

**ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑΣ – ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ**

ΤΣΙΦΤΣΟΓΛΟΥ ΣΤ. ΟΛΓΑ



**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ *ALLYSUM ALYSSOIDES* ΤΗΣ
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ BRASSICACEAE (CRUCIFERAE)**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ:
ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑ – ΦΥΤΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΑ
ΠΡΟΪΟΝΤΑ**

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2013

ΤΣΙΦΤΣΟΓΛΟΥ ΣΤ. ΟΛΓΑ

Πτυχιούχος Φαρμακοποιός

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ *ALLYSUM ALYSSOIDES* ΤΗΣ
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ BRASSICACEAE (CRUCIFERAE)**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ:
ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑ – ΦΥΤΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΑ
ΠΡΟΪΟΝΤΑ**

**Υποβλήθηκε στο Τμήμα Φαρμακευτικής
Τομέας Φαρμακογνωσίας-Φαρμακολογίας
Ημερομηνία Προφορικής Εξέτασης:**

**Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:
Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Λάζαρη Διαμάντω, Επιβλέπουσα
Αναπληρωτής Καθηγητής κ. Κοκκάλου Ευγένιος, Εξεταστής
Καθηγήτρια κ. Χατζηπαύλου-Λίτινα Δήμητρα, Εξετάστρια**

ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ *ALYSSUM ALYSSOIDES* ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ BRASSICACEAE (CRUCIFERAE)

Τα περισσότερα είδη του γένους *Alyssum* της οικογένειας Brassicaceae έχουν μελετηθεί κυρίως ως προς την συμβολή τους στην οικολογία. Στην παρούσα μελέτη αναλύθηκε φυτοχημικά το είδος *A. alyssoides*. Το μεθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του φυτού κλασματοποιήθηκε με εκχύλιση υγρού-υγρού (κατανομές), με σειρά διαλυτών αυξανόμενης πολικότητας: διαιθυλαιθέρα οξικό αιθυλεστέρα, βουτανόλη-1 και νερό. Περαιτέρω μελετήθηκαν ως προς τη χημική τους σύσταση τα κλάσματα του διαιθυλαιθέρα και του οξικού αιθυλεστέρα. Μέχρι στιγμής έχουν απομονωθεί, με τη χρήση χρωματογραφικών μεθόδων (C.C. και HPLC), και ταυτοποιηθεί, με τη χρήση φασματοσκοπικών μεθόδων (UV/Vis, NMR, και MS), δευτερογενείς μεταβολίτες που ανήκουν στην κατηγορία των φαινολικών παραγώγων και πιο συγκεκριμένα δύο φαινολοξέα, αμφότερα παράγωγα βενζοϊκού οξέος: *p*-υδροξυ-βενζοϊκό οξύ και 3-μεθοξυ-4-υδροξυ-βενζοϊκό οξύ (βανιλλικό οξύ) καθώς και επτά φλαβονοειδή, παράγωγα φλαβονόλης: καιμπφερολο-3-O-β-D-γλυκοκυρανοσίδης (αστραγαλίνη), καιμπφερολο-3-O-(6''-α-L-ραμνοκυρανοσυλο)-β-D-γλυκοκυρανοσίδης (νικοτιφλορίνη), κερκετινο-3-O-β-D-γλυκοκυρανοσίδης (ισοκερκετίνη), κερκετινο-3-O-β-εξοσίδης, ισοραμνετινο-3-O-β-D-γλυκοκυρανοσίδης και ισοραμνετινο-3-O-εξοσίδης, ισοραμνετινο-3-O-(6''-α-L-ραμνοκυρανο-συλο)-β-D-γλυκοκυρανοσίδης (ναρκισσίνη).

**STUDY OF THE PLANT *ALYSSUM ALYSSOIDES* OF THE FAMILY
BRASSICACEAE (CRUCIFERAE)**

Most of *Alyssum* species of Brassicaceae family have been mainly studied for their contribution in ecology. In this study *A.alyssoides* was examined for its chemical substitutes. The methanol extract of its aerial part was fractionated with liquid-liquid extraction (distribution) with four different solvents of increasing polarity: diethyl ether, ethyl acetate, 1-butanol and water. The diethyl ether and ethyl acetate extracts were further studied for their chemical composition. So far, were isolated by using several chromatographic methods (C.C. and HPLC) and were identified by using spectroscopic methods (UV/Vis, NMR and MS), secondary metabolites which belong to phenolics and specifically to phenolic acids and flavonoids. Have been isolated two phenolic acids, both are derivatives of benzoic acid: *p*-hydroxy-benzoic acid and 3-methoxy-4-hydroxy-benzoic acid (vanillic acid), and seven flavonoids, which are derivatives of flavonol: kaempferol 3-O- β -D-glucopyranoside (astragalin), kaempferol 3-O-(6''- α -L-rhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranoside (nicotiflorin), quercetin 3-O- β -D-glucopyranoside (isoquercetin), quercetin-3-O-hexoside, isorhamnetin-3-O- β -D-glucopyranoside, isorhamnetin-3-O-hexoside and isoramnetin 3-O-(6''- α -L-rhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranoside (narcissin).

Στον μπαμπά μου,

«Ο κάθε άνδρας μπορεί να γίνει Πατέρας αλλά πρέπει
να είσαι αληθινός άνδρας για να γίνεις Μπαμπάς»

Φίλιπ Γουίτμορ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Ευγένιο Κοκκάλου, Καθηγητή Φαρμακογνωσίας και Πρόεδρο του τμήματος Φαρμακευτικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, ο οποίος δέχτηκε να ενταχθώ στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα ειδίκευσης του Τομέα της Φαρμακογνωσίας και παρακολούθησε με ενδιαφέρον την πρόοδο των σπουδών μου. Επίσης τον ευχαριστώ για την επιλογή του θέματος της διατριβής μου, καθώς και για τη συλλογή του φυτικού υλικού.

Ευχαριστώ θερμώς την επιβλέπουσά μου, Επίκουρη καθηγήτρια κ. Διαμάντω Λάζαρη για τη συνεχή επιμέλεια, καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές που μου προσέφερε σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας και κυρίως για την υποστήριξη και ενθάρρυνση. Επίσης την ευχαριστώ για την λήψη των φασμάτων Πυρηνικού μαγνητικού Συντονισμού (NMR).

Ευχαριστώ θερμώς την τριμελή εξεταστική μου επιτροπή, τον Καθηγητή κ. Ευγένιο Κοκκάλου, την Επίκουρη καθηγήτρια κ. Διαμάντω Λάζαρη και την Καθηγήτρια κ. Δήμητρα Χατζηπαύλου–Λίτινα.

Ευχαριστώ επίσης, τον Καθηγητή Φαρμακολογίας κ. Αστέριο Τσιφτσόγλου για τις πολύτιμες συμβουλές του, καθώς και την Δρ. κ. Χρυσή Γαβριέλη για την βοήθειά και την συμπαράστασή της. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Δρ. κ. Νικόλαο Κρίγκα, Ερευνητή του Εργαστηρίου Συστηματικής Βοτανικής και Φυτογεωγραφίας, του Τμήματος Βιολογίας Α.Π.Θ, για την βοτανική περιγραφή του φυτού.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω όλους τους συναδέλφους μου από το Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας του ΑΠΘ και κυρίως τους Δρ. κ. Φίλιππο Τσατάλα και Δρ. κ. Μιχαήλ Πλιούκα, την υποψήφια διδάκτορα κ. Χριστίνα Καρακούση και την μεταπτυχιακή φοιτήτρια κ. Βασιλική Σαββανάκη για τη βοήθειά τους και για την συμπαράστασή του.

Ιδιαίτέρως ευχαριστώ, τον φίλο μου και υποψήφιο διδάκτορα του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου της Κρήτης, κ. Μιχαήλ Στεφανάκη για την πολύτιμη συμβολή του, για την λήψη των φασμάτων NMR ορισμένων κλασμάτων και όλων

των φασμάτων μάζας, καθώς επίσης για την συμπαράστασή του και την άψογη συνεργασία μας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τις φίλες μου Ζωή, Λένα, Βάγια και Ντία, τον ξάδελφό μου Γιάννη και την καθηγήτρια Αγγλικών, Δρ. κ. Ιωάννα Ζιάκα για την συμπαράστασή τους και την υπομονή τους.

Τέλος, ευχαριστώ ολόψυχα τους γονείς μου, Σταύρο και Θεοπίστη, την αδελφή μου Σοφία και τον σύζυγό της Βασίλη καθώς και το νέο μέλος της οικογένειάς μας, τον ανιψιό μου Μιχάλη, που είναι πάντα δίπλα μου, με στηρίζουν και με ενθαρρύνουν και χωρίς την βοήθεια και την υποστήριξή τους δεν θα είχα καταφέρει τίποτα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A.1. Δρογοϊστορία-Δρογοφαρμακολογία.....	5
A.2.Βοτανική Κατάταξη.....	8
A.3. Βοτανική Περιγραφή.....	9
A.4. Δρογοχημεία.....	11
A.5.Φαινολικές ενώσεις και παράγωγα.....	24
A.5.1.Γενικά για τα Φαινολοξέα.....	27
A.5.2.Βιοσύνθεση Φαινολοξέων.....	27
A.5.3.Φαρμακολογικές ιδιότητες-χρήσεις Φαινολοξέων	29
A.5.4.Γενικά για τα Φλαβονοειδή.....	34
A.5.5.Βιοσύνθεση Φλαβονοειδών	37
A.5.6.Φαρμακολογικές Ιδιότητες-Χρήσεις Φλαβονοειδών.....	41

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

B.1. Τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν.....	69
B.1.1 Χρωματογραφία.....	69
B.1.2.Φασματοσκοπικές Μέθοδοι.....	72
B.1.3 Διαλύτες.....	73
B.2. Κυρίως Έρευνα.....	74
B.2.1. Εκχύλιση της δρόγης.....	74
B.2.2. Μεθανολικό Εκχύλισμα.....	74
B.2.3. Αιθερικό Υπόλειμμα (AAA).....	76
B.2.4. Υπόλειμμα Οξικού Αιθυλεστέρα (AAE).....	81

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Γ.1. Φαινολοξέα.....	105
Γ.1.1. Ουσία 1: <i>p</i> -υδροξυ-βενζοϊκό οξύ.....	107
Γ.1.2. Ουσία 2: 3-μεθοξυ-4-υδροξυ-βενζοϊκό οξύ (Βανιλλικό οξύ).....	114

Γ.2. Φλαβονοειδή.....	121
Γ.2.1. Ουσία 3 : Καιμπφερόλο-3-Ο-β-D-γλυκοπυρανοσίδης (Αστραγαλίνη).....	123
Γ.2.2. Ουσία 4 : Καιμπφερόλο-3-Ο-(6''-α-L-ραμνοπυρανοσυλ)-β-D-γλυκοπυρανοσίδης (Καιμπφερόλο-3-ρουτινοσίδης, Νικοτιφλορίνη).....	132
Γ.2.3. Ουσία 5 : Κερκετινο-3-Ο-β-D-γλυκοπυρανοσίδης (Ισοκερκιτρίνη).....	141
Γ.2.4. Ουσία 6 : Κερκετινο-3-Ο-εξόζη.....	152
Γ.2.5. Ουσία 7 : 3'-μεθοξύ-κερκετινο-3-Ο-β-D-γλυκοπυρανοσίδης (Ισοραμνετινο-3-Ο-γλυκοσίδης).....	159
Γ.2.6. Ουσία 8 : 3'-μεθοξύ-κερκετινο-3-Ο-εξοοσίδης (Ισοραμνετινο- 3-Ο-εξοοσίδης).....	168
Γ.2.7. Ουσία 9 : 3'-μεθοξύ-κερκετινο-3-Ο-(6''-α-L-ραμνοπυρανοσυλ)-β-D-γλυκοπυρανοσίδης (Ισοραμνέτινο-3-ρουτινοσίδης, Ναρκισσίνη).....	176
Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	181
Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	185
ΣΤ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	215
ΣΤ.1. Μίγματα	217
ΣΤ.2. Εικόνες HPLC.....	231
ΣΤ.3. Πορεία Απομόνωσης.....	243



Α.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η απομόνωση και ταυτοποίηση φυσικών προϊόντων, αλλά και η διερεύνηση της βιολογικής τους δράσης είναι μια από τις κύριες κατευθύνσεις έρευνας του Εργαστηρίου Φαρμακογνωσίας του Τμήματος Φαρμακευτικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.

Η παρούσα μελέτη έχει ως αντικείμενο την απομόνωση και προσδιορισμό της δομής των δευτερογενών μεταβολιτών του φυτού *Alyssum alyssoides* της οικογένειας Brassicaceae, κυρίως των φαινολικών παραγώγων.

Στην Ελλάδα και συγκεκριμένα στην περιοχή της Καστοριάς, τα υπέργεια τμήματα του φυτού χρησιμοποιούνται εξωτερικώς για την αντιμετώπιση ορισμένων τύπων του ιού της οικογένειας των Ανθρωπίνων Θηλωμάτων (Human Papilloma Virus, HPV), όπως HPV-1, HPV-2, HPV-7, HPV-26, κ.ά., οι οποίοι προκαλούν γρήγορο πολλαπλασιασμό των κυττάρων του δέρματος με αποτέλεσμα να αναπτύσσονται εξογκώματα (δερματικοί ακροχορδώνες) τα οποία είναι ιδιαίτερα μεταδοτικά (Παπαπαναγώτου και Κυριαζοπούλου-Δαλαΐνα, 2004).

A.1. ΔΡΟΓΟΪΣΤΟΡΙΑ-ΔΡΟΓΟΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑ

Το γένος *Alyssum* το οποίο περιλαμβάνει περίπου 190 είδη, αρχικά περιγράφηκε από το Λινναίο το 1753 και βασίστηκε στο είδος *A. montanum*, που είναι ευρέως διαδεδομένο στον Ευρωπαϊκό χώρο και καλλιεργείται σε περιορισμένο βαθμό. Ωστόσο, φαρμακευτικά και καλλωπιστικά είδη του γένους καλλιεργούνται ήδη από το 1650. Το όνομα “*Alyssum*” είναι ελληνικό και προέρχεται από το πρόθεμα “α” που δηλώνει άρνηση (α στερητικό) και το “-lyssa” που αναφέρεται στην τρέλα, την οργή ή την υδροφοβία. Αμφότερα τα ονόματα “*Madwort*” και “*Alyssum*” προσδιορίζουν φυτά που χρησιμοποιήθηκαν για την αντιμετώπιση της λύσσας. Αναφέρεται ότι έγχυμα από άνθη και φύλλα φυτών που ανήκουν στο γένος *Alyssum* χορηγούνταν ως το ειδικό αντίδοτο για την αντιμετώπιση της οργής που προκαλείται από δάγκωμα λυσσασμένου σκύλου. Ορισμένες ιστορικές πηγές αναφέρουν τη χρήση του τσαγιού ως κατευναστικό και επίσης ότι χρησιμοποιούνταν από τους Έλληνες για την αντιμετώπιση του λόξυγκα. Υπάρχουν κάποιες ενδείξεις ότι το μονοετές αγριόχορτο *A. alyssoides* που ευδοκμεί στην Νότιο και Κεντρική Ευρώπη και έχει επίσης χαρτογραφηθεί και στην Βόρειο Αμερική (που συχνά εσφαλμένα αναφέρονταν ως (*A. calycinum*), ήταν το φυτό με το όνομα “*Heal-bite*” ή “*Heal-dog*” και σε αυτό στηρίχθηκε η σημερινή κοινή ονομασία “*Madwort*” (Dudley, 1966).

Στην Σερβία το είδος αυτό είναι γνωστό με την τοπική ονομασία “*Čačkasta gromotulja*” και τα φρέσκα φύλλα ή τα υπέργεια τμήματα του φυτού που συλλέγονται κατά την περίοδο της ανθοφορίας χρησιμοποιούνται αυτούσια ή υπό μορφή βάμματος (50g φρέσκων φύλλων σε 200g 70% αλκοόλη) ως διεγερτικό της όρεξης, βλεννολυτικό και αντι-σκορβουτικό (Porovic, 2012).

Στην Γερμανία είναι γνωστό με τα ονόματα “*Kelch-Kraut Stein*”, “*Stein Kraut*” και “*Schildkraut*” ως ευεργετικό για την αντιμετώπιση συμπτωμάτων πέτρας των νεφρών και της ουροδόχου κύστης. Επίσης, αφεινήματα των υπέργειων τμημάτων του φυτού χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση του λόξυγκα και του τρόμου των χεριών. Τέλος, σύμφωνα με την λαϊκή θεραπευτική περιοχών της Γερμανίας, κόνις των υπέργειων τμημάτων του φυτού αναμεμιγμένη με μέλι όταν εφαρμοστεί στο πρόσωπο βοηθά στην εξάλειψη ατελειών του προσώπου, όπως φακίδες και δυσχρωμίες (<http://www.volkoomen.nl/A/allyssUM.htm>).

Υδατικό εκχύλισμα των σπερμάτων του είδους *A. homalocarum* χρησιμοποιείται ως παραδοσιακό φυτοθεραπευτικό σκεύασμα σε περιοχές της Ν.Δ. Ασίας (Ιράκ, Ιράν, Πακιστάν, Αραβία και Αίγυπτο), με το τοπικό όνομα “Qodume”. Κυρίως συνιστάται για την αντιμετώπιση συμπτωμάτων του κοκκύτη, του άσθματος και άλλων λοιμώξεων των πνευμόνων, όπως ο ξηρός βήχας. Επιπλέον, χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση της δυσκοιλιότητας (ως μαλακτικό κοπράνων), καθώς επίσης και σε περιπτώσεις πέτρας των νεφρών. Η χορήγηση γίνεται από του στόματος (Koocheki *et al.*, 2009).



Εικόνα 1: *Alyssum alyssoides*

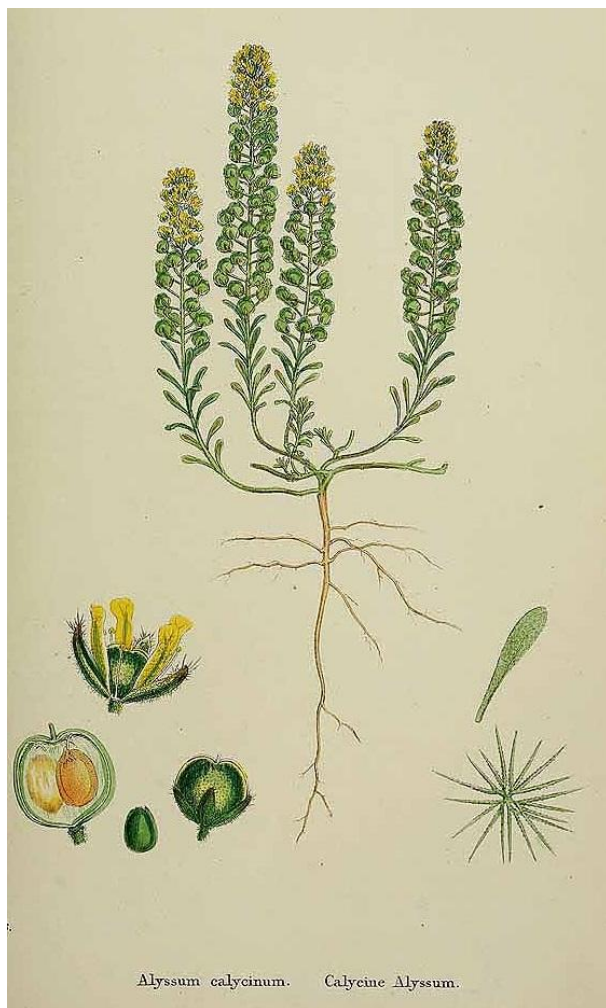
A.2. ΒΟΤΑΝΙΚΗ ΚΑΤΑΤΑΞΗ

Regnum Βασίλειο	Plantae
Division Διαίρεση	Magnoliophyta
Classis Κλάση	Magnoliopsida
Ordo Ταξη	Capparales
Familia Οικογένεια	Brassicaceae (Cruciferae)
Genus Γένος	<i>Alyssum</i> L.
Sectio Τμήμα	Psilonema
Species Είδος	<i>Alyssum alyssoides</i>

(AL- Shehbaz, 1987)

A.3. ΒΟΤΑΝΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

Μορφολογική περιγραφή: Είναι μονοετής πόα με ένα ή περισσότερους ανερχόμενους ή ανορθωμένους βλαστούς, ύψους έως 20cm. Τα φύλλα έχουν διαστάσεις 15×3mm, είναι στενά αντιλογχοειδή και καλύπτονται από κεκλιμένες αστεροειδείς τρίχες με 16 ακτίνες διαμέτρου περίπου 0.5mm. Τα βράκτια και τα σέπαλα φέρουν πολλές ασύμμετρες αστεροειδείς τρίχες με ανορθωμένες ή



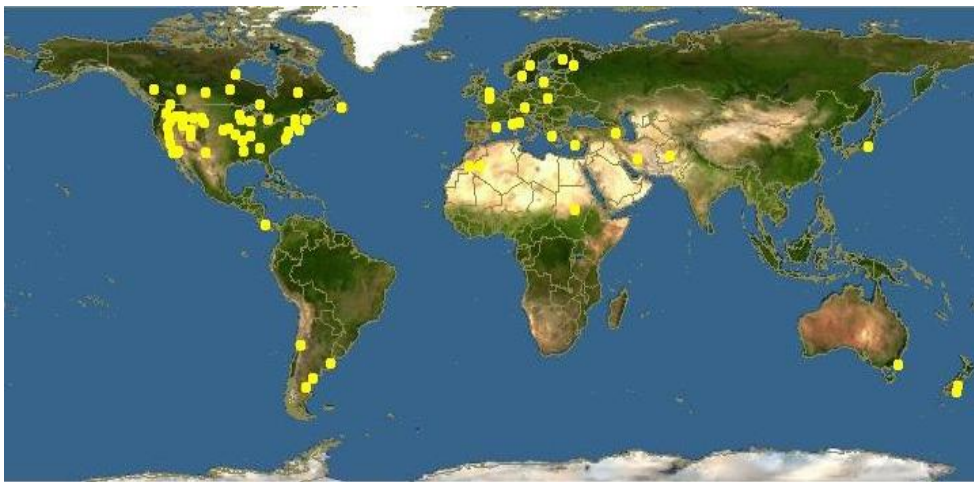
κεκλιμένες ακτίνες. Τα άνθη αναπτύσσονται σε ταξιανθία βότρυ μήκους 3-10cm η οποία σπανίως διακλαδίζεται στο κάτω τμήμα. Οι μίσχοι των κατώτερων καρπών είναι κεκλιμένοι και έχουν μήκος 2.5-4mm. Τα σέπαλα έχουν μήκος 2-2.5(-3)mm, είναι στενώς ωοειδή και παραμένουν μέχρι την ωρίμανση των καρπών. Τα πέταλα έχουν μήκος 3-5mm (1.5 φορά το μήκος των σεφάλων) είναι γραμμοειδή και πλαταίνουν στο άνω τμήμα, και φέρουν τρίχες. Τα νήματα των ανθέρων δεν φέρουν εξαρτήματα και οι ανθήρες έχουν μήκος 0.15-0.25mm. Τα νηματειδή νεκτάρια έχουν μήκος 0.5-0.7(-1)mm. Τα επιμέρους δύο τμήματα του τυπικού για την οικογένεια καρπού

(κεράτιο) διογκώνονται στο κέντρο τους, είναι κυκλικά-ωοειδή, φέρουν πυκνές αστεροειδείς τρίχες (μήκους περίπου 0.5mm οι οποίες δεν αλληλοεπικαλύπτονται) και έχουν συνολικό μήκος 3.5-4.5mm. Ο στύλος του υπέρου έχει μήκος (0.3-)0.5-0.8mm και είναι συνήθως τριχωτός στη βάση του. Τα σπέρματα έχουν μήκος περίπου 1.5mm, συμπεριλαμβανομένης της πτέρυγας πλάτους 0.1-0.2mm.

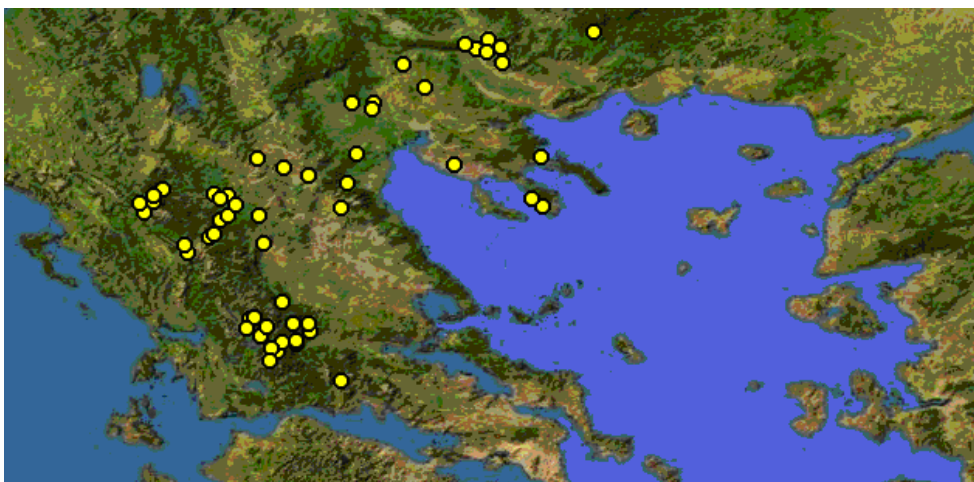
Ανθοφορία: Ανθίζει από τον Απρίλιο έως τον Ιούνιο.

Βιότοπος: Φύεται σε πετρώδεις πλαγιές ή πετρώδη λιβάδια, σε θαμνότοπους και ανοιχτές δασικές εκτάσεις, κυρίως σε ασβεστολιθικά υποστρώματα (αλλά και σε φλύσχη ή σχιστόλιθο, σπανίως σε σερπεντίνες), σε υψόμετρα από 300-1800m ή και σε μεγαλύτερα υψόμετρα.

Εξάπλωση: Είναι ενδημικό της Ευρώπης και της Βόρειας Αφρικής. Στην Ελλάδα αποτελεί συχνά απαντούμενο φυτό σε λοφώδεις και ορεινές περιοχές της ηπειρωτικής χώρας από την κεντρική Στερεά Ελλάδα έως τη βόρεια συνοριακή γραμμή, ενώ σπανίζει σε άλλες περιοχές της χώρας όπως η Πελοπόννησος.



Εικόνα 2: Περιοχές εξάπλωσης, Παγκοσμίως



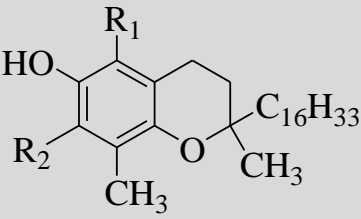
Εικόνα 3: Περιοχές εξάπλωσης, στην Ελλάδα

A.4. ΔΡΟΓΟΧΗΜΕΙΑ

Από είδη του γένους *Alyssum* έχουν απομονωθεί σύμφωνα με την βιβλιογραφία κυρίως τοκοφερόλες, στερόλες, λιπαρά οξέα, γλυκοσίδες με θειούχο άγλυκο, θειοκυανιούχα, νιτρίλια και ισοθειοκυανιούχα. Το σύνολο των βιβλιογραφικών δεδομένων παρουσιάζεται συνοπτικά στους πίνακες που ακολουθούν.

Τοκοφερόλες

Φυτό	Τοκοφερόλη	Βιβλιογραφία
<i>A. alyssoides</i>	α-Tocopherol, γ-Tocopherol	Fernando <i>et al.</i> , 1999
<i>A. corymbosum</i>	α-Tocopherol, γ-Tocopherol, δ-Tocopherol	
<i>A. granatense</i>	α-Tocopherol, γ-Tocopherol	
<i>A. murale</i>	α-Tocopherol, γ-Tocopherol, δ-Tocopherol,	
<i>A. repens</i>	α-Tocopherol, γ-Tocopherol, δ-Tocopherol	
<i>A. saxatile</i>	α-Tocopherol, γ-Tocopherol	

		
Τοκοφερόλη	R ₁	R ₂
α-Tocopherol	-CH ₃	-CH ₃
β-Tocopherol	-CH ₃	-H
γ-Tocopherol	-H	-CH ₃
δ-Tocopherol	-H	-H

Λιπαρά οξέα

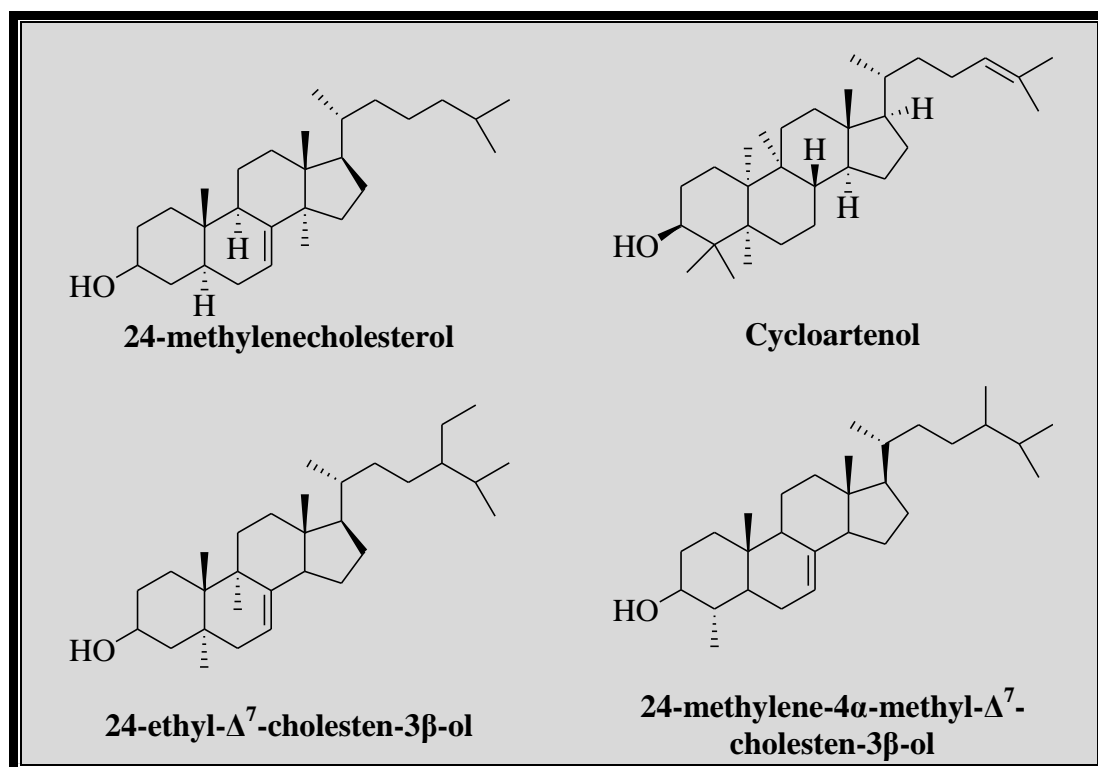
Φυτό	Λιπαρά οξέα	Βιβλιογραφία
<i>A. alyssoides</i>	Palmitic acid, Stearic acid, Oleic acid, Linoleic acid, Linolenic acid, Erucic acid	Fernando <i>et al.</i> , 1999
<i>A. corymbosum</i>	Palmitic acid, Stearic acid, Oleic acid, Linoleic acid, Linolenic acid, Gadoleic acid, Erucic acid	
<i>A. granatense</i>	Palmitic acid, Stearic acid, Oleic acid, Linoleic acid, Linolenic acid, Gadoleic acid, Erucic acid	
<i>A. murale</i>	Palmitic acid, Stearic acid, Oleic acid, Linoleic acid, Linolenic acid	
<i>A. repens</i>	Palmitic acid, Stearic acid, Oleic acid, Linoleic acid, Linolenic acid	
<i>A. saxatile</i>	Palmitic acid, Stearic acid, Oleic acid, Linoleic acid, Linolenic acid	

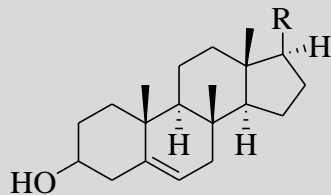
Λιπαρό οξύ	Δομή
Palmitic acid	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$
Stearic acid	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$
Oleic acid	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Linoleic acid	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Linolenic acid	$\text{H}_3\text{CH}_2\text{CHC}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Gadolenic acid	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Erucic acid	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{11}\text{COOH}$
Nervonic acid	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$

Στερόλες

Φυτό	Στερόλες	Βιβλιογραφία
<i>A. argeteum</i>	Cholesterol 24-methylcholesterol (Campesterol) 24-methylenecholesterol, 24-ethyl- $\Delta^{5,22}$ -cholestadien-3 β -3-ol (Stigmasterol), 24-ethylcholesterol (β -sitosterol), Δ^5 -avenasterol	Knights και Berrie, 1971
<i>A. maritimum</i> (L.) <i>Lam</i> (Carpet of snow)	Cholesterol, 24-methyl- $\Delta^{5,22}$ -cholestadien-3 β -ol (Brassicasterol), 24-methylcholesterol (Campesterol), 24-methylenecholesterol, 24-ethylcholesterol (β -sitosterol)	
<i>A. maritimum</i> (Rose O' Day)	Cholesterol, 24-methyl- $\Delta^{5,22}$ -cholestadien-3 β -ol (Brassicasterol), 24-methylcholesterol (Campesterol), 24-methylenecholesterol, 24-ethylcholesterol (β -sitosterol), Δ^5 -avenasterol	
<i>A. montanum</i> L.	Cholesterol, 24-methylcholesterol (Campesterol) 24-methylenecholesterol, 24-ethyl- $\Delta^{5,22}$ -cholestadien-3 β -3-ol (Stigmasterol), 24-ethylcholesterol (β -sitosterol), Δ^5 -avenasterol	

<p><i>A. montanum</i> L. (<i>A. flexicaule</i>)</p>	<p>Cholesterol, 24-methylcholesterol (Campesterol) 24-methylenecholesterol, 24-ethyl-$\Delta^{5,22}$-cholestadien-3β-ol (Stigmasterol), 24-ethylcholesterol (β-sitosterol), Δ^5-avenasterol, Cycloartenol, 24-ethyl-Δ^7-cholesten-3β-ol, 24-methylene-4α-methyl-Δ^7-cholesten-3β-ol</p>	<p>Knights και Berrie, 1971</p>
<p><i>A. saxatile</i> (<i>A. serpyllifolium</i>)</p>	<p>Cholesterol, 24-methylcholesterol (Campesterol), 24-methylenecholesterol, 24-ethylcholesterol (β-sitosterol), Δ^5-avenasterol</p>	

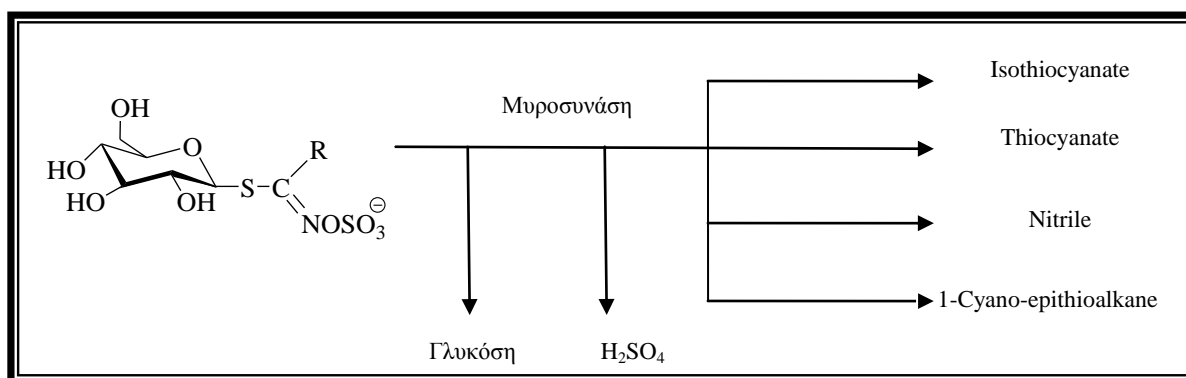




Στερόλη	-R
24-methyl- $\Delta^{5,22}$ -cholestadien-3 β -ol (Brassicasterol)	
24-methylcholesterol (Campesterol)	
24-ethylcholesterol (β -sitosterol)	
24-ethyl- $\Delta^{5,22}$ -cholestadien-3 β -3-ol (Stigmasterol)	
Δ^5 -avenasterol	
Cholesterol	

Γλυκοσίδες με θειούχο άγλυκο

Γλυκοσίδες με θειούχο άγλυκο είναι γλυκοσίδες που το άγλυκο και το σάκχαρο είναι ενωμένα με θειούχο δεσμό. Όλα τα φυτά στα οποία υπάρχουν γλυκοσίδες με θειούχο άγλυκο περιέχουν επίσης και το ένζυμο μυροσινάση. Το ένζυμο αυτό επιδρά στους γλυκοσίδες και τους υδρολύει, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση γλυκόσης, θειικού οξέος και ενδιάμεσων προϊόντων, όπως νιτρίλια, θειοκυανικοί και ισοθειοκυανικοί εστέρες.



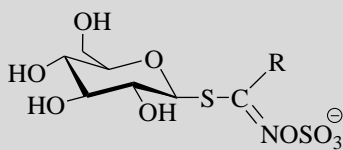
Οι θειογλυκοσίδες ή γλυκοσίδες ελαίου μουστάρδας είναι μια κατηγορία γλυκοσιδών όπου το τμήμα του σακχάρου είναι πάντοτε β-γλυκόση, η οποία συνδέεται με το άγλυκο μέσω ατόμου θείου (S-γλυκοσίδης). Το άγλυκο είναι ανιόν, το οποίο στο φυτό σχηματίζει άλας με ένα ανόργανο ή οργανικό κατιόν. Η ομάδα R είναι δυνατόν να είναι αλειφατική ή αρωματική.

Όπως είναι προφανές από την ανωτέρω αντίδραση, η υδρόλυση συνοδεύεται από μια επαναδιάταξη, κατά την οποία το άγλυκο μετατρέπεται σε ισοθειοκυανιούχο ομάδα. Οι θειογλυκοσίδες είναι άγευστες και άοσμες ουσίες, ενώ οι ισοθειοκυανιούχες ενώσεις, οι σχηματιζόμενες κατά την υδρόλυση είναι υγρά με έντονη οσμή και γεύση (έλαια μουστάρδας, σιναπέλαια). Θειογλυκοσίδες έχουν προσδιοριστεί σε έντεκα οικογένειες φυτών. Μεταξύ αυτών, προεξάρχει η οικογένεια Brassicaceae (φυτά ελαίων μουστάρδων), της οποίας όλα τα γένη περιέχουν θειογλυκοσίδες. Φυτά περιέχοντα γλυκοσίδες αυτού του τύπου διαθέτουν επίσης και ένζυμο ικανά να προκαλέσουν την υδρόλυσή τους (Samuelsson, 2004).

Φυτό	Γλυκοσίδης	Βιβλιογραφία
<i>A. alyssoides</i>	5-(Methylsulfinyl)pentyl[Glucoalyssin], 6-(Methylsulfinyl)hexyl[Glucohesperin], 5-(Methylthio)pentyl[Glucoberteroin], 6-(Methylthio)hexyl[Glucolesquerellin], 3-Butenyl[Gluconapin], 2(R)-2-Hydroxy-3-butenyl[Progoitrin], 2(S)-2-Hydroxy-3-butenyl[Epiprogoitrin], 4-Pentenyl[Glucobrassicapin]	Fahey <i>et al.</i> , 2001
<i>A. alpester</i>	3-(Methylsulfinyl)propyl[Glucoiberin], 4-(Methylthio)butyl[Glucoerucin], 3-(Methylthio)propyl[Glucoiberin]	Bennett <i>et al.</i> , 2004
<i>A. argenteum</i>	5-(Methylsulfinyl)pentyl[Glucoalyssin], 4-(Methylthio)butyl[Glucoerucin], 5-(Methylthio)pentyl[Glucoberteroin]	Fahey <i>et al.</i> , 2001
<i>A. bertolonii</i> <i>ssp. scutarinum</i>	5-(Methylsulfinyl)pentyl[Glucoalyssin], 5-(Methylthio)pentyl[Glucoberteroin]	
<i>A. chondrogynum</i>	4-(Methylthio)butyl[Glucoerucin], 5-(Methylthio)pentyl[Glucoberteroin]	
<i>A. constellatum</i>	3-(Methylsulfinyl)propyl[Glucoiberin]	
<i>A. dasycarpum</i>	(R)-2-Hydroxy-3-butenyl[Progoitrin] (S)-2-Hydroxy-3-butenyl[Epiprogoitrin], 4-Hydroxybenzyl{[Gluco]sinalbin}	
<i>A. desetorum</i>	6-(Methylsulfinyl)hexyl[Glucohesperin], 6-(Methylthio)hexyl[Glucolesquerellin], 4-Hydroxybenzyl{[Gluco]sinalbin}	

<i>A. granatense</i>	6-(Methylsulfinyl)hexyl[Glucohesperin], 5-(Methylsulfinyl)pentyl[Glucoalyssin], 6-(Methylthio)hexyl[Glucolesquerellin], 5-(Methylthio)pentyl[Glucoberteroin], (R)-2-Hydroxy-3-butenyl[Progoitrin], (S)-2-Hydroxy-3-butenyl[Epiprogoitrin]	Fahey <i>et al.</i> , 2001
<i>A. lubularia procumbens</i>	6-(Methylsulfinyl)hexyl[Glucohesperin], 6-(Methylthio)hexyl[Glucolesquerellin], 5-(Methylthio)pentyl[Glucoberteroin], 3-Butenyl[Gluconapin], 4-Pentenyl[Glucobrassicinapin]	Bennett <i>et al.</i> , 2004
<i>A. minus</i>	5-(Methylsulfinyl)pentyl[Glucoalyssin], 5-(Methylthio)pentyl[Glucoberteroin]	Fahey <i>et al.</i> , 2001
<i>A. minutum</i>	6-(Methylsulfinyl)hexyl[Glucohesperin], 5-(Methylsulfinyl)pentyl[Glucoalyssin], 6-(Methylthio)hexyl[Glucolesquerellin], 5-(Methylthio)pentyl[Glucoberteroin], (R)-2-Hydroxy-3-butenyl[Progoitrin], (S)-2-Hydroxy-3-butenyl[Epiprogoitrin]	
<i>A. murale</i>	6-(Methylsulfinyl)hexyl[Glucohesperin], 5-(Methylsulfinyl)pentyl[Glucoalyssin]	
<i>A. peltarioides</i>	3-(Methylsulfinyl)propyl[Glucoiberin], 3-(Methylthio)propyl[Glucoiberin]	
<i>A. perenne</i>	1-Methylethyl[Glucoputranjivin, isopropyl], 3-Butenyl[Gluconapin]	

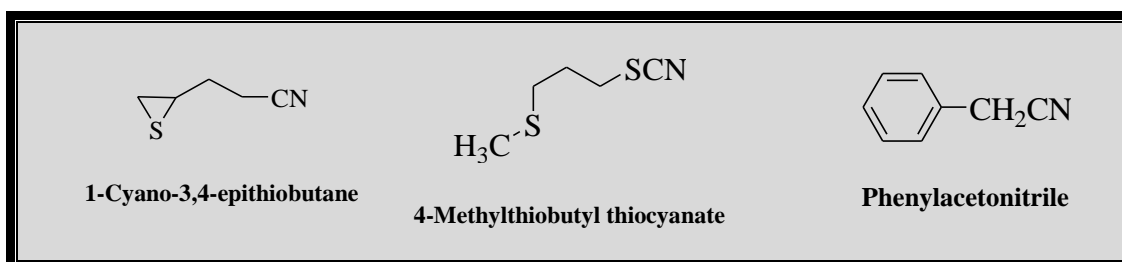
<i>A. saxatile</i>	5-(Methylsulfinyl)pentyl[Glucoalyssin], 5-(Methylthio)pentyl[Glucoberteroin], 3-(Methylthio)propyl[Glucoiberverin], 1-Methylethyl[Glucoputranjivin, isopropyl], 3-Butenyl[Gluconapin], 4-Pentenyl[Glucobrassicinapin], 3-Butenyl[Gluconapin]	Fahey <i>et al.</i> , 2001
<i>A. sibiricum</i>	3-(Methylsulfinyl)propyl[Glucoiberin], 3-(Methylthio)propyl[Glucoiberverin]	
<i>A. tortuosum</i>	5-(Methylsulfinyl)pentyl[Glucoalyssin], 4-(Methylthio)butyl[Glucocerucin], 5-(Methylthio)pentyl[Glucoberteroin], 2-Phenylethyl[Gluconasturtiin; phenethyl]	
<i>A. troodi</i>	6-(Methylthio)hexyl[Glucolesquerellin], 5-(Methylthio)pentyl[Glucoberteroin], 7-(Methylthio)heptyl, 2-Phenylethyl[Gluconasturtiin; phenethyl]	
<i>A. wulfenianum</i>	6-(Methylsulfinyl)hexyl[Glucohesperin], 5-(Methylsulfinyl)pentyl[Glucoalyssin], 6-(Methylthio)hexyl[Glucolesquerellin], 5-(Methylthio)pentyl[Glucoberteroin]	Bennett <i>et al.</i> , 2004




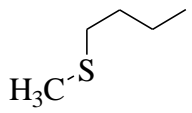
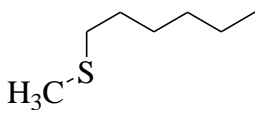
Ουσία	-R
1-Methylethyl[Glucoputranjivin, isopropyl]	$-\text{CH} \begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$
3-Butenyl[Gluconapin]	$\text{H}_2\text{C}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2^-$
4-Pentenyl[Glucobrassicinapin]	$\text{H}_2\text{C}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2^-$
(R)-2-Hydroxy-3-butenyl[Progoitrin], (S)-2-Hydroxy-3-butenyl[Epiprogoitrin]	$\text{H}_2\text{C}=\text{CH} \underset{\text{OH}}{\text{CH}} \text{CH}_2^-$
4-Hydroxybenzyl {[Gluco]sinalbin}	$\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2\text{CH}_2^-$
3-(Methylthio)propyl[Glucoibererin]	$\text{H}_3\text{C}-\text{S}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2^-$
4-(Methylthio)butyl[Glucoerucin]	$\text{H}_3\text{C}-\text{S}-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2^-$
5-(Methylthio)pentyl[Glucoberteroin]	$\text{H}_3\text{C}-\text{S}-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2^-$
6-(Methylthio)hexyl[Glucolesquerellin]	$\text{H}_3\text{C}-\text{S}-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2^-$
7-(Methylthio)heptyl	$\text{H}_3\text{C}-\text{S}-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_2^-$
3-(Methylsulfinyl)propyl[Glucoiberin]	$\text{H}_3\text{C}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{S}}}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2^-$
5-(Methylsulfinyl)pentyl[Glucoalyssin]	$\text{H}_3\text{C}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{S}}}-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2^-$
6-(Methylsulfinyl)hexyl[Glucohesperin]	$\text{H}_3\text{C}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{S}}}-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2^-$
2-Phenylethyl[Gluconasturtiin; phenethyl]	$\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2\text{CH}_2^-$

Ισοθειοκυανιούχα, νιτρίλια και θειοκυανιούχα

Φυτό	Ισοθειοκυανιούχα, νιτρίλια και θειοκυανιούχα	Βιβλιογραφία
<i>A. minimum</i>	3-Butenyl isothiocyanate, 1-Cyano-3,4-epithiobutane, Phenylacetonitrile, 6-Methylthiohexanitrile, 7-Methylthioheptanitrile, 8-Methylthiooctanitrile	Lockwood και Afsharypuor, 1986
<i>A. perenne</i> L.	Isopropyl isothiocyanate, 3-Butenyl isothiocyanate, 1-Cyano-3,4-epithiobutane, 4-Methylthiobutyl thiocyanate	Cole, 1976
<i>A. saxatile</i> L.	Isopropyl isothiocyanate, 3-Butenyl isothiocyanate, 4-Pentenyl isothiocyanate, 3-Methylthioalkyl isothiocyanates, 5-Methylthiopentyl isothiocyanate, 1-Cyano-3,4-epithiobutane, 4-Methylthiobutyl thiocyanate	



$\text{H}_3\text{C}-\text{S}-(\text{CH}_2)_5\text{CN}$	$\text{H}_3\text{C}-\text{S}-(\text{CH}_2)_6\text{CN}$	$\text{H}_3\text{C}-\text{S}-(\text{CH}_2)_7\text{CN}$
6-Methylthiohexanitrile	7-Methylthioheptanitrile	8-Methylthiooctanitrile

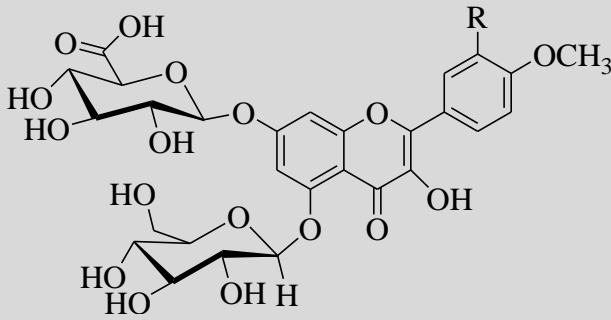
R-N=C=S	
Ισοθειοκυανιούχα	-R
Isopropyl Isothiocyanate	
3-Butenyl Isothiocyanate	$\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$
4-Pentenyl Isothiocyanate	$\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$
3-Methylthioalkyl Isothiocyanate	
5-Methylthiopentyl Isothiocyanate	

Κανονικά αλκάνια

Φυτό	n-Alkane	Βιβλιογραφία
<i>A. montanum</i>	$\text{C}_{21}, \text{C}_{22}, \text{C}_{23}, \text{C}_{24}, \text{C}_{25}, \text{C}_{26}, \text{C}_{27}, \text{C}_{28}, \text{C}_{29}, \text{C}_{30}, \text{C}_{31}, \text{C}_{32},$ $\text{C}_{33}, \text{C}_{34}, \text{C}_{35}, \text{C}_{36}$	Maffei, 1996
<i>A. saxatile</i>	$\text{C}_{22}, \text{C}_{23}, \text{C}_{24}, \text{C}_{25}, \text{C}_{26}, \text{C}_{27}, \text{C}_{28}, \text{C}_{29}, \text{C}_{30}, \text{C}_{31}, \text{C}_{32},$ $\text{C}_{33}, \text{C}_{34}, \text{C}_{35}$	

Φλαβονοειδή

Φυτό	Φλαβονοειδές	Βιβλιογραφία
<i>A. minimum</i>	Quercetin-5-glucoside-7-glucuronide -4'- methylether Quercetin-5-glucoside-7-glucuronide -3', 4'-dimethylether	Afsharypuor και Lockwood, 1986

	
Φλαβονοειδές	-R
Quercetin-5-glucoside-7-glucuronide -4'- methylether	-OH
Quercetin-5-glucoside-7-glucuronide -3', 4'- dimethylether	-OCH ₃

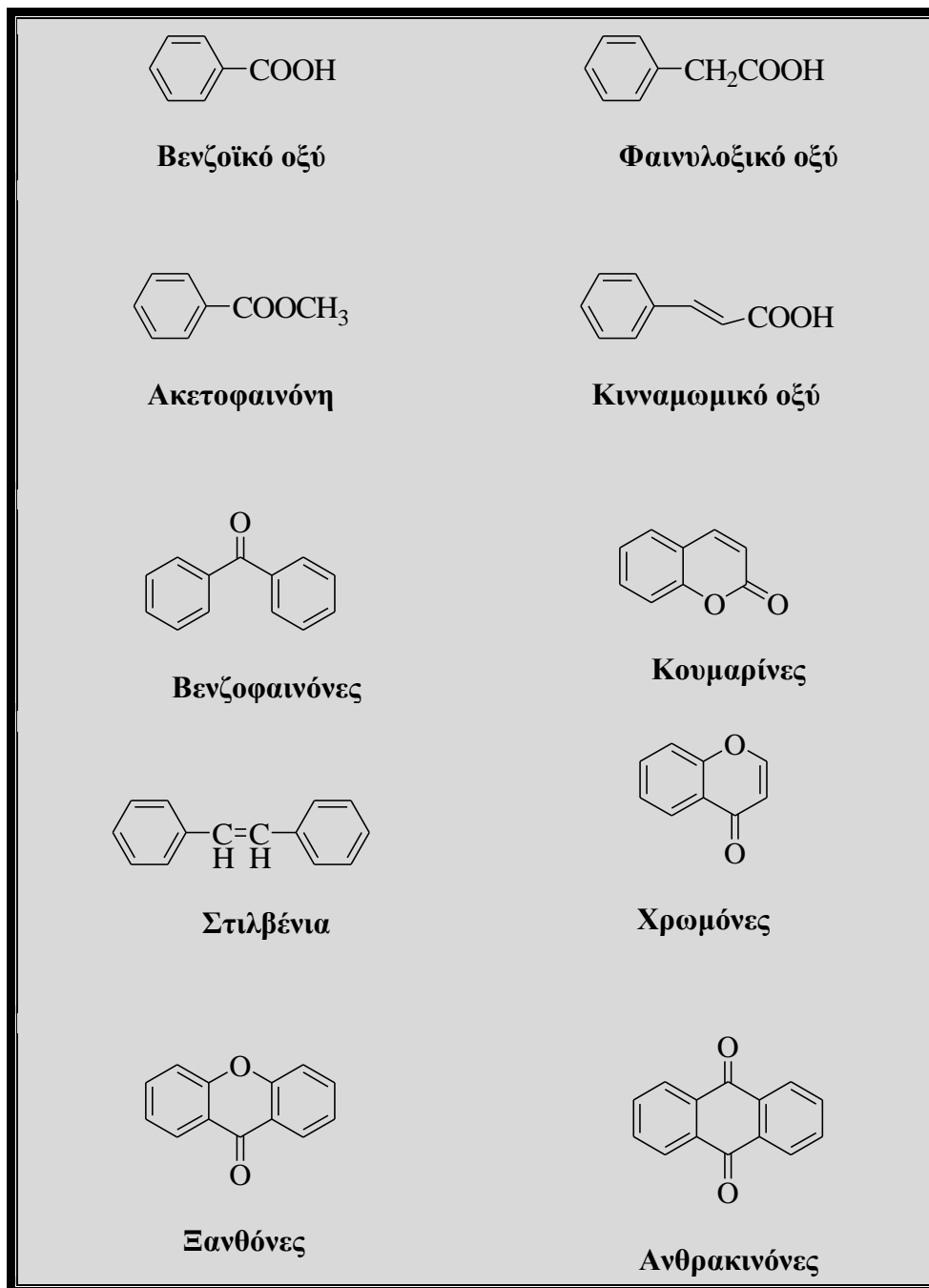
A.5. ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΩΓΑ

Ο όρος «φαινολικά παράγωγα» εμπεριέχει περίπου 8000 ουσίες φυσικής προελεύσεως, στις οποίες υπάρχει ένα κοινό δομικό χαρακτηριστικό, δηλαδή τουλάχιστον μια φαινόλη (ένας αρωματικός δακτύλιος που φέρει τουλάχιστον ένα υδροξύλιο). Τα φαινολικά παράγωγα διακρίνονται σε απλές φαινόλες και πολυφαινόλες ανάλογα με το πλήθος των φαινολομάδων που περιέχουν (Robbins, 2003). Υπάρχουν πολλές διαφορετικές δομικές ομάδες.

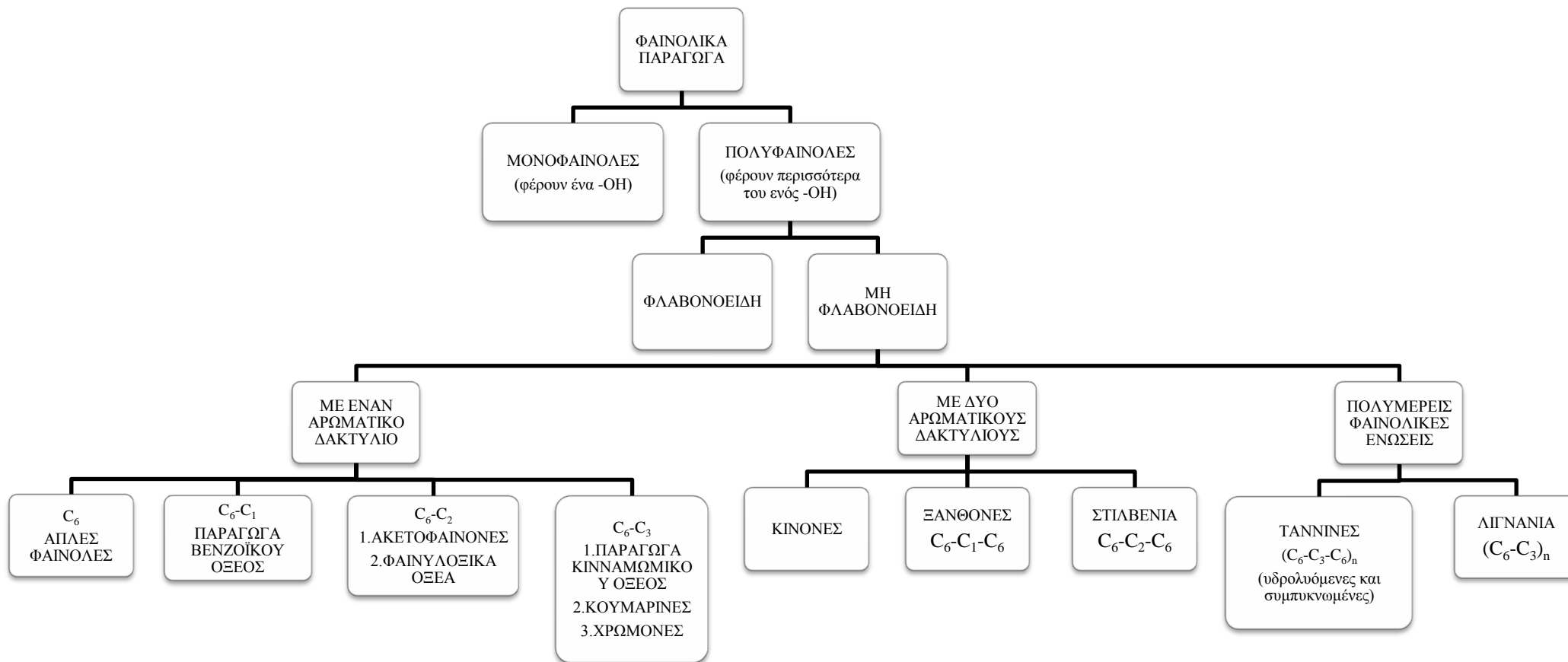
Η ταξινόμηση των φαινολικών παραγώγων γίνεται με βάση:

1. Τον αριθμό των ομάδων υδροξυλίου. Σύμφωνα με αυτό, μπορούμε να τα διακρίνουμε σε μονοφαινόλες και πολυφαινόλες. Φαινολικές ενώσεις που περιέχουν περισσότερα του ενός $-OH$ σε έναν αρωματικό δακτύλιο είναι πολυφαινόλες (Khadem και Marles, 2010).
2. Τον αριθμό των φαινολικών δακτυλίων και των ατόμων άνθρακα της πλευρικής αλυσίδας (C_6-C_1 , C_6-C_2 , C_6-C_3 , $C_6-C_1-C_6$, $C_6-C_2-C_6$, $C_6-C_3-C_6$)
3. Τον βαθμό πολυμερισμού [ελλαγικό οξύ: διμερές του γαλλικού οξέος, λιγνάνια: διμερή φαινυλοπροπανίων, ταννίνες: υρδολυόμενες που είναι είτε πολυμερή γαλλικού οξέος (γαλλοταννίνες), είτε ελλαγικού οξέος (ελλαγιταννίνες) και συμπυκνωμένες ταννίνες ή κατεχίνες].

Στην ομάδα των φαινολικών παραγώγων ανήκουν και τα φλαβονοειδή ($C_6-C_3-C_6$). Συχνά, στη σύγχρονη βιβλιογραφία τα φαινολικά παράγωγα ταξινομούνται επίσης και ως φλαβονοειδή και μη-φλαβονοειδή (Khadem και Marles, 2010). Τα φλαβονοειδή εξετάζονται ξεχωριστά από όλες τις υπόλοιπες φαινολικές ενώσεις, τόσο λόγω της ευρείας κατανομής τους στα φυτά, όσο και λόγω του μεγάλου αριθμού παραγώγων που υπάρχουν στην φύση και την πληθώρα θεραπευτικών δράσεων που εμφανίζουν.



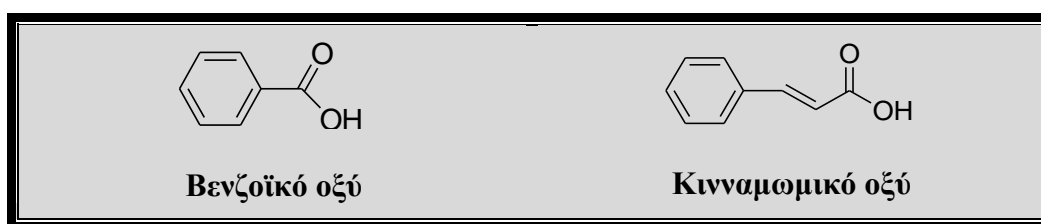
Εικόνα 4: Κυριότερες κατηγορίες φαινολικών ενώσεων



Εικόνα 5: Συνοπτική ταξινόμηση κατηγοριών φαινολικών παραγώγων

A.5.1. ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΑ ΦΑΙΝΟΛΟΞΕΑ

Τα φαινολοξέα αποτελούν υποκατηγορία μια μεγάλης ομάδας δευτερογενών μεταβολιτών που αναφέρονται ως «φαινολικά παράγωγα» και είναι ευρέως διαδεδομένα στο φυτικό βασίλειο. Ο όρος φαινολοξέα περιγράφει φαινόλες που φέρουν ένα καρβοξύλιο. Ωστόσο, όταν χρησιμοποιείται για να περιγράψει φυτικούς μεταβολίτες αφορά κυρίως παράγωγα βενζοϊκού οξέος (C_6-C_1) και παράγωγα κινναμωμικού οξέος (C_6-C_3) (Robbins, 2003).



Παρόλο που δεν έχει, μέχρι στιγμής, διευκρινιστεί με απόλυτη ακρίβεια ο ρόλος των φαινολοξέων στα φυτά, φαίνεται ότι ενέχονται σε διαδικασίες θρέψης, φωτοσύνθεσης, σε ενζυμικές αντιδράσεις, αποτελούν δομικό υλικό (λιγνάνια) και ότι έχουν αλληλοπαθητική δράση (Robbins, 2003).

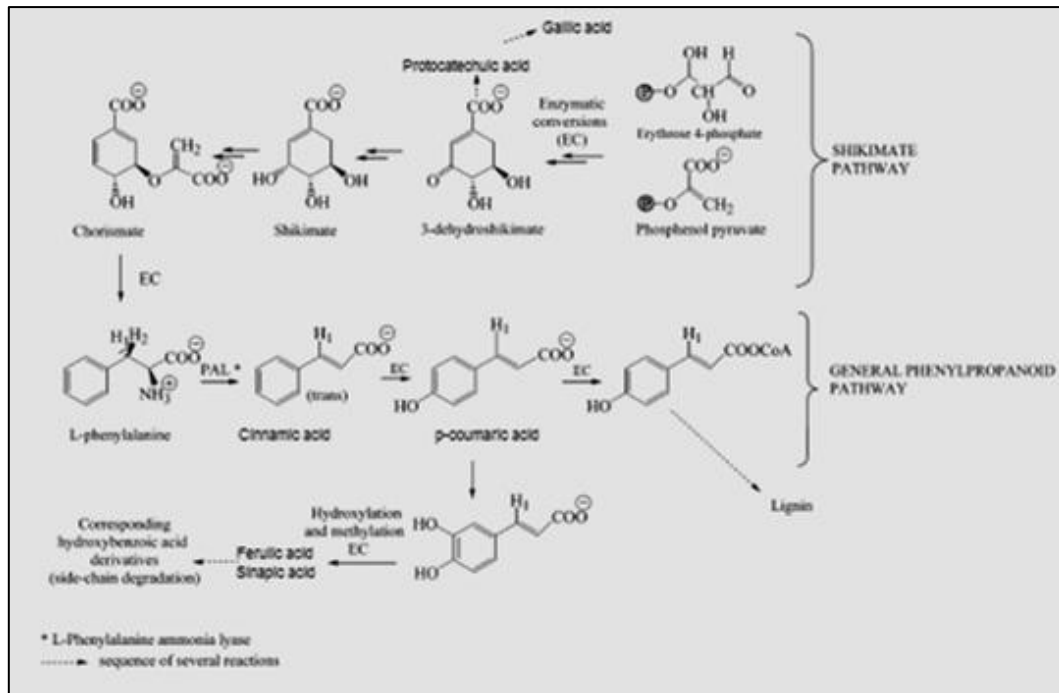
Παράγωγα του κινναμωμικού και βενζοϊκού οξέος υπάρχουν σε όλα τα φυτικής προελεύσεως τρόφιμα και είναι κατανεμημένα, όχι ομοιόμορφα, σε όλους τους φυτικούς ιστούς. Επίσης, τα επίπεδά τους εντός του φυτού διαφοροποιούνται ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης του φυτού και τις περιβαλλοντικές συνθήκες στις οποίες αναπτύσσεται. Μόνο ένα μικρό ποσοστό αυτών υπάρχει σε ελεύθερη μορφή. Αντίθετα η πλειοψηφία αυτών βρίσκεται υπό μορφή εστέρων, αιθέρων ή γλυκοσιδών (Robbins, 2003).

A.5.2. ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΦΑΙΝΟΛΟΞΕΩΝ

Η οδός του σικιμικού οξέος είναι μια εκ των δύο σειρών βιοχημικών αντιδράσεων μέσω των οποίων σχηματίζονται στη φύση αρωματικές ενώσεις.

Η βιοσύνθεση του σικιμικού οξέος περιλαμβάνει αρχικά μια αλδολική συμπύκνωση του φωσφοενολοπυροσταφυλλικού και του υδατάνθρακα φωσφορική ερυθρόζη, μεταβολίτες αμφότεροι της γλυκόσης. Στο pH που επικρατεί στο φυτό, τα συμμετέχοντα στην αντίδραση οξέα είναι ιονισμένα.

Το προϊόν της προσθήκης είναι ένα παράγωγο επτόξης, το οποίο υφίσταται κυκλοποίηση προς 3-δεϋδροκινικό. Η ένωση αυτή αφυδατώνεται προς 3-δεϋδροσικιμικό, το οποίο ανάγεται προς σικιμικό. Η ουσία αυτή αποτελεί την αφετηρία διαφόρων βιοσυνθετικών οδών οι οποίες καταλήγουν σε αρωματικά αμινοξέα και γαλλικό οξύ (Samuelsson, 2004).



Εικόνα 6: Βιοσύνθεση φαινολοξέων (Robbins, 2003)

A.5.3. ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ-ΧΡΗΣΕΙΣ ΦΑΙΝΟΛΟΞΕΩΝ

Η βιβλιογραφία παρέχει πληθώρα πληροφοριών που σχετίζει την κατανάλωση τροφών πλούσιων σε φαινολοξέα με την διατήρηση της υγείας και την πρόληψη ασθενειών. Επειδή τα φαινολοξέα παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση, είναι ευεργετικά για την πρόληψη νοσημάτων που οφείλονται σε οξειδωτικές βλάβες όπως καρδιαγγειακά νοσήματα, έμφραγμα και καρκίνο (Robbins, 2003).

1. Αντιοξειδωτική δράση

Τα περισσότερα φαινολοξέα έχουν αντιοξειδωτική ικανότητα και η αποτελεσματικότητα της αντιοξειδωτικής τους δράσης επηρεάζεται από τον αριθμό και από την θέση των υδροξυλικών και μεθοξυλικών ομάδων στο μόριο. **Οι μηχανισμοί δράσης των φαινολοξέων είναι ίδιοι με αυτούς των φλαβονοειδών και αναλύονται παρακάτω.**

2. Αντιφλεγμονώδης δράση

Τα περισσότερα φαινολοξέα έχουν αντιφλεγμονώδη δράση όπως π.χ. το καφεϊκό οξύ που είναι γνωστό ότι αποτελεί εκλεκτικό καταστολέα της βιοσύνθεσης λευκοτριενίων, συστατικών που εμπλέκονται σε νοσήματα του ανοσοποιητικού όπως άσθμα και αλλεργίες. Πρόσφατες μελέτες συνδέουν μια σειρά φαινολικών παραγώγων (*p*-κουμαρικό, φερουλικό, σιναπικό, καφεϊκό, πρωτοκατεχικό, γαλλικό οξύ) με την αναστολή της δράσης της AP-1 τρανσκριπτάσης (Activator protein-1) που είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που επηρεάζει διαδικασίες ελέγχου φλεγμονής, κυτταρική διαφοροποίηση και κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Robbins, 2003).

3. Αντιϊκή δράση

Το καφεϊκό οξύ και ορισμένα παράγωγά του έχουν αποδειχθεί ισχυροί και εκλεκτικοί αναστολείς της ιντεγκράσης του ανθρώπινου ιού HIV-1. Το ένζυμο αυτό καταλύει την ενσωμάτωση του γενετικού υλικού του ιού στην χρωματίνη του κυττάρου ξενιστή. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ώθηση για περαιτέρω έρευνα της

αντιϊκής δράσης που παρουσιάζουν τα παράγωγα του κινναμωμικού οξέος (Robbins, 2003).

4. Αντιδρεπανοτική δράση [Sickle cell anemia (SCA)]

Η δρεπανοκυτταρική αναιμία είναι μια κληρονομική ασθένεια η οποία οφείλεται σε ομόζυγη κατάσταση ενός μεταλλαγμένου β-γονιδίου (β^s), το οποίο παράγει τροποποιημένη την β-πολυπεπτιδική αλυσίδα της αιμοσφαιρίνης (HbA). Η τροποποίηση αφορά το 6^ο αμινοξύ που φυσιολογικά είναι γλουταμινικό οξύ (πολικό) και το οποίο αντικαθίσταται από βαλλίνη (μη πολικό). Η αιμοσφαιρίνη που παράγεται είναι ποιοτικά νέα και ονομάζεται αιμοσφαιρίνη S (HbS).

Τα ερυθροκύτταρα με HbS σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου αποκτούν χαρακτηριστικό δρεπανοειδές σχήμα που εμποδίζει τη φυσιολογική κυκλοφορία του αίματος στα τριχοειδή αγγεία, καθώς τα κάνει άκαμπτα, κολλώδη και εύθραυστα. Όταν συσσωρευτούν, παρακωλύεται η κυκλοφορία του αίματος μέσα από τα τριχοειδή, προκαλώντας απόφραξη, υποξία των ιστών και ακόμα εντονότερη δρεπάνωση των ερυθρών κυττάρων. Τα δρεπανοκύτταρα καταστρέφονται γρηγορότερα, με αποτέλεσμα την εμφάνιση αναιμίας. Η ασθένεια κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο, αν και φορείς εκτός HbA συνθέτουν HbS και γι' αυτό παρουσιάζουν δρεπάνωση σε συνθήκες μεγάλης έλλειψης οξυγόνου (υψόμετρο μεγαλύτερο από 3000m).

Εξαιτίας της υψηλής θνησιμότητας των ασθενών με δρεπανοκυτταρική αναιμία, κυρίως των παιδιών, σε χώρες κυρίως της Αφρικής, και επειδή η χρήση χημειοθεραπευτικών μέσων έχει πολλές ανεπιθύμητες ενέργειες, υπάρχει ανάγκη ανάπτυξης νέων φαρμάκων, όχι μόνο συνθετικών αλλά και φυσικής προελεύσεως που να έχουν αντιδρεπανοτική δράση. Στην προσπάθεια ανεύρεσης τέτοιων φαρμάκων, δηλαδή εναλλακτικών, φθηνότερων και λιγότερο τοξικών, παρατηρήθηκε ότι εκχυλίσματα δρογών [καρποί του *Cajanus cajan*, ρίζες του *Zanthoxylum zanthoxyloides*, άγουρα φρούτα *Carica papaya*, όλα τα μέρη του φυτού *Parquetina nigrescens*] πλούσια σε φαινολικά συστατικά εμφανίζουν ευεργετικά αποτελέσματα σε ασθενείς με δρεπανοκυτταρική αναιμία. Ο μηχανισμός δράσης δεν έχει

διευκρινιστεί με ακρίβεια. Πιθανώς η δράση να οφείλεται στην αντιοξειδωτική τους ικανότητα (Imaga, 2013).

Υπάρχει μεγάλος αριθμός δημοσιεύσεων που περιγράφει τη δράση των εκχυλισμάτων του φυτού *Fagara zanthoxyloides* (*Zanthoxylum zanthoxyloides*) επί των δρεπανοειδών ερυθροκυττάρων και των οποίων η δράση αποδίδεται στα παράγωγα βενζοϊκού οξέος, τα οποία σταθεροποιούν την κυτταρική μεμβράνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων και ενεργοποιούν τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες Na^+/K^+ -ATP άση και Ca^{++} -ATP άση (Ouattara, 2009).

5. Αντιμικροβιακή δράση

Η αντιμικροβιακή δράση των φαινολοξέων καθορίζεται από τη χημική τους δομή και πιο συγκεκριμένα από τον αριθμό και τη θέση των υποκαταστατών του βενζοϊκού δακτυλίου, τον βαθμό κορεσμού και τον αριθμό ατόμων άνθρακα της πλευρικής αλυσίδας. Η αποτελεσματικότητά τους είναι μεγαλύτερη όσο αυξάνεται το μήκος της πλευρικής αλυσίδας. Γενικά, τα φαινολοξέα έχουν μικρότερη αντιμικροβιακή δράση σε σύγκριση με τους αντίστοιχους βουτυλ- και μεθυλ-εστέρες τους. Επιπλέον, τα ολιγομερή εμφανίζουν υψηλότερη δράση σε σύγκριση με τα αντίστοιχα μονομερή (Sanchez-Maldonado *et al.*, 2011). Ωστόσο, υπάρχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα σχετικά με την αντιβακτηριακή δράση των ίδιων φαινολοξέων που οφείλονται στις διαφορετικές πειραματικές συνθήκες, κάτω από τις οποίες διεξάγεται κάθε φορά η μελέτη (Prachayasittikul *et al.*, 2009, Karioti *et al.*, 2011).

6. Αντικαρκινική δράση

Τα φαινολοξέα αναστέλλουν την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κύτταρων διότι επάγουν την απόπτωση μέσω της διακοπής του κυτταρικού κύκλου, επιπλέον ρυθμίζουν την μεταγωγή των σήματος στα σηματοδοτικά μονοπάτια, επάγουν ορισμένα ένζυμα και αναστέλλουν κάποια άλλα και τέλος, αυξάνουν της διαδικασίες αποτοξίνωσης του οργανισμού (Huang *et al.*, 2010). Οι μηχανισμοί δράσης των φαινολοξέων είναι ίδιοι με αυτούς των φλαβονοειδών και αναλύονται παρακάτω.

7. Αντιοστεοπορωτική

Η ανεπαρκής πρόσληψη ασβεστίου είναι γνωστός παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση οστεοπόρωσης. Η οστεοπόρωση παθολογικά χαρακτηρίζεται από χαμηλή πυκνότητα οστών και κυρίως εμφανίζεται σε γυναίκες μεταεμμηνοπαυσιακές (φυσική ή προκαλούμενη από χειρουργείο εμμηνόπαυση). Όταν η συγκέντρωση ιόντων ασβεστίου στο αίμα μειώνεται, τότε εκκρίνεται παραθορμόνη (PTH), η οποία έχει ως κύριο βιολογικό ρόλο τη διατήρηση σταθερής συγκέντρωσης ιόντων ασβεστίου στο αίμα και στα εξωκυττάρια υγρά, έτσι ώστε να ικανοποιούνται πάντα οι ανάγκες των νευρικών κυττάρων σε ασβέστιο (μεγάλη σημασία για τη διεγερσιμότητα του νευρικού ιστού, τη μυϊκή συστολή, τη λειτουργία της καρδιάς και την πήξη του αίματος). Η παραθορμόνη δρα στους νεφρούς, όπου αυξάνει την επαναρρόφηση ασβεστίου και μειώνει την επαναρρόφηση φωσφορικών. Επίσης, δρα και στα οστά στα οποία προκαλεί έκλυση ασβεστίου και φωσφορικών, με αποτέλεσμα μείωση της οστικής πυκνότητας.

Έχουν διενεργηθεί *in vitro* και *in vivo* μελέτες οι οποίες αποδεικνύουν ότι τα φαινολοξέα αναστέλλουν την έκκριση παραθορμόνης και επομένως εμφανίζουν αντιοστεοπορωτική δράση (Li *et al.*, 1998).

8. Οιστρογονική δράση

Το *p*-υδροξυ-βενζοϊκό οξύ είναι ο κύριος μεταβολίτης των parabens, που χρησιμοποιούνται ως συντηρητικά σε καλλυντικά σκευάσματα. Έχει αποδειχθεί ότι η μεταβολίτης αυτός έχει οιστρογονική δράση. Το *p*-υδροξυ-βενζοϊκό οξύ δεν επηρεάζει άμεσα την έκκριση των οιστρογόνων. Ουσιαστικά, βρέθηκε ότι είναι ικανό να εκτοπίζει τις ορμόνες που δρουν στους ειδικούς κυτταροπλασματικούς υποδοχείς (Pugazhendhi *et al.*, 2005). Τα στεροειδή/ορμόνες που δρουν σε αυτούς τους υποδοχείς σχηματίζουν σύμπλοκα στα νεοπλασματικά κύτταρα. Τα σύμπλοκα αυτά μετατοπίζονται μετά το σχηματισμό τους στον πυρήνα και αντιδρούν εκλεκτικά με το DNA.

Κλινικά, τα οιστρογόνα και γενικότερα οι στεροειδείς ορμόνες των γεννητικών οργάνων χορηγούνται για τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού, του προστάτη, του

ενδομητρίου και της μήτρας (Τσιφτσόγλου, 2004). Επομένως, εφόσον ο μηχανισμός δράσης του *p*-υδροξυ-βενζοϊκού οξέος είναι ίδιος με αυτό των οιστρογόνων θα μπορούσε να αποτελέσει οδηγό ένωση για τη σύνθεση αντικαρκινικών φαρμάκων για την αναχαίτιση ορμονο-εξαρτώμενων όγκων.

9. Συντηρητικά τροφίμων και καλλυντικών

Το βενζοϊκό οξύ και οι εστέρες του, λόγω της χαμηλής τοξικότητάς τους, έχουν καθιερωθεί ως συντηρητικά τροφίμων και φαρμάκων (Μαλαματάρης, 2004).

Τα φαινολικά οξέα συνδέονται με το χρώμα, τις οργανοληπτικές ιδιότητες και τις διατροφικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες των τροφών. Η μελέτη της σύστασης και του φυσικοχημικού προφίλ των φαινολικών οξέων, της επίδρασής τους στην ωρίμανση των φρούτων, της δράσης τους ως αναστολέων της ενζυματικής αμάυρωσης και του ρόλου τους ως συντηρητικών στα τρόφιμα αποτελούν πεδία έρευνας με ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τη βιομηχανία τροφίμων (Robbins, 2003).

Επίσης, παράγωγα του *p*-υδροξυ-βενζοϊκού οξέος (parabens), χρησιμοποιούνται ως συντηρητικά σε καλλυντικά σκευάσματα .

A.5.4. ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΑ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ

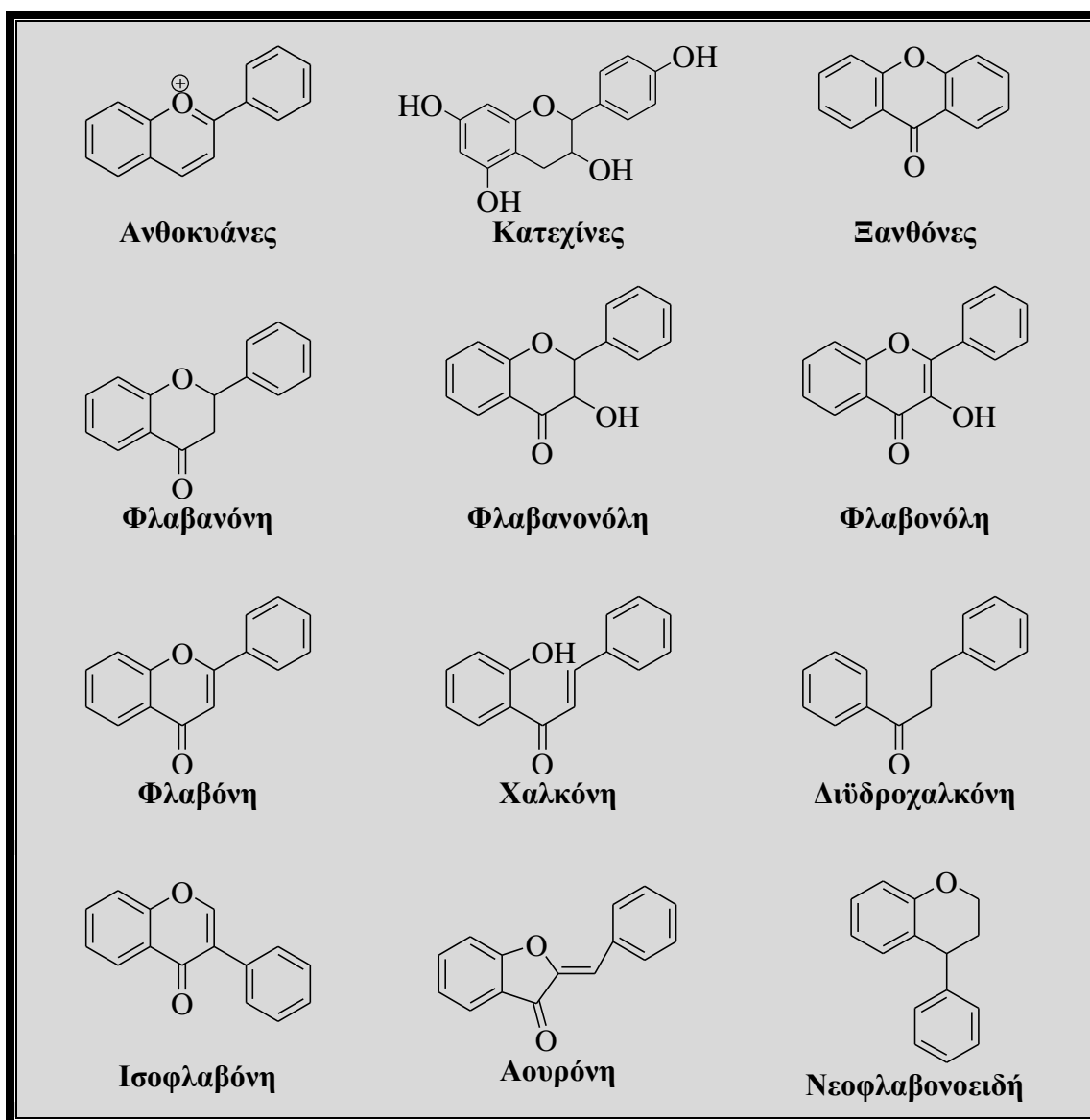
Τα φλαβονοειδή αποτελούν μία μεγάλη ομάδα πολυφαινολικών ενώσεων, ευρέως διαδεδομένων στο φυτικό βασίλειο που καταναλώνονται σε μεγάλες ποσότητες στην καθημερινή διατροφή και αποτελούν τα δραστικά συστατικά πολλών σκευασμάτων φυτικής προέλευσης. Παρουσιάζουν πλήθος βιολογικών ιδιοτήτων. Φλαβονοειδή υπάρχουν σχεδόν σε κάθε φυτό, αλλά οι υψηλότερες συγκεντρώσεις παρατηρούνται στα φρούτα και κυρίως στο εξωτερικό τους περίβλημα, δηλαδή στη φλούδα. Τα μήλα, τα σταφύλια και τα πορτοκάλια έχουν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις φλαβονοειδών. Από τα λαχανικά, τα μπρόκολα και τα κρεμμύδια αποτελούν σημαντικές πηγές, ενώ η σόγια περιέχει ισοφλαβόνη, ένα είδος φλαβονοειδούς, το οποίο λειτουργεί ως οιστρογόνο και έχει χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτική μέθοδος ορμονοθεραπειών σε γυναίκες. Ορισμένα φυτικά φαρμακευτικά σκευάσματα, όπως εκχύλισμα από ιτιά ή γκίγκο, που χρησιμοποιούνται ως καταπραϋντικά για τον πόνο, περιέχουν φλαβονοειδή. Επίσης, η σοκολάτα περιέχει ισοκατεχίνη (είδος φλαβονοειδών).

Το όνομά τους προέρχεται από τη λατινική λέξη «flavus» που σημαίνει κίτρινος (Σουλελής, 2000). Είναι ευρέως διαδεδομένα και απαντώνται σε πτεριδόφυτα και κυρίως στα ανώτερα φυτά υπό μορφή γενινών ή γλυκοσιδών. Η αφθονία των φλαβονοειδών στο φυτικό βασίλειο και το γεγονός ότι παρουσιάζουν διαφοροποίηση στην υποκατάστασή τους ανάλογα με το γένος, τα καθιστά πολύ ενδιαφέροντα από χημειοταξινομική άποψη. Δομικά θεωρούνται παράγωγα της χρωμόνης (βενζο-γ-πυρόνης) (Forster *et al.*, 1980, Harborne και Mabry, 1982, Harborne, 1994, Marby *et al.*, 1970, Palacios *et al.*, 1989, Markham, 1983).

Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί περίπου 4.000 ενώσεις της κατηγορίας των φλαβονοειδών στα ανώτερα φυτά (Pierpoint, 1986). Παρουσιάζουν εξαιρετικό ενδιαφέρον λόγω των βιολογικών τους δράσεων σε συνδυασμό με το γεγονός ότι αποτελούν σημαντικό μέρος της ανθρώπινης διατροφής. Απαντώνται στα φρούτα, στα λαχανικά, στους καρπούς, στα δημητριακά, στο κόκκινο κρασί και στο τσάι (Middleton και Kandaswami 1993, Hertog *et al.*, 1983).

Ανάλογα με το βαθμό οξείδωσης του πυρανικού τους δακτυλίου διαιρούνται σε κατηγορίες:

1. Παράγωγα του 2-φαινυλοβενζοπυριλίου: ανθοκυάνες.
2. Παράγωγα της 2-φαινυλοχρωμόνης: φλαβόνες, φλαβονόλες και τα διμερή τους, ισοφλαβόνες, ισοφλαβονόλες, ξανθόνες.
3. Παράγωγα της 2-φαινυλοχρωμανόνης: χαλκόνες, διϋδροχαλκόνες, κατεχίνες φλαβάνες, φλαβαν-3-όλες, φλαβαν-3,4-διόλες.
4. Παράγωγα της βενζυλιδενεκουμαρόνης: αουρόνες.



Εικόνα 7: Κυριότερες κατηγορίες φλαβονοειδών

Τα φλαβονοειδή απαντούν στα φυτά είτε με τη μορφή αγλύκου ή σε μορφή γλυκοσιδών. Οι γλυκοσίδες είναι συνήθως Ο-γλυκοσίδες και μικρός αριθμός είναι C-γλυκοσίδες (Σουλελής, 2000).

Διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τους υποκαταστάτες τους, τα σάκχαρα, καθώς και ως προς τη θέση σύνδεσης αυτών με τις γενίνες. Οι αρωματικοί δακτύλιοι φέρουν ως υποκαταστάτες κυρίως υδροξυλομάδες και μεθοξυ-ομάδες χωρίς να αποκλείονται (σε σπάνιες περιπτώσεις) και άλλοι υποκαταστάτες, όπως (-O-CH₂-O). Ο δακτύλιος Α φέρει υποκαταστάτες συνήθως στις θέσεις 5 και 7, ενώ ο δακτύλιος Β στις θέσεις 4' και / ή 3'.

Στους γλυκοσίδες των φλαβονοειδών τα σάκχαρα που συνήθως απαντώνται είναι η γλυκόση, η λακτόση, η ξυλόση, η ραμνόση, η αραβινόση καθώς και ορισμένοι δισακχαρίτες, όπως η ρουτίνη (6-O-α-L-ραμνοσυλο-D-γλυκόση) και η γεντιοβίωση (6-O-β-D-γλυκοσυλο-D-γλυκόση). Πρόσφατα, έχουν απομονωθεί τρισακχαρίτες και τετρασακχαρίτες.

Οι C-γλυκοσίδες σχηματίζονται μέσω δεσμού C-C ανάμεσα στον ανωμερικό άνθρακα της γλυκόσης και του άνθρακα 6 ή 8 του άγλυκου. Υπάρχουν ακόμη και ακυλιωμένοι γλυκοσίδες φλαβονοειδών, όπου μια υδροξυλομάδα του σακχάρου σχηματίζει εστερικό δεσμό με ένα αλειφατικό ή αρωματικό οξύ. Η εστεροποίηση μπορεί να γίνεται σε μια ή περισσότερες υδροξυλομάδες των σακχάρων με τα αλειφατικά οξέα (οξικό, μηλικό, μηλονικό, οξαλικό) και με αρωματικά οξέα (βενζοϊκό, κουμαρικό, καφεϊκό κ.ά.) (Σουλελής, 2000).

Τα φλαβονοειδή και οι γλυκοσίδες τους είναι σταθερές ενώσεις και μπορούν να παραλαμβάνονται από τα φυτά με εκχύλιση με ψυχρούς ή θερμούς διαλύτες. Οι διαλύτες μπορεί να είναι νερό, οργανικοί διαλύτες (μεθανόλη, αιθανόλη, οξικός αιθυλεστέρας, βουνανόλη, ακετόνη) ή συνδυασμός αυτών.

A.5.5. ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ

Τα κοινώς αποδεκτά δεδομένα, σχετικά με την βιοσύνθεση των φλαβονοειδών βασίζονται σε αποτελέσματα *in vivo* πειραμάτων με τη βοήθεια επισημασμένων ενώσεων ή σε *in vitro* πειραμάτων σε ενζυμικό επίπεδο. Αποδείχθηκε ότι σε όλες τις τάξεις των φλαβονοειδών ο ανθρακικός σκελετός προέρχεται από ουσίες του ενδιάμεσου κυτταρικού μεταβολισμού μέσω τριών διαδοχικών οδών:

1. Την οδό του φαινυλοπροπανίου.
2. Την οδό της γλυκοσυλίωσης των φλαβονοειδών.
3. Την οδό των πολυκετιδίων.

Μέσω της οδού του σικιμικού οξέος δημιουργείται στο φυτικό οργανισμό το αμινοξύ φαινυλαλανίνη. Μέσω μιας αλληλουχίας αντιδράσεων του γενικού μεταβολισμού του φαινυλοπροπανίου, η φαινυλαλανίνη μετατρέπεται σε παράγωγα του κινναμωμικού οξέος εστεροποιημένα με συνένζυμο A (CoA) ως εξής :

Αρχικά, το ένζυμο αμμωνιαλυάση της φαινυλαλανίνης καταλύει την μετατροπή του αμινοξέος σε *trans*-κινναμωμικό οξύ. Ακολούθως η 4-υδροξυλάση του κινναμωμικού οξέος καταλύει την 4-υδροξυλίωσή του. Έτσι, δημιουργείται το *p*-κουμαρικό οξύ, το οποίο αποτελεί υπόστρωμα του συνενζύμου A-λιγάση του *p*-κουμαρικού οξέος. Από την τελευταία αντίδραση δημιουργείται ο εστέρας του *p*-κουμαρικού οξέος με το CoA. Να σημειωθεί ότι το τελευταίο ένζυμο μπορεί επίσης να αποτελέσει υπόστρωμα πέραν του *p*-κουμαρικού οξέος και του καφεϊκού και φερουλικού οξέος τα οποία πιθανώς συντίθενται με τη δράση 3- ή 5-υδροξυλασών και μεθυλοτρανσφερασών μετά το σχηματισμό του *p*-κουμαρικού οξέος. Αυτές οι μεθυλοτρανσφεράσες σαφώς διαφέρουν από τις πλήρως εξειδικευμένες μεθυλοτρανσφεράσες των φλαβονοειδών που θα αναφερθούν παρακάτω. Όμως αυτό που πρέπει να τονιστεί είναι ότι κατά πάσα πιθανότητα η δεύτερη μεταβολική οδός, αυτή της σύνθεσης των φλαβονοειδών, χρησιμοποιεί CoA εστέρα του *p*-κουμαρικού οξέος αποκλειστικά. Οι CoA-εστέρες των οξέων: καφεϊκού, φερουλικού και συριγγικού, ναι μεν παράγονται στο τέλος της μεταβολικής οδού του φαινυλοπροπανίου, αλλά χρησιμοποιούνται μάλλον για την σύνθεση άλλων ενώσεων, όπως λιγνανίων.

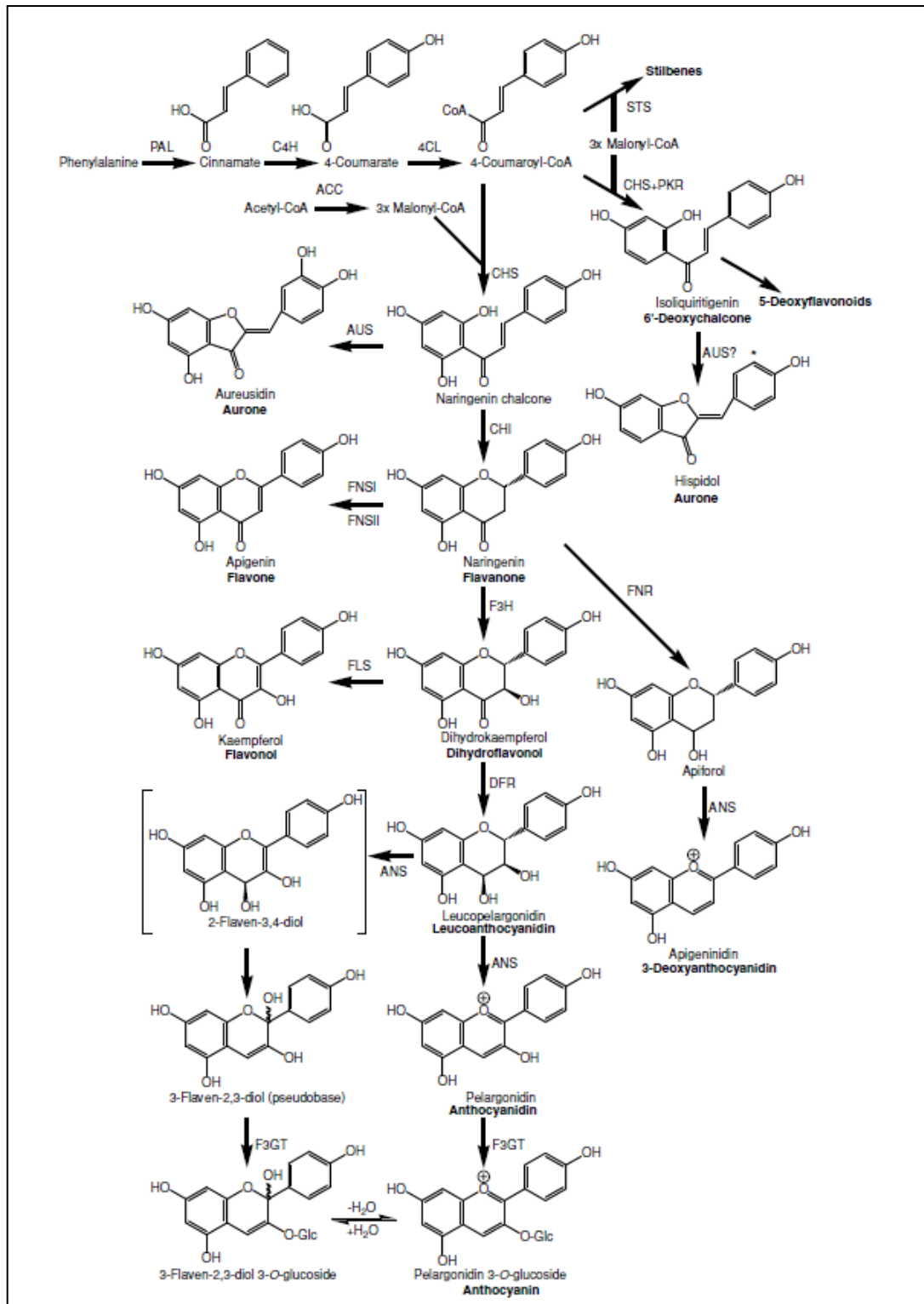
Το εξειδικευμένο ένζυμο συνθετάση της χαλκόνης καταλύει την συμπύκνωση ενός μορίου *p*-κουμαρικού CoA και τριών μορίων CH₃CO-5CoA. Η συμπύκνωση αυτή, που οδηγεί στο σχηματισμό μιας χαλκόνης, αποτελεί το πρώτο στάδιο της μεταβολικής οδού της βιογένεσης των φλαβονοειδών, που είναι οδός εξειδικευμένη, μια και οδηγεί στο σχηματισμό αποκλειστικά φλαβονοειδών. Να σημειωθεί ότι ο δακτύλιος A των φλαβονοειδών προκύπτει από συμπύκνωση τριών μορίων μηλονικού CoA, ενώ ο δακτύλιος B από το μόριο του *p*-κουμαρικού οξέος. Κατόπιν, μέσω ενός άλλου εξειδικευμένου ενζύμου, της ισομεράσης της χαλκόνης, η χαλκόνη μετατρέπεται στην αντίστοιχη φλαβονόνη. Οι εξειδικευμένες ενζυμικές διαδικασίες οι οποίες καταλύουν την οξείδωση της φλαβονόνης σε φλαβονόλη (διϋδροφλαβονόλη) και την περαιτέρω οξείδωσή της σε φλαβονόλη, δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς. Πάντως, μετά το σχηματισμό της φλαβονόνης μέσω οξειδασών και όχι υπεοξειδασών - κατά τους Abbott και Udenfriend (1974), ένζυμα της κατηγορίας των διοξυγενασών εξαρτώμενων από το 2-οξογλουταρικό οξύ, ακολουθεί συχνά περαιτέρω υδροξυλίωση και μεθυλίωση του B δακτυλίου. Υπάρχουν ερωτηματικά σχετικά με το αν η υποκατάσταση του B δακτυλίου του φλαβονοειδούς καθορίζεται στο στάδιο του κινναμωμικού οξέος ή λαμβάνει χώρα μετά το σχηματισμό της χαλκόνης ή αν καθορίζεται μετά από σχηματισμό και των δύο σταδίων.

Τελευταίο βήμα είναι η γλυκοσυλίωση του φλαβονοειδούς η οποία γίνεται στις θέσεις 7- ή / και 3- από εξειδικευμένες για κάθε θέση γλυκοσυλοτρανσφεράσες. Ως δότης γλυκόσης θεωρείται η UDP-γλυκόση και το υπεύθυνο για τη γλυκοσυλίωση ένζυμο ονομάζεται UDP-γλυκόση-7-O- (ή 3-O-) γλυκοσυλοτρανσφεράση. Ανάλογα ένζυμα υπάρχουν και για τα αντίστοιχα σάκχαρα. Η 7-O-γλυκοσυλοτρανσφεράση δεν γλυκοσυλιώνει 3-O-γλυκοσίδες φλαβονοειδών. Αντιθέτως 7-O-γλυκοσίδες συντίθενται από το ένζυμο 3-O-γλυκοσυλοτρανσφεράση. Σε περίπτωση ακυλίωσης του σακχάρου αυτή λαμβάνει χώρα μετά το σχηματισμό του γλυκοσίδη.

Κατά τη μετατροπή του χαλκονικού ενδιαμέσου σε άλλες ομάδες φλαβονοειδών η υποκατάσταση του A δακτυλίου παραμένει ως έχει. Δηλαδή χαλκόνες με υποκαταστάτη στο δακτύλιο A τύπου φλωρογλυκίνης, μετατρέπονται αποκλειστικά σε 5,7-διϋδρόξυ φλαβονοειδή. Τέτοιου τύπου εξειδίκευση δεν παρατηρείται στην υποκατάσταση του B δακτυλίου, δηλαδή 4'-υδροξυλιωμένες χαλκόνες (αρίθμηση

χαλκονών) δεν μετατρέπονται αποκλειστικά σε 4'-OH ή έστω σε 4'-OMe φλαβονοειδή, αλλά επίσης και σε φλαβονοειδή περαιτέρω υποκατεστημένα στο Β δακτύλιο. Να σημειωθεί ότι η μεθυλίωση, σε όποιο στάδιο και αν συμβαίνει γίνεται επί ήδη υπάρχοντων υδροξυλίων. Έχει βρεθεί μια εξειδικευμένη μεθυλοτρανσφεράση η οποία μεταφέρει ένα μεθύλιο από την S-αδενοσυλομεθειονίνη (SAM) σε 3,4'-διϋδροξυ συστήματα του Β δακτυλίου και μάλιστα αποκλειστικά σε μ-θέση. Το ένζυμο ονομάζεται φλαβονο-3'-O-μεθυλοτρανσφεράση SAM. Με αυτόν τον τρόπο σχηματίζεται η χρυσοεριόλη και η λουτεολίνη. Εδώ πρέπει να αναφερθεί ότι το προαναφερθέν ένζυμο δρα αποκλειστικά επί της λουτεολίνης, 7-O-γλυκοσίδη της λουτεολίνης και επί κερκετίνης υπάρχουν μεθυλοτρανσφεράσες οι οποίες μεθυλιώνουν μόρια φλαβανόνης ή διϋδροφλαβονόλης.

Τέλος, οι C-γλυκοσίδες δεν ακολουθούν την «ορθόδοξη» βιοσυνθετική πορεία, αλλά ο σχηματισμός τους ακολουθεί το ιδιόμορφο σχήμα: χαλκόνη φλαβανόνη C-γλυκοσίδης της, φλαβανόνη C-γλυκοσίδης, φλαβόνη (φλαβονόλης) O-γλυκοσυλίωση (Havsteen, 2002, Andersen και Markham, 2005).



Εικόνα 8: PAL:Phenylalanine ammonia lyase, C4H:Cinnamate 4-hydroxylase, 4CL:4-coumarate:CoA ligase, STS: Stilbene synthase, CHS: Chalcone synthase, AUS: aureusidin synthase, CHI: Chalcone isomerase, FNS I & II: Flavone synthase I & II, F3H: Flavone 3 β -hydroxylase, FNR: Flavanone 4 reductase, FLS: Flavonol synthase, DFR: Dihydroflavonol-4 reductase, ANS: anthocyanidin synthase, F3GT: UDP-Glc:anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase/ UDP-Glc:flavonol 3-O-glucosyltransferase

A.5.6. ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ-ΧΡΗΣΕΙΣ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ

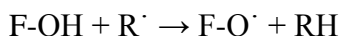
Τα φλαβονοειδή παρουσιάζουν πλήθος βιολογικών ιδιοτήτων. Μεταξύ αυτών είναι αντιβακτηριακές, αντιϊικές (Hanasaki *et al.*, 1994), αντιφλεγμονώδεις, αντιαλλεργικές (Middleton *et al.*, 1993, Hanasaki *et al.*, 1994, Hope *et al.*, 1983) και καρδιαγγειακές (Duarte *et al.*, 1993).

Αναστέλλουν τη λιπιδική υπεροξειδωση (LPO) και την συγκόλληση των αιμοπεταλίων (Cook και Samman, 1986), περιορίζουν τη διαπερατότητα των αγγείων και την ευθραυστότητά τους καθώς επίσης και τη δράση ενζυμικών συστημάτων όπως της κυκλοοξυγενάσης και λιποοξυγενάσης (Middleton *et al.*, 1993, Hope *et al.*, 1983). Η ιδιότητά τους να επεμβαίνουν σε διάφορα ενζυμικά συστήματα, να λειτουργούν ως σαρωτές ελευθέρων ριζών αλλά και ως ουσίες που σχηματίζουν σύμπλοκα με μεταλλικά ιόντα τα καθιστά αντιοξειδωτικά (Hanasaki *et al.*, 1994, Afanas'ev *et al.*, 1989). Περιορίζουν την κυτταροτοξικότητα που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες και σχετίζεται με την γήρανση των κυττάρων και με χρόνιες ασθένειες όπως η αρτηριοσκλήρυνση (Yuting *et al.*, 1990). Όλες οι φαρμακολογικές δράσεις των φλαβονοειδών στηρίζονται στις εξής τους ιδιότητες:

- I. Είναι αναστολείς πολλών ενζύμων. Η εκάστοτε αναστολή είναι αποτέλεσμα
 - ✓ Ανταγωνισμού των φλαβονοειδών με το υπόστρωμα του ενζύμου.
 - ✓ Αλλοστερική αλληλεπίδραση.
 - ✓ Δομική ομοιότητα φλαβονοειδών με συνένζυμα οπότε εμποδίζουν την πορεία της ενζυμικής αντίδρασης.
 - ✓ Σχηματισμός χηλικών συμπλόκων των φλαβονοειδών με τα μεταλλικά ιόντα (Zn^{2+} Cu^{2+} Fe^{2+}) του ενεργού κέντρου του ενζύμου.
- II. Αντιοξειδωτική δράση των φλαβονοειδών, με αποτέλεσμα να περιορίζουν το σχηματισμό ελευθέρων ριζών και το ακόλουθο οξειδωτικό stress που αποτελεί παράγοντα κινδύνου για εμφάνιση φλεγμονής (και όλων των σχετιζόμενων με αυτήν νοσημάτων π.χ αυτοάνοσα και αλλεργία), καρκίνο, νευροπάθειες κ.α.

1. Αντιοξειδωτική δράση

Τα φλαβονοειδή αποτελούν ισχυρά αντιοξειδωτικά και χαρακτηρίζονται ως σαρωτές ελευθέρων ριζών. Η δράση τους αυτή οφείλεται στο γεγονός ότι είναι δότες ατόμου υδρογόνου. Στην πραγματικότητα, η φαινολική ομάδα των φλαβονοειδών έχει άμεσα διαθέσιμο άτομο υδρογόνου με αποτέλεσμα να υποκαθιστά τις ελεύθερες ρίζες με ρίζες φλαβονοειδών (Kumar *et al.*, 2011).



Τα φλαβονοειδή αναστέλλουν *in vitro* την λιπιδική υπεροξειδωση δρώντας ως σαρωτές των υπεροξειδικών ανιόντων και των υδροξυλικών ριζών. Έχει βρεθεί ότι σταματούν τις αλυσιδωτές αντιδράσεις των ριζών προσφέροντας άτομα υδρογόνου και μετατρέποντας την υπεροξειδική ρίζα σε ρίζα φλαβονοειδούς (Torel *et al.*, 1986, Afanas'ev *et al.*, 1989). Το τελευταίο αντιδρά με τη σειρά του με τις ελεύθερες ρίζες με αποτέλεσμα να διακόπτεται η αλληλουχία των αντιδράσεων (Torel *et al.*, 1986, Robak και Gryglewski, 1988). Αυξάνουν την αντιοξειδωτική δράση της βιταμίνης C, διότι δρώντας ως δότες υδρογόνου προκαλούν την αναγωγή του ασκορβικού οξέος. Γι' αυτό το λόγο πολλές φορές χορηγούνται σε συνδυασμό με τη βιταμίνη C. Επίσης, τα φλαβονοειδή έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν σύμπλοκα με μεταλλικά ιόντα (π.χ χαλκός), που δρουν ως καταλύτες στην οξείδωση του ασκορβικού οξέος, καθώς και να αναστέλλουν την αντίδραση Fenton, η οποία αποτελεί σημαντική πηγή παραγωγής ενεργών μορφών οξυγόνου. Η αντιοξειδωτική τους δράση είναι σημαντική, διότι προστατεύουν τις κυτταρικές μεμβράνες, εμποδίζοντας την καταστροφή των φωσfolιπιδίων (Valenzuela *et al.*, 1986).

Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες των φλαβονοειδών μπορούν να συμβάλλουν στην παρατηρούμενη αντιφλεγμονώδη και αντιαιμοπεταλιακή δράση και σχετίζονται όχι μόνο με τα δομικά χαρακτηριστικά τους, αλλά επίσης και με την ικανότητά τους να διαπερνούν τις λιποειδείς διπλοστοιβάδες της κυτταρικής μεμβράνης (Νιώπας, 2008). Σύμφωνα με μελέτης της κινητικής των αντιδράσεων σχηματισμού και αποσύνθεσης των ελευθέρων ριζών, η αντιοξειδωτική δράση των φλαβονοειδών συνδέεται με τρία δομικά χαρακτηριστικά (Bors *et al.*, 1990).

- ✓ Η Ο-διυδροξυ δομή του Β-δακτυλίου (κατεχόλη), που παρέχει υψηλή σταθερότητα στην αροξυλική ρίζα (πιθανώς μέσω του δεσμού υδρογόνου, ο οποίος συμβάλει στην μετάθεση ηλεκτρονίου)
- ✓ Ο 2,3-διπλός δεσμός και η εγγύτητά του με την 4-οξο ομάδα, που είναι υπεύθυνη για την ηλεκτρονική μετάθεση από τον Β-δακτύλιο
- ✓ Η παρουσία των υδροξυλικών ομάδων σε θέσεις 3 και 5 καθώς και 3' και 4' που αποτελεί την πλέον χαρακτηριστική δομή των ισχυρών αντιοξειδωτικών.

2. Αντιφλεγμονώδης δράση

Η φλεγμονή αποτελεί πολύπλοκη παθοφυσιολογική διαταραχή του οργανισμού που εμφανίζεται ως αντίδραση σε ιογενείς και βακτηριακές λοιμώξεις, τραυματισμό ιστών, εισβολή αλλεργιογόνων, εκφυλιστικές αλλοιώσεις των ιστών και άλλους παράγοντες. Στα πρώτα στάδια της φλεγμονής περιλαμβάνουν, έκκριση ισταμίνης, σεροτονίνης, βραδυκινίνης, προσταγλανδινών και λευκοτριενίων που έχουν ως αποτέλεσμα την αγγειοδιαστολή, την αύξηση της διαπερατότητας των ενδοθηλικών τοιχωμάτων των αγγείων, χημειοτακτισμό των λευκών αιμοσφαιρίων, οίδημα και άλγος. Αμέσως μετά ακολουθεί ανοσολογική απόκριση λόγω ενεργοποίησης των λεμφοκυττάρων στους παράγοντες που εισέβαλαν στον οργανισμό και στις παραγόμενες από αυτόν τοξίνες ή στα αλλεργιογόνα. Η φλεγμονή συνοδεύεται από καταστροφή λευκών αιμοσφαιρίων, έκκριση λυσοσωματικών υδρολυτικών ενζύμων και αραχιδονικού οξέος το οποίο αποδεσμεύεται κατά την υδρόλυση φωσφολιπιδίων των κυτταρικών μεμβρανών από φωσφολιπάσες. Παρουσία ενζύμων κυκλοοξυγονασών (COX) ένα μέρος του αραχιδονικού οξέος μετατρέπεται σε ενδοϋπεροξειδία που είναι ασταθή και πολύ ενεργά μόρια και μετασχηματίζονται σε προσταγλανδίνες, θρομβοξάνες και προστακυκλίνη. Ένα άλλο μέρος του αραχιδονικού οξέος παρουσία λιποοξυγονασών (LOX) μετατρέπεται σε λευκοτριένια (Τσιφτσόγλου, 2001).

Τα φλαβονοειδή θεωρούνται επιφανείς αναστολείς των κυκλοοξυγονασών (COX) και λιποοξυγονασών (LOX) και έτσι επεμβαίνουν στο μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος και προλαμβάνουν έτσι τον σχηματισμό PGs (προσταγλανδινών) και καταστέλλουν τη δράση των T-λεμφοκυττάρων. Επιπλέον, τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος κατά τη διάρκεια της φλεγμονής επικοινωνούν μέσω

χημικών μεταβιβαστών που ονομάζονται κυτοκίνες, οι οποίες ελέγχονται από τα φλαβονοειδή. Τα φλαβονοειδή ανταγωνίζονται την PKC (φωσφοκινάση) στην θέση σύνδεσης με ATP, επίσης προάγουν το σχηματισμό IFN (ιντερφερονών) και αναστέλλουν τη δράση ενζύμων όπως κυττοσολικής κινάσης και κινάσης της τυροσίνης (Kumar *et al.*, 2011).

Η αντιφλεγμονώδης δράση του χαμομηλιού οφείλεται κυρίως στα φλαβονοειδή που περιέχει, με σημαντικότερο εκπρόσωπο τον απιγένινο-7-γλυκοσίδη. Από τις γενίνες δραστικότερες είναι: απιγενίνη, κερκετίνη, καιμφερόλη και λουτεολίνη. Φαίνεται ότι για την αντιφλεγμονώδη δράση είναι απαραίτητη η παρουσία της μεθοξυ-ομάδας στους C-5 και C-7 του δακτυλίου A (Arens *et al.*, 1986, Panthong *et al.*, 1994, Wagner 1988, Panthong *et al.*, 1989).

3. Δράση κατά της ρευματοειδούς αρθρίτιδας

Η ρευματοειδής αρθρίτιδα (RA) είναι μια χρόνια φλεγμονώδης διαταραχή, που χαρακτηρίζεται από επίμονη φλεγμονή αρθροθυλακίτιδας και κυρίως επηρεάζει τις περιφερειακές αρθρώσεις. Για τη ρευματοειδή αρθρίτιδα, μολονότι χρησιμοποιούνται μη-στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (NSAIDs), στεροειδείς παράγοντες και ανοσοκατασταλτικά, οι παρενέργειες και η τοξικότητά τους επιβάλουν την ανεύρεση νέων πιο αποτελεσματικών φυσικής προελεύσεως φαρμάκων (Lei Zhang *et al.*, 2007). Η ευεργετική επίδραση των φλαβονοειδών οφείλεται στην ικανότητά τους να μειώνουν τις PGs και έτσι μετριάζουν τον πόνο. Επιπλέον, τα φλαβονοειδή ενεργοποιούν τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα τα οποία όπως δεν επιτίθενται στα υπεραντιγόνα που προκαλούν την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού στην συγκεκριμένη αυτοάνοσο νόσο, αλλά στα T-λεμφοκύτταρα που είναι επιρρεπή στο να συνδεθούν με τα υπεραντιγόνα αυτά (Havsteen, 2002).

Η εσπεριδίνη είναι γνωστό ότι έχει μεγάλο εύρος φαρμακολογικών ιδιοτήτων. Αποτελέσματα από έρευνα προληπτικών και θεραπευτικών δράσεων της εσπεριτίνης στην ανάπτυξη της ρευματοειδούς αρθρίτιδας έδειξαν ότι η εξεταζόμενη ουσία βελτιώνει την κλινική εικόνα της αρθρίτιδας ρυθμίζοντας την λειτουργία των υπερενεργητικών μακροφάγων και τη δραστηριότητα των δυσλειτουργικών T-

λεμφοκυττάρων. Ως εκ τούτου, η εσπεριτίνη φαίνεται να έχει θεραπευτική αξία στην κλινική αντιμετώπιση της (Li *et al.*, 2008).

4. Αντιαλλεργική δράση

Ο όρος αλλεργία είναι ευρύς και προσδιορίζει τα συμπτώματα που εμφανίζει ο οργανισμός μετά από αντιδράσεις αντισωμάτων με αλλεργιογόνα. Κατά τις αντιδράσεις αυτές ελευθερώνονται ουσίες που είναι υπεύθυνες για τα διάφορα συμπτώματα της αλλεργίας (κνησμός, ερυθρότητα του δέρματος, οίδημα, αγγειοδιαστολή, σύσπαση βρόγχων κλπ.). Αυτές οι ουσίες που ονομάζονται μεσολαβητές της αλλεργίας, είναι κυρίως η ισταμίνη, η σεροτονίνη (5-HT) (όχι όμως στον άνθρωπο), τα λευκοτριένια (LTC₄ και LTD₄), οι προσταγλανδίνες (PGs), οι κινίνες του πλάσματος και ο χημειοτακτικός παράγοντας των ηωζινοφίλων. Ενώσεις που αναστέλλουν την ελευθέρωση των μεσολαβητών της φλεγμονής αποτελούν χρήσιμα φάρμακα για την αντιμετώπιση της αλλεργίας (Δημόπουλος, 2002). Το κύριο γνώρισμα της αλλεργίας είναι η φλεγμονή, όπως έχει ήδη αναφερθεί παραπάνω τα φλαβονοειδή αποτελούν καλά θεραπευτικά μέσα για την αντιμετώπιση φλεγμονών. Τα φλαβονοειδή αναστέλλουν τη φωσφοδιεστεράση του c-AMP (PDE) και την από του ασβεστίου εξαρτώμενη ATPαση (Ca²⁺/ATPase) που είναι υπεύθυνες για την έκκριση ισταμίνης από τα ιστιοκύτταρα (στα κύτταρα αυτά η ισταμίνη είναι αποθηκευμένη υπό μορφή συμπλόκου με θειϊκή χονδροϊτίνη σε εκλυτικά κοκκία και είναι ανενεργή) (Τσιφτσόγλου, 2001) και τα βασεόφιλα. Μεγάλες ποσότητες cAMP δρουν μπλοκάροντας τα ενδοκυτταρικά αποθέματα ισταμίνης. Επίσης, η Ca-εξαρτώμενη ATP-αση αποικοδομεί το ATP και η παραγόμενη ενέργεια καταναλώνεται προκειμένου να εισέλθουν Ca²⁺ διαμέσου των μεμβρανών. Έτσι τα φλαβονοειδή αναστέλλοντας το ενζυμο αυτό μειώνουν την ενδοκυτταρική συγκέντρωση Ca²⁺ με αποτέλεσμα να αναστέλλουν την έκκριση ισταμίνης από τα εκλυτικά κοκκία (Di Carlo *et al.*, 1999).

Η κελλίνη, φλαβονοειδές που απομονώθηκε από το Αιγυπτιακό φυτό *Ammi visnaga* χρησιμοποιούνταν για τη θεραπεία του άσθματος, όπως σήμερα δεν χρησιμοποιείται λόγω των ενοχλητικών παρενεργειών (ναυτία, έμετος) (Di Carlo *et al.*, 1999). Η κερκετίνη προστατεύει τα κύτταρα του ανοσοποιητικού και αναστέλλει την

παραγωγή και την έκκριση ισταμίνης, οπότε δρα ευεργετικά στην αντιμετώπιση αλλεργικών καταστάσεων (Kumar *et al.*, 2011).

5. Πρόληψη και θεραπεία καρδιαγγειακών νοσημάτων

(Υπερχοληστερολαιμία, αγγειοπάθειες, υπέρταση, στηθάγχη, ισχαιμία,

έμφραγμα μυοκαρδίου, ανεύρυσμα, αρρυθμία, καρδιακή ανεπάρκεια)

Ο κοινός παρονομαστής όλων αυτών των νοσημάτων είναι ο τραυματισμός του ενδοθηλιακού τοιχώματος των αιμοφόρων αγγείων που πυροδοτείται από υπερλιπιδαιμικά και οξειδωτικό stress. Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία αντιπροσωπεύει ένα κύριο λόγο ανάπτυξης καρδιαγγειακών νόσων. Τα καρδιομυοκύτταρα είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα σε προσβολή από ελεύθερες ρίζες. Καταστροφή του σαρκοπλάσματος και λόγω προσβολής από ελεύθερες ρίζες είναι μια από τις κυτταρικές διαδικασίες που συναντώνται στις αρρυθμίες κατά τη διάρκεια μυοκαρδιακής ισχαιμίας-επαναιμάτωσης. Υπεροξειδία λιπιδίων εμπλέκονται στην αρτηριοσκλήρυνση και σε βλάβες αγγείων.

Οι λιποπρωτεΐνες (LDL, VLDL, HDL) αναγνωρίζονται από ειδικούς υποδοχείς που υπάρχουν στις κυτταροπλασματικές μεμβράνες και από μακροφάγα. Όταν η ποσότητα των λιποπρωτεϊνών αυξηθεί στο αίμα (είτε λόγω γενετικά οφειλόμενης μεταβολής του υποδοχέα του είτε λόγω άλλων παθολογικών καταστάσεων) και δεν υπάρχουν διαθέσιμοι υποδοχείς στις κυτταροπλασματικές μεμβράνες τότε φαγοκυτταρώνονται από μακροφάγα του υπάρχουν στο αίμα και έτσι αρχίζει ένας φαύλος κύκλος που οδηγεί στο σχηματισμό προϊόντων οξειδωση (oxLDL) και ελευθέρων ριζών (ROS). Τα προϊόντα αυτά προκαλούν βλάβες στα τοιχώματα των αιμοφόρων αγγείων με αποτέλεσμα την έναρξη σχηματισμού αθηρωματικών πλακών και το σχηματισμό θρόμβων. Οι σχηματιζόμενοι θρόμβοι είναι ικανοί να προκαλέσουν κακή αιμάτωση ιστών και να προκαλέσουν ισχαιμικά επεισόδια.

Όλα αυτά μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι υψηλά επίπεδα χοληστερόλης και υψηλό ποσοστό κορεσμένων λιπαρών οξέων στο αίμα προδιαθέτει εμφάνιση καρδιαγγειακών νόσων.

Τα φλαβονοειδή λόγω της ανασταλτικής τους δράσης επί ορισμένων ενζύμων που ενέχονται σε καρδιαγγειακές νόσους, αποτελούν χρήσιμα επικουρικά θεραπευτικά μέσα σε τέτοιου είδους καταστάσεις.

- ✓ Αναστέλλουν την κολλαγενάση με αποτέλεσμα να συμβάλλουν στην καλύτερη στεγάνωση των τριχοειδών αγγείων και να περιορίζουν τον τραυματισμό και τη ρήξη τους και έτσι προστατεύουν από αιμορραγίες.
- ✓ Αναστέλλουν την αναγωγή του συνενζύμου HMG-CoA που αποτελεί το ένζυμο κλειδί στη σύνθεση των LDL και με αυτόν τον τρόπο προλαμβάνει την υπερχοληστερολαιμία και τις επακόλουθες καρδιαγγειακές διαταραχές.
- ✓ Αναστέλλουν την λιποξυγονάση LOX με αποτέλεσμα να περιορίζουν τόσο την ποσότητα της oxLDL όσο και τον λοιπών ελεύθερων ριζών που σχηματίζονται από την οξειδωση δρώντας έτσι κατά του σχηματισμού αθηρωματικών πλακών.
- ✓ Αναστέλλουν την κυκλοοξυγονάση (COX) που αποτελεί ένζυμο κλειδί στον μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος και έτσι ελέγχει την παραγωγή PGs και περιορίζει την φλεγμονή.
- ✓ Λόγω της δράσης τους επί του PAF, αναστέλλουν την συγκόλληση αιμομεταλίων και περιορίζουν το σχηματισμό θρόμβων και κατά συνέπεια και όλων των διαταραχών που μπορούν να προκληθούν από αυτούς.
- ✓ Επειδή αποτελούν σαρωτές ελευθέρων ριζών, προστατεύουν από οξειδωση σημαντικούς παράγοντες όπως το NO, διατηρώντας έτσι την συγκέντρωσή του σταθερή. Το NO έχει αγγειοδιασταλτική δράση και είναι χρήσιμο σε καταστάσεις υπέρτασης, στηθάγχης και ισχαιμίας.

Αντιθρομβωτική δράση: Τον βασικότερο ρόλο στην πήξη του αίματος και το σχηματισμό θρόμβων παίζουν τα αιμοπετάλια. Κατά τη θρομβογένεση που παρατηρείται μέσα στα αιμοφόρα αγγεία, αρχικά σχηματίζεται ένας λευκός θρόμβος κυρίως λόγω της προσκόλλησης και της καταστροφής των αιμοπεταλίων στα τοιχώματα των αρτηριών που παρουσιάζουν μεγάλη πίεση. Τα αιμοπετάλια που καταστρέφονται εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες θρομβίνης, θρομβοξάνης A₂, διφωσφορικής αδενοσίνης (ADP) που προσελκύει στη συγκόλληση ακόμη

περισσότερων αιμοπεταλίων. Η δημιουργία των θρόμβων μεταβάλλει τη ροή του αίματος στις αρτηρίες γεγονός που διεγείρει το σχηματισμό της ινικής και το σχηματισμό ερυθρού θρόμβου λόγω παγίδευσης ερυθρών αιμοσφαιρίων στο πλέγμα της ινικής (Τσιφτσόγλου, 2001).

Η αλληλεπίδραση αιμοπεταλίων και αγγείων εμπλέκεται στην ανάπτυξη θρόμβωσης και αθηρωμάτωσης. Ορισμένα φλαβονοειδή αποτρέπουν την συγκόλληση των αιμοπεταλίων και την προσκόλλησή τους στα τοιχώματα των αγγείων με αποτέλεσμα να μειώνουν τις πιθανότητες δημιουργίας θρόμβωσης (Gryglewski, 1987, Beretz και Cazenave, 1988). Η αντιαιμοπεταλιακή δράση των φλαβονοειδών δεν μπορεί να αποδοθεί σε ένα μόνο βιοχημικό μηχανισμό. Φαίνεται να επηρεάζει πολλές διαδικασίες που εμπλέκονται στην λειτουργία των αιμοπεταλίων, όπως την αναστολή των ενζύμων κυκλοοξυγενάση και λιποξυγενάση που παίρνουν μέρος στο μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος στα αιμοπετάλια (Tzeng *et al.*, 1991, Landolfi *et al.*, 1984) ή τον ανταγωνισμό σχηματισμού της θρομβοξάνης και της λειτουργίας του υποδοχέα αυτής. Ένας από του πιο πιθανούς μηχανισμούς με τον οποίο τα φλαβονοειδή φαίνεται να αποτρέπουν την συγκόλληση των αιμοπεταλίων είναι η αύξηση των επιπέδων του κυκλικού AMP (c-AMP) στα αιμοπετάλια. Αυτό το επιτυγχάνουν είτε διεγείροντας τη δράση της αδενυλοκυκλάσης είτε αναστέλλοντας την δράση της c-AMP φωσφοδιεστεράσης (PDE) (Duarte *et al.*, 1993, Beretz *et al.*, 1986, Ferrell *et al.*, 1979, Kuppusamy *et al.*, 1992).

Αγγειοπροστατευτική δράση: Οι ευεργετικές δράσεις των φλαβονοειδών όσον αφορά την ευθραυστότητα των τριχοειδών αγγείων (για την ακρίβεια του συνδετικού ιστού που περιβάλλει τα τριχοειδή αγγεία) έχουν τεκμηριωθεί από διάφορες κλινικές μελέτες (Νιώπας, 2008). Η μειωμένη ευθραυστότητα των τριχοειδών αγγείων σημαίνει βελτιωμένο τόνο συνεκτικού ιστού και μειωμένη τάση για διαρροή του περιεχομένου των τριχοειδών αγγείων στους περιβάλλοντες ιστούς (Νιώπας, 2008). Τα φλαβονοειδή προκαλούν αύξηση της αντίστασης των τοιχωμάτων των αιμοφόρων αγγείων, καθώς και ελάττωση της διαπερατότητας των τριχοειδών αγγείων. Επιπλέον αναστέλλουν την δράση πρωτεολυτικών ενζύμων, όπως η ελαστάση, κολλαγενάση, υαλουρονιδάση και κυκλοοξυγονάση, τα οποία καταστρέφουν το κολλαγόνο (Adzet, 1986, Pathak *et al.*, 1991). Χρησιμοποιούνται ευρέως σε περιπτώσεις περιφερικών

αγγειοπαθειών. Δρουν αγγειοπροστατευτικά επί του φλεβικού τόνου. Χορηγούνται σε περιπτώσεις φλεβικής ανεπάρκειας, κράμπες και οιδήματα κάτω άκρων, κισσούς, οφθαρμορραγίες διαβητικών, μητρορραγίες, σύνδρομο Raynaud (Laekeman *et al.*, 1986). Πειραματικές μελέτες έχουν αποκαλύψει ότι διάλυμα *Terminalia arjuna* ασκεί αξιοσημείωτη ινοτρόπο και υποτασική δράση, αυξάνοντας την κυκλοφορία των στεφανιαίων αρτηριών και προστατεύοντας το μυοκάρδιο έναντι ισχαιμικού επεισοδίου. Υπάρχει μια αξιόπιστη κλινική απόδειξη της ευεργετικής επίδρασής του στη στεφανιαία νόσο είτε μόνο του είτε συγχρηγούμενο με στατίνες (Dwivendi, 2007).

Αντιλιπιδαιμική δράση: *In vitro* πειράματα έχουν αποδείξει ότι τα φλαβονοειδή αναστέλλουν την οξειδωση των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών και την τάση δημιουργίας θρόμβων. Η κατανάλωση φλαβονοειδών μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου και εμφράγματος του μυοκαρδίου (Hertog *et al.*, 1993). Είναι αποδεδειγμένο πως οι ελεύθερες ρίζες που σχηματίζονται κατά την οξειδωση των LDL παίζουν σημαντικό ρόλο στην αθηρογένεση. Τα φλαβονοειδή, όπως έχει αναφερθεί, αποτελούν σαρωτές ελευθέρων ριζών όπως υπεροξειδικά ανιόντα και υπεροξυδικών ριζών, οπότε διακόπτουν την αλυσιδωτή αντίδραση σχηματισμού ελευθέρων (Benavente-Garcia *et al.*, 1997) ριζών. Πειραματικές μελέτες επί της αθηροσκλήρωσης, έδειξαν ότι η υποδόρια χορήγηση μίγματος κερκετίνης και καιμπερόλης μείωσε τα επίπεδα της χοληστερίνης στο αίμα. Η αντίστοιχη θεραπεία με γλυκοσίδες παρουσίασε μικρότερη αποτελεσματικότητα.

6. Δράση στο ΓΕΣ

Αναστολή της κινητικότητας του εντέρου

Οι περισταλτικές κινήσεις του ΓΕΣ εξυπηρετούν δυο σκοπούς 1^ο αναμιγνύουν τις τροφές και τις εκθέτουν σε πρωτεολυτικά ενζύμα και 2^ο τις ωθούν προς την έξοδο για αφόδευση. Οι κινήσεις αυτές επιτελούνται μέσω συσπάσεων των λείων μυϊκών ινών του εντερικού σωλήνα. Το ΓΕΣ βρίσκεται σε συνεχή περισταλτική κινητικότητα και εκκρίνει συνεχώς ουσίες που διευκολύνουν την πέψη. Το ΓΕΣ νευρώνεται απο το εντερικό νευρικό σύστημα (ΕΝΣ) που αποτελείται από δύο πλέγματα το μυεντερικό του Averbach (λ.μ.ι) και το πλέγμα του Meinsner (κύτταρα του μουκοειδούς

επιθηλίου). Οι διεγερτικοί νευρώνες έχουν σαν νευροδιαβιβαστή την ακετυλοχολίνη (Ach), ενώ οι ανασταλτικοί το μονοξείδιο του αζώτου (NO).

Τα φλαβονοειδή επηρεάζουν, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τη συγκέντρωση του NO και έτσι μειώνει την περισταλτικότητα του ΓΕΣ με αποτέλεσμα να δρουν ως αντιδιαρροϊκά και αντισπασμωδικά.

Το πεπτικό έλκος είναι μια από τις πλέον διαδεδομένες διαταραχές του ΓΕΣ που χαρακτηρίζεται από ασυνέχεια στη δομική ακεραιότητα του στομαχικού τοιχώματος και προκύπτει από τη διατάραξη της συγκέντρωσης ορισμένων ενδογενών ουσιών [υδροχλωρικού οξέος, πεψίνης, χολή, λευκοτριένια, ελεύθερες ρίζες (ROS)] και κυτταροπροστατευτικών παραγόντων [τασιενεργα φωσφολιπίδια, προσταγλανδίνες (PGs)] ροής αίματος βλεννογόνου, ανανέωση των κυττάρων και μετανάστευση, μη-ενζυματικών και ενζυματικών αντιοξειδωτικών και ορισμένοι παράγοντες ανάπτυξης. Η παθογένεση του γαστρικού έλκους ποικίλει, επηρεαζόμενη από ένα αγγωτικό τρόπο ζωής, κατανάλωση αλκοόλ, χρήση στεροειδών και (ΜΣΑΦ), χρήση φαρμάκων που διεγείρουν την έκκριση γαστρικού οξέος και πεψίνης, λοιμώξεις από *Helicobacter pylori*, κάπνισμα. Η περιορισμένη αποτελεσματικότητα και οι σοβαρές παρενέργειες των φαρμάκων που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση της νόσου, δημιουργεί δυσκολίες στη θεραπευτική της αντιμετώπιση. Η χρήση φυσικής προελεύσεως προϊόντων για την πρόληψη και τη θεραπεία διαφόρων παθολογικών καταστάσεων του ΓΕΣ και κυρίως των φλαβονοειδών, είναι πλέον διαδεδομένη.

Αντιελκωτική/Αντιελκογενητική δράση

Ένας σημαντικός αριθμός παθοφυσιολογικών διαταραχών του ΓΕΣ αποδίδεται σε διαταραχές του ομοιοστατικού ελέγχου της έκκρισης του γαστρικού υγρού από τα αδενικά κύτταρα του στομαχικού βλεννογόνου (parietal cells). Τα αδενικά κύτταρα του στομάχου εκκρίνουν το γαστρικό υγρό καθώς επίσης και ενδογενείς παράγοντες που συμβάλλουν στην απορρόφηση της βιταμίνης B₁₂, πεψινογόνο και πεψίνης. Στα κύτταρα του μουκοειδούς επιθηλίου του στομάχου εντοπίζονται H₂ υποδοχείς ισταμίνης (Hist), M₃ (μουσκαρινικού τύπου) υποδοχείς ακετυλοχολίνης (Ach), υποδοχείς γαστρίνης (CCK₂) και υποδοχείς προσταγλανδινών PGE₂/ PGI₂. Όταν οι προσταγλανδίνες PGE₂/PGI₂ συνδεθούν στους υποδοχείς τους τότε μέσω

μηχανισμού δευτερογενών μηνυμάτων μειώνεται η ενδοκυτταρική συγκέντρωση του cAMP με αποτέλεσμα την αναστολή της δράσης της αντλίας H^+/K^+ -ATP άσης που οδηγεί σε μείωση H^+ και επομένως σε μειωμένη έκκριση γαστρικού υγρού. Αντίθετα όταν συνδεθούν η Ach η Hist και η γαστρίνη στους αντίστοιχους υποδοχείς τους που εντοπίζονται στο τοίχωμα του μουκοειδούς επιθηλίου του στομάχου, τότε μέσω δευτερογενών μηνυμάτων αυξάνεται η ενδοκυτταρική συγκέντρωση ιόντων ασβεστίου (Ca^{2+}) που οδηγεί σε διέγερση της αντλίας H^+/K^+ -ATP άσης που οδηγεί σε αύξηση H^+ και επομένως σε αυξημένη έκκριση γαστρικού υγρού (Τσιφτσόγλου 2004).

Μια από τις πιο σημαντικές παρενέργειες των συμβατικών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων είναι η ελκογενητική τους δυναμικότητα. Τα φλαβονοειδή, όπως έχει ήδη αναφερθεί παραπάνω, είναι καλά αντιφλεγμονώδη και επομένως μπορούν να προστατεύουν το γαστρικό βλεννογόνο από τη δράση διαφόρων ελκογενητικών παραγόντων. Πολλές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί και εξέτασαν την αντιελκογενητική δράση τόσο φυσικής προελεύσεως όσο και συνθετικών φλαβονοειδών. Το σόλον (solon) είναι ένα συνθετικό ισοπρένυλο-φλαβονοειδές παράγωγο της σοφοραδίνης (sophoradin), που είναι φλαβονοειδές που απομονώθηκε από το κινέζικης προελεύσεως φαρμακευτικό φυτό *Sophora subprostrata*. Ο ακριβής μηχανισμός δράσης δεν έχει διευκρινιστεί, όμως πιθανώς να επιδρά στο σχηματισμό και το μεταβολισμό των PGs στο γαστρικό βλεννογόνο. Άλλα φλαβονοειδή που εμφανίζουν αντιελκωτική δράση είναι η ναριγγενίνη και η κερκετίνη.

Γενικά τα φλαβονοειδή παρέχουν σημαντικές φαρμακολογικές ιδιότητες στο ΓΕΣ :

1. Γαστροπροστατευτική:

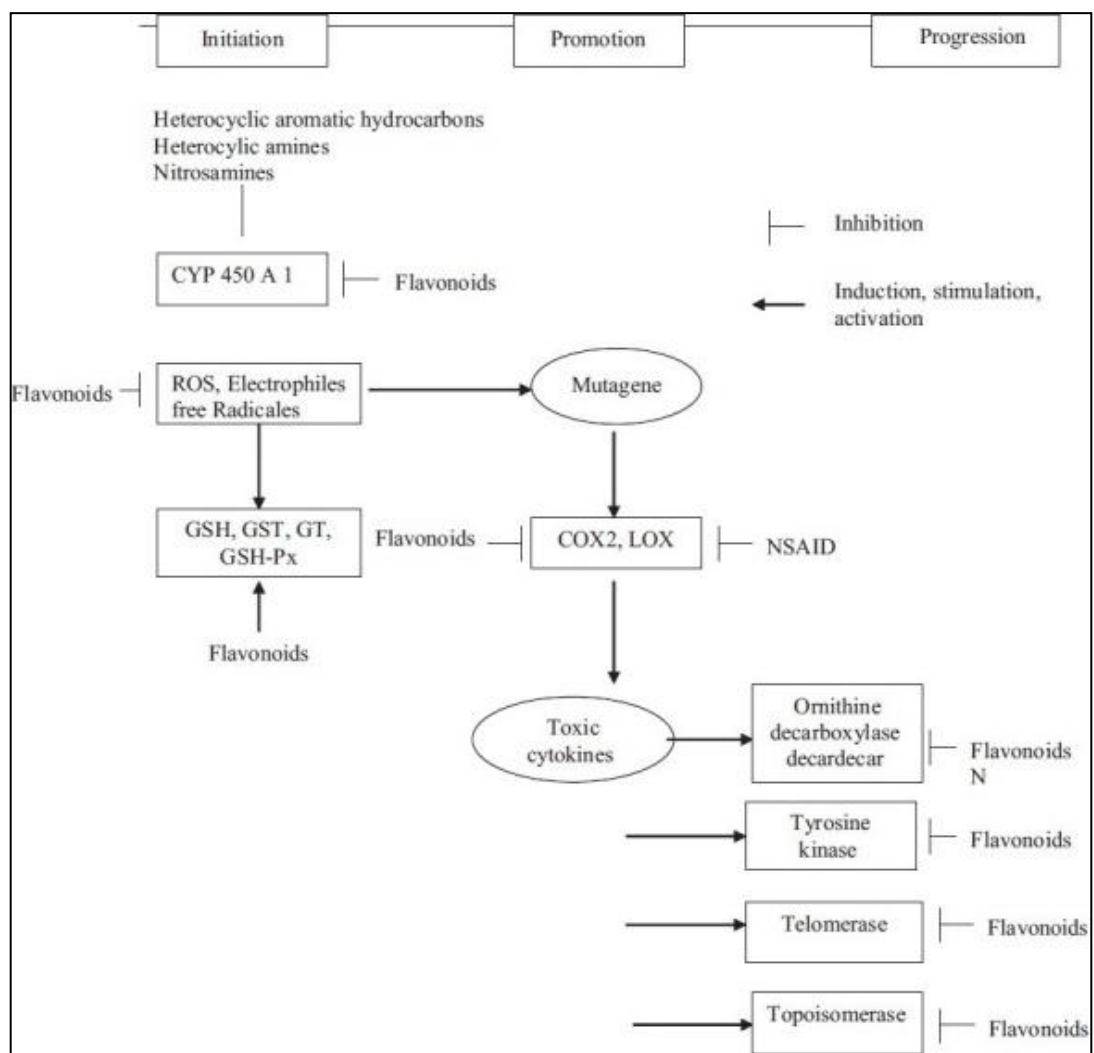
- ✓ Λόγω της αντιοξειδωτικής τους δράσης προστατεύουν το γαστρεντερικό βλεννογόνο από την ρήξη που προκαλούν ουσίες που προάγουν το σχηματισμό έλκους [γκαρσινολόλη (garcinol), ρουτίνη και κερκετίνη].
- ✓ Επιπλέον επειδή αυξάνουν τη σύνθεση των γλυκοπρωτεϊνών του πεπτικού βλεννογόνου.
- ✓ Αυξάνουν τη συνεκτικότητα του μουκοειδούς επιθηλίου μέσω της δράσης τους στα τριχοειδή αγγεία.

- ✓ Αυξάνουν την ροή του αίματος στο ΓΕΣ μέσω της αγγειοδιασταλτικής τους δράσης.
 - ✓ Επεμβαίνουν στο μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέως και έτσι επηρεάζουν την συγκέντρωση PGs.
 - ✓ Αναστέλλουν την υπερέκκριση του γαστρικού υγρού έμμεσα μέσω της δράσης τους την αντλία H^+/K^+ -ATPάσης.
2. Επιταχύνουν την επούλωση του έλκους:
- ✓ Λόγω της δράσης τους στη διαδικασία της φλεγμονής (αναφέρεται παραπάνω).
 - ✓ Προάγουν τη συγκόλληση των αιμοπεταλίων διεγείροντας τη δράση του PAF (παράγοντας συγκόλλησης αιμοπεταλίων). Η αντιελκωτική δράση των φλαβονοειδών, ναριγγενίνη, ρουτίνη, καιμπερόλη οφείλεται στη δράση τους επί του PAF.
 - ✓ Διεγείρουν τη σύνθεση γαστρικών συστατικών της βλέννας. Η κερκετίνη αυξάνει το ποσοστό της γλυκοπρωτεϊνικής περιεκτικότητας του γαστρικού βλεννογόνου.
 - ✓ Αυξάνουν τη ροή του αίματος στο ΓΕΣ λόγω της αγγειοδιασταλτικής τους δράσης (NO και PGs).
3. Αναστέλλουν την προσκόλληση και την ανάπτυξη του *Helicobacter pylori* στα επιθηλιακά κύτταρα του στομάχου και χρησιμοποιούνται επικουρικά στις συμβατικές θεραπευτικές αγωγές (Lira Mota *et al.*, 2009) .

7. Αντικαρκινική δράση

Ενώ δεν φαίνεται ο καρκίνος να αποτελεί γενετική νόσο γονιδίων που ευθύνονται για την νεοπλασία με την στενή έννοια της Μενδελικής Γενετικής δηλαδή της κληρονομικής μεταβίβασης, εν τούτοις οι γενετικές μεταλλάξεις και οι καρυοτυπικές αλλοιώσεις ευθύνονται για το μεγαλύτερο ποσοστό καρκίνων στον άνθρωπο. Γενετική προδιάθεση σε συνδυασμό με διατροφικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες οδηγεί σε συγκεκριμένους τύπους καρκίνου. Συχνά υποδοχείς αυξητικών παραγόντων που βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων διεγείρουν την κυτταρική αναπαραγωγή μέσω προϊόντων ενεργοποίησης γονιδίων που απορρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο. Ενεργοποίηση ογκογονιδίων και απώλεια μηχανισμών του

κυτταρικού θανάτου στα νεοπλάσματα που αποκτούν αθανασία μεταβάλλουν το ισοζύγιο μεταξύ κυτταρικής αναπαραγωγής, θανάτου και διαφοροποίησης. Στην απώλεια ελέγχου μηχανισμών του κυτταρικού θανάτου φαίνεται ότι σημαντικό ρόλο παίζει η τελομεράση, ένα ένζυμο που συμβάλλει στην διαμόρφωση των τελικών απολήξεων (τελομερίδια) των χρωμοσωμάτων. Υποστηρίζεται ότι το ένζυμο τελομεράση, ενεργοποιείται στα νεοπλασματικά κύτταρα στους περισσότερους καρκίνους (>90%) και μάλλον σχετίζεται άμεσα με την απώλεια φυσιολογικού ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (Τσιφτσόγλου, 2004).



Εικόνα 9: Μηχανισμοί δράσης φλαβονοειδών στην θεραπεία του καρκίνου

Τα φαινολικά παράγωγα παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα δράσεων και επηρεάζουν διαδικασίες οι οποίες απορυθμίζουν την καρκινική ανάπτυξη. Τα φλαβονοειδή εμπλέκονται σε μεγάλο αριθμό ρυθμιστικών μονοπατιών όπως ανάπτυξη, κυτταρική διαίρεση, μεταγραφή, απόπτωση.

Η καρκινογένεση γενικά θεωρείται ένα σύμπλεγμα διαδικασιών με πολλά στάδια στις οποίες συμβαίνουν μοριακές και κυτταρικές αλλαγές.

- I. Φάση έναρξης της καρκινογένεσης: Προκαλείται από έκθεση και αλληλεπίδραση των κυττάρων και κυρίως του DNA με καρκινικούς παράγοντες.
- II. Φάση προαγωγής καρκίνου: Το μη φυσιολογικό (μεταλλαγμένο) κύτταρο αποκτά ανθεκτικότητα, αναπαράγεται με γρήγορους ρυθμούς, καθίσταται αθάνατο και χάνει την ικανότητα διαφοροποίησης.
- III. Φάση ανάπτυξης: Καθιστά τα καρκινικά κύτταρα επιθετικά και ικανά για μετάσταση και αγγειογένεση.

Παρεμβολή φλαβονοειδών στην φάση έναρξης της καρκινογένεσης

- ✓ Τα φλαβονοειδή απορροφούν την UV ακτινοβολία και έτσι προστατεύουν από φθορά το DNA και επομένως περιορίζουν την πιθανότητα μεταλλάξεων (ναριγγενίνη, ρουτίνη).
- ✓ Επιπλέον, όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα φλαβονοειδή έχουν αντιοξειδωτικές ικανότητες και λειτουργούν ως «σαρωτές ελευθέρων ριζών» και έτσι μειώνουν την πιθανότητα αλληλεπίδρασης των ROS με το DNA.
- ✓ Έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν τα ίδια με χημικά καρκινογόνα γενοτοξικά και έτσι, έμμεσα, προστατεύουν το DNA.
- ✓ Αναστέλλουν ένζυμα της πρώτης φάσης μεταβολισμού όπως CYP1A1 και CYP1A2 τα οποία μεταβολίζουν προκαρκινογόνα και τα καθιστούν ενεργά καρκινογόνα.
- ✓ Επάγουν ένζυμα μεταβολισμού δεύτερης φάσης (GST, ρεδοκτάση κινονών κ.ά) με αποτέλεσμα να διευκολύνουν την αποτοξίνωση του οργανισμού από επιβλαβή προϊόντα μεταβολισμού.

Παρεμβολή των φλαβονοειδών στη φάση προαγωγής του καρκίνου

- ✓ Λόγω της αντιοξειδωτικής τους δράσης τα φλαβονοειδή αναστέλλουν προ-οξειδωτικές διαδικασίες και περιορίζουν τις ROS που καταλύουν την προαγωγή του καρκίνου. Τα φλαβονοειδή επίσης είναι αποτελεσματικοί αναστολείς ενζύμων όπως ξανθινοξειδάσες, COX και LOX τα οποία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε μεταβολικές διαδικασίες καρκίνου.
- ✓ Αναστέλλουν την δράση του ενζύμου αποκαρβοξυλάση της ορνιθίνης, το οποίο είναι ένζυμο που παίρνει μέρος στη διαδικασία βιοσύνθεσης πολυαμινών. Με αυτόν τον τρόπο αναστέλλουν την σύνθεση αζωτούχων βάσεων του DNA όσο και την πρωτεϊνοσύνθεση.
- ✓ Αναστέλλουν τη γλυκόλυση που είναι μια απαραίτητη διαδικασία που παρέχει ενέργεια (που είναι αναγκαία για την ανάπτυξη ταχέως αναπτυσσόμενων κυττάρων, όπως τα καρκινικά).
- ✓ Επηρεάζουν τη δράση διαφόρων ενζύμων που εμπλέκονται στη μετάδοση σήματος. Ένας μεγάλος αριθμός κυτταροπλασματικών υποδοχέων διαφόρων αναπτυξιακών παραγόντων (EGF, TGF- α , PDGF, IGF-1, CSF-1, FGF-1, NGF, HGF) είναι συνδεδεμένοι/συζευγμένοι με φωσφοκινάσες (PTKs). Όταν οι αυξητικοί αυτοί παράγοντες συνδεθούν με τους υποδοχείς τους τότε ενεργοποιείται η κινάση της τυροσίνης η οποία αυτοφωσφορυλιώνεται από υδρόλυση ATP μετά από αυτή την φωσφορυλίωση ακολουθεί η μεταγωγή σημάτων από το κυτταρόπλασμα προς τον πυρήνα που ενεργοποιεί την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με διαδικασίες μετάστασης, αγγειογένεσης, πολλαπλασιασμού και αναστολής της απόπτωσης. Οι φωσφοκινάσες είναι ένζυμα που αναστέλλονται από τα φλαβονοειδή, επομένως αναστέλλεται η δράση των κινάσεων και έμμεσα αναστέλλονται οι διαδικασίες που οδηγούν στην προαγωγή και την μετάσταση του όγκου (Chahar *et al.*, 2011).
- ✓ Απώλεια ελέγχου μηχανισμού κυτταρικού θανάτου μέσω της αναστολής της δράσης του ενζύμου τελομεράση.
- ✓ Διαταραχή της φυσιολογικής πορείας του κυτταρικού κύκλου. Γενικά κατά τον καρκίνο διαταράσσεται ο κυτταρικός κύκλος με αποτέλεσμα να έχουμε

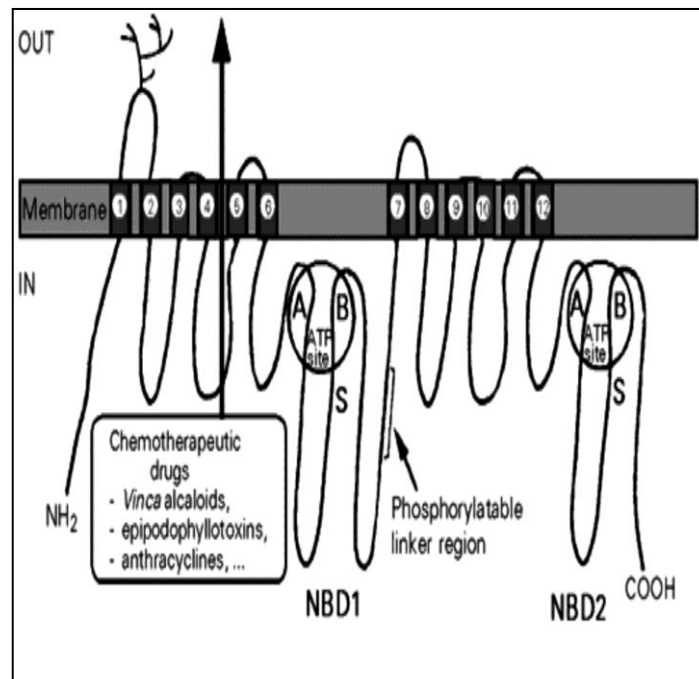
ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό, διακοπή της διαφοροποίησης και αθανатоποίησης των κυττάρων. Τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (G₁/S) και (G₂/M) ελέγχονται από κυκλίνες που είναι ένζυμα εξαρτώμενα από κινάσες (CDKs) (ένζυμα που η δράση τους αναστέλλεται από φλαβονοειδή). Φλαβονοειδή όπως συλιμαρίνη, γενιστεΐνη, κερκετίνη, daidzein, λουτεολίνη, καιμπερόλη, απιγενίνη, και επιγαλλοκατεχίνη-3-γαλλικό οξύ αναστέλλουν τη δράση των CDK και κατά συνέπεια επηρεάζουν τον κύκλο ζωής των καρκινικών κυττάρων.

- ✓ Τα φλαβονοειδή προάγουν της διαδικασίες απόπτωσης με διάφορους μηχανισμούς όπως αναστολή DNA topoisomerase I/II, μείωση των ROS, ρύθμιση σηματοδοτικών μονοπατιών, απορύθμιση του κυτταρικού παράγοντα νέκρωση (NF-κB), έκκριση του cytochrome c και επακόλουθη ενεργοποίηση της caspase-9 και caspase-3.
- ✓ Ορισμένα προάγουν τη διαφοροποίησης σε συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές. Οι φλαβόνες γενιστεΐνη, απιγενίνη, λουτεολίνη, κερκετίνη και φλωρετίνη βρέθηκε ότι επάγουν τη διαφοροποίηση των HL-60 κυττάρων σε οξεία μυελογενή λευχαιμία. Η ισοφλαβόνη daidzein επάγει τη διαφοροποίηση (Ren *et al.*, 2003).

Παρεμβολή των φλαβονοειδών στην φάση αγγειογένεσης και μετάστασης του όγκου.

- ✓ Η κατεχίνη αναστέλλει την μετάσταση του καρκίνου λόγω της ικανότητάς της να συνδέεται αυτή με την πρωτεΐνη λαμινίνη και έτσι να εμποδίζει το t-PA (tissue type plasminogen activator) να συνδεθεί με αυτής. Αυτός ο εξωκυττάριος δεσμός (ECM) έχει μεγάλη σημασία στην μετάσταση (Di Carlos, 1999).
- ✓ Οι κατεχίνες, οι ανθοκυάνες και οι προανθοκυάνες έχουν την ικανότητα να σταθεροποιούν το κολλαγόνο και να αναστέλλουν την καταστροφή του καθώς επίσης αναστέλλουν την δράση των κολλαγενασών. Είναι γνωστό ότι ένζυμα που αναστέλλουν την αποικοδόμηση του κολλαγόνου αναστέλλουν την μετάσταση (Di Carlos, 1999).
- ✓ Έχει παρατηρηθεί ότι υπάρχουν μηχανισμοί ανάπτυξης ανθεκτικότητας στα νεοπλασματικά φάρμακα για την οποία σε ορισμένες περιπτώσεις οφείλεται η

P-glycoprotein (Pgp), η οποία αυξάνει την εκροή του αντικαρκινικού φαρμάκου από το εσωτερικό του κυττάρου. Τα φλαβονοειδή αναστέλλουν την έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν την πρωτεΐνη αυτή και επιπλέον αλληλεπιδρούν άμεσα με την NBD καθώς επίσης αποτρέπουν την υδρόλυση ATP με αποτέλεσμα να εμποδίζουν την παραγωγή ενέργειας η οποία είναι απαραίτητη για την δράση της πρωτεΐνης να εξωθεί τα φάρμακα εκτός του κυττάρου.



Εικόνα 10: P-glycoprotein (Pgp)

8. Αντισπασμωδική δράση

Τέτοια δράση βρίσκουμε στα φλαβονοειδή της γλυκύρριζας, με πιο δραστικά σπασμολυτικά τις χαλκόνες. Από τις γενίνες δράση παρουσιάζουν η καιμπερόλη, η κερκετίνη καθώς και οι 3-O-γλυκοσίδες τους. Η αντισπασμωδική δράση φαίνεται να οφείλεται στο ότι τα φλαβονοειδή ανταγωνίζονται τη δράση της ακετυλοχολίνης και της ισταμίνης (Forster *et al.*, 1980). Ένα επιπλέον φυτό που εμφανίζει αντισπασμωδική δράση είναι το *Taxus wuallichiana*, του οποίου οι παρατηρούμενες φαρμακολογικές δράσεις επιβεβαιώνουν τη χρήση του φυτού στη λαϊκή θεραπευτική κατά της επιληψίας, της εμπύρετης κατάστασης και των οξέων πόνων (Nisar, 2008).

9. Αντιμικροβιακή δράση

Τα φλαβονοειδή και οι εστέρες των φαινολικών οξέων έχουν μελετηθεί για τις αντιβακτηριακές, αντιμυκητιακές και αντιϊικές τους δράσεις.

✓ Αντιβακτηρική δράση

Ένας σημαντικός αριθμός φλαβονοειδών έχει παρουσιάσει αντιβακτηρική δράση. Οι περισσότερες φλαβανόνες που δεν έχουν σάκχαρο εμφανίζουν αντιβακτηρική δράση. Αντίθετα καμία φλαβανόλη και κανένα φλαβονολιγνάνιο δεν έδειξε ανασταλτική δράση σε μικροοργανισμό (Tapas *et al.*, 2008).

✓ Αντιμυκητιακή δράση

Μεγάλος αριθμός φλαβονοειδών που απομονώθηκε από τον φλοιό των μανταρινιών, εξετάστηκαν για την αντιμυκητιακή τους δράση έναντι στο *Deuterophoma tracheiphila* και εμφάνισαν δραστηριότητα. Η νομπιλετίνη εμφανίζει ισχυρή αντιμυκητιακή δράση ενώ η langeritin ασθενή. Αντίθετα η εσπεριτίνη φάνηκε να διεγείρει ελαφρώς την ανάπτυξη των μυκήτων (Tapas *et al.*, 2008).

✓ Αντιϊκή δράση

Η αντιϊκή δράση των φλαβονοειδών φαίνεται να επηρεάζεται από τη δομή του αγλύκου και είναι απαραίτητη η παρουσία -OH στη θέση 3 για την εμφάνιση αντιϊκής δράσης. Έχει αποδειχθεί ότι οι φλαβανόλες είναι πιο δραστικές από τις φλαβόνες κατά του *Herpes simplex* ιού τύπου 1 με σειρά δραστηριότητας:

Γαλαγγίνη >Καιμπφερόλη > Κερκετίνη

Λόγω της παγκόσμιας εξάπλωσης του HIV από το 1980, η έρευνα γύρω από την αντιϊκή δράση των φλαβονοειδών επικεντρώθηκε κυρίως για τον HIV. Έχουν έρθει στο φως αντι-AIDs δράσεις των φλαβονοειδών. Από 28 εξεταζόμενα φλαβονοειδή φάνηκε ότι οι φλαβανόνες είναι γενικά πιο δραστικές συγκριτικά με τις φλαβόνες και οι φλαβανόλες είναι εκλεκτικοί αναστολείς του HIV-1 και HIV-2 καθώς και άλλων παρόμοιων ιών που προκαλούν ανοσολογική ανεπάρκεια (Tapas *et al.*, 2008). Τα φυτά, που έχουν μεγάλα ποσά φαινολικών συστατικών μπορούν να θεωρηθούν

σημαντικές πηγές μορίων για την αντιμετώπιση του ιού HIV-1. Βρέθηκε ότι παρουσιάζουν ανασταλτικές δράσεις στις διαφορετικές φάσεις του κύκλου ζωής του ιού HIV-1, περιλαμβάνοντας τη φάση της πρόσδεσης του ιού με τα κύτταρα ξενιστές, της απορρόφησης, της ανάστροφη μεταγραφή, της αφομοίωσης και της πρωτεολυτικής διαίρεσης του ιού.

Μικροοργανισμός	Φλαβονοειδές
Αντιβακτηριακή δράση	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Κερκετίνη, Μπαϊκαλίνη, Κερκετογετίνη, Εσπεριτίνη, Φισετίνη, Ισολικουϊριτιγενίνη, Ναριγγίνη+ρουτίνη, Ναριγγίνη+ Εσπεριτίνη
<i>Staphylococcus albus</i>	Φισετίνη
<i>Streptococcus pyogene</i>	Απιγενίνη
<i>Streptococcus viridans</i>	Απιγενίνη
<i>Streptococcus jaccalis</i>	Χρυσίνη
<i>Streptococcus baris</i>	Χρυσίνη
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Χρυσίνη
<i>Shigella boydii</i>	Εσπεριτίνη, Ναριγγίνη+Ρουτίνη Ναριγγενίνη+Εσπεριτίνη
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ρουτίνη, Ναριγγίνη, Μπαϊκαλίνη, Υδρόξυεθυλρουτοσίδης
<i>Escherichia coli</i>	Κερκετίνη
<i>Bacillus subtilis</i>	Κερκετίνη
<i>Bacillus anthracis</i>	Ρουτίνη
<i>Proteus vulgaris</i>	Δατισετίνη
<i>Clostridium perfringens</i>	Υδρόξυεθυλρουτοσίδης
Αντιϊκή δράση	
<i>Rabies virus</i>	Κερκετίνη, Κερκιτρίνη, Ρουτίνη
<i>Herpes Virus</i>	Κερκετίνη
<i>Para influenza virus</i>	Κερκετίνη, Ρουτίνη

<i>Herpes simplex virus type</i>	Γκαλανίνη, Κερκετίνη, Καιμπερόλη, Απιγενίνη, Χρυσίνη
<i>Potato virus</i>	Μορίνη, Ρουτίνη+Κερκετίνη
<i>Influenza virus</i>	Ρουτίνη+Κερκετίνη
<i>Herpes simplex virus type 2</i>	Κερκετίνη
<i>Respiratory syncytial virus</i>	Κερκετίνη, Ναριγγίνη
<i>Immuno-deficiency virus infection</i>	Απιγενίνη
<i>Auzesky virus</i>	Κερκετίνη, Κερκιτρίνη, Μορίνη, Απιγενίνη, Λουτεολίνη
<i>Polio virus</i>	Κερκετίνη
<i>Mengo virus</i>	Κερκετίνη
<i>Pseudorabies virus</i>	Κερκετίνη
Αντιμυκητιακή δράση	
<i>Candida albicans</i>	Χλωροφλαβονίνη
<i>Candida tropicalis</i>	Κερκετίνη
<i>Fusarium solani</i>	Χρυσοεριοόλη
<i>Botrytis cinerea</i>	Χρυσοεριοόλη
<i>Verticillium dahliae</i>	Χρυσοεριοόλη
<i>Azotobacter vinelandii</i>	Κερκετίνη, Ρουτίνη, Επικατεχίνη
<i>Alternacia tennisima</i>	Απιγενίνη, Εχινακίνη
<i>Cladosporium herbarum</i>	Φασεολινισοφλαβάνη

10. Αντιδιαβητική δράση

Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι ασθένεια που οφείλεται σε διαταραχή στην παραγωγή και έκκριση ινσουλίνης στο πάγκρεας ή σε μειωμένη απόκριση των ιστών στη δράση της ινσουλίνης. Η ορμόνη αυτή είναι απαραίτητη για τη ρύθμιση του επιπέδου της γλυκόσης στο αίμα σε σταθερά πλαίσια. Η ινσουλίνη συντίθεται στα β κύτταρα της νησίδας του Langerhans του παγκρέατος με τη μορφή της προϊνσουλίνης, που με την δράση πρωτεολυτικών ενζύμων μετατρέπεται τελικά σε

ινσουλίνη. Αυτή αποθηκεύεται σε ειδικά εκκριτικά κοκκία του παγκρέατος (Δημόπουλος, 2002).

Τα φλαβονοειδή, κυρίως η κερκετίνη, θεωρείται ότι έχουν αντιδιαβητική δράση, επειδή προάγει την αναγέννηση των β κυττάρων του παγκρέατος και με αυτόν τον τρόπο αυξάνει την έκλυση ινσουλίνης (Sandhar *et al.*, 2011). Τα β κύτταρα του παγκρέατος έχουν στην εξωτερική μεμβράνη ειδικούς υποδοχείς που αναγνωρίζονται από D-γλυκόση. Όταν η γλυκόση συνδεθεί με τους υποδοχείς αυτούς τότε διεγείρεται η αδενυλική κυκλάση (\uparrow cAMP) με αποτέλεσμα την είσοδο ιόντων ασβεστίου (Ca^{2+}). Η είσοδος ιόντων ασβεστίου προκαλεί την σύσπαση δομικών συστατικών του κυττάρου τα οποία σχετίζονται με την ενεργό μετακίνηση σωματιδίων ινσουλίνης προς την εξωτερική μεμβράνη και έτσι εκκρίνεται η ινσουλίνη (Σκλαβιάδης, 2001). Τα φλαβονοειδή αναστέλλουν τις PDEs του cAMP (Havsteen, 2002), με αποτέλεσμα να αυξάνουν την ενδοκυτταρική συγκέντρωση του cAMP που είναι καθοριστικής σημασίας για την έκλυση ινσουλίνης.

Στη χρόνια κατάσταση διαβήτη, οι πάσχοντες εμφανίζουν επιπλοκές όπως χρόνια αγγειοπάθεια που εξελίσσεται σε αθηροσκλήρωση, διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, κυρίως λόγω βλάβης των μικροαγγείων που αιματώνουν τον αμφιβληστοειδή. Τα φλαβονοειδή είναι γνωστό και ήδη έχει αναφερθεί έχουν αγγειοπροστατευτικές δράσεις.

11. Αντιηπατοτοξική δράση

Εκχυλίσματα του φυτού *Silybum marianum* χρησιμοποιούνται εδώ και αιώνες από τη λαϊκή θεραπευτική για την αντιμετώπιση δυσλειτουργιών του ήπατος. Πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε ζώα απέδειξαν ότι τα εκχυλίσματα *Silybum marianum* δεν έχουν μόνο θετική επίδραση σε ακέραια κύτταρα ήπατος ή κύτταρα που δεν έχουν υποστεί μη αναστρέψιμη βλάβη (δρουν επί της κυτταρικής μεμβράνης εμποδίζοντας την είσοδο τοξικών ουσιών) αλλά επιπλέον επιταχύνουν την αναγεννητική δυναμικότητα των ηπατικών κυττάρων μετά από μερική ηπατεκτομή. Ο μηχανισμός της ηπατοπροστατευτικής δράσης της σιλυβίνης που είναι το κύριο φλαβονολιγνάνιο που υπάρχει στο μίγμα της σιλυμαρίνης, δεν έχει γίνει πλήρως γνωστός, ωστόσο θεωρείται ότι η σιλυβίνη δεσμεύει την υπομονάδα της DNA-

εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης I με αποτέλεσμα να αυξάνεται ο ρυθμός της πρωτεϊνικής σύνθεσης και να επιταχύνεται η διαδικασία αναγέννησης των ηπατοκυττάρων (Di Carlos, 1999). Σε συστατικά που ανήκουν στην κατηγορία των φλαβονολιγνανίων (σιλυβίνη), οφείλεται η ηπατοπροστατευτική δράση του φυτού *Silibum marianum* Asteraceae (Gordon *et al.*, 1995, Soicke *et al.*, 1987).

Σε *in vitro* πειράματα που διενεργήθηκαν αποδείχθηκε η ηπατοπροστατευτική δράση των φλαβονοειδών χιρσουτρίνη (hirsutrin), αβικουλαρίνη και κερκετίνη. Η αντιοξειδωτική δράση των φλαβονοειδών αυτών είναι κυρίως υπεύθυνη για την ηπατοπροστατευτική τους δράση, επειδή φαίνεται να σταθεροποιούν την κυτταρική μεμβράνη εμποδίζοντας με αυτόν τον τρόπο την λιπιδική υπεροξειδωση που προκαλούν οι ελεύθερες ρίζες (Kim *et al.*, 2011).

12. Οιστρογονική δράση

Τα φλαβονοειδή και ιδιαίτερα οι ισοφλαβόνες εμφανίζουν οιστρογονική δράση. Η πρώτη παρατήρηση για τη δράση αυτή έγινε μετά το 1940 στην Αυστραλία, όταν κοπάδι προβάτων που τρέφονταν με τριφύλλι *Trifolium subterraneum* παρουσίασαν προβλήματα αναπαραγωγής (Mc Clure, 1975). Ακολούθησε φυτοχημική ανάλυση του τριφυλλίου και απομονώθηκε η ισοφλαβόνη γενιστεΐνη σε ποσοστό που έφτανε το 0,7%. Επιπλέον το φλαβονοειδές 8-ισοπεντενυλοναρινγγενίνη, το οποίο απομονώθηκε από το φυτό *Anaxagorea luzonensis* που φύεται στην Ταϊλάνδη, βρέθηκε να είναι αγωνιστής των οιστρογόνων υποδοχέων με δράση περίπου δέκα φορές μεγαλύτερη από τη γενιστεΐνη (Νιώπας, 2008). Γνωστό για την οιστρογονική του δράση είναι το φυτό *Medicago sativa*, το οποίο περιέχει κουμεστρόλη.

13. Αντιοστεοπορωτική δράση

Η οστεοπόρωση παθολογικά χαρακτηρίζεται από χαμηλή πυκνότητα οστών ή χαμηλό οστικό περιεχόμενο και κυρίως εμφανίζεται σε ηλικιωμένες γυναίκες. Διατροφικοί παράγοντες όπως βιταμίνες (κυρίως βιταμίνη D), πρωτεΐνες και ασβέστιο είναι σημαντικοί για τη διατήρηση της ποιότητας και της δύναμης των οστών. Τα οστά υπόκεινται σε συνεχή αναδιαμόρφωση μέσω μίας διαδικασίας προσρόφησης παλιών οστών από τους οστεοκλάστες και σχηματισμού νέων από τους οστεοβλάστες. Ανισορροπία της επαναρόφησης οστού έναντι του σχηματισμού

οδηγεί σε οστεοπόρωση, η οποία είναι ένα μείζον πρόβλημα δημόσιας υγείας και στον ηλικιωμένο πληθυσμό και κυρίως σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Η θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης (HRT- hormone replacement treatment) είναι αποτελεσματική στην πρόληψη της οστικής απώλειας όμως συνοδεύεται από παρενέργειες όπως καρκίνος. Μια υποκατηγορία φάβονοειδών, τα ισοφλαβονοειδή, που έχουν δομή παρόμοια με αυτή των οιστρογόνων αποτελούν εναλλακτική λύση για HRT. Έχει αποδειχθεί από μελέτες ότι η θεραπεία με ιπριφλαβόνη και παράγωγα ισοφλαβονών (7-ισοπροποξυ- ισοφλαβόνη) για ένα χρόνο (3×200mg/ημέρα) μειώνει τον πόνο και αυξάνει την κινητικότητα κατά 73% σε ασθενείς με οστεοπόρωση. Πειραματικές μελέτες έδειξαν ότι αυτή η ένωση δρα αναστέλλοντας την οστεοκλαστική επαναρρόφηση τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Παρόλο που ο μηχανισμός αναστολής δεν είναι σαφής, πιθανώς η ιπριφλαβόνη αναστέλλει άμεσα την οστεοκλαστική δραστηριότητα μέσω της τροποποίησης του ενδοκυτταρικών ελεύθερων ιόντων ασβεστίου (Ca^{2+}) (Di Carlo, 1999).

14. Δράση στο ΚΝΣ (Κεντρικό Νευρικό Σύστημα)

Τα φλαβονοειδή απαντώνται σε όλα σχεδόν τα φυτά συνήθως υπό μορφή γλυκοσιδών. Πριν από την απορρόφησή τους (μετά την κατανάλωσή τους από τις τροφές) από τον ανθρώπινο οργανισμό τα φλαβονοειδή μετατρέπονται σε άγλυκα (γενίνες). Η απορρόφηση των αγλύκων γίνεται μετά από τον μεταβολισμό τους και την μετατροπή τους σε μεθυλιωμένα και σουλφωρυλιωμένα παράγωγα και γλυκουρονιδια τα οποία διέρχονται και τον ΑΕΦ (Αιματο-Εγκεφαλικός Φραγμός). Τα φλαβονοειδή δρουν στο ΚΝΣ επειδή έχουν την ικανότητα:

- ✓ Να προστατεύουν ευπαθείς νευρώνες
- ✓ Να ενισχύουν τη λειτουργία των νευρώνων
- ✓ Να προάγουν την νευρογένεση

Αυτό οφείλεται στο ότι τα φλαβονοειδή:

- ✓ Αλληλεπιδρούν με υποδοχείς GABA_A (γ-άμινο-βουτυρικό οξύ)
- ✓ Επηρεάζουν τη δράση των ενζύμων MAO-A (ΜονοΑμινοΟξειδάση) και MAO-B
- ✓ Έχουν αντιοξειδωτική δράση
- ✓ Έχουν αντιφλεγμονώδη δράση

✓ Τονώνουν την κυκλοφορία του αίματος με αποτέλεσμα την καλύτερη αιμάτωση του εγκεφάλου και την παροχή με γλυκόση και οξυγόνο.

Αγχιστεία φλαβονοειδών με GABA_A υποδοχέα των βενζοδιαζεπινών:

Οι βενζοδιαζεπίνες και τα φλαβονοειδή δεν υποκαθιστούν το GABA δρώντας στις ίδιες θέσεις σύνδεσης αλλά ενισχύουν αλλοστερικά τη δράση του GABA. Διεγείρουν τους ανασταλτικούς νευρώνες δρώντας στα σημεία εκείνα όπου ο GABA δρα ως κατασταλτικός νευροδιαβιβαστής προκαλώντας κατευνασμό, αγχολυτική δράση αλλά και αντισπασμωδική δράση. Ο διπλός δεσμός στο δακτύλιο C είναι σημαντικός για την εμφάνιση δράσης, επειδή προσδίδει επίπεδη δομή δια το σύστημα δακτυλίων A-C (Jäger και Saaby, 2011).

Αναστολή της δράσης των ενζύμων MAO-A και MAO-B

Οι μονοαμινο-οξειδάσες μεταβολίζουν τους νευροδιαβιβαστές 5-HT (σεροτονίνη) και NE (νορεπινεφρίνη). Τα φλαβονοειδή αναστέλλουν τη δράση αυτών των ενζύμων με αποτέλεσμα να αυξάνονται οι συγκεντρώσεις αυτών των νευροδιαβιβαστών στο συναπτικό χώρο. Έτσι λειτουργούν ως αντικαταθλιπτικά και βελτιώνουν την κλινική εικόνα σε ασθενείς που πάσχουν από Parkinson. Οι φλαβονόλες, οι φλαβόνες και οι ανθοκυάνες έχουν προστατευτικές δράσεις και προλαμβάνουν φλεγμονώδεις διαδικασίες που οδηγούν σε τραυματισμό νευρικών κυττάρων (Jäger και Saaby, 2011).

Αντιοξειδωτική δράση

Η ενεργοποίηση του οξυγόνου είναι σημαντικός παράγοντας γήρανσης και καταστάσεων που σχετίζονται με αυτήν, όπως οι νόσοι Alzheimer και Parkinson. Το οξειδωτικό stress είναι μάλλον ο κυριότερος λόγος της βλάβης και εκφύλισης των νευρώνων. Τα φλαβονοειδή λόγω της αντιφλεγμονώδους δράσης τους προστατεύουν τους νευρώνες από τραυματισμό που προκαλούν νευροτοξικές ουσίες και από φλεγμονές νευρικών κυττάρων.

15. Χρωστικές και γλυκαντικές ιδιότητες

Ως χρωστικές χρησιμοποιούνται φλαβονοειδή του *Quercus*, ενώ ως γλυκαντικά οι διυδροχαλκόνες των *Citrus* όπως η ναρινγγίνη η οποία είναι 500 φορές γλυκύτερη της σακχαρόζης (Benavente-Garcia, 1997).



Β.ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

B.1. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ

B.1.1. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

1. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (T.L.C)

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (T.L.C) χρησιμοποιήθηκε εκτεταμένα, σε αναλυτική τεχνική, για έλεγχο και καθαρισμό συστατικών από τα εκχυλίσματα της δρόγης. Χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω χρωματογραφικό υλικό:

- ✓ Γέλη οξειδίου του πυριτίου με δείκτη φθορισμού σε φύλλα αλουμινίου (20 × 20cm). Πάχος στιβάδας 0.1mm (Kieselgel F₂₅₄, Merck, Art. 5554) (αναλυτική χρωματογραφία).
- ✓ Κελλουλόση χωρίς δείκτη φθορισμού σε φύλλα αλουμινίου (20 × 20cm). Πάχος στιβάδας 0.1mm (Merck, Art. 5552) (αναλυτική χρωματογραφία).

Οι πλάκες κελλουλόσης αναπτύχθηκαν σε συστήματα οξικού οξέος- νερού (15% και 30%), σύστημα διχλωρομεθάνιο: οξικό οξύ: νερό (50:45:5), στην ανώτερη στιβάδα του μίγματος οξικός αιθυλεστέρας: οξικό οξύ: νερό (120:30:60) καθώς επίσης και σε σύστημα Partridge [ανώτερη στιβάδα του μίγματος βουτανόλης: οξικό οξύ: νερό (4:1:5)]. Οι πλάκες γέλης οξειδίου του πυριτίου αναπτύχθηκαν σε συστήματα οργανικών διαλυτών.

Η παρατήρηση των χρωματογραφημάτων, πριν και μετά από τον ψεκασμό τους με κατάλληλα χρωματογραφικά αντιδραστήρια, γίνονται στο φως της ημέρας καθώς και στο υπεριώδες φως (254nm και 365nm). Για την εμφάνισή τους χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια :

- ✓ Αντιδραστήριο Neu (Naturstoffreagenz A):

1.00g διφαινυλοβορικού αμινοαιθυλεστέρα διαλύθηκε σε 100ml μεθανόλης (Neu, 1957).

Τα παράγωγα της απιγενίνης εμφανίζουν κιτρινοπράσινο φθορισμό και μετά από 24 ώρες χρωματίζονται κόκκινα στο φως της ημέρας, τα παράγωγα της λουτεολίνης εμφανίζουν κίτρινο φθορισμό, τα παράγωγα της καιμπερόλης εμφανίζουν κιτρινοπράσινο φθορισμό και της κερκετίνης έντονο πορτοκαλοκίτρινο.

✓ Αντιδραστήριο θειϊκής βανιλίνης:

Διάλυμα Α: βανιλίνη 5% σε μεθανόλη. Διάλυμα Β: π.Η₂SO₄ 5% σε μεθανόλη (Stahl, 1969). Ίσοι όγκοι αναμιγνύονται αμέσως πριν τον ψεκασμό και το χρωματογράφημα θερμαίνεται για 5 min στους 105 °C.

✓ Αντιδραστήριο πυκνού διαλύματος αμμωνίας (ατμοί αμμωνίας).

2. Χρωματογραφία στήλης (C.C., Column Chromatography)

Η χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιήθηκε εκτεταμένα για το διαχωρισμό και καθαρισμό των φλαβονοειδών και φαινολοξέων. Χρησιμοποιήθηκαν υάλινες στήλες διαφόρων διαστάσεων και ως διαχωριστικό υλικό Sephadex LH-20 (γέλη υδροξυπροπυλιωμένη δεξτράνη) και διαλύτη έκλουσης μεθανόλη.

Μέγεθος τεμαχιδίων 25-100μm. Πριν από τη χρήση διογκώνεται με το διαλύτη έκλουσης για 24 ώρες. Η χρήση μαγνητικού αναδευτήρα δεν προτιμάται μιας και υπάρχει κίνδυνος καταθρυματισμού των κόκκων. Η αναλογία δείγματος προς προσροφητικό ήταν 1:50 και η τοποθέτηση του διαλυτού μέρους δείγματος στη στήλη γινόταν μετά την προσθήκη μικρού όγκου μεθανόλης.

3. Χρωματογραφία στήλης υπό κενό (V.L.C, Vacuum Liquid Chromatography)

✓ Πολυαμίδιο: Χρησιμοποιήθηκε πολυαμίδιο (πολυκαπρολακτάμη) της Macherey-Nagel SC-6 με μέγεθος κόκκων < 0.07mm

Επειδή συνήθως το πολυαμίδιο που κυκλοφορεί στο εμπόριο έχει ανομοιομορφή σύσταση από άποψη μεγέθους τεμαχιδίων πολυμερούς και προκειμένου να αποκτήσει το υλικό ομοιομορφία μεγέθους τεμαχιδίων, προηγήθηκε κατεργασία του υλικού ως εξής: Έγιναν άφθονες πλύσεις του χρωματογραφικού υλικού με απεσταγμένο νερό και αποχύσεις του υπερκείμενου υγρού μέχρις ότου η μάζα του πολυαμιδίου να καθιζάνει γρήγορα στον πυθμένα του δοχείου (10-15min) και το υπερκείμενο υγρό να μην παρουσιάζει θολρότητα. Οι εκπλύσεις επαναλήφθηκαν διαδοχικά με μίγματα νερού–μεθανόλης (90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 70:30, 80:20, 90:10, 100:0) και πάλι αντίστροφα προς νερό. Τέλος, το πολυαμίδιο διηθήθηκε υπό κενό και ξηράνθηκε σε θερμοκρασία 50 °C στο πυριαντήριο.

Κατ' αυτόν τον τρόπο το πολυαμίδιο που λαμβάνεται έχει τις εξής επιθυμητές ιδιότητες :

- ✓ Απομακρύνονται τα «εν αιωρήσει» ολιγομερή της προλακτάμης.
- ✓ Αποκτά ομοιομορφία μεγέθους τεμαχιδίων και έτσι η στήλη γίνεται ομοιογενής.
- ✓ Ο ρυθμός ροής της στήλης που θα προκύψει είναι ικανοποιητικός.

4. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (H.P.L.C., High Performance Liquid Chromatography)

Για τον διαχωρισμό των κλασμάτων χρησιμοποιήθηκε, επίσης, η τεχνική της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) στον ακόλουθο χρωματογράφο:

Marathon III HPLC Pump, με την ακόλουθη στήλη αντίστροφης φάσης (reversed phase): Grace Apollo 5u (5 μ m) C18 (250.0mm \times 7.0mm). Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε το κατάλληλο κάθε φορά σύστημα διαλυτών διαβαθμισμένης πολικότητας με τους εξής διαλύτες: MeOH και H₂O (2% AcOH), με ταχύτητα ροής 1.0 ml/min. Όγκος έγχυσης: 1ml. Ανιχνευτής: UV-Vis SSI 500 Detector.

Για την επιλογή του μήκους κύματος ανίχνευσης όλων των κλασμάτων που επιλέχθηκαν και υποβλήθηκαν σε HPLC, ελήφθησαν τα φάσματα UV-Vis, με διαλύτη μεθανόλη. Το μέγιστο μήκος κύματος απορρόφησης του εκάστοτε κλάσματος, ρυθμίστηκε ως μήκος κύματος ανίχνευσης.

Όλα τα κλάσματα πριν υποβληθούν σε HPLC αραιώνονταν σε κατάλληλη αναλογία (1mg/ml–3mg/ml), διαλύονταν πλήρως με τη βοήθεια υπερήχων και φιλτράρονταν μέσω REG CELLULOSE 0.45 μ m.

B.1.2.ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Φασματοσκοπία Υπεριώδους – Ορατού (UV-Vis, Ultraviolet-Visible spectroscopy)

Τα φάσματα Υπεριώδους– Ορατού ελήφθησαν από τα φασματοφωτόμετρα Hitachi U-2000, 1212301-06.

2. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (N.M.R., Nuclear Magnetic Resonance)

Για την λήψη των φασμάτων Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθοι φασματογράφοι:

- ✓ Φασματογράφος Bruker DPX 300 (300.13 MHz για $^1\text{H-NMR}$ και 75.5 MHz για $^{13}\text{C-NMR}$)
- ✓ Φασματογράφος Bruker AMX 500 (500.1 MHz για $^1\text{H-NMR}$ και 125.5 MHz για $^{13}\text{C-NMR}$).
- ✓ Φασματογράφος AGILENT DD2 500 (500.1 MHz για $^1\text{H-NMR}$ και 125.5 MHz για $^{13}\text{C-NMR}$).

Τα φάσματα ελήφθησαν με διαλύτη CD_3OD δίχως εσωτερικό πρότυπο, λαμβάνοντας το σήμα του διαλύτη ως αναφορά (3.31ppm για $^1\text{H-NMR}$ και 49.05ppm για $^{13}\text{C-NMR}$ για την CD_3OD).

Οι χημικές μετατοπίσεις εκφράζονται σε δ (ppm) και οι σταθερές σύζευξης (J) σε Hertz (Hz).

Χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες τεχνικές:

- ✓ COSY (Correlation Spectroscopy)
- ✓ HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation)
- ✓ HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation)
- ✓ HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)
- ✓ NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)

Η λήψη φασμάτων Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού δυο διαστάσεων (2D-NMR), βοήθησε στη διευκρίνιση της δομής των ουσιών που απομονώθηκαν σε μίγματα.

3. Φασματοσκοπία Μάζας

Για την λήψη των φασμάτων Μάζας (MS) χρησιμοποιήθηκε ο ακόλουθος φασματογράφος: LCQ Advantage (ion trap) with Electrospray ionization source, Thermo, Source Voltage (kV): 4.00, Sheath Gas Flow Rate: 60, Aux Gas Flow Rate: 10, Capillary Temp. (C): 290 °C, Tube Lens Voltage (V): -95 V, (-) ESI Full Scan 110-2000.

Η λήψη φασμάτων μάζας (ESI-MS) βοήθησε στη διευκρίνιση της δομής των ουσιών που απομονώθηκαν σε μίγματα.

B.1.3. ΔΙΑΛΥΤΕΣ

Χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθοι διαλύτες:

- ✓ Αιθέρας (J.T. Baker 8254)
- ✓ Ακετόνη (Merck 1.00014.2511, Carlo Erba 400974)
- ✓ Διχλωρομεθάνιο (Panreac 131254, Merck 1.06050.2500, J.T. Baker 7053)
- ✓ Εξάνιο (J.T. Baker 8044, Riedel-de Haen 32293)
- ✓ Θεϊκό οξύ 96% (Panreac 131058)
- ✓ Μεθανόλη (Merck 1.06009.2511, Merck 1.06007.2500, Panreac 131091)
- ✓ Μεθανόλη δευτεριωμένη (CD₃OD) (Aldrich 99.8 + atom %D, Merck 1.06028.0010)
- ✓ Νερό (Panreac 361074)
- ✓ Νερό δευτεριωμένο (D₂O) (Merck 1.03428.0010)
- ✓ Οξικός αιθυλεστέρας (Panreac 131318)
- ✓ Οξικό οξύ (J.T. Baker 6152)
- ✓ Πετρελαϊκός αιθέρας (Carlo Erba 447832, Panreac 131315)

Οι διαλύτες για HPLC πριν χρησιμοποιηθούν, διηθήθηκαν υπό κενό και απαερώθηκαν.

B.2. ΚΥΡΙΩΣ ΕΡΕΥΝΑ

B.2.1. Εκχύλιση της δρόγης

Τα υπέργεια τμήματα του φυτού *Alyssum alyssoides* συλλέχθηκαν το 2010 κατά την περίοδο της ανθοφορίας (Ιούνιο) στην περιοχή της Καστοριάς.

Χρησιμοποιήθηκαν 119.29g υπέργειων τμημάτων ξηρού φυτού αδρομερώς κονιοποιημένων και εκχυλίστηκαν εξαντλητικά σε συσκευή Soxhlet διαδοχικά με τους παρακάτω διαλύτες :

- ✓ Πετρελαϊκός αιθέρας (40-60 °C) (AAP)
- ✓ Διχλωρομεθάνιο (AAD)
- ✓ Μεθανόλη (AAM)

B.2.2. Μεθανολικό εκχύλισμα

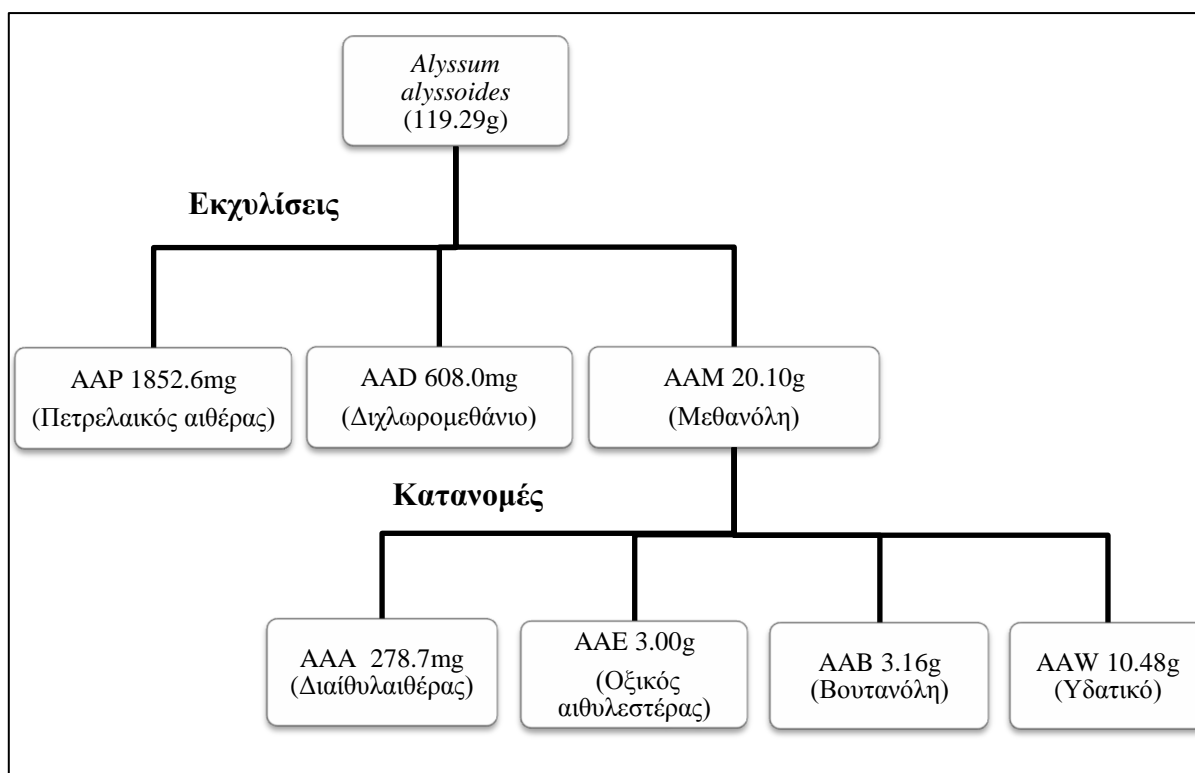
Το εκχύλισμα που προέκυψε από την παραπάνω διαδικασία, μετά την εξάτμιση του διαλύτη έδωσε στερεό υπόλειμμα βάρους 20.10g. Αυτό διαλύθηκε σε 1lit βρασμένου νερού και διηθήθηκε.

Το μεθανολικό εκχύλισμα μετά από ψύξη εκχυλίστηκε με τους παρακάτω διαλύτες:

- ✓ Αιθέρα (EtOEt)
- ✓ Οξικό αιθυλεστέρα (AcOEt)
- ✓ Βουτανόλη (BuOH)

Μετά από εξάτμιση των διαλυτών προέκυψαν τα παρακάτω υπολείμματα:

- ✓ Αιθερικό (278.8mg, AAA)
- ✓ Οξικό αιθυλεστερικό (3.00g AAE)
- ✓ n-Βουτανολικό (3.16g, AAB)
- ✓ Υδατικό (υψηλού ιξώδους) (10.48g, AAZ)



Εικόνα 11: Πορεία εκχυλίσεων

Το υπόλειμμα του διαίθυλαιθέρα (AAA, 278.7mg) υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης επί Sephadex LH-20 με διαλύτη έκλουσης MeOH.

Το υπόλειμμα του οξικού αιθυλεστέρα (AAE, 3.00g) υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης υπό κενό (V.L.C., 10.00cm × 7.00cm) επί πολυαμιδίου (M.N. Polyamid SC6/ Polyamid CC6/ Particle size < 0.07mm) με υγρό έκλουσης μίγματα διαλυτών αυξανόμενης πολικότητας: από 100% H₂O προς 100% MeOH.

Για τον έλεγχο και ομαδοποίηση των εκλουόμενων κλασμάτων χρησιμοποιήθηκε η αναλυτική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας επί κελλουλόσης (Merck, Art. 5552) και επί γέλης πυριτίου (Merck, Art. 5554), χρησιμοποιώντας ως αντιδραστήρια εμφάνισης Neu και θεϊκή βανιλίνη, αντίστοιχα.

B.2.3. ΑΙΘΕΡΙΚΟ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑ - AAA (278.7mg)

Υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης (75.0cm × 2.0cm) επί Sephadex LH-20 με διαλύτη έκλουσης MeOH. Ελήφθησαν 289 κλάσματα μέσου όγκου: (1→2, 50ml), (3→284, 4ml), (285→289, 50ml) τα οποία κατόπιν ελέγχου με αναλυτική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) συνενώθηκαν στις ακόλουθες ομάδες:

- ✓ AAA-A (1→128, 11.5mg)
- ✓ AAA-B (129→170, 38.6mg)
- ✓ AAA-C (171→199, 2.1mg)
- ✓ AAA-D (200→229, 33.3mg)
- ✓ AAA-E (230→250, 6.4mg)
- ✓ AAA-F (251→265, 25.3mg)
- ✓ AAA-G (266→269, 1.7mg)
- ✓ AAA-H (270→289, 14.7mg)

ΚΛΑΣΜΑ AAA-B (38.6mg)

Υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με διαλύτη έκλουσης MeOH:H₂O.

Το κλάσμα AAA-B διαλύθηκε σε H₂O (HPLC) με αναλογία αραίωσης 2mg/ml. Η ακόλουθη κινητή φάση είναι η καταλληλότερη συγκριτικά με άλλες οι οποίες δοκιμάστηκαν:

Πίνακας 1: AAA-B λ_{max}= 275nm, 38.6mg

Διάρκεια	Διαλύτης	
0→5min	100% A	Ισοκρατικά
5→10min	100% A → 50% A	Γραμμικά
10→15min	50% A	Ισοκρατικά
15→20min	50% A → 35% A	Γραμμικά
20→30min	35% A → 25% A	Γραμμικά
30→35min	25% A → 0% A (100% B)	Γραμμικά
35→38min	100% B	Ισοκρατικά
38→40min	100% B → 50% B	Γραμμικά
40→42min	50% B	Ισοκρατικά
42→45min	50% B → 0% B (100% A)	Γραμμικά
45→50min	100% A	Ισοκρατικά

Συλλέχθηκαν 5 κορυφές:

- AAA-B₁ (Rt=19.6min, 0.5mg)
- AAA-B₂ (Rt=19.8min, 1.2mg)
- AAA-B₃ (Rt=22.8min, 0.4mg)
- AAA-B₄ (Rt=23.2min, 1.2mg)
- AAA-B₅ (Rt=29.4min, 0.5mg)

Η κορυφή AAA-B₁ (Rt=19.6min, 0.5mg) κατόπιν φασματοσκοπικής μελέτης ταυτοποιήθηκε ως *p*-υδροξυ-βενζοϊκό οξύ (ουσία 1), ενώ η κορυφή AAA-B₂ (Rt=19.8min, 1.2mg), κατόπιν φασματοσκοπικής μελέτης ταυτοποιήθηκε ως μίγμα των ενώσεων *p*-υδροξυ-βενζοϊκό οξύ (ουσία 1) και 3-μεθοξυ-4-υδροξυ-βενζοϊκό οξύ (βανιλικό οξύ) (ουσία 2)

ΚΛΑΣΜΑ AAA-C (12.1mg)

Υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με διαλύτη έκλουσης MeOH:H₂O.

Το κλάσμα AAA-C διαλύθηκε σε H₂O (HPLC) με αναλογία αραίωσης 1mg/ml. Η ακόλουθη κινητή φάση είναι η καταλληλότερη συγκριτικά με άλλες οι οποίες δοκιμάστηκαν.

Πίνακας 2: AAA-C λ_{max}= 268nm, 12.1mg

Διάρκεια	Διαλύτης	
0→5min	100% A	Ισοκρατικά
5→10min	100% A → 50% A	Γραμμικά
10→12min	50% A	Ισοκρατικά
12→15min	50% A → 35% A	Γραμμικά
15→35min	35% A → 20% A	Γραμμικά
35→40min	20% A → 0% A (100% B)	Γραμμικά
40→43min	100% B	Ισοκρατικά
43→45min	100% B → 50% B	Γραμμικά
45→48min	50% B	Ισοκρατικά
48→50min	50% B → 0% B (100% A)	Γραμμικά
50→55min	100% A	Ισοκρατικά

Συλλέχθηκαν 5 κορυφές:

- AAA-C₁ (Rt=17.4min, 0.5mg)
- AAA-C₂ (Rt=18.2min, 0.3mg)
- AAA-C₃ (Rt=21.6min, 0.4mg)
- AAA-C₄ (Rt=23.1min, 0.8mg)
- AAA-C₅ (Rt=24.9min, 1.1mg)

ΚΛΑΣΜΑ AAA-D (33.3mg)

Υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με διαλύτη έκλουσης MeOH:H₂O.

Το κλάσμα AAA-D διαλύθηκε σε H₂O (HPLC) με αναλογία αραίωσης 1mg/ml. Η ακόλουθη κινητή φάση είναι η καταλληλότερη συγκριτικά με άλλες οι οποίες δοκιμάστηκαν:

Πίνακας 3: AAA-D λ_{\max} = 257nm, 33.3mg

Διάρκεια	Διαλύτης	
0→5min	100% A	Ισοκρατικά
5→10min	100% A → 50% A	Γραμμικά
10→15min	50% A	Ισοκρατικά
15→20min	50% A → 35% A	Γραμμικά
20→40min	35% A → 20% A	Γραμμικά
40→42min	20% A → 0% A (100% B)	Γραμμικά
42→43min	100% B	Ισοκρατικά
43→45min	100% B → 50% B	Γραμμικά
45→48min	50% B	Ισοκρατικά
48→50min	50% B → 0% B (100% A)	Γραμμικά
50→55min	100% A	Ισοκρατικά

Συλλέχθηκαν 7 κορυφές:

- AAA-D₁ (Rt=24.1min, 0.8mg)
- AAA-D₂ (Rt=25.5min, 2.3mg)
- AAA-D₃ (Rt=26.4min, 2.1mg)
- AAA-D₄ (Rt=26.8min, 4.4mg)
- AAA-D₅ (Rt=27.4min, 2.7mg)
- AAA-D₆ (Rt=27.9min, 0.8mg)
- AAA-D₇ (Rt=28.4min, 0.7mg)

Η κορυφή AAA-D₂ (Rt=25.5min, 2.3mg) κατόπιν φασματοσκοπικής μελέτης ταυτοποιήθηκε ως μίγμα των ενώσεων **κερκετινο-3-O-β-D-γλυκοπυρανοσίδης (ισοκερκετίνη)** (ουσία **5**) και **κερκετινο-3-O-εξοσίδης** (ουσία **6**), ενώ οι κορυφές AAA-D₃ (Rt=26.4min, 2.1mg) και AAA-D₄ (Rt=26.8min, 4.4mg), κατόπιν φασματοσκοπικής μελέτης ταυτοποιήθηκε ως μίγμα των ενώσεων **καμπφερολο-3-O-β-D-γλυκοπυρανοσίδης (αστραγαλίνη)** (ουσία **3**), **3'-μεθοξυ-κερκετινο-3-O-β-D-γλυκοπυρανοσίδης (ισοραμνετινο-3-O-γλυκοσίδης)** (ουσία **8**), **3'-μεθοξυ-κερκετινο-3-O-εξοσίδης (ισοραμνετινο-3-O-εξοσίδης)** (ουσία **9**) (βλεπ. σελ 219).

ΚΛΑΣΜΑ AAA-E (6.4mg)

Υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με διαλύτη έκλουσης MeOH:H₂O.

Το κλάσμα AAA-E διαλύθηκε σε H₂O (HPLC) με αναλογία αραίωσης 1mg/ml. Η ακόλουθη κινητή φάση είναι η καταλληλότερη συγκριτικά με άλλες οι οποίες δοκιμάστηκαν:

Πίνακας 4: AAA-E λ_{max}= 268nm, 6.4mg

Διάρκεια	Διαλύτης	
0→5min	100% A	Ισοκρατικά
5→10min	100% A → 50% A	Γραμμικά
10→15min	50% A	Ισοκρατικά
15→20min	50% A → 30% A	Γραμμικά
20→40min	30% A → 20% A	Γραμμικά
40→42min	20% A → 0% A (100% B)	Γραμμικά
42→44min	100% B	Ισοκρατικά
44→46min	100% B → 50% B	Γραμμικά
46→48min	50% B	Ισοκρατικά
48→50min	50% B → 0% B (100% A)	Γραμμικά
50→55min	100% A	Ισοκρατικά

Συλλέχθηκαν 4 κορυφές:

- AAA-E₁ (Rt=24.2min, 0.2mg)
- AAA-E₂ (Rt=25.0min, 0.3mg)
- AAA-E₃ (Rt=25.7min, 0.3mg)
- AAA-E₄ (Rt=32.8min, 0.2mg)

B.2.4.ΥΠΟΛΕΙΜΜΑ ΟΞΙΚΟΥ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑ - ΑΑΕ (3.00g)

Το υπόλειμμα του οξικού αιθυλεστέρα (ΑΑΕ, 3.00g) υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης υπό κενό (V.L.C., 10.00cm × 7.00cm) επί πολυαμιδίου (M. N Polyamid SC6/ Polyamid CC6/ Particle size <0.07mm) με υγρό έκλυσης μίγματα διαλυτών αυξανόμενης πολικότητας : από 100% H₂O προς 100% MeOH.

Πίνακας 5: VLC υπολείματος οξικού αιθυλεστέρα

Αναλογίες %	Διαλύτης	Όγκος	Βάρος	Κωδικός δείγματος
100%	H ₂ O	500ml	76.6mg	ΑΑΕ-A
95:5	H ₂ O:MeOH	300ml	58.3mg	ΑΑΕ-B
90:10	H ₂ O:MeOH	300ml	67.3mg	ΑΑΕ-C
85:15	H ₂ O:MeOH	300ml	60.7mg	ΑΑΕ-D
80:20	H ₂ O:MeOH	300ml	78.3mg	ΑΑΕ-E
75:25	H ₂ O:MeOH	300ml	68.8mg	ΑΑΕ-F
70:30	H ₂ O:MeOH	300ml	78.8mg	ΑΑΕ-G
65:35	H ₂ O:MeOH	300ml	74.0mg	ΑΑΕ-H
60:40	H ₂ O:MeOH	300ml	77.6mg	ΑΑΕ-I
55:45	H ₂ O:MeOH	300ml	86.0mg	ΑΑΕ-K
50:50	H ₂ O:MeOH	300ml	360.0mg	ΑΑΕ-L
45:55	H ₂ O:MeOH	300ml	171.1mg	ΑΑΕ-M
40:60	H ₂ O:MeOH	300ml	432.0mg	ΑΑΕ-N
35:65	H ₂ O:MeOH	300ml	171.2mg	ΑΑΕ-O
30:70	H ₂ O:MeOH	300ml	268.6mg	ΑΑΕ-P
25:75	H ₂ O:MeOH	300ml	245.0mg	ΑΑΕ-Q
20:80	H ₂ O:MeOH	300ml	164.0mg	ΑΑΕ-R
15:85	H ₂ O:MeOH	300ml	124.0mg	ΑΑΕ-S
10:90	H ₂ O:MeOH	300ml	123.8mg	ΑΑΕ-T
5:95	H ₂ O:MeOH	300ml	86.0mg	ΑΑΕ-U
100%	MeOH	500ml	82.7mg	ΑΑΕ-V

ΚΛΑΣΜΑ ΑΑΕ-N (432.0mg)

Αρχικά, το κλάσμα ΑΑΕ-N υποβλήθηκε σε δοκιμαστική χρωματογραφία HPLC η οποία δεν έδινε ικανοποιητικό διαχωρισμό των ουσιών.

Πίνακας 6: ΑΑΕ-N λ_{\max} =268nm, 432.0mg

Διάρκεια	Διαλύτης	
0→5min	100% A	Ισοκρατικά
5→10min	100% A → 50% A	Γραμμικά
10→30min	50% A → 20% A	Γραμμικά
30→35min	20% A → 0% A (100% B)	Γραμμικά
35→40min	100% B	Ισοκρατικά
40→45min	100% B → 50% B	Γραμμικά
45→50min	50% B	Ισοκρατικά
50→55min	50% B → 0% B (100% A)	Γραμμικά
55→60min	100% A	Ισοκρατικά

Τελικά, υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης (78.0cm × 2.5cm) επί Sephadex LH-20 με διαλύτη έκλουσης MeOH. Ελήφθησαν 241κλάσματα μέσου όγκου: (1, 100ml), (2, 75ml), (3→240, 1ml) και τέλος για τον καθαρισμό της στήλης Sephadex LH-20 καταναλώθηκαν επιπλέον 150ml MeOH (κλάσμα 241), τα οποία κατόπιν ελέγχου με αναλυτική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) συνενώθηκαν στις ακόλουθες ομάδες:

- ✓ ΑΑΕ-NA (1→129, 27.3mg)
- ✓ ΑΑΕ-NB (130→184, 6.1mg)
- ✓ ΑΑΕ-NC (185→205, 2.3mg)
- ✓ ΑΑΕ-ND (206→236, 2.2mg)
- ✓ ΑΑΕ-NE (237→241, 2.5mg)

Το ίζημα που παρέμενε στην κορυφή στις στήλης Sephadex LH-20 συλλέχθηκε και διηθήθηκε υπό κενό με MeOH και με μίγματα H₂O-AcOH (15%) και με H₂O. Το διήθημα συμπυκνώθηκε και ζυγίστηκε ΑΑΕ-NZ (8.2mg).

ΚΛΑΣΜΑ ΑΑΕ-Ο (171.2mg)

Υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης (72.0cm × 2.0cm) επί Sephadex LH-20 με διαλύτη έκλουσης MeOH. Ελήφθησαν 243 κλάσματα μέσου όγκου: (1→237, 1ml), (238→242, 25ml) και τέλος για τον καθαρισμό της στήλης Sephadex LH-20 καταναλώθηκαν επιπλέον 500ml MeOH (κλάσμα 243), τα οποία κατόπιν ελέγχου με αναλυτική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) συνενώθηκαν στις ακόλουθες ομάδες:

- ✓ ΑΑΕ-OA(1→106, 27.9mg)
- ✓ ΑΑΕ-OB (107→126, 6.2mg)
- ✓ ΑΑΕ-OC (127→128, 0.7mg)
- ✓ ΑΑΕ-OD (129→141, 33.8mg)
- ✓ ΑΑΕ-OE (142→155, 37.5mg)
- ✓ ΑΑΕ-OF (156→174, 10.1mg)
- ✓ ΑΑΕ-OG (175→195, 12.5mg)
- ✓ ΑΑΕ-OH (196→235, 10.2mg)
- ✓ ΑΑΕ-OI (236→242, 1.5mg)
- ✓ ΑΑΕ-OK (243, 3.2mg)

Τα κλάσματα ΑΑΕ-OB (6.2mg) και ΑΑΕ-OC (0.7mg) κατόπιν φασματοσκοπικής μελέτης ταυτοποιήθηκαν ως **καμπφερολο-3-O-(6''-α-L-ραμνοπυρανοσουλ)-β-D-γλυκοπυρανοσίδης (καμπφερολο-3-ρουτινοσίδης, νικοτιφλορίνη)** (ουσία 2).

Το ίζημα που παρέμενε στην κορυφή της στήλης Sephadex LH-20 συλλέχθηκε και διηθήθηκε υπό κενό με MeOH και με μίγματα H₂O-AcOH (15%) και με H₂O. Το διήθημα συμπυκνώθηκε και ζυγίστηκε ΑΑΕ-OZ(4.7mg).

ΚΛΑΣΜΑ ΑΑΕ-OD (33.8mg)

Υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με διαλύτη έκλουσης MeOH:H₂O.

Το κλάσμα ΑΑΕ-OD διαλύθηκε σε H₂O (HPLC) με αναλογία αραιώσης 2mg/ml. Η ακόλουθη κινητή φάση είναι η καταλληλότερη συγκριτικά με άλλες οι οποίες δοκιμάστηκαν.

Πίνακας 7: ΑΑΕ-OD λ_{max}=255nm, 33.8mg

Διάρκεια	Διαλύτης	
0→5min	100% A	Ισοκρατικά
5→10min	100% A → 50% A	Γραμμικά
10→12min	50% A → 35% A	Γραμμικά
12→35min	35% A → 20% A	Γραμμικά
35→40min	20% A → 0% A(100% B)	Γραμμικά

Συλλέχθηκαν 4 κορυφές:

- ΑΑΕ-OD₁ (Rt=21.5min, 1.1mg)
- ΑΑΕ-OD₂ (Rt=21.7min, 0.1mg)
- ΑΑΕ-OD₃ (Rt=22.8min, 1.1mg)
- ΑΑΕ-OD₄ (Rt=28.4min, 0.8mg)

ΚΛΑΣΜΑ ΑΑΕ-OE (37.5mg)

Υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με διαλύτη έκλουσης MeOH:H₂O.

Το κλάσμα ΑΑΕ-OE διαλύθηκε σε H₂O (HPLC) με αναλογία αραιώσης 2mg/ml. Η ακόλουθη κινητή φάση είναι η καταλληλότερη συγκριτικά με άλλες οι οποίες δοκιμάστηκαν.

Πίνακας 8: ΑΑΕ-ΟΕ $\lambda_{\max}=257\text{nm}$, 37.5mg

Διάρκεια	Διαλύτης	
0→5min	100% A	Ισοκρατικά
5→10min	100% A → 60% A	Γραμμικά
10→12min	60% A → 40% A	Γραμμικά
12→35min	40% A → 20% A	Γραμμικά
35→40min	20% A → 0% A (100% B)	Γραμμικά
40→43min	100% B	Ισοκρατικά
43→45min	100% B → 50% B	Γραμμικά
45→50min	50% B	Ισοκρατικά
50→55min	50% B → 0% B (100% A)	Γραμμικά
55→60min	100% A	Ισοκρατικά

Συλλέχθηκαν 8 κορυφές:

- ΑΑΕ-ΟΕ₁ (Rt=21.0min, 0.9mg)
- ΑΑΕ-ΟΕ₂ (Rt=21.7min, 1.1mg)
- ΑΑΕ-ΟΕ₃ (Rt=22.5min, 1.2mg)
- ΑΑΕ-ΟΕ₄ (Rt=24.7min, 1.6mg)
- ΑΑΕ-ΟΕ₅ (Rt=24.9min, 3.4mg)
- ΑΑΕ-ΟΕ₆ (Rt=27.1min, 1.0mg)
- ΑΑΕ-ΟΕ₇ (Rt=30.6min, 0.4mg)
- ΑΑΕ-ΟΕ₈ (Rt=31.0min, 0.8mg)

Η κορυφή ΑΑΕ-ΟΕ₄ (Rt=24.7min, 1.6mg) κατόπιν φασματοσκοπικής μελέτης ταυτοποιήθηκε ως **3'-μεθοξυ-κερκετινο-3-O-(6''-α-L-ραμνοπυρανοσυλ)-β-D-γλυκο-πυρανοσίδης (ναρκισσίνη)** (ουσία 9).

ΚΛΑΣΜΑ ΑΑΕ-ΟΦ (10.1mg)

Υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με διαλύτη έκλουσης MeOH:H₂O.

Το κλάσμα ΑΑΕ-ΟF διαλύθηκε σε H₂O (HPLC) με αναλογία αραιώσης 2mg/ml. Η ακόλουθη κινητή φάση είναι η καταλληλότερη συγκριτικά με άλλες οι οποίες δοκιμάστηκαν.

Πίνακας 9: ΑΑΕ-ΟF λ_{max}=255nm, 10.1mg

Διάρκεια	Διαλύτης	
0→5min	100% A	Ισοκρατικά
5→10min	100% A → 50% A	Γραμμικά
10→30min	50% A → 20% A	Γραμμικά
30→35min	20% A → 0% A (100% B)	Γραμμικά
35→40min	100% B	Ισοκρατικά
40→45min	100% B → 50% B	Γραμμικά
45→50min	50% B	Ισοκρατικά
50→55min	50% B → 0% B (100% A)	Γραμμικά
55→60min	100% A	Ισοκρατικά

Συλλέχθηκαν 7 κορυφές:

- ΑΑΕ-ΟF₁ (Rt=20.6min, 1.1mg)
- ΑΑΕ-ΟF₂ (Rt=21.0min, 0.4mg)
- ΑΑΕ-ΟF₃ (Rt=22.2min, 0.4mg)
- ΑΑΕ-ΟF₄ (Rt=23.2min, 0.9mg)
- ΑΑΕ-ΟF₅ (Rt=24.7min, 2.7mg)
- ΑΑΕ-ΟF₆ (Rt=28.1min, 0.3mg)
- ΑΑΕ-ΟF₇ (Rt=29.5min, 0.2mg)

ΚΛΑΣΜΑ ΑΑΕ-ΟG (12.5mg)

Υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με διαλύτη έκλουσης MeOH:H₂O.

Το κλάσμα ΑΑΕ-ΟG διαλύθηκε σε H₂O (HPLC) με αναλογία αραιώσης 1mg/ml. Η ακόλουθη κινητή φάση είναι η καταλληλότερη συγκριτικά με άλλες οι οποίες δοκιμάστηκαν.

Πίνακας 10: ΑΑΕ-ΟΓ $\lambda_{\max}=268\text{nm}$, 12.5mg

Διάρκεια	Διαλύτης	
0→5min	100% A	Ισοκρατικά
5→10min	100% A → 50% A	Γραμμικά
10→12 min	50% A → 40% A	Γραμμικά
12→35min	40% A → 20% A	Γραμμικά
35→40min	20% A → 0% A (100% B)	Γραμμικά
40→43min	100% B	Ισοκρατικά
43→45min	100% B → 50% B	Γραμμικά
45→48min	50% B	Ισοκρατικά
48→55min	50% B → 0% B (100% A)	Γραμμικά
55→60min	100% A	Ισοκρατικά

Συλλέχθηκαν 6 κορυφές:

- ΑΑΕ-ΟΓ₁ (Rt=18.8min, 0.2mg)
- ΑΑΕ-ΟΓ₂ (Rt=19.2min, 0.7mg)
- ΑΑΕ-ΟΓ₃ (Rt=19.9min, 0.4mg)
- ΑΑΕ-ΟΓ₄ (Rt=20.7min, 0.1mg)
- ΑΑΕ-ΟΓ₅ (Rt=22.0min, 0.6mg)
- ΑΑΕ-ΟΓ₆ (Rt=26.4min, 0.4mg)

ΚΛΑΣΜΑ ΑΑΕ-ΟΗ (10.2mg)

Υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με διαλύτη έκλουσης MeOH:H₂O.

Το κλάσμα ΑΑΕ-ΟΗ διαλύθηκε σε H₂O (HPLC) με αναλογία αραίωσης 1mg/ml. Η ακόλουθη κινητή φάση είναι η καταλληλότερη συγκριτικά με άλλες οι οποίες δοκιμάστηκαν.

Πίνακας 11: ΑΑΕ-ΟΗ $\lambda_{\max}=253\text{nm}$, 10.2mg

Διάρκεια	Διαλύτης	
0→5min	100% A	Ισοκρατικά
5→10min	100% A → 50% A	Γραμμικά
10→12min	50% A → 40% A	Γραμμικά
12→35min	40% A → 20% A	Γραμμικά
35→40min	20% A → 0% A (100% B)	Γραμμικά
40→45min	100% B	Ισοκρατικά

Συλλέχθηκαν 4 κορυφές:

- ΑΑΕ-ΟΗ₁ (Rt=18.8min, 0.6mg)
- ΑΑΕ-ΟΗ₂ (Rt=20.7min, 0.4mg)
- ΑΑΕ-ΟΗ₃ (Rt=21.3min, 0.4mg)
- ΑΑΕ-ΟΗ₄ (Rt=22.3min, 0.6mg)

ΚΛΑΣΜΑ ΑΑΕ-Ρ (268.6mg)

Υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης (72.0cm × 2.0cm) επί Sephadex LH-20 με διαλύτη έκλουσης MeOH. Ελήφθησαν 317 κλάσματα μέσου όγκου: (1, 15ml), (2→301, 1ml), (302→314, 4ml), (315→316, 25ml) και τέλος για τον καθαρισμό της στήλης Sephadex LH-20 καταναλώθηκαν επιπλέον 450ml MeOH (κλάσμα 317), τα οποία κατόπιν ελέγχου με αναλυτική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) συνενώθηκαν στις ακόλουθες ομάδες:

- ✓ ΑΑΕ-ΡΑ (1→134, 23.9mg)
- ✓ ΑΑΕ-ΡΒ (135→159, 5.8mg)
- ✓ ΑΑΕ-ΡC (160→189, 4.4mg)
- ✓ ΑΑΕ-ΡD (190→219, 20.5 mg)
- ✓ ΑΑΕ-ΡE (220→239, 25.4mg)
- ✓ ΑΑΕ-ΡF (240→315, 74.5mg)
- ✓ ΑΑΕ-ΡG (316→317, 3.7mg)

Το ίζημα που παρέμενε στην κορυφή στις στήλης Sephadex LH-20 συλλέχθηκε και διηθήθηκε υπό κενό με MeOH και με μίγματα H₂O-AcOH (15%) και με H₂O. Το διήθημα συμπυκνώθηκε και ζυγίστηκε AAE-PZ (16.9mg).

ΚΛΑΣΜΑ AAE-PD (20.5mg)

Υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με διαλύτη έκλουσης MeOH:H₂O.

Το κλάσμα AAE-PD διαλύθηκε σε H₂O (HPLC) με αναλογία αραιώσης 2mg/ml. Η ακόλουθη κινητή φάση είναι η καταλληλότερη συγκριτικά με άλλες οι οποίες δοκιμάστηκαν.

Πίνακας 12: AAE-PD $\lambda_{\max}=255\text{nm}$, 20.5mg

Διάρκεια	Διαλύτης	
0→5min	100% A	Ισοκρατικά
5→10min	100% A → 50% A	Γραμμικά
10→30min	50% A → 20% A	Γραμμικά
30→35min	20% A → 0% A (100% B)	Γραμμικά
35→40min	100% B	Ισοκρατικά
40→45min	100% B → 50% B	Γραμμικά
45→50min	50% B	Ισοκρατικά
50→55min	50% B → 0% B (100% A)	Γραμμικά
55→60min	100% A	Ισοκρατικά

Συλλέχθηκαν 10 κορυφές:

- AAE-PD1 (Rt=19.9min, 0.2mg)
- AAE-PD2 (Rt=20.1min, 0.4mg)
- AAE-PD3(Rt=21.0min, 0.5mg)
- AAE-PD4(Rt=21.9min, 0.4mg)
- AAE-PD5 (Rt=23.1min, 7.4mg)
- AAE-PD6 (Rt=25.7min, 0.9mg)
- AAE-PD7 (Rt=26.1min, 0.4mg)
- AAE-PD8 (Rt=26.7min, 0.4mg)
- AAE-PD9 (Rt=28.1min, 0.6mg)
- AAE-PD10 (Rt=30.2min, 0.2mg)

ΚΛΑΣΜΑ ΑΑΕ-PD₅ (7.4mg)

Υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με διαλύτη έκλουσης MeOH:H₂O.

Το κλάσμα ΑΑΕ-PD₅ διαλύθηκε σε H₂O (HPLC) με αναλογία αραιώσης 2mg/ml. Η ακόλουθη κινητή φάση είναι η καταλληλότερη συγκριτικά με άλλες οι οποίες δοκιμάστηκαν.

Πίνακας 13: ΑΑΕ-PD₅ λ_{max}=255nm, 5.0mg

Διάρκεια	Διαλύτης	
0→3min	100% A	Ισοκρατικά
3→5min	100% A → 60% A	Γραμμικά
5→12min	60% A	Ισοκρατικά
12→15min	60% A → 30% A	Γραμμικά
15→25min	30% A → 0% A (100% B)	Γραμμικά
25→28min	100% B	Ισοκρατικά

Συλλέχθηκαν 2 κορυφές:

- ΑΑΕ-PD₅₋₁ (Rt=20.2min, 0.5mg)
- ΑΑΕ-PD₅₋₂ (Rt=21.2min, 1.9mg)

ΚΛΑΣΜΑ ΑΑΕ-PE (25.4mg)

Υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με διαλύτη έκλουσης MeOH:H₂O.

Το κλάσμα ΑΑΕ-PE διαλύθηκε σε H₂O (HPLC) με αναλογία αραιώσης 2mg/ml. Η ακόλουθη κινητή φάση είναι η καταλληλότερη συγκριτικά με άλλες οι οποίες δοκιμάστηκαν.

Πίνακας 14: ΑΑΕ-ΡΕ λ_{max}=255nm, 25.4mg

Διάρκεια	Διαλύτης	
0→5min	100% Α	Ισοκρατικά
5→10min	100% Α → 50% Α	Γραμμικά
10→35min	50% Α → 20% Α	Γραμμικά
35→40min	20% Α → 0% Α (100% Β)	Γραμμικά
40→45min	100% Β	Ισοκρατικά
45→50min	100% Β → 50% Β	Γραμμικά
50→55min	50% Β → 0% Β (100% Α)	Γραμμικά
55→60min	100% Α	Ισοκρατικά

Συλλέχθηκαν 6 κορυφές:

- ΑΑΕ-ΡΕ₁ (Rt=21.4min, 0.4mg)
- ΑΑΕ-ΡΕ₂ (Rt=22.7min, 0.8mg)
- ΑΑΕ-ΡΕ₃ (Rt=24.0min, 1.1mg)
- ΑΑΕ-ΡΕ₄ (Rt=25.2min, 0.5mg)
- ΑΑΕ-ΡΕ₅ (Rt=29.6min, 0.2mg)
- ΑΑΕ-ΡΕ₆ (Rt=31.3min, 0.5mg)

ΚΛΑΣΜΑ ΑΑΕ-ΡΕ (74,5mg / καταναλώθηκαν μόνο τα 32.9mg)

Υποβλήθηκε σε γρήγη χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με διαλύτη έκλουσης MeOH:H₂O (2% AcOH).

Το κλάσμα ΑΑΕ-ΡΕ διαλύθηκε σε Η₂O (HPLC) με αναλογία αραιώσης 2mg/ml. Η ακόλουθη κινητή φάση είναι η καταλληλότερη συγκριτικά με άλλες οι οποίες δοκιμάστηκαν.

Πίνακας 15: ΑΑΕ-PF $\lambda_{\max}=255\text{nm}$, 32.9mg

Διάρκεια	Διαλύτης	
0→5min	100% A	Ισοκρατικά
5→10min	100% A → 50% A	Γραμμικά
10→30min	50% A → 20% A	Γραμμικά
30→35min	20% A → 0% A (100% B)	Γραμμικά
35→40min	100% B	Ισοκρατικά
40→45min	100% B → 50% B	Γραμμικά
45→50min	50% B	Ισοκρατικά
50→55min	50% B → 0% B (100% A)	Γραμμικά
55→60min	100% A	Ισοκρατικά

Συλλέχθηκαν 4 κορυφές:

- ΑΑΕ-PF₁ (Rt=26.8min, 0.4mg)
- ΑΑΕ-PF₂ (Rt=28.4min, 0.8mg)
- ΑΑΕ-PF₃ (Rt=29.1min, 1.1mg)
- ΑΑΕ-PF₄ (Rt=34.0min, 0.5mg)

Η κορυφή ΑΑΕ-PF₂ (Rt=28.4min, 0.8mg), κατόπιν φασματοσκοπικής μελέτης ταυτοποιήθηκε ως **κερκετινο-3-O-β-D-γλυκοκυρανοσίδης (ισοκερκετρίνη)** (ουσία 5), ενώ η κορυφή ΑΑΕ-PF₃ (Rt=29.1min, 1.1mg) ταυτοποιήθηκε ως μίγμα των ενώσεων **κερκετινο-3-O-β-D-γλυκοκυρανοσίδης (ισοκερκετρίνη)** (ουσία 5) και **3'-μεθοξυ-κερκετινο-3-O-εξοσίδης (ισοραμνετινο-3-O-εξοσίδης)** (ουσία 8) (βλεπ. σελ. 223).

ΚΛΑΣΜΑ ΑΑΕ-Q (245.0mg)

Χωρίστηκε σε 16 ίσα μέρη και το καθένα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης (65.0cm × 1.5cm) επί Sephadex LH-20 με διαλύτη έκλουσης MeOH και κάθε φορά λαμβάνονταν 17 κλάσματα τα οποία κατόπιν ελέγχου με αναλυτική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) συνενώθηκαν στις ακόλουθες ομάδες:

- ✓ ΑΑΕ-QA (3→6, 16.5mg)
- ✓ ΑΑΕ-QB (7→11, 53.1mg)
- ✓ ΑΑΕ-QC (12→14, 114.1mg)
- ✓ ΑΑΕ-QD (15→17, 15.5mg)

ΚΛΑΣΜΑ ΑΑΕ-QA (16.5mg)

Υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης (50.0cm × 1.5cm) επί Sephadex LH-20 με διαλύτη έκλουσης MeOH. Ελήφθησαν 52 κλάσματα μέσου όγκου: (1→17, 1ml), (18→23, 2ml), (24→37, 2ml) (38→51, 2ml) και τέλος για τον καθαρισμό της στήλης Sephadex LH-20 καταναλώθηκαν επιπλέον 150ml MeOH (κλάσμα 52), τα οποία κατόπιν ελέγχου με αναλυτική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) συνενώθηκαν στις ακόλουθες ομάδες:

- ✓ ΑΑΕ-QA₁ (1→17, 5.6mg)
- ✓ ΑΑΕ- QA₂ (18→23, 1.8mg)
- ✓ ΑΑΕ- QA₃ (24→51, 4.6mg)
- ✓ ΑΑΕ- QA₄ (52, 1.1mg)

Το κλάσμα ΑΑΕ- QA₂ (1.8mg) κατόπιν φασματοσκοπικής μελέτης ταυτοποιήθηκαν ως μίγμα των ουσιών: **καιμπφερολο-3-O-β-D-γλυκοπυρανοσίδης (αστραγαλίνη)** (ουσία 3) και **3'-μεθοξυ-κερκετινο-3-O-β-D-γλυκοπυρανοσίδης (ισοραμνετινο-3-O-γλυκοσίδης)** (ουσία 7).

ΚΛΑΣΜΑ ΑΑΕ-QB (53.1mg)

Υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με διαλύτη έκλουσης MeOH:H₂O.

Το κλάσμα ΑΑΕ-QB διαλύθηκε σε H₂O (HPLC) με αναλογία αραιώσης 1mg/ml. Η ακόλουθη κινητή φάση είναι η καταλληλότερη συγκριτικά με άλλες οι οποίες δοκιμάστηκαν.

Πίνακας 16: ΑΑΕ-QB λ_{max}=250nm, 53.1mg

Διάρκεια	Διαλύτης	
0→5min	100% A	Ισοκρατικά
5→25min	100% A → 50% A	Γραμμικά
25→60min	50% A → 0% A (100% B)	Γραμμικά
60→65min	100% B	Ισοκρατικά

Συλλέχθηκαν 2 κορυφές:

- AAE-QB₁ (Rt= 43.9min, 0.8mg)
- AAE-QB₂ (Rt=46.5min, 1.5mg)

ΚΛΑΣΜΑ AAE-QC (114.1mg)

Υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με διαλύτη έκλουσης MeOH:H₂O.

Το κλάσμα AAE-QC διαλύθηκε σε H₂O (HPLC) με αναλογία αραιώσης 1mg/ml. Η ακόλουθη κινητή φάση είναι η καταλληλότερη συγκριτικά με άλλες οι οποίες δοκιμάστηκαν.

Πίνακας 17: AAE-QC λ_{max}=266nm, 114.1mg

Διάρκεια	Διαλύτης	
0→5min	100% A	Ισοκρατικά
5→25min	100% A → 50% A	Γραμμικά
25→60min	50% A → 0% A (100% B)	Γραμμικά
60→65min	100% B	Ισοκρατικά

Συλλέχθηκαν 2 κορυφές:

- AAE-QC₁ (Rt=42.1min, 4.6mg)
- AAE-QC₂ (Rt=48.7min, 1.3mg)

ΚΛΑΣΜΑ AAE-QD (15.5mg)

Υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με διαλύτη έκλουσης MeOH:H₂O.

Το κλάσμα AAE-QD διαλύθηκε σε H₂O (HPLC) με αναλογία αραιώσης 1mg/ml. Η ακόλουθη κινητή φάση είναι η καταλληλότερη συγκριτικά με άλλες οι οποίες δοκιμάστηκαν.

Πίνακας 18: AAE-QD $\lambda_{\max}=256\text{nm}$, 15.5mg

Διάρκεια	Διαλύτης	
0→5min	100% A	Ισοκρατικά
5→25min	100% A → 50% A	Γραμμικά
25→60min	50% A → 0% A (100% B)	Γραμμικά
60→65min	100% B	Ισοκρατικά

Συλλέχθηκαν 2 κορυφές:

- AAE-QD₁ (Rt=44.2min, 3.8mg)
- AAE-QD₂ (Rt=46.8min, 1.3mg)

ΚΛΑΣΜΑ AAE-R (164.8mg)

Υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης (70.0cm × 2.0cm) επί Sephadex LH-20 με διαλύτη έκλουσης MeOH. Ελήφθησαν 267 κλάσματα μέσου όγκου: (1, 30ml), (2, 20ml), (3→265, 1ml), (266, 50ml) και τέλος για τον καθαρισμό της στήλης Sephadex LH-20 καταναλώθηκαν επιπλέον 400ml MeOH (κλάσμα 267), τα οποία κατόπιν ελέγχου με αναλυτική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) συνενώθηκαν στις ακόλουθες ομάδες:

- ✓ AAE-RA (1→84, 23.7mg)
- ✓ AAE-RB (85→130, 1.4mg)
- ✓ AAE-RC (131→174, 3.1mg)
- ✓ AAE-RD (175→215, 8.2mg)
- ✓ AAE-RE (216→235, 8.3mg)
- ✓ AAE-RF (236→260, 5.9mg)
- ✓ AAE-RG (261→267, 3.8mg)

Το ίζημα που παρέμενε στην κορυφή της στήλης Sephadex LH-20 συλλέχθηκε και διηθήθηκε υπό κενό με MeOH και με μίγματα H₂O-AcOH (15%) και με H₂O. Το διήθημα συμπυκνώθηκε και ζυγίστηκε AAE-RZ (22.8mg). Κατόπιν δημιουργήθηκε υδατικό διάλυμα σταθερής συγκέντρωσης 2mg/ml και υποβλήθηκε σε HPLC.

ΚΛΑΣΜΑ ΑΑΕ-RE (8.3mg)

Υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με διαλύτη έκλουσης MeOH:H₂O.

Το κλάσμα ΑΑΕ-RE διαλύθηκε σε H₂O (HPLC) με αναλογία αραίωσης 2mg/ml. Η ακόλουθη κινητή φάση είναι η καταλληλότερη συγκριτικά με άλλες οι οποίες δοκιμάστηκαν.

Πίνακας 19: ΑΑΕ-RE λ_{max}=259nm, 8.3mg

Διάρκεια	Διαλύτης	
0→5min	100% A	Ισοκρατικά
5→25min	100% A → 50% A	Γραμμικά
25→60min	50% A → 0% A (100% B)	Γραμμικά
60→65min	100% B	Ισοκρατικά

Συλλέχθηκαν 6 κορυφές:

- ΑΑΕ-RE₁ (Rt=31.3min, 0.3mg)
- ΑΑΕ-RE₂ (Rt=34.1min, 0.2mg)
- ΑΑΕ-RE₃ (Rt=36.2min, 1.7mg)
- ΑΑΕ-RE₄ (Rt=39.5min, 0.3mg)
- ΑΑΕ-RE₅ (Rt=40.6min, 0.5mg)
- ΑΑΕ-RE₆ (Rt=41.4min, 0.3mg)

Η κορυφή ΑΑΕ-RE₃ (Rt=36.2min, 1.7mg), κατόπιν φασματοσκοπικής μελέτης ταυτοποιήθηκε ως μίγμα των ενώσεων **κερκετινο-3-O-β-D-γλυκοκυρανοσίδης (ισοκερκιτρίνη)** (ουσία 5) και **κερκετινο-3-O-εξοσίδης** (ουσία 6).

ΚΛΑΣΜΑ ΑΑΕ-RF (5.9mg)

Υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με διαλύτη έκλουσης MeOH:H₂O.

Το κλάσμα ΑΑΕ-RF διαλύθηκε σε H₂O (HPLC) με αναλογία αραιώσης 2mg/ml. Η ακόλουθη κινητή φάση είναι η καταλληλότερη συγκριτικά με άλλες οι οποίες δοκιμάστηκαν.

Πίνακας 20: ΑΑΕ-RF λ_{max}=255nm, 5.9mg

Διάρκεια	Διαλύτης	
0→5min	100% A	Ισοκρατικά
5→25min	100% A → 50% A	Γραμμικά
25→60min	50% A → 0% A (100% B)	Γραμμικά
60→65min	100% B	Ισοκρατικά

Συλλέχθηκαν 5 κορυφές:

- ΑΑΕ-RF₁ (Rt=32.0min, 0.5mg)
- ΑΑΕ-RF₂ (Rt=37.0min, 2.1mg)
- ΑΑΕ-RF₃ (Rt=40.4min, 0.5mg)
- ΑΑΕ-RF₄ (Rt=41.4min, 0.5mg)
- ΑΑΕ-RF₅ (Rt=42.2min, 0.4mg)

Η κορυφή ΑΑΕ-RF₂ (Rt=37.0min, 2.1mg) κατόπιν φασματοσκοπικής μελέτης, ταυτοποιήθηκε ως **κερκετινο-3-O-εξοσίδης** (ουσία **6**).

ΚΛΑΣΜΑ ΑΑΕ-RG (3.8mg)

Υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με διαλύτη έκλουσης MeOH:H₂O.

Το κλάσμα ΑΑΕ-RG διαλύθηκε σε H₂O (HPLC) με αναλογία αραιώσης 2mg/ml. Η ακόλουθη κινητή φάση είναι η καταλληλότερη συγκριτικά με άλλες οι οποίες δοκιμάστηκαν.

Πίνακας 21: ΑΑΕ-RF $\lambda_{\max}=255\text{nm}$, 3.8mg

Διάρκεια	Διαλύτης	
0→5min	100% A	Ισοκρατικά
5→25min	100% A → 50% A	Γραμμικά
25→60min	50% A → 0% A (100% B)	Γραμμικά
60→65min	100% B	Ισοκρατικά

Συλλέχθηκαν 4 κορυφές:

- ΑΑΕ-RG₁ (Rt=34.4min, 0.1mg)
- ΑΑΕ-RG₂ (Rt=36.4min, 0.8mg)
- ΑΑΕ-RG₃ (Rt=38.1min, 0.5mg)
- ΑΑΕ-RG₄ (Rt=44.2min, 0.4mg)

ΚΛΑΣΜΑ ΑΑΕ-RZ (22.8mg)

Υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με διαλύτη έκλουσης MeOH:H₂O.

Το κλάσμα ΑΑΕ-RZ διαλύθηκε σε H₂O (HPLC) με αναλογία αραίωσης 2mg/ml. Η ακόλουθη κινητή φάση είναι η καταλληλότερη συγκριτικά με άλλες οι οποίες δοκιμάστηκαν.

Πίνακας 22: ΑΑΕ-RZ $\lambda_{\max}=257\text{nm}$, 22.8mg

Διάρκεια	Διαλύτης	
0→5min	100% A	Ισοκρατικά
5→25min	100% A → 50% A	Γραμμικά
25→60min	50% A → 0% A (100% B)	Γραμμικά
60→65min	100% B	Ισοκρατικά

Συλλέχθηκαν 4 κορυφές:

- ΑΑΕ-RZ₁ (Rt=18.2min, 0.3mg)
- ΑΑΕ-RZ₂ (Rt=21.5min, 0.5mg)
- ΑΑΕ-RZ₃ (Rt=23.0min, 1.4mg)
- ΑΑΕ-RZ₄ (Rt=24.7min, 0.5mg)

Η κορυφή AAE-RZ₃ (Rt=23.0min, 1.4mg), κατόπιν φασματοσκοπικής μελέτης ταυτοποιήθηκε ως μίγμα των ενώσεων **κερκετινο-3-O-β-D-γλυκοκυρανοσίδης (ισοκερκετρίνη)** (ουσία 5) και **κερκετινο-3-O-εξοσίδης** (ουσία 6).

ΚΛΑΣΜΑ AAE-S'(247.8mg)

Υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης (68.0cm × 2.0cm) επί Sephadex LH-20 με διαλύτη έκλουσης MeOH. Ελήφθησαν 267 κλάσματα μέσου όγκου: (1→2, 30ml), (3→267, 1ml) και τέλος για τον καθαρισμό της στήλης Sephadex LH-20 καταναλώθηκαν επιπλέον 400ml MeOH (κλάσμα 268), τα οποία κατόπιν ελέγχου με αναλυτική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) συνενώθηκαν στις ακόλουθες ομάδες:

- ✓ AAE-S'A (1→6, 20.0mg)
- ✓ AAE-S'B (7→79, 3.9mg)
- ✓ AAE-S'C (80→125, 5.7mg)
- ✓ AAE-S'D (126→154, 7.5mg)
- ✓ AAE-S'E (155→185, 7.3mg)
- ✓ AAE-S'F (186→187, 2.1mg)
- ✓ AAE-S'G (190→229, 2.8mg)
- ✓ AAE-S'H (230→245, 1.6mg)
- ✓ AAE-S'I (246→267, 4.8mg)

Το ίζημα που παρέμενε στην κορυφή στις στήλης Sephadex LH-20 συλλέχθηκε και διηθήθηκε υπό κενό με MeOH και με μίγματα H₂O-AcOH (15%) και με H₂O. Το διήθημα συμπυκνώθηκε και ζυγίστηκε AAE-S'Z (29.7mg).

ΚΛΑΣΜΑ AAE- S'E (7.3mg)

Υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με διαλύτη έκλουσης MeOH:H₂O.

Το κλάσμα AAE-S'E διαλύθηκε σε H₂O (HPLC) με αναλογία αραιώσης 3mg/ml. Η ακόλουθη κινητή φάση είναι η καταλληλότερη συγκριτικά με άλλες οι οποίες δοκιμάστηκαν.

Πίνακας 23: ΑΑΕ-S'E λ_{max}=258nm 7.3mg

Διάρκεια	Διαλύτης	
0→5min	100% A	Ισοκρατικά
5→10min	100% A → 50% A	Γραμμικά
10→15min	50% A→35%A	Γραμμικά
15→35min	35% A → 20% A	Γραμμικά
35→40min	20% A→ 0% A (100% B)	Γραμμικά
40→43min	100% B	Ισοκρατικά

Συλλέχθηκαν 6 κορυφές:

- ΑΑΕ-S'E₁ (Rt=30.9min, 0.3mg)
- ΑΑΕ-S'E₂ (Rt=35.7min, 0.5mg)
- ΑΑΕ-S'E₃ (Rt=39.7min, 0.3mg)
- ΑΑΕ-S'E₄ (Rt=40.7min, 0.6mg)
- ΑΑΕ-S'E₅ (Rt=42.0min, 0.4mg)
- ΑΑΕ-S'E₆ (Rt=43.4min, 0.2mg)

ΚΛΑΣΜΑ ΑΑΕ-U (86.0mg)

Υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης (67.0cm × 2.0cm) επί Sephadex LH-20 με διαλύτη έκλουσης MeOH. Ελήφθησαν 267 κλάσματα μέσου όγκου: (1→2, 60ml), (3→248, 1ml) και τέλος για τον καθαρισμό της στήλης Sephadex LH-20 καταναλώθηκαν επιπλέον 350ml MeOH (κλάσμα 249), τα οποία κατόπιν ελέγχου με αναλυτική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) συνενώθηκαν στις ακόλουθες ομάδες:

- ✓ ΑΑΕ-UA (1→62, 20.0mg)
- ✓ ΑΑΕ-UB (63→69, 10.0mg)
- ✓ ΑΑΕ-UC (70→99, 11.0mg)
- ✓ ΑΑΕ-UD (100→142, 16.0mg)
- ✓ ΑΑΕ-UE (143→174, 12.0mg)
- ✓ ΑΑΕ-UF (175→209, 13.0mg)
- ✓ ΑΑΕ-UG (210→237, 9.0mg)
- ✓ ΑΑΕ-UH (238→245, 9.0mg)
- ✓ ΑΑΕ-UI (246→249, 19.0mg)

ΚΛΑΣΜΑ AAE-V (82.7mg)

Υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης (66.0cm × 2.0cm) επί Sephadex LH-20 με διαλύτη έκλουσης MeOH. Ελήφθησαν 203 κλάσματα μέσου όγκου: (1, 50ml), (2, 15ml), (3→202, 1ml) και τέλος για τον καθαρισμό της στήλης Sephadex LH-20 καταναλώθηκαν επιπλέον 350ml MeOH (κλάσμα 203), τα οποία κατόπιν ελέγχου με αναλυτική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) συνενώθηκαν στις ακόλουθες ομάδες:

- ✓ AAE-VA (1→39, 10.9mg)
- ✓ AAE-VB (40→100, 2.8mg)
- ✓ AAE-VC (101→119, 0.2mg)
- ✓ AAE-VD (120→151, 0.2 mg)
- ✓ AAE-VE (152→174, 6.5mg)
- ✓ AAE-VF (175→196, 0.3mg)
- ✓ AAE-VG (197→203, 0.9mg)

Το ίζημα που παρέμενε στην κορυφή της στήλης Sephadex LH-20 συλλέχθηκε και διηθήθηκε υπό κενό με MeOH και με μίγματα H₂O-AcOH (15%) και με H₂O. Το διήθημα συμπυκνώθηκε και ζυγίστηκε AAE-VZ (8.1mg).

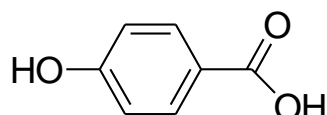


Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Γ.1.1. Ουσία 1: *p*-υδροξυ-βενζοϊκό οξύ

Η ουσία **1** απομονώθηκε ως κόνις λευκού χρώματος, αλλά και σε μίγμα με την ουσία **2** (βανιλλικό οξύ) και ταυτοποιήθηκε ως *p*-υδροξυ-βενζοϊκό οξύ κατόπιν φασματοσκοπικής μελέτης ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, COSY, HSQC, HMBC και ESI-MS). Για τη λήψη των φασμάτων $^{13}\text{C-NMR}$, COSY, HSQC και HMBC χρησιμοποιήθηκε το κλάσμα που περιείχε το μίγμα των ουσιών **1** και **2**.



Έχει απομονωθεί από πληθώρα φυτών που ανήκουν σε διάφορες οικογένειες όπως *Anastatica hierochuntica* Brassicaceae (Nakashima *et al.*, 2010), *Daucus carota* Apiaceae, *Elaeis guineensis* Arecaceae, *Vitis vinifera* Vitaceae, *Fagara macrophylla* Rutaceae, *Xanthophyllum rubescens* Polygalaceae, *Tabebuia impetiginosa* Bignoniaceae, *Pterocarpus santalinus* Fabaceae, *Catalpa bignonioides* Bignoniaceae, *Vitex negundo* Lamiaceae, *Areca catechu* Arecaceae, *Roystonea regia* Arecaceae, *Mespilus germanica* Rosaceae (Khadem και Marles, 2010), *Synsepalum dulcificum* Daniell Sapotaceae (Chen *et al.*, 2010), *Lantana trifolia* L. Verbenaceae (Julião *et al.*, 2010), *Vitex agnus-castus* Linn. Verbenaceae (Azizuddin *et al.*, 2010), *Siraitia grosvenorii* Swingle Cucurbitaceae (Zheng *et al.*, 2011), *Carica papaya* L. Caricaceae (Zhou *et al.*, 2011), *Equisetum debile* Roxb. Equisetaceae (Tan *et al.*, 2011), *Hygroryza aristata* Gramineae (Chung *et al.*, 2011), *Murraya paniculata* Rutaceae (Saeed *et al.*, 2011), *Erythrina sigmoidea* Hua Fabaceae (Ali *et al.*, 2011), *Apocynum venetum* Apocynaceae (Eshbakova *et al.*, 2011), *Hylomecon vernalis* Papaveraceae (Lee *et al.*, 2012), *Plantago asiatica* L. Plantaginaceae (Amakura *et al.*, 2012), *Rhodiola crenulata* Crassulaceae (Yang *et al.*, 2012), *Penicillium expansum* Euphorbiaceae (Wang *et al.*, 2012), *Sarcopyramis bodinieri* var. *delicate* Melastomataceae (Wan *et al.*, 2012), *Cinnamomum burmanii* Lauraceae (Chen *et al.*, 2012), *Zanthoxylum armatum* DC Rutaceae (Guo *et al.*, 2012), *Cymbidium* Great Flower Marie Laurencin Orchidaceae (Yoshikawa *et al.*, 2013), *Blumea balsamifera* Compositae (Tan *et al.*, 2013), *Hippophae rhamnoides* Elaeagnaceae (Yang *et al.*, 2013), *Carya cathayensis* Juglandaceae (Wu *et al.*, 2013).

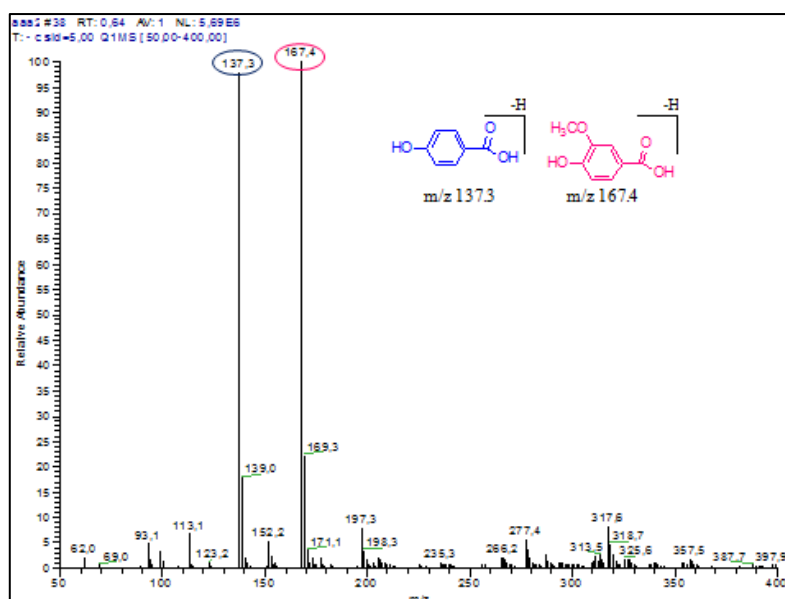
Το *p*-υδροξυ-βενζοϊκό οξύ εμφανίζει αντιμυκητιακή, αντι-μεταλλαξιογόνο, αντι-δρεπανοτική, οιστρογονική και αντιμικροβιακή δράση (Khadem και Marles, 2010).

Το *p*-υδροξυ-βενζοϊκό οξύ είναι ο κύριος μεταβολίτης των parabens τα οποία χρησιμοποιούνται ως συντηρητικά σε καλλυντικά σκευάσματα. Έχει βρεθεί ότι ο μεταβολίτης αυτός θεωρείται υπεύθυνος για την εμφάνιση καρκίνου του μαστού (Pugazhendhi *et al.*, 2005).

Η ένωση αυτή και κυρίως οι εστέρες, χρησιμοποιούνται ως συντηρητικά τροφίμων και καλλυντικών, λόγω της χαμηλής τους τοξικότητας (Μαλαματάρης, 2004).

ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Το φάσμα μάζας (ESI-MS) του μίγματος των ουσιών **1** (*p*-υδροξυ-βενζοϊκό οξύ) και **2** (βανιλλικό οξύ) έδειξε δυο κορυφές στα *m/z* 137.3 και 167.4 που αντιστοιχούν στα μοριακά ιόντα $[M-H]^-$ των ουσιών και συμφωνούν με τους μοριακούς τύπους $C_7H_6O_3$ και $C_8H_8O_4$ των ουσιών **1** και **2**, αντίστοιχα.



Εικόνα 12: Φάσμα μάζας (ESI-MS) του μίγματος των ουσιών **1** (■) και **2** (■)

Κατά τη φασματοσκοπική εξέταση της ουσίας **1** διαπιστώθηκε ότι στην αρωματική περιοχή του φάσματος 1H -NMR παρατηρούνται τα σήματα του δακτυλίου της φαινόλης που σχηματίζουν σύστημα AA'BB', γεγονός που υποδηλώνει ότι σε θέση *p*- υπάρχει υποκατάσταση. Έτσι, σε δ 7.86 ως διπλή κορυφή ($J=8.5$ Hz) εμφανίζονται τα πρωτόνια H-2 και H-6. Σε δ 6.79 ως διπλή κορυφή ($J=8.5$ Hz) εμφανίζονται τα πρωτόνια H-3 και H-5.

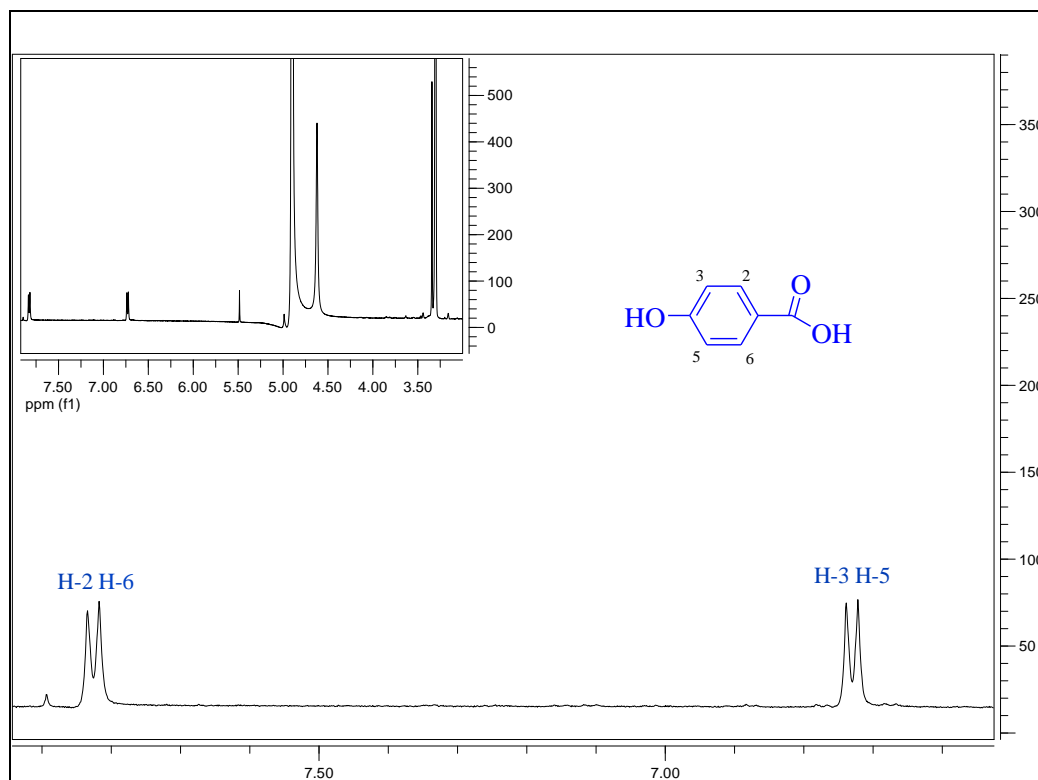
Στο φάσμα COSY εμφανίζονται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των H-2,6/H-3,5 που ουσιαστικά επιβεβαιώνουν τη δομή της ένωσης.

Στο φάσμα HMBC εμφανίζονται οι αλληλεπιδράσεις των πρωτονίων H-2 και H-6 (7.86ppm) με τους άνθρακες C-2 (131.2ppm), C-4 (161.2ppm), C-6 (131.2ppm) και C-7 (170.3ppm) και των πρωτονίων H-3 και H-5 (6.79ppm) με τον άνθρακα C-1 (122.8ppm).

Η σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων με αυτά που βρίσκονται στη βιβλιογραφία (Azizuddin *et al.*, 2010), οδηγούν στην ταυτοποίηση της ουσίας **1**, ως *p*-υδροξυ-βενζοϊκό οξύ.

Πίνακας 24: Πίνακας $^1\text{H-NMR}$ της ουσίας 1 (CD_3OD , 500 MHz)

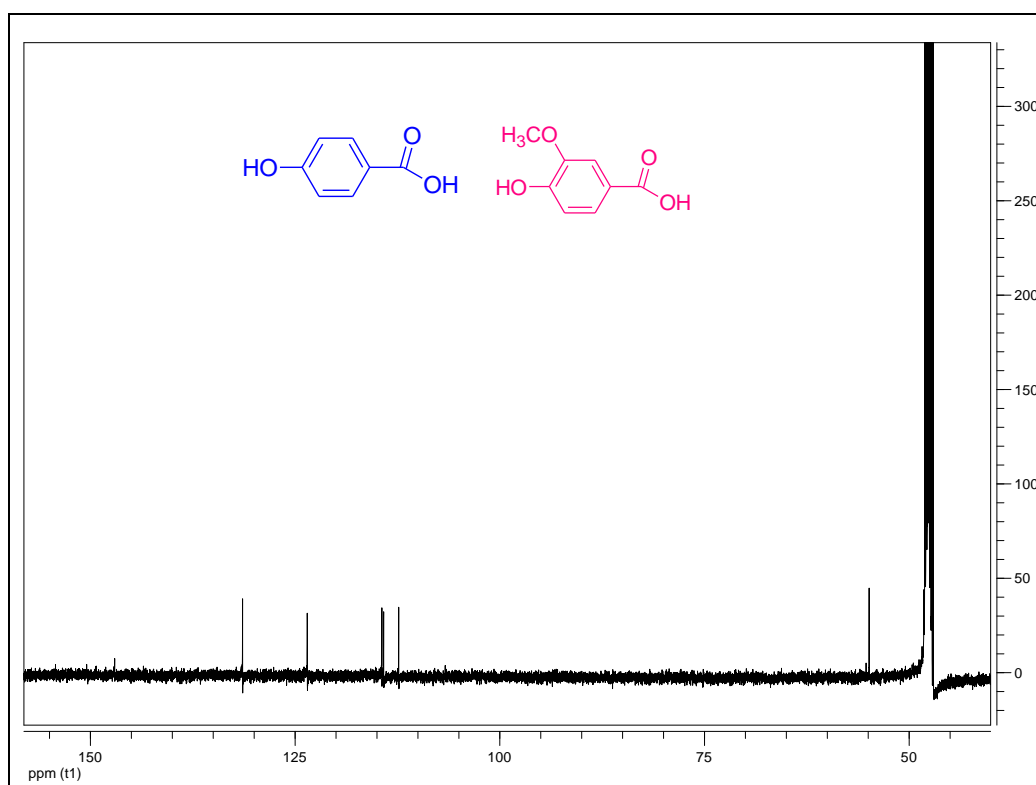
Χημική μετατόπιση δ (ppm)	Αριθμός H	Πολλαπλότητα J (Hz)	Ταυτοποίηση
7.86	2	d (J=8.5)	H-2, H-6
6.79	2	d (J=8.5)	H-3, H-5



Εικόνα 13: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 500 MHz) της ουσίας 1

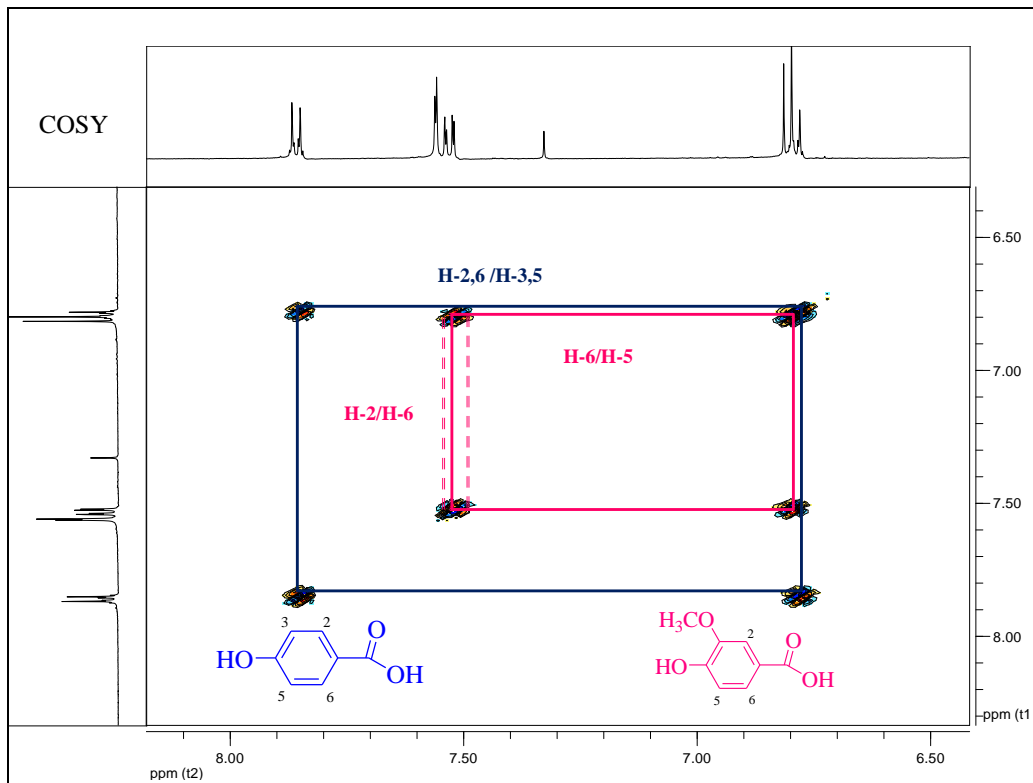
Πίνακας 25: Πίνακας ^{13}C -NMR της ουσίας 1 (CD_3OD , 125 MHz)¹

Χημική μετατόπιση δ (ppm)	Τύπος C	Ταυτοποίηση
131.2	CH	C-2, C-6
114.4	CH	C-3, C-5
161.2	C	C-4
170.3	C	C-7
122.8	C	C-1

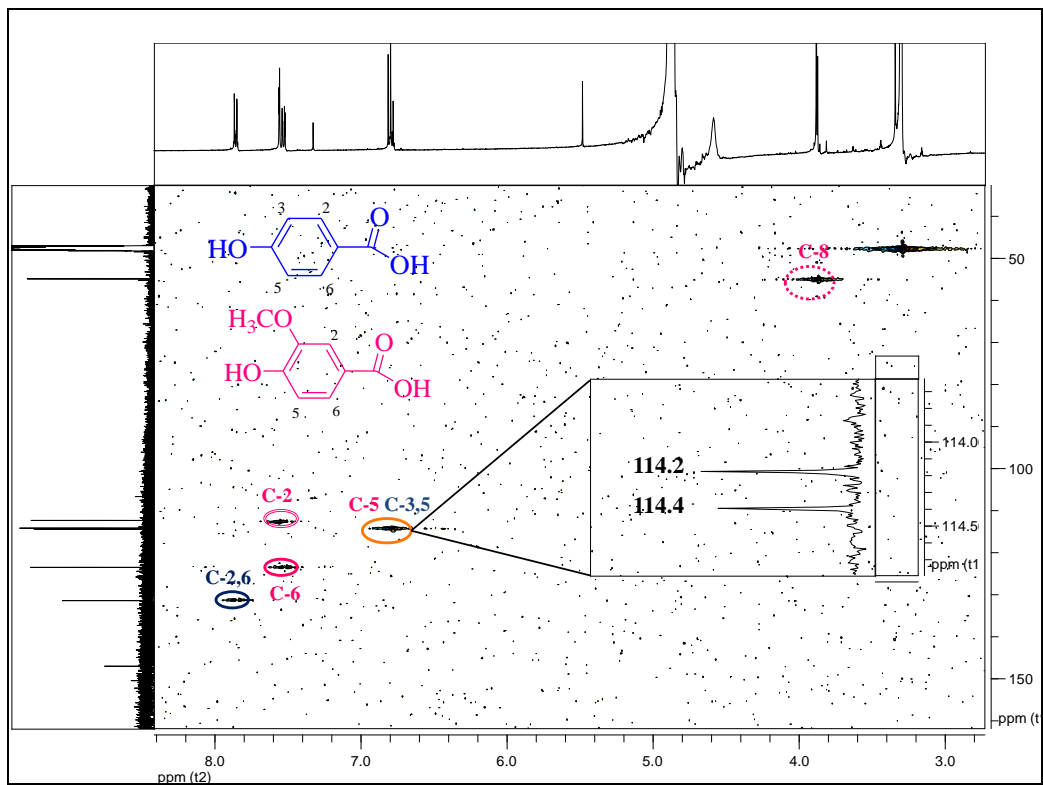


Εικόνα 14: Φάσμα ^{13}C -NMR (CD_3OD , 125 MHz) του μίγματος των ουσιών 1 (■) και 2 (■)

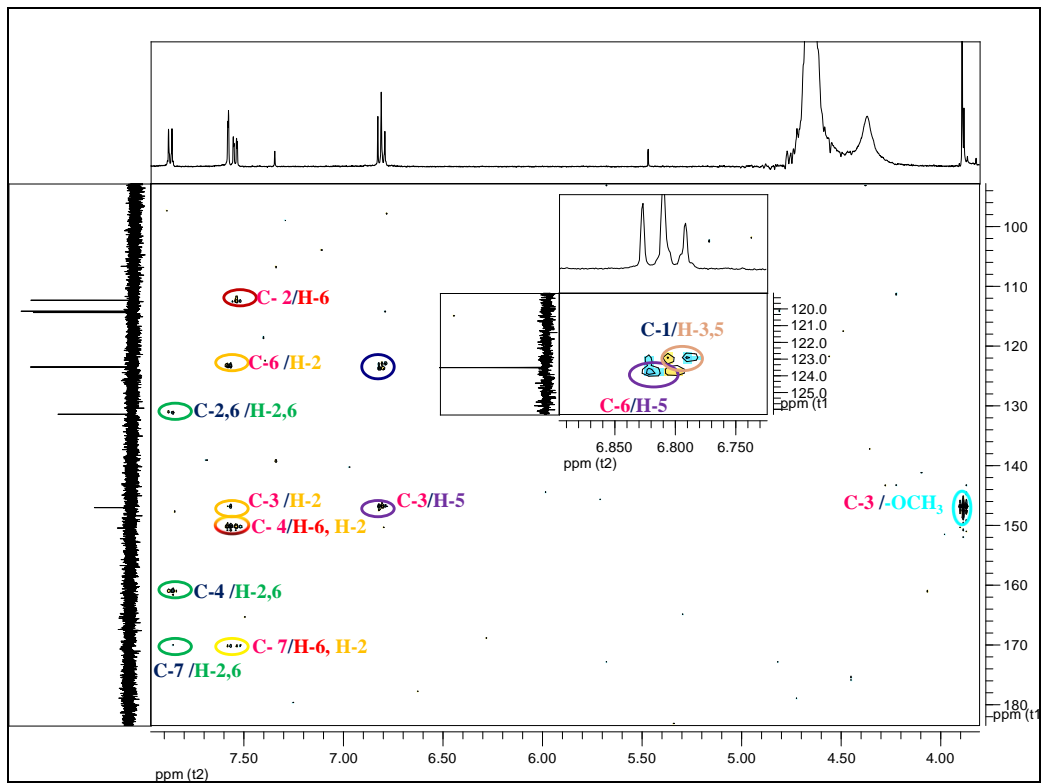
¹Με βάση τα φάσματα ^{13}C -NMR, HSQC και HMBC του μίγματος των ουσιών 1 και 2



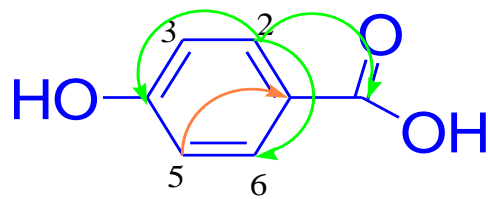
Εικόνα 15: Φάσμα COSY (CD₃OD, 500 MHz) του μίγματος των ουσιών 1 (■) και 2 (■)



Εικόνα 16: Φάσμα HSQC (CD₃OD, 500 MHz) του μίγματος των ουσιών 1 (■) και 2 (■)

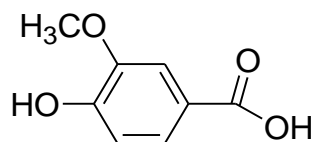


Εικόνα 17: Φάσμα HMBC (CD₃OD, 500 MHz) του μίγματος των ουσιών 1 (■) και 2 (■)



Γ.1.2. Ουσία 2: 3-μεθοξυ-4-υδροξυ-βενζοϊκό οξύ (βανιλλικό οξύ)

Η ουσία 2 απομονώθηκε σε μίγμα με την ουσία 1 (*p*-υδροξυ-βενζοϊκό οξύ) και ταυτοποιήθηκε ως βανιλλικό οξύ κατόπιν φασματοσκοπικής μελέτης (¹H-NMR, ¹³C-NMR, COSY, HSQC, HMBC και ESI-MS).



Έχει απομονωθεί από πληθώρα φυτών που ανήκουν σε διάφορες οικογένειες όπως *Dendrobium chrysotoxum* Orchidaceae (Li *et al.*, 2009), *Anastatica hierochuntica* Brassicaceae (Nakashima *et al.*, 2010), *Millettia leucantha* Leguminosae (Chatsumpun *et al.*, 2010), *Synsepalum dulcificum* Daniell Sapotaceae (Chen *et al.*, 2010), *Amburana cearensis* Fabaceae (Canuto *et al.*, 2010), *Brainea insignis* Blechnaceae (Wang *et al.*, 2010), *Lantana trifolia* L. Verbenaceae (Julião *et al.*, 2010), *Vitex agnus-castus* Linn. Verbenaceae (Azizuddin *et al.*, 2010), *Alnus japonica* Betulaceae, *Elaeagnus pungens* Elaeagnaceae, *Lentinula edodes* Marasmiaceae, *Erica australis* Ericaceae, *Gossypium mexicanum* Malvaceae, *Melia Azedarach* Meliaceae, *Panax ginseng* Araliaceae, *Rosa canina* Rosaceae (Khadem και Marles, 2010), *Quercus ilex* Fagaceae (Karioti *et al.*, 2011), *Aristolochia manshuriensis* Aristolochiaceae (Kang *et al.*, 2011), *Hygroryza aristata* Gramineae (Chung *et al.*, 2011), *Carica papaya* L. Caricaceae (Zhou *et al.*, 2011), *Pterospermum acerifolium* Willd. Sterculiaceae (Dixit *et al.*, 2011), *Plantago asiatica* L. Plantaginaceae (Amakura *et al.*, 2012), *Cinnamomum burmanii* Lauraceae (Chen *et al.*, 2012), *Rhodiola crenulata* Crassulaceae (Yang *et al.*, 2012), *Morinda citrifolia* L. Rubiaceae (Akihisa *et al.*, 2012), *Zingiber officinale* Zingiberaceae (Liao *et al.*, 2012), *Genus Caryopteris* Verbenaceae (Dai *et al.*, 2012), *Casearia grewiifolia* Flacourtiaceae (Rayanil *et al.*, 2012), *Nicotiana tabacum* L. Solanaceae (Chen *et al.*, 2012), *Cymbidium* Great Flower Marie Laurencin Orchidaceae (Yoshikawa *et al.*, 2013), *Hedyosmum brasiliense* Chloranthaceae (Amoaha *et al.*, 2013), *Citrus hystrix* Rutaceae (Panthong *et al.*, 2013), *Sparganium stoloniferum* Buch.-Ham. Typhaceae (Wang *et al.*, 2013) κ.ά.

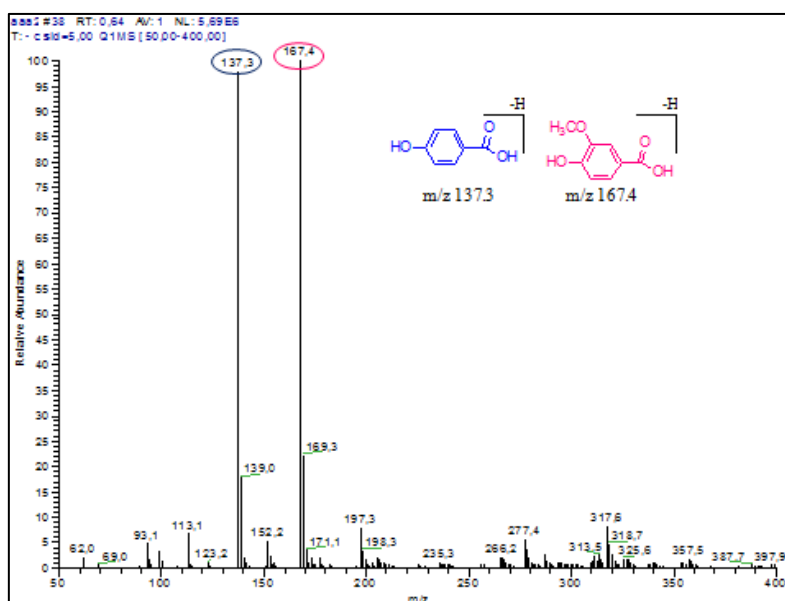
Το βανιλλικό οξύ εμφανίζει αντιδρεπανοτική δράση και ανθελμινθική δράση. Πρόσφατες μελέτες απέδειξαν ότι καταστέλλει την ηπατική ίνωση σε καταστάσεις

χρόνιας βλάβης του ήπατος. Τέλος, έχει βρεθεί αποτελεσματικός αναστολέας του δηλητηρίου venom-5'-νουκλεοτιδάση των φιδιών (Khadem και Marles, 2010).

In vivo πειράματα έχουν αποδείξει την δράση του βανιλλικού οξέος ως ισχυρό αναστολέα της παραθορμόνης. Η ουσία αυτή μπορεί να αποτελέσει πρόδρομο ένωση για τη σύνθεση φαρμάκων για την αντιμετώπιση στις οστεοπόρωσης που αποτελεί ένα σοβαρό πρόβλημα το οποίο εμφανίζεται κυρίως σε μεταεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (Li *et al.*, 1998).

ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Το φάσμα μάζας (ESI-MS) του μίγματος των ουσιών **1** (*p*-υδροξυ-βενζοϊκό οξύ) και **2** (βανιλλικό οξύ) έδειξε δυο κορυφές στα m/z 137.3 και 167.4 που αντιστοιχούν στα μοριακά ιόντα $[M-H]^-$ των ουσιών και συμφωνούν με τους μοριακούς τύπους $C_7H_6O_3$ και $C_8H_8O_4$ των ουσιών **1** και **2**, αντίστοιχα.



Εικόνα 18: Φάσμα μάζας (ESI-MS) του μίγματος των ουσιών **1** (■) και **2** (■)

Κατά τη φασματοσκοπική εξέταση της ουσίας **2** (βανιλλικό οξύ) διαπιστώθηκε ότι στην αρωματική περιοχή του φάσματος 1H -NMR παρατηρούνται σήματα που ανήκουν σε σύστημα ABX και είναι τα πρωτόνια του δακτυλίου της φαινόλης. Έτσι, σε δ 7.56 ως διπλή κορυφή ($J=2.0$ Hz) εμφανίζεται το πρωτόνιο H-2, σε δ 7.53 ως διπλώς διπλή κορυφή ($J=8.0, 2.0$ Hz) εμφανίζεται το πρωτόνιο H-6, ενώ σε δ 6.81 ως διπλή κορυφή ($J=8.0$ Hz) εμφανίζεται το πρωτόνιο H-5. Σε δ 3.88 ως έντονη απλή κορυφή εμφανίζεται το τυπικό σήμα των πρωτονίων του μεθυλίου της θέσης 3.

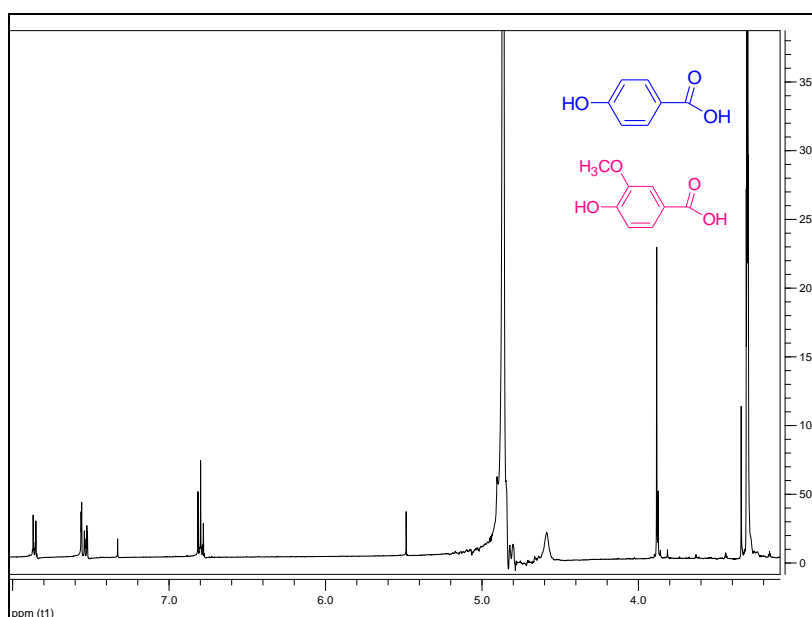
Στο φάσμα COSY εμφανίζονται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτονίων H-2/H-6 και H-5/H-6.

Στο φάσμα HMBC εμφανίζονται οι αλληλεπιδράσεις του πρωτονίου H-2 (7.56ppm) με τους άνθρακες C-3 (146.7ppm), C-4 (150.2ppm), C-6 (123.6ppm) και C-7 (170.1ppm), του πρωτονίου H-6 (7.53ppm) με τους άνθρακες C-2 (112.7ppm), C-4 (150.2ppm) και C-7 (170.1ppm), του πρωτονίου H-5 (6.81ppm) με τους άνθρακες C-3 (146.7ppm) και C-6 (123.6ppm). Τέλος, τα τρία πρωτόνια της μεθοξυομάδας (3.88ppm) αλληλεπιδρούν με τον άνθρακα C-3 (146.7ppm).

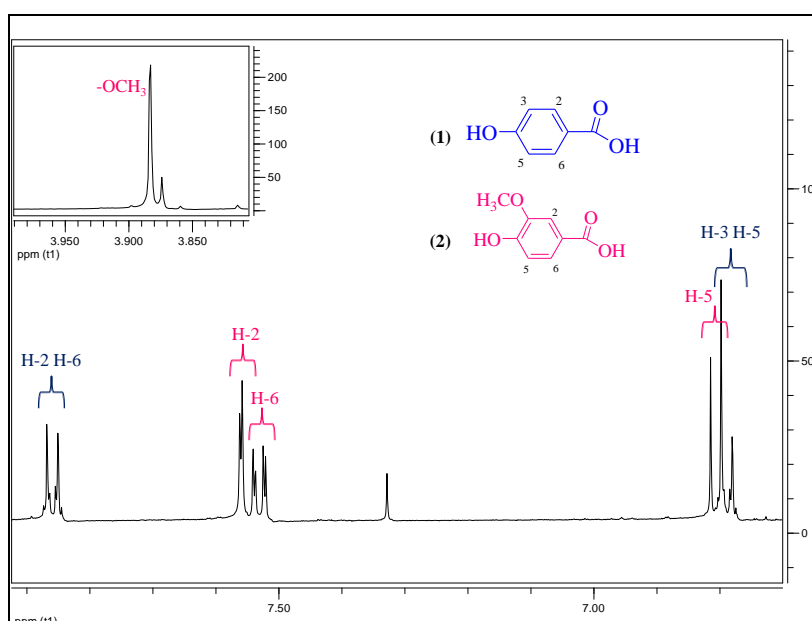
Η σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων με αυτά που βρίσκονται στη βιβλιογραφία (Azizuddin *et al.*, 2010), οδηγούν στην ταυτοποίηση της ουσίας **2** ως 3-μεθοξυ-4-υδροξυ-βενζοϊκό οξύ (βανιλλικό οξύ).

Πίνακας 26: Πίνακας $^1\text{H-NMR}$ της ουσίας 2 (CD_3OD , 500 MHz)

Χημική μετατόπιση δ (ppm)	Αριθμός H	Πολλαπλότητα J (Hz)	Ταυτοποίηση
7.56	1	d (J=2.0)	H-2
7.53	1	dd (J=8.0, 2.0)	H-6
6.81	1	d (J=8.0)	H-5
3.88	3	s	-OCH ₃



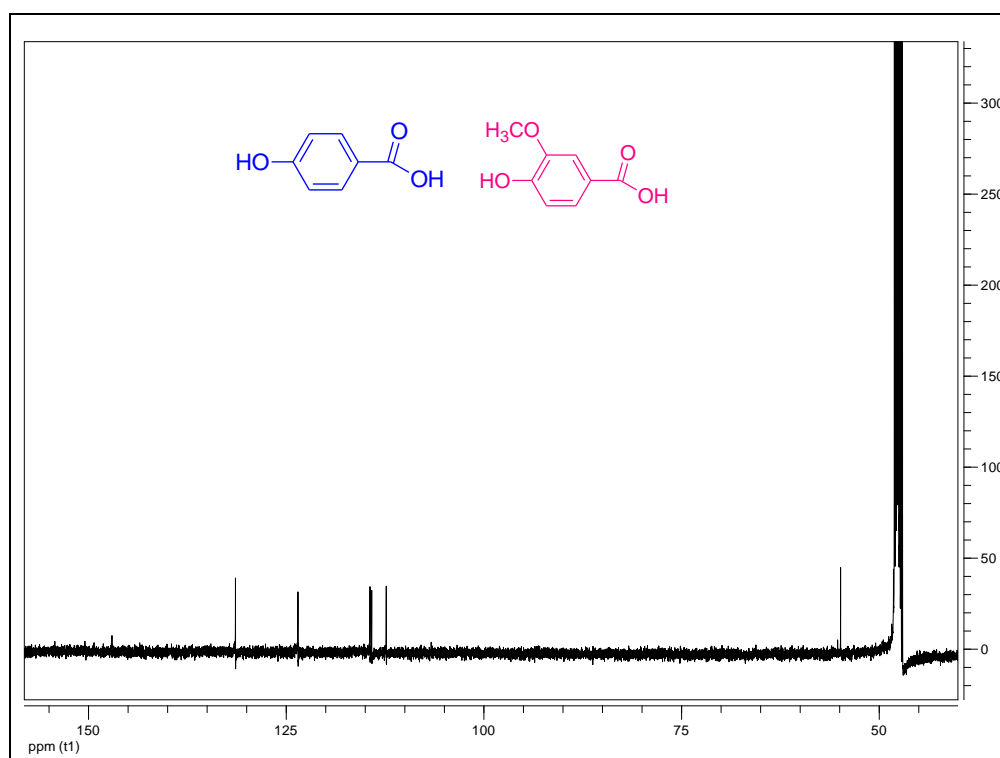
Εικόνα19: Πλήρες φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 500 MHz) του μίγματος των ουσιών 1 (■) και 2 (■)



Εικόνα 20: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 500 MHz) του μίγματος των ουσιών 1 (■) και 2 (■)

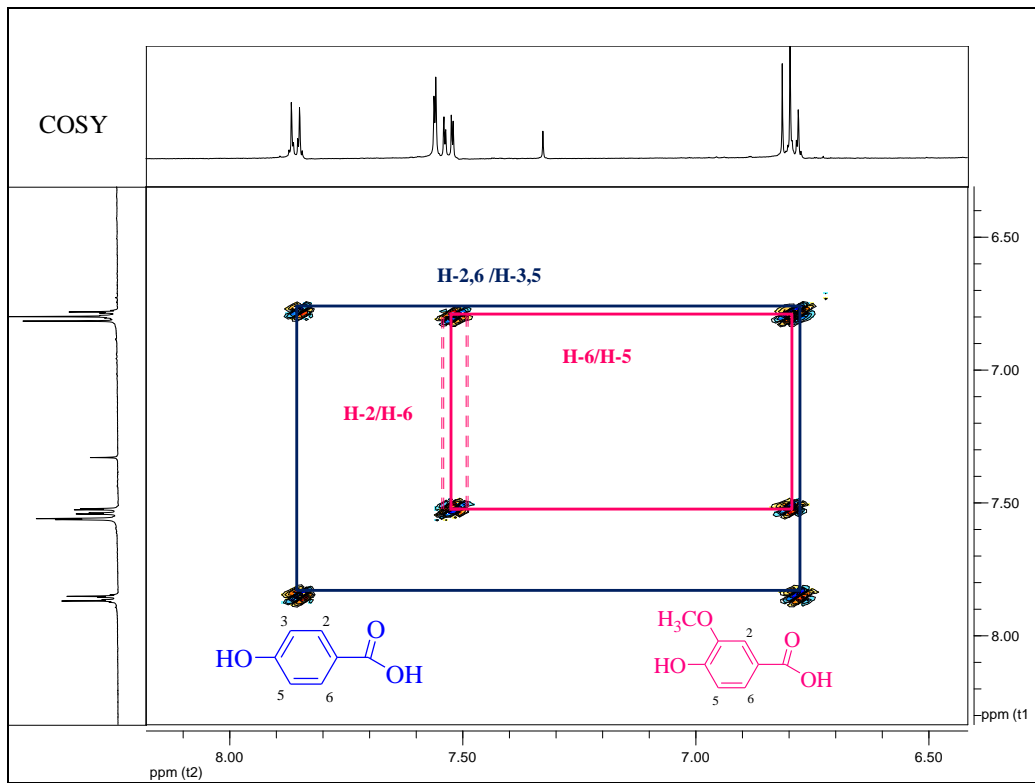
Πίνακας 27: Πίνακας ^{13}C -NMR της ουσίας 2 (CD_3OD , 125 MHz)¹

Χημική μετατόπιση δ (ppm)	Τύπος C	Ταυτοποίηση
54.8	CH_3	- OCH_3
112.7	CH	C-2
146.7	C	C-3
150.2	C	C-4
114.2	CH	C-5
123.6	CH	C-6
170.1	-C=O	C-7

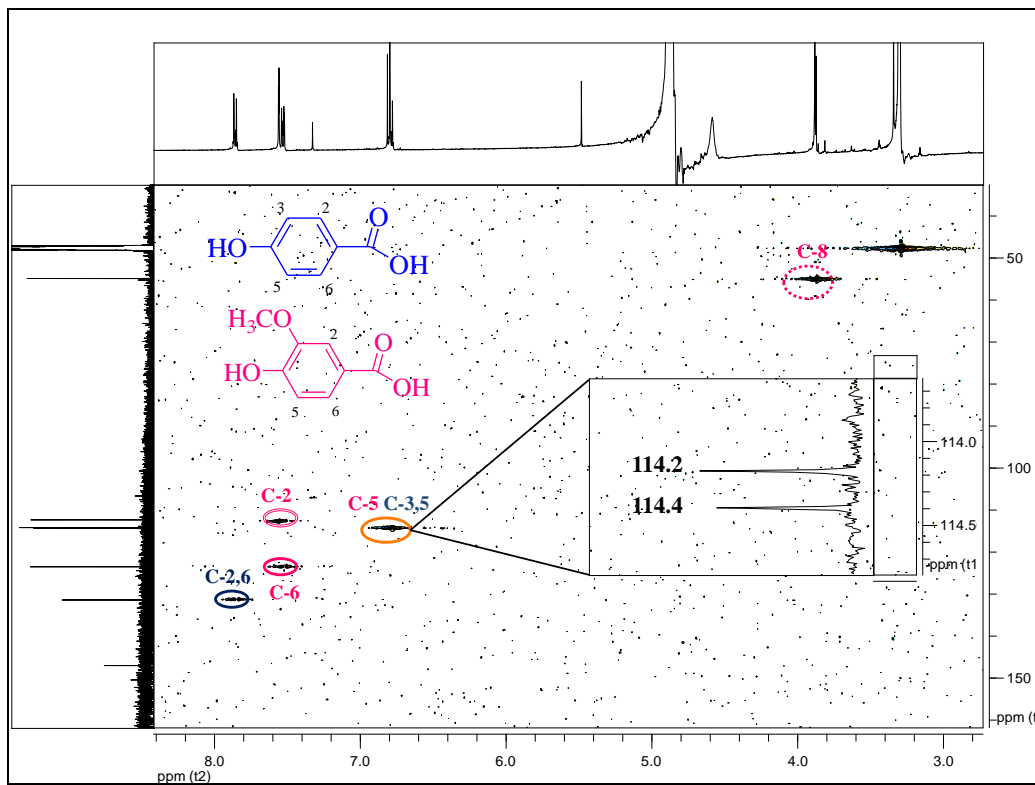


Εικόνα 21: Φάσμα ^{13}C -NMR (CD_3OD , 125MHz) του μίγματος των ουσιών 1 (■) και 2 (■)

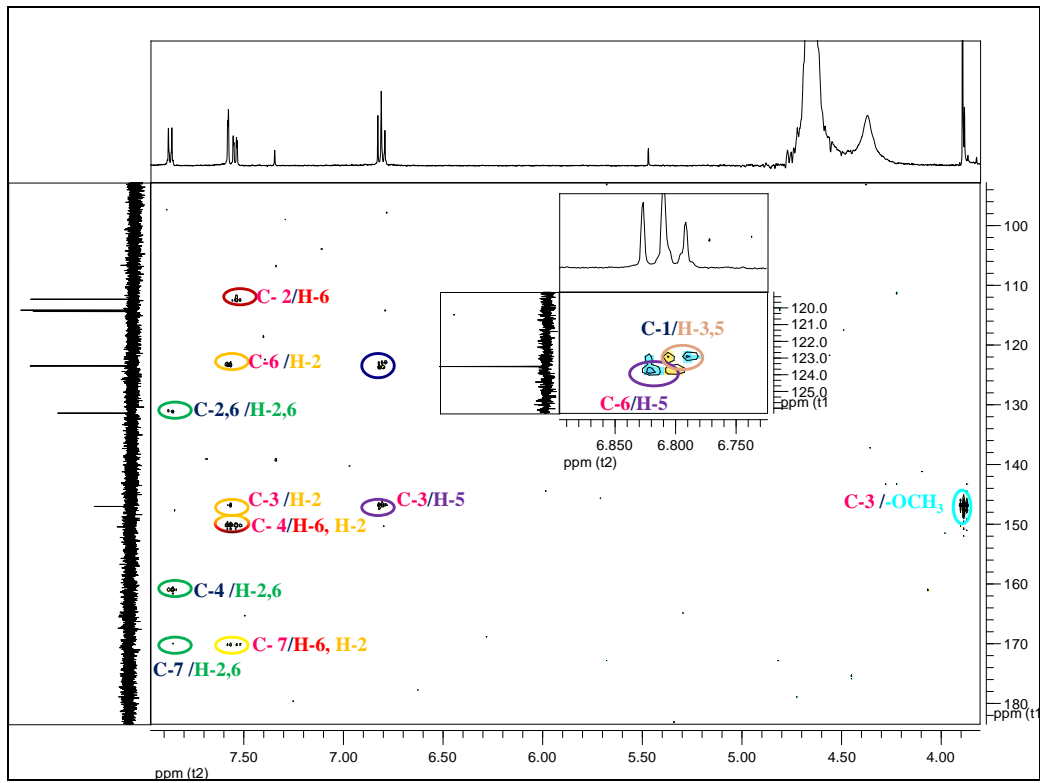
¹ Με βάση τα φάσματα ^{13}C -NMR, HSQC και HMBC του μίγματος των ουσιών 1 και 2



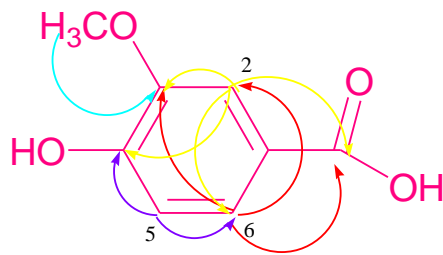
Εικόνα 22: Φάσμα COSY (CD₃OD, 500 MHz) του μίγματος των ουσιών 1 (■) και 2 (■)



Εικόνα 23: Φάσμα HSQC (CD₃OD, 500 MHz) του μίγματος των ουσιών 1 (■) και 2 (■)



Εικόνα 24: Φάσμα HMBC (CD₃OD, 500 MHz) του μίγματος των ουσιών 1 (■) και 2 (■)

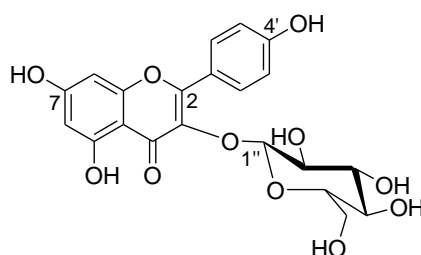




Γ.2. ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ

Γ.2.1. Ουσία 3: καιμπφερολο-3-O-β-D-γλυκοκυρανοσίδης (αστραγαλίνη)

Η ουσία **3** απομονώθηκε σε μίγμα με την ουσία **7** (ισοραμνετινο-3-O-γλυκοσίδης) καθώς επίσης και σε μίγμα με τις ουσίες **7** (ισοραμνετινο-3-O-γλυκοσίδης) και **8** (ισοραμνετινο-3-O-εξοσίδης) και ταυτοποιήθηκε ως καιμπφερολο-3-O-β-D-γλυκοκυρανοσίδης, κατόπιν φασματοσκοπικής μελέτης ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HMQC και ESI-MS). Για τη λήψη των φασμάτων $^{13}\text{C-NMR}$ και HMQC χρησιμοποιήθηκε το κλάσμα που περιείχε το μίγμα των ουσιών **3**, **7** και **8**.



Η ουσία αυτή είναι γνωστή από τα μέσα περίπου του περασμένου αιώνα. Η πρώτη αναφορά έγινε το 1952 από τον Nakasayashi από τα άνθη του φυτού *Astragalus sinicus* Fabaceae, όμως τα φασματοσκοπικά δεδομένα εδόθησαν αρκετά αργότερα, το 1978 (Okujama *et al.*, 1978). Έχει απομονωθεί από διάφορα φυτά, μερικά από αυτά με βάση τον Harborne είναι: *Carum carvi* Apiaceae, *Carthamus tinctorius* Asteraceae, *Clibadium spp.* Asteraceae, *Gerbera jamesonii* Asteraceae, *Diospyros kaki* Ebenaceae, *Pyrola spp.* Ericaceae, *Astragalus spp.*, *Baptisia spp.* και *Lotus corniculatus* της οικογένειας Fabaceae, *Liquidambar formosana* Hamamelidaceae, *Phlomis spectabilis* Labiatae, *Abies amabilis* και *Larix decidua* της οικογένειας Pinaceae, *Podocarpus nivalis* Podocarpaceae, *Haplophyllum glabrinum* Rutaceae, *Leptarrhena pyrolifolia* Saxifragaceae, *Thelypteris nipponica* Thelypteridaceae (Harborne και Baxter, 1999). Επίσης, αναφέρουμε *Carthamus tinctorius* L. Asteraceae (Kazuma *et al.*, 2000), *Anaxagorea dolichocharpa* Annonaceae (Santos *et al.*, 2000), *Barbarea vulgaris* L. Brassicaceae (Senatore *et al.*, 2000), *Allium porrum* Alliaceae (Fattorusso *et al.*, 2001), *Ginkgo biloba* Ginkgoaceae (Bedir *et al.*, 2002), *Chrysanthemum morifolium* Ramar Compositae (Lee *et al.*, 2003), *Papaver rhoeas* L. Papaveraceae (Hillenbrand *et al.*, 2004), *Azadirachta Indica* Meliaceae (Chattopadhyay *et al.*, 2005), *Galium verum* subsp. *verum* Rubiaceae (Demirezer *et al.*, 2006), *Agrimonia eupatoria* L. Rosaceae (Correia *et al.*, 2006), *Melilotus neapolitana* Leguminosae (Fiorentino *et al.*, 2007), *Nymphaea caerulea* Nymphaeaceae (Agnihotri *et al.*, 2008), *Chenopodium album*

Chenopodiaceae (Chludil *et al.*, 2008), *Lotus ucrainicus* & *L. arvensis* Fabaceae (Kovalev, 2009), *Rhodiola rosea* Crassulaceae (Jeong *et al.*, 2009), *Iris pseudopumila* Iridaceae (Conforti *et al.*, 2009), *Styphnolobium japonicum* Leguminosae (Kite *et al.*, 2009), *Anemone tomentosa* Ranunculaceae (Hu *et al.*, 2010), *Mikania laevigata* Shultz Bip. ex Baker Asteraceae (Ferreira *et al.*, 2010), *Amoora cucullata* Meliaceae (Abdelfattah *et al.*, 2010), *Erigeron annuus* Asteraceae (Jang *et al.*, 2010), *Centella erecta* Apiaceae (Rumalla *et al.*, 2010), *Actinidia kolomikta* Actinidiaceae (Lu *et al.*, 2010), *Cordia sinensis* Boraginaceae (Al-Musayeib *et al.*, 2011), *Wisteria floribunda* Fabaceae (Tai *et al.*, 2011), *Myrsine seguinii* Myrsinaceae (Matsunami *et al.* 2011), *Hemerocallis fulva* Liliaceae (Lin *et al.*, 2011), *Cardamine komarovii* NAKAI Brassicaceae (Lee *et al.*, 2011), *Aruncus dioicus* var. *kamtschaticus* Rosaceae (Jeong *et al.*, 2011), *Geranium purpureum* Geraniaceae (Sohretoglu *et al.*, 2011), *Chromolaena odorata* Asteraceae (Hung *et al.*, 2011), *Sarcopyramis bodinieri* var. *delicate* Melastomataceae (Wan *et al.*, 2012), *Pseudodrynaria coronans* Wall. ex. Mett. Drynariaceae (Tai *et al.*, 2012), *Moringa oleifera* Moringaceae (Kashiwada *et al.*, 2012), *Humulus lupulus* L. Cannabaceae (Akazawa *et al.*, 2012), *Brassica napus* L. Brassicaceae (Pei *et al.*, 2012), *Sorbus aria* (L.) Crantz Rosaceae (Olszewska *et al.*, 2012), *Dalbergia sissoo* Roxb. Fabaceae (Dixit *et al.*, 2012), *Euphorbia peplus* L. Euphorbiaceae (Ali *et al.*, 2013), κ.ά.

Σε *in vitro* πειράματα διαπιστώθηκε ότι η ένωση αυτή αναστέλλει τη δράση του ενζύμου νευραμινιδάση. Η νευραμινιδάση είναι μια γλυκοπρωτεΐνη η οποία εντοπίζεται στην λιπιδική στοιβάδα που περιβάλλει τα σωματίδια των βλεννοϊών (ιοί της γρίπης) και δρα στους δεσμούς σιαλικού οξέος, διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στο στάδιο της απελευθέρωσης των σχηματιζόμενων σωματιδίων του ιού από το κύτταρο ξενιστή (Παπαπαναγώτου και Κυριαζοπούλου-Δαλαΐνα, 2004). Η αστραγαλίνη, αναστέλλοντας τη δράση του ενζύμου αυτού, καθιστά ανίκανο τον ιό να εγκαταλείψει το κύτταρο ξενιστή και με αυτόν τον τρόπο περιορίζει την μολυσματική του ικανότητα (Jeong *et al.*, 2011).

Η ένωση αυτή έχει αποδειχθεί ότι έχει αντιφλεγμονώδη δράση. Σε *in vitro* πειράματα διαπιστώθηκε ότι αναστέλλει το σχηματισμό ριζών μονοξειδίου του αζώτου (NO), η οποία παράγεται με την επίδραση ομάδας ισοενζύμων (cNOS και iNOS) επί της L-αργινίνης. Η ρίζα μονοξειδίου του αζώτου (NO) αντιδρά ταχύτατα με ρίζες υπεροξειδικού ανιόντος ($\text{O}_2^{\cdot-}$) δίνοντας πολύ τοξικά υπεροξυνιτρώδη ανιόντα

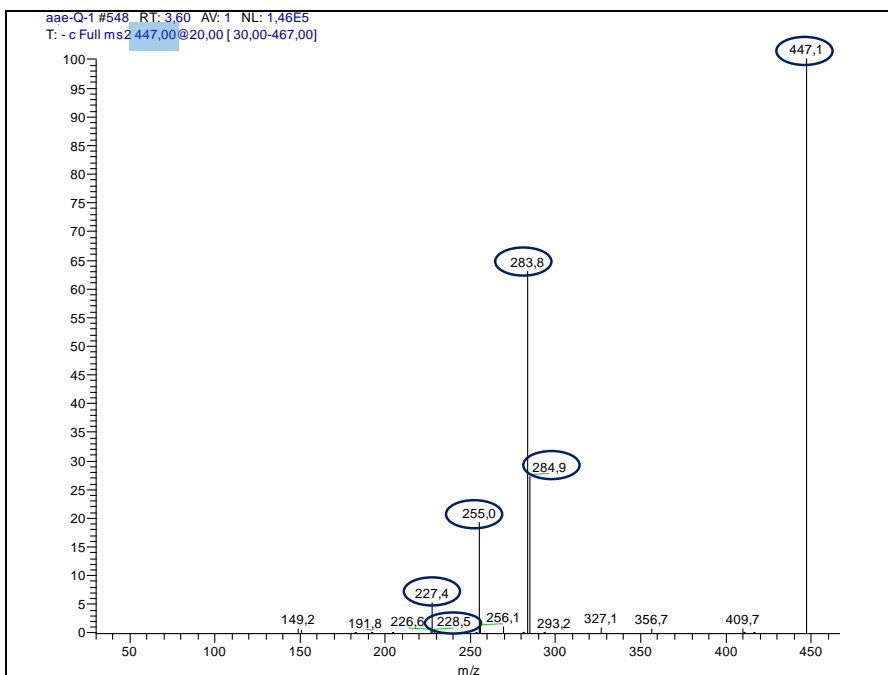
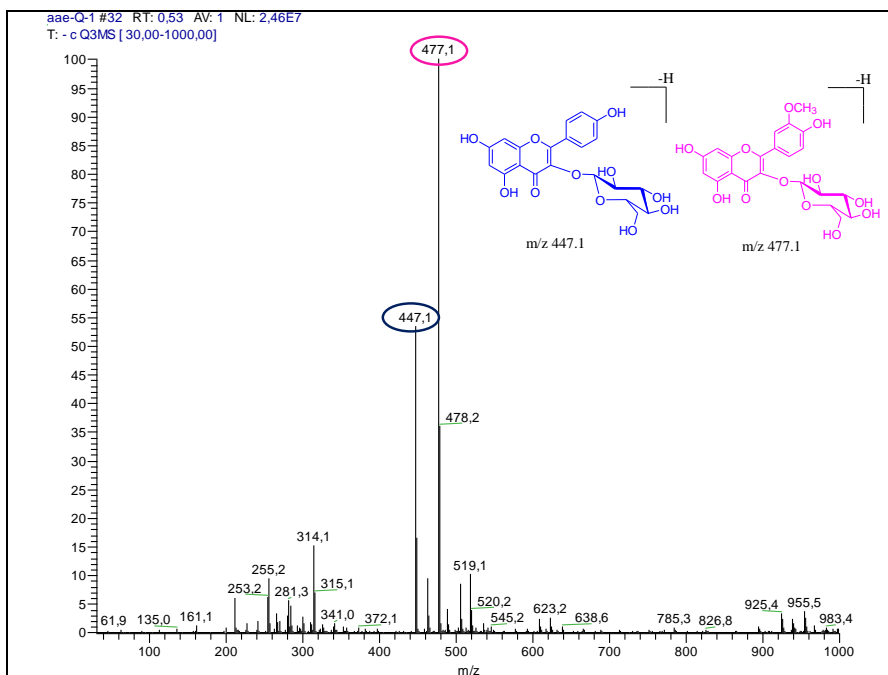
(ONOO⁻) που μπορεί να υπερπαραχθούν σε φλεγμονώδεις καταστάσεις (Conforti *et al.*, 2009).

Η αστραγαλίνη μπορεί να μειώσει το ρυθμό νευροεκφύλισης σε ασθένειες όπως Alzheimer (AD). Έχει αποδειχθεί με *in vitro* πειράματα ότι αναστέλλει τη δράση του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση (AChE). Ένα από τα κύρια συμπτώματα της νόσου Alzheimer είναι η μείωση των επιπέδων του νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνη (ACh) στο φλοιώδες και υποφλοιώδες νευρώνα. Ενώσεις οι οποίες αναστέλλουν την δράση του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση μπορούν να θεωρηθούν χρήσιμα θεραπευτικά μέσα για την συμπτωματική αντιμετώπιση της νόσου Alzheimer, επειδή συντελούν στην διατήρηση των επιπέδων ακετυλοχολίνης στον εγκέφαλο (Conforti *et al.*, 2009).

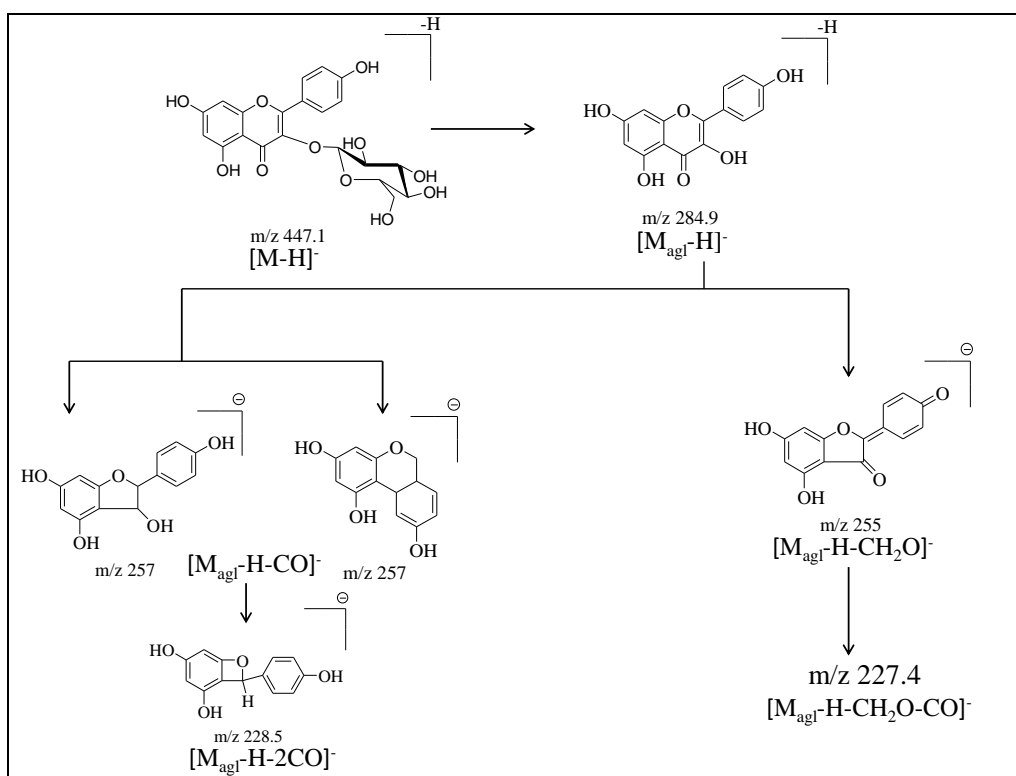
Σε *in vivo* πειράματα η ένωση αυτή εμφάνισε ισχυρή ανασταλτική δράση στο σχηματισμό προϊόντων AGEs καθώς επίσης αναστέλλει και το ένζυμο αναγωγή της αλδόζης (Jang *et al.*, 2010). Τα AGEs (advanced Glycation End-products) είναι πολύπλοκες δομές που σχηματίζονται με εκτεταμένη γλυκοσιλίωση εξωκυτταρικών και ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών. Ο σχηματισμός τους συνοδεύεται από αυξημένη δραστηριότητα ελευθέρων ριζών, που επιφέρουν βλάβες στους ιστούς (Ahmed, 2005) και αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους μοριακούς μηχανισμούς στον διαβήτη (Kim *et al.*, 2004, Fujimoto *et al.*, 2004).

ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Το φάσμα μάζας (ESI-MS-MS) του μίγματος των ουσιών **3** (αστραγαλίνη) και **7** (ισοραμνετινο 3-O-γλυκοσίδης) έδειξε δυο κορυφές στα m/z 447.1 και 477.1 που αντιστοιχούν στα μοριακά ιόντα $[M-H]^-$ των ουσιών και συμφωνούν με τους μοριακούς τύπους $C_{21}H_{20}O_{11}$ και $C_{22}H_{22}O_{12}$ των ουσιών **3** και **7**, αντίστοιχα. Για την ουσία **3** εμφανίζεται το ιόν του άγλυκου προϊόντος θραυσμάτωσης $[M_{agl}-H]^-$, m/z 284.5 και η ανιονική ρίζα $[M_{agl}-H]^+$, m/z 283.8, καθώς και τα παράγωγα ιόντα της θραυσμάτωσης του αγλύκου $[M_{agl}-H-CH_2O]^-$, m/z 255.0 και από συνδυασμένη θραυσμάτωση τα ιόντα $[M_{agl}-H-CH_2O-CO]^-$, m/z 227.4 και $[M_{agl}-H-2CO]^-$, m/z 228.5 (March και Miao, 2004, Ye *et al.*, 2005).



Εικόνα 25: Φάσμα μάζας (ESI-MS) του μίγματος των ουσιών 3 (■) και 7 (■)



Εικόνα 26: Πιθανός μηχανισμός θασμάτωσης της ουσίας 3

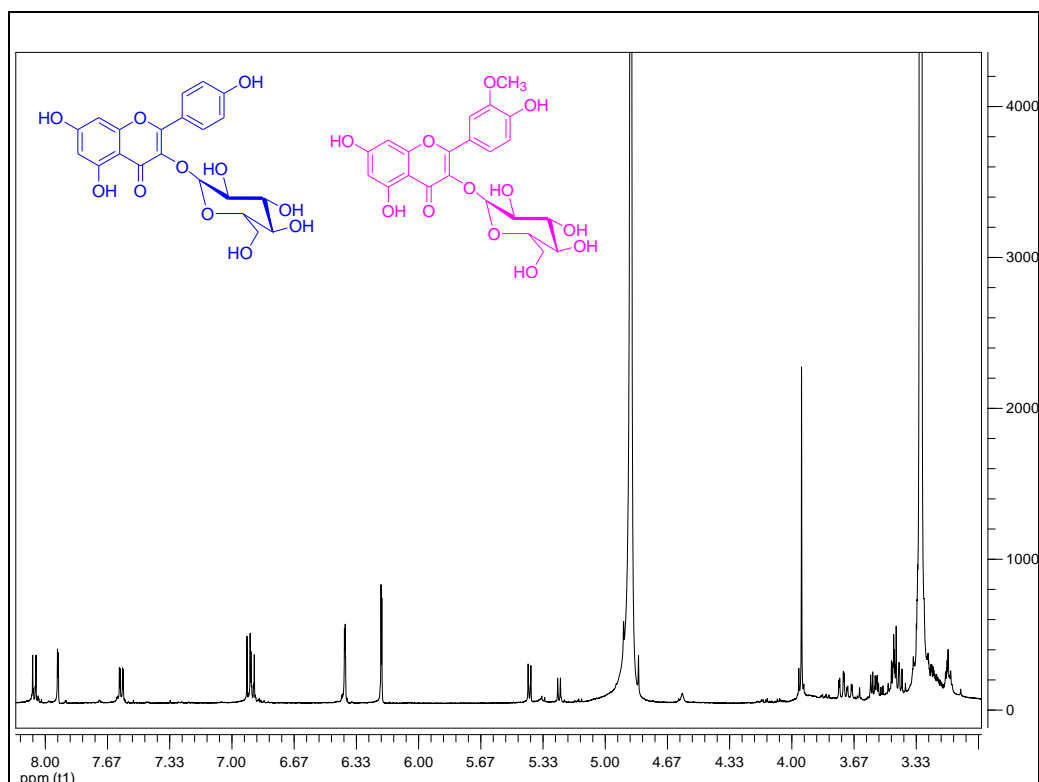
Στην αρωματική περιοχή του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ παρατηρούνται τα σήματα του πυρήνα του φλαβονοειδούς. Τα πρωτόνια του δακτυλίου B σχηματίζουν σύστημα AA'BB', γεγονός που υποδηλώνει ότι στη θέση 4' υπάρχει υποκατάσταση. Έτσι, σε δ 8.06 ως διπλή κορυφή ($J=9.0$ Hz) εμφανίζονται τα πρωτόνια H-2' και H-6'. Από την χημική μετατόπιση των πρωτονίων αυτών επιβεβαιώνεται ότι πρόκειται περί φλαβονόλης. Σε δ 6.88 ως διπλή κορυφή ($J=9.0$ Hz) εμφανίζονται τα πρωτόνια H-3' H-5'. Στην ίδια περιοχή λίγο πιο θωρακισμένα εμφανίζονται τα πρωτόνια του δακτυλίου A και πιο συγκεκριμένα τα πρωτόνια H-8 και H-6 ως διπλές κορυφές ($J=2.0$ Hz), χαρακτηριστική σταθερά σύζευξης για *p*-υποκατάσταση, σε δ 6.40 και 6.20, αντίστοιχα.

Στην κεντρική περιοχή του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ εμφανίζεται το ανωμερικό πρωτόνιο μιας β -γλυκόσης σε δ 5.26 ως διπλή κορυφή d ($J=7.0$ Hz). Επιπλέον, σε δ 3.69 εμφανίζεται ως διπλώς διπλή κορυφή ($J=12.0, 2.5$ Hz) το πρωτόνιο H-6a'' της γλυκόσης.

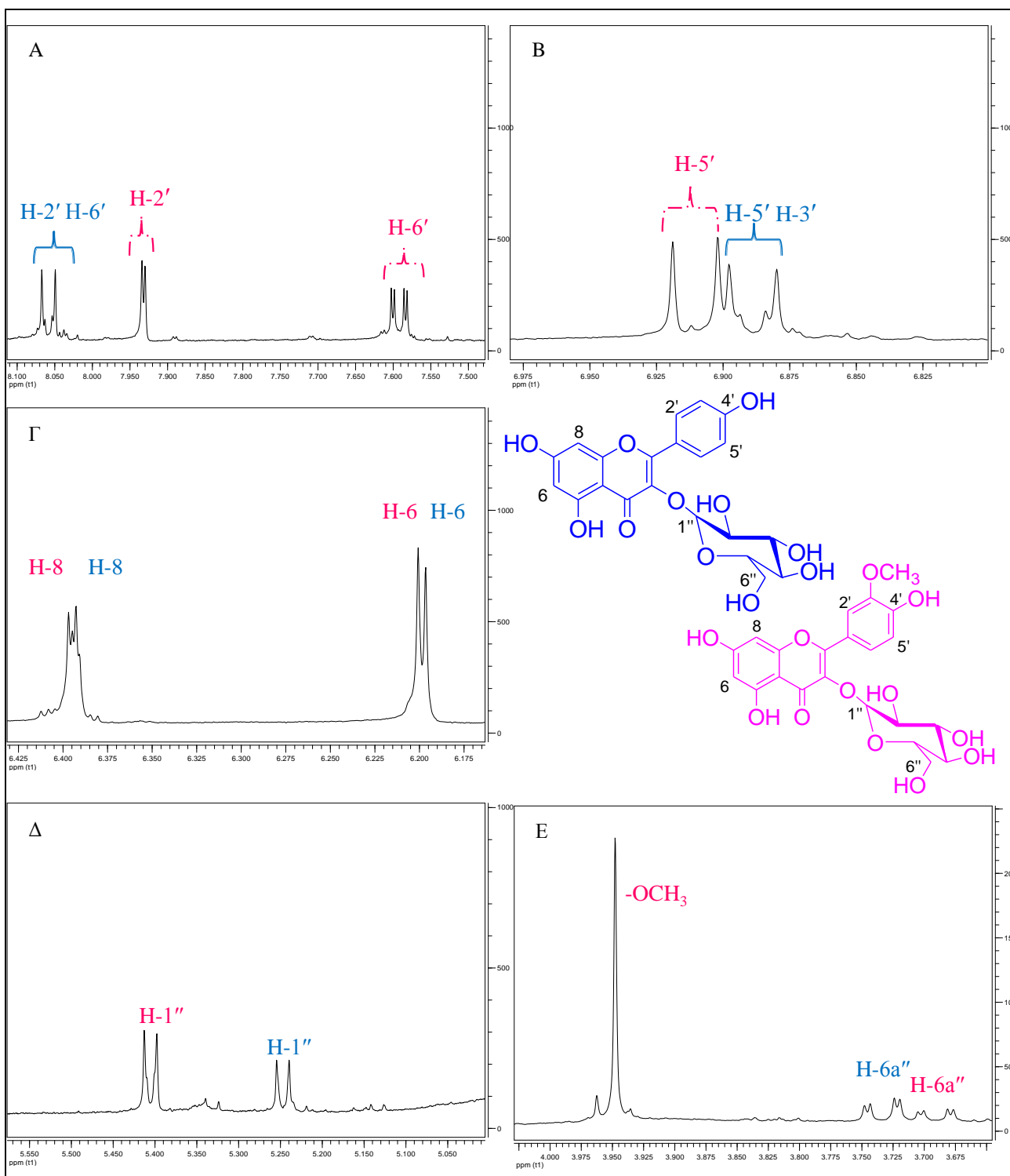
Η σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων με αυτά που βρίσκονται στη βιβλιογραφία (Demirezer *et al.*, 2006) οδηγούν στην ταυτοποίηση της ουσίας **3** ως καιμπερολο-3-*O*- β -D-γλυκοκυρανοσίδης.

Πίνακας 29: Πίνακας $^1\text{H-NMR}$ της ουσίας **3** (CD_3OD , 500 MHz)

Χημική μετατόπιση δ (ppm)	Αριθμός Η	Πολλαπλότητα J (Hz)	Ταυτοποίηση
8.06	2	d (J=9.0)	H-2' H-6'
6.88	2	d (J=9.0)	H-3' H-5'
6.39	1	d (J=2.0)	H-8
6.20	1	d (J=2.0)	H-6
5.26	1	d (J=7.0)	H-1''
3.69	1	dd (J=12.0, 2.5)	H-6a''
3.20-3.58	5	m	H-2''-H-6b''



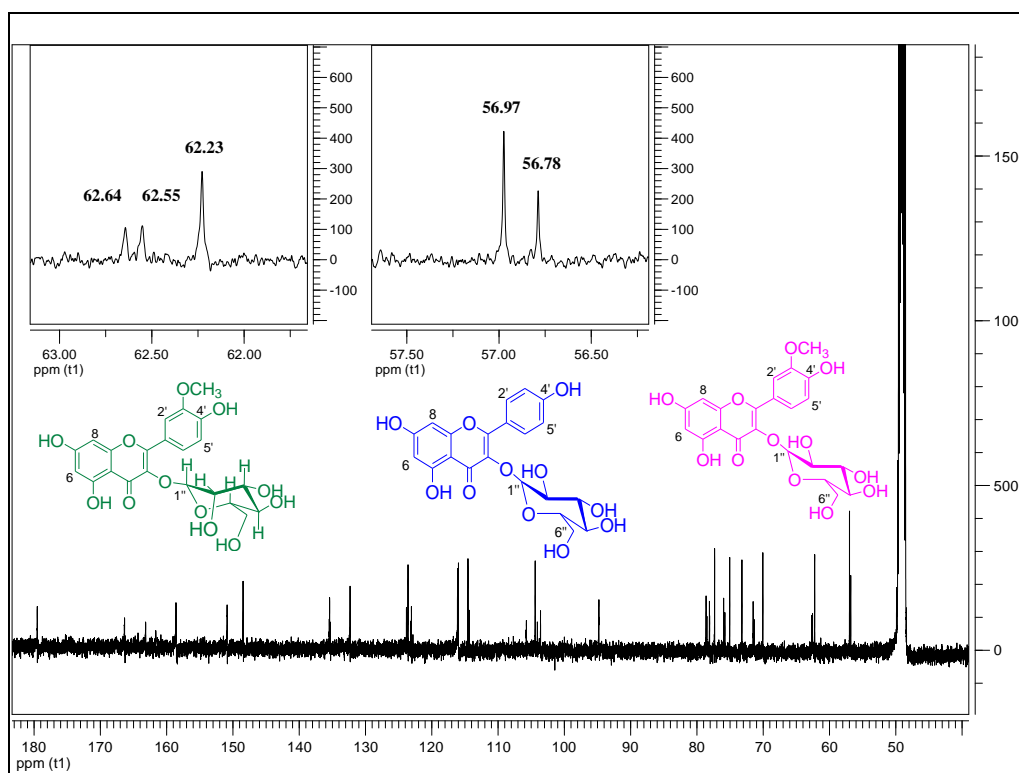
Εικόνα 27: Πλήρες φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 500 MHz) του μίγματος των ουσιών **3** (■) και **7** (■)



Εικόνα 28: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 500 MHz) του μίγματος των ουσιών 3 (■) και 7 (■). Α: 8.10-7.50ppm, Β: 6.95-6.55ppm, Γ: 6.43-6.10ppm, Δ: 5.55-5.00ppm, Ε: 4.10-3.60ppm

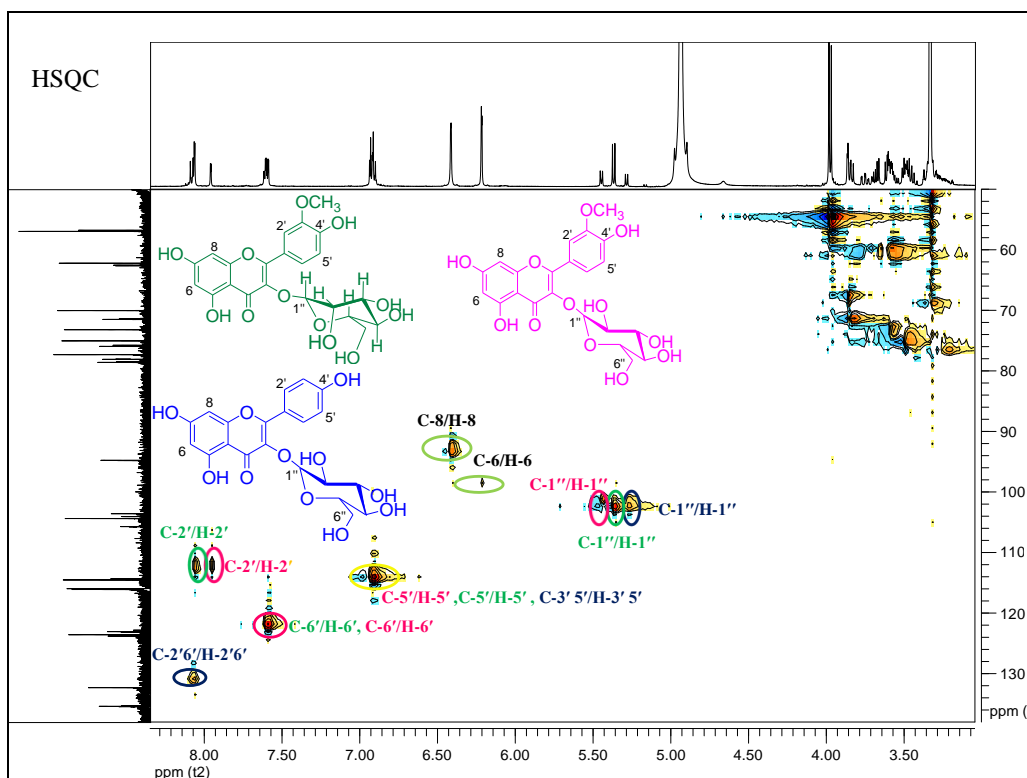
Πίνακας 30: Πίνακας ^{13}C -NMR της ουσίας 3 (CD_3OD , 125 MHz)¹

Χημική μετατόπιση δ (ppm)	Τύπος C	Ταυτοποίηση
131.5	CH	C-2' C-6'
113.5	CH	C-3' C-5'
92.9	CH	C-8
99.7	C	C-6
103.2	CH	C-1''



Εικόνα 29: Φάσμα ^{13}C -NMR (CD_3OD , 125 MHz) του μίγματος των ουσιών 3 (■), 7 (■) και 8 (■)

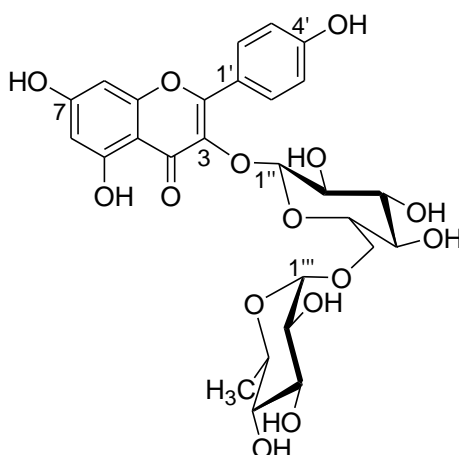
¹ Με βάση τα φάσματα ^{13}C -NMR και HMQC του μίγματος των ουσιών 3, 7 και 8



Εικόνα 30: Φάσμα ΗΜQC (CD₃OD, 500 MHz) του μίγματος των ουσιών 3 (■), 7 (■) και 8 (■)

Γ.2.2. Ουσία 4: καμπφερολο-3-O-(6''-α-L-ραμνοπυρανοσουλ)-β-D-γλυκοπυρανοσίδης (καμπφερολο-3-ρουτινοσίδης, νικοτιφλορίνη)

Η ουσία 4 απομονώθηκε ως κόνις κίτρινου χρώματος και ταυτοποιήθηκε ως καμπφερολο-3-O-(6''-α-L-ραμνοπυρανοσουλ)-β-D-γλυκοπυρανοσίδης, κατόπιν φασματοσκοπικής μελέτης (UV/Vis, ¹H NMR, COSY, ¹³C-NMR, HMQC και HMBC).



Η ουσία αυτή αναφέρθηκε για πρώτη φορά ως «νικοτοφλορίνη» από τον Wada το 1952 ο οποίος την απομόνωσε από τα άνθη του φυτού *Nicotiana sylvestris* της οικογένειας Solanaceae. Πριν από τον Wada ο διγλυκοσίδης αυτός της καμπφερόλης είχε αναφερθεί από τον Kondo το 1929, ο οποίος την απομόνωσε από το φυτό *Rosa polyantha* της οικογένειας Rosaceae καθώς και από τον Fukuchin το 1929, που απομόνωσε την ένωση αυτή από το φυτό *Calystegia subacaulis* της οικογένειας Convolvulaceae. Ωστόσο, τα δεδομένα του Wada να μεν διέφεραν από αυτά των προγενέστερων εργασιών αλλά η ένωση η οποία απομόνωσε ήταν υψηλότερης καθαρότητας σε σύγκριση με αυτές των Kondo και Fukuchin (Wada, 1952). Έκτοτε έχει απομονωθεί από πληθώρα φυτών που ανήκουν σε διάφορες οικογένειες, μερικά από αυτά με βάση τον Harborne είναι: *Calystegia japonica* Convolvulaceae, *Leptarrhena pyrolifolia* Saxifragaceae, *Limnanthes douglasii* Limnanthaceae, *Cassia* sp. Leguminosae, *Carthamus tinctorius* και *Montanoa tomentosa* Asteraceae, *Fumaria parviflora* Papaveraceae, *Cistus ladanifer* Cistaceae, *Pitcairnia* spp. Bromeliaceae, *Abies amabilis* Pinaceae, *Equisetum sylvaticum* Equisetaceae, *Adiantum capillus-veneris* και *Paesia anfractuosa* της οικογένειας Pteridaceae (Harborne και Baxter, 1999). Επίσης, αναφέρουμε *Anaxagorea dolichocharpa* Annonaceae (Santos *et al.*, 2000), *Conyxa filaginoides*

Asteraceae (Calzada *et al.*, 2001), *Hydrangea macrophylla* SERINGE var. *thunbergii* MAKINO Hydrangeaceae (Murakami *et al.*, 2001), *Ginkgo biloba* Ginkgoaceae (Bedir *et al.*, 2002), *Raphanus sativus* Brassicaceae (Srinivas *et al.*, 2002), *Marrubium velutinum* Lamiaceae (Karioti *et al.*, 2003), *Acalypha indica* Euphorbiaceae (Nahrstedt *et al.*, 2006), *Morus nigra* L. & *Morus alba* L. Moraceae (Pawlowska *et al.*, 2008), *Epiphyllum oxypetalum* Cactaceae (Hsu *et al.*, 2008), *Bupleurum chinense* DC Umbelliferae (Kuang *et al.*, 2009), *Dennstaedtia scabra* (WALL.) MOORE Dennstaedtiaceae (Li *et al.*, 2009), *Ilex paraguariensis* Aquifoliaceae (Sugimoto *et al.*, 2009), *Rhodiola rosea* Crassulaceae (Jeog *et al.*, 2009), *Styphnolobium japonicum* Leguminosae (Kite *et al.*, 2009), *Evolvulus alsinoides* Convolvulaceae (Kumar *et al.*, 2010), *Polyalthia sclerophylla* Annonaceae (Saepou *et al.*, 2010), *Allamanda neriifolia* Apocynaceae (Yu *et al.*, 2010), *Centaurea lippii* L. Asteraceae (Mezache *et al.*, 2010), *Camellia pachyandra* Hu. Theaceae (Gao *et al.*, 2010), *Leonurus japonicus* Houtt. Lamiaceae (Seo *et al.*, 2010), *Tripodanthus acutifolius* Loranthaceae (Soberon *et al.*, 2010), *Zizyphus spinachristi* L. Willd. Rhamnaceae (Mostafa *et al.*, 2010), *Actinidia kolomikta* Actinidiaceae (Lu *et al.*, 2010), *Chromolaena odorata* Asteraceae (Hung *et al.*, 2011), *Cardamine komarovii* NAKAI Brassicaceae (Lee *et al.*, 2011), *Acanthopanax brachypus* Araliaceae (Hu *et al.*, 2011), *Hemerocallis fulva* Liliaceae (Lin *et al.*, 2011), *Viburnum plicatum* Thunb. ex Murray var. *plicatum* f. *plicatum* (Kikuchi *et al.*, 2011), *Cordia sinensis* Boraginaceae (Al-Musayeib *et al.*, 2011), *Dalbergia sissoo* Roxb. Fabaceae (Dixit *et al.*, 2012), *Camellia sinensis* Theaceae (Manir *et al.*, 2012), *Caragana spinosa* Fabaceae (Olennikov *et al.*, 2012), *Humulus lupulus* L. Cannabaceae (Tanaka *et al.*, 2012), *Aster koraiensis* Asteraceae (Lee *et al.*, 2012), *Filicium decipiens* Sapindaceae (Jayasinghe *et al.*, 2012), *Euphorbia peplus* L. Euphorbiaceae (Ali *et al.*, 2013), κ.ά.

Η νικοτιφλορίνη εκτιμήθηκε ως προς την αντιπρωτοζωϊκή της δράση και βρέθηκε αποτελεσματική έναντι του αμοιβαδικού τροφοζωϊδίου *Entamoeba histolytica* και του μαστιγοφόρου εντερικού παρασίτου *Giardia lamblia*, κάτι που μπορεί να φανεί χρήσιμο στο μέλλον για την αντιμετώπιση γαστρεντερολογικών παθήσεων (Calzada *et al.*, 2001).

Η νικοτιφλορίνη που έχει απομονωθεί από το μεθανολικό εκχύλισμα *Hydrangea macrophylla* έχει βρεθεί αποτελεσματική, βάσει *in vitro* πειραμάτων, έναντι του

παρασίτου *Plasmodium falciparum* το οποίο προκαλεί σοβαρά και πολλές φορές θανατηφόρα επεισόδια ελονοσίας. Επομένως, η νικοτιφλορίνη μπορεί να αποτελέσει πρόδρομο ένωση για την ανεύρεση νέων φαρμάκων με υψηλή εκλεκτικότητα μόνο στα κύτταρα του παρασίτου και με μικρή τοξικότητα στα κύτταρα του οργανισμού ξενιστή (Murakami *et al.*, 2001).

Επίσης, η νικοτιφλορίνη, που απομονώθηκε από το μεθανολικό εκχύλισμα του μαύρου τσαγιού (*Camelia sinensis*), έδειξε ότι αποτελεί μαζί με άλλα τρία φλαβονοειδή (ρουτίνη, καιμπφερόλη, καιμφετρίνη), παράγοντα απενεργοποίησης των νευροτοξινών που παράγουν τα κλωστηρίδια (αναερόβια, σπορογόνα, θετικά κατά Gram βακτήρια). Λόγω της ιδιότητας αυτής μπορεί χρησιμοποιηθεί ως συντηρητικό τροφίμων χωρίς να επηρεάζει τη γεύση τους (Sawamura *et al.*, 2004).

Επιπλέον, έρευνες έδειξαν ότι η νικοτιφλορίνη που απομονώθηκε από το υδατικό εκχύλισμα του ίδιου φυτού αναστέλλει *in vitro* το ένζυμο αφυδρογονάση της αιθανόλης (ADH), με αποτέλεσμα να περιορίζει το σχηματισμό του ενδιάμεσου, τοξικού προϊόντος μεταβολισμού της αιθανόλης, την ακεταλδεΐδη. Η ακεταλδεΐδη θεωρείται υπεύθυνη για την εμφάνιση ασθενειών όπως καρκίνος στο ήπαρ και το πάγκρεας καθώς επίσης και στην εκδήλωση καρδιαγγειακών νοσημάτων (Manir *et al.*, 2012).

Τέλος, σε *in vitro* πειράματα εξετάστηκε η ηπατοπροστατευτική της δράση και αποδείχθηκε η αποτελεσματικότητά της. Σε χρόνιες καταστάσεις διαταραχών του ήπατος παρατηρείται αύξηση των ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS), οι οποίες διεγείρουν την υπερέκφραση της προ-φλεγμονώδους κυττοκίνης TNF- α , η οποία με τη σειρά της διεγείρει επιπλέον τον σχηματισμό ROS. Σε *in vitro* πειράματα, ηπατοκύτταρα HepG2 με επαγόμενη TNF- α κυττοκίνη στα οποία προστέθηκε νικοτιφλορίνη έδειξαν υψηλά ποσοστά βιωσιμότητας (Lin *et al.*, 2011).

ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Κατά τη φασματομετρική εξέταση της ουσίας (φάσματα UV-Vis), ελήφθησαν χαρακτηριστικές καμπύλες με τις ακόλουθες μέγιστες απορροφήσεις (nm):

Πίνακας 31: Πίνακας UV-Vis της ουσίας 4

	Κορυφή II		Κορυφή I		Δλ I
	II _b	II _a	I _b	I _a	
MeOH	253sh	266	343		
MeONa	275	322sh	395↑		+52
AlCl₃	275	305sh	350	400	+57
AlCl₃/HCl	275	305sh	346	397	+54
NaOAc	275 (Δλ=+9nm)		318sh	395	
NaOAc/H₃BO₃	268		356		+13

Από την τιμή απορρόφησης της πρώτης κορυφής του μεθανολικού διαλύματος 343.18nm συμπεραίνεται ότι η ουσία ανήκει στις φλαβονόλες με υποκατεστημένο το υδροξύλιο της 3 θέσης. Με την προσθήκη MeONa παρατηρείται βαθυχρωμική μετατόπιση κατά +52nm της κορυφής I και ταυτόχρονα αύξηση της εντάσεώς της, οπότε συμπεραίνουμε ότι το υδροξύλιο της θέσης 4' είναι ελεύθερο. Η βαθυχρωμική μετατόπιση κατά +57nm της κορυφής I_a μετά την προσθήκη AlCl₃, οφείλεται στο σχηματισμό συμπλόκου μεταξύ της κετονομάδας της θέσης 4 και του υδροξυλίου της θέσης 5, το οποίο μετά την προσθήκη π.HCl διατηρείται σταθερό, γεγονός που υποδηλώνει την απουσία συστήματος ο-OH στον Β δακτύλιο. Το υδροξύλιο της θέσης 7 είναι ελεύθερο, διότι στο φάσμα με NaOAc παρατηρείται βαθυχρωμική μετατόπιση της κορυφής II κατά +9nm.

Στην αρωματική περιοχή του φάσματος ¹H-NMR παρατηρούνται τα σήματα του πυρήνα του φλαβονοειδούς. Τα πρωτόνια του δακτυλίου Β σχηματίζουν σύστημα AA'BB', γεγονός που υποδηλώνει ότι στη θέση 4' υπάρχει υποκαταστάτης. Έτσι, σε δ 8.07 ως διπλή κορυφή (J=9.0 Hz) εμφανίζονται τα πρωτόνια H-2' H-6'. Από τη χημική μετατόπιση των πρωτονίων αυτών επιβεβαιώνεται ότι πρόκειται περί φλαβονόλης. Σε δ 6.89 ως διπλή κορυφή (J=9.0 Hz) εμφανίζονται τα πρωτόνια H-3'

H-5'. Στην ίδια περιοχή λίγο πιο θωρακισμένα εμφανίζονται τα πρωτόνια του δακτυλίου A και πιο συγκεκριμένα τα πρωτόνια H-6 και H-8 ως διπλές κορυφές ($J=2.0$ Hz) σε δ 6.20 και 6.40, αντίστοιχα.

Στην κεντρική περιοχή του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ εμφανίζονται δύο ανωμερικά πρωτόνια υποδηλώνοντας την παρουσία δυο σακχάρων. Σε δ 5.12 ως διπλή κορυφή ($J=7.0$ Hz) εμφανίζεται το ανωμερικό πρωτόνιο μιας β -γλυκόσης, ενώ σε δ 4.52 εμφανίζεται το ανωμερικό πρωτόνιο της α -ραμνόσης, ως ευρεία απλή κορυφή. Τα πρωτόνια αυτά στο φάσμα HMQC αντιστοιχούν σε δύο ανωμερικούς άνθρακες 103.1 (C-1'') και 100.5 (C-1'''). Από το φάσμα HMBC προκύπτει ότι η θέση σύνδεσης των δύο σακχάρων είναι ο άνθρακας 6'' της γλυκόσης, εφόσον ο C-6'' βλέπει το H-1'''. Αποτέλεσμα την σύνδεσης αυτής είναι η παραμαγνητική αποθωράκιση του άνθρακα αυτού σε δ 67.2.

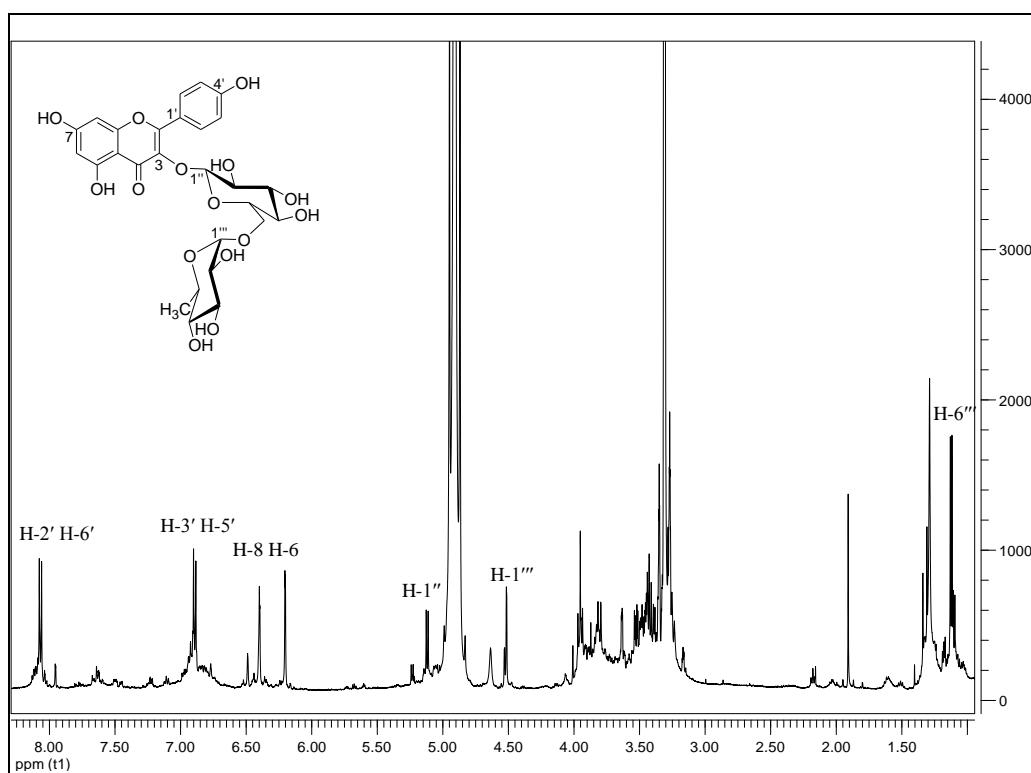
Στο φάσμα COSY εμφανίζονται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των H-2',6'/H-3',5', H-6/H-8, H-1''/H-2'', H-5'''/H-6''' που ουσιαστικά επιβεβαιώνουν την δομή της ένωσης.

Στο φάσμα HMBC εμφανίζονται οι αλληλεπιδράσεις των πρωτονίων H-2' και H-6' (8.07ppm) με τους άνθρακες C-2' (131.0ppm), C-4' (160.4ppm) και C-6' (131.0ppm), των πρωτονίων H-3' και H-5' (6.89ppm) με τους άνθρακες C-1' (121.3ppm), C-2' (131.0ppm), C-3' (114.8ppm) και C-5' (114.8ppm), του πρωτονίου H-6 (6.20ppm) με τους C-5 (161.7ppm), C-8 (94.2ppm) και C-10 (104.6ppm), του πρωτονίου H-8 (6.40ppm) με τους C-6 (99.4ppm), C-7 (165.1ppm), C-9 (156.9ppm) και C-10 (104.6ppm), του ανωμερικού πρωτονίου H-1''' (4.52ppm) της ραμνόσης με τους C-3''' (71.2ppm) και με τον C-6'' (67.2ppm) της γλυκόσης, επιβεβαιώνοντας την σύνδεση των δύο σακχάρων της ένωσης, καθώς και των πρωτονίων του μεθυλίου της ραμνόσης H-6''' (1.12ppm) με τους C-4''' (72.5ppm) και C-5''' (68.4 ppm).

Η σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων με αυτά που βρίσκονται στη βιβλιογραφία (Mezache *et al.*, 2010), οδηγούν στην ταυτοποίηση της ουσίας **4** ως καιμπερολο-3-O-(6''- α -L-ραμνοπυρανοσυλ)- β -D-γλυκοπυρανοσίδης.

Πίνακας 32: Πίνακας ^1H -NMR της ουσίας 4 (CD_3OD , 500 MHz)¹

Χημική μετατόπιση δ (ppm)	Αριθμός H	Πολλαπλότητα J (Hz)	Ταυτοποίηση
8.07	2	d (J=9.0)	H-2' H-6'
6.89	2	d (J=9.0)	H-3' H-5'
6.40	1	d (J=2.0)	H-8
6.20	1	d (J=2.0)	H-6
5.12	1	d (J=7.0)	H-1''
4.52	1	brs	H-1'''
3.46	1	m	H-2''
3.48	1	m	H-5'''
3.20-4.00	5	m	H-3''-H-6b''
3.20-4.00	3	m	H-2'''-H-4'''
1.12	3	d (J=6.5)	H-6'''

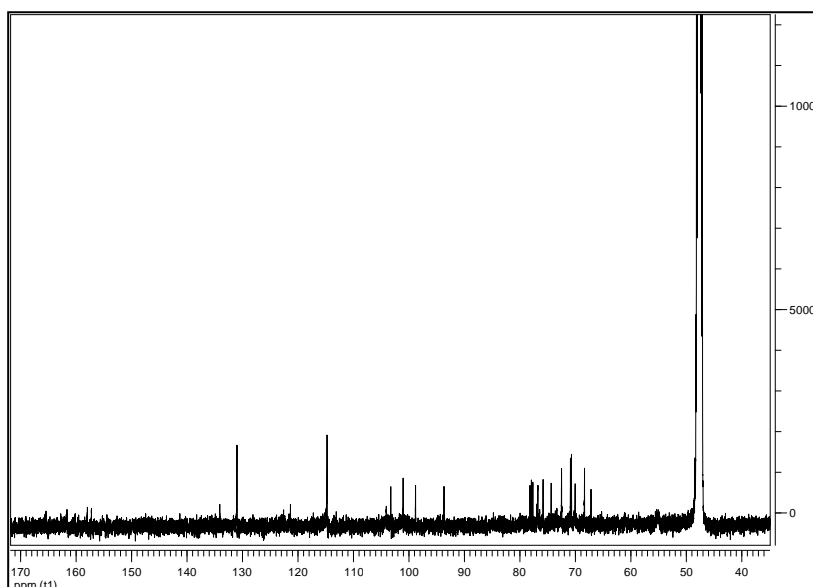


Εικόνα 31: Φάσμα ^1H -NMR (CD_3OD , 500 MHz) της ουσίας 4

¹ Με βάση τα φάσματα ^1H -NMR και COSY της ουσίας 4

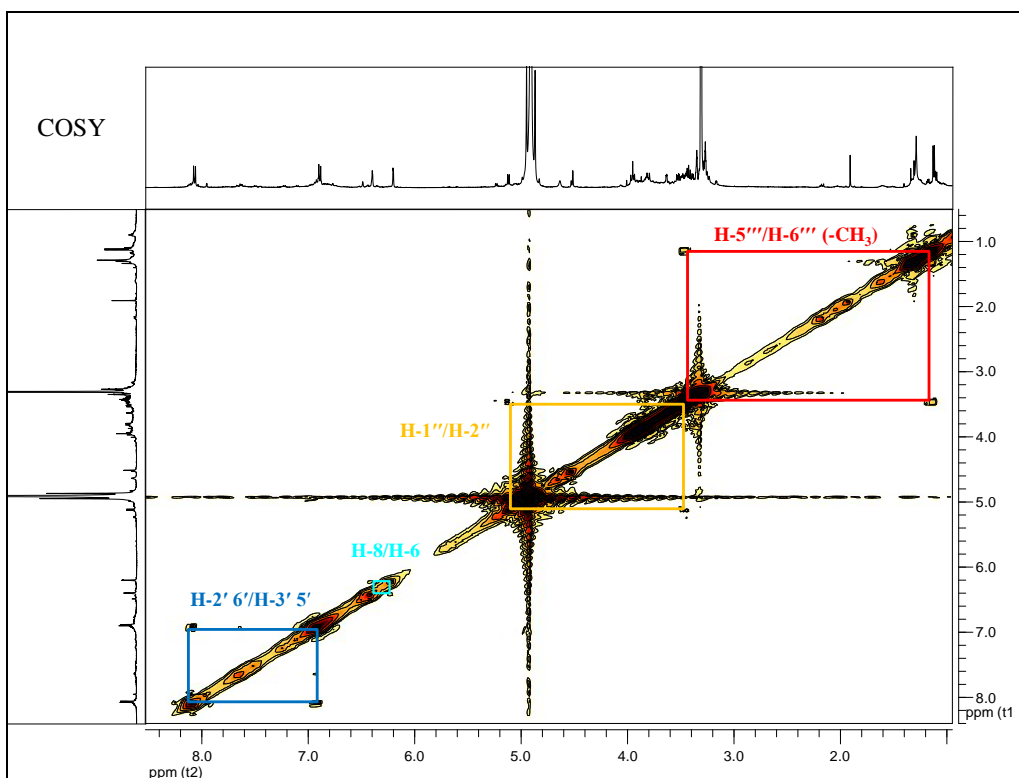
Πίνακας 33: Πίνακας ^{13}C -NMR της ουσίας 4 (CD_3OD , 125 MHz)²

Χημική μετατόπιση δ (ppm)	Τύπος C	Ταυτοποίηση
131.0	CH	C-2' C-6'
114.8	CH	C-3' C-5'
160.4	CH	C-4'
121.3	C	C-1'
157.3	C	C-2
134.2	C	C-3
178.3	C=O	C-4
161.7	C	C-5
99.4	CH	C-6
165.1	C	C-7
94.2	CH	C-8
156.9	C	C-9
104.6	C	C-10
103.1	CH	C-1''
67.2	CH ₂	C-6''
101.0	CH	C-1'''
71.2	CH	C-3'''
72.5	CH	C-4'''
68.4	CH	C-5'''
16.6	CH ₃	C-6'''

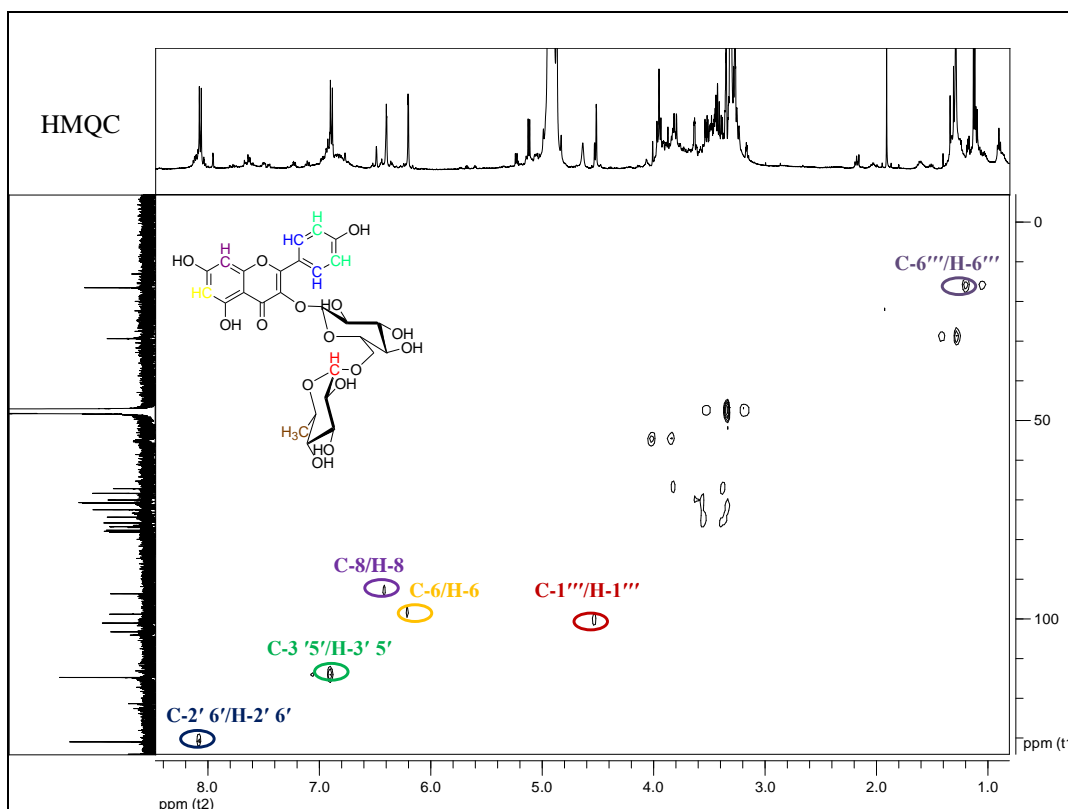


Εικόνα 32: Φάσμα ^{13}C -NMR (CD_3OD , 125 MHz) της ουσίας 4

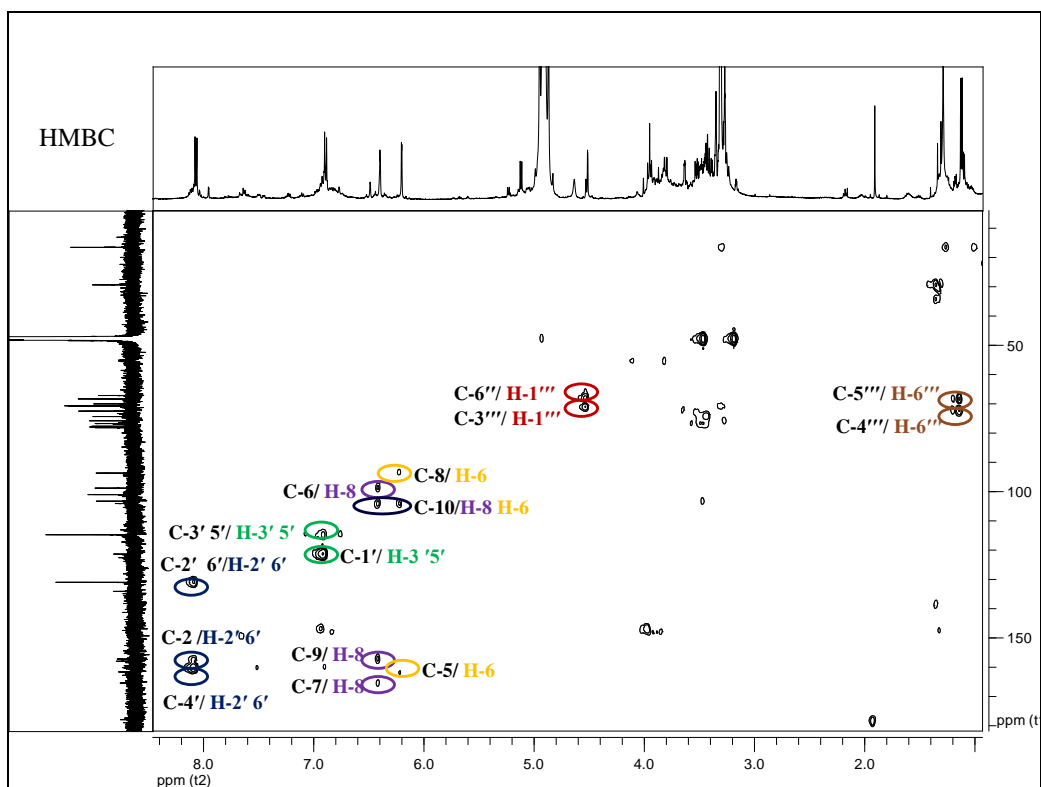
² Με βάση τα φάσματα ^{13}C -NMR, HMQC και HMBC



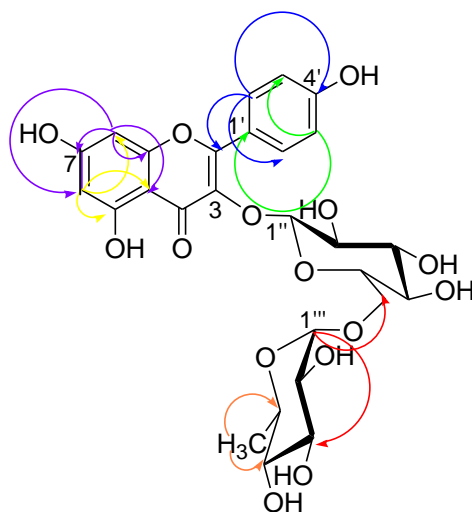
Εικόνα 33: Φάσμα COSY (CD₃OD, 500 MHz) της ουσίας 4



Εικόνα 34: Φάσμα HMQC (CD₃OD, 500 MHz) της ουσίας 4

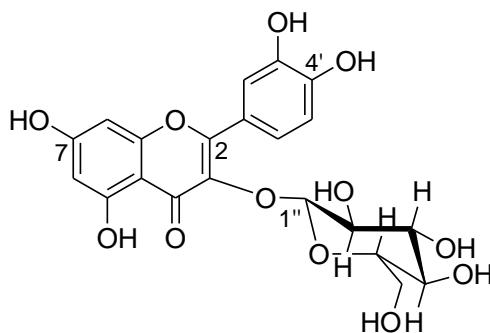


Εικόνα35: Φάσμα HMBC (CD₃OD, 500 MHz)της ουσίας 4



Γ.2.3. Ουσία 5: κερκετινο-3-O-β-D-γλυκοκυρανοσίδης (ισοκερκιτρίνη)

Η ουσία 5 απομονώθηκε ως κόνις κίτρινου χρώματος, αλλά και σε μίγμα με την ουσία 8 (ισοραμνετινο-3-O-εξοσίδης) και ταυτοποιήθηκε ως κερκετινο-3-O-β-D-γλυκοκυρανοσίδης, κατόπιν φασματοσκοπικής μελέτης (Uv/Vis, ¹H NMR, COSY, HSQC και ESI-MS). Για τη λήψη του φάσματος ESI-MS χρησιμοποιήθηκε το κλάσμα που περιέχει το μίγμα των ουσιών 5 και 8.



Η ουσία αυτή είναι γνωστή από τις αρχές του περασμένου αιώνα. Η πρώτη αναφορά είναι το 1901 από τον Perkin από το φυτό *Gossypium herbaceum* Malvaceae (Perkin in Harborne and Mabry, 1975), όμως τα φασματοσκοπικά δεδομένα εδόθησαν αρκετά αργότερα, το 1970 (Pakudina *et al.*, 1970). Είναι συστατικό της “κιτρίνης” που ανακαλύφθηκε από τον Sent Gyorgi. Έχει απομονωθεί από διάφορα φυτά, μερικά από αυτά με βάση τον Harborne είναι: *Salix viminalis* Salicaceae, *Lysimachia nummularia* Primulaceae, *Leptarrhena pyrofolia* Saxifragaceae, *Heterogaura heterancho* Onagraceae, *Desmanthodium* spp. *Artemisia* spp. Asteraceae, *Carum carvi*, *Chaerophyllum hirsutum* Umbelliferae, *Sedum acre* Crassulaceae, *Trifolium subterraneum*, *Baptisia* spp., *Milletia* spp. Leguminosae, *Pyrola* spp. Pyrolaceae, *Pitcairnia rubiflora* Bromeliaceae, *Davidsonia pruriens* Davidsoniaceae, *Abies amabilis*, *Larix decidua* Pinaceae, *Dicranopteris linearis*, *Gleichenaceae*, *Wagneriopteris nipponica* Thelypteridaceae (Harborne και Baxter, 1999). Επίσης, αναφέρουμε *Bupleurum rotundifolium* Apiaceae (Baeva και Karryev, 1983), *Zea mays* Poaceae (Ceska *et al.*, 1984), *Galphimia glauca* Malpighiaceae (Muller *et al.*, 1998), *Albizia julibrissin* Leguminosae (Kang *et al.*, 1999), *Umbilicus pendulinus* Crassulaceae (Viornerly *et al.*, 2000), *Anaxagorea dolichocharpa* Annonaceae (Santos *et al.*, 2000), *Juniperus zeravschanica* Cupressaceae (Yuldashev *et al.*, 2001), *Phlomis spinidens* Lamiaceae (Takeda *et al.*, 2001), *Ginkgo biloba* Ginkgoaceae (Bedir *et al.*, 2002), *Chrysophyllum cainito* Sapotaceae (Luo *et*

al., 2002), *Glycyrrhiza glabra* Leguminosae (Hayashi *et al.*, 2003), *Peucedanum japonicum* Umbelliferae (Hisamoto *et al.*, 2003), *Warburgia stuhlmannii* Canellaceae (Manguro *et al.*, 2003), *Eucommia ulmoides* O. Eucommiaceae (Kim *et al.*, 2004), *Azadirachta indica* Meliaceae (Chattopadhyay *et al.*, 2005), *Asperula arvensis* L. Rubiaceae (Guvenalp *et al.*, 2005), *Agrimonia eupatoria* L. Rosaceae (Correia *et al.*, 2006), *Byrsocarpus coccineus* Connaraceae (Ahmadu *et al.*, 2007), *Hyptis fasciculata* Benth. Lamiaceae (Gomes *et al.*, 2008), *Morus nigra* L. & *Morus alba* L. Moraceae (Pawlowska *et al.*, 2008), *Chenopodium album* Chenopodiaceae (Chludil *et al.*, 2008), *Styphnolobium japonicum* Leguminosae (Kite *et al.*, 2009), *Sambucus ebulus* L. Caprifoliaceae (Süntara *et al.*, 2010), *Mikania laevigata* Shultz Bip. ex Baker Asteraceae (Ferreira *et al.*, 2010), *Sambucus ebulus* L. Caprifoliaceae (Süntar *et al.*, 2010), *Psidium guajava* L. Myrtaceae (Matszaki *et al.*, 2010), *Tripodanthus acutifolius* Loranthaceae (Soberon *et al.*, 2010), *Centaurea lippii* L. Asteraceae (Mezache *et al.*, 2010), *Hemerocallis fulva* Liliaceae (Lin *et al.*, 2011), *Leonurus japonicus* Houtt. Lamiaceae (Seo *et al.*, 2010), *Camellia pachyandra* Hu. Theaceae (Gao *et al.*, 2010), *Anchusa azurea* var. *azurea* Boraginaceae (Kuruuezuem-Uz *et al.*, 2010), *Lespedeza cuneata* Fabaceae (Kim *et al.*, 2011), *Smyrniolum olusatrum* L. Apiaceae (Bencheraiet *et al.*, 2011), *Machilus philippinensis* Lauraceae (Lin *et al.*, 2011), *Aruncus dioicus* var. *kamtschaticus* Rosaceae (Jeong *et al.*, 2011), *Castanopsis fissa* Fagaceae (Huang *et al.*, 2011), *Cordia sinensis* Boraginaceae (Al-Musayeib *et al.*, 2011), *Aesculus hippocastanum* Hippocastanaceae (Dudek-Makuch and Matlawka *et al.*, 2011), *Livistona australis* Arecaceae (Kassem *et al.*, 2012), *Bupleurum marginatum* Apiaceae (Ashour *et al.*, 2012), *Psidium guajava* L. Myrtaceae (Park *et al.*, 2012), *Brassica napus* L. Brassicaceae (Pei *et al.*, 2012), *Moringa oleifera* Moringaceae (Kashiwada *et al.*, 2012), *Syzygium cumini* (L.) Skeels Myrtaceae (Ayyanar και Subash-Babu, 2012), *Euphorbia peplus* L. Euphorbiaceae (Ali *et al.*, 2013) κ.ά. Όπως φαίνεται και από τα ανωτέρω πρόκειται για έναν από τους πλέον κοινούς γλυκοσίδες φλαβονολών.

Η ισοκερκιτρίνη βρέθηκε ότι είναι δραστική έναντι του αμοιβαδικού τροφοζωιδίου *Entamoeba histolytica* και για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται για τη αντιμετώπιση γαστρεντερολογικών παθήσεων (Calzada *et al.*, 2001).

Η ισοκερκιτρίνη που απομονώθηκε από το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα των ανθέων του φυτού *Hyptis fasciculata* Benth. της οικογένειας Lamiaceae αποδείχθηκε

από τα αποτελέσματα *in vitro* πειραμάτων ότι αναστέλλει την αντιγραφή του ιού HSV-2 (Herpes simplex virus type 2) και αδρανοποιεί άμεσα τα σωματίδια του ιού (ιοκτόνος δράση) (Gomes *et al.*, 2008).

Η ένωση είναι χρήσιμη στην θεραπευτική αντιμετώπιση του διαβήτη και των επιπλοκών που επιφέρει η ασθένεια, καθώς αναστέλλει τον σχηματισμό των προϊόντων AGEs (Kim *et al.*, 2004, Fujimoto *et al.*, 2004). Τα AGEs (advanced Glycation End-products) είναι πολύπλοκες δομές που σχηματίζονται με εκτεταμένη γλυκοσίωση εξωκυτταρικών και ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών. Ο σχηματισμός τους συνοδεύεται από αυξημένη δραστηριότητα ελευθέρων ριζών, που επιφέρουν βλάβες στους ιστούς (Ahmed, 2005), και αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους μοριακούς μηχανισμούς στον διαβήτη (Kim *et al.*, 2004, Fujimoto *et al.*, 2004).

Ο γλυκοσίδης αυτός της κερκετίνης φάνηκε να επιμηκύνει την διάρκεια ύπνου που προκλήθηκε από πεντοβαρβιτάλη σε επίμυες με δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Το αποτέλεσμα της μελέτης αυτής οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η ένωση αυτή έχει κατευναστική δράση (Kang *et al.*, 1999).

Έρευνες έδειξαν επίσης ότι η ισοκερκιτρίνη που απομονώθηκε από το μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού *Psidium guajava* (Myrtaceae) αναστέλλει *in vitro* την έκλυση της ισταμίνης σε ποσοστό 93.1% και το σχηματισμό NO σε ποσοστό 52.1%, τα μόρια αυτά αποτελούν μεταβιβαστές φλεγμονής, καθώς επίσης αυξάνουν την έκλυση της κυττοκίνης IL-12. Με βάση όλα τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι η ισοκερκιτρίνη είναι ουσία η οποία έχει ισχυρή αντιφλεγμονώση δράση (Matsuzaki *et al.*, 2010).

Οι *in vitro* αντιοξειδωτικές ιδιότητες του κερκετινο-3-O-β-D-γλυκοπυρανοσίδη έχουν αποτελέσει το κέντρο συστηματικής έρευνας. Ταυτοποιήθηκε και χαρακτηρίστηκε ως ένα από τα κύρια αντιοξειδωτικά του φυτού *Hibiscus esculentus* (Shui και Peng, 2004), ομοίως και κατά την μελέτη του *Geranium macrorrhizum*, όπου προσδιορίστηκε η δράση του ως σαρωτής ελευθέρων ριζών (Miliauskas *et al.*, 2004). Επιπλέον, όταν μελετήθηκε ως συστατικό των φύλλων του *Hemerocallis fulva* (daylily), βρέθηκε ότι αναστέλλει την λιπιδική υπεροξειδωση (Zhang *et al.*, 2004).

Επιπλέον, *in vivo* πειράματα έδειξαν ότι η ισοκερκιτρίνη που απομονώθηκε από το μεθανολικό εκχύλισμα των φύλλων του φυτού *Sambucus ebulus* L. Caprifoliaceae

επιταχύνει την επούλωση των πληγών και την ανάπλαση της επιδερμίδας χωρίς σχηματισμό ουλής (Süntara *et al.*, 2010).

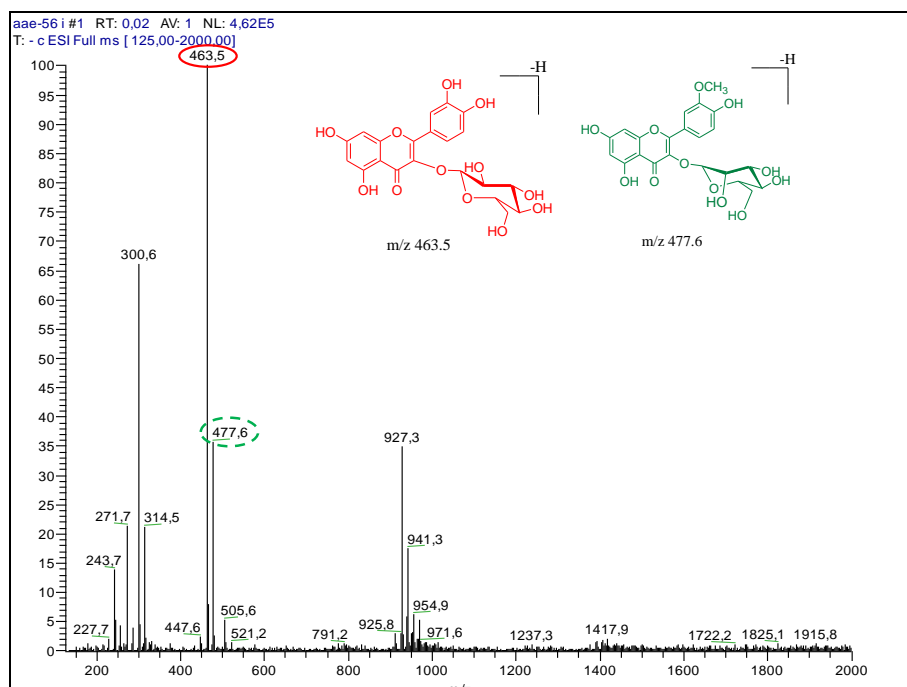
Επίσης, μελετήθηκε και ως προς την πιθανή αντικαρκινική της δράση και τη χρήση της στην πρόληψη κατά του καρκίνου, καθώς σε *in vitro* μελέτες βρέθηκε ότι αποτελεί επαγωγέα των ενζύμων ρεδουκτάση της κινόνης (quinine reductase) και γλουταθειονο-S-τρανσφεράσης (glutathione-S-transferase) (δείκτης αντικαρκινικής δράσης μορίων) και επιπλέον προάγει την κυτταρική διαφοροποίηση σε κυτταροκαλλιέργειες (Kim *et al.*, 2003). Επιπλέον, βάση αποτελεσμάτων *in vivo* πειραμάτων βρέθηκε ότι αναστέλλει την υπερσυσσώρευση του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1). Ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-1 ρυθμίζει την έκφραση περισσότερων από 70 γονιδίων που εμπλέκονται σε διαδικασίες κυτταρικής προσαρμογής και επιβίωσης σε συνθήκες υποξίας. Σε συμπαγείς όγκους, η ραγδαία ανάπτυξη του όγκου ξεπερνά την ικανότητα των υπάρχοντων αιμοφόρων αγγείων να καλύψουν τια απαιτήσεις του ιστού σε οξυγόνο με αποτέλεσμα να αναπτύσσονται υποξικές περιοχές. Η υποξία πυροδοτεί την αγγειογένεση, ωστόσο τα νεοσχηματιζόμενα αιμοφόρα αγγεία συχνά αδυνατούν να ωριμάσουν και δεν είναι λειτουργικά οπότε επιτείνουν την υποξία. Η παρατεταμένη υποξία των καρκινικών ιστών εμφανίζεται σε προχωρημένα στάδια καρκίνου με κακή θεραπευτική πρόγνωση, επειδή τα υποξικά καρκινικά κύτταρα, σε σύγκριση με τα μη υποξικά, είναι περισσότερο ανθεκτικά τόσο στην ακτινοθεραπεία όσο και στην χημειοθεραπεία. Προκλινικές μελέτες σε πολλά ζωικά μοντέλα έχουν αποδείξει ότι η καταστολή του HIF-1 αναστέλλει την αγγειογένεση, επιβραδύνει την ανάπτυξη του όγκου και ενισχύει τα αποτελέσματα της χημειοθεραπείας και της ακτινοβολίας σε ασθενείς με καρκίνο (Nagle *et al.*, 2006).

Επιπλέον, έχει εκτιμηθεί η ηπατοπροστατευτική δράση της ισοκερκιτρίνης και αποδείχθηκε η αποτελεσματικότητά της. Σε *in vitro* πειράματα, ηπατοκύτταρα HepG2 στα οποία προκλήθηκε οξειδωτικό stress με τη χρήση t-BHT (*tetra-butyl hydroperoxide*) και τα οποία αναπτύχθηκαν παρουσία ισοκερκιτρίνης έδειξαν υψηλά ποσοστά βιωσιμότητας (62.5-65.7%). Ωστόσο, η ηπατοπροστατευτική δράση της ένωσης αυτής φαίνεται ότι συνδέεται με την ιδιότητά της να δρα ως σαρωτής ελευθέρων ριζών (Kim *et al.*, 2011).

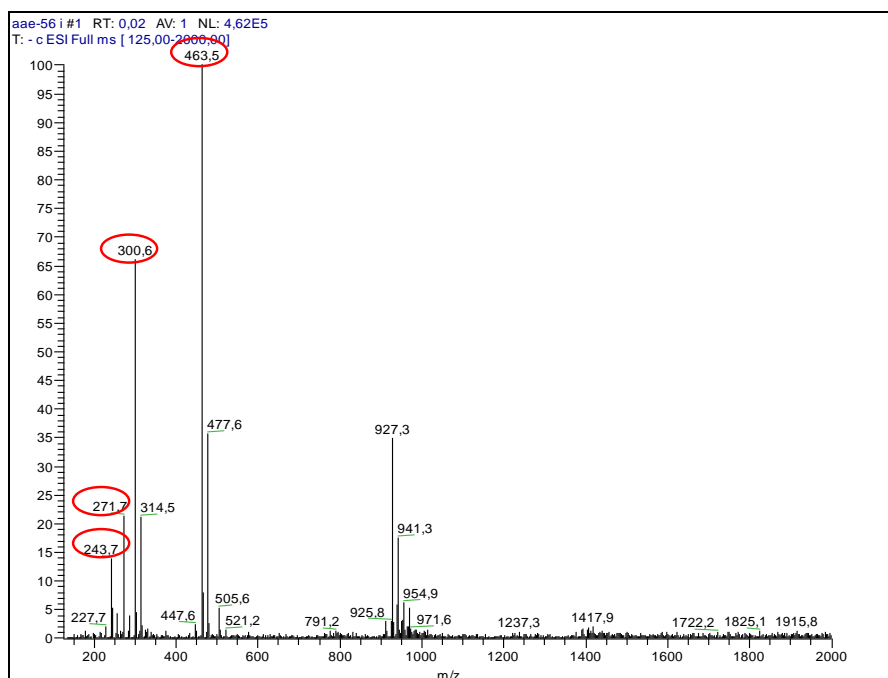
Τέλος, αποτελέσματα μελέτης έδειξαν ότι ο γλυκοσίδης αυτός της κερκετίνης αναστέλλει την υπεροξειδωση των μεμβρανών των ανθρώπινων ερυθροκυττάρων, που μπορεί να επέλθει από βλάβες που επιφέρουν οι ελεύθερες ρίζες στις βιολογικές τους μεμβράνες. Η δράση του αυτή είναι δοσοεξαρτώμενη (Kitagawa *et al.*, 2004).

ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

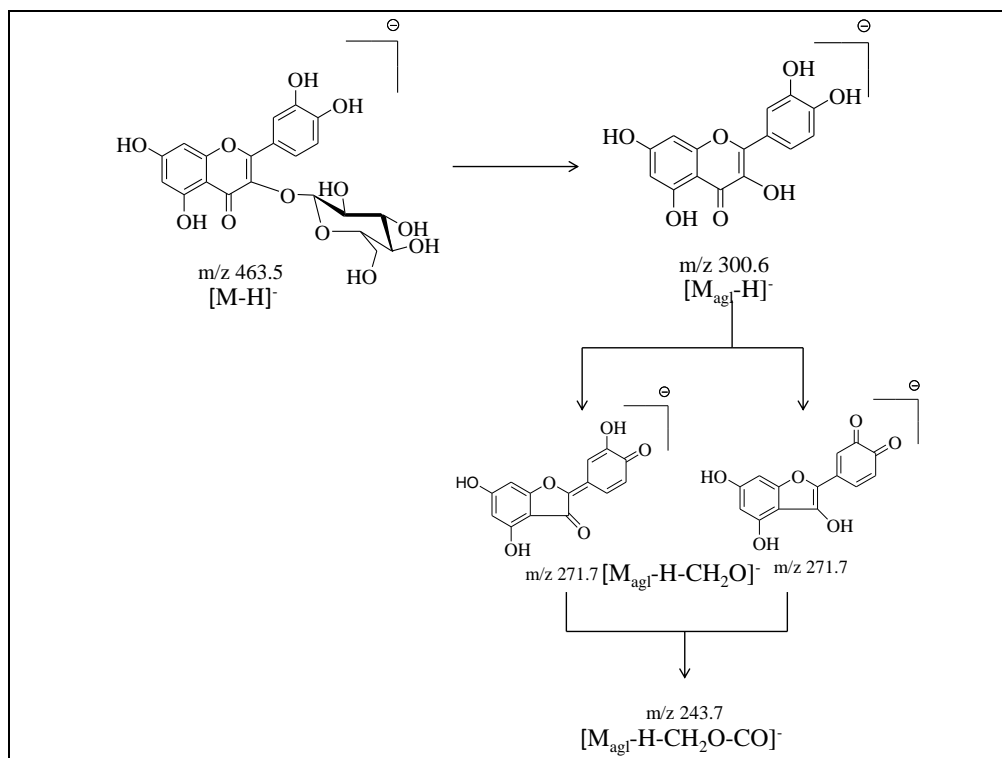
Το φάσμα μάζας (ESI-MS) του μίγματος των ουσιών **5** (ισοκερκοτρίνη) και **8** (ισοκερκετινο 3-O-βεξοσίδης) έδειξε δυο κορυφές στα m/z 463.5 και 477.6 που αντιστοιχούν στα μοριακά ιόντα $[M-H]^-$ των ουσιών και συμφωνούν με τους μοριακούς τύπους $C_{21}H_{20}O_{12}$ και $C_{22}H_{22}O_{12}$ των ουσιών **5** και **8**, αντίστοιχα. Για την ουσία **5** εμφανίζεται το ανιόν του άγλυκου προϊόντος θραυσμάτωσης $[M_{agl}-H]^-$, m/z 300.6, καθώς και τα παράγωγα ιόντα της θραυσμάτωσης της, $[M_{agl}-H-CH_2O]^-$, m/z 271.7 και από συνδυασμένη θραυσμάτωση $[M_{agl}-H-CH_2O-CO]^-$, m/z 243.7 (March και Miao, 2004, Ye *et al.*, 2005).



Εικόνα 36: Φάσμα μάζας (ESI-MS) του μίγματος των ουσιών **5** (■) και **8** (■)



**Εικόνα 37: Φάσμα μάζας (ESI-MS) του μίγματος των ουσιών 5 (■) και 8
Χαρακτηριστικά θραύσματα της ουσίας 5 (■)**



Εικόνα 38: Πιθανός μηχανισμός θραυσμάτωσης της ουσίας 5

Κατά τη φασματομετρική εξέταση της ουσίας (φάσματα UV-Vis), ελήφθησαν χαρακτηριστικές καμπύλες με τις ακόλουθες μέγιστες απορροφήσεις (nm):

Πίνακας 34: Πίνακας UV-Vis της ουσίας 5

	Κορυφή II		Κορυφή I		Δλ I
	II _a	II _b	I _b	I _a	
MeOH	255.78	266sh	302sh	360.4	
MeONa	272.63		329.2sh	392↑	+31.6
AlCl ₃	274.73		339.6sh	435.42	+75
AlCl ₃ /HCl	270.53	300sh	362.5	405	+44.6
NaOAc	274.74 (Δλ=+18.96)		321sh	400	
NaOAc/H ₃ BO ₃	262.10		375		+15.4

Από την τιμή της απορρόφησης της πρώτης κορυφής του μεθανολικού διαλύματος (360.4nm) συμπεραίνεται ότι η ουσία ανήκει στις φλαβονόλες. Με την προσθήκη MeONa παρατηρείται βαθυχρωμική μετατόπιση κατά +31.6nm της κορυφής I_a και ταυτόχρονα αύξηση της εντάσεώς της, θα πρέπει να αποδοθεί στο ελεύθερο υδροξύλιο της θέσης 4'. Η βαθυχρωμική μετατόπιση κατά +75nm της κορυφής I_a μετά από προσθήκη AlCl₃ οφείλεται στο σχηματισμό ενός συμπλόκου μεταξύ της κετονομάδας της θέσης 4 και του υδροξυλίου της θέσης 5, το οποίο μετά την προσθήκη π.HCl διαλύεται μερικώς και ενός συμπλόκου μεταξύ των υδροξυλίων των θέσεων 3' και 4', το οποίο μετά την προσθήκη π.HCl διαλύεται πλήρως, υποδηλώνοντας την παρουσία συστήματος ο-OH στον Β δακτύλιο. Αυτό επιβεβαιώνεται και μετά την προσθήκη NaOAc/H₃BO₃. Το υδροξύλιο της θέσης 7 είναι ελεύθερο, διότι στο φάσμα με NaOAc παρατηρείται βαθυχρωμική μετατόπιση της κορυφής II κατά +18.96nm.

Από το φάσμα ¹H-NMR συμπεραίνεται ότι η ουσία 5 ανήκει στην ομάδα των φλαβονολών, δεδομένου ότι δεν υπάρχει σήμα για H-3. Το σήμα του πρωτονίου H-2' εμφανίζεται ως διπλή κορυφή σε δ 7.71 (J=2.0 Hz). Το σήμα του πρωτονίου H-6' εμφανίζεται ως μια διπλώς διπλή κορυφή σε δ 7.59 (J= 8.5, 2.0 Hz). Το σήμα του πρωτονίου H-5' δίνει μια διπλή κορυφή σε δ 6.86 (J=8.5 Hz), ενώ τα σήματα των

πρωτονίων H-8 και H-6 εμφανίζονται ως διπλές κορυφές σε δ 6.39 ($J=2.0$ Hz) και 6.20 ($J=2.0$ Hz), αντίστοιχα.

Στην κεντρική περιοχή του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ εμφανίζεται το ανωμερικό πρωτόνιο μιας β -γλυκόσης σε δ 5,27 ως διπλή κορυφή ($J=7.0$). Το πρωτόνιο αυτό στο φάσμα HSQC αντιστοιχεί στον ανωμερικό άνθρακα σε δ 102.5. Με προσεκτική παρατήρηση του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ προκύπτει ότι τα πρωτόνια H-6 και H-8 βρίσκονται πριν από τα 6.5 ppm, γεγονός που μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το υδροξύλιο της θέσεως 7 είναι ελεύθερο, κάτι που έχει ήδη επιβεβαιωθεί από τα φάσματα UV/Vis. Επομένως, θα πρέπει να αναζητήσουμε τη θέση γλυκοσυλίωσης στη θέση 3 του φλαβονοειδούς, κάτι το οποίο είναι αναμενόμενο για τις φλαβονόλες. Η παραπάνω υπόθεση αποδεικνύεται εξάλλου και από το φάσμα UV/Vis, από το οποίο έχει ήδη επιβεβαιωθεί ότι υπάρχει ο-σύστημα υδροξυλίων στο δακτύλιο B, οπότε το σάκχαρο δεν μπορεί να είναι συνδεδεμένο ούτε στο υδροξύλιο 3' ούτε στο 4'.

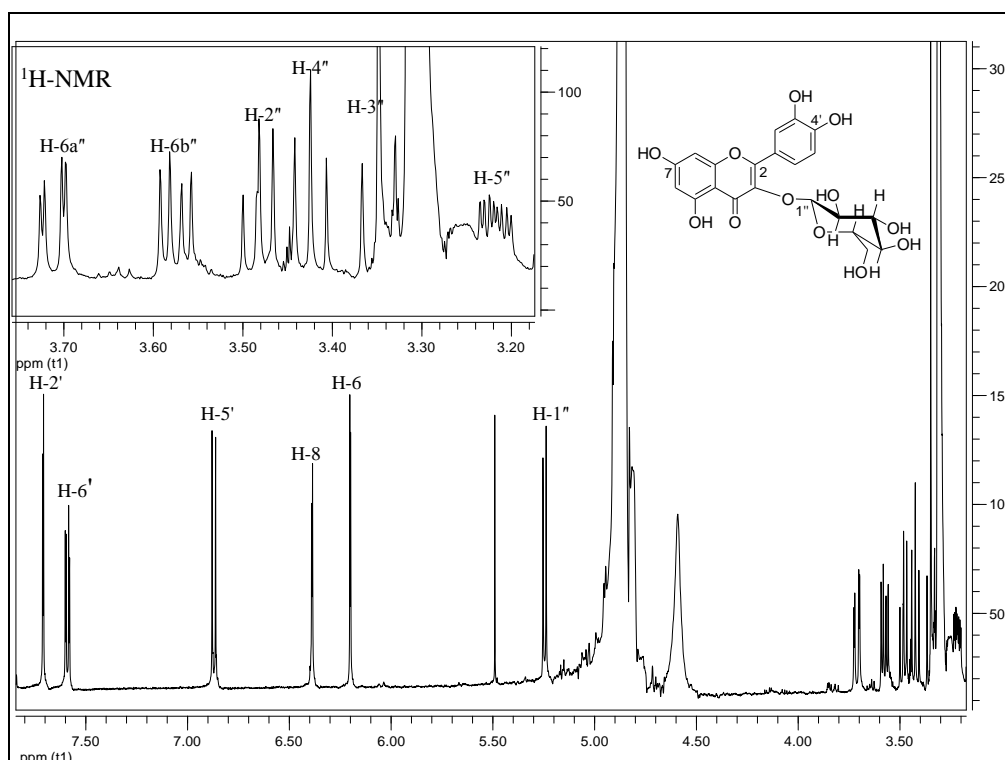
Στο φάσμα HSQC εμφανίζεται ένας οξυγονωμένος μεθυλενικός άνθρακας σε δ 61.1 (C-6'').

Στο φάσμα COSY εμφανίζονται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των H-5'/H-6' του B δακτυλίου της φλαβονόλης και οι αλληλεπιδράσεις των πρωτονίων H-1''/H-2'', H-4''/H-5'', H-6_b''/H-5'', H-6_a''/H-6_b'' των πρωτονίων της β -γλυκόσης.

Η σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων με αυτά που βρίσκονται στη βιβλιογραφία (Mezache *et al.*, 2010), οδηγούν στην ταυτοποίηση της ουσίας **5** ως κερκετινο-3-O- β -D-γλυκοκυρανοσίδη.

Πίνακας 35: Πίνακας $^1\text{H-NMR}$ της ουσίας 5 (CD_3OD , 500 MHz)

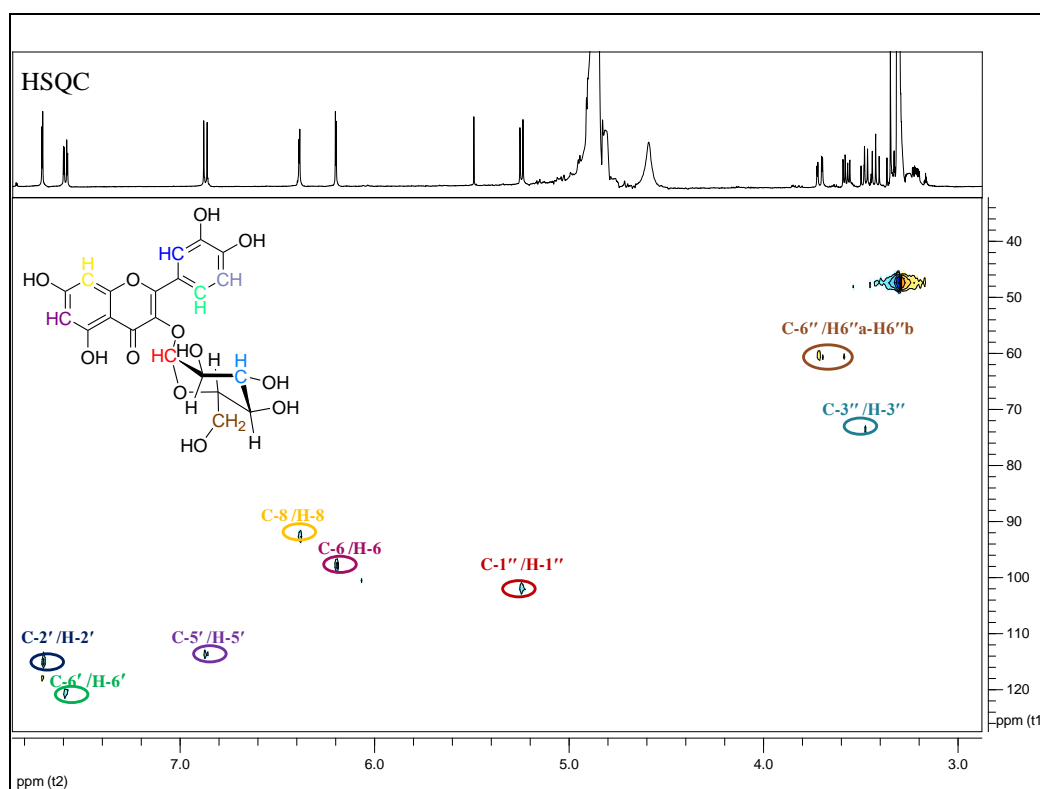
Χημική μετατόπιση δ (ppm)	Αριθμός H	Πολλαπλότητα J (Hz)	Ταυτοποίηση
7.71	1	d (J=2.0)	H-2'
7.59	1	dd (J=8.5, 2.0)	H-6'
6.86	1	d (J=8.5)	H-5'
6.38	1	d (J=2.0)	H-8
6.20	1	d (J=2.0)	H-6
5.26	1	d (J=8.0)	H-1''
3.72	1	dd(J=12.0, 2.5)	H-6a''
3.58	1	dd(J=12.0, 5.5)	H-6b''
3.48	1	t (J=8.5)	H-2''
3.42	1	t (J=9.0)	H-4''
3.34	1	t (J=9.0)	H-3''
3.22	1	m	H-5''



Εικόνα 39: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ουσίας 5 (CD_3OD , 500 MHz)

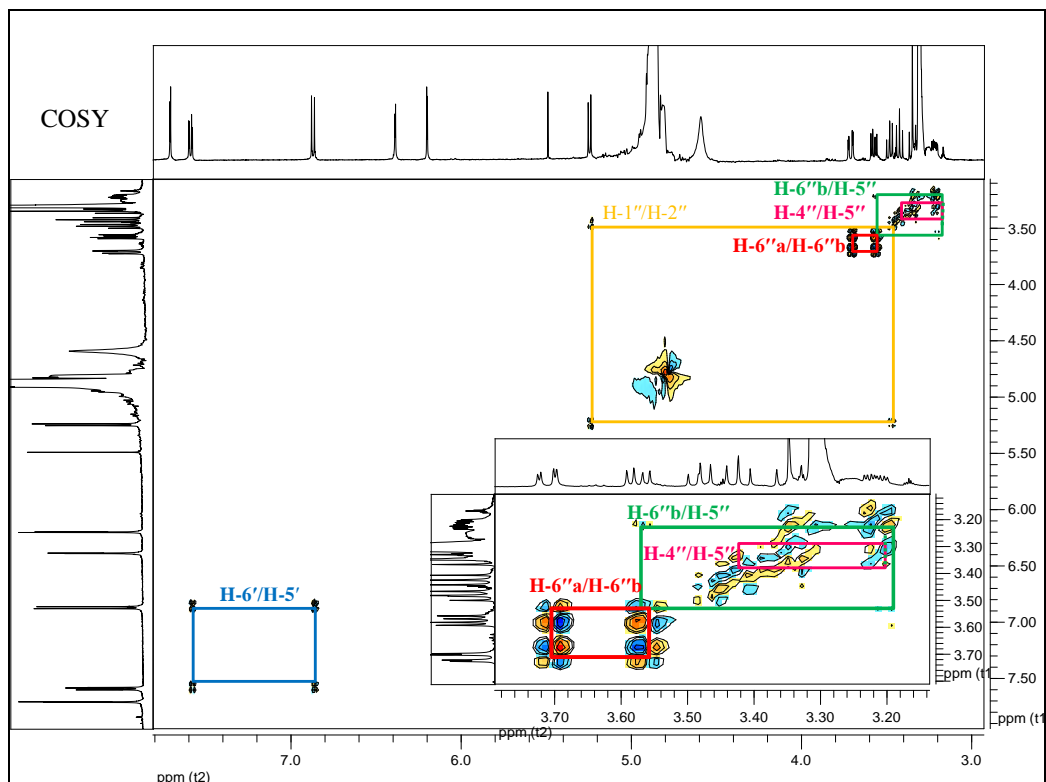
Πίνακας 36: Πίνακας ^{13}C -NMR της ουσίας 5 (CD_3OD , 125 MHz)¹

Χημική μετατόπιση δ (ppm)	Τύπος C	Ταυτοποίηση
114.2	CH	C-2'
121.2	CH	C-6'
115.0	CH	C-5'
98.6	CH	C-6
93.2	CH	C-8
102.5	CH	C-1''
61.1	CH_2	C-6''
74.4	CH	C-3''



Εικόνα 40: Φάσμα HSQC (CD_3OD , 125 MHz) της ουσίας 5

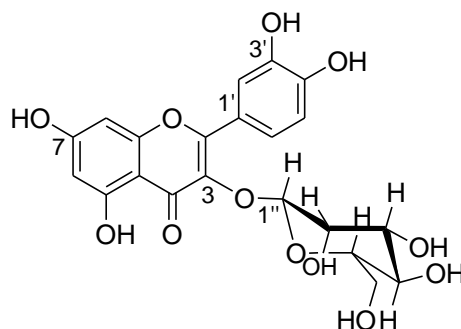
¹ Με βάση το φάσμα HSQC



Εικόνα 41: Φάσμα COSY (CD₃OD, 500 MHz) της ουσίας 5

Γ.2.5. Ουσία 6: κερκετινο-3-O-εξοσίδης

Η ουσία απομονώθηκε ως κόνις κίτρινου χρώματος, αλλά και σε μίγμα μαζί με την ουσία 5 (ισοκερκιτρίνη) και ταυτοποιήθηκε ως κερκετινο-3-O-εξοσίδης, κατόπιν φασματοσκοπικής μελέτης (UV/Vis, ^1H NMR, COSY, HSQC και HMBC).



ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Κατά τη φασματομετρική εξέταση της ουσίας (φάσματα UV-Vis), ελήφθησαν χαρακτηριστικές καμπύλες με τις ακόλουθες μέγιστες απορροφήσεις (nm):

Πίνακας 37: Πίνακας UV-Vis της ουσίας 6

	Κορυφή II		Κορυφή I		Δλ I
	II _a	II _b	I _b	I _a	
MeOH	256	270sh	304.54sh	362	
MeONa	273		321sh	395.45↑	+33.45
AlCl ₃	276		434		+72
AlCl ₃ /HCl	268	300sh	368.2sh	404.54	+42.54
NaOAc	270 (Δλ=+14)		321sh	393	+31
NaOAc/H ₃ BO ₃	261	299sh	376		+14

Από την τιμή της απορρόφησης της πρώτης κορυφής του μεθανολικού διαλύματος (362nm) συμπεραίνεται ότι η ουσία ανήκει στις φλαβονόλες. Με την προσθήκη MeONa παρατηρείται βαθυχρωμική μετατόπιση κατά +33.45nm της κορυφής I_a και ταυτόχρονα αύξηση της εντάσεώς της, θα πρέπει να αποδοθεί στο ελεύθερο υδροξύλιο της θέσης 4'. Η βαθυχρωμική μετατόπιση κατά +72 nm της κορυφής I_a μετά από προσθήκη AlCl₃ οφείλεται στο σχηματισμό ενός συμπλόκου μεταξύ της

κετονομάδας της θέσης 4 και του υδροξυλίου της θέσης 5, το οποίο μετά την προσθήκη π.HCl διαλύεται μερικώς και ενός συμπλόκου μεταξύ των υδροξυλίων των θέσεων 3' και 4', το οποίο μετά την προσθήκη π.HCl διαλύεται πλήρως, υποδηλώνοντας την παρουσία συστήματος ο-υδροξυλίων στον Β δακτύλιο. Επομένως δεν υπάρχει υποκαταστάτης στον δακτύλιο Β. Αυτό επιβεβαιώνεται και μετά την προσθήκη NaOAc/H₃BO₃. Το υδροξύλιο της θέσης 7 είναι ελεύθερο, διότι στο φάσμα με NaOAc παρατηρείται βαθυχρωμική μετατόπιση της κορυφής Π κατά +14nm.

Από το φάσμα ¹H-NMR συμπεραίνεται ότι η ουσία ανήκει στην ομάδα των φλαβονολών, δεδομένου ότι δεν υπάρχει σήμα για H-3. Το σήμα του πρωτονίου H-2' εμφανίζεται ως διπλή κορυφή σε δ 7.84 (J=2.0 Hz). Το σήμα του πρωτονίου H-6' εμφανίζεται ως μια διπλώς διπλή κορυφή σε δ 7.58 (J= 8.5, 2.0 Hz). Το σήμα του πρωτονίου H-5' δίνει μια διπλή κορυφή σε δ 6.86 (J=8.5 Hz), ενώ τα σήματα των πρωτονίων H-8 και H-6 εμφανίζονται ως διπλές κορυφές σε δ 6.40 (J=2.0 Hz) και 6.20 (J=2.0 Hz), αντίστοιχα.

Στην κεντρική περιοχή του φάσματος ¹H-NMR εμφανίζεται το ανωμερικό πρωτόνιο μιας εξόσης σε δ 5.16 ως διπλή κορυφή (J=8.0). Η εξόση αυτή συνδέεται στη θέση 3 του αγλύκου, αφού το ανωμερικό πρωτόνιο του σακχάρου δίνει σήμα με τον άνθρακα 3 της γενίνης (δ 134.51), όπως φαίνεται από το φάσμα HMBC της ουσίας.

Πρέπει να σημειωθεί ότι το σάκχαρο δεν μπορεί να είναι β-D-γλυκόση επειδή η ένωση αυτή (ουσία 6) έχει απομονωθεί και σε μίγμα μαζί με την ισοκερκιτρίνη (κερκετινο 3-O-β-D-γλυκοσίδη, ουσία 5) σε άλλα δείγματα από τα οποία λάβαμε φάσματα ¹H-NMR (AAA-12, AAE-68, AAI-7). Επίσης, επιβεβαιώνεται με προσεχτική μελέτη του φάσματος ¹H-NMR από το οποίο απουσιάζουν οι χαρακτηριστικές κορυφές των πρωτονίων H-6_a και H-6_b της β-D-γλυκόσης.

Παρατηρώντας τα φάσματα 1D και 2D NMR της ουσίας, είναι εμφανές ότι υπάρχουν 7 πρωτόνια σακχάρου [H-1": 5.16 d (J=8.0), H-2": 3.81 dd (J=9.5, 8.0), H-3": 3.52 dd (9.5, 3.5), H-4": 3.84 dd (J= 3.0, 1.0), H-5": 3.47 br d (J=6.0, 1.0), H-6a": 3.64 dd (J=11.0, 6.0), H-6b": 3.56 dd (J=11.0, 6.0)], επομένως το σάκχαρο δεν μπορεί να έχει δομή πεντόσης (6 πρωτόνια) αλλά δεν μπορεί αν είναι και γλυκουρονικό οξύ (5 πρωτόνια). Επιπλέον, από τις συζεύξεις των πρωτονίων όπως αυτές προκύπτουν από το φάσμα ¹H-NMR καθώς και από το φάσμα HMBC

συμπεραίνουμε ότι δεν πρόκειται για φουρανικό δακτύλιο αλλά για πυρανικό. Το ίδιο αποδεικνύουν και οι τιμές δ του φάσματος $^{13}\text{C-NMR}$ [στους φουρανικούς δακτυλίους υπάρχει τουλάχιστον ένα άτομο C (C-4), του οποίου η τιμή δ είναι μεγαλύτερη από 82 ppm] (Hobley και Howarth, 1996).

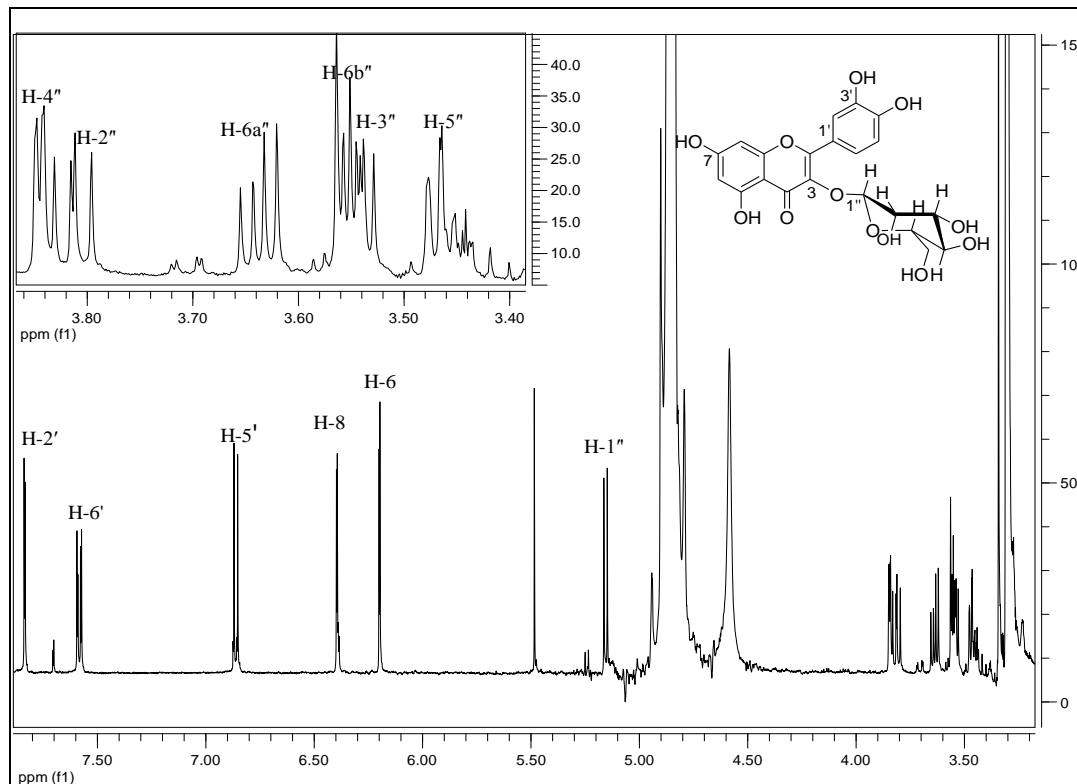
Τα παραπάνω γεγονότα οδήγησαν στην εκτενή μελέτη της βιβλιογραφίας σε βάσεις δεδομένων (SCOPUS, REAXYS, Google Scholar) για όλα τα μέχρι τώρα απομονωμένα, φυσικής προελεύσεως παράγωγα κερκετίνης με γλυκοσυλιωμένο το υδροξύλιο της θέσης 3. Η βιβλιογραφική έρευνα έδειξε ότι τα απομονωμένα μονογλυκοσυλιωμένα παράγωγα κερκετίνης έχουν ως σάκχαρο (πυρανόση) γλυκόση, γαλακτόση (Park *et al.*, 2012) και αλλόση (Iwashina *et al.*, 1990). Σύγκριση των τιμών δ αποδεικνύουν ότι δεν πρόκειται για καμία από αυτές, σε ορισμένες δε, δεν ταυτίζονται όχι μόνο οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων του σακχάρου αλλά ούτε και των πρωτονίων της κερκετίνης. Μια αναφορά υπάρχει για την ουσία 3',4',5,7-φλαβονο-3-O- β -D-μαννοπυρανόση (Qiu *et al.*, 2010), η οποία δεν είναι προσβάσιμη (είναι στην κινεζική γλώσσα).

Τελικά, από μελέτη βιβλιογραφικών δεδομένων για τα φάσματα NMR των σακχάρων με πυρανικούς δακτυλίους, εντοπίστηκε σχεδόν απόλυτη ταύτιση των τιμών δ (όλων των ατόμων C, εκτός του C-1, που οφείλεται στο γεγονός ότι το -OH του εν λόγω άνθρακα είναι συνδεδεμένο με γλυκοσιδικό δεσμό με την κερκετίνη) για τα άτομα C της β -D-μαννόσης (King-Morrissett και Serianni, 1987).

Επειδή η ποσότητα της καθαρής απομονωμένης ουσίας ήταν αρκετά μικρή (2.1mg) δεν έγινε υδρόλυση της ουσίας ώστε να μπορέσουμε με απόλυτη σαφήνεια να διευκρινίσουμε την ταυτότητα του σακχάρου και κυρίως την ταυτομέρειά του. Ωστόσο, υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι πρόκειται για την κερκετινο-3-O-μαννόση. Η μελέτη της δομής της ουσίας συνεχίζεται.

Πίνακας 38: Πίνακας ¹H-NMR της ουσίας 6 (CD₃OD, 500 MHz)

Χημική μετατόπιση δ (ppm)	Αριθμός Η	Πολλαπλότητα J (Hz)	Ταυτοποίηση
7.84	1	d (J=2.0)	H-2'
7.58	1	dd (J=8.5, 2.0)	H-6'
6.86	1	d (J=8.5)	H-5'
6.40	1	d (J=2.0)	H-8
6.20	1	d (J=2.0)	H-6
5.16	1	d (J=8.0)	H-1''
3.84	1	dd (J= 3.0, 1.0)	H-4''
3.81	1	dd (J=9.5, 8.0)	H-2''
3.64	1	dd (J=11.0, 6.0)	H-6a''
3.56	1	dd (J=11.0, 6.0)	H-6b''
3.52	1	dd (J=9.5, 3.0)	H-3''
3.47	1	br d (J=6.0, 1.0)	H-5''

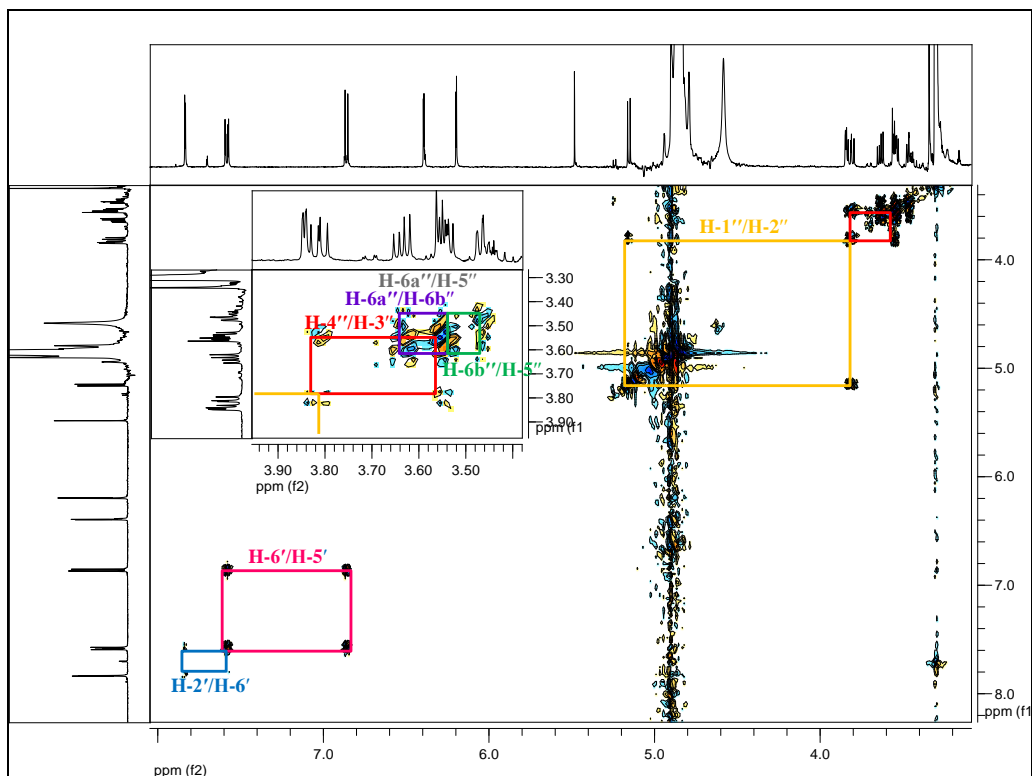


Εικόνα 42: Φάσμα ¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz) της ουσίας 6

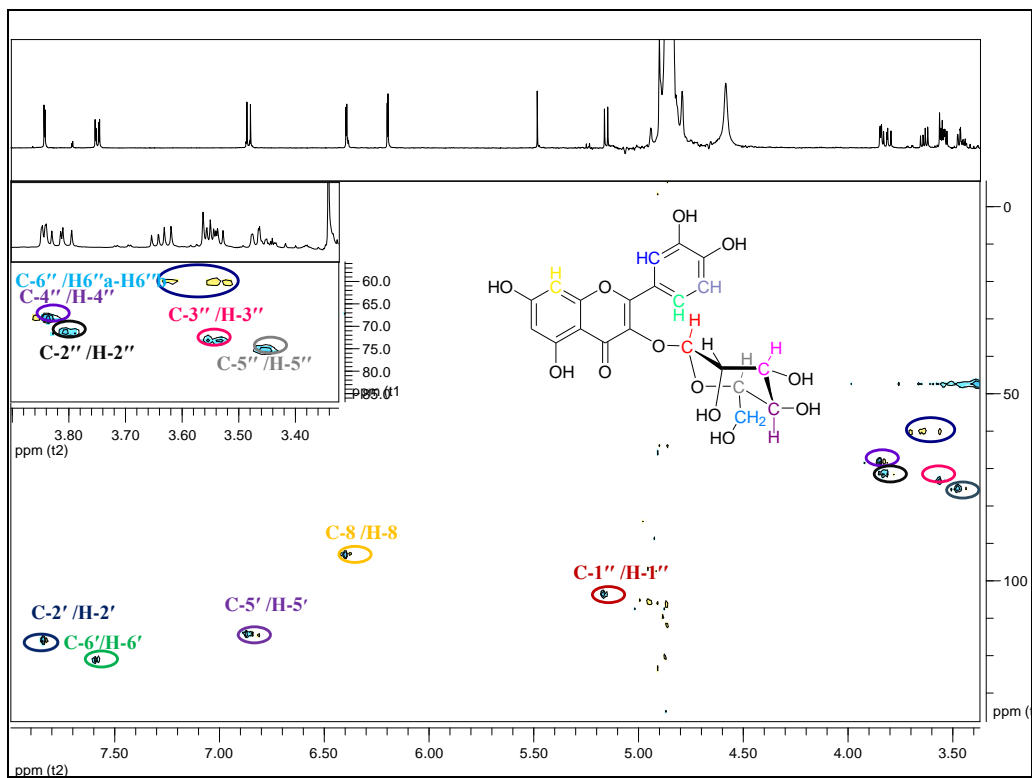
Πίνακας 39: Πίνακας ^{13}C -NMR της ουσίας 6 (CD_3OD , 125 MHz)¹

Χημική μετατόπιση δ (ppm)	Τύπος C	Ταυτοποίηση
116.24	CH	C-2'
144.36	C	C-3'
148.57	C	C-4'
114.20	CH	C-5'
121.86	CH	C-6'
134.51	C	C-3
98.42	CH	C-6
164.68	C	C-7
93.12	CH	C-8
156.54	C	C-9
104.05	C	C-10
103.27	CH	C-1''
72.81	CH	C-2''
74.37	CH	C-3''
68.19	CH	C-4''
76.78	CH	C-5''
60.31	CH ₂	C-6''

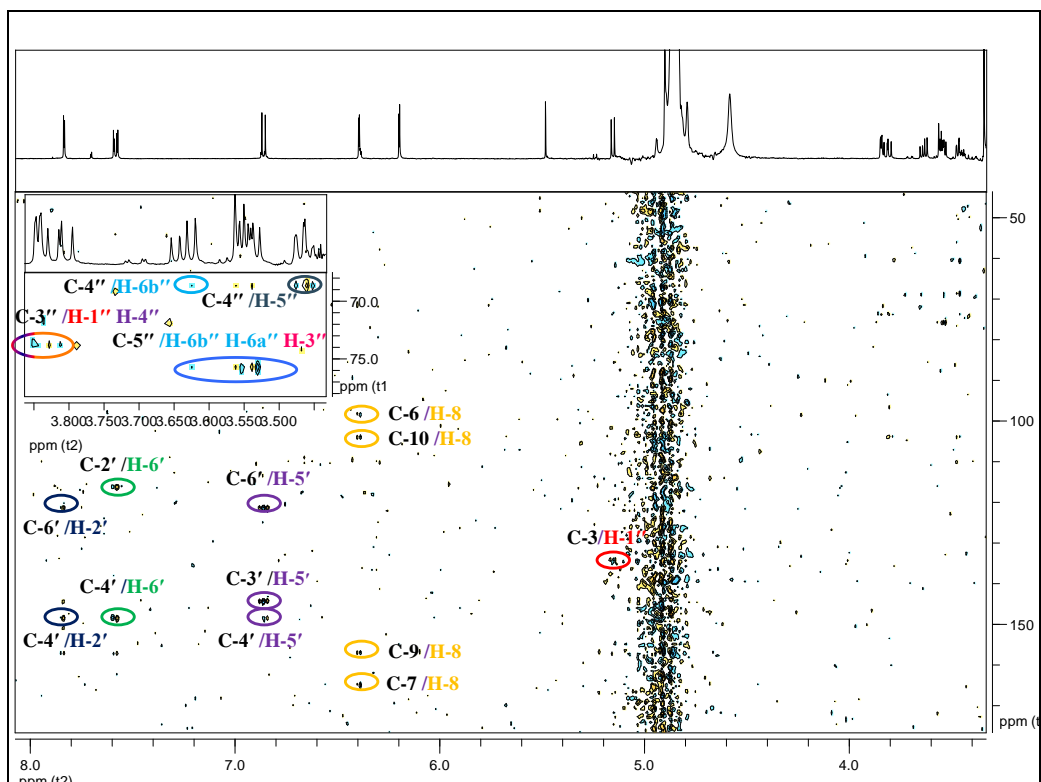
¹ Με βάση τα φάσματα HSQC και HMBC



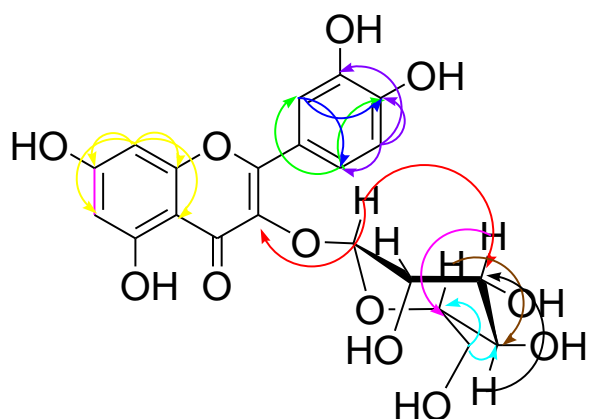
Εικόνα 43: Φάσμα COSY (CD₃OD, 500 MHz) της ουσίας 6



Εικόνα 44: Φάσμα HSQC (CD₃OD, 500 MHz) της ουσίας 6

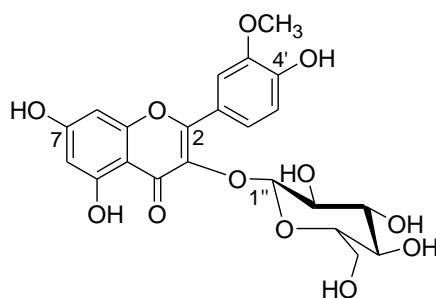


Εικόνα 45: Φάσμα HMBC (CD₃OD, 500 MHz) της ουσίας 6



Γ.2.5. Ουσία 7: 3'-μεθοξυ-κερκετινο-3-O-β-D-γλυκοκυρανοσίδης (ισοραμνετινο-3-O-γλυκοσίδης)

Η ουσία 7 απομονώθηκε σε μίγμα με τις ουσίες 3 (αστραγαλίνη) καθώς επίσης και σε μίγμα με τις ουσίες 3 (αστραγαλίνη) και 8 (ισοραμνετινο-3-O-εξοσίδη) και ταυτοποιήθηκε ως 3'-μεθοξυ-κερκετινο-3-O-β-D-γλυκοκυρανοσίδης, κατόπιν φασματοσκοπικής μελέτης ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HMQC και ESI-MS). Για τη λήψη των φασμάτων $^{13}\text{C-NMR}$ και HMQC χρησιμοποιήθηκε το κλάσμα που περιείχε το μίγμα των ουσιών 3, 7 και 8.



Η πρώτη αναφορά είναι το 1971 από τον Krolikowska από το φυτό *Hipporhaea rhamnoides* Elaeagnaceae (Krolikowska, 1971). Τα πρώτα φασματοσκοπικά δεδομένα εκδόθηκαν ένα χρόνο αργότερα το 1972 (Madvedeva *et al.*, 1972). Απομονώθηκε για πρώτη φορά από σε φυτά της οικογένειας Crassulaceae από τους Gumenyuk, Dykhanov και Batyuk, από το φυτό *Sempervivum ruthenicum* (Gumenyuk *et al.*, 1972). Έχει απομονωθεί από διάφορα φυτά, μερικά από αυτά με βάση τον Harborne είναι: *Arnica chamissonis*, *Brickellia arguta*, *Robinsonia gracilis*, *Tetragonotheca ludoviciana* της οικογένειας Asteraceae, *Cereus grandiflorus* Cactaceae, *Sedum acre* Crassulaceae, *Patersonia spp.* Iridaceae, *Argemone mexicana* Papaveraceae, *Abies amabilis* και *Larix decidua* της οικογένειας Pinaceae, *Pyrus bourgaeana* Rosaceae, *Haplophyllum glabrinum* Rutaceae, *Salix viminalis* Salicaceae, *Leptarrhena pyrolifolia* & *Saxifraga spp.* Saxifragaceae, *Typha latifolia* Typhaceae, *Fagonia Arabica* Zygophyllaceae (Harborne και Baxter, 1999). Επίσης αναφέρουμε *Larix sibirica* Ledb. Pinaceae (Medvedeva *et al.*, 1972), *Astragalus citer* L. Fabaceae (Alaniya *et al.*, 1983), *Bupleurum rotundifolium* L. Apiaceae (Baeva και Karryev, 1983), *Zea mays* Poaceae (Ceska *et al.*, 1984), *Haplophyllum sp.* Rutaceae (Yuldashev *et al.*, 1987), *Picea abies* Coniferae (Strack *et al.*, 1989), *Crocus sativum* Iridaceae και *Ipomoea batatas* Convolvulaceae (Kokubo *et al.*, 1991), *Calotropis gigantea* Asclepiadaceae (Sen *et al.*, 1992), *Annona monticola*, *Rollinia bahiensis* και

Anaxagorea dolichocharpa της οικογένειας Annonaceae (Santos *et al.*, 2000), *Barbarea vulgaris* L. Brassicaceae (Senatore *et al.*, 2000), *Calendula officinalis* Asteraceae (Yoshikawa *et al.*, 2001), *Aerva lanata* Amaranthaceae (Yuldashev *et al.*, 2002), *Marrubium velutinum* Lamiaceae (Karioti *et al.*, 2003), *Warburgia stuhlmannii* Canellaceae (Manguro *et al.*, 2003), *Psidium guajava* Myrtaceae (Salib και Michael., 2004), *Lychnophora pohlii* Asteraceae (Grael *et al.*, 2005), *Tamarix elongata* Ledeb. & *T. laxa* Tamaricaceae (Umbetova *et al.*, 2005), *Salicornia herbacea* Chenopodiaceae (Lee *et al.*, 2005), *Climacoptera obtusifolia* Chenopodiaceae (Yeskaliyeva *et al.*, 2006), *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* Cactaceae (Saleem *et al.*, 2006), *Pituranthos chloranthus* Apiaceae (Touil *et al.*, 2006), *Melilotus neapolitana* Leguminosae (Fiorentino *et al.*, 2007), *Alhagi sparsifolia* Fabaceae (Su *et al.*, 2008), *Paronychia argentea* Lam. Caryophyllaceae (Braca *et al.*, 2008), *Bellis perennis* Asteraceae (Yoshikawa *et al.*, 2008), *Vitis vinifera* Vitaceae (Lücker *et al.*, 2010), *Halostachys caspica* C.A. Mey. Chenopodiaceae (Liu *et al.*, 2010), *Celosia argentea* Amaranthaceae (Shen *et al.*, 2010), *Smyrniium olusatrum* L. Apiaceae (Bencheraiet *et al.*, 2011), *Genista pichisermolliana* Valsecchi Fabaceae (Noccioli *et al.*, 2011), *Sorbus torminalis* L. Crantz Rosaceae (Olszewska και Roj, 2011), *Callianthemum taipaicum* Ranunculacea (Wang *et al.*, 2012), *Syzygium cumini* (L.) Skeels Myrtaceae (Ayyanar *et al.*, 2012), κ.ά.

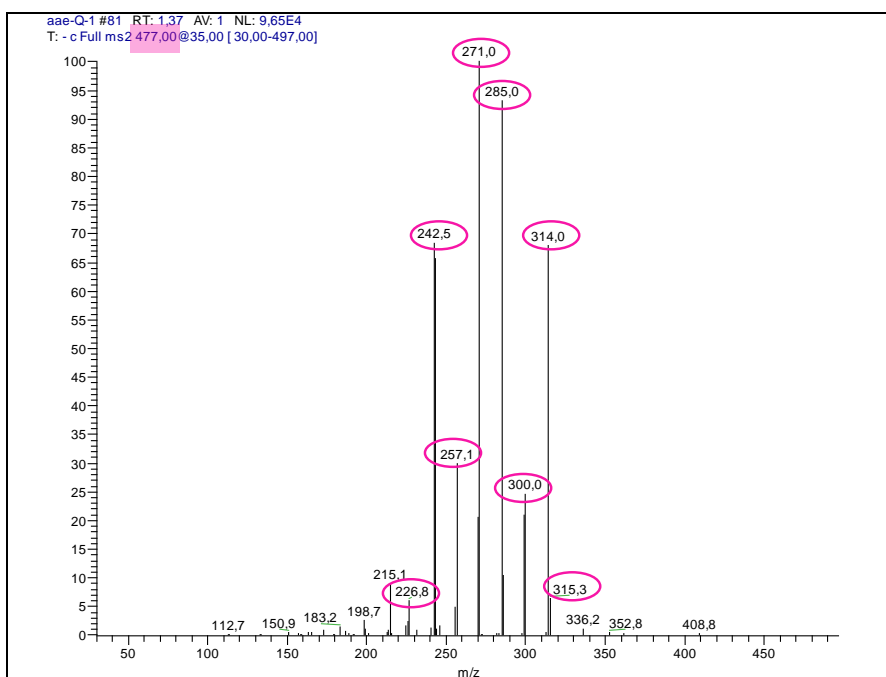
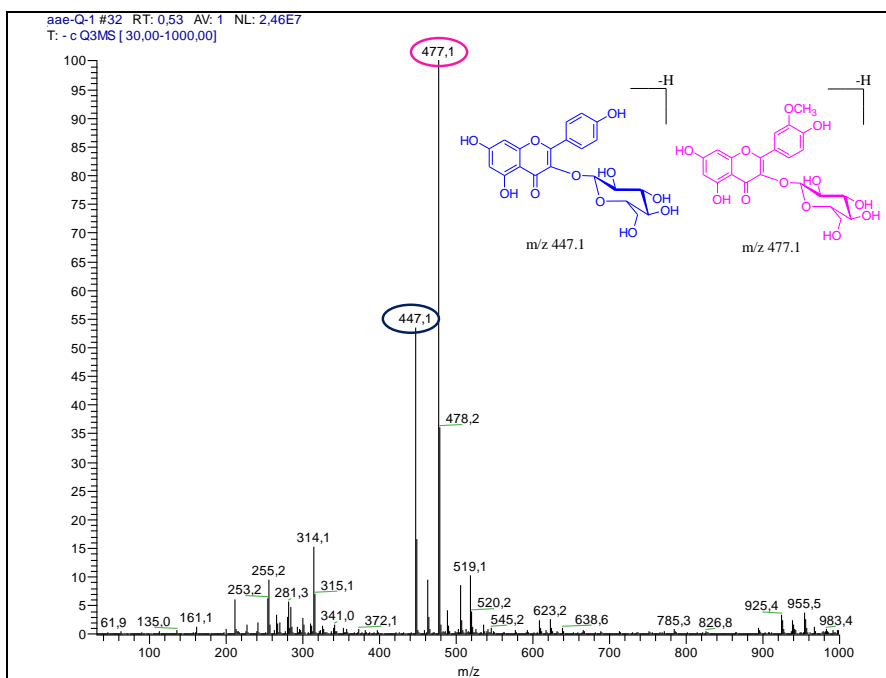
Η ένωση είναι χρήσιμη στην θεραπευτική αντιμετώπιση του μη ινσουλινοεξαρτώμενου διαβήτη και των επιπλοκών που επιφέρει η ασθένεια, καθώς αναστέλλει την δράση του ενζύμου αναγωγή της αλδόζης και με αυτόν τον τρόπο περιορίζει την ενδοκυτταρική συσσώρευση της σορβιτόλης. Κατά τον σακχαρώδη διαβήτη, οι υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης προκαλούν κορεσμό του κυρίως υπεύθυνου ενζύμου μεταβολισμού της (εξοκινάση). Έτσι λοιπόν η γλυκόση εισρέει στα κύτταρα των ιστών π.χ αμφιβληστροειδή και φακού οφθαλμών, νεφρούς, περιφερειακά νεύρα και τα αγγεία. Τότε επιλαμβάνεται του μεταβολισμού της το ενζυμικό σύστημα των πολυολών, δηλαδή η αναγωγή της αλδόζης και η αφυδρογονάση της σορβιτόλης. Το πρώτο ένζυμο ανάγει την γλυκόση σε σορβιτόλη και το δεύτερο οξειδώνει (με αφυδρογόνωση) τη σορβιτόλη προς φρουκτόση. Η δεύτερη μετατροπή είναι πολύ βραδύτερη της πρώτης, έτσι αυξάνεται πολύ η σορβιτόλη ενδοκυτταρικά, διότι αδυνατεί να διαβεί την κυτταρική μεμβράνη λόγω του πολύ ισχυρού πολικού χαρακτήρα της (Ρέκκα, 2010). Ο ισοραμετινο-3-O-β-D-

γλυκοσίδης αποδείχθηκε από *in vitro* πειράματα ότι αναστέλλει την αναγωγή της αλδόζης και σε *in vivo* πειράματα διαπιστώθηκε ότι περιορίζει τα επίπεδα σορβιτόλης στο αίμα (Lee *et al.*, 2004).

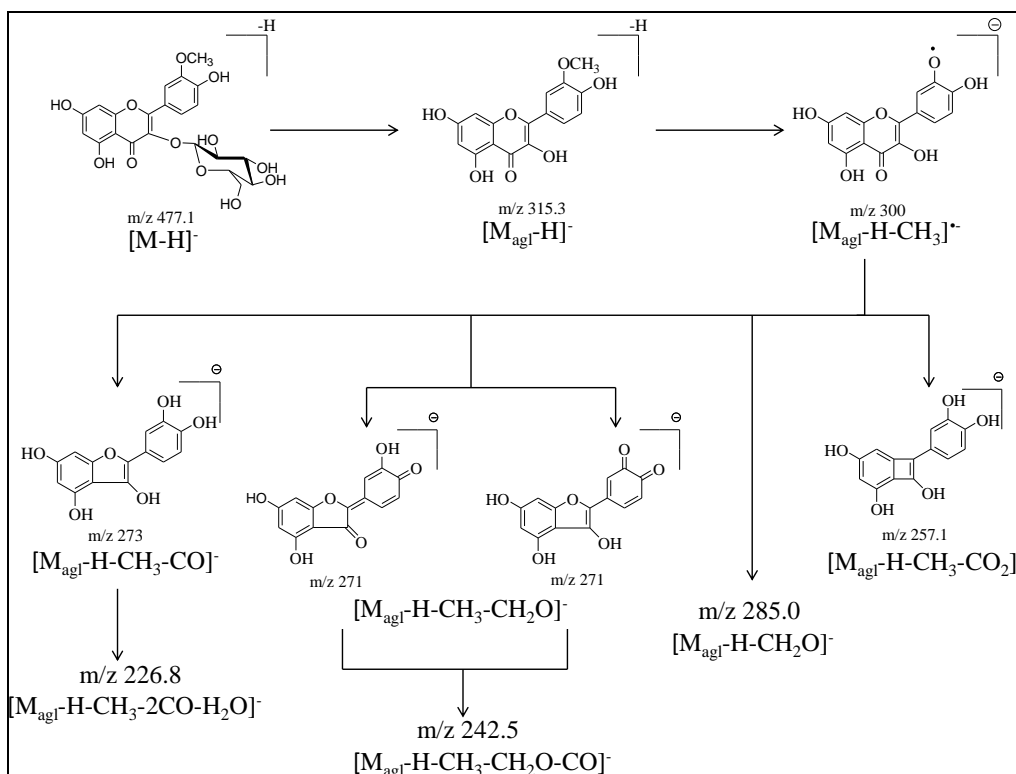
Ο ισοραμετινο-3-O-β-D-γλυκοσίδης έχει μελετηθεί και ως προς την αντιμικροβιακή του δράση (Liu *et al.*, 2010) καθώς και για την κυττοτοξική του δράση (Shen *et al.*, 2010) σε *in vitro* πειράματα, ωστόσο τα αποτελέσματα δεν ήταν θεαματικά. Επίσης, σε *in vitro* πειράματα που διενεργήθηκα φάνηκε αδρανές για την αντιμετώπιση του *Trypanosoma cruzi* (Grael *et al.*, 2004).

ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Το φάσμα μάζας (ESI-MS-MS) του μίγματος των ουσιών **3** (αστραγαλίνη) και **7** έδειξε δυο κορυφές στα m/z 447.1 και 477.1 που αντιστοιχούν στα μοριακά ιόντα $[M-H]^-$ των ουσιών και συμφωνούν με τους μοριακούς τύπους $C_{21}H_{20}O_{11}$ και $C_{22}H_{22}O_{12}$ των ουσιών **3** και **7**, αντίστοιχα. Για την ουσία **7** εμφανίζεται το ιόν του άγλυκου $[M_{agl}-H]^-$, m/z 315.3, αλλά και η ανιονική του ρίζα $[M_{agl}-H]^-$, m/z 314.0. Μετά από θραυσμάτωση του αγλύκου ιόντος με m/z 447.1 προκύπτουν το ανιόν $[M_{agl}-H-CH_2O]^-$, m/z 285.0 καθώς και η ανιονική ρίζα $[M_{agl}-H-CH_3]^-$, m/z 300.0, τα θραύσματα $[M_{agl}-H-CH_3-CH_2O]^-$, m/z 271.0 και $[M_{agl}-H-CH_3-CO_2]^-$, m/z 257.1, ενώ από συνδυασμένη θραυσμάτωση τα ιόντα $[M_{agl}-H-CH_3-CH_2O-CO]^-$, m/z 242.5 και $[M_{agl}-H-CH_3-2CO-H_2O]^-$, m/z 226.8 (Dubber *et al.*, 2005, Davis, 2007, Ye *et al.*, 2005).



Εικόνα 46: Φάσμα μάζας του μίγματος των ουσιών 3 (■) και 7 (■)



Εικόνα 47: Πιθανός μηχανισμός θραυσμάτωσης της ουσίας 7

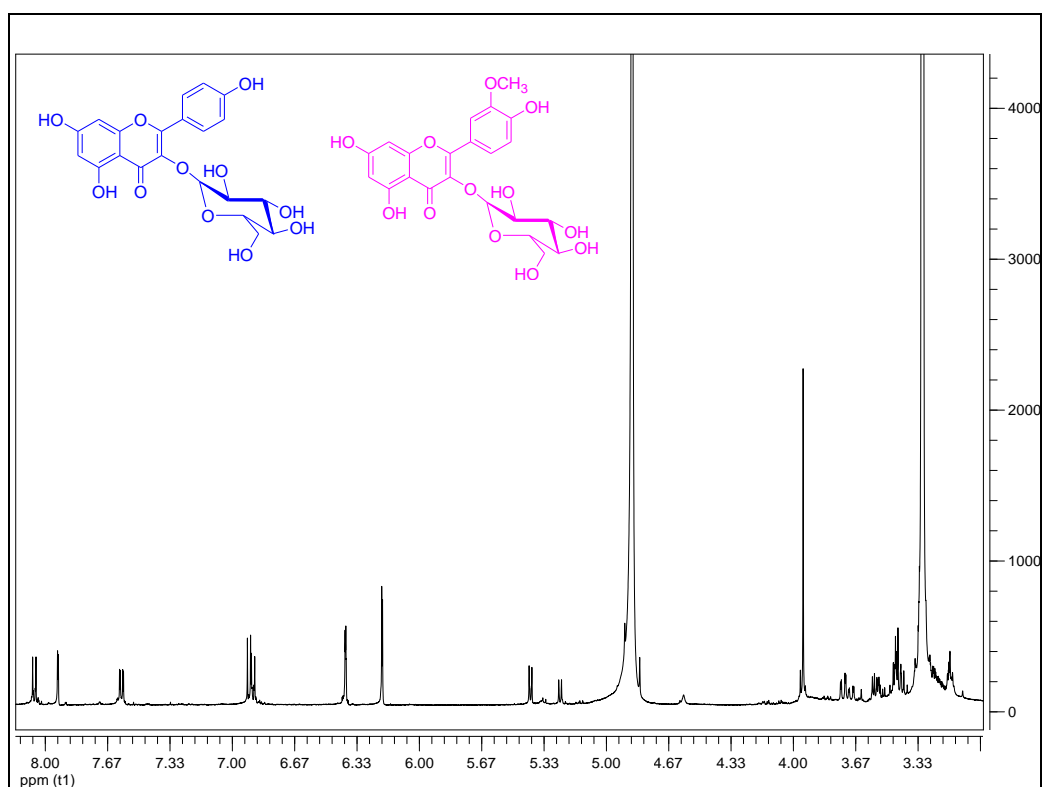
Στην αρωματική περιοχή του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ παρατηρούνται σήματα που ανήκουν σε σύστημα ABX και είναι τα πρωτόνια του δακτυλίου B του φλαβονοειδούς. Έτσι, σε δ 7.94 ως διπλή κορυφή ($J=2.0$ Hz) εμφανίζεται το πρωτόνιο H-2', σε δ 7.58 ως διπλώς διπλή κορυφή ($J=8.5, 2.0$ Hz) εμφανίζεται το πρωτόνιο H-6', ενώ σε δ 6.91 ως διπλή κορυφή ($J=8.5$ Hz) εμφανίζεται το πρωτόνιο H-5'. Ακολουθούν τα πρωτόνια του δακτυλίου A και πιο συγκεκριμένα τα πρωτόνια H-6 και H-8 εμφανίζονται ως διπλές κορυφές σε δ 6.40 ($J=2.0$ Hz) και 6.20 ($J=2.0$ Hz), αντίστοιχα. Σε δ 3.95 εμφανίζεται μια έντονη απλή κορυφή, όπου από την ολοκλήρωση της κορυφής στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$, προκύπτει ότι αντιστοιχεί σε 3H της μεθοξυομάδας της θέσης 3' της ουσίας 7.

Στην κεντρική περιοχή του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ εμφανίζεται το ανωμερικό πρωτόνιο μιας β -γλυκόσης σε δ 5.42 ($J=8.0$ Hz). Επιπλέον, σε δ 3.73 εμφανίζεται ως διπλώς διπλή κορυφή ($J=12.0, 2.5$ Hz) το πρωτόνιο H-6a" της γλυκόσης.

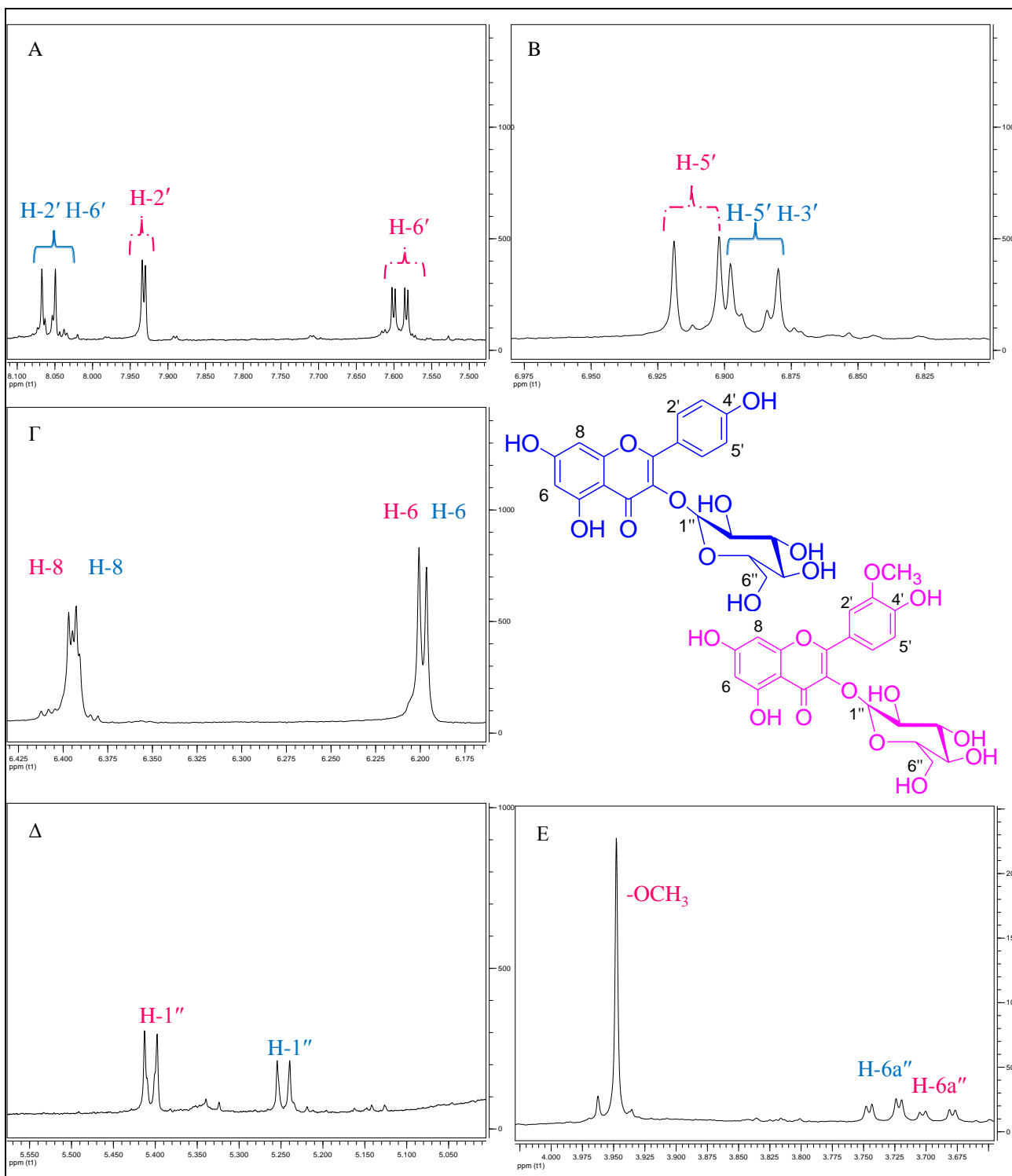
Η σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων με αυτά που βρίσκονται στη βιβλιογραφία (Touil *et al.*, 2006), οδηγούν στην ταυτοποίηση της ουσίας 7 ως 3'-μεθοξυ-κερκετινο-3-O- β -D-γλυκοπυρανοσίδης.

Πίνακας 40: Πίνακας $^1\text{H-NMR}$ της ουσίας 7 (CD_3OD , 500 MHz)

Χημική μετατόπιση δ (ppm)	Αριθμός H	Πολλαπλότητα J (Hz)	Ταυτοποίηση
7.94	1	d (J=2.0)	H-2'
7.58	1	dd (J=8.5, 2.0)	H-6'
6.91	1	d (J=8.5)	H-5'
6.40	1	d (J=2.0)	H-8
6.20	1	d (J=2.0)	H-6
5.42	1	d (J=8.0)	H-1''
3.73	1	dd (J=12.0, 2.5)	H-6a''
3.95	3	s	-OCH ₃
3.20-3.58	5	m	H-2''-H-6b''



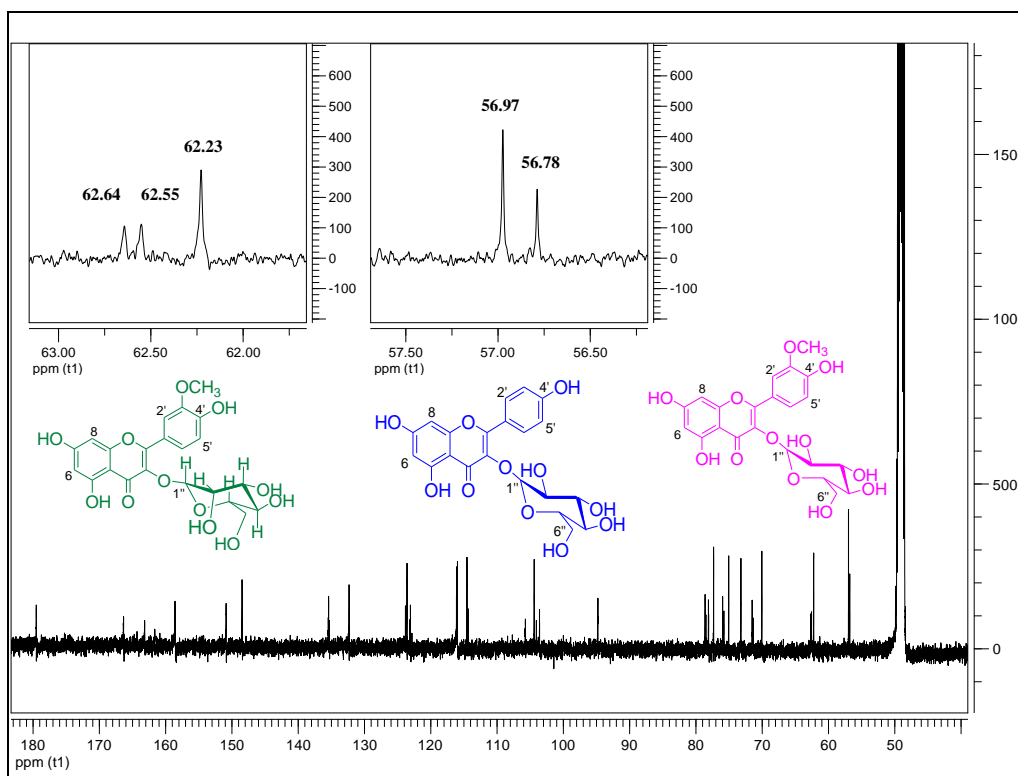
Εικόνα 48: Πλήρες φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 500 MHz) του μίγματος των ουσιών 3 (■) και 7 (■)



Εικόνα 49: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 500 MHz) του μίγματος των ουσιών 3 (■) και 7 (■). A: 8.10-7.50ppm, B: 6.95-6.55ppm, Γ: 6.43-6.10ppm, Δ: 5.55-5.00ppm, E: 4.10-3.60ppm

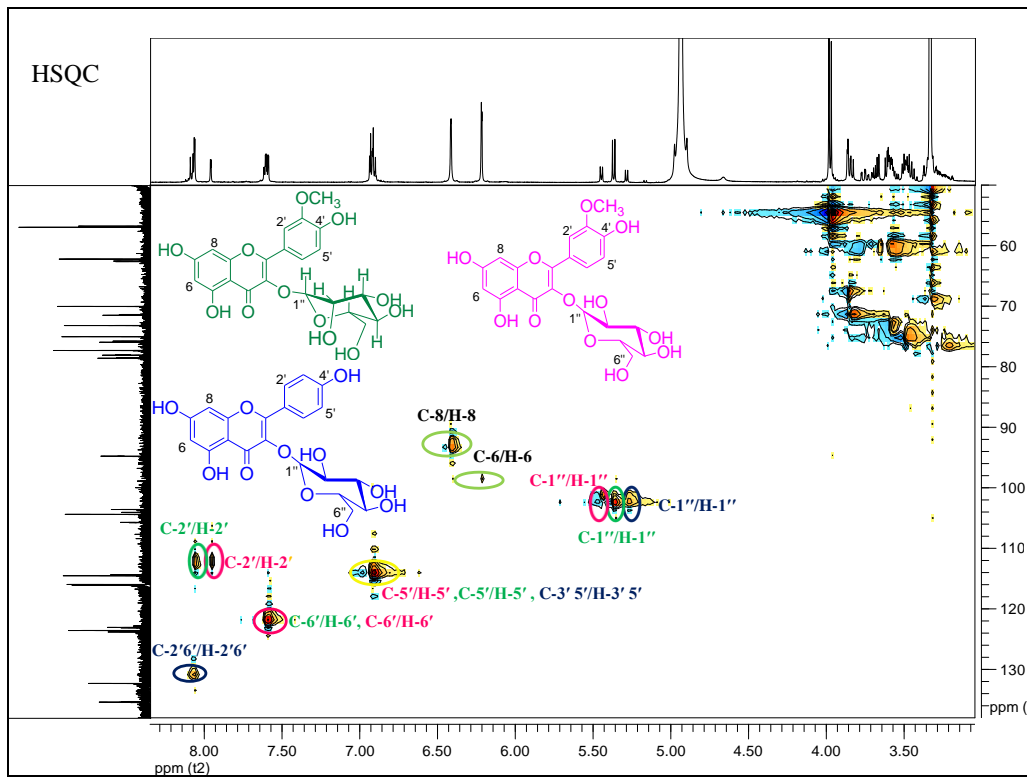
Πίνακας 41: Πίνακας ^{13}C -NMR της ουσίας 7 (CD_3OD , 125 MHz)¹

Χημική μετατόπιση δ (ppm)	Τύπος C	Ταυτοποίηση
113.4	CH	C-2'
121.0	CH	C-6'
112.0	CH	C-5'
99.1	CH	C-6
92.7	CH	C-8
100.5	CH	C-1''
56.5	CH	-OCH ₃



Εικόνα 50: Φάσμα ^{13}C -NMR (CD_3OD , 125 MHz) του μίγματος των ουσιών 3 (■), 7 (■) και 8 (■)

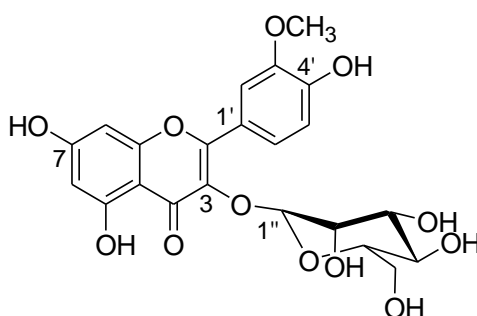
¹ Με βάση τα φάσματα ^{13}C -NMR και HMQC του μίγματος των ουσιών 3, 7 και 8



Εικόνα 51: Φάσμα HMQC (CD₃OD, 500 MHz) του μίγματος των ουσιών 3 (■), 7 (■) και 8 (■)

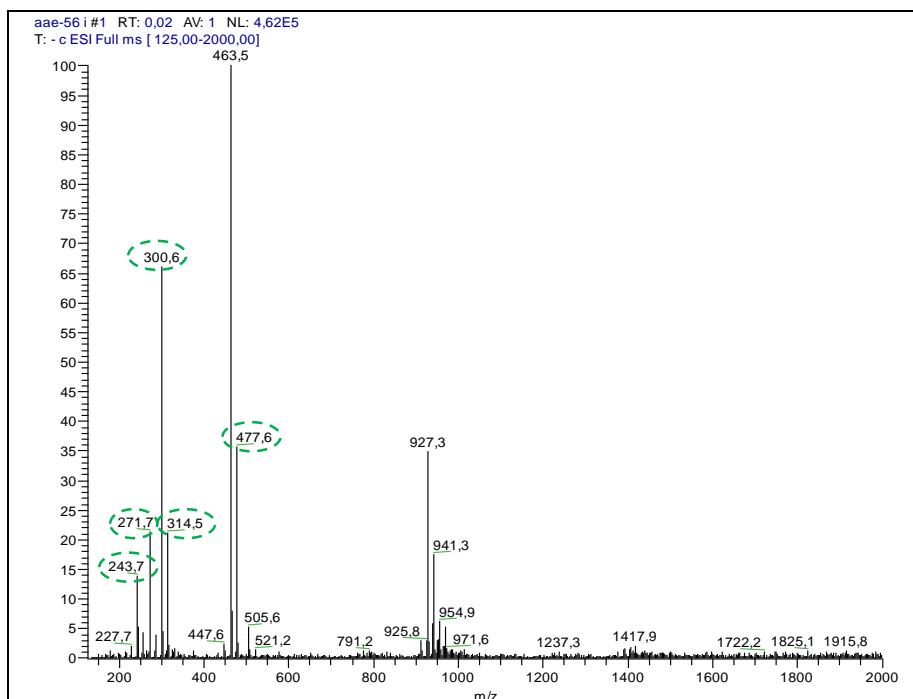
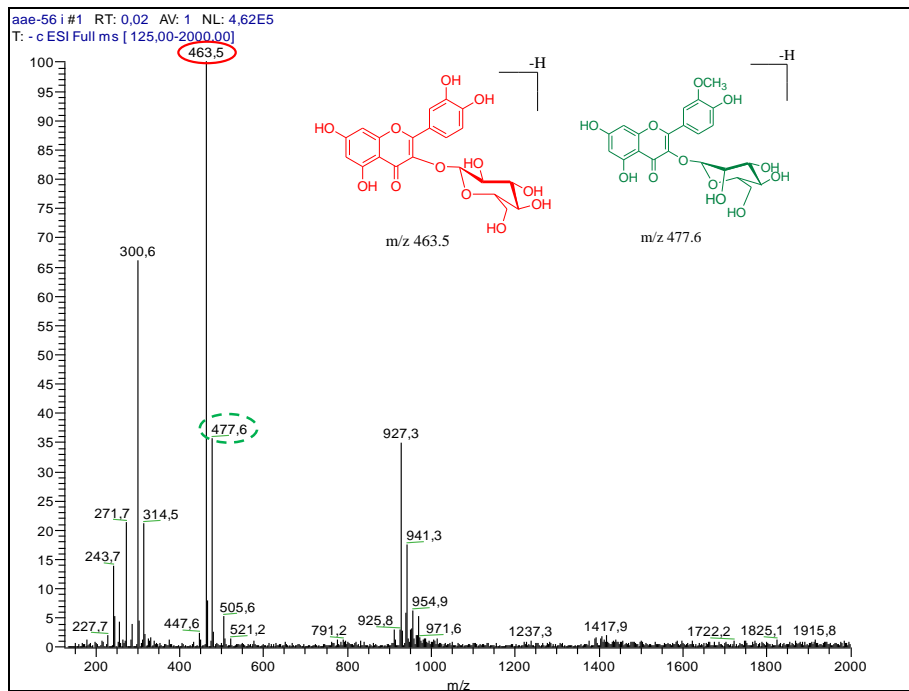
Γ.2.6. Ουσία 8: 3'-μεθοξυ-κερκετινο-3-O-εξοσιδης (ισοραμνετινο-3-O-εξοσιδης)

Η ουσία **8** απομονώθηκε σε μίγμα με την ουσία **5** (ισοκερκιτρίνη), αλλά και σε μίγμα με τις ουσίες **3** (αστραγαλίνη) και **7** (ισοραμνετινο 3-O-γλυκοσίδη) και ταυτοποιήθηκε ως 3'-μεθοξυ-κερκετινο-3-O-εξοσιδης, κατόπιν φασματοσκοπικής μελέτης ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HMQC και ESI-MS). Για τη λήψη των φασμάτων $^1\text{H NMR}$ και ESI-MS, χρησιμοποιήθηκε το κλάσμα που περιείχε το μίγμα των ουσιών **5** (ισοκερκιτρίνη) και **8**, ενώ για τη λήψη των φασμάτων $^{13}\text{C-NMR}$ και HMQC χρησιμοποιήθηκε το κλάσμα που περιείχε το μίγμα των ουσιών **3** (αστραγαλίνη), **7** (ισοραμνετινο 3-O-γλυκοσίδη) και **8**.

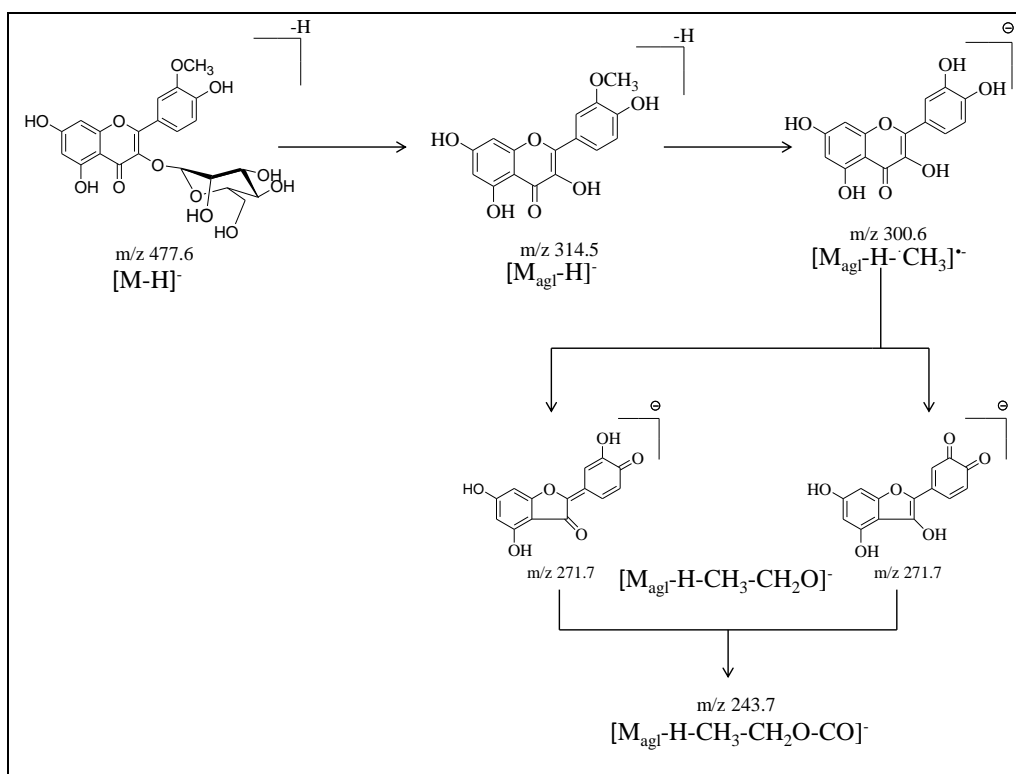


ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Το φάσμα μάζας (ESI-MS-MS) του μίγματος των ουσιών **5** (ισοκερκιτρίνη) και **8** (ισοραμνετινο 3-O-εξοσιδης) έδειξε δυο κορυφές στα m/z 463.5 και 477.6 που αντιστοιχούν στα μοριακά ιόντα $[\text{M-H}]^-$ των ουσιών και συμφωνούν με τους μοριακούς τύπους $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$ και $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{12}$ των ουσιών **5** και **8**, αντίστοιχα. Για την ουσία **8** εμφανίζεται το ιόν του άγλυκου προϊόντος θραυσμάτωσης $[\text{M}_{\text{agl}}\text{-H}]^-$, m/z 314.5. Μετά από θραυσμάτωση του αγλύκου $[\text{M}_{\text{agl}}\text{-H}]^-$, m/z 314.5 προκύπτει το ανιόν $[\text{M}_{\text{agl}}\text{-H-CH}_3]^-$, m/z 300.6. Από το θραύσμα m/z 300.6 προκύπτουν επίσης τα θραύσματα $[\text{M}_{\text{agl}}\text{-H-CH}_3\text{-CH}_2\text{O}]^-$, m/z 271.7 και από συνδυασμένη θραυσμάτωση το $[\text{M}_{\text{agl}}\text{-H-CH}_3\text{-CH}_2\text{O-CO}]^-$, m/z 243.7 (Dubber *et al.*, 2005, Davis, 2007).



Εικόνα 52: Φάσμα μάζας του μίγματος των ουσιών 5 (■) και 8 (■)



Εικόνα 53: Πιθανός μηχανισμός θραυσμάτωσης της ουσίας 8

Στην αρωματική περιοχή του φάσματος 1H -NMR παρατηρούνται σήματα που ανήκουν σε σύστημα ABX και είναι τα πρωτόνια του δακτυλίου B του φλαβονοειδούς. Έτσι, σε δ 8.04 ως διπλή κορυφή ($J=2.0$ Hz) εμφανίζεται το πρωτόνιο H-2', σε δ 7.57 ως διπλώς διπλή κορυφή ($J=8.5, 2.0$ Hz) εμφανίζεται το πρωτόνιο H-6', ενώ σε δ 6.90 ως διπλή κορυφή ($J=8.5$ Hz) εμφανίζεται το πρωτόνιο H-5'. Ακολουθούν τα πρωτόνια του δακτυλίου A και πιο συγκεκριμένα τα πρωτόνια H-6 και H-8 εμφανίζονται ως διπλές κορυφές σε δ 6.40 ($J=2.0$ Hz) και 6.20 ($J=2.0$ Hz), αντίστοιχα.

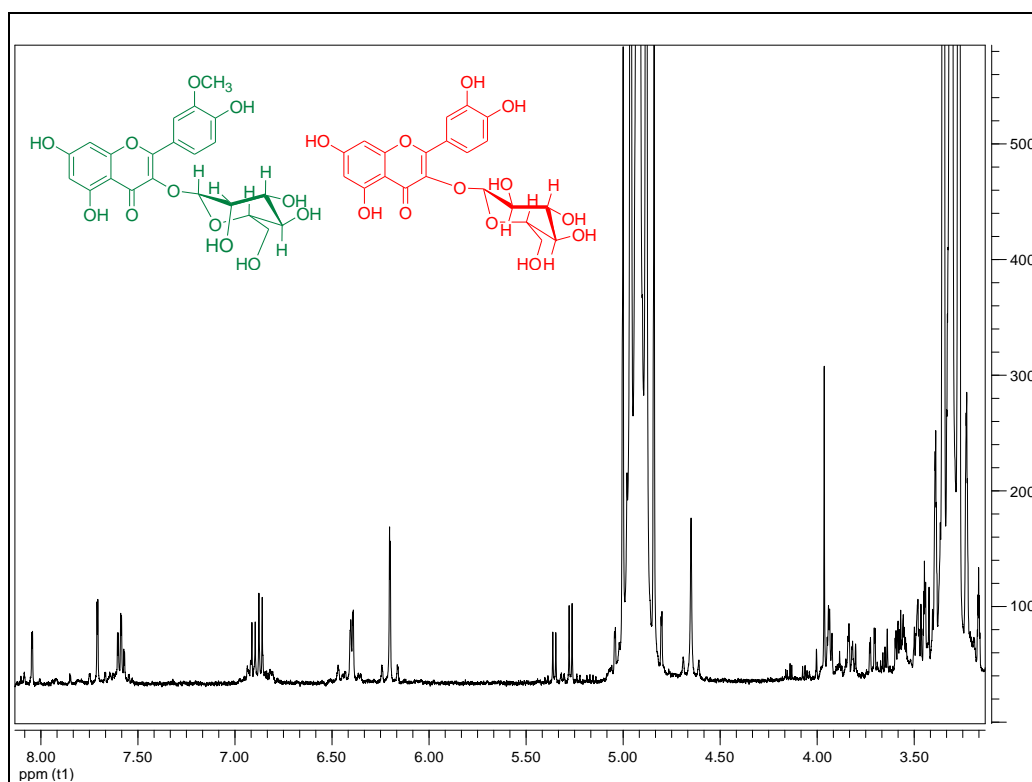
Στην κεντρική περιοχή του φάσματος 1H -NMR εμφανίζεται το ανωμερικό πρωτόνιο μιας εξοπυρανόσης σε δ 5.35 ($J=8.0$ Hz). Δεν μπορεί η θέση σύνδεσης του σακχάρου να είναι σε υδροξύλιο του A δακτυλίου της φλαβονόλης επειδή δεν υπάρχουν διαφορές στις τιμές δ των πρωτονίων H-6 και H-8 σε σύγκριση με αυτά της ισοκερκιτρίνης (ουσίας 5) του μίγματος. Επίσης, δεν μπορεί να είναι συνδεδεμένο σε υδροξύλια του δακτυλίου B των φλαβονοειδών επειδή σε αυτή την περίπτωση θα έπρεπε το πρωτόνιο H-5' να είναι πιο αποθωρακισμένα λόγω της υψηλής πολικότητας

του σακχάρου και να έχει τιμή δ μεγαλύτερη των 7.15ppm (Park και Lee, 1996). Επομένως, η εξόση αυτή συνδέεται στη θέση 3 του αγλύκου. Τέλος, το σάκχαρο δεν μπορεί να είναι γλυκόση και αυτό επειδή στην περιοχή 3.90-3.50ppm να μεν παρατηρούμε τα χαρακτηριστικά σήματα του Η-6α'' της γλυκόσης τα οποία ανήκουν στην κερκετινο-3-Ο-γλυκόση (ουσία 5) που συνυπάρχει με την εξεταζόμενη ουσία, αλλά επίσης παρατηρούμε σήματα παρόμοια με αυτά του σακχάρου που υπάρχει στην κερκετινο-3-Ο-εξόση (ουσία 6). Αποτέλεσμα είναι να έχουμε σοβαρές ενδείξεις ότι πρόκειται για το ίδιο σάκχαρο, το οποίο μέχρι στιγμής δεν έχει ταυτοποιηθεί πλήρως. Επιπλέον, έχει ήδη απομονωθεί και ταυτοποιηθεί σε μίγμα με την αστραγαλίνη (ουσία 3) η ισοραμνετινο-3-Ο-β-D-γλυκοπυρανόση (ουσία 7) όπου στο φάσμα του μίγματος φαίνονται ξεκάθαρα δυο Η-6''α γλυκόσης, ένα για κάθε ένα από τα δύο φλαβονοειδή του μίγματος. Εκτός αυτού, η μετατόπιση του πρωτονίου Η-2' είναι διαφορετική συγκριτικά με αυτή της ουσίας 7. Επίσης, οι ουσίες αυτές (ουσία 7 και ουσία 8) συνυπάρχουν σε μίγμα μαζί με την ουσία 3.

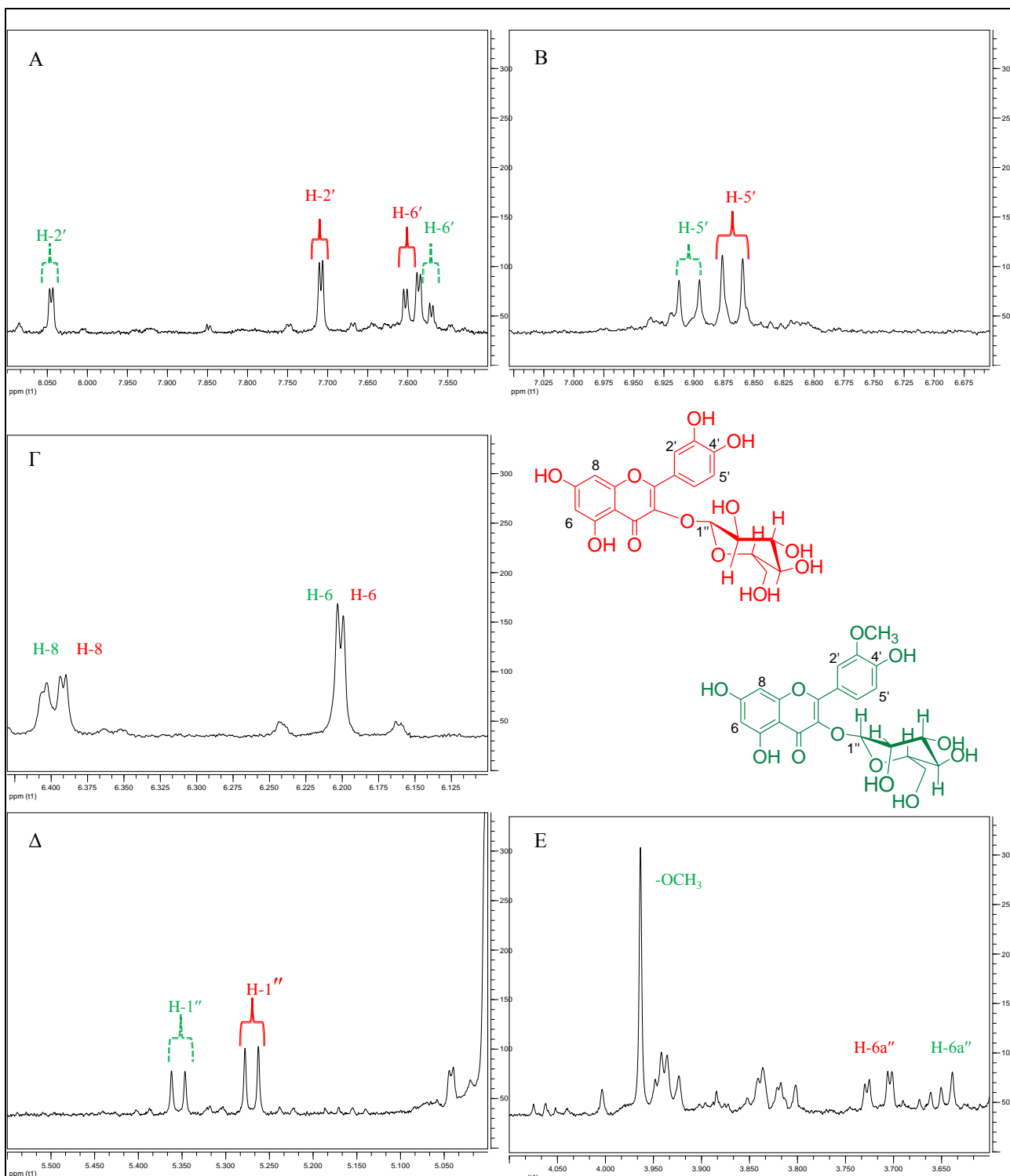
Σε δ 3.96ppm εμφανίζεται μια οξεία απλή κορυφή η οποία ανήκει σε μια μεθοξυ-ομάδα (-OCH₃). Από την ολοκλήρωση της κορυφής στο φάσμα ¹H-NMR, προκύπτει ότι αντιστοιχεί σε 3H της ουσίας 8. Η θέση υποκατάστασης, δεν μπορεί να είναι σε κανένα από τα -OH του Α δακτυλίου διότι τότε θα υπήρχε διαφορά στα πρωτόνια Η-6 και Η-8, συγκριτικά με αυτά της ισοκερκετίνης (ουσία 5) που υπάρχει στο μίγμα.. Σε αντίθετη περίπτωση θα έπρεπε τα πρωτόνια αυτά να είναι πιο θωρακισμένα. Όμως, στο συγκεκριμένο μίγμα τα σήματα των πρωτονίων αυτών αλληλεπικαλύπτονται (ταυτίζονται). Οι πιθανές θέσεις σύνδεσης που απομένουν, από τα παραπάνω, είναι τα -OH του Β δακτυλίου (3' και 4'). Συγκριτικά με την απομονωμένη και ταυτοποιημένη από το φυτό ισοραμνετινο-3-Ο-β-γλυκόση (ουσία 7), η ουσία αυτή (ουσία 8) διαφέρει μόνο ως προς τις μετατοπίσεις των Η-1'' και Η-2', έτσι συμπεραίνουμε ότι η ένωση αυτή είναι ο ισοραμνετινο-3-Ο-εξοσίδης και όχι γλυκοσίδης της ταμαριξετίνης (4' μεθοξυ-κερκετίνη) (βλ. σελ 226, Πίνακας 48).

Πίνακας 42: Πίνακας $^1\text{H-NMR}$ της ουσίας 8 (CD_3OD , 500 MHz)

Χημική μετατόπιση δ (ppm)	Αριθμός H	Πολλαπλότητα J (Hz)	Ταυτοποίηση
8.04	1	d (J=2.0)	H-2'
7.57	1	dd (J=8.5, 2.0)	H-6'
6.90	1	d (J=8.5)	H-5'
6.40	1	d (J=2.0)	H-8
6.20	1	d (J=2.0)	H-6
5.35	1	d (J=8.0)	H-1''
3.96	3	s	-OCH ₃
3.20-3.80	6	m	H-2''- H-6''a/b



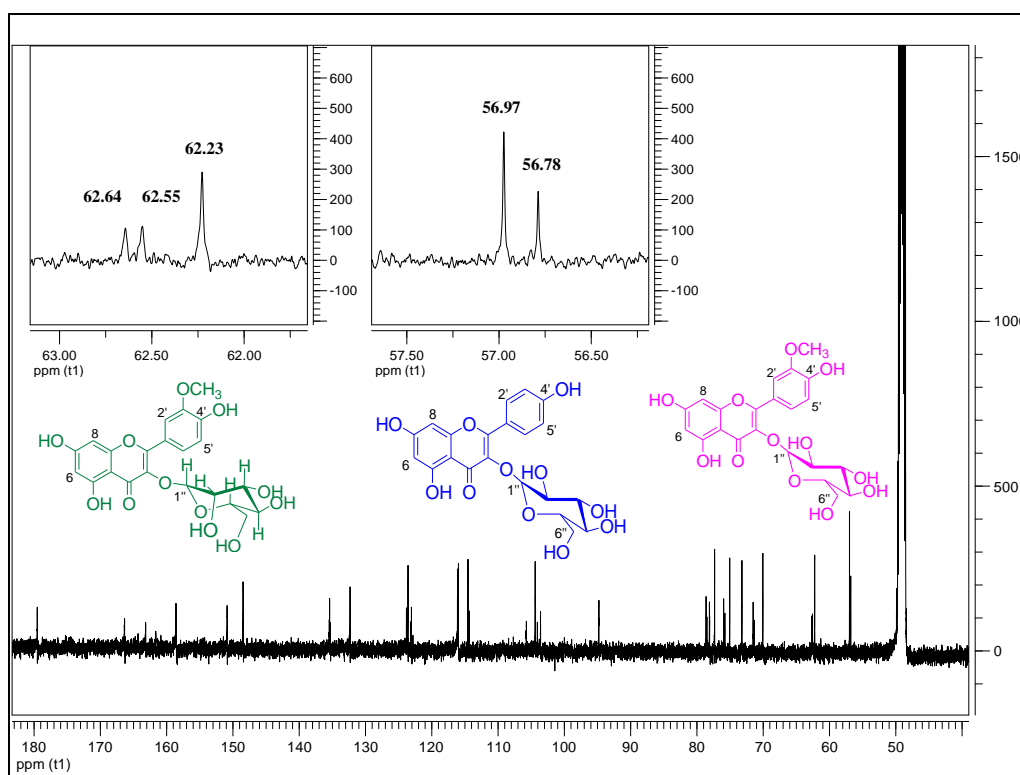
Εικόνα 54: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 500 MHz) του μίγματος των ουσιών 5 (■) και 8 (■)



Εικόνα 55: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (CD₃OD, 500 MHz) του μίγματος των ουσιών 5 (■) και 8 (■). Α: 8.10-7.50ppm, Β: 7.05-6.65ppm, Γ: 6.43-6.10ppm, Δ: 5.55-5.00ppm, Ε: 4.10-3.60ppm

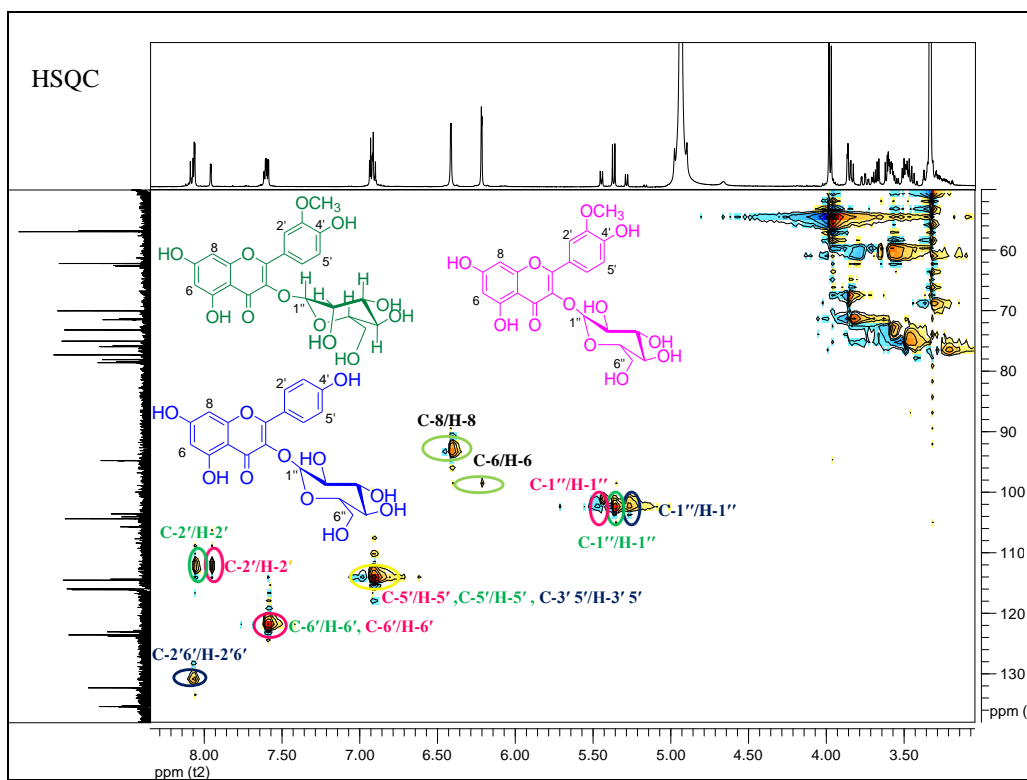
Πίνακας 43: Πίνακας ^{13}C -NMR της ουσίας 8 (CD_3OD , 125 MHz)¹

Χημική μετατόπιση δ (ppm)	Τύπος C	Ταυτοποίηση
112.1	CH	C-2'
121.0	CH	C-6'
113.0	CH	C-5'
99.1	CH	C-6
92.7	CH	C-8
102.8	CH	C-1''
56.5	CH	-OCH ₃



Εικόνα 56: Φάσμα ^{13}C -NMR (CD_3OD , 125 MHz) του μίγματος των ουσιών 3 (■), 7 (■) και 8 (■)

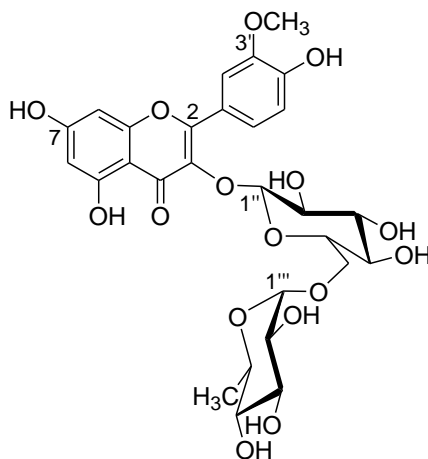
¹ Με βάση τα φάσματα ^{13}C -NMR και HMQC του μίγματος των ουσιών 3, 7 και 8



Εικόνα 57: Φάσμα HMQC (CD₃OD, 500 MHz) του μίγματος των ουσιών 3 (■), 7 (■) και 8 (■)

Γ.2.7. Ουσία 9: 3'-μεθοξυ-κερκετινο-3-O-(6''-α-L-ραμνοπυρανοσουλ)-β-D-γλυκοπυρανοσίδης (ναρκισσίνη)

Η ουσία 9 απομονώθηκε ως κόνις κίτρινου χρώματος και ταυτοποιήθηκε ως 3'-μεθοξυ-κερκετινο-3-O-(6''-α-L-ραμνοπυρανοσουλ)-β-D-γλυκοπυρανοσίδης κατόπιν φασματοσκοπικής μελέτης (UV/Vis και ¹H NMR).



Η ουσία αυτή αναφέρθηκε για πρώτη φορά ως «ναρκισσίνη» από τον Kubota το 1956 από το φυτό *Narcissus tazetta* της οικογένειας Amaryllidaceae (Kubota και Hase, 1956). Έκτοτε έχει απομονωθεί από πληθώρα φυτών που ανήκουν σε διάφορες οικογένειες όπως: *Eschscholtzia californica* Papaveraceae (Beck *et al.*, 1999), *Barbarea vulgaris* L. Brassicaceae (Senatore *et al.*, 2000), *Ginkgo biloba* Ginkgoaceae (Tang *et al.*, 2001), *Hydrangea macrophylla* SERINGE var. *thunbergii* MAKINO Hydrangeaceae (Murakami *et al.*, 2001), *Aerva lanata* Amaranthaceae (Yuldashev *et al.*, 2002), *Prunus amygdalus* Batsch. Rosaceae (Sang *et al.*, 2002), *Saussurea medusa* Asteraceae (Xie *et al.*, 2005), *Asperula arvensis* L. Rubiaceae (Guvenalp *et al.*, 2005), *Climacoptera obtusifolia* Chenopodiaceae (Yeskaliyeva *et al.*, 2006), *Pituranthos chloranthus* Apiaceae (Touil *et al.*, 2006), *Melilotus neapolitana* Fabaceae (Fiorentino *et al.*, 2007), *Calendula officinalis* Asteraceae (Kurkin και Sharova, 2007), *Kaempferia parviflora* Zingiberaceae (Azuma *et al.*, 2008), *Alhagi sparsifolia* Fabaceae (Su *et al.*, 2008), *Pituranthos scoparius* Apiaceae (Benmekhbi *et al.*, 2008), *Alhagi pseudoalhagi* Fabaceae (Novruzov *et al.*, 2009), *Androsace umbellate* Primulaceae (Lei *et al.*, 2009), *Bupleurum chinense* DC. Umbelliferae (Kuang *et al.*, 2009), *Halimodendron halodendron* Fabaceae (Wang *et al.*, 2010), *Halostachys caspica* Chenopodiaceae (Liu *et al.*, 2010), *Caragana sinica* Fabaceae (Tai *et al.*, 2012), *Bupleurum plantagineum* Apiaceae (Bencheraiet *et al.*,

2011), *Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter Poaceae (El-Alfya *et al.*, 2012), *Bupleurum marginatum* Apiaceae (Ashour *et al.*, 2012), *Caragana spinosa* Fabaceae (Olennikov *et al.*, 2012), *Marrubium thessalum* Boiss. & Heldr. Lamiaceae (Argyropoulou *et al.*, 2012), *Sarcopyramis bodinieri* var. *delicate* Melastomataceae (Wan *et al.*, 2012), *Zygophyllum cornutum* Zygophyllaceae (Ayad *et al.*, 2012), κ. ά.

Επίσης, έχει απομονωθεί και από πρόπολη Κρητικής προελεύσεως (Porova *et al.*, 2009).

Η ναρκισσίνη που έχει απομονωθεί από το μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού *Hydrangea macrophylla* έχει βρεθεί αποτελεσματική, βάσει *in vitro* πειραμάτων, έναντι του παρασίτου *Plasmodium falciparum*, το οποίο προκαλεί σοβαρά και πολλές φορές θανατηφόρα επεισόδια ελονοσίας. Επομένως, η ουσία αυτή μπορεί να αποτελέσει πρόδρομο ένωση για την ανεύρεση νέων φαρμάκων με υψηλή εκλεκτικότητα μόνο στα κύτταρα του παρασίτου και με μικρή τοξικότητα στα κύτταρα του οργανισμού ξενιστή (Murakami *et al.*, 2001).

Ο ισοραμετινο-3-O-β-D-ρουτινοσίδης έχει μελετηθεί και ως προς την αντιμικροβιακή του δράση, ωστόσο τα αποτελέσματα δεν ήταν θεαματικά. Συνήθως, τα άγλυκα φλαβονοειδή που είναι λιγότερο πολικά, συγκριτικά με τα γλυκοσιλιωμένα, εμφανίζουν καλή αντιμικροβιακή δράση. Ο συγκεκριμένος δισακχαρίτης της ισοραμετινής έχει ασθενή αντιμικροβιακή δράση (Liu *et al.*, 2010).

Επίσης, σε *in vitro* πειράματα διαπιστώθηκε ότι η ένωση αυτή δεν έχει ούτε οιστρογονική ούτε αντιοξειδωτική δράση, ενώ εμφανίζει μικρή νευροπροστατευτική δράση (Zhu *et al.*, 2007).

ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Κατά τη φασματομετρική εξέταση της ουσίας (φάσματα UV-Vis), ελήφθησαν χαρακτηριστικές καμπύλες με τις ακόλουθες μέγιστες απορροφήσεις (nm):

Πίνακας 44: Πίνακας Uv-Vis της ουσίας 9

	Κορυφή II		Κορυφή I		Δλ I
	II _a	II _b	I _a	I _b	
MeOH	252.27	267.45sh	352		
MeONa	273		319sh	377↑	+25
AlCl ₃	270	306sh	368sh	413	+61
AlCl ₃ /HCl	270	306sh	368sh	413	+61
NaOAc	272 (Δλ=+19.73nm)		320	377	+25
NaOAc/H ₃ BO ₃	256	270.45sh	304.5sh	361	+9

Από την τιμή απορρόφησης της πρώτης κορυφής του μεθανολικού διαλύματος (352nm) συμπεραίνουμε ότι η ουσία ανήκει στις φλαβονόλες με υποκατεστημένο το υδροξύλιο της θέσης 3. Το υδροξύλιο της θέσης 4' είναι ελεύθερο, δεδομένου ότι παρατηρείται βαθυχρωμική μετατόπιση κατά +25nm της κορυφής I χωρίς ελάττωση της εντάσεως της κατόπιν προσθήκης MeONa. Η βαθυχρωμική μετατόπιση κατά +61nm της κορυφής I μετά από προσθήκη AlCl₃ οφείλεται στο σχηματισμό σταθερού συμπλόκου στην επίδραση π.HCl. Το σύμπλοκο αυτό σχηματίζεται μεταξύ της κετονομάδας της θέσης 4 και του υδροξυλίου της θέσης 5. Η απουσία συστήματος ο-υδροξυλίων στο Β δακτύλιο επιβεβαιώνεται και από το γεγονός ότι παρατηρείται βαθυχρωμική μετατόπιση της κορυφής I μόνο κατά +9 μετά την προσθήκη NaOAc/H₃BO₃. Το υδροξύλιο της θέσης 7 είναι ελεύθερο επειδή με προσθήκη NaOAc παρατηρείται βαθυχρωμική μετατόπιση κατά +18nm της κορυφής II.

Από το φάσμα ¹H-NMR συμπεραίνεται ότι η ουσία 9 ανήκει στην ομάδα των φλαβονολών, δεδομένου ότι δεν υπάρχει σήμα για H-3. Το σήμα του πρωτονίου H-2' εμφανίζεται ως διπλή κορυφή σε δ 8.03 (J=2.0 Hz). Το σήμα του πρωτονίου H-6' εμφανίζεται ως μια διπλώς διπλή κορυφή σε δ 7.60 (J= 8.5, 2.0 Hz). Το σήμα του πρωτονίου H-5' δίνει μια διπλή κορυφή σε δ 6.91 (J=8.5 Hz), ενώ τα σήματα των

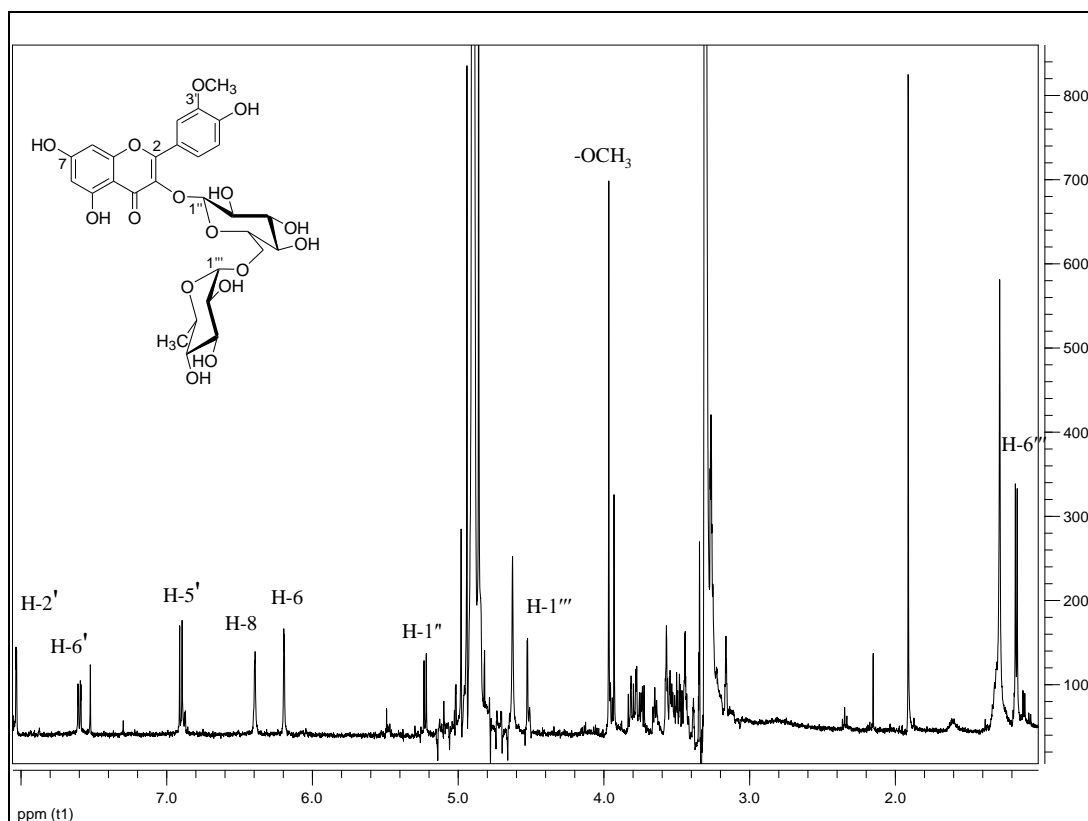
πρωτονίων H-8 και H-6 εμφανίζονται ως διπλές κορυφές σε δ 6.40 ($J=2.0$ Hz) και 6.20 ($J=2.0$ Hz), αντίστοιχα. Σε δ 3.97 ως έντονη απλή κορυφή εμφανίζεται το τυπικό σήμα των πρωτονίων μιας μεθοξυ- ομάδας, η οποία βρίσκεται στη θέσης 3', λόγω του ότι τα υδροξύλια των θέσεων 7 και 4' είναι ελεύθερα, όπως προκύπτει από τα δεδομένα του φάσματος UV-Vis.

Στην κεντρική περιοχή του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ εμφανίζονται δύο ανωμερικά πρωτόνια υποδηλώνοντας την παρουσία δυο σακχάρων, το πρωτόνιο μιας β -γλυκόσης εμφανίζεται σε δ 5.23 ως διπλή κορυφή ($J=7.0$) και σε δ 4.53 εμφανίζεται το ανωμερικό πρωτόνιο της α -ραμνόσης, ως απλή ευρεία κορυφή. Τέλος, σε δ 1.12 εμφανίζονται ως διπλή κορυφή ($J=6.0$) τα πρωτόνια H-6''' της ραμνόσης.

Η σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων με αυτά που βρίσκονται στη βιβλιογραφία (Sang *et al.*, 2002), οδηγούν στην ταυτοποίηση της ουσίας **9** ως 3'-μεθοξυ-κερκετινο-3-O-(6''- α -L-ραμνοπυρανοσυλ)- β -D-γλυκοπυρανοσίδης.

Πίνακας 45: Πίνακας ^1H -NMR της ουσίας 9 (CD_3OD , 500 MHz)

Χημική μετατόπιση δ (ppm)	Αριθμός H	Πολλαπλότητα J (Hz)	Ταυτοποίηση
8.03	1	d (J=2.0)	H-2'
7.60	1	dd (J=8.5, 2.0)	H-6'
6.91	1	d (J=8.5)	H-5'
6.40	1	d (J=2.0)	H-8
6.20	1	d (J=2.0)	H-6
5.23	1	d (J=7.5)	H-1''
4.53	1	brs	H-1'''
3.97	3	s	-OCH ₃
3.15-3.85	6	m	H-2''-H-6 _b ''
3.15-3.85	4	m	H-2'''-H-5'''
1.12	3	d (J=6.0)	H-6'''



Εικόνα 58: Φάσμα ^1H -NMR (CD_3OD , 500 MHz) της ουσίας 9



Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε το φυτό *Alyssum alyssoides* της οικογένειας Brassicaceae, ως προς το περιεχόμενο των φαινολικών του συστατικών.

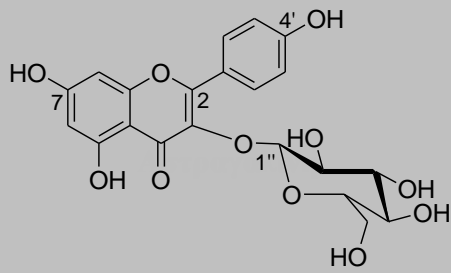
Από τη μέχρι τώρα μελέτη απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν δυο φαινολοξέα, αμφότερα παράγωγα βενζοϊκού οξέος: *p*-υδροξυ-βενζοϊκό οξύ (ουσία **1**) και 3-μεθοξυ-4-υδροξυ-βενζοϊκό οξύ (βανιλλικό οξύ) (ουσία **2**), καθώς και επτά φλαβονοειδή, που ανήκουν στην κατηγορία των φλαβονολών: καιμπφερολο-3-O-β-D-γλυκοπυρανοσίδης (αστραγαλίνη) (ουσία **3**), καιμπφερολο-3-O-(6''-α-L-ραμνοπυρανοσυλ)-β-D-γλυκοπυρανοσίδης (νικοτιφλορίνη) (ουσία **4**), κερκετινο-3-O-β-D-γλυκοπυρανοσίδης (ισοκερκιτρίνη) (ουσία **5**), κερκετινο-3-O-εξοσίσης (ουσία **6**), 3'-μεθοξυ-κερκετινο-3-O-β-D-γλυκοπυρανοσίδης (ουσία **7**), 3'-μεθοξυ-κερκετινο-3-O-εξοσίδης (ουσία **8**), 3'-μεθοξυ-κερκετινο-3-O-(6''-α-L-ραμνοπυρανοσυλ)-β-D-γλυκοπυρανοσίδης (ναρκισσίνη) (ουσία **9**).

Αξίζει να σημειωθεί ότι όλες οι παραπάνω ουσίες απομονώνονται πρώτη φορά από είδος του γένους *Alyssum*. Επιπλέον, είναι η πρώτη φορά που αναφέρονται φαινολοξέα στο γένος *Alyssum*.

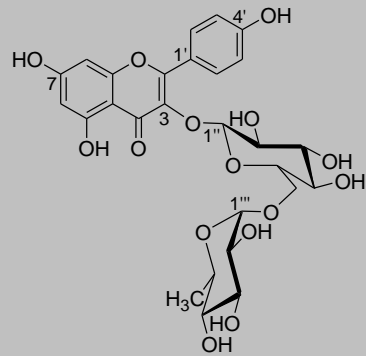
ΦΑΙΝΟΛΟΞΕΑ



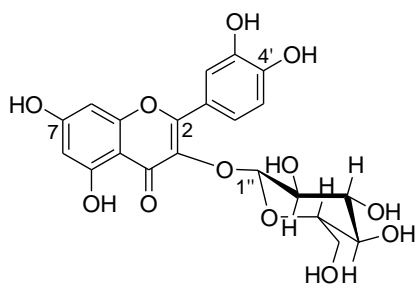
ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ



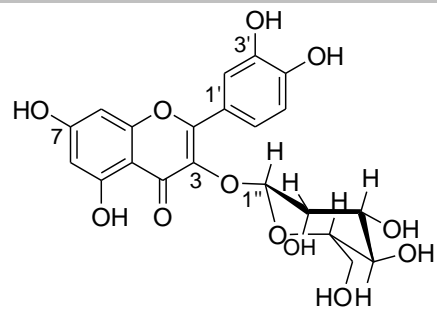
3



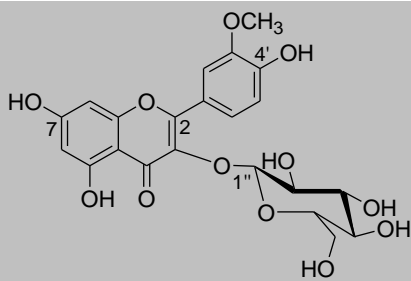
4



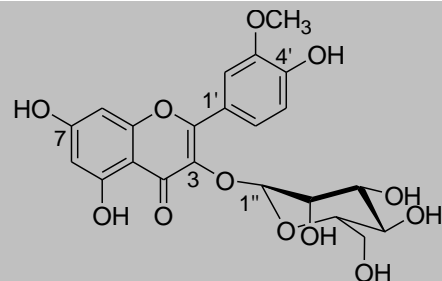
5



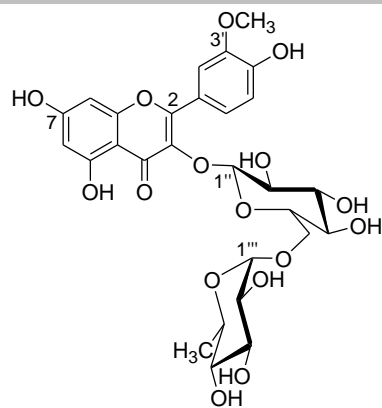
6



7



8



9



Ε.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

E.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

A

Ahmadu A.A., Hassan H.S., Abubakar M.U., Akpulu I.N. 2007. Flavonoid glycosides from *Byrsocarpus coccineus* leaves. Schum and Thonn (Connaraceae). Afr. J. Trad. CAM 4 (3), 257-260.

Abbott M.T., Underfriends S. 1974, Molecular Mechanism of Oxygen Activation, Hayashi O.(ed) Academic Press NY, 167.

Abdelfattah M.S., Toume K., Ahmed F., Ishibashi M., Sadhu S.K. 2010. Cucullamide, a New Putrescine Bisamide from *Amoora cucullata*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 58 (8) 1116-1118.

Adzet Y. 1986. Polyphenolic Compounds with Biological and Pharmacological Activity, in Herbs, Spices, and Medicinal Plants: Recent Advances in Botany, Horticulture, and Pharmacology, (eds. Lyle E. Craker and James E. Simon), Oryx Press 1, 167-184.

Afanas'ev I.B., Dorozhko A.I., Brodskii A.V., Kostyuk V.A., Potapovitch A.I. 1989. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. Biochemical Pharmacology 38, 1763-1769.

Afsharypuor S. and Lockwood G.B. 1986. Flavonoid Glucuronides from *Alyssum mimimum*. Journal of Natural Products 49 (5) 944-945.

Agnihotri V.K., ElSohly H.N., Khan S.I., Smillie T.J., Khan I.A., Walker L.A. 2008. Antioxidant constituents of *Nymphaea caerulea* flowers. Phytochemistry 69 (10), 2061-2066.

Akazawa H., Kohno H., Tokuda H., Suzuki N., Yasukawa K., Kimura Y., Manosroi A., Manosroi J., Akihisa T. 2012. Anti-Inflammatory and Anti-Tumor-Promoting Effects of 5-Deprenyllupulonol C and Other Compounds from Hop (*Humulus lupulus* L.). Chemistry and Biodiversity 9 (6), 1045 – 1054.

Akihisa T., Tochizawa S., Takahashi N., Yamamoto A., Zhang J., Kikuchi T., Fukatsu M., Tokuda H., Suzuki N. 2012. Melanogenesis-Inhibitory Saccharide Fatty Acid Esters and Other Constituents of the Fruits of *Morinda citrifolia* (Noni) Chemistry and Biodiversity 9 (6), 1172-1187.

Al-Musayeb, Perveen, Fatima, Hussain, Nasir, Muhammad. 2011. Antioxidant, Anti-Glycation and Anti-Inflammatory Activities of Phenolic Constituents from *Cordia sinensis*. *Molecules* 16 (12), 10214-10226.

Alaniya M.D., Aneli Dzh.N., Patudin A.V., Komelin R.V. 1983. Flavonoid glycosides of *Astragalus cicer*. *Chemistry of Natural Compounds* 19 (4), 500-501.

Ali A.A., Sayed H.M., Ibrahim S. R.M., Zaher A.M. 2013. Chemical constituents, antimicrobial, analgesic, antipyretic, and anti-inflammatory activities of *Euphorbia peplus* L. *Phytopharmacology* 4 (1), 69-80.

Ali M.S., Ali M.I., Ahmed Z., Onocha P.A. 2011. bis-Sigmodiol: a new prenylflavanone dimer from *Erythrina sigmoidea* Hua (Fabaceae) of Nigeria. *Journal of Asian Natural Products Research* 13 (2), 182-187.

Amakura Y., Yoshimura A., Yoshimura M., Yoshida T. 2012. Isolation and Characterization of Phenolic Antioxidants from Plantago Herb. *Molecules* 17 (5), 5459-5466

Amoah S.K.S., Biavatti M.W., De Oliveira F.L., Da Cruz A.C.H., De Souza N.M., Campos F.R., Barison A. 2013. Sesquiterpene lactones from the leaves of *Hedyosmum brasiliense* (Chloranthaceae). *Phytochemistry (Elsevier)* 87, 126-132.

Andersen Ø.M., Markham K.R. 2005. *Flavonoids. Chemistry, Biochemistry and Applications*. CRC Press. 150.

Arens H., Ulbrich B., Fischer H., Parnham M.J., Römer A. 1986. Novel antiinflammatory flavonoids from *Podophyllum versipelle* Cell Culture. *Planta Medica* 52, 468-473.

Argyropoulou A., Samara P., Tsitsilonis O., Skaltsa H. 2012. Polar Constituents of *Marrubium thessalum* Boiss. & Heldr. (Lamiaceae) and their Cytotoxic/Cytostatic Activity. *Phototherapy Research* 26, 1800–1806.

Ashour M.L., El-Readi M.Z., Tahrani A., Eid S.Y., Wink M. 2012. A novel cytotoxic aryltetraline lactone from *Bupleurum marginatum* (Apiaceae). *Phytochemistry Letters* 5 (2), 387-392.

Ayad R., Rahai M., Azouzi S., Louaar S., Dendougui H., Akkal S., Medjroubi K. 2012. Phytochemical investigation of the endemic plant *Zygophyllum cornutum*. *Chemistry of Natural Compounds* 48 (2), 313-314.

Ayyanar M., Subash-Babu P., 2012. *Syzygium cumini* (L.) Skeels: A review of its phytochemical constituents and traditional uses. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 240-246.

Azizuddin, Tmakhmoor, Choudhary. 2010. Radical scavenging potential of compounds isolated from *Vitex agnus-castus*. *Turkish Journal of Chemistry* 34, 119-126.

Azuma T., Tanaka Y., Kikuzaki H. 2008. Phenolic glycosides from *Kaempferia parviflora*. *Phytochemistry* 69, 2743-2748.

B

Baeva R.T., Karryev M.O. 1983. Flavonoids of *Bupleurum rotundifolium*. *Khimiya Prolodnykh Soedinenii* 5, 648.

Beck M.A., Haerberlein H. 1999. Flavonol glycosides from *Eschscholtzia californica*. *Phytochemistry (Elsevier)* 50 (2), 329-332.

Bedir E., Tatli I.I., Khan R.A., Zhao J., Takamatsu S., Walker L.A., Goldman P., Khan I.A. 2002. Biologically Active Secondary Metabolites from *Ginkgo biloba*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (11), 3150-3155.

Benavente-Garcia O., Castillo J., Marin F.R., Ortuno A, Del Rio J.A. 1997. Uses and Properties of Flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45 (12), 4505-4513.

Bencheraiet R., Jay M., Kabouche A., Kabouche Z. 2011. Flavonoids of *Smyrniolus atrum* from Algeria. *Chemistry of Natural Compounds* 47 (5), 812-813.

Bencheraiet R., Kabouche A., Kabouche Z., Jay M. 2011. Flavonoids of *Bupleurum plantagineum*. *Chemistry of Natural Compounds* 47 (5), 814-815.

Benmekhbi L., Kabouche A., Kabouche Z., Ait-Kaki B., Touzani R., Bruneau C. 2008. Five glycosylated flavonoids from the antibacterial butanolic extract of *Pituranthos scoparius*. *Chemistry of Natural Compounds* 44 (5), 639-641.

Bennett R.N., Mellon F.A., Kroon A. 2004. Screening Crucifer Seeds as Sources of Specific Intact Glucosinolates Using Ion-Pair High-Performance Liquid Chromatography Negative Ion Electrospray Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 428-438.

Berez A., Anton R., Cazenave J. 1986. The effect of flavonoids on cyclic nucleotide phosphodiesterase. In *Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological and Structure-Activity Relationships*. Alan R. Liss, New York, NY USA, 218-296.

Berez A., Cazenave J. 1988. The effect of flavonoids on blood-vessel wall interactions. In *Plant Flavonoids in Biology and Medicine 11: Biochemical, Cellular and Medicinal Properties*, Alan R. Liss (ed), New York, NY USA, 187-200.

Bors W., Hellers W., Michel C., Saran M. 1990. Radical chemistry of flavonoids antioxidant. In *Antioxidants in therapy and preventive medicine*; Emerit, Ed., Plenum Press: New York, 1, 165-170.

Braca A., Bader A., Siciliano T., De Tommasi N. 2008. Secondary metabolites from *Paronychia argentea*. *Magnetic Resonance in Chemistry* 46 (1), 88-93.

C

Calzada F., Cedillo-Rivera R., Mata R. 2001. Antiprotozoal activity of the constituents of *Conyxa filaginoides*. *Journal of Natural Products* 64 (5), 671-673.

Canuto K.M. Lima M.A.S., Silveira E.R. 2010. Amburosides C-H and 6-O-Protocatechuoyl Coumarin from *Amburana cearensi*. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 21 (9), 1746-1753.

Ceska and Style E. D. 1984. Flavonoids from *Zea mays* pollen. *Phytochemistry* 23 (8), 1822-1823.

Chahar M.K., Sharma N., Dobhal M.P., Joshi Y. C. 2011. Flavonoids: A versatile source of anticancer drugs. *Pharmacognosy Review* 5 (9), 1-12.

Chatsumpun M., Sritularak B., Likhitwitayawuid K. 2010. Phenolic compounds from stem wood of *Millettia leucantha*. *Chemistry of Natural Compounds* 46 (4), 634-635.

Chattopadhyay R.R., Bandyopadhyay M. 2005. Effect of *Azadirachta indica* leaf extract on serum lipid profile changes in normal and streptozotocin induced diabetic rats. *African Journal of Biomedical Research* 8, 101-104.

Chen C.Y, Hong Z.L, Yang W.L, Wu M.H, Huang J.C, Lee J.Y. 2012. A novel homosesquiterpenoid from the stems of *Cinnamomum burmanii*. Natural Product Research 26 (13), 1218-1223.

Chen Y.K., Li X.S., Yang G.Y., Chen Z.Y., Miao M.M., Hu Q.F. 2012. Phenolic compounds from *Nicotiana tabacum* and their biological activities. Journal of Asian Natural Products Research 14 (5), 450-456.

Chen C.Y., Wang Y.D., Wang H.M. 2010. Chemical Constituents from the roots of *Synsepalum dulcificum*. Chemistry of Natural Compounds 46 (3), 448-449.

Chludil H.D., Corbino G.B., Leicach S.R. 2008. Soil Quality Effects on *Chenopodium album* Flavonoid Content and Antioxidant Potential. Journal of Agricultural and Food Chemistry 56 (13), 5050 – 5056.

Chung Y.M., Hwang T.L., Leu Y.L., Lan Y.H. 2011. Anti-Inflammatory and Antioxidant Components from *Hygroryza aristata*. Molecules 16 (3), 1917-1927.

Cole R.A. 1976. Isothiocyanates, Nitriles and Thiocyanates Products of autolysis of glucosinolates in Cruciferae. Phytochemistry 15, 759-762.

Conforti F., Loizzo M.R., Rigano D., Senatore F., Menichini F. 2009. Protection against neurodegenerative diseases of *Iris pseudopumila* extracts and their constituents. Fitoterapia 80 (1), 62-67.

Constantinou A., Mehta R., Runyan C. 1995. Flavonoids as DNA Topoisomerase Antagonists and poisons: Structure - Activity Relationships. Journal of Natural Products 58, 217.

Cook N.C., Samman S. 1996. Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. Journal of Nutritional Biochemistry 7, 66-67.

Correia H., González-Paramás A., Amaral M. T., Celestino Santos-Buelga C., Batista M.T. 2006. Polyphenolic profile characterization of *Agrimonia eupatoria* L. by HPLC with different detection devices. Biomedical Chromatography 20, 88-94.

D

Δημόπουλος Β.Ι. 2002. Φαρμακευτική Χημεία: Ομάδες Χημειοθεραπευτικών και Φαρμακοδυναμικών Φαρμάκων.

Dai Y., Zhang B.B., Liao Z.X. 2012. Chemical constituents of *Caryopteris tangutica*. Natural Product Research 26 (7), 643- 647.

Davis B.D. 2007. Structural Characterization of Isomeric Flavonoid Glycosides and Metabolites by Metal Complexation and Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. The University of Texas at Austin.

Demirezer L.O., Gurbuz F., Guvenalp Z, Stroch K., Zeeck A. 2006. Iridoids, Flavonoids and Monoterpene Glycosides from *Galium verum* subsp. *verum*. Turkish Journal Of Chemistry 30, 525 -534.

Di Carlo D., Mascolo N., Izzo A. A., Capasso F. Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. Life Sciences 65 (4), 337-353.

Dixit P., Chillara R., Khedgikar V., Gautamb J. , Kushwaha P., Kumar A., Singh D., Trivedi R., Maurya R. 2012. Constituents of *Dalbergia sissoo* Roxb. leaves with osteogenic activity. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 22, 890-897.

Dixit P., Maurya R., Khan M.P., Swarnkar G., Chattopadhyay N. 2011. Osteogenic constituents from *Pterospermum acerifolium* Willd. flowers. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 21 (15), 4617-4621.

Duarte J., Vizcaino F.P. Utrilla P., Jimenez J., Tamargo J., Zarzuelo A. 1993. Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure activity relationships. Biochemical Pharmacology 24, 857-862.

Dubber M.J., Sewram V., Mshicileli N., Shephard G.S., Kanfer I. 2005. The simultaneous determination of selected flavonol glycosides and aglycones in Ginkgo biloba oral dosage forms by high-performance liquid chromatography–electrospray ionisation–mass spectrometry Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 37, 723-731.

Dudek-Makuch M. and Matlawka I. 2011. Flavonoids from the flowers of *Aesculus hippocastanum*. Acta Poloniae Pharmaceutica 68 (3), 403-408.

Dudley, 1966. Ornamental Madworts (*Alyssum*) and the correct name of the goldentuft *Alyssum* Bulletin of popular Information of Arnold Arboretum, Harvard University 26 (6-7), 33-45.

Dwivedi, S. 2007. Terminalia arjuna Wight & Arn.-A useful drug for cardiovascular disorders. Journal of Ethnopharmacology 114 (2), 114-129.

E

El-Alfya T.S., Ezzat S.M., Sleemb A.A. 2012. Chemical and biological study of the seeds of *Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter. *Natural Product Research* 26 (7), 619-629.

Eshbakova K.A., Bahang, Aisa H.A. 2011. Constituents of *Apocynum venetum*. *Chemistry of Natural Compounds* 46 (6), 974-975.

F

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 American Society Mass Spectrometry* 12, 707-715.

Fahey J.W., Zalcman A.T., Talalay P. 2000. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* 56, 5-51.

Fattorusso E., Lanzotti V., Tagliabatella-Scafati O., Cicala C., 2001. The flavonoids of leek, *Allium porrum*. *Phytochemistry* 57 (4), 565-570.

Ferreira F.P., De Oliveira D.C.R. 2010. New constituents from *Mikania laevigata* Shultz Bip. ex Baker. *Tetrahedron Letters* 51 (52), 6856-6859.

Ferrell J.E., Chang Sing P.D.G., Loew G., King R., Mansour J. M., Mansour T. E. 1979. Structure-activity studies of flavonoids as inhibitors of cyclic AMP phosphodiesterase and relationship to quantum indices. *Molecular Pharmacology* 16, 556-568.

Fiorentino A., D'Abrosca B., Pacifico S., Golino A., Mastellone C., Oriano P., Monaco P. 2007. Reactive Oxygen Species Scavenging Activity of Flavone Glycosides from *Melilotus neapolitana*. *Molecules* 12 (2), 263-270.

Forster H.B., Niklas H., Lutz S. 1980. Anti-spasmodic effects of some medicinal plants. *Planta Medica* 40, 309-319.

Fujimoto Y., Kitanaka S., Uchiyama T., Makino M., Machida N. 2004. Inhibitors against nonenzymatic glycation of proteins and their uses for treatment of diabetes and diabetic complications. Patent CA 141:179559.

G

Gao D.F., Xu M., Yang C.R. Zhang Y.J., Xu M. 2010. Phenolic Antioxidants from the Leaves of *Camellia papyrifera* Hu. Journal of Agricultural and Food Chemistry 58 (15), 8820-8824.

Goffman F.D., Thies W., Velasco L. 1999. Chemotaxonomic value of tocoferols in Brassicaceae. Phytochemistry 50, 793-798.

Gomes M.M.R., Cerqueira D.M., Falcão D.Q., Menezes F.S., Wigg M.D., Mendes G.S., Martins F.O., Silva J. F.M., Kuster R.M., Romanos M.T.V. 2008. *In vitro* Anti-HSV-2 activity of isoquercetin from *Hyptis fasciculata* Benth. VIRUS REVIEWS & RESEARCH 13

Gordon P.B., Holen I., Seglen P.O. 1995. Protection by naringin and some other flavonoids of hepatocytic autophagy and endocytosis against inhibition by okadaic acid. Journal of Biological Chemistry 270, 5830.

Graela C.F.F., Albuquerque S., Lopes J.L.C. 2005. Chemical constituents of *Lychnophora pohlii* and trypanocidal activity of crude plant extracts and of isolated compounds. Fitoterapia 76, 73-82.

Gryglewski R.J., Korbut R., Robak J., Swies J. 1987. On the mechanism of antithrombotic action of flavonoids. Biochemical Pharmacology 36, 317-322.

Guo T., Xie H., Deng Y.X., Pan S.L. 2012. A new lignan and other constituents from *Zanthoxylum armatum* DC. Natural Product Research 26 (9), 859-864.

Guzhva N.N., Luk'yanchikov M.S., Kazakov A.L. 1983. Flavonoids of *Astragalus levierei* and *A. sevangensis*. Chemistry of Natural Compounds 19 (4), 501-502.

Guvenalp Z., Demirezer O. 2005. Flavonol Glycosides from *Asperula arvensis* L. Turkish Journal of Chemistry 29, 163-169.

H

Hanasaki Y., Ogawa S., Fnkui S. 1994. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. Free Radical Biology and Medicine 16, 845-850.

Hasapis X., Mac Leod A.J., Moreau M. 1981. Glucosinolates of nine Cruciferae and two Capparaceae species. *Phytochemistry* 20 (10), 2355-2358.

Hassan Khan M.T., Ather A. 2007. Potentials of phenolic molecules of natural origin and their derivatives as anti-HIV agents. *Biotechnology Annual Review* 13, 223-264.

Harborne J.B., Baxter H., 1999. *Handbook of Natural Flavonoids*. 2 Vols. Wiley, Chichester.

Harborne J.B., Grayer R.J. Flavonoids and insects. In: Harborne JB, ed. *The Flavonoids -Advances in Research since 1986*. London: Chapman & Hall 1994: 589-618.

Harborne J.B., Mabry T.J. 1982. *The flavonoids. Advances in research*, Chapman and Hall Ltd.

Havsteen B.H. 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology and Therapeutics* 96, 67-202.

Hayashi H., Hattori S., Inoue K., Khodzhimatov O., Ashurmetov O., Ito M., Honda G. 2003. Field survey of *Glycyrrhiza* plant in central Asia (3). Chemical characterization of *G. glabra* collected in Uzbekistan. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 51 (11), 1338-1340.

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, 1007-1011.

Hillenbrand M., Zapp J., Becker H. 2004. Depsides from the Petals of *Papaver rhoeas*. *Planta Medica* 70 (4), 380-382.

Hisamoto M, Kikuzaki H., Ohigashi H., Nakatani N. 2003. Antioxidant compounds from the leaves of *Peucedanum japonicum* Thunb. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 51 (18), 5155-5261.

Hobley P., Howarth O. 1996. ^1H and ^{13}C NMR Shifts for Aldopyranose and Aldofuranose Monosaccharides: Conformational Analysis and Solvent Dependence. *Magnetic Resonance In Chemistry* 34, 755-760.

Hope W.C, Welton A.F, Fielder-Nagy C., Batula-Bernardo C., Coffey J.W. 1983. In vitro inhibition of the biosynthesis of slow reacting substances of anaphylaxis (SRS-A) and lipoxygenase activity of quercetin. *Biochemical Pharmacology* 32, 367-371.

Hsu H.Y., Tsang S.F., Lin K.W., Yang S.C., Lin C.N. 2008. Cell death induced by flavonoid glycosides with and without copper. *Food and Chemical Toxicology* 46 (7), 2394-2401.

Hu H.B., Zheng X.D., Hu H.S., Li Y., Zhang Y.Q., Jian Y.F. 2012. Flavonoids from *Anemone tomentosa* roots. *Chemistry of Natural Compounds* 46 (4), 636-637.

Hu H.B., Zhu J.H. 2011. Flavonoid Constituents from the Roots of *Acanthopanax brachyphu*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 59 (1), 135-139.

Huang Y.L., Tsujita T. Tanaka T., Matsuo Y., Kouno I., Li D.P., Nonaka G.I. 2011. Triterpene hexahydroxydiphenoyl esters and a quinic acid purpurogallin carbonyl ester from the leaves of *Castanopsis fissa*. *Phytochemistry* 72 (16), 2006-2014.

Huang W.Y, Cai Y.Z., Zhang Y. 2010. Natural Phenolic Compounds From Medicinal Herbs and Dietary Plants: Potential Use for Cancer Prevention. *Nutrition and Cancer* 62 (1), 1-20.

Hung T.M., Cuong T.D., Dang N.H., Zhu S., Long P.Q., Komatsu K., Min B.S. 2011. Flavonoid Glycosides from *Chromolaena odorata* Leaves and Their in Vitro Cytotoxic Activity. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 59 (1), 129-131.

I

Ihsan Al-Shehbaz. 1987. The genera of Alysseae (Cruciferae; Brassicaceae) in the southeastern United States. *Journal of the Arnold Arboretum* 68, 185-240.

Imaga N.A. 2013. Phytomedicines and Nutraceuticals: Alternative Therapeutics for Sickle Cell Anemia. *The ScientificWorld Journal* 2013, 1-12.

Iwashina T., Ootani S. 1990. Three Flavonol Allosides From *Glaucidium Palmatum*. *Phytochemistry*, 29 (11), 3639-3641.

J

Jäger A.K., Saaby L. 2011. Flavonoids and the CNS. *Molecules* 16, 1471-1485.

Jang D.S., Yoo N.H., Kim N.H., Lee Y.M., Kim C.S., Kim J., Kim J.S., Kim J.H. 2010. 3,5-Di-O-caffeoyl-epi-quinic Acid from the Leaves and Stems of *Erigeron annuus* Inhibits Protein Glycation, Aldose Reductase, and Cataractogenesis Biological and Pharmaceutical Bulletin 33 (2), 329-333.

Jayasinghe L., Amarasinghe N.R., Arundathie B.G.S., Rupasinghe G.K., Jayatilake N.H.A.N., Fujimoto Y. 2012. Antioxidant flavonol glycosides from *Elaeocarpus serratus* and *Filicium decipiens*. Natural Product Research 26 (8), 717-721.

Jeong S.Y., Min B.S., Min B.K., Woo M.H., Jun D.Y., Kim Y.H. 2011. Monoterpenoids from the aerial parts of *Aruncus dioicus* var. *kamtschaticus* and their antioxidant and cytotoxic activities. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 21 (11), 3252-3256.

Jeong H.J., Ryu Y.B., Park S.J., Kim J.H., Kwon H.J., Rho M.C., Lee W.S., Kim J.H., Park K.H. 2009. Neuraminidase inhibitory activities of flavonols isolated from *Rhodiola rosea* roots and their in vitro anti-influenza viral activities. Bioorganic and Medicinal Chemistry 17 (19), 6816-6823.

Jin Y.S., Du J.L., Zhao F., Chen H.S., Zou X.H., Tuo X.P. 2013. New antitumor compounds from *Carya cathayensis*. Asian Journal of Chemistry 25 (4), 2321-2322.

Juliao Lisieux de Santana, Leitao S.G., Lotti C., Picinelli A.L., Rastrelli L., Fernandes P.D., Noel F., Thibaut J.P.B., Leitao G.G. 2010. Flavones and phenylpropanoids from a sedative extract of *Lantana trifolia* L. Phytochemistry (Elsevier) 71 (2-3), 294-300.

K

Kang T.H., Jeong S.J., Kim N.Y., Higuchi R., Kim Y.C. 1999. Sedative activity of two flavonol glycosides isolated from the flowers of *Albizia julibrissin* Durazz. Journal of Ethnopharmacology 71, 321-323.

Kang D.L., Zhang H.L., Wang X.G., Liu H., Wang C. 2011. Chemical constituents of *Aristolochia manshuriensis*. Chemistry of Natural Compounds 46 (6), 957-958.

Kassem M.E.S., Shoela S., Marzouk M M., Sleem A.A. 2010. A sulphated flavone glycoside from *Livistona australis* and its antioxidant and cytotoxic activity. *Natural Product Research* 26 (15), 1381-1387.

Karioti A., Skaltsa H., Heilmann J., Sticher O. 2003. Acylated flavonoid and phenylethanoid glycosides from *Marrubium velutinum*. *Phytochemistry* 64, 655–660.

Karioti A., Skaltsa H., Sokovic M., Ciric A., Koukoulitsa C., Bilia A.R. 2011. Antimicrobial Properties of *Quercus ilex* L. Proanthocyanidin Dimers and Simple Phenolics: Evaluation of Their Synergistic Activity with Conventional Antimicrobials and Prediction of Their Pharmacokinetic Profile. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59 (12), 6412-6422.

Kashiwada Y., Ahmed F.A., Kurimoto S.I., Kim S.Y., Shibata H., Fujioka T., Takaishi Y. 2012. New a-glucosides of caffeoyl quinic acid from the leaves of *Moringa oleifera* Lam. *Journal of Natural Medicines* 66 (1), 217-221.

Kazuma K., Takahashi T, Sato K., Takeuchi H., Matsumoto T., Okuno T. 2000. Quinochalcones and Flavonoids from Fresh Florets in Different Cultivars of *Carthamus tinctorius* L. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 64 (8), 1588-1599.

Khadem S. and Marles J. Robin. 2010. Monocyclic Phenolic Acids; Hydroxy- and Polyhydroxybenzoic Acids: Occurrence and Recent Bioactivity Studies. *Molecules* 15, 7985-8005.

Kikuchi Masao, Rie Onoguchi, Yasunori Yaoita, Koichi Machida 2011. Two new glycosides from *Viburnum plicatum* Thunb. ex Murray var. *plicatum* f. *plicatum*. *Journal of Natural Medicines* 65 (1), 202-205.

Kim S.M., Kang K., Jho E.H., Jung Y. J., Nho C.W., Um B.H., Pan C.H. 2011. Hepatoprotective Effect of Flavonoid Glycosides from *Lespedeza cuneata* against Oxidative Stress Induced by tert-Butyl Hydroperoxide. *Phytotherapy Research* 25, 1011-1017.

Kim H.Y., Moon B. H., Lee H. J., Choi D. H. 2004. Flavonol glycosides from the leaves of *Eucommia ulmoides* O. with glycation inhibitory activity. *Journal of Ethnopharmacology* 93 (2-3), 227.

King-Morrisset M.J., Serianni A.S. 1987. ¹³C NMR Studies of [1-¹³C]Aldoses: Empirical Rules Correlating Pyranose Ring Configuration and Conformation with ¹³C

Chemical Shifts and ^{13}C - ^{13}C Spin Couplings. Journal Of The American Chemical Society 109 (12), 3501-3508.

Kitagawa S., Sakamoto H., Tano H. 2004. Inhibitory effects of flavonoids on free radical-induced hemolysis and their oxidative effect on hemoglobin. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 52 (8), 999-1001.

Kite G.C., Veitch N.C., Boalch M.E., Lewis G.P., Leon C.J., Simmonds M.S.J. 2009. Flavonol tetraglycosides from fruits of *Styphnolobium japonicum* (Leguminosae) and the authentication of Fructus Sophorae and Flos. Sophorae. Phytochemistry 70, 785-794.

Knights B. A., Berrie A. M. M., 1971. Chemosystematics: seed sterols in the Cruciferae. Phytochemistry 10, 131-139.

Kubota, Hase.1956. Journal of the Institute of Polytechnics, Osaka City University, Series C: Chemistry 5, 49-51.

Kokubo T., Ambe Y., Nakamura M., Yamakawa T., Noguchi H., Kodama T. 1991. Quercetin 3-O- β -D-Glucopyranoside and Isorhamnetin 3-O- β -D-Glucopyranoside Formation from Quercetin by Cell Cultures of *Ipomoea batatas* and *Crocus sativum*. Agricultural and Biological Chemistry 55 (2), 613-614.

Koocheki A., Mortazavi S.A., Shahidi F., Razavi S.M.A., Taherian A.R. 2009. Rheological properties of mucilage extracted from *Alyssum homolocarpum* seed as a new source of thickening agent. Journal of Food Engineering 91, 490-496.

Koolen H.H.F, Da Silva F.M.A., Gozzo F.C., De Souza A.Q.L., De Souza A.D.L. 2013. Antioxidant, antimicrobial activities and characterization of phenolic compounds from buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) by UPLC–ESI-MS/MS. Food Research International 51, 467-473.

Kovalev S.V. Flavonoids from *Lotus ucrainicus* and *L. arvensis*. 2009. Chemistry of Natural Compounds 45 (4), 550-551, 465-466.

Kuang H., Sun S., Yang B., Xia Y., Feng W. 2009. New megastigmane sesquiterpene and indole alkaloid glucosides from the aerial parts of *Bupleurum chinense* DC. Fitoterapia 80, 35-38.

Kumar M., Ahmad A., Rawat P., Khan M.F., Rasheed N., Gupta P., Sathiamoorthy B., Bhatia G., Palit G., Maurya R. 2010. Antioxidant flavonoid glycosides from *Evolvulus alsinoides*. *Fitoterapia* 81 (4), 234-242.

Kuppusamy U.R., Das N.P. 1992. Effects of flavonoids on cyclic AMP phosphodiesterase and lipid mobilization in rat adipocytes. *Biochemical Pharmacology* 44, 1307-1315.

Kurkin V.A., Sharova O.V. 2007. Flavonoids from *Calendula officinalis* flowers. *Chemistry of Natural Compounds* 43 (2),

Kuruuezuem-Uz A. Demirezer L.O., Guevenalp Z., Kazaz C., Salih B. 2010. Four New Triterpenes from *Anchusa azurea* var. *Azurea*. *Helvetica Chimica Acta* 93 (3), 457-465.

L

Laekeman G.M., Claeys M., Rwangabo P.G., Herman A.G., Vlietinck A.J. 1986. Cardiovascular effects of 3-methylquercetin. *Planta Medica* 52, 433.

Landolfi R., Mower R. L., Steiner M. 1984. Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids: Structure-activity relations. *Biochemical Pharmacology* 33, 1525-1530.

Lee Kyun, Eun-Kyung Jeong, Sang Un Choi, Jongki Hong, and Kang Ro Lee. 2011. New Flavonol Glycosides from *Cardamine komarovii*. *Heterocycles* 83 (11), 2615-2625.

Lee S.Y., Kim, Ki H., Lee I.K., Lee K.H., Lee K.R., Choi S.U. 2012. A New Flavonol Glycoside from *Hylomecon vernalis*. *Archives of Pharmacal Research* 35 (3), 415-421

Lee J.S., Kim H.J., Lee Y.S. 2003. A new Anti-HIV Flavonoid Glucuronide from *Chrysanthemum morifolium*. *Planta Medica* 69 (9), 859-861.

Lee Y.S., Lee S., Lee H.S., Kim B.K., Ohuchi K., Shin K.H. 2005. Inhibitory Effects of Isorhamnetin-3-O- β -D-glucoside from *Salicornia herbacea* on Rat Lens Aldose Reductase and Sorbitol Accumulation in Streptozotocin-Induced Diabetic Rat Tissues. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 28 (5), 916-918.

Lee I.K., Lee K.R., Jeong E.K., Hong J., Choi S.U. 2011. New Flavonol Glycosides from *Cardamine komarovii*. *Heterocycles* 83 (11), 2615-2625.

Lee J., Lee Y.M., Kim J.S., Lee B.W., Kim J.H. 2012. Chemical Constituents from the Aerial Parts of *Aster koraiensis* with Protein Glycation and Aldose Reductase Inhibitory Activities. *Journal of Natural Products* 75 (2), 267-270.

Lei J., Xiao Y.C., Huang J. Tang M., Deng P.C. 2009. Two New Kaempferol Glycosides from *Androsace umbellata*. *Helvetica Chimica Acta* 92, 1439-1444.

Li H., Li J., Prasain J.K., Tezuka Y., Namba T., Miyahara T., Tonami S., Seto H., Tada T., Kadota S. 1998. Antiosteoporotic activity of the stems of *Sambucus sieboldiana*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 21 (6), 594-598.

Li R., Li J., Cai L., Hu C.M., Zhang L. 2008. Suppression of adjuvant arthritis by hesperidin in rats and its mechanisms. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 60 (2), 221-228.

Li Y.P., Chen Qing C., Fang T.T., Liu Y., Chen Y.G. 2009. Chemical constituents of *Dendrobium chrysotoxum*. *Chemistry of Natural Compounds* 45 (3), 414-416.

Liao Y.R., Wu T.S., Leu Y.L., Chan Y.Y., Kuo P.C. 2012. Anti-Platelet Aggregation and Vasorelaxing Effects of the Constituents of the Rhizomes of *Zingiber officinale*. *Molecules* 17 (8), 8928-8937.

Lin H.C., Tsai S.F., Lee S.S. 2011. Flavonoid Glycosides from the Leaves of *Machilus philippinensis*. *Journal of the Chinese Chemical Society* 58 (4), 555-562.

Lin Y.L., Lu C.K., Huang Y.J., Chen H.J. 2011. Antioxidative Caffeoylquinic Acids and Flavonoids from *Hemerocallis fulva* Flowers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59 (16), 8789-8795.

Li M.M., Wang K., Pan Z.H., Chen X.Q., Peng L.Y., Li Y., Cheng X., Zhao Q.S. 2009. Two New Sesquiterpene Glucosides from *Dennstaedtia scabra* (WALL.) MOORE. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 57 (10), 1123-1125.

De Lira Mota K.S., Dias G.E.N., Pinto M.E.F, Luiz-Ferreira Â., Alba Regina Monteiro Souza-Brito, Clélia Akiko Hiruma-Lima, Barbosa-Filho J.M., Batista L.M.. 2009. Flavonoids with Gastroprotective Activity. *Molecules* 14, 979-1012.

Liu H., Mou Y, Zhao J., Wang J., Zhou L., Wang M., Wang D., Han J., Yu Z., Yang F. 2010. Flavonoids from *Halostachys caspica* and Their Antimicrobial and Antioxidant Activities. *Molecules* 15, 7933-7945.

Lockwood G.B., Afsharypuor S. 1986. Comparative study of the volatile aglucones of glucosinolates from *in vivo* and *in vitro* grown *Descurainia Sophia* and *Alyssum minimum* using gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography* 356, 438-440.

Lu L., Song F.R., Tsao R., Jin Y.R., Liu Z.G., Liu S.Y. 2010. Rapid Communication In *Mass Spectrometry* 24, 169-172.

Lücker J., Martens S., Lund S.T. 2010. Characterization of a *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon 3',5'-O-methyltransferase showing strong preference for anthocyanins and glycosylated flavonols. *Phytochemistry* 71, 1474-1484.

Luo X.D., Basile M.J., Kennelly E.J. 2002. Polyphenolic antioxidants from the fruits of *Chrysophyllum cainito* L. (star apple). *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 50 (6), 1379-1382.

M

Μαλαματάρης Σ.Χ. 2004. Τεχνολογία Υγρών και στείων Φαρμακευτικών Μορφών. Τμήμα εκδόσεων Πανεπιστημιακό Τυπογραφείο.

Mabry T.G., Markham K.R., Thomas M.B. 1970. The systematic identification of flavonoids. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Maffei M. 1996 Chemotaxonomic Significance of Leaf Wax n-Alkanes in the Umbelliferae, Cruciferae and Leguminosae (Subf.Papilionoidaea). *Biochemical Systematics and Ecology* 24 (6), 531-545.

Manguero L.O.A., Ugi, I., Hermann R., Lemmen P. 2003. Flavonol and drimane-type sesquiterpene glycosides of *Warburgia stuhlmannii* leaves. *Phytochemistry* 63 (4), 497-502.

Manir Md.M., Kimb J.K., Lee B.G., Moon S.S. 2012. Tea catechins and flavonoids from the leaves of *Camellia sinensis* inhibit yeast alcohol dehydrogenase. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 20 (7), 2376-2381

March R.E. and Miao X-S. 2004. A fragmentation study of kaempferol using electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry at high mass resolution. *International Journal of Mass Spectrometry* 231, 157-167.

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, 61-85.

Markham K.R. 1981. *Techniques of flavonoid identification*. Academic Press.

Matsunami K., Otsuka H., Takeda Y. 2011. Myrseguinosides A—E, Five New Glycosides from the Fruits of *Myrsine seguinii*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 59 (10), 1274-1280.

Matsuzaki K., Ishii R., Kobiyama K., Kitanaka S., 2011. New benzophenone and quercetin galloyl glycosides from *Psidium guajava* L. *Journal of Natural Medicines* 64, 252-256.

Mc Clure J. 1975. *The Flavonoids*. Chapman & Hall, London. Biosynthesis of flavonoids (Harborne J.B., Mabry T.J. and Mabry H. eds), 865-915.

Medvedeva S.A., Tyukavkina N.A, Ivanova S.Z. 1972. Flavonol 3-Glucosides of the Oleoresin of *Larix sibirica*. *Khimiya Prirodnvkh Soedinenii* 6, 800-801.

Melon F.A., Bennet R.N., Holst B., Williamson G. 2002. Intact glucosilate analysis in plant extracts by programmed Cone Voltage Electrospray LC/MS/MS: performance and comparison with LC/MS/MS methods. *Analytical Biochemistry* 306, 83-91.

Mezache N., Bendjeddou D., Satta D., Mekkiou R., Benayache S., Benayache F. 2010. Secondary metabolites from *Centaurea lippii*. *Chemistry of Natural Compounds* 46 (5), 801-802.

Middleton E.J., Kandaswami C. 1993. Chapman and Hall, London, UK. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: Implications for immunity, inflammation and cancer. In *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*. (J.B. Harborne, ed.), 619-652.

Miliauskas G., Van Beek T.A., Venskutonis P.R., Linssen J.P.H., De Waard P. 2004. Antioxidative activity of *Geranium macrorrhizum*. *European Food Research and Technology* 218 (3), 253-261.

Mostafa M., Takano F., Ohta T. 2010. Unique phenyl ether type biflavonoids, zizyflavosides A and B with biomimetic synthesis for zizyflavosides A. *Heterocycles* 81 (11), 2497-2509.

Muller A., Reiter S., Wirth C., Wagner H. 1998. Anticomplementary flavonoids from *Galphinia glauca*. *Phytomedicine* 5 (5), 341-345.

Murakami N., Mostaqul H.M., Tamura S., Itagaki S., Horii T., Kobayashi M. 2001. New anti-malarial flavonol glycoside from *hydrangeae dulcis folium*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 11 (18), 2445-2448.

N

Νιώπας Ι. 2008. Φαρμακολογικές δοκιμασίες φυτοθεραπευτικής αξιολόγησης. (Σημειώσεις μεταπτυχιακού προγράμματος του Τμήματος Φαρμακευτικής του ΑΠΘ, Κατεύθυνση Ε: Φαρμακογνωσία – Φυτικά Φαρμακευτικά προϊόντα).

Nahrstedt A., Hungeling M., Petereit N. 2006. Flavonoids from *Acalypha indica*. *Ftoterapia* 77 (6), 484-486.

Nagle D.G., Zhou Y.D., 2006. Natural Product-Based Inhibitors of Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1). *Current Drug Targets* 7 (3), 355–369.

Nakashima S., Matsuda H., Oda Y., Nakamura S., Xu F., Yoshikawa M. 2010. Melanogenesis inhibitors from the desert plant *Anastatica hierochuntica* in B16 melanoma cells. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 18 (6), 2337-2345.

Neu R. 1957. Chelate von Diarylborsäuren mit aliphatischen Oxyalkylaminen als Reagenzien für den Nachweis von Oxyphenyl-benzo- γ -pyronen. *Die Naturwissenschaften* 44, 181-183.

Nisar M., Khan I., Simjee S.U. 2008. Anticonvulsant, analgesic and antipyretic activities of *Taxus wallichiana* Zucc. *Journal of Ethnopharmacology* 116 (3), 490-494.

Noccioli C., Meini L., Loi M.C., Potenza D., Pistelli L. 2011. A new alpinumisoflavone derivative from *Genista pichisermolliana*. *Phytochemistry Letters* 4, 342-344.

Novruzov E.N., Abdullaeva G. A., Shamsizade L. A., Mustafaev N. Sh. 2009. Flavonoids and anthocyanins from *Alhagi pseudoalhagi*. *Chemistry of Natural Compounds* 45 (2), 249-250.

O

Olennikov D.N., Tankhaeva L.M., Partilkhayev V.V. 2012. Flavonol mono- and diglycosides from leaves of *Caragana spinosa*. Chemistry of Natural Compounds 48 (3), 500-502.

Olennikov D.N., Tankhaeva L.M., Partilkhayev V.V. 2012. Chemical investigation of *Caragana spinosa* runners. Chemistry of Natural Compounds 47 (6), 988-990.

Olszewska M.A., Roj J.M. 2011. Phenolic constituents of the inflorescences of *Sorbus torminalis* (L.) Crantz. Phytochemistry Letters 4, 151-157.

Olszewska M.A., Michel P. 2012. Activity-guided isolation and identification of free radical-scavenging components from various leaf extracts of *Sorbus aria* (L.) Crantz. Natural Product Research 26 (3), 243-254.

Ouattara B., Jansen O., Angenot L., Guissou I.P., Frederich M., Fondou P., Tits M. 2009. Antisickling properties of divanilloylquinic acids isolated from *Fagara zanthoxyloides* Lam. (Rutaceae). Phytomedicine 16, 125-129.

P

Παπαπαναγιώτου Ι.Κ., Κυριαζοπούλου-Δαλαΐνα Β. 2004. Ιατρική μικροβιολογία και ιολογία. University Studio Press Β' Έκδοση.

Packer, L., Glazer, A.N., Eds. 1990. Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies. In Methods in enzymology. Academic Press: San Diego, CA, 186, 343-355.

Pakudina Z.P., Leontev V.B., Kamaev F.G., Sadykov A.S. 1970. Structure and PMR spectra of isoquercitrin and hirsutrin. Khimiya Prirodnikh Soedinenii (5): 555.

Palacios P., Gutkind G., Roudina R.V.D., De Torres R., Coussio J.D. 1983. Genus *Baccharis*: Antimicrobial activity of *B. crispa* and *B. notoserghila*. Planta Medica 49, 128.

Panthong A., Kanjanapothi D., Tuntiwachwuttikul P., Pancharoen O., Reutrakul V. 1994. Antiinflammatory activity of Flavonoids. Phytomedicine 1, 141-144.

Panthong A., Tassaneeyakul W., Kanjanapothi D., Tuntiwachwuttikul P., Reutrakul V. 1989. Antiinflammatory activity of 5, 7-dimethoxyflavone. *Planta Medica* 53, 133-136.

Panthong K., Srisud Y., Rukachaisirikul V., Tewtrakul S., Hutadilok-Towatana N., Voravuthikunchai S.P. 2013. Benzene, coumarin and quinolinone derivatives from roots of *Citrus hystrix*. *Phytochemistry (Elsevier)* 88, 79-84.

Park Y.K., Lee C.Y. 1996. Identification of Isorhamnetin 4'-Glucoside in Onions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44 (1), 34-36.

Park B.J., Onjo M., Matsuta T., Kanazawa T. Park C.H., Chang K.J. 2012. Phenolic compounds from the leaves of *Psidium guajava* II. Quercetin and its glycosides. *Chemistry of Natural Compounds* 48 (3), 477-479.

Pathak D., Pathak H., Singla A.K. 1991. Flavonoids as medicinal agents - Recent advances. *Fitoterapia* 62, 371.

Pawlowska A.M., Oleszek W., Braca A. 2008. Quali-quantitative Analyses of Flavonoids of *Morus nigra* L. and *Morus alba* L. (Moraceae) Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (9), 3377-3380.

Pei D., Liu D.H., Liu J.X., Di D.L. 2012. Chemical investigation of the pollen of *Brassica napus*. *Chemistry of Natural Compounds* 48 (2), 310-312.

Piperpoint W.S. 1986. Alan R. Liss, New York, NY USA. Flavonoids in the human diet. In *Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological and Structure-Activity Relationships*, 125-140.

Popova M.P., Chinou I.B., Marekov I.N., Bankova V.S. 2009. Terpenes with antimicrobial activity from Cretan propolis. *Phytochemistry* 70, 1262-1271.

Popovic Zorica. 2012. Wild flora species used for medicinal purposes in the area of Deliblatska peščara (Deliblato Sand).

Poulton J. 1981. *The Biochemistry of Plants*, Conn .E.E Stumpf P.K (eds), Academic Press NY 7, 667-723.

Prachayasittikul S., Suphamong S., Worachartcheewan A., Lawung R., Prachayasittikul V., Ruchirawat S. 2009. Bioactive Metabolites from *Spilanthes acmella* Murr. *Molecules* 14 (2), 850-867.

Pugazhendhi D., Pope G.S., Darbre P.D. 2005. Oestrogenic activity of *p*-hydroxybenzoic acid (common metabolite of paraben esters) and methylparaben in human breast cancer cell lines. *Journal of Applied Toxicology* 25, 301-309.

Q

Qiu Y.Q., Qi S.H., Zhang S., Li Q.X. 2010. Chemical constituents of *Pluchea indica* (II). *Chinese Traditional and Herbal Drugs* 41 (1), 24-27.

R

Ρέκκα E.A., Κουρυνάκης Π.Ν. 2010. Οργανική φαρμακευτική Χημεία: Θέματα Φαρμακοχημείας- Σχεδιασμού Φαρμάκων (Σημειώσεις μαθήματος Φαρμακοχημείας του προπτυχιακού προγράμματος του Τμήματος Φαρμακευτικής του Α.Π.Θ).

Rayanil K.O., Nimnoun C., Tuntiwachwuttikul P. 2012. New phenolics from the wood of *Casearia grewiifolia*. *Phytochemistry Letters* 5 (1), 59-62.

Ren W., Qiao Z., Wang H., Zhu L., Zhang L. 2003. Flavonoids: Promising Anticancer Agents. *Medicinal Research Reviews* 23 (4), 519-534.

Robak J. and Gryglewski R.J. 1988. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochemical Pharmacology* 37, 837-841.

Robbins J. Rebecca. 2003. Phenolic acids in Food: An Overview of Analytical Methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 2866-2887.

Rumalla C.S., Ali Z., Weerasooriya A.D., Smillie T.J., Khan I.A. 2010. A new triterpene glycoside from *Centella erecta*. *Fitoterapia* 81 (7), 751-754.

S

Σκλαβιάδης Θ. 2005. Ορμόνες Βιταμίνες Μέρος II (Σημειώσεις Φαρμακολογίας του προπτυχιακού προγράμματος του Τμήματος Φαρμακευτικής του Α.Π.Θ. Τμήμα εκδόσεων Πανεπιστημιακό Τυπογραφείο).

Σουλελής X. 2000. Φαρμακογνωσία. Πήγασος. Α. Σιμώνη-Φ. Χατζηπάντου Ο.Ε.

Saeed S., Shah S., Mehmood R., Malik A. 2011. Paniculacin, a new coumarin derivative from *Murraya paniculata*. *Journal of Asian Natural Products Research* 13 (8), 724-727.

- Saleem M., Kim H. J., Han C.K., Jin C., Lee Y.S. 2006. Secondary metabolites from *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. *Phytochemistry* 67, 1390-1394.
- Salib J.Y., Michael H.N. 2004. Cytotoxic phenylethanol glycosides from *Psidium guajava* seeds. *Phytochemistry* 65, 2091-2093.
- Samuelsson G., 2004. Φαρμακευτικά προϊόντα φυσικής προελεύσεως. Εγχειρίδιο Φαρμακογνωσίας. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης.
- Sánchez-Maldonado A.F., Schieber A., Ganzle M.G. 2011. Structure–function relationships of the antibacterial activity of phenolic acids and their metabolism by lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 111 (5), 1176-1184.
- Sandhar H.K., Kumar B., Prasher S., Tiwari P., Salhan M., Sharma P. 2011. A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. *Internationale Pharmaceutica Scientia* 1 (1), 25-41.
- Sang S., Lapsley K., Jeong W.S., Lachance P.A., Ho. C.T., Rosen R.T. 2002. Antioxidative Phenolic Compounds Isolated from Almond Skins (*Prunus amygdalus* Batsch). *Journal of Agriculture Food Chemistry* 50, 2459-2463.
- Santos D.Y.A.C., Salatino M.L.F. 2000. Foliar flavonoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic significance. *Phytochemistry* 55, 567-573.
- Sawamura S., Nishimura M., Sakane I. 2004. Flavonol glycosides as neutralizing agent for clostridium bacterial neurotoxins and preparation method thereof. Patent CA 140:395496.
- Saepou S., Pohmakotr M., Reutrakul V., Tuchinda P., Yoosook C., Kasisit J., Napaswad C. 2010. Anti-HIV-1 Diterpenoids from Leaves and Twigs of *Polyalthia sclerophylla*. *Planta Medica* 76 (7), 721-725.
- Sen S., Sahu N.P., Mahato S.B. 1992. Flavonol Glucosides from *Calotropis gigantean*. *Phytochemistry* 31 (8), 2919-2921.
- Senatore F., D'Agostino M., Dini I. 2000. Flavonoid Glycosides of *Barbarea vulgaris* L. (Brassicaceae). *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 48, 2659-2662.
- Seo H.K., Kim J.S., Kang S.S. 2010. Labdane Diterpenes and Flavonoids from *Leonurus japonicas*. *Helvetica Chimica Acta* 93, 2045-2051.

Shen S., Ding X., Ouyang M.A., Wu Z.J., Xie L.H. 2010. A new phenolic glycoside and cytotoxic constituents from *Celosia argentea*. *Journal of Asian Natural Products Research* 12 (9), 821-827.

Shui G., Peng L.L. 2004. An improved method for the analysis of major antioxidants of *Hibiscus esculentus* Linn. *Journal of Chromatography A*, 1048 (1), 17-24.

Soberon J.R., Sgariglia M.A., Sampietro D.A., Quiroga E.N., Vattuone M.A. 2010. Free radical scavenging activities and inhibition of inflammatory enzymes of phenolics isolated from *Tripodanthus acutifolius*. *Journal of Ethnopharmacology* 130 (2), 329-333.

Sohretoglu D., Sakar M.K., Sterner O. 2011. Polyphenolic compounds from *Geranium purpureum* Vill. growing in Turkey. *Turkish Journal of Chemistry* 35 (5), 809-814.

Soicke H., Leng-Peschlow E. 1987. Characterisation of flavonoids from *Baccharis trimena* and their antihepatotoxic properties. *Planta Medica* 53, 37.

Souza A.D.L., Rodrigues-Filho E., Souza A.Q.L., Henrique-Silva F., Pereirac J.O. 2008. A New Guaiane Mannoside from a *Eutypa*-like Fungus Isolated from *Murraya paniculata* in Brazil. *Journal Of Brazilian. Chemical Society* 19 (7), 1321-1325.

Srinivas K., Rao M.E.B., Rao S.S., Prakash K. 2002. Chemical constituents of the leaves of *Raphanus sativus*. *Acta Ciencia Indica, Chemistry* 28 (1), 25-26. CA 141:328490.

Stahl E. 1969. *Thin-Layer Chromatography* (Berlin-Heidelberg-N.York).

Strack D., Heilemann J., Wray V., Dirks H. 1989. Structures and accumulation patterns of soluble and insoluble phenolics from Norway spruce needles. *Phytochemistry* 28 (8), 2071-2078.

Su X.C., Chen L., Aisa H.A. 2008. Flavonoids and sterols from *Alhagi sparsifolia*. *Chemistry of Natural Compounds* 44 (3), 365.

Sugimoto S., Nakamura S., Yamamoto S., Yamashita C., Oda Y., Matsuda H., Yoshikawa M. 2009. Brazilian Natural Medicines III.¹⁾ Structures of Triterpene

Oligoglycosides and Lipase Inhibitors from Mate, Leaves of *Ilex paraguariensis*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 57 (3), 257-261.

Süntara I.P., Akkol E.K., Yalcınb F.N., Kocaa U., Keles H., Yesiladad E. 2010. Wound healing potential of *Sambucus ebulus* L. leaves and isolation of an active component, quercetin 3-O-glucoside. Journal of Ethnopharmacology 129, 106-114.

T

Τσιφτσόγλου Αστέριος, 2004. Κλινική και Μοριακή Φαρμακολογία βασικές αρχές και οι μηχανισμοί δράσης των φαρμάκων. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.

Tai B.H., Trung T.N., Nhiem N.X., Ha D.T., Bae K.H., Kim Y.H., Luong H.V., Phuong T.T., Thu N.B. 2011. Chemical Components from the Fruit Peels of *Wisteria floribunda* and their Effects on Rat Aortic Vascular Smooth Muscle Cells. Bulletin of the Korean Chemical Society 32 (6), 2079-2082.

Tai Z., Zhang F., Cai L., Shi J., Cao Q., Ding Z. 2012. Flavonol glycosides of *Pseudodrynaria coronans* and their antioxidant activity. Chemistry of Natural Compounds 48 (2), 221-224.

Tai Z.G, Cai L., Dai L., Sun W.J., Zhe W, Yang Y.B., Cao Q.E., Ding Z.T. 2010. Antioxidant Activities of Caragana sinica Flower Extracts and Their Main Chemical Constituents. Molecules 15, 6722-6732.

Tan D., Yan Q., Kang H. 2013, Chemical Constituents from *Blumea balsamifera*. Chemistry of Natural Compounds 48 (6), 1072-1073.

Tan J.M., Qiu Y.H., Tan X.Q., Tan C.H., Xiao K. 2011. Chemical constituents of *Equisetum debile*. Journal of Asian Natural Products Research 13 (9), 811-816.

Tanaka Y., Honma D. Tagashira M., Kanda T., Tamura M., Yanagida A., Shibusawa Y., Zhao P., Shoji T. 2012. New chromanone and acylphloroglucinol glycosides from the bracts of hops. Phytochemistry Letters 5 (3), 514-518.

Tanga Y., Loua F., Wanga J., Lia Y., Zhuangc Sh. 2001. Coumaroyl flavonol glycosides from the leaves of *Ginkgo biloba*. Phytochemistry 58, 1251-1256.

Takeda Y., Isai N., Masuda T., Honda G., Takaishi Y., Ito M., Otsua H., Ashurmetov O.A., Khodzhimatov O.K. 2001. *Phlomis spinidens*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 49 (8), 1039-1041.

Tapas A.R., Sakarkar D.M., Kakde R.B. 2008. Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. Tropical Journal of Pharmaceutical Research 7 (3), 1089-1099.

Torel J., Cillard J., Cillard P. 1986. Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. Phytochemistry 25, 383-385.

Touil A., Rhouati S., Creche J. 2006. Flavonoid glycosides from *Pituranthos chloranthus*. Chemistry of Natural Compounds, 42 (1), 104-105.

Tzeng S.H., Ko W.C., Ko F.N., Teng C.M. 1991. Inhibition of platelet aggregation by some flavonoids. Thrombosis Research 64, 91-100.

U

Umbetova A.K., Choudhary M.I, Sultanova N A., Burasheva G.Sh., Abilov Zh.A. 2005. Flavonoids of plants from the genus *Tamarix*. Chemistry of Natural Compounds 41 (6), 728-729.

V

Valenzuela A., Guerra R., Videla L.A. 1986. Antioxidant properties of the flavonoids silybin and (+)-cyanidanol-3: comparison with butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. Planta Medica 52, 438.

Viornerly L., Saliba C., Daskiewicz J.B., Bayet C., Comte G., Fenet B., Gutierrez G., Barron D. 2000. Phenylpropanoids from *Umbilicus pendulinus*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 48 (11), 1768-1770.

W

Waba. 1952. Isolation from blossoms of *Nicotiana sylvestris*. Nippon Noigei Kagaku Kaishi 26, 159.

Wagner H. 1988. Search for new plant constituents with potential antiphlogistic and antiallergic activity. Planta Medica 55, 235-236.

Wan C.P., Cao S.W., Qiu Y. 2012. Chemical constituents from *Sarcopyramis bodinieri* var. *delicate*. Chemistry of Natural Compounds 48 (1), 126-127.

Wang J., Gao H., Zhao J., Wang Q., Zhou L., Han J., Yu Z., Yang F., 2010. Preparative Separation of Phenolic Compounds from *Halimodendron halodendron* by High-Speed Counter-Current Chromatography. *Molecules* 15, 5998-6007.

Wang D.M., Pu W.J., Wang Y.H., Zhang Y.J., Wang S.S. 2012. A New Isorhamnetin Glycoside and Other Phenolic Compounds from *Callianthemum taipaicum*. *Molecules* 17, 4595-4603.

Wang J., Lu Z., Liu P., Wang Y., Li J., Zhu W., Hong K. 2012. Cytotoxic Polyphenols from the Fungus *Penicillium expansum* 091 006 Endogenous with the Mangrove Plant *Excoecaria agallocha*. *Planta Medica* 78 (17),1861-1866.

Wang K., Li M.M., Chen X.Q., Peng L.Y., Cheng X.Q., Li Y., Zhao Q.S. 2010. Phenolic Constituents from *Brainea insignis*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 58 (6), 868-871.

Wang X., Chen G., Yue W., Liang Q., Wu Q., Wu Y. 2013. Optimisation of ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from *Sparganii rhizoma* with response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry* 20 (3), 846-854.

Wong E. In Harborne J.B., Mabry T. J., Mabry H. (Eds) Chapman & Hall, London. 1979. The Flavonoids, 970.

www.volkoomen.nl/A/allyssUM.htm

X

Xie H., Wang T., Matsuda H., Morikawa T., Yoshika M., Tani T. 2005. Bioactive Constituents from Chinese Natural Medicines. XV.1) Inhibitory Effect on Aldose Reductase and Structures of Saussureosides A and B from *Saussurea medusa*. *Chemistry Pharmaceutical Bulletin* 53 (11), 1416-1422.

Y

Yang Z.G., Matsuzaki K., Kitanaka S., Wen X.F., Li Y.H. 2013. Inhibitory Effects of the Constituents of *Hippophae rhamnoides* on 3T3- L1 Cell Differentiation and Nitric Oxide Production in RAW264.7 Cells *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 61 (3), 279-285.

Yang Y.N., Liu Z.Z., Feng Z.M., Jiang J.S. Zhang P.C.2012. Lignans from the Root of *Rhodiola crenulata*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 60 (4), 964-972.

Ye M., Yan Y., Guo D. 2005. Characterization of phenolic compounds in the Chinese herbal drug Tu-Si-Zi by liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. Rapid Communications In Mass Spectrometry 19, 1469-1484

Yeskaliyeva B., Mesaik M. A., Abbaskhan A., Kulsoom A. Burasheva G. Sh., Abilov Zh. A., M. Iqbal Choudhary, Atta-ur-Rahman. 2006. Bioactive flavonoids and saponins from *Climacoptera obtusifolia*. Phytochemistry 67, 2392-2397.

Yoshikawa M., Li X., Nishida E., Nakamura S., Matsuda H., Muraoka O., Morikawa T. 2008. Medicinal Flowers. XXI.¹⁾ Structures of Perennisaponins A, B, C, D, E, and F, Acylated Oleanane-Type Triterpene Oligoglycosides, from the Flowers of *Bellis perennis*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 56 (4), 559-568.

Yoshikawa K., Otsu M., Ito T., Asakawa Y., Hashimoto T., Kawano S. 2013. Aromatic constituents of *Cymbidium* Great Flower Marie Laurencin and their antioxidative activity. Journal of Natural Medicines 67 (1), 217-221.

Yu Y.L., Li X., Ke C.Q., Tang C.P., Yang X.Z., Li X.Q., Ye Y. 2010. Iridoid glucosides from *Allamanda neriifolia*. Chinese Chemical Letters 21 (6), 709-711.

Yuldashev, M.P., Batirov E.Kh., Malikov V.M. 1987. Chemistry of Natural Compounds 23 (3), 377 - 378

Yuldashev M.P., Rasulova L.K., 2001. Flavonoids of *Juniperus zeravschanica*. Chemistry of Natural Compounds 37 (3), 226-227.

Yuldashev A.A., Yuldashev M.P., Abdullabekova V.N. 2002. Components of *Aerva lanata*. Chemistry of Natural Compounds 38 (3), 293-294.

Yuting C., Rongliang Z., Zhongjian J., Yong J. 1990. Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. Free Radical Biology & Medicine 9, 19-21.

Z

Zang Y., Cichewicz R.H, Nair M.G. 2004. Lipid peroxidation inhibitory compounds from daylily (*Hemerocallis fulva*) leaves. Life Sciences 75 (6), 753-763.

Zhang L., Li. J., Yu S.C., Jin Y., Lv X.W., Zou Y.H., Li Y. 2008. Therapeutic effects and mechanisms of total flavonoids of *Turpinia Arguta* Seen on adjuvant arthritis in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 116, 167-172.

Zheng Y., Huang W., Yoo J.G., Ebersole J.L., Huang C.B. 2011. Antibacterial compounds from *Siraitia grosvenorii* leaves. *Natural Product Research* 25 (9), 890-897.

Zhou K., Wang H., Mei W., Li X., Luo Y., Dai H. Antioxidant Activity of Papaya Seed Extracts. 2011. *Molecules* 16 (8), 6179-6192.

Zhu J.T.T., Choi R.C.Y., Chu G.K.Y., Cheung A.W.H., Gao Q.T., Li J., Jiang Z.Y., Dong T.T.X., Tsim K.W.K. 2007. Flavonoids Possess Neuroprotective Effects on Cultured Pheochromocytoma PC12 Cells: A Comparison of Different Flavonoids in Activating Estrogenic Effect and in Preventing β -Amyloid-Induced Cell Death *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (6), 2438-2445.



ΣΤ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

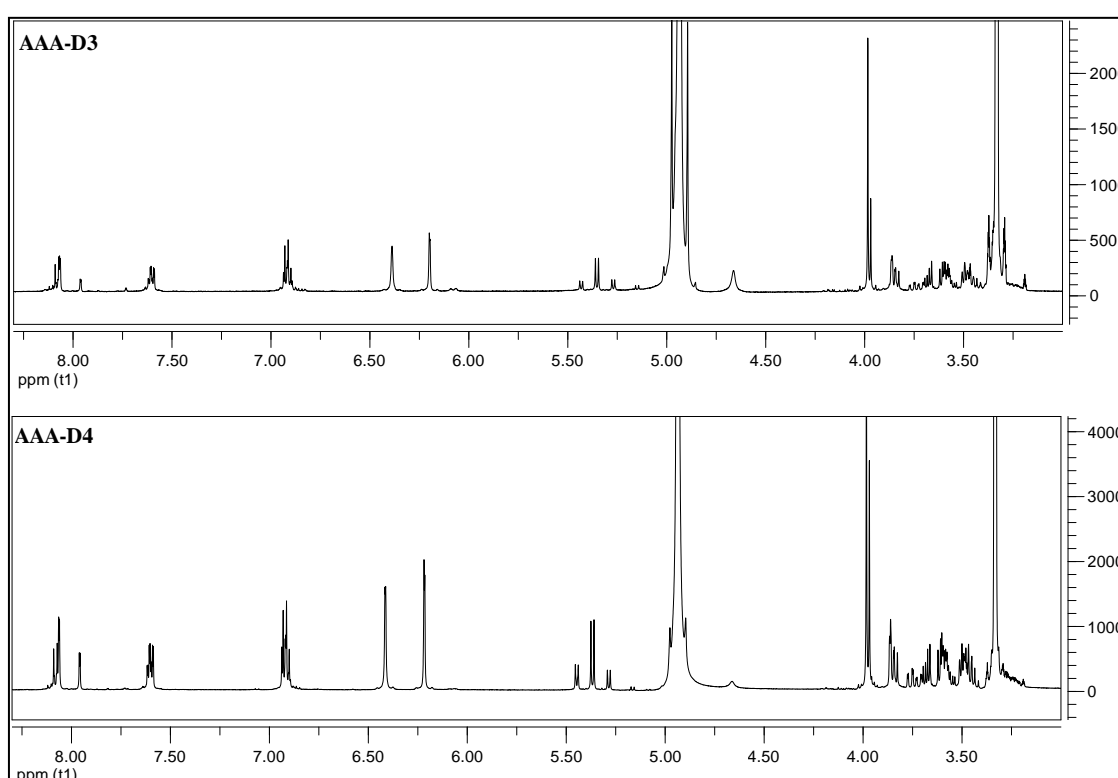
ΣΤ.1. ΜΙΓΜΑΤΑ



ΜΙΓΜΑΤΑ AAA-D₃ ΚΑΙ AAA-D₄

(Μίγματα ουσιών 3, 7 και 8)

Μελετώντας τα φάσματα των δειγμάτων AAA-D₃ και AAA-D₄ παρατηρεί κανείς ότι πρόκειται για μίγμα (μη ισομοριακό, βάση της ολοκλήρωσης των κορυφών του φάσματος ¹H-NMR) τριών φλαβονοειδών και πιο συγκεκριμένα δυο παραγώγων κερκετίνης και ενός παραγώγου καιμπερόλης. Αυτό συμπεραίνεται από τα χαρακτηριστικά σήματα που υπάρχουν στην αρωματική περιοχή του φάσματος ¹H-NMR.



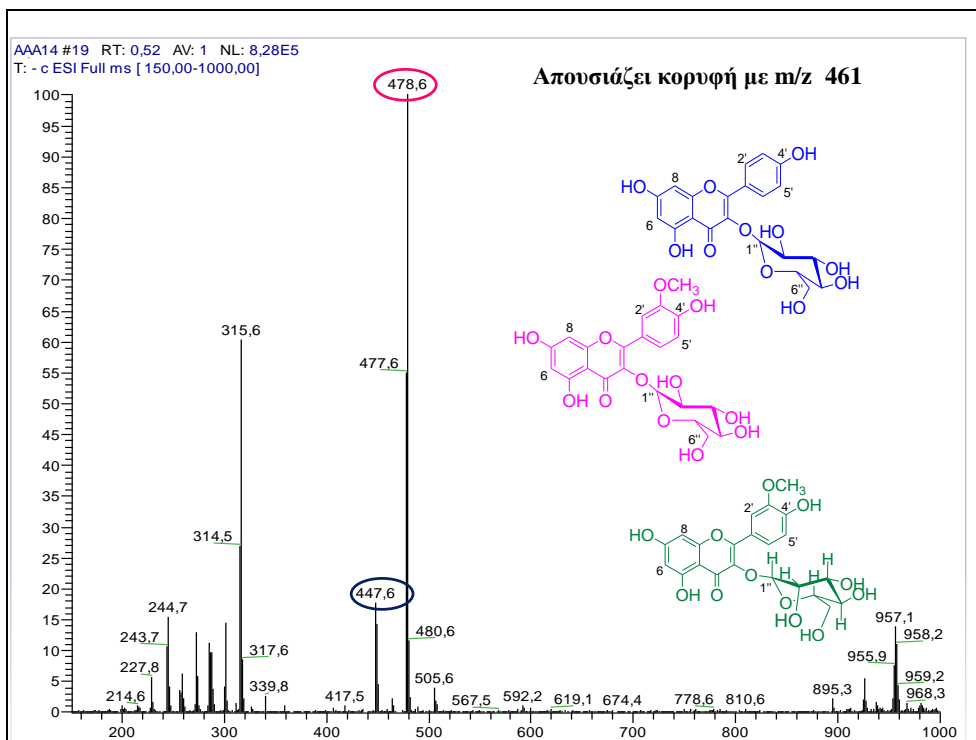
Εικόνα 59: Πλήρη φάσματα ¹H-NMR των δειγμάτων AAA-D₃ και AAA-D₄

Στην κεντρική περιοχή του φάσματος ¹H-NMR εμφανίζονται τρία ανωμερικά πρωτόνια σε δ 5.42 (J=7.5 Hz), δ 5.35 (J=8.0 Hz) και δ 5.26 (J=7.0 Hz), τα οποία ανήκουν το καθένα σε ένα από τα τρία φλαβονοειδή και αυτό επειδή οι κορυφές τους δεν έχουν την ίδια ένταση. Αυτό αποδεικνύει και η ολοκλήρωσή τους. Δεν μπορεί η θέση σύνδεσης του σακχάρου σε κανένα από τα τρία φλαβονοειδή του μίγματος να βρίσκεται σε υδροξύλιο του A δακτυλίου του φλαβονοειδούς επειδή δεν υπάρχουν διαφορές στις τιμές δ των πρωτονίων H-6 και H-8 των φλαβονοειδών του μίγματος, συγκριτικά με άλλα φλαβονοειδή που έχουν απομονωθεί ως καθαρές ουσίες από

εκχυλίσματα του φυτού και ανήκουν στην κατηγορία των φλαβονολών και τα οποία δεν έχουν υποκατάσταση στα αντίστοιχα υδροξύλια. Επίσης, δεν μπορεί να είναι συνδεδεμένα σε υδροξύλια του δακτυλίου Β των φλαβονοειδών επειδή σε αυτή την περίπτωση θα έπρεπε τα πρωτόνια H-5' [τόσο των παραγώγων κερκετίνης όπως και του παραγώγου καιμπερόλης (H-5' και H-3')] να είναι πιο αποθωρακισμένα λόγω της υψηλής πολικότητας του σακχάρου και να έχουν τιμές δ μεγαλύτερες των 7.15ppm (Park και Lee, 1996).

Στο φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ εμφανίζονται τρεις χημικές μετατοπίσεις ανθράκων C-6 πυρανικού δακτυλίου σακχάρου 62.64ppm, 62.55ppm και 62.23ppm. Άρα, και τα τρία σάκχαρα είναι εξόζες με διαμόρφωση πυρανικού δακτυλίου (Hobley και Howarth, 1996).

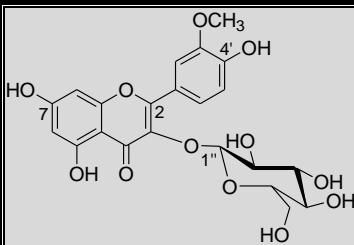
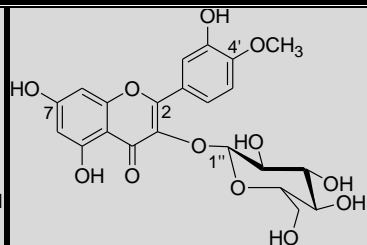
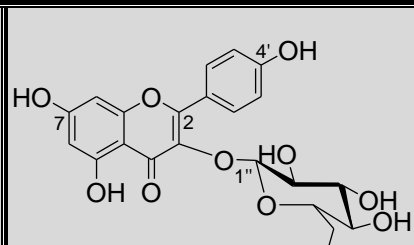
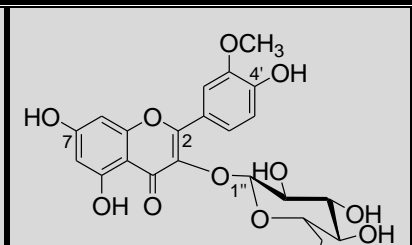
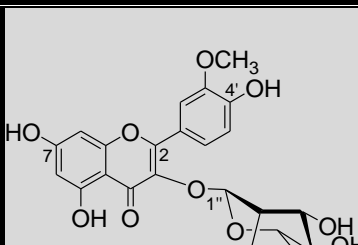
Στην περιοχή 3.80-3.90ppm εμφανίζονται δύο οξείες απλές κορυφές οι οποίες ανήκουν σε δύο μεθοξυ-ομάδες (-OCH₃). Επειδή, δεν έχουν την ίδια ένταση, δεν μπορεί να ανήκουν στην ίδια ουσία. Αυτό αποδεικνύεται και από την ολοκλήρωσή τους στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$. Επιπλέον, στο φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ εμφανίζονται μόνο δύο χημικές μετατοπίσεις μεθοξυλικών ανθράκων 56.97ppm και 56.78ppm. Επιπροσθέτως, επειδή το ακριβώς προηγούμενο κλάσμα που συλλέχθηκε από την HPLC (**AAA-D₂**), ήταν μίγμα της κερκετινο-3-O- β -D-γλυκόσης και της κερκετινο-3-O-εξόσης συμπεραίνουμε ότι οι δύο αυτές μεθοξυ-ομάδες του κλάσματος **AAA-D₃** ανήκουν στα κερκετινο παράγωγα του μίγματος. Η παραπάνω υπόθεση είναι απόλυτα λογική αν αναλογιστεί κανείς ότι το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε στην HPLC για το διαχωρισμό, ξεκινούσε από 100% H₂O και σταδιακά, μη γραμμικά, έφτανε σε 100% MeOH (βλ. σελ 79, Πίνακας 3). Επομένως, αρχικά εκλούνται οι πιο πολικές ουσίες, αυτές δηλαδή που φέρουν περισσότερες ελεύθερες ομάδες υδροξυλίων, και κατόπιν οι λιγότερο πολικές. Αυτό επιβεβαιώνεται και από το φάσμα μάζας του δείγματος, μιας και απουσιάζει το μοριακό ιόν μιας γλυκοσυλιωμένης καιμπερόλης με υποκαταστάτη μεθοξυομάδα σε m/z 461 (Al-Musayeb *et al.*, 2011). Η θέση υποκατάστασης της μεθυλομάδας είναι το υδροξύλιο 3' και όχι το 4' επειδή τα βιβλιογραφικά δεδομένα δεν δικαιολογούσαν παρά μόνο αυτή τη δομή.

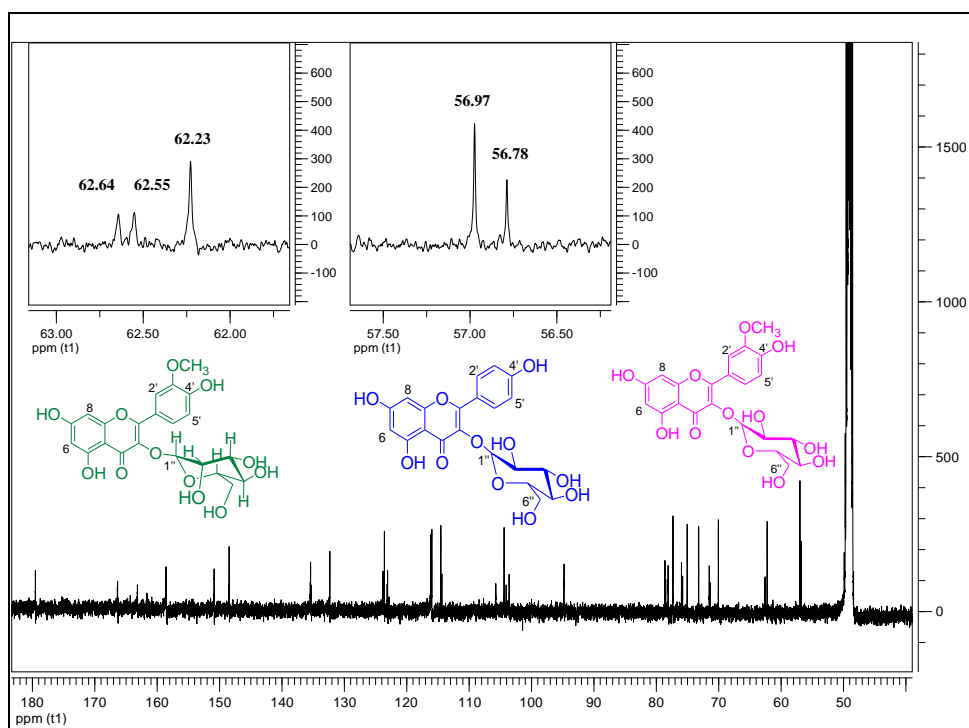


Εικόνα 60: Φάσμα μάζας (ESI-MS) του δείγματος AAA-D₄

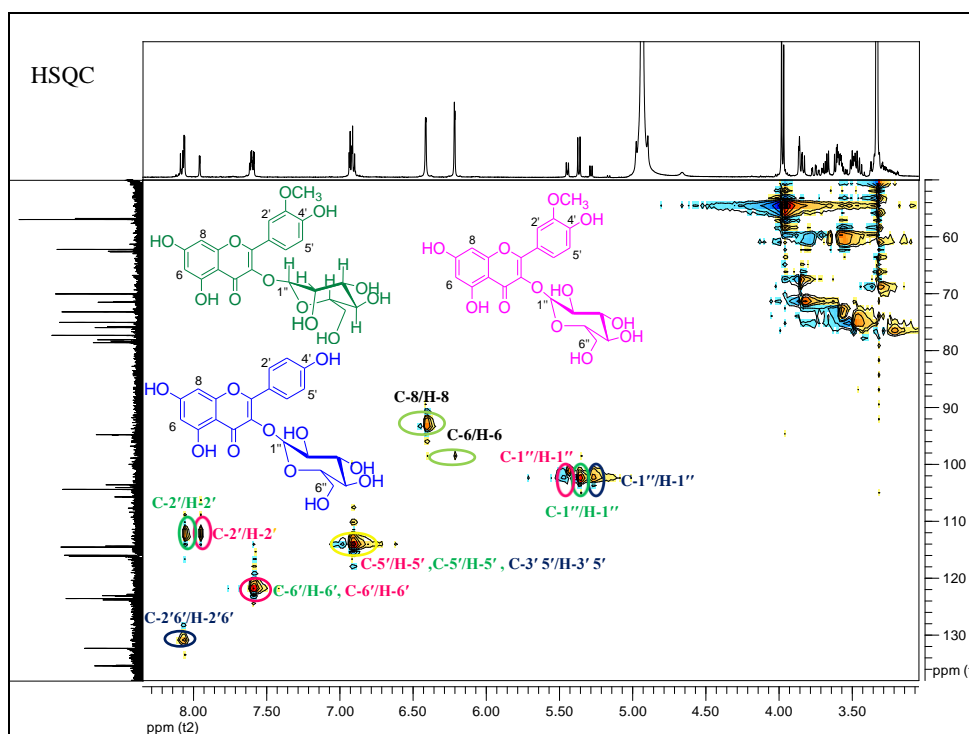
Τέλος, ανατρέχοντας στη βιβλιογραφία για πληροφορίες σχετικές με τις χημικές μετατοπίσεις και τις συζεύξεις των πρωτονίων των παραπάνω (σε διαλύτη ίδιο με αυτόν που χρησιμοποιήσαμε για την λήψη των φασμάτων, δηλαδή CD₃OD), παρατηρήσαμε ταύτιση των τιμών της βιβλιογραφίας με αυτές των ουσιών μας. Οπότε, μπορούμε με βεβαιότητα να πούμε ότι πρόκειται για αυτές τις ουσίες.

Πίνακας 46: Πίνακας φασμάτων των ουσιών ισοραμνετινο-3-O-β-D-γλυκοπυρανοσίδης και ταμαριξέτινο-3-O-β-D-γλυκοπυρανοσίδης (CD₃OD, 250MHz), καθώς και των ουσιών των μίγματος AAA-D₃ και AAA-D₄

 <p>Ισοραμνετινο-3-O-β-D-γλυκοπυρανοσίδης (CD₃OD, 250 MHz) (Touil <i>et al.</i>, 2006)</p>	 <p>Ταμαριξέτινο-3-O-β-D-γλυκοπυρανοσίδης (CD₃OD, 250 MHz) (Touil <i>et al.</i>, 2006)</p>	 <p>Καιμπφερολο-3-O-β-D-γλυκοπυρανοσίδης (CD₃OD, 500 MHz)</p>	 <p>Ισοραμνετινο-3-O-β-D-γλυκοπυρανοσίδης (CD₃OD, 500 MHz)</p>	 <p>Ισοραμνετινο-3-O-εξοσίδης (CD₃OD, 500 MHz)</p>
δ (ppm) J(Hz)	δ (ppm) J(Hz)	δ (ppm) J(Hz)	δ (ppm) J(Hz)	δ (ppm) J(Hz)
7.92 d (J=2.0) H-2'	7.71 m H-2'	8.06 d (J=9.0) H-2'	7.94 d (J=2.0) H-2'	8.04 d (J=2.0) H-2'
7.61 dd (J=8.5, 2.0) H-6'	7.71 m H-6'	8.06 dd (J=9.0) H-6'	7.58 dd (J=8.5, 2.0) H-6'	7.57 dd (J=8.5, 2.0) H-6'
6.92 d (J=8.5) H-5'	7.06 d (J=9.1) H-5'	6.88 d (J=2.0) H-3'	6.91 d (J=8.5) H-5'	6.90 d (J=8.5) H-5'
6.35 d (J=2.0) H-8	6.25 d (J=1.9) H-8	6.88 d (J=2.0) H-5'	6.40 d (J=2.0) H-8	6.40 d (J=2.0) H-8
6.17 d (J=2.0) H-6	6.10 d (J=1.9) H-6	6.39 d (J=2.0) H-8	6.20 d (J=2.0) H-6	6.20 d (J=2.0) H-6
5.38 d (J=7.5) H-1''	5.16 d (J=7.2) H-1''	6.20 d (J=2.0) H-6	5.42 d (J=8.0) H-1''	5.35 d (J=8.5) H-1''
3.96 s -OCH ₃	3.95 s -OCH ₃	5.26 d (J=8.0) H-1''	3.95 s -OCH ₃	3.96 s -OCH ₃



Εικόνα 61: Φάσμα ^{13}C -NMR (CD_3OD , 125 MHz) του δείγματος AAA-D₄

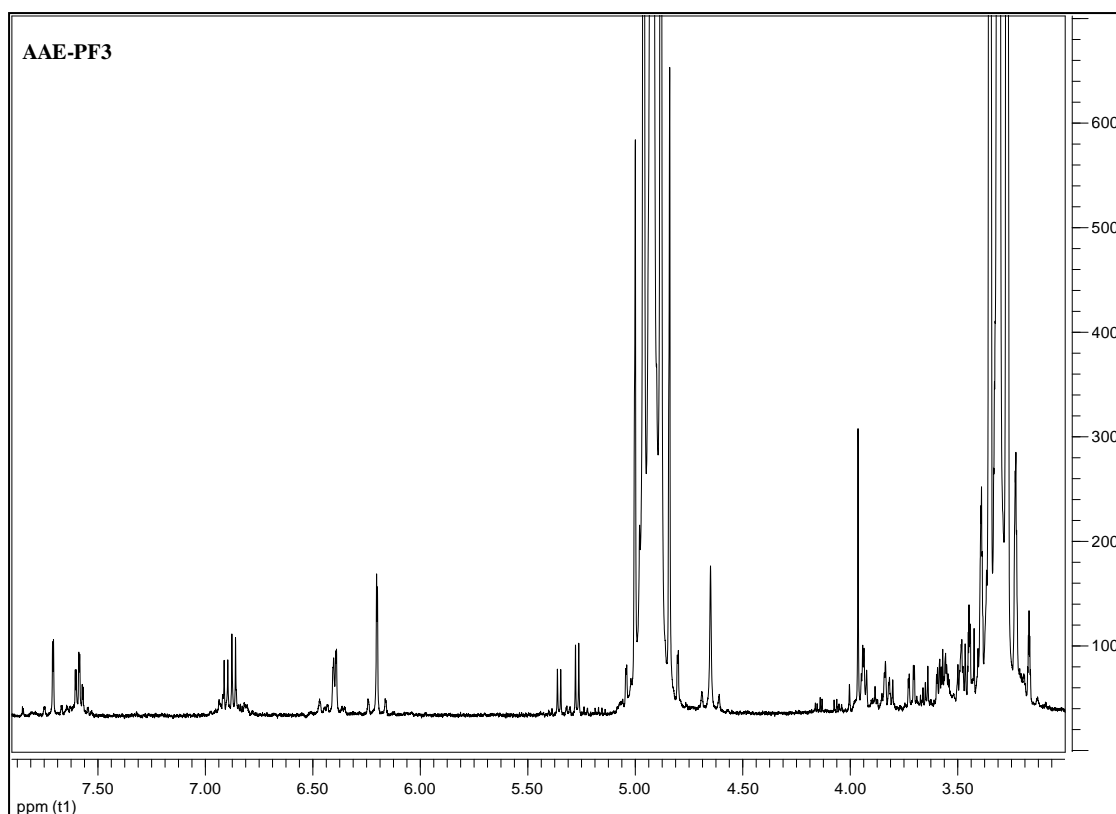


Εικόνα 62: Φάσμα HMQC (CD_3OD , 500 MHz) του δείγματος AAA-D₄

ΜΙΓΜΑ ΑΑΕ-PF₃

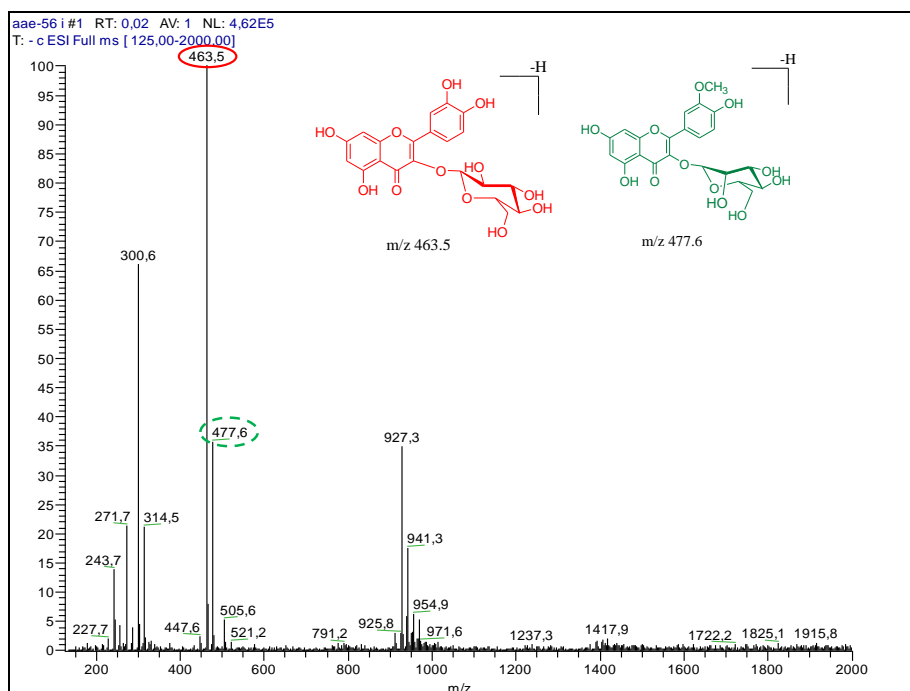
(Μίγμα ουσιών 3 και 8)

Μελετώντας το φάσμα ¹H-NMR του δείγματος ΑΑΕ-PF₃ παρατηρεί κανείς ότι πρόκειται για μίγμα (μη ισομοριακό, βάση της ολοκλήρωσης των κορυφών του φάσματος ¹H-NMR) δυο φλαβονοειδών και πιο συγκεκριμένα δυο παραγώγων κερκετίνης. Αυτό συμπεραίνεται από τα χαρακτηριστικά σήματα που υπάρχουν στην αρωματική περιοχή του φάσματος: Το ένα κερκετινο-παράγωγο είναι η ισοκερκιτρίνη (ουσία 5), επειδή τα σήματα στο φάσμα ¹H-NMR αντιστοιχούν σε αυτά της απομονωμένης και ταυτοποιημένης από το φυτό ισοκερκιτρίνης.



Εικόνα 63: Πλήρες φάσμα ¹H-NMR του δείγματος ΑΑΕ-PF₃

Επιπλέον, στο φάσμα μάζας του συγκεκριμένου δείγματος, φαίνονται ξεκάθαρα τα μοριακά ιόντα μίας κερκετινο-γλυκόσης [M-H]⁻, m/z 463 και μιας μεθοξυ-κερκετινο-εξόσης [M-H]⁻, m/z 477.



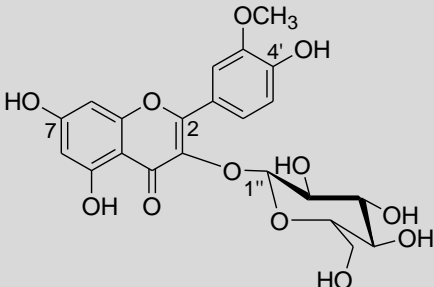
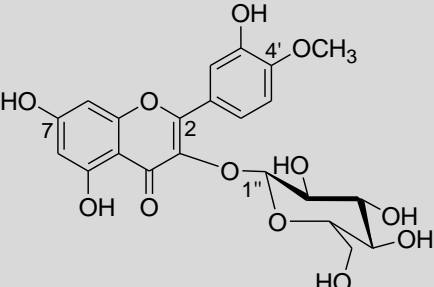
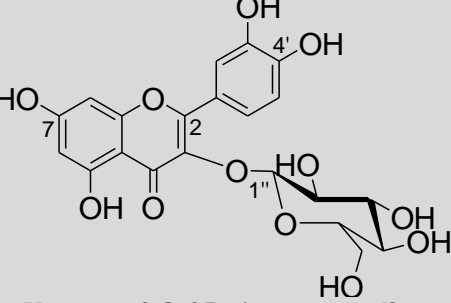
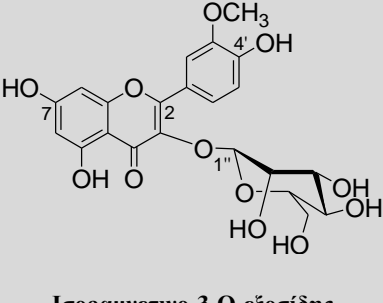
Εικόνα 64: Φάσμα μάζας του δείγματος AAE-PF₃

Στην κεντρική περιοχή του φάσματος ¹H-NMR εμφανίζονται δυο ανωμερικά πρωτόνια σε δ 5.35 (J=7.0 Hz) και δ 5.27 (J=7.0 Hz), τα οποία ανήκουν το καθένα σε ένα από τα δυο φλαβονοειδή και αυτό επειδή οι κορυφές τους δεν έχουν την ίδια ένταση αλλά το ίδιο αποδεικνύει και η ολοκλήρωσή τους στο φάσμα ¹H-NMR. Το ανωμερικό πρωτόνιο στα δ 5.27 (J=7.0 Hz), ανήκει στην ισοκερκιτρίνη. Δεν μπορεί η θέση σύνδεσης του σακχάρου στο δεύτερο φλαβονοειδές του μίγματος να βρίσκεται σε υδροξύλιο του Α δακτυλίου του φλαβονοειδούς επειδή δεν υπάρχουν διαφορές στις τιμές δ των πρωτονίων H-6 και H-8 των φλαβονοειδών του μίγματος. Επίσης, δεν μπορεί να είναι συνδεδεμένο σε υδροξύλια του δακτυλίου Β των φλαβονοειδών επειδή σε αυτή την περίπτωση θα έπρεπε το πρωτόνιο H-5' να είναι πιο αποθωρακισμένα λόγω της υψηλής πολικότητας του σακχάρου και να έχει τιμή δ μεγαλύτερη των 7.15ppm (Park και Lee, 1996). Επομένως, η θέση σύνδεσης του σακχάρου και στο δεύτερο φλαβονοειδές του μίγματος είναι το -OH της θέσης 3. Τέλος, πρόκειται για δυο διαφορετικά σάκχαρα και αυτό επειδή στην περιοχή 3.90-3.50ppm και μεν παρατηρούμε τα χαρακτηριστικά σήματα του H-6a'' της γλυκόσης (ουσία 5) αλλά επίσης παρατηρούμε σήματα παρόμοια με αυτά του σακχάρου που υπάρχει στην κερκέτινο-3-Ο-εξόση (ουσία 6). Αποτέλεσμα είναι να έχουμε σοβαρές ενδείξεις ότι πρόκειται για το ίδιο σάκχαρο, το οποίο μέχρι στιγμής δεν έχει ταυτοποιηθεί πλήρως. Επιπλέον, έχει ήδη απομονωθεί και ταυτοποιηθεί σε μίγμα με

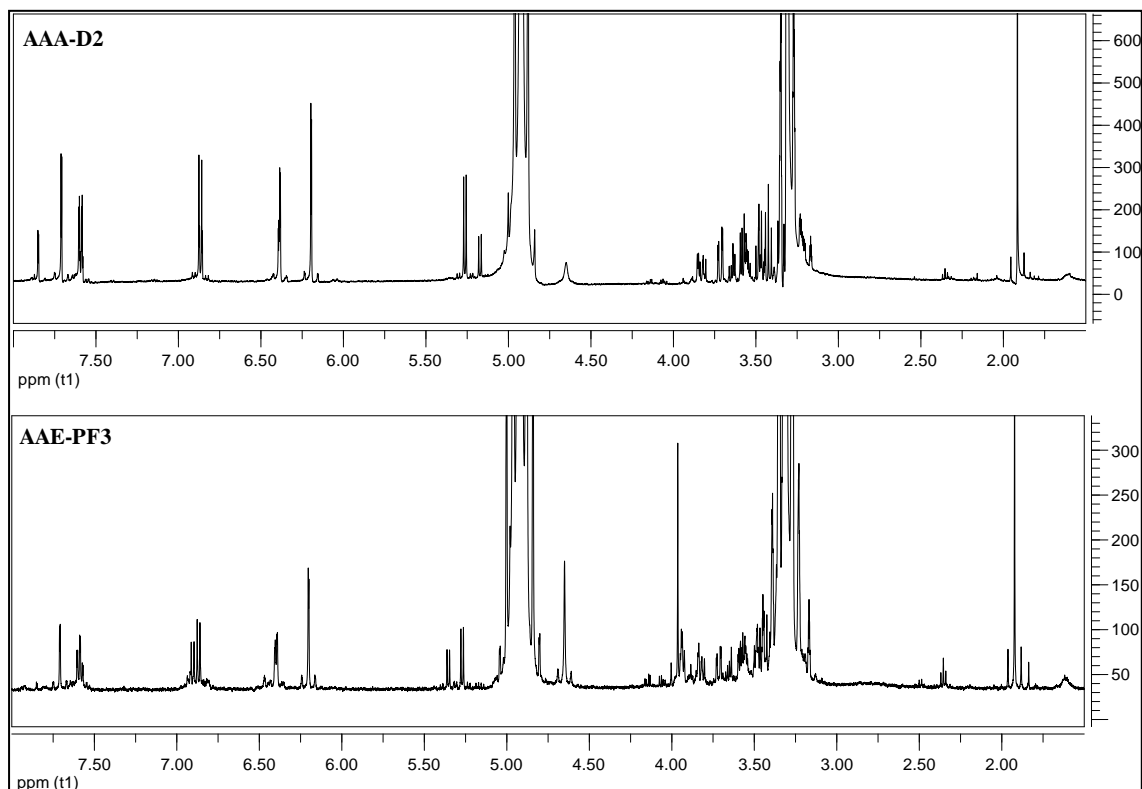
την αστραγαλίνη (ουσία **3**) η ισοραμνέτινο-3-O-β-D-γλυκοκυρανόση (ουσία **7**) όπου στο φάσμα του μίγματος φαίνονται ξεκάθαρα δυο H-6''a γλυκόσης, ένα για κάθε ένα από τα δύο φλαβονοειδή του μίγματος. Εκτός αυτού η μετατόπιση του πρωτονίου H-2' είναι διαφορετική συγκριτικά με αυτή της ουσίας **7**.

Στα 3.96ppm εμφανίζεται μια οξεία απλή κορυφή η οποία ανήκει σε μια μεθοξυ-ομάδα (-OCH₃). Από την ολοκλήρωση της κορυφής στο φάσμα ¹H-NMR, προκύπτει ότι αντιστοιχεί σε 3H του δεύτερου φλαβονοειδούς του μίγματος (ουσία **8**). Η θέση υποκατάστασης στην κερκετίνη που απομένει, δεν μπορεί να είναι σε κανένα από τα -OH του A δακτυλίου, διότι τότε θα υπήρχε διαφορά στα πρωτόνια H-6 και H-8, συγκριτικά με αυτά της ισοκερκετίνης. Σε αντίθετη περίπτωση θα έπρεπε τα πρωτόνια αυτά να είναι πιο θωρακισμένα. Όμως, στο συγκεκριμένο μίγμα τα σήματα των πρωτονίων αυτών αλληλεπικαλύπτονται (ταυτίζονται). Οι πιθανές θέσεις σύνδεσης που απομένουν, από τα παραπάνω, είναι τα -OH του B δακτυλίου (3' και 4'). Συγκριτικά με την απομονωμένη και ταυτοποιημένη από το φυτό ισοραμνέτινο-3-O-β-γλυκόση (ουσία **7**), η ουσία αυτή διαφέρει μόνο ως προς τις μετατοπίσεις των H-1'' και H-2', επομένως συμπεραίνουμε ότι η ένωση αυτή είναι ο ισοραμνέτινο-3-O-εξοσίδης και όχι γλυκοσίδης της ταμαριξετίνης (4' μεθοξυ-κερκετίνη).

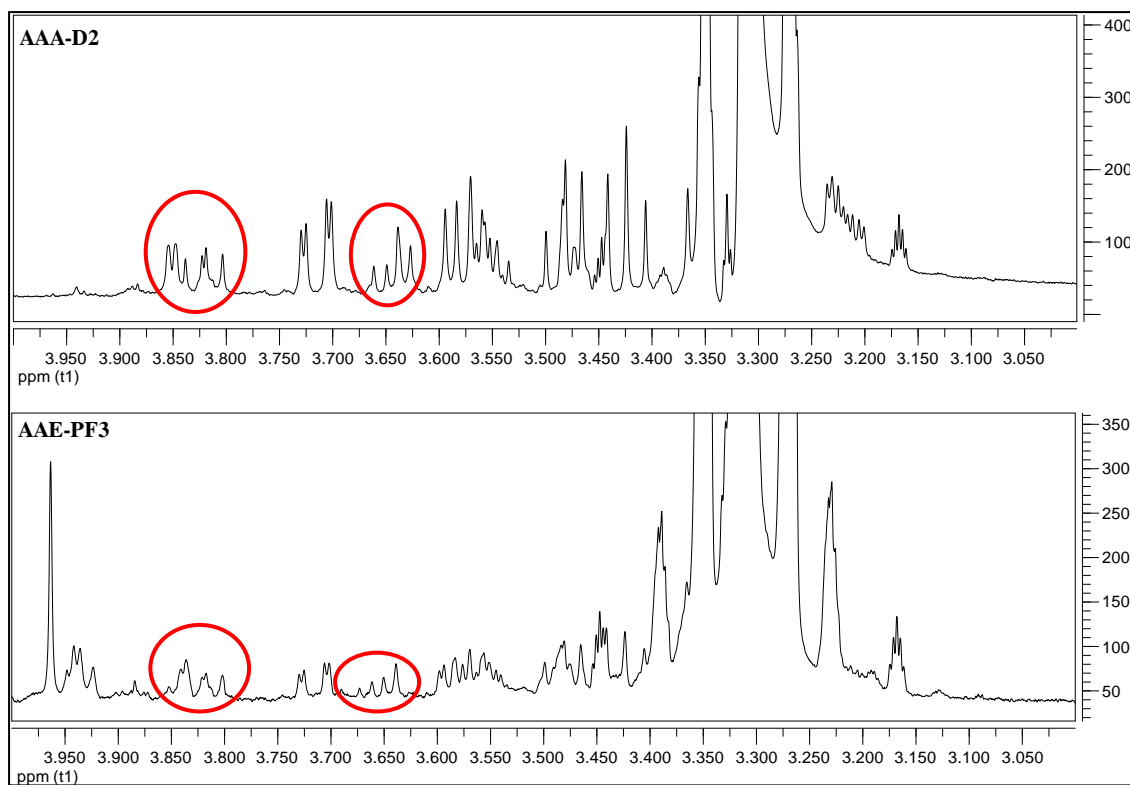
Πίνακας 47: Πίνακας φασμάτων των ουσιών ισοραμνετινο3-Ο-β-D-γλυκοκυρανοσίδη και ταμαριξετινο-3-Ο-β-D-γλυκοκυρανοσίδη (CD₃OD, 250MHz), καθώς και των ουσιών του μίγματος ΑΑΕ-PF₃

 <p>Ισοραμνετινο3-Ο-β-D-γλυκοκυρανοσίδη (CD₃OD, 250MHz) (Touil <i>et al.</i>, 2006)</p>	 <p>Ταμαριξετινο-3-Ο-β-D-γλυκοκυρανοσίδη (CD₃OD, 250MHz) (Touil <i>et al.</i>, 2006)</p>	 <p>Κερκετινο-3-Ο-β-D-γλυκοκυρανοσίδη (CD₃OD, 250MHz)</p>	 <p>Ισοραμνετινο-3-Ο-εξοσίδη (CD₃OD, 250MHz)</p>
δ (ppm) J(Hz)	δ (ppm) J(Hz)	δ (ppm) J(Hz)	δ (ppm) J(Hz)
7.92 d (J=2.0) H-2'	7.71 m H-2'	7.71 d (J=2.0) H-2'	8.04 d (J=2.0) H-2'
7.61 dd (J=8.5, 2.0) H-6'	7.71 m H-6'	7.59 dd (J=8.5, 2.0) H-6'	7.57 dd (J=8.5, 2.0) H-6'
6.92 d (J=8.5) H-5'	7.06 d (J=9.1) H-5'	6.86 d (J=8.5) H-5'	6.90 d (J=8.5) H-5'
6.35 d (J=2.0) H-8	6.25 d (J=1.9) H-8	6.38 d (J=2.0) H-8	6.40 d (J=2.0) H-8
6.17 d (J=2.0) H-6	6.10 d (J=1.9) H-6	6.20 d (J=2.0) H-6	6.20 d (J=2.0) H-6
5.38 d (J=7.5) H-1''	5.16 d (J=7.2) H-1''	5.26 d (J=8.0) H-1''	5.35 d (J=8.5) H-1''
3.96 s -OCH ₃	3.95 s -OCH ₃	-	3.96 s -OCH ₃

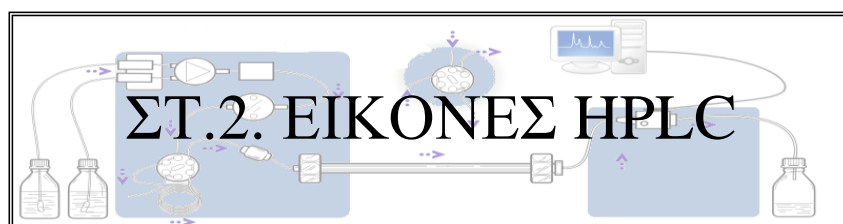
Από φάσμα του δείγματος **AAA-D₂**, ταυτοποιήθηκαν ο κερκετινο 3-O-β-D-γλυκόσιδης (ουσία **5**) και ο κερκετινο 3-O-εξοσιδης (ουσία **6**) ενώ από το φάσματα του δείγματος **AAE-PF₃** ταυτοποιήθηκαν ο κερκετινο 3-O-β-D-γλυκόσιδης (ουσία **5**) και ουσία **8**. Και στα δυο φάσματα φαίνονται χαρακτηριστικά σήματα στην περιοχή 3.80ppm και 3.65ppm που δεν ανήκουν σε β-D-γλυκόση.

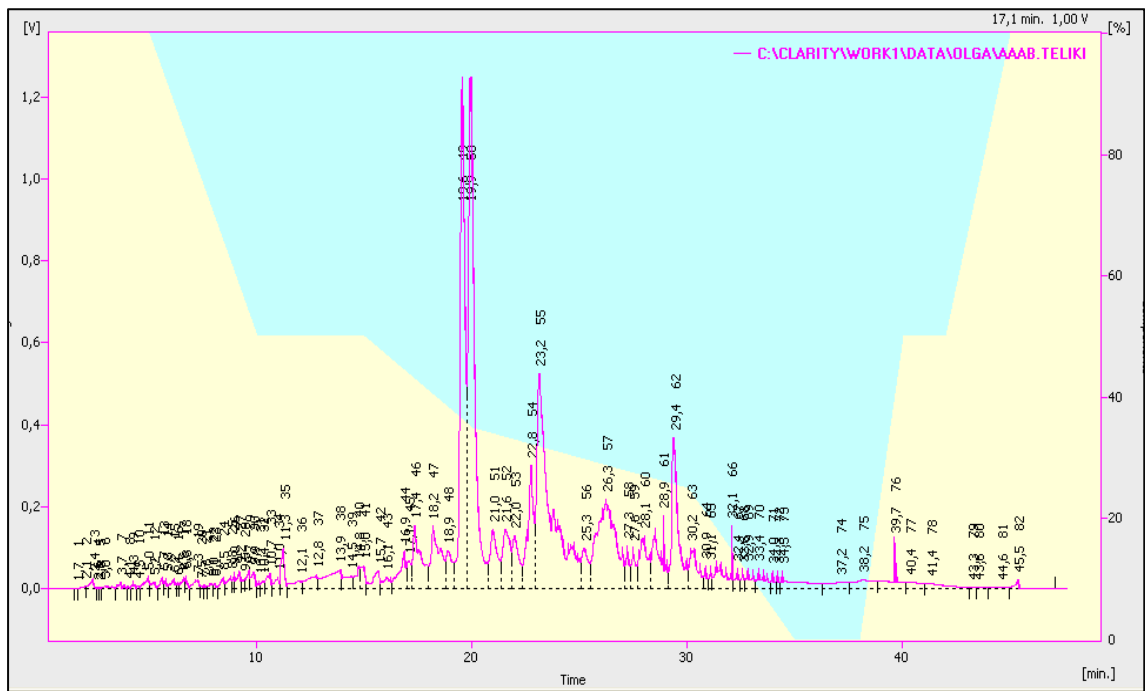


**Εικόνα 65: Α. Πλήρες φάσμα ¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz) του μίγματος των ουσιών 5 και 6
Β. Πλήρες φάσμα ¹H-NMR του μίγματος των ουσιών 5 και 8**

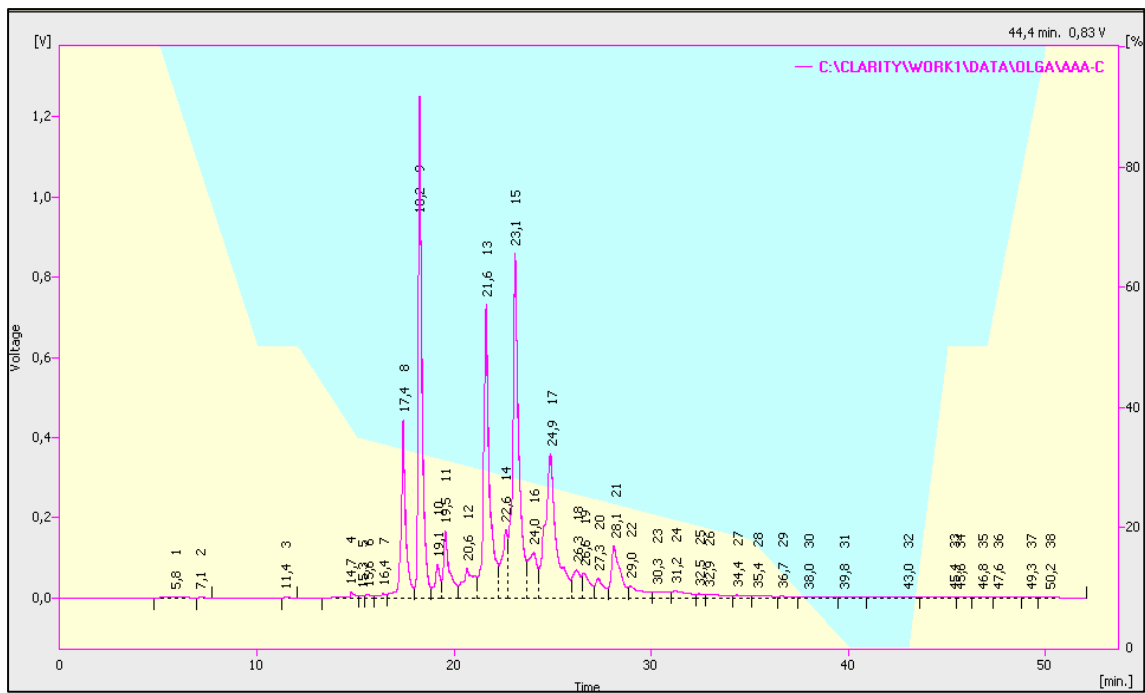


**Εικόνα 66: Α. Φάσμα ¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz) του μίγματος των ουσιών 5 και 6 (δ 4.00ppm 3.00ppm)
Β. Φάσμα ¹H-NMR του μίγματος των ουσιών 5 και 8 (δ 4.00ppm-3.00ppm)**

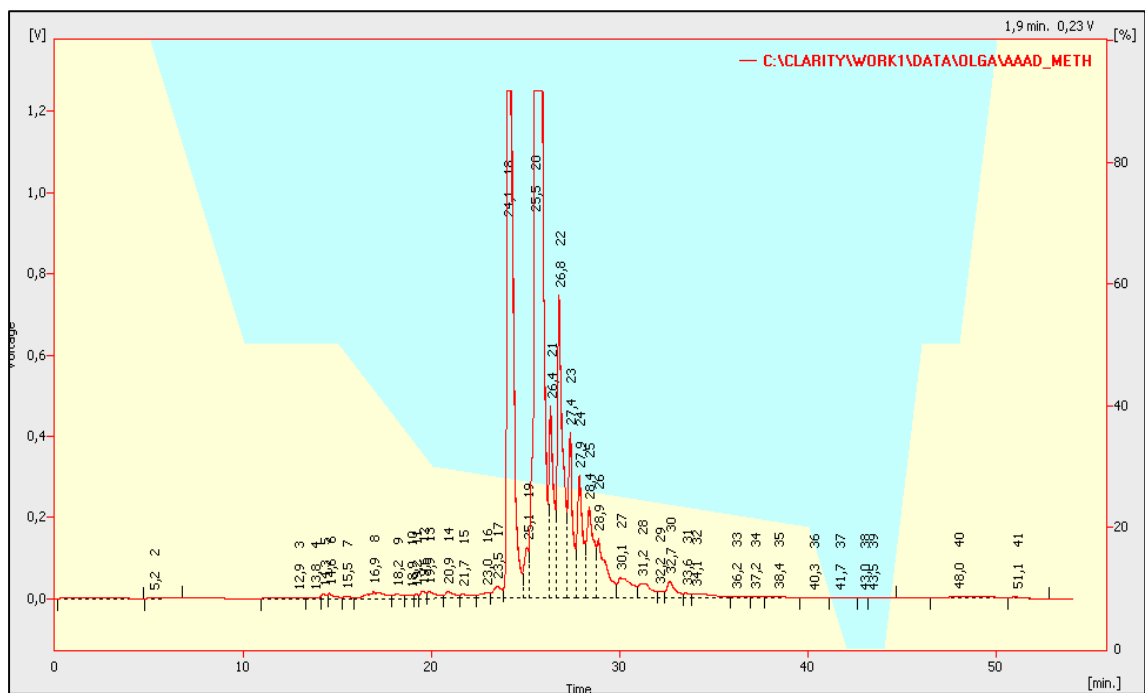




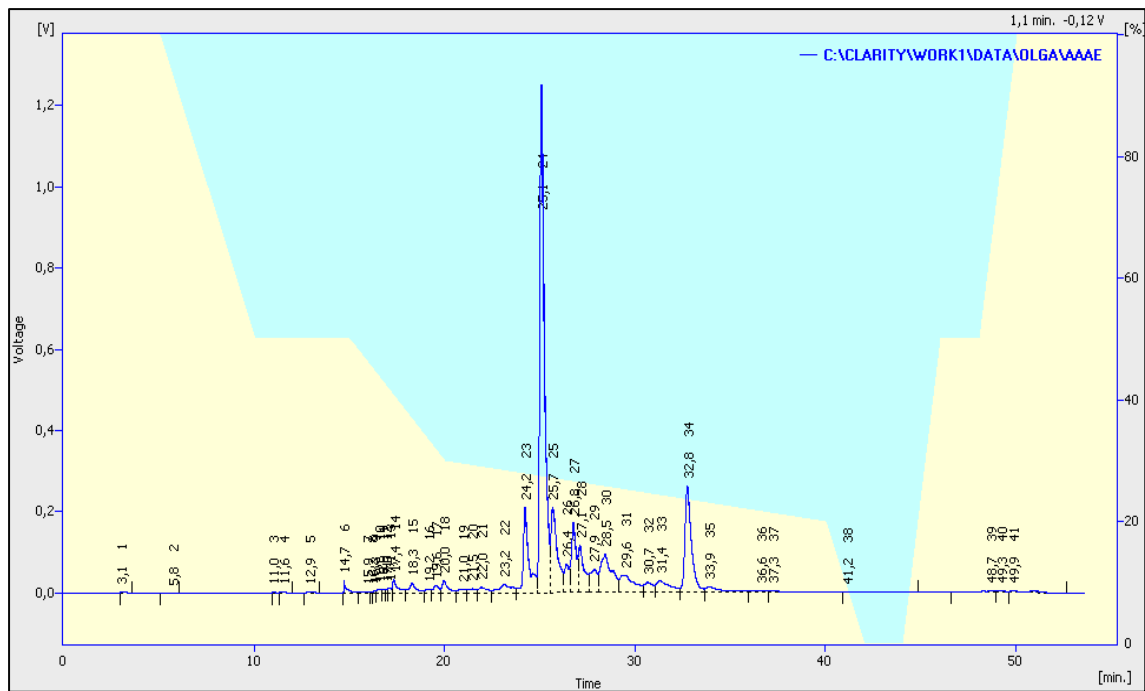
Εικόνα 67: Χρωματογραφία HPLC AAA-B



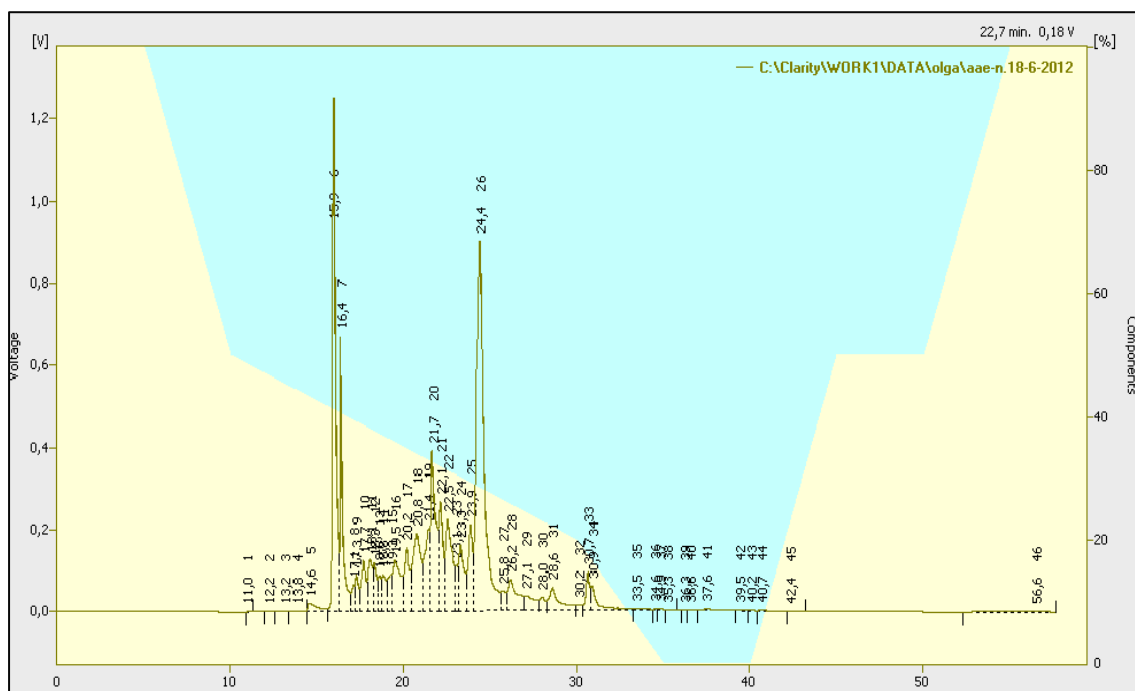
Εικόνα 68: Χρωματογραφία HPLC AAA-C



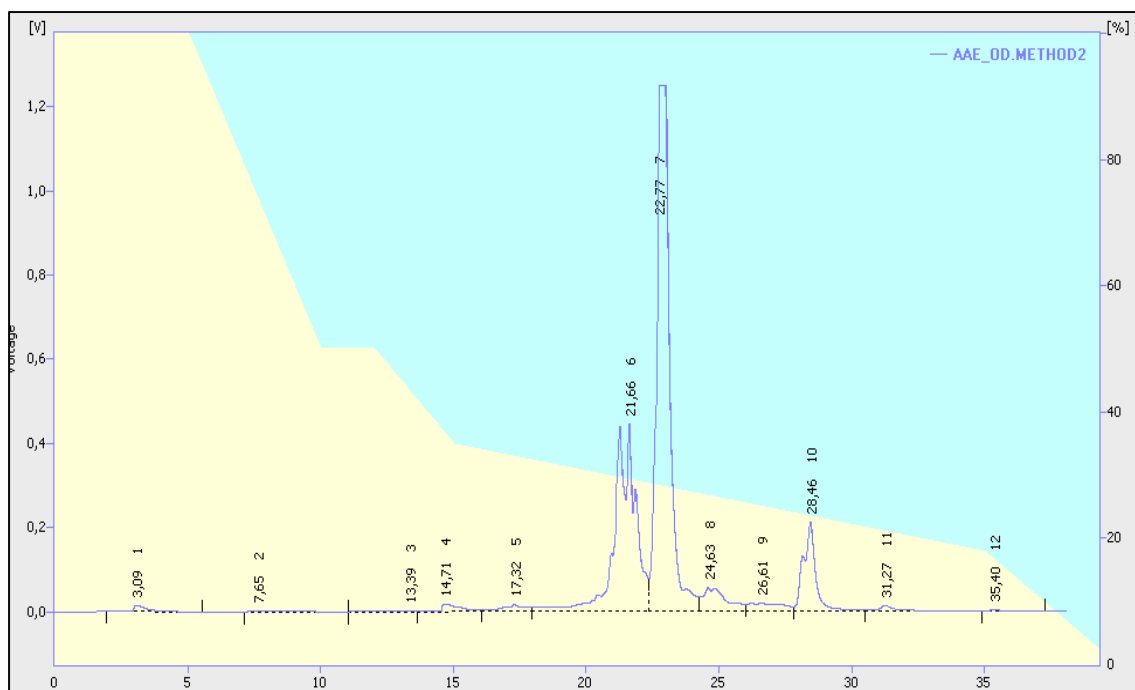
Εικόνα 69: Χρωματογραφία HPLC AAA-D



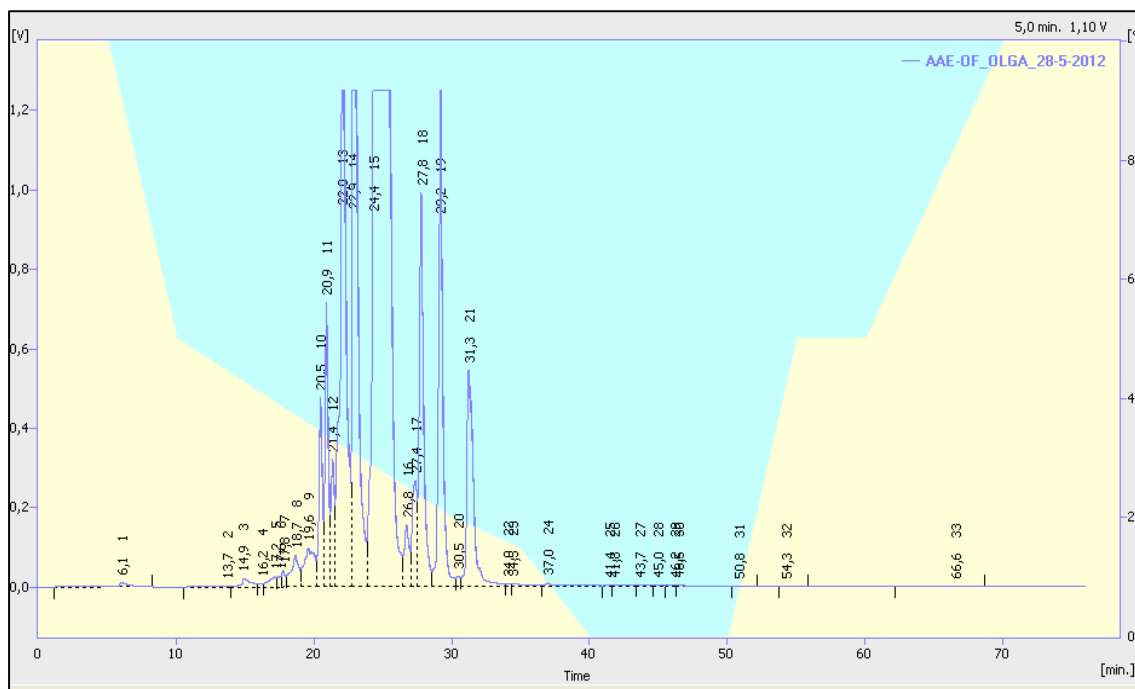
Εικόνα 70: Χρωματογραφία HPLC AAA-E



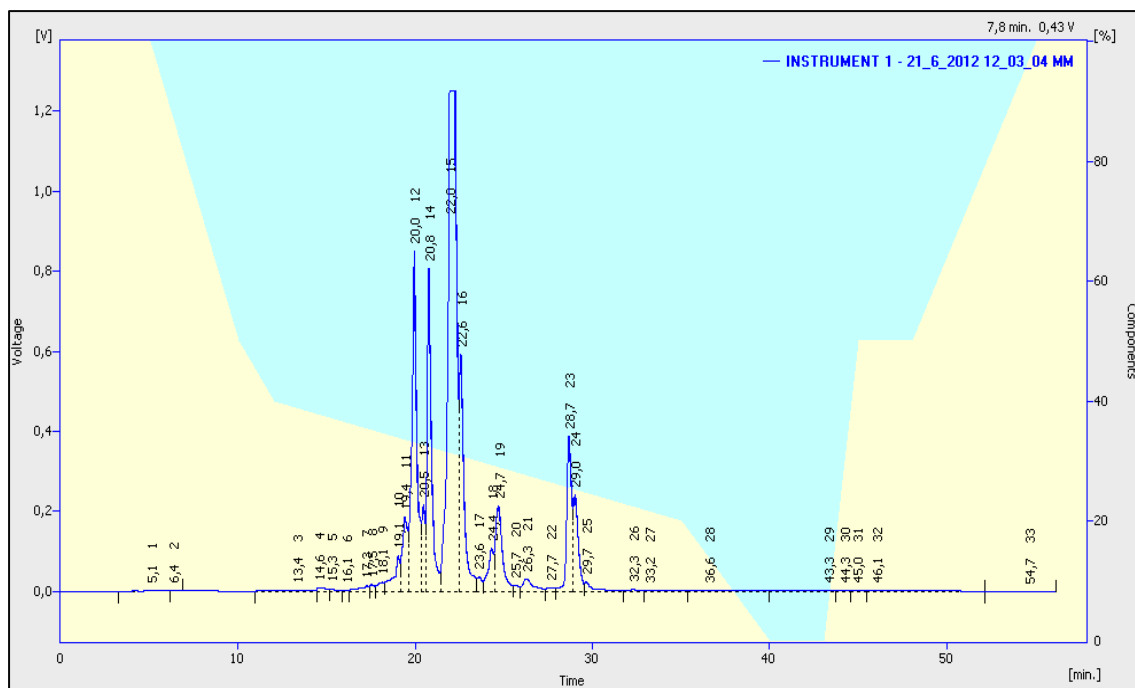
Εικόνα 71: Χρωματογραφία HPLC AAE-N



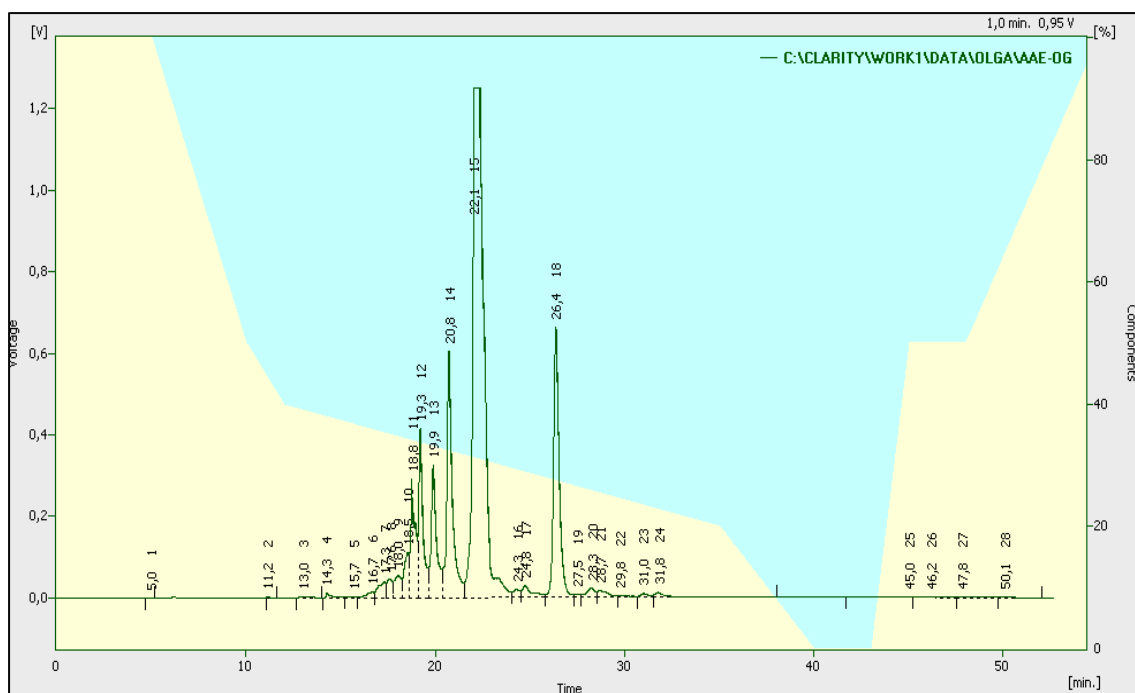
Εικόνα 72: Χρωματογραφία HPLC AAE-OD



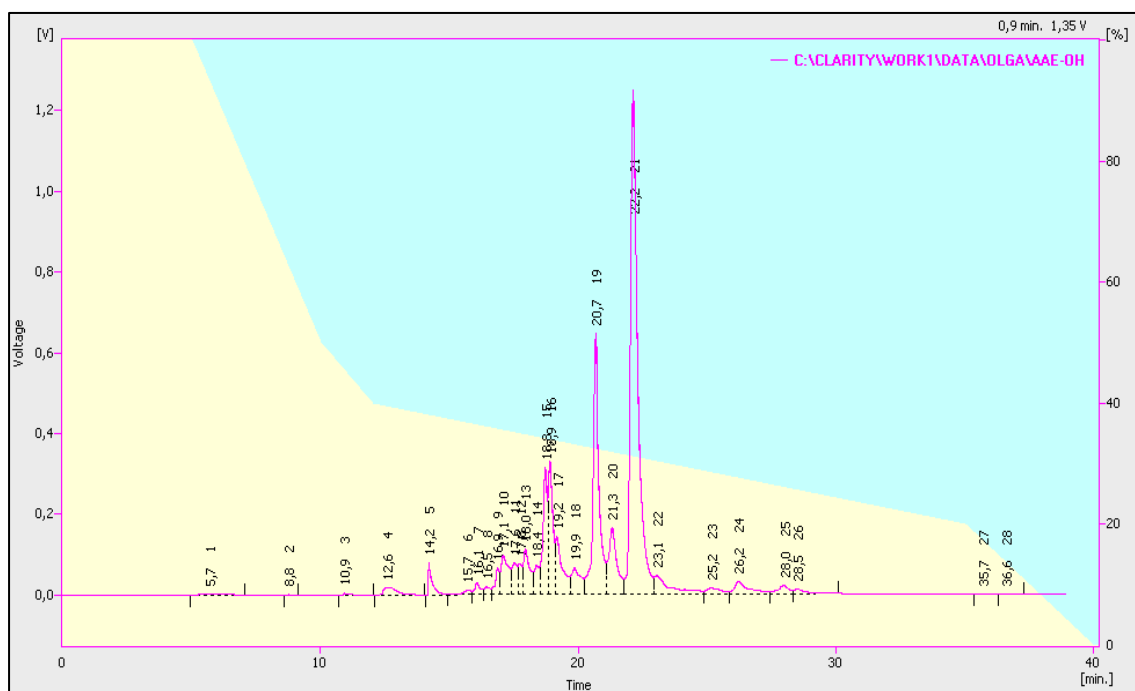
Εικόνα 73: Χρωματογραφία HPLC ΑΑΕ-ΟΦ



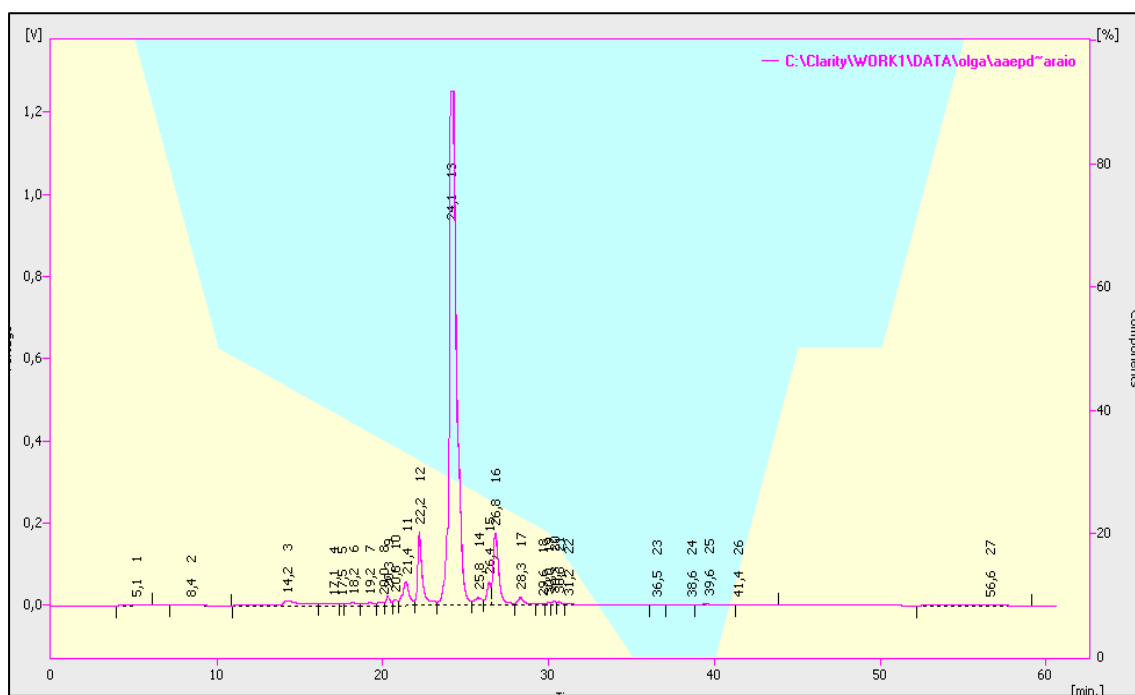
Εικόνα 74: Χρωματογραφία HPLC ΑΑΕ-ΟΕ



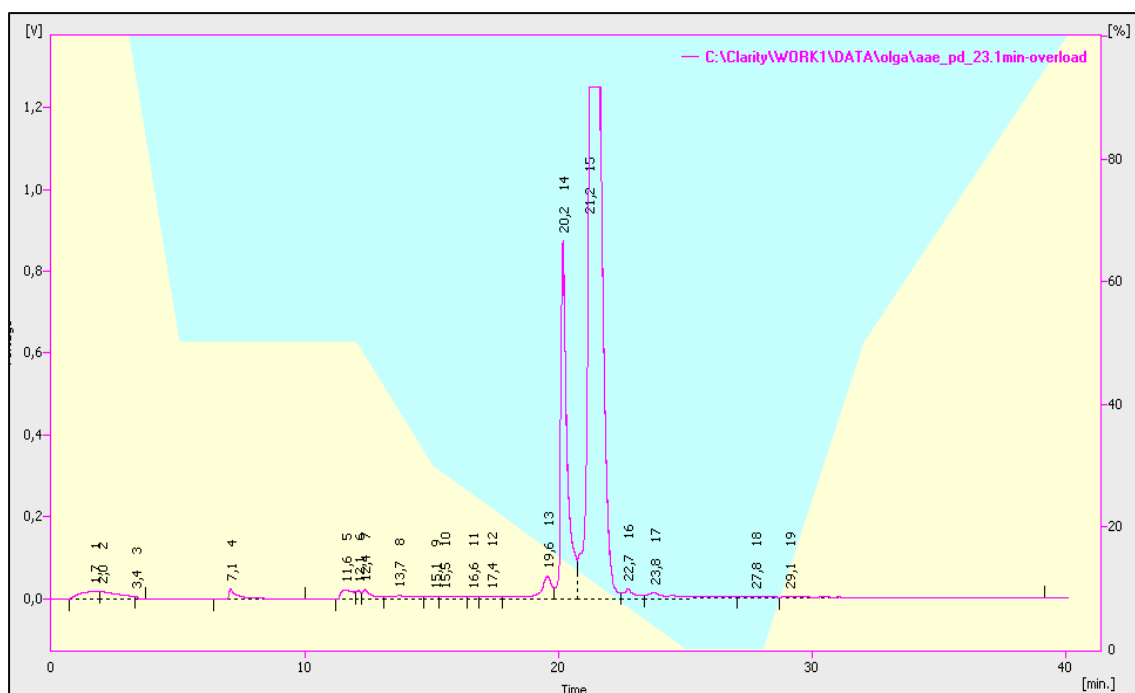
Εικόνα 75: Χρωματογραφία HPLC AAE-OG



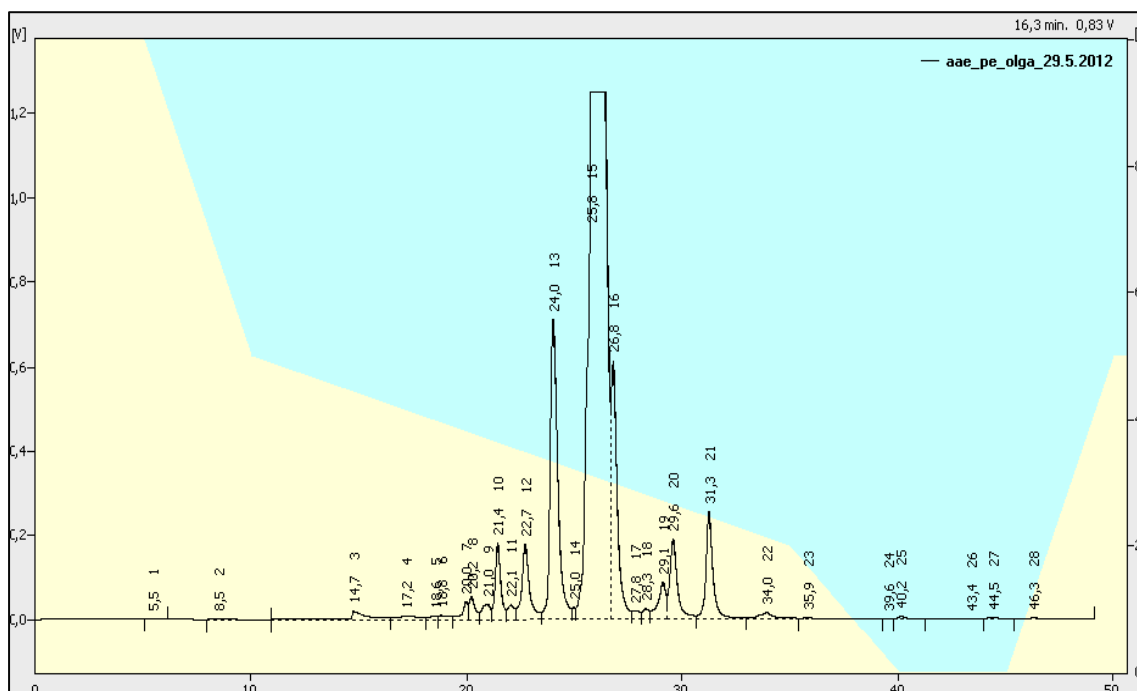
Εικόνα 76: Χρωματογραφία HPLC AAE-OH



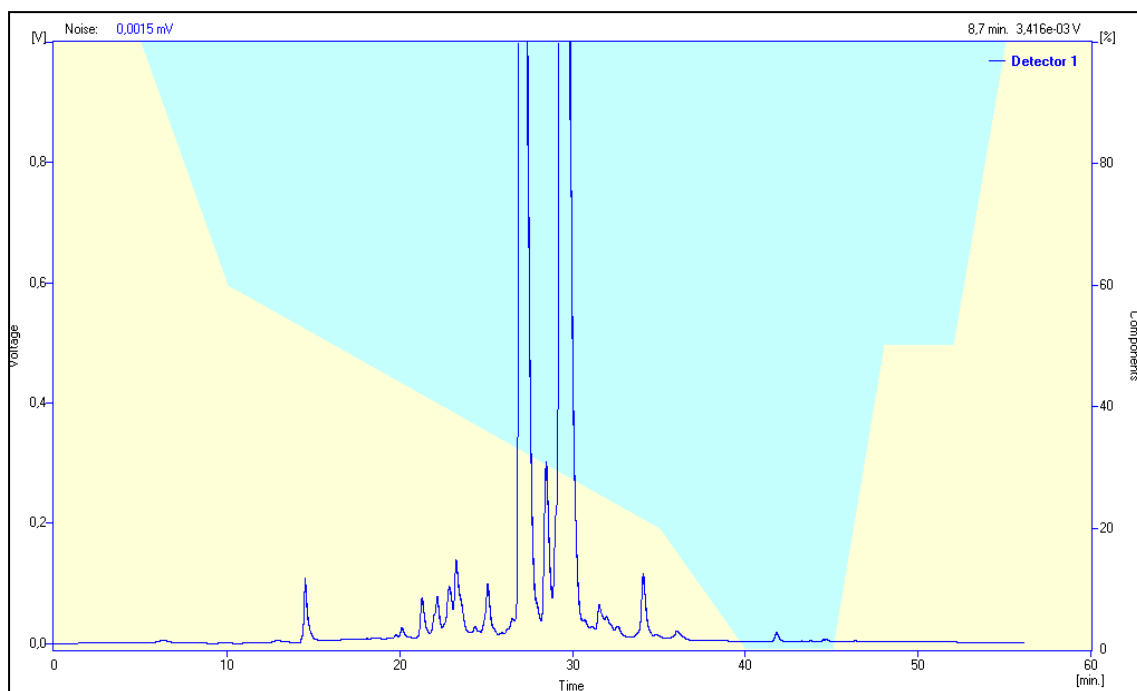
Εικόνα 77: Χρωματογραφία HPLC AAE-PD



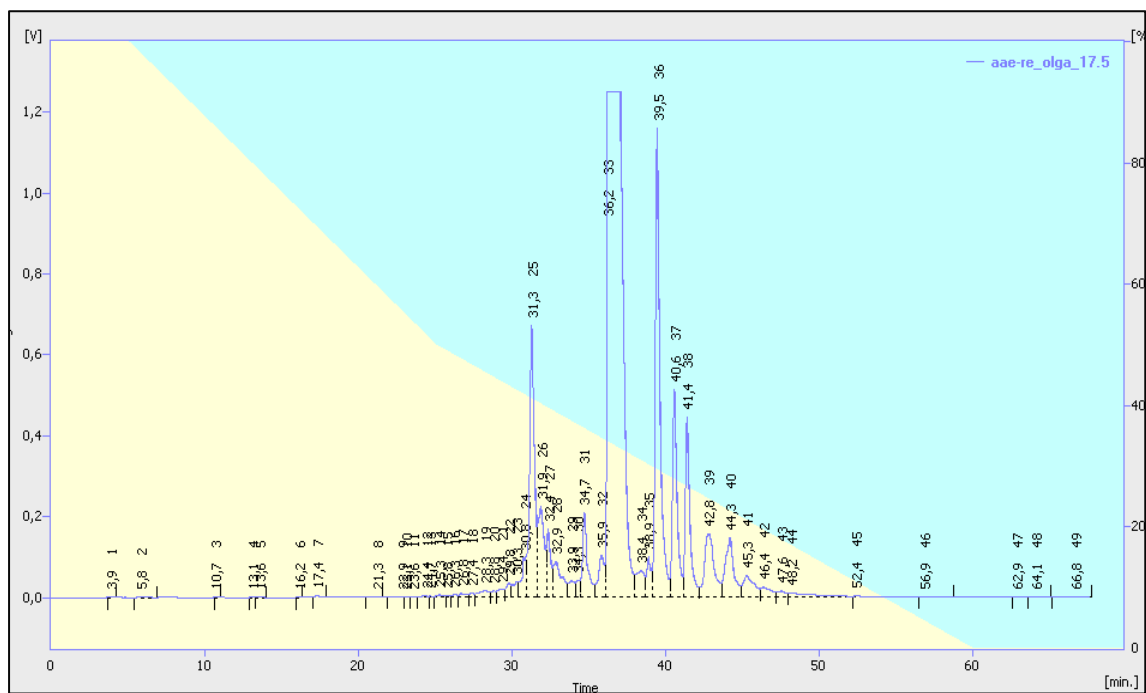
Εικόνα 78: Χρωματογραφία HPLC AAE-PD_{23,1}



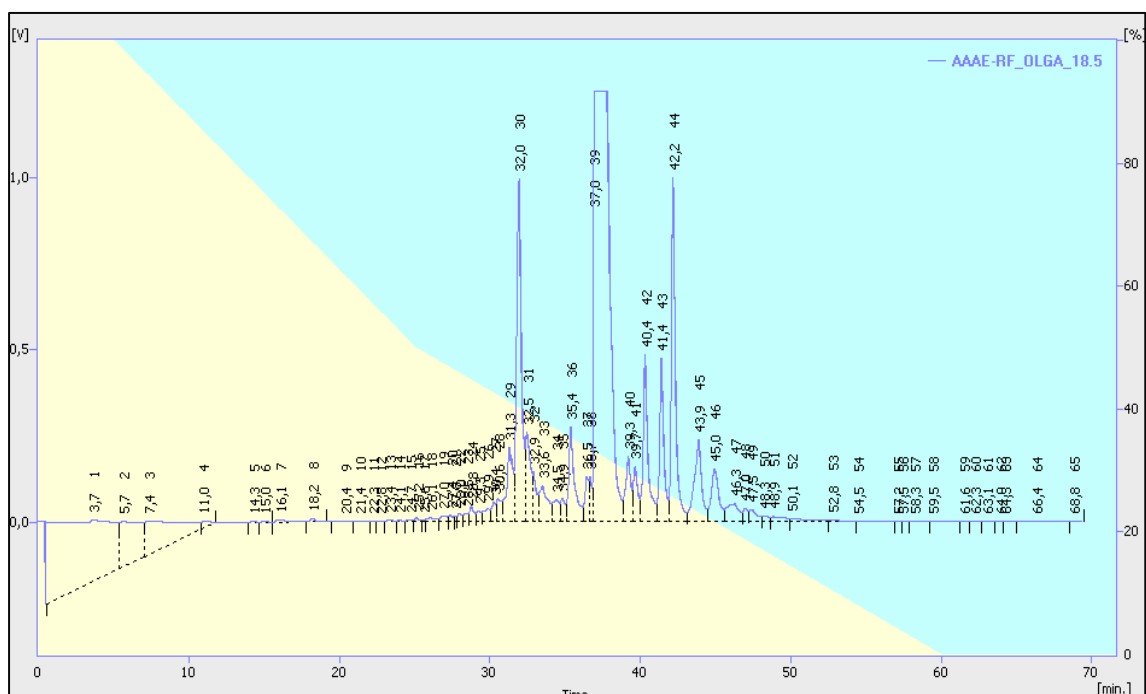
Εικόνα 79: Χρωματογραφία HPLC ΑΑΕ-ΡΕ



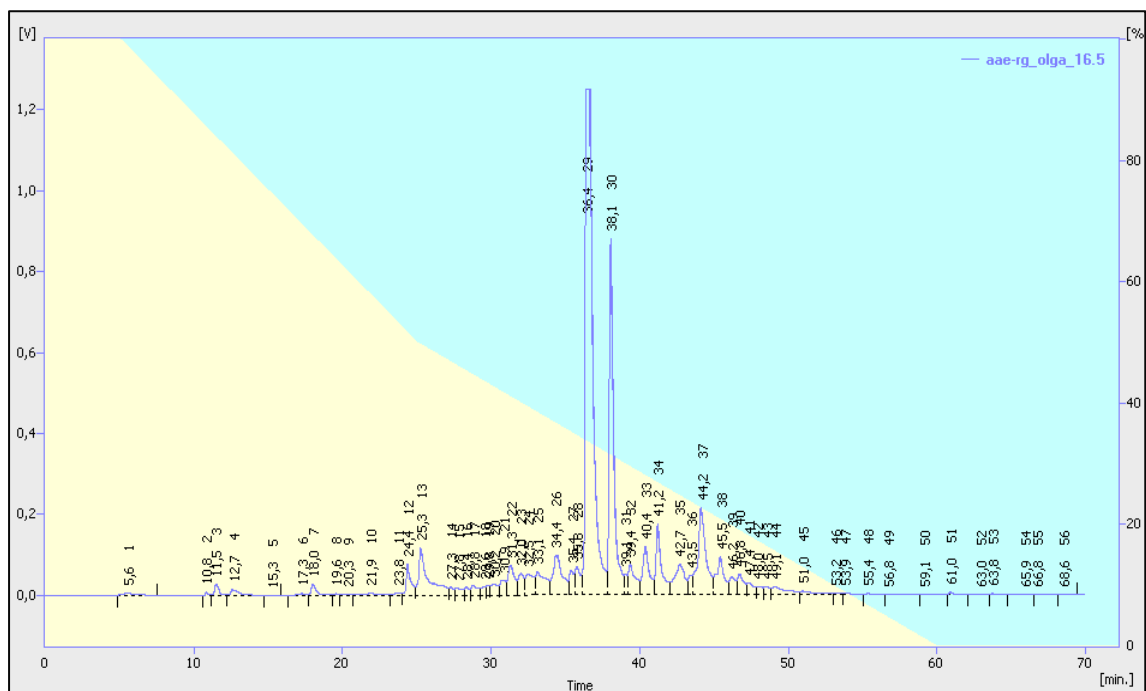
Εικόνα 80: Χρωματογραφία HPLC ΑΑΕ-ΡΕ



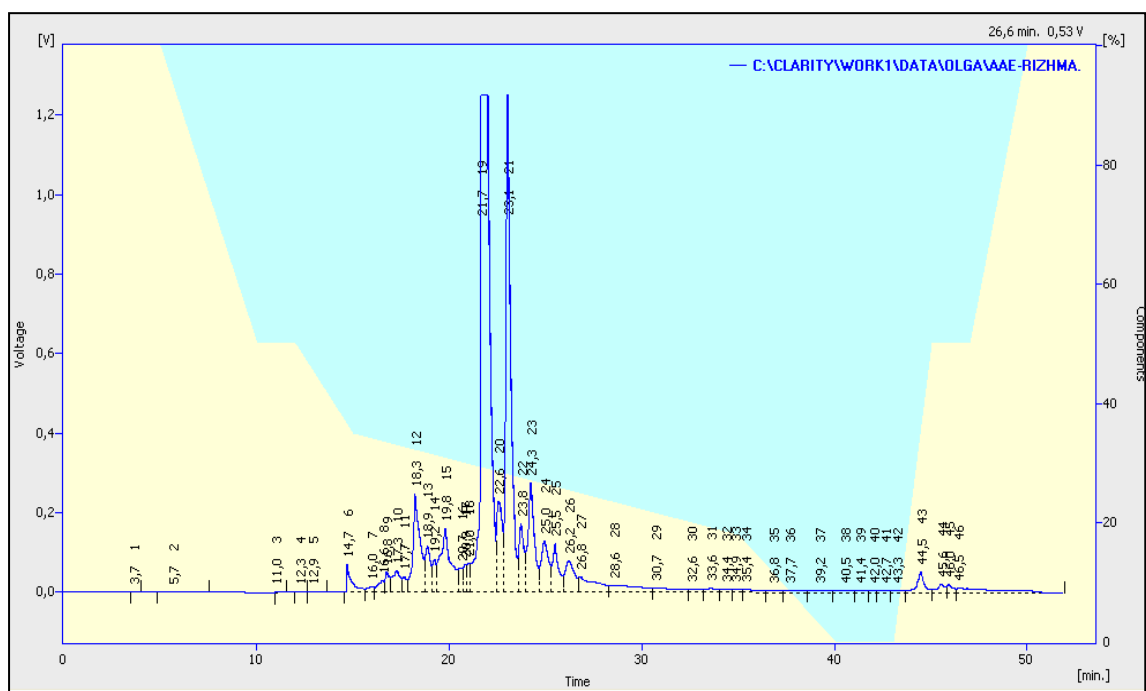
Εικόνα 81: Χρωματογραφία HPLC ΑΑΕ-RE



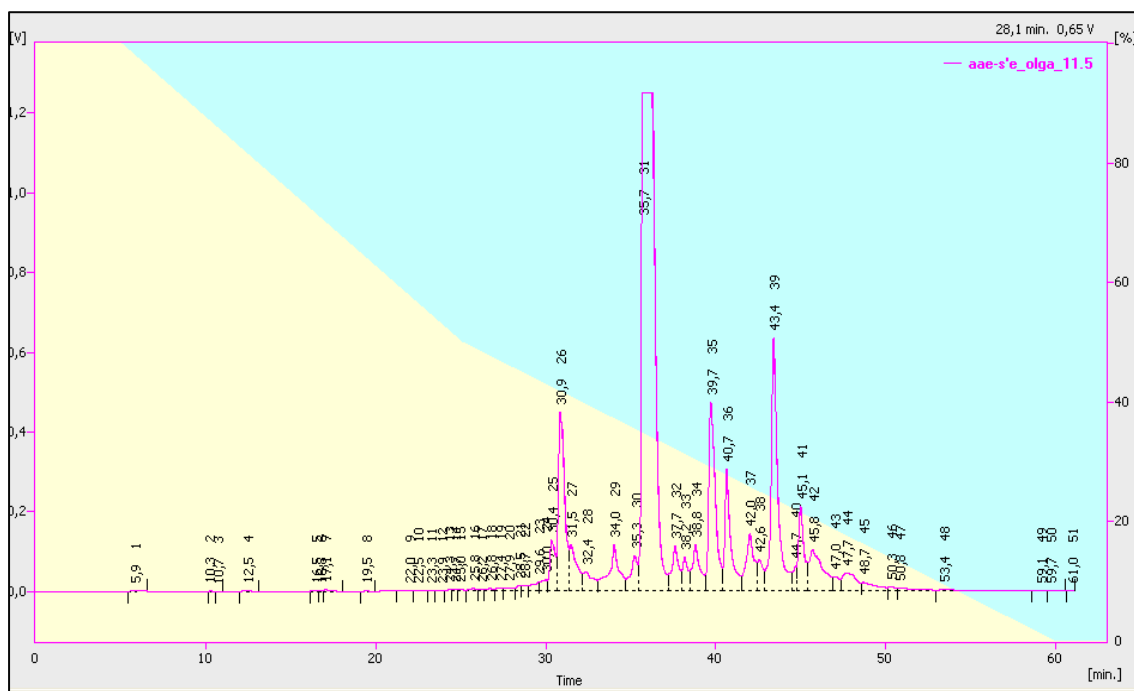
Εικόνα 82: Χρωματογραφία HPLC ΑΑΕ-RF



Εικόνα 83: Χρωματογραφία HPLC AAE-RG



Εικόνα 84: Χρωματογραφία HPLC AAE-RI



Εικόνα 85: Χρωματογραφία HPLC ΑΑΕ-Σ'Ε



ΣΤ.3. ΠΟΡΕΙΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ

