



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ**  
**ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑΣ ΚΑΙ ΧΗΜΕΙΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ**  
**ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ**  
**Διευθυντής: Καθηγητής κ. Ανάργυρος Λουκής**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΧΗΜΙΚΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΚΑΙ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ  
ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΩΝ ΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΩΝ  
ΥΠΟΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ-ΦΥΤΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ  
ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ *Polygonum maritimum* ΚΑΙ *Dorycnium pentaphyllum*  
subsp. *herbaceum***

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΚΑΖΑΝΤΖΟΓΛΟΥ**

**Αθήνα 2006**

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

- Ευχαριστώ τα μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής της διδακτορικής διατριβής, τον Καθηγητή κ. Αλέξιο -Λέανδρο Σκαλτσούνη, τον Καθηγητή κ. Σέρρο Χαρουτουνιάν και την Αν. Καθηγήτρια κα. Σοφία Μητάκου για την επιλογή του θέματος και τις χρήσιμες συμβουλές τους.
- Ευχαριστώ τα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής της διδακτορικής διατριβής, τον Καθηγητή κ. Αλέξιο -Λέανδρο Σκαλτσούνη, τον Καθηγητή κ. Σέρρο Χαρουτουνιάν, την Αν. Καθηγήτρια κα. Σοφία Μητάκου, τον Καθηγητή κ. Ανάργυρο Λουκή, τον Αν. Καθηγητή κ. Αντώνιο Τσαρμπόπουλο, τον Αν. Καθηγητή κ. Δημήτριο Κουρέτα και τον Λέκτορα κ. Προκόπιο Μαγιάτη οι οποίοι δέχτηκαν να κρίνουν την παρούσα διδακτορική διατριβή.
- Ευχαριστώ τον Λέκτορα κ. Προκόπιο Μαγιάτη για τη συνεχή παρακολούθηση και καθοδήγησή του, σε όλη την διάρκεια της διδακτορικής διατριβής.
- Ευχαριστώ την ΚΕΟΣΟΕ και τη Γ.Γ.Ε.Τ για τη χρηματοδότηση και τη στήριξη του προγράμματος ΠΕΝΕΔ ''Οίνος και Υγεία'' στο οποίο εντάσσεται η παρούσα διδακτορική διατριβή.
- Ευχαριστώ την Λέκτορα κα. Ιωάννα Ανδρεάδου και την ερευνητική ομάδα του Καθηγητή Καρδιολογίας κ. Ιωάννη Λεκάκη, για την πραγματοποίηση των κλινικών δοκιμών σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο, στην Καρδιολογική Κλινική του Αττικού Νοσοκομείου.
- Ευχαριστώ τον Υπ. Διδάκτορα κ. Δημήτριο Στάγκο για την πραγματοποίηση των *in vitro* βιολογικών ελέγχων αναστολής της δράσης της μιτομυκίνης C, της τοποϊσομεράσης I και οξειδωτικών παραγόντων (μπλεομυκίνη, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), στο εργαστήριο του Αν. Καθηγητή κ. Δημήτριου Κουρέτα, στο Τμήμα Βιοχημείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
- Ευχαριστώ την Υπ. Διδάκτορα κα. Άννα Παληογιάννη και την Υπ. Διδάκτορα κα. Μαρία Αναστασιάδη για την άψογη συνεργασία στα πλαίσια του προγράμματος ΠΕΝΕΔ ''Οίνος και Υγεία''.
- Ευχαριστώ τον Υπ. Διδάκτορα κ. Απόστολο Αγάλια για την άψογη συνεργασία σε θέματα που αφορούσαν τη χρήση των ρητινών προσρόφησης.

- Ευχαριστώ τον Υπ. Διδάκτορα κ. Ελευθέριο Καλπουτζάκη για τη συλλογή των φυτών *Polygonum maritimum* και *Dorycnium pentaphyllum* subsp. *herbaceum*, τη βιοτανική ταυτοποίηση του φυτού *Polygonum maritimum* και για τις χρήσιμες συμβουλές του.
- Ευχαριστώ τον Λέκτορα κ. Νεκτάριο Αληγιάννη για τις πολύτιμες συμβουλές του στη χρήση του προγράμματος Hyperchem (Molecular Modelling).
- Ευχαριστώ τον Υπ. Διδάκτορα κ. Raphael Grougnet για τις χρήσιμες παρατηρήσεις του στη χρήση της τεχνικής FCPC.
- Ευχαριστώ τον Επ. Καθηγητή κ. Θεοφάνη Κωνσταντίνη για τη βιοτανική ταυτοποίηση του φυτού *Dorycnium pentaphyllum* subsp. *herbaceum*.
- Ευχαριστώ την Υπ. Διδάκτορα κα. Φαίη Ψαχούλια από το Εργαστήριο Γονιδιακής Ρύθμισης του κ. Αλέξανδρου Πίντζα στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, για την πραγματοποίηση του *in vitro* βιολογικού ελέγχου της βιωσιμότητας των αδενωματικών κυττάρων του παχέος εντέρου.
- Ευχαριστώ την Διδάκτορα κα. Μαρία Χαλαμπαλάκη και την Υπ. Διδάκτορα Μαρίνα Κριτσανίδα για τις εποικοδομητικές παρατηρήσεις τους στη συγγραφή της διδακτορικής διατριβής.
- Ευχαριστώ τον Υπ. Διδάκτορα κ. Γεώργιο Πανουτσόπουλο για τη συμβολή του στην εξοικείωσή μου στον εργαστηριακό χώρο.
- Ευχαριστώ τους καθηγητές του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων για την άψογη συνεργασία.
- Ευχαριστώ τους μεταπτυχιακούς φοιτητές του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων για το ευχάριστο κλίμα που επικρατούσε στο εργαστήριο.
- Ευχαριστώ την οικογένειά μου για την ηθική και υλική συμπαράσταση.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Εισαγωγή

σελ. 11

## **1) ΜΕΡΟΣ Α: ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΧΗΜΙΚΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΚΑΙ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΩΝ ΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΩΝ ΥΠΟΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ**

<b>1.1) ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	<b>σελ. 15</b>
<b>1.1.1) Δρογοβοτανική</b>	<b>σελ. 15</b>
<b>1.1.1.α) Ιστορική αναδρομή</b>	<b>σελ. 15</b>
<b>1.1.1.β) Συστηματική ταξινόμηση</b>	<b>σελ. 17</b>
<b>1.1.1.γ) Χαρακτηριστικά της οικογένειας Vitaceae</b>	<b>σελ. 18</b>
<b>1.1.1.δ) Χαρακτηριστικά του γένους <i>Vitis</i> και του είδους <i>vinifera</i></b>	<b>σελ. 19</b>
<b>1.1.2) Δρογοχημεία και φαρμακολογικά στοιχεία των απομονωθέντων ουσιών</b>	<b>σελ. 27</b>
<b>1.1.2.α) Φυτοχημική και φαρμακολογική προσέγγιση του φυτού <i>Vitis vinifera</i></b>	<b>σελ. 27</b>
<b>1.1.2.β) Οίνος, το σημαντικότερο παράγωγο του φυτού <i>Vitis vinifera</i></b>	<b>σελ. 38</b>
<b>1.1.2.γ) Χημικές κατηγορίες φυσικών προϊόντων που απομονώθηκαν από το φυτό <i>Vitis vinifera</i></b>	<b>σελ. 42</b>
<b>Α) ΣΤΙΛΒΕΝΙΑ</b>	<b>σελ. 43</b>
<b>Β) ΙΣΟΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ</b>	<b>σελ. 54</b>
<b>Γ) ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΟΞΕΑ</b>	<b>σελ. 56</b>
<b>Δ) ΦΑΙΝΥΛΑΙΘΑΝΟΛΕΣ</b>	<b>σελ. 58</b>
<b>Ε) ΑΖΩΤΟΥΧΕΣ ΒΑΣΕΙΣ</b>	<b>σελ. 59</b>
<b>1.2) ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	<b>σελ. 60</b>
<b>1.2.1) Κατεργασία στεμφύλων με ρητίνες</b>	<b>σελ. 60</b>
<b>Εισαγωγή</b>	<b>σελ. 60</b>

<b>1.2.1.α) Οινοποίηση και στέμφυλα</b>	<b>σελ. 62</b>
<b>1.2.1.β) Επιλογή ποικιλίας σταφυλιού</b>	<b>σελ. 68</b>
<b>1.2.1.γ) Επιλογή τύπου ρητίνης</b>	<b>σελ. 71</b>
<b>1.2.1.δ) Εφαρμογή και βελτιστοποίηση της μεθόδου</b>	<b>σελ. 85</b>
<b>Συμπεράσματα</b>	<b>σελ. 123</b>
<b>1.2.2) Φασματοσκοπική μελέτη των απομονωθέντων μορίων</b>	<b>σελ. 124</b>
<b>1.2.2.α) Αρχική κατεργασία δρόγης</b>	<b>σελ. 124</b>
<b>1.2.2.β) Μελέτη μεθανολικού κλάσματος από ρητίνη XAD16</b>	<b>σελ. 125</b>
i.) Φασματοσκοπική μελέτη του γαλλικού οξέος (gallic acid) (1)	σελ. 127
ii.) Φασματοσκοπική μελέτη της (+)-κατεχίνης [(+)-catechin] (2)	σελ. 127
iii.) Φασματοσκοπική μελέτη της (-)-επικατεχίνης [(-)-epicatechin] (3)	σελ. 129
iv.) Φασματοσκοπική μελέτη της <i>trans</i> -ρεσβερατρόλης ( <i>trans</i> -resveratrol) (4)	σελ. 131
v.) Φασματοσκοπική μελέτη της <i>trans</i> -ε-βινιφερίνης ( <i>trans</i> -ε-viniferin) (5)	σελ. 133
vi.) Φασματοσκοπική μελέτη του <i>trans</i> -καφεϊκού οξέος ( <i>trans</i> -caffeiic acid) (6)	σελ. 136
vii.) Φασματοσκοπική μελέτη του πρωτοκατεχικού οξέος (protocatechuic acid) (7)	σελ. 137
viii.) Φασματοσκοπική μελέτη της γενιστεΐνης (genistein) (8)	σελ. 138
ix.) Φασματοσκοπική μελέτη της γενιστίνης (genistin) (9)	σελ. 139
x.) Φασματοσκοπική μελέτη της ουριδίνης (uridine) (10)	σελ. 141
xi.) Φασματοσκοπική μελέτη του <i>trans</i> -π-κουμαρικού οξέος ( <i>trans</i> - <i>p</i> -coumaric acid) (11)	σελ. 142
xii.) Φασματοσκοπική μελέτη της γνετίνης H (gnetin H) (12)	σελ. 143
xiii.) Φασματοσκοπική μελέτη της τυροσόλης (tyrosol) (13)	σελ. 146
xiv.) Φασματοσκοπική μελέτη του συρινγκικού οξέος (syringic acid) (14)	σελ. 147
xv.) Φασματοσκοπική μελέτη του <i>trans</i> -π-μεθοξινκουμαρικού οξέος <i>trans</i> - <i>p</i> -methoxycinnamic acid) (15)	σελ. 148
xvi.) Φασματοσκοπική μελέτη της καιμπφερόλης (kaempferol) (16)	σελ. 149
<b>1.3) ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	<b>σελ. 151</b>
<b>1.3.1) Τεχνικές-Οργανολογία</b>	<b>σελ. 151</b>
<b>1.3.2) Κατεργασία φυτικού υλικού</b>	<b>σελ. 154</b>

<b>1.3.3) Μελέτη της χημικής σύστασης του μεθανολικού κλάσματος από ρητίνη XAD16</b>	<b>σελ. 156</b>
<b>1.3.3.a) Στήλη A<sub>1</sub></b>	<b>σελ. 156</b>
<b>1.3.3.β) Στήλη A<sub>2</sub></b>	<b>σελ. 158</b>
<b>1.3.3.γ) Στήλη A<sub>3</sub></b>	<b>σελ. 169</b>
<b>1.3.3.δ) Στήλη A<sub>4</sub></b>	<b>σελ. 172</b>
<b>1.3.3.ε) Στήλη A<sub>5</sub></b>	<b>σελ. 176</b>
<b>1.3.3.στ) Στήλη A<sub>6</sub></b>	<b>σελ. 180</b>
<b>1.3.4) Απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών με τη χρήση παρασκευαστικής υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (preparative HPLC)</b>	<b>σελ. 184</b>
<b>1.3.4.a) Στήλη A<sub>7</sub></b>	<b>σελ. 185</b>
<b>1.3.4.β) Στήλη A<sub>8</sub></b>	<b>σελ. 188</b>
<b>1.4) ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΕΛΕΓΧΟΙ</b>	<b>σελ. 193</b>
<b>Εισαγωγή</b>	<b>σελ. 193</b>
<b>1.4.1) <i>In vitro</i> έλεγχοι</b>	<b>σελ. 194</b>
<b>1.4.1.a) Επιδράσεις πολυφαινολών και εκχυλισμάτων σταφυλιού από ελληνικές ποικιλίες <i>Vitis vinifera</i> στη θραύση του DNA που προκαλείται τεχνητά από τη μιτομυκίνη C και το ένζυμο τοποϊσομεράση I</b>	<b>σελ. 194</b>
<b>1.4.1.β) Αντιμεταλλαξιογόνος δράση πολυφαινολών και εκχυλισμάτων σταφυλιού από ελληνικές ποικιλίες <i>Vitis vinifera</i> ενάντια σε μεταλλάξεις που προκαλούνται τεχνητά σε στελέχη του βακτηρίου <i>Salmonella typhimurium</i> TA 102, από τις χημικές ουσίες μπλεομυκίνη και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>σελ. 205</b>
<b>1.4.2) Κλινικές δοκιμές</b>	<b>σελ. 213</b>
<b>1.4.2.a) Στεφανιαία νόσος</b>	<b>σελ. 214</b>
<b>1.4.2.β) Επιδράσεις πολυφαινολών από κόκκινα σταφύλια στη λειτουργία του ενδοθηλίου, σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο</b>	<b>σελ. 215</b>

## **2) ΜΕΡΟΣ Β: ΦΥΤΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ**

***Polygonum maritimum* οικ. Polygonaceae**

<b>2.1) ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	<b>σελ. 225</b>
<b>2.1.1) Δρογοβιτανική</b>	<b>σελ. 225</b>
<b>2.1.1.a) Συστηματική ταξινόμηση</b>	<b>σελ. 225</b>
<b>2.1.1.β) Χαρακτηριστικά της οικογένειας Polygonaceae</b>	<b>σελ. 226</b>
<b>2.1.1.γ) Χαρακτηριστικά του γένους <i>Polygonum</i> και του είδους <i>maritimum</i></b>	<b>σελ. 228</b>
<b>2.1.1.δ) Γεωγραφική εξάπλωση του φυτού <i>Polygonum maritimum</i> στον ελληνικό χώρο</b>	<b>σελ. 236</b>
<b>2.1.2) Δρογοχημεία και φαρμακολογικά στοιχεία των απομονωθέντων ουσιών</b>	<b>σελ. 237</b>
<b>2.1.2.a) Φυτοχημική και φαρμακολογική προσέγγιση του γένους <i>Polygonum</i></b>	<b>σελ. 237</b>
<b>2.1.2.β) Χημικές κατηγορίες φυσικών προϊόντων που απομονώθηκαν από το φυτό <i>Polygonum maritimum</i></b>	<b>σελ. 243</b>
<b>Α) ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ</b>	<b>σελ. 244</b>
<b>Β) ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΠΑΡΑΓΩΓΑ</b>	<b>σελ. 252</b>
<b>i.) ΑΡΥΛΟΠΡΟΠΑΝΙΑ</b>	<b>σελ. 254</b>
<b>ii.) ΡΕΣΟΡΚΙΝΟΛΕΣ</b>	<b>σελ. 254</b>
<b>iii.) ΑΚΕΤΟΦΑΙΝΟΝΕΣ</b>	<b>σελ. 259</b>
<b>iv.) ΦΑΙΝΟΛΙΚΟΙ ΓΛΥΚΟΣΙΔΕΣ</b>	<b>σελ. 260</b>
<b>Γ) ΣΕΣΚΙΤΕΡΠΕΝΙΑ</b>	<b>σελ. 262</b>
<b>Δ) ΦΥΤΟΣΤΕΡΟΛΕΣ</b>	<b>σελ. 266</b>
<b>Ε) ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ</b>	<b>σελ. 269</b>
<b>2.2) ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	<b>σελ. 271</b>
<b>2.2.1) Φασματοσκοπική μελέτη των απομονωθέντων μορίων</b>	<b>σελ. 271</b>
<b>2.2.1.a) Αρχική κατεργασία δρόγης</b>	<b>σελ. 271</b>
<b>2.2.1.β) Μελέτη διχλωρομεθανικού εκχυλίσματος</b>	<b>σελ. 273</b>
<b>i.) Φασματοσκοπική μελέτη του (+)-<i>cis</i>-8-υδροξυκαλαμένιου [(+)-<i>cis</i>-8-hydroxycalamene] (17)</b>	<b>σελ. 274</b>

ii.) Φασματοσκοπική μελέτη της <b>β-σιτοστερόλης</b> ( <b><math>\beta</math>-sitosterol</b> ) (18)	σελ. 277
iii.) Φασματοσκοπική μελέτη του <b>παλμιτικού οξέος</b> ( <b>palmitic acid</b> ) (19)	σελ. 278
iv.) Φασματοσκοπική μελέτη των μορίων:	σελ. 279
φερουλικός εστέρας της εικοσιτετρανόλης (tetracosyl ferulate) (20)	
φερουλικός εστέρας της εικοσιεξανόλης (hexacosyl ferulate) (21)	
φερουλικός εστέρας της εικοσιοκτανόλης (octacosyl ferulate) (22)	
φερουλικός εστέρας της τριακοντανόλης (triacontyl ferulate) (23)	
v.) Φασματοσκοπική μελέτη της <b>πολυγονοκινόλης</b> ( <b>polygonocinol</b> ) (24)	σελ. 283
<b>2.2.1.γ)</b> Μελέτη μεθανολικού κλάσματος από ρητίνη XAD16	σελ. 286
i.) Φασματοσκοπική μελέτη της <b>πολυγονοφαινόνης</b> ( <b>polygonophenone</b> ) (25)	σελ. 287
ii.) Φασματοσκοπική μελέτη της <b>μπρουσσονίνης B</b> ( <b>broussonin B</b> ) (26)	σελ. 290
iii.) Φασματοσκοπική μελέτη της <b>κερκετίνης</b> ( <b>quercetin</b> ) (27)	σελ. 292
iv.) Φασματοσκοπική μελέτη της <b>(+)-κατεχίνης</b> [ <b>(+)-catechin</b> ] (2)	σελ. 293
v.) Φασματοσκοπική μελέτη της <b>κερκιτρίνης</b> ( <b>quercitrin</b> ) (28)	σελ. 294
vi.) Φασματοσκοπική μελέτη του <b>ισοταχιοσίδη</b> ( <b>isotachioside</b> ) (29)	σελ. 296
<b>2.3) ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	σελ. 299
<b>2.3.1) Κατεργασία φυτικού υλικού</b>	σελ. 299
<b>2.3.2) Μελέτη της χημικής σύστασης του διχλωρομεθανικού εκχυλίσματος</b>	σελ. 302
<b>2.3.2.α) Στήλη B<sub>1</sub></b>	σελ. 302
<b>2.3.2.β) Στήλη B<sub>2</sub></b>	σελ. 304
<b>2.3.2.γ) Στήλη B<sub>3</sub></b>	σελ. 309
<b>2.3.2.δ) Στήλη B<sub>4</sub></b>	σελ. 313
<b>2.3.3) Μελέτη της χημικής σύστασης του μεθανολικού κλάσματος από ρητίνη XAD16</b>	σελ. 316
<b>2.3.3.α) Στήλη B<sub>5</sub></b>	σελ. 316
<b>2.3.3.β) Στήλη B<sub>6</sub></b>	σελ. 318
<b>2.3.3.γ) Στήλη B<sub>7</sub></b>	σελ. 322
<b>2.3.3.δ) Στήλη B<sub>8</sub></b>	σελ. 327

### **3) ΜΕΡΟΣ Γ: ΦΥΤΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ *Dorycnium pentaphyllum* subsp. *herbaceum* οικ. Leguminosae**

<b>3.1) ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	<b>σελ. 333</b>
<b>3.1.1) Δρογοβιτανική</b>	<b>σελ. 333</b>
<b>3.1.1.α) Συστηματική ταξινόμηση</b>	<b>σελ. 333</b>
<b>3.1.1.β) Χαρακτηριστικά της οικογένειας Leguminosae</b>	<b>σελ. 334</b>
<b>3.1.1.γ) Χαρακτηριστικά του γένους <i>Dorycnium</i> και του είδους <i>pentaphyllum</i> σελ. 335</b>	
<b>3.1.1.δ) Χαρακτηριστικά του υποείδους <i>herbaceum</i> και των άλλων υποειδών</b>	<b>σελ. 340</b>
<b>3.1.1.ε) Γεωγραφική εξάπλωση του φυτού <i>Dorycnium pentaphyllum</i> subsp. <i>herbaceum</i> στον ελληνικό χώρο</b>	<b>σελ. 344</b>
<b>3.1.2) Δρογοχημεία και φαρμακολογικά στοιχεία των απομονωθέντων ουσιών</b>	<b>σελ. 345</b>
<b>3.1.2.α) Φυτοχημική και φαρμακολογική προσέγγιση του γένους <i>Dorycnium</i></b>	<b>σελ. 345</b>
<b>3.1.2.β) Χημικές κατηγορίες φυσικών προϊόντων που απομονώθηκαν από το φυτό <i>Dorycnium pentaphyllum</i> subsp. <i>herbaceum</i></b>	<b>σελ. 349</b>
<b>Α) ΦΑΙΝΥΛΟΒΟΥΤΑΝΟΝΕΣ</b>	<b>σελ. 349</b>
<b>Β) KYANIAPINIKOI ΓΛΥΚΟΣΙΔΕΣ</b>	<b>σελ. 352</b>
<b>Γ) ΚΥΚΛΙΤΟΛΕΣ</b>	<b>σελ. 357</b>
<b>3.2) ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	<b>σελ. 360</b>
<b>3.2.1) Φασματοσκοπική μελέτη των απομονωθέντων μορίων</b>	<b>σελ. 360</b>
<b>3.2.1.α) Αρχική κατεργασία δρόγης</b>	<b>σελ. 360</b>
<b>3.2.1.β) Μελέτη μεθανολικού κλάσματος από ρητίνη XAD16</b>	<b>σελ. 361</b>
i.) Φασματοσκοπική μελέτη της $\beta$ -σιτοστερόλης ( $\beta$ -sitosterol) (18)	σελ. 363
ii.) Φασματοσκοπική μελέτη του γαλλικού μεθυλεστέρα (gallic acid methylester) (30)	σελ. 363
iii.) Φασματοσκοπική μελέτη της (+)-2,3-διυδρομυρικετίνης [(+)-dihydromyricetin] (31)	σελ. 364
iv.) Φασματοσκοπική μελέτη της (-)-κατεχίνης [(-)-catechin] (32)	σελ. 366
v.) Φασματοσκοπική μελέτη του καιμπερολο-3-O-(6''-ακετυλο)- $\beta$ -D-γλυκοπυρανοσίδη [kaempferol 3-O-(6''-acetyl)- $\beta$ -D-glucopyranoside] (33)	σελ. 367

vi.) Φασματοσκοπική μελέτη της λοταουστραλίνης (lotaustralin) (34)	σελ. 369
vii.) Φασματοσκοπική μελέτη της 4-(4'-Ο-β-δ-γλυκοπυρανοσυλ-φαινυλ)-2-βουτανόνης [4-(4'-Ο-β-δ-glucopyranosylphenyl)-2-butanone] (35)	σελ. 371
viii.) Φασματοσκοπική μελέτη της 4-(4'-Ο-β-δ-γλυκοπυρανοσυλ-3'-μεθοξυφαινυλ)-2-βουτανόνης [4-(4'-Ο-β-δ-glucopyranosyl-3'-methoxyphenyl)-2-butanone] (36)	σελ. 373
ix.) Φασματοσκοπική μελέτη του δορυκνιοσίδη (dorycnioside) (37)	σελ. 375
x.) Φασματοσκοπική μελέτη του ταχιοσίδη (tachioside) (38)	σελ. 378
xi.) Φασματοσκοπική μελέτη της D-πινιτόλης (D-pinitol) (39)	σελ. 380
xii.) Φασματοσκοπική μελέτη της μυρικετρίνης (myricitrin) (40)	σελ. 382
xiii.) Φασματοσκοπική μελέτη της κερκιτρίνης (quercitrin) (28)	σελ. 384
xiv.) Φασματοσκοπική μελέτη του καιμπερολο-3-O-β-δ-γλυκοπυρανοσίδη [kaempferol 3-O-β-δ-glucopyranoside] (41)	σελ. 384

### **3.3) ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ** σελ. 386

#### **3.3.1) Κατεργασία φυτικού υλικού** σελ. 386

<b>3.3.2) Μελέτη της χημικής σύστασης των μεθανολικού κλάσματος από ρητίνη XAD16</b>	σελ. 388
<b>3.3.2.α) Στήλη Γ<sub>1</sub></b>	σελ. 388
<b>3.3.2.β) Στήλη Γ<sub>2</sub></b>	σελ. 390
<b>3.3.2.γ) Στήλη Γ<sub>3</sub></b>	σελ. 392
<b>3.3.2.δ) Στήλη Γ<sub>4</sub></b>	σελ. 394
<b>3.3.2.ε) Στήλη Γ<sub>5</sub></b>	σελ. 408
<b>3.3.2.στ) Στήλη Γ<sub>6</sub></b>	σελ. 412
<b>3.3.2.ζ) Στήλη Γ<sub>7</sub></b>	σελ. 413
<b>3.3.2.η) Στήλη Γ<sub>8</sub></b>	σελ. 418
<b>3.3.2.θ) Στήλη Γ<sub>9</sub></b>	σελ. 420

### **3.4) ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΕΛΕΓΧΟΙ** σελ. 424

#### **3.4.1) Τεχνική ελέγχου της (+)-2,3-διυδρομυρικετίνης σε αδενωματικά κύτταρα παχέος εντέρου (CACO-2)** σελ. 424

<b>3.4.2) Αποτελέσματα</b>	<b>σελ. 425</b>
<b>Γενική Σύνοψη</b>	<b>σελ. 426</b>
<b>Summary (Περίληψη στα Αγγλικά)</b>	<b>σελ. 429</b>
<b>Βιβλιογραφία</b>	<b>σελ. 432</b>
<b>Παράρτημα Φασμάτων</b>	

## **ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος ΠΕΝΕΔ ''Οίνος και Υγεία'' και αποτελεί αντικείμενο διδακτορικής διατριβής. Χωρίζεται σε τρία κυρίως μέρη, καθένα από τα οποία μελετά διαφορετική φυτική πηγή. Ακολουθεί η συνοπτική περιγραφή κάθε τμήματος ξεχωριστά:

➤ **Μέρος Α:** Το συγκεκριμένο μέρος αποτελείται από τέσσερις θεματικές ενότητες και συνιστά τη βάση της ερευνητικής εργασίας. Περιέχει τη μελέτη της χημικής σύστασης και τη διερεύνηση του βιολογικού ρόλου των δραστικών συστατικών των υποπροϊόντων οινοποίησης. Πιο συγκεκριμένα, εφαρμόζεται η τεχνική των ρητινών προσρόφησης στην κατεργασία των στεμφύλων του *Vitis vinifera* var. *mandilaria* της οικογένειας **Vitaceae**, μίας ερυθρής δηλαδή ποικιλίας σταφυλιού. Τα στέμφυλα είναι το στερεό υπόλειμμα των σταφυλιών που παραμένει μετά την οινοποιητική διαδικασία, από τα οποία έχει αφαιρεθεί ο χυμός και αποτελούνται μόνο από τους φλοιούς και τα γύγαρτα. Αποτελούν ένα γεωργικό απόβλητο και καθώς εμπεριέχουν μεγάλες ποσότητες πολυφαινολών, επιβαρύνουν με οργανικό φορτίο τα οικοσυστήματα στα οποία απορρίπτονται και αποτελούν εστία μόλυνσης για τις οινοπαραγωγικές περιοχές. Με την παρούσα εργασία επιδιώχθηκε η αξιοποίηση των στεμφύλων με την ανάπτυξη μίας διαδικασίας υψηλής τεχνολογίας, κατά την οποία ανακτώνται οι φυσικές πολυφαινόλες υψηλής προστιθέμενης αξίας από αυτά. Οι πολυφαινόλες χρησιμοποιούνται ευρύτατα είτε ως διατροφικά συμπληρώματα είτε ως πρώτες ύλες στις βιομηχανίες τροφίμων, καλλιντικών και φαρμάκων. Η προτεινόμενη μεθοδολογία είναι φιλική για το περιβάλλον αφού χρησιμοποιεί ως διαλύτες μόνο νερό και αλκοόλη, ενώ λόγω της συνεχούς ανακύκλωσης των διαλύτων είναι και συμφέρουσα οικονομικά.

Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε και η φυτοχημική μελέτη των στεμφύλων ώστε να μελετηθεί πιθανή σχέση της δράσης των παραγόμενων εκχυλισμάτων και της σύστασής τους, ενώ διερευνήθηκε και ο βιολογικός ρόλος κάποιων από τους απομονωθέντες μεταβολίτες.

Στην πρώτη θεματική ενότητα (**γενικό μέρος**) αναφέρονται τα βοτανικά στοιχεία του είδους , του γένους και της οικογένειας , ενώ παρουσιάζονται παράλληλα οι κυριότερες ποικιλίες σταφυλιού στην Ελλάδα. Επιπλέον, γίνεται αναφορά στις ουσίες που έχουν απομονωθεί σε προηγούμενες φυτοχημικές μελέτες από φυτά του γένους *Vitis*, αλλά και μία ανασκόπηση στις χημικές και φαρμακολογικές ιδιότητες των χημικών ομάδων στις οποίες υπάγονται οι ουσίες που απομονώθηκαν κατά την παρούσα φυτοχημική μελέτη του φυτού.

Η ενότητα των **προσωπικών αποτελεσμάτων** διαιρείται σε δύο υποενότητες. Στην ενότητα της **κατεργασίας των στεμφύλων με ρητίνες** παρουσιάζονται αναλυτικά όλα τα στάδια των εργαστηριακών δοκιμών καθώς και η πιλοτική εφαρμογή της μεθόδου. Στόχος της διαδικασίας ήταν η αξιοποίηση των αποβλήτων της οινοποίησης και η παραγωγή ενός εμπλούτισμένου πολυφαινολικού κλάσματος που θα έχει θετικά αποτελέσματα στην ανθρώπινη υγεία . Στην άλλη υποενότητα (**φασματοσκοπική μελέτη των απομονωθέντων μορίων**) περιγράφεται συνοπτικά η διαδικασία απομόνωσης των φυσικών προϊόντων και επεξηγείται αναλυτικά ο καθορισμός της δομής τους με βάση τα φασματοσκοπικά δεδομένα.

Στην τρίτη ενότητα (**πειραματικό μέρος**) αναφέρονται αναλυτικά οι εκχυλίσεις, οι διαδικασίες απομόνωσης, ενώ παρουσιάζονται και πίνακες με τα φασματοσκοπικά δεδομένα των ουσιών που απομονώθηκαν.

Στην ενότητα των **βιολογικών ελέγχων** περιέχονται τα αποτελέσματα των κλινικών δοκιμών του παραγόμενου πολυφαινολικού κλάσματος από την κατεργασία με ρητίνες, σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο . Επίσης , παρουσιάζονται τα *in vitro* πειράματα που έγιναν σε μόρια, κλάσματα και εκχυλίσματα από δύο ελληνικές ποικιλίες σταφυλιού, τη *Μανδηλαριά* και το *Ασύρτικο*. Τα πειράματα αυτά εξ ετάζουν την ανασταλτική δράση των παραπάνω, ενάντια στις βλάβες που προκαλεί η μιτομυκίνη C, το ένζυμο τοποϊσομεράση I και οξειδωτικοί παράγοντες (μπλεομυκίνη,  $H_2O_2$ ).

➤ **Μέρος Β:** Αποτελείται από τρεις θεματικές ενότητες και περιλαμβάνει τη φυτοχημική μελέτη του φυτού *Polygonum maritimum* της οικογένειας **Polygonaceae**. Το συγκεκριμένο φυτό επιλέχθηκε γιατί δεν έχει μελετηθεί ξανά στο παρελθόν, έχουν βρεθεί σημαντικές κατηγορίες πολυφαινολικών μορίων σε άλλα είδη του γένους, ενώ αποτελεί και την αφετηρία μελέτης του γένους *Polygonum* από το εργαστήριο μας. Οι

τρεις ενότητες (**γενικό μέρος, προσωπικά αποτελέσματα και πειραματικό μέρος**) περιέχουν τα αντίστοιχα στοιχεία των ενοτήτων του μέρους Α, δηλαδή μία θεωρητική προσέγγιση (βιοτανολογική, φυτοχημική και φαρμακολογική) του φυτού, τη φασματοσκοπική ανασκόπηση των απομονωθέντων μορίων και τη διαδικασία απομόνωσής τους. Πρέπει να σημειωθεί ότι εφαρμόστηκε επίσης η τεχνική των ρητινών προσρόφησης στη φυτοχημική μελέτη του μεθανολικού εκχυλίσματος του φυτού αφού όπως αποδείχθηκε και στο μέρος Α, μ' αυτόν τον τρόπο διευκολύνεται η απομόνωση των δευτερογενών μεταβολιτών.

➤ **Μέρος Γ:** Αποτελείται από τέσσερις θεματικές ενότητες και περιλαμβάνει τη φυτοχημική μελέτη φυτού *Dorycnium pentaphyllum* subsp. *herbaceum* της οικογένειας **Leguminosae**. Η επιλογή του φυτού έγινε επειδή ανήκει στην οικογένεια **Leguminosae**, μία σημαντική οικογένεια που περιλαμβάνει φυτά με αξιόλογες δράσεις των δευτερογενών μεταβολιτών τους και οι μελέτες που έχουν γίνει στο παρελθόν σε άλλα είδη του γένους *Dorycnium* κάνουν λόγο για τη σημαντική περιεκτικότητά τους σε φλαβονοειδή, δεν αναφέρουν όμως την απομόνωση ου σιών από άλλες χημικές κατηγορίες. Οι τρεις πρώτες ενότητες έχουν ανάλογο περιεχόμενο με τις αντίστοιχες των δύο προηγούμενων μερών (**γενικό μέρος, προσωπικά αποτελέσματα και πειραματικό μέρος**), ενώ η τέταρτη (**βιολογικοί έλεγχοι**) περιέχει τα αποτελέσματα των βιολογικών ελέγχων της απομονωθείσας ουσίας (+)-2,3-διυδρομυρικετίνης επί των αδενωματικών κυττάρων παχέος εντέρου (CACO-2). Όπως και στα δύο προηγούμενα μέρη, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική των ρητινών προσρόφησης στη φυτοχημική μελέτη του φυτού.

# 1) ΜΕΡΟΣ Α

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΧΗΜΙΚΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΚΑΙ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ  
ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΩΝ ΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΩΝ  
ΥΠΟΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ



## **1.1) ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **1.1.1) ΔΡΟΓΟΒΟΤΑΝΙΚΗ**

#### **1.1.1.a) Ιστορική αναδρομή**

Η καλλιέργεια της αμπέλου ανάγεται στους προϊστορικούς χρόνους, γεγονός που αποδεικνύει ότι τόσο η αμπελουργία, όσο και η οινοποιία είναι γνωστές στον άνθρωπο από την αρχή σχεδόν της ιστορίας του (Καββάδας Δ.Σ., 1956).

Αναφορές μπορεί να βρει κανείς και στην Ομηρική περίοδο όπου γίνεται λόγος για καλλιέργεια της αμπέλου στην Ιστιαία, την Επίδαυρο και τη Θρακική πόλη Ίσμαρο που αργότερα μετονομάστηκε σε Μαρώνεια. Άλλωστε, είναι γνωστό ότι ο Οδυσσέας μέθυσε τον Πολύφημο με τον Ισμαρικό ή Μαρώνειο οίνο.

Από πολύ παλιά ήταν γνωστή η αμπελουργία στις παραμεσόγειες περιοχές και ειδικά στην Αίγυπτο. Πολλές ιστορικές αναφορές υπάρχουν για τα περίφημα σταφύλια της περιοχής του Νείλου, όπως και για τον οίνο άριστης ποιότητας της αιγυπτιακής πόλης Αντίλλης, ενώ κατά τον Ελλάνιο η πρώτη άμπελος βρέθηκε σε μία άλλη αιγυπτιακή πόλη, την Πλινθήνη.

Γενικότερα πάντως, στις διάφορες περιόδους της ιστορίας, παρατηρείται η παρουσία των σταφυλιών και του οίνου ως στοιχεία που ευφραίνουν την ψυχή του ανθρώπου σε στιγμές χαράς, όπως σε γιορτές προς τιμήν βασιλιάδων, θεών, μετά από ένα νικηφόρο πόλεμο κλπ. Επιπρόσθετα, μία από τις βασικές προϋποθέσεις της καλής φιλοξενίας κατά την αρχαιότητα ήταν η προσφορά στον επισκέπτη ενός πλούσιου γεύματος στο οποίο τα σταφύλια και ο οίνος κατείχαν κυρίαρχη θέση.

Στην αρχαία Αίγυπτο, το κρασί ήταν ένα από τα δώρα πρώτης επιλογής για τη θεά Όστρις και χρησιμοποιούταν ως διαλύτης άλλων φαρμάκων ή ακέραιο σε ιατρικές συνταγές. Στην αρχαία Κίνα, τα κρασιά που προέρχονταν από κόκκινες ποικιλίες σταφυλιών χρησιμοποιούνταν σε θυσίες και μάλιστα αναμιγνύονταν με αίμα και οστά και πίνονταν.

Κατά τη μυθολογία, η αμπελουργία εισήχθη στην Ελλάδα από την Ασία, από τον Διόνυσο και τον γιο του Οινοπίωνα. Αυτοί δίδαξαν την αμπελουργία και κυρίως την παραγωγή οίνου στους Έλληνες, ο μεν Διόνυσος στους Αθηναίους, ο δε Οινοπίωνας στους Χιώτες. Αυτός είναι και ο λόγος που λατρευόταν ο Διόνυσος ως θεός της αμπέλου, της οινοποιίας και της οινοποσίας. Οι Έλληνες είχαν εισαγάγει το κρασί ως μέρος της καθημερινής τους διατροφής αφού πίστευαν ότι τους δυναμώνει, ενώ ακόμα και ο Ιπποκράτης ανέφερε το κρασί ως επουλωτικό πληγών, αντιπυρετικό και διουρητικό. Ανάλογες μαρτυρίες συναντάμε και στην αρχαία Ρώμη και το Βυζάντιο (Sandler M. & Pinder R., 2003).

Είναι σίγουρο ότι η καλλιέργεια της αμπέλου ήταν γνωστή στην Ασία από τα πανάρχαια χρόνια αφού ακόμα και στην Παλαιά Διαθήκη υπάρχουν σχετικές αναφορές. Για παράδειγμα, ο Νώε μέθυσε από χυμό σταφυλιών και ο ίδιος φύτευσε μετά τον κατακλυσμό την περίφημη άμπελο της Χαναάν.

Η ιθαγένεια της αμπέλου και ο τόπος που άρχισε η αμπελουργία δεν έχει εξακριβωθεί. Πολλοί συστηματικοί βοτανικοί θεωρούν πατρίδα της οιναμπέλου τις περιοχές γύρω από τον Καύκασο και τις νότιες προς την Κασπία θάλασσα περιοχές του Πόντου και της Αρμενίας. Εκεί απαντά αυτοφυής η άγρια άμπελος (*Vitis silvestris*) από την οποία προέρχεται η οινάμπελος (*Vitis vinifera*). Κάποιοι επιστήμονες όμως υποστηρίζουν ότι η οινάμπελος συναντάται αυτοφυής με την άγρια μορφή, όπως αυτή του Καυκάσου, σε παραμεσόγειες ευρωπαϊκές περιοχές, στην Αλγερία και το Μαρόκο. Αυτό ίσως σημαίνει, δεχόμενοι πάντα την ασιατική καταγωγή της οιναμπέλου, ότι αμπελοφάγα πτηνά μετέφεραν σπέρματα της άγριας αμπέλου από τον Καύκασο στις παραπάνω περιοχές. Ωστόσο, δεν υπάρχουν εξακριβωμένες πληροφορίες για την ιστορική περίοδο που ήρθε η αμπελουργία στην Ευρώπη. Αν η παραπάνω υπόθεση είναι αληθής, τότε η μεταφορά σπερμάτων έγινε κατά τα προϊστορικά χρόνια, αφού τα σταφύλια χρησιμοποιούνταν από τους ανθρώπους ακόμα και στην εποχή του ορείχαλκου, όπως φαίνεται από σπέρματα και φύλλα που έχουν βρεθεί σε σπήλαια της εποχής στην Ελλάδα, την Ιταλία και σε λιμναίους οικισμούς της Ελβετίας (Sandler M. & Pinder R., 2003).

### 1.1.1.β) Συστηματική ταξινόμηση

Το φυτό *Vitis vinifera* var. *mandilaria* το οποίο αποτελεί αντικείμενο φυτοχημικής μελέτης του Μέρους Α της παρούσας εργασίας ανήκει στην οικογένεια **Vitaceae** και η συστηματική κατάταξή του έχει ως εξής:

<b>Βασίλειο (Regnum)</b>	<i>Plantae</i>
<b>Αθροισμα (Divisio)</b>	<i>Magnoliophyta</i>
<b>Κλάση (Classis)</b>	<i>Rosidae</i>
<b>Υποκλάση (Subclassis)</b>	<i>Dicotyledones</i>
<b>Τάξη (Ordo)</b>	<i>Rhamnales</i>
<b>Οικογένεια (Familia)</b>	<i>Vitaceae</i>
<b>Γένος (Genera)</b>	<i>Vitis</i>
<b>Είδος (Species)</b>	<i>vinifera</i>
<b>Ποικιλία (Varieties)</b>	<i>mandilaria</i>

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι το φυτό *Vitis vinifera* ανήκει στο άθροισμα των **Μανολιόφυτων**, την κλάση των **Rosidae**, την υποκλάση των **Δικοτυλήδονων**, την τάξη των **Rhamnales** και την οικογένεια των **Vitaceae**. Το κοινό όνομα του φυτού είναι το πολύ γνωστό σταφύλι και αποτελεί ίσως το φυτό που συναντάται περισσότερο στην καθημερινή ζωή του ανθρώπου, τόσο αυτούσιο όσο και με τη μορφή των παραγώγων του (κρασί, σταφίδα κλπ.). Το σταφύλι αποτελείται από πολλές ποικιλίες, ενώ στη συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκε η ποικιλία κόκκινου σταφυλιού **Μανδηλαριά**.

### 1.1.1.γ) Χαρακτηριστικά της οικογένειας **Vitaceae**

Τα είδη που περιλαμβάνονται στην οικογένεια **Vitaceae** υπερβαίνουν σήμερα τα 1200. Κυρίαρχη θέση βέβαια κατέχει το είδος *Vitis vinifera*, γνωστό και ως Άμπελος η οινοφόρος. Η συστηματική διαίρεση της οικογένειας **Vitaceae** σε γένη έχει αποτελέσει αντικείμενο διχογνωμίας των συστηματικών βοτανικών (Νταβίδης Ο.Ξ., 1982). Κατά τον Planchon (1887), η οικογένεια περιλαμβάνει τα εξής 10 γένη: *Vitis, Ampelocissus, Pterisanthes, Clematocissus, Tetrastigma, Landukia, Parthenocissus, Ampelopsis, Rhoicissus, Cissus*.

Κατά τον Suessenguth (1953) περιλαμβάνει 12 γένη: *Cissus, Acareosperma, Cayratia, Vitis, Ampelocissus, Parthenocissus, Ampelopsis, Pterisanthes, Clematocissus, Tetrastigma, Rhoicissus, Pterocissus*.

Κατά την νεότερη εργασία του Galet (1967) η οικογένεια **Vitaceae** περιλαμβάνει 14 γένη: *Vitis, Cissus, Ampelopsis, Pterisanthes, Tetrastigma, Ampelocissus, Clematocissus, Landukia, Parthenocissus, Rhoicissus, Cayratia, Acareosperma, Pterocissus, Cyphostemma*.

Τα κυριότερα κοινά βοτανικά χαρακτηριστικά των φυτών που συναποτελούν την οικογένεια περιγράφονται παρακάτω (Καββάδας Δ.Σ., 1956):

- Θάμνοι αναρριχώμενοι με έλικες απλές ή διακλαδισμένες.
- Άνθη αρρενοθήλεα ή μονόφυλα, μικρά, ακτινωτά, πολυάριθμα κατά κυματοειδείς, βιτρυοειδείς ή φοβοειδείς ταξιανθίες.
- Κάλυκας με μικρά σέπαλα, δυσδιάκριτα συνήθως 4-5.
- Στεφάνη με 3, 6 ή 7 πέταλα.
- Στήμονες ισάριθμοι με τα πέταλα, αλλά αντίθετοι από αυτά.
- Καρπός ράγα και κάρυο μονόχωρο και μονόσπερμο.
- Σπέρμα με σκληρό κεράτινο ενδοσπέρμιο.
- Ωθήκη επιφυής εκ 2 ή σπανιότερα 3-8 καρπόφυλλων.

Οι περισσότερες φυτοχημικές εργασίες στα **Vitaceae** αφορούν το φυτό *Vitis vinifera* και τα μόρια που έχουν απομονωθεί είναι κατά μεγάλο ποσοστό

πολυφαινολικά. Οι συνηθέστερες χημικές κατηγορίες φυσικών προϊόντων που απαντούν στα **Vitaceae** είναι:

- ✓ **Φλαβονοειδή**
- ✓ **Στιλβενοειδή**
- ✓ **Φαινολικά μόρια**
- ✓ **Ταννίνες**
- ✓ **Ανθοκυάνες**

Η ποικιλότητα όσον αφορά τους δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών της οικογένειας **Vitaceae**, αποτελεί σίγουρα ένα κίνητρο για περαιτέρω φυτοχημική μελέτη. Επιπρόσθετα, οι φαρμακολογικές ιδιότητες που αποδεικνύονται συνεχώς για το σταφύλι και τα παράγωγά του, καθώς και η παρουσία του στη διατροφή επιτείνουν σίγουρα το επιστημονικό ενδιαφέρον.

#### 1.1.1.δ) Χαρακτηριστικά του γένους *Vitis* και του είδους *vinifera*

Το γένος *Vitis* αποτελείται από 2 υπογένη, το *euvitis* και το *muscadinia* και 60 περίπου είδη. Στο *euvitis* ανήκει και η οινοφόρος άμπελος (*Vitis vinifera*). Τα κυριότερα βιοτανικά γνωρίσματα των φυτών του γένους *Vitis* είναι (Καββάδας Δ.Σ., 1956):

- Θάμνοι αναρριχώμενοι με έλικες απλές ή διακλαδισμένες.
- Φύλλα επαλλάσσοντα.
- Άνθη αρρενοθήλεα ή δίκλινα, ακτινωτά, πολυάριθμα κατά κυματοειδείς, βιτρυοειδείς ή φοβοειδείς ταξιανθίες.
- Κάλυκας μικρός, δυσδιάκριτος και μονοσέπαλος.
- Στεφάνη εύπτωτη με 5 πέταλα συμφυή στην κορυφή.
- 5 στήμονες φυόμενοι από την ανθοδόχη και εναλλασσόμενοι με ισάριθμους νεκταροφόρους αδένες.
- Καρπός ράγα με 1-4 σπέρματα.
- Ωοθήκη επιφυής.

Το φυτό *Vitis vinifera* όπως έχει ήδη αναφερθεί, αποτελεί τον σημαντικότερο εκπρόσωπο του γένους. Αυτό οφείλεται κυρί ως στη διατροφική χρήση του και στη

συμμετοχή του στην παραγωγή του οίνου. Παρακάτω παρατίθενται τα σημαντικότερα βιτανικά χαρακτηριστικά του:

- Θάμνος αναρριχώμενος που αποκτά τεράστιες διακλαδώσεις (κληματόβεργες).
- Φύλλα έμμισχα, παλαμοσχιδή με 3-5 λοβούς ακέραιους ή οδοντωτούς.
- Άνθη μικρά, πρασινωπά κατά κυματοειδείς , βιτρυοειδείς ή φοβοειδείς ταξιανθίες.
- Στεφάνη εύπτωτη.
- 5 στήμονες εναλλασσόμενοι με ισάριθμους νεκταροφόρους αδένες.
- Καρπός ράγα με 1-4 σπέρματα.
- Σπέρματα αχλαδόμορφα με κεράτινο ενδοσπέρμιο.
- Ωοθήκη δίχωρη με 2 σπερματοβλάστες κατά χώρο.

Το σταφύλι αποτελείται από τον βόστρυχο και τις ράγες . Το μέγεθός του οφείλεται στον βόστρυχο, είναι πολύ μεταβλητό και επηρεάζεται από το κλίμα (σε ξηρό και θερμό κλίμα τα σταφύλια είναι μικρότερα), το έδαφος, την ηλικία της αμπέλου, το εφαρμοζόμενο σύστημα κλαδέματος και τη θέση επί του καρποφόρου βλαστού (τα σταφύλια είναι συνήθως μεγαλύτερα, όσο πιο κοντά βρίσκονται στη βάση ). Ο βόστρυχος διαμορφώνει ακόμα με τις διακλαδώσεις του, το σχήμα και την πυκνότητα του σταφυλιού (Κουράκου-Δραγωνά Σ., 1998).

Ανατομικά η ράγα αποτελείται από 3 μέρη:

- Τον φλοιό που αποτελεί το περικάρπιο.
- Τη σάρκα που αποτελείται από το μεσοκάρπιο και το ενδοκάρπιο.
- Τα γίγαρτα (κουκούτσια) που περιβάλλονται από το ενδοκάρπιο.

Ο φλοιός αντιπροσωπεύει μικρό ποσοστό επί του μέρους της ράγας , αλλά συνίσταται από τις οργανικές ουσίες εκείνες που χαρακτηρίζουν τις διάφορες ποικιλίες αμπέλου και διαμορφώνουν τους οργανοληπτικούς χαρακτήρες των οίνων. Στον φλοιό συναντώνται επίσης ανθοκυάνες, αδιάλυτες πηκτίνες, μικρές ποσότητες σακχάρων και οξέων καθώς και ανόργανα συστατικά. Ο φλοιός προμηθεύει τον οίνο με το μεγαλύτερο μέρος των αρωματικών συστατικών. Η σάρκα αποτελείται από νερό 75-80%, ζυμώσιμα σάκχαρα 17-25%, οργανικά οξέα , αζωτούχες ε νώσεις, ανόργανα άλατα , πηκτινικές ουσίες, ταννίνες και αρωματικές ουσίες σε μικρότερο ποσοστό από τον φλοιό . Τα

κυριότερα συστατικά της σάρκας είναι τα ζυμώσιμα σάκχαρα και τα οργανικά οξέα που εξασφαλίζουν στον οίνο την υδραλκοολική δομή του και τη γευστική ισορροπία. Όσον αφορά τη χημική σύσταση των γιγάρτων, χαρακτηρίζεται από την παρουσία νερού, σακχάρων, ελαιούχων ουσιών, λιπαρών οξέων, φαινολικών παραγώγων, αζωτούχων ουσιών και ανόργανων συστατικών.

Ο βόστρυχος συνίσταται από ξυλώδεις ιστούς (10-15%), ρητίνες, αζωτούχες ενώσεις, ανόργανες ενώσεις, φαινολικά παράγωγα και οργανικά οξέα. Δεν αποτελείται από σάκχαρα μέχρι την έναρξη της ωρίμανσης. Αργότερα, κατά την έναρξη της ωρίμανσης διέρχονται σάκχαρα από τους βόστρυχους, αλλά περιορίζονται εκ νέου όσο πλησιάζει η ωριμότητα, κατά την οποία οι βόστρυχοι περιέχουν σάκχαρα λιγότερα από 10 g/kg (Κουράκου-Δραγωνά Σ., 1998).

Το φυτό *Vitis vinifera* χωρίζεται περαιτέρω σε ποικιλίες. Η διάκριση αυτή παρουσιάζει εξαιρετική δυσκολία, καθώς οι ποικιλίες δεν είνα ι βοτανολογικά τεκμηριωμένες κατηγορίες που μπορούν να διαχωριστούν με βάση σταθερά βοτανικά γνωρίσματα, αλλά είναι κλώνοι, δηλαδή πληθυσμοί που προέρχονται από τον αγενή πολλαπλασιασμό της αμπέλου και έχουν άμεση εξάρτηση από τις κλιματολογικές συνθήκες στις οποίες παράγονται. Παρατηρείται λοιπόν, η διατήρηση των χαρακτηριστικών τους μόνο στον τόπο παραγωγής τους, ενώ τα γνωρίσματά τους διαφοροποιούνται αν μεταφερθούν σε άλλη περιοχή.

Η κατάταξη των διαφόρων ποικιλιών της αμπέλου γίνεται με μάλλον ποιοτικά και όχι τόσο αντικειμενικά χαρακτηριστικά, όπως η γεύση, το άρωμα του καρπού, η παρουσία ή όχι σπερμάτων, η μορφή του καρπού, το είδος του τριχώματος, το χρώμα της ώριμης ράγας κλπ. Πάντως, υπάρχουν ποικιλίες που ομοιάζουν τόσο μεταξύ τους ώστε να μην μπορούν να διακριθούν (Καββάδας Δ.Σ., 1956).

Οι ποικιλίες σταφυλιών που χρησιμοποιούνται στην οινοποίηση πρέπει να παράγουν οίνο υψηλής ποιότητας (κριτήριο αποτελεί ο σακχαρικός τίτλος), ενώ ο χρόνος πλήρης ωρίμανσης του φορτίου είναι πολύ σημαντικός παράγοντας για την καταλληλότητα ή όχι μίας ποικιλίας. Σε βόρειες περιοχές προτιμάται η πρώιμη ωρίμανση, σ' αντίθεση με περιοχές όπως η Ελλάδα όπου επιδιώκεται αργή ωρίμανση. Οι κυριότερες ποικιλίες σταφυλιού που καλλιεργούνται στην Ελλάδα με σκοπό την οινοποίηση είναι (Νταβίδης Ο.Ξ., 1982):

**Λευκές ποικιλίες:**

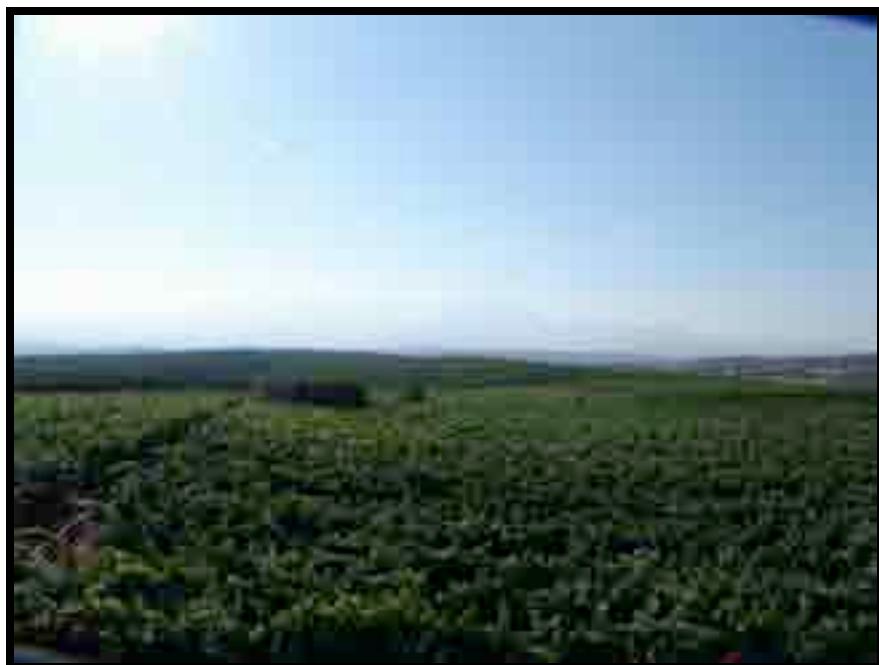
- *Aθήρι*
- *Ασύρτικο*
- *Γουστολίδι*
- *Zουμιάτικο*
- *Κακοτρύγης*
- *Μονεμβασιά*
- *Μοσχάτο Σάμου*
- *Μπατίκι*
- *Nτεμπίνα*
- *Ξυνιστέρι*
- *Ρομπόλα*
- *Σαββατιανό*

**Έγχρωμες ποικιλίες:**

- *Βερτζαμί*
- *Καλλινιάτικο*
- *Κοτσιφάλι*
- *Λημνίο*
- *Λιάτικο*
- *Μανδηλαριά*
- *Μαυροδάφνη*
- *Μαύρο Αράχωβης*
- *Μαύρο Μεσενικόλα*
- *Μαύρο Νεμέας*
- *Μαύρο Νάουσσας*
- *Μαύρο Κύπρου*
- *Μαύρο Ρωμέϊκο*
- *Μαυρούδι Θράκης*
- *Παμίδι*
- *Ροδίτης*

- Σκοπελίτικο
- Σκυλοπνίχτης
- Φιλέρι
- Φωκιανό μαύρο

Στο πειραματικό μέρος της παρούσας εργασίας μελετάται φυτοχημικά η ποικιλία **Μανδηλαριά** (Εικόνα 1) η οποία καλλιεργείται στις Κυκλαδες, τα Δωδεκάνησα, την Κρήτη, την Νοτιοανατολική Εύβοια, τη Βοιωτία και την Αττική.



Εικόνα 1. Καλλιέργεια αμπέλου *Vitis vinifera* var. *mandilaria*.

Διαθέτει μεγάλα φύλλα που έχουν κυματώδες έλασμα με ερυθροιώδες εις νευρώσεις. Ο καρπός είναι μέτριου ως μεγάλου μεγέθους και ο φλοιός είναι παχύς και κυανομέλανος (Εικόνα 2). Ο οίνος που παράγεται από τη συγκεκριμένη ποικιλία χαρακτηρίζεται από τον πλούτο του σε χρωστικές και γι' αυτό χρησιμοποιείται στην ενίσχυση του χρώματος άλλων ποικιλιών προς οινοποίηση. Το γλεύκος της ποικιλίας συνδυάζεται με το γλεύκος άλλων ποικιλιών, όπως Αθήρι, Ασύρτικο και παράγονται οίνοι υψηλής ποιότητας.



Εικόνα 2. *Vitis vinifera* var. *mandilaria*.

Οι ποικιλίες επιτραπέζιων σταφυλιών θα πρέπει να διαθέτουν καλή εξωτερική εμφάνιση, ευχάριστη γεύση, αλλά και την ικανότητά να διατηρούν τα παραπάνω χαρακτηριστικά για αρκετό χρονικό διάστημα. Οι κυριότερες ποικιλίες επιτραπέζιου σταφυλιού στην Ελλάδα είναι:

- *Aητονύχι λευκό*
- *Aητονύχι κόκκινο*
- *Aητονύχι μαύρο*
- *Αυγουλάτο*
- *Βέρικο*
- *Επτάκοιλο*
- *Kορίθι άσπρο*
- *Kορίθι μαύρο*
- *Μοσχάτο Αλεξανδρείας*
- *Μοσχάτο Αμβούργου*
- *Οψιμο Έδεσσας*
- *Οψιμο Σουφλίου*
- *Ραζάκι*
- *Σιδερίτης*
- *Συρίκι*
- *Τσαούσι*
- *Φράουλα*

Εκτός από τις παραπάνω ποικιλίες, υπάρχουν και ποικιλίες που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή σταφίδας, όπως η κορινθιακή σταφίδα, η σουλτανίνα κ.α. (Νταβίδης Ο.Ξ., 1982).

Πέρα από το *Vitis vinifera*, υπάρχουν και άλλα είδη με κάποιο ενδιαφέρον, όπως το *V. rotundifolia*, το *V. labruska*, το *V. candicans*, το *V. aestivalis*, το *V. berlandieri*, το *V. rupestris* και το *V. riparia*. Πιο αναλυτικά:

***Vitis rotundifolia*:** Απαντά σε υγρές παραποτάμιες περιοχές της Φλόριντα, του Τέξας και του Μεξικού. Καλλιεργείται περισσότερο για την κληματαριά του, παρά για τον καρπό του.

- Θάμνος αναρριχώμενος μήκους 30-40 cm.
- Φύλλα μικρά, ωοειδή.
- Σπέρματα μεγέθους 6-9 mm.
- Σταφύλι ολιγόκαρπο και κόκκινο.

***Vitis labruska*:** Καλλιεργείται στην Αμερική ως επιτραπέζιο σταφύλι.

- Θάμνος αναρριχώμενος μήκους 30-40 cm.
- Φύλλα πλατιά, παχιά και ωοειδή.
- Σταφύλι ολιγόκαρπο, μικρό και κόκκινο.

***Vitis candicans*:**

- Θάμνος ισχυρός με πυκνές κληματαριές.
- Φύλλα σχεδόν ασχιδή με 5-7 λοβούς.
- Σταφύλι ολιγόκαρπο, με μέγεθος 10-20 mm κόκκινου, ρόδινου ή λευκού χρώματος.

***Vitis aestivalis*:** Καλλιεργείται στην Αμερική ως επιτραπέζιος οίνος.

- Θάμνος ισχυρός, αναρριχώμενος.
- Φύλλα πλατιά, ωοειδή με 3-5 λοβούς.
- Σταφύλι πολύκαρπο και μικρό.

*Vitis rupestris*:

- Θάμνος μήκους 0.6-2 m.
- Φύλλα μικρά με ρόδινες νευρώσεις.
- Σταφύλι ολιγόκαρπο, μελανοιώδες και μικρό.

*Vitis berlandieri*: Συναντάται στις ΗΠΑ και το Μεξικό.

- Θάμνος μέτριας ανάπτυξης.
- Φύλλα νεφροειδή και ασχιδή.
- Σταφύλι πυραμοειδές, σφαιρικό και μικρό.

*Vitis riparia*: Καλλιεργείται στην Αμερική.

- Θάμνος αναρριχόμενος και ισχυρός.
- Φύλλα οξύληκτα.
- Σταφύλι σφαιρικό και μικρό.

## **1.1.2) ΔΡΟΓΟΧΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΩΝ ΟΥΣΙΩΝ**

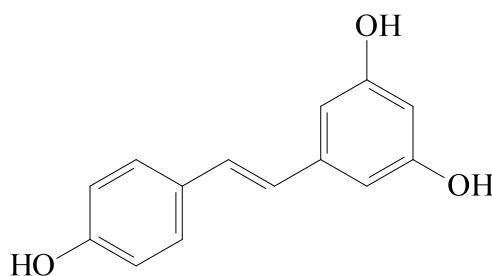
### **1.1.2.a) Φυτοχημική και φαρμακολογική προσέγγιση του φυτού *Vitis vinifera***

Το *Vitis vinifera* έχει αποτελέσει αντικείμενο εκτεταμένης φυτοχημικής μελέτης. Πληθώρα εργασιών με θέμα διάφορες ποικιλίες σταφυλιού κατακ λύζουν συνεχώς τα επιστημονικά περιοδικά, εμπλουτίζοντας ολοένα και περισσότερο τον κατάλογο των δευτερογενών μεταβολιτών που έχουν απομονωθεί από αυτό. Στον Πίνακα 1 παρατίθενται ορισμένες μόνο δημοσιεύσεις με θέμα το φυτό *Vitis vinifera*, ενδεικτικές όσον αφορά τις χημικές κατηγορίες των ουσιών που έχουν απομονωθεί.

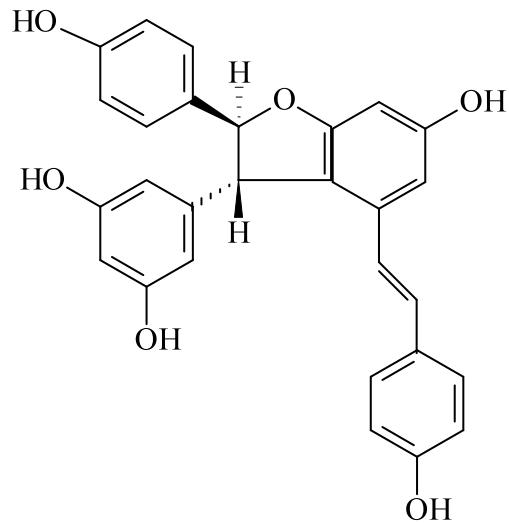
ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ
Φαινολικά	Guendez R. et al., 2005
Φλαβονοειδή	Yilmaz Y. & Toledo R.T., 2004
Τερπένια	Lucker J. et al., 2004
Ταννίνες	Vivas N. et al., 2004
Στιλβένια	Ito J. et al., 1999
Ανθοκυάνες	Renault J.H. et al., 1997

Πίνακας 1. Φυτοχημική μελέτη του φυτού *Vitis vinifera*.

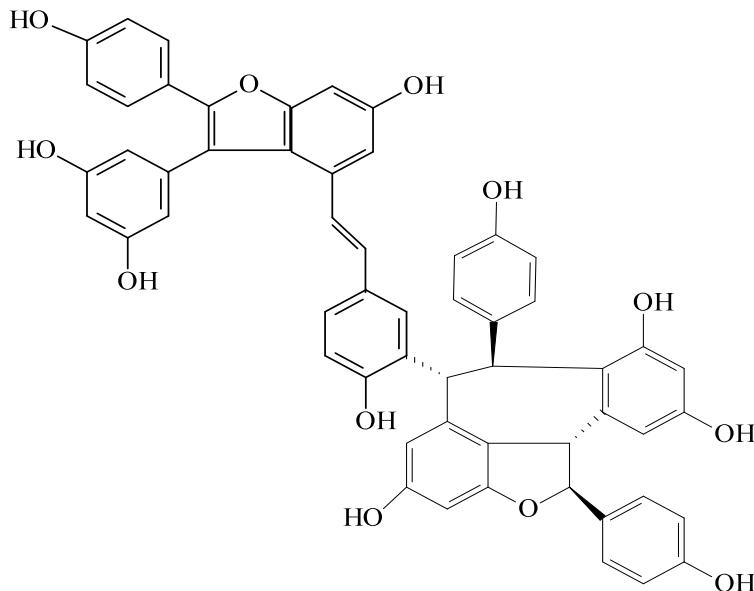
Όπως φαίνεται από τον παραπάνω πίνακα, τα μόρια που έχουν απομονωθεί από το σταφύλι ανήκουν στην ευρύτερη κατηγορία των πολυφαινολικών μορίων. Είναι εμφανές λοιπόν ότι η έντονη και ποικίλη παρουσία φαινολικών ουσιών στις διάφορες ποικιλίες του *Vitis vinifera*, το καθιστά στο επίκεντρο του φυτοχημικού ενδιαφέροντος. Άλλωστε, κανένα άλλο φυτό δεν έχει μελετηθεί φυτοχημικά όσο το σταφύλι, καθώς για τα περισσότερα φυτά που έχουν μελετηθεί, δεν υπάρχουν παρά μία-δύο εργασίες με φυτοχημικό περιεχόμενο. Ακολουθούν οι χημικοί τύποι κάποιων μορίων από αυτά που έχουν απομονωθεί.



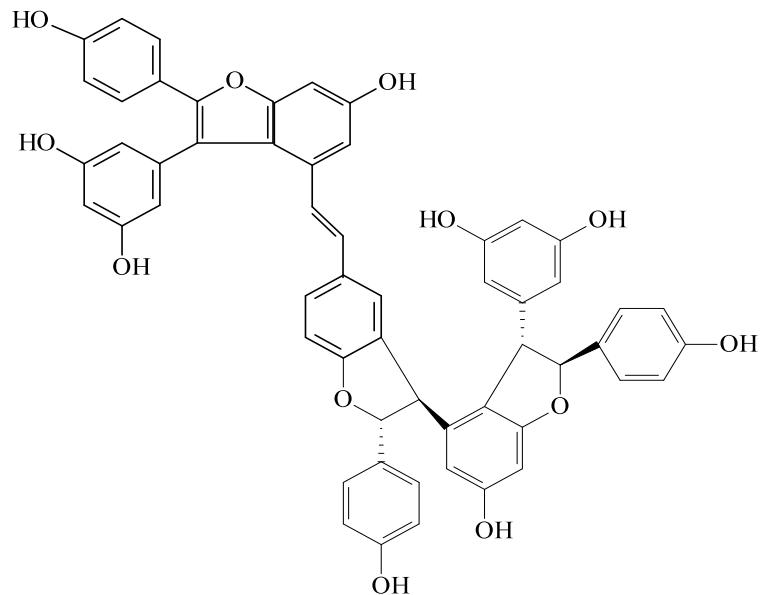
*trans-ρεσβερατρόλη*



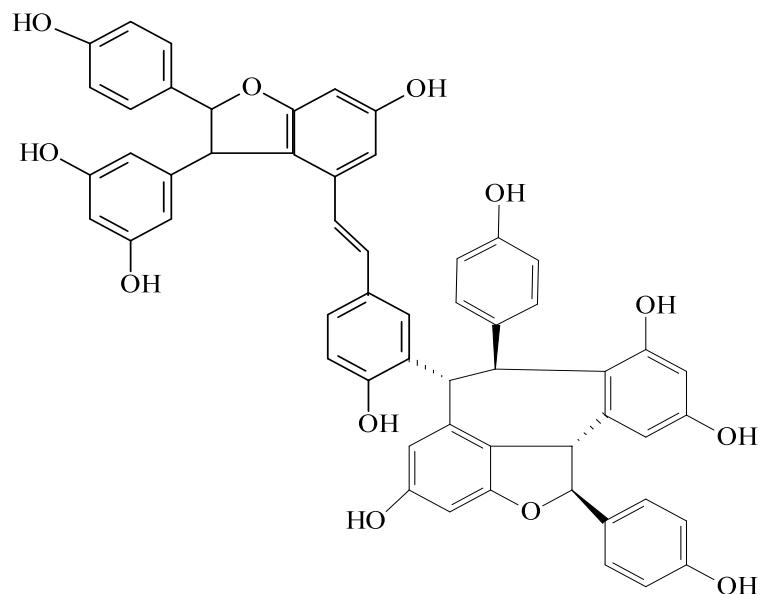
*trans-ε-βινιφερίνη*



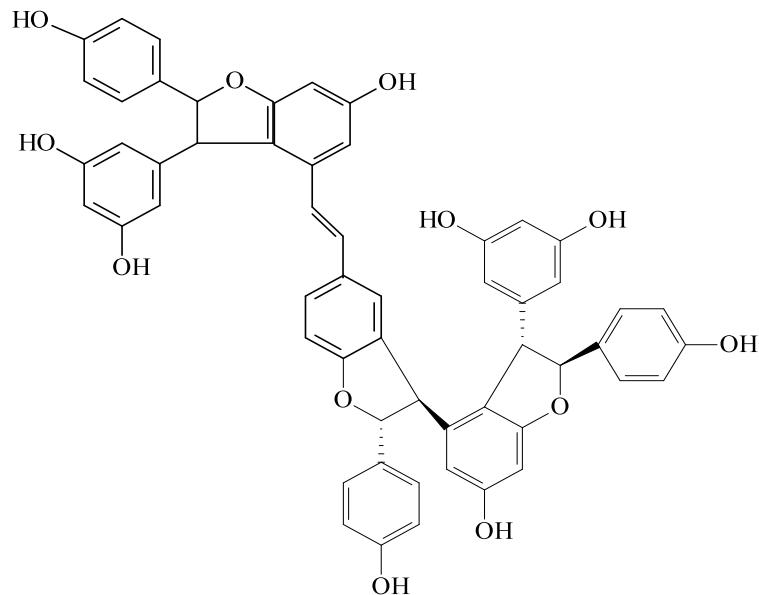
*ε-βιτισιφουράνη Α*



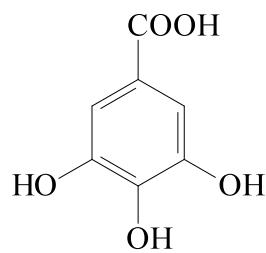
$\epsilon$ -βιτισιφονράνη Β



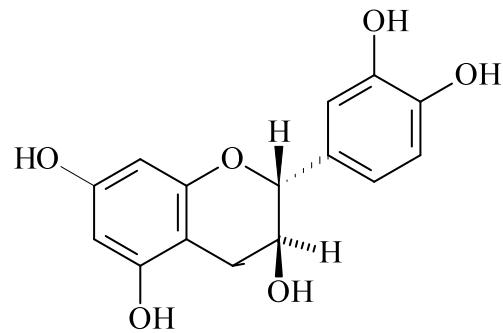
$\beta$ ιτισίνη Α



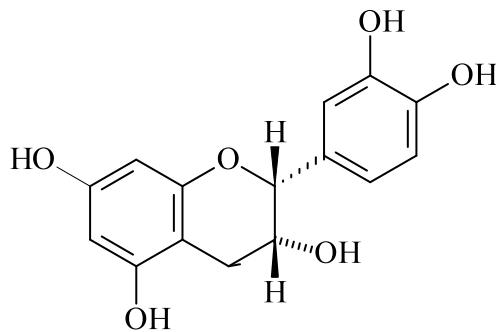
**βιτισίνη Β**



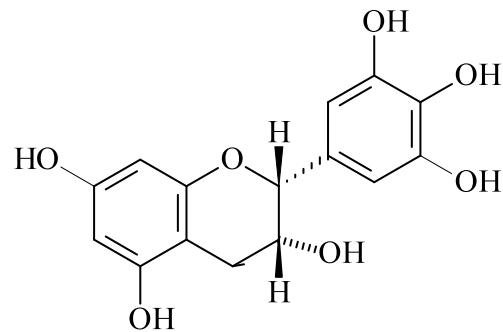
**γαλλικό οξύ**



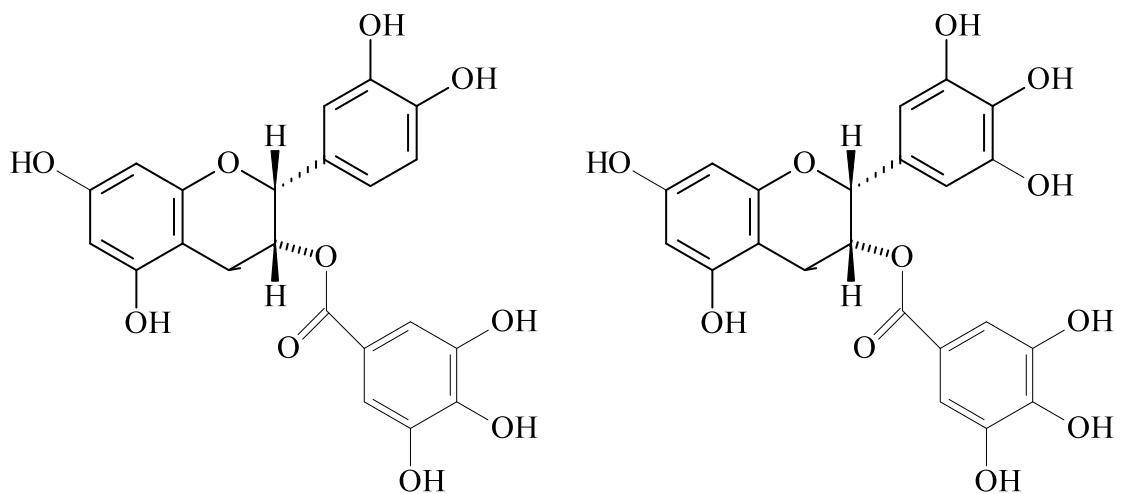
**(+)-κατεχίνη**



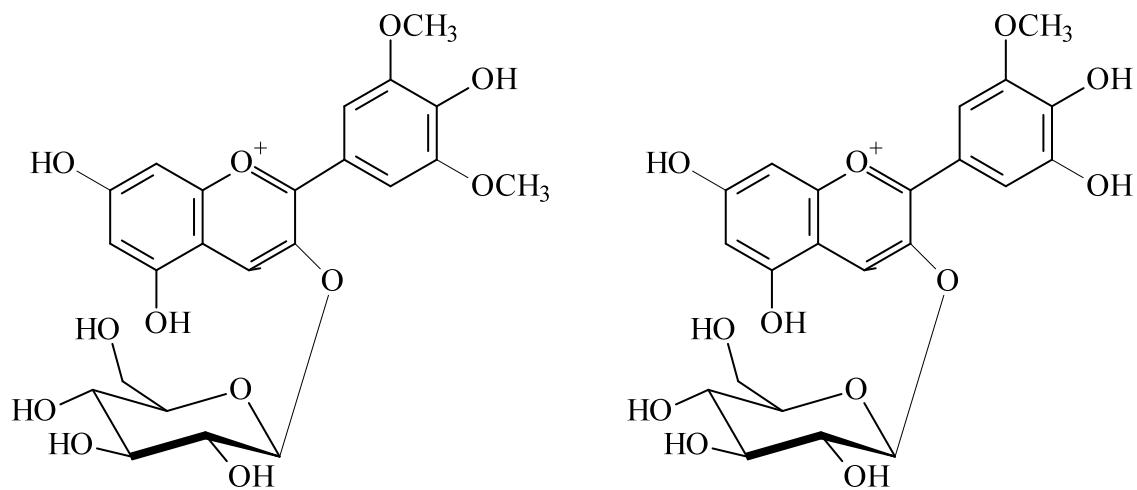
**(-)-επικατεχίνη**



**(-)-επιγαλλοκατεχίνη**

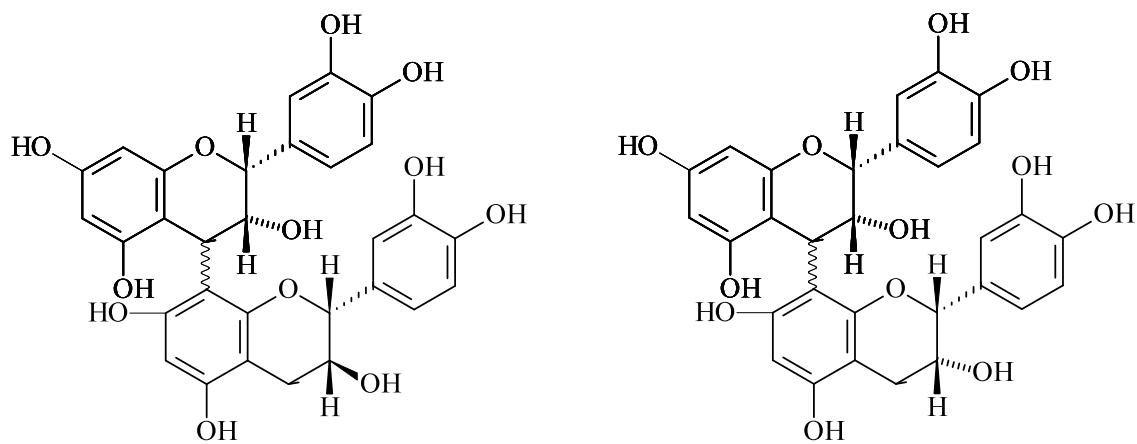


γαλλικός εστέρας της (-)-επικατεχίνης γαλλικός εστέρας της (-)-επιγαλλοκατεχίνης



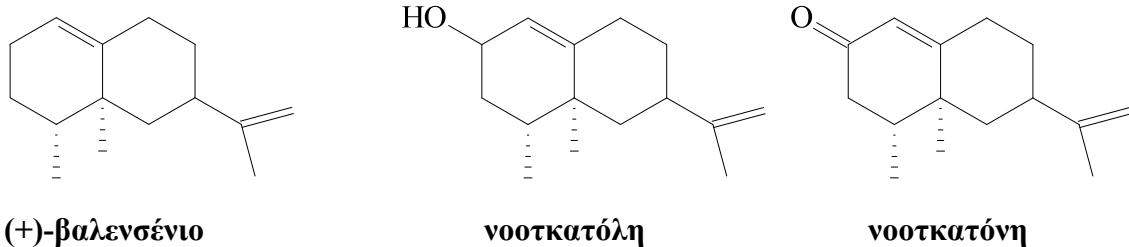
μαλβιδινο-3-O-γλυκοπυρανοσίδης

παιωνιδινο-3-O-γλυκοπυρανοσίδης



προκυανιδίνη B<sub>1</sub>

προκυανιδίνη B<sub>2</sub>



Αν όμως η φυτοχημεία του *Vitis vinifera* είναι ιδιαίτερα ελκυστική για τους επιστήμονες, άλλο τόσο ελκυστικά είναι και τα φαρμακολογικά αποτελέσματα που αναδύονται συνεχώς για το φυτό, αλλά και για τους μεταβολίτες του (Πίνακας 2).

ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΗ	
<b>Αντιοξειδωτική</b>	
<b>Προστασία στη στεφανιαία νόσο, την υπέρταση και άλλες καρδιαγγειακές παθήσεις</b>	
<b>Αντικαρκινική</b>	
<b>Σε ασθένειες του ΚΝΣ</b>	
<b>Αντιβακτηριακή</b>	
<b>Στους οιστρογονικούς υποδοχείς</b>	
<b>Σε κρυώματα και βήχα</b>	
<b>Κατά της ουρικής αρθρίτιδας και ρευματοειδών παθήσεων</b>	
<b>Κατά των τσιμπημάτων εντόμων</b>	
<b>Σε αφροδίσια νοσήματα</b>	

Πίνακας 2. Φαρμακολογικές δράσεις του φυτού *Vitis vinifera* και των δευτερογενών μεταβολιτών του.

Στον παραπάνω πίνακα περιέχονται συνοπτικά οι φαρμακολογικές ιδιότητες του *Vitis vinifera* και των δευτερογενών μεταβολιτών του, όπως αυτές προκύπτουν από στοιχεία της διεθνής βιβλιογραφίας. Ακολουθεί μία πιο αναλυτική προσέγγιση του φαρμακολογικού δυναμικού του φυτού.

➤ **Αντιοξειδωτική δράση:** Ισως αποτελεί την πιο διαδεδομένη δράση του σταφυλιού. Είναι γνωστή η πλούσια σε αντιοξειδωτικές ουσίες, περιεκτικότητα των σταφυλιών, όπως φλαβονοειδή, στιλβένια, ανθοκυανίνες κ.α. Εκχυλίσματα που προέρχονται από κόκκινα σταφύλια κυρίως, έχουν επιδείξει σημαντική αντιοξειδωτική ικανότητα η οποία μάλιστα αυξάνεται αναλογικά με το ποσοστό των πολυφαινολικών μορίων που περιέχουν (Negro C. *et al.*, 2003). Επιπλέον, εκχυλίσματα από σπέρματα, φλοιούς, αλλά και από ολόκληρα σταφύλια, εμφανίζουν σπουδαία παρεμποδιστική δράση έναντι των ελευθέρων ριζών, γεγονός που επίσης συνδέεται με το πολυφαινολικό δυναμικό τους (Caillet S. *et al.*, 2006).

Έχουν ακόμα μελετηθεί ως προς τη συγκεκριμένη δράση και οι μεταβολίτες που απομονώθηκαν από τα σταφύλια. Τα φλαβονοειδή είναι πολύ γνωστά αντιοξειδωτικά με δράση που κυμαίνεται ανάλογα με τη δομή τους (Heim K.E. *et al.*, 2002). Μία ακόμα κατηγορία ουσιών που απαντούν στα σταφύλια και παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση, είναι τα στιλβένια. Η ρεσβερατρόλη ειδικότερα, η οποία είναι και ο κυριότερος εκπρόσωπός τους, ασκεί έντονη αντιοξειδωτική δράση και προστατεύει τα κύτταρα του οργανισμού από το οξειδωτικό stress. Αυτή η προστατευτική δράση αποκτά μεγαλύτερη σημασία στα κύτταρα του καρδιαγγειακού συστήματος (Li Y. *et al.*, 2006). Την ίδια δραστικότητα έναντι των ελευθέρων ριζών εμφανίζουν και οι ανθοκυανίδινες οι οποίες είναι επίσης υπεύθυνες για τον χρωματισμό των σταφυλιών (Stintzing F.C. & Carle R., 2004). Πρόσφατα αποδείχθηκε μία ακόμα θετική επίδραση των ανθοκυανίδινων που είναι αποτέλεσμα της αντιοξειδωτικής ικανότητάς τους. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η ευεργετική επίδρασή τους στις επιπλοκές που προκαλεί ο διαβήτης (καρδιαγγειακές παθήσεις, νεφροπάθεια, νευροπάθεια, προβλήματα στον αμφιβληστροειδή). Σε διαβητικούς ασθενείς έχουν βρεθεί υψηλά επίπεδα ελευθέρων ριζών οι οποίες είναι ενδεικτικοί δείκτες οξειδωτικού stress που θεωρείται ότι συμβάλλει στην εκδήλωση διαβήτη και των επιπλοκών του. Οι ανθοκυανίδινες σε συνέργεια με τις υπόλοιπες αντιοξειδωτικές ουσίες που υπάρχουν στα εκχυλίσματα του σταφυλιού, παρεμποδίζουν την οξείδωση των κυττάρων του παγκρέατος που παράγουν ινσουλίνη, αποτελώντας ένα προστατευτικό μέσο στην εμφάνιση διαβήτη (Rahimi R. *et al.*, 2005).

➤ **Προστατευτική δράση σε καρδιαγγειακές παθήσεις:** Έχει αναφερθεί ο προστατευτικός ρόλος εκχυλίσματος που προέρχεται από τα σταφύλια σε καταστάσεις

ισχαιμικού επεισοδίου και θεωρείται ανάλογος ενδογενών παραγόντων , όπως η βραδυκινίνη και η αδενοσίνη (Gross G.J., 2005). Ακόμα , έχει διαπιστωθεί η καρδιοπροστατευτική ικανότητα ενός υδαταλκοολικού εκχυλίσματος που έχει προέλθει από σταφύλια . Πιο συγκεκριμένα , τόσο σε *in vivo* πειρά ματα όσο και σε κλινικές δοκιμές έχει αποδειχθεί η ικανότητά του να εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες , η προστασία που παρέχει στα κύτταρα του μυοκαρδίου, η ελάττωση της πιθανότητας αθηρογένεσης με αποτέλεσμα την αντιμετώπιση της υπερχοληστερολαμίας και γενικότερα την καλύτερη λειτουργία της καρδιάς (Bagchi D. *et al.*, 2003). Παράλληλα, κλινικές έρευνες οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η κατανάλωση μέτριων ποσοτήτων χυμού από ερυθρές ποικιλίες σταφυλιού βελτιώνει τη λειτουργία του ενδοθηλίου σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο χωρίς να προκαλούνται δυσμενή αποτελέσματα στον μεταβολισμό των λιπών και της γλυκόσης (Chou E.J., *et al.*, 2001).

Πέρα από τη χρησιμότητα δρογών από τα σταφύλια , δεν πρέπει σε καμία περίπτωση να αγνοηθεί και ο φαρμακολογικός ρόλος των δευτερογενών μεταβολιτών (κυρίως πολυφαινολών) που έχουν απομονωθεί από αυτά. Οι πολυφαινόλες που έχουν απομονωθεί από τα παράγωγά του , εμφανίζουν ευεργετική δράση στην υπέρταση, τη στεφανιαία νόσο και άλλες καρδιαγγειακές παθήσεις. Έχει διαπιστωθεί μία αντίστροφη σχέση μεταξύ της πρόσληψης πολυφαινολών και της εκδήλωσης καρδιαγγειακών παθήσεων, καθώς μέσω διαφόρων πιθανών μηχανισμών (αυξημένη παραγωγή NO, μείωση της συγκόλλησης αιμοπεταλίων κ.α.), προκαλούν αγγειοδιαστολή και καλύτερη λειτουργία της καρδιάς (Dell' Agli M. *et al.*, 2004; Stoclet J.C. *et al.*, 2004). Τα φλαβονοειδή επίσης που είναι από τα πιο συνηθισμένα προϊόντα των σταφυλιών, μειώνουν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και εμποδίζουν την οξείδωση της πρωτεΐνης LDL, με αποτέλεσμα την ελάττωση των επιπέδων χοληστερίνης στο αίμα και τη μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακών παθήσεων. Ανάλογη δραστικότητα παρουσιάζει και η ρεσβερατρόλη που ανήκει στην κατηγορία των στιλβενοειδών και είναι το πιο δημοφιλές μόριο που υπάρχει στα σταφύλια (Etherton P.M.K. *et al.*, 2002). Σημαντική δράση εμφανίζουν και ορισμένα πολυμερή που συναντώνται στα σταφύλια, όπως είναι οι προκυανιδίνες . Οι μεταβολίτες αυτοί εμποδίζουν την οξείδωση της πρωτεΐνης LDL και κατά συνέπεια τη δημιουργία αθηροσκλήρυνσης , γεγονός που προστατεύει την ομαλή καρδιακή λειτουργία (Da Silva P.A.I. *et al.*, 2003).

➤ **Αντικαρκινική δράση:** Οι αντικαρκινικές ιδιότητες των σταφυλιών φαίνεται ότι είναι γνωστές από την αρχαιότητα, καθώς ο Ορειβάσιος αναφέρει ως ένα θεραπευτικό σχήμα ενάντια στον καρκίνο, τον συνδυασμό μολύβδου, ελαίου τριανταφύλλων, ελαιόλαδου και ανώριμων σταφυλιών (Karpozilos A. & Pavlidis N., 2004). Στη σύγχρονη εποχή, η χημειοπροστατευτική δράση του φυτού έχει ελεγχθεί σε *in vivo* πείραμα σε καρκίνο δέρματος των ποντικιών, κατά το οποίο δημιούργησε πολλοί όγκοι στην επιφάνεια του δέρματος. Αποδείχθηκε ότι το αιθανολικό εκχύλισμα του σταφυλιού παρατείνει τη λανθάνουσα κατάσταση των όγκων και μειώνει τον αριθμό τους. Η αντιοξειδωτική δράση των συστατικών του που εκφράζεται με την παρεμπόδιση των ελευθέρων ριζών, προσφέρει ένα λογικό μηχανισμό που εξηγεί τις χημειοπροστατευτικές ικανότητες του εκχυλίσματος (Alam A. et al., 2002). Εξάλλου, πολλά από τα συστατικά της διατροφής που θεωρούνται ευεργετικά στην καταπολέμηση του καρκίνου, συναντώνται στα σταφύλια (ρεσβερατρόλη, κερκετίνη κ.α.). Αυτό τα τοποθετεί στα πιο ωφέλιμα για την υγεία τρόφιμα, καθώς αποτελούν μία σημαντική πηγή πρόσληψης ουσιών με προστατευτικές ικανότητες ενάντια στον καρκίνο (Chen C. & Kong A.N.T., 2005).

Οι πολυφαινόλες του σταφυλιού θεωρούνται αποτελεσματικές στην αντιμετώπιση της παρουσίας ογκογόνων παραγόντων σε πολλές τροφές. Οι παράγοντες αυτοί είτε προϋπάρχουν είτε δημιουργούνται κατά την προετοιμασία του τροφίμου για κατανάλωση. Τα φλαβονοειδή των σταφυλιών ανήκουν στην κατηγορία των ουσιών που μπορούν να επηρεάσουν τον μεταβολισμό των ογκογόνων παραγόντων των τροφίμων και να τα αδρανοποιήσουν. Αυτό το επιτυγχάνουν με την επαγωγή διαφόρων ενζυμικών συστημάτων (Stavric B., 1994). Η ρεσβερατρόλη επίσης, εμφανίζει σημαντική αντικαρκινική δράση και θεωρείται ένα από τα πιο αποτελεσματικά αντινεοπλασματικά μόρια φυτικής προέλευσης. Μπορεί να συμμετέχει σε θεραπευτικά σχήματα μαζί με τα κλασικά αντικαρκινικά φάρμακα, να αυξάνει την ευαισθησία του όγκου σ' αυτά και να μειώνει τις ανεπιθύμητες ενέργειές τους (D' Incalci M., 2005). Γνωστά για την αντικαρκινική δράση τους είναι και παράγωγα του φλαβανίου (κατεχίνη, επικατεχίνη, επιγαλλοκατεχίνη κ.α.) που απαντώνται στα σταφύλια (Azam S. et al., 2004).

➤ **Δράση σε ασθένειες του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος:** Η κατανάλωση σταφυλιών προσφέρει σε κάποιο ποσοστό, προστασία από παθήσεις νευρογενούς

φύσης. Αυτό οφείλεται, όπως σχεδόν και το σύνολο των δράσεών τους, στην υψηλή περιεκτικότητά τους σε αντιοξειδωτικές ουσίες. *In vivo* μελέτες έχοντας αποδείξει τον προστατευτικό ρόλο μορίων όπως η κερκετίνη, η ρεσβερατρόλη και η κατεχίνη σε κάποιους τύπους νευροτοξικότητας. Επιπρόσθετα, έχει διαπιστωθεί ότι η ενδοπεριτοναϊκή ένεση ρεσβερατρόλης προστατεύει τον εγκέφαλο από τις καταστροφές που προκαλούνται από οξειδωτικές καταστάσεις, γεγονός που υποδεικνύει ότι το μόριο διέρχεται του αιματεγκεφαλικού φραγμού (Russo A. et al., 2003). Θεωρείται ακόμα αποδεκτό ότι η ρεσβερατρόλη είναι αποτελεσματική στην νόσο Alzheimer λόγω της αντιοξειδωτικής δράσης της. Χρήσιμη είναι επίσης και τα φλαβονοειδή και μπερόλη και κερκετίνη (Anenkoda T.S. & Reddy P.H., 2005). Συνεπώς η λήψη σταφυλιών, αλλά και άλλων τροφίμων φυτικής προέλευσης, ισχυροποιεί τον ανθρώπινο οργανισμό έναντι των νευρογενών παθήσεων, όπως η νόσος του Parkinson και η νόσος Alzheimer αφού τον προσφέρει ένα σύνολο αντιοξειδωτικών συστατικών. Ωστόσο πρέπει να σημειωθεί ότι η ευεργετική δράση περιορίζεται στα υγιή νευρικά κύτταρα και δεν θεραπεύει τα ήδη νοσούντα (Esposito E. et al., 2002).

➤ **Αντιβακτηριακή δράση:** Εκχυλίσματα σταφυλιού έχουν εμφανίσει αντιβακτηριακή δράση σε πληθώρα *in vitro* πειραμάτων η οποία αποδίδεται στους πολυνφαινολικούς μεταβολίτες που περιέχουν. Πιο συγκεκριμένα, σκόνη που προερχόταν από ερυθρές ποικιλίες σταφυλιού εκχυλίστηκε με διάφορους διαλύτες, όπως  $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{OH}$ , EtOH και  $\text{H}_2\text{O}$ , σε διάφορους συνδυασμούς και δημιουργήθηκαν εκχυλίσματα τα οποία ελέγχθησαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ως προς τη δράση τους έναντι 15 στελεχών μικροοργανισμών όπως *Bacillus brevis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* κ.α. Τα αποτελέσματα ήταν άκρως ενθαρρυντικά αφού αποδείχθηκε ότι τα εκχυλίσματα ήταν δραστικά σε συγκεντρώσεις 4% και 20%. Μάλιστα, βρέθηκε ότι πιο αποτελεσματικό απ' όλα τα μόρια του εκχυλίσματος ήταν το γαλλικό οξύ. Η δράση αυτή είναι ι διαίτερα σημαντική, καθώς τα εκχυλίσματα σταφυλιών μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν αντιβακτηριακοί παράγοντες για την προστασία των τροφίμων από την αλλοίωση που προκαλούν τα βακτήρια. Μ' αυτόν τον τρόπο διατηρούνται και οι οργανοληπτικές ιδιότητες των τροφίμων (Baydar N.G. et al., 2004).

➤ **Δράση στους οιστρογονικούς υποδοχείς:** Στα σταφύλια συναντώνται δευτερογενείς μεταβολίτες που δρουν με διαφορετικό τρόπο στους οιστρογονικούς υποδοχείς. Η ρεσβερατρόλη σε χαμηλές δόσεις είναι ένας ισχυρός οιστρογονικός αγωνιστής, η κατεχίνη εμφανίζει ασθενή οιστρογονική δράση, ενώ η κερκετίνη δρα ισχυρώς ανταγωνιστικά (Ratna W.N. & Simonelli J.A., 2002). Επομένως, τα σταφύλια αποτελούν μία πηγή φυσικών συστατικών με αντίθετες ιδιότητες, αλλά με πολύ σημαντικές δυνητικές χρήσεις, καθώς τα μόρια με οιστρογονική δράση μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη μετεμμηνοπαυσιακή οιστρογονική θεραπεία υποκατάστασης, περιορίζοντας τον κίνδυνο εμφάνισης οστεοπόρωσης και καρδιαγγειακών παθήσεων στις γυναίκες και αυτά με αντιοιστρογόνο δράση σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού ή καρκίνο του προστάτη.

➤ **Δράσεις στη λαϊκή θεραπευτική:** Η παρουσία των σταφυλιών στη διατροφή είναι γνωστή από τα αρχαία χρόνια και ως εκ τούτου έχουν χρησιμοποιηθεί και στη θεραπεία διαφόρων ασθενειών. Ανατρέχοντας κανείς στις λαϊκές θεραπευτικές πρακτικές, συναντά συνταγές που περιέχουν τα σταφύλια αυτούσια ή και προερχόμενες από αυτά δρόγες (χυμός, κ.α.). Πρέπει να σημειωθεί ότι στα σταφύλια και τα παράγωγα δεν υπολογίζεται ο οίνος ο οποίος εξαιτίας της πολλαπλής θεραπευτικής χρήσης του, εξετάζεται χωριστά.

Τα ξηρά σταφύλια είναι γνωστά για την ευεργετική δράση που έχουν σε κρυώματα και για τη χρήση τους ως αντιβηχικά σε περιοχές της νότιας Ιταλίας. Χρησιμοποιούνται μόνα τους ή σε αφεψήματα μαζί με μολόχες, σύκα, σπέρματα και ρίζες μάραθου και μήλα. Ακόμα, για τον ίδιο λόγο χρησιμοποιούνται και οι βόστρυχοι (Guarrera P.M. *et al.*, 2005). Επιπρόσθετα, το γλεύκος (μούστος) αξιοποιείται θεραπευτικά στην κεντρική Ιταλία. Συγκεκριμένα, βράζεται και χρησιμοποιείται ως στυπτικό, αντιρρευματικό και κατά της ουρικής αρθρίτιδας (Guarrera P.M., 2003). Στην ίδια περιοχή χρησιμοποιούνται τα αμπελόφυλλα υπό μορφή αφεψήματος, τόσο ως προστατευτικά στα τσιμπήματα των εντόμων όσο και σε καταστάσεις ψωρίασης (Guarrera P.M., 1999). Και σε περιοχές εκτός Ευρώπης, όπως στην Ινδία τα σταφύλια συμμετέχουν σε πρακτικές λαϊκής θεραπευτικής. Ο πολτός λοιπόν που δημιουργείται από θρυμματισμένα σταφύλια, θεωρείται από ορισμένες φυλές ευεργετικός σε αφροδίσια νοσήματα. Στους άνδρες αυξάνει τις σεξουαλικές ικανότητες, ενώ στις

γυναίκες δίνεται κατά της λευκόρροιας και της εμμηνορραγίας (Jain A. et al., 2004). Επιπρόσθετα, στο Μαρόκο χρησιμοποιούνται οι καρποί και τα φύλλα του φυτού *Vitis vinifera* ως προστατευτικά στην υπέρταση και άλλες ασθένειες της καρδιάς (Eddouks M. et al., 2002).

Όλες οι παραπάνω δράσεις αποδεικνύουν τη φαρμακολογική σημασία των σταφυλιών, αλλά και των μορίων που έχουν απομονωθεί από αυτά. Η πληθώρα και η ποικιλία των συγκεκριμένων δράσεων έχουν οδηγήσει στην επικράτηση της άποψης ότι μία αυξημένη πρόσληψη σταφυλιών με τη διατροφή, επιφέρει θετικά αποτελέσματα στην υγεία του ανθρώπου. Επιπλέον σε ελέγχους τοξικότητας εκχυλισμάτων που προέρχονται από σταφύλια, δεν έχουν διαπιστωθεί περιπτώσεις τοξικότητας, ενώ το ίδιο ισχύει και για εμπλουτισμένα πολυφαινολικά μίγματα που προέρχονται από σταφύλια. Χαρακτηριστικό είναι ότι σε *in vivo* δοκιμές, η οξεία θανατηφόρος δόση ενός εκχυλίσματος σταφυλιών υπολογίστηκε μεγαλύτερη των 4000mg/Kg, ενώ δεν παρατηρήθηκε τοξικότητα σε χρόνια *in vivo* πειράματα (Yamakoshi J. et al., 2002). Γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι η θανατηφόρος δόση είναι τόσο υψηλή ώστε δεν προσεγγίζεται ούτε με τη συνήθη πρόσληψη μέσω της διατροφής ούτε με την κατανάλωση των διαφόρων εμπορικών πολυφαινολικών συμπληρωμάτων.

### 1.1.2.β) Οίνος, το σημαντικότερο παράγωγο του φυτού *Vitis vinifera*

Ο οίνος αποτελεί το παράγωγο του σταφυλιού με την πιο ευρεία χρήση. Ως οίνος καλείται το ποτό που προέρχεται αποκλειστικά από ολική ή μερική αλκοολική ζύμωση νωπών σταφυλιών, σπασμένων ή όχι, ή του γλ εύκους των σταφυλιών. Με τον όρο γλεύκος εννοείται ο μούστος των σταφυλιών, δηλαδή το υγρό προϊόν που λαμβάνεται φυσικώς ή με φυσικές επεξεργασίες από τα νωπά σταφύλια. Κανείς βέβαια δεν μπορεί να παραβλέψει και τα υπόλοιπα παράγωγα όπως το ξύδι, το τσίπουρο, τη σταφίδα και τον χυμό του (σταφυλόζουμο) (Κουράκου-Δραγωνά Σ., 1998). Ωστόσο, ο οίνος είναι το παράγωγο γύρω από το οποίο έχει στηθεί παγκοσμίως μία τεράστια βιομηχανία παραγωγής, διακίνησης και κατανάλωσης. Η οινοποιία έχει λάβει τεράστιες διαστάσεις

και κινείται σε επιστημονικά πλαίσια, καθώς ένα σύνολο επιστημόνων έχουν διεισδύσει στον χώρο και επιβλέπουν όλη την παραγωγική διαδικασία.

Το κρασί χρησιμοποιείται στην εποχή μας κυρίως ως ποτό που συνοδεύει τα γεύματα και στιγμές χαράς. Ωστόσο, κατά την αρχαιότητα πέρα από αυτή τη χρήση, είχε και άλλη σημασία φαρμακολογικού περιεχομένου (Πίνακας 3) (Sandler M. & Pinder R., 2003).

ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΗ
Αντισηπτική
Ηρεμιστική/καταπραϋντική
Υπνωτική
Αναισθητική
Αντιεμετική
Διεγερτικό ορέξεως
Τονωτική
Αντιαναιμική
Διουρητική
Καθαρτική (ορισμένα είδη οίνου)
Αντιδιαρροϊκή (ορισμένα είδη οίνου)
Κατάπλασμα

Πίνακας 3. Φαρμακολογικές δράσεις οίνου κατά την αρχαιότητα.

Η φαρμακολογική σπουδαιότητα του κρασιού λοιπόν είναι γνωστή από την αρχαιότητα καὶ σίγουρα εμπλουτίζεται όλο και περισσότερο στις μέρες μας, ενώ παράλληλα τεκμηριώνονται και επιστημονικά οι επιμέρους ιδιότητές του. Ακολουθούν συγκεντρωμένες οι θεραπευτικές δράσεις του οίνου.

➤ **Προστατευτική δράση σε καρδιαγγειακές παθήσεις:** Η συγκεκριμένη η ιδιότητα είναι η πιο γνωστή στο ευρύτερο κοινό και αρκετές φορές έχει γίνει προϊόν εκμετάλλευσης με σκοπό την προώθηση οικονομικών συμφερόντων διαφόρων εταιριών οίνου. Αυτό όμως σε καμία περίπτωση δεν μειώνει την πραγματική συμβολή μέχρι ένα σημείο του κρασιού, στην ομαλή λειτουργία της καρδιάς.

Η στεφανιαία νόσος είναι ένα πρόβλημα στο οποίο το κρασί φαίνεται να επιδρά ευεργετικά. Κύρια αιτία της πάθησης όπως και άλλων καρδιαγγειακών προβλημάτων είναι η αρτηριοσκλήρυνση η οποία επιταχύνεται με την οξείδωση της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL). Σε διάφορες κλινικές δοκιμές που έχουν πραγματοποιηθεί, έχει διαπιστωθεί ότι ασθενείς που κατανάλων μικρές ή μέσες ποσότητες οίνου εμφανίζαν μικρότερη θνησιμότητα από αυτούς που δεν κατανάλων καθόλου. Η μεγάλη περιεκτικότητα του οίνου σε πολυφαινολικά μόρια που έχουν αντιοξειδωτική δράση, ίσως προσφέρει ένα επιστημονικά αποδεκτό μηχανισμό της θετικής επίδρασης που αυτό έχει σε άτομα με στεφανιαία νόσο. Η αντιοξειδωτική αυτή δράση προστατεύει τη λιποπρωτεΐνη LDL από την οξείδωση και επομένως καθυστερεί την αρτηριοσκλήρυνση. Έχει επιπλέον διαπιστωθεί σε έρευνες που έχουν γίνει σχετικά με την κατανάλωση κόκκινων κρασιών ότι παρατηρούνται αυξημένα ποσοστά της λιποπρωτεΐνης υψηλής πυκνότητας (HDL) και μειωμένη συγκόλληση αιμοπεταλίων (Cordova A.C. *et al.*, 2005; German J.B. & Walzem R.L., 2000). Ανάλογα ενθαρρυντικά αποτελέσματα έχουν επιδείξει και πειράματα με λευκά κρασιά, αν και είναι γνωστό ότι περιέχουν μικρότερο ποσοστό πολυφαινολικών από τα κόκκινα (Lamuela-R.R.M. & De la Torre B.M.C., 1999).

Η δραστικότητα των πολυφαινολικών μορίων στην καταπολέμηση της συγκεκριμένης πάθησης έχει αποδειχθεί και με πειράματα μεμονωμένων τέτοιων μορίων που έχουν απομονωθεί από το κρασί η άλλες φυτικές πηγές όπως η σόγια, η σοκολάτα, το τσάι κ.α. (Visioli F. *et al.*, 2000).

Σχετικό με αυτήν την πραγματικά πολύ ωφέλιμη δράση του οίνου είναι ένα φαινόμενο που εμφανίζεται για πρώτη φορά στη διεθνή βιβλιογραφία το 1992 (Renaud S. & De Lorgeril M., 1992) και ονομάζεται ''Γαλλικό παράδοξο'' (French paradox). Η αρχή για τη διατύπωση αυτού του φαινομένου έγινε με τη διεξαγωγή κλινικών ερευνών σε παγκόσμια κλίμακα, σχετικά με τη σχέση μίας δίαιτας πλούσιας σε λιπαρά και μεγάλου αριθμού θερμίδων με τη θνησιμότητα από στεφανιαία νόσο. Η σχέση αυτή αποδείχθηκε ότι ήταν ανάλογη. Ωστόσο, σε κάποιες περιοχές της Γαλλίας, η θνησιμότητα ήταν εμφανώς χαμηλότερη (περίπου στο 1/3) από αυτή στις ΗΠΑ και στη Μ. Βρετανία και ήταν πιο κοντά στις στατιστικές που παρατηρούνται στην Κίνα και την Ιαπωνία. Το γεγονός αυτό φάνταζε αρχικά παράδοξο, καθώς η ημερήσια λίγη λίπους

από τους Γάλλους ήταν ίδια με αυτή στις άλλες χώρες. Ως εκ τούτου, οι επιστήμονες επεδίωξαν να διακρίνουν τη διαφορά στη διατροφή των χωρών αυτών. Αρχικά θεώρησαν ότι οι Γάλλοι ζουν μία λιγότερο αγχώδη ζωή, με χαμηλότερα ποσοστά καπνίσματος και μικρότερο σωματικό βάρος, κάτι όμως που δεν ισχύει αφού και οι τρεις δείκτες που αναφέρθηκαν είναι ίδιοι στη Γαλλία και τον υπόλοιπο δυτικό κόσμο. Μετά από πιο εκτεταμένες μελέτες διαπιστώθηκε ότι οι Γάλλοι κατανάλωναν μεγαλύτερη ποσότητα κόκκινου κρασιού στα γεύματά τους και σ' αυτό αποδόθηκε η χαμηλή θνησιμότητά τους (Stanley L.L. & Mazier M.J.P., 1999).

Στη θετική επίδραση του κρασιού στην αντιμετώπιση της στεφανιαίας νόσου συμβάλλει και η περιεχόμενη ποσότητα αλκοόλ ης. Σήμερα, είναι επιστημονικά αποδεκτό ότι μία μέτρια λήψη αλκοόλης ημερησίως, μειώνει κατά 20-30% τη θνησιμότητα από στεφανιαία νόσο σε σχέση με τη μηδενική λήψη. Η αιτιολογία του γεγονότος αυτού αναζητείται στα χαμηλά επίπεδα της LDL, σε συνδυασμό με τα υψηλά επίπεδα HDL που προστατεύουν από την αρτηριοσκλήρυνση. Βέβαια, πρέπει να σημειωθεί ότι αναφερόμαστε σε λήψη μέτριας ποσότητας αλκοόλ, καθώς σε μεγάλες δόσεις το αλκοόλ είναι καταστροφικό για τον άνθρωπο, τόσο άμεσα (κίρρωση ήπατος, καρδιακά και νεφρ ολογικά προβλήματα), όσο και έμμεσα (πρόκληση τροχαίων ατυχημάτων κ.λπ.) (Sandler M. & Pinder R., 2003).

➤ **Αντικαρκινική δράση:** Η μέτρια κατανάλωση κρασιού συνδέεται ακόμα και με τη μείωση της θνησιμότητας από καρκίνο κατά 1/3 (Adami H.O. *et al.*, 2001). Αυτό είναι πολύ σημαντικό αφού υπάρχει η άποψη ότι τα αλκοολούχα ποτά αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης διαφόρων μορφών καρκίνου, όπως ο καρκίνος του προστάτη. Ωστόσο φαίνεται ότι η κατανάλωση κρασιού έχει ευεργετικές επιδράσεις σε διάφορους τύπους καρκίνου. Η ημερήσια λήψη κρασιού μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης γαστρικού καρκίνου, όπως αποδείχθηκε σε δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν σε άνδρες και γυναίκες οι οποίοι κατανάλωναν συγκεκριμένες και ελεγχόμενες ποσότητες κρασιού (Barstad B. *et al.*, 2005). Γενικότερα πάντως ο κρασί ελαττώνει την πιθανότητα εμφάνισης και άλλων καρκίνων, όπως του ανώτερου γαστρεντερικού, του πνεύμονα και του εντέρου (Bianchini F. & Vainio H., 2003). Και για αυτή τη δράση, πρωτεύοντα ρόλο διαδραματίζουν οι πολυφαινόλες του κρασιού, καθώς είνα γνωστές οι

χημειοπροστατευτικές ιδιότητές τους, κυρίως λόγω της προστασίας από το οξειδωτικό stress που παρέχουν στο DNA των κυττάρων (Dolara P. et al., 2005).

➤ **Αντιμικροβιακή δράση:** Η περιεχόμενη αλκοόλη (αντισηπτικές ιδιότητες), η χαμηλή τιμή του pH (κακό υπόστρωμα για την ανάπτυξη μικροβίων) και οι πολυφαινόλες που απαντώνται στο κρασί, του έχουν προσδώσει και αντιμικροβιακές ιδιότητες οι οποίες είναι γνωστές από την αρχαιότητα. Η κατανάλωση κρασιού συντελεί στην αντιμετώπιση εντερικών μικροβίων, όπως *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Shigella* οπότε περιορίζονται και τα συμπτώματα (διάρροια κ.λ.π.). Είναι επίσης δραστικό και κατά του μικροοργανισμού *Staphylococcus aureus* ο οποίος μολύνει τις πληγές. Συνεπώς, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και τοπικά στο δέρμα στα σημεία όπου υπάρχει πληγή και να λειτουργήσει αντισηπτικά. Γνωστή είναι επιπλέον η δραστικότητά του έναντι του βακίλλου της χολέρας και του *Elicobacter pylori* (Sandler M. & Pinder R., 2003).

➤ **Δράση σε ασθένειες του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος:** Υπάρχει σύνδεση της κατανάλωσης κρασιού με τη μείωση του κινδύνου εμφάνισης της νόσου Alzheimer. Αυτό βέβαια δεν έχει διαπιστωθεί ακόμα αν οφείλεται στην αλκοόλη ή στη χημική σύσταση του οίνου, καθώς ανάλογα αποτελέσματα έχουν προκύψει και από την κατανάλωση και άλλων οινοπνευματωδών ποτών. Θετικά αποτελέσματα έχουν επίσης αναφερθεί και για τη σχέση κατανάλωσης κρασιού και εμφάνισης σχιζοφρένειας. Θεωρείται πάντως ότι η επίδραση του κρασιού πρέπει να αναζητηθεί τόσο στην περιεχόμενη αλκοόλη όσο και στα πολυφαινολικά μόρια (Luchsinger J.A. & Mayeux R., 2004).

➤ **Άλλες δράσεις:** Επιστημονικές έρευνες έχουν οδηγήσει επίσης στο συμπέρασμα ότι μία ήπια κατανάλωση οίνου προστατεύει την ωχρή κηλίδα του ματιού από τον εκφυλισμό που προκαλεί η φθορά του χρόνου. Πιθανοί λόγοι γι' αυτό, είναι η αντιοξειδωτική δράση του οίνου και η παρεμπόδιση της συγκόλλησης των αιμοπεταλίων. Τέλος, τα τελευταία χρόνια έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι το κόκκινο κρασί σε μέτριες ποσότητες, λόγω των αντιοξειδωτικών συστατικών του, προστατεύει τον άνθρωπο από νεφρικές παθήσεις που οφείλονται στο οξειδωτικό stress (Rodrigo R. & Rivera G., 2002).

### **1.1.2.γ) Χημικές κατηγορίες φυσικών προϊόντων που απομονώθηκαν από το φυτό *Vitis vinifera***

Κατά τη φυτοχημική μελέτη του φυτού που πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της παρούσας εργασίας , απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 16 φυσικά προϊόντα που ανήκουν σε τέσσερις συνολικά χημικές κατηγορίες:

- ✓ **Στιλβένια**
- ✓ **Φλαβονοειδή**
- ✓ **Φαινολικά παράγωγα**
  - α) Φαινολικά οξέα
  - β) Φαινυλαιθανόλες
- ✓ **Αζωτούχες βάσεις**

Στις επόμενες παραγράφους παρατίθενται ορισμένα στοιχεία και οι φαρμακολογικές ιδιότητες των κατηγοριών στις οποίες ανήκουν οι ουσίες που απομονώθηκαν κατά τη φυτοχημική μελέτη του φυτού. Πρέπει να σημειωθεί ότι στην περίπτωση των φαινολικών παραγώγων, γίνεται αναφορά σε δύο φαινολικές υποομάδες (φαινολικά οξέα και φαινυλαιθανόλες), για τα φλαβονοειδή υπάρχουν στοιχεία μόνο για τα ισοφλαβονοειδή , καθώς τα μόρια που απομονώθηκαν ανήκουν σε αυτές τις υποομάδες, ενώ για τα φλαβονοειδή και την ευρύτερη κατηγορία των πολυφαινολικών μορίων, πληροφορίες υπάρχουν στις επόμενες παραγράφους αντίστοιχα.

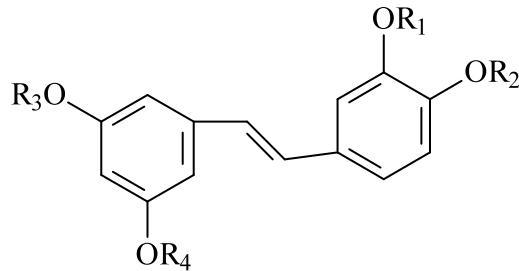
#### **A) ΣΤΙΛΒΕΝΙΑ**

Τα στιλβένια είναι πολυφαινολικές ενώσεις που παράγονται από διάφορους φυτικούς οργανισμούς ως απάντηση σε καταστάσεις stress (Schultz T.P. et al., 1990). Όταν επομένως ένα φυτό αντιμετω πίζει ένα εξωτερικό παράγοντα κινδύνου (π.χ. μικρόβια όπως ο βιοτρύπης, κακές καιρικές συνθήκες), κινεί τους μηχανισμούς σύνθεσης αυτών των ουσιών. Τα στιλβένια αλλά και τα υπόλοιπα μόρια με αμυντικές ικανότητες περιγράφονται με τον όρο φυτοαλεξίνες και η παραγωγή τους είναι άμεση συνάρτηση

του πόσο δυσμενείς είναι οι εξωτερικές συνθήκες. Η κατανομή τους στην ομάδα των φυτοαλεξινών είναι σύμφωνη με τον επιστημονικά αποδεκτό ορισμό τους, δηλαδή μόρια χαμηλού μοριακού βάρους, με αντιμικροβιακή δράση που συντίθεται όταν το φυτό εκτεθεί σε μικρόβια.

Τα στιλβένια απαντούν ευρύτατα στο φυτικό βασίλειο, καθώς ανιχνεύονται στα σταφύλια, τα φιστίκια, τα όσπρια, τον ευκάλυπτο, σε φυτά της οικογένειας *Leguminosae* και άλλοι. Μέχρι το 1980 είχαν εξακριβωθεί περίπου 100 δομές στιλβενοειδών, ενώ σήμερα είναι γνωστές περί τις 300. Πρέπει ακόμα να σημειωθεί ότι είναι αποδεδειγμένη η συνεργιστική δράση τους με άλλες ουσίες με σκοπό την προστασία του φυτού.

Ο γενικός χημικός τύπος των στιλβενίων φαίνεται στο Σχήμα 1.



Σχήμα 1. Σκελετός στιλβενίων.

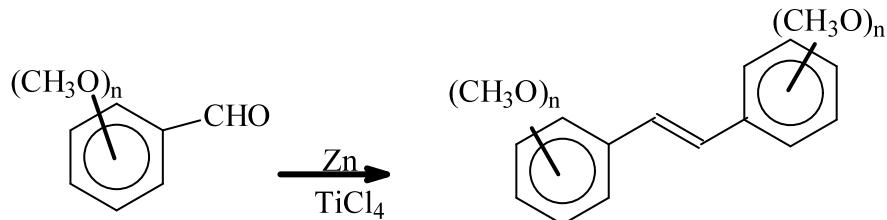
### Συνθετικές πορείες στιλβενίων

Έχουν επιχειρηθεί προσπάθειες σύνθεσης στιλβενικών παραγώγων, με κύριο στόχο τις περισσότερες φορές την παραγωγή υδροξυπαραγώγων όπως η ρεσβερατρόλη. Βέβαια, εκτός από την *in vitro* σύνθεση, υπάρχει και η *in vivo* δημιουργία τους στα πλαίσια μεταβολικών δραστηριοτήτων φυτικών οργανισμών. Παρακάτω ακολουθούν δύο παραδείγματα, ένα από κάθε περίπτωση.

#### 1) *In vitro* σύνθεση

Η σύνθεση έχει ως τελικά προϊόντα υδροξυστιλβενικά π αράγωγα και χρησιμοποιεί μεθοξυβενζαλδεΰδες ως πρόδρομα μόρια (Ali M.A. et al., 1992).

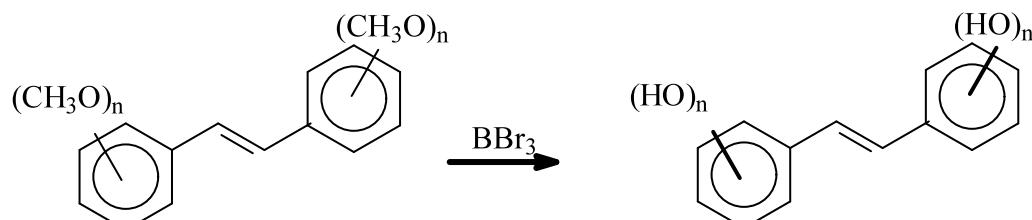
Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την παραγωγή των μεθοξυπαραγώγων από τις μεθοξυβενζαλδεύδες. Καταλυτικά δρουν τα Zn και TiCl<sub>4</sub> (Σχήμα 2).



Σχήμα 2. Πρώτο στάδιο *in vitro* σύνθεσης.

Με αυτή τη μέθοδο συνθέτονται αποκλειστικά συμμετρικά E -στιλβένια. Η σύνθεση ασύμμετρων Z-παραγώγων πραγματοποιείται με την αντίδραση Wittig, όπου οι μεθοξυβενζαλδεύδες μετατρέπονται σε μίγμα E - και Z -παραγώγων με τη βοήθεια βενζυλοβρωμιδίου και την παρουσία *tert*-βουτοξειδίου του νατρίου. Το ισομερικό μίγμα οδηγείται με ισομερείωσή του σε E -παράγωγα με θέρμανση, παρουσία ενός καταλυτικού μέσου, του διφαινυλοδισουλφιδίου σε διαλύτη τετραυδροφουράνιο (THF). Σε ορισμένες περιπτώσεις, μπορούν να απο μονωθούν τα Z -μεθοξυστιλβένια με επαναλαμβανόμενη χρωματογραφία.

Στην συνέχεια τα συμμετρικά και ασύμμετρα E -διμεθοξυστιλβένια μετατρέπονται σε E-υδροξυστιλβένια με BBr<sub>3</sub> (Σχήμα 3).

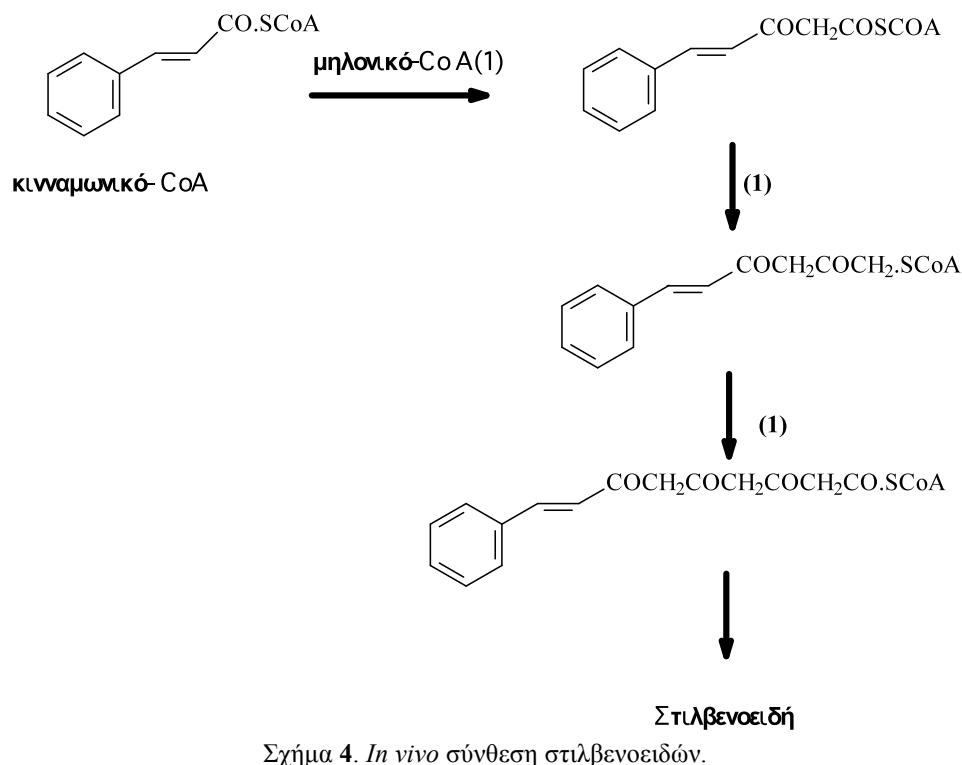


Σχήμα 3. Δεύτερο στάδιο *in vitro* σύνθεσης.

## 2) *In vivo* σύνθεση

Είναι γνωστή στους επιστήμονες η σύνθεση στιλβενίων και ειδικότερα της ρεσβερατρόλης στο φυτικό βασίλειο. Τα φιστίκια είναι ένα από τα περιορισμένα σε

αριθμό φυτά που διαθέτουν συνθετικούς μηχανισμούς στιλβενίων (ρεσβερατρόλης και αναλόγων) (Chung I.L. et al., 2003). Η ρεσβερατρόλη και τα υπόλοιπα παράγωγα συντίθενται σε συνθήκες πίεσης, όπως η επίδραση υπεριώδους φωτός, επιθέσεις από έντομα, έντονες κλιματικές δυσχέρειες και ορμονικές αλληλεπιδράσεις. Η βιοσυνθετική της πορεία εμπεριέχει την αντίδραση ενός μορίου κινναμωνοσυνένζυμου A με τρία μόρια μηλονυλοσυνένζυμου A (Σχήμα 4).

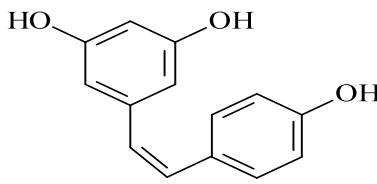


Σχήμα 4. *In vivo* σύνθεση στιλβενοειδών.

Αν και η χημική ομάδα των στιλβενίων μετρά μερικές εκατοντάδες μορίων, η ρεσβερατρόλη είναι στο προσκήνιο των επιστημονικών ερευνών και γι' αυτό πολλές φορές υπάρχει ταύτιση των στιλβενοειδών με το μόριο αυτό. Στην επόμενη παράγραφο παρουσιάζονται ορισμένα στοιχεία για τη ρεσβερατρόλη.

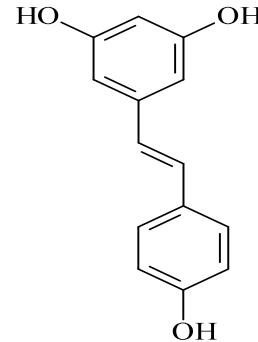
## Ρεσβερατρόλη

Η ρεσβερατρόλη αποτελεί το 3, 5, 4'-τριωδροξυστιλβένιο και απαντά σε *cis*- και *trans*-μορφή (Σχήμα 5).



**cis-ρεσβερατρόλη**

Σχήμα 5. Μορφές ρεσβερατρόλης.



**trans-ρεσβερατρόλη**

Η ρεσβερατρόλη έχει κινήσει το διεθνές επιστημονικό ενδιαφέρον εξαιτίας των σημαντικών φαρμακολογικών ιδιοτήτων της. Σήμερα, μπορεί να ανιχνευθεί σε κάποιες φυτικές πηγές, ενώ γίνεται συνεχής προσπάθεια να αυξηθεί η χημική παραγωγή της και να ανιχνευθεί σε νέες φυσικές πηγές. Η μορφή της ρεσβερατρόλης που συνήθως αναζητείται είναι η *trans*, καθώς αυτή είναι υπεύθυνη για σημαντικές θεραπευτικές ιδιότητες. Παρακάτω αναφέρονται ορισμένες από τις κύριες πηγές ρεσβερατρόλης.

**Σταφύλια και κρασί:** Η πιο γνωστή φυσική πηγή της *trans*-ρεσβερατρόλης είναι τα σταφύλια. Η ποσότητά της ποικίλει ανάλογα με την καλλιέργεια, τον χρόνο συλλογής και την πίεση από δυσμενείς συνθήκες που δέχονται οι ποικιλίες σταφυλιών που μελετώνται (Burns J. et al., 2002). Αυτό είναι ευνόητο αν σκεφτεί κανείς το γεγονός ότι η ρεσβερατρόλη είναι φυτοαλεξίνη και αυξάνεται η βιο σύνθεσή της όταν το φυτό αντιμετωπίζει κινδύνους. Η *cis*-μορφή υπάρχει επίσης στα σταφύλια, όπως και ο γλυκοσίδης της ρεσβερατρόλης στη θέση 3, ο πικεΐδης. Όλα τα παραπάνω συστατικά υπάρχουν κυρίως στον φλοιό και σε ξυλώδη μέρη, όπως η ρίζα και τα κλαδιά.

Το κρασί που είναι το πιο διαδεδομένο παράγωγο των σταφυλιών περιέχει επίσης ρεσβερατρόλη. Στο κόκκινο κρασί έχει αναφερθεί η παρουσία *trans*-ρεσβερατρόλης σε μεγαλύτερη ποσότητα από το λευκό (Bavarese L. et al., 1999). Χαρακτηριστικό είναι ότι η μέση περιεκτικότητα της *trans*-ρεσβερατρόλης σε κόκκινα ελληνικά κρασιά, είναι υπερεκατονταπλάσια της αντίστοιχης περιεκτικότητας σε λευκά ελληνικά κρασιά (Dourtoglou V.G. et al., 1999). Το ποσοστό ρεσβερατρόλης παρουσιάζει διακυμάνσεις ανάλογα με την ποικιλία του κρασιού και τον τόπο

παραγωγής του (κλίμα κ.α.). Τα ανάλογα της ρεσβερατρόλης υπάρχουν και στο λευκό κρασί σε μικρότερο ποσοστό.

**Φιστίκια:** Έχει διαπιστωθεί η παρουσία *trans*-ρεσβερατρόλης και του γλυκοσίδη της (πικεΐδης). Ωστόσο, η ποσότητά τους είναι πολύ μικρή.

**Τσάι:** Η *trans*-ρεσβερατρόλη έχει ανιχνευθεί στα κλαδιά και στα φύλλα. Ο γλυκοσίδης της έχει επίσης βρεθεί στο τσάι, σε πολλές περιπτώσεις μάλιστα σε υψηλό ποσοστό.

**Άλλα φυτά:** Μεγάλες συγκεντρώσεις στιλβενοειδών ανευρίσκονται στο ξύλο φυτών των γενών *Pinus* και *Eucalyptus* και σε αποταμιευτικούς ιστούς των *Dioscorea*, *Tamus* και *Rheum* (Creasy G.L., 2002).

Η ρεσβερατρόλη εμφανίζει πλούσια φαρμακολογική δράση ώστε να θεωρείται σήμερα ένα δραστικό μέσο στην αντιμετώπιση δύσκολων παθολογικών καταστάσεων για τον άνθρωπο και να συμπεριλαμβάνεται στα πιο δραστικά μόρια φυτικής προέλευσης. Οι δράσεις της συνοψίζονται παρακάτω.

➤ **Αντιοξειδωτική δράση:** Η δράση αυτή είναι η χαρακτηριστικότερη για τη ρεσβερατρόλη και σ' αυτή στηρίζονται όλες σχεδόν οι υπόλοιπες βιολογικές ιδιότητές της. Η αντιοξειδωτικότητά της οφείλεται στην καταστροφή που προκαλεί στις ελεύθερες ρίζες και επομένως στην προστασία που παρέχει στα κύτταρα. Επιπλέον, πρέπει να σημειωθεί ότι προστατεύει τα κύτταρα και με την αναστολή της οξείδωσης των λιπιδίων της μεμβράνης τους (Fremont L., 2000).

➤ **Αντικαρκινική δράση:** Η *trans*-ρεσβερατρόλη επιδεικνύει χημειοπροστατευτική δράση ενάντια στον καρκίνο. Δρα ως αντιοξειδωτικός και αντιμεταλλαξιογόνος παράγοντας. Επάγει τα μεταβολικά ένζυμα της φάσης II, εμφανίζοντας δραστικότητα στην έναρξη της καρκινογένεσης (anti-initiation active). Επίσης, αναστέλλει τη δράση της κυκλοξυγενάσης (COX) και της υπεροξειδάσης και έχει και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και επομένως αντιπροαγωγική επίδραση επί του καρκίνου (antipromotion active) (Signorelli P. & Ghidoni R., 2005). Τέλος, αυξάνει τη διαφοροποίηση των προμυελωτικών κυττάρων (antiprogression active) (Jang M. et al., 1997).

Στις μέρες μας, η χρήση ενέσιμων χημειοπροστατευτικών αναδεικνύεται σε ένα από τα ισχυρότερα μέσα αντιμετώπισης του καρκίνου. Επιπλέον, από τα πιο ευρέως

χρησιμοποιούμενα φάρμακα είναι τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη (πχ. ινδομεθακίνη) τα οποία αναστέλλουν τη δράση της κυκλοξυγενάσης. Η COX καταλύει τη σύνδεση του αραχιδονικού οξέος με προφλεγμονώδεις παράγοντες και διεγείρει την ανάπτυξη κυτταρικών όγκων και την αποδοτικότητα των αντισωμάτων. Επιπρόσθετα, η COX προκαλεί καρκινογένεση με καταστροφή του γενετικού υλικού. Σύμφωνα με τα παραπάνω, η καταστολή της δράσης της COX είναι σημαντική στην καρκινοθεραπεία. Γι' αυτό το λόγο οι επιστήμονες στράφηκαν σε φυτικά εκχυλίσματα και η ρεσβερατρόλη αποτελεί πια ένα σημαντικό μέσο στο σύνολο των αντικαρκινικών όπλων. Τελευταία μάλιστα γίνεται λόγος για τη χρησιμότητά της στον καρκίνο του στήθους (Le Corre L. et al., 2005).

➤ **Προστατευτική δράση σε καρδιαγγειακές παθήσεις:** Μειώνει τη συχνότητα εμφάνισης θρόμβωσης της στεφανιαίας αρτηρίας (CHD). Πολλές έρευνες έχουν δείξει ότι η ρεσβερατρόλη είναι ένα δραστικό αντιοξειδωτικό. Αναστέλλοντας την υπεροξείδωση της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL), εμποδίζει τις βλαβερές συνέπειες της οξειδωμένης LDL και προστατεύει τα κύτταρα από την υπεροξείδωση των λιπών. Πιστεύεται ότι εξαιτίας της εξαιρετικής περιεκτικότητας της σε υδρόφιλες και λιπόφιλες ομάδες η *trans*-ρεσβερατρόλη παρέχει υψηλότερο επίπεδο προστασίας από άλλα γνωστά αντιοξειδωτικά, όπως οι βιταμίνες C και E. Η μείωση της συγκόλλησης των αιμοπεταλίων από τη ρεσβερατρόλη έχει επίσης αποδειχθεί, γεγονός που αναστέλλει την αθηροσκλήρωση. Αυτό επιτυγχάνεται με την αναστολή του ενζύμου COX (Bradamante S. et al., 2004; Kopp P., 1998). Επιπρόσθετα, η ρεσβερατρόλη αυξάνει τα επίπεδα του NO οπότε προκαλείται αγγειοδιαστολή η οποία λειτουργεί ευεργετικά στην καρδιαγγειακή λειτουργία (Fremont L., 2000).

Σε όλα παραπάνω οφείλεται πιθανότατα κατά μεγάλο ποσοστό, το ''Γαλλικό παράδοξο''. Θεωρείται δηλαδή πως οι ποικιλίες κρασιού στη Γαλλία περιέχουν μεγάλα ποσά ρεσβερατρόλης.

➤ **Αντιμικροβιακή δράση:** Η *trans*-ρεσβερατρόλη ως φυτοαλεξίνη που είναι, έχει αντιμικροβιακές ιδιότητες. Επιπλέον, πρόσφατα διαπιστώθηκε η αντιμικροβιακή δράση δύο νέων τετραμερών της (Pols J.R.Z. et al., 2002). Τα δύο αυτά νέα φυσικά προϊόντα ονομάστηκαν οπεαφαινόλη και ισοπεαφαινόλη και απομονώθηκαν από τον φλοιό του βλαστού του φυτού *Vatica oblongifolia*. spp. *oblongifolia* μαζί με το γνωστό φυσικό

τετραμερές της *trans*-ρεσβερατρόλης, τη βατικαφαινόλη . Επέδειξαν σημαντική δραστικότητα ενάντια στους ανθεκτικούς στη μεθικιλίνη οργανισμούς *Staphylococcus* και *Mycobacterium smegmatis*.

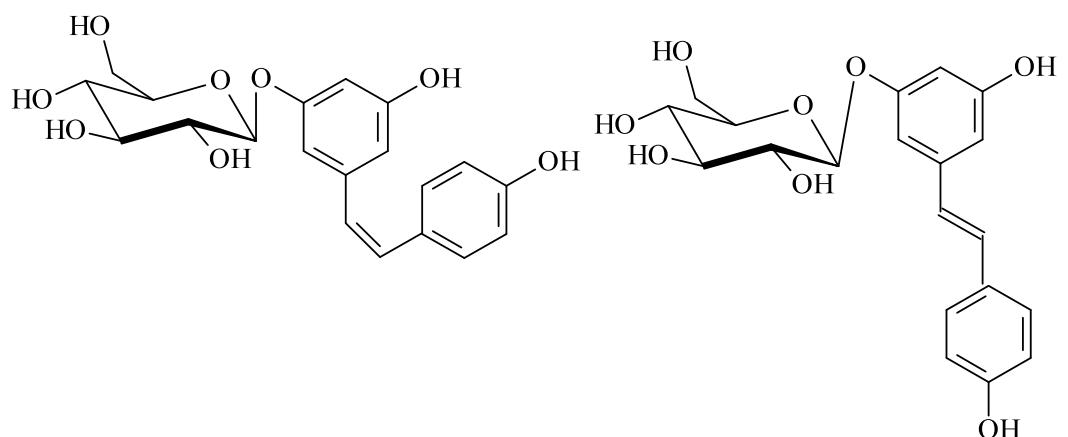
- **Αντιγηραντική δράση:** Έχει αποδειχθεί ότι η *trans*-ρεσβερατρόλη παρατείνει τον χρόνο ζωής του μύκητα *Saccharomyces cerevisiae*, γεγονός που την υποδεικνύει ως ένα πιθανό αντιγηραντικό παράγοντα στη θεραπεία των ανθρώπινων παθήσεων που προκαλούνται από τη γήρανση. Ο μηχανισμός δράσης της *trans*-ρεσβερατρόλης ήταν η κινητοποίηση του ενζύμου SIR2 το οποίο σχετίζεται με κυτταρικές λειτουργίες που προκαλούν επέκταση του χρόνου ζωής οργανισμών, όπως οι μύκητες και οι σκώληκες. Στη συγκεκριμένη εργασία υποστηρίχθηκε ότι η *trans*-ρεσβερατρόλη αύξησε τη δράση του ενζύμου οπότε προκάλεσε έμμεσα , αύξηση της σταθερότητας του DNA και επέκταση του χρόνου ζωής του μύκητα κατά 70% (Howitz K.T. *et al.*, 2003). Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί για την *trans*-ρεσβερατρόλη και σε άλλους οργανισμούς, όπως ο *Caenorhabditis elegans* και η *Drosophila melanogaster* (Wood J.G. *et al.*, 2004). Η αντιγηραντική δράση της *trans*-ρεσβερατρόλης ίσως επεξηγεί τα θετικά αποτελέσματα της μέτριας κατανάλωσης κόκκινου οίνου στον χρόνο ζωής, αν και δεν έχει τεκμηριωθεί πλήρως επιστημονικά (Corder R. *et al.*, 2003). Πρέπει να σημειωθεί επίσης, ότι η *trans*-ρεσβερατρόλη είχε δοσοεξαρτώμενη δράση στο ένζυμο SIR1 το οποίο εμφανίζει παρόμοια δράση με το SIR2. Σε χαμηλές δόσεις κινητοποιούσε το ένζυμο, ενώ σε μεγαλύτερες ανέστειλε τη δράση του (Howitz K.T. *et al.*, 2003).
- **Άλλες δράσεις:** Η *trans*-ρεσβερατρόλη έχει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (Lastra de la C. & Villegas I., 2005), ενώ δρα και ως κατασταλτικός παράγοντας της κινητοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος. Ο ακριβής μηχανισμός της λειτουργίας αυτής δεν έχει ακόμα εξακριβωθεί πλήρως. Πάντως υπάρχουν επιστημονικές έρευνες που καταδεικνύουν ότι προκαλεί καταστολή του πολλαπλασιασμού των λεμφοκυττάρων, μείωση της τοξικότητας των κυττάρων -μεσολαβητών και της παραγωγής κυτοκίνης . Οπωσδήποτε ό μως, αποτελεί ένα υποψήφιο μόριο για μελλοντική χρήση σε διάφορες θεραπείες του ανοσοποιητικού συστήματος (Falchetti R. *et al.*, 2001; Gao X. *et al.*, 2001). Μία ακόμα δράση της ρεσβερατρόλης είναι η οιστρογονική η οποία εκδηλώνεται σε χαμηλές δόσεις , ενώ σε υψηλότερες δρα ως αντιοιστρογόνο (Etherton P.M.K. *et al.*, 2002). Τέλος , έχει αναφερθεί ότι η

ρεσβερατρόλη αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των αστεροειδών κυττάρων του ήπατος τα οποία ευθύνονται σε μεγάλο βαθμό για την πρόκληση κίρρωσης . Ο πολλαπλασιασμός των συγκεκριμένων κυττάρων εντείνεται σε καταστάσεις οξειδωτικού stress και η ρεσβερατρόλη δρα αποτελεσματικά στην αποφυγή τέτοιων συνθηκών (Fremont L., 2000).

### Άλλα στιλβένια που απαντώνται στη φύση

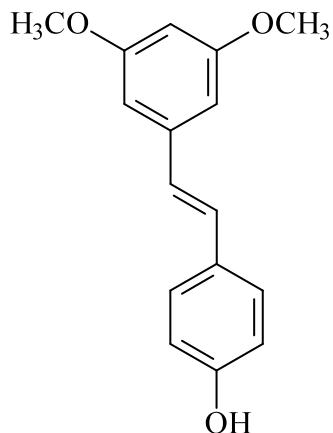
Εκτός από τη ρεσβερατρόλη, συναντάμε και κάποια άλλα στιλβένια σε φυτικούς οργανισμούς, με σημαντική πολλές φορές χρησιμότητα. Παρακάτω ακολουθούν τα πιο διαδεδομένα απ' αυτά.

**Πικεΐδης:** Αποτελεί τον 3-O-β-γλυκοσίδη της ρεσβερατρόλης και ανευρίσκεται και αυτός σε δύο μορφές, την *cis* και την *trans* όπως ακριβώς και η ρεσβερατρόλη (Σχήμα 6). Η πιο άμεση και εύκολη πηγή πρόσληψής του για τον άνθρωπο είναι το κόκκινο αλλά και το λευκό κρασί (σε μικρότερη ποσότητα) και το συναντάμε κυρίως στην *trans* μορφή του (Perez A.I.R. et al., 1999). Είναι επίσης διαπιστωμένο ότι η γλυκοσυλιωμένη μορφή φαινολικών ουσιών, είναι πιο εύκολα απορροφήσιμη από την άγλυκη (Hollman P.C. et al., 1995).



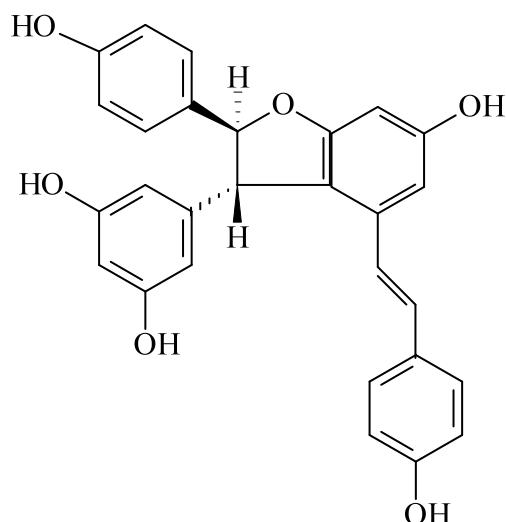
Σχήμα 6. Χημικός τύπος πικεΐδη.

**Πτεροστιλβένιο:** Είναι η 3,5-διμεθοξυρεσβερατρόλη (Σχήμα 7).



Σχήμα 7. Χημικός τύπος πτεροστιλβενίου.

**ε-Βινιφερίνη:** Τη συναντάμε στα σταφύλια (Σχήμα 8).



Σχήμα 8. Χημικός τύπος ε-βινιφερίνης.

Παρά την επικέντρωση των επιστημονικών εργα σιών στις δράσεις της ρεσβερατρόλης, δεν πρέπει να παραβλέπει κανείς τη φαρμακολογική δυναμική και άλλων στιλβενίων.

Το σύνολο λοιπόν των στιλβενίων, θεωρείται ότι ανήκουν στην κατηγορία των φυτοοιστρογόνων με χρησιμότητα στην καταστολή των συνεπειών που προκαλεί η εμμηνόπαυση στις γυναίκες (Chadwick L.R. et al., 2006). Χαρακτηρίζονται όπως είναι αναμενόμενο από τις αντιοξειδωτικές ικανότητές τους (Torres P. et al., 2003), ενώ γνωστές είναι και οι αντιμικροβιακές τους ιδιότητες (Chatterjee A. et al., 2005). Πολλά

παράγωγα (π.χ. α-βινιφερίνη) έχουν εμφανίσει αντιφλεγμονώδη δράση (Chung E.Y. *et al.*, 2003). Επιπρόσθετα, η αντιοξειδωτική δράση πολλών στιλβενίων προστατεύει τα νευρικά κύτταρα του εγκεφάλου από τις συνέπειες που προκαλεί το οξειδωτικό stress και πιθανόν αυτό να αποτελεί ένα εφαρμόσιμο παράγοντα στη θεραπεία της νόσου Alzheimer (Xia Z. *et al.*, 2003). Τέλος, ορισμένα στιλβένια έχει αποδειχθεί ότι εκδηλώνουν δράση κατά της συσσώρευσης αιμοπεταλίων (Aburjai T.A., 2000).

Οι παραπάνω σοβαρές δράσεις των στιλβενίων ώθησαν την επιστημονική κοινότητα να αναζητήσει νέες φυσικές πηγές τους αλλά και μεθόδους συνθετικής παρασκευής τους.

Μία άλλη προσπάθεια που γίνεται για την αύξηση της παραγωγής τους από το σταφύλι, είναι η εφαρμογή χημικών μέσων. Στα πλαίσια αυτού του εγχειρήματος επιδιώκεται η κινητοποίηση των αμυντικών μηχανισμών των σταφυλιών ώστε να επαχθεί η σύνθεση ρεσβερατρόλης στο φυτό. Αυτό στηρίζεται στη σκέψη ότι τα στιλβένια είναι φυτοαλεξίνες και η παραγωγή τους αυξάνεται όταν το φυτό κινδυνεύει.

Οι μέχρι τώρα συνηθέστερες δίοδοι χημικής επαγωγής των συνθετικών οδών παραγωγής τους στηρίζονται στον ψεκασμό των σταφυλιών με τρεις ουσίες:

**Πυριτικό νάτριο**

**Τριχλωριούχο αργύριο**

**Alliete (αργιλούχο σκεύασμα)**

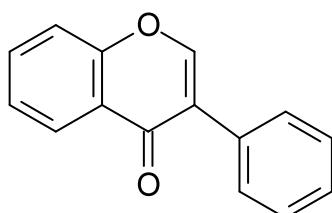
Στη συνέχεια ακολουθεί η συλλογή των σταφυλιών μία μέρα αργότερα και ο διαχωρισμός τους με HPLC μετά από εκχύλιση και μέτρηση της περιεκτικότητάς τους σε στιλβένια.

Εκτός από την παραπάνω μέθοδο, χρησιμοποιήθηκε και η έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία. Έχει διαπιστωθεί ότι ο ήλιος επιδρά στη σύνθεση των φαινολικών παραγώγων στα σταφύλια. Αν και θα περίμενε κανείς ότι η έκθεση στον ήλιο έχει ευεργετική επίδραση στην παραγωγή ρεσβερατρόλης και στιλβενίων, η υπερβολική επίδραση του ηλιακού φωτός μειώνει την ικανότητα του φυτού να βιοσυνθέτει τα στιλβενοειδή (Creasy G.L., 2002).

Γενικά, θα μπορούσε να λεχθεί ότι η ρεσβερατρόλη και τα ανάλογά της είναι χρήσιμα εργαλεία στα χέρια της ιατρικής, αρκεί να χρησιμοποιηθούν κατάλληλα και να βρεθούν νέοι τρόποι αύξησης της παραγωγής τους.

## B) ΙΣΟΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ

Τα ισοφλαβονοειδή αποτελούν μία υποκατηγορία των φλαβονοειδών που έχουν τον γενικό τύπο του Σχήματος 9.



Σχήμα 9. Σκελετός ισοφλαβονοειδών.

Σ' αντίθεση με άλλες ομάδες φλαβονοειδών, τα ισοφλαβονοειδή παρουσιάζουν μια άτακτη κατανομή στα φυτά, πιθανότατα εξαιτίας της σποραδικής ύπαρξης της συνθετάσης των ισοφλαβονών που είναι το ένζυμο που συμμετέχει στη βιοσύνθεσή τους (Tahara S. & Ibrahim R.K., 1995).

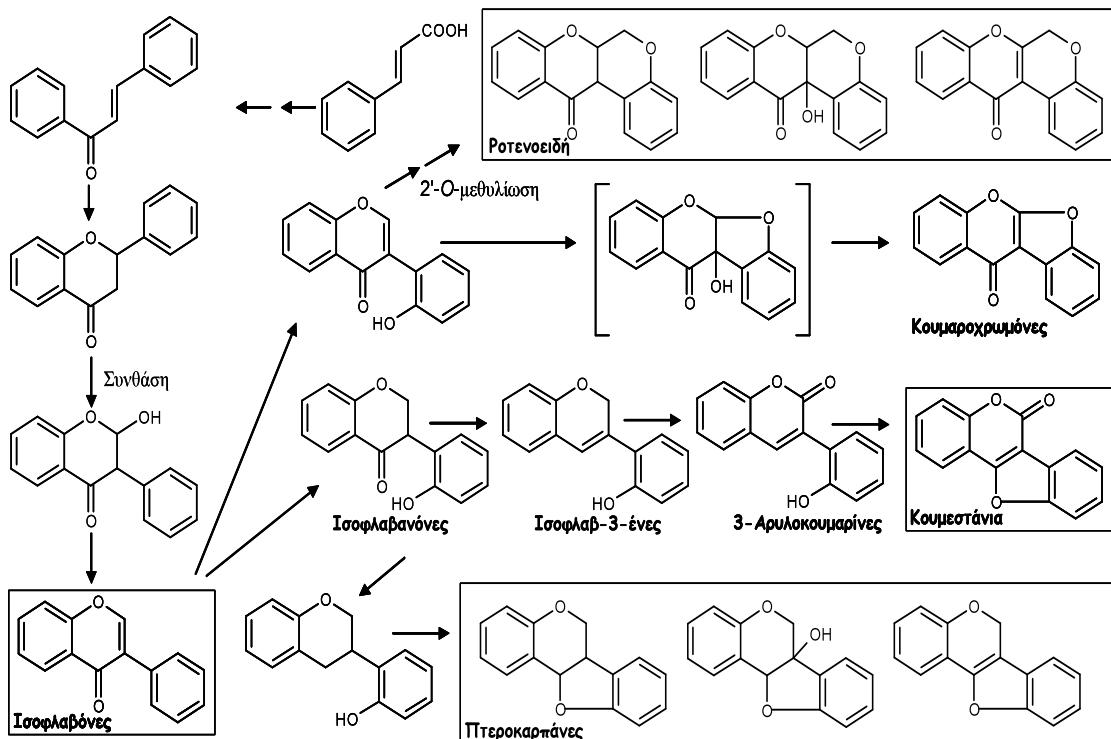
Εξαιτίας της δομικής ποικιλομορφίας που παρουσιάζουν τα ισοφλαβονοειδή, κατηγοριοποιήθηκαν περαιτέρω σε απλά και σύνθετα ισοφλαβονοειδή. Απλά χαρακτηρίζονται τα ισοφλαβονοειδή τα οποία αποτελούνται από 15 άτομα άνθρακα ( $C_{15}$ -1,2-διφαινυλοπροπάνιο), ενώ σύνθετα είναι εκείνα που αποτελούνται από περισσότερα άτομα άνθρακα, είτε με τη μορφή άκυκλης υποκατάστασης είτε με τη μορφή δακτυλίου που προέρχονται από ομάδες ισοπρενυλίου ή γερανυλίου

Οι σημαντικότερες ομάδες ισοφλαβονοειδών είναι

- ✓ **ισοφλαβόνες**
- ✓ **ισοφλαβανόνες**
- ✓ **ισοφλαβαν-3-ένες**
- ✓ **ισοφλαβάνες**
- ✓ **ροτενοειδή**

- ✓ κουμαροχρωμόνες
- ✓ 3-αρυλοκουμαρίνες
- ✓ κουμεστάνες
- ✓ πτεροκαρπάνες

Οι βιοσυνθετικές σχέσεις των ισοφλαβονοειδών απεικονίζεται στο Σχήμα 10.



Σχήμα 10. Οι κυριότερες κατηγορίες ισοφλαβονοειδών και οι βιοσυνθετικές τους σχέσεις.

Τα ισοφλαβονοειδή θεωρούνται μία πολύ ενδιαφέρουσα φαρμακολογικά ομάδα, με πληθώρα εργασιών γύρω από τη δραστικότητα και τη χρήση τους. Η κύρια ιδιότητα που τα χαρακτηρίζει είναι η οιστρογονική και θεωρούνται βασικοί εκπρόσωποι των φυτοοιστρογόνων (Duncan A.M. *et al.*, 2003). Η οιστρογονική δράση καθιστά τα ισοφλαβονοειδή χρήσιμα στην πρόληψη και τη θεραπεία γυναικολογικών προβλημάτων όπως το μετεμηνοπαυσιακό σύνδρομο (Watanabe S., *et al.*, 2002). Εμφανίζουν ακόμα αντιβακτηριακή (Dastidar S.G. *et al.*, 2004) και αντιφλεγμονώδη δράση (Rahman A. *et al.*, 2003). Παράλληλα, οι αντικαρκινικές δράσεις της σόγιας αποδίδονται κυρίως στα ισοφλαβονοειδή που περιέχει (Miano L., 2003; Barnes S. *et al.*, 1996).

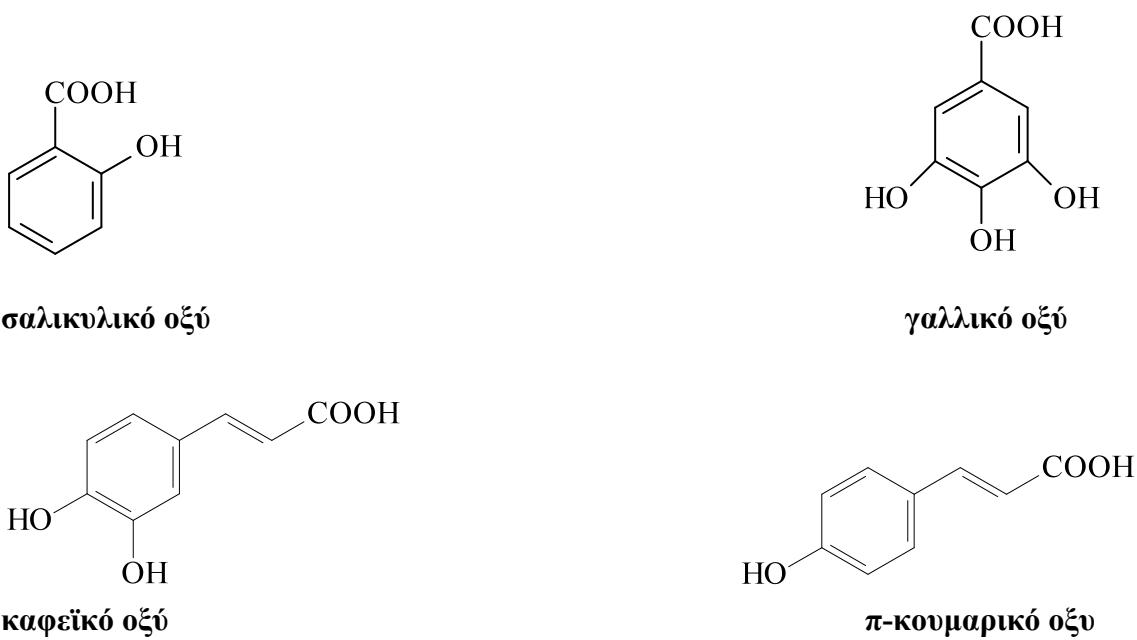
Οι ισοφλαβόνες αποτελούν την πιο πολυπληθή και μελετημένη κατηγορία ισοφλαβονοειδών. Απαντούν κατά κύριο λόγο στην οικογένεια Leguminosae η οποία περιλαμβάνει όσπρια, ενώ για τη μεγάλη περιεκτικότητα σε ισοφλαβόνες διακρίνονται διάφορα είδη του τριφυλλιού (*Trifolium* sp.) (Ososki A. & Kennelly E.J., 2003). Πλούσιες πηγές ισοφλαβονών αποτελούν φυτά κι άλλων οικογενειών, από τα οποία προέρχονται μάλιστα διάφορα είδη τροφίμων όπως τα σπορέλαια (π.χ. ηλιέλαιο, *Helianthus* sp. A steraceae) και οι ξηροί καρποί π.χ. τα καρύδια (*Juglans nigra*, Juglandaceae). Ισοφλαβόνες έχουν απομονωθεί και από φυτά της οικογένειας Iridaceae και Euphorbiaceae (Dewick P.M., 1993).

### Γ) ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΟΞΕΑ

Τα φαινολοξέα αποτελούν μία ομάδα οργανικών οξέων και εμπεριέχουν όλες τις οργανικές ενώσεις που έχουν το λιγότερο μία καρβοξυλομάδα και ένα φαινολικό υδροξύλιο. Ο όρος όμως χρησιμοποιείται και για παράγωγα του βενζοϊκού και του κινναμωμικού οξέος που είναι πολύ διαδεδομένα στα φυτά ελεύθερα, σαν εστέρες ή σαν γλυκοσίδες (Βερυκοκίδου-Βιτσαροπούλου Ε., 1997) (Σχήμα 11).



Στα παράγωγα του βενζοϊκού ανήκουν το σαλικυλικό και το γαλλικό οξύ, ενώ στα παράγωγα του κινναμωμικού συγκαταλέγονται μεταξύ άλλων το καφεΐκο και το π-κουμαρικό οξύ (Σχήμα 12).



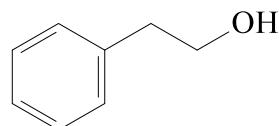
Σχήμα 12. Χημικοί τύποι συνηθέστερων φαινολικών οξέων.

Από βιολογικής άποψης, τα φαινολοξέα παρουσιάζουν μεγάλο αριθμό δράσεων, όπως χολαγωγό . Πολλά εμφανίζουν επίσης αντιμικροβιακή (αντιβακτηριακή και αντιμυκητιασική) και αντιϊκή δράση (Panizzi L. *et al.*, 2002; Corthout J. *et al.*, 1994). Εξάλλου, διάφορα φαινολικά οξέα όπως το χλωρογενικό, το καφεϊκό, το  $\pi$ -κουμαρικό και το φερουλικό έχουν επιδείξει δράση έναντι του μικροβίου *Listeria monocytogenes*, δρώντας άλλα ως βακτηριοστατικά και άλλα ως βακτηριοκτόνα (Wen A. *et al.*, 2003). Η αντιφλεγμονώδης και η κυτταροστατική δράση συμπεριλαμβάνονται ακόμα στις ιδιότητες των φαινολοξέων (Fernandez M.A. *et al.*, 1998), όπως και η μείωση των επιπέδων χοληστερόλης (Nakajima H. *et al.*, 1992). Τέλος, ως γνήσιοι εκπρόσωποι των φαινολικών παραγώγων εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση (Carton E. *et al.*, 2001; Lu Y. & Foo Y.L., 2001). Κάποια φαινολικά οξέα (2,3-διυδρόξυβενζοϊκό οξύ , 3,4-διυδρόξυβενζοϊκό οξύ , καφεϊκό οξύ ) αλληλεπιδρούν με τον δισθενή σίδηρο και εμποδίζουν την οξείδωση του DNA σε *in vitro* μελέτες (Lodovici M. *et al.*, 2001). Μάλιστα, εστέρες πολλών φαινολικών οξέων έχουν εμφανίσει κυτταροτοξικότητα σε ανθρώπινες καρκινικές σειρές κυττάρων της γλώσσας , με αποτέλεσμα να θεωρείται πιθανή η χρησιμότητά τους σε θεραπευτικά σχήματα για την καταπολέμηση στοματικών καρκίνων (Lee Y.T. *et al.*, 2005). Τέλος, πολυφαινολικά μόρια μεταξύ των οποίων και

φαινολικά οξέα που έχουν απομονωθεί από το πράσινο τσάι, φέρονται να εμφανίζουν *in vitro* και *in vivo* ηπατοτοξικότητα (Galati G. et al., 2006).

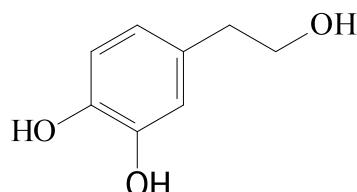
#### Δ) ΦΑΙΝΥΛΑΙΘΑΝΟΛΕΣ

Οι φαινυλαιθανόλες ανήκουν στα φαινολικά παράγωγα και ο δακτύλιος τους αποτελείται από ένα βενζολικό πυρήνα που φέρει ως υποκαταστάτη μία υδροξυαιθυλομάδα (Σχήμα 13).



Σχήμα 13. Σκελετός φαινυλαιθανολών.

Ο σημαντικότερος εκπρόσωπος της κατηγορίας είναι η υδροξυτυροσόλη (Σχήμα 14) που συναντάται μεταξύ άλλων στο ελαιόλαδο και είναι μία ουσία με πολύ σημαντικές αντιοξειδωτικές ικανότητες, αντιμικροβιακή δραστικότητα και προστατευτική δράση στην αθηροσκλήρωση και τη στεφανιαία νό σο (Tuck K.L. & Hayball P.J., 2002). Κυρίως σ' αυτή (και την τυροσόλη) έχουν επικεντρωθεί οι φαρμακολογικές έρευνες. Όσον αφορά γενικότερα τις φαινυλαιθανόλες, εκτός από την αναμενόμενη αντιοξειδωτική τους δράση έχουν μελετηθεί, σε περιορισμένο εύρος και σε άλλες φαρμακολογικές δοκιμασίες, δίνοντας κάποιες φορές θετικά αποτελέσματα. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι γλυκοσίδες φαινυλαιθανολών έχουν εκδηλώσει *in vitro* κυτταροτοξικότητα σε καρκινικές κυτταρικές σειρές (P388 λευχαιμία και Ehrlich) (Salib J.Y. & Michael H.N., 2004).



Σχήμα 14. Χημικός τύπος υδροξυτυροσόλης.

## **E) ΑΖΩΤΟΥΧΕΣ ΒΑΣΕΙΣ**

Στα φυτά υπάρχουν κυρίως ως συστατικά των νουκλεϊκών οξέων. Διακρίνονται σε πουρίνες (αδενίνη και γουανίνη) και πυριμιδίνες (κυτοσίνη, ουρακίλη και θυμίνη). Απαντούν με τη μορφή γλυκοσίδη (νουκλεοσίδια) ή συνδεδεμένες με σάκχαρα και φωσφορικά οξέα (νουκλεοτίδια). Τα νουκλεοσίδια διαθέτουν ένα πλήθος βιολογικών δράσεων, από τις οποίες η πιο σημαντική είναι η αντική, ιδιαίτερα έναντι του ιού HIV. Η δράση τους οφείλεται στην αντιγραφή του ιūκού γενώματος, με αποτέλεσμα τη μείωση του αριθμού των σωματιδίων του ιού (Saito Y. *et al.* 2000; Gosselin G. *et al.*, 1987; Gosselin G. *et al.*, 1986). Υπάρχουν επίσης αναφορές για κυτταροτοξική δράση (Johnson F. *et al.*, 1984).

## **1.2) ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

### **1.2.1) ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΣΤΕΜΦΥΛΩΝ ΜΕ ΡΗΤΙΝΕΣ**

#### **ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Στο συγκεκριμένο τμήμα της διδακτορικής διατριβής πραγματοποιήθηκε η ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μίας οικονομικά βιώσιμης διαδικασίας για την ολοκληρωμένη διαχείριση των οινοποιητικών αποβλήτων σε πιλοτικό επίπεδο. Τα περισσότερα οινοποιεία είναι μικρής κλίμακας επιχειρήσεις που δεν έχουν τη δυνατότητα να διαχειριστούν κατάλληλα τα απόβλητά τους. Συνήθως, αυτά εναποτίθενται σε αγρούς όπου μετατρέπονται σε λίπασμα, μέσα από διαδικασίες αερόβιας διάσπασης και αποτελούν μία συνεχή εστία μόλυνσης.

Η κατεργασία των στεμφύλων στόχευε στην ανάκτηση των περιεχόμενων πολυνφαινολών και περιελάμβανε τη χρήση ρητινών προσρόφησης με τις οποίες, όπως θα παρουσιαστεί αναλυτικά στις επόμενες παραγράφους, απομακρύνονται σε μεγάλο ποσοστό τα γλυκοσιδικά μόρια που κυριαρχούν στα σταφύλια και παραμένουν τα πολυνφαινολικά. Παράχθηκε μ' αυτόν τον τρόπο ένα κλάσμα πλούσιο σε πολυνφαινόλες το οποίο ήταν αποτελεσματικό σε φαρμακολογικές δοκιμές (κλινικές δοκιμές, *in vitro* πειράματα). Επιπρόσθετα, από ένα τέτοιο κλάσμα απαλλαγμένο σε μεγάλο βαθμό από σάκχαρα θα ήταν ευκολότερη η απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών. Ακόμα, με τη χρήση ενός ειδικού τύπου ρητίνης παραλήφθηκε ένα μίγμα που περιείχε τις χρωστικές ουσίες του σταφυλιού και το οποίο μπορεί να αξιοποιηθεί στον χρωματισμό τροφίμων, εκχυλισμάτων κ.α.

Η συνολική διαδικασία διαιρέθηκε σε τρία στάδια, καθοριστικά για την επιτυχή έκβασή της.

- **Επιλογή της καλύτερης δυνατής ποικιλίας σταφυλιού.**
- **Επιλογή του καλύτερου δυνατού τύπου ρητίνης.**
- **Εφαρμογή και βελτιστοποίηση της μεθόδου.**

Στο πρώτο στάδιο επιδιώχθηκε η επιλογή μίας ποικιλίας πλούσιας σε πολυνφαινολικούς μεταβολίτες. Εδώ πρέπει να σημειωθεί ότι για λόγους που αναφέρονται παρακάτω, ως πρωταρχική φυτική πηγή κατεργασίας χρησιμοποιήθηκαν τα στέμφυλα, το υπόλειμμα δηλαδή της οινοποιητικής διαδικασίας και όχι αυτούσια τα σταφύλια.

Στο δεύτερο στάδιο πραγματοποιήθηκε η επιλογή της ρητίνης που θα χρησιμοποιηθεί. Αυτό έγινε με τη μελέτη της βιβλιογραφίας και με στατικές και κινητικές εργαστηριακές δοκιμές.

Κατά το τελευταίο στάδιο εφαρμόστηκε η μέθοδος σε εργαστηριακό και σε πιλοτικό επίπεδο και με βάση τα δεδομένα που προέκυψαν, έγιναν συνεχείς διορθώσεις με τελικό σκοπό τη βελτιστοποίηση της μεθόδου.

Πριν από την περιγραφή των διαφόρων σταδίων της κατεργασίας, κρίνεται σκόπιμο να παρουσιαστούν κάποια σημαντικά στοιχεία για τη διαδικασία παραγωγής του οίνου, καθώς τα στέμφυλα αποτελούν το υπόλειμμα αυτής της διαδικασίας.

### **1.2.1.a) Οινοποίηση και στέμφυλα**

Ο οίνος προέρχεται ουσιαστικά από τα χυμοτόπια της σάρκας των ραγών η οποία αντιπροσωπεύει περίπου το 85% του βάρος του σταφυλιού. Στα χυμοτόπια αυτά έχουν συγκεντρωθεί τα σάκχαρα όταν τα σταφύλια είναι ώριμα και τα οξέα που δίνουν τη γεύση στο υδραλκοολικό διάλυμα που δημιουργείται από την αλκοολική ζύμωση των σακχάρων. Επιπρόσθετα, οι ανθοκυάνες που δίνουν το χρώμα στους ερυθρούς οίνους, συγκεντρώνονται στους φλοιούς, όπως και μεγάλο μέρος των πολυφαινολικών μορίων που αφθονούν επίσης στα γύγαρτα και τους βόστρυχους. Ανάλογα με τον τρόπο που εργάζεται ο κάθε οινοποιός και τον τύπο του οίνου που παράγεται, το υδραλκοολικό διάλυμα που σχηματίζεται κατά την αλκοολική ζύμωση εμπλουτίζεται λιγότερο ή περισσότερο με τα συστατικά του φλοιού και των γιγάρτων. Κατά την οινοποίηση των ερυθρών οίνων που είναι και πιο σύνθετη διαδικασία σε σύγκριση με τη λευκή, συμβαίνουν δύο κύρια φαινόμενα (Κουράκου-Δραγώνα Σ., 1998):

- Η αλκοολική ζύμωση των σακχάρων παρουσία των στερεών τμημάτων των σταφυλιών (στέμφυλα).
- Η εκχύλιση των συστατικών των στερεών μερών των σταφυλιών από το υδραλκοολικό διάλυμα που σχηματίζεται κατά τη ζύμωση.

Τα βασικά στάδια της κλασικής μεθόδου ερυθρής οινοποίησης είναι τα εξής:

- ✓ Έκθλιψη των σταφυλιών με ή χωρίς αποβιοστρύχωση. Η έκθλιψη που αποτελεί το πρώτο στάδιο της οινοποίησης, είναι το σπάσιμο των ραγών με αποτέλεσμα την εκροή του χυμού από τα χυμοτόπια των κυττάρων της σάρκας και την επαφή του με τα στερεά μέρη των σταφυλιών και με τα σπόρια των ζυμών και των βακτηρίων που επικάθονται στον φλοιό της ράγας. Παλαιότερα, γινόταν από τους ανθρώπους με τα πόδια, ενώ σήμερα πραγματοποιείται με ειδικά μηχανήματα που ονομάζονται θλιπτήρια ή κοινώς σπαστήρες.
- ✓ Μεταφορά της σταφυλομάζας στα δοχεία οινοποίησης (δεξαμενές, βαρέλια) με ταυτόχρονη θείωση. Η μεταφορά της σταφυλομάζας από τα θλιπτήρια στις δεξαμενές οινοποίησης ή τους οινοποιητές, γίνεται συγχρόνως με τη θείωση με θειώδη ανυδρίτη. Ο θειώδης ανυδρίτης εμφανίζει ποικίλες θετικές επιδράσεις στην οινοποιητική διαδικασία. Καταρχήν, συ μβάλλει στην καταπολέμηση των μικροοργανισμών πλην των χρήσιμων

ζυμομυκήτων και στην παραγωγή οίνων διαυγών , μικρής πτητικής οξύτητας και μεγάλης διάρκειας. Ακόμα, διευκολύνει την εκχύλιση των φαινολικών παραγώγων των στερεών συστατικών της σταφυλομάζας από το ζυμούμενο γλεύκος , με συνέπεια τη δημιουργία οίνων με πιο έντονο χρώμα και με μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ολικές φαινόλες. Σημαντικό επίσης είναι ότι ακόμα και χωρίς την εκδήλωση αλκοολικής ζύμωσης, η απλή παραμονή της σταφυλομάζας σε θερμοκρασία περιβάλλοντος αυξάνει την πρόσληψη των ανθοκυανών , χωρίς την αντίστοιχη αύξηση του ποσοστού των πολυφαινολών.

✓ Αλκοολική ζύμωση των σακχάρων του χυμού του σταφυλιού παρουσία των στερεών μερών του (στέμφυλα) οπότε πραγματοποιείται συγχρόνως και η εκχύλιση των συστατικών των μερών αυτών. Κατά την αλκοολική ζύμωση τα σάκχαρα του χυμού του σταφυλιού αποικοδομούνται προς τον σχηματισμό αιθυλικής αλκοόλης. Παράλληλα, τα συστατικά των στερεών συστατικών των σταφυλιών εκχυλίζονται από το γλεύκος . Η απόδοση της εκχύλισης αυτής εξαρτάται από τη σχηματιζόμενη αιθυλική αλκοόλη, τη διάρκεια παραμονής του ζυμούμενου γλεύκους με τα στέμφυλα, τη θερμοκρασία, την αναλογία γλεύκους και στεμφύλων, τον ρυθμό διαβροχής των στεμφύλων με το γλεύκος και όπως ήδη αναφέρθηκε τον θειώδη ανυδρίτη. Η αιθυλική αλκοόλη που σχηματίζεται κατά τη ζύμωση διαδραματίζει πρωτεύοντα ρόλο, τόσο στην εκχύλιση των ανθοκυανών και των φαινολικών παραγώγων όσο και στην παραλαβή των ουσιών που συντελούν στη δημιουργία αρωματικής οισμής και γεύσης . Η ένταση το υ χρώματος αυξάνεται ταχύτατα στα πρώτα στάδια εντατικής παραγωγής αλκοόλης και στη συνέχεια παρουσιάζει μία ελάττωση λιγότερο ή περισσότερο απότομη. Το ίδιο ισχύει και για τις αρωματικές ουσίες των φλοιών. Σχετικά με τη διάρκεια παραμονής του γλεύκους με τα στέμφυλα και τον ρυθμό διαβροχής των στεμφύλων με το γλεύκος, δεν υπάρχει κανόνας και πρέπει σε κάθε ξεχωριστή περίπτωση να αξιοποιείται η πρώτη ύλη ανάλογα με τον τύπο του οίνου που θα παρασκευαστεί . Η θερμοκρασία επίσης πρέπει να ευνοεί την εκχύλιση χωρίς να μειώνεται η αρωματική ένταση και η δράση των σακχαρομυκήτων. Επομένως, αν και οι υψηλές θερμοκρασίες ευνοούν την εκχύλιση των πολυφαινολών από τα στέμφυλα προς το γλεύκος, η θερμοκρασία που συνήθως επικρατεί είναι 30-35 °C. Η αναλογία γλεύκους και στεμφύλων επηρεάζει την ποσότητα των χρωστικών κατά την παραγωγή ερυθρών οίνων. Μάλιστα, έχει διαπιστωθεί ότι η ένταση του χρώματος

και η περιεκτικότητα σε ανθοκυάνες και ολικές φαινόλες είναι αντιστρόφως ανάλογος με την απόδοση των σταφυλιών σε χυμό. Γι' αυτό στη Γαλλία κατά την οινοποίηση ορισμένων ερυθρών ποικιλιών που δίνουν υψηλό ποσοστό χυμού και ο οίνος κινδυνεύει να μην έχει επάρκεια χρώματος, αφαιρείται μέρος του γλεύκους πριν την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης για να αυξηθεί η αναλογία στερεής φάσης.

- ✓ Διαχωρισμός του ημιζυμωμένου ή αποζυμωμένου γλεύκους από τα στερεά μέρη (στέμφυλα) προς παραγωγή του ''οίνου εκροής''. Το χρονικό σημείο του συγκεκριμένου διαχωρισμού εξαρτάται από τον τύπο του οίνου και μπορεί να είναι πριν, κατά τη διάρκεια ή μετά την αλκοολική ζύμωση.
- ✓ Εκκένωση των δεξαμενών από τα στέμφυλα. Πραγματοποιείται χειρονακτικά ακόμα και σήμερα.
- ✓ Πίεση των στεμφύλων προς παραγωγή του ''οίνου πίεσης''. Μετά την εκροή του ζυμούμενου γλεύκους ή του οίνου, παραμένει στα στέμφυλα εγκλωβισμένος χυμός που παραλαμβάνεται με ισχυρή πίεση. Ο παραγόμενος οίνος έχει στυφή και χορτώδη γεύση που είναι τόσο πιο απωθητική όσο πιο κοινή είναι η ποικιλία της αμπέλου και κακό το πιεστήριο.

Τα παραπάνω στάδια χαρακτηρίζουν σε γενικές γραμμές τη διαδικασία ερυθρής οινοποίησης. Στην παραγωγή λευκών οίνων η διαδικασία απλοποιείται γιατί η αλκοολική ζύμωση γίνεται χωρίς την παρουσία των στεμφύλων, καθώς δεν απαιτείται εκχύλιση των ανθοκυανών ώστε να χρωματιστεί ο οίνος. Συνεπώς, η λευκή οινοποίηση περιλαμβάνει την έκθλιψη και την αποβοστρύχωση των σταφυλιών, την άμεση πίεσή τους για να διαχωριστεί το γλεύκος από τα στέμφυλα και την αλκοολική ζύμωση των σακχάρων του γλεύκους χωρίς τη συνύπαρξή του με στέμφυλα.

Κατά την κλασική μέθοδο ερυθρής οινοποίησης οι θερμοκρασίες που επικρατούν είναι 30-35 °C, με αποτέλεσμα να μην επιτυγχάνεται η καλύτερη δυνατή εκχύλιση. Επικρατεί ακόμα η άποψη ότι η ταυτόχρονη διεξαγωγή της αλκοολικής ζύμωσης των σακχάρων του γλεύκους και της εκχύλισης των συστατικών των στεμφύλων επηρεάζει αρνητικά τη διεξαγωγή και των δύο φαινομένων. Στην κατεύθυνση αυτή επινοήθηκε μία τεχνική που λέγεται θερμοοινοποίηση και στην οποία διαχωρίζονται τα δύο αυτά στάδια. Χρησιμοποιείται μόνο για ερυθρούς οίνους και τα

σταφύλια ακέραια ή μετά από έκθλιψη θερμαίν ονται σε υψηλές θερμοκρασίες , με συνέπεια την ταχεία διάχυση των συστατικών των στεμφύλων πριν αρχίσει η αλκοολική ζύμωση των σακχάρων του γλεύκους η οποία πραγματοποιείται στη συνέχεια αφού διαχωριστεί το γλεύκος από τα στέμφυλα . Στο τέλος τα στέμφυλα υποβάλλονται σε πίεση και λαμβάνεται το γλεύκος πίεσης που συγκεντρώνεται σε ξεχωριστές δεξαμενές. Το πλεονέκτημα της συγκεκριμένης τεχνικής είναι ότι για 20-30 min η θερμοκρασία φτάνει τους 70-80 °C και ευνοείται η εκχύλιση των φαινολικών και των χρωστικών ουσιών. Οπωσδήποτε όμως απαιτούνται ειδικές εγκαταστάσεις που ανξάνουν το κόστος και σημαντική σπατάλη ενέργειας αφού απαιτείται η θέρμανση και μετά η ψύξη των στεμφύλων.

Μία άλλη τεχνική που χρησιμοποιείται ευρύτατα είναι η ανθρακική αναεροβίωση. Σ' αυτή τη μέθοδο, ακέραια σταφύλια φέρονται σε δεξαμενές από τις οποίες έχει απομακρυνθεί ο αέρας με τη διοχέτευση CO<sub>2</sub> και κλείνονται αεροστεγώς. Μετά το γέμισμα των δεξαμενών μέρος των ραγών συνθλίβονται υπό το βάρος των υπερκείμενων σταφυλιών και έτσι σχηματίζεται στο κάτω μέρος των δεξαμενών ένα στρώμα γλεύκους. Στις σπασμένες ράγες και το γλεύκος, τα σάκχαρα ζυμώνονται υπό την επίδραση των ενζύμων των σακχαρομυκήτων παρουσία των στεμφύλων. Συγχρόνως, η ατμόσφαιρα εμπλουτίζεται με ατμούς αιθυλικής αλκοόλης και πτητικές αρωματικές ουσίες. Στις ράγες που έχουν μείνει άθικτες συμβαίνει πρόσληψη CO<sub>2</sub>, με αποτέλεσμα τον αναερόβιο μεταβολισμό και την ενδοκυτταρική αλκοολική ζύμωση των σακχάρων. Ακολουθεί ο διαχωρισμός του γλεύκους από τα σταφύλια και ασκείται πίεση στα σταφύλια που είναι ακέραια, με συνέπεια τον σχηματισμό του γλεύκους πίεσης που περιέχει μεγάλη ποσότητα σακχάρων και γι' αυτό μεταφέρεται σε δεξαμενές όπου λαμβάνει χώρα ζύμωση με τη βοήθεια σακχαρομυκήτων . Με αυτή την τεχνική παράγονται δύο είδη γλεύκους, ένα το γλεύκος εκροής και δεύτερο το γλεύκος πίεσης, όπως και στην κλασική μέθοδο ερυθρής οινοποίησης , αλλά εδώ ο οίνος ποιότητας προέρχεται από το γλεύκος πίεσης των άθικτων σταφυλιών αφού αυτά είναι το υπόστρωμα των φαινομένων του αναερόβιου μεταβολισμού.

Οι ροζέ οίνοι παρασκευάζονται από διάφορες ποικιλίες σταφυλιού (λευκά ή ερυθρά), με την εφαρμογή της κατάλληλης τεχνικής . Για παράδειγμα ένα συνήθης τρόπος είναι η συνοινοποίηση ερυθρών και λευκών σταφυλιών οπότε παράγονται ροζέ ή

ανοιχτόχρωμοι οίνοι. Η ανθρακική αναεροβίωση επίσης χρησιμοποιείται στην παραγωγή ροζέ οίνων με μοναδική παραλλαγή τη μειωμένη παραμονή σε ατμόσφαιρα CO<sub>2</sub> (2-3 ημέρες), ανάλογα με την ποικιλία και τη θερμοκρασία. Μία ακόμα ευρέως διαδεδομένη μέθοδος είναι η λευκή οινοποίηση ερ υθρών ποικιλιών οπότε και προκύπτουν έγχρωμοι οίνοι. Ο χρωματισμός του οίνου οφείλεται στην επαφή του χυμού με τους φλοιούς κατά την έκθλιψη των σταφυλιών από τους οποίους παραλαμβάνει ένα ποσοστό ανθοκυανών. Η ένταση του χρώματος εξαρτάται από την περιεκτικότητα σε ανθοκυάνες της εκάστοτε ερυθρής ποικιλίας. Για τους ροζέ οίνους υπάρχουν και άλλες ειδικές μέθοδοι, όπως η τεχνική της αφαίμαξης (Κουράκου-Δραγώνα Σ., 1998).

Συμπερασματικά θα μπορούσε να υπογραμμιστεί ότι τα σταφύλια μεταφέρονται στο οινοποιείο με ένα ορισμένο δυναμικό σε άρωμα και χημική σύσταση που είναι συνάρτηση της ποικιλίας της αμπέλου, των στρεμματικών αποδόσεων, των καιρικών συνθηκών, του βαθμού ωριμότητας και της γενικότερης κατάστασης τους. Οι συνθήκες που θα τηρηθούν κατά την οινοποίηση επηρεάζουν την ποιότητα του οίνου αξιοποιώντας το παραπάνω δυναμικό.

Ανεξάρτητα από τη μέθοδο οινοποίησης που ακολουθήθηκε, στο τέλος παραμένει ένα στερεό υπόλειμμα, τα στέμφυλα τα οποία προορίζονται να απορριφθούν στο περιβάλλον (Εικόνα 3). Επιπλέον πρέπει να σημειωθεί ότι ακόμα και αν η οινοποίηση πραγματοποιηθεί με τις καλύτερες δυνατές συνθήκες, η περιεκτικότητα του παραγόμενου οίνου σε χρωστικές και πολυφαινόλες μπορεί να φτάσει μέχρι 40% σε σχέση με τη σύσταση του σταφυλιού από το οποίο προέρχεται, ενώ το υπόλοιπο ποσοστό παραμένει στα στέμφυλα. Η διεθνής βιβλιογραφία μάλιστα κάνει λόγο για ακόμα μικρότερο ποσοστό της τάξης του 20-30%. Γίνεται επομένως κατανοητό ότι απορρίπτεται μία πλούσια πηγή μεταβολιτών χωρίς να αξιοποιείται.



Εικόνα 3. Στέμφυλα που έχουν απορριφθεί μετά την οινοποίηση.

Όπως ήδη αναφέρθηκε παραπάνω , στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν στέμφυλα, αντί για αυτούσια σταφύλια . Αυτό έγινε γιατί υπήρξε η σκέψη της αξιοποίησης των αποβλήτων της οινοποίησης, καθώς κάτι τέτοιο δεν θα επέφερε κανένα κόστος στους παραγωγούς , σ' αντίθεση με τη χρήση σταφυλιών που οπωσδήποτε θα είχε οικονομικές επιπτώσεις στα οινοποιεία . Τα στέμφυλα είναι ουσιαστικά ένα γεωργικό απόβλητο που παράγεται σε τεράστιες ποσότητες κατ ά τη διαδικασία παραγωγής οίνου. Αποτελούν το στερεό υπόλειμμα (φλοιός και γύραρτο) των σταφυλιών που παραμένει όταν απομακρυνθεί ο χυμός τους που συνίσταται κυρίως από σάκχαρα τα οποία οπωσδήποτε μειώνουν το ποσοστό πολυφαινολικών συστατικών και δυσκολεύουν τη διαδικασία απομόνωσής τους.

Στην Ελλάδα οινοποιούνται ετησίως 530.000 τόνοι σταφυλιού και παράγονται 400.000.000 L κρασιού σε 400 περίπου οινοποιεία , ενώ μεγάλος όγκος στεμφύλων απορρίπτεται χωρίς καμία επεξεργασία στο περιβάλλον . Τα στέμφυλα συνιστούν το 17% της βιομάζας των σταφυλιών που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή κρασιού (περίπου 100.000 τόνοι) και είναι πλούσια σε πολυφαινολικά μόρια, κυρίως στιλβένια, φλαβονοειδή και φαινολικά οξέα.

Τα στέμφυλα έχουν αποτελέσει και στο παρελθόν αντικείμενο επιστημονικής μελέτης. Φαρμακολογικές εργασίες που έχουν γίνει, κάνουν λόγο τόσο για αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Monagas M. *et al.*, 2006), όσο και για μείωση της χοληστερόλης σε *in vivo* πειράματα (Bobek P., 1999). Πέρα από τη βιολογική σημασία τους, τα στέμφυλα έχουν εξεταστεί και φυτοχημικά, δίνοντας ένα χημικό προφίλ πλούσιο σε πολυφαινολικά μόρια, όπως φλάβονοειδή και στιλβένια (Kammerer D. *et al.*, 2004; Lu Y. & Foo Y., 1999). Επιπρόσθετα, από στέμφυλα κόκκινων ποικιλιών έχουν γίνει προσπάθειες απομόνωσης των χρωστικών (ανθοκυανιδινών) για μετέπειτα χρήση στον χρωματισμό προϊόντων και έχουν δημιουργηθεί βιομηχανίες για τον σκοπό αυτόν σε χώρες, όπως η Ιταλία και η Αλγερία (Bridle P. & Timberlake C.F., 1997; Timberlake C.F. & Henry B.S., 1986).

Στις επόμενες παραγράφους παρουσιάζεται αναλυτικά η πορεία της κατεργασίας των στεμφύλων.

### **1.2.1.β) Επιλογή ποικιλίας σταφυλιού**

Η ποικιλία που θα χρησιμοποιηθεί, διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στο τελικό αποτέλεσμα. Είναι βασικό για την επιτυχία της μεθόδου να μελετηθεί μία ποικιλία που θα έχει υψηλό χημικό φορτίο σε πολυφαινόλες. Η επιλογή έγινε μετά από χρωματογραφικό έλεγχο των μεθανολικών εκχυλισμάτων 13 ελληνικών ποικιλιών και μελέτη της βιβλιογραφίας.

Τα στέμφυλα που μελετήθηκαν, ανήκουν στις παρακάτω ποικιλίες:

- *Aθήρι* Σαντορίνης
- *Ασύρτικο* Σαντορίνης
- *Βινσάντο* Σαντορίνης
- *Βοϊδομάτο* Σαντορίνης
- *Μανδηλαριά* Σαντορίνης
- Ποικιλίες λευκών σταφυλιών Σαντορίνης
- *Κοτσιφάλι* Κρήτης (Πεζά Ηρακλείου)
- *Λιάτικο* Κρήτης (Πεζά Ηρακλείου)

- *Μανδηλαριά* Κρήτης (Πεζά Ηρακλείου)
- *Ασύρτικο* Ρόδου
- *Μανδηλαριά* Ρόδου
- *Μοσχάτο* Τυρνάβου
- *Ροδίτης* Τυρνάβου

Ο έλεγχος περιελάμβανε την κονιοποίηση μίας ποσότητας στεμφύλων (περίπου 100 g) από κάθε ποικιλία, στη συνέχεια ακολούθησε η εκχύλιση με 1 L MeOH, η εξάτμιση του διαλύτη και ολοκληρώθηκε με τον έλεγχο του στερεού υπολείμματος με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC), την παρατήρηση στο υπεριώδες-ορατό (UV-Vis) και τον ψεκασμό με διάλυμα θειικής βανιλλίνης (Σχήμα 15).



Σχήμα 15. Έλεγχος ποικιλιών σταφυλιών.

Βασικό μέλημα κατά την παρατήρηση των εκχυλισμάτων με TLC, ήταν η παρατήρηση και ο εντοπισμός απορροφήσεων και χρωμάτων που να παραπέμπουν σε πολυνφαινολικά μόρια, όπως στιλβένια, φλαβονοειδή και άλλα παράγωγα. Η προσοχή στράφηκε κυρίως στην παρουσία ρεσβερατρόλης και άλλων σ τιλβενίων, καθώς τα

συγκεκριμένα μόρια αναρριχώνται όλο και περισσότερο στην πυραμίδα του διεθνούς επιστημονικού ενδιαφέροντος . Το πρώτο συμπέρασμα που εξήχθη ήταν ότι τα εκχυλίσματα των κόκκινων ποικιλιών είχαν πολύ καλύτερη χρωματογραφική εικόνα από τα α ντίστοιχα των λευκών . Αυτό σημαίνει δηλαδή ότι τα εκχυλίσματα των ποικιλιών *Bivisanito*, *Boiodomato* και *Mandilaria Santorinensis*, *Kotsifali*, *Liatiko*, *Mandilaria Kritias* και *Mandilaria Rodou* έδωσαν χρωματογραφήματα πλούσια σε απορροφήσεις (κίτρινες και σκούρες) και χρώματα (κίτρινα, κόκκινα, ιώδη, γκρίζα), σ' αντίθεση με τις υπόλοιπες ποικιλίες (λευκές) οι οποίες με εξαίρεση την παρουσία κατεχίνης και επικατεχίνης, δεν εμφάνιζαν άλλη σημαντική χρωματογραφική ένδειξη.

Η επιλογή λοιπόν περιορίστηκε ανάμεσα στις κόκκινες ποικιλίες. Από αυτές πιο ενδιαφέρουσα φάνηκε να είναι η ποικιλία *Mandilaria Santorinensis*, καθώς εμφάνιζε μία εξαιρετική εικόνα στην TLC (Εικόνα 4).



Εικόνα 4. Χρωματογράφημα TLC μεθανολικού εκχυλίσματος στεμφύλων ποικιλίας *Mandilaria*ς Σαντορίνης από δύο διαφορετικές χρονιές.

Όλες οι παρατηρήσεις ήταν σύμφωνες με τα βιβλιογραφικά δεδομένα , από τα οποία προκύπτει, τόσο ότι οι κόκκινες ποικιλίες υπερέχουν φυτοχημικά των λευκών όσο και ότι σε αναλύσεις που έχουν γίνει σε οίνους από ελληνικές αμπέλους, το μεγαλύτερο ποσοστό ρεσβερατρόλης συναντάται στην ποικιλία *Mandilaria* (Dourtoglou V.G. et

*al.*, 1999). Είναι ακόμα σημαντικό να σημειωθεί ότι η περιεκτικότητα της συγκεκριμένης ποικιλίας διαφέρει από περιοχή σε περιοχή. Αυτό οφείλεται στις διαφορετικές κλιμα τολογικές συνθήκες που επικρατούν σε κάθε περιοχή. Μάλιστα, μεγαλύτερο ποσοστό ρεσβερατρόλης εμφανίζεται στις νησιωτικές περιοχές (Κυκλαδες, Κρήτη, Ρόδος) και αυτό οφείλεται στο άγονο έδαφος των νησιών και τη μεγαλύτερη έκθεση στον ήλιο σε σχέση με τις ηπειρωτικές περιοχές. Η ρεσβερατρόλη ως γνήσια φυτοαλεξίνη, παράγεται σε τέτοιες δύσκολες συνθήκες (Kallithraka S. *et al.*, 2001).

Είναι πάντως αξιοσημείωτο ότι ακόμα και στην ίδια ποικιλία από την ίδια γεωγραφική περιοχή, η σύσταση σε ρεσβερατρόλη αλλά και γε νικότερα σε πολυνφαινολικούς δευτερογενείς μεταβολίτες ποικίλει από χρονιά σε χρονιά. Αυτό είναι απόρροια της μεταβολής των κλιματολογικών συνθηκών.

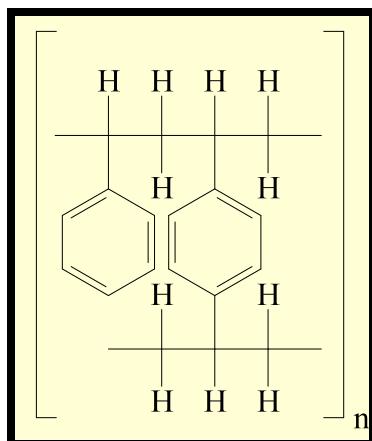
Τέλος, πρέπει να αναφερθεί ότι ενώ επιλέχθηκε η **Μανδηλαριά** Σαντορίνης για περαιτέρω κατεργασία, επεξεργάστηκ αν σε εργαστηριακή κλίμακα τα εκχυλίσματα όλων των κόκκινων ποικιλιών και το εκχύλισμα της λευκής ποικιλίας **Ασύρτικο Σαντορίνης**, τα αποτελέσματα όμως δεν ήταν τόσο αξιόλογα όσο τα αντίστοιχα της **Μανδηλαριάς**.

### 1.2.1.γ) Επιλογή τύπου ρητίνης

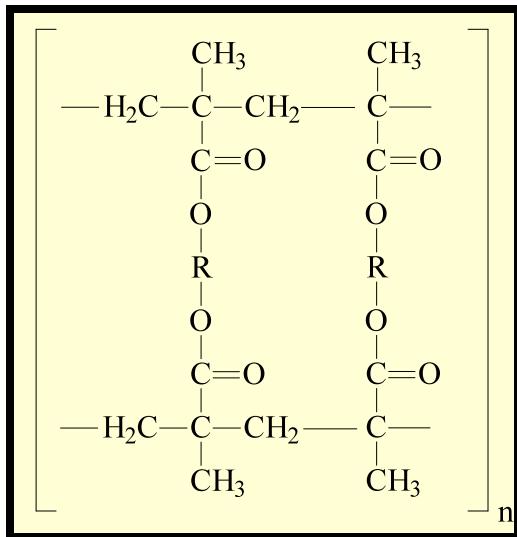
Στο παρόν στάδιο έγινε ο έλεγχος της προσροφητικής ικανότητας και η τελική επιλογή των ρητινών που χρησιμοποιήθηκαν. Πριν την περιγραφή των πειραμάτων που οδήγησαν στην τελική επιλογή της ρητίνης, παρατίθενται ορισμένα στοιχεία σχετικά με τις ρητίνες προσρόφησης.

### i.) Χαρακτηριστικά και χρήσεις ρητινών προσρόφησης

Οι ρητίνες προσρόφησης που ελέγχθηκαν ήταν η XAD4, η XAD7HP και η XAD16. Είναι μη ιονικές ρητίνες, έχουν μορφή λευκών σφαιριδίων και αποτελούνται από μία υδρόφοβη επιφάνεια με πλεγματοειδή δομή η οποία περιλαμβάνει μία συνεχή πολυμερή φάση αρωματικής ή ακρυλικής φύσης. Η επιφάνεια των XAD4 και XAD16 συνίσταται από αλυσίδες στυρενίου διασταυρούμενες με ομάδες διβινυλοβενζολίου (Σχήμα 16), ενώ η XAD7HP εμφανίζει μία ακρυλική επιφάνεια συνδεδεμένη επίσης με διβινυλοβενζολικές ομάδες (Σχήμα 17) και είναι λιγότερο υδρόφοβη από τις παραπάνω ρητίνες. Η συγκεκριμένη δομή δίνει στις ρητίνες άριστη φυσική, χημική και θερμική σταθερότητα, όπως και σταθερότητα στις διακυμάνσεις του pH των υδατικών διαλυμάτων και επιτρέ πει την προσρόφηση υδροφοβικών μορίων από πολικούς διαλύτες ή πτητικών οργανικών συστατικών από μίγματα. Πολύ σημαντικό στοιχείο είναι η δυνατότητα της συνεχούς επαναχρησιμοποίησής τους.



Σχήμα 16. Δομή ρητινών XAD4 και XAD16.



Σχήμα 17. Δομή ρητίνης XAD7HP.

Τα κυριότερα χαρακτηριστικά των ρητινών XAD4, XAD7HP και XAD16 παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.

Χαρακτηριστικά	XAD4	XAD7HP	XAD16
Δομή	Αρωματική	Ακρυλική	Αρωματική
Χρώμα	Λευκό	Λευκό	Λευκό
Εμβαδόν επιφάνειας (m <sup>2</sup> /g)	750	450	750
Πορώδες (cm/cm <sup>3</sup> )	0.65-0.70	0.55	0.58-0.63
Πυκνότητα (g/cm <sup>3</sup> )	0.62-0.63	0.62	0.61
Μέγεθος κόκκου (mm)	0.3-1.2	0.3-1.2	0.3-1.2

Πίνακας 4. Κυριότερα χαρακτηριστικά ρητινών προσρόφησης.

Κατά τη διέλευση υδατικών διαλυμάτων από τις ρητίνες κατακρατούνται τα πολυνφαινολικά μόρια τα οποία παραλαμβάνονται στη συνέχεια με οργανικούς διαλύτες, π.χ. MeOH. Αυτό οφείλεται κυρίως σε αλληλεπιδράσεις Van der Waals μεταξύ των υδρόφοβων ομάδων των μορίων και της ρητίνης που προκα λούνται από αλληλεπιδράσεις των ομάδων αυτών και από την τάση τους να αποδράσουν από το υδατικό περιβάλλον. Γενικότερα, πρέπει να λεχθεί ότι η χημική δομή κάθε ρητίνης σε συνδυασμό με τις φυσικές ιδιότητές της (π.χ. πορώδες), καθορίζει την προσροφητική της ικανότητα (Kyriakopoulos G. et al., 2005). Η διαδικασία που ακολουθείται είναι

αρχικά η διέλευση του υδατικού διαλύματος , η κατακράτηση των μορίων και στη συνέχεια η αναγέννηση της ρητίνης με τον κατάλληλο διαλύτη ο οποίος παρασύρει από τη ρητίνη τα προσκ ολλημένα μόρια. Αναλυτικότερα η λειτουργία των ρητινών προσρόφησης υπάρχει στην παράγραφο **1.2.1.δ.**

Πρέπει να διευκρινιστεί ότι πριν από κάθε χρήση η ρητίνη ενεργοποιείται ώστε να μπορεί να εκδηλώσει την προσροφητική δράση . Στη βιβλιογραφία αναφέρονται διάφοροι τρόποι ενεργοποίησης των ρητινών , από τους οποίους για την παρούσα εφαρμογή τόσο σε εργαστηριακό όσο και σε πιλοτικό επίπεδο, επιλέχθηκε η διαδοχική έκπλυση με H<sub>2</sub>O-Αλκοόλη-H<sub>2</sub>O (Kujawski W. *et al.*, 2004).

Η χρήση των ρητινών προσρόφησης είναι διαδεδομένη στον επιστημονικό χώρο και έχει αξιοποιηθεί ποικιλοτρόπως. Τα βιβλιογραφικά δεδομένα κάνουν λόγο κυρίως για χρήση των ρητινών XAD2 και XAD4 και σε μικρότερο βαθμό των XAD7HP και XAD16. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον εμφανίζουν οι ρητίνες XAD2 και XAD4 στην κατακράτηση και τον διαχωρισμό οργανικών συστατικών από το πόσιμο και το θαλάσσιο νερό (Malayappan B. *et al.*, 2004; Spotte S. & Adams G., 1982). Μία επιπλέον σημαντική εφαρμογή των ρητινών (XAD4 και XAD7HP) συναντάται στην κατακράτηση ουσιών που δρουν ως φυτοφ άρματα, όπως η αμιτρόλη και η τριφλουραλίνη (Kyriakopoulos G. *et al.*, 2005). Η συγκεκριμένη δράση μπορεί να αποδειχθεί πολύ χρήσιμη στις γεωργικές περιοχές όπου πολλές φορές παρατηρούνται υψηλά ποσοστά φυτοφαρμάκων στα ύδατα . Μία ακόμα χρήση που μελετήθηκε σε εργαστηριακό επίπεδο, είναι η κατακράτηση μετάλλων από σύμπλοκα Cl<sub>2</sub>-μετάλλουν. Σ' αυτή τη δοκιμή χρησιμοποιήθηκαν υδροχλωρικά και αλκαλικά διαλύματα συμπλόκων μετάλλων με Cl<sub>2</sub> και ως ρητίνη προσρόφησης η XAD7HP. Τα μέταλλα που μελετήθηκαν ήταν ο Au (III), ο Fe (III) και το Te (IV). Τα αποτελέσματα ήταν άκρως ενθαρρυντικά (Laatikainen M. & Paatero E., 2005). Η πιο διαδεδομένη χρήση της ρητίνης XAD7HP είναι η κατακράτηση και η ανάκτηση χρωστικών ουσιών . Για παράδειγμα, πρόσφατες έρευνες αποδεικνύουν την υψηλή απόδοση της XAD7HP, στην κατακράτηση των χρωστικών ουσιών (π.χ. καροτενοειδή ) από δείγματα που προέρχονται από διάφορα λαχανικά (Schoefs B., 2004).

Για τα πολυφαινολικά μόρια έχει διαπιστωθεί η καταλληλότητα των ρητινών XAD4 και XAD16 σε εργαστηριακά πειράματα, κατά τα οποία διέρχονταν από τις ρητίνες υδατικά διαλύματα πολυφαινολών, όπως η φαινόλη, χλωροφαινόλ ες, νιτροφαινόλες και μεθυλοφαινόλες (Abburi K. 2003; Ku Y. & Lee K.C., 2000).

Η τελική επιλογή της ρητίνης που χρησιμοποιήθηκε έγινε με βάση τη βιβλιογραφία και τα συμπεράσματα που εξήχθησαν σε εργαστηριακές δοκιμές οι οποίες συνέκριναν τη δυνατότητα προσρόφησης κάθε ρητίνης.

## ii.) Δοκιμές και αποτελέσματα

Η επιλογή της ρητίνης που είναι κατάλληλη για μια συγκεκριμένη διαδικασία γίνεται με βάση την ικανότητα προσρόφησης που εμφανίζει η ρητίνη για μία καθορισμένη ουσία που βρίσκεται διαλυμένη σε ορισμένο ύγρο  $H_2O$ . Η μελέτη της ισορροπίας προσρόφησης προσφέρει ένα μέτρο της προσροφητικής ικανότητας ενός υλικού και περιγράφεται από μία ισόθερμη καμπύλη. Η ισορροπία προσρόφησης εγκαθίσταται όταν η ποσότητα της ουσίας στο διάλυμα είναι σε δυναμική ισορροπία με την ποσότητα της ουσίας που έχει προσροφηθεί στην επιφάνεια του προσροφητικού υλικού. Η σχέση ισορροπίας μεταξύ του προσροφητικού υλικού και της προσροφόμενης ουσίας σε μία δεδομένη θερμοκρασία, καθορίζει μία ισόθερμη καμπύλη που χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένες σταθερές των οποίων η τιμή εκφράζει τις ικανότητες της επιφάνειας του προσροφητικού υλικού (Scordino M. *et al.*, 2004). Το πιο δημοφιλές πρότυπο για τη μελέτη της προσρόφησης για ένα απλό σύστημα διαλύτη-διαλυμένης ουσίας είναι η ισόθερμη Freundlich. Έχει χρησιμοποιηθεί σε πολλές μελέτες για τη σύγκριση της ικανότητας προσρόφησης εμπορικών ρητινών ( Scordino M. *et al.*, 2003; Li A. *et al.*, 2002; Li A. *et al.*, 2001) και θεωρείται από τις πιο αξιόπιστες μεθόδους.

## **Βασικές αρχές προτύπου Freundlich**

Η εφαρμογή του προτύπου Freundlich έγινε κάτω υπό στατικές και κινητικές συνθήκες και χρησιμοποιήθηκε διάλυμα ουσίας γνωστής συγκέντρωσης.

### **Προσρόφηση υπό στατικές συνθήκες**

Για κάθε ρητίνη που ελέγχθηκε σε στατικές συνθήκες πραγματοποιήθηκαν τα εξής βήματα:

- ✓ Εκχύλιση ρητίνης με  $\text{CH}_3\text{COCH}_3$  για 8 h.
- ✓ Ξήρανση για 2 h υπό κενό, σε θερμοκρασία δωματίου.
- ✓ Εισαγωγή 0.1 g ρητίνης σε 5 κωνικές φιάλες όγκου 250 ml.
- ✓ Προσθήκη 0.5 ml MeOH στις ρητίνες σε κάθε κωνική φιάλη.
- ✓ Έκπλυση των ρητινών τρεις φορές με απιονισμένο  $\text{H}_2\text{O}$  σε κάθε κωνική φιάλη.
- ✓ Προσθήκη 100 ml υδατικού διαλύματος της επιλεγόμενης ουσίας σε κάθε κωνική φιάλη ( $V_1$ ).
- ✓ Στις πέντε κωνικές φιάλες η συγκέντρωση της ουσίας ( $C_0$ ) ήταν 200 mg/L, 400 mg/L, 600 mg/L, 800 mg/L και 1000 mg/L αντίστοιχα.
- ✓ Οι κωνικές φιάλες πωματίστηκαν και τοποθετήθηκαν σε αναδευτήρα για 24 h.
- ✓ Μετρήθηκαν οι συγκεντρώσεις της ουσίας ( $C_e$ ).
- ✓ Η ικανότητα προσρόφησης ( $q_e$ ) της ρητίνης υπολογίστηκε με βάση τη μαθηματική σχέση:

$$q_e = V_1(C_0 - C_e)/MW$$

όπου  $q_e$  είναι η ικανότητα προσρόφησης της ρητίνης (mmol/g).

$V_1$  είναι ο όγκος του διαλύματος της ουσίας (L).

**C<sub>0</sub>** είναι η αρχική συγκέντρωση του διαλύματος της ουσίας (mmol/L).

**C<sub>e</sub>** είναι η συγκέντρωση του διαλύματος της ουσίας (mmol/L), σε μία συγκεκριμένη χρονική στιγμή.

**M** είναι το μοριακό βάρος της ουσίας.

**W** είναι το βάρος της ξηρής ρητίνης (g).

Η μαθηματική μορφή του προτύπου Freundlich είναι:

$$q_s = K_F C_s^{b_F} \quad \text{ή στη γραμμική μορφή του: } \log q_s = \log K_F + b_F \log C_s$$

όπου **q<sub>s</sub>** είναι η συγκέντρωση της ουσίας που έχει προσροφηθεί στη ρητίνη (mg/g).

**C<sub>s</sub>** είναι η συγκέντρωση της ουσίας που βρίσκεται στο διάλυμα (mg/L).

**K<sub>F</sub>**, **b<sub>F</sub>** είναι σταθερές που η τιμή τους καθορίζει την προσροφητική ικανότητα της ρητίνης. Εξαρτώνται από τη θερμοκρασία. Το **b<sub>F</sub>** ισούται με **1/n** όπου **n** είναι επίσης μία σταθερά. Ακόμα, όσο αυξάνεται η τιμή του **K<sub>F</sub>** (L/g) τόσο αυξάνεται και η προσροφητική ικανότητα της ρητίνης.

### Προσρόφηση υπό κινητικές συνθήκες

Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε κινητικές συνθήκες, ξεχωρίζουν τα εξής:

- ✓ Χρήση μίας στήλης χρωματογραφίας διαστάσεων 4.5 cm x 1.5 cm.
- ✓ Πλήρωση της στήλης με την υπό εξέταση ρητίνη.
- ✓ Σύνδεση της στήλης με μία αντλία πίεσης Prep 100 pump στους 20 °C.
- ✓ Η συγκέντρωση του διαλύματος ήταν 70.9 mmol/L.
- ✓ Ο ρυθμός ροής του διαλύματος από τη στήλη ήταν 6 BV/h όπου BV είναι ο συνολικός όγκος ρητίνης στη στήλη. Στην παρούσα δοκιμή το BV ισούται με 8 ml.
- ✓ Η προσροφητική ικανότητα κάθε ρητίνης εκτιμήθηκε με δύο τρόπους:

- **Τη χωρητικότητα σημείου καμπής (breakthrough capacity):** Αποτελεί το συνολικό ποσό της προσροφηθείσας ουσίας, μέχρι η συγκέντρωση του διαλύματος που εξέρχεται από τη στήλη να γίνει ίση με 0.05 mM και εκφράζεται σε mmol/ml.
- **Τη συνολική ικανότητα προσρόφησης (total capacity):** Εκφράζει το συνολικό ποσό της προσρόφησης ουσίας, όταν η συγκέντρωση του εξερχόμενου διαλύματος από τη στήλη γίνει ίσο με αυτή του εισερχόμενου και εκφράζεται σε mmol/ml.

Είναι ευνόητο ότι όσο μεγαλύτερη τιμή λαμβάνουν τα δύο παραπάνω μεγέθη, τόσο πιο αυξημένη είναι η προσροφητική ικανότητα της ρητίνης.

- ✓ Οι ικανότητες προσρόφησης ( $q_c$ ) υπολογίστηκαν με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$q_c = V_2(C_1 - C_e) / V_3$$

όπου  $q_c$  είναι η ικανότητα προσρόφησης της ρητίνης (mmol/ml).

$V_2$  είναι ο όγκος του διαλύματος της ουσίας μέσα στη στήλη (L).

$C_1$  είναι η αρχική συγκέντρωση του διαλύματος της ουσίας (mmol/L).

$C_e$  είναι η συγκέντρωση του διαλύματος της ουσίας (mmol/L), σε μία συγκεκριμένη χρονική στιγμή.

$V_3$  είναι ο όγκος της ρητίνης στη στήλη (ml).

Η μέτρηση των συγκεντρώσεων της ουσίας κατά τη διάρκεια όλων των παραπάνω δοκιμών, έγινε σε φασματοφωτόμετρο Shimadzu-160A.

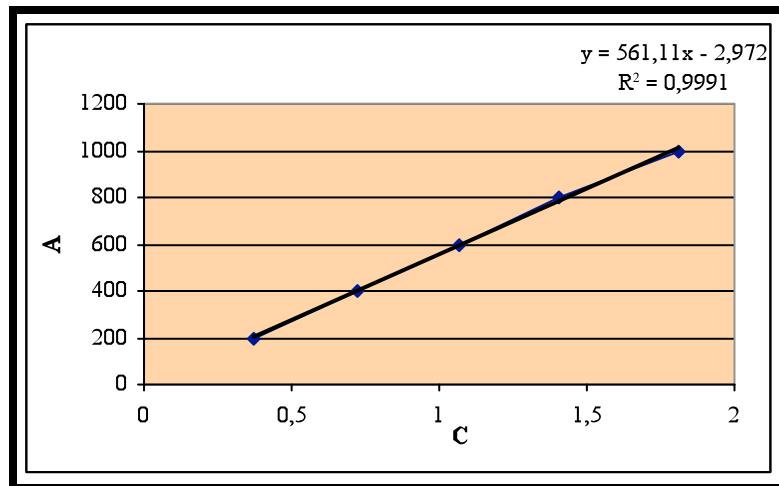
Μετά την παρουσίαση των βασικών αρχών της μεθόδου, ακολουθεί η πρακτική εφαρμογή της στη μελέτη των ρητινών XAD4, XAD7HP και XAD16.

## Μελέτη της προσροφητικής ικανότητας των ρητινών XAD4, XAD7HP και XAD16

Στη δοκιμή ελέγχθηκε η ικανότητα των ρητινών στην προσρόφηση της (+)-κατεχίνης η οποία έχει μοριακό βάρος ίσο με 290. Στις δοκιμές σε στατικές συνθήκες υπολογίστηκε το  $q_e$  για κάθε ρητίνη στις πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις της (+)-κατεχίνης, σχεδιάστηκαν οι καμπύλες  $C_e/q_e$  και  $\log C_e/\log q_e$  και υπολογίστηκαν τα  $K_F$  και  $n$ . Ο υπολογισμός των συγκεντρώσεων  $C_e$  έγινε με την κατασκευή καμπύλης αναφοράς (Σχήμα 18), μετά από μέτρηση της απορρόφησης στο UV, πέντε διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης (Πίνακας 5).

A <sub>0</sub>	C <sub>0</sub> (mg/L)
1.808	1000
1.405	800
1.07	600
0.72	400
0.37	200

Πίνακας 5. Τιμές καμπύλης αναφοράς.



Σχήμα 18. Καμπύλη αναφοράς.

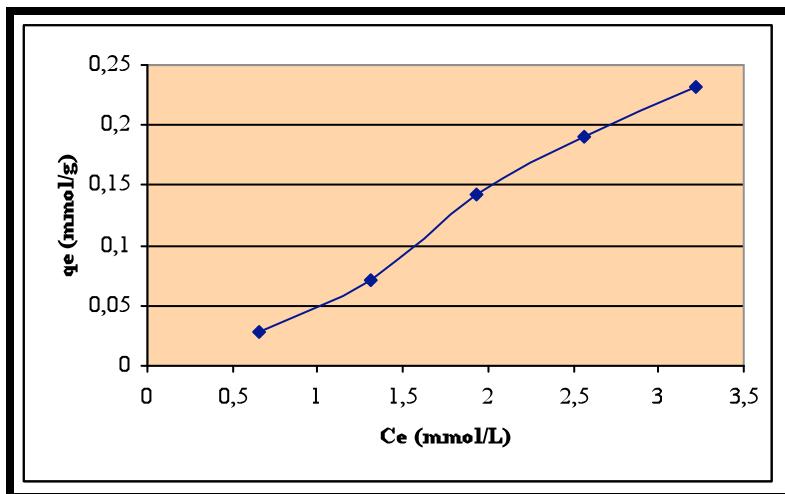
Στις δοκιμές σε κινητικές συνθήκες υπολογίστηκε η χωρητικότητα σημείου καμπής (**breakthrough capacity**) και η συνολική ι κανότητα προσρόφησης (**total capacity**) των ρητινών.

### Προσρόφηση υπό στατικές συνθήκες

#### XAD4

A	C <sub>e</sub> (mg/L)	V <sub>1</sub> (L)	W (g)	M	C <sub>e</sub> (mmol/L)	q <sub>e</sub> (mmol/g)
1.668	932.9595	0.1	0.1	290	3.217101655	0.231174
1.333	744.9876	0.1	0.1	290	2.568922862	0.189698
1.001	558.6991	0.1	0.1	290	1.926548655	0.142417
0.681	379.1439	0.1	0.1	290	1.307392793	0.071918
0.347	191.7332	0.1	0.1	290	0.661148862	0.028506

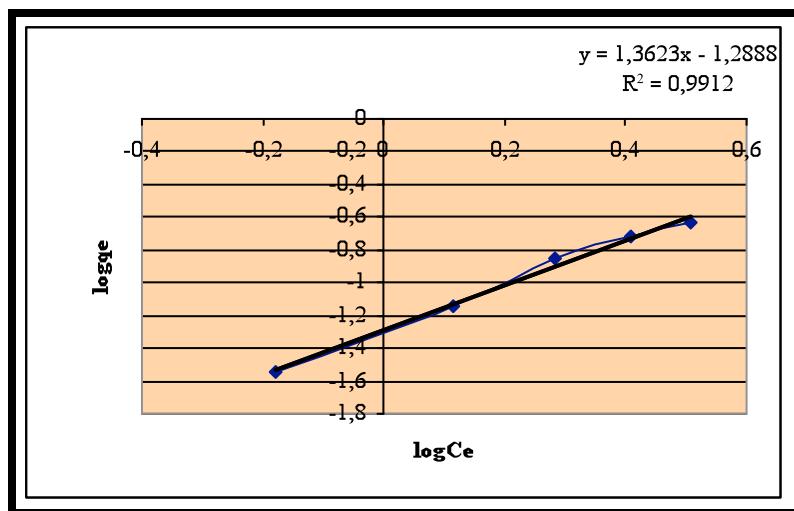
Πίνακας 6. Μελέτη ρητίνης XAD4 σε στατικές συνθήκες.



Σχήμα 19. Γραφική παράσταση C<sub>e</sub>/q<sub>e</sub> για τη ρητίνη XAD4.

logC <sub>e</sub>	logq <sub>e</sub>
0.507465	-0.63606
0.409751	-0.72194
0.28478	-0.84644
0.116406	-1.14317
-0.1797	-1.54506

Πίνακας 7. Μελέτη ρητίνης XAD4 σε στατικές συνθήκες.



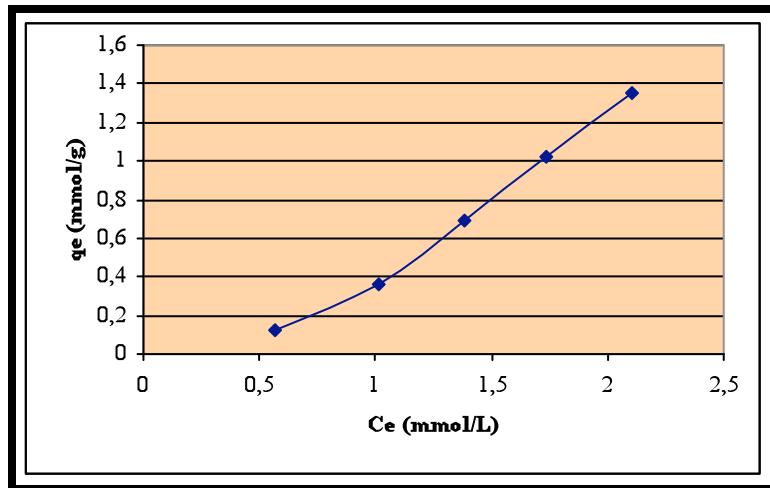
Σχήμα 20. Γραφική παράσταση  $\log C_e / \log q_e$  για τη ρητίνη XAD4.

Από την τελευταία γραφική παράσταση μπορούν να υπολογιστούν οι σταθερές  $K_F$  και  $n$  για τη ρητίνη XAD4. Πιο συγκεκριμένα, η μαθηματική εξίσωση που εκφράζει την παραπάνω γραφική παράσταση, είναι η γραμμική μορφή του προτύπου Freundlich  $\log q_s = b_F \log C_s + \log K_F$  ή  $\log q_s = 1/n \log C_s + \log K_F$ . Αντιστοιχώντας τον προηγ oύμενο γενικό τύπο, με αυτόν που εκφράζει την παρούσα γραφική παράσταση  $y = 1.3623x - 1.2888$ , προκύπτει ότι  $\log K_F = -1.2888$  και  $n = 1/1.3623$  οπότε οι τιμές είναι  $K_F = 0.05$  (L/g) και  $n = 0.734$ .

### XAD7HP

A	$C_e$ (mg/L)	$V_1$ (L)	W (g)	M	$C_e$ (mmol/L)	$q_e$ (mmol/g)
1.091	609.199	0.1	0.1	290	2.100686	1.34759
0.901	502.5881	0.1	0.1	290	1.733062	1.025558
0.718	399.905	0.1	0.1	290	1.378983	0.689983
0.529	293.8552	0.1	0.1	290	1.013294	0.366017
0.298	164.2388	0.1	0.1	290	0.566341	0.123315

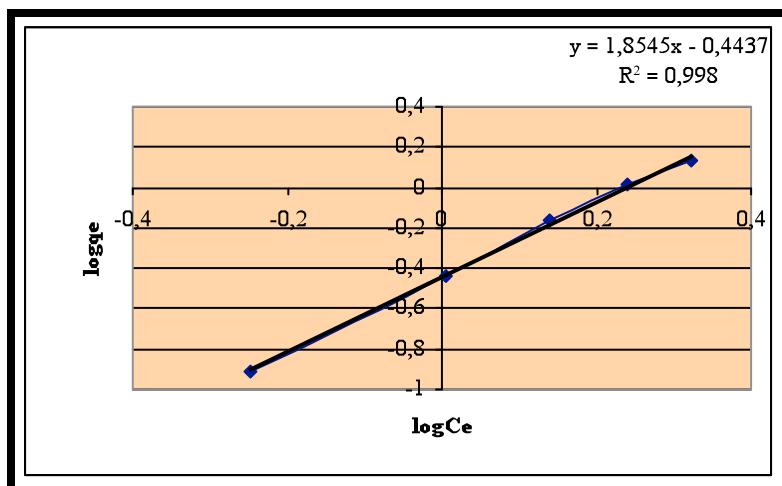
Πίνακας 8. Μελέτη ρητίνης XAD7HP σε στατικές συνθήκες.



Σχήμα 21. Γραφική παράσταση  $C_e/q_e$  για τη ρητίνη XAD7HP.

$\log C_e$	$\log q_e$
0.322361	0.129558
0.238814	0.01096
0.139559	-0.16116
0.005735	-0.4365
-0.24692	-0.90899

Πίνακας 9. Μελέτη ρητίνης XAD7HP σε στατικές συνθήκες.



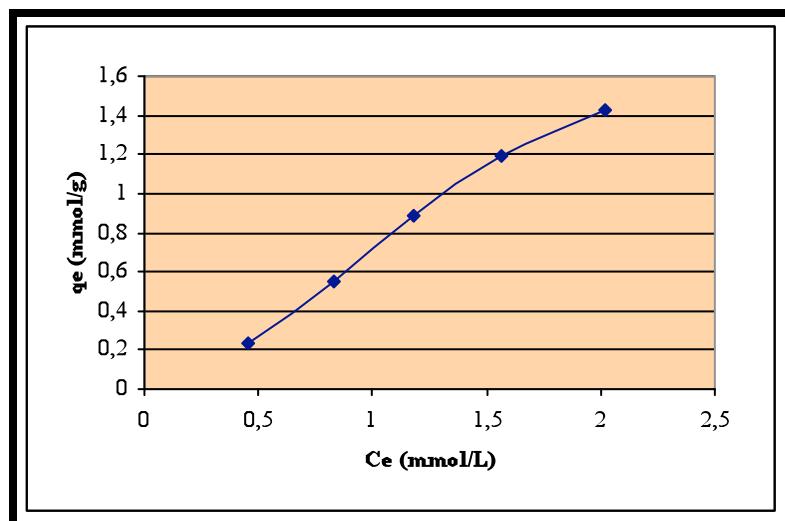
Σχήμα 22. Γραφική παράσταση  $\log C_e/\log q_e$  για τη ρητίνη XAD7HP.

Από την τελευταία γραφική παράσταση μπορούν να υπολογιστούν οι σταθερές  $K_F$  και  $n$  για τη ρητίνη XAD7HP, με τον τρόπο που περιγράφηκε στην περίπτωση της ρητίνης XAD4. Οι τιμές είναι  $K_F= 0.36$  (L/g) και  $n= 0.539$ .

### XAD16

A	C <sub>e</sub> (mg/L)	V <sub>1</sub> (L)	W (g)	M	C <sub>e</sub> (mmol/L)	q <sub>e</sub> (mmol/g)
1.05	586.1935	0.1	0.1	290	2.021356897	1.426919
0.814	453.7715	0.1	0.1	290	1.564729448	1.193891
0.616	342.6718	0.1	0.1	290	1.181626759	0.887339
0.434	240.5497	0.1	0.1	290	0.829481862	0.549828
0.24	131.6944	0.1	0.1	290	0.454118621	0.235537

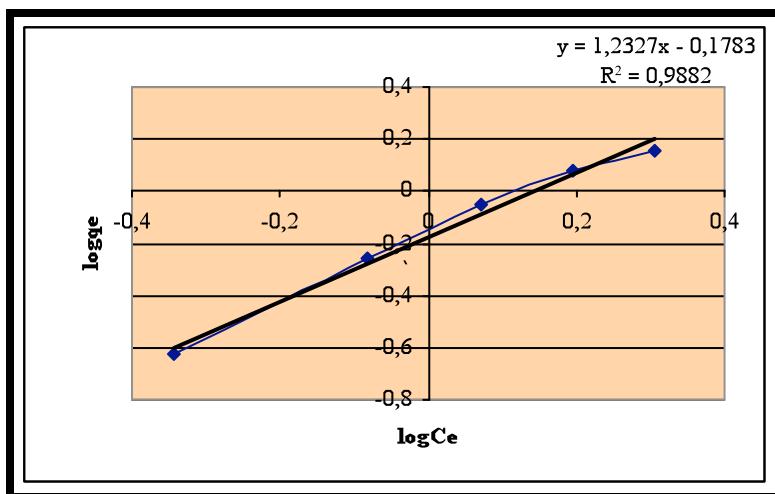
Πίνακας 10. Μελέτη ρητίνης XAD16 σε στατικές συνθήκες.



Σχήμα 23. Γραφική παράσταση C<sub>e</sub>/q<sub>e</sub> για τη ρητίνη XAD16.

logC <sub>e</sub>	logq <sub>e</sub>
0.305643	0.154399
0.194439	0.076965
0.07248	-0.05191
-0.08119	-0.25977
-0.34283	-0.62794

Πίνακας 11. Μελέτη ρητίνης XAD16 σε στατικές συνθήκες.



Σχήμα 24. Γραφική παράσταση  $\log C_e/\log q_e$  για τη ρητίνη XAD16.

Από την τελευταία γραφική παράσταση μπορούν να υπολογιστούν οι σταθερές  $K_F$  και  $n$  για τη ρητίνη XAD16, με τον τρόπο που περιγράφηκε στην περίπτωση της ρητίνης XAD4. Οι τιμές είναι  $K_F = 0.66 \text{ (L/g)}$  και  $n = 0.811$ .

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 12) αναφέρονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα των στατικών δοκιμών στις ρητίνες XAD4, XAD7HP και XAD16. Όπως φαίνεται από τον πίνακα, οι υψηλότερες τιμές  $K_F$  και  $n$  παρατηρούνται στην περίπτωση της ρητίνης XAD16, γεγονός που συνεπάγεται μεγαλύτερη προσροφητική ικανότητα γι ' αυτή . Συνεπώς , την καλύτερη προσρόφηση την εμφανίζει η XAD16, ενώ την ακολουθεί η XAD7HP.

Ρητίνη	Μαθηματική Σχέση	$K_F \text{ (L/g)}$	$n$	$R^2$
XAD4	$y=1.3623x-1.2888$	0.05	0.734	0.9912
XAD7HP	$y=1.8545x-0.4437$	0.36	0.539	0.9980
XAD16	$y=1.2327x-0.1783$	0.66	0.811	0.9882

Πίνακας 12. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα δοκιμών σε στατικές συνθήκες.

### Προσρόφηση υπό κινητικές συνθήκες

Μετά την πραγματοποίηση του πειράματος όπως ακριβώς περιγράφη κε στην παράγραφο προηγούμενα, υπολογίστηκαν η χωρητικότητα σημείου καμπής

(**breakthrough capacity**) και η συνολική ικανότητα προσρόφησης (**total capacity**) των ρητινών XAD4 και XAD16 (Πίνακας 13).

Pητίνη	Breakthrough capacity (mmol/ml)	Total capacity) (mmol/ml)
XAD4	0.248	0.618
XAD16	0.377	0.942

Πίνακας 13. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα δοκιμών σε κινητικές συνθήκες.

Η μελέτη του Πίνακα 13 αποδεικνύει ότι η ρητίνη XAD16 έχει τη μεγαλύτερη ικανότητα προσρόφησης, καθώς εμφανίζει τις υψηλότερες τιμές και στα δύο μετρούμενα μεγέθη.

Τα συμπεράσματα που εξήχθησαν μετά από τις πειραματικές δοκιμές σε στατικές και κινητικές συνθήκες, ήταν ότι την υψηλότερη ικανότητα προσρόφησης την εκδηλώνει η XAD16 και τη μικρότερη η XAD4. Η XAD7HP εμφανίζει μία ενδιάμεση προσροφητική ικανότητα. Σύμφωνα με τα παραπάνω **επιλέχθηκε η ρητίνη XAD16 για την εφαρμογή της κατεργασίας στα στέμφυλα, με ζητούμενο την παραλαβή των πολυνφαινολικών μορίων.** Επιπλέον, μετά από τη μελέτη και της βιβλιογραφίας (Schoefs B. et al., 2004), αποφασίστηκε η χρήση της ρητίνης XAD7HP στην κατεργασία των στεμφύλων, με σκοπό την απομόνωση των χρωστικών ουσιών.

#### 1.2.1.δ) Εφαρμογή και βελτιστοποίηση της μεθόδου

Τα δύο προηγούμενα βήματα είναι πολύ σημαντικά για τη δημιουργία μίας σωστής βάσης ανάπτυξης της μεθοδολογίας, ωστόσο το κυριότερο και πιο κρίσιμο στάδιο είναι η εφαρμογή της μεθόδου κατεργασίας με ρητίνες και η συνεχής βελτίωσή της.

Σκοπός μας ήταν η ανάπτυξη της κατεργασίας σε μεγαλύτερη κλίμακα από την εργαστηριακή ώστε να αποτελέσει την αφετηρία για μία πιο εκτεταμένη μελλοντική χρήση στα οινοποιεία.

Μετά την επιλογή της καλύτερης δυνατής ποικιλίας στεμφύλων (Μανδηλαριά Σαντορίνης) και ρητίνης (XAD16 και XAD7HP), ακολούθησε η πραγματοποίηση της

κατεργασίας αρχικά σε εργαστηριακό επίπεδο , για να περάσει σταδιακά σε πιλοτική κλίμακα.

### i.) Εφαρμογή της μεθόδου σε εργαστηριακό επίπεδο

Ξεκινώντας την πρώτη δοκιμή, πραγματοποιήθηκε αρχικά η προετοιμασία του διαχωριστικού μέσου, δηλαδή η πλήρωση της χρωματογραφικής στήλης με ρητίνη, όπως περιγράφεται παρακάτω.

- ✓ Πραγματοποιήθηκε η διέλευση ενός όγκου διαλύματος της τάξης του 1 L (10 g) οπότε επιλέχθηκε μία στήλη με διάμετρο 4.0 cm. Η ποσότητα της ρητίνης XAD16 που χρησιμοποιήθηκε ήταν 100 g (164 ml). Η τιμή της χωρητικότητας του σημείου καμπής (breakthrough capacity) για τη ρητίνη XAD16 είναι 0.377 mmol/ml (παρ. 1.2.1.γ). Επίσης, η περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες (εκφρασμένη σε κατεχίνη) του εκχυλίσματος που θα εισέλθει στη στήλη, έχει υπολογιστεί με ανάλυση με HPLC ίση με 0.27 mmol/10g. Γίνεται αντιληπτό ότι τα 164 ml ρητίνης που χρησιμοποιούνται τελικά, αρκούν για την κατακράτηση πολύ μεγαλύτερης ποσότητας πολυφαινολών. Η ρητίνη προστέθηκε στη στήλη υπό τη μορφή εναιωρήματος σε απιονισμένο  $H_2O$ .
- ✓ Η προσθήκη μίας πολύ μικρής ποσότητας χαλαζία στο κατώτερο μέρος της στήλης πριν την πλήρωσή της με ρητίνη, κρίθηκε αναγκαία για να μην φράξουν οι πόροι εξόδου.
- ✓ Στη συνέχεια ακολούθησε η ενεργοποίηση της ρητίνης που έγινε με τη διαδοχική διέλευση  $H_2O$ -EtOH- $H_2O$ . Η ποσότητα διαλυτών που απαιτείται, εξαρτάται από την ποσότητα της ρητίνης και για τα 100 g ρητίνης αρκούν 300 ml από τον κάθε διαλύτη.

Αφού ολοκληρώθηκε η προετοιμασία της στήλης με τη ρητίνη, ακολούθησε η παραγωγή του διαλύματος που θα χρησιμοποιούταν και η διέλευσή του από τη στήλη. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν είναι τα εξής:

- ✓ Μετά τη συλλογή των στεμφύλων, τη ξήρανση, την κονιοποίηση, την εκχύλιση με αλκοόλη και την εξάτμιση του διαλύτη , έγινε η αραίωση του εκχυλίσματος με απιονισμένο  $H_2O$ . Σ' αυτό το σημείο πρέπει να τονιστεί ότι η ξήρανση πραγματοποιήθηκε σε σκιερό χώρο, χωρίς τεχνητά μέσα. Η εκχύλιση μπορεί να γίνει

είτε με MeOH είτε με EtOH, καθώς το αποτέλεσμα είναι το ίδιο αφού τα πολυφαινολικά μόρια εκχυλίζονται και παραλαμβάνονται εξίσου καλά και με τους δύο διαλύτες. Σε όλες τις δοκιμές που έγιναν σε εργαστηρι ακό επίπεδο , χρησιμοποιήθηκαν ποσότητες εκχυλισμάτων που προέρχονταν από μία αρχική εκχύλιση 2.5 Kg στεμφύλων με 3x8L MeOH. Ωστόσο, συνίσταται η χρήση της EtOH επειδή είναι λιγότερο επιβλαβής για την υγεία του ανθρώπου . Επίσης , η εξάτμιση της αλκοόλης δεν ήταν μέχρι ξηρού και ολοκληρώθηκε όταν είχε μείνει ένα ποσοστό 5% του αρχικού όγκου της. Ακόμα, όσον αφορά την ποσότητα H<sub>2</sub>O που χρησιμοποιήθηκε στην αραίωση, αυτή σχετίζεται με την ποσότητα του εκχυλίσματος . Στην πρώτη δοκιμή χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα που ζύγιζε 10 g και όγκος απιονισμένου H<sub>2</sub>O ίσος με 1 L. Η ποσότητα αυτή θα μπορούσε να διαλυθεί και σε πολύ μικρότερο όγκο H<sub>2</sub>O, αλλά επιλέχθηκε ο συγκεκριμένος όγκος για να μην δημιουργηθούν τυχόν προβλήματα από την ύπαρξη πολλών αιωρούμενων σωματιδίων στο διάλυμα. Το γεγονός αυτό θα δυσχέραινε πολύ το επόμενο στάδιο που ήταν η διήθηση.

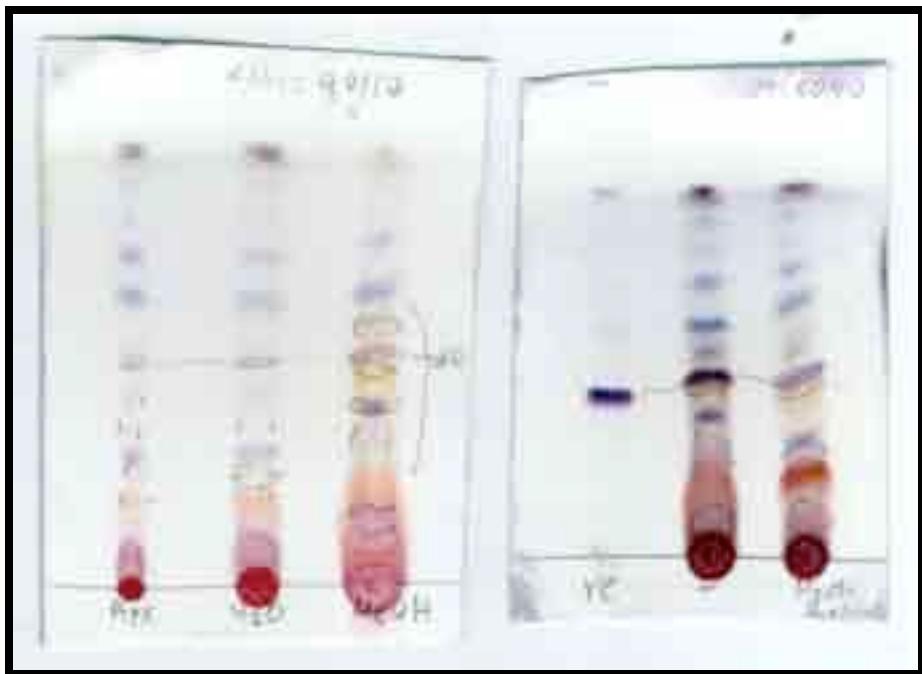
- ✓ Στόχος της διήθησης ήταν η δημιουργία ενός όσο το δυνατόν διαυγούς διαλύματος που δεν θα έφραζε τους πόρους της χρωματογραφικής στήλης και έγινε υπό κενό, σε χωνί Buchner με διηθητικό χαρτί.
- ✓ Επόμενο βήμα αποτελούσε η διέλευση του υδαταλκοολικού διαλύματος (1 L) από τη στήλη ώστε να κατακρατηθούν τα πολυφαινολικά μόρια και να απομακρυνθούν τα γλυκοσιδικά συστατικά αφού αυτά δεν προσροφούνται στη ρητίνη. Ο ρυθμός με τον οποίο το διάλυμα διαπερνούσε τη στήλη ήταν 1L/h.
- ✓ Αφού ολοκληρώθηκε η διέλευση του διαλύματος από τη στήλη, ακολούθησε η προσθήκη απιονισμένου H<sub>2</sub>O ίσου με το 1/3 του όγκου του υδαταλκοολικού διαλύματος και με την άσκηση πίεσης αέρα απομακρύνθηκε όλο το H<sub>2</sub>O από τη στήλη.
- ✓ Στη συνέχεια εισήχθη στη στήλη όγκος αλκοόλης ίσος με το 1/3 του όγκου του υδαταλκοολικού διαλύματος, για να αποκολληθούν οι πολυφαινόλες από τη ρητίνη και αφέθηκε να διέλθει με γρηγορότερο ρυθμό από αυτόν που διήλθε το αρχικό διάλυμα.
- ✓ Τελικό στάδιο α ποτέλεσε η εξάτμιση του αλκοολικού εκλούσματος και η παραλαβή των πολυφαινολικών ουσιών. Το μίγμα ζύγιζε 1.1 g.
- ✓ Η ρητίνη που χρησιμοποιήθηκε, μπορεί να χρησιμοποιηθεί πάλι αφού ξεπλυνθεί με αρκετή ποσότητα απιονισμένου H<sub>2</sub>O (1 L στη συγκεκριμένη ποσότητα).

Η σχηματική παράσταση της συνολικής διαδικασίας που ισχύει πάντα, άσχετα με τις χρησιμοποιούμενες ποσότητες διαχωριστικών μέσων και φυτικού υλικού και αποτελεί τη βάση της μεθόδου, παρουσιάζεται στο Σχήμα 25.



Σχήμα 25. Αρχή μεθόδου κατεργασίας με ρητίνες.

Το τελικό κλάσμα ελέγχθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) και ψεκάστηκε με διάλυμα θεικής βανιλλίνης (Εικόνα 5).



Εικόνα 5. Έλεγχος με TLC του αλκοολικού εκλούσματος μετά την κατεργασία με ρητίνη XAD16.

Στο αριστερό χρωματογράφημα παρατηρείται κατά σειρά το αρχικό υδαταλκοολικό διάλυμα που προστέθηκε στη στήλη, το τελικό υδαταλκοολικό διάλυμα που εξήχθη της στήλης και το αλκοολικό έκλουσμα που περιέχει τα πολυφαινολικά μόρια. Είναι εμφανής η διαφορά μεταξύ του αλκοολικού εκλούσματος και των άλλων δύο διαλυμάτων, καθώς φαίνεται ότι είναι πλουσιότερο σε πολυφαινόλες. Στο δεξιό χρωματογράφημα γίνεται συγχρωματογράφηση του αλκοολικού εκλούσματος και πρότυπης *trans*-ρεσβερατρόλης η οποία αποδεικνύει την παρουσία του συγκεκριμένου μορίου.

Ένα θέμα που προκύπτει είναι το κατά πόσο είναι αρκετή μία διέλευση του υδαταλκοολικού διαλύματος από τη ρητίνη για να κατακρατηθεί το μεγαλύτερο ποσοστό πολυφαινολών. Γι' αυτόν τον λόγο πραγματοποιήθηκε η ίδια διαδικασία άλλες τρεις φορές στο υδαταλκοολικό διάλυμα που παρελήφθη από τη στήλη μετά την πρώτη διέλευση. Εξετάστηκαν χρωματογραφικά τα αλκοολικά εκλούσματα και υπολογίστηκε το βάρος τους. Από 1.1 g που ήταν το βάρος του πρώτου, το δεύτερο ήταν 370 mg και τα επόμενα δύο ήταν κάτω από 100 mg. Όσον αφορά το χρωματογράφημα (Εικόνα 6),

εύκολα διαπιστώνεται ότι ενώ στα δύο πρώτα εκλούσματα υπάρχει μία πλούσια εικόνα σε πολυφαινολικά, τα δύο τελευταία εμφανώς υστερούν.



Εικόνα 6. Έλεγχος με TLC των αλκοολικών εκλουσμάτων μετά από τέσσερις διελεύσεις από στήλη με ρητίνη XAD16.

Στη συνέχεια το υδαταλκοολικό διάλυμα οδηγήθηκε σε κατεργασία με ρητίνη XAD7HP, ώστε να παραληφθούν οι χρωστικές ουσίες των στεμφύλων. Ακολουθήθηκε ακριβώς η ίδια διαδικασία όπως και στην περίπτωση της ρητίνης XAD16 και το τελικό αλκοολικό έκλουσμα ζύγιζε 3.5 g. Επαναλήφθηκε η διαδικασία ακόμα δύο φορές και ζυγίστηκαν τα αλκοολικά εκλούσματα, δίνοντας πολύ χαμηλά βάρη (300-400 mg). Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι μετά τη δεύτερη διέλευση από τη στήλη το υδαταλκοολικό διάλυμα είχε χάσει την ένταση του κόκκινου χρώματός του και διατηρούσε ένα ροζέ χρώμα το οποίο ατόνησε τελείως μετά την τρίτη διέλευση.

Σχετικά λοιπόν με τον απαιτούμενο αριθμό διελεύσεων από τη στήλη, για την περίπτωση της ρητίνης XAD16, δύο φορές είναι αρκετές ακόμα και για τα πιο πυκνά διαλύματα. Το ίδιο ισχύει και για τη XAD7HP.

Στις επόμενες δοκιμές κύριο μέλημα ήταν η εξέταση του χρονικού διαστήματος που απαιτείται για να διέλθει το υδαταλκοολικό διάλυμα από τη στήλη ώστε να επιτευχθεί το μέγιστο δυνατό αποτέλεσμα.

## **Μελέτη του απαιτούμενου ρυθμού διέλευσης από τη στήλη**

Πρέπει να σημειωθεί ότι ο χρόνος διέλευσης από τη ρητίνη δεν μεταβάλλεται αναλογικά, π.χ. αν το 1 L διέρχεται σε 1 h, δεν σημαίνει ότι τα 2 L χρειάζονται 2 h. Είναι συνάρτηση της συγκέντρωσης του διαλύματος σε πολυφαινόλες, του μεγέθους της στήλης και της ποσότητας της ρητίνης. Για τις επόμενες μελέτες χρησιμοποιήθηκε 1 g αλκοολικού εκχυλίσματος το οποίο διαλύθηκε σε 1 L H<sub>2</sub>O. Σκόπιμα έγινε τέτοια μεγάλη αραίωση για πρακτική διευκόλυνση ώστε να αποφευχθούν προβλήματα από την πυκνότητα του διαλύματος. Χρησιμοποιήθηκε η ίδια στήλη και η ίδια ποσότητα ρητίνης, δηλαδή είχε βάρος 100 g και όγκο 164 ml. Πρέπει να σημειωθεί ότι ο όγκος της ρητίνης στη στήλη ορίζεται ως **“Bed Volume” (BV)**. Επίσης, η χρήση μεγαλύτερης ποσότητας ρητίνης από αυτή που πρακτικά απαιτείται δεν επηρεάζει την απόδοση, αντίθετα μικρότερη ποσότητα από την απαιτούμενη οδηγεί σε γρήγορο κορεσμό της και μειώνει την απόδοση. Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία και στο τέλος ελέγχθηκε το βάρος των αλκοολικών εκλουσμάτων. Πραγματοποιήθηκαν επτά δοκιμές με χρόνους 30 min (12 BV/h), 45 min (8 BV/h), 1 h (6 BV/h), 1.5 h (4 BV/h), 2 h (3 BV/h), 2.5 h (2.4 BV/h) και 3 h (2 BV/h). Στο πείραμα με χρόνο 30 min (12 BV/h), το αλκοολικό έκλουσμα ζύγιζε 70 mg, σ' αυτό με χρόνο 45 min (8 BV/h), ζύγιζε 86 mg. Η διέλευση σε 1 h (6 BV/h), έδωσε βάρος 115 mg, ενώ η περαιτέρω αύξηση του χρόνου μετέβαλε λίγο το αποτέλεσμα (130 mg), χωρίς όμως μεγάλη πρακτική σημασία.

Στη συνέχ εια έγιναν πειράματα με υδαταλκοολικά διαλύματα με την ίδια συγκέντρωση σε μεγαλύτερο όγκο (2g/2L). Το διάλυμα διήλθε σε 1 h (12 BV/h), 1.5 h (8 BV/h), 2 h (6 BV/h), 2.5 h (4.8 BV/h) και 3 h (4 BV/h) από τη στήλη. Διαπιστώθηκε ότι το καλύτερο αποτέλεσμα ήταν αν στις 2 h (6 BV/h). Οι υπόλοιπες δοκιμές σε μεγαλύτερους χρόνους δεν είχαν ουσιαστική διαφοροποίηση στο αποτέλεσμα. Επομένως, αποδείχθηκε ότι ο προτεινόμενος ρυθμός κυμαίνεται μεταξύ 4-6 BV/h. Ο ακριβής ρυθμός πρέπει να καθορίζεται ανάλογα με τη συγκέντρωση του διαλύματος που εισάγεται στη στήλη. Όσο αυξάνονται οι συγκεντρώσεις, τόσο απαιτείται πιο αργός ρυθμός και η χρήση πιο αργού ρυθμού από τον απαιτούμενο δεν επηρεάζει αρνητικά

την απόδοση της διαδικασίας, ενώ πιο γρήγορος ρυθμός επιφέρει σαφή μείωση της απόδοσης.

Συγχρόνως έγιναν δοκιμές ελέγχου της μέγιστης δυνατής συγκέντρωσης εκχυλίσματος που μπορεί να διαλυθεί στο απιονισμένο H<sub>2</sub>O.

### **Μελέτη της απαιτούμενης συγκέντρωσης του διαλύματος που εισάγεται στη στήλη**

Κριτήριο για την αποτελεσματική διάλ υση ήταν η ευκολία με την οποία το δημιουργούμενο υδαταλκοολικό διάλυμα διηθούταν και περνούσε από τη στήλη με ρητίνη. Πρακτικά διαπιστώθηκε ότι μέχρι τη συγκέντρωση 100g/L, δεν υπήρχε πρόβλημα στην απόδοση της μεθόδου. Βέβαια αυξανόταν ο χρόνος διέλευσης του διαλύματος από τη στήλη και ήταν αναγκαία η πραγματοποίηση μίας δεύτερης διέλευσης, κάτι που δεν χρειάζεται σε αραιότερα διαλύματα, π.χ. 1 g/L.

Η ποσότητα της ρητίνης επίσης, εξετάστηκε σε μία σειρά πειραμάτων με σκοπό την επιπλέον βελτίωση της μεθόδου.

### **Μελέτη της απαιτούμενης ποσότητας ρητίνης**

Ως σταθερό στοιχείο χρησιμοποιήθηκε ένα υδαταλκοολικό διάλυμα συγκέντρωσης 10g/L. Το ζητούμενο ήταν ο υπολογισμός της κατώτερης ποσότητας ρητίνης που απαιτείται για να κατακρατηθούν σε ικανοποιητικό βαθμό οι πολυφαινόλες. Ως κριτήριο χρησιμοποιήθηκε η αναμενόμενη ποσότητα αλκοολικού εκλούσματος που θα λαμβανόταν σύμφωνα με τις προηγούμενες δοκιμές και ήταν 1 g. Έγιναν δοκιμές με αυξανόμενες ποσότητες ρητίνης XAD16, 10, 20, 30, 40, 50, 70 και 100 g. Με εξαίρεση τις δύο πρώτες ποσότητες (στις οποίες ελήφθησαν κλάσματα που ζύγιζαν 650 mg και 770 mg αντίστοιχα), οι υπόλοιπες έδωσαν τα αναμενόμενα αποτελέσματα (1.13-1.16 g), δηλαδή για ένα διάλυμα συγκέντρωσης 10 g/L, 30 g (49 ml) ρητίνης αρκούν. Η τελευταία εργαστηριακή δοκιμή που πραγματοποιήθηκε αφορούσε ένα υδαταλκοολικό διάλυμα με συγκέντρωση 200g/5L, σε μεγαλύτερη χρωματογραφική στήλη από την προηγούμενη και με ποσότητα ρητίνης ίση με 600 g. Η δοκιμή διήρκησε 3.5 h και το

βάρος το υ αλκοολικού εκλούσματος ήταν 29.7 g. Ακολούθησε μία δεύτερη διέλευση από τη ρητίνη που έδωσε 6 g αλκοολικού εκλούσματος. Το τελευταίο αποτέλεσμα επιβεβαίωσε όλες τις προηγούμενες δοκιμές.

### **Ανάλογες μελέτες για τη ρητίνη XAD7HP**

Παρόμοιοι πειραματισμοί έγιναν και για τη ρητίνη XAD7HP. Τα συμπεράσματα που εξήχθησαν ήταν σε γενικές γραμμές τα ίδια με την περίπτωση της ρητίνης XAD16. Μία μικρή διαφορά παρατηρήθηκε μόνο στην ποσότητα της ρητίνης που απαιτείται για την κατακράτηση και την παραλαβή των χρωστικών ουσιών, καθώς χρειαζόταν λίγο περισσότερη ποσότητα, π.χ. για ένα διάλυμα συγκέντρωσης 10 g/L ήταν απαραίτητα 40 g (65.5 ml) ρητίνης XAD7HP, αντί για 30 g που απαιτούσε η ρητίνη XAD16. Αυτό δεν οφειλόταν τόσο στη μικρότερη χωρητική ικανότητα της ρητίνης XAD7HP (παρ. 1.2.1.γ), όσο στο μεγάλο ποσοστό χρωστικών μορίων που περιέχονται στη συγκεκριμένη ποικιλία στεμφύλων. Πρέπει επιπλέον να σημειωθεί ότι οι δοκιμές για τη ρητίνη XAD7HP ήταν πιο εύκολες αφού το κυριότερο κριτήριο αποτελεσματικότητας ήταν η ένταση του χρώματος του υδαταλκοολικού διαλύματος.

Οι εργαστηριακές δοκιμές λοιπόν, της μεθόδου κατεργασίας με ρητίνες των στεμφύλων της ποικιλίας *Vitis vinifera* var. *mandilaria* είχαν σκοπό την εφαρμογή της μεθοδολογίας σε μικρή κλίμακα ώστε να εξαχθούν χρήσιμα συμπεράσματα που θα χρησιμοποιηθούν σε πιλοτικό επίπεδο. Συνοψίζοντας θα πρέπει να σημειωθούν τα εξής:

- Η μέθοδος κατεργασίας με ρητίνη XAD16 επιτρέπει την παραλαβή ενός μεγάλου ποσοστού των πολυφαινολών που περιέχονται στο αλκοολικό εκχύλισμα των στεμφύλων. Παράγεται μ' αυτόν τον τρόπο ένα πλούσιο πολυφαινολικό κλάσμα το οποίο έχει απαλλαχθεί κατά πολύ από τα γλυκοσιδικά συστατικά.
- Η μέθοδος κατεργασίας με ρητίνη XAD7HP επιτρέπει την παραλαβή ενός μεγάλου ποσοστού των χρωστικών ουσιών που περιέχονται στο αλκοολικό εκχύλισμα των στεμφύλων. Παράγεται μ' αυτόν τον τρόπο ένα πλούσιο σε χρωστικές κλάσμα που εμφανίζει ένα πολύ έντονο κόκκινο χρώμα.

- Η μεθοδολογία που ακολουθείται, παρουσιάζεται σχηματικά στο Σχήμα 25 και ισχύει και για τα δύο είδη ρητίνης, τόσο σε εργαστηριακό όσο και σε πιλοτικό επίπεδο.
- Η συγκέντρωση που πρέπει να έχει το υδαταλκοολικό διάλυμα έχει υπολογιστεί ότι μπορεί να είναι μέχρι 100 g/L. Μέχρι αυτή τη συγκέντρωση δεν δημιουργούνται προβλήματα στη διαδικασία. Αύξηση του όγκου του απιονισμένου  $H_2O$  με σύγχρονη ελάττωση της συγκέντρωσης του διαλύματος δεν επηρεάζει αρνητικά την απόδοση, αντίθετα προτείνεται η μεγαλύτερη δυνατή αύξηση της αραίωσης του διαλύματος που εισάγεται στη στήλη ώστε να μην υπάρχει ο κίνδυνος απόφραξης της στήλης. Βασικό πάντως κριτήριο για την επιλογή του βαθμού αραίωσης του αρχικού διαλύματος είναι οι διαστάσεις της στήλης που θα χρησιμοποιηθεί.
- Η ελάχιστη ποσότητα της ρητίνης που απαιτείται είναι 30 g (49 ml) XAD16 για ένα αρχικό διάλυμα συγκέντρωσης 10g/L. Για το ίδιο διάλυμα απαιτούνται 40 g (65.5 ml) ρητίνης XAD7HP.
- Ο χρόνος διέλευσης του αρχικού υδαταλκοολικού διαλύματος εξαρτάται από τον όγκο, τη συγκέντρωσή του και τις διαστάσεις της στήλης. Προτείνεται ο ρυθμός διέλευσης να κυμαίνεται μεταξύ 4-6 BV/h. Γενικότερα πάντως, πρέπει να γίνονται δοκιμές για τον χρόνο διέλευσης του αρχικού διαλύματος κάθε φορά που ξεκινά μία κατεργασία ή όποτε αλλάζει ένα από τα παραπάνω τρία δεδομένα και καλό είναι να επιδιώκεται αργή διέλευση (στάγδην για μία κοινή εργαστηριακή στήλη χρωματογραφίας). Η μετέπειτα αναγέννηση της ρητίνης με αλκοόλη μπορεί να γίνει με τον γρηγορότερο δυνατό ρυθμό.

Αξιοποιώντας τα παραπάνω συμπεράσματα και αυξάνοντας συνεχώς την εμπειρία στην τεχνογνωσία των ρητινών, ακολούθησε η εφαρμογή της σε μία βαθμιαία μεγαλύτερη κλίμακα.

## ii.) Εφαρμογή της μεθόδου σε πιλοτικό επίπεδο

Ο σχεδιασμός και η ανάπτυξη σε πιλοτική κλίμακα ενός συστήματος για την επεξεργασία των αποβλήτων των οινοποιείων είχε δύο στόχους:

- Την ανάκτηση και την αξιοποίηση των πολυφαινολών
- Τη μείωση των περιβαλλοντικών προβλημάτων

Γίνεται σαφές ότι για τον χειρισμό μεγάλων ποσοτήτων, απαιτούνταν συστήματα ρητινών, εκχύλισης και ανακύκλωσης διαλύτη μεγάλης κλίμακας τα οποία θα αναφερθούν αναλυτικά παρακάτω. Κύρια αρχή κατά τη διάρκεια όλης της διαδικασίας ήταν η διασφάλιση της ποιότητας του προϊόντος εφόσον τελικός προορισμός του αποτελούσε η χρησιμοποίησή του σε κλινικές δοκιμές. Επιπρόσθετα, η μείωση του κόστους της επεξεργασίας, χωρίς να μειωθεί το τελικό αποτέλεσμα ήταν βασικός κανόνας στην πορεία της κατεργασίας.

Πραγματοποιήθηκαν λοιπόν ορισμένες δοκιμές ώστε να επαληθευθούν και να εφαρμοστούν τα εργαστηριακά δεδομένα σε μεγαλύτερη κλίμακα. Πρέπει να σημειωθεί ότι σε όλες τις δοκιμές που ακολούθησαν χρησιμοποιήθηκαν στέμφυλα της ίδιας ποικιλίας όπως και στο εργαστήριο (*Μανδηλαριά Σαντορίνης*).

Η πρώτη πιλοτική εφαρμογή του συστήματος πραγματοποιήθηκε με 100 Kg στέμφυλα και περιελάμβανε τη χρήση όλων των συσκευών και των μηχανημάτων μεγάλης κλίμακας.

### **Κατεργασία 100 Kg στεμφύλων**

Η πορεία που ακολουθήθηκε στηριζόταν στη βασική αρχή που διέπει την κατεργασία με ρητίνες (Σχήμα 25). Εξαιτίας όμως των μεγάλων ποσοτήτων φυτικού υλικού και διαχωριστικών μέσων που χρησιμοποιήθηκαν, ο διαχωρισμός της διαδικασίας σε στάδια ήταν πια ευκρινής και για την καλύτερη κατανόηση θα εξεταστεί κάθε στάδιο ξεχωριστά.

### **Προετοιμασία διαχωριστικού μέσου**

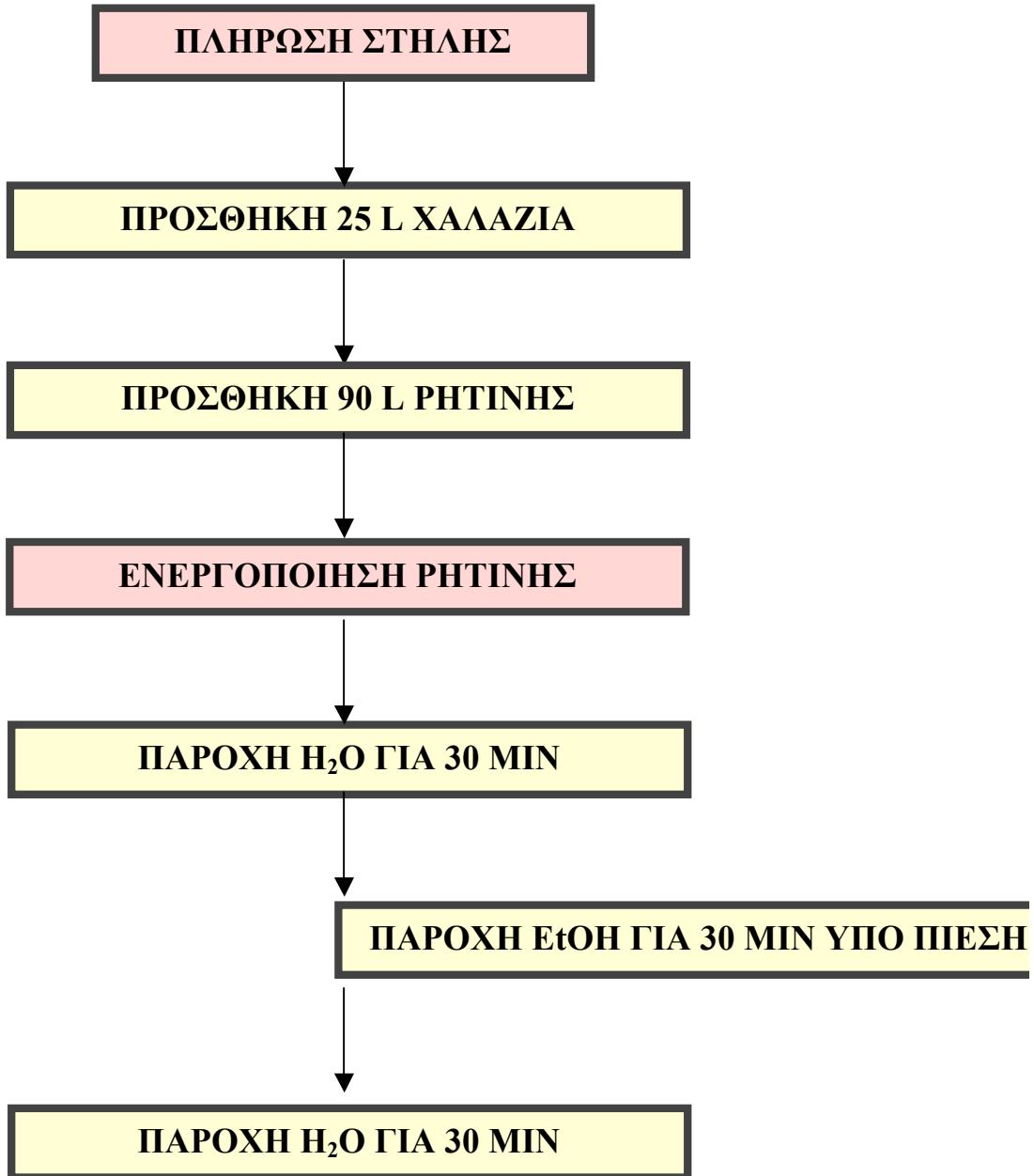
Στην παρούσα κατεργασία χρησιμοποιήθηκαν δύο στήλες μήκους 160 cm και διαμέτρου 40 cm. Κάθε στήλη έχει δύο θέσεις σύνδεσης, μία στο πάνω και μία στο κάτω μέρος. Η πάνω θέση χρησιμοποιείται ως είσοδος και η κάτω ως έξοδος (Εικόνα 7).



Εικόνα 7. Χρωματογραφικές στήλες.

Οι στήλες πληρώθηκαν με 90 L ρητίνης και 25 L χαλαζία η καθεμία. Στη μία στήλη προστέθηκε ρητίνη XAD16 και στην άλλη XAD7HP και συνδέθη καν με ένα σωλήνα από πολυβινυλοχλωρίδιο (PVC) ώστε το υδαταλκοολικό διάλυμα να εισάγεται πρώτα στη στήλη με ρητίνη XAD16 και όταν εξέρχεται από αυτή να διέρχεται κατευθείαν στην άλλη στήλη που περιέχει την XAD7HP. Μ' αυτόν τον τρόπο εξοικονομείται πολύτιμο χρόνος, καθώς το χρονικό διάστημα που απαιτείται για τη διαδικασία μειώνεται στο μισό. Γενικότερα όλοι οι σωλήνες τροφοδοσίας των στηλών αποτελούνταν από πολυβινυλοχλωρίδιο (PVC). Ο χαλαζίας που προστέθηκε στο κάτω μέρος προστάτευε τη στήλη από το φράξιμο των πόρων εξόδου.

Επόμενο βήμα στην προετοιμασία της ρητίνης ήταν η ενεργοποίησή της ώστε να μπορεί να κατακρατήσει τα πολυφαινολικά μόρια. Αυτό επιτεύχθηκε με την αρχική διέλευση H<sub>2</sub>O από κάθε στήλη για 30 min, τη μετέπειτα παροχή EtOH υπό πίεση μέσω αντλίας για 30 min με ρυθμό ροής 250L/h (2.8 BV/h) και στο τέλος πάλι την παροχή H<sub>2</sub>O για 30 min. Η συγκεκριμένη ενεργοποίηση εφαρμόζεται μόνο όταν η ρητίνη χρησιμοποιείται για πρώτη φορά. Αν η ρητίνη έχει χρησιμοποιηθεί ξανά, ακολουθείται η πορεία που περιγράφεται στο Σχήμα 25. Σχηματικά, η διαδικασία προετοιμασίας της ρητίνης περιγράφεται στο Σχήμα 26.



Σχήμα 26. Προετοιμασία διαχωριστικού μέσου.

#### Παραγωγή υδαταλκοολικού διαλύματος

Η προετοιμασία του διαλύματος που θα εισαχθεί στις στήλες περιελάμβανε διαδοχικά τη συλλογή των στεμφύλων, τη ξήρανση, την κονιοποίηση και την εκχύλιση με Ε tOH. Στη συνέχεια εξατμίστηκε η αλκοόλη και το υπόλειμμα που απέμεινε,

διαλύθηκε σε  $H_2O$  το οποίο αφού διηθήθηκε, εισήχθη στη στήλη. Παρακάτω δίνονται περαιτέρω πληροφορίες για τα στάδια αυτά.

Μετά τη συλλογή των 100 Kg στεμφύλων, ακολούθησε η ξήρανση τους στον αέρα (Εικόνα 8).



Εικόνα 8. Στέμφυλα κατά τη ξήρανση.

Η κονιοποίηση σε μύλο ήταν η επόμενη κατεργασία των στεμφύλων και στόχευε στη δημιουργία σκόνης η οποία θα ήταν πιο εύκολη στον χειρισμό και ιδιαίτερα στην εκχύλιση που ακολουθούσε.

Η ξηρή σκόνη εκχυλίστηκε δύο φορές με 250 L EtOH τη φορά, σε εκχυλιστήρα χωρητικότητας 500 L (Εικόνα 9). Κάθε εκχύλιση διήρκησε δύο ημέρες, ενώ για συνολικά 12 h εφαρμόστηκε ανάδευση.



Εικόνα 9. Εκχύλιση σκόνης στεμφύλων υπό ανάδευση.

Μετά το τέλος κάθε εκχύλισης άρχισε η παραλαβή του αιθανολικού εκχυλίσματος (Εικόνα 10).



Εικόνα 10. Συλλογή εκχυλίσματος.

Αφού ολοκληρώθηκε η συλλογή και των δύο εκχυλισμάτων , ξεκίνησε η εξάτμιση του διαλύτη . Αυτή έγινε σε ένα θερμικό σύστημα επεξεργασίας που αποτελούταν από ένα περιστροφικό εξατμιστήρα (Rotary evaporator Buchi). Οι

συνθήκες που εφαρμόστηκαν για την εξάτμιση οργανικών διαλυτών ήταν  $45^{\circ}\text{C}$  υπό κενό 100 mbar. Παράλληλα, η συμπύκνωση των ατμών των εξατμιζόμενων οργανικών διαλυτών έγινε με τη βοήθεια συστήματος παροχής ψυκτικού υγρού (γλυκόλης) (Εικόνα 11).



Εικόνα 11. Εξάτμιση διαλύτη.

Το συγκεκριμένο στάδιο μειώθηκε ακόμα περισσότερο σε χρόνο, με τη χρήση ενός συστήματος εξάτμισης, του QVF (Εικόνα 12) το οποίο παρέχει τη δυνατότητα της εξάτμισης του διαλύτη με ρυθμό 50 L/h.



Εικόνα 12. Σύστημα εξάτμισης διαλύτη QVF.

Όπως αναφέρθηκε και στις εργαστηριακές δοκιμές, η συμπύκνωση του διαλύματος δεν ήταν πλήρης και παρέμεινε 5% της αρχικής ποσότητας διαλύτη γιατί έτσι ήταν πιο εύκολη η μετέπειτα διάλυση στο H<sub>2</sub>O. Η ανακύκλωση του διαλύτη ήταν ένα ζητούμενο σ' αυτό το σημείο και υπολογίστηκε ότι από τα 500 L EtOH, επανακτήθηκαν 400 L, ποσοστό 80%. Ένα μέρος από τη συγκεκριμένη ανακυκλωμένη ποσότητα χρησιμοποιήθηκε αργότερα στην αναγέννηση των ρητινών και την παραλαβή των πολυφαινολικών και των χρωστικών ουσιών.

Στη συνέχεια, το εκχύλισμα (6.5 Kg) διαλύθηκε σε 225 L απιονισμένου H<sub>2</sub>O. Επόμενο στάδιο ήταν η διήθηση που έγινε σε σακόφιλτρα (25 μm). Τα σακόφιλτρα είναι υφασμάτινα φίλτρα με ποικίλη χωρητικότητα και πόρους διάφορων μεγεθών, μέσα από τα οποία διέρχονται διαλύματα και κατακρατούνται τα στερεά που περιέχονται σ' αυτά. Με τη χρήση των σακόφιλτρων απομακρύνθηκαν τα στερεά υπολείμματα που είχαν απομείνει στο υδαταλκοολικό διάλυμα από την εκχύλιση. Μόλις ολοκληρώθηκε και η διήθηση, το υδαταλκοολικό διάλυμα ήταν έτοιμο να εισαχθεί στη στήλη.

### Εκλεκτική προσρόφηση πολυφαινολών και χρωστικών ουσιών

Το υδαταλκοολικό διάλυμα διήλθε μέσα από ένα σύστημα συνδεδεμένων στηλών που περιείχαν ειδικές προσροφητικές ρητίνες (XAD16 και XAD7HP), με σκοπό την ανάκτηση των πολυφαινολικών ουσιών (XAD16) και εν συνεχείᾳ των χρωστικών

(XAD7HP) (Εικόνα 13). Η διαδικασία χωρίστηκε λοιπόν, σεδύο φάσεις όπως αναλυτικά παρουσιάζεται παρακάτω.



Εικόνα 13. Σύστημα στηλών με προσροφητικές ρητίνες.

#### Φάση 1η:

Πραγματοποιήθηκε η παραλαβή των πολυφαινολών. Ξεκίνησε με την εισαγωγή του υδαταλκοολικού διαλύματος στην πρώτη στήλη που είχε πληρωθεί με ρητίνη XAD16 (90 L). Ο ρυθμός ήταν 125 L/h (1.4 BV/h) και η τροφοδοσία γινόταν με τη βιοήθεια αντλίας αέρα υπό πίεση. Αφού ολοκληρώθηκε η διέλευση του διαλύματος από τη στήλη με τη ρητίνη XAD16, ακολούθησαν τέσσερα βήματα που είχαν ως αποτέλεσμα την αναγέννηση και την επανεργοποίηση της ρητίνης, αλλά και την ανάκτηση των πολυφαινολικών μορίων:

- ✓ Έκπλυση της ρητίνης με H<sub>2</sub>O για 15 min υπό πίεση 3 bar για να απομακρυνθούν τα στερεά σωματίδια που πιθανόν έχουν προσκολληθεί στη ρητίνη.
- ✓ Αναδιάταξη της ρητίνης με την αντίστροφη παροχή H<sub>2</sub>O για 5 min.
- ✓ Παραλαβή των πολυφαινολικών μορίων με την παροχή 75 L EtOH με ρυθμό ροής 250 L/h. Η φάση αυτή διαρκεί περίπου 20 min.
- ✓ Έκπλυση της ρητίνης με H<sub>2</sub>O για 30 min.
- ✓ Η ρητίνη ήταν διαθέσιμη για νέα χρήση.

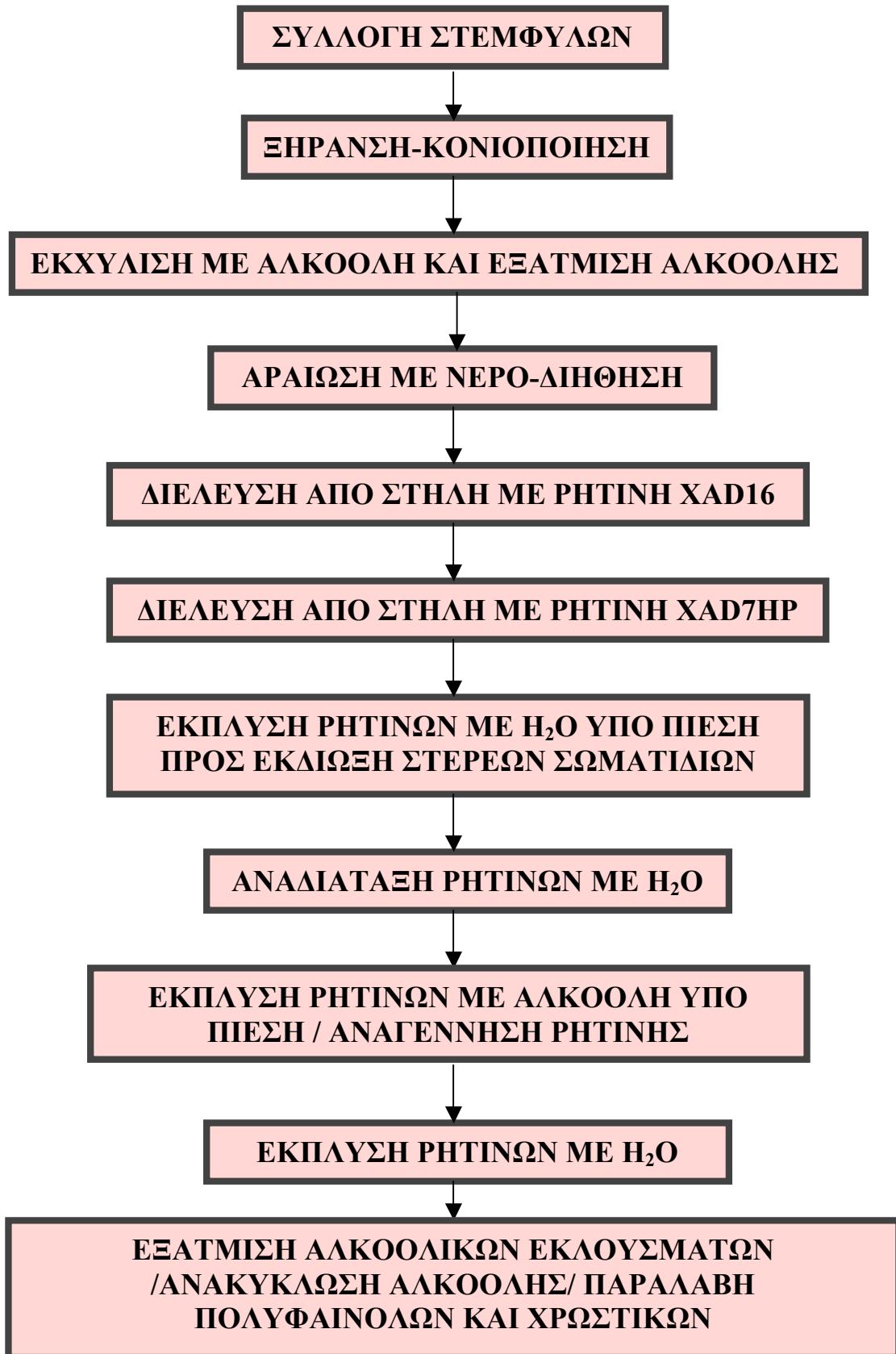
## **Φάση 2η:**

Το διάλυμα καθώς εξερχόταν από την πρώτη στήλη, περνούσε κατευθείαν στη δεύτερη που περιείχε ρητίνη XAD7HP και τηρήθηκε η ίδια διαδικασία όπως και πριν, με τελικό αποτέλεσμα την παραλαβή των χρωστικών ουσιών.

Η συνολική διαδικασία είχε διάρκεια περίπου 2.5 h και επαναλήφθηκε άλλη μία φορά ώστε να αυξηθεί η απόδοση. Επόμενο βήμα ήταν η εξάτμιση των δύο αιθανολικών εκλουσμάτων που προέρχονταν από τις δύο στήλες και η παραλαβή δύο ξηρών μιγμάτων από τα οποία το ένα περιείχε τις πολυφαινόλες και το άλλο τις χρωστικές. Παράλληλα, ένα ποσοστό του διαλύτη ανακυκλώθηκε (75-80%). Η εξάτμιση των αλκοολικών εκλουσμάτων έγινε στο Rotary evaporator και στο QVF (Εικόνες 11, 12). Το τελικό μίγμα πολυφαινολών ζύγιζε 750 g και το μίγμα χρωστικών ζύγιζε 2 Kg.

Πρέπει να σημειωθεί ότι η EtOH που χρησιμοποιήθηκε και στις δύο στήλες, προήλθε από την ποσότητα που ανακυκλώθηκε μετά την εκχύλιση της σκόνης στεμφύλων.

Η συνολική διαδικασία περιγράφεται στο Σχήμα 27 και όπως φαίνεται στηρίζεται στη βασική αρχή του συστήματος επεξεργασίας με προσροφητικές ρητίνες που εφαρμόστηκε σε εργαστηριακό επίπεδο (παρ. 1.2.1.δ).



Σχήμα 27. Κατεργασία με ρητίνες σε πιλοτική κλίμακα.

Η οσμή και το χρώμα του υδαταλκοολικού διαλύματος άλλαξαν σημαντικά. Ενώ το αρχικό υδαταλκοολικό διάλυμα πριν εισέλθει στην επεξεργασία με ρητίνες, ήταν έντονα κόκκινο, το τελικό υδαταλκοολικό διάλυμα ήταν ένα άοσμο, υποκίτρινο υγρό το οποίο απορρίφθηκε μετά τον έλεγχό του σε TLC οπότε και επιβεβαιώθηκε ότι δεν περιείχε πολυνφαινολικές και χρωστικές ουσίες. Στην Εικόνα 14 είναι εμφανής η διαφορά χρώματος του αρχικού και του τελικού υδαταλκοολικού διαλύματος και του αλκοολικού εκλούσματος που προέρχεται από τη ρητίνη XAD16 και περιέχει τα πολυνφαινολικά μόρια.



Εικόνα 14. Οπτική εικόνα αρχικού, τελικού υδαταλκοολικού διαλύματος και αλκοολικού εκλούσματος πολυνφαινολών.

Η τελική επιβεβαίωση της επιτυχίας της μεθόδου έγινε με την ανάλυση με εφαρμογή υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC) του πολυνφαινολικού μίγματος και τη σύγκρισή του με τα αν τίστοιχα αποτελέσματα από το αρχικό αιθανολικό εκχύλισμα που εισήλθε στη στήλη (Πίνακας 14). Η ανάλυση έγινε σε υγρό χρωματογράφο ThermoFinnigan HPLC [Lichrocart 250-4 Merck-Lichrospher RP 18 (5 μμ)] που διέθετε PDA, με κινητή φάση gradient A:  $H_2O/CH_3COOH$ , B: ACN. Το όργανο ήταν συνδεδεμένο με φασματοφωτόμετρο για τη μέτρηση της απορρόφησης στο υπεριώδες (UV 2000).

Συστατικό	Πολυφαινολικό μίγμα μετά από κατεργασία με ρητίνη XAD16 (mg/g)	Αιθανολικό εκχύλισμα που εισάγεται στη στήλη με ρητίνη XAD16 (mg/g)
(-)-επικατεχίνη	4.32	1.10
(+)-κατεχίνη	2.72	0.90
γαλλικό οξύ	2.07	1.23
<i>trans</i> -ρεσβερατρόλη	1.06	0.22
ρουτίνη	0.47	0.10
ε-βινιφερίνη	0.42	0.14
π-κονμαρικό οξύ	0.28	0.16
φερουλικό οξύ	0.14	0.09
κερκετίνη	0.04	ΔΑ

Πίνακας 14. Συγκριτική μελέτη του πολυφαινολικού μίγματος μετά από κατεργασία με ρητίνη XAD16 και του αιθανολικού εκχυλίσματος που εισήχθη στη στήλη.

Από τα αποτελέσματα του πίνακα φαίνεται ξεκάθαρα η αυξημένη σύσταση σε δευτερογενείς μεταβολίτες του πολυφαινολικού μίγματος σε σχέση με το αρχικό υδαταλκοολικό διάλυμα. Η προσοχή πρέπει να εστιαστεί ιδιαίτερα στο ποσοστό της *trans*-ρεσβερατρόλης η οποία στο εμπλουτισμένο τελικό αλκοολικό μίγμα εμφανίζεται υπερτετραπλάσια απ' ότι στο αρχικό διάλυμα.

Μετά την εφαρμογή της τεχνικής των ρητινών και την ανάκτηση των πολυφαινολών, ακολούθησε η απομόνωση καθαρής *trans*-ρεσβερατρόλης κατευθείαν από το μίγμα, χωρίς τη χρήση χρωματογραφικών στηλών.

#### Απομόνωση *trans*-ρεσβερατρόλης με τη γρήση FCPC (Fast Centrifugal Partition Chromatography)

Σκοπός της παρούσας δοκιμής ήταν η άμεση και γρήγορη απομόνωση της *trans*-ρεσβερατρόλης απευθείας από το πολυφαινολικό μίγμα. Αυτό πραγματοποιήθηκε με τη γρήση μίας ειδικής χρωματογραφικής συσκευής που αποδίδεται στα ελληνικά ως χρωματογράφος ταχείας φυγόκεντρου κατανομής (Εικόνα 15).



Εικόνα 15. Χρωματογράφος ταχέως φυγόκεντρου διαχωρισμού (FCPC).

Είναι μία μέθοδος που μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην επεξεργασία διαφορετικών τύπων εκχυλισμάτων και το βασικό αποτέλεσμά της είναι η κλασμάτωση των μορίων μέσα από πολύπλοκα μίγματα, όπως είναι τα φυτικά εκχυλίσματα. Με την κατάλληλη τροποποίηση βέβαια, μπορούν να απομονωθούν και καθαρά μόρια. Βασίζεται στην αρχή του υγρού-υγρού διαχωρισμού μεταξύ δύο μη αναμίξιμων φάσεων που έχουν παρασκευαστεί από δύο ή περισσότερους διαλύτες ή διαλύματα. Η μία υγρή φάση συγκρατείται στη στήλη με φυγόκεντρες δυνάμεις και ονομάζεται στατική φάση και η άλλη εισάγεται στη στατική φάση με αντλία και καλείται κινητή φάση.

Η CPC τεχνική είναι δυνατόν να εφαρμοστεί με διαφορετικούς τρόπους και να ρυθμιστεί η εκλεκτικότητα, ενώ και οι δύο υγρές φάσεις μπορούν αν επιλεγούν τόσο ως στατική όσο και ως κινητή και να αλλάξουν ρόλους κατά τη διάρκεια του διαχωρισμού. Συγκεκριμένα υπάρχουν δύο κύριοι τρόποι για να αρχίσει η μεθοδολογία. Ο πρώτος είναι ''καθοδικός'' τρόπος (descending) που επιλέγεται όταν η κινητή φάση είναι κάτω από τη στατική στη στήλη και ο δεύτερος είναι ο ''ανοδικός'' τρόπος (ascending) που επιλέγεται όταν η κινητή φάση είναι πάνω από τη στατική. Σημαντικά επίσης

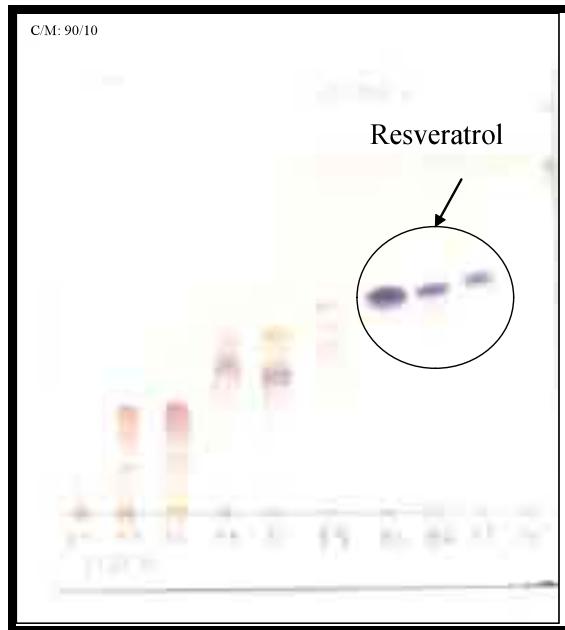
χαρακτηριστικά της μεθόδου είναι η χωρητικότητα της στήλης, η ταχύτητα περιστροφής της στήλης με την επίδραση των φυγόκεντρων δυνάμεων και ο ρυθμός ροής της κινητής φάσης. Τα κυριότερα πλεονεκτήματά της είναι η εξολοκλήρου ανάκτηση του δείγματος μετά το τέλος της διαδικασίας, η απλή προετοιμασία του δείγματος και η εύκολη εισαγωγή του στη στήλη με μία απλή ένεση, η αξιοποίησή της σε δείγματα ποικίλης πολικότητας και βάρους, το μειωμένο κόστος λόγω της μειωμένης κατανάλωσης διαλυτών και της απουσία στερεού μέσου ως στατική φάση και η κατά βούληση δυνατότητα παύσης και επανέναρξης της διαδικασίας, χωρίς να επηρεάζεται το αποτέλεσμα. Το τελευταίο γεγονός μάλιστα, είναι αυτό που επιτρέπει τον συνεχή έλεγχο του διαχωρισμού με χρω ματογραφία λεπτής στοιβάδας και την επιλογή του σημείου αλλαγής της κινητής φάσης. Η μεθοδολογία που ακολουθείται σε γενικές γραμμές είναι η εξής:

- ✓ Επιλογή των δύο ή περισσοτέρων μη αναμειγνυόμενων διαλυτών και προσθήκη τους σε διαχωριστική χοάνη, στην κατάλληλη αναλογία ώστε να σχηματιστούν οι δύο φάσεις. Διαχωρισμός και συλλογή των δύο φάσεων.
- ✓ Επιλογή στατικής/κινητής φάσης και τρόπου αρχής της μεθόδου (ascending/descending).
- ✓ Διάλυση του δείγματος σε λίγα ml από το μίγμα διαλυτών.
- ✓ Ένεση του δείγματος στη συσκευή.
- ✓ Εφαρμογή της μεθόδου και συλλογή των κλασμάτων. Ο διαλύτης εισάγεται στη στήλη με αντλία και με ρυθμιζόμενο ρυθμό.
- ✓ Άλλαγή τρόπου "ascendin"/"descendin" της τεχνικής οπότε και αλλαγή κινητής/στατικής φάσης.
- ✓ Παύση της διαδικασίας όταν έχουν συλλεχθεί τα επιθυμητά μόρια.
- ✓ Λήψη του δείγματος.

Στις παραπάνω ενέργειες στηρίχθηκε και η απομόνωση της *trans*-ρεσβερατρόλης. Η κατεργασία άρχισε με τη χρήση 18 g από το εμπλουτισμένο πολυφαινολικό μίγμα από τη ρητίνη XAD 16. Προκειμένου να αυξηθεί ακόμα περισσότερο το ποσοστό σε πολυφαινόλες του μίγματος που θα ακολουθήσει τη FCPC τεχνική, διαλύθηκε σε 1 L H<sub>2</sub>O και εκχυλίστηκε με 1 L EtOAc οπότε το οργανικό

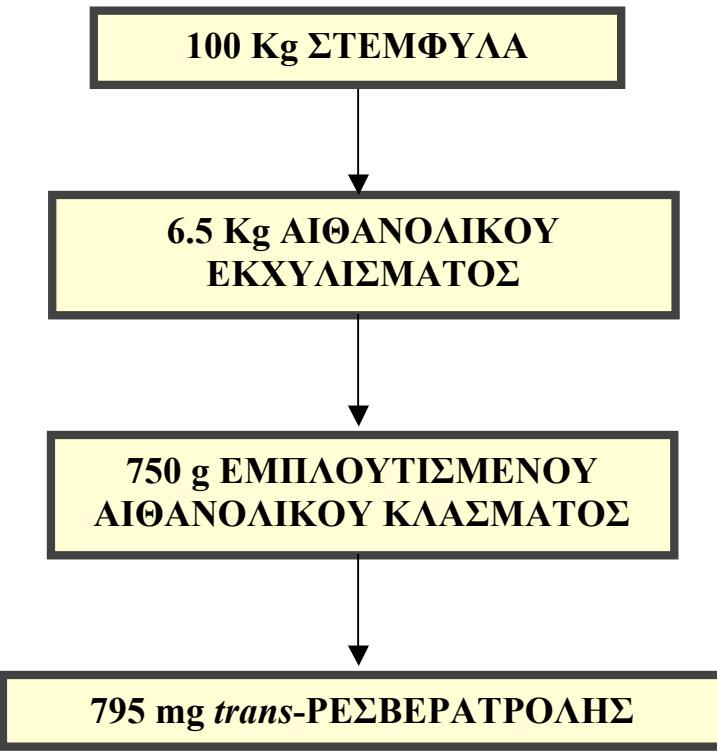
κλάσμα περιείχε τα πολυφαινολικά μόρια, ενώ στην υδατική στοιβάδα πέρασαν τα γλυκοσιδικά μόρια που τυχόν είχαν απομείνει μετά την κατεργασία με τις ρητίνες. Το κλάσμα EtOAc εξατμίστηκε και ζυγίστηκε (5.2 g). Αυτό διαλύθηκε σε 25 ml H<sub>2</sub>O και υποβλήθηκε σε διαχωρισμό μέσω της συσκευής FCPC. Παρακάτω παρατίθενται τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά της διαδικασίας που πραγματοποιήθηκε:

- Ο ρυθμός ροής της κινητής φάσης ήταν 15 ml/min.
- Η ταχύτητα περιστροφής ήταν 500 rpm.
- Το σύστημα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκε ήταν 1 L από CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O:10/10/6.
- Ως κινητή φάση επιλέχθηκε το CHCl<sub>3</sub> που διέτρεχε τη στατική φάση (MeOH/H<sub>2</sub>O) με τον "descending" τρόπο και παρέσυρε τα πιο άπολα συστατικά συστατικά του μίγματος κατά σειρά αυξανόμενης πολικότητας.
- Συνολικά συλλέχθηκαν 89 κλάσματα.
- Τα πρώτα 70 είχαν όγκο 15 ml, ενώ τα υπόλοιπα 19 είχαν όγκο 30 ml.
- Η αλλαγή σε "ascending" έγινε μετά από 48 κλάσματα και σ' αυτό το σημείο το μίγμα MeOH/H<sub>2</sub>O έγινε κινητή φάση οπότε άρχισε η μετακίνηση από τη στήλη των πολικών συστατικών και συλλέχθηκαν ακόμα 41 κλάσματα.
- Σε όλη τη διάρκεια του διαχωρισμού τα κλάσματα ελέγχονταν με TLC και γινόταν σύγκριση με την εικόνα που παρουσίαζε το αρχικό δείγμα που εισήχθη στη στήλη. Όταν διαπιστώθηκε από την TLC ότι επρόκειτο να διέλθει στην κινητή φάση η ρεσβερατρόλη, έγινε η αλλαγή της κινητής φάσης από CHCl<sub>3</sub> σε MeOH/H<sub>2</sub>O. Επομένως, τα πιο πολικά μόρια σε σχέση με τη ρεσβερατρόλη άρχισαν να περνούν βαθμιαία στην κινητή φάση κατά σειρά μειούμενης πολικότητας, με τελικό σκοπό την απομόνωση της *trans*-ρεσβερατρόλης.
- Η *trans*-ρεσβερατρόλη απομονώθηκε σε τρία κλάσματα (85-87) και ζύγιζε 17 mg (Εικόνα 16). Η ταυτότητά της πιστοποιήθηκε με τη βοήθεια της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και διαπιστώθηκε ότι είχε υψηλό βαθμό καθαρότητας.



Εικόνα 16. Απομόνωση *trans*-ρεσβερατρόλης με τη χρήση FCPC.

Η απομόνωση της *trans*-ρεσβερατρόλης με τη βοήθεια του FCPC απλοποιεί την παραγωγική διαδικασία και εντάσσεται ως το τελευταίο στάδιο στην πορεία επεξεργασίας των στεμφύλων. Συνολικά θα μπορούσε να παρατηρηθεί ότι ξεκινώντας από την εκχύλιση 100 Kg στεμφύλων με EtOH, παραλήφθηκε ένα αιθανολικό εκχύλισμα 6.5 Kg το οποίο μετά από την κατεργασία του με ρητίνη XAD16 έδωσε ένα εμπλουτισμένο σε πολυφαινόλες αλκοολικό κλάσμα βάρους 750 g. Μετά από την ανάλυσή του κλάσματος με HPLC διαπιστώθηκε ότι περιείχε 795 mg *trans*-ρεσβερατρόλης (Σχήμα 28). Το παραπάνω εξακριβώθηκε και πρακτικά με την ποσότητα *trans*-ρεσβερατρόλης που απομονώθηκε με την τεχνική FCPC, κάνοντας τις απαραίτητες αριθμητικές αναγωγές.



Σχήμα 28. Ποσοτική σχέση των σταδίων της επεξεργασίας.

Η επόμενη δοκιμή α ποσκοπούσε στη βελτίωση της μορφής του παραγόμενου πολυφαινολικού κλάσματος.

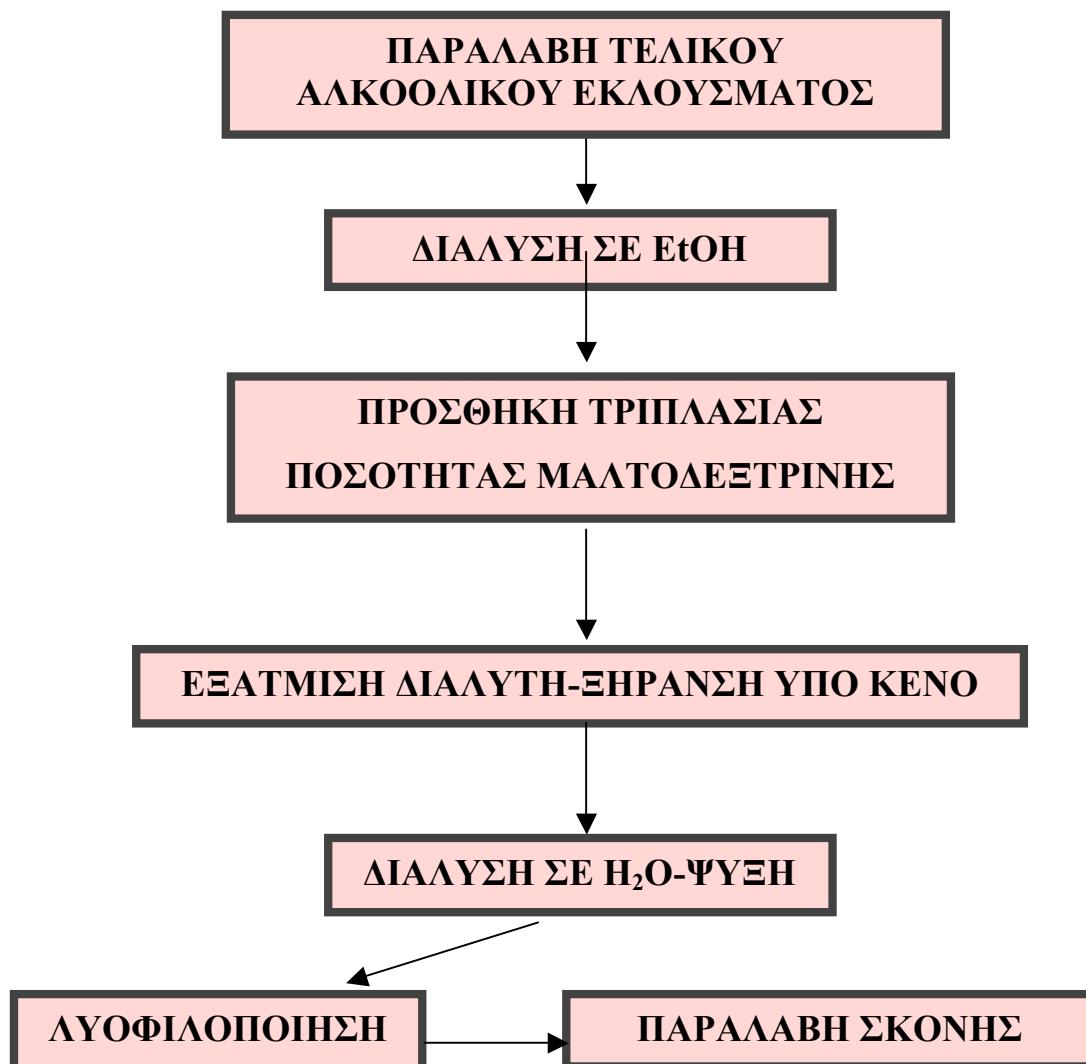
#### Κατεργασία 50 Kg στεμφύλων-Μορφοποίηση του πολυφαινολικού μίγματος με τη χρήση mini Spray Dryer

Το τελικό προϊόν της μεθόδου κατεργασίας με ρητίνη XAD16 ήταν ένα εμπλουτισμένο πολυφαινολικό μίγμα. Ωστόσο, η μορφή του δημιουργούσε πρακτική δυσκολία στη χορήγηση, καθώς παρουσίαζε μία κολλώδη και παχύρρευστη υφή. Γι' αυτό το λόγο κρίθηκε αναγκαία η βελτίωση της εξωτερικής εμφάνισής του.

Στη συγκεκριμένη κατεργασία χρησιμοποιήθηκε το αλκοολικό έκλουσμα που προήλθε από τη διέλευση ενός υδαταλκοολικού διαλύματος από στήλη με ρητίνη XAD16. Αφετηρία όλης της πορείας υπήρξε η εκχύλιση 50 Kg στεμφύλων με EtOH και στη συνέχεια ακολουθήθηκε η γνωστή τεχνική της επεξεργασίας με ρητίνες. Το τελικό αποτέλεσμα της κατεργασίας ήταν η παραλαβή 525 g αλκοολικού μίγματος εμπλουτισμένου σε πολυφαινόλες. Ελήφθησαν 25 g από το τελικό αλκοολικό κλάσμα

από τη ρητίνη XAD16. Σκοπός της κατεργασίας ήταν η δημιουργίας μίας σκόνης που θα διευκόλυνε την οποιαδήποτε μετέπειτα χρήση της και ιδιαίτερα την ένταξή της σε κλινικές δοκιμές.

Η δημιουργία σκόνης επιτεύχθηκε με τη χρήση ενός εκδόχου που είναι κατάλληλο για τέτοιες κατεργασίες, τη μαλτοδεξτρίνη. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιελάμβανε τη διάλυση της ποσότητας των 25 g στον όγκο EtOH που απαιτείται και την προσθήκη τριπλάσιας ποσότητας μαλτοδεξτρίνης (75 g). Το μίγμα εξατμίστηκε μέχρι ξηρού και υποβλήθηκε σε εκ νέου ξήρανση υπό κενό ώστε να απομακρυνθούν και τα τελευταία υπολείμματα διαλύτη. Εν συνεχείᾳ, το μίγμα διαλύθηκε στο  $H_2O$  και καταψύχθηκε με τελική κατεργασία τη λυοφιλοποίηση (Σχήμα 29).



Σχήμα 29. Μετατροπή του τελικού αλκοολικού μίγματος σε σκόνη.

Το τελικό προϊόν της παραπάνω επεξεργασίας ήταν μία λεπτή κόκκινη σκόνη που εύκολα μπορεί να διαλυθεί σε H<sub>2</sub>O (1 g/10ml H<sub>2</sub>O).

Πρέπει να σημειωθεί ότι έγιναν δοκιμές με την προσθήκη ίσης ή και διπλάσιας ποσότητας μαλτοδεξτρίνης, αλλά δεν είχε τα αναμενόμενα αποτελέσματα και η ποιότητα της σκόνης ήταν κακή.

Στη συνέχεια, επιδιώχθηκε η επιπλέον βελτίωση της ποιότητας της σκόνης και γι' αυτό πραγματοποιήθηκε μία νέα δοκιμή που περιελάμβανε τη χρήση μίας ειδικής συσκευής.

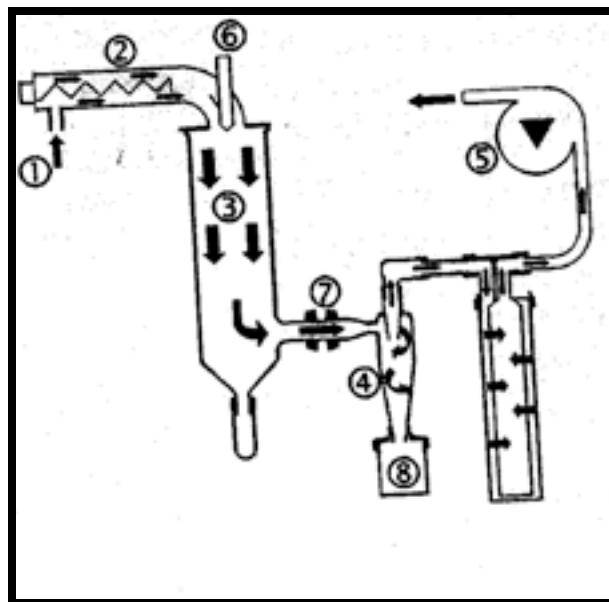
Στη σκόνη που παρασκευάστηκε όπως περιγράφηκε παραπάνω, η αναλογία πολυνφαινολικού μίγματος-μαλτοδεξτρίνης ήταν 1/3 και βασική επιδίωξη στην παρούσα δοκιμή ήταν η μείωση του ποσοστού μαλτοδεξτρίνης.

Γι αυτόν τον λόγο χρησιμοποιήθηκε μία συσκευή που ονομάζεται Buchi Mini Spray Dryer B-290 (Εικόνα 17). Η λειτουργία της στηρίζεται στην αρχή της ξήρανσης διά ψεκασμού και σε γενικές γραμμές προκαλεί τη μετατροπή ενός διαλύματος σε σκόνη, μέσα από ένα σύνολο διαδικασιών που στηρίζονται στον ψεκασμό των σταγονιδίων του διαλύματος με θερμό αέρα. Η ξήρανση διά ψεκασμού είναι μία τεχνική που χρησιμοποιείται ευρύτατα για τη ξήρανση υδατικών ή οργανικών διαλυμάτων, στη χημική βιομηχανία και τη βιομηχανία τροφίμων.



Εικόνα 17. Buchi Mini Spray Dryer B-290.

Η σχηματική απεικόνιση της πορείας του θερμού αέρα στη συσκευή, παρουσιάζεται στην Εικόνα 18.



Εικόνα 18. Σχηματική παράσταση του Buchi Mini Spray Dryer B-290.

Όπως φαίνεται και από την παραπάνω εικόνα, τα κυριότερα τμήματα της συσκευής είναι τα εξής:

- 1) Σημείο εισόδου αέρα.
- 2) Θερμαντήρας.
- 3) Είσοδος σταθεροποιητή ροής στον χώρο ξήρανσης.
- 4) Χώρος όπου επικρατούν συνθήκες αεροδίνης και το προϊόν διαχωρίζεται από τον αέρα.
- 5) Αναρροφητική συσκευή.
- 6) Αισθητήρας θερμοκρασίας στην είσοδο αέρα.
- 7) Αισθητήρας θερμοκρασίας στην έξοδο αέρα.
- 8) Δοχείο συλλογής της σκόνης.

Μία συνοπτική περιγραφή της λειτουργίας του Buchi Mini Spray Dryer B-290 περιλαμβάνει την είσοδο του διαλύματος στον χώρο θέρμανσης με ρεύμα θερμού αέρα (2), στη συνέχεια τον ψεκασμό του μίγματος θερμού αέρα -προϊόντος στον χώρο ξήρανσης (3), τον διαχωρισμό του αέρα από το προϊόν (4), εξαιτίας των συνθηκών

αεροδίνης που επικρατούν και τελικά την απομάκρυνση του αέρα με την αναρροφητική συσκευή (5) και τη συλλογή της σκόνης σε ένα ειδικό δοχείο (8). Σημαντικά χαρακτηριστικά είναι η θερμοκρασία εισόδου (6) και η θερμοκρασία εξόδου του αέρα (7). Η πρώτη ανταποκρίνεται στη θερμοκρασία του θερμού αέρα και η δεύτερη στη θερμοκρασία που έχει το μίγμα θερμού αέρα -προϊόντος πριν εισέλθει στον χώρο διαχωρισμού τους. Στην προκείμενη διαδικασία η θερμοκρασία εισόδου ήταν 139 °C και η θερμοκρασία εξόδου κυμαινόταν μεταξύ 55-60 °C.

Μία ποσότητα 500 g αλκοολικού εκλούσματος διαλύθηκε σε 18.5 L απιονισμένου H<sub>2</sub>O. Η συγκέντρωση δηλαδή του διαλύματος ήταν 27 g/L. Επίσης, προστέθηκαν 500 g μαλτοδεξτρίνης. Έγιναν δοκιμές δημιουργίας και μεγαλύτερων συγκεντρώσεων, αλλά αυξανόταν πολύ ο χρόνος της διαδικασίας. Ο χρόνος που διήρκησε η επεξεργασία ήταν 2 h/L.

Το τελικό αποτέλεσμα ήταν η δημιουργία μίας λεπτής κόκκινης σκόνης (Εικόνα 19) που ήταν πλήρως απαλλαγμένη από διαλύτες. Το γεγονός αυτό είναι πολύ σημαντικό αφού διασφαλίζει την ποιότητα του προϊόντος και κατοχυρώνει την ασφαλή λήψη από τους ασθενείς σε περιπτώσεις κλινικών δοκιμών. Επιπλέον μειώθηκε σε 1/1 η αναλογία πολυφαινολικού μίγματος-μαλτοδεξτρίνης.



Εικόνα 19. Τελικό πολυφαινολικό μίγμα υπό μορφή σκόνης.

Μία επόμενη εφαρμογή της μεθοδολογίας που έγινε, αφορούσε 20 Kg στέμφυλα και πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται παρακάτω.

### **Κατεργασία 20 Kg στεμφύλων-Μελέτη διαλύτη εκχύλισης**

Η δοκιμή αυτή είναι η μοναδική που έγινε σε μεγάλη ποσότητα με μία σημαντική παραλλαγή που δεν είχε μελετηθεί πρωτύτερα σε εργαστηριακό επίπεδο. Ως διαλύτης εκχύλισης χρησιμοποιήθηκε απιονισμένο  $H_2O$ . Αναλυτικότερα, η ποσότητα των στεμφύλων αφού κονιοποιήθηκε σε σκόνη, χωρίστηκε σε τέσσερα μέρη των 5 Kg και καθένα από αυτά εκχυλίστηκε με 50 L  $H_2O$  ξεχωριστά για 12 h σε ένα εκχυλιστήρα χωρητικότητας 100 L, υπό συνεχή ανάδευση, ενώ θερμάνθηκε και για 1 h στους  $40^{\circ}C$ . Στη συνέχεια, ακολούθησε παραλαβή του εκχυλίσματος και η διήθησή του με σακόφιλτρα με πορώδες 25 μμ. Η ίδια διαδικασία τηρήθηκε και για τις άλλες τρεις ποσότητες των 5 Kg και στο τέλος ενώθηκαν τα τέσσερα εκχυλίσματα. Ένα πιθανότατα αρνητικό στοιχείο ήταν ότι το εκχύλισμα δεν είχε κόκκινο χρώμα, αλλά διατηρούσε ένα σκούρο καφέ χρώμα. Συνεχίστηκε η επεξεργασία όπως έχει περιγραφεί προηγούμενα, δηλαδή τα διηθημένα 200 L  $H_2O$  πέρασαν μέσα από τη στήλη με ρητίνη XAD16. Μετά το τέλος της διαδικασίας και την αναγέννηση της ρητίνης με EtOH, ακολούθησε μία δεύτερη διέλευση από τη στήλη και στο τέλος εξατμίστηκε η EtOH. Τα δύο ξηρά υπολείμματα ζύγιζαν 48 και 20 g αντίστοιχα, ενώ και κατά τον χρωματογραφικό τους έλεγχο με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας επέδειξαν κακή εικόνα.

Η συγκεκριμένη δοκιμή απέδειξε ότι οι οργανικοί αλκοολικοί διαλύτες είναι πιο αποτελεσματικοί από το  $H_2O$  στην εκχύλιση των στεμφύλων. Η χρήση του  $H_2O$  έγινε με τη σκέψη ότι αφενός απλοποιείται η διαδικασία, καθώς παραλείπονται τα στάδια εξάτμισης του οργανικού διαλύτη και της διάλυσης σε  $H_2O$  και αφετέρου είναι πιο συμφέρουσα οικονομικά αφού η χρήση οργανικών διαλυτών αυξάνει το κόστος. Ωστόσο όπως έχει ήδη αναφερθεί, αλλά θα μελετηθεί και θα αποδειχθεί στην επόμενη παράγραφο, το κόστος από τη χρήση διαλυτών μειώνεται πολύ εφόσον επιτυγχάνεται η ανάκτησή τους με τη θερμική εξάτμιση σε ποσοστό 80%.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν άλλες δύο δοκιμές, με σκοπό να μελετηθούν επιπλέον κάποιες παράμετροι και να βελτιωθεί η μέθοδος. Παράλληλα βέβαια αποσκοπούσαν και στην παραγωγή νέων ποσοτήτων από το πολυφαινολικό μίγμα.

### **Κατεργασία 150 Kg στεμφύλων-Μελέτη ανακύκλωσης διαλύτη**

Ένα θέμα που έπρεπε να διευκρινιστεί ήταν το ποσοστό ανακύκλωσης των χρησιμοποιούμενων διαλυτών. Γι' αυτό το λόγο ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία σε 150 Kg στέμφυλα όπως και προηγούμενα και μελετήθηκε λεπτομερώς και με μεγάλη προσοχή, η σχέση της ποσότητας του χρησιμοποιούμενου με αυτήν του ανακυκλώσιμου διαλύτη.

Στη συγκεκριμένη κατεργασία με ρητίνες προσρόφησης, η χρήση διαλύτη γίνεται σε δύο σημεία, πρώτα στην εκχύλιση των στεμφύλων και στη συνέχεια στην αναγέννηση της ρητίνης. Τα 150 Kg στεμφύλων εκχυλίστηκαν δύο φορές με 300 L EtOH. Μετά την εξάτμιση του διαλύτη ανακυκλώθηκαν τα 470 L διαλύτη, ένα ποσοστό δηλαδή 78%. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν 100 L από την παραπάνω ποσότητα για την αναγέννηση της ρητίνης. Η εξάτμιση οδήγησε στην ανάκτηση 80 L διαλύτη.

Συνολικά από τα 600 L EtOH τα οποία χρησιμοποιήθηκαν αρχικά στην εκχύλιση, παραλήφθηκαν στο τέλος όλης της διαδικασίας 450 L. Παρατηρείται δηλαδή μία ανακύκλωση διαλύτη που αγγίζει το 75%. Το συμπέρασμα αυτό έχει μεγάλη οικονομική αξία και αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα της μεθόδου.

Η επόμενη δοκιμή πραγματοποιήθηκε με σκοπό να λυθεί ένα πρακτικό πρόβλημα που είχε προκύψει και πιθανόν να οδηγούσε σε μειωμένη απόδοση.

### **Κατεργασία 200 Kg στεμφύλων-Καθορισμός χρονικών σημείων συλλογής και απόρριψης διαλύτη**

Ένα κρίσιμο σημείο της μεθόδου είναι το χρονικό σημείο στο οποίο θα αρχίσει η παραλαβή του αλκοολικού εκλούσματος από τη στήλη. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το στάδιο της εκλεκτικής προσρόφησης των πολυφαινολών και των χρωστικών μορίων αποτελείται από τα τέσσερα παρακάτω βήματα:

- 1) Έκπλυση της ρητίνης με H<sub>2</sub>O για 15 min υπό πίεση για να απομακρυνθούν τα στερεά σωματίδια που πιθανόν έχουν προσκολληθεί στη ρητίνη.
- 2) Αναδιάταξη της ρητίνης με την αντίστροφη παροχή H<sub>2</sub>O για 5 min.

- 3) Παραλαβή των πολυφαινολικών μορίων με την παροχή 75 L EtOH με ρυθμό ροής 250L/h. Η φάση αυτή διαρκεί περίπου 20 min.
- 4) Έκπλυση της ρητίνης με H<sub>2</sub>O για 30 min.

Στο 3ο βήμα αρχίζει η παροχή του διαλύτη στη στήλη ώστε να κατακρατηθούν και να παραληφθούν οι πολυφαινόλες ή οι χρωστικές, ανάλογα σε ποια ρητίνη αναφερόμαστε. Πρέπει όμως να επισημανθεί ότι όταν αρχίσει η τροφοδοσία του συστήματος με EtOH δεν μπορεί να ξεκινήσει αμέσως η συλλογή του αιθανολικού κλάσματος γιατί οι πρώτες ποσότητες διαλύτη που βγαίνουν από τη στήλη ανήκουν στο H<sub>2</sub>O που έχει κατακρατηθεί στη στήλη. Επομένως είναι αναγκαίο να προσδιοριστεί μετά από πόσο όγκο διαλύτη που εκρέει της στήλης, θα αρχίσει να βγαίνει από τη στήλη η EtOH, δηλαδή θα πρέπει να αρχίσει η συλλογή του αιθανολικού κλάσματος.

Το ίδιο ζήτημα τίθεται και μεταξύ των βημάτων 3 και 4. Όταν σταματήσει η παροχή της EtOH και αρχίσει η τροφοδοσία της στήλης με H<sub>2</sub>O, ο διαλύτης που βγαίνει από τη στήλη δεν είναι H<sub>2</sub>O, αλλά αποτελείται από την EtOH που έχει κατακρατηθεί στη ρητίνη. Οπότε θα πρέπει να συλλεχθεί γιατί περιέχει τα μόρια για τα οποία γίνεται όλη η κατεργασία και όχι να απορριφθεί. Το ερώτημα όμως είναι πόσος όγκος διαλύτη από αυτόν που βγαίνει από τη στήλη αμέσως μετά από την παύση της παροχής EtOH και την έναρξη έκπλυσης με H<sub>2</sub>O, θα πρέπει να συλλέγεται.

Η απάντηση στα παραπάνω δύο ζητήματα δόθηκε με τη παρούσα δοκιμή κατά την οποία εκχυλίστηκαν 200 Kg και ακολουθήθηκε η γνωστή πορεία.

Μόλις διήλθε το υδαταλκοολικό διάλυμα από τη στήλη με ρητίνη XAD16 και μετά την έκπλυση της ρητίνης με H<sub>2</sub>O για 15 min υπό πίεση για να απομακρυνθούν τα στερεά σωματίδια που πιθανόν να έχουν προσκολληθεί στη ρητίνη, ετοιμάστηκε ένας όγκος 80 L EtOH για να εισαχθεί στη στήλη. Με την εισαγωγή του διαλύτη στη στήλη, ξεκίνησε και η ανά 5 L συλλογή δειγμάτων από την έξοδο της στήλης. Μόλις σταμάτησε η παροχή της EtOH, άρχισε η έκπλυση της ρητίνης με H<sub>2</sub>O. Η δειγματοληψία ανά 5 L συνεχίστηκε και τα δείγματα ελέχθηκαν σε φασματοφωτόμετρο Shimadzu-160A (Πίνακας 15).

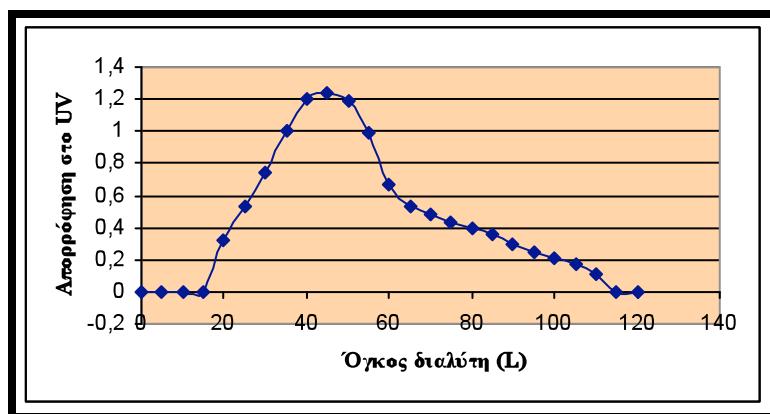
ΟΓΚΟΣ ΔΙΑΛΥΤΗ (L)	ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ ΣΤΟ UV
0	0
5	0
10	0
15	0
20	0.324
25	0.534
30	0.744
35	1.000
40	1.203
45	1.243
50	1.191
55	0.990
60	0.670
65	0.530
70	0.484
75	0.431
80	0.399
85	0.355
90	0.295
95	0.251
100	0.210
105	0.173
110	0.109
115	0
120	0

Πίνακας 15. Όγκος διαλύτη σε σχέση με την απορρόφηση στο UV κατά την κατεργασία με ρητίνη XAD16.

Στον παραπάνω πίνακα φαίνεται η μεταβολή της απορρόφησης στο UV του διαλύματος που εκρέει της στήλης σε σχέση με τον όγκο του. Η αλλαγή χρώματος στα κελιά του πίνακα, σημαίνει αλλαγή διαλύτη που εισέρχεται στη στήλη, από EtOH σε H<sub>2</sub>O. Παρατηρείται λοιπόν, ότι αφού εξέλθουν 20 L από τη στήλη με ρητίνη XAD16, αρχίζουν να βγαίνουν οι πρώτες ποσότητες EtOH αφού η απορρόφηση είναι διαφορετική του μηδενός. Η απορρόφηση οφείλεται στη διαλυμένη ποσότητα των πολυνφαινολών στην EtOH. Από το σημείο αυτό και μετά η απορρόφηση αυξάνεται συνεχώς και στα 50 L παρατηρείται η μέγιστη απορρόφηση που σημαίνει ότι τότε εκδηλώνεται και η μέγιστη συγκέντρωση του εξερχόμενου διαλύματος. Μετά τον όγκο των 50 L, η απορρόφηση μειώνεται. Στα 85 L αρχίζει η παροχή H<sub>2</sub>O και παρατηρείται μία συνεχής ελάττωση της απορρόφησης μέχρι τον τελικό μηδενισμό της στα 115 L.

Στο σημείο αυτό σταματά η εκροή του αλκοολικού εκλούσματος και ξεκινά εξολοκλήρου η έξοδος του  $H_2O$ .

Επομένως, σύμφωνα με τα παραπάνω προκύπτει ότι για τη συγκεκριμένη ποσότητα EtOH, η συλλογή του διαλύτη πρέπει να αρχίζει μόλις βγουν από τη στήλη 20 L διαλύτη από τη στιγμή που ξεκίνησε η εισαγωγή EtOH και να σταματήσει όταν εξέλθουν 35 L από τη στιγμή που ξεκίνησε η παροχή  $H_2O$ . Η σχέση του όγκου διαλύτη σε σχέση με την απορρόφηση παρουσιάζεται σχηματικά στο Σχήμα 30.



Σχήμα 30. Όγκος διαλύτη σε σχέση με την απορρόφηση στο UV κατά την κατεργασία με ρητίνη XAD16.

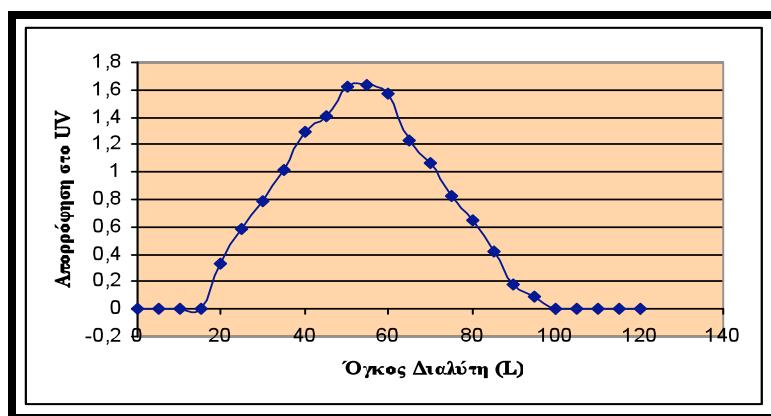
Το ίδιο ακριβώς π είραμα πραγματοποιήθηκε και για τη ρητίνη XAD7HP (Πίνακας 16). Όπως και προηγούμενα, η αλλαγή χρώματος στα κελιά του πίνακα, σημαίνει αλλαγή διαλύτη που εισέρχεται στη στήλη από EtOH σε  $H_2O$ . Παρατηρείται λοιπόν, ότι αφού εξέλθουν 20 L από τη στήλη με ρητίνη XAD7HP, αρχίζουν να βγαίνουν οι πρώτες ποσότητες EtOH αφού η απορρόφηση είναι διαφορετική του μηδενός. Η απορρόφηση οφείλεται στη διαλυμένη ποσότητα των χρωστικών στην EtOH. Από το σημείο αυτό και μετά η απορρόφηση αυξάνεται συνεχώς και στα 55 L παρατηρείται η μέγιστη απορρόφηση που σημαίνει ότι τότε εκδηλώνεται και η μέγιστη συγκέντρωση του εξερχόμενου διαλύματος. Μετά τον όγκο των 55 L, η απορρόφηση μειώνεται. Στα 85 L αρχίζει η παροχή  $H_2O$  και παρατηρείται μία συνεχής ελάττωση της απορρόφησης μέχρι τον τελικό μηδενισμό της στα 100 L.

Η διαφορά που εντοπίζεται σε σχέση με τη ρητίνη XAD16 είναι ότι χρειάζεται λιγότερος όγκος διαλύτη για να μηδενιστεί η απορρόφηση.

ΟΓΚΟΣ ΔΙΑΛΥΤΗ (L)	ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ ΣΤΟ UV
0	0
5	0
10	0
15	0
20	0.333
25	0.580
30	0.791
35	1.011
40	1.288
45	1.412
50	1.623
55	1.637
60	1.578
65	1.230
70	1.060
75	0.824
80	0.647
85	0.423
90	0.185
95	0.097
100	0
105	0
110	0
115	0
120	0

Πίνακας 16. Όγκος διαλύτη σε σχέση με την απορρόφηση στο UV κατά την κατεργασία με ρητίνη XAD7HP.

Ακολουθεί η γραφική παράσταση της σχέσης του όγκου διαλύτη σε σχέση με την απορρόφηση (Σχήμα 31).



Σχήμα 31. Όγκος διαλύτη σε σχέση με την απορρόφηση στο UV κατά την κατεργασία με ρητίνη XAD7HP.

Με τις δύο παραπάνω δοκιμές καθορίσθηκαν τα σημεία στα οποία πρέπει να αρχίζει και να ολοκληρώνεται η συλλογή του αλκοολικού κλάσματος. Ορίστηκε δηλαδή ο όγκος του εξερχόμενου υγρού μετά τον οποίο ξεκινά η έξοδος του μίγματος πολυνφαινολών ή χρωστικών και για πόσα L συνεχίζεται η έξοδος των ουσιών αυτών.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η εφαρμογή σε πιλοτικό επίπεδο της τεχνικής των ρητινών προσρόφησης στην επεξεργασία των στεμφύλων εμφανίζει ορισμένα πλεονεκτήματα τα οποία μπορούν με την κατάλληλη αξιοποίηση να αποτελέσουν τη βάση μίας μελλοντικής πιο εκτεταμένης χρήσης. Συνοπτικά θα μπορούσαν να τονιστούν τα εξής:

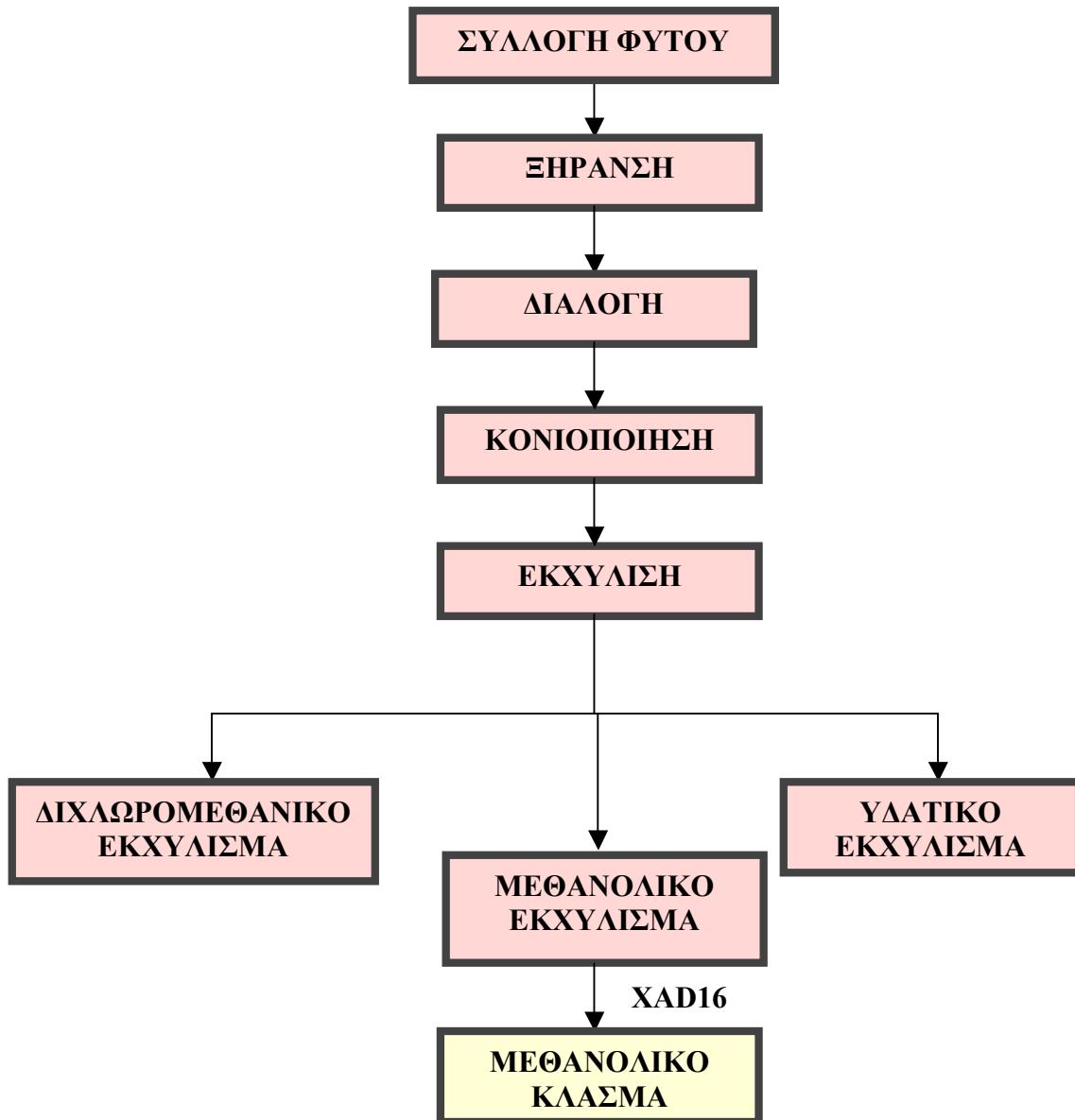
- Χρησιμοποιήθηκαν ως αρχική φυτική πρώτη ύλη της κατεργασίας τα στέμφυλα που είναι ένα απόβλητο της οινοποιητικής διαδικασίας, χωρίς καμμία επιπλέον χρησιμότητα.
- Επιλύθηκε το πρόβλημα της διαχείρισης των οινοποιητικών αποβλήτων και μειώθηκε η περιβαλλοντική ρύπανση αφού συλλέχθηκαν εκατοντάδες κιλά αποβλήτων. Έχει άλλωστε αποδειχθεί ότι οι μεγάλες ποσότητες πολυφαινολικών μορίων που περιέχουν, είναι ένας επιβαρυντικός παράγοντας για το περιβάλλον εξαιτίας της αργής αποικοδόμησής τους και εκδηλώνουν τοξικότητα στους ζωντανούς οργανισμούς.
- Παράχθηκε ένα εμπλουτισμένο μίγμα που περιείχε σημαντικούς πολυφαινολικούς μεταβολίτες (π.χ. στιλβένια), με αντιοξειδωτική δράση και υψηλή προστιθέμενη αξία.
- Παράχθηκε ένα εκχύλισμα που περιείχε τις χρωστικές ουσίες των στεμφύλων.
- Απομονώθηκε καθαρή *trans*-ρεσβερατρόλη με τη χρήση FCPC.
- Μορφοποιήθηκε το τελικό πολυφαινολικό κλάσμα σε μία λεπτή κόκκινη σκόνη που ήταν πλήρως απαλλαγμένη από υπολείμματα διαλυτών, εύκολη στον χειρισμό και κατάλληλη για ένταξη σε κλινικές δοκιμές.
- Η ανακύκλωση των διαλυτών έφτασε το 80% και μειώθηκε σημαντικά το κόστος της διαδικασίας.
- Το κόστος μειώθηκε ακόμα περισσότερο, καθώς οι ρητίνες προσρόφησης μπορούν να χρησιμοποιηθούν πολλές φορές, ιδιαίτερα όταν ακολουθούνται πιστά οι κατάλληλες ενέργειες αναγέννησης και έκπλυσής τους.

## 1.2.2) ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΩΝ ΜΟΡΙΩΝ

### 1.2.2.a) Αρχική κατεργασία δρόγης

Η συλλογή των στεμφύλων (το στερεό υπόλειμμα των σταφυλιών όταν απομακρυνθεί ο χυμός τους) της ποικιλίας *Μανδηλαριάς* του φυτού *Vitis vinifera* της οικογένειας *Vitaceae* πραγματοποιήθηκε τον Αύγουστο του 2003 στο νησί Σαντορίνη του νομού Κυκλαδων. Πρέπει να σημειωθεί ότι τα στέμφυλα που χρησιμοποιήθηκαν, προέρχονταν από λιαστά σταφύλια, δηλαδή σταφύλια που είχαν εκτεθεί στον ήλιο για δέκα ημέρες και είχαν συρρικνωθεί χάνοντας μεγάλο ποσοστό της υγρασίας τους. Η επίδραση της ηλιακής ακτινοβολίας κινητοποιεί τους αμυντικούς μηχανισμούς των σταφυλιών και προάγει τη σύνθεση φυτοαλεξινών, όπως η *trans*-ρεσβερατρόλη κ.α. Στη συνέχεια, τα στέμφυλα υποβλήθηκαν σε ξηράνση, κονιοποίηση και η κόνις που προέκυψε, εκχυλίστηκε διαδοχικά με  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{MeOH}$  και  $\text{H}_2\text{O}$ . Μετά από έλεγχο των εκχυλισμάτων με τη χρήση χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC), αποφασίστηκε η μελέτη του μεθανολικού εκχυλίσματος.

Το μεθανολικό κλάσμα που προερχόταν από την κατεργασία του μεθανολικού εκχυλίσματος των στεμφύλων με ρητίνη XAD16 (παρ. 1.2.1.δ), ήταν πλουσιότερο σε πολυυφαινολικά μόρια από το μεθανολικό εκχύλισμά τους και γι' αυτό χρησιμοποιήθηκε ως σημείο εκκίνησης στην πορεία απομόνωσης και διαχωρισμού δευτερογενών μεταβολιτών, δηλαδή αυτό εισήλθε στους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς που περιγράφονται στις επόμενες παραγράφους. Στο Σχήμα 32 φαίνεται η συνολική πορεία κατεργασίας του φυτικού υλικού. Πιο συγκεκριμένα απεικονίζεται η αρχική κατεργασία του φυτικού υλικού που οδήγησε στην παρασκευή των εκχυλισμάτων από τα οποία **απομονώθηκαν 16 δευτερογενείς μεταβολίτες**.

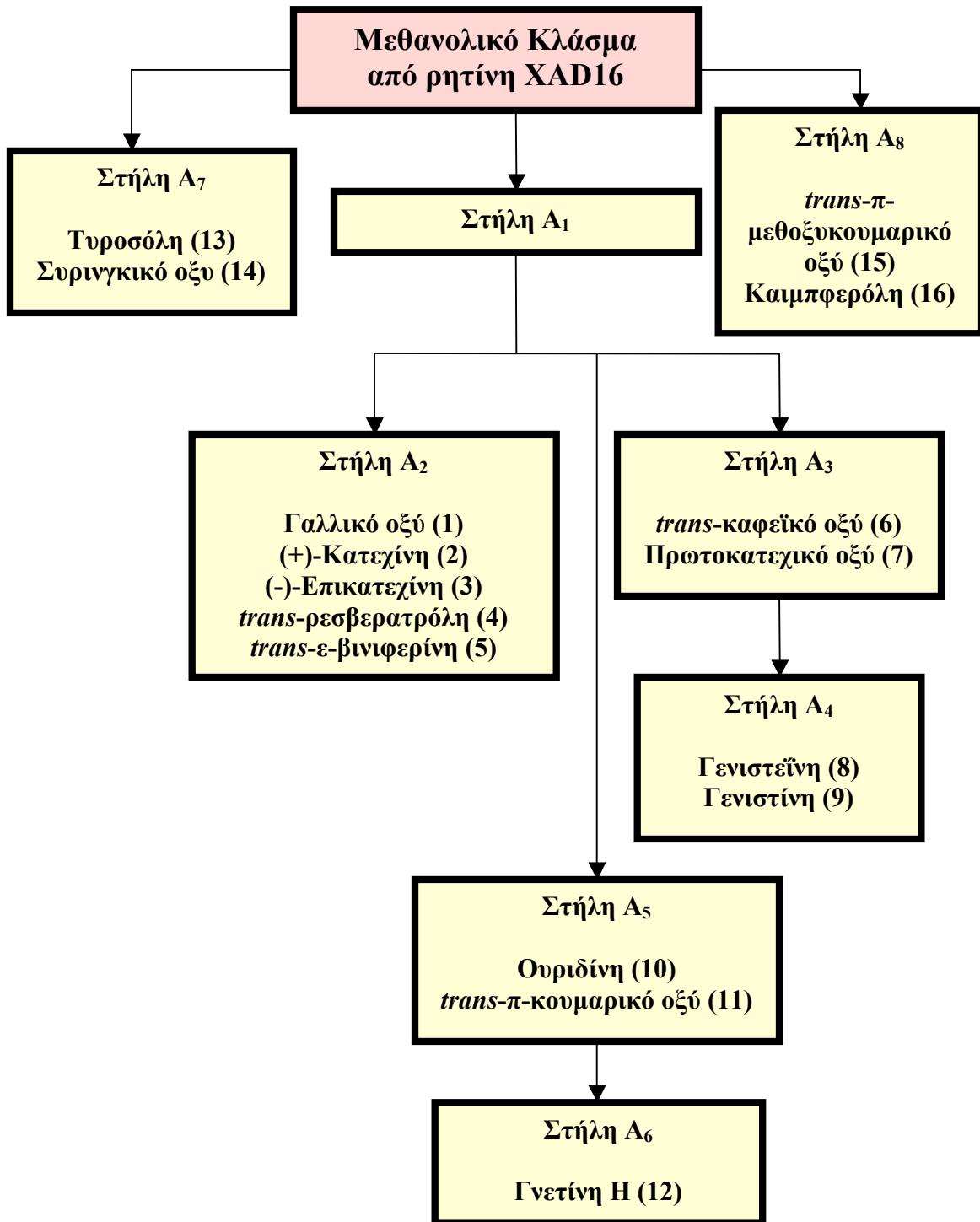


Σχήμα 32. Αρχική κατεργασία του φυτικού υλικού.

### 1.2.2.β) Μελέτη μεθανολικού κλάσματος από ρητίνη XAD16

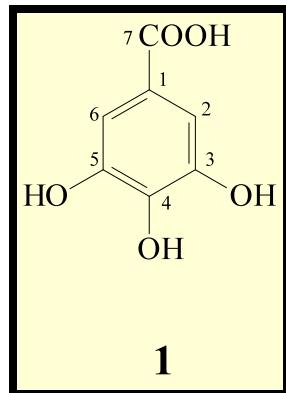
Η ενότητα αυτή περιλαμβάνει τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά των **16 δευτερογενών μεταβολιτών** που απομονώθηκαν από τη χρωματογραφική κατεργασία του μεθανολικού κλάσματος το οποίο προήλθε από την κατεργασία του μεθανολικού εκχυλίσματος με ρητίνη XAD16. Ο τρόπος και η αναλυτική πορεία απομόνωσης των

ουσιών περιγράφεται στην παράγραφο 1.3.3 του πειραματικού μέρους. Στο Σχήμα 33 εμφανίζονται οι στήλες που πραγματοποιήθηκαν και τα μόρια που προέκυψαν.



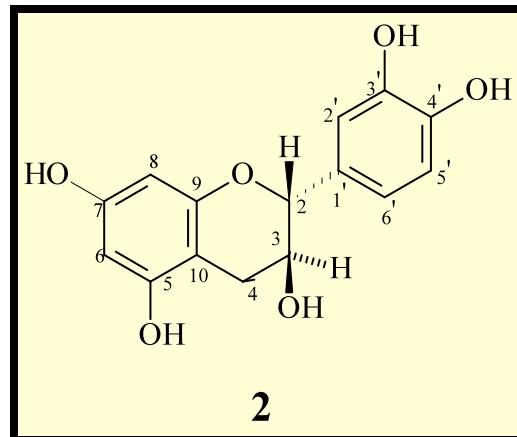
Σχήμα 33. Μελέτη του μεθανολικού κλάσματος που προήλθε από από την κατεργασία του μεθανολικού εκχυλίσματος των στεμφύλων με ρητίνη XAD16.

i.) Φασματοσκοπική μελέτη του γαλλικού οξέος (gallic acid) (1)  
 (στήλη A<sub>2</sub>, κλάσμα 47-61)



Ο προσδιορισμός της δομής του έγινε με τη λήψη φασμάτων <sup>1</sup>H-NMR και <sup>13</sup>C-NMR (D<sub>2</sub>O), από τα οποία προέκυψαν στοιχεία που ήταν σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Lu Y. & Foo Y., 1999). Σημαντικότερα φασματοσκοπικά γνωρίσματα είναι: Στο φάσμα <sup>1</sup>H-NMR, η μοναδική μετατόπιση που παρατηρείται, είναι η απλή κορυφή των αρωματικών υδρογόνων H-2 και H-6 στα 7.10 ppm. Στο φάσμα <sup>13</sup>C-NMR διακρίνονται τα σήματα του C-7 του καρβονυλίου του καρβοξυλικού οξέος στα 170.8 ppm και η μετατόπιση των αρωματικών ανθράκων C-1-C-6 στα 110.5-144.9. Από τους αρωματικούς άνθρακες, πιο αποθωρακισμένοι είναι οι οξυγονωμένοι (C-3, C-4, C-5) που συντονίζονται στην περιοχή 135.9-144.9.

ii.) Φασματοσκοπική μελέτη της (+)-κατεχίνης [(+)-catechin] (2)  
 (στήλη A<sub>2</sub>, κλάσμα 224-244)



Είναι παράγωγο του φλαβανίου και ταυτοποιήθηκε με τη βοήθεια των φασματοσκοπικών δεδομένων που προέκυψαν από τα φάσματα  $^1\text{H-NMR}$  και  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) τα οποία ήταν σε πλήρη συμφωνία με τη βιβλιογραφία (Goetz G. et al., 1999). Στα φάσματα NMR αξίζουν ιδιαίτερης προσοχής τα εξής:

**Στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$ :**

- ✓ Η διπλή κορυφή στα 6.93 ppm που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο, αντιστοιχεί στο αρωματικό πρωτόνιο της θέσης 2' το οποίο εμφανίζει *meta* σύζευξη με το αρωματικό πρωτόνιο H-6'.
- ✓ Η πολλαπλή κορυφή στα 6.80-6.88 ppm, αντιστοιχεί στα αρωματικά πρωτόνια των θέσεων 5', 6' τα οποία εμφανίζουν *ortho* μεταξύ τους, ενώ το H-6' εμφανίζει μία επιπλέον *meta* σύζευξη με το H-2'.
- ✓ Η διπλή κορυφή στα 6.03 ppm που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-6 το οποίο εμφανίζει *meta* σύζευξη με το αρωματικό πρωτόνιο H-8 (5.96 ppm).
- ✓ Η διπλή κορυφή στα 4.66 ppm που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-2.
- ✓ Η πολλαπλή κορυφή στα 4.07 ppm που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο H-3.
- ✓ Οι δύο διπλές-διπλές κορυφές στα 2.94 και 2.60 ppm που ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η καθεμία και αντιστοιχούν στα πρωτόνια της θέσης 4 ( $4_{\text{ax}}$ ,  $4_{\text{eq}}$  αντίστοιχα).

**Στο φάσμα  $^{13}\text{C-NMR}$ :**

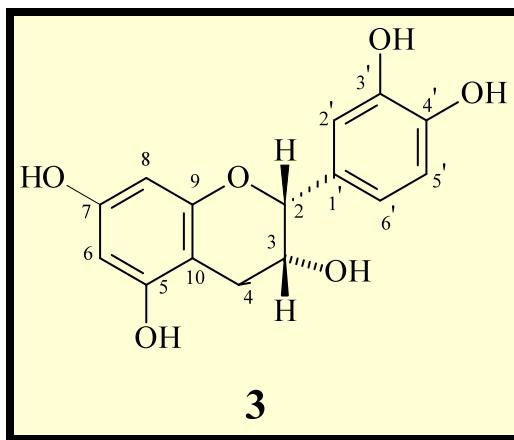
- ✓ Οι χημικές μετατοπίσεις των αρωματικών ανθράκων εντοπίζονται στην περιοχή 95.8-158.1 ppm.
- ✓ Οι κορυφές στα 83.1 και 69.1 ppm ανήκουν αντίστοιχα στους άνθρακες των θέσεων 2, 3.
- ✓ Ο άνθρακας της θέσης 4 συντονίζεται στα 28.7 ppm.

Η (+)-μορφή είναι η συνηθέστερη στη φύση. Η διαπίστωση της ταυτότητας του οπτικού αντίποδα έγινε με μέτρηση της στροφικής ικανότητας και σύγκριση με τα αντίστοιχα βιβλιογραφικά δεδομένα (El-Seedi H.R. et al., 1999). Η ακριβής τιμή σε

θερμοκρασία  $22^{\circ}\text{C}$ , διαλύτη  $\text{CH}_3\text{COCH}_3$  και με σ υγκέντρωση του διαλύματος  $0.20 \text{ g}/100\text{ml}$  ήταν  $[\alpha]^{22} = +11.3^{\circ}$ .

H (+)-κατεχίνη απαντά στο Gambir το οποίο είναι ξηρό εκχόλισμα φύλλων και κλαδίσκων του φυτού *Uncaria gambir* της οικογένειας Rubiaceae (Βερυκοκίδου-Βιτσαροπούλου Ε., 1997). Όσον αφορά τη βιολογική δραστικότητά της, εμφανίζει αντιοξειδωτική, αιμοστατική και ηπατοπροστατευτική δράση. Έχει χρησιμοποιηθεί στη θεραπεία ηπατικών δυσλειτουργιών και κυρίως στην ηπατίτιδα (Harborne J.B. & Baxter H., 1993). Σημαντική είναι επίσης η δράση του μορίου στη μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακών παθήσεων. Έχει αποδειχθεί ότι η κατεχίνη και τα παράγωγά της, μειώνουν τα επίπεδα χοληστερόλης στο αίμα, προστατεύουν τη λιποπρωτεΐνη LDL από την οξείδωση, εμποδίζουν τη συγκόλληση των αιμοπεταλίων και μειώνουν τη συστολική και διαστολική πίεση (Hernandez Figueroa T.T. et al., 2004). Επιπρόσθετα, η κατανάλωση τροφίμων που έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε κατεχίνη και άλλα πολυφαινολικά μόρια, δρα προστατευτικά έναντι του καρκίνου (Yu J. et al., 2006), ενώ νεότερες έρευνες εξ κάνουν λόγο για συμβολή της κατεχίνης στη σταθεροποίηση του κολλαγόνου (Madhan B. et al., 2005) και την προστασία των νευρικών κυττάρων σε νευροεκφυλιστικές παθήσεις, όπως Parkinson, Alzheimer κ.α. (Mandel S. & Youdim M.B., 2004).

**iii.) Φασματοσκοπική μελέτη της (-)-επικατεχίνης [(-)-epicatechin] (3)  
(στήλη A<sub>2</sub>, κλάσμα 301-315)**



Η επικατεχίνη ανήκει και αυτή στα παράγωγα του φλαβανίου. Ο προσδιορισμός της δομής της έγινε με τη λήψη φασμάτων  $^1\text{H-NMR}$  και  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO), από τα οποία προέκυψαν στοιχεία που ήταν σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Shen C.C. et al., 1993). Ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα εξής στοιχεία:

**Στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$ :**

- ✓ Η διπλή κορυφή στα 6.91 ppm που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο, αντιστοιχεί στα αρωματικό πρωτόνιο της θέσης 2' το οποίο εμφανίζει *meta* σύζευξη με το αρωματικά πρωτόνιο H-6'.
- ✓ Η πολλαπλή κορυφή στα 6.68 ppm αντιστοιχεί στα αρωματικά πρωτόνια των θέσεων 5', 6' τα οποία εμφανίζουν μία *ortho* μεταξύ τους, ενώ το H-6' εμφανίζει μία επιπλέον *meta* σύζευξη με το H-2'.
- ✓ Η διπλή κορυφή στα 5.91 ppm που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-6 το οποίο εμφανίζει μία *meta* σύζευξη με το αρωματικό πρωτόνιο H-8 (5.75 ppm).
- ✓ Η απλή κορυφή στα 4.75 ppm που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-2.
- ✓ Η πολλαπλή κορυφή στα 4.03 ppm που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο H-3.
- ✓ Οι δύο διπλές-διπλές κορυφές στα 2.70 και 2.50 ppm που ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η καθεμία και αντιστοιχούν στα πρωτόνια της θέσης 4 ( $4_{\text{ax}}$ ,  $4_{\text{eq}}$  αντίστοιχα).

**Στο φάσμα  $^{13}\text{C-NMR}$ :**

- ✓ Οι χημικές μετατοπίσεις των αρωματικών ανθράκων εντοπίζονται στην περιοχή 94.2-156.5 ppm.
- ✓ Οι κορυφές στα 78.1 και 65.0 ppm που ανήκουν αντίστοιχα στους άνθρακες των θέσεων 2, 3.
- ✓ Ο άνθρακας της θέσης 4 συντονίζεται στα 28.2 ppm.

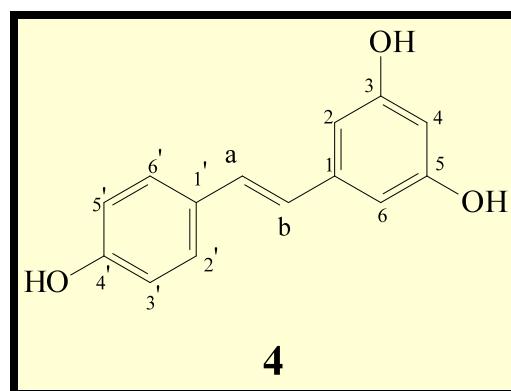
Η (-)-μορφή είναι η συνηθέστερη στη φύση. Η διαπίστωση της ταυτότητας του οπτικού αντίποδα έγινε με μέτρηση της στροφικής ικανότητας και σύγκριση με τα αντίστοιχα βιβλιογραφικά δεδομένα (El-Seedi H.R. et al., 1999). Η ακριβής τιμή σε

θερμοκρασία  $22^{\circ}\text{C}$ , διαλύτη  $\text{CH}_3\text{COCH}_3$  και με συγκέντρωση του διαλύματος  $0.2 \text{ g}/100\text{ml}$  ήταν  $[\alpha]^{22} = -12.2^0$ .

Η (-)-επικατεχίνη είναι ευρύτατα διαδεδομένη στη φύση και απαντά μεταξύ άλλων, στα σπέρματα κακάο και το πράσινο τσάι (Βερυκοκίδου-Βιτσαροπούλου Ε., 1997). Όσον αφορά τη βιολογική δραστικότητά της, εμφανίζει αντιβακτηριακή, αντιαλλεργική, αντιυπεργλυκαιμική, αντιφλεγμονώδη, αντιμεταλλαξιογόνο και φυσικά αντιοξειδωτική δράση (Harborne J.B. & Baxter H., 1993). Η αντιμεταλλαξιογόνος δράση της μάλιστα, έχει προκαλέσει το επιστημονικό ενδιαφέροντα και πραγματοποιούνται συνεχώς εργασίες που επιβεβαιώνουν τη συγκεκριμένη δράση (Geetha T. et al., 2004). Η επικατεχίνη συγκαταλέγεται σήμερα στους παράγοντες που υπάρχουν στα τρόφιμα (σταφύλια, τσάι κ.α.) και θεωρείται ότι συμβάλλει στην πρόληψη και τη θεραπεία του καρκίνου (Aggarwal B.B & Shishodia S., 2006). Τέλος, όπως και η κατεχίνη έχει ευεργετική επίδραση στη μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακών παθήσεων (Hernandez Figueroa T.T. et al., 2004).

#### iv.) Φασματοσκοπική μελέτη της *trans*-ρεσβερατρόλης (*trans*-resveratrol) (4)

(στήλη A<sub>2</sub>, κλάσμα 369-380)



Η ρεσβερατρόλη ανήκει στην κατηγορία των στιλβενοειδών και αποτελεί τον πιο χαρακτηριστικό αντιπρόσωπό της. Ταυτοποιήθηκε με τη βοήθεια των φασματοσκοπικών δεδομένων που προέκυψαν από τα φάσματα  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  και COSY ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) τα οποία ήταν σε πλήρη συμφωνία με τη βιβλιογραφία (Su B.N. et al.,

2002; Casabuono A.C. & Pomilio A.B., 1994). Οι σημαντικότερες παρατηρήσεις που οδήγησαν στην ταυτοποίηση του μορίου είναι:

**Στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$ :**

- ✓ Η διπλή κορυφή στα 7.40 ppm που ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια, αντιστοιχεί στα αρωματικά πρωτόνια των θέσεων 2', 6' τα οποία εμφανίζουν μία *ortho* σύζευξη το καθένα με τα αρωματικά πρωτόνια των θέσεων 3', 5' αντίστοιχα.
- ✓ Η διπλή κορυφή στα 6.82 ppm που ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια, αντιστοιχεί στα αρωματικά πρωτόνια των θέσεων 3', 5' τα οποία εμφανίζουν μία *ortho* σύζευξη το καθένα με τα αρωματικά πρωτόνια των θέσεων 2', 6' αντίστοιχα.
- ✓ Η διπλή κορυφή στα 6.52 ppm που ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια, αντιστοιχεί στα αρωματικά πρωτόνια των θέσεων 2, 6 τα οποία εμφανίζουν μία *meta* σύζευξη το καθένα με το αρωματικό πρωτόνιο H-4.
- ✓ Η τριπλή κορυφή στα 6.24 ppm αντιστοιχεί στο αρωματικό πρωτόνιο της θέσης 4 που έχει μία *meta* σύζευξη με τα αρωματικά πρωτόνια H-2, H-6.
- ✓ Οι δύο διπλές κορυφές στα 7.05 ppm και 6.83 ppm αντιστοιχούν στα ολεφινικά πρωτόνια (H-a, H-b αντίστοιχα) του διπλού δεσμού. Η τιμή της σταθεράς σύζευξης ( $J$ ) είναι 16 Hz, γεγονός που αποδεικνύει την *trans* διαμόρφωση των πρωτονίων του διπλού δεσμού.

**Στο φάσμα  $^{13}\text{C-NMR}$ :**

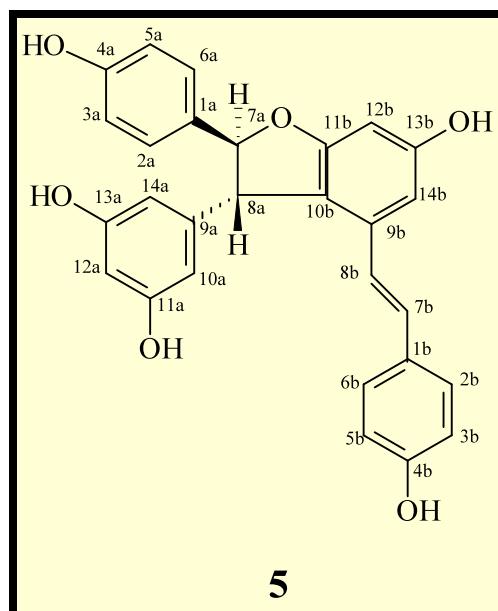
- ✓ Στην περιοχή 102.7-159.7 ppm εμφανίζονται οι κορυφές που αντιστοιχούν στους αρωματικούς άνθρακες του ενός αρωματικού δακτυλίου, δύο από τους οποίους είναι οξυγονωμένοι (C-3 και C-5 στα 159.7 ppm).
- ✓ Στην περιοχή 116.5-158.4 ppm εμφανίζονται οι κορυφές που αντιστοιχούν στους αρωματικούς άνθρακες του άλλου αρωματικού δακτυλίου, ένας από τους οποίους είναι οξυγονωμένος (C-4' στα 158.4 ppm).
- ✓ Οι δύο άνθρακες του διπλού δεσμού συντονίζονται στα 129.4 ppm (C-a) και 127.1 ppm (C-b).

**Στο φάσμα COSY:**

- ✓ Με το φάσμα αυτό πιστοποιήθηκε η δομή των δύο αρωματικών δακτυλίων. Παρατηρήθηκε συγκεκριμένα ότι τα αρωματικά πρωτόνια H-2' και H-6' εμφανίζουν  $^3J$  σύζευξη με τα αρωματικά πρωτόνια των θέσεων 3', 5'.

Η ρεσβερατρόλη είναι ο πιο γνωστός εκπρόσωπος των στιλβενοειδών και μάλιστα τα περισσότερα μέλη της κατηγορίας αυτής είναι ολιγομερή ή πολυμερή της. Περισσότερες πληροφορίες για το μόριο και τη βιολογική δράση του παρατίθενται στην παράγραφο 1.1.2.γ.

v.) Φασματοσκοπική μελέτη της *trans-ε-βινιφερίνης (trans-ε-viniferin) (5)*  
(στήλη Α<sub>2</sub>, κλάσμα 405-439)



Η ε-βινιφερίνη ανήκει επίσης στα στιλβένια και μπορεί να θεωρηθεί ως διμερές της ρεσβερατρόλης. Ο καθορισμός της δομής της έγινε με τη βιοήθεια του NMR και σύγκριση με τη βιβλιογραφία (Yan K.X. et al., 2001; Ito J. et al, 1999). Μάλιστα, πρέπει να σημειωθεί ότι για τη λήψη των φασμάτων χρησιμοποιήθηκαν δύο δευτεριωμένοι διαλύτες, η CD<sub>3</sub>OD και η CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>. Και με τους δύο διαλύτες ελήφθησαν φάσματα <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, HMQC, COSY. Οι παρατηρήσεις που ήταν καθοριστικές στην ταυτοποίηση του μορίου είναι:

#### Στο φάσμα <sup>1</sup>H-NMR:

- ✓ Η διπλή κορυφή στα 7.13 ppm (CD<sub>3</sub>OD) και 7.20 ppm (CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>) που ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια, αντιστοιχεί στα αρωματικά πρωτόνια των θέσεων 2a, 6a

τα οποία εμφανίζουν μία *ortho* σύζευξη το καθένα με τα αρωματικά πρωτόνια των θέσεων 3a, 5a τα οποία εμφανίζονται στα 6.76 ppm ( $CD_3OD$ ) και 6.82 ppm ( $CD_3COCD_3$ ) ως μία διπλή κορυφή.

- ✓ Οι διπλές κορυφές στα 5.36 ppm ( $CD_3OD$ ), 5.42 ppm ( $CD_3COCD_3$ ) και 4.34 ppm ( $CD_3OD$ ), 4.47 ppm ( $CD_3COCD_3$ ) ανήκουν αντίστοιχα στα πρωτόνια των θέσεων 7a, 8a του φουρανικού δακτυλίου. Η τιμή της σταθεράς σύζευξης ( $J$ ) είναι 6.6 Hz σε  $CD_3OD$  (5.5 Hz σε  $CD_3COCD_3$ ), γεγονός που αποδεικνύει την *trans* διαμόρφωση των πρωτονίων H-7a, H-8a.
- ✓ Η τριπλή κορυφή στα 6.17 ppm ( $CD_3OD$ ) και η απλή στα 6.23 ( $CD_3COCD_3$ ) ppm αντιστοιχεί στο αρωματικό πρωτόνιο της θέσης 12a που έχει μία *meta* σύζευξη με τα αρωματικά πρωτόνια H-10a, H-14a.
- ✓ Η διπλή κορυφή στα 6.15 ppm ( $CD_3OD$ ) και η απλή στα 6.23 ppm ( $CD_3COCD_3$ ) που ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια, αντιστοιχεί στα αρωματικά πρωτόνια των θέσεων 10a, 14a τα οποία εμφανίζουν μία *meta* σύζευξη το καθένα με το αρωματικό πρωτόνιο H-12a.
- ✓ Η διπλή κορυφή στα 7.03 ppm ( $CD_3OD$ ), 7.17 ppm ( $CD_3COCD_3$ ) που ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια, αντιστοιχεί στα αρωματικά πρωτόνια των θέσεων 2b, 6b τα οποία εμφανίζουν μία *ortho* σύζευξη το καθένα με τα αρωματικά πρωτόνια των θέσεων 3b, 5b αντίστοιχα τα οποία εμφανίζονται στα 6.64 ppm ( $CD_3OD$ ), 6.73 ppm ( $CD_3COCD_3$ ) ως μία διπλή κορυφή.
- ✓ Η διπλή κορυφή στα 6.62 ppm ( $CD_3OD$ ), 6.72 ppm ( $CD_3COCD_3$ ) αντιστοιχεί στο αρωματικό πρωτόνιο H-14b, ενώ η διπλή κορυφή στα 6.24 ppm ( $CD_3OD$ ), 6.32 ppm ( $CD_3COCD_3$ ) ανήκει στο H-12b.
- ✓ Οι δύο διπλές κορυφές στα 6.81 ppm και 6.56 ppm ( $CD_3OD$ ) και στα 6.90 ppm, 6.71 ppm ( $CD_3COCD_3$ ) αντιστοιχούν στα ολεφινικά πρωτόνια (H-7b, H-8b αντίστοιχα) του διπλού δεσμού. Η τιμή της σταθεράς σύζευξης ( $J$ ) είναι 16.1 Hz σε  $CD_3OD$  (16.5 Hz σε  $CD_3COCD_3$ ), γεγονός που αποδεικνύει την *trans* διαμόρφωση των πρωτονίων του διπλού δεσμού.

#### Στο φάσμα $^{13}C$ -NMR:

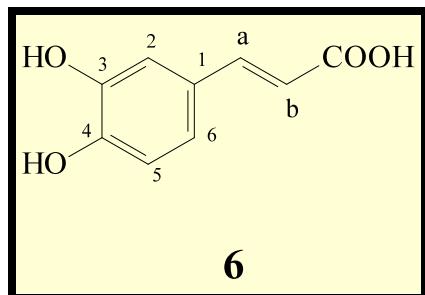
- ✓ Οι αρωματικοί άνθρακες C-1a-C-6a συντονίζονται στην περιοχή 116.3-158.4 ppm ( $CD_3OD$ ) και 116.1-158.1 ppm ( $CD_3COCD_3$ ), ένας από τους οποίους είναι

οξυγονωμένος (C-4a) και εμφανίζεται πιο αποθωρακισμένος από τους υπόλοιπους στα 158.4 ppm ( $CD_3OD$ ) και 158.1 ppm ( $CD_3COCD_3$ ).

- ✓ Οι άνθρακες των θέσεων 7a, 8a του φουρανικού δακτυλίου παρουσιάζουν χημική μετατόπιση στα 94.8 ppm ( $CD_3OD$ ), 93.8 ppm ( $CD_3COCD_3$ ) και 58.3 ppm ( $CD_3OD$ ), 57.0 ppm ( $CD_3COCD_3$ ) αντίστοιχα.
- ✓ Στην περιοχή 102.2-160.1 ppm ( $CD_3OD$ ) και 102.0-159.8 ppm ( $CD_3COCD_3$ ) εμφανίζονται οι κορυφές που αντιστοιχούν στους αρωματικούς άνθρακες C-9a-C-14a του άλλου αρωματικού δακτυλίου, δύο από τους οποίους (C11a, C13a) είναι οξυγονωμένοι και αποθωρακίζονται σε σχέση με τους υπόλοιπους στα 160.1 ppm ( $CD_3OD$ ) και 159.8 ppm ( $CD_3COCD_3$ ).
- ✓ Τα σήματα των αρωματικών ανθράκων C-1b-C-6b εμφανίζονται στην περιοχή 116.4-158.5 ppm ( $CD_3OD$ ) και 116.1-158.1 ppm ( $CD_3COCD_3$ ), ένας από τους οποίους είναι οξυγονωμένος (C-4b) και εμφανίζεται πιο αποθωρακισμένος από τους υπόλοιπους στα 158.5 ppm ( $CD_3OD$ ) και 158.1 ppm ( $CD_3COCD_3$ ).
- ✓ Στην περιοχή 96.9-162.8 ppm ( $CD_3OD$ ) και 96.7-162.4 ppm ( $CD_3COCD_3$ ) εμφανίζονται οι κορυφές που αντιστοιχούν στους αρωματικούς άνθρακες C-9b-C-14b του άλλου αρωματικού δακτυλίου, ένας από τους οποίους (C-11b) είναι οξυγονωμένος και αποθωρακίζεται σε σχέση με τους υπόλοιπους στα 162.8 ppm ( $CD_3OD$ ) και 162.4 ppm ( $CD_3COCD_3$ ).
- ✓ Οι δύο άνθρακες του διπλού δεσμού συντονίζονται στα 130.4 ppm ( $CD_3OD$ ), 129.8 ppm ( $CD_3COCD_3$ ) για τον C-7b και στα 123.7 ppm ( $CD_3OD$ ), 123.4 ppm ( $CD_3COCD_3$ ) για τον C-8b.

Πραγματοποιήθηκε ακόμα, η μέτρηση της στροφικής ικανότητας του μορίου και σύγκριση με τα αντίστοιχα βιβλιογραφικά δεδομένα (Kim H.J. *et al.*, 2002). Η ακριβής τιμή σε θερμοκρασία 22 °C, διαλύτη MeOH και με συγκέντρωση του διαλύματος 0.52 g/100ml ήταν  $[\alpha]^{22} = +64.4^0$ .

vi.) Φασματοσκοπική μελέτη του ***trans*-καφεϊκού οξέος (*trans*-caffeic acid) (6)**  
(στήλη Α<sub>3</sub>, κλάσμα 104-120)



Είναι παράγωγο του  $\pi$ -κουμαρικού οξέος και συγκαταλέγεται στα φαινολικά οξέα. Η ταυτοποίηση του μορίου έγινε με τη φασματοσκοπική μελέτη (<sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR σε CD<sub>3</sub>OD) και σύγκριση με τα βιβλιογραφικά στοιχεία (Pale E. et al., 1998). Οι σημαντικότερες παρατηρήσεις που οδήγησαν στην ταυτοποίηση του μορίου είναι:

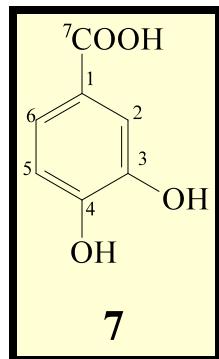
**Στο φάσμα <sup>1</sup>H-NMR:**

- ✓ Η διπλή κορυφή στα 6.61 ppm που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο αρωματικό πρωτόνιο H-5 που έχει μία *ortho* σύζευξη με το H-6.
- ✓ Η διπλή κορυφή στα 6.60 ppm που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο αρωματικό πρωτόνιο H-2 που έχει μία *meta* σύζευξη με το H-6.
- ✓ Η διπλή -διπλή κορυφή στα 6.50 ppm που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο αρωματικό πρωτόνιο της θέσης 6 που έχει μία *ortho* σύζευξη με το H-5 και μία *meta* σύζευξη με το H-2.
- ✓ Οι δύο διπλές κορυφές στα 7.00 ppm και 5.75 ppm αντιστοιχούν στα ολεφινικά πρωτόνια H-a, H-b αντίστοιχα του διπλού δεσμού.

**Στο φάσμα <sup>13</sup>C-NMR:**

- ✓ Ο άνθρακας του καρβονυλίου (C-7) συντονίζεται στα 168.6 ppm.
- ✓ Οι μετατοπίσεις των αρωματικών ανθράκων C-1-C-6 εντοπίζονται στην περιοχή 115-149.3. Από τους αρωματικούς άνθρακες, πιο αποθωρακισμένοι είναι οι οξυγονωμένοι C-3, C-4 που συντονίζονται στα 146.4 ppm και 149.3 ppm αντίστοιχα.
- ✓ Τα σήματα των ανθράκων του διπλού δεσμού εμφανίζονται στα 146.6 ppm για τον C-a και στα 114.3 ppm για τον C-b.

vii.) Φασματοσκοπική μελέτη του πρωτοκατεχυικού οξέος (protocatechuic acid) (7)  
 (στήλη Α<sub>3</sub>, κλάσμα 121-136)



Πρόκειται για ένα φαινολικό οξύ. Ταυτοποιήθηκε με τη βιοήθεια των φασματοσκοπικών δεδομένων που προέκυψαν από τα φάσματα <sup>1</sup>H-NMR και <sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD) τα οποία ήταν σε πλήρη συμφωνία με τη βιβλιογραφία (Lee J.C. et al., 2004). Στα φάσματα NMR αξίζουν ιδιαίτερης προσοχής τα εξής:

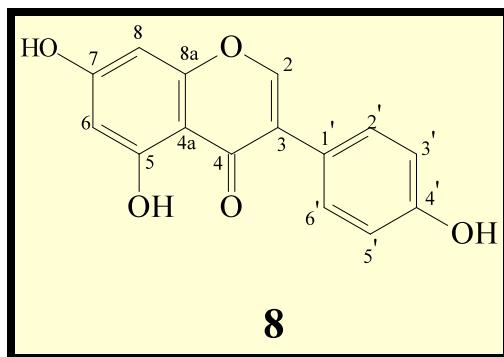
**Στο φάσμα <sup>1</sup>H-NMR:**

- ✓ Η διπλή -διπλή κορυφή στα 7.43 ppm που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο αρωματικό πρωτόνιο της θέσης 6 που έχει μία *ortho* σύζευξη με το H-5 και μία *meta* σύζευξη με το H-2.
- ✓ Η διπλή κορυφή στα 7.42 ppm που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο αρωματικό πρωτόνιο H-2 που έχει μία *meta* σύζευξη με το H-6.
- ✓ Το πρωτόνιο της θέσης 5 του αρωματικού δακτυλίου εμφανίζει μία *ortho* σύζευξη με το H-6 και συντονίζεται στα 6.80 ppm.

**Στο φάσμα <sup>13</sup>C-NMR:**

- ✓ Ο άνθρακας του καρβονυλίου (C-7) συντονίζεται στα 169.2 ppm.
- ✓ Οι μετατοπίσεις των αρωματικών ανθράκων C-1-C-6 εντοπίζονται στην περιοχή 116.8-150.5. Από τους αρωματικούς άνθρακες, πιο αποθωρακισμένοι είναι οι οξυγονωμένοι C-3, C-4 που συντονίζονται στα 145.1 ppm και 150.5 ppm αντίστοιχα.

viii.) Φασματοσκοπική μελέτη της γενιστεΐνης (genistein) (8)  
 (στήλη A<sub>4</sub>, κλάσμα 176-195)



Είναι ισοφλαβόνη και ταυτοποιήθηκε με τη βοήθεια των φασματοσκοπικών δεδομένων που προέκυψαν από τα φάσματα <sup>1</sup>H-NMR και <sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD) τα οποία ήταν σε πλήρη συμφωνία με τη βιβλιογραφία (Soidinsalo O. & Wahala K., 2004). Στα φάσματα NMR αξίζουν ιδιαίτερης προσοχής τα εξής:

**Στο φάσμα <sup>1</sup>H-NMR:**

- ✓ Η απλή κορυφή στα 8.32 ppm που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο, αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-2 και είναι χαρακτηριστική των ισοφλαβονών.
- ✓ Η διπλή κορυφή στα 7.38 ppm που ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια, αντιστοιχεί στα αρωματικά πρωτόνια H-2' και H-6' που έχουν μία *ortho* σύζευξη με τα H-3', H-5' αντίστοιχα.
- ✓ Η διπλή κορυφή στα 6.83 ppm που ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια, αντιστοιχεί στα αρωματικά πρωτόνια των θέσεων 3', 5', που έχουν μία *ortho* σύζευξη με τα H-2' και H-6' αντίστοιχα.
- ✓ Η διπλή κορυφή στα 6.39 ppm αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-8 το οποίο εμφανίζει μία *ortho* σύζευξη με το H-6 που συντονίζεται στα 6.23 ppm με τη μορφή μίας διπλής κορυφής.

**Στο φάσμα <sup>13</sup>C-NMR:**

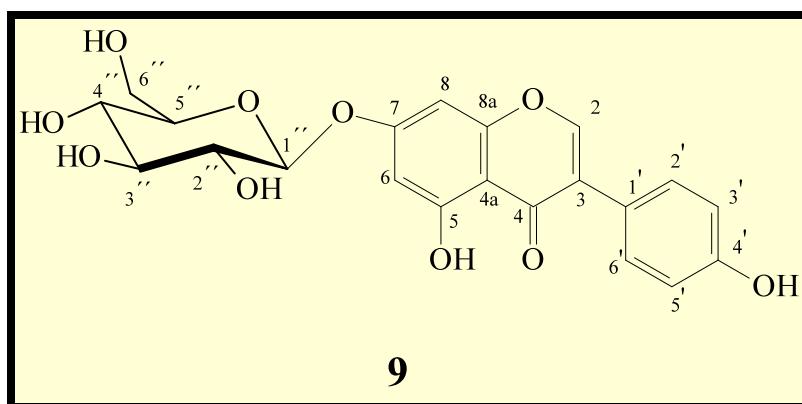
- ✓ Ο άνθρακας του καρβονυλίου (C-4) συντονίζεται στα 180.1 ppm.
- ✓ Ο άνθρακας της θέσης 2 συντονίζεται στα 153.9 ppm.
- ✓ Το σήμα του άνθρακα της θέσης 3 εμφανίζεται στα 122.2 ppm.

- ✓ Οι κορυφές στην περιοχή 93.6-164.2 ppm ανήκουν στους υπόλοιπους αρωματικούς άνθρακες.

Η γενιστείνη απομονώνεται για πρώτη φορά στο γένος *Vitis*. Απαντάται ευρύτατα στη φύση και μία από τις κυριότερες πηγές της είναι η σόγια (*Glycine max*). Ως γνήσια ισοφλαβόνη εμφανίζει οιστρογονική δράση η οποία αξιοποιείται στην καταπολέμηση της οστεοπόρωσης και του μετεμηνοπαυσιακού συνδρόμου στις γυναίκες (Suthar A.C. *et al.*, 2001). Έχει επίσης, αντικαρκινικές ιδιότητες συμβάλλοντας στην αντιμετώπιση διαφόρων ειδών καρκίνου, όπως του καρκίνου του προστάτη, του στήθους, του στομάχου και του πνεύμονα και μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών παθήσεων λόγω κυρίως της υποχοληστερολαιμικής της δράσης (Dixon R.A. & Ferreira D., 2002). Προστατεύει ακόμα τα νευρικά κύτταρα του εγκεφαλικού φλοιού από την εκφύλιση (Sonee M. *et al.*, 2004) και εκδηλώνει αντιερπητική δράση εναντί των ερπητοϊών HSV-1 και HSV-2 (Lyu S.Y. *et al.*, 2005).

#### ix.) Φασματοσκοπική μελέτη της γενιστίνης (genistin) (9)

(στήλη Α<sub>4</sub>, κλάσμα 224-229)



Η γενιστίνη είναι ο γλυκοσίδης της γενιστείνης στη 7-θέση. Τα φάσματα <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR και HMBC (CD<sub>3</sub>OD) και <sup>1</sup>H-NMR (DMSO) συγκρίθηκαν με αυτά της βιβλιογραφίας (Rauter A.P. *et al.*, 2005; Vitor R.F. *et al.*, 2004) και βρέθηκαν ταυτόσημα. Μερικά από τα χαρακτηριστικότερα σήματα των φασμάτων είναι τα εξής:

**Στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$ :**

- ✓ Η απλή κορυφή στα 8.09 ppm ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) και 8.14 ppm (DMSO) ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-2.
- ✓ Η διπλή κορυφή στα 7.36 ppm ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) και 7.38 ppm (DMSO) ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια και αντιστοιχεί στα αρωματικά πρωτόνια H-2' και H-6' που έχουν μία *ortho* σύζευξη με τα H-3', H-5' αντίστοιχα.
- ✓ Η διπλή κορυφή στα 6.83 ppm ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) και 6.84 ppm (DMSO) ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια και αντιστοιχεί στα αρωματικά πρωτόνια των θέσεων 3', 5' που έχουν μία *ortho* σύζευξη με τα H-2' και H-6' αντίστοιχα.
- ✓ Η διπλή κορυφή στα 6.65 ppm ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) και 6.70 ppm (DMSO) αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-8 το οποίο εμφανίζει μία *meta* σύζευξη με το H-6 που συντονίζεται στα 6.48 ppm ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) και 6.50 ppm (DMSO) με τη μορφή μίας διπλής κορυφής.
- ✓ Το ανωμερικό πρωτόνιο H-1'' εμφανίζεται υπό τη μορφή μίας διπλής κορυφής στα 5.03 ppm ( $\text{CD}_3\text{OD}$  και DMSO).
- ✓ Τα σήματα στην περιοχή 3.20-4.20 ppm ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) και 3.39-3.90 ppm (DMSO) αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-2''-H-6'' του σακχάρου.

**Στο φάσμα  $^{13}\text{C-NMR}$ :**

- ✓ Ο άνθρακας του καρβονυλίου (C-4) συντονίζεται στα 182.4 ppm.
- ✓ Ο άνθρακας της θέσης 2 συντονίζεται στα 154.6 ppm.
- ✓ Το σήμα του άνθρακα της θέσης 3 εμφανίζεται στα 124.4 ppm.
- ✓ Οι κορυφές στην περιοχή 95.9-164.7 ppm ανήκουν στους υπόλοιπους αρωματικούς άνθρακες.
- ✓ Ο άνθρακας (C-1'') στον οποίο βρίσκεται το ανωμερικό πρωτόνιο του σακχάρου εμφανίζεται με μία κορυφή στα 101.8 ppm, ενώ τους υπόλοιπους γλυκοσιδικούς άνθρακες τους συναντάμε στην περιοχή 62.4-78.3 ppm.

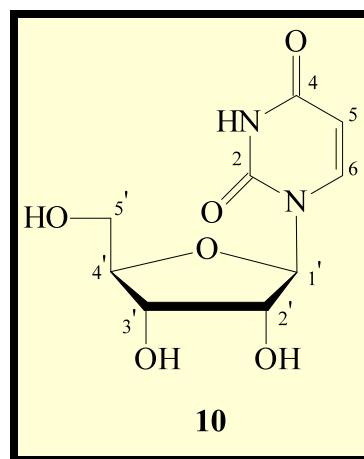
**Στο φάσμα HMBC:**

- ✓ Ο άνθρακας C-7 εμφανίζει  $^3J$  σύζευξη με το ανωμερικό πρωτόνιο H-1'' του σακχάρου, γεγονός που αποδεικνύει ότι η θέση σύνδεσης του σακχάρου είναι στον άνθρακα C-7.

Η γενιστίνη απομονώνεται για πρώτη φορά στο γένος *Vitis* και όπως και το άγλυκο ανάλογό της η γενιστεΐνη, χαρακτηρίζεται ως φυτοοιστρογόνο (Garritano S. *et al.*, 2005). Στις δράσεις της περιλαμβάνονται η κυτταροτοξικότητα (Polkowski K. *et al.*, 2004), η δράση σε καρκίνους των γυναικών (Watanabe S. *et al.*, 2002) και κυρίως σε καρκίνους του στήθους (Barnes S., 1998).

**x.) Φασματοσκοπική μελέτη της ουριδίνης (uridine) (10)**

(στήλη A<sub>5</sub>, κλάσμα 41-49)



Πρόκειται για ένα νουκλεοσίδιο που αποτελείται από την αζωτούχο βάση ουρακίλη και το σάκχαρο ριβόση. Τα φάσματα <sup>1</sup>H-NMR και <sup>13</sup>C-NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) συγκρίθηκαν με αυτά της βιβλιογραφίας (Sang S. *et al.*, 2002) και βρέθηκαν ταυτόσημα. Μερικά από τα χαρακτηριστικότερα σήματα των φασμάτων είναι τα εξής:

**Στο φάσμα <sup>1</sup>H-NMR:**

- ✓ Η διπλή κορυφή στα 8.04 ppm αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-6 το οποίο εμφανίζεται πιο αποθωρακισμένο από το H-5 (5.74 ppm), εξαιτίας της γειτνίασής του με το άτομο αζώτου.
- ✓ Η διπλή κορυφή στα 5.94 ppm αντιστοιχεί στο ανωμερικό πρωτόνιο (H-1') της ριβόσης.
- ✓ Τα πρωτόνια των θέσεων 2'-5' της ριβόσης εμφανίζονται στην περιοχή 3.72-4.17.

**Στο φάσμα  $^{13}\text{C-NMR}$ :**

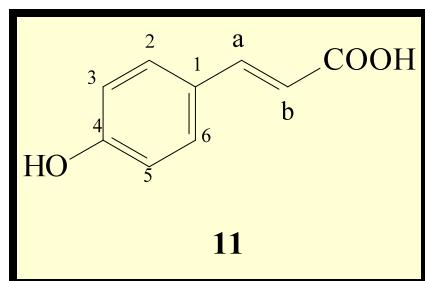
- ✓ Οι καρβονυλικοί άνθρακες συντονίζονται στα 152.6 ppm (C-2) και 166.3 ppm (C-4).

Η ουριδίνη έχει απομονωθεί από τον εγκέφαλο των ποντικών που κοιμούνται, γεγονός που δείχνει ότι προάγει τη φυσιολογική διαδικασία του ύπνου. Παράγωγά της δρουν ως καταστολείς του ΚΝΣ, έχοντας ηρεμιστική και υπνωτική δράση (Kimura T. *et al.*, 2001; Yamamoto I. *et al.*, 1987).

**xi.) Φασματοσκοπική μελέτη του *trans*- $\pi$ -κουμαρικού οξέος (*trans*-*p*-coumaric acid)**

**(11)**

**(στήλη Α<sub>5</sub>, κλάσμα 96-109)**



Είναι φαινολικό οξύ. Η ταυτοποίηση του μορίου έγινε με τη φασματοσκοπική μελέτη ( $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  σε  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) και σύγκριση με τα βιβλιογραφικά στοιχεία (Bergman M. *et al.*, 2001). Οι σημαντικότερες παρατηρήσεις που οδήγησαν στον προσδιορισμό της δομής του μορίου είναι:

**Στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$ :**

- ✓ Η διπλή κορυφή στα 7.45 ppm που ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια, αντιστοιχεί στα αρωματικά πρωτόνια H-2 και H-6 που έχουν μία *ortho* σύζευξη με τα H-3, H-5 αντίστοιχα.
- ✓ Η διπλή κορυφή στα 6.80 ppm ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια και αντιστοιχεί στα αρωματικά πρωτόνια των θέσεων 3, 5 που έχουν μία *ortho* σύζευξη με τα αρωματικά πρωτόνια H-2, H-6 αντίστοιχα.

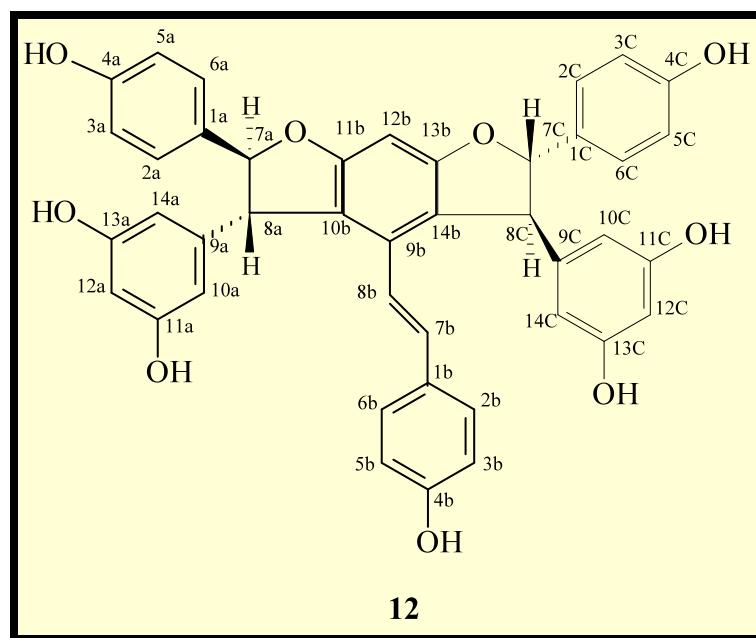
- ✓ Οι δύο διπλές κορυφές στα 7.60 ppm και 6.28 ppm αντιστοιχούν στα ολεφινικά πρωτόνια H-a, H-b αντίστοιχα του διπλού δεσμού.

**Στο φάσμα  $^{13}\text{C-NMR}$ :**

- ✓ Ο άνθρακας του καρβονυλίου (C-7) συντονίζεται στα 171.1 ppm.
- ✓ Οι μετατοπίσεις των αρωματικών ανθράκων C-1-C-6 εντοπίζονται στην περιοχή 116.8-161.0. Από τους αρωματικούς άνθρακες, πιο αποθωρακισμένος είναι ο οξυγονωμένος C-4 που συντονίζεται στα 161.0 ppm.
- ✓ Τα σήματα των ανθράκων του διπλού δεσμού εμφανίζονται στα 146.7 ppm για τον C-a και στα 115.5 ppm για τον C-b.

**xii.) Φασματοσκοπική μελέτη της γνετίνης H (gnetin H) (12)**

**(στήλη A<sub>6</sub>, κλάσμα 53-70)**



Η γνετίνη H αποτελεί ένα ακόμα στιλβενοειδές και μάλιστα έχει την πιο πολύπλοκη δομή από τα δύο προηγούμενα στιλβένια (ρεσβερατρόλη, βινιφερίνη) που απομονώθηκαν στην παρούσα φυτοχημική μελέτη. Ο προσδιορισμός της δομής του έγινε με τη λήψη φασμάτων  $^1\text{H-NMR}$  και  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ), από τα οποία προέκυψαν στοιχεία που ήταν σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Kim H.J. et al., 2002). Στα φάσματα NMR αξίζουν ιδιαίτερης προσοχής τα εξής:

### **Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ :**

- ✓ Η διπλή κορυφή στα 7.22 ppm αντιστοιχεί στα αρωματικά πρωτόνια των θέσεων 2a, 6a τα οποία εμφανίζουν μία *ortho* σύζευξη το καθένα με τα αρωματικά πρωτόνια των θέσεων 3a, 5a τα οποία εμφανίζονται στα 6.82 ppm ως μία διπλή κορυφή. Λόγω συμμετρίας του μορίου τα αρωματικά πρωτόνια των θέσεων 2a-6a εμφανίζουν τις ίδιες χημικές μετατοπίσεις με τα αρωματικά πρωτόνια H-2c-H-6c. Συνεπώς, τα πρωτόνια H-2c, H-6c συντονίζονται στα 7.22 ppm και το σήμα στα 6.82 ppm ανήκει στα H-3c, H-5c.
- ✓ Οι διπλές κορυφές στα 5.50 ppm και 4.45 ppm ανήκουν αντίστοιχα στα πρωτόνια των θέσεων 7a, 8a του φουρανικού δακτυλίου. Λόγω συμμετρίας του μορίου, τα πρωτόνια H-7c, H-8c του άλλου φουρανικού δακτυλίου παρουσιάζουν τις ίδιες χημικές μετατοπίσεις με τα πρωτόνια H-7a, H-8a αντίστοιχα. Η τιμή της σταθεράς σύζευξης (*J*) είναι 6.0 Hz, γεγονός που αποδεικνύει την *trans* διαμόρφωση των πρωτονίων H-7a, H-8a και H-7c, H-8c.
- ✓ Η απλή κορυφή στα 6.20 ppm αντιστοιχεί στα αρωματικά πρωτόνια των θέσεων 10a, 12a και 14a, αλλά και λόγω συμμετρίας του μορίου στα πρωτόνια των θέσεων 10c, 12c και 14c.
- ✓ Η διπλή κορυφή στα 6.74 ppm που ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια, αντιστοιχεί στα αρωματικά πρωτόνια των θέσεων 2b, 6b τα οποία εμφανίζουν μία *ortho* σύζευξη το καθένα με τα αρωματικά πρωτόνια των θέσεων 3b, 5b αντίστοιχα τα οποία εμφανίζονται στα 6.56 ppm ως μία διπλή κορυφή.
- ✓ Η απλή κορυφή στα 6.43 ppm αντιστοιχεί στα ολεφινικά πρωτόνια (H-7b, H-8b) του διπλού δεσμού.
- ✓ Η απλή κορυφή στα 6.48 ppm αντιστοιχεί στο αρωματικό πρωτόνιο H-12b.

### **Στο φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ :**

- ✓ Οι αρωματικοί άνθρακες C-1a-C-6a συντονίζονται στην περιοχή 116.3-158.3 ppm, ένας από τους οποίους είναι ο ξυγονωμένος (C-4a) και εμφανίζεται πιο αποθωρακισμένος από τους υπόλοιπους στα 158.3 ppm. Λόγω συμμετρίας οι άνθρακες C-1c-C-6c δίνουν αντίστοιχα τα ίδια σήματα.
- ✓ Οι άνθρακες των θέσεων 7a, 8a του φουρανικού δακτυλίου παρουσιάζουν χημική μετατόπιση στα 94.7 ppm και 58.8 ppm αντίστοιχα. Λόγω συμμετρίας του

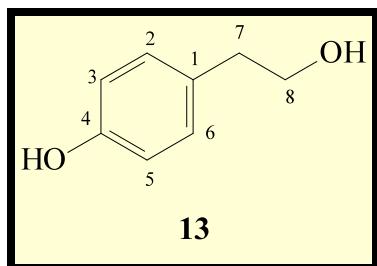
μορίου, οι άνθρακες C-7c, C-8c του άλλου φουρανικού δακτυλίου παρουσιάζουν τις ίδιες χημικές μετατοπίσεις με τους άνθρακες C-7a, C-8a αντίστοιχα.

- ✓ Στην περιοχή 102.1-159.9 ppm εμφανίζονται οι κορυφές που αντιστοιχούν στους αρωματικούς άνθρακες C-9a-C-14a του άλλου αρωματικού δακτυλίου, δύο από τους οποίους (C-11a, C-13a) είναι οξυγονωμένοι και αποθωρακίζονται σε σχέση με το υς υπόλοιπους στα 159.9 ppm. Η συμμετρία του μορίου καθορίζει ότι οι αρωματικοί άνθρακες C-9c-C-14c συντονίζονται αντίστοιχα στην ίδια περιοχή.
- ✓ Τα σήματα των αρωματικών ανθράκων C-1b-C-6b εμφανίζονται στην περιοχή 116.1-158.1 ppm, ένας από τους οποίους είναι οξυγονωμένος (C-4b) και εμφανίζεται πιο αποθωρακισμένος από τους υπόλοιπους στα 158.1 ppm.
- ✓ Στην περιοχή 91.5-162.8 ppm εμφανίζονται οι κορυφές που αντιστοιχούν στους αρωματικούς άνθρακες C-9b-C-14b του άλλου αρωματικού δακτυλίου, δύο από τους οποίους (C-11b και C-13b) είναι οξυγονωμένοι και αποθωρακίζονται σε σχέση με τους υπόλοιπους στα 162.8 ppm.
- ✓ Οι δύο άνθρακες του διπλού δεσμού συντονίζονται στα 130.4 ppm για τον C-7b και στα 122.4 ppm για τον C-8b.

Πραγματοποιήθηκε ακόμα, η μέτρηση της στροφικής ικανότητας του μορίου και η σύγκριση με τα αντίστοιχα βιβλιογραφικά δεδομένα (Kim H.J. *et al.*, 2002). Η ακριβής τιμή σε θερμοκρασία 22 °C, διαλύτη MeOH και με συγκέντρωση του διαλύματος 0.52 g/100ml ήταν  $[\alpha]^{22} = +160.7^0$ .

Η γνετίνη Η παρουσιάζει αντιοξειδωτ ική (Kim H.J. *et al.*, 2002), αντιμεταλλαξιογόνο, κυτταροτοξική (Kim H.J. *et al.*, 2002) και αντιλευκαιμική δραστικότητα (Kang J.H. *et al.*, 2003).

xiii.) Φασματοσκοπική μελέτη της **τυροσόλης (tyrosol) (13)**  
(στήλη A<sub>7</sub>, κλάσμα 23)



Η τυροσόλη ανήκει στις φαινολικές αλκοόλες (φαινυλαιθυλαλκοόλες) και η ταυτοποίησή της επιτεύχθηκε με τη βιοήθεια των φασματοσκοπικών δεδομένων που προέκυψαν από τα φάσματα <sup>1</sup>H-NMR και <sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD) τα οποία ήταν σε πλήρη συμφωνία με τη βιβλιογραφία (Khatib A. et al., 2006). Στα φάσματα NMR αξιζουν ιδιαίτερης προσοχής τα εξής:

**Στο φάσμα <sup>1</sup>H-NMR:**

- ✓ Η διπλή κορυφή στα 7.02 ppm που ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια, αντιστοιχεί στα αρωματικά πρωτόνια H-2 και H-6 που έχουν μία *ortho* σύζευξη με τα αρωματικά πρωτόνια H-3, H-5 αντίστοιχα.
- ✓ Η διπλή κορυφή στα 6.70 ppm ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια και αντιστοιχεί στα αρωματικά πρωτόνια των θέσεων 3, 5 που έχουν μία *ortho* σύζευξη με τα αρωματικά πρωτόνια H-2, H-6 αντίστοιχα.
- ✓ Το αλειφατικό πρωτόνιο της θέσης 8 έχει χημική μετατόπιση στα 3.66 ppm υπό τη μορφή μίας τριπλής κορυφής, ενώ το άλλο αλειφατικό πρωτόνιο H-7, συντονίζεται στα 2.71 ppm, επίσης υπό τη μορφή μίας τριπλής κορυφής. Το H-8 είναι πιο αποθωρακισμένο επειδή συνδέεται με την υδροξυλική ομάδα.

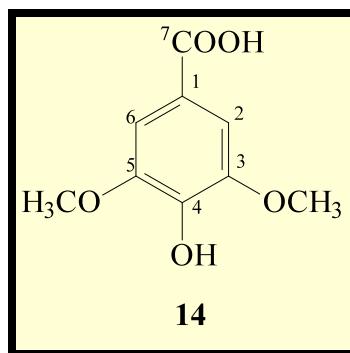
**Στο φάσμα <sup>13</sup>C-NMR:**

- ✓ Οι μετατοπίσεις των αρωματικών ανθράκων C-1-C-6 εντοπίζονται στην περιοχή 115.8-156.6. Από τους αρωματικούς άνθρακες, πιο αποθωρακισμένος είναι ο οξυγονωμένος C-4 που συντονίζεται στα 156.6 ppm.

- ✓ Ο αλειφατικός άνθρακας C-8 που φέρει το υδροξύλιο συντονίζεται στα 75.9 ppm, ενώ το σήμα του άλλου άνθρακα C-9 της αλειφατικής αλυσίδας εμφανίζεται στα 36.7 ppm.

Η τυροσόλη εκδηλώνει σπουδαία φαρμακολογική δράση . Ως ένα από τα πολυνφαινολικά μόρια που συνυπάρχουν στο ελαιόλαδο, έχει αποδειχθεί ότι συμβάλλει στη βελτίωση της κατάστασης ασθενών με στεφανιαία νόσο (σε συνδυασμό βέβαια με την κατάλληλη θεραπευτική αγωγή ) (Fito M. *et al.*, 2005). Επιπλέον , εμφανίζει αντιοξειδωτική (Garrote G. *et al.*, 2004), αντιφλεγμονώδη (Petroni A. *et al.*, 1995) και χημειοπροστατευτική δράση (Gerhauser C., 2005).

**xiv.) Φασματοσκοπική μελέτη του **συρινγκικού οξέος (syringic acid) (14)****  
**(στήλη A<sub>7</sub>, κλάσμα 31)**



Το συρινγκικό οξύ ανηκει στα φαινολικά οξέα. Η ταυτοποίηση του μορίου έγινε με τη φασματοσκοπική μελέτη (<sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR σε C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) και σύγκριση με τα βιβλιογραφικά στοιχεία (Inoshiri S. *et al.*, 1987). Οι σημαντικότερες παρατηρήσεις που οδήγησαν στην ταυτοποίηση του μορίου είναι:

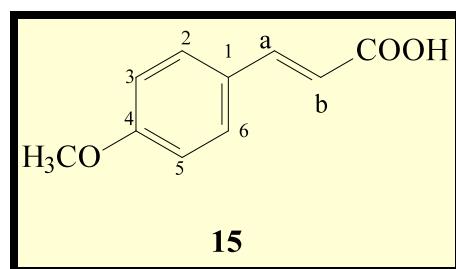
**Στο φάσμα <sup>1</sup>H-NMR:**

- ✓ Η απλή κορυφή στα 7.72 ppm ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια και αντιστοιχεί στα αρωματικά πρωτόνια των θέσεων 2 και 6.
- ✓ Η κορυφή στα 3.76 ppm που ολοκληρώνει για έξι πρωτόνια και αντιστοιχεί στα μεθοξυλικά πρωτόνια των θέσεων 3 και 5.

**Στο φάσμα  $^{13}\text{C-NMR}$ :**

- ✓ Ο άνθρακας του καρβονυλίου (C-7) συντονίζεται στα 169.2 ppm.
- ✓ Οι μετατοπίσεις των αρωματικών ανθράκων C-1-C-6 παρατηρούνται στην περιοχή 122.0-148.7. Από τους αρωματικούς άνθρακες, οι πιο αποθωρακισμένοι είναι οι οξυγονωμένοι (C-3, C-4, C-5) που συντονίζονται στην περιοχή 142.2-148.7.
- ✓ Οι άνθρακες των δύο μεθοξυλίων εμφανίζονται στα 56.3 ppm.

xv.) Φασματοσκοπική μελέτη του ***trans*- $\pi$ -μεθοξυκονυμαρικού οξέος (*trans-p-methoxycinnamic acid*) (15)**  
(στήλη Α<sub>8</sub>, κλάσμα 19-22)



Είναι φαινολικό οξύ (παράγωγο του  $\pi$ -κονυμαρικού οξέος). Τα φάσματα  $^1\text{H-NMR}$  και  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO) συγκρίθηκαν με αυτά της βιβλιογραφίας (Scalbert A. *et al.*, 1985) και βρέθηκαν ταυτόσημα. Μερικά από τα χαρακτηριστικότερα σήματα των φασμάτων είναι τα εξής:

**Στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$ :**

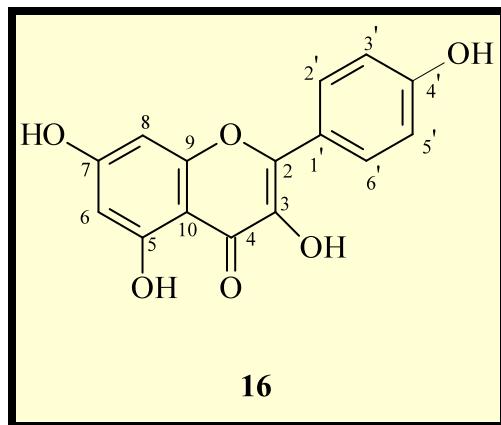
- ✓ Η διπλή κορυφή στα 7.47 ppm ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια και αντιστοιχεί στα αρωματικά πρωτόνια H-2 και H-6 που έχουν μία *ortho* σύζευξη με τα H-3, H-5 αντίστοιχα.
- ✓ Η διπλή κορυφή στα 6.81 ppm που ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια, αντιστοιχεί στα αρωματικά πρωτόνια των θέσεων 3, 5 που έχουν μία *ortho* σύζευξη με τα αρωματικά πρωτόνια H-2, H-6 αντίστοιχα.
- ✓ Οι δύο διπλές κορυφές στα 7.63 ppm και 6.29 ppm αντιστοιχούν στα ολεφινικά πρωτόνια H-a, H-b αντίστοιχα του διπλού δεσμού.

**Στο φάσμα  $^{13}\text{C-NMR}$ :**

- ✓ Ο άνθρακας του καρβονυλίου (C-7) συντονίζεται στα 167.5 ppm.

- ✓ Οι μετατοπίσεις των αρωματικών ανθράκων C-1-C-6 εντοπίζονται στην περιοχή 114.1-160.6. Από τους αρωματικούς άνθρακες, πιο αποθωρακισμένος είναι ο οξυγονωμένος C-4 που συντονίζεται στα 160.6 ppm.
- ✓ Τα σήματα των ανθράκων του διπλού δεσμού εμφανίζονται στα 143.5 ppm για τον C-a και στα 116.3 ppm για τον C-b.
- ✓ Ο άνθρακας του μεθοξυλίου που συνδέεται με τον αρωματικό δακτύλιο στη θέση 4, συντονίζεται στα 56.5 ppm.

**xvi.) Φασματοσκοπική μελέτη της καιμπφερόλης (kaempferol) (16)  
(στήλη Α<sub>8</sub>, κλάσμα 40)**



Ανήκει στην κατηγορία των φλαβονοειδών και συγκεκριμένα πρόκειται για μία φλαβονόλη. Η ταυτοποίηση του μορίου έγινε με μελέτη των φασμάτων NMR (<sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR σε DMSO) και σύγκριση με τα στοιχεία της βιβλιογραφίας (Ho H.M. et al., 2002). Σημαντικές παρατηρήσεις που συνετέλεσαν στον προσδιορισμό της δομής του μορίου είναι οι ακόλουθες:

**Στο φάσμα <sup>1</sup>H-NMR:**

- ✓ Η διπλή κορυφή στα 8.03 ppm που ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια και αντιστοιχεί στα ισοδύναμα αρωματικά πρωτόνια H-2', H-6' τα οποία εμφανίζουν μία *ortho* σύζευξη με τα H-3', H-5' αντίστοιχα.

- ✓ Η διπλή κορυφή στα 6.91 ppm που ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια και αντιστοιχεί στα ισοδύναμα αρωματικά πρωτόνια H-3', H-5' τα οποία εμφανίζουν μία *ortho* σύζευξη με τα H-2', H-6' αντίστοιχα.
- ✓ Οι διπλές κορυφές στα 6.43 και 6.18 ppm που ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η καθεμία, αντιστοιχούν στα αρωματικά πρωτόνια των θέσεων 6 και 8 και οφείλονται στη *meta* σύζευξη μεταξύ τους.

**Στο φάσμα  $^{13}\text{C-NMR}$ :**

- ✓ Ο άνθρακας του καρβονυλίου (C-4) συντονίζεται στα 175.6 ppm.
- ✓ Οι κορυφές των ανθράκων των τριών δακτυλίων του φλαβονοειδούς παρατηρούνται στην περιοχή 93.4-163.6.

Η καιμπερόλη είναι ένα από τα πιο διαδεδομένα φλαβονοειδή στο φυτικό βασίλειο. Συναντάται πολύ συχνά και με τη γλυκοσυλιωμένη μορφή. Δρα κατά των ελευθέρων ριζών. Εμφανίζει επίσης, αντιφλεγμονώδεις και αντιβακτηριακές ιδιότητες (Harborne J.B. & Baxter H., 1993).

## **1.3) ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **1.3.1) ΤΕΧΝΙΚΕΣ-ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ**

Η πορεία που ακολουθείται για την απομόνωση και τη μελέτη των βιοδραστικών φυσικών προϊόντων είναι μία πολύπλοκη διαδικασία που περιλαμβάνει πολλά στάδια. Αρχικά πραγματοποιείται η **βοτανική μελέτη** όπου διεξάγεται ο βοτανικός έλεγχος, η συλλογή, η διαλογή και η αρχική επεξεργασία του φυτικού υλικού. Ακολουθεί η **φυτοχημική μελέτη** η οποία περιλαμβάνει την απομόνωση και ταυτοποίηση των δευτερογενών μεταβολιτών.

Καθόλη τη διάρκεια της πορείας, γίνεται ποιοτικός έλεγχος τόσο των αρχικών εκχυλισμάτων όσο και των κλασμάτων, διαδικασία απαραίτητη για την ποσοτική παραλαβή των ουσιών του φυτικού οργανισμού σε καθαρή μορφή. Το επόμενο βήμα είναι η ταυτοποίηση των μορίων που απομονώθηκαν.

Στην παρούσα ερευνητική εργασία για τον ποιοτικό έλεγχο των εκχυλισμάτων, των μιγμάτων και των καθαρών συστατικών χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) σε υάλινες πλάκες και σε πλάκες αλουμινίου με επίστρωση πυριτίου (Silica gel 60 F<sub>254</sub>-Merck). Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν υάλινες πλάκες τύπου RP-18 F<sub>254</sub> για τις χρωματογραφίες αντιστρόφου φάσης. Τα χρωματογραφήματα ελέγχθηκαν ως προς την απορρόφησή τους, με έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία, σε μήκος κύματος 254 και 366 nm και μετά ακολούθησε ψεκασμός με μεθανολικό διάλυμα θειικής βανιλλίνης και παρατήρηση στο ορατό.

Ο ποσοτικός διαχωρισμός των προϊόντων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση χρωματογραφικών μεθόδων και συγκεκριμένα με υγρή χρωματογραφία ανοικτής στήλης υπό κενό, υγρή χρωματογραφία στήλης υπό χαμηλή πίεση, παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, υγρή χρωματογραφία μέσης πίεσης (MPLC).

Για την απόδοση της δομής των απομονωθέντων φυσικών προϊόντων, χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες τεχνικές: Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού

Συντονισμού (NMR), Φασματοσκοπία Υπεριώδους-Ορατού (UV-Vis), Φασματοσκοπία Υπερύθρου (IR), Φασματομετρία Μάζας (MS).

Ο ποιοτικός διαχωρισμός των προϊόντων πραγματοποιήθηκε με τους εξής τρόπους:

- α) Υγρή χρωματογραφί α ανοικτής στήλης υπό κενό .** Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε διοξείδιο του πυριτίου (Silica gel 60H) και ως κινητή φάση συστήματα οργανικών διαλυτών κατάλληλης πολικότητας.
- β) Υγρή χρωματογραφία στήλης υπό χαμηλή πίεση (300 mbar).** Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε γέλη πυριτίου (Silica gel) διαμέτρου 0.04-0.06 mm (flash) και ως κινητή φάση οργανικοί διαλύτες κατάλληλης πολικότητας.
- γ) Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC).** Πραγματοποιήθηκε σε χρωματογράφο Spectra System Phinigan συνδεδεμένο με φασματοφωτόμετρο για τη μέτρηση της απορρόφησης στο υπεριώδες (UV 2000). Η προστήλη και η στήλη ήταν Nucleosil 100-7-C<sub>18</sub>. Το μέγεθος του κόκκου ήταν 7±1.5 μm και η επιφάνεια 350 m<sup>2</sup>/g. Ο όγκος πόρων ήταν 1 ml/g και το μέγεθός τους 100 Å.
- δ) Υγρή χρωματογραφία μέσης πίεσης (MPLC).** Πραγματοποιήθηκε σε συσκευή Buchi 688, ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε γέλη πυριτίου αντιστρόφου φάσης (R<sub>18</sub>) και ως κινητή φάση διαλύτες με κατάλληλη πολικότητα.
- ε) Παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (Preparative TLC).** Πραγματοποιήθηκε σε υάλινες πλάκες με επίστρωση πυριτίου (Silica gel F<sub>254</sub>-Merck). Για την ανάπτυξη των χρωματογραφημάτων επιλέχθηκαν μίγματα οργανικών διαλυτών σε συγκεκριμένες αναλογίες, μετά από έλεγχο σε απλές πλάκες TLC.

Για την απόδοση της δομής των απομονωθέντων φυσικών προϊόντων, χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες τεχνικές:

- α) Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR).** Η λήψη των φασμάτων άνθρακα (<sup>13</sup>C NMR, 50 MHz) πραγματοποιήθηκε σε συσκευή NMR Bruker AC 200. Η λήψη των φασμάτων πρωτονίου (<sup>1</sup>H NMR, 400MHz), όπως και των φασμάτων δύο διαστάσεων COSY (Correlation Spectroscopy), COSY-LR (Correlation Spectroscopy Long Range), NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy), HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) και HMBC (Heteronuclear Multiple Bond

Correlation) έγινε σε συσκευή NMR Bruker DRX 400. Οι χημικές μετατοπίσεις ( $\delta$ ) εκφράζονται σε ppm, ενώ οι σταθερές σύζευξης ( $J$ ) σε Hz. Η πολλαπλότητα των κορυφών εκφράζεται ως s= απλή, d= διπλή, t= τριπλή, q= τετραπλή, dd= διπλή-διπλή, m= πολλαπλή. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για την λήψη των φασμάτων ήταν: δευτεριωμένο χλωροφόρμιο ( $CDCl_3$ ), δευτεριωμένη μεθανόλη ( $CD_3OD$ ), δευτεριωμένη ακετόνη ( $CD_3COCD_3$ ), δευτεριωμένο διμεθυλσουλφοξείδιο (DMSO), δευτεριωμένη πυριδίνη ( $C_5D_5N$ ) και δευτεριωμένο ύδωρ ( $D_2O$ ).

β) **Φασματοσκοπία Υπεριώδους-Ορατού (UV-Vis).** Τα φάσματα έχουν ληφθεί σε φασματοφωτόμετρο Shimadzu-160A.

γ) **Φασματοσκοπία Υπερύθρου (IR).** Τα φάσματα ελήφθησαν σε συσκευή Perkin-Elmer FT-IR Paragon 500 με διαλύτη MeOH σε κρύσταλλο  $CaF_2$ .

δ) **Φασματομετρία Μάζας (MS).** Τα φάσματα μάζας ελήφθησαν με τη μέθοδο της φασματομετρίας μάζας υψηλής ανάλυσης (High Resolution Mass Spectrum) σε φασματογράφο μάζας AEI MS-902. Επίσης, χρησιμοποιήθηκ αν η μέθοδος του ηλεκτρονιακού βομβαρδισμού (Electron Impact Mass Spectrum) και η μέθοδος της φασματομετρίας μάζας χημικού ιονισμού (Chemical Ionization Mass Spectrum) σε φασματογράφο μάζας Thermo-Finnigan.

Οι στροφικές ικανότητες των μορίων μετρήθηκαν σε πολωσίμετρο PERKIN ELMER 341 και οι συμπυκνώσεις των εκχυλισμάτων και των κλασμάτων έγιναν με εξάτμιση υπό ελαττωμένη πίεση σε Rotavapor R-114 Buchi. Τέλος, οι αντιδράσεις ακετυλίωσης έλαβαν χώρα προκειμένου να μελετηθούν καλύτερα τα πολικά μόρια. Τα εξεταζόμενα πολικά μόρια διαλύθηκαν σε μικρή ποσότητα πυριδίνης και αφέθηκαν για 24 ώρες να αντιδράσουν με οξικό ανυδρίτη. Ακολούθησε εξάτμιση της πυριδίνης με αντλία υψηλού κενού.

Πρέπει να σημειωθεί ότι οι τεχνικές και η οργανολογία που χρησιμοποιήθηκαν στο Α μέρος, ισχύουν και στα δύο άλλα μέρη (Β, Γ).

### 1.3.2) ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΦΥΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ

Από όλες τις ποικιλίες *Vitis vinifera* που μελετήθηκαν χρωματογραφικά, επιλέχθηκε η ποικιλία *Μανδηλαριά* από τη Σαντορίνη για περαιτέρω φυτοχημική μελέτη, για τους λόγους που αναφέρθηκαν στην παράγραφο 1.2.1.β. Ως πρώτη ύλη χρησιμοποιήθηκαν τα στέμφυλα, το υπόλειμμα δηλαδή των σταφυλιών που μένει όταν απομακρυνθεί ο χυμός τους κατά την οινοποιητική πορεία. Μάλιστα το μεθανολικό κλάσμα που προερχόταν από την κατεργασία του μεθανολικού εκχυλίσματος των στεμφύλων με ρητίνη XAD16 (παρ. 1.2.1.δ), ήταν πλουσιότερο σε πολυφαινολικά μόρια από το μεθανολικό εκχύλισμά τους και γι' αυτό χρησιμοποιήθηκε ως σημείο εκκίνησης στην πορεία απομόνωσης και διαχωρισμού δευτερογενών μεταβολιτών.

Η συλλογή των στεμφύλων της ποικιλίας *Μανδηλαριάς* του φυτού *Vitis vinifera* της οικογένειας *Vitaceae* πραγματοποιήθηκε τον Αύγουστο του 2003 στο νησί Σαντορίνη του νομού Κυκλαδων. Τα συγκεκριμένα στέμφυλα προέρχονταν από λιαστά σταφύλια, δηλαδή είχαν εκτεθεί στον ήλιο για δέκα ημέρες. Η συλλογή έγινε αμέσως μετά το τέλος της οινοποίησης και όπως προαναφέρθηκε περιελάμβανε το τμήμα του σταφυλιού (στέμφυλο) που απέμενε μετά την απομάκρυνση του χυμού. Ακολούθησε, η ξήρανση του φυτικού υλικού, η κονιοποίηση και η ζύγιση της σκόνης. Η ξηρή σκόνη ζύγιζε 2.5 Kg. Στη συνέχεια έγινε εκχύλιση της κονιοποιημένης σκόνης ως εξής: Πρώτα χρησιμοποιήθηκε  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3x8L), μετά  $\text{MeOH}$  (3x8L) και τέλος  $\text{H}_2\text{O}$  (2x8L). Τα μεσοδιαστήματα μεταξύ δύο διαδοχικών εκχυλίσεων ήταν δύο ημέρες. Τα εκχυλίσματα συμπυκνώθηκαν και ζυγίστηκαν:

- Εκχύλισμα  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : 30 g.
- Εκχύλισμα  $\text{MeOH}$ : 235 g.
- Εκχύλισμα  $\text{H}_2\text{O}$ : 17 g.

Τα εκχυλίσματα ελέγχθηκαν ποιοτικά με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC), με τη χρήση των διαλυτών Cyclohexane,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{MeOH}$  και  $\text{H}_2\text{O}$ , σε διάφορες αναλογίες.

**Έλεγχος διχλωρομεθανικού εκχυλίσματος:** Χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθοι διαλύτες σε διάφορες αναλογίες: Cyclohexane, Cyclohexane/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: 90/10, 80/20, 50/50, 40/60, 20/80, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH: 99/1, 98/2, 97/3, 95/5, 90/10, 85/15.

**Έλεγχος μεθανολικού εκχυλίσματος:** Χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθοι διαλύτες σε διάφορες αναλογίες: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH: 99/1, 98/2, 97/3, 95/5, 90/10, 85/15, 80/20, 70/30, 50/50, 30/70, 20/80. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας αντιστρόφου φάσης (RP-18), με συστήματα διαλυτών H<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>O/MeOH: 99/1, 95/5, 90/10, 85/15, 80/20 και 60/40.

**Έλεγχος υδατικού εκχυλίσματος:** Χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας αντιστρόφου φάσης (RP-18) με συστήματα διαλυτών H<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>O/MeOH: 99/1, 95/5, 90/10, 80/20, 85/15, 60/40 και 50/50.

Στη συνέχεια, παρατηρήθηκαν τα χρωματογραφήματα σε λυχνία UV σε δύο μήκη κύματος (254 και 366 nm) και ψεκάστηκαν με διάλυμα θειικής βανιλλίνης.

Ακολούθησε προσεκτική εξέταση των χρωματογραφημάτων για να γίνει επιλογή του εκχυλίσματος που θα μελετηθεί ως προς τη χημική του σύσταση.

Με την πρώτη εκτίμηση το διχλωρομεθανικό εκχύλισμα περιείχε κυρίως:

- **Χλωροφύλλες**
- **Λιπαρά οξέα**

Αντίστοιχα, η εξέταση των χρωματογραφημάτων του μεθανολικού εκχυλίσματος έδειξε την πιθανή παρουσία μορίων από τις παρακάτω κατηγορίες ουσιών:

- **Φαινολικά παράγωγα**
- **Σάκχαρα**

Τέλος, η μελέτη του υδατικού εκχυλίσματος οδήγησε στο συμπέρασμα ότι περιέχονται σε μεγάλο ποσοστό σάκχαρα.

Μετά από τους παραπάνω χρωματογραφικούς ελέγχους, αποφασίστηκε η μελέτη του μεθανολικού εκχυλίσματος, εξαιτίας κυρίως της περιεκτικότητάς του σε φαινολικά

παράγωγα, σε αντίθεση με το διχλωρομεθανικό που αποτελούταν από λιπαρά παράγωγα και με το υδατικό εκχύλισμα που περιείχε σάκχαρα σε μεγάλο ποσοστό. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, στη χρωματογραφική μελέτη δεν χρησιμοποιήθηκε το μεθανολικό εκχύλισμα, αλλά το αλκοολικό κλάσμα που προκύπτει από αυτό, μετά από την κατεργασία με ρητίνη XAD16 (παρ. 1.2.1.δ). Αυτό έγινε επειδή το συγκεκριμένο αλκοολικό κλάσμα ήταν πλουσιότερο σε πολυφαινολικά μόρια και είχε απαλλαχθεί από τα σάκχαρα οπότε ήταν ευκολότερη η απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών. Το κλάσμα ζύγιζε 40 g και η ανάλυση είχε ως αποτέλεσμα την **απομόνωση και ταυτοποίηση 16 δευτερογενών μεταβολιτών**.

### **1.3.3) ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΧΗΜΙΚΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΤΟΥ ΜΕΘΑΝΟΛΙΚΟΥ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΡΗΤΙΝΗ XAD16**

Η μελέτη του κατεργασμένου μεθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Vitis vinifera* περιλαμβάνει την απομόνωση ουσιών σε καθαρή μορφή με τη χρήση χρωματογραφικών μεθόδων και την ταυτοποίησή τους με φασματοσκοπικές τεχνικές. Σ' αυτήν την ενότητα περιγράφονται αναλυτικά οι πορείες απομόνωσης των **16 φυσικών προϊόντων** που απομονώθηκαν κατά τη φυτοχημική μελέτη και παρατίθενται πίνακες με τα φασματοσκοπικά τους δεδομένα.

#### **1.3.3.a) Στήλη A<sub>1</sub>**

**Διαχωριζόμενο μίγμα:** Μεθανολικό κλάσμα μετά από κατεργασία του μεθανολικού εκχυλίσματος με ρητίνη XAD16 (40 g).

**Στατική φάση:** Γέλη πυριτίου 60H.

**Κινητή φάση:** CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, MeOH σε αναλογίες αυξανόμενης πολικότητας.

Η **στήλη A<sub>1</sub>** αποτελεί την πρώτη του μεθανολικού κλάσματος και πραγματοποιήθηκε με σκοπό να γίνει μία αρχική κλασμάτωση του μίγματος που θα βοηθούσε στην περαιτέρω επεξεργασία. Χρησιμοποιήθηκαν ως διαλύτες έκλουσης το CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> και η MeOH. Τα κλάσματα που ελήφθησαν είχαν όγκο 200 ml το καθένα. Η ακριβής πορεία που ακολουθήθηκε, οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν, τα 17 συνολικά

κλάσματα που προέκυψαν από τη συνένωση των επιμέρους κλασμάτων και τα βάρη των συνενωθέντων κλασμάτων, περιγράφονται στον Πίνακα 17. Η συνένωση των κλασμάτων έγινε μετά από χρωματογραφικό έλεγχο με TLC σε συστήματα διαλυτών CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> και MeOH, παρατήρηση σε λάμπα υπεριώδους (UV) και ψεκασμό με διάλυμα θεικής βανιλλίνης.

ΚΛΑΣΜΑΤΑ ΣΤΗΛΗΣ Α <sub>1</sub>	ΔΙΑΛΥΤΕΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (% ΑΝΑΛΟΓΙΑ)	ΒΑΡΟΣ
1-4	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0.39 g
5-12	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 99/1	0.40 g
13-16	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 99/1	0.89 g
17-20	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 98/2	0.90 g
21-25	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 97/3	1.05 g
26-30	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 97/3	1.30 g
31-34	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 96/4	1.85 g
35-37	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 95/5	1.70 g
38-50	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 93/7	2.70 g
51-70	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 90/10	2.80 g
71-83	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 85/15	5.30 g
84-88	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 80/20	2.00 g
89-92	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 70/30	1.80 g
93-96	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 60/40	2.50 g
97-100	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 50/50	2.00 g
101-105	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 30/70	2.40 g
106-110	MeOH	2.80 g

Πίνακας 17. Στήλη Α<sub>1</sub>.

Μετά τις συνενώσεις προέκυψαν **17 κλάσματα** τα οποία κωδικοποιήθηκαν ως εξής:

Κλάσμα 1-4: **1**  
 Κλάσμα 5-12: **2**  
 Κλάσμα 13-16: **3**  
 Κλάσμα 17-20: **4**  
 Κλάσμα 21-25: **5**  
 Κλάσμα 26-30: **6**  
 Κλάσμα 31-34: **7**  
 Κλάσμα 35-37: **8**  
 Κλάσμα 38-50: **9**

Κλάσμα 51-70: **10**  
 Κλάσμα 71-83: **11**  
 Κλάσμα 84-88: **12**  
 Κλάσμα 89-92: **13**  
 Κλάσμα 93-96: **14**  
 Κλάσμα 97-100: **15**  
 Κλάσμα 101-105: **16**  
 Κλάσμα 106-110: **17**

Στη συνέχεια έγινε χρωματογραφικός έλεγχος στα 17 κλάσματα σε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC), με συστήματα διαλυτών ανάπτυξης  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ : 99/1,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ : 95/5  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ : 90/10 και  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ : 80/20 και ψεκασμός με διάλυμα θεικής βανιλλίνης. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας αντιστρόφου φάσης (RP-18), με συστήματα διαλυτών  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ : 99/1, 95/5, 90/10, 85/15, 80/20 και 60/40.

Μετά τη μελέτη των χρωματογραφημάτων, αποφασίστηκε η μελέτη των **κλασμάτων 9** (38-50), **10** (51-70), **11** (71-83), καθώς σ' αυτά παρατηρήθηκαν ενδιαφέρουσες απορροφήσεις και χρώματα που εκδήλωναν την παρουσία φαινολικών συστατικών. Πιο συγκεκριμένα, στο **κλάσμα 9** παρατηρήθηκαν συστατικά που απορροφούσαν στο υπεριώδες και μετά τον ψεκασμό με διάλυμα θεικής βανιλλίνης έδιναν κόκκινο χρώμα. Επιπρόσθετα, η σημαντικότερη διαπίστωση από τον χρωματογραφικό έλεγχο ήταν η ύπαρξη μορίων που επίσης απορροφούσαν στο UV και χρωματίζονταν σκούρα ιώδη μετά από τον ψεκασμό με διάλυμα θεικής βανιλλίνης, γεγονός που ίσως σήμαινε παρουσία στιλβενοειδών. Στο **κλάσμα 10** σημειώθηκαν απορροφήσεις στο UV και χρώματα (γκρίζα και κίτρινα) πο ν παρέπεμπαν στην παρουσία φαινολικών ουσιών, πιθανόν αρωματικών οξέων και φλαβονοειδών. Η μελέτη σε TLC του **κλάσματος 11** υπέδειξε επίσης την παρουσία φαινολικών μεταβολιτών αφού εμφανίζονταν κηλίδες που απορροφούσαν στο υπεριώδες και είτε χρωματίζονταν γκρίζες (αρωματικά οξέα), είτε χρωματίζονταν σκούρες ιώδεις (στιλβενοειδή) με ψεκασμό με διάλυμα θεικής βανιλλίνης. Στις παραγράφους που ακολουθούν περιγράφεται η διαδικασία διαχωρισμού και απομόνωσης των 16 συνολικά φυσικών προϊόντων.

### 1.3.3.β) Στήλη A<sub>2</sub>

**Διαχωριζόμενο μίγμα:** **Κλάσμα 9 στήλης A<sub>1</sub>** (2.7 g).

**Στατική φάση:** Γέλη πυριτίου αντίστροφης φάσης (R<sub>18</sub>).

**Κινητή φάση:**  $\text{H}_2\text{O}$  και  $\text{MeOH}$  σε αναλογίες μειούμενης πολικότητας.

**Διάμετρος στήλης:** 3.5 cm.

Μετά από εξέταση με TLC του κλάσματος 9 της στήλης A<sub>1</sub>, επιλέχθηκε η πραγματοποίηση υγρής χρωματογραφίας μέσης πίεσης (MPLC), με διαλύτες H<sub>2</sub>O/MeOH. Η πλήρης πορεία της στήλης φαίνεται στον Πίνακα 18.

ΚΛΑΣΜΑΤΑ ΣΤΗΛΗΣ A <sub>2</sub>	ΔΙΑΛΥΤΕΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (% ΑΝΑΛΟΓΙΑ)	ΒΑΡΟΣ
1-46	H <sub>2</sub> O	670 mg
47-61	H <sub>2</sub> O	100 mg
62-117	H <sub>2</sub> O/MeOH: 95/5	529 mg
118-154	H <sub>2</sub> O/MeOH: 90/10	350 mg
155-187	H <sub>2</sub> O/MeOH: 80/20	130 mg
188-223	H <sub>2</sub> O/MeOH: 80/20	100 mg
224-244	H <sub>2</sub> O/MeOH: 80/20	32 mg
245-280	H <sub>2</sub> O/MeOH: 70/30	20 mg
281-300	H <sub>2</sub> O/MeOH: 70/30	25 mg
301-315	H <sub>2</sub> O/MeOH: 70/30	30 mg
316-368	H <sub>2</sub> O/MeOH: 60/40	150 mg
369-380	H <sub>2</sub> O/MeOH: 60/40	25 mg
381-404	H <sub>2</sub> O/MeOH: 50/50	45 mg
405-439	H <sub>2</sub> O/MeOH: 50/50	17 mg
440-515	H <sub>2</sub> O/MeOH: 40/60	65mg
516-550	MeOH	75 mg

Πίνακας 18. Στήλη A<sub>2</sub>.

Τα κλάσματα υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, σε συστήματα ανάπτυξης CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH: 90/10, 80/20, 70/30. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας αντιστρόφου φάσης (RP-18) με συστήματα διαλυτών H<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>O/MeOH: 99/1, 95/5, 90/10, 80/20, 85/15, 60/40 και 50/50 και ακολούθησε παρατήρηση στο UV και ψεκασμός με διάλυμα θεικής βανιλλίνης. Εξήχθησαν τα εξής συμπεράσματα:

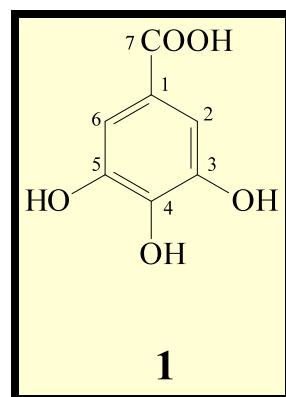
➤ Το κλάσμα 47-61 εμφάνιζε μία κηλίδα στην TLC που απορροφούσε στο UV-Vis και χρωματιζόταν γκρίζα, μετά από ψεκασμό με διάλυμα θεικής βανιλλίνης. Η

φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού οδήγησε στην ταυτοποίηση του μορίου ως το **γαλλικό οξύ** που αποτελεί ένα από τα πιο γνωστά φαινολοξέα.

- Στο **κλάσμα 224-244** παρατηρήθηκε κατά την εξέταση με χρωμα τογραφία λεπτής στοιβάδας μία ουσία που απορροφούσε στο υπεριώδες-ορατό και ο ψεκασμός με διάλυμα θεικής βανιλλίνης τη χρωμάτιζε κόκκινη. Η φασματοσκοπική μελέτη του μορίου οδήγησε στον καθορισμό της δομής του. Πρόκειται για την **(+)-κατεχίνη**.
- Το **κλάσμα 301-315** εμφάνιζε μία κηλίδα που απορροφούσε στο UV-Vis και χρωματίζοταν κόκκινη μετά από ψεκασμό με διάλυμα θεικής βανιλλίνης. Με τη βοήθεια του NMR ταυτοποιήθηκε ως η **(-)-επικατεχίνη**.
- Στο **κλάσμα 369-380** παρατηρήθηκε μία ουσία που είχε τα χρωματογραφικά γνωρίσματα των στιλβενοειδών (απορρόφηση στο UV-Vis, έντονος κυανός χρωματισμός με θεική βανιλλίνη). Με τη χρήση φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού η δομή της ταυτίστηκε με την **trans-ρεσβερατρόλη**.
- Η χρωματογραφική μελέτη του **κλάσματος 405-439** πιστοποίησε την παρουσία ενός μορίου το οποίο απορροφούσε στο υπεριώδες και χρωματίζοταν σκούρο κυανό όταν ψεκάστηκε με διάλυμα θεικής βανιλλίνης. Με τη χρήση φασματοσκοπικού πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού αποδείχθηκε ότι πρόκειται για το στιλβενοειδές **trans-ε-βινιφερίνη**.

Η ακριβής φασματοσκοπική ταυτότητα των πέντε παραπάνω μορίων παρουσιάζεται στις επόμενες παραγράφους.

### i.) Γαλλικό οξύ (1)



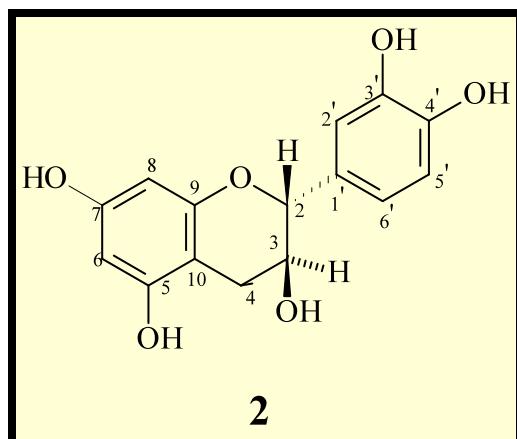
Το γαλλικό οξύ έχει μοριακό τύπο **C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>5</sub>** και μοριακό βάρος **170**.

Στον παρακάτω πίνακα υπάρχουν οι τιμές δ των φασμάτων, οι σταθερές σύζευξης *J* και η πολλαπλότητα των κορυφών στα φάσματα <sup>1</sup>H-NMR και <sup>13</sup>C-NMR (D<sub>2</sub>O) του γαλλικού οξέος. Το μοριακό βάρος του μορίου πιστοποιήθηκε με τη μέθοδο του χημικού ιονισμού [CIMS, m/z: 171 (M+H)<sup>+</sup>].

Άτομο	$\delta$ <sup>13</sup> C σε ppm	$\delta$ <sup>1</sup> H σε ppm	<i>J</i> σε Hz
1	121.4	-	...
2	110.5	7.10 s	...
3	144.9	-	...
4	135.9	-	...
5	144.9	-	...
6	110.5	7.10 s	...
7	170.8	-	...

Πίνακας 19. Φασματοσκοπικά δεδομένα <sup>1</sup>H-NMR και <sup>13</sup>C-NMR (D<sub>2</sub>O) του γαλλικού οξέος.

## ii.) (+)-Κατεχίνη (2)



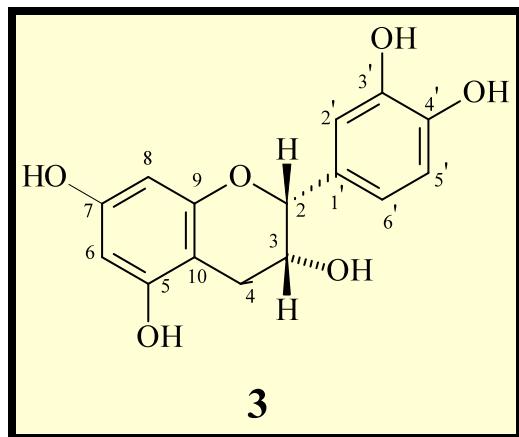
Η κατεχίνη έχει μοριακό τύπο **C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>** και μοριακό βάρος **290**.

Ο Πίνακας 20 περιέχει τις τιμές  $\delta$  των φασμάτων, τις σταθερές σύζευξης  $J$  και την πολλαπλότητα των κορυφών στα φάσματα  $^1\text{H-NMR}$  και  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) του μορίου. Το μοριακό βάρος του μορίου πιστοποιήθηκε με τη μέθοδο του χημικού ιονισμού [CIMS,  $m/z$ : 291 ( $\text{M}+\text{H}^+$ )], ενώ μετρήθηκε και η στροφική ικανότητά του. Η ακριβής τιμή σε θερμοκρασία  $22\ ^\circ\text{C}$ , διαλύτη  $\text{CH}_3\text{COCH}_3$  και με συγκέντρωση του διαλύματος  $0.20\ \text{g}/100\text{ml}$  ήταν  $[\alpha]^{22} = +11.3^0$ .

Άτομο	$\delta\ ^{13}\text{C}$ σε ppm	$\delta\ ^1\text{H}$ σε ppm	$J$ σε Hz
2	<b>83.1</b>	<b>4.66 d</b>	<b>7.5</b>
3	<b>69.1</b>	<b>4.07 m</b>	...
4	<b>28.7</b>	<b><math>4_{\text{ax}}: 2.94\ dd</math></b> <b><math>4_{\text{eq}}: 2.60\ dd</math></b>	<b>16.1, 5.4</b> <b>16.1, 8.1</b>
5	<b>157.8</b>	-	...
6	<b>96.6</b>	<b>6.03 d</b>	<b>2.2</b>
7	<b>158.1</b>	-	...
8	<b>95.8</b>	<b>5.96 d</b>	<b>2.2</b>
9	<b>157.2</b>	-	...
10	<b>101.1</b>	-	...
1'	<b>132.5</b>	-	...
2'	<b>115.5</b>	<b>6.93 d</b>	<b>1.6</b>
3'	<b>146.5</b>	-	...
4'	<b>146.5</b>	-	...
5'	<b>116.4</b>	<b>6.80-6.88 m</b>	...
6'	<b>120.3</b>	<b>6.80-6.88 m</b>	...

Πίνακας 20. Φασματοσκοπικά δεδομένα  $^1\text{H-NMR}$  και  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) της (+)-κατεχίνης.

iii.) (-)-Επικατεχίνη (3)



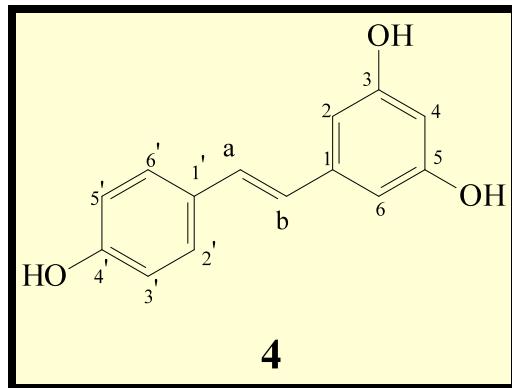
Η επικατεχίνη έχει μοριακό τύπο **C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>** και μοριακό βάρος **290**.

Το μοριακό βάρος του μορίου πιστοποιήθηκε με τη μέθοδο του χημικού ιονισμού [CIMS, m/z: 291 (M+H)<sup>+</sup>], ενώ μετρήθηκε και η στροφική ικανότητά του. Η ακριβής τιμή σε θερμοκρασία 22 °C, διαλύτη CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub> και με συγκέντρωση του διαλύματος 0.2 g/100ml ήταν  $[\alpha]^{22} = -12.2^0$ . Οι τιμές δ των φασμάτων, οι σταθερές σύζευξης *J* και η πολλαπλότητα των κορυφών στα φάσματα <sup>1</sup>H-NMR και <sup>13</sup>C-NMR (DMSO) του μορίου περιέχονται στον παρακάτω πίνακα.

Άτομο	$\delta^{13}\text{C}$ σε ppm	$\delta^1\text{H}$ σε ppm	$J$ σε Hz
2	78.1	4.75 s	...
3	65.0	4.03 m	...
4	28.2	4 <sub>ax</sub> : 2.70 dd 4 <sub>eq</sub> : 2.50 dd	16.4, 4.4 16.4, 3.5
5	156.5	-	...
6	95.2	5.91 d	2.3
7	156.3	-	...
8	94.2	5.75 d	2.3
9	155.8	-	...
10	98.6	-	...
1'	130.7	-	...
2'	114.9	6.91 d	2.3
3'	144.4	-	...
4'	144.5	-	...
5'	114.8	6.68 m	...
6'	118.0	6.68 m	...

Πίνακας 21. Φασματοσκοπικά δεδομένα  $^1\text{H-NMR}$  και  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO) της (-)-επικατεχίνης.

#### iv.) *trans*-ρεσβερατρόλη (4)



H *trans*-ρεσβερατρόλη έχει μοριακό τύπο  $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_3$  και μοριακό βάρος 228.

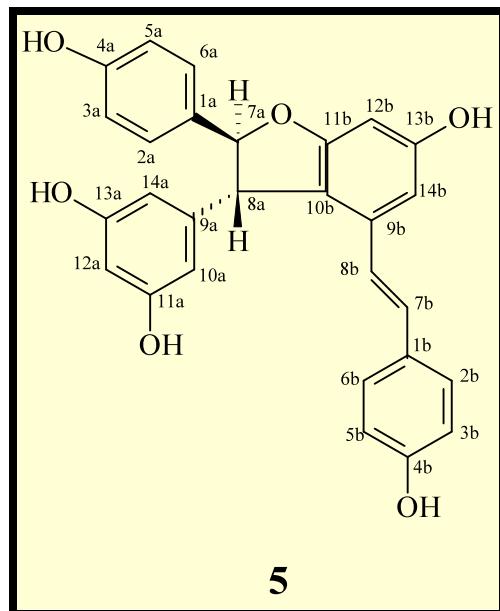
Οι τιμές  $\delta$  των φασμάτων, οι σταθερές σύζευξης  $J$  και η πολλαπλότητα των κορυφών στα φάσματα  $^1\text{H-NMR}$  και  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) του μορίου παρουσιάζονται

στον Πίνακα 22. Το μοριακό βάρος του μορίου πιστοποιήθηκε με τη μέθοδο του χημικού ιονισμού [CIMS, m/z: 229 ( $M+H$ )<sup>+</sup>].

Άτομο	$\delta^{13}\text{C}$ σε ppm	$\delta^1\text{H}$ σε ppm	$J$ σε Hz
1	142.3	-	...
2	105.8	6.52 d	2.0
3	159.7	-	...
4	102.7	6.24 t	2.0
5	159.7	-	...
6	105.8	6.52 d	2.0
1'	130.2	-	...
2'	128.8	7.40 d	8.6
3'	116.5	6.82 d	8.6
4'	158.4	-	...
5'	116.5	6.82 d	8.6
6'	128.8	7.40 d	8.6
a	129.4	7.05 d	16.0
b	127.1	6.83 d	16.0

Πίνακας 22. Φασματοσκοπικά δεδομένα  $^1\text{H-NMR}$  και  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) της *trans*-ρεσβερατρόλης.

v.) *trans*- $\epsilon$ -βινιφερίνη (5)



Η  $\epsilon$ -βινιφερίνη έχει μοριακό τύπο **C<sub>28</sub>H<sub>22</sub>O<sub>6</sub>** και μοριακό βάρος **454**.

Το μοριακό βάρος του μορίου πιστοποιήθηκε με τη μέθοδο του χημικού ιονισμού [CIMS, m/z: 455 (M+H)<sup>+</sup>], ενώ μετρήθηκε και η στροφική ικανότητά του. Η ακριβής τιμή σε θερμοκρασία 22 °C, διαλύτη MeOH και με συγκέντρωση του διαλύματος 0.52 g/100ml ήταν  $[\alpha]^{22} = +64.4^0$ . Στον παρακάτω πίνακα υπάρχουν οι τιμές δ των φασμάτων, οι σταθερές σύζευξης  $J$  και η πολλαπλότητα των κορυφών στα φάσματα <sup>1</sup>H-NMR και <sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD) της  $\epsilon$ -βινιφερίνης.

Ατομο	$\delta$ $^{13}\text{C}$ σε ppm	$\delta$ $^1\text{H}$ σε ppm	$J$ σε Hz
1a	133.9	-	...
2a	128.2	7.13 d	8.8
3a	116.3	6.76 d	8.8
4a	158.4	-	...
5a	116.3	6.76 d	8.8
6a	128.2	7.13 d	8.8
7a	94.8	5.36 d	6.6
8a	58.3	4.34 d	6.6
9a	147.4	-	...
10a	107.5	6.15 d	2.2
11a	160.1	-	...
12a	102.2	6.17 t	2.2
13a	160.1	-	...
14a	107.5	6.15 d	2.2
1b	130.4	-	...
2b	128.8	7.03 d	8.8
3b	116.4	6.64 d	8.8
4b	158.5	-	...
5b	116.4	6.64 d	8.8
6b	128.8	7.03 d	8.8
7b	130.4	6.81 d	16.1
8b	123.7	6.56 d	16.1
9b	136.9	-	...
10b	120.1	-	...
11b	162.8	-	...
12b	96.9	6.24 d	2.2
13b	159.8	-	...
14b	104.4	6.62 d	2.2

Πίνακας 23. Φασματοσκοπικά δεδομένα  $^1\text{H}$ -NMR και  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) της *trans*-ε-βινιφερίνης.

Στον παρακάτω πίνακα αναφέρονται αναλυτικά οι τιμές  $\delta$  των φασμάτων, οι σταθερές σύζευξης  $J$  και η πολλαπλότητα των κορυφών στα φάσματα  $^1\text{H-NMR}$  και  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ ) της ε-βινιφερίνης.

Ατομο	$\delta$ $^{13}\text{C}$ σε ppm	$\delta$ $^1\text{H}$ σε ppm	$J$ σε Hz
1a	133.8	-	...
2a	128.7	7.20 d	8.4
3a	116.1	6.82 d	8.4
4a	158.1	-	...
5a	116.1	6.82 d	8.4
6a	128.7	7.20 d	8.4
7a	93.8	5.42 d	5.5
8a	57.0	4.47 d	5.5
9a	147.4	-	...
10a	106.9	6.23 s	...
11a	159.8	-	...
12a	102.0	6.23 s	...
13a	159.8	-	...
14a	106.9	6.23 s	...
1b	130.0	-	...
2b	127.9	7.17 d	8.4
3b	116.1	6.73 d	8.4
4b	158.1	-	...
5b	116.1	6.73 d	8.4
6b	127.9	7.17 d	8.4
7b	129.8	6.90 d	16.5
8b	123.4	6.71 d	16.5
9b	136.3	-	...
10b	119.8	-	...

<b>11b</b>	<b>162.4</b>	-	...
<b>12b</b>	<b>96.7</b>	<b>6.32 d</b>	<b>2.2</b>
<b>13b</b>	<b>159.5</b>	-	...
<b>14b</b>	<b>104.1</b>	<b>6.72 d</b>	<b>2.2</b>

Πίνακας 24. Φασματοσκοπικά δεδομένα  $^1\text{H}$ -NMR και  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ ) της *trans*-ε-βινιφερίνης.

### 1.3.3.γ) Στήλη A<sub>3</sub>

**Διαχωριζόμενο μίγμα:** **Κλάσμα 10 στήλης A<sub>1</sub>** (2.8 g).

**Στατική φάση:** Γέλη πυριτίου διαμέτρου 0.040-0.063 mm.

**Κινητή φάση:**  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  και  $\text{MeOH}$  σε αναλογίες αυξανόμενης πολικότητας.

**Διάμετρος στήλης:** 3.5 cm.

Η **στήλη A<sub>3</sub>** έγινε με σκοπό να απομονωθούν οι αρωματικοί δευτερογενείς μεταβολίτες (πιθανότατα φλαβονοειδή και οξέα) του **κλάσματος 10** της **στήλης A<sub>1</sub>** που παρατηρήθηκαν στην TLC. Ο Πίνακας 25 περιέχει τα κλάσματα που συλλέχθηκαν, τα βάρη τους και τις αντίστοιχες αναλογίες των συστημάτων διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν.

ΚΛΑΣΜΑΤΑ ΣΤΗΛΗΣ A <sub>3</sub>	ΔΙΑΛΥΤΕΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (% ΑΝΑΛΟΓΙΑ)	ΒΑΡΟΣ
<b>1-32</b>	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	<b>65 mg</b>
<b>33-50</b>	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}: 99/1$	<b>50 mg</b>
<b>51-72</b>	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}: 99/1$	<b>60 mg</b>
<b>73-103</b>	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}: 98/2$	<b>70 mg</b>
<b>104-120</b>	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}: 97/3$	<b>10 mg</b>
<b>121-136</b>	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}: 97/3$	<b>9 mg</b>
<b>137-180</b>	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}: 95/5$	<b>50 mg</b>
<b>181-202</b>	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}: 93/7$	<b>120 mg</b>
<b>203-220</b>	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}: 93/7$	<b>150 mg</b>
<b>221-246</b>	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}: 92/8$	<b>200 mg</b>
<b>247-265</b>	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}: 90/10$	<b>250 mg</b>
<b>266-295</b>	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}: 90/10$	<b>250 mg</b>
<b>296-317</b>	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}: 85/15$	<b>200 mg</b>
<b>318-330</b>	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}: 80/20$	<b>150 mg</b>
<b>331-360</b>	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}: 70/30$	<b>200 mg</b>
<b>361-370</b>	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}: 60/40$	<b>150 mg</b>
<b>371-390</b>	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}: 50/50$	<b>200 mg</b>
<b>391-420</b>	$\text{MeOH}$	<b>200 mg</b>

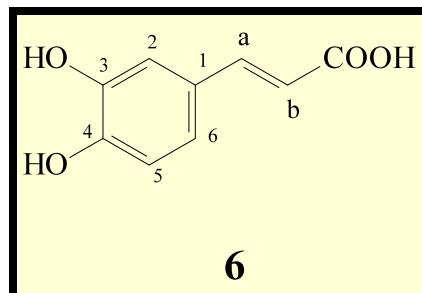
Πίνακας 25. Στήλη A<sub>3</sub>.

Τα κλάσματα υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, σε συστήματα ανάπτυξης  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ : 99/1, 95/5, 90/10, παρατήρηση στο UV και ψεκασμό με διάλυμα θεικής βανιλλίνης. Εξήχθησαν τα εξής συμπεράσματα:

- Στο **κλάσμα 104-120** υπήρχε μία κηλίδα που απορροφούσε στο υπεριώδες, ενώ χρωματίζοταν γκρίζα κατά τον ψεκασμό της με διάλυμα θεικής βανιλλίνης. Η φασματοσκοπική μελέτη οδήγησε στο ***trans*-καφεϊκό οξύ**.
- Η χρωματογραφική μελέτη του **κλάσματος 121-136** υπέδειξε μία ουσία που απορροφούσε στο UV και έπαιρνε γκρίζο χρώμα με διάλυμα θεικής βανιλλίνης. Με τη χρήση φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού αποδείχθηκε ότι πρόκειται για το φαινολοξύ **πρωτοκατεχικό οξύ**.
- Το **κλάσμα 266-295** περιείχε δύο κυρίως μόρια με τα χρωματογραφικά χαρακτηριστικά των φλαβονοειδών (απορρόφηση στο UV και κίτρινος χρωματισμός κατά τον ψεκασμό με θεική βανιλλίνη). Το συγκεκριμένο κλάσμα εισήλθε σε περαιτέρω επεξεργασία με σκοπό να απομονωθούν τα δύο μόρια (παρ. 1.3.3.δ).

Η ακριβής φασματοσκοπική ταυτότητα των δύο παραπάνω μορίων παρουσιάζεται στις επόμενες παραγράφους.

### i.) *trans*-καφεϊκό οξύ (6)



Το καφεϊκό οξύ έχει μοριακό τύπο  $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$  και μοριακό βάρος 180.

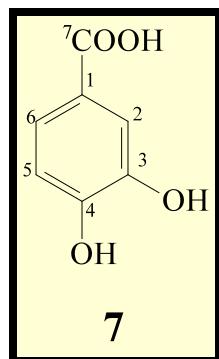
Οι τιμές δ των φασμάτων, οι σταθερές σύζευξης  $J$  και η πολλαπλότητα των κορυφών στα φάσματα  $^1\text{H-NMR}$  και  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) του μορίου περιέχονται στον

παρακάτω πίνακα . Το μοριακό βάρος του μορίου πιστοποιήθηκε με τη μέθοδο του χημικού ιονισμού [CIMS, m/z: 181 (M+H)<sup>+</sup>].

Άτομο	$\delta$ <sup>13</sup> C σε ppm	$\delta$ <sup>1</sup> H σε ppm	J σε Hz
1	127.0	-	...
2	115.0	6.60 d	1.8
3	146.4	-	...
4	149.3	-	...
5	116.3	6.61 d	8.4
6	122.8	6.50 dd	8.4, 1.8
a	146.6	7.00 d	16.0
b	114.3	5.75 d	16.0
C=O	168.6	-	...

Πίνακας 26. Φασματοσκοπικά δεδομένα <sup>1</sup>H-NMR και <sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD) του *trans*-καφεϊκού οξέος.

## ii.) Πρωτοκατεχικό οξύ (7)



Το πρωτοκατεχικό οξύ έχει μοριακό τύπο C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>4</sub> και μοριακό βάρος 154.

Οι τιμές δ των φασμάτων , οι σταθερές σύζευξης J και η πολλαπλότητα των κορυφών στα φάσματα <sup>1</sup>H-NMR και <sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD) του μορίου παρουσιάζονται στον Πίνακα 27. Το μοριακό βάρος του μορίου πιστοποιήθηκε με τη μέθοδο του χημικού ιονισμού [CIMS, m/z: 155 (M+H)<sup>+</sup>].

Άτομο	$\delta^{13}\text{C}$ σε ppm	$\delta^1\text{H}$ σε ppm	$J$ σε Hz
1	122.2	-	...
2	116.8	7.42 <i>d</i>	2.0
3	145.1	-	...
4	150.5	-	...
5	114.8	6.80 <i>d</i>	8.0
6	122.9	7.43 <i>dd</i>	8.0, 2.0
7	169.2	-	...

Πίνακας 27. Φασματοσκοπικά δεδομένα  $^1\text{H}$ -NMR και  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) του πρωτοκατεχικού οξεος.

### 1.3.3.δ) Στήλη A<sub>4</sub>

**Διαχωριζόμενο μίγμα:** Κλάσμα 266-295 στήλης A<sub>3</sub> (0.25 g).

**Στατική φάση:** Γέλη πυριτίου διαμέτρου 0.040-0.063 mm.

**Κινητή φάση:**  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  και MeOH σε αναλογίες αυξανόμενης πολικότητας.

**Διάμετρος στήλης:** 1.5 cm.

Η απομόνωση των δύο ουσιών που πιθανότατα είναι φλαβονοειδή, ήταν ο σκοπός της στήλης A<sub>4</sub>. Η πλήρης πορεία της στήλης φαίνεται στον Πίνακα 28.

ΚΛΑΣΜΑΤΑ ΣΤΗΛΗΣ A <sub>4</sub>	ΔΙΑΛΥΤΕΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (% ΑΝΑΛΟΓΙΑ)	ΒΑΡΟΣ
1-38	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	15 mg
39-60	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}: 99/1$	10 mg
61-76	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}: 99/1$	10 mg
77-107	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}: 98/2$	10 mg
108-120	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}: 97/3$	15 mg
121-144	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}: 97/3$	12 mg
145-150	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}: 95/5$	10 mg
151-175	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}: 95/5$	12 mg
176-195	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}: 93/7$	8 mg
196-210	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}: 95/5$	15 mg
211-223	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}: 92/8$	20 mg
224-229	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}: 90/10$	5 mg
230-240	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}: 85/15$	12 mg
241-260	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}: 80/20$	15 mg
261-300	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}: 70/30$	15 mg
301-330	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}: 60/40$	20 mg
331-350	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}: 50/50$	15 mg

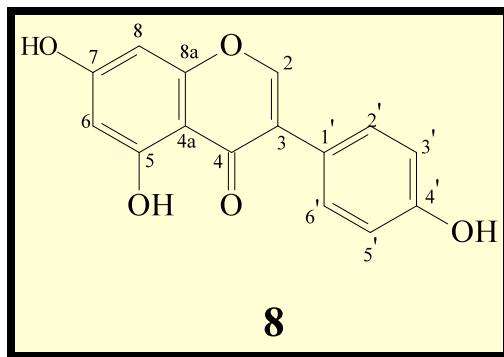
Πίνακας 28. Στήλη A<sub>4</sub>.

Τα κλάσματα υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, σε συστήματα ανάπτυξης  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ : 99/1, 95/5, 90/10, παρατήρηση στο UV και ψεκασμό με διάλυμα θεικής βανιλλίνης. Εξήχθησαν τα εξής συμπεράσματα:

- Στο **κλάσμα 176-195** παρατηρήθηκε κατά την εξέταση με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας μία ουσία που απορροφούσε στο υπεριώδες-ορατό και ο ψεκασμός με διάλυμα θεικής βανιλλίνης τη χρωμάτιζε σκούρα κίτρινη. Η φασματοσκοπική μελέτη του μορίου οδήγησε στον καθορισμό της δομής του. Πρόκειται για την ισοφλαβόνη **γενιστεῖνη**.
- Το **κλάσμα 224-229** εμφάνιζε μία κηλίδα που απορροφούσε στο UV-Vis και χρωματιζόταν κόκκινη μετά από ψεκασμό με διάλυμα θεικής βανιλλίνης. Με τη βοήθεια του NMR ταυτοποιήθηκε ως **γενιστίνη** που είναι ο γλυκοσίδης στην **7 θέση της γενιστεῖνης**.

Η ακριβής φασματοσκοπική ταυτότητα των δύο παραπάνω μορίων παρουσιάζεται στις επόμενες παραγράφους.

### i.) Γενιστεῖνη (8)



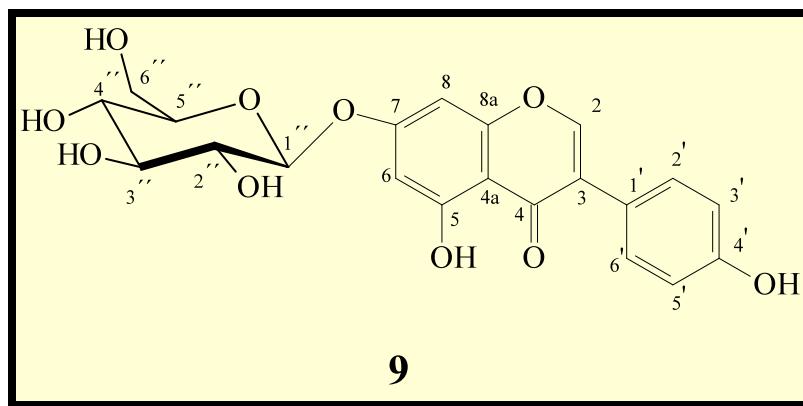
Η γενιστεῖνη έχει μοριακό τύπο  **$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$**  και μοριακό βάρος **270**.

Οι τιμές δ των φασμάτων, οι σταθερές σύζευξης  $J$  και η πολλαπλότητα των κορυφών στα φάσματα  $^1\text{H-NMR}$  και  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO) του μορίου περιέχονται στον Πίνακα **29**. Το μοριακό βάρος του μορίου πιστοποιήθηκε με τη μέθοδο του χημικού ιονισμού [CIMS, m/z: 271 ( $\text{M}+\text{H}^+$ )].

Άτομο	$\delta^{13}\text{C}$ σε ppm	$\delta^1\text{H}$ σε ppm	$J$ σε Hz
2	153.9	8.32 s	...
3	122.2	-	...
4	180.1	-	...
4a	104.4	-	...
5	161.9	-	...
6	98.9	6.23 d	2.2
7	164.2	-	...
8	93.6	6.39 d	2.2
8a	157.5	-	...
1'	121.1	-	...
2'	130.1	7.38 d	8.6
3'	115.0	6.83 d	8.4
4'	157.3	-	...
5'	115.0	6.83 d	8.4
6'	130.1	7.38 d	8.6

Πίνακας 29. Φασματοσκοπικά δεδομένα  $^1\text{H-NMR}$  και  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO) της γενιστείνης.

## ii.) Γενιστίνη (9)



Η γενιστίνη έχει μοριακό τύπο **C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>10</sub>** και μοριακό βάρος **432**.

Το μοριακό βάρος του μορίου πιστοποιήθηκε με τη μέθοδο του χημικού ιονισμού [CIMS, m/z: 433 ( $M+H$ )<sup>+</sup>]. Στους παρακάτω δύο πίνακες αναφέρονται αντίστοιχα αναλυτικά οι τιμές  $\delta$  των φασμάτων, οι σταθερές σύζευξης  $J$  και η πολλαπλότητα των κορυφών στα φάσματα  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO) και  $^1\text{H-NMR}$  και  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) της γενιστίνης.

Άτομο	$\delta$ $^1\text{H}$ σε ppm	$J$ σε Hz
<b>2</b>	<b>8.14 s</b>	...
<b>3</b>	-	...
<b>4</b>	-	...
<b>5</b>	-	...
<b>6</b>	<b>6.50 d</b>	<b>2.1</b>
<b>7</b>	-	...
<b>8</b>	<b>6.70 d</b>	<b>2.1</b>
<b>8a</b>	-	...
<b>4a</b>	-	...
<b>1'</b>	-	...
<b>2'</b>	<b>7.38 d</b>	<b>8.1</b>
<b>3'</b>	<b>6.84 d</b>	<b>8.1</b>
<b>4'</b>	-	...
<b>5'</b>	<b>6.84 d</b>	<b>8.1</b>
<b>6'</b>	<b>7.38 d</b>	<b>8.1</b>
<b>1''</b>	<b>5.03 d</b>	<b>7.5</b>
<b>2''</b>	<b>3.39-3.51 m</b>	...
<b>3''</b>	<b>3.39-3.51 m</b>	...
<b>4''</b>	<b>3.39-3.51 m</b>	...
<b>5''</b>	<b>3.39-3.51 m</b>	...
<b>6''</b>	<b><math>6''_a: 3.90 dd</math></b> <b><math>6''_b: 3.70 dd</math></b>	<b>11.7</b> <b>11.8</b>

Πίνακας 30. Φασματοσκοπικά δεδομένα  $^1\text{H-NMR}$  και  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO) της γενιστίνης.

Άτομο	$\delta^{13}\text{C}$ σε ppm	$\delta^1\text{H}$ σε ppm	$J$ σε Hz
2	154.6	8.09 s	...
3	124.4	-	...
4	182.4	-	...
5	163.4	-	...
6	101.6	6.48 d	2.2
7	164.7	-	...
8	95.9	6.65 d	2.2
8a	159.1	-	...
4a	107.4	-	...
1'	123.1	-	...
2'	131.3	7.36 d	8.4
3'	116.8	6.83 d	8.4
4'	158.9	-	...
5'	116.8	6.83 d	8.4
6'	131.3	7.36 d	8.4
1''	101.8	5.03 d	7.5
2''	72.9	3.20-4.20 m	...
3''	77.8	3.20-4.20 m	...
4''	71.2	3.20-4.20 m	...
5''	78.3	3.20-4.20 m	...
6''	62.4	3.20-4.20 m	...

Πίνακας 31. Φασματοσκοπικά δεδομένα  $^1\text{H-NMR}$  και  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) της γενιστίνης.

### 1.3.3.e) Στήλη A<sub>5</sub>

Διαχωριζόμενο μίγμα: Κλάσμα 11 στήλης A<sub>1</sub> (5.3 g).

Στατική φάση: Γέλη πυριτίου αντίστροφης φάσης (R<sub>18</sub>).

Κινητή φάση: H<sub>2</sub>O και MeOH σε αναλογίες μειούμενης πολικότητας.

Διάμετρος στήλης: 4.0 cm.

Το κλάσμα 11 της στήλης Α<sub>1</sub> κίνησε το ενδιαφέρον, κυρίως εξαιτίας της πιθανής παρουσίας στιλβενοειδών. Πρωταρχικό μέλημα ήταν η απομάκρυνση των σακχάρων που κυριαρχούσαν στο κλάσμα. Η επιλογή της MPLC έγινε μετά από χρωματογραφικό έλεγχο του κλάσματος όπου ο διαχωρισμός των ουσιών ήταν καλύτερος με αντίστροφη γέλη πυριτίου, απ' ότι με γέλη κανονικής φάσης. Η πλήρης πορεία της στήλης παρουσιάζεται στον Πίνακα 32.

ΚΛΑΣΜΑΤΑ ΣΤΗΛΗΣ Α <sub>5</sub>	ΔΙΑΛΥΤΕΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (% ΑΝΑΛΟΓΙΑ)	ΒΑΡΟΣ
1-40	H <sub>2</sub> O	450 mg
41-49	H <sub>2</sub> O/MeOH: 99/1	15 mg
50-64	H <sub>2</sub> O/MeOH: 97/3	175 mg
65-95	H <sub>2</sub> O/MeOH: 95/5	360 mg
96-109	H <sub>2</sub> O/MeOH: 90/10	18 mg
110-130	H <sub>2</sub> O/MeOH: 85/15	290 mg
131-165	H <sub>2</sub> O/MeOH: 80/20	330 mg
166-205	H <sub>2</sub> O/MeOH: 80/20	400 mg
206-235	H <sub>2</sub> O/MeOH: 70/30	450 mg
236-260	H <sub>2</sub> O/MeOH: 70/30	240 mg
261-295	H <sub>2</sub> O/MeOH: 70/30	220 mg
296-330	H <sub>2</sub> O/MeOH: 70/30	245 mg
331-250	H <sub>2</sub> O/MeOH: 50/50	180 mg
351-370	H <sub>2</sub> O/MeOH: 50/50	130 mg
371-400	MeOH	300 mg

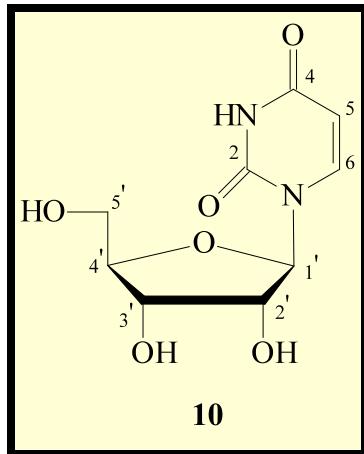
Πίνακας 32. Στήλη Α<sub>5</sub>.

Τα κλάσματα υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, σε συστήματα ανάπτυξης CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH: 90/10, 80/20, 70/30. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας αντιστρόφου φάσης (RP-18) με συστήματα διαλυτών H<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>O/MeOH: 99/1, 95/5, 90/10, 80/20, 85/15, 60/40 και 50/50 και ακολούθησε παρατήρηση στο UV και ψεκασμός με διάλυμα θεικής βανιλλίνης. Εξήχθησαν τα εξής συμπεράσματα:

- Το **κλάσμα 41-49** εμφάνιζε μία κηλίδα που δεν απορροφούσε στο UV-Vis και χρωματιζόταν κίτρινη μετά από ψεκασμό με διάλυμα θεικής βανιλίνης. Με τη χρήση τεχνικών NMR διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για την **ουριδίνη** που είναι μία αζωτούχος βάση.
- Η χρωματογραφική μελέτη του **κλάσματος 96-109** πιστοποίησε την παρουσία ενός μορίου το οποίο απορροφούσε στο υπεριώδες και χρωματιζόταν γκρίζο όταν ψεκαζόταν με διάλυμα θεικής βανιλίνης. Με τη χρήση φασματοσκοπικού πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού αποδείχθηκε ότι πρόκειται για έναν εκπρόσωπο των φαινολικών οξέων, το ***trans*-π-κουμαρικό οξύ**.
- Το **κλάσμα 166-205** παρουσίαζε εξαιρετικό ενδιαφέρον καθώς παρατηρήθηκαν οι κηλίδες στο υπεριώδες οι οποίες έπαιρναν κυανό χρώμα μετά από ψεκασμό με διάλυμα θεικής βανιλίνης. Τα μόρια αυτά ήταν ο κύριος λόγος που πραγματοποιήθηκε η στήλη και γι' αυτό αποφασίστηκε η περαιτέρω κατεργασία του κλάσματος (παρ. **1.3.3.στ**).

Η ακριβής φασματοσκοπική ταυτότητα των δύο παραπάνω μορίων παρουσιάζεται στις επόμενες παραγράφους.

### i.) Ουριδίνη (10)



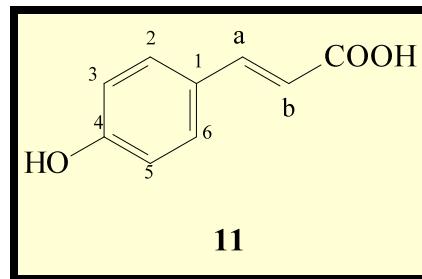
Η ουριδίνη έχει μοριακό τύπο **C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>** και μοριακό βάρος **244**.

Το μοριακό βάρος του μορίου πιστοποιήθηκε με τη μέθοδο του χημικού ιονισμού [CIMS, m/z: 245 ( $M+H$ )<sup>+</sup>]. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται αναλυτικά οι τιμές  $\delta$  των φασμάτων, οι σταθερές σύζευξης  $J$  και η πολλαπλότητα των κορυφών στα φάσματα  $^1\text{H-NMR}$  και  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) της ουριδίνης.

Άτομο	$\delta$ $^{13}\text{C}$ σε ppm	$\delta$ $^1\text{H}$ σε ppm	$J$ σε Hz
2	152.6	-	...
4	166.3	-	...
5	102.9	5.74 d	8.4
6	142.9	8.04 d	8.4
1'	90.9	5.94 d	4.8
2'	75.8	4.17 t	4.8
3'	71.4	4.14 t	4.8
4'	86.5	3.99 m	12.0
5'	62.4	5' a: 3.82 dd 5' β: 3.72 dd	12, 2.8 12, 2.8

Πίνακας 33. Φασματοσκοπικά δεδομένα  $^1\text{H-NMR}$  και  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) της ουριδίνης.

## ii.) *trans*- $\pi$ -κουμαρικό οξύ (11)



To *trans*- $\pi$ -κουμαρικό οξύ έχει μοριακό τύπο  $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_3$  και μοριακό βάρος **164**.

Οι τιμές  $\delta$  των φασμάτων, οι σταθερές σύζευξης  $J$  και η πολλαπλότητα των κορυφών στα φάσματα  $^1\text{H-NMR}$  και  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) του μορίου περιέχονται στον Πίνακα 34. Το μοριακό βάρος του μορίου πιστοποιήθηκε με τη μέθοδο του χημικού ιονισμού [CIMS, m/z: 165 ( $M+H$ )<sup>+</sup>].

Άτομο	$\delta^{13}\text{C}$ σε ppm	$\delta^1\text{H}$ σε ppm	$J$ σε Hz
1	127.2	-	...
2	131.1	7.45 d	8.6
3	116.8	6.80 d	8.6
4	161.0	-	...
5	116.8	6.80 d	8.6
6	131.1	7.45 d	8.6
a	146.7	7.60 d	16.0
b	115.5	6.28 d	16.0
C=O	171.1	-	...

Πίνακας 34. Φασματοσκοπικά δεδομένα  $^1\text{H-NMR}$  και  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) του *trans*- $\pi$ -κουμαρικού οξέος.

### 1.3.3.στ) Στήλη A<sub>6</sub>

**Διαχωριζόμενο μίγμα:** Κλάσμα 166-205 στήλης A<sub>5</sub> (0.40 g).

**Στατική φάση:** Γέλη πυριτίου διαμέτρου 0.040-0.063 mm.

**Κινητή φάση:**  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  και  $\text{MeOH}$  σε αναλογίες αυξανόμενης πολικότητας.

**Διάμετρος στήλης:** 2 cm.

Η απομόνωση των ουσιών που πιθανότατα είναι στιλβενοειδή, ήταν ο σκοπός της στήλης A<sub>6</sub>. Η πλήρης πορεία της στήλης φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

ΚΛΑΣΜΑΤΑ ΣΤΗΛΗΣ Α <sub>6</sub>	ΔΙΑΛΥΤΕΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (% ΑΝΑΛΟΓΙΑ)	ΒΑΡΟΣ
1-22	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	42 mg
23-37	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 99/1	11 mg
38-52	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 98/2	18 mg
53-70	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 97/3	5 mg
71-95	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 95/5	23 mg
96-105	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 95/5	3 mg
106-140	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 93/7	90 mg
141-150	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 90/10	10 mg
151-170	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 90/10	30 mg
171-190	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 85/15	18 mg
191-200	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 80/20	15 mg
201-220	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 70/30	20 mg
221-240	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 60/40	22 mg
241-270	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 50/50	25 mg
271-285	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 40/60	20 mg
286-300	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 30/70	20 mg
301-330	MeOH	30 mg

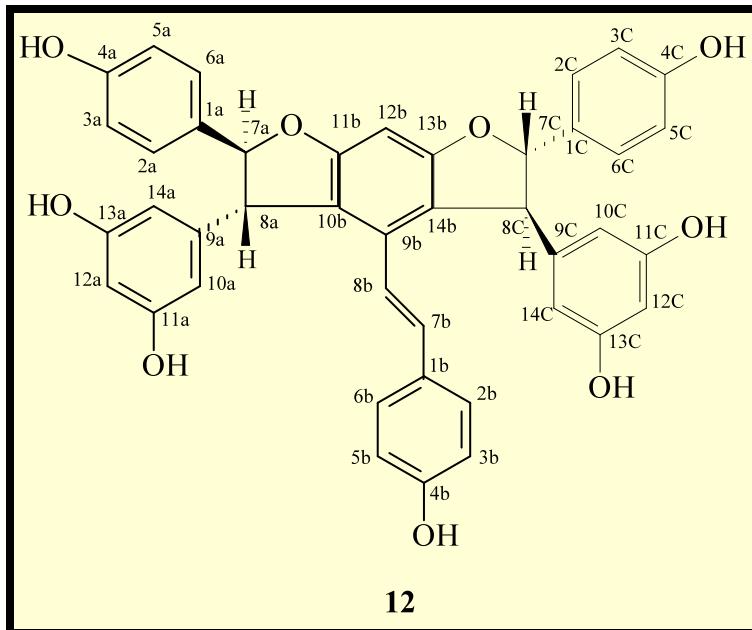
Πίνακας 35. Στήλη Α<sub>6</sub>.

Τα κλάσματα υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, σε συστήματα ανάπτυξης CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH: 99/1, 95/5, 90/10, παρατήρηση στο UV και ψεκασμό με διάλυμα θεικής βανιλλίνης. Εξήχθησαν τα εξής συμπεράσματα:

- Το **κλάσμα 53-70** εμφάνιζε μία κηλίδα που απορροφούσε στο UV-Vis και εμφάνιζε κυανό χρώμα όταν ψεκαζόταν με διάλυμα θεικής βανιλλίνης. Μετά από μελέτη με τη χρήση φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για το στιλβενοειδές **γνετίνη H**.
- Το **κλάσμα 96-105** εμφάνιζε μία βασική κηλίδα κατά τον χρωματογραφικό έλεγχο με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας η οποία απορροφούσε στο ορατό και το υπεριώδες και παρουσίαζε κυανό χρώμα μετά από ψεκασμό με διάλυμα θεικής βανιλλίνης. Μετά από φασματοσκοπική μελέτη με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) αποδείχθηκε ότι η ουσία αυτή ήταν το στιλβενοειδές **ε-βινιφερίνη** που έχει απομονωθεί στη **στήλη A<sub>2</sub>**.
- Στο **κλάσμα 141-150** παρατηρήθηκε μία κηλίδα στην TLC που επίσης παρέπεμπε σε στιλβένια και η φασματοσκοπική μελέτη με τη χρήση φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για την **trans-ρεσβερατρόλη** που επίσης έχει απομονωθεί στη **στήλη A<sub>2</sub>**.

Η ακριβής φασματοσκοπική ταυτότητα των δύο παραπάνω μορίων (**γνετίνη H και ε-βινιφερίνη**) παρουσιάζεται στις επόμενες παραγράφους.

### i.) Γνετίνη H (12)



Η γνετίνη H έχει μοριακό τύπο **C<sub>42</sub>H<sub>32</sub>O<sub>9</sub>** και μοριακό βάρος **680**.

Οι τιμές δ των φασμάτων, οι σταθερές σύζευξης *J* και η πολλαπλότητα των κορυφών στα φάσματα <sup>1</sup>H-NMR και <sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD) του μορίου περιέχονται στον Πίνακα 36. Το μοριακό βάρος του μορίου πιστοποιήθηκε με τη μέθοδο του χημικού ιονισμού [CIMS, m/z: 681 (M+H)<sup>+</sup>], ενώ μετρήθηκε και η στροφική ικανότητά του. Η ακριβής τιμή σε θερμοκρασία 22 °C, διαλύτη MeOH και με συγκέντρω ση του διαλύματος 0.52 g/100ml ήταν [α]<sup>22</sup> = + 160.7°.

Άτομο	$\delta^{13}\text{C}$ σε ppm	$\delta^1\text{H}$ σε ppm	$J$ σε Hz
1a	133.5	-	...
2a	128.1	7.22 <i>d</i>	8.5
3a	116.3	6.82 <i>d</i>	8.5
4a	158.3	-	...
5a	116.3	6.82 <i>d</i>	8.5
6a	128.1	7.22 <i>d</i>	8.5
7a	94.7	5.50 <i>d</i>	6.0
8a	58.8	4.45 <i>d</i>	6.0
9a	147.4	-	...
10a	107.4	6.20 <i>s</i>	...
11a	159.9	-	...
12a	102.1	6.20 <i>s</i>	...
13a	159.9	-	...
14a	107.4	6.20 <i>s</i>	...
1b	130.6	-	...
2b	128.6	6.74 <i>d</i>	8.5
3b	116.1	6.56 <i>d</i>	8.5
4b	158.1	-	...
5b	116.1	6.56 <i>d</i>	8.5
6b	128.6	6.74 <i>d</i>	8.5
7b	130.4	6.43 <i>s</i>	...
8b	122.4	6.43 <i>s</i>	...
9b	134.4	-	...
10b	120.2	-	...
11b	162.8	-	...
12b	91.5	6.48 <i>s</i>	...
13b	162.8	-	...
14b	120.2	-	...

<b>1c</b>	<b>133.5</b>	-	...
<b>2c</b>	<b>128.1</b>	<b>7.22 d</b>	<b>8.5</b>
<b>3c</b>	<b>116.3</b>	<b>6.82 d</b>	<b>8.5</b>
<b>4c</b>	<b>158.3</b>	-	...
<b>5c</b>	<b>116.3</b>	<b>6.82 d</b>	<b>8.5</b>
<b>6c</b>	<b>128.1</b>	<b>7.22 d</b>	<b>8.5</b>
<b>7c</b>	<b>94.7</b>	<b>5.50 d</b>	<b>6.0</b>
<b>8c</b>	<b>58.8</b>	<b>4.45 d</b>	<b>6.0</b>
<b>9c</b>	<b>147.4</b>	-	...
<b>10c</b>	<b>107.4</b>	<b>6.20 s</b>	...
<b>11c</b>	<b>159.9</b>	-	...
<b>12c</b>	<b>102.1</b>	<b>6.20 s</b>	...
<b>13c</b>	<b>159.89</b>	-	...
<b>14c</b>	<b>107.4</b>	<b>6.20 s</b>	...

Πίνακας 36. Φασματοσκοπικά δεδομένα  $^1\text{H-NMR}$  και  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) της γνετίνης H.

### 1.3.4) ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΤΙΚΗΣ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ (PREPARATIVE HPLC)

Η χρήση της παρασκευαστικής HPLC έγινε στο αρχικό κλάσμα που προέκυψε από την κατεργασία με ρητίνη XAD16 του μεθανολικού εκχυλίσματος, με σκοπό την απομόνωση μορίων που ήταν σε πολύ μικρή ποσότητα στο εκχύλισμα, κα θώς και ουσιών που δεν διαχωρίζονταν με τις συνηθισμένες χρωματογραφικές τεχνικές βαρύτητας. Στην πορεία της τεχνικής απομόνωσης με HPLC, παρακολουθούνταν οι κορυφές του χρωματογραφήματος στο UV (254 και 280 nm) και συγχρόνως συλλέγονταν τα κλάσματα στα οποία διαφαινόταν (από τις αντίστοιχες κορυφές) η ύπαρξη καθαρών ουσιών. Με τον τρόπο αυτό απομονώθηκαν δύσκολα διαχωριζόμενα μόρια που ήταν σε ελάχιστη ποσότητα. Πρέπει επιπλέον να σημειωθεί ότι πριν την έναρξη της διαδικασίας, είχε προηγηθεί αναλυτική HPLC με σειρά προτύπων ουσιών

για να υπάρχει μία ένδειξη του χρόνου που εμφανίζεται κάθε μόριο και να είναι πιο εύκολη η απομόνωσή τους.

#### 1.3.4.a) Στήλη A<sub>7</sub>

**Διαχωριζόμενο μίγμα:** Μεθανολικό κλάσμα μετά από κατεργασία του μεθανολικού εκχυλίσματος με ρητίνη XAD16 (0.1 g).

**Κινητή φάση :** Μίγμα H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>COOH: 99/1 και ACN (ακετονιτρίλιο) σε αναλογίες μειούμενης πολικότητας.

Ως διαλύτες χρησιμοποιήθηκαν μίγμα H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>COOH: 99/1 και ACN (ακετονιτρίλιο) και για κάθε κορυφή που αντιστοιχούσε σε καθαρό μόριο, συλλεγόταν το αντίστοιχο κλάσμα, ενώ για μεγαλύτερη σιγουριά τα υπόλοιπα κλάσματα που περιείχαν μίγματα συλλέγονταν σε κωνικές φιάλες και ελέγχονταν με TLC. Η ακριβής μέθοδος (αναλογία διαλυτών κάθε χρονική στιγμή και συνολική διάρκεια) περιγράφεται στον παρακάτω πίνακα.

ΧΡΟΝΟΣ (min)	ΔΙΑΛΥΤΕΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (%) ΑΝΑΛΟΓΙΑ
0	H <sub>2</sub> O
45	H <sub>2</sub> O/ ACN: 85/15
60	H <sub>2</sub> O/ ACN: 70/30
65	H <sub>2</sub> O/ ACN: 50/50
70	ACN

Πίνακας 37. Μέθοδος Στήλης A<sub>7</sub>.

Η πλήρης πορεία της στήλης (κορυφές, χρόνος και αριθμός κλασμάτων) φαίνεται στον Πίνακα 38.

ΚΛΑΣΜΑΤΑ ΣΤΗΛΗΣ Α <sub>7</sub>	ΚΟΡΥΦΕΣ	ΧΡΟΝΟΣ (min)
1-5	1	8.90
6-7	2	10.30
8-10	3	12.79
11-13	4	18.05
14	5	19.75
15-17	6	20.63
18-19	7	26.00
20	8	27.08
21	9	27.88
22	10	28.78
23	11	29.75
24	12	30.49
25	13	31.80
26-27	14	34.70
28	15	38.64
29	16	39.65
30	17	41.90
31	18	66.93
32	19	70.56

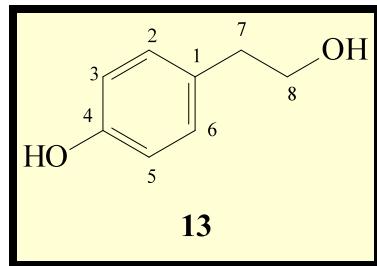
Πίνακας 38. Στήλη Α<sub>7</sub>.

Τα κλάσματα υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, σε σύστημα ανάπτυξης CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH: 90/10, παρατήρηση στο UV και ψεκασμό με διάλυμα θεικής βανιλλίνης. Εξήχθησαν τα εξής συμπεράσματα:

- Στο **κλάσμα 23 (κορυφή 11)** παρατηρήθηκε μία ουσία που απορροφούσε στο υπεριώδες και έπαιρνε βαθύ κόκκινο χρώμα κατά την επίδραση θεικής βανιλλίνης. Οι πληροφορίες που αντλήθηκαν από το NMR οδήγησαν στον καθορισμό της δομής του μορίου. Πρόκειται για την αρωματική αλκοόλη **τυροσόλη**.
- Το **κλάσμα 31** περιείχε το μόριο που αντιστοιχούσε στην **κορυφή 18** και εμφάνιζε τα χρωματογραφικά χαρακτηριστικά των αρωματικών οξέων (απορρόφηση στο UV και γκρίζο χρώμα μετά από ψεκασμό με θεική βανιλλίνη). Η χρήση φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το φαινολοξύ **συρινγκικό οξύ**.
- Πέρα από τα δύο παραπάνω μόρια παραλήφθηκαν επίσης μεταβολίτες που έχουν ήδη απομονωθεί κατά τους προηγούμενους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς, όπως η *trans*-ρεσβερατρόλη, η (+)-κατεχίνη, η (-)-επικατεχίνη και το γαλλικό οξύ.

Η ακριβής φασματοσκοπική ταυτότητα των δύο μορίων (**τυροσόλη** και **συρινγκικό οξύ**) παρουσιάζεται στις επόμενες παραγράφους.

### i.) Τυροσόλη (13)



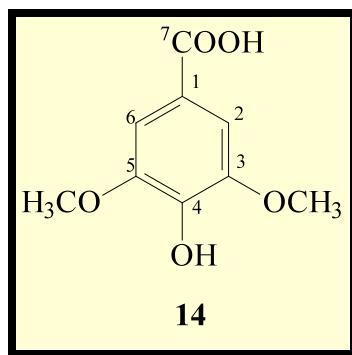
Η τυροσόλη έχει μοριακό τύπο **C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>** και μοριακό βάρος **138**.

Στον Πίνακα **39** αναφέρονται αναλυτικά οι τιμές δ των φασμάτων, οι σταθερές σύζευξης *J* και η πολλαπλότητα των κορυφών στα φάσματα <sup>1</sup>H-NMR και <sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD) της τυροσόλης. Το μοριακό βάρος του μορίου πιστοποιήθηκε με τη μέθοδο του χημικού ιονισμού [CIMS, m/z: 139 (M+H)<sup>+</sup>].

Άτομο	$\delta$ <sup>13</sup> C σε ppm	$\delta$ <sup>1</sup> H σε ppm	<i>J</i> σε Hz
<b>1</b>	<b>130.8</b>	-	...
<b>2</b>	<b>128.5</b>	<b>7.02 d</b>	<b>8.5</b>
<b>3</b>	<b>115.8</b>	<b>6.70 d</b>	<b>8.5</b>
<b>4</b>	<b>156.6</b>	-	...
<b>5</b>	<b>115.8</b>	<b>6.70 d</b>	<b>8.5</b>
<b>6</b>	<b>128.5</b>	<b>7.02 d</b>	<b>8.5</b>
<b>7</b>	<b>36.7</b>	<b>2.71 t</b>	<b>5.1</b>
<b>8</b>	<b>75.9</b>	<b>3.66 t</b>	<b>5.1</b>

Πίνακας **39**. Φασματοσκοπικά δεδομένα <sup>1</sup>H-NMR και <sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD) της τυροσόλης.

ii.) Συρινγκικό οξύ (14)



Το συρινγκικό οξύ έχει μοριακό τύπο **C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>** και μοριακό βάρος **198**.

Στον παρακάτω πίνακα αναφέρονται αναλυτικά οι τιμές δ των φασμάτων, οι σταθερές σύζευξης *J* και η πολλαπλότητα των κορυφών στα φάσματα <sup>1</sup>H-NMR και <sup>13</sup>C-NMR (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) του συρινγκικού οξέος. Το μοριακό βάρος του μορίου πιστοποιήθηκε με τη μέθοδο του χημικού ιονισμού [CIMS, m/z: 199 (M+H)<sup>+</sup>].

Άτομο	$\delta^{13}\text{C}$ σε ppm	$\delta^1\text{H}$ σε ppm	<i>J</i> σε Hz
1	122.0	-	...
2	108.3	7.72 s	...
3	148.7	-	...
4	142.2	-	...
5	148.7	-	...
6	108.3	7.72 s	...
7	169.2	-	...
2xOCH <sub>3</sub>	56.3	3.76 s	...

Πίνακας 40. Φασματοσκοπικά δεδομένα <sup>1</sup>H-NMR και <sup>13</sup>C-NMR (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) του συρινγκικού οξέος.

### 1.3.4.β) Στήλη A<sub>8</sub>

**Διαχωριζόμενο μίγμα:** Μεθανολικό κλάσμα μετά από κατεργασία του μεθανολικού εκχυλίσματος με ρητίνη XAD16 (0.1 g).

**Κινητή φάση:** Μίγμα H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>COOH: 99/1 και ACN (ακετονιτρίλιο) σε αναλογίες μειούμενης πολικότητας.

Επιχειρήθηκε εκ νέου μία παρασκευαστική χρωμα τογραφία HPLC, ώστε να απομονωθούν σε μεγαλύτερη ποσότητα τα μόρια που είχαν ήδη απομονωθεί, αλλά να διαχωριστούν πιθανότατα και επιπλέον ουσίες. Χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιοι διαλύτες και η ίδια μέθοδος (Πίνακας 41).

ΚΛΑΣΜΑΤΑ ΣΤΗΛΗΣ A <sub>8</sub>	ΚΟΡΥΦΕΣ	ΧΡΟΝΟΣ (min)
1-3	1	6.67
4-5	2	11.42
6-8	3	12.83
9-14	4	17.20
15	5	23.37
16	6	24.90
17	7	25.50
18	8	25.67
19-22	9	26.70
23-24	10	32.70
25	11	33.18
26-29	12	35.75
30-32	13	43.76
33-36	14	45.35
37-39	15	56.28
40	16	59.45
41-43	17	66.54
44-46	18	67.80
47	19	69.60
48	20	70.56
49	21	75.00

Πίνακας 41. Στήλη A<sub>8</sub>.

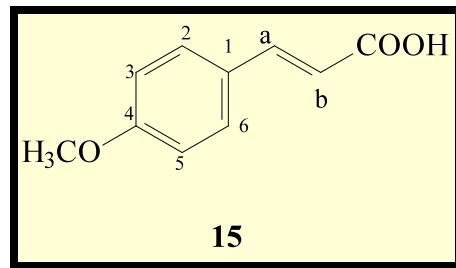
Τα κλάσματα υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, σε σύστημα ανάπτυξης CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH: 90/10, παρατήρηση στο UV και ψεκασμό με διάλυμα θεικής βανιλλίνης. Εξήχθησαν τα εξής συμπεράσματα:

- Στο κλάσμα 19-22 (κορυφή 9) παρατηρήθηκε μία ουσία που απορροφούσε στο υπεριώδες και χρωματιζόταν γκρίζα κατά την επίδραση θεικής βανιλλίνης. Οι πληροφορίες από το NMR οδήγησαν στην ταυτοποίηση του μορίου. Πρόκειται για το *trans*-π-μεθοξυκουμαρικό οξύ που ανήκει στην κατηγορία των φαινολοξέων.

- Στο **κλάσμα 40 (κορυφή 16)** παρατηρήθηκε μία ουσία που απορροφούσε στο υπεριώδες και χρωματίζόταν κίτρινη κατά την επίδραση θεικής βανιλλίνης . Οι πληροφορίες από το NMR οδήγησαν στην ταυτοποίηση του μορίου. Πρόκειται για το φλαβονοειδές **καιμπερόλη**.
- Επιπρόσθετα, η ***trans*-ρεσβερατρόλη**, η **(+)-κατεχίνη**, η **(-)-επικατεχίνη**, το **γαλλικό οξύ** και το ***trans*- $\pi$ -κουμαρικό οξύ** απομονώθηκαν πάλι όπως και σε προηγούμενες στήλες.

Η ακριβής φασματοσκοπική ταυτότητα των δύο μορίων (***trans*- $\pi$ -μεθοξυκουμαρικό οξύ και καιμπερόλη**) παρουσιάζεται στις επόμενες παραγράφους.

### i.) *trans*- $\pi$ -μεθοξυκουμαρικό οξύ (15)



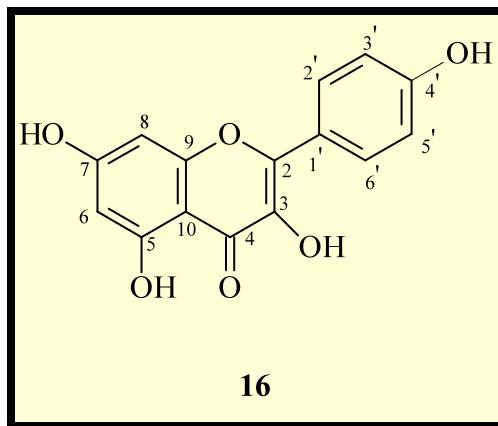
Το  $\pi$ -μεθοξυκουμαρικό οξύ έχει μοριακό τύπο **C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub>** και μοριακό βάρος **178**.

Οι τιμές δ των φασμάτων, οι σταθερές σύζευξης *J* και η πολλαπλότητα των κορυφών στα φάσματα <sup>1</sup>H-NMR και <sup>13</sup>C-NMR (DMSO) του μορίου περιέχονται στον Πίνακα 42. Το μοριακό βάρος του μορίου πιστοποιήθηκε με τη μέθοδο του χημικού ιονισμού [CIMS, m/z: 179 (M+H)<sup>+</sup>].

Άτομο	$\delta^{13}\text{C}$ σε ppm	$\delta^1\text{H}$ σε ppm	$J$ σε Hz
1	126.6	-	...
2	129.6	7.47 d	8.6
3	114.1	6.81 d	8.6
4	160.6	-	...
5	114.1	6.81 d	8.6
6	129.6	7.47 d	8.6
4-OCH <sub>3</sub>	56.5	3.85 s	...
a	143.5	7.63 d	16.1
b	116.3	6.29 d	16.1
C=O	167.5	-	...

Πίνακας 42. Φασματοσκοπικά δεδομένα  $^1\text{H-NMR}$  και  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO) του *trans*- $\pi$ -μεθοξυκονιμαρικού οξέος.

## ii.) Καιμπφερόλη (16)



Η καιμπφερόλη έχει μοριακό τύπο  $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$  και μοριακό βάρος 286.

Στον Πίνακα 43 αναφέρονται αναλυτικά οι τιμές  $\delta$  των φασμάτων, οι σταθερές σύζευξης  $J$  και η πολλαπλότητα των κορυφών στα φάσματα  $^1\text{H-NMR}$  και  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO) της καιμπφερόλης. Το μοριακό βάρος του μορίου πιστοποιήθηκε με τη μέθοδο του χημικού ιονισμού [CIMS, m/z: 287 ( $\text{M}+\text{H}^+$ )].

Άτομο	$\delta$ $^{13}\text{C}$ σε ppm	$\delta$ $^1\text{H}$ σε ppm	$J$ σε Hz
2	146.6	-	...
3	135.5	-	...
4	175.6	-	...
5	160.5	-	...
6	98.1	6.18 <i>d</i>	3.0
7	163.6	-	...
8	93.4	6.43 <i>d</i>	3.0
9	156.0	-	...
10	102.3	-	...
1'	121.5	-	...
2'	129.3	8.03 <i>d</i>	15.0
3'	115.3	6.91 <i>d</i>	15.0
4'	159.0	-	...
5'	115.3	6.91 <i>d</i>	15.0
6'	129.3	8.03 <i>d</i>	15.0

Πίνακας 43. Φασματοσκοπικά δεδομένα  $^1\text{H-NMR}$  και  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO) της καιμπερόλης.

## **1.4) ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΕΛΕΓΧΟΙ**

### **ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Στη συγκεκριμένη ενότητα περιγράφονται οι βιολογικές δοκιμασίες που πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση εκχυλισμάτων, κλασμάτων και μορίων από διάφορα στάδια της φυτοχημικής ανάλυσης των στεμφύλων. Χωρίζονται σε δύο κατηγορίες:

- **Τις *in vitro* βιολογικές δοκιμές** όπου εξετάζονται οι δράσεις των προϊόντων σε εργαστηριακή κλίμακα. Έγιναν δύο *in vitro* εργασίες που συνοψίζονται ως εξής:
  - Επιδράσεις πολυφαινολών και εκχυλισμάτων σταφυλιού από ελληνικές ποικιλίες *Vitis vinifera* στη θραύση του DNA που προκαλείται τεχνητά από τη μιτομυκίνη C και το ένζυμο τοποϊσομεράση I.
  - Αντιμεταλλαξιογόνος δράση πολυφαινολών και εκχυλισμάτων σταφυλιού από ελληνικές ποικιλίες *Vitis vinifera* ενάντια σε μεταλλάξεις που προκαλούνται τεχνητά σε στελέχη του βακτηρίου *Salmonella typhimurium* TA 102, από τις χημικές ουσίες μπλεομυκίνη και υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ).
- **Τις κλινικές δοκιμές** όπου εξετάζονται οι θετικές επιδράσεις του εμπλουτισμένου πολυφαινολικού κλάσματος που προέρχεται από την κατεργασία των στεμφύλων μίας ερυθρής ποικιλίας *Vitis vinifera* με ρητίνη XAD16, σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο (παρ. 1.2.1.δ).

Τα αποτελέσματα και των τριών συνολικά ελέγχων ήταν άκρως ενθαρρυντικά και εγκαινιάζουν νέες προοπτικές για το μέλλον, τόσο στη χημειοθεραπεία όσο και στην αντιμετώπιση των καρδιαγγειακών παθήσεων.

### **1.4.1) IN VITRO ΕΛΕΓΧΟΙ**

**1.4.1.a)** Επιδράσεις πολυφαινολών και εκχυλισμάτων σταφυλιού από ελληνικές ποικιλίες *Vitis vinifera* στη θραύση του DNA που προκαλείται τεχνητά από τη μιτομυκίνη C και το ένζυμο τοποϊσομεράση I

Τα τελευταία χρόνια έχουν πραγματοποιηθεί πολλές επιστημονικές εργασίες που κάνουν λόγο για αντικαρκινική δράση των εκχυλισμάτων διαφόρων ποικιλιών σταφυλιού και οίνου ενάντια σε καρκίνους του στήθους, του πνεύμονα και του στομάχου. Η δράση αυτή αποδίδεται κυρίως στις πολυφαινόλες που υπάρχουν στα σταφύλια (Torres J.L. et al., 2002; Meyer A.S. et al., 1997). Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση των μηχανισμών με τους οποίους τα εκχυλίσματα και οι πολυφαινόλες ασκούν τις χημειοπροστατευτικές και αντιογκογόνες δράσεις.

Χρησιμοποιήθηκαν λοιπόν τα μεθανολικά και υδατικά εκχυλίσματα από δύο ελληνικές ποικιλίες *Vitis vinifera*, κλάσματα εμπλουτισμένα σε πολυφαινόλες και τρία καθαρά πολυφαινολικά μόρια (γαλλικό οξύ, καφεϊκό οξύ και πρωτοκατεχικό οξύ) τα οποία ελέγχθηκαν με δύο *in vitro* δοκιμές. Πρώτος ήταν ο έλεγχος της αναστολής της θραύσης των αλυσίδων του DNA που προκαλείται από τη μιτομυκίνη C και δεύτερος ο έλεγχος της αναστολής του ενζύμου τοποϊσομεράση I.

Οι DNA τοποϊσομεράσεις είναι ένζυμα που καταλύουν τις μετατροπές που συμβαίνουν στο μόριο του DNA. Υπάρχουν δύο είδη τοποϊσομερασών που διαφέρουν στη λειτουργία και τον μηχανισμό δράσης τους. Δρουν με τη διαδοχική θραύση και επανασύνδεση της μίας (τοποϊσομεράση I) ή και των δύο αλυσίδων του DNA (τοποϊσομεράση II). Τα συγκεκριμένα ένζυμα διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στην αντιγραφή, τον συνδυασμό, τη μεταγραφή, τη συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων και τη διατήρηση της σταθερότητας των γονιδίων (Wang J.C., 1996). Εξαιτίας της συμμετοχής των παραπάνω ενζύμων σε πολλές κυτταρικές πορείες, θεωρούνται καλοί στόχοι για αντικαρκινικούς (Li T.K & Liu L.F., 2001) και αντιβακτηριακούς παράγοντες (Chakraborty A.K. & Majumder H.K., 1988). Ένας μεγάλος αριθμός πολυφαινολών που έχουν απομονωθεί από φυτά, έχουν χαρακτηριστεί ως αναστολείς τοποϊσομερασών (Chowdhury A.R. et al., 2002; Boege F. et al., 1996; Constantinou A. et al., 1995). Έχει

διαπιστωθεί η αναστολή της δράσης της τοποϊσομεράσης II από πολλές ουσίες οι οποίες έχουν χρησιμοποιηθεί ως αντικαρκινικοί παράγοντες , όπως ο τενιποσίδης , η δοξορούμπικίνη κ.α.) (Liu L.F., 1989). Αντίθετα, λίγα μόρια (π.χ. καμπτοθηκίνη) έχουν αποδειχθεί αναστολείς της τοποϊσομεράσης I (Hsiang Y.H. *et al.*, 1985). Γενικότερα πάντως, επειδή η τοποϊσομεράση I δεν επηρεάζεται από τον κυτταρικό κύκλο, θεωρείται πιο κατάλληλος στόχος για αντικαρκινικούς παράγοντες από την τοποϊσομεράση II (Sobhani A.M. *et al.*, 2002).

Η θραύση των αλυσίδων του DNA από ενεργές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species) θεωρείται ότι σχετίζεται με πολλές παθολογικές καταστάσεις, όπως η δημιουργία όγκων και η καρκινογένεση (Cerutti P.A., 1991). Ενεργές μορφές οξυγόνου θεωρούνται το μονό οξυγόνο ( $^1\text{O}_2$ ), το ανιόν υπεροξειδίου ( $\text{O}_2^-$ ), το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) και οι ρίζες υδροξυλίου ( $\text{OH}^-$ ) που παράγονται από ενζυματικές ή όχι αντιδράσεις στα κύτταρα (Halliwell B. & Gutteridge J.M.C., 1999). Οι παραπάνω μορφές δεν παρουσιάζουν την ίδια τοξικότητα αφού κάποιες μορφές ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^-$ ) αντιδρούν με λίγα μόρια στον ανθρώπινο οργανισμό, ενώ άλλες είναι πολύ δραστικές ( $\text{OH}^-$ ). Η μιτομυκίνη C είναι μία κινόνη που έχει απομονωθεί από τον μύκητα *Streptomyces caespitosus* και είναι γνωστό ότι με τη σύγχρονη παρουσία ιόντων  $\text{Fe}^{+2}$  παράγει ρίζες  $\text{OH}^-$  που προκαλούν βλάβες στο DNA (Krishna M.C. *et al.*, 1991). Όλοι οι πιθανοί αναστολείς τέτοιων βλαβών του DNA προσφέρουν ένα προστατευτικό παράγοντα για τις ασθένειες που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες (Ames B.N. *et al.*, 1995).

Τα πολύ ενδιαφέροντα αποτελέσματα καθώς και οι λεπτομέρειες που αφορούν τη συγκεκριμένη φαρμακολογική δοκιμή αναφέρονται παρακάτω.

## Υλικά και μέθοδοι

**Χημικά, ένζυμα και DNA:** Η προμήθεια της μιτομυκίνης C έγινε από την εταιρία Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd (Τόκιο, Ιαπωνία ). Τα δύο στελέχη του DNA (pGem-3z DNA και pBR322 DNA) που χρησιμοποιήθηκαν, προμηθεύθηκαν από τις εταιρίες Promega (Μάντισον, ΗΠΑ ) και New England BioLabs (Χερτς, Μεγάλη Βρετανία) αντίστοιχα. Η τοποϊσομεράση I προερχόταν επίσης από την εταιρία Promega

(Μάντισον, ΗΠΑ). Η διθειοθρεῖτόλη (DTT) αγοράστηκε από την εταιρία Applichem GmbH (Ντάρμσταντ, Γερμανία) και το αιθυλενοδιάμινο τετραοξικό οξύ (EDTA) από την εταιρία Pancreac (Βαρκελώνη, Ισπανία). Τέλος, οι συμπληρωματικές ποσότητες των μορίων που χρησιμοποιήθηκαν στα tests και τα άλλα χημικά, προέρχονταν από την εταιρία Sigma-Aldrich (Σεντ Λιούις, ΗΠΑ).

**Φυτικό υλικό:** Στον παρόντα βιολογικό έλεγχο χρησιμοποιήθηκαν το μεθανολικό και υδατικό εκχύλισμα των στεμφύλων της ερυθρής ποικιλίας *Μανδηλαριάς* (παρ. 1.3.3), το μεθανολικό κλάσμα που παραλήφθηκε μετά από την κατεργασία του μεθανολικού εκχυλίσματος της *Μανδηλαριάς* με ρητίνη XAD16 (παρ. 1.2.1.δ). Από το συγκεκριμένο κλάσμα πραγματοποιήθηκε και η απομόνωση των πολυφαινολικών μορίων γαλλικό οξύ, πρωτοκατεχικό οξύ και καφεϊκό οξύ (παρ. 1.3.3) τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στους ελέγχους. Ένα τμήμα από το υδατικό εκχύλισμα της ποικιλίας *Μανδηλαριάς* υποβλήθηκε σε κατεργασία με ρητίνη XAD16, ακολουθώντας την ίδια διαδικασία όπως και το μεθανολικό εκχύλισμα που περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 1.2.1.δ και το εμπλουτισμένο αλκοολικό κλάσμα που παραλήφθηκε, εντάχθηκε στις μελέτες. Τέλος, ένα τμήμα από το παραπάνω μεθανολικό κλάσμα εκχυλίστηκε δύο φορές με μίγμα EtOAc/H<sub>2</sub>O: 1/1 και μελετήθηκε το οξεικό αιθυλεστερικό κλάσμα.

Μελετήθηκαν επίσης το μεθανολικό και υδατικό εκχύλισμα των στεμφύλων της λευκής ποικιλίας *Ασύρτικου*, που προέκυψαν μετά από την εκχύλιση 4 Kg στεμφύλων, διαδοχικά με MeOH (3x14L) και H<sub>2</sub>O (3x14L) στους 45 °C. Κάθε εκχύλιση διαρκούσε 48 h.

**Έλεγχος της αναστολής της δράσης της μιτομυκίνης C:** Η αναστολή της δράσης της μιτομυκίνης C και η θραύση του DNA αξιολογήθηκε από τη μετατροπή του υπερελικωμένου pGem-3z διπλού DNA σε "χαλαρωμένες" και γραμμικές μορφές. Η διάσπαση του DNA έγινε με την ακόλουθη διαδικασία (Wakata A. et al., 1985):

- ✓ Κατεργασία του pGem-3z διπλού DNA (37.5 ng/10µl) με 143 µM FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 78 µM EDTA και 0.004% μιτομυκίνη C, με ή χωρίς την παρουσία του εξεταζόμενου δείγματος.
- ✓ Επώαση του μίγματος στους 37 °C για 60 min.

- ✓ Ανάμιξη με 3 μl διαλύματος που αποτελείται από 30% γλυκερόλης , 0.25% βρωμοφαινόλης και 0.25% ξυλενοκυανόλης (διάλυμα εκκίνησης).
- ✓ Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόσης 0.9%, με 40 mM Tris-acetate και 2 mM EDTA (pH 8.0), ως διάλυμα διεξαγωγής της διαδικασίας στα 100 V για 35 min.
- ✓ Χρωματισμός του DNA με 0.5 μg/ml ethidium bromide για 30 min.
- ✓ Εμβάπτιση του μίγματος σε H<sub>2</sub>O για 30 min.
- ✓ Τα διαλύματα φωτογραφήθηκαν με UV ακτινοβολία χρησιμοποιώντας κάμερα Polaroid DS-34 και η εικόνα ταυτοποιήθηκε με τη χρήση ενός λογισμικού Gel-Pro Analyzer version 3.0.

Η % αναστολή της διάσπασης του DNA που προκαλείται από τη μιτομυκίνη C, υπολογίζεται από τον εξής μαθηματικό τύπο:

$$\text{% Αναστολή} = \frac{(S - S_0)}{(S_{\text{control}} - S_0)} \times 100$$

όπου  $S$  είναι το % ποσοστό του υπερελικωμένου DNA το οποίο βρίσκεται μαζί με τη μιτομυκίνη C και το εξεταζόμενο δείγμα.

$S_0$  είναι το % ποσοστό του υπερ ελικωμένου DNA το οποίο βρίσκεται μαζί με τη μιτομυκίνη C, αλλά χωρίς το εξεταζόμενο δείγμα.

$S_{\text{control}}$  είναι το % ποσοστό του υπερελικωμένου DNA το οποίο βρίσκεται μόνο του, χωρίς τη μιτομυκίνη C και το εξεταζόμενο δείγμα.

Τα εξεταζόμενα δείγματα διαλύθηκαν σε MeOH σε συγκέντρωση 0.03%, καθώς σ' αυτή τη συγκέντρωση η MeOH δεν επιδρά στη δράση της μιτομυκίνης C. Το υδατικό εκχύλισμα της ποικιλίας *Aσύρτικου* δεν ελέγχθηκε επειδή διαλυόταν σε διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) που μπορεί σε συγκέντρωση 0.5% να προκαλέσει αναστολή στη δράση της μιτομυκίνης C.

**Έλεγχος της αναστολής της δράσης της τοποϊσομεράσης I:** Η δράση της τοποϊσομεράσης I ελέγχθηκε με κριτήριο τη ''χαλάρωση'' της διάταξης του pBR322

DNA με μία συγκεκριμένη διαδικασία (Dynan W.S. *et al.*, 1981), όπως περιγράφεται παρακάτω:

- ✓ Δημιουργία του μίγματος της τοποïσομεράσης (25 μl) που αποτελείται από 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 20% γλυκερόλη, 50 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.2 μg pBR322 και 1 μονάδα ενζύμου (είναι η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για να μετατρέψει 0.5 μg υπερελικωμένου DNA στη χαλαρή του μορφή κάτω από τις σταθερές συνθήκες του πειράματος).
- ✓ Οι αντιδράσεις έγιναν στους 37 °C για 30 min.
- ✓ Η ολοκλήρωση των αντιδράσεων έγινε με την προσθήκη 5 μl διαλύματος που αποτελείται από 30% γλυκερόλης, 0.25% βρωμοφαινόλης και 0.25% ξυλενοκυανόλης (διάλυμα εκκίνησης).
- ✓ Ηλεκτροφόρηση του μίγματος σε γέλη αγαρόσης 0.8%, με 40 mM Tris-acetate και 2 mM EDTA (pH 8.0) ως διάλυμα διεξαγωγής της διαδικασίας στα 45 V για 30 min.
- ✓ Χρωματισμός του DNA με 0.5 μg/ml ethidium bromide για 30 min.
- ✓ Εμβάπτιση του μίγματος σε H<sub>2</sub>O για 30 min.
- ✓ Τα διαλύματα φωτογραφήθηκαν με UV ακτινοβολία χρησιμοποιώντας κάμερα Polaroid DS-34 και η εικόνα ταυτοποιήθηκε με τη χρήση ενός λογισμικού Gel-Pro Analyzer version 3.0.
- ✓ Ως διαλύτες για τα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν η MeOH και το DMSO που σε συγκεντρώσεις 0.03 και 0.5% αντίστοιχα δεν επηρεάζουν το αποτέλεσμα.

Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέσος όρος±στατιστικό σφάλμα (n=3).

### Αποτελέσματα

**Επίδραση των εκχυλισμάτων του σταφυλιού και των πολυφαινολών στην προκαλούμενη από τη μιτομυκίνη C, διάσπαση της αλυσίδας του DNA:** Όταν το DNA pGEM-3z επωάστηκε με μιτομυκίνη C, παρουσία ιόντων Fe<sup>+2</sup> στους 37 °C για 60 min, συντελέστηκε η θραύση των αλυσίδων του και η υπερελικωμένη μορφή άρχισε να μετατρέπεται στις ''χαλαρωμένες'' και γραμμικές μορφές.

Το μεθανολικό εκχύλισμα της ποικιλίας *Aσύρτικου* ανέστειλε τη θραύση των αλυσίδων του DNA με ένα δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Η ανασταλτική δράση του συγκεκριμένου εκχυλίσματος σε συγκέντρωση 400 µg/ml και 200 µg/ml ήταν περίπου 46% και 36% αντίστοιχα. Το μεθανολικό και το υδατικό εκχύλισμα της *Μανδηλαριάς* είχαν επίσης ανασταλτική δράση, σαφώς όμως μικρότερη. Σε συγκέντρωση 400 µg/ml το μεθανολικό εκχύλισμα ανέστειλε τη μετατροπή της δομής του DNA στη χαλαρή μορφή κατά 19% και το υδατικό κατά 38%.

Σ' αντίθεση με την ανασταλτική δράση των παραπάνω εκχυλισμάτων, το εμπλουτισμένο σε πολυφαινόλες κλάσμα του EtOAc και το μεθανολικό κλάσμα από το υδατικό εκχύλισμα της *Μανδηλαριάς* επέφεραν αύξηση στο ποσοστό μετατροπής του DNA, υποδεικνύοντας προοξειδωτική δράση. Συγκεκριμένα, το κλάσμα EtOAc αύξησε τη θραύση του DNA, καθώς παρατηρήθηκε αύξηση των ''χαλαρωμένων'' μορφών σε σχέση με το ποσοστό τους, πριν προστεθεί το εξεταζόμενο κλάσμα (δηλαδή όταν υπήρχε μόνο η μιτομυκίνη C). Το μέγιστο από οτέλεσμα σημειώθηκε όταν η συγκέντρωση του κλάσματος ήταν 200 µg/ml, ενώ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (400 µg/ml και 600 µg/ml) η δράση μειωνόταν. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στο μεθανολικό κλάσμα από το υδατικό εκχύλισμα όπου σε συγκεντρώσεις της τάξης των 200 µg/ml και των 400 µg/ml προκλήθηκε μερικός θρυμματισμός του DNA, υποδεικνύοντας επίσης προοξειδωτική δράση. Το μεθανολικό κλάσμα από το μεθανολικό εκχύλισμα σε συγκεντρώσεις 50, 100 και 600 µg/ml δεν εμφάνισε καμία δραστικότητα.

Όσον αφορά τα πολυφαινολικά μόρια που εξετάστηκαν, επέδειξαν συνεργιστική δράση στη δραστικότητα της μιτομυκίνης C.

Τα συνολικά αποτελέσματα αναφέρονται στον Πίνακα 44.

Εξεταζόμενο δείγμα		% Ποσοστό DNA στις 3 μορφές		
Εξεταζόμενο δείγμα	Δόση	Υπερελικωμένη	''Χαλαρωμένη''	Γραμμική
<b>Μεθανολικό εκχύλισμα <i>Aσύρτικον</i></b>	Έλεγχος	98±2	2±2	MM
	Μιτομυκίνη C	29±3	71±3	MM
	50 µg/ml	30±2	70±2	MM
	100 µg/ml	33±3	67±3	MM
	200 µg/ml	54±2	46±2	MM
	400 µg/ml	61±4	39±4	MM
<b>Μεθανολικό εκχύλισμα <i>Μανδηλαριάς</i></b>	Έλεγχος	82±7	18±7	MM
	Μιτομυκίνη C	20±2	80±2	MM
	100 µg/ml	22±2	78±2	MM
	200 µg/ml	28±3	72±3	MM
	400 µg/ml	32±1	68±1	MM
<b>Υδατικό εκχύλισμα <i>Μανδηλαριάς</i></b>	Έλεγχος	94±5	6±5	MM
	Μιτομυκίνη C	29±3	71±3	MM
	100 µg/ml	32±1	68±1	MM
	200 µg/ml	35±2	65±2	MM
	400 µg/ml	54±3	46±3	MM
<b>Κλάσμα EtOAc από το υδατικό εκχύλισμα <i>Μανδηλαριάς</i></b>	Έλεγχος	98±2	MM	MM
	Μιτομυκίνη C	41±2	51±2	8±4
	100 µg/ml	18±2	66±2	16±1
	200 µg/ml	MA	MA	MA
	400 µg/ml	21±3	64±4	16±1
	600 µg/ml	28±1	59±5	13±6
<b>Μεθανολικό κλάσμα από το υδατικό εκχύλισμα <i>Μανδηλαριάς</i></b>	Έλεγχος	87±4	13±4	MM
	Μιτομυκίνη C	14±3	71±3	15±5
	50 µg/ml	9±3	74±5	17±2
	100 µg/ml	16±2	72±1	11±3
	200 µg/ml	MA	MA	MA
	400 µg/ml	MA	MA	MA
<b>Γαλλικό οξύ</b>	Έλεγχος	98±2	MM	MM
	Μιτομυκίνη C	45±6	55±6	MM
	10 µM	31±2	69±2	MM
	50 µM	20±4	80±4	MM
	100 µM	16±3	84±3	MM
<b>Καφεϊκό οξύ</b>	Έλεγχος	97±5	MM	MM
	Μιτομυκίνη C	MM	92±2	8±2
	10 µM	MM	91±1	9±1
	50 µM	MM	81±3	19±3
	100 µM	MM	77±3	23±3
<b>Πρωτοκατεχικό οξύ</b>	Έλεγχος	86±6	14±4	MM
	Μιτομυκίνη C	MM	79±2	21±3
	10 µM	MM	63±4	37±4
	50 µM	MM	56±2	44±2
	100 µM	MM	45±5	55±5

Πίνακας 44. Αποτελέσματα *in vitro* ελέγχου αναστολής της δράσης της μιτομυκίνης C.

**Σημείωση:** MM: Μη μετρήσιμη, τιμή <5%.

MA: Μη ανιχνεύσιμη τιμή εξαιτίας του μερικού τεμαχισμού του DNA.

**Επίδραση των εκχυλισμάτων του σταφυλιού και των πολυφαινολών στη δράση της τοποϊσομεράσ ης I:** Η αναστολή της καταλυτικής δράσης της τοποϊσομεράσης I μελετήθηκε με την *in vitro* δοκιμή της μείωσης της θραύσης του μορίου του DNA.

Το μεθανολικό εκχύλισμα της ποικιλίας *Μανδηλαριάς* ελάττωσε τη θραύση του pBR322 υπερ ελικωμένου DNA με ένα δοσοεξαρτώ μενο τρόπο . Σε συγκέντρωση 50 μg/ml προκάλεσε αναστολή 65% και σε συγκέντρωση 200 μg/ml η αναστολή άγγιζε το 83%. Παράλληλα, το μεθανολικό κλάσμα του ίδιου εκχυλίσματος σε συγκέντρωση 50 μg/ml προξένησε αναστολή της δράσης της τοποϊσομεράσης κατά 70%. Το υδατικό εκχύλισμα της ίδιας ποικιλίας εκδήλωσε αναστολή της ενζυμικής δραστηριότητας κατά 78% και 88%, σε συγκεντρώσεις 50 μg/ml και 100 μg/ml αντίστοιχα. Το κλάσμα EtOAc του υδατικού εκχυλίσματος μείωσε τη δράση της τοποϊσομεράσης κατά 84% και 95%, σε συγκεντρώσεις 20 μg/ml και 50 μg/ml αντίστοιχα.

Το υδατικό εκχύλισμα της ποικιλίας *Ασύρτικου* εκδήλωσε ανασταλτική δράση κατά 97% σε συγκέντρωση 200 μg/ml. Το μεθανολικό εκχύλισμα της ίδιας ποικιλίας εκδήλωσε δραστικότητα της τάξης του 77% και 91%, σε συγκεντρώσεις 50 μg/ml και 100 μg/ml αντίστοιχα.

Από τα πολυφαινολικά μόρια, το καφεϊκό και το πρωτοκατεχικό οξύ επέδειξαν δράση 85% και 80% αντίστοιχα, σε συγκέντρωση 20 μM. Αντίθετα, το γαλλικό οξύ δεν εμφάνισε καμία δραστικότητα.

Τα συνολικά αποτελέσματα της συγκεκριμένης δοκιμής παρουσιάζονται στον Πίνακα 45.

Εξεταζόμενο δείγμα	Δόση	% Αναστολή
<b>Μεθανολικό εκχύλισμα <i>Μανδηλαριάς</i></b>	800 μg/ml	97±2
	400 μg/ml	93±5
	200 μg/ml	89±3
	100 μg/ml	83±3
	50 μg/ml	66±4
<b>Υδατικό εκχύλισμα <i>Μανδηλαριάς</i></b>	200 μg/ml	89±2
	100 μg/ml	88±3
	50 μg/ml	79±4
<b>Μεθανολικό εκχύλισμα <i>Ασύρτικου</i></b>	200 μg/ml	96±3
	100 μg/ml	91±4
	50 μg/ml	77±6
<b>Υδατικό εκχύλισμα <i>Ασύρτικου</i></b>	200 μg/ml	97±2
	100 μg/ml	ΜΔ
	50 μg/ml	ΜΔ
<b>Κλάσμα EtOAc από το υδατικό εκχύλισμα <i>Μανδηλαριάς</i></b>	50 μg/ml	95±3
	20 μg/ml	84±3
	10 μg/ml	ΜΔ
<b>Μεθανολικό κλάσμα από το υδατικό εκχύλισμα <i>Μανδηλαριάς</i></b>	50 μg/ml	ΜΔ
<b>Μεθανολικό κλάσμα από το μεθανολικό εκχύλισμα <i>Μανδηλαριάς</i></b>	50 μg/ml	70±6
	20 μg/ml	ΜΔ
	10 μg/ml	ΜΔ
<b>Γαλλικό οξύ</b>	50 μM	ΜΔ
<b>Καφεϊκό οξύ</b>	50 μM	96±4
	20 μM	86±2
	10 μM	ΜΔ
<b>Πρωτοκατεχικό οξύ</b>	50 μM	94±5
	20 μM	82±3
	10 μM	ΜΔ

Πίνακας 45. Αποτελέσματα *in vitro* ελέγχου αναστολής της δράσης του ενζύμου τοποϊσομεράσης I.

**Σημείωση:** ΜΔ: Δεν υπήρξε αναστολή της δράσης του ενζύμου.

### Αξιολόγηση αποτελεσμάτων

**Επίδραση των πολυφαινολών και των εκχυλισμάτων του σταφυλιού στη δράση της μιτομυκίνης C:** Το μεθανολικό εκχύλισμα του *Ασύρτικου*, το μεθανολικό και το υδατικό εκχύλισμα της *Μανδηλαριάς* εμφάνισαν 42%, 19% και 31% αντίστοιχα, μείωση στη θραύση του DNA σε συγκέντρωση 400 μg/ml. Η ανασταλτική αυτή δράση στη θραύση του DNA από τις ενεργές μορφές οξυγόνου, δεν έχει αναφερθεί ξανά στη διεθνή βιβλιογραφία και ίσως αποτελεί την εξήγηση για την αντιμεταλλαξιογόνο και αντικαρκινική δράση των εκχυλισμάτων των σταφυλιών.

Αντίθετα, οι πολυφαινόλες που μελετήθηκαν (γαλλικό οξύ, καφεϊκό οξύ και πρωτοκατεχικό οξύ), ενίσχυσαν την ικανότητα της μιτομυκίνης C. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει μία προοξειδωτική δράση των πολυφαινολικών μορίων. Άλλωστε, πολλές πολυφαινόλες φυτικής προέλευσης, παρουσία μετάλλων όπως Fe, δρουν προοξειδωτικά και προκαλούν βλάβες στο DNA, σε λιπίδια και άλλα βιολογικά μόρια (Li A.S. *et al.*, 2000; Yamanaka N. *et al.*, 1997; Li Y. & Trush M.A., 1994). Αν και φαίνεται παράδοξο να συμβάλλουν τα πολυφαινολικά μόρια στη χημειοθεραπεία κατά του καρκίνου, τη στιγμή που προκαλούν βλάβες στο μόριο του DNA, θεωρείται ότι ασκούν εκλεκτικά τη δράση τους σε καρκινικά κύτταρα και όχι σε υγιή, όπως έχει αποδειχθεί για κάποιες πολυφαινόλες του τσαγιού (Yamamoto T. *et al.*, 2003).

Την ίδια προοξειδωτική δράση εμφάνισαν και τα εμπλουτισμένα σε πολυφαινόλες κλάσματα της ποικιλίας *Μανδηλαριάς*, κάτι που είναι σύμφωνο με τις προηγούμενες μετρήσεις. Η αντίθετη δράση μεταξύ του μεθανολικού εκχυλίσματος και του εμπλουτισμένου μεθανολικού κλάσματος, εξηγείται πιθανότατα με την παρουσία στο συνολικό εκχύλισμα μη πολυφαινολικών ουσιών που δεν απαντούν στο μεθανολικό κλάσμα και είναι υπεύθυνες για την προστατευτική δράση. Άλλη μία πιθανή εξήγηση είναι η διαφορετική σύστασή τους σε πολυφαινόλες. Είναι αποδεκτό ότι κάποιες πολυφαινόλες, όπως η κατεχίνη προστατεύουν το DNA από τη δράση των ελεύθερων ριζών (Yamagishi M. *et al.*, 2001), ενώ άλλες όπως αυτές που μελετώνται στην παρούσα μελέτη επιτείνουν τη διάσπαση του DNA. Συνεπώς, ανάλογα με την ποσότητα και τη δράση των επιμέρους μορίων, επικρατεί πότε η μία και πότε η άλλη δράση.

**Επίδραση των πολυφαινολών και των εκχυλισμάτων του σταφυλιού στη δράση της τοποϊσομεράσης I:** Σε συγκέντρωση 200 µg/ml όλα τα εκχυλίσματα ανέστειλαν την καταλυτική δράση του ενζύμου. Επιπρόσθετα, πρέπει να αναφερθεί ότι τα εκχυλίσματα της ποικιλίας *Μανδηλαριάς*, εμφάνισαν συνολικά μεγαλύτερη ανασταλτική ισχύ από αυτά της ποικιλίας *Ασύρτικου*. Είναι χαρακτηριστικό ότι το υδατικό εκχύλισμα της *Μανδηλαριάς* σε συγκέντρωση 50 µg/ml εμφάνισε μείωση της δράσης της τοποϊσομεράσης I κατά 79%, ενώ το υδατικό εκχύλισμα του *Ασύρτικου* δεν εκδήλωσε καμία δράση στην ίδια συγκέντρωση. Στα εκχυλίσματα της ποικιλίας *Μανδηλαριάς* δεν παρατηρήθηκε ουσιαστική διαφορά στη δράση μεταξύ μεθανολικού

και υδατικού εκχυλίσματος, ενώ το μεθανολικό εκχύλισμα του *Ασύρτικου* ήταν σαφώς πιο δραστικό από το αντίστοιχο υδατικό.

Το κλάσμα EtOAc που προερχόταν από το υδατικό εκχύλισμα της *Μανδηλαριάς*, εκδήλωσε μεγαλύτερη δράση σε σχέση με το υδατικό εκχύλισμα αφού σε συγκέντρωση 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  μείωνε τη δράση του ενζύμου κατά 84%, ενώ το υδατικό εκχύλισμα εμφάνιζε την ίδια δραστικότητα σε συγκέντρωση 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Αυτό οφείλεται πιθανότατα στο μεγαλύτερο ποσοστό πολυφαινολών που περιέχει το κλάσμα EtOAc, καθώς έχει προέλθει από το υδατικό εκχύλισμα με εκχύλιση με EtOAc που κατακρατά τις πολυνφαινόλες και στο υδατικό κλάσμα περνούν τα σάκχαρα. Είναι σημαντικό επίσης να τονιστεί ότι το μεθανολικό κλάσμα που προερχόταν από το μεθανολικό εκχύλισμα της *Μανδηλαριάς*, εκδήλωσε δράση της ίδιας τάξης περίπου με το μεθανολικό εκχύλισμα αν και είναι πιο πλούσιο σε πολυφαινόλες.

Όσον αφορά τις καθαρές ουσίες που ελέγχθηκαν, το καφεϊκό και το πρωτοκατεχικό οξύ εμφάνισαν σημαντική δραστικότητα. Είναι χαρακτηριστικό ότι σε συγκέντρωση 20  $\mu\text{M}$ , το καφεϊκό οξύ ελάττωσε τη δράση του ενζύμου κατά 86% και το πρωτοκατεχικό οξύ κατά 82%. Αποδεικνύεται λοιπόν ότι πέρα από την αθροιστική δράση που εκδηλώνουν τα πολυφαινολικά μόρια στα εκχυλίσματα, εμφανίζουν και δραστικότητα το καθένα ξεχωριστά.

Συμπερασματικά, θα μπορούσε να σημειωθεί ότι η κεντρική διαπίστωση της συγκεκριμένης *in vitro* δοκιμής ήταν ότι τα εκχυλίσματα ελληνικών σταφυλιών είναι αποτελεσματικά στην αναστολή της τοποϊσομεράσης I. Η αναχαίτιστική αυτή δραστικότητα προσφέρει άλλο ένα μηχανισμό που επεξηγεί τις αντιογκογόνες και χημειοπροστατευτικές ενέργειές των εκχυλισμάτων.

Επιπλέον, τα εκχυλίσματα αναστέλλουν την προκαλούμενη από τη μιτομυκίνη C διάσπαση του DNA και μπορούν να δράσουν προστατευτικά ενάντια στις ελεύθερες ρίζες και τις καταστροφικές για τα κύτταρα συνέπειές τους. Είναι ενδιαφέρον ακόμα ότι κάποια κλάσματα εμπλουτισμένα σε πολυφαινόλες εκδηλώνουν προοξειδωτικές ενέργειες που μπορούν εν δυνάμει να είναι αξιοποιήσιμες στη θεραπεία του καρκίνου.

Αυτό επιβεβαιώνεται μάλιστα από το γεγονός ότι κάποια πολυφαινολικά μόρια φυτικής προέλευσης βρίσκονται τώρα στις φάσεις II και III κλινικών δοκιμών ως αντικαρκινικά φάρμακα.

**1.4.1.β)** Αντιμεταλλαξιογόνος δράση πολυφαινολών και εκχυλισμάτων σταφυλιού από ελληνικές ποικιλίες *Vitis vinifera* ενάντια σε μεταλλάξεις που προκαλούνται τεχνητά σε στελέχη του βακτηρίου *Salmonella typhimurium* TA 102, από τις χημικές ουσίες μπλεομυκίνη και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Η άποψη που επικρατεί στις μέρες μας, είναι ότι οι βλάβες στο DNA και ειδικότερα οι οξειδωτικές, είναι υπεύθυνες για παθήσεις, όπως οι καρδιαγγειακές και οι νευροεκφυλιστικές (π.χ. νόσοι Parkinson, Alzheimer) και για την πρόωρη γήρανση των κυττάρων (Finkel T. & Holbroock N.J., 2000; Wiseman H. et al., 1995; Mc Cord J.M., 1993). Επιπλέον, πολλές εργασίες αποδεικνύουν ότι εκχυλίσματα σταφυλιού είναι νιχυρά αντιοξειδωτικά και δρούν αποτελεσματικά κατά των ελεύθερων ριζών (Murthy K.N.C. et al., 2002; Bagchi D. et al., 2000). Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση της δραστικότητας των εκχυλισμάτων και των πολυφαινολών του σταφυλιού ως ενός νέου χημειοπροστατευτικού μηχανισμού, ενάντια στην καταστροφή που προκαλείται στο DNA από τις ενεργές μορφές οξυγόνου. Επίσης, επειδή πολλές ερευνητικές μελέτες υποστηρίζουν ότι τα περισσότερα αντιοξειδωτικά και πιο αποτελεσματικά μόρια στα σταφύλια είναι οι πολυφαινόλες (Gonzalez-Paramas A.M. et al., 2004; Landrault N. et al., 2001), συγχρόνως με τα υδατικά και μεθανολικά εκχυλίσματα των ποικιλιών *Μανδηλαριάς* και *Ασύρτικου*, μελετήθηκαν εμπλουτισμένα σε πολυφαινόλες κλάσματα και απομονωμένες πολυφαινολικές ο υσίες (*trans*-ρεσβερατρόλη, κερκετίνη, (+)-κατεχίνη, (-)-επικατεχίνη, γαλλικό οξύ και πρωτοκατεχικό οξύ).

Ο έλεγχος βασίστηκε στην αντιμεταλλαξιογόνο δοκιμή Ames που χρησιμοποιείται ευρύτατα στη μελέτη αντιμεταλλαξιογόνων παραγόντων (Grey C.E. & Adlercreutz P., 2003; Santana-Rios G. et al., 2001). Το στέλεχος *Salmonella typhimurium* TA102 χρησιμοποιήθηκε στη δοκιμή επειδή παρουσιάζει ευαισθησία σε

οξειδωτικούς παράγοντες (Levin D.E. *et al.*, 1982). Ως οξειδωτικοί παράγοντες χρησιμοποιήθηκαν η μπλεομυκίνη και το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ). Η μπλεομυκίνη είναι ένα αντιβιοτικό γλυκοπεπτιδικής φύσης που εκδηλώνει μεταλλαξιογόνο δράση η οποία περιλαμβάνει την ενεργοποίηση του μοριακού οξυγόνου, παρουσία δισθενών ιόντων σιδήρου ( $Fe^{+2}$ ) και την παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου, όπως υπεροξειδικό ανιόν ( $O_2^-$ ) και ρίζες υδροξυλίου ( $OH^-$ ). Είναι γνωστό ότι οι προηγούμενες ενεργές μορφές προκαλούν βλάβες στις αλυσίδες του DNA (Evans P.J. & Halliwell B., 1994; Dorr R.T., 1992). Το  $H_2O_2$  παράγεται ενδοκυτταρικά στη διάρκεια του κυτταρικού μεταβολισμού ενζυματικά ή όχι.

Τα πολύ ενδιαφέροντα αποτελέσματα καθώς και οι λεπτομέρειες που αφορούν τη συγκεκριμένη φαρμακολογική δοκιμή αναφέρονται παρακάτω.

### Υλικά και μέθοδοι

**Χημικά:** Η μπλεομυκίνη και το  $H_2O_2$  προμηθεύτηκαν από τις εταιρίες Nippon Kayaku Co., Ltd., (Τόκυο, Ιαπωνία) και Merck (Ντάρμσταντ, Γερμανία) αντίστοιχα. Οι επιπλέον ποσότητες των πολυφαινολικών μορίων που χρησιμοποιήθηκαν, προμηθεύτηκαν από την εταιρία Sigma (Σεντ Λιούις, ΗΠΑ). Το χλωριούχο νάτριο, το άνυδρο φωσφορικό διβασικό κάλιο, η MeOH και η EtOH προμηθεύτηκαν από τη Merck. Το διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO), το ένυδρο θειϊκό μαγνήσιο, η D(+)-γλυκόση, η L-ιστιδίνη, η αμπικιλίνη, η τετρακυκλίνη και το ένυδρο κιτρικό οξύ αγοράστηκαν από τη Sigma. Τέλος, η προμήθ εια του άγαρ έγινε από την εταιρία Genaxis (Μοντινί λε Μπρετονέ, Γαλλία) και του θρεπτικού ζωμού πο. 2 από την εταιρία Oxoid (Μπάσινγκτοκ, Μεγάλη Βρετανία).

**Φυτικό υλικό:** Στον παρόντα βιολογικό έλεγχο χρησιμοποιήθηκαν τα μεθανολικά και υδατικά εκχυλίσματα α των στεμφύλων των ποικιλιών *Manodelaria*ς (ερυθρή) και *Aσύρτικου* (λευκή), το μεθανολικό κλάσμα μετά την κατεργασία του μεθανολικού εκχυλίσματος της *Manodelaria*ς με ρητίνη XAD16, το μεθανολικό κλάσμα μετά την κατεργασία του υδατικού εκχυλίσματος της *Manodelaria*ς με ρητίνη XAD16 και το κλάσμα EtOAc που προέκυψε από το υδατικό εκχύλισμα, με εκχύλιση δύο φορές

με μίγμα EtOAc/H<sub>2</sub>O: 1/1. Η παραγωγή όλων των παραπάνω εκχυλισμάτων και κλασμάτων έχει περιγραφεί σε προηγούμενες παραγράφους.

Από το μεθανολικό κλάσμα μετά την κατεργασία του μεθανολικού εκχυλίσματος της *Μανδηλαριάς* με ρητίνη XAD16 απομονώθηκαν οι ουσίες *trans*-ρεσβερατρόλη, κερκετίνη, (+)-κατεχίνη, (-)-επικατεχίνη, γαλλικό οξύ και πρωτοκατεχικό οξύ (παρ. 1.2.1.δ, 1.3.3).

**Έλεγχος της αναστολής της δράσης της μπλεομυκίνης και του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στο βακτήριο *Salmonella typhimurium* TA102:** Το στέλεχος *Salmonella typhimurium* TA102 ελέγχθηκε αρχικά για να επιβεβαιωθούν οι γενετικές τους ιδιότητες, χρησιμοποιώντας τη διαδικασία των Maron και Ames (Maron D.M. & Ames B.N., 1983). Αρχικά, η καλλιέργεια του στελέχους που βρισκόταν υπό ψύξη (-80 °C), αφέθηκε να λιώσει σε θερμοκρασία δωματίου και 300 μl από την καλλιέργεια ενοφθαλμίστηκαν σε 30 ml θρεπτικού υλικού σε αυτόκλειστη συσκευή. 10 h πριν από την έναρξη του πειράματος, η ενοφθαλμισμένη καλλιέργεια εισήχθη σε αναδευτήρα (100 rpm) και επωάστηκε στο σκοτάδι στους 37 °C, μέχρι τα βακτηριακά κύτταρα να φτάσουν σε μία πυκνότητα από 1-2x10<sup>9</sup> μονάδες αποικίας σε 1 ml (CFU/ml).

Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Mortelmans K. & Zeiger E., 2000) και περιελάμβανε την τριπλή επανάληψη κάθε πειράματος ξεχωριστά για καθένα από τους δύο οξειδωτικούς παράγοντες (μπλεομυκίνη και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) που χρησιμοποιήθηκαν. Σε κάθε περίπτωση έγινε η προσθήκη των παρακάτω συστατικών σε αποστειρωμένα σωληνάρια στους 45 °C:

- ✓ 2 ml άγαρ
- ✓ 100 μl βακτηριακής καλλιέργειας.
- ✓ 50 μl διαλύματος μπλεομυκίνης ή H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- ✓ 50 μl αντιοξειδωτικού διαλύματος.

Τα συστατικά των σωληναρίων αναμίχτηκαν και ακολούθησε η έγχυσή τους σε πλάκα με άγαρ. Όταν το άγαρ έπηξε, τα τρυβλία αναστράφηκαν και τοποθετήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο (37 °C) για 48 h. Στη συνέχεια, τα τρυβλία ελέγχθηκαν ως προς τη

συνοχή της επιφάνειάς τους και καταμετρήθηκε ο αριθμός των υπερμεταλλαγμένων αποικιών του βακτηρίου. Κάθε δοκιμή περιελάμβανε τόσο θετικούς (μόνο οξειδωτικός παράγοντας), όσο και αρνητικούς (τρυβλία χωρίς οξειδωτικό παράγοντα ή εξεταζόμενα συστατικά) ελέγχους. Επίσης, κάθε αντιοξειδωτικό συστατικό ελέγχθηκε στη μέγιστη χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση, για πιθανή δημιουργία όγκων.

Τα φυτικά εκχυλίσματα και κλάσματα διαλύθηκαν σε MeOH ή απεσταγμένο H<sub>2</sub>O. Τα διαλύματα των πολυφαινολών δημιουργήθηκαν με τη διάλυση τους σε MeOH, EtOH και DMSO σε συγκεντρώσεις 100 mM και αποθηκεύτηκαν στους -20 °C. Η μέγιστη συγκέντρωση των MeOH, EtOH και DMSO ήταν 2.5%, 0.03% και 2.5% ανά πλάκα αντίστοιχα στις δοκιμές με μπλεομυκίνη, ενώ η μέγιστη συγκέντρωση της MeOH και DMSO ήταν 2.5% και 0.65% ανά πλάκα αντίστοιχα στις δοκιμές με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Οι διαλύτες ελέγχθηκαν στις παραπάνω συγκεντρώσεις και δεν είχαν επ ίδραση στη μεταλλαξιογόνο δράση των οξειδωτικών παραγόντων.

Η % αναστολή της μεταλλαξιογόνου δράση των οξειδωτικών παραγόντων υπολογίζεται από τον παρακάτω μαθηματικό τύπο:

$$\text{% Αναστολή} = \frac{[1 - \text{ΑΑ ανά τρυβλίο με οξειδωτικό παράγοντα} - \text{δείγμα/ΑΑ ανά τρυβλίο με οξειδωτικό παράγοντα}]}{\text{ΑΑ}} \times 100$$

όπου ΑΑ: αριθμός αποικιών του βακτηρίου

## Αποτελέσματα

**Επίδραση των πολυφαινολών και των εκχυλισμάτων του σταφυλιού στη μεταλλαξιογόνο δράση οξειδωτικών παραγόντων (μπλεομυκίνη και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), στο βακτήριο *Salmonella typhimurium* TA102:** Η συγκέντρωση των οξειδωτικών παραγόντων ήταν 0.5 μg και 100 μg ανά τρυβλίο για τη μπλεομυκίνη και το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> αντίστοιχα. Στις συγκεκριμένες συγκεντρώσεις δεν παρατηρήθηκε βακτηριακή δραστηριότητα, γεγονός που επαληθεύτηκε και από τη βιβλιογραφία (Ferguson L.R. et al., 2003; Anderson D. et al., 1995).

Το μεθανολικό και το υδατικό εκχύλισμα της ποικιλίας *Μανδηλαριάς* μείωσαν τη δράση της μπλεομυκίνης κατά 69% και 75% αντίστοιχα, σε συγκέντρωση 6 mg ανά τρυβλίο. Στην ίδια συγκέντρωση το μεθανολικό και το υδατικό διάλυμα της ποικιλίας *Ασύρτικου* ελάττωσαν τη δράση της μπλεομυκίνης κατά 75% και 35% αντίστοιχα. Επιπρόσθετα, τα μεθανολικά εκχυλίσματα και των δύο ποικιλιών έδρασαν ανασταλτικά στη δράση του  $H_2O_2$  με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Πιο συγκεκριμένα, το μεθανολικό εκχύλισμα της *Μανδηλαριάς* ανέστειλε τη δράση του  $H_2O_2$  κατά 69%, ενώ το μεθανολικό εκχύλισμα του *Ασύρτικου* κατά 82% σε συγκέντρωση 6 mg ανά τρυβλίο. Αντίθετα, το υδατικό εκχύλισμα της *Μανδηλαριάς* αύξησε τη δράση του  $H_2O_2$  με δοσοεξαρτώμενο τρόπο, ενώ το υδατικό εκχύλισμα του *Ασύρτικου* είχε ανασταλτική δράση.

Τα εμπλουτισμένα σε πολυφαινόλες μεθανολικά κλάσματα του μεθανολικού και του υδατικού εκχυλίσματος της ποικιλίας *Μανδηλαριάς* επέφεραν μικρή αύξηση στη δράση της μπλεομυκίνης. Το κλάσμα EtOAc που προσέφεραν από το υδατικό εκχύλισμα, αύξησε τη μεταλλαξιογόνη δράση της μπλεομυκίνης με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Για παράδειγμα, παρατηρήθηκε αύξηση κατά 44% σε μία συγκέντρωση 3 mg ανά τρυβλίο. Όσον αφορά τη δράση των εμπλουτισμένων πολυφαινολικών κλασμάτων ενάντια στο  $H_2O_2$  και τα τρία αύξησαν τη δράση του.

Η *trans*-ρεσβερατρόλη και η κερκετίνη παρουσίασαν αύξηση της δράσης της μπλεομυκίνης με δοσοεξαρτώμενο τρόπο, όπως και η (+)-κατεχίνη και η (-)-επικατεχίνη. Στη μελέτη της δράσης των πολυφαινολών έναντι στο  $H_2O_2$ , όλα τα μόρια αύξησαν τη δράση του  $H_2O_2$ , με εξαίρεση το γαλλικό οξύ που είχε μικρή ανασταλτική δράση. Κάποιες πολυφαινόλες δεν μελετήθηκαν σε κάποιο από τα δύο οξειδωτικά γιατί η συγκεκριμένη δράση τους έχει αναφερθεί σε προηγούμενες δοκιμές με την ίδια μέθοδο.

Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα αναφέρονται στους Πίνακες 46 και 47.

Εξεταζόμενο δείγμα	Δόση (mg/τρυβλίο)	Αριθμός επαναμεταλλαγμένων αποικιών του <i>S. typhimurium</i> (% Αναστολή)	
		Μπλεομυκίνη (0.5 µg/τρυβλίο)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (100 µg/τρυβλίο)
<b>Μεθανολικό εκχύλισμα <i>Μανδηλαριάς</i></b>	0	306±30	68±4
	0.3	179±17 (42%)	49±2 (28%)
	2.0	-	43±18 (37%)
	3.0	122±31 (60%)	-
	6.0	96±4 (69%)	21±6 (69%)
<b>Υδατικό εκχύλισμα <i>Μανδηλαριάς</i></b>	0	428±57	83±6
	0.3	350±18 (18%)	148±10 (+78%)
	2.0	-	201±10 (+142%)
	3.0	144±46 (66%)	-
	6.0	106±8 (75%)	354±25 (+327%)
<b>Μεθανολικό εκχύλισμα <i>Ασύρτικου</i></b>	0	426±45	223±26
	0.3	408±15 (4%)	136±8 (39%)
	2.0	-	74±2 (67%)
	3.0	185±44 (57%)	-
	6.0	107±8 (75%)	40±15 (82%)
<b>Υδατικό εκχύλισμα <i>Ασύρτικου</i></b>	0	240±14	132±13
	0.3	211±27 (12%)	110±29 (29%)
	2.0	-	214±28 (28%)
	3.0	200±3 (17%)	-
	6.0	155±5 (35%)	196±39 (39%)
<b>Κλάσμα EtOAc από το υδατικό εκχύλισμα <i>Μανδηλαριάς</i></b>	0	209±7	124±36
	0.03	270±13 (+29%)	91±9 (27%)
	0.3	315±23 (+51%)	140±19 (+13%)
	3.0	301±19 (+44%)	177±24 (+43%)
<b>Μεθανολικό κλάσμα από το υδατικό εκχύλισμα <i>Μανδηλαριάς</i></b>	0	402±45	116±34
	0.03	432±12 (+7%)	114±20 (2%)
	0.3	411±41 (+2%)	121±26 (+4%)
	3.0	419±7 (+4%)	198±26 (+71%)
<b>Μεθανολικό κλάσμα από το μεθανολικό εκχύλισμα <i>Μανδηλαριάς</i></b>	0	258±31	82±14
	0.03	281±34 (+9%)	79±5 (4%)
	0.3	282±50 (+9%)	119±10 (+45%)
	3.0	315±7 (+22%)	183±27 (+123%)

Πίνακας 46. Αποτελέσματα *in vitro* ελέγχου αναστολής της μεταλλαξιογόνου δράσης της μπλεομυκίνης και του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, στο βακτήριο *Salmonella typhimurium* TA102-Εκχυλίσματα και κλάσματα.

Εξεταζόμενο δείγμα	Δόση (μΜ/τρυβλίο)	Αριθμός επαναμεταλλαγμένων αποικιών του <i>S. typhimurium</i> (% Αναστολή)	
		Μπλεομυκίνη (0.5 μg/τρυβλίο)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (100 μg/τρυβλίο)
<i>trans</i> -ρεσβερατρόλη	0	494±31	109±13
	1	497±13 (+1%)	96±5 (12%)
	10	545±31 (+10%)	130±8 (+19%)
	100	582±37 (+18%)	174±15 (+60%)
(+) -Κατεχίνη	0	332±44	116±18
	1	350±14 (+5%)	134±10 (+16%)
	10	365±46 (+10%)	153±23 (+32%)
	100	371±30 (+12%)	145±4 (+25%)
(-)-Επικατεχίνη	0	416±22	108±13
	1	439±38 (+6%)	129±23 (+19%)
	10	426±14 (+2%)	134±19 (+24%)
	100	376±37 (10%)	122±4 (+13%)
Κερκετίνη	0	386±8	-
	5	371±21 (4%)	-
	50	419±5 (+9%)	-
	100	460±6 (+19%)	-
Γαλλικό οξύ	0	-	91±12
	1	-	78±8 (14%)
	10	-	73±17 (20%)
	100	-	71±26 (22%)
Πρωτοκατεχικό οξύ	0	-	114±16
	1	-	118±6 (+4%)
	10	-	117±19 (+3%)
	100	-	128±4 (+12%)

Πίνακας 47. Αποτελέσματα *in vitro* ελέγχου αναστολής της μεταλλαξιογόνου δράσης της μπλεομυκίνης και του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, στο βακτήριο *Salmonella typhimurium* TA102-Απομονωμένες ουσίες.

### Αξιολόγηση αποτελεσμάτων

**Επίδραση των πολυφαινολών και των εκχυλισμάτων του σταφυλιού στη μεταλλαξιογόνο δράση οξειδωτικών παραγόντων (μπλεομυκίνη και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), στο βακτήριο *Salmonella typhimurium* TA102:** Τα μεθανολικά και υδατικά εκχυλίσματα των δύο ποικιλιών ανέστειλαν τη δράση της μπλεομυκίνης και τα μεθανολικά εκχυλίσματά τους ανέστειλαν τη δράση του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Επιπλέον, το υδατικό εκχύλισμα της *Μανδηλαριάς* επέδειξε συνεργιστική δράση με το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ενώ το υδατικό του *Ασύρτικου* εμφάνισε ανασταλτική δράση. Η παράδοξη συμπεριφορά του υδατικού εκχυλίσματος της *Μανδηλαριάς* που ελαττώνει τη δράση της μπλεομυκίνης και αυξάνει αυτή του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, οφείλεται πιθανόν σ τους διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης των δύο οξειδωτικών παραγόντων. Τα παραπάνω εκχυλίσματα αναστέλλουν τη μεταλλαξιογόνο

δράση των δύο οξειδωτικών είτε καταστρέφοντας τις ελεύθερες ρίζες είτε δεσμεύοντας τα ιόντα  $\text{Fe}^{+2}$  ή ακόμα και με τους δύο τρόπους. Η διαπίστωση αυτή επιβεβαιώνεται και από άλλες εργασίες όπου παρατηρείται αναστολή στις μεταλλάξεις που προκαλούνται από το  $\text{H}_2\text{O}_2$  στο βακτήριο *Salmonella typhimurium* TA 102, από ενώσεις που καταστρέφουν τις ελεύθερες ρίζες ή σχηματίζουν σύμπλοκα με τα μέταλλα (Grey C.E. & Adlercreutz P., 2003; Santana-Rios G. et al., 2001). Είναι επίσης πιθανό η προστατευτική δράση των εκχυλισμάτων να οφείλεται σε εξωκυτταρικές ενέργειες ορισμένων συστατικών τους, όπως η δέσμευση της μπλεομυκίνης και κατά συνέπεια η μείωση της συγκέντρωσής της.

Τα εμπλουτισμένα σε πολυφαινόλες κλάσματα από την ποικιλία *Μανδηλαριά*, ασκούν διαφορετική δράση από τα αντίστοιχα εκχυλίσματα. Συγκεκριμένα, τα κλάσματα αυτά είχαν ανξητική ή μηδενική δράση στη μπλεομυκίνη και στο  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ενώ τα εκχυλίσματα επέδειξαν ανασταλτική δραστηριότητα, με μόνη εξαίρεση το υδατικό εκχύλισμα της *Μανδηλαριάς* που αύξησε τη μεταλλαξιογόνο δράση του  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Η αντίθεση αυτή οφείλεται στη διαφορετική σύσταση των κλασμάτων και των εκχυλισμάτων αφού τα κλάσματα έχουν υψηλό ποσοσ τό πολυφαινολών. Έτσι, η ανασταλτική δράση των εκχυλισμάτων είτε οφείλεται σε άλλα συστατικά και όχι σε πολυφαινόλες είτε αποδίδεται σε συνεργιστική δράση των πολυφαινολών με άλλα μόρια που υπάρχουν στα εκχυλίσματα, απουσιάζουν όμως από τα κλάσματά τους.

Οι απομονωμένες ουσίες εμφάνισαν σε γενικές γραμμές ανάλογη δράση μ' αυτή των εμπλουτισμένων πολυφαινολικών κλασμάτων. Δεν ανέστειλαν δηλαδή τη δράση της μπλεομυκίνης, αλλά την αύξησαν ή ήταν αδρανείς. Όσον αφορά την αναστολή της δράσης του  $\text{H}_2\text{O}_2$ , η (+)-κατεχίνη και η (-)-επικατεχίνη δεν ανέστειλαν τη δράση του, σ' αντίθεση με την κερκετίνη που σε υψηλές συγκεντρώσεις μειώνει τη δράση του, όπως έχει αποδειχθεί σε προηγούμενες μελέτες (Grey C.E. & Adlercreutz P., 2003). Στην παρούσα έρευνα αποδείχθηκε ότι η κερκετίνη αυξάνει τη δράση της μπλεομυκίνης. Η αντίθετη συμπεριφορά του συγκεκριμένου φλαβονοειδούς εξηγείται με τους διαφορετικούς μηχανισμούς που δρουν η μπλεομυκίνη και το  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Η *trans*-ρεσβερατρόλη αύξησε τη δράση και των δύο οξειδωτικών παραγόντων, γεγο νός που υποδηλώνει συνεργιστική δράση του μορίου και των μεταλλαξιογόνων παραγόντων. Το γαλλικό οξύ ανέστειλε σε πολύ μικρό ποσοστό τη δράση του  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Η επίδραση των πολυφαινολών και των εμπλουτισμένων κλασμάτων στις ενέργειες των μεταλλαξιογόνων παραγόντων, αποδεικνύει την προοξειδωτική τους ικανότητα. Ακόμα και αν οι προοξειδωτικές ιδιότητες ενοχοποιούνται για καρκινογένεση, τελευταίες έρευνες έχουν οδηγήσει σε αναθεώρηση της παραπάνω άποψης αφού μόρια που διαθέτουν τέτοιες ικανότητες έχουν ευεργετικά αποτελέσματα σε καρκινικά κύτταρα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο στην πρόληψη όσο και στη θεραπεία κάποιων τύπων καρκίνων (Sun S.Y., 2004). Στην παρούσα δοκιμή οι πολυφαινόλες ασκούν προοξειδωτική δράση σε υψηλές συγκεντρώσεις που δεν μπορούν να επιτευχθούν με τη λήψη φυτικών πολυφαινολών μέσω της διατροφής (Augustin S. & Williamson G., 2000). Αυτό αποκλείει τη χρήση τους προληπτικά της εκδήλωσης καρκίνου, αλλά επιτρέπει την ένταξή τους σε χημειοθεραπευτικά σχήματα, ειδικά σ' αυτά που περιέχουν μπλεομυκίνη η οποία χρησιμοποιείται στην καταπολέμηση πολλών μορφών καρκίνου (Byrnes R.W., 1990).

Γενικότερα, θα μπορούσε να σημειωθεί ότι σύμφωνα με τον παρόντα βιολογικό έλεγχο, οι αντιμεταλλαξιογόνες ιδιότητες των εκχυλισμάτων των ποικιλιών *Μανδηλαριάς* και *Ασύρτικου* δεν οφείλονται σε καμία από τις εξεταζόμενες πολυφαινόλες αφού όχι μόνο δεν αναστέλλουν, αλλά κάποιες από αυτές ενισχύουν τη δράση της μπλεομυκίνης και του  $H_2O_2$ . Ωστόσο, το πιθανότερο είναι η προστατευτική δράση των εκχυλισμάτων να είναι αποτέλεσμα της συνεργιστικής δράσης του μίγματος των φυτοχημικών ουσιών που περιέχουν.

#### 1.4.2) ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ

Οι κλινικές δοκιμές αφορούσαν τη μελέτη της επίδρασης ενός εμπλουτισμένου σε πολυφαινόλες κλάσματος που προερχόταν από την κόκκινη ποικιλία *Μανδηλαριά Σαντορίνης*, σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο. Πριν περιγραφεί αναλυτικά ο έλεγχος, κρίνεται σκόπιμο να παρουσιαστούν κάποια στοιχεία για τη στεφανιαία νόσο που είναι μία πάθηση που μαστίζει τον σύγχρονο άνθρωπο.

#### **1.4.2.a) Στεφανιαία νόσος**

Οι κύριες στεφανιαίες αρτηρίες βρίσκονται στην επιφάνεια της καρδιάς, ενώ μέσα στη μυϊκή μάζα διεισδύουν μικρές αρτηρίες. Η αριστερή στεφανιαία αρτηρία αρδεύει κυρίως στο πρόσθιο τμήμα της αριστερής κοιλίας και η δεξιά αρτηρία το μεγαλύτερο τμήμα της δεξιάς και στα περισσότερα άτομα το οπίσθιο τμήμα της αριστερής κοιλίας.

Η στεφανιαία αιματική ροή σε κατάσταση ηρεμίας στον άνθρωπο είναι περίπου 225 ml/min που αναλογεί στο 4-5% περίπου της συνολικής καρδιακής παροχής. Κατά τη διάρκεια έντονης σωματικής άσκησης η καρδιά αυξάνει την παροχή της 4-6 φορές και προωθεί αυτό το αίμα έναντι μιας αρτηριακής πίεσης, υψηλότερης από τη φυσιολογική. Η αιματική ροή στα στεφανιαία αγγεία ρυθμίζεται ανάλογα με τις ανάγκες του μυοκαρδίου σε οξυγόνο. Ακόμα και στη φυσιολογική κατάσταση ηρεμίας το 65-70% του οξυγόνου του αρτηριακού αίματος αφαιρείται απ' αυτό, καθώς περνά από την καρδιά. Όταν απαιτείται επιπλέον ποσότητα οξυγόνου, προκαλείται αγγειοδιαστολή και αύξηση της αιματικής ροής. Η ρύθμιση της στεφανιαίας αιματικής ροής γίνεται άμεσα και έμμεσα μέσω του αυτόνομου νευρικού συστήματος (Guyton M.D., 1990).

Η ανεπαρκής στεφανιαία αιματική ροή προκαλεί ισχαιμική καρδιοπάθεια, δηλαδή ανεπαρκή αιμάτωση (παροχή οξυγόνου) της καρδιάς, εξαιτίας της απόφραξης των στεφανιαίων αρτηριών. Τα κυριότερα αίτια του φαινομένου είναι τα εξής (Τούτουζας Π.Κ., 1999):

- Αθηροσκλήρυνση
- Αρτηριακή υπέρταση
- Σακχαρώδης διαβήτης
- Παχυσαρκία
- Κάπνισμα
- Καθιστική ζωή και έλλειψη σωματικής άσκησης
- Άγχος
- Νεότεροι παράγοντες (έλλειψη οιστρογόνων, χλαμύδια πνευμονίας, ουρικό οξύ, ομοκυντείνη, ινωδογόνο)

Οι κλινικές εκδηλώσεις της στεφανιαίας νόσου είναι (Τούτουζας Π.Κ., 1999):

- Στηθάγχη
- Έμφραγμα του μυοκαρδίου
- Καρδιακή ανεπάρκεια

Οι θάνατοι από τη νόσο φτάνουν το 35% στις ΗΠΑ και μερικοί είναι αιφνίδιοι ως αποτέλεσμα οξείας στεφανιαίας απόφραξης ή μαρμαρυγής, ενώ άλλοι επέρχονται σταδιακά σε περίοδο εβδομάδων, μηνών ή και χρόνων ως αποτέλεσμα της προοδευτικής απόφραξης των στεφανιαίων (Guyton M.D., 1990).

Η θεραπευτική αντιμετώπιση της νόσου γίνεται με τη χορήγηση φαρμάκων που αντιμετωπίζουν τα αίτια, μειώνουν τα συμπτώματα και αυξάνουν το προσδόκιμο επιβίωσης. Τα θεραπευτικά σχήματα αποτελούνται από τις παρακάτω κατηγορίες ουσιών:

- Αναστολείς των β-αδρενεργικών υποδοχέων
- Στρεπτοκινάση
- Στατίνες
- Ασπιρίνη

Παράλληλα με τη χορήγηση των παραπάνω φαρμακευτικών ουσιών ενδείκνυται σε κάποιες περιπτώσεις η χειρουργική αντιμετώπιση των ασθενών, κατά την οποία παρακάμπτεται η αποφρακτική βλάβη της στεφανιαίας αρτηρίας. Επιπρόσθετα, συνίσταται στους ασθενείς η διακοπή του καπνίσματος, η μείωση του άγχους και μία ήπια σωματική άσκηση που θα γίνεται σύμφωνα με τις οδηγίες του θεράποντα ιατρού (Τούτουζας Π.Κ., 1999).

#### **1.4.2.β) Επιδράσεις πολυφαινολών από σταφύλια της ερυθρής ποικιλίας *Μανδηλαριάς* στη λειτουργία του ενδοθηλίου, σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο**

Πολλές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, έχουν υποδείξει μία αντίστροφη σχέση μεταξύ της κατανάλωσης αλκοόλ και της εκδήλωσης στεφανιαίας νόσου (Rimm E.B. *et al.*, 1999). Ο τύπος της αλκοόλης που λαμβάνεται, δηλαδή το είδος του οινοπνευματώδους ποτού, είναι καθοριστικός παράγοντας για την παραπάνω σχέση (Goldberg U. *et al.*, 2001). Το ''Γαλλικό παράδοξο'' που αναφέρεται στο χαμηλότερο

ποσοστό θνησιμότητας από στεφανιαία νόσο στη Γαλλία σε σχέση με άλλες χώρες του δυτικού κόσμου , αν και οι ρυθμοί ζωής και οι τρόποι διατροφής είναι ίδιοι , έχει αποδοθεί στη μεγαλύτερη κατανάλωση κόκκινου κρασιού στη Γαλλία (παρ. 1.1.2.β).

Το κόκκινο κρασί διαφέρει από άλλους τύπους αλκοολούχων ποτών λόγω της υψηλότερης περιεκτικότητάς τους σε πολυφαινολικά μόρια που είναι συστατικά του φλοιού των σταφυλιών (Dell' Agli M. et al., 2004). Η συγκέντρωση των πολυφαινολών στα κόκκινα κρασιά δείχνει μία ποικιλότητα που εξαρτάται από τη γεωγραφική πηγή και την οινοποιητική μέθοδο παραγωγής (Rodriguez-Delgado M.A. et al., 2001; Sakkiadi A.V. et al., 2001). Έχει επικρατήσει η άποψη ότι οι πολυφαινόλες μπορεί να συντελούν στην καρδιοπροστατευτική επίδραση του κόκκινου κρασιού επειδή προστατεύουν από την οξείδωση τη λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας (LDL) (Frankel E.N. et al., 1993), μειώνουν τη συγκόλληση των αιμοπεταλίων (Vita J.A., 2005; Russo P. et al., 2001) και βελτιώνουν τη λειτουργία του ενδοθηλίου (Vita J.A., 2005; Leikert J.F. et al., 2002). Παράλληλα, *in vivo* δοκιμές έχουν καταδείξει την αποτελεσματικότητα των πολυφαινολών ενάντια στη διαδικασία αθηροσκλήρυνσης (Vinson J.A. et al., 2001; Yamakoshi J. et al., 1999).

Έχει αποδειχθεί ότι η οξεία λήψη κόκκινου κρασιού προάγει την αγγειοδιαστολή του ενδοθηλίου σε υγιή πειραματόζωα (Hashimoto M. et al., 2001). Δεν είναι σαφές ποια συστατικά του κόκκινου κρασιού είναι υπεύθυνα για τη συγκεκριμένη δράση. Στην παρούσα μελέτη ελέγχθηκε η υπόθεση ότι η οξεία λήψη ενός εμπλουτισμένου σε πολυφαινόλες κλάσματος από κόκκινα σταφύλια , έχει ευεργετικά αποτελέσματα στην αγγειοδιαστολή μέσω ροής της βραχιόνιας αρτηρίας (Flow Mediated Dilatation) σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο.

## Υλικά και μέθοδοι

**Σχεδιασμός έρευνας:** Στην έρευνα συμμετείχαν 30 ασθενείς ανδρικού φύλου, στους οποίους είχε αποδειχθεί αγγειογραφικά η στεφανιαία νόσος . Κριτήρια αποκλεισμού από την έρευνα ήταν η ηλικία άνω των 70 ετών, ένα πρόσφατο (<2 μηνών) οξύ στεφανιαίο επεισόδιο, μία bypass επέμβαση στη στεφανιαία αρτηρία και η στένωση αορτής. Χωρίστηκαν με τυχαίο τρόπο σε δύο ομάδες των 15 ατόμων. Στη μία ομάδα έγινε οξεία χορή ήγηση του εξεταζόμενου πολυφαινολικού κλάσματος (600 mg

κλάσματος διαλυμένου σε 20 ml H<sub>2</sub>O) και στην άλλη 20 ml H<sub>2</sub>O (placebo). Τα κυριότερα συστατικά του χρησιμοποιούμενου πολυφαινολικού κλάσματος καθώς και τα ποσοστά τους στο μίγμα, αναφέρονται στον Πίνακα 14 (παρ. 1.2.1.δ). Όλοι οι ασθενείς έδωσαν τη συγκατάθεσή τους πριν εισέλθουν στην έρευνα.

**Φυτικό υλικό:** Η παραγωγή του εμπλουτισμένου σε πολυφαινόλες κλάσματος έγινε με την κατεργασία με ρητίνη XAD16 των στεμφύλων της ερυθρής ποικιλίας *Μανδηλαριάς* που συλλέχθηκαν στο νησί Σαντορίνη τον Αύγουστο του 2003. 15 g από το τελικό κλάσμα αναμίχθηκαν με 45 g μαλτοδεξτρίνης και μέσα από κάποιες επιπλέον διεργασίες παραλήφθηκε μία λεπτή κόκκινη σκόνη (Εικόνα 19). Η αναλυτική παρουσίαση της παραγωγής του κλάσματος και της μορφοποίησής του σε σκόνη, υπάρχει στην παράγραφο 1.2.1.δ.

Η σκόνη διαιρέθηκε σε 25 δόσεις που καθεμία περιείχε 600 mg πολυφαινολικού μίγματος και 1.8 g μαλτοδεξτρίνης. Βασιζόμενοι στη συγκέντρωση της *trans*-ρεσβερατρόλης, η χορήγηση μίας δόσης αντι στοιχούσε στην κατανάλωση 1 κιλού σταφυλιού.

**Μέτρηση της λειτουργίας του ενδοθηλίου της βραχιόνιας αρτηρίας:** Η αγγειοδιαστολή μέσω ροής της βραχιόνιας αρτηρίας (**FMD**) και η προκαλούμενη από τη νιτρογλυκερίνη αγγειοδιαστολή της ίδιας αρτηρίας, εκτιμήθηκαν σ ύμφωνα με τις μεθόδους που αναφέρονται στη βιβλιογραφία και είναι ανεξάρτητες από τον τρόπο χορήγησης (Papamichael C. *et al.*, 2004; Corretti M., 2002). Όλες οι μελέτες έγιναν τις πρωινές ώρες και απαραίτητες προϋποθέσεις ήταν η μη σίτιση το προηγούμενο βράδυ και η διακοπή της λήψης νιτρωδών για 24 h πριν τον έλεγχο.

Η αρχή της έρευνας περιελάμβανε την ανάπτυξη του ασθενούς για 10 min σε ύπτια θέση και τη μέτρηση της διαμέτρου της δεξιάς βραχιόνιας αρτηρίας και της "baseline" της αιματικής ροής στο αντιβράχιο με μία συσκευή υπερήχων (ATL HDL 3500, Μπόθελ, Ουάσινγκτον, ΗΠΑ), χρησιμοποιώντας γραμμικό μετατροπέα 7.5 Hz. Η αύξηση της αιματικής ροής στο αντιβράχιο επιτεύχθηκε με το "φούσκωμα" ενός επιδέσμου που είχε τοποθετηθεί γύρω από τον καρπό ώστε να επιτευχθεί μία συστολική πίεση της τάξης των 250 mmHg για 5 min. Αμέσως μετά από κάθε "ξεφούσκωμα" γίνονταν επαναλαμβανόμενες μετρήσεις της ροής του αίματος και η βραχιόνια αρτηρία σαρωνόταν για 2 min και καθοριζόταν η μέγιστη διάμετρος της. Η ίδια πορεία

ακολουθήθηκε 30, 60 και 120 min μετά από τη λήψη του διαλύματος που περιείχε το δείγμα. Μετά τη λήψη του δείγματος ακολουθούσαν 10 min ηρεμίας για να επανέλθουν τα αγγεία και πραγματοποιούνταν ανάλογες μετρήσεις 3 min πριν και μετά την υπογλώσσια χορήγηση 400 µg νιτρογλυκερίνης.

Οι ασθενείς παρέμεναν στην ύπτια θέση καθόλη τη διάρκεια του πειράματος και η **FMD** καθορίστηκε ως η % αλλαγή της διαμέτρου της αρτηρίας (εξαρτώμενη από το ενδοθήλιο αγγειοδιαστολή ), ενώ η υπεραιμία ως η % αύξηση της ροής . Οι ίδιες μετρήσεις έγιναν πριν και μετά από τη χορήγηση νιτρογλυκερίνης. Η εξωκυτταρική και εσωκυτταρική μεταβλητότητα στις μετρήσεις της διαμέτρου της βραχιόνιας αρτηρίας ήταν  $0.1\pm0.12$  mm και  $0.08\pm0.19$  mm αντίστοιχα..

Τα δεδομένα εκφράστηκαν ως μέσος όρος $\pm$ στατιστικό σφάλμα. Οι μεταβλητές ανάμεσα στις δύο ομάδες συγκρίθηκαν χρησιμοποιώντας το *t* test. Η ανάλυση των διαφορών που προέκυπταν από τις επαναλαμβανόμενες μετρήσεις, έγινε με μέθοδο της διόρθωσης Bonferroni και η ομοιογένεια των διαφορών ελέγχθηκε με το test Levene. Κάθε τιμή  $P<0.05$  θεωρήθηκε ως στατιστικά σημαντική.

### Αποτελέσματα

Οι δύο ομάδες ασθενών είχαν παραπλήσιες ηλικίες ( $59.7\pm9.3$  ετών η ομάδα στην οποία χορηγήθηκε το πολυφαινολικό κλάσμα και  $62.2\pm8.6$  ετών η ομάδα της placebo χορήγησης), παραπλήσιο αριθμό κατεστραμμένων αγγείων ( $2.1\pm0.95$  και  $2.3\pm0.95$  αντίστοιχα) και όμοιο επίπεδο λιπιδίων και άλλων επικίνδυνων παραγόντων για καρδιαγγειακές παθήσεις (Πίνακας 48).

Παράγοντας επικινδυνότητας	Ομάδα ατόμων που της χορηγήθηκε το πολυφαινολικό κλάσμα	Ομάδα που της έγινε placebo χορήγηση	P
Ολική χοληστερόλη (mg/dl)	212.7±28	214.6±38	ΜΣ
LDL χοληστερόλη (mg/dl)	135.5±30	136.7±39	ΜΣ
Τριγλυκερίδια (mg/dl)	155.9±48.9	162.4±48.5	ΜΣ
HDL χοληστερόλη (mg/dl)	41±7	40±6	ΜΣ
Συστολική πίεση (mmHg)	128.4±12	126.2±16.8	ΜΣ
Διαστολική πίεση (mmHg)	81.6±15	78.9±11	ΜΣ
Σακχαρώδης διαβήτης (%)	26.7	20	ΜΣ
Κάπνισμα (%)	40	33.3	ΜΣ
Δείκτης σωματικής μάζας (Kg/m <sup>2</sup> )	28±3.2	27.9±4.2	ΜΣ
Οικογενειακό ιστορικό σε στεφανιαία νόσο (%)	33.3	26.7	ΜΣ

Πίνακας 48. Λιπίδια και παράγοντες επικινδυνότητας για καρδιαγγειακές παθήσεις στους ασθενείς με στεφανιαία νόσο που συμμετείχαν στο πείραμα.

Σημείωση: ΜΣ: Μη σημαντικό.

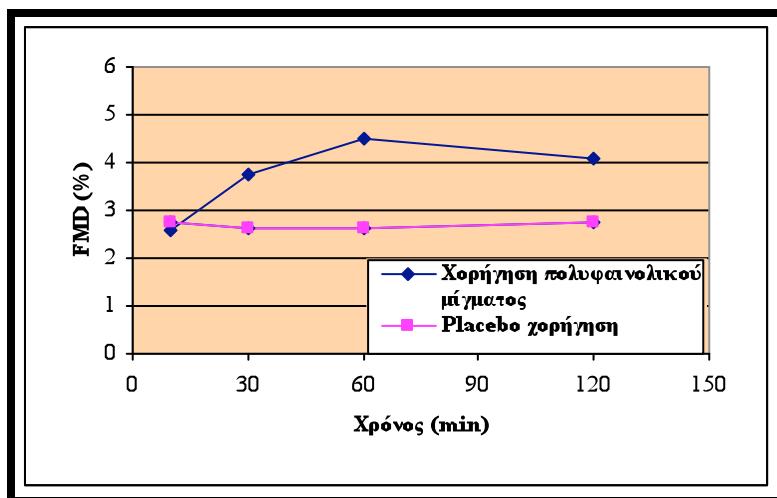
Επιπρόσθετα, η φαρμακευτική αγωγή και στις δύο ομάδες ασθενών ήταν ίδια (Πίνακας 49).

Φάρμακο	Ομάδα ατόμων που της χορηγήθηκε το πολυφαινολικό κλάσμα	Ομάδα που της έγινε placebo χορήγηση	P
Στατίνες (%)	60	60	ΜΣ
Νιτρώδη (%)	46.7	40	ΜΣ
Αναστολείς ACE (%)	46.7	46.7	ΜΣ
β-αδρενεργικοί ανταγωνιστές (%)	66.7	53.3	ΜΣ
ΑΤ <sub>1</sub> -ανταγωνιστές (%)	13.3	6.7	ΜΣ
Αναστολείς Ca <sup>+2</sup> (%)	20	13.3	ΜΣ

Πίνακας 49. Φαρμακευτική αγωγή των ασθενών με στεφανιαία νόσο που συμμετέχουν στο πείραμα.

Η "baseline" της διαμέτρου της αρτηρίας και της αγγειοδιαστολής μέσω ροής της βραχιόνιας αρτηρίας (**FMD**), η ροή σε κατάσταση ηρεμίας και η υπεραιμική απάντηση δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των δύο ομάδων. Μετά τη χορήγηση του πολυφαινολικού κλάσματος παρατηρήθηκε μία αύξηση στη **FMD** που κορυφώθηκε στα 60 min και ήταν σημαντικά υψηλότερη από το επίπεδο της "baseline" (Πίνακας 50). Η τιμή της **FMD** στα 60 min μετά από τη λήψη του πολυφαινολικού μίγματος ήταν

υψηλότερη και από την τιμή στην αντίστοιχη χρονική στιγμή, μετά από τη λήψη H<sub>2</sub>O (Σχήμα 34).



Σχήμα 34. Τιμές FMD στις διάφορες χρονικές στιγμές κατά τη χορήγηση πολυφαινολικού μίγματος και τη placebo χορήγηση.

Επιπρόσθετα, καμία χρονική στιγμή μετά από τη χορήγηση του H<sub>2</sub>O δεν παρατηρήθηκε αλλαγή στις τιμές της FMD και της υπεραιμίας, ενώ η διαστολή της αρτηρίας εξαιτίας της χορήγησης νιτρογλυκερίνης ήταν ίδια και στις δύο ομάδες ασθενών ( $8.4 \pm 3.6\%$  και  $8.5 \pm 3.2\%$  αντίστοιχα).

Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα της δοκιμής υπάρχουν στον Πίνακα 50.

	Baseline	30 min	60 min	120 min
<b>Χορήγηση του πολυφαινολικού μίγματος (n=15)</b>				
Διάμετρος αρτηρίας σε κατάσταση ηρεμίας (mm)	$4.78 \pm 0.5$	$4.67 \pm 0.45$	$4.7 \pm 0.44$	$4.71 \pm 0.48$
Ροή αίματος σε κατάσταση ηρεμίας (ml/min)	$152.6 \pm 51$	$135 \pm 62$	$151 \pm 68$	$139 \pm 54$
Υπεραιμία (%)	$190 \pm 96$	$235 \pm 105$	$225 \pm 110$	$235 \pm 141$
FMD (%)	$2.6 \pm 1.5$	$3.73 \pm 2.1$	$4.52 \pm 1.34$	$4.1 \pm 2.6$
<b>Placebo χορήγηση (n=15)</b>				
Διάμετρος αρτηρίας σε κατάσταση ηρεμίας (mm)	$4.5 \pm 0.28$	$4.6 \pm 0.28$	$4.58 \pm 0.3$	$4.5 \pm 0.37$
Ροή αίματος σε κατάσταση ηρεμίας (ml/min)	$107 \pm 67$	$109 \pm 57$	$114 \pm 59$	$140 \pm 78$
Υπεραιμία (%)	$257 \pm 78$	$278 \pm 107$	$274 \pm 123$	$248 \pm 123$
FMD (%)	$2.75 \pm 1.85$	$2.62 \pm 1.65$	$2.64 \pm 1.8$	$2.73 \pm 1.8$

Πίνακας 50. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα κλινικών δοκιμών.

## **Αξιολόγηση αποτελεσμάτων**

Τα αποτελέσματα της παρούσας δοκιμής αποδεικνύουν ότι οι πολυφαινόλες που προέρχονται από κόκκινα σταφύλια αυξάνουν την τιμή της **FMD** σε οξεία χορήγηση, σε άνδρες με δεδομένη στεφανιαία νόσο. Είναι η πρώτη μελέτη που επιβεβαιώνει τα ευεργετικά αποτελέσματα της κατανάλωσης ενός εκχυλίσματος από κόκκινα σταφύλια του οποίου τα μόνα βιοδραστικά συστατικά είναι οι πολυφαινόλες.

Προηγούμενες μελέτες ανέφεραν την έμμεση επίδραση των πολυφαινολών στο ενδοθήλιο. Είχε συγκεκριμένα αποδειχθεί ότι η οξεία λήψη κόκκινου κρασιού από το οποίο είχε αφαιρεθεί το αλκοόλ, αύξανε την τιμή της **FMD** σε υγιείς λήπτες και είχε υποτεθεί ότι αυτό οφείλεται στις πολυφαινόλες (Papamichael C. *et al.*, 2004; Hashimoto M. *et al.*, 2001; Agewall S. *et al.*, 2000). Σε μία άλλη μελέτη, η μικρής διάρκειας κατανάλωση από ασθενείς με στεφανιαία νόσο χυμού από ερυθρή ποικιλία σταφυλιών που ήταν πλούσιος σε φλαβονοειδή, αύξησε την **FMD** και μείωσε την εναισθησία της LDL στην οξείδωση (Stein J.H. *et al.*, 1999).

Επιπρόσθετα, *in vitro* πειράματα έχουν προτείνει ότι η θετική επίδραση του χυμού κόκκινων σταφυλιών στη λειτουργία του ενδοθηλίου οφείλεται στην παραγωγή NO (Leikert J.F. *et al.*, 2002; Freedman J.E. *et al.*, 2001; Fitzpatrick D.F. *et al.*, 1993). Ένα σπουδαίο βήμα στην ενεργοποίηση της σύνθεσης του NO είναι η αύξηση της εξωκυτταρικής απελευθέρωσης ασβεστίου (Martin S. *et al.*, 2002). Πρόσφατα, η επώαση στεφανιαίας αρτηρίας που προερχόταν από χοίρο με πολυφαινόλες του κόκκινου κρασιού, αύξησε τον σχηματισμό του NO (Ndiaye M. *et al.*, 2005).

Το π ολυφαινολικό μίγμα που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα δοκιμή αποτελούταν κυρίως από (-)-επικατεχίνη, (+)-κατεχίνη, γαλλικό οξύ, *trans*-ρεσβερατρόλη, ρουτίνη, ε-βινιφερίνη, π-κουμαρικό οξύ, φερουλικό οξύ και κερκετίνη. Από αυτά, η (+)-κατεχίνη, η *trans*-ρεσβερατρόλη και η κερκετίνη έχουν μελετηθεί περισσότερο αποκλειστικά για τις αντιοξειδωτικές τους *in vitro* ικανότητες ενάντια στην οξείδωση της LDL πρωτεΐνης (Soleas G.J. *et al.*, 1997). Επίσης, έχει υποστηριχθεί στο παρελθόν ότι μόνο η *trans*-ρεσβερατρόλη μπορεί ανάμεσα στις πολυφαινόλες του κόκκινου κρασιού να αυξήσει *in vitro* τη σύνθεση του NO στο ενδοθήλιο (Leikert J.F. *et al.*, 2002). Σε ένα *in vivo* πείραμα, η χορήγηση *trans*-ρεσβερατρόλης σε υπερχοληστερολαιμικά κουνέλια για 12 εβδομάδες, αύξησε την τιμή της **FMD** και τα

επίπεδα του NO (Zou J.G. *et al.*, 2003). Η *trans*-ρεσβερατρόλη και η κερκετίνη αναστέλλουν τη συγκόλληση των αιμοπεταλίων και τη σύνθεση των εικοσανοειδών που αποτελούν προφλεγμονώδεις παράγοντες (Pace-Asciak C.R. *et al.*, 1995). Τέλος, η χορήγηση (+)-κατεχίνης, κερκετίνης και *trans*-ρεσβερατρόλης σε υπερχοληστερολαιμικά ποντίκια λειτουργησε προστατευτικά ενάντια στη συσσώρευση λίπους στην αορτή (Auger C. *et al.*, 2005).

Όσον αφορά τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, η αύξηση της **FMD** άρχισε στα 30 min και κορυφώθηκε στα 60 min μετά τη λήψη του πολυφαινολικού κλάσματος. Η δράση αυτή εξηγείται από παλαιότερες μελέτες απορρόφησης των πολυφαινολών (Goldberg D.M. *et al.*, 2003) οι οποίες εξετάζουν την ικανότητα απορρόφησης της (+)-κατεχίνης, της *trans*-ρεσβερατρόλης και της κερκετίνης. Βρέθηκε συγκεκριμένα ότι οι συγκεντρώσεις των παραπάνω ουσιών στον ορρό του αίματος έλαβαν τη μέγιστη τιμή 30 min μετά από τη λήψη τους. Η *trans*-ρεσβερατρόλη εμφάνισε τη μέγιστη ικανότητα απορρόφησης, ακολουθησε η κερκετίνη και η (+)-κατεχίνη. Επίσης, η διάρκεια της ευεργετικής επίδρασης του πολυφαινολικού μίγματος στο ενδοθήλιο ήταν σε πλήρη συμφωνία με προηγούμενες αναφορές που έδειχναν ότι η μέγιστη αντιοξειδωτική ικανότητα στο πλάσμα παρατηρήθηκε 1-4 h μετά από τη χορήγηση του πολυφαινολικού σκευάσματος (Manach C. *et al.*, 2005).

Ένα ερώτημα που προκύπτει από τη συγκεκριμένη μελέτη είναι αν οι ποσότητες των πολυφαινολών που χρησιμοποιήθηκαν, μπορούν να επιτευχθούν στον οργανισμό με την κατανάλωση σταφυλιού. Το μίγμα που χορηγήθηκε στους ασθενείς παράχθηκε από 1 Kg σταφυλιών που είναι μία ποσότητα η οποία δύσκολα μπορεί να καταναλωθεί, ακόμα και από ένα άτομο που ακολουθεί μία δίαιτα μεσογειακού τύπου. Θα ήταν οπωδόποτε ενδιαφέρουνσα η επιβεβαίωση σε μελέτες μεγαλύτερης διάρκειας, των ευεργετικών επιδράσεων που έχουν μίγματα με πολυφαινόλες που προέρχονται από κόκκινα σταφύλια.

Επιπλέον θα πρέπει να εκτιμηθούν τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την παράλληλη κατανάλωση του εμπλουτισμένου πολυφαινολικού μίγματος και ενός πλούσιου σε λιπαρά γεύματος. Έχει προηγουμένως αναφερθεί ότι η λήψη ενός πλούσιου σε λιπαρά γεύματος βλάπτει τη λειτουργία του ενδοθηλίου για περίπου 4 h (Vogel R.A. *et al.*, 1997). Η επίδραση αυτή είναι πιο έντονη σε άτομα με στεφανιαία νόσο (Tsai

W.C. *et al.*, 2004). Η δυσλειτουργία αυτή έχει αποδοθεί κυρίως στην αύξηση του οξειδωτικού stress (Zhao S.P. *et al.*, 2001) και έχει αποδειχθεί ότι η κατανάλωση κόκκινου κρασιού προστατεύει από το οξειδωτικό stress (Sies H. *et al.*, 2005; Ventura P. *et al.*, 2004). Συνεπώς, θα ήταν σημαντικό σε μελλοντικές έρευνες να διαπιστωθεί αν η σύγχρονη κατανάλωση του συγκεκριμένου πολυφαινολικού κλάσματος με γεύματα πλούσια σε λιπαρά, απλώς μειώνει ή αναιρεί εντελώς τη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου.

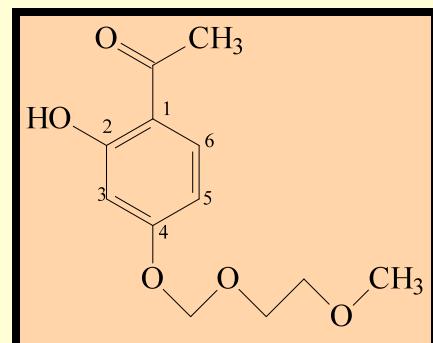
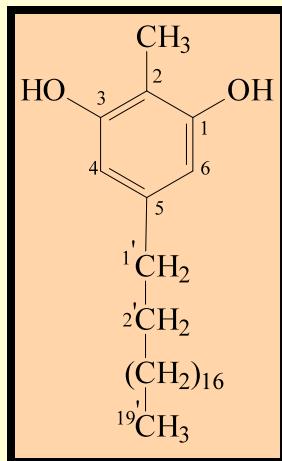
Ένας περιορισμός που προκύπτει από την παρούσα έρευνα είναι ότι δεν μετρήθηκαν οι δείκτες του οξειδωτικού stress, όπως οι ενεργές μιορφές οξυγόνου ή τα επίπεδα των αντιοξειδωτικών στο αίμα, καθώς η καταστροφή των ελευθέρων ριζών από τις πολυφαινόλες έχει διαπιστωθεί στο παρελθόν (Manach C. *et al.*, 2005). Αυτό θα παρείχε ένα μηχανισμό δράσης του πολυφαινολικού μίγματος. Ένα άλλο θέμα που προκύπτει είναι ότι το πολυφαινολικό κλάσμα που χρησιμοποιήθηκε, δεν περιείχε μόνο τα συστατικά του Πίνακα 14, αλλά και κάποια άλλα πολυφαινολικά μόρια, όπως βανιλλικό οξύ, συρινγκικό οξύ, πρωτοκατεχικό οξύ κ.α. που πιθανόν να συμβάλλουν στην εκδήλωση της αύξησης της τιμής της FMD. Ωστόσο, η πολύ χαμηλή συγκέντρωσή τους σε σχέση με τις άλλες πολυφαινόλες, ελαχιστοποιεί αυτή την πιθανότητα.

Συμπερασματικά, θα πρέπει να σημειωθεί ότι το εμπλουτισμένο σε πολυφαινόλες κλάσμα που παράχθηκε από τα κόκκινα σταφύλια, βελτιώνει τη λειτουργία του ενδοθηλίου σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο. Η δράση αυτή εξηγεί εν μέρει τις ευεργετικές επιδράσεις του κόκκινου κρασιού στο καρδιαγγειακό σύστημα. Ένας άμεσος στόχος είναι η διαπίστωση των επιδράσεων του παραπάνω κλάσματος σε κλινικές δοκιμές μακράς διάρκειας ώστε να μπορεί υπάρχει μία πιο ολοκληρωμένη θεώρηση των αισιόδοξων οπωσδήποτε αποτελεσμάτων.

## 2) ΜΕΡΟΣ Β

ΦΥΤΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ

*Polygonum maritimum* οικ. Polygonaceae



## **2.1) ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **2.1.1) ΔΡΟΓΟΒΟΤΑΝΙΚΗ**

#### **2.1.1.a) Συστηματική ταξινόμηση**

Το φυτό *Polygonum maritimum* το οποίο αποτελεί αντικείμενο φυτοχημικής μελέτης του μέρους Β της παρούσας εργασίας ανήκει στην οικογένεια **Polygonaceae** και η συστηματική κατάταξή του έχει ως εξής:

<b>Βασίλειο (Regnum)</b>	<i>Plantae</i>
<b>Άθροισμα (Divisio)</b>	<i>Spermatophyta</i>
<b>Κλάση (Classis)</b>	<i>Angiospermae</i>
<b>Υποκλάση (Subclassis)</b>	<i>Dicotyledones</i>
<b>Τάξη (Ordo)</b>	<i>Polygonales</i>
<b>Οικογένεια (Familia)</b>	<i>Polygonaceae</i>
<b>Γένος (Genera)</b>	<i>Polygonum</i>
<b>Είδος (Species)</b>	<i>maritimum</i>

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι το φυτό *Polygonum maritimum* ανήκει στο άθροισμα των **Σπερματόφυτων**, την κλάση των **Αγγειοσπέρμων**, την υποκλάση των **Δικοτυλήδονων**, την τάξη των **Polygonales** και την οικογένεια των **Polygonaceae**. Η ταυτοποίηση και η συστηματική κατάταξη του φυτού έγινε μετά από την εξέταση των ανατομικών γνωρισμάτων του και μελέτη της αντίστοιχης βιβλιογραφίας.

### **2.1.1.β) Χαρακτηριστικά της οικογένειας *Polygonaceae***

Η οικογένεια **Polygonaceae** είναι μία από τις πιο γνωστές οικογένειες του φυτικού βασιλείου και περιλαμβάνει 45 γένη και 1200 είδη φυτών περίπου (*Flora Hellenica*, 1997). Η γεωγραφική εξάπλωση των φυτών της εντοπίζεται σε όλη σχεδόν την υδρόγειο σε ήπια κυρίως κλίματα, αλλά και σε λίγες περιπτώσεις μέλη της οικογένειας συναντώνται σε ψυχρά καθώς και σε τροπικά κλίματα. Οι μόνες ίσως περιοχές που παρατηρείται απουσία φυτικών ειδών της οικογένειας **Polygonaceae**, είναι η τροπική Νότια Αμερική, το δυτικό τμήμα των Ινδιών και η νοτιοανατολική πλευρά της Ασίας (Watson L & Dallwitz M.J., 1992).

Τα γένη που απαρτίζουν την οικογένεια είναι τα εξής:

*Afrobrunnichia, Antigonon, Aristocapsa, Atraphaxis, Brunnichia, Calligonum, Centrostegia, Chorizanthe, Coccloba, Dedeckera, Dodecahema, Emex, Eriogonum, Fagopyrum, Fallopia, Gilmania, Goodmania, Gymnopodium, Harfordia, Hollisteria, Knorreria, Koenigia, Lastarriaea, Leptogonium, Muconea, Muehlenbeckia, Nemacaulis, Neomillspaughia, Oxygonum, Oxyria, Oxytheca, Parapteropyrum, Persicaria, Podopterus, Polygonella, Polygonum, Pteropyrum, Pterostegia, Rheum, Rumex, Ruprechtia, Stenogonium, Symmeria, Systenotheca, Triplaris.*

Από τα παραπάνω γένη, πιο γνωστά είναι τα *Rheum*, *Rumex*, *Polygonum* και *Fagopyrum* (Polunin O., 1980), κυρίως λόγω των χρήσεών τους στη λαϊκή θεραπευτική.

Χαρακτηριστικά αναφέρουμε ότι φύλλα από είδη των γενών *Rheum* και *Rumex*, χρησιμοποιούνται ως λαχανικά (Καββάδας Δ.Σ., 1956), το *Rheum officinale* και το *Polygonum hydropiper* έχουν καθαρτικές ιδιότητες (Καββάδας Δ.Σ., 1956), το *Rheum emodi* έχει καθαρτική, αντιμυκητιασική και αντιμικροβιακή δράση (Babu K.S. et al., 2003; Agarwal S.K. et al., 2000), το *Rheum tinctorum* παρέχει κυανή χρωστική (Καββάδας Δ.Σ., 1956), ενώ το *Rheum pulmatum* χρησιμοποιείται στην κινεζική και τουρκική λαϊκή θεραπευτική μόνο του ή μαζί με άλλα φυτά και παρουσιάζει δραστικότητα έναντι της *Trichomonas hominis*, αντιφλεγμονώδη, καθαρτική και κυτταροτοξική δράση (Tseng S.H. et al., 2005; Wang H.H., 1993; Kubo I. et al., 1992). Το *Rumex patienta* δρα ανακουφιστικά στο έλκος του στομάχου (Gurbuz I et al., 2005),

το *Rumex bequaertii* εμφανίζει δράση έναντι του ιού HIV-1 (Cos P. et al., 2002), το *Rumex nepalensis* συναντάται στη λαϊκή θεραπευτική στην περιοχή των Ιμαλαΐων ως καθαρτικό, ηπατοπροστατευτικό, αναλγητικό, υποτασικό και ηρεμιστικό (Ghosh L. et al., 2002), ενώ τα σπέρματα του φυτού *Fagopyrum esculentum* χρησιμοποιούνται στην αρτοποιία και τη ζαχαροπλαστική ως υποκατάστata του σίτου (Καββάδας Δ.Σ., 1956).

Πολλές είναι οι αναφορές για χρήση και άλλων φυτών της οικογένειας στη διατροφή και για καλλωπιστικούς λόγους. Αν και η ανατομική διάπλαση των φυτών που συναποτελούν την οικογένεια **Polygonaceae** δεν είναι απολύτως χαρακτηριστική, τα κυριότερα κοινά βιοτανικά χαρακτηριστικά των φυτών που συναποτελούν την οικογένεια περιγράφονται παρακάτω (Καββάδας Δ.Σ., 1956):

- Πόες ή θάμνοι με βλαστούς αρθρωτούς και γονατώδεις.
- Φύλλα απλά με μεμβρανώδη παράφυλλα.
- Άνθη με διάφορα χρώματα, πράσινα, κίτρινα, κόκκινα και λευκά, δίοικα ή πολύγαμα, απέταλα με περιγόνιο μόνιμο, ποώδες ή πεταλοειδές με 5-6 τμήματα χωρισμένα ή συμφυή στη βάση.
- Στήμονες 1-15 και ωοθήκη επιφυής, πεπιεσμένη ή τριγωνική με 1 σπερματοβλάστη και 2-3 στύλους ή στίγματα.
- Καρπός ξηρός και κάρυο μονόχωρο και μονόσπερμο.
- Σπέρμα ορθότροπο.
- Η κύρια ρίζα έχει 4 ξυλώδεις εναλλασσόμενες με 4 ηθμώδεις δεσμίδες.
- Σε όλα σχεδόν τα μέλη της οικογένειας ακόμα και στα μονοετή, η κύρια ρίζα αντικαθίσταται πρώιμα, ενώ σε άλλες περιπτώσεις παρατηρείται απόληξη υπογείων παραφυάδων που διογκώνονται σε κονδυλώδεις όγκους στην κορυφή.
- Τα φυτά που αναπτύσσονται σε υδροβιότοπους, πολλαπλασιάζονται με αυτόματη αποκοπή τμημάτων του βλαστού.

Ανάμεσα στις πολλές και πολύπλοκες δομές που απομονώνονται από είδη της οικογένειας, κυρίαρχη θέση κατέχουν τα πολυφαινολικά παράγωγα. Οι συνηθέστερες χημικές κατηγορίες φυσικών προϊόντων που απαντούν στα **Polygonaceae** είναι:

- ✓ **Φλαβονοειδή**

- ✓ **Μονοσακχαρίτες, δισακχαρίτες, πολυσακχαρίτες**
- ✓ **Στιλβενοειδή**
- ✓ **Τερπένια**
- ✓ **Ανθρακινόνες**

Η ποικιλότητα όσον αφορά τους δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών της οικογένειας **Polygonaceae**, αποτελεί ένα κίνητρο για περαιτέρω φυτοχημική μελέτη, ενώ οι φαρμακολογικές ιδιότητες και χρήσεις πολλών εξ' αυτών, επιτείνουν σίγουρα το ενδιαφέρον γι' αυτήν την πραγματικά πλούσια σε χημικές ουσίες οικογένεια.

#### **2.1.1.γ) Χαρακτηριστικά του γένους *Polygonum* και του είδους *maritimum***

Το γένος ***Polygonum*** συναντάται σε ευρεία γεωγραφική κλίμακα, με 200 περίπου είδη εξαπλωμένα από τις τροπικές ως και τις αρκτικές περιοχές. Στον ευρωπαϊκό χώρο φύονται περίπου 36 είδη του γένους (Polunin O., 1969). Πολλά από τα φυτά του γένους είναι ζιζάνια, άλλα έχουν φαρμακευτική χρήση, κάποια καλλιεργούνται, ενώ λίγα έχουν διακοσμητικό ρόλο (Καββάδας Δ.Σ., 1956).

Πολλαπλασιάζονται εύκολα με σπορά και δια σχίσεως σε ξηρά, υγρά, ηλιόλουστα καθώς και σκιερά εδάφη. Τα περισσότερα μέλη του γένους είναι μονοετείς ή πολυετείς πόρες ή θάμνοι όρθιοι ή αναρριχώμενοι. Τα φύλλα τους είναι επαλλάσσοντα, απλά με μεμβρανώδη και διαφανή παράφυλλα που σχηματίζουν κολεό ο οποίος περιβάλλει τον βλαστό. Τα άνθη τους είναι μικρά και εμφανίζονται κατά μασχαλιαίους έμμισχους στάχυς, βότρυς ή κεφαλιόμορφους κορύμβους, σπανίως μονήρη, απέταλα. Έχουν κάλυκα 4-6μερώς συσσέπαλο πράσινο ή έγχρωμο και πεταλόμορφο. Έχουν 3-9 στήμονες, η ωοθήκη τους είναι μονόχωρη με 2-3μερή στύλο ή στίγμα. Ο καρπός τους είναι τριγωνικός ή δισκοειδής (Καββάδας Δ.Σ., 1956; *Flora Hellenica*, 1997).

Τα είδη του γένους ***Polygonum*** εμφανίζουν βοτανικές διαφορές, έντονες ή όχι. Επίσης, έχουν διαφορές και στη γεωγραφική τους εξάπλωση, αφού υπάρχουν τόποι που ευνοούν την ανάπτυξη κάποιου είδους, αλλά αποκλείουν την παρουσία κάποιου άλλου.

Από τα αναφισβήτητα πολλά είδη του γένους (περισσότερα από 200), θα επικεντρωθούμε στην παράθεση κάποιων βοτανικών στοιχείων για το ***Polygonum maritimum***, αλλά και των υπολοίπων ειδών που αναπτύσσονται στον ελληνικό χώρο.

Όλες οι πληροφορίες που αφορούν τη βοτανική ταυτότητα των ειδών, αντλήθηκαν από τη διεθνή βιβλιογραφία (*Flora Hellenica*, 1997; *Flora Europaea*, 1972; Καββάδας Δ.Σ., 1956). Στην Ελλάδα απαντούν τα εξής είδη:

***Polygonum maritimum*:** Είναι γνωστό και ως Πολύγωνο το παράλιο. Συναντάται σε αμμώδεις ακτές σε ολόκληρη την Ελλάδα, σε παραλίες ωκεανών της Ευρώπης, της Αμερικής, της Βόρειας Αφρικής, καθώς και σε παραμεσόγειες ακτές. Η άνθισή του προσδιορίζεται χρονικά μεταξύ των μηνών Απριλίου -Οκτωβρίου. Τα κυριότερα βοτανικά χαρακτηριστικά του είδους (Εικόνες 20, 21) είναι τα εξής:



Εικόνα 20 . *Polygonum maritimum*.

- Πολυετές φυτό.
- Πόα ή θάμνος.
- Σκληρός βλαστός μήκους 20-50 cm με γόνατα, σχεδόν πλήρως αποξυλωμένος στη βάση.
- Φύλλα ελλειψοειδή-λογχοειδή, δερματώδη με χείλη συνεστραμμένα.
- Κολεοί μακριοί, λευκοί, μεμβρανώδεις με 12 νευρώσεις.
- Άνθη λευκά ή κόκκινα, μονήρη ή σε μασχαλιαίους σχηματισμούς ανά 2-4.
- Καρπός μήκους 4-5 mm, τριγωνικός και κιτρινωπός.



Εικόνα 21. *Polygonum maritimum*.

***Polygonum alpinum*:** Το συγκεκριμένο είδος (Πολύγωνο το αλπικό) αναπτύσσεται σε υγρά, πυριτικά μέρη σε μεγάλα υψόμετρα της βορειοηπειρωτικής Ελλάδας, στην κεντρική και ανατολική Ευρώπη και στο δυτικό, το κεντρικό και βόρειο τμήμα της Ασίας. Η βιοτανική ταυτότητα του περιγράφεται ως εξής:

- Πολυετές φυτό.
- Πόα ή θάμνος.
- Βλαστός μήκους 30-80 cm με πολλά κλαδιά και πολλά φύλλα.
- Φύλλα ωοειδή-λογχοειδή, οξέα που στενεύουν στη βάση.
- Κολεοί βραχείς και πλατείς.
- Άνθη λευκά ή κόκκινα.
- 8 στήμονες και 3 κόκκινα στίγματα.

***Polygonum kitaibelianum*:** Η γεωγραφική του εξάπλωση παρατηρείται σε ασβεστολιθικά κατά προτίμηση εδάφη, στην Ελλάδα, την ανατολική Ευρώπη, την Ασία και τη βόρεια Αφρική. Τα κυριότερα βιοτανικά γνωρίσματά του παρατίθενται παρακάτω:

- Μονοετές φυτό.
- Πόα ή θάμνος.
- Βλαστός μήκους 20-80 cm με γόνατα.
- Φύλλα λίγα σε αριθμό, ελλειψοειδή-λογχοειδή.
- Κολεοί βραχείς με 6-7 νευρώσεις.

- Άνθη ανά 2-3 με ισομήκεις ποδίσκους.

**Polygonum pulchellum:** Ονομάζεται και Πολύγωνο το κομψό, είναι συχνό φυτό σε αμμώδεις περιοχές της ηπειρωτικής Ελλάδας, της Πελοποννήσου και των νησιών του Αιγαίου, στην παραμεσόγειο Ευρώπη και τις μικρασιατικές ακτές. Στη βόρεια Ελλάδα είναι γνωστό και ως πολύκομπο. Χρησιμοποιείται σε παθήσεις των νεφρών και στον σακχαρώδη διαβήτη. Τα κύρια βοτανικά χαρακτηριστικά του είδους είναι τα εξής:

- Μονοετές φυτό.
- Πόα ή θάμνος.
- Βλαστός μήκους 20-80 cm με γόνατα.
- Φύλλα λίγα σε αριθμό, ελλειψοειδή-λογχοειδή.
- Κολεοί βραχείς με 4-6 νευρώσεις.
- Άνθη ανά 1-3 με ποδίσκους.

**Polygonum arenarium:** Στον ελληνικό χώρο το συναντάμε και ως Πολύγονο το αμμόφιλο. Συνήθως φύεται σε καλλιεργούμενους αγρούς και εδάφη της ηπειρωτικής Ελλάδας και της Πελοποννήσου, στη νοτιοανατολική Ευρώπη και τη Μικρά Ασία. Τα κυριότερα βοτανικά γνωρίσματά του είναι:

- Μονοετές φυτό.
- Πόα ή θάμνος.
- Βλαστός μήκους 20-60 cm με γόνατα.
- Φύλλα λίγα σε αριθμό, γραμμοειδή-λογχοειδή.
- Κολεοί βραχείς με 4-6 νευρώσεις.
- Άνθη ανά 2-3 με ισομήκεις ποδίσκους.
- Καρπός καστανός, μήκους 2 mm.

**Polygonum aviculare:** Το συγκεκριμένο είδος αναπτύσσεται σε καλλιεργούμενα και χερσαία εδάφη της Ελλάδας και χρησιμοποιείται ως διουρητικό υπό τη μορφή αφεγήματος και για διακοσμητικούς λόγους. Η βοτανική ταυτότητα του περιγράφεται ως εξής:

- Μονοετές φυτό.
- Πόα ή θάμνος.

- Βλαστός λεπτός μήκους 10-80 cm.
- Φύλλα ωοειδή, ελλειψοειδή ή λογχοειδή.
- Κολεοί δερματώδεις με 6 νευρώσεις.
- Άνθη λευκά ή ροδίζοντα, ανά 1-4 με ποδίσκους.
- Καρπός τριγωνικός.

**Polygonum equisetiforme:** Αναπτύσσεται σε άγονα εδάφη της Πελοποννήσου, σε νησιά του Ιονίου και του Αιγαίου, στην Κορσική, τη Σαρδηνία, την Τυνησία και την Αλγερία. Τα κύρια βοτανικά χαρακτηριστικά του είδους συνοψίζονται ως εξής:

- Πολυετές φυτό.
- Πόα ή θάμνος.
- Βλαστός μήκους 30-100 cm, αποξυλωμένος στη βάση, με διακλαδώσεις.
- Φύλλα ατροφικά, προμήκη-λογχοειδή με χείλη συνεστραμμένα.
- Κολεοί βραχείς, μήκους 3-4 mm.
- Άνθη ρόδινα ανά 2-3 σχηματίζουν στάχυς.
- Καρπός τριγωνικός και μελανός.

**Polygonum idaeum:** Είναι ενδημικό είδος του ελληνικού χώρου. Συναντάται σε μεγάλα υψόμετρα στην Κρήτη και την Πελοπόννησο. Τα κυριότερα βοτανικά γνωρίσματά του είδους είναι τα εξής:

- Πολυετές φυτό.
- Πόα ή θάμνος.
- Βλαστός μήκους 3-6 cm, αποξυλωμένος στη βάση, με διακλαδώσεις.
- Φύλλα ελλειψοειδή-λογχοειδή.
- Κολεοί λευκοί και δερματώδεις.
- Καρπός λείος και κίτρινος.

**Polygonum lapathifolium:** Η γεωγραφική του εξάπλωση παρατηρείται σε υγρές περιοχές της Ελλάδας και σε εύκρατα κλίματα σε όλο τον κόσμο. Τα κυριότερα βοτανικά χαρακτηριστικά του παρατίθενται παρακάτω:

- Μονοετές φυτό.
- Πόα ή θάμνος.

- Βλαστός διακλαδισμένος μήκους 20-80 cm.
- Φύλλα ωοειδή-λογχοειδή.
- Κολεοί με λεία ή βλεφαριδωτά χείλη.
- Άνθη λευκοπράσινα ή ρόδινα που σχηματίζουν προμήκεις, κυλινδρικούς και συμπαγείς στάχυς.
- Καρπός λείος και δισκοειδής

**Polygonum hydropiper:** Το συγκεκριμένο είδος αναπτύσσεται σε υγρά μέρη της ηπειρωτικής Ελλάδας και είναι γνωστό και ως αγριοπιπεριά. Η βοτανική ταυτότητα του περιγράφεται ως εξής:

- Μονοετές φυτό.
- Πόα ή θάμνος.
- Βλαστός μήκους 20-80 cm.
- Φύλλα προμήκη ή λογχοειδή.
- Κολεοί λείοι.
- Άνθη λευκοπράσινα ή ρόδινα.
- Καρπός τριγωνικός και δισκοειδής

**Polygonum serrulatum:** Συνήθως φύεται σε υγρά εδάφη της Στερεάς Ελλάδας, της Πελοποννήσου, της Κρήτης, των νησιών του Ιονίου, στην παραμεσόγειο Ευρώπη, την Αφρική, την Ασία και την Ωκεανία. Τα κυριότερα βοτανικά γνωρίσματά του είναι:

- Πολυετές φυτό.
- Πόα ή θάμνος.
- Βλαστός μήκους 30-100 cm.
- Φύλλα λογχοειδή-γραμμοειδή.
- Κολεοί χνουδωτοί.
- Άνθη λευκά ή ρόδινα.

**Polygonum persicaria:** Αναπτύσσεται σε υγρά εδάφη της βορειοηπειρωτικής Ελλάδας και σε εύκρατες περιοχές σε όλη την υδρόγειο. Τα κύρια βοτανικά χαρακτηριστικά του είδους συνοψίζονται ως εξής:

- Μονοετές φυτό.

- Πόα ή θάμνος.
- Βλαστός μήκους 20-80 cm.
- Φύλλα λογχοειδή-ωοειδή.
- Κολεοί χνουδωτοί και βλεφαριδωτοί.
- Άνθη λευκά ή ρόδινα.

**Polygonum mite:** Το συγκεκριμένο είδος αναπτύσσεται κατά μήκος ποταμών και σε ρυάκια της βορειοηπειρωτικής Ελλάδας, στην κεντρική Ευρώπη μέχρι και τον Καύκασο. Η βοτανική ταυτότητα του περιγράφεται ως εξής:

- Μονοετές φυτό.
- Πόα ή θάμνος.
- Βλαστός μήκους 20-80 cm.
- Φύλλα λογχοειδή-προμήκη.
- Κολεοί με βραχείες βλεφαρίδες.
- Άνθη λευκά ή πρασινέρυθρα.

**Polygonum amphibium:** Είναι συχνό φυτό σε ελώδεις περιοχές της βορειοηπειρωτικής Ελλάδας, της Ευρώπης, της Ασίας, της Αφρικής και της βόρειας Αμερικής. Τα κυριότερα βοτανικά γνωρίσματά του παρατίθενται παρακάτω:

- Πολυετές φυτό.
- Πόα ή θάμνος.
- Βλαστός υποθαλάσσιος.
- Φύλλα λογχοειδή ή προμήκη.
- Κολεοί χνουδωτοί και βλεφαριδωτοί.
- Άνθη ρόδινα.
- Καρπός καστανός μήκους 3 mm.

**Polygonum viviparum:** Συναντάται σε μεγάλα υψόμετρα στην ηπειρωτική Ελλάδα, την Πελοπόννησο, την Ευρώπη, την Ασία, τη βόρεια Αμερική και σε αρκτικές περιοχές. Κύρια βοτανικά χαρακτηριστικά του είδους είναι τα εξής:

- Πολυετές φυτό.
- Πόα ή θάμνος.

- Βλαστός παχύς μήκους 10-30 cm.
- Φύλλα λογχοειδή και ελλειψοειδη.
- Κολεοί πλατείς.
- Άνθη λευκά ή ρόδινα.
- Καρπός καστανός, τριγωνικός, μήκους 2-3 mm.

**Polygonum bistorta:** Συνήθως φύεται σε υγρά και ορεινά εδάφη της ηπειρωτικής Ελλάδας, της Πελοποννήσου, των νησιών του Ιονίου, στην Ευρώπη, την Ασία και τη βόρεια Αμερική. Η βοτανική ταυτότητα του περιγράφεται ως εξής:

- Πολυετές φυτό.
- Πόα ή θάμνος.
- Βλαστός μήκους 20-90 cm.
- Φύλλα αμβλεία και μακρόμισχα τα κατώτερα, οξέα τα ανώτερα.
- Κολεοί μακριοί και κυλινδρικοί.
- Άνθη ρόδινα.
- Καρπός καστανός, τριγωνικός μήκους 4-5 mm.

Πέρα από τα παραπάνω είδη, ενδιαφέρον παρουσιάζουν κάποια ακόμα φυτά του γένους **Polygonum** που απαντούν στον ελληνικό χώρο. Το ελληνικό ενδημικό φυτό **Polygonum icaricum** αναπτύσσεται στην Ικαρία, τη Σαμοθράκη και τη Χίο και είναι συγγενικό με κάποια ασιατικά είδη, π.χ. **Polygonum setosum**. Το **Polygonum praelongum** απαντάται στο Καστελλόριζο, ενώ υπάρχουν μη εξακριβωμένες πληροφορίες για παρουσία του και στην Τουρκία, ενώ το ελληνικό ενδημικό είδος **Polygonum papillosum** φύεται στη Φωκίδα και τη Φθιώτιδα και είναι και αυτό συγγενικό με το **Polygonum setosum**. Αξιοσημείωτες είναι ακόμα οι περιπτώσεις του **Polygonum mesembricum** που εμφανίζεται σε νησιά του Αιγαίου (και σε περιοχές της Μαύρης Θάλασσας), του **Polygonum albanicum** που απαντάται στα σύνορα της Ελλάδας με την Αλβανία και τα Σκόπια και του **Polygonum longipes** που επίσης υπάρχει στον ελληνικό χώρο, όπως και σε γειτονικά κράτη (Αλβανία, Τουρκία).

Από τα είδη που δεν συναντάμε στην ελληνική επικράτεια, ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα παρακάτω:

**Polygonum cuspidatum:** Είδος της Ιαπωνίας και της Κίνας.

*Polygonum orientale*: Ιθαγενές είδος της Ινδίας.

*Polygonum tinctorum*: Ιθαγενές είδος της Ιαπωνίας, γνωστό για την κυανή χρωστική που περιέχει.

#### 2.1.1.δ) Γεωγραφική εξάπλωση του φυτού *Polygonum maritimum* στον ελληνικό χώρο

Το φυτό *Polygonum maritimum* είναι κοινό είδος της ελληνικής χλωρίδας και συναντάται κυρίως σε αμμώδεις ακτές σε ολόκληρη την Ελλάδα (Καββάδας Δ.Σ., 1956). Ωστόσο η συλλογή του για τη συγκεκριμένη φυτοχημική μελέτη έγινε στον νομό Αρκαδίας στην Πελοπόννησο (Εικόνα 22).



Εικόνα 22. Τόπος συλλογής του φυτού *Polygonum maritimum*.

## 2.1.2) ΔΡΟΓΟΧΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

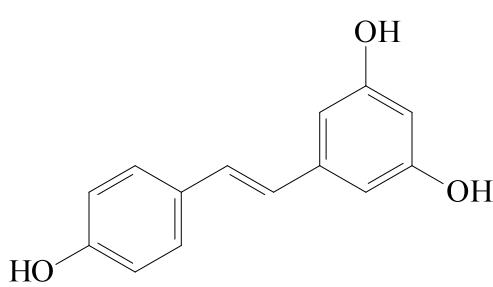
### 2.1.2.a) Φυτοχημική και φαρμακολογική προσέγγιση του γένους *Polygonum*

Ο χημικός πλούτος των ειδών *Polygonum* έχει εκτιμηθεί από τους επιστήμονες και έχουν γίνει αντικείμενο φυτοχημικής μελέτης σε πολλές εργασίες. Έχουν απομονωθεί δευτερογενείς μεταβολίτες που κατά κύριο λόγο ανήκουν στην ευρύτερη κατηγορία των πολυφαινολικών ενώσεων, αλλά και μόρια, όπως τερπενοειδή που δεν συγκαταλέγονται στις πολυφαινόλες. Στον Πίνακα 51 αναφέρονται ενδεικτικά κάποιες φυτοχημικές εργασίες που έχουν πραγματοποιηθεί στο γένος *Polygonum*.

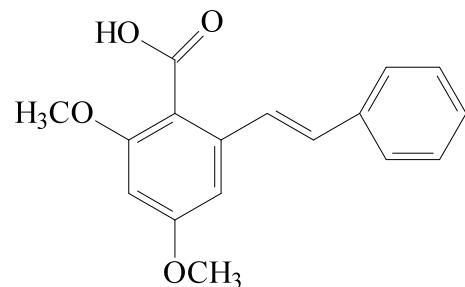
ΦΥΤΑ	ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ
<i>Polygonum cuspidatum</i>	Στιλβένια Ανθρακινόνες	Chu X. <i>et al.</i> , 2005
<i>Polygonum persicaria</i>	Στιλβένια	Smolarz H.D & Potrzewboski M.J., 2002
<i>Polygonum chinensis</i>	Τερπένια	Tsai P.L. <i>et al.</i> , 1998
<i>Polygonum bistorta</i>	Τριτερπένια	Manoharan K.P. <i>et al.</i> , 2005
<i>Polygonum hydropiper</i>	Φλαβονοειδή	Peng Z.F. <i>et al.</i> , 2003
<i>Polygonum hydropiper</i>	Φλαβονοειδή	Furuta T. <i>et al.</i> , 1986
<i>Polygonum hydropiper</i>	Σεσκιτερπένια	Fukuyama Y. <i>et al.</i> , 1985
<i>Polygonum stagninum</i>	Φλαβονοειδή	Datta B.K. <i>et al.</i> , 2002
<i>Polygonum minus</i>	Φλαβονοειδή	Urones J.G. <i>et al.</i> , 1990
<i>Polygonum nodosum</i>	Φλαβονοειδή	Isobe T. <i>et al.</i> , 1980
<i>Polygonum nepalense</i>	Φλαβονοειδή	Rathore A. <i>et al.</i> , 1986
<i>Polygonum viscosum</i>	Φλαβονοειδή Σεσκιτερπένια	Datta B.K. <i>et al.</i> , 2000
<i>Polygonum lapathifolium</i>	Φλαβονοειδή	Ahmed M. <i>et al.</i> , 1990
<i>Polygonum paleaceum</i>	Φλαβονοειδή Φαινολικά μόρια	Wang K.J. <i>et al.</i> , 2005

Πίνακας 51. Φυτοχημική μελέτη των ειδών του γένους *Polygonum*.

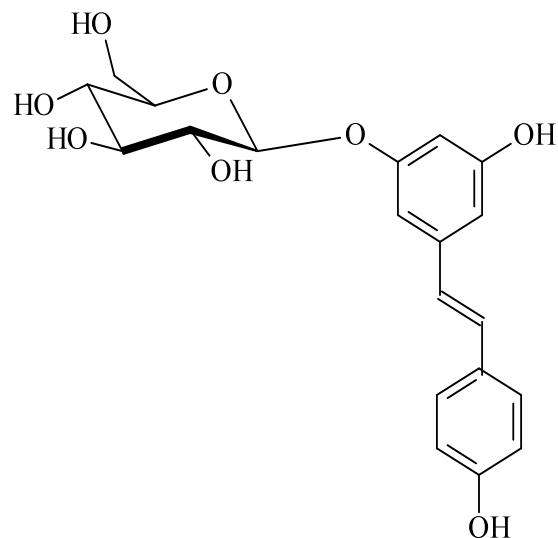
Από τον παραπάνω πίνακα φαίνεται η έντονη παρουσία πολυφαινολικών μεταβολιτών, κυρίως φλαβονοειδών, στα είδη *Polygonum*. Σε κάποιες περιπτώσεις όμως έχουν απομονωθεί και ανθρακινόνες, αλλά και διάφοροι τύποι τερπενίων. Ακολουθούν οι χημικοί τύποι κάποιων μορίων, από αυτά που έχουν απομονωθεί.



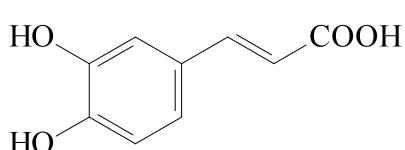
*trans*-ρεσβερατρόλη



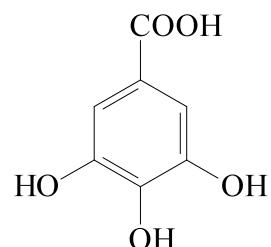
περσιλβένιο



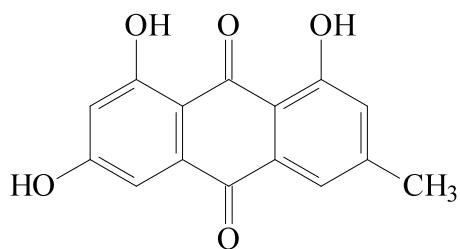
*trans*-πικεΐδης



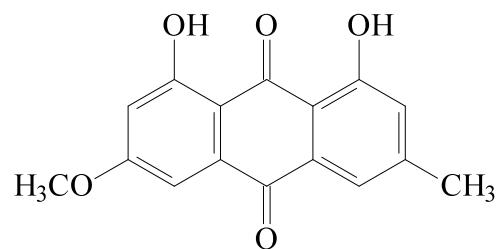
*trans*-καφεϊκό οξύ



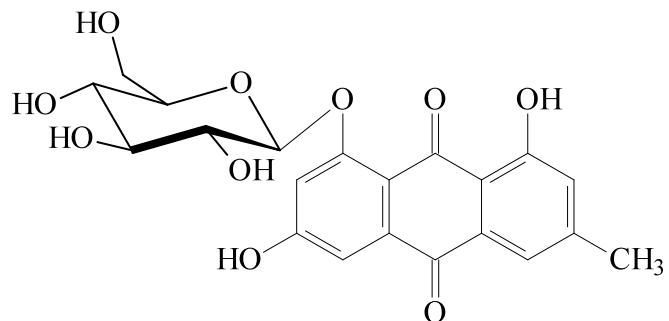
γαλλικό οξυ



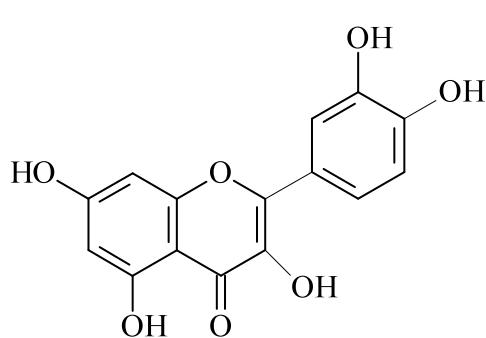
**εμοδίνη**



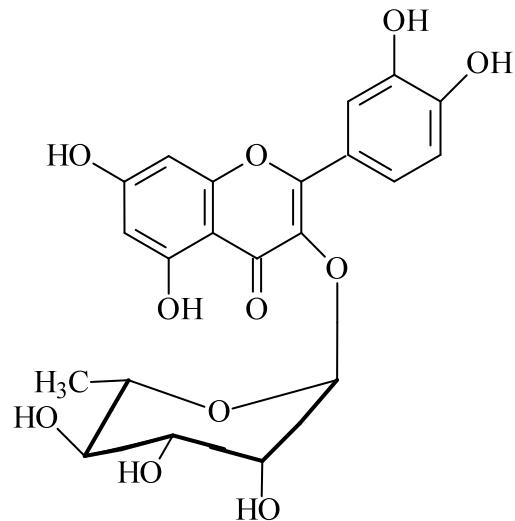
**φυσκιονίνη**



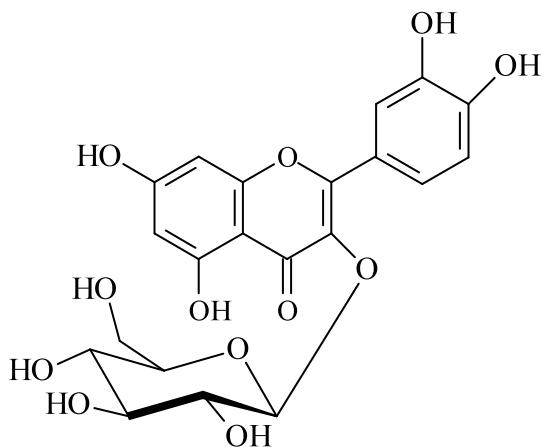
**αντραγλυκοσίδης Β**



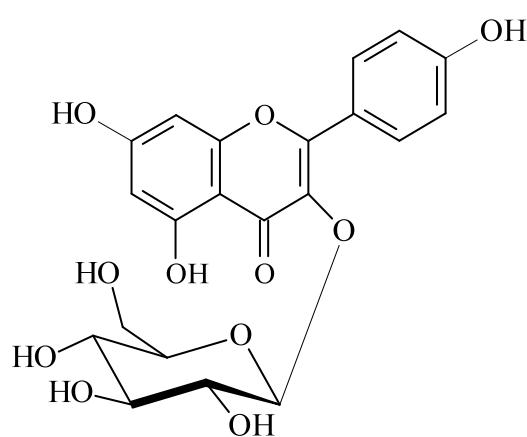
**κερκετίνη**



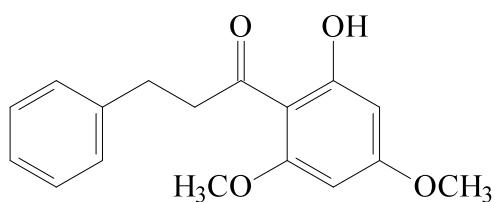
**κερκιτρίνη**



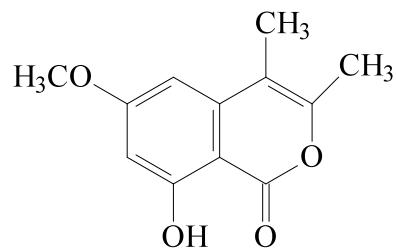
κερκετινο-3-O-γλυκοπυρανοσίδης



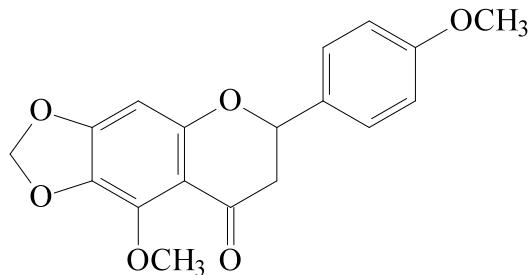
καιμπερολο-3-O-γλυκοπυρανοσίδης



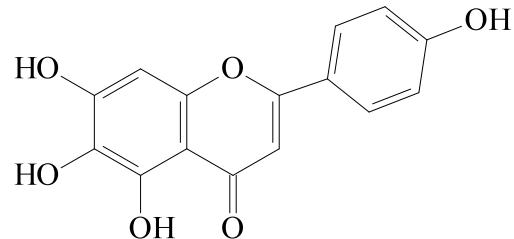
λαπαθόνη



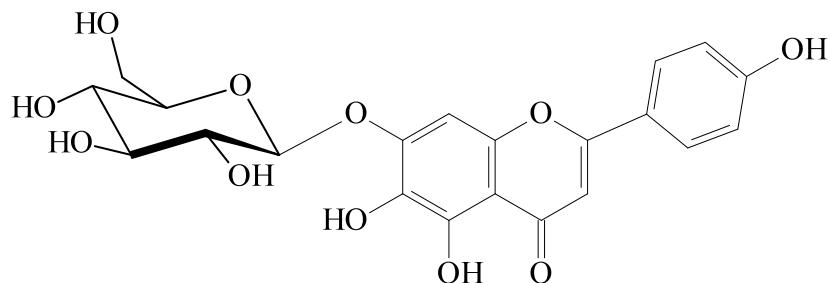
πολυγονολίδιο



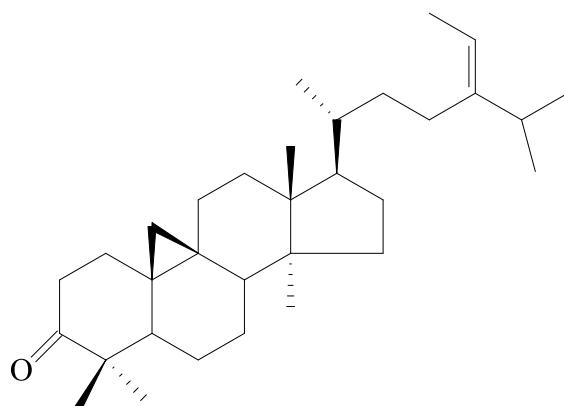
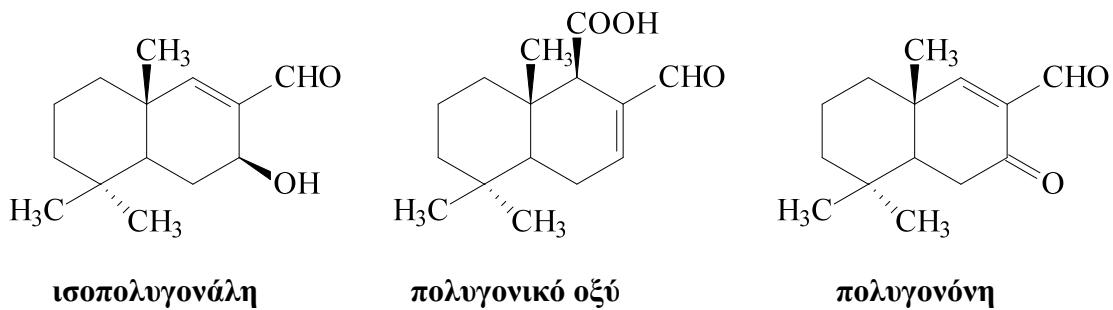
5,4'-διμεθοξυ-6,7-μεθυλενοδιοξυφλαβανόνη



σκουτελαρεΐνη



6-υδροξυαπιγενίνη



**24 (E)-αιθυλιδενοκυκλοαρτανόνη**

Εκτός όμως από το φυτοχημικό ενδιαφέρον, πολλά φυτά του γένους *Polygonum* έχουν αναφερθεί στη διεθνή βιβλιογραφία, λόγω κάποιων φαρμακολογικών ιδιοτήτων των ίδιων ή των μεταβολιτών τους (Πίνακας 52).

ΦΥΤΑ	ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΗ	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ
<i>Polygonum paleaceum</i>	Αντιοξειδωτική	Wang K.J. <i>et al.</i> , 2005
<i>Polygonum cuspidatum</i>	Οιστρογονική	Matsuda H. <i>et al.</i> , 2001
<i>Polygonum chinensis</i>	Αντιφλεγμονώδης Αντιαλλεργική	Tsai P.L. <i>et al.</i> , 1998
<i>Polygonum tinctorium</i>	Έναντι του ιού HIV-1	Zhong Y. <i>et al.</i> , 2005
<i>Polygonum multiflorum</i>	Έναντι της νόσου Parkinson	Li X. <i>et al.</i> , 2005
<i>Polygonum multiflorum</i>	Αντιοξειδωτική	Wong C.C. <i>et al.</i> , 2006
<i>Polygonum multiflorum</i>	Αντιφλεγμονώδης	Li R.W. <i>et al.</i> , 2003
<i>Polygonum viscosum</i>	Αντιχολινεργική Έναντι του ιού HIV-1 Κυτταροτοξική	Datta B.K. <i>et al.</i> , 2004
<i>Polygonum argyrocoleum</i>	Στομαχική	Rahman M. A. <i>et al.</i> , 2004
<i>Polygonum hydropiper</i>	Αντιμεταλλαξιογόνος	Fujimoto T. <i>et al.</i> , 1987
<i>Polygonum lapathifolium</i>	Προληπτική σε καρκίνο του δέρματος	Takasaki M. <i>et al.</i> , 2001
<i>Polygonum punctatum</i>	Αντιμικροβιακή	Penna C. <i>et al.</i> , 2001
<i>Polygonum cuspidatum</i>	Έναντι του ιού HBV	Chang J.C. <i>et al.</i> , 2005

Πίνακας 52. Φαρμακολογικές δράσεις των ειδών του γένους *Polygonum*.

Στον Πίνακα 52 παρουσιάζονται συνοπτικά κάποιες επιστημονικές εργασίες που περιέχουν στοιχεία για τη δραστικότητα ορισμένων ειδών *Polygonum*.

Πιο συγκεκριμένα, η αντιοξειδωτική δράση του φυτού *Polygonum paleaceum*, τόσο του εκχυλίσματος των ριζών του με CH<sub>3</sub>COCCH<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O, όσο και των φαινολικών μορίων που απομονώθηκαν αναφέρεται σε *in vitro* πειράματα.

Η αντιοξειδωτική δράση του υδαταλκοολικού εκχυλίσματος των βλαστών του *Polygonum multiflorum* ελέγχθηκε επίσης *in vitro*. Το ίδιο φυτό εμφάνισε ακόμα *in vitro* αντιφλεγμονώδη (το αιθανολικό εκχύλισμα των βλαστών του) καθώς και *in vivo* αντιπαρκισονική δράση (το αιθανολικό εκχύλισμα των ριζών του).

Η οιστρογονική δράση στην περίπτωση του φυτού *Polygonum cuspidatum*, αναφέρεται στα ανθρακινονικά παράγωγα που απομονώθηκαν από τις ρίζες του. Επιπρόσθετα, τα τερπενικά παράγωγα που απομονώθηκαν από τους βλαστούς και τις ρίζες του *Polygonum chinensis*, είναι υπεύθυνα για *in vitro* αντιαλλεργική και αντιφλεγμονώδη δραστικότητα.

Το υδατικό εκχύλισμα του φυτού *Polygonum hydropiper* εκδηλώνει *in vitro* αντιμεταλλαξιογόνο δράση και το *Polygonum argyrocoleum* δρα ως στομαχικό στη λαϊκή θεραπευτική. Αντιμικροβιακή δράση σε *in vitro* πειράματα, επέδειξαν το διχλωρομεθανικό και το μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού *Polygonum punctatum*, ενώ οι μεταβολίτες που απομονώθηκαν από το υ πέργειο τμήμα του *Polygonum lapathifolium*, λειτουργούν ως προληπτικά σε καρκίνο του δέρματος, σε *in vivo* πειράματα.

Τέλος, *in vitro* αντιϊκή δράση εμφανίζουν το αιθανολικό εκχύλισμα του φυτού *Polygonum cuspidatum* (ηπατίτιδα B) και το υδατικό εκχύλισμα του *Polygonum tinctorium* (AIDS), ενώ πολυσύνθετη *in vitro* δράση (αντιχολινεργική, κυτταροτοξική και αντί -HIV-1 δράση) παρουσιάζουν μόρια (σεσκιτερπένια και γλυκοσίδης φλαβονοειδούς) που απομονώθηκαν από το υπέργειο τμήμα του *Polygonum viscosum*.

#### 2.1.2.β) Χημικές κατηγορίες φυσικών προϊόντων που απομονώθηκαν από το φυτό *Polygonum maritimum*

Κατά τη φυτοχημική μελέτη του φυτού που πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 14 φυσικά προϊόντα που ανήκουν σε πέντε συνολικά χημικές κατηγορίες:

- ✓ **Φλαβονοειδή**
- ✓ **Φαινολικά παράγωγα**
  - α) Αρυλοπροπάνια
  - β) Ρεσορκινόλες
  - γ) Ακετοφαινόνες
  - δ) Φαινολικοί γλυκοσίδες
- ✓ **Σεσκιτερπένια**

- ✓ **Φυτοστερόλες**
- ✓ **Λιπαρά οξέα**

Στις επόμενες παραγράφους παρατίθενται ορισμένα στοιχεία και οι φαρμακολογικές ιδιότητες των κατηγοριών στις οποίες ανήκουν οι ουσίες που απομονώθηκαν κατά τη φυτοχημική μελέτη του φυτού. Πρέπει να σημειωθεί ότι στην περίπτωση των φαινολικών παραγώγων, πέρα από τις πληροφορίες που δίνονται για την ευρύτερη κατηγορία, γίνεται ειδική μνεία καὶ σε τέσσερις φαινολικές υποομάδες (αρυλοπροπάνια, ρεσορκινόλες, ακετοφαινόνες και φαινολικούς γλυκοσίδες), καθώς τα φαινολικά μόρια που απομονώθηκαν ανήκουν σε αυτές τις υποομάδες. Ενώ τα φλαβονοειδή, ανήκουν μεν στα πολυφαινολικά μόρια, αλλά εξετάζονται ξεχωριστά, λόγω της ποικιλότητάς τους.

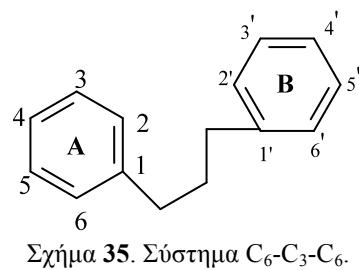
#### A) ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ

Τα φλαβονοειδή ανήκουν στις φαινολικές ενώσεις και αποτελούν μία μεγάλη και σπουδαία κατηγορία φυσικών προϊόντων. Κάποια από αυτά είναι ισχυρώς χρωματισμένα, π.χ. ανθοκυάνες και προσδίδουν ένα ευρύ φάσμα χρωματισμού από κόκκινο σε μπλε, σε διάφορα άνθη, καρπούς και φύλλα. Το πιο συνηθισμένο χρώμα τους είναι το κίτρινο και σ' αυτό οφείλουν και το όνομά τους (flavus=κίτρινο). Υπάρχουν όμως και τα άχρωμα (φλαβόνες) τα οποία είναι υπεύθυνα για το άσπρο χρώμα των λευκών ανθέων. Απαντούν κυρίως στα ανώτερα φυτά, αλλά και σε πολλές ομάδες κατωτέρων φυτών και μυκήτων, ποτέ όμως στα βακτήρια (Harborne J.B. & Baxter H., 1999).

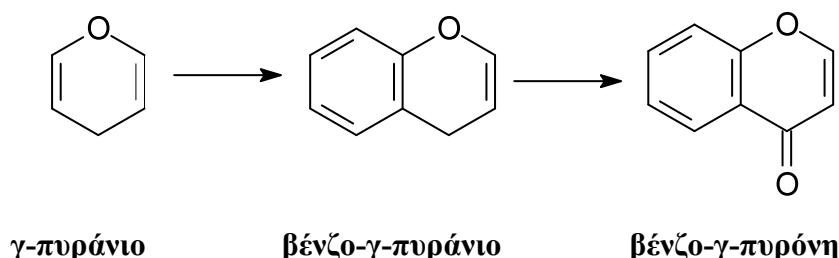
Άλλοι παράπλευροι με τον χρωματισμό ρόλοι που επωμίζονται τα φλαβονοειδή, είναι η συμμετοχή τους στην ανάπτυξη και την εξέλιξη των φυτών. Είναι αποδεδειγμένο ότι τα φλαβονοειδή των φύλλων, κατανέμονται τόσο στην εξωτερική όσο και στην εσωτερική επιδερμική στοιβάδα και παρέχουν προστασία από την ακτινοβολία UV-B. Επιπρόσθετα, έχει αναφερθεί ότι τα φλαβονοειδή που υπάρχουν στις ρίζες των *Leguminosae* αποκαθιστούν την ισορροπία αζώτου στα φυτά, με τη σηματοδότηση της μόλυνσής τους από βακτήρια του γένους *Rhizobium*. Πειράματα φυσιολογίας έχουν

αποδείξει ότι οι γλυκοσίδες φλαβονοειδών που εκκρίνονται στη γύρη, συμμετέχουν στην εναπόθεσή της, συμβάλλοντας μ' αυτόν τον τρόπο στην αναπαραγωγή των φυτών. Τέλος, τα φλαβονοειδή ασκούν και προστατευτική δράση στα φυτά, έναντι ζώων και μυκήτων. Συγκεκριμένα, υπάρχουν φλαβονοειδή που συνδέονται με πρωτεΐνες και εμποδίζουν τη βρώση φυτών από τα φυτοφάγα ζώα και υπάρχουν κάποια άλλα (φλαβόνες, ισοφλαβόνες) που δρουν ως φυτοαλεξίνες με την de novo σύνθεσή τους, σαν απάντηση σε μυκητιασική μόλυνση κάποιου φυτού.

Από χημικής άποψης, τα φλαβονοειδή είναι φαινολι ή παράγωγα που συνίστανται από 15 τουλάχιστον άτομα άνθρακα (δύο βενζολικούς πυρήνες ενωμένους με μία αλυσίδα τριών ατόμων άνθρακα), δομή που αναφέρεται και ως C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> (Σχήμα 35). Η δομή αυτή με τροποποίηση οδηγεί στις χαλκόνες.

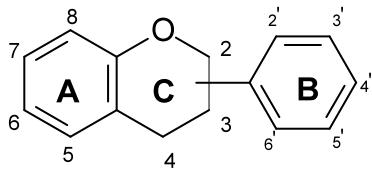


Η βένζο-γ-πυρόνη (χρωμόνη) είναι βασική πρόδρομη ουσία για τον σχηματισμό των φλαβονοειδών (Βερυκοκίδου-Βιτσαροπούλου Ε., 1997) (Σχήμα 36).



Σχήμα 36. Σχηματισμός βένζο-γ-πυρόνης.

Ως βασικός σκελετός των φλαβονοειδών θεωρείται ο δακτύλιος χρωμανίου (Σχήμα 37).



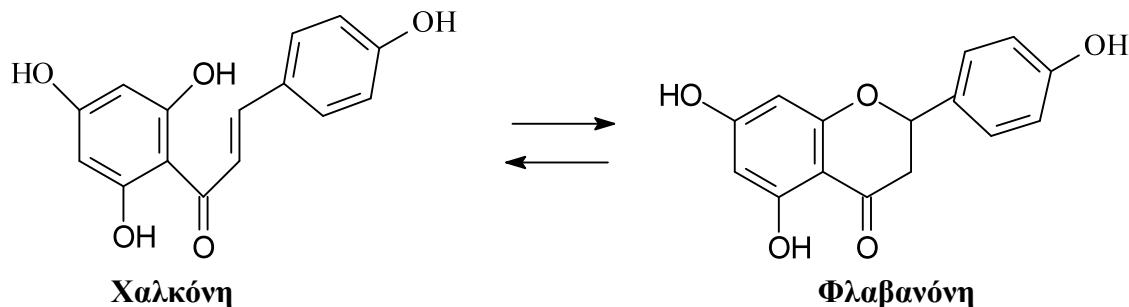
Σχήμα 37. Χρωμάνιο.

Τα φλαβονοειδή μπορούν να διαχωριστούν σε υποκατηγορίες, ανάλογα τα χρησιμοποιούμενα κριτήρια:

- 1) Ανάλογα με το αν ο ετεροκυκλικός δακτύλιος είναι **κορεσμένος ή όχι**, ταξινομούνται σε δύο ομάδες. Τα φλαβονοειδή με κορεσμένο δακτύλιο ανήκουν σε φλαβανόνες και φλαβάνες, ενώ αυτά με ακόρεστο δακτύλιο είναι ανθοκυάνες, φλαβόνες και φλαβονόλες.
- 2) Ανάλογα με το **μοριακό βάρος** τους, διακρίνονται σε μονομερή, διμερή, αλλά και πολυμερή.
- 3) Ανάλογα με τη **βιοσυνθετική πορεία** που ακολουθούν, κατατάσσονται σε κύρια προϊόντα (χαλκόνες, φλαβανόνες) και παραπροϊόντα (ανθοκυάνες).
- 4) Ανάλογα με τη **θέση της πλάγιας αλυσίδας της φαίνυλ-ομάδας στις θέσεις 2 ή 3** του ετεροκυκλικού δακτυλίου, διακρίνονται σε φλαβόνες ή ισοφλαβόνες αντίστοιχα.
- 5.) Ανάλογα με το αν είναι **συνδεδεμένα με σάκχαρα ή όχι και με ποιον τρόπο**, διακρίνονται σε μονοσακχαρίτες, δισακχαρίτες, ολιγοσακχαρίτες, O-γλυκοσίδες και C-γλυκοσίδες.

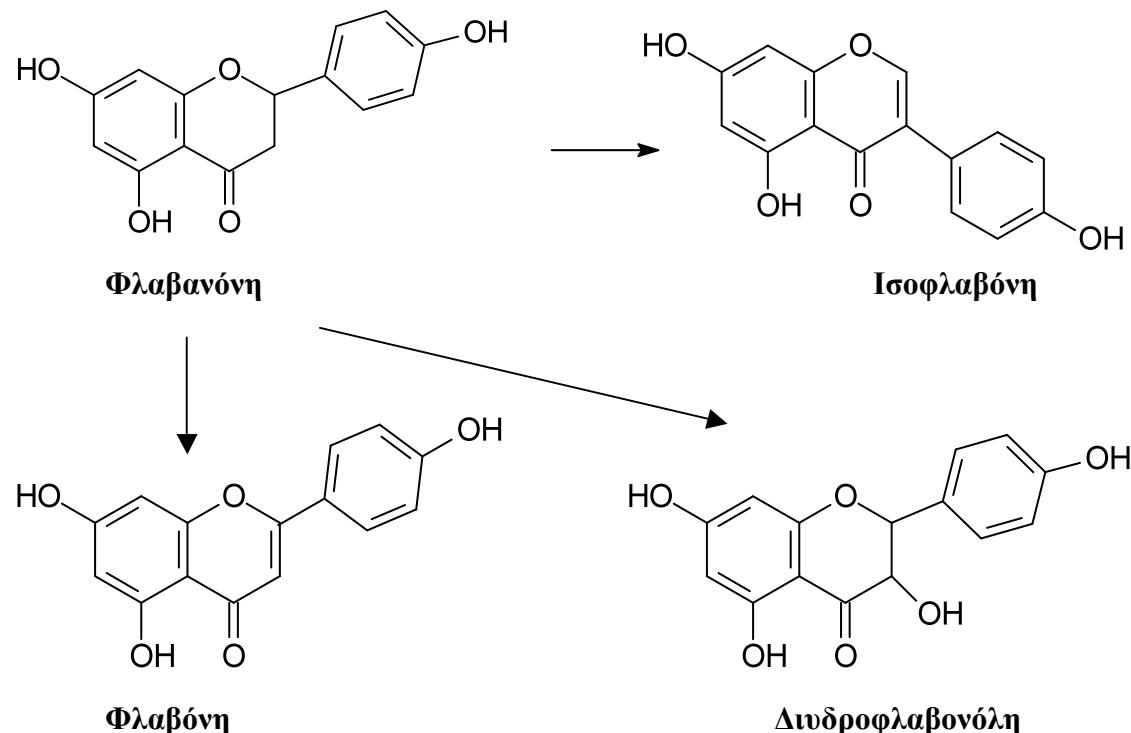
Τα διάφορα φλαβονοειδή συντίθενται μέσω των βιοσυνθετικών οδών του σικιμικού και του οξικού οξέος και οι κυριότερες κατηγορίες τους με βάση τη

βιοσυνθετική τους πορεία, φαίνονται στα ακόλουθα σχήματα (Σχήμα 38, 39, 40) (Harborne J.B., 1986).



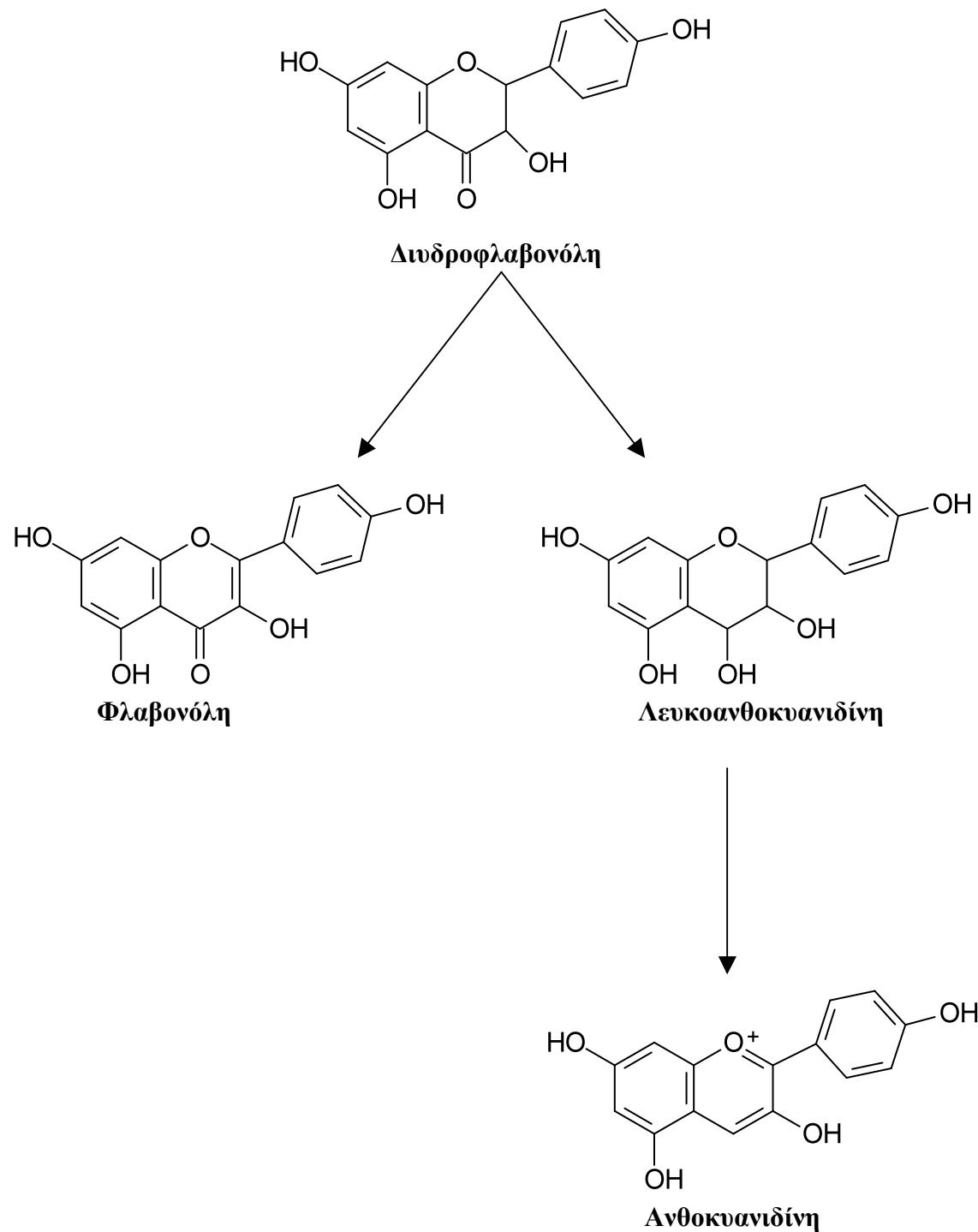
Σχήμα 38. Σχηματισμός φλαβανονών.

Από τον σκελετό φλαβανόνης προκύπτουν με διάφορες μετατροπές οι ισοφλαβόνες, οι διυδροφλαβονόλες και οι φλαβόνες. Πιο συγκεκριμένα, οι ισοφλαβόνες προκύπτουν με ανακατάταξη, οι διυδροφλαβονόλες με επίδραση αλκάλεως και οι φλαβόνες με αφυδρογόνωση.



Σχήμα 39. Βιοσύνθεση ισοφλαβονών, φλαβονών και διυδροφλαβονολών.

Η διυδροφλαβονόλη είναι το μόριο από το οποίο αρχίζει η βιοσύνθεση των φλαβονολών, των λευκοανθοκυανιδινών και των ανθοκυανιδινών.



Σχήμα 40. Σχηματισμός φλαβονολών, λευκοανθοκυανιδινών και ανθοκυανιδινών.

Τα φλαβονοειδή είναι από τις πιο συχνά απομονώσιμες ουσίες στους φυτικούς οργανισμούς, γεγονός που οδήγησε σε λεπτομερή έλεγχο των βιολογικών τους ιδιοτήτων και τη διαπίστωση των σημαντικών επιδράσεών τους στον ανθρώπινο οργανισμό.

➤ **Αντιοξειδωτική δράση:** Η ύπαρξη φαινολικών υδροξυλίων έχει ως αποτέλεσμα την εκδήλωση αντιοξειδωτικής δράσης. Τα υδροξύλια αυτά δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες και εμποδίζουν την οξείδωση των φωσφολιπιδίων των κυτταρικών μεμβρανών. Επίσης, τα φλαβονοειδή αυξάνουν την αντιοξειδωτική ισχύ της βιταμίνης C, δρώντας ως δότες υδρογόνου και προκαλώντας αναγωγή του ασκορβικού οξέος. (Valenzuela A. et al., 1986). Πρόσφατες έρευνες συσχετίζουν τη δομή των φλαβανονών με το αντιοξειδωτικό αποτελέσμα (Di Majo D. et al., 2005). Παρατηρήθηκε λοιπόν ότι η παρουσία υδροξυλίων στις θέσεις 3', 4' σε άγλυκες φλαβανονες, δεν επηρεάζει την αντιοξειδωτική δράση, ενώ στις γλυκοζυλιωμένες στη θέση 7 φλαβανόνες αυξάνει την αντιοξειδωτική ισχύ. Η O -μεθυλίωση σε άγλυκες φλαβονόνες δεν επιφέρει καμία αλλαγή, σ' αντίθεση με τις γλυκ οξυλιωμένες στη θέση 7 όπου μειώνεται το αντιοξειδωτικό αποτελέσμα. Τέλος, το είδος του σακχάρου προκαλεί διακυμάνσεις στη δράση, ενώ όταν η θέση 7 είναι ελεύθερη, παρατηρείται αυξημένη δραστικότητα. Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες των φλαβονοειδών έχουν και ευεργετικά αποτελέσματα στην προστασία της οξείδωσης της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL) οπότε και μειώνεται ο κίνδυνος καρδιαγγειακών παθήσεων (Cirico T.L. & Omaye S.T., 2006). Διάφορα φυτά που περιέχουν φλαβονοειδή, είναι γνωστά για τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες. Στη διεθνή βιβλιογραφία ολοένα και πληθαίνουν οι αναφορές στις αντιοξειδωτικές δράσεις φυτικών εκχυλισμάτων και άλλων παρασκευασμάτων που οφείλονται στα φλαβονοειδή. Αυτό είναι πολύ σημαντικό αν αναλογιστεί κανείς τις δυσλειτουργίες που προκαλούνται στον ανθρώπινο οργανισμό από τις οξειδωτικές διαδικασίες (οξειδωτικό stress).

➤ **Αντιφλεγμονώδης δράση :** Τα φλαβονοειδή έχουν την ικανότητα να παρεμβαίνουν στον μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος, παράγοντα καθοριστικού στις φλεγμονώδεις αντιδράσεις. Όσον αφορά τα δομικά στοιχεία, καθοριστική φαίνεται να είναι η παρουσία του υδροξυλίου στις θέσεις 5 και 7 του μορίου του φλαβονοειδούς (Panthong A. et al., 1994; 1988). Ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο φυσικό προϊόν, το

χαμομήλι, περιέχει πολλά φλαβονοειδή στα οποία οφείλει την αντιφλεγμονώδη δράση. Πρόσφατα διαπιστώθηκε ότι ορισμένα φλαβονοειδή, όπως η κερκετίνη και η λουτεολίνη επιδρούν ανακουφιστικά στις φλεγμονώδεις εκδηλώσεις μίας ασθένειας του κεντρικού νευρικού συστήματος που ονομάζεται πολλαπλή σκλήρυνση. Αυτό το επιτυγχάνουν εμποδίζοντας τη φαγοκυττάρωση της μυελίνης από τα μακροφάγα και τη μετέπειτα έκκριση φλεγμονωδών παραγόντων (Hendricks J.J.A. et al., 2003). Η επίδραση των φλαβονοειδών στους μηχανισμούς της φλεγμονής είναι ένα συνεχές πεδίο έρευνας για τους επιστήμονες, με συνεχή και ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Χαρακτηριστικά αναφέρουμε νεότερα αποτελέσματα που αποδεικνύουν την ανασταλτική δράση φλαβονοειδών στην απελευθέρωση της λυσοζύμης και τον σχηματισμό του υπεροξειδικού ανιόντος, γεγονός ανακουφιστικό σε φλεγμονώδεις καταστάσεις (Ko H.H. et al., 2004). Ακόμα, η δράση κάποιων φυτικών εκχυλισμάτων σε γαστρικά έλκη, αποδίδεται στην παρουσία φλαβονοειδών (Sannomiya M. et al., 2005).

➤ **Βιταμινική Ρ δράση:** Η δράση αυτή σηματοδοτεί την αύξηση της αντίστασης των αιμοφόρων αγγείων και την ελάττωση της διαπερατότητάς τους. Πολλά υδατοδιαλυτά σκευάσματα, τα κιτροφλαβονοειδή, η διοσμίνη κ.α. χρησιμοποιούνται σε φλεβικές και εγκεφαλικές κυκλοφορικές ανεπάρκειες, κιρσούς, σκορβούτο, οφθαλμορραγίες, μητρορραγίες και σε άλλες μορφές αιμορραγιών. Αξιόλογη δρόγη εμφανίζουν τα φύλλα του φυτού *Ginkgo biloba* που έχουν ως δραστικά συστατικά διάφορα φλαβονοειδή (Βερυκοκίδου-Βιτσαροπούλου Ε., 1997). Έχει ακόμα διαπιστωθεί, η αναστολή της δράσης πρωτεολυτικών ενζύμων, όπως η κολλαγενάση, προστατεύοντας μάυτόν τον τρόπο το κολλαγόνο (Pathak D. et al., 1991).

➤ **Αντισπασμωδική δράση:** Οφείλεται στην ικανότητα των φλαβονοειδών να ανταγωνίζονται τη δράση της ακετυλοχολίνης και της ισταμίνης (Forster H. et al., 1980). Χαρακτηριστική περίπτωση δρόγης με αντισπασμωδικές ιδιότητες είναι η *Glycyrrhiza glabra*. Η χρήση φυτών στη λαϊκή θεραπευτική ως μυοχαλαρωτικά σε ρευματοειδείς παθήσεις και τετανικούς σπασμούς, αποδεικνύεται σήμερα ότι οφείλεται στα περιεχόμενα φλαβονοειδή. Ένα παράδειγμα τέτοιου φυτού είναι το *Elaeagnus angustifolia L.* του οποίου τα σπέρματα εμφανίζουν μυοχαλαρωτική δράση. Πιστοποιήθηκε ότι η δράση αυτή οφειλόταν αποκλειστικά και μόνο στα φλαβονοειδή

(Hosseinzadeh H. *et al.*, 2003). Επιπρόσθετα, μέλη της οικογένειας των φλαβονοειδών επιδρούν προστατευτικά (αντιοξειδωτικά) στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες οπότε γίνεται κατανοητή μία πιθανή θετική συμβολή τους σε περιπτώσεις ασθενών που πάσχουν από τη νόσο Parkinson (Mercer L.D. *et al.*, 2005). Αναφορές υπάρχουν επίσης και για την προστασία που ασκούν τα φλαβονοειδή στα κύτταρα, σε καταστάσεις οξειδωτικού stress, αναμένοντας θεραπευτικά οφέλη από τη χρήση τους σε νευρολογικές παθήσεις (π.χ. νόσος Alzheimer) (Kang S.S. *et al.*, 2005).

- **Αντιηπατοτοξική δράση:** Διάφορες έρευνες που έχουν γίνει, αναφέρουν την ηπατοπροστατευτική δράση κάποιων φλαβονοειδών. Τα πειράματα διεξήχθησαν με την χρήση ηπατοτοξινών και εν συνεχείᾳ τη χορήγηση φλαβονοειδών. Τα αποτελέσματα ήταν άκρως ενθαρρυντικά (Oh H. *et al.*, 2004; Kadarian C. *et al.*, 2002).
- **Αντιογκογόνος δράση:** Ένας αριθμός φλαβονοειδών έχει επιδείξει ικανότητα να συγκρατεί τους μηχανισμούς καρκινογένεσης σε ποικίλα μοντέλα ζώων. Η γνωστή από καιρό αντιοξειδωτική δράση των φλαβονοειδών, ήταν ο πρώτος μηχανισμός δράσης που μελετήθηκε. Τα φλαβονοειδή έχουν ανασταλτική δράση στους περισσότερους τύπους οξειδωτικών μορίων όπως οι ελεύθερες ρίζες και το μονό οξυγόνο που ενέχονται στην καταστροφή του DNA και τη δημιουργία όγκων. Επίσης ορισμένα φλαβονοειδή αναστέλλουν τη δράση του ηπατικού ενζυμικού συστήματος P450 το οποίο συνδέεται με τη δραστικότητα συγκεκριμένων καρκινικών παραγόντων (Le Marchand L., 2002). Ένας άλλος πιθανός τρόπος δράσης είναι η ανασταλτική δράση τους επί των τοποϊσομερασών I και II που συμμετέχουν στην αντιγραφή του DNA και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (Constantinou A. *et al.*, 1995). Κάποια φλαβονοειδή οφείλουν την ανασταλτική δράση τους σε οιστρογονοεξαρτώμενους όγκους, στη δέσμευση των υποδοχέων οιστρογόνων. Νεότερες πληροφορίες για κυτταροτοξική δράση των φλαβονοειδών σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές, εμπλουτίζουν συνεχώς τη διεθνή βιβλιογραφία (Cardenas M. *et al.*, 2006). Πρέπει να σημειωθεί ότι ο ακριβής μηχανισμός δράσης των φλαβονοειδών δεν έχει ακόμα διευκρινισθεί πλήρως. Ωστόσο, υπάρχουν προϊόντα διατροφής που περιέχουν φλαβονοειδή και δρουν ως αντικαρκινικά. Τέτοιες τροφές είναι η σόγια που περιέχει ισοφλαβόνες και θεωρείται αποτελεσματική στον καρκίνο του μαστού. Αντινεοπλασματική δράση επιδεικνύει

επίσης το τσάι (πλούσιο σε φλαβονόλες και φλαβανόλες), ενώ διφλαβονύλια μπορούν να αποδειχθούν χρήσιμα σε ασθενείς με λευχαιμία (Matsui J. et al., 2005).

➤ **Αντιμικροβιακή δράση** : Ορισμένα φλαβονοειδή εμφανίζουν σημαντική αντιβακτηριακή και αντιμυκητιασική δράση . Η αντιμικροβιακή δράση μελετάται συνεχώς και ενθαρρυντικά αποτελέσματα έρχονται συνεχώς στο προσκήνιο (Cushnie T.P.T & Lamb A.J., 2005). Μικρόβια όπως ο *Staphylococcus aureus*, ο *Bacillus subtilis*, η *Escherichia coli*, η *Pseudomonas aeruginosa* κ.α., έχουν ευαισθησία σε κάποια φλαβονοειδή (Fukai T. et al., 2002), όπως και ορισμένα πλασμώδια (Yenesew A. et al., 2004) και δερματόφυτα (Prasad N.R. et al., 2004).

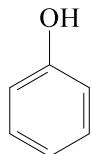
➤ **Αγχολυτική δράση** : Φλαβονοειδή με αγχολυτική ή/και κατευναστική δράση έχουν περιγραφεί, με τη βοήθεια της λαϊκής θεραπευτικής (Rocha F.F. et al., 2002). Η ικανότητα αυτή αρχικά αποδόθηκε στην πρόσδεσή τους , στους υποδοχείς των βενζοδιαζεπινών (Medina J.H. et al., 1990). Ωστόσο, αυτό δεν έχει πιστοποιηθεί, καθώς δεν υπάρχει ακόμα άμεση συσχέτιση ανάμεσα στους βενζοδιαζεπινικούς υποδοχείς και τα φλαβονοειδή και γίνονται προσπάθειες εξήγησης της δράσης αυτής με άλλους μηχανισμούς δράσης. Υπάρχει επιπλέον η άποψη της σύνδεσης της αγχολυτικής δράσης τους με την σεροτονίνη και τους υποδοχείς της.

➤ **Άλλες δράσεις:** Τα φλαβονοειδή παρουσιάζουν επίσης διουρητικές, γλυκαντικές, αντιϊκές (Lameira J. et al., 2006), οιστρογονικές (Garritano S. et al., 2005) και χρωστικές ιδιότητες που τα καθιστούν μία σημαντική ομάδα φυσικών προϊόντων και επιτείνουν το επιστημονικό ενδιαφέρον για περαιτέρω μελέτη.

## B) ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΠΑΡΑΓΩΓΑ

Τα φαίνολικά παράγωγα αποτελούν μία ευρύτατη κατηγορία φυσικών προϊόντων που περιλαμβάνει ένα πλήθος δομών οι οποίες έχουν ως κοινό χαρακτηριστικό την ύπαρξη ενός βενζολικού δακτυλίου με 1 ή περισσότερα υδροξύλια ελεύθερα ή συνδεδεμένα (Σχήμα 41). Βιοσυνθετικά προέρχονται από τον δρόμο του σικιμικού και του οξικού οξέος. Οι δρόμοι αυτοί συνδυάζονται σε κάποιες περιπτώσεις,

ενώ σπανιότερα προστίθεται και το βιοσυνθετικό μονοπάτι του μεβαλονικού (Χήνου I., 2002).



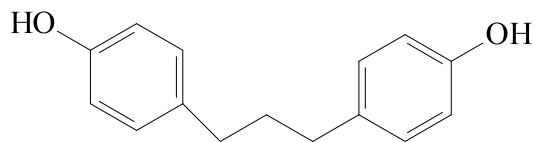
Σχήμα 41. Φαινολικός δακτύλιος.

Στα μέλη της κατηγορίας αυτής έχει κατά καιρούς αποδοθεί ένας μεγάλος αριθμός φαρμακολογικών ιδιοτήτων. Είναι γνωστή λοιπόν η αντιοξειδωτική ικανότητα πολλών φαινολικών παραγώγων (Soobrattee M.A. *et al.*, 2005) και μπορεί να υποστηριχθεί ότι είναι η ιδιότητα που τα χαρακτηρίζει. Συγχρόνως, πολλά φαινολικά μόρια εμφανίζουν αντιμικροβιακή (Randhir R. *et al.*, 2004), αντινεοπλασματική (Saleem A. *et al.*, 2002), αντιϊκή (Sokmen M. *et al.*, 2005), προστατευτική δράση σε καρδιαγγειακές παθήσεις (Visioli F. *et al.*, 2000) και άλλες δράσεις. Η αντιοξειδωτική ικανότητα των φαινολικών παραγώγων συνδέεται με την καταπολέμηση του οξειδωτικού stress (Grassmann J. *et al.*, 2002) το οποίο είναι πιθανότατα το γενεσιοναργό αίτιο πολλών ασθενειών για τον άνθρωπο. Οι παραπάνω δράσεις οδηγούν στην όλο και συχνότερη επιδίωξη της εισαγωγής φαινολικών ουσιών σε τρόφιμα (Shahidi F. & Naczk M., 2003).

Πολλές υποκατηγορίες συνιστούν την οικογένεια των φαινολικών μορίων. Ωστόσο, στη συνέχεια θα αναφερθούν κάποια αποσπασματικά στοιχεία για τις πέντε υποομάδες στις οποίες υπάγονται οι δευτερογενείς μεταβολίτες που απομονώθηκαν στο Β μέρος της παρούσας εργασίας (αρυλοπροπάνια, ρεσορκινόλες, ακετοφαινόνες και φαινολικοί γλυκοσίδες).

### i.) ΑΡΥΛΟΠΡΟΠΑΝΙΑ

Τα αρυλοπροπάνια αποτελούνται από δύο φαινολικούς δακτυλίους, ενωμένους με μία αλυσίδα τριών ατόμων άνθρακα (Σχήμα 42).

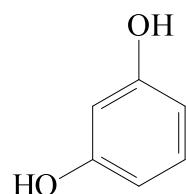


Σχήμα 42. Σκελετός αρυλοπροπανίων.

Έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία αντιβακτηριακές (Pauletti P.M. *et al.*, 2000) και αντιμυκητιασικές (Zacchino S.A. *et al.*, 1999) δράσεις των αρυλοπροπανίων.

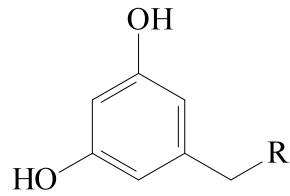
### ii.) ΡΕΣΟΡΚΙΝΟΛΕΣ

Οι ρεσορκινόλες είναι οι φαινολικές ενώσεις εκείνες που περιέχουν τον χαρακτηριστικό δακτύλιο του 1,3-διυδροξυβενζολίου (Σχήμα 43).



Σχήμα 43. Σκελετός ρεσορκινόλης.

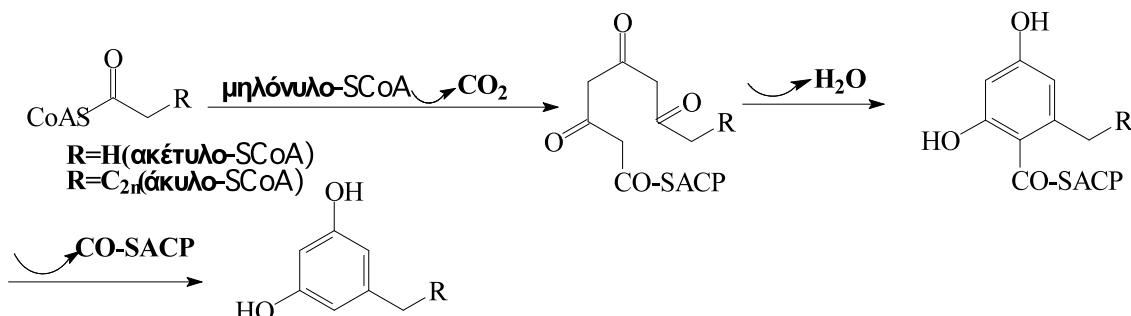
Μία συνήθης μορφή των ρεσορκινολών που συναντάται στα φυτά είναι οι 5-αλκυλορεσορκινολές (Σχήμα 44).



Σχήμα 44. Σκελετός 5-αλκυλορεσορκινολών.

Αρχικά θεωρούταν ότι οι ρεσορκινόλες απαντούν μόνο στο φυτικό βασίλειο και ειδικότερα σε συγκεκριμένες οικογένειες. Το *Ginkgo biloba* (Ginkgoaceae) ήταν το πρώτο φυτό από το οποίο απομονώθηκαν μέλη της συγκεκριμένης κατηγορίας. Αργότερα, απομονώθηκαν και από φυτά άλλων οικογενειών, όπως το κριθάρι και η σίκαλη (Graminae) και ακολούθησαν αντιπρόσωποι των οικογενειών Anacardiaceae, Proteaceae, Myrsinaceae, Primulaceae, Myristicaceae, Iridaceae, Araceae, Compositae και Leguminosae. Έχει επίσης αποδειχθεί ότι οι αλκυλορεσορκινόλες συναντώνται και σε μικροοργανισμούς. Οι λεπροσόλες είναι εκπρόσωποι της κατηγορίας που υπάρχουν στο *Mycobacterium leprae*, ενώ και σε οικογένειες άλλων μικροβίων (*Pseudomonas*, *Azotobacter*) έχουν βρεθεί αλκυλορεσορκινόλες. Συγκεντρωτικά, αναφορές για την παρουσία αλκυλορεσορκινολών υπάρχουν στις ένδεκα οικογένειες φυτών και τρεις οικογένειες βακτηρίων που ήδη αναφέρθηκαν, σε φύκη (*Botryococcus*, *Cystophora*, *Caulocystis*), σε βρύα (*Sphaerophorus*, *Lobaria*) και σε μύκητες (*Merulius*, *Phlebia*, *Phoma*, *Corticium*, *Pulcherricum*, *Verticildiella*, *Streptomyces*, *Stemphyllum*) (Kozubek A., 1999).

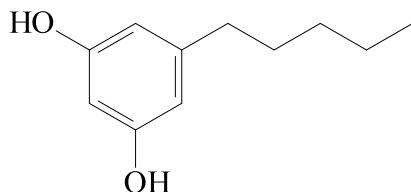
Οι 5-αλκυλορεσορκινολές βιοσυντίθενται όπως περιγράφεται στο Σχήμα 45 (Suzuki Y. et al., 2003).



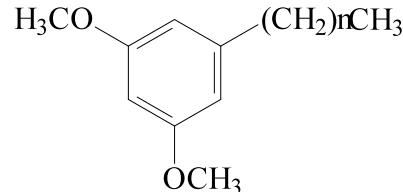
Σχήμα 45. Βιοσύνθεση αλκυλօρεσօρκινολών.

Όπως φαίνεται στο παραπάνω σχήμα, η βιοσυνθετική πορεία ξεκινά από το ακέτυλο-SCoA ή το άκυλο -SCoA και μέσα από ένα σύνολο ενδιάμεσων σταδίων, καταλήγει στον σχηματισμό του σκελετού των 5-αλκυλօρεσօρκινολών.

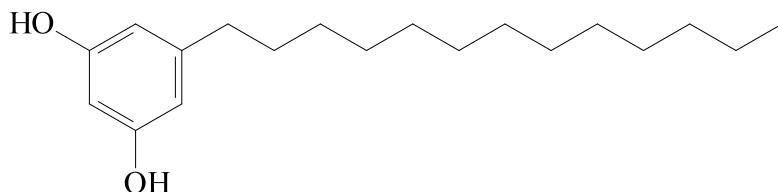
Ακολουθούν ορισμένοι χημικοί τύποι ρεσορκινολών που έχουν απομονωθεί από φυτά (Masaki M.E. *et al.*, 2004; Kozubek A., 1999; Harborne J.B. & Baxter H., 1993).



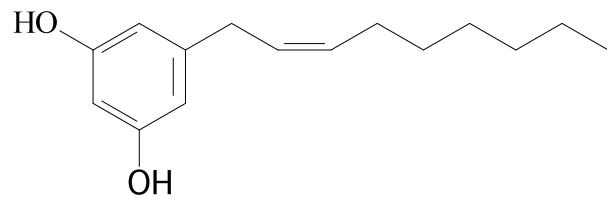
ολιβετόλη



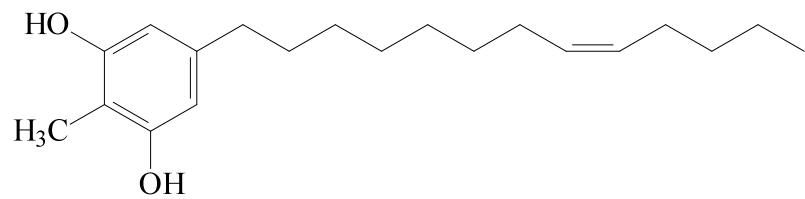
Διμεθυλαιθέρες αλκυλօρεσօρκινόλης



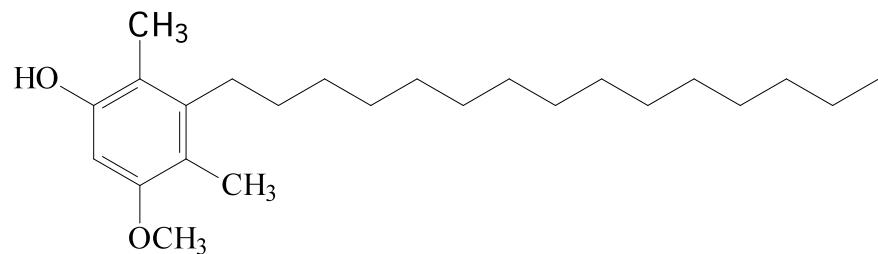
γκρεβινόλη



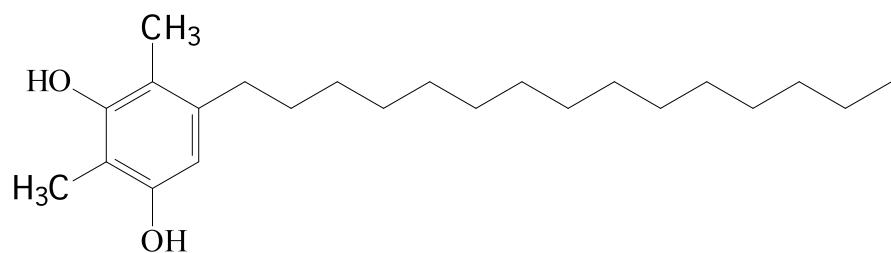
κλιμακοστόλη



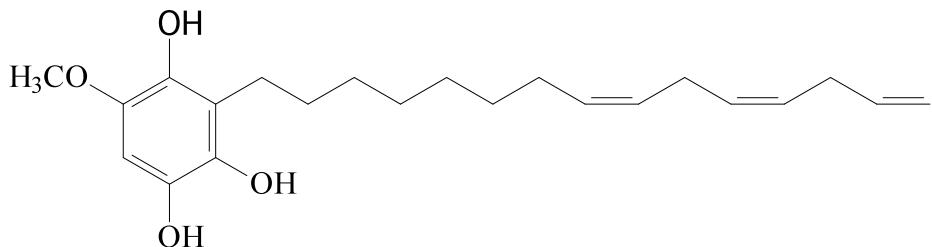
αρντισινόλη Ι



α-λεπροσόλη



β-λεπροσόλη



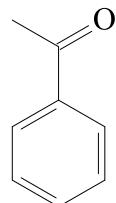
### ξενογνοσίνη

Οι αλκυλορεσορκινόλες θεωρούνται φυτολεξίνες και η σύνθεσή τους στα φυτά κινητοποιείται όταν επιδρά κάποιος εξωτερικός παράγοντας (Kozubek A., 1999; Droby S. et al., 1987). Όσον αφορά τον φαρμακολογικό χαρακτήρα των ρεσορκινολών, είναι γνωστές οι αντιβακτηριακές ιδιότητές τους και έχουν χρησιμοποιηθεί στη θεραπεία μολύνσεων. Πρόσφατες έρευνες απέδειξαν ότι η αντιβακτηριακή δράση των εκχυλισμάτων των φυτών *Ginkgo biloba*, *Ardisia japonica*, *Myristica fragans* οφειλόταν στις περιεχόμενες ρεσορκινόλες. Πιο συγκεκριμένα, οι ρεσορκινόλες εκδήλωσαν υψηλή δραστικότητα έναντι gram-(+) και φυτοπαθογόνων βακτηρίων (Kozubek A., 1999). Παράλληλα με την αντιβακτηριακή δράση τους, οι ρεσορκινόλες είναι υπεύθυνες και για αντιμυκητιασική (*Penicillium chrysogenum*, *Penicillium roqueforte*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus versicolor*) και αντιπαρασιτική δράση (ελμινθίαση). Επειδή οι ρεσορκινόλες δεν είναι τοξικές για τους ανθρώπους, έχουν χρησιμοποιηθεί σε φαρμακευτικά και καλλυντικά σκευάσματα για τη θεραπεία στοματικών μολύνσεων και περιπτώσεων ακμής (Kozubek A., 1999).

Στις δράσεις των ρεσορκινολών περιλαμβάνονται επίσης, η διέγερση της παραγωγής θρομβοξανίου στα ανθρώπινα θρομβοκύτταρα, γεγονότος καθοριστικού στην πήξη του αίματος (Hengtrakul P. et al., 1991), η αντιμεταλλαξιογόνος δράση (Gasiorowski K. et al., 1996) και η προφύλαξη των κυτταρικών λιπιδίων από την οξείδωση (Kozubek A., 1999). Τέλος, η απλούστερη μορφή ρεσορκινόλης (Σχήμα 43) εκδηλώνει κερατολυτική, τοπική αντισηπτική και αντικνησμική δράση (Harborne J.B. & Baxter H., 1993).

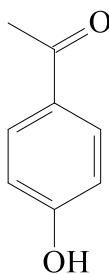
### iii.) ΑΚΕΤΟΦΑΙΝΟΝΕΣ

Οι ακετοφαινόνες είναι μόρια που έχουν τον παρακάτω σκελετό:

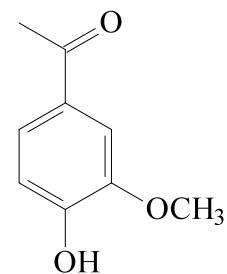


Σχήμα 46. Σκελετός ακετοφαινονών.

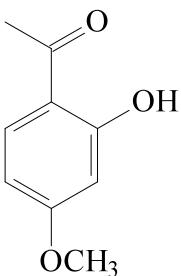
Τα περισσότερα μέλη της κατηγορίας συνθέτονται από δύο βιοσυνθετικές οδους, από τη συμπύκνωση τεσσάρων ακέτυλο -ομάδων ή από την α πώλεια CO<sub>2</sub> από μία φαινυλοπροπανική (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>) πρόδρομη ένωση. Αμφότερες οι δύο περιπτώσεις οδηγούν σε δομές C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>. Οι ακετοφαινόνες είναι μία ομάδα φυσικών προϊόντων που περιέχουν πολλές φορές υδρόξυ και μεθόξυ ομάδες. Παρακάτω ακολουθούν οι χημικοί τύποι ορισμένων από τα μόρια της κατηγορίας που έχουν απομονωθεί από φυτικούς οργανισμούς (Harborne J.B. & Baxter H., 1993; Strack D. *et al.*, 1989).



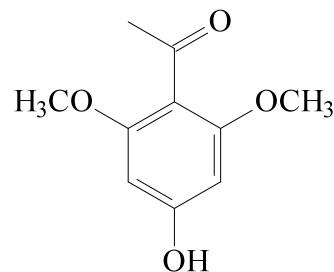
4-υδροξυ-ακετοφαινόνη



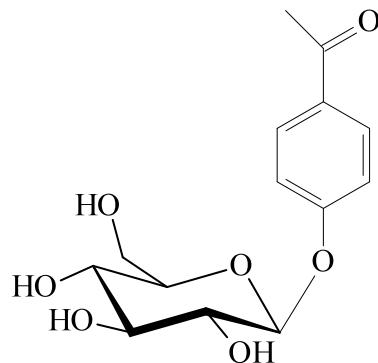
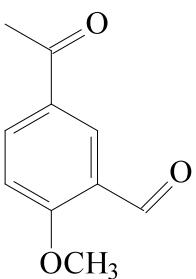
4-υδροξυ-3-μεθοξυακετοφαινόνη



**2-υδροξυ-4-μεθοξυακετοφαινόνη**



**2,6-διμεθοξυ-4-υδροξυακετοφαινόνη**



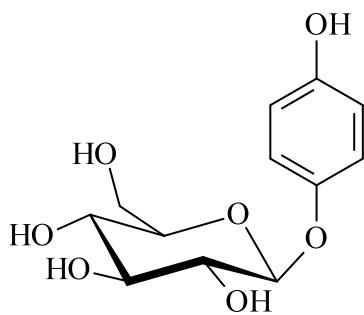
**3-ακετυλο-6-μεθοξυβενζαλδεύδη 4-υδροξυακετοφαινονο-4-O-β-γλυκοπυρανοσίδης**

Στις δράσεις τους περιλαμβάνονται η αντιμυκοβακτηριακή (Rajabi L. *et al.*, 2005), η αντιλεϊσμανιακή (Narender T. *et al.*, 2005), η κυτταροτοξική (Chou H.C. *et al.*, 2005), καθώς και η β-αδρενολυτική και αντιαρρυθμική (Cizmarikova R. *et al.*, 1990). Η απλούστερη μορφή ακετοφαινόνης (Σχήμα 46) ονομάζεται και υπνόνη, εξαιτίας της υπνωτικής δράσης που εκδηλώνει (Harborne J.B. & Baxter H., 1993).

#### iv.) ΦΑΙΝΟΛΙΚΟΙ ΓΛΥΚΟΣΙΔΕΣ

Οι φαινολικοί γλυκοσίδες είναι αρκετά διαδεδομένοι στη φύση και σχετίζονται με τους μηχανισμούς άμυνας και αποτοξίνωσης των φυτών. Πρόκειται για γλυκοσίδες που αποτελούνται από αρωματικούς δακτυλίους με ένα ή περισσότερα φαινολικά υδροξύλια.

Στο Σχήμα 47 φαίνεται μία απλή μορφή φαινολικού γλυκοσίδη.



Σχήμα 47. Σκελετός φαινολικού γλυκοσίδη.

Έντονη φαρμακολογική δράση ασκούν πολλοί φαινολικοί γλυκοσίδες . Έχει αποδειχθεί η αντιμικροβιακή δράση τους σε περιπτώσεις μαλάριας, σε μυκητιάσεις, πρωτοζωικές και βακτηριακές λοιμώξεις (Bravo J.A. *et al.*, 1999). Εξάλλου , οι αντιμικροβιακές ιδιότητες του πιπεριού (*Piper nigrum L.*) οφείλονται κατά μεγάλο ποσοστό, στην περιεκτικότητά του σε φαινολικούς γλυκοσίδες οι οποίοι αναστέλλουν την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών (Pradhan K.J. *et al.*, 1999). Ακόμα, χαρακτηρίζονται από τις αντιοξειδωτικές ικανότητές τους (Braham H. *et al.*, 2005), αλλά και από διουρητική, καθαρτική και καρδιοτονωτική δράση (Bergman A.M. *et al.*, 2001). Μία σημαντική δράση που εξακριβώθηκε σχετικά πρόσφατα , είναι η γαστροπροστατευτική. Πιο συγκεκριμένα, η γαστροπροστατευτική δράση του υδατικού εκχυλίσματος από τον φλοιό του φυτού *Azadirachta indica* (Neem), αποδόθηκε σε ένα φαινολικό γλυκοσίδη που απομονώθηκε από αυτό , με χρωματογραφικές μεθόδους. Ο μηχανισμός δράσης φαίνεται να σχετίζεται με την αναστολή του ενζύμου  $H^+-K^+$  ATP-άσης και προσφέρει προστασία στο προερχόμενο από άγχος έλκος, εμποδίζοντας την προσκόλληση βλέννας και την ενδογενή μείωση της γλουταθειόνης. Επίσης, ανακόπτει την υπεροξείδωση των λιπών και απομακρύνει τις υδροξυλιωμένες ρίζες , με αποτέλεσμα να προστατεύει τον γαστρικό βλεννογόνο . Μάλιστα , το εκχύλισμα είναι δραστικότερο γνωστών ουσιών που χρησιμοποιούνται ενάντια στο έλκος , όπως η βιταμίνη E , η μελατονίνη, η ομεπραζόλη και η δεσφεριοξαμίνη , αλλά και σχεδόν ισοδύναμο της ρανιτιδίνης (Bandyopadhyay U. *et al.*, 2001). Τέλος , σε *in vivo* πειράματα που έχουν γίνει σε ποντίκια , έχει διαπιστωθεί η αποτελεσματικότητα εκχυλισμάτων που περιέχουν φαινολικούς γλυκοσίδες στη διακοπή της εγκυμοσύνης

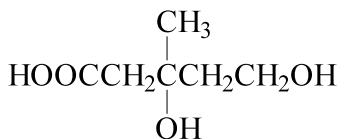
(Shivalingappa N.D. *et al.*, 2001). Ωστόσο , δεν είναι σίγουρο ότι αυτή η δράση οφείλεται στα φαινολικά παράγωγα και πιθανόν να αιτιολογείται από την παρουσία άλλων συστατικών ή να πρόκειται για συνέργεια.

### Γ) ΣΕΣΚΙΤΕΡΠΕΝΙΑ

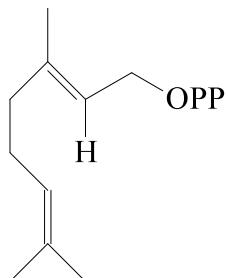
Τα σεσκιτερπένια από τελούν μία υποομάδα χημικών ουσιών της μεγάλης κατηγορίας των τερπενίων η οποία περιλαμβάνει τον μεγαλύτερο αριθμό φυσικών προϊόντων (περισσότερες από 20.000 δομές έχουν απομονωθεί από φυτά).

Τα τερπένια διακρίνονται ανάλογα με τον αριθμό των ατόμων άνθρακα που περιέχουν, στα μονοτερπένια (10C), τα σεσκιτερπένια (15C), τα διτερπένια (20C), τα σεστερτερπένια (25C), τα τριτερπένια (30C) και τα καροτενοειδή (40C). Πολύ γνωστά φυσικά προϊόντα, όπως το λιμονένιο, το  $\beta$ -καροτένιο, η διγιταλίνη κ.λπ., ανήκουν στα τερπένια (Harborne J.B. & Baxter H., 1993).

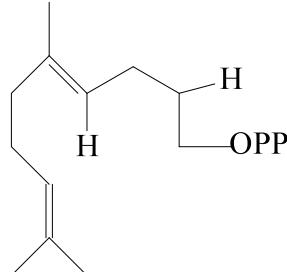
Βιοσυνθετικά προέρχονται από το μεβαλονικό οξύ το οποίο σχηματίζεται αρχικά από το ακετούλο CoA και ακέτυλο CoA, με ενδιάμεσο προϊόν το  $\beta$  - υδροξυμεθυλογλουταρικό CoA. Στη συνέχεια , το μεβαλονικό οξύ μετατρέπεται σταδιακά σε πυροφωσφορικό ισοπεντενύλιο το οποίο αποτελεί και την *in vivo* πρόδρομη ουσία των τερπενοειδών . Αυτό μετατρέπεται τελικά στο πυροφωσφορικό γερανύλιο, από το οποίο προέρχονται τα μονοτερπένια και το πυροφωσφορικό φαρνεσύλιο που είναι πρόδρομη ένωση όλων των υπολοίπων τερπενίων (Λουκής Α., 2002). Στο Σχήμα 48 παρατίθενται οι δομές κάποιων από τα μόρια που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση των τερπενίων.



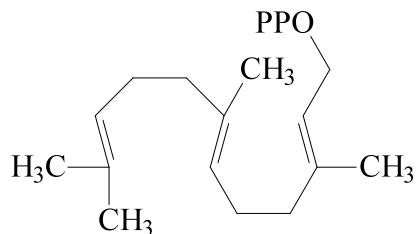
(R) Μεβαλονικό οξύ



(E) Πυροφωσφορικό γερανύλιο



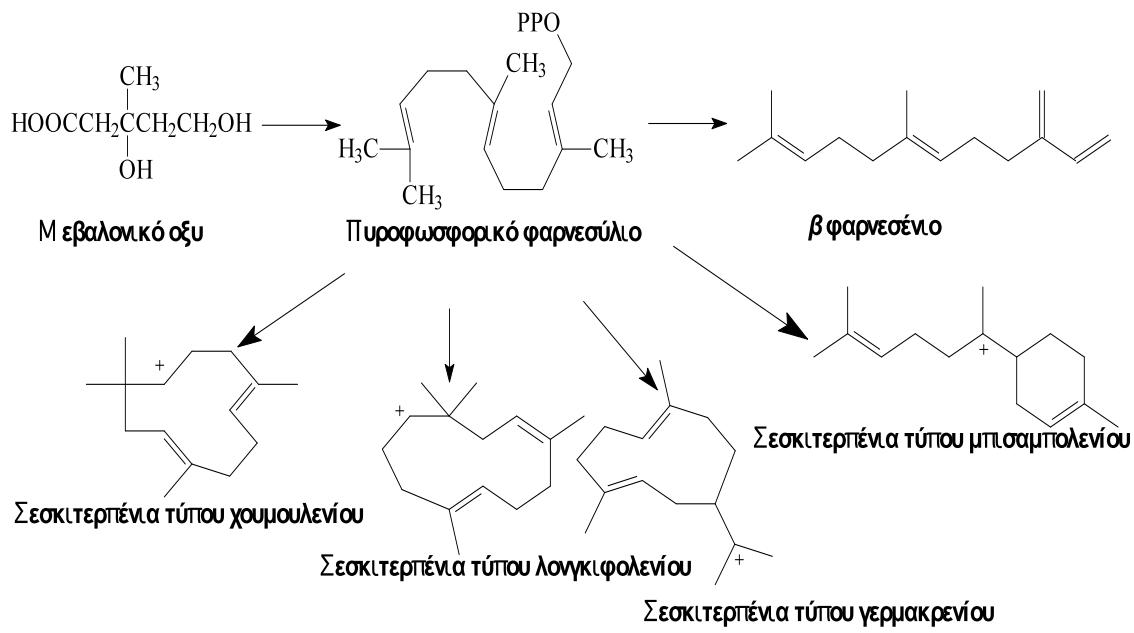
(Z) Πυροφωσφορικό γερανύλιο



(E,E) Πυροφωσφορικό φαρνεσύλιο

Σχήμα 48. Πρόδρομα μόρια τερπενίων.

Τα σεσκιτερπένια λοιπόν είναι ουσιαστικά μία υποκατηγορία των τερπενοειδών και σ' αυτήν περιλαμβάνονται όλα τα τερπενικά μόρια με 15 άτομα C και η βιοσύνθεσή τους όπως προαναφέρθηκε, έχει ως αφετηρία το μεβαλονικό οξύ το οποίο μετατρέπεται μέσα από ορισμένα στάδια σε πυροφωσφορικό φαρνεσύλιο που δίνει τελικά τους διάφορους τύπους σεσκιτερπενίων (Σχήμα 49).



Σχήμα 49. Βιοσύνθεση σεσκιτερπενίων.

Τα σεσκιτερπένια απαντούν ευρύτατα σε αιθέρια έλαια φυτών και μερικά από αυτά ανήκουν στα πτητικά συστατικά των φυτών, όπως στις οικογένειες Labiatae, Myrtaceae, Pinaceae και Rutaceae. Άλλα είναι χαρακτηριστικά συγκεκριμένων φυτών, π.χ. η καροτόλη στο καρότο.

Πολλά σεσκιτερπένια θεωρούνται φυτοαλεξίνες, δηλαδή παράγονται από τα φυτά ως αντίδραση σε περιπτώσεις εξωτερικής απειλής (π.χ. μικροοργανισμοί). Ο προστατευτικός ρόλος των σεσκιτερπενίων για τα φυτά στις καταστάσεις stress αυξάνει τη σημαντικότητά τους και τα αναδεικνύει σε πολύ χρήσιμους δευτερογενείς μεταβολίτες (Stoessl A. et al., 1976). Ωστόσο δεν πρέπει να αγνοηθούν και ορισμένες αρνητικές δράσεις των σεσκιτερπενικών παραγώγων, όπως η αιμόλυση, η πρόκληση δερματικών αλλεργιών και η υψηλή κυτταροτοξικότητα η οποία μπορεί να αξιοποιείται στις περιπτώσεις νεοπλασιών, αλλά δεν παύει να είναι μία δυνητικά επικίνδυνη ιδιότητα (Warshaw E.M. & Zug K.A., 1996).

Εκτός από την παρουσία τους στα φυτά, έχει αναφερθεί και η ύπαρξή τους σε βρυσόφυτα, σε μικροοργανισμούς, σε θαλάσσιους οργανισμούς, ενώ συναντώνται σε έντομα ως συστατικά φερομονικών εκκρίσεων (Harborne J.B. & Baxter H., 1993).

Παράλληλα με τον σπουδαίο ρόλο που διαδραματίζουν στη φυσιολογία των

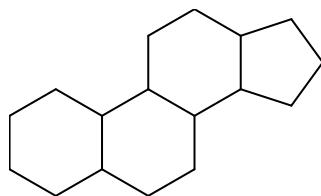
φυτών, έχει αποδειχθεί ότι τα τερπένια εκδηλώνουν και ένα σύνολο θετικών επιδράσεων για τον άνθρωπο:

- **Αντιμικροβιακή δράση:** Πολλά σεσκιτερπενικά μόρια έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία για την αντιμικροβιακή δράση τους. Αυτό είναι και αναμενόμενο ως ένα σημείο, καθώς όπως ήδη αναφέρθηκε παραπάνω, δρουν ως φυτοαλεξίνες στα φυτά, σε περίπτωση μικροβιακής απειλής. Αρκετά στελέχη βακτηρίων (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*) και μυκήτων (*Aspergillus niger*, *Candida albicans*) έχουν δείξει ευαισθησία σε εκχυλίσματα φυτών (*Achillea clavennae*) που είναι πλούσια σε σεσκιτερπενία (Stojanovic G. et al., 2005). Πέρα από τη συνεργιστική δράση σε εκχυλίσματα, αντιμικροβιακές ιδιότητες έχουν εμφανίσει και καθαρά σεσκιτερπενία που απομονώθηκαν από φυτά, μάλιστα τόσο σε βακτήρια (Rabe T. & Van Staden J., 2000) όσο και σε άλλα είδη μικροβίων, όπως τα πλασμώδια (Tchuendem M.H.K. et al., 1999).
- **Αντιογκογόνος δράση:** Η κυτταροτοξικότητα των σεσκιτερπενίων είναι γνωστή αρκετά χρόνια. Η ιδιότητα αυτή ώθησε τους επιστήμονες να δοκιμάσουν τέτοιες δομές στην καταπολέμηση διαφόρων περιπτώσεων όγκων. Οι φαρμακολογικές δοκιμασίες που πραγματοποιήθηκαν είχαν θετικά κατά βάση αποτελέσματα (Prokof'eva N.G. et al., 2004; Belofsky G.N. et al., 1998). Σε ορισμένες περιπτώσεις μάλιστα, οι *in vivo* βιολογικοί έλεγχοι είχαν τόσο θετικά αποτελέσματα ώστε συνεχίστηκε η έρευνα και σε επίπεδο κλινικών δοκιμών, όπως στο ημισυνθετικό σεσκιτερπένιο υδροξυμεθυλακυλφουβένιο (HMAF) που έχει προχωρήσει στη φάση II κλινικών δοκιμών σε στέρεους όγκους (Mc Morris T.C., 1999).
- **Αντιφλεγμονώδης δράση:** Οι αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες συμπεριλαμβάνονται στα χαρακτηριστικά των σεσκιτερπενίων. Για παράδειγμα, ένα σεκιτερπενικό οξύ το δεϋδροκοστικό, αναστέλλει την παραγωγή λευκοτριενίων και κατά συνέπεια δρα ανακουφιστικά σε φλεγμονώδεις καταστάσεις (Hernandez V. et al., 2005).
- **Αντιωπερχοληστερολαιμική δράση:** Η δραστικότητα αυτή κάποιων σεσκιτερπενίων οφείλεται πιθανότατα στην αναστολή της δράσης της γλυκοπρωτεΐνης CETP η οποία μεταφέρει τον εστέρα της χοληστερόλης από τις πρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας (HDL), σ' αυτές χαμηλής πυκνότητας (LDL). Η μεταφορά αυτή αυξάνει τα επίπεδα της LDL και μειώνει αυτά της H DL, γεγονός που αυξάνει τα επίπεδα

χοληστερόλης στο αίμα, με αποτέλεσμα τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίας νόσου και άλλων καρδιαγγειακών παθήσεων (Chackalamannil S. *et al.*, 1995).

## Δ) ΦΥΤΟΣΤΕΡΟΛΕΣ

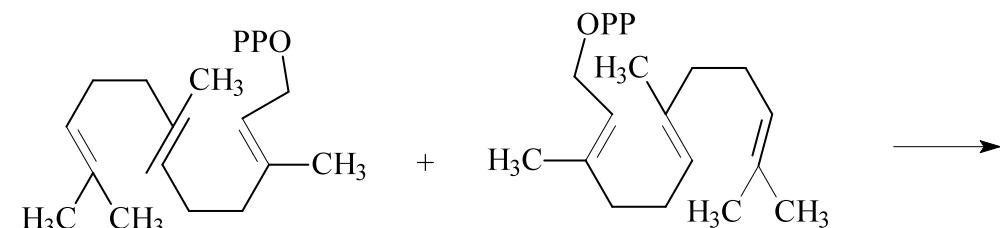
Οι φυτοστερόλες όπως αναδεικνύεται και από το όνομά τους, ανήκουν στη γενικότερη κατηγορία των στεροειδών. Στεροειδή θεωρούνται οι ουσίες που έχουν στο μόριό τους τρεις εξαμελείς δακτυλίους και έναν πενταμελή δακτύλιο (Briggs M.H. *et al.*, 1970) (Σχήμα 50).



Σχήμα 50. Στεροειδικός δακτύλιος.

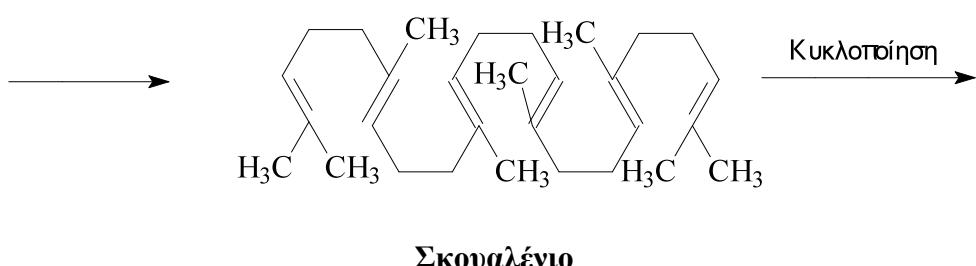
Τα στεροειδή είναι ευρύτατα διαδεδομένα στη φύση, έχουν πλήθος βιολογικών δράσεων και παλαιότερα επικρατούσε η άποψη ότι απαντούν αποκλειστικά στους ζωικούς οργανισμούς. Ωστόσο, αυτό έπαψε να πιστεύεται, καθώς ο αριθμός των προερχόμενων από τα φυτά στεροειδών όλο και αυξάνεται. Τα στεροειδικά αυτά μόρια που έχουν ως πηγή προέλευσης τα φυτά, ονομάζονται φυτοστερόλες και διαφέρουν από τις ζωικές στερόλες, στην ύπαρξη μίας επιπλέον μεθυλ- ή αίθυλ- ομάδας στην πλάγια αλυσίδα του C<sub>17</sub> (Harborne J.B & Baxter H., 1993). Πρέπει να σημειωθεί ότι ζωικές στερόλες έχουν απομονωθεί και από τα φυτά (η τεστοστερόνη απομονώθηκε από τη γύρη ενός σκοτσέζικου πεύκου). Ο ρόλος των φυτοστερολών στα φυτά είναι η συμβολή τους στη δομή των μεμβρανών και τη διαδικασία της ανάπτυξης.

Βιοσυνθετικά οι φυτοστερόλες προέρχονται από τη συμπύκνωση δύο μορίων πυροφωσφορικού φαρνεσυλίου οπότε σχηματίζεται το σκουαλένιο (άκυκλος υδρογονάνθρακας με 30 άτομα άνθρακα) που μετατρέπεται σε κυκλοαρτενόλη, μετά από κυκλοποίηση (Σχήμα 51). Από την κυκλοαρτενόλη προκύπτουν τα στεροειδή στα ανώτερα φυτά και φύκη (Nes N.W. *et al.*, 1992).

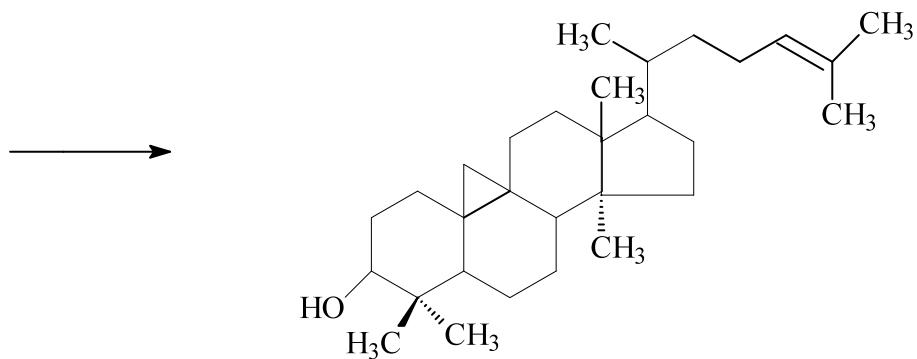


Πυροφωσφορικό φαρνεσύλιο

Πυροφωσφορικό φαρνεσύλιο



Σκουαλένιο



Κυκλοαρτενόλη

Σχήμα 51. Βιοσυνθετική πορεία σχηματισμού στερολών στα ανώτερα φυτά.

Οι φυτοστερόλες έχουν να επιδείξουν σημαντικές βιολογικές ιδιότητες οι οποίες συνοψίζονται στις παρακάτω:

- **Μείωση επιπέδων χοληστερόλης στο αίμα:** Από πολύ παλιά είχε διαπιστωθεί η επιδραση κάποιων φυτοστερολών στον μεταβολισμό της χοληστερόλης. Στη δεκαετία του '50, κουνέλια και κοτόπουλα που λάμβαναν τροφές με σιτοστερόλη, εμφάνισαν

χαμηλότερα επίπεδα χοληστερόλης. Αυτό το γεγονός ήταν η απαρχή μίας ερευνητικής δραστηριότητας γύρω από την υποχοληστερολική δράση των φυτοστερολών. Στις επόμενες δεκαετίες, η σιτοστερόλη, η στιγμαστερόλη και μίγματά τους με στερόλες που απαντούν στη σόγια, μελετήθηκαν εκτενώς. Στις μέρες μας, έχει πια πιστοποιηθεί η συγκεκριμένη δράση των φυτοστερολών (Shin M.J. *et al.*, 2003; Frohlich J.J & Moghadasian M.H., 2000) και θεωρείται ότι σε συνδυασμό με μία δίαιτα χαμηλή σε λιπαρά έχει ευεργετικά αποτελέσματα στην αντιμετώπιση της υπερχοληστερολαιμίας. Οι φυτοστερόλες με την εντονότερη δράση είναι η σιτοστανόλη και οι εστέρες της, καθώς και η σιτοστερόλη. Η σιτοστανόλη έχει την πιο ισχυρή δράση και μειώνει τόσο πολύ την απορρόφηση της χοληστερόλης ώστε μελετάται η προστατευτική δράση της στο καρδιαγγειακό σύστημα (Plat J. *et al.*, 2000). Ακόμα νεότερες έρευνες απέδειξαν τη μείωση του κινδύνου στεφανιαίας νόσου, σε άτομα που είχαν διαιτολόγιο πλούσιο σε φυτοστερόλες (Moreau R.A. *et al.*, 2002). Διάφορα εμπορικά προϊόντα, όπως η μαργαρίνη στα οποία έχει προστεθεί σιτοστανόλη, μειώνουν τα επίπεδα χοληστερόλης στο πλάσμα κατά 10,2% σε άτομα με υπερχοληστερολαιμία (Grundy S.M. *et al.*, 1977; 1969). Τέλος, πολλές εταιρίες διαθέτουν στην αγορά προϊόντα διατροφής με σιτοστανόλη και εστέρες της, αλλά και με άλλες φυτοστερόλες. Ένα ερώτημα που προκύπτει, είναι κατά πόσο ασφαλής είναι η κατανάλωση τροφίμων πολύ εμπλουτισμένων σε φυτοστερόλες. Ωστόσο, μέχρι σήμερα καμία αρνητική επίπτωση δεν έχει επιστημονικά τεκμηριωθεί (Kritchevsky D. & Chen S.C., 2005).

➤ **Μείωση συμπτωμάτων καλοήθους υπερπλασίας του προστάτη:** Η καλοήθης υπερπλασία του προστάτη (BHP), είναι πάθηση που απασχολεί το 50% των ανδρών σε ηλικία πάνω από 50 χρόνια και χαρακτηρίζεται από τη διόγκωση του προστατικού αδένα, που έχει συνέπεια την πίεση στην ουρήθρα.

Η  $\beta$ -σιτοστερόλη και η στιγμαστερόλη διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε άτομα με υπερπλασία προστάτη, μειώνοντας σταδιακά τα συμπτώματα. Αυτό αποδείχθηκε με μελέτη της επίδρασης σιτοστερόλης σε ασθενείς με προστάτη όπου εμφανίστηκε αξιοσημείωτη δραστικότητα. Άλλωστε, η αντιμετώπιση της υπερπλασίας του προστάτη στη λαϊκή θεραπευτική γίνεται συνήθως με φυτά πλούσια σε φυτοστερόλες (Steenkamp V., 2003). Επιπρόσθετες έρευνες γύρω από το θέμα επιβεβαίωσαν τα παραπάνω αποτελέσματα (Wilt T.G. *et al.*, 1999; Klipell K.F. *et*

*al.*, 1997). Αντίθετα, η χρήση γλυκοσιδών φυτοστερολών δεν είχε αποτελέσματα (Berges R.R. *et al.*, 1995). Πρέπει να σημειωθεί ότι το pygeum, μία δρόγη που συνίσταται από το εκχύλισμα του φλοιού ενός αφρικάνικου δένδρου, έχει εγκριθεί από πολλές ευρωπαϊκές χώρες (Γαλλία, Γερμανία, Ιταλία) και κυκλοφορεί ως φάρμακο για τη συγκεκριμένη πάθηση (Andro M.C. & Riffaud J.P., 1995).

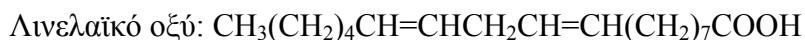
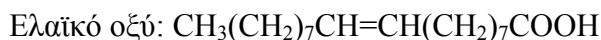
- **Κυτταροτοξικότητα:** Η  $\beta$ -σιτοστερόλη και τα δομικά τους ανάλογα, έχουν ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη καρκινικών σειρών σε *in vivo* πειράματα (Kiriakidis S. *et al.*, 1997). Η σιτοστερόλη εμφάνισε δράση σε καρκινικές σειρές από κύτταρα μαστού και προστάτη (Awad A.B. *et al.*, 2000) και επέδειξε ικανότητα αναστολής και καθυστέρησης της μετάστασης των καρκινικών κυττάρων σε *in vivo* μελέτες, σε ποντίκια (Awad A.B. *et al.*, 2000).
- **Άλλες δράσεις:** Αντιφλεγμονώδη δράση εμφανίζουν η σιτοστερόλη και η στιγμαστερόλη, όπως και αντιϊκή (Muniappan M & Sundararaj T., 2003; Abid Ali Khan M.M. *et al.*, 1991), αντιβακτηριακή και αντιμυκητιαστική δράση (Akihisa T. *et al.*, 2000). Δρουν επίσης συνεργικά σε γνωστά αντιοξειδωτικά. Υπό έρευνα είναι η δράση της σιτοστερόλης, αλλά και γενικά των φυτοστερολών ως παράγοντες αντιμετώπισης των απαντήσεων του ανοσοποιητικού συστήματος σε διάφορα ερεθίσματα (Bright J.J., 2004; Bouic P.J.D., 2002). Οι φλεγμονές και άλλες αυτοάνοσες αντιδράσεις πιθανόν να αντιμετωπίζονται με φυτοστερόλες. Αυτό είναι λογικό ως σκέψη, αν αναλογιστεί κανείς την ευρύτατη χρήση στεροειδών (γλυκοκορτικοειδή) σε αλλεργικές καταστάσεις.

## Ε) ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ

Μερικές εκατοντάδες λιπαρών οξέων υπάρχουν στους φυτικούς οργανισμούς. Κατατάσσονται σε ομάδες, ανάλογα με τον βαθμό ακορεστότητάς τους, την ύπαρξη υδροξυλίων ή κυκλικού δακτυλίου στο μόριο (Χαρβάλα Α., 1994). Διακρίνουμε λοιπόν τις εξής κατηγορίες λιπαρών οξέων:

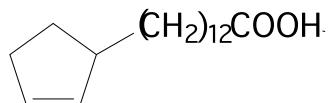
**1) Κεκορεσμένα λιπαρά οξέα:** Έχουν γενικό τύπο  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ . Τα πιο γνωστά είναι το παλμιτικό οξύ  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$  και το στεατί κό οξύ  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$

**2) Ακόρεστα λιπαρά οξέα:** Περιέχουν στο μόριό τους 1 ή περισσότερους πολλαπλούς δεσμούς. Τα πιο διαδεδομένα στη φύση ακόρεστα λιπαρά οξέα είναι:



**3) Λιπαρά οξέα με υδροξυλομάδα:** Πιο χαρακτηριστικός αντιπρόσωπος είναι το ρικινελαϊκό οξύ  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CHOHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ .

**4) Λιπαρά οξέα με κυκλικό δακτύλιο:** Το χαουλμογκρικό οξύ αποτελεί το γνωστό οξύ της κατηγορίας αυτής:



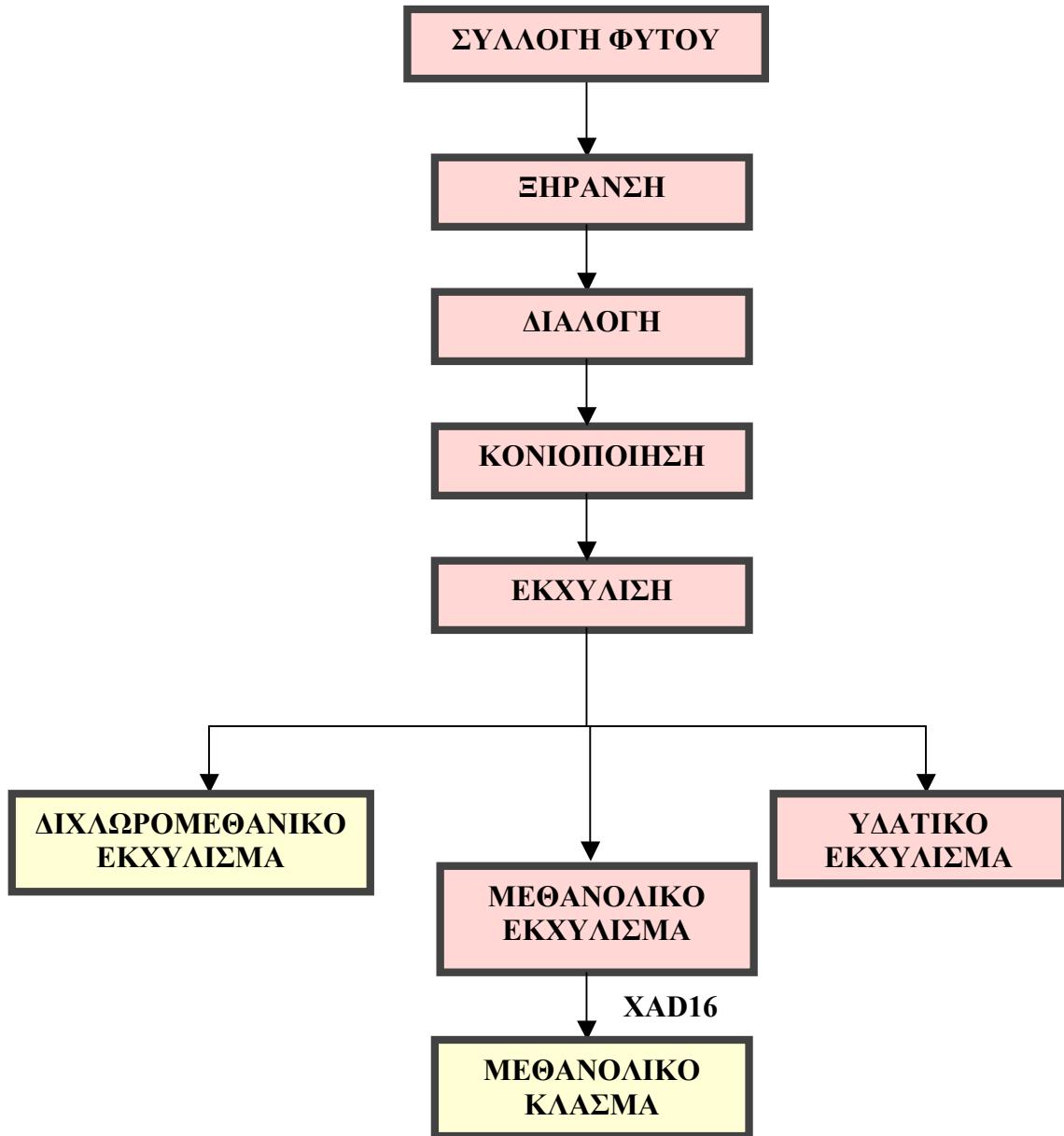
Τα λιπαρά οξέα απαντούν είτε σε ελεύθερη μορφή είτε εστεροποιημένα με γλυκερόλη. Πολλά λιπαρά οξέα είναι χαρακτηριστικά για το φυτικό προϊόν στο οποίο εντοπίζονται, όπως το ελαϊκό και το λινελαϊκό οξύ στο ελαιό λαδο (Harborne J.B. & Baxter H., 1993), ενώ άλλα διακρίνονται για τον βιολογικό ρόλο τους, π.χ. τα ω-3 λιπαρά οξέα που έχουν ευεργετική επίδραση στις φλεγμονώδεις παθήσεις (ρευματοπάθειες) και ως συστατικά των ιχθυελαίων συμμετέχουν στην αντιμετώπιση της υπερχοληστερολαιμίας.

## **2.2) ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

### **2.2.1) ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΩΝ ΜΟΡΙΩΝ**

#### **2.2.1.a) Αρχική κατεργασία δρόγης**

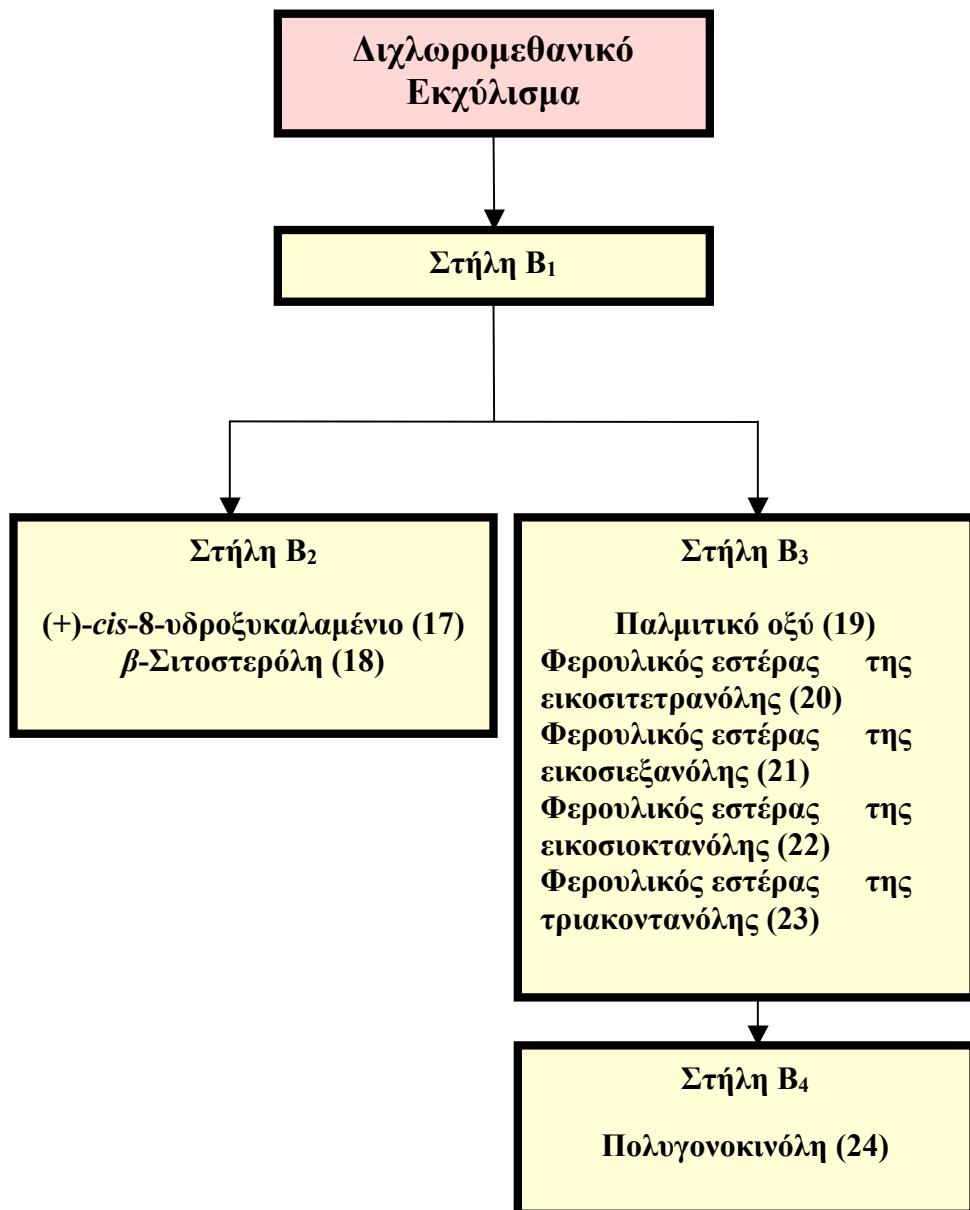
Το φυτό *Polygonum maritimum* συλλέχθηκε τον Αύγουστο του 2004 στις ακτές της παραλίας Χερονήσι, στο χωριό Άγιος Ανδρέας της επαρχίας Κυνουρίας του νομού Αρκαδίας, στην Πελοπόννησο. Το φυτό ξηράνθηκε, κονιοποιήθηκε και η κόνις που προέκυψε, εκχυλίστηκε διαδοχικά με CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, MeOH και H<sub>2</sub>O. Μετά από έλεγχο των εκχυλισμάτων με τη χρήση χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC), αποφασίστηκε η μελέτη του διχλωρομεθανικού και μεθανολικού εκχυλίσματος. Όσον αφορά το μεθανολικό εκχύλισμα, υποβλήθηκε σε κατεργασία με ρητίνη XAD16, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 1.2.1.δ και παραλήφθηκε το μεθανολικό κλάσμα το οποίο μελετήθηκε στη συνέχεια. Αυτό έγινε για να αυξηθεί το ποσοστό των πολυνφαινολών στο κλάσμα που θα εισερχόταν στους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς και για να απομακρυνθούν τα σάκχαρα που θα δυσκόλευαν την απομόνωση των ουσιών. Στο παρακάτω διάγραμμα (Σχήμα 52) φαίνεται η συνολική πορεία κατεργασίας του φυτικού υλικού. Πιο συγκεκριμένα απεικονίζεται η αρχική κατεργασία του φυτικού υλικού που οδήγησε στην παρασκευή των εκχυλισμάτων από τα οποία **απομονώθηκαν 14 δευτερογενείς μεταβολίτες**, όπως αναλυτικά περιγράφεται στις παραγράφους 2.3.2 και 2.3.3.



Σχήμα 52. Αρχική κατεργασία του φυτικού υλικού.

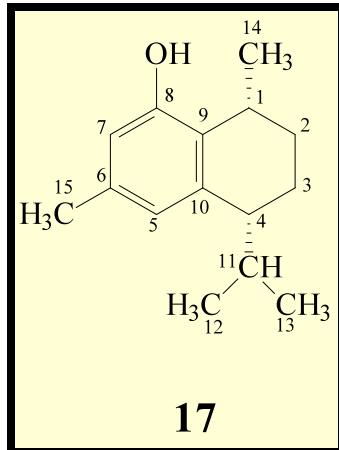
### 2.2.1.β) Μελέτη διχλωρομεθανικού εκχυλίσματος

Στην ενότητα αυτή περιγράφονται τα φασματοσκοπικά δεδομένα που οδήγησαν στον προσδιορισμό της δομής των **8 μορίων** που απομονώθηκαν κατά τη φυτοχημική μελέτη του διχλωρομεθανικού εκχυλίσματος. Ο τρόπος και η αναλυτική πορεία απομόνωσης των ουσιών περιγράφεται στην παράγραφο 2.3.2 του πειραματικού μέρους. Η σηματική απεικόνιση της κατεργασίας του διχλωρομεθανικού εκχυλίσματος παρουσιάζεται στο παρακάτω διάγραμμα.



Σχήμα 53. Μελέτη του διχλωρομεθανικού εκχυλίσματος του φυτού.

i.) Φασματοσκοπική μελέτη του **(+)-cis-8-υδροξυκαλαμένιου** [**(+)-cis-8-hydroxycalamene**] (17)  
 (στήλη B<sub>2</sub>, κλάσμα 61-90)



Η ταυτοποίησή του έγινε με φασματοσκοπικές μεθόδους (<sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, DEPT, HMBC, HMQC, COSY, NOESY, σε CDCl<sub>3</sub>) και σύγκριση των αποτελεσμάτων με τα βιβλιογραφικά δεδομένα (Serra S. & Fuganti C., 2005). Επιπρόσθετα, με τη χρήση GC-MS το μοριακό ιόν M<sup>+</sup> βρέθηκε ίσο με 218 που είναι σύμφωνο με την προσδιοριζόμενη δομή. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα εξής φασματοσκοπικά στοιχεία:

**Στο φάσμα <sup>1</sup>H-NMR:**

- ✓ Το αρωματικό πρωτόνιο της θέσης 7 συντονίζεται στα 6.42 ppm, με τη μορφή μίας διευρυμένης απλής κορυφής, ενώ το άλλο αρωματικό πρωτόνιο (H-5) εμφανίζεται επίσης ως μία διευρυμένη απλή κορυφή στα 6.71 ppm.
- ✓ Η πολλαπλή κορυφή στα 3.01 ppm αντιστοιχεί στο μεθινικό πρωτόνιο H-1.
- ✓ Τα υπόλοιπα δύο μεθινικά πρωτόνια H-4 και H-11 συντονίζονται στα 2.63 ppm (πολλαπλή κορυφή) και 2.35 ppm (διπλή-διπλή κορυφή) αντίστοιχα.
- ✓ Τα δύο μεθυλενικά πρωτόνια της θέσης 2 και τα δύο μεθυλενικά πρωτόνια H-3 εμφανίζονται ως πολλαπλή κορυφή στην περιοχή 1.50-1.70 ppm.
- ✓ Η απλή κορυφή στα 2.20 ppm ανήκει στα πρωτόνια του μεθυλίου (H-15) που βρίσκεται συνδεδεμένο με τον αρωματικό δακτύλιο και γι' αυτό τα πρωτόνιά του είναι πιο αποθωρακισμένα από τα πρωτόνια των μεθυλίων που συνδέονται με τους μη αρωματικούς άνθρακες.

- ✓ Τα πρωτόνια των μεθυλίων (H-12, H -13, H -14) που συνδέονται με τους μη αρωματικούς άνθρακες εμφανίζονται στην περιοχή 0.64-1.20 ppm ως διπλές κορυφές.

**Στο φάσμα  $^{13}\text{C-NMR}$ :**

- ✓ Οι αρωματικοί άνθρακες (C-5-C-10) συντονίζονται στην περιοχή 112.8-153.0 ppm.
- ✓ Οι άνθρακες των μεθινίων, C-1, C-4, C-11 δίνουν σήμα στα 26.5 ppm, 43.3 ppm και 30.9 ppm αντίστοιχα.
- ✓ Οι μεθυλενικοί άνθρακες των θέσεων 2 και 3 εμφανίζονται στα 28.8 ppm και 17.4 ppm αντίστοιχα.
- ✓ Τα σήματα στην περιοχή 16.4-21.0 ppm αντιστοιχούν στους άνθρακες των μεθυλίων (C-12, C-13, C-14, C-15).

**Στο φάσμα HMBC:**

- ✓ Τα πρωτόνια H-12, H-13 των μεθυλίων εμφανίζουν  $^2J$  σύζευξη με τον μεθινικό άνθρακα C-11 και  $^3J$  σύζευξη με τον μεθινικό άνθρακα C-4. Επίσης, παρατηρείται μία  $^3J$  σύζευξη μεταξύ των πρωτονίων H -12, H -13 με τους άνθρακες C-13 και C-12 αντίστοιχα.
- ✓ Τα πρωτόνια H-14 εμφανίζουν  $^2J$  σύζευξη με τον άνθρακα C-1 και  $^3J$  συζεύξεις με τους άνθρακες C-2 και C-9.
- ✓ Τα πρωτόνια H-15 έχουν  $^3J$  συζεύξεις με τους αρωματικούς άνθρακες C-5 και C-7.

**Στο φάσμα COSY:**

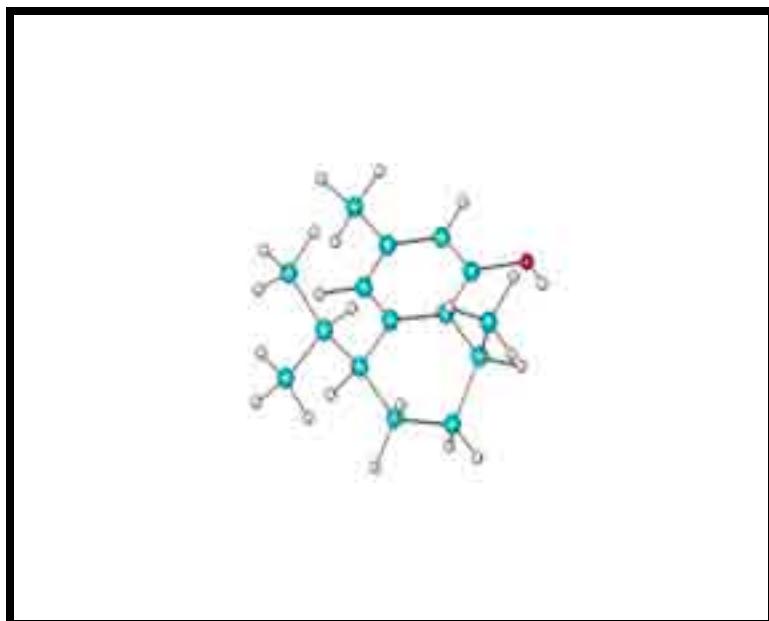
- ✓ Το μεθινικό πρωτόνιο H-1 εμφανίζει  $^3J$  σύζευξη με τα μεθυλικά πρωτόνια H-14 και με τα μεθυλενικά πρωτόνια H-2.
- ✓ Το μεθινικό πρωτόνιο H-11 εμφανίζει  $^3J$  σύζευξη με τα μεθυλικά πρωτόνια H-12 και H-13 και με το επίσης μεθινικό πρωτόνιο H-4.
- ✓ Τα μεθυλενικά πρωτόνια H-2, H-3 έχουν μία  $^3J$  σύζευξη μεταξύ τους.
- ✓ Το πρωτόνιο H-3 εμφανίζει μία  $^3J$  σύζευξη με το πρωτόνιο H-4.

**Στο φάσμα NOESY:**

- ✓ Το πρωτόνιο H-1 (3.01 ppm) έχει σύζευξη με το πρωτόνιο H-14 (1.20 ppm).
- ✓ Το πρωτόνιο H-15 (2.20 ppm) εμφανίζει σύζευξη με τα αρωματικά πρωτόνια H-5 (6.71 ppm) και H-7 (6.42 ppm).

- ✓ Το αρωματικό πρωτόνιο H-5 (6.71 ppm) έχει σύζευξη με το μεθινικό πρωτόνιο H-11 (2.35 ppm).
- ✓ Το μεθινικό πρωτόνιο H-11 (2.35 ppm) εμφανίζει σύζευξη με τα πρωτόνια H-12 (0.64 ppm) και H-13 (0.99 ppm).
- ✓ Δεν παρατηρείται σύζευξη του πρωτονίου H-4 (2.63 ppm) με το αρωματικό πρωτόνιο H-5 (6.71 ppm) οπότε το πρωτόνιο H-4 είναι αξονικό ( $H-4_{ax}$ ). Το γεγονός αυτό συνεπάγεται ότι η ισοπροπυλομάδα στη θέση 4 είναι σε ισημερινή διάταξη.
- ✓ Δεν παρατηρείται σύζευξη μεταξύ του πρωτονίου H-14 (1.20 ppm) και του πρωτονίου H-2 (1.50-1.70 ppm) οπότε η μεθυλομάδα στη θέση 1 είναι σε αξονική διάταξη.
- ✓ Από τις δύο τελευταίες παρατηρήσεις προκύπτει ότι η μεθυλομάδα που συνδέεται στη θέση 1 και η ισοπροπυλομάδα στη θέση 4 είναι σε *cis*- διαμόρφωση μεταξύ τους.

Παράλληλα με το φάσμα  $\alpha$  N OESY, η σχετική στερεοχημεία του μορίου μελετήθηκε και με τη χρήση του προγράμματος Hyperchem (Molecular Modelling), με το οποίο διαπιστώθηκε ότι η θέση των υποκαταστατών στις θέσεις 1 και 4 (*cis*- μεταξύ τους) είναι όπως φαίνεται στην Εικόνα 23.

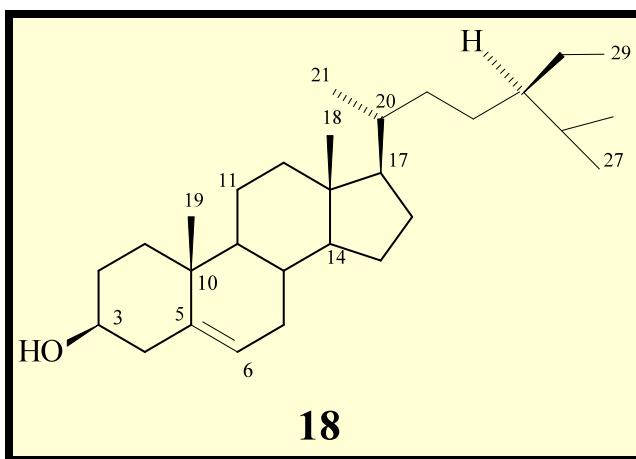


Εικόνα 23. Απεικόνιση σχετικής στερεοχημείας του μορίου.

Το υδροξυκαλαμένιο ταυτίστηκε με την (+)-μορφή. Συγκεκριμένα, υπολογίστηκε ότι η στροφική ικανότητά του είναι +36.5 σε θερμοκρασία 20 °C, σε διαλύτη CHCl<sub>3</sub> και με συγκέντρωση 1 g/100 ml, δηλαδή  $[\alpha]^{20} = +67.9^0$ . Το αποτέλεσμα αυτό είναι σύμφωνο με τη βιβλιογραφία (Serra S. & Fuganti C., 2005).

Το (+)-*cis*-8-υδροξυκαλαμένιο απομονώνεται για πρώτη φορά από φυτό της οικογένειας Polygonaceae.

**ii.) Φασματοσκοπική μελέτη της  $\beta$ -σιτοστερόλης ( $\beta$ -sitosterol) (18)  
(στήλη B<sub>2</sub>, κλάσμα 263-271)**



Ελήφθησαν φάσματα <sup>1</sup>H-NMR και <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>) που είναι απολύτως σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Nes N.W. *et al.*, 1992; Rubinstein I. *et al.*, 1976; Thompson J.M. & Dutky R.S., 1972) και από τα οποία ξεχωρίζουν τα εξής:

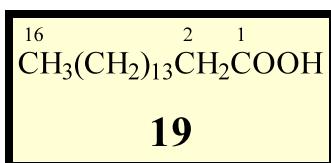
Στο φάσμα <sup>1</sup>H-NMR, χαρακτηριστικές είναι οι μετατοπίσεις του πρωτονίου H-17 στα 1.10 ppm και των πρωτονίων H-18, H-19 στα 0.68 και 1.00 ppm αντίστοιχα όπου εμφανίζονται με την μορφή απλών κορυφών. Γενικότερα, χαρακτηριστικό του φάσματος <sup>1</sup>H-NMR της  $\beta$ -σιτοστερόλης είναι ο μεγάλος αριθμός των κορυφών που συγκεντρώνονται στην περιοχή μεταξύ 0.68-2.28 ppm και η πολλαπλή κορυφή στα 3.53. ppm που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-3.

Στο φάσμα <sup>13</sup>C-NMR, διακρίνονται οι χημικές μετατοπίσεις χαρακτηριστικών ανθράκων του στεροειδικού σκελετού, όπως του C-17 στα 56.0 ppm, καθώς και των ανθράκων C-3, C-10, C-11 και C-14, στα 71.8, 36.5, 21.1 και 56.7 ppm αντίστοιχα.

Ανήκει στις φυτοστερόλες και πρόκειται για ένα μόριο που περιέχει τον βασικό σκελετό πρ εγνανίου όπου ο άνθρακας στη θέση 17 είναι υποκατεστημένος με μία πλάγια αλυσίδα 10 ατόμων άνθρακα . Είναι η σημαντικότερη φυτική στερόλη και υπάρχει σχεδόν σε όλα τα φυτά . Κύριες πηγές απομόνωσής της είναι τα λάδια των σιτηρών, όπως το αραβισιτέλαιο, το σογιέλαιο και το έλαιο από το φύτρο του σιταριού. Λόγω των θεραπευτικών αποτελεσμάτων της στην καλοήθη υπερπλασία προστάτη (Wilt T.J. *et al.*, 1999) και στην υπερχοληστερολαιμία (Sudhop T. *et al.*, 2005), χρησιμοποιείται σε φυτοθεραπευτικά σκευάσματα ευρείας κυκλοφορίας, όπως το San Palmetto που ενδείκνυται στις δύο παραπάνω περιπτώσεις (Pelletier X. *et al.*, 1995; Lees A.M. *et al.*, 1977). Επιπροσθέτως , εμφανίζει όλες τις άλλες δράσεις των φυτοστερολών που έχουν ήδη αναφερθεί , όπως αντιφλεγμονώδη , αντιμικροβιακή , αντιϊκή και αντιαλλεργική δράση χωρίς να έχουν αναφερθεί σημαντικές παρενέργειες και αλληλεπιδράσεις.

### iii.) Φασματοσκοπική μελέτη του **παλμιτικού οξέος (palmitic acid) (19)**

**(στήλη B<sub>3</sub>, κλάσμα 19-30)**



Ο προσδιορισμός της δομής του έγινε με τη λήψη φασμάτων <sup>1</sup>H-NMR και <sup>13</sup>C-NMR ( $\text{CDCl}_3$ ), από τα οποία προέκυψαν στοιχεία που ήταν σύμφωνα με τη βιβλιογραφία. (Pouchert C.J & Benhke J., 1993). Επίσης , πραγματοποιήθηκε αέριος χρωματογραφία συνδεδεμένη με φασματογράφο μάζας η οποία πιστο ποίησε τη δομή του. Σημαντικότερα φασματοσκοπικά γνωρίσματα είναι : Στο φάσμα <sup>1</sup>H-NMR, η μετατόπιση του πρωτονίου H-2 το οποίο εμφανίζεται πιο αποθωρακισμένο στα 2.23 ppm, εξαιτίας της γειτνίασης με το καρβοξύλιο της θέσης 1 καθώς και η πολλαπλή κορυφή των πρωτονίων των μεθυλενίων των θέσεων 3-15 στα 1.30 ppm. Στο φάσμα <sup>13</sup>C-NMR ξεχωρίζουν τα σήματα του C-1 του καρβονυλίου του καρβοξυλικού οξέος στα 180.5 ppm των ανθράκων των θέσεων 3-15 της μεθυλενικής αλυσίδας στα 22.7-34.1 ppm.

Επιπρόσθετα, στο GC-MS το μοριακό ιόν  $M^+$  βρέθηκε ίσο με 256 που είναι σύμφωνο με την προσδιοριζόμενη δομή.

Το παλμιτικό οξύ βρίσκεται σε πολλά φυτικά λίπη, έλαια, κεριά. Χρησιμοποιείται σαν λιπαντικό, παράγοντας γαλακτωματοποίησης, συστατικό των σαπώνων και των ξηρών ελαίων (Harborne J.B. & Baxter H., 1993).

iv.) Φασματοσκοπική μελέτη των μορίων:

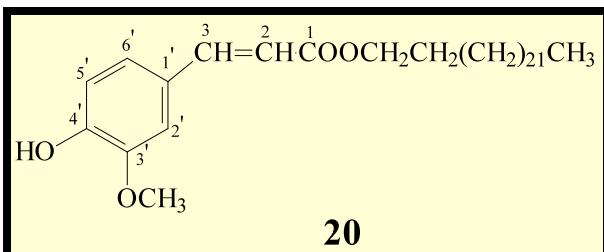
φερουνλικός εστέρας της εικοσιτετρανόλης (tetracosyl ferulate) (20)

φερουνλικός εστέρας της εικοσιεξανόλης (hexacosyl ferulate) (21)

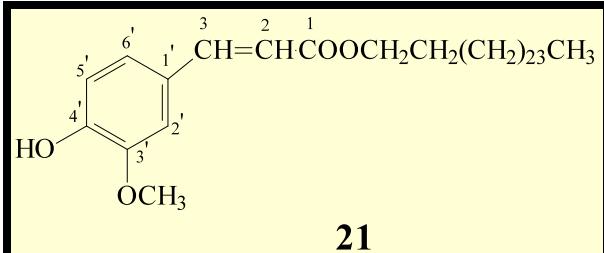
φερουνλικός εστέρας της εικοσιοκτανόλης (octacosyl ferulate) (22)

φερουνλικός εστέρας της τριακοντανόλης (triacontyl ferulate) (23)

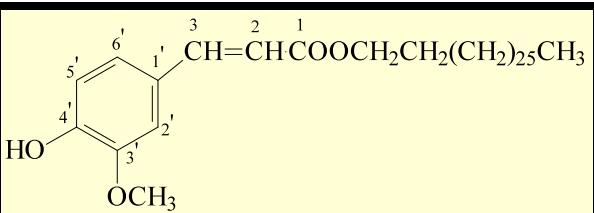
(στήλη B<sub>3</sub>, κλάσμα 235-240)



**Φερουνλικός εστέρας της εικοσιτετρανόλης (20)**

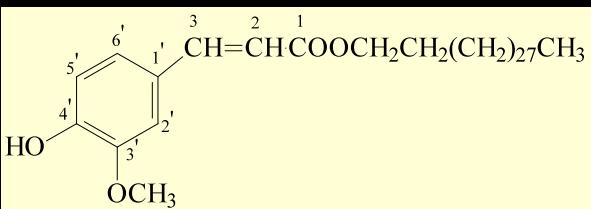


**Φερουνλικός εστέρας της εικοσιεξανόλης (21)**



22

Φερουνλικός εστέρας της εικοσιοκτανόλης (22)



23

Φερουνλικός εστέρας της τριακοντανόλης (23)

Η δομή των παραπάνω τεσσάρων μεταβολιτών παραπέμπει σε εστέρες του φερουνλικού οξέος με λιπαρές αλκοόλες. Η ταυτοποίησή τους πραγματοποιήθηκε με τη φασματοσκοπική μελέτη ( $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  και COSY-LR σε  $\text{CDCl}_3$ ), τη σύγκριση με τη βιβλιογραφία (Addae-Mensah I. et al., 1992; Boonyaratavej S. et al., 1992) και με τη βοήθεια της αέριας χρωματογραφίας μάζας (GC-MS). Στα φάσματα NMR, τα τέσσερα μόρια έδιναν τα ίδια σήματα οπότε οδηγηθήκαμε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για ένα προϊόν. Ωστόσο, κατά την εξέτασή τους με GC-MS προέκυψαν τέσσερις κορυφές που αντιστοιχούσαν σε τέσσερα μοριακά ιόντα τα οποία διέφεραν μεταξύ τους κατά δύο μεθυλένια (530, 558, 586, 614). Διαφέρουν δηλαδή στον αριθμό των ατόμων άνθρακα της εστεροποιημένης αλκοόλης. Σημαντικές παρατηρήσεις που συνετέλεσαν στον προσδιορισμό της δομής των μορίων είναι οι ακόλουθες:

#### Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ :

- ✓ Η διπλή κορυφή στα 7.62 ppm, ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και ανήκει στο ολεφινικό πρωτόνιο H-3 του διπλού δεσμού. Το άλλο πρωτόνιο (H-2) του διπλού δεσμού εμφανίζεται στα 6.28 ppm, με τη μορφή μίας διπλής κορυφής. Η τιμή της σταθεράς σύζευξης ( $J$ ) είναι 16.5 Hz, γεγονός που αποδεικνύει την *trans* διαμόρφωση των πρωτονίων του διπλού δεσμού.
- ✓ Το αρωματικό πρωτόνιο της θέσης 6', συντονίζεται στα 7.07 ppm με τη μορφή μίας διπλής -διπλής κορυφής που οφείλεται στις συζεύξεις του με τα υπόλοιπα δύο αρωματικά πρωτόνια (*ortho* με το H-5' και *meta* με το H-2').

- ✓ Η διπλή κορυφή στα 7.04 ppm αντιστοιχεί στο αρωματικό πρωτόνιο H-2' το οποίο έχει μία *meta* σύζευξη με το H-6'.
- ✓ Η διπλή κορυφή στα 6.94 ppm ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο, αντιστοιχεί στο αρωματικό πρωτόνιο H-5' και οφείλεται στην *ortho* σύζευξή του με το H-6'.
- ✓ Η τριπλή κορυφή στα 4.18 ppm ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια και ανήκει στα πρωτόνια του μεθυλενίου το οποίο είναι γειτονικό στην καρβοξυλομάδα  $OCH_2CH_2(CH_2)nCH_3$  και εξαιτίας αυτής της θέσης, τα πρωτόνια εμφανίζονται πιο αποθωρακισμένα από τα υπόλοιπα πρωτόνια της ανθρακικής αλυσίδας.
- ✓ Τα τρία πρωτόνια του μεθοξυλίου του αρωματικού δακτυλίου εμφανίζονται ως μία απλή κορυφή στα 3.93 ppm.
- ✓ Η πολλαπλή κορυφή στα 1.69 ppm ανήκει στα πρωτόνια του μεθυλενίου που βρίσκεται σε β-θέση ως προς την καρβοξυλομάδα  $OCH_2CH_2(CH_2)nCH_3$  και γι' αυτό είναι λίγο πιο αποθωρακισμένα από τα υπόλοιπα πρωτόνια της ανθρακικής αλυσίδας.
- ✓ Τα πρωτόνια της αλειφατικής ανθρακικής αλυσίδας ( $CH_2$ ) $n$  εμφανίζονται ως μία διευρυμένη κορυφή στα 1.25 ppm.
- ✓ Η τριπλή κορυφή στα 0.89 ppm ανήκει στα τρία πρωτόνια του μεθυλίου που βρίσκεται στο άκρο της αλειφατικής αλυσίδας.

**Στο φάσμα  $^{13}C$ -NMR:**

- ✓ Ο άνθρακας (C-1) του καρβονυλίου συντονίζεται στα 167.4 ppm.
- ✓ Οι άνθρακες του διπλού δεσμού δίνουν κορυφές στα 146.7 ppm (C-3) και 114.7 ppm (C-2).
- ✓ Οι αρωματικοί άνθρακες συντονίζονται στην περιοχή 109.4-147.8 ppm, από τους οποίους οι δύο οξυγονωμένοι (C-3' και C-4'), εμφανίζονται σαφώς πιο αποθωρακισμένοι στα 147.8 ppm και 144.7 ppm αντίστοιχα.
- ✓ Ο άνθρακας που γειτονεύει με την καρβοξυλομάδα  $OCH_2CH_2(CH_2)nCH_3$  δίνει μία κορυφή στα 64.6 ppm, ενώ ο αμέσως επόμενος, αυτός δηλαδή που είναι σε θέση-β ως προς την καρβοξυλομάδα  $OCH_2CH_2(CH_2)nCH_3$  συντονίζεται στα 31.9 ppm.
- ✓ Τα σήματα στην περιοχή 22.7-29.7 ppm αντιστοιχούν στους άνθρακες της αλειφατικής ανθρακικής ( $CH_2$ ) $n$  αλυσίδας.
- ✓ Η κορυφή στα 14.1 ppm στον άνθρακα του τελικού μεθυλίου της αλειφατικής αλυσίδας.

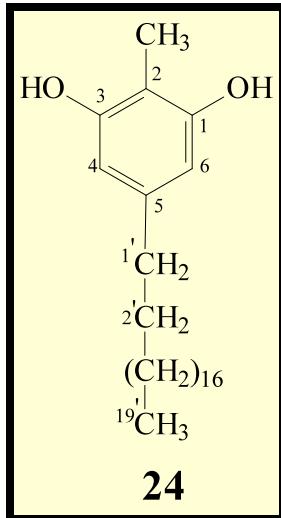
### **Στο φάσμα COSY-LR:**

- ✓ Το ολεφινικό πρωτόνιο H-3 εμφανίζει  $^4J$  σύζευξη με δύο αρωματικά πρωτόνια (H-2', H -6') οπότε δεν υπάρχει υποκαταστάτης σε γειτονική θέση από αυτή που βρίσκεται η ακόρεστη ανθρακική αλυσίδα.
- ✓ Πιστοποιήθηκε η θέση του μεθοξυλίου. Συγκεκριμένα , τα πρωτόνια του μεθοξυλίου ε μφανίζουν μία μόνο σύζευξη ( $^5J$ ) με το αρωματικό πρωτόνιο H-2'. Επομένως, το μεθοξύλιο βρίσκεται συνδεδεμένο στον αρωματικό δακτύλιο, σε θέση που γειτονεύει με τη θέση που βρίσκεται συνδεδεμένο το υδροξύλιο.

Πραγματοποιήθηκε επίσης η μέθοδος του ηλεκτρονιακού βομβαρδισμού [EIMS, φερουλικός εστέρας της εικοσιτετρανόλης: m/z: 530 ( $M^{++}$ ), 196, 195, 194, 177, 150, 145, 137, φερουλικός εστέρας της εικοσιεξανόλης: m/z: 558 ( $M^{++}$ ), 196, 195, 194, 177, 150, 145, 137, φερουλικός εστέρας της εικοσιοκτανόλης: m/z: 586 ( $M^{++}$ ), 196, 195, 194, 177, 150, 145, 137, φερουλικός εστέρας της τριακοντανόλης: m/z: 614 ( $M^{++}$ ), 196, 195, 194, 177, 150, 145, 137].

Κανένα από τα τέσσερα μόρια **δεν έχει απομονωθεί ξανά από φυτό της οικογένειας Polygonaceae**. Ο φερουλικός εστέρας της εικοσιτετρανόλης έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία για την παρεμπόδιση της συγκόλλησης των αιμοπεταλίων, σε *in vivo* πειράματα (Tsai I.L. *et al.*, 2000) και για την εμφάνιση κυτταροτοξικής δράσης (Chen J.J. *et al.*, 2002).

v.) Φασματοσκοπική μελέτη της **πολυγονοκινόλης (polygonocinol) (24)**  
**(στήλη B<sub>4</sub>, κλάσμα 74-94)**



Ανήκει στις ρεσορκινόλες, **αποτελεί νέο φυσικό προϊόν** και του προσδώσαμε το κοινό όνομα **πολυγονοκινόλη**. Η ταυτοποίησή του επιτεύχθηκε με φασματοσκοπικές μεθόδους NMR (<sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, DEPT, HMBC, HMQC, COSY, NOESY σε CDCl<sub>3</sub>), φασματοσκοπία υπεριώδους -ορατού (UV-Vis), φασματοσκοπία υπερύθρου (IR) και φασματομετρία μάζας (CIMS, EIMS, HRMS). Σημαντικές παρατηρήσεις που συνετέλεσαν στον προσδιορισμό της δομής του μορίου είναι οι ακόλουθες:

**Στο φάσμα <sup>1</sup>H-NMR:**

- ✓ Η απλή κορυφή στα 6.27 ppm ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια και αντιστοιχεί στα αρωματικά πρωτόνια H-4, H-6.
- ✓ Τα πρωτόνια του μεθυλίου που είναι συνδεδεμένο στη θέση 2 του αρωματικού δακτυλίου, συντονίζονται στα 2.12 ppm ως μία απλή κορυφή.
- ✓ Η τριπλή κορυφή στα 2.45 ppm αντιστοιχεί στα μεθυλενικά πρωτόνια της θέσης 1'. Τα πρωτόνια αυτά είναι τα πιο αποθωρακισμένα της ανθρακικής αλυσίδας οπότε η σύνδεση της αλυσίδας με τον αρωματικό δακτύλιο γίνεται απευθείας.
- ✓ Στα 1.58 ppm παρατηρείται μία διευρυμένη απλή κορυφή που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 2'.
- ✓ Τα υπόλοιπα μεθυλενικά πρωτόνια H-3'-H-18' συντονίζονται στα 1.25 ppm ως μία διευρυμένη απλή κορυφή.

- ✓ Η τριπλή κορυφή στα 0.85 ppm ολοκληρώνει για 3 πρωτόνια και αντιστοιχεί στα μεθυλικά πρωτόνια H-19'.

**Στο φάσμα  $^{13}\text{C-NMR}$ :**

- ✓ Στα 154.5 ppm παρατηρείται μία κορυφή που αντιστοιχεί στους αρωματικούς άνθρακες C-1, C-3 που φέρουν ως υποκατάσταση το υδροξύλιο.
- ✓ Ο αρωματικός άνθρακας C-2 που είναι υποκατεστημένος με μεθύλιο δίνει σήμα στα 107.3 ppm, ενώ ο άνθρακας του μεθυλίου στα 7.7 ppm.
- ✓ Οι υπόλοιποι αρωματικοί άνθρακες (C-4-C-6) συντονίζονται στην περιοχή 107.8-142.1 ppm.
- ✓ Οι δύο πρώτοι μεθυλικοί άνθρακες (C-1', C-2') της αλειφατικής ανθρακικής αλυσίδας συντονίζονται στα 36.1 ppm και 31.9 ppm αντίστοιχα. Η αποθωράκιση της κορυφής του άνθρακα C-1' οφείλεται στην απευθείας σύνδεσή του στον αρωματικό δακτύλιο.
- ✓ Στην περιοχή 22.7-29.7 ppm παρατηρούνται οι κορυφές των αλειφατικών ανθράκων C-3'-C-18'.
- ✓ Ο άνθρακας του μεθυλίου στη θέση 19', δίνει σήμα στα 14.1 ppm.

**Στο φάσμα DEPT:**

- ✓ Εξακριβώθηκε ότι η αλειφατική αλυσίδα δεν είναι διακλαδισμένη γιατί παρατηρήθηκε ένα μόνο μεθύλιο σε τελική θέση, στα 14.1 ppm.
- ✓ Παρατηρήθηκε ένα μεθύλιο (7.7 ppm) συνδεδεμένο στον αρωματικό δακτύλιο.

**Στο φάσμα HMBC:**

- ✓ Οι οξυγονωμένοι αρωματικοί άνθρακες C-1 και C-3 στα 154.5 ppm, παρουσιάζουν  $^3J$  σύζευξη με τα πρωτόνια του μεθυλίου (2.12 ppm) που είναι συνδεδεμένο στη θέση 2 του αρωματικού δακτυλίου, γεγονός που αποδεικνύει την *ortho* θέση της μεθυλομάδας μεταξύ των δύο υδροξυλίων.
- ✓ Οι αρωματικοί άνθρακες C-4 και C-6 στα 107.8 ppm παρουσιάζουν  $^3J$  σύζευξη με τα πρωτόνια του μεθυλενίου της θέσης 1' της αλειφατικής ανθρακικής στα 2.45 ppm, αποδεικνύοντας ότι η αλειφατική αλυσίδα συνδέεται στη θέση 5 του αρωματικού δακτυλίου.

### **Στο φάσμα HMQC:**

- ✓ Τα πρωτόνια του μεθυλίου (2.12 ppm) εμφανίζουν σύζευξη με τον άνθρακα του μεθυλίου (7.7 ppm).
- ✓ Τα αρωματικά πρωτόνια H-4, H-6 που αντιστοιχούν στην απλή κορυφή στα 6.27 ppm, παρουσιάζουν σύζευξη με τους άνθρακες C-4, C-6 αντίστοιχα οι οποίοι συντονίζονται στα 107.8 ppm.

### **Στο φάσμα COSY:**

- ✓ Επιβεβαιώθηκε η παρουσία της αλειφατικής αλυσίδας, καθώς παρατηρήθηκαν οι συζεύξεις μεταξύ των αλειφατικών πρωτονίων.

### **Στο φάσμα NOESY:**

- ✓ Τα αρωματικά πρωτόνια εμφανίζουν σύζευξη με τα πρωτόνια της αλειφατικής αλυσίδας.

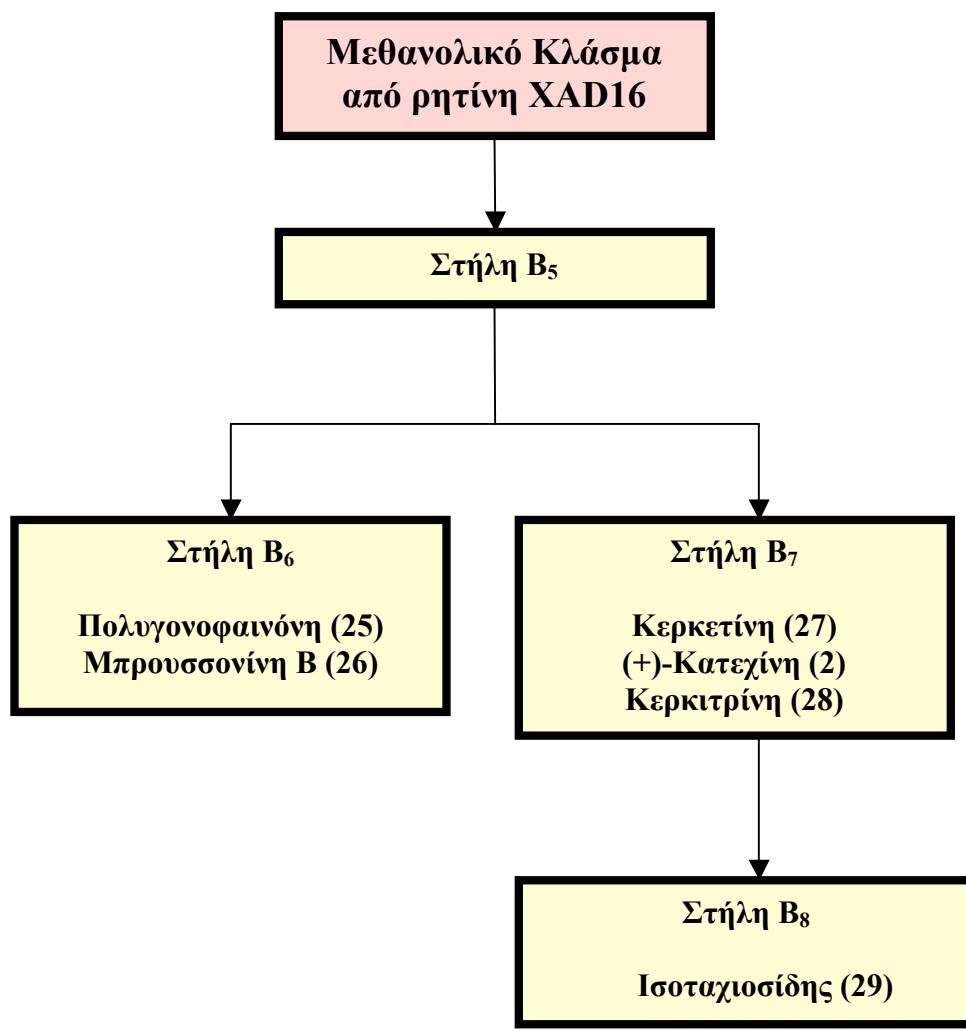
Η πολυγονοκινόλη απομονώθηκε ως ένα λευκό άμορφο συστατικό. Η δομή του μορίου επιβεβαιώθηκε και με τη χρήση φασματομετρίας μάζας. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του χημικού ιονισμού [CIMS, m/z: 391 ( $M+H$ )<sup>+</sup>], η μέθοδος του ηλεκτρονιακού βομβαρδισμού [EIMS, m/z: 390 ( $M^+$ ), 131, 118] και η μέθοδος υψηλής ανάλυσης [HRMS, m/z: 390.3497 ( $M$ )<sup>+</sup>, (υπολογίστηκε για τον μοριακό τύπο  $C_{26}H_{46}O_2$ : 390.3498)].

Μελετήθηκαν επίσης τα φάσματα UV και IR. Στο φάσμα UV ( $CHCl_3$ ) παρατηρήθηκαν  $\lambda_{max}$ : 241 (3.46), 271 (2.97), 280 (sh) nm. Στο φάσμα IR ( $CHCl_3$ ) παρατηρήθηκαν μέγιστα απορρόφησης στα  $3400\text{ cm}^{-1}$ ,  $3000\text{ cm}^{-1}$ ,  $1618\text{ cm}^{-1}$ ,  $1591\text{ cm}^{-1}$  και  $1250\text{ cm}^{-1}$ .

Η πολυγονοκινόλη όπως έχει ήδη αναφερθεί, **απομονώνεται για πρώτη φορά από φυτικό οργανισμό**. Πρέπει να σημειωθεί ότι το φυτό *Polygonum maritimum* αποτελεί μία νέα πηγή αλκυλορεσορκινολών. Φυσικά προϊόντα της ίδιας κατηγορίας έχουν απομονωθεί σε ένδεκα μόνο οικογένειες φυτών. Συγγενικές αλκυλορεσορκινόλες με διαφορετική αλειφατική ανθρακική αλυσίδα, έχουν αναφερθεί και άλλες φορές στη βιβλιογραφία (Van Tran H. *et al.*, 1997).

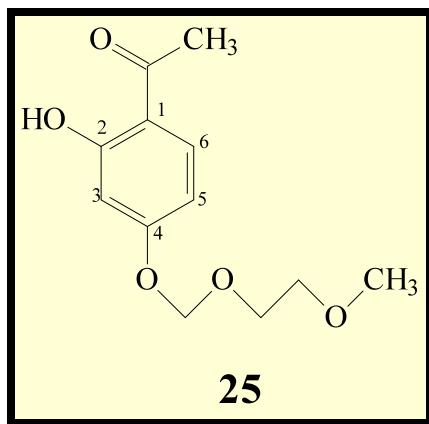
### 2.2.1.γ) Μελέτη μεθανολικού κλάσματος από ρητίνη XAD16

Η ενότητα αυτή περιλαμβάνει τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά των **16 δευτερογενών μεταβολιτών** που απομονώθηκαν από τη χρωματογραφική κατεργασία του μεθανολικού κλάσματος το οποίο προήλθε από την κατεργασία του μεθανολικού εκχυλίσματος με ρητίνη XAD16. Ο τρόπος και η αναλυτική πορεία απομόνωσης των ουσιών περιγράφεται στην παράγραφο **2.3.3** του πειραματικού μέρους. Στο ο επόμενο σχήμα εμφανίζονται οι στήλες που πραγματοποιήθηκαν και τα μόρια που προέκυψαν.



Σχήμα 54. Μελέτη του μεθανολικού κλάσματος που προήλθε από από την κατεργασία του μεθανολικού εκχυλίσματος του φυτού με ρητίνη XAD16.

i.) Φασματοσκοπική μελέτη της **πολυγονοφαινόνης (polygonophenone) (25)**  
**(στήλη Β<sub>6</sub>, κλάσμα 31-40)**



Το παραπάνω μόριο ανήκει στις ακετοφαινόνες, αποτελεί ένα **νέο φυσικό προϊόν** και του προσδώσαμε το κοινό όνομα **πολυγονοφαινόνη**. Ο προσδιορισμός της δομής του επιτεύχθηκε με μεθόδους φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (<sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, DEPT, HMBC, HMQC και COSY σε CDCl<sub>3</sub>), φασματοσκοπία υπεριώδους -ορατού (UV-Vis), φασματοσκοπία υπερύθρου (IR) και φασματομετρία μάζας (CIMS, EIMS, HRMS). Στα φάσματα NMR μπορούν να τονιστούν τα εξής:

**Στο φάσμα <sup>1</sup>H-NMR:**

- ✓ Η διπλή κορυφή στα 7.65 ppm αντιστοιχεί στο αρωματικό πρωτόνιο H-6 το οποίο έχει μία *ortho* σύζευξη με το αρωματικό πρωτόνιο H-5.
- ✓ Η διπλή κορυφή στα 6.60 ppm αντιστοιχεί στο αρωματικό πρωτόνιο H-3 το οποίο εμφανίζει μία *meta* σύζευξη με το αρωματικό πρωτόνιο H-5.
- ✓ Η διπλή -διπλή κορυφή στα 6.56 ppm ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο αρωματικό πρωτόνιο H-5 το οποίο έχει μία *ortho* σύζευξη με το πρωτόνιο H-6 και μία *meta* με το πρωτόνιο H-3.
- ✓ Τα πρωτόνια του μεθυλενίου που βρίσκεται ανάμεσα σε δύο οξυγόνα (OCH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>) στην αλειφατική αλυσίδα, συντονίζονται στα 5.30 ppm ως μία απλή κορυφή. Η αποθωράκιση των συγκεκριμένων πρωτονίων οφείλεται στην παρουσία δύο οξυγόνων στις γειτονικές θέσεις.

- ✓ Τα πρωτόνια των υπόλοιπων δύο μεθυλενίων ( $\text{OCH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$  και  $\text{OCH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ ) δίνουν δύο πολλαπλές κορυφές στα 3.81 και 3.55 ppm αντίστοιχα.
- ✓ Η απλή κορυφή στα 3.38 ppm αντιστοιχεί στα μεθυλικά πρωτόνια  $\text{OCH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ .
- ✓ Τα πρωτόνια του μεθυλίου που βρίσκεται συνδεδεμένο στον καρβονυλικό άνθρακα ( $\text{O}=\text{CCH}_3$ ), δίνουν μία απλή κορυφή στα 2.56 ppm.

**Στο φάσμα  $^{13}\text{C-NMR}$ :**

- ✓ Στα 202.4 ppm παρατηρείται μία κορυφή που αντιστοιχεί στον άνθρακα του καρβονυλίου.
- ✓ Οι αρωματικοί άνθρακες (C-1-C-6) συντονίζονται στην περιοχή 107.8-164.5 ppm. Οι οξυγονωμένοι άνθρακες (C-2, C-4) είναι πιο αποθωρακισμένοι. Συγκεκριμένα, στα 164.5 ppm δίνει σήμα ο άνθρακας C-4 και στα 163.3 ppm συντονίζεται ο άνθρακας C-2.
- ✓ Τα σήματα στην περιοχή 67.9-92.7 ppm ανήκουν στους τρεις μεθυλενικούς άνθρακες της αλειφατικής αλυσίδας. Μάλιστα, πιο αποθωρακισμένος στα 92.7 ppm εμφανίζεται ο άνθρακας που βρίσκεται ανάμεσα σε δύο οξυγόνα ( $\text{OCH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ ).
- ✓ Στον άνθρακα του μεθυλίου στο άκρο της αλειφατικής αλυσίδας ( $\text{OCH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ ) αντιστοιχεί η κορυφή στα 58.6 ppm.
- ✓ Ο άνθρακας του μεθυλίου που βρίσκεται συνδεδεμένο στον καρβονυλικό άνθρακα ( $\text{O}=\text{CCH}_3$ ) δίνει σήμα κορυφή στα 25.9 ppm.

**Στο φάσμα DEPT:**

- ✓ Πιστοποιήθηκε η δομή της πλευρικής αλυσίδας, δηλαδή η παρουσία ενός διπλά-οξυγονωμένου μεθυλενίου, δύο μόνο-οξυγονωμένων μεθυλενίων και ενός μεθυλίου στην άκρη.

**Στο φάσμα HMBC:**

- ✓ Ο καρβονυλικός άνθρακας στα 202.4 ppm παρουσιάζει  $^2J$  σύζευξη με τα πρωτόνια του μεθυλίου που είναι συνδεδεμένο με αυτόν στα 2.56 ppm και  $^3J$  σύζευξη με το αρωματικό πρωτόνιο της θέσης 6 στα 7.65 ppm.

- ✓ Τα πρωτόνια του μεθυλίου που είναι συνδεδεμένο στον καρβονυλικό άνθρακα στα 2.56 ppm, εμφανίζουν  $^3J$  σύζευξη με τον τεταρτοταγή μη οξυγονωμένο αρωματικό άνθρακα C-1 στα 114.4 ppm.
- ✓ Ο οξυγονωμένος αρωματικός άνθρακας C-4 στα 164.5 ppm εμφανίζει  $^3J$  σύζευξη με τα δύο μεθυλενικά πρωτόνια του μεθυλενίου ανάμεσα στα δύο οξυγόνα (OCH2OCH2CH2OCH3) που δίνουν σήμα στα 5.30 ppm και  $^2J$  σύζευξη με τα αρωματικά πρωτόνια H-3 και H-5.
- ✓ Ο μεθυλενικός άνθρακας OCH2OCH2CH2OCH3 στα 67.9 ppm παρουσιάζει σύζευξη με τα μεθυλενικά πρωτόνια OCH2OCH2CH2OCH3 στα 5.30 ppm.
- ✓ Ο μεθυλενικός άνθρακας OCH2OCH2CH2OCH3 στα 71.2 ppm έχει σύζευξη  $^3J$  με τα μεθυλικά πρωτόνια OCH2OCH2CH2OCH3 στα 3.38 ppm.

**Στο φάσμα COSY:**

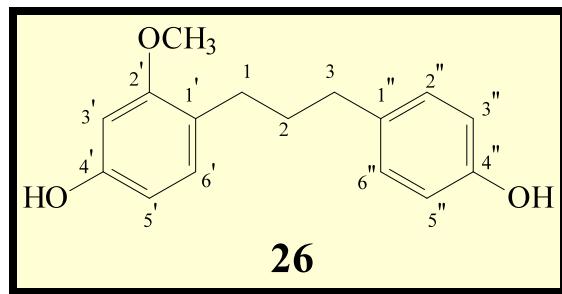
- ✓ Τα πρωτόνια που βρίσκονται στα γειτονικά μεθυλένια (OCH2OCH2CH2OCH3) της πλευρικής αλυσίδας, εμφανίζουν  $^3J$  σύζευξη μεταξύ τους.

Η πολυγονοφαινόνη απομονώθηκε ως ένα λευκό άμορφο συστατικό. Η δομή του μορίου επιβεβαιώθηκε και με τη χρήση φασματομετρίας μάζας. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του χημικού ιονισμού [CIMS, m/z: 241 ( $M+H$ ) $^+$ ], η μέθοδος του ηλεκτρονιακού βομβαρδισμού [EIMS, m/z: 240 ( $M$ ) $^+$ , 165, 164, 137, 135, 123, 90, 89, 65, 60, 59, 45] και η μέθοδος υψηλής ανάλυσης [HRMS, m/z: 240.0995 ( $M$ ) $^+$ , (υπολογίστηκε για τον μοριακό τύπο C12H16O5: 240.0998)].

Μελετήθηκαν επίσης τα φάσματα UV και IR. Στο φάσμα UV (CHCl3) παρατηρήθηκαν  $\lambda_{max}$ : 272 (4.76), 315 (1.98). Στο φάσμα IR (CHCl3) παρατηρήθηκαν μέγιστα απορρόφησης στα  $3312\text{ cm}^{-1}$ ,  $2919\text{ cm}^{-1}$ ,  $1637\text{ cm}^{-1}$ ,  $1454\text{ cm}^{-1}$ ,  $1367\text{ cm}^{-1}$ ,  $1251\text{ cm}^{-1}$  και  $990\text{ cm}^{-1}$ .

Η πολυγονοφαινόνη όπως έχει ήδη αναφερθεί, **απομονώνεται για πρώτη φορά από φυτικό οργανισμό**, ενώ έχει χρησιμοποιηθεί ως συνθετικό προϊόν σε συνθετική πορεία σχηματισμού υποκατεστημένων ισοφλαβονών (Susse M. et al., 1992).

ii.) Φασματοσκοπική μελέτη της **μπρουσσονίνης B (broussonin B) (26)**  
**(στήλη B<sub>6</sub>, κλάσμα 41-53)**



Η μπρουσσονίνη B είναι ένα φαινολικό παράγωγο που έχει τη δομή του 1, 3-διυαρυλοπροπανίου. Η ταυτοποίησή του έγινε με φασματοσκοπικές μεθόδους (<sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, HMBC, COSY-LR σε CDCl<sub>3</sub>) και σύγκριση των αποτελεσμάτων με τα βιβλιογραφικά δεδομένα (Almeida de P.A. *et al.*, 1999). Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε και αέριος χρωματογραφία συνδεδεμένη με φασματογράφο μάζας, από την οποία υπολογίστηκε το μοριακό ιόν M<sup>+</sup> ίσο με 258 που είναι σύμφωνο με την προσδιοριζόμενη δομή. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα εξής φασματοσκοπικά στοιχεία:

**Στο φάσμα <sup>1</sup>H-NMR:**

- ✓ Η διπλή κορυφή στα 7.06 ppm που ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια και αντιστοιχεί στα χημικώς ισοδύναμα αρωματικά πρωτόνια H-2'', H-6'' τα οποία έχουν μία *ortho* σύζευξη με τα αρωματικά πρωτόνια H-3'', H-5''.
- ✓ Η διπλή κορυφή στα 6.75 ppm που ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια και αντιστοιχεί στα χημικώς ισοδύναμα αρωματικά πρωτόνια H-3'', H-5'' τα οποία έχουν μία *ortho* σύζευξη με τα αρωματικά πρωτόνια H-2'', H-6''.
- ✓ Η διπλή κορυφή στα 6.95 ppm που αντιστοιχεί στο αρωματικό πρωτόνιο H-6' το οποίο εμφανίζει μία *ortho* σύζευξη με το H-5'.
- ✓ Η διπλή κορυφή στα 6.40 ppm που αντιστοιχεί στο αρωματικό πρωτόνιο H-3' το οποίο εμφανίζει μία *meta* σύζευξη με το H-5'.
- ✓ Η διπλή-διπλή κορυφή στα 6.33 ppm ανήκει στο αρωματικό πρωτόνιο της θέσης H-5'. Το πρωτόνιο αυτό εμφανίζει μία *ortho* σύζευξη με το H-6' και μία *meta* σύζευξη με το H-3'.

- ✓ Τα μεθοξυλικά πρωτόνια εμφανίζονται υπό τη μορφή μίας απλής κορυφής στα 3.78 ppm.
- ✓ Τα αλειφατικά πρωτόνια των θέσεων 1, 2, 3 δίνουν σήματα στα 2.57 ppm (τριπλή κορυφή), 1.83 ppm (πολλαπλή κορυφή) και 2.56 ppm (τριπλή κορυφή) αντίστοιχα.

**Στο φάσμα  $^{13}\text{C-NMR}$ :**

- ✓ Οι αρωματικοί άνθρακες του πρώτου δακτυλίου ( $\text{C-1}'-\text{C-6}'$ ) συντονίζονται στην περιοχή 98.1-157.7 ppm, ενώ αυτοί του δεύτερου ( $\text{C-1}''-\text{C-6}''$ ) στην περιοχή 114.3-153.7 ppm.
- ✓ Η κορυφή του άνθρακα του μεθοξυλίου εμφανίζεται στα 54.0 ppm.
- ✓ Τα σήματα των αλειφατικών ανθράκων ( $\text{C-1-C-3}$ ) παρατηρούνται μεταξύ 28.4-34.0 ppm.

**Στο φάσμα HMBC:**

- ✓ Ο αλειφατικός άνθρακας της θέσης 1 στα 28.4 ppm εμφανίζει  $^3J$  σύζευξη με ένα αρωματικό πρωτόνιο ( $\text{H-6}'$ ) στα 6.95 ppm.
- ✓ Το αλειφατικό πρωτόνιο  $\text{H-1}$  (2.57 ppm) εμφανίζει  $^3J$  σύζευξη με τους αρωματικούς άνθρακες  $\text{C-2}'$  (157.7 ppm) και  $\text{C-6}'$  (129.5 ppm).

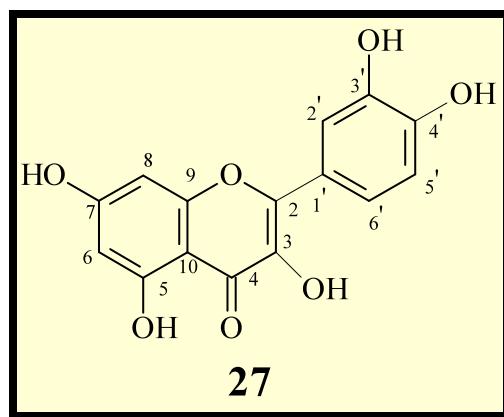
**Στο φάσμα COSY-LR:**

- ✓ Τα πρωτόνια του μεθοξυλίου έχουν σύζευξη με ένα μόνο αρωματικό πρωτόνιο ( $\text{H-3}'$ ), γεγονός που σημαίνει ότι η θέση που είναι συνδεδεμένο το μεθοξύλιο στον αρωματικό δακτύλιο βρίσκεται ανάμεσα σε ένα ελεύθερο και ένα υποκατεστημένο αρωματικό άνθρακα.
- ✓ Τα αλειφατικά πρωτόνια  $\text{H-1}$  και  $\text{H-2}$  εμφανίζουν  $^4J$  και  $^5J$  σύζευξη αντίστοιχα με 1 μόνο αρωματικό πρωτόνιο ( $\text{H-6}'$ ). Αυτό αποδεικνύει ότι η α-θέση ως προς τον αρωματικό άνθρακα που συνδέεται η αλειφατική αλυσίδα με τον ένα αρωματικό δακτύλιο είναι υποκατεστημένη. Σύμφωνα και με την προηγούμενη διαπίστωση από το ίδιο φάσμα, η υποκατάσταση αυτή είναι το μεθοξύλιο.
- ✓ Τα μεθυλενικά πρωτόνια  $\text{H-3}$  εμφανίζουν  $^4J$  και  $^5J$  σύζευξη με δύο ζεύγη αρωματικών πρωτονίων ( $\text{H-2}''$ ,  $\text{H-6}''$  και  $\text{H-3}''$ ,  $\text{H-5}''$  αντίστοιχα).

Η μπρουσσονίνη B απομονώνεται για πρώτη φορά από φυτό της οικογένειας **Polygonaceae**. Έχει απομονωθεί άλλες δύο φορές από φυτά. Συγκεκριμένα, από το

*Broussonetia pyrifera* της οικογένειας Moraceae (Takasugi M. et al., 1980) και το *Anemarrhena asphodeloides* (Tsukamoto S. et al., 2005). Στην πρώτη περίπτωση η παραγωγή της μπρουσσονίνης B ήταν αποτέλεσμα της τεχνητής επίδρασης στο φυτό ενός μύκητα (*Fusarium solani* f. sp. *mori*). Αυτός είναι και ο λόγος που θεωρείται φυτοαλεξίνη.

iii.) Φασματοσκοπική μελέτη της **κερκετίνης (quercetin) (27)**  
(στήλη Β<sub>7</sub>, κλάσμα 101-110)



Ανήκει στην κατηγορία των φλαβονοειδών και συγκεκριμένα πρόκειται για μία φλαβονόλη. Η ταυτοποίηση του μορίου έγινε με μελέτη των φασμάτων NMR (<sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD) και σύγκριση με τα στοιχεία της βιβλιογραφίας (Fossen T. et al., 1998). Σημαντικές παρατηρήσεις που συνετέλεσαν στον προσδιορισμό της δομής του μορίου είναι οι ακόλουθες:

**Στο φάσμα <sup>1</sup>H-NMR:**

- ✓ Η διπλή κορυφή στα 7.82 ppm που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο αρωματικό πρωτόνιο H-2' το οποίο εμφανίζει μία *meta* σύζευξη με το H-6'.
- ✓ Η διπλή -διπλή κορυφή στα 7.72 ppm που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο αρωματικό πρωτόνιο H-6' το οποίο έχει μία *ortho* σύζευξη με το πρωτόνιο 5' και μία *meta* με το πρωτόνιο H-2'.

- ✓ Η διπλή κορυφή στα 6.97 ppm που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο αρωματικό πρωτόνιο H-5' το οποίο εμφανίζει μία *ortho* σύζευξη με το πρωτόνιο H-6'.
- ✓ Οι διπλές κορυφές στα 6.47 και 6.27 ppm που ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η καθεμία, αντιστοιχούν στα αρωματικά πρωτόνια των θέσεων 8 και 6 και οφείλονται στη *meta* σύζευξη μεταξύ τους.

**Στο φάσμα  $^{13}\text{C-NMR}$ :**

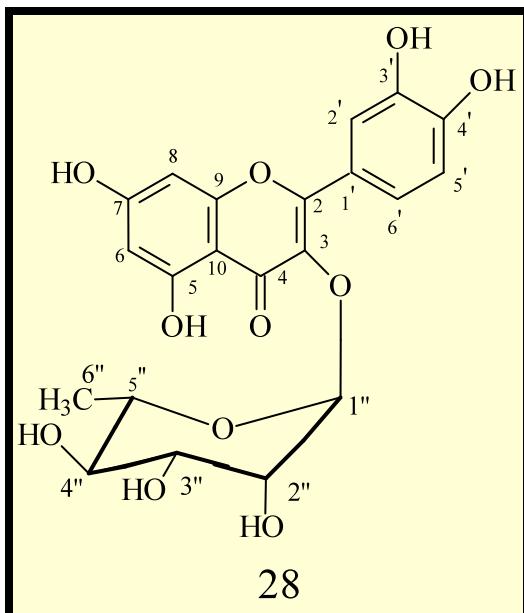
- ✓ Ο άνθρακας του καρβονυλίου (C-4) συντονίζεται στα 177.3 ppm.
- ✓ Οι κορυφές των ανθράκων των τριών δακτυλίων του φλαβονοειδούς παρατηρούνται στην περιοχή 94.4-165.3.

Η κερκετίνη είναι ένα από τα πιο διαδεδομένα φλαβονοειδή στο φυτικό βασίλειο. Συναντάται πολύ συχνά και με τη γλυκοσυλιωμένη μορφή. Αναστέλλει τη δράση πολλών ενζύμων, π.χ. πρωτεΐνική κινάση C. Εμφανίζει επίσης, αντιφλεγμονώδεις, αντιβακτηριακές, αντιϊκές, αλλεργικές και αντιηπατοτοξικές δράσεις (Harborne J.B. & Baxter H., 1993). Ενοχοποιείται όμως και για πιθανή μεταλλαξιογόνο δράση σε *in vivo* πειράματα, χωρίς όμως να έχει αποδειχθεί παρόμοια δράση στον άνθρωπο (Okamoto T., 2005).

**iv.) Φασματοσκοπική μελέτη της (+)-κατεχίνης [(+)-catechin] (2)  
(στήλη Β<sub>7</sub>, κλάσμα 163-170)**

Η πλήρης φασματοσκοπική μελέτη του μορίου παρουσιάζεται στην παράγραφο **1.2.2.β.**

v.) Φασματοσκοπική μελέτη της κερκιτρίνης (quercitrin) (28)  
 (στήλη Β<sub>7</sub>, κλάσμα 171-180)



Η κερκιτρίνη είναι ο ραμνοσίδης του φλαβονοειδούς κερκετίνη στη θέση 3 του μορίου. Η ταυτοποίηση του μορίου έγινε με την φασματοσκοπική μελέτη (<sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, HMBC σε CD<sub>3</sub>OD) και σύγκριση με τα βιβλιογραφικά στοιχεία (Lawrence O. et al., 1997; Masanori K. & Fukushima S., 1982). Οι σημαντικότερες παρατηρήσεις που οδήγησαν στην ταυτοποίηση του μορίου είναι:

**Στο φάσμα <sup>1</sup>H-NMR:**

- ✓ Η διπλή κορυφή στα 7.32 ppm αντιστοιχεί στο αρωματικό πρωτόνιο της θέσης 2' το οποίο εμφανίζει μία *meta* σύζευξη με το πρωτόνιο της θέσης 6'.
- ✓ Η διπλή-διπλή κορυφή στα 7.27 ppm αντιστοιχεί στο αρωματικό πρωτόνιο της θέσης 6' το οποίο εμφανίζει μία *ortho* με το H-5' και μία *meta* σύζευξη με το H-2'.
- ✓ Η διπλή κορυφή στα 6.87 ppm αντιστοιχεί στο αρωματικό πρωτόνιο της θέσης 5' το οποίο εμφανίζει μία *ortho* σύζευξη με το πρωτόνιο της θέσης 6'.
- ✓ Οι δύο διπλές κορυφές στα 6.32 και 6.16 ppm που ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η καθεμία και αντιστοιχούν στα αρωματικά πρωτόνια των θέσεων 8, 6 αντίστοιχα.

- ✓ Η διπλή κορυφή στα 5.37 ppm αντιστοιχεί στο ανωμερικό πρωτόνιο (H-1'') της ραμνόσης. Το J που εμφανίζει είναι μικρό (1.5 Hz) σε σχέση με αυτό του ανωμερικού πρωτονίου της γλυκόσης, στοιχείο ενδεικτικό της παρουσίας ραμνόσης.
- ✓ Τα πρωτόνια H-2''-H-5'' της ραμνόσης εμφανίζονται στην περιοχή 3.35-4.25 ως πολλαπλή κορυφή.
- ✓ Η διπλή κορυφή στα 0.97 ppm που ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια αντιστοιχεί στα τρία πρωτόνια του μεθυλίου της θέσης 6'' της ραμνόσης.

**Στο φάσμα  $^{13}\text{C-NMR}$ :**

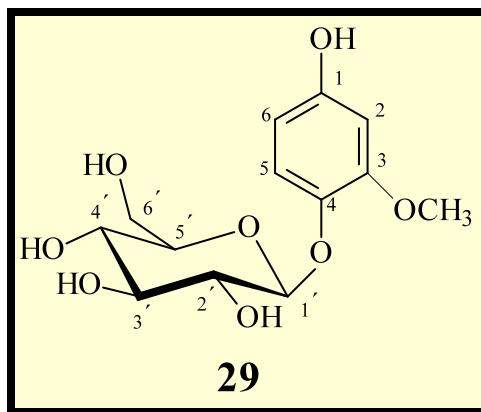
- ✓ Οι κορυφές των ανθράκων των τριών δακτυλίων του φλαβονοειδούς παρατηρούνται στην περιοχή 94.0-179.7 ppm.
- ✓ Ο άνθρακας της θέσης 1'' του σακχάρου συντονίζεται στα 102.0 ppm.
- ✓ Οι υπόλοιποι άνθρακες του σακχάρου συντονίζονται στην περιοχή 70.1-74.7 ppm.
- ✓ Ο άνθρακας του μεθυλίου της θέσης 6'' της ραμνόσης συντονίζεται στα 17.6 ppm.

**Στο φάσμα HMBC:**

- ✓ Το ανωμερικό πρωτόνιο της ραμνόσης (H-1'') στα 5.37 ppm, έχει σύζευξη  $^3J$  με τον άνθρακα στη θέση 3 στα 134.2 ppm, γεγονός που αποδεικνύει ότι η σύνδεση του σακχάρου γίνεται στον C-3.

Η κερκιτρίνη οφείλει το όνομά της στη απομόνωσή της από τον φλοιό του φυτού *Quercus tinctoria* (Fagaceae). Έχει αναφερθεί σε είδη *Polygonum* ότι είναι αντιτροφικό για τον μεταξοσκώληκα *Bombyx mori*, αλλά έλκει για τροφή το σκαθάρι *Gastrophysa atrocyanea*. Εμφανίζει ακόμα αντιφλεγμονώδη, αντιϊκή, αντιηπατοτοξική, προστατευτική κατά του έλκους και αντιβακτηριακή κατά των μικροβίων *Pseudomonas maltophilia* και *Enterobacter cloacae* (Harborne J.B. & Baxter H., 1993).

vi.) Φασματοσκοπική μελέτη του **ισοταχιοσίδη** (isotachioside) (29)  
 (στήλη Β<sub>8</sub>, κλάσμα 15-25)



Ο ισοταχιοσίδης αποτελεί έναν αντιπρόσωπο της κατηγορίας των φαινολικών γλυκοσιδών. Ο καθορισμός της δομής του έγινε με τη βοήθεια του NMR και σύγκριση με τη βιβλιογραφία (Zhong X.N. et al., 1999; Saijo R. et al., 1989). Μάλιστα, πρέπει να σημειωθεί ότι για τη λήψη των φασμάτων, χρησιμοποιήθηκαν τρεις δευτεριωμένοι διαλύτες, η CD<sub>3</sub>OD και συνδυασμός CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>+D<sub>2</sub>O. Με CD<sub>3</sub>OD ελήφθησαν φάσματα <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, COSY, COSY-LR, HMQC, HMBC και με CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>+D<sub>2</sub>O φάσματα <sup>1</sup>H-NMR και <sup>13</sup>C-NMR. Οι παρατηρήσεις που ήταν καθοριστικές στην ταυτοποίηση του μορίου είναι:

**Στο φάσμα <sup>1</sup>H-NMR:**

- ✓ Η διπλή κορυφή στα 6.94 ppm (CD<sub>3</sub>OD) αντιστοιχεί στο αρωματικό πρωτόνιο της θέσης 5 το οποίο εμφανίζει μία *ortho* σύζευξη με το H-6. Η ίδια κορυφή εμφανίζεται στα 7.03 ppm σε διαλύτη CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>+D<sub>2</sub>O
- ✓ Η διπλή κορυφή στα 6.43 ppm (CD<sub>3</sub>OD) αντιστοιχεί στο αρωματικό πρωτόνιο της θέσης 2 το οποίο εμφανίζει μία *meta* σύζευξη με το H-6. Η ίδια κορυφή εμφανίζεται στα 6.54 ppm σε διαλύτη CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>+D<sub>2</sub>O.
- ✓ Η διπλή -διπλή κορυφή στα 6.27 ppm (CD<sub>3</sub>OD) που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο αρωματικό πρωτόνιο της θέσης 6 το οποίο εμφανίζει μία *ortho* σύζευξη με το πρωτόνιο H-5 και μία *meta* σύζευξη με το πρωτόνιο H-2. Η ίδια κορυφή εμφανίζεται στα 6.36 ppm σε διαλύτη CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>+D<sub>2</sub>O.

- ✓ Το ανωμερικό πρωτόνιο του σακχάρου H-1' εμφανίζεται με τη μορφή μίας διπλής κορυφής στα 4.67 ppm (CD<sub>3</sub>OD), ενώ σε CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>+D<sub>2</sub>O παρατηρείται στα 4.85 ppm.
- ✓ Η απλή κορυφή στα 3.84 ppm (CD<sub>3</sub>OD) και 3.82 ppm (CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>+D<sub>2</sub>O) που ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια και αντιστοιχεί στα πρωτόνια του μεθοξυλίου της θέσης 3.
- ✓ Τα σήματα στην περιοχή 3.35-3.71 ppm (CD<sub>3</sub>OD) αντιστοιχούν στα πρωτόνια των θέσεων 2', 3', 4', 5', 6' του σακχάρου.

**Στο φάσμα <sup>13</sup>C-NMR:**

- ✓ Στην περιοχή 104.0-152.9 ppm (CD<sub>3</sub>OD), εμφανίζονται οι κορυφές που αντιστοιχούν στους αρωματικούς άνθρακες, 3 από τους οποίους είναι οξυγονωμένοι (C-1 στα 152.9 ppm, C-3 στα 149.3 ppm, C-4 στα 143.0 ppm). Σε διαλύτη CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>+D<sub>2</sub>O οι αρωματικοί άνθρακες συντονίζονται μεταξύ 104.4-153.3 ppm.
- ✓ Ο άνθρακας (C-1') στον οποίο βρίσκεται το ανωμερικό πρωτόνιο του σακχάρου, εμφανίζεται με μία κορυφή στα 103.8 ppm (CD<sub>3</sub>OD), ενώ τους υπόλοιπο υγρά γλυκοσιδικούς άνθρακες τους συναντάμε στην περιοχή 62.7-78.1 ppm. Σε διαλύτη CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>+D<sub>2</sub>O ο άνθρακας που φέρει το ανωμερικό πρωτόνιο παρατηρείται στα 102.5 ppm, ενώ οι γλυκοσιδικοί άνθρακες συντονίζονται μεταξύ 64.6-76.6 ppm.
- ✓ Το σήμα του άνθρακα του μεθοξυλίου διακρίνεται στα 56.4 ppm (CD<sub>3</sub>OD) και στα 56.3 ppm (CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>+D<sub>2</sub>O).

**Στο φάσμα HMBC:**

- ✓ Το ανωμερικό πρωτόνιο της γλυκό σης στα 4.85 ppm έχει σύζευξη <sup>3</sup>J με τον άνθρακα στη θέση 4 στα 143.0 ppm, γεγονός που αποδεικνύει ότι η σύνδεση του σακχάρου γίνεται στον C-4.

**Στο φάσμα COSY:**

- ✓ Παρατηρείται σύζευξη <sup>3</sup>J μεταξύ των αρωματικών πρωτονίων H-5 και H-6.

**Στο φάσμα COSY-LR:**

- ✓ Με το φάσμα αυτό διαπιστώθηκε ότι τα πρωτόνια του μεθοξυλίου που είναι συνδεδεμένο στον αρωματικό δακτυλίου, έχουν σύζευξη μόνο με ένα αρωματικό πρωτόνιο. Οπότε το μεθοξύλιο είναι σε αρωματικό άνθρακα που γειτονεύει με υποκατεστημένο αρωματικό άνθρακα γιατί σε διαφορετική περίπτωση αν το μεθοξύλιο

ήταν σε αρωματικό άνθρακα χωρίς υποκαταστάτη σε γειτονική θέση, τα πρωτόνιά του θα είχαν σύζευξη με δύο αρωματικά πρωτόνια.

- ✓ Παρατηρήθηκε σύζευξη μεταξύ του ανωμερικού πρωτονίου H-1' και ενός μόνο αρωματικού πρωτονίου (H-5) οπότε το μεθοξύλιο βρίσκεται σε γειτονικό άνθρακα από τον άνθρακα που είναι συνδεδεμένος με το σάκχαρο.

**Απομονώνεται για πρώτη φορά από φυτό της οικογένειας Polygonaceae.**

## **2.3) ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **2.3.1) ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΦΥΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ**

Η συλλογή του φυτού *Polygonum maritimum* της οικογένειας **Polygonaceae** πραγματοποιήθηκε τον Αύγουστο του 2004 στις ακτές της παραλίας Χερονήσι, στο χωριό Άγιος Ανδρέας της επαρχίας Κυνουρίας του νομού Αρκαδίας, στην Πελοπόννησο. Οι περιοχές απ' όπου συλλέχθηκε, ήταν αμμώδεις και πετρώδεις θέσεις 10 m από τη θάλασσα. Η συλλογή περιελάμβανε ολόκληρο το τμήμα του φυτού (υπόγειο, υπέργειο) και ι ακολούθησε η διαλογή, η ξήρανση του φυτικού υλικού, η κονιοποίηση και η ζύγιση της σκόνης. Η ξηρή σκόνη ζύγιζε 1.2 Kg. Στη συνέχεια έγινε εκχύλιση της κονιοποιημένης σκόνης ως εξής: Πρώτα χρησιμοποιήθηκε CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x5L), μετά MeOH (3x5L) και τέλος H<sub>2</sub>O (2x5L). Τα μεσοδιαστήματα μεταξύ δύο διαδοχικών εκχυλίσεων ήταν δύο ημέρες. Τα εκχυλίσματα συμπυκνώθηκαν και ζυγίστηκαν:

- Εκχύλισμα CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: 17.5 g.
- Εκχύλισμα MeOH: 110 g.
- Εκχύλισμα H<sub>2</sub>O: 27 g.

Τα εκχυλίσματα ελέγχθηκαν ποιοτικά με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC), με τη χρήση των διαλυτών Cyclohexane, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, MeOH και H<sub>2</sub>O, σε διάφορες αναλογίες.

**Έλεγχος διχλωρομεθανικού εκχυλίσματος:** Χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθοι διαλύτες σε διάφορες αναλογίες: Cyclohexane, Cyclohexane/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: 90/10, 80/20, 50/50, 40/60, 20/80, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH: 99/1, 98/2, 97/3, 95/5, 90/10, 85/15.

**Έλεγχος μεθανολικού εκχυλίσματος:** Χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθοι διαλύτες σε διάφορες αναλογίες: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH: 99/1, 98/2, 97/3, 95/5, 90/10, 85/15, 80/20, 70/30, 50/50, 30/70, 20/80. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία

λεπτής στοιβάδας αντιστρόφου φάσης (RP-18), με συστήματα διαλυτών H<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>O /MeOH: 99/1, 95/5, 90/10, 85/15, 80/20 και 60/40.

**Έλεγχος υδατικού εκχυλίσματος:** Χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας αντιστρόφου φάσης (RP-18) με συστήματα διαλυτών H<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>O/MeOH: 99/1, 95/5, 90/10, 80/20, 85/15, 60/40 και 50/50.

Στη συνέχεια, παρατηρήθηκαν τα χρωματογραφήματα σε λυχνία UV σε δύο μήκη κύματος (254 και 366 nm) και ψεκάστηκαν με διάλυμα θεικής βανιλλίνης.

Ακολούθησε προσεκτική εξέταση των χρωματογραφημάτων για να γίνει επιλογή του εκχυλίσματος που θα μελετηθεί ως προς τη χημική του σύσταση.

Με την πρώτη εκτίμηση το διχλωρομεθανικό εκχύλισμα περιείχε κυρίως:

- **Χλωροφύλλες**
- **Τερπενοειδή**
- **Λιπαρά οξέα**
- **Φαινολικά παράγωγα**

Αντίστοιχα, η εξέταση των χρωματογραφημάτων του μεθανολικού εκχυλίσματος έδειξε την πιθανή παρουσία μορίων από τις παρακάτω κατηγορίες ουσιών:

- **Φαινολικά παράγωγα**
- **Σάκχαρα**

Τέλος, η χρωματογραφική μελέτη του υδατικού εκχυλίσματος οδήγησε στο συμπέρασμα ότι περιέχονται σε μεγάλο ποσοστό σάκχαρα.

Μετά από τους παραπάνω χρωματογραφικούς ελέγχους, αποφασίστηκε η μελέτη του διχλωρομεθανικού και του μεθανολικού εκχυλίσματος, εξαιτίας κυρίως της περιεκτικότητάς τους σε φαινολικά παράγωγα, σε αντίθεση με το υδατικό εκχύλισμα που περιείχε σάκχαρα σε μεγάλο ποσοστό. Όσον αφορά το μεθανολικό εκχύλισμα, υποβλήθηκε σε κατεργασία με ρητίνη XAD16. Συγκεκριμένα, το μεθανολικό εκχύλισμα

(110 g) διαλύθηκε σε ορισμένο όγκο απιονισμένου  $H_2O$  (2 L), το διάλυμα που προέκυψε διηθήθηκε, διήλθε από στήλη με ρητίνη XAD16 (η μέθοδος περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο **1.2.1.δ)** και παραλήφθηκε το μεθανολικό κλάσμα (35 g) το οποίο μελετήθηκε στη συνέχεια. Αυτό έγινε για να αυξηθεί το ποσοστό των πολυφαινολών στο κλάσμα που θα εισερχόταν στους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς και για να απομακρυνθούν τα σάκχαρα που θα δυσκόλευαν την απομόνωση των ουσιών. Η ανάλυση των δύο εκχυλισμάτων είχε ως αποτέλεσμα την **απομόνωση και ταυτοποίηση 14 δευτερογενών μεταβολιτών.**

## 2.3.2) ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΧΗΜΙΚΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΤΟΥ ΔΙΧΛΩΡΟΜΕΘΑΝΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ

Η μελέτη του διχλωρομεθανικού εκχυλίσματος του φυτού *Polygonum maritimum* περιλαμβάνει την απομόνωση ουσιών σε καθαρή μορφή με τη χρήση χρωματογραφικών μεθόδων και την ταυτοποίησή τους με φασματοσκοπικές τεχνικές. Σ' αυτήν την ενότητα περιγράφονται αναλυτικά οι πορείες απομόνωσης των **8 φυσικών προϊόντων** που βρέθηκαν κατά την εξέταση του εκχυλίσματος και παρατίθενται πίνακες με τα φασματοσκοπικά τους δεδομένα.

### 2.3.2.a) Στήλη B<sub>1</sub>

**Διαχωριζόμενο μίγμα:** Διχλωρομεθανικό εκχύλισμα (17.5 g).

**Στατική φάση:** Γέλη πυριτίου 60H.

**Κινητή φάση:** Cyclohexane, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, MeOH σε αναλογίες ανξανόμενης πολικότητας.

Στην πρώτη στήλη χρησιμοποιήθηκαν τα 17.5 g διχλωρομεθανικού εκχυλίσματος. Η στήλη αυτή αποτελεί μία αρχική κλασμάτωση του εκχυλίσματος και πρόκειται για χρωματογραφία ανοικτής στήλης υπό κενό. Η επιλογή των διαλυτών Cyclohexane, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, MeOH έγινε με βάση τη μελέτη των χρωματογραφημάτων των εκχυλισμάτων που αναφέρθηκε παραπάνω. Ακόμα, τα κλάσματα που ελήφθησαν είχαν όγκο 200 ml το καθένα. Η ακριβής πορεία που ακολουθήθηκε περιγράφεται στον Πίνακα 53, ενώ αναφέρονται επίσης οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν, τα 17 συνολικά κλάσματα που προέκυψαν από τη συνένωση των επιμέρους κλασμάτων και τα βάρη των συνενωθέντων κλασμάτων. Η συνένωση των κλασμάτων έγινε μετά από χρωματογραφικό έλεγχο με TLC σε συστήματα διαλυτών Cyclohexane, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> και MeOH, παρατήρηση σε λάμπα υπεριώδους φωτός (UV) και ψεκασμό με διάλυμα θεικής βανιλλίνης.

ΚΛΑΣΜΑΤΑ ΣΤΗΛΗΣ Β <sub>1</sub>	ΔΙΑΛΥΤΕΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (% ΑΝΑΛΟΓΙΑ)	ΒΑΡΟΣ
1-6	Cyclohexane	0.09 g
7-12	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : 90/10	0.12 g
13-16	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : 80/20	0.12 g
17-18	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : 80/20	0.32 g
19-20	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : 70/30	0.50 g
21-32	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : 70/30	1.10 g
33-44	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : 60/40	0.49 g
45-48	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : 50/50	0.56 g
49-64	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : 40/60	1.30 g
65-68	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : 30/70	0.50 g
69-72	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : 20/80	0.70 g
73-80	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : 10/90	0.90 g
81-105	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1.40 g
106-112	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 90/10	1.30 g
113-118	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 70/30	0.60 g
119-121	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 50/50	0.90 g
122-125	MeOH	1.40 g

Πίνακας 53. Στήλη Β<sub>1</sub>.

Μετά τις συνενώσεις προέκυψαν **17 κλάσματα** τα οποία κωδικοποιήθηκαν ως εξής:

Κλάσμα 1-6: 1  
 Κλάσμα 7-12: 2  
 Κλάσμα 13-16: 3  
 Κλάσμα 17-18: 4  
 Κλάσμα 19-20: 5  
 Κλάσμα 21-32: 6  
 Κλάσμα 33-44: 7  
 Κλάσμα 45-48: 8  
 Κλάσμα 49-64: 9

Κλάσμα 65-68: 10  
 Κλάσμα 69-72: 11  
 Κλάσμα 73-80: 12  
 Κλάσμα 81-105: 13  
 Κλάσμα 106-112: 14  
 Κλάσμα 113-118: 15  
 Κλάσμα 119-121: 16  
 Κλάσμα 122-125: 17

Στη συνέχεια έγινε χρωματογραφικός έλεγχος στα 17 κλάσματα σε TLC, με συστήματα διαλυτών ανάπτυξης Cyclohexane/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: 80/20, 50/50, 20/80, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH: 99/1, 95/5 και ψεκασμός με διάλυμα θεικής βανιλλίνης. Μετά τη μελέτη των χρωματογραφημάτων, ακολούθησε η περαιτέρω ανάλυση των **κλασμάτων 5** (19-20), **6** (21-32), **9** (49-64), **10** (65-68) και **11** (69-72), καθώς σ' αυτά παρατηρήθηκαν απορροφήσεις και χρώματα που παρέπεμπαν σε φαινολικά συστατικά και τερπενοειδή. Πιο συγκεκριμένα, στα **κλάσματα 5** και **6** παρατηρήθηκαν δύο κυρίως άπολα συστατικά τα οποία μετά τον ψεκασμό έδιναν σκούρο καστανό και βαθύ ιώδες

χρώμα αντίστοιχα.. Στα κλάσματα 9, 10, και 11, επισημάνθηκαν απορροφήσεις στο UV και χρώματα (καφέ, κόκκινα και ιώδη) που υποδήλωναν την παρουσία ενδιαφέροντων φαινολικών ουσιών. Στις επόμενες παραγράφους παρουσιάζεται αναλυτικά η διαδικασία διαχωρισμού και απομόνωσης των 8 συνολικά φυσικών προϊόντων από το διχλωρομεθανικό εκχύλισμα.

### 2.3.2.β) Στήλη B<sub>2</sub>

**Διαχωριζόμενο μίγμα:** Κλάσματα 5, 6 στήλης B<sub>1</sub> (1.6 g).

**Στατική φάση:** Γέλη πυριτίου διαμέτρου 0.040-0.063 mm.

**Κινητή φάση :** Cyclohexane, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> και MeOH σε αναλογίες αυξανόμενης πολικότητας.

**Διάμετρος στήλης:** 3 cm.

Η πλήρης πορεία της στήλης παρουσιάζεται στον Πίνακα 54.

ΚΛΑΣΜΑΤΑ ΣΤΗΛΗΣ B <sub>2</sub>	ΔΙΑΛΥΤΕΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (% ΑΝΑΛΟΓΙΑ)	ΒΑΡΟΣ
1-16	Cyclohexane	7 mg
17-20	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : 90/10	4 mg
21-30	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : 80/20	28 mg
31-43	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : 70/30	11 mg
49-54	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : 70/30	19 mg
55-60	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : 70/30	2 mg
61-90	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : 70/30	5 mg
91-120	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : 60/40	68 mg
121-147	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : 40/60	90 mg
148-200	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : 30/70	220 mg
201-213	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : 20/80	109 mg
214-262	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : 10/90	190 mg
263-271	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	8 mg
272-285	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 99/1	70 mg
286-300	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 98/2	50 mg
301-325	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 97/3	125 mg
326-338	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 95/5	75 mg
339-350	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 90/10	150 mg

Πίνακας 54. Στήλη B<sub>2</sub>.

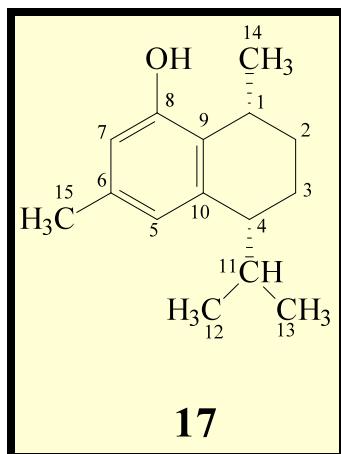
Εξετάστηκαν τα κλάσματα με χρωματογρα φία λεπτής στοιβάδας (TLC), σε συστήματα διαλυτών που αποτελούνταν από Cyclohexane/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: 80/20, 50/50, 20/80, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> και CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH: 99/1, 95/5 και προέκυψαν τα εξής:

➤ Το **κλάσμα 61-90** εμφάνιζε μία κηλίδα που απορροφούσε στο UV-Vis και εμφάνιζε σκούρο καστανό χρώμα όταν ψεκαζόταν με διάλυμα θεικής βανιλίνης. Μετά από τη χρήση φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και φασματογράφου μάζας συνδεδεμένου με αέριο χρωματογραφία (GC-MS), διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για το σεσκιτερπένιο (+)-**cis-8-υδροξυκαλαμένιο**.

➤ Το **κλάσμα 263-271** εμφάνιζε μία βασική κηλίδα κατά τον χρωματογραφικό έλεγχο με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας η οποία δεν απορροφούσε στο ορατό και το υπεριώδες, αλλά παρουσίαζε σκούρο μπλε χρώμα μετά από ψεκασμό με διάλυμα θεικής βανιλίνης. Μετά από φασματοσκοπική μελέτη με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και με τη βοήθεια του φασματογράφου μάζας συνδεδεμένου με αέριο χρωματογραφία (GC-MS), αποδείχθηκε ότι η ουσία αυτή είναι η **β-σιτοστερόλη**.

Στις ακόλουθες παραγράφους παρατίθενται οι πίνακες με τα φασματοσκοπικά δεδομένα των δύο μορίων.

### i.) (+)-**cis-8-υδροξυκαλαμένιο (17)**



Το (+)-**cis-8-υδροξυκαλαμένιο** έχει μοριακό τύπο **C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>O** και μοριακό βάρος

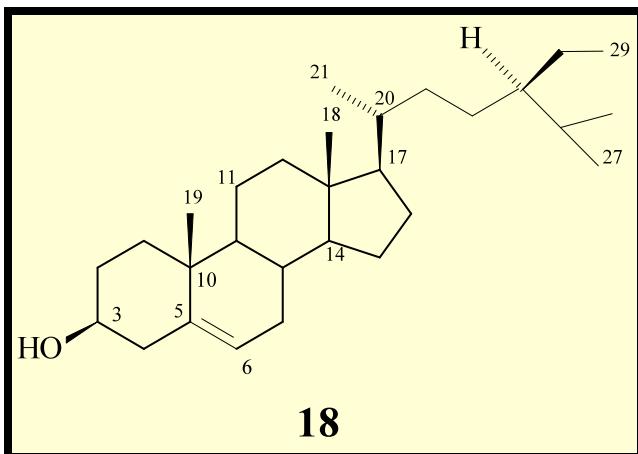
**218.**

Το μοριακό βάρος του μορίου πισ τοποιήθηκε με τη μέθοδο του χημικού ιονισμού [CIMS, m/z: 219 ( $M+H$ )<sup>+</sup>], ενώ μετρήθηκε και η στροφική ικανότητά του. Η ακριβής τιμή σε θερμοκρασία 20  $^0C$ , διαλύτη  $CHCl_3$  και με συγκέντρωση του διαλύματος 1 g/100ml ήταν  $[\alpha]^{20} = + 67.9^0$ . Οι τιμές  $\delta$  των φασμάτων, οι σταθερές σύζευξης  $J$  και η πολλαπλότητα των κορυφών στα φάσματα  $^1H$ -NMR και  $^{13}C$ -NMR ( $CDCl_3$ ) του μορίου αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα.

Άτομο	$\delta$ $^{13}C$ σε ppm	$\delta$ $^1H$ σε ppm	$J$ σε Hz
1	26.5	3.01 <i>m</i>	...
2	28.8	1.50-1.70 <i>m</i>	...
3	17.4	1.50-1.70 <i>m</i>	...
4	43.3	2.63 <i>m</i>	...
5	120.9	6.71 <i>br s</i>	...
6	135.7	-	...
7	112.8	6.42 <i>br s</i>	...
8	153.0	-	...
9	126.7	-	...
10	141.3	-	...
11	30.9	2.35 <i>m</i>	...
12	16.4	0.64 <i>d</i>	7.0
13	21.1	0.99 <i>d</i>	7.0
14	20.5	1.20 <i>d</i>	7.0
15	21.0	2.20 <i>s</i>	...

Πίνακας 55. Φασματοσκοπικά δεδομένα  $^1H$ -NMR και  $^{13}C$ -NMR ( $CD_3OD$ ) του (+)-*cis*-8-υδροξυκαλαμένιου.

ii.)  $\beta$ -Σιτοστερόλη (18)



Η  $\beta$ -σιτοστερόλη έχει μοριακό τύπο **C<sub>29</sub>H<sub>50</sub>O** και μοριακό βάρος **414**.

Στον Πίνακα 56 αναφέρονται αναλυτικά οι τιμές των χημικών μετατοπίσεων  $\delta$ , οι σταθερές σύζευξης  $J$  και η πολλαπλότητα των κορυφών που εμφανίζονται στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ), καθώς και οι χημικές μετατοπίσεις στο φάσμα  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) του μορίου. Το μοριακό βάρος του μορίου πιστοποιήθηκε με τη μέθοδο του χημικού ιονισμού [CIMS, m/z: 415 ( $\text{M}+\text{H}^+$ )].

Άτομο	$\delta$ $^{13}\text{C}$ σε ppm	$\delta$ $^1\text{H}$ σε ppm	$J$ σε Hz
1	37.2	1.15, 1.89	...
2	31.6	1.85, 1.56	...
3	71.8	3.53 <i>m</i>	...
4	42.3	2.28 <i>m</i>	...
5	140.7	-	...
6	121.7	5.35 <i>m</i>	...
7	31.9	1.53	...
8	31.9	1.93	...
9	50.1	0.98	...
10	36.5	-	...
11	21.1	1.51	...
12	39.7	1.19, 2.03	...
13	42.3	-	...
14	56.7	1.00	...
15	24.3	1.13, 1.61	...
16	28.2	1.35, 1.86	...
17	56.0	1.10	...
18	11.9	0.68 <i>s</i>	...
19	19.4	1.00 <i>s</i>	...
20	36.1	1.37	...
21	18.8	0.92 <i>d</i>	6.5
22	33.9	1.04, 1.35	...
23	26.0	1.20	...
24	45.8	1.97	...
25	29.1	1.70	...
26	19.8	0.84 <i>d</i>	6.5
27	19.0	0.81 <i>d</i>	6.5
28	23.0	1.27	...
29	12.0	0.85 <i>t</i>	7.5

Πίνακας 56. Φασματοσκοπικά δεδομένα  $^1\text{H-NMR}$  και  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) της  $\beta$ -σιτοστερόλης.

### 2.3.2.γ) Στήλη B<sub>3</sub>

**Διαχωριζόμενο μίγμα:** Κλάσματα 9, 10 και 11 στήλης B<sub>1</sub> (2.5 g).

**Στατική φάση:** Γέλη πυριτίου διαμέτρου 0.040-0.063 mm.

**Κινητή φάση :** Cyclohexane, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> και MeOH σε αναλογίες αυξανόμενης πολικότητας.

**Διάμετρος στήλης:** 3.5 cm.

Τα κλάσματα 9-11 της στήλης B<sub>1</sub>, μετά τον έλεγχο με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, έδειξαν πολλές ομοιότητες στη σύστασή τους. Το γεγονός αυτό ώθησε στη συνένωσή τους και στην πραγματοποίηση μίας στήλης στο συνολικό κλάσμα που ζύγιζε συνολικά 2.5 g. Η πλήρης πορεία της στήλης παρουσιάζεται στον Πίνακα 57.

ΚΛΑΣΜΑΤΑ ΣΤΗΛΗΣ B <sub>3</sub>	ΔΙΑΛΥΤΕΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (% ΑΝΑΛΟΓΙΑ)	ΒΑΡΟΣ (mg)
1-18	Cyclohexane	10 mg
19-30	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : 90/10	12 mg
31-60	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : 80/20	30 mg
61-75	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : 70/30	47 mg
76-103	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : 60/40	93 mg
104-200	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : 50/50	350 mg
201-234	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : 40/60	125 mg
235-240	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : 30/70	10 mg
241-283	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : 20/80	90 mg
284-310	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : 20/80	240 mg
311-323	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : 20/80	120 mg
324-354	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : 10/90	190 mg
355-386	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100 mg
387-405	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 99/1	80 mg
406-425	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 98/2	120 mg
426-440	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 97/3	125 mg
441-460	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 95/5	165 mg
461-480	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 90/10	130 mg
481-490	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 50/50	180 mg

Πίνακας 57. Στήλη B<sub>3</sub>.

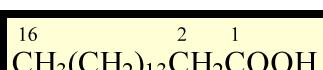
Τα κλάσματα υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, σε συστήματα ανάπτυξης Cyclohexane/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: 80/20, 50/50, 20/80, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> και CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH: 99/1,

95/5, παρατήρηση στο UV και ψεκασμό με διάλυμα θεικής βανιλλίνης. Μετά από τους παραπάνω ελέγχους, εξήχθησαν τα εξής συμπεράσματα:

- Η χρωματογραφική μελέτη του **κλάσματος 19-30** πιστοποίησε την παρουσία ενός μορίου το οποίο δεν απορροφούσε στο υπεριώδες και χρωματίζόταν καφέ όταν ψεκάστηκε με διάλυμα θεικής βανιλλίνης. Με τη χρήση φασματοσκοπικού πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού και αέριας χρωματογραφίας με τη βοήθεια φασματογράφου μάζας, αποδείχθηκε ότι πρόκειται για ένα συνήθη εκπρόσωπο των λιπαρών οξέων, το **παλμιτικό οξύ**.
- Τα **κλάσματα 61-75, 76-103** και **104-200** ήταν παρόμοια οπότε συνενώθηκαν και παρουσίαζαν εξαιρετικό ενδιαφέρον, καθώς παρατηρήθηκε μία κη λίδα στο υπεριώδες που χρωματίζόταν κόκκινη μετά από ψεκασμό με διάλυμα θεικής βανιλλίνης. Το μόριο όμως που αντιστοιχούσε στην κηλίδα αυτή, δεν ήταν καθαρό, καθώς στα συγκεκριμένα κλάσματα υπήρχαν και άλλες ουσίες. Γι' αυτό συνεκτιμώντας και το συνολικό βάρος τους (490 mg) αποφασίστηκε η περαιτέρω κατεργασία τους (παρ. 2.3.2.δ).
- Το **κλάσμα 235-240** εμφάνιζε μία κηλίδα που απορροφούσε στο UV-Vis και χρωματίζόταν σκούρα καφέ μετά από ψεκασμό με διάλυμα θεικής βανιλλίνης. Με τη χρήση τεχνικών NMR και GC-MS δι απιστώθηκε ότι πρόκειται για μίγμα τεσσάρων εστέρων του **φερουλικού οξέος με αλκοόλες** που διέφεραν μεταξύ τους στην αλειφατική ανθρακική αλυσίδα κατά δύο μεθυλένια. Συγκεκριμένα απομονώθηκαν ο **φερουλικός εστέρας της εικοσιτετρανόλης**, ο **φερουλικός εστέρας της εικοσιεξανόλης**, ο **φερουλικός εστέρας της εικοσιοκτανόλης** και ο **φερουλικός εστέρας της τριακοντανόλης**.

Στις επόμενες παραγράφους παρατίθενται οι πίνακες με τα φασματοσκοπικά δεδομένα του **παλμιτικού οξέους** και των τεσσάρων **εστέρων του φερουλικού οξέος**.

### i.) Παλμιτικό οξύ (19)



19

Το παλμιτικό οξύ έχει μοριακό τύπο **C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub>** και μοριακό βάρος **256**.

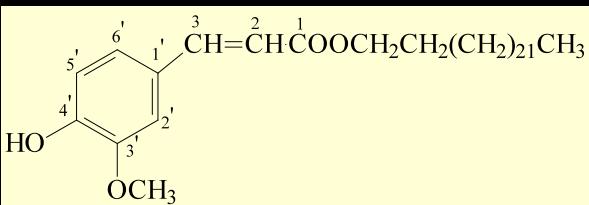
Το μοριακό βάρος του μορίου πιστοποιήθηκε με τη μέθοδο του χημικού ιονισμού [CIMS, m/z: 257 (M+H)<sup>+</sup>]. Οι τιμές δ των φασμάτων, οι σταθερές σύζευξης *J* και η πολλαπλότητα των κορυφών στα φάσματα <sup>1</sup>H-NMR και <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>) του παλμιτικού οξέος, υπάρχουν στον παρακάτω πίνακα.

Άτομο	$\delta$ <sup>13</sup> C σε ppm	$\delta$ <sup>1</sup> H σε ppm	<i>J</i> σε Hz
1	180.5	-	...
2	34.1	2.23 <i>t</i>	...
3-15	22.7-34.1	1.30 <i>m</i>	...
16	14.1	0.90 <i>t</i>	...

Πίνακας **58**. Φασματοσκοπικά δεδομένα <sup>1</sup>H-NMR και <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>) του παλμιτικού οξέος.

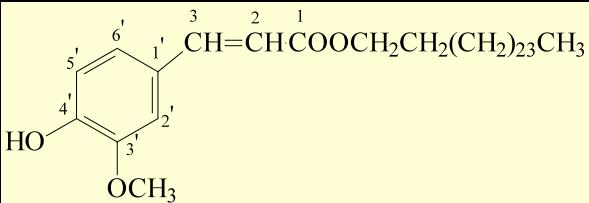
- ii.) Φερουλικός εστέρας της εικοσιτετρανόλης (20), φερουλικός εστέρας της εικοσιεξανόλης (21), φερουλικός εστέρας της εικοσιοκτανόλης (22), φερουλικός εστέρας της τριακοντανόλης (23)

Τα συγκεκριμένα μόρια εμφάνιζαν το ίδιο φάσμα κατά την εξέτασή τους με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, με αποτέλεσμα η ταυτοποίησή τους να γίνει με τη χρήση GC-MS οπότε και διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για τέσσερα διαφορετικά μόρια.



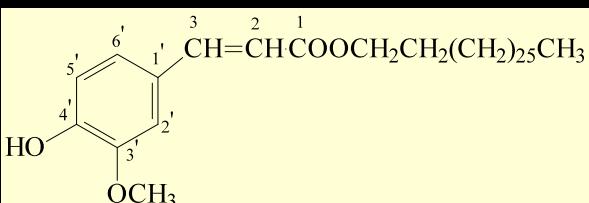
**20**

Ο φερουλικός εστέρας της εικοσιτετρανόλης έχει μοριακό τύπο  $C_{34}H_{58}O_4$  και μοριακό βάρος **530**.



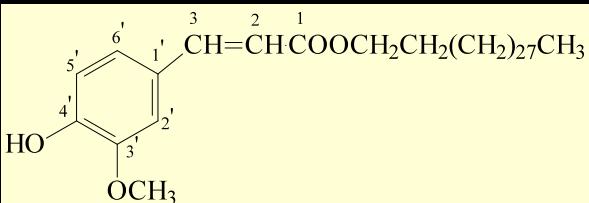
**21**

Ο φερουλικός εστέρας της εικοσιεξανόλης έχει μοριακό τύπο  $C_{36}H_{62}O_4$  και μοριακό βάρος **558**.



**22**

Ο φερουλικός εστέρας της εικοσιοκτανόλης έχει μοριακό τύπο  $C_{38}H_{66}O_4$  και μοριακό βάρος **586**.



**23**

Ο φερουλικός εστέρας της τριακοντανόλης έχει μοριακό τύπο  $C_{40}H_{70}O_4$  και μοριακό βάρος **614**.

Τα μοριακά βάρη των μορίων πιστοποιήθηκαν με τη μέθοδο του χημικού ιονισμού [CIMS, φερουλικός εστέρας της εικοσιτετρανόλης:  $m/z: 531 (M+H)^+$ , φερουλικός εστέρας της εικοσιεξανόλης:  $m/z: 559 (M+H)^+$ , φερουλικός εστέρας της εικοσιοκτανόλης:  $m/z: 587 (M+H)^+$ , φερουλικός εστέρας της τριακοντανόλης:  $m/z: 615 (M+H)^+$ ]. Πραγματοποιήθηκε επίσης η μέθοδος του ηλεκτρονιακού βομβαρδισμού [EIMS, φερουλικός εστέρας της εικοσιτετρανόλης:  $m/z: 530 (M^+)$ , 196, 195, 194, 177, 150, 145, 137, φερουλικός εστέρας της εικοσιεξανόλης:  $m/z: 558 (M^+)$ , 196, 195, 194, 177, 150, 145, 137, φερουλικός εστέρας της εικοσιοκτανόλης:  $m/z: 586 (M^+)$ , 196, 195, 194, 177, 150, 145, 137, φερουλικός εστέρας της τριακοντανόλης:  $m/z: 614 (M^+)$ , 196, 195, 194, 177, 150, 145, 137]. Ο Πίνακας **59** περιέχει τις τιμές δ των φασμάτων, τις

σταθερές σύζευξης  $J$  και την πολλαπλότητα των κορυφών στα φάσματα  $^1\text{H-NMR}$  και  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) των μορίων.

Άτομο	$\delta ^{13}\text{C}$ σε ppm	$\delta ^1\text{H}$ σε ppm	$J$ σε Hz
1	167.4	-	...
2	114.7	6.28 d	16.5
3	146.7	7.62 d	16.5
1'	127.1	-	...
2'	109.4	7.04 d	2.0
3'	147.8	-	...
4'	144.7	-	...
5'	123.0	6.94 d	8.5
6'	115.7	7.07 dd	8.5, 2.0
3'-OCH <sub>3</sub>	55.9	3.93 s	...
OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> )nCH <sub>3</sub>	64.6	4.18 t	7.0
OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> )nCH <sub>3</sub>	31.9	1.69 m	...
OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> )nCH <sub>3</sub>	22.7-29.7	1.25 br	...
OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> )nCH <sub>3</sub>	14.1	0.89 t	7.0

Πίνακας 59. Φασματοσκοπικά δεδομένα  $^1\text{H-NMR}$  και  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) των τεσσάρων εστέρων του φερουλικού οξέος.

### 2.3.2.δ) Στήλη B<sub>4</sub>

**Διαχωριζόμενο μίγμα:** Κλάσματα 61-75, 76-103 και 104-200 στήλης B<sub>3</sub> (0.490 g).

**Στατική φάση:** Γέλη πυριτίου διαμέτρου 0.040-0.063 mm.

**Κινητή φάση :** Cyclohexane, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> και MeOH σε αναλογίες αυξανόμενης πολικότητας.

**Διάμετρος στήλης:** 2 cm.

Στη στήλη B<sub>4</sub> σκοπός ήταν η απομόνωση και ο προσδιορισμός της δομής του μεταβολίτη που αντιστοιχούσε στην κηλίδα που απορροφούσε στο υπεριώδες και χρωματιζόταν κόκκινη με διάλυμα θεικής βανιλλίνης. Τα υπόλοιπα μόρια του μίγματος

είχαν τα χρωματογραφικά χαρακτηριστικά λιπαρών ο υσιών (δεν απορροφούσαν, χρωματίζονταν με διάλυμα θεικής βανιλλίνης). Στον Πίνακα 60 αναφέρονται λεπτομερώς τα κλάσματα που συλλέχθηκαν, τα βάρη τους και οι αντίστοιχες αναλογίες των συστημάτων διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν.

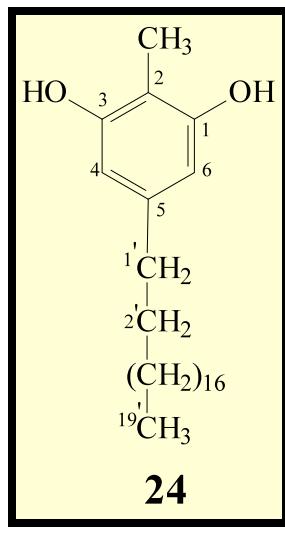
ΚΛΑΣΜΑΤΑ ΣΤΗΛΗΣ B <sub>4</sub>	ΔΙΑΛΥΤΕΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (% ΑΝΑΛΟΓΙΑ)	ΒΑΡΟΣ
1-16	Cyclohexane	12 mg
17-30	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : 90/10	15 mg
31-40	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : 80/20	11 mg
41-50	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : 70/30	12 mg
51-63	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : 60/40	18 mg
64-73	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : 50/50	20 mg
74-94	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : 40/60	6 mg
95-110	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : 30/70	23 mg
111-140	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : 20/80	55 mg
141-150	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : 10/90	18 mg
151-170	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	25 mg
171-194	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 99/1	30 mg
195-216	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 95/5	40 mg
217-230	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 90/10	45 mg
231-245	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 80/20	40 mg
246-270	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 50/50	85 mg

Πίνακας 60. Στήλη B<sub>4</sub>.

Κατά τον έλεγχο των κλασμάτων της στήλης με TLC διαπιστώθηκε η παρουσία του μορίου που μας ενδιέφερε (απορρόφηση στο υπεριώδες και κόκκινος χρωματισμός με διάλυμα θεικής βανιλλίνης) στο κλάσμα 74-94. Η ταυτοποίησή του επιτεύχθηκε με τη χρήση NMR, UV-Vis, IR και φασματομετρία μάζας (CIMS, EIMS, HRMS). Πρόκειται για την **2-μεθυλο-5-νοναδεκυλορεσορκινόλη** που κατατάσσεται στις ρεσορκινόλες, αποτελεί **νέο φυσικό προϊόν**, για το οποίο προτείναμε το όνομα **πολυγονοκινόλη**.

Στην επόμενη παράγραφο παρατίθεται ο πίνακας με τα φασματοσκοπικά δεδομένα του μορίου.

i.) Πολυγονοκινόλη (24)



24

Η πολυγονοκινόλη έχει μοριακό τύπο **C<sub>26</sub>H<sub>46</sub>O<sub>2</sub>** και μοριακό βάρος **390**, είναι λευκό και άμορφο συστατικό.

Η δομή του μορίου πιστοποιήθηκε και με τη χρήση της μεθόδου των χημικού ιονισμού [CIMS, m/z: 391 (M+H)<sup>+</sup>], της μεθόδου του ηλεκτρονιακού βομβαρδισμού [EIMS, m/z: 390 (M<sup>+</sup>), 131, 118] και της μεθόδου υψηλής ανάλυσης [HRMS, m/z: 390.3497 (M)<sup>+</sup>, (υπολογίστηκε για τον μοριακό τύπο C<sub>26</sub>H<sub>46</sub>O<sub>2</sub>: 390.3498)].

Μελετήθηκαν επίσης τα φάσματα UV και IR. Στο φάσμα UV (CHCl<sub>3</sub>) παρατηρήθηκαν  $\lambda_{\text{max}}$  : 241 (3.46), 271 (2.97), 280 (sh) nm. Στο φάσμα IR (CHCl<sub>3</sub>) παρατηρήθηκαν μέγιστα απορρόφησης στα 3400 cm<sup>-1</sup>, 3000 cm<sup>-1</sup>, 1618 cm<sup>-1</sup>, 1591 cm<sup>-1</sup> και 1250 cm<sup>-1</sup>.

Στον Πίνακα **61** υπάρχουν συγκεντρωμένα οι τιμές δ των φασμάτων, οι σταθερές σύζευξης *J* και η πολλαπλότητα των κορυφών στα φάσματα <sup>1</sup>H-NMR και <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>) της πολυγονοκινόλης.

Άτομο	$\delta^{13}\text{C}$ σε ppm	$\delta^1\text{H}$ σε ppm	$J$ σε Hz
1	154.5	-	...
2	107.3	-	...
3	154.5	-	...
4	107.8	6.27 s	...
5	142.1	-	...
6	107.8	6.27 s	...
1'	36.1	2.45 t	8.0
2'	31.9	1.58 br s	...
3'-18'	22.7-29.7	1.25 br s	...
19'	14.1	0.85 t	7.0
2-CH <sub>3</sub>	7.7	2.12 s	...
OH	-	4.61 s	...

Πίνακας 61. Φασματοσκοπικά δεδομένα  $^1\text{H}$ -NMR και  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) της πολυγονοκινόλης.

### 2.3.3) ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΧΗΜΙΚΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΤΟΥ ΜΕΘΑΝΟΛΙΚΟΥ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΡΗΤΙΝΗ XAD16

Κατά τη μελέτη του κατεργασμένου μεθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Polygonum maritimum* απομονώθηκαν **6 δευτερογενείς μεταβολίτες** σε καθαρή μορφή με τη χρήση χρωματογραφικών μεθόδων και η ταυτοποίησή τους έγινε με φασματοσκοπικές τεχνικές. Στις επόμενες παραγράφους υπάρχουν αναλυτικά οι πορείες απομόνωσης των φυσικών προϊόντων και οι πίνακες με τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά τους.

#### 2.3.3.a) Στήλη B<sub>5</sub>

**Διαχωριζόμενο μίγμα:** Μεθανολικό κλάσμα μετά από κατεργασία του μεθανολικού εκχυλίσματος με ρητίνη XAD16 (35 g).

**Στατική φάση:** Γέλη πυριτίου 60H.

**Κινητή φάση:**  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , MeOH σε αναλογίες αυξανόμενης πολικότητας.

Η στήλη Β<sub>5</sub> η οποία αποτελεί την πρώτη του μεθανολικού κλάσματος, πραγματοποιήθηκε με σκοπό να γίνει μία αρχική κλασμάτωση του μίγματος που θα βοηθούσε στην περαιτέρω επεξεργασία. Χρησιμοποιήθηκαν το CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> και η MeOH ως διαλύτες έκλουσης, μετά από έλεγχο με TLC. Τα κλάσματα που ελήφθησαν είχαν όγκο 250 ml το καθένα. Η ακριβής πορεία που ακολουθήθηκε, οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν, τα 19 συνολικά κλάσματα που προέκυψαν από τη συνένωση των επιμέρους κλασμάτων και τα βάρη των συνενωθέντων κλασμάτων, περιγράφονται στον Πίνακα 62. Η συνένωση των κλασμάτων έγινε μετά από χρωματογραφικό έλεγχο με TLC σε συστήματα διαλυτών CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> και MeOH, παρατήρηση σε λάμπα υπεριώδους φωτός (UV) και ψεκασμό με διάλυμα θειικής βανιλλίνης.

ΚΛΑΣΜΑΤΑ ΣΤΗΛΗΣ Β <sub>5</sub>	ΔΙΑΛΥΤΕΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (% ΑΝΑΛΟΓΙΑ)	ΒΑΡΟΣ
1-8	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0.28 g
9-12	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 99/1	0.40 g
13-16	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 98/2	0.62 g
17-20	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 97/3	0.79 g
21-28	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 97/3	1.05 g
29-33	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 95/5	0.70 g
34-37	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 95/5	0.70 g
38-39	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 95/5	0.50 g
40-43	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 92/8	1.80 g
44-52	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 90/10	2.42 g
53-55	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 85/15	1.80 g
56-60	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 80/20	1.60 g
61-64	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 80/20	1.40 g
65-68	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 70/30	2.20 g
69-76	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 60/40	2.60 g
77-80	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 50/50	3.00 g
81-83	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 30/70	2.70 g
84-87	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 20/80	2.70 g
88-90	MeOH	3.60 g

Πίνακας 62. Στήλη Β<sub>5</sub>.

Μετά τις συνενώσεις προέκυψαν **19 κλάσματα** τα οποία κωδικοποιήθηκαν ως εξής:

Κλάσμα 1-8: <b>1</b>	Κλάσμα 53-55: <b>11</b>
Κλάσμα 9-12: <b>2</b>	Κλάσμα 56-60: <b>12</b>
Κλάσμα 13-16: <b>3</b>	Κλάσμα 61-64: <b>13</b>
Κλάσμα 17-20: <b>4</b>	Κλάσμα 65-68: <b>14</b>
Κλάσμα 21-28: <b>5</b>	Κλάσμα 69-76: <b>15</b>
Κλάσμα 29-33: <b>6</b>	Κλάσμα 77-80: <b>16</b>
Κλάσμα 34-37: <b>7</b>	Κλάσμα 81-83: <b>17</b>
Κλάσμα 38-39: <b>8</b>	Κλάσμα 84-87: <b>18</b>
Κλάσμα 40-43: <b>9</b>	Κλάσμα 88-90: <b>19</b>
Κλάσμα 44-52: <b>10</b>	

Στη συνέχεια έγινε χρωματογραφικός έλεγχος στα 19 κλάσματα σε TLC, με συστήματα διαλυτών ανάπτυξης: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH: 99/1, 95/5, 90/10 και 80/20 και ψεκασμός με διάλυμα θεικής βανιλίνης. Μετά τη μελέτη των χρωματογραφημάτων, αποφασίστηκε η μελέτη των **κλασμάτων 6 (29-33), 7 (34-37), 8 (38-39), 11 (53-55), 12 (56-60)**, καθώς σ' αυτά παρατηρήθηκαν ενδιαφέρουσες απορροφήσεις και χρώματα που παρέπεμπαν σε φαινολικά συστατικά. Πιο συγκεκριμένα, στα **κλάσματα 6, 7, 8** παρατηρήθηκαν δύο κυρίως συστατικά τα οποία μετά τον ψεκασμό έδιναν κόκκινο χρώμα. Στα **κλάσματα 11, 12** σημειώθηκαν απορροφήσεις στο UV και χρώματα (κίτρινα και κόκκινα) που παρέπεμπαν στην παρουσία ενδιαφέροντων φαινολικών ουσιών, πιθανόν φλαβονοειδών. Στις παραγράφους που ακολουθούν περιγράφεται η διαδικασία διαχωρισμού και απομόνωσης των 6 συνολικά φυσικών προϊόντων από το μεθανολικό εκχύλισμα.

### 2.3.3.β) Στήλη B<sub>6</sub>

**Διαχωριζόμενο μίγμα:** Κλάσματα **6, 7, 8** στήλης **B<sub>5</sub>** (1.9 g).

**Στατική φάση:** Γέλη πυριτίου διαμέτρου 0.040-0.063 mm.

**Κινητή φάση:** CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> και MeOH σε αναλογίες αυξανόμενης πολικότητας.

**Διάμετρος στήλης:** 3 cm.

Τα **κλάσματα 6-8** της **στήλης B<sub>5</sub>** μετά τον έλεγχο με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, έδειξαν πολλές ομοιότητες στη σύστασή τους. Το γεγονός αυτό οδήγησε στην ένωσή τους και στην πραγματοποίηση μίας στήλης, σ' όλο το συνενωμένο κλάσμα που ζύγιζε συνολικά 1.9 g. Η πλήρης πορεία της στήλης παρουσιάζεται στον Πίνακα **63**.

ΚΛΑΣΜΑΤΑ ΣΤΗΛΗΣ Β <sub>6</sub>	ΔΙΑΛΥΤΕΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (% ΑΝΑΛΟΓΙΑ)	ΒΑΡΟΣ
<b>1-30</b>	<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	<b>62 mg</b>
<b>31-40</b>	<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH: 99/1</b>	<b>10 mg</b>
<b>41-53</b>	<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH: 98/2</b>	<b>12 mg</b>
<b>54-80</b>	<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH: 97/3</b>	<b>90 mg</b>
<b>81-93</b>	<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH: 95/5</b>	<b>88 mg</b>
<b>94-113</b>	<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH: 93/7</b>	<b>90 mg</b>
<b>114-130</b>	<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH: 93/7</b>	<b>90 mg</b>
<b>131-150</b>	<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH: 90/10</b>	<b>93 mg</b>
<b>151-170</b>	<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH: 85/15</b>	<b>95 mg</b>
<b>171-180</b>	<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH: 80/20</b>	<b>78 mg</b>
<b>181-200</b>	<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH: 70/30</b>	<b>85 mg</b>
<b>201-214</b>	<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH: 60/40</b>	<b>100 mg</b>
<b>215-236</b>	<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH: 50/50</b>	<b>110 mg</b>
<b>237-260</b>	<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH: 30/70</b>	<b>95 mg</b>
<b>261-285</b>	<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH: 20/80</b>	<b>200 mg</b>
<b>286-320</b>	<b>MeOH</b>	<b>225mg</b>

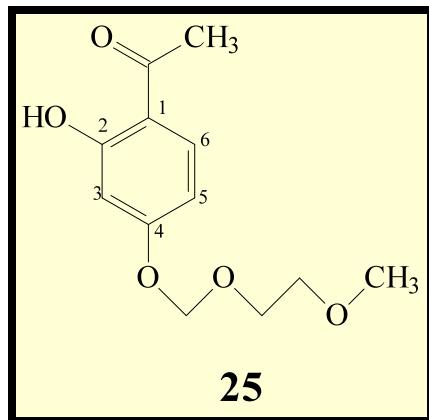
Πίνακας 63. Στήλη Β<sub>6</sub>.

Τα κλάσματα υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, σε συστήματα ανάπτυξης CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH: 99/1, 95/5, 90/10, παρατήρηση στο UV και ψεκασμό με διάλυμα θεικής βανιλλίνης. Εξήχθησαν τα εξής συμπεράσματα:

- Το **κλάσμα 31-40** εμφάνιζε μία κηλίδα στην TLC που απορροφούσε στο UV-Vis και χρωματίζοταν κόκκινη, μετά από ψεκασμό με διάλυμα θεικής βανιλλίνης. Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού και η αέριος χρωματογραφία με τη βοήθεια φασματογράφου μάζας, οδήγησε στην ταυτοποίηση του μορίου. Πρόκειται για την ακετοφαινόνη **[2-υδροξυ-4-(2-μεθοξυαιθοξυ)μεθοξυ]-ακετοφαινόνη** που αποτελεί **νέο φυσικό προϊόν**, για το οποίο προτείναμε την ονομασία **πολυγονοφαινόνη**.
- Στο **κλάσμα 41-53** παρατηρήθηκε κατά την εξέταση με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, μία ουσία που απορροφούσε στο υπεριώδες -ορατό και ο ψεκασμός με διάλυμα θεικής βανιλλίνης τη χρωμάτιζε κόκκινη. Η φασματοσκοπική μελέτη του μορίου σε συνδυασμό με τη χρήση GC-MS οδήγησε στον καθορισμό της δομής του. Πρόκειται για το δυαρυλοπροπάνιο **[1-(4'-υδροξυ-2'-μεθοξυφαινυλ)-3-(4''-υδροξυφαινυλ)-προπάνιο]** που είναι πιο γνωστό ως **μπρουσσονίνη B**.

Στις επόμενες παραγράφους παρατίθενται οι πίνακες με τα φασματοσκοπικά δεδομένα των δύο μορίων.

**i.) Πολυγονοφαινόνη (25)**



Η πολυγονοφαινόνη έχει μοριακό τύπο **C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>O<sub>5</sub>** και μοριακό βάρος **240**, είναι λευκό και άμορφο συστατικό.

Η δομή του μορίου επιβεβαιώθηκε και με τη χρήση φασματομετρίας μάζας. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του χημικού ιονισμού [CIMS, m/z: 241 (M+H)<sup>+</sup>], η μέθοδος του ηλεκτρονιακού βομβαρδισμού [EIMS, m/z: 240 (M<sup>+</sup>), 165, 164, 137, 135, 123, 90, 89, 65, 60, 59, 45] και η μέθοδος υψηλής ανάλυσης [HRMS, m/z: 240.0995 (M)<sup>+</sup>, (υπολογίστηκε για τον μοριακό τύπο C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>O<sub>5</sub>: 240.0998)].

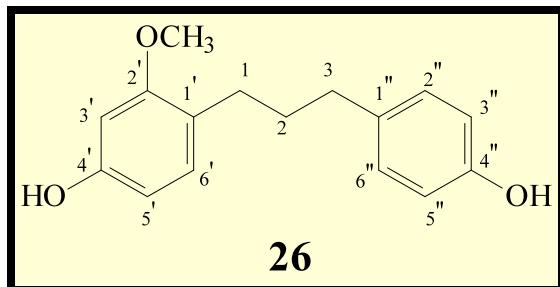
Μελετήθηκαν επίσης τα φάσμα τα UV και IR. Στο φάσμα UV (CHCl<sub>3</sub>) παρατηρήθηκαν  $\lambda_{\text{max}}$  : 272 (4.76), 315 (1.98). Στο φάσμα IR (CHCl<sub>3</sub>) παρατηρήθηκαν μέγιστα απορρόφησης στα 3312 cm<sup>-1</sup>, 2919 cm<sup>-1</sup>, 1637 cm<sup>-1</sup>, 1454 cm<sup>-1</sup>, 1367, 1251 και 990 cm<sup>-1</sup>.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται αναλυτικά οι τιμές δ των φασμάτων, οι σταθερές σύζευξης *J* και η πολλαπλότητα των κορυφών στα φάσματα <sup>1</sup>H-NMR και <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>) της πολυγονοφαινόνης.

Ατομο	$\delta^{13}\text{C}$ σε ppm	$\delta^1\text{H}$ σε ppm	$J$ σε Hz
$\text{O}=\text{CCH}_3$	25.9	2.56 s	...
C=O	202.4	-	...
1	114.4	-	...
2	163.3	-	...
3	103.4	6.60 d	2.4
4	164.5	-	...
5	107.8	6.56 dd	8.8, 2.4
6	132.1	7.65 d	8.8
$\text{OCH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$	92.7	5.30 s	...
$\text{OCH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$	67.9	3.81 m	...
$\text{OCH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$	71.2	3.55 m	...
$\text{OCH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$	58.6	3.38 s	...
OH	-	12.63 s	...

Πίνακας 64. Φασματοσκοπικά δεδομένα  $^1\text{H-NMR}$  και  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) της πολυγονοφαινόνης.

## ii.) Μπρουσσονίνη Β (26)



Η μπρουσσονίνη Β έχει μοριακό τύπο  $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_3$  και μοριακό βάρος 258.

Οι τιμές  $\delta$  των φασμάτων, οι σταθερές σύζευξης  $J$  και η πολλαπλότητα των κορυφών στα φάσματα  $^1\text{H-NMR}$  και  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) του μορίου αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα. Το μοριακό βάρος του μορίου πιστοποιήθηκε με τη μέθοδο του χημικού ιονισμού [CIMS, m/z: 259 ( $\text{M}+\text{H}^+$ )].

Άτομο	$\delta$ $^{13}\text{C}$ σε ppm	$\delta$ $^1\text{H}$ σε ppm	$J$ σε Hz
1	28.4	2.57 <i>t</i>	8.0
2	31.4	1.83 <i>m</i>	...
3	34.0	2.56 <i>t</i>	7.3
1'	121.3	-	...
2'	157.7	-	...
3'	98.1	6.40 <i>d</i>	2.4
4'	155.2	-	...
5'	105.8	6.33 <i>dd</i>	7.9, 2.4
6'	129.5	6.95 <i>d</i>	7.9
1''	133.3	-	...
2'', 6''	128.8	7.06 <i>d</i>	8.5
3'', 5''	114.3	6.75 <i>d</i>	8.5
4''	153.7	-	...
2'-OCH <sub>3</sub>	54.0	3.78 <i>s</i>	...

Πίνακας 65. Φασματοσκοπικά δεδομένα  $^1\text{H}$ -NMR και  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) της μπρουσσονίνης B.

### 2.3.3.γ) Στήλη B<sub>7</sub>

**Διαχωριζόμενο μίγμα:** Κλάσματα 11, 12 στήλης B<sub>5</sub> (3.4 g).

**Στατική φάση:** Γέλη πυριτίου διαμέτρου 0.040-0.063 mm.

**Κινητή φάση:** CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> και MeOH σε αναλογίες αυξανόμενης πολικότητας.

**Διάμετρος στήλης:** 4 cm.

Τα κλάσματα 11-12 της στήλης B<sub>5</sub> συνενώθηκαν, καθώς είχαν παρόμοια εικόνα σε TLC. Στη χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας εμφανίζονταν κηλίδες με τα χαρακτηριστικά των φλαβονοειδών και αυτός ήταν ο λόγος που πραγματοποιήθηκε η στήλη. Ο Πίνακας 66 περιέχει τα κλάσματα που συλλέχθηκαν, τα βάρη τους και τις αντίστοιχες αναλογίες των συστημάτων διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν.

ΚΛΑΣΜΑΤΑ ΣΤΗΛΗΣ Β <sub>7</sub>	ΔΙΑΛΥΤΕΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (% ΑΝΑΛΟΓΙΑ)	ΒΑΡΟΣ
1-28	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	85 mg
29-40	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 99/1	78 mg
41-52	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 98/2	30 mg
53-70	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 98/2	90 mg
71-100	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 97/3	88 mg
101-110	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 95/5	9 mg
111-133	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 95/5	90 mg
134-162	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 93/7	120 mg
163-170	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 93/7	5 mg
171-180	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 92/8	7 mg
181-210	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 90/10	185 mg
211-218	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 90/10	110 mg
219-280	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 85/15	290 mg
281-300	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 80/20	195 mg
301-335	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 70/30	400 mg
336-370	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 60/40	425mg
371-390	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 50/50	300 mg
391-420	MeOH	400 mg

Πίνακας 66. Στήλη Β<sub>7</sub>.

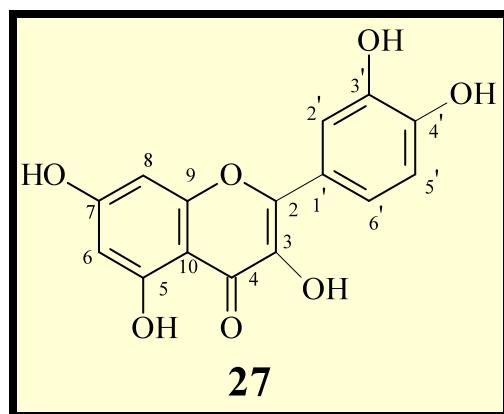
Τα κλάσματα υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, σε συστήματα ανάπτυξης CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH: 99/1, 95/5, 90/10, παρατήρηση στο UV και ψεκασμό με διάλυμα θεικής βανιλλίνης. Εξήχθησαν τα εξής συμπεράσματα:

- Στο **κλάσμα 101-110** παρατηρήθηκε μία ουσία που είχε τα χρωματογραφικά γνωρίσματα των φλαβονοειδών (απορρόφηση στο UV-Vis, κίτρινος χρωματισμός με θεική βανιλλίνη). Με τη χρήση φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού η δομή της ταυτίστηκε με το φλαβονοειδές **κερκετίνη**.
- Το **κλάσμα 163-170** εμφάνιζε μία κηλίδα που απορροφούσε στο UV-Vis και χρωματίζοταν κόκκινη μετά από ψεκασμό με διάλυμα θεικής βανιλλίνης. Με τη βοήθεια του NMR ταυτοποιήθηκε ως **(+)-κατεχίνη**.
- Η χρωματογραφική μελέτη του **κλάσματος 171-180** πιστοποίησε την παρουσία ενός μορίου το οποίο απορροφούσε στο υπεριώδες και χρωματίζοταν σκούρο κίτρινο όταν ψεκάστηκε με διάλυμα θεικής βανιλλίνης. Με τη χρήση φασματοσκοπικού πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού αποδείχθηκε ότι πρόκειται για τον **ραμνοσίδη της κερκετίνης στη θέση 3**, την **κερκιτρίνη**.

➤ Τα κλάσματα **211-218**, **219-280** περιείχαν πέρα από τα φλαβονοειδή, δύο επιπλέον μόρια που απορροφούσαν στο υπεριώδες και χρωματίζονταν ιώδες και κόκκινο αντίστοιχα . Τα παραπάνω κλάσματα συνενώθηκαν προκειμένου να υποβληθούν σε νέο χρωματογραφικό διαχωρισμό.

Η ακριβής φασματοσκοπική ταυτότητα των τριών παραπάνω μορίων παρουσιάζεται στις επόμενες παραγράφους.

### i.) Κερκετίνη (27)



Η κερκετίνη έχει μοριακό τύπο **C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>7</sub>** και μοριακό βάρος **302**.

Το μοριακό βάρος του μορίου πιστοποιήθηκε με τη μέθοδο του χημικού ιονισμού [CIMS, m/z: 303 (M+H)<sup>+</sup>]. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται αναλυτικά οι τιμές δ των φασμάτων, οι σταθερές σύζευξης *J* και η πολλαπλότητα των κορυφών στα φάσματα <sup>1</sup>H-NMR και <sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD) της κερκετίνης.

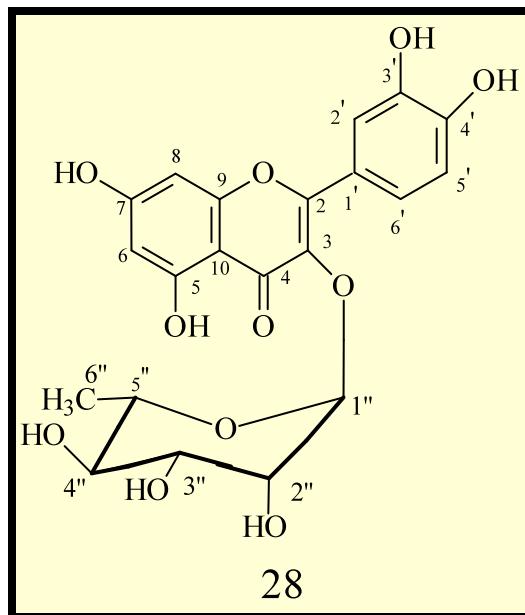
Άτομο	$\delta^{13}\text{C}$ σε ppm	$\delta^1\text{H}$ σε ppm	$J$ σε Hz
2	148.8	-	...
3	137.2	-	...
4	177.3	-	...
5	162.5	-	...
6	99.3	6.27 d	2.5
7	165.3	-	...
8	94.4	6.47 d	2.5
9	158.2	-	...
10	104.5	-	...
1'	124.2	-	...
2'	116.0	7.82 d	2.0
3'	148.8	-	...
4'	146.2	-	...
5'	116.2	6.97 d	9.0
6'	121.7	7.72 dd	9.0, 2.0

Πίνακας 67. Φασματοσκοπικά δεδομένα  $^1\text{H}$ -NMR και  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) της κερκετίνης.

### ii.) (+)-Κατεχίνη (2)

Ο πίνακας με τις τιμές  $\delta$  των φασμάτων, τις σταθερές σύζευξης  $J$  και την πολλαπλότητα των κορυφών στα φάσματα  $^1\text{H}$ -NMR και  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) και στοιχεία για το φάσμα μάζας και τη στροφική ικανότητα της (+)-κατεχίνης υπάρχουν στην παράγραφο 1.3.3.β.

iii.) Κερκιτρίνη (28)



Η κερκιτρίνη έχει μοριακό τύπο **C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>11</sub>** και μοριακό βάρος **448**.

Στον Πίνακα **68** αναφέρονται αναλυτικά οι τιμές δ των φασμάτων, οι σταθερές σύζευξης *J* και η πολλαπλότητα των κορυφών στα φάσματα <sup>1</sup>H-NMR και <sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD) του μορίου. Το μοριακό βάρος του μορίου πιστοποιήθηκε με τη μέθοδο του χημικού ιονισμού [CIMS, m/z: 449 (M+H)<sup>+</sup>].

Άτομο	$\delta$ $^{13}\text{C}$ σε ppm	$\delta$ $^1\text{H}$ σε ppm	$J$ σε Hz
2	158.8	-	...
3	134.2	-	...
4	179.7	-	...
5	163.3	-	...
6	98.8	6.16 <i>d</i>	2.5
7	166.3	-	...
8	94.0	6.32 <i>d</i>	2.5
9	158.4	-	
10	104.7	-	
1'	121.3	-	...
2'	115.6	7.32 <i>d</i>	2.0
3'	144.9	-	...
4'	148.6	-	...
5'	115.4	6.87 <i>d</i>	9.0
6'	122.0	7.27 <i>dd</i>	9.0, 2.0
1''	102.0	5.37 <i>d</i>	1.5
2''	70.1	3.35-4.25 <i>m</i>	...
3''	70.3	3.35-4.25 <i>m</i>	...
4''	74.7	3.35-4.25 <i>m</i>	...
5''	71.0	3.35-4.25 <i>m</i>	...
6''	17.6	0.97 <i>d</i>	5.5

Πίνακας 68. Φασματοσκοπικά δεδομένα  $^1\text{H}$ -NMR και  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) της κερκιτρίνης.

### 2.3.3.δ) Στήλη B<sub>8</sub>

Διαχωριζόμενο μίγμα: Κλάσματα 211-218, 219-280 στήλης B<sub>7</sub> (0.4 g).

Στατική φάση: Γέλη πυριτίου αντίστροφης φάσης ( $R_{18}$ ).

Κινητή φάση:  $\text{H}_2\text{O}$  και  $\text{MeOH}$  σε αναλογίες μειούμενης πολικότητας.

Διάμετρος στήλης: 1.8 cm.

Στα κλάσματα 211-218, 219-280 της στήλης B<sub>7</sub>, τα συστατικά που παρατηρήθηκαν εμφάνιζαν υψηλή πολικότητα και γι' αυτό αποφασίστηκε η πραγματοποίηση υγρής χρωματογραφίας μέσης πίεσης (MPLC), με διαλύτες H<sub>2</sub>O/MeOH. Η πλήρης πορεία της στήλης φαίνεται στον Πίνακα 69.

ΚΛΑΣΜΑΤΑ ΣΤΗΛΗΣ B <sub>8</sub>	ΔΙΑΛΥΤΕΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (% ΑΝΑΛΟΓΙΑ)	ΒΑΡΟΣ
1-14	H <sub>2</sub> O	25 mg
15-25	H <sub>2</sub> O/MeOH: 99/1	5 mg
26-55	H <sub>2</sub> O/MeOH: 97/3	45 mg
56-74	H <sub>2</sub> O/MeOH: 95/5	26 mg
75-106	H <sub>2</sub> O/MeOH: 90/10	38 mg
107-120	H <sub>2</sub> O/MeOH: 85/15	9 mg
121-165	H <sub>2</sub> O/MeOH: 80/20	33 mg
166-187	H <sub>2</sub> O/MeOH: 80/20	23 mg
188-193	H <sub>2</sub> O/MeOH: 70/30	5 mg
194-204	H <sub>2</sub> O/MeOH: 70/30	24 mg
205-214	H <sub>2</sub> O/MeOH: 70/30	20 mg
215-230	H <sub>2</sub> O/MeOH: 70/30	25 mg
231-236	H <sub>2</sub> O/MeOH: 50/50	32 mg
237-260	H <sub>2</sub> O/MeOH: 50/50	24 mg
261-280	MeOH	20 mg

Πίνακας 69. Στήλη B<sub>8</sub>.

Τα κλάσματα υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, σε συστήματα ανάπτυξης CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH: 90/10, 80/20, 70/30. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας αντιστρόφου φάσης (RP-18) με συστήματα διαλυτών H<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>O/MeOH: 99/1, 95/5, 90/10, 80/20, 85/15, 60/40 και 50/50. Ακολούθησε παρατήρηση στο UV και ψεκασμός με διάλυμα θεικής βανιλλίνης. Εξήχθησαν τα εξής συμπεράσματα:

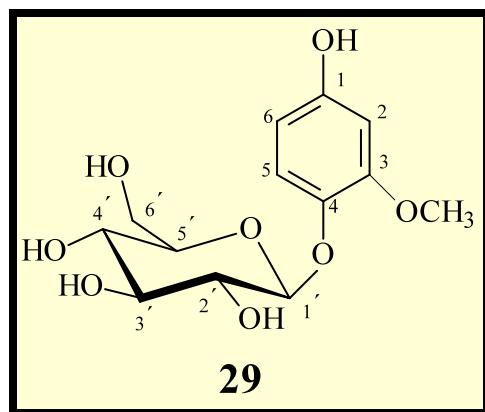
➤ Στο κλάσμα 15-25 παρατηρήθηκε, κατά την εξέταση με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας μία ουσία καθαρή που απορροφούσε στο υπεριώδες-ορατό και ο ψεκασμός της με διάλυμα θεικής βανιλλίνης τη χρωμάτιζε κόκκινη. Η φασματοσκοπική μελέτη

του μορίου με NMR, οδήγησε στην ταυτοποίηση της ως **ισοταχιοσίδης (4-β-D-γλυκοπυρανοσίδης της 3-μεθοξυδροκινόνης)** ο οποίος κατατάσσεται στους φαινολικούς γλυκοσίδες.

➤ Το **κλάσμα 205-214** εμφάνιζε μία κηλίδα που απορροφούσε στο UV-Vis και χρωματίζοταν σκούρα κίτρινη μετά από ψεκασμό με διάλυμα θεικής βανιλλίνης. Με τη βοήθεια του NMR ταυτοποιήθηκε ως **κερκιτρίνη** η οποία έχει απομονωθεί στη **στήλη Β<sub>7</sub>** και τα φασματοσκοπικά της χαρακτηριστικά υπάρχουν στην παράγραφο 2.3.3.γ.

Στις επόμενες παραγράφους παρατίθενται οι πίνακες με τα φασματοσκοπικά δεδομένα του **ισοταχιοσίδη**.

### i.) Ισοταχιοσίδης (29)



Ο ισοταχιοσίδης έχει μοριακό τύπο **C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>O<sub>8</sub>** και μοριακό βάρος **302**.

Στον Πίνακα 70 υπάρχουν συγκεντρωμένα οι τιμές δ των φασμάτων, οι σταθερές σύζευξης *J* και η πολλαπλότητα των κορυφών στα φάσματα <sup>1</sup>H-NMR και <sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD) του ισοταχιοσίδη. Το μοριακό βάρος του μορίου πιστοποιήθηκε με τη μέθοδο του χημικού ιονισμού [CIMS, m/z: 303 (M+H)<sup>+</sup>].

Άτομο	$\delta^{13}\text{C}$ σε ppm	$\delta^1\text{H}$ σε ppm	$J$ σε Hz
1	152.9	-	...
2	104.0	6.43 <i>d</i>	2.2
3	149.3	-	...
4	143.0	-	...
5	116.0	6.94 <i>d</i>	8.1
6	110.0	6.27 <i>dd</i>	8.1, 2.2
1'	103.8	4.67 <i>d</i>	7.3
2'	75.1	3.35-3.63 <i>m</i>	...
3'	78.2	3.35-3.63 <i>m</i>	...
4'	71.6	3.35-3.63 <i>m</i>	...
5'	77.9	3.35-3.63 <i>m</i>	...
6'	62.7	$6''_a$ : 3.71 <i>m</i> $6''_b$ : 3.66 <i>m</i>	...
3-OCH <sub>3</sub>	56.4	3.84 <i>s</i>	...

Πίνακας 70. Φασματοσκοπικά δεδομένα  $^1\text{H-NMR}$  και  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) του ισοταχιοσίδη.

Στον Πίνακα 71 υπάρχουν οι τιμές  $\delta$  των φασμάτων, οι σταθερές σύζευξης  $J$  και η πολλαπλότητα των κορυφών στα φάσματα  $^1\text{H-NMR}$  και  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{COCD}_3+\text{D}_2\text{O}$ ) του ισοταχιοσίδη.

Άτομο	$\delta^{13}\text{C}$ σε ppm	$\delta^1\text{H}$ σε ppm	$J$ σε Hz
1	153.3	-	...
2	104.4	6.54 <i>d</i>	3.0
3	150.4	-	...
4	148.5	-	...
5	118.1	7.03 <i>d</i>	9.0
6	107.4	6.36 <i>dd</i>	9.0, 3.0
1'	102.5	4.85 <i>d</i>	8.0
2'	74.0	-	...
3'	76.6	-	...
4'	71.0	-	...
5'	74.5	-	...
6'	64.6	-	...
3-OCH <sub>3</sub>	56.3	3.82 <i>s</i>	...

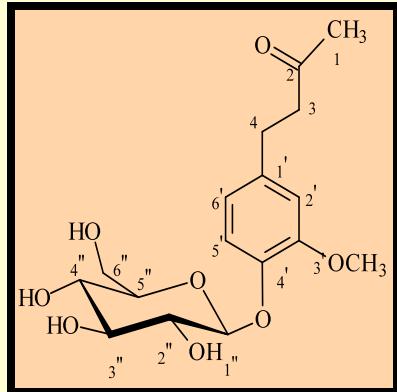
Πίνακας 71. Φασματοσκοπικά δεδομένα  $^1\text{H-NMR}$  και  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{COCD}_3 + \text{D}_2\text{O}$ ) του ισοταχιοσίδη.

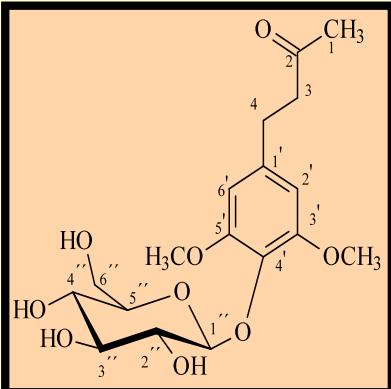
# 3) ΜΕΡΟΣ Γ

ΦΥΤΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ

*Dorycnium pentaphyllum* subsp. *herbaceum*

οικ. Leguminosae





## **3.1) ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **3.1.1) ΔΡΟΓΟΒΟΤΑΝΙΚΗ**

#### **3.1.1.a) Συστηματική ταξινόμηση**

Το φυτό *Dorycnium pentaphyllum* subsp. *herbaceum* (Villars) Rouy το οποίο αποτελεί αντικείμενο φυτοχημικής μελέτης του Γ μέρους της παρούσας εργασίας , ανήκει στην οικογένεια **Leguminosae** και η συστηματική κατάταξή του έχει ως εξής:

<b>Βασίλειο (Regnum)</b>	<i>Plantae</i>
<b>Αθροισμα (Divisio)</b>	<i>Spermatophytina</i>
<b>Υποάθροισμα (Subdivisio)</b>	<i>Spermatophytina</i>
<b>Κλάση (Classis)</b>	<i>Angiospermae</i>
<b>Υποκλάση (Subclassis)</b>	<i>Dicotyledones</i>
<b>Υπερτάξη (Superordo)</b>	<i>Rosidae</i>
<b>Τάξη (Ordo)</b>	<i>Fabales</i>
<b>Οικογένεια (Familia)</b>	<i>Leguminosae</i>
<b>Υποοικογένεια (Subfamily)</b>	<i>Papilionoideae</i>
<b>Φυλή (Tribe)</b>	<i>Loteae</i>
<b>Γένος (Genera)</b>	<i>Dorycnium</i>
<b>Είδος (Species)</b>	<i>pentaphyllum</i>
<b>Υποείδος (Subspecies)</b>	<i>herbaceum</i>

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι το φυτό *Dorycnium pentaphyllum* subsp. *herbaceum* ανήκει στην υπερτάξη των *Rosidae*, την τάξη των *Fabales*, την οικογένεια των *Leguminosae*, την υποοικογένεια των *Papilionoideae* και την φυλή των *Loteae*. Η συστηματική κατάταξη ενός φυτικού οργανισμού στηρίζεται στα ανατομικά του

χαρακτηριστικά αλλά και στο είδος των χημικών ουσιών που έχουν απομονωθεί από αυτόν (χημειοταξινομικοί δείκτες).

### 3.1.1.β) Χαρακτηριστικά της οικογένειας **Leguminosae**

Η οικογένεια των **Leguminosae** ή **Fabaceae** είναι μία από τις πιο ενδιαφέρουσες επιστημονικά οικογένειες, συγκεντρώνοντας το διεθνές ενδιαφέρον για την ποικιλότητα των χημικών ουσιών που απομονώνονται από τους εκπροσώπους της. Στον μεγάλο αριθμό μορίων τα οποία προκύπτουν από τη φυτοχημική μελέτη των **Leguminosae**, συντελεί και το γεγονός ότι είναι μία από τις πολυπληθέστερες οικογένειες, έχοντας τα περισσότερα μέλη μετά τις *Compositae* (*Asteraceae*) και *Orchidaceae* (Chapman & Hall, 1994). Περιλαμβάνει 560-590 γένη και 12.000-17.000 είδη, από τελώντας έτσι πάνω από το 1/10 των φυτών του πλανήτη. Πρέπει ακόμα να σημειωθεί ότι τα **Leguminosae** εμφανίζουν βιοχημικούς και εξελικτικούς δεσμούς με μεγάλο αριθμό άλλων οικογενειών, γεγονός που τους προσδίδει κεντρική θέση ανάμεσα στα Δικοτυλήδονα (Harborne J.B. et al., 1971; Grylls N.E. & Peak J.W., 1969).

Ανάμεσα στις πολλές και πολύπλοκες δομές που απομονώνονται από είδη της οικογένειας, εξέχουσα θέση κατέχουν τα φαινολικά παράγωγα. Οι συνηθέστερες χημικές κατηγορίες φυσικών προϊόντων που απαντούν στα **Leguminosae** είναι:

- ✓ **Φλαβονοειδή** και **γλυκοσίδες τους**
- ✓ **Μονοσακχαρίτες, δισακχαρίτες** και **πολυσακχαρίτες**
- ✓ **Πολυόλες**
- ✓ **Τερπένια**
- ✓ **Αλκαλοειδή**

Η χαρακτηριστική χημική ομάδα των **Leguminosae** είναι τα φλαβονοειδή τα οποία υπάρχουν σχεδόν σε όλα τα είδη της.

Τα βοτανικά γνωρίσματα των **Leguminosae** είναι τα εναλλασσόμενα φύλλα, οι σπόροι τύπου οσπρίων (Legumes), άνθη συνήθως ερμαφρόδιτα, σέπαλα κατά κανόνα ενωμένα, στήμονες δέκα ή λιγότεροι κ.λπ. (Tutin T.G., 1972).

Υπάρχουν είδη της οικογένειας **Leguminosae** που καλλιεργούν ται και χρησιμεύουν ως τροφή για τον άνθρωπο, αλλά και ως ζωοτροφές. Η καλλιέργεια των

**Leguminosae** είναι γνωστή εδώ και 6.000 χρόνια . Ιστορικές πηγές αναφέρουν ότι κάτοικοι των λιμνών στην Ελβετία χρησιμοποιούσαν τα φυτά από το 4.000 π.Χ., ενώ γνώστες της καλλιέργειάς τους ήταν οι Ρωμαίοι και οι Αιγύπτιοι.

Ο οικολογικός ρόλος των **Leguminosae** είναι επίσης σημαντικός. Εξαπλώνονται σχεδόν σε όλα τα μήκη και τα πλάτη της γης, καθώς επιδεικνύουν μία αξιοθαύμαστη προσαρμογή στις κλιματολογικές συνθήκες . Η μεγαλύτερη συγκέντρωσή τους εμφανίζεται σε τροπικές και υποτροπικές περιοχές. Επιπρόσθετα, τα περισσότερα είδη της οικογένειας συμμετέχουν στον κύκλο του αζώτου στην φύση αφού στις ρίζες τους παρατηρούνται φαινόμενα συμβίωσης με αζωτοβακτήρια (Harborne J.B. et al., 1971).

Μία τόσο σπουδαία οικογένεια, με πολυάριθμους αντιπροσώπους είναι φυσικό να γίνει προϊόν οικονομικής εκμετάλλευσης. Εκτός από τα φρούτα και τα όσπρια που είναι βασικά στοιχεία της διατροφής του ανθρώπου , τα **Leguminosae** εμφανίζουν πρόσθετη οικονομική σπουδαιότητα . Για παράδειγμα , ορισμένα χρησιμοποιούνται ως ζωοτροφές (*Trifolium pratense*), κάποια στις βαφές (*Acacia catechu*), ενώ άλλα έχουν και θεραπευτικές ιδιότητες (*Cassia acutifolia*) (Harborne J.B. et al., 1971).

Η εξαιρετική σημασία που αναδύεται από την πληθώρα των οικονομικών, επιστημονικών και οικολογικών ρόλων της οικογένειας **Leguminosae**, την κατατάσσει στις υψηλότερες βαθμίδες ερευνητικού ενδιαφέροντος και δικαιολογεί πλήρως την εκτεταμένη φυτοχημική της μελέτη.

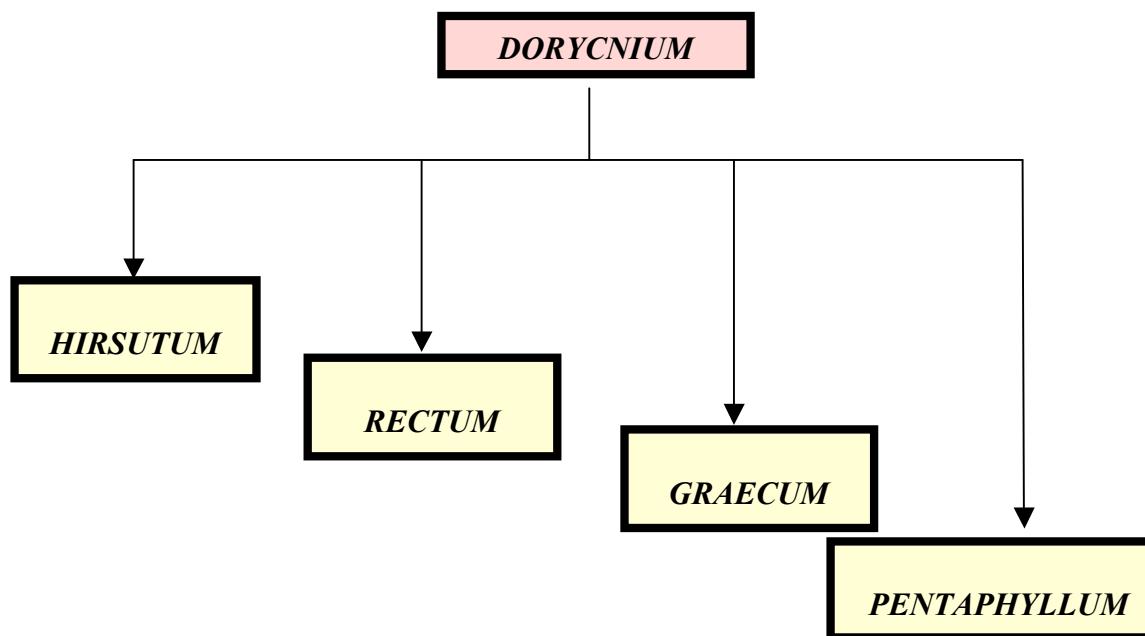
### 3.1.1.γ) Χαρακτηριστικά του γένους *Dorycnium* και του είδους *pentaphyllum*

Είδη του γένους ***Dorycnium*** (Miller) ή Δορύκνιον φύονται σε περιοχές της Μεσογείου, στην κεντρική Ευρώπη , τον Καύκασο και τη δυτική Ασία . Τα γενικά βιοτανικά χαρακτηριστικά του γένους (Καββάδας Δ.Σ., 1956) είναι τα εξής:

Περιλαμβάνει φυτά πολυετή ή μικρούς θάμνους. Τα φύλλα τους είναι τρίφυλλα, αποξυλωμένα στη βάση τους, τα φυλλάριά τους είναι ακέραια και με παράφυλλα όμοια με τα φυλλάρια . Έχουν άνθη λευκά ή ροζ , με τροπίδα μελανωπή, υποσφαιρικά, μασχαλιαία ή επάκρια κεφάλια. Ο κάλυκας τους είναι κωδωνοειδής, σχεδόν δίχειλος με πέντε όδοντες όμοιους ή όχι. Ο πέτασος είναι ανιών και οι πτέρυγες συμφυείς, μπροστά μακρύτερες της κυρτής τρόπιδος . Η στεφάνη τους είναι λευκή ή ροζ με αμβλεία καστανοκόκκινη ή μαύρη καρίνα και οι στήμονες είναι δίδελφοι. Ο λωβός τους είναι

ωοειδής ή υποσφαιρικός , ευθύς , προεξέχων του μόνιμου κάλυκα , λείος με δύο ως τέσσερα σπέρματα , χωρίς να χωρίζονται μεταξύ τους με διάφραγμα κυττάρων . Τέλος , τα σπέρματά τους είναι επιμήκη ή ωοειδή , πάντα διαρρηγμένα.

Το γένος ***Dorycnium*** ανήκει στα δικοτυλήδονα της υποοικογένειας των Ψυχανθών ή Παπιλιονιδών (Papilionaceae), όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη ενότητα . Χωρίζεται σε τέσσερα είδη (Σχήμα 55), το ***Dorycnium hirsutum***, το ***Dorycnium rectum***, το ***Dorycnium graecum*** και το ***Dorycnium pentaphyllum*** στο οποίο ανήκει και το εξεταζόμενο φυτό



Σχήμα 55. Είδη του γένους ***Dorycnium***.

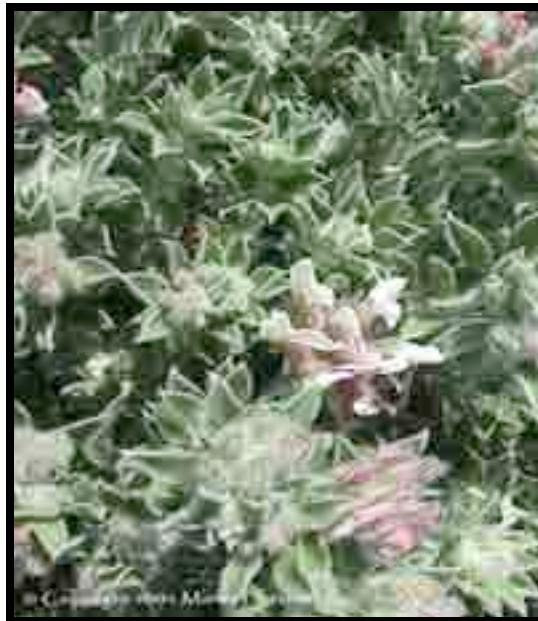
Τα παραπάνω είδη εμφανίζουν βοτανικές διαφορές , έντονες ή όχι . Επίσης , έχουν διαφορές και στη γεωγραφική τους εξάπλωση , αφού υπάρχουν τόποι που ευνοούν την ανάπτυξη κάποιου είδους , αλλά αποκλείουν την παρουσία κάποιου άλλου .

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα κυριότερα βοτανικά γνωρίσματα και οι τόποι ανάπτυξης των τεσσάρων ειδών του γένους ***Dorycnium***.

***Dorycnium hirsutum*** (Ledeb): Ονομάζεται και ***Bonjeanea hirsute*** (Reichenb.) . Συναντάται σε βραχώδεις αλλά και σε χλοώδεις περιοχές (Polunin O., 1969) , στην

Αφρική (Αλγερία, Λιβύη), στις μεσογειακές χώρες της Ευρώπης (Ελλάδα, Τουρκία κ.α), αλλά και σε χώρες της Μέσης Ανατολής, όπως το Ισραήλ και η Ιορδανία. Τα κυριότερα βιοτανικά χαρακτηριστικά (Εικόνα 24) του είδους είναι τα εξής (Flora Europaea):

- Φυτά πολυετή ή μικροί θάμνοι, συνήθως τριχωτοί, 20-50 cm.
- Φύλλα με μικρό ή χωρίς καθόλου μίσχο, φυλλάρια επιμήκη.
- Όδοντες κάλυκα ανόμοιοι.
- Στεφάνη 10-20 mm, λευκή ή ροζ.
- Λωβός 6-12 mm, επιμήκης-ωοειδής.



Εικόνα 24. *Dorycnium hirsutum*.

***Dorycnium rectum*** (Ledeb): Ονομάζεται και ***Bonjeanea recta*** (Reichenb.). Η γεωγραφική του εξάπλωση παρατηρείται στην Αφρική (Αλγερία, Μαρόκο, Τυνησία, Λιβύη), τις νότιες ευρωπαϊκές χώρες και τη Μέση Ανατολή. Συνήθως φύεται σε θαμνώδεις εκτάσεις. Η βιοτανική του ταυτότητα (Εικόνα 25) περιγράφεται ως εξής (Polunin O., 1980; Flora Europaea):

- Πολυετή φυτά ή χαμηλοί θάμνοι, 30-150 cm.
- Φύλλα με μίσχο, 5-10 mm .
- Φυλλάρια ωοειδή.
- Όδοντες κάλυκα όμοιοι.

- Στεφάνη 5-6 mm, λευκή ή ροζ.
- Λωβός 10-20 mm, γραμμικός-ωοειδής.



Εικόνα 25. *Dorycnium rectum*.

***Dorycnium graecum*** (Ledeb.): Ονομάζεται και ***Lotus graecus*** (Blamey M. & Grey-Wilson C., 1993). Γεωγραφικά εμφανίζεται σε δάση της Ασίας, της Ευρώπης (Ελλάδα, Τουρκία, Βουλγαρία) και στη Μέση Ανατολή. Τα κυριότερα βιοτανικά του γνωρίσματα (Εικόνα 26) παρατίθενται παρακάτω (Blamey M. & Grey-Wilson C., 1993; Flora Europaea):

- Πολυετή φυτά ή χαμηλοί θάμνοι, 20-80 cm.
- Φύλλα με ή χωρίς μίσχο.
- Φυλλάρια επιμήκη.
- Όδοντες κάλυκα όμοιοι.
- Στεφάνη 6-7 mm, λευκή.
- Λωβός 5-7 mm, επιμήκης.



Εικόνα 26. *Dorycnium graecum*.

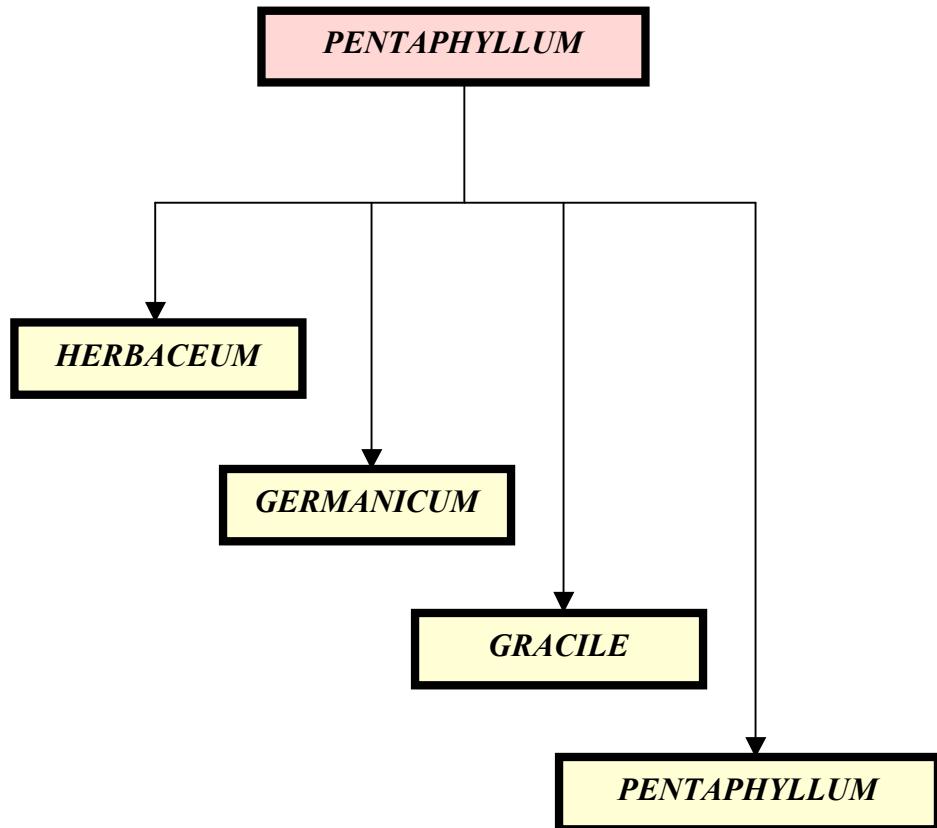
***Dorycnium pentaphyllum*** (Scopoly): Είναι αι συχνό φυτό στην Αφρική (Αλγερία, Τυνησία), την Ασία και σε πολλές ευρωπαϊκές χώρες, όχι μόνο νότιες, αλλά και της κεντρικής Ευρώπης (π.χ. Ελβετία, Ουγγαρία). Τα κύρια βιοτανικά χαρακτηριστικά του είδους, όπως περιγράφονται στη Flora Europaea είναι τα εξής:

- Πολυετή φυτά ή χαμηλοί θάμνοι, 10-80 cm.
- Φύλλα χωρίς μίσχο.
- Φυλλάρια γραμμικά-επιμήκη.
- Όδοντες κάλυκα ανόμοιοι.
- Στεφάνη 3-6 mm, λευκή.
- Λωβός 3-5 mm, κυκλικός.

Το είδος *pentaphyllum* περιλαμβάνει τέσσερα υποείδη (Σχήμα 56) τα οποία αναφέρονται από κάποιους συγγραφείς ως ξεχωριστά είδη:

- ✓ *D. pentaphyllum*
- ✓ *D. germanicum*
- ✓ *D. gracile*
- ✓ *D. herbaceum*

Το υποείδος ***herbaceum*** στο οποίο ανήκει το εξεταζόμενο φυτό, αλλά και τα υπόλοιπα τρία υποείδη θα εξεταστούν στην επόμενη παράγραφο.



Σχήμα 56. Υποείδη του είδους *pentaphyllum*.

### 3.1.1.δ) Χαρακτηριστικά του υποείδους *herbaceum* και των άλλων υποειδών

Τα τέσσερα υποείδη που αναφέρθηκαν, αν και όπως σημειώθηκε θεωρούνται από κάποιους βοτανικούς ως ξεχωριστά είδη, είναι εξαιρετικά δύσκολο να διαφοροποιηθούν μεταξύ τους με βάση τα εξωτερικά τους γνωρίσματα. Μόνο το *D. herbaceum* μπορεί σχετικά εύκολα να αναγνωριστεί από τα άλλα και αυτός είναι ο λόγος που αναφέρεται όλο και πιο συχνά ως ξεχωριστό είδος.

Τα βοτανικά γνωρίσματα των υποειδών, όπως αυτά αναφέρονται στη Flora Europaea και στον Καββάδα (Βοτανικόν και Φυτολογικόν Λεξικόν) παρατίθενται παρακάτω.

*Dorycnium pentaphyllum* subsp. *herbaceum* (Villars) Rouy: Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ακόμα ως *Dorycnium herbaceum* (Villars), αλλά και ως *Dorycnium intermedium* (Ledeb.). Φύεται σ την Αλγερία, την Ασία (Ιράν), τη νότια Ευρώπη (Αλβανία, Ελλάδα, Ιταλία, Γαλλία, Ισπανία, Κροατία, Σερβία) και τη Μέση Ανατολή. Τα κυριότερα βιοτανικά του χαρακτηριστικά (Εικόνες 27, 28) είναι τα εξής:

- Πολυετή φυτά, 20-40 cm.
- Βλαστός 20-65 cm, φανερά τριχωτός, ποώδης.
- Φυλλάρια επιμήκη, σφηνοειδή στη βάση τους.
- Όδοντες κάλυκα όχι μεγαλύτεροι από το μήκος του σωλήνα του κάλυκα.
- Τροπίς κυανοϊώδης χωρίς μελανή κηλίδα στην κορυφή.
- Στεφάνη 3-5 mm.
- Λωβός ωοειδής με μήκος διπλάσιο του πλάτους του.



Εικόνα 27. *Dorycnium pentaphyllum* subsp. *herbaceum*.

Τα φυτά του συγκεκριμένου υποείδους αναφέρονται και ως μελικάρι, μελιγγάρι, αυγονυστόχορτο και Δορύκνιον το ποώδες (Καββάδας Δ.Σ., 1956).



Εικόνα 28. *Dorycnium pentaphyllum* subsp. *herbaceum*.

***Dorycnium pentaphyllum* subsp. *germanicum*** (Gremli): Ονομάζεται και Δορύκνιον το γερμανικό (Καββάδας Δ.Σ., 1956). Το συναντάμε γεωγραφικά στην κεντρική Ευρώπη, αλλά και τα Βαλκάνια. Τα σημαντικότερα εξωτερικά τους γνωρίσματα είναι:

- Πολυετή φυτά, 10-80 cm.
- Βλαστός αποξυλωμένος, τριχωτός.
- Τροπίς με κηλίδα μελανοϊώδη στην άκρη.
- Λωβός σφαιρικός με διπλάσιο μήκος από τον κάλυκα.

***Dorycnium pentaphyllum* subsp. *pentaphyllum*** (Villars): Στη βιβλιογραφία συναντάται και με το όνομα ***Dorycnium suffruticosum*** (Villars). Βοτανικά (Εικόνα 29) ομοιάζει με το προηγούμενο υποείδος, με μόνη διαφορά στο γεγονός ότι έχει λιγότερα φυλλάρια. Φύεται στη νοτιοδυτική Ευρώπη.



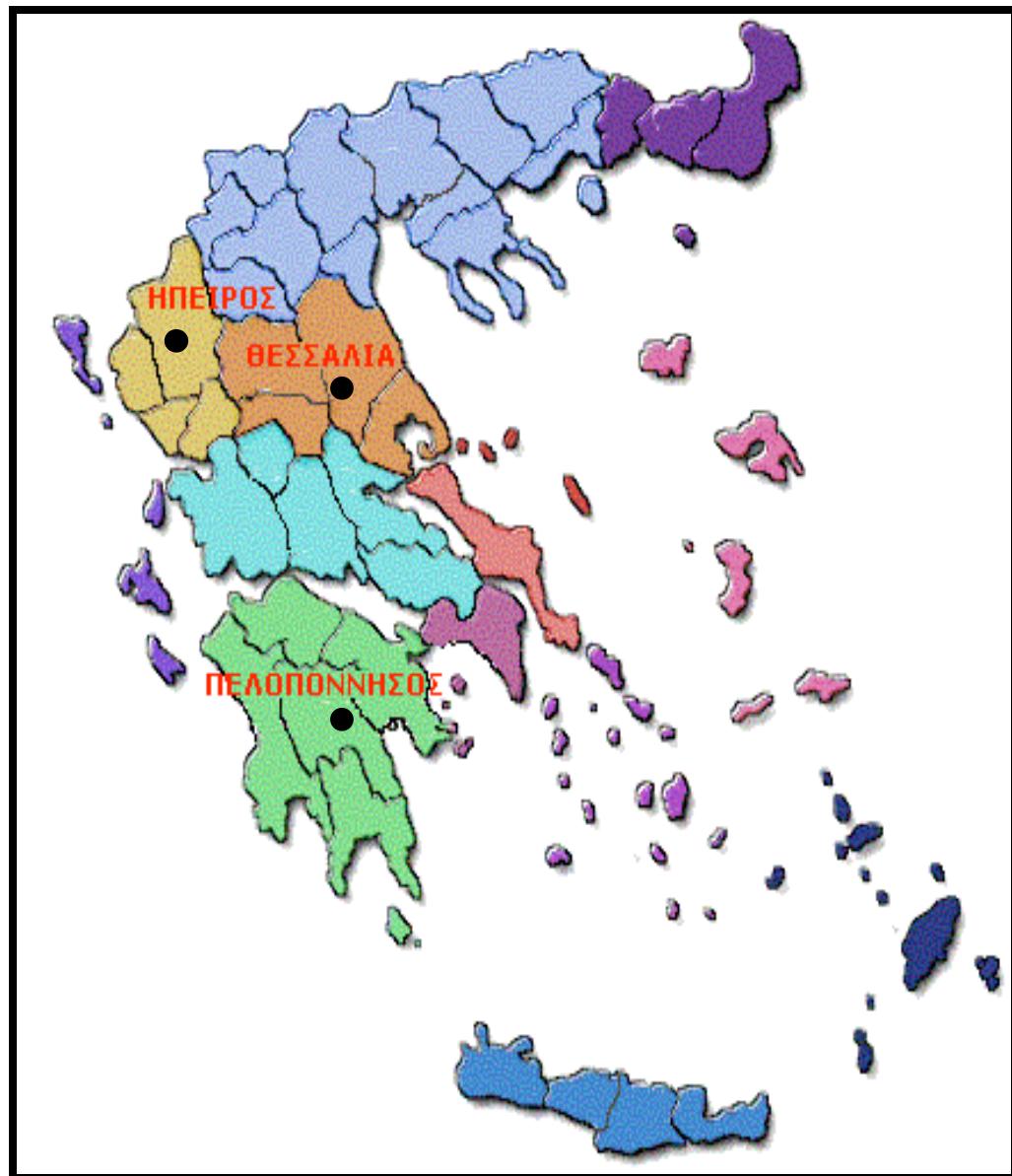
Εικόνα 29. *Dorycnium pentaphyllum* subsp. *pentaphyllum*.

***Dorycnium pentaphyllum* subsp. *gracile*** (Jordan) Rouy: Είναι συχνό φυτό των Μεσογειακών ακτών της Γαλλίας και της Ισπανίας. Εξωτερικά είναι παρόμοιο με τα δύο προηγούμενα με κύρια διαφορά στο ύψος του βλαστού (είναι μεγαλύτερος).

Στο σημείο αυτό πρέπει να σημειωθεί ότι στο είδος *pentaphyllum*, μπορούν να καταταγούν και άλλα υποείδη τα οποία διαφέρουν από τα τέσσερα που αναφέρθηκαν. Οι διαφορές βέβαια είναι ελάχιστες και δύσκολα διακριτές, με αποτέλεσμα να θεωρείται από την πλειονότητα των βοτανικών η ύπαρξη μόνο τεσσάρων υποειδών. Ωστόσο, σε μεμονωμένες περιπτώσεις (κυρίως στην Ιβηρική χερσόνησο), παρατηρείται η ύπαρξη και άλλων υποειδών τοπικού χαρακτήρα, π.χ. στην Πορτογαλία σύμφωνα με ορισμένους συγγραφείς φύεται το υποείδος *fulgurans* που είναι τόσο όμοιο με το ***Dorycnium pentaphyllum* subsp. *pentaphyllum*** ώστε οι περισσότεροι βοτανικοί να μην τα διαφοροποιούν.

**3.1.1.ε) Γεωγραφική εξάπλωση του φυτού *Dorycnium pentaphyllum* subsp. *herbaceum* στον ελληνικό χώρο**

Το φυτό *Dorycnium pentaphyllum* subsp. *herbaceum* είναι κοινό είδος της ελληνικής χλωρίδας και συναντάται κυρίως σε λειβάδια, δάση και κατά μήκος χειμάρρων της Ηπείρου, της Θεσσαλίας και της Πελοποννήσου (Καββάδας Δ.Σ., 1956).



Εικόνα 30. Εξάπλωση *Dorycnium pentaphyllum* subsp. *herbaceum* στον ελληνικό χώρο.

### 3.1.2) ΔΡΟΓΟΧΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

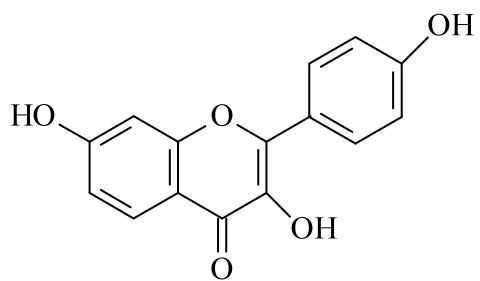
#### 3.1.2.a) Φυτοχημική και φαρμακολογική προσέγγιση του γένους *Dorycnium*

Τα είδη του γένους *Dorycnium* δεν έχουν τύχει εκτεταμένης προσοχής από τους επιστήμονες, όσον αφορά τον χημικό τους πλούτο. Έχουν δημοσιευθεί ελάχιστες εργασίες σχετικά με την μελέτη της περιεκτικότητας σε χημικές ουσίες των ειδών *Dorycnium* (Πίνακας 72).

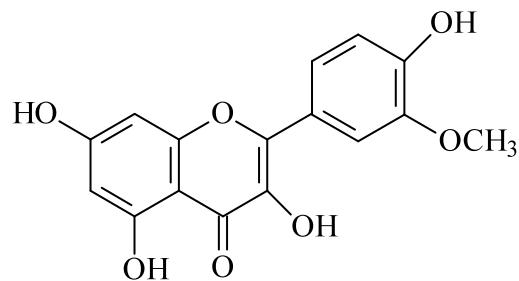
Φυτά	Μεταβολίτες	Βιβλιογραφία
<i>Dorycnium pentaphyllum</i> subsp. <i>pentaphyllum</i>	5-Δεσοξυκαιμπφερόλη Ισοραμνετίνη Καιμπφερόλη Μεαρνσετίνη Μυρικετίνη Κερκετίνη Κερκιτρίνη Συρινγκετίνη Κερκετινο-3-O-γλυκοσίδης Μυρικετρίνη Μυρικετινο-3-O-γλυκοσίδης	Jay M. et al., 1978
<i>Dorycnium hirsutum</i>	Καναβανίνη	Bell E.A. et al., 1978
<i>Dorycnium rectum</i>	Καιμπφερολο-3,7-O-α-δι-ραμνοπυρανοσίδης Καιμπφερολο-3-O-β-γλυκοπυρανοσυλο-7-O-α-ραμνοπυρανοσίδης	Moreno A.C. et al., 2002

Πίνακας 72. Φυτοχημική μελέτη ειδών του γένους *Dorycnium*.

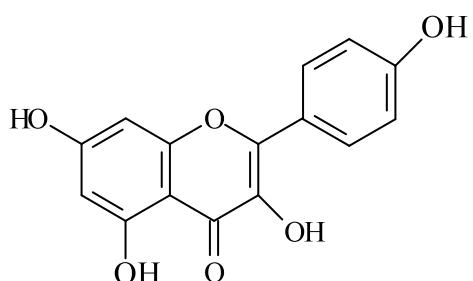
Στον Πίνακα 72 φαίνονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα των φυτοχημικών αναλύσεων που έχουν γίνει στα φυτά *Dorycnium* όπου καταγράφονται οι μεταβολίτες που απομονώθηκαν και η αντίστοιχη βιβλιογραφία, ενώ στις επόμενες δύο σελίδες υπάρχουν οι χημικοί τύποι των ουσιών αυτών.



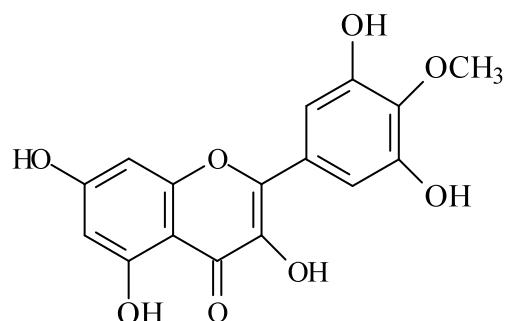
5-Δεσοξυκαιμπφερόλη



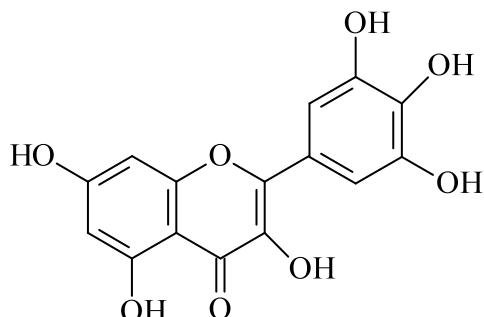
Ισοραμνετίνη



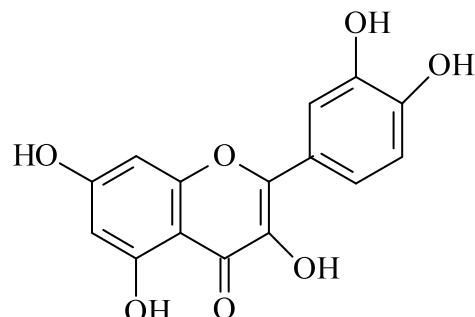
Καιμπφερόλη



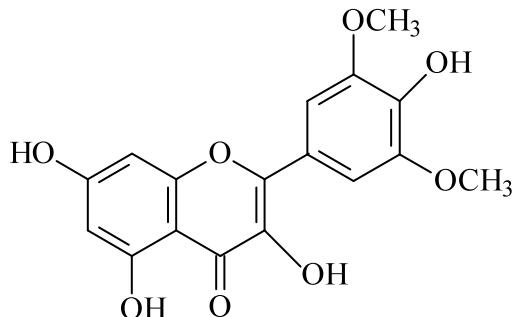
Μεαρνσετίνη



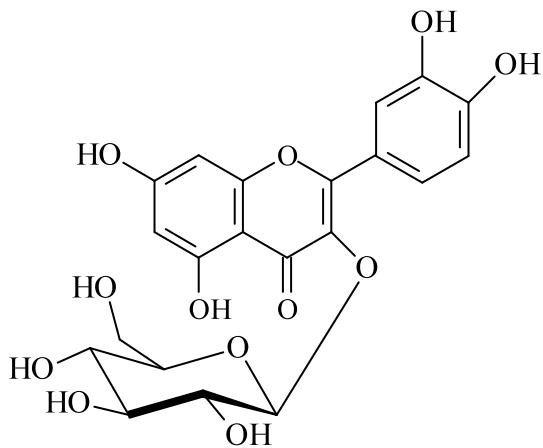
Μυρικετίνη



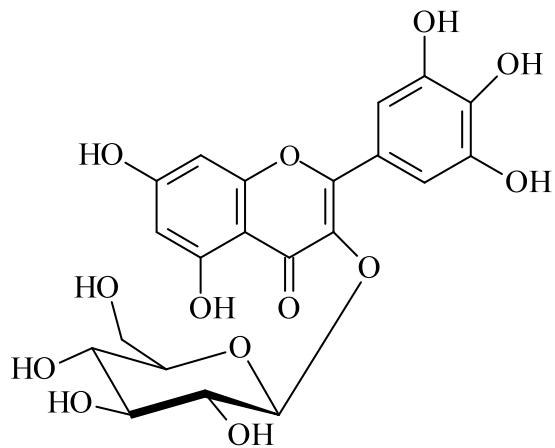
Κερκετίνη



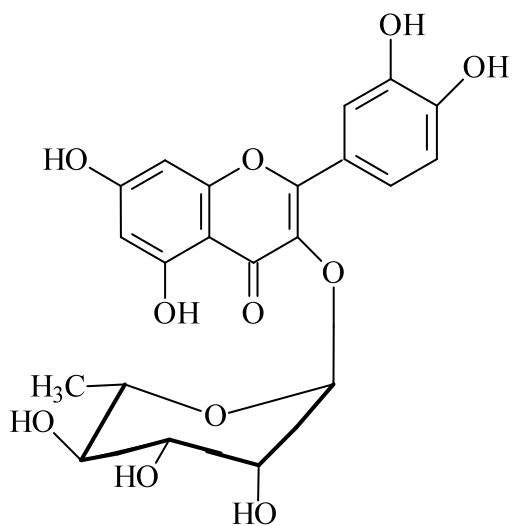
Συριγκετίνη



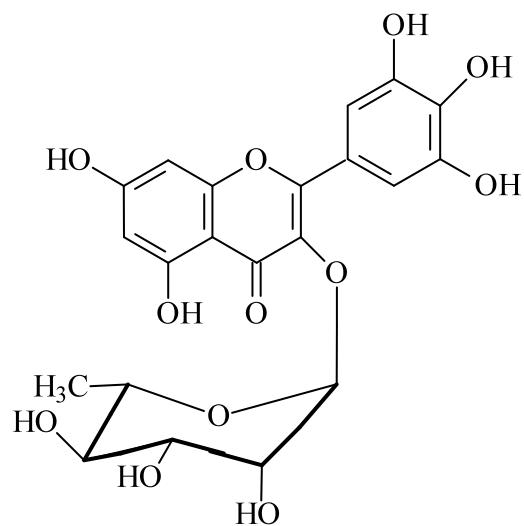
**Κερκετίνο-3-O-γλυκοπυρανοσίδης**



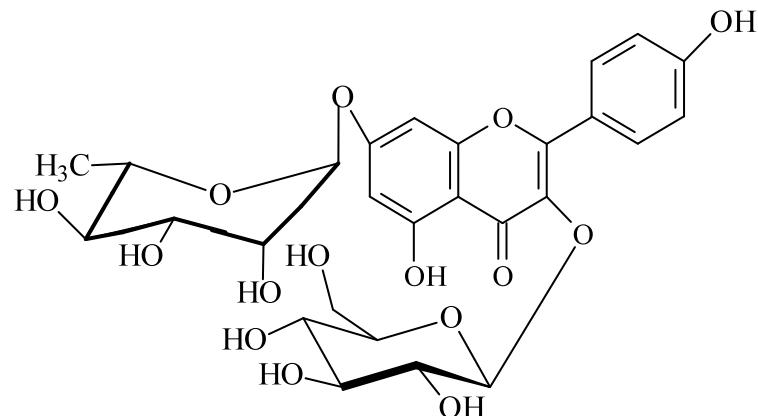
**Μυρικετίνο-3-O-γλυκοπυρανοσίδης**



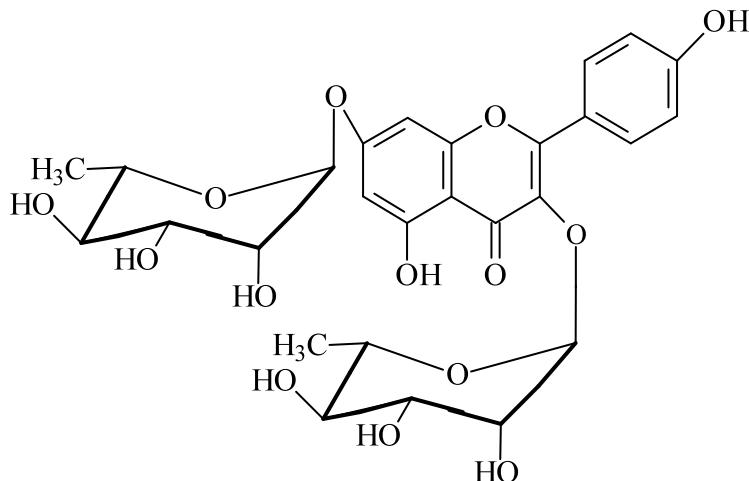
**Κερκιτρίνη**



**Μυρικετρίνη**



**Καιμπφερολο-3-O-β-γλυκοπυρανοσύλο-7-O-α-ραμνοπυρανοσίδης**



**Καιμπερολο-3,7-O- $\alpha$ -δι-ραμνοπυρανοσίδης**

Στο *Dorycnium pentaphyllum* subsp. *pentaphyllum* (*Dorycnium suffruticosum*) που είναι και το πιο κοντινό βοτανικά στο μελετούμενο φυτό της παρούσας εργασίας, είχε γίνει μία ερευνητική μελέτη (Jay M. et al., 1978) η οποία απέβλεπε στην απομόνωση των φλαβονοειδών που υπήρχαν στα φύλλα του φυτού. Πραγματοποιήθηκε όξινη υδρόλυση των φύλλων και απομονώθηκαν φλαβονοειδή, κυρίως υπό μορφή γλυκοσιδών με γλυκόση, αραβινόση και ραμνόση. Οι μέθοδοι ταυτοποίησης που ακολουθήθηκαν ήταν συγχρωματογράφηση με γνωστές πρότυπες ουσίες, χρήση φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis).

Η ανάλυση των σπερμάτων του *Dorycnium hirsutum* (Bell E.A., 1978) οδήγησε σε περιορισμένα αποτελέσματα, απόρροια κατά κύριο λόγο της κατευθυνόμενης απομόνωσης (στόχευαν στην απομόνωση και τη μελέτη μόνο του μη πρωτεΐνικου αμινοξέος καναβανίνη).

Η πιο πρόσφατη μελέτη είδους του γένους *Dorycnium*, αναφέρεται στο φυτό *Dorycnium rectum* και έγινε το 2002 (Moreno A.C. et al., 2002). Χρησιμοποιήθηκαν τα υπέργεια τμήματα τα οποία πρώτα ξηράνθηκαν και μετά εκχυλίστηκαν με νερό υπό θέρμανση. Το υδατικό εκχύλισμα εξατμίστηκε και το στερεό υπόλειμμα εκχυλίστηκε με μεθανόλη, σε θερμοκρασία δωματίου. Στο αυτό το εκχύλισμα έγιναν περαιτέρω χρωματογραφίες που κατέληξαν στην απομόνωση φλαβονοειδών.

**3.1.2.β) Χημικές κατηγορίες φυσικών προϊόντων που απομονώθηκαν από το φυτό *Dorycnium pentaphyllum* subsp. *herbaceum***

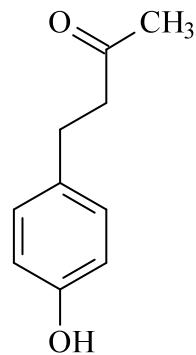
Κατά τη φυτοχημική μελέτη του φυτού, που πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της παρούσας εργασίας απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 14 φυσικά προϊόντα που ανήκουν σε πέντε συνολικά χημικές κατηγορίες:

- ✓ **Φλαβονοειδή**
- ✓ **Φαινολικά παράγωγα**
  - α) Φαινυλοβουτανόνες**
  - β) Φαινολικά οξέα**
  - γ) Φαινολικοί γλυκοσίδες**
- ✓ **Κυανιδρινικοί γλυκοσίδες**
- ✓ **Κυκλιτόλες**
- ✓ **Φυτοστερόλες**

Στις επόμενες παραγράφους περιγράφονται ορισμένα χημικά στοιχεία και οι φαρμακολογικές ιδιότητες των φαινυλοβουτανονών, των κυανιδρινικών γλυκοσιδών και των κυκλιτολών. Οι υπόλοιπες κατηγορίες έχουν παρουσιαστεί στα προηγούμενα μέρη.

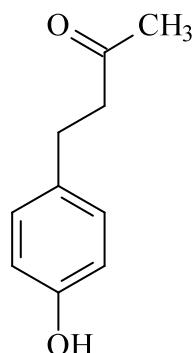
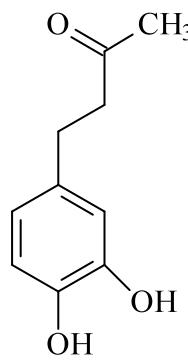
**A) ΦΑΙΝΥΛΟΒΟΥΤΑΝΟΝΕΣ**

Οι φαινυλοβουτανόνες χημικά υπάγονται στα φαινολικά παράγωγα. Ο δακτύλιος τους αποτελείται από ένα φαινολικό τμήμα και μία αλειφατική αλυσίδα τεσσάρων ανθράκων, ένας από τους οποίους είναι υπό την μορφή καρβονυλίου (Σχήμα 57).

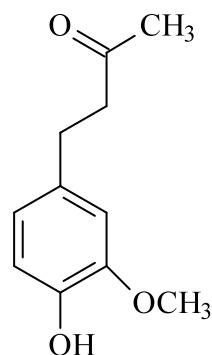


Σχήμα 57. Σκελετός φαινυλοβουτανονών.

Αποτελούν μία εξαιρετικά σπάνια κατηγορία φυσικών προϊόντων γι' αυτό άλλωστε και δεν έχει δημιουργηθεί ξεχωριστή ομάδα που να τις περιλαμβάνει και θεωρούνται αντιπ ρόσωποι των πολυάριθμων φαινολικών παραγώγων. Ορισμένες φαινυλοβουτανόνες που έχουν βρεθεί σε φυτά, παρατίθενται στη συνέχεια (Pabst A. *et al.*, 1990):

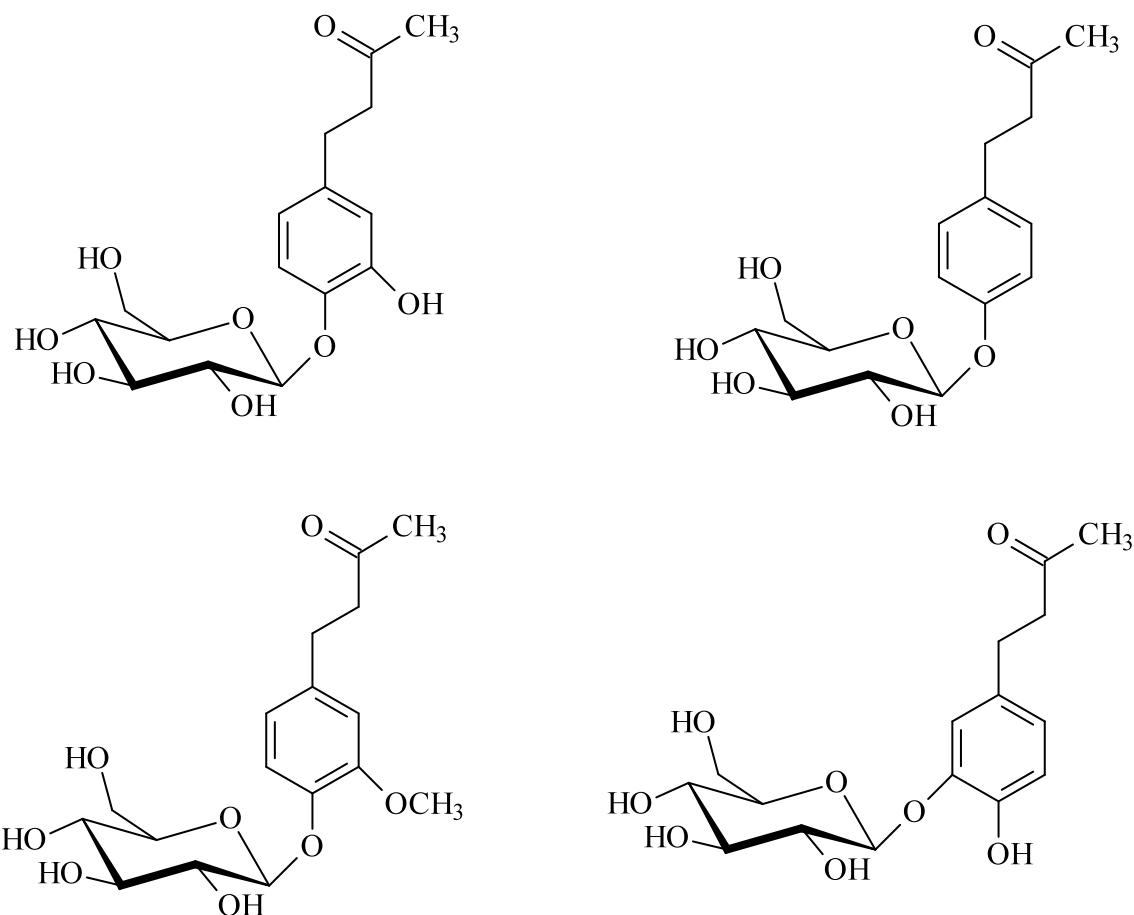


**4-(3',4'-διωδροξυφαινυλο) βουταν-2-όνη    4-(4'-υδροξυφαινυλο) βουταν-2-όνη**



**4-(4'-υδροξυ, 3'-μεθοξυφαινυλο) βουταν-2-όνη**

Οι φαινυλοβουτανόνες υπάρχουν επίσης και με την μορφή των γλυκοσιδών. Όπως και τα αντίστοιχα άγλυκα παράγωγα, έτσι και οι γλυκοσίδες εμφανίζουν λίγες αναφορές από μόνωσης από φυσικές πηγές. Παρακάτω, αναφέρονται περιπτώσεις γλυκοσιδών φαινυλοβουτανονών που έχουν απομονωθεί από διάφορα φυτά (Nagatani Y. et al., 2001; Shikishima Y. et al., 2001; Fan W. et al., 2000; Taskova R. et al., 1998; Jakupovic J. et al., 1991; Andersson R. & Lundgren L.N., 1988 ; Kouno I. et al., 1988):



Εκτός από τις παραπάνω ενώσεις, έχουν απομονωθεί και άλλες παρόμοιας δομής, με άλλο σάκχαρο (π.χ. ραμνόση) ή ακόμα και με δύο σάκχαρα στο μόριό τους.

Όσον αφορά τις φαρμακολογικές τους δράσεις, λίγα στοιχεία είναι γνωστά. Δεν έχει αναφερθεί κάποια συγκεκριμένη ιδιότητά τους και γενικότερα δεν τους έχει ως τώρα αποδοθεί καμία θεραπευτική δράση. Το μόνο που θα μπορούσε να σημειωθεί είναι

ότι ευθύνονται για το άρωμα ορισμένων φρούτων, όπως το φραμπουάζ οπότε μέχρι σήμερα θεωρούνται μόνο ως παράγοντες που ενισχύουν το άρωμα φυτικών ειδών (Wlodzimierz B.W. & Geza H., 1996).

## B) KYANIΔΡΙΝΙΚΟΙ ΓΛΥΚΟΣΙΔΕΣ

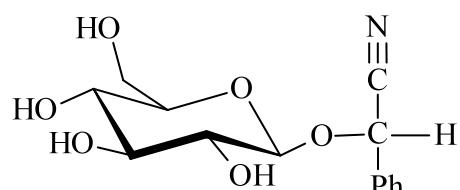
Οι κυανιδρινικοί γλυκοσίδες είναι προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού και κατά την υδρόλυσή τους ελευθερώνουν σάκχαρο και υδροκυάνιο. Αυτή είναι η χαρακτηριστικότερη ιδιότητά τους, άλλωστε η γνωστή από την αρχαιότητα εμφάνιση δηλητηριάσεων από τα πικραμύδαλα, οφείλεται στους κυανιδρινικούς γλυκοσίδες. Απαντούν ευρύτατα στο φυτικό βασίλειο και συναντώνται τουλάχιστον σε 100 οικογένειες, 500 γένη και 1000 είδη (Harborne J.B. & Baxter H., 1993). Χημικώς ανήκουν στα παράγωγα του α-υδροξυνιτριλίου. Περιέχουν στο μόριό τους και ένα σακχαριδικό τμήμα, κατά κανόνα γλυκόση. Ταξινομούνται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, ανάλογα με τη φύση του άγλυκου τμήματος του μορίου, στους γλυκοσίδες με αλειφατικό άγλυκο και σ' αυτούς με αρωματικό άγλυκο.

**α)** Κυανιδρινικοί γλυκοσίδες με αλειφατικό άγλυκο



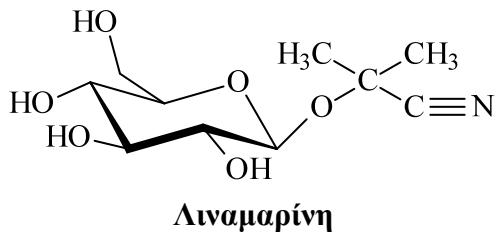
όπου R και R', αλκύλια ή οξυγονωμένοι υποκαταστάτες

**β)** Κυανιδρινικοί γλυκοσίδες με αρωματικό άγλυκο



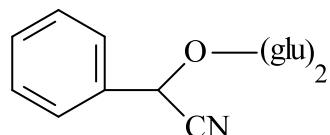
όπου Ph, αρωματικοί δακτύλιοι

Από την πρώτη κατηγορία σημαντικότερη είναι η ένωση λιναμαρίνη που απαντά σε φυτά, όπως το *Linum usitatissimum*, το *Phaseolus lunatus* και στους κονδύλους του *Manihot*. Προκαλεί δηλητηριάσεις σε ζώα που τρώνε υπολείμματα λιναριού ή σε ανθρώπους που τρέφονται με φασόλια της Λίμα και κονδύλους του *Manihot*.



**Λιναμαρίνη**

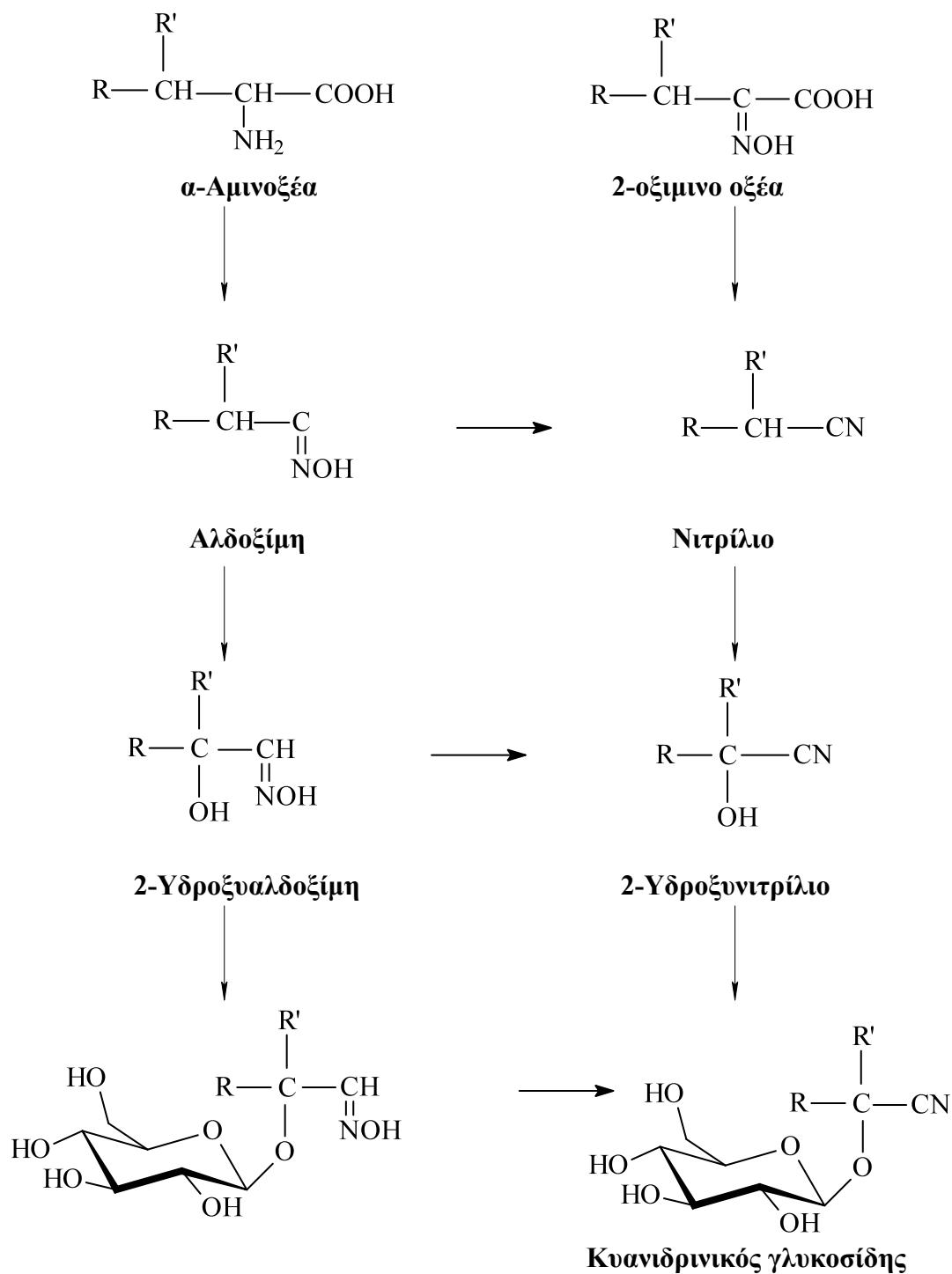
Από τη δεύτερη κατηγορία ξεχωρίζει η αμυγδαλίνη. Είναι ένας διγλυκοσίδης που ανευρίσκεται στα πικραμύγδαλα (*Prunus amygdalus* var. *amara* οικ. *Rosaceae*) (Santamour F.S.JR., 1998), αλλά και στα σπέρματα κερασιών, δαμάσκηνων, μήλων και ροδάκινων. Ένα πικραμύγδαλο περιέχει περίπου 1 mg υδροκυανίου, ενώ 60 πικραμύγδαλα αρκούν να προκαλέσουν τον θάνατο σε έναν ενήλικα και 6-10 πικραμύγδαλα σε παιδιά. Η αμυγδαλίνη εμπειριέχεται και στα άγουρα σπέρματα των γλυκών αμυγδάλων, όμως ελαχιστοποιείται ή εξαφανίζεται τελείως όταν ωριμάζουν (Βερυκοκίδου-Βιτσαροπούλου Ε., 1997).



**Αμυγδαλίνη**

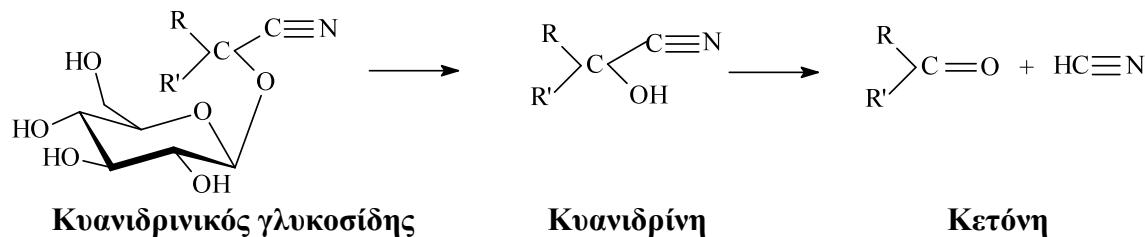
Βιοσυνθετικά οι κυανιδρινικοί γλυκοσίδες προέρχονται από τα αμινόξεα, γεγονός που έχει αποδειχθεί με τη χρήση ραδιοεπισημασμένης  $^{14}\text{C}$  τυροσίνης. Η διεργασία αυτή της παραγωγής κυανιδρινικών ουσιών ονομάζεται κυανογένεση (Σχήμα 58) (Olafsdottir E.S., 2002; Vetter J., 2000). Η κυανογένεση έχει προστατευτικό χαρακτήρα για τα φυτά, κυρίως ενάντια στα φυτοφάγα ζώα. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι η παραγωγή κυανιδρινικών παραγώγων είναι ασταθής σε ένα πληθυσμό φυτών, με κάποια μέλη του πληθυσμού να παράγουν κυανιδρινικά και άλλα όχι. Αν και η κυανογένεση αντιμετωπίζει ται εν μέρει από τα φυτοφάγα ζώα και τα έντομα με

ειδικούς μηχανισμούς που έχουν αναπτύξει, παραμένει μία αποτελεσματική αμυντική θωράκιση (Gilbert G., 2000).



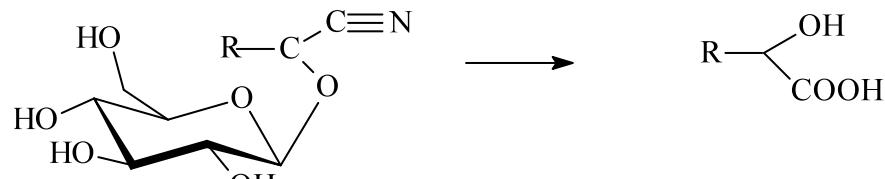
Σχήμα 58. Βιοσύνθεση κυανιδρινικών γλυκοσιδών.

Ο όρος κυανογένεση αναφέρεται επίσης και στην ενζυμική υδρόλυση διαφόρων κυανιδρινικών γλυκοσιδών και την απελευθέρωση ελεύθερου υδροκυανίου. Στα παρακάτω σχήματα απεικονίζεται η διάσπαση των κυανιδρινικών γλυκοσιδών με δύο δυνατούς τρόπους. Στο Σχήμα 59 φαίνεται η υδρόλυση ενός γλυκοσίδη μετά την επίδραση αραιού οξείου ή ενζύμου (εμουλσίνη) οπότε προκύπτει κυανιδρίνη που διασπάται στη συνέχεια σε υδροκυανίο και αλδεΰδη ή κετόνη.



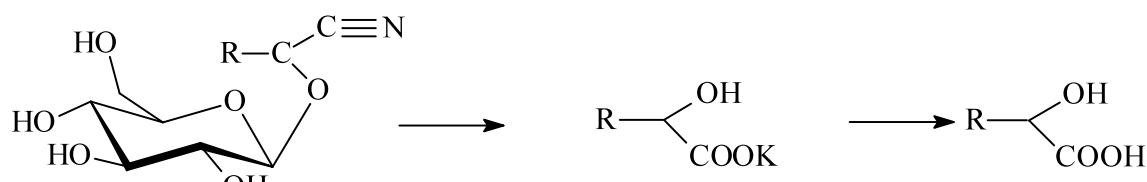
Σχήμα 59. Υδρόλυση κυανιδρινικών γλυκοσιδών με αραιό οξύ ή ένζυμο.

Η υδρόλυση μπορεί να γίνει βέβαια και με ισχυρά οξέα οπότε με την απομάκρυνση του σακχάρου πραγματοποιείται ο σχηματισμός του οξυοξείου από την αντίστοιχη κυανιδρίνη (Σχήμα 60).



Σχήμα 60. Υδρόλυση κυανιδρινικών γλυκοσιδών με πυκνό οξύ.

Ένας άλλος τρόπος υδρόλυσης είναι η επίδραση αλκάλεων οπότε σχηματίζεται το αλκαλικό άλας του γλυκοσιδο-οξυοξείου το οποίο υδρολύεται με αραιό οξύ ή ένζυμο (Σχήμα 61).



Σχήμα 61. Υδρόλυση κυανιδρινικών γλυκοσιδών με αλκάλεα.

Οι κυανιδρινικοί γλυκοσίδες εμφανίζουν πλήθος επιδράσεων στα φυτά, τα ζώα και τον άνθρωπο (Vetter J., 2000), ένα μέρος των οποίων παρατίθενται παρακάτω.

➤ **Επίδραση στα φυτά :** Ο ρόλος των κυανιδρινικών γλυκοσιδών στα φυτά εντοπίζεται στη φυσιολογική τους πορεία και τη συμμετοχή τους στους αμυντικούς μηχανισμούς. Το υδροκυάνιο που παράγεται από τα κυανιδρινικά φυτά, καθώς μεταξύ άλλων είναι το κυριότερο συστατικό των αμινοξέων και των πρωτεΐνων. Όσον αφορά την άμυνα των φυτών, οι κυανιδρινικοί γλυκοσίδες διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στην αντιμετώπιση παθογενών παραγόντων. Μπορούν να δρουν τόσο ως αντιτροφικοί παράγοντες ή ως έλκοντες τα έντομα, ανάλογα με το είδος του εντόμου και το αποτέλεσμα που θα προκαλέσει στο φυτό η επαφή με το συγκεκριμένο έντομο. Γενικότερα όμως οι κυανιδρινικοί γλυκοσίδες είναι ανασταλτικός παράγοντας για τη βρώση και την καταστροφή του φυτού από έντομα, φυτοφάγα ζώα ή άλλους οργανισμούς.

➤ **Επίδραση στα ζώα:** Οι κυανιδρινικοί γλυκοσίδες είναι πολύ τοξικοί εξαιτίας της απελευθέρωσης υδροκυανίου κατά την υδρόλυσή τους. Το εύρος της τοξικότητας εξαρτάται εκτός των άλλων από την ευαισθησία του ζώου, αλλά και από την ποσότητα των φυτών που καταναλώνεται. Επίσης, σημαντικό ρόλο παίζει και το τμήμα του φυτού που τρώει το ζώο. Έχουν παρατηρηθεί πολλές περιπτώσεις δηλητηρίασης ζωικών οργανισμών μετά από βρώση φυτών που περιείχαν κυανιδρινικά παράγωγα. Ως κύρια συμπτώματα αναφέρονται η ανορεξία, η αδυναμία, η κατάπτωση, ο λήθαργος, η υπέρμετρη σιελόρροια. Ο θάνατος επέρχεται μετά από δέκα ώρες. Σε άλλες περιπτώσεις εμφανίζονται ταχυκαρδία, ατονία του γαστρεντερικού συστήματος, μυϊκός σπασμός, δύσπνοια, δυσκαμψία, αδυναμία μάσησης και θάνατος μετά από 18-24 ώρες.

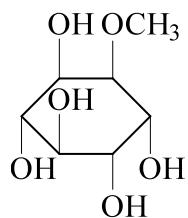
➤ **Επίδραση στους ανθρώπους:** Η τοξικότητα των κυανιδρινικών γλυκοσιδών στους ανθρώπους εστιάζεται, όπως και στην περίπτωση των ζώων, στην αποδέσμευση υδροκυανίου. Είναι δυνατή η άμεση εκδήλωση της δηλητηρίασης και ο επερχομός του θανάτου σε ελάχιστο χρονικό διάστημα. Ο μηχανισμός δράσης έγκειται στην καταστροφή κυττάρων από πολλούς ιστούς, με τις κυριότερες αλλοιώσεις να παρατηρούνται στον νευρικό σύστημα (Soto-Blanco B., 2002). Αυτό συμβαίνει με την

αδρανοποίηση ορισμένων μεταλλικών ιόντων καθοριστικών στη λειτουργία των ενζυμικών μηχανισμών. Έχει βρεθεί μάλιστα ότι περισσότερα από 40 ενζυμικά συστήματα αναστέλλονται από τα κυανιούχα παράγωγα, με σημαντικότερο το σύστημα της οξειδάσης του κυτοχρώ ματος το οποίο είναι υπεύθυνο για τη μεταφορά ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα. Τα κυανιδρινικά ασκούν τοπική και συστηματική δράση. Η συστηματική δράση αναφέρεται στην παράλυση των εγκεφαλικών κέντρων και ιδίως σ' αυτά του προμήκη. Επιπροσθέτως, εμφανίζονται και συμπτώματα από το καρδιαγγειακό, με υπόταση, βραδυκαρδία και αρρυθμίες. Ως αντίδοτο σε περιπτώσεις δηλητηρίασης με κυανιδρινικά παράγωγα είναι ο συνδυασμός νιτρώδους και θειοθειϊκού νατρίου, το δικοβάλτιο EDTA, η βιταμίνη B<sub>12</sub> (Κουτσελίνης Α., 1997).

### Γ) ΚΥΚΛΙΤΟΛΕΣ

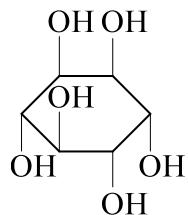
Είναι κυκλικές πολυυόλες ευρύτατα διαδεδομένες σε φυτικούς και ιζωικούς οργανισμούς, με συγγενικό χαρακτήρα στις πολυσθενείς αλειφατικές αλκοόλες (σορβιτόλη, μαννιτόλη κ.λπ.). Οι κυκλιτόλες αποτελούνται από τον σκελετό του κυκλοεξανίου ο οποίος είναι συνήθως υποκατεστημένος με 6 υδρόξυλομάδες, από τις οποίες μία ή περισσότερες μπορεί να είναι μεθυλιωμένες. Η οπτική ισομέρεια θεωρείται το κύριο γνώρισμά τους (Harborne J.B. & Baxter., 1993).

Όπως είναι κατανοητό, προκύπτουν πολλές πιθανές διαμορφώσεις στον χώρο για κάθε μόριο κυκλιτόλης αφού τα υδροξύλια μπορούν να δια ταχθούν κατά πολλούς τρόπους. Ένα παράδειγμα μορίου κυκλιτό λης φαίνεται στον παρακάτω τύπο όπου απεικονίζεται ένα μεθυλιωμένο παράγωγο κυκλιτόλης, η 1<sub>D</sub>-1-O-μεθυλο-μούκοινοσιτόλη.



**1<sub>D</sub>-1-O-μέθυλο-μούκοινοσιτόλη**

Κυριότερος εκπρόσωπος της κατηγορίας είναι η ινοσιτόλη η οποία είναι κυκλοεξανόλη με εννέα πιθανές μορφές, με τις έξι από αυτές να έχουν ανευρεθεί στη φύση. Η πιο διαδεδομένη φυσική της μορφή είναι ο οπτικός ανενεργός μεσοϊνοσίτης ή μυοϊνοσίτης.



**Ινοσιτόλη**

Ο μυοϊνοσίτης βρίσκεται ελεύθερος σε πολλά φυτά, όπως το τσάι και η καρυδιά, αλλά και σε ζωικούς ιστούς όπως η καρδιά και το ήπαρ. Η ινοσιτόλη υπάρχει επίσης υπό τη μορφή αλάτων με Ca και Mg στη φυτίνη, ένα υλικό εναπόθεσης οργανικού φωσφόρου στα σπέρματα που έχει χρησιμοποιηθεί ως δυναμωτικό φάρμακο. Δεν πρέπει να παραβλεφθεί ακόμα, η χρήση της σε καλλιέργειες μικροβίων (ανήκει στο σύμπλεγμα βιταμινών B) (Βερυκοκίδου-Βιτσαροπούλου Ε., 1997).

Άλλες συνήθεις κυκλιτόλες είναι η πινιτόλη (3-μεθυλαιθέρας της D-ινοσιτόλης), παρούσα σε δεκατρείς οικογένειες αγγειοσπέρμων και η κεμπρασιτόλη (2-μεθυλαιθέρας της L-ινοσιτόλης) που εμφανίζεται τουλάχιστον σε ένδεκα οικογένειες αγγειοσπέρμων.

Μία σημαντική ικανότητα ορισμένων κυκλιτολών η οποία αποδείχθηκε πρόσφατα, είναι η προστατευτική τους δράση στα φυτά, ενάντια στις επιπτώσεις του κρύου (Orthen B. & Popp M., 2000). Συγκεκριμένα, η ονονιτόλη, η πινιτόλη, η κεμπρασιτόλη και η Ο-μεθυλο-μούκο-ινοσιτόλη ελάττωσαν την καταστροφή των θυλακοειδών μεμβρανών σπανακιού, μετά την έκθεσή τους για 3 h σε ψύχος (18 °C). Η δράση τους ήταν ισοδύναμη της γλυκόζης η οποία είναι γνωστή για την προστασία που παρέχει στο κρύο. Είναι γενικώς αποδεκτό ότι οι βιομεμβράνες είναι οι κυριότεροι στόχοι του ψύχους. Οι λόγοι που συντελούν στην καταστροφή των μεμβρανών είναι πολλοί, αλλά οι περισσότεροι από αυτούς έγκεινται στη μείωση της διαθεσιμότητας του

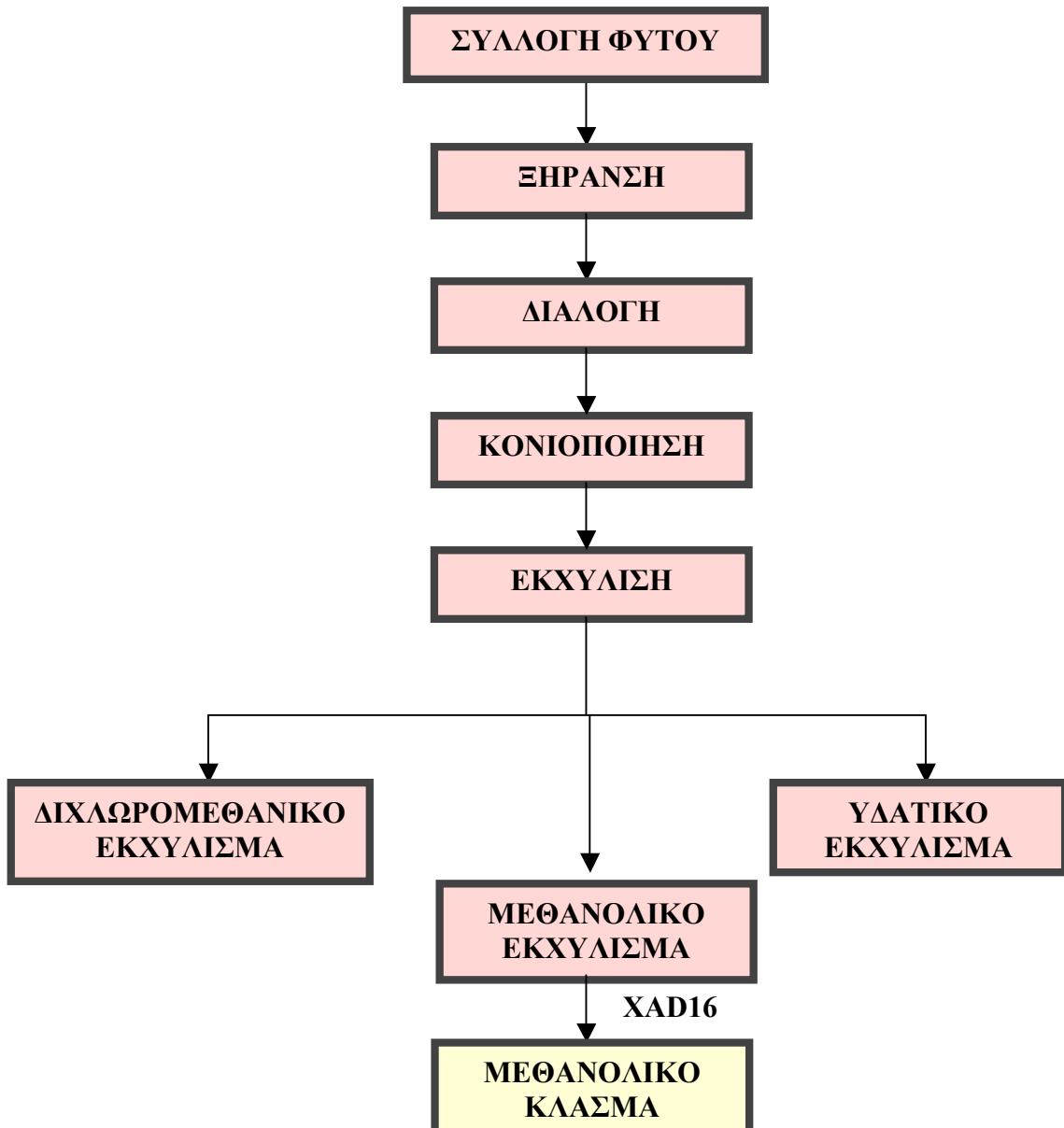
νερού εξαιτίας του σχηματισμού κρυστάλλων πάγου. Η επίδραση των προαναφερθείσων κυκλιτολών εμποδίζει τον σχηματισμό πάγου και αυξάνει τη διαθέσιμη ποσότητα νερού στα κύτταρα, με αποτέλεσμα να αποφεύγονται οι προκαλούμενες από τις χαμηλές θερμοκρασίες, μεταβολικές δυσλειτουργίες.

## **3.2) ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

### **3.2.1) ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΩΝ ΜΟΡΙΩΝ**

#### **3.2.1.a) Αρχική κατεργασία δρόγης**

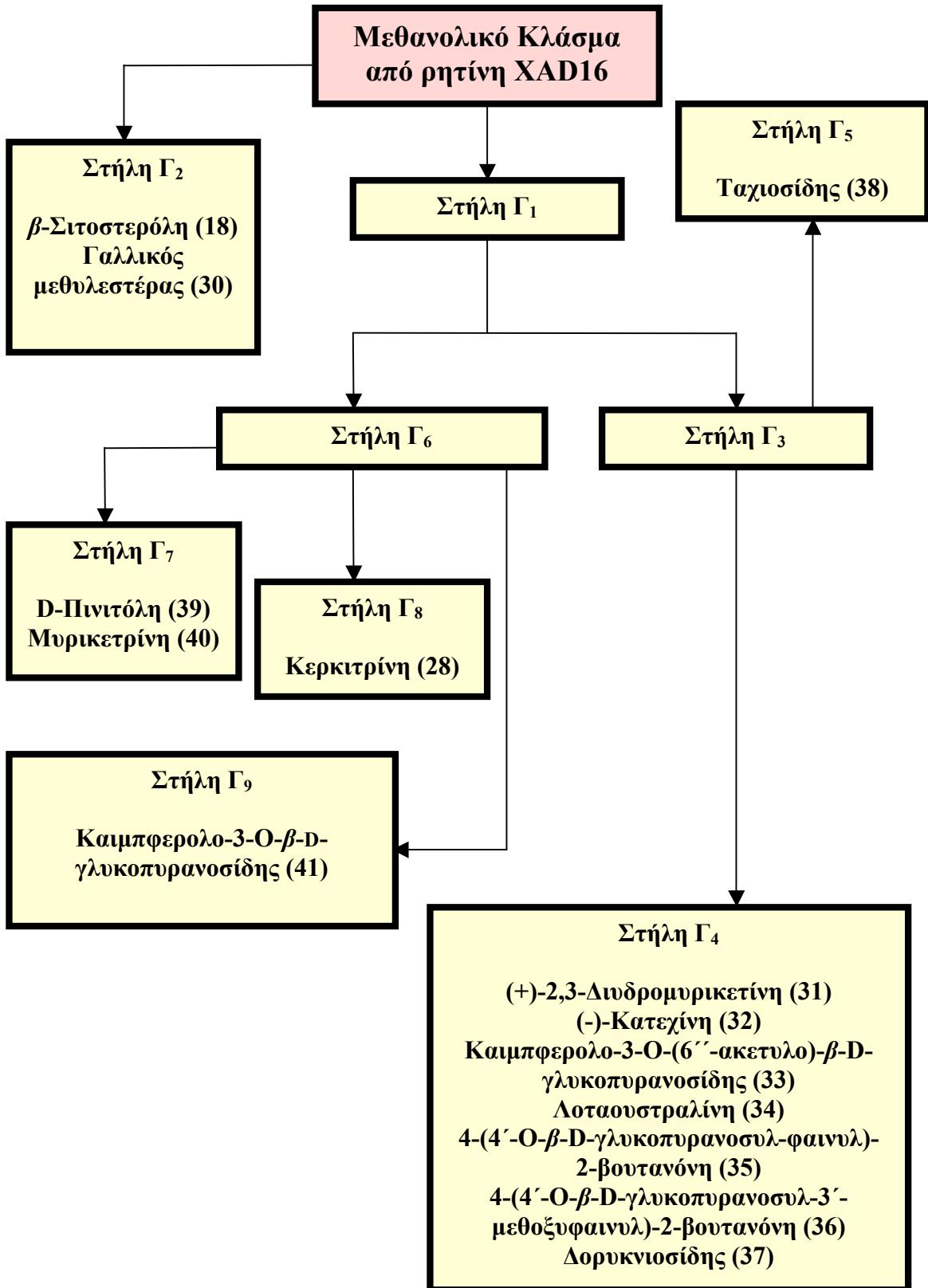
Το φυτό *Dorycnium pentaphyllum* subsp. *herbaceum* συλλέχθηκε τον Ιούνιο του 2000 στο βόρειο τμήμα του όρους Πίνδου, στην Ήπειρο. Το υπέργειο τμήμα του φυτού ξηράνθηκε, κονιοποιήθηκε και η κόνις που προέκυψε, εκχυλίστηκε διαδοχικά με  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{MeOH}$  και  $\text{H}_2\text{O}$ . Μετά από χρωματογραφικό έλεγχο των εκχυλισμάτων αποφασίστηκε η μελέτη του μεθανολικού εκχυλίσματος. Το μεθανολικό εκχύλισμα μάλιστα, υποβλήθηκε σε κατεργασία με ρητίνη XAD16, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 1.2.1.δ και παραλήφθηκε το μεθανολικό κλάσμα το οποίο μελετήθηκε στη συνέχεια. Αυτό έγινε για να αυξηθεί το ποσοστό των πολυφαινολών στο κλάσμα που θα εισερχόταν στους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς και για να απομακρυνθούν τα σάκχαρα που θα δυσκόλευαν την απομόνωση των ουσιών. Στο Σχήμα 62 φαίνεται η αρχική κατεργασία του φυτικού υλικού.



Σχήμα 62. Αρχική κατεργασία του φυτικού υλικού.

### 3.2.1.β) Μελέτη μεθανολικού κλάσματος από ρητίνη XAD16

Η ενότητα αυτή περιλαμβάνει τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά των 14 δευτερογενών μεταβολιτών που απομονώθηκαν από τη χρωματογραφική μελέτη του μεθανολικού κλάσματος το οποίο προήλθε από την κατεργασία του μεθανολικού εκχυλίσματος με ρητίνη XAD16. Ο τρόπος και η αναλυτική πορεία απομόνωσης των ουσιών περιγράφεται στην παράγραφο 3.3.2 του πειραματικού μέρους. Στο επόμενο ο σχήμα εμφανίζονται οι στήλες που πραγματοποιήθηκαν και τα μόρια που προέκυψαν.

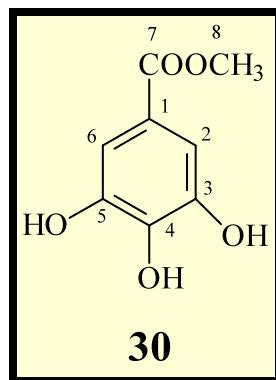


Σχήμα 63. Μελέτη του μεθανολικού κλάσματος που προήλθε από από την κατεργασία του μεθανολικού εκχυλίσματος του φυτού με ρητίνη XAD16.

i.) Φασματοσκοπική μελέτη της  **$\beta$ -σιτοστερόλης ( $\beta$ -sitosterol) (18)**  
**(στήλη Γ<sub>2</sub>, κλάσμα 221-236)**

Η πλήρης φασματοσκοπική μελέτη του μορίου παρουσιάζεται στην παράγραφο  
**2.2.1.β.**

ii.) Φασματοσκοπική μελέτη του γαλλικού μεθυλεστέρα (gallic acid methylester) (30)  
**(στήλη Γ<sub>2</sub>, κλάσμα 160-183)**



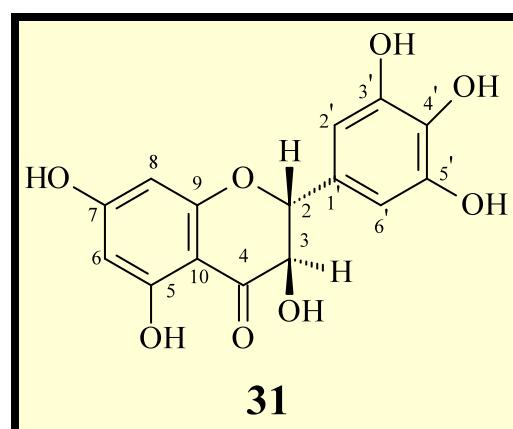
Στα φάσματα <sup>1</sup>H-NMR και <sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD) τα οποία συγκρίθηκαν με τη βιβλιογραφία και ταυτίστηκαν πλήρως (Haddock E. et al., 1982), αξιοσημείωτα είναι τα εξής:

Ο γαλλικός μεθυλεστέρας όπως φαίνεται και από τον παραπάνω χημικό τύπο, είναι εστέρας ενός φαινολοξέος, του γαλλικού οξέος και πρόκειται χημικά για μία απλή ένωση. Όσον αφορά τα φασματοσκοπικά δεδομένα του μορίου, το φάσμα <sup>1</sup>H-NMR είναι εξαιρετικά απλό, καθώς εμφανίζει δύο μόνο κορυφές. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται η ύπαρξη μίας απλής κορυφής στα 7.10 ppm η οποία ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια και αντιστοιχεί στα ισοδύναμα αρωματικά πρωτόνια H-2, 6 του βενζολικού δακτυλίου και μία απλή κορυφή στα 3.80 ppm που ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια και αντιστοιχεί στα πρωτόνια του μεθοξυλίου του εστέρα. Στο φάσμα <sup>13</sup>C-NMR χαρακτηριστική είναι η παρουσία μίας κορυφής στα 53.0 ppm που αντιστοιχεί στον άνθρακα C-8 του μεθυλίου, μίας κορυφής στα 169.0 ppm που ανήκει στον άνθρακα C-7 του καρβονυλίου και η κορυφή στα 121.0 ppm η οποία αντιστοιχεί στον άνθρακα C-1 του βενζολικού πυρήνα. Επιπρόσθετα, οι οξυγονωμένοι αρωματικοί άνθρακες των

θέσεων 3, 5 συντονίζονται στα 147 ppm, ενώ οι ισοδύναμοι αρωματικοί άνθρακες C-2, C-6 συντονίζονται στα 110.0 ppm.

Εμφανίζει αντιβακτηριακή , αντιμυκητιασική , αντιογκογόνο , αντιφλεγμονώδη, αντιαναφυλακτική και χολαιρετική δράση . Επιταχύνει ακόμα τη χαλάρωση των λείων μυών, ενώ παλαιότερα είχε χρησιμοποιηθεί ως στυπτικό , ιδιαίτερα στην κτηνιατρική όπου το συναντάμε ως εντερικό στυπτικό (Harborne J.B. & Baxter H., 1993).

**iii.) Φασματοσκοπική μελέτη της **(+)-2,3-διυδρομυρικετίνης [(+)-dihydromyricetin]** (31)  
(στήλη Γ<sub>4</sub>, κλάσμα 10-12)**



Ανήκει στην κατηγορία των φλαβονοειδών και συγκεκριμένα πρόκειται για μία διυδροφλαβονόλη, δηλαδή δεν υπάρχει ο διπλός δεσμός ανάμεσα στους άνθρακες των θέσεων 2, 3. Αν και η αντίστοιχη φλαβονόλη της η μυρικετίνη, ανευρίσκεται συχνά στα φυτά, η διυδρομυρικετίνη είναι πιο σπάνια και δεν συναντάται σε μεγάλη κλίμακα ως απομονωθέν φυσικό προϊόν. Ονομάζεται και αμπελοψίνη.

Η ταυτοποίηση του μορίου έγινε με μελέτη των φασμάτων NMR (<sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR σε DMSO) και (<sup>1</sup>H-NMR σε CD<sub>3</sub>OD) και σύγκριση με τα στοιχεία της βιβλιογραφίας (Chien-Chang S. et al., 1993; Lundgren L.N. & Theander O., 1988). Σημαντικές παρατηρήσεις που συνετέλεσαν στον προσδιορισμό της δομής του μορίου είναι οι ακόλουθες:

### **Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ :**

- ✓ Η απλή κορυφή στα 6.53 ppm ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) και στα 6.40 ppm (DMSO) που ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια και αντιστοιχεί στα αρωματικά πρωτόνια των θέσεων 2', 6'.
- ✓ Η διπλή κορυφή στα 5.89 ppm ( $\text{CD}_3\text{OD}$  και DMSO) που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο αρωματικό πρωτόνιο της θέσης 6 το οποίο εμφανίζει μία *meta* σύζευξη με το H-8.
- ✓ Η διπλή κορυφή στα 5.86 ppm ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) και στα 5.85 ppm (DMSO) που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο αρωματικό πρωτόνιο της θέσης 8 το οποίο εμφανίζει μία *meta* σύζευξη με το H-6.
- ✓ Η διπλή κορυφή στα 4.85 ppm ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) και στα 4.90 ppm (DMSO) που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 2. Το μεγάλο *J* (11.4 Hz) που εμφανίζει το πρωτόνιο της θέσης 2, αποδεικνύει την *trans* διάταξη των πρωτονίων H-2, H-3.
- ✓ Η διπλή κορυφή στα 4.45 ppm ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) και στα 4.38 ppm (DMSO) που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 3.

### **Στο φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$**

- ✓ Οι άνθρακες των θέσεων 2', 6', συντονίζονται στα 106.9 ppm, ενώ οι κορυφές που αντιστοιχούν στους άνθρακες των θέσεων 6, 8, παρατηρούνται στα 95.9 και 94.9 αντίστοιχα.
- ✓ Οι κορυφές των ανθράκων 2, 3 παρατηρούνται στα 83.2 και 71.6 ppm αντίστοιχα.
- ✓ Ο άνθρακας του καρβονυλίου συντονίζεται στα 197.2 ppm.

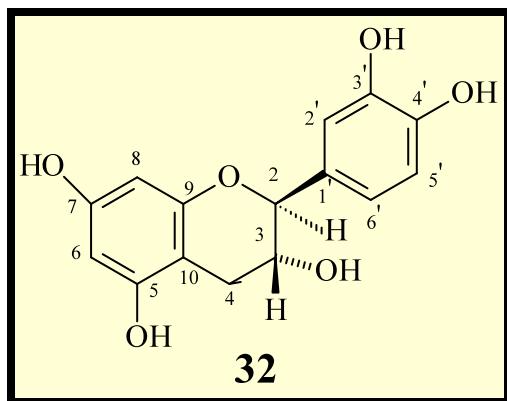
Η διωδρομυρικετίνη ταυτίστηκε με την (+)-μορφή, μετά από μέτρηση της στροφικής ικανότητας. Συγκεκριμένα, υπολογίστηκε ότι η στροφική της ικανότητα είναι +15.5 σε θερμοκρασία 20  $^{\circ}\text{C}$ , σε διαλύτη  $\text{MeOH}$  και με συγκέντρωση διαλύματος 2.7 g/100ml, δηλαδή  $[\alpha]^{20} = +15.5^0$ .

**Απομονώνεται για πρώτη φορά από φυτό του γένους *Dorycnium*,** ενώ έχει αναφερθεί η παρουσία της στο κόκκινο κρασί από την Ν.Δ Γαλλία (Virac X. et al., 2001), καθώς και σε άλλα φυτά, όπως το *Hovenia dulcis* (Hase K. et al., 1997), το

*Cistus incanus* (Petereit F. et al., 1991) και το *Leptarrhena pyrolifolia* (Miller J.M. & Bohm B.A., 1979).

iv.) Φασματοσκοπική μελέτη της **(-)-κατεχίνης [(-)-catechin] (32)**

(στήλη Γ<sub>4</sub>, κλάσμα 26-51)



Είναι παράγωγο του φλαβανίου και ταυτοποιήθηκε με τη βοήθεια των φασματοσκοπικών δεδομένων που προέκυψαν από τα φάσματα <sup>1</sup>H-NMR και <sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD) τα οποία ήταν σε πλήρη συμφωνία με τη βιβλιογραφία (Goetz G. et al., 1999). Στα φάσματα NMR αξιζουν ιδιαίτερης προσοχής τα εξής:

**Στο φάσμα <sup>1</sup>H-NMR:**

- ✓ Η διπλή κορυφή στα 4.66 ppm που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-2.
- ✓ Η πολλαπλή κορυφή στα 4.07 ppm που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο H-3.
- ✓ Οι δύο διπλές-διπλές κορυφές στα 2.94 και 2.60 ppm, που ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η καθεμία και αντιστοιχούν στα πρωτόνια της θέσης 4 (4<sub>ax</sub>, 4<sub>eq</sub> αντίστοιχα).

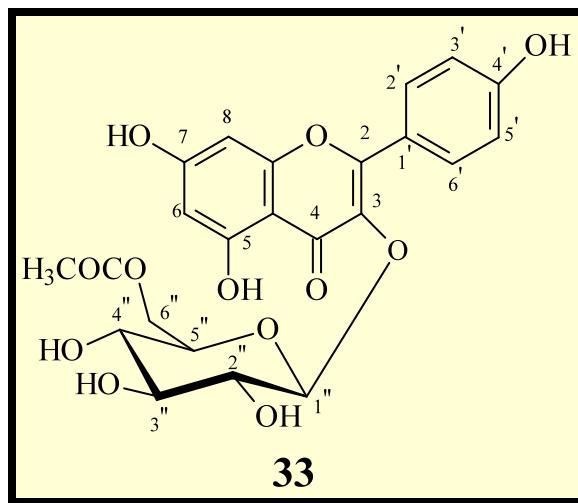
**Στο φάσμα <sup>13</sup>C-NMR:**

- ✓ Οι κορυφές στα 83.1 και 69.1 ppm που ανήκουν στους άνθρακες των θέσεων 2, 3.
- ✓ Ο άνθρακας της θέσης 4 ο οποίος συντονίζεται στα 28.7 ppm.

Η (-)-κατεχίνη είναι πιο σπάνια στη φύση από την (+) μορφή. Η διαπίστωση της ταυτότητας του οπτικού αντίποδα έγινε με μέτρηση της στροφικής ικανότητας και σύγκριση με τα αντίστοιχα βιβλιογραφικά δεδομένα (Teresita M. et al., 2000). Η ακριβής τιμή σε θερμοκρασία 20 °C, διαλύτη MeOH και σε συγκέντρωση διαλύματος 0.22 g/100ml ήταν  $[\alpha]^{20} = -4.54^0$ .

Η (-)-κατεχίνη απαντά στο Gambir και στο Catechu (Βερυκοκίδου-Βιτσαροπούλου Ε., 1997). Όσον αφορά τη βιολογική δραστικότητά του, εμφανίζει αιμοστατική και ηπατοπροστατευτική δράση. Έχει χρησιμοποιηθεί στη θεραπεία ηπατικών δυσλειτουργιών και κυρίως στη νηπατίτιδα (Harborne J.B. & Baxter H., 1993).

v.) Φασματοσκοπική μελέτη του καιμπφερολο-3-O-(6''-ακετυλο)- $\beta$ -D-γλυκοπυρανοσίδη [kaempferol 3-O-(6''-acetyl)- $\beta$ -D-glucopyranoside] (33)  
(στήλη Γ4, κλάσμα 82-93)



Πρόκειται για έναν γλυκοσίδη της καιμπφερόλης, ακετυλιωμένο στη θέση 6'' του σακχάρου και απομονώνεται για πρώτη φορά από φυτό του γένους *Dorycnium*. Ο καθορισμός της δομής του έγινε με τη χρήση των φασμάτων <sup>1</sup>H-NMR και <sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD) και σύγκριση με τα αντίστοιχα βιβλιογραφικά δεδομένα (Slimestad R. et al., 1995), με τα οποία υπήρχε πλήρης ταύτιση. Κάποια χαρακτηριστικά σήματα που βοήθησαν στον καθορισμό της δομής είναι τα εξής:

### **Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ :**

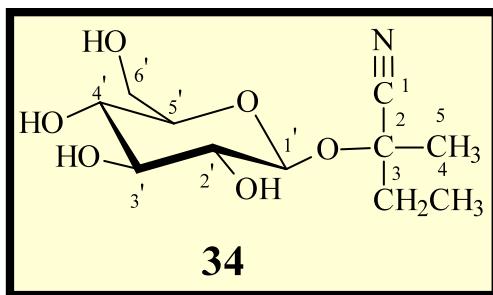
- ✓ Η διπλή κορυφή στα 8.11 ppm που ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια και αντιστοιχεί στα αρωματικά πρωτόνια που βρίσκονται στις θέσεις 2', 6'.
- ✓ Η διπλή κορυφή στα 6.94 ppm που ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια και αντιστοιχεί στα αρωματικά πρωτόνια των θέσεων 3', 5'.
- ✓ Οι διπλές κορυφές στα 6.28 και 6.47 ppm που ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η καθεμία, αντιστοιχούν στα αρωματικά πρωτόνια των θέσεων 6, 8 και φανερώνουν *meta* σύζευξη.
- ✓ Η διπλή κορυφή στα 5.24 ppm που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο ανωμερικό πρωτόνιο ( $\text{H}-1''$ ) του σακχάρου.
- ✓ Οι δύο διπλές -διπλές κορυφές στα 4.26 και 4.15 ppm που αντιστοιχούν στα πρωτόνια της θέσης 6'' του σακχάρου. Εμφανίζονται αποθωρακισμένα λόγω της ακετυλιώσης της γλυκόσης στη θέση 6''.
- ✓ Τα πρωτόνια ( $\text{H}-2'', \text{H}-3'', \text{H}-4'', \text{H}-5''$ ) της γλυκόσης εμφανίζονται στην περιοχή 3.18-3.46 ppm.
- ✓ Η απλή κορυφή στα 1.92 ppm, που ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια και αντιστοιχεί στα πρωτόνια του μεθυλίου του ακετυλίου στη θέση 6'' του σακχάρου.

### **Στο φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ :**

- ✓ Οι κορυφές των ανθράκων των τριών δακτυλίων του φλαβονοειδούς παρατηρούνται στην περιοχή 95.0-179.3 ppm.
- ✓ Οι άνθρακες του σακχάρου συντονίζονται στην περιοχή 64.3-104.4 ppm.
- ✓ Ο ανωμερικός άνθρακας ( $\text{C}-1''$ ) του σακχάρου συντονίζεται στα 104.4 ppm.

Στο σημείο αυτό πρέπει να σημειειωθεί ότι για την πιστοποίηση της ταυτότητας του σακχάρου έγινε και ακετυλίωση του μορίου με πυριδίνη και οξικό ανυδρίτη και ακολούθησε λήψη φάσματος  $^1\text{H-NMR}$  σε διαλύτη  $\text{CDCl}_3$ . Η μελέτη του φάσματος του ακετυλιωμένου μορίου έδειξε ξεκάθαρα ότι πρόκειται για τη  $\beta$ -γλυκόση.

vi.) Φασματοσκοπική μελέτη της λοταουστραλίνης (**lotaustralin**) (34)  
 (στήλη Γ<sub>4</sub>, κλάσμα 104-107)



Ανήκει στους κυανιδρινικούς γλυκοσίδες **και απομονώνεται για πρώτη φορά από φυτό του γένους *Dorycnium***. Για τον προσδιορισμό του χρησιμοποιήθηκαν φάσματα NMR (<sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, DEPT, HMBC, HMQC και COSY) και η αντίστοιχη βιβλιογραφία (Smith R.C. *et al.*, 1980; Seigler D.C. *et al.*, 1975). Κατά τη μελέτη των φασμάτων οι σημαντικότερες παρατηρήσεις ήταν οι εξής:

**Στο φάσμα <sup>1</sup>H-NMR:**

- ✓ Μία διπλή κορυφή στα 4.61 ppm που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο, αντιστοιχεί στο ανωμερικό πρωτόνιο (H-1') του σακχάρου.
- ✓ Μία πολλαπλή κορυφή στα 1.89 ppm ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια και αντιστοιχεί στα πρωτόνια του μεθυλενίου στη θέση 3.
- ✓ Τα πρωτόνια των δύο μεθυλίων στις θέσεις 4, 5 εμφανίζονται υπό τη μορφή τριπλής κορυφής στα 1.08 ppm (H-4) και απλής κορυφής στα 1.63 ppm (H-5).
- ✓ Τα υπόλοιπα πρωτόνια του σακχάρου εμφανίζονται στην περιοχή 3.18-3.81 ppm, ως πολλαπλές κορυφές.

**Στο φάσμα <sup>13</sup>C-NMR:**

- ✓ Ο άνθρακας του νιτριλίου (C-1) εμφανίζεται στα 121.1 ppm.
- ✓ Οι αλειφατικοί άνθρακες (C-2, C-3, C-4, C-5) εμφανίζονται στην περιοχή 8.8-78.0 ppm, με τον οξυγονωμένο τεταρτοταγή άνθρακα (C-2) να εμφανίζεται στα 78.0 ppm.
- ✓ Τα σήματα στην περιοχή 62.5-101.6 ppm αντιστοιχούν στους γλυκοσιδικούς άνθρακες (C-1'-C-6').

**Στο φάσμα DEPT:**

- ✓ Οι θέσεις και ο αριθμός των ανθράκων ήταν σε πλήρη συμφωνία με το φάσμα  $^{13}\text{C}$ -NMR.

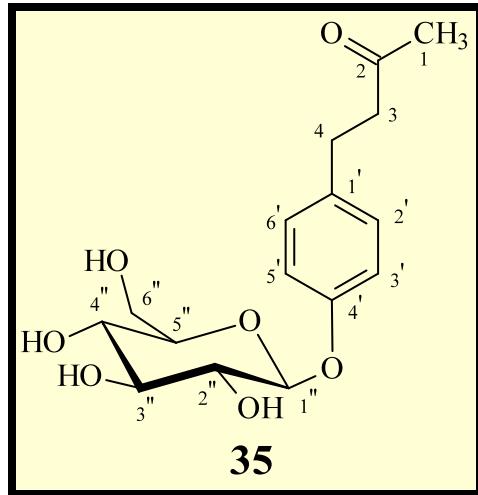
**Στο φάσμα HMBC:**

- ✓ Το ανωμερικό πρωτόνιο του σακχάρου έχει σύζευξη με τον άνθρακα στη θέση 2 που συντονίζεται στα 78.0 ppm, γεγονός που αποδεικνύει ότι η σύνδεση του σακχάρου γίνεται στον C-2.
- ✓ Τα πρωτόνια του μεθυλενίου στη θέση 3 έχουν σύζευξη με τους άνθρακες των μεθυλίων στις θέσεις 4, 5 (8.8 ppm, 24.6 ppm) και με τον άνθρακα του νιτριλίου (121.1 ppm).

Η λοταουστραλίνη εμφανίζει τοξικότητα σε ανθρώπους που τρώνε φασόλια της Λίμα ή κονδύλους του Manihot (Βερυκοκίδου-Βιτσαροπούλου Ε., 1997). Επίσης προκαλεί δηλητηριάσεις σε ζώα που καταναλώνουν τριφύλλι.

Ενώ δεν έχει απομονωθεί ξανά από φυτό του γένους *Dorycnium*, έχει αναφερθεί η παρουσία της σε άλλα φυτά των Leguminosae, όπως στο *Trifolium repens* (Honda K., 1997), στο *Lotus arabicus* (Abrol Y.P. & Conn E.E., 1966) και σε είδη του γένους *Acacia* (Seigler D.S. et al., 1979). Τη συναντάμε επίσης στο *Linum usitatissimum* (Niedz I., 1998), σε φυτά του γένους *Passiflora* (Spencer K.C. & Seigler D.S., 1985) και σε άλλα.

vii.) Φασματοσκοπική μελέτη της 4-(4'-O- $\beta$ -D-γλυκοπυρανοσυλ-φαινυλ)-2-βουτανόνης [4-(4'-O- $\beta$ -D-glucopyranosylphenyl)-2-butanone] (35) (στήλη Γ<sub>4</sub>, κλάσμα 151-157)



Όπως φαίνεται από τον χημικό τύπο της, πρόκειται για ένα γλυκοσίδη της φαινυλοβουτανόνης. Ο καθορισμός της δομής της έγινε με τη βιοήθεια της φασματοσκοπίας NMR (<sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, DEPT, HMBC, HMQC και COSY) και της βιβλιογραφίας (Fan W. et al., 2000).

Παρακάτω παρατίθενται ορισμένα στοιχεία των φασμάτων που οδήγησαν στην ταυτοποίηση του μορίου.

#### Στο φάσμα <sup>1</sup>H-NMR:

- ✓ Παρατηρείται μία διπλή κορυφή στα 7.10 ppm η οποία ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια και αντιστοιχεί στα αρωματικά πρωτόνια των θέσεων 2', 6'.
- ✓ Υπάρχει μία διπλή κορυφή στα 7.00 ppm που ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια και αντιστοιχεί στα αρωματικά πρωτόνια των θέσεων 3', 5'.
- ✓ Παρατηρείται το ανωμερικό πρωτόνιο του σακχάρου (H-1') το οποίο εμφανίζεται ως διπλή κορυφή στα 4.85 ppm.
- ✓ Είναι χαρακτηριστικές οι κορυφές των πρωτονίων του σακχάρου στην περιοχή 3.20-3.88 ppm.
- ✓ Παρατηρείται στα 2.09 ppm μία απλή κορυφή που ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια και αντιστοιχεί στα πρωτόνια του μεθυλίου της θέσης 1 και στα 2.76 ppm μία

πολλαπλή κορυφή που ολοκληρώνει για τέσσερα πρωτόνια και αντιστοιχεί στα αλειφατικά πρωτόνια των μεθυλενίων των θέσεων 3, 4.

**Στο φάσμα  $^{13}\text{C-NMR}$ :**

- ✓ Στα 211.9 ppm παρατηρείται μία κορυφή που αντιστοιχεί στον άνθρακα του καρβονυλίου (C-2).
- ✓ Οι αρωματικοί άνθρακες (C-1'-C-6') συντονίζονται στην περιοχή 118.6-158.1 ppm όπου παρατηρούνται τέσσερα είδη σημάτων.
- ✓ Οι άνθρακες του σακχάρου (C-1''-C-6'') συντονίζονται στην περιοχή 63.2-103.1 ppm.
- ✓ Οι αλειφατικοί άνθρακες (C-1, C-3, C-4) παρατηρούνται στην περιοχή 30.7-46.7 ppm

**Στο φάσμα DEPT:**

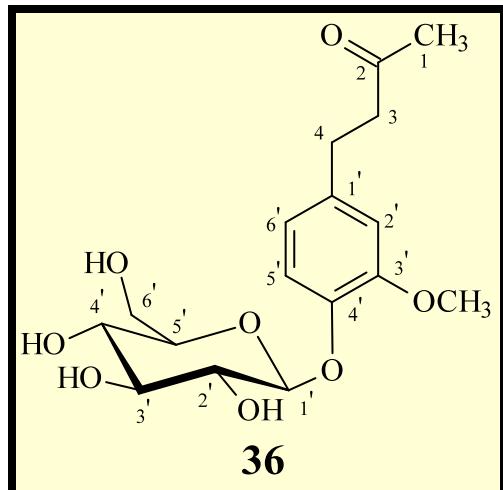
- ✓ Πιστοποιήθηκε η παρουσία των μεθυλενίων στις θέσεις 3, 4 και του μεθυλίου στη θέση 1.

**Στο φάσμα HMBC:**

- ✓ Τα αρωματικά πρωτόνια στις θέσεις 2', 6' έχουν σύζευξη με τον οξυγονωμένο αρωματικό άνθρακα στη θέση 4' που βρίσκεται στα 158.1 ppm και με τον αρωματικό άνθρακα στη θέση 1' στα 137.1 ppm. Τα αρωματικά πρωτόνια στις θέσεις 3', 5' έχουν σύζευξη με τον οξυγονωμένο αρωματικό άνθρακα στη θέση 4' που παρατηρείται στα 158.1 ppm.
- ✓ Τα πρωτόνια του μεθυλίου της θέσης 1, παρουσιάζουν  $^2J$  σύζευξη με τον άνθρακα του καρβονυλίου (C-2) στα 211.9 ppm και  $^3J$  σύζευξη με τον άνθρακα του μεθυλενίου της θέσης 3 στα 30.7 ppm.

Οπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο 3.1.2.β ελάχιστα στοιχεία υπάρχουν για τις βιολογικές ιδιότητες των φαινυλοβουτανονών. Το μόνο αξιοσημείωτο στοιχείο είναι ότι προσδίνουν άρωμα στα φυτά. Η 4-(4'-O- $\beta$ -D-γλυκοπυρανοσυλ-φαινυλ)-2-βουτανόνη, ενώ δεν έχει ξανά απομονωθεί από φυτά των Leguminosae, έχει αναφερθεί στα φρούτα φραμπουάζ (Pabst A. et al., 1990), σε φυτά του γένους *Rheum* (Jakupovic J. et al., 1991), του γένους *Artemisia* (Shikishima Y. et al., 2001), αλλά και του γένους *Pinus* (Andersson R. & Lundgren L.N., 1988).

viii.) Φασματοσκοπική μελέτη της 4-(4'-Ο-β-D-γλυκοπυρανοσυλ-3'-μεθοξυφαινυλ)-2-βουτανόνης [4-(4'-Ο-β-D-glucopyranosyl-3'-methoxyphenyl)-2-butanone] (36) (στήλη Γ<sub>4</sub>, κλάσμα 211-224)



Η ταυτοποίηση έγινε με φασματοσκοπικές μεθόδους NMR (<sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, HMBC, HMQC, COSY και COSY-LR) και σύγκριση με τα βιβλιογραφικά δεδομένα (Fan C.Q. et al., 2001). Στα φάσματα NMR μπορούν να τονιστούν τα εξής:

**Στο φάσμα <sup>1</sup>H-NMR:**

- ✓ Στα 6.90 ppm υπάρχει μία διπλή κορυφή που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο αρωματικό πρωτόνιο της θέσης 5' το οποίο εμφανίζει *ortho* σύζευξη με το πρωτόνιο στη θέση 6'.
- ✓ Στα 6.70 ppm παρατηρείται μία διπλή κορυφή που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο αρωματικό πρωτόνιο της θέσης 2' το οποίο εμφανίζει μία *meta* σύζευξη με το αρωματικό πρωτόνιο της θέσης 6'.
- ✓ Στα 6.55 ppm διακρίνεται μία διπλή -διπλή κορυφή που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο αρωματικό πρωτόνιο της θέσης 6' το οποίο εμφανίζει *ortho* σύζευξη με το πρωτόνιο στη θέση 5' και μία *meta* σύζευξη με το H-2'.
- ✓ Το ανωμερικό πρωτόνιο του σακχάρου (H-1') εμφανίζεται με μία διπλή κορυφή στα 4.67 ppm.
- ✓ Στα 3.67 ppm παρατηρείται μία απλή κορυφή που ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια και αντιστοιχεί στα πρωτόνια της μεθόξυ-ομάδας στη θέση 3'.

- ✓ Στα 2.65 ppm μία διευρυμένη απλή κορυφή που ολοκληρώνει για τέσσερα πρωτόνια και αντιστοιχεί στα αλειφατικά πρωτόνια των θέσεων 3, 4.
- ✓ Οι κορυφές των πρωτονίων του σακχάρου παρατηρούνται στην περιοχή 3.20-3.70 ppm.

**Στο φάσμα  $^{13}\text{C-NMR}$ :**

- ✓ Στα 211.4 ppm, παρατηρείται μία κορυφή που αντιστοιχεί στον άνθρακα του καρβονυλίου (C-2).
- ✓ Οι αρωματικοί άνθρακες (C-1'-6') συντονίζονται στην περιοχή 114.5-151.2 ppm, όπου παρατηρούνται τέσσερα είδη σημάτων.
- ✓ Οι άνθρακες του σακχάρου (C-1''-6'') συντονίζονται στην περιοχή 63.0-103.5 ppm.
- ✓ Οι αλειφατικοί άνθρακες (C-1, 3, 4) παρατηρούνται στην περιοχή 30.4-46.4 ppm.

**Στο φάσμα DEPT:**

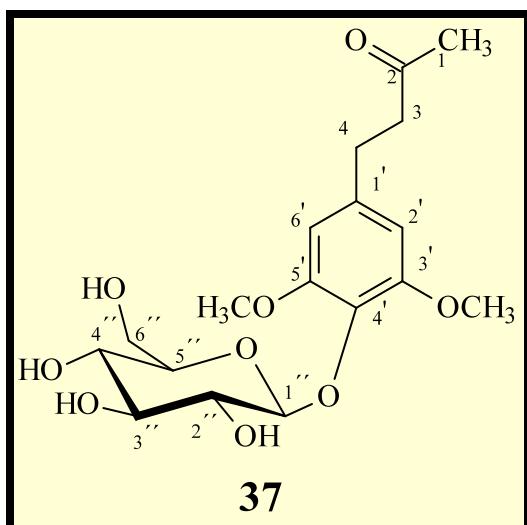
- ✓ Πιστοποιήθηκε η παρουσία των μεθυλενίων στις θέσεις 3, 4 και του μεθυλίου στη θέση 1.

**Στο φάσμα HMBC:**

- ✓ Το αρωματικό πρωτόνιο στη θέση 5' έχει σύζευξη με τον αρωματικό άνθρακα στη θέση 3' που βρίσκεται στα 151.2 ppm και με τον αρωματικό άνθρακα στη θέση 1' στα 138.0 ppm.
- ✓ Το αρωματικό πρωτόνιο στη θέση 2' έχει σύζευξη με τον αρωματικό άνθρακα στη θέση 6' που βρίσκεται στα 122.2 ppm, με τον αρωματικό άνθρακα στη θέση 4' στα 146.8 ppm και με τον άνθρακα του αλειφατικού μεθυλενίου (C-4) στα 30.9 ppm.
- ✓ Το αρωματικό πρωτόνιο στη θέση 6' έχει σύζευξη με τον αρωματικό άνθρακα στη θέση 2' που βρίσκεται στα 114.5 ppm, με τον αρωματικό άνθρακα στη θέση 4' στα 146.8 ppm και με τον άνθρακα (C-4) του αλειφατικού μεθυλενίου στα 30.9 ppm.
- ✓ Τα πρωτόνια του μεθυλίου της θέσης 1 παρουσιάζουν  $^2J$  σύζευξη με τον άνθρακα του καρβονυλίου (C-2) και  $^3J$  σύζευξη με τον άνθρακα του μεθυλενίου της θέσης 3 στα 46.4 ppm.

H (4'-O- $\beta$ -D-γλυκοπυρανοσυλ-3'-μεθοξυφαινυλ)-2-βουτανόνη είναι ένα ακόμα μόριο που ανήκει στην χημική ομάδα των φαινυλοβουτανονών, **απομονώνεται για πρώτη φορά από φυτό της οικογένειας Leguminosae**, ενώ η ύπαρξή του έχει ακόμη αναφερθεί στο *Pinus sylvestris* (Andersson R. & Lundgren L.N., 1988) και στο *Baccharis dracunculifolia* (Nagatani Y. et al., 2001).

**ix.) Φασματοσκοπική μελέτη του δορυκνιοσίδη (dorycnioside) (37)**  
**(στήλη Γ<sub>4</sub>, κλάσμα 225-250)**



Αποτελεί ένα **νέο φυσικό προϊόν** στο οποίο προσδώσαμε το κοινό όνομα **δορυκνιοσίδης**. Ο προσδιορισμός της δομής του έγινε με μεθόδους φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (<sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, DEPT, HMBC, HMQC και COSY), φασματοσκοπία υπεριώδους -օρατού (UV-Vis), φασματοσκοπία υπερύθρου (IR) και φασματοσκοπία μάζας (CIMS, EIMS, HRMS, ES), ενώ μετρήθηκε και η στροφική του ικανότητα. Στα φάσματα NMR μπορούν να τονιστούν τα εξής:

**Στο φάσμα <sup>1</sup>H-NMR:**

- ✓ Ένα σήμα (απλή κορυφή) στα 6.54 ppm που αντιστοιχεί στα δύο αρωματικά πρωτόνια (H-2', H-6') του μορίου.
- ✓ Το ανωμερικό πρωτόνιο (H-1'') του μορίου παρατηρείται με τη μορφή μίας διπλής κορυφής στα 4.79 ppm και μεταξύ 3.18-3.78 ppm υπάρχουν

αλληλεπικαλυπτόμενα σήματα που αντιστοιχούν στα πρωτόνια του σακχάρου (H-2'', H-3'', H-4'', H-5'', H-6'').

- ✓ Μία απλή κορυφή στα 3.82 ppm που ολοκληρώνει για έξι πρωτόνια και αντιστοιχεί στα πρωτόνια των δύο μεθόξυ-ομάδων που είναι συνδεδεμένες με τον αρωματικό δακτύλιο στις θέσεις 3', 5'.
- ✓ Μία διευρυμένη απλή κορυφή στα 2.80 ppm που αντιστοιχεί στα αλειφατικά πρωτόνια των δύο μεθυλενίων (H-3, H-4).
- ✓ Μία απλή κορυφή στα 2.13 ppm που αντιστοιχεί στα πρωτόνια της μεθυλομάδας στη θέση 1.

#### **Στο φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ :**

- ✓ Στα 210.9 ppm, παρατηρείται μία κορυφή που αντιστοιχεί στον άνθρακα του καρβονυλίου (C-2).
- ✓ Οι αρωματικοί άνθρακες (C-1'-C-6') συντονίζονται στην περιοχή 107.0-154.6 ppm όπου παρατηρούνται τέσσερα είδη σημάτων, δύο από τα οποία αντιστοιχούν σε οξυγονωμένους άνθρακες. Συγκεκριμένα, στα 154.6 ppm συντονίζονται οι άνθρακες C-3', C-5' και στα 134.6 ppm ο άνθρακας C-4'.
- ✓ Οι άνθρακες του σακχάρου (C-1''-C-6'') συντονίζονται στην περιοχή 62.3-105.2 ppm.
- ✓ Οι αλειφατικοί άνθρακες (C-1, C-3, C-4) παρατηρούνται στην περιοχή 30.6-45.5 ppm.

#### **Στο φάσμα DEPT:**

- ✓ Πιστοποιήθηκε η παρουσία των μεθυλενίων στις θέσεις 3, 4 (45.5 και 30.7 ppm αντίστοιχα) και του μεθυλίου στη θέση 1 (30.6 ppm), όπως και η θέση των αρωματικών ανθράκων.

#### **Στο φάσμα HMBC:**

- ✓ Τα αρωματικά πρωτόνια στις θέσεις 2', 6' έχουν σύζευξη με τον άνθρακα του μεθυλενίου στα 30.7 ppm και με τον αρωματικό οξυγονωμένο άνθρακα (C-4') στα 134.6 ppm.

- ✓ Τα πρωτόνια των μεθοξυλίων που είναι συνδεδεμένα με τον αρωματικό δακτύλιο στις θέσεις 3', 5', έχουν σύζευξη με τους οξυγονωμένους άνθρακες των θέσεων 3', 5', στα 154.6 ppm.
- ✓ Τα πρωτόνια του μεθυλίου της θέσης 1 παρουσιάζουν  $^2J$  σύζευξη με τον άνθρακα του καρβονυλίου (C-2) στα 210.9 ppm και  $^3J$  σύζευξη με τον άνθρακα του μεθυλενίου της θέσης 3 στα 45.5 ppm.
- ✓ Το ανωμερικό πρωτόνιο (H-') έχει σύζευξη με τον αρωματικό οξυγονωμένο άνθρακα της θέσης 4' στα 134.6 ppm.

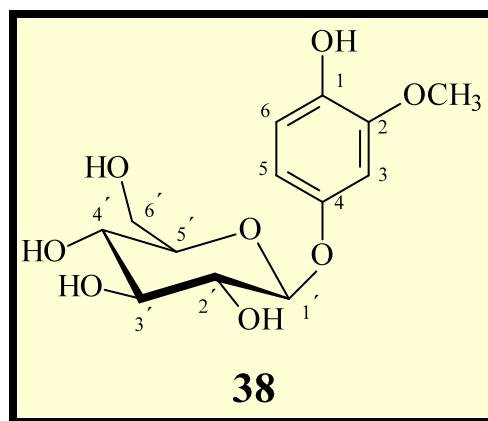
Ο δορυκνιοσίδης απομονώθηκε ως ένα λευκό, άμορφο στερεό. Η δομή του μορίου επιβεβαιώθηκε και με τη χρήση φασματομετρίας μάζας. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του χημικού ιονισμού [CIMS, m/z: 387 ( $M+H^+$ )], η μέθοδος υψηλής ανάλυσης [HRMS, m/z: 386.1650 ( $M^+$ ), (υπολογίστηκε για τον μοριακό τύπο  $C_{18}H_{26}O_9$ : 386)] και η μέθοδος του ηλεκτροψεκασμού (ES) όπου το ιόν  $M+Na^+$  υπολογίστηκε ίσο με 409. Επίσης, μελετήθηκαν τα φάσματα UV και IR. Στο φάσμα UV παρατηρήθηκαν απορροφήσεις σε μήκη κύματος 256.0 nm και 273.5 nm που είναι χαρακτηριστικές του φαινολικού δακτυλίου. Στο φάσμα IR εμφανίστηκαν μέγιστα απορρόφησης στα  $1710\text{ cm}^{-1}$  που αντιστοιχεί σε απορρόφηση καρβονυλίου (C=O) και αποδίδεται στην καρβονυλομάδα της θέσης 2 και στα  $1660\text{ cm}^{-1}$  που αντιστοιχεί σε απορρόφηση δεσμού άνθρακα -άνθρακα (C=C) και αποδίδεται στους διπλούς δεσμούς του αρωματικού δακτυλίου. Επίσης, στον δορυκνιοσίδη έγινε μέτρηση της στροφικής του ικανότητας η οποία προσδιορίστηκε -  $40^\circ$ , σε διαλύτη MeOH, με συγκέντρωση 0.05 g/100ml και θερμοκρασία  $20\text{ }^\circ\text{C}$ .

Τέλος, η ακριβής ταυτότητα του σακχάρου προσδιορίσθηκε με την ακετυλίωση μίας ποσότητας (2 mg) του μορίου με οξικό ανυδρίτη, παρουσία πυριδίνης. Στο ακετυλιωμένο μόριο έγινε λήψη φάσματος  $^1\text{H-NMR}$ . Στο φάσμα αυτό παρατηρήθηκε το ανωμερικό πρωτόνιο (διπλή κορυφή με  $J=7.8\text{ Hz}$ ) και τρία αποθωρακισμένα πρωτόνια (εξαιτίας της ακετυλίωσης) τα οποία εμφανίζονταν ως διπλή-διπλή με  $J=9.5$  και  $7.8\text{ Hz}$  και δύο τριπλές με  $J=9.5$ . Τα στοιχεία αυτά ταυτίζονταν μόνο με τα υδρογόνα H-1, H-2, H-3, H-4 της β-γλυκοπυρανόσης. Επιπρόσθετα, η απόλυτη στερεοχημεία του σακχάρου διαπιστώθηκε με ενζυματική υδρόλυση με  $\beta$ -D-γλυκοσιδάση οπότε διασπάστηκε το

μόριο σε μίγμα σακχάρου -γενίνης, όπως διαπιστώθηκε μετά από έλεγχο με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας. Το γεγονός ότι το ένζυμο  $\beta$ -D-γλυκοσιδάση διασπούσε το μόριο απεδείκνυε ότι το σάκχαρο είναι η  $\beta$ -D-γλυκόση. Σε αντίθετη περίπτωση δεν θα μπορούσε να διασπαστεί το μόριο και στην TLC θα παρατηρούταν μία μόνο κηλίδα.

**x.) Φασματοσκοπική μελέτη του **ταχιοσίδη (tachioside) (38)****

**(στήλη Γ<sub>5</sub>, κλάσμα 163-182)**



Ανήκει στους φαινολικούς γλυκοσίδες και συγκεκριμένα είναι παράγωγο της υδροκινόνης και **απομονώνεται για πρώτη φορά από φυτό του γένους *Dorycnium***. Η ταυτοποίησή του έγινε με φασματοσκοπικές μεθόδους ( $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C NMR}$ , COSY-LR) και μελέτη της βιβλιογραφίας (Zhong X.N. *et al.*, 1999; Inoshiri S. *et al.*, 1987). Μάλιστα, πρέπει να σημειωθεί ότι για τη λήψη των φασμάτων χρησιμοποιήθηκαν δύο δευτεριωμένοι διαλύτες, η  $\text{CD}_3\text{OD}$  και η  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$  (δευτεριωμένη πυριδίνη). Με  $\text{CD}_3\text{OD}$  ελήφθησαν φάσματα  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C NMR}$  και COSY-LR, ενώ με  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$  φάσμα  $^1\text{H-NMR}$ . Οι σημαντικότερες παρατηρήσεις στα φάσματα με  $\text{CD}_3\text{OD}$  ήταν:

**Στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$ :**

- ✓ Η διπλή κορυφή στα 6.82 ppm που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο αρωματικό πρωτόνιο της θέσης 3 το οποίο εμφανίζει μία *meta* σύζευξη με το πρωτόνιο H-5.

- ✓ Η διπλή κορυφή στα 6.73 ppm που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο αρωματικό πρωτόνιο της θέσης 6 το οποίο εμφανίζει μία *ortho* σύζευξη με το πρωτόνιο H-5.
- ✓ Η διπλή-διπλή κορυφή στα 6.51 ppm, που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο αρωματικό πρωτόνιο της θέσης 5 το οποίο εμφανίζει μία *ortho* σύζευξη με το πρωτόνιο H-6 και μία *meta* σύζευξη με το πρωτόνιο H-3.
- ✓ Η διπλή κορυφή στα 4.76 ppm που αντιστοιχεί στο ανωμερικό πρωτόνιο του σακχάρου.
- ✓ Η απλή κορυφή στα 3.84 ppm που ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια και αντιστοιχεί στα πρωτόνια του μεθοξυλίου της θέσης 2.
- ✓ Τα σήματα στην περιοχή 3.35-3.71 ppm που αντιστοιχούν στα πρωτόνια των θέσεων 2', 3', 4', 5', 6' του σακχάρου.

**Στο φάσμα  $^{13}\text{C-NMR}$ :**

- ✓ Στην περιοχή 104.4-155.0 ppm εμφανίζονται οι κορυφές που αντιστοιχούν στους αρωματικούς άνθρακες, τρεις από τους οποίους είναι οξυγονωμένοι (C-1 στα 141.1 ppm, C-2 στα 152.0 ppm, C-4 στα 155.0 ppm).
- ✓ Ο άνθρακας στον οποίο βρίσκεται το ανωμερικό πρωτόνιο (H-1') του σακχάρου, εμφανίζεται με μία κορυφή στα 101.9 ppm, ενώ οι υπόλοιποι γλυκοσιδικοί άνθρακες παρατηρούνται στην περιοχή 62.6-78.2 ppm.
- ✓ Το σήμα του άνθρακα του μεθοξυλίου παρατηρείται στα 56.6 ppm.

**Στο φάσμα COSY-LR:**

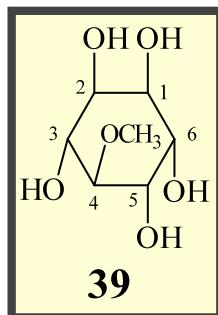
- ✓ Με το φάσμα αυτό διαπιστώθηκε ότι τα πρωτόνια του μεθοξυλίου στη θέση 3 του αρωματικού δακτυλίου είχαν σύζευξη μόνο με ένα αρωματικό πρωτόνιο, αυτό της θέσης 3. Οπότε το μεθοξύλιο ήταν δίπλα στο υδροξύλιο, γιατί σε διαφορετική περίπτωση, αν το μεθοξύλιο ήταν σε θέση χωρίς υποκαταστάση σε γειτονική θέση, θα είχε σύζευξη με δύο αρωματικά πρωτόνια.

Όπως αναφέθηκε προηγούμενα, μελετήθηκαν οι φασματοσκοπικές ιδιότητες του μορίου σε φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  με τη χρήση διαλύτη  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ . Στο φάσμα αυτό διαπιστώθηκαν τα εξής:

- ✓ Η διπλή κορυφή στα 7.16 ppm που ολοκληρώνει για ένα πρωτ όνιο και αντιστοιχεί στο αρωματικό πρωτόνιο της θέσης 3.
- ✓ Η διπλή κορυφή στα 7.15 ppm που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο αρωματικό πρωτόνιο της θέσης 6.
- ✓ Η διπλή-διπλή κορυφή στα 7.05 ppm που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο αρωματικό πρωτόνιο της θέσης 5.
- ✓ Η διπλή κορυφή στα 5.55 ppm που αντιστοιχεί στο ανωμερικό πρωτόνιο (H-1') του σακχάρου.
- ✓ Η απλή κορυφή στα 3.71 ppm που ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια και αντιστοιχεί στα πρωτόνια του μεθοξυλίου της θέσης 2.
- ✓ Τα σήματα στην περιοχή 4.12-4.59 ppm που αντιστοιχούν στα πρωτόνια των θέσεων 2', 3', 4', 5', 6' του σακχάρου.

Ενώ **απομονώνεται για πρώτη φορά από φυτό του γένους *Dorycnium***, έχει ανιχνευθεί και σε άλλα μέλη των Leguminosae, όπως στο φυτό *Glycyrrhiza glabra* (Li W. et al., 2000), όπως επίσης και σε μέλη άλλων οικογενειών, π.χ. *Myrsine seguinii* (Zhong X.N. et al., 1999), στον φλοιό της *Betula pendula* (Smite E. et al., 1995) και τις ρίζες του φυτού *Picea abies* (Pan H. & Lundgren N., 1995).

**xii.) Φασματοσκοπική μελέτη της **D-πινιτόλης (D-pinitol) (39)**  
(στήλη Γ<sub>7</sub>, κλάσματα 8-76)**



Η ταυτοποίηση του μορίου έγινε με τη φασματοσκοπική μελέτη ( $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ ) και σύγκριση με τα βιβλιογραφικά στοιχεία (Naidoo L.A.C., 1992). Οι σημαντικότερες παρατηρήσεις που οδήγησαν στην ταυτοποίηση της D-πινιτόλης είναι:

**Στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$ :**

- ✓ Η πολλαπλή κορυφή στα 3.85 ppm που ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια και αντιστοιχεί στα πρωτόνια των θέσεων 1 και 6.
- ✓ Η διπλή-διπλή κορυφή στα 3.66 ppm που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-5 και η διπλή-διπλή κορυφή στα 3.60 ppm που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 2.
- ✓ Η διπλή-διπλή κορυφή στα 3.49 ppm που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-3 και η διπλή-διπλή κορυφή στα 3.18 ppm που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 4.
- ✓ Η απλή κορυφή που ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια και αντι στοιχεί στα πρωτόνια του μεθοξυλίου της θέσης 4.

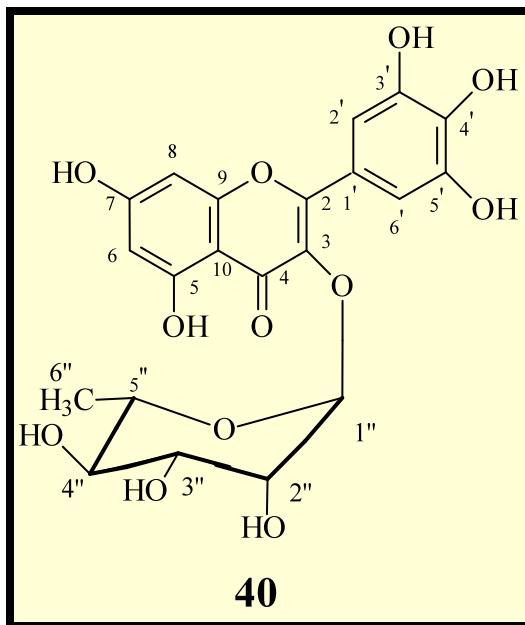
**Στο φάσμα  $^{13}\text{C-NMR}$ :**

- ✓ Οι άνθρακες του δακτυλίου συντονίζονται στην περιοχή 72.6-85.5 ppm, περιοχή χαρακτηριστική για τους γλυκοσιδικούς άνθρακες.
- ✓ Ο άνθρακας του μεθοξυλίου στη θέση 4 συντονίζεται στα 62.4 ppm.

Η D-πινιτόλη είναι μία κυκλιτόλη χαρακτηριστική της οικογένειας των Leguminosae. Μεταξύ άλλων έχει απομονωθεί από τα φυτά *Medicago sativa*, *Ononis spinosa* και *Trifolium incarnatum* (Dittrich P. & Brandl A., 1987).

xii.) Φασματοσκοπική μελέτη της μυρικετρίνης (**myricitrin**) (40)

(στήλη Γ<sub>7</sub>, κλάσματα 77-140)



Η μυρικετρίνη είναι ο ραμνοσίδης στη θέση 3 της μυρικετίνης, πρόκειται δηλαδή για έναν ραμνοσίδη φλαβονοειδούς. Ο προσδιορισμός της δομής της μυρικετρίνης έγινε με τη χρήση φασματοσκοπικών μεθόδων NMR (<sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR σε DMSO και <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, HMBC COSY, σε CD<sub>3</sub>OD) και σύγκριση με τα στοιχεία της βιβλιογραφίας (Mahmoud I., et al., 2001; Addae Mensah I. & Achenbach H., 1985). Οι σημαντικότερες παρατηρήσεις στα φάσματα που βοήθησαν στην ταυτοποίηση του μορίου είναι:

**Στο φάσμα <sup>1</sup>H-NMR:**

- ✓ Η απλή κορυφή στα 6.97 ppm (MeOD) και στα 6.87 ppm (DMSO) που ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια, αντιστοιχεί στα δύο αρωματικά πρωτόνια των θέσεων 2', 6' της μυρικετίνης.
- ✓ Η διπλή κορυφή στα 6.37 ppm (MeOD) και 6.35 ppm (DMSO) αντιστοιχεί στο αρωματικό πρωτόνιο της θέσης 8, ενώ η διπλή κορυφή στα 6.21 ppm (MeOD) και 6.18 ppm (DMSO) αντιστοιχεί στο αρωματικό πρωτόνιο της θέσης 6.
- ✓ Το ανωμερικό πρωτόνιο της ραμνόσης (H-1'') εμφανίζεται ως μία διπλή κορυφή στα 5.33 ppm (MeOD) και 5.20 ppm (DMSO). Το *J* που εμφανίζει είναι μικρό (1.5 Hz).

σε σχέση με αυτό του ανωμερικού πρωτονίου της γλυκόζης, στοιχείο ενδεικτικό της παρουσίας ραμνόσης.

- ✓ Τα πρωτόνια H-2''-H-5'' της ραμνόσης εμφανίζονται στην περιοχή 3.35-4.25 (MeOD) ως πολλαπλή κορυφή . Αντίθετα , στο φάσμα σε DMSO οι θέσεις των γλυκοσιδικών πρωτονίων είναι πιο ξεκάθαρες και το H-2'' εμφανίζεται ως διπλή-διπλή στα 3.96 ppm, το H-3'' επίσης ως διπλή-διπλή στα 3.60 ppm, το H-4'' ως τριπλή στα 3.15 ppm και το H-5'' ως πολλαπλή στα 3.46 ppm.
- ✓ Μία διπλή κορυφή που ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια στα 0.98 ppm (MeOD) και στα 0.83 ppm (DMSO) αντιστοιχεί στα πρωτόνια του μεθυλίου της ραμνόσης στην θέση 6''.

#### **Στο φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ :**

- ✓ Οι κορυφές των ανθράκων των τριών δακτυλίων του φλαβονοειδούς παρατηρούνται στην περιοχή 95.5-179.8 (MeOD) ppm και 93.5-177.8 ppm (DMSO).
- ✓ Ο άνθρακας της θέσης 1'' του σακχάρου συντονίζεται στα 102.0 ppm (MeOD) και στα 101.9 ppm (DMSO).
- ✓ Οι υπόλοιποι άνθρακες του σακχάρου συντονίζονται στην περιοχή 70.1-74.7 ppm (MeOD) και στα 70.0-71.3 ppm (DMSO).
- ✓ Ο άνθρακας του μεθυλίου της θέσης 6'' της ραμνόσης συντονίζεται στα 17.6 ppm (MeOD) και στα 17.5 ppm (DMSO).

#### **Στο φάσμα HMBC:**

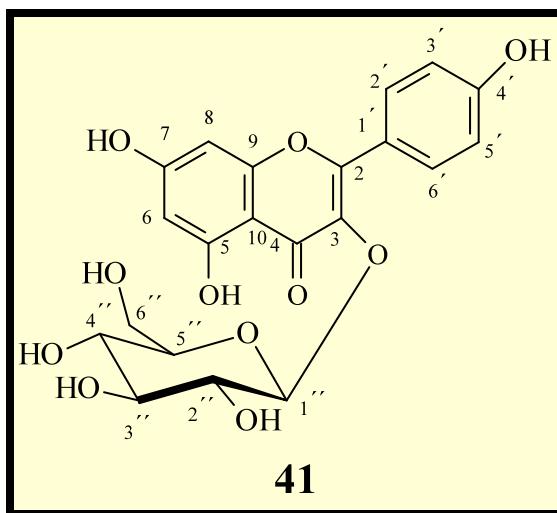
- ✓ Το ανωμερικό πρωτόνιο της ραμνόσης έχει σύζευξη με τον άνθρακα στη θέση 3 στα 136.2 ppm, γεγονός που αποδεικνύει ότι η σύνδεση του σακχάρου γίνεται στον C-3.

Η μυρικετρίνη έχει απομονωθεί παλαιότερα και από άλλα είδη του γένους *Dorycnium* (Jay M. et al., 1978), ενώ το όνομά της το οφείλει στη απομόνωσή της από τον φλοιό του φυτού *Myrica rubra*. Εμφανίζει δραστικότητα ενάντια στους μικροοργανισμούς *Pseudomonas maltophilia* και *Enteromorpha cloacae* και ανακόπτει τη φλεγμονή που προκαλείται από κάποιους ογκογόνους παράγοντες (Harborne J.B. & Baxter H., 1993).

xiii.) Φασματοσκοπική μελέτη της κερκιτρίνης (quercitrin) (28)  
 (στήλη Γ<sub>8</sub>, κλάσμα 84-126)

Η πλήρης φασματοσκοπική μελέτη του μορίου παρουσιάζεται στην παράγραφο  
 2.2.1.γ.

xiv.) Φασματοσκοπική μελέτη του καιμπερολο-3-O-β-D-γλυκοπυρανοσίδη  
 [kaempferol 3-O-β-D-glucopyranoside] (41)  
 (στήλη Γ<sub>9</sub>, κλάσμα 101-125)



Το μόριο ανήκει στους γλυκοσίδες των φλαβονοειδών. Συ γκεκριμένα είναι γλυκοσίδης στη θέση 3 του σκελετού του φλαβονοειδούς. Η ταυτοποίηση του μορίου έγινε με τη φασματοσκοπική μελέτη (<sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, HMBC) και σύγκριση με τη βιβλιογραφία (Slimestad R. et al., 1995; Strack D. et al., 1989). Οι σημαντικότερες παρατηρήσεις που οδήγησαν στον προσδιορισμό της δομής του μορίου είναι:

**Στο φάσμα <sup>1</sup>H-NMR:**

- ✓ Η διπλή κορυφή στα 8.10 ppm που ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια και αντιστοιχεί στα αρωματικά πρωτόνια που βρίσκονται στις θέσεις 2', 6'.
- ✓ Η διπλή κορυφή στα 6.93 ppm που ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια και αντιστοιχεί στα αρωματικά πρωτόνια των θέσεων 3', 5'.
- ✓ Οι διπλές κορυφές στα 6.23 και 6.43 ppm που ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η καθεμία και αντιστοιχούν στα αρωματικά πρωτόνια των θέσεων 6, 8.

- ✓ Η διπλή κορυφή στα 5.29 ppm που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο ανωμερικό πρωτόνιο (H-1'') του σακχάρου.
- ✓ Τα υπόλοιπα πρωτόνια (H-2'', H -3'', H -4'', H -5'', H -6'') της γλυκόσης εμφανίζονται στην περιοχή 3.20-3.50 ppm.

**Στο φάσμα  $^{13}\text{C-NMR}$ :**

- ✓ Οι κορυφές των ανθράκων των τριών δακτυλίων του φλαβονοειδούς παρατηρούνται στην περιοχή 93.8-177.6 ppm.
- ✓ Ο ανωμερικός άνθρακας (C-1'') του σακχάρου συντονίζεται στα 100.1 ppm.
- ✓ Οι άνθρακες του σακχάρου συντονίζονται στην περιοχή 60.9-77.6 ppm.

**Στο φάσμα HMBC:**

- ✓ Το ανωμερικό πρωτόνιο του σακχάρου έχει σύζευξη με τον άνθρακα στη θέση 3 στα 133.3 ppm, γεγονός που αποδεικνύει ότι η σύνδεση του σακχάρου γίνεται στον άνθρακα C-3.

## **3.3) ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **3.3.1) ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΦΥΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ**

Η συλλογή των υπέργειων τμημάτων του φυτού *Dorycnium pentaphyllum* subsp. *herbaceum* πραγματοποιήθηκε τον Ιούνιο του 2000 στο βόρειο τμήμα του όρους Πίνδου, στην Ήπειρο. Ακολούθησε η διαλογή, η ξήρανση του φυτικού υλικού, η κονιοποίηση και η ζύγιση της σκόνης. Η ξηρή σκόνη ζύγιζε 505 g. Στη συνέχεια έγινε εκχύλιση της κονιοποιημένης σκόνης ως εξής: Πρώτα χρησιμοποιήθηκε CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x2L), μετά MeOH (4x2L) και τέλος H<sub>2</sub>O (3x2L). Τα μεσοδιαστήματα μεταξύ δύο διαδοχικών εκχυλίσεων ήταν δύο ημέρες. Τα εκχυλίσματα συμπυκνώθηκαν και υπολογίστηκε το βάρος τους:

- Εκχύλισμα CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: 9.7 g.
- Εκχύλισμα MeOH: 59.5 g.
- Εκχύλισμα H<sub>2</sub>O: 17 g.

Τα εκχυλίσματα ελέγχθησαν ποιοτικά με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC), με τη χρήση των διαλυτών Cyclohexane, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, MeOH και H<sub>2</sub>O, σε διάφορες αναλογίες:

**Έλεγχος διχλωρομεθανικού εκχυλίσματος:** Χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθοι διαλύτες σε διάφορες αναλογίες: Cyclohexane, Cyclohexane/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: 90/10, 80/20, 50/50, 40/60, 20/80, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH: 99/1, 98/2, 97/3, 95/5, 90/10, 85/15.

**Έλεγχος μεθανολικού εκχυλίσματος:** Χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθοι διαλύτες σε διάφορες αναλογίες: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH: 99/1, 98/2, 97/3, 95/5, 90/10, 85/15, 80/20, 70/30, 50/50, 30/70, 20/80. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας αντιστρόφου φάσης (RP-18), με συστήματα διαλυτών H<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>O/MeOH: 99/1, 95/5, 90/10, 85/15, 80/20 και 60/40.

**Έλεγχος υδατικού εκχυλίσματος:** Χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας αντιστρόφου φάσης (RP-18) με συστήματα διαλυτών  $H_2O$ ,  $H_2O/MeOH$ : 99/1, 95/5, 90/10, 80/20, 85/15, 60/40 και 50/50.

Στη συνέχεια, παρατηρήθηκαν τα χρωματογραφήματα σε λυχνία UV σε δύο μήκη κύματος (254 και 366 nm) και ψεκάστηκαν με διάλυμα θεικής βανιλλίνης.

Ακολούθησε προσεκτική εξέταση των χρωματογραφημάτων για να γίνει επιλογή του εκχυλίσματος που θα μελετηθεί ως προς τη χημική του σύσταση.

Με την πρώτη εκτίμηση το διχλωρομεθανικό εκχύλισμα περιείχε κυρίως:

- **Χλωροφύλλες**
- **Τερπενοειδή**
- **Λιπαρά οξέα**

Αντίστοιχα, η εξέταση των χρωματογραφημάτων του μεθανολικού εκχυλίσματος έδειξε την πιθανή παρουσία μορίων από τις παρακάτω κατηγορίες ουσιών:

- **Τερπενοειδή**
- **Φαινολικά παράγωγα (κυρίως φλαβονοειδή)**
- **Σάκχαρα**

Τέλος, η μελέτη του υδατικού εκχυλίσματος οδήγησε στο συμπέρασμα ότι περιέχονται σε μεγάλο ποσοστό σάκχαρα.

Μετά από τους παραπάνω χρωματογραφικούς ελέγχους αποφασίστηκε η μελέτη του μεθανολικού εκχυλίσματος, εξαιτίας της περιεκτικότητάς του σε φαινολικά παράγωγα. Όσον αφορά το μεθανολικό εκχύλισμα, υποβλήθηκε σε κατεργασία με ρητίνη XAD16. Συγκεκριμένα, μία ποσότητα από το μεθανολικό εκχύλισμα διαλύθηκε σε ορισμένο όγκο απιονισμένου  $H_2O$  (2 L), το διάλυμα που προέκυψε διηγήθηκε, διήλθε από στήλη με ρητίνη XAD16 (η μέθοδος περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο **1.2.1.δ)** και παραλήφθηκε το μεθανολικό κλάσμα (38 g) το οποίο μελετήθηκε στη συνέχεια. Αυτό έγινε για να αυξηθεί το ποσοστό των πολυφαινολών στο κλάσμα που θα εισερχόταν στους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς και για να

απομακρυνθούν τα σάκχαρα που θα δυσκόλευναν την απομόνωση των ουσιών . Η ανάλυση είχε ως αποτέλεσμα την **απομόνωση και ταυτοποίηση 14 δευτερογενών μεταβολιτών**.

### **3.3.2) ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΧΗΜΙΚΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΤΟΥ ΜΕΘΑΝΟΛΙΚΟΥ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΡΗΤΙΝΗ XAD16**

Η μελέτη του κατεργασμένου μεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων του φυτού *Dorycnium pentaphyllum* subsp. *herbaceum* περιλαμβάνει την απομόνωση ουσιών σε καθαρή μορφή με τη χρήση χρωματογραφικών μεθόδων και την ταυτοποίησή τους με φασματοσκοπικές τεχνικές. Σ' αυτήν την ενότητα περιγράφονται αναλυτικά οι πορείες απομόνωσης των **14 φυσικών προϊόντων** που βρέθηκαν κατά την εξέταση του κλάσματος και παρατίθενται πίνακες με τα φασματοσκοπικά τους δεδομένα.

#### **3.3.2.a) Στήλη Γ<sub>1</sub>**

**Διαχωριζόμενο μίγμα:** Μεθανολικό κλάσμα μετά από κατεργασία του μεθανολικού εκχυλίσματος με ρητίνη XAD16 (38 g).

**Στατική φάση:** Γέλη πυριτίου 60H.

**Κινητή φάση:** CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, MeOH σε αναλογίες αυξανόμενης πολικότητας.

Στην πρώτη στήλη χρησιμοποιήθηκαν 38 g από το σύνολο του μεθανολικού εκχυλίσματος. Η στήλη αυτή αποτελεί μία αρχική κλασμάτωση του εκχυλίσματος και πρόκειται για χρωματογραφία ανοικτής στήλης υπό κενό. Η χρωματογραφική μελέτη που πραγματοποιήθηκε μετά τις εκχυλίσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι το CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> και η MeOH ήταν οι κατάλληλοι διαλύτες για τον καλύτερο διαχωρισμό των ουσιών. Ακόμα, τα κλάσματα που ελήφθησαν είχαν όγκο 200 ml το καθένα. Η ακριβής πορεία που ακολουθήθηκε περιγράφεται στον Πίνακα 73. Στον πίνακα αυτό παρατίθενται οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν , τα 16 συνολικά κλάσματα που προέκυψαν από τη συνένωση των επιμέρους κλασμάτων και τα βάρη των συνενωθέντων κλασμάτων . Η συνένωση των κλασμάτων έγινε μετά από

χρωματογραφικό έλεγχο με TLC σε συστήματα διαλυτών  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  και  $\text{MeOH}$ , παρατήρηση σε λάμπα υπεριώδους (UV) και ψεκασμό με διάλυμα θεικής βανιλλίνης.

ΚΛΑΣΜΑΤΑ ΣΤΗΛΗΣ Γ <sub>1</sub>	ΔΙΑΛΥΤΕΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (% ΑΝΑΛΟΓΙΑ)	ΒΑΡΟΣ
<b>1-5</b>	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	<b>0.35 g</b>
<b>6-24</b>	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	<b>0.71 g</b>
<b>25-31</b>	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}: 99/1$	<b>0.80 g</b>
<b>32-50</b>	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}: 98/2$	<b>0.27 g</b>
<b>51-60</b>	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}: 97/3$	<b>0.19 g</b>
<b>61-65</b>	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}: 95/5$	<b>0.25 g</b>
<b>66-74</b>	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}: 93/7$	<b>0.92 g</b>
<b>75-80</b>	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}: 93/7$	<b>0.56 g</b>
<b>81-85</b>	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}: 90/10$	<b>0.50 g</b>
<b>86-89</b>	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}: 90/10$	<b>0.64 g</b>
<b>90-97</b>	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}: 85/15$	<b>1.10 g</b>
<b>98-104</b>	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}: 85/15$	<b>3.19 g</b>
<b>105-110</b>	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}: 80/20$	<b>1.75 g</b>
<b>111-120</b>	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}: 70/30$	<b>3.81 g</b>
<b>121-133</b>	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}: 50/50$	<b>8.40 g</b>
<b>134-150</b>	$\text{MeOH}$	<b>9.22 g</b>

Πίνακας 73. Στήλη Γ<sub>1</sub>.

Τα **16 συνενωθέντα κλάσματα** κωδικοποιήθηκαν ως εξής:

- |                        |                           |
|------------------------|---------------------------|
| Κλάσμα 1-5: <b>1</b>   | Κλάσμα 81-85: <b>9</b>    |
| Κλάσμα 6-24: <b>2</b>  | Κλάσμα 86-89: <b>10</b>   |
| Κλάσμα 25-31: <b>3</b> | Κλάσμα 90-97: <b>11</b>   |
| Κλάσμα 32-50: <b>4</b> | Κλάσμα 98-104: <b>12</b>  |
| Κλάσμα 51-60: <b>5</b> | Κλάσμα 105-110: <b>13</b> |
| Κλάσμα 61-65: <b>6</b> | Κλάσμα 111-120: <b>14</b> |
| Κλάσμα 66-74: <b>7</b> | Κλάσμα 121-133: <b>15</b> |
| Κλάσμα 75-80: <b>8</b> | Κλάσμα 134-150: <b>16</b> |

Στη συνέχεια έγινε χρωματογραφικός έλεγχος στα 16 κλάσματα με  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}: 93/7$ ,  $90/10$  και  $80/20$  σε TLC (υάλινες και πλάκες αλουμινίου) και ψεκασμός με διάλυμα θεικής βανιλλίνης. Μετά τη μελέτη των χρωματογραφημάτων, αποφασίστηκε η περαιτέρω μελέτη των **κλασμάτων 3** (25-31), **7** (66-74), **8** (75-80), **9** (81-85), **10** (86-89), **12** (98-104), **13** (105-110), και **15** (121-133), καθώς σ' αυτά υπήρχαν απορροφήσεις και χρώματα που παρέπεμπαν σε φαινολικά συστατικά κά και

τερπενοειδή. Πιο συγκεκριμένα, στο **κλάσμα 3** παρατηρήθηκαν άπολα συστατικά τα οποία μετά τον ψεκασμό έδιναν σκούρα χρώματα. Στα **κλάσματα 7, 8, 9 και 10**, διακρίνονταν απορροφήσεις στο UV και ψεκασμοί (κίτρινοι, κόκκινοι και κυανοί) που υποδήλωναν την παρουσία φλαβονοειδών, καθώς και άλλων φαινολικών ουσιών. Τέλος, στα **κλάσματα 12 και 13**, ο έλεγχος με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας έδειξε την ύπαρξη πολικών φλαβονοειδών (πιθανόν γλυκοσιδών φλαβονοειδών) αφού υπήρχαν έντονες απορροφήσεις στο UV και κίτρινα χρώματα μετά τον ψεκασμό με διάλυμα θεικής βανιλλίνης. Το είδος του χρωματογραφικού διαχωρισμού που ακολουθήθηκε ήταν συνάρτηση της πολικότητας του μίγματος, αλλά και της ποσότητάς του. Στις επόμενες ενότητες περιγράφεται αναλυτικά η διαδικασία διαχωρισμού και απομόνωσης 14 συνολικά φυσικών προϊόντων.

### 3.3.2.β) Στήλη Γ<sub>2</sub>

**Διαχωριζόμενο μίγμα:** **Κλάσμα 3 στήλης Γ<sub>1</sub>** (0.8 g).

**Στατική φάση:** Γέλη πυριτίου διαμέτρου 0.040-0.063 mm.

**Κινητή φάση :** Cyclohexane, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> και MeOH σε αναλογίες ανξανόμενης πολικότητας.

**Διάμετρος στήλης:** 2.2 cm.

Το **κλάσμα 3** είναι το πιο άπολο μίγμα που χρησιμοποιήθηκε προς διαχωρισμό. Γι' αυτό άλλωστε προστέθηκε στους διαλύτες έκλουστης και το Cyclohexane. Η πλήρης πορεία της στήλης υπάρχει στον Πίνακα 74.

ΚΛΑΣΜΑΤΑ ΣΤΗΛΗΣ Γ <sub>2</sub>	ΔΙΑΛΥΤΕΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (% ΑΝΑΛΟΓΙΑ)	ΒΑΡΟΣ
1-20	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : 70/30	10 mg
21-38	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : 60/40	16 mg
39-47	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : 50/50	12 mg
48-68	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : 40/60	36 mg
69-90	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : 30/70	30 mg
91-112	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : 20/80	47 mg
113-136	Cyclohexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : 10/90	33 mg
137-159	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	16 mg
160-183	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	25 mg
184-209	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 99.5/0.5	22 mg
210-220	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 99/1	33 mg
221-236	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 98/2	8 mg
237-246	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 97/3	36 mg

<b>247-260</b>	<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH: 95/5</b>	<b>35 mg</b>
<b>261-273</b>	<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH: 90/10</b>	<b>84 mg</b>
<b>274-300</b>	<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH: 50/50</b>	<b>98 mg</b>

Πίνακας 74. Στήλη Γ<sub>2</sub>.

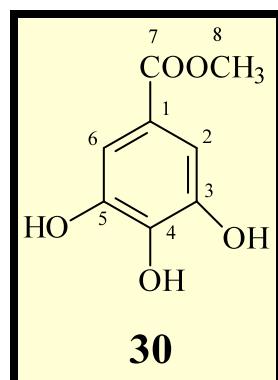
Εξετάστηκαν τα κλάσματα με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) και εξήχθησαν τα εξής συμπεράσματα:

➤ Το **κλάσμα 160-183** εμφάνιζε μία βασική κηλίδα, κατά τον χρωματογραφικό έλεγχο με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας η οποία δεν απορροφούσε στο ορατό και το υπεριώδες, αλλά παρουσίαζε σκούρο μπλε χρώμα μετά από ψεκασμό με διάλυμα θειικής βανιλλίνης. Μετά από φασματοσκοπική μελέτη με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού και με τη βοήθεια του φασματογράφου μάζας συνδεδεμένου με αέριο χρωματογραφία (GC-MS), αποδείχθηκε ότι η ουσία αυτή ήταν η **β-σιτοστερόλη**. Ο πίνακας με τις φασματοσκοπικές τιμές του μορίου υπάρχει στην παράγραφο 2.3.2.β.

➤ Το **κλάσμα 221-236** εμφάνιζε μία κηλίδα που απορροφούσε στο υπεριώδες και μετά από φασματοσκοπική μελέτη διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για τον **γαλλικό μεθυλεστέρα**.

Στην επόμενη παράγραφο παρατίθεται πίνακας με τα φασματοσκοπικά δεδομένα του γαλλικού μεθυλεστέρα.

### i.) Γαλλικός μεθυλεστέρας (30)



Ο μεθυλεστέρας του γαλλικού οξέος έχει μοριακό τύπο **C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>5</sub>** και μοριακό βάρος **184**.

Το μοριακό βάρος του μορίου πιστοποιήθηκε με τη μέθοδο του χημικού ιονισμού [CIMS, m/z: 185 ( $M+H$ )<sup>+</sup>]. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται αι συγκεντρωτικά οι τιμές δ των φασμάτων, οι σταθερές σύζευξης  $J$  και η πολλαπλότητα των κορυφών που εμφανίζονται στα φάσματα <sup>1</sup>H-NMR και <sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD) του γαλλικού μεθυλεστέρα.

Άτομο	$\delta$ <sup>13</sup> C σε ppm	$\delta$ <sup>1</sup> H σε ppm	$J$ σε Hz
1	121.0	-	...
2	110.0	7.10 s	...
3	147.0	-	...
4	139.0	-	...
5	147.0	-	...
6	110.0	7.10 s	...
7	169.0	-	...
8	53.0	3.80 s	...

Πίνακας 75. Φασματοσκοπικά δεδομένα <sup>1</sup>H-NMR και <sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD) του γαλλικού μεθυλεστέρα.

### 3.3.2.γ) Στήλη Γ<sub>3</sub>

**Διαχωριζόμενο μίγμα:** Κλάσματα Z, H, Θ, και I στήλης 1 (2.62 g).

**Στατική φάση:** Γέλη πυριτίου διαμέτρου 0.040-0.063 mm.

**Κινητή φάση:** CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH σε αναλογίες αυξανόμενης πολικότητας.

**Διάμετρος στήλης:** 3.5 cm.

Τα κλάσματα 7, 8, 9, και 10 της στήλης Γ<sub>1</sub> μετά τον έλεγχο με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας , έδειξαν πολλές ομοι ότητες στη σύστασή τους . Κατά τον χρωματογραφικό έλεγχο χρησιμοποιήθηκαν πολλά συστήματα διαλυτών , αλλά σαφή συμπεράσματα εξήχθησαν με το σύστημα CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH: 93/7. Σ' αντό το σύστημα ανάπτυξης παρατηρηθηκαν έντονες απορροφήσεις στο υπεριώδες (254 nm) και πολλοί χρωματισμοί των κηλίδων μετά τον ψεκασμό με διάλυμα θειικής βανιλίνης . Στα πολικά συστατικά ) υπήρχαν κίτρινες χρώσεις που υποδήλωναν την παρουσία φλαβονοειδών. Παρατηρώντας το άνω τμήμα της πλάκας TLC (άπολα συστατικά), έντονη ήταν η ύπαρξη κόκκινων κηλίδων, όπως και μωβ, κυανών και μπλε κηλίδων. Η

ομοιότητα των κλασμάτων ώθησε στην ένωσή τους και στην πραγματοποίηση μίας στήλης σ' όλο το συνενωμένο κλάσμα που ζύγιζε συνολικά 2.62 g. Η πορεία της στήλης αναφέρεται αναλυτικά στον Πίνακα 76.

ΚΛΑΣΜΑΤΑ ΣΤΗΛΗΣ Γ <sub>3</sub>	ΔΙΑΛΥΤΕΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (% ΑΝΑΛΟΓΙΑ)	ΒΑΡΟΣ
1-10	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	37 mg
11-16	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 99.7/0.3	28 mg
17-30	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 99.5/0.5	57 mg
31-45	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 99.2/0.8	64 mg
46-73	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 99/1	92 mg
74-95	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 98/2	86 mg
96-117	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 97/3	106 mg
118-150	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 96/4	127 mg
151-185	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 95/5	155 mg
186-207	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 93/7	100 mg
208-256	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 93/7	500 mg
257-274	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 92/8	135 mg
275-300	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 90/10	220 mg
301-330	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 88/12	115 mg
331-360	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 85/15	102 mg
361-380	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 80/20	102 mg
381-405	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 70/30	111 mg
406-420	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 50/50	131 mg
421-448	MeOH	136 mg

Πίνακας 76. Στήλη Γ<sub>3</sub>.

Από την παραπάνω στήλη , μετά από έλεγχο των κλασμάτων με TLC σε συστήματα ανάπτυξης αποτελούμενα από Cyclohexane/EtOAc: 80/20, EtOAc, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH: 98/2, 94/6, 90/10 επιλέχθηκαν τα **κλάσματα 208-256** και **275-300** για τη διενέργεια επιπλέον διαχωρισμών . Στο **κλάσμα 208-256** παρατηρήθηκαν πολλές

κηλίδες που απορροφούσαν στο υπεριώδες (254 nm) και χρωματίζονταν κίτρινα, μωβ, ιώδη και σκούρα μπλε μετά από ψεκασμό με διάλυμα θεικής βανιλλίνης. Στο **κλάσμα 275-300** επικρατούσαν κηλίδες που χρωματίζονταν κίτρινες με θεική βανιλλίνη καθώς και μία κηλίδα που χρωματίζόταν σκούρα κόκκινη.

### 3.3.2.δ) Στήλη $\Gamma_4$

**Διαχωριζόμενο μίγμα:** **Κλάσμα 208-256 στήλης  $\Gamma_3$  (0.5 g).**

**Στατική φάση:** Γέλη πυριτίου διαμέτρου 0.040-0.063 mm.

**Κινητή φάση:** Cyclohexane, EtOAc, MeOH σε αναλογίες αυξανόμενης πολικότητας.

**Διάμετρος στήλης:** 2.0 cm.

Στη **στήλη  $\Gamma_4$** , σκοπός ήταν η απομόνωση και ο προσδιορισμός της δομής των ουσιών που απορροφούσαν και χρωματίζονταν μωβ και ιώδες εις με διάλυμα θεικής βανιλλίνης σε ελέγχους με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας. Σίγουρα όμως δεν μπορούσε να παραβλεφθεί και η παρουσία ουσιών που απορροφούσαν και χρωματίζονταν κίτρινες με θεική βανιλλίνη οι οποίες πιθανόν ήταν φλαβονοειδή. Γενικά, ο έλεγχος με TLC έδειχνε ότι το κλάσμα αυτό ήταν πλούσιο σε μόρια. Μάλιστα η εικόνα του χρωματογραφήματος έδειχνε πιο ξεκάθαρη και σαφής όταν χρησιμοποιούταν ως διαλύτης ανάπτυξης ο EtOAc, παρά το μίγμα CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH. Αυτό ώθησε στη χρήση του EtOAc στη στήλη. Ως πιο άπολο διαλύτη χρησιμοποιήθηκε το Cyclohexane και για να αυξηθεί η πολικότητα του συστήματος έκλουσης χρησιμοποιήθηκε MeOH που έχει μεγαλύτερη πολικότητα από τον EtOAc. Στον Πίνακα 77 αναφέρονται λεπτομερώς τα κλάσματα που συλλέχθηκαν, τα βάρη τους και οι αντίστοιχες αναλογίες των συστημάτων διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν.

ΚΛΑΣΜΑΤΑ ΣΤΗΛΗΣ Γ <sub>4</sub>	ΔΙΑΛΥΤΕΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (% ΑΝΑΛΟΓΙΑ)	ΒΑΡΟΣ
1-9	Cyclohexane/EtOAc: 40/60	13 mg
10-12	Cyclohexane/EtOAc: 30/70	6 mg
13-25	Cyclohexane/EtOAc: 30/70	11 mg
26-51	Cyclohexane/EtOAc: 30/70	31 mg
52-73	Cyclohexane/EtOAc: 20/80	18 mg
74-81	Cyclohexane/EtOAc: 10/90	9 mg
82-93	EtOAc	25 mg
94-103	EtOAc	12 mg
104-107	EtOAc	20 mg
108-150	EtOAc	56 mg
151-157	EtOAc/MeOH: 99/1	11 mg
158-181	EtOAc/MeOH: 99/1	18 mg
182-210	EtOAc/MeOH: 98/2	23 mg
211-224	EtOAc/MeOH: 97/3	15 mg
225-250	EtOAc/MeOH: 97/3	27 mg
251-275	EtOAc/MeOH: 95/5	16 mg
276-300	EtOAc/MeOH: 90/10	22 mg
301-330	EtOAc/MeOH: 80/20	44 mg
331-350	EtOAc/MeOH: 70/30	22 mg
351-370	EtOAc/MeOH: 50/50	31 mg
371-400	MeOH	42 mg

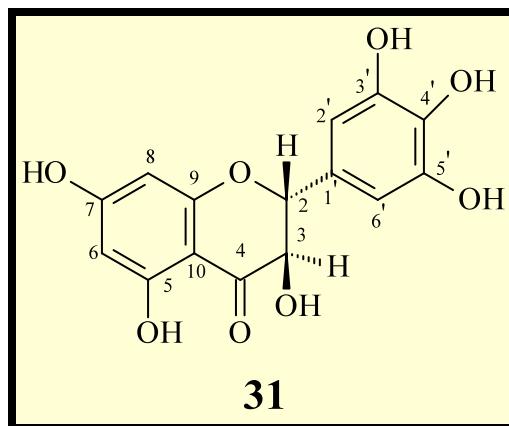
Πίνακας 77. Στήλη Γ<sub>4</sub>.

Τα κλάσματα υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, σε σύστημα ανάπτυξης EtOAc/MeOH: 98/2 και EtOAc/MeOH: 88/12, παρατήρηση στο UV και ψεκασμό με διάλυμα θεικής βανιλλίνης. Μετά από τους παραπάνω ελέγχους, εξήχθησαν τα εξής συμπεράσματα:

- Στο **κλάσμα 10-12** υπήρχε κηλίδα που απορροφούσε έντονα στο υπεριώδες και ήταν κόκκινη μετά από ψεκασμό με διάλυμα θεικής βανιλλίνης . Μετά από τη φασματοσκοπική μελέτη του μορίου αποδείχθηκε ότι είναι η (+)-**2,3-διυδρομυρικετίνη**.
- Στο **κλάσμα 26-51** παρατηρήθηκε κηλίδα που απορροφούσε στο UV και χρωματίζόταν κόκκινη μετά από ψεκασμό με διάλυμα θεικής βανιλλίνης . Ο φασματοσκοπικός έλεγχος της ουσίας οδήγησε στην ταυτοποίηση του μορίου, το οποίο ήταν ένα παράγωγο του φλαβανίου, η **(-)-κατεχίνη**.
- Στο **κλάσμα 82-93** δεν υπήρχε μόνο μία κηλίδα, αλλά φαίνονταν δύο κηλίδες που απορροφούσαν στο UV και μετά από ψεκασμό με διάλυμα θεικής βανιλλίνης χρωματίζονταν κίτρινες . Το κλάσμα αυτό υποβλήθηκε σε επιπλέον κατεργασίες και απομονώθηκε τελικά μία καθαρή ουσία (7 mg) που ταυτοποιήθηκε φασματοσκοπικά ως ο **καιμπφερολο-3-Ο-(6''-ακετυλο)-β-D-γλυκοπυρανοσίδης**.
- Στο **κλάσμα 104-107** εμφανιζόταν μία κηλίδα που είχε ένα πολύ έντονο κίτρινο χρώμα μετά από ψεκασμό με διάλυμα θεικής βανιλλίνης και δεν απορροφούσε στο UV. Μετά από τη φασματοσκοπική μελέτη του μορίου ταυτίστηκε με τον κυανιδρινικό γλυκοσίδη **λοταουστραλίνη**.
- Στο **κλάσμα 151-157** υπήρχε μία κηλίδα που απορροφούσε στο UV και χρωματίζόταν κυανή μετά από ψεκασμό με διάλυμα θεικής βανιλλίνης . Μετά από φασματοσκοπική μελέτη αποδείχθηκε ότι το μόριο αυτό είναι η **4-(4'-Ο-β-D-γλυκοπυρανοσυλ-φαινυλ)-2-βουτανόνη** που ανήκει στους γλυκοσίδες των φαινυλοβουτανονών.
- Στο **κλάσμα 211-224** υπάρχει μία κηλίδα με τα χαρακτηριστικά αυτής που αναφέρθηκε προηγούμενα. Με τη βοήθεια φασματοσκοπικών μεθόδων προσδιορίστηκε ως η **4-(4'-Ο-β-D-γλυκοπυρανοσυλ-3'-μεθοξφαινυλ)-2-βουτανόνη**.
- Στο **κλάσμα 225-250** παρατηρήθηκαν α ρκετές κηλίδες και γι ' αυτό έγινε παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας για την απομόνωση καθαρού προιόντος. Τελικά , απομονώθηκε μία ουσία (5 mg) που απορροφούσε στο UV και χρωματίζόταν μωβ μετά από ψεκασμό με διάλυμα θεικής βανιλλίνης . Μετά από τη φασματοσκοπική μελέτη του μορίου διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για ένα **νέο φυσικό προϊόν**, την **4-(4'-Ο-β-D-γλυκοπυρανοσυλ-3',5'-διμεθοξφαινυλ)-2-βουτανόνη**, για το οποίο προτείναμε το κοινό όνομα **δορυκνιοσίδης**.

Στις ακόλουθες παραγράφους περιγράφονται αναλυτικά τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά όλων των προαναφερθέντων μορίων, ενώ υπάρχει και πλήρης αναφορά στους επιπλέον διαχωρισμούς που έγιναν στα **κλάσματα 82-93** και **225-250**.

i.) (+)-2,3-Διυδρομυρικετίνη (31)



H (+)-2,3-διυδρομυρικετίνη έχει μοριακό τύπο **C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>O<sub>8</sub>** και μοριακό βάρος **320**.

Στους Πίνακες **78, 79** αναφέρονται αναλυτικά οι τιμές δ των φασμάτων, οι σταθερές σύζευξης *J* και η πολλαπλότητα των κορυφών στα φάσματα <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD), <sup>13</sup>C-NMR (DMSO) και <sup>1</sup>H-NMR (DMSO) του μορίου. Το μοριακό βάρος του μορίου πιστοποιήθηκε με τη μέθοδο του χημικού ιονισμού [CIMS, m/z: 321 (M+H)<sup>+</sup>], ενώ μετρήθηκε και η στροφική ικανότητά του. Η ακριβής τιμή σε θερμοκρασία 20 °C, διαλύτη MeOH και με συγκέντρωση του διαλύματος 2.7 g/100ml ήταν [α]<sup>20</sup> = + 15.5<sup>0</sup>.

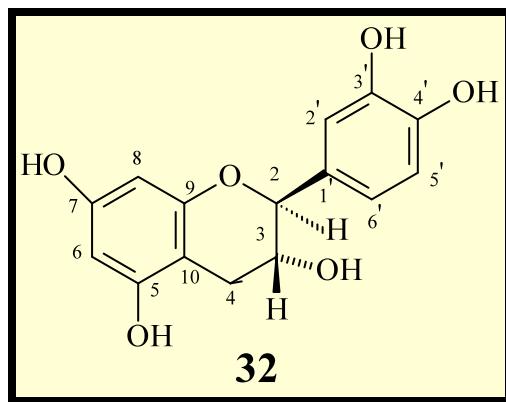
Άτομο	<i>δ</i> <sup>1</sup> H σε ppm	<i>J</i> σε Hz
<b>2</b>	<b>4.85 d</b>	<b>11.4</b>
<b>3</b>	<b>4.45 d</b>	<b>11.4</b>
<b>6</b>	<b>5.89 d</b>	<b>2.2</b>
<b>8</b>	<b>5.86 d</b>	<b>2.2</b>
<b>2'</b>	<b>6.53 s</b>	...
<b>6'</b>	<b>6.53 s</b>	...

Πίνακας 78. Φασματοσκοπικά δεδομένα <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD) της (+)-2,3-διυδρομυρικετίνης.

Άτομο	$\delta^{13}\text{C}$ σε ppm	$\delta^1\text{H}$ σε ppm	$J$ σε Hz
2	83.2	4.90 <i>d</i>	10.5
3	71.6	4.38 <i>d</i>	10.5
4	197.2	-	...
5	163.2		...
6	95.9	5.89 <i>d</i>	1.6
7	166.7	-	...
8	94.9	5.85 <i>d</i>	1.6
9	162.4	-	...
10	100.4	-	...
1'	127.1	-	...
2'	106.9	6.40 <i>s</i>	...
3'	145.6	-	...
4'	133.4	-	...
5'	145.6	-	...
6'	106.9	6.40 <i>s</i>	...

Πίνακας 79. Φασματοσκοπικά δεδομένα  $^1\text{H-NMR}$  και  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO) της (+)-2,3-διυδρομυρικετίνης.

## ii.) (-)-Κατεχίνη (32)



Η κατεχίνη έχει μοριακό τύπο  $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$  μοριακό βάρος 290.

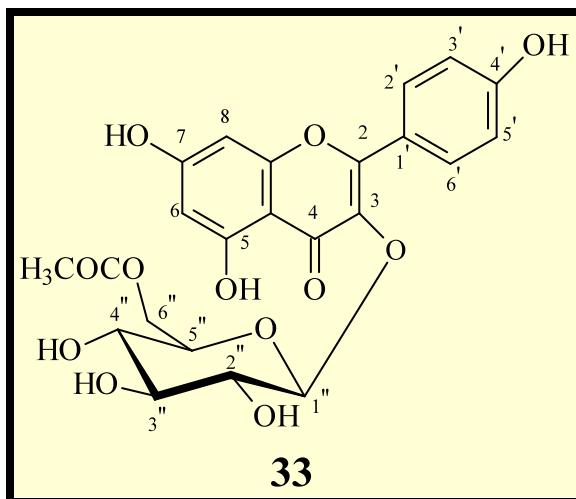
Ο Πίνακας 80 περιέχει τις τιμές  $\delta$  των φασμάτων, τις σταθερές σύζευξης  $J$  και την πολλαπλότητα των κορυφών στα φάσματα  $^1\text{H-NMR}$  και  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) του μορίου. Το μοριακό βάρος του μορίου πιστοποιήθηκε με τη μέθοδο του χημικού ιονισμού [CIMS, m/z: 291 ( $\text{M}+\text{H}^+$ )], ενώ μετρήθηκε και η στροφική ικανότητά του. Η ακριβής τιμή σε θερμοκρασία  $20\ ^\circ\text{C}$ , διαλύτη  $\text{MeOH}$  και με συγκέντρωση του διαλύματος  $0.22\ \text{g}/100\text{ml}$  ήταν  $[\alpha]^{20} = -4.54^0$ .

Άτομο	$\delta\ ^{13}\text{C}$ σε ppm	$\delta\ ^1\text{H}$ σε ppm	$J$ σε Hz
2	<b>83.1</b>	<b>4.66 d</b>	<b>7.5</b>
3	<b>69.1</b>	<b>4.07 m</b>	...
4	<b>28.7</b>	<b><math>4_{\text{ax}}: 2.94\ dd</math></b> <b><math>4_{\text{eq}}: 2.60\ dd</math></b>	<b>5.4, 16.1</b> <b>8.1, 16.1</b>
5	<b>157.8</b>	-	...
6	<b>96.6</b>	<b>6.03 d</b>	<b>2.2</b>
7	<b>158.1</b>	-	...
8	<b>95.8</b>	<b>5.96 d</b>	<b>2.2</b>
9	<b>157.2</b>	-	...
10	<b>101.1</b>	-	...
1'	<b>132.5</b>	-	...
2'	<b>115.5</b>	<b>6.93 d</b>	<b>1.6</b>
3'	<b>146.5</b>	-	...
4'	<b>146.5</b>	-	...
5'	<b>116.4</b>	<b>6.80-6.88 m</b>	...
6'	<b>120.3</b>	<b>6.80-6.88 m</b>	...

Πίνακας 80. Φασματοσκοπικά δεδομένα  $^1\text{H-NMR}$  και  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) της (-)-κατεχίνης.

### iii.) Καιμπερολο-3-O-(6''-ακετυλο)- $\beta$ -D-γλυκοπυρανοσίδης (33)

Όπως αναφέ ρθηκε και προηγούμενα , ο καιμπφ ερολο-3-O-(6''-ακετυλο)- $\beta$ -D-γλυκοπυρανοσίδης δεν απομονώθηκε σε καθαρή μορφή από τη **στήλη Γ4**. Χρειάστηκε να γίνει παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδ ας στο **κλάσμα 82-93** της **στήλης Γ4**. Χρησιμοποιήθηκε υάλινη πλάκα με επίστρωση πυριτίου και ως σύστημα ανάπτυξης διαλυτών το μίγμα CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH: 90/10. Επελέγη αυτό το σύστημα διαλυτών γιατί σε έλεγχο με TLC που έγινε στο κλάσμα διαπιστώθηκε ότι στην αναλογία αυτή χώριζαν καλύτερα οι ζώνες του χρωματογραφήματος. Τελικά μ' αυτόν τον τρόπο απομονώθηκε ο καιμφέρολο-3-O-(6''-ακετυλο)- $\beta$ -D-γλυκοπυρανοσίδης που αποτελούσε την άνω ζώνη στην πλάκα TLC.



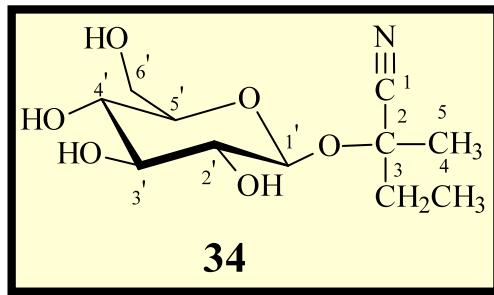
Ο καιμπερολο-3-O-(6''-ακετυλο)- $\beta$ -D-γλυκοπυρανοσίδης έχει μοριακό τύπο **C<sub>23</sub>H<sub>22</sub>O<sub>12</sub>** και μοριακό βάρος **490**.

Στον Πίνακα **81** παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι τιμές δ των φασμάτων, οι σταθερές σύζευξης *J* και η πολλαπλότητα των κορυφών στα φάσματα <sup>1</sup>H-NMR και <sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD) του μορίου. Το μοριακό βάρος του μορίου πιστοποιήθηκε με τη μέθοδο του χημικού ιονισμού [CIMS, m/z: 491 (M+H)<sup>+</sup>].

Άτομο	$\delta^{13}\text{C}$ σε ppm	$\delta^1\text{H}$ σε ppm	$J$ σε Hz
2	158.6	-	...
3	135.3	-	...
4	179.3	-	...
5	163.0	-	...
6	100.3	6.28 <i>d</i>	1.8
7	167.0	-	...
8	95.0	6.47 <i>d</i>	1.8
9	159.3	-	...
10	105.3	-	...
1'	122.7	-	...
2'	132.3	8.11 <i>d</i>	8.9
3'	116.0	6.94 <i>d</i>	8.5
4'	161.6	-	...
5'	116.0	6.94 <i>d</i>	8.5
6'	132.3	8.11 <i>d</i>	8.9
1''	104.4	5.24 <i>d</i>	7.2
2''	75.7	3.18-3.46 <i>m</i>	...
3''	77.9	3.18-3.46 <i>m</i>	...
4''	71.3	3.18-3.46 <i>m</i>	...
5''	75.5	3.18-3.46 <i>m</i>	...
6''	64.3	$6''_a$ : 4.26 <i>dd</i>	9.7
		$6''_b$ : 4.15 <i>dd</i>	9.7
CH <sub>3</sub>	20.5	1.92 <i>s</i>	...

Πίνακας 81. Φασματοσκοπικά δεδομένα  $^1\text{H-NMR}$  και  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) του καιμπερολο-3-O-(6''-ακετυλο)- $\beta$ -D-γλυκοπυρανοσίδη.

iv.) Λοταουστραλίνη (34)



Η λοταουστραλίνη έχει μοριακό τύπο **C<sub>11</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>6</sub>** και μοριακό βάρος **261**.

Στον Πίνακα **82** υπάρχουν οι τιμές δ των φασμάτων, οι σταθερές σύζευξης *J* και η πολλαπλότητα των κορυφών στα φάσματα <sup>1</sup>H-NMR και <sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD) του μορίου. Το μοριακό βάρος του μορίου πιστοποιήθηκε με τη μέθοδο του χημικού ιονισμού [CIMS, m/z: 262 (M+H)<sup>+</sup>].

Άτομο	$\delta$ <sup>13</sup> C σε ppm	$\delta$ <sup>1</sup> H σε ppm	<i>J</i> σε Hz
<b>1</b>	<b>121.1</b>	-	...
<b>2</b>	<b>78.0</b>	-	...
<b>3</b>	<b>34.7</b>	<b>1.89 m</b>	...
<b>4</b>	<b>8.8</b>	<b>1.08 t</b>	<b>7.4</b>
<b>5</b>	<b>24.6</b>	<b>1.63 s</b>	...
<b>1'</b>	<b>101.6</b>	<b>4.61 d</b>	<b>7.7</b>
<b>2'</b>	<b>74.8</b>	<b>3.18-3.41 m</b>	...
<b>3'</b>	<b>77.9</b>	<b>3.18-3.31 m</b>	...
<b>4'</b>	<b>71.3</b>	<b>3.18-3.41 m</b>	...
<b>5'</b>	<b>77.8</b>	<b>3.18-3.41m</b>	...
<b>6'</b>	<b>62.5</b>	<b>6''<sub>a</sub>: 3.81 m</b> <b>6''<sub>b</sub>: 3.66 m</b>	...

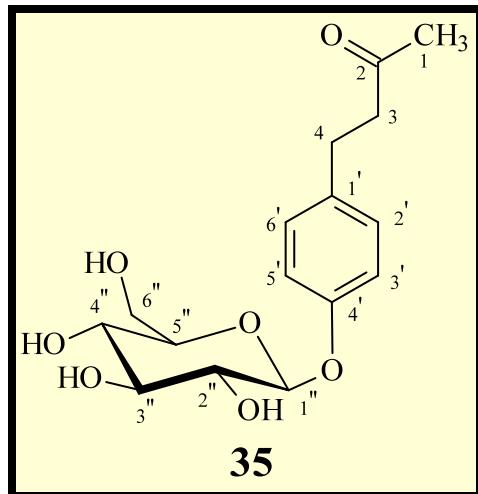
Πίνακας **82**. Φασματοσκοπικά δεδομένα <sup>1</sup>H-NMR και <sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD) της λοταουστραλίνης.

Εκτός από τα παραπάνω στοιχεία, στην ταυτοποίηση της λοταουστραλίνης οδήγησε το φάσμα <sup>13</sup>C-NMR (D<sub>2</sub>O) και η σύγκρισή του με τα αντίστοιχα βιβλιογραφικά στοιχεία (Smith R.C. *et al.*, 1980) το οποίο αναφέρεται αναλυτικά στον Πίνακα **83**.

Άτομο	$\delta^{13}\text{C}$ σε ppm
<b>1</b>	<b>123.9</b>
<b>2</b>	<b>78.6</b>
<b>3</b>	<b>35.7</b>
<b>4</b>	<b>10.6</b>
<b>5</b>	<b>25.9</b>
<b>1'</b>	<b>101.4</b>
<b>2'</b>	<b>75.6</b>
<b>3'</b>	<b>78.9</b>
<b>4'</b>	<b>72.3</b>
<b>5'</b>	<b>78.4</b>
<b>6'</b>	<b>63.4</b>

Πίνακας 83. Φασματοσκοπικά δεδομένα  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ ) της λοταουστραλίνης.

v.) **4-(4'-O- $\beta$ -D-γλυκοπυρανοσυλ-φαινυλ)-2-βουτανόνη (35)**



Η 4-(4'-O- $\beta$ -D-γλυκοπυρανοσυλ-φαινυλ)-2-βουτανόνη έχει μοριακό τύπο  $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_7$  και μοριακό βάρος 326.

Στον Πίνακα 84 αναφέρονται οι τιμές  $\delta$  των φασμάτων, οι σταθερές σύζευξης  $J$  και η πολλαπλότητα των κορυφών στα φάσματα  $^1\text{H}$ -NMR και  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) του

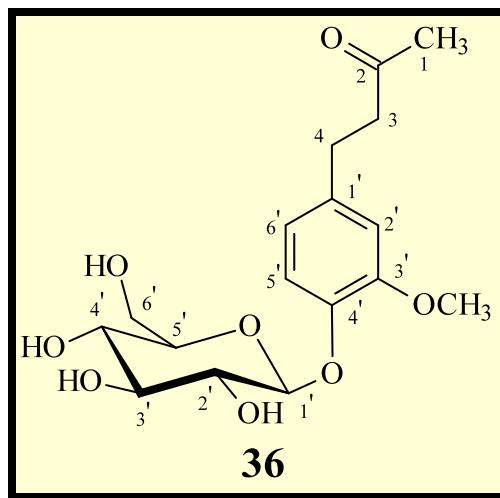
μορίου. Το μοριακό βάρος του μορίου πιστοποιήθηκε με τη μέθοδο του χημικού ιονισμού [CIMS, m/z: 327 ( $M+H$ )<sup>+</sup>].

Άτομο	$\delta^{13}\text{C}$ σε ppm	$\delta^1\text{H}$ σε ppm	$J$ σε Hz
1	30.7	2.09 s	...
2	211.9	-	...
3	30.7	2.76 m	...
4	46.7	2.76 m	...
1'	137.1	-	...
2'	131.0	7.10 d	8.5
3'	118.6	7.00 d	8.5
4'	158.1	-	...
5'	118.6	7.00 d	8.5
6'	131.0	7.10 d	8.5
1''	103.1	4.85 d	7.8
2''	75.6	3.20-3.65 m	...
3''	78.7	3.20-3.65 m	...
4''	72.1	3.20-3.65 m	...
5''	78.6	3.20-3.65 m	...
6''	63.2	$6''_a$ : 3.88 dd $6''_b$ : 3.70 dd	12.0, 4.0 12.0, 2.2

Πίνακας 84. Φασματοσκοπικά δεδομένα  $^1\text{H-NMR}$  και  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) του 4-(4'-Ο-β-D-

γλυκοπυρανοσυλ-φαινυλ)-2-βουτανόνης.

vi.) 4-(4'-O- $\beta$ -D-γλυκοπυρανοσυλ-3'-μεθοξυφαινυλ)-2-βουτανόνη (36)



Η 4-(4'-O- $\beta$ -D-γλυκοπυρανοσυλ-3'-μεθοξυφαινυλ)-2-βουτανόνη έχει μοριακό τύπο  $C_{17}H_{24}O_8$  και μοριακό βάρος 356.

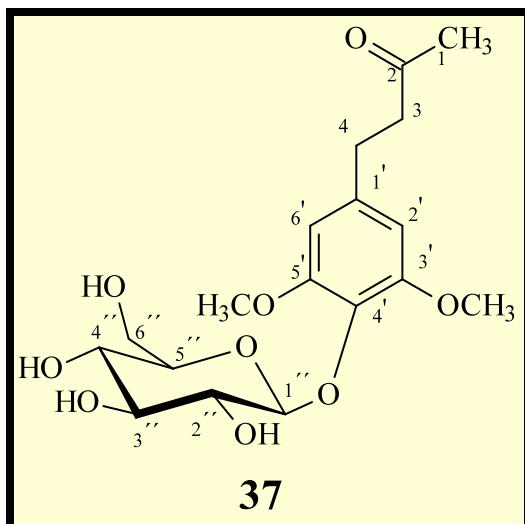
Ο Πίνακας 85 περιέχει τις τιμές δ των φασμάτων, τις σταθερές σύζευξης  $J$  και την πολλαπλότητα των κορυφών στα φάσματα  $^1H$ -NMR και  $^{13}C$ -NMR ( $CD_3OD$ ) του μορίου. Το μοριακό βάρος του μορίου πιστοποιήθηκε με τη μέθοδο του χημικού ιονισμού [CIMS, m/z: 357 ( $M+H$ ) $^+$ ].

Ατομο	$\delta^{13}C$ σε ppm	$\delta^1H$ σε ppm	$J$ σε Hz
1	30.4	1.95 s	...
2	211.4	-	...
3	46.4	2.65 br s	...
4	30.9	2.65 br s	...
1'	138.0	-	...
2'	114.5	6.70 d	1.6
3'	151.2	-	...
4'	146.8	-	...
5'	116.8	6.90 d	8.4
6'	122.2	6.55 dd	8.4, 1.6
1''	103.5	4.67 d	7.7

<b>2''</b>	<b>75.4</b>	<b>3.20-3.35 m</b>	...
<b>3''</b>	<b>78.6</b>	<b>3.20-3.35m</b>	...
<b>4''</b>	<b>71.8</b>	<b>3.20-3.35 m</b>	...
<b>5''</b>	<b>78.3</b>	<b>3.20-3.35 m</b>	...
<b>6''</b>	<b>63.0</b>	<b>6''<sub>a</sub>: 3.70 m 6''<sub>b</sub>: 3.50 m</b>	...
<b>3'-OCH<sub>3</sub></b>	<b>57.2</b>	<b>3.67 s</b>	...

Πίνακας 85. Φασματοσκοπικά δεδομένα <sup>1</sup>H-NMR και <sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD) της 4-(4'-O-β-D-γλυκοπυρανοσυλ-3'-μεθοξυφαινυλ)-2-βουτανόνης.

### vii.) Δορυκνιοσίδης (37)



Ο δορυκνιοσίδης έχει χημικό τύπο C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>O<sub>9</sub> και μοριακό βάρος 386 και είναι λευκό άμορφο στερεό.

Η απομόνωση του μορίου δεν έγινε απευθείας από τη στήλη Γ<sub>4</sub>, αλλά χρησιμοποιήθηκε και παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας. Συγκεκριμένα, στο κλάσμα 225-250 της στήλης Γ<sub>4</sub> έγινε παρασκευαστική TLC, σε υάλινη πλάκα επιστρωμένη με πυρίτιο και σύστημα διαλυτών ανάπτυξης EtOAc/MeOH: 88/12. Το συγκεκριμένο σύστημα ανάπτυξης επελέγη μετά από χρωματογραφικό έλεγχο του κλάσματος 225-250, σε διάφορα συστήματα διαλυτών όπου διαπιστώθηκε ότι μ' αυτό επιτυγχανόταν ο καλύτερος διαχωρισμός. Στην TLC ο

δορυκνιοσίδης αποτελούσε την κάτωτερη ζώνη (πιο πολική) του χρωματογραφήματος που απορροφούσε στο UV και χρωματίζόταν σκούρα κόκκινη μετά από ψεκασμό με διάλυμα θεικής βανιλλίνης.

Η δομή του μορίου πιστοποιήθηκε με τη μέθοδο του χημικού ιονισμού [CIMS, m/z: 387 ( $M+H$ )<sup>+</sup>], τη μέθοδο υψηλής ανάλυσης [HRMS, m/z: 386.1650 ( $M$ )<sup>+</sup>, (υπολογίστηκε για τον μοριακό τύπο  $C_{18}H_{26}O_9$ : 386)] και τη μέθοδο του ηλεκτροψεκασμού (ES) όπου το ιόν  $M+Na^+$  υπολογίστηκε ίσο με 409. Μελετήθηκε επίσης το φάσμα UV όπου παρατηρήθηκαν απορροφήσεις σε μήκη κύματος 256.0 nm και 273.5 nm που είναι χαρακτηριστικές του φαινολικού δακτυλίου και το φάσμα IR όπου εμφανίστηκαν μέγιστα απορρόφησης στα 1710  $\text{cm}^{-1}$  που αντιστοιχεί σε απορρόφηση καρβονυλίου (C=O) και αποδίδεται στην καρβονυλομάδα της θέσης 2 και στα 1660  $\text{cm}^{-1}$  που αντιστοιχεί σε απορρόφηση δεσμού άνθρακα-άνθρακα (C=C) και αποδίδεται στους διπλούς δεσμούς του αρωματικού δακτυλίου.

Ακόμα, μετρήθηκε και η στροφική ικανότητά του. Η ακριβής τιμή σε θερμοκρασία  $25^0\text{C}$ , διαλύτη MeOH και με συγκέντρωση του διαλύματος 0.05 g/100ml ήταν  $[\alpha]^{25} = -40.0^0$ . Επιπρόσθετα, η απόλυτη στερεοχημεία του σακχάρου διαπιστώθηκε με ενζυματική υδρόλυση με  $\beta$ -D-γλυκοσιδάση οπότε διασπάστηκε το μόριο σε μίγμα σακχάρου-γενίνης, όπως διαπιστώθηκε μετά από έλεγχο με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας. Το γεγονός ότι το ένζυμο  $\beta$ -D-γλυκοσιδάση διασπούσε το μόριο απεδείκνυε ότι το σάκχαρο είναι η  $\beta$ -D-γλυκόση. Σε αντίθετη περίπτωση δεν θα μπορούσε να διασπαστεί το μόριο και στην TLC θα παρατηρούταν μία μόνο κηλίδα. Στον Πίνακα 86 αναφέρονται οι τιμές δ των φασμάτων, οι σταθερές σύζευξης  $J$  και η πολλαπλότητα των κορυφών στα φάσματα  $^{13}\text{C-NMR}$  και  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) του μορίου.

Άτομο	$\delta^{13}\text{C}$ σε ppm	$\delta^1\text{H}$ σε ppm	$J$ σε Hz
1	30.6	2.13 s	...
2	210.9	-	...
3	45.5	2.80 br s	...
4	30.7	2.80 br s	...
1'	110.1	-	
2'	107.0	6.54 s	...
3'	154.6	-	
4'	134.6	-	
5'	154.6	-	
6'	107.0	6.54 s	...
1''	105.2	4.79 d	7.1
2''	75.4	3.38-3.46 m	...
3''	78.0	3.38-3.46 m	...
4''	71.0	3.38-3.46 m	...
5''	77.4	3.18 m	...
6''	62.3	$6''_a$ : 3.78 dd $6''_b$ : 3.65 dd	12.0, 2.5 12.0, 5.4
3'-OCH <sub>3</sub>	56.7	3.82 s	...
5'-OCH <sub>3</sub>	56.7	3.82 s	...

Πίνακας 86. Φασματοσκοπικά δεδομένα  $^1\text{H-NMR}$  και  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) του δορυκνιοσίδη.

### 3.3.2.e) Στήλη Γ<sub>5</sub>

**Διαχωριζόμενο μίγμα:** Κλάσμα 275-300 στήλης Γ<sub>3</sub> (0.22 g).

**Στατική φάση:** Γέλη πυριτίου διαμέτρου 0.040-0.063 mm.

**Κινητή φάση:** Cyclohexane, EtOAc, MeOH σε αναλογίες αυξανόμενης πολικότητας.

**Διάμετρος στήλης:** 1.5 cm.

Κατά τον χρωματογραφικό έλεγχο με TLC, παρατηρήθηκε μία κη λίδα που απορροφούσε στο UV και χρωματιζόταν σκούρα κόκκινη μετά από ψεκασμό με διάλυμα θεικής βανιλλίνης. Μαζί με αυτήν την κηλίδα διακρίνονταν κηλίδες που

εμφάνιζαν τα χρωματογραφικά χαρακτηριστικά των φλαβονοειδών (απορρόφηση στο UV και κίτρινο χρώμα μετά από ψεκασμό με διάλυμα θεικής βανιλλίνης). Η πλήρης πορεία της στήλης παρουσιάζεται στον Πίνακα 87.

ΚΛΑΣΜΑΤΑ ΣΤΗΛΗΣ Γ <sub>5</sub>	ΔΙΑΛΥΤΕΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (% ΑΝΑΛΟΓΙΑ)	ΒΑΡΟΣ
1-8	Cyclohexane/EtOAc: 40/60	9 mg
9-26	Cyclohexane/EtOAc: 30/70	7 mg
27-40	Cyclohexane/EtOAc: 20/80	7 mg
41-50	Cyclohexane/EtOAc: 10/90	10 mg
51-60	Cyclohexane/EtOAc: 10/90	8 mg
61-76	Cyclohexane/EtOAc: 10/90	12 mg
77-90	EtOAc	13 mg
91-110	EtOAc/MeOH: 99/1/	15 mg
111-150	EtOAc/ MeOH: 98/2	13 mg
151-162	EtOAc/MeOH: 97/3	12 mg
163-182	EtOAc/MeOH: 95/5	20 mg
183-193	EtOAc/MeOH: 90/10	11 mg
194-212	EtOAc/MeOH: 85/15	17 mg
213-230	EtOAc/MeOH: 80/20	18 mg
231-250	EtOAc/MeOH: 50/50	16 mg
251-275	MeOH	22 mg

Πίνακας 87. Στήλη Γ<sub>5</sub>.

Με τον χρωματογραφικό έλεγχο της στήλης διαπιστώθηκαν τα εξής:

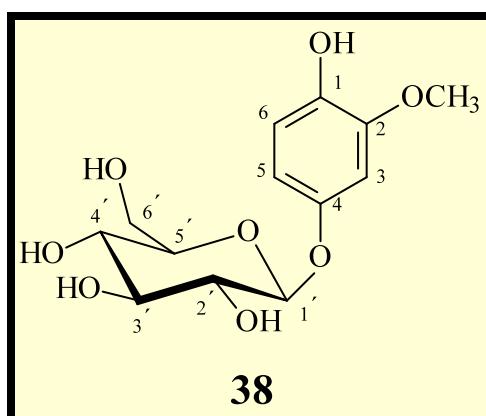
- Στο **κλάσμα 27-40** υπήρχε κηλίδα που απορροφούσε στο UV και χρωματίζόταν κόκκινη μετά από ψεκασμό με διάλυμα θεικής βανιλλίνης. Μετά από συγχρωματογράφηση με **κατεχίνη** διαπιστώθηκε ότι είχαν όμοια εικόνα στην TLC ( $R_F$ , χρώμα και απορρόφηση στο UV), κάτι που πιστοποιήθηκε με τη μελέτη του φάσματος  $^1\text{H-NMR}$  του **κλάσματος 27-40**.
- Στο **κλάσμα 91-110** παρατηρήσαμε μία κηλίδα που απορροφούσε στο UV και μετά από ψεκασμό με διάλυμα θεικής βανιλλίνης χρωματίζόταν κίτρινη. Μετά από

λήψη φάσματος  $^1\text{H-NMR}$  αποδείχθηκε ότι το μόριο αυτό ήταν ο **καιμπερολο-3-O-(6''-ακετυλο)- $\beta$ -D-γλυκοπυρανοσίδης** που είχε ήδη απομονωθεί στη **στήλη Γ<sub>4</sub>**.

➤ Στο **κλάσμα 163-182** ήταν έντονη η παρουσία μίας κηλίδας που απορροφούσε στο UV και μετά από ψεκασμό με διάλυμα θεικής βανιλλίνης χρωματίζόταν κόκκινη. Ωστόσο, στο κλάσμα υπήρχαν κι άλλες ουσίες οπότε ήταν αναγκαία η πραγματοποίηση μίας παρασκευαστικής χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας. Τελικά απομονώθηκε μία καθαρή ουσία που μετά τη φασματοσκοπική ταυτοποιήθηκε ως ο φαινολικός γλυκοσίδης **ταχιοσίδης (4- $\beta$ -D-γλυκοπυρανοσίδης της 2-μεθοξυδροκινόνης)**.

Στην επόμενη παράγραφο περιγράφεται η απομόνωση και τα φασματοσκοπικά δεδομένα του **ταχιοσίδη**.

### i.) Ταχιοσίδης (38)



Ο ταχιοσίδης έχει μοριακό τύπο **C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>O<sub>8</sub>** και μοριακό βάρος **302**.

Η απομόνωση του μορίου δεν έγινε απευθείας από τη **στήλη Γ<sub>5</sub>**, αλλά χρησιμοποιήθηκε και παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας. Συγκεκριμένα, στο **κλάσμα 163-182** της **στήλης Γ<sub>5</sub>** έγινε παρασκευαστική TLC, σε υάλινη πλάκα επιστρωμένη με πυρίτιο και σ ύστημα διαλυτών ανάπτυξης CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH: 85/15. Στην TLC ο ταχιοσίδης (3 mg) αποτελούσε την κατώτερη ζώνη (πιο πολική) του χρωματογράφηματος που απορροφούσε στο UV και χρωματίζόταν κόκκινη μετά από ψεκασμό με διάλυμα θεικής βανιλλίνης.

Το μοριακό βάρος το ν μορίου πιστοποιήθηκε με τη μέθοδο του χημικού ιονισμού [CIMS, m/z: 303 ( $M+H$ )<sup>+</sup>].

Στον Πίνακα 88 υπάρχουν συγκεντρωμένα οι τιμές  $\delta$  των φασμάτων, οι σταθερές σύζευξης  $J$  και η πολλαπλότητα των κορυφών στα φάσματα  $^1\text{H-NMR}$  και  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) του ταχιοσίδη:

Άτομο	$\delta$ $^{13}\text{C}$ σε ppm	$\delta$ $^1\text{H}$ σε ppm	$J$ σε Hz
1	141.1	-	...
2	152.0	-	...
3	104.4	6.82 d	2.2
4	155.0	-	...
5	107.6	6.51 dd	8.1, 2.2
6	120.6	6.73 d	8.1
1'	101.9	4.76 d	7.3
2'	75.0	3.35-3.63 m	...
3'	78.2	3.35-3.63 m	...
4'	71.4	3.35-3.63 m	...
5'	78.1	3.35-3.63 m	...
6'	62.6	$6''_a$ : 3.71 m $6''_b$ : 3.66 m	...
2-OCH <sub>3</sub>	56.6	3.84 s	...

Πίνακας 88. Φασματοσκοπικά δεδομένα  $^1\text{H-NMR}$  και  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) του ταχιοσίδη.

Στον Πίνακα 89 αναφέρονται οι τιμές  $\delta$  των φασμάτων, οι σταθερές σύζευξης  $J$  και η πολλαπλότητα των κορυφών στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) του ταχιοσίδη.

Άτομο	$\delta$ $^1\text{H}$ σε ppm	$J$ σε Hz
-------	------------------------------	-----------

<b>1</b>	-	...
<b>2</b>	-	...
<b>3</b>	<b>7.16 d</b>	<b>2.5</b>
<b>4</b>	-	...
<b>5</b>	<b>7.05 dd</b>	<b>8.0, 2.5</b>
<b>6</b>	<b>7.15 d</b>	<b>8.1</b>
<b>1'</b>	<b>5.55 d</b>	<b>7.0</b>
<b>2'</b>	<b>4.45-4.29 m</b>	...
<b>3'</b>	<b>4.45-4.29 m</b>	...
<b>4'</b>	<b>4.45-4.29 m</b>	...
<b>5'</b>	<b>4.12 m</b>	...
<b>6'</b>	<b>6''<sub>a</sub>: 4.59 d</b>	<b>10.0</b>
	<b>6''<sub>b</sub>: 4.40 dd</b>	<b>10.0, 5.0</b>
<b>2-OCH<sub>3</sub></b>	<b>3.71 s</b>	...

Πίνακας 89. Φασματοσκοπικά δεδομένα <sup>1</sup>H-NMR (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) του ταχιοσίδη.

### 3.3.2.στ) Στήλη Γ<sub>6</sub>

**Διαχωριζόμενο μίγμα:** Κλάσματα 12, 13 στήλης Γ<sub>1</sub> (4.94 g).

**Στατική φάση:** Γέλη πυριτίου αντίστροφης φάσης (R<sub>18</sub>).

**Κινητή φάση:** H<sub>2</sub>O/MeOH σε αναλογίες μειούμενης πολικότητας.

**Διάμετρος στήλης:** 4.0 cm.

Με τη χρωματογραφική μελέτη στα κλάσματα 12, 13 της στήλης Γ<sub>1</sub>, παρατηρήθηκε η ομοιότητα που υπήρχε μεταξύ τους όσον αφορά τα συστατικά που περιείχαν τα οποία πιθανόν να ήταν γλυκοσίδες φλαβονοειδών (μικρό R<sub>F</sub>, κίτρινος ψεκασμός και απορρόφηση στο UV). Αυτός ήταν ο λόγος που ενώθηκαν τα δύο κλάσματα. Επίσης, επειδή τα συστατικά ήταν πολύ πολικά αποφασίστηκε η διενέργεια MPLC, με διαλύτες H<sub>2</sub>O/MeOH σε αναλογίες μειούμενης πολικότητας. Η πλήρης πορεία της στήλης φαίνεται στον Πίνακα 90.

ΚΛΑΣΜΑΤΑ ΣΤΗΛΗΣ Γ <sub>6</sub>	ΔΙΑΛΥΤΕΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (% ΑΝΑΛΟΓΙΑ)	ΒΑΡΟΣ
1-5	H <sub>2</sub> O	380 mg
6-26	H <sub>2</sub> O/MeOH: 95/5	470 mg
27-43	H <sub>2</sub> O/MeOH: 95/5	386 mg
44-58	H <sub>2</sub> O/MeOH: 90/10	345 mg
59-79	H <sub>2</sub> O/MeOH: 90/10	553 mg
80-111	H <sub>2</sub> O/MeOH: 85/15	770 mg
112-121	H <sub>2</sub> O/MeOH: 80/20	263 mg
122-140	H <sub>2</sub> O/MeOH: 80/20	190 mg
141-165	H <sub>2</sub> O/MeOH: 70/30	222 mg
166-187	H <sub>2</sub> O/MeOH: 70/30	180 mg
188-210	H <sub>2</sub> O/MeOH: 60/40	212 mg
211-235	H <sub>2</sub> O/MeOH: 50/50	299 mg
236-260	MeOH	328 mg

Πίνακας 90. Στήλη Γ<sub>6</sub>.

Σε έλεγχο με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας σε σύστημα διαλυτών CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH: 80/20 και μετά από ψεκασμό με διάλυμα θειικής βανιλλίνης, ξεχώρισαν τα κλάσματα 27-43, 44-58, 59-79, 80-111, 122-140 και 166-187. Στα έξι αυτά κλάσματα διαπιστώθηκε μίγμα φλαβονοειδών τα οποία εμφάνιζαν πιο σαφή και ξεκάθαρη εικόνα απ' ότι στα αλλά κλάσματα. Έτσι, αποφασίστηκε η πραγματοποίηση νέων στηλών στα τρία αυτά κλάσματα.

### 3.2.2.ζ) Στήλη Γ<sub>7</sub>

**Διαχωριζόμενο μίγμα:** Κλάσματα 27-43, 44-58, 59-79 και 80-111 στήλης Γ<sub>6</sub> (2.05 g).

**Στατική φάση:** Γέλη πυριτίου αντίστροφης φάσης (R<sub>18</sub>).

**Κινητή φάση:** H<sub>2</sub>O/MeOH σε αναλογίες μειούμενης πολικότητας.

**Διάμετρος στήλης:** 3.5 cm.

Τα κλάσματα 27-43, 44-58, 59-79 και 80-111 της στήλης 6 ενώθηκαν επειδή κατά τον έλεγχο με TLC παρουσίαζαν παρόμοια εικόνα α. Κατά τον έλεγχο αυτόν,

διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα αυτά αποτελούνταν κυρίως από μία ουσία που απορροφούσε στο υπεριώδες και χρωματιζόταν κίτρινη κατά τον ψεκασμό με διάλυμα θεικής βανιλλίνης. Επίσης, υπήρχε και ένα μόριο που χρωματιζόταν μετά από ψεκασμό, αλλά δεν απορροφούσε στο UV. Η **στήλη Γ<sub>7</sub>** περιγράφεται αναλυτικά στον Πίνακα 91.

ΚΛΑΣΜΑΤΑ ΣΤΗΛΗΣ Γ <sub>7</sub>	ΔΙΑΛΥΤΕΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (% ΑΝΑΛΟΓΙΑ)	ΒΑΡΟΣ
1-7	H <sub>2</sub> O	193 mg
8-26	H <sub>2</sub> O/MeOH: 95/5	170 mg
27-37	H <sub>2</sub> O/MeOH: 90/10	166 mg
38-50	H <sub>2</sub> O/MeOH: 85/15	125 mg
51-76	H <sub>2</sub> O/MeOH: 80/20	153 mg
77-96	H <sub>2</sub> O/MeOH: 80/20	210 mg
97-120	H <sub>2</sub> O/MeOH: 80/20	163 mg
121-140	H <sub>2</sub> O/MeOH: 70/30	170 mg
141-165	H <sub>2</sub> O/MeOH: 60/40	112 mg
166-190	H <sub>2</sub> O/MeOH: 60/40	174 mg
191-207	H <sub>2</sub> O/MeOH: 50/50	189 mg
207-220	MeOH	208 mg

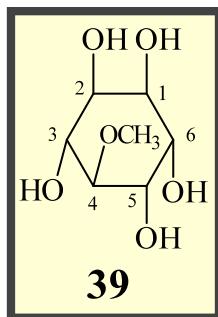
Πίνακας 91. Στήλη Γ<sub>7</sub>.

Μελετήθηκαν τα κλάσματα της στήλης με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας σε σύστημα διαλυτών CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH: 80/20 και ψεκάστηκαν με διάλυμα θεικής βανιλλίνης. Διαπιστώθηκε ότι:

- Τα κλάσματα **8-26, 27-37, 38-50** και **51-76** ήταν όμοια και περιείχαν μόνο μία κηλίδα που χρωματιζόταν σκούρα κατά τον ψεκασμό και δεν απορροφούσε στο UV. Η φασματοσκοπική μελέτη της ουσίας, οδήγησε στην κυκλιτόλη **D-πινιτόλη (1<sub>D</sub>-3-O-μεθυλο-χειρο-ινοσιτόλη)**.
- Τα κλάσματα **77-96, 97-120** και **121-140** ήταν όμοια και περιείχαν μόνο μία κηλίδα που χρωματιζόταν κίτρινη κατά τον ψεκασμό και απορροφούσε στο UV. Μετά από τον φασματοσκοπικό έλεγχο της ουσίας καταλήξαμε στην δομή της **μυρικετρίνης (μυρικετινο-3-O-ραμνοπυρανοσίδης)**.

Στις επόμενες παραγράφους περιγράφονται αναλυτικά τα φασματοσκοπικά στοιχεία των δύο ουσιών.

**i.) D-πινιτόλη (39)**



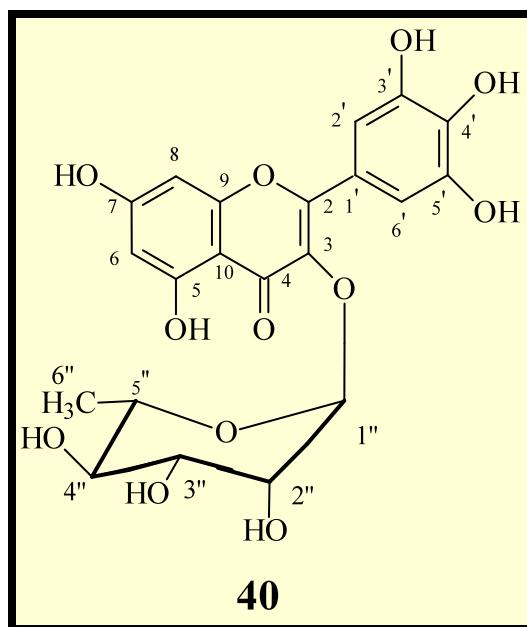
Έχει μοριακό τύπο **C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>** και μοριακό βάρος **194**.

Στον Πίνακα **92** υπάρχουν αναλυτικά οι τιμές  $\delta$  των φασμάτων, οι σταθερές σύζευξης  $J$  και η πολλαπλότητα των κορυφών στα φάσματα <sup>1</sup>H-NMR και <sup>13</sup>C-NMR (D<sub>2</sub>O) της D-πινιτόλης. Το μοριακό βάρος του μορίου πιστοποιήθηκε με τη μέθοδο του χημικού ιονισμού [CIMS, m/z: 195 (M+H)<sup>+</sup>].

Άτομο	$\delta$ <sup>13</sup> C σε ppm	$\delta$ <sup>1</sup> H σε ppm	$J$ σε Hz
1	74.2	3.85 m	...
2	73.3	3.60 dd	9.89, 2.2
3	74.9	3.49 dd	10.1, 3.0
4	85.5	3.18 dd	9.45, 9.45
5	72.6	3.66 dd	9.91, 2.56
6	74.4	3.85 m	...
OCH <sub>3</sub>	62.4	3.44 s	...

Πίνακας **92**. Φασματοσκοπικά δεδομένα <sup>1</sup>H-NMR και <sup>13</sup>C-NMR (D<sub>2</sub>O) της D-πινιτόλης.

ii.) Μυρικετρίνη (40)



Η μυρικετρίνη έχει μοριακό τύπο  $C_{21}H_{20}O_{12}$  και μοριακό βάρος 464.

Το μόριο αυτό απομονώθηκε σε μεγάλη ποσότητα. Συνολικά απομονώθηκαν 1g προϊόντος, 543 mg από τη **στήλη Γ<sub>7</sub>** και από τις επόμενες στήλες η υπόλοιπη ποσότητα.

Το μοριακό βάρος του μορίου πιστοποιήθηκε με τη μέθοδο του χημικού ιονισμού [CIMS, m/z: 465 ( $M+H^+$ )].

Στον Πίνακα 93 καταγράφονται αναλυτικά οι τιμές δ των φασμάτων, οι σταθερές σύζευξης *J* και η πολλαπλότητα των κορυφών στα φάσματα  $^1H$ -NMR και  $^{13}C$ -NMR ( $CD_3OD$ ) της μυρικετρίνης.

Άτομο	$\delta^{13}\text{C}$ σε ppm	$\delta^1\text{H}$ σε ppm	$J$ σε Hz
2	159.5	-	...
3	136.2	-	...
4	179.8	-	...
5	163.4	-	...
6	100.2	6.21 <i>d</i>	1.9
7	166.4	-	...
8	95.5	6.37 <i>d</i>	1.9
9	159.31	-	...
10	105.9	-	...
1'	122.2	-	...
2'	110.3	6.97 <i>s</i>	...
3'	146.7	-	...
4'	138.4	-	...
5'	146.7	-	...
6'	110.3	6.97 <i>s</i>	...
1''	102.0	5.33 <i>d</i>	1.5
2''	70.1	3.35-4.25 <i>m</i>	...
3''	70.3	3.35-4.25 <i>m</i>	...
4''	74.7	3.35-4.25 <i>m</i>	...
5''	71.0	3.35-4.25 <i>m</i>	...
6''	17.6	0.98 <i>d</i>	5.5

Πίνακας 93. Φασματοσκοπικά δεδομένα  $^1\text{H-NMR}$  και  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) της μυρικετρίνης.

Στον Πίνακα 94 υπάρχουν τα αντίστοιχα στοιχεία με τον παραπάνω πίνακα, με μόνη διαφορά ότι ως δευτεριωμένος διαλύτης έχει χρησιμοποιηθεί DMSO.

Άτομο	$\delta^{13}\text{C}$ σε ppm	$\delta^1\text{H}$ σε ppm	$J$ σε Hz
2	157.5	-	...
3	134.2	-	...
4	177.8	-	...
5	161.3	-	...
6	98.6	6.18 <i>d</i>	1.9
7	164.2	-	...
8	93.5	6.35 <i>d</i>	1.9
9	156.4		
10	104.0		
1'	119.6		...
2'	107.9	6.87 <i>s</i>	...
3'	145.7	-	...
4'	136.4	-	...
5'	145.8	-	...
6'	107.9	6.87 <i>s</i>	...
1''	101.9	5.20 <i>d</i>	1.5
2''	70.0	3.96 <i>dd</i>	1.5, 3.3
3''	70.4	3.60 <i>dd</i>	3.3, 9.4
4''	71.3	3.15 <i>t</i>	9.4
5''	70.6	3.46 <i>m</i>	...
6''	17.5	0.83 <i>d</i>	6.1

Πίνακας 94. Φασματοσκοπικά δεδομένα  $^1\text{H-NMR}$  και  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO) της μυρικετρίνης.

### 3.3.2.η) Στήλη Γ<sub>8</sub>

Διαχωριζόμενο μίγμα: Κλάσμα 122-140 στήλης Γ<sub>6</sub> (0.190 g).

Στατική φάση: Γέλη πυριτίου διαμέτρου 0.040-0.063 mm.

Κινητή φάση:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  σε αναλογίες αυξανόμενης πολικότητας.

Διάμετρος στήλης: 1.5 cm.

**Η στήλη Γ<sub>8</sub>** έγινε κυρίως για να απομονωθούν τα φλαβονοειδή που παρατηρήθηκαν κατά τους χρωματογραφικούς ελέγχους. Συγκεκριμένα, σε έλεγχο του κλάσματος 122-140 της στήλης Γ<sub>6</sub>, σε TLC με σύστημα ανάπτυξης CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH: 85/15, διαπιστώθηκε η ύπαρξη κυρίως δύο κηλίδων, η μία από τις οποίες εμφάνιζε τα χρωματογραφικά χαρακτηριστικά της μυρικετρίνης και η άλλη, η πιο άπολη, έδινε επίσης την εικόνα ενός φλαβονοειδούς. Η αναλυτική πορεία της στήλης Γ<sub>8</sub>, περιγράφεται στον Πίνακα 95.

ΚΛΑΣΜΑΤΑ ΣΤΗΛΗΣ Γ <sub>8</sub>	ΔΙΑΛΥΤΕΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (% ΑΝΑΛΟΓΙΑ)	ΒΑΡΟΣ
1-20	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	5 mg
21-40	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 98/2	6 mg
41-60	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 97/3	8 mg
61-83	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 95/5	9 mg
84-126	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 93/7	6 mg
127-139	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 93/7	7 mg
140-156	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 92/8	10 mg
157-185	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 90/10	13 mg
186-200	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 88/12	9 mg
201-222	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 85/15	8 mg
223-240	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 80/20	10 mg
241-260	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 70/30	14 mg
261-275	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 50/50	16 mg
276-310	MeOH	22 mg

Πίνακας 95. Στήλη Γ<sub>8</sub>.

Μετά τον χρωματογραφικό έλεγχο εξήχθησαν τα εξής συμπεράσματα:

- Στο κλάσμα 84-126 υπήρχε μία ουσία που απορροφούσε στο υπεριώδες και χρωματιζόταν κίτρινη όταν ψεκαζόταν με διάλυμα θειικής βανυλλίνης. Η δομή της προσδιορίσθηκε φασματοσκοπικά και ταυτοποιήθηκε ως η **κερκιτρίνη (κερκετινο-3-Ο-ραμνοπυρανοσίδης)**. Τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά του μορίου παρουσιάζονται στην παράγραφο 2.3.3.γ.

➤ Στα κλ άσματα 157-185, 186-200, 201-222, 223-240 υπήρχε μία ουσία που απορροφούσε στο υπεριώδες και χρωματιζόταν κίτρινη όταν ψεκαζόταν με διάλυμα θεικής βανιλλίνης. Η ουσία αυτή προσδιορίσθηκε φασματοσκοπικά και ταυτοποιήθηκε ως η **μυρικετρίνη (μυρικετινο-3-O-ραμνοπυρανοσίδης)** που είχε απομονωθεί και από τη **στήλη Γ<sub>7</sub>**.

### 3.3.2.θ) Στήλη Γ<sub>9</sub>

**Διαχωριζόμενο μίγμα:** **Κλάσμα 166-187 στήλης Γ<sub>6</sub>** (0.180 g).

**Στατική φάση:** Γέλη πυριτίου διαμέτρου 0.040-0.063 mm.

**Κινητή φάση:** CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH σε αναλογίες αυξανόμενης πολικότητας.

**Διάμετρος στήλης:** 1.5 cm.

Στη **στήλη Γ<sub>9</sub>** επιδιώχθηκε κυρίως να απομονωθούν τα φλαβονοειδή που παρατηρήθηκαν κατά τους χρωματογραφικούς ελέγχους. Συγκεκριμένα, σε έλεγχο του **κλάσματος 166-187** της **στήλης Γ<sub>6</sub>**, σε TLC με σύστημα ανάπτυξης CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH: 80/20, διαπιστώθηκε η ύπαρξη κυρίως δύο κηλίδων, η μία από τις οποίες εμφάνιζε τα χρωματογραφικά χαρακτηριστικά της μυρικετρίνης και η άλλη, η λιγότερο πολική, έδινε επίσης την εικόνα ενός φλαβονοειδούς, πιθανόν γλυκοσίδη. Η αναλυτική πορεία της στήλης, περιγράφεται στον Πίνακα 96.

ΚΛΑΣΜΑΤΑ ΣΤΗΛΗΣ Γ <sub>9</sub>	ΔΙΑΛΥΤΕΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (% ΑΝΑΛΟΓΙΑ)	ΒΑΡΟΣ
1-18	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	4 mg
19-45	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 98/2	9 mg
46-85	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 97/3	8 mg
86-100	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 96/4	6 mg
101-125	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 95/5	7 mg
126-170	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 93/7	12 mg
171-210	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 92/8	14 mg
211-224	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 90/10	9 mg
225-238	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 88/12	9 mg
239-252	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 85/15	8 mg
253-273	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 80/20	10 mg
274-310	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 70/30	13 mg
311-330	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH: 50/50	17 mg
331-360	MeOH	26 mg

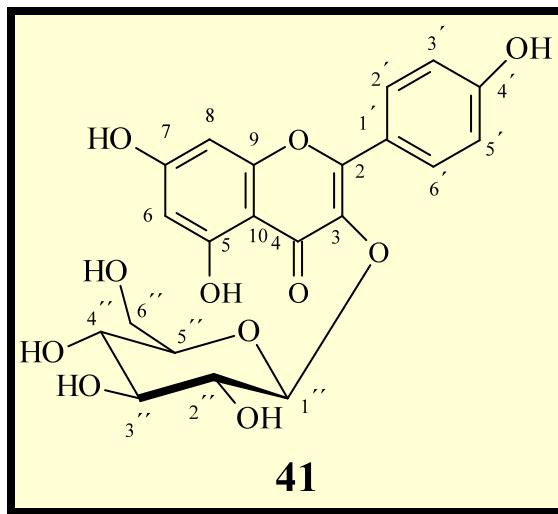
Πίνακας 96. Στήλη Γ<sub>9</sub>.

Μετά τον χρωματογραφικό έλεγχο εξήχθησαν τα εξής συμπεράσματα:

- Παρατηρήθηκε μία κηλίδα στο **κλάσμα 101-125** που απορροφούσε στο υπεριώδες και χρωματιζόταν κίτρινη κατά τον ψεκασμό με διάλυμα θεικής βανιλλίνης. Η φασματοσκοπική μελέτη οδήγησε στη δομή του **καιμπφερολο-3-O-β-D-γλυκοπυρανοσίδη**.
- Υπήρχε μία κηλίδα στα **κλάσματα 171-210, 211-224, 225-238, 239-252, 253-273** που εμφάνιζε τα χρωματογραφικά χαρακτηριστικά της **μυρικετρίνης** η οποία έχει απομονωθεί ξανά στις **στήλες Γ<sub>7</sub> και Γ<sub>8</sub>**, κάτι που πιστοποίησε και η φασματοσκοπική εξέταση της ουσίας.

Στην επόμενη παράγραφο υπάρχουν τα φασματοσκοπικά δεδομένα του **καιμπφερολο-3-O-β-D-γλυκοπυρανοσίδη**.

i.) Καιμπφερολο-3-O- $\beta$ -D-γλυκοπυρανοσίδης (41)



Ο καιμπφέρολο-3-O- $\beta$ -D-γλυκοπυρανοσίδης έχει μοριακό τύπο  $C_{21}H_{20}O_{11}$  και μοριακό βάρος **448**.

Το μοριακό βάρος του μορίου πιστοποιήθηκε με τη μέθοδο του χημικού ιονισμού [CIMS, m/z: 449 ( $M+H$ )<sup>+</sup>]. Στον παρακάτω πίνακα αναφέρονται αναλυτικά οι τιμές δ των φασμάτων, οι σταθερές σύζευξης  $J$  και η πολλαπλότητα των κορυφών στα φάσματα  $^1H$ -NMR και  $^{13}C$ -NMR ( $CD_3OD$ ) του καιμφέρολο-3-O- $\beta$ -D-γλυκοπυρανοσίδη.

Άτομο	$\delta^{13}\text{C}$ σε ppm	$\delta^1\text{H}$ σε ppm	$J$ σε Hz
2	156.4	-	...
3	133.3	-	...
4	177.6	-	...
5	161.8	-	...
6	98.8	6.23 <i>d</i>	2.1
7	164.3	-	...
8	93.8	6.43 <i>d</i>	2.1
9	156.5	-	...
10	104.1	-	...
1'	121.0	-	...
2'	131.0	8.10 <i>d</i>	9.0
3'	115.2	6.93 <i>d</i>	8.5
4'	160.1	-	...
5'	115.2	6.93 <i>d</i>	8.5
6'	131.0	8.10 <i>d</i>	9.0
1''	100.1	5.29 <i>d</i>	7.6
2''	74.4	3.20-3.50 <i>m</i>	...
3''	76.5	3.20-3.50 <i>m</i>	...
4''	70.0	3.20-3.50 <i>m</i>	...
5''	77.6	3.20-3.50 <i>m</i>	...
6''	60.9	$6''_a$ 3.73 <i>dd</i> $6''_b$ 3.57 <i>dd</i>	11.9 5.3

Πίνακας 97. Φασματοσκοπικά δεδομένα  $^1\text{H-NMR}$  και  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) του καιμπερολο-3-O- $\beta$ -D-γλυκοπυρανοσίδη.

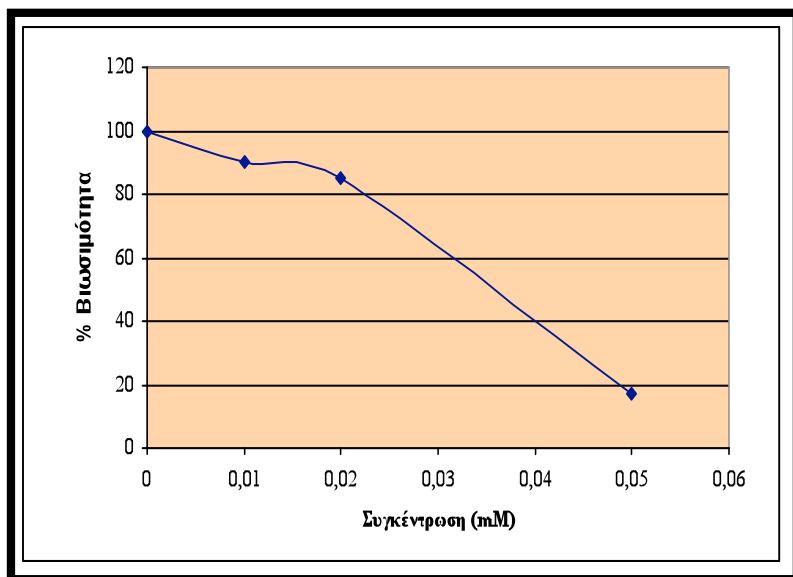
## **3.4) ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΕΛΕΓΧΟΙ**

Στην παρακάτω ενότητα περιγράφονται η τεχνική του ελέγχου της επίδρασης της (+)-2,3-διυδρομυρικετίνης σε αδενωματικά κύτταρα (CACO-2) παχέος εντέρου και τα αποτελέσματα του ελέγχου.

### **3.4.1) ΤΕΧΝΙΚΗ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΗΣ (+)-2,3-ΔΙΥΔΡΟΜΥΡΙΚΕΤΙΝΗΣ ΣΕ ΑΔΕΝΩΜΑΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ (CACO-2)**

Ελέγχθηκε η βιωσιμότητα των αδενωματικών κυττάρων παχέος εντέρου, μετά από την επίδραση της υπό μελέτη ουσίας. Αρχικά, τοποθετήθηκαν τα κύτταρα σε εξάτρυπες πλάκες με ορρό. Την επόμενη ημέρα, η ουσία προστέθηκε σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις ( $10^{-5}$ ,  $2 \times 10^{-5}$  και  $5 \times 10^{-5}$  M), ενώ χρησιμοποιήθηκε και ένα διάλυμα ελέγχου. Την τρίτη ημέρα και για τις επόμενες τρεις ημέρες (4η, 5η, 6η), προστέθηκαν νέες ποσότητες από την ουσία μας και αλλάχθηκε και ο ορρός. Την 7η ημέρα, συλλέχθηκαν τα κύτταρα και ακολούθησε η δοκιμασία βιωσιμότητας (Viability test). Συγκεκριμένα, μετά την καθίζηση του μέσου προστέθηκε 100% διαλύματος MeOH (2ml) για 5 min. Στη συνέχεια, προστέθηκε 0.5% Crystal Violet (1ml) για 10 min. Εκπλύθηκε η περίσσεια του Crystal Violet με H<sub>2</sub>O και στεγνώθηκαν οι τρύπες των εξάτρυπων πλακών. Μετά προστέθηκαν 1ml διαλύματος CH<sub>3</sub>COOH 30% και ήρθαν τα κύτταρα στην επιφάνεια. Τέλος, μετρήθηκε το επίπεδο των ζωντανών σε σχέση με τα νεκρά κύτταρα σε απορρόφηση 595 nm.

### 3.4.2) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Σχήμα 64. Δράση (+)-2,3-διυδρομυρικετίνης.

Όπως φαίνεται από το παραπάνω διάγραμμα η (+)-2,3-διυδρομυρικετίνη εμφανίζει  $IC_{50}=32 \mu M$ . Αυτό αποδεικνύει αξιόλογη δραστικότητα, ενώ κανένα από τα υπόλοιπα φλαβονοειδή που απομονώθηκαν, δεν επέδειξαν ανάλογη δράση στον συγκεκριμένο βιολογικό έλεγχο.

## ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΝΟΨΗ

Μελετήθηκαν φυτοχημικά **3 φυτικές δρόγες**, απομονώθηκαν συνολικά **44 φυσικά προϊόντα** και παρουσιάστηκαν αναλυτικά οι πορείες και τα αποτελέσματα σε **3 αντίστοιχα μέρη** που συναποτελούν την παρούσα διδακτορική διατριβή. Ακολουθεί μία συνοπτική παράθεση των αποτελεσμάτων.

### **Μέρος Α**

- ✓ Ως **αρχικό φυτικό υλικό** χρησιμοποιήθηκαν τα **στέμφυλα**, αφενός επειδή είναι απαλλαγμένα από τον χυμό (που περιέχει μεγάλη ποσότητα σακχάρων) οπότε είναι πιο εύκολη η απομόνωση πολυφαινολικών μορίων και αφετέρου γιατί ουσιαστικά είναι ένα **γεωργικό απόβλητο** που παραμένει στα οινοποιεία μετά την οινοποιητική διαδικασία, χωρίς καμία επιπλέον χρησιμότητα.
- ✓ Το **μεθανολικό εκχύλισμα** των σ τεμφύλων που προέρχονταν από τα λιαστά σταφύλια της ποικιλίας *Μανδηλαριάς Σαντορίνης*, υποβλήθηκε σε κατεργασία με ρητίνες **προσρόφησης XAD16** και **XAD7HP**, με αποτέλεσμα την παραγωγή **2 κλασμάτων**, ενός που ήταν **εμπλουτισμένο σε πολυφαινόλες** και ενός που περιείχε τις **χρωστικές των σταφυλιών αντίστοιχα**.
- ✓ Το **κλάσμα** που προήλθε από τη ρητίνη **XAD16**, μετατράπηκε με την προσθήκη **μαλτοδεξτρίνης** σε μία **ξηρή σκόνη εξαιρετικής ποιότητας**, ιδανική για χρήση σε κλινικές δοκιμές.
- ✓ Το **κλάσμα** που προήλθε από τη ρητίνη **XAD16**, εξετάστηκε σε **ασθενείς με στεφανιαία νόσο** και παρατηρήθηκε **σημαντική βελτίωση της λειτουργίας του ενδοθηλίου της στεφανιαίας αρτηρίας**.
- ✓ Το ίδιο κλάσμα μαζί με **μόρια, κλάσματα** και **εκχυλίσματα** από τις ποικιλίες *Μανδηλαριά* και *Ασύρτικο*, μελετήθηκαν *in vitro* ως προς την **ανασταλτική δράση** τους, ενάντια στη **μιτομυκίνη C**, το **ένζυμο τοποϊσομεράση I** και σε **οξειδωτικούς παράγοντες** (μπλεομυκίνη,  $H_2O_2$ ). Καταγράφηκαν **ενδιαφέροντα αποτελέσματα** τα οποία ανοίγουν νέους ορίζοντες στη χρήση μορίων ή και εκχυλισμάτων που

προέρχονται από σταφύλια , στην **πρόληψη** και τη **Θεραπεία ορισμένων μορφών καρκίνων**.

- ✓ Μελετήθηκε φυτοχημικά το **μεθανολικό κλάσμα** που προήλ θε από την κατεργασία με ρητίνη **XAD16** του **μεθανολικού εικυλίσματος** των **στεμφύλων Vitis vinifera var. mandilaria**.
- ✓ Απομονώθηκαν και τα υτοποιήθηκαν συνολικά **16 δευτερογενείς μεταβολίτες** που κατατάσσονται σε **4 κατηγορίες φυσικών προϊόντων**. Συγκεκριμένα, ανήκουν στα **στιλβένια, φλαβονοειδή (ισοφλαβονοειδή, φλαβάνια και φλαβονόλες), φαινολικά παράγωγα (φαινολικά οξέα, φαινυλαιθανόλες)** και **αζωτούχες βάσεις**.
- ✓ Από τα απομονωθέντα μόρια, **2 απαντώνται για πρώτη φορά σε φυτό του γένους Vitis**. Πρόκειται για τα ισοφλαβονοειδή γενιστεῖνη και γενιστίνη.
- ✓ Από το κλάσμα που προήλθε από τη ρητίνη **XAD16, αναπτύχθηκε η μεθοδολογία για την κατευθείαν απομόνωση της trans-ρεσβερατρόλης**, με τη χρήση **της τεχνικής FCPC**.
- ✓ Αναπτύχθηκε συνολικά μία **διαδικασία υψηλής τεχνολογίας, αξιοποίησης των αποβλήτων των οινοποιείων**, κατά την οποία ανακτώνται οι φυσικές πολυφαινόλες και παράλληλα **απομακρύνονται από το περιβάλλον χιλιάδες τόνοι από στέμφυλα που αποτελούν πηγή μόλυνσης**.

## Μέρος Β

- ✓ Μελετήθηκε το **διχλωρομεθανικό** και το **μεθανολικό εικύλισμα** του φυτού **Polygonum maritimum** οικ. **Polygonaceae**.
- ✓ Το **μεθανολικό εικύλισμα** υποβλήθηκε σε κατεργασία με **ρητίνη προσρόφησης XAD16** και το **κλάσμα που προέκυψε** εισήλθε στους **χρωματογραφικούς διαχωρισμούς**.
- ✓ Απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν συνολικά **14 δευτερογενείς μεταβολίτες** που κατατάσσονται σε **5 κατηγορίες φυσικών προϊόντων**. Συγκεκριμένα, ανήκουν σε **φλαβονοειδή, φαινολικά παράγωγα (αρυλοπροπάνια, ρεσορκινόλες, ακετοφαινόνες, φαινολικοί γλυκοσίδες), σεσκιτερπένια, φυτοστερόλες** και **λιπαρά οξέα**.
- ✓ Από τα απομονωθέντα μόρια, **2 αποτελούν νέα φυσικά προϊόντα**. Πρόκειται για τη **ρεσορκινόλη πολυγονοκινόλη** και την **ακετοφαινόνη πολυγονοφαινόνη**.

- ✓ Από τα απομονωθέντα μόρια, **7 απαντώνται για πρώτη φορά σε φυτό της οικογένειας Polygonaceae**. Πρόκειται για το (+)-*cis*-8-υδροξυκαλαμένιο, τους φερουλικούς εστέρες της εικοσιτετρανόλης, της εικοσιεξανόλης, της εικοσιοκτανόλης, της τριακοντανόλης, τη μπρουσσονίνη **B** και τον **ισοταχιοσίδη**.

## Μέρος Γ

- ✓ Μελετήθηκε το **μεθανολικό εκχύλισμα** του υπέργειου τμήματος του φυτού *Dorycnium pentaphyllum* subsp. *herbaceum* της οικογένειας **Leguminosae**.
- ✓ Το **μεθανολικό εκχύλισμα** υποβλήθηκε σε κατεργασία με **ρητίνη** προσρόφησης **XAD16** και το **κλάσμα που προέκυψε** εισήλθε στους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς.
- ✓ Απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν συνολικά **14 δευτερογενείς μεταβολίτες** που ανήκουν σε **5 κατηγορίες φυσικών προϊόντων**. Συγκεκριμένα, χαρακτηρίζονται ως φλαβονοειδή, φαινολικά παράγωγα (φαινυλοβουτανόνες, φαινολικοί γλυκοσίδες, εστέρες φαινολικών οξέων), κυανιδρινικοί γλυκοσίδες, κυκλιτόλες και φυτοστερόλες.
- ✓ Από τα απομονωθέντα μόρια, **1 αποτελεί νέο φυσικό προϊόν**. Πρόκειται για τον **δορυκνιοσίδη** που είναι ένας γλυκοσίδης φαινυλοβουτανόνης.
- ✓ Από τα απομονωθέντα μόρια, **2 απαντώνται για πρώτη φορά σε φυτό της οικογένειας Leguminoseae**. Πρόκειται για την 4-(4'-O- $\beta$ -D-γλυκοπυρανοσυλ-φαινυλ)-2-βουτανόνη και την 4-(4'-O- $\beta$ -D-γλυκοπυρανοσυλ-3'-μεθοξυφαινυλ)-2-βουτανόνη.
- ✓ Από τα απομονωθέντα μόρια, η (+)-2,3-διυδρομυρικετίνη, ο **καιμπφερολο-3-O-(6''-ακετυλο)- $\beta$ -D-γλυκοπυρανοσίδης**, η **λοταουστραλίνη** και ο **ταχιοσίδης** απαντώνται για πρώτη φορά σε φυτό του γένους ***Dorycnium***.
- ✓ Η (+)-2,3-διυδρομυρικετίνη μελετήθηκε *in vitro* σε **αδενωματικά κύτταρα παχέος εντέρου (CACO-2)** και επέδειξε σημαντική δραστικότητα στη **μείωση της βιωσιμότητάς τους**.

## **SUMMARY**

**Three plants** were studied phytochemically, **44 natural products** were isolated. The analytical courses and results were presented in **3 corresponding parts** which compose the present PhD Thesis. A brief description of the results follows.

### **Part A**

- ✓ **Grape pomace** was used as the **initial plant material**. Firstly, because it is exempt of the juice (which contains a significant amount of hydrocarbons) so it is easier to isolate polyphenolic molecules. Secondly, because essentially it is an **agricultural waste** which remains in the wineries after the wine-making procedure, with no further utility.
- ✓ The **methanol extract** of grape pomace which comes from the grapes of the ***mandilaria*** variety exposed to sunlight, was subjected to elaboration with **adsorption resins XAD16 and XAD7HP**, resulting in the production of **2 fractions**, one **enriched with polyphenols** and one containing the **colorants of the grapes**, respectively.
- ✓ The **fraction** that came from resin **XAD16**, was rendered with the addition of **maltodextrin** to a **dry powder of excellent quality**, ideal for use in clinical trials.
- ✓ The **fraction** that came from resin **XAD16** was tested on **patients suffering from coronary heart disease** and a **significant improvement of the function of the endothelium of the coronary artery**.
- ✓ The same fraction along with **molecules, fractions and extracts** from the ***mandilaria*** and ***assyrtiko*** varieties, were studied ***in vitro*** in relation to their **suspensive activity**, against **mitomycin C** and the enzyme **topoisomerase I** and **oxidative factors** (bleomycin, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). **Interesting results** were recorded which may have use in the **prevention and cure of certain forms of cancer**.
- ✓ The **methanol fraction** that resulted from the elaboration with resins **XAD16** of the **methanol extract of grape pomace *Vitis vinifera* var *mandilaria***, was studied phytochemically.
- ✓ In total **16 secondary metabolites** were isolated and identified, which can be categorized to **4 natural products categories**. Specifically, they belong to **stilbenoids**,

**flavonoids (isoflavonoids, flavanes and flavonoles), phenolic derivatives (phenolic acids, phenylethanols) and nitrogenous bases.**

- ✓ From the isolated products, **2 are encountered for the first time in a plant of the *Vitis* genus**. These are the **isoflavonoids genistein and genistin**.
- ✓ From the fraction that resulted from the resin **XAD16**, a method was developed for the direct isolation of ***trans*-resveratrol**, using the FCPC method.
- ✓ Conclusively, a **high technology procedure of exploitation of the wineries waster** was developed, during which **natural polyphenols are recovered** and at the same time **thousands tones of grape pomace, which are a source of pollution, are removed from the environment**.

## **Part B**

- ✓ The **dichloromethane and methanol extract** of the plant ***Polygonum maritimum*** family **Polygonaceae** were studied.
- ✓ The **methanol extract** was subjected to elaboration with the **adsorption resin XAD16** and the **resulting fraction** was submitted to **chromatographic separations**.
- ✓ In total, **14 secondary metabolites** were isolated and identified, which can be categorized to **5 natural products categories**. Specifically, they belong to **flavonoids, phenolic derivatives (arylpropanoids, resorcinols, acetophenones, phenolic glucosides), sesquiterpenoids, phytosterols and lipid acids**.
- ✓ From the isolated molecules, **2 are new natural products**, the **resorcinol polygonocinol** and the **acetophenone polygonophenone**.
- ✓ From the isolated molecules, **7 are encountered for the first time in a plant of the Polygonaceae family**. These are **(+)-*cis*-8-hydroxycalamene, tetracosyl ferulate, hexacosyl ferulate, octacosyl ferulate, triacontyl ferulate, broussonin B and isotachioside**.

## **Part C**

- ✓ The **methanol extract** of the aerial part of the plant ***Dorycnium pentaphyllum*** subsp. ***herbaceum*** of the **Leguminosae** family was studied.

- ✓ The **methanol extract** was subjected to elaboration with the **adsorption resin XAD16** and the **resulted fraction** was submitted to chromatographic separations.
- ✓ In total, **14 secondary metabolites** were isolated and identified, which can be categorized to **5 natural products categories**. Specifically, they are characterized as **flavonoids, phenolic derivatives (phenylbutanones, phenolic glucosides, phenolic acid esters), cyanogenic glucosides, cyclitols and phytosterols**.
- ✓ From the isolated molecules, **1 is a new natural product named dorycnioside**, which is a phenylbutanone glucoside.
- ✓ From the isolated molecules, **2 are encountered for the first time in a plant of the Leguminosae family**. These are **4-(4'-O- $\beta$ -D-glucopyranosylphenyl)-2-butanone** and **4-(4'-O- $\beta$ -glucopyranosyl-3'-methoxyphenyl)-2-butanone**.
- ✓ From the isolated molecules, **(+)-2,3,-dihydromyricetin, kaempferol 3-O-(6''-acetyl)- $\beta$ -glucopyranoside, iotaustralin and tachioside** are encountered for the first time in a plant of the ***Dorycnium*** genus.
- ✓ **(+)-2,3-dihydromyricetin** was studied ***in vitro*** in **adenomatic cells of the large intestine (CACO-2)** and showed a significant activity in the **reduction of their viability**.

# ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ



- Abburi K. Adsorption of phenol and *p*-chlorophenol from their single and bisolute aqueous solutions on Amberlite XAD-16 resin. *Journal of Hazardous Materials*, **2003**, B, 105, 143-156.
- Abid Ali Khan M.M., Jain D.C., Bhakuni R.S., Zaim M., Thakur R.S. Occurrence of some antiviral sterols in *Artemisia annua*. *Plant Science*, **1991**, 75, 161-165.
- Abrol Y.P. & Conn E.E. Studies on cyanide metabolism in *Lotus arabicus* L. and *Lotus tenuis* L. *Phytochemistry*, **1966**, 5 (2), 237-242.
- Aburjai T.A. Anti-platelet stilbenes from aerial part of *Rheum palaestinum*. *Phytochemistry*, **2000**, 55, 407-410.
- Adami H.O., Day N.E., Trichopoulos D., Willett W.C. Primary and secondary prevention in the reduction of cancer morbidity and mortality. *European Journal of Cancer*, **2001**, 37, S118-S127.
- Addae-Mensah I., Achenbach H., Thoithi G.N., Waibel R., Mwangi J.W. Epoxychiromodine and other constituents of *Croton megalocarpus*. *Phytochemistry*, **1992**, 31 (6), 2055-2058.
- Agarwal S.K., Singh S.S., Verma S., Kumar S. Antifungal activity of anthraquinone derivatives from *Rheum emodi*. *Journal of Ethnopharmacology*, **2000**, 72, 43-46.
- Agewall S., Wright S., Droughty R.N., Whalley G.A., Duxbury M., Sharpe N. Does a glass of red wine improve endothelial function? *Eur. Heart J.*, **2000**, 21, 74-78.
- Aggarwal B.B. & Shishodia S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochemical Pharmacology*, **2006**, 71, 1397-1421.
- Ahmed M., Khaleduzzaman M., Islam M.S. Isoflavan-4-ol, dihydrochalcone and chalcone derivatives from *Polygonum lapathifolium*. *Phytochemistry*, **1990**, 29 (6), 2009-2011.
- Aiub C., Stankevicius L., Da Costa V., Ferreira F., Mazzei J., Ribeiro Da Silva A., Soares de Moura R., Felzenszwalb I., *Food. Chem. Toxicol.*, **2004**, 42 (6), 969-973.

- Akihisa T., Yasukawa K., Yamaura M., Ukiya M., Kimura Y., Shimuzu N., Arai K. Triterpene alcohol and sterol ferulates from rice bran and their anti-inflammatory effects. *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48 (6), 2313-2319.
- Alam A., Khan N., Sharma S., Saleem M., Sultana S. Chempreventive effect of *Vitis vinifera* extract on 12-O-tetradecanoyl-13-phorbol acetate-induced cutaneous oxidative stressS and tumor promotion in murine skin. *Pharmacological Research*, **2002**, 46 (6), 557-564.
- Ali M.A., Kondo K., Tsuda Y. (*E*)-3,5,4'-Trimethoxystilbene. *Chem. Pharm. Bull.*, **1992**, 40 (5), 1130-1136.
- Almeida de P.A., Fraiz Jr. S.V., Filho-Braz R. Synthesis and structural confirmation of natural 1,3-Diarylpropanes. *J. Braz. Chem. Soc.*, **1999**, 10 (5), 347-353.
- Ames B.N., Gold L.S., Willett W.C. The causes and prevention of cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, **1995**, 92, 5258-5265.
- Anderson D., Basaran N., Blowers S.D., Edwards A.J. The effects of antioxidants on bleomycin treatment *in vitro* and *in vivo* genotoxicity assays. *Mutat. Res.*, **1995**, 329, 37-47.
- Andersson R. & Lundgren L.N. Monoaryl and cyclohexenone glycosides from needles of *Pinus sylvestris*. *Phytochemistry*, **1988**, 27 (2), 559-562.
- Andro M.C & Riffaud J.P. Pygeum africanum extract for the treatment of patients with benign prostatic hyperplasia: a review of 25 years of published experienence. *Curr. Ther. Res.*, **1995**, 56, 796-817.
- Anekonda T.S. & Reddy P.H. Can herbs provide a new generation of drugs for treating Alzheimer's disease? *Brain Research Reviews*, **2005**, 50, 361-376.
- Auger C., Teissedre P.L., Gerain P., Lequeux N., Bornet A., Serisier S. Dietary wine phenolics catechin, quercetin, and resveratrol efficiently protect hypercholesterolemic hamsters against aortic fatty streak accumulation. *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53, 2015-2021.
- Augustin S. & Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.*, **2000**, 130, 2073S-2085S.
- Awad A.B., Chan K.C., Downie A.C., Fink C.S. Peanuts as a source of  $\beta$ -sitosterol, a sterol with anticancer properties. *Nutr. Cancer*, **2000**, 36 (2), 238-241.

- Awad A.B., Downie A., Fink C.S., Kim U. Dietary phytosterols inhibits the growth and metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer cells grown in SCID mice. *Anticancer Res.*, **2000**, 20 (2A), 821-824.
- Azam S., Hadi N., Khan N.U., Hadi S.M. Prooxidant property of green tea polyphenols epicatechin and epigallocatechin-3-gallate: implications for anticancer properties. *Toxicology in Vitro*, **2004**, 18, 555-561.
- Babu K.S., Srinivas P.V., Praveen B., Kishore K.H., Murty U.S., Rao J.M. Antimicrobial constituents from the rhizomes of *Rheum emodi*. *Phytochemistry*, **2003**, 62, 203-207.
- Bagchi D., Sen C.K., Ray S.D., Das D.K., Bagchi M., Pruess H.G., Vinson J.A. Molecular mechanisms of cardioprotection by a novel grape seed proanthocyanidin extract. *Mutation Research*, **2003**, 523-524, 87-97.
- Bagchi D., Bagchi M., Stohs S.J., Das D.K., Ray S.D., Kuszynski C.A., Joshi S.S., Pruess H.G. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology*, **2000**, 148, 187-197.
- Bandyopadhyay U., Biswas K., Chatterjee A., Bandyopadhyay D., Chattopadhyay I., Chayan K.G., Chakraborty T., Bhattacharya K., Banerjee R.K., *Life Sciences*, **2001**, 71, 2845-2865.
- Barnes S. Phytoestrogens and breast cancer. *Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism*, **1998**, 12 (4), 559-579.
- Barnes S., Sfakianos J., Coward L., Kirk M. Soy isoflavonoids and cancer prevention. Underlying biochemical and pharmacological issues. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1996**, 401, 87-100.
- Barstad B., Sorensen T.I., Tjonneland A., Johansen D., Becker U., Andersen I.B., Gronbaek M. Intake of wine, beer and spirits and risk of gastric cancer. *Eur. J.Cancer Prev.*, **2005**, 14 (3), 239-243.
- Bavaresco L., Fregoni C., Cantu E., Trevisan M. From the grapevine to wine. *Drugs Under Experimental and Clinical Research*, **1999**, 25, (2-3), 57-63.
- Baydar N.G., Ozkan G., Sagdic O. Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts. *Food Control*, **2004**, 15, 335-339.

- Bell E.A., Lackey J.A., Polhill R.M. Systematic significance of canavanine in the Papilioideae (Faboideae). *Bioch. Syst. Ecol.*, **1978**, 6, 201-202.
- Belofsky G.N., Jensen P.R., Renner M.K., Fenical W. New cytotoxic sesquiterpenoid nitrobenzoyl esters from a marine isolate of the fungus *Aspergillus versicolor*. *Tetrahedron*, **1998**, 54, 1715-1724.
- Berges R.R., Windler J., Trampisch H.J. Phytotherapy in the treatment of benign prostatic hyperplasia. Benign prostatic hyperplasia. *Lancet*, **1995**, 345, 1529-1532.
- Bergman A.M., Munc-Petersen B., Jensen P.B., Sehested M., Veerman G., Voorn D.A., Smid K., Pinedo H.M., Peters G.J. Collateral sensitivity to gemcitabine and cytocine arabinoside of daunorubicine and VM-26 resistant variants of human small cell lung cancer cell lines. *Biochemical Pharmacology*, **2001**, 61 (11), 1401-1408.
- Bergman M., Varshavsky L., Gottlieb H.E., Grossman S. The antioxidant activity of aqueous spinach extract: chemical identification of active fractions. *Phytochemistry*, **2001**, 58, 143-152.
- Bianchini F. & Vainio H. Wine and resveratrol: mechanisms of cancer prevention? *Eur. J.Cancer Prev.*, **2003**, 12 (5), 417-425.
- Blamey M. & Grey-Wilson C., *Mediterranean Wild Flowers*, **1993**, 104-105.
- Bobek P. Dietary tomato and grape pomace in rats: effect on lipids in serum and liver, and on antioxidant status. *Br. J. Biomed. Sci.*, **1999**, 56 (2), 109-113.
- Boege F., Straub T., Kehr A., Boesenbergs C., Christiansen K., Andersen A., Jakob F., Kohrle J. Selected novel flavones inhibit the DNA binding or the DNA religation step of eukaryotic topoisomerase I. *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271, 2262-2270.
- Boonyaratavej S., Tantayanontha S., Kitchanachai P. *Trans*-triacontyl-4-hydroxy-3-methoxycinnamate, a new compound from the Thai plant *Bridelia ovata*. *J. Nat. Prod.*, **1992**, 55 (12), 1761-1763.
- Bouic P.J.D. Sterols and sterolins: new drugs for the immune system? *Drug Discovery Today*, **2002**, 7 (14), 775-778.
- Bradamante S., Barenghi L., Villa A. Cardiovascular protective effects of resveratrol. *Cardiovasc. Drug Rev.*, **2004**, 22 (3), 169-188.
- Braham H., Mighri Z., Jannet H.B., Matthew S., Abreu P.M. Antioxidant phenolic glycosides from *Moricandia arvensis*. *J. Nat. Prod.*, **2005**, 68 (4), 517-522.

- Bravo J.A., Sauvain M., Gimenez T., Munoz V.O., Callapa J., Le Men-Olivier L., Massiot G., Lavaud C. Bioactive phenolic glycosides from *Amburana cearensis*. *Phytochemistry*, **1999**, 50, 71-74.
- Bridle P. & Timberlake C.F. Anthocyanins as a natural food colours-selected aspects. *Food Chemistry*, **1997**, 58 (1-2), 103-109.
- Briggs M.H. & Brotheron J., *Steroid Biochemistry and Pharmacology*, **1970**, London and N.Y.
- Bright J.J. Targeting autoimmune diseases through nutraceuticals. *Nutrition*, **2004**, 20, 39-43.
- Burns J., Yokota T., Ashihara H., Lean M.E.J., Crozier A. Plant foods and herbal sources of resveratrol. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, 3337-3340.
- Byrnes R.W., Templin J., Sem D., Lyman S., Petering D.H. Intracellular DNA strand scission and growth inhibition of Ehrlich ascites tumor. *Cancer Res.*, **1990**, 50, 5275-5286.
- Caillet S., Salmieri S., Lacroix M. Evaluation of free radical-scavenging properties of commercial grape phenol extracts by a fast colorimetric method. *Food Chemistry*, **2006**, 95, 1-8.
- Cardenas M., Marder M., Blank V.C., Roguin L.P. Antitumor activity of some natural flavonoids and synthetic derivatives on various human and murine cancer cell lines. *Bioorg. Med. Chem.*, **2006**, 14, 2966-2971.
- Carton E., Carboneau M.A., Fouret G., Descomps B., Leger C.L., *J. Nat. Prod.*, **2001**, 64 (4), 480-486.
- Casabuono A.C. & Pomilio A.B. Lignans and a stilbene from *Festuca argentina*. *Phytochemistry*, **1994**, 35 (2), 479-483.
- Cerutti P.A. Oxidant stress and carcinogenesis. *Eur. J. Clin. Invest.*, **1991**, 21, 1-5.
- Chackalamannil S., Xia Y., Wang Y., Tsai H., Czarniecki M., Wang S., Clemons A., Ahn H.S., Boykow G. Novel inhibitors of cholesterol ester transfer protein. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1995**, 5 (17), 2005-2010.

- Chadwick L.R., Pauli G.F., Farnsworth N.R. The pharmacognosy of *Humulus lupulus* L. (hops) with an emphasis on estrogenic properties. *Phytomedicine*, **2006**, 13, 119-131.
- Chakraborty A.K. & Majumder H.K. Mode of action of pentavalent antimonials: specific inhibition of type I DNA topoisomerase of *Leishmania donovani*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1988**, 152, 605-611.
- Chang J.S., Liu H.W., Wang K.C., Chen M.C., Chiang L.C., Hua Y.C., Lin C.C. Ethanol extract of *Polygonum cuspidatum* inhibits hepatitis B in a stable HBV-producing cell line. *Antiviral Research*, **2005**, 66, 29-34.
- Chapman & Hall, *Phytochemical Dictionary of the Leguminosae*, **1994**, Bisby F.A., Buckingham J., Harborne J.B., Eds, London.
- Chatterjee A., Bagchi D., Yasmin T., Stohs S.J. Antimicrobial effects of antioxidants with and without clarithromycin on Helicobacter pylori. *Mol. Cell. Biochem.*, **2005**, 270 (1-2), 125-130.
- Chen C. & Kong A.N.T. Dietary cancer-chemopreventive compounds: from signaling and gene expression to pharmacological effects. *Trends in Pharmacological Sciences*, **2005**, 26 (6), 318-325.
- Chen J.J., Huang Y.C., Chen Y.C., Huang Y.T., Wang S.W., Peng C.Y., Teng C.M., Chen I.S. Cytotoxic amides from *Piper sintense*. *Planta Med.*, **2002**, 68, 980-985.
- Chien-Chang S., Chang Y.S., Kang L.H. Nuclear magnetic studies of 5,7-dihydroxyflavonoids. *Phytochemistry*, **1993**, 34 (3), 843-845.
- Chou E.J., Keevil J.G., Aeschlimann S., Wiebe D.A., Folts J.D., Stein J.H. Effect of ingestion of purple grape juice on endothelial function in patients with coronary heart disease. *The American Journal of Cardiology*, **2001**, 88, 553-555.
- Chou H.C., Chen J.J., Duh C.Y., Huang T.F., Chen I.S. Cytotoxic and anti-platelet aggregation constituents from the root wood of *Melicope semecarpifolia*. *Planta Med.*, **2005**, 71 (11), 1078-1081.
- Chowdhury A.R., Sharma S., Mandal S., Goswami A., Mukhopadhyay S. Majumder H.K. Luteolin, an emerging anti-cancer flavonoid, poisons eukaryotic DNA topoisomerase I. *Biochem. J.*, **2002**, 366, 653-661.

- Chu X., Sun A., Liu R. Preparative isolation and purification of five compounds from the Chinese medicinal herb *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Ethnopharmacology*, **2005**, A, 1097, 33-39.
- Chung E.Y., Kim B.H., Lee M.K., Yun Y.P., Lee S.H., Min K.R., Kim Y., Anti-inflammatory effect of the oligomeric stilbene alpha-Viniferin and its mode of the action through inhibition of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase. *Planta Med.*, **2003**, 69 (8), 710-714.
- Chung I.L., Park M.R., Chun J.C., Yun S.J. *Plant Science*, **2003**, 164, 103-109.
- Cirico T.L. & Omaye S.T. Additive or synergistic effects of phenolic compounds on human low density lipoprotein oxidation. *Food and Chemical Toxicology*, **2006**, 44, 510-516.
- Cizmarikova R., Dingova A., Kozlovsky J., Greksakova O. Derivatives of para-hydroxyacetophenone and para-hydroxypropiophenone as a potential new beta-adrenolytic agent. *Cesk. Farm.*, **1990**, 39 (9), 403-408.
- Constantinou A., Mehta R.A., Runyan C. Flavonoids as DNA topoisomerase antagonists and poisons: structure-activity relationships. *J. Nat. Prod.*, **1995**, 58, 217.
- Corder R., Crozier A., Kroon P.A. Drinking your health? It's too early to say. *Nature*, **2003**, 426, 119.
- Cordova A.C., Jackson S.M., Schlessel D.W.B., Sumpio B.E. The cardiovascular protective effect of red wine. **2005**, 200 (3).
- Corretti M. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **2002**, 39, 257-265
- Cortout J., Pieters L., Claeys M., Geerts S., Varden Berghe D., Vlietinck A., *Planta Med.*, **1994**, 60 (5), 460-463.
- Cos P., Hermans N., De Bruyne T., Apers S., Sindambiwe J.B., Witvrouw M., De Clercq E., Berghe D.V., Pieters L., Vlietinck A.J. Antiviral activity of Rwandan medicinal plants against human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1). *Phytomedicine*, **2002**, 9, 62-68.
- Creasy G.L. Antifungal stilbenes in grapevines-Implication for disease control. *Viticulture and Oenology*, **2002**.

- Cushnie T.P.T & Lamb A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **2005**, 26, 343-356.
- Da Silva P.A.L., Laranjinha J.A.N., De Freitas V.A.P. Antioxidant protection of low density lipoprotein by procyanidins: structure/activity relationships. *Biochemical Pharmacology*, **2003**, 66, 947-954.
- Dastidar S.G., Manna A., Kumar K.A., Mazumdar K., Dutta N.K., Chakrabarty A.N., Motohashi N., Shirataki Y. Studies on the antibacterial potentiality of isoflavones. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **2004**, 23, 99-102.
- Datta B.K., Datta S.K., Khan T.H., Kundu J.K., Rashid M.A., Nahar L., Sarker S.D. Anti-cholinergic, cytotoxic and anti-HIV-1 activities of sesquiterpenes and a flavonoid glucoside from the aerial parts of *Polygonum viscosum*. *Pharmaceutical Biology*, **2004**, 42 (1), 18-23.
- Datta B.K., Datta S.K., Rashid M.A., Sarker S.D. Flavonoids from *Polygonum stagninum* (Polygonaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, **2002**, 30, 693-696.
- Datta B.K., Datta S.K., Rashid M.A., Nash R.J., Sarker S.D. A sesquiterpene acid and flavonoids from *Polygonum viscosum*. *Phytochemistry*, **2000**, 54, 201-205.
- Dell' Agli M., Busciale A., Bosisio E. Vascular effects of wine polyphenols. *Cardiovascular Res.*, **2004**, 63, 593-602.
- Dewick P.M., *Isoflavonoids. The Flavonoids: Advances in research since 1986*. Chapman & Hall: London, **1993**.
- D' Incalci M. Use of cancer chemopreventive phytochemicals as antineoplastic agents. *Lancet Oncol.*, **2005**, 6, 899-904.
- Di Majo D., Giannanco M., La Guardia M., Tripoli E., Giannanco S., Finotti E. Flavanones in *Citrus* fruit: Structure-antioxidant activity relationships. *Food Research International*, **2005**, 38, 1161-1166.
- Dittrich P. & Brandl A. Revision of the pathway of D-pinitol formation in Leguminosae. *Phytochemistry*, **1987**, 26 (7), 1925-1926.
- Dixon R.A. & Ferreira D. Genistein. *Phytochemistry*, **2002**, 60, 205-211.
- Dolara P., Luceri C., De Filippo C., Femia A.P., Giovannelli L., Caderni G., Cecchini C., Silvi S., Orpianesi C., Cresci A. Red wine polyphenols influence

carcinogenesis, intestinal microflora, oxidative damage and gene expression profiles of colonic mucosa in F344 rats. *Mutation Research*, **2005**, 591, 237-246.

- Dorr R.T. Bleomycin pharmacology: mechanism of action and resistance, and clinical Pharmacokinetics. *Semin. Oncol.*, **1992**, 19, 3-8.
- Dourtoglou V.G., Makris D.P., Dounas F.B., Zonas C. Trans-resveratrol concentration in wines produced in Greece. *Journal of Food Composition and Analysis*, **1999**, 12, 227-233.
- Droby S., Prusky D., Jacoby B., Goldman A. Induction of antifungal resorcinols in flesh of unripe mango fruits and its relation to latent infection by *Altenaria alternata*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **1987**, 30, 285-292.
- Dunkan A.M., Phipps W.R., Kurzer M.S. Phyto-oestrogens. *Best Pract. & Res. Clin. Endocr. and Metab.*, **2003**, 17 (2), 253-271.
- Dynan W.S., Jendrisak J.J., Hager D.A., Burgess R.R. Purification and characterization of wheat germ DNA topoisomerase I (nicking-closing enzyme). *J. Biol. Chem.*, **1981**, 256, 5860-5865.
- Eddouks M., Maghrani M., Lemhadri A., Quahidi M.L., Jouad H. Ethnopharmacological survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes mellitus, hypertension and cardiac diseases in the south-east region of Morocco (Tafilalet). *Journal of Ethnopharmacology*, **2002**, 82, 97-103.
- El-Seedi H.R., Gohil S., Perera P., Torsell K.B.G., Bohlin L. Cyclopeptide alkaloids from *Heisteria nitida*. *Phytochemistry*, **1999**, 52, 1739-1744.
- Esposito E., Rotilio D., Di Matteo V., Di Giulio C., Cacchio M., Algeri S. A review of specific dietary antioxidants and the effects on biochemical mechanisms related to neurodegenerative processes. *Neurobiology of Aging*, **2002**, 23, 719-735.
- Etherton P.M.K., Hecker K.D., Bonanome A., Coval S.M., Binkoski A.E., Hilpert K.F., Griel A.E., Etherton T.D. Bioactive compounds in foods: Their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American Journal of Medicine*, **2002**, 113 (9B), 71S-88S.
- Evans P.J. & Halliwell B. Measurement of iron and copper in biological systems: bleomycin and copper-phenanthroline assays. *Method Enzymol.*, **1994**, 233, 82-92.

- Falchetti R., Fuggetta M.P., Lanzilli G., Tricarico M., Ravagnan C. Effects of resveratrol on human immune cell function. *Life Sciences*, **2001**, 70 (1), 81-96.
- Fan C.Q., Zhao W.M., Ding B.Y., Qin G.W. Constituents from the leaves of *Rhododendron latoucheae*. *Fitoterapia*, **2001**, 72, 449-452.
- Fan W., Tezuka Y., Kadota S. Propyl endopeptidase inhibitory activity of fourteen kampo formulas and inhibitory constituents of Tokaku-joki-to. *Chem. Pharm. Bull.*, **2000**, 48 (7), 1055-1061.
- Ferguson L.R., Lim I.F., Pearson A.E., Ralph J., Harris P.J. Bacterial antimutagenesis by hydroxycinnamic acids from plant cell walls. *Mutat. Res.*, **2003**, 542, 49-58.
- Fernandez M.A., Saenz M.T., Garcia M.D., *J. Pharm. Pharmacol.*, **1998**, 50 (10), 1183-1186.
- Finkel T. & Holbroock N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, **2000**, 408, 239-247.
- Fito M., Cladellas M., De la Torre R., Marti J., Alcantara M., Bastardes M.P., Marrugat J., Bruguera J., Sabater M.C.L., Vila J., Covas M.I. Antioxidant effect of virgin olive oil in patients with stable coronary heart disease: a randomized, crossover, controlled, clinical trial. *Atherosclerosis*, **2005**, 181, 149-158.
- Fitzpatrick D.F., Hirschfield S.L., Coffey R.G. Endothelium-dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **1993**, 265, H774-H778.
- Forster H., Nicklas H., Lutz S., *Planta Med.*, **1980**, 40, 309.
- Fossen T., Pedersen A.T., Andersen O.M. Flavonoids from red onion (*Allium cepa*). *Phytochemistry*, **1998**, 47 (2), 281-285.
- Frankel E.N., Kanmer J., German J.B., Parks E., Kinsella J.B. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet*, **1993**, 341, 454-457.
- Freedman J.E., Parker C., Li L., Perlman J.A., Frei B., Ivanov V. Select flavonoids and whole juice from purple grapes inhibit platelet function and enhance nitric oxide release. *Circulation*, **2001**, 103, 2792-2798.

- Fremont L. Biological effects of resveratrol. *Life Sciences*, **2000**, 66 (8), 663-673.
- Frohlich J.J & Moghadasian M.H. Effects of dietary phytosterols on cholesterol metabolism and atherosclerosis: clinical and experimental evidence: the reply. *The American Journal of Medicine*, **2000**, 109, 600-601.
- Fujimoto T., Ose Y., Sato T., Matsuda H., Nagase H., Kito H. Antimutagenic factors in aquatic plants. *Mutation Research*, **1987**, 178, 211-216.
- Fukai T., Marumo Ai., Kaitou K., Kanda T., Terada S., Nomura T. Antimicrobial activity of licorice flavonoids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Fitoterapia*, **2002**, 73, 536-539.
- Fukuyama Y., Sato T., Miura I., Asakawa Y. Drimane-type sesqui- and norsesquiterpenoids from *Polygonum hydropiper*. *Phytochemistry*, **1985**, 24 (7), 1521-1524.
- Furuta T., Fukuyama Y., Asakawa Y. Polygonolide, an isocoumarin from *Polygonum hydropiper* possessing anti-inflammatory activity. *Phytochemistry*, **1986**, 25, (2), 517-520.
- Galati G., Lin A., Sultan A.M., O' Brien P.J. Cellular and *in vivo* hepatotoxicity caused by green tea phenolic acids and catechins. *Free Radical Biology & Medicine*, **2006**, 40, 570-580.
- Gao X., Xu Y.X., Janakiraman N., Chapman R.A., Gautam S.C. Immunomodulatory activity of resveratrol: suppression of lymphocyte proliferation, development of cell mediated cytotoxicity, and cytokine production. *Biochemical Pharmacology*, **2001**, 62, 1299-1308.
- Garritano S., Pinto B., Giachi I., Pistelli L., Reali D. Assessment of estrogenic activity of flavonoids from Mediterranean plants using an *in vitro* short-term test. *Phytomedicine*, **2005**, 12, 143-147.
- Garrote G., Cruz J.M., Moure A., Dominguez H., Parajo J.C. Antioxidant activity of byproducts from the hydrolytic processing of selected lignocellulosic materials. *Trends in Food Science & Technology*, **2004**, 15, 191-200.
- Gasiorowski K., Szyba K., Brokos B., Kozubek A. Antimutagenic activity of resorcinolic lipids from cereal grains. *Mutation Research*, **1996**, 360, 201-300.

- Geetha T., Garg A., Chopra K., Kaur I.P. Delineation of antimutagenic activity of catechin, epicatechin and green tea extract. *Mutation Research*, **2004**, 556, 65-74.
- Gerhauser C. Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. *European Journal of Cancer*, **2005**, 41, 1941-1954.
- German J.B. & Walzem R.L. The health benefits of wine. *Annu. Rev. Nutr.*, 2000, 20, 561-593.
- Ghosh L., Arunachalam G., Murugesan M., Pal M., Saha B.P. Studies on the psychopharmacological activities of *Rumex nepalensis* Spreng. root extract in rats and mice. *Phytomedicine*, **2002**, 9, 202-206.
- Gilbert G., *Trends in plant sciences*, **2000**, 5 (10), 417.
- Goldberg D.M., Yan J., Soleas G.J., *Clin. Chem.*, **2003**, 36, 79-87.
- Goldberg U., Mosca A., Piano M.R., Fisher E.A. Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. *Circulation*, **2001**, 312, 731-736.
- Goldberg U., Mosca L., Piano M.R., Fischer E.A. Wine and your heart. *Circulation*, **2001**, 103, 472-475.
- Gonzalez-Paramas A.M., Esteban-Ruano S., Santos-Buelga C., Pascual-Teresa S., Rivas-Gonzalo J.C. Flavanol content and antioxidant activity in winery byproducts. *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 52, 234-238.
- Goetz G., Fkyerat A., Metais N., Kunz M., Tabacchi R., Pezet R., Pont V. Resistance factors to grey mould in grape berries: identification of some phenolics inhibitors of *Botrytis cinerea* stilbene oxidase. *Phytochemistry*, **1999**, 52, 759-767.
- Gosselin G., Bergogne J., Rudder J., Clercq E., Imbach J., *Journal of Medicinal Chemistry*, **1987**, 30, 982-991.
- Gosselin G., Bergogne J., Clercq E., Imbach J., *Journal of Medicinal Chemistry*, **1986**, 29, 9203-9213.
- Grassmann J., Hippeli S., Elstner E.F. Plant's defense and its benefits for animals and medicine: role of phenolics and terpenoids in avoiding oxidative stress. *Plant Physiol. Biochem.*, **2002**, 40, 471-478.
- Grey C.E. & Adlercreutz P. Ability of antioxidants to prevent oxidative mutations in *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutat. Res.*, **2003**, 527, 27-36.

- Gross G.J. Pharmacological preconditioning: Potential new treatment modalities for the ischemic myocardium. *Vascular Pharmacology*, **2005**, 42, 199.
- Grundy S.M., Ahrens E.H.Jr., Davignon J., *J. Lipid Res.*, **1969**, 10, 30415.
- Grundy S.M., *Am. J. Clin. Nutr.*, **1977**, 30 (6), 985-992.
- Grylls N.E. & Peak J.W., *Aust. J. Agric. Res.*, **1969**, 20 (37), 256-58.
- Guarnera P.M., Salerno G., Caneva G. Folk phytotherapeutical plants from *Maratea area* (Basilicata, Italy). *Journal of Ethnopharmacology*, **2005**, 99, 367-378.
- Guarnera P.M. Food medicine and minor nourishment in the folk traditions of Central Italy (Marche, Abruzzo and Latium). *Fitoterapia*, **2003**, 74, 515-544.
- Guarnera P.M. Traditional antihelmintic, antiparasitic and repellent uses of plants in Central Italy. *Journal of Ethnopharmacology*, **1999**, 68, 183-192.
- Guendez R., Kallithraka S., Makris D.P., Kefalas P. Determination of low molecular weight polyphenolic constituents in grape (*Vitis vinifera* sp.) seed extracts: Correlation with antiradical activity. *Food Chemistry*, **2005**, 89, 1-9.
- Gurbuz I., Ozkan A.M., Yesilada E., Kutsal O. Anti-ulcerogenic activity of some plants used in folk medicine of Pinarbasi (Kayseri, Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, **2005**, 101, 313-318.
- Guyton M.D., *Φυσιολογία του ανθρώπου*, **1990**.
- Haddock E., Gupta R., Al-Shafi S., Xaslam E. The metabolism of gallic acid and hexahydroxydiphenic acids in plants. Part I. Introduction. Naturally occurring galloyl esters. *J. Chem. Soc.*, **1982**, 2515-2524.
- Halliwell B. & Gutteridge J.M.C. The chemistry of oxygen radicals and other oxygen-derived species. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 2nd edition, Oxford University Press, Oxford, **1999**, 22-85.
- Harborne J.B & Baxter H., *The Handbook of Natural Flavonoids*, **1999**, London.
- Harborne J.B. & Baxter H., *Phytochemical Dictionary*, **1993**, Taylor & Francis, Eds, London.
- Harborne J.B., *The Flavonoids*, **1986**.
- Harborne J.B., Boulter D. & Turner B.L., *Chemotaxonomy of the Leguminosae*, **1971**, London and New York.

- Hase K., Oshugi M., Xiong Q., Basnet P., Kadota S., Namba T., *Biol. Pharm. Bull.*, **1997**, 20 (4), 381-385.
- Hashimoto M., Kim S., Eto M., Iijima K., Ako J., Yoshizumi M. Effect of acute intake of red wine on flow-mediated vasodilation of the brachial artery. *Am. J. Cardiol.*, **2001**, 88, 1457-1460.
- Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **2002**, 13, 572-584.
- Hendricks J.J.A., De Vries H., Van der Pol S.M.A., Van der Berg T.K., Van Tol E.A.F., Dijkstra C.D., *Biochemical Pharmacology*, **2003**, 65, 877-885.
- Hengtrakul P., Mathias M., Lorenz K. Effects of cereal alkylresorcinols on human platelet thromboxane production. *J. Nutr. Biochem.*, **1991**, 2, 20-24.
- Hernandez V., Manez S., Recio M.C., Giner R.M., Rios J.L. Anti-inflammatory profile of dehydrocostic acid, a novel sesquiterpene acid with a pharmacophoric conjugated diene. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2005**, 26 (2), 162-169.
- Hernandez Figueroa T.T., Rodriguez Rodriguez E., Sanchez Muniz F.J. The green tea, a good choice for cardiovascular disease prevention? *Arch. Latinoam. Nutr.*, **2004**, 54 (4), 380-394.
- Heywood V.H., *Flowering Plants of the World*, **1993**, Taylor & Francis, Eds, London.
- Heywood V.H. & Ball, P.W., **1968**, Leguminosae. In: *Flora Europaea* Vol 2, Tutin, T.G. *et al.*
- Ho H.M., Chen R.Y., Leung L.K., Chan F.L., Huang Y., Chen Z.C. Difference in flavonoid and isoflavone profile between soybean and soy leaf. *Biomed. Pharmacother.*, **2002**, 56, 289-295.
- Hollman P.C., De Vries J.H.M., Van Keewen S.D., Mengelers M.J.B., Katan M.B., *Am. J. Clin. Nutr.*, **1995**, 62, 1276-1282.
- Honda K., Nishii W., Hayashi N., *J. Chem. Ecol.*, **1997**, 23 (2), 323-332.
- Hosseinzadeh H., Ramezani M., Namjo N. Muscle relaxant activity of *Elaeagnus angustifolia* L. fruit seeds in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, **2003**, 84 (2-3), 275-278.

- Howitz K.T., Bitterman K.J., Cohen H.Y., Lamming D.W. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*, **2003**, 425, 191-196.
- Hsiang Y.H., Hertzberg R., Hecht S., Liu L.F. Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *J. Biol. Chem.*, **1985**, 260, 14873-14878.
- Inoshiri S., Sasaki M., Kohda H., Otsuka H., Yamasaki K. Aromatic glucosides from *Berchemia racemosa*. *Phytochemistry*, **1987**, 26 (10), 2811-2814.
- Isobe T., Ito N., Noda Y. Minor flavonoids from *Polygonum nodosum*. *Phytochemistry*, **1980**, 19, 1877.
- Ito J., Takaya Y., Oshima Y., Niwa M. New oligostilbenes having a benzofuran from *Vitis vinifera* ‘Kyohou’. *Tetrahedron*, **1999**, 55, 2529-2544.
- Jain A., Katewa S.S., Chaudhary B.L., Galav P. Folk herbal medicines used in birth control and sexual diseases by tribals of southern Rajasthan, India. *Journal of Ethnopharmacology*, **2004**, 90, 171-177.
- Jakupovic J., Tan F., Jia Z.J., Bolhmann F., Huneck S. Seco- and Nor-sesquiterpene lactones with a new carbon skeleton from *Artemisia santolinifolia*. *Phytochemistry*, **1991**, 30, (6), 1941-1946.
- Jang M., Cai L., Udeani G.O., Slowing K.V., Thomas C.F., Beecher C.W.W., Fong H.H.S., Farnsworth N.R., Kinghorn A.D., Mehta R.G., Moon R.C., Pezzuto J.M., *Science*, **1997**, 275, 218-220.
- Jay M., Aurangzeb H., Voirin B., Favre-Boinvin J., Virichel M.R. Les flavonoides de *Dorycnium suffruticosum* et de *Tetragonolobus siliquosus*. *Phytochemistry*, **1978**, 17, 1196-1198.
- Johnson F., Pillai K., Grollman A., Tseng L., Takeshita M., *Journal of Medicinal Chemistry*, **1984**, 27, 954-958.
- Kadarian C., Broussalis A.M., Mino J., Lopez P., Gorzalczany S., Ferraro G., Acevedo C. Hepatoprotective activity of *Achyrocline satureoides* (Lam) D.C. *Pharmacological Research*, **2002**, 45 (1), 57-61.

- Kallithraka S., Arvanitoyannis I., El-Zajouli A., Kefalas P. The application of an improved method for *trans*-resveratrol to determine the origin of Greek red wines. *Food Chemistry*, **2001**, 75, 355-363.
- Kammerer D., Claus A., Carle R., Schieber A. Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 52 (14), 4360-4367.
- Kang J.H., Park Y.H., Choi S.W., Yank E.K., Lee W.J. Resveratrol derivatives potently induce apoptosis in human promyelocytic leukemia cells. *Exp. Mol. Med.*, **2003**, 35 (6), 467-474.
- Kang S.S., Lee J.Y., Choi Y.K., Song S.S., Kim J.S., Jeon S.J., Han Y.N., Son K.H., Han B.H. Neuroprotective effects of naturally occurring biflavonoids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2005**, 15, 3588-3591.
- Karpozilos A. & Pavlidis N. The treatment of cancer in Greek antiquity. *European Journal of Cancer*, **2004**, 40, 2033-2040.
- Khatib A., Wilson E.G., Kim H.K., Lefeber A.W.M., Erkelens C., Choi Y.H., Verpoorte R. Application of two-dimensional J-resolved nuclear magnetic resonance spectroscopy to differentiantion of beer. *Analytica Chimica Acta*, **2006**, 559, 264-270.
- Kim H.J., Chang E.J., Cho S.H., Chung S.K., Park H.D., Choi S.W. Antioxidative activity of resveratrol and its derivatives isolated from seeds of *Paeonia lactiflora*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2002**, 66 (9), 1990-1993.
- Kim H.J., Chang E.J., Bae S.J., Shim S.M., Park H.D., Rhee C.H., Park J.H., Choi S.W. Cytotoxic and antimutagenic stilbenes from seeds of *Paeonia lactiflora*. *Arch. Pharm. Res.*, **2002**, 25 (3), 293-299.
- Kimura T., Yao S., Watanabe K., Kondo S., Ho I., Yamamoto I. Hypnotic action of N 3-substituted arabinofuranosyluracil on mice. *Chem. Pharm. Bull.*, **2001**, 49 (1), 111-113.
- Kiriakidis S., Stathi S., Jha H.C., *J.Clin. Biochem. Nutr.*, **1997**, 22, 139-147.
- Klipell K.F., Hiltl D.M., Schipp B.A., *Br. J. Urol.*, **1997**, 80, 427-432.
- Ko H.H., Weng J.R., Tsao L.T., Yen M.H., Wang J.P., Lin C.N. Anti-inflammatory flavonoids and pterocarpanoid from *Crotalaria pallida* and *C. assamica*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2004**, 14, 1011-1014.

- Kopp P., *Journal of Endocrinology*, **1998**, 138, 619-620.
- Kouno I., Inoue M., Onizuka Y., Fujisaki T., Kawano N. Iridoid and phenolic glucoside from *Vitex rotundifolia*. *Phytochemistry*, **1988**, 27 (2), 611-612.
- Kozubek A. Resorcinolic Lipids, the Natural Non-isoprenoid Phenolic Amphiphiles and Their Biological Activity. *Chemical Reviews*, **1999**, 99 (1), 1-25.
- Krishna M.C., De Graff W., Tamura S., Gonzalez F.J., Samuni A., Russo A., Mitchell J.B. Mechanisms of hypoxic and aerobic cytotoxicity of mitomycin C in Chinese hamster V79 cells. *Cancer Res.*, **1991**, 51, 6622-6628.
- Kritchevsky D. & Chen S.C. Phytosterols-health benefits and potential concerns: a review. *Nutrition Research*, **2005**, 25, 413-428.
- Ku Y. & Lee K.C. Removal of phenols from aqueous solution by XAD-4 resin. *Journal of Hazardous Materials*, **2000**, B, 80, 59-68.
- Kubo I., Murai Y., Soediro I., Soetarno S., Sastrodihardjo S. Cytotoxic anthraquinones from *Rheum pulmatum*. *Phytochemistry*, **1992**, 31 (3), 1063-1065.
- Kujawski W., Warszawski A., Ratajczak W., Porebski T., Capala W., Ostrowska I. Application of pervaporation and adsorption to the phenol removal from wastewater. *Separation and Purification Technology*, **2004**, 40, 123-132.
- Kyriakopoulos G., Doulia D., Anagnostopoulos E. Adsorption of pesticides on porous polymeric adsorbents. *Chemical Engineering Science*, **2005**, 60, 1177-1186.
- Laatikainen M. & Paatero E. Gold recovery from chloride solutions with XAD-7: Competitive adsorption of Fe (II)and Te (V). *Hydrometallurgy*, **2005**, 79, 154-171.
- Lameira J., Alves C.N., Moliner V., Silla E. A density functional study of flavonoid compounds with anti-HIV activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2006**, 41, 616-623.
- Lamuela-R.R.M. & De la Torre B.M.C. Beneficial effects of white wines. *Drugs Exp. Clin. Res.*, **1999**, 25 (2-3), 121-124.
- Landrault N., Poucheret P., Ravel P., Gasc F., Cros G., Teissedre P.L. Antioxidant capacities and phenolics levels of French wines from different varieties and vintages. *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, 49, 3341-3348.
- Lastra de la C. & Villegas I. Resveratrol as an anti-inflammatory and anti-aging agent: Mechanisms and clinical implications. *Mol. Nutr. Food Res.*, **2005**, 49, 405-430.

- Lawrence O., Manguro A., Lawrence A.D.W., A flavonol glucoside from *Embelia schimperi* leaves. *Phytochemistry*, **1997**, 44 (7), 1397-1398.
- Le Corre L., Chalabi N., Delort L., Bignon Y.J., Gallon D.J.B. Resveratrol and breast cancer chemoprevention: Molecular mechanisms. *Mol. Nutr. Food Res.*, **2005**, 49, 462-471.
- Le Marchand L. Cancer preventive effects of flavonoids--a review. *Biomed. Pharmacother.*, **2002**, 56, 296-301.
- Lee J.C., Lee K.Y., Kim J., Na C.S., Jung N.C., Chung G.H., Jang Y.S. Extract from *Rhus verniciflua* Stokes is capable of inhibiting the growth of human lymphoma cells. *Food and Chemical Toxicology*, **2004**, 42, 1383-1388.
- Lee Y.T., Don M.J., Hung P.S., Shen Y.C., Lo Y.S., Chang K.W., Chen C.F., Ho L.K. Cytotoxicity of phenolic acid phenethyl esters on oral cancer cells. *Cancer Letters*, **2005**, 223, 19-25.
- Lees A.M., Mok H.Y.I., Lee R.S. Plant sterols as cholesterol lowering agents: clinical trials in patients with hypercholesterolemia and studies of sterol balance. *Atheroscler.*, **1977**, 28, 325-338.
- Leikert J.F., Rathel T.R., Wohlfart P., Cheynier V., Vollmar A.M., Dirch V.M. Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells. *Circulation*, **2002**, 106, 1614-1617.
- Levin D.E., Hollstein M., Christman M.F., Schwiers E.A., Ames B.N. A new *Salmonella* tester strain (TA102) with A X T base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **1982**, 79, 7445-7449.
- Li A., Zhang Q., Zhang G., Chen J., Fei Z., Liu F. Adsorption of phenolic compounds from aqueous solutions by a water-compatible hypercrosslinked polymeric adsorbent. *Chemosphere*, **2002**, 47, 981-989.
- Li A., Zhang Q., Zhang G., Chen J., Fei Z., Long C., Li W. Adsorption of phenolic compounds on Amberlite XAD-4 and its acetylated derivative MX-4. *Reactive & Functional Polymers*, **2001**, 49, 225-233.

- Li A.S., Bandy B., Tsang S.S., Davison A.J. DNA-breaking versus DNA-protecting activity of four phenolic compounds *in vitro*. *Free Radic. Res.*, **2000**, 33, 551-566.
- Li R.W., Lin G.D., Myers S.P., Leach D.N. Anti-inflammatory activity of Chinese medicinal vine plants. *Journal of Ethnopharmacology*, **2003**, 85, 61-67.
- Li T.K & Liu L.F. Tumor cell death induced by topoisomerase-targeting drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **2001**, 41, 53-77.
- Li W., Asada Y., Yoshikama T. Flavonoid constituents from *Glycyrrhiza glabra* hairy root cultures. *Phytochemistry*, **2000**, 55 (5), 447-456.
- Li X., Matsumoto K., Murakami Y., Tezuka Y., Wu Y., Kadota S. Neuroprotective effects of *Polygonum multiflorum* on nigrostriatal dopaminergic degeneration induced by paraquat and maneb in mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, **2005**, 82, 345-352.
- Li Y., Cao Z., Zhu H. Upregulation of endogenous antioxidants and phase 2 enzymes by the red wine polyphenol, resveratrol in cultured aortic smooth muscle cells leads to cytoprotection against oxidative and electrophilic stress. *Pharmacological Research*, **2006**, 53, 6-15.
- Li Y. & Trush M.A. Reactive oxygen-dependent DNA damage resulting from the oxidation of phenolic compounds by a copper-redox cycle mechanism. *Cancer Res.*, **1994**, 54 (7), 1895s-1898s.
- Liu L.F. DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. *Annu. Rev. Biochem.*, **1989**, 58, 351-375.
- Lodovici M., Guglielmi M., Meoni M., Dolara P. Effect of natural phenolic acids on DNA oxidation *in vitro*. *Food and Chemical Toxicology*, **2001**, 39, 1205-1210.
- Lu Y. & Foo Y.L. Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chemistry*, **2001**, 75, 197-202.
- Lu Y. & Foo Y.L. The polyphenol constituents of grape pomace. *Food Chemistry*, **1999**, 65, 1-8.
- Luchsinger J.A. & Mayeux R. Dietary factors and Alzheimer's disease. *The Lancet, Neurology*, **2004**, 3, 579-587.

- Lucke J., Bowen P., Bohlmann J. *Vitis vinifera* terpenoid cyclases: functional identification of two sesquiterpene synthase cDNAs encoding (+)-valencene synthase and (-)-germacrene D synthase and expression of mono- and sesquiterpene synthases in grapevine flowers and berries. *Phytochemistry*, **2004**, 65, 2649-2559.
- Lundgren L.N. & Theander O. *Cis-* and *trans*-dihydroquercetin glucosides from needles of *Pinus sylvestris*. *Phytochemistry*, **1988**, 27 (3), 829-832.
- Lyu S.Y., Rhim J.Y., Park W.B. Antiherpetic activities of flavonoids against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) in vitro. *Arch. Pharm. Res.*, **2005**, 28 (11), 1293-1301.
- Madhan B., Subramanian V., Rao Raghava J., Balachandran U.N., Ramasami T. Stabilization of collagen using plant polyphenol: Role of catechin. *International Journal of Biological Macromolecules*, **2005**, 37 (1-2), 47-53.
- Mahmoud I., Marzouk M.S.A., Moharram F.A., El-Gindi M.R., Hassan A.M.K. Acylated flavonol glucosides from *Eugenia jambolana* leaves. *Phytochemistry*, **2001**, 58, 1239-1244.
- Malayappan B., Palanisamy A., Rama J.G.J., Ganga R.  $\beta$ -Cyclodextrin-polyurethane polymer as solid phase extraction material for the analysis of carcinogenic aromatic amines. *Analytica Chimica Acta*, **2004**, 509, 39-45.
- Manach C., Mazur A., Scalbert A. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Curr. Opin. Lipidol.*, **2005**, 16, 77-84.
- Mandel S. & Youdim M.B. Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases. *Free Radic. Biol. Med.*, **2004**, 37 (3), 304-317.
- Manoharan K.P., Benny T.K.H., Yang D. Cycloartane type triterpenoids from the rhizomes of *Polygonum bistorta*. *Phytochemistry*, **2005**, 66, 2304-2308.
- Maron D.M. & Ames B.N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity assay. *Mutat. Res.*, **1983**, 113, 173-215.
- Martin S., Andriambeloson E., Takeda K., Andriantsitohaina R. Red wine polyphenols increase calcium in bovine aortic endothelial cells: a basis to elucidate signaling pathways leading to nitric oxide production. *Br. J. Pharmacol.*, **2002**, 135, 1579-1587.

- Masaki M.E., Hiro S., Usuki Y., Harumoto T., Terazima M.N., Buonanno F., Miyake A., Iio H. Climacostol, a defense toxin of *Climacostomum virens* (protozoa, ciliata), and its congeners. *Tetrahedron*, **2004**, 60, 7041-7048.
- Masanori K. & Fukushima S., *Chem. Pharm. Bull.*, **1982**, 30 (4), 1163-1168.
- Matsuda H., Shimoda H., Morikawa T., Yoshikawa M. Phytoestrogens from the roots of *Polygonum cuspidatum* (Polygonaceae). Structure-requirement of hydroxyanthraquinones for estrogenic activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2001**, 11, 1839-1842.
- Matsui J., Kiyokawa N., Takenouchi H., Taguchi T., Suzuki K., Shiozawa Y., Saito M., Tang W.R., Katagiri Y.U., Okita H., Fujimoto J. Dietary bioflavonoids induce apoptosis in human leukemia cells. *Leukemia Research*, **2005**, 29, 573-581.
- Mc Cord J.M. Human disease, free radicals and the oxidant/antioxidant balance. *Clin. Biochem.*, **1993**, 26, 351-357.
- Mc Morris T.C. Discovery and development of sesquiterpenoid derived hydroxymethylacylfulvene: A new anticancer drug. *Bioorg. Med. Chem.*, **1999**, 7, 881-886.
- Medina J.H., Paladini A.C., Wolfman C., Levi de Stein M., Calvo D., Diaz L.E., Pena C., *Biochem Pharmacol.*, **1990**, 40 (10), 2227-2231.
- Mercer L.D., Kelly B.L., Horne M.K., Beart P.M. Dietary polyphenols protect dopamine neurons from oxidative insults and apoptosis: investigations in primary rat mesencephalic cultures. *Biochemical Pharmacology*, **2005**, 69, 339-345.
- Meyer A.S. Yi O.S., Pearson D.A., Waterhouse A.L., Frankel E.N. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation in relation to composition of phenolic antioxidants in grapes (*Vitis vinifera*). *J. Agric. Food Chem.*, **1997**, 45, 1638-1643.
- Miano L. Mediterranean diet, micronutrients and prostate carcinoma: a rationale approach to primary prevention of prostate cancer. *Arch. Ital. Urol. Androl.*, **2003**, 75 (3), 166-178.
- Miller J.M. & Bohm B.A. Flavonoids of *Leptarrhena pyrolifolia*. *Phytochemistry*, **1979**, 18, 1412-1413.

- Monagas M., Hernadez L.B., Gomez C.C., Bartolome B. Commercial dietary ingredients from *Vitis vinifera* L. leaves and grape skins: antioxidant and chemical characterization. *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, 54 (2), 319-327.
- Moreau R.A., Whitaker B.D., Hicks K.V. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Progress in Lipid Research*, **2002**, 41, 457-500.
- Moreno Angel. C., Martin-Cordero C., Iglesias-Guerra F., Victoria Toro M. Flavonoids from *Dorycnium rectum*. *Bioch. Syst. Ecol.*, **2002**, 30, 73-74.
- Mortelmans K. & Zeiger E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutat. Res.*, **2000**, 455, 29-60.
- Muniappan M & Sundararaj T. Antiinflammatory and antiulcer activities of *Bambusa arundinacea*. *Journal of Ethnopharmacology*, **2003**, 88, 161-167.
- Murthy K.N.C., Singh R.P., Jayaprakasha G.K. Antioxidant Activities of Grape (*Vitis vinifera*) Pomace Extracts. *Toxicol.*, **2002**, 40, 941-947.
- Nagatani Y., Warashina T., Noro T. Studies on the constituents from the aerial part of *Baccharis dracunculifolia* DC. *Chem. Pharm. Bull.*, **2001**, 49 (11), 1388-1394.
- Naidoo L.A.C., Drewes S.E., Van Staden J., Hutchings A. Exocarpic acid and other compounds from tubers and inflorescences of *Sarcophyte sanguinea*. *Phytochemistry*, **1992**, 31 (11), 3929-3931.
- Nakajima H., Wada M., Ota T., *Igaku to Seibutsugaku*, **1992**, 125 (60), 211-214.
- Narender T., Khaliq T., Goyal N., Gupta S. Synthesis of chromenochalcones and evaluation of their in vitro antileishmanial activity. *Bioorg. Med. Chem.*, **2005**, 13 (23), 6543-6550.
- Ndiaye M., Chataigneau M., Lobysheva I., Chataigneau M., Schini-Kerth V.B. Red wine polyphenols-induced, endothelium-dependent NO-mediated relaxation is due to the redox-sensitive PI3-kinase/Akt-dependenter phosphorylation of endothelial NO-synthase in the isolated porcine coronary artery. *FASEB J.*, **2005**, 19, 455-457.
- Negro C., Tommasi L., Miceli A. Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. *Bioresource Technology*, **2003**, 87, 41-44.
- Ness N.W., Norton A.R., Benson M. Carbon13-NMR studies on sitosterol biosynthesized from (<sup>13</sup>C) mevalonates. *Phytochemistry*, **1992**, 31 (3), 805-811.

- Niedz I. Cyanogenic Glucosides In *Linum usitatissimum*. *Phytochemistry*, **1998**, 49 (1), 59-63.
- Oh H., Kim D.H., Cho J.H., Kim Y.C. Hepatoprotective and free radical scavenging activities of phenolic petrosins and flavonoids isolated from *Equisetum arvense*. *Journal of Ethnopharmacology*, **2004**, 95, 421-424.
- Okamoto T. Safety of quercetin for clinical application (Review). *Int. J. Mol. Med.*, **2005**, 16 (2), 275-278.
- Olafsdottir E.S., Jorgensen L.B., Jaroszewski W.J. Incorporation of [1-<sup>13</sup>C]1-deoxy-D-xylulose into isoprenoids of the liverwort *Conocephalum conicum*. *Phytochemistry*, **2002**, 60, 269-273.
- Orthen P. & Popp M. Cyclitols as cryoprotectants for spinach and chickpea thylakoids. *Environmental and Experimental Botany*, **2000**, 44, 125-132.
- Ososki A.L. & Kennelly E.J. Phytoestrogens: A. review of the present state of research. *Phytotherapy Res.*, **2003**, 17, 845-869.
- Pabst A., Barron D., Adda J., Schreier P. Phenylbutan-2-one β-D-glucosides from raspberry fruit. *Phytochemistry*, **1990**, 29 (12), 3853-3858.
- Pace-Asciak C.R., Hahn S., Diamandis E.P., Soleas G., Goldberg D.M. The red wine phenolics *trans*-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implication for protection against heart coronary disease. *Clin. Chim. Acta*, **1995**, 235, 207-219.
- Pale E., Nacro M., Vanhaelen M., Vanhaelen-Fastre R., Ottinger R. Acylated anthocyanins from the flowers of *Ipomoea asapifolia*. *Phytochemistry*, **1998**, 48 (8), 1433-1437.
- Pan H. & Lundgren N. Phenolic extractives from root bark of *Picea abies*. *Phytochemistry*, **1995**, 39 (6), 1423-1428.
- Panizzi L., Caponi C., Catalano S., Cioni P.L., Morelli I. *In vitro* antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of *Rubus ulmifolius*. *Journal of Ethnopharmacology*, **2002**, 79, 165-168.
- Panthong A., Kanjanapothi D., Tuntiwachwuttikul P., Panchaoren O., Reutrakul V., *Phytomedicine*, **1994**, 1, 41.

- Panthong A., Kanjanapothi D., Tassaneeyakul W., Tuntiwachwuttikul P., Panchaoren O., Reutrakul V., *Planta Med.*, **1988**, 53, 133.
- Papamichael C., Karatzis E., Karatzi K., Aznaouridis K., Papaioannou T., Protopgerou A. Red wine's antioxidants counteract acute endothelial dysfunction caused by cigarette smoking in healthy nonsmokers. *Am. Heart. J.*, **2004**, 147: e5.
- Pathak D., Pathak H., Singla A.K. Flavonoids as medicinal agents. Recent advances. *Fitoterapia*, **1991**, 62, 371-389.
- Pauletti P.M., Araujo A.R., Young M.C., Giesbrecht A.M., Bolzani V.D. Nor-Lignans from the leaves of *Styrax ferrugineus* (Styracaceae) with antibacterial and antifungal activity. *Phytochemistry*, **2000**, 55 (6), 597-601.
- Pelletier X., Belbraouet S., Mirabel D. A diet moderately enriched in phytosterols lowers plasma cholesterol concentrations in normocholesterolemic humans. *Ann. Nutr. Metab.*, **1995**, 39, 291-295.
- Penna C., Marino S., Vivot E., Cruanes M.C., Munoz J. de D., Cruanes J., Ferraro G., Gutkind G., Martino V. Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*. *Journal of Ethnopharmacology*, **2001**, 77, 37-40.
- Peng Z.F., Strack D., Baumert A., Subramaniam R., Goh N.K., Chia T.F., Tan S.N., Chia L.S. Antioxidant flavonoids from leaves of *Polygonum hydropiper* L. *Phytochemistry*, **2003**, 62, 219-228.
- Perez A.I.R., Gomez M.I., Raventos R.M.L., De la Torre B.M.C., *J. Agric. Food. Chem.*, **1999**, 47, 1533-1536.
- Petereit F., Kalodziej H., Nahrstedt A. Flavan-3-ols and proanthocyanidins from *Cistus incanus*. *Phytochemistry*, **1991**, 30 (3), 981-985.
- Petroni A., Blasevich M., Salami M., Papini N., Montedoro G.F., Galli C. Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil. *Thrombosis Research*, **1995**, 78 (2), 151-160.
- Plat J., Kerckhofs D.A., Mensink R.P., *Curr. Opin. Lipidol.*, **2000**, 11 (6), 571-576.
- Polkowski K., Popiolkiewicz J., Krzeczkynski P., Ramza J., Pucko W., Stendel O.Z., Boryski J., Skierski J.S., Mazurek A.P., Grynkiewicz G. Cytostatic and Cytotoxic

activity of synthetic genistein glucosides against human cancer cell lines. *Cancer Letters*, **2004**, 203, 59-69.

- Pols J.R.Z., Freyer A.J., Killmer L.B., Porter J.R. Antimicrobial resveratrol tetramers from the stem bark of *Vatica oblongifolia* ssp. *oblongifolia*. *J. Nat. Prod.*, **2002**, 65, (110), 1554-1559.
- Polunin O., *Flowers of Greece and the Balkans*, **1980**, 216.
- Polunin O., *Flowers of Europe*, **1969**, 61-63.
- Pouchert C.J & Benhke J., *The Aldrich library of <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H spectra*, **1993**, 1, 756.
- Pradhan K.J., Variyar P.S., Bandekar J.R. Antimicrobial activity of novel phenolic compounds from green pepper (*Piper nigrum* L.). *Lebensm.-Wiss.u-Technol.*, **1999**, 32, 121-123.
- Prasad N.R., Anandi C., Balasubramanian S., Pugalendi K.V. Antidermatophytic activity of extracts from *Psoralea corylifolia* (Fabaceae) correlated with the presence of a flavonoid compound. *Journal of Ethnopharmacology*, **2004**, 91, 21-24.
- Prokof'eva N.G., Utkina N.K., Chaikina E.L., Makarchenko A.E. Biological activities of marine sesquiterpenoid quinones: structure-activity relationships in cytotoxic and hemolytic assays. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **2004**, Part B, 139, 169-173.
- Rabe T. & Van Staden J. Isolation of an antibacterial sesquiterpenoid from *Warburgia salutaris*. *Journal of Ethnopharmacology*, **2000**, 73, 171-174.
- Rahimi R., Nikfar S., Larijani B., Abdollahi M. Review on the role of antioxidants in the management of diabetes and its complications *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **2005**, 59, 365-373.
- Rahman M.A., Mossa J.S., Al-Said M.S., Al-Yahya M.A. Medicinal plant diversity in the flora of Saudi Arabia I: a report on seven plant families. *Fitoterapia*, **2004**, 75, 149-161.
- Rahman A., Nasim S., Baig I., Jalil S., Orhan I., Sener B., Choudhary M.I. Anti-inflammatory isoflavonoids from the rhizomes of *Iris germanica*. *Journal of Ethnopharmacology*, **2003**, 86, 177-180.

- Rajabi L., Courreges C., Montoya J., Aguilera R.J., Primm T.P. Acetophenones with selective antimycobacterial activity. *Lett. Appl. Microbiol.*, **2005**, 40 (3), 212-217.
- Randhir R., Lin Y.T., Shetty K. Stimulation of phenolics, antioxidant and antimicrobial activities in dark germinated mung bean sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. *Process Biochemistry*, **2004**, 39, 637-646.
- Rathore A., Sharma S.C., Tandon J.S. Flavanones from *Polygonum nepalense*. *Phytochemistry*, **1986**, 25 (9), 2223-2225.
- Ratna W.N. & Simonelli J.A. The action of dietary phytochemicals quercetin, catechin, resveratrol and naringenin on estrogen-mediated gene expression. *Life Sciences*, **2002**, 70, 1577-1589.
- Rauter A.P., Martins A., Borges C., Ferreira J., Justino J., Bronze M.R., Coelho A.V., Choi Y.H., Verpoorte R. Liquid chromatography-diode array detection-electrospray ionisation mass spectrometry/nuclear magnetic resonance analyses of the anti-hyperglycemic flavonoid extract of *Genista tenera*. Structure elucidation of a flavonoid-C-glucoside. *Journal of Chromatography A*, **2005**, 1089, 59-64.
- Renaud S. & De Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*, **1992**, 339, 1523-1526.
- Rimm E.B., Klatsky A., Grobbee D., Stampfer M.J., Review of moderate alcohol consumption and reduced risk of coronary heart disease: is the effect due to beer, wine or spirits? *B.M.J.*, **1999**, 312, 731-736.
- Renault J.H., Thepenier P., Hanrot M.Z., Olivier L. Le Men., Durand A., Foucault A., Margraff R. Preparative separation of anthocyanins by gradient elution centrifugal partition chromatography. *Journal of Chromatography A*, **1997**, 763, 345-352.
- Rocha F.F., Lapa A.J., De Lima T.C.M. Evaluation of the anxiolytic-like effects of Cecropia glazioui Sneth in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, **2002**, 71, 183-190.
- Rodrigo R. & Rivera G. Renal damage mediated by oxidative stress: a hypothesis of protective effects of red wine. *Free Radical Biology & Medicine*, **2002**, 33 (3), 409-422.

- Rodriguez-Delgado M.A., Malovana S., Perez J.R., Borges T., Garcia M.F.J. Separation of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography with absorbance and fluorimetric detection. *Journal of Chromatography A*, **2001**, 912, 249-257.
- Rubinstein I., Goad J.L., Clague D.A., Mulheirn L. The 220 MHz NMR spectra of phytosterols. *Phytochemistry*, **1976**, 15, 195-200.
- Russo A., Palumbo M., Aliano C., Lempereur L., Scoto G., Renis M. Red wine micronutrients as protective agents in Alzheimer-like induced insult. *Life Sciences*, **2003**, 72, 2369-2379.
- Russo P., Tedesco I., Russo M., Russo G.L., Venezia A., Cicala C. Effects of de-alcoholated red wine and its phenolic fractions on platelet aggregation. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, **2001**, 11, 25-29.
- Saijo R., Nonaka G.I., Nishioka I. Phenol glucoside gallates from *Mallotus japonicus*. *Phytochemistry*, **1989**, 28 (9), 2443-2446.
- Saito Y., Zevako T., Agrofoglio L. Chemical synthesis of <sup>13</sup>C labeled anti-HIV nucleosides as mass-internal standards. *Tetrahedron*, **2002**, 58, 9593-9603.
- Sakkiadi A.V., Stavrakakis M.N., Haroutounian S. Direct HPLC assay of five biologically interesting phenolic antioxidants in varietal Greek red wines. *Lebensm.-Wiss. Technol.*, **2001**, 34, 410-413.
- Saleem A., Husheem M., Harkonen P., Pihlaja K. Inhibition of cancer cell growth by crude extract and the phenolics of *Terminalia chebula* retz. fruit. *Journal of Ethnopharmacology*, **2002**, 81, 327-336.
- Salib J.Y. & Michael H.N. Cytotoxic phenylethanol glucosides from *Psidium guaiava* seeds. *Phytochemistry*, **2004**, 65, 2091-2093.
- Sandler M. & Pinder R., *Wine. A scientific Exploration*, **2003**.
- Sang S., Kikuzaki H., Lapsley K., Rosen R.T., Nakatani N., Ho C.T. Sphingolipid and other constituents from almond nuts (*Prunus amygdalus* Batsch). *Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, 4709-4712.
- Sannomiya M., Fonseca V.B., Da Silva M.A., Rocha L.R.M., Dos Santos L.C., Hiruma-Lima C.A., Brito A.R.M.S., Vilegas W. Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, **2005**, 97, 1-6.

- Santamour F.S J<sub>R</sub>. Amygdalin in *Prunus* leaves. *Phytochemistry*, **1998**, 47 (8), 1537-1538.
- Santana-Rios G., Orner G.A., Amantana A., Provost C., Wu S.Y., Dashwood R.H. Potent antimutagenic activity of white tea in comparison with green tea in the *Salmonella* assay. *Mutat. Res.*, **2001**, 495, 61-74.
- Scalbert A., Monties B., Lallemand J.Y., Guittet E., Rolando C. Ether linkage between phenolic acids and lignin fractions from wheat straw. *Phytochemistry*, **1985**, 24 (6), 1359-1362.
- Schoefs B. Determination of pigments in vegetables. *Journal of Chromatography A*, **2004**, 1054, 217-226.
- Schultz T.P., Hubbard T.M.J<sub>R</sub>, Jin Le H., Fisher T.H., Nicholas D.D. Role of stilbenes in the natural durability of wood: Fungicidal structure-activity relationships. *Phytochemistry*. **1990**, 29 (5), 1501-1507.
- Scordino M., Di Mauro A., Passerini A., Maccarone E. Adsorption of flavonoids on resins: Cyanidin-3-glucoside. *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 52, 1965-1972.
- Scordino M., Di Mauro A., Passerini A., Maccarone E. Adsorption of flavonoids on resins: Hesperidin. *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51, 6998-7004.
- Seigler D.S., Conn E. E., Dunn J.E., Janzen D.H. Cyanogenesis in *Acacia farnesiana*. *Phytochemistry*, **1979**, 18 (8), 1389-1390.
- Seigler D.S. Isolation and characterization of naturally occurring cyanogenic compounds. *Phytochemistry*, **1975**, 14, 9-29.
- Serra S. & Fuganti C. Aromatic annulation on the *p*-menthane monoterpenes: enantiospecific synthesis of the trans and cis isomers of calamene and 8-hydrocycalamene. *Tetrahedron Letters*, **2005**, 46, 4769-4772.
- Shahidi F. & Naczk M. Phenolics in Food and Nutraceuticals. *Phenolics in Food and Nutraceuticals*, **2003**.
- Shen C.C., Chang Y.S., Ho L.K. Nuclear magnetic resonance studies of 5,7-dihydroxyflavonoids. *Phytochemistry*, **1993**, 34 (3), 843-845.
- Shikishima Y., Takaishi Y., Honda G., Ito M., Takeda Y., Kodzhimatov O.K., Ashurmertov O. Phenylbutanoids and stilbene derivatives of *Rheum maximowiczii*. *Phytochemistry*, **2001**, 56, 377-381.

- Shin M.J., Rim S.J., Jang Y., Choi D., Kang S.M., Cho S.Y., Kim S.S., Kim D.K., Song K., Chung N. The cholesterol-lowering effect of plant sterol-containing beverage in hypercholesterolemic subjects with low cholesterol intake. *Nutrition Research*, **2003**, 23, 489-496.
- Shivalingappa N.D., Satyanarayan N.D., Purohit M.G. Antiimplantation and pregnancy interruption efficacy of *Rivea hypocrateriformis* in the rat. *Journal of Ethnopharmacology*, **2001**, 74, 245-249.
- Sies H., Stahl W., Sevanian A. A nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. *J. Nutr.*, **2005**, 135, 969-972.
- Signorelli P. & Ghidoni R. Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **2005**, 16, 449-466.
- Slimestad R., Andersen M.Q., Francis W.G., Marston A., Hostettmann K. Syringetin 3-O-(6''-acetyl)- $\beta$ -glucopyranoside and other flavonols from needles of Norway spruce. *Picea abies*. *Phytochemistry*, **1995**, 40 (5), 1537-1542.
- Smite E., Pan H., Lundgren L.N. Lignan glycosides from inner bark of *Betula pendula*. *Phytochemistry*, **1995**, 40 (1), 341-344.
- Smith R. C., Weisleder D., Miller R.W. Linustatin and neolinustatin: cyanogenic glucosides of linseed meal that protect animals against selenium toxicity. *J. Org. Chem.*, **1980**, 45, 507-510.
- Smolarz H.D & Potrzewboski M.J. Persilben, a new carboxystilbene from *Polygonum persicaria*. *Journal of Molecular Structure*, **2002**, 605, 151-156.
- Sobhani A.M., Ebrahimi S.A., Mahmoudian M. An in vitro evaluation of human DNA topoisomerase I inhibition by *Peganum Harmala* L. seeds extract and its beta-carboline alkaloids. *J. Pharm. Pharm. Sci.*, **2002**, 5, 19-23.
- Soidinsalo O. & Wahala K. Synthesis of phytoestrogenic isoflavanoid disulfates. *Steroids*, **2004**, 69, 613-616.
- Sokmen M., Angelova M., Krumova E., Pashova S., Ivancheva S., Sokmen A., Serkedjieva J. *In vitro* antioxidant activity of polyphenol extracts with antiviral properties from *Geranium sanguineum* L. *Life Sciences*, **2005**, 76, 2981-2993.
- Soleas G.J., Diamandis E.P., Goldberg D.M. Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention. *J. Clin. Lab. Anal.*, **1997**, 11, 287-313.

- Sonee M., Sum T., Wang C., Mukherjee S.K. The soy isoflavone, genistein protects human cortical neuronal cells from oxidative stress. *Neurotoxicology*, **2004**, 25, 885-891.
- Soobrattee M.A., Neergheen V.S., Luximon-Ramma A., Aruoma O.I., Bahorun T. Phenolic as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanisms and actions. *Mutation Research*, **2005**, 579, 200-213.
- Soto-Blanco B., Maiorka P.C., Gorniac S.L. Neuropathologic study of long term cyanide administration to goats. *Food and Chemical Toxicology*, **2002**, 40, 1693-1698.
- Spencer K.C. & Seigler D.S. Co-occurrence of Valine/Isoleucine-derived and cyclopentenoid cyanogens in a *Passiflora* species. *Biochemical Systematics and Ecology*, **1985**, 13 (3), 303-304.
- Spotte S. & Adams G. Effect of two polymeric resins on total organic carbon (TOC) in recirculated seawater. *Aquaculture*, **1982**, 29, 159-164.
- Stanley L.L. & Mazier M.J.P. Potential explanations for the french paradox. *Nutrition Research*, **1999**, 19 (1), 3-15.
- Stavric B. Antimutagens and anticarcinogens in foods. *Fd Chem. Toxic.*, **1994**, 32 (1), 79-90.
- Steenkamp V. Phytomedicines for the prostate. *Fitoterapia*, **2003**, 74, 545-552.
- Stein J.H., Keevil J.G., Wiebe D.A., Aeschlimann S., Folts J.D. Purple grape juice improves endothelial function and reduces the susceptibility of LDL cholesterol to oxidation in patients with coronary artery disease. *Circulation*, **1999**, 100, 1050-1055.
- Stintzing F.C. & Carle R. Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends in Food Science and Technology*, **2004**, 15, 19-38.
- Stoclet J.C., Chataigneau T., Ndiaye M., Oak M.H., Bedoui J.E., Chataigneau M., Kerth V.B.S. Vascular protection by dietary polyphenols. *European Journal of Pharmacology*, **2004**, 500, 299-313.
- Stoessl A., Stothers J.B., Ward E.W.B. Sesquiterpenoid stress compounds of the Solanaceae. *Phytochemistry*, **1976**, 15, 855-872.

- Stojanovic G., Radulovic N., Hashimoto T., Palic R. In vitro antimicrobial activity of extracts of four Achillea species: The composition of *Achillea clavennae* L. (Asteraceae) extract. *Journal of Ethnopharmacology*, **2005**, 101, 185-190.
- Strack D., Heilemann J., Wray V., Dirks H. Structures and accumulation patterns of soluble and insoluble phenolics from Norway spruce needles. *Phytochemistry*, **1989**, 28 (8), 2071-2078.
- Strid A., *Flora Hellenica*, **1997**, 1, 75-84.
- Su B.N., Cuendet M., Hawthorne E., Kardono L.B.S., Riswan S., Fong H.H.S., Mehta R.G., Pezzuto J.M., Kinghorn A.D. Constituents of the bark and twigs of *Atocarpus dadah* with cyclooxygenase inhibitory activity. *J. Nat. Prod.*, **2002**, 65, 163-169.
- Sudhop T., Lutjohann D., Von Bergmann K. Sterol transporters: targets of natural sterols and new lipid lowering drugs. *Pharmacology and Therapeutics*, **2005**, 105, 333-341.
- Sugihara N., Kaneko A., Furuno K. Oxidation of flavonoids which promote DNA degradation induced by bleomycin-Fe Complex. *Biol. Pharm. Bull.*, **2003**, 26, 1108-1114.
- Sun S.Y., Hail N., Lotan R. Apoptosis as a novel target for cancer chemoprevention. *J. Nat. Cancer Inst.*, **2004**, 96, 662-672.
- Susse M., Johne S., Hesse M. Synthese un Reaktionsverhalten 2'-substituierter Isoflavone. *Helvetica Chimica Acta*, **1992**, 75, 457-470.
- Suthar A.C., Banavalikar M.M., Biyani M.K. Pharmacological activities of Genistein, an isoflavone from soy (*Glycine max*): part II--anti-cholesterol activity, effects on osteoporosis & menopausal symptoms. *Indian J. Exp. Biol.*, **2001**, 39 (6), 520-525.
- Suzuki Y., Kurano M., Esumi Y., Yamaguchi I., Doi Y. Biosynthesis of 5-alkylresorcinol in rice: incorporation of a putative fatty acid unit in the 5-alkylresorcinol carbon chain. *Bioorganic Chemistry*, **2003**, 31, 437-452.
- Tahara S. & Ibrahim R.K. Prenylated isoflavonoids—An update. *Phytochemistry*, **1995**, 38 (5), 1073-1094.

- Takasaki M., Konoshima T., Kuroki S., Tokuda H., Nishino H. Cancer chemopreventive activity of phenylpropanoid esters of sucrose, vanicoside B and lapathoside A, from *Polygonum lapathifolium*. *Cancer Letters*, **2001**, 173, 133-138.
- Takasugi M., Anetaj M., Masamune T., Shirata A., Takahashi K. Broussonins A and B, new phytoalexins from diseased *Paper mulberry*. *Chemistry Letters*, 1980, 339-340.
- Taskova R., Handjieva N., Peev D., Popov S. Iridoid glucosides from three veronica species. *Phytochemistry*, **1998**, 49 (5), 1323-1327.
- Tchuendem M.H.K., Mbah J.A., Tsopmo A., Ayafor J.F., Sterner O., Okunjic C.C., Iwu M.M., Schuster B.M. Anti-plasmodial sesquiterpenoids from the African *Renealmia cincinnata*. *Phytochemistry*, **1999**, 52, 1095-1099.
- Teresita M., Kilkuzaki H., Hisamoto M., Nakatani N., *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **2000**, 77 (6), 667-673.
- Thompson J.M. & Dutky R.S. NMR spectra of C-24 isomeric sterols. *Phytochemistry*, **1972**, 11, 1781-1790.
- Timberlake C.F. & Henry B.S. Plant pigments as a natural food colours. *Endeavour, New Series*, **1986**, 10 (1), 31-36.
- Torres J.L., Varela B., Garcia M.T., Garilla J., Matito C., Centelles J.J., Cascante M., Sort X., Bobet R. Valorization of grape (*Vitis vinifera*) byproducts. Antioxidant and biological properties of polyphenolic fractions differing in procyanidin composition and flavonol content. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, 7548-7555.
- Torres P., Avila J.G., Vivar de A.R., Garcia A.M., Marin J.C., Aranda E., Cespedes C.L. Antioxidant and insect growth regulatory activities of stilbenes and extracts from *Yucca periculosa*. *Phytochemistry*, **2003**, 64, 463-473.
- Tsai I.L., Lin W.Y., Teng C.M., Ishikawa T., Doong S.L., Huang M.W., Chen Y.C., Chen I.S. Coumarins and antiplatelet constituents from the root bark of *Zanthoxylum schinifolium*. *Planta Med.*, **2000**, 66, 618-623.
- Tsai P.L., Wang J.P., Chang C.W., Kuo S.C., Chao P.D.L. Constituents and bioactive principles of *Polygonum chinensis*. *Phytochemistry*, **1998**, 49 (6), 1663-1666.
- Tsai W.C., Li Y.H., Lin C.C., Chao T.H., Chen J.H. Effects of oxidative stress on endothelial function after a high fat meal. *Clin. Sci.*, **2004**, 106, 315-319.

- Tseng S.H., Lee H.H., Chen L.G., Wu C.H., Wang C.C. Effects of three purgative decoctions on inflammatory mediators. *Journal of Ethnopharmacology*, **2005**, 72, 43-46.
- Tsukamoto S., Wakana T., Koimaru K., Yoshida T., Sato M., Ohta T. 7-hydroxy-3-(4-hydroxybenzyl)chroman and broussonin b: neurotrophic compounds, isolated from Anemarrhena aspheloides BUNGE, function as proteasome inhibitors. *Biol. Pharm. Bull.*, **2005**, 28 (9), 1798-1800.
- Tuck K.L. & Hayball P.J. Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **2002**, 13, 636-644.
- Tutin T.G., Heywood V.H., Burges N.A., Moore D.M., Valentine D.H., Walters S.M., Webb D.A., *Flora Europaea*, University Press, Cambridge, UK, **1972**, 1, 75-80.
- Urones J.G., Marcos I.S., Perez B.G., Barcala P.B. Flavonoids from *Polygonum minus*. *Phytochemistry*, 1990, 29 (11), 3687-3689.
- Valenzuela A., Guerra R., Videla L.A. Antioxidant properties of the flavonoids silybin and (+)-cyanidanol-3: Comparison with butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *Planta Med.*, **1986**, 52, 438.
- Van Tran H., Roufogalis B.D., Duke C.C. An Efficient Synthesis of 5,5'-(Tetradecane-1,14-diyl)bis(2-methylbenzene-1,3-diol). *Aust. J. Chem.*, **1997**, 50, 747-750.
- Ventura P., Bini A., Panini R., Marri L., Tomasi A., Salvioli G. Red wine consumption prevents vascular oxidative stress induced by a high-fat meal in healthy volunteers. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, **2004**, 74, 137-43.
- Vetter J. Plant cyanogenic glycosides. *Toxicon*, **2000**, 38, 11-36.
- Vinson J.A., Teufel K., Wu N. Red wine, dehalcolized red wine, and especially grape juice, inhibit atherosclerosis in a hamster model. *Atherosclerosis*, **2001**, 156, 67-72.
- Virac X., Castagnino C., Walto-Teguo P., Delaunay J.C., Vercauteren J., Monti J.P., Deffieux G., Merillon J.M., *J. Agric. Food. Chem.*, **2001**, 49 (12), 5934-5938.
- Visioli F., Borsani L., Galli C. Diet and prevention of coronary heart disease: the potential role of phytochemicals. *Cardiovascular Research*, **2000**, 47, 419-425.

- Vita J.A. Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function. *Am. J. Clin. Nutr.*, **2005**, 81, 292S-297S.
- Vitor R.F., Filipe H.M., Texeira G., Borges C., Rodrigues A.I., Texeira A., Paulo A. Flavonoids of an extract of *Pterospartum tridentatum* showing endothelial protection against oxidative injury. *Journal of Ethnopharmacology*, **2004**, 93, 363-370.
- Vivas N., Nonier M.F., Gaulejac de N.V., Absalon C., Bertrand A., Mirabel M. Differentiation of proanthocyanidin tannins from seeds, skins and stems of grapes (*Vitis vinifera*) and heartwood of Quebracho (*Schinopsis balansae*) by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry and thioacidolysis/liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, **2004**, 513, 247-256.
- Vogel R.A., Corretti M.C., Plotnick G.D. Effect of a single high-fat meal on endothelial function in healthy subjects. *Am. J. Cardiol.*, **1997**, 79, 350-354.
- Wakata A., Oka N., Hiramoto K., Yoshioka A., Negishi K., Wataya Hayatsu H. DNA strand cleavage *in vitro* by 3-hydroxyamino-1-methyl-5H-pyridol [4,3-b]-indole, a direct acting mutagen formed in the metabolism of carcinogenic 3-amino-1-methyl-5H-pyridol[4,3-b] indole. *Cancer Res.*, **1985**, 45, 5867-5871.
- Wang H.H. Antitrichomonal action of emodin in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, **1993**, 40, 111-116.
- Wang J.C. DNA topoisomerases. *Annu. Rev. Biochem.*, **1996**, 65, 635-692.
- Wang K.J., Zhang Y.J., Yang C.R. Antioxidant phenolic compounds from rhizomes of *Polygonum paleaceum*. *Journal of Ethnopharmacology*, **2005**, 96, 483-487.
- Warshaw E.M. & Zug K.A. Sesquiterpene lactone allergy. *American Journal of Contact Dermatitis*, **1996**, 7 (1), 1-23.
- Watanabe S., Uesugi S., Kikuchi Y. Isoflavones for prevention of cancer, cardiovascular diseases, gynecological problems and possible immune potentiation. *Biomed. Pharmacother.*, **2002**, 56, 302-312.
- Watson L & Dallwitz M.J., 1992 onwards. *The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval*. Version: 23rd October **2005**.

- Wen A., Delaquis P., Stanich K., Toivonen P. Antilisterial activity of selected phenolic acids. *Food Microbiology*, **2003**, 20, 305-311.
- Wilt T.G., Mac Donald R., Ishani A. Beta-sitosterol for the treatment of benign prostatic hyperplasia: a systematic review. *Br. J. Urol.*, **1999**, 83 (9), 976-983.
- Wiseman H., Kaur H., Halliwell B. DNA damage and cancer: measurement and mechanism. *Cancer Lett.*, **1995**, 93, 113-120.
- Wlodzimierz B.W. & Geza H., *Plant Physiol.*, **1996**, 110, 791-799.
- Wong C.C., Li H.B., Cheng K.W., Chen F. A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chemistry*, **2006**, 97, 705-711.
- Wood J.G., Rogina B., Lavu S., Howitz K. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature*, **2004**, 430, 686-689.
- Xia Z., Tauskela J., Small D.L. Disulfonic stilbenes prevent b-amyloid (25-35) neuronal toxicity in rat cortical cultures. *Neuroscience Letters*, **2003**, 340, 53-56.
- Yamagishi M., Osakabe N., Natsume N., Adachi T., Takizawa T., Kumon H., Osawa T. Anticlastogenic activity of cacao: inhibitory effects of cacao liquor polyphenols against mitomycin C-induced DNA damage. *Food Chem. Toxic.*, **2001**, 39, 1279-1283.
- Yamakoshi J., Saito M., Kataoka S., Kikuchi M. Proanthocyanidin-rich extract from grape seeds attenuates the development of aortic atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Food and Chemical Toxicology*, **2002**, 40, 599-607.
- Yamakoshi J., Kataoka S., Koga T., Ariga T. Proanthocyanidin-rich extract from grape seeds attenuates the development of aortic atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis*, **1999**, 142, 139-149.
- Yamamoto I., Kimura T., Tateoka Y., Watanabe K., Ho I. *Journal of Medicinal Chemistry*, **1987**, 30, 2227-2231.
- Yamamoto T., Hsu S., Lewis J., Wataha J., Dickinson D., Singh B., Bollag W.B., Lockwood P., Ueta E., Osaki T., Schuster G. Green tea polyphenol causes differential oxidative environments in tumor versus normal epithelial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2003**, 307, 230-236.

- Yamanaka N., Oda O., Nagao S. Prooxidant activity of caffeic acid, dietary non-flavonoid phenolic acid, on Cu<sup>2+</sup> induced low density lipoprotein oxidation. *FEBS Lett.*, **1997**, 405, 186-190.
- Yan K.X., Terashima K., Takaya Y., Niwa M. A novel oligostilbene named (+)-viniferol A from the stem of *Vitis vinifera* ,Kyohou'. *Tetrahedron*, **2001**, 57, 2711-2715.
- Yenesew A., Induli M., Derese S., Midiwo J.O., Heydenreich M., Peter M.G., Akala H., Wangui J., Liyala P., Waters N.C. Anti-plasmodial flavonoids from the stem bark of *Erythrina abyssinica*. *Phytochemistry*, **2004**, 65, 3029-3032.
- Yilmaz Y. & Toledo R.T. Major flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 52 (2), 255-260.
- Yu J., Ahmedna M., Goktepe I., Dai J. Peanut skin procyanidins: Composition and antioxidant activities as affected by processing. *Journal of Food Composition and Analysis*, **2006**, 19, 364-371.
- Zacchino S.A., Lopez S.N., Pezzenati G.D., Furlan R.L., Santecchia C.B., Munoz L., Giannini F.A., Rodriguez A.M., Enriz R.D. In vitro evaluation of antifungal properties of phenylpropanoids and related compounds acting against dermatophytes. *J. Nat. Prod.*, **1999**, 62 (10), 1353-1357.
- Zhao S.P., Liu L., Gao M., Zhou Q.C., Li Y.L., Xia B. Impairment of endothelial function after a high-fat meal in patients with coronary artery disease. *Coron. Artery Dis.*, **2001**, 12, 561-565.
- Zhong Y., Yoshinaka Y., Takeda T., Shimizu N., Yoshizaki S., Inagaki Y., Matsuda S., Honda G., Fujii N., Yamamoto N. Highly potent anti-HIV-1 activity isolated from fermented *Polygonum tinctorium* Aiton. *Antiviral Research*, **2005**, 66, 119-128.
- Zhong X.N., Otsuka H., Ide T., Hirata E., Takeda Y. Hydroquinones diglucoside acyl esters from the leaves of *Myrsine seguinii*. *Phytochemistry*, **1999**, 52, 923-927.
- Zou J.G., Wang Z.R., Huang Y.Z., Cao K.J., Wu J. Effect of red wine and red wine polyphenol resveratrol on endothelial function in hypercholesterolemic rabbits. *Int. J. Mol. Med.*, **2003**, 11, 317-320.
- Βερυκοκίδου-Βιτσαροπούλου Ε., *Σημειώσεις Φαρμακογνωσίας I*, **1997**, Αθήνα.

- Καββάδας Δ.Σ., *Εικονογραφημένον Βοτανικόν -Φυτολογικόν Λεξικόν*, 1956, 3212-3220, ΣΤ (88), Αθήνα.
- Κουράκου-Δραγώνα Σ., *Θέματα Οινολογίας*, 1998, Αθήνα.
- Κουτσελίνης Α., 1997, *Τοξικολογία*, B, 175-184.
- Λουκής Α., *Χημεία Φυσικών Προϊόντων I-Βιοσύνθεση*, 2002, Αθήνα.
- Νταβίδης Ο.Ξ., *Ελληνική Αμπελολογία*, 1982, (Γ), Αθήνα.
- Τούτουζας Π.Κ., *Καρδιολογία*, 1999.
- Χαρβάλα Α., *Αλκαλοειδή και μη μορφοποιημένες δρόγες*, 1994, Αθήνα.
- Χήνου Ι., *Χημεία Φυσικών Προϊόντων III. Φαινολικά Παράγωγα*, 2002, Αθήνα.