aldrich Corporation) που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα αναστολής της LOX είναι:

- Διμέθυλο σουλφοξειδίο (DMSO)
- Άλας με νάτριο του λινελαϊκού οξέος (0.1mM) σε pH 9.00
- Φυτική λιποξυγονάση (σόγιας) (1.9×10^4 w/v σε φυσιολογικό ορό) (LOX)
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris pH=9.00 (Tris·HCl)

B. Χρωματογραφικές μέθοδοι για την απομόνωση και έλεγχο των περιεχόμενων ουσιών

B1. Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC)

- Πλάκες κυτταρίνης (20x20cm), 0.1mm (Merck, Art. 5552).
- Πλάκες Kieselgel 60 F (20x20cm), 0.2mm (Merck, Art. 5554).
- Πλάκες Kieselgel 60 (20x20cm), 0.2mm (Merck, Art. 5553).

Η μέθοδος της χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας χρησιμοποιήθηκε εκτεταμένα για παρασκευαστική και αναλυτική χρήση.

Διαλύτες ανάπτυξης TLC:

- Σύστημα AcOH 15% ο/ο.
- Σύστημα EAW: Οξικός αιθυλεστέρας, Οξικό οξύ, νερό 4:1:2 (οργ. φάση).
- Σύστημα CAW: Διχλωρομεθάνιο, Οξικό οξύ, νερό σε αναλογία 50:45:5.
- Σύστημα BAW: n-Βουτανόλη, Οξικό οξύ, νερό 4:1:5 (οργ. φάση).

Διαλύτες ανάπτυξης, σε διάφορες αναλογίες, για τις πλάκες οξειδίου του πυριτίου:

- C_6H_{14}
- CH_2Cl_2
- EtOAc
- MeOH

Τα χρωματογραφήματα παρατηρήθηκαν στο υπεριώδες φώς (254 nm και 366 nm) προ και μετά από την έκθεση στα παρακάτω αντιδραστήρια:

- Ατμοί αμμωνίας.
- Αντιδραστήριο Neu (Naturstoffregenz A): (μεθανολικό διάλυμα 1% διφαινυλοβορικού αμινοαιθυλεστέρα).
- Αντιδραστήριο θειικής βανιλίνης (Vanillin 99%, ACROS Organics): (1. μεθανολικό διάλυμα βανιλίνης 5%, 2. διάλυμα θειϊκού οξέος 5% σε μεθανόλη. Ίσοι όγκοι από τα δύο διαλύματα). Ακολουθεί θέρμανση για 2 λεπτά περίπου στους 100°C.

B2. Χρωματογραφία στήλης (Column Chromatography, CC)

•Πολυαμίδιο CC6 Macherey-Nagel, 70-160μm, βαθμωτής έκλουσης (H₂O→MeOH). Για χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, το πολυαμίδιο κατεργάστηκε προηγουμένως με απεσταγμένο νερό και μείγμα νερού-μεθανόλης προς απομάκρυνση των ολιγομερών του.

•Πολυαμίδιο CC6 Macherey-Nagel, 70-160μm βαθμωτής έκλουσης (H₂O→MeOH).

•Silica gel 60, 0.040-0.063mm (Merck, Art.9385), βαθμωτής έκλουσης (C₆H₁₄→CH₂Cl₂→MeOH).

•Sephadex LH-20 (Amersham Biosciences), με MeOH.

•Υπό κενό (VLC, Vacuum Liquid Chromatography), με υλικά πλήρωσης

α. Πολυαμίδιο CC6 Macherey-Nagel, 70-160μm, βαθμωτής έκλουσης (H₂O→MeOH)

β. Kieselgel 60H (Merck, Art. 7736), βαθμωτής έκλουσης (C₆H₁₄→CH₂Cl₂→MeOH).

B3. Υγρή Χρωματογραφία Μέσης Πίεσης (MPLC, Medium Pressure Liquid Chromatography)

- Περισταλτική αντλία Gilson M312
- Πολυαμίδιο CC6 Macherey-Nagel, 70-160μm βαθμωτής έκλουσης.

B4. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC)- S.P

Το σύστημα χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκε αποτελείται από αντλία HPLC Pump SSI Marathon III, σύστημα βαθμωτής έκλουσης Gradient SSI 232C και ανιχνευτή υπεριώδους - ορατού Detector Variable UV-Vis SSI 500 με λογισμικό SSI 232 Clarity Lite).

Οι χρωματογραφικές στήλες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι παρακάτω:

- Προστήλη αντίστροφης φάσης Apollo C-18 PrepGuard, (33mmX7mm, με 5μm μέγεθος σωματιδίων).
- Ημιπαρασκευαστική στήλη αντίστροφης φάσης: Apollo C-18 Semi-prep (250mmX 5mm, με 5μm μέγεθος σωματιδίων).

Γ. Φασματοσκοπικές μέθοδοι

Γ1. Φασματοφωτομετρία Υπεριώδους- Ορατού (UV-Vis Spectra)

- Hitachi U-2000 Spectrometer με κυψελίδες χαλαζία 10mm QS
- Hitachi U-2001 Spectrometer με κυψελίδες χαλαζία 10mm QS
- Λουμινόμετρο SiriusLuminometer (Berthold Detection Systems)

Γ2. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR)

- Φασματόμετρο Varian 600MHz (599.833MHz για $^1\text{H-NMR}$ και 150MHz για $^{13}\text{C-NMR}$)
- Φασματόμετρο Bruker DPX 300 (300.13MHz για $^1\text{H-NMR}$ και 75.5MHz για $^{13}\text{C-NMR}$)
- Φασματόμετρο Bruker AMX 500 (500.1MHz για $^1\text{H-NMR}$ και 125.5MHz για $^{13}\text{C-NMR}$).

Τα φάσματα ελήφθησαν με τους παρακάτω διαλύτες:

- CDCl_3
- $\text{CD}_3\text{OD-d}_4$
- DMSO-d_6 .

Γ3. Φασματοσκοπία μάζης

- Φασματογράφος MS/MS TQ Detector-Ultra Performance LC (Acquity Waters)
- Φασματογράφος μάζας Shimadzu GC/MS QP 2010 (χρωματογράφος Shimadzu GC 2010-gas chromatograph)
- Φασματογράφος HR-MS LTQ Orbitrap velos (ThermoScientific)
- Φασματογράφος LC-MS (Shimadzu 2020)

Γ4. LC-DAD-MS (ESI+)

Η ποιοτική και ποσοτική ανάλυση του φαινολικού περιεχομένου όλων των δειγμάτων, καθώς και η λήψη των φασμάτων μάζης απομονωμένων ενώσεων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση συστήματος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, συνδεδεμένου με δύο κανάλια ανιχνευτών υπεριώδους-ορατού, καθώς και με φασματογράφο μάζης θετικού ιονισμού (LC/DAD/MS, ESI+). Η αντλία της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης ήταν Finnigan MAT Spectra System P4000, ο ανιχνευτής υπεριώδους-ορατού UV6000LP και ο φασματογράφος μάζης Finnigan AQA. Ο διαχωρισμός των ουσιών επιτεύχθηκε σε στήλη Superspher 100-4 αντίστροφης φάσης RP-18 (Macherey-Nagel, 4μm μέγεθος σωματιδίων) διαστάσεων 125 x 2 mm. Η ροή μετά από δοκιμές και εξισορρόπηση της πίεσης ορίστηκε στα 0.33ml/min και η θερμοκρασία στους 40°C. Η ανίχνευση καταγράφηκε στα 278 και 340nm. Η φασματοσκοπία μάζης πραγματοποιήθηκε με θετικό ιονισμό (Electron Spray Ionization +) σε θερμοκρασία 400°C, τάση 4,9kV και αναλυτή μάζας από 121-894amu, στα 12eV και 60eV για την κατανομή του ζέοντος ύδατος προ κατανομών [Terph.-H₂O (αναφέρεται παρακάτω)] και για το ίζημα του ηθμού [Terph.-Hθμού (αναφέρεται παρακάτω)], και στα 12eV και 70eV για τις κατανομές του διαιθυλαιθέρα, του οξικού αιθυλεστέρα και του υπολείμματός του, καθώς και της βουτανόλης. Μετά από δοκιμές εφαρμόστηκε το ακόλουθο πρόγραμμα ανάλυσης για τις κατανομές του διαιθυλαιθέρα, του οξικού αιθυλεστέρα και του υπολείμματός του, καθώς και της βουτανόλης : (A) AcOH (2%) και (B) MeOH, 100% A για 2 min, 0% A στα 52 min, 0% A στα 57 min, ενώ για το Terph.-Hθμού και για το Terph.-H₂O το αντίστοιχο πρόγραμμα ήταν 95% A για 2 min, 0% A στα 25 min, 0% A στα 30 min. Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων κυμάνθηκαν από 1.0 έως 1.3 mg/ml. Ο όγκος

έγχυσης ήταν σε όλες τις περιπτώσεις 1μl και τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν με τη χρήση λογισμικού Xcalibur 1.2.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Το φυτικό υλικό συλλέχθηκε από περιοχές της Κεντροαφρικανικής Δημοκρατίας. Αποτελείται από υπέργεια τμήματα του φυτού *Tephrosia humilis* που είχαν προηγουμένως καθαριστεί από τυχόν υπολείμματα χώματος και άλλων ακαθαρσιών. Διατηρήθηκε στην κατάψυξη και πριν χρησιμοποιηθεί, αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για να αποψυχθεί και στην συνέχεια τεμαχίστηκε σε μικρότερα μέρη.

Η διαδικασία της εκχύλισης

Φυτικό υλικό βάρους 300g τοποθετήθηκε σε συσκευή Soxhlet και έγινε εξαντλητική διαδοχική εκχύλιση με διαλύτες αυξανόμενης πολικότητας (πετρελαϊκός αιθέρας, διχλωρομεθάνιο και μεθανόλη). Τα εκχυλίσματα στη συνέχεια συμπυκνώθηκαν μέχρι ξηρού σε περιστροφικό συμπυκνωτή απόσταξης υπό κενό (Buchí 461) και παρελήφθησαν αντίστοιχα τα ακόλουθα στερεά υπολείμματα:

- Πετρελαϊκός αιθέρας 4.33g
- CH₂Cl₂ 5.21g
- MeOH 44.68g.

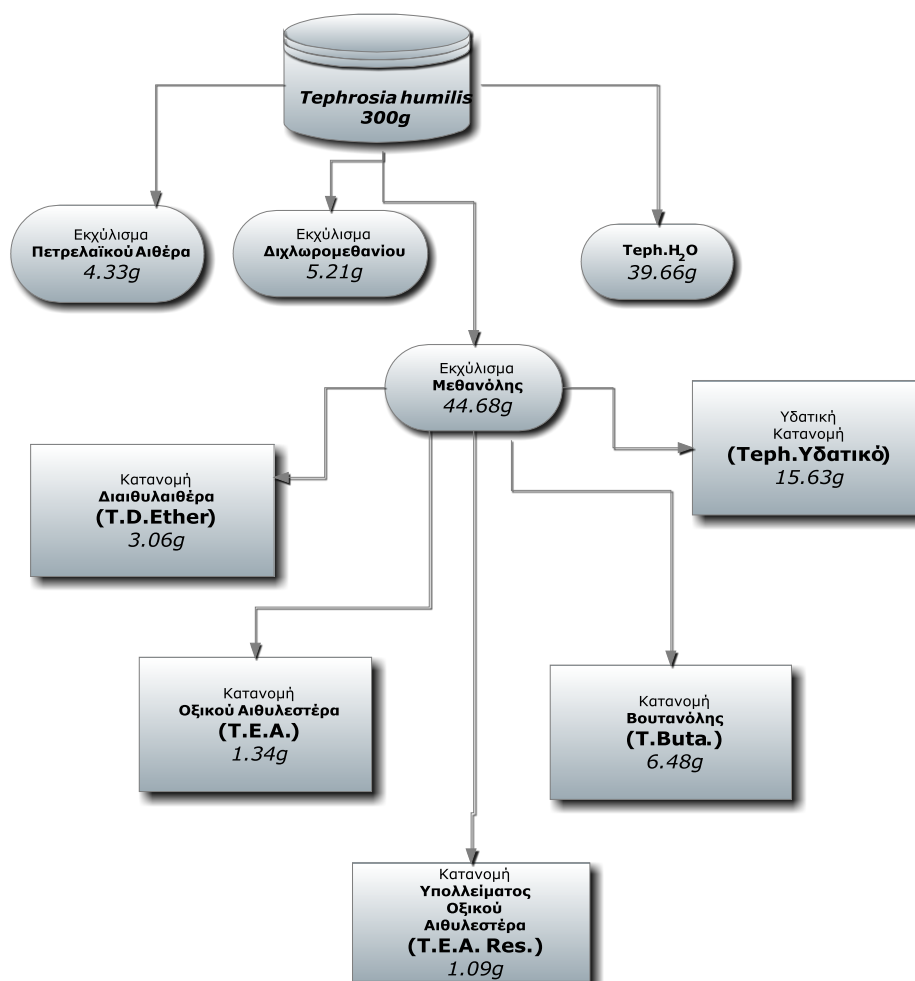
Το φυτικό εκχύλισμα που παρέμεινε μετά από την εξαντλητική εκχύλιση με τους οργανικούς διαλύτες, εκχυλίστηκε με ζέον ύδωρ (7L), μετά την απομάκρυνση του οποίου προέκυψε στερεό υπόλειμμα βάρους 39.66g (**Teph.-H₂O**).

Στη συνέχεια το στερεό υπόλειμμα της μεθανόλης διαλύθηκε σε 2L βραστό νερού διηθήθηκε και εκχυλίστηκε σε διαχωριστική χοάνη με διαιθυλαιθέρα, οξικό αιθυλεστέρα και κ-βουτανόλη. Στο διηθητικό χαρτί που χρησιμοποιήθηκε ως φίλτρο, παρέμεινε μικρή ποσότητα ιζήματος (**Teph.-Hθμού**). Στην κατανομή του οξικού

αιθυλεστέρα, μετά από παραμονή τριών ημερών, παρατηρήθηκε ο σχηματισμός ιζήματος, το οποίο μετά από διήθηση, έδωσε στερεό υπόλειμμα βάρους 1.09g (**T.E.A. Res**). Ακολούθησε συμπύκνωση σε περιστροφικό συμπυκνωτή υπό κενό, και παρελήφθησαν τα ακόλουθα στερεά υπολείμματα:

- Διαιθυλαιθέρας (**T.D.Ether**) 3.06g
- Οξικός αιθυλεστέρας (**T.E.A.**) 1.34g
- κ-Βουτανόλη (**T.Buta.**): 6.48g
- Υδατικό (**Teph. Υδατικό**): 15.63g.

Όλα τα εκχυλίσματα, τα κλάσματα και τα ιζήματα που προέκυψαν από τη διήθηση του αρχικού υδατικού διαλύματος αποθηκεύθηκαν στους 4°C υπό ατμόσφαιρα αζώτου.



Χρωματογραφικός διαχωρισμός των εκχυλισμάτων

Κατανομή	α/α	Κωδικός Ένωσης	Ποσότητα (mg)	Όνομασία Ένωσης	
Εκχύλισμα Διχλωρομεθανίου	1	MTH-1	135.9	1,4-διυδροξυ-3,4-(εποξυαιθανο)-5-κυκλοεξένιο	
	2	MTH-3	7.7	1,4-διυδροξυ-1,2-(εποξυαιθανο)-5-κυκλοεξάνιο (Κλεροϊντισίνη Ε)	
Κατανομή Διαιθυλαιθέρα	3	M-70*	0.7	Unidentified	
	4	M-71	1.6	3-υδροξυ-λουπ-20(29)-ένιο (λουπεόλη)	
	5	M72*	0.7	Unidentified	
	6	M-73*	0.9	Unidentified	
	7	M-74	2.9	Μεθυλεστέρας του Κουμαρικού Οξέος	
	8	"		Μεθυλεστέρας του π-υδροξυ-βενζοϊκού οξέος	
	9	M-75*	0.8	Αουρόνη	
	10	M-76*	0.9	Unidentified	
	11	M-77*	0.9	Φλαβανόνη (Τύπου Εσπεριτίνης)	
	12	M-78*	1.0	Φλαβανόνη (Τύπου Εσπεριτίνης)	
	Κατανομή Οξικού Αιθυλεστέρα	13	M-49*	0.8	Ισοφλαβόνη (Τύπου Νταιντζίνης)
		14	M-50*	1.0	Ισοφλαβόνη (Τύπου Νταιντζίνης)
15		M-48*	1.0	Φλαβανόνη (Τύπου Εσπεριτίνης)	
16		M-47*	0.9	Unidentified	
17		M-51*	1.0	Unidentified	
18		M-52	4.4	7-O-β-D-γλυκοζίτης της ναριγγεΐνης (προυΐνη)	
19		M-53	3.1	7-O-β-D-γλυκοζίτης της 5,7,3',6'-τετραϋδροξυ-φλαβανόνης	
20		M-54*	1.0	Φλαβανόνη (Τύπου Ναριγγίνης)	
21		M-56*	0.9	Unidentified	
22		M-55*	0.8	Unidentified	
23		M-57*	0.7	Unidentified	
24		M-58	1.1	3,4-διυδροξυ-βενζοϊκό οξύ (πρωτοκατεχικό οξύ)	
25		M-59*	0.6	Unidentified	
26		M-60*	0.7	Φλαβανόνη (Τύπου Ναριγγίνης)	
27		M-61	1.8	7-O-β-D-(2''-O-a-L-ραμνοζυλο-)γλυκοζίτης της απιγενΐνης (ροΐφολΐνη)	
28		M-62	3.1	7-O-β-D-γλυκοζίτης της λουτεολΐνης	
29		M-63*	0.9	Φλαβανόνη (Τύπου Ναριγγΐνης)	
30		M-64*	1.0	Unidentified	
31		M-65*	0.9	Διυδροφλαβονόλη (Τύπου Διυδροφουσεΐνη)	
32		M-66	2.1	Απιγενΐνη	
33	M-67*	0.7	Φλαβόνη (Τύπου Απιγενΐνης)		
34	M-68*	1.0	Ισοφλαβόνη (Τύπου Ιριγενΐνης)		
35	M-69*	0.7	Unidentified		
Κατανομή Βουτανόλης	36	M-41*	0.4	Ισοφλαβόνη (Τύπου 5,7- Διυδροξυισοφλαβόνης)	
	37	M-42*	0.7	Ισοφλαβόνη (Τύπου 5,7- Διυδροξυισοφλαβόνης)	
	38	M-43*	0.8	Ισοφλαβόνη (Τύπου Γενισΐνης)	

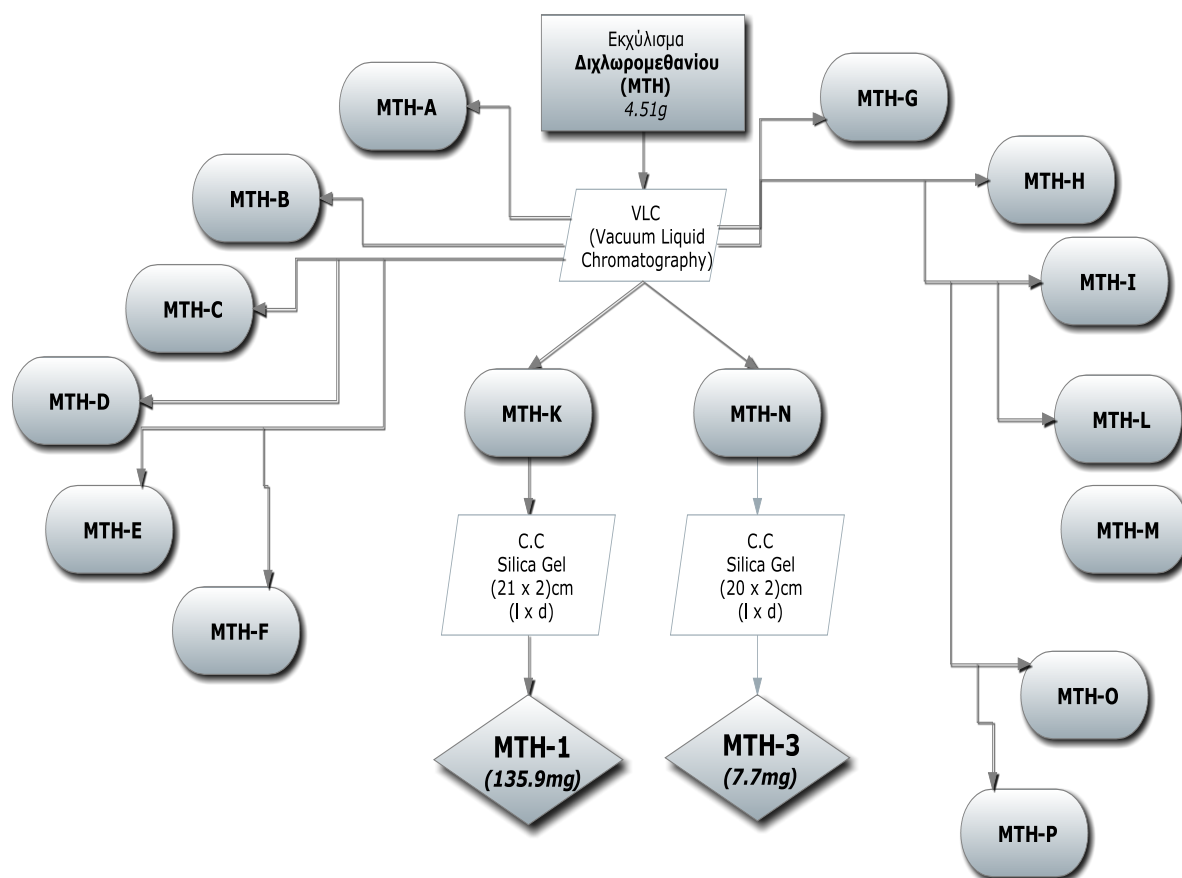
	39	M-44*	1.0	Τύπου Χλωρογενικού/Κινικού Οξέος
	40	M-14*	0.9	Φλαβανόνη (Τύπου Ναριγγίνης)
	41	M-15*	1.0	Φλαβανόνη (Τύπου Ναριγγίνης)
	42	M-17	5.0	7-O-β-D-(2''-O-a-L-ραμνοζυλο-)γλυκοζιτης της ναριγγενίνης (ναριγγίνη)
	43	M-24*	1.0	Φλαβανόνη (Τύπου Ναριγγίνης)
	44	M-18*	0.8	Φλαβανόνη (Τύπου Ναριγγίνης)
	45	M-19*	1.0	Φλαβανόνη (Τύπου Ναριγγίνης)
	46	M-20*	0.9	Φλαβανόνη (Τύπου Εσπεριδίνης)
	47	M-16*	0.9	Φλαβόνη (Τύπου Απιγενίνης)
	48	M-46	7.7	7-O-β-D-(2''-O-a-L-ραμνοζυλο-)γλυκοζιτης της απιγενίνης (ροϊφολίνη)
	49	M-45*	0.4	Διυδροφλαβονόλη (Τύπου Γκαρβανζόλης)
	50	M-11*	0.6	Τύπου Χλωρογενικού/Κινικού Οξέος
	51	M-10*	0.7	Αουρόνη (Τύπου 3'-υδροξυ-4,4',6-τριμεθοξυ-αουρόνης)
	52	M-12*	0.7	Φλαβόνη (Τύπου Λουτεολίνης)
	53	M-34*	0.9	Φλαβανόνη (Τύπου Σακουραίνης)
	54	M-35*	0.9	Φλαβανόνη (Τύπου Σακουραίνης)
	55	M-36*	0.4	Φλαβανόνη (Τύπου Εσπεριτίνης)
	56	M-37*	0.8	Ισοφλαβόνη (Τύπου Τεξασίνης)
	57	M-38*	1.0	Αουρόνη
	58	M-39*	0.7	Φλαβόνη (Τύπου Απιγενίνης)
	59	M-40	2.1	7-O-β-γλυκουρονίδιο της λουτεολίνης
Υδατική Κατανομή	60	M-29*	0.6	Unidentified
	61	M-26*	0.7	Φλαβανόνη (Τύπου Εσπεριτίνης)
	62	M-30*	0.7	Unidentified
	63	M-31*	0.6	Φλαβόνη (Τύπου Λουτεολίνης)
	64	M-32	1.2	7-O-β-D-(2''-O-a-L-ραμνοζυλο-)γλυκοζιτης της απιγενίνης
	65	M-33*	0.8	Φλαβόνη (Τύπου Απιγενίνης)

*Λόγω μικρής ποσότητας, δεν κατέστη δυνατή η διεκρίνιση της δομής της ένωσης μετά βεβαιότητας (αδυναμία πραγματοποίησης NMR). Υπήρχε δυσκολία αποστολής μεγαλύτερης ποσότητας δρόγης (300gr) και με μεγάλη δυσχέρεια επετεύχθη και η αποστολή αυτής της αρχικής ποσότητας. Ο προτεινόμενος προσδιορισμός των ενώσεων έγινε με βάση το φάσμα υπεριώδους-ορατού αυτών (Mabry et al., 1970)

Από την φυτοχημική ανάλυση ανιχνεύθηκαν συνολικά 95 ενώσεις εκ των οποίων 65 απομονώθηκαν με χρωματογραφικές τεχνικές και 30 αναλύθηκαν με την τεχνική του LC-DAD-MS. 13 από τις συνολικά 65, ταυτοποιήθηκαν με όλα τα φασματοσκοπικά τους στοιχεία, 38 με τα φάσματα UV-Vis κατά Mabry (1970) ενώ δεν κατέστη δυνατή η διεκρίνιση σε 14 ενώσεις. Εκτιμήθηκε η δομή σε 29 ενώσεις

από τις 30 με την τεχνική του LC-DAD-MS, ενώ δεν κατέστη δυνατή η διευκρίνιση σε μία εξ αυτών.

1. ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ ΔΙΧΛΩΡΟΜΕΘΑΝΙΟΥ



Μέρος (4.51g) του εκχυλίσματος του διχλωρομεθανίου χρωματογραφήθηκε σε στήλη υπό κενό [VLC, (7.0 x 10)cm (h x d)] επί ηηκτηής οξειδίου του πυριτίου (Merck, Art. 7736) με υγρό έκλουσης αυξανόμενης πολικότητας: εξάνιο → διχλωρομεθάνιο → μεθανόλη → νερό. Το προς διαχωρισμό δείγμα, αφού διαλύθηκε σε μίγμα διχλωρομεθανίου/μεθανόλης, αναμιχθηκε με ορισμένη ποσότητα οξειδίου του πυριτίου (Merck, Art. 9385) και μετά την εξάτμιση του διαλύτη τοποθετήθηκε σε στερεή μορφή πάνω από τη στατική φάση. Ελήφθησαν 21 κλάσματα μέσου όγκου 300ml, τα οποία κατόπιν ελέγχου με αναλυτική TLC συνενώθηκαν όπως παρατίθεται στον παρακάτω πίνακα.

Ν° Κλασμάτων	Όγκος Διαλυτών	Αναλογία Διαλυτών	Καθ.Βάρος (mg)	Ονομασία Ομαδοποιημένων Κλασμάτων
1	500ml	100% Εξάνιο	42.8	MTH-A
2	300ml	100% Εξάνιο	3.1	MTH-B
3	"	50:50 (Εξάνιο:Διχλωρομεθάνιο)		

4	"	100% Διχλωρομεθάνιο(DM)	216.7	MTH-C
5	"	99.5:0.5 (DM:MeOH)	207.4	MTH-D
6	"	99:1(DM:MeOH)	183.4	MTH-E
7	"	98.5:1.5(DM:MeOH)	1115.4	MTH-F
8	"	98:2(DM:MeOH)		
9	"	97:3(DM:MeOH)	146.5	MTH-G
10	"	96:4(DM:MeOH)		
11	"	95:5(DM:MeOH)		
12	500ml	94:6(DM:MeOH)	458.1	MTH-H
13	300ml	93:7(DM:MeOH)	140.9	MTH-I
14	"	92:8(DM:MeOH)	363.5	MTH-K
15	"	91:9(DM:MeOH)		
16	"	90:10(DM:MeOH)	201.8	MTH-L
17	"	85:15(DM:MeOH)	130.0	MTH-M
18	"	80:20(DM:MeOH)	211.3	MTH-N
19	"	50:50(DM:MeOH)	209.4	MTH-O
20	"	100%MeOH	334.2	MTH-P
21	600ml	"		

• Ομάδα κλασμάτων MTH-K

Χρωματογραφήθηκε σε στήλη με υλικό πλήρωσης πηκτή οξειδίου του πυριτίου (Merck, Art. 9385) διαστάσεων (21 x 2)cm (Ιxd). Ελήφθησαν 347 κλάσματα , τα οποία κατόπιν ελέγχου με TLC, συνενώθηκαν και προέκυψε η ένωση **MTH-1**.

N° Κλασμάτων	Αναλογία Διαλυτών	Καθ.Βάρος (mg)	Ονομασία Ομαδοποιημένων Κλασμάτων Ή Καθαρής Ουσίας
1-108	100% Εξάνιο έως 95:5(Διχλωρομεθάνιο:Μεθανόλη)	25.8	MTH-KA
109-118	95:5(Διχλωρομεθάνιο:Μεθανόλη) έως 94:6(Διχλωρομεθάνιο:Μεθανόλη)	58.2	MTH-KB
119-131	94:6(Διχλωρομεθάνιο:Μεθανόλη)	135.9	MTH-1
132-143	94:6(Διχλωρομεθάνιο:Μεθανόλη) έως 93:7(Διχλωρομεθάνιο:Μεθανόλη)	47.1	MTH-KD
144-159	93:7(Διχλωρομεθάνιο:Μεθανόλη) έως 92:8(Διχλωρομεθάνιο:Μεθανόλη)	39.6	MTH-KE(MTH-2)
160-180	92:8(Διχλωρομεθάνιο:Μεθανόλη) έως 91:9(Διχλωρομεθάνιο:Μεθανόλη)	19.9	MTH-KF

181-195	91:9(Διχλωρομεθάνιο:Μεθανόλη) έως 90:10(Διχλωρομεθάνιο:Μεθανόλη)	8.0	MTH-KG
196-230	90:10(Διχλωρομεθάνιο:Μεθανόλη) έως 86:14(Διχλωρομεθάνιο:Μεθανόλη)	15.6	MTH-KH
231-249	86:14(Διχλωρομεθάνιο:Μεθανόλη) έως 84:16(Διχλωρομεθάνιο:Μεθανόλη)	9.6	MTH-KI
250-300	84:16(Διχλωρομεθάνιο:Μεθανόλη) έως 75:25(Διχλωρομεθάνιο:Μεθανόλη)	20.7	MTH-KK
301-347	75:25(Διχλωρομεθάνιο:Μεθανόλη) έως 100% Μεθανόλη	19.7	MTH-KL

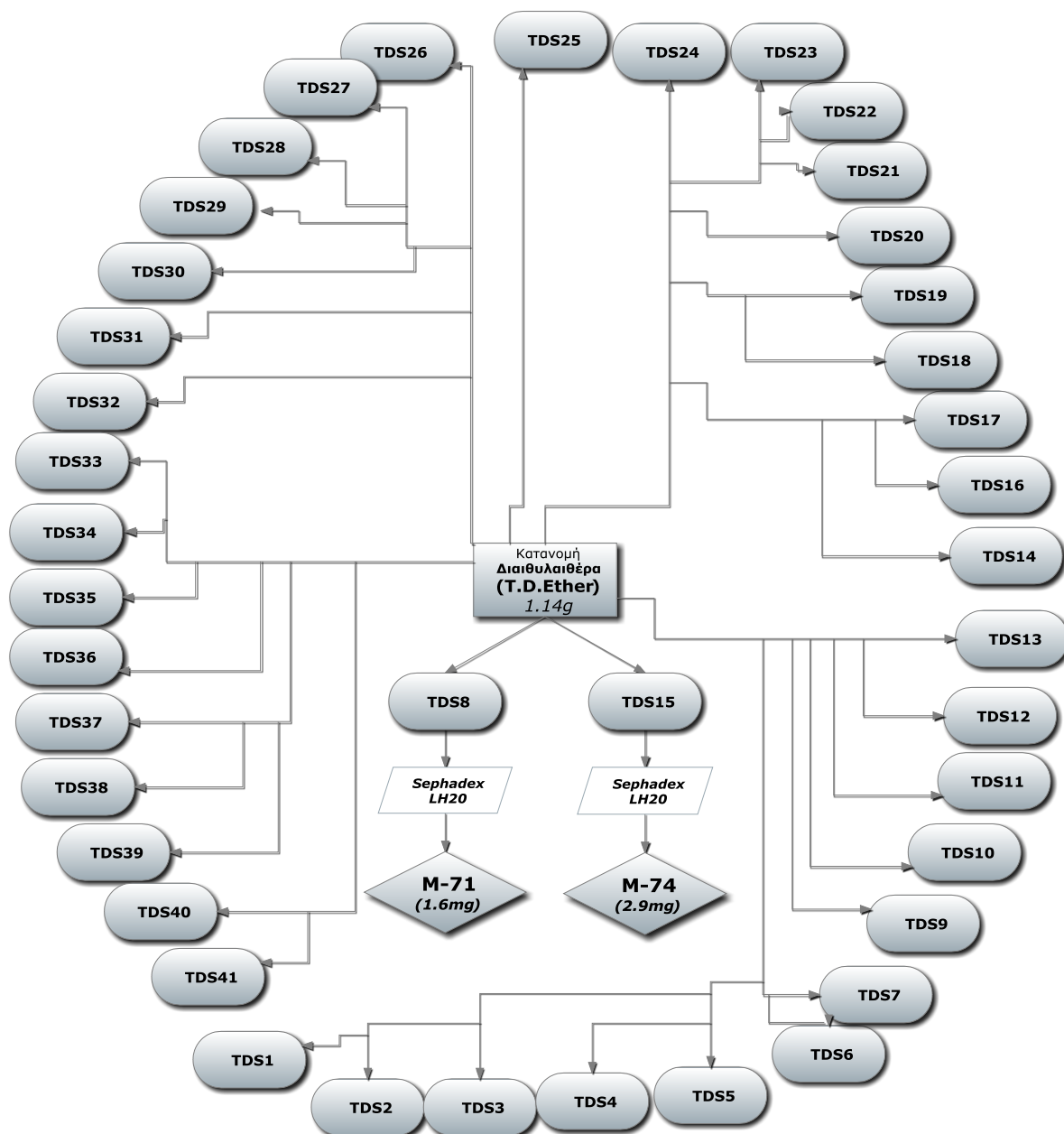
• **Ομάδα κλασμάτων MTH-N**

Χρωματογραφήθηκε σε στήλη με υλικό πλήρωσης πηκτή οξειδίου του πυριτίου (Merck, Art. 9385) διαστάσεων (20 x 2)cm (Ιxd). Ελήφθησαν 246 κλάσματα, τα οποία κατόπιν ελέγχου με TLC, συνενώθηκαν και προέκυψε η ένωση **MTH-3**.

N° Κλασμάτων	Αναλογία Διαλυτών	Καθ.Βάρος (mg)	Όνομασία Ομαδοποιημένων Κλασμάτων 'Η Καθαρής Ουσίας
1-30	100% Εξάνιο έως 95:5(Διχλωρομεθάνιο:Μεθανόλη)	16.3	MTH-NA
31-45	95:5(Διχλωρομεθάνιο:Μεθανόλη) έως 93:7(Διχλωρομεθάνιο:Μεθανόλη)	7.7	MTH-3
46-47	93:7(Διχλωρομεθάνιο:Μεθανόλη)	1.3	MTH-NC
48-50	"	8.8	MTH-ND (MTH-4)
51-55	"	27.8	MTH-NE (MTH-5)
56-71	90:10(Διχλωρομεθάνιο:Μεθανόλη)	99.5	MTH-NF
72-80	90:10(Διχλωρομεθάνιο:Μεθανόλη) έως 88:12(Διχλωρομεθάνιο:Μεθανόλη)	17.6	MTH-NG (MTH-6)
81-104	88:12(Διχλωρομεθάνιο:Μεθανόλη) έως 86:14(Διχλωρομεθάνιο:Μεθανόλη)	16.5	MTH-NH
105-246	86:14(Διχλωρομεθάνιο:Μεθανόλη) έως 100% Μεθανόλη	-	MTH-NI

2.ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ ΜΕΘΑΝΟΛΗΣ

2.1.Κατανομή Διαιθυλαιθέρα (T.D.Ether)



Μέρος (1.14g) του στερεού υπολείμματος διαιθυλαιθέρα χρωματογραφήθηκε σε στήλη με υλικό πλήρωσης πηκτή οξειδίου του πυριτίου (silica gel 60, 0.040-0.063mm, Merck Art.9385), διαστάσεων (21 x 1.8)cm (lxd) και κινητή φάση μίγματα διαλυτών αυξανόμενης πολικότητας, εξάνιο → διχλωρομεθάνιο → μεθανόλη,

με μέσο όγκο συλλεγομένων κλασμάτων 50ml. Συλλέχθηκαν 369 κλάσματα και μετά από έλεγχο με TLC προέκυψαν συνολικά 40 συνενώσεις κλασμάτων που ονομάστηκαν **TDS**.

N° Κλασμάτων	Καθ.Βάρος (mg)	Αναλογία Διαλυτών	Ονομασία Ομαδοποιημένων Κλασμάτων
1-2	1.8	100% Εξάνιο	TDS ₁
3-16	8.6	"	TDS ₂
17	22.6	75:25(Εξάνιο:Διχλωρομεθάνιο)	TDS ₃
18-20	8.4	"	TDS ₄
21	0.9	"	TDS ₅
22-24	5.6	"	TDS ₆
25	1.7	"	TDS ₇
26-29	8.8	"	TDS ₈
30-31	2.3	"	TDS ₉
32-37	23.9	75:25(Εξάνιο:Διχλωρομεθάνιο) έως 50:50(Εξάνιο:Διχλωρομεθάνιο)	TDS ₁₀
38-39	62.4	50:50(Εξάνιο:Διχλωρομεθάνιο) έως 25:75(Εξάνιο:Διχλωρομεθάνιο)	TDS ₁₁
40-46	46.3	25:75(Εξάνιο:Διχλωρομεθάνιο)	TDS ₁₂
47-50	24.2	"	TDS ₁₃
51	7.5	"	TDS ₁₄
52-63	34.3	"	TDS ₁₅
64-69	12.9	"	TDS ₁₆
70-75	13.6	"	TDS ₁₇
76-78	4.3	"	TDS ₁₈
79-81	4.6	"	TDS ₁₉
82-84	5.9	"	TDS ₂₀
85-90	15.8	15:85(Εξάνιο:Διχλωρομεθάνιο)	TDS ₂₁
91-96	11.5	15:85(Εξάνιο:Διχλωρομεθάνιο) έως 10:90(Εξάνιο:Διχλωρομεθάνιο)	TDS ₂₂
97-103	16.3	10:90(Εξάνιο:Διχλωρομεθάνιο) έως 5:95(Εξάνιο:Διχλωρομεθάνιο)	TDS ₂₃
104-120	22.9	5:95(Εξάνιο:Διχλωρομεθάνιο) έως 100% Διχλωρομεθάνιο	TDS ₂₄
121-129	13.2	100% Διχλωρομεθάνιο έως 99:1(Διχλωρομεθάνιο:Μεθανόλη)	TDS ₂₅
130-133	74.7	99:1(Διχλωρομεθάνιο:Μεθανόλη)	TDS ₂₆
134-135	10.1	"	TDS ₂₇
136-138	16.1	"	TDS ₂₈
139-145	23.9	"	TDS ₂₉
146-155	22.2	"	TDS ₃₀
156-164	18.3	99:1(Διχλωρομεθάνιο:Μεθανόλη) έως 98.5:1.5(Διχλωρομεθάνιο:Μεθανόλη)	TDS ₃₁
165-170	21.7	98:2(Διχλωρομεθάνιο:Μεθανόλη)	TDS ₃₂
171-191	89.8	98:2(Διχλωρομεθάνιο:Μεθανόλη) έως 97:3(Διχλωρομεθάνιο:Μεθανόλη)	TDS ₃₃
192-206	27.7	97:3(Διχλωρομεθάνιο:Μεθανόλη)	TDS ₃₄

207-229	57.0	97:3(Διχλωρομεθάνιο:Μεθανόλη) έως 96:4(Διχλωρομεθάνιο:Μεθανόλη)	TDS ₃₅
230-245	28.1	96:4(Διχλωρομεθάνιο:Μεθανόλη)	TDS ₃₆
246-248	6.4	96:4(Διχλωρομεθάνιο:Μεθανόλη) έως 95:5(Διχλωρομεθάνιο:Μεθανόλη)	TDS ₃₇
249-254	96.2	90:10(Διχλωρομεθάνιο:Μεθανόλη)	TDS ₃₈
255-266	49.0	"	TDS ₃₉
267-280	44.1	90:10(Διχλωρομεθάνιο:Μεθανόλη) έως 85:15(Διχλωρομεθάνιο:Μεθανόλη)	TDS ₄₀
281-369	195.7	85:15(Διχλωρομεθάνιο:Μεθανόλη) έως 100% Μεθανόλη	TDS ₄₁

• Ομάδα κλασμάτων TDS₄

Το κλάσμα χρωματογραφήθηκε σε στήλη με υλικό πλήρωσης Sephadex LH-20 με διαστάσεις 40x1.3 (l x d) και διαλύτη έκλουσης μεθανόλη. Συλλέχθηκαν 17 κλάσματα των 2 ml. Μετά από χρωματογραφικούς ελέγχους με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, συνενώθηκαν τα κλάσματα 3 και 4, τα οποία περιείχαν καθαρή την ένωση M-70 (0.7mg)

Ν° Κλάσματος	Βάρος Συνενώματος (mg)	Ονομασία Καθαρής Ουσίας
3-4	0.7	M-70*

*Λόγω των μικρών ποσοτήτων, δεν κατέστη δυνατό να διευκρινιστεί η δομή της ουσίας μετά βεβαιότητας

• Ομάδα κλασμάτων TDS₈

Χρωματογραφήθηκε σε στήλη με υλικό πλήρωσης Sephadex LH-20 με διαστάσεις (40 x 1.3)cm (lxd) και διαλύτη έκλουσης μεθανόλη. Συλλέχθηκαν 19 κλάσματα των 2ml. Μετά από χρωματογραφικούς ελέγχους με TLC συνενώθηκαν τα κλάσματα 1-6, τα οποία περιείχαν καθαρή την ένωση M-71 (1.6mg).

Ν° Κλάσματος	Βάρος Συνενώματος (mg)	Ονομασία Ομαδοποιημένων Κλασμάτων	Ονομασία Καθαρής Ουσίας
1-6	1.6		M-71
7-13	1.0	TDS _{8B}	

• Ομάδα κλασμάτων TDS₁₄

Χρωματογραφήθηκε σε στήλη με υλικό πλήρωσης Sephadex LH-20 με διαστάσεις 40x1.3 (l x d) και διαλύτη έκλουσης μεθανόλη. Από την επεξεργασία με αυτή τη μέθοδο, προέκυψε η καθαρή ουσία που αναφέρεται στον παρακάτω πίνακα. Συλλέχθηκαν 9 κλάσματα των 2ml.

Ν° Κλάσματος	Βάρος Συνενώματος (mg)	Ονομασία Καθαρής Ουσίας
6-7	0.7	M-72*

*Λόγω των μικρών ποσοτήτων, δεν κατέστη δυνατό να διευκρινιστεί η δομή της ουσίας μετά βεβαιότητας

• Ομάδα κλασμάτων TDS₁₅

Χρωματογραφήθηκε σε στήλη με υλικό πλήρωσης Sephadex LH-20 και διαστάσεις (70 x 1.4)cm (l x d) και μεθανόλη ως διαλύτη έκλουσης. Από την επεξεργασία με αυτή τη μέθοδο, προέκυψαν οι ομάδες κλασμάτων που αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα. Συλλέχθηκαν 19 κλάσματα των 2ml.

Ν° Κλάσματος	Βάρος Συνενώματος (mg)	Ονομασία Ομαδοποιημένων Κλασμάτων	Ονομασία Καθαρής Ουσίας
1-4		TDS ₁₅ A	
5-6	0.9		M-73*
8-9	2.9		M-74
10-14	5.8	TDS ₁₅ Δ	
15-19	1.3	TDS ₁₅ E	

*Λόγω των μικρών ποσοτήτων, δεν κατέστη δυνατό να διευκρινιστεί η δομή της ουσίας μετά βεβαιότητας

• Ομάδα κλασμάτων TDS₁₇

Χρωματογραφήθηκε σε στήλη με υλικό πλήρωσης Sephadex LH-20 και διαστάσεις 80x1.4 (l x d), με μεθανόλη ως διαλύτη έκλουσης. Από την επεξεργασία με αυτή τη μέθοδο, προέκυψε η καθαρή ουσία που αναφέρεται στον παρακάτω πίνακα. Συλλέχθηκαν 30 κλάσματα των 2ml.

Ν° Κλάσματος	Βάρος Συνενώματος (mg)	Ονομασία Καθαρής Ουσίας
2-5	0.8	M-75*

*Λόγω των μικρών ποσοτήτων, δεν κατέστη δυνατό να διευκρινιστεί η δομή της ουσίας μετά βεβαιότητας

• **Ομάδα κλασμάτων TDS₃₆**

Χρωματογραφήθηκε σε στήλη με υλικό πλήρωσης Sephadex LH-20 με διαστάσεις 40x1.3 (l x d) και διαλύτη έκλουσης μεθανόλη. Από την επεξεργασία με αυτή τη μέθοδο, προέκυψαν οι ομάδες κλασμάτων που αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα. Συλλέχθηκαν 21 κλάσματα των 2ml.

N° Κλάσματος	Βάρος Συνενώματος (mg)	Ονομασία Ομαδοποιημένων Κλασμάτων	Ονομασία Καθαρής Ουσίας
1-4	0.4	TDS ₃₆ A	
5-6	0.8	TDS ₃₆ B	
8-9	0.9		M-76*

*Λόγω των μικρών ποσοτήτων, δεν κατέστη δυνατό να διευκρινιστεί η δομή της ουσίας μετά βεβαιότητας

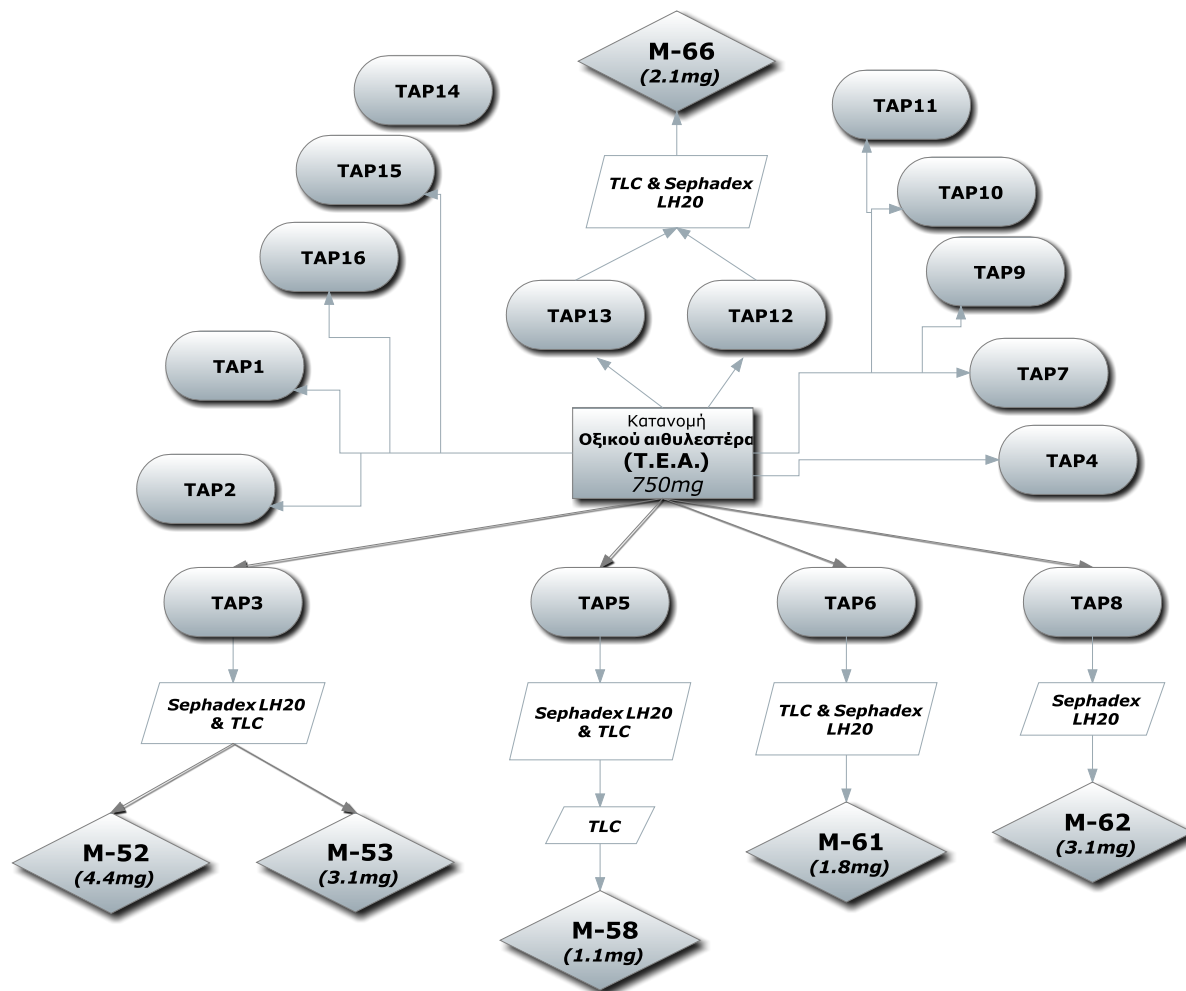
• **Ομάδα κλασμάτων TDS₃₈**

Χρωματογραφήθηκε σε στήλη με υλικό πλήρωσης Sephadex LH-20 με διαστάσεις 40x1.4 (l x d) και μεθανόλη ως διαλύτη έκλουσης. Από την επεξεργασία με αυτή τη μέθοδο, προέκυψαν οι ομάδες κλασμάτων που αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα. Συλλέχθηκαν 25 κλάσματα των 2ml.

N° Κλάσματος	Βάρος Συνενώματος (mg)	Ονομασία Καθαρής Ουσίας
6	0.9	M-77*
7	1.0	M-78*

*Λόγω των μικρών ποσοτήτων, δεν κατέστη δυνατό να διευκρινιστεί η δομή της ουσίας μετά βεβαιότητας

2.2. Κατανομή Οξικού Αιθυλεστέρα (Τ.Ε.Α.)



Μέρος (750mg) της κατανομής του οξικού αιθυλεστέρα χρωματογραφήθηκε σε στήλη πολυαμιδίου αντίστροφης φάσης με διαστάσεις (39 x 2.2)cm (l x d) και κινητή φάση νερό → μεθανόλη έως 100%, με ροή 6ml/min. Προέκυψαν συνολικά 16 ομάδες κλασμάτων που ονομάστηκαν **T.A.P.** .

Ν° Κλασμάτων	Καθ.Βάρος	Αναλογία Διαλυτών	Όνομασία Ομαδοποιημένων Κλασμάτων
1-4	31.3	100% H ₂ O	TAP ₁
5-16	314.2	"	TAP ₂
17-25	48.5	"	TAP ₃
26-34	28.1	"	TAP ₄
35-44	28.2	90:10(H ₂ O:MeOH) έως 80:20(H ₂ O:MeOH)	TAP ₅
45-48	8.0	80:20(H ₂ O:MeOH)	TAP ₆

49-56	19.0	80:20(H ₂ O:MeOH) έως 70:30(H ₂ O:MeOH)	TAP ₇
57-75	37.3	70:30(H ₂ O:MeOH) έως 60:40(H ₂ O:MeOH)	TAP ₈
76-82	23.2	60:40(H ₂ O:MeOH) έως 40:60(H ₂ O:MeOH)	TAP ₉
83-90	15.7	40:60(H ₂ O:MeOH)	TAP ₁₀
91-98	8.7	"	TAP ₁₁
99-105	19.2	20:80(H ₂ O:MeOH)	TAP ₁₂
106-110	8.2	"	TAP ₁₃
111-122	12.3	"	TAP ₁₄
123-147	55.2	100% MeOH	TAP ₁₅
148-161	31.9	"	TAP ₁₆

• Ομάδα κλασμάτων TAP₁

Χρωματογραφήθηκε σε στήλη με υλικό πλήρωσης Sephadex LH-20 με διαστάσεις (55 x 1.4)cm (l x d) και διαλύτη έκλουσης μεθανόλη. Από την επεξεργασία με αυτή τη μέθοδο, προέκυψαν οι ομάδες κλασμάτων που αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα. Συλλέχθηκαν 25 κλάσματα των 2ml.

Ν° Κλάσματος	Καθ.Βάρος (mg)	Ονομασία Ομαδοποιημένων Κλασμάτων
6-16	22.7	TAP _{1A}
17-21	1.8	TAP _{1B}
22-23	2.1	TAP _{1Γ}

Από δοκιμαστικές χρωματογραφίες λεπτής στιβάδας, αποφασίστηκε να γίνει διαχωρισμός των περιεχόμενων ουσιών του **TAP_{1B}** με TLC. Στατική φάση ήταν πλάκες κυτταρίνης και διαλύτης ανάπτυξης το CAW. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα

R _f ζώνης	Καθ.Βάρος Ουσίας (mg)	Ονομασία Απομονωμένης Ουσίας
0.935	0.8	M-49*
0.851	1.0	M-50*

*Λόγω των μικρών ποσοτήτων, δεν κατέστη δυνατό να διευκρινιστεί η δομή των ουσιών μετά βεβαιότητας

Η **M-49** εμφανίστηκε ως μια ζώνη γαλάζιου φθορισμού στη λάμπα UV-Vis και η **M-50** με λευκό χρώμα. Κόπηκε η κάθε ζώνη χωριστά και οι ουσίες εκλούστηκαν και συλλέχθηκαν.

• **Ομάδα κλασμάτων TAP₂**

Μέρος αυτής της ομάδας κλασμάτων χρωματογραφήθηκε σε στήλη αντίστροφης φάσης C18 (250mm x 7mm, Apollo, Female, Grace) των 5μ με προστήλη C18 (33mm x 7mm, Apollo, PrepGuard, Alltech) των 5μ με χρήση της μεθόδου της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης. Η κινητή φάση ήταν οι διαλύτες (A):H₂O με AcOH 2% και (B):MeOH. Το πρόγραμμα που ακολουθήθηκε ήταν 0min (A) 100% και (B) 0%, στο 7min (A) 100% και (B) 0%, στο 12min (A) 60% και (B) 40%, στο 40min (A) 59% και (B) 41%, στο 60min (A) 54% και (B) 46%, στο 65min (A) 0% και (B) 100%, στο 70min (A) 0% και (B) 100%. Ο ανιχνευτής υπεριώδους-ορατού ορίστηκε στα 283nm και η ροή σταθερά σε 1.25ml/min. Τα βάρη των κλασμάτων που ελήφθησαν από αυτή τη διαδικασία και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Αριθμός Κορυφής	Χρόνος Καταγραφής Κορυφής (min)	Βάρος Κλάσματος(mg)	Όνομασία Ομαδοποιημένων Κλασμάτων	Όνομασία Απομονωμένης Ουσίας
1	25	0.2	TAP ₂ -25	
2	30	2.2	TAP ₂ -30	
3	35	0.6	TAP ₂ -35	
4	38	0.4		M-48*
5	46	0.5	TAP ₂ -46	
6	61	0.7	TAP ₂ -61	
7	69	0.3	TAP ₂ -69	

*Λόγω των μικρών ποσοτήτων, δεν κατέστη δυνατό να διευκρινιστεί η δομή της ουσίας μετά βεβαιότητας

Λόγω μη καθαρότητας και προσμίξεων του **TAP₂-30**, χρωματογραφήθηκε σε στήλη με υλικό πλήρωσης Sephadex LH-20 με διαστάσεις (57 x 1.4)cm (l x d) και διαλύτη έκλουσης μεθανόλη. Από την επεξεργασία με αυτή τη μέθοδο προέκυψε η καθαρή ουσία **M-47**, που αναφέρεται στον παρακάτω πίνακα. Συλλέχθηκαν 9 κλάσματα των 2ml.

Όνομασία Συνενώματος	N° Κλάσματος	Καθ.Βάρος Ουσίας(mg)	Όνομασία Απομονωμένης Ουσίας
TAP ₂ -30	2-9	0.9	M-47*

*Λόγω των μικρών ποσοτήτων, δεν κατέστη δυνατό να διευκρινιστεί η δομή της ουσίας μετά βεβαιότητας

• **Ομάδα κλασμάτων TAP₃**

Χρωματογραφήθηκε σε στήλη με υλικό πλήρωσης Sephadex LH-20 με διαστάσεις (55 x 1.4)cm (l x d) και διαλύτη έκλουσης μεθανόλη. Από την επεξεργασία με αυτή τη μέθοδο, προέκυψαν οι ομάδες κλασμάτων που αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα. Συλλέχθηκαν 37 κλάσματα των 2ml.

Ν° Κλάσματος	Καθ.Βάρος (mg)	Ονομασία Ομαδοποιημένων Κλασμάτων
6-16	34.6	TAP ₃ A
17-21	11.0	TAP ₃ B
22-23	1.3	TAP ₃ Γ

Από δοκιμαστικές TLC, αποφασίστηκε να γίνει διαχωρισμός των περιεχόμενων ουσιών του καθενός από τις ομάδες κλασμάτων TAP₃B και TAP₃Γ, με παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας. Στατική φάση ήταν πλάκες κυτταρίνης και διαλύτης ανάπτυξης το CAW. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

R _f ζώνης	Ονομασία Ομαδοποιημένων Κλασμάτων	Καθ.Βάρος Ουσίας (mg)	ΝΕΑ Ονομασία Ομαδοποιημένων Κλασμάτων	Ονομασία Απομονωμένης Ουσίας
0.81	TAP ₃ B	1.0		M-51*
0.73	TAP ₃ B	4.4	TAP ₃ B2	M-52
0.62	TAP ₃ B	1.9	TAP ₃ B3	M-53
0.62	TAP ₃ Γ	1.2	TAP ₃ Γ1	
0.44	TAP ₃ B	0.5		M-54*
0.44	TAP ₃ Γ	0.5		

Από δοκιμαστικές χρωματογραφίες λεπτής στιβάδας προέκυψε ότι οι ομάδες κλασμάτων **TAP₃B3** και **TAP₃Γ1** ταυτίζονται, όπως και τα **TAP₃B4** και **TAP₃Γ2**, και για το λόγο αυτό οι ποσότητές τους συνενώθηκαν. Η **M-52** εμφανίστηκε ως μια ζώνη με κίτρινο φθορισμό στη λάμπα UV-Vis που μετατρέποταν σε πράσινο σε ατμούς αμμωνίας και η **M-53** με καφέ χρώμα, που αποκτούσε σκούρο πράσινο χρωματισμό σε ατμούς αμμωνίας. Κόπηκε η κάθε ζώνη χωριστά και οι ουσίες εκλούστηκαν και συλλέχθηκαν.

• **Ομάδα κλασμάτων TAP₅**

Χρωματογραφήθηκε σε στήλη με υλικό πλήρωσης Sephadex LH-20 με διαστάσεις (55 x 1.4)cm (l x d) και διαλύτη έκλουσης μεθανόλη. Από την επεξεργασία με αυτή τη μέθοδο, προέκυψαν οι ομάδες κλασμάτων που αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα. Συλλέχθηκαν 25 κλάσματα των 2ml.

Ν° Κλάσματος	Καθ.Βάρος (mg)	Ονομασία Ομαδοποιημένων Κλασμάτων
4-9	7.7	TAP ₅ A
10-13	8.3	TAP ₅ B
14-19	6.7	TAP ₅ Γ
20-21	3.1	TAP ₅ Δ
22-25	1.1	TAP ₅ E

Στις ομάδες κλασμάτων **TAP₅Γ** και **TAP₅Δ** εφαρμόστηκε, έπειτα από δοκιμαστικές TLC, η τεχνική της παρασκευαστικής χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας για κάθε ένα ξεχωριστά. Από τις ίδιες χρωματογραφίες, και για να έχουμε καλύτερα αποτελέσματα και απόδοση, προέκυψε ότι η **TAP₅E** προσομοιάζει με την **TAP₅Δ** και για το λόγο αυτό συνενώθηκε με την τελευταία. Στατική φάση ήταν πλάκες κυτταρίνης και διαλύτης ανάπτυξης το CAW. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

Ονομασία Ομαδοποιημένων Κλασμάτων	R _f ζώνης	Βάρος Κλάσματος(mg)	NEA Ονομασία Ομαδοποιημένων Κλασμάτων	Ονομασία Απομονωμένης Ουσίας
TAP ₅ Γ	0.839	1.1	TAP ₅ Γ ₁	
	0.724	0.9		M-56*
	0.660	1.2	TAP ₅ Γ ₃	
	0.655	1.0	TAP ₅ Γ ₄	
	0.632	1.0	TAP ₅ Γ ₅	
	0.603	1.3	TAP ₅ Γ ₆	
TAP ₅ Δ	0.897	0.8		M-55*
	0.833	0.7	TAP ₅ Δ ₂	
	0.724	0.7		M-57*
	0.632	0.4	TAP ₅ Δ ₄	
	0.603	0.4	TAP ₅ Δ ₅	

Στη συνέχεια, στις ομάδες κλασμάτων **TAP₅Γ₃** και **TAP₅Γ₄** που συνενώθηκαν, εφαρμόστηκε και πάλι παρασκευαστική TLC με στατική φάση πλάκες κυτταρίνης και διαλύτη ανάπτυξης το 15% AcOH, αυτή τη φορά. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον ακόλουθο πίνακα.

Όνομασία Ομαδοποιημένων Κλασμάτων	R _f ζώνης	Βάρος Κλάσματος(mg)	ΝΕΑ Όνομασία Ομαδοποιημένων Κλασμάτων	Όνομασία Απομονωμένης Ουσίας
TAP₅Γ₃+ TAP₅Γ₄	0.569	1.1		M-58
	0.436	0.6		M-59*
	0.298	0.2	TAP ₅ Γ ₉	

Η **M-58** εμφανίστηκε ως μια ζώνη με σκούρο βιολετί φθορισμό στα 254nm και η **M-59** με λευκό φθορισμό στη λάμπα UV-Vis.

• Ομάδα κλασμάτων TAP₆

Έπειτα από δοκιμαστικές TLC, εφαρμόστηκε η τεχνική της παρασκευαστικής χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας. Στατική φάση ήταν πλάκες κυτταρίνης και διαλύτη ανάπτυξης το CAW. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

R _f ζώνης	Βάρος Κλάσματος(mg)	Όνομασία Ομαδοποιημένων Κλασμάτων	Όνομασία Απομονωμένης Ουσίας
0.884	1.2	TAP ₆ A	
0.664	0.7		M-60*
0.641	1.0	TAP ₆ Γ	
0.520	0.7	TAP ₆ Δ	
0.410	2.7	TAP ₆ E	
0.320	0.7	TAP ₆ Z	

*Λόγω των μικρών ποσοτήτων, δεν κατέστη δυνατό να διευκρινιστεί η δομή της ουσίας μετά βεβαιότητας

Μετά από κοπή της κάθε ζώνης με διαφορετικό R_f, οι ουσίες εκλούστηκαν και συλλέχθηκαν. Η **M-60** εμφανίστηκε ως μια ζώνη πράσινου φθορισμού στη λάμπα UV-Vis που μετατρεπόταν σε λευκό σε ατμούς αμμωνίας.

Το **TAP₆E** χρωματογραφήθηκε σε στήλη με υλικό πλήρωσης Sephadex LH-20 με διαστάσεις (65 x 1.4)cm (l x d) και διαλύτη έκλουσης μεθανόλη. Από την επεξεργασία με αυτή τη μέθοδο, προέκυψε η καθαρή ουσία **M-61** που αναφέρεται

στον παρακάτω πίνακα, καθώς και τα κλάσματα από τα οποία προήλθε. Συλλέχθηκαν 19 κλάσματα των 2ml.

Ν° Κλάσματος	Καθαρό Βάρος Ουσίας(mg)	Ονομασία Ομαδοποιημένων Κλασμάτων	<u>Ονομασία Απομονωμένης Ουσίας</u>
8-14	1.8		M-61
15-19	0.5	TAP ₆ E2	

• Ομάδα κλασμάτων TAP₈

Χρωματογραφήθηκε σε στήλη με υλικό πλήρωσης Sephadex LH-20 με διαστάσεις (65 x 1.4)cm (l x d) και διαλύτη έκλουσης μεθανόλη. Από την επεξεργασία με αυτή τη μέθοδο, προέκυψαν οι ομάδες κλασμάτων που αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα. Συλλέχθηκαν 55 κλάσματα των 2ml.

Ν° Κλάσματος	Καθαρό Βάρος (mg)	Ονομασία Ομαδοποιημένων Κλασμάτων	<u>Ονομασία Απομονωμένης Ουσίας</u>
5-15	4.9	TAP ₈ A	
16-19	1.5	TAP ₈ B	
20-28	5.4	TAP ₈ Γ	
29-34	2.2	TAP ₈ Δ	
35-39	2.5	TAP ₈ E	
40-55	3.1		M-62

• Ομάδα κλασμάτων TAP₉

Χρωματογραφήθηκε σε στήλη με υλικό πλήρωσης Sephadex LH-20 με διαστάσεις (65 x 1.4)cm (l x d) και διαλύτη έκλουσης μεθανόλη. Από την επεξεργασία με αυτή τη μέθοδο, προέκυψαν οι ομάδες κλασμάτων που αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα. Συλλέχθηκαν 30 κλάσματα των 2ml.

Ν° Κλάσματος	Καθαρό Βάρος (mg)	Ονομασία Ομαδοποιημένων Κλασμάτων	<u>Ονομασία Απομονωμένης Ουσίας</u>
12-18	0.9		M-63*
19-24	1.0	TAP ₉ B	
25-27	1.2	TAP ₉ Γ	
28-30	1.6	TAP ₉ Δ	

*Λόγω των μικρών ποσοτήτων, δεν κατέστη δυνατό να διευκρινιστεί η δομή της ουσίας μετά βεβαιότητας

• **Ομάδα κλασμάτων TAP₁₁**

Χρωματογραφήθηκε σε στήλη με υλικό πλήρωσης Sephadex LH-20 με διαστάσεις (65 x 1.4)cm (l x d) και διαλύτη έκλουσης μεθανόλη. Από την επεξεργασία με αυτή τη μέθοδο, προέκυψαν οι ομάδες κλασμάτων που αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα. Συλλέχθηκαν 24 κλάσματα των 2ml.

Ν° Κλάσματος	Καθαρό Βάρος (mg)	Ονομασία Ομαδοποιημένων Κλασμάτων	Ονομασία Απομονωμένης Ουσίας
4-9	1.0		M-64*
10-12	1.1	TAP ₁₁ B	
13-16	0.9	TAP ₁₁ Γ	
21-22	0.9		M-65*

*Λόγω των μικρών ποσοτήτων, δεν κατέστη δυνατό να διευκρινιστεί η δομή των ουσιών μετά βεβαιότητας

• **Ομάδα κλασμάτων TAP₁₂**

Έπειτα από δοκιμαστικές TLC, εφαρμόστηκε η τεχνική της παρασκευαστικής χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας. Στατική φάση ήταν πλάκες κυτταρίνης και διαλύτης ανάπτυξης το CAW. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

R _f ζώνης	Βάρος Κλάσματος(mg)	Ονομασία Ομαδοποιημένων Κλασμάτων
0.930	10.8	TAP ₁₂ A
0.713	2.7	TAP ₁₂ B
0.395	0.8	TAP ₁₂ Γ
0.265	0.8	TAP ₁₂ Δ
0.189	1.1	TAP ₁₂ E
0.162	0.6	TAP ₁₂ Z
0.065	1.0	TAP ₁₂ H

Μετά από κοπή της κάθε ζώνης με διαφορετικό R_f, οι ουσίες εκλούστηκαν και συλλέχθηκαν. Το **TAP₁₂B** εμφανίστηκε ως μια ζώνη με χρώμα κιτρινωπό στη λάμπα UV-Vis που αποκτούσε πράσινο φθορισμό σε ατμούς αμμωνίας.

Το **TAP₁₂B** χρωματογραφήθηκε σε στήλη με υλικό πλήρωσης Sephadex LH-20 με διαστάσεις (65 x 1.4)cm (l x d) και διαλύτη έκλουσης μεθανόλη. Από την

επεξεργασία με αυτή τη μέθοδο, προέκυψε η καθαρή ουσία **M-66** που αναφέρεται στον παρακάτω πίνακα. Συλλέχθηκαν 9 κλάσματα των 2ml.

Ν° Κλάσματος	Καθαρό Βάρος Ουσίας(mg)	<u>Όνομασία Απομονωμένης Ουσίας</u>
2-4	1.2	M-66

Έπειτα από δοκιμαστικές TLC, πρόεκυψε ότι η **M-66** ταυτίζεται με την **TAP₁₃B** που περιγράφεται ακριβώς παρακάτω και για το λόγο αυτό, τα κλάσματα συνενώθηκαν, αποδίδοντας συνολικό καθαρό βάρος για την **M-66** 2.1mg.

• Ομάδα κλασμάτων TAP₁₃

Έπειτα από δοκιμαστικές TLC, εφαρμόστηκε η τεχνική της παρασκευαστικής χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας. Στατική φάση ήταν πλάκες κυτταρίνης και διαλύτης ανάπτυξης το CAW. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

R_f ζώνης	Βάρος Κλάσματος(mg)	Όνομασία Ομαδοποιημένων Κλασμάτων	<u>Όνομασία Απομονωμένης Ουσίας</u>
0.919	2.7	TAP ₁₃ A	
0.713	0.9	TAP ₁₃ B	
0.508	0.9	TAP ₁₃ Γ	
0.395	0.7		M-67*
0.197	0.7	TAP ₁₃ E	
0.108	0.8	TAP ₁₃ Z	
0.070	1.0		M-68*

*Λόγω των μικρών ποσοτήτων, δεν κατέστη δυνατό να διευκρινιστεί η δομή των ουσιών μετά βεβαιότητας

Η **M-67** εμφανίστηκε ως μια ζώνη με χρώμα μουσταρδί στη λάμπα UV-Vis, ενώ η **M-68** ως ζώνη του ίδιου χρωματισμού. Κόπηκε η κάθε ζώνη χωριστά και οι ουσίες εκλούστηκαν και συλλέχθηκαν.

• Ομάδα κλασμάτων TAP₁₅

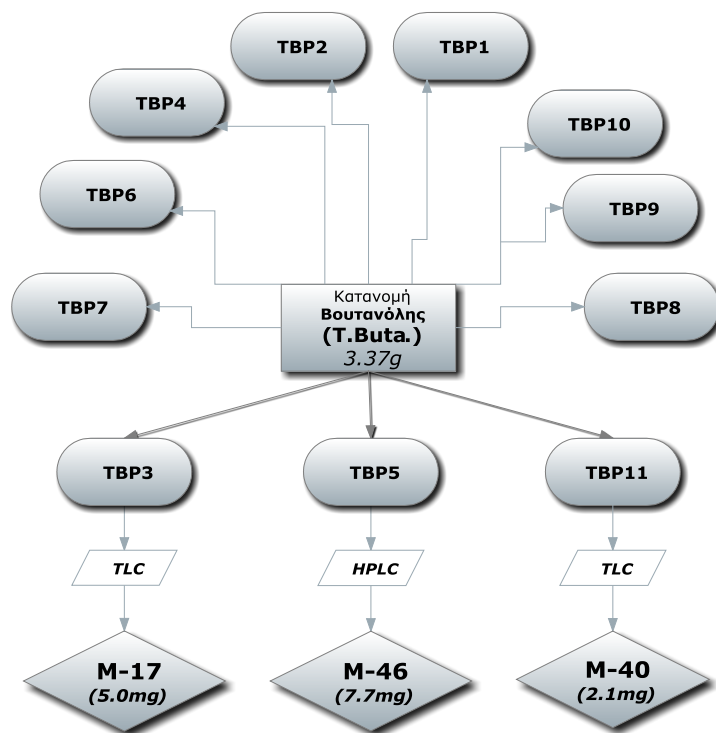
Χρωματογραφήθηκε σε στήλη με υλικό πλήρωσης Sephadex LH-20 με διαστάσεις (65 x 1.4)cm (l x d). Από την επεξεργασία με αυτή τη μέθοδο,

προέκυψαν οι ομάδες κλασμάτων που αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα.
Συλλέχθηκαν κλάσματα των 2ml.

Ν° Κλάσματος	Καθαρό Βάρος (mg)	Ονομασία Ομαδοποιημένων Κλασμάτων	<u>Ονομασία Απομονωμένης Ουσίας</u>
4-6	0.7		M-69*
7-14	2.3	TAP ₁₅ B	
23-25	1.0	TAP ₁₅ Γ	

*Λόγω των μικρών ποσοτήτων, δεν κατέστη δυνατό να διευκρινιστεί η δομή της ουσίας μετά βεβαιότητας

2.3. Κατανομή Βουτανόλης (T.Buta.)



Μέρος (3.37gr) της βουτανολικής κατανομής χρωματογραφήθηκε σε στήλη πολυαμιδίου αντίστροφης φάσης [(42 x 2.2)cm (l x d)] και κινητή φάση νερό → μεθανόλη έως 100% προέκυψαν συνολικά 12 ομάδες κλασμάτων (**T.B.P.**). Χρησιμοποιήθηκε και περισταλτική αντλία, επιτυγχάνοντας σταθερή ροή 3.3ml/min.

Ν° Κλασμάτων	Καθ.Βάρος	Αναλογία Διαλυτών	Ονομασία Ομαδοποιημένων Κλασμάτων
1-5	873.9mgr	100% H ₂ O	TBP ₁
6-16	90.8mgr	"	TBP ₂
17-19	104.9mgr	"	TBP ₃
20-41	119.0mgr	"	TBP ₄
42-56	201.4mgr	100% H ₂ O έως 80:20(H ₂ O:MeOH)	TBP ₅
57-66	64.6mgr	70:30(H ₂ O:MeOH)	TBP ₆
67-74	19.5mgr	"	TBP ₇
75-87	28.2mgr	70:30(H ₂ O:MeOH) έως 60:40(H ₂ O:MeOH)	TBP ₈
88-93	21.8mgr	60:40(H ₂ O:MeOH) έως 50:50(H ₂ O:MeOH)	TBP ₉
94-101	86.9mgr	40:60(H ₂ O:MeOH)	TBP ₁₀
102-127	163.0mgr	40:60(H ₂ O:MeOH) έως 100%MeOH	TBP ₁₁

• **Ομάδα κλασμάτων TBP₁**

Από δοκιμαστικές TLC, αποφασίστηκε να γίνει διαχωρισμός των περιεχόμενων ουσιών της ομάδας κλασμάτων TBP₁ με παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας με διπλή ανάπτυξη. Διαλύτης ανάπτυξης οξικός αιθυλεστέρας : οξικό οξύ : νερό (EAW)-(οργανική φάση) σε αναλογία 4:1:2 και στατική φάση πλάκες κυτταρίνης. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

Αριθμός ζώνης (από την υψηλότερη προς τη χαμηλότερη)	Βάρος Κλάσματος(mg)	Ονομασία Ομαδοποιημένων Κλασμάτων
0.428	1.7	TBP ₁ P ₁
0.417	2.3	TBP ₁ P ₂
0.361	2.3	TBP ₁ P ₃
0.255	2.2	TBP ₁ P ₄
0.233	8.1	TBP ₁ P ₅
0.167	4.6	TBP ₁ P ₆

Η ομάδα κλασμάτων TBP₁P₁ εμφανίστηκε ως μια ζώνη μαύρου χρώματος στη λάμπα UV-Vis, η TBP₁P₂ ως ζώνη με γαλάζιο φθορισμό, η TBP₁P₄ με μαύρο χρώμα και η TBP₁P₅ με κίτρινο φθορισμό. Κόπηκε η κάθε ζώνη χωριστά και οι ουσίες εκλούστηκαν και συλλέχθηκαν.

Λόγω μη καθαρότητας και προσμίξεων, όλα οι παραπάνω ομάδες κλασμάτων υποβλήθηκαν, η καθεμιά ξεχωριστά, σε στήλη με υλικό πλήρωσης Sephadex LH-20 με διαστάσεις (51 x 1.4)cm (l x d) και διαλύτη έκλουσης μεθανόλη. Από την επεξεργασία με αυτή τη μέθοδο προέκυψαν οι καθαρές ουσίες που αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα. Συλλέχθηκαν κλάσματα των 2ml.

Ονομασία Ομαδοποιημένων Κλασμάτων	Ν° Κλάσματος	Καθ.Βάρος Ουσίας(mg)	Ονομασία Απομονωμένης Ουσίας
TBP ₁ P ₁	1-3	0.4	M-41*
TBP ₁ P ₂	3-8	0.7	M-42*
TBP ₁ P ₄	8-10	0.8	M-43*
TBP ₁ P ₅	8-11	1.0	M-44*

*Λόγω των μικρών ποσοτήτων, δεν κατέστη δυνατό να διευκρινιστεί η δομή των ουσιών μετά βεβαιότητας

Η απομονωμένη ουσία **M-41** εμφανίστηκε ως μια ζώνη μαύρου χρώματος στη λάμπα UV-Vis, η **M-42** ως ζώνη με γαλάζιο φθορισμό, η **M-43** με μαύρο χρώμα και η **M-44** με κίτρινο φθορισμό. Κόπηκε η κάθε ζώνη χωριστά και οι ουσίες εκλούστηκαν και συλλέχθηκαν.

• Ομάδα κλασμάτων TBP₃

Μέρος αυτής της ομάδας κλασμάτων χρωματογραφήθηκε σε στήλη αντίστροφης φάσης C18 (250mm x 7mm, Apollo, Female, Grace) των 5μ με προστήλη C18 (33mm x 7mm, Apollo, PrepGuard, Alltech) των 5μ με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης. Η κινητή φάση ήταν οι διαλύτες (A) :H₂O με AcOH 2% και (B):MeOH. Το πρόγραμμα που ακολουθήθηκε ήταν 0min (A) 95% και (B) 5%, στο 10min (A) 95% και (B) 5%, στο 15min (A) 15% και (B) 85%, στο 25min (A) 8% και (B) 92%, στο 30min (A) 0% και (B) 100%, στο 40min (A) 0% και (B) 100%. Ο ανιχνευτής υπεριώδους-ορατού ορίστηκε στα 280nm και η ροή σταθερά σε 1.0ml/min. Έγιναν συνολικά 25 εγχύσεις του 1ml έκαστη. Τα βάρη των καθαρών κλασμάτων που ελήφθησαν από αυτή τη διαδικασία και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Αριθμός Κορυφής	Χρόνος Καταγραφής Κορυφής (min)	Βάρος Κλάσματος(mg)	<u>Όνομασία Απομονωμένης Ουσίας</u>
1	21	0.9	M-14*
2	22	1.0	M-15*

*Λόγω των μικρών ποσοτήτων, δεν κατέστη δυνατό να διευκρινιστεί η δομή των ουσιών μετά βεβαιότητας

Έπειτα από δοκιμαστικές TLC, αποφασίστηκε να γίνει διαχωρισμός των περιεχόμενων ουσιών της ομάδας κλασμάτων TBP₃ με παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας και διπλή ανάπτυξη. Διαλύτης ανάπτυξης οξικός αιθυλεστέρας : οξικό οξύ : νερό (EAW)-(οργανική φάση) σε αναλογία 4:1:2 και στατική φάση πλάκες κυτταρίνης. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

R _f ζώνης	Βάρος Κλάσματος(mg)	Όνομασία Ομαδοποιημένων Κλασμάτων	<u>Όνομασία Απομονωμένης Ουσίας</u>
0.722	5.0		M-17
0.583	1.7	TAP ₃ B	
0.344	0.2	TAP ₃ C	
0.194	0.3	TAP ₃ D	

Η ουσία **M-17** εμφανίστηκε ως μια ευδιάκριτη ζώνη (R_f 0.722) με κίτρινο φθορισμό στο υπεριώδες και στο ορατό (254nm και 365nm) και έντονο πράσινο

φθορισμό σε ατμούς NH₃. Κόπηκε η ζώνη με αυτό το R_f, και η ουσία συλλέχθηκε με καθαρό βάρος 5.0mg.

• Ομάδα κλασμάτων TBP₄

Έγινε διαχωρισμός των περιεχόμενων ουσιών του TBP₄ με παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας με διπλή ανάπτυξη. Στατική φάση ήταν πλάκες κυτταρίνης και διαλύτης ανάπτυξης οξικός αιθυλεστέρας:οξικό οξύ:νερό (EAW) (οργανική φάση) σε αναλογία 4:1:2. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

Αριθμός ζώνης (από την υψηλότερη προς τη χαμηλότερη)	Βάρος Κλάσματος(mg)	Ονομασία Ομαδοποιημένων Κλασμάτων	Ονομασία Απομονωμένης Ουσίας
0.778	1.0		M-24*
0.538	0.8		M-18*
0.411	2.4	TBP ₄ C	
0.278	1.1	TBP ₄ D	
0.178	1.8	TBP ₄ E	
0.094	1.0		M-19*
0.567	0.9		M-20*
0.067	1.9	TBP ₄ H	

*Λόγω των μικρών ποσοτήτων, δεν κατέστη δυνατό να διευκρινιστεί η δομή των ουσιών μετά βεβαιότητας

Η απομονωμένη ουσία **M-24** εμφανίστηκε ως μια ζώνη με γαλάζιο φθορισμό στη λάμπα UV-Vis, η **M-18** ως ζώνη με κυανό φθορισμό, η **M-19** με πορτοκαλί φθορισμό και η **M-20** με κίτρινο φθορισμό. Κόπηκε η κάθε ζώνη χωριστά και οι ουσίες εκλούστηκαν και συλλέχθηκαν.

• Ομάδα κλασμάτων TBP₅

Μέρος αυτής της ομάδας κλασμάτων, χρωματογραφήθηκε σε στήλη αντίστροφης φάσης C18 (250mm x 7mm, Apollo, Female, Grace) των 5μ με προστήλη C18 (33mm x 7mm, Apollo, PrepGuard, Alltech) των 5μ, με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης. Η κινητή φάση ήταν οι διαλύτες (A):H₂O με AcOH 2% και (B):MeOH. Το πρόγραμμα που ακολουθήθηκε ήταν 0min (A) 97% και (B) 3%, στο 7min (A) 97% και (B) 3%, στο 17min (A) 33% και (B) 67%, στο

25min (A) 28% και (B) 72%, στο 28min (A) 0% και (B) 100%, στο 40min (A) 0% και (B) 100%. Ο ανιχνευτής υπεριώδους-ορατού ορίστηκε στα 333nm και η ροή σταθερά σε 1.7ml/min. Έγιναν συνολικά 48 εγχύσεις του 1ml έκαστη. Τα βάρη των κλασμάτων που ελήφθησαν από αυτή τη διαδικασία και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Αριθμός Κορυφής	Χρόνος Καταγραφής Κορυφής (min)	Βάρος Κλάσματος(mg)	<u>Όνομασία Απομονωμένης Ουσίας</u>
1	20	0.9	M-16*

*Λόγω των μικρών ποσοτήτων, δεν κατέστη δυνατό να διευκρινιστεί η δομή της ουσίας μετά βεβαιότητας

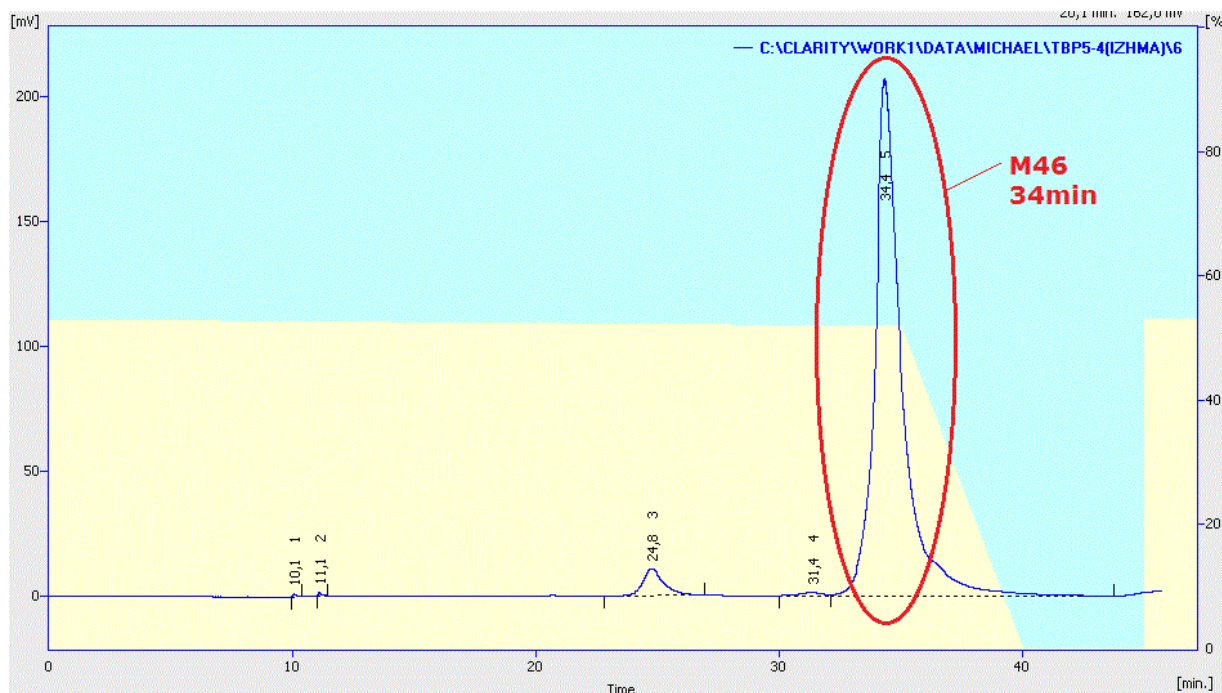
Το υπόλοιπο του εγχύματος που δεν αντιστοιχούσε σε καθαρή ουσία και υποβλήθηκε στην HPLC με τα στοιχεία που δίνονται παραπάνω, συλλέχθηκε και επαναυποβλήθηκε σε νέα, με διαφορετικό πρόγραμμα: 0min (A) 53% και (B) 47%, στο 40min (A) 52% και (B) 48%. Ο ανιχνευτής υπεριώδους-ορατού ορίστηκε στα 268nm και η ροή σταθερά σε 1.1ml/min. Τα βάρη των κλασμάτων που ελήφθησαν από αυτή τη διαδικασία και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής φαίνονται στον παρακάτω πίνακα

Αριθμός Κορυφής	Χρόνος Καταγραφής Κορυφής (min)	Βάρος Κλάσματος(mg)	Όνομασία Ομαδοποιημένων Κλασμάτων	<u>Όνομασία Απομονωμένης Ουσίας</u>
1	24	1.4	TBP ₅ -24	
2	34	7.7		M-46

Έπειτα από δοκιμαστικές TLC, αποφασίστηκε να γίνει διαχωρισμός των περιεχόμενων ουσιών του **TBP₅-24** με παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας. Στατική φάση ήταν πλάκες κυτταρίνης και διαλύτης ανάπτυξης οξικό οξύ 15%. Η απομονωμένη ουσία **M-45** εμφανίστηκε ως μια ευδιάκριτη ζώνη με καφέ φθορισμό στο υπεριώδες και στο ορατό (254nm και 365nm) και έντονο χρυσαφί φθορισμό σε ατμούς NH₃. Κόπηκε η κάθε ζώνη χωριστά και οι ουσίες εκλούστηκαν και συλλέχθηκαν.

R _f ζώνης	Βάρος Κλάσματος(mg)	<u>Όνομασία Απομονωμένης Ουσίας</u>
0.186	0.4	M-45*

*Λόγω των μικρών ποσοτήτων, δεν κατέστη δυνατό να διευκρινιστεί η δομή της ουσίας μετά βεβαιότητας



• Ομάδα κλασμάτων TBP₇

Η ομάδα κλασμάτων TBP₇ χρωματογραφήθηκε σε στήλη αντίστροφης φάσης C18 (250mm x 7mm, Apollo, Female, Grace) των 5μ με προσθήκη C18 (33mm x 7mm, Apollo, PrepGuard, Alltech) των 5μ, με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης. Η κινητή φάση ήταν οι διαλύτες (Α):H₂O με AcOH 2% και (Β):MeOH. Το πρόγραμμα που ακολουθήθηκε ήταν: στο 0min (Α) 100% και (Β) 0%, στο 7min (Α) 100% και (Β) 0%, στο 17min (Α) 66% και (Β) 34%, στο 37min (Α) 66% και (Β) 34%, στο 57min (Α) 64% και (Β) 46%, στο 65min (Α) 26% και (Β) 74%, στο 105min (Α) 23% και (Β) 77%, στο 110min (Α) 0% και (Β) 100%, στο 116min (Α) 0% και (Β) 100. Ο ανιχνευτής υπεριώδους-ορατού ορίστηκε στα 280nm και η ροή σταθερά σε 1.5ml/min. Έγιναν συνολικά 20 εγχύσεις του 1ml έκαστη. Τα βάρη των κλασμάτων που ελήφθησαν από αυτή τη διαδικασία και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Αριθμός Κορυφής	Χρόνος Καταγραφής Κορυφής (min)	Βάρος Κλάσματος(mg)	Ονομασία Ομαδοποιημένων Κλασμάτων	Ονομασία Απομονωμένης Ουσίας
1	28.5	0.6		M-11*

2	42.5	0.7		M-10*
3	59	0.7		M-12*
4	104	0.2	TBP ₇ -104	
5	114.5	0.3	TBP ₇ -114	

*Λόγω των μικρών ποσοτήτων, δεν κατέστη δυνατό να διευκρινιστεί η δομή των ουσιών μετά βεβαιότητας

Το υπόλοιπο του εγχύματος που δεν αντιστοιχούσε σε καθαρή ουσία και υποβλήθηκε στην HPLC παραπάνω, συλλέχθηκε και αποφασίστηκε να γίνει διαχωρισμός των περιεχόμενων ουσιών του με παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας. Στατική φάση ήταν πλάκες κυτταρίνης και διαλύτης ανάπτυξης το CAW. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

R_f ζώνης	Βάρος Κλάσματος(mg)	Ονομασία Ομαδοποιημένων Κλασμάτων	Ονομασία Απομονωμένης Ουσίας
0.859	0.9		M-34*
0.566	0.9		M-35*
0.494	0.8	TBP ₇ C	
0.468	0.4		M-36*
0.293	0.5	TBP ₄ E	
0.136	0.8		M-37*
0.028	1.0		M-38*

*Λόγω των μικρών ποσοτήτων, δεν κατέστη δυνατό να διευκρινιστεί η δομή των ουσιών μετά βεβαιότητας

Η απομονωμένη ουσία **M-34** εμφανίστηκε ως μια ζώνη με γαλάζιο φθορισμό στη λάμπα UV-Vis, η **M-35** ως ζώνη με ελαφρύ πράσινο φθορισμό, η **M-36** με ιώδες φθορισμό στα 254nm μόνο, η **M-37** με καφετί φθορισμό και η **M-38** με χρυσαφί φθορισμό. Κόπηκε η κάθε ζώνη χωριστά και οι ουσίες εκλούστηκαν και συλλέχθηκαν.

• Ομάδα κλασμάτων TBP₁₁

Έπειτα από δοκιμαστικές TLC, αποφασίστηκε να γίνει διαχωρισμός των περιεχομένων ουσιών της ομάδας κλασμάτων TBP₁₁ τη χρήση παρασκευαστικής χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας. Στατική φάση ήταν πλάκες κυτταρίνης και διαλύτης ανάπτυξης διχλωρομεθάνιο:οξικό οξύ:νερό (CAW) σε αναλογία 50:45:5. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

Αριθμός ζώνης (από την υψηλότερη προς τη χαμηλότερη)	Βάρος Κλάσματος(mg)	Ονομασία Ομαδοποιημένων Κλασμάτων	Ονομασία Απομονωμένης Ουσίας
--	----------------------------	--	-------------------------------------

0,725	4.3	TBP ₁₁ -A	
0,656	2.1		M-40

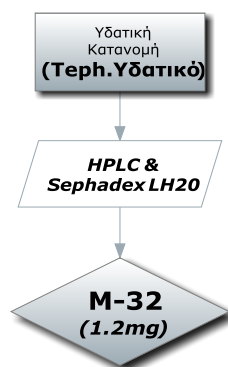
Η ουσία **M-40** εμφανίστηκε ως μια ευδιάκριτη ζώνη με καφέ φθορισμό στα 254nm και 365nm και σκούρο χρυσαφί φθορισμό σε ατμούς NH₃.

Λόγω μη καθαρότητας και προσμίξεων στην **TBP₁₁-A**, εφαρμόστηκε υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης σε στήλη αντίστροφης φάσης C18 (250mm x 7mm, Apollo, Female, Grace) των 5μ με προστήλη C18 (33mm x 7mm, Apollo, PrepGuard, Alltech) των 5μ. Η κινητή φάση ήταν οι διαλύτες (A):H₂O με AcOH 2% και (B):MeOH. Το πρόγραμμα που ακολουθήθηκε ήταν 0min (A) 100% και (B) 0%, στο 10min (A) 50% και (B) 50%, στο 30min (A) 50% και (B) 50%, στο 35min (A) 0% και (B) 100%, στο 45min (A) 0% και (B) 100%. Ο ανιχνευτής υπεριώδους-ορατού ορίστηκε στα 269nm και η ροή σταθερά σε 1.5ml/min. Το βάρος του κλάσματος που ελήφθη από αυτή τη διαδικασία και ο χρόνος καταγραφής της κορυφής φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Αριθμός Κορυφής	Χρόνος Καταγραφής Κορυφής (min)	Βάρος Κλάσματος(mg)	<u>Ονομασία Απομονωμένης Ουσίας</u>
1	25	0.7	M-39*

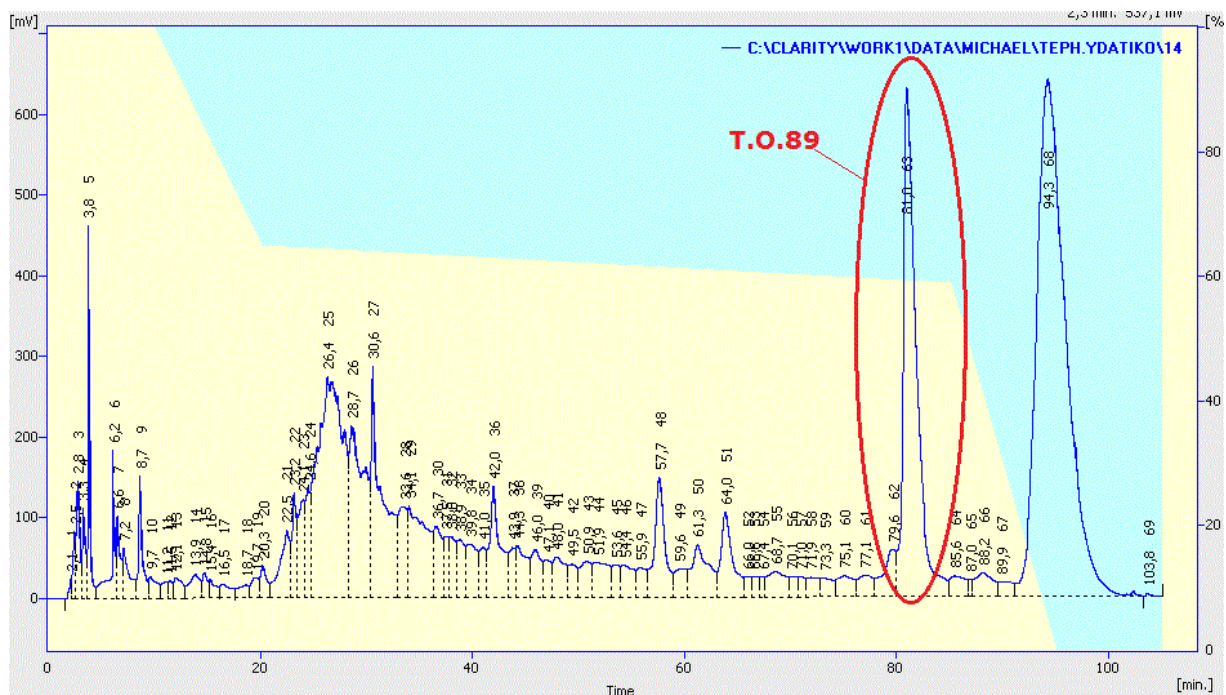
*Λόγω των μικρών ποσοτήτων, δεν κατέστη δυνατό να διεκρινιστεί η δομή της ουσίας μετά βεβαιότητας

2.4. Υδατική Κατανομή (Τερη. Υδατικό)



Μέρος της κατανομής χρωματογραφήθηκε, απευθείας, σε στήλη αντίστροφης φάσης C18 (250 x 7)mm, Apollo, Female, Grace) των 5μ με προστήλη C18 (33mm x 7mm, Apollo, PrepGuard, Alltech) των 5μ, με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης. Η κινητή φάση ήταν οι διαλύτες (A):H₂O με AcOH 2% και (B):MeOH. Το πρόγραμμα που ακολουθήθηκε ήταν 0min (A) 100% και (B) 0%, στο 10min (A) 100% και (B) 0%, στο 20min (A) 65% και (B) 35%, στο 85min (A) 59% και (B) 41%, στο 90min (A) 0% και (B) 100%, στο 100min (A) 0% και (B) 100%. Ο ανιχνευτής υπεριώδους-ορατού ορίστηκε στα 268nm και η ροή σταθερά σε 1.15ml/min. Τα βάρη των κλασμάτων που ελήφθησαν από αυτή τη διαδικασία και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Αριθμός Κορυφής	Χρόνος Καταγραφής Κορυφής (min)	Βάρος Κλάσματος(mg)	Ονομασία Ομαδοποιημένων Κλασμάτων
1	12	1.5	T.O.12
2	44	1.2	T.O.44
3	62	1.3	T.O.62
4	69	1.3	T.O.69
5	89	2.2	T.O.89
6	93	7.2	T.O.93



Λόγω μη καθαρότητας και προσμίξεων, όλες οι παραπάνω ομάδες κλασμάτων υποβλήθηκαν, η καθεμιά ξεχωριστά, σε στήλη με υλικό πλήρωσης Sephadex LH-20 με διαστάσεις (56 x 1.4)cm (l x d). Από την επεξεργασία με αυτή τη μέθοδο προέκυψαν οι καθαρές ουσίες που αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα. Συλλέχθηκαν κλάσματα των 2ml.

Όνομασία Ομαδοποιημένων Κλασμάτων	Ν° Κλάσματος (χωριστές στήλες Sephadex)	Καθ.Βάρος Ουσίας(mg)	Όνομασία Απομονωμένης Ουσίας
T.O.12	1-3	0.6	M-29*
T.O.62	3-5	0.7	M-26*
T.O.69	2	0.7	M-30*
"	5	0.6	M-31*
T.O.89	4-19	1.2	M-32
T.O.93	3-5	0.8	M-33*

*Λόγω των μικρών ποσοτήτων, δεν κατέστη δυνατό να διευκρινιστεί η δομή των ουσιών μετά βεβαιότητας

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ LC-DAD-MS (ESI+) ΑΝΑΛΥΣΗ

Χρόνοι κατακράτησης (R_t), μοριακά ιόντα $[M+H]^+$, ιόντα προσθήκης νατρίου $[M+Na]^+$, θραύσματα μάζης MS (12 και 60eV ή 70 eV) και φάσματα απορρόφησης υπεριώδους/ορατού (λ_{max}) όλων των ενώσεων. Στην τελευταία στήλη αναγράφονται οι κωδικοί των δειγμάτων στα οποία ανιχνεύθηκε η κάθε ένωση.

Η θραυσμάτωση των μητρικών μορίων, καθώς και όλες οι δομές που περιγράφονται στην ανάλυση των φασμάτων στο LC-DAD-MS ακολουθούν προτεινόμενο μηχανισμό θραυσμάτωσης με προτεινόμενες δομές αυτού!

a/a	N°	R_t (min)	$[M+H]^+$ (m/z)	Θραύσματα (m/z) στα 12 eV	Θραύσματα (m/z) στα 70 eV	UV-Vis λ_{max} (nm)	Διευκρίνιση δομής	Κωδικοί
1	22	12.68	581	273, 419, 449, 581, 603	273, 419, 449, 581, 603	278, 334	7-O-ραμνο- γλυκοζίτης της ναριγγερίνης	Teph- Hθμού
2	23	12.96	581	273, 435, 581	273, 581, 603	278, 330	7-O- ραμνογλυκοζίτης της ναριγγερίνης	Teph- Hθμού
3	1	13.09	581	273, 435, 581, 603	273, 603	282	Ναριγγερίνη 7-O- (γλυκοραμνοζίτης)	Teph.-H ₂ O
4	24	13.65	647	271, 433, 579, 647	271, 433, 579, 647	266, 338	Πρενυλιωμένος 7- O-ραμνογλυκοζίτης της απιγενίνης	Teph- Hθμού
5	25	14.17	683	271, 433, 579, 601, 705	195, 271, 433, 463, 579, 601, 683	266, 318, 338	7-O-Βενζοϋλο- ραμνογλυκοζίτης της απιγενίνης	Teph- Hθμού
6	2	14.26	683	271, 327, 477, 579, 601	271, 327, 355, 477, 579, 601, 683	266, 338	Απιγενίνη 7-O- [γλυκοζο- (βενζοϋλο)- ραμνοζίτης]	Teph.-H ₂ O
7	3	14.92	635	297, 395, 435, 635	181, 287, 362, 623	240, 310	Unidentified	T.D.Ether
8	26	19.01	597	289, 451, 597, 619	597, 619	284, 328	7-O-[κουμαροϋλ- καφεοϋλο]-εστέρας της εριοδικτυόλης	T.Buta.
9	17	19.04	597	289, 311, 451, 597, 619	289, 311, 435, 597, 619	238, 284, 328	7-O-[κουμαροϋλ- καφεοϋλο]-αιθέρας της εριοδικτυόλης	T.E.A. Res
10	9	19.51	597	311, 451, 597, 619	289, 311, 597, 619	238, 284, 328sh	7-O-(Κουμαροϋλο- καφεοϋλο)-εστέρας της εριοδικτυόλης	T.E.A.
11	18	20.15	625	325, 471, 625, 643,	279, 325, 647	244, 322sh,	[Διυδροκιναμοϋλ- διυδροκουμαροϋλ-	T.E.A. Res

				647		330	γαλλοϋλο]- διεστέρας του κιννικού οξέος	
12	4	20.47	435	273, 435, 457, 891	-	240, 288, 320	4'-καφεϊκός εστέρας της ναριγγενίνης	T.D.Ether
13	10	20.79	647	311, 325, 339, 647	311, 325, 339, 471, 647	240, 330, 380sh	[Πρωτοκατεχοϋλ- κουμαροϋλ- βανιλλοϋλο]- τριεστέρας του κιννικού οξέος	T.E.A.
14	11	20.96	435	273, 435, 457, 867, 891	435, 891	282, 328	7-O-καφεϊκός εστέρας της ναριγγενίνης	T.E.A.
15	5	21.29	581	273, 435, 581, 603	273, 339, 581, 603	282, 332	7-O-[καφεοϋλο-7''- κουμαροϋλο-]εστέρας της ναριγγενίνης	T.D.Ether
16	19	21.32	581	273, 339, 435, 581	273, 581, 603	280, 328	7-O-[κουμαροϋλ- καφεοϋλο]-αιθέρας της ναριγγενίνης	T.E.A. Res
17	27	21.33	581	273, 581, 603	273, 435, 581, 603	280, 328	7-O-[κουμαροϋλ- καφεοϋλο]-αιθέρας της ναριγγενίνης	T.Buta.
18	28	21.82	595	287, 595, 617	287, 595, 617	254, 266, 348	7-O-αιθερικό παράγωγο της λουτεολίνης με κουμαρικό και καφεϊκό οξύ	T.Buta.
19	12	21.90	581	273, 435, 581	273, 581, 603	282, 328	7-O-[κουμαροϋλ- καφεοϋλο]-αιθέρας της ναριγγενίνης	T.E.A.
20	13	22.32	625	311, 471, 475, 625, 643, 647	311, 325, 471, 475, 647	248, 288, 328	[Διυδροκιναμοϋλ- διυδροκουμαροϋλ- γαλλοϋλο]- τριεστέρας του κιννικού οξέος	T.E.A.
21	29	22.85	565	447, 565, 587	285, 447, 551, 565, 587	266, 322sh, 340	7-Μεθυλοβενζοϋλ- καφεϊκός αιθέρας της μεθυλοαπιγενίνης	T.Buta.
22	6	22.99	433	433, 455, 887	271, 433, 455	264, 340	7-O-καφεϊκός αιθέρας της απιγενίνης	T.D.Ether
23	20	23.00	433	271, 433, 455, 865, 887	271, 433, 455, 887	266, 322sh, 338	7-O-καφεϊκός αιθέρας της απιγενίνης	T.E.A. Res
24	7	23.67	579	579, 601	271, 463, 579, 601	266, 340	7-O- [κουμαροϋλ/καφεοϋ λο] παράγωγο της	T.D.Ether

							<i>απιγενίνης</i>	
25	21	23.70	579	271, 463, 579, 601	271, 463, 579, 601	264, 342	7-Ο- [κουμαροϋλο/καφεοϋ λο] παράγωγο της απιγενίνης	T.E.A. Res
26	30	23.74	579	271, 463, 579, 601	271, 433, 579, 601	266, 320sh, 340	7-Ο-[κουμαρουλ- καφεοϋλο]-αιθέρας της απιγενίνης	T.Buta.
27	14	23.79	645	271, 339, 433, 515, 645	271, 311, 339, 433, 515, 645	266, 322(sh) , 334	[4'-Ο-πρενυλ(3'''- υδροξυ)]-6'''- διμεθυλ-5'''-υδροξυ- 4'''μεθοξυ- πυρανο[2''',3''':2',3']-7-Ο-καφεϊκός αιθέρας της απιγενίνης	T.E.A.
28	8	24.63	663	295, 481, 501, 515, 663	179, 339, 501, 663	240, 310	[Μεθοξυ- κινναμοϋλο, κουμαροϋλο, διϋδροκαφεοϋλο]- τριεστέρας του κινικού οξέος	T.D.Ether
29	15	24.63	579	579	271, 579, 601	240, 266, 342	7-Ο- [κουμαροϋλο/καφεο ϋλο] παράγωγο της απιγενίνης	T.E.A.
30	16	28.31	675	311, 339, 507, 675	311, 339, 529, 675	242, 288sh, 328	Παράγωγο του [2,6- διυδροξυ-4- υδροξυλ-4- καρβοξυλ-1- καρβοξυλο]- κυκλοεξανίου με 4- υδροξυ-3,5- διοξοκυκλοεξανο- καρβοξυλικό οξύ και βανιλλικά οξέα	T.E.A.

Κατανομή ζέοντος ύδατος μεθανολικού εκχυλίσματος - προ κατανομών (Terph.-H₂O)

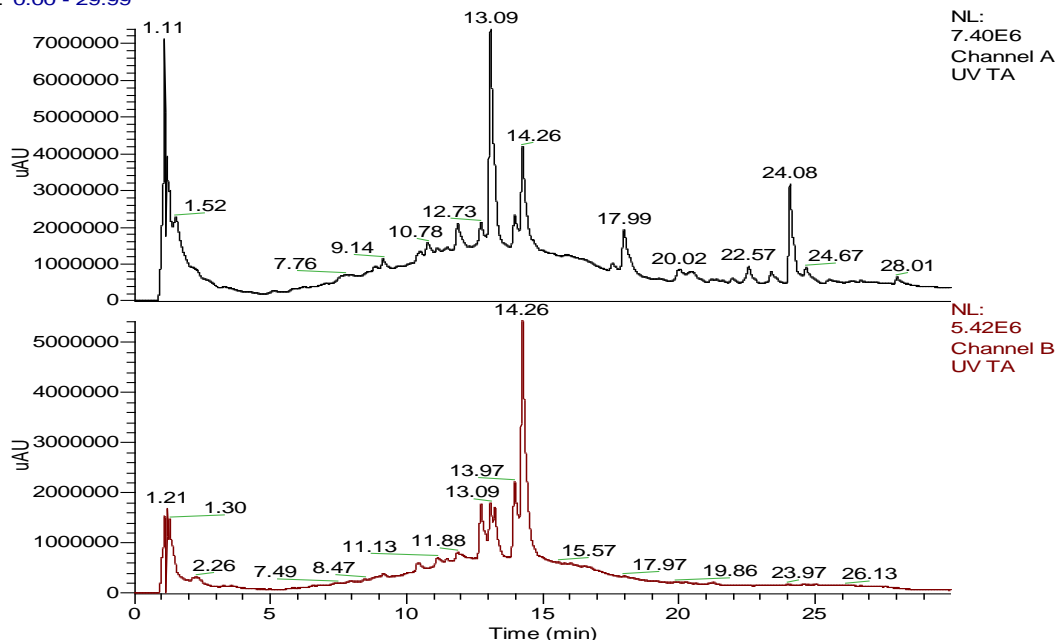
Superspher 100-4, 4μ, (125x2mm) RP18 Macherey Nagel

Time (min)	H ₂ O (+2.5%AcOH)	MeOH
0	95	5
2	95	5
25	0	100
30	0	100

Flow rate: 0.33ml/min; inj. vol: 10ul; DAD: 278, 340 nm

Ionization Mode:	ESI+	Ionization Mode:	Electrospray
Capillary (kV):	4.0	None in use.	
Source Voltage (V):	40 ⁰ C	1 +ve 12	
Probe Temperature (°C):	400 ⁰ C	2 +ve 70	
RF Lens (V):	0.3	Scans per Second:	0.7
Ion Energy (eV):	1.0	Scan Range Start (amu):	121
Ion Energy Ramp (mV/amu):	0.5	Scan Range End (amu):	894
Detector Voltage (V):	650		
Low Mass Resolution:	12.5		
High Mass Resolution:	16.5		

RT: 0.00 - 29.99



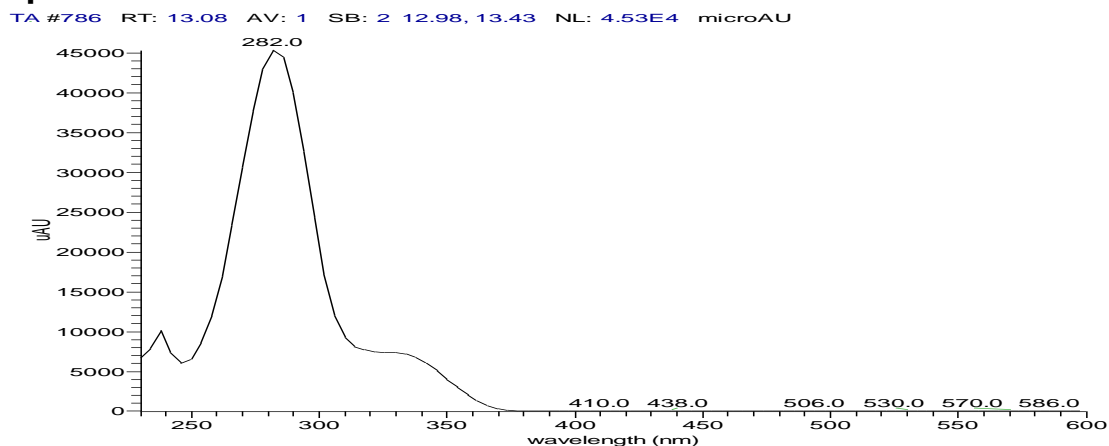
N ^o	R _t (min)	[M+H] ⁺ (m/z)	Θραύσματα (m/z) στα 12 eV	Θραύσματα (m/z) στα 60 eV	UV-Vis λ _{max} (nm)	Διευκρίνιση δομής
1	13.09	581	273, 435, 581, 603	273, 603	282	Ναριγγενίνη 7-O-(γλυκοραμνοζίτης)
2	14.26	683	271, 327, 477,	271, 327, 355,	266, 338	Απιγενίνη 7-O-[γλυκοζο-

			579, 601	477, 579, 601, 683		(βενζούλο)-ραμνοζίτης]
--	--	--	----------	-----------------------	--	------------------------

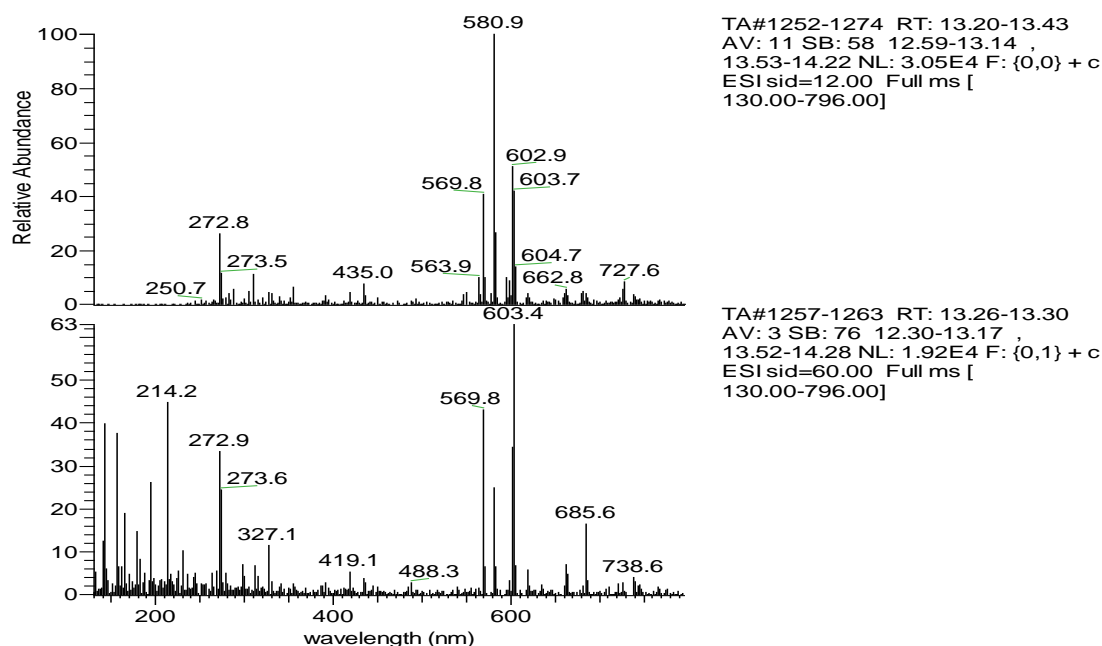
Ένωση 1: Ναριγγενίνη 7-O-(γλυκοραμνοζίτης)

Χρόνος κατακράτησης: 13.09min

Φάσμα UV-Vis:

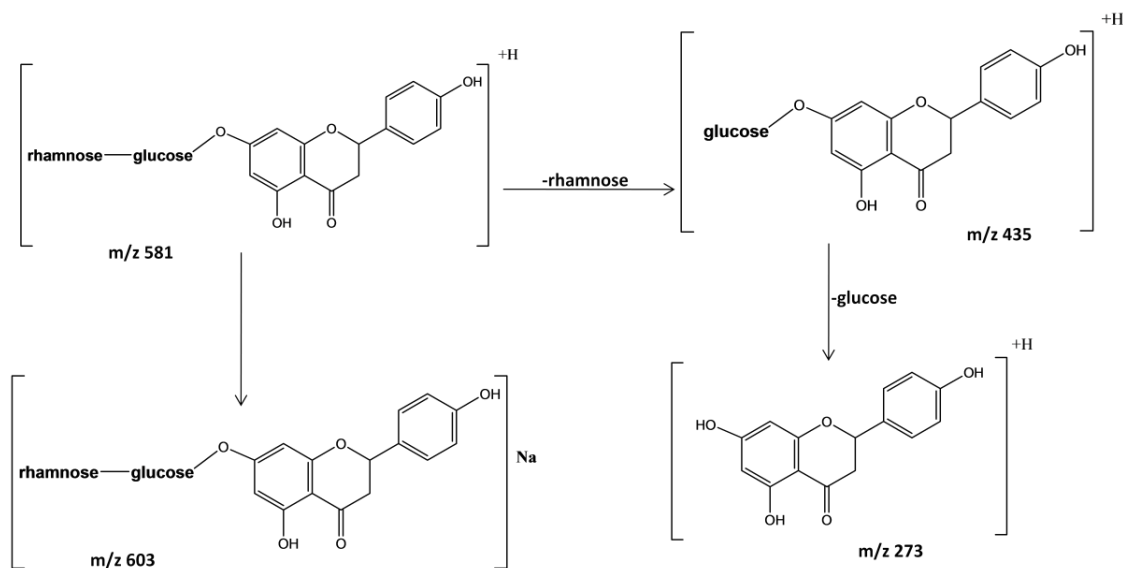


Φάσμα μάζας:



Από το φάσμα υπεριώδους-ορατού της ένωσης συμπεραίνεται ότι πρόκειται για φλαβονόη και πιο συγκεκριμένα για παράγωγο ναριγγενίνης. Από το φάσμα μάζας προκύπτει ότι το μοριακό ιόν της ένωσης είναι $[M+H]^+=581$ και σταθεροποιείται με την προσθήκη νατρίου $[M+Na]=603$. Στην χαμηλή τάση των 12eV, παρατηρείται το ιόν που προκύπτει από την απόσπαση μιας ραμνόζης και αντιστοιχεί σε $m/z 435=[M-$

(ραμνόζη-OH)+H]⁺. Το ιόν με m/z 273 αντιστοιχεί στο άγλυκο ναριγγενίνη, μετά την απομάκρυνση όλων των σακχάρων. Το θραύσμα με m/z 727 φαίνεται να αντιστοιχεί σε adduct του 581 με ραμνόζη [581+(ραμνόζη-H₂O)]. Η θραυσμάτωση του μορίου παρατίθεται παρακάτω.

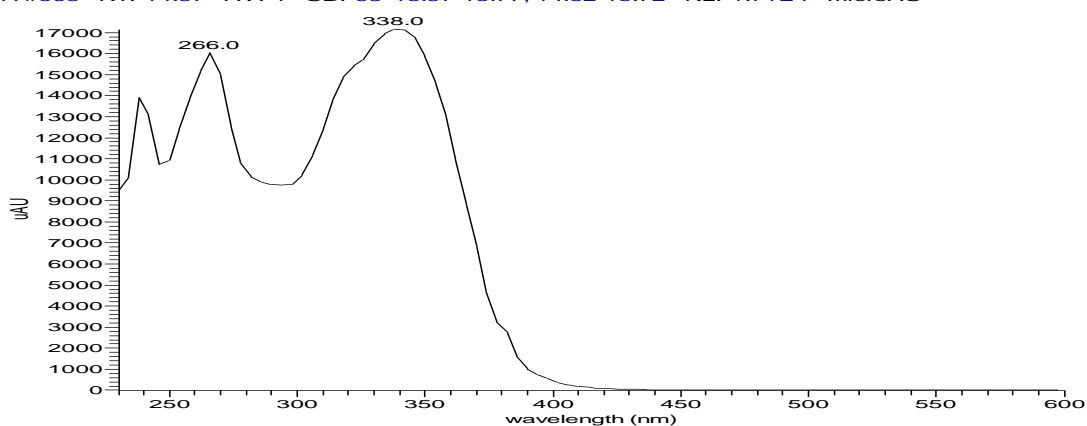


Ένωση 2: Απιγενίνη 7-O-[γλυκοζο-(βενζοϋλο)-ραμνοζίτης]

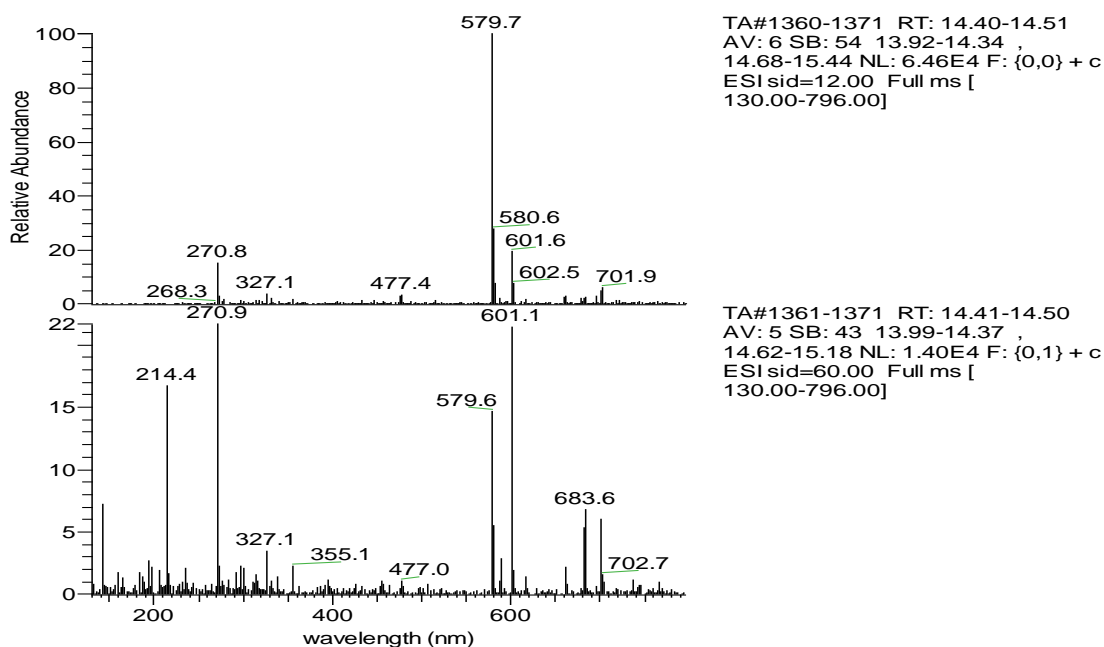
Χρόνος κατακράτησης: 14.26min

Φάσμα UV-Vis:

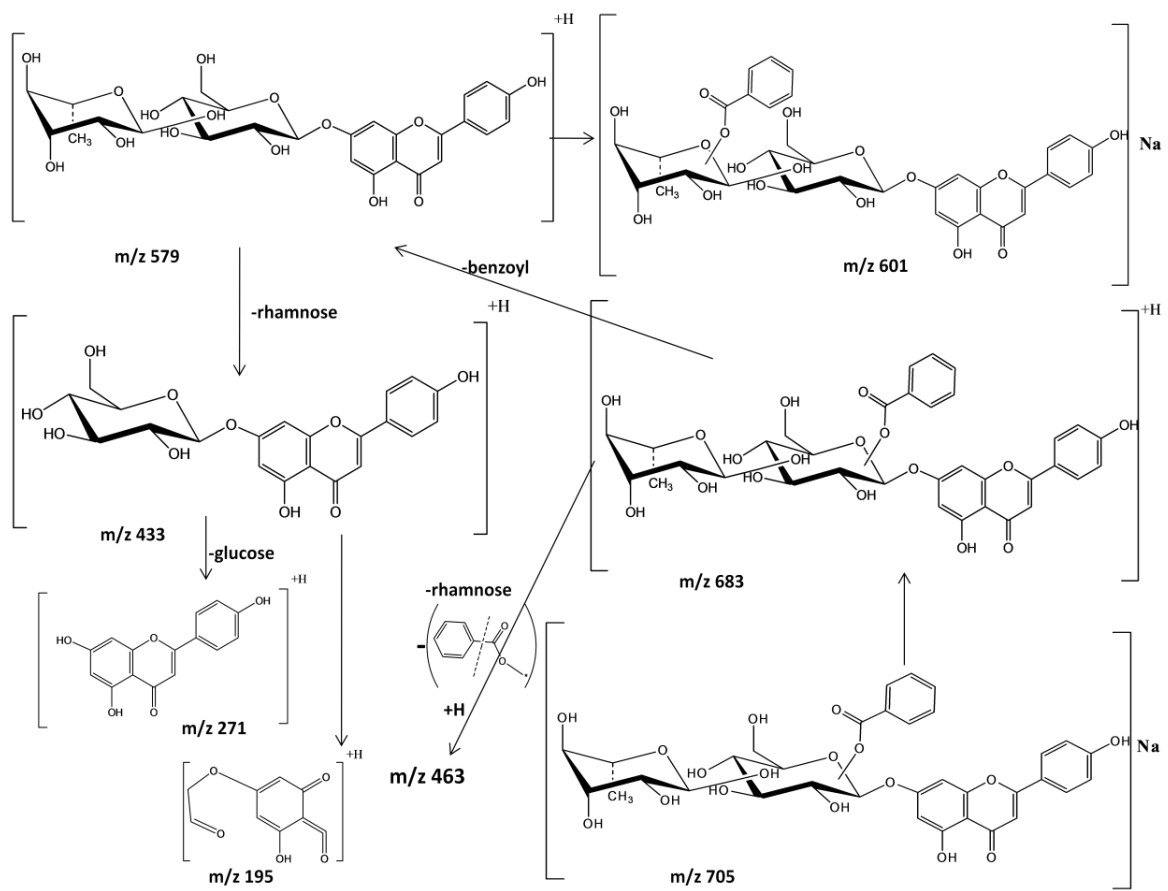
TA #863 RT: 14.37 AV: 1 SB: 68 13.57-13.77, 14.82-15.72 NL: 1.71E4 microAU



Φάσμα μάζας:



Από το φάσμα υπεριώδους-ορατού της δεύτερης ένωσης συμπεραίνεται ότι πρόκειται για φλαβόνη και πιο συγκεκριμένα για παράγωγο απιγενίνης. Από το φάσμα μάζας προκύπτει ότι το μοριακό ιόν της ένωσης είναι $[M+H]^+=683$. Το θραύσμα με m/z 579 προκύπτει μετά από απομάκρυνση του βενζοϊκού οξέος $[M-(\text{βενζοϊκό οξύ-OH})+H]^+$ και σταθεροποιείται με την προσθήκη νατρίου $[M-(\text{βενζοϊκό οξύ-OH})+Na]=601$. Το ιόν με m/z 271 αντιστοιχεί στο άγλυκο απιγενίνη, μετά την απομάκρυνση και των δύο σακχάρων $[M-(\text{βενζοϊκό οξύ-OH})-(\text{ραμνόζη-OH})-(\text{γλυκόζη-OH})+H]^+$. Από τα δεδομένα που υπάρχουν δεν μπορούν να προσδιοριστούν οι θέσεις σύνδεσης των σακχάρων και του βενζοϊκού στη ραμνόζη. Η θραυσμάτωση του μητρικού μορίου παρατίθεται παρακάτω, μαζί με τις προτεινόμενες δομές των θραυσμάτων με m/z 327 και 355. Ωστόσο, το θραύσμα με m/z 327 θα μπορούσε να αντιστοιχεί και στο $[\text{ραμνόζη}+(\text{γλυκόζη-OH})+H]^+$, στο οποίο με την προσθήκη μιας ομάδας C=O από τη σύνδεση με το βενζοϊκό οξύ να προκύψει το θραύσμα 355.



Κατανομή Διαιθυλαιθέρα (T.D.Ether)

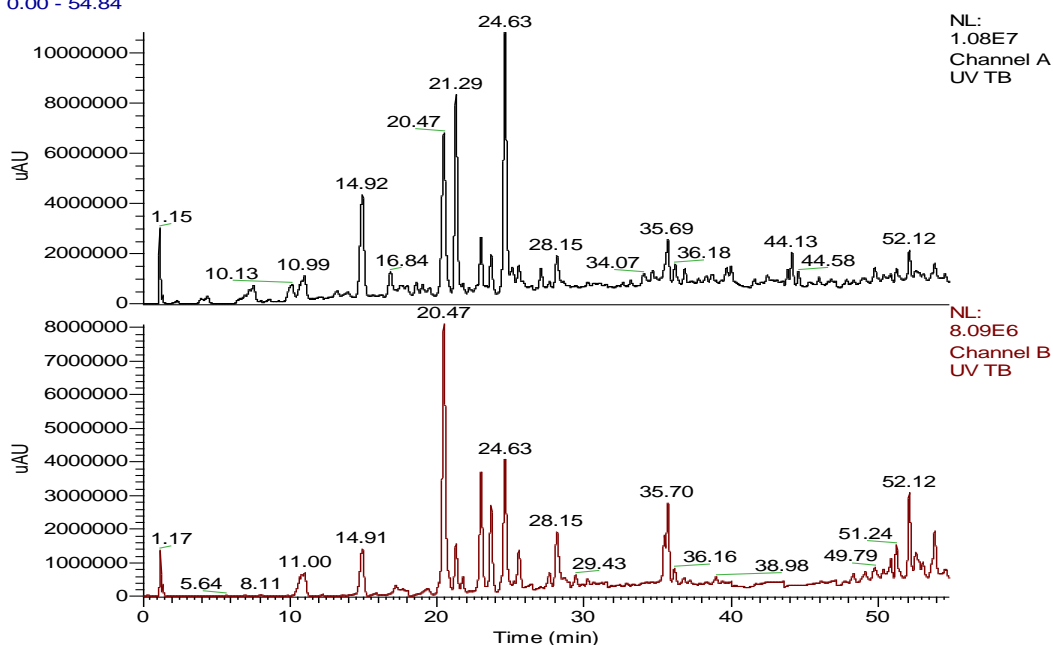
Superspher 100-4, 4 μ , (125x2mm) RP18 Macherey Nagel

Time (min)	H ₂ O(+2.5%AcOH)	MeOH
0	100	0
2	100	0
52	0	100
57	0	100

Flow rate: 0.33ml/min; inj. vol: 10 μ l; DAD: 278, 340 nm

Ionization Mode:	ESI+	Ionization Mode:	Electrospray
Capillary (kV):	4.0	None in use.	
Source Voltage (V):	40 ⁰ C	1 +ve 12	
Probe Temperature (°C):	400 ⁰ C	2 +ve 70	
RF Lens (V):	0.3	Scans per Second:	0.7
Ion Energy (eV):	1.0	Scan Range Start (amu):	121
Ion Energy Ramp (mV/amu):	0.5	Scan Range End (amu):	894
Detector Voltage (V):	650		
Low Mass Resolution:	12.5		
High Mass Resolution:	16.5		

RT: 0.00 - 54.84



N ^o	R _t (min)	[M+H] ⁺ (m/z)	Θραύσματα (m/z) στα 12 eV (%R.I.)	Θραύσματα (m/z) στα 70 eV (%R.I.)	UV-Vis λ _{max} (nm)	Διευκρίνιση δομής
3	14.92	-	297, 395, 435, 635	181, 287, 362, 623	240, 310	Unidentified

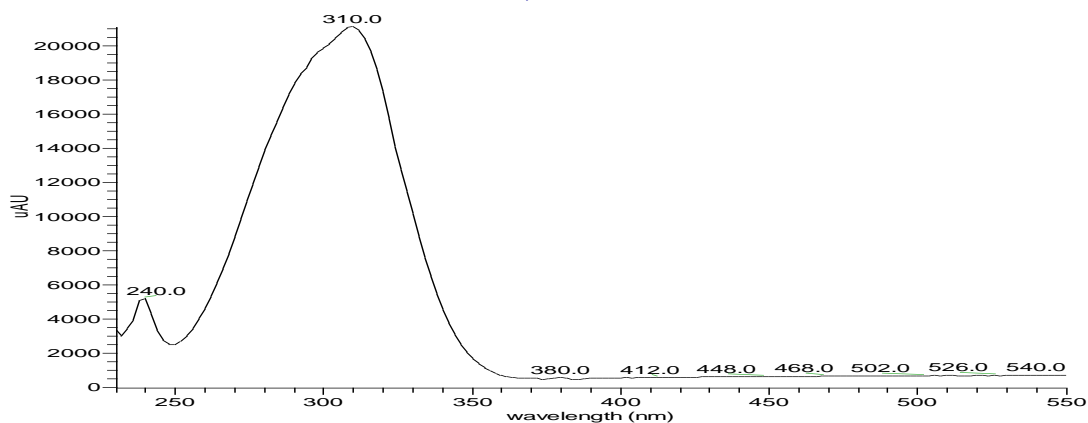
4	20.47	435	273, 435, 457, 891	-	240, 288, 320	4'-καφεϊκός εστέρας της ναριγγενίνης
5	21.29	581	273, 435, 581, 603	273, 339, 581, 603	282, 332	7-O-[καφεοϋλο-7''-κουμαροϋλο-]εστέρας της ναριγγενίνης
6	22.99	433	433, 455, 887	271, 433, 455	264, 340	7-O-καφεϊκός αιθέρας της απιγενίνης
7	23.67	579	463, 579, 601	271, 463, 579, 601	266, 340	7-O-[κουμαροϋλο/καφεοϋλο] παράγωγο της απιγενίνης
8	24.63	663	295, 481, 501, 515, 663	179, 339, 501, 663	240, 310	[Μεθοξυ-κινναμοϋλο, κουμαροϋλο, διϋδροκαφεοϋλο]-τριεστέρας του κινικού οξέος

Ένωση 3: Unidentified

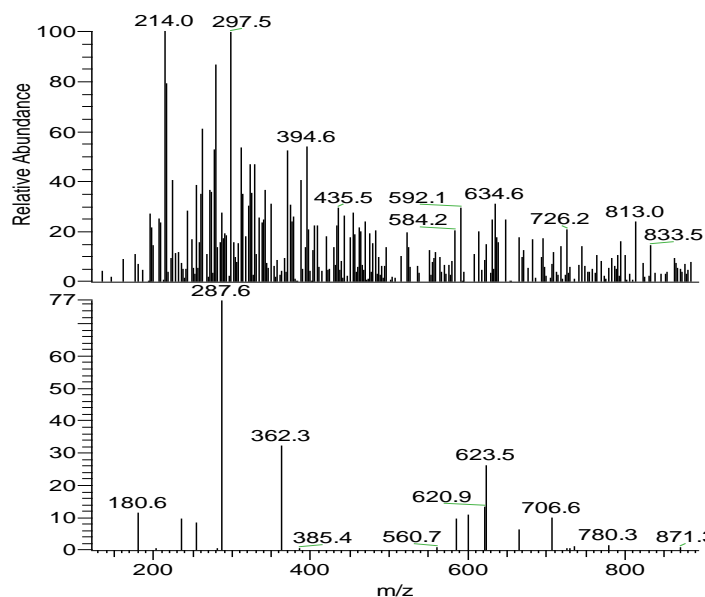
Χρόνος κατακράτησης: 14.92min

Φάσμα UV-Vis:

TB #1769 RT: 14.73 AV: 1 SB: 33 14.28-14.39, 15.53-15.67 NL: 2.11E4 microAU



Φάσμα μάζας:



TB#1249-1251 RT: 14.91-14.93
AV: 2 SB: 21 14.74-14.90 ,
14.95-15.27 NL: 1.05E3 F: {0,0} + c
ESI sid=12.00 Full ms [
121.00-894.00]

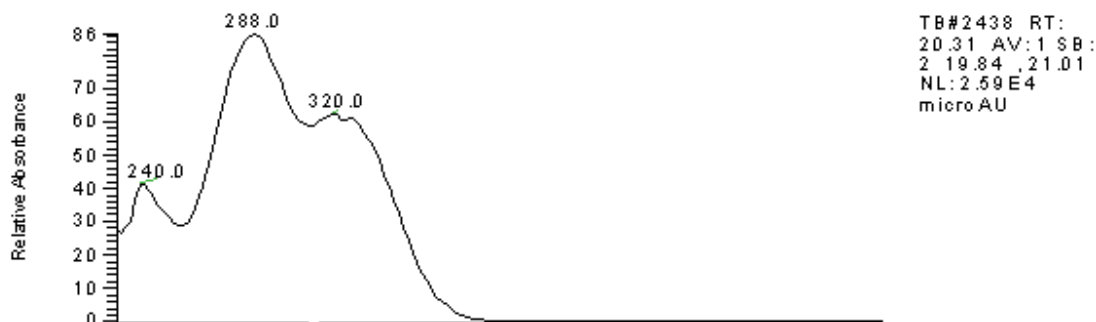
TB#1249 RT: 14.92 AV: 1 SB: 21
14.74-14.90 , 14.95-15.27 NL:
8.12E2 F: {0,1} + c ESI sid=70.00
Full ms [121.00-894.00]

Με τα δεδομένα από το φάσμα υπεριώδους-ορατού και από το φάσμα μάζας, δεν κατέστη δυνατό να προσδιοριστεί αυτή η ένωση.

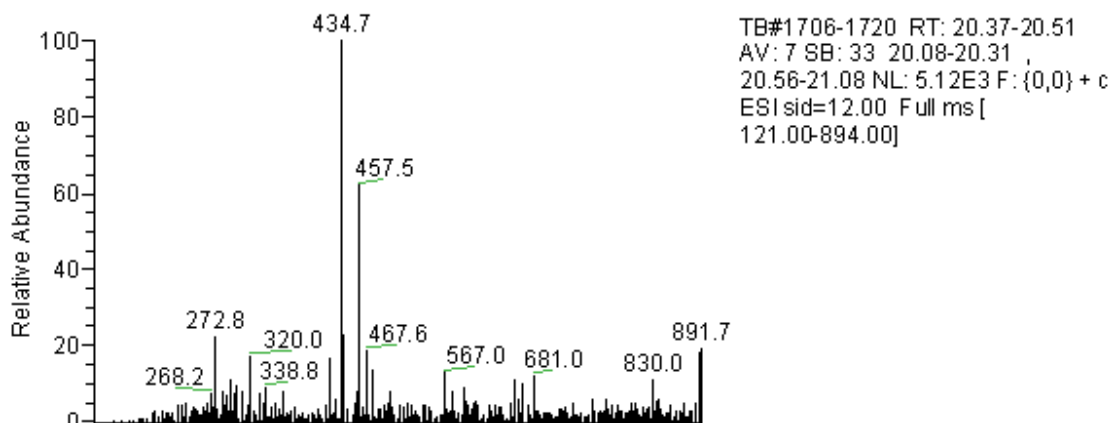
Ένωση 4: 4'-καφεϊκός εστέρας της ναριγγενίνης

Χρόνος κατακράτησης: 20.47min

Φάσμα UV-Vis

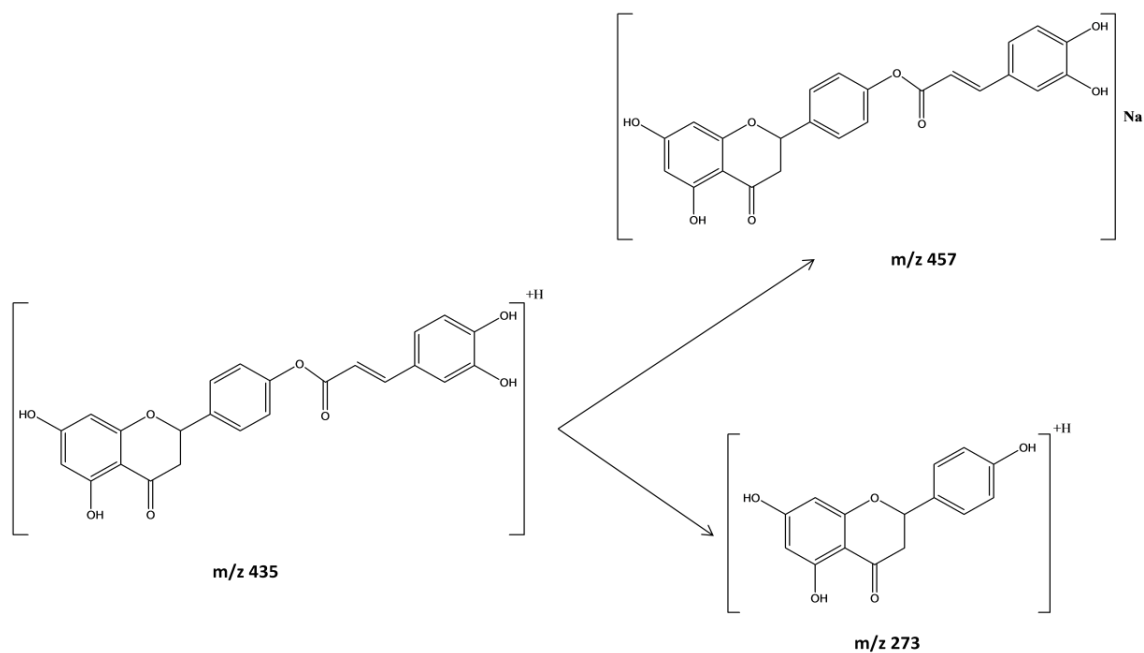


Φάσμα μάζας:



Από το φάσμα υπεριώδους-ορατού της ένωσης συμπεραίνεται ότι πρόκειται για φλαβανόνη και πιο συγκεκριμένα για παράγωγο ναριγγενίνης, με την απορρόφηση στα 320nm να επιβεβαιώνει την ύπαρξη καφεϊκού. Η κορυφή I εμφανίζει απορρόφηση στα 288nm που οφείλεται στο ότι το καφεϊκό προσδέεται στη θέση 4', αφήνοντας ελεύθερο το 7-OH της φλαβανόνης (Mabry et al., 1970). Από το φάσμα μάζας προκύπτει ότι το μοριακό ιόν της ένωσης είναι $[M+H]^+=435$ και σταθεροποιείται με την προσθήκη νατρίου $[M+Na]=457$. Το ιόν με m/z 273 αντιστοιχεί στο άγλυκο ναριγγενίνη, μετά την απομάκρυνση του καφεϊκού και εμφανίζει μικρότερη ένταση από το ιόν 435 διότι το καφεϊκό συνδέεται με το άγλυκο μέσω εστερικού δεσμού που είναι ισχυρότερος από τον αιθερικό δεσμό. Το ιόν με

m/z 891 αντιστοιχεί στο [2M+Na]. Στο παρακάτω σχήμα παρατίθεται η θραυσμάτωση του μορίου.

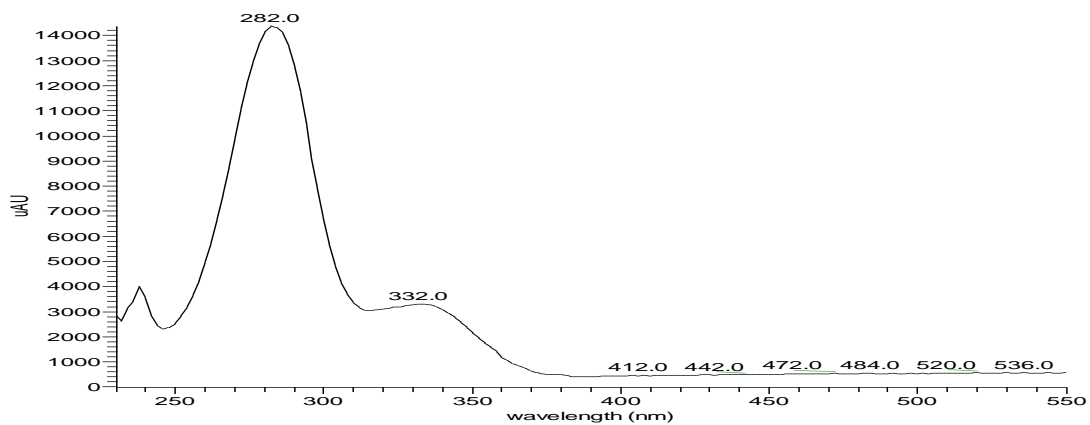


Ένωση 5: 7-O-[καφεοϋλο-7''-κουμαροϋλο-]εστέρας της ναριγγενίνης

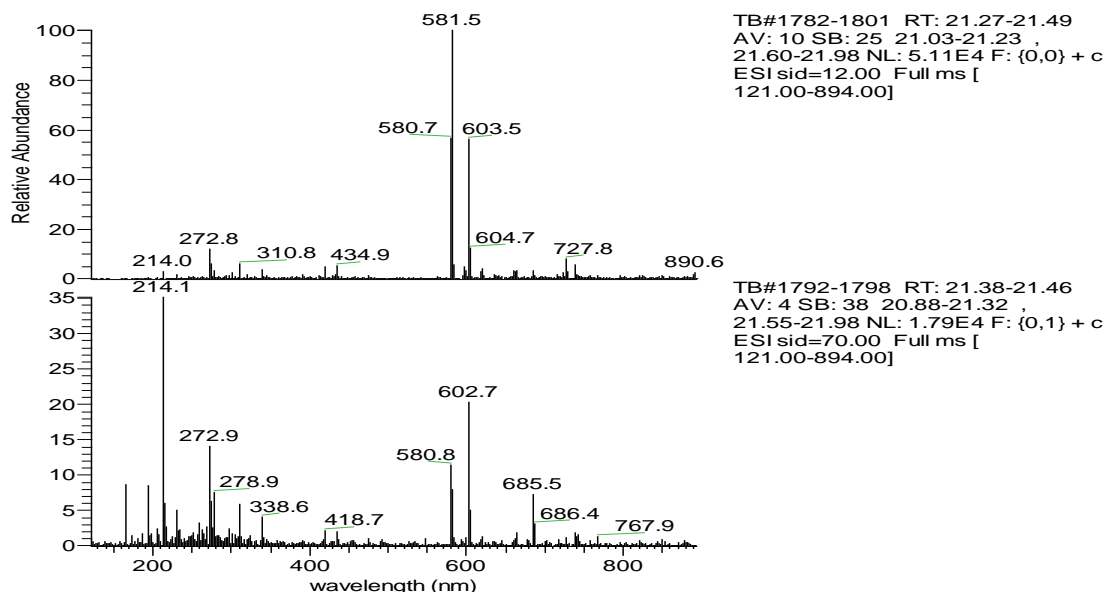
Χρόνος κατακράτησης: 21.29min

Φάσμα UV-Vis:

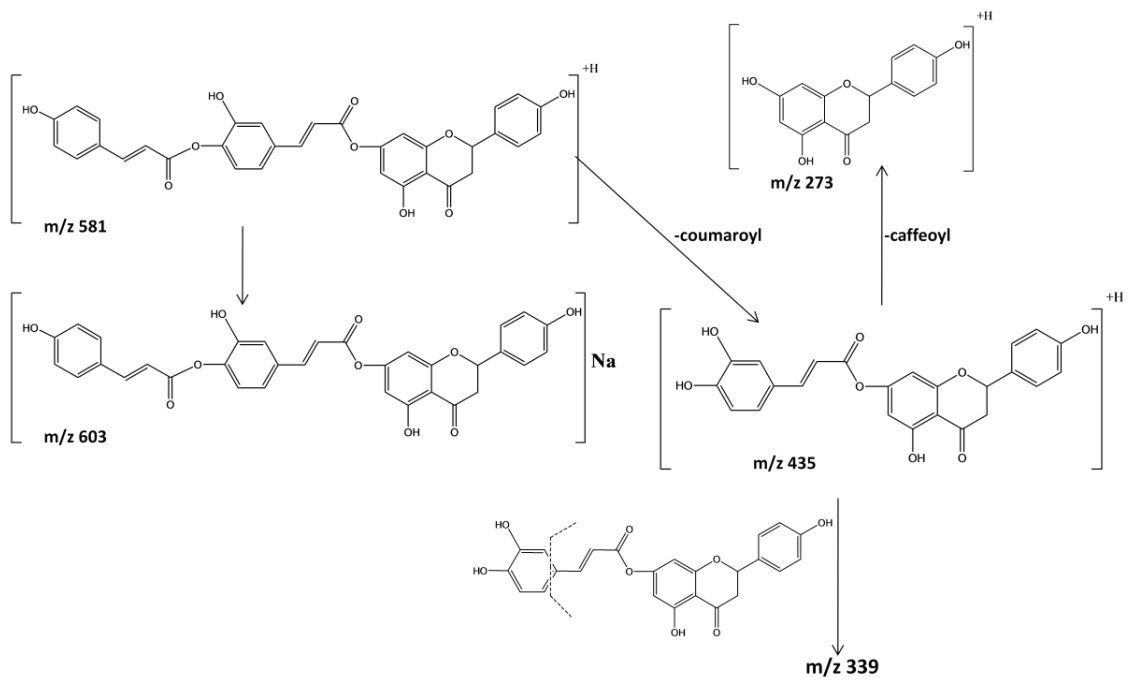
TB #2539 RT: 21.15 AV: 1 SB: 74 19.63-19.79, 21.98-22.42 NL: 1.44E4 microAU



Φάσμα μάζας:



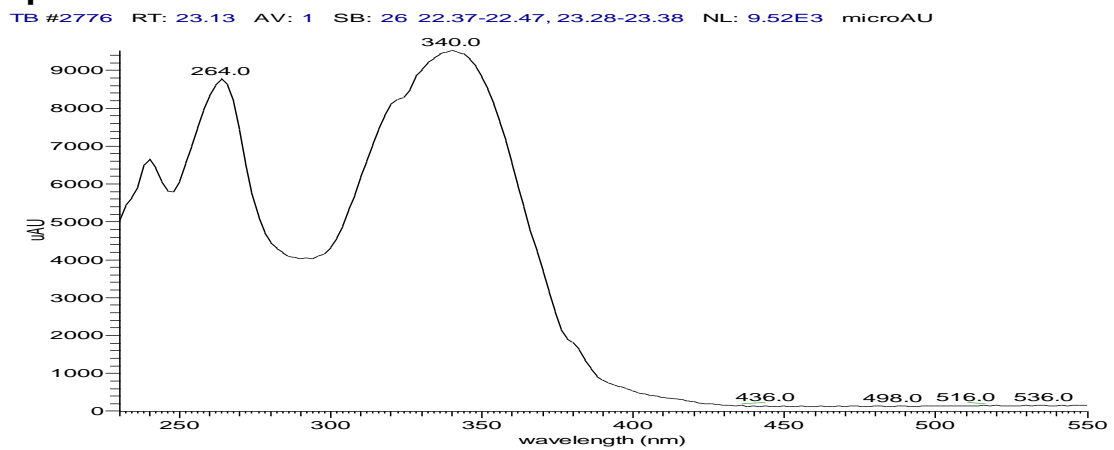
Από το φάσμα υπεριώδους-ορατού της ένωσης συμπεραίνεται ότι πρόκειται για φλαβανόνη και πιο συγκεκριμένα για παράγωγο ναριγγενίνης. Από το φάσμα μάζας προκύπτει ότι το μοριακό ιόν της ένωσης είναι $[M+H]^+=581$ που σταθεροποιείται με την προσθήκη νατρίου $[M+Na]=603$. Λόγω της υψηλής έντασης του θραύσματος 581 και των χαμηλών εντάσεων των θραυσμάτων 273, προκύπτει ότι το πρώτο οξύ (καφεϊκό) συνδέεται με εστερικό δεσμό με το άγλυκο και το δεύτερο οξύ (κουμαρικό) συνδέεται μέσω εστέρα με το καφεϊκό, καθότι έχουν βρεθεί και οξέα που συνδέονται μέσω εστερικού δεσμού με φλαβανόνες στην 7-θέση (Hoeneisen M. et al., 1993). Επιπροσθέτως, από το φάσμα υπεριώδους-ορατού, προκύπτει ότι το υδροξύλιο της θέσης 4' του Β δακτυλίου του φλαβονοειδούς παραμένει ελεύθερο και λόγω της υπιχρωμικής μετατόπισης της κορυφής II του αγλύκου, προτείνεται ότι το υδροξύλιο της θέσης 7 είναι υποκατεστημένο (Mabry et al., 1970; Hoeneisen M. et al., 1993). Στη χαμηλή τάση των 12eV το θραύσμα 435 αντιστοιχεί στο $[M-(\text{κουμαρικό-OH})+H]^+$. Τέλος, το ιόν με m/z 273 αντιστοιχεί στο άγλυκο ναριγγενίνη, μετά την απομάκρυνση και του κουμαρικού. Το θραύσμα με m/z 727 φαίνεται να αντιστοιχεί σε adduct του 581 με κουμαρικό $[581+(\text{κουμαρικό-H}_2\text{O})]$. Στο παρακάτω σχήμα παρατίθεται η θραυσμάτωση του μορίου.



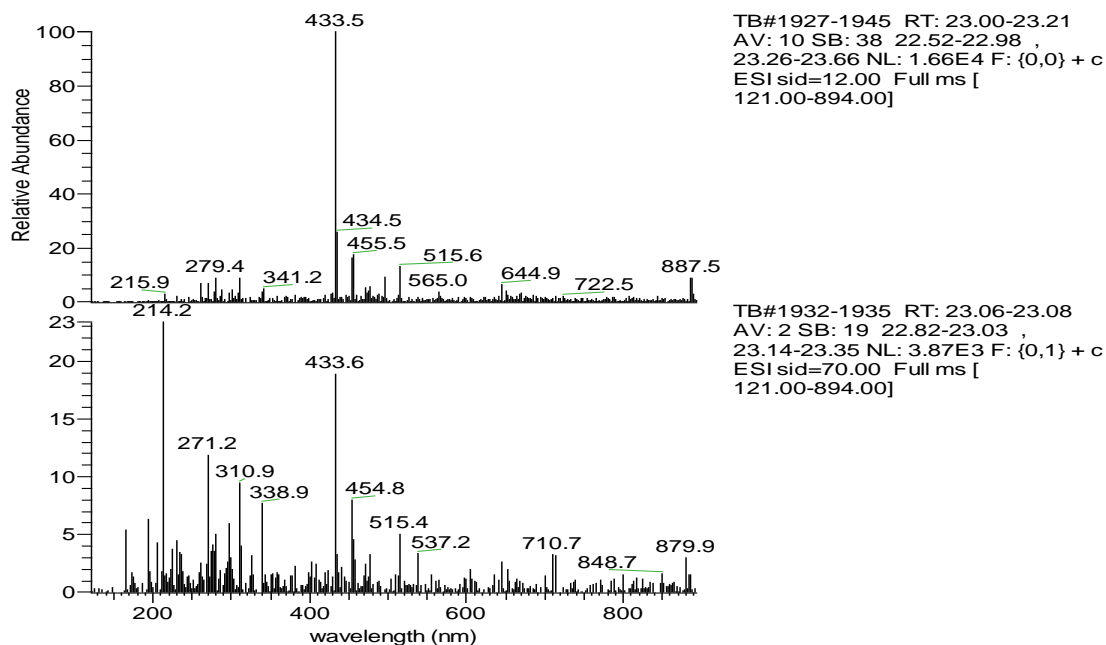
Ένωση 6: 7-O-καφεϊκός αιθέρας της απιγενίνης

Χρόνος κατακράτησης: 22.99min

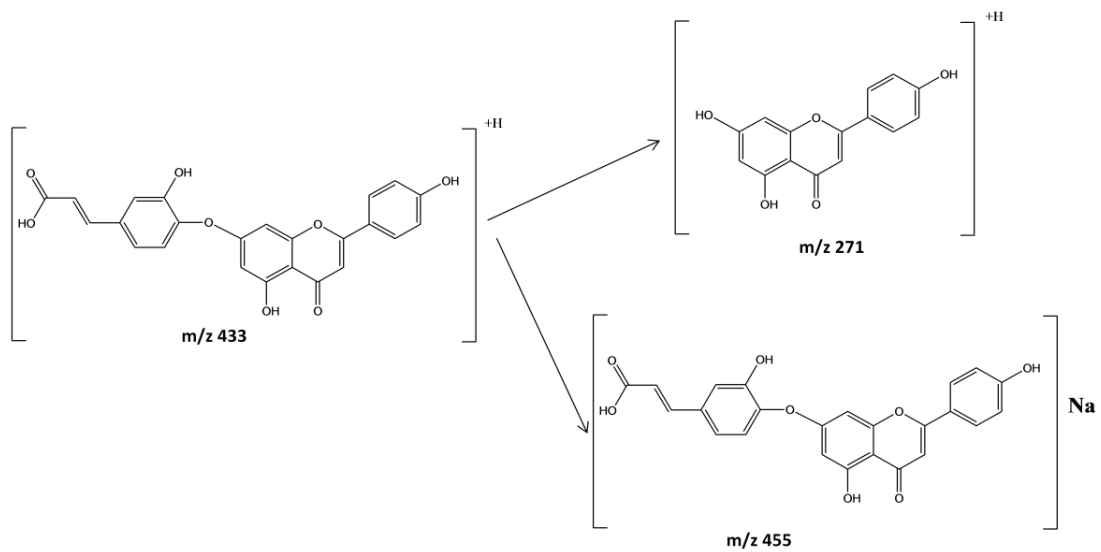
Φάσμα UV-Vis:



Φάσμα μάζας:



Από το φάσμα υπεριώδους-ορατού της ένωσης συμπεραίνεται ότι πρόκειται για φλαβόνη και πιο συγκεκριμένα για παράγωγο απιγενίνης. Από το φάσμα μάζας προκύπτει ότι το μοριακό ιόν της ένωσης είναι $[M+H]^+=433$ και σταθεροποιείται με την προσθήκη νατρίου $[M+Na]=455$, τιμές που εμφανίζονται και στη χαμηλή, αλλά και στην υψηλή τάση. Λόγω της τιμής της κορυφής I στο φάσμα υπεριώδους-ορατού, συμπεραίνεται ότι το καφεϊκό συνδέεται μέσω αιθερικού δεσμού με την απιγενίνη και όχι μέσω εστερικού, διότι δεν παρατηρείται υψιχρωμική μετατόπιση της κορυφής I στο φάσμα. Το ιόν με m/z 271 αντιστοιχεί στο άγλυκο απιγενίνη, μετά την απομάκρυνση του καφεϊκού $[M-(\text{καφεϊκό-OH})+H]^+$ με το $[2M+Na]$ να αντιστοιχεί στην τιμή 887. Η θραυσμάτωση του μητρικού μορίου παρατίθεται παρακάτω.

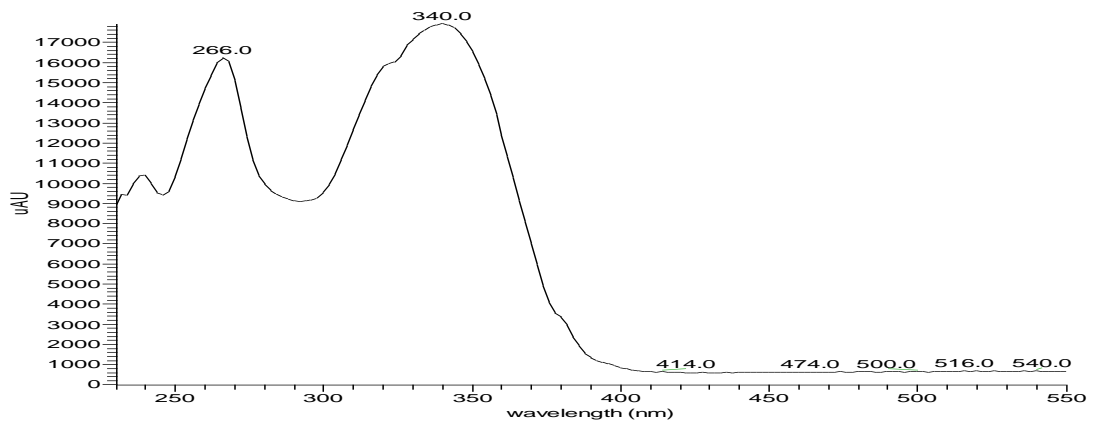


Ένωση 7: 7-O-[κουμαρούλο/καφεοϋλο] παράγωγο της απιγενίνης

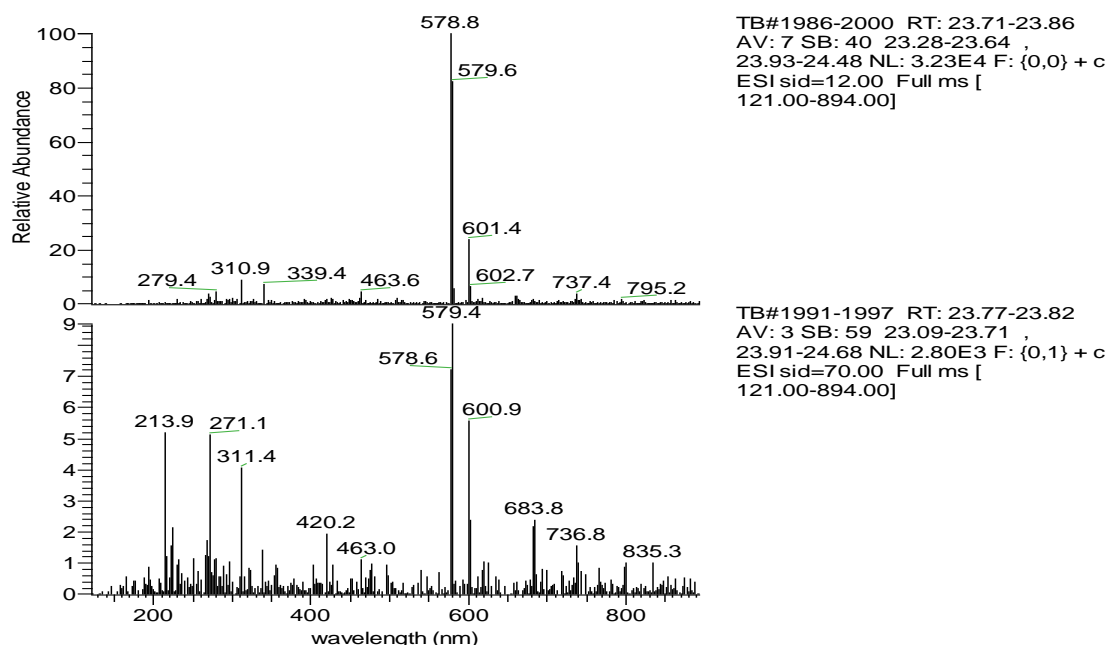
Χρόνος κατακράτησης: 23.67min

Φάσμα UV-Vis:

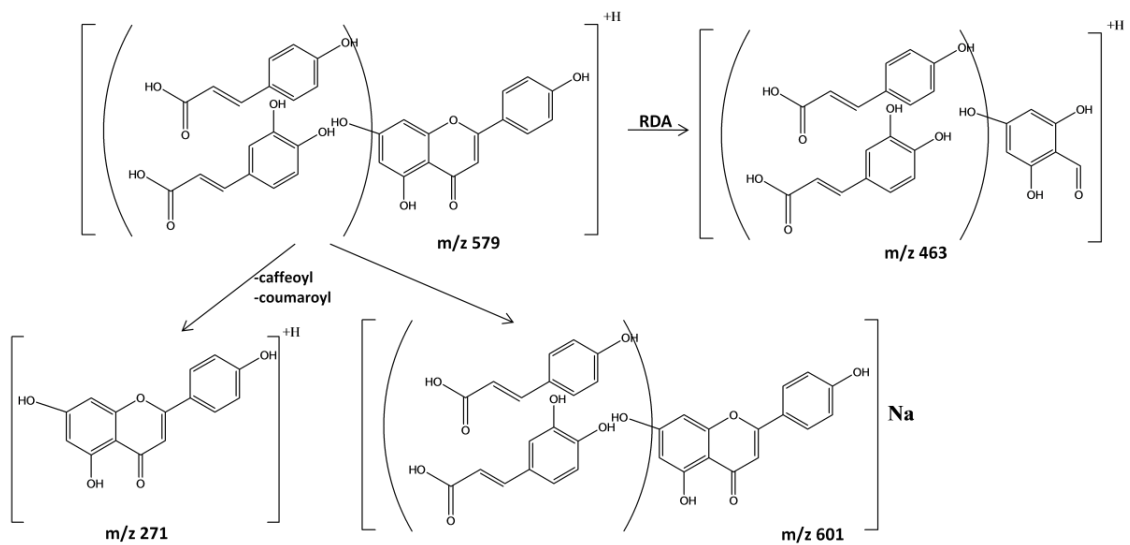
TB #2838 RT: 23.64 AV: 1 SB: 2 23.46, 23.96 NL: 1.79E4 microAU



Φάσμα μάζας:



Από το φάσμα υπεριώδους-ορατού της ένωσης συμπεραίνεται ότι πρόκειται για φλαβόνη συνδεδεμένη με οξύ στη θέση 7 και πιο συγκεκριμένα για παράγωγο απιγενίνης με καφεϊκό και κουμαρικό οξύ (Fabry et al., 1970). Από το φάσμα μάζας προκύπτει ότι το μοριακό ιόν της ένωσης είναι $[M+H]^+=579$ και σταθεροποιείται με την προσθήκη νατρίου $[M+Na]=601$, τιμές που εμφανίζονται και στη χαμηλή, αλλά και στην υψηλή τάση. Το ιόν με m/z 271 αντιστοιχεί στο άγλυκο απιγενίνη, μετά την απομάκρυνση και του καφεϊκού και του κουμαρικού $[M-(\text{καφεϊκό-OH})-(\text{κουμαρικό-OH})+H]^+$. Λόγω της τιμής της κορυφής I στο φάσμα υπεριώδους-ορατού, συμπεραίνεται ότι το καφεϊκό/κουμαρικό συνδέεται μέσω αιθερικού δεσμού με την απιγενίνη και όχι μέσω εστερικού, διότι δεν παρατηρείται υπιχρωμική μετατόπιση της κορυφής I στο φάσμα. Ωστόσο η διευκρίνιση της σειράς των οξέων στη σύνδεσή τους με την απιγενίνη δεν κατέστη δυνατή με τις υπάρχουσες πληροφορίες. Η θραυσμάτωση του μητρικού μορίου παρατίθεται παρακάτω.

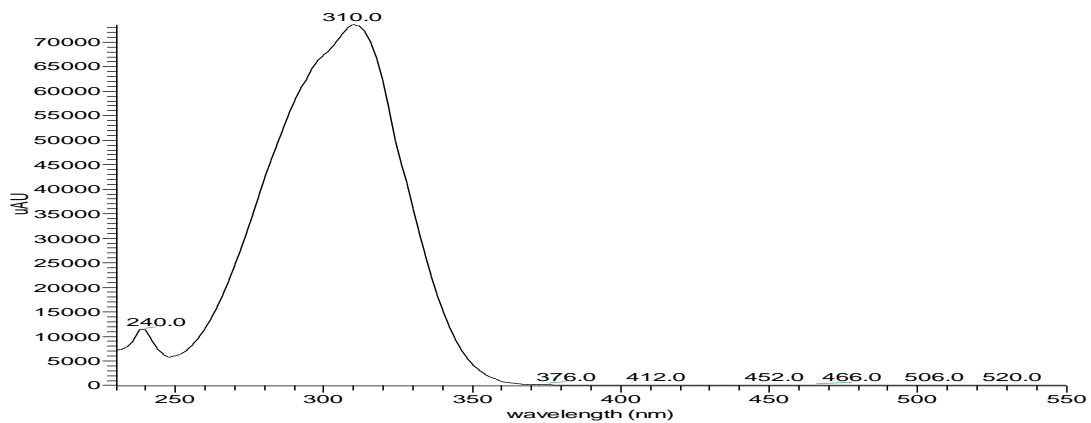


Ένωση 8: [Μεθοξυ-κινναμοΐλο, κουμαροΐλο, διϋδροκαφεοΐλο]-τριεστέρας του κινικού οξέος

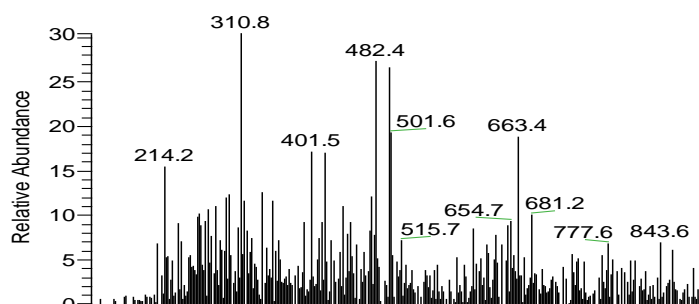
Χρόνος κατακράτησης: 24.63min

Φάσμα UV-Vis:

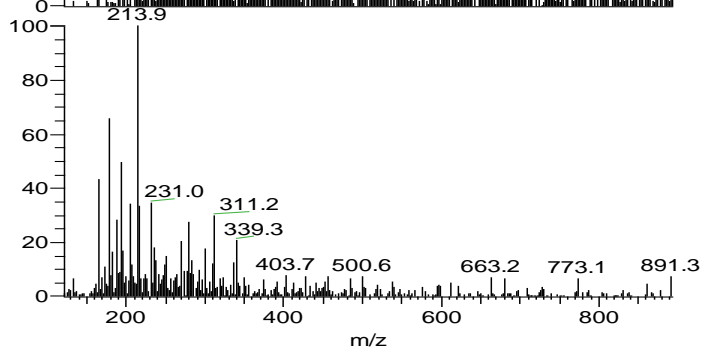
TB #2969 RT: 24.73 AV: 1 SB: 2 24.23, 25.14 NL: 7.35E4 microAU



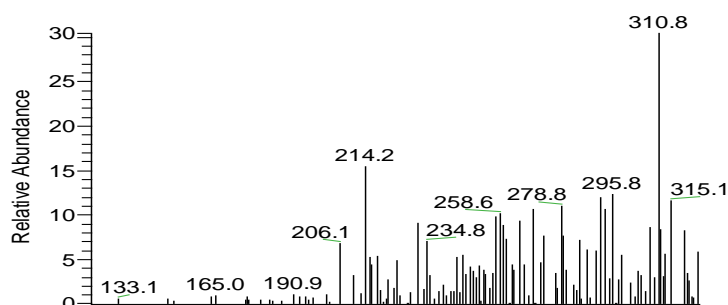
Φάσμα μάζας:



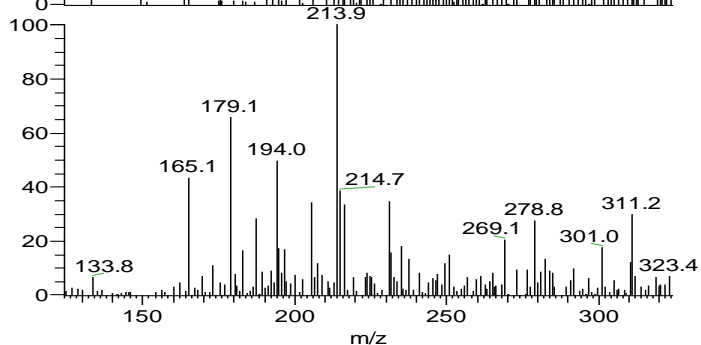
TB#2083-2088 RT: 24.86-24.91
AV: 3 SB: 20 24.59-24.83 ,
24.94-25.16 NL: 2.62E3 F: {0,0} + c
ESI sid=12.00 Full ms [
121.00-894.00]



TB#2083 RT: 24.87 AV: 1 SB: 30
24.50-24.84 , 24.89-25.23 NL:
8.64E3 F: {0,1} + c ESI sid=70.00
Full ms [121.00-894.00]



TB#2083-2088 RT: 24.86-24.91
AV: 3 SB: 20 24.59-24.83 ,
24.94-25.16 NL: 2.62E3 F: {0,0} + c
ESI sid=12.00 Full ms [
121.00-894.00]

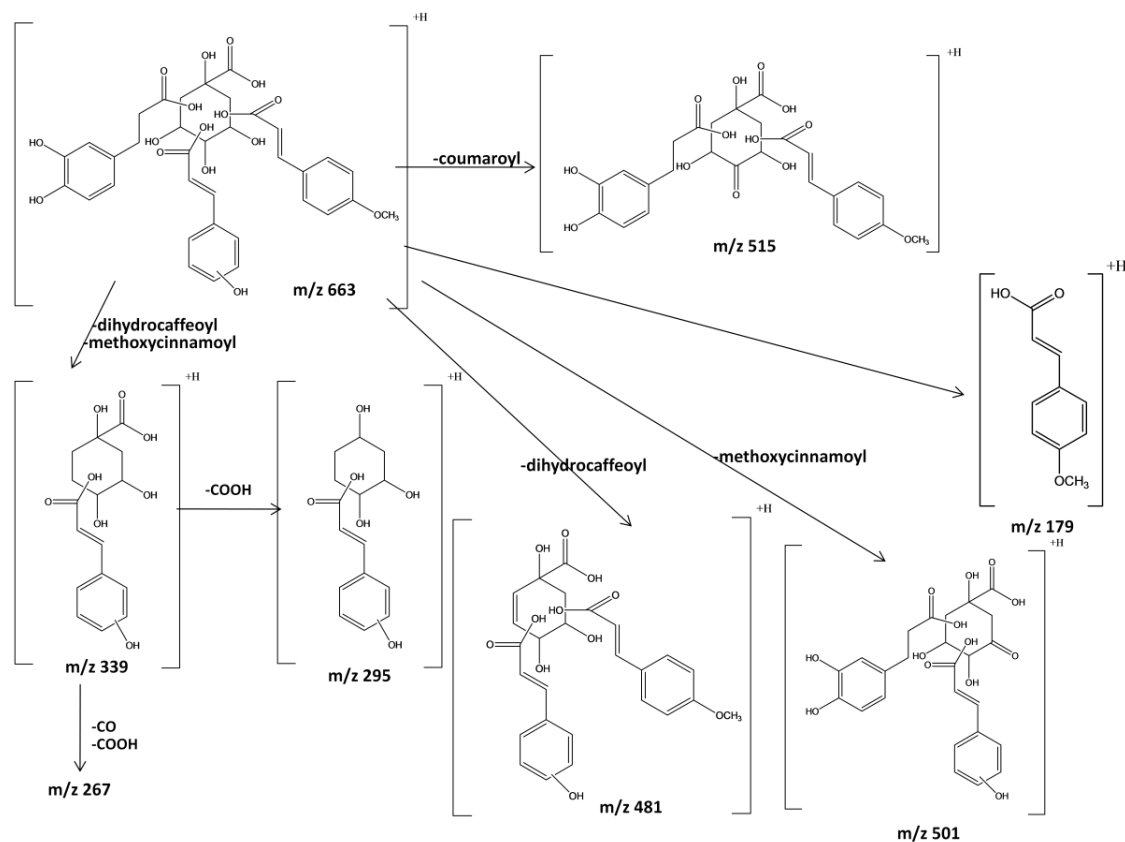


TB#2083 RT: 24.87 AV: 1 SB: 30
24.50-24.84 , 24.89-25.23 NL:
8.64E3 F: {0,1} + c ESI sid=70.00
Full ms [121.00-894.00]

Το φάσμα απορρόφησης της ένωσης είναι χαρακτηριστικό για εστέρες του κινικού με υδροξυκινναμωμικά οξέα. Το μοριακό ιόν της ένωσης με πρωτόνιο $[M+H]$ διακρίνεται σε m/z 663 στα 12eV και με μικρότερη ένταση στα 70eV. Το ιόν αυτό αντιστοιχεί στο μόριο του κινικού οξέως το οποίο, σε τρεις από τις υδροξυλομάδες του, έχει εστεροποιημένα τα ακόλουθα κινναμωμικά οξέα: μεθοξυ-κινναμικό οξύ,

κουμαρικό οξύ και διϋδροκαφεϊκό οξύ. Επειδή δεν γνωρίζουμε τις θέσεις εστεροποίησης των παραπάνω οξέων, δίνουμε τον τύπο του κιννικού οξέως με 'ανοιχτές' τις θέσεις εστεροποίησης ως ακολούθως και με το υδροξύλιο στο μόριο του κουμαρικού οξέως να μην 'εντοπίζεται' καθότι δεν γνωρίζουμε εάν πρόκειται για το όρθο- ή πάρα- παράγωγο.

Το θραύσμα με m/z 515, το οποίο διακρίνεται στα 12eV αντιστοιχεί σε απώλεια μιας κουμαροϋλο-ομάδας από το μητρικό μόριο $[M-(\text{κουμαρικό-OH})+H]^+$, ενώ αν υπάρχει απώλεια της μεθοξικινναμοϋλομάδας ή της διϋδροκαφεοϋλομάδας, τα θραύσματα με m/z 501 και 481, αντίστοιχα. Από το μοριακό ιόν με απόσπαση της διϋδροκαφεοϋλομάδας και της μεθοξικινναμοϋλομάδας, εμφανίζεται το ιόν στα 339 και από αυτό με την απομάκρυνση της καρβοξυλομάδας προκύπτει το ιόν με m/z 295, ενώ με την επιπλέον απομάκρυνση ενός C=O προκύπτει το θραύσμα με m/z 267. Στα 70eV στα κύρια ιόντα εμφανίζεται το μεθοξικινναμικό οξύ με m/z 179. Η θραυσμάτωση του μητρικού μορίου δίνεται παρακάτω:



Κατανομή οξικού αιθυλεστέρα(Τ.Ε.Α.)

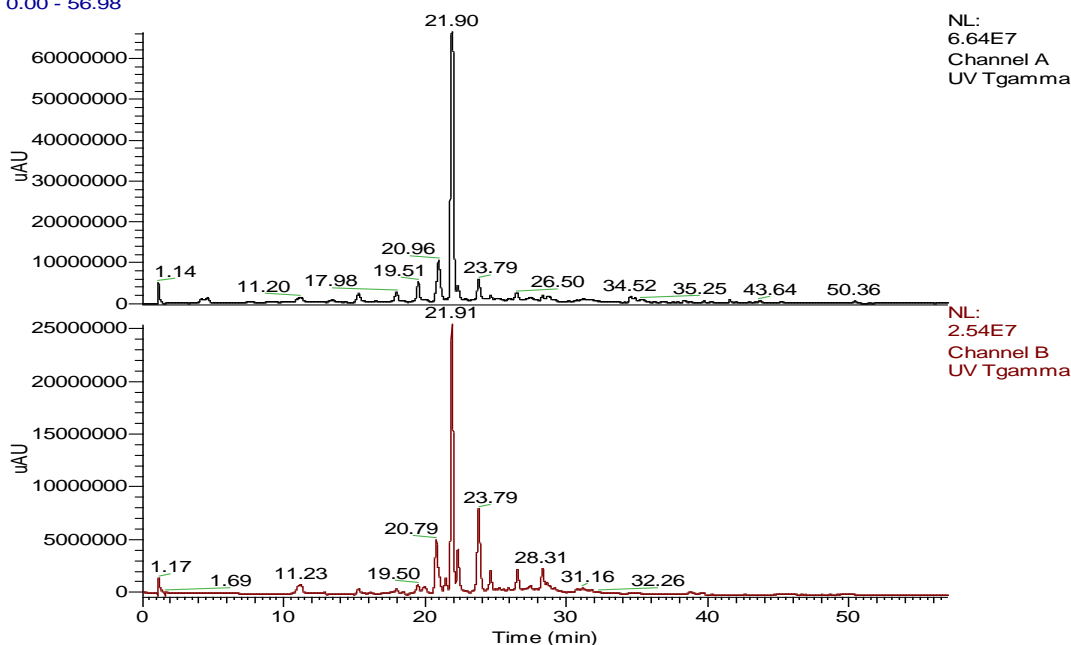
Superspher 100-4, 4 μ , (125x2mm) RP18 Macherey Nagel

Time (min)	H ₂ O(+2.5%AcOH)	MeOH
0	100	0
2	100	0
52	0	100
57	0	100

Flow rate: 0.33ml/min; inj. vol: 10 μ l; DAD: 278, 340 nm

Ionization Mode:	ESI+	Ionization Mode:	Electrospray
Capillary (kV):	4.0	None in use.	
Source Voltage (V):	40 ⁰ C	1 +ve 12	
Probe Temperature (°C):	400 ⁰ C	2 +ve 70	
RF Lens (V):	0.3	Scans per Second:	0.7
Ion Energy (eV):	1.0	Scan Range Start (amu):	121
Ion Energy Ramp (mV/amu):	0.5	Scan Range End (amu):	894
Detector Voltage (V):	650		
Low Mass Resolution:	12.5		
High Mass Resolution:	16.5		

RT: 0.00 - 56.98



N ^o	R _t (min)	[M+H] ⁺ (m/z)	Θραύσματα (m/z) στα 12 eV (%R.I.)	Θραύσματα (m/z) στα 70 eV (%R.I.)	UV-Vis λ _{max} (nm)	Διευκρίνιση δομής
9	19.51	597	311, 451, 597, 619	289, 311, 597, 619	238, 284,	7-O-(Κουμαροϋλο-καφεοϋλο)-εστέρας της εριοδικτυόλης

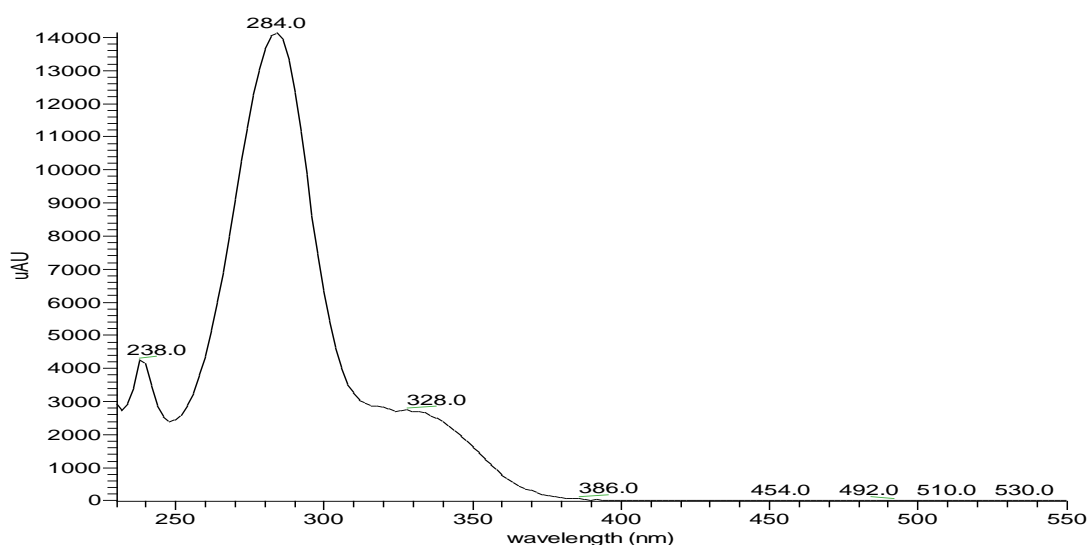
					328sh	
10	20.79	647	311, 325, 339, 647	311, 325, 339, 471, 647	240, 330, 380sh	[Πρωτοκατεχοϋλ-κουμαροϋλ- βανιλλοϋλο]-τριεστέρας του κιννικού οξέος
11	20.96	435	273, 435, 457, 869, 891	435, 891	282, 328	7-Ο-καφεϊκός εστέρας της ναριγγενίνης
12	21.90	581	273, 435, 581	273, 581, 603	282, 328	7-Ο-[κουμαροϋλ-καφεοϋλο]- αιθέρας της ναριγγενίνης
13	22.32	625	311, 471, 475, 625, 643, 647	311, 325, 471, 475, 647	248, 288, 328	[Διυδροκιναμοϋλ- διυδροκουμαροϋλ-γαλλοϋλο]- τριεστέρας του κιννικού οξέος
14	23.79	645	271, 339, 433, 515, 645	271, 311, 339, 433, 515, 645	266, 322(sh), 334	[4'-Ο-πρενυλ(3'''-υδροξυ)]-6'''- διμεθυλ-5'''-υδροξυ-4'''μεθοξυ- πυρανο[2''',3''':2',3']-7-Ο- καφεϊκός αιθέρας της απιγενίνης
15	24.63	579	579	271, 579, 601	240, 266, 342	7-Ο-[κουμαροϋλο/καφεοϋλο] παράγωγο της απιγενίνης
16	28.31	675	311, 339, 507, 675	311, 339, 529, 675	242, 288sh, 328	Παράγωγο του [2,6-διυδροξυ-4- υδροξυλ-4-καρβοξυλ-1- καρβοξυλο]-κυκλοεξανίου με 4- υδροξυ-3,5-διοξοκυκλοεξανο- καρβοξυλικό οξύ και βανιλλικά οξέα

Ένωση 9: 7-Ο-(Κουμαροϋλο-καφεοϋλο)-εστέρας της εριοδικτυόλης

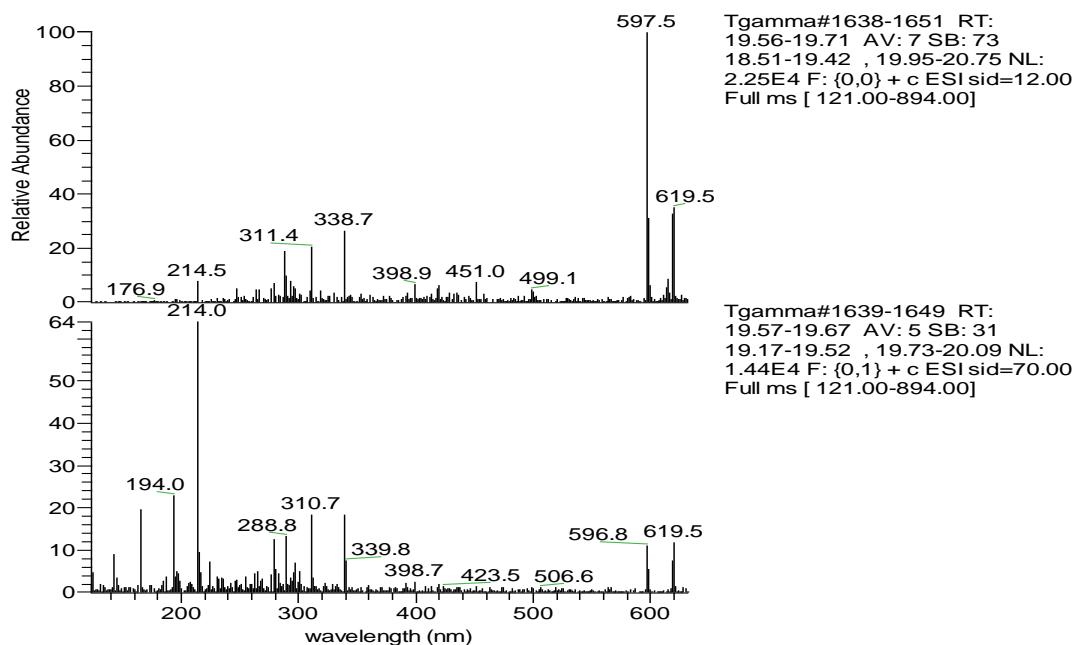
Χρόνος κατακράτησης: 19.51min

Φάσμα UV-Vis:

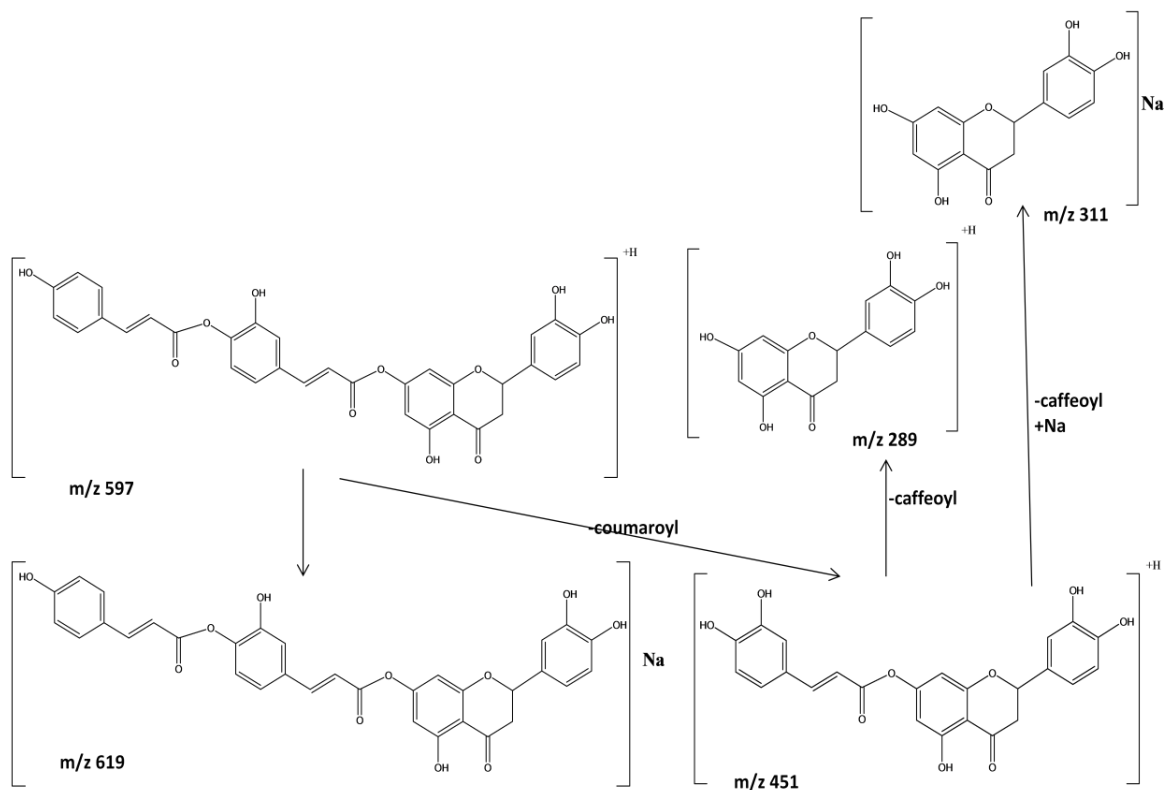
Tgamma #2330 RT: 19.41 AV: 1 SB: 2 19.31, 19.66 NL: 1.42E4 microAU



Φάσμα μάζας:



Από το φάσμα υπεριώδους-ορατού της ένωσης συμπεραίνεται ότι πρόκειται για φλαβανόνη και πιο συγκεκριμένα για παράγωγο εριοδικτυόλης. Από το φάσμα μάζας προκύπτει ότι το μοριακό ιόν της ένωσης είναι το $[M+H]^+=597$ και σταθεροποιείται με την προσθήκη νατρίου $[M+Na]=619$, τιμές που εμφανίζονται και στη χαμηλή, αλλά και στην υψηλή τάση. Λόγω της υψηλής έντασης του θραύσματος m/z 597 και της ταυτόχρονα χαμηλής έντασης του θραύσματος m/z 289, προτείνεται ότι το πρώτο οξύ (καφεϊκό) συνδέεται μέσω εστερικού δεσμού με την εριοδικτυόλη, αλλά και με το δεύτερο οξύ (κουμαρικό), καθότι έχουν βρεθεί και οξέα που συνδέονται μέσω εστερικού δεσμού με φλαβανόνες στην 7-θέση (Hoeneisen M. et al., 1993). Από την υπυχρωμική μετατόπιση της κορυφής II στο φάσμα υπεριώδους-ορατού, συμπεραίνεται ότι είναι δεσμευμένο το 7-OH και το 4'-OH ελεύθερο (Mabry et al., 1970). Στην χαμηλή τάση των 12eV, παρατηρείται το ιόν που προκύπτει από την απόσπαση του τμήματος του κουμαρικού και αντιστοιχεί σε m/z 451= $[M-(\text{κουμαρικό-OH})+H]^+$. Το ιόν με m/z 289 αντιστοιχεί στην εριοδικτυόλη $[M-(\text{κουμαρικό-OH})-(\text{καφεϊκό-OH})+H]^+$. Η θραυσμάτωση του μορίου δίνονται στο παρακάτω σχήμα.

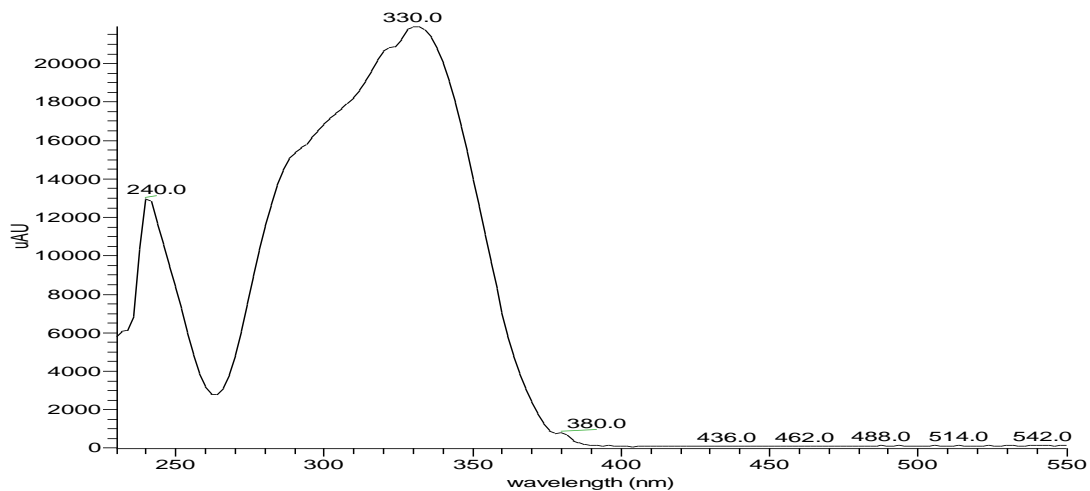


Ένωση 10: [Πρωτοκατεχοΐλ-κουμαροΐλ-βανιλλοΐλο]-τριεστέρας του κιννικού οξέος

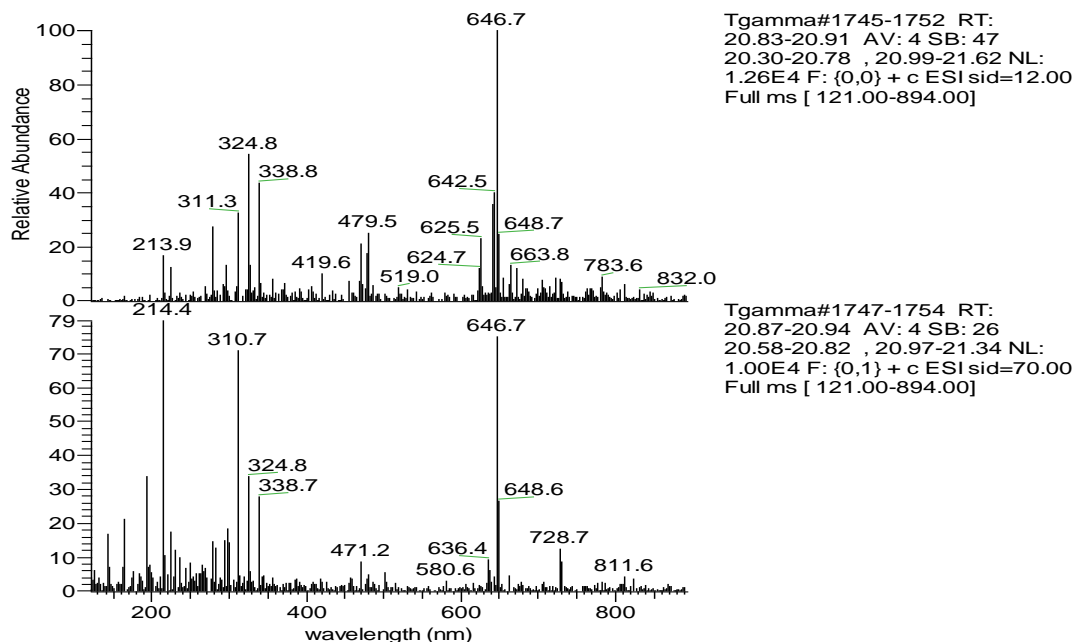
Χρόνος κατακράτησης: 20.79min

Φάσμα UV-Vis:

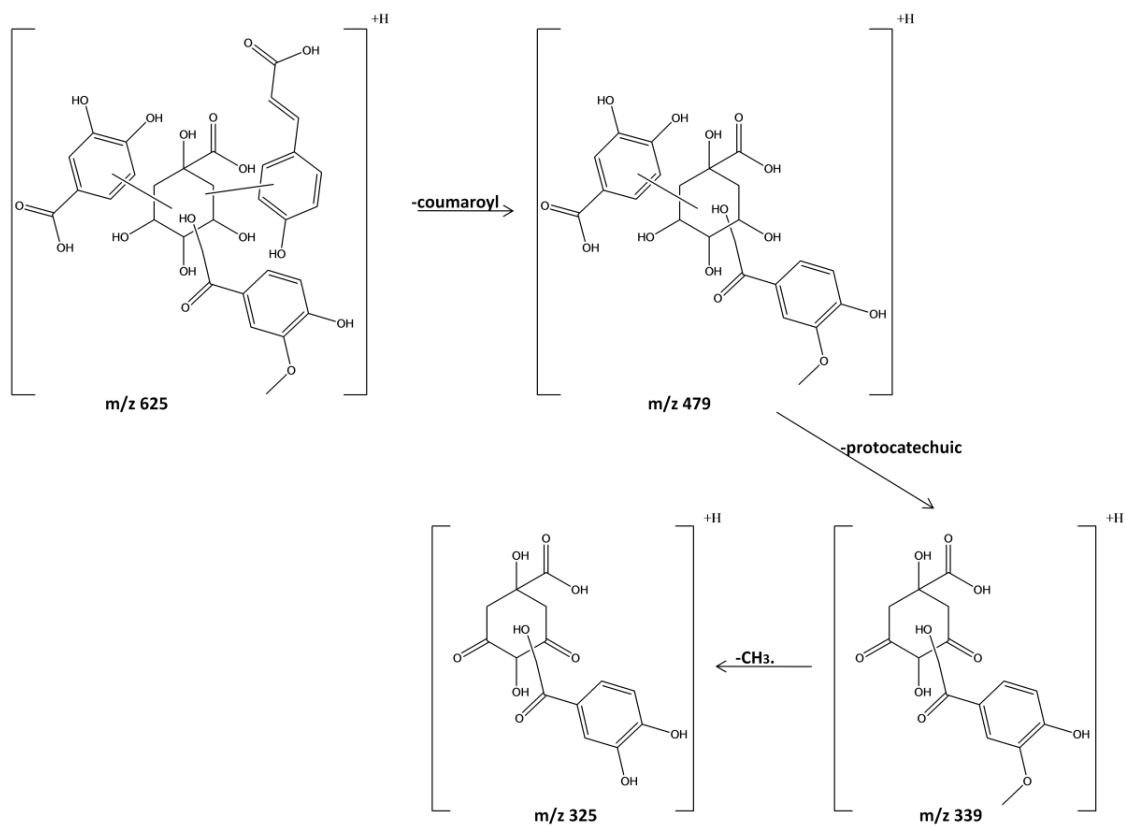
Tgamma #2485 RT: 20.70 AV: 1 SB: 15 20.39-20.45, 21.28-21.33 NL: 2.19E4 microAU



Φάσμα μάζας



Το μοριακό ιόν της ένωσης με πρωτόνιο $[M+H]^+$ διακρίνεται με m/z 625. Το ιόν αυτό αντιστοιχεί στο μόριο του κιννικού οξέως το οποίο, σε τρεις από τις υδροξυλομάδες του, είναι συνδεδεμένα ένα βανιλλικό, ένα κουμαρικό και ένα πρωτοκατεχικό οξύ. Επειδή δεν γνωρίζουμε τις θέσεις σύνδεσης των παραπάνω οξέων, δίνουμε τον τύπο του κιννικού οξέως με 'ανοιχτές' τις θέσεις αυτές και προτείνεται ότι μόνο το βανιλλικό οξύ είναι εστεροποιημένο στο κινικό, λόγω της υψηλής έντασης των θραυσμάτων 325 και 339. Τα θραύσματα με m/z 643 και 647 αντιστοιχούν στα $[M+H+(H_2O)]^+$ και $[M+Na]^+$ αντίστοιχα. Το θραύσμα με m/z 479, το οποίο διακρίνεται στα 12eV, αντιστοιχεί σε απώλεια της κουμαροϋλομάδας από το μητρικό μόριο $[M-(\text{κουμαρικό οξύ-OH})+H]^+$. Από το προηγούμενο θραύσμα, με επιπλέον απομάκρυνση του πρωτοκατεχικού οξέος, προκύπτει το θραύσμα με m/z 339 $[M-(\text{κουμαρικό οξύ-OH})-(\text{πρωτοκατεχικό οξύ-OH})+H]^+$, που διακρίνεται στα 12eV και 70eV. Το θραύσμα με m/z 325 προκύπτει από το παραπάνω, μετά την απομάκρυνση του μεθυλίου από το μεθοξύλιο του βανιλλικού. Η θραυσμάτωση του μητρικού μορίου δίνονται παρακάτω.

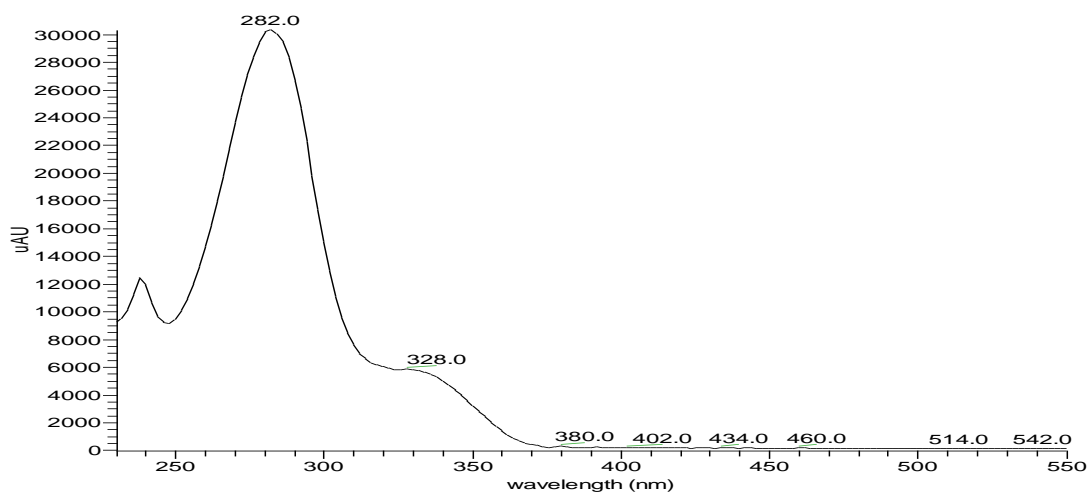


Ένωση 11: 7-Ο-καφεϊκός εστέρας της ναριγγενίνης

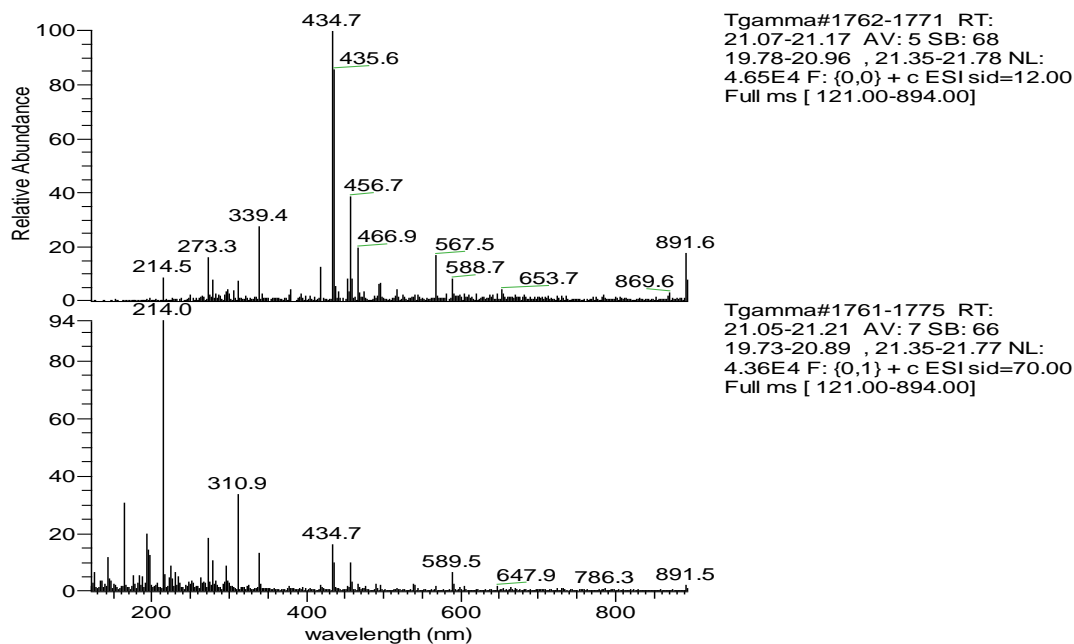
Χρόνος κατακράτησης: 20.96min

Φάσμα UV-Vis:

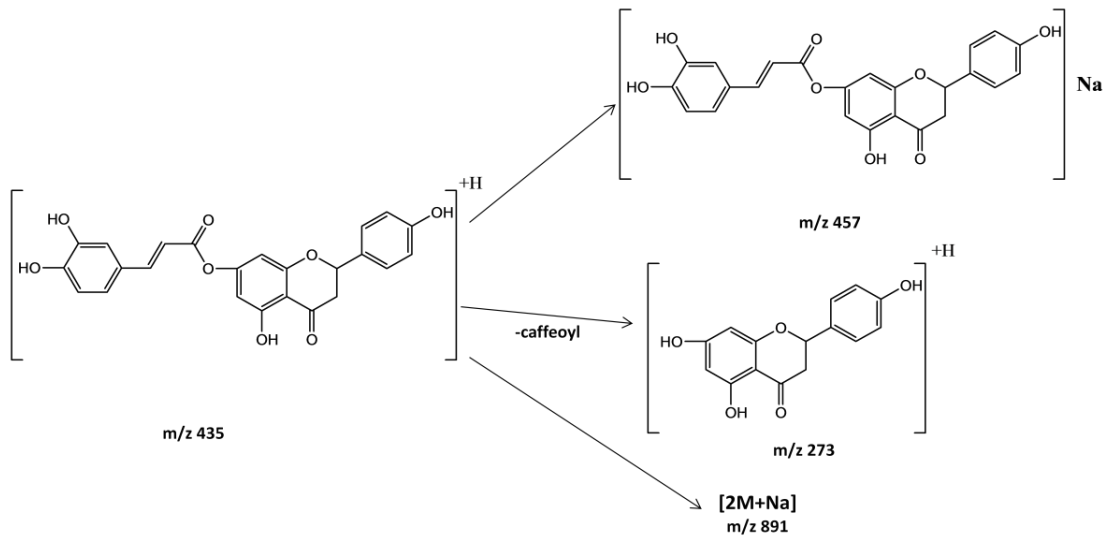
Tgamma #2535 RT: 21.12 AV: 1 SB: 15 20.39-20.45, 21.28-21.33 NL: 3.03E4 microAU



Φάσμα μάζας:



Από το φάσμα υπεριώδους-ορατού της ένωσης συμπεραίνεται ότι πρόκειται για φλαβανόνη και πιο συγκεκριμένα για παράγωγο ναριγγενίνης. Από το φάσμα μάζας προκύπτει ότι το μοριακό ιόν της ένωσης είναι το $[M+H]^+=435$ και σταθεροποιείται με την προσθήκη νατρίου $[M+Na]=457$, τιμή που εμφανίζεται στη χαμηλή τάση. Το καφεϊκό συνδέεται μέσω εστερικού δεσμού στη θέση 7 της ναριγγενίνης λόγω της υπιχρωμικής μετατόπισης της κορυφής II του φλαβονοειδούς και της υψηλής έντασης του θραύσματος 435, καθότι έχουν βρεθεί και οξέα που συνδέονται μέσω εστερικού δεσμού με φλαβανόνες στην 7-θέση (Hoeneisen M. et al., 1993; Mabry et al., 1970). Στην χαμηλή τάση των 12eV, παρατηρείται ακόμη το ιόν που αντιστοιχεί στη ναριγγενίνη και αντιστοιχεί σε m/z 273= $[M-(\text{καφεϊκό-OH})+H]^+$. Στην υψηλή τάση των 70eV, αλλά και στη χαμηλή των 12eV, εμφανίζεται το ιόν με m/z 891 που αντιστοιχεί στο $[2M+Na]$, ενώ στη χαμηλή τάση των 12eV εμφανίζεται και το θραύσμα $[2M+H]^+$. Παρακάτω παρατίθεται η θραυσμάτωση του μορίου.

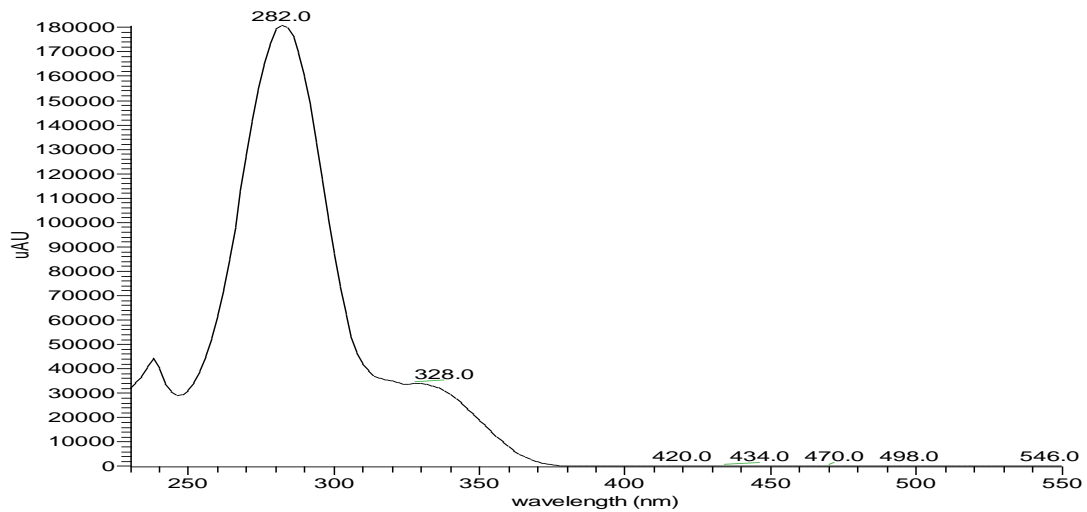


Ένωση 12: 7-O-[κουμαρούλ-καφεούλο]-αιθέρας της ναριγγενίνης

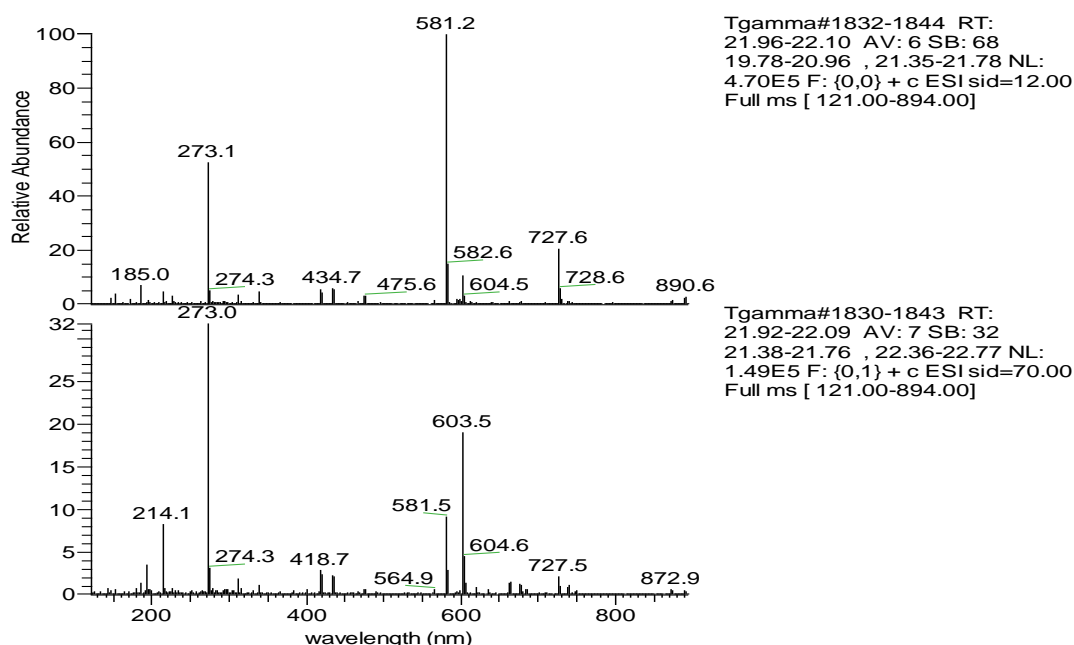
Χρόνος κατακράτησης: 21.90min

Φάσμα UV-Vis:

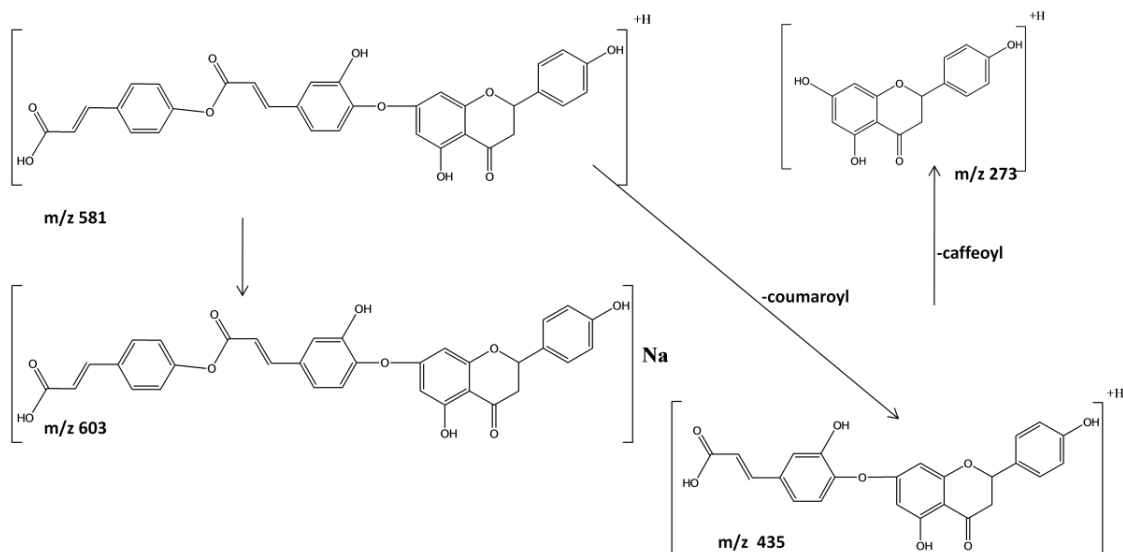
Tgamma #2646-2650 RT: 22.04-22.07 AV: 5 SB: 2 21.55, 22.63 NL: 1.81E5 microAU



Φάσμα μάζας:



Από το φάσμα υπεριώδους-ορατού της ένωσης συμπεραίνεται ότι πρόκειται για φλαβανόνη και πιο συγκεκριμένα για παράγωγο ναριγγενίνης. Από το φάσμα μάζας προκύπτει ότι το μοριακό ιόν της ένωσης είναι $[M+H]^+ = 581$ που σταθεροποιείται με την προσθήκη νατρίου $[M+Na] = 603$. Λόγω της υψηλής έντασης των θραυσμάτων 273 και 581, προκύπτει ότι το πρώτο οξύ (καφεϊκό) συνδέεται με αιθερικό δεσμό με το άγλυκο και επομένως μέσω εστερικού δεσμού με το δεύτερο οξύ (κουμαρικό). Επιπροσθέτως, από το φάσμα υπεριώδους-ορατού, προκύπτει ότι το υδροξύλιο της θέσης 4' του Β δακτυλίου του φλαβονοειδούς παραμένει ελεύθερο και λόγω της υπιχρωμικής μετατόπισης της κορυφής II του αγλύκου, προτείνεται ότι το υδροξύλιο της θέσης 7 είναι υποκατεστημένο (Mabry et al., 1970). Στη χαμηλή τάση των 12eV το ιόν 435 αντιστοιχεί στο $[M-(\text{κουμαρικό-OH})+H]^+$. Το θραύσμα με m/z 727 φαίνεται να αντιστοιχεί σε adduct του 581 με κουμαρικό $[581+(\text{κουμαρικό-H}_2\text{O})]$. Τέλος, το ιόν με m/z 273 αντιστοιχεί στο άγλυκο ναριγγενίνη, μετά την απομάκρυνση και του κουμαρικού. Στο παρακάτω σχήμα παρατίθεται η θραυσμάτωση του μορίου.

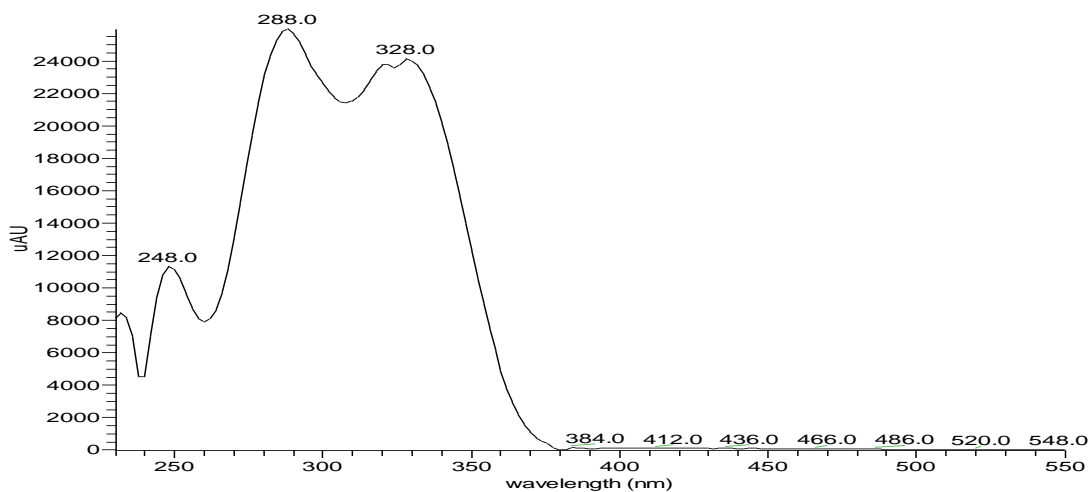


Ένωση 13: [Διυδροκιναμούλ-διυδροκουμαρούλ-γαλλούλο]-τριεστέρας του κινικού οξέος

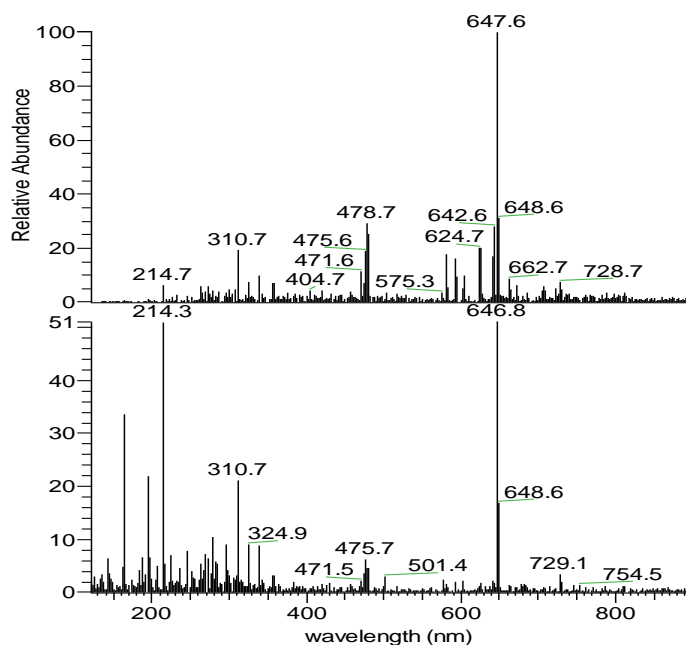
Χρόνος κατακράτησης: 22.32min

Φάσμα UV-Vis:

Tgamma #2672 RT: 22.26 AV: 1 SB: 47 21.30-21.44, 22.85-23.08 NL: 2.60E4 microAU



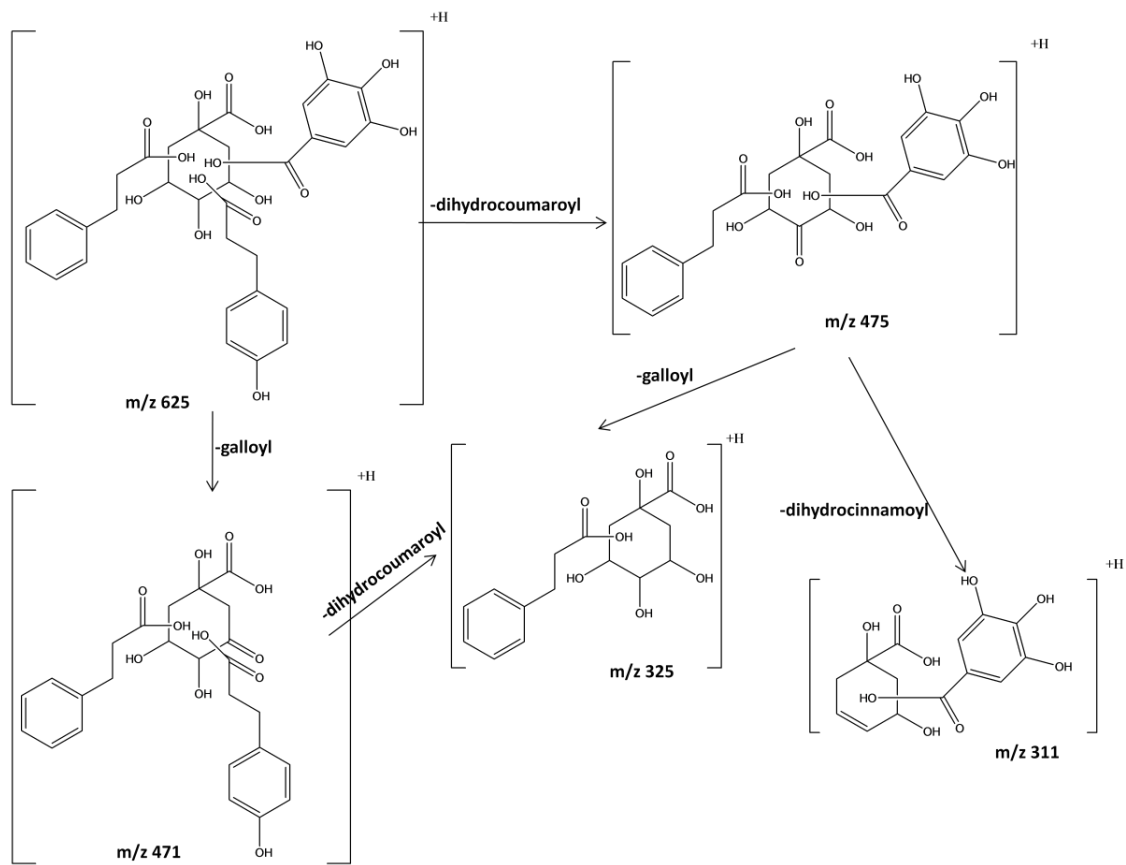
Φάσμα μάζας (165,311,194.5 out):



Tgamma#1863-1875 RT:
22.38-22.54 AV: 7 SB: 56
19.26-19.94 , 23.08-23.81 NL:
2.70E4 F: {0,0} + c ESI sid=12.00
Full ms [121.00-894.00]

Tgamma#1863-1876 RT:
22.39-22.55 AV: 7 SB: 44
21.25-21.82 , 23.27-23.82 NL:
1.37E4 F: {0,1} + c ESI sid=70.00
Full ms [121.00-894.00]

Το μοριακό ιόν της ένωσης με πρωτόνιο $[M+H]^+$ διακρίνεται με m/z 625. Το ιόν αυτό αντιστοιχεί στο μόριο του κιννικού οξέως το οποίο, σε τρεις από τις υδροξυλομάδες του, έχει εστεροποιημένα ένα διυδροκιναμωμικό οξύ, ένα διυδροκουμαρικό οξύ και ένα γαλλικό οξύ. Επειδή δεν γνωρίζουμε τις θέσεις εστεροποίησης των παραπάνω οξέων, δίνουμε τον τύπο του κιννικού οξέως με 'ανοιχτές' τις θέσεις εστεροποίησης. Τα θραύσματα με m/z 643 και 647 αντιστοιχούν στα $[M+H+(H_2O)]^+$ και $[M+Na]^+$ αντίστοιχα. Το θραύσμα με m/z 475, το οποίο διακρίνεται και στα 12eV και στα 70eV, αντιστοιχεί σε απώλεια της διυδροκουμαρόλης από το μητρικό μόριο $[M-(\text{διυδροκουμαρικό-OH})+H]^+$. Από το προηγούμενο θραύσμα, με επιπλέον απομάκρυνση του γαλλικού οξέος, προκύπτει το θραύσμα με m/z 325 $[M-(\text{διυδροκουμαρικό οξύ-OH})-(\text{γαλλικό οξύ-OH})+H]^+$, που διακρίνεται στα 70eV. Το θραύσμα με m/z 471 προκύπτει από το μητρικό μόριο με την απομάκρυνση του γαλλικού $[M-(\text{γαλλικό οξύ-OH})+H]^+$. Η θραυσμάτωση του μητρικού μορίου δίνεται παρακάτω.

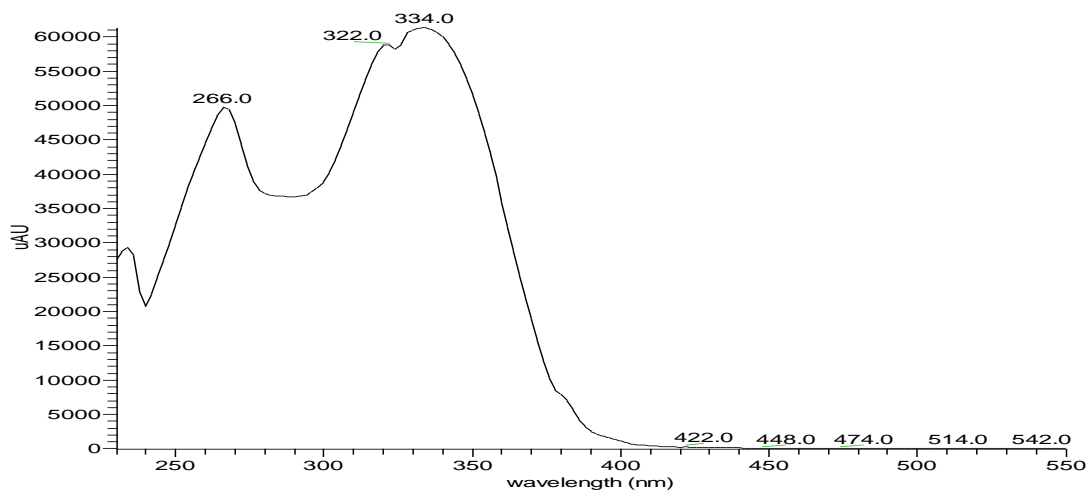


Ένωση 14: [4'-O-πρενυλ(3'''-υδροξυ)]-6'''-διμεθυλ-5'''-υδροξυ-4'''μεθοξυ-πυρανο[2''' ,3''' :2',3']-7-O-καφεϊκός αιθέρας της απιγενίνης

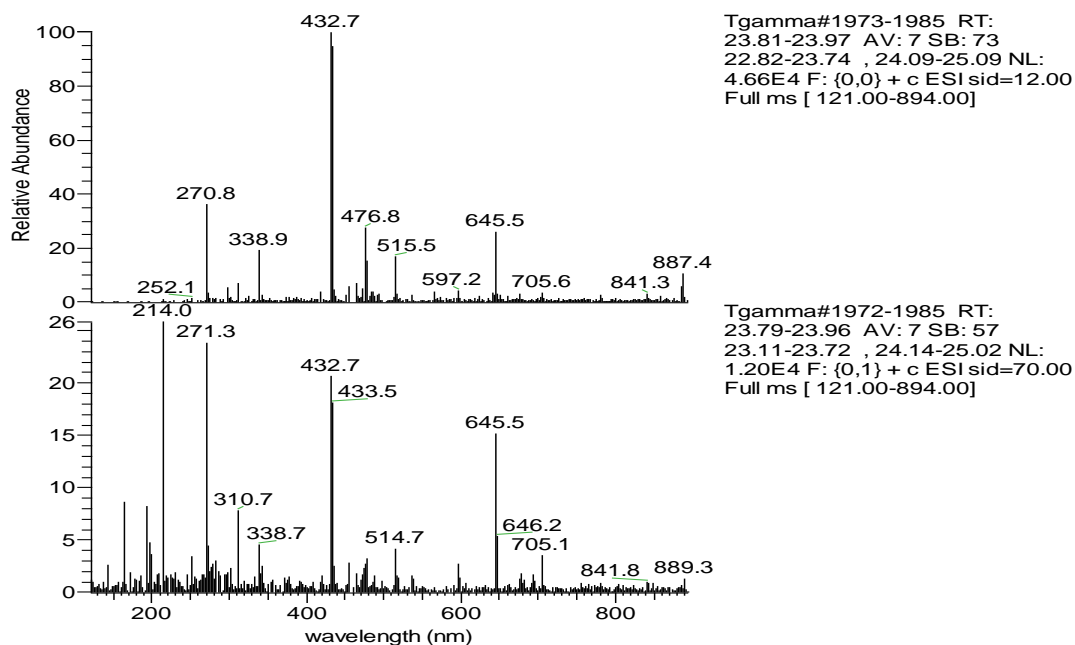
Χρόνος κατακράτησης: 23.79min

Φάσμα UV-Vis:

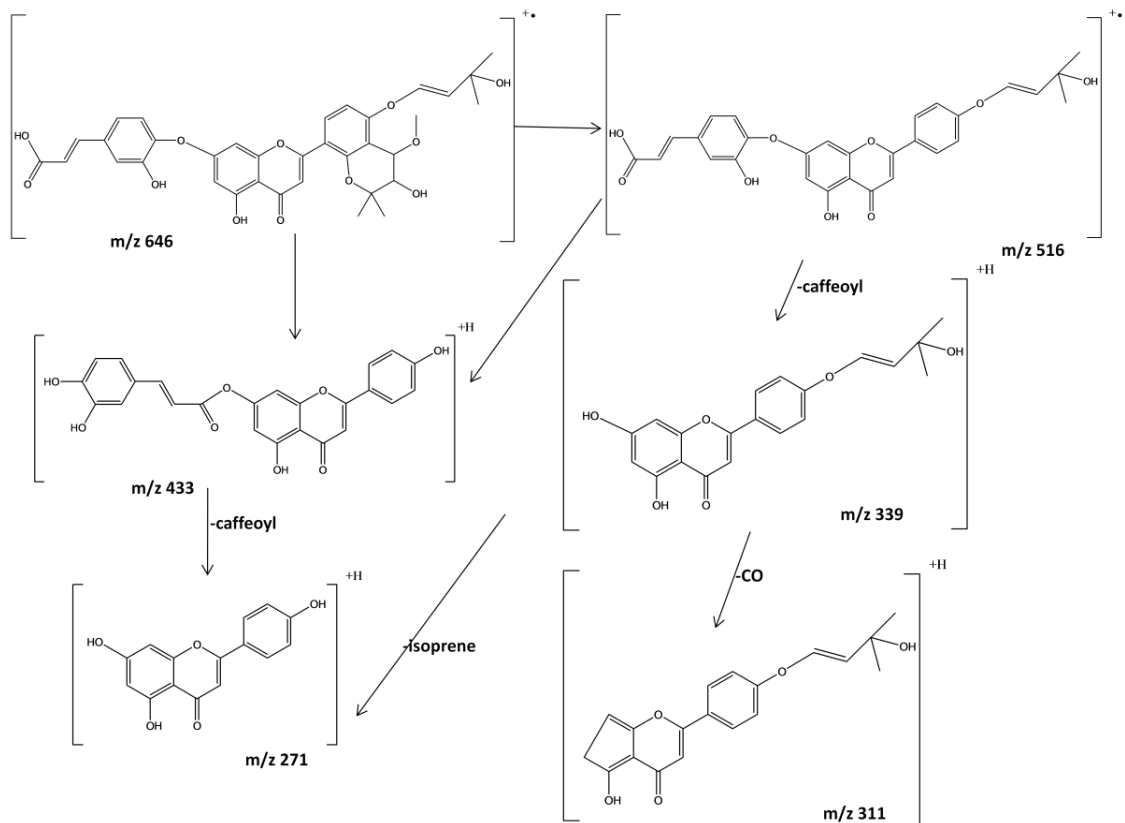
Tgamma #2857 RT: 23.80 AV: 1 SB: 49 23.11-23.28, 24.23-24.45 NL: 6.13E4 microAU



Φάσμα μάζας:



Από το φάσμα υπεριώδους-ορατού της ένωσης συμπεραίνεται ότι πρόκειται για φλαβόνη και πιο συγκεκριμένα για παράγωγο απιγενίνης, με την απορρόφηση στα 322nm να επιβεβαιώνει την ύπαρξη καφεϊκού. Από το φάσμα μάζας προκύπτει ότι το μοριακό ιόν της ένωσης αντιστοιχεί σε $[M+H]^+=645$. Το θραύσμα με m/z 515 προκύπτει με την απομάκρυνση της προσθετικής ομάδας του Β δακτυλίου του φλαβονοειδούς και με την επιπλέον απομάκρυνση και του ισοπρενίου προκύπτει το θραύσμα m/z 433. Το ισοπρένιο προτείνεται ότι συνδέεται με το άγλυκο στην 4' θέση του Β δακτυλίου, λόγω της υπιχρωμικής μετατόπισης της κορυφής I στο φάσμα υπεριώδους-ορατού, ενώ εξαιτίας αυτής της μικρής υπιχρωμίας, το καφεϊκό συνδέεται μέσω αιθερικού και όχι μέσω εστερικού δεσμού με το άγλυκο στο 7-OH, διότι τότε η υπιχρωμική μετατόπιση της κορυφής I θα ήταν μεγαλύτερη (Gabrieli C. et al., 1990). Η συγκεκριμένη προσθετική ομάδα και ο τύπος του ισοπρενίου απαντώνται σε φλαβονοειδή που έχουν απομονωθεί από το γένος *Tephrosia* (Jang D.S. et al., 2003; Khalafallah A.K. et al., 2009). Το θραύσμα με m/z 339 προκύπτει από το 515 με την απομάκρυνση της καφεοϋλομάδας, και από αυτό με απομάκρυνση ενός (-CO) προκύπτει το θραύσμα με m/z 311, ενώ το θραύσμα με m/z 271 αντιστοιχεί στο άγλυκο απιγενίνη. Η θραυσμάτωση του μητρικού μορίου παρατίθεται παρακάτω.

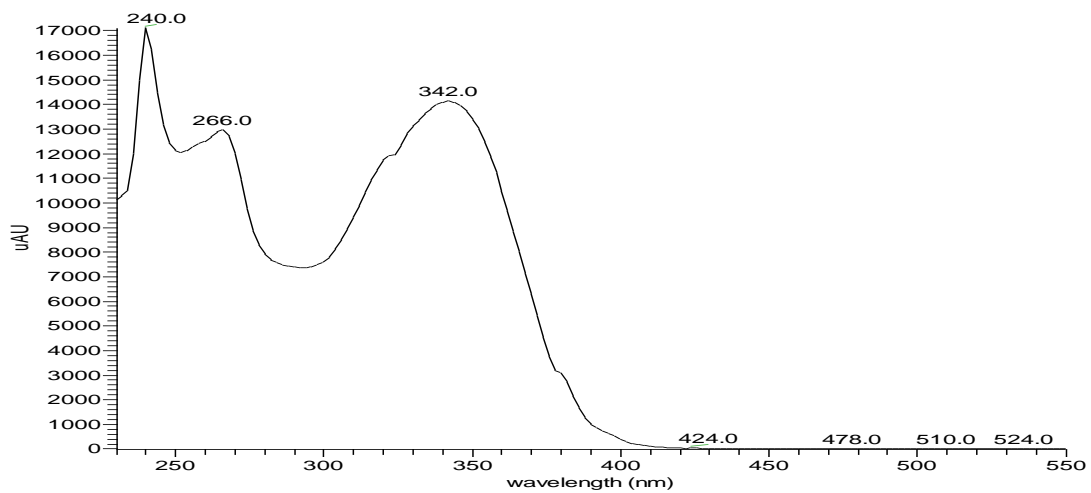


Ένωση 15: 7-O-[κουμαροϋλο/καφεοϋλο] παράγωγο της απιγενίνης

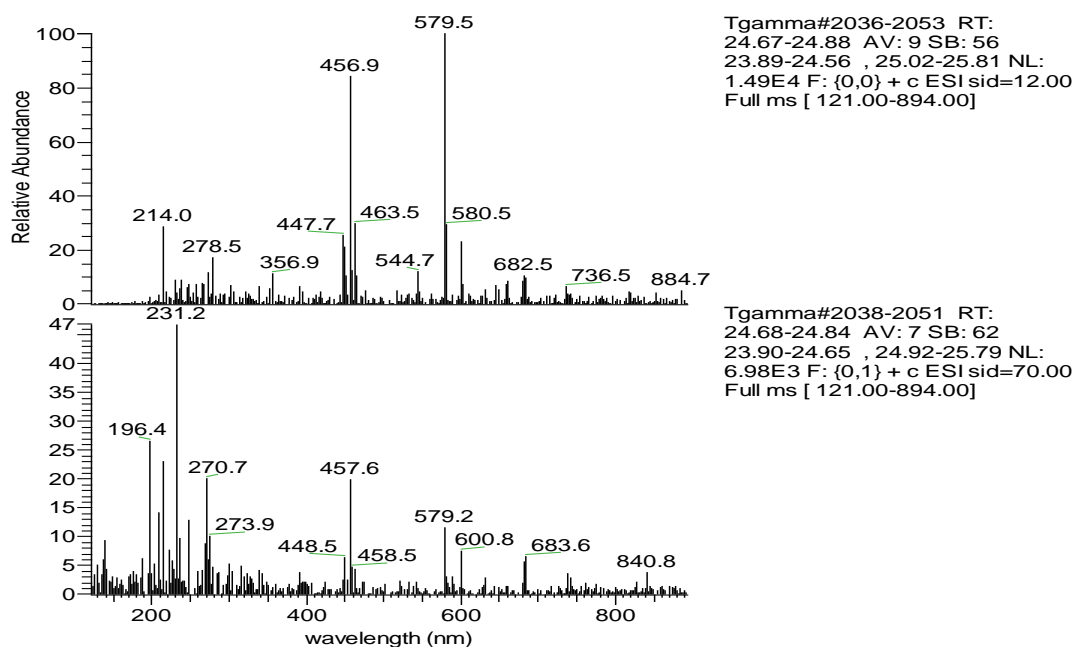
Χρόνος κατακράτησης: 24.63min

Φάσμα UV-Vis:

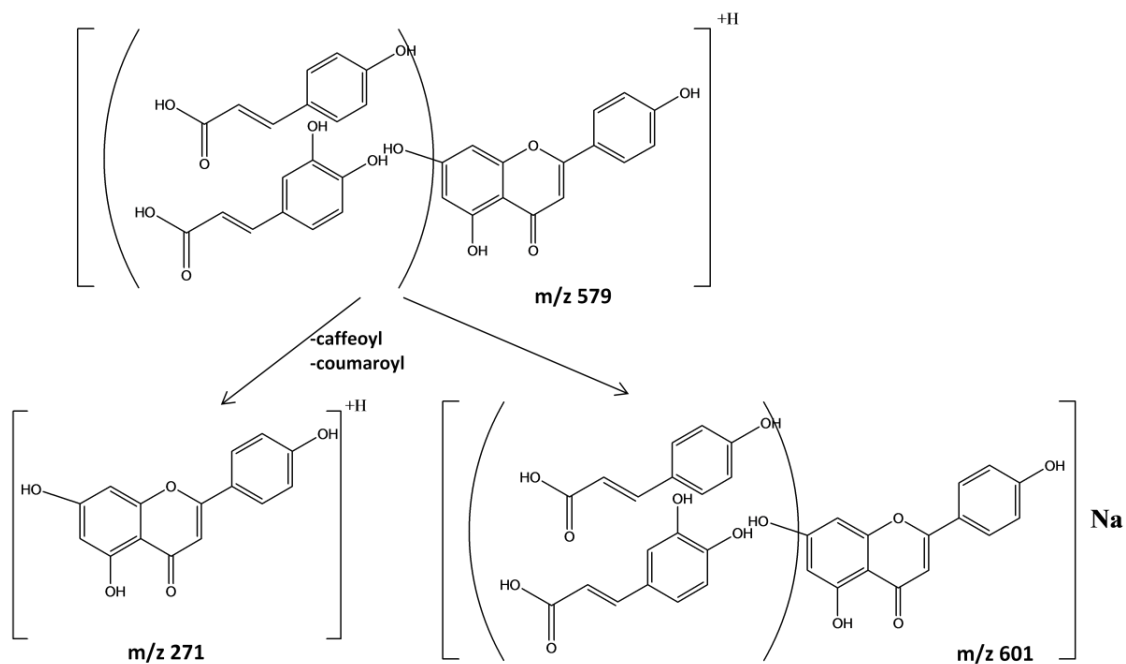
Tgamma #2958 RT: 24.64 AV: 1 SB: 2 24.27, 24.87 NL: 1.71E4 microAU



Φάσμα μάζας:



Από το φάσμα υπεριώδους-ορατού της ένωσης συμπεραίνεται ότι πρόκειται για φλαβόνη συνδεδεμένη με οξύ στη θέση 7 και πιο συγκεκριμένα για παράγωγο απιγενίνης με καφεϊκό και κουμαρικό οξύ (Fabry et al., 1970). Από το φάσμα μάζας προκύπτει ότι το μοριακό ιόν της ένωσης είναι $[M+H]^+=579$ και σταθεροποιείται με την προσθήκη νατρίου $[M+Na]=601$, τιμές που εμφανίζονται και στη χαμηλή, αλλά και στην υψηλή τάση. Το ιόν με m/z 271 αντιστοιχεί στο άγλυκο απιγενίνη, μετά την απομάκρυνση και του καφεϊκού και του κουμαρικού $[M-(\text{καφεϊκό-OH})-(\text{κουμαρικό-OH})+H]^+$. Λόγω της τιμής της κορυφής I στο φάσμα υπεριώδους-ορατού, συμπεραίνεται ότι το καφεϊκό συνδέεται μέσω αιθερικού δεσμού με την απιγενίνη, και όχι μέσω εστερικού, διότι δεν παρατηρείται υψιχρωμική μετατόπιση της κορυφής I στο φάσμα. Ωστόσο η διευκρίνιση της σειράς των οξέων στη σύνδεσή τους με την απιγενίνη δεν κατέστη δυνατή με τις υπάρχουσες πληροφορίες. Η θραυσμάτωση του μητρικού μορίου παρατίθεται παρακάτω.

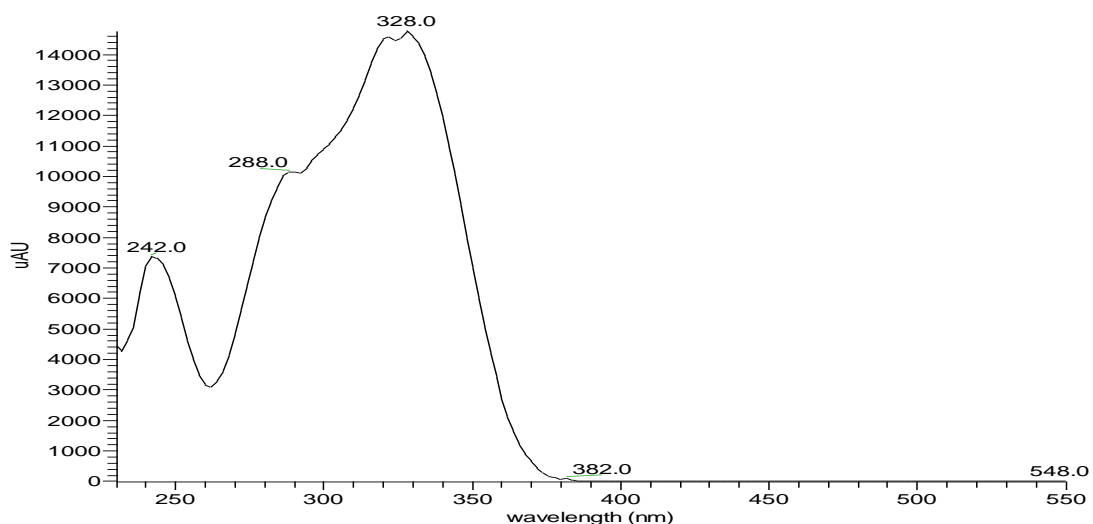


Ένωση 16: Παράγωγο του [2,6-διυδροξυ-4-υδροξυλ-4-καρβοξυλ-1-καρβοξυλο]-κυκλοεξανίου με 4-υδροξυ-3,5-διοξοκυκλοεξανο-καρβοξυλικό οξύ και βανιλλικά οξέα

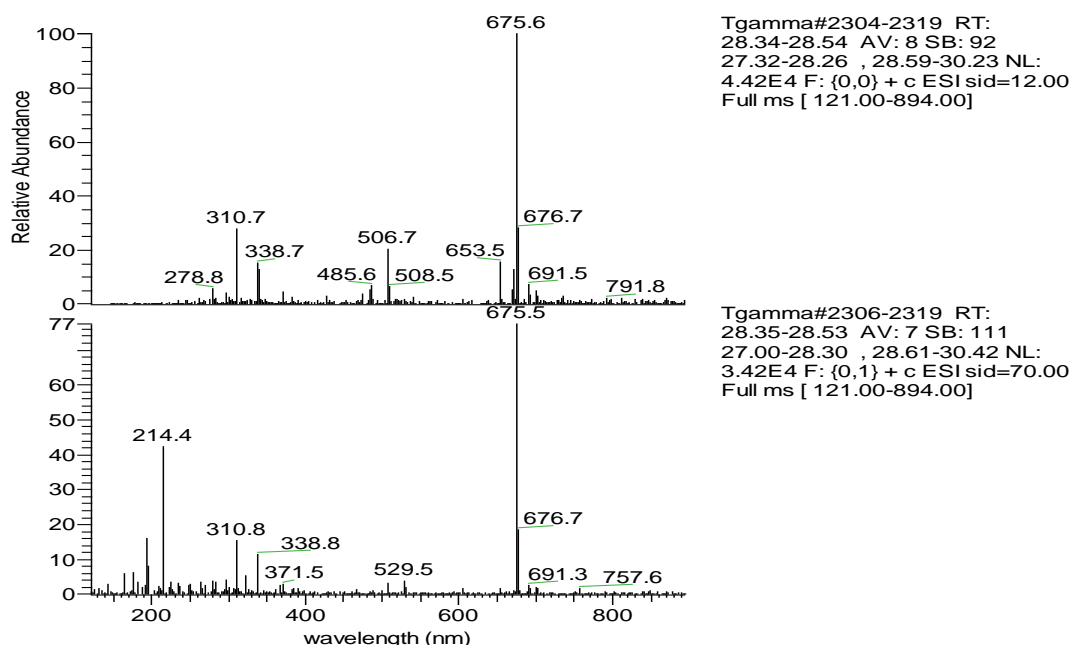
Χρόνος κατακράτησης: 28.31min

Φάσμα UV-Vis:

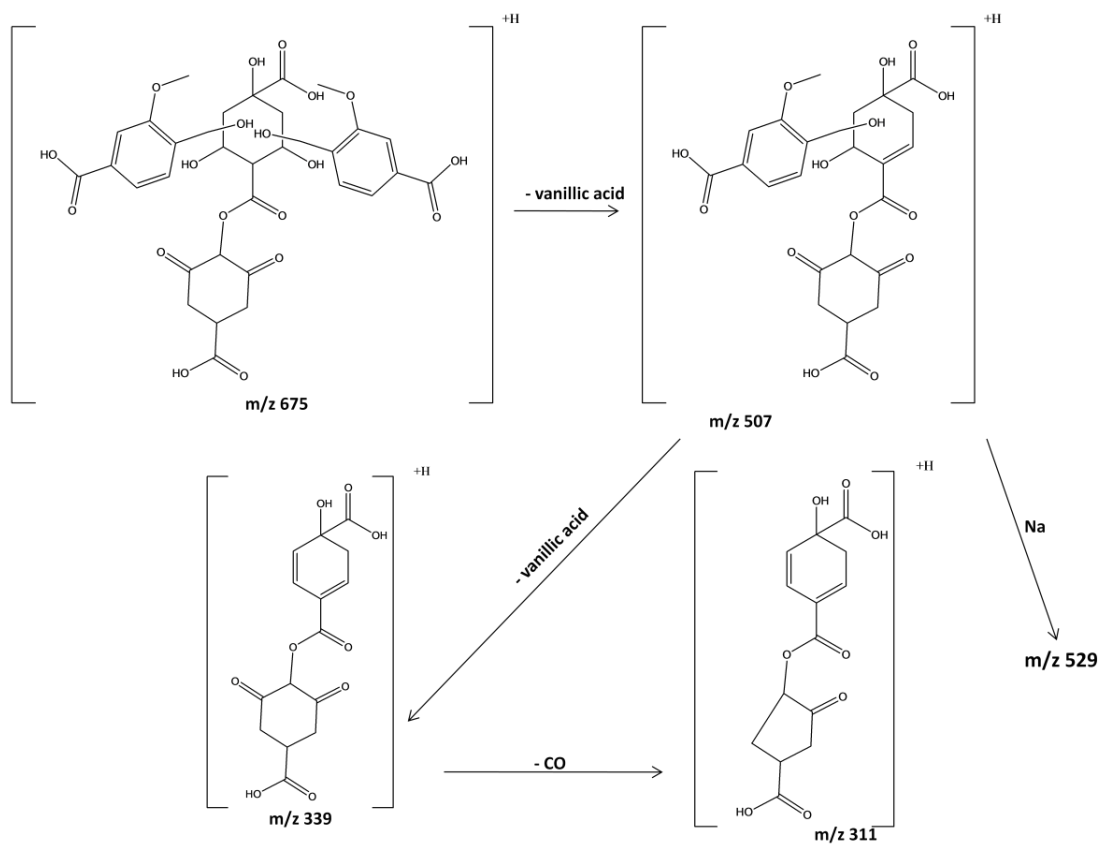
Tgamma #3394 RT: 28.28 AV: 1 SB: 2 28.12, 28.47 NL: 1.48E4 microAU



Φάσμα μάζας:



Το μοριακό ιόν της ένωσης με πρωτόνιο $[M+H]$ διακρίνεται με m/z 675. Το ιόν αυτό αντιστοιχεί στο μόριο του κιννικού οξέως με καρβοξύλιο σε ένα από τα τρία υδροξύλιά του, το οποίο στις δύο από τις υδροξυλομάδες του, έχει αιθεροποιημένα τα δύο βανιλλινικά οξέα και στο καρβοξύλιό του ένα 4-υδροξυ-3,5-διοξοκυκλοεξανο-καρβοξυλικό οξύ (IUPAC). Το τελευταίο αποτελεί προτεινόμενη δομή (artefact) εκ συνθέσεως (Patent US5318987-Deposit Date:15/06/2012), ενώ το [2,6-διυδροξυ-4-υδροξυλ-4-καρβοξυλ-1-καρβοξυλο]-κυκλοεξάνιο εμφανίζεται ως παράγωγο εκ συνθέσεως (Jones P.S. et al., 1999). Ως τρόπος σύνδεσης των βανιλλικών οξέων προτείνεται ο αιθερικός, έτσι ώστε η διαμόρφωσή τους με τις καρβοξυλομάδες εκτεθειμένες, να δικαιολογεί το υψηλό χρόνο κατακράτησης λόγω φαινομένων προσρόφησης. Το θραύσμα με m/z 507, το οποίο διακρίνεται στα 12eV αντιστοιχεί σε απώλεια ενός ολόκληρου βανιλλικού οξέος από το μητρικό μόριο $[M-(\text{βανιλλικό οξύ})+H]^+$ και σταθεροποιείται με Na σε m/z 529. Από το προηγούμενο θραύσμα, με επιπλέον απομάκρυνση και του δεύτερου βανιλλικού οξέος-εξ ολοκλήρου-, προκύπτει το θραύσμα με m/z 339 $[M-(\text{βανιλλικό οξύ})-(\text{βανιλλικό οξύ})+H]^+$, που διακρίνεται στα 12eV και 70eV. Το θραύσμα με m/z 311 προκύπτει από το 339 με απομάκρυνση ενός (-CO) από τον κορεσμένο εξαμελή δακτύλιο. Η προτεινόμενη θραυσμάτωση του μητρικού μορίου δίνεται παρακάτω.



Κατανομή υπολείμματος οξικού αιθυλεστέρα (T.E.A. Res)

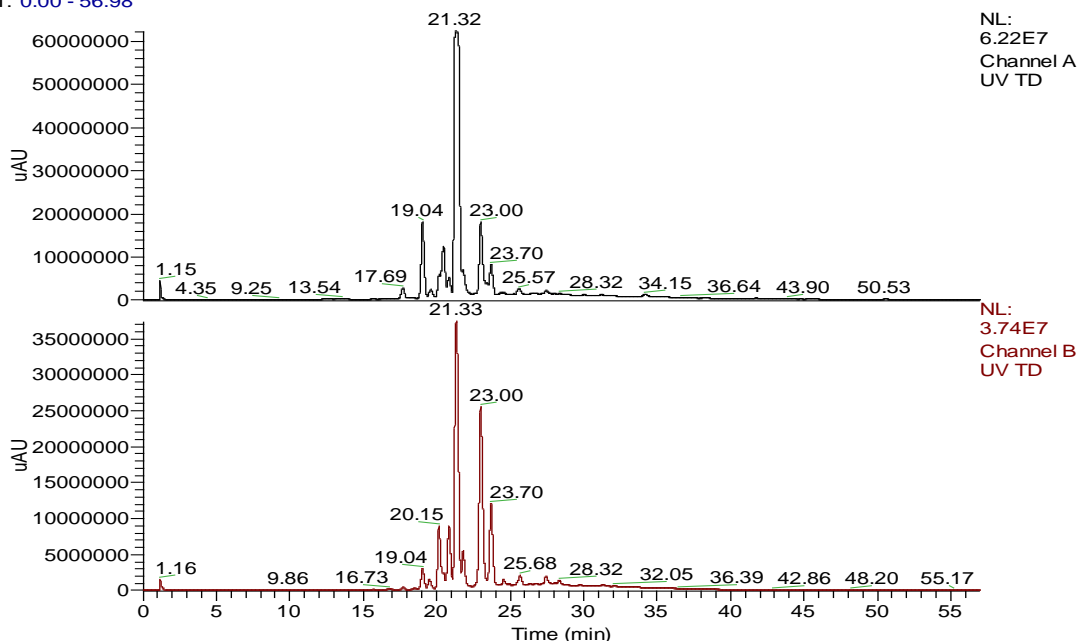
Superspher 100-4, 4 μ , (125x2mm) RP18 Macherey Nagel

Time (min)	H ₂ O(+2.5%AcOH)	MeOH
0	100	0
2	100	0
52	0	100
57	0	100

Flow rate: 0.33ml/min; inj. vol: 10 μ l; DAD: 278, 340 nm

Ionization Mode:	ESI+	Ionization Mode:	Electrospray
Capillary (kV):	4.0	None in use.	
Source Voltage (V):	40 ⁰ C	1 +ve 12	
Probe Temperature (°C):	400 ⁰ C	2 +ve 70	
RF Lens (V):	0.3	Scans per Second:	0.7
Ion Energy (eV):	1.0	Scan Range Start (amu):	121
Ion Energy Ramp (mV/amu):	0.5	Scan Range End (amu):	894
Detector Voltage (V):	650		
Low Mass Resolution:	12.5		
High Mass Resolution:	16.5		

RT: 0.00 - 56.98



N ^o	R _t (min)	[M+H] ⁺ (m/z)	Θραύσματα (m/z) στα 12 eV (%R.I.)	Θραύσματα (m/z) στα 70 eV (%R.I.)	UV-Vis λ _{max} (nm)	Διευκρίνιση δομής
17	19.04	597	289, 311, 451,	289, 311, 435,	238, 284,	7-O-[κουμαρούλ-καφεούλο]-

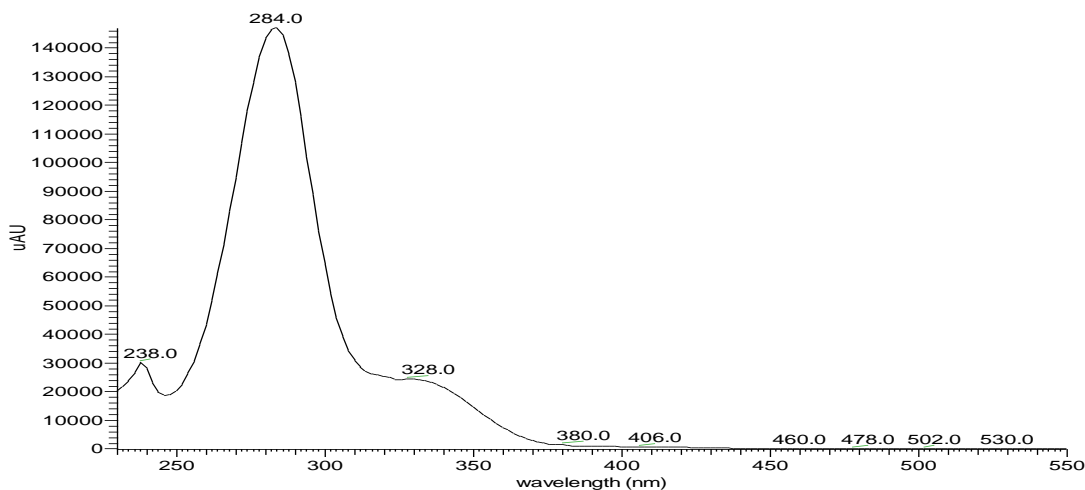
			597, 619	597, 619	328	αιθέρας της εριοδικτυόλης
18	20.15	625	325, 471, 625, 643, 647	279, 325, 647	244, 322sh, 330	[Διυδροκιναμοϋλ-διυδροκουμαροϋλ-γαλλοϋλο]-διστερας του κιννικου οξεος
19	21.32	581	273, 339, 435, 581	273, 581, 603	280, 328	7-O-[κουμαροϋλ-καφεοϋλο]-αιθερας της ναριγγενινης
20	23.00	433	271, 433, 455, 865, 887	271, 433, 455, 887	266, 322sh, 338	7-O-καφεϊκος αιθερας της απιγενινης
21	23.70	579	271, 463, 579, 601	271, 463, 579, 601	264, 342	7-O-[κουμαροϋλ-καφεοϋλο] παραγωγο της απιγενινης

Ένωση 17: 7-O-[κουμαροϋλ-καφεοϋλο]-αιθερας της εριοδικτυόλης

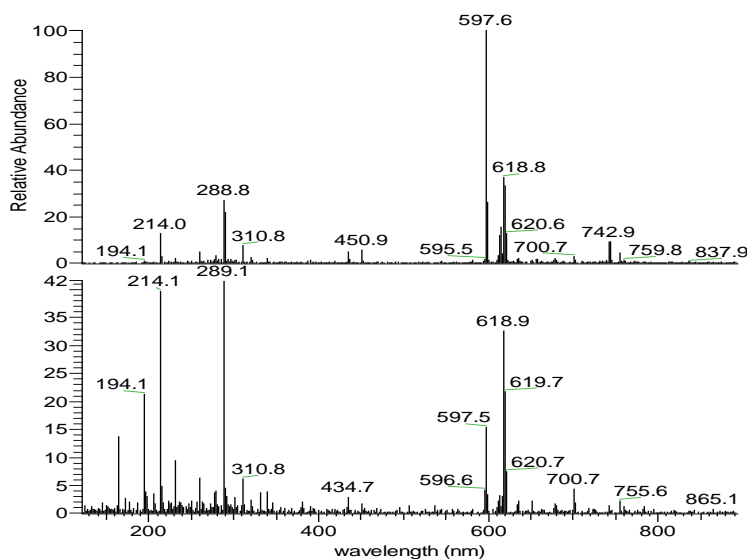
Χρόνος κατακράτησης: 19.04min

Φάσμα UV-Vis:

TD #2287 RT: 19.05 AV: 1 SB: 38 18.54-18.77, 19.29-19.37 NL: 1.47E5 microAU



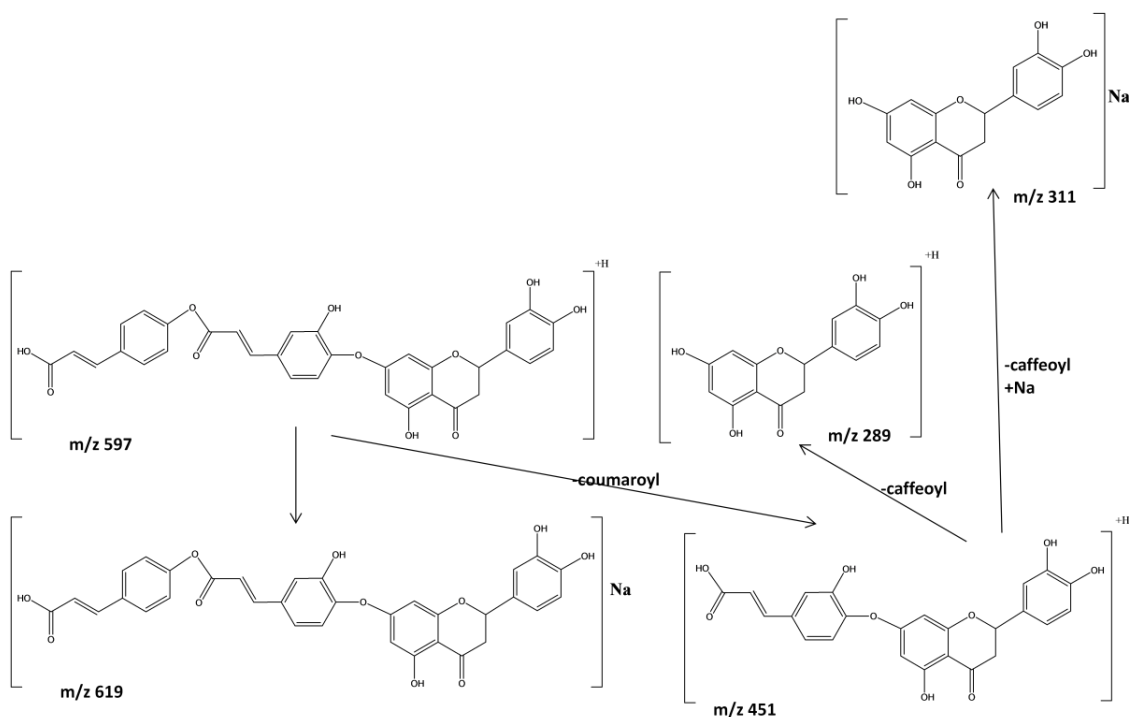
Φάσμα μάζας (Do NOT consider 214, 194, 165)



TD#1595-1616 RT: 19.03-19.28
AV: 11 SB: 77 18.12-18.97 ,
19.33-20.31 NL: 6.53E4 F: {0,0} + c
ESI sid=12.00 Full ms [
121.00-894.00]

TD#1605-1609 RT: 19.17-19.19
AV: 2 SB: 49 18.51-19.09 ,
19.28-19.86 NL: 2.71E4 F: {0,1} + c
ESI sid=70.00 Full ms [
121.00-894.00]

Από το φάσμα υπεριώδους-ορατού της ένωσης συμπεραίνεται ότι πρόκειται για φλαβανόνη και πιο συγκεκριμένα για παράγωγο εριοδικτυόλης. Από το φάσμα μάζας προκύπτει ότι το μοριακό ιόν της ένωσης είναι το $[M+H]^+=597$ και σταθεροποιείται με την προσθήκη νατρίου $[M+Na]=619$, τιμές που εμφανίζονται και στη χαμηλή, αλλά και στην υψηλή τάση. Λόγω της υψηλής έντασης του θραύσματος m/z 289, προτείνεται ότι το πρώτο οξύ (καφεϊκό) συνδέεται μέσω αιθερικού δεσμού με την εριοδικτυόλη και από την υπιχρωμική μετατόπιση της κορυφής II στο φάσμα υπεριώδους-ορατού, συμπεραίνεται ότι είναι δεσμευμένο στο 7-OH, με το 4'-OH ελεύθερο (Mabry et al., 1970). Στην χαμηλή τάση των 12eV, παρατηρείται το ιόν που προκύπτει από την απόσπαση και του τμήματος του κουμαρικού και αντιστοιχεί σε m/z 451= $[M-(\text{κουμαρικό-OH})+H]^+$. Το ιόν με m/z 289 αντιστοιχεί στην εριοδικτυόλη $[M-(\text{κουμαρικό-OH})-(\text{καφεϊκό-OH})+H]^+$ και σταθεροποιείται με την προσθήκη νατρίου σε m/z 311. Το θραύσμα με m/z 743 φαίνεται να αντιστοιχεί σε adduct του 597 με κουμαρικό $[597+(\text{κουμαρικό-H}_2\text{O})]$. Η θραυσμάτωση του μορίου δίνονται στο παρακάτω σχήμα.

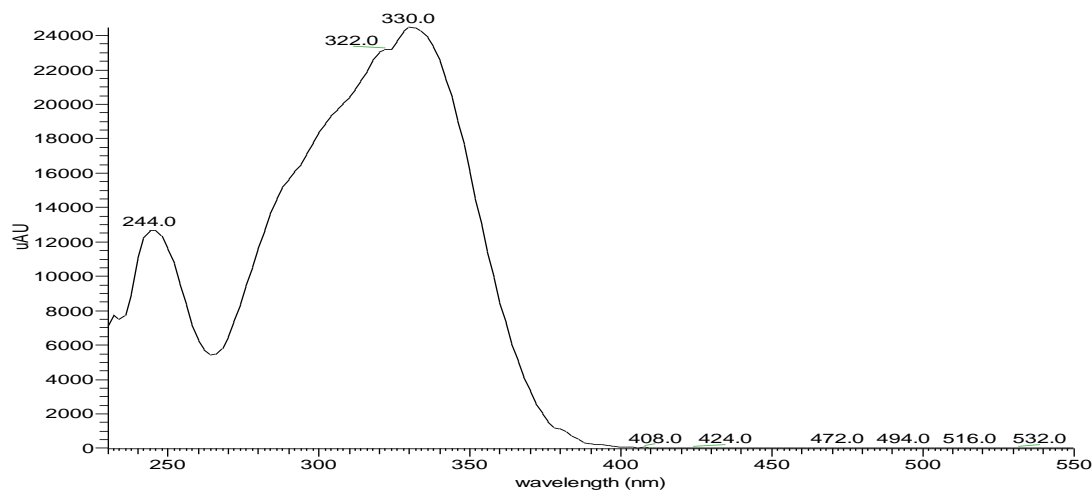


Ένωση 18: [Διυδροκιναμοΰλ-διυδροκουμαροΰλ-γαλλοΰλο]-διεστέρας του κιννικού οξέος

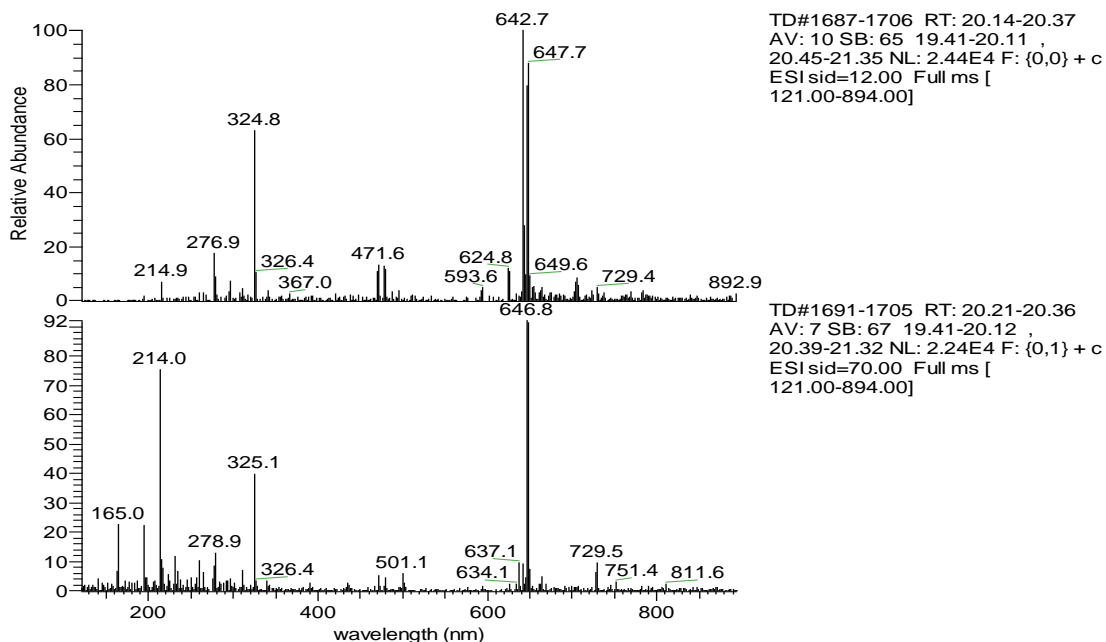
Χρόνος κατακράτησης: 20.15min

Φάσμα UV-Vis:

TD #2406 RT: 20.04 AV: 1 SB: 15 19.85-19.96, 20.29 NL: 2.45E4 microAU

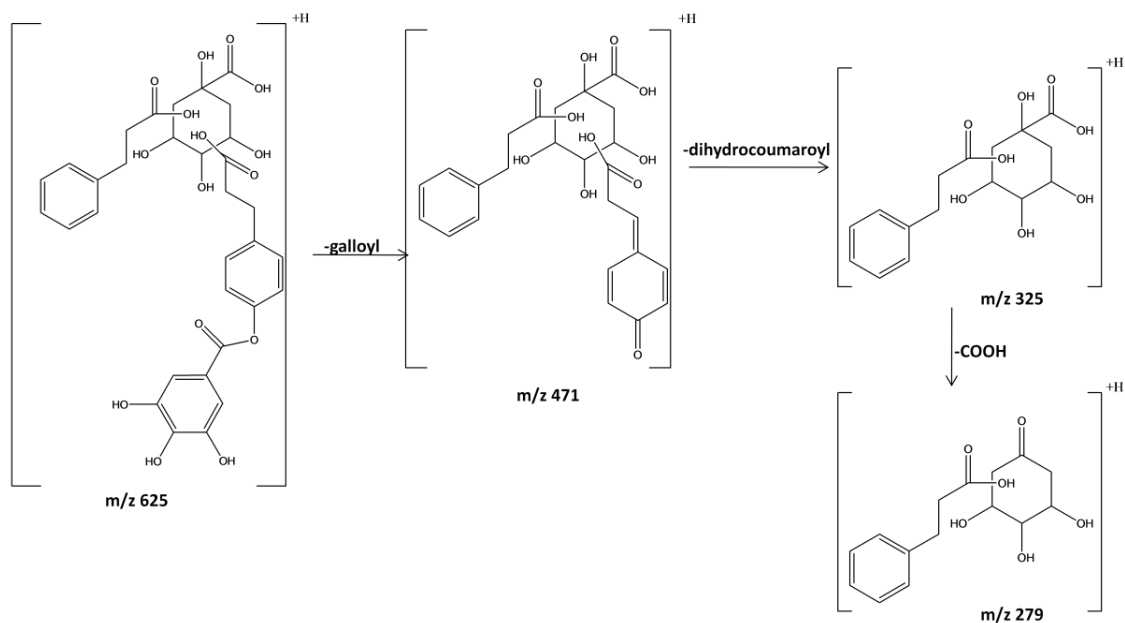


Φάσμα μάζας: (Do NOT consider 214, 165)



Το μοριακό ιόν της ένωσης με πρωτόνιο $[M+H]^+$ διακρίνεται με m/z 625. Το ιόν αυτό αντιστοιχεί στο μόριο του κιννικού οξέως το οποίο, σε δύο από τις υδροξυλομάδες του, έχει εστεροποιημένα ένα διυδροκιναμωμικό οξύ, ένα διυδροκουμαρικό οξύ και το γαλλικό οξύ να ενώνεται με το τελευταίο. Επειδή δεν γνωρίζουμε τις θέσεις εστεροποίησης των παραπάνω οξέων, δίνουμε τον τύπο του

κιννικού οξέως με 'ανοιχτές' τις θέσεις εστεροποίησης. Τα θραύσματα με m/z 643 και 647 αντιστοιχούν στα $[M+H+(H_2O)]^+$ και $[M+Na]^+$ αντίστοιχα. Το θραύσμα με m/z 471, το οποίο διακρίνεται και στα 12eV, αντιστοιχεί σε απώλεια του γαλλικού οξέος από το μητρικό μόριο $[M-(\text{γαλλικό οξύ-OH})+H]^+$. Από το προηγούμενο θραύσμα, με επιπλέον απομάκρυνση του διυδροκουμαρικού οξέος, προκύπτει το θραύσμα με m/z 325 $[M-(\text{διυδροκουμαρικό οξύ-OH})-(\text{γαλλικό οξύ-OH})+H]^+$, που διακρίνεται και στα 12eV και στα 70eV και από αυτό με την απομάκρυνση της καρβοξυλομάδας του κιννικού, προκύπτει το θραύσμα με m/z 279. Η θραυσμάτωση του μητρικού μορίου δίνονται παρακάτω.

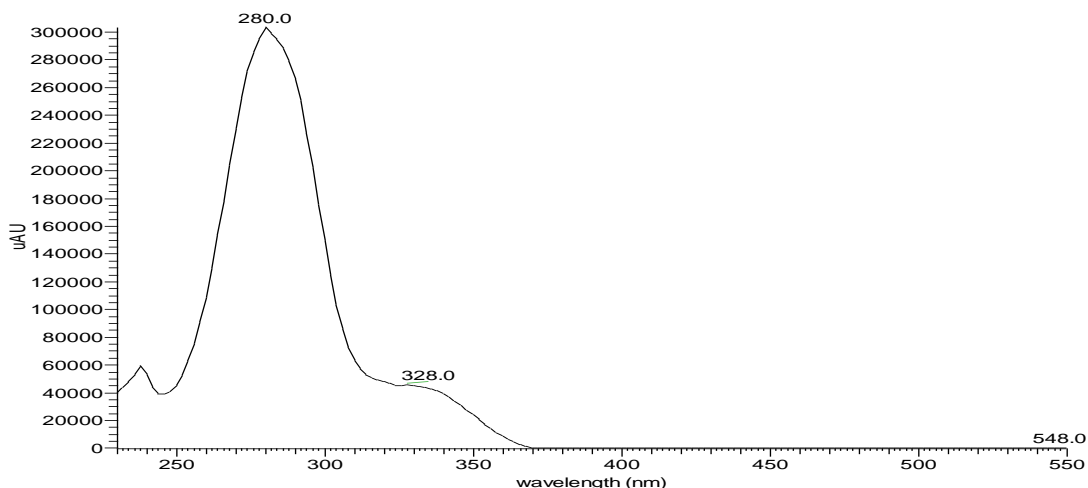


Ένωση 19: 7-O-[κουμαρούλ-καφεούλο]-αιθέρας της ναριγγενίνης

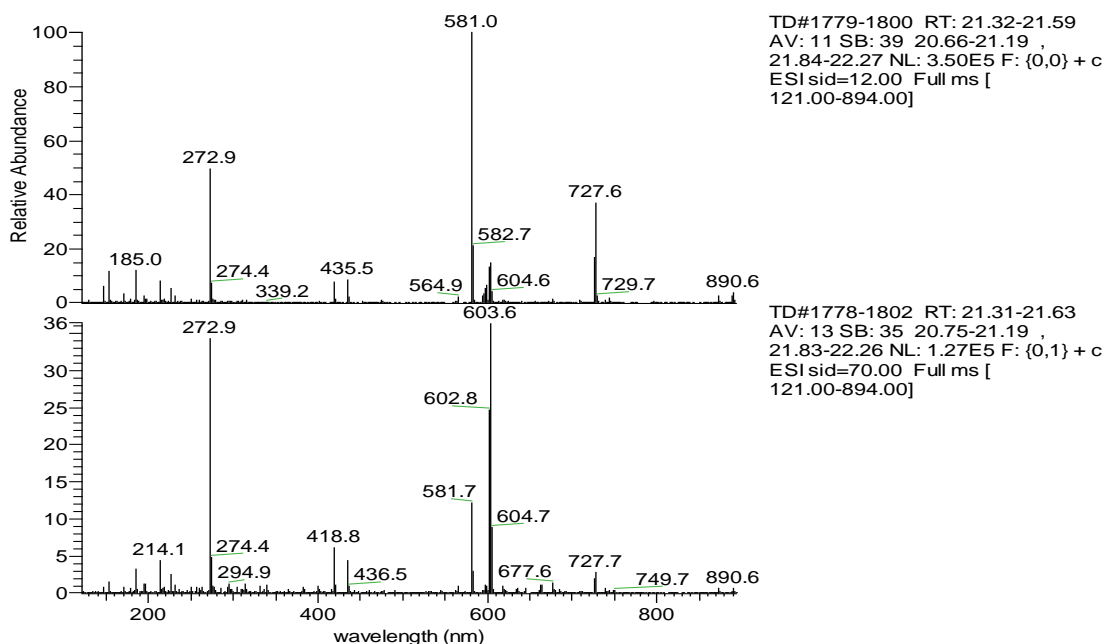
Χρόνος κατακράτησης: 21.32min (ΙΔΙΟ με την ένωση 5 με χρόνο κατακράτησης 21.29)

Φάσμα UV-Vis:

TD #2587 RT: 21.55 AV: 1 SB: 42 20.95-21.10, 21.65-21.83 NL: 3.03E5 microAU

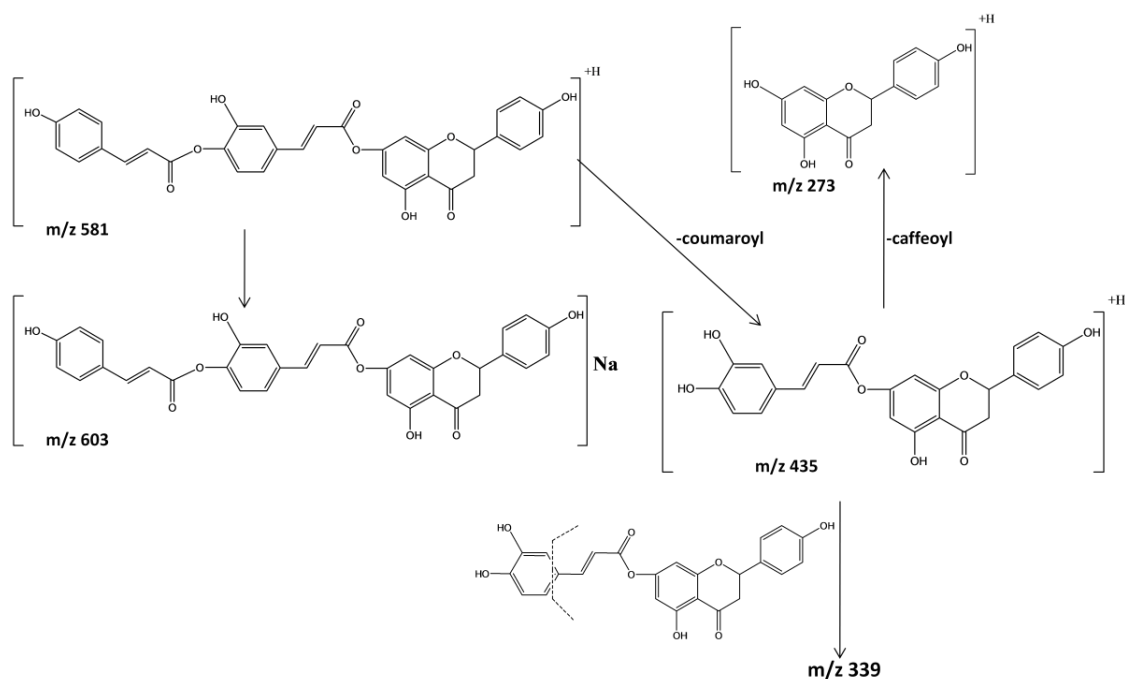


Φάσμα μάζας:



Από το φάσμα υπεριώδους-ορατού της ένωσης συμπεραίνεται ότι πρόκειται για φλαβανόνη και πιο συγκεκριμένα για παράγωγο ναριγγενίνης. Από το φάσμα μάζας προκύπτει ότι το μοριακό ιόν της ένωσης είναι $[M+H]^+=581$ που σταθεροποιείται με την προσθήκη νατρίου $[M+Na]=603$. Λόγω της υψηλής έντασης του θραύσματος 581 και των χαμηλών εντάσεων των θραυσμάτων 273, προκύπτει ότι το πρώτο οξύ

(καφεϊκό) συνδέεται με εστερικό δεσμό με το άγλυκο και το δεύτερο οξύ (κουμαρικό) συνδέεται μέσω εστέρα με το καφεϊκό, καθότι έχουν βρεθεί και οξέα που συνδέονται μέσω εστερικού δεσμού με φλαβανόνες στην 7-θέση (Hoeneisen M. et al., 1993). Επιπροσθέτως, από το φάσμα υπεριώδους-ορατού, προκύπτει ότι το υδροξύλιο της θέσης 4' του Β δακτυλίου του φλαβονοειδούς παραμένει ελεύθερο και λόγω της υψιχρωμικής μετατόπισης της κορυφής II του αγλύκου, προτείνεται ότι το υδροξύλιο της θέσης 7 είναι υποκατεστημένο (Mabry et al., 1970; Hoeneisen M. et al., 1993). Στη χαμηλή τάση των 12eV το θραύσμα 435 αντιστοιχεί στο [M-(κουμαρικό-OH)+H]⁺. Τέλος, το ιόν με m/z 273 αντιστοιχεί στο άγλυκο ναριγγενίνη, μετά την απομάκρυνση και του κουμαρικού. Το θραύσμα με m/z 727 φαίνεται να αντιστοιχεί σε adduct του 581 με κουμαρικό [581+(κουμαρικό-H₂O)]. Στο παρακάτω σχήμα παρατίθεται η θραυσμάτωση του μορίου.

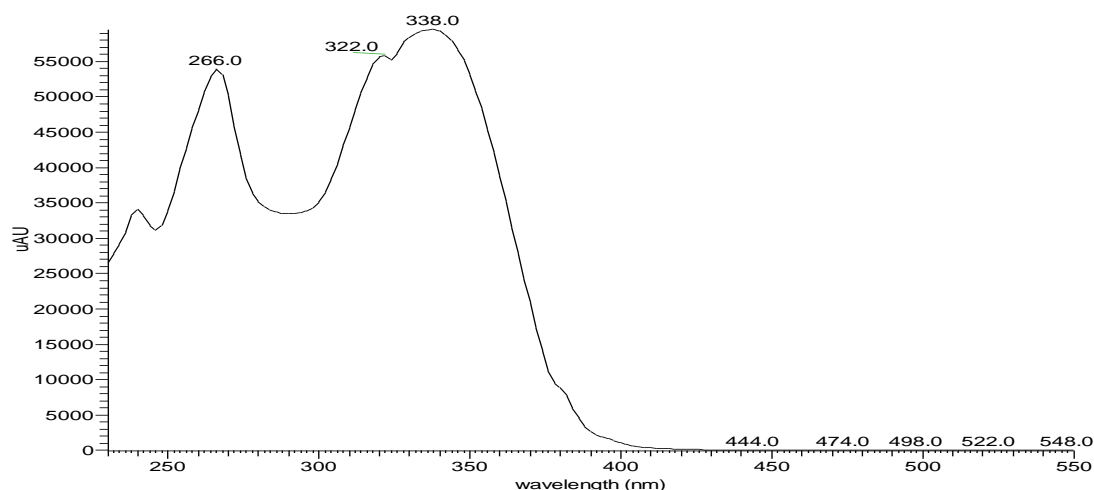


Ένωση 20: 7-O-καφεϊκός αιθέρας της απιγενίνης

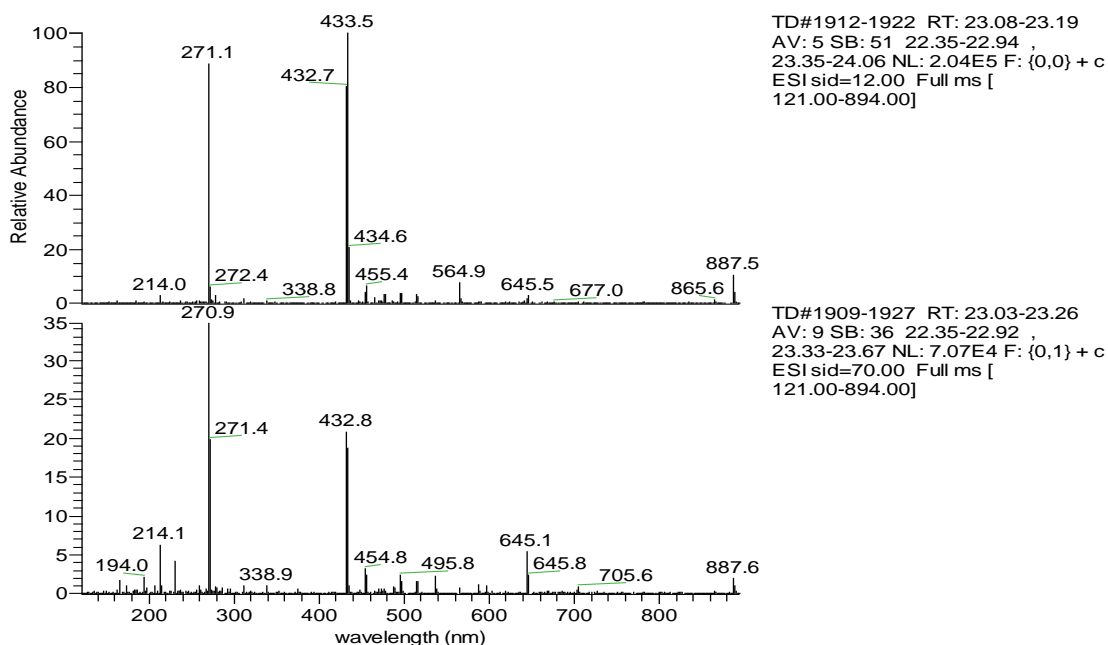
Χρόνος κατακράτησης: 23.00min

Φάσμα UV-Vis:

TD #2783 RT: 23.18 AV: 1 SB: 87 22.25-22.80, 23.33-23.49 NL: 5.95E4 microAU

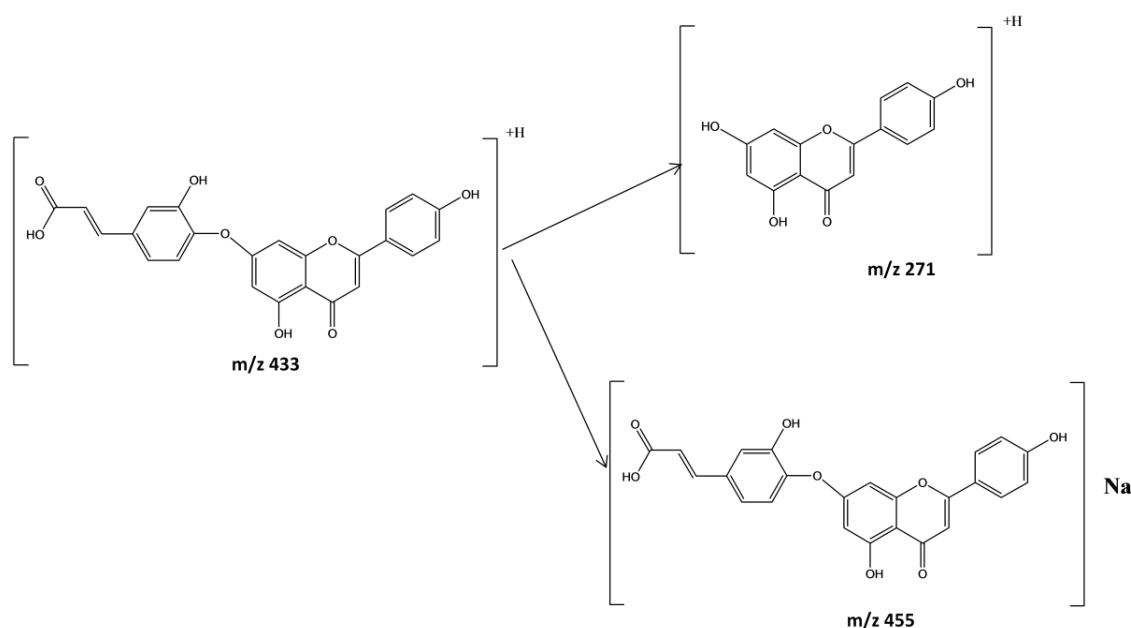


Φάσμα μάζας:



Από το φάσμα υπεριώδους-ορατού της ένωσης συμπεραίνεται ότι πρόκειται για φλαβόνη και πιο συγκεκριμένα για παράγωγο απιγενίνης, με την απορρόφηση στα 322nm να επιβεβαιώνει την ύπαρξη καφεϊκού. Από το φάσμα μάζας προκύπτει ότι το μοριακό ιόν της ένωσης είναι $[M+H]^+ = 433$ και σταθεροποιείται με την προσθήκη νατρίου $[M+Na] = 455$, τιμές που εμφανίζονται και στη χαμηλή, αλλά και στην υψηλή τάση. Λόγω της υψηλής έντασης του θραύσματος του 271, καθώς και από την τιμή

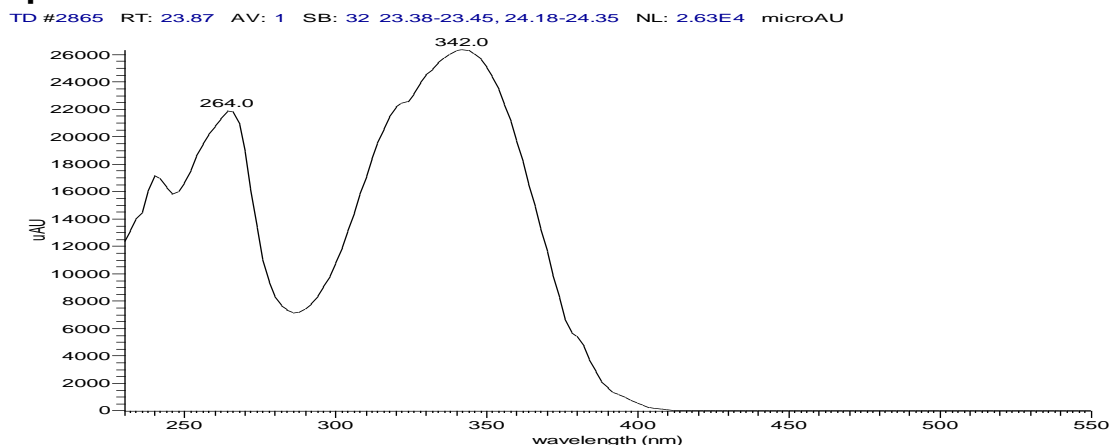
της κορυφής I στο φάσμα υπεριώδους-ορατού, συμπεραίνεται ότι το καφεϊκό συνδέεται μέσω αιθερικού δεσμού με την απιγενίνη στη θέση 7, και όχι μέσω εστερικού, διότι δεν παρατηρείται υψιχρωμική μετατόπιση της κορυφής I στο φάσμα. Το ιόν με m/z 271 αντιστοιχεί στο άγλυκο απιγενίνη, μετά την απομάκρυνση του καφεϊκού $[M-(\text{καφεϊκό-OH})+H]^+$, ενώ παρατηρούνται και τα θραύσματα 865 και 887 που αντιστοιχούν στα $[2M+H]^+$ και $[2M+Na]$. Η θραυσμάτωση του μητρικού μορίου παρατίθεται παρακάτω.



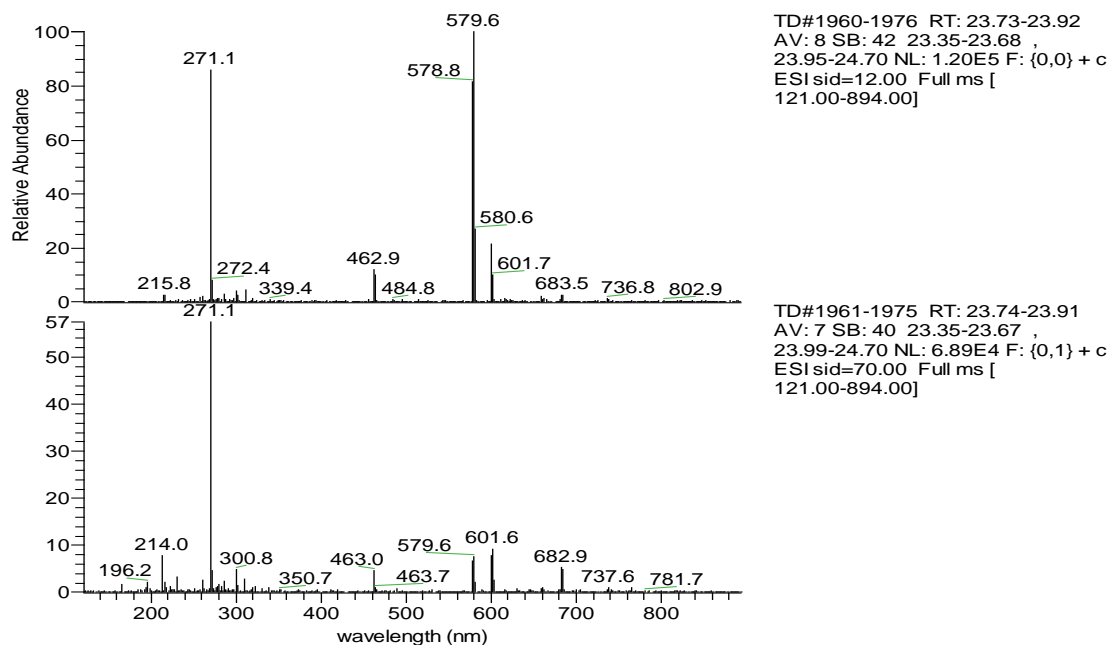
Ένωση 21: 7-O-[κουμαροϋλ-καφεοϋλο] παράγωγο της απιγενίνης

Χρόνος κατακράτησης: 23.70min (ΙΔΙΟ με ένωση 7 σε χρόνο κατακράτησης 23.67)

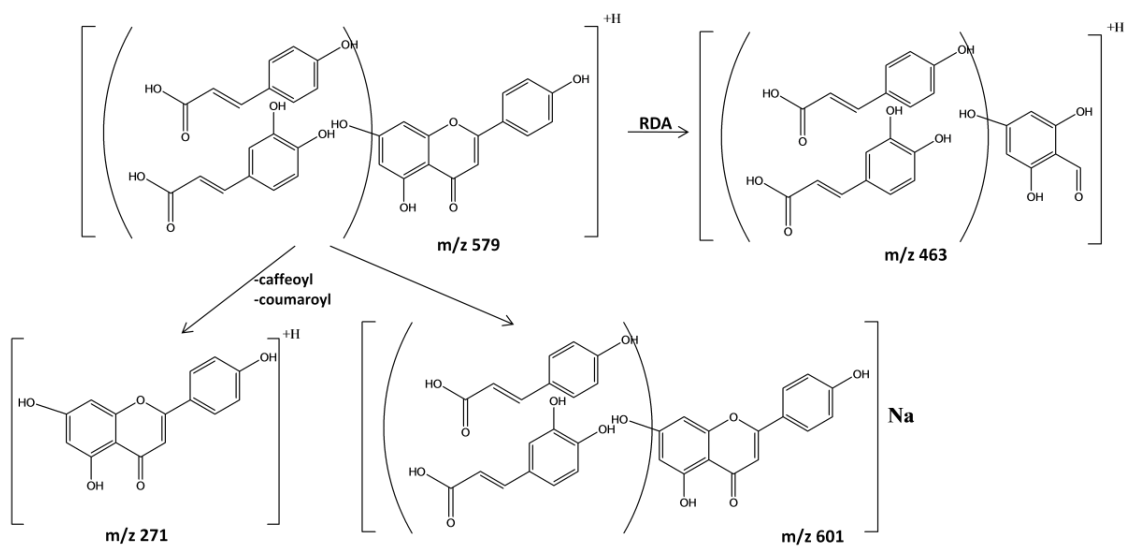
Φάσμα UV-Vis:



Φάσμα μάζας:



Από το φάσμα υπεριώδους-ορατού της ένωσης συμπεραίνεται ότι πρόκειται για φλαβόνη συνδεδεμένη με οξύ στη θέση 7 και πιο συγκεκριμένα για παράγωγο απιγενίνης με καφεϊκό και κουμαρικό οξύ (Fabry et al., 1970). Από το φάσμα μάζας προκύπτει ότι το μοριακό ιόν της ένωσης είναι $[M+H]^+=579$ και σταθεροποιείται με την προσθήκη νατρίου $[M+Na]=601$, τιμές που εμφανίζονται και στη χαμηλή, αλλά και στην υψηλή τάση. Το ιόν με m/z 271 αντιστοιχεί στο άγλυκο απιγενίνη, μετά την απομάκρυνση και του καφεϊκού και του κουμαρικού $[M-(\text{καφεϊκό-OH})-(\text{κουμαρικό-OH})+H]^+$. Λόγω της αυξημένης έντασης του αγλύκου (271) και της τιμής της κορυφής I στο φάσμα υπεριώδους-ορατού, συμπεραίνεται ότι το καφεϊκό/κουμαρικό συνδέεται μέσω αιθερικού δεσμού με την απιγενίνη και όχι μέσω εστερικού, διότι δεν παρατηρείται υψιχρωμική μετατόπιση της κορυφής I στο φάσμα. Ωστόσο η διευκρίνιση της σειράς των οξέων στη σύνδεσή τους με την απιγενίνη δεν κατέστη δυνατή με τις υπάρχουσες πληροφορίες. Η θραυσμάτωση της ένωσης παρατίθεται παρακάτω.



Αδιάλυτο ίζημα ηθμού (Terh-Ηθμού)

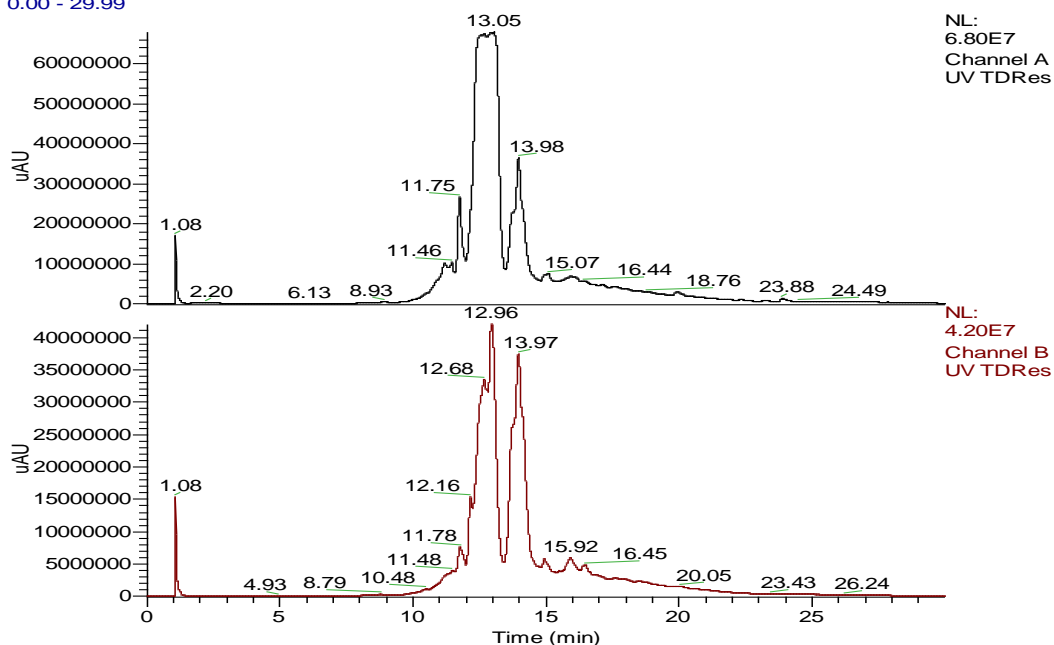
Superspher 100-4, 4 μ , (125x2mm) RP18 Macherey Nagel

Time (min)	H ₂ O(+2.5%AcOH)	MeOH
0	95	5
2	95	5
25	0	100
30	0	100

Flow rate: 0.33ml/min; inj. vol: 10 μ l; DAD: 278, 340 nm

Ionization Mode:	ESI+	Ionization Mode:	Electrospray
Capillary (kV):	4.0	None in use.	
Source Voltage (V):	40 ⁰ C	1 +ve 12	
Probe Temperature (°C):	400 ⁰ C	2 +ve 70	
RF Lens (V):	0.3	Scans per Second:	0.7
Ion Energy (eV):	1.0	Scan Range Start (amu):	121
Ion Energy Ramp (mV/amu):	0.5	Scan Range End (amu):	894
Detector Voltage (V):	650		
Low Mass Resolution:	12.5		
High Mass Resolution:	16.5		

RT: 0.00 - 29.99



N ^o	R _t (min)	[M+H] ⁺ (m/z)	Θραύσματα (m/z) στα 12 eV (%R.I.)	Θραύσματα (m/z) στα 60 eV (%R.I.)	UV-Vis λ _{max} (nm)	Διευκρίνιση δομής
22	12.68	581	273, 419, 449, 581, 603	273, 419, 449, 581, 603	278, 334	7-O-ραμνο-γλυκοζίτης της ναριγγενίνης

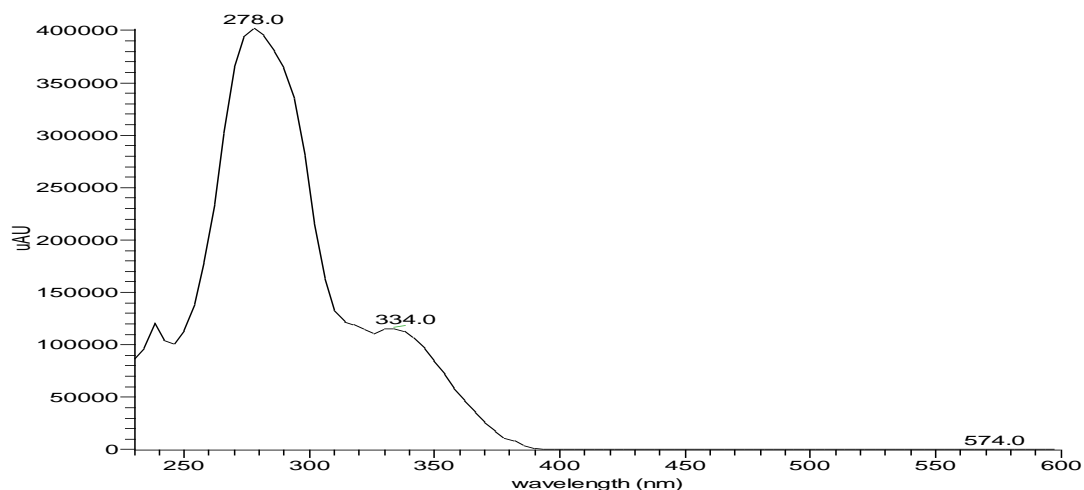
23	12.96	581	273, 435, 581	273, 581, 603	278, 330	7-O-ραμνογλυκοζίτης της ναριγγενίνης
24	13.65	647	271, 433, 579, 647	271, 433, 579, 647	266, 338	Πρενυλιωμένος 7-O-ραμνογλυκοζίτης της απιγενίνης
25	14.17	683	271, 433, 579, 601, 705	195, 271, 433, 463, 579, 601, 683	266, 318, 338	7-O-Βενζοϋλο-ραμνογλυκοζίτης της απιγενίνης

Ένωση 22: 7-O-ραμνο-γλυκοζίτης της ναριγγενίνης

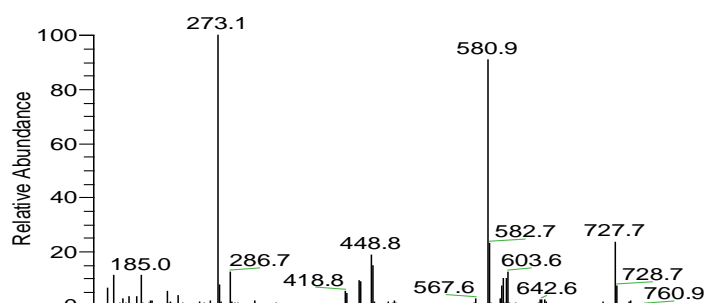
Χρόνος κατακράτησης: 12.68min

Φάσμα UV-Vis:

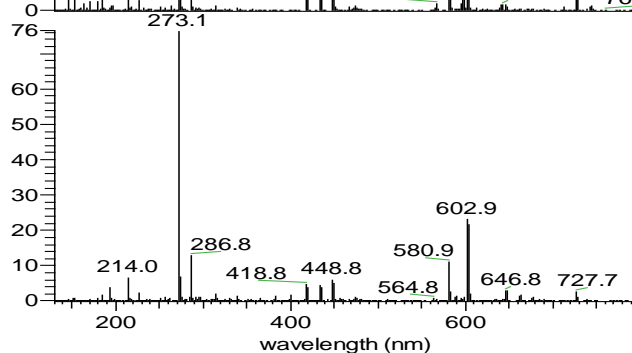
TDRes #743 RT: 12.37 AV: 1 SB: 2 12.00, 14.58 NL: 4.02E5 microAU



Φάσμα μάζας:

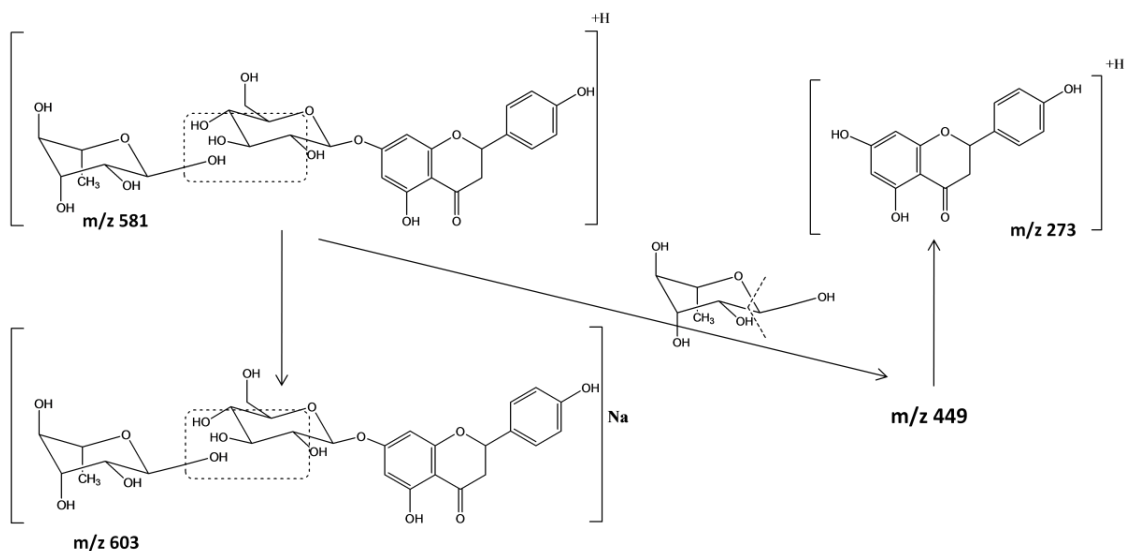


TDRes#1168-1218 RT: 12.44-13.08
AV: 25 SB: 235 9.57-11.43 ,
14.27-18.52 NL: 2.53E5 F: {0,0} + c
ESI sid=12.00 Full ms [
130.00-796.00]



TDRes#1169-1210 RT: 12.45-12.99
AV: 21 SB: 253 9.55-12.04 ,
14.21-18.24 NL: 1.94E5 F: {0,1} + c
ESI sid=60.00 Full ms [
130.00-796.00]

Από το φάσμα υπεριώδους-ορατού της ένωσης συμπεραίνεται ότι πρόκειται για φλαβανόνη και πιο συγκεκριμένα για παράγωγο ναριγγενίνης. Από το φάσμα μάζας προκύπτει ότι το μοριακό ιόν της ένωσης είναι $[M+H]^+=581$ που σταθεροποιείται με την προσθήκη νατρίου $[M+Na]=603$, τιμές που εμφανίζονται και στη χαμηλή, αλλά και στην υψηλή τάση. Λόγω της επόμενης ένωσης (No 23) που ακολουθεί στο ίδιο κλάσμα σε χρόνο 12.96min, προτείνεται ότι στη συγκεκριμένη περίπτωση, η ραμνόζη συνδέεται σε οποιαδήποτε θέση της γλυκόζης, εκτός από την 6-θέση, έτσι ώστε η ένωση 22 να καταστεί έστω και λίγο πιο πολική από την ένωση 23 που ακολουθεί αμέσως μετά. Πιθανώς να πρόκειται για νεοεσπεριδοζίτη και επομένως το ανωμερικό πρωτόνιο της ραμνόζης να συνδέεται στον C-2 της γλυκόζης, δίχως όμως κάτι τέτοιο να προκύπτει μετά βεβαιότητας. Το θραύσμα με m/z 419, προτείνεται ότι προκύπτει με την απομάκρυνση ενός H_2O μεταξύ του C-5 και της ελεύθερης 6-θέσης της γλυκόζης. Το ιόν με m/z 273 αντιστοιχεί στο άγλυκο ναριγγενίνη, μετά την απομάκρυνση και της τελευταίας εναπομείνουσας ραμνόζης. Το θραύσμα με m/z 727 φαίνεται να αντιστοιχεί σε adduct του 581 με ραμνόζη $[581+(ραμνόζη-H_2O)]$. Η θραυσμάτωση του μορίου παρατίθεται παρακάτω.

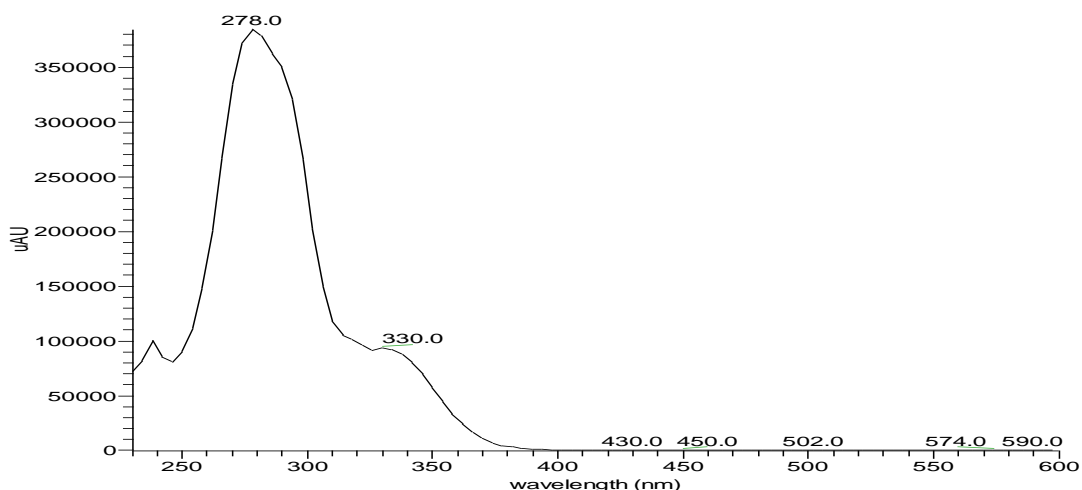


Ένωση 23: 7-O-ραμνογλυκοζίτης της ναριγγενίνης

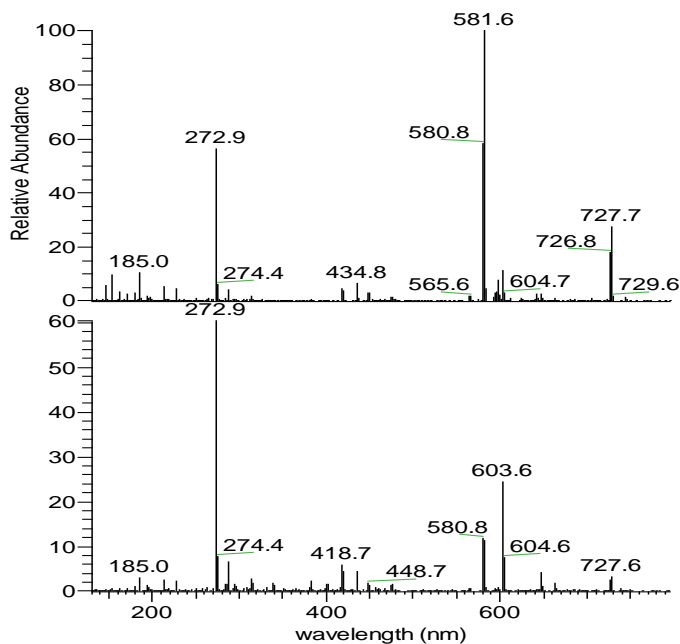
Χρόνος κατακράτησης: 12.96min

Φάσμα UV-Vis:

TDRes #792 RT: 13.18 AV: 1 SB: 2 11.98, 13.48 NL: 3.84E5 microAU



Φάσμα μάζας:

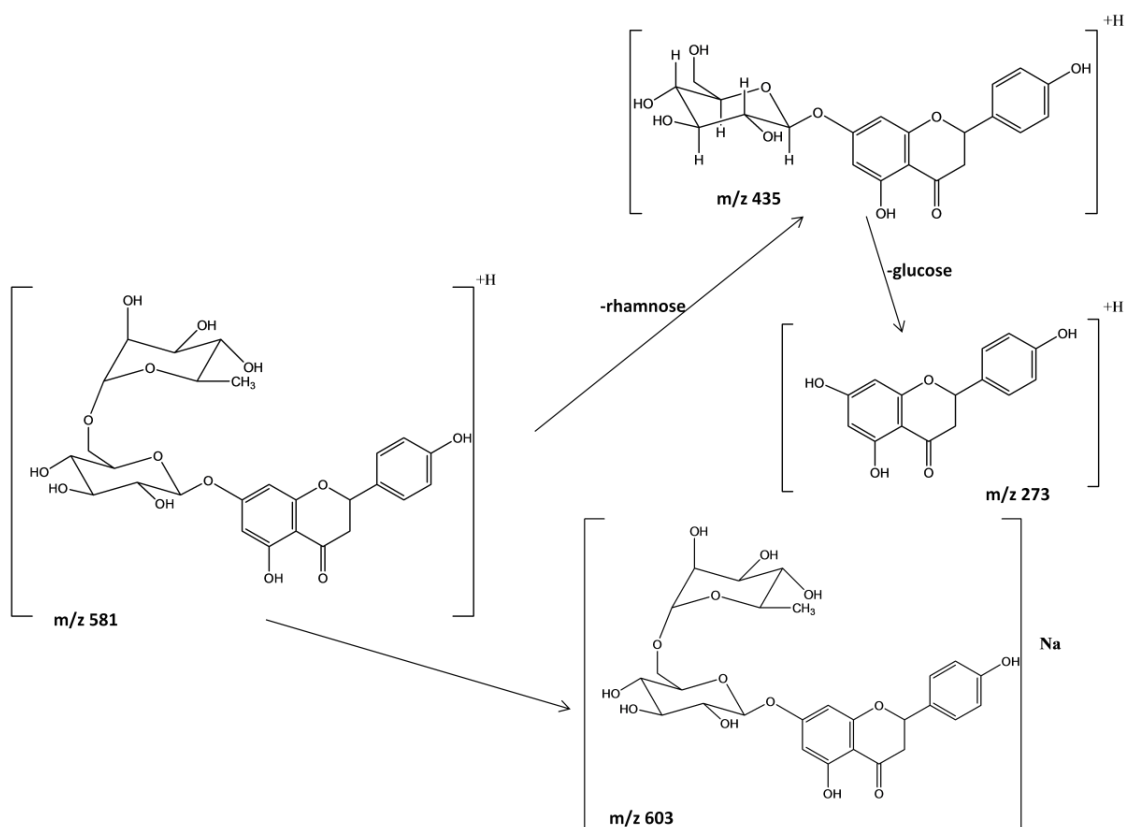


TDRes#1222-1253 RT: 13.16-13.57
AV: 16 SB: 125 10.87-11.98 ,
14.97-17.20 NL: 2.93E5 F: {0,0} + c
ESI sid=12.00 Full ms [
130.00-796.00]

TDRes#1218-1245 RT: 13.09-13.45
AV: 14 SB: 189 10.30-12.13 ,
13.90-16.97 NL: 1.76E5 F: {0,1} + c
ESI sid=60.00 Full ms [
130.00-796.00]

Από το φάσμα υπεριώδους-ορατού της ένωσης συμπεραίνεται ότι πρόκειται για φλαβονόνη και πιο συγκεκριμένα για παράγωγο ναριγγενίνης. Από το φάσμα μάζας προκύπτει ότι το μοριακό ιόν της ένωσης είναι $[M+H]^+ = 581$ που σταθεροποιείται με την προσθήκη νατρίου $[M+Na] = 603$, τιμές που εμφανίζονται και στη χαμηλή, αλλά και στην υψηλή τάση. Στην χαμηλή τάση των 12eV, παρατηρείται το ιόν που προκύπτει από την απόσπαση μιας ραμνόζης και αντιστοιχεί σε $m/z 435 = [M-$

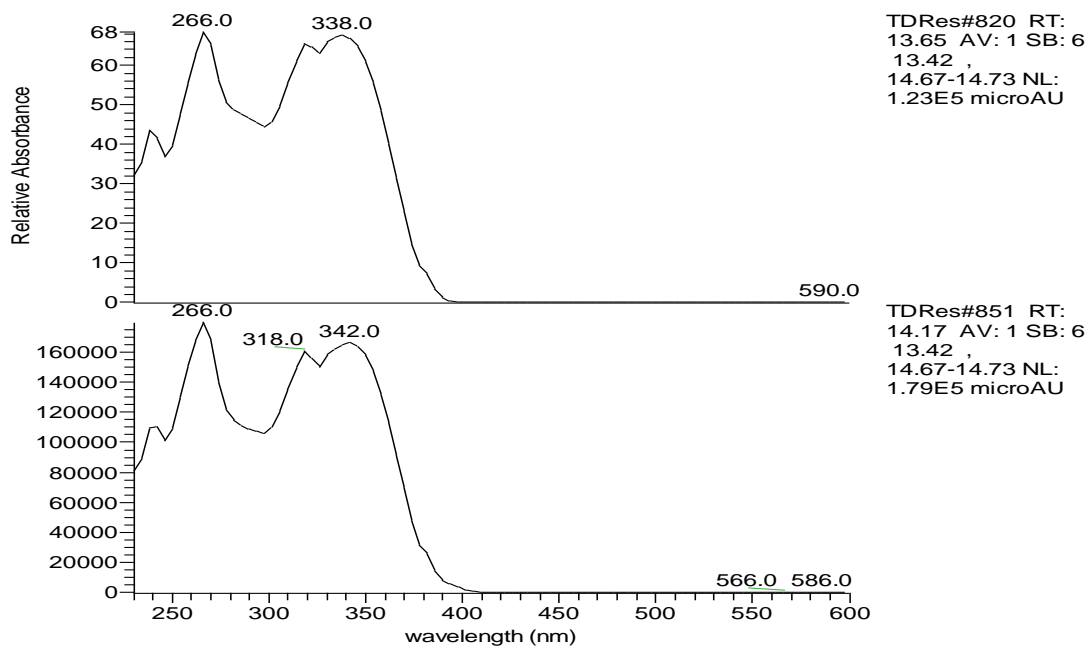
(ραμνόζη-OH)+H]⁺. Το ιόν με m/z 273 αντιστοιχεί στο άγλυκο ναριγγενίνη, μετά την απομάκρυνση όλων των σακχάρων. Προτείνεται ότι πρόκειται για ρουτινοζίτη, έτσι ώστε να δικαιολογείται η αλληλουχία των ενώσεων στην ίδια κατανομή με διαφορετικούς χρόνους κατακράτησης (ένωση 22-χρόνος κατακράτησης 12.68min) και κατά αυτόν τον τρόπο να καταστεί η ένωση 23 έστω και λίγο πιο άπολη από την προηγούμενη ένωση. Επομένως το ανωμερικό πρωτόνιο της ραμνόζης να συνδέεται στον C-6 της γλυκόζης, δίχως όμως κάτι τέτοιο να προκύπτει μετά βεβαιότητας. Το θραύσμα με m/z 419, προτείνεται ότι προκύπτει με την απομάκρυνση ενός H₂O μεταξύ του C-5 και της ελεύθερης 6-θέσης της γλυκόζης. Το θραύσμα με m/z 727 φαίνεται να αντιστοιχεί σε adduct του 581 με ραμνόζη [581+(ραμνόζη-H₂O)]. Η θραυσμάτωση του μορίου παρατίθεται παρακάτω.



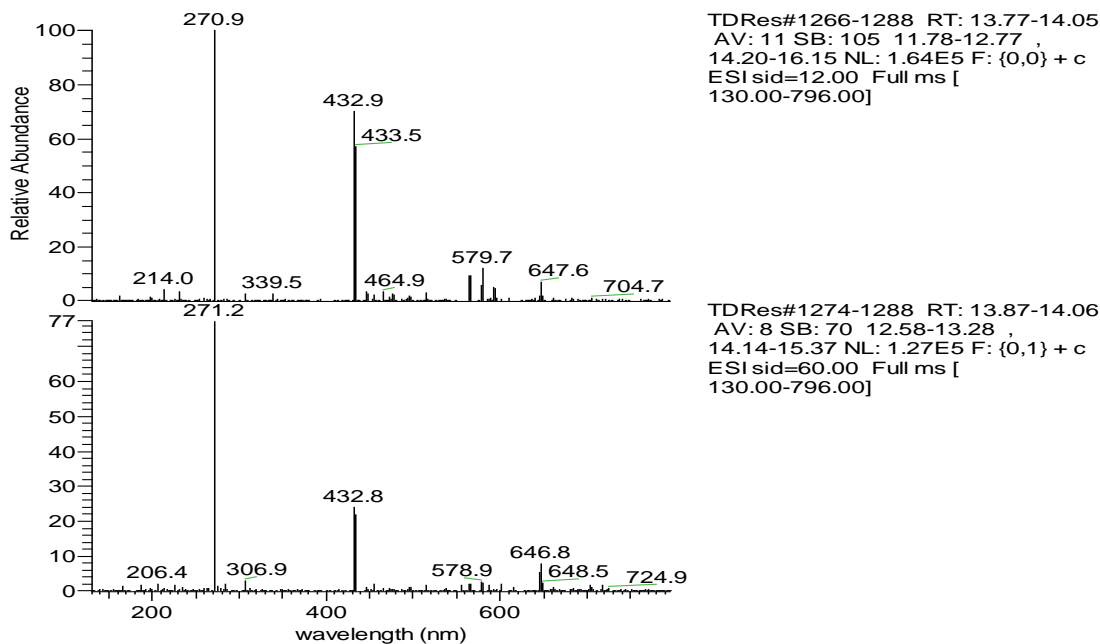
**Ενώσεις 24 & 25: Πρενυλιωμένος 7-O-ραμνογλυκοζίτης της απιγενίνης (1^η)
7-O-Βενζούλο-ραμνογλυκοζίτης της απιγενίνης (2^η)**

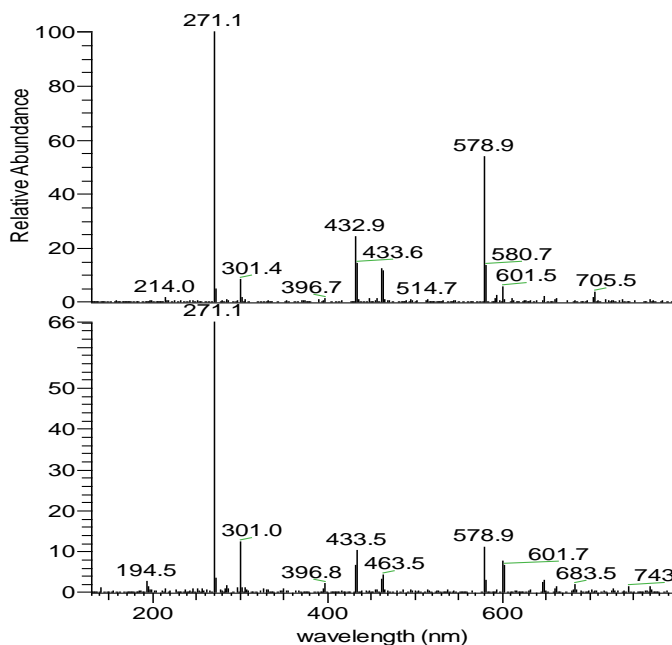
Χρόνος κατακράτησης: 13.65min & 14.17min

Φάσμα UV-Vis: (2 compounds)



Φάσμα μάζας: (2 compounds)

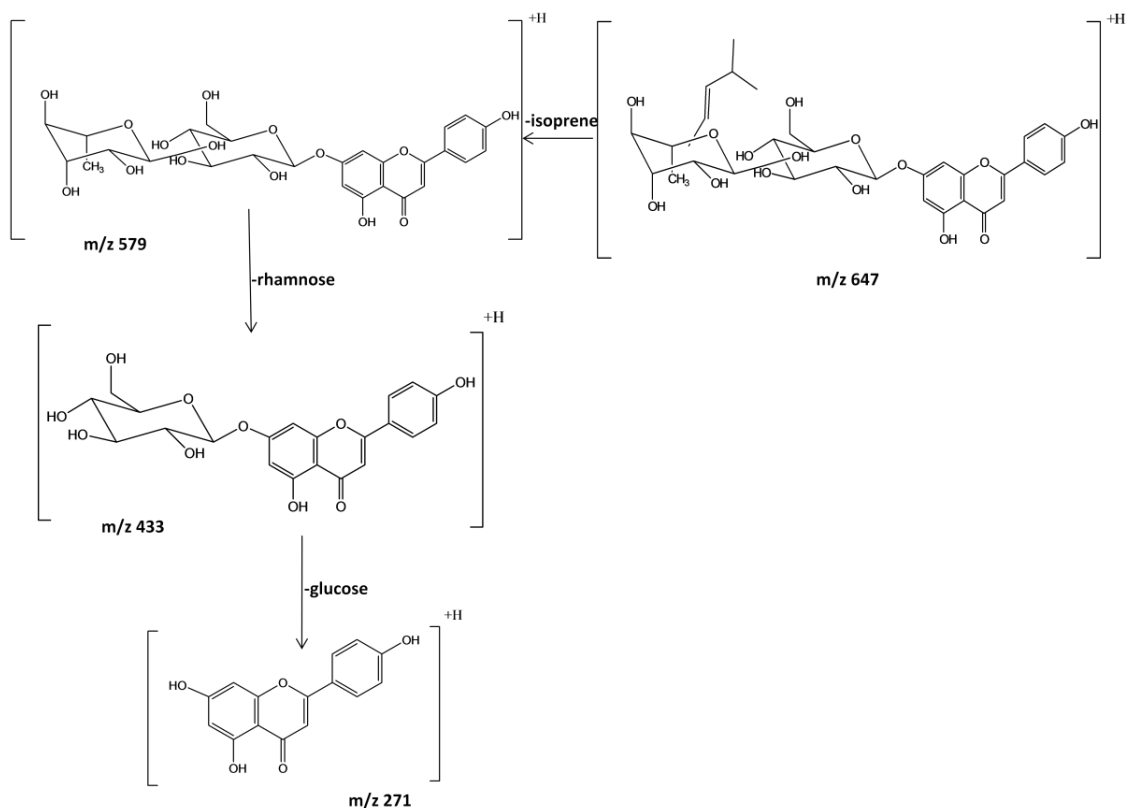




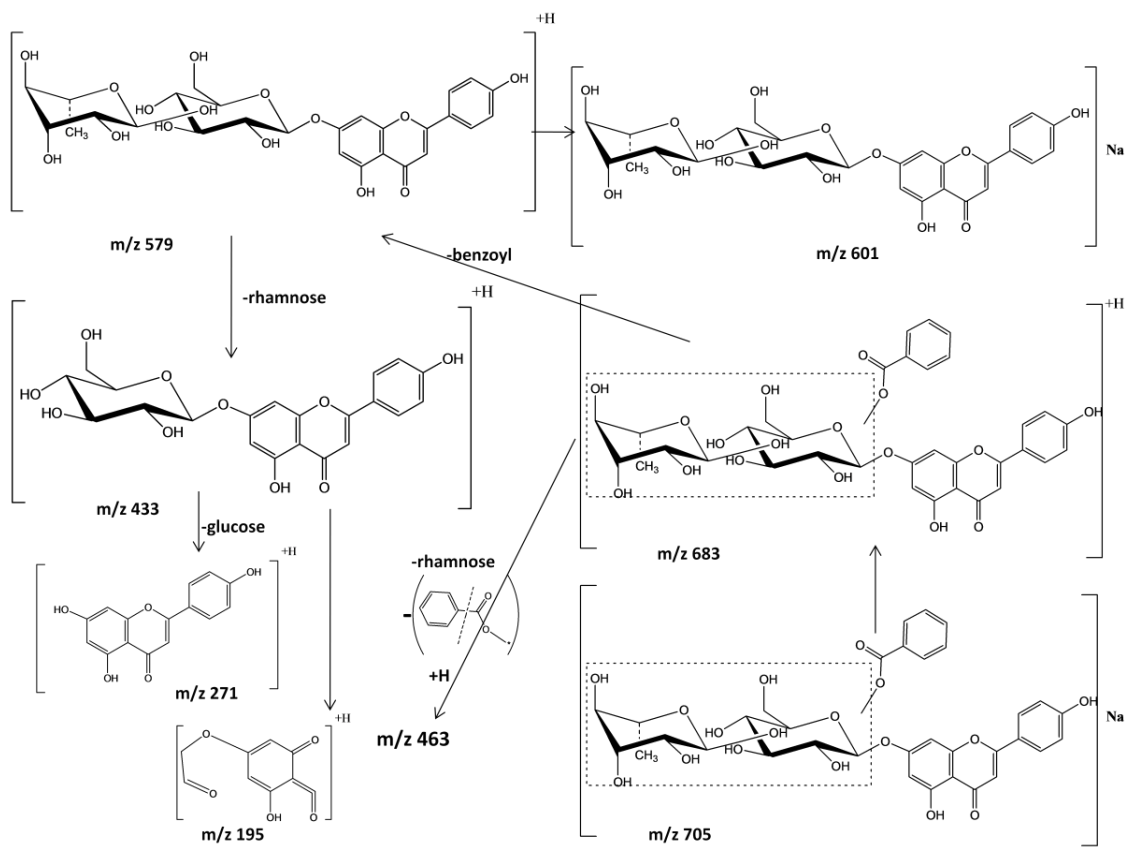
TDRes#1304-1325 RT: 14.30-14.58
 AV: 11 SB: 73 13.49-14.20 ,
 14.96-16.32 NL: 1.58E5 F: {0,0} + c
 ESI sid=12.00 Full ms [
 130.00-796.00]

TDRes#1301-1327 RT: 14.25-14.59
 AV: 13 SB: 67 13.47-14.16 ,
 15.07-16.29 NL: 1.04E5 F: {0,1} + c
 ESI sid=60.00 Full ms [
 130.00-796.00]

Από το φάσμα υπεριώδους-ορατού της πρώτης ένωσης συμπεραίνεται ότι πρόκειται για φλαβόνη και πιο συγκεκριμένα για παράγωγο απιγενίνης. Από το φάσμα μάζας προκύπτει ότι το μοριακό ιόν της ένωσης είναι $[M+H]^+=647$. Το θραύσμα με m/z 579 προκύπτει από το παραπάνω, μετά την απομάκρυνση του ισοπρενίου $[M\text{-ισοπρένιο}+H]^+$, ενώ το θραύσμα με m/z 433 μετά από την επιπλέον απομάκρυνση και της ραμνόζης $[M\text{-ισοπρένιο}-(\text{ραμνόζη-OH})+H]^+$. Το ιόν με m/z 271 αντιστοιχεί στο άγλυκο απιγενίνη, μετά την απομάκρυνση και των δύο σακχάρων και του ισοπρενίου $[M\text{-ισοπρένιο}-(\text{ραμνόζη-OH})-(\text{γλυκόζη-OH})+H]^+$. Από τα δεδομένα που υπάρχουν δεν μπορεί να προσδιοριστεί η θέση σύνδεσης του ισοπρενίου πάνω στη ραμνόζη. Η θραυσμάτωση του μητρικού μορίου παρατίθεται παρακάτω.



Από το φάσμα υπεριώδους-ορατού της δεύτερης ένωσης συμπεραίνεται ότι πρόκειται για φλαβόνη και πιο συγκεκριμένα για παράγωγο απιγενίνης. Από το φάσμα μάζας προκύπτει ότι το μοριακό ιόν της ένωσης είναι το $[M+H]^+=683$ που σταθεροποιείται με Na στα 705 $[M+Na]$. Το θραύσμα με m/z 579 προκύπτει μετά από απομάκρυνση του βενζοϊκού οξέος $[M-(\text{βενζοϊκό οξύ-OH})+H]^+$ και σταθεροποιείται με την προσθήκη νατρίου $[M-(\text{βενζοϊκό οξύ-OH})+Na]=601$. Το θραύσμα με m/z 433 προκύπτει από το θραύσμα 579, μετά την απομάκρυνση και της ραμνόζης $[M-(\text{βενζοϊκό οξύ-OH})-(\text{ραμνόζη-OH})+H]^+$. Το ιόν με m/z 271 αντιστοιχεί στο άγλυκο απιγενίνη, μετά την επιπλέον απομάκρυνση της γλυκόζης $[M-(\text{βενζοϊκό οξύ-OH})-(\text{ραμνόζη-OH})-(\text{γλυκόζη-OH})+H]^+$. Από τα δεδομένα που υπάρχουν δεν μπορούν να προσδιοριστούν οι θέσεις σύνδεσης και ο τρόπος σύνδεσης των σακχάρων, παρά μόνο ότι το βενζοϊκό συνδέεται στη γλυκόζη, λόγω του προτεινόμενου θραύσματος με m/z 463 της υψηλής τάσης. Η θραυσμάτωση του μητρικού μορίου με τις επιπλέον προτεινόμενες δομές παρατίθεται παρακάτω.



Κατανόηση Βουτανόλης(T.Buta.)

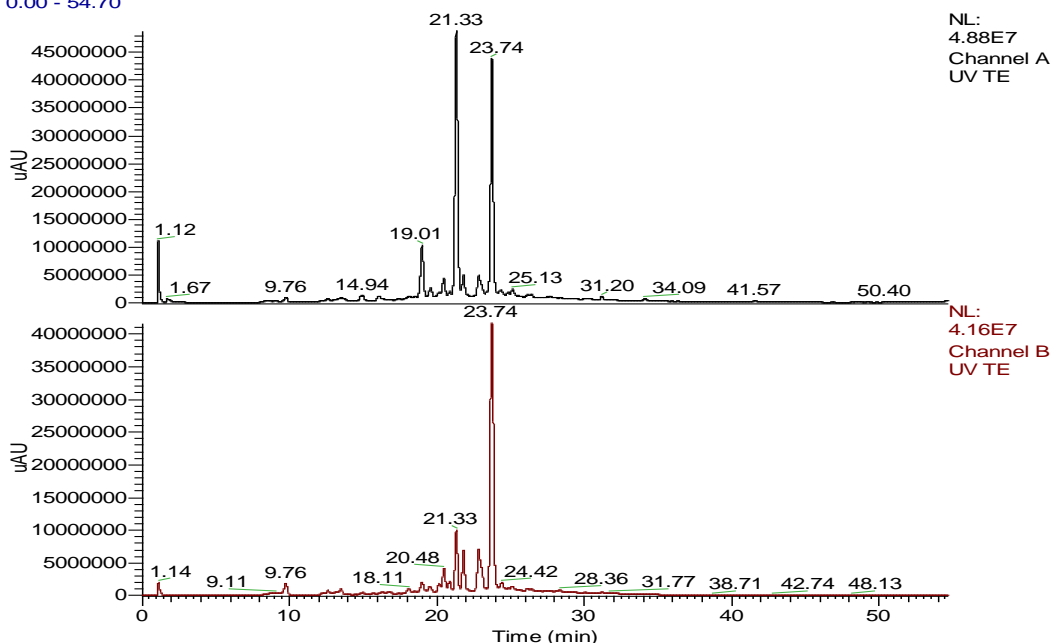
Superspher 100-4, 4 μ , (125x2mm) RP18 Macherey Nagel

Time (min)	H ₂ O(+2.5%AcOH)	MeOH
0	100	0
2	100	0
52	0	100
57	0	100

Flow rate: 0.33ml/min; inj. vol: 10 μ l; DAD: 278, 340 nm

Ionization Mode:	ESI+	Ionization Mode:	Electrospray
Capillary (kV):	4.0	None in use.	
Source Voltage (V):	40 ⁰ C	1 +ve 12	
Probe Temperature (°C):	400 ⁰ C	2 +ve 70	
RF Lens (V):	0.3	Scans per Second:	0.7
Ion Energy (eV):	1.0	Scan Range Start (amu):	121
Ion Energy Ramp (mV/amu):	0.5	Scan Range End (amu):	894
Detector Voltage (V):	650		
Low Mass Resolution:	12.5		
High Mass Resolution:	16.5		

RT: 0.00 - 54.70



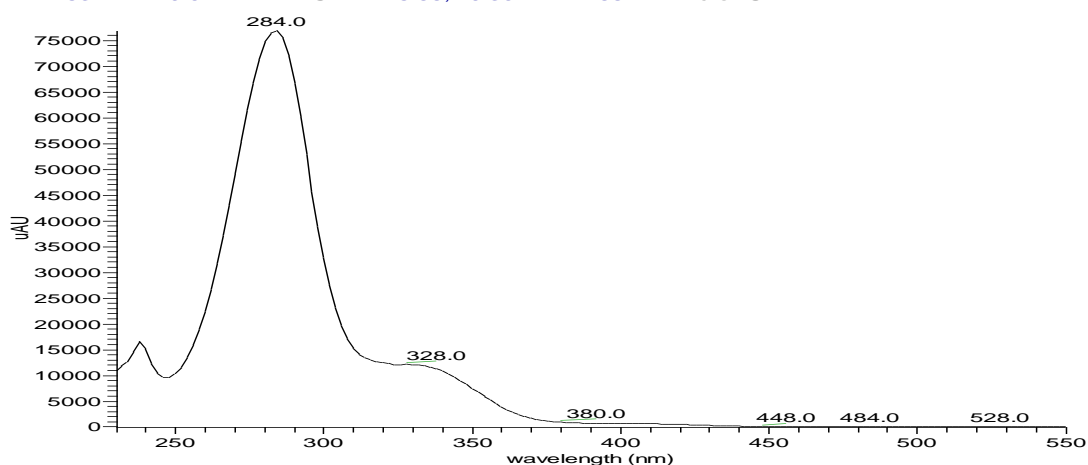
N ^o	R _t (min)	[M+H] ⁺ (m/z)	Θραύσματα (m/z) στα 12 eV (%R.I.)	Θραύσματα (m/z) στα 70 eV (%R.I.)	UV-Vis λ _{max} (nm)	Διευκρίνιση δομής
	19.01	597	289, 451,	597, 619	284, 328	7-O-[κουμαροϋλ-καφεοϋλο]-

26			597, 619			εστέρας της εριοδικτυόλης
27	21.33	581	273, 581, 603	273, 435, 581, 603	280, 328	7-O-[κουμαρουλ-καφεούλο]-αιθέρας της ναριγγενίνης
28	21.82	595	287, 595, 617	287, 595, 617	254, 266, 348	7-O-αιθερικό παράγωγο της λουτεολίνης με κουμαρικό και καφεϊκό οξύ
29	22.85	565	447, 565, 587	285, 447, 551, 565, 587	266, 322sh, 340	7-Μεθυλοβενζούλ-καφεϊκός αιθέρας της μεθυλοαπιγενίνης
30	23.74	579	271, 463, 579, 601	271, 433, 579, 601	266, 320sh, 340	7-O-[κουμαρουλ-καφεούλο]-αιθέρας της απιγενίνης

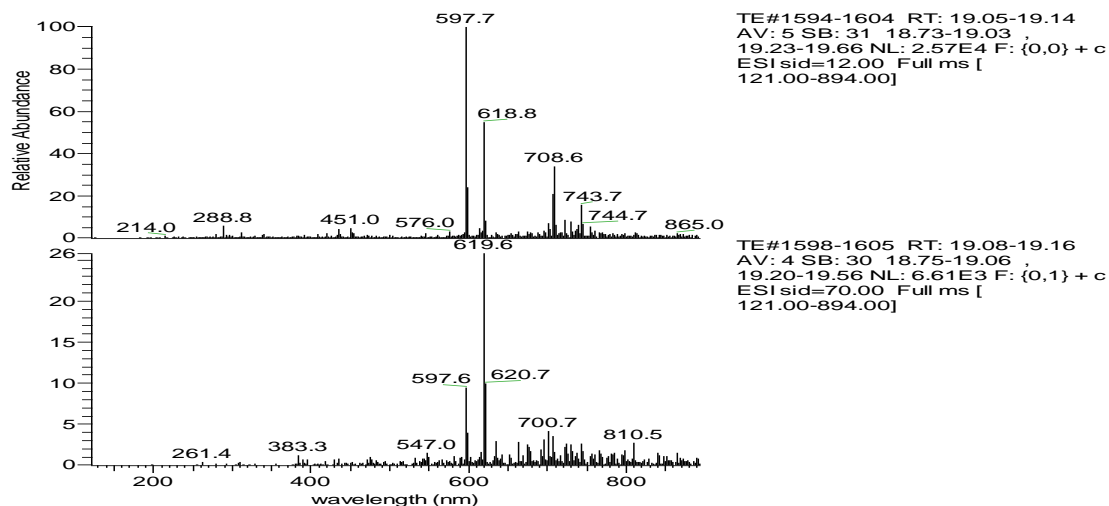
Ένωση 26: 7-O-[κουμαρουλ-καφεούλο]-εστέρας της εριοδικτυόλης
Χρόνος κατακράτησης: 19.01min (ΙΔΙΑ με την ένωση 9 με χρόνο κατακράτησης 19.51)

Φάσμα UV-Vis:

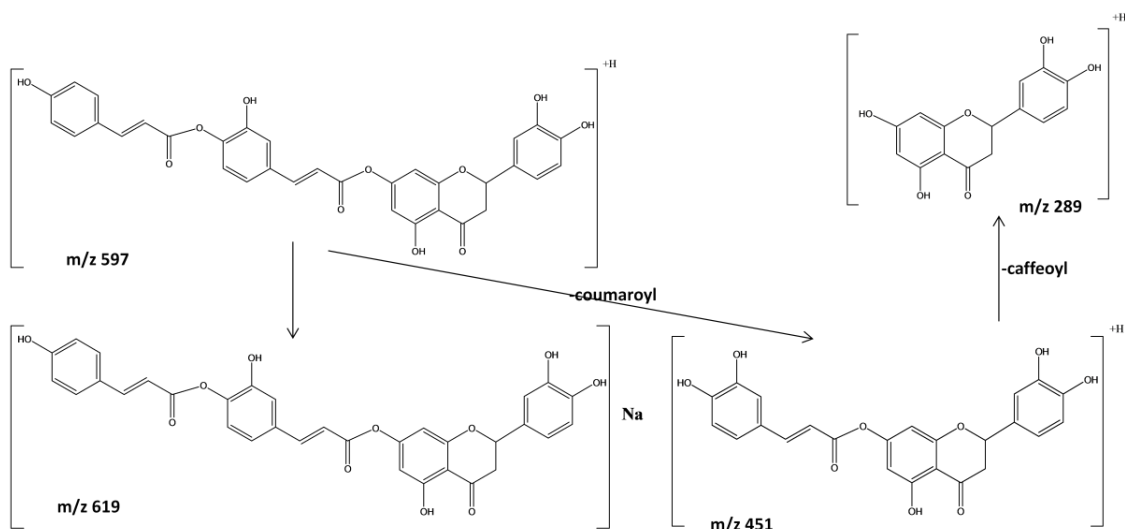
TE #2283 RT: 19.02 AV: 1 SB: 2 18.66, 19.30 NL: 7.68E4 microAU



Φάσμα μάζας:



Από το φάσμα υπεριώδους-ορατού της ένωσης συμπεραίνεται ότι πρόκειται για φλαβανόνη και πιο συγκεκριμένα για παράγωγο εριοδικτυόλης. Από το φάσμα μάζας προκύπτει ότι το μοριακό ιόν της ένωσης είναι το $[M+H]^+=597$ και σταθεροποιείται με την προσθήκη νατρίου $[M+Na]=619$, τιμές που εμφανίζονται και στη χαμηλή, αλλά και στην υψηλή τάση. Λόγω της υψηλής έντασης του θραύσματος m/z 597 και της ταυτόχρονα χαμηλής έντασης του θραύσματος m/z 289, προτείνεται ότι το πρώτο οξύ (καφεϊκό) συνδέεται μέσω εστερικού δεσμού με την εριοδικτυόλη, αλλά και με το δεύτερο οξύ (κουμαρικό), καθότι έχουν βρεθεί και οξέα που συνδέονται μέσω εστερικού δεσμού με φλαβανόνες στην 7-θέση (Hoeneisen M. et al., 1993). Από την υπιχρωμική μετατόπιση της κορυφής II στο φάσμα υπεριώδους-ορατού, συμπεραίνεται ότι είναι δεσμευμένο το 7-OH και το 4'-OH ελεύθερο (Mabry et al., 1970). Στην χαμηλή τάση των 12eV, παρατηρείται το ιόν που προκύπτει από την επιπλέον απόσπαση και του τμήματος του κουμαρικού και αντιστοιχεί σε m/z 451= $[M-(\text{κουμαρικό-OH})+H]^+$. Το ιόν με m/z 289 αντιστοιχεί στην εριοδικτυόλη $[M-(\text{κουμαρικό-OH})-(\text{καφεϊκό-OH})+H]^+$. Το θραύσμα με m/z 727 φαίνεται να αντιστοιχεί σε adduct του 581 με κουμαρικό $[581+(\text{κουμαρικό-H}_2\text{O})]$. Η θραυσμάτωση του μορίου δίνονται στο παρακάτω σχήμα.

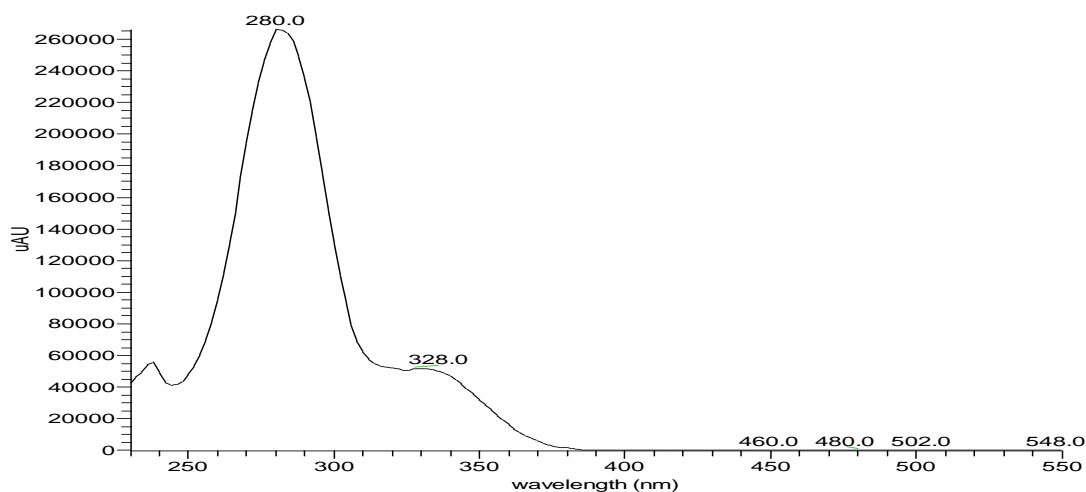


Ένωση 27: 7-O-[κουμαρουλ-καφεούλο]-αιθέρας της ναριγγενίνης

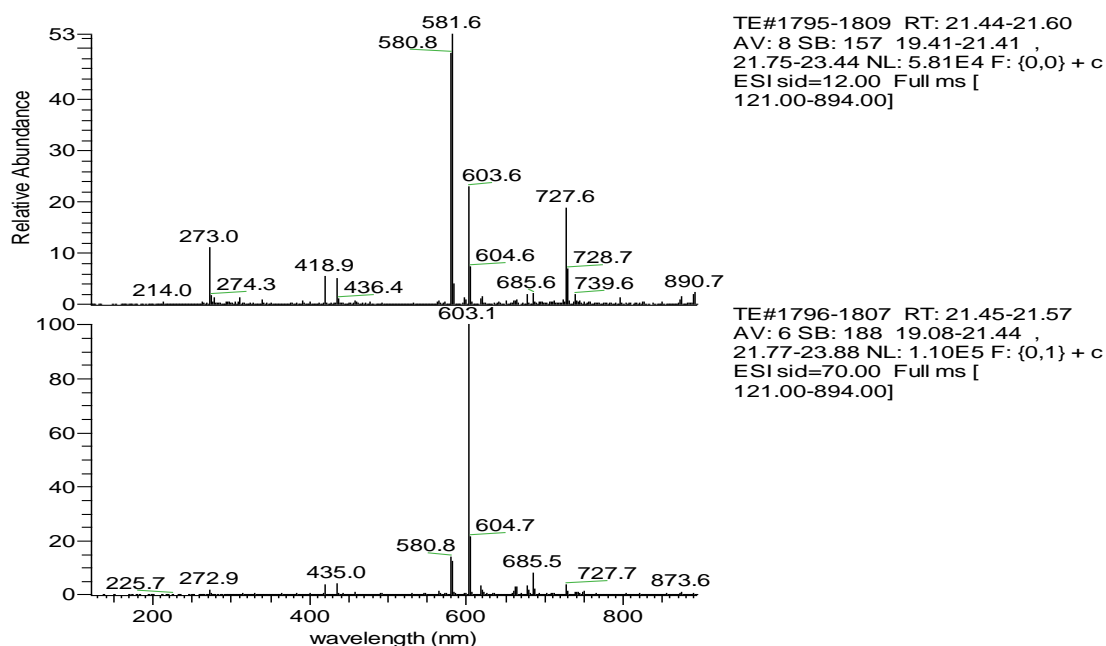
Χρόνος κατακράτησης: 21.33min

Φάσμα UV-Vis:

TE #2570 RT: 21.41 AV: 1 SB: 2 18.66, 19.30 NL: 2.66E5 microAU

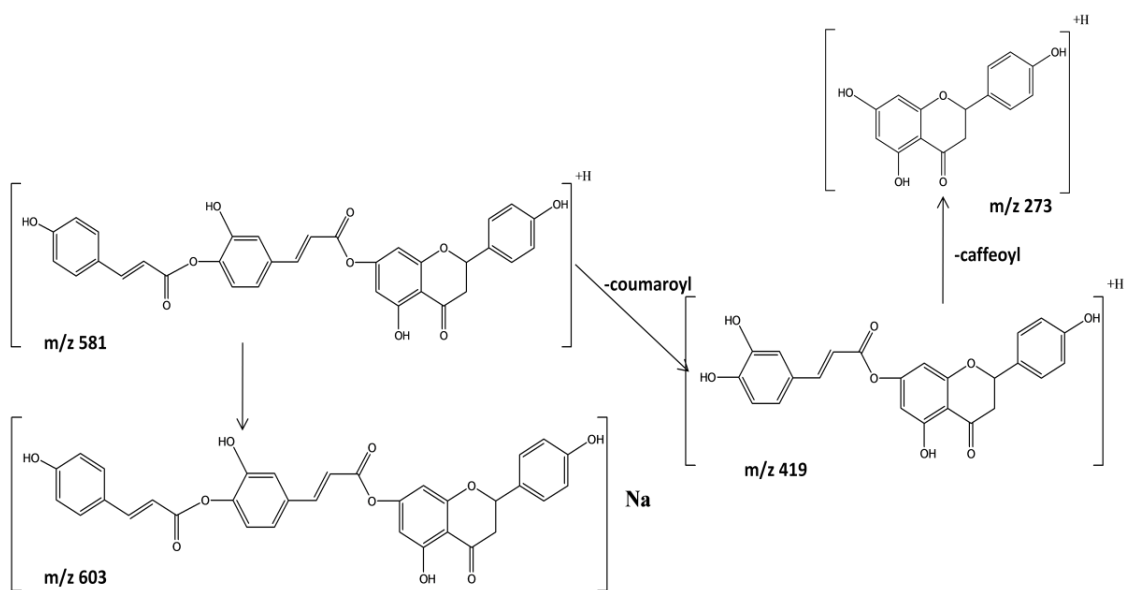


Φάσμα μάζας:



Από το φάσμα υπεριώδους-ορατού της ένωσης συμπεραίνεται ότι πρόκειται για φλαβονόη και πιο συγκεκριμένα για παράγωγο ναριγγενίνης. Από το φάσμα μάζας προκύπτει ότι το μοριακό ιόν της ένωσης είναι $[M+H]^+ = 581$ που σταθεροποιείται με την προσθήκη νατρίου $[M+Na] = 603$. Λόγω της υψηλής έντασης του θραύσματος 581 και της χαμηλής έντασης του 273, προκύπτει ότι το πρώτο οξύ (καφεϊκό) συνδέεται με εστερικό δεσμό με το άγλυκο, και το δεύτερο οξύ (κουμαρικό)

συνδέεται μέσω εστέρα με το καφεϊκό και όχι μέσω αιθερικού, καθότι έχουν βρεθεί και οξέα που συνδέονται μέσω εστερικού δεσμού με φλαβανόνες στην 7-θέση (Hoeneisen M. et al., 1993). Επιπροσθέτως, από το φάσμα υπεριώδους-ορατού, προκύπτει ότι το υδροξύλιο της θέσης 4' του Β δακτυλίου του φλαβονοειδούς παραμένει ελεύθερο και λόγω της υψιχρωμικής μετατόπισης της κορυφής II του αγλύκου, προτείνεται ότι το υδροξύλιο της θέσης 7 είναι υποκατεστημένο (Mabry et al., 1970). Στην υψηλή τάση των 70eV το ιόν 435 αντιστοιχεί στο $[M-(\text{κουμαρικό}-\text{OH})+\text{H}]^+$. Το θραύσμα με m/z 727 φαίνεται να αντιστοιχεί σε adduct του 581 με κουμαρικό $[581+(\text{κουμαρικό}-\text{H}_2\text{O})]$. Τέλος, το θραύσμα με m/z 273 αντιστοιχεί στο άγλυκο ναριγγενίνη, μετά την απομάκρυνση και του καφεϊκού. Στο παρακάτω σχήμα παρατίθεται η θραυσμάτωση του μορίου.

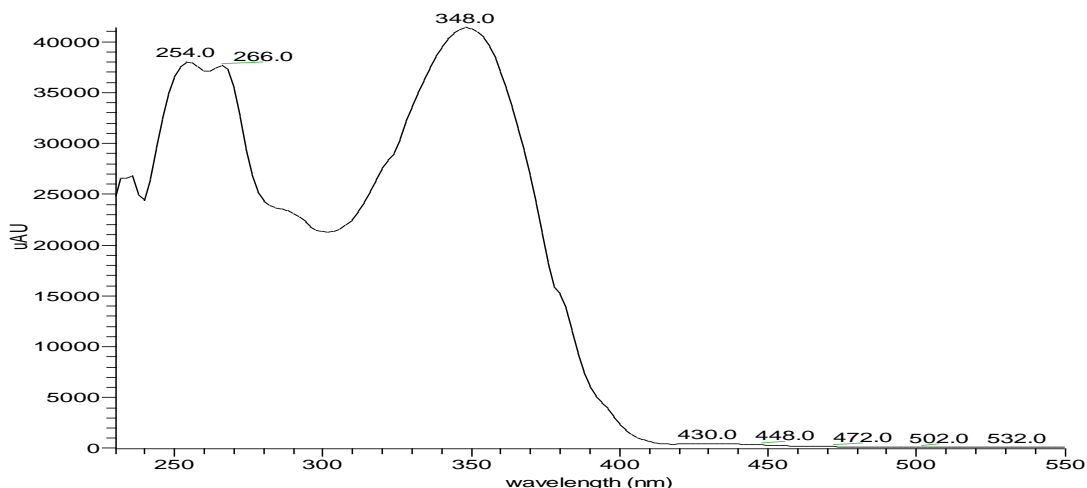


Ένωση 28: 7-O-αιθερικό παράγωγο της λουτεολίνης με κουμαρικό και καφεϊκό οξύ

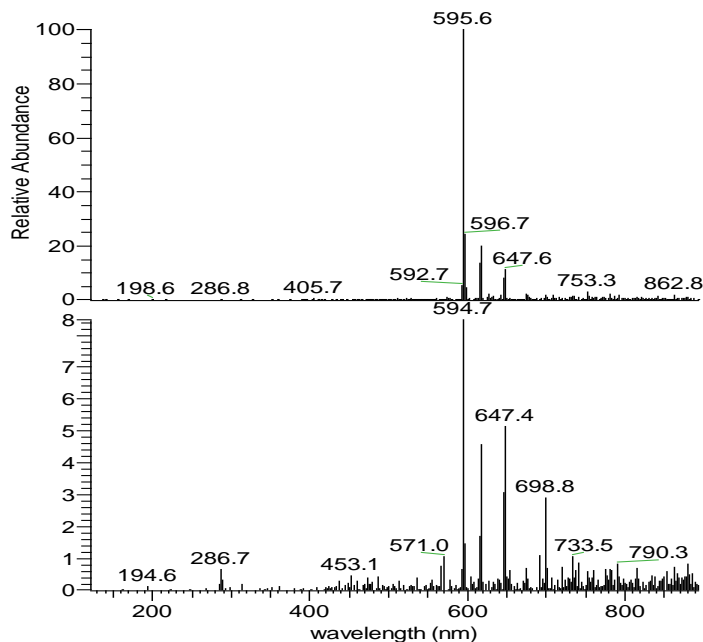
Χρόνος κατακράτησης: 21.82min

Φάσμα UV-Vis:

TE #2613 RT: 21.77 AV: 1 SB: 2 18.66, 19.30 NL: 4.14E4 microAU



Φάσμα μάζας:

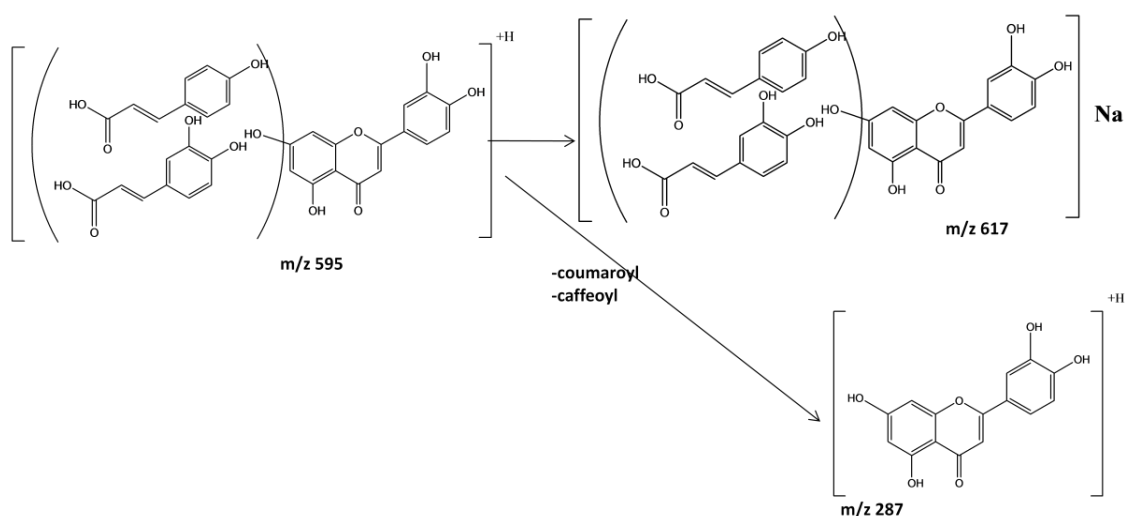


TE#1834-1841 RT: 21.91-21.98
AV: 4 SB: 44 21.45-21.89 ,
22.02-22.61 NL: 4.16E4 F: {0,0} + c
ESI sid=12.00 Full ms [
121.00-894.00]

TE#1833-1841 RT: 21.90-21.97
AV: 4 SB: 27 21.60-21.88 ,
22.03-22.38 NL: 3.53E3 F: {0,1} + c
ESI sid=70.00 Full ms [
121.00-894.00]

Από το φάσμα υπεριώδους-ορατού της ένωσης συμπεραίνεται ότι πρόκειται για φλαβόνη με διυδροξυ-υποκατάσταση στον Β δακτύλιο και πιο συγκεκριμένα για παράγωγο λουτεολίνης. Από το φάσμα μάζας προκύπτει ότι το μοριακό ιόν της ένωσης είναι το $[M+H]^+=595$ και σταθεροποιείται με την προσθήκη νατρίου $[M+Na]=617$, που δεν διακρίνεται ευκρινώς. Το ιόν με m/z 287 αντιστοιχεί στο

άγλυκο λουτεολίνη, μετά την απομάκρυνση του καφεϊκού και του κουμαρικού. Λόγω της τιμής της κορυφής I στο φάσμα υπεριώδους-ορατού, συμπεραίνεται ότι τα οξέα συνδέονται μέσω αιθερικού δεσμού με την λουτεολίνη, και όχι μέσω εστερικού, διότι δεν παρατηρείται υψιχρωμική μετατόπιση της κορυφής I στο φάσμα. Η θέση πρόσδεσης των οξέων είναι στο 7-OH, καθότι το 4-OH παραμένει ελεύθερο λόγω μη υψιχρωμικής μετατόπισης της κορυφής I (Mabry et al., 1970). Στο παρακάτω σχήμα παρατίθεται η θραυσμάτωση του μορίου.

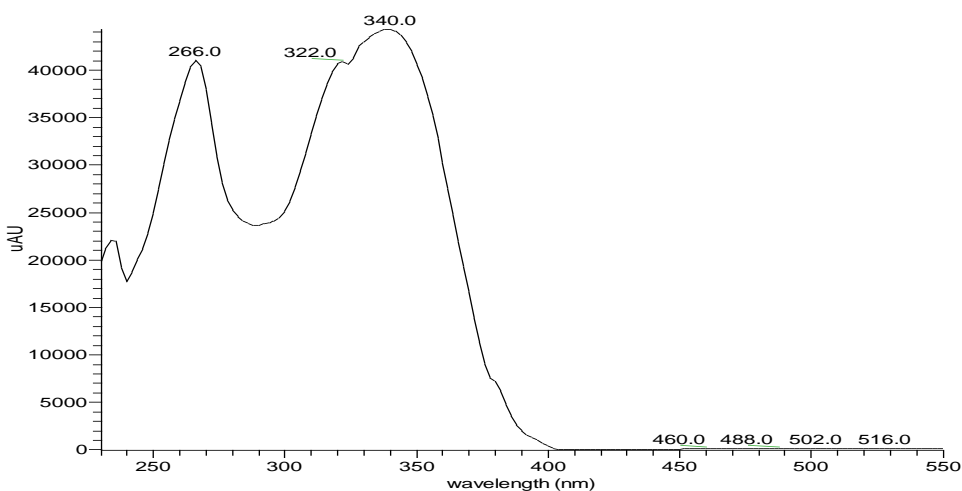


Ένωση 29: 7-Μεθυλοβενζοΐλ-καφεϊκός αιθέρας της μεθυλοσιπινίνης

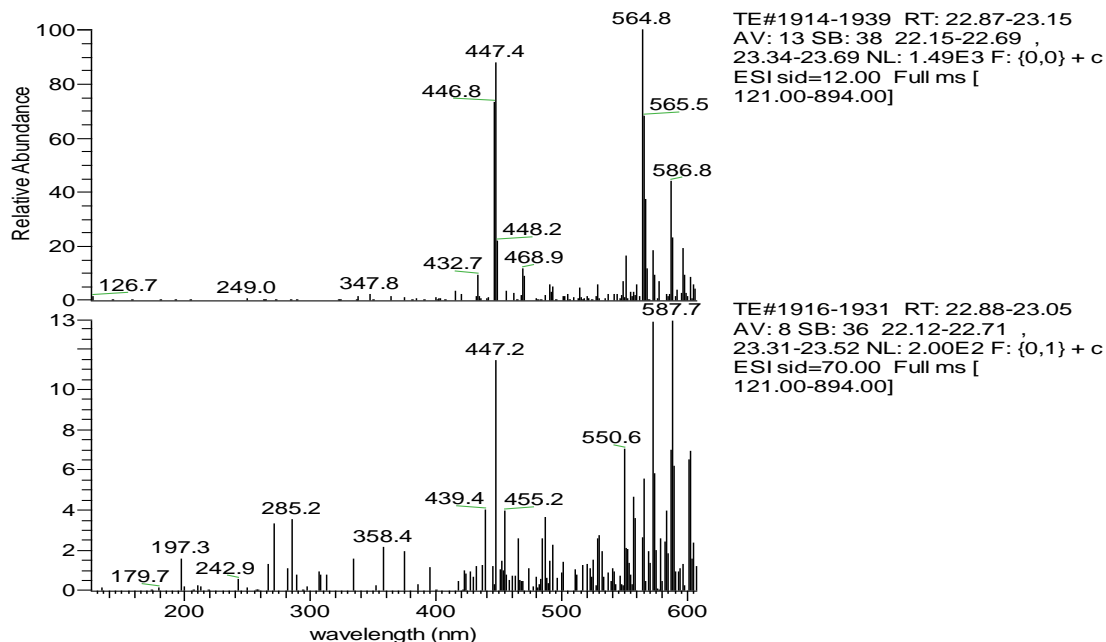
Χρόνος κατακράτησης: 22.85min

Φάσμα UV-Vis:

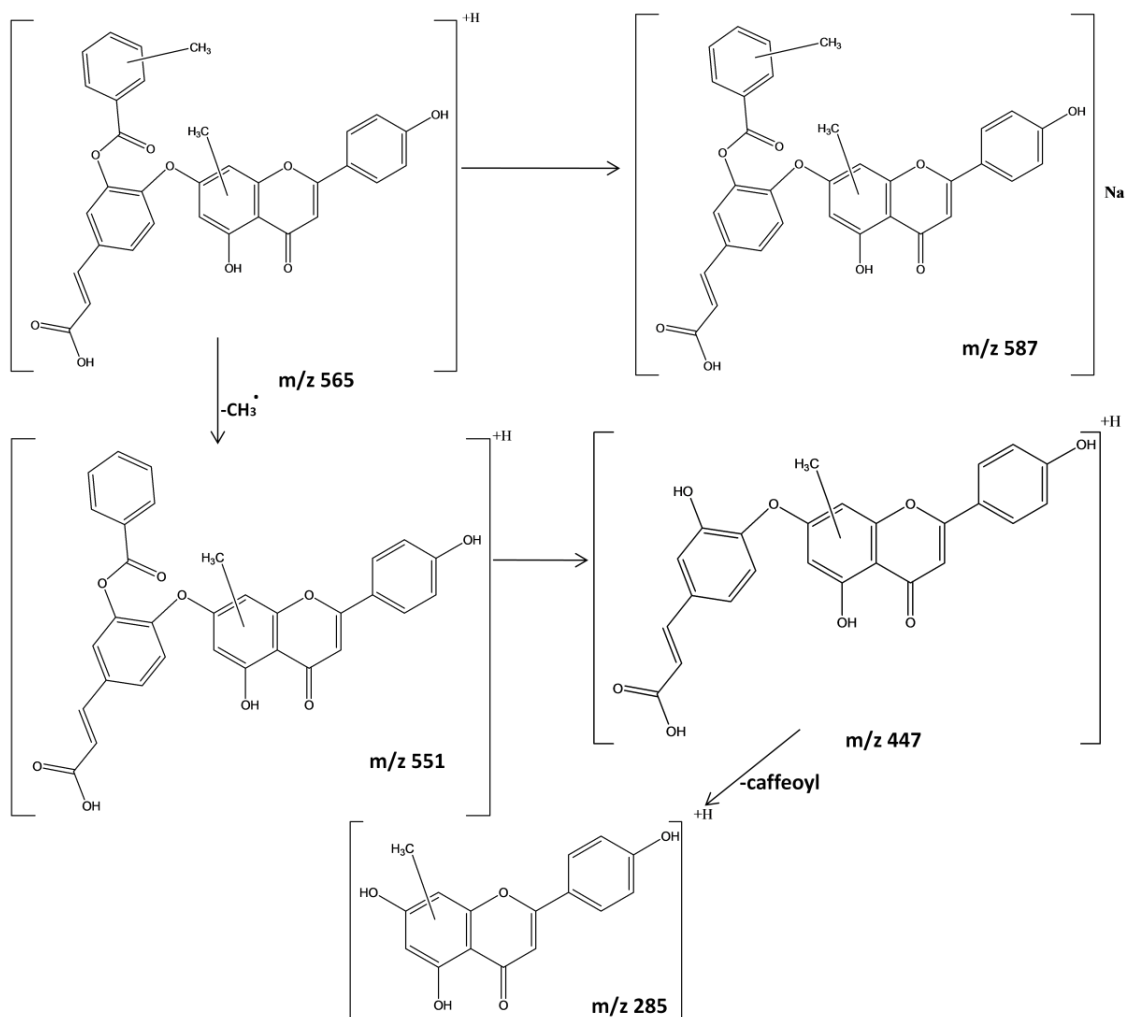
TE #2749 RT: 22.90 AV: 1 SB: 2 18.66, 19.30 NL: 4.43E4 microAU



Φάσμα μάζας:



Από το φάσμα υπεριώδους-ορατού της ένωσης συμπεραίνεται ότι πρόκειται για φλαβόνη και πιο συγκεκριμένα για παράγωγο απιγενίνης, με την απορρόφηση στα 322nm να επιβεβαιώνει την ύπαρξη καφεϊκού και με κάποια προσθετική ομάδα. Η θέση πρόσδεσης του οξέος είναι στο 7-OH, καθότι το 4-OH παραμένει ελεύθερο λόγω μη υψιχρωμικής μετατόπισης της κορυφής I και λόγω αυτής της τιμής της κορυφής I στο φάσμα υπεριώδους-ορατού, συμπεραίνεται ότι το κουμαρικό συνδέεται μέσω αιθερικού δεσμού με την απιγενίνη και όχι μέσω εστερικού, διότι τότε η υψιχρωμική μετατόπιση της κορυφής I θα ήταν μεγαλύτερη (Mabry et al., 1970). Από το φάσμα μάζας προκύπτει ότι το μοριακό ιόν της ένωσης είναι $[M+H]^+=565$ και σταθεροποιείται με την προσθήκη νατρίου $[M+Na]=587$. Το θραύσμα με m/z 551 προκύπτει από το μοριακό ιόν, μετά από την απομάκρυνση μιας ρίζας CH_3 , ενώ το θραύσμα με m/z 447 προκύπτει με την επιπλέον απομάκρυνση του βενζοϊκού οξέος. Το θραύσμα με m/z 285 αντιστοιχεί στην μεθυλοαπιγενίνη και σταθεροποιείται στα 309 με Na, θραύσμα που δεν διακρίνεται ευκρινώς. Στο παρακάτω σχήμα παρατίθεται η θραυσμάτωση του μορίου.

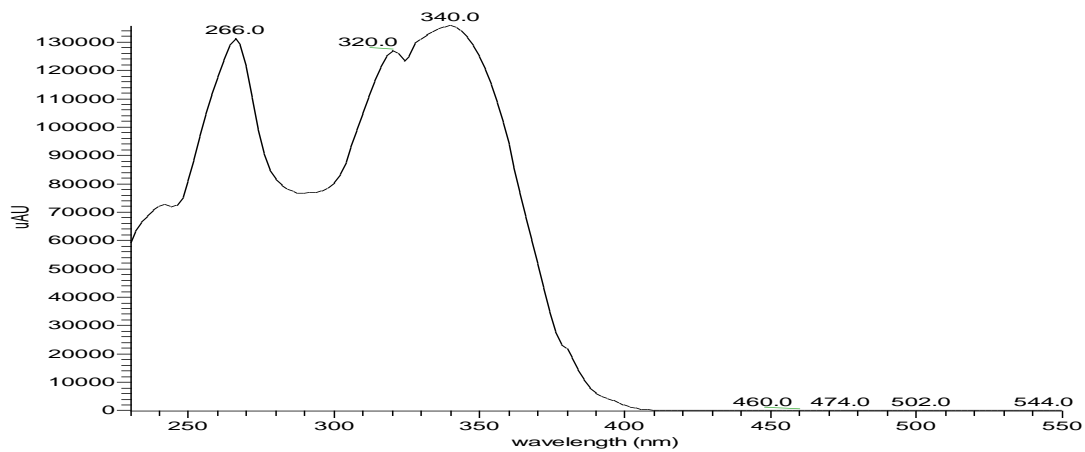


Ένωση 30: 7-O-[κουμαρουλ-καφεούλο]-αιθέρας της απιγενίνης

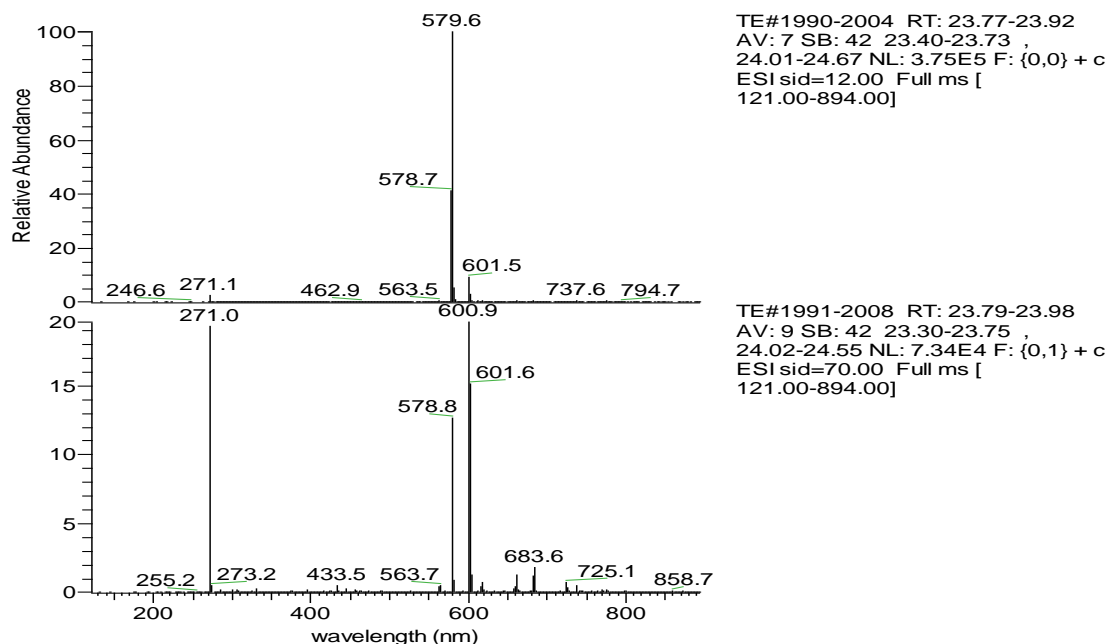
Χρόνος κατακράτησης: 23.74min

Φάσμα UV-Vis:

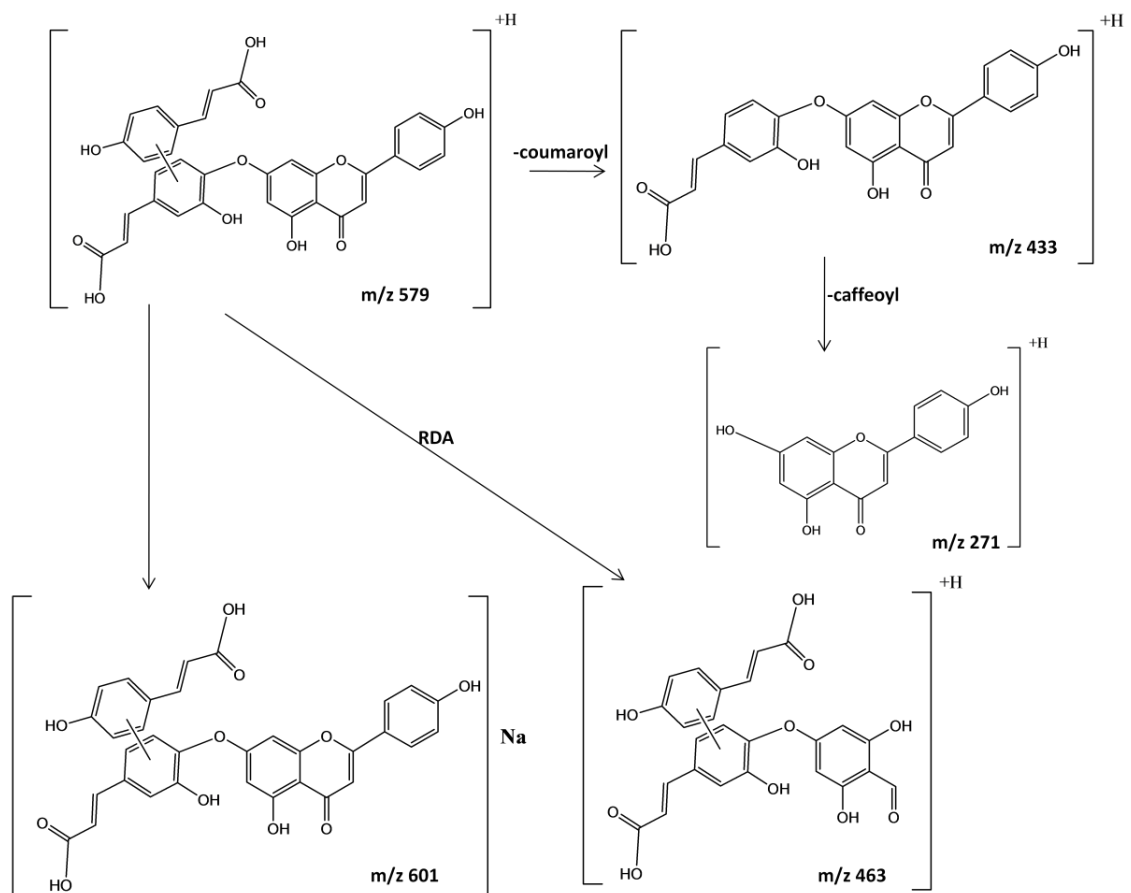
TE #2866 RT: 23.88 AV: 1 SB: 2 18.66, 19.30 NL: 1.36E5 microAU



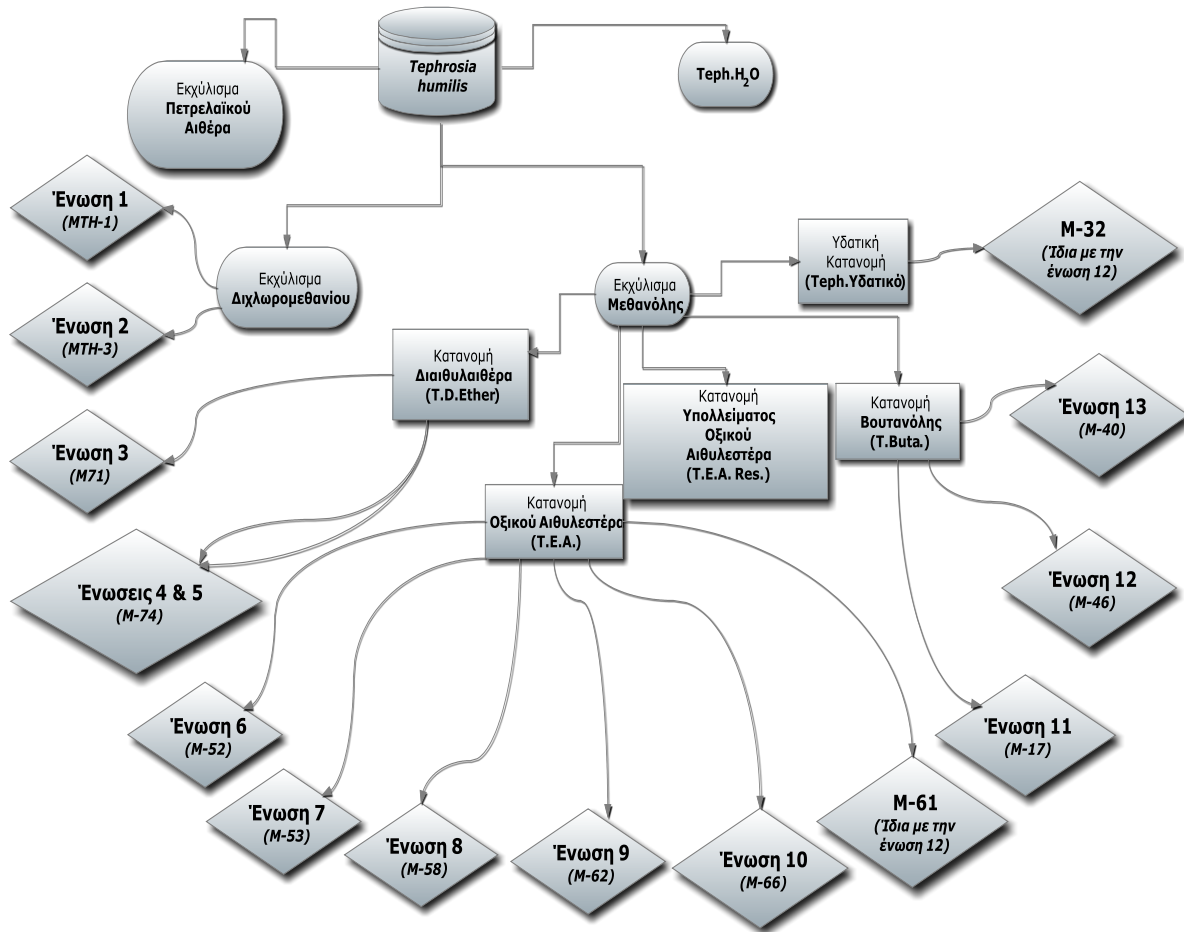
Φάσμα μάζας:



Από το φάσμα υπεριώδους-ορατού της ένωσης συμπεραίνεται ότι πρόκειται για φλαβόνη και πιο συγκεκριμένα για παράγωγο απιγενίνης, με την απορρόφηση στα 320nm να επιβεβαιώνει την ύπαρξη καφεϊκού. Από το φάσμα μάζας προκύπτει ότι το μοριακό ιόν της ένωσης είναι το $[M+H]^+ = 579$, που σταθεροποιείται με την προσθήκη νατρίου $[M+Na]$ στα 601. Με την απομάκρυνση του κουμαρικού προκύπτει το θραύσμα με m/z 433 $[M-(\text{κουμαρικό-OH})+H]^+$. Το ιόν με m/z 271 αντιστοιχεί στο άγλυκο απιγενίνη, μετά την απομάκρυνση και του καφεϊκού. Η θέση πρόσδεσης του καφεϊκού οξέος είναι στο 7-OH, καθότι το 4-OH παραμένει ελεύθερο λόγω μη υψιχρωμικής μετατόπισης της κορυφής I και λόγω αυτής της τιμής της κορυφής I στο φάσμα υπεριώδους-ορατού, συμπεραίνεται ότι το καφεϊκό συνδέεται μέσω αιθερικού δεσμού με την απιγενίνη και όχι μέσω εστερικού, διότι τότε η υψιχρωμική μετατόπιση της κορυφής I θα ήταν μεγαλύτερη (Mabry et al., 1970). Ωστόσο, δεν μπορεί να προσδιοριστεί ο τρόπος σύνδεσης του κουμαρικού στο καφεϊκό, καθότι μπορεί να συνδεθεί μαζί του είτε με αιθερικό, είτε με εστερικό δεσμό. Το θραύσμα με m/z 725 φαίνεται να αντιστοιχεί σε adduct του 579 με κουμαρικό $[579+(\text{κουμαρικό-H}_2\text{O})]$. Η θραυσμάτωση του μορίου, μαζί με την προτεινόμενη δομή θραύσματος για m/z 463, δίνεται παρακάτω.



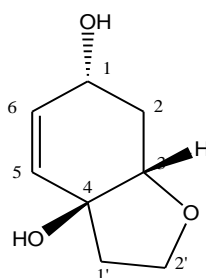
ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΙΣ ΟΥΣΙΩΝ



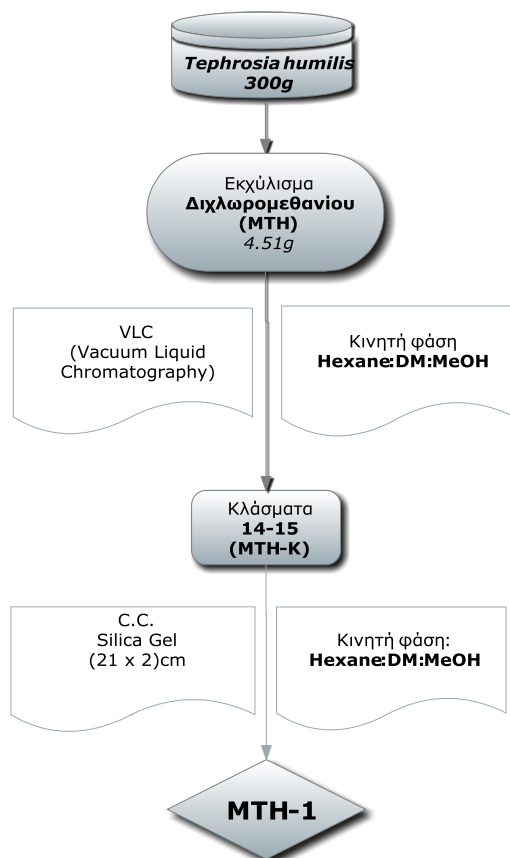
Εκχύλισμα Διχλωρομεθανίου

Ένωση 1

(Ουσία MTH-1): 1,4-διυδροξυ-3,4-(εποξυαιθανο)-5-κυκλοεξένιο



Απομόνωση ουσίας MTH-1



Το στερεό υπόλειμμα του εκχυλίσματος του διχλωρομεθανίου χρωματογραφήθηκε σε στήλη υπό κενό [VLC, (7.0 x 10)cm (h x d)] επί πηκτής οξειδίου του πυριτίου, με κινητή φάση εξάνιο → διχλωρομεθάνιο → μεθανόλη και με

όγκο συλλεγομένων κλασμάτων 300ml. Τα κλάσματα 14-15, που αντιστοιχούσαν σε ποσοστό 92:8 (DM:MeOH), συνενώθηκαν (MTH-K) και χρωματογραφήθηκαν σε στήλη με υλικό πλήρωσης πηκτή οξειδίου του πυριτίου (Merck, Art. 9385) (2.0 x 21)cm με διαλύτη έκλουσης μίγματα διαλυτών αυξημένης πολικότητας, εξάνιο → διχλωρομεθάνιο → μεθανόλη. Συλλέχθηκαν 347 κλάσματα μέσου όγκου 10ml και μετά από χρωματογραφικούς ελέγχους με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, συνενώθηκαν τα κλάσματα 119-131 που εκλούστηκαν με DM:MeOH 94:6 και συμπυκνώθηκαν, δίνοντας στερεό υπόλειμμα συνολικού βάρους 135.9mg.

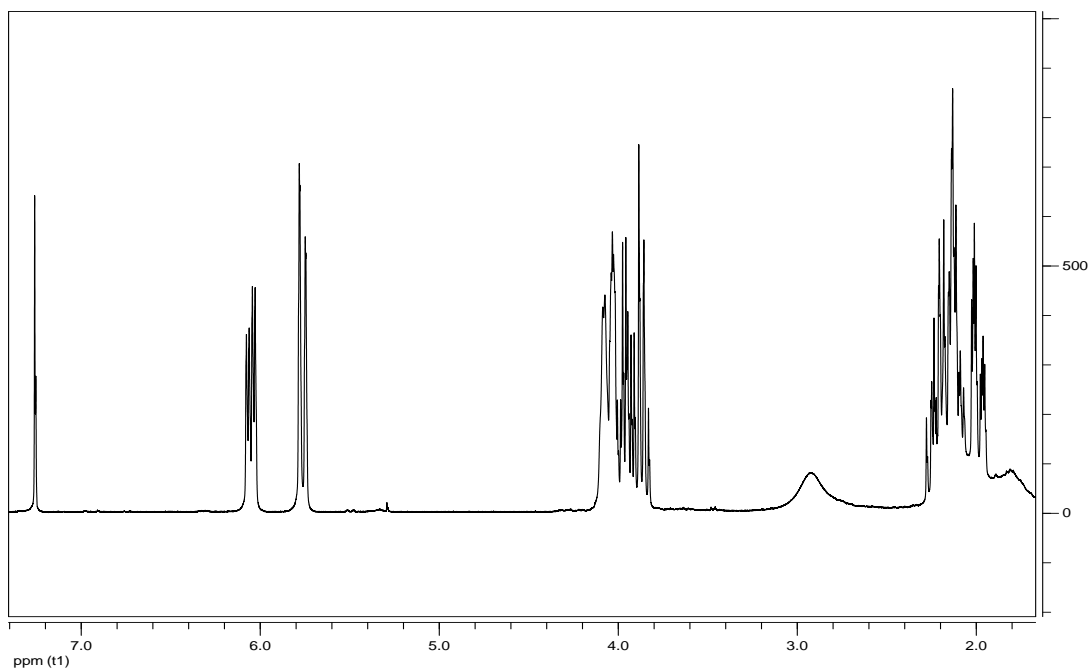
Φάσμα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού

$^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3, 300MHz)			
Θέση	δ_{H} (ppm)	J_{HH} (Hz)	δ_{C} (ppm)*
1	4.08(m)		63.0
2 _a	2.07-2.16(m)		31.7
2 _b			
3	4.04(m)		81.1
4			74.6
5	5.76(d)	$J=10.0$	130.2
6	6.05(dd)	$J=10.0, 4.6$	131.9
1' _a	2.18-2.25(m)		39.7
1' _b	1.95-2.03(m)		
2' _a	3.95(m)		65.7
2' _b	3.85(m)		

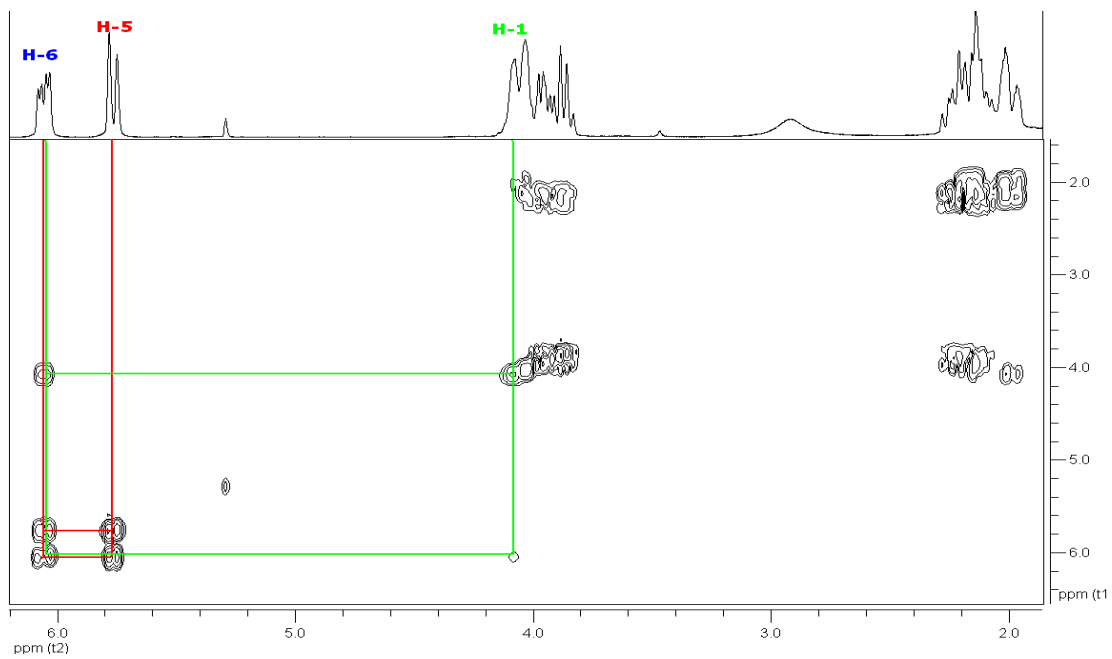
*Τιμές που προκύπτουν από το φάσμα ^{13}C

Τα σήματα δύο ολεφινικών μεθινίων εμφανίζονται με χημικές μετατοπίσεις 5.76ppm και 6.05ppm, που φαίνονται από το φάσμα $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$ ότι σχάζονται μεταξύ τους και αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-5 και H-6, αντίστοιχα. Αυτό επιβεβαιώνεται και από το γεγονός ότι μόνο το H-5 εμφανίζεται ως διπλή κορυφή λόγω του ότι είναι πρωτόνιο διπλού δεσμού του πυρανικού δακτυλίου, γειτονικό του τεταρτοταγούς C-4, και έχει σήμα στα 81.2 στο HMBC που αντιστοιχεί στον C-3. Στην περιοχή των 3.82ppm έως 4.08ppm εμφανίζονται τα σήματα των πρωτονίων δύο μεθινίων και των δύο πρωτονίων ενός μεθυλενίου που είτε φέρουν υδροξύλιο,

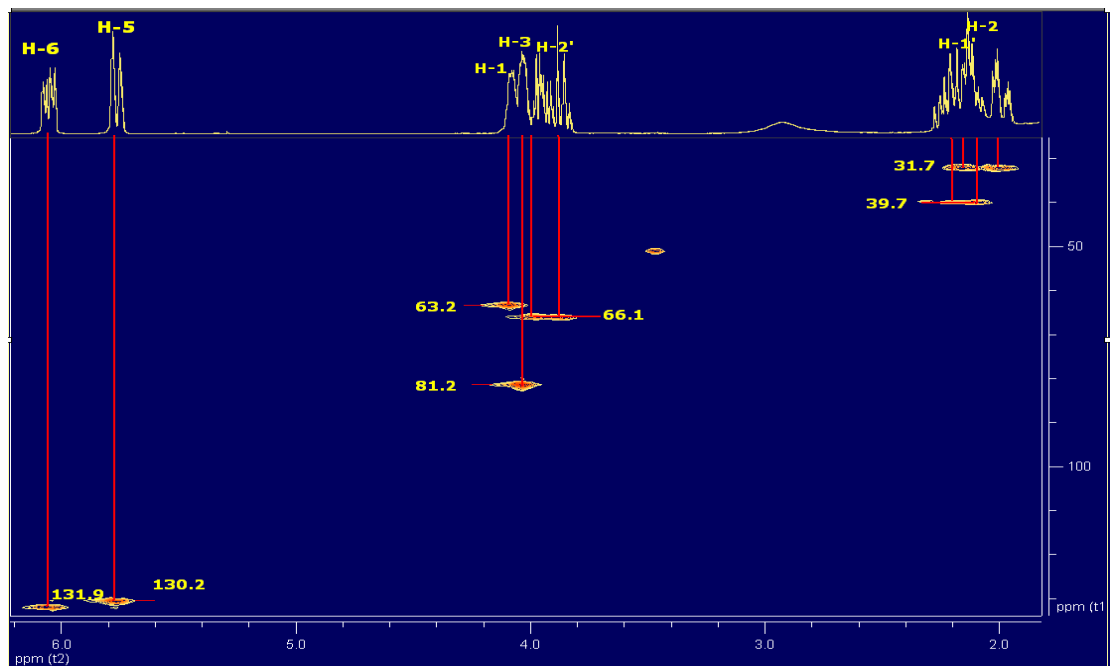
είτε είναι γειτονικά του αιθερικού δεσμού και έχουν χημικές μετατοπίσεις δ (1H, 4.08), δ (1H, 4.04) και δ (2H, 3.85 / 3.95). Οι τιμές αυτές προκύπτουν για τα H-1, H-3 και τα δύο πρωτόνια H-2, αντίστοιχα. Στην περιοχή 1.95-2.25ppm εμφανίζονται τα πρωτόνια των δύο μεθυλενίων που αντιστοιχούν στις θέσεις 1' και 2. Τέλος από το HMBC προκύπτει κοινό σήμα στα 74.5 που έχουν τα H-6, H-5, H-2 και H-2', το οποίο αντιστοιχεί στον τεταρτοταγή άνθρακα C-4. Από το φάσμα ^{13}C -NMR προκύπτουν οκτώ σήματα που περιλαμβάνουν τα δύο ολεφινικά σήματα μεθινίου σε δ 131.9 και δ 130.2, ένα σήμα για τον τεταρτοταγή οξυγονωμένο άνθρακα που προαναφέρθηκε σε δ 74.6, δύο σήματα οξυγονωμένων μεθινίων σε δ 81.1 και δ 63.0, ένα σήμα οξυγονωμένου μεθυλενίου σε δ 65.7 και δύο σήματα μεθυλενίων σε δ 39.7 και δ 31.7. Σύμφωνα με τα φασματοσκοπικά δεδομένα και τη μελέτη της βιβλιογραφίας, η ουσία MTH-1 ταυτοποιήθηκε ως το 1,4-διυδροξυ-3,4-(εποξυαιθανο)-5-κυκλοεξένιο. Είναι η τρίτη φορά που απομονώνεται από φυσικές πηγές. Προηγουμένως έχει απομονωθεί από τα φυτά *Millingtonia hortensis* (Hase T. et al., 1995) και *Campsis grandiflora* (Kim D.-H. et al., 2005).



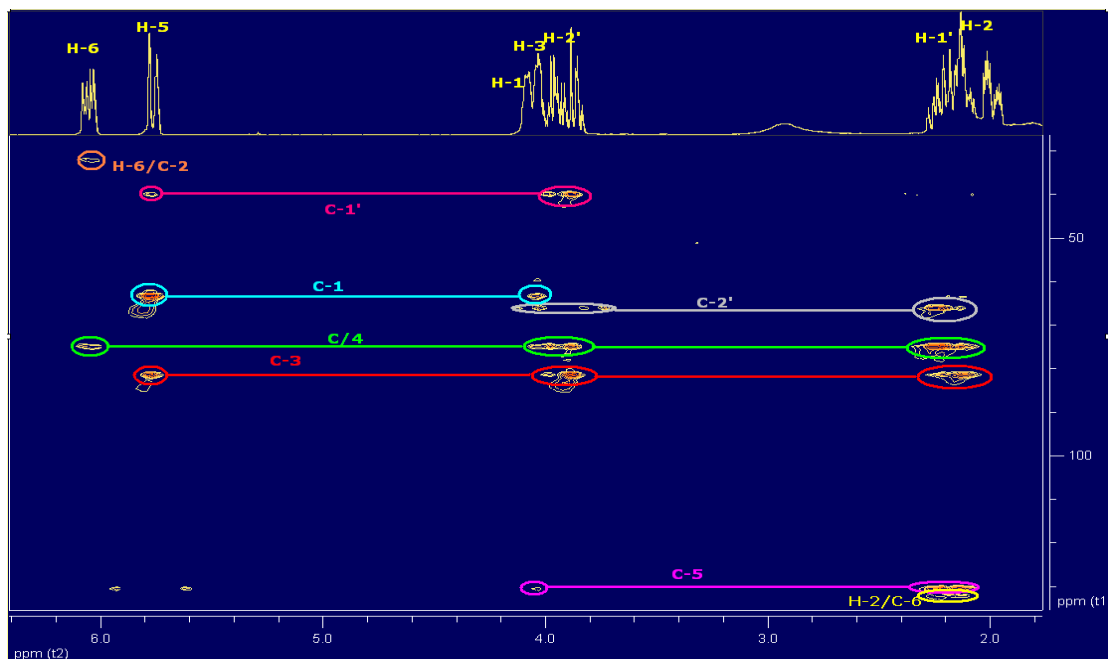
Φάσμα ^1H -NMR της MTH-1 (CDCl_3 , 300MHz)



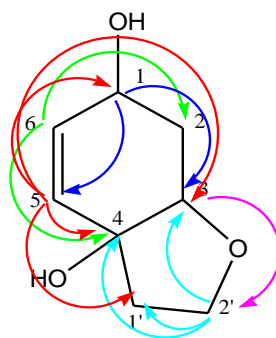
Λεπτομέρεια φάσματος COSY της MTH-1 (CDCl₃, 300MHz)



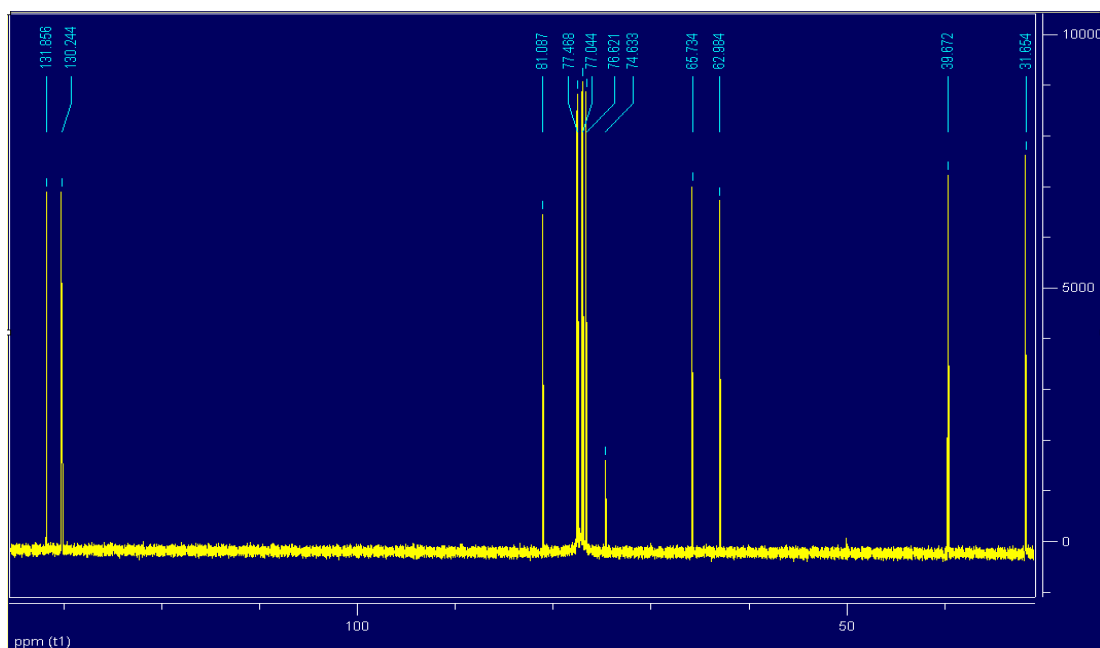
Φάσμα HSQC της MTH-1 (CDCl₃, 500MHz)



Φάσμα HMBC της MTH-1 (CDCl₃, 500MHz)

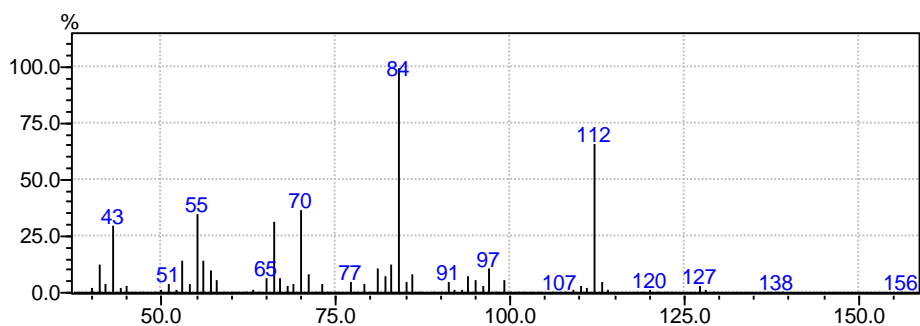


Κυριότερες συζεύξεις H-C που προκύπτουν από το HMBC

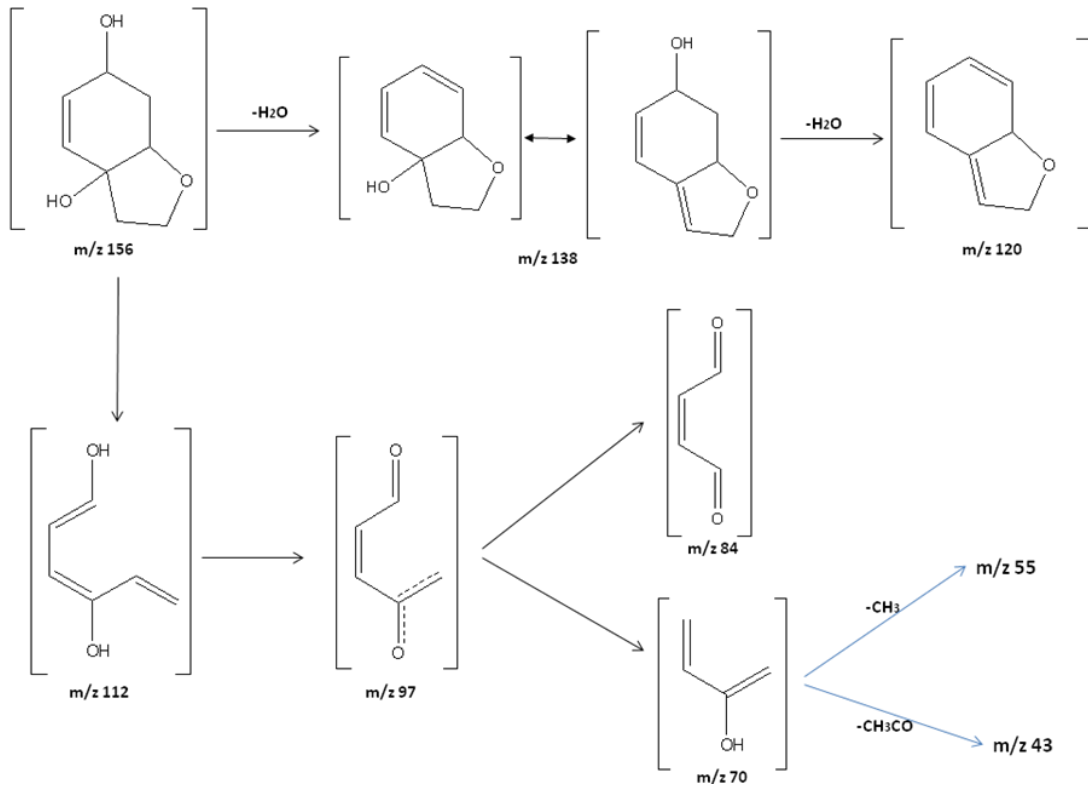


Φάσμα ^{13}C -NMR της MTH-1 (CDCl_3 , 125MHz)

Φάσμα Μάζας

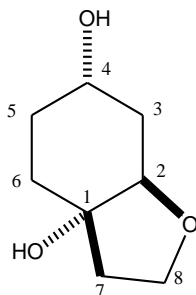


Από το φάσμα μάζας της ένωσης, που ελήφθη σε σύστημα GC-MS [Shimadzu GC/MS QP 2010 (χρωματογράφος Shimadzu GC 2010-gas chromatograph)], προκύπτει το μοριακό ιόν της ένωσης σε m/z 156 που αντιστοιχεί στο μοριακό τύπο $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{O}_3$. Η θραυσμάτωση της ένωσης με τις προτεινόμενες δομές θραυσμάτων δίδονται στο παρακάτω σχήμα.

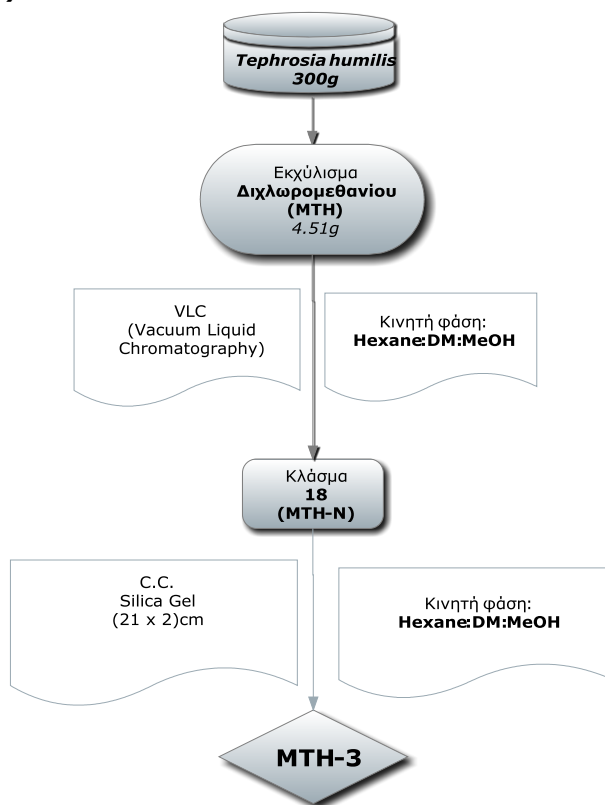


Ένωση 2

(Ουσία MTH-3): 1,4-διυδροξυ-1,2-(εποξυαιθανο)-5-κυκλοεξάνιο (Κλεροϊντισίνη Ε)



Απομόνωση ουσίας MTH-3



Το στερεό υπόλειμμα του εκχυλίσματος του διχλωρομεθανίου χρωματογραφήθηκε σε στήλη υπό κενό [VLC, (7.0 x 10)cm (h x d)] επί πηκτής οξειδίου του πυριτίου, με κινητή φάση εξάνιο → διχλωρομεθάνιο → μεθανόλη και με όγκο συλλεγομένων κλασμάτων 300ml. Το κλάσμα 18 (MTH-N) που αντιστοιχεί σε ποσοστό 80:20 (DM:MeOH), συνενώθηκε και χρωματογραφήθηκε σε στήλη με υλικό πλήρωσης πηκτή οξειδίου του πυριτίου (Merck, Art. 9385) (2.0 x 21)cm με διαλύτη έκλυσης μίγματα διαλυτών αυξημένης πολικότητας, εξάνιο → διχλωρομεθάνιο →

μεθανόλη. Συλλέχθηκαν 246 κλάσματα μέσου όγκου 10ml και μετά από χρωματογραφικούς ελέγχους με TLC, συνενώθηκαν τα κλάσματα 31-45 που εκλούστηκαν με DM:MeOH 95:5 έως 93:7 και συμπυκνώθηκαν, δίνοντας στερεό υπόλειμμα συνολικού βάρους 7.7mg.

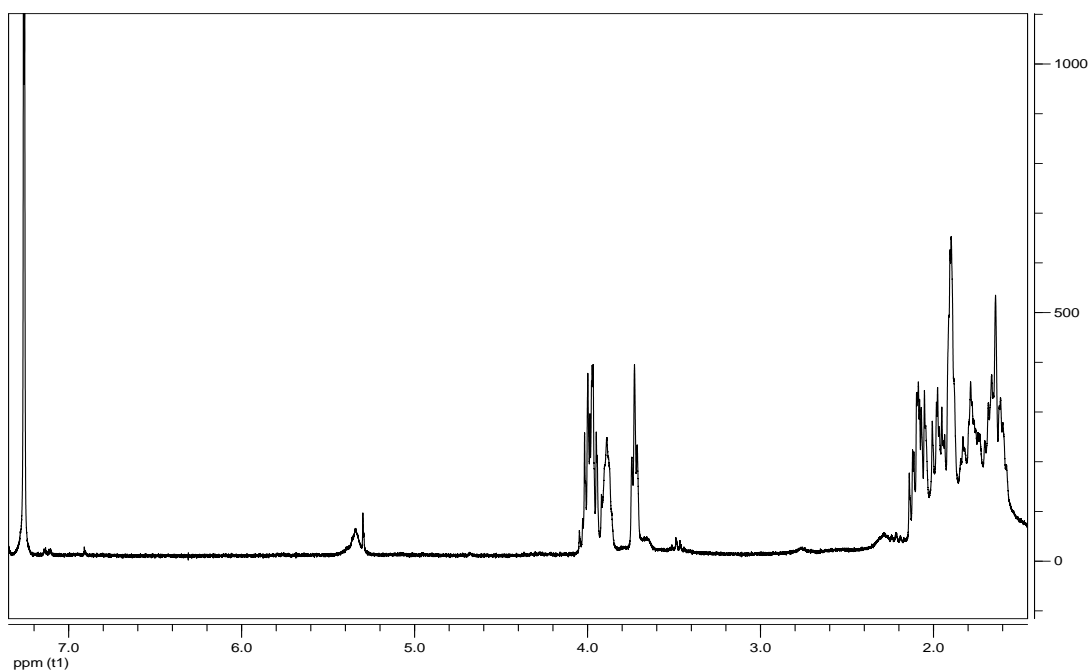
Φάσμα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού

$^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}(\text{CDCl}_3, 300\text{MHz})$			
Θέση	$\delta_{\text{H}}(\text{ppm})$	$J_{\text{HH}}(\text{Hz})$	$\delta_{\text{C}}(\text{ppm})$
1			75.8
2	3.73(t)	$J=4.8, 9.5$	80.8
3 _a	1.89-1.91(m)		33.2
3 _b			
4	3.89(m)		66.1
5 _a	1.60-1.68(m)		29.1
5 _b			
6 _a	1.93-2.12(m)		28.4
6 _b			
7 _a	2.07-2.16(m)		38.6
7 _b			
8 _a	3.95-4.02(m)		64.9
8 _b			

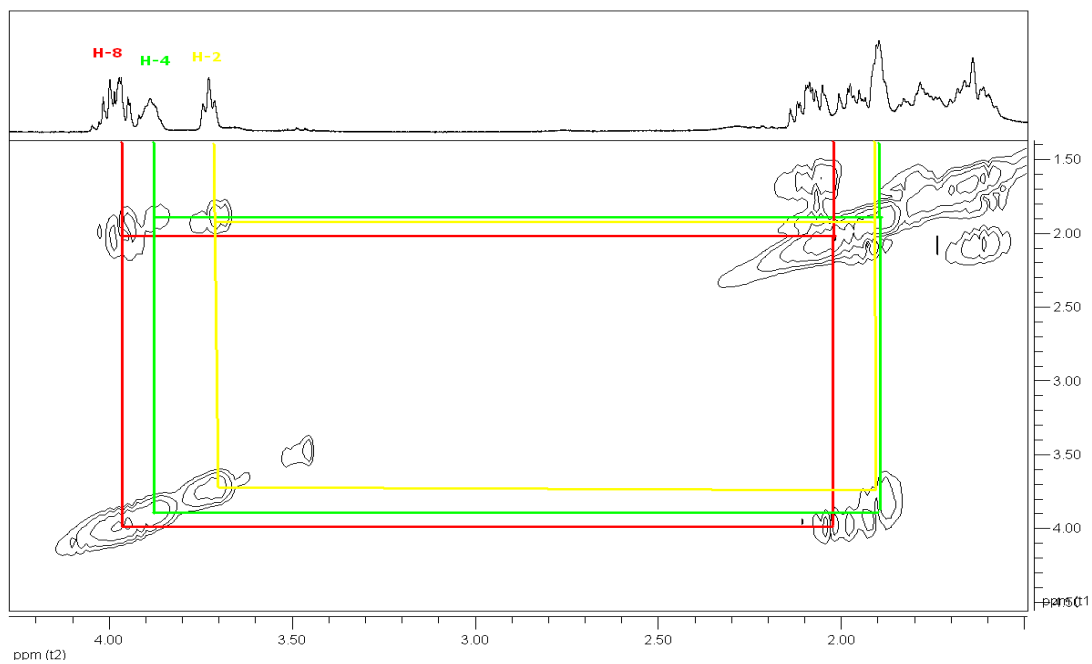
*Τιμές που προκύπτουν από το φάσμα ^{13}C

Στην περιοχή 3.70-4.02ppm απαντώνται τα πρωτόνια της ένωσης που φέρουν είτε υδροξύλιο, είτε είναι γειτονικά του αιθερικού δεσμού. Ως πολλαπλές κορυφές εμφανίζονται τα δύο πρωτόνια του C-8 και το ένα πρωτόνιο του C-4, ενώ ως τριπλή κορυφή εμφανίζεται το πρωτόνιο του C-2 με χημική μετατόπιση δ στα 3.73ppm. Από τη βιβλιογραφία προκύπτει και ότι, βιογενετικά, το H-2 και το 1-OH έχουν α-προσανατολισμό (Huang Z.-S. et al., 2009). Από το φάσμα HSQC προκύπτει ότι οι άνθρακες των θέσεων 8, 4 και 2 αντιστοιχούν στις τιμές 64.9, 66.1 και 80.8. Τα υπόλοιπα 8 μεθυλικά πρωτόνια των θέσεων 3, 5, 6 και 7 εμφανίζονται στην περιοχή 1.60-2.16ppm, των οποίων η διευκρίνιση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια των στοιχείων που προέκυψαν από τα δισδιάστατα φάσματα COSY, HSQC και HMBC. Πιο αναλυτικά, από το φάσμα HMBC προκύπτουν τα κοινά σήματα των πρωτονίων H-2 και H-8 με τιμές 38.6 και 75.8, που αντιστοιχούν στους C-7 και C-1 αντίστοιχα,

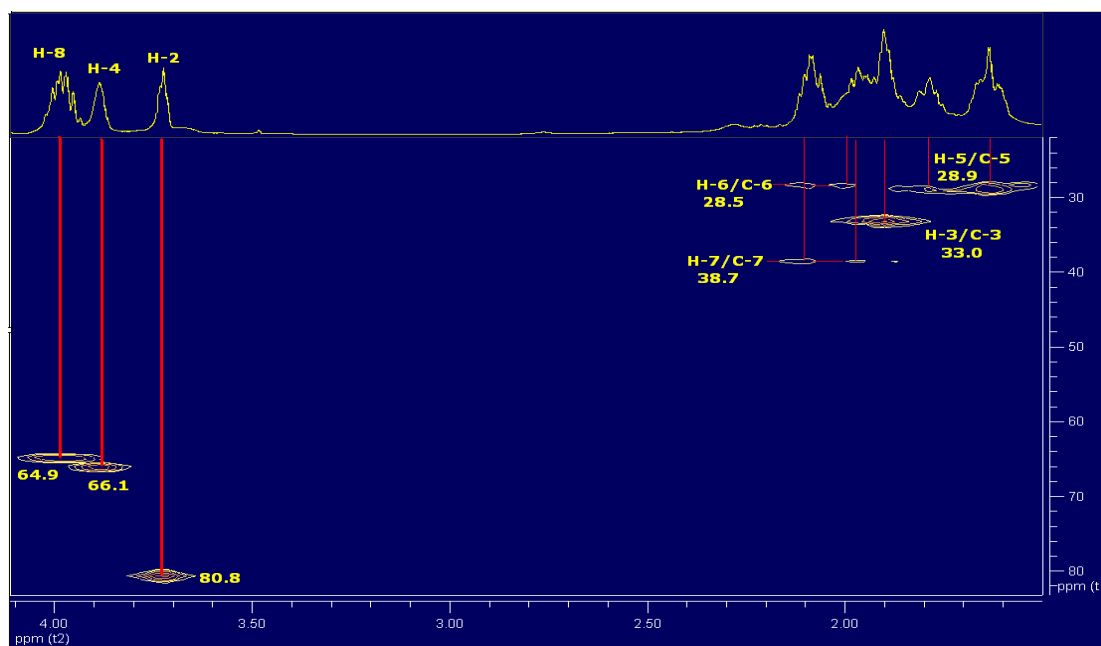
διότι ο C-1 θα εμφανίσει τη μεγαλύτερη τιμή ως τεταρτοταγής άνθρακας που φέρει οξυγόνο. Στη συνέχεια, με τη βοήθεια του φάσματος HSQC προκύπτει ότι τα πρωτόνια της θέσης 7 εμφανίζονται με χημική μετατόπιση δ στην περιοχή των 2.07-2.16ppm. Από όλα τα παραπάνω και με τις πληροφορίες από φάσματα NMR της βιβλιογραφίας προκύπτει ότι η ένωση 2 αντιστοιχεί στο 1,4-διυδροξυ-1,2-(εποξυαίθανο)-5-κυκλοεξάνιο (κλεροϊντισίνη E) που απομονώθηκε για πρώτη φορά από το *Millingtonia hortensis* και στη συνέχεια, από δύο γένη του είδους *Clerodendrum*, το *C. indicum* και το *C. bungei*, και όχι το συνθετικό-μη φυσικό εναντιομερές ισοκλεροϊντισίνη E που απαντάται με *trans*-διαμόρφωση ως προς τα δύο υδροξύλια. Μάλιστα, τα τελευταία χρόνια παρουσιάζεται ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τη σύνθεση αυτής, καθώς και παραγώγων της (Hase T. et al., 1995; Chen J. et al., 2001; Tian J. et al., 1997; Wenderski T.A. et al., 2009; Yang H. et al., 2002; You Z. et al., 2009; Barradas S. et al., 2007).



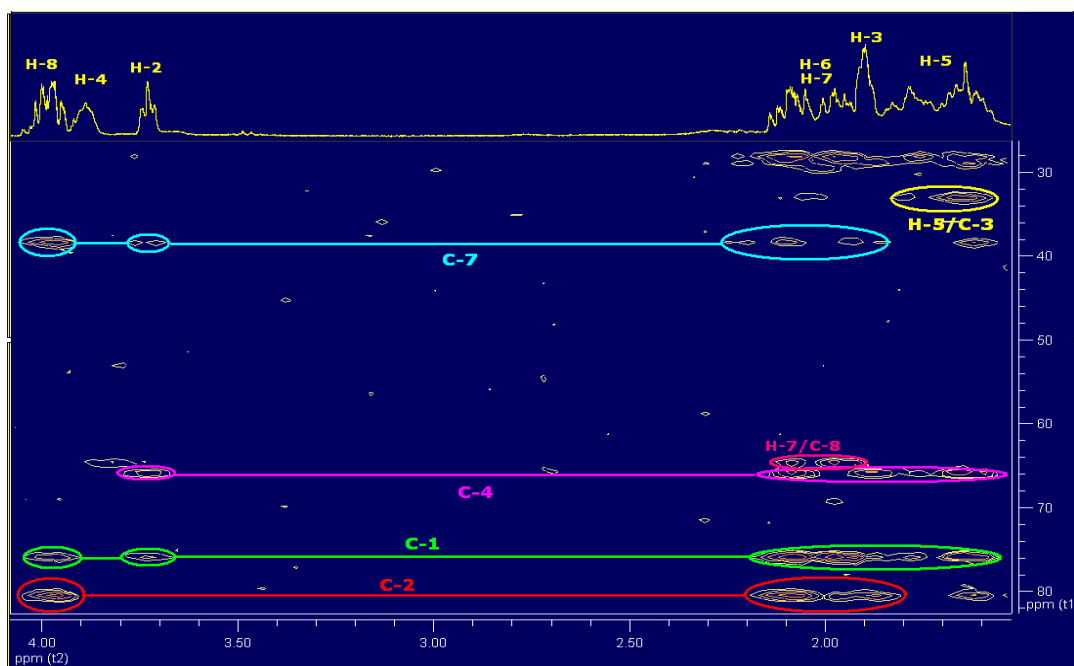
Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της MTH-3 (CDCl_3 , 300MHz)



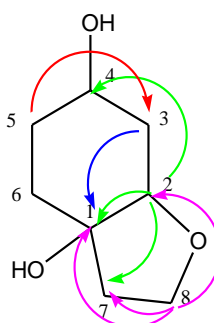
Φάσμα COSY της MTH-3 (CDCl₃, 500MHz)



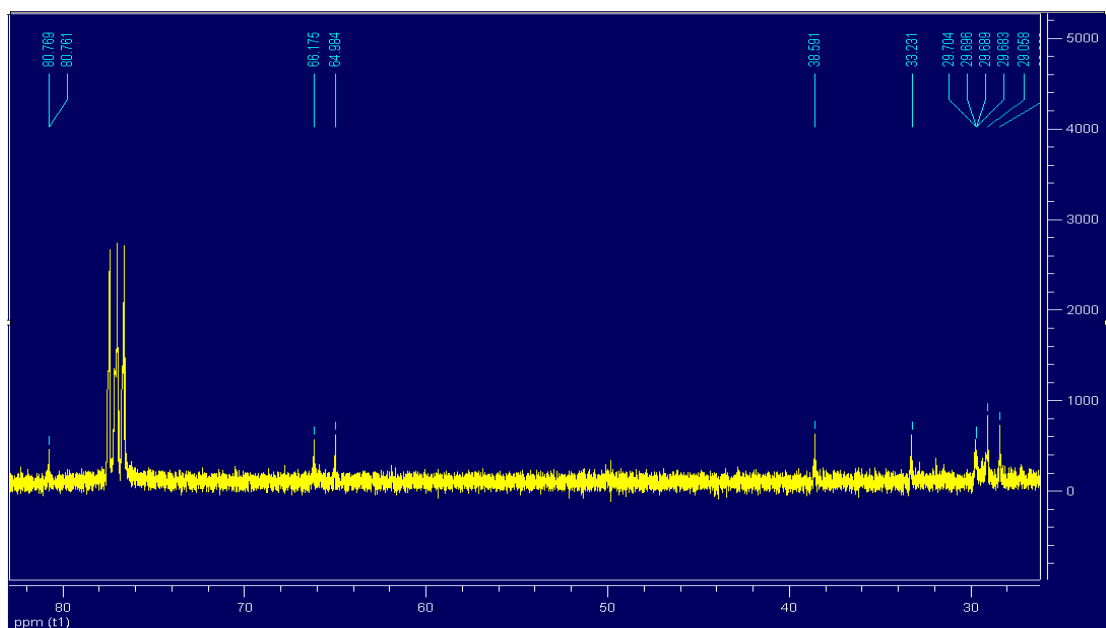
Φάσμα HSQC της MTH-3 (CDCl₃, 500MHz)



Φάσμα HMBC της MTH-3 (CDCl₃, 500MHz)

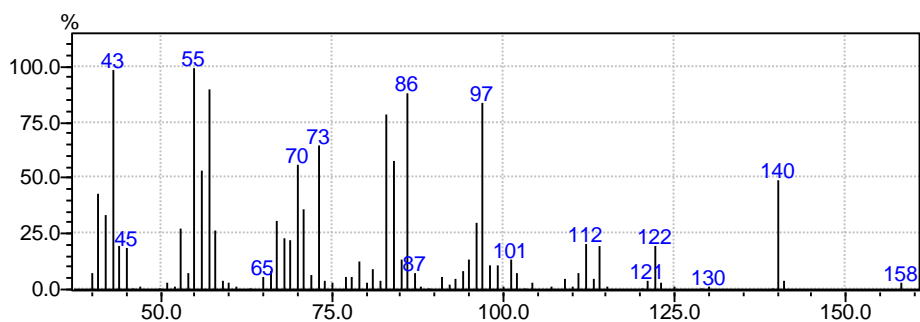


Μερικές από τις συζεύξεις H-C που προκύπτουν από το HMBC

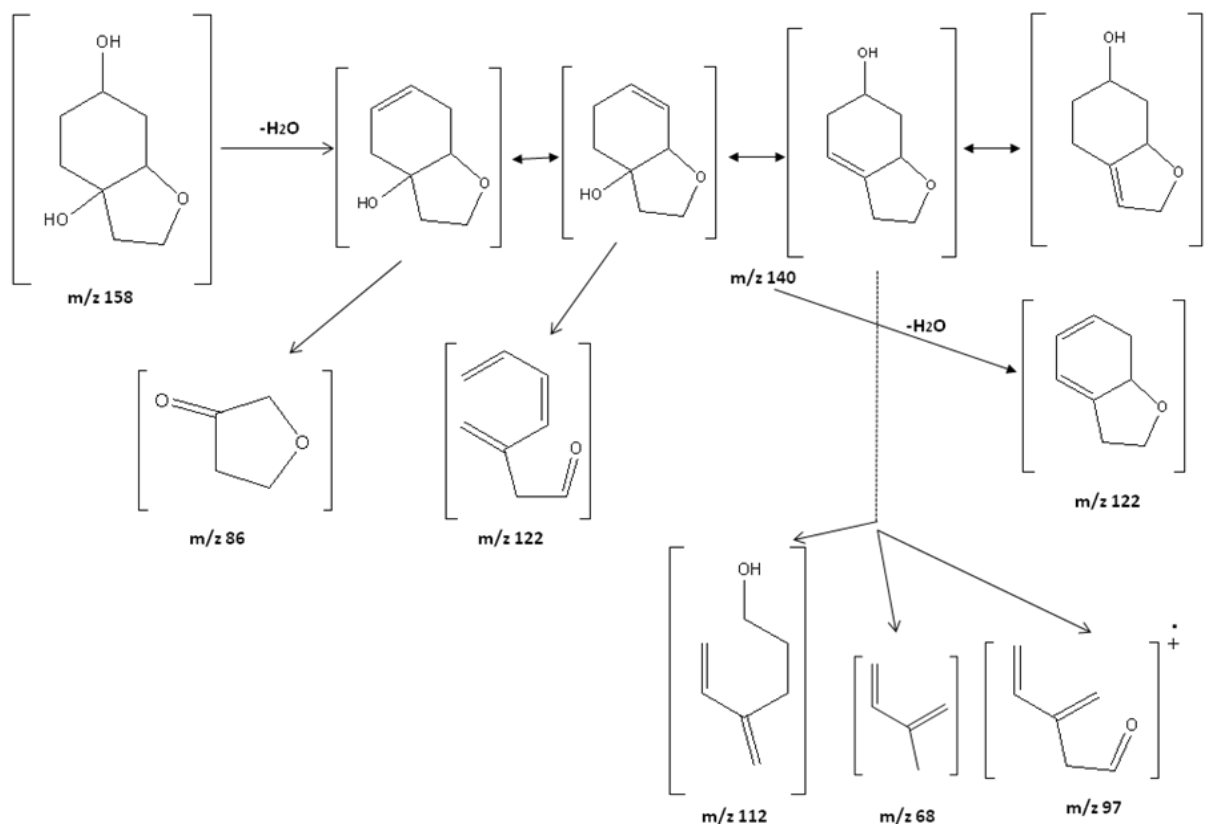


Φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ της MTH-3 (CDCl_3 , 125MHz)

Φάσμα Μάζας



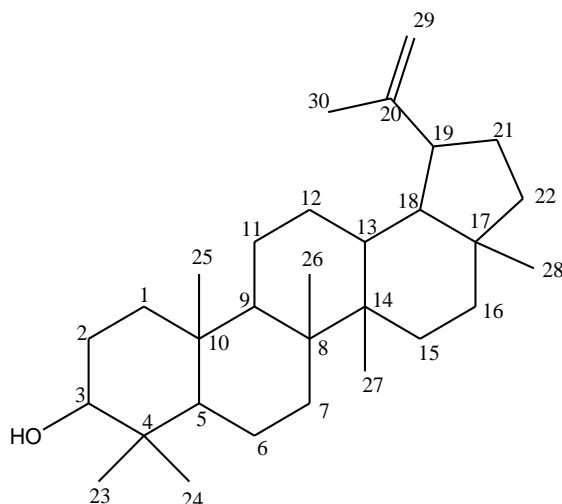
Από το φάσμα μάζας της ένωσης, που ελήφθη σε σύστημα GC-MS [Shimadzu GC/MS QP 2010 (χρωματογράφος Shimadzu GC 2010-gas chromatograph)], προκύπτει το μοριακό ιόν της ένωσης σε m/z 158 που αντιστοιχεί στο μοριακό τύπο $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{O}_3$. Η θραυσμάτωση της ένωσης με τις προτεινόμενες δομές θραυσμάτων δίδονται στο παρακάτω σχήμα.



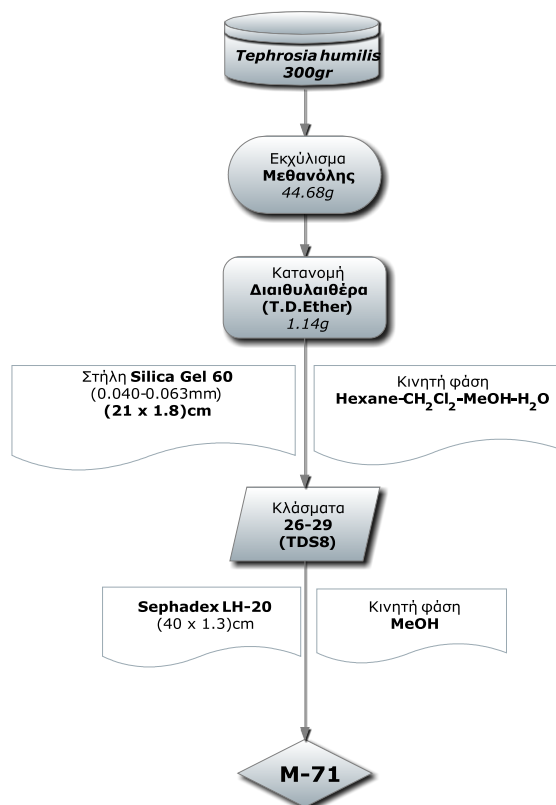
Κατανομή Διαιθυλαιθέρα

Ένωση 3

(Ουσία M71): 3-υδροξυ-λουπ-20(29)-ένιο (λουπεόλη)



Απομόνωση ουσίας M71



Το στερεό υπόλειμμα του διαιθυλαιθέρα χρωματογραφήθηκε σε στήλη Silica gel 60 (21 x 1.8)cm με κινητή φάση μίγματα διαλυτών, εξάνιο → διχλωρομεθάνιο → μεθανόλη → νερό, με αυξανόμενη πολικότητα. Τα κλάσματα 26-29, που αντιστοιχούσαν σε ποσοστό 75:25 (Εξάνιο:Διχλωρομεθάνιο), συνενώθηκαν (TDS8) και χρωματογραφήθηκαν σε στήλη Sephadex LH-20 (40 x 1.3)cm με διαλύτη έκλουσης μεθανόλη. Συλλέχθηκαν κλάσματα όγκου 2ml και μετά από χρωματογραφικούς ελέγχους με TLC, συνενώθηκαν τα κλάσματα 1-6, που αντιστοιχούσαν στην ουσία M-71 και συμπυκνώθηκαν, δίνοντας στερεό υπόλειμμα συνολικού βάρους 1.6mg.

Έλεγχος καθαρότητας

Για τον έλεγχο καθαρότητας, έγινε TLC σε πλάκες Silica Gel 60 (Merck 5553). Η ουσία δεν εμφάνισε φθορισμό τόσο στο ορατό όσο και στο υπεριώδες. Μετά από ψεκασμό της πλάκας με διάλυμα θειικής βανιλίνης και θέρμανση εμφανίσθηκε η M71 σαν σκοτεινή κηλίδα.

Στο σύστημα εξάνιο:διχλωρομεθάνιο (25:75) το R_f της ουσίας αντιστοιχεί στην τιμή 0.30 και σε σύστημα εξάνιο:διχλωρομεθάνιο (50:50) $R_f=0.05$.

Φάσμα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού

$^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}(\text{DMSO}, 600\text{MHz})$			
Θέση	$\delta_{\text{H}}(\text{ppm})$	$J_{\text{HH}}(\text{Hz})$	$\delta_{\text{C}}(\text{ppm})^*$
1	0.85		45.4
	1.55		
2	1.44		30.0
3	2.97(dd)	5.4, 10.8	79.7
4	-		41.2
5	0.63(m)		57.7
6	1.44(m)		20.9
	1.34(m)		
7	1.34(m)		36.6
8	-		43.1
9	1.23(m)		53.0
10	-		39.8

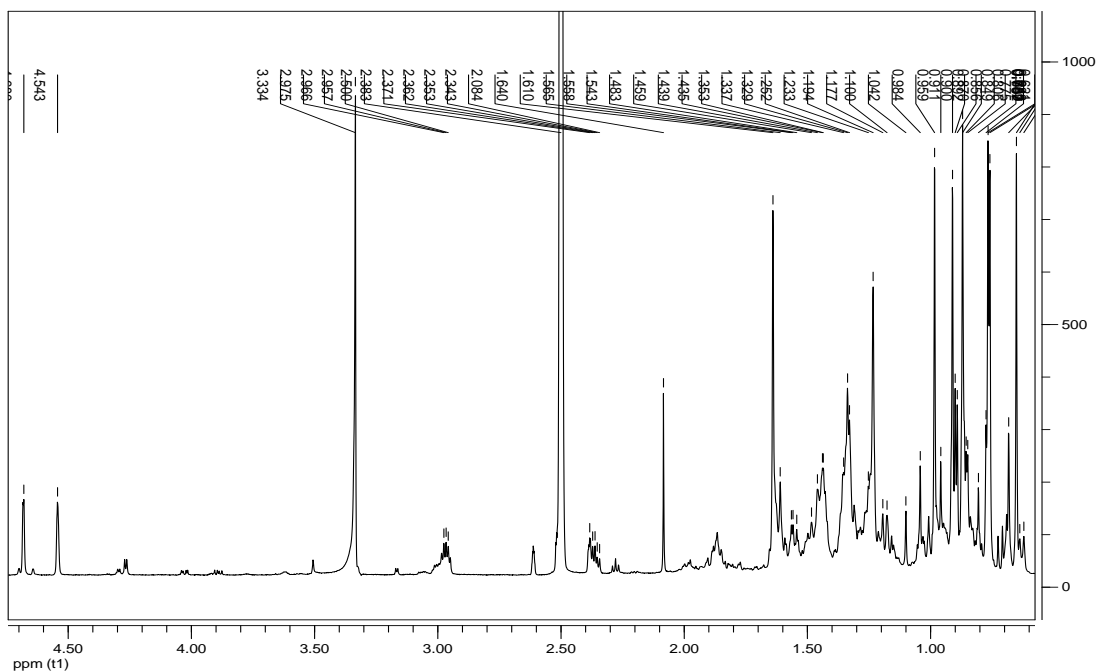
11	1.34(m)		20.9
12	1.48(m)		23.0
13	1.34(m)		41.2
14	-		45.0
15	1.44(m)		30.0
16	1.34(m)		38.0
	1.44(m)		
17	-		45.5
18	2.36(m)		50.6
19	1.23(m)		50.2
20	-		152.8
21	1.23(m)		31.7
22	1.19(m)		42.1
	1.34(m)		
23	0.87(s)		31.0
24	0.65(s)		18.8
25	0.77(s)		18.8
26	0.98(s)		18.8
27	0.91(s)		17.3
28	0.76(s)		20.5
29	4.68(br s)		112.5
	4.54(br s)		
30	1.64(s)		21.9

*Τιμές που προκύπτουν από τα φάσματα HSQC, HMBC

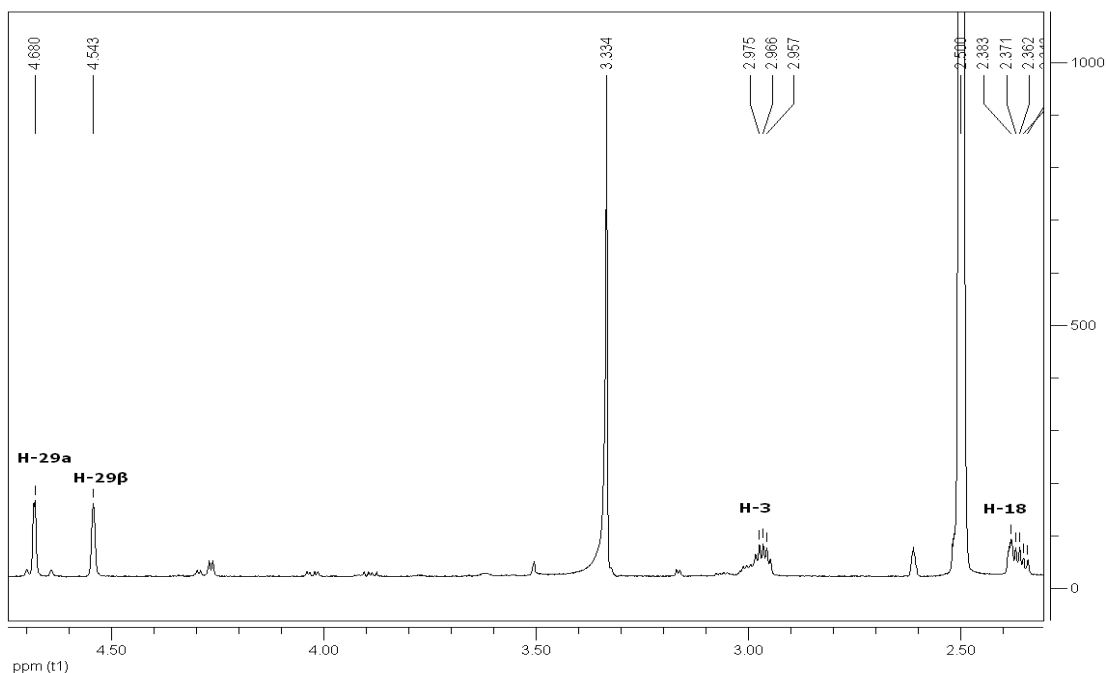
Από το φάσμα πρωτονίου (600 MHz, DMSO-d₆) παρατηρείται ένα οξυγονωμένο μεθίνιο, ένα τελικό μεθυλένιο γειτονικό διπλού δεσμού και επτά απλές κορυφές που αντιστοιχούν σε μεθύλια, ενώ αντίθετα υπάρχει απουσία σημάτων στην αρωματική περιοχή. Επιπρόσθετα, μελέτη και των δισδιάστατων φασμάτων οδηγεί στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για ένωση με σκελετό λουπανίου (πεντακυκλικό τριτερπένιο). Έτσι, στο φάσμα πρωτονίου εμφανίζεται ένα πρωτόνιο μεθινίου (**H-3**) σε δ_H 2.97 (dd, J=5.4, 10.8Hz) που υποδεικνύει την παρουσία οξυγονούχου ομάδας, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τα δισδιάστατα φάσματα, όπου εμφανίζεται ένας μοναδικός άνθρακας με τιμή δ_C 79.7, λόγω της παρουσίας υδροξυλίου και ο οποίος αντιστοιχεί στον **C-3**. Από το φάσμα COSY προκύπτει η αλληλουχία των πρωτονίων

H-3 και **H-2**, οπότε συμπεραίνεται ότι το ένα από τα δύο πρωτόνια της θέσης 2 εμφανίζεται σε χημική μετατόπιση με δ_H 1.44. Ακόμη, στο φάσμα πρωτονίου εμφανίζονται τα δύο μεθυλενικά πρωτόνια του διπλού δεσμού (**H-29**) σε δ_H 4.54 και 4.68ppm με τον άνθρακα C-29 σε τιμή 112.5 από το φάσμα HSQC, καθώς και επτά απλές κορυφές που αντιστοιχούν στα σήματα των επτά αντίστοιχων μεθυλίων της ένωσης (δ_H 1.64, 0.98, 0.91, 0.87, 0.77, 0.76, 0.65). Επειδή όλα τα μεθύλια εμφανίζονται ως απλές κορυφές, συμπεραίνεται ότι ενώνονται με τεταρτοταγείς άνθρακες, ενώ από αυτά ξεχωρίζει το μεθύλιο που είναι γειτονικό στο διπλό δεσμό, καθώς εμφανίζεται σε μεγαλύτερη τιμή χημικής μετατόπισης με δ_H 1.64 (**H-30**) και με δ_C 21.9, όπως προκύπτει από το φάσμα HSQC. Στο φάσμα HMBC, υπάρχει κοινό σήμα των πρωτονίων δύο μεθυλίων σε δ_C 79.7, που όπως προαναφέρθηκε αντιστοιχεί στον C-3, [εντοπισμός **H-23** (δ_H 0.87, δ_C 31.0) και **H-24** (δ_H 0.65, δ_C 18.8)]. Επιπροσθέτως, όπως φαίνεται στο φάσμα HMBC, υπάρχει μοναδικό κοινό σήμα των μεθυλίων των θέσεων 23, 24 και ενός τρίτου μεθυλίου σε δ_C 57.7 [εντοπισμός του μεθυλίου της θέσης **25** (δ_H 0.77, δ_C 18.8)]. Αυτό το σήμα (δ_C 57.7) μπορεί να αντιστοιχεί μόνο στον άνθρακα της θέσεως 5 (**C-5**), όπου από το φάσμα HSQC προκύπτει ότι εμφανίζει τιμή χημικής μετατόπισης δ_H 0.63. Η ύπαρξη ενός ακόμη κοινού σήματος των H-23 και H-24 σε δ_C 41.2 αντιστοιχεί αναγκαστικά στον τεταρτοταγή άνθρακα **C-4**. Η ύπαρξη κοινού σήματος του μεθυλίου της θέσεως 25 με ένα ακόμη μεθύλιο σε δ_C 53.0 [εντοπισμός του μεθυλίου της θέσης **26** (δ_H 0.98, δ_C 18.8)] αντιστοιχεί αναγκαστικά στην τιμή δ_C του άνθρακα **C-9**. Από το συγκεκριμένο σήμα σε δ_C 53.0, από το φάσμα HSQC, προκύπτει ότι το αντίστοιχο πρωτόνιο **H-9** εμφανίζεται σε χημική μετατόπιση με δ_H 1.23ppm. Η εμφάνιση κοινών σημάτων του μεθυλίου της θέσης 26 με έτερο μεθύλιο, βοηθάει στον εντοπισμό του μεθυλίου της θέσης **27** σε δ_H 0.91 και δ_C 17.3. Το εναπομείναν μεθύλιο του φάσματος αντιστοιχεί αναγκαστικά στο μεθύλιο της θέσης **28** με δ_H 0.76 και δ_C 20.5. Ακόμη εμφανίζεται η σύζευξη των πρωτονίων των μεθυλίων 25, 26&27, 26&27, 28 και 30 με τους τεταρτοταγείς άνθρακες σε δ_C 39.8 (**C-10**), 43.1 (**C-8**), 45.0 (**C-14**), 45.5 (**C-17**) και 152.8 (**C-20**), αντίστοιχα. Αυτό προκύπτει από τα σήματα των ανθράκων που εμφανίζουν τα μεθύλια στο HMBC, τα οποία δεν εμφανίζονται στο HSQC, και επομένως ανήκουν σε τεταρτοταγείς άνθρακες. Από τη σύγκριση όλων

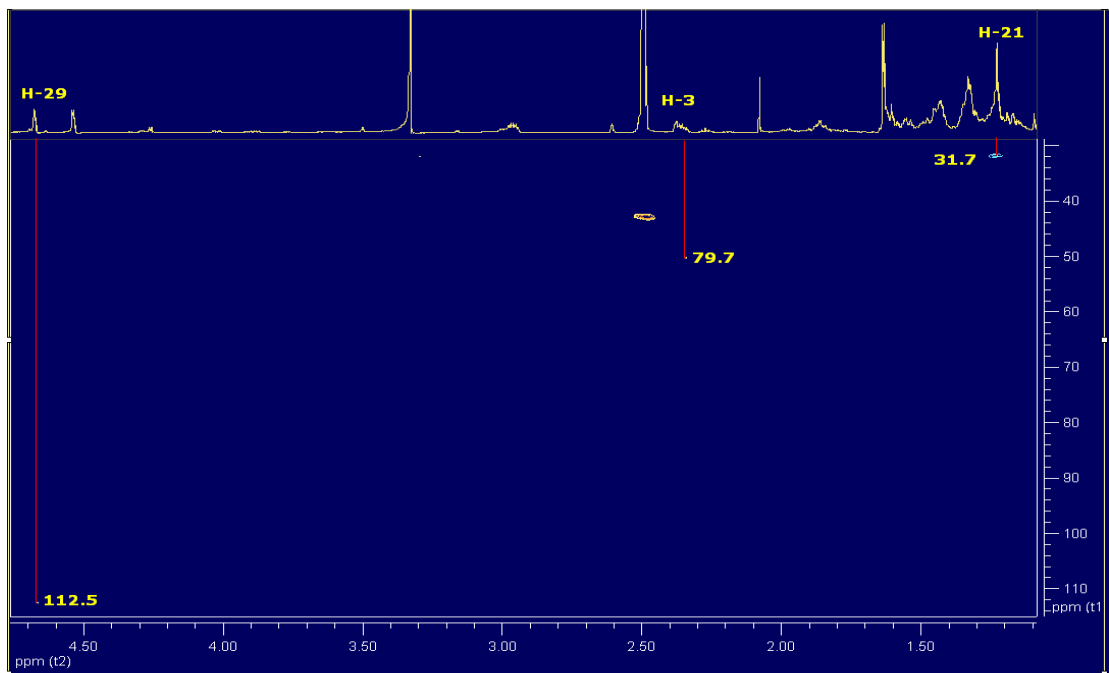
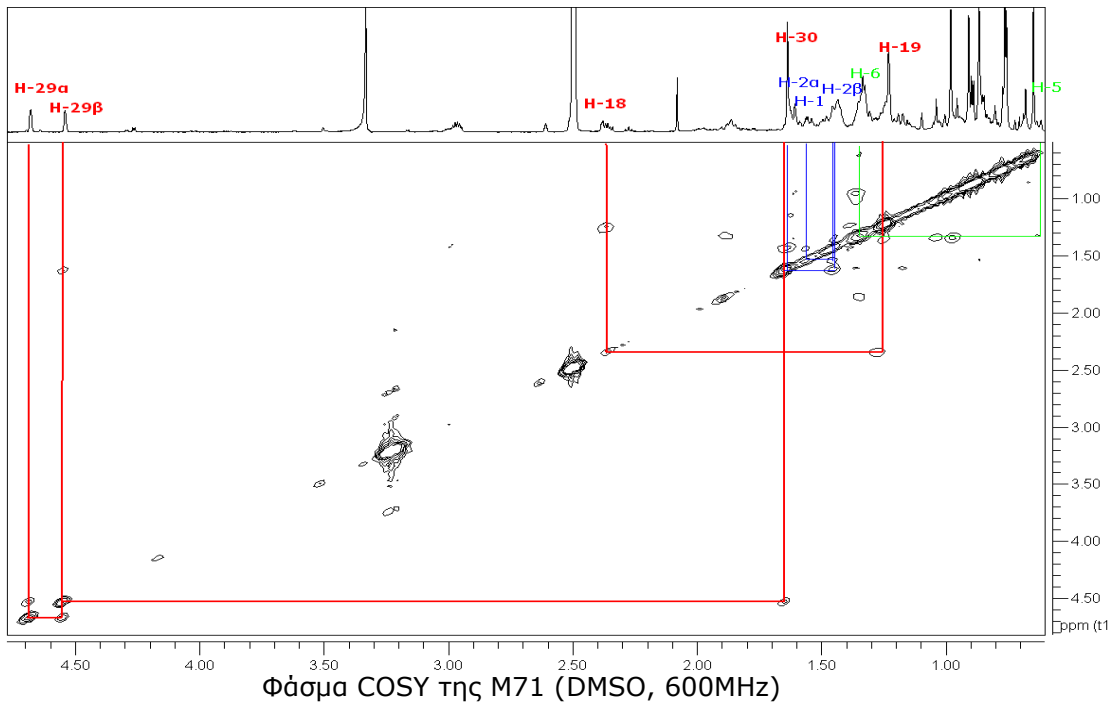
των φασματοσκοπικών δεδομένων της ένωσης M71 με αυτά της βιβλιογραφίας, προκύπτει ότι η ένωση αυτή αντιστοιχεί στη λουπεόλη (Baek M.-Y. et al., 2010).

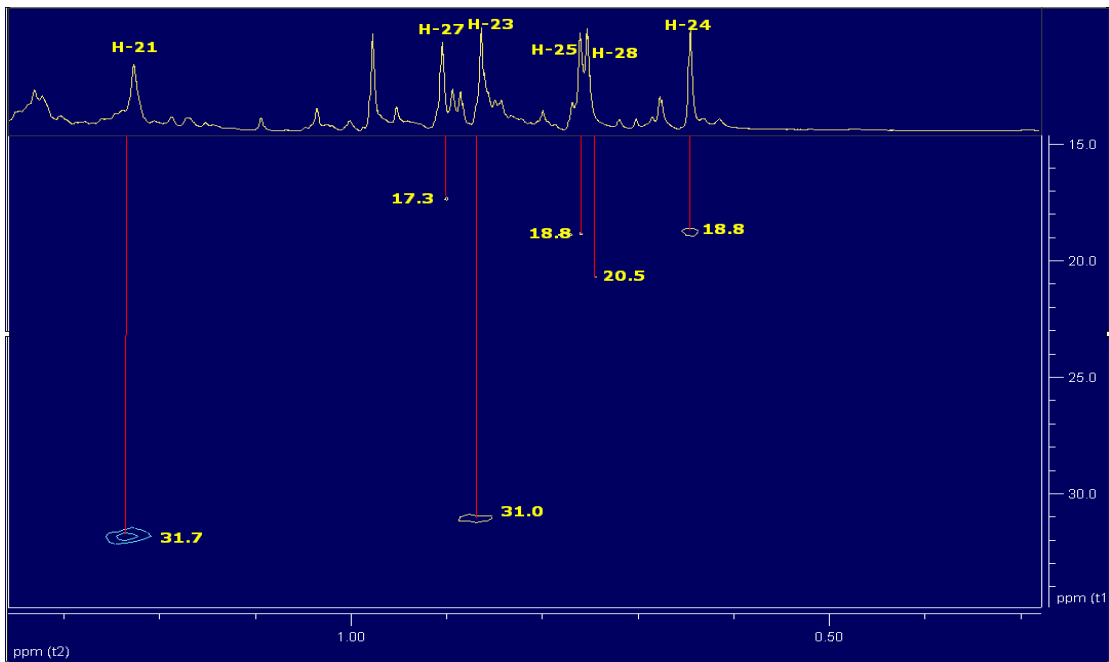


Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της M71 (DMSO, 600MHz)

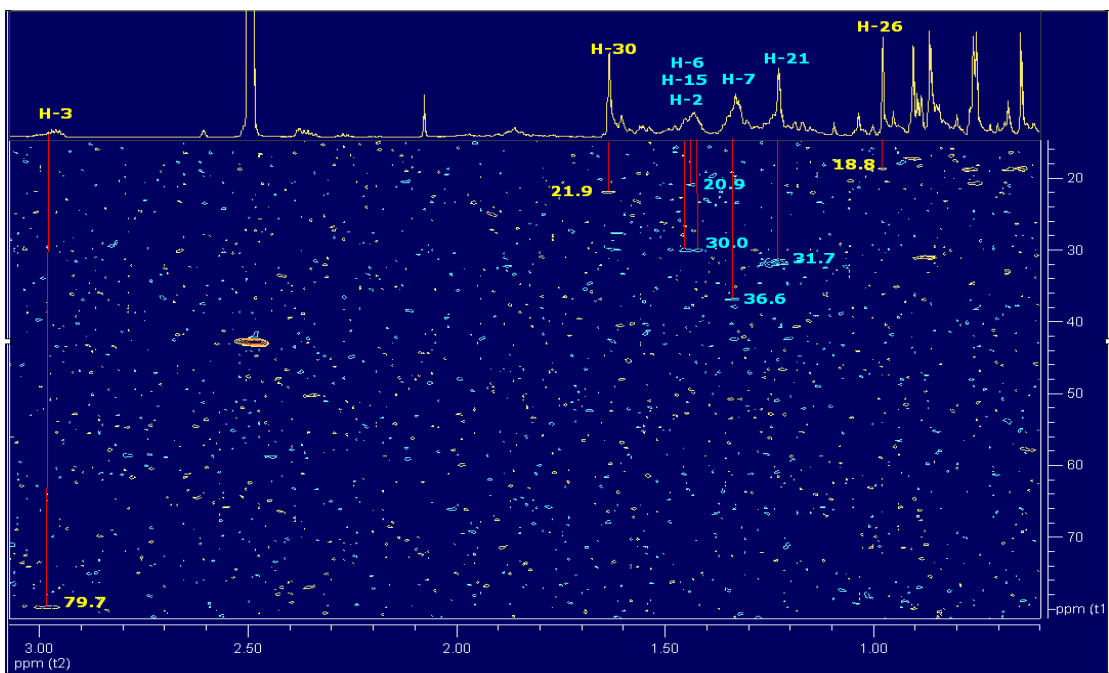


Λεπτομέρεια φάσματος του $^1\text{H-NMR}$ της M71 (DMSO, 600MHz)

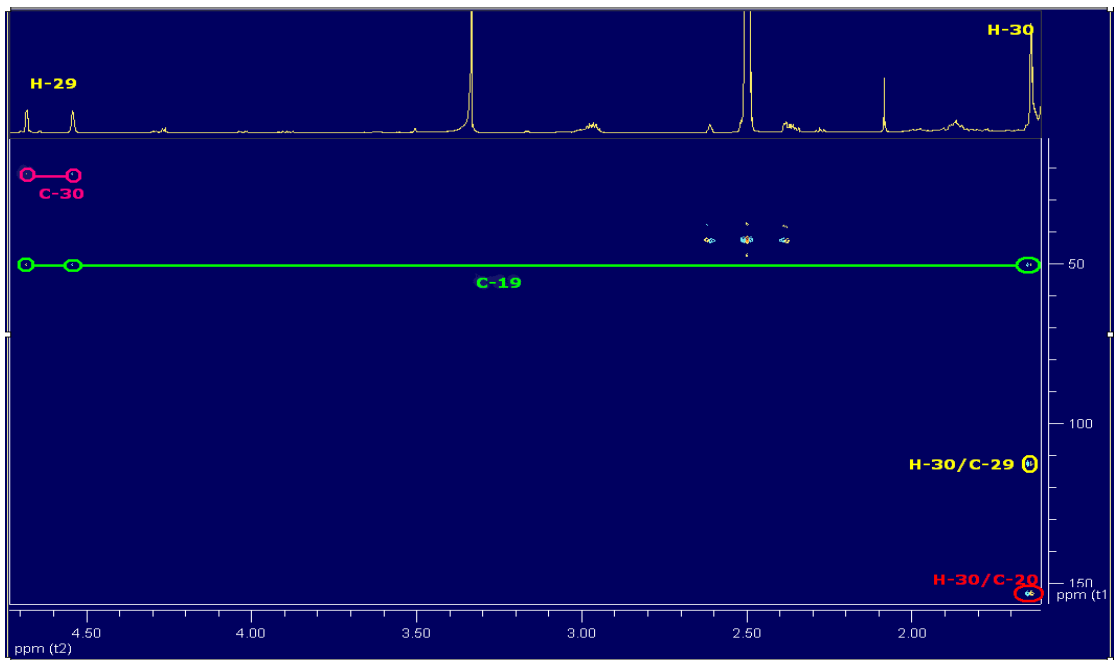




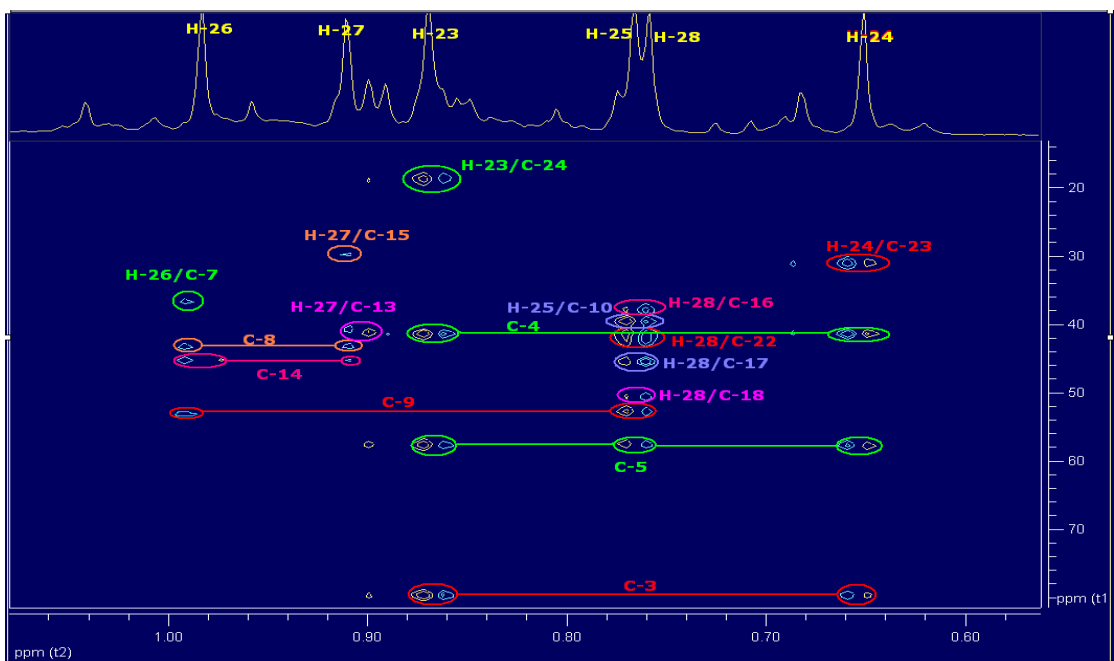
Λεπτομέρεια φάσματος HSQC της M71 (DMSO, 600MHz)



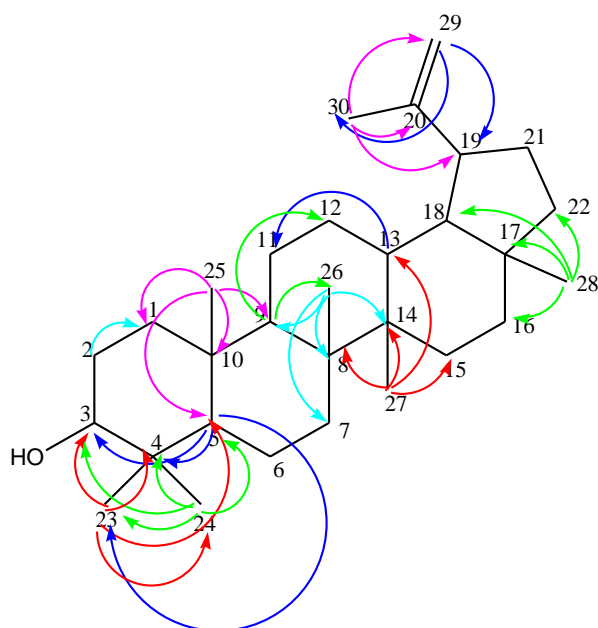
Λεπτομέρεια φάσματος HSQC της M71 με αυξημένη ένταση/ευαισθησία



Λεπτομέρεια φάσματος HMBC της M71 (DMSO, 600MHz)

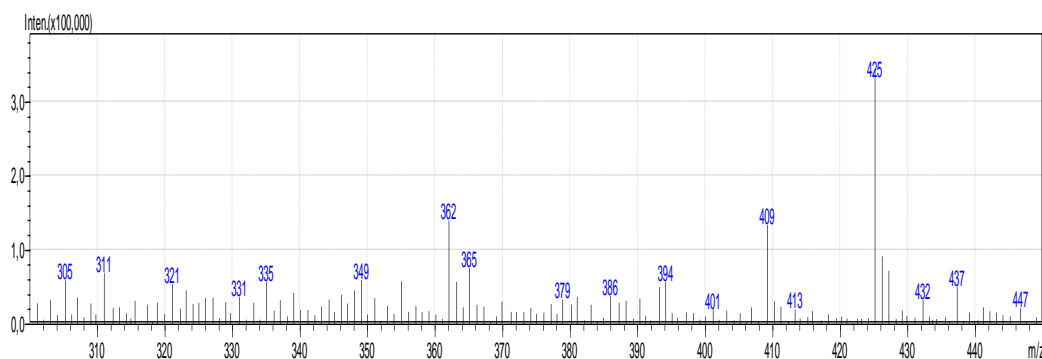


Λεπτομέρεια φάσματος HMBC της M71 (DMSO, 600MHz)



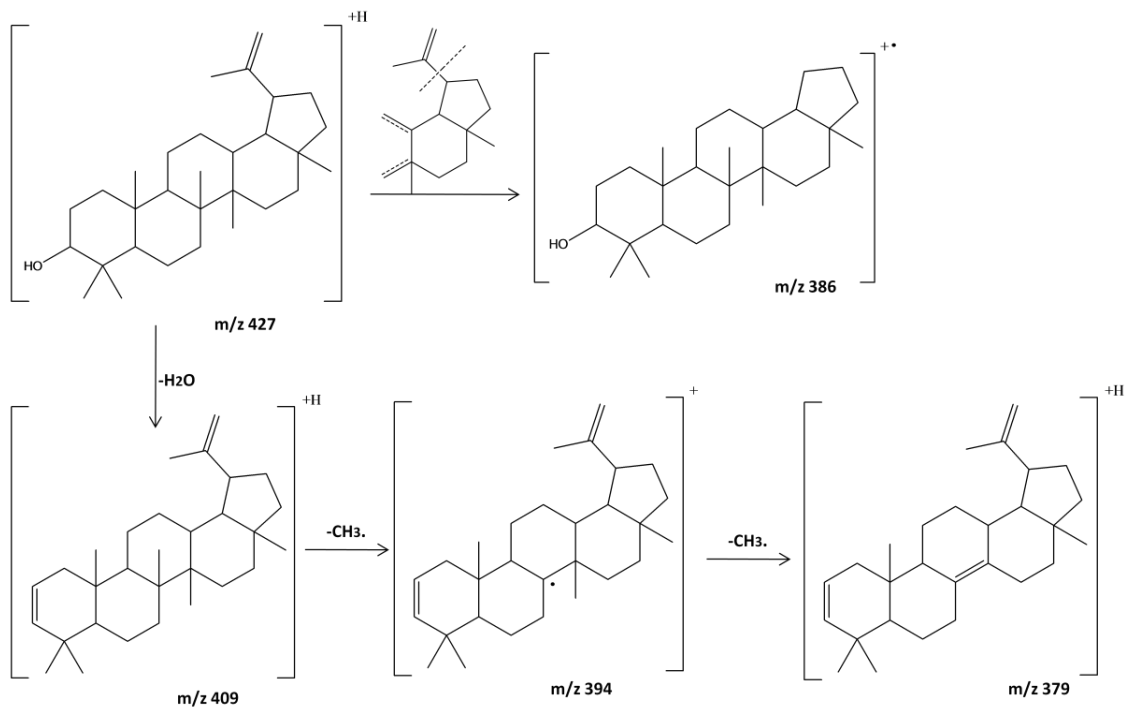
Μερικές από τις συζεύξεις H-C που προκύπτουν από το HMBC

Φάσμα μάζας



Από το φάσμα μάζας της ουσίας, που ελήφθη σε σύστημα LC-MS TIC(+) (Shimadzu 2020) με θετικό ιονισμό, προκύπτει το θραύσμα 427 που αντιστοιχεί στο $[M+H]^+$. Η τιμή του μοριακού ιόντος αντιστοιχεί στο μοριακό τύπο $C_{30}H_{50}O$. Με την απόσπαση της προπενυλομάδας του πενταμελούς δακτυλίου προκύπτει το θραύσμα με m/z 386. Από το μοριακό ιόν με την απομάκρυνση ενός μορίου H_2O , προκύπτει το θραύσμα m/z 409, από το οποίο με απομάκρυνση μιας ρίζας μεθυλίου, προκύπτει η κατιονική ρίζα 394. Με την επιπλέον απομάκρυνση μιας μεθυλομάδας, σχηματίζεται το θραύσμα με m/z 379. Η θραυσματοποίηση με τις ακόλουθες προτεινόμενες δομές που δίνονται παρακάτω. Η θραυσμάτωση της ένωσης και οι προτεινόμενες δομές των

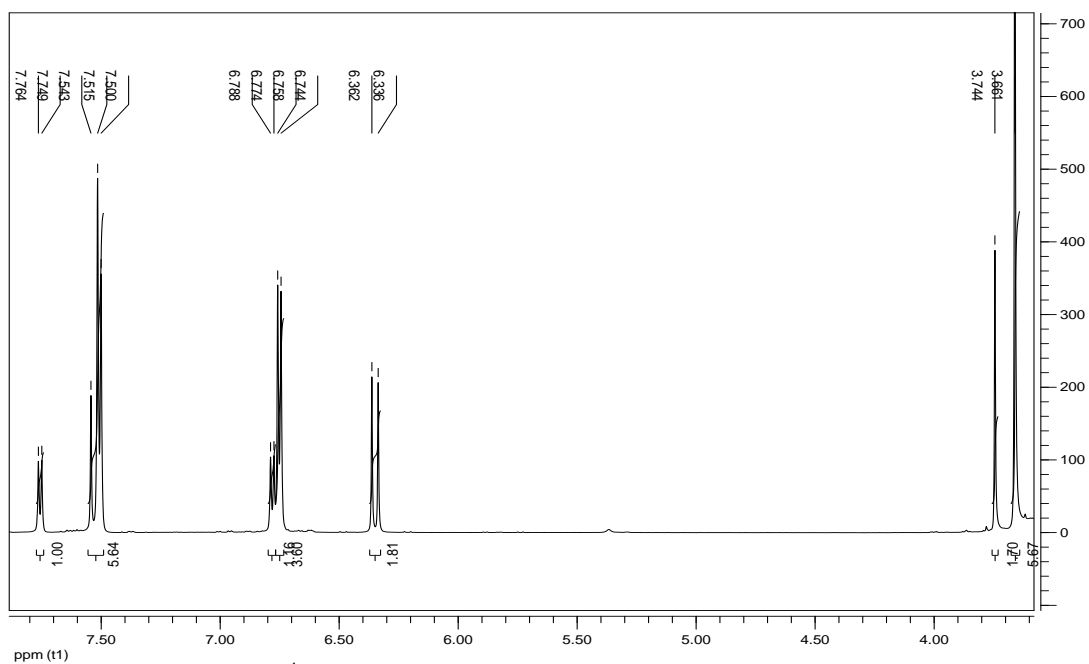
θραυσμάτων δίδονται στο παρακάτω σχήμα. Από τα παραπάνω δεδομένα φαίνεται ότι η ένωση 3 είναι η λουπεόλη, όπως προκύπτει και από τη βιβλιογραφία (Baek M.-Y. et al., 2010).



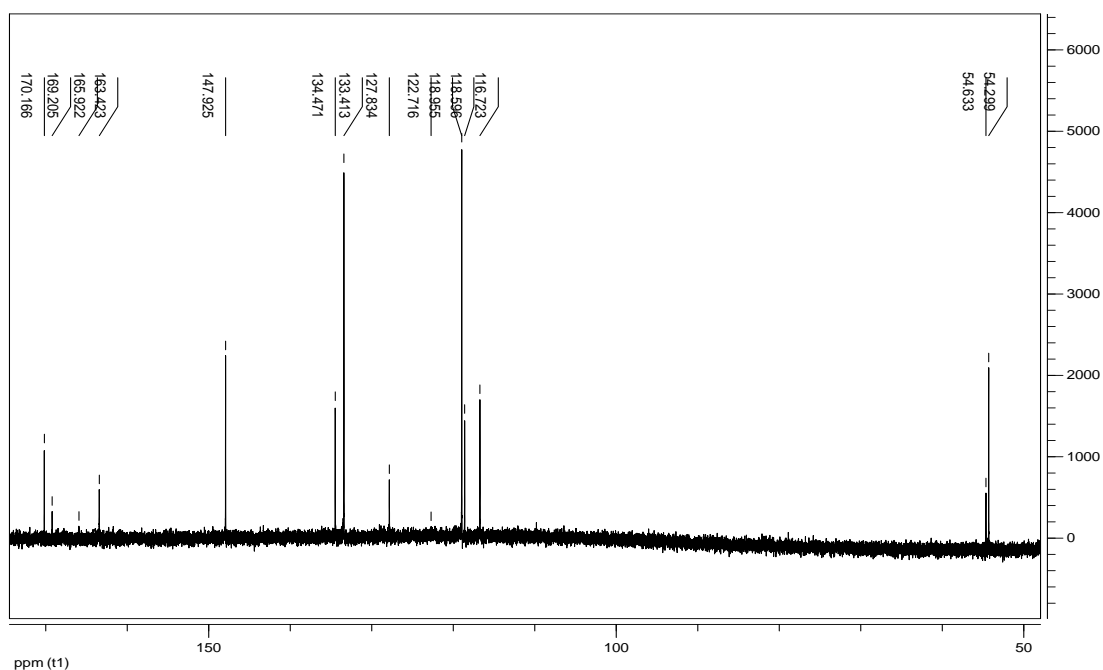
Ενώσεις 4 & 5

Ουσία M74

Απομονώθηκαν 2 ουσίες μαζί, σε αναλογία περίπου 3:1. Η μία [ένωση 4] είναι ο μεθυλεστέρας του κουμαρικού οξέος και η άλλη [ένωση 5] ο μεθυλεστέρας του *π*-υδροξυ-βενζοϊκού οξέος



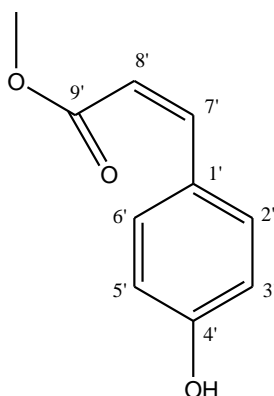
Φάσμα ¹H-NMR των ενώσεων 4 και 5 (DMSO, 600MHz)



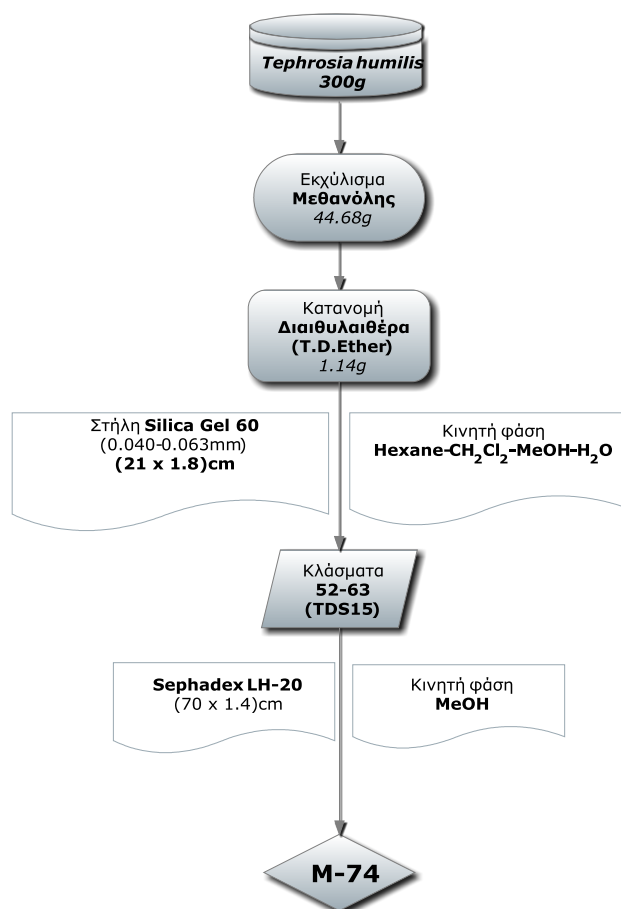
Φάσμα ^{13}C -NMR των ενώσεων 4 και 5 (DMSO, 150MHz)

Ένωση 4

Μεθυλεστέρας του Κουμαρικού Οξέος



Απομόνωση ουσίας M74



Το στερεό υπόλειμμα του διαιθυλαιθέρα χρωματογραφήθηκε σε στήλη (21 x 1.8)cm, με υλικό πλήρωσης Silica gel 60 (0.040-0.063) και κινητή φάση εξάνιο →

διχλωρομεθάνιο → μεθανόλη → νερό. Τα κλάσματα 52-63, που αντιστοιχούσαν σε ποσοστό 25:75 (εξάνιο:διχλωρομεθάνιο), συνενώθηκαν (TDS15) και χρωματογραφήθηκαν σε στήλη Sephadex LH-20 (1.4 x 70)cm με διαλύτη έκλουσης μεθανόλη. Συλλέχθηκαν κλάσματα όγκου 2ml και μετά από χρωματογραφικούς ελέγχους με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, συνενώθηκαν τα κλάσματα 8-9 και συμπυκνώθηκαν, δίνοντας στερεό υπόλειμμα συνολικού βάρους 2.9mg.

Έλεγχος καθαρότητας

Η ουσία είχε βιολετί φθορισμό τόσο στο ορατό όσο και στο υπεριώδες μετά από θέρμανση της πλάκας και αφού προηγουμένως ψεκάστηκε με διάλυμα βανιλίνης. Για τον έλεγχο καθαρότητας, έγινε TLC σε πλάκες Silica Gel 60 (Merck 5553).

Στο σύστημα διχλωρομεθάνιο:οξικός αιθυλεστέρας (95:5) το R_f της ουσίας αντιστοιχεί στην τιμή 0.35 και στο σύστημα πετρελαϊκός αιθέρας:διχλωρομεθάνιο (1:1) το R_f ισούται με 0.08. Παρόλο που και στα δύο αυτά χρωματογραφικά συστήματα φάνηκε ότι η ένωση M74 ήταν καθαρή, μετά από την επεξεργασία των φασμάτων NMR και μάζας, προέκυψε ότι αποτελείται από δύο παρεμφερείς ουσίες (4 και 5) σε αναλογία ~3:1.

Φάσμα υπεριώδους-ορατού

Κατά τη φασματοφωτομετρική εξέταση της ουσίας M74 ελήφθησαν τα ακόλουθα μέγιστα (nm) που επαληθεύονται και από τη βιβλιογραφία (Wan C. et al., 2012, Youn U.J. et al., 2010).

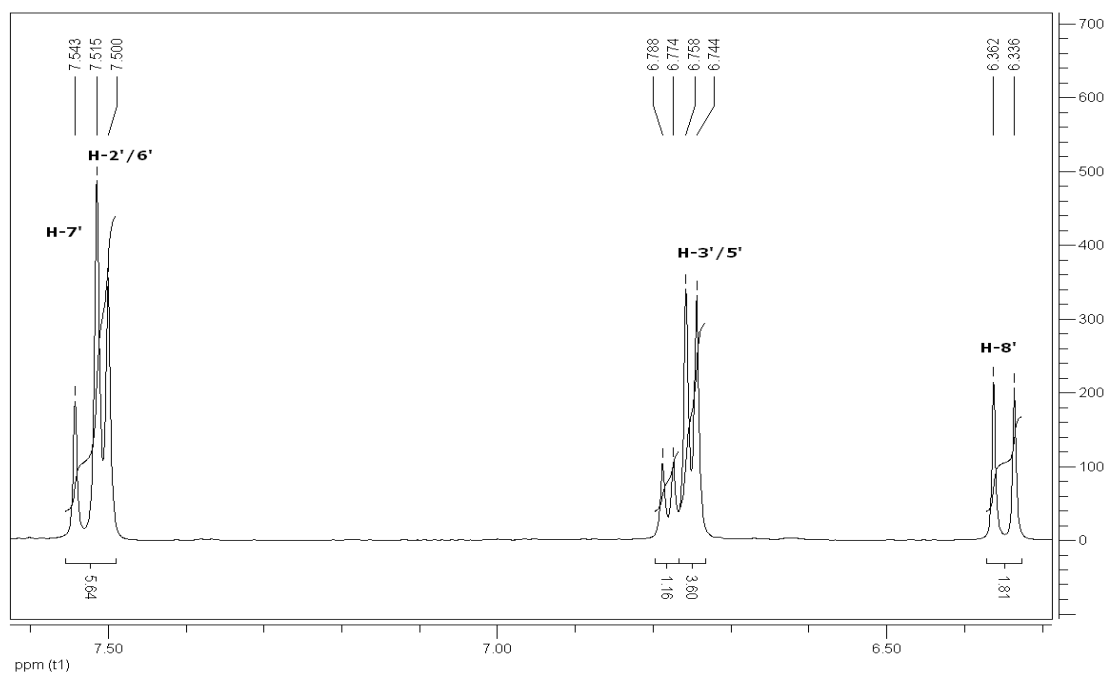
M74	Κορυφή II	Κορυφή I
<i>MeOH</i>	228.0, 260.0 (sh)	310.5

Φάσμα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού

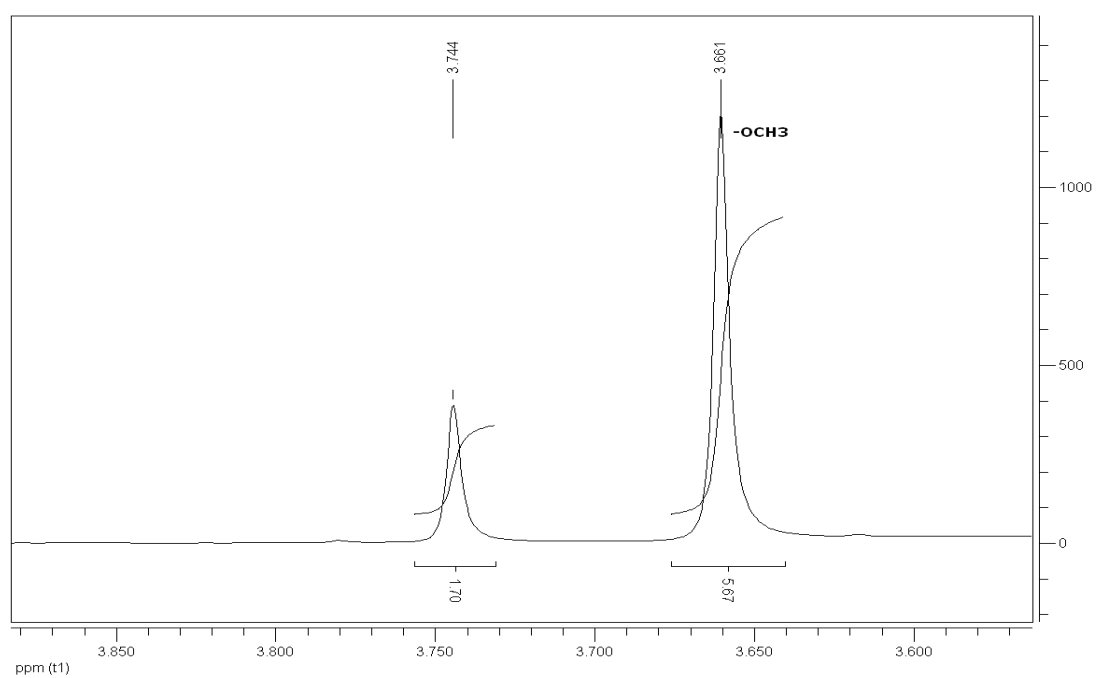
1H-NMR και ¹³ C-NMR(DMSO, 600MHz)			
Θέση	δ _H (ppm)	J _{HH} (Hz)	δ _C (ppm)*
1'			127.8
2'	7.51(d)	8.3	133.4
3'	6.75(d)	8.3	119.0
4'			163.4
5'	6.75(d)	8.3	119.0
6'	7.51(d)	8.3	133.4
7'	7.53(d)	15.6	147.9
8'	6.35(d)	15.6	116.7
9'			170.2
-OCH ₃	3.66(s)		54.3

*Τιμές που προκύπτουν από το φάσμα ¹³C

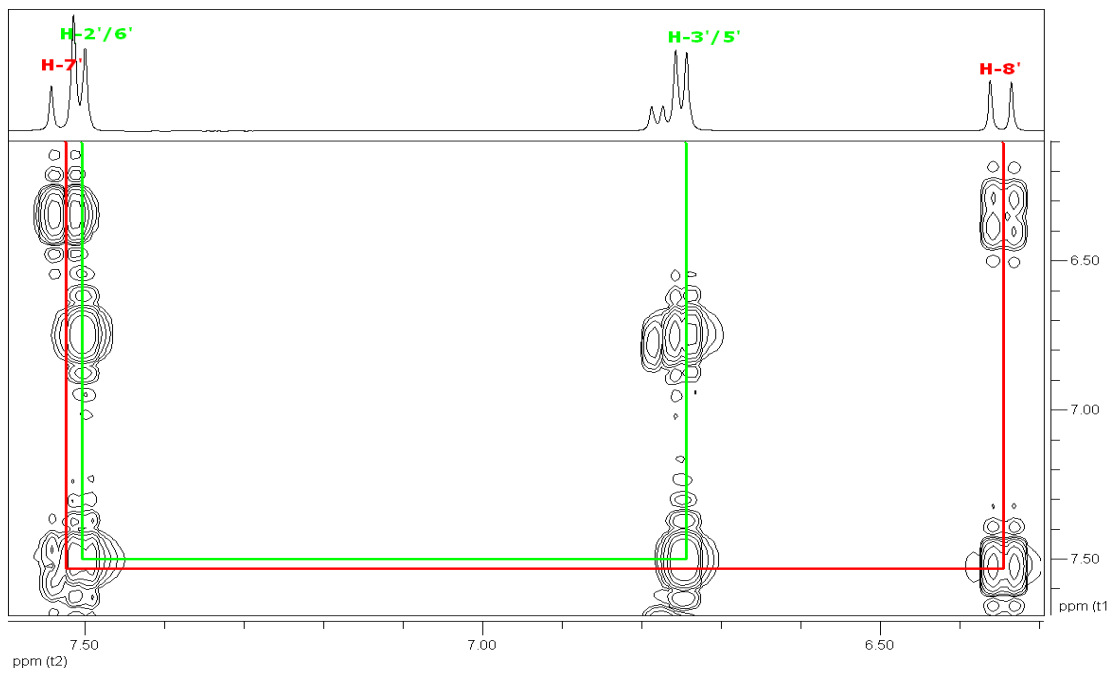
Στο φάσμα ¹H-NMR παρατηρούνται δύο διπλές κορυφές με σταθερά σύζευξης 8.3Hz, στα 6.75 και 7.51ppm, δύο πρωτονίων η καθεμιά που αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-3',5' και H-2',6' του αρωματικού δακτυλίου του κουμαρικού. Τα πρωτόνια H-7' και H-8' του διπλού δεσμού του κουμαρικού οξέος εμφανίζονται σαν διπλές κορυφές με σταθερά σύζευξης 15.6Hz και τα οποία εμφανίζουν σήμα στο HMBC στα 169.8 (καρβονύλια κουμαρικών). Λόγω της τιμής της σταθεράς σύζευξης, το συμπέρασμα που προκύπτει για τη στερεοχημεία των πρωτονίων του διπλού δεσμού είναι ότι, πρόκειται για πρωτόνια με *trans* διαμόρφωση. Το ίδιο σήμα παρατηρείται και στη μεθυλομάδα στο φάσμα HMBC, η οποία εμφανίζεται σαν απλή κορυφή 3 πρωτονίων στα 3.66ppm, ενδεικτικό της εστεροποίησης της καρβοξυλομάδας του κουμαρικού με μεθύλιο. Τα παραπάνω επιβεβαιώνουν την ύπαρξη μεθυλεστέρα του κουμαρικού οξέος που επαληθεύονται και από τη βιβλιογραφία (Chaabi M. et al., 2010).



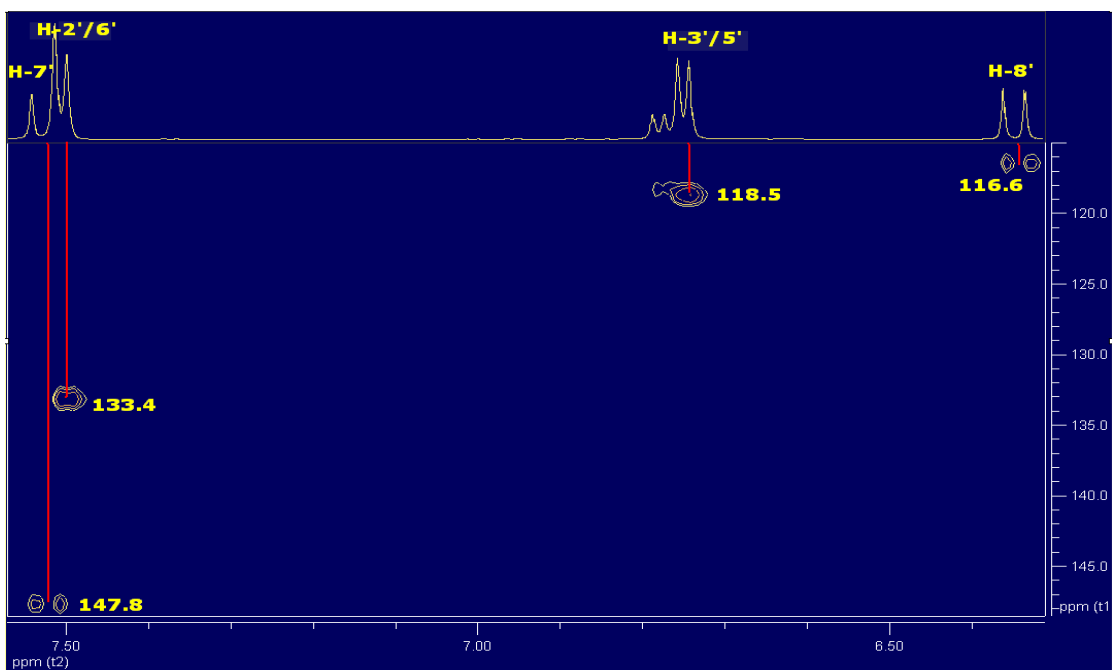
Λεπτομέρεια φάσματος $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης 4 (DMSO, 600MHz)



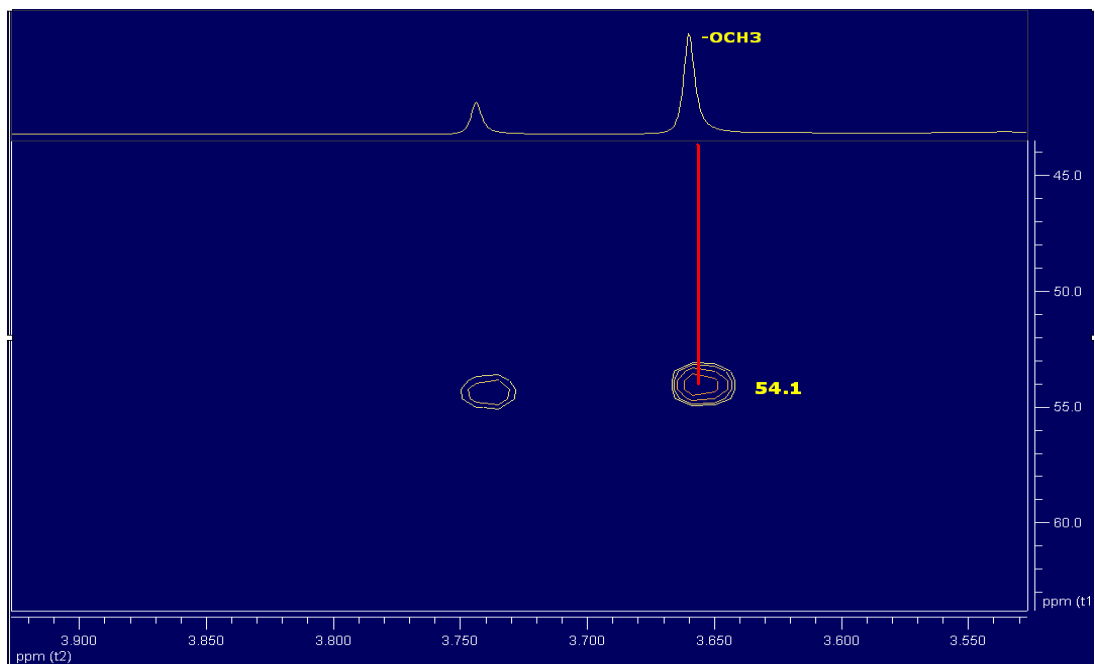
Λεπτομέρεια φάσματος $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης 4 (DMSO, 600MHz)



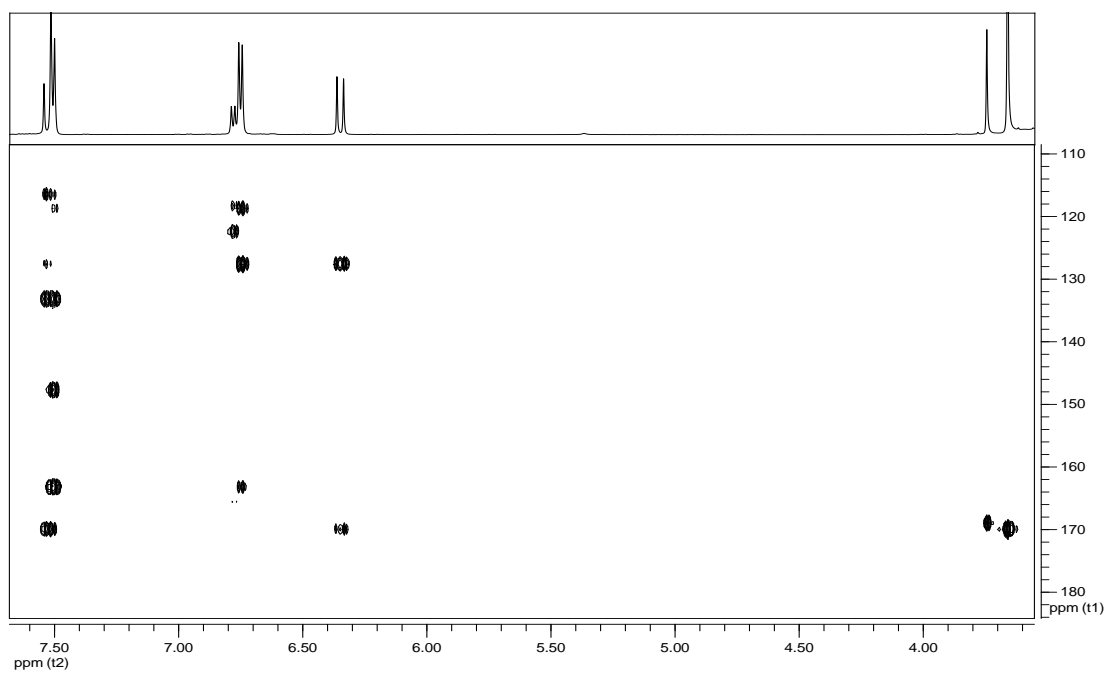
Λεπτομέρεια φάσματος COSY της ένωσης 4 (DMSO, 600MHz)



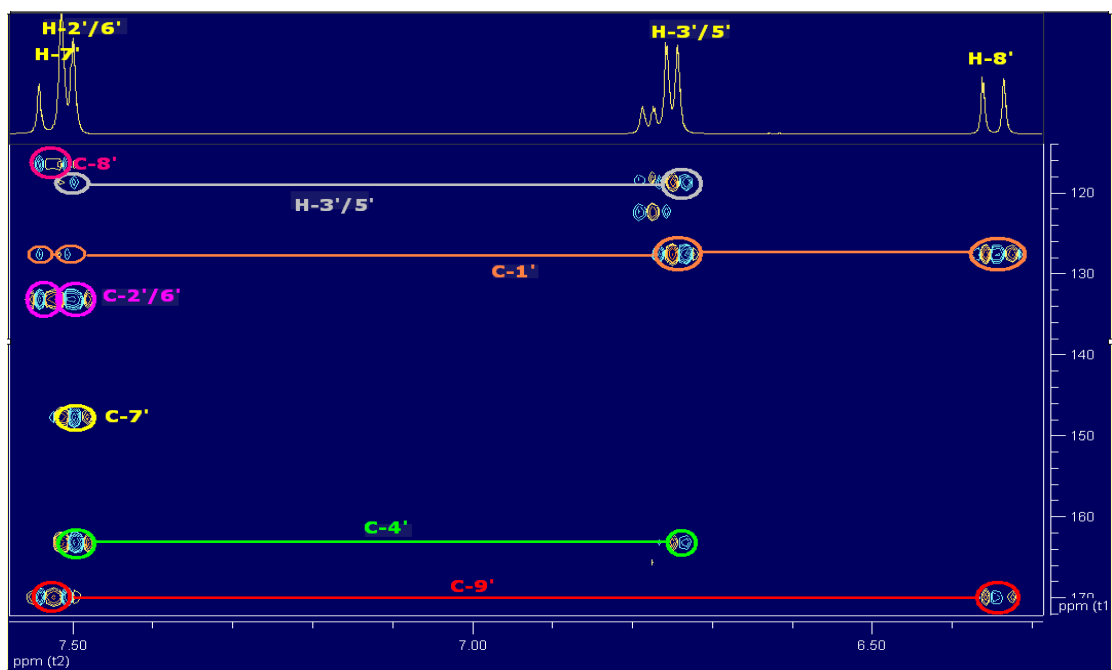
Λεπτομέρεια φάσματος HSQC της ένωσης 4 (DMSO, 600MHz)



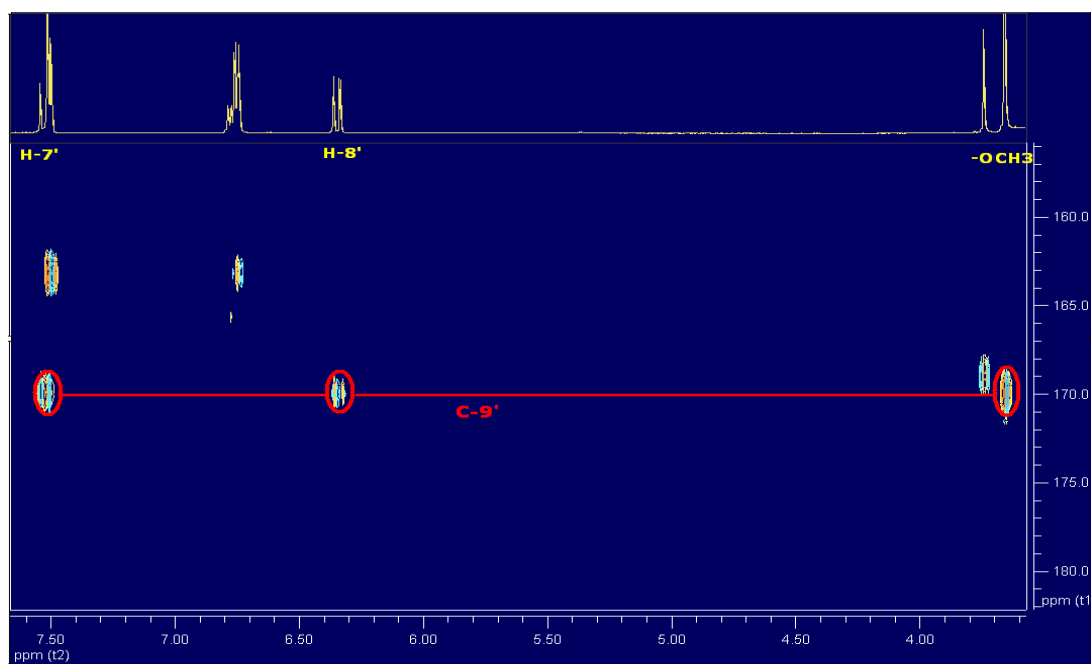
Λεπτομέρεια φάσματος HSQC της ένωσης 4 (DMSO, 600MHz)



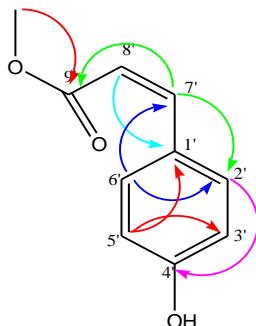
Φάσμα HMBC της ένωσης 4 (DMSO, 600MHz)



Λεπτομέρεια φάσματος HMBC της ένωσης 4 (DMSO, 600MHz)



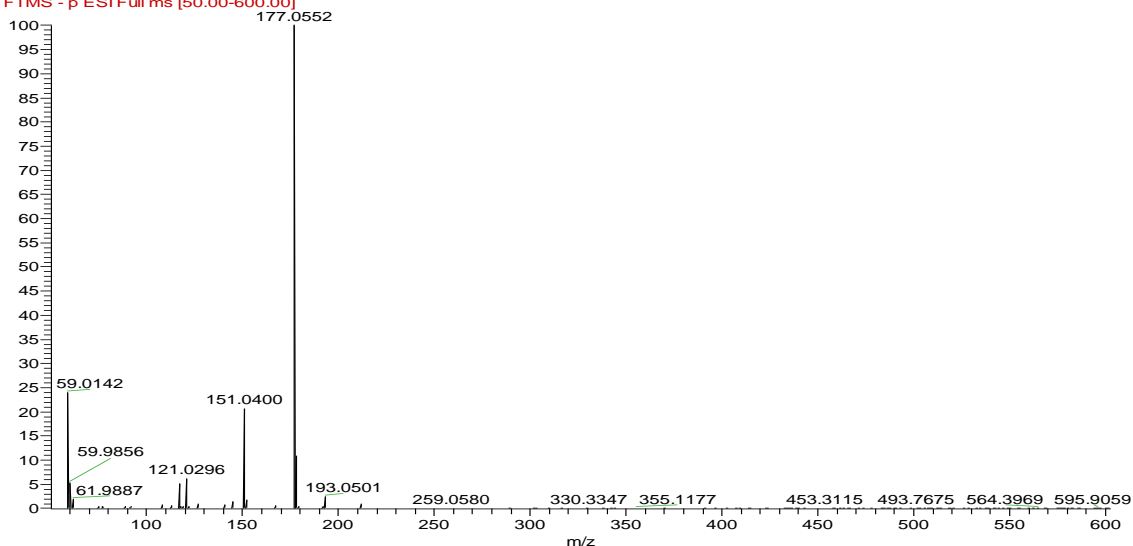
Λεπτομέρεια φάσματος HMBC της ένωσης 4 (DMSO, 600MHz)



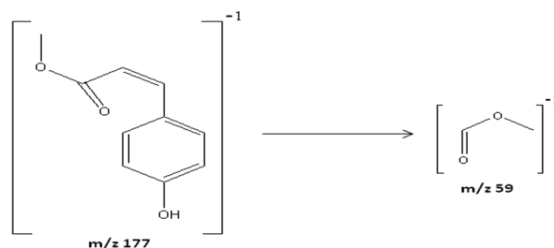
Μερικές από τις συζεύξεις H-C που προκύπτουν από το HMBC

Φάσμα μάζας

KOKA_M74_07122011_neg_me_aa01 #365-393 RT: 3.78-3.98 AV: 28 NL: 7.36E7
 F: FTMS - p ESI Full ms [50.00-600.00]

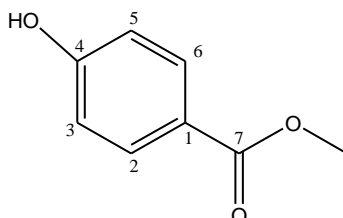


Από το φάσμα μάζας της ουσίας, που ελήφθη σε σύστημα HR-MS (Thermo Scientific) με αρνητικό ιονισμό, προκύπτει το θραύσμα 177 που αντιστοιχεί στο $[M-H]$. Η τιμή του μοριακού ιόντος αντιστοιχεί στο μοριακό τύπο $C_{10}H_{10}O_3$. Η θεωρητική μέτρηση της μάζας ($[M-H]=177.0549$) επιβεβαιώνεται και από την πραγματική της τιμή (177.0552). Τα υπόλοιπα θραύσματα που αναγράφονται αντιστοιχούν στα θραύσματα της ένωσης 5 που περιέχονται μαζί στο ίδιο κλάσμα και περιγράφονται παρακάτω.



Ένωση 5

Μεθυλεστέρας του *p*-υδροξυ-βενζοϊκού οξέος

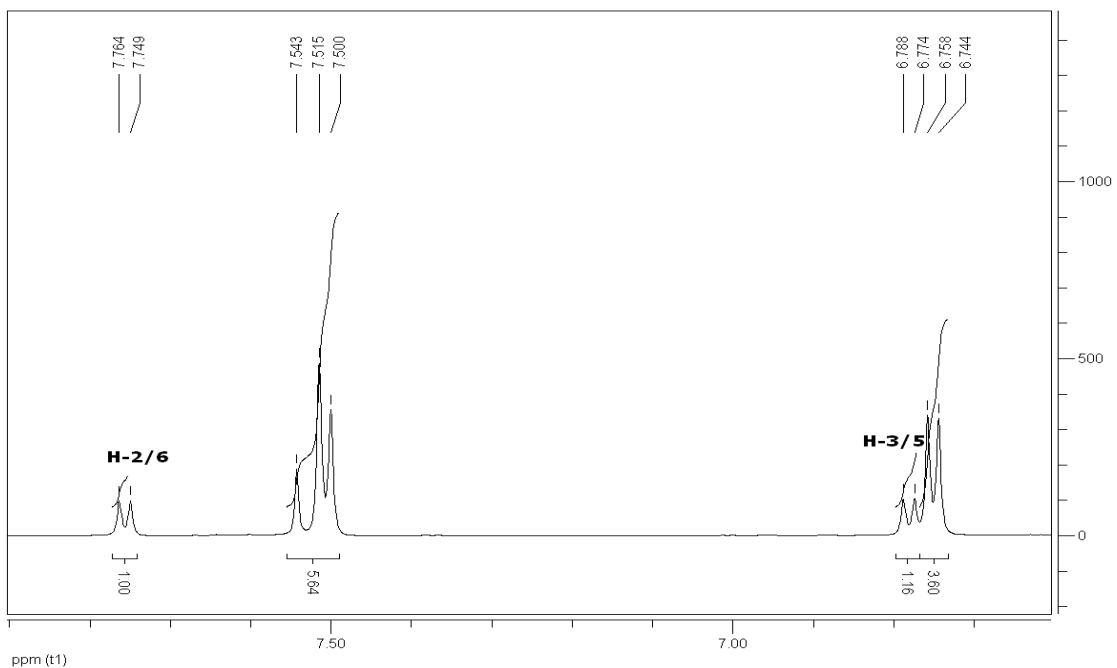


Φάσμα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού

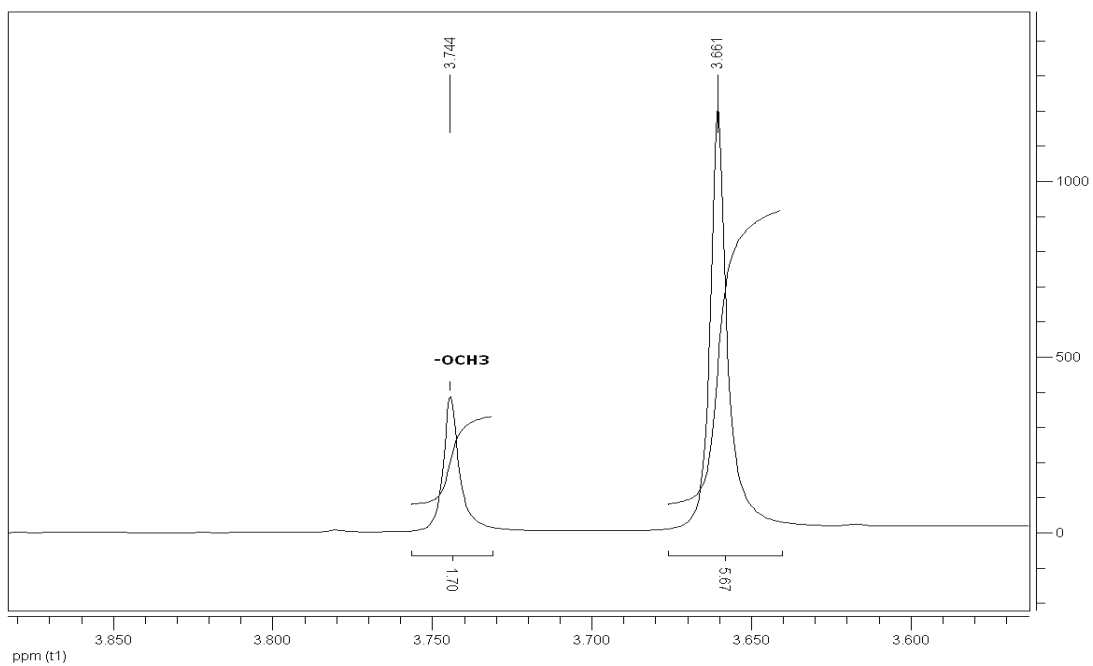
1H-NMR και ¹³C-NMR(DMSO, 600MHz)			
Θέση	δ _H (ppm)	J _{HH} (Hz)	δ _C (ppm)*
1			122.7
2	7.76(d)	8.3	134.5
3	6.78(d)	8.3	118.6
4			165.9
5	6.78(d)	8.3	118.6
6	7.76(d)	8.3	134.5
7			169.2
-OCH ₃	3.74(s)		54.6

*Τιμές που προκύπτουν από το φάσμα ¹³C

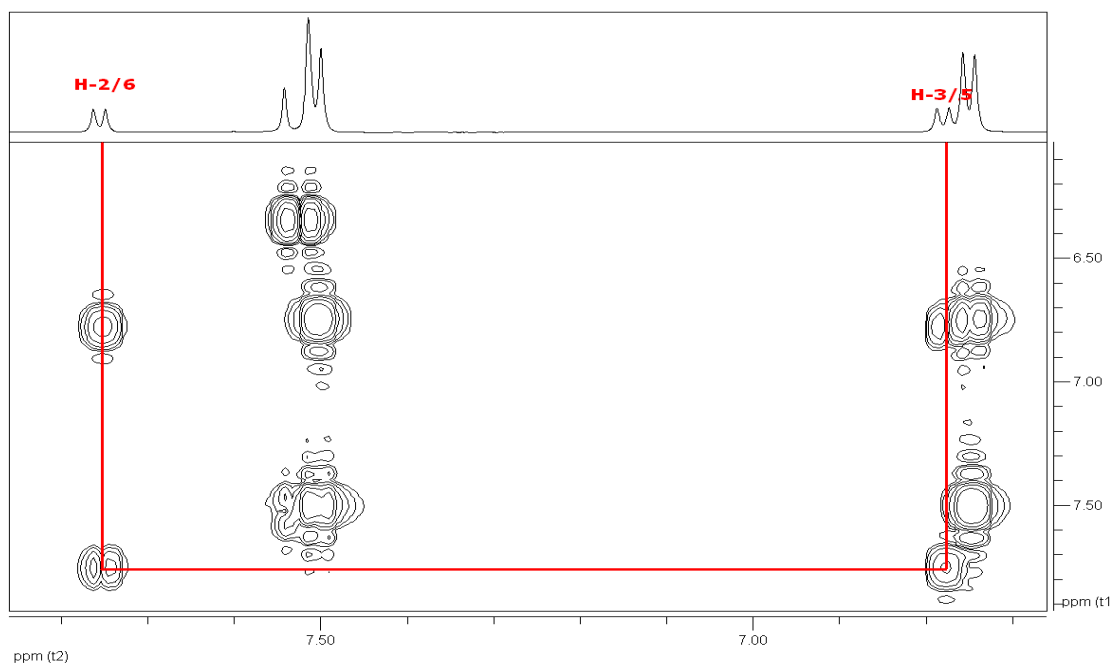
Στο φάσμα ¹H-NMR παρατηρούνται στην περιοχή των αρωματικών πρωτονίων, δύο διπλές κορυφές δύο πρωτονίων η καθεμιά, σε 6.78 και 7.76ppm, που σχάζονται μεταξύ τους με $J=8.3$. Η πρώτη αντιστοιχεί στα H-3,5 και η δεύτερη στα H-2,6 του αρωματικού δακτυλίου. Επειδή τα φάσματα των ενώσεων 4 και 5 ελήφθησαν μαζί, η αναλογία των πρωτονίων της ένωσης 5 φαίνεται να αποτελεί το 1/3 της αναλογίας των πρωτονίων της ένωσης 4 (Τιμή μονάδας για την ολοκλήρωση θεωρήθηκαν τα δύο πρωτόνια H-2,6 της ένωσης 5). Τα H-2,6 έχουν κοινό σήμα με τη μεθυλομάδα σε δ_C 168.8 στο HMBC, που αντιστοιχεί στον άνθρακα του καρβοξυλικού οξέος και από το οποίο συνεπάγεται ότι το μεθύλιο είναι εστεροποιημένο με το καρβοξύλιο του αρωματικού δακτυλίου. Τα παραπάνω επιβεβαιώνουν την ύπαρξη μεθυλεστέρα του *p*-υδροξυ-βενζοϊκού οξέος που επαληθεύονται και από τη βιβλιογραφία (Owen C. et al., 2003)



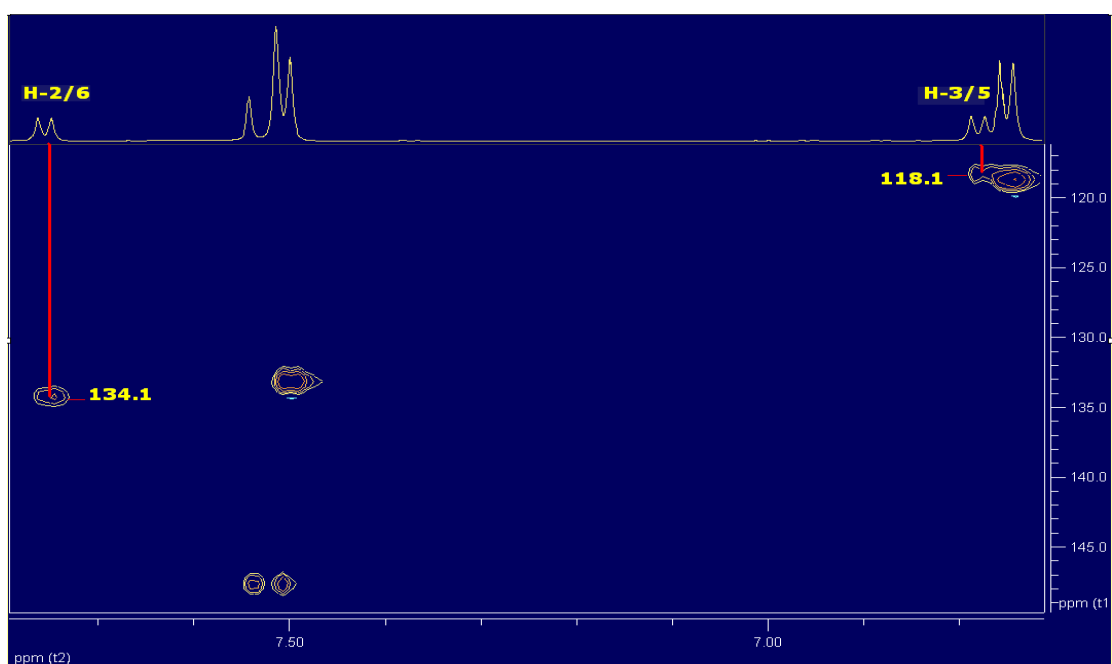
Λεπτομέρεια φάσματος $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης 5 (DMSO, 600MHz)



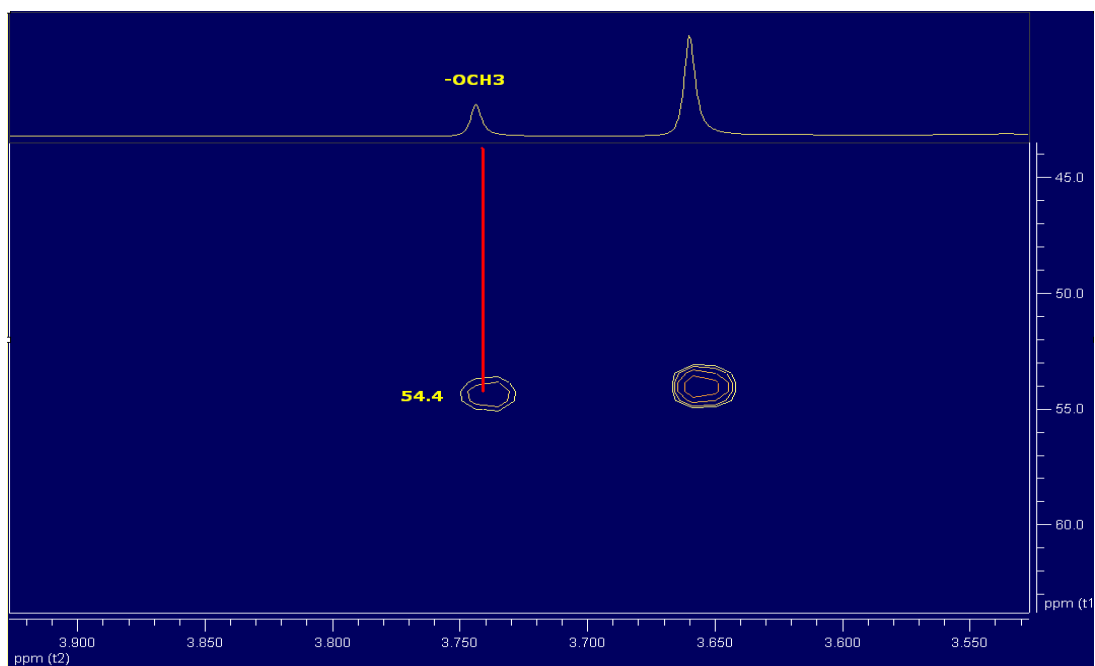
Λεπτομέρεια φάσματος $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης 5 (DMSO, 600MHz)



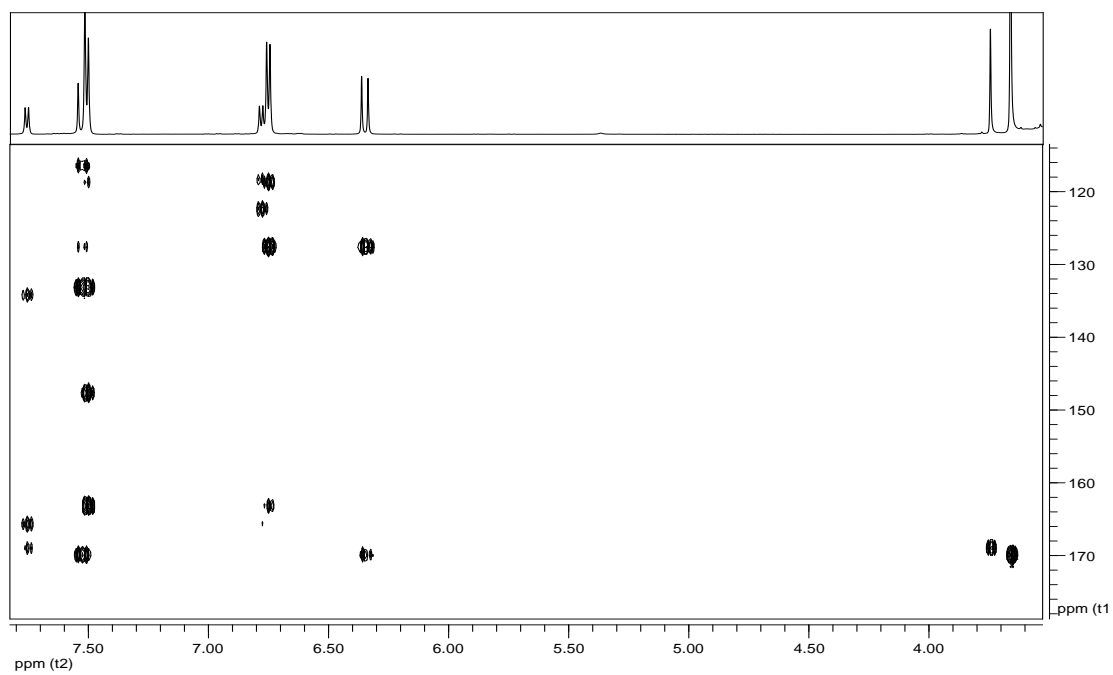
Λεπτομέρεια φάσματος COSY της ένωσης 5 (DMSO, 600MHz)



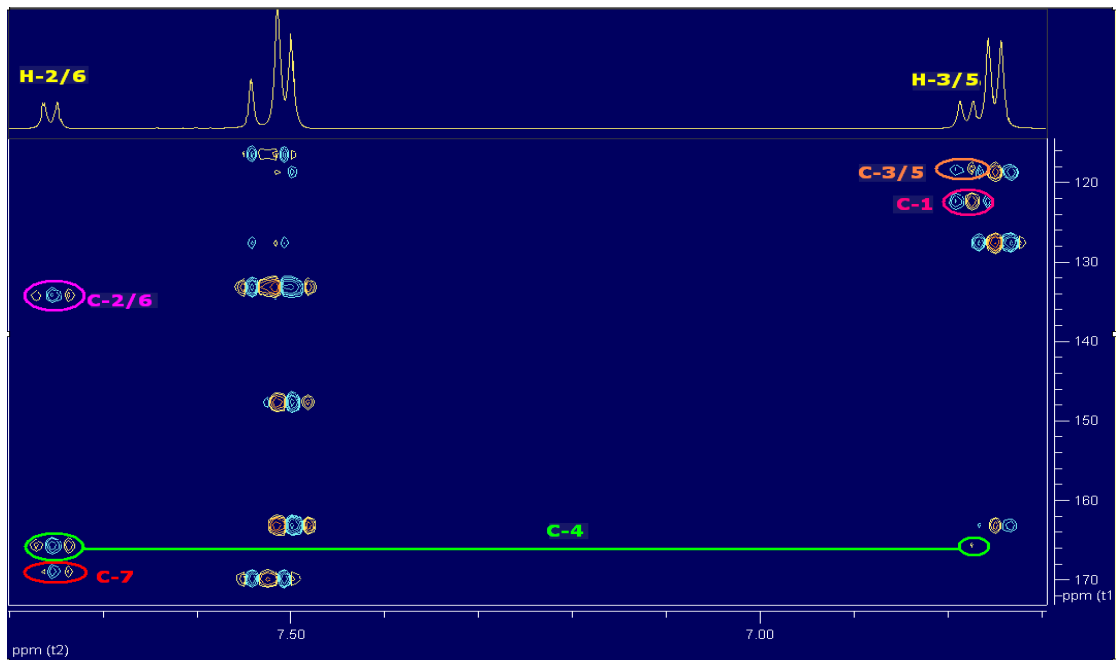
Λεπτομέρεια φάσματος HSQC της ένωσης 5 (DMSO, 600MHz)



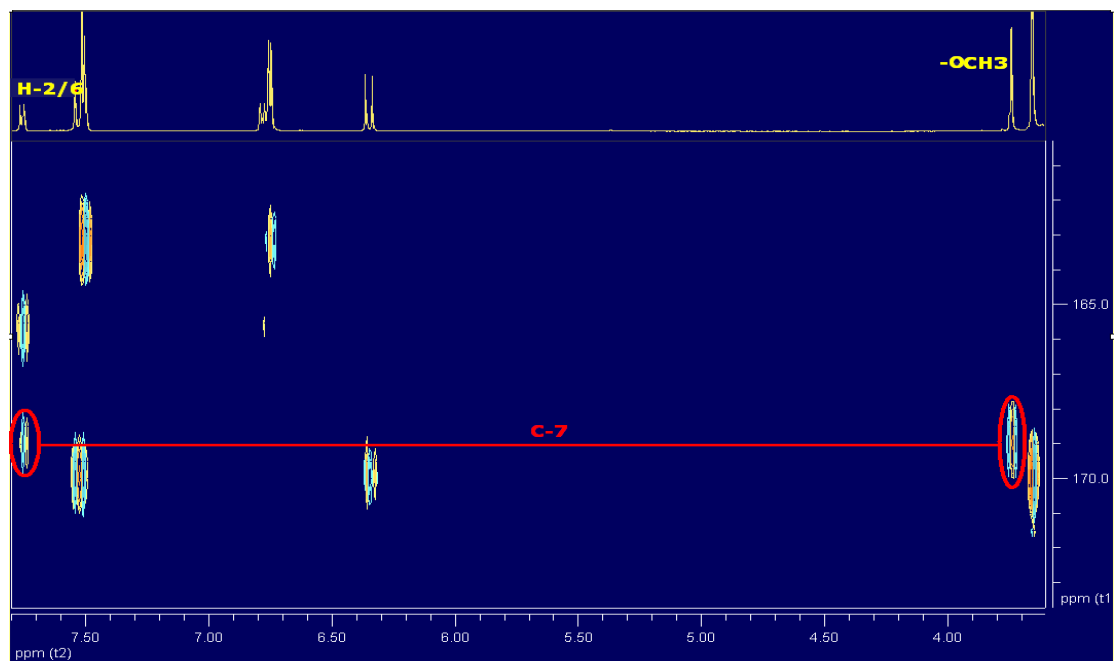
Λεπτομέρεια φάσματος HSQC της ένωσης 5 (DMSO, 600MHz)



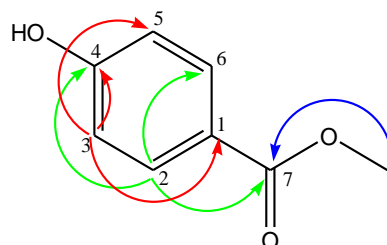
Φάσμα HMBC της ένωσης 5 (DMSO, 600MHz)



Λεπτομέρεια φάσματος HMBC της ένωσης 5 (DMSO, 600MHz)



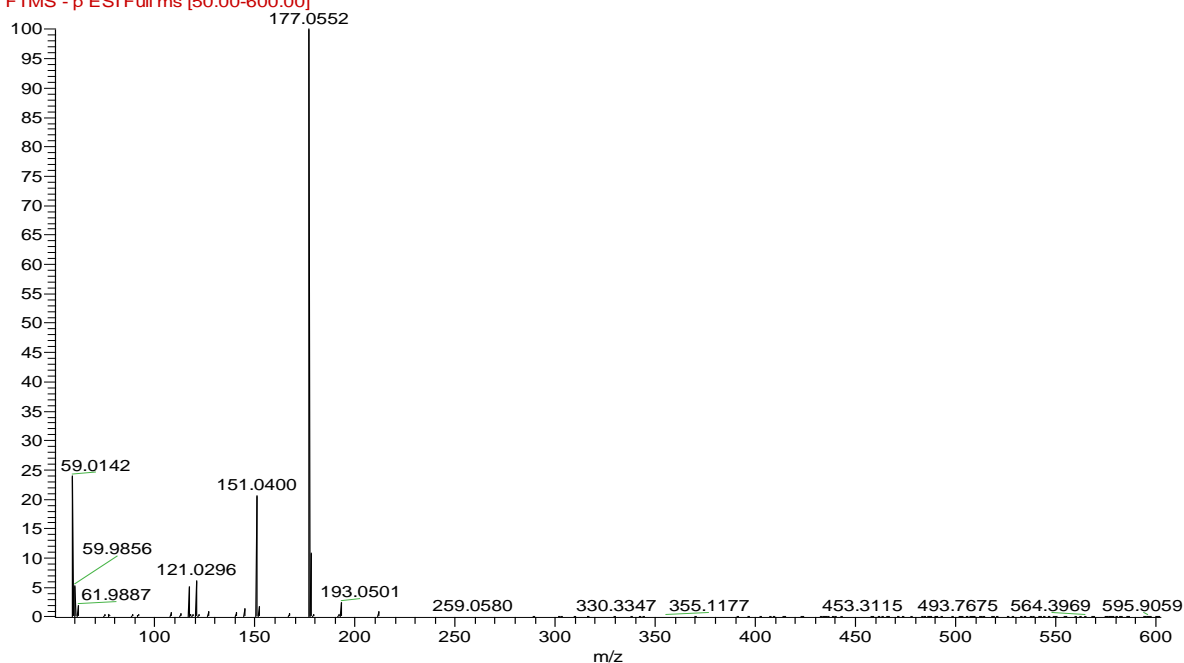
Λεπτομέρεια φάσματος HMBC της ένωσης 5 (DMSO, 600MHz)



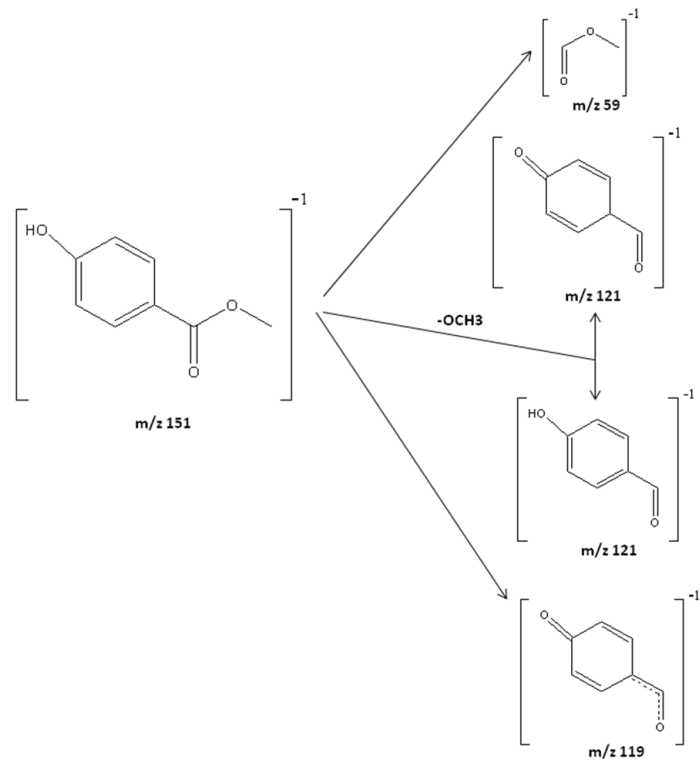
Συζεύξεις H-C που προκύπτουν από το HMBC

Φάσμα μάζας

KOKA_M74_07122011_neg_me_aa01 #365-393 RT: 3.78-3.98 AV: 28 NL: 7.36E7
 F: FTMS - p ESI Full ms [50.00-600.00]



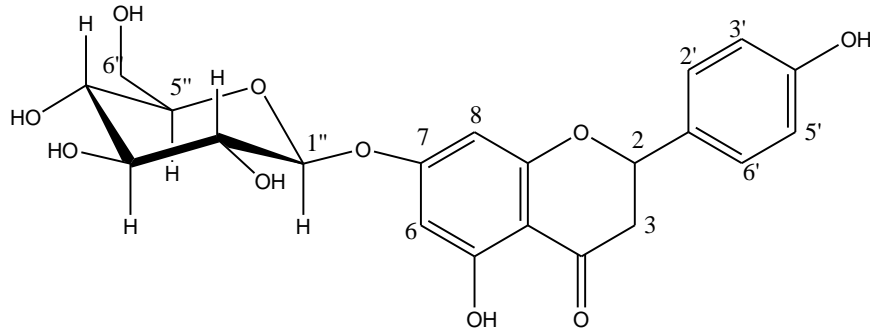
Από το φάσμα μάζας της ουσίας, που ελήφθη σε σύστημα HR-MS (Thermo Scientific) με αρνητικό ιονισμό, προκύπτει το θραύσμα 151 που αντιστοιχεί στο [M-H]. Η τιμή του μοριακού ιόντος αντιστοιχεί στο μοριακό τύπο $C_8H_8O_3$. Η θεωρητική μέτρηση της μάζας ([M-H]= 151.0393) επιβεβαιώνεται και από την πραγματική της τιμή (151.0400). Με την απόσπαση της μεθοξυλομάδας προκύπτει η θραυσματοποίηση με τις ακόλουθες προτεινόμενες δομές που δίνονται παρακάτω.



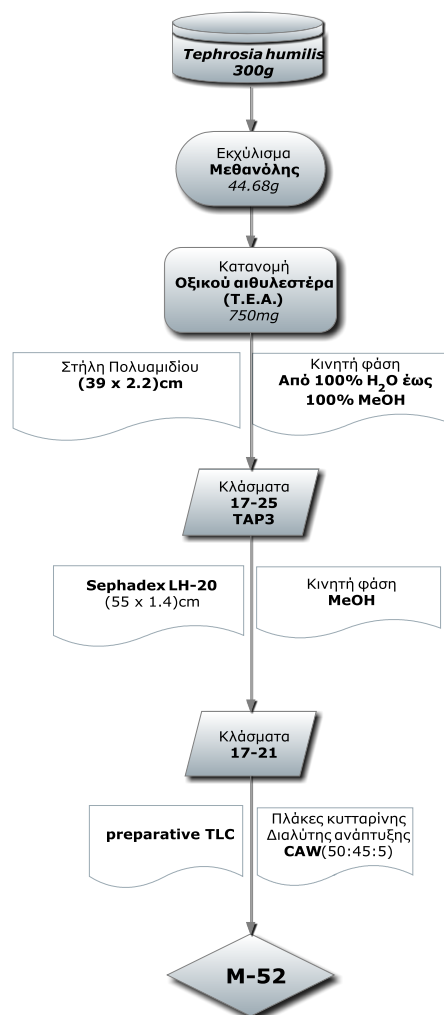
Κατανομή Οξικού Αιθυλεστέρα

Ένωση 6

(Ουσία M52): 7-O-β-D-γλυκοζίτης της ναριγγενίνης (προυίνης)



Απομόνωση ουσίας M52



Το στερεό υπόλειμμα του οξικού αιθυλεστέρα χρωματογραφήθηκε σε στήλη πολυαμιδίου (39 x 2.2)cm αντιστρόφου φάσεως με κινητή φάση νερό προς μεθανόλη και με όγκο συλλεγομένων κλασμάτων 500ml. Τα κλάσματα 17-25, που αντιστοιχούσαν σε ποσοστό H₂O 100%, συνενώθηκαν (TAP3) και χρωματογραφήθηκαν σε στήλη Sephadex LH-20 (1.3 x 55)cm με διαλύτη έκλουσης μεθανόλη. Συλλέχθηκαν κλάσματα όγκου 2ml και μετά από χρωματογραφικούς ελέγχους με TLC, συνενώθηκαν τα κλάσματα 17-21 και συμπυκνώθηκαν, δίνοντας στερεό υπόλειμμα συνολικού βάρους 7.4mg. Ακολούθησε παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, με στατική φάση πλάκες κυτταρίνης (Merck 5552) και διαλύτη ανάπτυξης διχλωρομεθάνιο:οξικό οξύ:νερό (CAW) σε αναλογία 50:45:5. Η ουσία M52 εμφανίστηκε ως μια ευδιάκριτη ζώνη (R_f 0.73) με κίτρινο φθορισμό στο υπεριώδες, έντονο πράσινο φθορισμό μετά από έκθεση σε ατμούς NH₃ και μετά την απομάκρυνση του διαλύτη έκλουσης της ζώνης (μεθανόλη), έδωσε καθαρό βάρος 4.4mg.

Έλεγχος καθαρότητας

Πραγματοποιήθηκε με TLC σε πλάκες κυτταρίνης (Merck 5552), σε AcOH 15% :R_f=0.62 και CAW :R_f=0.73

Φάσμα υπεριώδους-ορατού

Κατά τη φασματοφωτομετρική εξέταση της ουσίας ελήφθησαν χαρακτηριστικές καμπύλες με τα ακόλουθα μέγιστα (nm).

M52	Κορυφή II	Κορυφή I	Δ_λ I
MeOH	283.5	329.0	
MeONa	284.0	415.0	+86.0
AlCl ₃	307.0(Δ _λ =+23.5)	379.5	+50.5
AlCl ₃ /HCl	307.0(Δ _λ =+23.5)	379.5	+50.5
AcONa	282.5(Δ _λ =-1)	329.0	
AcONa/H ₃ BO ₃	282.5(Δ _λ =-1)	329.0	+0.0

Από την τιμή απορρόφησης των κορυφών I και II του μεθανολικού διαλύματος και ιδιαίτερα της κορυφής II που εμφανίζεται ως κύρια, συμπεραίνεται ότι η ουσία ανήκει στις φλαβανόνες. Από το φάσμα με AcONa, προκύπτει ότι το 7-OH είναι

υποκατεστημένο διότι δεν παρουσιάζεται βαθυχρωμική μετατόπιση στην κορυφή II. Η βαθυχρωμική μετατόπιση της κορυφής II κατά 23.5nm στο AlCl₃, η οποία παραμένει σταθερή με την προσθήκη HCl, αποτελεί χαρακτηριστικό των φλαβονών με ελεύθερο 5-OH (Yuldashev M.P. et al., 1993).

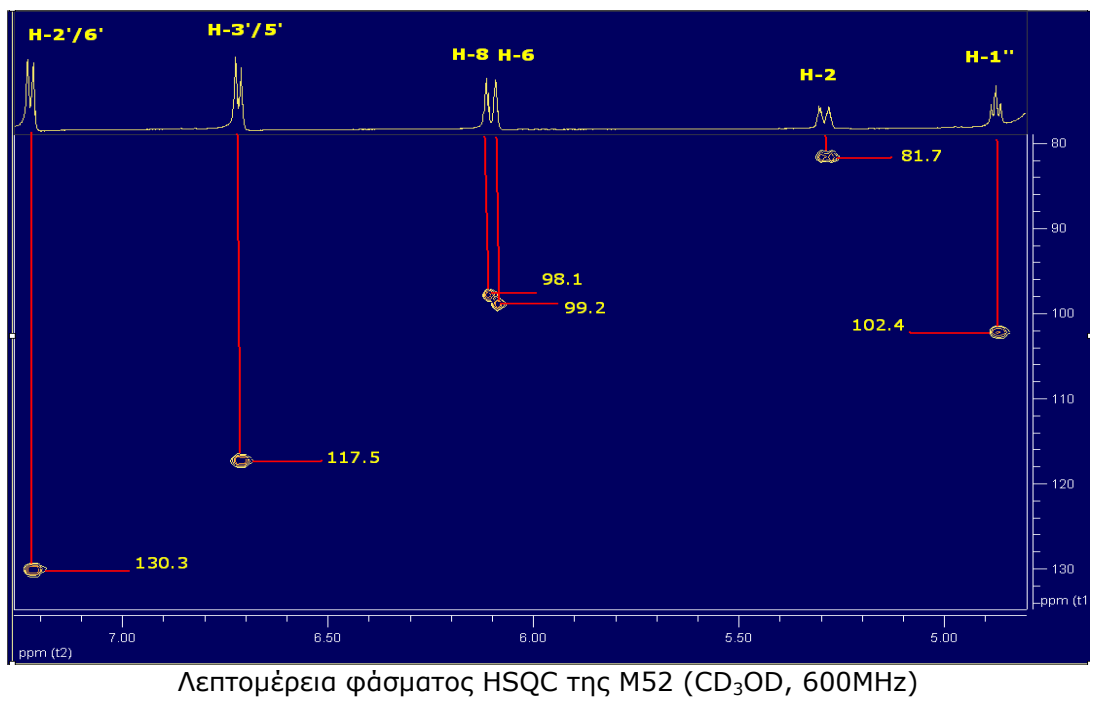
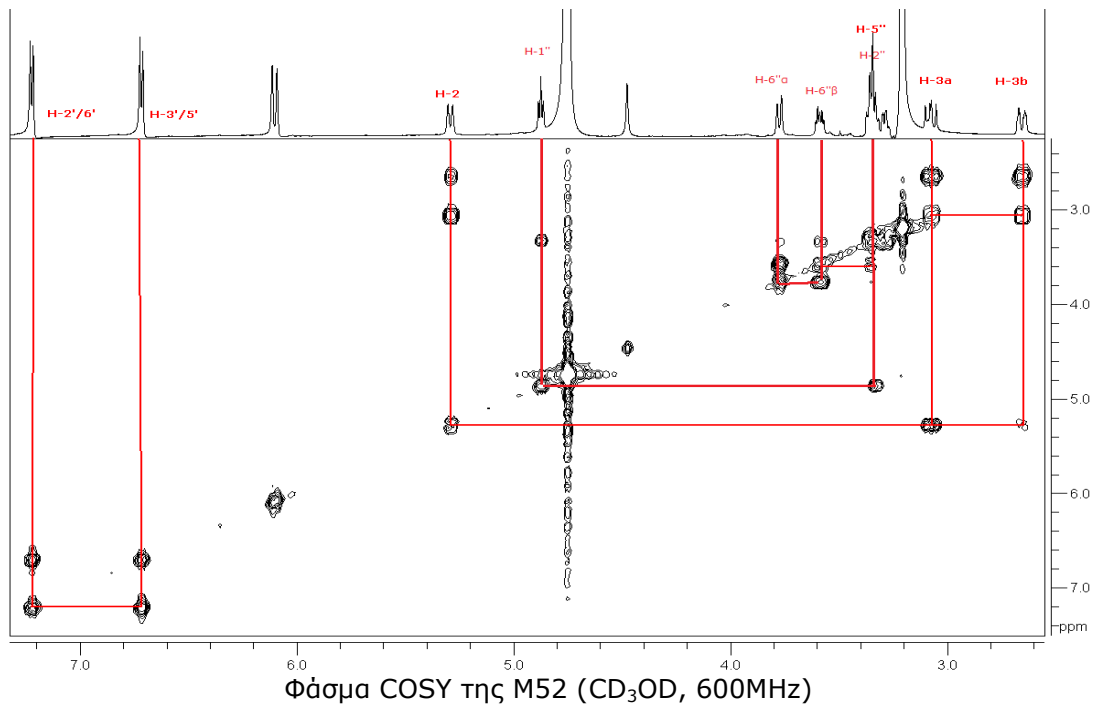
Φάσμα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού

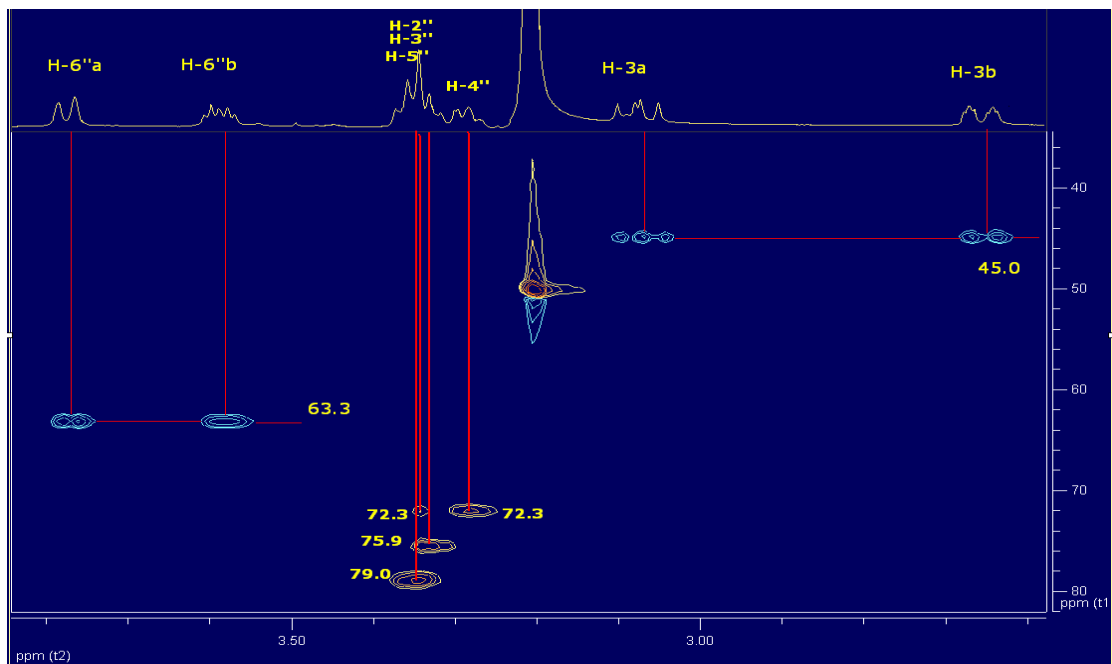
¹H-NMR και ¹³C-NMR (CD₃OD, 600MHz)			
Θέση	δ _H (ppm)	J _{HH} (Hz)	δ _C (ppm)*
2	5.29(2 dd overlapped)	3.0, 3.0, 13.2, 13.2	81.9
3	3.08(2 dd overlapped)	13.2, 13.2, 16.8, 16.8	45.2
	2.66(2 dd overlapped)	3.0, 3.0, 16.8, 16.8	
4			199.8
5			166.2
6	6.09(d)	1.8	99.2
7			168.2
8	6.12(d)	1.8	98.1
9			165.8
10			106.2
1'			132.0
2'	7.22(d)	8.4	130.3
3'	6.72(d)	8.4	117.5
4'			160.3
5'	6.72(d)	8.4	117.5
6'	7.22(d)	8.4	130.3
<u>Glc</u>			
1''	4.88(2 d)	6.6, 7.2	102.5
2''	3.36(overlapped)		72.3
3''	3.32(overlapped)		79.0
4''	3.29(m)		72.3
5''	3.35(overlapped)		75.9
6''	3.78(broad d)	12.1	63.6
	3.57-3.61 (2 overlapped dd)	5.1, 5.7, 11.5, 12.1	

*Τιμές που προκύπτουν από το φάσμα ¹³C

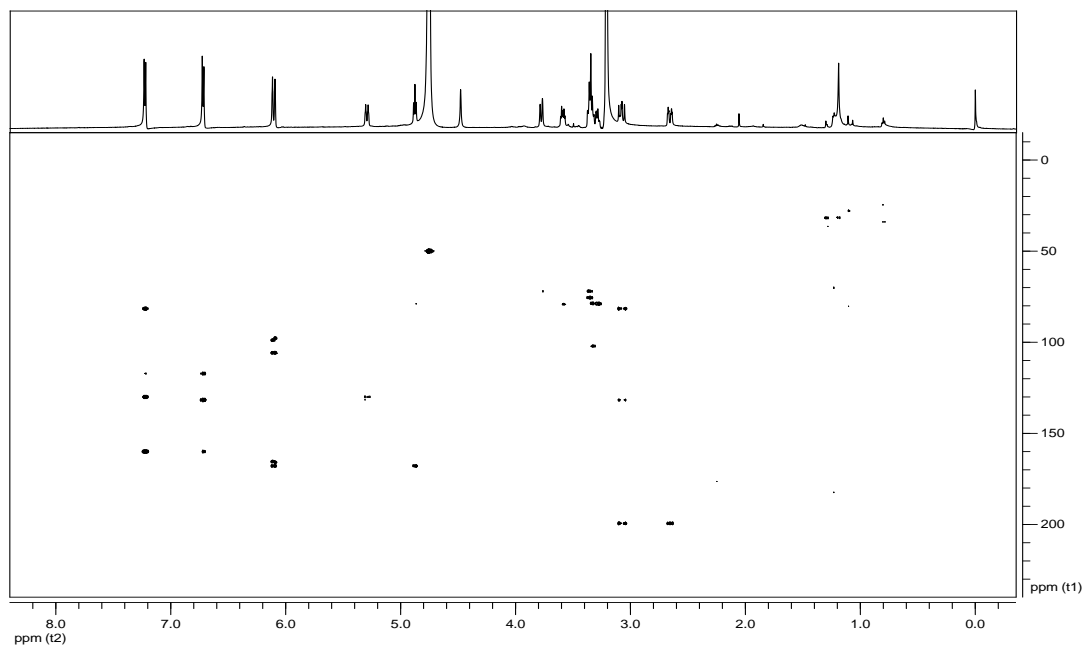
Στο φάσμα ¹H-NMR παρατηρούνται τα χαρακτηριστικά σήματα ενός ΑΑ'ΜΜ' συστήματος, δύο αρωματικών πρωτονίων σε ορθο-θέση του δακτυλίου Β που

σχάζονται μεταξύ τους με χημικές μετατοπίσεις δ_{H} 7.22 (2H, d, $J=8.4\text{Hz}$, H-2'/6') και δ_{H} 6.72 (2H, d, $J=8.4\text{Hz}$, H-3'/5'). Πιο θωρακισμένα εμφανίζονται τα πρωτόνια H-8 και H-6 σε δ_{H} 6.12 και 6.09 αντίστοιχα. Στην περιοχή του φάσματος πρωτονίου από δ_{H} 5.30 ως 2.60 παρατηρείται η ύπαρξη πλευρικών σημάτων (side signals) που υποδεικνύουν την παρουσία και μιας άλλης φλαβανόνης, καθώς πρόκειται για μίγμα δύο διαστερομερών φλαβανονών (S- και R-) (Maltese F. et al., 2009). Στην περίπτωση αυτή τα σήματα αλληλεπικαλύπτονται και μεταβάλλεται η μορφή των κορυφών. Ωστόσο και για τις δύο φλαβανόνες, προκύπτει ένα AMX σύστημα, τυπικό για φλαβανόνες, με χημικές μετατοπίσεις σε δ_{H} 5.29 (2 dd overlapped, $J=3.0, 3.0, 13.2, 13.2\text{ Hz}$, H-2), δ_{H} 3.08 (2 dd overlapped, $J=13.2, 13.2, 16.8, 16.8\text{Hz}$, H-3α) και δ_{H} 2.66 (2 dd overlapped, $J=3.0, 3.0, 16.8, 16.8\text{Hz}$, H-3β). Στην κεντρική περιοχή του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ δύο διπλές κορυφές των ανωμερικών πρωτονίων των διαστερομερών φλαβανονών R- και S- με χημική μετατόπιση 4.88ppm και με σταθερές σύζευξης 6.6, 7.2Hz, ενδεικτικές για γλυκόζες $\beta\text{-D-}$ διαμόρφωσης (Beninger C.W. et al., 2004; Mabry T.J. et al., 1970). Το σάκχαρο φαίνεται να συνδέεται με το φλαβονοειδές στη θέση 7, από το γεγονός ότι στο φάσμα HMBC υπάρχει κοινό σήμα του ανωμερικού πρωτονίου και των πρωτονίων 6 και 8 σε δ_{C} 168.2, το οποίο αντιστοιχεί στον άνθρακα της θέσεως 7. Η ταυτοποίηση του σακχάρου έγινε με βάση βιβλιογραφικές αναφορές (Turner A. et al., 2005).

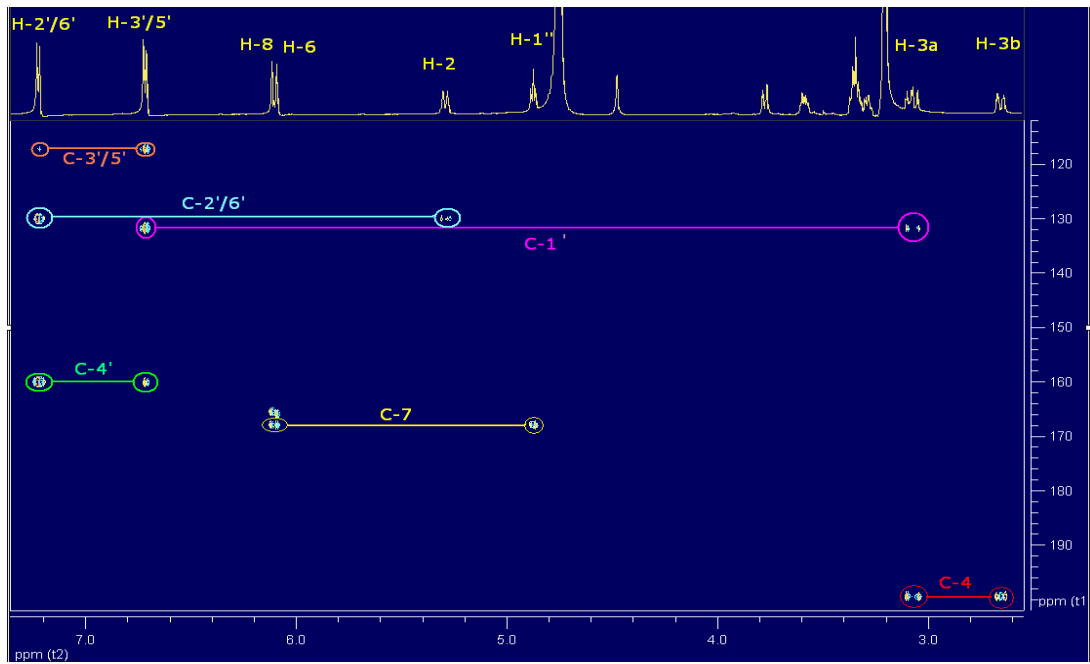




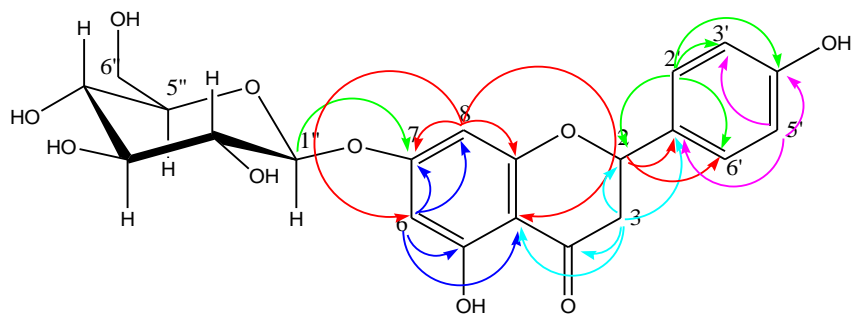
Λεπτομέρεια φάσματος HSQC της M52 (CD₃OD, 600MHz)



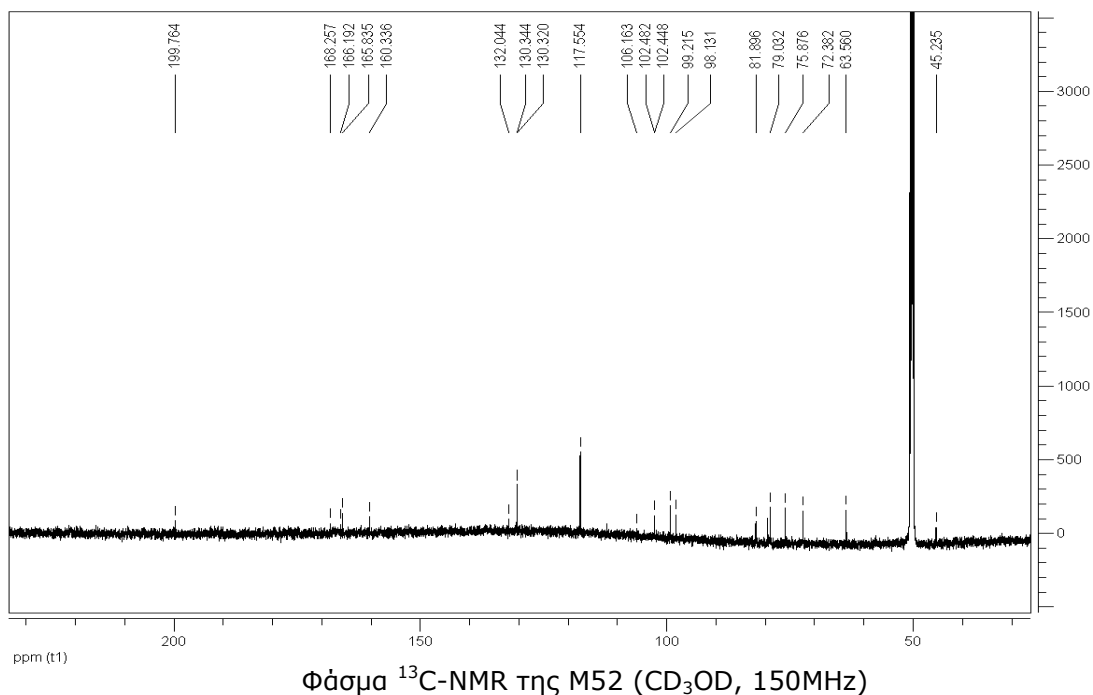
Φάσμα HMBC της M52 (CD₃OD, 600MHz)



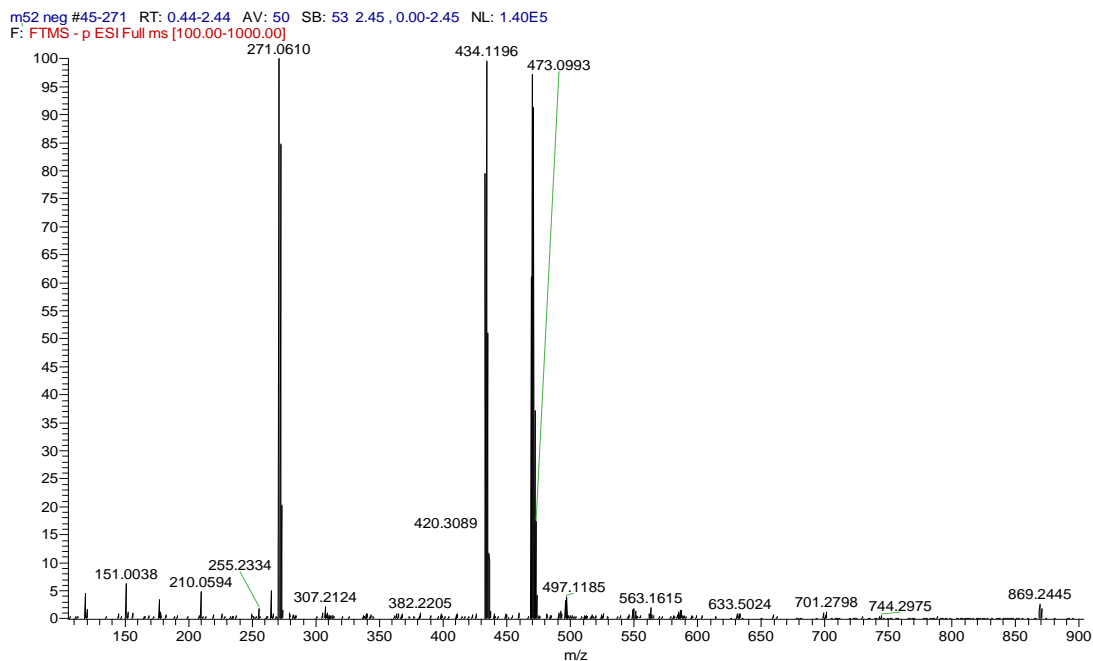
Λεπτομέρεια φάσματος HMBC της M52 (CD₃OD, 600MHz)



Οι συζεύξεις H-C που προκύπτουν από το HMBC

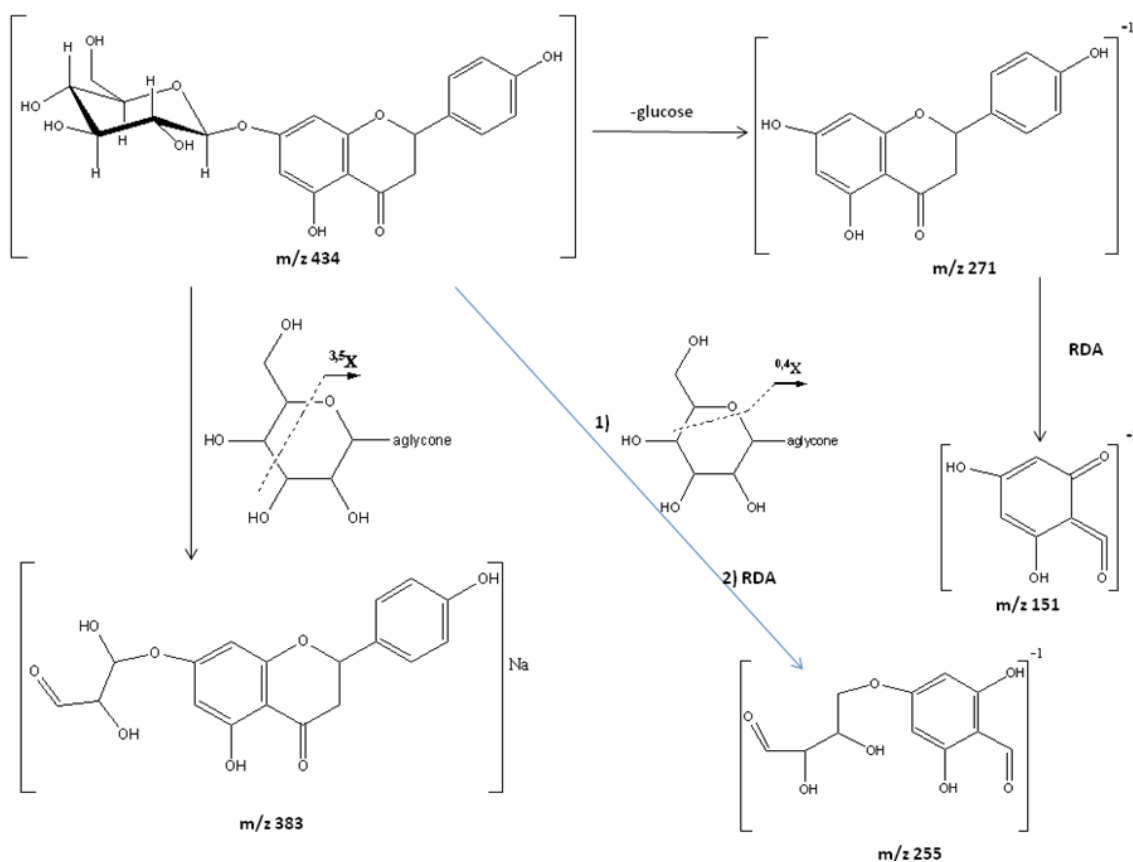


Φάσμα μάζας



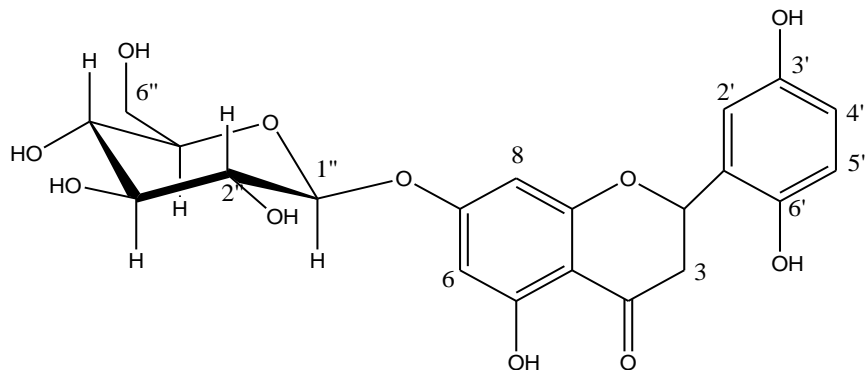
Από το φάσμα μάζας της ένωσης, που ελήφθη σε σύστημα HR-MS (Thermo Scientific) με αρνητικό ιονισμό, προκύπτει το μοριακό ιόν της ένωσης σε m/z 434 που αντιστοιχεί στο μοριακό τύπο $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$. Η θεωρητική μέτρηση της μάζας (434.1206) επιβεβαιώνεται και από την πραγματική της τιμή (434.1196). Το

θραύσμα 473 αντιστοιχεί σε $[M + H_2O + Na]$. Μετά την απομάκρυνση του σακχάρου παρατηρείται το θραύσμα με m/z 271 που αντιστοιχεί στο άγλυκο ναριγγενίνη, όπως άλλωστε επιβεβαιώνεται και από τα δεδομένα του NMR, και στη συνέχεια μέσω του μηχανισμού Retro-Diels-Alder προκύπτει το θραύσμα με m/z 151 (Kammerer B. et al., 2005). Η θραυσμάτωση της ένωσης και οι προτεινόμενες δομές των θραυσμάτων δίδονται στο παρακάτω σχήμα. Από τα παραπάνω δεδομένα φαίνεται ότι η ένωση 6 είναι η προυνίνη, όπως προκύπτει και από τη βιβλιογραφία (Turner A. et al., 2005).

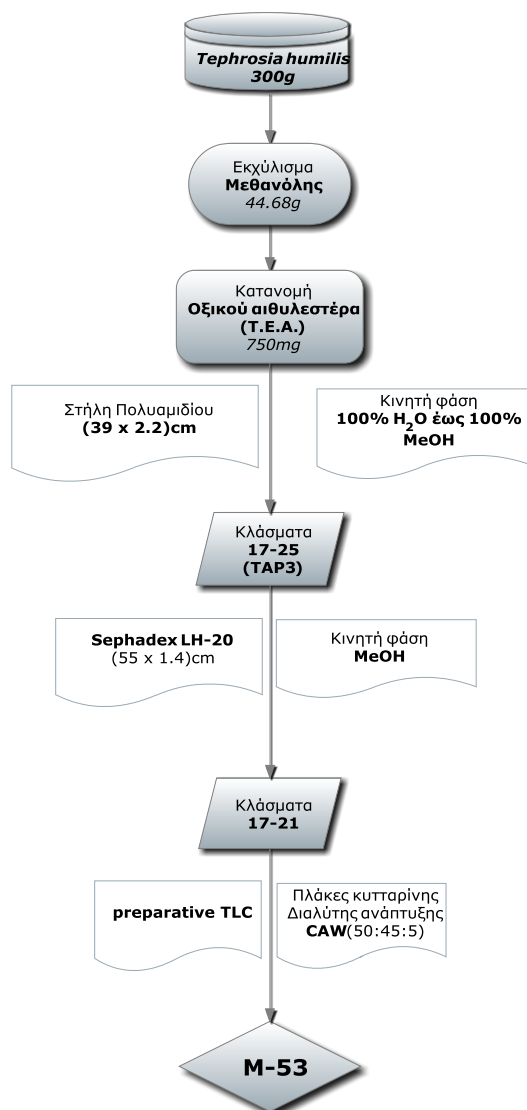


Ένωση 7

(Ουσία M53): 7-O-β-D-γλυκοζιτης της 5,7,3',6'-τετραϋδροξυ-φλαβανόνης



Απομόνωση ουσίας M53



Το στερεό υπόλειμμα του οξικού αιθυλεστέρα χρωματογραφήθηκε σε στήλη πολυαμιδίου (39 x 2.2)cm με κινητή φάση ύδωρ προς μεθανόλη έως 100% και με όγκο συλλεγομένων κλασμάτων 500ml. Η ομάδα κλασμάτων TAP3 (κλάσματα 17-25, 100% νερό) χρωματογραφήθηκε σε στήλη Sephadex LH-20 (1.3 x 55)cm με διαλύτη έκλουσης μεθανόλη. Τα κλάσματα 17-21 συνολικού βάρους 7.1mg χρωματογραφήθηκαν σε παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας με στατική φάση κυτταρίνη (Merck 5552) και διαλύτη ανάπτυξης διχλωρομεθάνιο:οξικό οξύ:νερό (CAW) σε αναλογία 50:45:5. Η ουσία M53 εμφανίστηκε ως μια ζώνη ($R_f=0.62$) καφέ χρώματος στο UV-Vis και σκούρου πρασίνου μετά από έκθεση σε ατμούς NH_3 . Η ουσία M53 εκλούστηκε από την πλάκα με μεθανόλη και μετά από την απομάκρυνση του διαλύτη, έδωσε στερεό υπόλειμμα καθαρού βάρους 1.9mg.

Έλεγχος καθαρότητας

Η ουσία είχε καφέ φθορισμό στη λάμπα υπεριώδους/ορατού και σκούρο πράσινο φθορισμό μετά από έκθεση σε ατμούς NH_3 .

Για τον έλεγχο καθαρότητας της ουσίας, χρησιμοποιήθηκαν δύο συστήματα ανάπτυξης σε χρωματογραφία λεπτής στιβάδας με στατική φάση πλάκες κυτταρίνης.

Σε σύστημα AcOH 15% : $R_f=0.56$ και CAW : $R_f=0.62$

Φάσμα υπεριώδους-ορατού

Κατά τη φασματοφωτομετρική εξέταση της ουσίας ελήφθησαν χαρακτηριστικές καμπύλες με τα ακόλουθα μέγιστα (nm).

<i>M53</i>	Κορυφή II	Κορυφή I	Δ_λ I
<i>MeOH</i>	283.0	330.5	
<i>MeONa</i>	287.0	364.5	+34.0
<i>AlCl₃</i>	306.5($\Delta_\lambda=+23.5$)	379.5	+49.5
<i>AlCl₃/HCl</i>	304.5($\Delta_\lambda=+21.5$)	379.5	+49.5
<i>AcONa</i>	283.0	329.0	-1.5
<i>AcONa/H₃BO₃</i>	283.0	326.0	-3.0

Από την τιμή απορρόφησης των κορυφών I και II του μεθανολικού διαλύματος και ιδιαίτερα της κορυφής II που εμφανίζεται ως κύρια, συμπεραίνεται ότι η ουσία

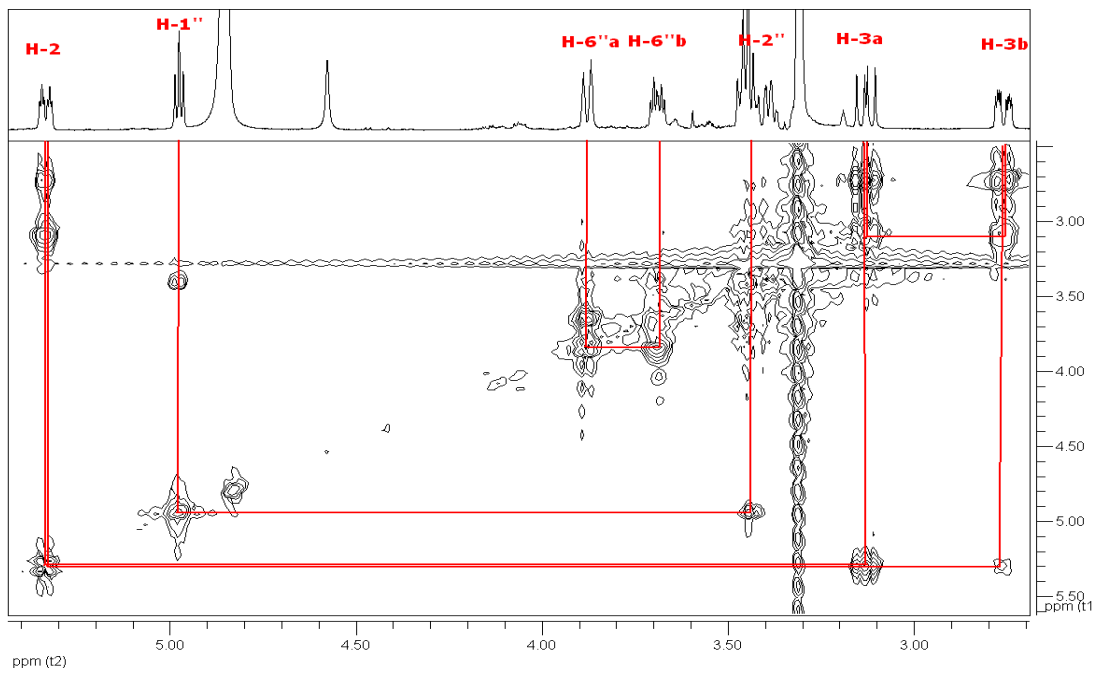
ανήκει στις φλαβανόνες. Από το φάσμα με AcONa, προκύπτει ότι το 7-OH είναι υποκατεστημένο, διότι δεν παρουσιάζεται βαθυχρωμική μετατόπιση στην κορυφή II. Στο φάσμα AlCl₃ παρατηρείται βαθυχρωμική μετατόπιση της κορυφής II κατά 23.5nm, η οποία παραμένει σταθερή (21.5nm) με την προσθήκη HCl, ενδεικτικό των φλαβανονών με ελεύθερο 5-OH (Yuldashev M.P. et al., 1993).

Φάσμα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού

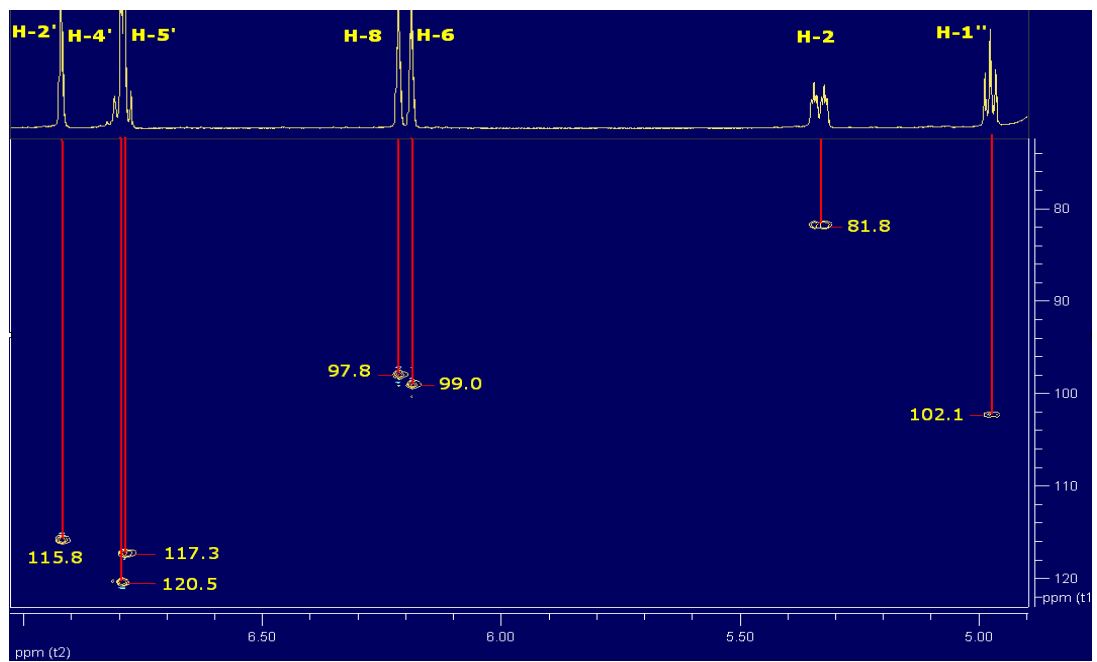
¹H-NMR και ¹³C-NMR (CD₃OD, 600MHz)			
Θέση	δ _H (ppm)	J _{HH} (Hz)	δ _C (ppm)*
2	5.31(2 dd overlapped)	3.0, 3.0, 12.6, 12.6	81.8
3	3.13(2 dd overlapped)	12.6, 12.6, 17.4, 17.4	45.1
	2.76(2 dd overlapped)	3.0, 3.0, 17.4, 17.4	
4			199.2
5			165.9
6	6.19(d)	1.8	99.0
7			167.8
8	6.22(d)	1.8	97.8
9			165.4
10			105.9
1'			132.6
2'	6.90(d)	1.5	115.8
3'			147.6
4'	6.78(dd)	1.5, 8.2	120.5
5'	6.77(d)	8.2	117.3
6'			147.6
<u>Glc</u>			
1''	4.98(2 d)	6.6, 7.2	102.1
2''	3.47(overlapped)		72.0
3''	3.45(overlapped)		79.2
4''	3.39(m)		72.0
5''	3.43(overlapped)		75.5
6''	3.87-3.89 (2 overlapped dd)	11.7, 12.0	63.4
	3.67-3.71 (2 overlapped dd)	5.0, 5.2, 11.7, 12.0	

*Τιμές που προκύπτουν από τα φάσματα HSQC, HMBC

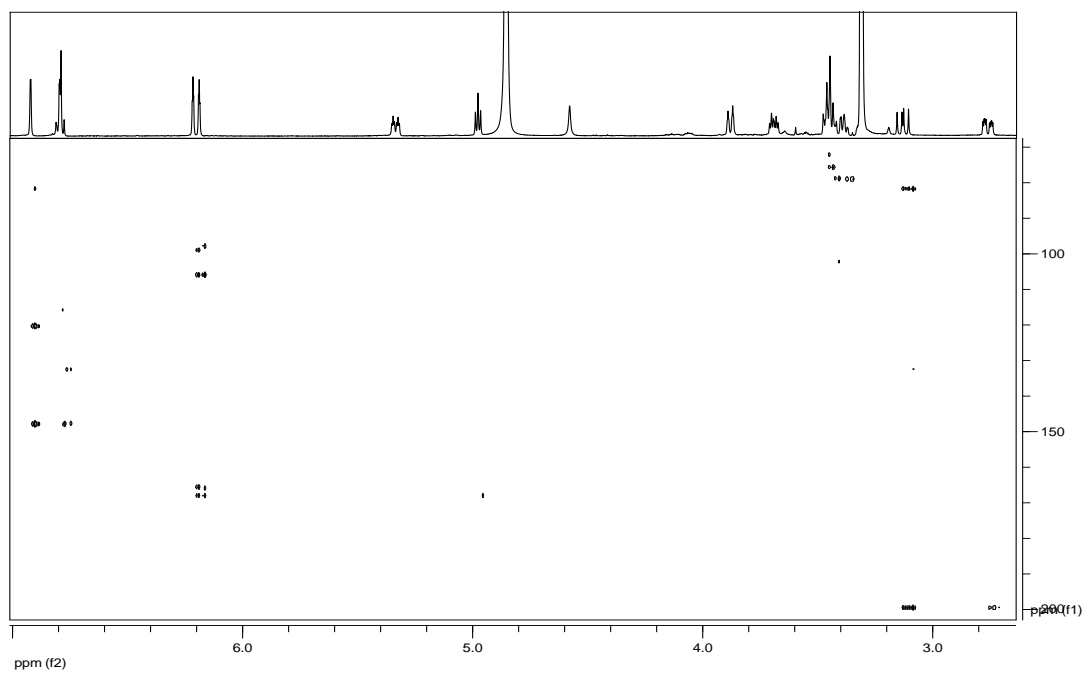
Στην αρωματική περιοχή του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ παρατηρείται μια διπλή κορυφή σε δ_{H} 6.90 ($J=1.5\text{Hz}$), η οποία αντιστοιχεί στο H-2' του Β δακτυλίου του φλαβονοειδούς, μια διπλή κορυφή σε δ_{H} 6.77 ($J=8.2\text{Hz}$) που αντιστοιχεί στο H-5' και μια διπλή διπλών κορυφή σε δ_{H} 6.78 ($J=1.5, 8.2\text{Hz}$) που αντιστοιχεί στο H-4' και οι οποίες επιβεβαιώνουν την ασυνήθιστη 3',6' διυδροξυ-υποκατάσταση (Mendez J. et al., 1994). Επίσης παρατηρούνται δύο διπλές κορυφές, δ_{H} 6.19 ($J=1.8$) και δ_{H} 6.22 ($J=1.8$), οι οποίες αντιστοιχούν στα H-6 και H-8 του Α δακτυλίου, αντίστοιχα. Στην περιοχή από δ_{H} 5.40 ως 2.60 παρατηρείται η ύπαρξη πλευρικών σημάτων (side signals) που υποδεικνύουν την παρουσία και μιας άλλης φλαβανόνης, καθώς πρόκειται για μίγμα δύο διαστερομερών φλαβανονών (S- και R-) (Maltese F. et al., 2009). Στην περίπτωση αυτή τα σήματα αλληλεπικαλύπτονται και μεταβάλλεται η μορφή των κορυφών. Ωστόσο και για τις δύο φλαβανόνες, προκύπτει ένα AMX σύστημα, τυπικό για φλαβανόνες, με χημικές μετατοπίσεις σε δ_{H} 5.31 (2 dd overlapped, $J=3.0, 3.0, 12.6, 12.6$ Hz, H-2), δ_{H} 3.13 (2 dd overlapped, $J=12.6, 12.6, 17.4, 17.4$ Hz, H-3a) και δ_{H} 2.76 (2 dd overlapped, $J=3.0, 3.0, 17.4, 17.4$ Hz, H-3β). Στην κεντρική περιοχή του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ εμφανίζονται οι δύο διπλές κορυφές των ανωμερικών πρωτονίων των διαστερομερών φλαβανονών R- και S- με χημική μετατόπιση 4.98ppm και με σταθερές σύζευξης 6.6 και 7.2Hz, ενδεικτικές για γλυκόζες β-D-διαμόρφωσης (Beninger C.W. et al., 2004; Mabry T.J. et al., 1970). Το σάκχαρο φαίνεται να συνδέεται με το φλαβονοειδές στη θέση 7, από το γεγονός ότι στο φάσμα HMBC υπάρχει κοινό σήμα του ανωμερικού πρωτονίου και των πρωτονίων 6 και 8 σε δ_{C} 167.8, το οποίο αντιστοιχεί στον άνθρακα της θέσεως 7. Η ταυτοποίηση του σακχάρου έγινε με βάση βιβλιογραφικές αναφορές (Aquino R. et al., 1990).



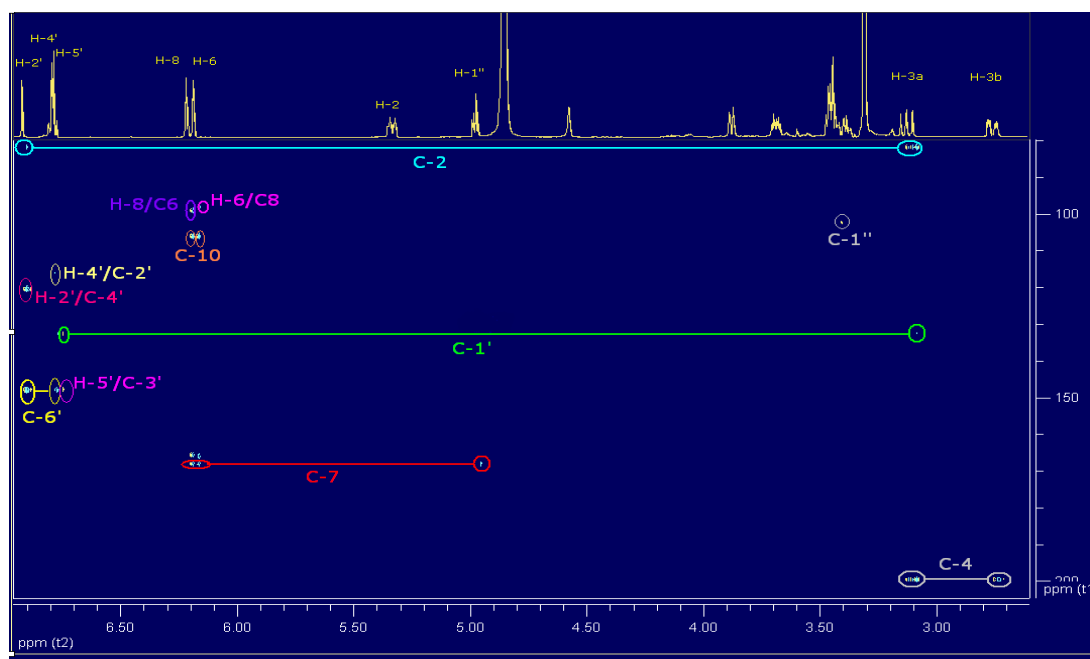
Φάσμα COSY της M53 (CD₃OD, 600MHz)



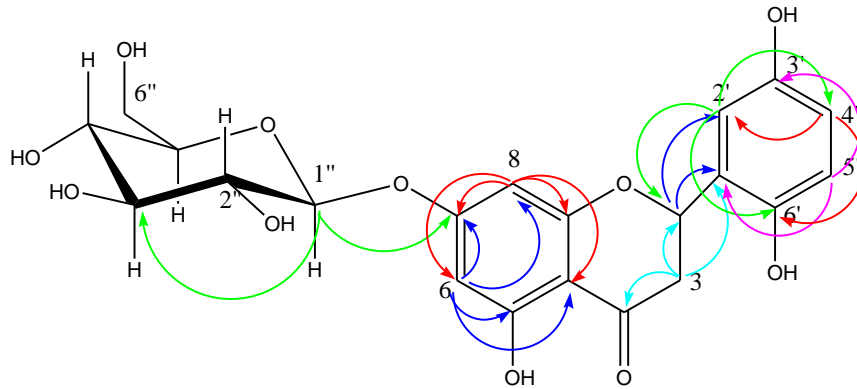
Φάσμα HSQC της M53 (CD₃OD, 600MHz)



Φάσμα HMBC της M53(CD₃OD, 600MHz)

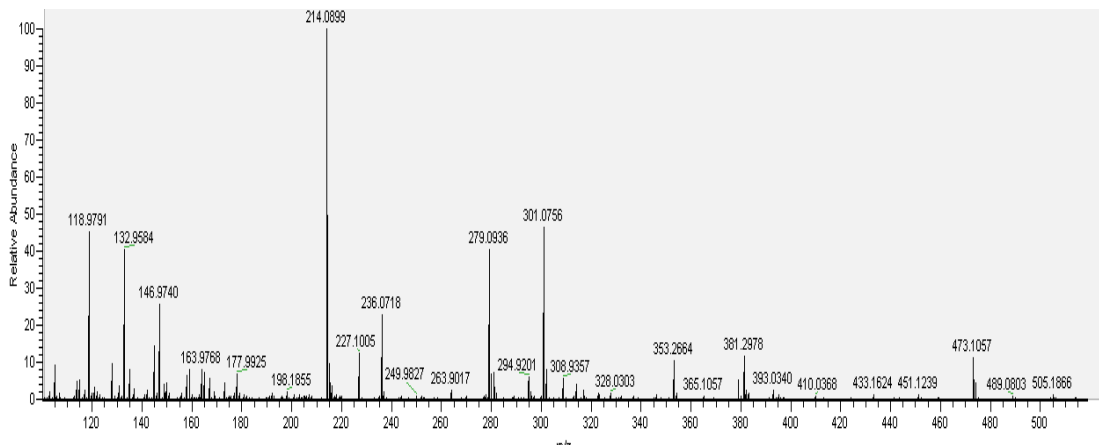
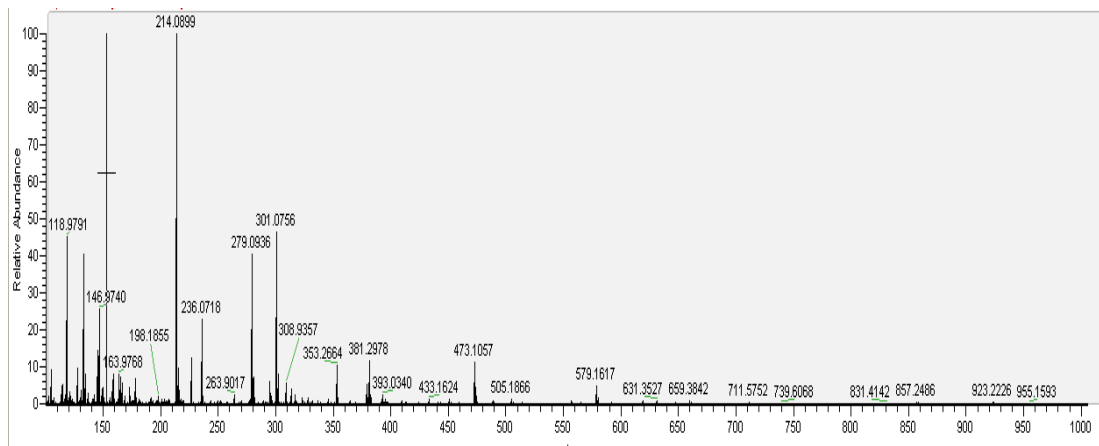


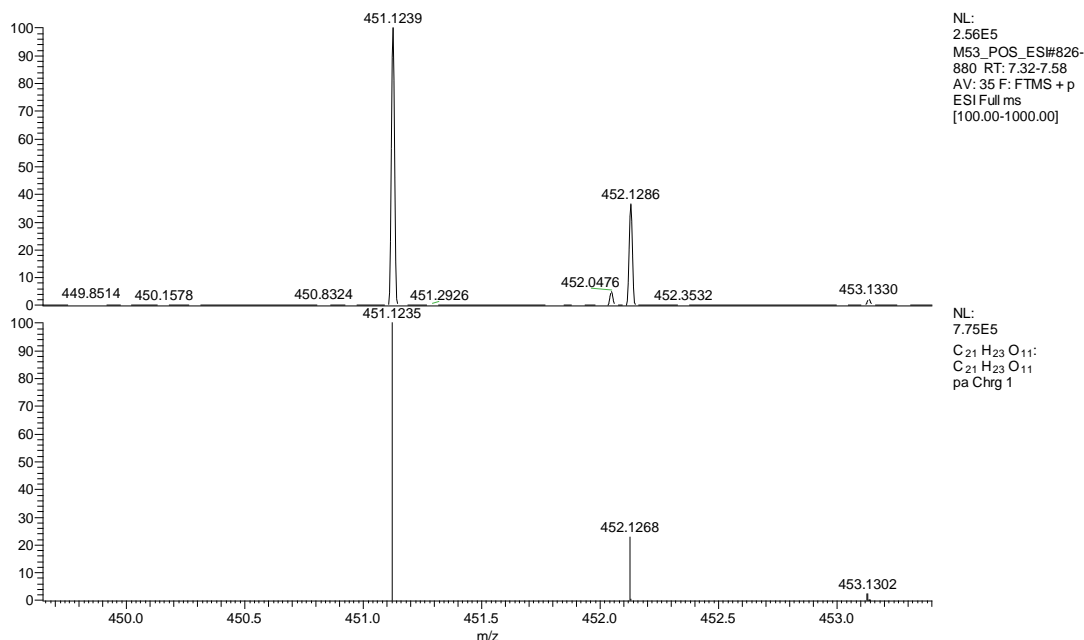
Λεπτομέρεια φάσματος HMBC της M53 (CD₃OD, 600MHz)



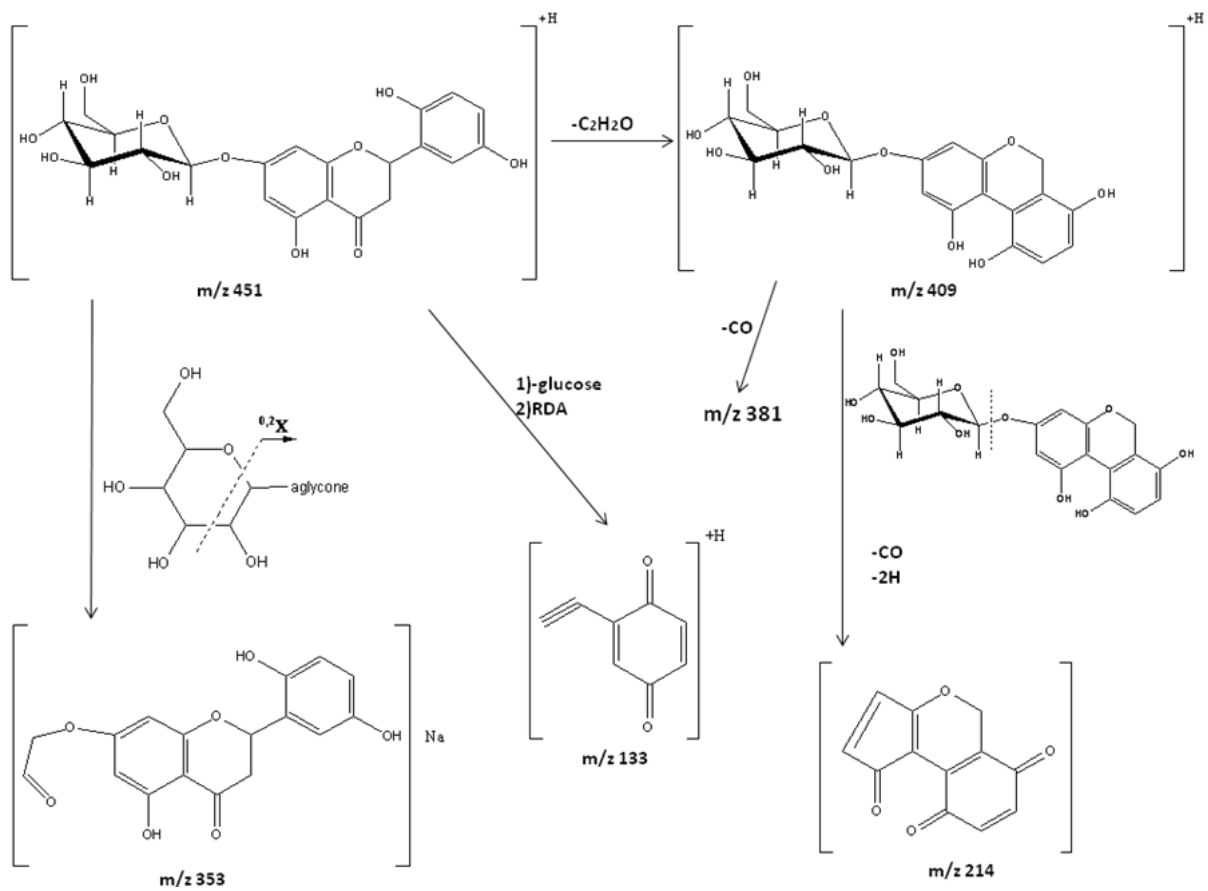
Οι συζεύξεις H-C που προκύπτουν από το HMBC

Φάσμα μάζης



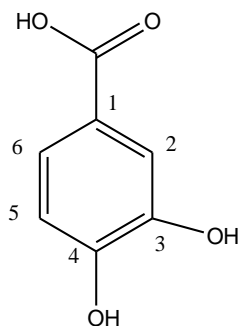


Από το φάσμα μάζας της ουσίας, που ελήφθη σε σύστημα HR-MS (Thermo Scientific) με θετικό ιονισμό, προκύπτει το θραύσμα $[M+H]^+=451$ που αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν, καθώς και το θραύσμα $[M+Na]=473$. Η θεωρητική μέτρηση της μάζας ($[M+H]=451.1233$) επιβεβαιώνεται και από την πραγματική της τιμή (451.1235). Με αφαίρεση ενός μορίου νερού από το μοριακό ιόν προκύπτει το θραύσμα $[M-H_2O]^+=433$. Το προτεινόμενο θραύσμα με m/z 353 προκύπτει μετά από την απομάκρυνση μέρους του σακχάρου $[M-120+Na]$, ενώ η προτεινόμενη δομή θραύσματος με m/z 409 αντιστοιχεί στο $[M-C_2H_2O]^+$ (Cuyckens F. et al., 2004, Fabre N. et al., 2001). Οι υπόλοιπες προτεινόμενες δομές και η θραυσμάτωση της ένωσης δίνονται σχηματικά παρακάτω. Από όλα τα παραπάνω προκύπτει ότι η ένωση M53 είναι ο 7-O-β-D-γλυκοζίτης της 5,7,3',6'-τετραϋδροξυ-φλαβανόνης γεγονός που συμφωνεί και με την υπάρχουσα βιβλιογραφία (Aquino R. et al., 1990).

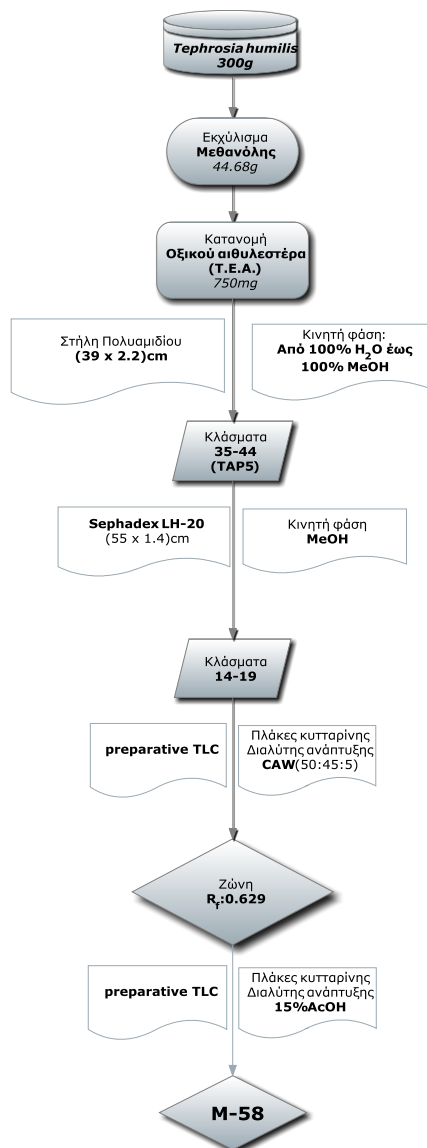


Ένωση 8

(Ουσία M58): 3,4-διυδροξυ-βενζοϊκό οξύ (πρωτοκατεχικό οξύ)



Απομόνωση ουσίας M58



Το πρωτοκατεχικό οξύ θεωρείται ως ένα από τα πλέον συνήθη φαινολικά οξέα που απομονώθηκαν στο γένος *Tephrosia*, διότι σε έρευνα που διενεργήθηκε σε σύνολο 18 ειδών, εμφανίστηκε στα 13 από αυτά (Suba Rao J.V. et al., 1993). Το στερεό υπόλειμμα του οξικού αιθυλεστέρα χρωματογραφήθηκε σε στήλη πολυαμιδίου με κινητή φάση νερό → μεθανόλη. Η ομάδα κλασμάτων 35-44 (TAP5) που εκλούστηκε σε αναλογία διαλυτών H₂O:MeOH από 90:10 έως 80:20 χρωματογραφήθηκε σε στήλη Sephadex LH-20 με διαλύτη έκλουσης μεθανόλη. Συνενώθηκαν τα κλάσματα 14-19 και χρωματογραφήθηκαν με παρασκευαστική TLC σε πλάκες κυτταρίνης (Merck 5552) με CAW (διχλωρομεθάνιο:οξικό οξύ:νερό 50:45:5, οργ.φάση). Η ζώνη με R_f 0.63 μετά από εκχύλιση με μεθανόλη επαναχρωματογραφήθηκε σε δεύτερη TLC κυτταρίνης με διαλύτη ανάπτυξης οξικό οξύ 15%. Η ουσία M58 εμφανίστηκε σαν μια ευδιάκριτη ζώνη (R_f 0.57) με έντονο βιολετί φθορισμό στα 254nm και καθαρό βάρος 1.2mg.

Έλεγχος καθαρότητας

Η ουσία είχε έντονο σκούρο βιολετί φθορισμό στη λάμπα υπεριώδους/ορατού, ιδιαίτερα στα 254nm. Για τον έλεγχο καθαρότητας της ουσίας χρησιμοποιήθηκαν δύο συστήματα ανάπτυξης σε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας με στατική φάση πλάκες κυτταρίνης.

Σε σύστημα AcOH 15% :R_f=0.57 και CAW :R_f=0.63

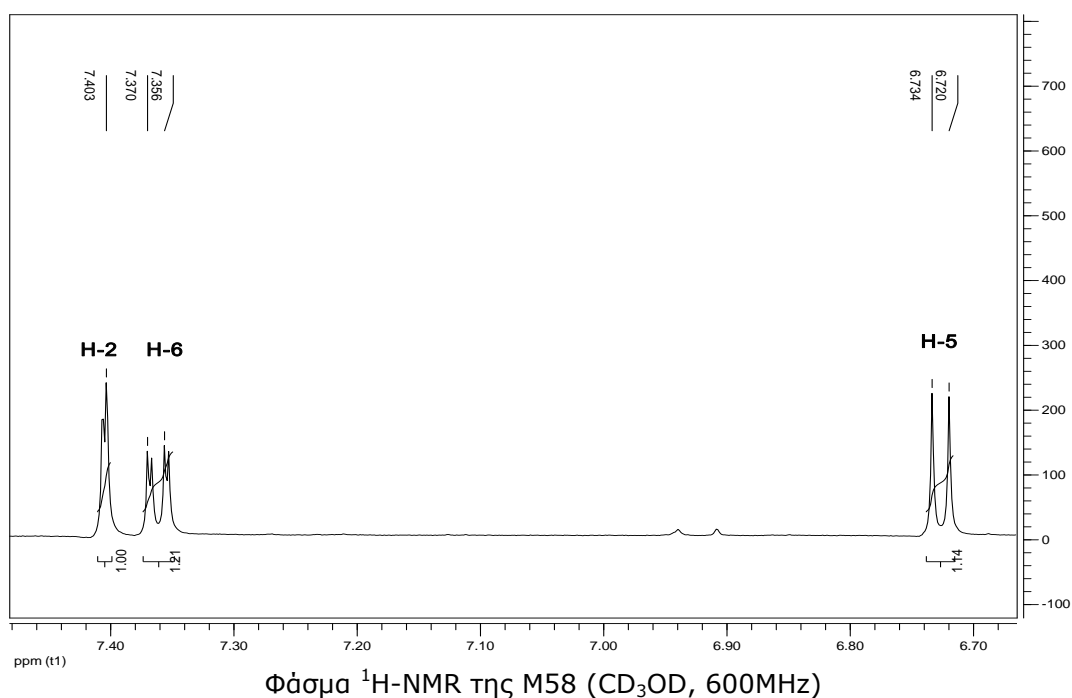
Φάσμα υπεριώδους-ορατού

Κατά τη φασματοφωτομετρική εξέταση της ουσίας σε μεθανόλη, εμφανίστηκαν δύο μέγιστα. Η πρώτη κορυφή, που ήταν και υψηλότερη στα 255.5nm (1.000) και η δεύτερη στα 292.5nm (0.540) και είναι τυπική για τα διυποκατεστημένα βενζοϊκά οξέα σε *πάρσ*- και *μέτα*- θέση ως προς την καρβοξυλική ομάδα (Waldron K.W. et al., 1996).

Φάσμα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού

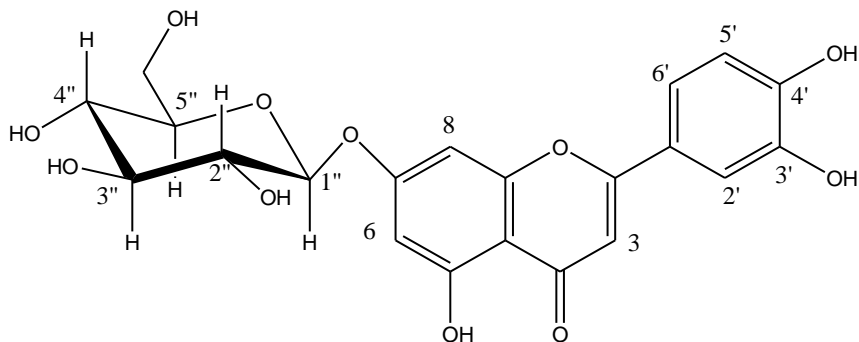
¹ H-NMR και ¹³ C-NMR (CD ₃ OD, 600MHz)		
Θέση	δ _H (ppm)	J _{HH} (Hz)
1		
2	7.40(d)	J _(2/6) =2.0
3		
4		
5	6.73(d)	J _(5/6) =8.3
6	7.36(dd)	J _(5/6) =8.3 J _(2/6) =2.0
-COOH		

Το φάσμα ¹H-NMR δίνει στην αρωματική περιοχή τρεις ευδιάκριτες κορυφές που αντιστοιχούν στο ABX σύστημα του αρωματικού δακτυλίου. Η πρώτη διπλή κορυφή [δ_H 7.40 (J=2.0Hz)] αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-2 και δίνει *μέτα*- σύζευξη με το H-6. Το H-6 εμφανίζεται σαν μια διπλή διπλών κορυφή [δ_H 7.36 (J=2.0Hz & 8.3Hz)] που σχάζεται επιπλέον με το H-5, το οποίο εμφανίζεται ως μια διπλή κορυφή [δ_H 6.73 (J=8.3 Hz)]. Η δομή που προκύπτει, αντιστοιχεί στο πρωτοκατεχικό οξύ, οι τιμές του οποίου επιβεβαιώνονται και από βιβλιογραφικά δεδομένα (Lee I.-C. et al, 2011).

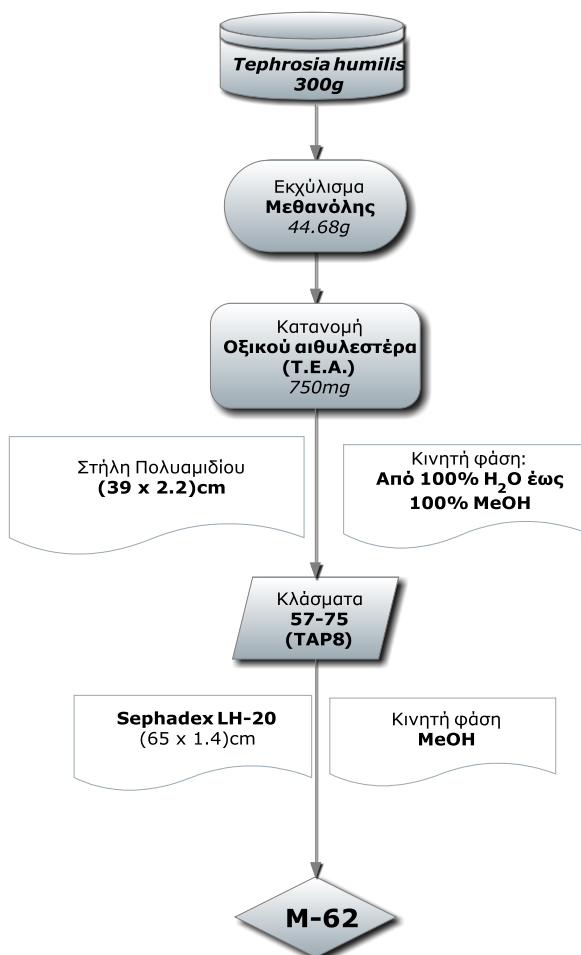


Ένωση 9

Ουσία M62: 7-O-β-D-γλυκοζίτης της λουτεολίνης



Απομόνωση ουσίας M62



Το στερεό υπόλειμμα του οξικού αιθυλεστέρα χρωματογραφήθηκε σε στήλη πολυαμιδίου (39 x 2.2)cm αντιστρόφου φάσεως με κινητή φάση νερό προς μεθανόλη και με όγκο συλλεγομένων κλασμάτων 500ml. Τα κλάσματα 57-75, που αντιστοιχούσαν σε

ποσοστό H₂O:MeOH από 70%:30% έως 60%:40%, συνενώθηκαν (TAP8) και χρωματογραφήθηκαν σε στήλη Sephadex LH-20 (65 x 1.4)cm με διαλύτη έκλουσης μεθανόλη. Συλλέχθηκαν κλάσματα όγκου 2ml και μετά από χρωματογραφικούς ελέγχους λεπτής στιβάδας, συνενώθηκαν τα κλάσματα 40-55 και συμπυκνώθηκαν, δίνοντας στερεό υπόλειμμα συνολικού βάρους 3.1mg.

Έλεγχος καθαρότητας

Η ουσία M62 είχε σκούρο ιώδη φθορισμό στη λάμπα υπεριώδους/ορατού και κίτρινο φθορισμό μετά από έκθεση σε ατμούς NH₃.

Χρησιμοποιήθηκαν δύο συστήματα ανάπτυξης με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας σε πλάκες κυτταρίνης για τον έλεγχο καθαρότητας της ουσίας.

Σε σύστημα EAW:R_f=0.32 και σε AcOH 15% :R_f=0.07

Φάσμα υπεριώδους-ορατού

Κατά τη φασματοφωτομετρική εξέταση της ουσίας ελήφθησαν χαρακτηριστικές καμπύλες με τα ακόλουθα μέγιστα (nm) που επαληθεύονται και από τη βιβλιογραφία (Ferreres F. et al., 1991, Grayer R.J. et al., 2000).

M62	Κορυφή II	Κορυφή I	Δλ I
MeOH	255.5, 267.0	343.0	
MeONa	270.0	385.5	+42.5
AlCl ₃	273.5, 295.0sh	426.0	+83.0
AlCl ₃ /HCl	273.5, 295.0sh	364.0	+21.0
AcONa	260.0	395.0	
AcONa/H ₃ BO ₃	260.0	368.0	+25.0

Από την τιμή απορρόφησης των κορυφών I και II του φάσματος της ένωσης σε MeOH, συμπεραίνεται ότι η ουσία ανήκει στις φλαβόνες που έχουν διυδροξύ σύστημα στο δακτύλιο B, διότι εμφανίζει δύο κορυφές απορρόφησης μεταξύ 250nm και 275nm (Mabry J.T. et al., 1970).

Μετά την προσθήκη AcONa, δεν παρατηρείται βαθυχρωμική μετατόπιση της κορυφής II σε σχέση με την αντίστοιχη της μεθανόλης, ενδεικτικό της απουσίας ελεύθερου 7-OH. Από το γεγονός ότι υπάρχει βαθυχρωμική μετατόπιση της κορυφής I, μετά την προσθήκη AcONa και H₃BO₃, κατά 25.0nm, σε σχέση με την αντίστοιχη σε μεθανόλη, προκύπτει ότι

υπάρχει ορθο-διυδροξυ σύστημα στον Β δακτύλιο. Με προσθήκη MeONa παρατηρείται βαθυχρωμική μετατόπιση της κορυφής I κατά 42.5nm, με αύξηση της έντασής της, χαρακτηριστικό ύπαρξης ελεύθερου 4'-OH. Η παρουσία ο-διυδροξυ συστήματος στον Β δακτύλιο επιβεβαιώνεται και από την υψιχρωμική μεταβολή κατά 62.0nm που παρατηρείται στην κορυφή I του φάσματος σε AlCl₃ μετά την προσθήκη HCl, λόγω της αποσύνθεσης του συμπλόκου του AlCl₃ με το ο-διυδροξυ σύστημα. Η διαφορά στην απορρόφηση της κορυφής I σε AlCl₃/HCl σε σχέση με την αντίστοιχη σε MeOH κατά 21.0nm, δείχνει την ύπαρξη ελεύθερου 5-OH (Mabry J.T. et al., 1970; Mues R., 1983).

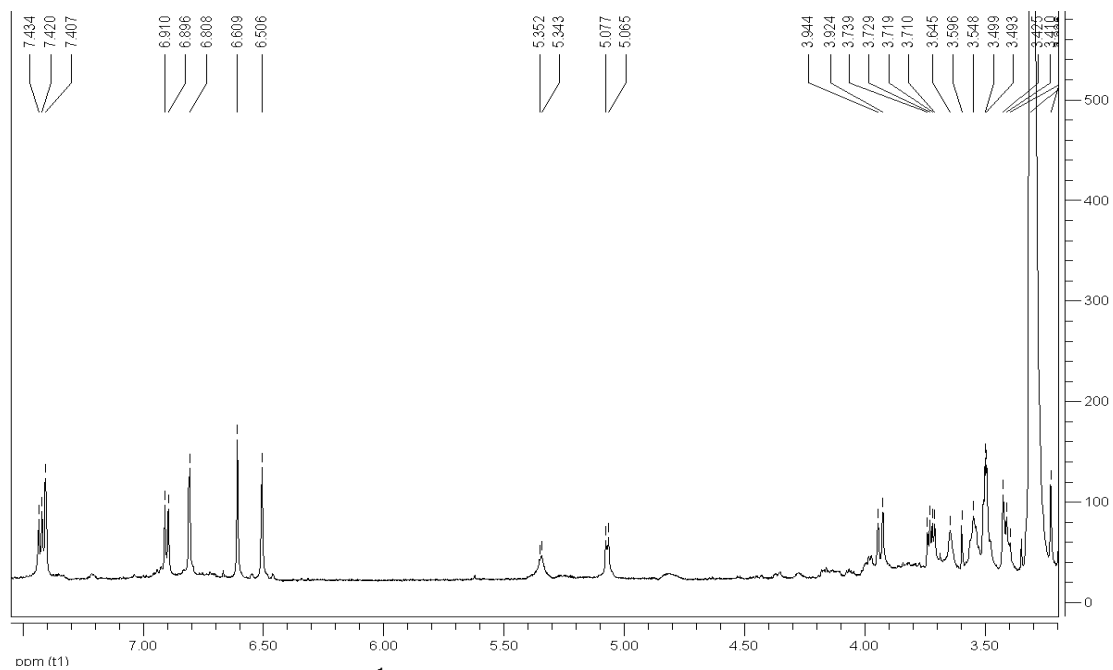
Φάσμα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού

¹H-NMR και ¹³C-NMR(CD₃OD, 600MHz)			
Θέση	δ _H (ppm)	J _{HH} (Hz)	δ _C (ppm)*
2			167.8
3	6.61(s)		105.2
4			185.2
5			163.8
6	6.51(d)	1.8	102.1
7			165.8
8	6.81(d)	1.8	97.0
9			159.8
10			108.0
1'			124.4
2'	7.41(d)	1.8	115.0
3'			148.3
4'			152.8
5'	6.90(d)	7.8	117.7
6'	7.43(dd)	7.8, 1.8	121.5
Gluc.			
1''	5.07(d)	6.6	102.9
2''	3.49(m)		75.5
3''	3.50(m)		79.1
4''	3.41(m)		72.4
5''	3.55(m)		79.4
6''	3.93(dd)	1.8, 12.0	63.4
	3.72(dd)	6.0, 12.0	

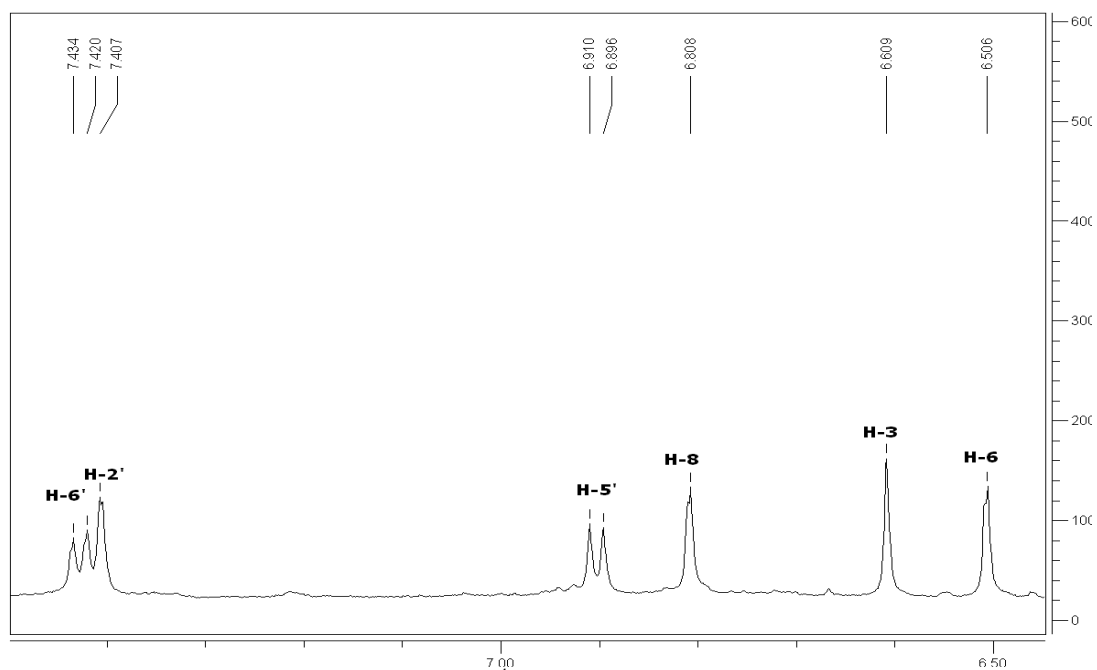
*Τιμές που προκύπτουν από τα φάσματα HSQC, HMBC

Στην αρωματική περιοχή του φάσματος ^1H NMR παρατηρείται μια διπλή διπλών κορυφή [dd, δ_{H} 7.43 ($J=1.8, 7.8$)], και δύο διπλές κορυφές σε δ_{H} [d, 7.41 ($J=1.8$)] και σε δ_{H} [d, 6.90 ($J=7.8$)] χαρακτηριστικές ύπαρξης ενός ABX συστήματος, και που αντιστοιχούν στα H-6', H-2' και H-5' του B δακτυλίου, αντίστοιχα. Οι αντίστοιχοι άνθρακες βρίσκονται σε χημικές μετατοπίσεις δ_{C} 121.5, 115.0 και 117.7ppm. Στο φάσμα ^1H - ^1H COSY φαίνονται οι σχάσεις μεταξύ των πρωτονίων H-5'/H-6'. Στο φάσμα πρωτονίου παρατηρούνται επίσης δύο διπλές κορυφές, δ_{H} 6.51 και δ_{H} 6.81 ($J=1.8$), οι οποίες σχάζονται μεταξύ τους και αποδίδονται στα H-6 και H-8 του A δακτυλίου αντίστοιχα, καθώς και μια απλή κορυφή στα 6.61ppm που αντιστοιχεί στο H-3.

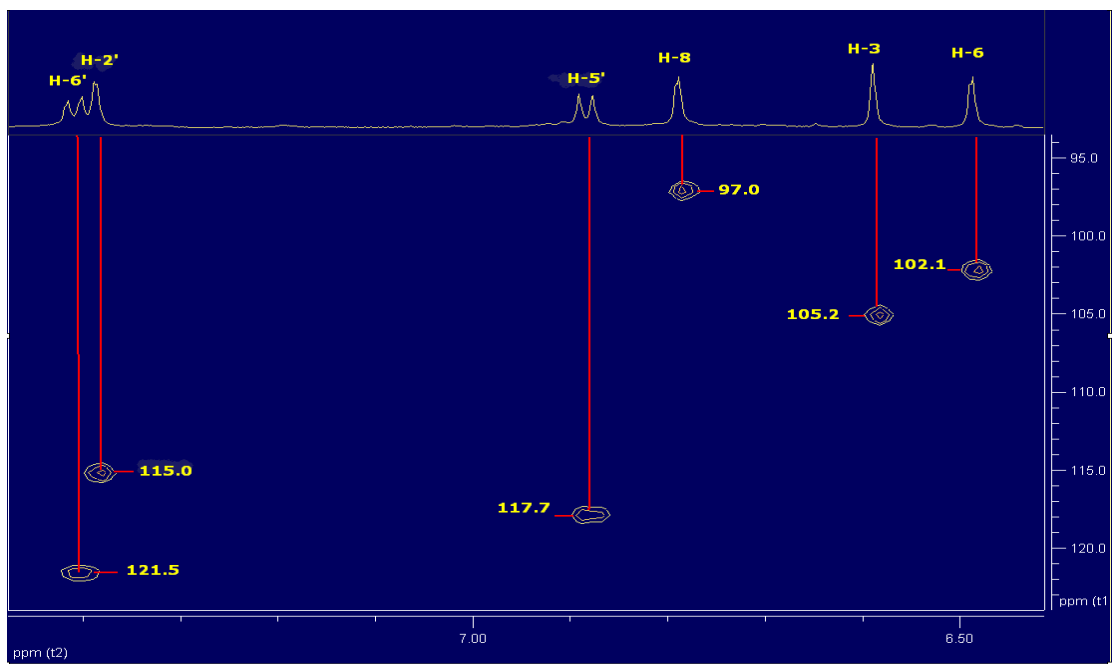
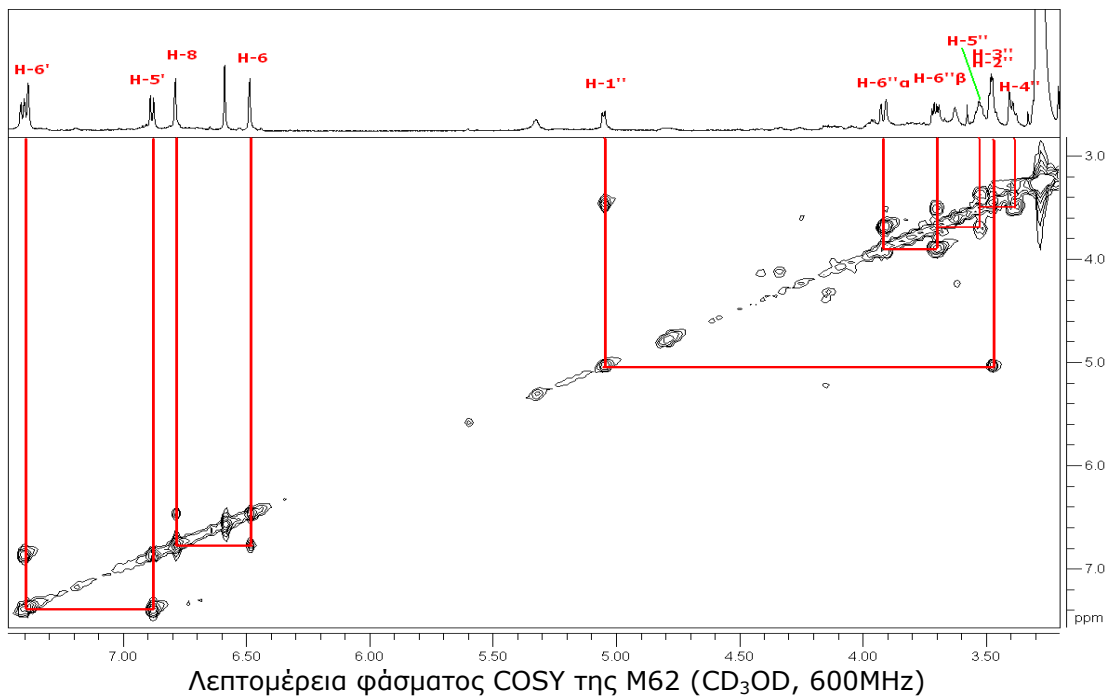
Στην κεντρική περιοχή του φάσματος μεταξύ 5.10-3.40ppm παρατηρούνται σήματα σακχάρου. Η διπλή κορυφή με χημική μετατόπιση 5.07 αντιστοιχεί στο ανωμερικό πρωτόνιο της γλυκόζης και με σταθερά σύζευξης 6.6Hz, ενδεικτική της θέσης σύνδεσης για γλυκόζη β -D-διαμόρφωσης (Beninger C.W. et al., 2004; Mabry T.J. et al., 1970). Η σύνδεση του σακχάρου γίνεται στη θέση-7 του αγλύκου, καθώς παρατηρείται σήμα του ανωμερικού πρωτονίου του σακχάρου για τον C-7 του αγλύκου (165.8), που είναι κοινό με τα σήματα των H-6 και H-8 (Mues R., 1983) γεγονός που επιβεβαιώνεται και από το φάσμα υπεριώδους ορατού της ένωσης με AcONa που υποδεικνύει την ύπαρξη 7-υποκατάστασης. Από την τιμή της σταθεράς σύζευξης ($J=6.6\text{Hz}$) του ανωμερικού πρωτονίου του σακχάρου προκύπτει η β -διαμόρφωση αυτού. Οι υπόλοιπες τιμές για τα πρωτόνια και τους άνθρακες προκύπτουν από τα φάσματα ^1H - ^1H COSY, HSQC και HMBC.

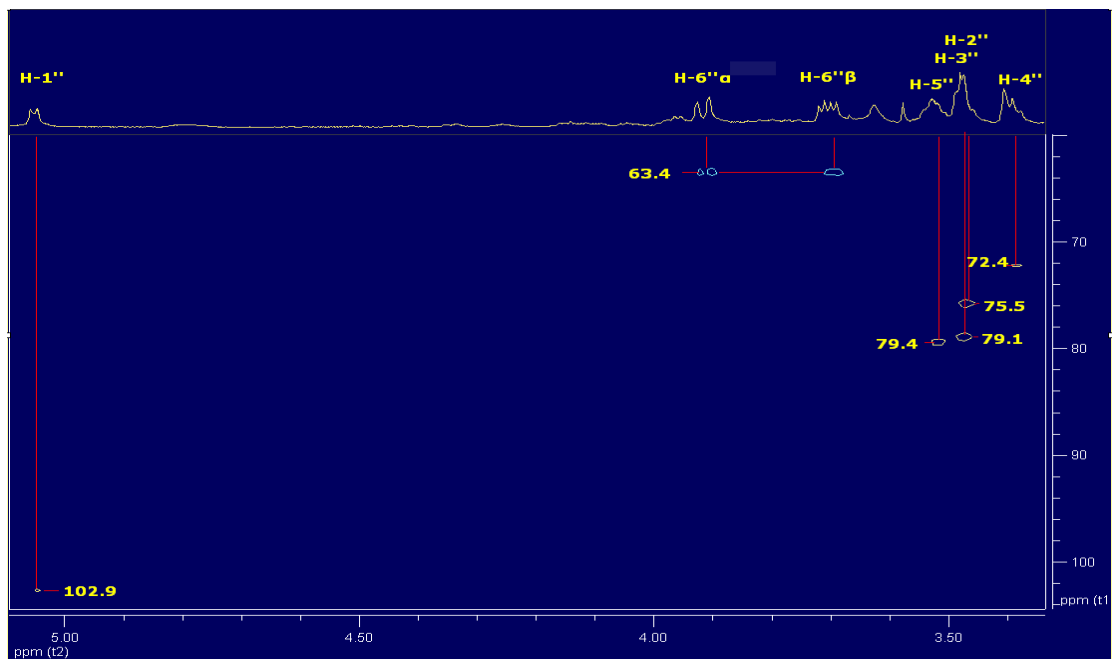


Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της M62 (CD_3OD , 600MHz)

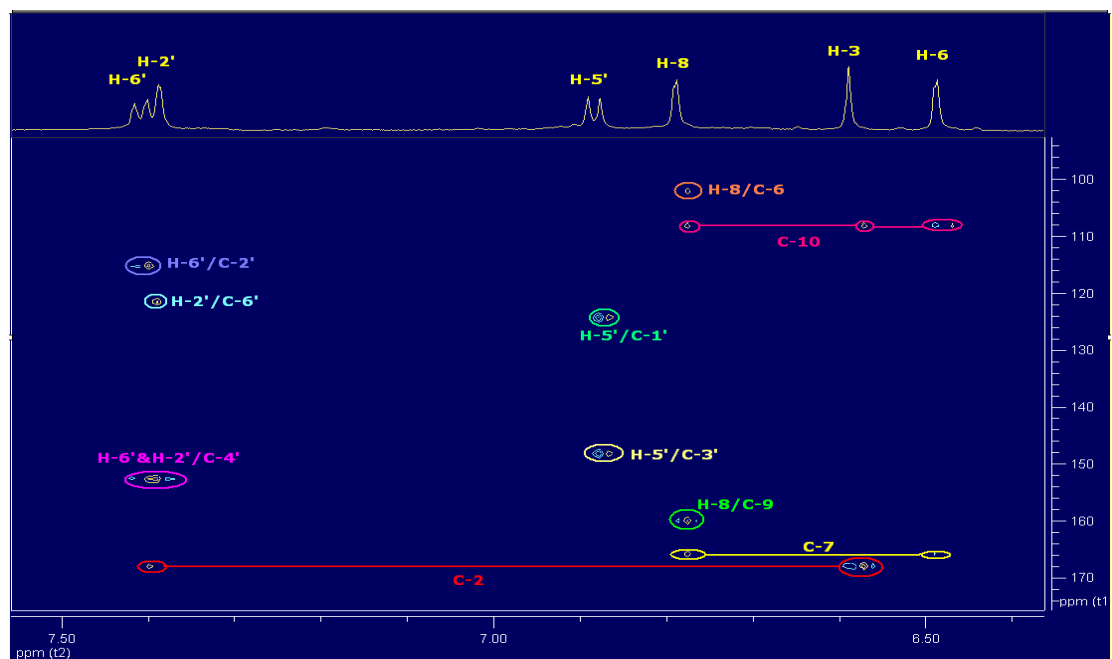


Λεπτομέρεια φάσματος του $^1\text{H-NMR}$ της M62 (CD_3OD , 600MHz)

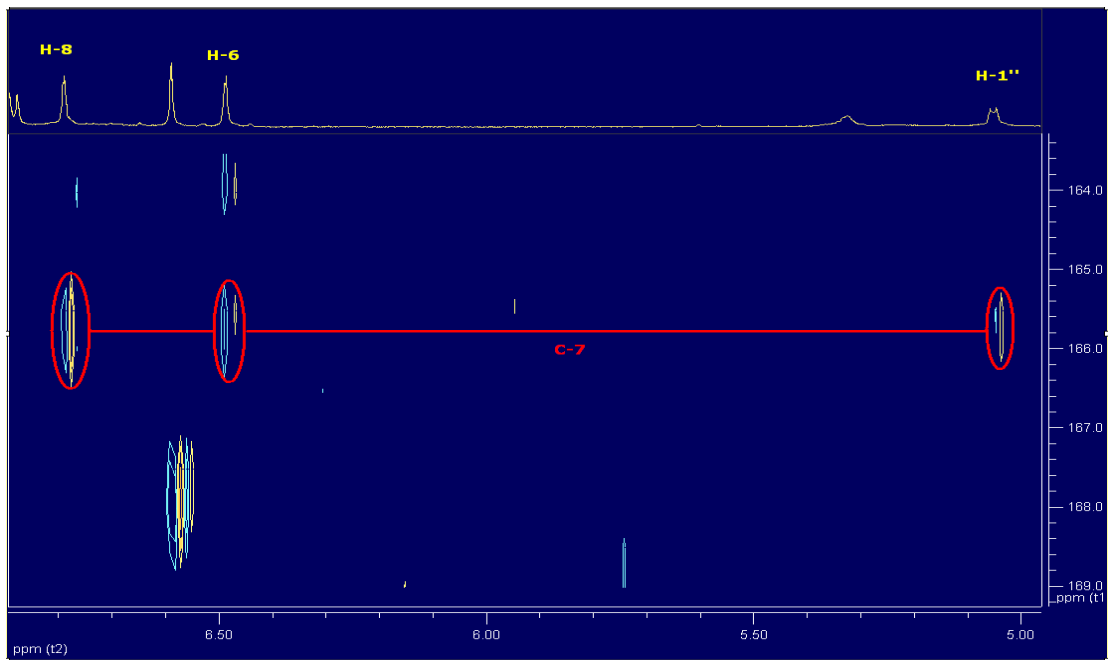




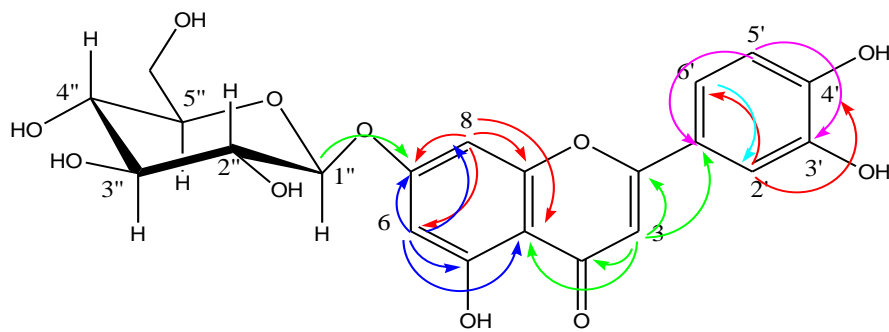
Λεπτομέρεια φάσματος HSQC της M62 (CD₃OD, 600MHz)



Λεπτομέρεια φάσματος HMBC της M62 (CD₃OD, 600MHz)

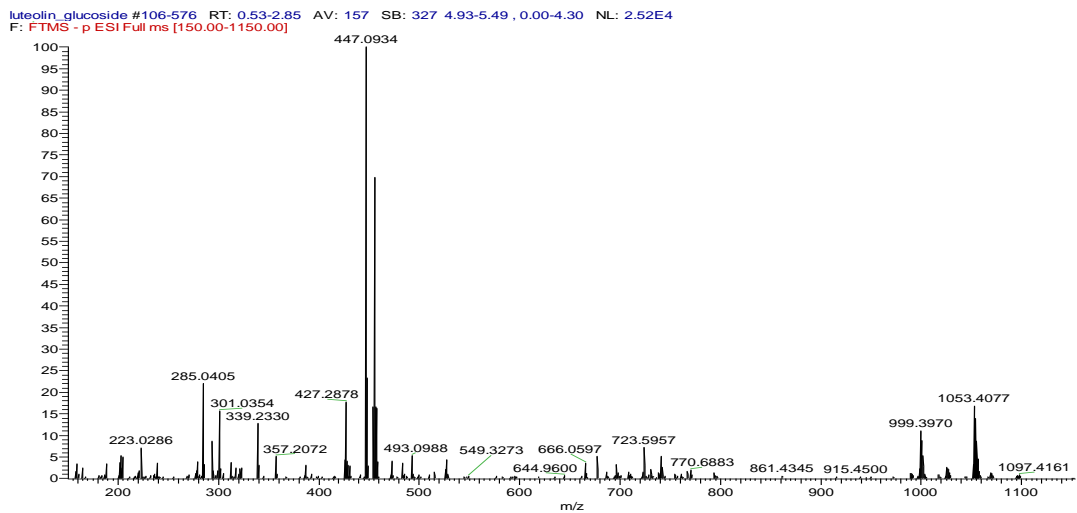


Λεπτομέρεια φάσματος HMBC της M62 (CD₃OD, 600MHz)



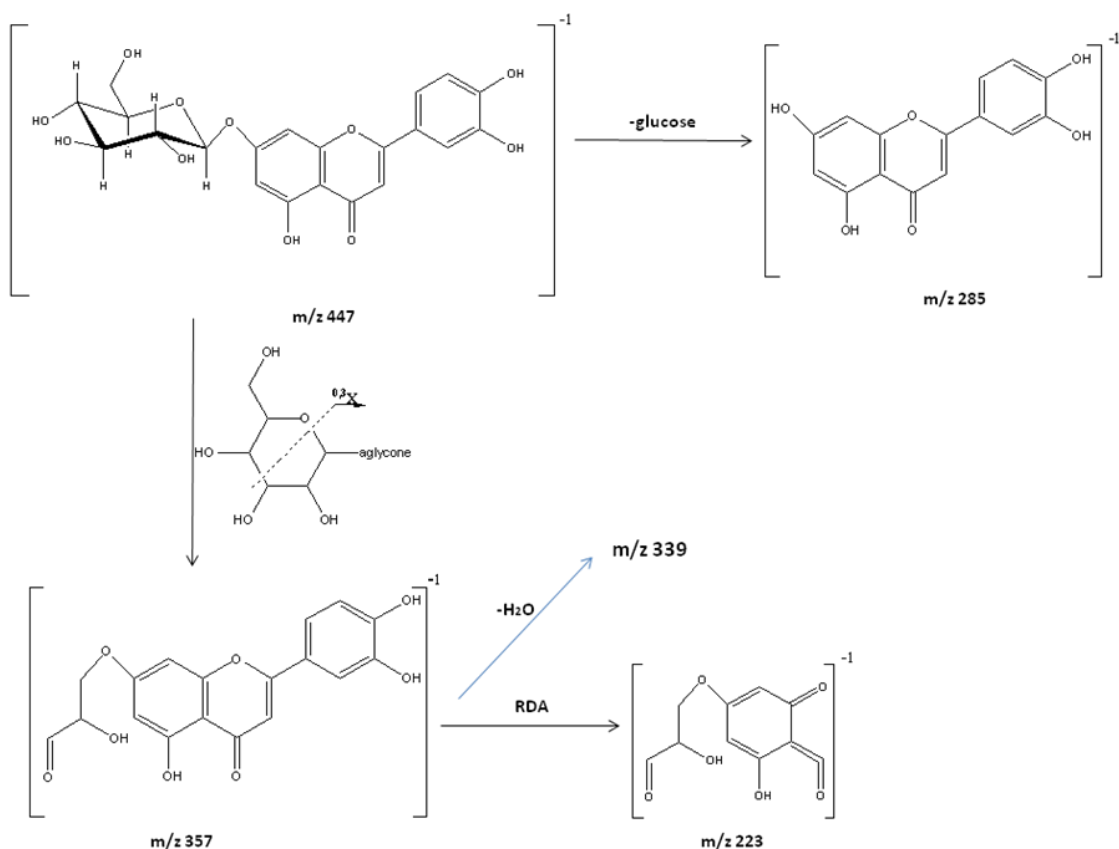
Συζεύξεις H-C που προκύπτουν από το HMBC

Φάσμα μάζης



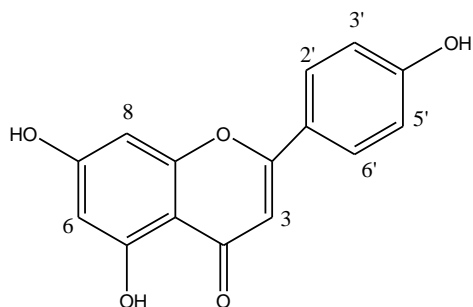
Από το φάσμα μάζας της ουσίας, που ελήφθη σε σύστημα HR-MS (Thermo Scientific) με αρνητικό ιονισμό, προκύπτει το θραύσμα 447 που αντιστοιχεί στο [M-H]. Η τιμή του μοριακού ιόντος αντιστοιχεί στο μοριακό τύπο C₂₁H₂₀O₁₁. Η θεωρητική μέτρηση της μάζας ([M-H]= 447.0921) επιβεβαιώνεται και από την πραγματική της τιμή (447.0934). Το θραύσμα με m/z 285 αντιστοιχεί στη λουτεολίνη (άγλυκο) [M-glucose]⁻, ενώ το θραύσμα με m/z 357 στο θραύσμα [M-90]⁻ (^{0,3}X) (March R.E. et al., 2006, Guzel Y. et al., 2011). Από το τελευταίο αυτό θραύσμα με θραυσμάτωση Retro-Diels-Alder προκύπτει το προτεινόμενο θραύσμα με m/z 223. Το θραύσμα με m/z 915 αντιστοιχεί στο [2M+Na]. Η θραυσμάτωση της ένωσης και με τα προτεινόμενα θραύσματα, εμφανίζονται σχηματικά παρακάτω.

Από όλα τα παραπάνω προκύπτει ότι η ένωση M62 είναι ο 7-O-β-D-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, όπως άλλωστε επιβεβαιώνεται και από την υπάρχουσα βιβλιογραφία. Έχει αποδειχθεί δε, ότι δύναται να έχει πιθανή αντικαρκινική δράση κατά της καρκινογένεσης στο κόλον (Liu Q.-M. et al., 2012; Baskar A.A. et al., 2011).

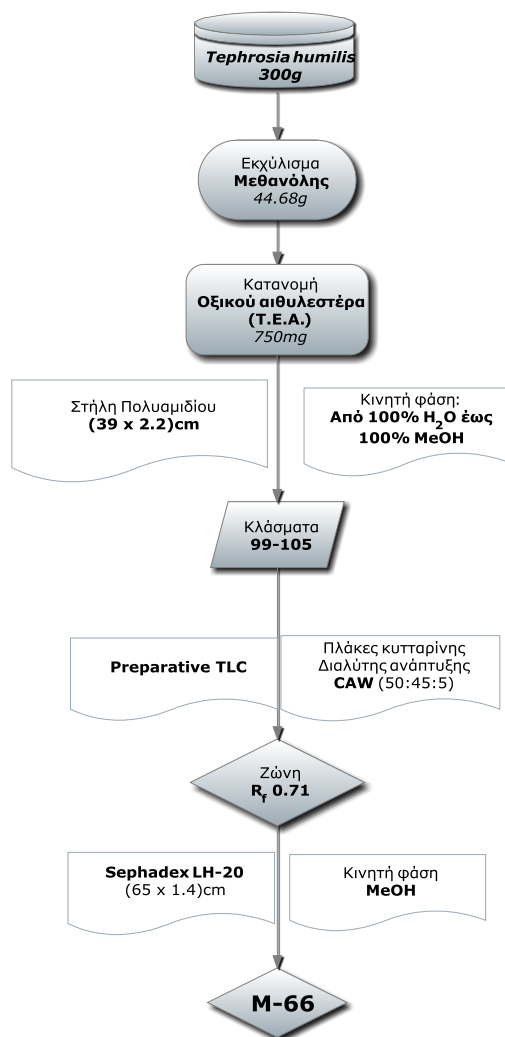


Ένωση 10

(Ουσία M66): Απιγενίνη



Απομόνωση ουσίας M66



Το στερεό υπόλειμμα του οξικού αιθυλεστέρα χρωματογραφήθηκε σε στήλη πολυαμιδίου (39 x 2.2)cm αντιστρόφου φάσεως με κινητή φάση νερό προς μεθανόλη και με όγκο συλλεγομένων κλασμάτων 500ml. Τα κλάσματα 99-105, που αντιστοιχούσαν σε ποσοστό 20%:80% (H₂O:MeOH), συνενώθηκαν (TAP12) και μετά από χρωματογραφικούς ελέγχους με TLC, ακολούθησε παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, με στατική φάση πλάκες κυτταρίνης (Merck 5552) και διαλύτη ανάπτυξης διχλωρομεθάνιο:οξικό οξύ:νερό (CAW) σε αναλογία 50:45:5. Κόπηκε η ζώνη με R_f 0.713 και φθορισμό κιτρινωπό στη λάμπα UV-Vis που αποκτούσε πράσινο φθορισμό σε ατμούς αμμωνίας, ακολούθησε έκλουσή της με μεθανόλη τρεις φορές και το διάλυμα διηθήθηκε. Το στερεό υπόλειμμα βάρους 1.4mg που προέκυψε, χρωματογραφήθηκε σε στήλη Sephadex LH-20 (1.4 x 65)cm με διαλύτη έκλουσης μεθανόλη. Συλλέχθηκαν κλάσματα όγκου 2ml και μετά από χρωματογραφικούς ελέγχους με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, συνενώθηκαν τα κλάσματα 2-4 και συμπυκνώθηκαν, δίνοντας στερεό υπόλειμμα συνολικού βάρους 1.1mg. Από την επεξεργασία με αυτή τη μέθοδο, προέκυψε η καθαρή ουσία **M-66**.

Η ίδια ακριβώς διαδικασία ακολουθήθηκε και στην επόμενη ομάδα κλασμάτων της κατανομής του οξικού αιθυλεστέρα (TAP13). Επιλέχθηκε και εδώ η ζώνη (**TAP₁₃B**) με το ίδιο R_f (0.713) στο CAW και χρωματογραφήθηκε στη συνέχεια σε στήλη Sephadex. Έπειτα από δοκιμαστικές TLC, πρόεκυψε ότι η **M-66** ταυτίζεται με την **TAP₁₃B** και για το λόγο αυτό, τα κλάσματα συνενώθηκαν, αποδίδοντας συνολικό καθαρό βάρος για την **M-66** 2.1mg.

Έλεγχος καθαρότητας

Πραγματοποιήθηκε με TLC σε πλάκες κυτταρίνης (Merck 5552), σε AcOH 15% :R_f =0.06 και CAW :R_f =0.71

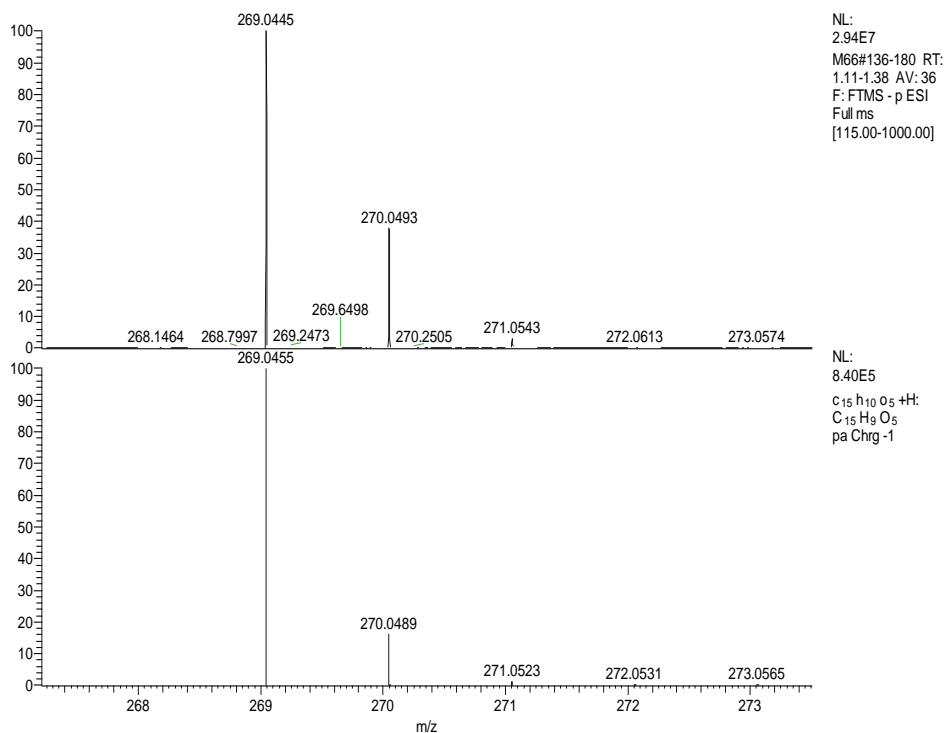
Φάσμα υπεριώδους-ορατού

Κατά τη φασματοφωτομετρική εξέταση της ουσίας ελήφθησαν χαρακτηριστικές καμπύλες με τα ακόλουθα μέγιστα (nm).

<i>M46</i>	Κορυφή II	Κορυφή I	Δ_λ I
<i>MeOH</i>	268.5	333.5	
<i>MeONa</i>	275.0	389.5	+46.0
<i>AlCl₃</i>	275.5	351.5	+18.0
<i>AlCl₃/HCl</i>	277.5	348.5	+15.0
<i>AcONa</i>	274.5($\Delta_\lambda=6.0$)	358.5	+15.0
<i>AcONa/H₃BO₃</i>	268.5	339.0	+5.5

Από την τιμή απορρόφησης της κορυφής I του μεθανολικού διαλύματος στα 333.5nm, συμπεραίνεται ότι η ουσία ανήκει στις φλαβόνες. Το 4'-OH φαίνεται να είναι ελεύθερο, διότι με την προσθήκη MeONa παρατηρείται βαθυχρωμική μετατόπιση της κορυφής I κατά 46nm, με αύξηση της έντασής της. Από το φάσμα με AcONa προκύπτει ότι το 7-OH είναι ελεύθερο, διότι παρατηρείται βαθυχρωμική μετατόπιση της κορυφής II κατά 6nm σε σχέση με την αντίστοιχη σε μεθανόλη. Μετά την προσθήκη H₃BO₃ στο διάλυμα AcONa, προκύπτει ότι δεν υπάρχει ορθο-διυδροξυ-σύστημα ούτε στον A, ούτε στον B δακτύλιο, γιατί δεν εμφανίζεται βαθυχρωμική μετατόπιση (12-30nm) στις κορυφές I και II (Mabry J.T. et al., 1970). Η βαθυχρωμική μετατόπιση κατά 18.0nm της κορυφής I μετά την προσθήκη AlCl₃, οφείλεται στο σχηματισμό συμπλόκου μεταξύ της κετονομάδας και του υδροξυλίου της θέσης 5. Η απουσία υψιχρωμικής μετατόπισης της κορυφής I κατά 30-40 nm, καθώς και της κορυφής II, μετά την προσθήκη HCl επιβεβαιώνει την απουσία ορθο-διυδροξυ-συστήματος στον A ή τον B δακτύλιο (Mabry J.T. et al., 1970).

Φάσμα Μάζας

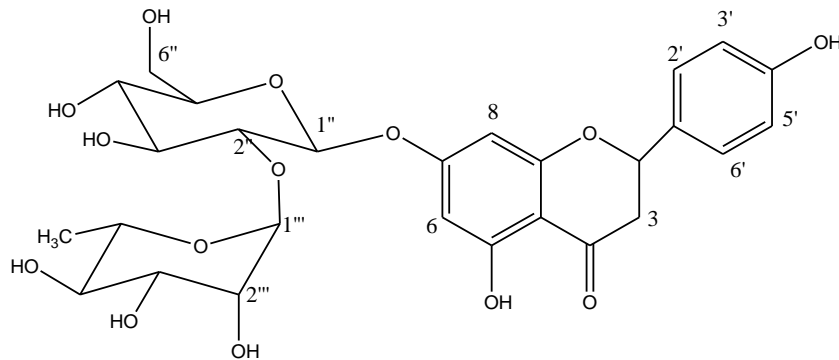


Από το φάσμα μάζας της ουσίας, που ελήφθη σε σύστημα HR-MS (Thermo Scientific) με αρνητικό ιονισμό, προκύπτει το θραύσμα 269 που αντιστοιχεί στο [M-H]. Η τιμή του μοριακού ιόντος αντιστοιχεί στο μοριακό τύπο C₁₅H₁₀O₅. Η θεωρητική μέτρηση της μάζας ([M-H]=269.0447) επιβεβαιώνεται και από την πραγματική της τιμή (269.0445). Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω δεδομένα προκύπτει ότι η ένωση M66 αντιστοιχεί στην απιγενίνη.

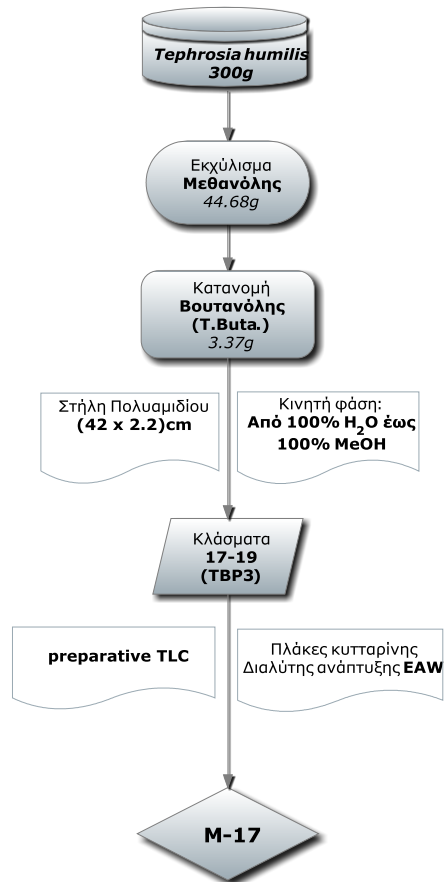
Κατανομή Βουτανόλης

Ένωση 11

(Ουσία M17): 7-O-β-D-(2''-O-α-L-ραμνοζυλο-)γλυκοζίτης της ναριγγενίνης (ναριγγίνη)



Απομόνωση ουσίας M17



Το στερεό υπόλειμμα του βουτανολικού εκχυλίσματος χρωματογραφήθηκε σε στήλη πολυαμιδίου με κινητή φάση νερό → μεθανόλη. Συνενώθηκαν τα κλάσματα 17-19 (TBP3) με κινητή φάση νερό 100% και χρωματογραφήθηκαν με παρασκευαστική TLC σε πλάκες κυτταρίνης και διαλύτη ανάπτυξης EAW [οξικός αιθυλεστέρας:οξικό οξύ:νερό (EAW) (οργ. φάση) σε αναλογία 4:1:2]. Η ουσία M17 εμφανίστηκε σαν μια ευδιάκριτη ζώνη (R_f 0.75) με κίτρινο φθορισμό στο υπεριώδες-ορατό και έντονο πράσινο φθορισμό μετά από έκθεση σε ατμούς NH_3 και καθαρό βάρος 5.0mg.

Έλεγχος καθαρότητας

Η ουσία είχε κίτρινο φθορισμό στη λάμπα υπεριώδους/ορατού και έντονο πράσινο φθορισμό μετά από έκθεση σε ατμούς NH_3 . Χρησιμοποιήθηκαν δύο συστήματα ανάπτυξης σε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας με στατική φάση πλάκες κυτταρίνης για τον έλεγχο καθαρότητας της ουσίας.

Σε σύστημα AcOH 15% : R_f =0.72 και EAW : R_f =0.75

Φάσμα υπεριώδους-ορατού και φάσμα μάζης

Κατά τη φασματοφωτομετρική εξέταση της ουσίας ελήφθησαν χαρακτηριστικές καμπύλες με τα ακόλουθα μέγιστα (nm).

<i>M17</i>	Κορυφή II	Κορυφή I	Δ_λ I
<i>MeOH</i>	283.0	327.5	
<i>MeONa</i>	283.0	417.5	+90.0
<i>AlCl₃</i>	308.0(Δ_λ =+25.0)	379.5	+52.0
<i>AlCl₃/HCl</i>	305.0(Δ_λ =+22.0)	379.5	+52.0
<i>AcONa</i>	281.5(Δ_λ =-1.5)	329.0	
<i>AcONa/H₃BO₃</i>	282.5	333.5	+6.0

Από την τιμή απορρόφησης των κορυφών I και II του μεθανολικού διαλύματος και ιδιαίτερα της κορυφής II που εμφανίζεται ως κύρια, συμπεραίνεται ότι η ουσία ανήκει στις φλαβανόνες. Από το φάσμα με AcONa, προκύπτει ότι το 7-OH είναι υποκατεστημένο διότι δεν παρουσιάζεται βαθυχρωμική μετατόπιση στην κορυφή II. Η βαθυχρωμική μετατόπιση κατά 25.0nm της κορυφής II μετά την προσθήκη $AlCl_3$, η οποία παραμένει σταθερή (22.0nm) με την προσθήκη HCl,

αποτελεί χαρακτηριστικό των φλαβονών με ελεύθερο 5-OH (Yuldashev M.P. et al., 1993).

Φάσμα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού

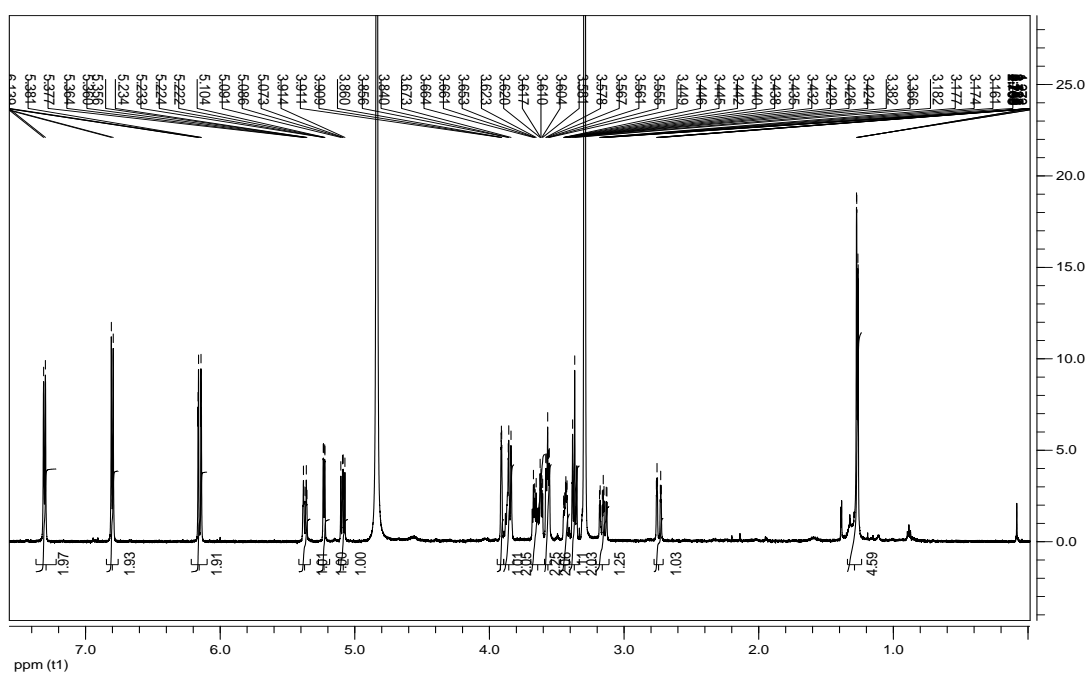
¹H-NMR και ¹³C-NMR (CD₃OD, 600MHz)			
Θέση	δ _H (ppm)	J _{HH} (Hz)	δ _C (ppm)*
2	5.37(2 dd overlapped)	2.4, 3.0, 12.6, 13.2	79.5
3	3.16(2 dd overlapped)	12.6, 13.2, 16.8, 17.4	43.2
	2.74(2 dd overlapped)	2.4, 3.0, 16.8, 17.4	
4			196.8
5			163.3
6	6.14(d)	1.8	96.4
7			164.8
8	6.16(d)	2.4	95.4
9			162.8
10			103.4
1'			129.3
2'	7.30(d)	8.4	127.5
3'	6.80(d)	8.4	114.8
4'			157.2
5'	6.80(d)	8.4	114.8
6'	7.30(d)	8.4	127.5
<u>Glc</u>			
1''	5.08, 5.10 (2 d)	7.8, 7.8	97.9
2''	3.62(m)		77.5
3''	3.57(m)		77.5
4''	3.37(m)		72.3
5''	3.43(m)		76.5
6''	3.86(dd)	2.3, 12.0	60.9
	3.67(dd)	5.4, 12.0	
<u>Rha</u>			

1'''	5.23, 5.22 (2 d)	1.6, 1.7	101.2
2'''	3.91(m)		70.5
3'''	3.57(m)		70.5
4'''	3.37(m)		69.7
5'''	3.84(m)		68.4
CH ₃	1.27(2 d)	6.0, 6.6	16.9

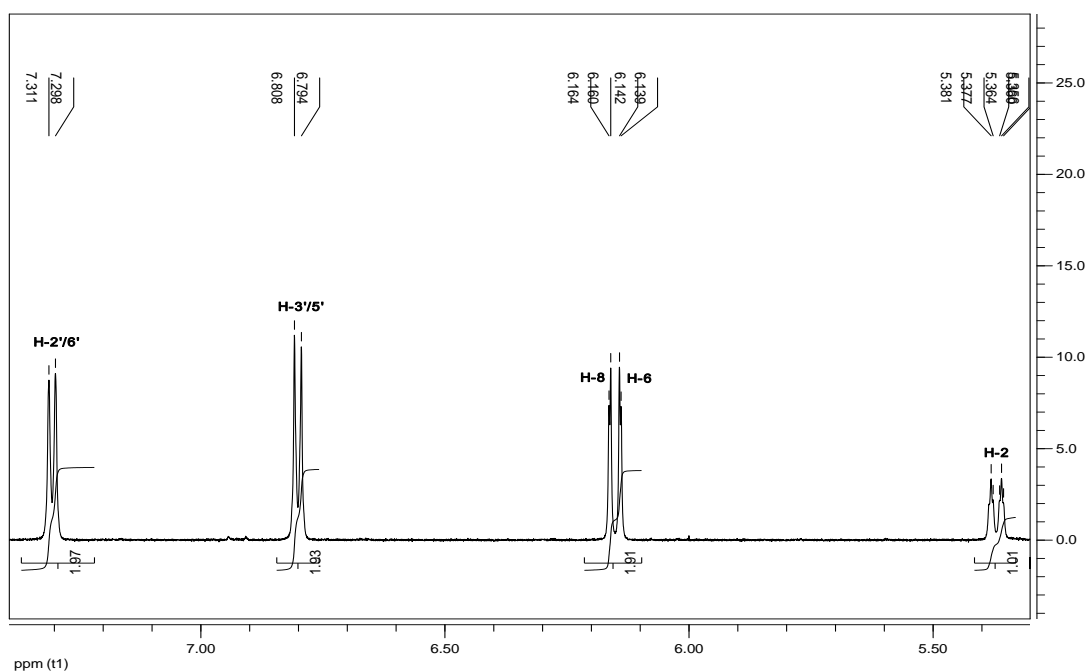
*Τιμές που προκύπτουν από τα φάσματα HSQC, HMBC

Στο φάσμα ¹H-NMR παρατηρούνται τα σήματα ενός AA'MM' συστήματος, χαρακτηριστικά ύπαρξης *para*-υποκατάστασης στο Β δακτύλιο με χημικές μετατοπίσεις σε δ_H 7.30 (2H, d, J=8.4Hz, H-2'/6') και δ_H 6.80 (2H, d, J=8.4Hz, H-3'/5'). Τα πρωτόνια H-8 και H-6 εμφανίζονται σε δ_H 6.16 και 6.14 αντίστοιχα. Στην περιοχή του φάσματος πρωτονίου από δ_H 5.50 ως 2.60 παρατηρείται η ύπαρξη πλευρικών σημάτων (side signals) που υποδεικνύουν την παρουσία και μιας άλλης φλαβανόνης, καθώς πρόκειται για μίγμα δύο διαστερομερών φλαβανονών (*S*- και *R*-) (Maltese F. et al., 2009). Στην περίπτωση αυτή τα σήματα αλληλεπικαλύπτονται και μεταβάλλεται η μορφή των κορυφών. Ωστόσο και για τις δύο φλαβανόνες, προκύπτει ένα AMX σύστημα, τυπικό για φλαβανόνες, με χημικές μετατοπίσεις σε δ_H 5.37 (2 dd overlapped, J=2.4, 3.0, 12.6, 13.2 Hz, H-2), δ_H 3.16 (2 dd overlapped, J=12.6, 13.2, 16.8, 17.4Hz, H-3α) και δ_H 2.74 (2 dd overlapped, J=2.4, 3.0, 16.8, 17.4Hz, H-3β). Στην κεντρική περιοχή του φάσματος ¹H-NMR εμφανίζονται οι κορυφές των ανωμερικών πρωτονίων της γλυκόζης και της ραμνόζης των δύο διαστερομερών φλαβανονών *R*- και *S*-). Σε δ_H 5.23 και 5.22 εμφανίζονται δύο διπλές κορυφές με σταθερές σύζευξης 1.6 και 1.7Hz που αντιστοιχούν στα ανωμερικά πρωτόνια της ραμνόζης των δύο διαστερομερών. Σε δ_H 5.08 και 5.10 και με σταθερές σύζευξης 7.8Hz εμφανίζονται τα ανωμερικά πρωτόνια της γλυκόζης (*R*- και *S*- διαστερομερών), ενδεικτικές για γλυκόζη β-D-διαμόρφωσης (Beninger C.W. et al., 2004; Mabry T.J. et al., 1970). Η γλυκόζη φαίνεται να συνδέεται με το φλαβονοειδές στη θέση 7, από το γεγονός ότι στο φάσμα HMBC υπάρχει κοινό σήμα του ανωμερικού πρωτονίου και των πρωτονίων 6 και 8 σε δ_C 164.8, το οποίο αντιστοιχεί στον άνθρακα της θέσεως 7. Η ραμνόζη συνδέεται στη θέση 2'' της γλυκόζης, όπως φαίνεται στο φάσμα HMBC, όπου παρατηρείται συσχέτιση του H-2'' με τον άνθρακα C-1'''. Αυτό επιβεβαιώνεται και από το σήμα συσχέτισης στα

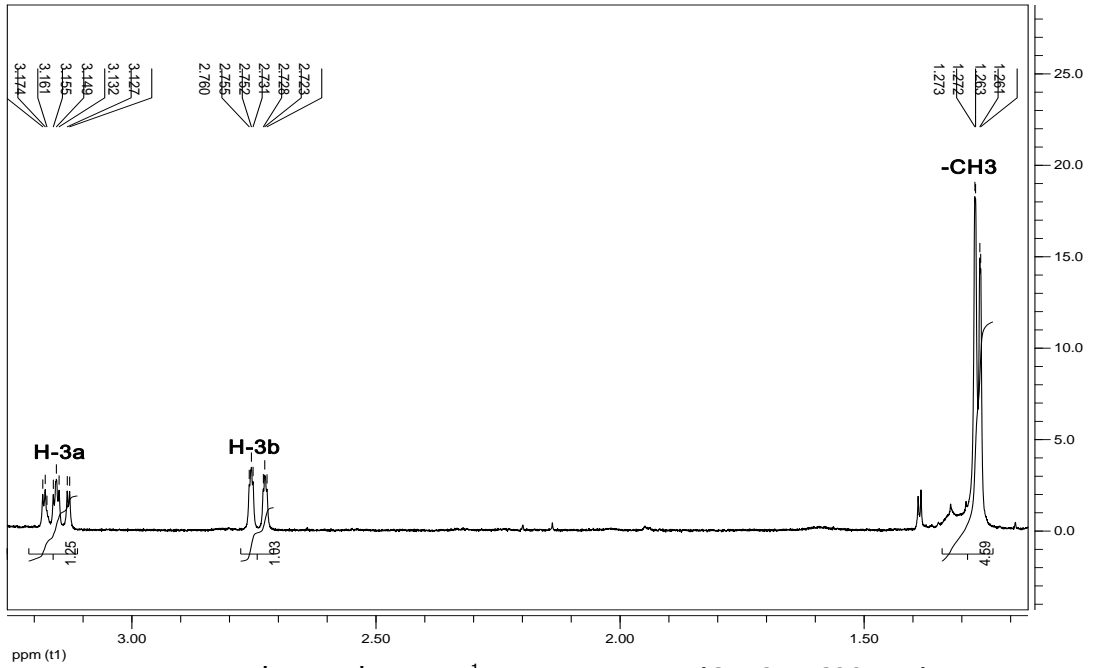
77.7ppm του H-1''' της ραμνόζης με τον άνθρακα C-2'' της γλυκόζης. Επιπροσθέτως, το μεθύλιο της ραμνόζης έχει κοινό σήμα στα 68.4 (C-5''') με το ανωμερικό της ραμνόζης. Τέλος, τα πρωτόνια του μεθυλίου της ραμνόζης των δύο διαστερομερών αντιστοιχούν σε δύο διπλές κορυφές, δ_H 1.27 ($J=6.0, 6.6\text{Hz}$). Η ταυτοποίηση του σακχάρου έγινε με βάση βιβλιογραφικές αναφορές (Yoon H.-Y. et al., 2012).



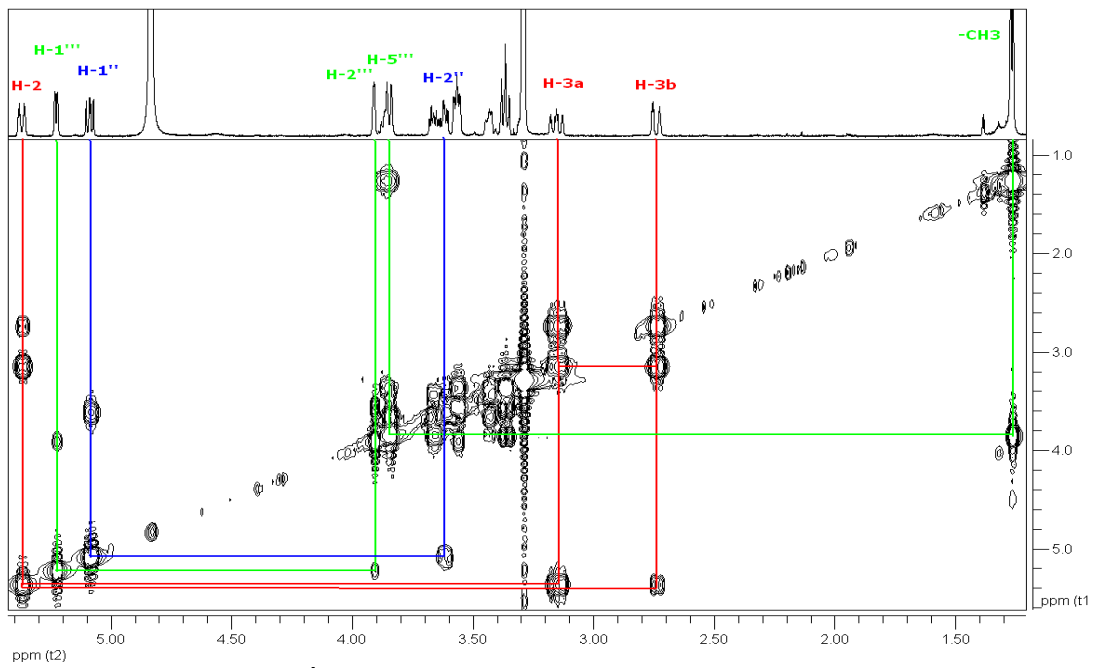
Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της M17 (CD_3OD , 600MHz)



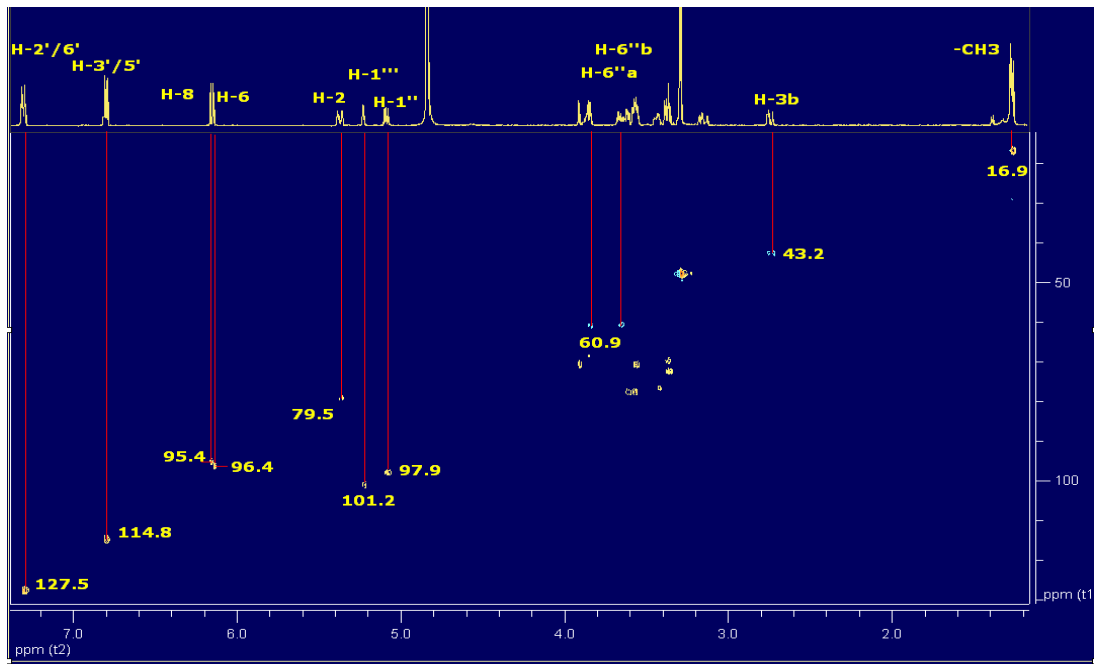
Λεπτομέρεια φάσματος $^1\text{H-NMR}$ της M17 (CD_3OD , 600MHz)



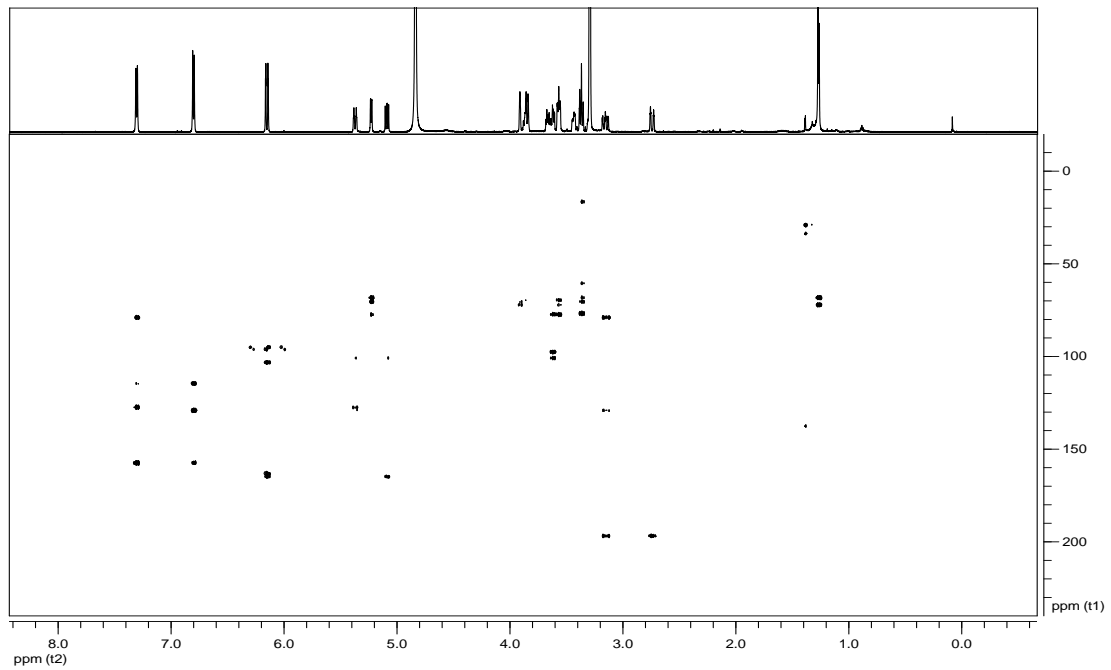
Λεπτομέρεια φάσματος $^1\text{H-NMR}$ της M17 (CD_3OD , 600MHz)



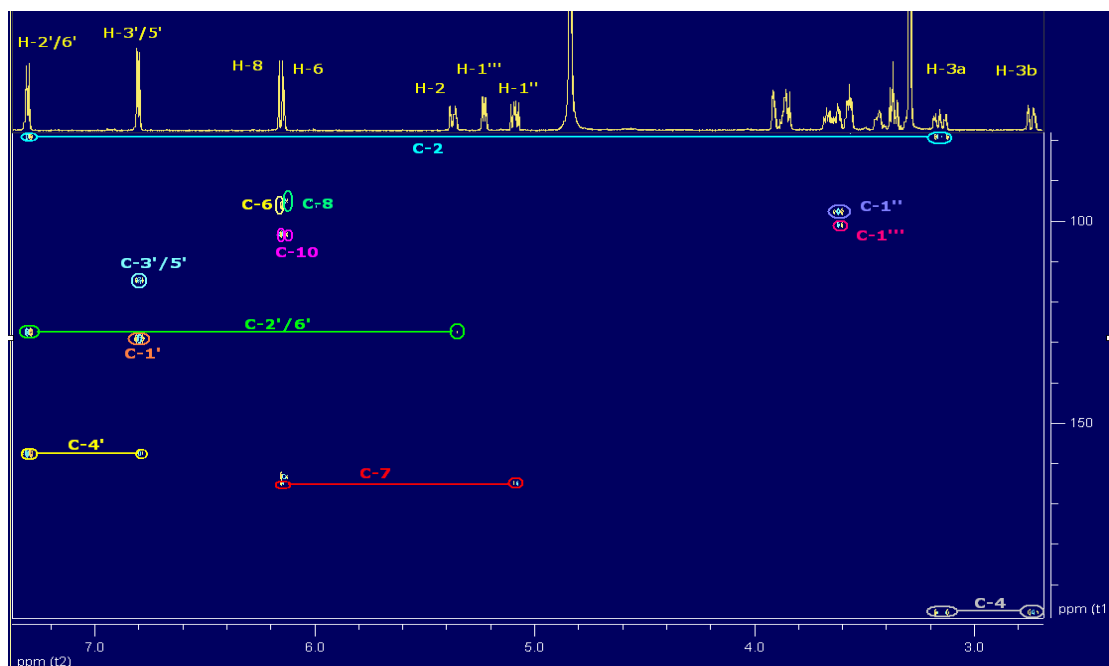
Φάσμα COSY της M17 (CD_3OD , 600MHz)



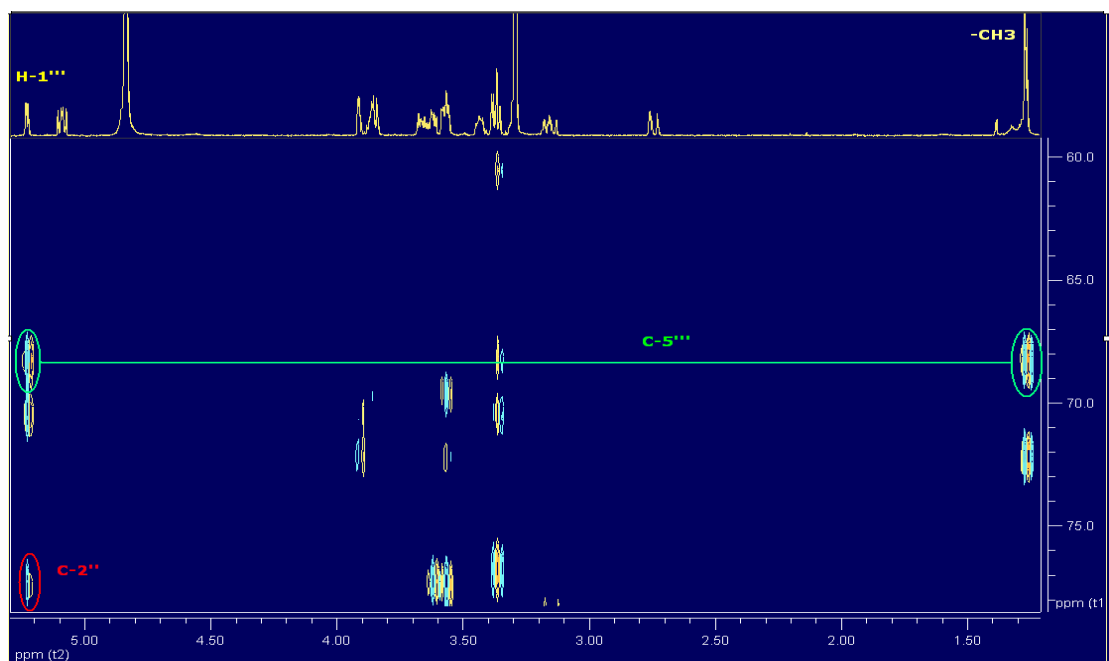
Φάσμα HSQC της M17 (CD₃OD, 600MHz)



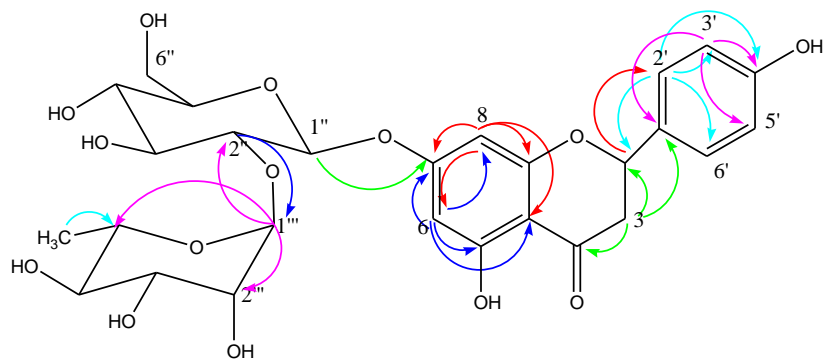
Φάσμα HMBC της M17 (CD₃OD, 600MHz)



Λεπτομέρεια φάσματος HMBC της M17 (CD₃OD, 600MHz)

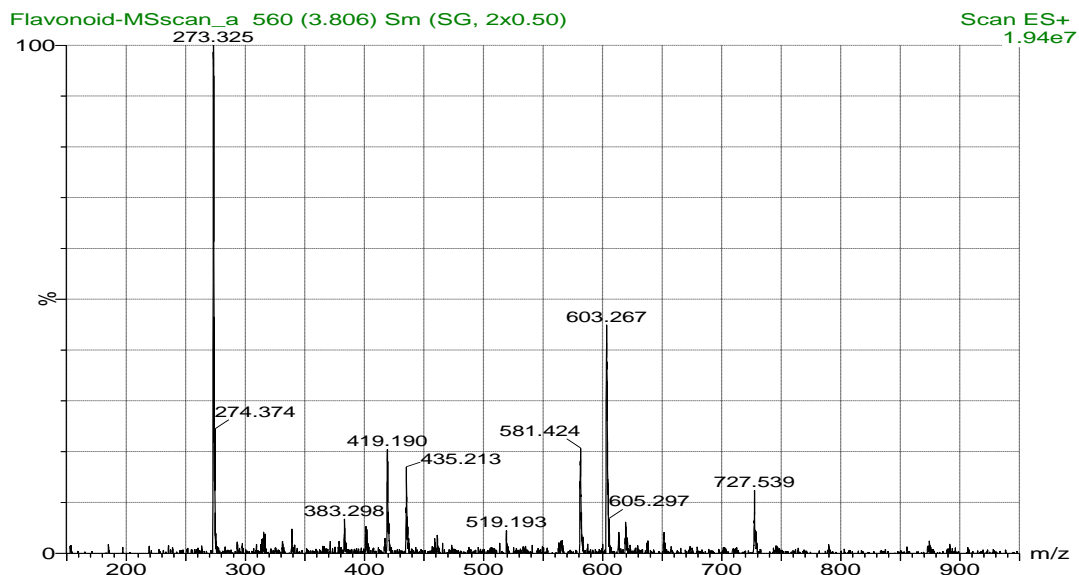


Λεπτομέρεια φάσματος HMBC της M17 (CD₃OD, 600MHz)



Κυριότερες συζεύξεις H-C που προκύπτουν από το HMBC

Φάσμα Μάζας

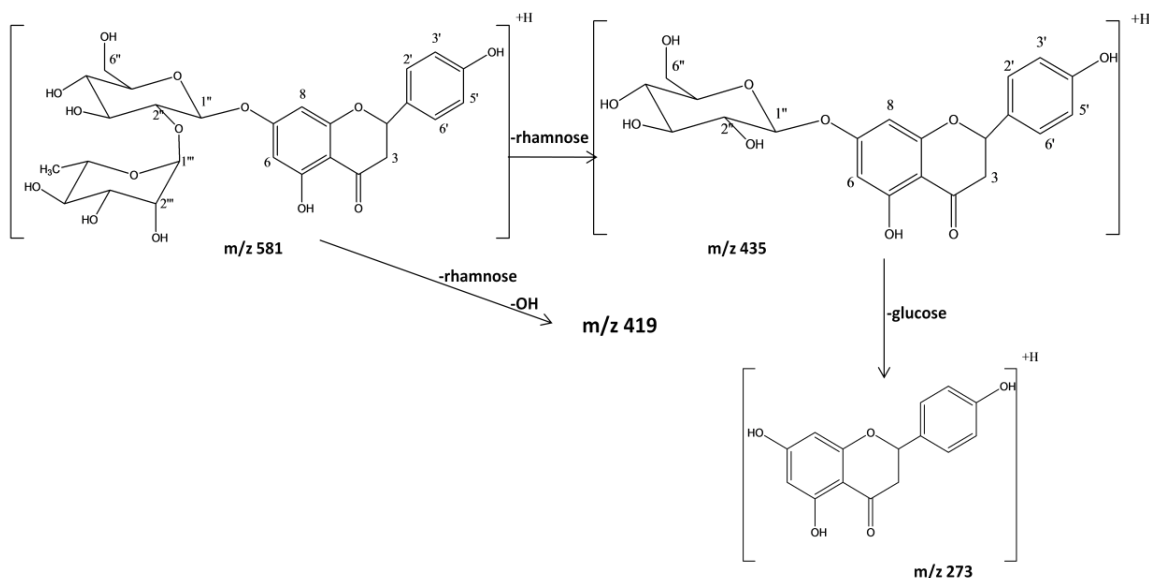


Το φάσμα μάζας της ουσίας ελήφθη σε σύστημα MS/MS TQ Detector-Ultra Performance LC (Acquity Waters). Η κινητή φάση ήταν οι διαλύτες (A):(H₂O:MeOH 98:2) με 0.1% φορμικό οξύ και (B):MeOH με 0.1% φορμικό οξύ, με ροή σταθερά στα 0.15ml/min. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν 0min (A) 95% και (B) 5%, 0.25min (A) 95% και (B) 5%, 7.75min (A) 0% και (B) 100%, 8.50min (A) 0% και (B) 100%, 8.51min (A) 95% και (B) 5%, 10.00min (A) 95% και (B) 5%. Ο χρόνος κατακράτησης της ουσίας ήταν στα 3.86min.

Από το φάσμα μάζας προκύπτουν τα $[M+H]^+=581$ και $[M+Na]=603$ που αντιστοιχούν σε ένωση με μοριακό τύπο C₂₇H₃₂O₁₄ που αποδίδεται στο 7-O-β-D-(2''-O-α-L-ραμνοζυλο-) γλυκοζίτη της ναριγγενίνης. Έτσι σε m/z 273 εμφανίζεται κορυφή που αντιστοιχεί στο άγλυκο ναριγγενίνη, ενώ σε m/z 435 εμφανίζεται

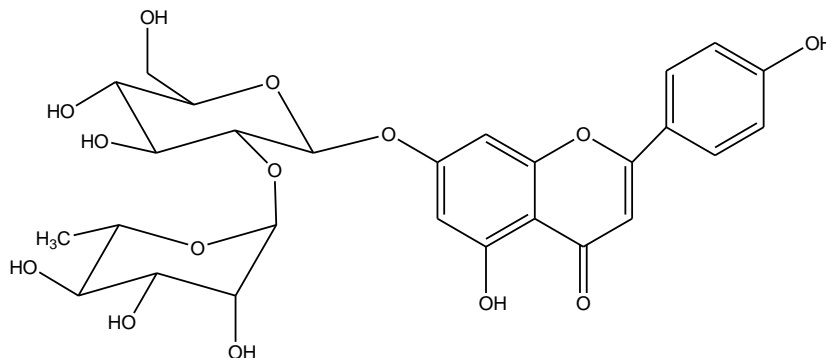
κορυφή που αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν μετά την απομάκρυνση μιας ραμνόζης, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι η ραμνόζη εμφανίζεται σαν δεύτερο σάκχαρο (Yoon H.-Y. et al., 2012, Hamdan D. et al., 2011). Το θραύσμα με m/z 419 φαίνεται να αντιστοιχεί στο $[M\text{-rhamnose-OH}]^+$, ενώ το θραύσμα με m/z 727 προτείνεται ότι αντιστοιχεί σε adduct του 581 με ραμνόζη $[581+(\text{ραμνόζη-H}_2\text{O})]$. Αυτές οι θραυσματώσεις δίδονται σχηματικά παρακάτω.

Σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα και όπως αυτό επιβεβαιώνεται και από την βιβλιογραφία (Yoon H.-Y. et al., 2012) προκύπτει ότι η ένωση M17 αντιστοιχεί σε μίγμα των δύο διαστερεομερών *R*- και *S*- της ναριγγίνης.

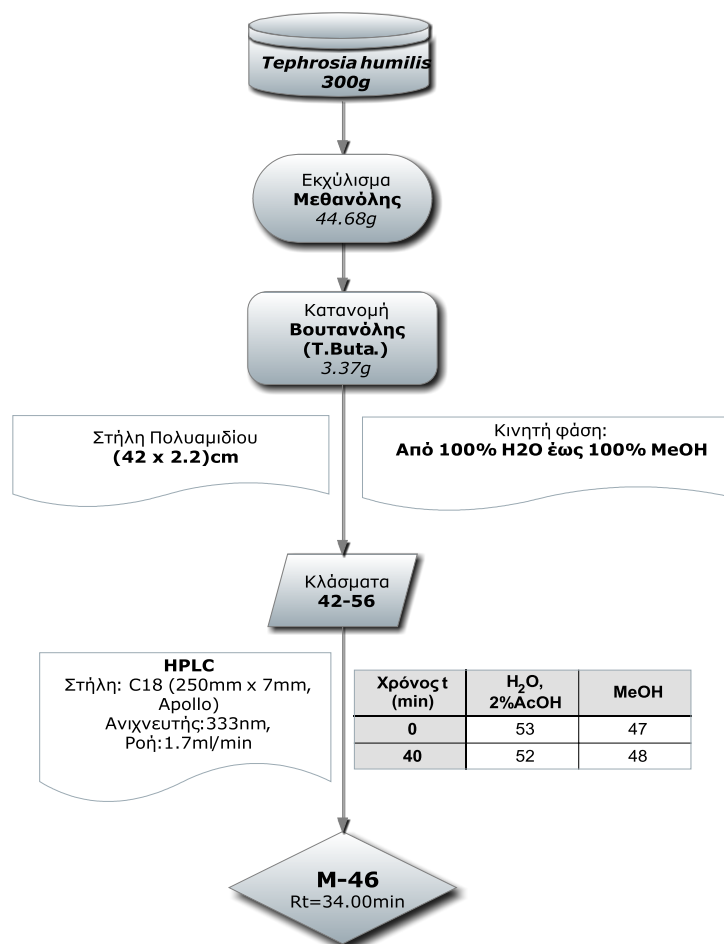


Ένωση 12

(Ουσία M46): 7-O-β-D-(2''-O-α-L-ραμνοζυλο-)γλυκοζίτης της απιγενίνης (ροϊφολίνη)



Απομόνωση ουσίας M46



Το στερεό υπόλειμμα του εκχυλίσματος της βουτανόλης χρωματογραφήθηκε σε στήλη πολυαμιδίου αντίστροφης φάσης με διαλύτη έκλουσης από νερό έως μεθανόλη 100%. Η ομάδα κλασμάτων TBP5 (μεθανόλη από 10 έως 20%) χρωματογραφήθηκε με παρασκευαστική χρωματογραφία HPLC σε στήλη αντίστροφης φάσης με πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης [C18 (250 x 7)mm των 5μ]. Κινητή φάση (A):H₂O με AcOH 2% και (B):MeOH. Το πρόγραμμα που ακολουθήθηκε ήταν 0min (A) 53% και (B) 47%, 40min (A) 52% και (B) 48%. Ο ανιχνευτής υπεριώδους-ορατού ορίστηκε στα 268nm και η ροή σταθερά σε 1.7ml/min. Η ουσία M46 απομονώθηκε ως μια έντονη κορυφή στο τέλος του προγράμματος με χρόνο κατακράτησης 34min και μετά την απομάκρυνση του διαλύτη έδωσε στερεό υπόλειμμα βάρους 4.5mg.

Έλεγχος καθαρότητας

Η ουσία είχε σκούρο κίτρινο φθορισμό στη λάμπα υπεριώδους/ορατού και έντονο ανοιχτό πράσινο φθορισμό μετά από έκθεση σε ατμούς NH₃.

Για τον έλεγχο καθαρότητας της ουσίας χρησιμοποιήθηκαν τρία συστήματα ανάπτυξης σε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας με στατική φάση πλάκες κυτταρίνης.

Σε σύστημα EAW:R_f=0.51, σε AcOH 15% :R_f=0.33 και CAW :R_f=0.52

Φάσμα υπεριώδους-ορατού

Κατά τη φασματοφωτομετρική εξέταση της ουσίας ελήφθησαν χαρακτηριστικές καμπύλες με τα ακόλουθα μέγιστα (nm).

M46	Κορυφή II	Κορυφή I	Δ_λ I
MeOH	267.5	333.0	
MeONa	273.0	380.0	+47.0
AlCl ₃	275.0	348.5	+15.5
AlCl ₃ /HCl	275.0	341.0	+8.0
AcONa	267.5(Δ _λ =0)	379.5	+46.5
AcONa/H ₃ BO ₃	267.5	332.0	-1.0

Από την τιμή απορρόφησης της κορυφής I του μεθανολικού διαλύματος στα 333nm, συμπεραίνεται ότι η ουσία ανήκει στις φλαβόνες. Το 4'-OH φαίνεται να είναι

ελεύθερο, διότι με την προσθήκη MeONa παρατηρείται βαθυχρωμική μετατόπιση της κορυφής I κατά 47nm, με αύξηση της έντασής της. Από το φάσμα με AcONa προκύπτει ότι το 7-OH είναι υποκατεστημένο, διότι δεν παρατηρείται βαθυχρωμική μετατόπιση της κορυφής II σε σχέση με την αντίστοιχη σε μεθανόλη. Μετά την προσθήκη H₃BO₃ σε αυτό, προκύπτει ότι δεν υπάρχει ορθο-διυδροξυ-σύστημα ούτε στον A, ούτε στον B δακτύλιο, γιατί δεν εμφανίζεται βαθυχρωμική μετατόπιση στις κορυφές I και II (Mabry J.T. et al., 1970). Η βαθυχρωμική μετατόπιση κατά 15.5nm της κορυφής I μετά την προσθήκη AlCl₃, οφείλεται στο σχηματισμό συμπλόκου μεταξύ της κετονομάδας και του υδροξυλίου της θέσης 5. Η απουσία υψιχρωμικής μετατόπισης της κορυφής I κατά 30-40 nm, καθώς και της κορυφής II, μετά την προσθήκη HCl επιβεβαιώνει την απουσία ορθο-διυδροξυ-συστήματος στον A ή τον B δακτύλιο (Mabry J.T. et al., 1970).

Φάσμα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού

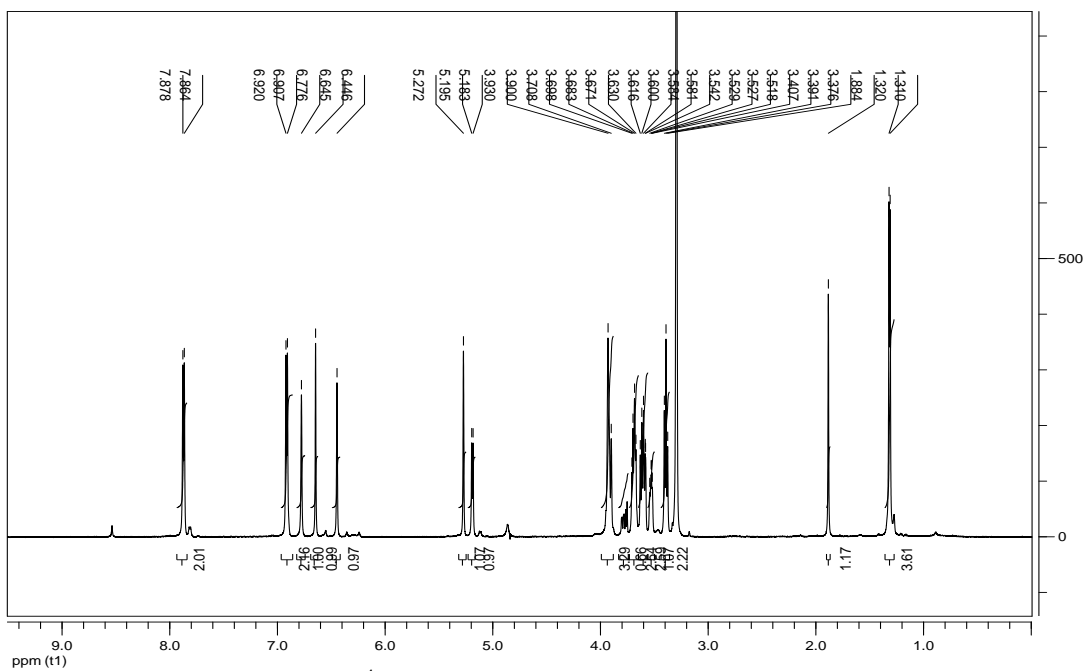
¹H-NMR και ¹³C-NMR (CD₃OD, 600MHz)			
Θέση	δ _H (ppm)	J _{HH} (Hz)	δ _C (ppm)*
2			165.3
3	6.65(s)		102.7
4			182.6
5			162.3
6	6.45(s)		99.7
7			162.8
8	6.77(s)		94.6
9			157.2
10			105.4
1'			121.2
2'	7.87(d)	8.2	128.3
3'	6.91(d)	8.2	115.8
4'			161.8
5'	6.91(d)	8.2	115.8
6'	7.87(d)	8.2	128.3
<u>Glc</u>			
1''	5.19(d)	7.2	98.6

2''	3.68(m)		77.7
3''	3.53(m)		77.0
4''	3.39(m)		70.0
5''	3.60(m)		77.7
6''	3.90(m)		61.1
	3.70(m)		
<u>Rha</u>			
1'''	5.27(broad s)		101.1
2'''	3.93(m)		70.8
3'''	3.62(m)		70.4
4'''	3.39(m)		72.5
5'''	3.92(m)		68.5
-CH ₃	1.32(d)	6.0	16.6

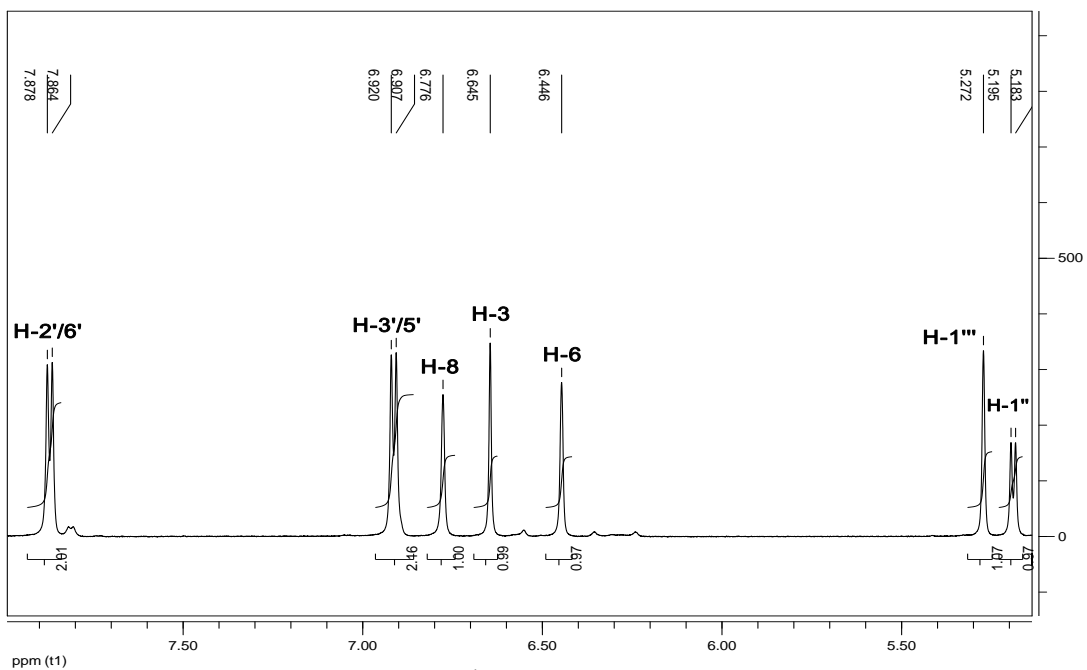
*Τιμές που προκύπτουν από τα φάσματα HSQC, HMBC

Στην αρωματική περιοχή του φάσματος ¹H-NMR παρατηρούνται τα σήματα του φλαβονοειδούς. Τα πρωτόνια του δακτυλίου Β σχηματίζουν σύστημα AA'MM', γεγονός που υποδηλώνει ότι υπάρχει *para*-υποκατάσταση στο Β δακτύλιο, γεγονός που συμφωνεί με τα φάσματα υπεριώδους-ορατού από τα οποία προκύπτει ότι στη θέση 4' υπάρχει υδροξυλομάδα. Οι διπλές κορυφές με χημική μετατόπιση 7.87ppm και 6.91ppm που σχάζονται ανά δύο μεταξύ τους, αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-2',6' και H-3',5' αντίστοιχα. Πιο θωρακισμένα εμφανίζονται με τη μορφή απλών κορυφών το πρωτόνιο H-3 καθώς και τα πρωτόνια H-6 και H-8, με χημικές μετατοπίσεις στα 6.65, 6.45 και 6.77ppm αντίστοιχα. Στην κεντρική περιοχή του φάσματος ¹H-NMR εμφανίζονται δύο ανωμερικά πρωτόνια υποδηλώνοντας την παρουσία δύο σακχάρων. Η ευρέως απλή κορυφή με χημική μετατόπιση δ_H 5.27 αντιστοιχεί στο ανωμερικό πρωτόνιο ραμνόζης και η διπλή κορυφή με δ_H 5.19 και με σταθερά σύζευξης 7.2Hz-ενδεικτική β -D-διαμόρφωσης-, στο ανωμερικό πρωτόνιο γλυκόζης. Το μεθύλιο της ραμνόζης εμφανίζεται ως διπλή κορυφή σε δ_H 1.32 με σταθερά σύζευξης 6.0Hz. Η ταυτοποίηση των σακχάρων έγινε μετά από σύγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα (Lee E.J. et al., 2010). Από το κοινό σήμα του φάσματος HMBC του ανωμερικού πρωτονίου της γλυκόζης και των πρωτονίων H-6 και H-8 σε δ_c 162.8ppm, που αντιστοιχεί στον C-7, προκύπτει ότι η γλυκόζη ενώνεται στη θέση 7 του φλαβονοειδούς. Η ραμνόζη συνδέεται στη θέση 2'' της γλυκόζης, όπως φαίνεται στο φάσμα HMBC, όπου παρατηρείται συσχέτιση του H-2'' με τον άνθρακα

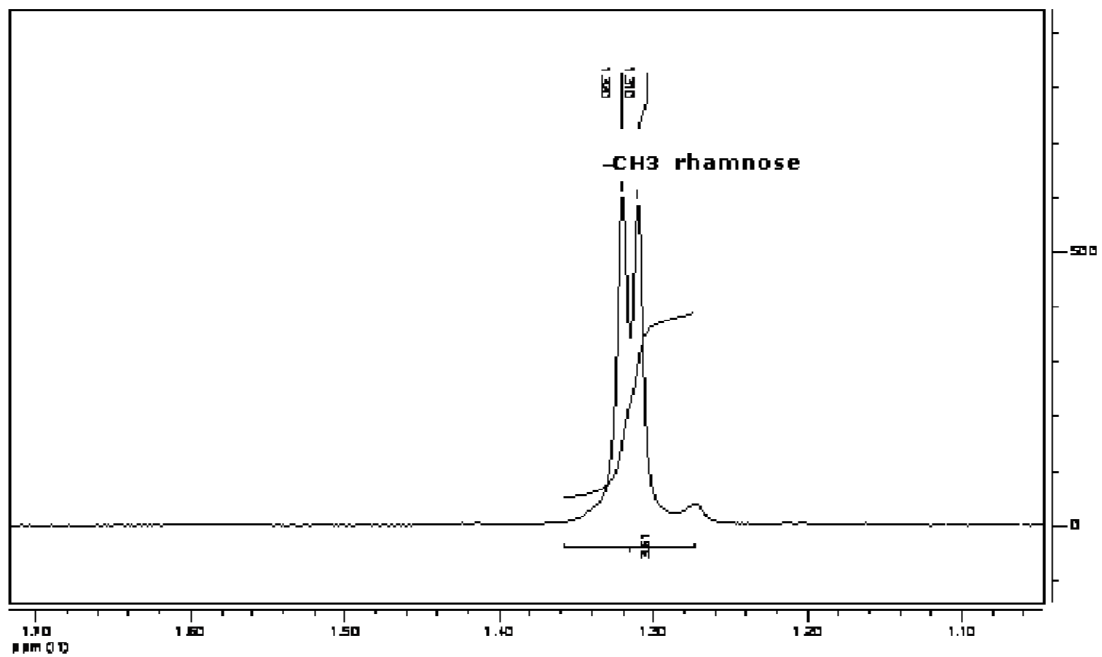
C-1'''. Αυτό επιβεβαιώνεται και από το σήμα συσχέτισης στα 77.7ppm του H-1''' της ραμνόζης με τον άνθρακα C-2''' της γλυκόζης.



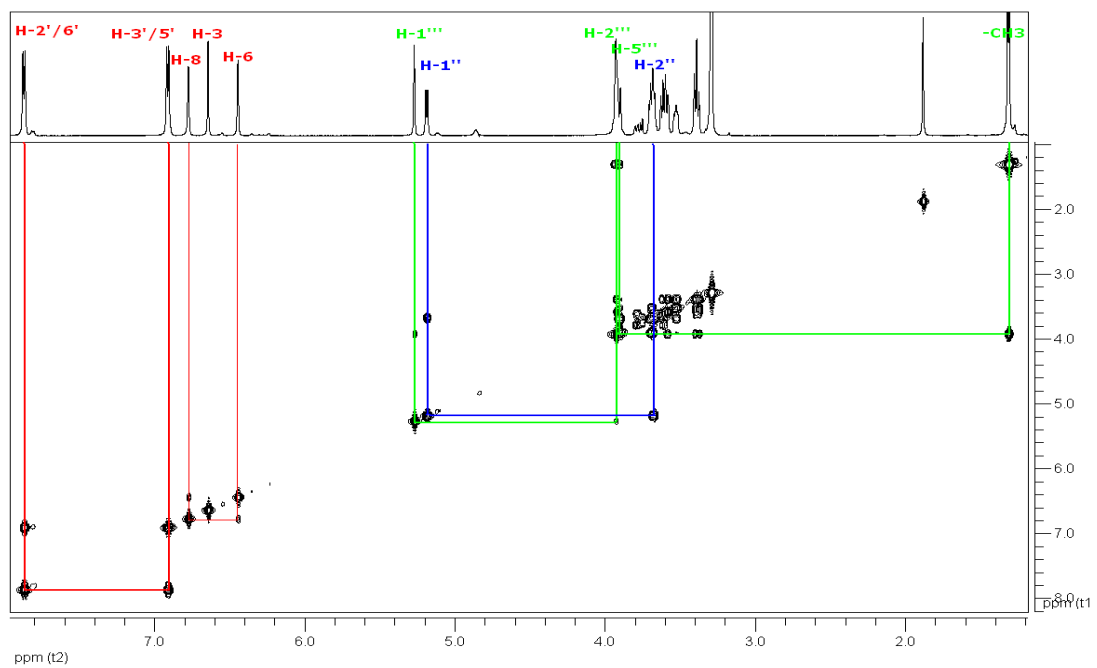
Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της M46 (CD_3OD , 600MHz)



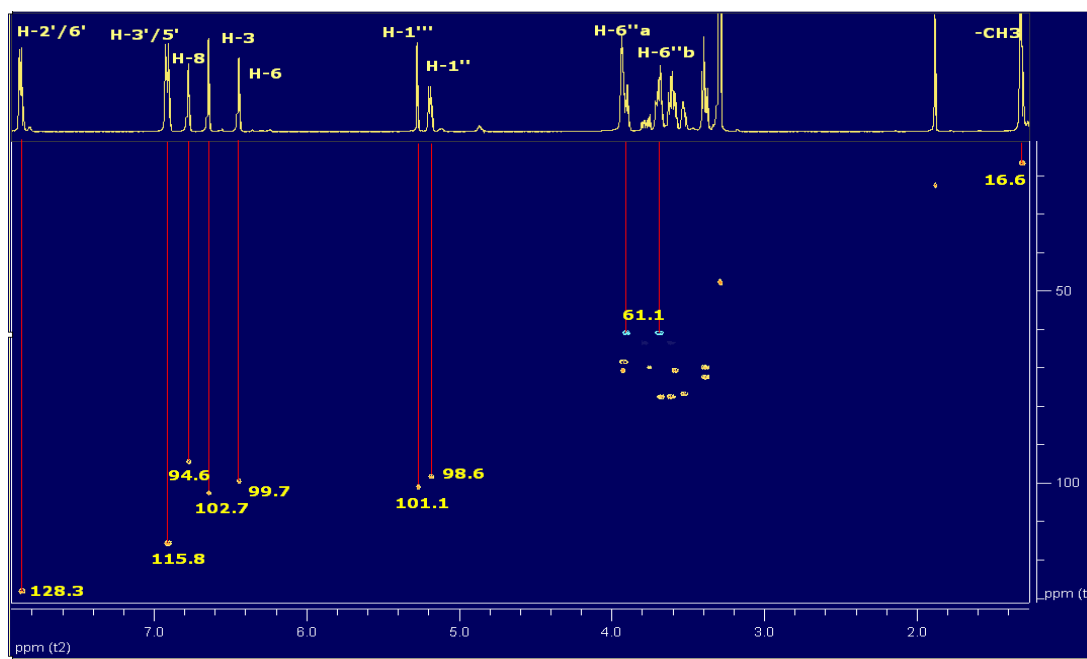
Λεπτομέρεια φάσματος $^1\text{H-NMR}$ της M46 (CD_3OD , 600MHz)



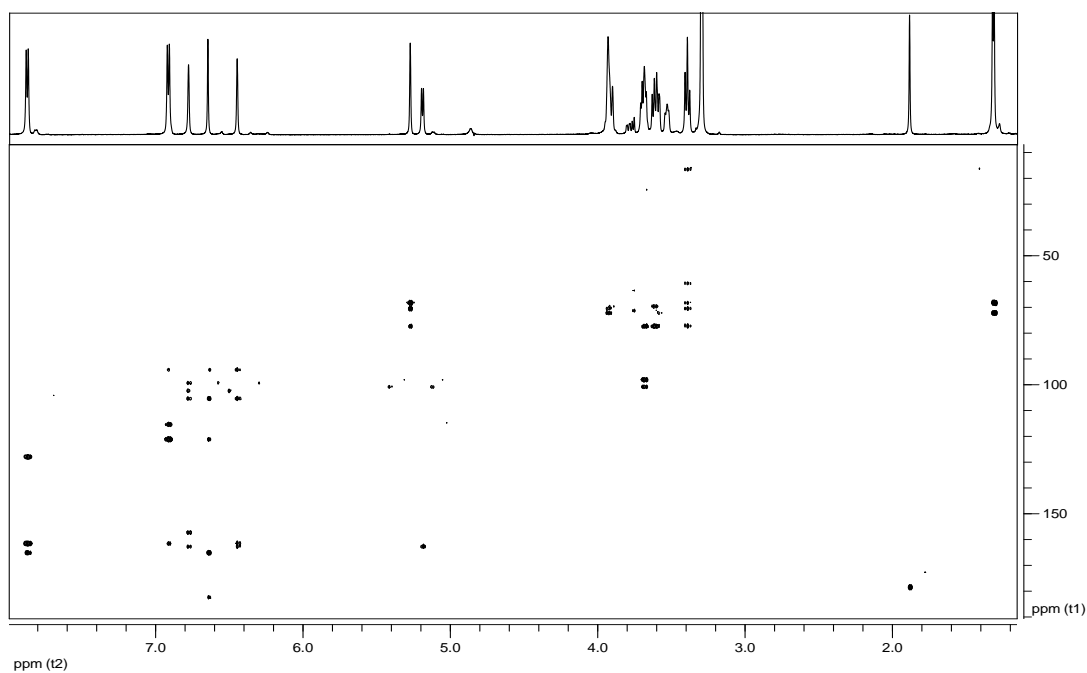
Λεπτομέρεια φάσματος $^1\text{H-NMR}$ της M46 (CD_3OD , 600MHz)



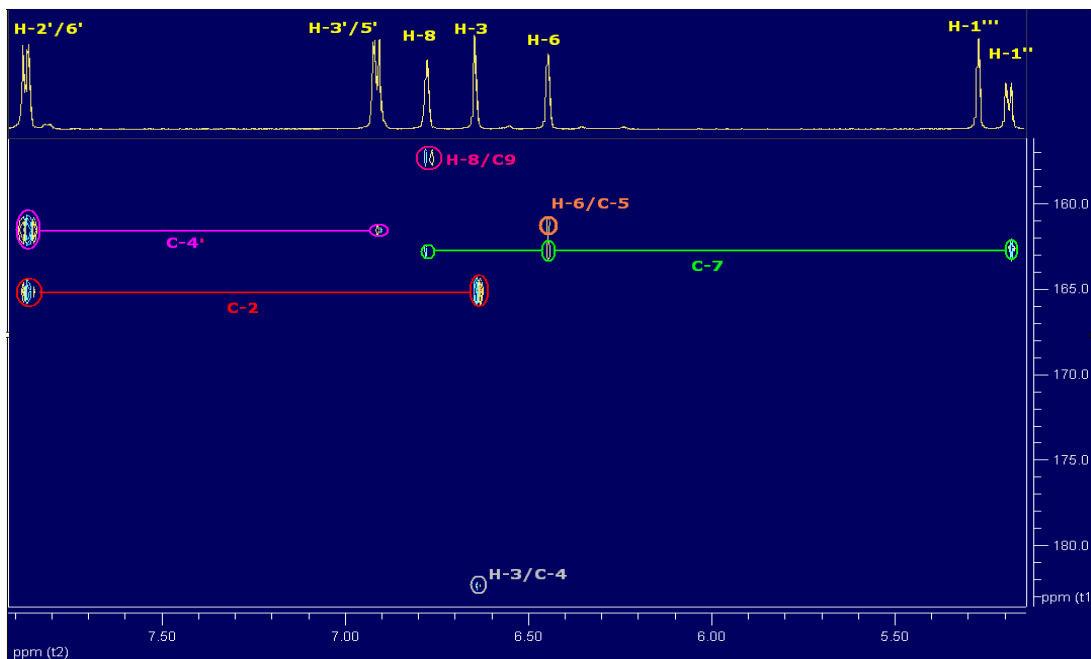
Φάσμα COSY της M46 (CD_3OD , 600MHz)



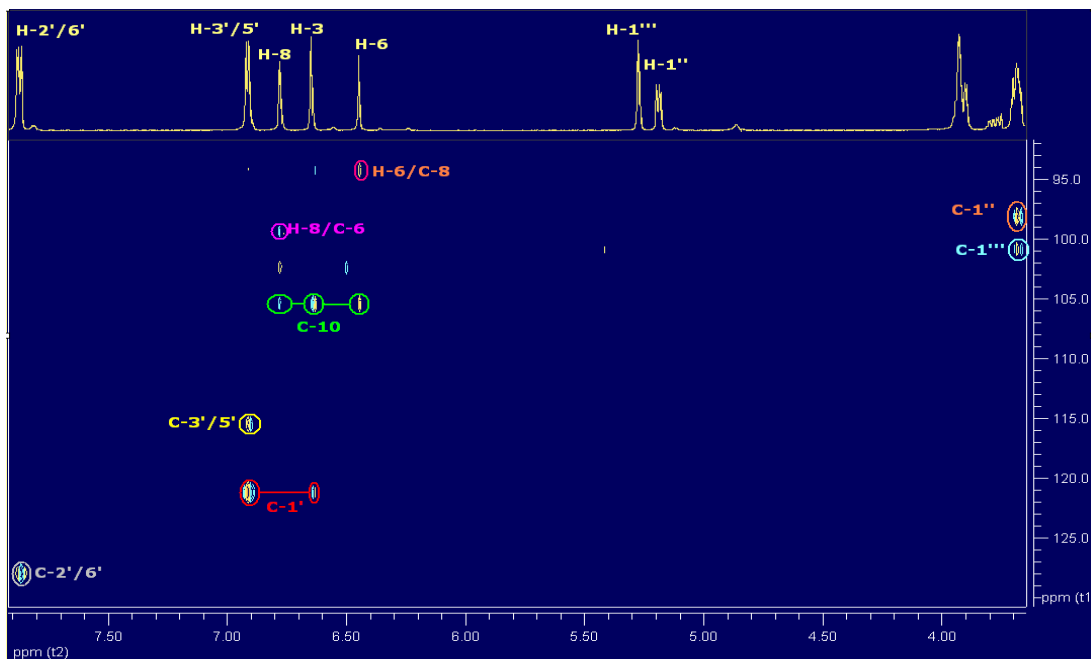
Φάσμα HSQC της M46 (CD₃OD, 600MHz)



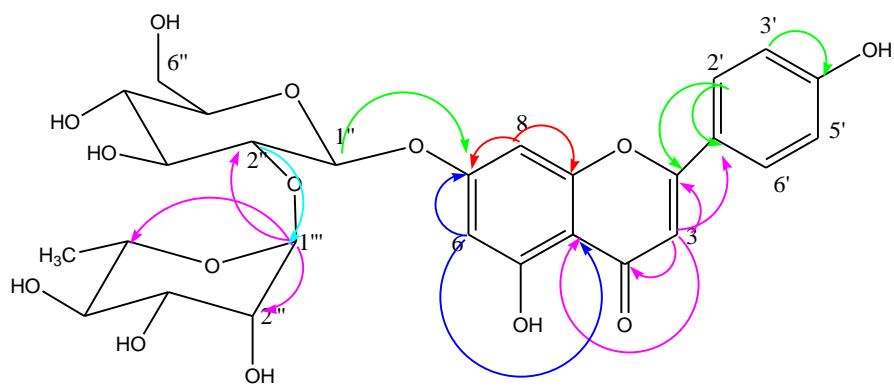
Φάσμα HMBC της M46 (CD₃OD, 600MHz)



Λεπτομέρεια φάσματος HMBC της M46 (CD₃OD, 600MHz)



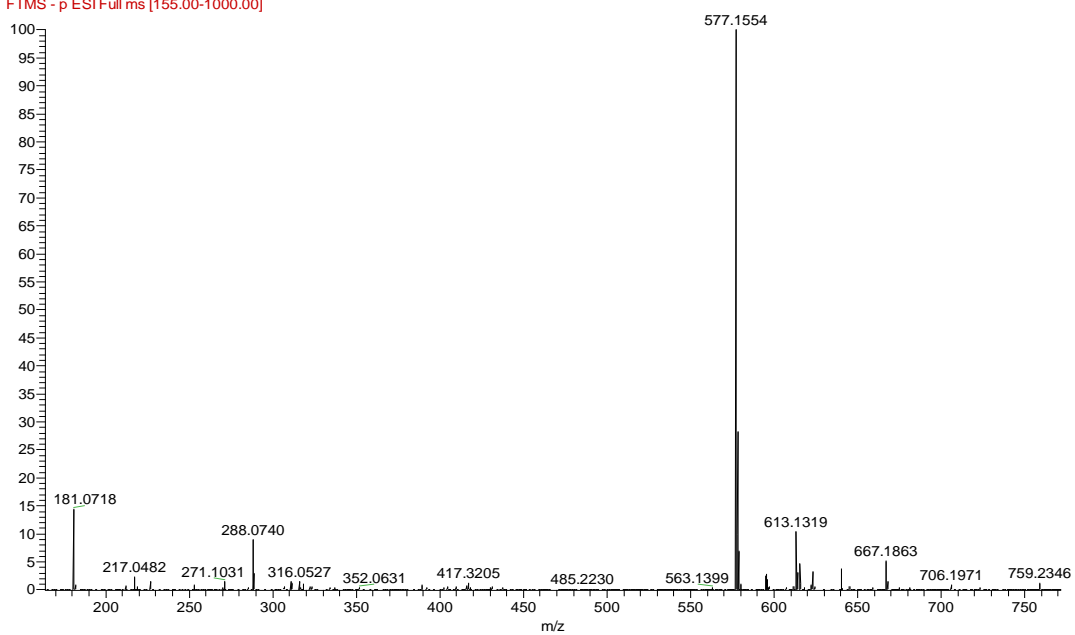
Λεπτομέρεια φάσματος HMBC της M46 (CD₃OD, 600MHz)



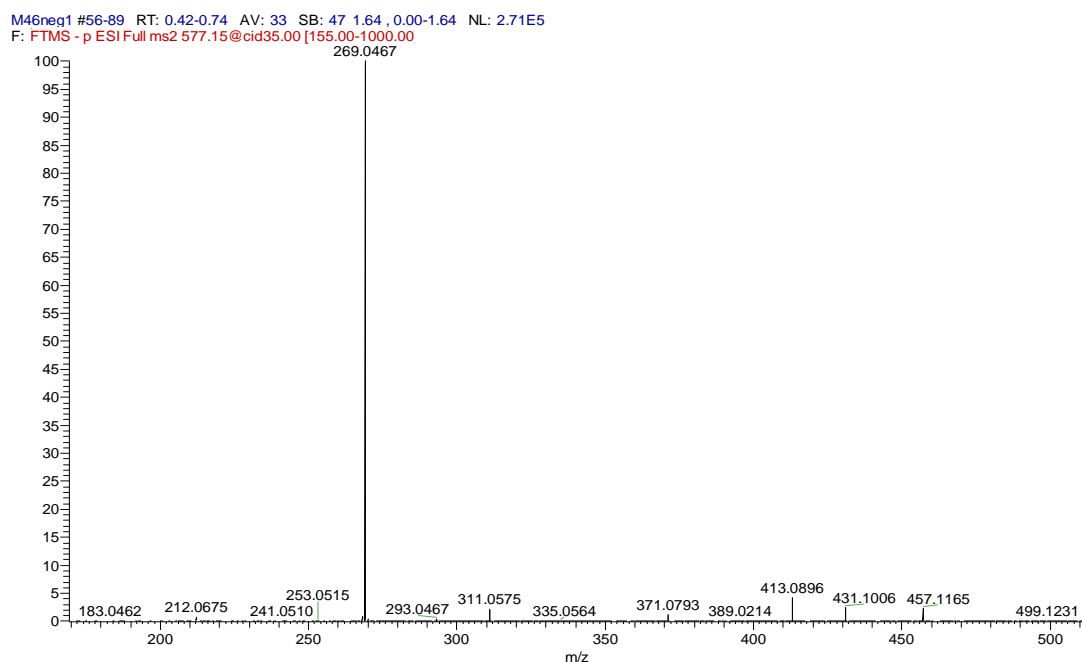
Κυριότερες συζεύξεις H-C που προκύπτουν από το HMBC

Φάσμα μάζης

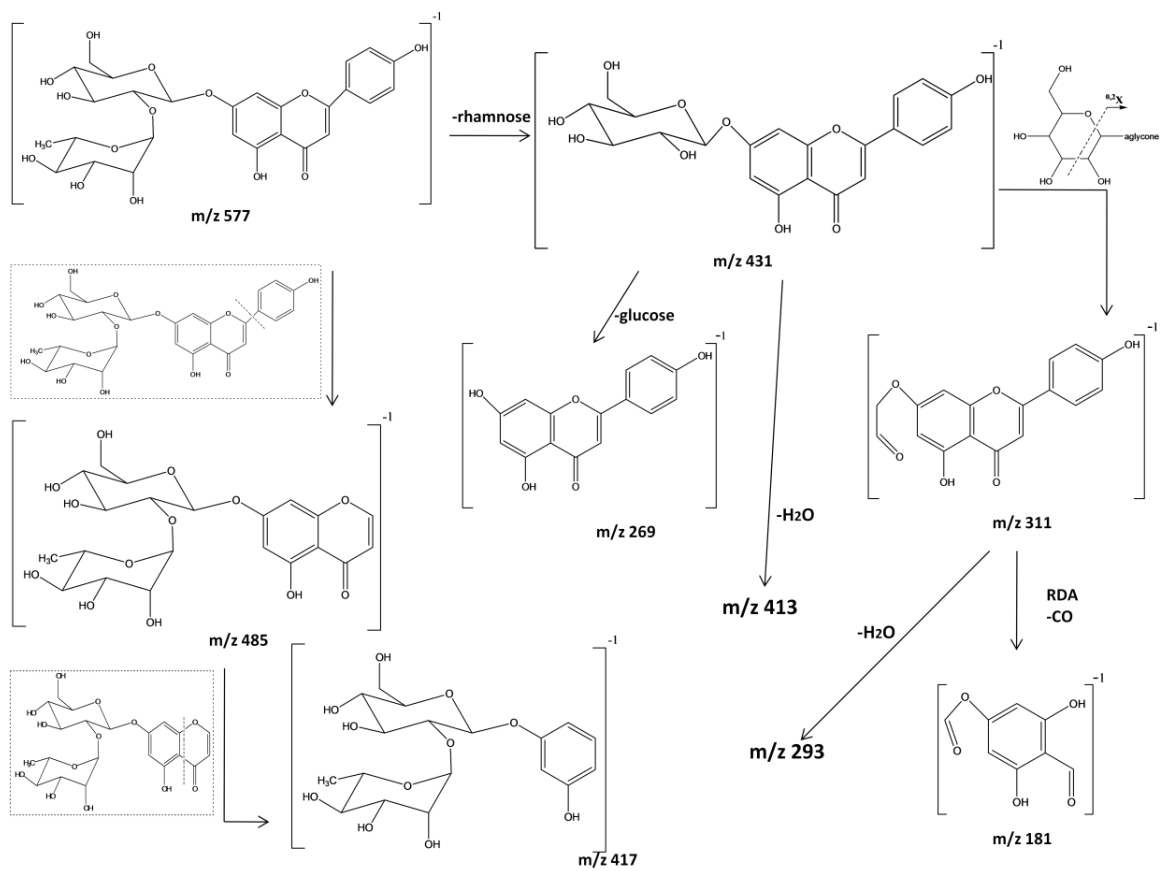
M46neg1 #8 RT: 0.05 AV: 1 SB: 56 1.64, 0.00-1.64 NL: 2.90E6
 F: FTMS - p ESI Full ms [155.00-1000.00]



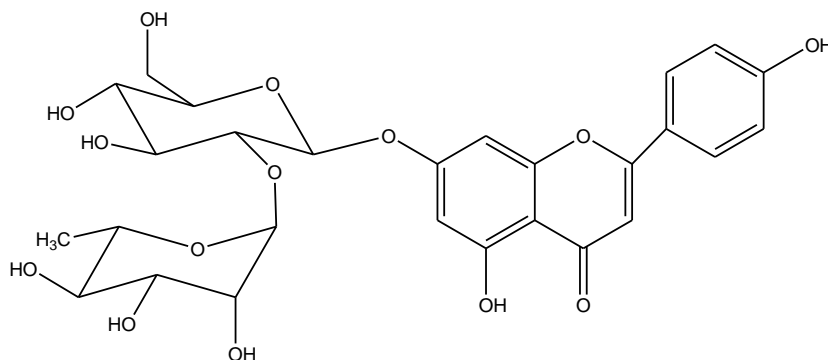
MS2-577.15



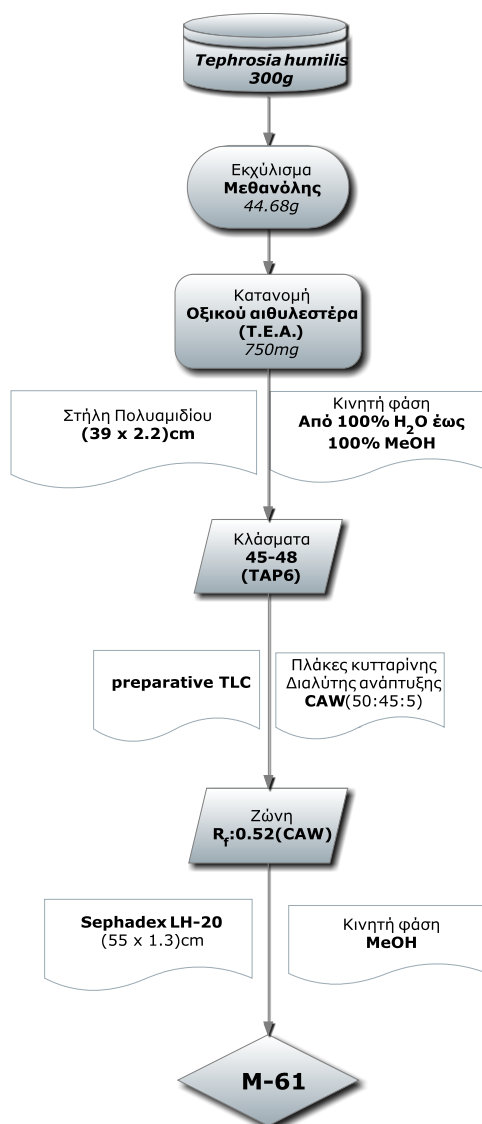
Από το φάσμα μάζας της ουσίας, που ελήφθη σε σύστημα HR-MS (Thermo Scientific) με αρνητικό ιονισμό, προκύπτει το θραύσμα 577 που αντιστοιχεί στο $[M-H]^-$. Η τιμή του μοριακού ιόντος αντιστοιχεί στο μοριακό τύπο $C_{27}H_{30}O_{14}$. Η θεωρητική μέτρηση της μάζας ($[M-H] = 577.1548$) επιβεβαιώνεται και από την πραγματική της τιμή (577.1554). Το θραύσμα με m/z 431 προκύπτει με την απόσπαση της ραμνόζης και με την απόσπαση ενός μορίου νερού το προτεινόμενο θραύσμα 413 $[M-(\text{ραμνόζη-OH})-H_2O]^-$. Το θραύσμα ($^{0,2}X_0$) με m/z 311 προκύπτει από το θραύσμα 431, μετά από την απόσπαση μέρους της γλυκόζης και αντιστοιχεί στο $[M-(\text{ραμνόζη-OH})-120]^-$ και στη συνέχεια με την απόσπαση ενός μορίου νερού προκύπτει το θραύσμα 293 $[M-(\text{ραμνόζη-OH})-120-H_2O]^-$. Το θραύσμα m/z 269 αντιστοιχεί σε άγλυκο παράγωγο απιγενίνης $[M-(\text{ραμνόζη-OH})-(\text{γλυκόζη-OH})]$ ενώ από την τιμή του μοριακού ιόντος φαίνεται ότι πρόκειται για διγλυκοζίτη απιγενίνης με γλυκόζη και ραμνόζη. Η θραυσμάτωση της ένωσης και άλλες προτεινόμενες δομές αυτής, δίδονται σχηματικά παρακάτω (Cuyckens F. et al., 2001, Gattuso G. et al., 2006, Fabre N. et al., 2001). Από όλα τα παραπάνω προκύπτει ότι η ένωση M46 είναι η ροϊφολίνη, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τη βιβλιογραφία (Lee E.J. et al., 2010).



Ουσία M61: 7-O-β-D-(2''-O-α-L-ραμνοζυλο-)γλυκοζίτης της απιγενίνης (ροϊφολίνη-ΙΔΙΑ με την ένωση 12)

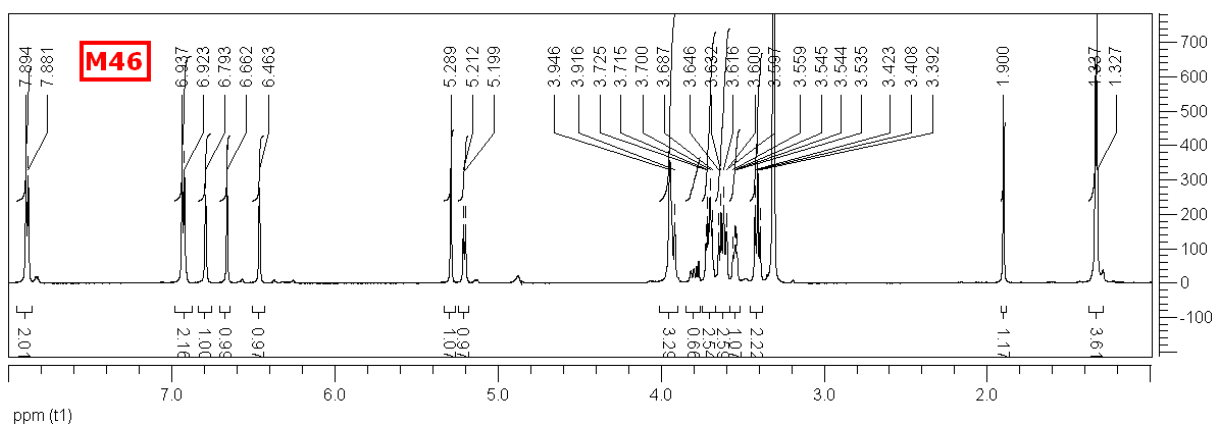
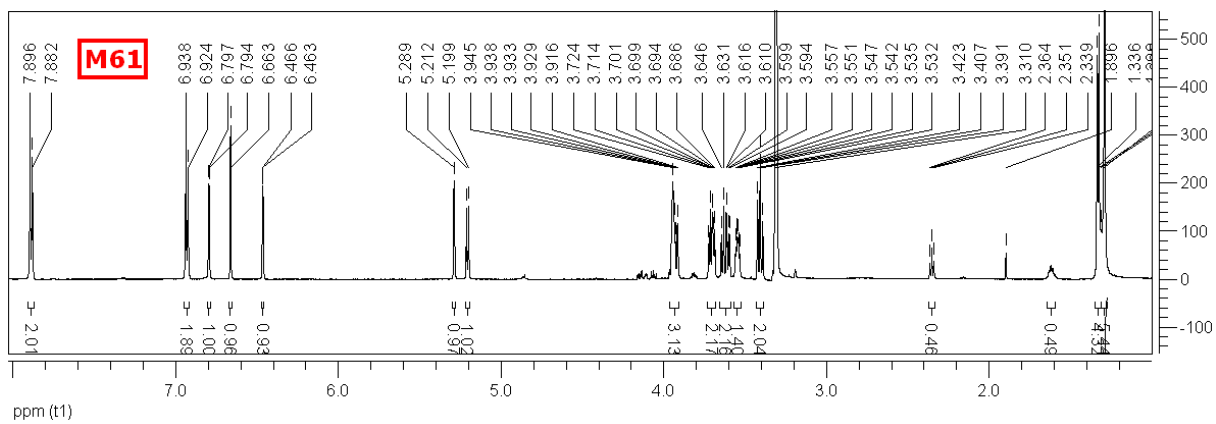


Απομόνωση ουσίας

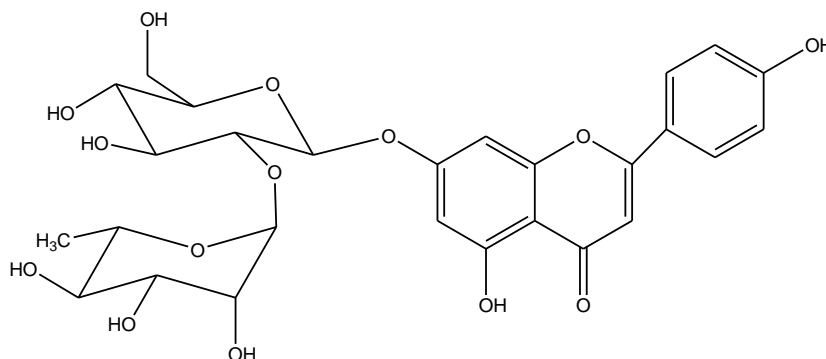


Το στερεό υπόλειμμα του οξικού αιθυλεστέρα χρωματογραφήθηκε σε στήλη πολυαμιδίου (39 x 2.2)cm αντιστρόφου φάσεως με κινητή φάση νερό προς μεθανόλη και με όγκο συλλεγομένων κλασμάτων 500ml. Τα κλάσματα 45-48, που αντιστοιχούσαν σε ποσοστό 80:20 (H₂O:MeOH), συνενώθηκαν (TAP6) και ακολούθησε παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, με στατική φάση πλάκες κυτταρίνης (Merck 5552) και διαλύτη ανάπτυξης διχλωρομεθάνιο:οξικό οξύ:νερό (CAW) σε αναλογία 50:45:5. Η ουσία M61 περιέχονταν σε μια ευδιάκριτη ζώνη η οποία κόπηκε, εκλούστηκε με μεθανόλη τρεις φορές και το στερεό υπόλειμμα επαναχρωματογραφήθηκε σε στήλη Sephadex LH-20 (1.3 x 55)cm με διαλύτη έκλουσης μεθανόλη. Συλλέχθηκαν κλάσματα όγκου 2ml και μετά από χρωματογραφικούς ελέγχους με TLC, συνενώθηκαν τα κλάσματα 8-14 και συμπυκνώθηκαν, δίνοντας στερεό υπόλειμμα συνολικού βάρους 1.8mg που αντιστοιχούσαν στην καθαρή ουσία M61.

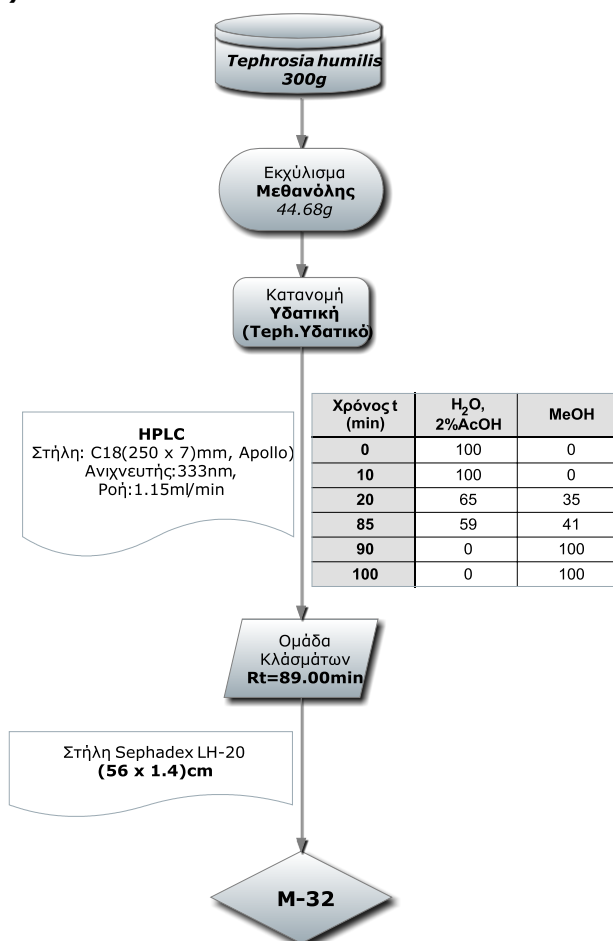
Η ουσία M61 εμφανίστηκε ως μια ευδιάκριτη ζώνη με σκούρο κίτρινο φθορισμό στο υπεριώδες και στο ορατό (254nm και 365nm) και έντονο ανοιχτό πράσινο φθορισμό σε ατμούς NH₃. Η ουσία M61 αποδείχθηκε ότι είναι ίδια με την M46 που απομονώθηκε από τη βουτανολική κατανομή και περιγράφεται αναλυτικά παραπάνω. Εμφάνισε τις ίδιες τιμές R_f, ενώ κατά τη φασματοφωτομετρική εξέταση της ουσίας ελήφθησαν οι ίδιες χαρακτηριστικές καμπύλες με τα μέγιστά τους. Οι τιμές NMR που ελήφθησαν, συνέπιπταν και αυτές με τις αντίστοιχες της M46 (**Ένωση 12**).



Ουσία M32: 7-O-β-D-(2''-O-α-L-ραμνοζυλο-)γλυκοζίτης της απιγενίνης (ροϊφολίνη-ΙΔΙΑ με την ένωση 12)



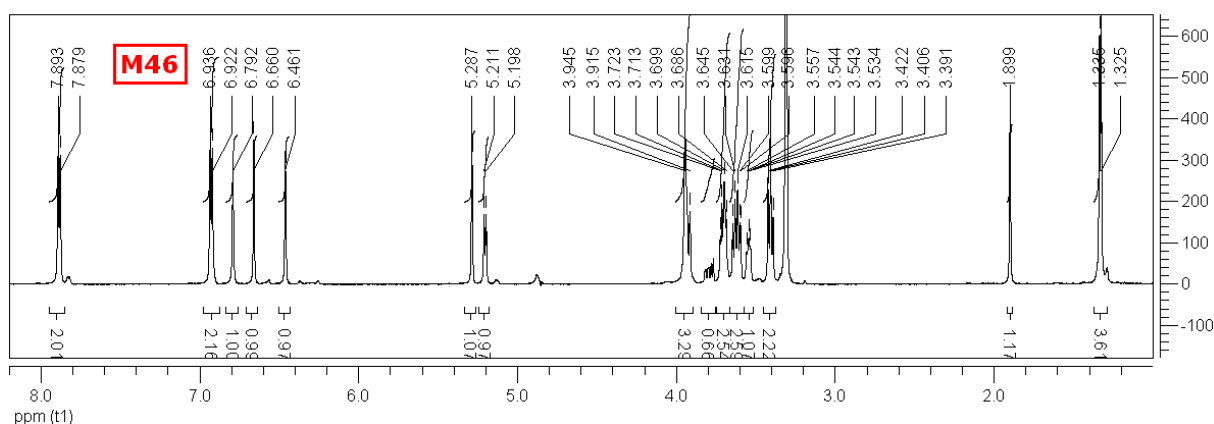
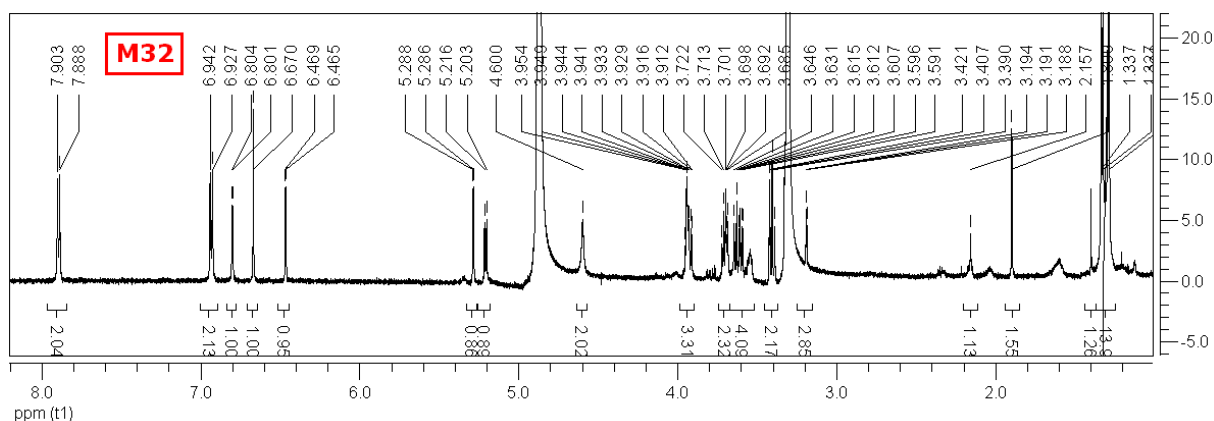
Απομόνωση ουσίας M32



Το στερεό υπόλειμμα της υδατικής κατανομής του μεθανολικού εκχυλίσματος χρωματογραφήθηκε με παρασκευαστική χρωματογραφία HPLC σε στήλη αντίστροφης φάσης με πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης [C18 (250 x 7)mm των 5μ]. Κινητή φάση (A):H₂O με AcOH 2% και (B):MeOH. Το πρόγραμμα που ακολουθήθηκε

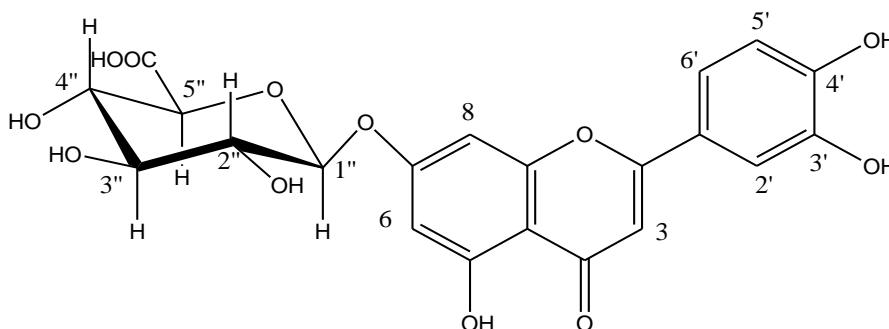
ήταν 0min (A) 100% και (B) 0%, 10min (A) 100% και (B) 0%, 20min (A) 65% και (B) 35%, 85min (A) 59% και (B) 41%, 90min (A) 0% και (B) 100%, 100min (A) 0% και (B) 100%. Ο ανιχνευτής υπεριώδους-ορατού ορίστηκε στα 268nm και η ροή σταθερά σε 1.15ml/min. Η ουσία M32 απομονώθηκε ως μια έντονη κορυφή προς το τέλος του προγράμματος με χρόνο κατακράτησης 89min και μετά την απομάκρυνση του διαλύτη έδωσε στερεό υπόλειμμα που επαναχρωματογραφήθηκε σε στήλη Sephadex LH-20 (1.4 x 56)cm με διαλύτη έκλουσης μεθανόλη για να παραληφθεί ως καθαρή ουσία. Η ουσία που απομονώθηκε είχε καθαρό βάρος 1.2mgr.

Η ουσία M32 αποδείχθηκε ότι είναι ίδια με την M46 που απομονώθηκε από τη βουτανολική κατανομή και περιγράφηκε παραπάνω. Εμφάνισε τις ίδιες τιμές R_f , ενώ κατά τη φασματοφωτομετρική εξέταση της ουσίας ελήφθησαν οι ίδιες χαρακτηριστικές καμπύλες με τα μέγιστα τους. Οι τιμές NMR που ελήφθησαν, συνέπιπταν και αυτές με τις αντίστοιχες της M46 (**Ένωση 11**).

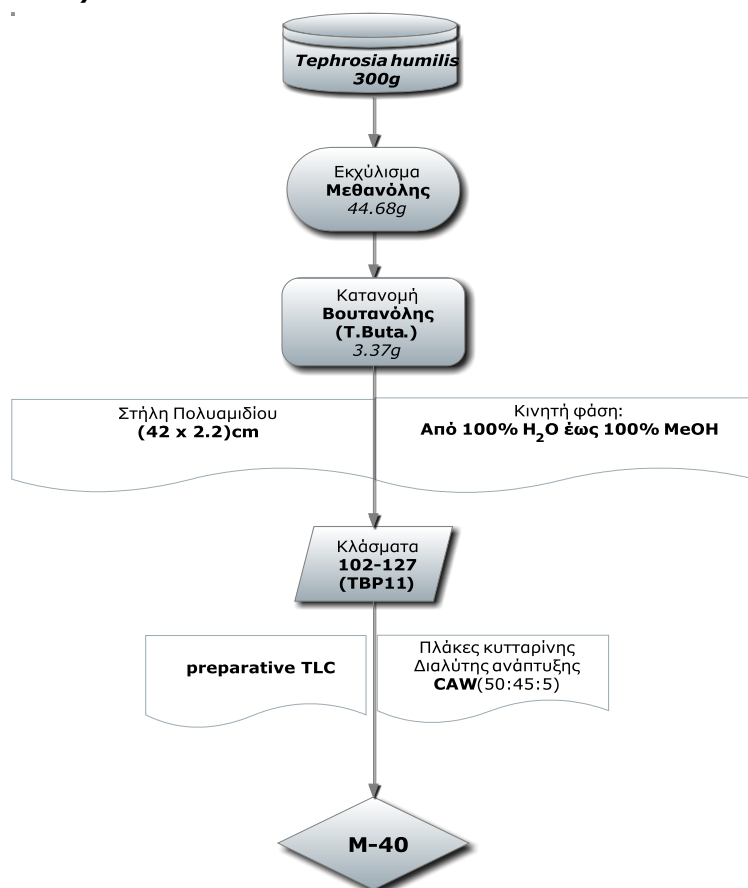


Ένωση 13

Ουσία M40: 7-O-β-γλυκουρονίδιο της λουτεολίνης



Απομόνωση ουσίας M40



Το στερεό υπόλειμμα της βουτανόλης χρωματογραφήθηκε σε στήλη πολυαμιδίου (42 x 2.2)cm αντιστρόφου φάσεως με κινητή φάση νερό προς μεθανόλη και με όγκο συλλεγομένων κλασμάτων 500ml. Τα κλάσματα 102-127, που αντιστοιχούσαν σε ποσοστό H₂O:MeOH από 40:60 έως 30:70, συνενώθηκαν (TBP11) και χρωματογραφήθηκαν με παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής

στιβάδας, σε πλάκες κυτταρίνης (Merck 5552) και διαλύτη ανάπτυξης διχλωρομεθάνιο:οξικό οξύ:νερό (CAW) σε αναλογία 50:45:5. Η ουσία M40 εμφανίστηκε ως μια ευδιάκριτη ζώνη (R_f 0.22) με καφέ φθορισμό στα 254nm και 365nm και σκούρο χρυσαφί φθορισμό μετά από έκθεση σε ατμούς NH_3 και μετά την απομάκρυνση του διαλύτη έκλουσης της ζώνης (μεθανόλη), έδωσε καθαρό βάρος 2.1mg.

Έλεγχος καθαρότητας

Για τον έλεγχο καθαρότητας της ουσίας χρησιμοποιήθηκαν τρία συστήματα ανάπτυξης σε TLC με στατική φάση πλάκες κυτταρίνης.

Σε σύστημα EAW: $R_f = 0.61$, σε AcOH 15% : $R_f = 0.08$ και CAW : $R_f = 0.22$

Φάσμα υπεριώδους-ορατού

Κατά τη φασματοφωτομετρική εξέταση της ουσίας ελήφθησαν χαρακτηριστικές καμπύλες με τα ακόλουθα μέγιστα (nm) που επαληθεύονται και από τη βιβλιογραφία (Ringl A. et al., 2007).

M40	Κορυφή II	Κορυφή I	Δ_λ I
<i>MeOH</i>	255.0, 269.0	347.0	
<i>MeONa</i>	266.5	386.0	+39.0
<i>AlCl₃</i>	273.5, 295.0sh	425.5	+78.5
<i>AlCl₃/HCl</i>	273.5, 295.0sh	360.0	+13.0
<i>AcONa</i>	265.0	357.0	
<i>AcONa/H₃BO₃</i>	260.0	367.5	+20.5

Από την τιμή απορρόφησης των κορυφών I και II του φάσματος της ένωσης σε MeOH, συμπεραίνεται ότι η ουσία ανήκει στις φλαβόνες που έχουν διυδροξύ σύστημα στο δακτύλιο B, διότι εμφανίζει δύο κορυφές απορρόφησης μεταξύ 250nm και 275nm (Mabry J.T. et al., 1970). Μετά την προσθήκη AcONa, δεν παρατηρείται βαθυχρωμική μετατόπιση της κορυφής II σε σχέση με την αντίστοιχη της μεθανόλης, ενδεικτικό της απουσίας ελεύθερου 7-OH. Από το γεγονός ότι υπάρχει βαθυχρωμική μετατόπιση της κορυφής I, μετά την προσθήκη AcONa και H_3BO_3 , κατά 20.5nm, σε σχέση με την αντίστοιχη σε μεθανόλη, προκύπτει ότι υπάρχει ορθο-διυδροξύ σύστημα στον B δακτύλιο. Με προσθήκη MeONa παρατηρείται βαθυχρωμική

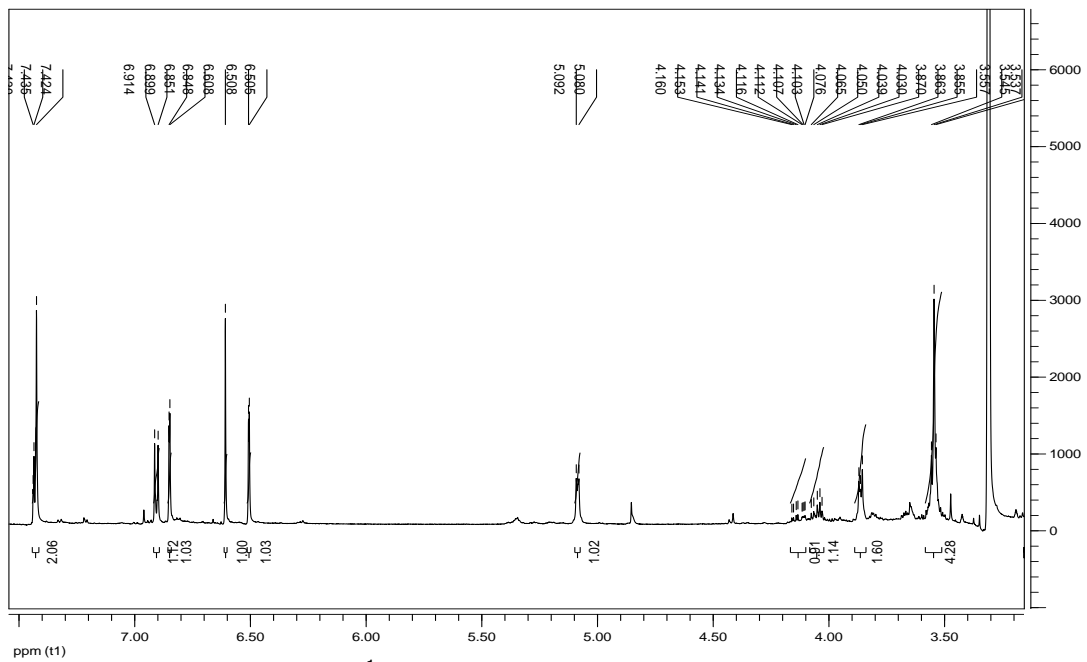
μετατόπιση της κορυφής I κατά 39.0nm, με αύξηση της έντασής της, χαρακτηριστικό ύπαρξης ελεύθερου 4'-OH. Η παρουσία ο-διυδροξυ συστήματος στον Β δακτύλιο επιβεβαιώνεται και από την υπυχρωμική μεταβολή κατά 65.5nm που παρατηρείται στην κορυφή I του φάσματος σε AlCl₃ μετά την προσθήκη HCl, λόγω της αποσύνθεσης του συμπλόκου του AlCl₃ με το ο-διυδροξυ σύστημα. Η διαφορά στην απορρόφηση της κορυφής I σε AlCl₃/HCl σε σχέση με την αντίστοιχη σε MeOH κατά 13nm, δείχνει την ύπαρξη ελεύθερου 5-OH (Mabry J.T. et al., 1970; Mues R., 1983).

Φάσμα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού

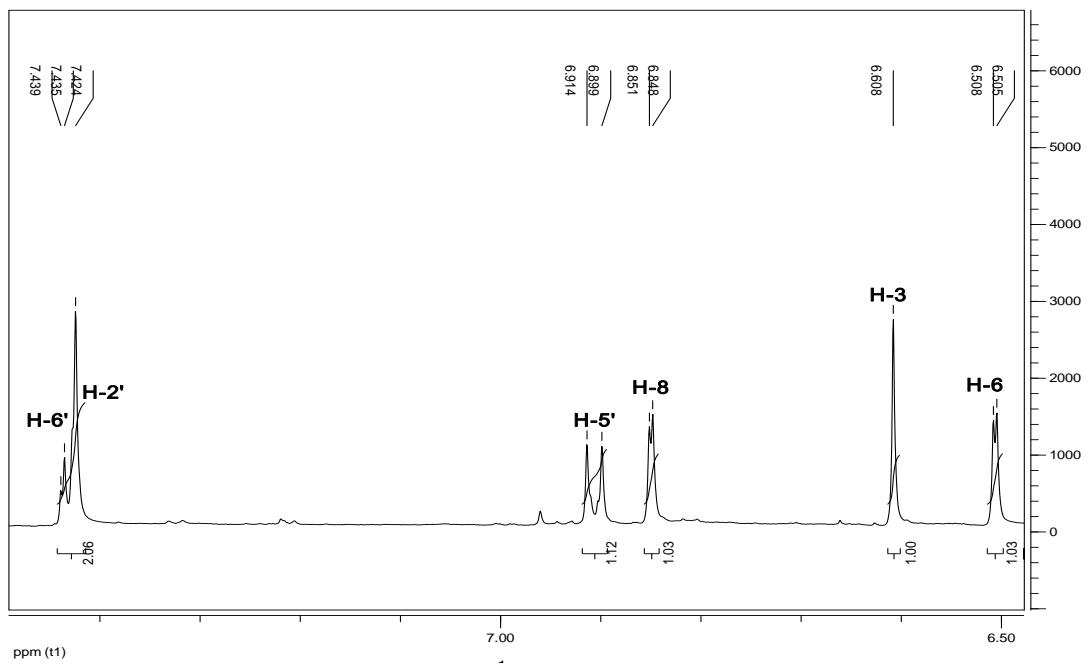
¹H-NMR και ¹³C-NMR(CD₃OD, 600MHz)			
Θέση	δ _H (ppm)	J _{HH} (Hz)	δ _C (ppm)*
2			165.3
3	6.61(s)		102.6
4			182.1
5			161.3
6	6.51(d)	2.0	99.9
7			163.3
8	6.85(d)	2.0	94.6
9			157.2
10			105.4
1'			121.7
2'	7.42(d)	2.4	112.5
3'			145.5
4'			149.6
5'	6.90(d)	9.0	115.8
6'	7.43(dd)	9.0, 2.4	118.8
Glucur.			
1''	5.09(d)	7.1	100.2
2''	3.53-356(m)		73.0
3''			76.0
4''			72.0
5''	3.86(d)	9.0	75.0
-COOH			174.5

*Τιμές που προκύπτουν από τα φάσματα HSQC, HMBC

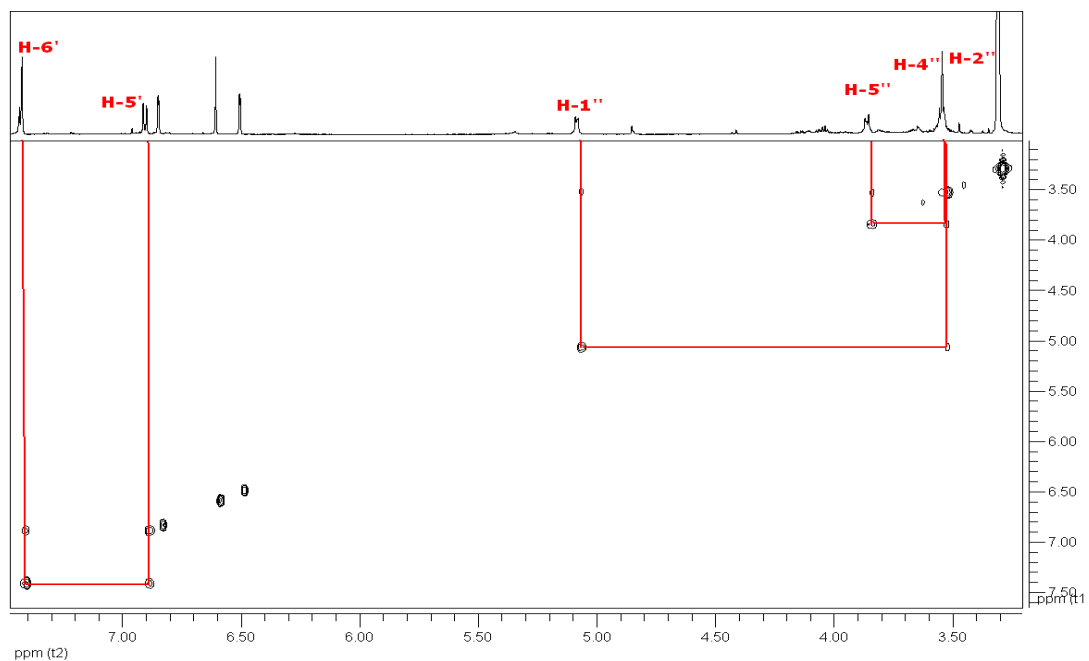
Στην αρωματική περιοχή του φάσματος ^1H NMR παρατηρείται μια διπλή διπλών κορυφή σε δ_{H} 7.43 [dd, ($J=9.0, 2.4$)], και δύο διπλές κορυφές σε δ_{H} 7.42 [d, ($J=2.4$)] και σε δ_{H} 6.90 [d, ($J=9.0$)], χαρακτηριστικές ύπαρξης ενός ABX συστήματος, και που αντιστοιχούν στα H-6', H-2' και H-5' του Β δακτυλίου, αντίστοιχα. Οι αντίστοιχοι άνθρακες βρίσκονται σε χημικές μετατοπίσεις δ_{C} 118.8, 112.5 και 115.8ppm. Στο φάσμα ^1H - ^1H COSY φαίνονται οι σχέσεις μεταξύ των πρωτονίων H-5'/H-6'. Στο φάσμα πρωτονίου παρατηρούνται επίσης δύο διπλές κορυφές, δ_{H} 6.51 και δ_{H} 6.85 ($J=2.0$), οι οποίες αντιστοιχούν στα H-6 και H-8 του Α δακτυλίου αντίστοιχα, καθώς και μια απλή κορυφή σε δ_{H} 6.61ppm που αντιστοιχεί στο H-3. Στην κεντρική περιοχή του φάσματος μεταξύ 5.20-3.40ppm παρατηρούνται σήματα σακχάρου. Η σύνδεση του σακχάρου γίνεται στη θέση-7 του αγλύκου, καθώς παρατηρείται ασθενές σήμα του ανωμερικού πρωτονίου του σακχάρου για τον C-7 του αγλύκου (163.3), που είναι κοινό με τα σήματα των H-6 και H-8 (Mues R., 1983) γεγονός που επιβεβαιώνεται και από το φάσμα υπεριώδους ορατού της ένωσης με AcONa που υποδεικνύει την ύπαρξη 7-υποκατάστασης. Από την τιμή της σταθεράς σύζευξης ($J=7.1\text{Hz}$) του ανωμερικού πρωτονίου του σακχάρου προκύπτει η β -διαμόρφωση αυτού. Το σάκχαρο φαίνεται να είναι γλυκουρονίδιο, γεγονός που προκύπτει από την ύπαρξη σήματος στο HMBC σε δ_{C} 174.5 που αντιστοιχεί στον άνθρακα του καρβοξυλίου και επιβεβαιώνεται και από το φάσμα μάζας της ένωσης. Η υψηλή τιμή της σταθεράς σύζευξης του H-5'' (9.0Hz) επιβεβαιώνει την axial-axial διαμόρφωση μεταξύ των H-4''/H-5'', χαρακτηριστική επίσης της ύπαρξης γλυκουρονιδίου (Huang Y. et al., 1999). Οι υπόλοιπες τιμές για τα πρωτόνια και τους άνθρακες προκύπτουν από τα φάσματα ^1H - ^1H COSY, HSQC και HMBC.



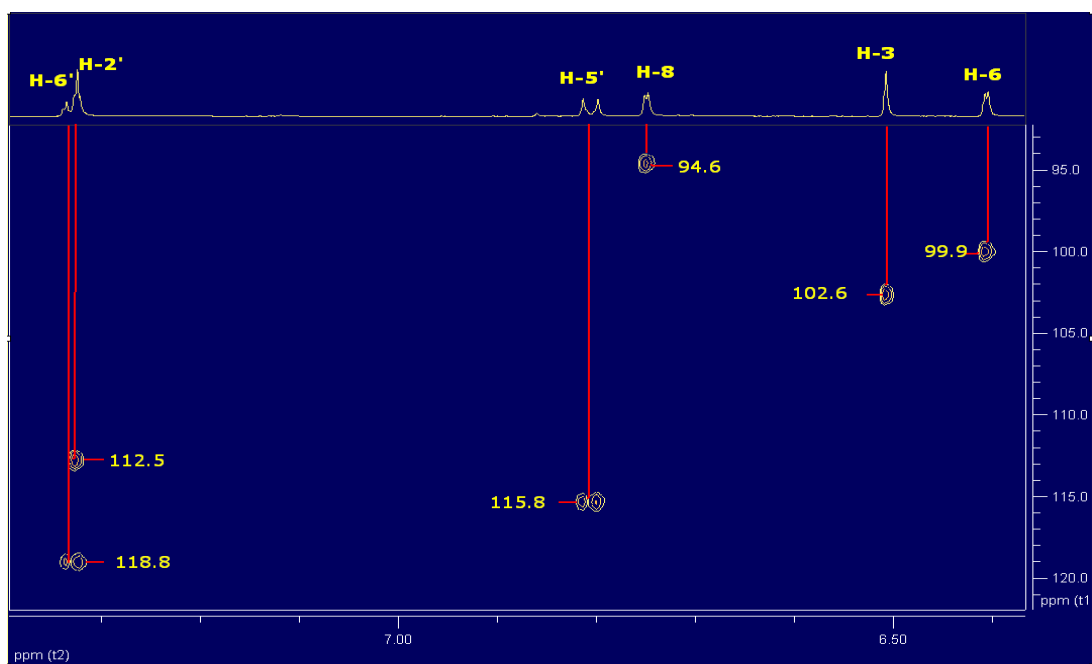
Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της M40 (CD_3OD , 600MHz)



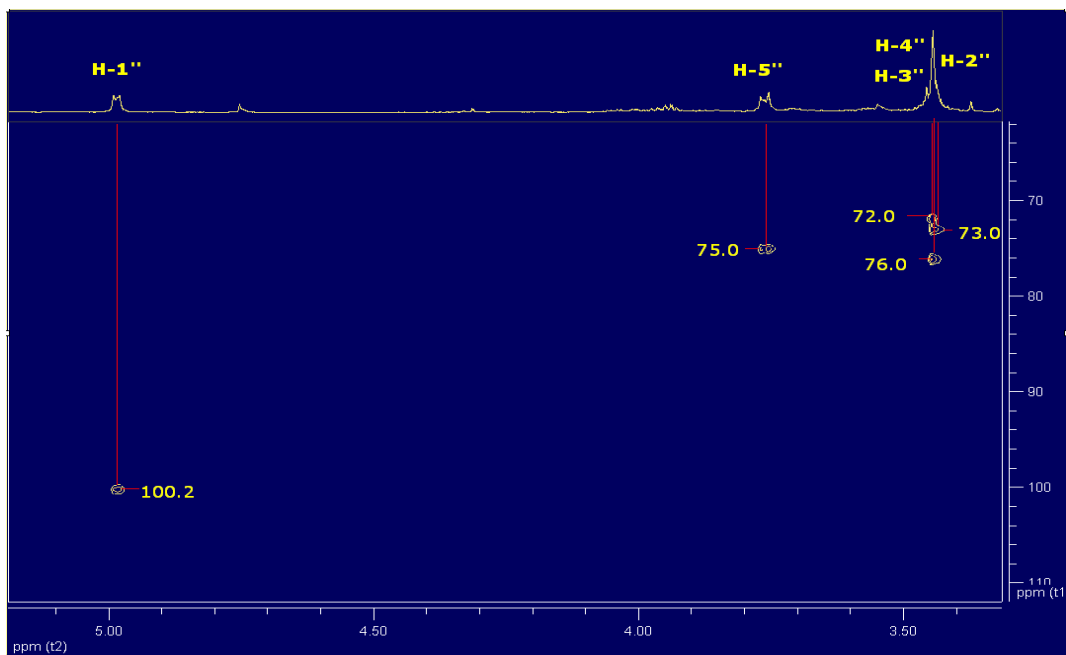
Λεπτομέρεια φάσματος του $^1\text{H-NMR}$ της M40 (CD_3OD , 600MHz)



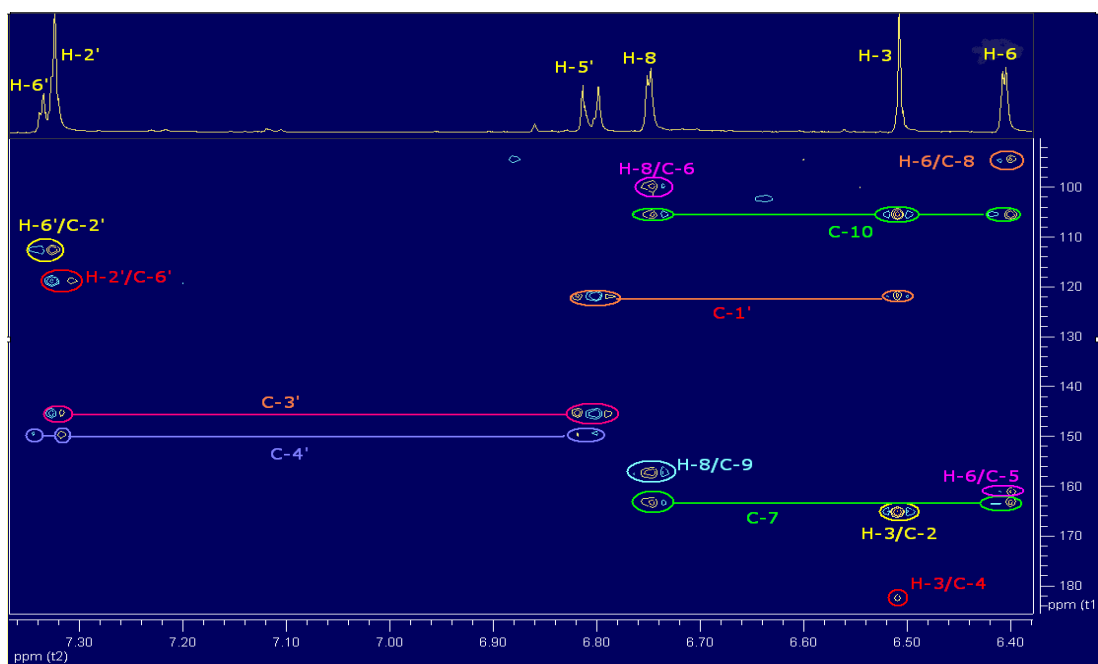
Φάσμα COSY της M40 (CD₃OD, 600MHz)



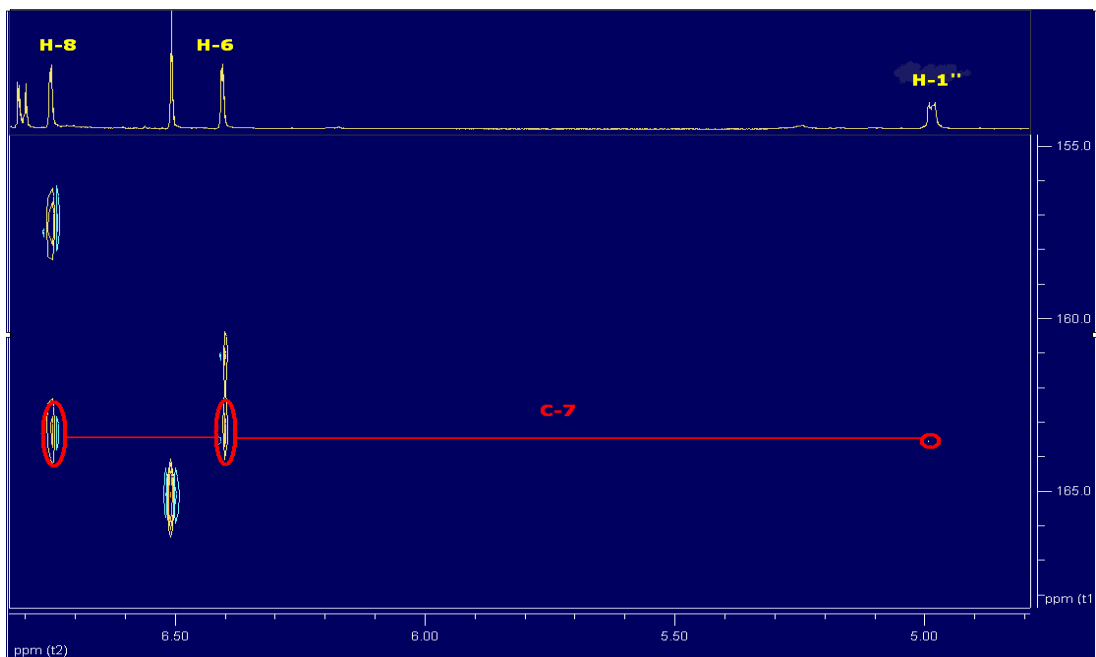
Λεπτομέρεια φάσματος HSQC της M40 (CD₃OD, 600MHz)



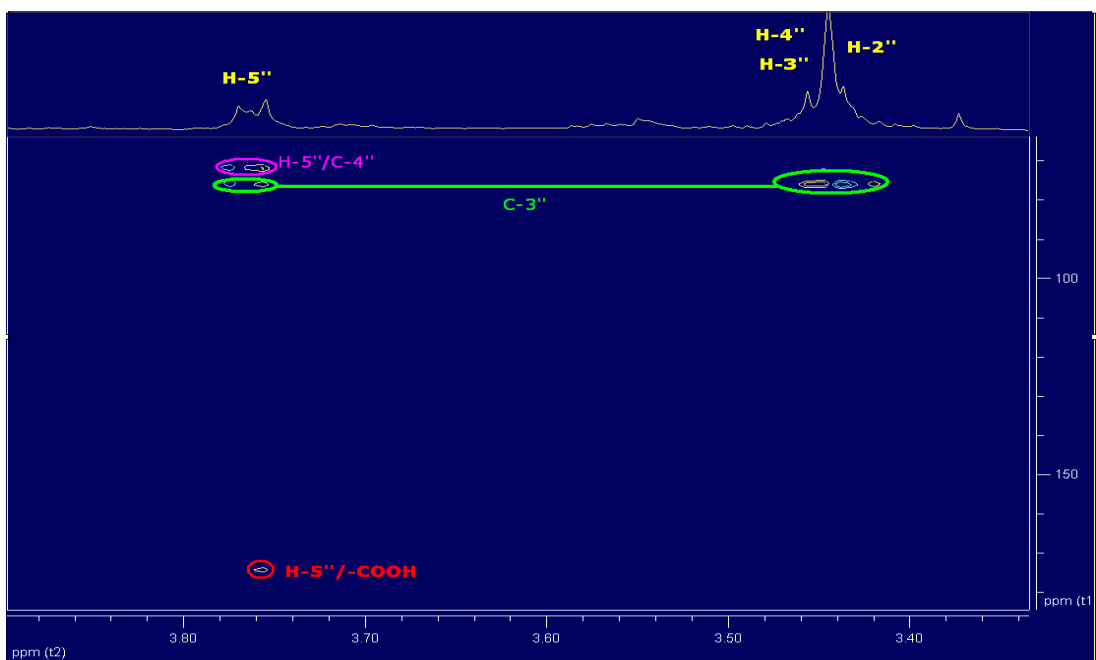
Λεπτομέρεια φάσματος HSQC της M40 (CD₃OD, 600MHz)



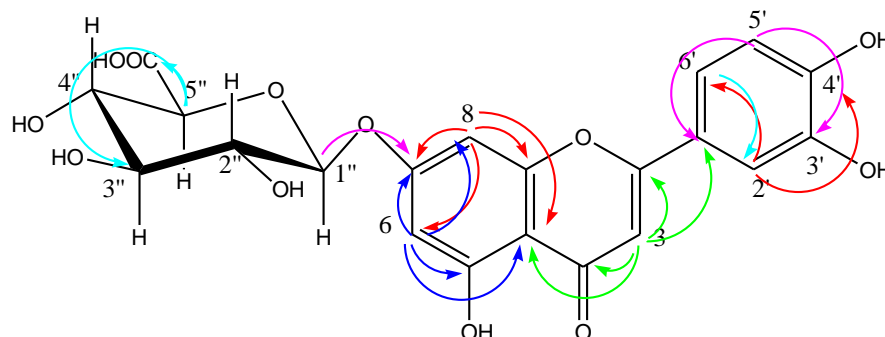
Λεπτομέρεια φάσματος HMBC της M40 (CD₃OD, 600MHz)



Λεπτομέρεια φάσματος HMBC της M40 (CD₃OD, 600MHz)



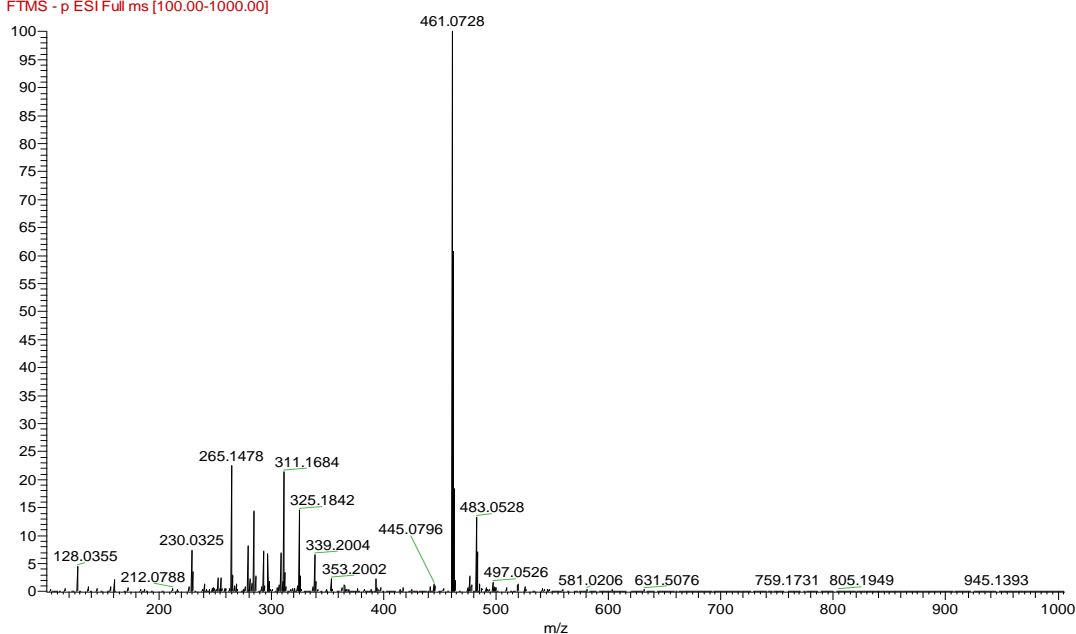
Λεπτομέρεια φάσματος HMBC της M40 (CD₃OD, 600MHz)



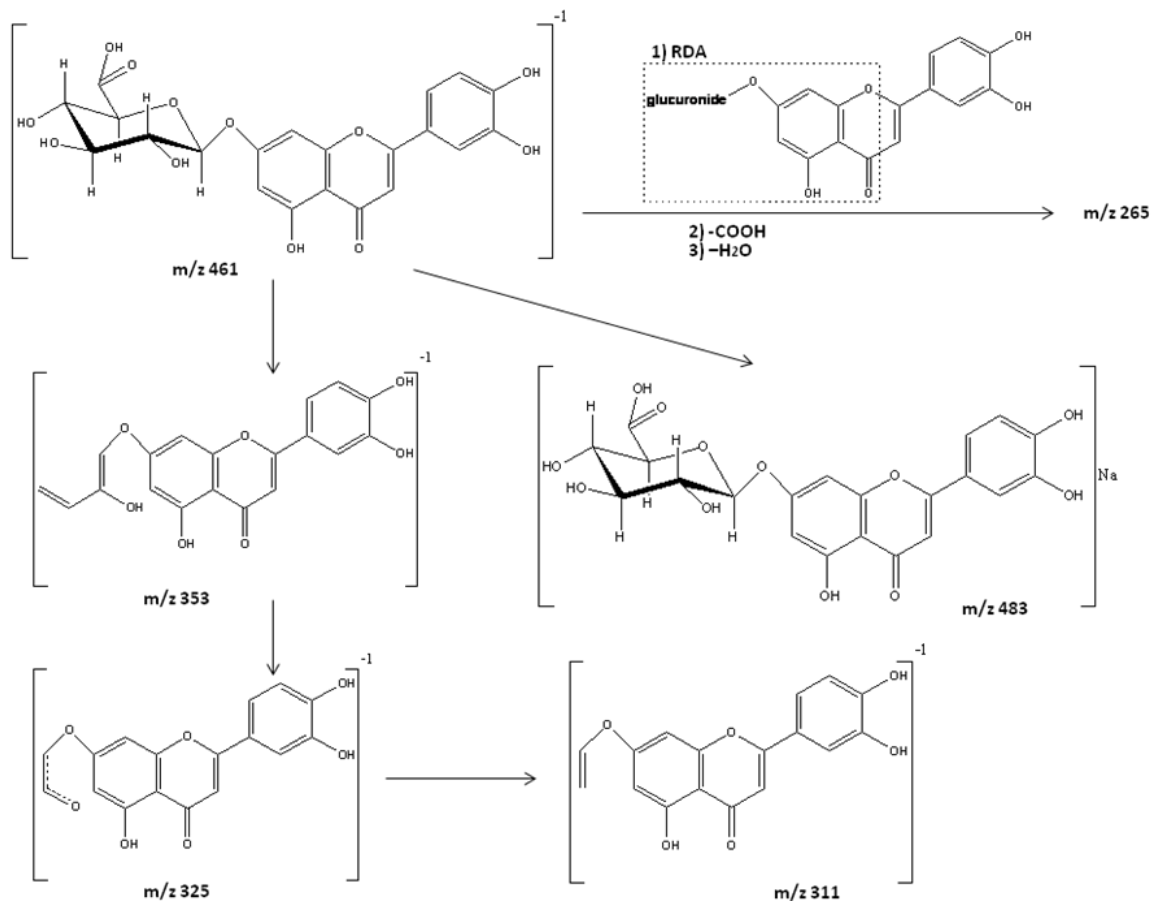
Μερικές από τις συζεύξεις H-C που προκύπτουν από το HMBC

Φάσμα μάζας

M40_01102012_Π #291 RT: 2.38 AV: 1 SB: 45 4.84, 0.00-4.30 NL: 1.98E6
F: FTMS - p ESI Full ms [100.00-1000.00]



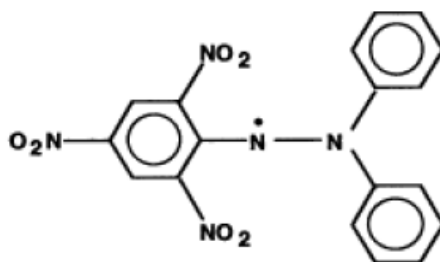
Από το φάσμα μάζας της ουσίας, που ελήφθη σε σύστημα HR-MS (Thermo Scientific) με αρνητικό ιονισμό, προκύπτει το θραύσμα 461 που αντιστοιχεί στο [M-H] και το θραύσμα σε m/z 483 [M+Na] (Parejo I. et al., 2004). Η τιμή του μοριακού ιόντος αντιστοιχεί στο μοριακό τύπο C₂₁H₁₈O₁₂. Η θεωρητική μέτρηση της μάζας ([M-H]= 461.0714) επιβεβαιώνεται και από την πραγματική της τιμή (461.0728). Η θραυσμάτωση της ένωσης με τις προτεινόμενες δομές δίνεται παρακάτω. Από όλα τα παραπάνω προκύπτει ότι η ένωση M40 είναι το 7-O-β-γλυκουρονίδιο της λουτεολίνης, όπως άλλωστε επιβεβαιώνεται και από την υπάρχουσα βιβλιογραφία (Lu Y. et al., 2000; Ringl A. et al., 2007; Ozgen U. et al., 2010).



IN VITRO ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΥΝΑΜΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΤΗΣ ΑΝΑΓΩΓΑΣΗΣ ΤΗΣ ΑΛΔΟΖΗΣ (ALR2)

Η λιπιδική υπεροξειδωση μπορεί να οριστεί ως η οξειδωτική «παρακμή» των πολυακόρεστων λιπών. Η εκκίνηση μιας αλυσίδας αντιδράσεων υπεροξειδωσης σε μια μεμβράνη ή στα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα γίνεται λόγω της απόσπασης ενός ατόμου υδρογόνου από το διπλό δεσμό των λιπαρών οξέων. Η ελεύθερη ρίζα τείνει να σταθεροποιηθεί με μια μοριακή αναδιοργάνωση και να παράγει ένα συζυγιακό διένιο, το οποίο εύκολα αντιδρά με μοριακό οξυγόνο με αποτέλεσμα το σχηματισμό μιας υπεροξειδικής ρίζας. Αυτές οι υπεροξειδικές ρίζες μπορούν να αποσπάσουν ένα άτομο υδρογόνου από ένα άλλο μόριο και να δώσουν ένα λιπιδικό υδροϋπεροξειδίο (R-OOH). Μια πιθανή κατάληξη των υπεροξειδικών ριζών είναι να σχηματίσουν κυκλικά υπεροξειδία. Αυτά τα κυκλικά υπεροξειδία, τα λιπιδικά υπεροξειδία, καθώς και τα κυκλικά ενδοϋπεροξειδία, κλασματούνονται σε αλδεΐδες. Απ'την άλλη μεριά τα αντιοξειδωτικά διακόπτουν την αλυσίδα των οξειδώσεων που προέρχονται από τις 'αυτοοξειδώσεις' των ακόρεστων λιπών και αποδίδονται στις ελεύθερες ρίζες, κυρίως, είτε λειτουργώντας ως σαρωτές ελευθέρων ριζών, είτε προσφέροντας υδρογόνα από τις ομάδες των φαινολικών υδροξυλίων. Έτσι σχηματίζουν ένα σταθερό τελικό προϊόν που καθυστερεί ή τερματίζει την περαιτέρω οξειδωση των λιπών.

Ικανότητα σάρωσης ελευθέρων ριζών των διαφόρων κατανομών του μεθανολικού εκχυλίσματος του *T.humilis* με τη χρήση της μεθόδου DPPH



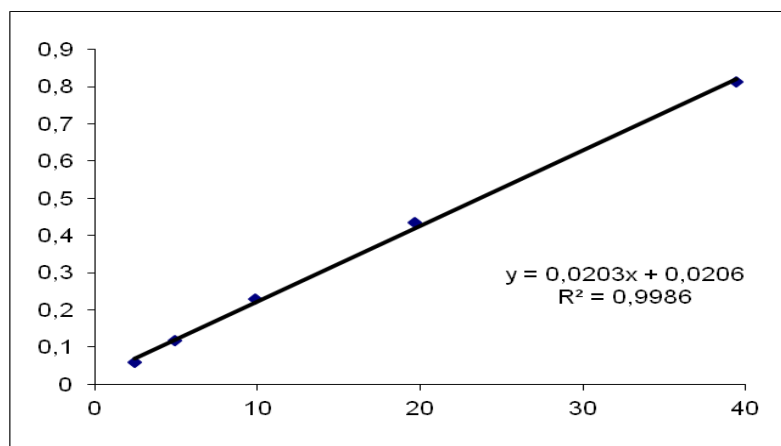
1,1 διφαινυλο-2-πικρυλ-υδραζυλίο(DPPH)

Η μέτρηση της αντιοξειδωτικής δύναμης με τη μέθοδο της σάρωσης της ρίζας 2,2-διφαινυλο-1-πικρυλυδραζυλίου πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που αναφέρεται από τους Parejo και συνεργάτες (2000). Το DPPH· ανάγεται και η αναγωγή του καταγράφεται από την μείωση της απορρόφησης της ρίζας του στα 515nm. Εφόσον το DPPH· ανάγεται από κάποιο αντιοξειδωτικό, η απορρόφηση σταδιακά εξαφανίζεται. Ετοιμάστηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις των δειγμάτων των κατανομών (διαιθυλαιθερικού, οξικού αιθυλεστέρα, υπολείμματος οξικού αιθυλεστέρα, βουτανολικού, υδατικού) του μεθανολικού εκχυλίσματος, καθώς και του ίδιου του αρχικού μεθανολικού εκχυλίσματος. Ποσότητα 25 μl διαλυμένου δείγματος προστέθηκε σε 975 μl διαλύματος DPPH· ($2 \times 10^{-5} M$) και αναμείχθηκαν καλά σε vortex. Η μείωση της απορρόφησης μετρήθηκε στα 517nm, όταν η αντίδραση έφτασε σε ένα plateau με τη χρήση ενός φασματοφωτόμετρου U-2000 HITACHI σε κυψελίδα quartz. Για όλα τα δείγματα, πλην υδατικού, που διαλύονται εντελώς σε μεθανόλη, χρησιμοποιήθηκε η μεθανόλη για το μηδενισμό του οργάνου (1000μl). Για την υδατική κατανομή που δεν διαλύεται σε μεθανόλη, χρησιμοποιήθηκαν 975μl μεθανόλης και 25μl απεσταγμένου ύδατος. Αρχικά μετρήθηκε η απορρόφηση της ρίζας DPPH· χωρίς κανένα δείγμα και προέκυψαν τρεις καμπύλες αναφοράς:

1^η καμπύλη αναφοράς:

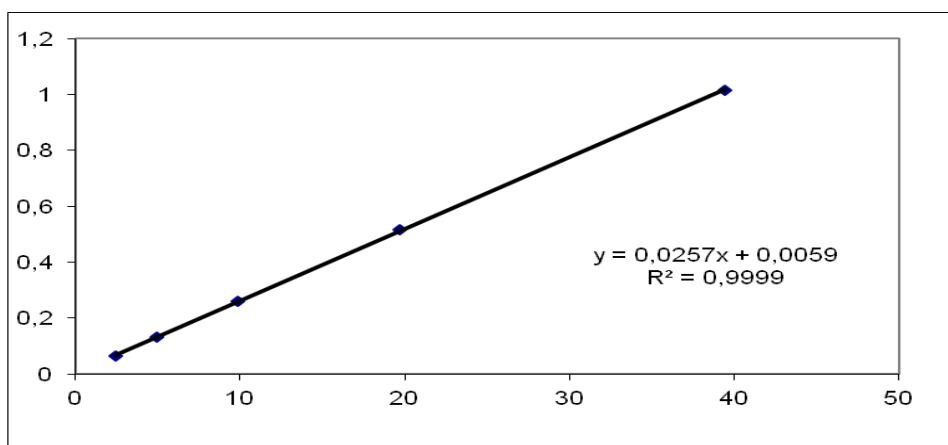
μg/ml DPPH	Απορρόφηση DPPH(Abs)
C=39.44 (μητρικό δ/μα)	0.812
C/2= 19.7	0.435
C/4= 9.85	0.229
C/8 = 4.925	0.117
C/16= 2.4625	0.059

Οι τιμές αυτές αντιστοιχούν στην ακόλουθη καμπύλη αναφοράς:



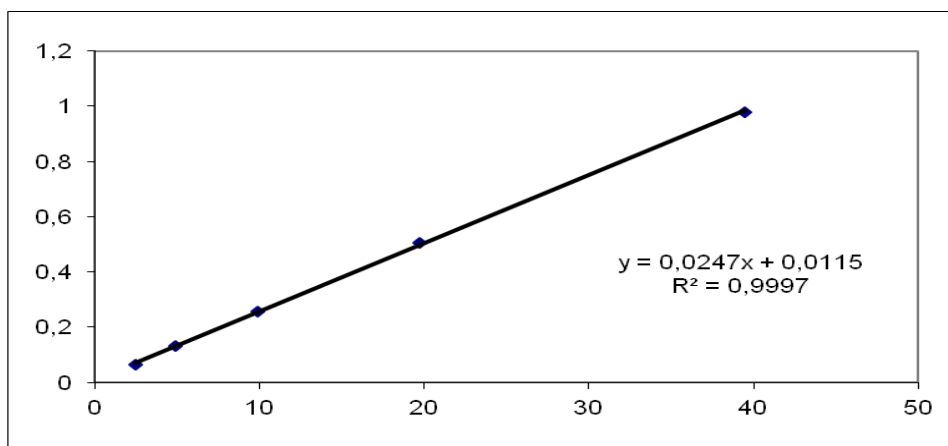
2^η καμπύλη αναφοράς:

μg/ml DPPH	Απορρόφηση DPPH(Abs)
C=39.44 (μητρικό δ/μα)	1.015
C/2= 19.7	0.516
C/4= 9.85	0.261
C/8 = 4.925	0.133
C/16= 2.4625	0.064



3^η καμπύλη αναφοράς:

μg/ml DPPH	Απορρόφηση DPPH(Abs)
C=39.44 (μητρικό δ/μα)	0.979
C/2= 19.7	0.507
C/4= 9.85	0.258
C/8 = 4.925	0.131
C/16= 2.4625	0.066



$$A_{515\text{nm}} = 0.020 \times [\text{DPPH}'(\mu\text{g/ml})] + 0.020, (R^2= 0.998) \quad (1)$$

$$A_{515\text{nm}} = 0.025 \times [\text{DPPH}'(\mu\text{g/ml})] + 0.025, (R^2= 0.999) \quad (2)$$

$$A_{515\text{nm}} = 0.024 \times [\text{DPPH}'(\mu\text{g/ml})] + 0.011, (R^2= 0.999) \quad (3)$$

Η ευθεία αναφοράς (1) χρησιμοποιήθηκε για την κατανομή του αιθερικού, του οξικού αιθυλεστέρα, της βουτανόλης και του υδατικού, η (2) για το υπόλειμμα του οξικού αιθυλεστέρα, ενώ η (3) για το αρχικό μεθανολικό εκχύλισμα.

Κατανομή δισουλφαιθέρα

Οι απορροφήσεις των μαρτύρων στα 515nm στην περίπτωση όπου μελετήθηκε η κατανομή του δισουλφαιθέρα (εις τριπλούν) ήταν: **0.151, 0.157, 0.162**. Εισάγοντας τις τιμές αυτές της απορρόφησης (άξονας Υ) στην εξίσωση της καμπύλης αναφοράς (1), λαμβάνουμε τη συγκέντρωση (μg DPPH/ml) του DPPH' που περιέχεται στους μάρτυρες (τιμές άξονα Χ). Αναλυτικότερα:

<u>Απορρόφηση(Abs) DPPH</u>	<u>μg/ml DPPH</u>
<u>Μάρτυρες</u>	
0.151	6.42364532
0.157	6.719211823
0.162	6.965517241
	M.O= 6.702791461

Οι συγκεντρώσεις (αραιώσεις) της κατανομής του δισουλφαιθέρα που παρασκευάστηκαν σε erpendorf ήταν **C_s = 62.5μg/ml** (ή **0.0625mg/ml**),

125µg/ml και **250µg/ml**. Όμως για τις μετρήσεις, από καθένα από αυτά τα erpendorf παίρνουμε μόνον 25µl και προσθέτουμε 975µl stock διάλυμα DPPH'. Οπότε η τελική συγκέντρωση που εμφανίζεται μέσα στο erpendorf είναι

$$C_c = C_s * 25 / 1000$$

Με άλλα λόγια η συγκέντρωση που μπαίνει στην κυψελίδα του φωτόμετρου είναι 40 φορές μικρότερη από τις αρχικές συγκεντρώσεις (αραιώσεις) του εκχυλίσματος που παρασκευάσαμε. Συνεπώς:

C_s (µg/ml)	C_c (µg/ml)
62.5	1.5625
125	3.125
250	6.25

Για κάθε δείγμα και για κάθε συγκέντρωση που ελέγχθηκε υπολογίστηκε το ποσοστό του DPPH' που παρέμενε αφού είχε ήδη επέλθει η σταθερή κατάσταση της αντίδρασης, σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\% \text{ of remaining DPPH}' = ([\text{DPPH}']_{\text{at } t=T} / [\text{DPPH}']_{\text{at } t=0}) \times 100$$

όπου T είναι ο χρόνος που χρειάστηκε για να φτάσει η αντίδραση σε σταθερή κατάσταση. Ο χρόνος αυτός για το αιθερικό ήταν τα 60min, για τον οξικό αιθυλεστέρα τα 120min, για το υπόλειμμα του οξικού αιθυλεστέρα τα 120min, για το βουτανολικό τα 90min, για το υδατικό τα 90min και για το αρχικό μεθανολικό εκχύλισμα τα 90min.

Εν προκειμένω, για το αιθερικό, προκύπτει ότι:

i) $C_c = 1.5625 \mu\text{g/ml}$:

Για τη συγκέντρωση αυτή, οι τρεις τιμές της απορρόφησης ήταν: **0.146**, **0.143**, **0.140**. Και πάλι από την καμπύλη αναφοράς (1), θέτοντας τις παραπάνω τιμές (Y), λαμβάνουμε τη συγκέντρωση του DPPH' (µg/ml) που απέμεινε στην κυψελίδα (δεν καταναλώθηκε) και διαιρώντας, όπως προαναφέρθηκε, αυτές τις τιμές με τον μέσο όρο (M.O) της συγκέντρωσης που υπήρχε στους τρεις μάρτυρες (**6.702791461** στην προκειμένη περίπτωση), λαμβάνουμε το επί τοις (%) ποσοστό του DPPH' που απέμεινε (%rem DPPH') από τη δράση του αντιοξειδωτικού για τη δεδομένη συγκέντρωση C_s . Αναλυτικότερα:

<u>Απορρόφηση (Abs)</u>	<u>μg DPPH·/ml</u>	<u>%rem DPPH·</u>
0.146	6.177339901	92.160705
0.143	6.02955665	89.955904
0.140	5.881773399	87.7511024

ii) $C_c = \underline{3.125 \mu\text{g/ml}}$

Ομοίως για την παραπάνω συγκέντρωση:

<u>Απορρόφηση (Abs)</u>	<u>μg DPPH·/ml</u>	<u>%rem DPPH·</u>
0.127	5.24137931	78.1969623
0.128	5.290640394	78.9318961
0.126	5.192118227	77.4620284

iii) $C_c = \underline{6.25 \mu\text{g/ml}}$

<u>Απορρόφηση (Abs)</u>	<u>μg DPPH·/ml</u>	<u>%rem DPPH·</u>
0.105	4.157635468	62.028417
0.106	4.206896552	62.763351
0.103	4.0591133	60.55855

Στη συνέχεια διαιρούνται οι συγκεντρώσεις C_c ($\mu\text{g/ml}$) (**1.5625, 3.125, 6.25**) με τον μέσο όρο της συγκέντρωσης των μαρτύρων ($M.O = \mathbf{6.702791461}$) και προκύπτει ο λόγος $X(C_{\text{sample}}/C_{\text{αρχDPPH}})$. Οι τιμές που λαμβάνονται από αυτόν τον λόγο τοποθετούνται στον άξονα των (X), ενώ στον άξονα των (Y) η $1^{\text{η}}$ τιμή κάθε φορά από το (%remDPPH·) από κάθε C_c . Για παράδειγμα:

<u>$X(C_{\text{sample}}/C_{\text{αρχDPPH}})$</u>	<u>$Y(\% \text{rem DPPH} \cdot)$</u>
0.233111832	92.16070498
0.466223665	78.19696227
0.93244733	62.02841744

<u>$X(C_{\text{sample}}/C_{\text{αρχDPPH}})$</u>	<u>$Y(\% \text{rem DPPH} \cdot)$</u>
0.233111832	89.95590397
0.466223665	78.93189613
0.93244733	62.7633513

<u>$X(C_{\text{sample}}/C_{\text{αρχDPPH}})$</u>	<u>$Y(\% \text{rem DPPH} \cdot)$</u>
0.233111832	87.7511024
0.466223665	77.46202842
0.93244733	60.55854973

Από τους τρεις παραπάνω πίνακες προκύπτουν τρία διαγράμματα από τα οποία αν θέσουμε όπου (Y) το 50 λαμβάνουμε τρεις τιμές EC_{50} από τις οποίες εξάγουμε τον

μέσο όρο. Η αντιοξειδωτική ικανότητα κάθε δείγματος εκφράστηκε σαν την ποσότητα του δείγματος που απαιτείται, εκφρασμένη ως ο λόγος των mg του δείγματος προς τα mg του αρχικού DPPH', για να μειωθεί η αρχική συγκέντρωση του DPPH' κατά 50% (EC₅₀). Η αντιοξειδωτική ικανότητα (AE, antiradical efficiency) υπολογίζεται σύμφωνα με τον τύπο:

$$AE = 1/EC_{50}.$$

Στην περίπτωση του εκχυλίσματος του δειθυλαιθέρα οι εξισώσεις που προέκυψαν για την εξαγωγή του EC₅₀ είναι οι ακόλουθες:

$$y = 103.4e^{-0,55x} (R^2 = 0.991) \text{ με } EC_{50} = 1.307488$$

$$y = 100.8e^{-0,51x} (R^2 = 0.998) \text{ με } EC_{50} = 1.372524$$

$$y = 99.24e^{-0,53x} (R^2 = 1.0) \text{ με } EC_{50} = 1.293526$$

Μέσος όρος **EC₅₀ = 1.324513 ± 0.04** και **AE = 0.75499**

Τα αποτελέσματα επίσης εκφράστηκαν σαν ισοδύναμα κβερκετίνης και τρόλοξ με βάση την τιμή του EC₅₀. Οι δύο αυτές ουσίες είναι γνωστές από βιβλιογραφικές αναφορές για την καλή αντιοξειδωτική τους δράση.

Κατανομή οξικού αιθυλεστέρα

Όπως με την κατανομή του δειθυλαιθέρα έχουμε αντίστοιχα:

<u>Απορρόφηση(Abs) DPPH</u>	<u>μg/ml DPPH</u>
<u>Μάρτυρες</u>	
0.159	6.81773399
0.161	6.916256158
	M.O= 6.866995074

<u>C_s(μg/ml)</u>	<u>C_c(μg/ml)</u>
70	1.75
130	3.25
200	5

i) **C_c = 1.75 μg/ml:**

<u>Απορρόφηση (Abs)</u>	<u>μg DPPH' /ml</u>	<u>%rem DPPH'</u>
0.136	5.684729064	82.78335725
0.124	5.093596059	74.17503587
0.131	5.389162562	78.47919656

ii) $C_c = 3.25 \mu\text{g/ml}$:

<u>Απορρόφηση (Abs)</u>	<u>$\mu\text{g DPPH}/\text{ml}$</u>	<u>%rem DPPH</u>
0.11	4.403940887	64.1319943
0.091	3.467980296	50.5021521
0.085	3.172413793	46.1979914

iii) $C_c = 5.0 \mu\text{g/ml}$:

<u>Απορρόφηση (Abs)</u>	<u>$\mu\text{g DPPH}/\text{ml}$</u>	<u>%rem DPPH</u>
0.045	1.201970443	17.5035868
0.041	1.004926108	14.6341463
0.055	1.694581281	24.6771879

<u>$X(C_{\text{sample}}/C_{\text{app}} \text{ DPPH})$</u>	<u>$Y(\% \text{rem DPPH})$</u>
0.254842181	82.78335725
0.473278336	64.13199426
0.728120516	17.5035868

<u>$X(C_{\text{sample}}/C_{\text{app}} \text{ DPPH})$</u>	<u>$Y(\% \text{rem DPPH})$</u>
0.254842181	74.17503587
0.473278336	50.50215208
0.728120516	14.63414634

<u>$X(C_{\text{sample}}/C_{\text{app}} \text{ DPPH})$</u>	<u>$Y(\% \text{rem DPPH})$</u>
0.254842181	78.47919656
0.473278336	46.19799139
0.728120516	24.67718795

Στην περίπτωση της κατανομής του οξικού αιθυλεστέρα, οι εξισώσεις που προέκυψαν για την εξαγωγή του EC_{50} είναι οι ακόλουθες:

$$y = 228.4e^{-3,33x} \quad (R^2 = 0.897) \quad \mu\epsilon \quad EC_{50} = 0.455768$$

$$y = 204.6e^{-3,46x} \quad (R^2 = 0.938) \quad \mu\epsilon \quad EC_{50} = 0.406204$$

$$y = 146.5e^{-2,44x} \quad (R^2 = 1.0) \quad \mu\epsilon \quad EC_{50} = 0.439813$$

Μέσος όρος $EC_{50} = 0.433928 \pm 0.03$ και $AE = 2.30453$

Κατανομή υπολείμματος οξικού αιθυλεστέρα

Στην περίπτωση του υπολείμματος του οξικού αιθυλεστέρα, εισάγουμε τις τιμές της απορρόφησης στην εξίσωση της καμπύλης αναφοράς (2), όπως προαναφέρθηκε:

Απορρόφηση(Abs) DPPH	μg/ml DPPH
Μάρτυρες	
0.177	6.6575875
0.190	7.1634241
0.196	7.3968871
	M.O= 7.0726329

C_s(μg/ml)	C_c(μg/ml)
70	1.75
130	3.25
200	5
300	7.5

i) **C_c= 1.75μg/ml:**

Απορρόφηση (Abs)	μg DPPH /ml	%rem DPPH:
0.163	6.1128404	86.4294879
0.159	5.9571984	84.2288648
0.162	6.0739299	85.8793322

ii) **C_c= 3.25μg/ml:**

Απορρόφηση (Abs)	μg DPPH /ml	%rem DPPH:
0.14	5.2178988	73.77590317
0.134	4.9844357	70.47496697
0.129	4.7898832	67.72418798

iii) **C_c= 5.0μg/ml:**

Απορρόφηση (Abs)	μg DPPH /ml	%rem DPPH:
0.102	3.7392996	52.86998
0.094	3.4280155	48.4687322
0.084	3.0389105	42.96717422

iv) **C_c= 7.5μg/ml:**

Απορρόφηση (Abs)	μg DPPH /ml	%rem DPPH:
0.056	1.9494163	27.56280904
0.052	1.7937743	25.36218584
0.054	1.8715953	26.46249744

X(C_{sample}/C_{σροχ} DPPH)	Y(%rem DPPH)
0.247432607	86.42948795
0.4595177	73.77590317
0.706950307	52.86998
1.060425461	27.56280904

<u>X(C_{sample}/C_{ααx} DPPH')</u>	<u>Y(%rem DPPH')</u>
0.247432607	84.22886476
0.4595177	70.47496697
0.706950307	48.4687322
1.060425461	25.36218584

<u>X(C_{sample}/C_{ααx} DPPH')</u>	<u>Y(%rem DPPH')</u>
0.247432607	85.87933215
0.4595177	67.72418798
0.706950307	42.96717422
1.060425461	26.46249744

Στην περίπτωση της κατανομής του υπολείμματος του οξικού αιθυλεστέρα, οι εξισώσεις που προέκυψαν για την εξαγωγή του EC₅₀ είναι οι ακόλουθες:

$$y = 133,6e^{-1,42x} \quad (R^2 = 0.972) \quad \mu\epsilon \quad EC_{50} = 0.689193$$

$$y = 131,8e^{-1,50x} \quad (R^2 = 0.980) \quad \mu\epsilon \quad EC_{50} = 0.644603$$

$$y = 127,0e^{-1,48x} \quad (R^2 = 0.994) \quad \mu\epsilon \quad EC_{50} = 0.628070$$

Μέσος όρος **EC₅₀ = 0.65396 ± 0.03** και **AE = 2.30453**

Κατανομή βουτανόλης

Στην περίπτωση του βουτανόλης, επανερχόμαστε στην εξίσωση της καμπύλης αναφοράς (1) και εισάγουμε εκεί τις τιμές της απορρόφησης:

<u>Απορρόφηση(Abs) DPPH</u>	<u>μg/ml DPPH</u>
<u>Μάρτυρες</u>	
0.156	6.669950739
0.157	6.719211823
0.157	6.719211823
	M.O= 6.702791461

<u>C_s(μg/ml)</u>	<u>C_c(μg/ml)</u>
100	2.5
160	4
250	6.25
330	8.25

i) **C_c = 2.5 μg/ml**:

<u>Απορρόφηση (Abs)</u>	<u>μg DPPH' /ml</u>	<u>%rem DPPH'</u>
0.117	4.748768473	70.847624
0.115	4.650246305	69.377756
0.115	4.650246305	69.377756

ii) $C_c = 4.0 \mu\text{g/ml}$:

<u>Απορρόφηση (Abs)</u>	<u>$\mu\text{g DPPH} / \text{ml}$</u>	<u>%rem DPPH</u>
0.087	3.270935961	48.799608
0.084	3.123152709	46.5948065
0.084	3.123152709	46.5948065

iii) $C_c = 6.25 \mu\text{g/ml}$:

<u>Απορρόφηση (Abs)</u>	<u>$\mu\text{g DPPH} / \text{ml}$</u>	<u>%rem DPPH</u>
0.053	1.596059113	23.8118569
0.039	0.906403941	13.5227829
0.055	1.684466019	25.1308135

iv) $C_c = 8.25 \mu\text{g/ml}$:

<u>Απορρόφηση (Abs)</u>	<u>$\mu\text{g DPPH} / \text{ml}$</u>	<u>%rem DPPH</u>
0.032	0.561576355	8.37824596
0.023	0.118226601	1.76384125
0.024	0.167487685	2.49877511

<u>$X(C_{\text{sample}}/C_{\text{app}}, \text{DPPH})$</u>	<u>$Y(\% \text{rem DPPH})$</u>
0.372978932	70.84762371
0.596766291	48.79960804
0.93244733	23.81185693
1.230830475	8.378245958

<u>$X(C_{\text{sample}}/C_{\text{app}}, \text{DPPH})$</u>	<u>$Y(\% \text{rem DPPH})$</u>
0.372978932	69.377756
0.596766291	46.59480647
0.93244733	13.52278295
1.230830475	1.763841254

<u>$X(C_{\text{sample}}/C_{\text{app}}, \text{DPPH})$</u>	<u>$Y(\% \text{rem DPPH})$</u>
0.372978932	69.377756
0.596766291	46.59480647
0.93244733	25.13081347
1.230830475	2.49877511

Στην περίπτωση της κατανομής της βουτανόλης, οι εξισώσεις που προέκυψαν για την εξαγωγή του EC_{50} είναι οι ακόλουθες:

$$y = 198.4e^{-2,46x} \quad (R^2 = 0.975) \quad \mu\epsilon \quad EC_{50} = 0.559575$$

$$y = 468.5e^{-4,26x} \quad (R^2 = 0.944) \quad \mu\epsilon \quad EC_{50} = 0.525297$$

$$y = 377.9e^{-3,67x} \quad (R^2 = 0.868) \quad \mu\epsilon \quad EC_{50} = 0.550189$$

Μέσος όρος $EC_{50} = 0.54502 \pm 0.02$ και $AE = 1.8348$

Υδατική κατανομή

Ομοίως για την υδατική κατανομή:

<u>Απορρόφηση(Abs) DPPH</u>	<u>μg/ml DPPH</u>
<u>Μάρτυρες</u>	
0.158	6.768472906
0.148	6.275862069
0.148	6.275862069
	M.O= 6.440065681

<u>C_S(μg/ml)</u>	<u>C_C(μg/ml)</u>
150	3.75
250	6.25
350	8.75
450	11.25

i) $C_c = 3.75 \mu\text{g/ml}$:

<u>Απορρόφηση (Abs)</u>	<u>μg DPPH /ml</u>	<u>%rem DPPH</u>
0.138	5.783251232	89.8011219
0.137	5.733990148	89.036206
0.136	5.684729064	88.2712902

ii) $C_c = 6.25 \mu\text{g/ml}$:

<u>Απορρόφηση (Abs)</u>	<u>μg DPPH /ml</u>	<u>%rem DPPH</u>
0.134	5.586206897	86.74145844
0.134	5.586206897	86.74145844
0.133	5.536945813	85.97654258

iii) $C_c = 8.75 \mu\text{g/ml}$:

<u>Απορρόφηση (Abs)</u>	<u>μg DPPH /ml</u>	<u>%rem DPPH</u>
0.13	5.389162562	83.681795
0.124	5.093596059	79.0922998
0.125	5.142857143	79.8572157

iv) $C_c = 11.25 \mu\text{g/ml}$:

<u>Απορρόφηση (Abs)</u>	<u>μgDPPH /ml</u>	<u>%remDPPH</u>
0.119	4.84729064	75.2677206
0.119	4.84729064	75.2677206
0.118	4.798029557	74.5028047

<u>X(C_{sample}/C_{app} DPPH·)</u>	<u>Y(%rem DPPH·)</u>
0.582292198	89.8011219
0.970486996	89.03620602
1.358681795	83.681795
1.746876594	75.26772055

<u>X(C_{sample}/C_{app} DPPH·)</u>	<u>Y(%rem DPPH·)</u>
0.582292198	89.03620602
0.970486996	86.74145844
1.358681795	79.09229985
1.746876594	75.26772055

<u>X(C_{sample}/C_{app} DPPH·)</u>	<u>Y(%rem DPPH·)</u>
0.582292198	88.27129016
0.970486996	85.97654258
1.358681795	79.85721571
1.746876594	74.50280469

Στην περίπτωση της υδατικής κατανομής, οι εξισώσεις που προέκυψαν για την εξαγωγή του EC₅₀ είναι οι ακόλουθες:

$$y = 100.6e^{-0,15x} \quad (R^2 = 0.880) \quad \mu\epsilon \quad EC_{50} = 4.587462$$

$$y = 98.47e^{-0,15x} \quad (R^2 = 0.960) \quad \mu\epsilon \quad EC_{50} = 4.412628$$

$$y = 97.62e^{-0,15x} \quad (R^2 = 0.965) \quad \mu\epsilon \quad EC_{50} = 4.457970$$

Μέσος όρος **EC₅₀ = 4.48602 ± 0.1** και **AE = 0.22291**

Μεθανολικό εκχύλισμα (προ κατανομών-crude)

Στην περίπτωση του αρχικού μεθανολικού εκχυλίσματος, εισάγουμε τις τιμές της απορρόφησης στην εξίσωση της καμπύλης αναφοράς (3), όπως προαναφέρθηκε:

<u>Απορρόφηση(Abs) DPPH</u>	<u>μg/ml DPPH</u>
<u>Μάρτυρες</u>	
0.213	8.157894737
0.213	8.157894737
0.214	8.198380567
	M.O= 8.171390013

<u>C_s(μg/ml)</u>	<u>C_c(μg/ml)</u>
150	3.75
250	6.25
350	8.75

i) $C_c = 3.75 \mu\text{g/ml}$:

<u>Απορρόφηση (Abs)</u>	<u>$\mu\text{g DPPH}/\text{ml}$</u>	<u>%rem DPPH</u>
0.185	7.024291498	85.9620149
0.186	7.064777328	86.4574732
0.191	7.267206478	88.9347647

ii) $C_c = 6.25 \mu\text{g/ml}$:

<u>Απορρόφηση (Abs)</u>	<u>$\mu\text{g DPPH}/\text{ml}$</u>	<u>%rem DPPH</u>
0.166	6.255060729	76.5483072
0.167	6.295546559	77.0437655
0.169	6.376518219	78.0346821

iii) $C_c = 8.75 \mu\text{g/ml}$:

<u>Απορρόφηση (Abs)</u>	<u>$\mu\text{g DPPH}/\text{ml}$</u>	<u>%rem DPPH</u>
0.127	4.67611336	57.2254335
0.123	4.51417004	55.2436003
0.123	4.51417004	55.2436003

<u>$X(C_{\text{sample}}/C_{\text{αρχ. DPPH}})$</u>	<u>$Y(\% \text{rem DPPH})$</u>
0.458918249	85.96201486
0.764863749	76.54830718
1.070809249	57.22543353

<u>$X(C_{\text{sample}}/C_{\text{αρχ. DPPH}})$</u>	<u>$Y(\% \text{rem DPPH})$</u>
0.458918249	86.45747316
0.764863749	77.04376548
1.070809249	55.24360033

<u>$X(C_{\text{sample}}/C_{\text{αρχ. DPPH}})$</u>	<u>$Y(\% \text{rem DPPH})$</u>
0.458918249	88.93476466
0.764863749	78.03468208
1.070809249	55.24360033

Στην περίπτωση του αρχικού-προ κατανομών-μεθανολικού εκχυλίσματος, οι εξισώσεις που προέκυψαν για την εξαγωγή του EC_{50} είναι οι ακόλουθες:

$$y = 120.0e^{-0,66x} \quad (R^2 = 0.942) \quad \mu\epsilon \quad EC_{50} = 1.317622$$

$$y = 125.4e^{-0,73x} \quad (R^2 = 0.927) \quad \mu\epsilon \quad EC_{50} = 1.256564$$

$$y = 131.7e^{-0,77x} \quad (R^2 = 0.936) \quad \mu\epsilon \quad EC_{50} = 1.244836$$

Μέσος όρος $EC_{50} = 1.27301 \pm 0,04$ και $AE = 0.78554$

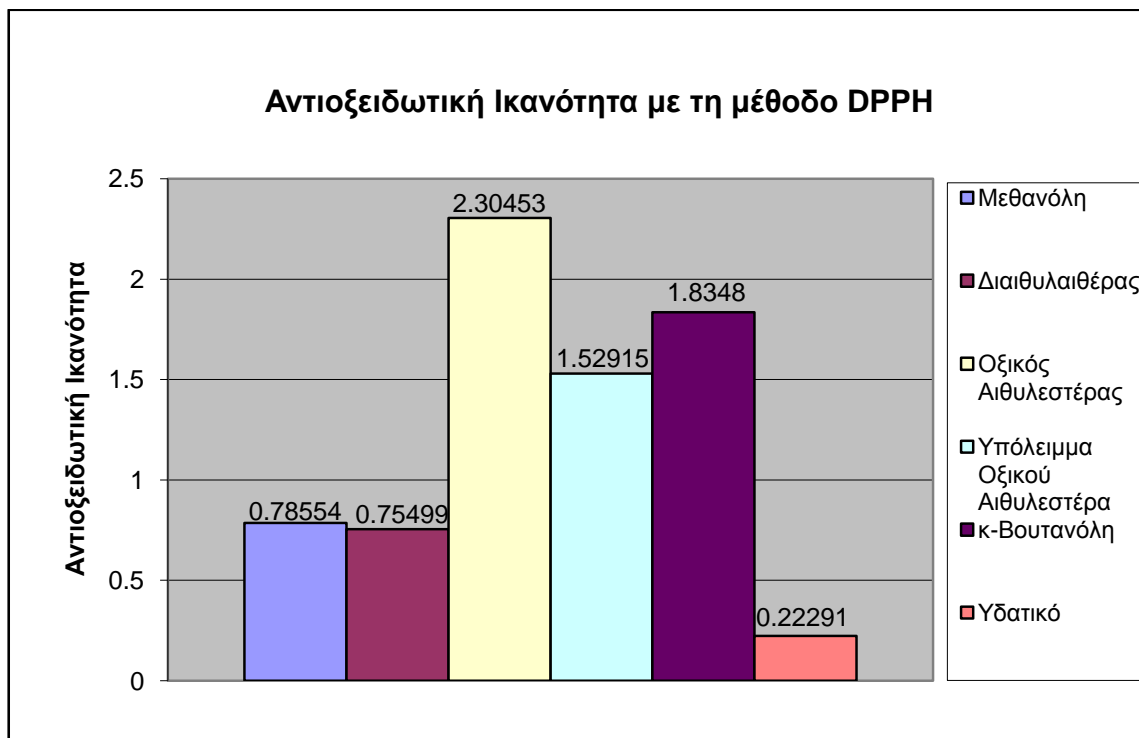
Η ικανότητα σάρωσης ριζών, εκφρασμένη σαν EC_{50} , κυμάνθηκε από 0.434 έως 4.486 mg ξηρού εκχυλίσματος/mg DPPH*. Τα κλάσματα του οξικού αιθυλεστέρα παρουσίασαν τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δύναμη ανάμεσα σε όλες τις κατανομές, ακολουθούμενα από τα αντίστοιχα κλάσματα της βουτανόλης, του υπολείμματος του οξικού αιθυλεστέρα, του διαιθυλαιθέρα και της μεθανολικής κατανομής, με την κατανομή του υδατικού να εμφανίζει την πιο ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Συνολικά, τα αποτελέσματα της αντιοξειδωτικής δράσης όλων των κατανομών με τη μέθοδο του DPPH παρουσιάζονται παρακάτω:

Μέθοδος Σάρωσης Ριζών DPPH*		
Δείγμα	$EC_{50} \pm SD^*$	AE
Μεθανόλης	1.27301 \pm 0.04	0.78554
Διαιθυλαιθέρα	1.324513 \pm 0.04	0.75499
Οξικού Αιθυλεστέρα	0.433928 \pm 0.03	2.30453
Υπολείμματος Οξικού Αιθυλεστέρα	0.65396 \pm 0.03	1.52915
Βουτανόλης	0.54502 \pm 0.02	1.8348
Υδατικό	4.48602 \pm 0.1	0.22291

$EC_{50} \pm SD$: Αποτελεσματική Συγκέντρωση (Efficient Concentration) σε (mg antioxidant / mg DPPH): η ποσότητα του αντιοξειδωτικού που απαιτείται για να μειωθεί η αρχική συγκέντρωση του DPPH κατά 50%

*Ο όρος EC_{50} δεν χρησιμοποιείται με την κυριολεκτική του έννοια, καθώς αναφέρεται σε επίπεδο καθαρής ουσίας-ένωσης, αλλά σε επίπεδο μέσης δραστικής συγκέντρωσης εκχυλίσματος.

AE: Αντιοξειδωτική Ικανότητα (Antiradical Efficiency): $1/EC_{50}$



ΑΕ_{κβερκετίνης}: 14.71

ΑΕ_{τρόλος}: 5.59

Αντιοξειδωτική ικανότητα όλων των κατανομών όπως υπολογίστηκε με τη μέθοδο της ρίζας DPPH

Ικανότητα σάρωσης ελευθέρων ριζών των διαφόρων κατανομών του μεθανολικού εκχυλίσματος του *T.humilis* με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας της Λουμινόλης, επαγόμενης από το σύμπλοκο Co(II)-EDTA

Η δοκιμή αυτή είναι μια έμμεση μέθοδος ελέγχου της αντιοξειδωτικής δράσης και στηρίζεται στον ελεγχόμενο σχηματισμό ριζών οξυγόνου ($O_2^{\cdot-}$) και (OH^{\cdot}) από υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2). Είναι μια μέθοδος ανεξάρτητη του χρόνου και δίχως την παρουσία κάποιου ενζύμου. Τα πλεονεκτήματα αυτής έγκεινται στο ότι η ένταση της χημειοφωταύγειας φθάνει σε plateau όπου και παραμένει σταθερή ως και 30 δευτερόλεπτα, καθιστώντας εφικτή την καταγραφή της, δίχως τη χρήση ολοκλήρωσης. Μάλιστα, παρατηρείται και γραμμικότητα μεταξύ των τιμών έντασης της χημειοφωταύγειας και των διαφόρων συγκεντρώσεων του H_2O_2 . Επιπροσθέτως, η χρήση των οργάνων που χαρακτηρίζονται από υψηλή ευαισθησία, είναι απλή και εύκολη, δίνοντας στοιχεία που είναι πολύ ακριβή. Ωστόσο, μειονέκτημα της μεθόδου μπορεί να χαρακτηριστεί η επαναληψιμότητα των τιμών που λαμβάνονται, λόγω της υψηλής ευαισθησίας των οργάνων και της ίδιας της μεθόδου.

Η μέτρηση της αντιοξειδωτικής δύναμης με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας της λουμινόλης, επαγόμενης από το σύμπλοκο Co(II)-EDTA πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που αναφέρεται από τους Gulsen και συνεργάτες (2007), με κάποιες αλλαγές. Οι μετρήσεις της χημειοφωταύγειας πραγματοποιήθηκαν σε φθορισμόμετρο Serius Single Tube (Berthold Detection Systems).

Ετοιμάστηκαν τουλάχιστον τρία, διαφορετικής συγκέντρωσης, διαλύματα για κάθε δείγμα. 1 ml βορικού ρυθμιστικού διαλύματος (0.05M, προσαρμοσμένο σε pH 9 με NaOH 1M), που περιέχει 1mg/ml EDTA και 0,2mg/ml $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, προστέθηκε σε 100 μl διαλύματος λουμινόλης (5.6×10^{-4} M) βορικού ρυθμιστικού διαλύματος (0.05M, προσαρμοσμένο σε pH 9 με NaOH 1M) μέσα σε δοκιμαστικό σωλήνα και αναμείχθηκε καλά σε συσκευή vortex για 15sec. Στη συνέχεια, το μείγμα λουμινόλης-βορικού τοποθετήθηκε στον πάτο μιας 10 x 10 γυάλινης κυψελίδας με τη χρήση πιπέτας ακριβείας. Στο μείγμα λουμινόλης-βορικού ρυθμιστικού διαλύματος προστέθηκαν και 25μl υδατικού διαλύματος H_2O_2 (5.4×10^{-1} M) απευθείας στην

κυψελίδα με τη χρήση πιπέτας Pasteur και αναμείχθηκε προσεκτικά για 15sec, έτσι ώστε να ξεκινήσει η αντίδραση της χημειοφωταύγειας. Όταν η αντίδραση έφτασε σε ένα plateau, καταγράφηκε η ένταση (I_0) της χημειοφωταύγειας (CL).

Για να καταγραφεί η στιγμιαία μείωση της εκπομπής του φωτός (I), ακολουθήθηκε ακριβώς η ίδια διαδικασία που απαιτήθηκε για την καταγραφή της έντασης I_0 , με τη διαφορά ότι μαζί με τα 25ml H_2O_2 , προστέθηκαν την ίδια ακριβώς στιγμή και 25ml διαλύματος δείγματος με τη χρήση πιπέτας Pasteur και αναμείχθηκαν όλα μαζί προσεκτικά για 15sec. Έπειτα υπολογίστηκε η αναλογία I_0/I . Η αναλογία αυτή σε συνάρτηση με τα μg του δείγματος/ml αναπαραστάθηκε γραφικά για τις τρεις συγκεντρώσεις του κάθε δείγματος και βρέθηκε η γραμμική συνάρτηση ώστε να υπολογιστεί το IC_{50} . Το IC_{50} είναι η ποσότητα του δείγματος που απαιτείται για να μειωθεί κατά 50% η ένταση της χημειοφωταύγειας., σύμφωνα με την εξίσωση:

$$[I_0/I = a (\text{mg εκχυλίσματος/ml}) + b]$$

Η αντιοξειδωτική ικανότητα ($AE=1/IC_{50}$), επίσης υπολογίζεται. Τα αποτελέσματα επίσης εκφράστηκαν σαν ισοδύναμα κβερκετίνης και τρόλοξ με βάση την τιμή του IC_{50} .

Πιο αναλυτικά:

Κατανομή δισουλφαιθέρα

Οι τιμές των αραιώσεων που χρησιμοποιήθηκαν στην περίπτωση της κατανομής του δισουλφαιθέρα σε mg/ml είναι $C_s = 0.0125, 0.003125$ και 0.00625 . Αυτές οι τιμές όμως δεν αντιστοιχούν στην πραγματική συγκέντρωση που μπαίνει στην κυψελίδα μέτρησης καθότι από τις προαναφερθείσες αραιώσεις μόνο 25ml μπαίνουν σ'αυτήν. Ο τελικός όγκος μέσα στην κυψελίδα είναι: (1000ml ρυθμιστικού $Co(II)$ / EDTA + 100ml λουμινόλης + 25ml H_2O_2 + 25ml CH_3OH ή δείγματος = 1150ml). Συνεπώς η πραγματική συγκέντρωση $C_c = C_s \cdot 25/1150$. Συνεπώς:

<u>C_s (mg/ml)</u>	<u>C_c (mg/ml)</u>
0.0125	$27.1739 \cdot 10^{-05}$
0.003125	$6.79348 \cdot 10^{-05}$
0.00625	$13.587 \cdot 10^{-05}$

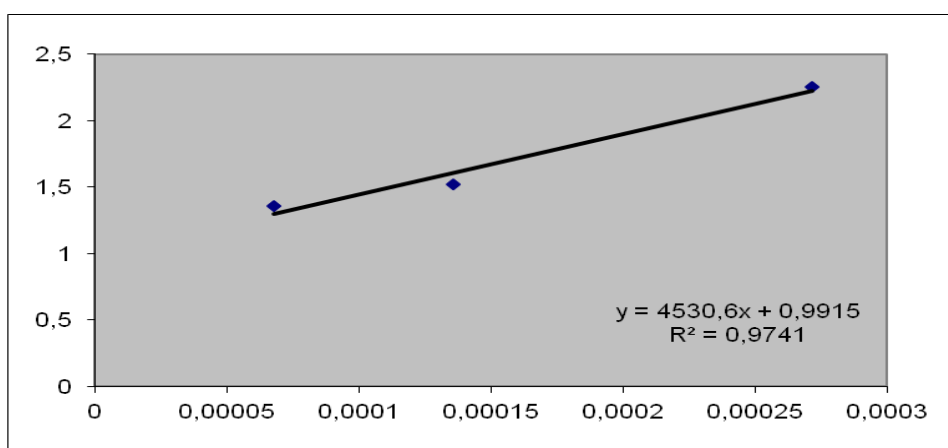
Απορρόφηση μαρτύρων (I_0)	Απορρόφηση συγκεντρώσεων εκχυλίσματος (I)		
	(0.0125	- 0.003125	- 0.00625)
27746			
28163	12504	20744	18520
28554	14820	25116	18590
M.O= 28154.33333			

Στη συνέχεια υπολογίζεται ο λόγος I_0/I για κάθε μια από τις τρεις συγκεντρώσεις:

<u>I_0/I (0.0125)</u>	<u>I_0/I (0.003125)</u>	<u>I_0/I (0.00625)</u>
2.251626146	1.35722779	1.52021238
1.899752587	1.12097202	1.51448808

Όπου I_0 είναι ο μέσος όρος της απορρόφησης των μαρτύρων (28154.33333). Ακολούθως, κατασκευάζονται διαγράμματα όπου στον άξονα των (X) έχουν την C_c σε mg/ml και στον άξονα των (Y) έχουν τον λόγο I_0/I από κάθε μία από τις τρεις συγκεντρώσεις:

<u>X= C_c(mg/ml)</u>	<u>Y= I_0/I</u>
$27.1739 \cdot 10^{-05}$	2,251626146
$6.79348 \cdot 10^{-05}$	1,357227793
$13.587 \cdot 10^{-05}$	1,520212383

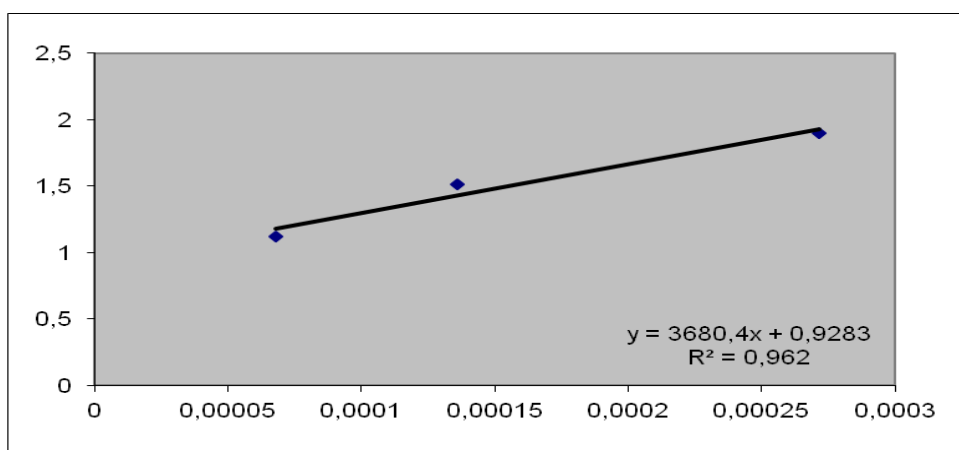


Το IC_{50} είναι η ποσότητα του δείγματος που απαιτείται για την μείωση της έντασης της χημειοφωταύγειας στο 50%. Από τη συνάρτηση του διαγράμματος

$y=4530.6 \cdot x + 0,974$ λαμβάνουμε τιμή IC_{50} για την κατανομή του διαιθυλαιθέρα ίση με $22.2597 \cdot 10^{-5} \text{mg/ml}$ ή $0.222597448 \mu\text{g/ml}$, όπου $AE=1/IC_{50}=4.49241448$.

Αντίστοιχα:

<u>X= C_c(mg/ml)</u>	<u>Y= I₀/I</u>
$27.1739 \cdot 10^{-05}$	1.899752587
$6.79348 \cdot 10^{-05}$	1.120972023
$13.587 \cdot 10^{-05}$	1.514488076



και $IC_{50}=0.000291191 \text{mg/ml}$ ή $0.291191175 \mu\text{g/ml}$ με $AE=3.43417001$

Από τις παραπάνω τιμές IC_{50} και AE εξάγεται ο μέσος όρος που αντιπροσωπεύει την κατανομή του αιθέρα:

$IC_{50}=0.256894 (\pm 0.034297)$ και $AE=3.963292 (\pm 0.529122)$

Κατανομή οξικού αιθυλεστέρα

Οι τιμές των αραιώσεων που χρησιμοποιήθηκαν στην περίπτωση της κατανομής του οξικού αιθυλεστέρα σε mg/ml είναι $C_s=0.1, 0.0125$ και 0.003125 .

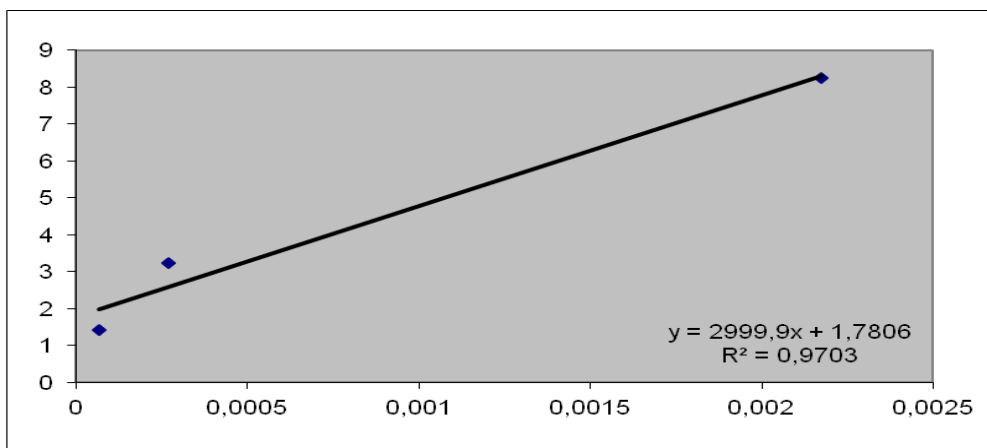
<u>C_s (mg/ml)</u>	<u>C_c (mg/ml)</u>
0.1	$217.3913 \cdot 10^{-05}$
0.0125	$27.1739 \cdot 10^{-05}$
0.003125	$6.79348 \cdot 10^{-05}$

<u>Απορρόφηση μαρτύρων (I₀)</u>	<u>Απορρόφηση συγκεντρώσεων εκχυλίσματος (I)</u>		
	<u>(0.1</u>	<u>- 0.0125</u>	<u>- 0.003125)</u>
30546			
44617	4346	11074	25435
32274	4155	11935	21731
M.O=35812.33333			

Στη συνέχεια υπολογίζεται ο λόγος I_0/I για κάθε μια από τις τρεις συγκεντρώσεις

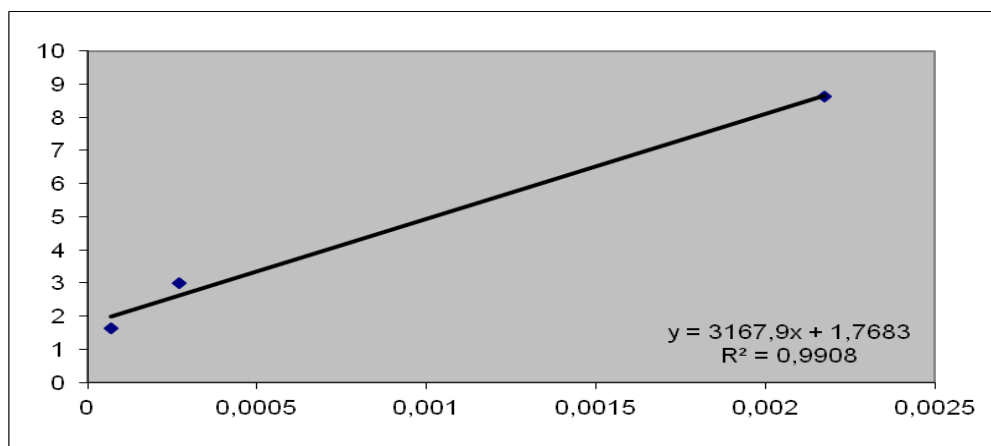
$I_0/I (0.1)$	$I_0/I (0.0125)$	$I_0/I (0.003125)$
8.240297592	3.233911	1.40799423
8.619093462	3.000614	1.64798368

$X = C_c(\text{mg/ml})$	$Y = I_0/I$
$217.3913 \cdot 10^{-05}$	8.240297592
$27.1739 \cdot 10^{-05}$	3.233911264
$6.79348 \cdot 10^{-05}$	1.407994234



και $IC_{50} = 7.31358 \cdot 10^{-5} \text{mg/ml}$ ή $0.073135771 \mu\text{g/ml}$ με $AE = 13.6732$

$X = C_c(\text{mg/ml})$	$Y = I_0/I$
$217.3913 \cdot 10^{-05}$	8.619093462
$27.1739 \cdot 10^{-05}$	3.000614439
$6.79348 \cdot 10^{-05}$	1.647983679



και $IC_{50} = 7.31399 \cdot 10^{-5} \text{ mg/ml}$ ή $0.073139935 \mu\text{g/ml}$ με $AE = 13.67242$

Από τις παραπάνω τιμές IC_{50} και AE εξάγεται ο μέσος όρος που αντιπροσωπεύει την κατανομή του οξικού αιθυλεστέρα:

$IC_{50} = 0.073137583 (\pm 0.000002081)$ και $AE = 13.67281 (\pm 0.000389)$

Κατανομή υπολείμματος οξικού αιθυλεστέρα

Οι τιμές των αραιώσεων που χρησιμοποιήθηκαν στην περίπτωση της κατανομής του υπολείμματος του οξικού αιθυλεστέρα σε mg/ml είναι $C_s = 0.1, 0.05$ και 0.0125 .

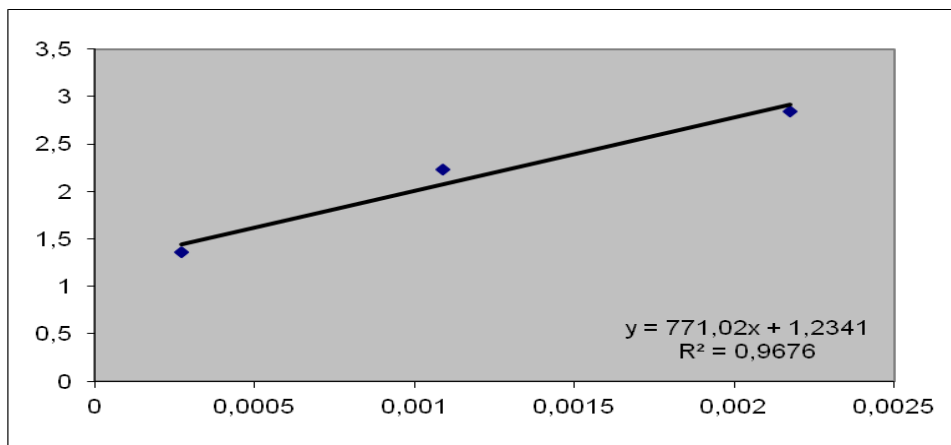
<u>C_s (mg/ml)</u>	<u>C_c (mg/ml)</u>
0.1	$217.3913 \cdot 10^{-05}$
0.05	$108.6957 \cdot 10^{-05}$
0.0125	$27.1739 \cdot 10^{-05}$

Απορρόφηση μαρτύρων (I_0)	Απορρόφηση συγκεντρώσεων εκχυλίσματος (I)		
	0.1	0.05	0.0125
29737	10871	13881	22815
32086	9770	16345	24558
30921	9230	11530	24553
M.O=30914.66667			

Στη συνέχεια υπολογίζεται ο λόγος I_0/I για κάθε μια από τις τρεις συγκεντρώσεις

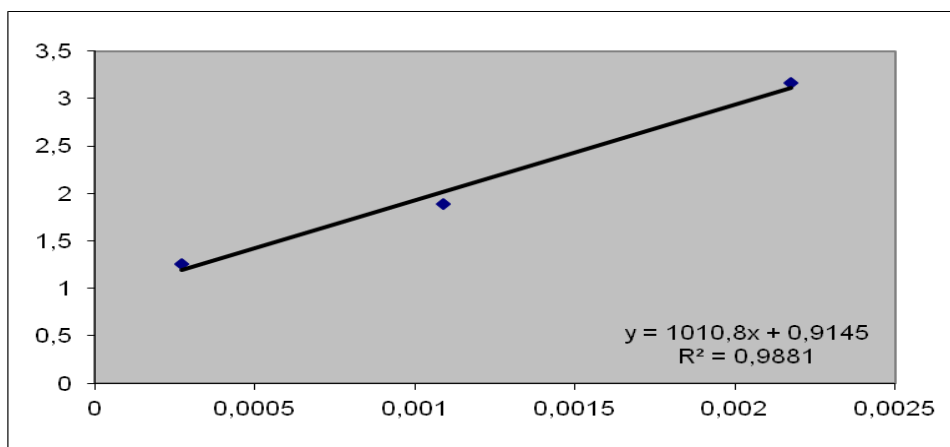
<u>I_0/I (0.1)</u>	<u>I_0/I (0.05)</u>	<u>I_0/I (0.0125)</u>
2.843773955	2.227121	1.355015
3.164244285	1.891384	1.258843
3.349368003	2.681237	1.259099

<u>X= C_c(mg/ml)</u>	<u>Y= I₀/I</u>
217.3913*10 ⁻⁰⁵	2.843773955
108.6957*10 ⁻⁰⁵	2.227121005
27.1739*10 ⁻⁰⁵	1.355014976



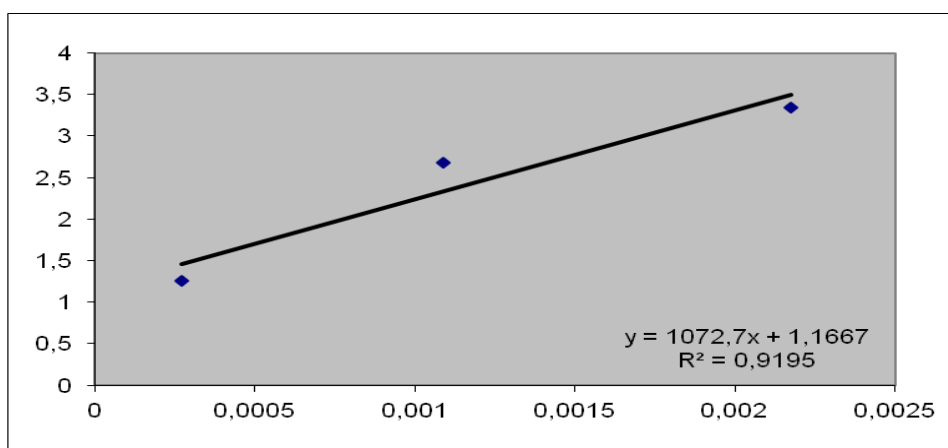
και IC₅₀= 99.3359*10⁻⁵mg/ml ή 0.993359446μg/ml με AE= 1.006685

<u>X= C_c(mg/ml)</u>	<u>Y= I₀/I</u>
217.3913*10 ⁻⁰⁵	3.164244285
108.6957*10 ⁻⁰⁵	1.891383706
27.1739*10 ⁻⁰⁵	1.258843011



και IC₅₀= 107.3902*10⁻⁵mg/ml ή 1.07390186μg/ml με AE= 0.931184

<u>X= C_c(mg/ml)</u>	<u>Y= I₀/I</u>
217.3913*10 ⁻⁰⁵	3.349368003
108.6957*10 ⁻⁰⁵	2.681237352
27.1739*10 ⁻⁰⁵	1.259099363



και IC₅₀= 77.6825*10⁻⁵mg/ml ή 0.776824835μg/ml με AE= 1.287291

Από τις παραπάνω τιμές IC₅₀ και AE εξάγεται ο μέσος όρος που αντιπροσωπεύει την κατανομή του υπολείμματος του οξικού αιθυλεστέρα :

IC₅₀= 0.948028713 (±0.125445463) και AE= 1.05482 (±0.153541)

Κατανομή βουτανόλης

Οι τιμές των αραιώσεων που χρησιμοποιήθηκαν στην περίπτωση της κατανομής της βουτανόλης σε mg/ml είναι C_s= **0.3, 0.05** και **0.025**.

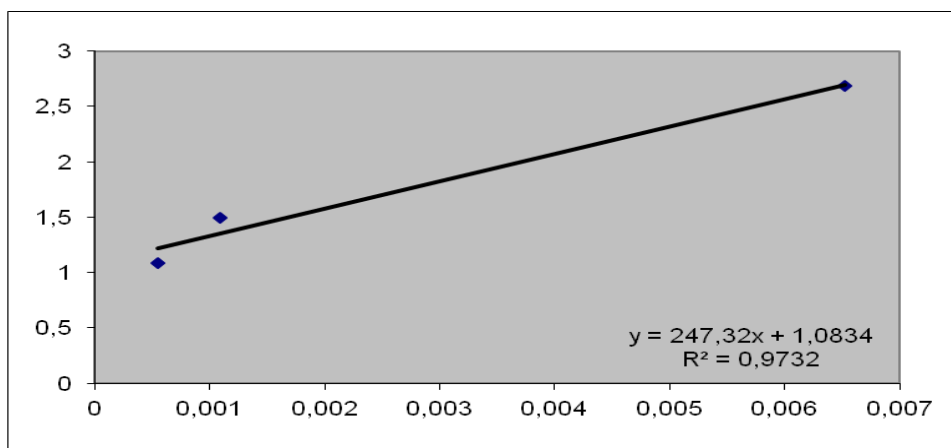
<u>C_s (mg/ml)</u>	<u>C_c (mg/ml)</u>
0.3	652.1739*10 ⁻⁰⁵
0.05	108.6957*10 ⁻⁰⁵
0.025	54.3478*10 ⁻⁰⁵

<u>Απορρόφηση μαρτύρων (I₀)</u>	<u>Απορρόφηση συγκεντρώσεων εκχυλίσματος (I)</u>		
	(0.3	- 0.05	- 0.025)
26826	9848	17689	24267
26028	11450	17250	24056
M.O.=26427	6988	19440	25268

Στη συνέχεια υπολογίζεται ο λόγος I₀/I για κάθε μια από τις τρεις συγκεντρώσεις

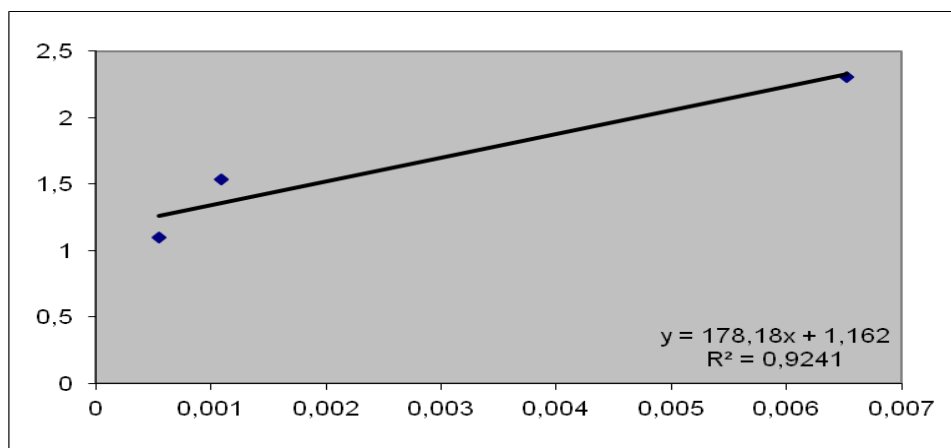
<u>$I_0/I(0.3)$</u>	<u>$I_0/I(0.05)$</u>	<u>$I_0/I(0.025)$</u>
2.683489033	1.493979	1.08901
2.308034934	1.532	1.098562
3.781768746	1.359414	1.045868

<u>$X = C_c(\text{mg/ml})$</u>	<u>$Y = I_0/I$</u>
$652.1739 \cdot 10^{-05}$	2.683489033
$108.6957 \cdot 10^{-05}$	1.493979309
$54.3478 \cdot 10^{-05}$	1.089009766



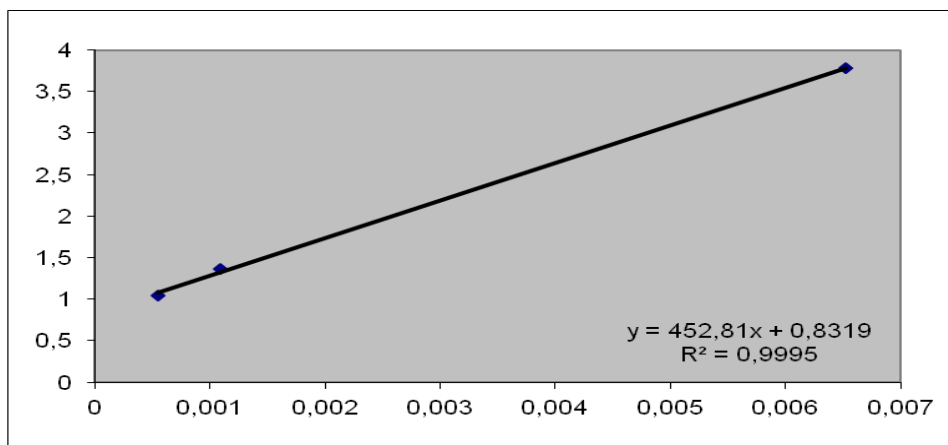
και $IC_{50} = 370.613 \cdot 10^{-5} \text{mg/ml}$ ή $3.70612971 \mu\text{g/ml}$ με $AE = 0.269823$

<u>$X = C_c(\text{mg/ml})$</u>	<u>$Y = I_0/I$</u>
$652.1739 \cdot 10^{-05}$	2.308034934
$108.6957 \cdot 10^{-05}$	1.532
$54.3478 \cdot 10^{-05}$	1.098561689



και $IC_{50} = 470.3109 \cdot 10^{-5} \text{mg/ml}$ ή $4.703109215 \mu\text{g/ml}$ με $AE = 0.212625$

<u>X= C_c(mg/ml)</u>	<u>Y= I₀/I</u>
652.1739*10 ⁻⁰⁵	3.781768746
108.6957*10 ⁻⁰⁵	1.35941358
54.3478*10 ⁻⁰⁵	1.045868292



και IC₅₀= 257.9669*10⁻⁵mg/ml ή 2.579669177μg/ml με AE= 0.387647

Από τις παραπάνω τιμές IC₅₀ και AE εξάγεται ο μέσος όρος που αντιπροσωπεύει την κατανομή της βουτανόλης:

IC₅₀= 3.662969368 (±0.867427811) και AE=0.290032 (±0.072867)

Υδατική κατανομή

Οι τιμές των αραιώσεων που χρησιμοποιήθηκαν στην περίπτωση της υδατικής κατανομής σε mg/ml είναι C_S= **0.4, 0.2** και **0.1**.

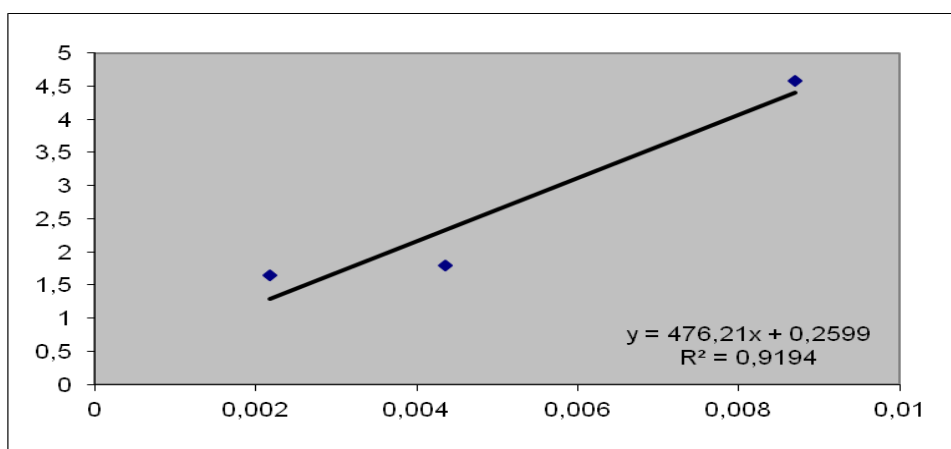
<u>C_S (mg/ml)</u>	<u>C_C (mg/ml)</u>
0.4	869.5652*10 ⁻⁰⁵
0.2	434.7826*10 ⁻⁰⁵
0.1	217.3913*10 ⁻⁰⁵

<u>Απορρόφηση μαρτύρων (I₀)</u>	<u>Απορρόφηση συγκεντρώσεων εκχυλίσματος (I)</u>		
	(0.4	- 0.2	- 0.1)
67250			
61644	13674	34785	37960
58898	13583	32165	39950
M.O=62597.3333			

Στη συνέχεια υπολογίζεται ο λόγος I₀/I για κάθε μια από τις τρεις συγκεντρώσεις

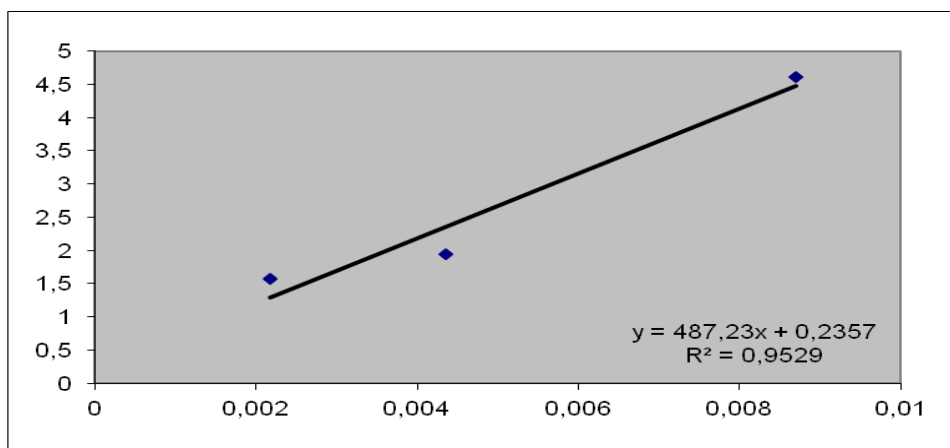
<u>I₀/I (0.4)</u>	<u>I₀/I (0.2)</u>	<u>I₀/I (0.1)</u>
4.577836283	1.79955	1.649034
4.60850573	1.946132	1.566892

<u>X= C_c(mg/ml)</u>	<u>Y= I₀/I</u>
869.5652*10 ⁻⁰⁵	4.577836283
434.7826*10 ⁻⁰⁵	1.799549614
217.3913*10 ⁻⁰⁵	1.649034071



και IC₅₀ = 365.406*10⁻⁵mg/ml ή 3.654060184μg/ml με AE= 0.273668

<u>X= C_c(mg/ml)</u>	<u>Y= I₀/I</u>
869.5652*10 ⁻⁰⁵	4.60850573
434.7826*10 ⁻⁰⁵	1.946131924
217.3913*10 ⁻⁰⁵	1.566891948



και IC₅₀ = 362.11082*10⁻⁵mg/ml ή 3.621082446μg/ml με AE= 0.276161

Από τις παραπάνω τιμές IC₅₀ και ΑΕ εξάγεται ο μέσος όρος που αντιπροσωπεύει την υδατική κατανομή:

$$IC_{50} = 3.637571315 (\pm 0.016488869) \text{ και } AE = 0.274914 (\pm 0.001246)$$

Μεθανολικό εκχύλισμα (crude-pro κατανομών)

Οι τιμές των αραιώσεων που χρησιμοποιήθηκαν στην περίπτωση του μεθανολικού εκχυλίσματος σε mg/ml είναι C_S = **0.01**, **0.1** και **0.025**.

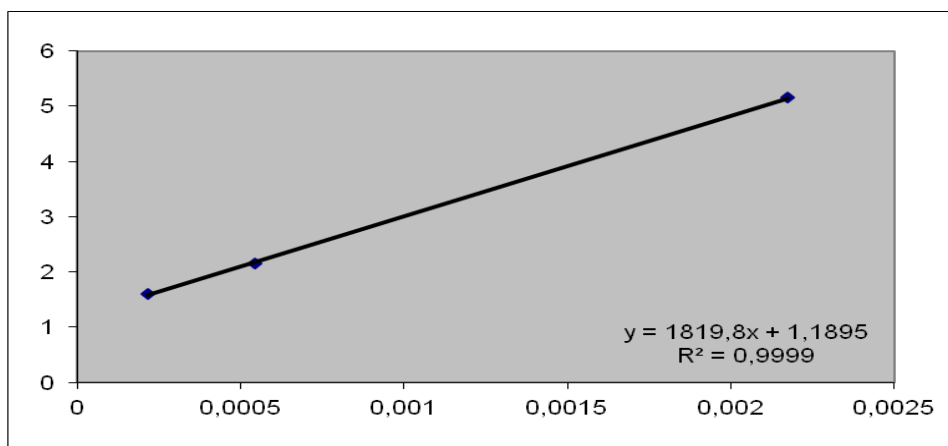
<u>C_S (mg/ml)</u>	<u>C_C (mg/ml)</u>
0.01	21.7391*10 ⁻⁰⁵
0.1	217.3913*10 ⁻⁰⁵
0.025	54.3478*10 ⁻⁰⁵

<u>Απορρόφηση μαρτύρων (I₀)</u>	<u>Απορρόφηση συγκεντρώσεων εκχυλίσματος (I)</u>		
	(0.01)	- 0.1	- 0.025)
20172	13430	4179	9971
22863	14700	5283	8979
M.O=21517.5			

Στη συνέχεια υπολογίζεται ο λόγος I₀/I για κάθε μια από τις τρεις συγκεντρώσεις

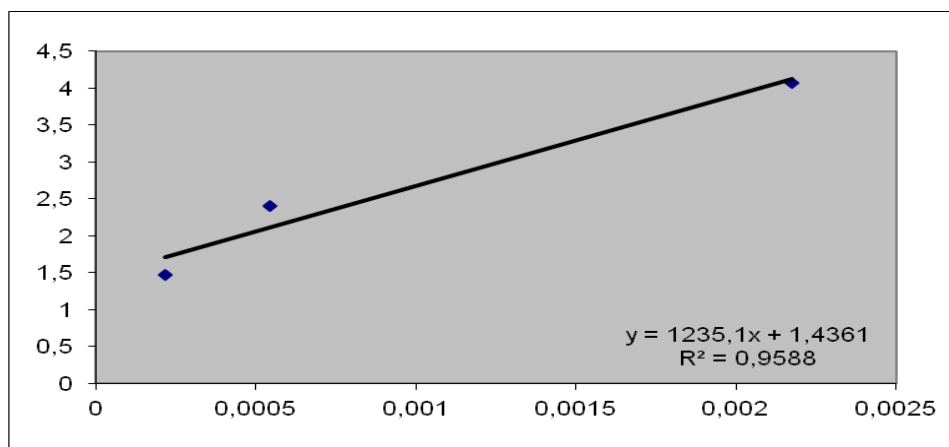
<u>I₀/I (0.01)</u>	<u>I₀/I (0.1)</u>	<u>I₀/I (0.025)</u>
1.602196575	5.148959081	2.158008
1.46377551	4.072969903	2.396425

<u>X= C_C(mg/ml)</u>	<u>Y= I₀/I</u>
21.7391*10 ⁻⁰⁵	1,602196575
217.3913*10 ⁻⁰⁵	5,148959081
54.3478*10 ⁻⁰⁵	2,158008224



και $IC_{50} = 44.5379 \cdot 10^{-5} \text{ mg/ml}$ ή $0.445378613 \mu\text{g/ml}$ με $AE = 2.245280691$

<u>X= C_c(mg/ml)</u>	<u>Y= I₀/I</u>
$21.7391 \cdot 10^{-05}$	1.46377551
$217.3913 \cdot 10^{-05}$	4.072969903
$54.3478 \cdot 10^{-05}$	2.396424992



και $IC_{50} = 45.6562 \cdot 10^{-5} \text{ mg/ml}$ ή $0.45652222 \mu\text{g/ml}$ με $AE = 2.190281965$

Από τις παραπάνω τιμές IC_{50} και AE εξάγεται ο μέσος όρος που αντιπροσωπεύει το μεθανολικό εκχύλισμα:

$IC_{50} = 0.450970417 (\pm 0.005591804)$ και
 $AE = 2.21744035 (\pm 0.027500068)$

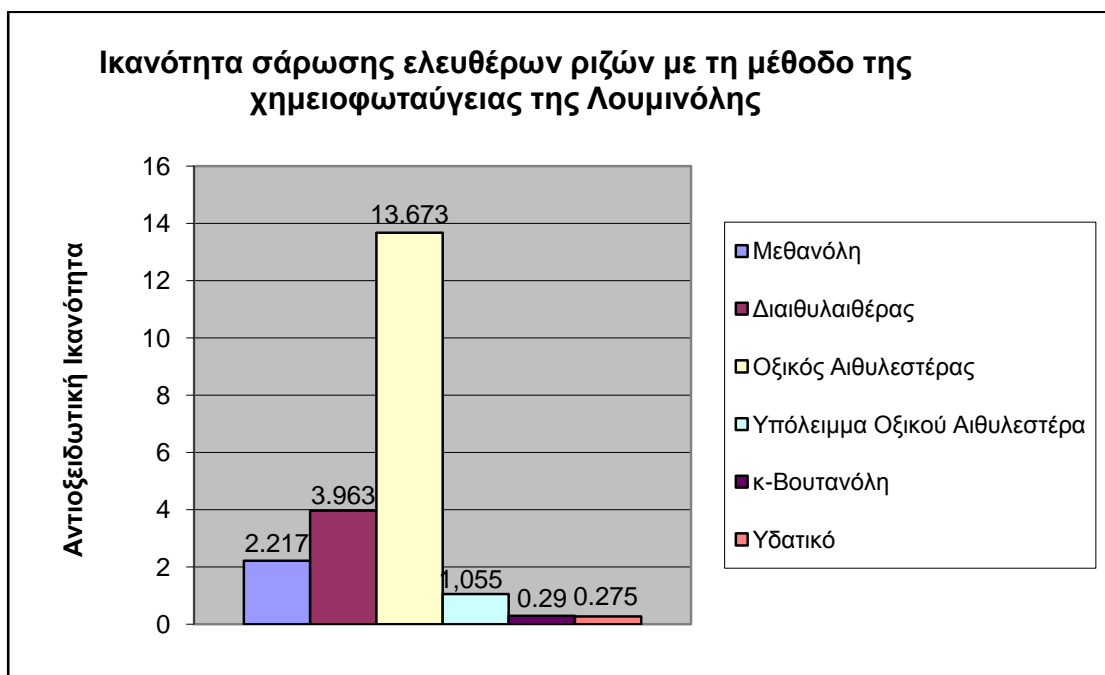
Ένα μεγάλο εύρος αντιοξειδωτικών ικανοτήτων παρατηρήθηκε επίσης για τα αποτελέσματα της χημειοφωταύγειας της λουμινόλης που εκφράστηκαν σαν συγκέντρωση που επιτυγχάνει αναστολή κατά 50% (IC_{50}). Οι τιμές αυτές κυμάνθηκαν από 0.073 έως 3.663 mg ξηρού εκχυλίσματος/ml. Όπως και στην περίπτωση της δοκιμής του DPPH*, το κλάσμα του οξικού αιθυλεστέρα εμφάνισε το υψηλότερο αντιοξειδωτικό δυναμικό, 4.5 φορές πιο ισχυρό από την κβερκετίνη. Χαμηλότερες τιμές αντιοξειδωτικής ικανότητας είχαν τα κλάσματα του διαιθυλαιθέρα και του μεθανολικού εκχυλίσματος, αλλά και πάλι ήταν μεγαλύτερες από το τρόλοξ, ενώ αντίθετα εξαιρετικά χαμηλές τιμές έδωσαν η βουτανολική και η υδατική κατανομή. Τα αποτελέσματα της αντιοξειδωτικής δράσης όλων των κατανομών με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας της λουμινόλης, επαγόμενης από το σύμπλοκο Co(II)-EDTA παρουσιάζονται παρακάτω:

Μέθοδος Χημειοφωταύγειας της Λουμινόλης, επαγόμενης από το σύμπλοκο Co(II)-EDTA		
Δείγμα	$IC_{50} \pm SD^*$	AE
Μεθανόλης	0.4510 \pm 0.0056	2.217
Διαιθυλαιθέρα	0.2568 \pm 0.03	3.963
Οξικού Αιθυλεστέρα	0.073137 \pm 0.00002	13.673
Υπολείμματος Οξικού Αιθυλεστέρα	0.9480 \pm 0.125	1.054
Βουτανόλης	3.6630 \pm 0.867	0.290
Υδατικό	3.6376 \pm 0.016	0.275

$IC_{50} \pm SD$: Αποτελεσματική Συγκέντρωση (Efficient Concentration) σε (μ g antioxidant / ml): η ποσότητα του αντιοξειδωτικού που απαιτείται για να μειωθεί η αρχική ένταση της χημειοφωταύγειας της λουμινόλης κατά 50%

**Ο όρος IC_{50} δεν χρησιμοποιείται με την κυριολεκτική του έννοια, καθώς αναφέρεται σε επίπεδο καθαρής ουσίας-ένωσης, αλλά σε επίπεδο μέσης δραστηρικής συγκέντρωσης εκχυλίσματος.

AE: Αντιοξειδωτική Ικανότητα (Antiradical Efficiency): $1/IC_{50}$



ΑΕ_{κβερκετίνης}: 3.125

ΑΕ_{τρόλος}: 0.4

Αντιοξειδωτική ικανότητα όλων των κατανομών όπως υπολογίστηκε με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας της Λουμινόλης, επαγόμενη από το σύμπλοκο Co(II)-EDTA

In vitro μελέτη της ικανότητας αναστολής της αναγωγής της αλδόζης (ALR2)

Ο προσδιορισμός της ικανότητας αναστολής του ενζύμου αναγωγή της αλδόζης πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που αναφέρεται από τους Nicolaou και συνεργάτες (2003, 2004). Για τη διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 0.067M (pH=6.2), διάλυμα NADPH 0.104mM το οποίο παρασκευάζεται λίγο πριν την έναρξη του πειράματος και διατηρείται σε πάγο, διάλυμα DL-γλυκεραλδεΐδης 10mM το οποίο επίσης παρασκευάζεται λίγο πριν την έναρξη του πειράματος και διατηρείται σε πάγο, κορεσμένο διάλυμα $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ και τέλος υδατικά διαλύματα των δειγμάτων υπό έλεγχο σε συγκεντρώσεις από 10^{-4}M έως 10^{-6}M .

Για την προετοιμασία του ενζύμου αναγωγή της αλδόζης, φακοί αφαιρέθηκαν από επίμυες Fischer-344 αρσενικά και θηλυκά μετά από ευθανασία. Ομογενοποιήθηκαν δέκα φακοί σε 5ml νερό υπό ψύξη. Ακολούθησε φυγοκέντρωση (10000rpm/15min) στους 0°C . Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και αναμείχθηκε με κορεσμένο διάλυμα $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ σε αναλογία 4,5 ml υπερκείμενο / 3 ml κορεσμένο διάλυμα $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, έτσι ώστε να προκύψει κορεσμός 40%. Ακολούθησε εκ νέου φυγοκέντρωση σε 10000rpm/15min στους 0°C . Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και διατηρήθηκε στους -80°C , το μέγιστο για 24 ώρες. Το γεγονός ότι επιλέχθηκε ένζυμο που λαμβάνεται από φακούς επιμύων δεν επηρεάζει τα αποτελέσματα, διότι το ένζυμο από τους φακούς επιμύων και το αντίστοιχο από άνθρωπο, εμφανίζουν 89% ομολογία στην αλληλουχία των αμινοξέων, ενώ και τα ενεργά κέντρα των ενζύμων είναι ταυτόσημα (Gui T. et al., 1995).

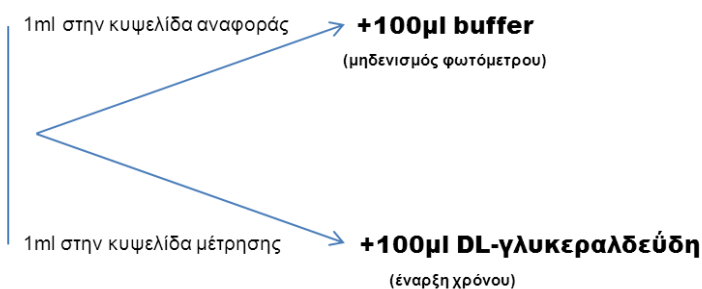
Η δραστηριότητα του ενζύμου πριν τον έλεγχο των υπό εξέταση δειγμάτων ελέγχεται φασματοφωτομετρικά στους 30°C με προσδιορισμό της ελάττωσης της συγκέντρωσης του NADPH σε μήκος κύματος 340nm. Το μείγμα της αντίδρασης περιέχει 2.4ml ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 0.067M (pH=6.2), 100μl διάλυμα NADPH 0.104mM, 100μl διάλυμα DL-γλυκεραλδεΐδης 10mM και 300μl υπερκείμενο του ενζυμικού παρασκευάσματος σε τελικό όγκο 1.1ml. Το δείγμα αναφοράς περιέχει όλα τα παραπάνω εκτός από το υπόστρωμα DL-γλυκεραλδεΐδη, για τυχόν διόρθωση της οξειδωσης του NADPH που δεν συνδέεται με την αναγωγή

του υποστρώματος. Η καταλυόμενη από το ένζυμο αντίδραση αρχίζει με την προσθήκη του υποστρώματος και παρακολουθείται για χρονικό διάστημα 5 λεπτών, μετά από ισορρόπηση της αντίδρασης για 1 λεπτό. Η δραστηριότητα του ενζύμου ρυθμίζεται με την αραιώση του υπερκείμενου με δις- απεσταγμένο νερό, έτσι ώστε η ταχύτητα της αντίδρασης να είναι ~0,02 ή 0,01 μονάδες απορρόφησης ανά λεπτό. Η επίδραση των αναστολέων στην δραστηριότητα του ενζύμου υπολογίζεται με τη προσθήκη 100μl υδατικού διαλύματος 10% DMSO του αναστολέα στο μείγμα. Γίνεται επίσης προσθήκη του αντίστοιχου αναστολέα και στο δείγμα αναφοράς, για τη διόρθωση τυχούσας απορρόφησης που μπορεί να οφείλεται στον αναστολέα.

Πείραμα μάρτυρα (control):

Αναμειξη:

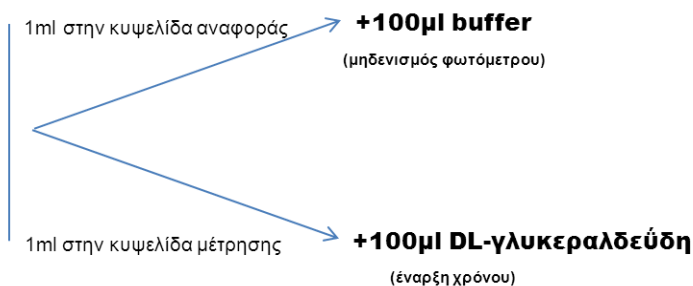
Buffer : 2.4ml
NADPH : 100μl
Ένζυμο : 300μl
NaHCO₃ ή 10% DMSO: 100μl



Πείραμα με αναστολέα:

Αναμειξη:

Buffer : 2.4ml
NADPH : 100μl
Ένζυμο : 300μl
90μl H₂O+10μl ουσία σε DMSO



Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων υπολογίζεται το ποσοστό της αναστολής του ενζύμου με σύγκριση της ταχύτητας αντίδρασης του διαλύματος που περιέχει υπόστρωμα και αναστολέα σε σχέση με το διάλυμα που περιέχει μόνο υπόστρωμα (control). Το αποτέλεσμα προκύπτει σύμφωνα με τον ακόλουθο τύπο:

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

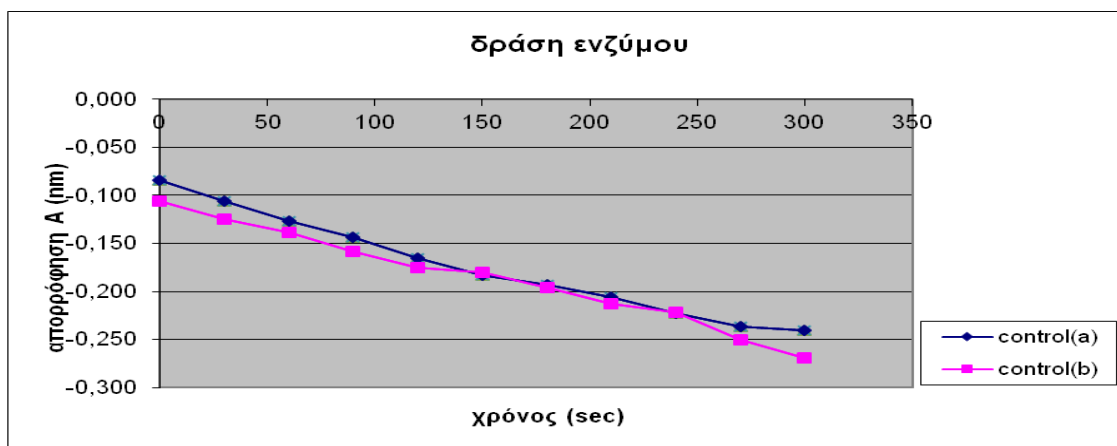
Σε περιπτώσεις που ελέγχονται μείγματα ουσιών τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σαν % ανασταλτικές δράσεις και τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος από τρεις διαφορετικές μετρήσεις με τυπική απόκλιση (SD) < 10%.

Εκτίμηση της ικανότητας αναστολής του ενζύμου αναγωγή της αλδόζης (ALR2)

Κατανομή διαιθυλιθέρα

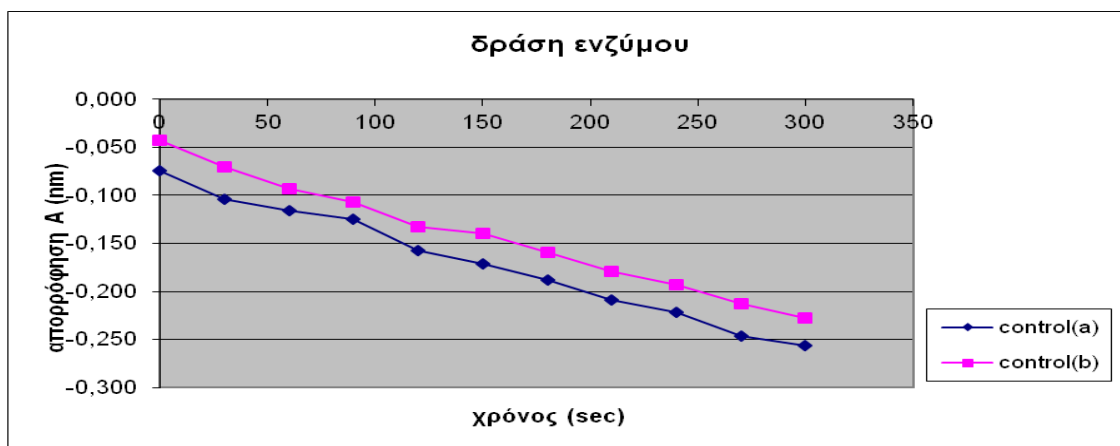
Συγκέντρωση δείγματος 50μg/ml

<u>ΧΡΟΝΟΣ</u>		<u>ΜΑΡΤΥΡΑΣ (control)</u>		<u>Abs (340nm)</u>	
	0s	-0,084	-0,106	-0,053	-0,045
	30s	-0,106	-0,125	-0,057	-0,061
1 min	60s	-0,127	-0,139	-0,058	-0,051
	90s	-0,144	-0,158	-0,063	-0,059
2 min	120s	-0,165	-0,175	-0,073	-0,062
	150s	-0,183	-0,180	-0,073	-0,065
3 min	180s	-0,193	-0,196	-0,079	-0,064
	210s	-0,206	-0,213	-0,081	-0,067
4 min	240s	-0,223	-0,222	-0,082	-0,069
	270s	-0,237	-0,250	-0,083	-0,07
5 min	300s	-0,241	-0,269	-0,084	-0,083
Ταχύτητα αντίδρασης (μον./min)		0.0314	0.0326	0.0062	0.0076
M.O. Ταχύτητας αντίδρασης (μον./min)		0.032		0.0069	
	<i>St.Dev</i>	0.000848528		0.000989949	
		157	163	31	38
% Αναστολή				80.63	76.25
M.O (% Αναστολής)				78.44	
	<i>St.Dev</i>			3.093592168	



Συγκέντρωση δείγματος 25μg/ml

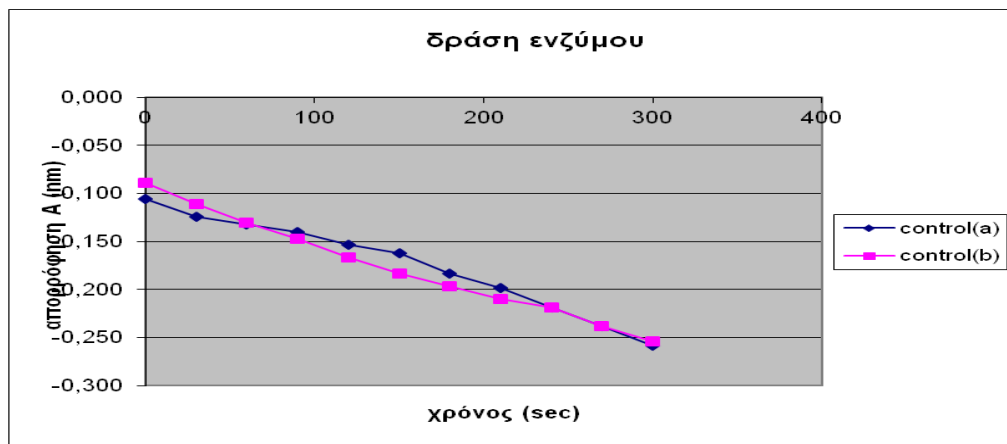
<u>ΧΡΟΝΟΣ</u>		<u>ΜΑΡΤΥΡΑΣ (control)</u>		<u>Abs (340nm)</u>	
	0s	-0,074	-0,043	-0,043	-0,041
	30s	-0,104	-0,070	-0,052	-0,045
1min	60s	-0,116	-0,093	-0,057	-0,055
	90s	-0,125	-0,107	-0,068	-0,063
2 min	120s	-0,157	-0,133	-0,059	-0,068
	150s	-0,171	-0,140	-0,087	-0,073
3 min	180s	-0,188	-0,159	-0,088	-0,083
	210s	-0,209	-0,179	-0,088	-0,091
4 min	240s	-0,222	-0,193	-0,107	-0,097
	270s	-0,246	-0,213	-0,101	-0,104
5 min	300s	-0,256	-0,228	-0,114	-0,111
Ταχύτητα αντίδρασης (μον./min)		0.0364	0.0370	0.0142	0.0140
M.O. Ταχύτητας αντίδρασης (μον./min)		0.0367		0.0141	
<i>St.Dev</i>		0,000424264		0,000141421	
		182	185	71	70
% Αναστολή				61.31	61.85
M.O (% Αναστολής)				61.58	
<i>St.Dev</i>				0,385344295	



Κατανομή οξικού αιθυλεστέρα

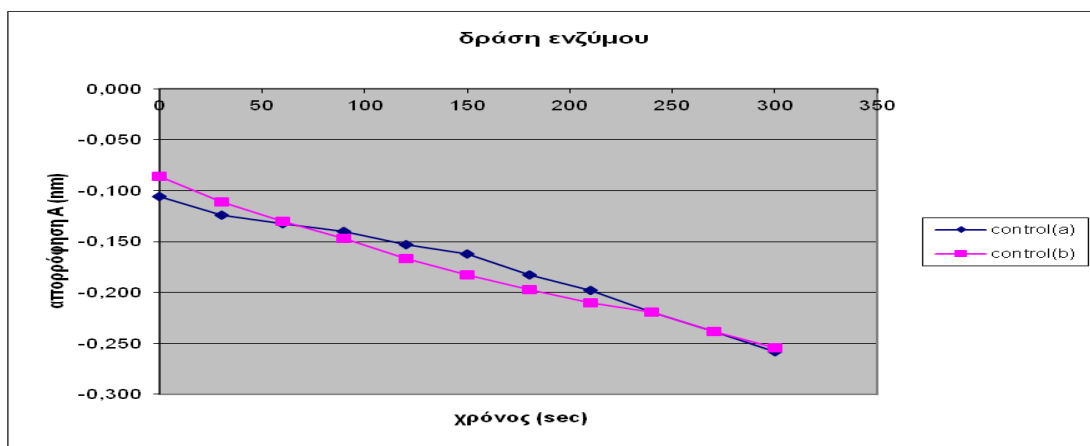
Συγκέντρωση δείγματος 50μg/ml

<u>ΧΡΟΝΟΣ</u>		<u>ΜΑΡΤΥΡΑΣ (control)</u>		<u>Abs (340nm)</u>	
	0s	-0,106	-0,089	-0,101	-0,101
	30s	-0,124	-0,111	-0,106	-0,099
1min	60s	-0,132	-0,130	-0,106	-0,101
	90s	-0,140	-0,147	-0,106	-0,099
2 min	120s	-0,153	-0,167	-0,112	-0,102
	150s	-0,162	-0,183	-0,112	-0,107
3 min	180s	-0,183	-0,197	-0,130	-0,107
	210s	-0,198	-0,210	-0,135	-0,117
4 min	240s	-0,219	-0,219	-0,135	-0,125
	270s	-0,238	-0,238	-0,136	-0,124
5 min	300s	-0,258	-0,254	-0,137	-0,132
Ταχύτητα αντίδρασης (μον./min)		0.0304	0.0330	0.0072	0.0062
M.O. Ταχύτητας αντίδρασης (μον./min)		0.0317		0.0067	
<i>St.Dev</i>		<i>0,001838478</i>		<i>0,000707107</i>	
		152	165	36	31
% Αναστολή				77.29	80.44
M.O (% Αναστολής)				78.86	
<i>St.Dev</i>				<i>2,230620761</i>	



Συγκέντρωση δείγματος 25μg/ml

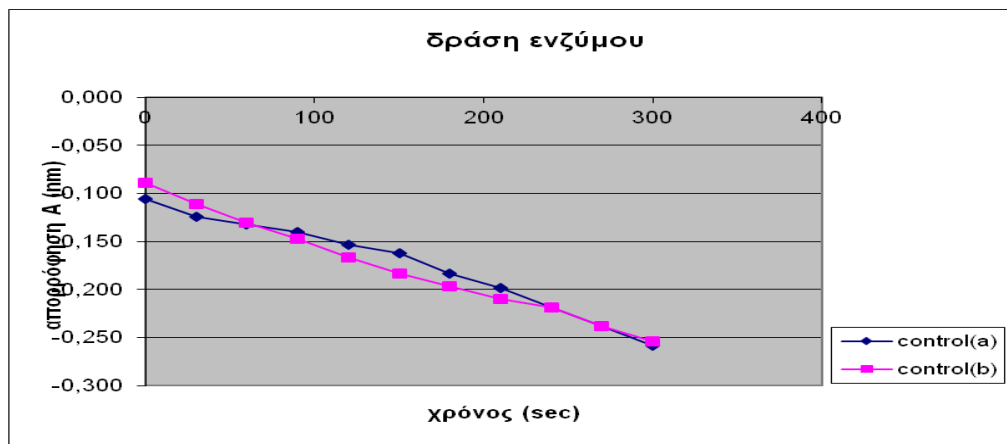
<u>ΧΡΟΝΟΣ</u>		<u>ΜΑΡΤΥΡΑΣ (control)</u>		<u>Abs (340nm)</u>	
	0s	-0,106	-0,086	-0,023	-0,032
	30s	-0,124	-0,111	-0,023	-0,042
1min	60s	-0,132	-0,130	-0,036	-0,042
	90s	-0,140	-0,147	-0,036	-0,049
2 min	120s	-0,153	-0,167	-0,047	-0,052
	150s	-0,162	-0,183	-0,052	-0,061
3 min	180s	-0,183	-0,197	-0,049	-0,066
	210s	-0,198	-0,210	-0,053	-0,072
4 min	240s	-0,219	-0,219	-0,062	-0,073
	270s	-0,238	-0,238	-0,062	-0,081
5 min	300s	-0,258	-0,254	-0,074	-0,088
Ταχύτητα αντίδρασης (μον./min)		0.0304	0.0336	0.0102	0.0112
M.O. Ταχύτητας αντίδρασης (μον./min)		0.032		0.0107	
	<i>St.Dev</i>	0,002262742		0,000707107	
		152	168	51	56
% Αναστολή				68.13	65.00
M.O (% Αναστολής)				66.56	
	<i>St.Dev</i>			2,209708691	



Κατανομή υπολειμματος οξικού αιθυλεστερά

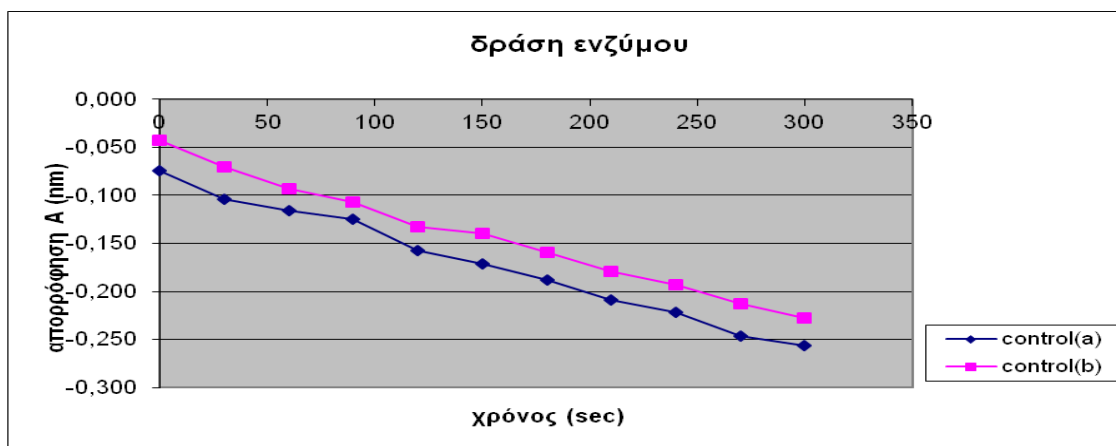
Συγκέντρωση δείγματος 50μg/ml

<u>ΧΡΟΝΟΣ</u>		<u>ΜΑΡΤΥΡΑΣ (control)</u>		<u>Abs (340nm)</u>	
	0s	-0,106	-0,089	-0,097	-0,074
	30s	-0,124	-0,111	-0,104	-0,078
1min	60s	-0,132	-0,130	-0,104	-0,073
	90s	-0,140	-0,147	-0,104	-0,078
2 min	120s	-0,153	-0,167	-0,104	-0,091
	150s	-0,162	-0,183	-0,104	-0,094
3 min	180s	-0,183	-0,197	-0,104	-0,104
	210s	-0,198	-0,210	-0,108	-0,104
4 min	240s	-0,219	-0,219	-0,112	-0,104
	270s	-0,238	-0,238	-0,122	-0,104
5 min	300s	-0,258	-0,254	-0,123	-0,104
Ταχύτητα αντίδρασης (μον./min)		0.0304	0.0330	0.0052	0.0060
M.O. Ταχύτητας αντίδρασης (μον./min)		0.0317		0.0056	
<i>St.Dev</i>		<i>0,001838478</i>		<i>0,000565685</i>	
		152	165	26	30
% Αναστολή				83.60	81.07
M.O (% Αναστολής)				82.33	
<i>St.Dev</i>				<i>1,784496609</i>	



Συγκέντρωση δείγματος 25μg/ml

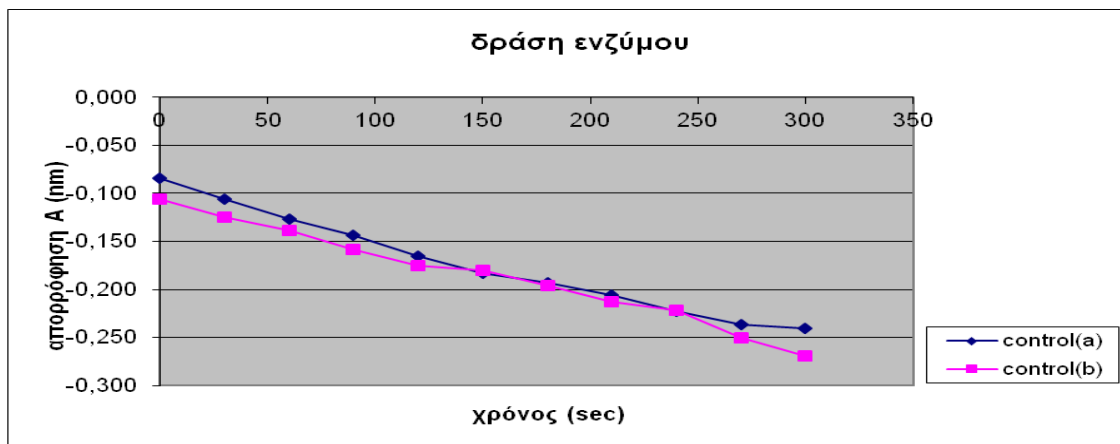
<u>ΧΡΟΝΟΣ</u>		<u>ΜΑΡΤΥΡΑΣ (control)</u>		<u>Abs (340nm)</u>	
	0s	-0,074	-0,043	-0,040	-0,053
	30s	-0,104	-0,070	-0,046	-0,065
1min	60s	-0,116	-0,093	-0,057	-0,071
	90s	-0,125	-0,107	-0,061	-0,072
2 min	120s	-0,157	-0,133	-0,061	-0,075
	150s	-0,171	-0,140	-0,054	-0,071
3 min	180s	-0,188	-0,159	-0,067	-0,076
	210s	-0,209	-0,179	-0,072	-0,087
4 min	240s	-0,222	-0,193	-0,075	-0,088
	270s	-0,246	-0,213	-0,075	-0,088
5 min	300s	-0,256	-0,228	-0,080	-0,097
Ταχύτητα αντίδρασης (μον./min)		0.0364	0.0370	0.0080	0.0088
M.O. Ταχύτητας αντίδρασης (μον./min)		0.0367		0.0084	
St.Dev		0,000424264		0,000565685	
		182	185	40	44
% Αναστολή				78.20	76.02
M.O (% Αναστολής)				77.11	
St.Dev				1,54137718	



Κατανομή βουτανόλης

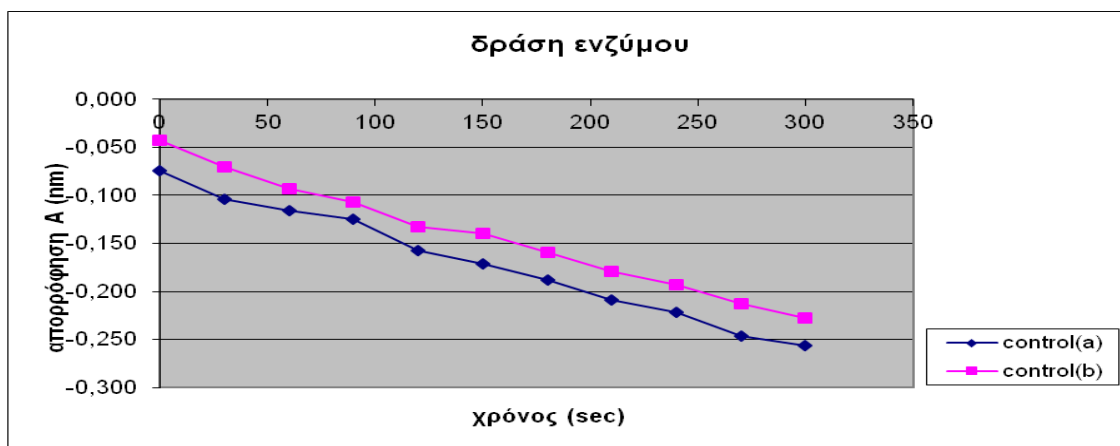
Συγκέντρωση δείγματος 50μg/ml

<u>ΧΡΟΝΟΣ</u>		<u>ΜΑΡΤΥΡΑΣ (control)</u>		<u>Abs (340nm)</u>	
	0s	-0,084	-0,106	-0,054	-0,057
	30s	-0,106	-0,125	-0,064	-0,059
1min	60s	-0,127	-0,139	-0,064	-0,069
	90s	-0,144	-0,158	-0,069	-0,072
2 min	120s	-0,165	-0,175	-0,079	-0,075
	150s	-0,183	-0,180	-0,084	-0,075
3 min	180s	-0,193	-0,196	-0,086	-0,076
	210s	-0,206	-0,213	-0,094	-0,080
4 min	240s	-0,223	-0,222	-0,091	-0,081
	270s	-0,237	-0,250	-0,097	-0,084
5 min	300s	-0,241	-0,269	-0,106	-0,090
Ταχύτητα αντίδρασης (μον./min)		0.0314	0.0326	0.0103	0.0067
M.O. Ταχύτητας αντίδρασης (μον./min)		0.032		0.0085	
<i>St.Dev</i>		<i>0,000848528</i>		<i>0,000565685</i>	
		157	163	52	33
% Αναστολή				67.81	79.06
M.O (% Αναστολής)				73.435	
<i>St.Dev</i>				<i>1,767766953</i>	



Συγκέντρωση δείγματος 25μg/ml

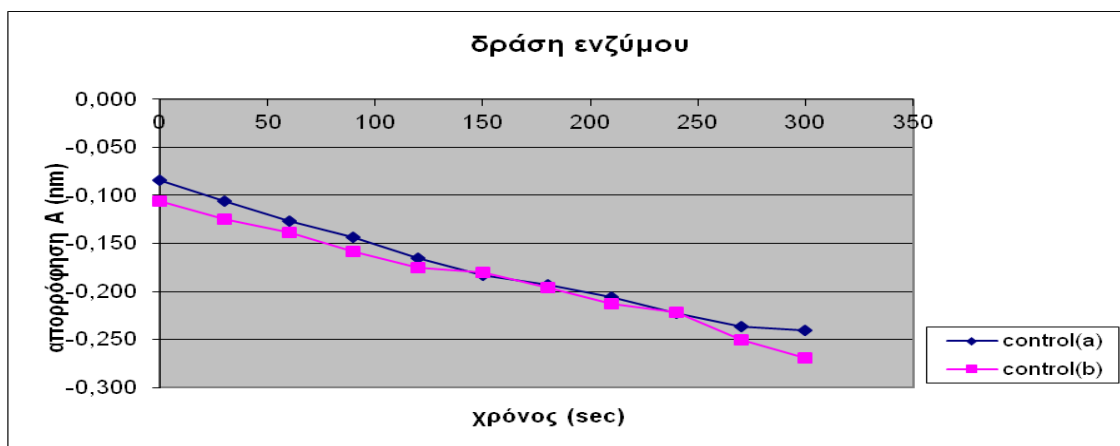
<u>ΧΡΟΝΟΣ</u>		<u>ΜΑΡΤΥΡΑΣ (control)</u>		<u>Abs (340nm)</u>	
	0s	-0,074	-0,043	-0,049	-0,033
	30s	-0,104	-0,070	-0,059	-0,043
1min	60s	-0,116	-0,093	-0,069	-0,047
	90s	-0,125	-0,107	-0,074	-0,048
2 min	120s	-0,157	-0,133	-0,085	-0,049
	150s	-0,171	-0,140	-0,095	-0,049
3 min	180s	-0,188	-0,159	-0,105	-0,057
	210s	-0,209	-0,179	-0,113	-0,062
4 min	240s	-0,222	-0,193	-0,121	-0,064
	270s	-0,246	-0,213	-0,129	-0,070
5 min	300s	-0,256	-0,228	-0,139	-0,075
Ταχύτητα αντίδρασης (μον./min)		0.0364	0.0370	0.018	0.0085
M.O. Ταχύτητας αντίδρασης (μον./min)		0.0367		0.01325	
<i>St.Dev</i>		<i>0,000424264</i>		<i>0,0013435025</i>	
		182	185	90	43
% Αναστολή				50.95	76.84
M.O (% Αναστολής)				63.895	
<i>St.Dev</i>				<i>3,6607708015</i>	



Υδατική κατανομή

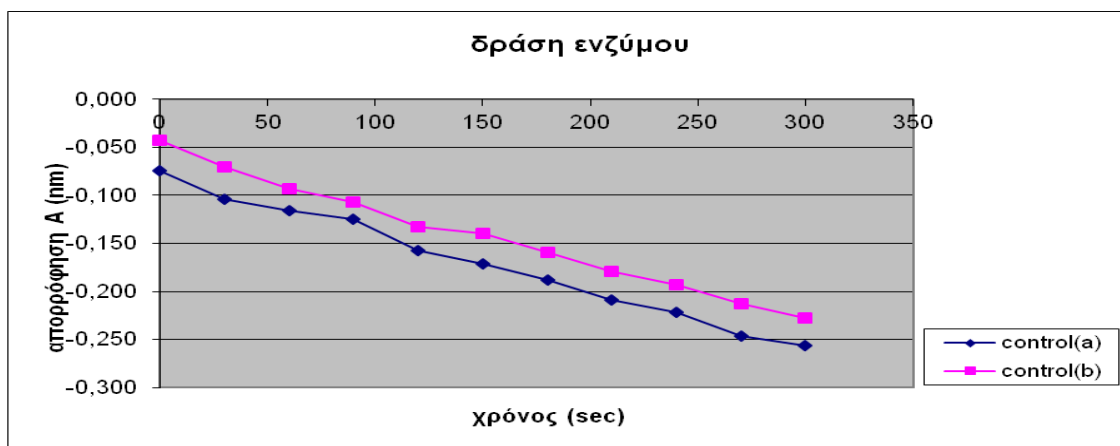
Συγκέντρωση δείγματος 50μg/ml

<u>ΧΡΟΝΟΣ</u>		<u>ΜΑΡΤΥΡΑΣ (control)</u>		<u>Abs (340nm)</u>	
	0s	-0,084	-0,106	-0,053	-0,033
	30s	-0,106	-0,125	-0,065	-0,046
1 min	60s	-0,127	-0,139	-0,070	-0,055
	90s	-0,144	-0,158	-0,071	-0,065
2 min	120s	-0,165	-0,175	-0,073	-0,066
	150s	-0,183	-0,180	-0,088	-0,077
3 min	180s	-0,193	-0,196	-0,098	-0,079
	210s	-0,206	-0,213	-0,101	-0,089
4 min	240s	-0,223	-0,222	-0,109	-0,095
	270s	-0,237	-0,250	-0,124	-0,104
5 min	300s	-0,241	-0,269	-0,131	-0,107
Ταχύτητα αντίδρασης (μον./min)		0.0314	0.0326	0.0156	0.0148
M.O. Ταχύτητας αντίδρασης (μον./min)		0.032		0.0152	
<i>St.Dev</i>		<i>0,000848528</i>		<i>0,000565685</i>	
		157	163	78	74
% Αναστολή				51.25	53.75
M.O (% Αναστολής)				52.50	
<i>St.Dev</i>				<i>1,767766953</i>	



Συγκέντρωση δείγματος 25μg/ml

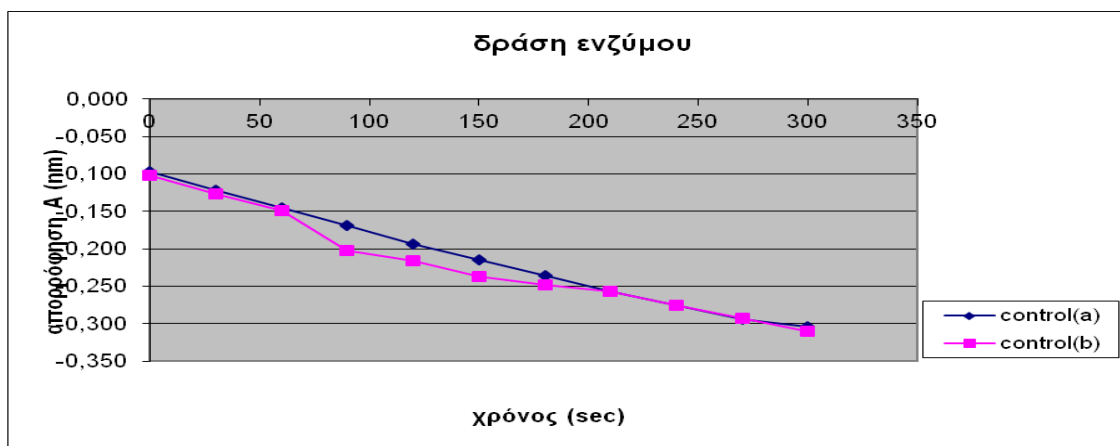
<u>ΧΡΟΝΟΣ</u>		<u>ΜΑΡΤΥΡΑΣ (control)</u>		<u>Abs (340nm)</u>	
	0s	-0,074	-0,043	-0,057	-0,066
	30s	-0,104	-0,070	-0,068	-0,077
1min	60s	-0,116	-0,093	-0,079	-0,086
	90s	-0,125	-0,107	-0,090	-0,106
2 min	120s	-0,157	-0,133	-0,100	-0,115
	150s	-0,171	-0,140	-0,115	-0,133
3 min	180s	-0,188	-0,159	-0,128	-0,141
	210s	-0,209	-0,179	-0,140	-0,153
4 min	240s	-0,222	-0,193	-0,156	-0,166
	270s	-0,246	-0,213	-0,167	-0,182
5 min	300s	-0,256	-0,228	-0,184	-0,198
Ταχύτητα αντίδρασης (μον./min)		0.0364	0.0370	0.0254	0.0264
M.O. Ταχύτητας αντίδρασης (μον./min)		0.0367		0.0259	
	<i>St.Dev</i>	0,000424264		0,000707107	
		182	185	127	132
% Αναστολή				30.79	28.07
M.O (% Αναστολής)				29.43	
	<i>St.Dev</i>			1,926721475	



Εκχύλισμα διχλωρομεθανίου

Συγκέντρωση δείγματος 50μg/ml

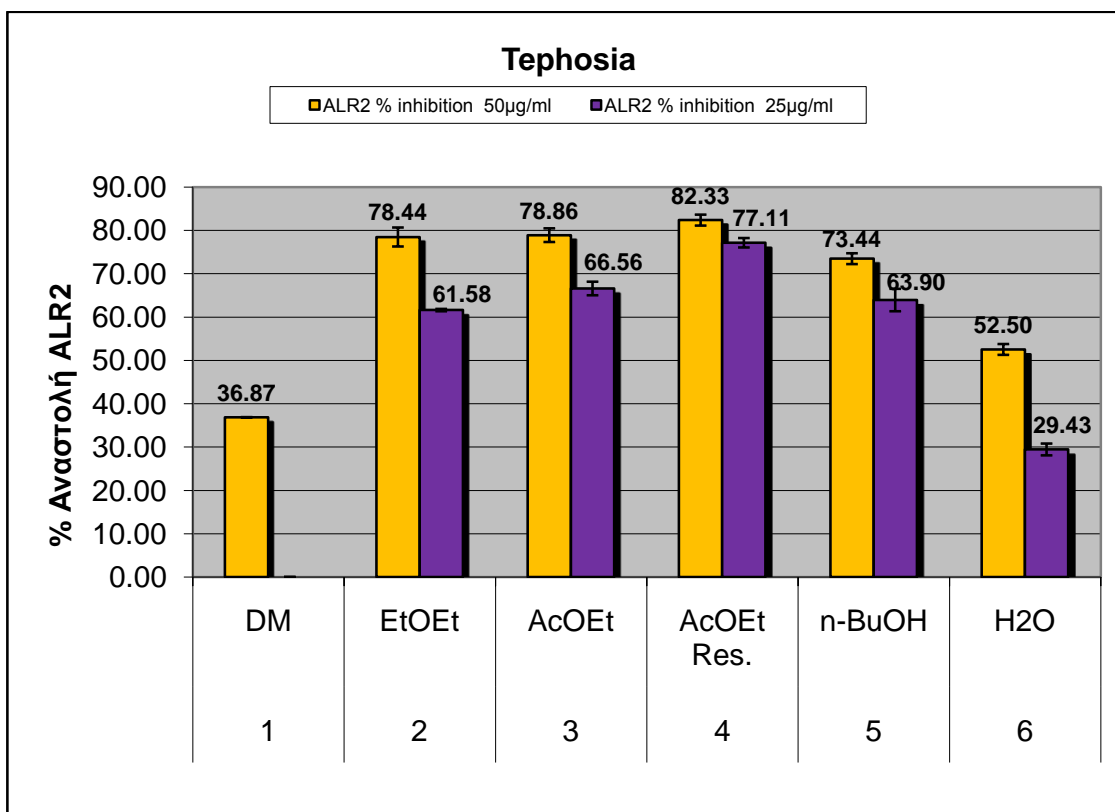
<u>ΧΡΟΝΟΣ</u>		<u>ΜΑΡΤΥΡΑΣ (control)</u>		<u>Abs (340nm)</u>	
	0s	-0,097	-0,102	-0,110	-0,050
	30s	-0,122	-0,126	-0,124	-0,063
1min	60s	-0,145	-0,149	-0,137	-0,075
	90s	-0,169	-0,202	-0,151	-0,088
2 min	120s	-0,193	-0,216	-0,164	-0,102
	150s	-0,215	-0,237	-0,177	-0,113
3 min	180s	-0,236	-0,248	-0,190	-0,128
	210s	-0,257	-0,257	-0,203	-0,141
4 min	240s	-0,275	-0,275	-0,217	-0,155
	270s	-0,294	-0,293	-0,230	-0,168
5 min	300s	-0,304	-0,310	-0,241	-0,181
Ταχύτητα αντίδρασης (μον./min)		0.0414	0.0416	0.0262	0.0262
M.O. Ταχύτητας αντίδρασης (μον./min)		0.0415		0.0262	
<i>St.Dev</i>		<i>0,000141421</i>		<i>0</i>	
		207	208	131	131
% Αναστολή				36.87	36.87
M.O (% Αναστολής)				36.87	
<i>St.Dev</i>				<i>0</i>	



Όπως φαίνεται από τον πίνακα και το γράφημα που παρατίθεται παρακάτω, όλα τα κλάσματα (δισακχαρίδια, οξικού αιθυλεστέρα, υπολειμματος οξικού αιθυλεστέρα, βουτανόλης) της μεθανολικής κατανομής, πλην του υδατικού, εμφανίζουν υψηλότερη, άνω του 70%, ικανότητα αναστολής της ALR2 σε τελική συγκέντρωση 50μg/ml. Σε αυτή της συγκέντρωση προκύπτει ότι στο σύνολό του, το μεθανολικό εκχύλισμα εμφανίζει μια αναστολή του ενζύμου σε ποσοστό άνω του 52%, σε αντίθεση με την κατανομή του διχλωρομεθανίου που αντιστοιχεί στο 36%. Σε τελική συγκέντρωση 25 μg/ml, και πάλι όλα τα κλάσματα, πλην υδατικού, της μεθανολικής κατανομής διατηρούν τα υψηλά ποσοστά αναστολής του ενζύμου, με ποσοστά άνω του 60%. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι σε τελική συγκέντρωση 25μg/ml, η ανασταλτική δράση της υδατικής κατανομής σχεδόν υποδιπλασιάζεται, φτάνοντας το 29% και δεν ξεπερνά τη δράση της σορβινίλης (45% αναστολή σε συγκέντρωση 59μg/ml) που χρησιμοποιήθηκε σαν ένωση αναφοράς και της οποίας η δράση ως αναστολέας είναι γνωστή (Robison Jr. W.G. et al., 1995; Zaher N. et al., 2002). Λόγω του χαμηλού ποσοστού αναστολής του ενζύμου από την κατανομή του διχλωρομεθανίου στα 50μg/ml, δεν κρίθηκε απαραίτητο να διερευνηθεί η ανασταλτική ικανότητα σε αραιώσεις αυτού. Από τα πειραματικά αποτελέσματα που αναφέρθηκαν προκύπτει ότι η ικανότητα των εκχυλισμάτων να αναστέλλουν το ένζυμο ALR2 παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, δεδομένου ότι εμφανίζουν υψηλή αποτελεσματικότητα αν και πρόκειται για μίγματα ουσιών φυτικών φυτικών παρασκευασμάτων.

Tephrosia		%Αναστολή ALR2			
		50μg/ml	St.Dev.	25μg/ml	St.Dev.
1	Διχλωρομεθάνιο (DM)	36,87	0,00	-	-
2	Διαιθυλαιθέρας (EtOEt)	78,44	3,09	61,58	0,38
3	Οξικός Αιθυλεστέρας (AcOEt)	78,86	2,23	66,56	2,20
4	Υπόλειμμα Οξικού Αιθυλεστέρα (AcOEt Res.)	82,33	1,78	77,11	1,54
5	κ-Βουτανόλη (n-BuOH)	73,44	1,77	63,90	3,66
6	Υδατικό (H ₂ O)	52,50	1,77	29,43	1,93

Ένα συγκριτικό ραβδόγραμμα για την ικανότητα των εκχυλισμάτων να αναστείλουν τη δράση της αναγωγάσης της αλδόζης στις δύο δεδομένες συγκεντρώσεις (50 & 25μg/ml) είναι το ακόλουθο:



In vitro μελέτη της ικανότητας αναστολής της αναγωγής της αλδεΐδης (ALR1)

Ο προσδιορισμός της ικανότητας αναστολής του ενζύμου αναγωγής της αλδεΐδης πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που αναφέρεται από τους Stefek και συνεργάτες (2008). Για τη διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 0.1M (pH=7.2), καθώς επίσης και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 10mM (pH=7.2) με αραιώση του προηγούμενου 1:10, S-ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (10mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων + 2mM EDTA + 2mM 2-μερκαπτοαιθανόλη), S-ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων + σουκρόζη (10mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων + 2mM EDTA + 2.5mM 2-μερκαπτοαιθανόλη + 0.25M σουκρόζη), διάλυμα NADPH 0.104mM το οποίο παρασκευάζεται λίγο πριν την έναρξη του πειράματος και διατηρείται σε πάγο, διάλυμα του μετά νατρίου άλατος του γλυκουρονικού οξέος 600mM το οποίο επίσης παρασκευάζεται λίγο πριν την έναρξη του πειράματος και διατηρείται σε πάγο, κορεσμένο διάλυμα $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ και τέλος 10% υδατικά διαλύματα DMSO των υπό έλεγχο δειγμάτων σε συγκεντρώσεις από 10^{-4}M έως 10^{-6}M .

Το ένζυμο της αναγωγής των αλδεϊδών απομονώνεται από νεφρούς επιμύων με τη διαδικασία της κλασματοποίησης με χρήση θειικού αμμωνίου $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Οι νεφροί απομακρύνονται γρήγορα από επίμυες Fisher-344 του ίδιου φύλου και βάρους όχι μεγαλύτερου από 250g, μετά από ευθανασία των πειραματόζων. Στη συνέχεια οι δυο νεφροί ζυγίζονται και ομογενοποιούνται σε τριπλάσιο όγκο (ml) διαλύματος S-buffer + σουκρόζη. Το ομογενοποίημα φυγοκεντρείται στις 15000rpm για 30min στους 0-4°C. Το υπερκείμενο λαμβάνεται, προστίθεται διάλυμα $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ μέχρι να επιτευχθεί κορεσμός 40% και αναδεύεται έντονα. Στη συνέχεια το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία για 30min και αναδεύεται ήπια ανά τακτά χρονικά διαστήματα και ακολουθεί φυγοκέντριση του διαλύματος στα 15000rpm για 30min στους 0-4°C. Λαμβάνεται το υπερκείμενο κλάσμα και αναμειγνύεται ξανά με την απαραίτητη ποσότητα κορεσμένου διαλύματος $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ και αναδεύεται έντονα, ώστε να επιτευχθεί κορεσμός 50%. Στη συνέχεια το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία για 30min και αναδεύεται ήπια ανά τακτά χρονικά διαστήματα και ακολουθεί φυγοκέντριση του διαλύματος στις 15000rpm για 30min στους 0-4°C. Λαμβάνεται το υπερκείμενο

κλάσμα και αναμειγνύεται ξανά με κορεσμένο διάλυμα $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ και αναδεύεται έντονα, ώστε να επιτευχθεί κορεσμός 75%. Στη συνέχεια το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία για 30min και αναδεύεται ήπια ανά τακτά χρονικά διαστήματα και ακολουθεί φυγοκέντριση του διαλύματος στις 15000rpm για 30min στους 0-4°C. Αποχύνεται το υπερκείμενο κλάσμα και γίνεται επαναδιάλυση του ιζήματος σε κατάλληλη ποσότητα διαλύματος S-ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων ώστε η συγκέντρωση του ενζυμικού παρασκευάσματος να είναι ~20mg/ml. Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη διαιθυλαμινοαιθυλο-κελουλόζης (DEAE-cellulose) [330mg/10ml] και μετά από ηρεμία του διαλύματος για 15min, αυτό φυγοκεντρείται στις 15000rpm για 15min στους 0-4°C. Το υπερκείμενο διάλυμα αποτελεί το ενζυμικό παρασκεύασμα που θα χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια.

Η δραστικότητα του ενζύμου καθώς και η ικανότητα αναστολής αυτού από τις εξεταζόμενες ενώσεις προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά στα 340nm με προσδιορισμό της μείωσης της απορρόφησης που οφείλεται στην οξειδωση του NADPH υπό την καταλυτική δράση της ALR1. Όλες οι μετρήσεις γίνονται εις τριπλούν.

Η αποτίμηση της δράσης του ενζύμου γίνεται στους 30°C σε αντιδρόν μίγμα που αποτελείται από 2.4ml ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 0,01M (pH=7.2), 100μl διάλυμα NADPH 0.104mM, 300μl ενζυμικό παρασκεύασμα, 100μl διάλυμα του μετά νατρίου άλατος του γλυκουρονικού οξέος 600mM και 100μl υδατικό διάλυμα 10% DMSO σε τελικό όγκο 1.1ml. Το διάλυμα του μετά νατρίου άλατος του γλυκουρονικού οξέος προστίθεται στο τέλος και σηματοδοτεί την έναρξη της αντίδρασης, η οποία παρακολουθείται για 5min με λήψη των απορροφήσεων ανά 30 δευτερόλεπτα, αφού όμως έχει προηγηθεί ισορρόπηση της αντίδρασης για 1 λεπτό. Το δείγμα της αναφοράς περιέχει όλα τα προηγούμενα εκτός από το υπόστρωμα του γλυκουρονικού οξέος, ώστε να διορθωθεί τυχούσα οξειδωση του NADPH που δεν οφείλεται στην αναγωγή του υποστρώματος. Η ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης πρέπει να είναι ~0,02 ή 0,01 μονάδες απορρόφησης ανά λεπτό και γίνεται ρύθμιση στα προαναφερόμενα όρια με αραιώση του ενζυμικού παρασκευάσματος αν χρειαστεί.

Όμοια γίνεται και η αποτίμηση της ανασταλτικής δράσης των υπό μελέτη ενώσεων στους 30°C σε αντιδρόν μίγμα που αποτελείται από 2,4ml ρυθμιστικό

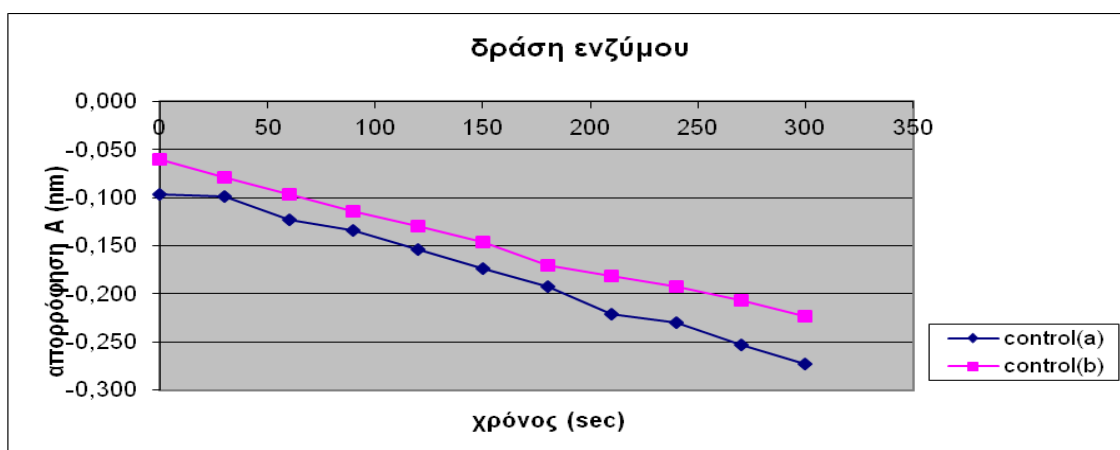
διάλυμα φωσφορικών ιόντων 0,01M (pH=7,2), 100μl διάλυμα NADPH 0,104mM, 300μl ενζυμικό παρασκεύασμα, 100μl διάλυμα του μετά νατρίου άλατος του γλυκουρονικού οξέος 600mM και 100μl διάλυμα της ουσίας σε τελικό όγκο 1,1ml. Το δείγμα της αναφοράς περιέχει όλα τα προηγούμενα εκτός από το υπόστρωμα, ώστε να διορθωθεί, εκτός από την τυχόν οξειδωση του NADPH που δεν οφείλεται στην αναγωγή του υποστρώματος και η ενδεχόμενη απορρόφηση της ουσίας. Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων υπολογίζεται το ποσοστό της αναστολής του ενζύμου με σύγκριση της ταχύτητας αντίδρασης του διαλύματος που περιέχει υπόστρωμα και αναστολέα σε σχέση με το διάλυμα που περιέχει μόνο υπόστρωμα (control). Το αποτέλεσμα προκύπτει σύμφωνα με τον ακόλουθο τύπο:

$$\frac{\text{ταχύτητα}_{\text{control}} - \text{ταχύτητα}_{\text{αναστολέα}}}{\text{ταχύτητα}_{\text{control}}} \cdot 100 = \% \text{ αναστολή}$$

Εκτίμηση της ικανότητας αναστολής του ενζύμου αναγωγή των αλδευδών (ALR1) και προσδιορισμός της εκλεκτικότητας με το ομόλογο ένζυμο αναγωγή της αλδόζης(ALR2)

Κατανομή διαιθυλαιθέρα

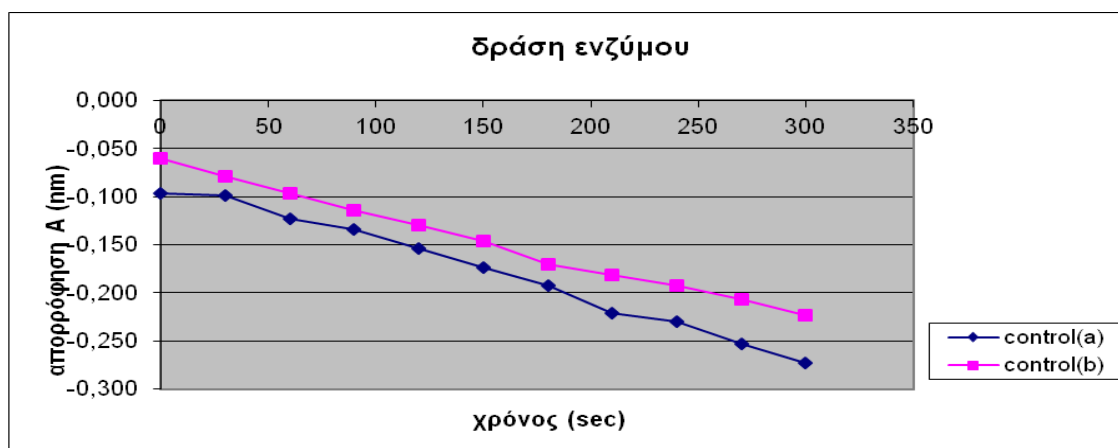
Συγκέντρωση δείγματος 50μg/ml



<u>ΧΡΟΝΟΣ</u>		<u>ΜΑΡΤΥΡΑΣ (control)</u>		<u>Abs (340nm)</u>	
	0s	-0,097	-0,060	-0,036	-0,039
	30s	-0,099	-0,079	-0,037	-0,042
1min	60s	-0,123	-0,096	-0,043	-0,057
	90s	-0,134	-0,114	-0,050	-0,063
2 min	120s	-0,154	-0,130	-0,050	-0,078
	150s	-0,174	-0,146	-0,057	-0,078
3 min	180s	-0,192	-0,170	-0,076	-0,076
	210s	-0,221	-0,181	-0,071	-0,081
4 min	240s	-0,230	-0,192	-0,085	-0,096
	270s	-0,253	-0,207	-0,091	-0,100
5 min	300s	-0,273	-0,223	-0,096	-0,111
Ταχύτητα αντίδρασης (μον./min)		0.0352	0.0326	0.0120	0.0144
M.O. Ταχύτητας αντίδρασης (μον./min)		0.0339		0.0132	
<i>St.Dev</i>		<i>0,001838478</i>		<i>0,001697056</i>	
		176	163	60	72
% Αναστολή				64.60	57.52
M.O (% Αναστολής)				61.06	
<i>St.Dev</i>				<i>5,006065708</i>	

Κατανομή οξικού αιθυλεστέρα

Συγκέντρωση δείγματος 50μg/ml

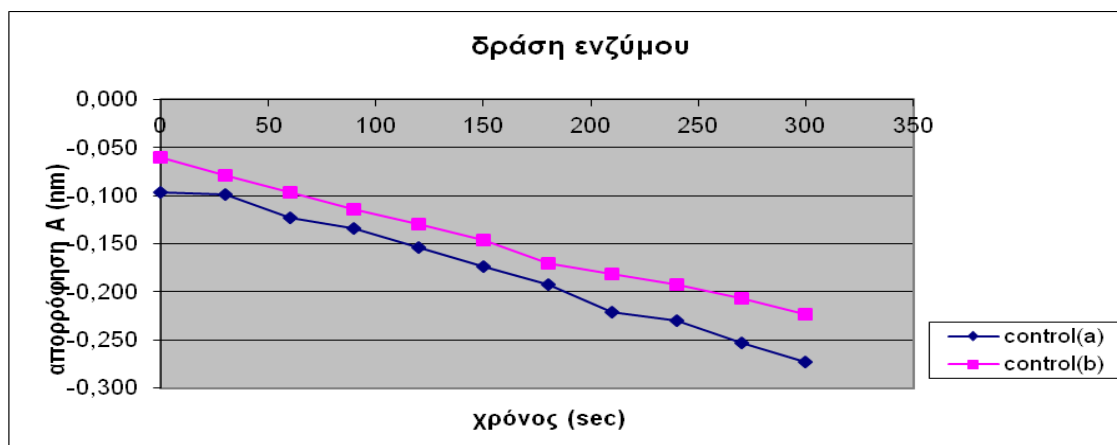


<u>ΧΡΟΝΟΣ</u>		<u>ΜΑΡΤΥΡΑΣ (control)</u>		<u>Abs (340nm)</u>	
	0s	-0,097	-0,060	-0,040	-0,052
	30s	-0,099	-0,079	-0,024	-0,075
1min	60s	-0,123	-0,096	-0,065	-0,058
	90s	-0,134	-0,114	-0,054	-0,051

2 min	120s	-0,154	-0,130	-0,070	-0,060
	150s	-0,174	-0,146	-0,056	-0,072
3 min	180s	-0,192	-0,170	-0,075	-0,093
	210s	-0,221	-0,181	-0,075	-0,085
4 min	240s	-0,230	-0,192	-0,093	-0,106
	270s	-0,253	-0,207	-0,105	-0,111
5 min	300s	-0,273	-0,223	-0,116	-0,125
Ταχύτητα αντίδρασης (μον./min)		0.0352	0.0326	0.0152	0.0146
Μ.Ο. Ταχύτητας αντίδρασης (μον./min)		0.0339		0.0149	
<i>St.Dev</i>		0,001838478		0,000424264	
		176	163	76	73
% Αναστολή				55.16	56.93
Μ.Ο (% Αναστολής)				56.05	
<i>St.Dev</i>				1,251516427	

Κατανομή υπολείμματος οξικού αιθυλεστέρα

Συγκέντρωση δείγματος 50μg/ml

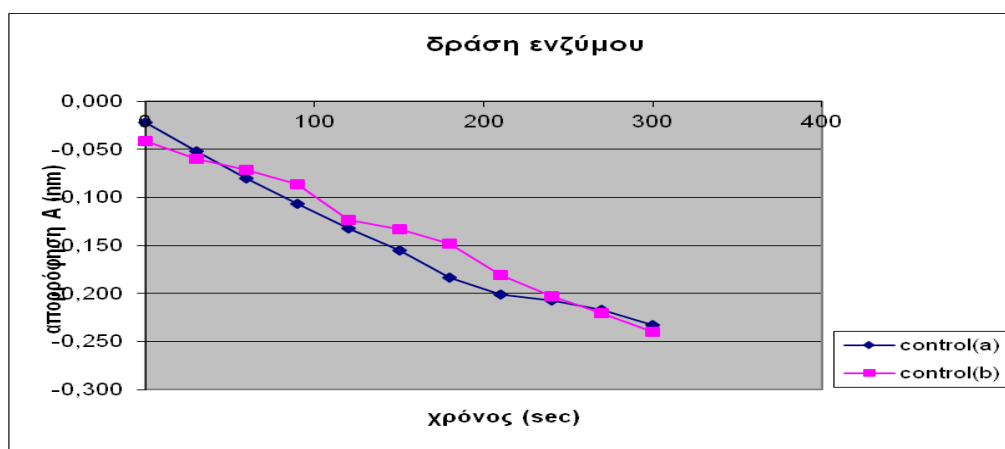


<u>ΧΡΟΝΟΣ</u>		<u>ΜΑΡΤΥΡΑΣ (control)</u>		<u>Abs (340nm)</u>		
	0s	-0,097	-0,060	-0,012	-0,011	-0,060
	30s	-0,099	-0,079	-0,010	-0,024	-0,067
1min	60s	-0,123	-0,096	-0,015	-0,019	-0,069
	90s	-0,134	-0,114	-0,033	-0,028	-0,058
2 min	120s	-0,154	-0,130	-0,033	-0,036	-0,075
	150s	-0,174	-0,146	-0,029	-0,026	-0,083
3 min	180s	-0,192	-0,170	-0,041	-0,040	-0,080
	210s	-0,221	-0,181	-0,034	-0,031	-0,086
4 min	240s	-0,230	-0,192	-0,049	-0,043	-0,092
	270s	-0,253	-0,207	-0,061	-0,050	-0,104
5 min	300s	-0,273	-0,223	-0,041	-0,051	-0,112
Ταχύτητα αντίδρασης (μον./min)		0.0352	0.0326	0.0058	0.0080	0.0104

M.O. Ταχύτητας αντίδρασης (μον./min)	0.0339	0.0081
<i>St.Dev</i>	<i>0,001838478</i>	<i>0,002300725</i>
	176 163	29 40 52
% Αναστολή		82.89 76.40 69.32
M.O (% Αναστολής)		76.20
<i>St.Dev</i>		<i>6,786798005</i>

Κατανομή βουτανόλης

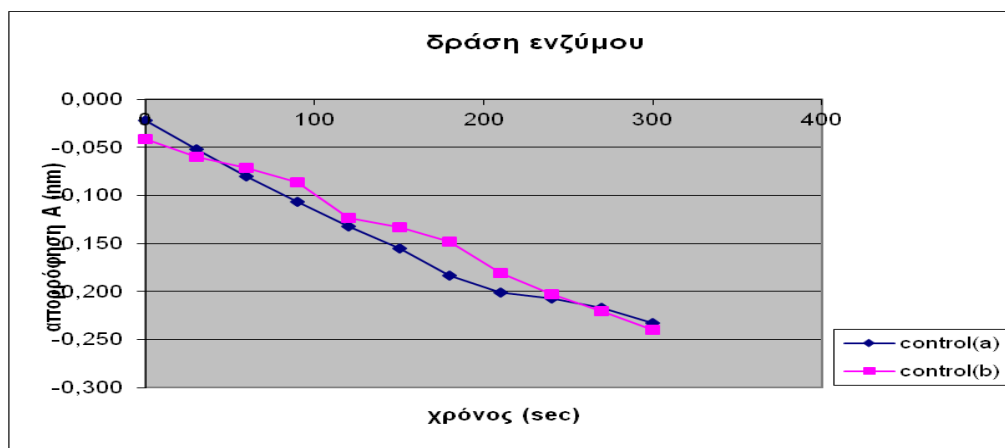
Συγκέντρωση δείγματος 50μg/ml



<u>ΧΡΟΝΟΣ</u>	<u>ΜΑΡΤΥΡΑΣ (control)</u>		<u>Abs (340nm)</u>		
0s	-0,022	-0,041	-0,023	-0,052	
30s	-0,052	-0,060	-0,029	-0,053	
1min	60s	-0,080	-0,071	-0,036	-0,080
	90s	-0,107	-0,086	-0,038	-0,076
2 min	120s	-0,132	-0,123	-0,050	-0,080
	150s	-0,155	-0,133	-0,056	-0,085
3 min	180s	-0,183	-0,148	-0,070	-0,090
	210s	-0,201	-0,181	-0,096	-0,089
4 min	240s	-0,207	-0,203	-0,096	-0,088
	270s	-0,217	-0,220	-0,111	-0,092
5 min	300s	-0,233	-0,240	-0,123	-0,107
Ταχύτητα αντίδρασης (μον./min)	0.0422	0.0398	0.0201	0.0111	
M.O. Ταχύτητας αντίδρασης (μον./min)	0.041	0.0156			
<i>St.Dev</i>	<i>0,001697056</i>	<i>0,001697056</i>			
	211 199	100 55			
% Αναστολή		40.71 72.93			
M.O (% Αναστολής)		56.82			
<i>St.Dev</i>		<i>4,4642506705</i>			

Υδατική κατανομή

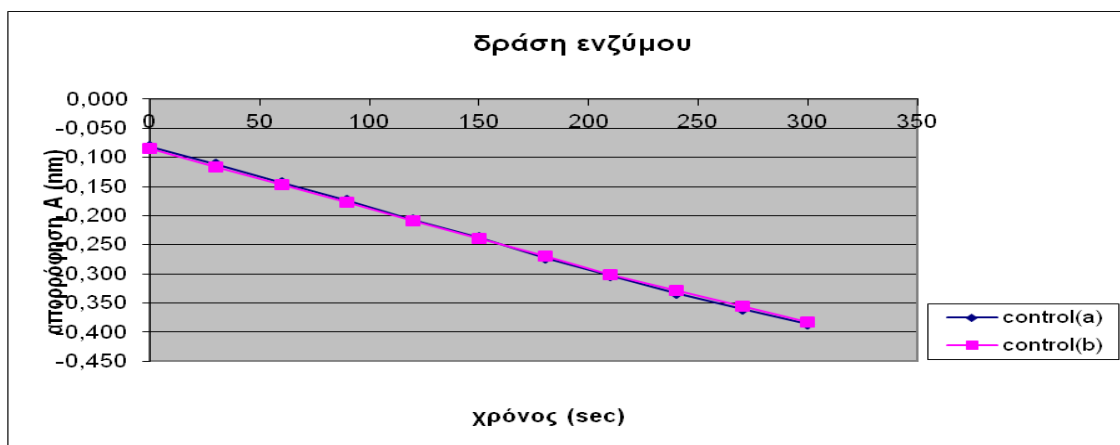
Συγκέντρωση δείγματος 50μg/ml



<u>ΧΡΟΝΟΣ</u>		<u>ΜΑΡΤΥΡΑΣ (control)</u>		<u>Abs (340nm)</u>	
	0s	-0,022	-0,041	-0,028	-0,046
	30s	-0,052	-0,060	-0,043	-0,068
1min	60s	-0,080	-0,071	-0,050	-0,068
	90s	-0,107	-0,086	-0,063	-0,087
2 min	120s	-0,132	-0,123	-0,074	-0,097
	150s	-0,155	-0,133	-0,083	-0,103
3 min	180s	-0,183	-0,148	-0,101	-0,121
	210s	-0,201	-0,181	-0,113	-0,112
4 min	240s	-0,207	-0,203	-0,125	-0,147
	270s	-0,217	-0,220	-0,146	-0,163
5 min	300s	-0,233	-0,240	-0,153	-0,159
Ταχύτητα αντίδρασης (μον./min)		0.0422	0.0398	0.0250	0.0226
M.O. Ταχύτητας αντίδρασης (μον./min)		0.041		0.0238	
	<i>St.Dev</i>	<i>0,001697056</i>		<i>0,001697056</i>	
		211	199	125	113
	% Αναστολή			39.02	44.88
	M.O (% Αναστολής)			41.95	
	<i>St.Dev</i>			<i>4,139161646</i>	

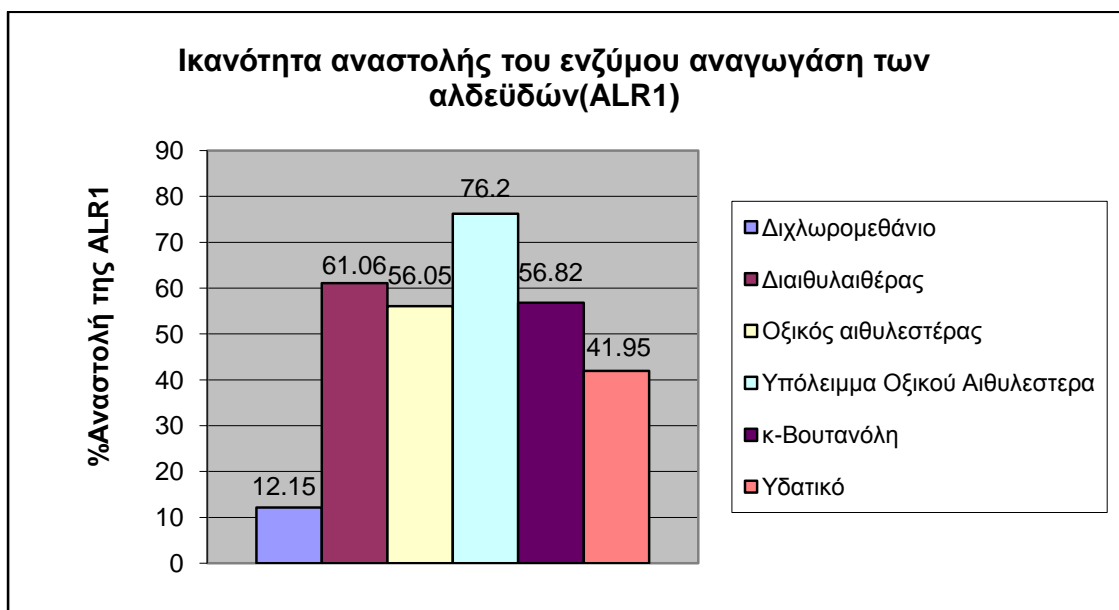
Εκχύλισμα διχλωρομεθανίου

Συγκέντρωση δείγματος 50μg/ml



<u>ΧΡΟΝΟΣ</u>		<u>ΜΑΡΤΥΡΑΣ (control)</u>		<u>Abs (340nm)</u>	
	0s	-0,082	-0,085	-0,116	-0,099
	30s	-0,111	-0,117	-0,140	-0,118
1min	60s	-0,143	-0,147	-0,163	-0,144
	90s	-0,174	-0,177	-0,193	-0,171
2 min	120s	-0,208	-0,209	-0,219	-0,197
	150s	-0,237	-0,239	-0,249	-0,225
3 min	180s	-0,272	-0,270	-0,278	-0,254
	210s	-0,303	-0,301	-0,305	-0,280
4 min	240s	-0,333	-0,329	-0,332	-0,308
	270s	-0,361	-0,356	-0,358	-0,335
5 min	300s	-0,386	-0,382	-0,383	-0,360
Ταχύτητα αντίδρασης (μον./min)		0.0608	0.0594	0.0534	0.0522
M.O. Ταχύτητας αντίδρασης (μον./min)		0.0601		0.0528	
<i>St.Dev</i>		<i>0,000989949</i>		<i>0,000848528</i>	
		304	297	267	261
% Αναστολή				11.15	13.14
M.O (% Αναστολής)				12.15	
<i>St.Dev</i>				<i>1,411860462</i>	

Ένα συνοπτικό διάγραμμα για την ικανότητα αναστολής των κατανομών του φυτού *Tephrosia humilis* για το ένζυμο της αναγωγάσης της αλδεΐδης, δίνεται παρακάτω:



Όπως προαναφέρθηκε, σε περιπτώσεις διαβήτη παρατηρείται υπερέκφραση της ALR2 στους περισσότερους ιστούς, γεγονός που δεν συμβαίνει στην περίπτωση της ALR1, διαπίστωση που υπερτονίζει το ζήτημα της εκλεκτικότητας μεταξύ ALR1 και ALR2. Προκειμένου να γίνει εκτίμηση των αποτελεσμάτων της αναστολής του ενζύμου αναγωγή των αλδεϋδών σε σχέση με τα *in vitro* αποτελέσματα που αφορούν την αναστολή της ALR2, δίνονται αρχικά συνολικά τα αποτελέσματα αυτά, στον πίνακα και στο διάγραμμα παρακάτω.

Η ικανότητα αναστολής των ενζύμων ALR2 και ALR1, κατά φθίνουσα σειρά είναι η εξής:

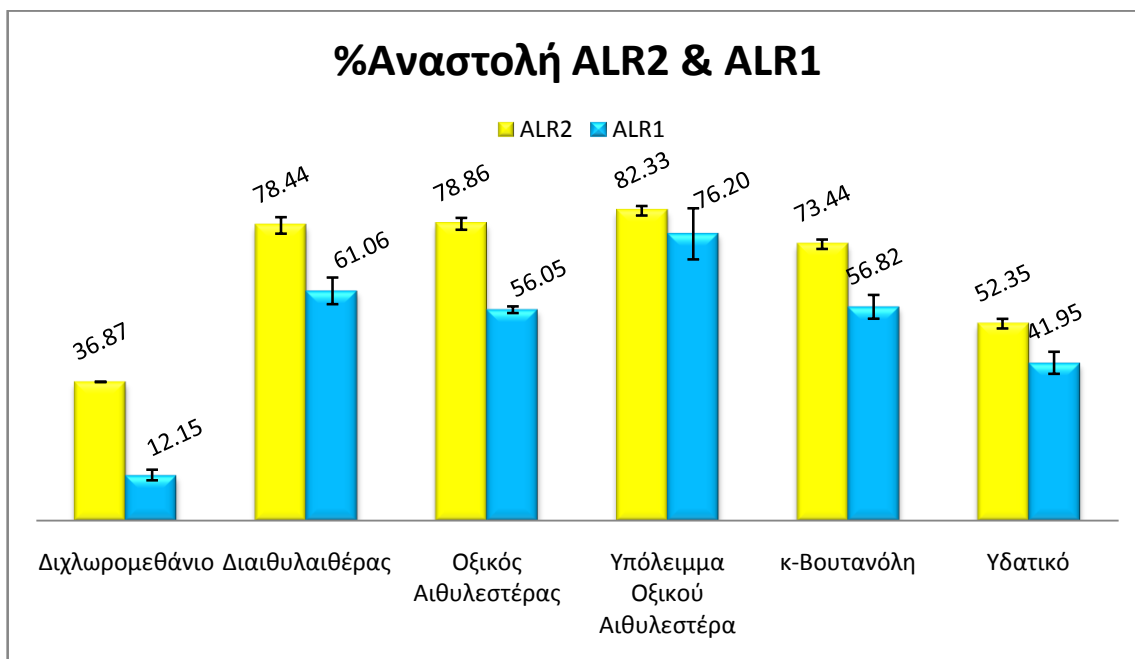
**[ALR2] : EtOAc-Residue>EtOAc ≈ EtOEt >n-BuOH>Υδατικό
υπόλειμμα>CH₂Cl₂**

**[ALR1] : EtOAc-Residue >EtOEt >n-BuOH ≈ EtOAc >Υδατικό
υπόλειμμα>CH₂Cl₂**

Σε όλες τις περιπτώσεις των κλασμάτων των κατανομών που μελετήθηκαν, προκαλείται μεγαλύτερη αναστολή της ALR2 σε σχέση με την ALR1. Ωστόσο οι υψηλές τιμές αναστολής της ALR2 συνοδεύονται από αρκετά υψηλές τιμές για την ALR1, τουλάχιστον για τα κλάσματα (διαιθυλαιθέρα, οξικού αιθυλεστέρα, υπολείμματος οξικού αιθυλεστέρα, βουτανόλης, υδατικού) του μεθανολικού εκχυλίσματος. Η μεγαλύτερη διαφορά παρατηρείται στην κατανομή του οξικού

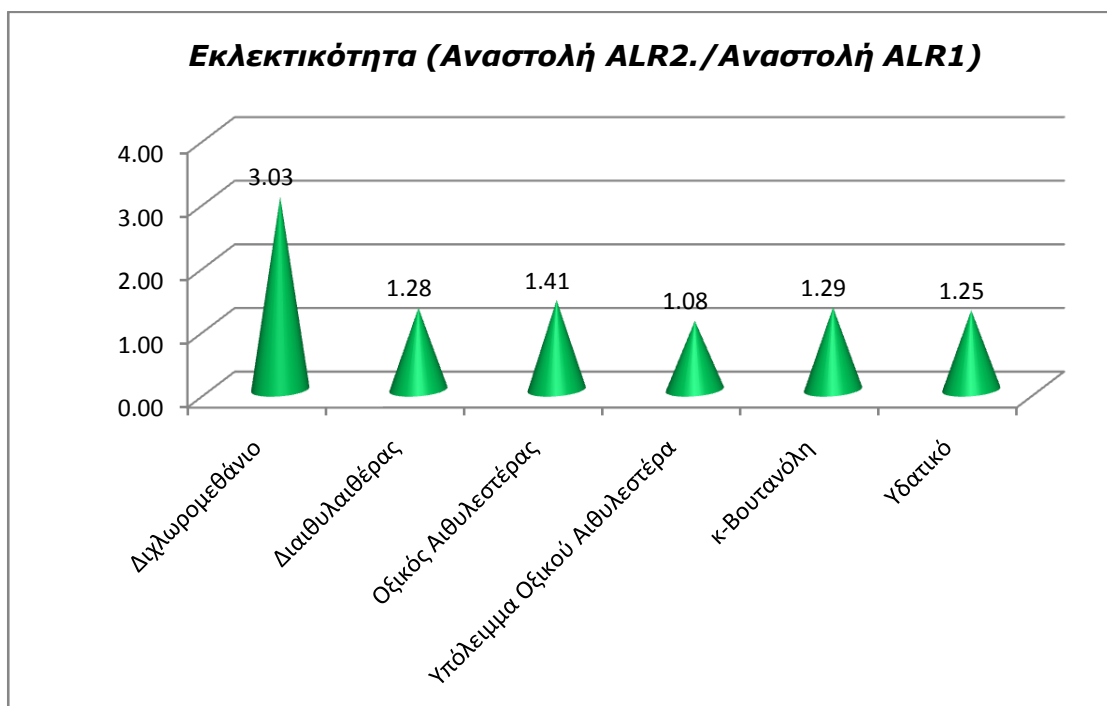
αιθυλεστέρα, ενώ η διαφορά στο κλάσμα του υπολείμματος του οξικού αιθυλεστέρα είναι πολύ μικρή, σχεδόν αμελητέα. Όσον αφορά το εκχύλισμα του διχλωρομεθανίου, η συγκριτικά μικρή αναστολή (36%) του ενζύμου της αναγωγής της αλδόζης, συνοδεύεται από μια εξαιρετικά μικρή αναστολή (12%) του ενζύμου αναγωγής της αλδεΐδης.

Tephrosia		Αναστολή σε 50μg/ml				Εκλεκτικότητα (Αναστολή ALR2./Αναστολή ALR1)
		ALR2	St.Dev.	ALR1	St.Dev.	
1	Διχλωρομεθάνιο	36,87	0,00	12,15	1,41	3,03
2	Διαιθυλαιθέρας	78,44	3,09	61,06	5,00	1,28
3	Οξικός Αιθυλεστέρας	78,86	2.23	56,05	1,25	1,41
4	Υπόλειμμα Οξικού Αιθυλεστέρα	82,33	1,78	76,20	6,79	1,08
5	κ-Βουτανόλη	73,44	1,77	56,82	4,46	1,29
6	Υδατικό	52,35	1,77	41,95	4,14	1,25



Για την εκλεκτικότητα των υπό εξέταση κατανομών, προσδιορίζεται ο λόγος της ποσοστιαίας (%) αναστολής της ALR2 προς την ποσοστιαία (%) αναστολή της ALR1. Όσο πιο μεγάλος είναι αυτός ο λόγος, τόσο μεγαλύτερη και η εκλεκτικότητα της υπό εξέταση κατανομής. Από το διάγραμμα που παρατίθεται παρακάτω προκύπτει ότι, παρότι πρόκειται για μίγμα ουσιών, το κλάσμα της κατανομής του διχλωρομεθανίου

συγκεντρώνει τις καλύτερες προοπτικές στο να εμφανίζει την περισσότερο εκλεκτική δράση κατά της ALR2, έναντι της δράσης κατά της ALR1. Ωστόσο αυτό συνδυάζεται από σχετικά μικρή αναστολή του ενζύμου αναγωγή της αλδόζης, συγκριτικά με όλα τα κλάσματα της μεθανολικής κατανομής (διαιθυλαιθέρα, οξικού αιθυλεστέρα, υπολείμματος οξικού αιθυλεστέρα, βουτανόλης, υδατικού). Επομένως, εάν θεωρηθεί ως συμπληρωματικό στοιχείο η εκλεκτικότητα, προκύπτει ότι η αναστολή της ALR2 αποτελεί χαρακτηριστικό ιδιαίτερης βαρύτητας και αποκτά ειδικό βάρος, καθώς έχει μεγαλύτερη σημασία για τους διαβητικούς η υπογλυκαιμική δράση ενός εκχυλίσματος και όχι τόσο η εκλεκτικότητά του, αν και ένας ιδανικός συνδυασμός των δύο αυτών στοιχείοθετούν την ιδανική συνθήκη. Συμπερασματικά, κρίνεται ως βέλτιστο το κλάσμα του οξικού αιθυλεστέρα, διότι συγκαταλέγεται μεταξύ αυτών που έχουν μία από τις υψηλότερες τιμές αναστολής του ενζύμου της αναγωγής της αλδόζης και ταυτόχρονα εμφανίζει την μεγαλύτερη εκλεκτικότητα από τα υπόλοιπα κλάσματα, αν εξαιρεθεί το εκχύλισμα του διχλωρομεθανίου με τη χαμηλή ικανότητα αναστολής της ALR2.



Ανασταλτική δράση επί της λιποξυγονάσης φυτικής προέλευσης

Έχει αποδειχθεί ότι η αναστολή της δράσης της λιποξυγονάσης φυτικής προέλευσης είναι ποιοτικά παρόμοια με την αναστολή που παρατηρείται στη δράση της λιποξυγονάσης κυττάρων συνδετικού ιστού επίμυος και γι' αυτό το λόγο το συγκεκριμένο πρωτόκολλο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένας σωστός ποιοτικός και ημιποσοτικός έλεγχος της δράσης αυτής. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι, παρά τη διαφορά στον αριθμό των αμινοξέων μεταξύ λιποξυγονασών από θηλαστικά και από φυτά (περί τα 600 αμινοξέα έναντι 800, αντίστοιχα), οι πρωτεΐνες εμφανίζουν εκπληκτική ομολογία στην αλληλουχία των αμινοξέων, καθώς και στο ενεργό κέντρο των ενζύμων (Skrzyczak-Jankun E. et al., 2003). Οι περισσότεροι αναστολείς των λιποξυγονασών αποτελούν αντιοξειδωτικά ως σαρωτές ελευθέρων ριζών και μελέτες που έχουν διενεργηθεί υποδεικνύουν ότι υπάρχει πιθανή σχέση μεταξύ της αναστολής της λιποξυγονάσης και της ικανότητας των αναστολέων να ανάγουν τον Fe^{3+} στο ανενεργό Fe^{2+} , στο ενεργό κέντρο του ενζύμου (Muller K., 1994; Kemal C. et al., 1987; Van Der Zee J. et al., 1989).

Όλοι οι διαλύτες και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν προμηθεύτηκαν από το εμπόριο (Sigma-Aldrich Corporation). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο HITACHI U-2001.

Στο πείραμα γίνεται προσπάθεια να μελετηθεί η επίδραση των διαφόρων κατανομών (δισουλφαιθέρια, οξικού αιθυλεστέρα, υπολείμματος οξικού αιθυλεστέρα, βουτανολικού, υδατικού) του μεθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Tephrosia humilis* στη λιποξυγονάση, ένζυμο που εμπλέκεται στον κύκλο του αραχιδονικού οξέος. Η αναστολή της φυτικής προέλευσης λιποξυγονάσης (σόγιας) (1.9×10^4 w/v σε φυσιολογικό ορό) έγινε σε διάλυμα που περιείχε τελικές συγκεντρώσεις των εξεταζόμενων ουσιών 0.1mM. Οι ενώσεις διαλύονται σε DMSO, ενώ υπόστρωμα αποτέλεσε το άλας με νάτριο του λινελαϊκού οξέος (0.1mM) σε pH 9.00 με ρυθμιστικό διάλυμα (Tris·HCl) σε θερμοκρασία δωματίου. Μελετάται και παρακολουθείται η μετατροπή του λινελαϊκού οξέος σε 13-υδροϋπεροξυ-λινελαϊκό οξύ που καταλύεται από τη LOX, με την καταγραφή να γίνεται στα 234nm τη στιγμή που παρατηρείται ότι η αντίδραση φτάνει σε plateau, με απορρόφηση που

διατηρείται σταθερή για λίγα δευτερόλεπτα (Pontiki E. et al., 2006; Kontogiorgis C. et al., 2006; Katsori A.-M. et al., 2011).

Πραγματοποιούνται δύο μετρήσεις, μία του μάρτυρα (control) και μία με την προσθήκη της υπό εξέταση κατανομής για τη μέτρηση της αναστολής του ενζύμου. Μέσα στην κυψελίδα τοποθετούνται κατά την πρώτη μέτρηση 690μl ρυθμιστικού διαλύματος, 10μl διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO), 200μl λιποξυγονάσης (LOX) και 100μl λινελαϊκού οξέως (LLA), με αυτή τη σειρά και μετράται η απορρόφηση ($Abs_{(LOX+LLA)}$) του μείγματος στα 234nm, με την μέτρηση αυτή να επαναλαμβάνεται και δεύτερη φορά. Στη συνέχεια μετράται η απορρόφηση ($Abs_{(LOX)}$) που προκύπτει, δίχως την προσθήκη του λινελαϊκού οξέος, τα οποία αντικαθίστανται από επιπλέον 100μl ρυθμιστικού, και η οποία είναι μικρότερη διότι δεν έχουμε τη δημιουργία λιπιδικών υπεροξειδίων. Από τον μέσο όρο των απορροφήσεων ($Abs_{(LOX+LLA)}$) του μάρτυρα, αφαιρείται η απορρόφηση ($Abs_{(LOX)}$) του μάρτυρα και το αποτέλεσμα που προκύπτει είναι η απορρόφηση (**Abs_(control)**) που οφείλεται στο σχηματισμό του 13-υδροϋπεροξυ-λινελαϊκού οξέος. Οι μετρήσεις στο πείραμα με αναστολέα είναι ακριβώς οι ίδιες με το πείραμα του μάρτυρα, μόνο που στην περίπτωση αυτή αντί να προστεθούν μέσα στην κυψελίδα 10μl DMSO, προστίθενται 10μl δείγματος διαλυμένο σε DMSO. Παρομοίως, από τον μέσο όρο των απορροφήσεων ($Abs_{(LOX+LLA)}$) του δείγματος, αφαιρείται η απορρόφηση ($Abs_{(LOX)}$) που ελήφθη με το δείγμα, και το αποτέλεσμα που προκύπτει είναι η απορρόφηση (**Abs**). Η αναστολή του ενζύμου υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\% \text{Αναστολ}\Psi = \text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs} \times 100$$

Κατανομή δισουλφιδίου

Πιο αναλυτικά, για την κατανομή του δισουλφιδίου προκύπτει ο πίνακας:

Πείραμα μάρτυρα (control)/ πείραμα με αναστολέα

Πείραμα μάρτυρα (control)		Πείραμα με αναστολέα	
$Abs_{(LLA+LOX)}$	$Abs_{(LOX)}$	$Abs_{(LLA+LOX)}$	$Abs_{(LOX)}$
2392	1145	1534	1136
2378		1527	
M.O= 2385		M.O= 1530	

και από τον μέσο όρο της απορρόφησης (LLA+LOX) του μάρτυρα αφαιρείται η απορρόφηση της LOX του μάρτυρα, με την απορρόφηση (**Abs_(control)**) που οφείλεται στο σχηματισμό του 13-υδροϋπεροξυ-λινελαϊκού οξέος να ισούται με 2385-1145=**1240**. Στη συνέχεια, όπως προαναφέρθηκε, από τον μέσο όρο της απορρόφησης (LLA+LOX) του δείγματος, αφαιρείται η απορρόφηση της LOX που ελήφθη με το δείγμα και που στην προκειμένη περίπτωση προκύπτει ότι είναι ίση με (**Abs**)=1530-1136= **394**. Η αναστολή του ενζύμου υπολογίζεται από τον τύπο που δίνεται παραπάνω και επομένως ισούται με

$$\% \text{ αναστολή} = [(1240-394)/1240]*100 = \mathbf{68.22}$$

Κατανομή οξικού αιθυλεστέρα

$$\text{Ομοίως } \% \text{ αναστολή} = [(1240-307)/1240]*100 = \mathbf{75.25}$$

Κατανομή υπολειμματος οξικού αιθυλεστέρα

$$\text{Ομοίως } \% \text{ αναστολή} = [(1240-217)/1240]*100 = \mathbf{82.5}$$

Κατανομή βουτανόλης

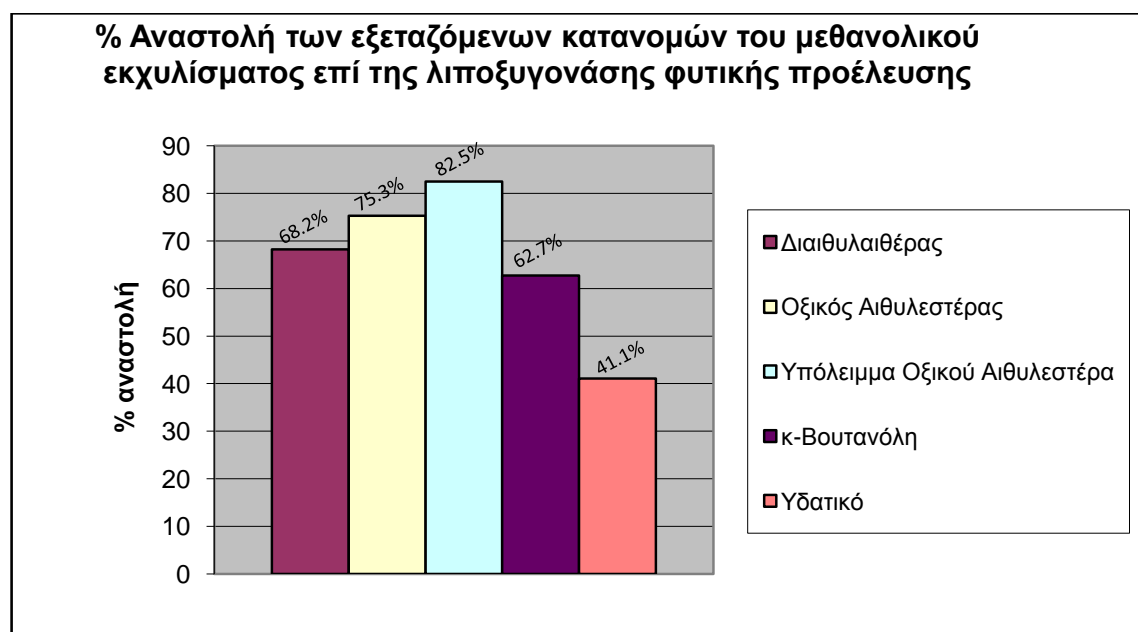
$$\text{Ομοίως } \% \text{ αναστολή} = [(1240-463)/1240]*100 = \mathbf{62.66}$$

Υδατική Κατανομή

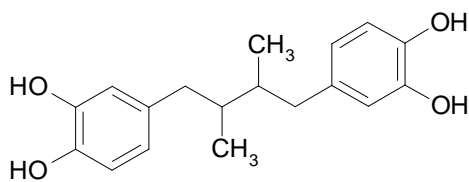
$$\text{Ομοίως } \% \text{ αναστολή} = [(1240-730)/1240]*100 = \mathbf{41.13}$$

Με τον τρόπο αυτό ελέγχεται η ικανότητα των κατανομών του μεθανολικού εκχυλίσματος του φυτού να αναστέλλει αυτήν την ενζυμική αντίδραση και από τις συνολικές μετρήσεις που έγιναν, προκύπτει ο παρακάτω πίνακας:

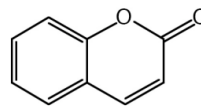
% Αναστολή των εξεταζόμενων κατανομών του μεθανολικού εκχυλίσματος επί της λιποξυγονάσης φυτικής προέλευσης	
Δείγμα	% Αναστολή
Διαιθυλαιθέρας	68.2
Οξικός Αιθυλεστέρας	75.3
Υπόλειμμα Οξικού Αιθυλεστέρα	82.5
κ-Βουτανολή	62.7
Υδατικό	41.1



Ως ουσίες αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν η κουμαρίνη και το νορδιυδρογουαϊαρετικό οξύ (NDGA-nordihydroguaiaretic acid), τα οποία στις ίδιες συγκεντρώσεις εμφανίζουν 36% και 83% αναστολή του ενζύμου, αντίστοιχα (Pontiki E. et al., 2006; Kontogiorgis C. et al., 2006; Katsori A.-M. et al., 2011).



NDGA



Κουμαρίνη

Από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι όλες οι κατανομές ξεπερνούν το ποσοστό αναστολής που προκαλεί η κουμαρίνη και ιδιαίτερα η κατανομή του οξικού αιθυλεστέρα, και του υπολείμματος αυτού, προκαλεί ποσοστό αναστολής της δράσης της λιποξυγονάσης φυτικής προέλευσης που προσεγγίζει την τιμή και του NDGA. Από τα παραπάνω συμπεραίνεται η εξαιρετική δράση των διαφόρων εκχυλισμάτων του φυτού και η ενδεχόμενη χρήση του ως αντιοξειδωτικό, με εξειδικευμένη δράση κατά της λιποξυγονάσης. Πιθανόν να αποδίδεται αυτή η δράση στα φλαβονοειδή που περιέχονται στο φυτό και τα οποία είναι γνωστό ότι δρουν ως σαρωτές ελευθέρων ριζών με αντιοξειδωτική δράση.

Μάλιστα, η λιποφιλικότητα αναφέρεται ως μια σπουδαία φυσικοχημική ιδιότητα για την αναστολή της λιποξυγονάσης (Pontiki E. et al., 2004; Pontiki E. et al., 2008). Από τα πειραματικά αποτελέσματα επιβεβαιώνεται το παραπάνω, διότι με την αύξηση της λιποφιλικότητας προκύπτει και αύξηση του ποσοστού αναστολής της δράσης της λιποξυγονάσης, με μοναδική εξαίρεση την κατανομή του διαιθυλαιθέρα που θεωρητικά θα έπρεπε να εμφανίζει τη μεγαλύτερη αναστολή ως η πιο άπολη κατανομή.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η φυτοχημική ανάλυση των υπέργειων τμημάτων του φυτού *Tephrosia humilis* έδειξε την παρουσία 95 συνολικά ενώσεων με συνδυασμό των τεχνικών LC-DAD-MS(ESI+) ανάλυσης, φασμάτων υπεριώδους-ορατού, πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ($^1\text{H-NMR}$, $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$, HSQC , HMBC , $^{13}\text{C-NMR}$) και φασμάτων μάζης. Από την φυτοχημική ανάλυση ανιχνεύθηκαν συνολικά 95 ενώσεις εκ των οποίων 65 απομονώθηκαν με χρωματογραφικές τεχνικές και 30 αναλύθηκαν με την τεχνική του LC-DAD-MS. 13 από τις συνολικά 65, ταυτοποιήθηκαν με όλα τα φασματοσκοπικά τους στοιχεία, 38 με τα φάσματα UV-Vis κατά Mabry (1970) ενώ δεν κατέστη δυνατή η διευκρίνιση σε 14 ενώσεις. Εκτιμήθηκε η δομή σε 29 ενώσεις από τις 30 με την τεχνική του LC-DAD-MS, ενώ δεν κατέστη δυνατή η διευκρίνιση σε μία εξ αυτών.

Η ποιοτική ανάλυση των αρχικών εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε σε σύστημα LC-DAD-MS (ESI+) και έδειξε την παρουσία φλαβονών, φλαβανονών και παραγώγων του κινικού οξέος. Ιδιαίτερως σημαντική κρίνεται η ύπαρξη μεγάλου αριθμού φαινυλοπροπανοειδών που συνδέονται με φλαβονοειδή, μέσω εστέρα ή αιθέρα, με επικρατούσα μορφή αυτή των φλαβανονών και των φλαβονών. Για τις ενώσεις για τις οποίες δεν ήταν δυνατή η ταυτοποίηση με το παραπάνω σύστημα, διευκρινίστηκε η δομή τους με τη βοήθεια διαφόρων τεχνικών Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (φάσματα NMR) σε συνδυασμό με φάσματα μάζης (HR-MS) και προέκυψε ότι 7 από αυτές ανήκουν στην κατηγορία των φλαβονοειδών (φλαβανόνες, φλαβόνες), 2 στην κατηγορία των κυκλοεξυλαιθανοειδών, μία στην κατηγορία των τερπενίων, μία αποτελεί παράγωγο κουμαρικού οξέος, μία παράγωγο βενζοϊκού οξέος και ακόμα μία ένωση που αντιστοιχεί στο πρωτοκατεχικό οξύ. Είναι η πρώτη φορά που μελετάται το συγκεκριμένο είδος του γένους *Tephrosia* με ταυτόχρονη απομόνωση ουσιών και κυρίως το φαινολικό του περιεχόμενο. Ιδιαίτερη σημασίας κρίνεται και το γεγονός ότι όλες οι φλαβανόνες που απομονώθηκαν ως καθαρές ουσίες, εμφανίστηκαν ταυτόχρονα ως S- και R- ισομερή, και για πρώτη φορά σε αναλογία 1:1. Η αναλογία του (S)-ισομερούς έναντι του (R)-ισομερούς δικαιολογείται από τη βιβλιογραφία, καθότι, σύμφωνα με μελέτη σε καρπούς

γκρέιπφρουτ, προέκυψε ότι κατά τη διάρκεια ωρίμανσής τους, η 2S-variγγίνη υπόκειται σε μη ενζυματική ρακεμοποίηση στον C-2 μέσω διάνοιξης του δακτυλίου, προκύπτοντας τελικώς μίγμα και των δύο C-2 διαστερομερών, με αναλογία που αγγίζει το 3:2 υπέρ του 2-S έναντι του 2-R, παρά το ότι η αρχική αναλογία των εναντιομερών είναι 100.000:1, υπέρ της σύνθεσης του (S)-ισομερούς. Ακόμη, με την απομόνωση των συγκεκριμένων κυκλοεξυλαιθανοειδών, το *T.humilis* καθίσταται –όπως έχει προαναφερθεί– το τρίτο μόλις φυτικό γένος στο οποίο επιβεβαιώνεται η ύπαρξη ενώσεων της κατηγορίας αυτής, στοιχείο ιδιαίτερος σημαντικό διότι οι ενώσεις αυτές εμφανίζουν σημαντική κυτταροστατική δράση με αντικαρκινικές ιδιότητες. Μάλιστα, τα τελευταία χρόνια αποτελούν στοιχεία έρευνας για την σύνθεση παραγώγων τους, με προς έγκριση-κατατεθειμένες ήδη 3 πατέντες για την ανάπτυξη φαρμακομορίων με δομή κυκλοεξυλαιθανοειδούς.

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των κατανομών που προέκυψαν από το φυτικό υλικό μελετήθηκε με διάφορες μεθόδους. Η πρώτη μέθοδος δοκιμασίας της αντιοξειδωτικής ικανότητας ήταν η δοκιμασία αναγωγής της ελεύθερης ρίζας του DPPH[•]. Από τη μέθοδο αυτή προκύπτει ότι τα κλάσματα του οξικού αιθυλεστέρα παρουσίασαν τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δύναμη ανάμεσα σε όλες τις κατανομές, ακολουθούμενα από τα αντίστοιχα κλάσματα της βουτανόλης, του υπολείμματος του οξικού αιθυλεστέρα, του διαιθυλαιθέρα και της μεθανολικής κατανομής, με την κατανομή του υδατικού να εμφανίζει την μικρότερη αντιοξειδωτική δράση. Συγκριτικά με τις ουσίες αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν, μόνο η κατανομή του οξικού αιθυλεστέρα προσεγγίζει σχεδόν κατά το ήμισυ την αντίστοιχη αντιοξειδωτική ικανότητα του τρόλοξ που είναι και ασθενέστερη της κβερκετίνης. Ένα μεγάλο εύρος αντιοξειδωτικού δυναμικού παρατηρήθηκε επίσης και με την δεύτερη μέθοδο μέτρησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω της χημειοφωταύγειας της λουμινόλης. Όπως και στην περίπτωση της δοκιμής του DPPH[•], το κλάσμα του οξικού αιθυλεστέρα εμφάνισε το υψηλότερο αντιοξειδωτικό δυναμικό, 4.5 φορές πιο ισχυρό από την κβερκετίνη (1^η ουσία αναφοράς). Χαμηλότερες τιμές αντιοξειδωτικής ικανότητας είχαν τα κλάσματα του διαιθυλαιθέρα και του μεθανολικού εκχυλίσματος, αλλά και πάλι ήταν μεγαλύτερες από το τρόλοξ (2^η ουσία αναφοράς), ενώ αντίθετα εξαιρετικά χαμηλές τιμές έδωσαν η βουτανολική και η υδατική κατανομή. Από τα πειραματικά αποτελέσματα για την ανασταλτική δράση επί της λιποξυγονάσης

φυτικής προέλευσης προκύπτει ότι όλες οι κατανομές ξεπερνούν το ποσοστό αναστολής που προκαλεί η κουμαρίνη (1^η ουσία αναφοράς) και ιδιαίτερα η κατανομή του οξικού αιθυλεστέρα, και του υπολείμματος αυτού, προκαλώντας ποσοστό αναστολής της δράσης της λιποξυγονάσης φυτικής προέλευσης που προσεγγίζει την τιμή και του NDGA (2^η ουσία αναφοράς με υψηλότατο ποσοστό αναστολής). Από όλα τα παραπάνω συμπεραίνεται η εξαιρετική δράση των διαφόρων εκχυλισμάτων του φυτού και η ενδεχόμενη χρήση του ως αντιοξειδωτικό/αντιφλεγμονώδες. Η δράση αυτή αποδίδεται στα φλαβονοειδή που περιέχονται στο φυτό και τα οποία είναι γνωστό ότι δρουν ως σαρωτές ελευθέρων ριζών.

Επιπροσθέτως, τα πειραματικά αποτελέσματα που προκύπτουν από την αναστολή του ενζύμου αναγωγή της αλδόζης (ALR2) εμφανίζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, δεδομένου ότι τα εκχυλίσματα εμφανίζουν υψηλή αποτελεσματικότητα αναστολής του ενζύμου, αν και πρόκειται για μίγματα ουσιών φυτικών παρασκευασμάτων. Όλα τα κλάσματα (δισουλφιθέρια, οξικού αιθυλεστέρα, υπολείμματος οξικού αιθυλεστέρα, βουτανόλης) της μεθανολικής κατανομής, πλην του υδατικού, εμφανίζουν υψηλότατη, άνω του 70%, ικανότητα αναστολής της ALR2 σε τελική συγκέντρωση 50μg/ml. Σε αυτή της συγκέντρωσης προκύπτει ότι στο σύνολό του, το μεθανολικό εκχύλισμα εμφανίζει μια αναστολή του ενζύμου σε ποσοστό άνω του 52%, σε αντίθεση με την κατανομή του διχλωρομεθανίου που αντιστοιχεί στο 36%. Σε τελική συγκέντρωση 25 μg/ml, και πάλι όλα τα κλάσματα, πλην υδατικού, της μεθανολικής κατανομής διατηρούν τα υψηλά ποσοστά αναστολής του ενζύμου, με ποσοστά άνω του 60%. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι σε τελική συγκέντρωση 25μg/ml, η ανασταλτική δράση της υδατικής κατανομής σχεδόν υποδιπλασιάζεται, φτάνοντας το 29% και δεν ξεπερνά ούτε τη δράση της σορβινίλης, ουσία που χρησιμοποιήθηκε σαν ένωση αναφοράς. Όσον αφορά την αναστολή του ενζύμου αναγωγή της αλδεΐδης (ALR1), σε όλες τις περιπτώσεις των κλασμάτων των κατανομών που μελετήθηκαν, προκαλείται μεγαλύτερη αναστολή της ALR2 σε σχέση με την ALR1. Ωστόσο οι υψηλές τιμές αναστολής της ALR2 συνοδεύονται από αρκετά υψηλές τιμές για την ALR1, τουλάχιστον για τα κλάσματα (δισουλφιθέρια, οξικού αιθυλεστέρα, υπολείμματος οξικού αιθυλεστέρα, βουτανόλης, υδατικού) του μεθανολικού εκχυλίσματος. Η μεγαλύτερη διαφορά παρατηρείται στην κατανομή του οξικού αιθυλεστέρα, ενώ η διαφορά στο κλάσμα

του υπολείμματος του οξικού αιθυλεστέρα είναι πολύ μικρή, σχεδόν αμελητέα. Σχετικά με το εκχύλισμα του διχλωρομεθανίου, η συγκριτικά μικρή αναστολή (36%) του ενζύμου της αναγωγής της αλδόζης, συνοδεύεται από μια εξαιρετικά μικρή αναστολή (12%) του ενζύμου αναγωγής της αλδεΐδης. Για την εκλεκτικότητα των υπό εξέταση κατανομών προκύπτει ότι, παρότι πρόκειται για μίγμα ουσιών, το κλάσμα της κατανομής του διχλωρομεθανίου συγκεντρώνει τις καλύτερες προοπτικές στο να εμφανίζει την περισσότερο εκλεκτική δράση κατά της ALR2, έναντι της δράσης κατά της ALR1. Ωστόσο αυτό συνδυάζεται από σχετικά μικρή αναστολή του ενζύμου αναγωγής της αλδόζης, συγκριτικά με όλα τα κλάσματα της μεθανολικής κατανομής (δισουλφαιθέρια, οξικού αιθυλεστέρα, υπολείμματος οξικού αιθυλεστέρα, βουτανόλης, υδατικού). Ως βέλτιστο όμως, κρίνεται το κλάσμα του οξικού αιθυλεστέρα, διότι συγκαταλέγεται μεταξύ αυτών που έχουν μία από τις υψηλότερες τιμές αναστολής του ενζύμου αυτού και ταυτόχρονα εμφανίζει την μεγαλύτερη εκλεκτικότητα από τα υπόλοιπα κλάσματα, αν εξαιρεθεί το εκχύλισμα του διχλωρομεθανίου με τη χαμηλή ικανότητα αναστολής της ALR2. Τα αποτελέσματα αυτά μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι ορισμένα εκχυλίσματα της εν λόγω δρόγης έχουν αντιοξειδωτική δράση σε συνδυασμό με ανασταλτική δράση της αναγωγής της αλδόζης, γεγονός που δικαιολογεί τη χρήση του φυτού στην τοπική λαϊκή θεραπευτική.

Όλα τα παραπάνω δεδομένα συνηγορούν στο γεγονός της πολύ καλής *in vitro* αντιοξειδωτικής ικανότητας των διαφόρων εκχυλισμάτων του φυτού *Tephrosia humilis* σε συνδυασμό με την αναστολή του ενζύμου αναγωγής της αλδόζης, ενισχύοντας το ενδεχόμενο της χρήσης του για φαρμακευτικούς σκοπούς, και ιδιαίτερα με τη δυναμική του κατά των μακροχρόνιων δευτερογενών επιπλοκών του διαβήτη. Για τους λόγους αυτούς, κρίνεται σκόπιμη η περαιτέρω έρευνα των εκχυλισμάτων του φυτού με *in vivo* πειράματα σε πειραματόζωα και κλινικές μελέτες.

Βιβλιογραφία

- Adinarayana, K., Jayaveera, K.N., Mallikarjuna Rao, P., Madhusudhana Chetty, C., Sandeep, D.K., Swetha, C., Mohamed Saleem, T.S., 2011, Acute toxicity and hepatoprotective effect of methanolic extract of *Tephrosia calophylla*, *Research Journal of Medicinal Plant* 5 (3), pp. 266-273
- Adlercreutz, C.H.T., Goldin, B.R., Gorbach, S.L., Hockerstedt, K.A.V., Watanabe, S., Hamalainen, E.K., Markkanen, M.H., Fotsis, T., 1995, Soybean phytoestrogen intake and cancer risk, *Journal of Nutrition* 125 (7), pp. 1960
- Adlercreutz, H., Fotsis, T., Bannwart, C., 1986, Determination of urinary lignans and phytoestrogen metabolites, potential antiestrogens and anticarcinogens, in urine of women on various habitual diets, *Journal of Steroid Biochemistry* 25 (5 B), pp. 791-797
- Alcaraz, M.J., Ferrandiz, M.L., 1987, Modification of arachidonic metabolism by flavonoids, *Journal of Ethnopharmacology* 21 (3), pp. 209-229
- Alderton, W.K., Cooper, C.E., Knowles, R.G., 2001, Nitric oxide synthases: Structure, function and inhibition, *Biochemical Journal* 357 (3), pp. 593-615
- Alexiou, P., Pegklidou, K., Chatzopoulou, M., Nicolaou, I., Demopoulos, V.J., 2009, Aldose reductase enzyme and its implication to major health problems of the 21st century, *Current Medicinal Chemistry* 16 (6), pp. 734-752
- Amić, D., Davidović-Amić, D., Bešlo, D., Rastija, V., Lučić, B., Trinajstić, N., 2007, SAR and QSAR of the antioxidant activity of flavonoids, *Current Medicinal Chemistry* 14 (7), pp. 827-845
- Amić, D., Lučić, B., 2010, Reliability of bond dissociation enthalpy calculated by the PM6 method and experimental TEAC values in antiradical QSAR of flavonoids, *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 18 (1), pp. 28-35
- Anderson, K.M., Seed, T., Vos, M., Mulshine, J., Meng, J., Alrefai, W., Ou, D., Harris, J.E., 1998, 5-lipoxygenase inhibitors reduce PC-3 cell proliferation and initiate nonnecrotic cell death, *Prostate* 37 (3), pp. 161-173
- Andrei, C.C., Vieira, P.C., Fernandes, J.B., Da Silva, M.F.D.G.F., Fo, E.R., 1997, Dimethylchromene rotenoids from *Tephrosia candida*, *Phytochemistry* 46 (6), pp. 1081-1085
- Andrei, C.C., Ferreira, D.T., Faccione, M., De Moraes, L.A.B., De Carvalho, M.G., Braz-Filho, R., 2000, C-prenylflavonoids from roots of *Tephrosia tunicata*, *Phytochemistry* 55 (7), pp. 799-804
- Ansari, N.H., Srivastava, S.K., 1990, Allopurinol promotes and butylated hydroxy toluene prevents sugar-induced cataractogenesis, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 168 (3), pp. 939-943
- Ansari, N.H., Bhatnagar, A., Fulep, E., Khanna, P., Srivastava, S.K., 1994, Trolox protects hyperglycemia-induced cataractogenesis in cultured rat lens, *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology* 84 (1), pp. 93-104

- Aquino, R., Ciavatta, M.L., De Simone, F., Pizza, C., 1990, A flavanone glycoside from *Hamelia patens*, *Phytochemistry* 29 (7) , pp. 2359-2360
- Arai, Y., Shimoji, K., Konno, M., 1983, Synthesis and 5-lipoxygenase inhibitory activities of eicosanoid compounds, *Journal of Medicinal Chemistry* 26 (1), pp. 72-78
- Arai, Y., Watanabe, S., Kimira, M., Shimoi, K., Mochizuki, R., Kinae, N., 2000, Dietary intakes of flavonols, flavones and isoflavones by Japanese women and the inverse correlation between quercetin intake and plasma LDL cholesterol concentration, *Journal of Nutrition* 130 (9), pp. 2243-2250
- Archer, S., 1993, Measurement of nitric oxide in biological models, *FASEB Journal* 7 (2), pp. 349-360
- Argoti, J.C., Salido, S., Linares-Palomino, P.J., Ramírez, B., Insuasty, B., Altarejos, J. , 2011, Antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of a selection of wild-growing Colombian plants, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91 (13) , pp. 2399-2406
- Arnous, A., Makris, D.P., Kefalas, P., 2001, Effect of principal polyphenolic components in relation to antioxidant characteristics of aged red wines, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (12), pp. 5736-5742
- Arriaga, A.M.C., Lima, J.Q., Vasconcelos, J.N., De Oliveira, M.C.F., Andrade-Neto, M., Santiago, G.M.P., Uchoa, D.E.A., Malcher G.T., Mafezoli J., Braz-Filho, R., 2009, Unequivocal assignments of flavonoids from *Tephrosia sp.* (Fabaceae), *Magnetic Resonance in Chemistry* 47 (6), pp. 537-540
- Avis, I.M., Jett, M., Boyle, T., Vos, M.D., Moody, T., Treston, A.M., Martínez, A., Mulshine, J.L., 1996, Growth control of lung cancer by interruption of 5-lipoxygenase-mediated growth factor signaling, *Journal of Clinical Investigation* 97 (3), pp. 806-813
- Awad, H.M., Boersma, M.G., Boeren, S., Van Bladeren, P.J., Vervoort, J., Rietjens, I.M.C.M., 2002, The regioselectivity of glutathione adduct formation with flavonoid quinone/quinone methides is pH-dependent, *Chemical Research in Toxicology* 15 (3), pp. 343-351
- Bae, E.-A., Han, M.J., Lee, M., Kim, D.-H., 2000, In vitro inhibitory effect of some flavonoids on rotavirus infectivity, *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 23 (9), pp. 1122-1124
- Baek, M.-Y., Cho, J.-G., Lee, D.-Y., Ahn, E.-M., Jeong, T.-S., Baek, N.-I., 2010, Isolation of triterpenoids from the stem bark of *Albizia julibrissin* and their inhibition activity on ACAT-1 and ACAT-2, 2010, *Journal of Applied Biological Chemistry* 53 (3) , pp. 310-315
- Bailey, D.G., Dresser, G.K., Kreeft, J.H., Munoz, C., Freeman, D.J., Bend, J.R., 2000, Grapefruit-felodipine interaction: Effect of unprocessed fruit and probable active ingredients, *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 68 (5), pp. 468-477
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S., 2006, Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses, *Food Chemistry* 99 (1), pp. 191-203
- Barnes, S., Kirk, M., Coward, L., 1994, Isoflavones and their conjugates in soy foods: Extraction conditions and analysis by HPLC-mass spectrometry, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42 (11), pp. 2466-2474

- Barradas, S., Carreño, M.C., González-López, M., Latorre, A., Urbano, A., 2009, Direct stereocontrolled synthesis of polyoxygenated hydrobenzofurans and hydrobenzopyrans from p-peroxy quinols, *Organic Letters* 9 (24) , pp. 5019-5022
- Barski, O.A., 1995, Mechanism of human aldehyde reductase: Characterization of the active site pocket, *Biochemistry* 34 (35), pp. 11264-11275
- Barski, O.A., Gabbay, K.H., Bohren, K.M., 1996, The C-terminal loop of aldehyde reductase determines the substrate and inhibitor specificity, *Biochemistry* 35 (45), pp. 14276-14280
- Barski, O.A., Tipparaju, S.M., Bhatnagar, A., 2008, The aldo-keto reductase superfamily and its role in drug metabolism and detoxification, *Drug Metabolism Reviews* 40 (4) , pp. 553-624
- Bashir, A.K., Hassan, E.S.S., Amiri, M.H., Abdalla, A.A., Wasfi, I.A., 1992, Antimicrobial activity of certain plants used in the folk-medicine of United Arab Emirates. *Fitoterapia* 63 (4), pp. 371-375
- Baskar, A.A., Ignacimuthu, S., Michael, G.P., Al Numair, K.S., 2011, Cancer chemopreventive potential of Luteolin-7-O-Glucoside isolated from ophiorrhiza mungos linn, *Nutrition and Cancer* 63 (1) , pp. 130-138
- Bassam, B.J., Djordjevic, M.A., Redmond, J.W., Batley, M., Rolfe, B.G., 1988, Identification of a nodD-dependent locus in the Rhizobium strain NGR234 activated by phenolic factors secreted by soybeans and other legumes., *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 1 (4), pp. 161-168
- Bayrakçeken, F., Aktaş, S., Toptan, M., Ünlügedik, A., 2003, High resolution electronic absorption spectra of anisole and phenoxyl radical, *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 59 (1), pp. 135-138
- Beckman, K.B., Ames, B.N., 1997, Oxidative decay of DNA, *Journal of Biological Chemistry* 272 (32), pp. 19633-19636
- Beninger, C.W., Abou-Zaid, M.M., Kistner, A.L.E., Hallett, R.H., Iqbal, M.J., Grodzinski, B., Hall, J.C., 2004, A flavanone and two phenolic acids from Chrysanthemum morifolium with phytotoxic and insect growth regulating activity, *Journal of Chemical Ecology* 30 (3), pp. 589-606
- Benzie, I.F.F., Strain, J.J., 1996, The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power': The FRAP assay, *Analytical Biochemistry* 239 (1), pp. 70-76
- Benzie, I.F.F., Szeto, Y.T., 1999, Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47 (2), pp. 633-636
- Bergendi, L., Beneš, L., Ďuracková, Z., Ferenčík, M., 1999, Chemistry, physiology and pathology of free radicals, *Life Sciences* 65 (18-19), pp. 1865-1874
- Bhaskar Rao, D., Subhashini Devi, P., Aparanji, P., Rama Rao, M., Raghava Rao, T., 2007, In vitro evaluation of antioxidant properties and their capacity of *Alternanthera sessilis* and *Tephrosia purpurea*, *Biosciences Biotechnology Research Asia* 4 (2) , pp. 551-560
- Blois, M.S., 1958, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature* 181 (4617), pp. 1199-1200
- Blomquist, C.H., Lima, P.H., Hotchkiss, J.R., 2005, Inhibition of 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase (3 α -HSD) activity of human lung microsomes by genistein, daidzein, coumestrol and C 18-, C19- and C21-hydroxysteroids and ketosteroids, *Steroids* 70 (8), pp. 507-514

- Boon, P.J.M., Marinho, H.S., Oosting, R., Mulder, G.J., 1999, Glutathione conjugation of 4-hydroxy-trans-2,3-nonenal in the rat in vivo, the isolated perfused liver and erythrocytes, *Toxicology and Applied Pharmacology* 159 (3), pp. 214-223
- Borhani, D.W., Harter, T.M., Petrash, J.M., 1992, The crystal structure of the aldose reductase-NADPH binary complex, *Journal of Biological Chemistry* 267 (34), pp. 24841-24847
- Borradaile, N.M., Carroll, K.K., Kurowska, E.M., 1999, Regulation of HepG2 cell apolipoprotein B metabolism by the citrus flavanones hesperetin and naringenin, *Lipids* 34 (6), pp. 591-598
- Bredt, D.S., Snyder, S.H., 1994, Nitric oxide: A physiological messenger molecule, *Annual Review of Biochemistry* 63, pp. 175-195
- Breinholt, V., Lauridsen, S.T., Dragsted, L.O., 1999, Differential effects of dietary flavonoids on drug metabolizing and antioxidant enzymes in female rat, *Xenobiotica* 29 (12), pp. 1227-1240
- Brown, J.E., Khodr, H., Hider, R.C., Rice-Evans, C.A., 1998, Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: Implications for their antioxidant properties, *Biochemical Journal* 330 (3), pp. 1173-1178
- Brownlee, M., 2001, Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications, *Nature* 414 (6865), pp. 813-820
- Brownlee, M., 2003, A radical explanation for glucose-induced β cell dysfunction, *Journal of Clinical Investigation* 112 (12), pp. 1788-1790
- Bruno, G., Costantino, L., Curinga, C., Maccari, R., Monforte, F., Nicolò, F., Ottanà, R., Vigorita, M.G., 2002, Synthesis and aldose reductase inhibitory activity of 5-arylidene-2,4-thiazolidinediones, *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 10 (4), pp. 1077-1084
- Bucher, J.R., Tien, M., Aust, S.D., 1983, The requirement for ferric in the initiation of lipid peroxidation by chelated ferrous iron, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 111 (3), pp. 777-784
- Burda, S., Oleszek, W., 2001, Antioxidant and antiradical activities of flavonoids, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (6), pp. 2774-2779
- Burg, M.B., 1988, Role of aldose reductase and sorbitol in maintaining the medullary intracellular milieu, *Kidney International* 33 (3), pp. 635-641
- Burg, M.B., 1995, Molecular basis of osmotic regulation, *American Journal of Physiology - Renal Fluid and Electrolyte Physiology* 268 (6 37-6), pp. F983-F996
- Byung, H.K., Sung, M.C., Reddy, A.M., Yeong, S.K., Kyung, R.M., Kim, Y., 2005, Down-regulatory effect of quercitrin gallate on nuclear factor- κ B-dependent inducible nitric oxide synthase expression in lipopolysaccharide-stimulated macrophages RAW 264.7, *Biochemical Pharmacology* 69 (11), pp. 1577-1583
- Caccamese, S., Chillemi, R., 2010, Racemization at C-2 of naringin in pummelo (*Citrus grandis*) with increasing maturity determined by chiral high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A* 1217 (7), pp. 1089-1093
- Cadenas, E., 1989, Biochemistry of oxygen toxicity, *Annual Review of Biochemistry* 58, pp. 79-110

- Caltagirone, S., Rossi, C., Poggi, A., Ranelletti, F.O., Natali, P.G., Brunetti, M., Aiello, F.B., Piantelli, M., 2000, Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potential, *International Journal of Cancer* 87 (4), pp. 595-600
- Camele, G., Delle Monache, F., Delle Monache, G., Marini Bettolo, G.B., 1980, Three new flavonoids from *Tephrosia praecans*, *Phytochemistry* 19 (4), pp. 707-709
- Canada, A.T., Giannella, E., Nguyen, T.D., Mason, R.P., 1990, The production of reactive oxygen species by dietary flavonols, *Free Radical Biology and Medicine* 9 (5), pp. 441-449
- Cao, G., Alessio, H.M., Cutler, R.G., 1993, Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants, *Free Radical Biology and Medicine* 14 (3), pp. 303-311
- Cao, G., Verdon, C.P., Wu, A.H.B., Wang, H., Prior, R.L., 1995, Automated assay of oxygen radical absorbance capacity with the COBAS FARA II, *Clinical Chemistry* 41 (12), pp. 1738-1744
- Cao, G., Sofic, E., Prior, R.L., 1997, Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relationships, *Free Radical Biology and Medicine* 22 (5), pp. 749-760
- 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 eukaryotes and prokaryotes, *Experimental Eye Research* 49 (3), pp. 377-388
- Carr, A., Frei, B., 1999, Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions?, *FASEB Journal* 13 (9), pp. 1007-1024
- Carr, A.C., McCall, M.R., Frei, B., 2000, Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: Reaction pathways and antioxidant protection, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 20 (7), pp. 1716-1723
- Cavaliere, C., Foglia, P., Pastorini, E., Samperi, R., Laganà, A., 2005, Identification and mass spectrometric characterization of glycosylated flavonoids in *Triticum durum* plants by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 19 (21), pp. 3143-3158
- Cavaliere, C., Cucci, F., Foglia, P., Guarino, C., Samperi, R., Laganà, A., 2007, Flavonoid profile in soybeans by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 21 (14), pp. 2177-2187
- Cavia-Saiz, M., Busto, M.D., Pilar-Izquierdo, M.C., Ortega, N., Perez-Mateos, M., Muñiz, P., 2010, Antioxidant properties, radical scavenging activity and biomolecule protection capacity of flavonoid naringenin and its glycoside naringin: A comparative study, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90 (7), pp. 1238-1244
- Chaabi, M., Chabert, P., Vonthron-Sénécheau, C., Weniger, B., Ouattara, M., Corstjens, H., Sente, I., Lobstein, A., 2010, Acylated flavonol pentaglycosides from *Baphia nitida* leaves, *Phytochemistry Letters* 3 (2), pp. 70-74
- Chakrabarti, S., Malick, M.A., 1991, In vivo nephrotoxic action of an isomeric mixture of S-(1-phenyl-2-hydroxyethyl)glutathione and S-(2-phenyl-2-hydroxyethyl)glutathione in Fischer-344 rats, *Toxicology* 67 (1), pp. 15-27

- Chamulitrat, W., Mason, R.P., 1989, Lipid peroxy radical intermediates in the peroxidation of polyunsaturated fatty acids by lipoxygenase. Direct electron spin resonance investigations, *Journal of Biological Chemistry* 264 (35), pp. 20968-20973
- Chan, T., Galati, G., O'Brien, P.J., 1999, Oxygen activation during peroxidase catalysed metabolism of flavones or flavanones, *Chemico-Biological Interactions* 122 (1), pp. 15-25
- Chance, B., Sies, H., Boveris, A., 1979, Hydroperoxide metabolism in mammalian organs, *Physiological Reviews* 59 (3), pp. 527-605
- Chang, W.-S., Lee, Y.-J., Lu, F.-J., Chiang, H.-C., 1993, Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase, *Anticancer Research* 13 (6 A), pp. 2165-2170
- Chang, L.C., Gerhäuser, C., Song, L., Farnsworth, N.R., Pezzuto, J.M., Kinghorn, A.D., 1997, Activity-guided isolation of constituents of *Tephrosia purpurea* with the potential to induce the phase II enzyme, quinone reductase, *Journal of Natural Products* 60 (9), pp. 869-873
- Chang, L.C., Chávez, D., Song, L.L., Farnsworth, N.R., Pezzuto, J.M., Kinghorn, A.D., 2000, Absolute configuration of novel bioactive flavonoids from *Tephrosia purpurea*, *Organic Letters* 2 (4), pp. 515-518
- Chang, T., Wang, R., Wu, L., 2005, Methylglyoxal-induced nitric oxide and peroxynitrite production in vascular smooth muscle cells, *Free Radical Biology and Medicine* 38 (2), pp. 286-293
- Charlier, C., Michaux, C., 2003, Dual inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) and 5-lipoxygenase (5-LOX) as a new strategy to provide safer non-steroidal anti-inflammatory drugs, *European Journal of Medicinal Chemistry* 38 (7-8), pp. 645-659
- Chaudhuri, S.K., Huang, L., Fullas, F., Brown, D.M., Wani, M.C., Wall, M.E., Tucker, J.C., (...), Kinghorn, A.D., 1995, Isolation and structure identification of an active DNA strand-scission agent, (+)-3,4-di-hydroxy-8,9-methylenedioxypterocarpan, *Journal of Natural Products* 58 (12), pp. 1966-1969
- Chen, J., Tian, J., Wu, F.E., Kawabe, N., Tokuda, M., 2001, First Total Synthesis of Cleroindicin B, (\pm) Cleroindicin C and E, *Chinese Chemical Letters* 12 (9), pp. 771-774
- Chen, Y., Hu, Y., Zhang, H., Peng, C., Li, S., 2009, Loss of the Alox5 gene impairs leukemia stem cells and prevents chronic myeloid leukemia, *Nature Genetics* 41 (7), pp. 783-792
- Chibber, S.S., Dutt, S.K., 1981, Candidin, a pyranoflavone from *Tephrosia candida* seeds, *Phytochemistry* 20 (6), pp. 1460
- Chinniah, A., Mohapatra, S., Goswami, S., Mahapatra, A., Kar, S.K., Mallavadhani, U.V., Das, P.K., 2009, On the potential of *Tephrosia purpurea* as anti-Helicobacter pylori agent, *Journal of Ethnopharmacology* 124 (3), pp. 642-645
- Chiueh, C.C., 1999, Neuroprotective properties of nitric oxide, *Annals of the New York Academy of Sciences* 890, pp. 301-311
- Chlebda, E., Magdalan, J., Merwid-Lad, A., Trocha, M., Kopacz, M., Kuźniar, A., Nowak, D., Szelag, A., 2010, Influence of water-soluble flavonoids, quercetin-5'-sulfonic acid sodium salt and morin-5'-sulfonic acid sodium salt, on antioxidant parameters in the subacute cadmium intoxication mouse model, *Experimental and Toxicologic Pathology* 62 (2), pp. 105-108

- Chowdhury, A.R., Mandal, S., Mitra, B., Sharma, S., Mukhopadhyay, S., Majumder, H.K., 2002, Betulinic acid, a potent inhibitor of eukaryotic topoisomerase I: Identification of the inhibitory step, the major functional group responsible and development of more potent derivatives, *Medical Science Monitor* 8 (7), pp. BR254-BR260
- Cichewicz, R.H., Kouzi, S.A., 2004, Chemistry, Biological Activity, and Chemotherapeutic Potential of Betulinic Acid for the Prevention and Treatment of Cancer and HIV Infection, *Medicinal Research Reviews* 24 (1), pp. 90-114
- Ciolino, H.P., Daschner, P.J., Yeh, G.C., 1999, Dietary flavonols quercetin and kaempferol are ligands of the aryl hydrocarbon receptor that affect CYP1A1 transcription differentially, *Biochemical Journal* 340 (3), pp. 715-722
- Conner, E.M., Grisham, M.B., 1996, Inflammation, free radicals and antioxidants, *Nutrition* 12 (4), pp. 274-277
- Cook, N.C., Samman, S., 1996, Flavonoids - Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources, *Journal of Nutritional Biochemistry* 7 (2), pp. 66-76
- Corey, E.J., Kantner, S.S., Lansbury Jr., P.T., 1983, Irreversible inhibition of the leukotriene pathway by 4,5-dehydroarachidonic acid, *Tetrahedron Letters* 24 (3), pp. 265-268
- Cornicelli, J.A., Trivedi, B.K., 1999, 15-lipoxygenase and its inhibition: A novel therapeutic target for vascular disease, *Current Pharmaceutical Design* 5 (1), pp. 11-20
- Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J.P., Cimanga, K., Van Poel, B., Pieters, L., Vanden Berghe, D., 1998, Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers, *Journal of Natural Products* 61 (1), pp. 71-76
- Cos, P., Calomme, M., Sindambiwe, J.B., De Bruyne, T., Cimanga, K., Pieters, L., Vlietinck, A.J., Vanden Berghe, D., 2001, Cytotoxicity and lipid peroxidation-inhibiting activity of flavonoids, *Planta Medica* 67 (6), pp. 515-519
- Costantino, L., Rastelli, G., Gamberini, M.C., Vinson, J.A., Bose, P., Iannone, A., Staffieri, M., (...), Albasini, A., 1999, 1-Benzopyran-4-one antioxidants as aldose reductase inhibitors, *Journal of Medicinal Chemistry* 42 (11), pp. 1881-1893
- Cotelle, N., Bernier, J.-L., Catteau, J.-P., Pommery, J., Wallet, J.-C., Gaydou, E.M., 1996, Antioxidant properties of hydroxy-flavones, *Free Radical Biology and Medicine* 20 (1), pp. 35-43
- Cuyckens, F., Rozenberg, R., De Hoffmann, E., Claeys, M., 2001, Structure characterization of flavonoid O-diglycosides by positive and negative nano-electrospray ionization ion trap mass spectrometry, *Journal of Mass Spectrometry* 36 (11), pp. 1203-1210
- Cuyckens, F., Shahat, A.A., Van den Heuvel, H., Abdel-Shafeek, K.A., El-Messiry, M.M., Seif-El Nasr, M.M., (2003), The application of liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry and collision-induced dissociation in the structural characterization of acylated flavonol O-glycosides from the seeds of *Carrichtera annua*, *European Journal of Mass Spectrometry* 9 (4), pp. 409-420
- Cuyckens, F., Claeys, M., 2004, Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids, *Journal of Mass Spectrometry* 39 (1), pp. 1-15

- Dagne E., Dinku B., Gray A., Waterman P.G., 1988, Pumilaisoflavones A and B from the seed pods of *Tephrosia pumila*, *Phytochemistry* 27(5), pp 1503-1505
- Dagne E., Yenesew A., Waterman P.G., 1989, FLAVONOIDS AND ISOFLAVONOIDS FROM *TEPHROSIA-FULVINERVIS AND TEPHROSIA-PENTAPHYLLA*, *Phytochemistry* 28(11), pp 3207-3210
- Dagne, E., Mammo, W., Sterner, O., 1992, Flavonoids of *Tephrosia polyphylla*, *Phytochemistry* 31 (10), pp. 3662-3663
- Dailey, L.A., Imming, P., 1999, 12-Lipoxygenase: Classification, possible therapeutic benefits from inhibition, and inhibitors, *Current Medicinal Chemistry* 6 (5), pp. 389-398
- Damas, J., Bourdon, V., Remacle-Volon, G., Lecomte, J., 1985, Pro-inflammatory flavonoids which are inhibitors of prostaglandin biosynthesis, *Prostaglandins Leukotrienes and Medicine* 19 (1), pp. 11-24
- Darbarwar, M., Sundaramurthy, V., Rao, N.V.S., 1974, A new route to the synthesis of coumestans, *Proceedings of the Indian Academy of Sciences - Section A* 80 (2), pp. 93-96
- Davydov, V.V., Dobaeva, N.M., Bozhkov, A.I., 2004, Davydov, V.V., Dobaeva, N.M., Bozhkov, A.I., Possible role of alteration of aldehyde's scavenger enzymes during aging, *Experimental Gerontology* 39 (1), pp. 11-16
- De Groot, H., Rauen, U., 1998, Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids, *Fundamental and Clinical Pharmacology* 12 (3), pp. 249-255
- de Oliveira, A.B., Gottlieb, O.R., Ollis, W.D., Rizzini, C.T., 1971, A phylogenetic correlation of the genera *Dalbergia* and *Machaerium*, *Phytochemistry* 10 (8), pp. 1863-1876
- De Stefani, E., Boffetta, P., Deneo-Pellegrini, H., Mendilaharsu, M., Carzoglio, J.C., Ronco, A., Olivera, L., 1999, Dietary antioxidants and lung cancer risk: A case-control study in Uruguay, *Nutrition and Cancer* 34 (1), pp. 100-110
- Dehmlow, C., Erhard, J., De Groot, H., 1996, Inhibition of Kupffer cell functions as an explanation for the hepatoprotective properties of silibinin, *Hepatology* 23 (4), pp. 749-754
- Del Corso, A., Cappiello, M., Mura, U., 2008, From a dull enzyme to something else: Facts and perspectives regarding aldose reductase, *Current Medicinal Chemistry* 15 (15), pp. 1452-1461
- Derubertis, F.R., Craven, P.A., 1994, Activation of protein kinase C in glomerular cells in diabetes: Mechanisms and potential links to the pathogenesis of diabetic glomerulopathy, *Diabetes* 43 (1), pp. 1-8
- Despande, S.S., Shah, G.B., Parmar, N.S., 2003. Antiulcer activity of *Tephrosia purpurea* in rats. *Indian Journal of Pharmacology* 35, 168-172.
- Di Carlo, G., Autore, G., Izzo, A.A., Maiolino, P., Mascolo, N., Viola, P., Diurno, M.V., Capasso, F., 1993, Inhibition of intestinal motility and secretion by flavonoids in mice and rats: Structure-activity relationships, *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 45 (12), pp. 1054-1059
- Dixit, B.L., Balendiran, G.K., Watowich, S.J., Srivastava, S., Ramana, K.V., Petrash, J.M., Bhatnagar, A., Srivastava, S.K., 2000, Kinetic and structural characterization of the glutathione-binding site of aldose reductase, *Journal of Biological Chemistry* 275 (28), pp. 21587-21595

- Doiron, J., Boudreau, L.H., Picot, N., Villebonet, B., Surette, M.E., Touaibia, M., 2009, Synthesis and 5-lipoxygenase inhibitory activity of new cinnamoyl and caffeoyl clusters, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 19 (4), pp. 1118-1121
- Dominguez, X.A., Tellez, O., Ramirez E., G., 1983, Mixtecacin, a prenylated flavanone and oaxacacin its chalcone from the roots of *Tephrosia woodii*, *Phytochemistry* 22 (9), pp. 2047-2049
- Downing, D.T., Ahern, D.G., Bacht, M., 1970, Enzyme inhibition by acetylenic compounds, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 40 (1), pp. 218-223
- Dresser, G.K., Spence, J.D., Bailey, D.G., 2000, Pharmacokinetic-pharmacodynamic consequences and clinical relevance of cytochrome P450 3A4 inhibition, *Clinical Pharmacokinetics* 38 (1), pp. 41-57
- Dutt, S.K., Chibber, S.S., 1983, Candidol, a flavonol from *Tephrosia candida*, *Phytochemistry* 22 (1), pp. 325-326
- Duxin, S., McDonnell, M., Chen, X.-S., Lakkis, M.M., Li, H., Isaacs, S.N., Elsea, S.H., (...), Funk, C.D., 1998, Human 12(R)-lipoxygenase and the mouse ortholog: Molecular cloning, expression, and gene chromosomal assignment, *Journal of Biological Chemistry* 273 (50), pp. 33540-33547
- El-Kabbani, O., Carper, D.A., McGowan, M.H., Devedjiev, Y., Rees-Milton, K.J., Flynn, T.G., 1997, Studies on the inhibitor-binding site of porcine aldehyde reductase: Crystal structure of the holoenzyme-inhibitor ternary complex, *Proteins: Structure, Function and Genetics* 29 (2), pp. 186-192
- El-Kabbani, O., Wilson, D.K., Petrash, M., Quiocho, F.A., 1998, Structural features of the aldose reductase and aldehyde reductase inhibitor-binding sites., *Molecular vision* 4, pp. 19
- El-Kabbani, O., Carbone, V., Darmanin, C., Oka, M., Mitschler, A., Podjarny, A., Schulze-Briese, C., Chung, R.P.-T., 2005, Structure of aldehyde reductase holoenzyme in complex with the potent aldose reductase inhibitor fidarestat: Implications for inhibitor binding and selectivity, *Journal of Medicinal Chemistry* 48 (17), pp. 5536-5542
- Endo, K., Hikino, H., 1984, Structures of renygol, renyoxide, and renyolone, new cyclohexylethane derivatives from *Forsythia suspensa* fruits, *Canadian Journal of Chemistry* 62 (10) , pp. 2011-2014
- Endo, K., Seya, K., Hikino, H., 1989, Biogenesis-like transformation of salidroside to renygol and its related cyclohexyletanoids of forsythia suspensa, *Tetrahedron* 45 (12) , pp. 3673-3682
- Engler, T.A., Lynch Jr., K.O., Reddy, J.P., Gregory, G.S., 1993, Synthetic pterocarpan with anti-HIV activity, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 3 (6), pp. 1229-1232
- Engler, T.A., LaTessa, K.O., Iyengar, R., Chai, W., Agrios, K., 1996, Stereoselective syntheses of substituted pterocarpan with anti-HIV activity, and 5-aza-/5-thia-pterocarpan and 2-aryl-2,3-dihydrobenzofuran analogues, *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 4 (10), pp. 1755-1769
- Enomoto, S., Okada, Y., Güvenc, A., Erdurak, C.S., Coşkun, M., Okuyama, T., 2004, Inhibitory effect of traditional Turkish folk medicines on aldose reductase (AR) and hematological activity, and on AR inhibitory activity of quercetin-3-O-methyl ether isolated from *Cistus laurifolius L.*, *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 27 (7) , pp. 1140-1143

- Esterbauer, H., Schaur, R.J., Zollner, H., 1991, Chemistry and Biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes, *Free Radical Biology and Medicine* 11 (1), pp. 81-128
- Fabre, N., Rustan, I., De Hoffmann, E., Quetin-Leclercq, J., 2001, Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 12 (6) , pp. 707-715
- Fan, T.-P.D., Jaggar, R., Bicknell, R., 1995, Controlling the vasculature: Angiogenesis, anti-angiogenesis and vascular targeting of gene therapy, *Trends in Pharmacological Sciences* 16 (2), pp. 57-66
- Feiters, M.C., Aasa, R., Malmstrom, B.G., 1985, Substrate fatty acid activation in soybean lipoxygenase-1 catalysis, *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology* 831 (3), pp. 302-305
- Ferrali, M., Signorini, C., Caciotti, B., Sugherini, L., Ciccoli, L., Giachetti, D., Comporti, M., 1997, Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity, *FEBS Letters* 416 (2), pp. 123-129
- Ferrandiz, M.L., Ramachandran Nair, A.G., Alcaraz, M.J., 1990, Inhibition of sheep platelet arachidonate metabolism by flavonoids from Spanish and Indian medicinal herbs, *Pharmazie* 45 (3), pp. 206-208
- Ferrandiz, M.L., Alcaraz, M.J., 1991, Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids, *Agents and Actions* 32 (3-4), pp. 283-255
- Ferrándiz, M.L., Gil, B., Sanz, M.J., Ubeda, A., Erazo, S., González, E., Negrete, R., Alcaraz, M.J., 1996, Effect of bakuchiol on leukocyte functions and some inflammatory responses in mice, *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 48 (9), pp. 975-980
- Ferreres F., Francisco A. Tomas-Barberan, Maria I. Gil, Francisco Tomas-Lorente, 1991, An HPLC Technique for Flavonoid Analysis in Honey, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Volume 56, Issue 1, pp 49-56
- Ferriola, P.C., Cody, V., Middleton Jr., E., 1989, Protein kinase C inhibition by plant flavonoids. Kinetic mechanisms and structure-activity relationships, *Biochemical Pharmacology* 38 (10), pp. 1617-1624
- Fiorucci, S., Meli, R., Bucci, M., Cirino, G., 2001, Dual inhibitors of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. A new avenue in anti-inflammatory therapy?, *Biochemical Pharmacology* 62 (11), pp. 1433-1438
- Firmin, J.L., Wilson, K.E., Rossen, I., Johnston, A.W.B., 1986, Flavonoid activation of nodulation genes in *Rhizobium* reversed by other compounds present in plants, *Nature* 324 (6092), pp. 90-92
- Fogliano, V., Verde, V., Randazzo, G., Ritieni, A., 1999, Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47 (3), pp. 1035-1040
- Folkes, L.K., Candeias, L.P., Wardman, P., 1995, Kinetics and mechanisms of hypochlorous acid reactions, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 323 (1), pp. 120-126

- Ford-Hutchinson, A.W., Gresser, M., Young, R.N., 1994, 5-Lipoxygenase, *Annual Review of Biochemistry* 63, pp. 383-417
- Formica, J.V., 1995, Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids, *Food and Chemical Toxicology* 33 (12), pp. 1061-1080
- Förstermann, U., Boissel, J.-P., Kleinert, H., 1998, Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III), *FASEB Journal* 12 (10), pp. 773-790
- Fotsis, T., Pepper, M.S., Aktas, E., Breit, S., Rasku, S., Adlercreutz, H., Wähälä, K., Schweigerer, L., 1997, Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis, *Cancer Research* 57 (14), pp. 2916-2921
- Fournier, B., Bendeif, E.-E., Guillot, B., Podjarny, A., Lecomte, C., Jelsch, C., 2009, Charge density and electrostatic interactions of fidarestat, an inhibitor of human aldose reductase, *Journal of the American Chemical Society* 131 (31), pp. 10929-10941
- Fuhr, U., 1998, Drug interactions with grapefruit juice: Extent, probable mechanism and clinical relevance, *Drug Safety* 18 (4), pp. 251-272
- Funari, C.S., Passalacqua, T.G., Rinaldo, D., Napolitano, A., Festa, M., Capasso, A., Piacente, S., (...), Silva, D.H.S., 2011, Interconverting flavanone glucosides and other phenolic compounds in *Lippia salviaefolia* Cham. ethanol extracts, *Phytochemistry* 72 (16) , pp. 2052-2061
- Funk, C.D., 1996, The molecular biology of mammalian lipoxygenases and the quest for eicosanoid functions using lipoxygenase-deficient mice, *Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism* 1304 (1), pp. 65-84
- Gabrieli, C., Kokkalou, E., 1990, A glucosylated acylflavone from *Sideritis raeseri*, *Phytochemistry* 29 (2), pp. 681-683
- Gajhede, M., Schuller, D.J., Henriksen, A., Smith, A.T., Poulos, T.L., 1997, Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 Å resolution, *Nature Structural Biology* 4 (12), pp. 1032-1038
- Galati, G., Chan, T., Wu, B., O'Brien, P.J., 1999, Glutathione-dependent generation of reactive oxygen species by the peroxidase-catalyzed redox cycling of flavonoids, *Chemical Research in Toxicology* 12 (6), pp. 521-525
- Galati, G., Sabzevari, O., Wilson, J.X., O'Brien, P.J., 2002, Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics, *Toxicology* 177 (1), pp. 91-104
- Ganapaty, S., Srilakshmi, G.V.K., Pannakal, S.T., Rahman, H., Laatsch, H., Brun, R., 2009, Cytotoxic benzil and coumestan derivatives from *Tephrosia calophylla*, *Phytochemistry* 70 (1), pp. 95-99
- Ganguly, A., Das, B., Roy, A., Sen, N., Dasgupta, S.B., Mukhopadhyay, S., Majumder, H.K., 2007, Betulinic acid, a catalytic inhibitor of topoisomerase I, inhibits reactive oxygen species-mediated apoptotic topoisomerase I-DNA cleavable complex formation in prostate cancer cells but does not affect the process of cell death, *Cancer Research* 67 (24), pp. 11848-11858
- Gao Yan-Ping, Yun-Heng Shen, Shou-De Zhang, Jun-Mian Tian, Hua-Wu Zeng, Ji Ye, Hui-Liang Li, Lei Shan, Wei-Dong Zhang, 2012, Incarvilleatone, A new cyclohexylethanoid dimer from *Incarvillea*

- younghusbandii* and its inhibition against nitric oxide (NO) Release, *Organic Letters* 14 (8), pp. 1954-1957
- Gattuso, G., Caristi, C., Gargiulli, C., Bellocco, E., Toscano, G., Leuzzi, U., 2006, Flavonoid glycosides in bergamot juice (*Citrus bergamia* Risso), *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (11) , pp. 3929-3935
- Gerhäuser, C., You, M., Liu, J., Moriarty, R.M., Hawthorne, M., Mehta, R.G., Moon, R.C., Pezzuto, J.M., 1997, Cancer chemopreventive potential of sulforamate, a novel analogue of sulforaphane that induces phase 2 drug-metabolizing enzymes, *Cancer Research* 57 (2), pp. 272-278
- Ghafourifar, P., Cadenas, E., 2005, Mitochondrial nitric oxide synthase, *Trends in Pharmacological Sciences* 26 (4), pp. 190-195
- Ghosal, A., Satoh, H., Thomas, P.E., Bush, E., Moore, D., 1996, Inhibition and kinetics of cytochrome P4503A activity in microsomes from rat, human, and cDNA-expressed human cytochrome P450, *Drug Metabolism and Disposition* 24 (9), pp. 940-947
- Giovannucci, E., Harlan, D.M., Archer, M.C., Bergenstal, R.M., Gapstur, S.M., Habel, L.A., Pollak, M., (...), Yee, D., 2010, Diabetes and cancer: A consensus report, *CA Cancer Journal for Clinicians* 60 (4) , pp. 207-221
- Gleissner, C.A., Galkina, E., Nadler, J.L., Ley, K., 2007, Mechanisms by which diabetes increases cardiovascular disease, *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms* 4 (3), pp. 131-140
- Graier, W.F., Grubenthal, I., Dittrich, P., Wascher, T.C., Kostner, G.M., 1995, Intracellular mechanism of high D-glucose-induced modulation of vascular cell proliferation, *European Journal of Pharmacology* 294 (1), pp. 221-229
- Greene, D.A., Sima, A.A.F., Stevens, M.J., Feldman, E.L., Lattimer, S.A., 1992, Complications: Neuropathy, pathogenetic considerations, *Diabetes Care* 15 (12) , pp. 1902-1925
- Gryglewski, R.J., Korbut, R., Robak, J., Swies, J., 1987, On the mechanism of antithrombotic action of flavonoids, *Biochemical Pharmacology* 36 (3), pp. 317-322
- Gomez Federico, Leovigildo Quijano, Jose S Calderon, Carlos Rodriguez, Tirso R., 1985, Prenylflavans from *Tephrosia watsoniana* , *Phytochemistry* 24(5), pp 1057-1059
- Gomez F., Calderon J.S., Quijano L., Dominguez M., Rios T., 1985, Viridiflorin, an isoflavone from *Tephrosia viridiflora*, *Phytochemistry* 24(5), pp.1126-1128
- Gomez Garibay F., Quijano L., Calderon J.S., Morales S., Tirso R., 1988, Prenylflavanones from *Tephrosia Quercetorum*, *Phytochemistry* 27 (9), pp.2971-2973
- Gomez Garibay F., Quijano L., Hernandez C., Tirso R., 1991, Flavanones from *Tephrosia leiocarpa*, 1991, *Phytochemistry* 30(11), pp 3832-3834
- Gomez Garibay F., Quijano L., Hernandez C., Tirso R., 1992, Enantiomultijugin, a flavones from *Tephrosia viciodes*, *Phytochemistry* 31(8), pp 2925-2926
- Gómez-Garibay, F., Calderón, J.S., De La O Arciniega, M., Céspedes, C.L., Téllez-Valdés, O., Taboada, J., 1999, An unusual isopropenyldihydrofuran biflavanol from *Tephrosia crassifolia*, *Phytochemistry* 52 (6), pp. 1159-1163

- Grayer, R.J., Kite, G.C., Abou-Zaid, M., Archer, L.J., 2000, The application of atmospheric pressure chemical ionisation liquid chromatography-mass spectrometry in the chemotaxonomic study of flavonoids: Characterisation of flavonoids from *Ocimum gratissimum* var. *gratissimum*, *Phytochemical Analysis* 11 (4) , pp. 257-267
- Gu, L., Gu, W., 2001, Characterisation of soy isoflavones and screening for novel malonyl glycosides using high-performance liquid chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry, *Phytochemical Analysis* 12 (6), pp. 377-382
- Gui, T., Tanimoto, T., Kokai, Y., Nishimura, C., 1995, Presence of a closely related subgroup in the aldo-ketoreductase family of the mouse, *European Journal of Biochemistry* 227 (1-2), pp. 448-453
- Gülşen, A., Makris, D.P., Kefalas, P., 2007, Biomimetic oxidation of quercetin: Isolation of a naturally occurring quercetin heterodimer and evaluation of its in vitro antioxidant properties, *Food Research International* 40 (1), pp. 7-14
- Gupta R.K, Krishnamutri M., Parthasarathi J, 1980, Purpurin, a new flavanone from *Tephrosia purpurea* seeds, *Phytochemistry*, 19, p.1264
- Gupta, M.P., Dobashi, K., Greene, E.L., Orak, J.K., Singh, I., 1997, Studies on hepatic injury and antioxidant enzyme activities in rat subcellular organelles following in vivo ischemia and reperfusion, *Molecular and Cellular Biochemistry* 176 (1-2), pp. 337-347
- Gutteridge, J.M.C., 1995, Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage, *Clinical Chemistry* 41 (12 SUPPL.), pp. 1819-1828
- Güzel, Y., Aktoklu, E., Roumy, V., Alkhatib, R., Hennebelle, T., Bailleul, F., Şahpaz, S., 2011, Chemotaxonomy and flavonoid profiling of *Torilis* species by HPLC/ESI/MS², *Biochemical Systematics and Ecology* 39 (4-6) , pp. 781-786
- Haffner, S.M., 2000, Coronary heart disease in patients with diabetes, *New England Journal of Medicine* 342 (14), pp. 1040-1042
- Hajji, H.E., Nkhili, E., Tomao, V., Dangles, O., 2006, Interactions of quercetin with iron and copper ions: Complexation and autoxidation, *Free Radical Research* 40 (3), pp. 303-320
- Halliwell, B., Aruoma, O.I., 1991, DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems, *FEBS Letters* 281 (1-2), pp. 9-19
- Halliwell, B. & Gutteridge, J. *Free radicals in biology and medicine*, 1998, Oxford Science Publications
- Hamada, Y., Araki, N., Koh, N., Nakamura, J., Horiuchi, S., Hotta, N., 1996, Rapid formation of advanced glycation end products by intermediate metabolites of glycolytic pathway and polyol pathway, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 228 (2) , pp. 539-543
- Hamberg, M., Samuelsson, B., 1974, Prostaglandin endoperoxides. Novel transformations of arachidonic acid in human platelets, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71 (9), pp. 3400-3404
- Hamdan, D., El-Readi, M.Z., Tahrani, A., Herrmann, F., Kaufmann, D., Farrag, N., El-Shazly, A., Wink, M., 2011, Chemical composition and biological activity of *Citrus jambhiri* Lush, *Food Chemistry* 127 (2) , pp. 394-403

- Hanasaki, Y., Ogawa, S., Fukui, S., 1994, The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids, *Free Radical Biology and Medicine* 16 (6), pp. 845-850
- Harborne, J. B. (1986). Plant flavonoids in biology and medicine: Biochemical pharmacological, and structure-activity relationships. NY, USA: Alan R. Liss. pp.15-24.
- Harborne, J. B. (1988). Plant flavonoids in biology and medicine 11: Biochemical, cellular and medicinal properties. NY, USA: Alan R. Liss. pp. 17-27.
- Harborne, J. B., Baxter, H., & Moss, G. P. (1999). Phytochemical dictionary: Handbook of bioactive compounds from plants (2nd ed.). London: Taylor and Francis
- Hase, T., Kawamoto, Y., Ohtani, K., Kasai, R., Yamasaki, K., Picheansoonthon, C., 1995, Cyclohexylethanoids and related glucosides from *Millingtonia hortensis*, *Phytochemistry* 39 (1) , pp. 235-241
- Haviv, F., Ratajczyk, J.D., DeNet, R.W., Martin, Y.C., Dyer, R.D., Carter, G.W., 1987, Structural requirements for the inhibition of 5-lipoxygenase by 15-hydroxyeicosa-5,8,11,13-tetraenoic acid analogues, *Journal of Medicinal Chemistry* 30 (2), pp. 254-263
- He, X.-G., 2000, On-line identification of phytochemical constituents in botanical extracts by combined high-performance liquid chromatographic-diode array detection-mass spectrometric techniques, *Journal of Chromatography A* 880 (1-2), pp. 203-232
- Hegazy, M.-E.F., Abd El-Razek, M.H., Nagashima, F., Asakawa, Y., Paré, P.W., 2009, Rare prenylated flavonoids from *Tephrosia purpurea*, *Phytochemistry* 70 (11-12), pp. 1474-1477
- Hegazy, M.-E.F., Mohamed, A.E.-H.H., El-Halawany, A.M., Djemgou, P.C., Shahat, A.A., Paré, P.W., 2011, Estrogenic activity of chemical constituents from *Tephrosia candida*, *Journal of Natural Products* 74 (5) , pp. 937-942
- Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J., 2002, Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships, *Journal of Nutritional Biochemistry* 13 (10), pp. 572-584
- Hernández, I., Alegre, L., Van Breusegem, F., Munné-Bosch, S., 2009, How relevant are flavonoids as antioxidants in plants?, *Trends in Plant Science* 14 (3), pp. 125-132
- Hertog, M.G.L., Feskens, E.J.M., Hollman, P.C.H., Katan, M.B., Kromhout, D., 1993, Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: The Zutphen Elderly Study, *Lancet* 342 (8878), pp. 1007-1011
- Hertog, M.G.L., Kromhout, D., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Fidanza, F., Giampaoli, S., Katan, M.B., 1995, Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the Seven Countries Study, *Archives of Internal Medicine* 155 (4), pp. 381-386
- Hers H.G., 1956, The mechanism of the transformation of glucose in fructose in the seminal vesicles. | [Le mécanisme de la transformation de glucose en fructose par les vésicules séminales.], *Biochimica et biophysica acta* 22 (1), pp. 202-203
- Hirano, T., Fukuoka, K., Oka, K., Naito, T., Hosaka, K., Mitsunashi, H., Matsumoto, Y., 1990, Antiproliferative activity of mammalian lignan derivatives against the human breast carcinoma cell line, ZR-75-1, *Cancer Investigation* 8 (6), pp. 595-602

- Hirano, R., Sasamoto, W., Matsumoto, A., Itakura, H., Igarashi, O., Kondo, K., 2001, Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation, *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 47 (5), pp. 357-362
- Hisham A., Shaly J., Wafa A.-S., Teigo A., Yoshinori F., 2006, Apollineanin: a new flavanone from *Tephrosia apollinea*, *Natural Product Research* 20 (12), pp. 1046-1052
- Ho, P.-C., Saville, D.J., Wanwimolruk, S., 2001, Inhibition of human CYP3A4 activity by grapefruit flavonoids, furanocoumarins and related compounds, *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 4 (3), pp. 217-227
- Hodnick, W.F., Milosavljevic, E.B., Nelson, J.H., Pardini, R.S., 1988, Electrochemistry of flavonoids. Relationships between redox potentials, inhibition of mitochondrial respiration, and production of oxygen radicals by flavonoids, *Biochemical Pharmacology* 37 (13), pp. 2607-2611
- Hoeneisen, M., Silva, M., Jakupovic, J., Papastergiou, F., Peter, M.G., 1993, Flavanones of *Lophopappus tarapacanus* and triterpenoids of *Pachylaena atriplicifolia*, *Phytochemistry* 34 (6), pp. 1653
- Hollman, P.C.H., Katan, M.B., 1999, Dietary flavonoids: Intake, health effects and bioavailability, *Food and Chemical Toxicology* 37 (9-10), pp. 937-942
- Horvath, J.J., Witmer, C.M., Witz, G., 1992, Nephrotoxicity of the 1:1 acrolein-glutathione adduct in the rat, *Toxicology and Applied Pharmacology* 117 (2), pp. 200-207
- Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J.A., Prior, R.L., 2002, High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (16), pp. 4437-4444
- Huang, Y., De Bruyne, T., Apers, S., Ma, Y., Claeys, M., Pieters, L., Vlietinck, A., 1999, Flavonoid glucuronides from *Picria fel-terrae*, *Phytochemistry* 52 (8) , pp. 1701-1703
- Huang, Z.-S., Pei, Y.-H., Shen, Y.-H., Lin, S., Liu, C.-M., Lu, M., Zhang, W.-D., 2009, Cyclohexyl-ethanol derivatives from the roots of *Incarvillea mairei*, *Journal of Asian Natural Products Research* 11 (6) , pp. 523-528
- Huk, I., Brovkovich, V., Nanobash Vili, J., Weigel, G., Neumayer, Ch., Partyka, L., Patton, S., Malinski, T., 1998, Bioflavonoid quercetin scavenges superoxide and increases nitric oxide concentration in ischaemia-reperfusion injury: An experimental study, *British Journal of Surgery* 85 (8), pp. 1080-1085
- Hwang, C., Sinskey, A.J., Lodish, H.F., 1992, Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum, *Science* 257 (5076), pp. 1496-1502
- Ignarro, L.J., Cirino, G., Casini, A., Napoli, C., 1999, Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: An overview, *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 34 (6), pp. 879-886
- Iio, M., Ono, Y., Kai, S., Fukumoto, M., 1986, Effects of flavonoids on xanthine oxidation as well as on cytochrome c reduction by milk xanthine oxidase, *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 32 (6), pp. 635-642

- Ingham J.L., Markham R.K., 1982, 1982-Tephrocarpin, a pterocarpan phytoalexin from *Tephrosia bidwilli* and a structure proposal for acanthocarpan, *Phytochemistry* 21 (12), 2969-2972
- Inoue, M., Sato, E.F., Nishikawa, M., Park, A.-M., Kira, Y., Imada, I., Utsumi, K., 2003, Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life, *Current Medicinal Chemistry* 10 (23), pp. 2495-2505
- Iwashina, T. (2000). The structure and distribution of the flavonoids in plants., *Journal of Plant Research* 113 (1111), pp. 287-299
- Iwashina, T., 2003, Flavonoid function and activity to plants and other organisms., *Journal of Plant Research*, 113, 287-299
- Jampilek, J., Martin Dolezal, M., Opletalova, V., Hartl, J., 2006, 5-lipoxygenase, leukotrienes biosynthesis and potential antileukotrienic agents, *Current Medicinal Chemistry* 13 (2), pp. 117-129
- Jang, D.S., Park, E.J., Kang, Y.-H., Hawthorne, M.E., Vigo, J.S., Graham, J.G., Cabieses, F., Fong H.H.S., Mehta R.G., Pezzuto J.M., Kinghorn, A.D., 2003, Potential cancer chemopreventive flavonoids from the stems of *Tephrosia toxicaria*, *Journal of Natural Products* 66 (9), pp. 1166-1170
- Jay, D., Hitomi, H., Griendling, K.K, 2006, Oxidative stress and diabetic cardiovascular complications, *Free Radical Biology and Medicine* 40 (2), pp. 183-192
- Jean, T., Bodinier, M.C., 1994, Mediators involved in inflammation: Effects of Daflon 500 mg on their release, *Angiology* 45 (6 SUPPL.), pp. 554-559
- Jez, J.M., Bowman, M.E., Dixon, R.A., Noel, J.P., 2000, Structure and mechanism of the evolutionarily unique plant enzyme chalcone isomerase, *Nature Structural Biology* 7 (9), pp. 786-791
- Jiménez-González, L., Álvarez-Corral, M., Muñoz-Dorado, M., Rodríguez-García, I., 2008, Pterocarpan: Interesting natural products with antifungal activity and other biological properties, *Phytochemistry Reviews* 7 (1), pp. 125-154
- Jones, P.S., Smith, P.W., Hardy, G.W., Howes, P.D., Upton, R.J., Bethell, R.C., 1999, Synthesis of tetrasubstituted bicycle[3.2.1]octenes as potential inhibitors of influenza virus sialidase, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 9 (4), pp. 605-610
- Juma, W.P., Akala, H.M., Eyase, F.L., Muiva, L.M., Heydenreich, M., Okalebo, F.A., Gitu, P.M., (...), Yenesew, A., 2011, *Terpurinflavone: An antiplasmodial flavone from the stem of Tephrosia purpurea*, *Phytochemistry Letters* 4 (2) , pp. 176-178
- Jun Tian, Qin-Shi Zhao, Hong-Jie Zhang, Zhong-Wen Lin, and Han-Dong Sun, 1997, New Clerodindicins from *Clerodendrum indicum*, *Journal of Natural Products* 60 (8), pp.766-769
- Justesen, U., Knuthsen, P., Leth, T., 1998, Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photodiode array and mass spectrometric detection, *Journal of Chromatography A* 799 (1-2), pp. 101-110
- Kähkönen, M.P., Heinonen, M., 2003, Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (3), pp. 628-633

- Kakhlon, O., Cabantchik, Z., Ioav, 2002, The labile iron pool: Characterization, measurement, and participation in cellular processes, *Free Radical Biology and Medicine* 33 (8), pp. 1037-1046
- Kammerer, B., Kahlich, R., Biegert, C., Gleiter, C.H., Heide, L., 2005, HPLC-MS/MS analysis of willow bark extracts contained in pharmaceutical preparations, *Phytochemical Analysis* 16 (6), pp. 470-478
- Kanakis, C.D., Tarantilis, P.A., Polissiou, M.G., Diamantoglou, S., Tajmir-Riahi, H.A., 2005, DNA interaction with naturally occurring antioxidant flavonoids quercetin, kaempferol, and delphinidin, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 22 (6), pp. 719-724
- Kapiotis, S., Hermann, M., Held, I., Seelos, C., Ehringer, H., Gmeiner, B.M.K., 1997, Genistein, the dietary-derived angiogenesis inhibitor, prevents LDL oxidation and protects endothelial cells from damage by atherogenic LDL, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 17 (11), pp. 2868-2874
- Katsori, A.-M., Chatzopoulou, M., Dimas, K., Kontogiorgis, C., Patsilidakos, A., Tragas, T., Hadjipavlou-Litina, D., 2011, Curcumin analogues as possible anti-proliferative & anti-inflammatory agents, *European Journal of Medicinal Chemistry* 46 (7), pp. 2722-2735
- Kaul, T.N., Middleton Jr., E., Ogra, P.L., 1985, Antiviral effect of flavonoids on human viruses, *Journal of Medical Virology* 15 (1), pp. 71-79
- Kawamura, M., Heinecke, J.W., Chait, A., 1994, Pathophysiological concentrations of glucose promote oxidative modification of low density lipoprotein by a superoxide-dependent pathway, *Journal of Clinical Investigation* 94 (2), pp. 771-778
- Kemal, C., Louis-Flamberg, P., Krupinski-Olsen, R., Shorter, A.L., 1987, Reductive inactivation of soybean lipoxygenase 1 by catechols: A possible mechanism for regulation of lipoxygenase activity, *Biochemistry* 26 (22), pp. 7064-7072
- Kemal, C., Louis-Flamberg, P., Krupinski-Olsen, R., Shorter, A.L., 1987, Reductive inactivation of soybean lipoxygenase 1 by catechols: A possible mechanism for regulation of lipoxygenase activity, *Biochemistry* 26 (22), pp. 7064-7072
- Khalafallah, A.K., Suleiman, S.A., Yousef, A.H., El-kanzi, N.A.A., Mohamed, A.E.-H.H., 2009, Prenylated flavonoids from *Tephrosia apollinea*, *Chinese Chemical Letters* 20 (12), pp. 1465-1468
- Khalivulla, S.I., Reddy, B.A.K., Gunasekar, D., Blond, A., Bodo, B., Murthy, M.M., Rao, T.P., 2008, A new di-O-prenylated isoflavone from *Tephrosia tinctoria*, *Journal of Asian Natural Products Research* 10 (10), pp. 953-955
- Khan H. A., Chandrasekharan I., Ghanim A., 1986, Falciformin, a flavanone from pods of *Tephrosia falciformis*, *Phytochemistry* 25 (3), pp. 767-768
- Khatri, A., Garg, A., Agrawal, S.S., 2009, Evaluation of hepatoprotective activity of aerial parts of *Tephrosia purpurea* L. and stem bark of *Tecomella undulata*, *Journal of Ethnopharmacology* 122 (1), pp. 1-5
- Kikuchi, S., Shinpo, K., Takeuchi, M., Yamagishi, S., Makita, Z., Sasaki, N., Tashiro, K., 2003, Glycation - A sweet tempter for neuronal death, *Brain Research Reviews* 41 (2-3), pp. 306-323

- Kim, H.P., Mani, I., Iversen, L., Ziboh, V.A., 1998, Effects of naturally-occurring flavonoids and biflavonoids on epidermal cyclooxygenase and lipoxygenase from guinea-pigs, *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 58 (1), pp. 17-24
- Kim, H.K., Cheon, B.S., Kim, Y.H., Kim, S.Y., Kim, H.P., 1999, Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure-activity relationships, *Biochemical Pharmacology* 58 (5), pp. 759-765
- Kim, D.-H., Oh, Y.-J., Han, K.-M., Chung, I.-S., Kim, D.-K., Kim, S.-H., Kwon, B.-M., Park, M.-H., Baek, N.-I., 2005, Development of Biologically Active Compounds from Edible Plant Sources XIV. Cyclohexylethanoids from the Flower of *Campsis grandiflora* K. Schum., *Agric. Chem. Biotechnol.* 48(1), pp. 35-37
- Kinjo, J., Tsuchihashi, R., Morito, K., Hirose, T., Aomori, T., Nagao, T., Okabe, H., (...), Masamune, Y., 2004, Interactions of phytoestrogens with estrogen receptors α and β (III). Estrogenic activities of soy isoflavone aglycones and their metabolites isolated from human urine, *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 27 (2), pp. 185-188
- Kinoshita, J.H., Dvornik, D., Kramil, M., Gabbay, K.H., 1968, The effect of an aldose reductase inhibitor on the galactose-exposed rabbit lens, *BBA - General Subjects* 158 (3), pp. 472-475
- Kinoshita, J.H., Kador, P., Catiles, M., 1981, Aldose reductase in diabetic cataracts, *Journal of the American Medical Association* 246 (3), pp. 257-261
- Kishore Kumar, D.V., Jayaveera, K.N., Kumar, G.S., 2007, Anti-inflammatory and anti-nociceptive properties of *Tephrosia Falciformis* root extract, *Pharmacologyonline* 2, pp. 371-384
- Klaunig J.E., Y. Xu, S. Bachowski, J. Jiang, Free-radical oxygen-induced changes in chemical carcinogenesis, in: K.B. Wallace (Ed.), *Free Radical Toxicology*, Taylor & Francis, London, 1997, pp. 375-400
- Klaunig, J.E., Kamendulis, L.M., 2004, The Role of Oxidative Stress in Carcinogenesis, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 44, pp. 239-267
- Klejdus, B., Vacek, J., Benešová, L., Kopecký, J., Lapčík, O., Kubáň, V., 2007, Rapid-resolution HPLC with spectrometric detection for the determination and identification of isoflavones in soy preparations and plant extracts, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389 (7-8), pp. 2277-2285
- Knekt, P., Jarvinen, R., Seppanen, R., Rissanen, A., Aromaa, A., Heinonen, O.P., Albanes, D., (...), Teppo, L., 1991, Dietary antioxidants and the risk of lung cancer, *American Journal of Epidemiology* 134 (5), pp. 471-479
- Knekt, P., Järvinen, R., Seppänen, R., Heliövaara, M., Teppo, L., Pukkala, E., Aromaa, A., 1997, Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms, *American Journal of Epidemiology* 146 (3), pp. 223-230
- Kohen, R., Nyska, A., 2002, Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification, *Toxicologic Pathology* 30 (6), pp. 620-650

- Kojo, S., 2004, Vitamin C: Basic metabolism and its function as an index of oxidative stress, *Current Medicinal Chemistry* 11 (8), pp. 1041-1064
- Kokkalou Eugene, *Plants in Traditional and Modern Medicine: Chemistry and Activity 2010*, Transworld Research Network, Kerala, India
- Kole R.K., C. Satpathi, A. Chowdhury, M.R.Ghosh, and N. Adityachaudhury, *J. Agric.Food Chem.* 40, 1208 (1992).
- Koleva, I.I., Van Beek, T.A., Linssen, J.P.H., De Groot, A., Evstatieva, L.N., 2002, Screening of plant extracts for antioxidant activity: A comparative study on three testing methods, *Phytochemical Analysis* 13 (1), pp. 8-17
- Koleva, I.I., Linssen, J.P.H., Van Beek, T.A., Evstatieva, L.N., Kortenska, V., Handjieva, N., 2003, Antioxidant activity screening of extracts from Sideritis species (Labiatae) grown in Bulgaria, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83 (8), pp. 809-819
- Konoshima, T., Terada, H., Kokumai, M., Kozuka, M., Tokuda, H., Estes, J.R., Li, L., (...), Lee, K.-H., 1993, Studies on inhibitors of skin tumor promotion, XII. Rotenoids from *Amorpha fruticosa*, *Journal of Natural Products* 56 (6), pp. 843-848
- Kontogiorgis, C., Hadjipavlou-Litina, D., 2003, Biological evaluation of several coumarin derivatives designed as possible anti-inflammatory/antioxidant agents, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 18 (1), pp. 63-69
- Konturek, S.J., Radecki, T., Brzozowski, T., 1986, Antiulcer and gastroprotective effects of Solon, a synthetic flavonoid derivative of sophoradin. Role of endogenous prostaglandins, *European Journal of Pharmacology* 125 (2), pp. 185-192
- Kopacz, M., Kuźniar, A., 2003, Complexes of Cadmium(II), Mercury(II) and Lead(II) with Quercetin-5'-sulfonic Acid (QSA), *Polish Journal of Chemistry* 77 (12), pp. 1777-1786
- Korkina, L.G., Afanas'ev, I.B., 1997, Antioxidant and chelating properties of flavonoids., *Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)* 38, pp. 151-163
- Koshland Jr., D.E., 1992, The molecule of the year, *Science* 258 (5090), pp. 1861
- Koya, D., King, G.L., 1998, Protein kinase C activation and the development of diabetic complications, *Diabetes* 47 (6), pp. 859-866
- Kurzer, M.S., 2000, Hormonal effects of soy isoflavones: Studies in premenopausal and postmenopausal women, *Journal of Nutrition* 130 (3 SUPPL.), pp. 660S-661S
- Kuwajima, H., Takahashi, M., Ito, M., Hua-Xin, W., Takaishi, K., Inoue, K., 1993, A quinol glucoside from *Abeliophyllum distichum*, *Phytochemistry* 33 (1) , pp. 137-139
- Lander, H.M., 1997, An essential role for free radicals and derived species in signal transduction, *FASEB Journal* 11 (2), pp. 118-124
- Landolfi, R., Mower, R.L., Steiner, M., 1984, Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. Structure-activity relations, *Biochemical Pharmacology* 33 (9), pp. 1525-1530

- Larocca, L.M., Piantelli, M., Leone, G., Sica, S., Teofili, L., Benedetti Panici, P., Scambia, G., Ranelletti, F.O., 1990, Type II oestrogen binding sites in acute lymphoid and myeloid leukaemias: Growth inhibitory effect of oestrogen and flavonoids, *British Journal of Haematology* 75 (4), pp. 489-495
- Laughton, M.J., Evans, P.J., Moroney, M.A., Hoult, J.R.S., Halliwell, B., 1991, Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. Relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability, *Biochemical Pharmacology* 42 (9), pp. 1673-1681
- Lautraite, S., Musonda, A.C., Doehmer, J., Edwards, G.O., Chipman, J.K., 2002, Flavonoids inhibit genetic toxicity produced by carcinogens in cells expressing CYP1A2 and CYP1A1
- Le Marchand, L., 2002, Cancer preventive effects of flavonoids - A review, *Biomedicine and Pharmacotherapy* 56 (6), pp. 296-301
- Lee, Y.S., Chen, Z., Kador, P.F., 1998, Molecular modeling studies of the binding modes of aldose reductase inhibitors at the active site of human aldose reductase, *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 6 (10), pp. 1811-1819
- Lee, K.W.Y., Ko, B.C.B., Jiang, Z., Cao, D., Chung, S.S.M., 2001, Overexpression of aldose reductase in liver cancers may contribute to drug resistance, *Anti-Cancer Drugs* 12 (2), pp. 129-132
- Lee, E.J., Kim, J.S., Kim, H.P., Lee, J.-H., Kang, S.S., 2010, Phenolic constituents from the flower buds of *Lonicera japonica* and their 5-lipoxygenase inhibitory activities, *Food Chemistry* 120 (1), pp. 134-139
- Lee, I.-C., Bae, J.-S., Kim, T., Kwon, O.J., Kim, T.H., 2011, Polyphenolic constituents from the aerial parts of *Thymus quinquecostatus* var. *Japonica* collected on Ulleung Island, *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* 54 (5), pp. 811-816
- Leopoldini, M., Marino, T., Russo, N., Toscano, M., 2004(a), Antioxidant properties of phenolic compounds: H-atom versus electron transfer mechanism, *Journal of Physical Chemistry A* 108 (22), pp. 4916-4922
- Leopoldini, M., Marino, T., Russo, N., Toscano, M., 2004(b), Density functional computations of the energetic and spectroscopic parameters of quercetin and its radicals in the gas phase and in solvent, *Theoretical Chemistry Accounts* 111 (2-6), pp. 210-216
- Leopoldini, M., Prieto Pitarch, I., Russo, N., Toscano, M., 2004(c), Structure, conformation, and electronic properties of apigenin, luteolin, and taxifolin antioxidants. A first principle theoretical study, *Journal of Physical Chemistry A* 108 (1), pp. 92-96
- Li, L., Wang, H.-K., Chang, J.-J., McPhail, A.T., McPhail, D.R., Terada, H., Konoshima, T., (...), Lee, K.-H., 1993, Antitumor agents, 138. Rotenoids and isoflavones as cytotoxic constituents from *Amorpha fruticosa*, *Journal of Natural Products* 56 (5), pp. 690-698
- Li, C., Jackson, R.M., 2002, Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury, *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 282 (2 51-2), pp. C227-C241
- Lilja, J.J., Kivistö, K.T., Neuvonen, P.J., 2000, Duration of effect of grapefruit juice on the pharmacokinetics of the CYP3A4 substrate simvastatin, *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 68 (4), pp. 384-390

- Limiroli, R., Consonni, R., Ranalli, A., Bianchi, G., Zetta, L., 1996, ¹H NMR Study of Phenolics in the Vegetation Water of Three Cultivars of *Olea europaea*: Similarities and Differences, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44 (8) , pp. 2040-2048
- Liochev, S.I., Fridovich, I., 2002, The Haber-Weiss cycle - 70 years later: An alternative view [1], *Redox Report* 7 (1), pp. 55-57
- Liu, Q.-M., Zhao, H.-Y., Zhong, X.-K., Jiang, J.-G., 2012, *Eclipta prostrata* L. phytochemicals: Isolation, structure elucidation, and their antitumor activity, *Food and Chemical Toxicology* 50 (11) , pp. 4016-4022
- Liu, Y.-L., Ho, D.K., Cassady, J.M., Cook, V.M., Baird, W.M., 1992, Isolation of potential cancer chemopreventive agents from *Eriodictyon californicum*, *Journal of Natural Products* 55 (3), pp. 357-363
- Llera, L.D., Trujillo, J.M., Breton, J.L., Navarro, E., 1987, New cyclohexane derivative from *Isoplexis canariensis* var. *tomentosa*, *Journal of Natural Products* 50 (2) , pp. 251-252
- Lotito, S.B., Actis-Goretta, L., Renart, M., Lourdes, Caligiuri, M., Rein, D., Schmitz, H.H., Steinberg, F.M., Fraga, C.G., 2000, Influence of oligomer chain length on the antioxidant activity of procyanidins, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 276 (3), pp. 945-951
- Lotito, S.B., Frei, B., 2006, Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: Cause, consequence, or epiphenomenon?, *Free Radical Biology and Medicine* 41 (12), pp. 1727-1746
- Lou -q., F., Zhang -f., M., Zhang -g., X., Liu -m., J., Yuan -l., W., 1989, A study on tea-pigment in prevention of atherosclerosis, *Chinese Medical Journal* 102 (8), pp. 579-583
- Lowenstein, W.R., 1979, Junctional intercellular communication and the control of growth, *Biochimica et Biophysica Acta* 560 (1), pp. 1-65
- Lu, Y., Yeap Foo, L., 2000, Flavonoid and phenolic glycosides from *Salvia officinalis*, *Phytochemistry* 55 (3) , pp. 263-267
- Lwande W., Bentley M.D., Macfoy C., Lugemwa F.N., Hassanali A., Nyandat E., 1987, A new pterocarpan from the roots of *Tephrosia hildebrandtii*, *Phytochemistry* 26(8), pp 2425-2426
- Mabry, T.J.; Markham, K.R. & Thomas, M.B. *The Systematic Identification of Flavonoids*. 1970, Berlin-Heidelberg-New York: Springer-Verlag.
- MacRae, W.D., Towers, G.H.N., 1984, Biological activities of lignans, *Phytochemistry* 23 (6), pp. 1207-1220
- Mack, A.J., Peterman, T.K., Siedow, J.N., 1987, Lipoxygenase isozymes in higher plants: biochemical properties and physiological role., *Isozymes* 13, pp. 127-154
- Madhusudhana, J., Reddy, R.V.N., Reddy, B.A.K., Reddy, M.V.B., Gunasekar, D., Deville, A., Bodo, B., 2010, Two new geranyl flavanones from *Tephrosia villosa*, *Natural Product Research* 24 (8), pp. 743-749
- Malamas, M.S., Millen, J., 1991, Quinazolineacetic acids and related analogues as aldose reductase inhibitors, *Journal of Medicinal Chemistry* 34 (4), pp. 1492-1503

- Maldini, M., Montoro, P., MacChia, M., Pizza, C., Piacente, S., 2011, Profiling of phenolics from *Tephrosia cinerea*, *Planta Medica* 77 (16) , pp. 1861-1864
- Maltese, F., Erkelens, C., Kooy, F.v.d., Choi, Y.H., Verpoorte, R., 2009, Identification of natural epimeric flavanone glycosides by NMR spectroscopy, *Food Chemistry* 116 (2) , pp. 575-579
- Manthey, J.A., Guthrie, N., 2002, Antiproliferative activities of citrus flavonoids against six human cancer cell lines, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (21), pp. 5837-5843
- March, R.E., Lewars, E.G., Stadey, C.J., Miao, X.-S., Zhao, X., Metcalfe, C.D., 2006, A comparison of flavonoid glycosides by electrospray tandem mass spectrometry, *International Journal of Mass Spectrometry* 248 (1-2) , pp. 61-85
- Markham, K.R. Flavones, flavonols and their glycosides. Dey, P.M.; Harborne, J.B, eds. *Method in plant biochemistry*, Vol.1, Plant phenolics. London, UK: Academic Press, 1989, p. 197-235.
- Markkanen, T., Makinen, M.L., Maunulcsela, E., Himanen, P., 1981, Podophyllotoxin lignans under experimental antiviral research, *Drugs under Experimental and Clinical Research* 7 (6), pp. 711-718
- Marnett, L.J., 1999, Lipid peroxidation - DNA damage by malondialdehyde, *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 424 (1-2), pp. 83-95
- Martel-Pelletier, J., Lajeunesse, D., Reboul, P., Pelletier, J.-P., 2003, Therapeutic role of dual inhibitors of 5-LOX and COX, selective and non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs, *Annals of the Rheumatic Diseases* 62 (6), pp. 501-509
- Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C., Giovannini, C., 2005, Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes, *Journal of Nutritional Biochemistry* 16 (10), pp. 577-586
- Matés, J.M., Pérez-Gómez, C., De Castro, I.N., 1999, Antioxidant enzymes and human diseases, *Clinical Biochemistry* 32 (8), pp. 595-603
- Matsuda, H., Morikawa, T., Ando, S., Toguchida, I., Yoshikawa, M., 2003, Structural requirements of flavonoids for nitric oxide production inhibitory activity and mechanism of action, *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 11 (9), pp. 1995-2000
- Matsuura, K., Deyashiki, Y., Bunai, Y., Ohya, I., Hara, A., 1996, Aldose reductase is a major reductase for isocaproaldehyde, a product of side-chain cleavage of cholesterol, in human and animal adrenal glands, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 328 (2), pp. 265-271
- Maulik, G., Maulik, N., Bhandari, V., Kagan, V.E., Pakrashp, S., Das, D.K., 1997, Evaluation of antioxidant effectiveness of a few herbal plants, *Free Radical Research* 27 (2), pp. 221-228
- McCord, J.M., Fridovich, I., 1969, Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein)., *Journal of Biological Chemistry* 244 (22), pp. 6049-6055
- McCord, J.M., 1995, Superoxide radical: Controversies, contradictions, and paradoxes, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 209 (2), pp. 112-117
- McCord, J.M., 2000, The evolution of free radicals and oxidative stress, *American Journal of Medicine* 108 (8), pp. 652-659

- McMillan, R.M., Walker, E.R.H., 1992, Designing therapeutically effective 5-lipoxygenase inhibitors, *Trends in Pharmacological Sciences* 13 (8), pp. 323-330
- Mendez, J., Hasegawa, M., Bilia, A.R., Morelli, I., 1994, 5,7,2',5',tetrahydroxydihydroflavonol 3-rhamnoside from *Plinia pinnata*, *Phytochemistry* 36 (4), pp. 1087-1088
- Merfort, I., Heilmann, J., Weiss, M., Pietta, P., Gardana, C., 1996, Radical scavenger activity of three flavonoid metabolites studied by inhibition of chemiluminescence in human PMNs, *Planta Medica* 62 (4), pp. 289-292
- Merken, H.M., Beecher, G.R., 2000, Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (3), pp. 577-599
- Messana, I., Sperandei, M., Multari, G., Galeffi, C., Bettolo, G.B.M., 1984, A cyclohexadienone and a cyclohexenone from *Halleria lucida*, *Phytochemistry* 23 (11), pp. 2617-2619
- Middleton Jr., E., Kandaswami, C., 1992, Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions, *Biochemical Pharmacology* 43 (6), pp. 1167-1179
- Miksicek, R.J., 1993, Commonly occurring plant flavonoids have estrogenic activity, *Molecular Pharmacology* 44 (1), pp. 37-43
- Miller, H.M., 1971, A simplified method for the evaluation of antioxidants. *J Am Oil Chem Soc*, 45: 91
- Miller, N.J., Rice-Evans, C., Davies, M.J., Gopinathan, V., Milner, A., 1993, A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates, *Clinical Science* 84 (4), pp. 407-412
- Miller, N.J., Sampson, J., Candeias, L.P., Bramley, P.M., Rice-Evans, C.A., 1996, Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls, *FEBS Letters* 384 (3), pp. 240-242
- Milligan, S.R., Kalita, J.C., Heyerick, A., Rong, H., De Cooman, L., De Keukeleire, D., 1999, Identification of a potent phytoestrogen in hops (*Humulus lupulus* L.) and beer, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 84 (6), pp. 2249-2252
- Mishra, B., Priyadarsini, K.I., Kumar, M.S., Unnikrishnan, M.K., Mohan, H., 2003, Effect of O-glycosylation on the antioxidant activity and free radical reactions of a plant flavonoid, chrysoeriol, *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 11 (13), pp. 2677-2685
- Mohamed, A.K., Bierhaus, A., Schiekhofer, S., Tritschler, H., Ziegler, R., Nawroth, P.P., 1999, The role of oxidative stress and NF- κ B activation in late diabetic complications, *BioFactors* 10 (2-3), pp. 157-167
- Monig, J., Asmus, K.-D., Forni, L.G., Willson, R.L., 1987, On the reaction of molecular oxygen with thiyl radicals: A re-examination, *International Journal of Radiation Biology* 52 (4), pp. 589-602
- Moroney, M.-A., Alcaraz, M.J., Forder, R.A., Carey, F., Houlst, J.R.S., 1988, Selectivity of neutrophil 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase inhibition by an anti-inflammatory flavonoid glycoside and related aglycone flavonoids, *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 40 (11), pp. 787-792
- Mueller, S.O., Simon, S., Chae, K., Metzler, M., Korach, K.S., 2004, Phytoestrogens and their human metabolites show distinct agonistic and antagonistic properties on estrogen receptor α (ER α) and ER β in human cells, *Toxicological Sciences* 80 (1), pp. 14-25

- Mues, R., 1983, Species Specific Flavone Glucuronides in Elodea Species, *Biochemical Systematics and Ecology* 11 (3) , pp. 261-265
- Muller, K., 1994, 5-Lipoxygenase and 12-lipoxygenase: Attractive targets for the development of novel antipsoriatic drugs, *Archiv der Pharmazie* 327 (1), pp. 3-19
- Müller, K., Altmann, R., Prinz, H., 2002, 2-Arylalkyl-substituted anthracenones as inhibitors of 12-lipoxygenase enzymes. 2. Structure-activity relationships of the linker chain, *European Journal of Medicinal Chemistry* 37 (1), pp. 83-89
- Muiva, L.M., Yenesew, A., Derese, S., Heydenreich, M., Peter, M.G., Akala, H.M., Eyase, F., Waters N.C., Mutai C., Keriko J.M., Walsh, D., 2009, Antiplasmodial β -hydroxydihydrochalcone from seedpods of *Tephrosia elata*, *Phytochemistry Letters* 2 (3), pp. 99-102
- Muller, K., 1994, 5-Lipoxygenase and 12-lipoxygenase: Attractive targets for the development of novel antipsoriatic drugs, *Archiv der Pharmazie* 327 (1), pp. 3-19
- Münch, G., Thome, J., Foley, P., Schinzel, R., Riederer, P., 1997, Advanced glycation endproducts in ageing and Alzheimer's disease, *Brain Research Reviews* 23 (1-2), pp. 134-143
- Muto, S., Fujita, K.-I., Yamazaki, Y., Kamataki, T., 2001, Inhibition by green tea catechins of metabolic activation of procarcinogens by human cytochrome P450, *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 479 (1-2), pp. 197-206
- Mylari, B.L., Larson, E.R., Beyer, T.A., Zembrowski, W.J., Aldinger, C.E., Dee, M.F., Siegel, T.W., Singleton, D.H., 1991, Novel, potent aldose reductase inhibitors: 3,4-Dihydro-4-oxo-3-[[5-(trifluoromethyl)-2-benzothiazolyl]methyl]-1-phthalazine-acetic acid (zopolrestat) and congeners, *Journal of Medicinal Chemistry* 34 (1), pp. 108-122
- Mylari, B.L., Armento, S.J., Beebe, D.A., Conn, E.L., Coutcher, J.B., Dina, M.S., O'Gorman, M.T., (...), Zembrowski, W.J., 2005, A novel series of non-carboxylic acid, non-hydantoin inhibitors of aldose reductase with potent oral activity in diabetic rat models: 6-(5-Chloro-3-methylbenzofuran-2-sulfonyl)-2H-pyridazin-3-one and congeners, *Journal of Medicinal Chemistry* 48 (20), pp. 6326-6339
- Nagakura, A.; Sato, M.; Kikuchi, M.; Nakatsu, T., (Takasago Perfumery Co.) JP 02,200,631, 1990 [Chem.Abstr. **1991**, 114, 30162u]
- Narayan, K.M.V., Boyle, J.P., Thompson, T.J., Sorensen, S.W., Williamson, D.F., 2003, Lifetime Risk for Diabetes Mellitus in the United States, *Journal of the American Medical Association* 290 (14) , pp. 1884-1890
- Natarajan, R., Nadler, J.L., 2004, Lipid inflammatory mediators in diabetic vascular disease, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 24 (9), pp. 1542-1548
- Nelson, M.J., Cowling, R.A., 1990, Observation of a peroxy radical in samples of 'purple' lipoxygenase, *Journal of the American Chemical Society* 112 (7), pp. 2820-2821
- Nerland, D.E., 2007, The antioxidant/electrophile response element motif, *Drug Metabolism Reviews* 39 (1), pp. 235-248

- Ng, T.B., Huang, B., Fong, W.P., Yeung, H.W., 1997, Anti-human immunodeficiency virus (anti-HIV) natural products with special emphasis on HIV reverse transcriptase inhibitors, *Life Sciences* 61 (10), pp. 933-949
- 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, *Journal of Medicinal Chemistry* 46 (3), pp. 417-426
- 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, *Journal of Medicinal Chemistry* 47 (10), pp. 2706-2709
- Nie, D., Che, M., Grignon, D., Tang, K., Honn, K.V., 2001, Role of eicosanoids in prostate cancer progression, *Cancer and Metastasis Reviews* 20 (3-4), pp. 195-206
- Nijveldt, R.J., Van Nood, E., Van Hoorn, D.E.C., Boelens, P.G., Van Norren, K., Van Leeuwen, P.A.M., 2001, Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications, *American Journal of Clinical Nutrition* 74 (4), pp. 418-425
- Nile, S.H., Khobragade, C.N., 2011, Phytochemical analysis, antioxidant and xanthine oxidase inhibitory activity of *Tephrosia purpurea* Linn. root extract, *Indian Journal of Natural Products and Resources* 2 (1), pp. 52-58
- Nishikawa, T., Edelstein, D., Du, X.L., Yamagishi, S.-I., Matsumura, T., Kaneda, Y., Yorek, M.A., (...), Brownlee, M., 2000, Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage, *Nature* 404 (6779), pp. 787-790
- Nishino, C., Kobayashi, K., Fukushima, M., 1988, *Halleridone, a cytotoxic constituent from Cornus controversa*, *Journal of Natural Products* 51 (6), pp. 1281-1282
- Nishino, C.; Kobayashi, K. (Mitsubishi Kasei Corp.), JP 01,290,627, 1989a [*Chem. Abstr.* **1990**, 112, 191943y]
- Nishino, C.; Kobayashi, K. (Mitsubishi Kasei Corp.), JP 01,290,666, 1989b [*Chem. Abstr.* **1990**, 112, 235165c]
- Noguchi, N., Yamashita, H., Hamahara, J., Nakamura, A., Kühn, H., Niki, E., 2002, The specificity of lipoxygenase-catalyzed lipid peroxidation and the effects of radical-scavenging antioxidants, *Biological Chemistry* 383 (3-4), pp. 619-626
- Oates, P.J., 2008, Aldose reductase, still a compelling target for diabetic neuropathy, *Current Drug Targets* 9 (1), pp. 14-36
- Obermüller-Jevic, U.C., Francz, P.I., Frank, J., Flaccus, A., Biesalski, H.K., 1999, Enhancement of the UVA induction of haem oxygenase-1 expression by β -carotene in human skin fibroblasts, *FEBS Letters* 460 (2), pp. 212-216
- Offord, E.A., Gautier, J.-C., Avanti, O., Scaletta, C., Runge, F., Krämer, K., Applegate, L.A., 2002, Photoprotective potential of lycopene, β -carotene, vitamin E, vitamin C and carnosic acid in UVA-irradiated human skin fibroblasts, *Free Radical Biology and Medicine* 32 (12), pp. 1293-1303

- Ohara, T., Sussman, K.E., Draznin, B., 1991, Effect of diabetes on cytosolic free Ca²⁺ and Na⁺-K⁺-ATPase in rat aorta, *Diabetes* 40 (11), pp. 1560-1563
- Ohkatsu, Y., Sakurai, T., Sato, T., 2010, Relationship between chemical structure and antioxidant function of flavonoids, *Journal of the Japan Petroleum Institute* 53 (4), pp. 213-221
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979, Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Analytical Biochemistry* 95 (2), pp. 351-358
- Oikawa, T., Shimamura, M., Ashino, H., Nakamura, O., Kanayasu, T., Morita, I., Murota, S.-I., 1992, Inhibition of angiogenesis by staurosporine, a potent protein kinase inhibitor, *Journal of Antibiotics* 45 (7), pp. 1155-1160
- Oka, M., Kato, N., 2001, Aldose reductase inhibitors, *Journal of Enzyme Inhibition* 16 (6), pp. 465-473
- Olszanecki, R., Gębska, A., Kozlovski, V.I., Gryglewski, R.J., 2002, Flavonoids and nitric oxide synthase, *Journal of Physiology and Pharmacology* 53 (4 I), pp. 571-584
- Orrenius, S., McConkey, D.J., Bellomo, G., Nicotera, P., 1989, Role of Ca²⁺ in toxic cell killing, *Trends in Pharmacological Sciences* 10 (7), pp. 281-285
- Osman, H.E., Maalej, N., Shanmuganayagam, D., Folts, J.D., 1998, Grape juice but not orange or grapefruit juice inhibits platelet activity in dogs and monkeys (*Macaca fascicularis*), *Journal of Nutrition* 128 (12), pp. 2307-2312
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Prior, R.L., 2001, Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (10), pp. 4619-4626
- Owen, C., James, K., Sampson, L., Ahmed, S., 2003, Synthesis and biochemical evaluation of some novel benzoic acid based esters as potential inhibitors of oestrone sulphatase, *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 55 (1), pp. 85-93
- Oya, T., Hattori, N., Mizuno, Y., Miyata, S., Maeda, S., Osawa, T., Uchida, K., 1999, Methylglyoxal modification of protein. Chemical and immunochemical characterization of methylglyoxal-arginine adducts, *Journal of Biological Chemistry* 274 (26), pp. 18492-18502
- Oyama, T., Miyasita, Y., Watanabe, H., Shirai, K., 2006, The role of polyol pathway in high glucose-induced endothelial cell damages, *Diabetes Research and Clinical Practice* 73 (3), pp. 227-234
- Ozgen, U., Sevindik, H., Kazaz, C., Yigit, D., Kandemir, A., Secen, H., Calis, I., 2010, A new sulfated a-ionone glycoside from *sonchus erzincanicus matthews*, *Molecules* 15 (4), pp. 2593-2599
- Palmer, H.J., Paulson, K.E., 1997, Reactive oxygen species and antioxidants in signal transduction and gene expression, *Nutrition Reviews* 55 (10), pp. 353-361
- Paper, D.H., 1998, Natural products as angiogenesis inhibitors, *Planta Medica* 64 (8), pp. 686-695
- Parejo, I., Codina, C., Petrakis, C., Kefalas, P., 2000, Evaluation of scavenging activity assessed by Co(II)/EDTA-induced luminol chemiluminescence and DPPH· (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical assay, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 44 (3), pp. 507-512
- Parejo, I., Petrakis, C., Kefalas, P., 2000b, A transition metal enhanced luminol chemiluminescence in the presence of a chelator, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 43 (3), pp. 183-190

- Parejo, I., Caprai, E., Bastida, J., Viladomat, F., Jáuregui, O., Codina, C., 2004, Investigation of *Lepechinia graveolens* for its antioxidant activity and phenolic composition, *Journal of Ethnopharmacology* 94 (1) , pp. 175-184
- Parmar V.S., Jain R., 1987, Isolation of candirone a novel penta-oxygenation pattern in a naturally occurring 2-phenyl-4h-1-benzopyran-4-one from *Tephrosia candida*, *Tetrahedron* 43(18), pp 4241-4247
- Pastor, N., Weinstein, H., Jamison, E., Brenowitz, M., 2000, A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP-DNA complex reveals the role of dynamics in mechanism of sequence-specific binding, *Journal of Molecular Biology* 304 (1), pp. 55-68
- Patel, A., Patel, A., Patel, N.M., 2010, Determination of polyphenols and free radical scavenging activity of *Tephrosia purpurea* linn leaves (Leguminosae), *Pharmacognosy Research* 2 (3) , pp. 152-158
- Patwekar, F.I., Gopalakrishana, B., Durga Rao, K., Mohsin, A.A., Patwekar, M.F., 2010, Free radical scavenging activity of *Tephrosia procumbens* Buch-Ham, *International Journal of Pharmaceutical Sciences* 2 (2 A) , pp. 528-532
- Pau, A., Asproni, B., Boatto, G., Grella, G.E., De Caprariis, P., Costantino, L., Pinna, G.A., 2004, Synthesis and aldose reductase inhibitory activities of novel thienocinnolinone derivatives, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 21 (4), pp. 545-552
- Pavana, P., Sethupathy, S., Manoharan, S., 2007, Antihyperglycemic and antilipidperoxidative effects of *Tephrosia purpurea* seed extract in streptozotocin induced diabetic rats, *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 22 (1), pp. 77-83
- Pavana, P., Sethupathy, S., Santha, K., Manoharan, S., 2009, Effects of *tephrosia purpurea* aqueous seed extract on blood glucose and antioxidant enzyme activities in streptozotocin induced diabetic rats, *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* 6 (1) , pp. 78-86
- Pergola, C., Werz, O., 2010, 5-Lipoxygenase inhibitors: A review of recent developments and patents, *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 20 (3), pp. 355-375
- Perrin, D.R., Cruickshank, I.A.M., 1969, The antifungal activity of pterocarpan towards *Monilinia fructicola*, *Phytochemistry* 8 (6), pp. 971-978
- Peterson, G., Barnes, S., 1993, Genistein and biochanin A inhibit the growth of human prostate cancer cells but not epidermal growth factor receptor tyrosine autophosphorylation, *Prostate* 22 (4), pp. 335-345
- Petersson, L., Slappendel, S., Feiters, M.C., Vliegthart, J.F.G., 1987, Magnetic susceptibility studies on yellow and anaerobically substrate-treated yellow soybean lipoxygenase-1, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular* 913 (2), pp. 228-237
- Petrash, J.M., Harter, T.M., Murdock, G.L., 1997, A potential role for aldose reductase in steroid metabolism, *Advances in Experimental Medicine and Biology* 414, pp. 465-473
- Pienaar, B.J. 1993 *Bothalia* 23:68-70 *Vigna kokii*, a new species from S.Africa

- Pietta, P.G., Gardana, C., Mauri, P.L., 1997, Identification of *Ginkgo biloba* flavonol metabolites after oral administration to humans, *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications* 693 (1), pp. 249-255
- Pietta, P.-G., , 2000, Flavonoids as antioxidants, *Journal of Natural Products* 63 (7), pp. 1035-1042
- Pinchuk, I., Schnitzer, E., Lichtenberg, D., 1998, Kinetic analysis of copper-induced peroxidation of LDL, *Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism* 1389 (2), pp. 155-172
- Pláteník, J., Stopka, P., Vejrazka, M., Stípek, S., 2001, Quinolinic acid - Iron(II) complexes: Slow autoxidation, but enhanced hydroxyl radical production in the fenton reaction, *Free Radical Research* 34 (5), pp. 445-459
- Podjarny, A., Cachau, R.E., Schneider, T., Van Zandt, M., Joachimiak, A., 2004, Subatomic and atomic crystallographic studies of aldose reductase: Implications for inhibitor binding, *Cellular and Molecular Life Sciences* 61 (7-8), pp. 763-773
- Poli, G., Leonarduzzi, G., Biasi, F., Chiarotto, E., 2004, Oxidative stress and cell signalling, *Current Medicinal Chemistry* 11 (9), pp. 1163-1182
- Pontiki, E., Hadjipavlou-Litina, D., 2004, Quantitative structure activity relationships (QSARs) on lipoxygenase inhibitors, *Current Medicinal Chemistry: Anti-Inflammatory and Anti-Allergy Agents* 3 (2), pp. 139-156
- Pontiki, E., Hadjipavlou-Litina, D., 2006, Antioxidant and anti-inflammatory activity of aryl-acetic and hydroxamic acids as novel lipoxygenase inhibitors, *Medicinal Chemistry* 2 (3), pp. 251-264
- Pontiki, E., Hadjipavlou-Litina, D., 2008, Lipoxygenase inhibitors: A comparative QSAR study review and evaluation of new QSARs, *Medicinal Research Reviews* 28 (1), pp. 39-117
- Prabhakar, P., Vanangamudi, A., Gandhidasan, R., Raman, P.V., 1996, Hookerianin: A flavone from *Tephrosia hookeriana*, *Phytochemistry* 43 (1), pp. 315-316
- Pradeepa, R., Mohan, V., 2002, The changing scenario of the diabetes epidemic: Implications for India, *Indian Journal of Medical Research* 116 (OCT.), pp. 121-132
- Prashant, A., Krupadanam, G.L.D., 1993, Dehydro-6-hydroxyrotenoid and lupenone from *Tephrosia villosa*, *Phytochemistry* 32 (2), pp. 484-486
- Prashant, A., Krupadanam, G.L.D., 1993, A new prenylated dehydrorotenoid from *Tephrosia villosa* seeds
- Prochaska, H.J., Santamaria, A.B., 1988, Direct measurement of NAD(P)H: Quinone reductase from cells cultured in microtiter wells: A screening assay for anticarcinogenic enzyme inducers, *Analytical Biochemistry* 169 (2), pp. 328-336
- Pryor, W.A., 2000, Vitamin E and heart disease: Basic science to clinical intervention trials, *Free Radical Biology and Medicine* 28 (1), pp. 141-164
- Pulla Rao, P., Srimannarayana, G., 1980, Tephrosol, a new coumestone from the roots of *Tephrosia villosa*, *Phytochemistry* 19 (6), pp. 1272-1273
- Rajani, P., Sarma, N. , 1988, A coumestone from the roots of *Tephrosia hamiltonii*, *Phytochemistry* 27 (2), pp. 648-649

- Rajendran, P., Jaggi, M., Singh, M.K., Mukherjee, R., Burman, A.C., 2008, Pharmacological evaluation of C-3 modified Betulinic acid derivatives with potent anticancer activity, *Investigational New Drugs* 26 (1), pp. 25-34
- Ramamurthy SM, Srinivasan M. Hepatoprotective effect of *Tephrosia purpurea* in experimental animals. *Indian J Pharmacol* 1993; 25: 34-8.
- Ramana, K.V., Dixit, B.L., Srivastava, S., Balendiran, G.K., Srivastava, S.K., Bhatnagar, A., 2000, Selective recognition of glutathiolated aldehydes by aldose reductase, *Biochemistry* 39 (40), pp. 12172-12180
- Ramana, K.V., Friedrich, B., Srivastava, S., Bhatnagar, A., Srivastava, S.K., 2004, Activation of nuclear factor- κ B by hyperglycemia in vascular smooth muscle cells is regulated by aldose reductase, *Diabetes* 53 (11), pp. 2910-2920
- Ramana, K.V., Bhatnagar, A., Srivastava, S.K., 2004b, Inhibition of aldose reductase attenuates TNF- α -induced expression of adhesion molecules in endothelial cells, *FASEB Journal* 18 (11), pp. 1209-1218
- Ramana, K.V., Willis, M.S., White, M.D., Horton, J.W., Dimaio, J.M., Srivastava, D., Bhatnagar, A., Srivastava, S.K., 2006, Endotoxin-induced cardiomyopathy and systemic inflammation in mice is prevented by aldose reductase inhibition, *Circulation* 114 (17), pp. 1838-1846
- Rapoport, S.M., Schewe, T., Wiesner, R., 1978, The lipoxygenase of reticulocytes. Purification, characterization and biological dynamics of the lipoxygenase; its identity with the respiratory inhibitors of the reticulocyte, *European Journal of Biochemistry* 96 (3), pp. 545-560
- Ravanel P., Tissut M., Douce R., 1984, Effects of rotenoids on isolated Plant Mitochondria, *Plant Physiology* 75, pp. 414-420
- 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 Radical Biology and Medicine* 26 (9-10), pp. 1231-1237
- Reboul, E., Thap, S., Perrot, E., Amiot, M.-J., Lairon, D., Borel, P., 2007, Effect of the main dietary antioxidants (carotenoids, γ -tocopherol, polyphenols, and vitamin C) on α -tocopherol absorption, *European Journal of Clinical Nutrition* 61 (10), pp. 1167-1173
- Retsky, K.L., Chen, K., Zeind, J., Frei, B., 1999, Inhibition of copper-induced LDL oxidation by vitamin C is associated with decreased copper-binding to LDL and 2-oxo-histidine formation, *Free Radical Biology and Medicine* 26 (1-2), pp. 90-98
- Rice-Evans, C., Miller, N.J., 1994, Total antioxidant status in plasma and body fluids, *Methods in Enzymology* 234, pp. 279-293
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., 1996, Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radical Biology and Medicine* 20 (7), pp. 933-956
- Ringl, A., Prinz, S., Huefner, A., Kurzmann, M., Kopp, B., 2007, Chemosystematic value of flavonoids from *Crataegus x macrocarpa* (Rosaceae) with special emphasis on (R)- and (S)-eriodictyol-7-O-glucuronide and luteolin-7-O-glucuronide, *Chemistry and Biodiversity* 4 (2), pp. 154-162

- Rioux, N., Castonguay, A., 1998, Inhibitors of lipoxygenase: A new class of cancer chemopreventive agents, *Carcinogenesis* 19 (8), pp. 1393-1400
- Robak, J., Gryglewski, R.J., 1996, Bioactivity of flavonoids, *Polish Journal of Pharmacology* 48 (6), pp. 555-564
- Robards, K., Li, X., Antolovich, M., Boyd, S., 1997, Characterisation of citrus by chromatographic analysis of flavonoids, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 75 (1), pp. 87-101
- Robards, K., Antolovich, M., 1997, Analytical chemistry of fruit bioflavonoids. A review, *Analyst* 122 (2), pp. 11R-34R
- Robinson, D.S., Wu, Z., Domoney, C., Casey, R., 1995, Lipoxygenases and the quality of foods, *Food Chemistry* 54 (1), pp. 33-43
- Robison Jr., W.G., Laver, N.M., Jacot, J.L., Glover, J.P. , 1995, Sorbinil prevention of diabetic-like retinopathy in the galactose-fed rat model, *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 36 (12) , pp. 2368-2380
- Roy M., Mitra S.R., Bhattacharyya A., Adityachaudhury N., 1986, Candidone a flavanone from *Tephrosia candida*, *Phytochemistry* 25 (4), pp 961-962
- Sadik, C.D., Sies, H., Schewe, T., 2003, Inhibition of 15-lipoxygenases by flavonoids: Structure-activity relations and mode of action, *Biochemical Pharmacology* 65 (5), pp. 773-781
- Saleem, M., Ahmed, S.-U., Alam, A., Sultana, S., 2001, *Tephrosia purpurea* alleviates phorbol ester-induced tumor promotion response in murine skin, *Pharmacological Research* 43 (2), pp. 135-144
- Samuelsson, B., 1983, Leukotrienes: Mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation, *Science* 220 (4597), pp. 568-575
- Sánchez, I., Gómez-Garibay, F., Taboada, J., Ruiz, B.H., 2000, Antiviral effect of flavonoids on the dengue virus, *Phytotherapy Research* 14 (2), pp. 89-92
- Saraswat, M., Mrudula, T., Kumar, P.U., Suneetha, A., Rao, T.S., Srinivasulu, M., Reddy, G.B., 2006, Overexpression of aldose reductase in human cancer tissues, *Medical Science Monitor* 12 (12), pp. CR525-CR529
- Sarin J.P.S., S. Singh, H.S. Garg, N.M.Khanna, and M.M. Dhar, A flavonol glycoside with anticancer activity from *Tephrosia candida*, *Phytochemistry* 15,232 (1976).
- Sato, S., Kador, P.F., 1990, Inhibition of aldehyde reductase by aldose reductase inhibitors, *Biochemical Pharmacology* 40 (5), pp. 1033-1042
- Scalbert, A., 1991, Antimicrobial properties of tannins, *Phytochemistry* 30 (12), pp. 3875-3883
- Scambia, G., Ranelletti, F.O., Benedetti Panici, P., Piantelli, M., Bonanno, G., De Vincenzo, R., Ferrandina, G., Mancuso, S., 1990, Inhibitory effect of quercetin on OVCA 433 cells and presence of type II oestrogen binding sites in primary ovarian tumours and cultured cells, *British Journal of Cancer* 62 (6), pp. 942-946
- Schäfer, W., Friebe, W.-G., Leinert, H., Mertens, A., Poll, T., Von Der Saal, W., Zilch, H., (...), Ziegler, M.L., 1993, Non-nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase: Molecular modeling and X-ray structure investigations, *Journal of Medicinal Chemistry* 36 (6), pp. 726-732

- Schneider, I., Bucar, F., 2005, Lipoxygenase inhibitors from natural plant sources. Part 2: Medicinal plants with inhibitory activity on arachidonate 12-lipoxygenase, 15-lipoxygenase and leukotriene receptor antagonists, *Phytotherapy Research* 19 (4), pp. 263-272
- Schulz, J.B., Lindenau, J., Seyfried, J., Dichgans, J., 2000, Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration, *European Journal of Biochemistry* 267 (16), pp. 4904-4911
- Selvam, C., Jachak, S.M., Oli, R.G., Thilagavathi, R., Chakraborti, A.K., Bhutani, K.K., 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), pp. 4311-4314
- Selway, J.W., 1986, Antiviral activity of flavones and flavans., *Progress in clinical and biological research* 213, pp. 521-536
- Seshasai, S.R.K., Kaptoge, S., Thompson, A., Di Angelantonio, E., Gao, P., Sarwar, N., Whincup, P.H., (...), Danesh, J., 2011, Diabetes mellitus, fasting glucose, and risk of cause-specific death, *New England Journal of Medicine* 364 (9) , pp. 829-841
- Sevilla, M.D., Yan, M., Becker, D., Gillich, S., 1989, ESR investigations of the reactions of radiation-produced thiyl and DNA peroxy radicals: Formation of sulfoxyl radicals, *Free Radical Research Communications* 6 (2-3), pp. 99-102
- Seya, K., Endo, K., Hikino, H., 1989, Structures of rengyosides A, B and C, three glucosides of *Forsythia suspensa* fruits, *Phytochemistry* 28 (5) , pp. 1495-1498
- Sharma, V.M., Rao, P.S., 1992, A prenylated chalcone from the roots of *Tephrosia spinosa*, *Phytochemistry* 31 (8), pp. 2915-2916
- Sharma, P., Rastogi, S., Bhatnagar, S., Srivastava, J.K., Dube, A., Guru, P.Y., Kulshrestha, D.K., Mehrotra B. N., Dhawan, B.N., 2003, Antileishmanial Action of *Tephrosia purpurea* Linn, Extract and Its Fractions Against Experimental Visceral Leishmaniasis, *Drug Development Research* 60 (4), pp. 285-293
- Shenoy, S., Shwetha, K., Prabhu, K., Maradi, R., Bairy, K.L., Shanbhag, T, 2010, Evaluation of antiinflammatory activity of *Tephrosia purpurea* in rats, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 3 (3), pp. 193-195
- Sher, E., Codignola, A., Biancardi, E., Cova, D., Clementi, F., 1992, Amine uptake inhibition by diosmin and diosmetin in human neuronal and neuroendocrine cell lines, *Pharmacological Research* 26 (4), pp. 395-402
- Shin, K.H., Kang, S.S., Seo, E.A., Shin, S.W., 1995, Isolation of aldose reductase inhibitors from the flowers of *Chrysanthemum boreale*, *Archives of Pharmacal Research* 18 (2) , pp. 64-68
- Shoskes, D.A., 1998, Effect of bioflavonoids quercetin and curcumin on ischemic renal injury: A new class of renoprotective agents, *Transplantation* 66 (2), pp. 147-152
- Shutenko, Z., Henry, Y., Pinard, E., Seylaz, J., Potier, P., Berthet, F., Girard, P., Sercombe, R., 1999, Influence of the antioxidant quercetin in vivo on the level of nitric oxide determined by electron paramagnetic resonance in rat brain during global ischemia and reperfusion, *Biochemical Pharmacology* 57 (2), pp. 199-208

- Silva, E.M., Souza, J.N.S., Rogez, H., Rees, J.F., Larondelle, Y., 2006, Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region, *Food Chemistry* 101 (3), pp. 1012-1018
- Sima, A.A.F., Bril, V., Nathaniel, V., McEwen, T.A.J., Brown, M.B., Lattimer, S.A., Greene, D.A., 1988, Regeneration and repair of myelinated fibers in sural-nerve biopsy specimens from patients with diabetic neuropathy treated with sorbinil, *New England Journal of Medicine* 319 (9), pp. 548-555
- Simic, A., Manojlovic, D., Segan, D., Todorovic, M., 2007, Electrochemical behavior and antioxidant and prooxidant activity of natural phenolics, *Molecules* 12 (10), pp. 2327-2340
- Sinha, B., Natu, A.A., Nanavati, D.D., 1982, Prenylated flavonoids from *Tephrosia purpurea* seeds, *Phytochemistry* 21 (6), pp. 1468-1470
- Sinkkonen, J., Liimatainen, J., Karonen, M., Pihlaja, K., 2005, A new dihydroflavonol from *Pinus sylvestris* L., *Magnetic Resonance in Chemistry* 43 (4), pp. 348-349
- Skrzypczak-Jankun, E., Zhou, K., Jankun, J., 2003, Inhibition of lipoxygenase by (-)-epigallocatechin gallate: X-ray analysis at 2.1 Å reveals degradation of EGCG and shows soybean LOX-3 complex with EGC instead., *International journal of molecular medicine* 12 (4), pp. 415-420
- Smalberger, T.M., van den Berg, A.J., Vlegaar, R., 1973, Flavonoids from *Tephrosia*-VI. The structure of semiglabin and semiglabinol, *Tetrahedron* 29 (19), pp. 3099-3104
- Smalberger, T.M., Vlegaar, R., Weber, J.C., 1974, Flavonoids from *Tephrosia*-VII. The constitution and absolute configuration of lupinifolin and lupinifolinol, two flavanones from *Tephrosia lupinifolia* Burch (DC), *Tetrahedron* 30 (21), pp. 3927-3931
- Smalberger, T.M., Vlegaar, R., Weber, J.C., 1975, Flavonoids from *Tephrosia*-VIII. The structure of elongatin, an isoflavone from *Tephrosia elongata* E. Mey., *Tetrahedron* 31 (18), pp. 2297-2301
- Soni, K., Suresh Kumar, P., Saraf, M.N., 2003, Free radical scavenging and antilipid peroxidation activity of *Tephrosia purpurea* linn, *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 65 (1), pp. 27-30
- Sorata, Y., Takahama, U., Kimura, M., 1984, Protective effect of quercetin and rutin on photosensitized lysis of human erythrocytes in the presence of hematoporphyrin, *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 799 (3), pp. 313-317
- Sotriffer, C.A., Krämer, O., Klebe, G., 2004, Probing flexibility and "induced-fit" phenomena in aldose reductase by comparative crystal structure analysis and molecular dynamics simulations, *Proteins: Structure, Function and Genetics* 56 (1), pp. 52-66
- Sree Rama Murthy M., Venkata Rao E, 1985, 1985-Maxima Isoflavone J a New O-Prenylated Isoflavone from *Tephrosia maxima*, *Journal of Natural Products* 48 (6), pp 967-968
- Srivastava, S.K., Ansari, N.H., 1988, Prevention of sugar-induced cataractogenesis in rats by butylated hydroxytoluene, *Diabetes* 37 (11), pp. 1505-1508
- Srivastava, S., Liu, S.-Q., Conklin, D.J., Zacarias, A., Srivastava, S.K., Bhatnagar, A., 2001, Involvement of aldose reductase in the metabolism of atherogenic aldehydes, *Chemico-Biological Interactions* 130-132, pp. 563-571

- Srivastava, S., Chandrasekar, B., Bhatnagar, A., Prabhu, S.D., 2002, Lipid peroxidation-derived aldehydes and oxidative stress in the failing heart: Role of aldose reductase, *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 283 (6 52-6), pp. H2612-H2619
- Srivastava, S.K., Ramana, K.V., Bhatnagar, A., 2005, Role of aldose reductase and oxidative damage in diabetes and the consequent potential for therapeutic options, *Endocrine Reviews* 26 (3), pp. 380-392
- Steinhilber, D., 1999, 5-lipoxygenase: A target for antiinflammatory drugs revisited, *Current Medicinal Chemistry* 6 (1), pp. 71-85
- Stefek, M., Snirc, V., Djoubissie, P.-O., Majekova, M., Demopoulos, V., Rackova, L., Bezakova, Z., (...), El-Kabbani, O., 2008, Carboxymethylated pyridoindole antioxidants as aldose reductase inhibitors: Synthesis, activity, partitioning, and molecular modeling, *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 16 (9), pp. 4908-4920
- Stobiecki, M., Malosse, C., Kerhoas, L., Wojlaszek, P., Einhorn, J., 1999, Detection of isoflavonoids and their glycosides by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry in root extracts of lupin (*Lupinus albus*), *Phytochemical Analysis* 10 (4), pp. 198-207
- Storz, P., 2005, Reactive oxygen species in tumor progression, *Frontiers in Bioscience* 10 (2), pp. 1881-1896
- Suba Rao, J.V., Shanmukha Rao, R.S., 1993, Phenolic compounds in the taxonomy of *Tephrosia Pers*(Leguminosae), *Feddes Repertorium* 104(3-4), pp. 245-250
- Subramanyam, R., Gollapudi, A., Bonigala, P., Chinnaboina, M., Amooru, D.G., 2009, Betulinic acid binding to human serum albumin: A study of protein conformation and binding affinity, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 94 (1), pp. 8-12
- Sumalatha, B.V., Devprakash, Senthil Kumar, G.P., Mani, T., 2012, Isolation of flavonol of *Tephrosia purpurea*, *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* 3 (3) , pp. 105-110
- Sun, C., Fu, J., Chen, J., Jiang, L., Pan, Y., 2010, On-line HPLC method for screening of antioxidants against superoxide anion radical from complex mixtures, *Journal of Separation Science* 33 (8), pp. 1018-1023
- Szelag, A., Magdalan, J., Kopacz, M., Kuźniar, A., Kowalski, P., Pieśniewska, M., 2003, Assessment of efficacy of quercetin-5'-sulfonic acid sodium salt in the treatment of acute chromium poisoning: Experimental studies, *Polish Journal of Pharmacology* 55 (6), pp. 1097-1103
- Tammali, R., Ramana, K.V., Singhal, S.S., Awasthi, S., Srivastava, S.K., 2006, Aldose reductase regulates growth factor-induced cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in human colon cancer cells, *Cancer Research* 66 (19), pp. 9705-9713
- Tammali, R., Reddy, A.B.M., Ramana, K.V., Petrash, M.J., Srivastava, S.K., 2009, Aldose reductase deficiency in mice prevents azoxymethane-induced colonic preneoplastic aberrant crypt foci formation, *Carcinogenesis* 30 (5), pp. 799-807

- Tappel, A.L., Lundberg, W.O., Boyer, P.D., 1953, Effect of temperature and antioxidants upon the lipoxidase-catalyzed oxidation of sodium linoleate, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 42 (2), pp. 293-304
- Tarus, P.K., Machocho, A.K., Lang'at-Thoruwa, C.C., Chhabra, S.C., 2002, Flavonoids from *Tephrosia aequilata*, *Phytochemistry* 60 (4), pp. 375-379
- Taubert, D., Breitenbach, T., Lazar, A., Censarek, P., Harlfinger, S., Berkels, R., Klaus, W., Roesen, R., 2003, Reaction rate constants of superoxide scavenging by plant antioxidants, *Free Radical Biology and Medicine* 35 (12), pp. 1599-1607
- Thannickal, V.J., Fanburg, B.L., 2000, Reactive oxygen species in cell signaling, *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 279 (6 23-6), pp. L1005-L1028
- Thomas, P.R.S., Nash, G.B., Dormandy, J.A., 1988, White cell accumulation in dependent legs of patients with venous hypertension: A possible mechanism for trophic changes in the skin, *British Medical Journal* 296 (6638), pp. 1693-1695
- Thomas, T.P., Porcellati, F., Kato, K., Stevens, M.J., Sherman, W.R., Greene, D.A., 1994, Effects of glucose on sorbitol pathway activation, cellular redox, and metabolism of myo-inositol, phosphoinositide, and diacylglycerol in cultured human retinal pigment epithelial cells, *Journal of Clinical Investigation* 93 (6), pp. 2718-2724
- Tian, J., Zhao, Q.-S., Zhang, H.-J., Lin, Z.-W., Sun, H.-D., 1997, New clerodindicins from *Clerodendrum indicum*, *Journal of Natural Products* 60 (8) , pp. 766-769
- Torres, J.L., Lozano, C., Maher, P., 2005, Conjugation of catechins with cysteine generates antioxidant compounds with enhanced neuroprotective activity, *Phytochemistry* 66 (17 SPEC. ISS.), pp. 2032-2037
- Tsai, E.C., Hirsch, I.B., Brunzell, J.D., Chait, A., 1994, Reduced plasma peroxy radical trapping capacity and increased susceptibility of LDL to oxidation in poorly controlled IDDM, *Diabetes* 43 (8), pp. 1010-1014
- Turner, A., Chen, S.-N., Joike, M.K., Pendland, S.L., Pauli, G.F., Farnsworth, N.R., 2005, Inhibition of uropathogenic *Escherichia coli* by cranberry juice: A new antiadherence assay, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (23) , pp. 8940-8947
- Tzeng, S.-H., Ko, W.-C., Ko, F.-N., Teng, C.-M., 1991, Inhibition of platelet aggregation by some flavonoids, *Thrombosis Research* 64 (1), pp. 91-100
- Ursini, F., Maiorino, M., Morazzoni, P., Roveri, A., Pifferi, G., 1994, A novel antioxidant flavonoid (IdB 1031) affecting molecular mechanisms of cellular activation, *Free Radical Biology and Medicine* 16 (5), pp. 547-553
- Urzhumtsev, A., Tête-Favier, F., Mitschler, A., Barbanton, J., Barth, P., Urzhumtseva, L., Biellmann, J.-F., (...), Moras, D., 1997, A 'specificity' pocket inferred from the crystal structures of the complexes of aldose reductase with the pharmaceutically important inhibitors tolrestat and sorbinil, *Structure* 5 (5), pp. 601-612

- Van Acker, S.A.B.E., Tromp, M.N.J.L., Haenen, G.R.M.M., Van Der Vijgh, W.J.F., Bast, A., 1995, Flavonoids as scavengers of nitric oxide radical, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 214 (3), pp. 755-759
- Van Acker, S.A.B.E., Van Den Berg, D.-J., Tromp, M.N.J.L., Griffioen, D.H., Van Bennekom, W.P., Van Der Vijgh, W.J.F., Bast, A., 1996, Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids, *Free Radical Biology and Medicine* 20 (3), pp. 331-342
- Van Der Zee, J., Eling, T.E., Mason, R.P., 1989, Formation of free radical metabolites in the reaction between soybean lipoxygenase and its Inhibitors. An ESR study, *Biochemistry* 28 (21), pp. 8363-8367
- Van Heyningen, R., 1959, Formation of polyols by the lens of the rat with 'sugar' cataract, *Nature* 184 (4681), pp. 194-195
- Van Wauwe, J., Goossens, J., 1983, Effects of antioxidants on cyclooxygenase and lipoxygenase activities in intact human platelets: Comparison with indomethacin and ETYA, *Prostaglandins* 26 (5), pp. 725-730
- Varma, S.D., Mikuni, I., Kinoshita, J.H., 1975, Flavonoids as inhibitors of lens aldose reductase, *Science* 188 (4194), pp. 1215-1216
- Varma, S.D. Inhibition of aldose reductase by flavonoids. In: *Progress in Clinical and Biological Research*. Vol.23. Cody, V.; Middleton Jr., E. & Harborne, J.B (eds.) 1986, Alan R. Liss Inc., N.Y.
- Venkata Rao E., Sree Rama Murthy, Robert S. Ward, 1984, Nine Isoflavones from *Tephrosia maxima*, *Phytochemistry* 23, (7), pp.1493-1501
- Venkata Rao E., Ranga Ragu N., 1984, Two flavonoids from *Tephrosia purpurea*, *Phytochemistry* 23, (10), pp.2339-2342
- Venkata Rao E., Venkataratnam G., Vilain C., 1985, Flavonoids from *Tephrosia fulvinervis*, *Phytochemistry* 24, (10), pp 2427-2430
- Venkata Rao E., Rajendra Prasad Y., 1992, Two chalcones from *Tephrosia spinosa*, *Phytochemistry* 31(6), pp 2121-2122
- Venkata Rao E., Rajendra Prasad Y., 1993, Prenylated flavonoids from *Tephrosia spinosa*, *Phytochemistry* 32(1), pp 183-185
- Venkata Rao E., Rajendra Prasad, Y., Rama Murthy, M.S., 1994, A prenylated flavanone from *Tephrosia maxima*, *Phytochemistry* 37 (1), pp. 111-112
- Venkataratnam G., Venkata Rao E., Vilain C., 1986, Fulvinervin C, a flavones from *Tephrosia fulvinervis*, *Phytochemistry* 25(6), pp1507-1508
- Vilain, C., 1980, Barbigerone, a new pyranoisoflavone from seeds of *Tephrosia barbiger*, *Phytochemistry* 19 (5), pp. 988-989
- Villaño, D., Fernández-Pachón, M.S., Moyá, M.L., Troncoso, A.M., García-Parrilla, M.C., 2007, Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical, *Talanta* 71 (1), pp. 230-235
- Vleggaar, R., Smalberger, T.M., van den Berg, A.J., 1975, Flavonoids from *Tephrosia*-IX. The structure of multijugin and multijuginol, *Tetrahedron* 31 (20), pp. 2571-2573

- Vleggaar, R., Kruger, G.J., Smalberger, T.M., Van Den Berg, A.J., 1978, Flavonoids from *tephrosia*-XI1
1 Part X: R. Vleggaar, T.M. Smalberger and J.L. van Aswegen, *S. Afr. J. Chem.* submitted for
publication. The structure of glabratephrin, *Tetrahedron* 34 (9), pp. 1405-1408
- Vlietinck, A.J., De Bruyne, T., Apers, S., Pieters, L.A., 1998, Plant-derived leading compounds for
chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection, *Planta Medica* 64 (2), pp. 97-
109
- Waldron, K.W., Parr, A.J., Ng, A., Ralph, J., 1996, Cell wall esterified phenolic dimers: Identification
and quantification by reverse phase high performance liquid chromatography and diode array
detection, *Phytochemical Analysis* 7 (6), pp. 305-312
- Wan, C., Yuan, T., Cirello, A.L., Seeram, N.P., 2012, Antioxidant and α -glucosidase inhibitory
phenolics isolated from highbush blueberry flowers, *Food Chemistry* 135 (3) , pp. 1929-1937
- Wang, H.-K., Xia, Y., Yang, Z.-Y., Morris Natschke, S.L., Lee, K.-H., 1998, Recent advances in the
discovery and development of flavonoids and their analogues as antitumor and anti-HIV agents,
Advances in Experimental Medicine and Biology 439, pp. 191-225
- Wang, W., Goodman, M.T., 1999, Antioxidant property of dietary phenolic agents in a human LDL-
oxidation ex vivo model: Interaction of protein binding activity, *Nutrition Research* 19 (2), pp.
191-202
- Wang, D., Dubois, R.N., 2010, Eicosanoids and cancer, *Nature Reviews Cancer* 10 (3), pp. 181-193
- Wei, H.-H., Xu, H.-H., Xie, H.-H., Xu, L.-X., Wei, X.-Y., 2009, Sesquiterpenes and lignans from
Tephrosia vogelii, *Helvetica Chimica Acta* 92 (2), pp. 370-374
- Weissmann, G., 1992, Prostaglandins as modulators rather than mediators of inflammation, *Journal of
Lipid Mediators* 6 (1-3), pp. 275-286
- Wenderski, T.A., Huang, S., Pettus, T.R.R., 2009, Enantioselective total synthesis of all of the known
chiral cleroidicins (C-F): Clarification among optical rotations and assignments, *Journal of
Organic Chemistry* 74 (11) , pp. 4104-4109
- Wermuth, B., Monder, C., 1983, Aldose and aldehyde reductase exhibit isocorticosteroid reductase
activity, *European Journal of Biochemistry* 131 (2), pp. 423-426
- Werz, O., 2007, Inhibition of 5-lipoxygenase product synthesis by natural compounds of plant origin,
Planta Medica 73 (13), pp. 1331-1357
- Williams, M.D., Nadler, J.L., 2007, Inflammatory mechanisms of diabetic complications, *Current
Diabetes Reports* 7 (3), pp. 242-248
- Williamson, J.R., Chang, K., Frangos, M., Hasan, K.S., Ido, Y., Kawamura, T., Nyengaard, J.R., (...),
Tilton, R.G., 1993, Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications, *Diabetes* 42 (6),
pp. 801-813
- Winkel-Shirley, B., 1999, Evidence for enzyme complexes in the phenylpropanoid and flavonoid
pathways, *Physiologia Plantarum* 107 (1), pp. 142-149
- Wright, J.S., Johnson, E.R., DiLabio, G.A., 2001, Predicting the activity of phenolic antioxidants:
Theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of
antioxidants, *Journal of the American Chemical Society* 123 (6), pp. 1173-1183

- Xu, F., Liu, Y., Zhang, Z., Yang, C., Tian, Y., 2009, Quasi-MSn identification of flavanone 7-glycoside isomers in Da Chengqi Tang by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Chinese Medicine* 4 , art. no. 15
- Yadav, U.C.S., Srivastava, S.K., Ramana, K.V., 2007, Aldose reductase inhibition prevents endotoxin-induced uveitis in rats, *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 48 (10), pp. 4634-4642
- Yang, H., Hou, A.-J., Mei, S.-X., Sun, H.-D., Che, C.-T., 2002, Constituents of *Clerodendrum bungei*, *Journal of Asian Natural Products Research* 4 (3) , pp. 165-169
- Yeh, J.I., Claiborne, A., Hol, W.G.J., 1996, Structure of the native cysteine-sulfenic acid redox center of enterococcal NADH peroxidase refined at 2.8 Å resolution, *Biochemistry* 35 (31), pp. 9951-9957
- Yeh, S.-L., Wang, W.-Y., Huang, C.-H., Hu, M.-L., 2005, Pro-oxidative effect of β-carotene and the interaction with flavonoids on UVA-induced DNA strand breaks in mouse fibroblast C3H10T1/2 cells, *Journal of Nutritional Biochemistry* 16 (12), pp. 729-735
- Yen, G.-C., Duh, P.-D., Tsai, H.-L., Huang, S.-L., 2003, Pro-oxidative properties of flavonoids in human lymphocytes, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 67 (6), pp. 1215-1222
- Yildiz, G., Demiryürek, A.T., Sahin-Erdemli, I., Kanzik, I., 1998, Comparison of antioxidant activities of aminoguanidine, methylguanidine and guanidine by luminol-enhanced chemiluminescence, *British Journal of Pharmacology* 124 (5), pp. 905-910
- Yildiz, G., Demiryürek, A.T., 1998b, Ferrous iron-induced luminol chemiluminescence: A method for hydroxyl radical study, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 39 (3), pp. 179-184
- Yoon, H.-Y., Cho, Y.-S., Jin, Q., Kim, H.-G., Woo, E.-R., Chung, Y.-S., 2012, Effects of ethyl acetate extract of *Poncirus trifoliata* fruit for glucocorticoid-induced osteoporosis, *Biomolecules and Therapeutics* 20 (1) , pp. 89-95
- Yoshida, M., Sakai, T., Hosokawa, N., Marui, N., Matsumoto, K., Fujioka, A., Nishino, H., Aoike, A., 1990, The effect of quercetin on cell cycle progression and growth of human gastric cancer cells, *FEBS Letters* 260 (1), pp. 10-13
- Yoshimoto, T., Furukawa, M., Yamamoto, S., 1983, Flavonoids: Potent inhibitors of arachidonate 5-lipoxygenase, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 116 (2), pp. 612-618
- Yoshimoto, T., Takahashi, Y., 2002, Arachidonate 12-lipoxygenases, *Prostaglandins and Other Lipid Mediators* 68-69, pp. 245-262
- You, Z., Hoveyda, A.H., Snapper, M.L., 2009, Catalytic enantioselective silylation of acyclic and cyclic triols: Application to total syntheses of cleroidicins D, F, and C, *Angewandte Chemie - International Edition* 48 (3) , pp. 547-550
- Youn, U.J., Lee, J.-H., Lee, Y.J., Nam, J.W., Bae, H., Seo, E.-K., 2010, Regulation of the 5-HT 3A receptor-mediated current by alkyl 4-hydroxybenzoates isolated from the seeds of *Nelumbo nucifera*, *Chemistry and Biodiversity* 7 (9) , pp. 2296-2302
- Yuldashev, M.P., Batirov, E.Kh., Malikov, V.M., Yuldashev, P.Kh., 1993, Acylated flavanone glycosides from *Ricinus communis*, *Chemistry of Natural Compounds* 29 (3) , pp. 303-305

- Zaat, S.A.J., Schripsema, J., Wijffelman, C.A., van Brussel, A.A.N., Lugtenberg, B.J.J., 1989, Analysis of the major inducers of the Rhizobium nodA promoter from Vicia sativa root exudate and their activity with different nodD genes, *Plant Molecular Biology* 13 (2), pp. 175-188
- Zaher, N., Nicolaou, I., Demopoulos, V.J., 2002, Pyrrolylbenzothiazole derivatives as aldose reductase inhibitors, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 17 (2) , pp. 131-135
- Zhang, Y., Marcillat, O., Giulivi, C., Ernster, L., Davies, K.J.A., 1990, The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase, *Journal of Biological Chemistry* 265 (27), pp. 16330-16336
- Zheng, M., Storz, G., 2000, Redox sensing by prokaryotic transcription factors, *Biochemical Pharmacology* 59 (1), pp. 1-6
- Zhou, B., Miao, Q., Yang, L., Liu, Z.-L., 2005, Antioxidative effects of flavonols and their glycosides against the free-radical-induced peroxidation of linoleic acid in solution and in micelles, *Chemistry - A European Journal* 11 (2), pp. 680-691
- Zhu, Q.Y., Huang, Y., Chen, Z.-Y., 2000, Interaction between flavonoids and α -tocopherol in human low density lipoprotein, *Journal of Nutritional Biochemistry* 11 (1), pp. 14-21
- Zhu, M., Fahl, W.E., 2001, Functional characterization of transcription regulators that interact with the electrophile response element, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 289 (1), pp. 212-219
- Zimmet, P.Z., 1999, Erratum: Diabetes epidemiology as a tool to trigger diabetes research and care (*Diabetologia* (1999) 42 (499-570)), *Diabetologia* 42 (8), pp. 1032

Online sources:

www.zipcodezoo.com

www.worldagroforestrycentre.org

plants.usda.gov

plantnet.rbgsyd.nsw.gov.au