

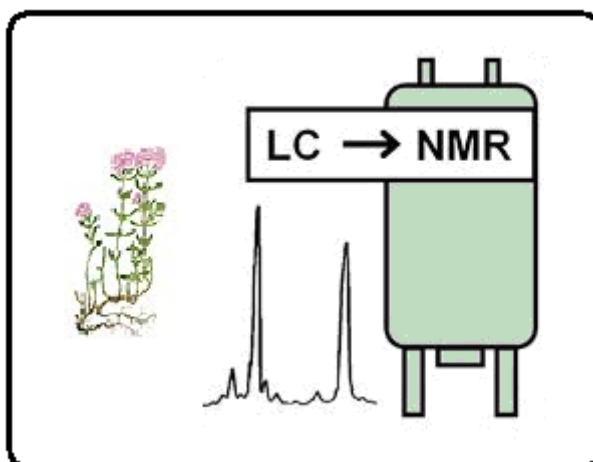


**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**  
**ΤΟΜΕΑΣ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ**

**Ανάπτυξη Μεθοδολογιών Συνδυαστικών Υγροχρωματογραφικών  
Τεχνικών και Τεχνικών Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού**

**Συντονισμού (NMR) για την Αξιοποίηση Βιοενεργών**

**Συστατικών από Φυσικά Προϊόντα**



**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΓΟΥΛΑΣ ΒΛΑΣΙΟΣ**

**ΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2009**



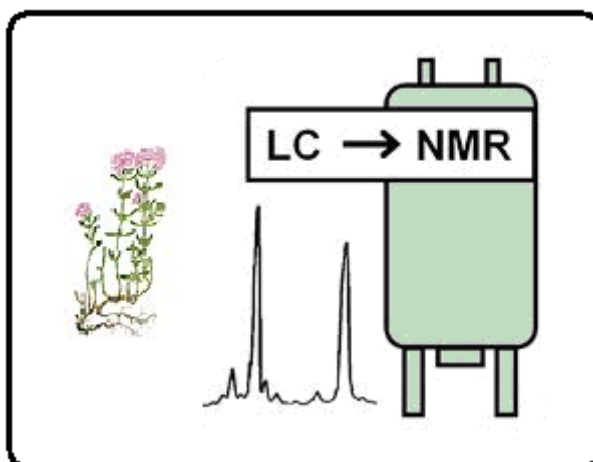


**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**  
**ΤΟΜΕΑΣ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ**

**Ανάπτυξη Μεθοδολογιών Συνδυαστικών Υγροχρωματογραφικών  
Τεχνικών και Τεχνικών Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού**

**Συντονισμού (NMR) για την Αξιοποίηση Βιοενεργών**

**Συστατικών από Φυσικά Προϊόντα.**



**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΓΟΥΛΑΣ ΒΛΑΣΙΟΣ**

**ΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2009**

*στους γονείς μου*  
*Γιώργο και Ευδοξία*

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η διδακτορική διατριβή με θέμα «Ανάπτυξη Μεθοδολογιών Συνδυαστικών Υγροχρωματογραφικών Τεχνικών και Τεχνικών Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) για την Αξιοποίηση Βιοενεργών Συστατικών από Φυσικά Προϊόντα» πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Φασματοσκοπίας Οργανικών Ενώσεων του Τμήματος Χημείας υπό την επίβλεψη του Καθηγητή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων Ι.Π. Γεροθανάση. Η τριμελής Συμβουλευτική επιτροπή συμπληρώνεται από την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μ. Τσιμίδου του Τμήματος Χημείας του Α.Π.Θ και τον Επίκουρο Καθηγητή Αναστάσιο Τρογκάνη του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Για τη διευκόλυνση και την καλύτερη κατανόηση της διατριβής, κρίθηκε αναγκαίος ο διαχωρισμός της σε έξι επιμέρους κεφάλαια. Τα δυο πρώτα Κεφάλαια συνθέτουν το θεωρητικό μέρος της διατριβής και αναφέρεται στα φυσικά προϊόντα και στις βασικές αρχές των τεχνικών της υγρής χρωματογραφίας, της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού και της συνδυαστικής τεχνικής υγρής χρωματογραφίας- φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (LC-NMR). Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής και η συζήτηση τους περιέχονται στα Κεφάλαια 4, 5 και 6. Πιο αναλυτικά, στο κεφάλαιο 4 περιγράφεται η ανάπτυξη μεθοδολογίας για την συνδυαστική τεχνική LC-SPE-NMR για την μελέτη φυσικών προϊόντων. Στο κεφάλαιο 5 παρατίθεται πλήρες πρωτόκολλο εργασίας για την μελέτη της σύστασης των εκχυλισμάτων των φυτών *Teucrium polium* και *Sideritis syriaca* με την χρήση μεθοδολογιών NMR μιας και δυο διαστάσεων και συζευγμένων τεχνικών LC-UV, LC-MS και LC-SPE-NMR. Τέλος, η ανάπτυξη της τεχνικής που επιτρέπει την αυτοματοποιημένη παρακολούθηση της αντιοξειδωτικής ικανότητα των φυσικών προϊόντων και η εφαρμογή της στον εντοπισμό των αντιοξειδωτικών στα εκχυλίσματα των φυτών *Teucrium polium*, *Sideritis syriaca* και *Olea europaeae* περιγράφεται στο Κεφάλαιο 6.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθ. Ι. Π. Γεροθανάση για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την πολύτιμη και συνεχή καθοδήγηση του, για τις γνώσεις που μου πρόσφερε κατά τη

διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής και για τις υποδείξεις του κατά την συγγραφή της.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στην Αν. Καθ. Μ. Τσιμίδου για την καθοδήγηση της, για τις ιδιαίτερα εποικοδομητικές συζητήσεις για το πειραματικό μέρος της διατριβής, για τις πάντα εύστοχες υποδείξεις της τόσο κατά την εκπόνηση της διατριβής όσο και κατά την συγγραφή της.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Επ. Καθ. Αν. Τρογκάνη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, για την αγόγγυστη καθοδήγηση και συμπαράσταση του, για τις σημαντικότερες υποδείξεις του για την πειραματική διαδικασία και για τη συγγραφή της διατριβής και για το συνεχές ενδιαφέρον του και την αμεσότητα της συνεργασίας μας.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω και στα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, τον Καθ. Τ. Αλμπάνη, τον Καθ. Δ. Γαλάρη, τον Καθ. Θ. Φώτση και τον Αν. Καθ. Κ. Σταλικά για τις διορθώσεις και τις υποδείξεις που πρότειναν και για την αμεσότητα της συνεργασίας μας.

Ευχαριστώ θερμά την Δρ. Β. Εξάρχου για την πολύτιμη βοήθεια της χωρίς την οποία δεν θα ήταν δυνατή η ολοκλήρωση της διατριβής, για τις γνώσεις που μου πρόσφερε για το θεωρητικό και πειραματικό μέρος του LC-NMR καθώς και για την αгаστή συνεργασία μας και την συμπαράσταση της.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συναδέλφους μου στο Εργαστήριο Φασματοσκοπίας Οργανικών Ενώσεων του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων Παντελή Χαρισιάδη, Βασιλική Κοντογιάννη, Αλεξάνδρα Νεραντζάκη και Αλεξάνδρα Πριμοκύρη καθώς και την Βασιλική Παπώτη, μέλος του Εργαστηρίου Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του Α.Π.Θ για την συνεργασία τους και την φιλική ατμόσφαιρα.

Τέλος, ευχαριστώ τους γονείς μου Γεώργιο και Ευδοξία και την αδερφή μου Κατερίνα για την συνεχή υποστήριξη και ηθική συμπαράσταση που μου πρόσφεραν όλα αυτά τα χρόνια και όλους όσους ήταν κοντά μου.

Βλάσιος Γ. Γούλας

Ιωάννινα, Μάιος 2009

<b>Πρόλογος</b>	I
<b>Περιεχόμενα</b>	III
<b>Κατάλογος Σχημάτων</b>	VII
<b>Κατάλογος Πινάκων</b>	XVIII
<b>1. Εισαγωγή</b>	
1.1 Τα φυσικά προϊόντα ως πηγή βιοενεργών ενώσεων.	1
1.2 Τα φυτά της οικογένειας <i>Lamiaceae</i> ως πηγή βιοενεργών ενώσεων.	4
1.3 Εκτίμηση της βιοδραστικότητας των φυτικών εκχυλισμάτων.	12
1.4 Σκοπός της διδακτορικής διατριβής	13
<b>2. Θεωρητικό Μέρος</b>	
2.1 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR).	15
2.1.1 Το φαινόμενο του Πυρηνικού Μαγνητισμού.	15
2.1.2 Πορείες Αποδιέγερσης.	17
2.1.3 Χημική Μετατόπιση.	17
2.1.4 Σταθερά Σύζευξης.	18
2.1.5 Το φαινόμενο NOE (Nuclear Overhauser Effect, NOE).	19
2.1.6 Φασματοσκοπία NMR δυο διαστάσεων.	21
2.1.7 Μελέτη φυσικών προϊόντων με χρήση NMR: βασικοί παράμετροι και μεθοδολογίες.	22
2.2 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Αποδόσεως (HPLC).	33
2.2.1 Γενικές αρχές υγρής χρωματογραφίας υψηλής αποδόσεως.	33
2.2.2 Χαρακτηριστικά απόδοσης χρωματογραφικών διαχωρισμών.	34
2.2.3 Οργανολογία.....	35
2.2.4 Μελέτη φυσικών προϊόντων με χρήση HPLC.	35
2.2.5 Συζευγμένες τεχνικές υγρής χρωματογραφίας.	39
2.3 Συνδυαστική τεχνική υγρής χρωματογραφίας- φασματοσκοπίας NMR (LC-NMR).	42
2.3.1 Εισαγωγικά.	42
2.3.2 Οργανολογία για το LC-NMR και τρόποι λειτουργίας του.	43
<b>3. Πειραματικό Μέρος</b>	
3.1 Αντιδραστήρια-Υλικά.	56
3.2 Δείγματα.	56

3.2.1 Συλλογή φυτικού υλικού.	56
3.2.2 Προετοιμασία εκχυλισμάτων.	58
3.3 Μελέτη σύστασης εκχυλισμάτων με την χρήση φασματοσκοπίας NMR μιας (1D) και δυο (2D) διαστάσεων.....	60
3.4 Μελέτη σύστασης εκχυλισμάτων με την χρήση Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Αποδόσεως HPLC.	64
3.5 Μελέτη της σύστασης εκχυλισμάτων με τη χρήση της συνδυαστικής τεχνικής LC-MS.	65
3.6 Μελέτη της σύστασης εκχυλισμάτων με τη χρήση της συνδυαστικής τεχνικής LC-SPE-NMR.	66
3.6.1 Οργανολογία.	66
3.6.2 Σύστημα εκχύλισης στερεής φάσης (Solid Phase Extraction, SPE).	68
3.6.3 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR).	71
3.7 Εκτίμηση βιοδραστικότητας των εκχυλισμάτων	
3.7.1 Χρωμομετρικός Προσδιορισμός Ολικών Φαινολικών εκχυλισμάτων.	72
3.7.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων με τη δοκιμή της σταθερής ρίζας DPPH.	73
3.7.3 Αυτοματοποιημένη εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των συστατικών των εκχυλισμάτων.	73
<b>4. Ανάπτυξη μεθοδολογίας συνδυαστικής τεχνικής LC-SPE-NMR: Προσδιορισμός βέλτιστων συνθηκών ανάλυσης φυτοχημικών</b>	
4.1 Εισαγωγή.	75
4.2 Επιλογή των ενώσεων.	77
4.3 Η επίδραση της παρουσίας του οργανικού διαλύτη.	79
4.4 Η επίδραση της στατικής φάσης των μικροστηλών.	82
4.5 Η επίδραση του χρόνου ξήρανσης των μικροστηλών.	84
4.6 Η επίδραση του δευτεριωμένου διαλύτη ανάκτησης.	85
4.7 Η διαδικασία της πολλαπλής παγίδευσης (multiple trapping).	89
4.8 Προσδιορισμός βέλτιστων συνθηκών ανάλυσης φυτοχημικών με την τεχνική LC-SPE-NMR.	92
<b>5. Μελέτη της σύστασης φυτών της οικογένειας <i>Lamiaceae</i></b>	
5.1 Μελέτη σύστασης εκχυλισμάτων του φυτού <i>T. polium</i> .	94
5.1.1 Εισαγωγή.	94



5.1.2 Μελέτη σύστασης εκχυλισμάτων του φυτού <i>T. polium</i> με την χρήση της φασματοσκοπίας NMR μιας (1D) και δυο (2D) δυο διαστάσεων.	95
5.1.3 Μελέτη σύστασης εκχυλισμάτων του φυτού <i>T. polium</i> με την χρήση της υγρής χρωματογραφίας υψηλής αποδόσεως (HPLC).	103
5.1.4 Μελέτη σύστασης εκχυλισμάτων του φυτού <i>T. polium</i> με την χρήση της συνδυαστικής τεχνικής LC-MS.	108
5.1.5 Μελέτη σύστασης εκχυλισμάτων του φυτού <i>T. polium</i> με την χρήση της συνδυαστικής τεχνικής LC-SPE-NMR.	111
5.2 Μελέτη σύστασης εκχυλισμάτων του φυτού <i>S. Syriaca</i> .	128
5.2.1 Εισαγωγή.	128
5.2.2 Μελέτη σύστασης εκχυλισμάτων του φυτού <i>S. syriaca</i> με την χρήση της φασματοσκοπίας NMR μιας (1D) και δυο (2D) διαστάσεων.	129
5.2.3 Μελέτη σύστασης εκχυλισμάτων του φυτού <i>S. syriaca</i> με την χρήση της υγρής χρωματογραφίας υψηλής αποδόσεως (HPLC).	135
5.2.4 Μελέτη σύστασης εκχυλισμάτων του φυτού <i>S. syriaca</i> με την χρήση της συνδυαστικής τεχνικής LC-MS.	140
5.2.5 Μελέτη σύστασης εκχυλισμάτων του φυτού <i>S. syriaca</i> με την χρήση της συνδυαστικής τεχνικής LC-SPE-NMR.	142
5.3 Συμπεράσματα.	157
<b>6. On line παρακολούθηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των φυτικών εκχυλισμάτων</b>	
6.1 Εισαγωγή.	159
6.2 Οργανολογία την on line παρακολούθηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των φυτικών εκχυλισμάτων.	162
6.3 Επιλογή των παραμέτρων για την ανάπτυξη της on line παρακολούθησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων.	164
6.4 On line εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των φυτικών εκχυλισμάτων του <i>T. polium</i> .	167
6.5 On line εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των φυτικών εκχυλισμάτων του <i>S. Syriaca</i> .	171
6.6 On line εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των φυτικών εκχυλισμάτων του <i>O. europeae</i> .	177
Παράρτημα I. Το ελαιόδεντρο.	184

Παράρτημα II.	186
Βιβλιογραφία.	190

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1.1.	Γραφική απεικόνιση της κατάθεσης ευρεσιτεχνιών από το 1960 έως σήμερα, σύμφωνα με τα στοιχεία από το <a href="http://www.scopus.com">www.scopus.com</a> .	2
Σχήμα 1.2.	Οι δραστικές ουσίες των φαρμακευτικών σκευασμάτων (N = 1184) από το 1981 έως το 2006 κατηγοριοποιημένες ανά πηγή προέλευσης τους και ανά έτος (Newman, <i>et al.</i> , 2007).	3
Σχήμα 1.3.	Οι δραστικές ουσίες των φαρμακευτικών σκευασμάτων (N = 974) από το 1981 έως το 2006 με κριτήριο την προέλευση τους (Newman, <i>et al.</i> , 2007).	3
Σχήμα 1.4.	Δομές υδροξυλιωμένων παράγωγων του κινναμωμικού οξέος (1), του βενζοϊκού οξέος (2) και του φαινυλοξικού οξέος (3).	5
Σχήμα 1.5.	Δομές των κυριότερων κατηγοριών της τάξης των φλαβονοειδών.	6
Σχήμα 1.6.	Δομές των κυριότερων κατηγοριών διτερπενίων που απαντώνται στα φυτά.	7
Σχήμα 1.7.	Ασθένειες του ανθρώπινου οργανισμού πιστεύεται ότι προκαλούνται από την επίδραση ενεργών ενώσεων οξυγόνου	12
Σχήμα 2.1.	(α) Τυχαίος προσανατολισμός των ανυσμάτων της μαγνητικής ροπής πυρήνα με $I=1/2$ απουσία μαγνητικού πεδίου, (β) Με την επίδραση του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου $B_0$ τα ανύσματα της μαγνητικής ροπής αποκτούν προσανατολισμό παράλληλο ή αντιπαράλληλο της έντασης του πεδίου $B_0$	16
Σχήμα 2.2.	Η ηλεκτρονική προστασία του πυρήνα (Hore, 1995).	18
Σχήμα 2.3.	Ενεργειακό διάγραμμα των πιθανών μεταπτώσεων των υπό αλληλεπίδραση πυρήνων I και S ( $\alpha$ = βασική κατάσταση, $\beta$ = διεγερμένη κατάσταση). Οι πιθανές μεταπτώσεις των δύο πυρήνων παριστάνονται από τα βέλη.	19
Σχήμα 2.4.	Το πείραμα NOE (Gerothanassis, <i>et al.</i> , 2002)	20
Σχήμα 2.5.	Διεργασία μετασχηματισμού Fourier για τη λήψη 2D-NMR (Αλεξάνδρου, 1992).	21

- Σχήμα 2.6. Δομές των τριών κατηγοριών φαινολικών οξέων. 23
- Σχήμα 2.7. Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του καφεϊκού οξέος (3,4-διυδροξυ-κινναμωμικό οξύ) σε  $\text{CD}_3\text{OD}$  (NS=16, T=295 K) με τη χρήση φασματομέτρου NMR 400 MHz. Με αστερίσκο σημειώνονται οι κορυφές που αντιστοιχούν στα πρωτόνια της μεθανόλης. 24
- Σχήμα 2.8. Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του αιθανολικού εκχυλίσματος *Origanum vulgare* σε  $\text{CD}_3\text{OD}$  (NS=16, T=295 K) με τη χρήση φασματομέτρου NMR 400 MHz. 25
- Σχήμα 2.9. Περιοχή ενός φάσματος  $^1\text{H-}^1\text{H}$  COSY ενός μίγματος φαινολικών οξέων σε φασματομέτρο NMR 400 MHz. Στο σχήμα απεικονίζονται οι κορυφές διασταύρωσης των κινναμωμικών οξέων (s: σιναπικό οξύ, f: φερουλικό οξύ, cp: p-κουμαρικό οξύ, c: καφεϊκό οξύ και ch: χλωρογενικό οξύ). Τα αντίστοιχα πρωτόνια του ο-κουμαρικού οξέος δεν παρατηρούνται στην περιοχή αυτή αλλά σε χημικές μετατοπίσεις  $\text{H}_{2a}=6.53$  ppm και  $\text{H}_{3a}=7.96$ . 26
- Σχήμα 2.10. Απεικόνιση των συζεύξεων που παρατηρούνται μέσω πειραμάτων TOCSY στο κυκλικό μόριο του χλωρογενικού οξέος. 27
- Σχήμα 2.11. Οι αλληλεπιδράσεις NOE στο μόριο του καφεϊκού οξέος. 28
- Σχήμα 2.12. Επιλεγμένη περιοχή δυσδιάστατου φάσματος  $^1\text{H-}^{13}\text{C}$  HMBC μεθανολικού εκχυλίσματος του *O. Onites* σε θερμοκρασία 298 K. Τα βέλη επισημαίνουν τις κορυφές διασταύρωσης r ( $\text{H}_{3a}, \text{C}_{1a}$ ), r( $\text{H}_{2a}, \text{C}_{1a}$ ), c( $\text{H}_{2a}, \text{C}_{1a}$ ) και c( $\text{H}_{2a}, \text{C}_{1a}$ ). (NS=316, expt=28h). 29
- Σχήμα 2.13. Τυπική απεικόνιση φλαβονοειδών. 30
- Σχήμα 2.14. (α) επιλεγμένη περιοχή του φάσματος  $^1\text{H NMR}$  ακετονικού εκχυλίσματος *S. hortensis* στους 240 K. Το ίδιο φάσμα μετά από spiking (β) με 0.01 mmol απιγενίνης, (γ) με 0,03 mmol απιγενίνης και 0,02 mmol κερκετίνης, (δ) με 0,06 mmol κερκετίνης (NS=2048, expT= $\sim$ 4h) (Boskou et al., 2006). 32
- Σχήμα 2.15. Απεικόνιση του τρόπου διαχωρισμού των ενώσεων. 33
- Σχήμα 2.16. Τυπική διάταξη Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης. 35

- Σχήμα 2.17. Ενδεικτικό φάσμα δυο διαστάσεων PEG-C<sub>18</sub> για το διαχωρισμό (α) μίγματος πρότυπων φαινολικών ενώσεων και (β) φαινολικού κλάσματος από δείγμα μπίρας (Jandera, 2006). 37
- Σχήμα 2.18. Χαρακτηριστικά φάσματα μαζών (α) της απιγενίνης (M.B=270) και (β) της μολφολίνης(M.B=578) (Zhang, *et al.*, 2005). 41
- Σχήμα 2.19. Χρωματογραφική ανάλυση και on line παρακολούθηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκλούμενων συστατικών με τις ριζες DPPH και ABTS των εκχυλισμάτων *Tilia europea* και *Hypericum perforatum* (Exarchou, *et al.*, 2006). 42
- Σχήμα 2.20. Σχηματική απεικόνιση (α) συμβατικού και (β) συνεχής ροής υποδοχέα NMR (Albert, 2002). 44
- Σχήμα 2.21. Σχηματική αναπαράσταση των συστημάτων LC-NMR. 45
- Σχήμα 2.22. Τυπική οργανολογική διάταξη LC-SPE-NMR. 52
- Σχήμα 2.23. Το φάσμα <sup>1</sup>H-NMR μιας εκλούμενης κορυφής από ακετονικό εκχύλισμα ελληνικής ρίγανης, που παγιδεύτηκε τρεις φορές στην ίδια μικροστήλη σε φασματόμετρο AV-600MHz. (A) με χρήση ακολουθία καταστολής του σήματος του διαλύτη, (B) χωρίς χρήση ακολουθίας καταστολής του σήματος του διαλύτη με 32 παλμούς και σε θερμοκρασία δωματίου. 53
- Σχήμα 2.24. (A) <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMQC και (B) <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC φάσματα καρβακρόλης σε φασματογράφο 600-MHz κατόπιν τριπλής παγίδευσης της στην ίδια μικροστήλη. 54
- Εικόνα 3.1. Τόπος συλλογής *Sideritis syriaca*. 57
- Εικόνα 3.2. Τόπος συλλογής *Teucrium polium*. 58
- Σχήμα 3.3. Παραλαβή υδατικού εκχυλίσματος με βρασμό. 59
- Σχήμα 3.4. Παραλαβή εκχυλίσματος με εκχύλιση Soxhlet. 59
- Σχήμα 3.5. Σχηματική απεικόνιση της παλμικής ακολουθίας για τη λήψη πρωτονιακού φάσματος. 60
- Σχήμα 3.6. Σχηματική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων λόγω σταθερών σύζευξης με την εφαρμογή της φασματοσκοπίας COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H. 60
- Σχήμα 3.7. Σχηματική απεικόνιση της παλμικής ακολουθίας (α) για τη

	λήψη τυπικού φάσματος COSY και (β) για λήψη φάσματος COSY με χρήση βαθμωτού πεδίου	61
Σχήμα 3.8.	Σχηματική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων λόγω σταθερών σύζευξης με την εφαρμογή της φασματοσκοπίας TOCSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ .	62
Σχήμα 3.9.	Σχηματική απεικόνιση της παλμικής ακολουθίας για τη λήψη φάσματος TOCSY.	62
Σχήμα 3.10.	Σχηματική απεικόνιση της παλμικής ακολουθίας για τη λήψη φάσματος (α) HMQC και (β) HMBC.	63
Σχήμα 3.11.	Σχηματική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ μέσω σταθεράς σύζευξης ( $^1J_{\text{CH}}$ ) για την φασματοσκοπία HMQC.	64
Σχήμα 3.12.	Σχηματική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ μέσω σταθεράς σύζευξης ( $^{2-4}J_{\text{CH}}$ ) για την φασματοσκοπία HMBC.	64
Σχήμα 3.13.	Τυπική οργανολογική διάταξη LC-SPE-NMR.	67
Σχήμα 3.14.	Υποδοχέας NMR ενδιάμεσης ροής LC-SEI 4mm $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ .	68
Σχήμα 3.15.	Γραφική απεικόνιση της διαδικασίας (α) πλυσίματος και εξισορρόπησης των μικροστηλών πριν την χρήση τους, (β) χρωματογραφικού διαχωρισμού και παγίδευσης των ενώσεων στις μικροστήλες, (γ) ανάκτησης των ενώσεων από τις μικροστήλες και μεταφορά τους στο φασματογράφο NMR.	71
Σχήμα 3.16.	Σχηματική απεικόνιση της παλμικής ακολουθίας <i>lc1prhf2</i> για τη λήψη φάσματος $^1\text{H}$ με διπλή καταστολή των σημάτων συντονισμού των διαλυτών.	72
Σχήμα 3.17.	Γραφική απεικόνιση της οργανολογικής διάταξης που χρησιμοποιήθηκε για το on-line DPPH.	74
Σχήμα 4.1.	Οι δομές των φαινολικών οξέων που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη της μεθοδολογίας LC-SPE-NMR.	78
Σχήμα 4.2.	Οι δομές των φλαβονοειδών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη της μεθοδολογίας LC-SPE-NMR.	79
Σχήμα 4.3.	Χρήση διαφορετικών ταχυτήτων ροής στην τεχνική LC-SPE-NMR.	80
Σχήμα 4.4.	Εκτίμηση της ικανότητας κατακράτησης τεσσάρων προτύπων ενώσεων σε τρία διαφορετικά υλικά πλήρωσης των	

	μικροστηλών.	83
Σχήμα 4.5.	Συγκριτική μελέτη για την επίδραση των δευτεριωμένων διαλυτών ανάκλισης για τα φαινολικά οξέα..	87
Σχήμα 4.6.	Συγκριτική μελέτη για την επίδραση των δευτεριωμένων διαλυτών ανάκλισης για τα φλαβονοειδή.	89
Σχήμα 4.7.	Έλεγχος της αποτελεσματικότητας της πολλαπλής παγίδευσης για ενώσεις διαφορετικής πολικότητας.	91
Σχήμα 4.8.	Προσδιορισμός βέλτιστων συνθηκών ανάλυσης φυτοχημικών με την τεχνική LC-SPE-NMR.	93
Σχήμα 5.1.	Φάσματα NMR- $^1\text{H}$ των τεσσάρων φυτικών εκχυλισμάτων του <i>Teucrium polium</i> σε διαλύτη MeCN- $d_3$ (NS=1024, T= 298 K).	96
Σχήμα 5.2.	Επιλεγμένη περιοχή(11-15 ppm) των φασμάτων NMR- $^1\text{H}$ των τεσσάρων φυτικών εκχυλισμάτων του <i>Teucrium polium</i> σε διαλύτη MeCN- $d_3$ (NS=1024, T= 298 K).	97
Σχήμα 5.3.	Διάκριση φλαβονών και φλαβονολών με χρήση φασματοσκοπίας NMR- $^1\text{H}$ . Επιλεγμένη περιοχή των φασμάτων NMR- $^1\text{H}$ (α) κερκετίνης (φλαβονόλη) και (β) λουτεολίνης (φλαβόνη) σε διαλύτη δευτεριωμένο ακετονιτρίλιο, CD <sub>3</sub> CN στους 298 K (NS= 64).	98
Σχήμα 5.4	. Επιλεγμένη περιοχή (6-8 ppm) των φασμάτων NMR- $^1\text{H}$ των τεσσάρων φυτικών εκχυλισμάτων του <i>Teucrium polium</i> σε διαλύτη MeCN- $d_3$ (NS=1024, T= 298 K).	99
Σχήμα 5.5.	Δισδιάστατος χάρτης του φάσματος COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ του μεθανολικού εκχυλίσματος METP3 στους 298 K (NS=32, $t_{\text{exp}}$ =5h ). Στο φάσμα σημειώνονται οι δυο χαρακτηριστικές κορυφές που αντιστοιχούν στη δομική μονάδα κινναμωμικού τύπου.	100
Σχήμα 5.6.	Δισδιάστατος χάρτης του φάσματος COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ του υδατικού εκχυλίσματος AETP στους 298 K (NS=32, $t_{\text{exp}}$ = 5h). Στο φάσμα σημειώνονται οι δυο χαρακτηριστικές κορυφές που αντιστοιχούν στη δομική μονάδα κινναμωμικού τύπου.	101
Σχήμα 5.7.	Δισδιάστατος χάρτης του φάσματος COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ του εκχυλίσματος του οξικού αιθυλεστέρα EETP3 στους 298 K	

- (NS=32,  $t_{\text{exp}}=5\text{h}$ ). Στο φάσμα σημειώνεται η απουσία των χαρακτηριστικών κορυφών που αντιστοιχούν στη δομική μονάδα κινναμωμικού τύπου. 102
- Σχήμα 5.8. Σύγκριση των χρωματογραφικών προφίλ των εκχυλισμάτων από το φυτό *Teucrium polium* στα 280 nm. 104
- Σχήμα 5.9. Σύγκριση των χρωματογραφικών προφίλ των εκχυλισμάτων από το φυτό *Teucrium polium* στα 254 nm. 105
- Σχήμα 5.10. Σύγκριση των χρωματογραφικών προφίλ των εκχυλισμάτων από το φυτό *Teucrium polium* στα 340 nm. 106
- Σχήμα 5.11. Τα αντίστοιχα φάσματα UV-Vis των αριθμημένων κορυφών 1 έως 4 όπου φαίνονται και τα μέγιστα των απορροφήσεων τους. 107
- Σχήμα 5.12. Τα αντίστοιχα φάσματα UV-Vis των αριθμημένων κορυφών 5 έως 8 όπου φαίνονται και τα μέγιστα των απορροφήσεων τους. 107
- Σχήμα 5.13. Τα φάσματα UV-Vis των ενώσεων (α) καφεϊκού οξέος και (β) ροσμαρινικού οξέος. 108
- Σχήμα 5.14. Τα χρωματογραφήματα συνολικού ιοντος (TIC) των εκχυλισμάτων (α) υδατικού ΑΕΤΡ, (β) μεθανολικών ΜΕΤΡ1, (γ) ΜΕΤΡ3 και (δ) οξικού αιθυλεστέρα ΕΕΤΡ3. Στο χρωματογράφημα σημειώνεται τα μοριακά θραύσματα [M-H]<sup>-</sup> των κυριότερων κορυφών. 109
- Σχήμα 5.15. Χρωματογραφικά προφίλ των εκχυλισμάτων ΜΕΤΡ1 και ΕΕΤΡ3 στα 280 nm που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση με την τεχνική του LC-SPE-NMR. 112
- Σχήμα 5.16. Φάσμα NMR- <sup>1</sup>H του βερμπασκοζίτη (κορυφή 1) σε ACN-*d*<sub>3</sub>. Επιλεγμένη περιοχή του ίδιου φάσματος που σημειώνονται οι χαρακτηριστικές διπλές κορυφές των βινυλικών πρωτονίων του καφεϊκού τμήματος του βερμπασκοζίτη. 113
- Σχήμα 5.17. Οι δομές συντονισμού του ο-κουμαρικού οξέος που εξηγούν την διαφορά στην χημική μετατόπιση των βινυλικών πρωτονίων H-7 και H-8. 114
- Σχήμα 5.18. Φάσμα NMR- <sup>1</sup>H του βερμπασκοζίτη (κορυφή 1) σε ACN-*d*<sub>3</sub>. Επιλεγμένη περιοχή του ίδιου φάσματος που σημειώνονται οι χαρακτηριστικές κορυφές των ανωμερικών υδρογόνων για την



- διάκριση της διαμόρφωσης των σακχάρων. Επιπλέον, σημειώνονται και χαρακτηριστικές κορυφές για την ταυτοποίηση των σακχάρων. 115
- Σχήμα 5.19. Η αλειφατική περιοχή των φασμάτων COSY και TOCSY του βερμπασκοζίτη (κορυφή 1), όπου παρουσιάζονται οι κορυφές διασταύρωσης της γλυκόζης. 116
- Σχήμα 5.20. Φάσματα NMR-<sup>1</sup>H των ενώσεων (α) πολιουμοζίτη και (β) βερμπασκοζίτη σε ACN-d<sub>3</sub>. Με αστερίσκο σημειώνονται οι βασικές διαφορές των φασμάτων που εμφανίζουν διαγνωστική αξία. 117
- Σχήμα 5.21. Φάσμα μαζών MS του πολιουμοζίτη (κορυφή 2). 118
- Σχήμα 5.22. Δισδιάστατος χάρτης φάσματος HMBC <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C του πολιουμοζίτη και επιλεγμένη περιοχή του ίδιου φάσματος, που σημειώνονται οι διασταυρούμενες κορυφές που φανερώνουν τη δομή της ένωσης. 118
- Σχήμα 5.23. Φάσμα NMR-<sup>1</sup>H της απιγενίνης σε ACN-d<sub>3</sub> και φάσμα μαζών της ίδιας ένωσης. 121
- Σχήμα 5.24. Φάσματα NMR-<sup>1</sup>H σε ACN-d<sub>3</sub> των ενώσεων (α) 7-O-ρουτινοζίτη της απιγενίνης, (β) 7-O-γλυκοζίτη της απιγενίνης, (γ) 4'-O-γλυκοζίτη της απιγενίνης και (δ) της απιγενίνης. 122
- Σχήμα 5.25. Επιλεγμένη περιοχή φάσματα NMR-<sup>1</sup>H σε ACN-d<sub>3</sub> των ενώσεων (α) 7-O-ρουτινοζίτη της απιγενίνης, (β) 7-O-γλυκοζίτη της απιγενίνης, (γ) 4'-O-γλυκοζίτη της απιγενίνης και (δ) της απιγενίνης. 123
- Σχήμα 5.26. Φάσμα NMR-<sup>1</sup>H σε ACN-d<sub>3</sub> της 3,7-διμεθοξυ-κερκετίνης. 125
- Σχήμα 5.27. Φάσμα NMR-<sup>1</sup>H σε ACN-d<sub>3</sub> της 3,7-διμεθοξυ-καιμφερόλης. 126
- Σχήμα 5.28. Φάσματα NMR-<sup>1</sup>H των τεσσάρων φυτικών εκχυλισμάτων του *Sideritis syriaca* σε διαλύτη MeCN-d<sub>3</sub> (NS=1024, T= 298 K). 130
- Σχήμα 5.29. Επιλεγμένη περιοχή (11-15 ppm) των φασμάτων NMR-<sup>1</sup>H των τεσσάρων φυτικών εκχυλισμάτων του *Sideritis syriaca* σε διαλύτη MeCN-d<sub>3</sub> (NS=1024, T= 298 K). 131
- Σχήμα 5.30. Επιλεγμένη περιοχή (6-8 ppm) των φασμάτων NMR-<sup>1</sup>H των τεσσάρων φυτικών εκχυλισμάτων του *Sideritis syriaca* σε

- διαλύτη MeCN- $d_3$  (NS=1024, T= 298 K). 132
- Σχήμα 5.31. Δισδιάστατος χάρτης του φάσματος COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  του υδατικού εκχυλίσματος AESS στους 298 K (NS=32,  $t_{\text{exp}}$ = 5h). Στο φάσμα μεγεθύνεται η περιοχή που συντονίζονται τα πρωτόνια  $\text{H}_{2\alpha}$  των παραγώγων του υδροξυκινναμωμικού οξέος. 133
- Σχήμα 5.32. Δισδιάστατος χάρτης του φάσματος COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  του μεθανολικού εκχυλίσματος MESS1 στους 298 K (NS=32,  $t_{\text{exp}}$ = 5h). Στο φάσμα μεγεθύνεται η περιοχή που συντονίζονται τα πρωτόνια  $\text{H}_{2\alpha}$  των παραγώγων του υδροξυκινναμωμικού οξέος. 134
- Σχήμα 5.33. Δισδιάστατος χάρτης του φάσματος COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  του εκχυλίσματος του οξικού αιθυλεστέρα EESS3 στους 298 K (NS=32,  $t_{\text{exp}}$ = ). Στο φάσμα σημειώνεται η απουσία των πρωτονίων  $\text{H}_{2\alpha}$  των παραγώγων του υδροξυκινναμωμικού οξέος στην περιοχή που θα έπρεπε να συντονίζονται. 135
- Σχήμα 5.34. Σύγκριση των χρωματογραφικών προφίλ των εκχυλισμάτων από το φυτό *Sideritis syriaca* στα 280 nm. 137
- Σχήμα 5.35. Σύγκριση των χρωματογραφικών προφίλ των εκχυλισμάτων από το φυτό *Sideritis syriaca* στα 254 nm. 138
- Σχήμα 5.36. Σύγκριση των χρωματογραφικών προφίλ των εκχυλισμάτων από το φυτό *Sideritis syriaca* στα 340 nm. 139
- Σχήμα 5.37. Τα αντίστοιχα φάσματα UV-Vis των αριθμημένων κορυφών 1 έως 4 όπου φαίνονται και τα μέγιστα των απορροφήσεων. 140
- Σχήμα 5.38. Τα αντίστοιχα φάσματα UV-Vis των αριθμημένων κορυφών 5, 6 και 7 όπου φαίνονται και τα μέγιστα των απορροφήσεων. 140
- Σχήμα 5.39. Τα χρωματογραφήματα συνολικού ιοντος (TIC) των εκχυλισμάτων (α) υδατικού AESS, (β) μεθανολικών MESS1, (γ) MESS3 και (δ) οξικού αιθυλεστέρα EESS3. Στο χρωματογράφημα σημειώνεται τα μοριακά θραύσματα [M-H]<sup>-</sup> των κυριότερων κορυφών. 141
- Σχήμα 5.40. Χρωματογραφικό προφίλ του υδατικού εκχυλίσματος AESS στα 280 nm που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση με την

- τεχνική του LC-SPE-NMR. 143
- Σχήμα 5.41. Φάσμα NMR-  $^1\text{H}$  του χλωρογενικού οξέος (κορυφή 1) σε  $\text{ACN-}d_3$ . Επιλεγμένη περιοχή του ίδιου φάσματος που αποδίδονται τα αρωματικά πρωτόνια. 144
- Σχήμα 5.42. Φάσματα NMR-  $^1\text{H}$  των ενώσεων (α) μαρτυνοζίτη και (β) βερμπασκοζίτη σε  $\text{ACN-}d_3$ . Με αστερίσκο σημειώνονται οι βασικές διαφορές των φασμάτων που εμφανίζουν διαγνωστική αξία. 145
- Σχήμα 5.43. Φάσματα NMR-  $^1\text{H}$  των ενώσεων (α) βερμπασκοζίτη και (β) λαβαντουλιφολιοζίτη σε  $\text{ACN-}d_3$ . Με αστερίσκο σημειώνεται η βασική διαφορά των φασμάτων που εμφανίζει διαγνωστική αξία. 146
- Σχήμα 5.44. Φάσμα μαζών MS του λαβαντουλιφολιοζίτη (κορυφή 3). 147
- Σχήμα 5.45. Φάσμα NMR- $^1\text{H}$  του 7-O-διγλυκοζίτη της ισοσκουτελλαρεΐνης (κορυφή 6) σε διαλύτη  $\text{ACN-}d_3$ . 150
- Σχήμα 5.46. Επιλεγμένη περιοχή των φασμάτων COSY και TOCSY του 7-O-διγλυκοζίτη της ισοσκουτελλαρεΐνης (κορυφή 6) σε διαλύτη  $\text{ACN-}d_3$ . 151
- Σχήμα 5.47 Φάσμα NMR- $^1\text{H}$  του 7-O-διγλυκοζίτη της υπολαετίνης (κορυφή 5) σε διαλύτη  $\text{ACN-}d_3$ . 152
- Σχήμα 5.48. Επιλεγμένη περιοχή των φασμάτων NMR-  $^1\text{H}$  των ενώσεων (α) 7-O-[6'''-O-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοζυλ-(1→2) -β-D-γλυκοπυρανοζίτης] της υπολαετίνης, (β) 7-O-[6'''-O-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοζυλ-(1→2) -β-D-γλυκοπυρανοζίτης] της 3'-μεθοξυ-υπολαετίνης και (γ) 7-O-[6'''-O-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοζυλ-(1→2) -β-D-γλυκοπυρανοζίτης] της ισοσκουτελλαρεΐνης σε  $\text{ACN-}d_3$ . 153
- Σχήμα 5.49. Σύγκριση της αρωματικής περιοχής των φασμάτων NMR-  $^1\text{H}$  των ενώσεων (α) 7-O-[6'''-O-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοζυλ-(1→2) -β-D-γλυκοπυρανοζίτη] της 4'-μεθοξυ-υπολαετίνης, (β) 7-O-[6'''-O-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοζυλ-(1→2) -β-D-γλυκοπυρανοζίτη] της υπολαετίνης σε διαλύτη  $\text{ACN-}d_3$ . 154
- Σχήμα 6.1. Σχηματική αναπαράσταση τω τεχνικών ελέγχου

- αντιοξειδωτικών υψηλής διακριτικής ικανότητας με χρήση της HPLC ως τεχνική διαχωρισμού. Με αλλαγή του διαλύματος της ρίζας προκύπτει τεχνική που ελέγχει διαφορετική βιολογική δράση. Η οργανολογική διάταξη είναι δυνατό να διαφοροποιηθεί χρησιμοποιώντας *ς syringe pump* αντί της συμβατικής αντλίας HPLC, να χρησιμοποιηθούν δυο αντλίες μετά την στήλη ή δυο βρόγχοι υστέρησης για ενζυμικές κυρίως αντιδράσεις. Τέλος, ως ανιχνευτές είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν οι ELSD, MS ή το NMR. 160
- Σχήμα 6.2. Μετατροπή της διάταξης LC-SPE-NMR σε διάταξη που επιτρέπει την *on line* παρακολούθηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων. Οι μαύρες γραμμές δείχνουν τη διάταξη της τεχνικής HRS ενώ οι γκρι γραμμές αντιστοιχούν στην διάταξη του LC-SPE-NMR και δεν χρησιμοποιούνται. 163
- Σχήμα 6.3. Γραφική των ολοκληρωμάτων των αρνητικών κορυφών της λουτεολίνης συναρτήσει της συγκέντρωσης της. 166
- Σχήμα 6.4. Χρωματογράφημα στα 280 nm και 517 nm που λήφθηκαν με αυτοματοποιημένο σύστημα HPLC-DPPH για το μεθανολικό εκχύλισμα METP3. Με τους αριθμούς 1-8 σημειώνονται τα συστατικά του εκχυλίσματος. Πιο συγκεκριμένα 1: βερμπασκοζίτης, 2: πολιουμοζίτης, 3: 7-O-ρουτινοζίτης της απιγενίνης, 4: 7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης, 5: 4'-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης, 6: απιγενίνη, 7: 3,7-διμεθοξυκερκετίνη, 8: 3,7-διμεθοξυκαιμφορόλη. 168
- Σχήμα 6.5. Χρωματογραφήματα στα 280 nm και στα 517 nm που λήφθηκαν με το *on line* σύστημα HPLC-DPPH για το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα EETP3. Στο χρωματογράφημα με τους αριθμούς σημειώνονται τα συστατικά του εκχυλίσματος. Πιο συγκεκριμένα 2: πολιουμοζίτης, 6: απιγενίνη, 7: 3,7-διμεθοξυκερκετίνη, 8: 3,7-διμεθοξυκαιμφορόλη,\* άγνωστη ένωση 1, \*\* άγνωστη ένωση 2. 170

- Σχήμα 6.6. Χρωματογραφήματα στα 280 nm και 517 nm που λήφθηκαν με το on line σύστημα HPLC-DPPH για το υδατικό εκχύλισμα AESS. Στο χρωματογράφημα με τους αριθμούς σημειώνονται τα συστατικά του εκχυλίσματος. Πιο συγκεκριμένα 1: γλωρογενικό οξύ, 2: μαρτυνοζίτης, 3: λαβαντουλιφολιοζίτης, 4: βερμπασκοζίτης, 5: 7-O-[6'''-O-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοζυλ-(1→2) -β-D-γλυκοπυρανοζίτης] της υπολαετίνης, 6: 7-O-[6'''-O-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοζυλ-(1→2) -β-D-γλυκοπυρανοζίτης] της ισοσκουτελλαρεΐνης, 7: 7-O-[6'''-O-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοζυλ-(1→2) -β-D-γλυκοπυρανοζίτης] της 4'-μεθοξυ-υπολαετίνης, \* άγνωστη ένωση. 173
- Σχήμα 6.7. Χρωματογραφήματα στα 280 nm και 517 nm που λήφθηκαν με το on line σύστημα HPLC-DPPH για το μεθανολικό εκχύλισμα MESS1. Στο χρωματογράφημα με τους αριθμούς σημειώνονται τα συστατικά του εκχυλίσματος. Πιο συγκεκριμένα 1: γλωρογενικό οξύ, 2: μαρτυνοζίτης, 3: λαβαντουλιφολιοζίτης, 4: βερμπασκοζίτης, 5: 7-O-[6'''-O-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοζυλ-(1→2) -β-D-γλυκοπυρανοζίτης] της υπολαετίνης, 6: 7-O-[6'''-O-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοζυλ-(1→2) -β-D-γλυκοπυρανοζίτης] της ισοσκουτελλαρεΐνης, 7: 7-O-[6'''-O-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοζυλ-(1→2) -β-D-γλυκοπυρανοζίτης] της 4'-μεθοξυ-υπολαετίνης, \* άγνωστη ένωση. 174
- Σχήμα 6.8. Χρωματογραφήματα στα 280 nm, 254 nm, 335 nm και 517 nm που λήφθηκαν με το on line σύστημα HPLC-DPPH εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς των ποικιλιών (α) κορωνεΐκη 2006 και (β) βασιλικάδα 2006. 179
- Σχήμα 6.9. Χρωματογραφήματα στα 280 nm, 254 nm, 335 nm και 517 nm που λήφθηκαν με το on line σύστημα HPLC-DPPH εκχυλίσματος φύλλων ελιάς των ποικιλιών χονδροελιά 2006. 180

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 3.1	Σύσταση κινητής φάσης για την μελέτη εκχυλισμάτων <i>Sideritis syriaca</i> και <i>Teucrium polium</i> .	65
Πίνακας 3.2.	Τύποι πληρωτικού υλικού των μικροστηλών του συστήματος SPE.	69
Πίνακας 4.1.	Το % ποσοστό του ακετονιτριλίου τη στιγμή της παγίδευσης των επιμέρους ενώσεων στις μικροστήλες και το αποτέλεσμα της μείωσης της παρουσίας του οργανικού διαλύτη εκφρασμένο σε όρους S/N.	81
Πίνακας 4.2.	Μελέτη της επίδρασης του χρόνου ξήρανσης των μικροστηλών.	85
Πίνακας 4.3.	Συγκριτική μελέτη της επίδρασης του δευτεριωμένου διαλύτη ανάκτησης των φαινολικών οξέων.	86
Πίνακας 4.4.	Συγκριτική μελέτη της επίδρασης του δευτεριωμένου διαλύτη ανάκτησης των φλαβονοειδών.	88
Πίνακας 4.5.	Έλεγχος της αποτελεσματικότητας της πολλαπλής παγίδευσης για ενώσεις διαφορετικής πολικότητας.	92
Πίνακας 5.1.	Προσδιορισμός ολικών φαινολικών συστατικών και εκτίμηση της ικανότητας δέσμευσης των ελευθέρων ριζών των εκχυλισμάτων του φυτού <i>Teucrium polium</i> .	95
Πίνακας 5.2.	Χημικές μετατοπίσεις και σταθερές σύζευξης για τον βερμπασκοζίτη και τον πολιουμοζίτη σε διαλύτη ACN- $d_3$ .	120
Πίνακας 5.3.	Χημικές μετατοπίσεις και σταθερές σύζευξης για τον την απιγενίνη, τον 4'-O- γλυκοζίτη της απιγενίνης, τον 7- O- γλυκοζίτη της απιγενίνης και τον 7- O- ρουτινοζίτη της απιγενίνης σε διαλύτη ACN- $d_3$ .	124
Πίνακας 5.4.	Χημικές μετατοπίσεις και σταθερές σύζευξης για την 3,7-διμεθοξυ-κερκετίνη και την 3,7-διμεθοξυ-καμπφερόλη σε διαλύτη ACN- $d_3$ .	127
Πίνακας 5.5.	Προσδιορισμός ολικών φαινολικών συστατικών και εκτίμηση της ικανότητας δέσμευσης των ελευθέρων ριζών των εκχυλισμάτων του φυτού <i>Sideritis syriaca</i> .	129

- Πίνακας 5.6. Χημικές μετατοπίσεις και σταθερές σύζευξης για τον βερμπασκοζίτη, τον μαρτυνοζίτη και τον λαβαντουλιοφολιοζίτη σε διαλύτη ACN- $d_3$ . 148
- Πίνακας 5.7. Χημικές μετατοπίσεις και σταθερές σύζευξης για τον 7-O-[6'''-O-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοζυλ-(1→2) -β-D-γλυκοπυρανοζίτη] της 4'-μεθοξυ-υπολαετίνης, 7-O-[6'''-O-ακετυλο-β-D-άλλοπυρανοζυλ-(1→2) -β-D-γλυκοπυρανοζίτη] της υπολαετίνης και 7-O-[6'''-O-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοζυλ-(1→2) -β-D-γλυκοπυρανοζίτη] της ισοσκουτελλαρεΐνης σε διαλύτη ACN- $d_3$ . 155
- Πίνακας 6.1. Η εκατοστιαία συνεισφορά των συστατικών στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων του φυτού *Teucrium polium*. 171
- Πίνακας 6.2. Η εκατοστιαία συνεισφορά των συστατικών στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων του φυτού *Sideritis syriaca*. 176
- Πίνακας 6.3. Η εκατοστιαία συνεισφορά των συστατικών στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων των φύλλων ελιάς (*Olea europaeae*). 180

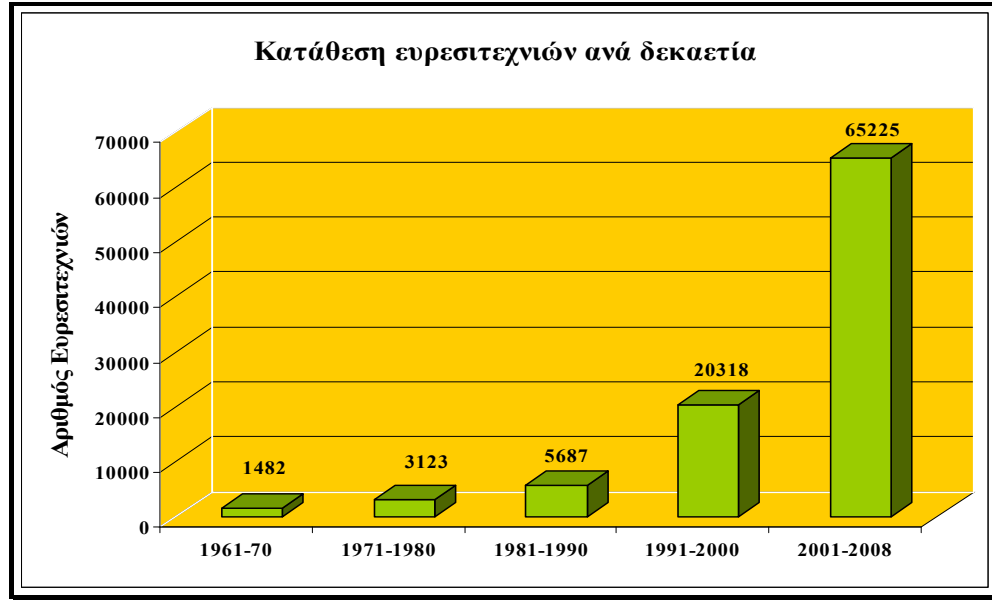
## 1. Εισαγωγή

### *1.1 Τα φυσικά προϊόντα ως πηγή βιοενεργών ενώσεων*

Τα φυσικά προϊόντα είναι ανεξάντλητη πηγή βιοενεργών ενώσεων που αποκτούν ολοένα και περισσότερο αυξανόμενο ενδιαφέρον ως προς τη χρήση τους στη θεραπευτική και στη βιοτεχνολογία. Η χρήση φυσικών προϊόντων για θεραπευτικούς κι άλλους σκοπούς δεν είναι κάτι πρωτόγνωρο αλλά αποτελούσε κοινή πρακτική από την αρχαιότητα, όπως προκύπτει από τη μελέτη κειμένων της Αρχαίας Ελληνικής, της Αιγυπτιακής και Ρωμαϊκής γραμματείας.

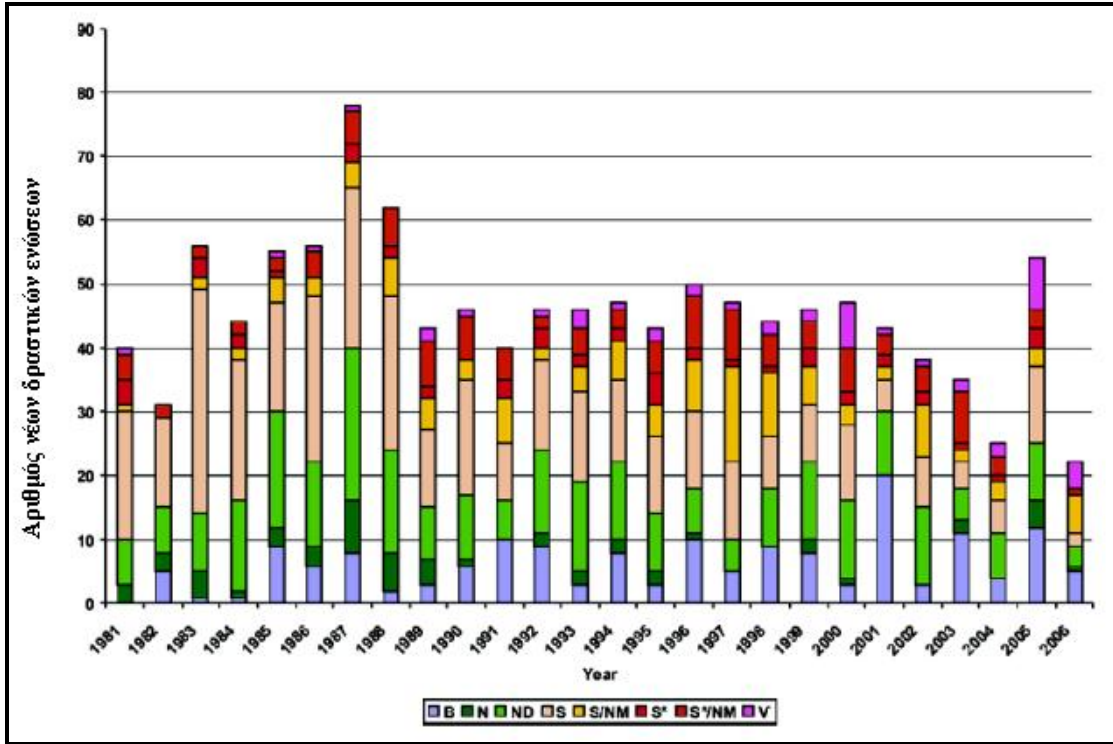
Τα τελευταία χρόνια είναι αναμφισβήτητο γεγονός η στροφή της επιστημονικής κοινότητας στην αναζήτηση φυτικών εκχυλισμάτων πλούσιων σε βιοενεργές ενώσεις για την πρόληψη ή/και καταπολέμηση μεγάλου αριθμού ασθενειών. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι την τελευταία δεκαετία αυξήθηκε κατά 300% η κατάθεση ευρεσιτεχνιών για την απομόνωση βιοενεργών ενώσεων και την παρασκευή εκχυλισμάτων ή κλασμάτων με ευεργετικές ιδιότητες για την ανθρώπινη υγεία. Το ενδιαφέρον αυτό αποτυπώνεται στο Σχήμα 1.1, που ακολουθεί.



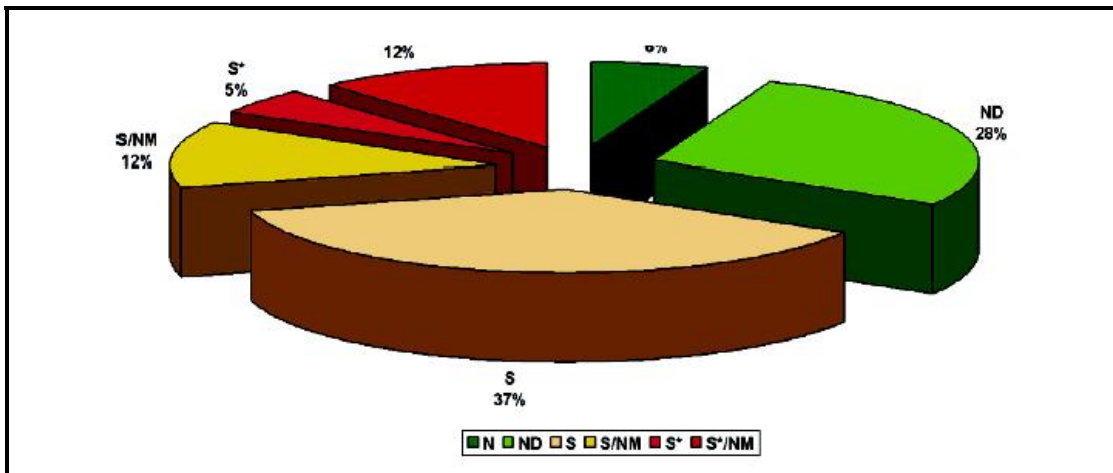


Σχήμα 1.1. Γραφική απεικόνιση της κατάθεσης ευρεσιτεχνιών από το 1960 έως σήμερα, σύμφωνα με τα στοιχεία από το [www.scopus.com](http://www.scopus.com).

Ιδιαίτερα σημαντικά είναι και τα στοιχεία που αφορούν την εισαγωγή νέων φαρμακευτικών σκευασμάτων από το 1981 έως το 2002, σύμφωνα με τα οποία το 67 % των δραστικών ουσιών τους έχουν φυτική προέλευση (Gragg, *et al.*, 1997, Gragg, *et al.*, 2006). Πιο συγκεκριμένα, το 34 % των φαρμάκων προκύπτουν είτε άμεσα είτε έμμεσα από φυτικά εκχυλίσματα, το 24% είναι φαρμακευτικά σκευάσματα που προσομοιάζουν τα φυτικά προϊόντα και έχουν παρασκευασθεί με συνθετικό ή με ημι-συνθετικό τρόπο, και τέλος το 37% των δραστικών ουσιών που περιέχονται στα φαρμακευτικά σκευάσματα προκύπτουν εξολοκλήρου με συνθετικό τρόπο. Τα παραπάνω στοιχεία αποτυπώνονται παραστατικά στα Σχήματα 1.2 και 1.3 (Newman, *et al.*, 2007).



Σχήμα 1.2. Οι δραστικές ουσίες των φαρμακευτικών σκευασμάτων (N = 1184) από το 1981 έως το 2006 κατηγοριοποιημένες ανά πηγή προέλευσης και ανά έτος (Newman, et al., 2007).



Σχήμα 1.3. Οι δραστικές ουσίες των φαρμακευτικών σκευασμάτων (N = 974) από το 1981 έως το 2006 με κριτήριο την προέλευση τους (Newman, et al., 2007).

Στο σημείο αυτό είναι χρήσιμο να αναφερθεί ότι δραστικές ουσίες με φυτική προέλευση νοούνται εκείνες που είναι φυσικό προϊόν (N), εκείνες που προκύπτουν με ημισυνθετικό τρόπο παραγωγής αλλά η βάση τους είναι κάποιο φυσικό προϊόν (ND) και

εκείνες που παράγονται με συνθετικό τρόπο αλλά προσομοιάζουν τις αντίστοιχες που περιέχονται στα φυσικά προϊόντα (NM). Τέλος, εκτός από τον αμιγώς συνθετικό τρόπο παραγωγής τους (S), υπάρχουν και ενώσεις που δεν έχουν καμιά φυτική προέλευση αλλά ο σχεδιασμός τους έχει προκύψει από τη μελέτη φυσικού προϊόντος (S\*).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει και το εύρος των ασθενειών που αντιμετωπίζονται με επιτυχία από τα φυτικά προϊόντα. Τα φυτικά εκχυλίσματα και ενώσεις που περιέχονται σε αυτά έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μυκητοκτόνο, αντιβακτηριδιακή, αναλγητική, αντική και διουρητική δράση τους αλλά και για την αντιμετώπιση πιο σοβαρών ασθενειών όπως η οστεοπόρωση, η νόσος Alzheimer και η αυξημένη αρτηριακή πίεση. Τα νέα φαρμακευτικά σκευάσματα που εισήχθησαν από το 1981 έως το 2006 καταπολεμούν πάνω από εβδομήντα ασθένειες. Ξεχωριστή θέση κατέχουν οι δραστικές ενώσεις, που απομονώθηκαν από φυτικά εκχυλίσματα, για την αντιμετώπιση του καρκίνου με αποτέλεσμα σήμερα το 60 % των αντικαρκινικών φαρμάκων να έχουν φυσική προέλευση (Gragg, *et al.*, 2005).

## **1.2 Τα φυτά της οικογένειας *Lamiaceae* ως πηγή βιοενεργών ενώσεων**

Η οικογένεια *Lamiaceae* (ή *Labiatae*) περιλαμβάνει 210 γένη και 3500 είδη φυτών, που φύονται κυρίως στην Μεσόγειο και σε μικρότερο βαθμό στην Αυστραλία, τη Ν.Δ Ασία και την Ν. Αμερική. Τα φυτά της είναι συχνά αρωματικά και αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι των διατροφικών συνηθειών των λαών. Χρησιμοποιούνται από την αρχαιότητα ευρέως ως αρτύματα, αφεψήματα και συχνά για την αντιμετώπιση ασθενειών. Συνήθως είναι ποώδη φυτά και σπανιότερα θάμνοι και μικρά δέντρα. Τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά είναι ο τετράγωνος βλαστός τους, τα απλά και αντίθετα φύλλα τους και τα ζυγόμορφα ερμαφρόδιτα άνθη (μοβ, πορφυρά, λευκά) που σχηματίζουν κυματώδεις ταξιανθίες (Kokkini, *et al.*, 1991, Watson and Dalwitz, 1992).

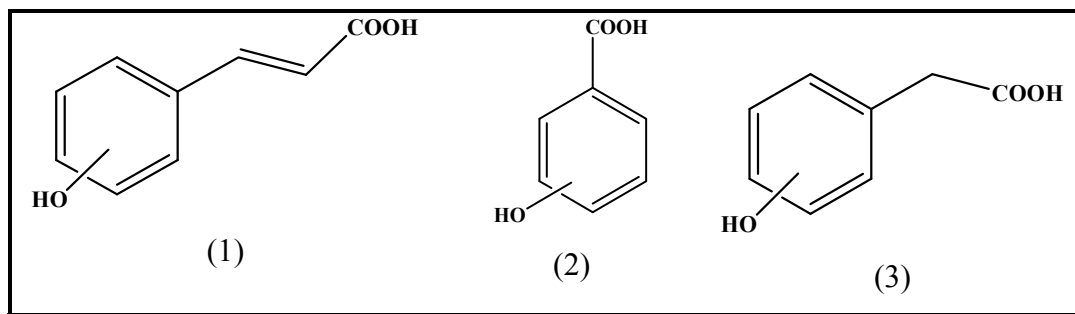
Τα φυτά της οικογένειας *Lamiaceae*, που απαντώνται κυρίως στον Ελλαδικό χώρο είναι η ρίγανη (*oregano*), το τσάι του βουνού (*sideritis*), το μελισσόχορτο (*lemon balm*), η μέντα (*mentha*), ο βασιλικός (*basil*), το δεντρολίβανο (*rosemary*), το

φασκόμηλο (*sage*), η μαντζουράνα (*marjoram*), ο δίκταμος (*dittany*), το θυμάρι (*thyme*), η λεβάντα (*lavender*), το τεύκριο (*germander*), το θρούμπι (*savory*) κ.ά..

Στα φυτά αυτά έχει αποδοθεί πληθώρα βιολογικών δράσεων με την αντιοξειδωτική δράση να αποτελεί το αντικείμενο των περισσότερων εργασιών (Caperka, *et al.*, 2005, Matkoski, *et al.*, 2006, Ozgen, *et al.*, 2006) και πολλά από αυτά έχουν χρησιμοποιηθεί στη λαϊκή ιατρική ως φαρμακευτικά φυτά. Χρησιμοποιούνται ως διουρητικά, αντιφλεγμονώδη, αντιμικροβιακά, αντισπασμωδικά, αιμοστατικά, καταϋπραντικά καθώς και για την αντιμετώπιση απλών κρυολογημάτων (Vokou, *et al.*, 1993, Meister, *et al.*, 1999 Kipel, *et al.*, 2007, Unal, *et al.*, 2008). Εμπειριστατωμένες μελέτες προτείνουν ότι ορισμένα φυτικά εκχυλίσματα ή απομονωμένα συστατικά αυτών μπορούν να χρησιμοποιηθούν ακόμη και για την αντιμετώπιση πιο σοβαρών ασθενειών όπως η νόσος Alzheimer και ο καρκίνος και τέλος έχει καταδειχθεί η συμβολή τους ως αντι-γηραντικός παράγοντας (Chung, *et al.*, 2001, Badisa, *et al.*, 2003, Kaileh, *et al.*, 2007).

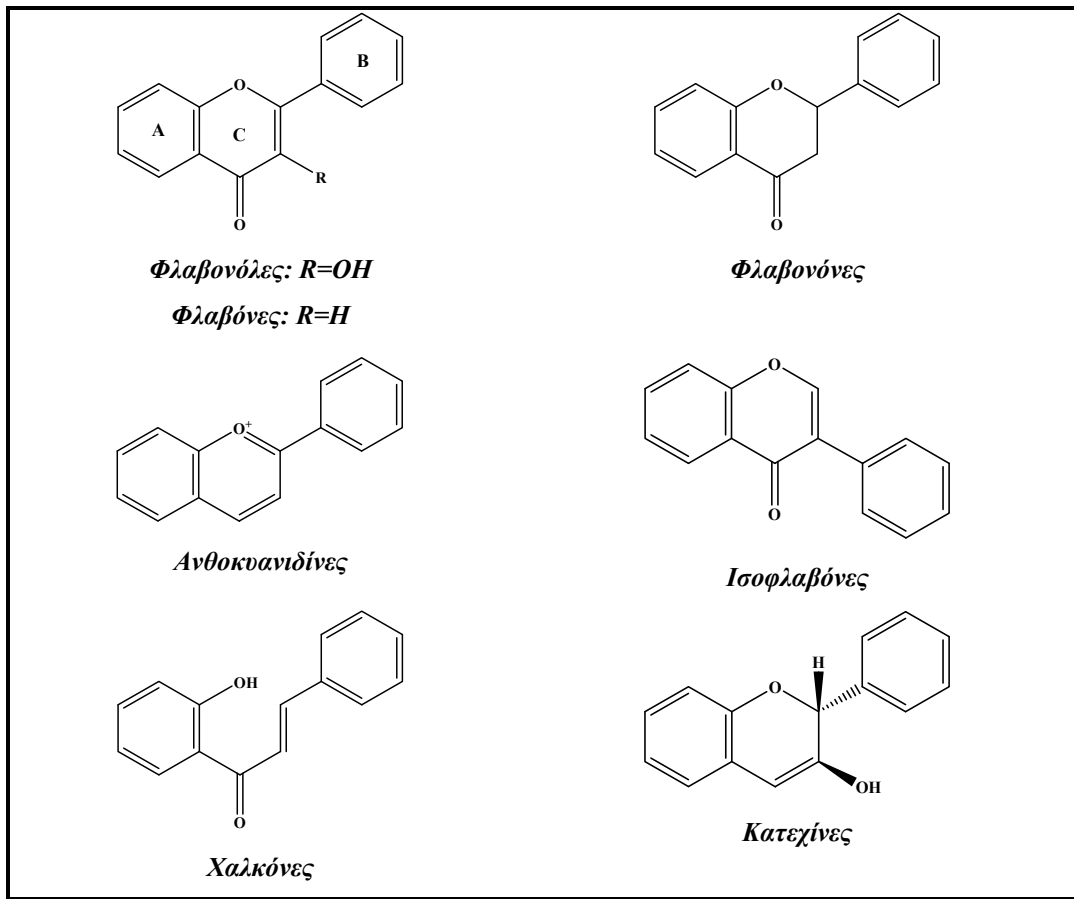
Οι ευεργετικές αυτές δράσεις έχουν αποδοθεί κυρίως στα φαινολικά συστατικά των φυτών αυτών. Τα φαινολικά συστατικά που απαντούν στα αρωματικά φυτά της οικογένειας *Lamiaceae* μπορούν να χωριστούν στις παρακάτω κύριες κατηγορίες:

(α) Φαινολικά οξέα που είναι συνήθως υδροξυλιωμένα παράγωγα του κινναμωμικού οξέος (1), του βενζοϊκού οξέος (2) και του φαινυλοξικού οξέος (3) (Σχήμα 1.4)



Σχήμα 1.4: Δομές υδροξυλιωμένων παράγωγων του κινναμωμικού οξέος (1), του βενζοϊκού οξέος (2) και του φαινυλοξικού οξέος (3).

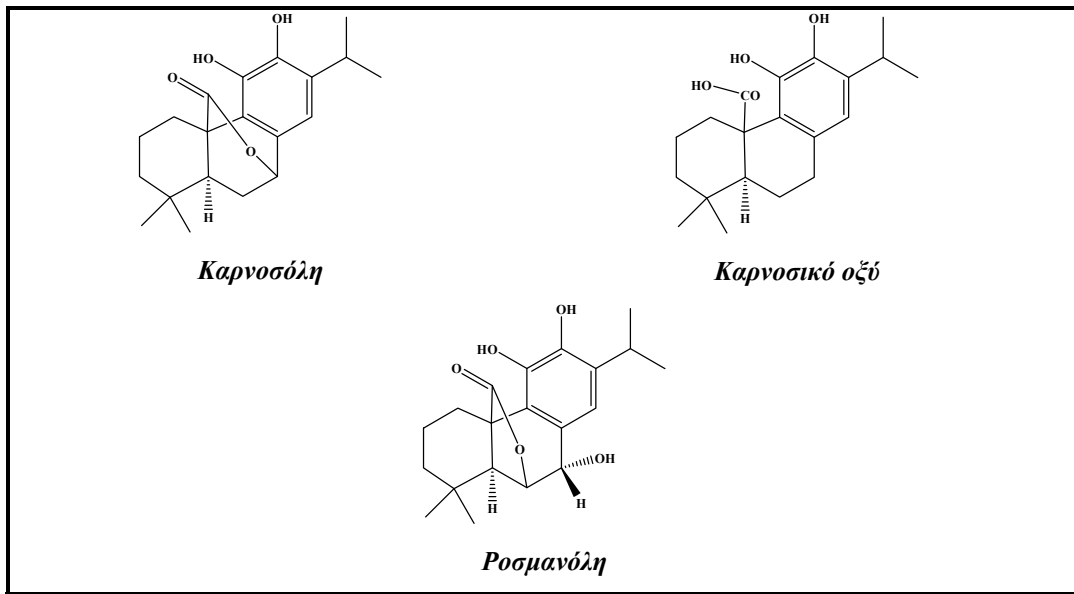
(β) *Φλαβονοειδή* τα οποία απαντούν στα περισσότερα φυτά και είναι μέρος της διατροφής του ανθρώπου. Υπολογίζεται ότι ο άνθρωπος παίρνει με την τροφή του ένα γραμμάριο φλαβονοειδών ημερησίως (Bruneton, 1996). Έχουν αναφερθεί πάνω από 3.000 φλαβονοειδή που απαντούν στα ανώτερα φυτά και διακρίνονται ανάλογα με το βαθμό οξειδωσης του πυρανικού τους δακτυλίου σε: φλαβονόλες, φλαβόνες, ισοφλαβόνες, κατεχίνες, ανθοκυανιδίνες και τις χαλκόνες (Σχημα 1.5) (Makham, 1982, Ikan, 1991).



Σχήμα 1.5: Δομές των κυριότερων κατηγοριών της τάξης των φλαβονοειδών.

(γ) *Τερπένια και τερπενοειδή*, που είναι ενώσεις με βασική δομική μονάδα το ισοπρένιο ( $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$ ). Συνήθως, στα φυτικά εκχυλίσματα απαντούν κυρίως τα διτερπένια (τέσσερις ισοπρενικές μονάδες) (Ραγκούση, 1996, Salminen, *et al.*, 2008,

Bohlmann *and* Keeling, 2008) που είναι και ιδιαίτερα δραστικές ενώσεις φαινολικού τύπου και όπως φαίνεται και στο Σχήμα 1.6.



Σχήμα 1.6: Δομές των κυριότερων κατηγοριών διτερπενίων που απαντώνται στα φυτά.

Από τις παραπάνω κατηγορίες φαινολικών ενώσεων μελετήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή τα φαινολικά οξέα και τα φλαβονοειδή. Οι ενώσεις αυτές είναι τα κύρια συστατικά των πολικών κλασμάτων των φυτών της οικογένειας *Lamiaceae* όπως για παράδειγμα των υδατικών εκχυλισμάτων. Στα πλαίσια μιας διδακτορικής διατριβής επιλέχθηκαν να μελετηθούν ως προς της σύσταση των εκχυλισμάτων τους το τσάι του βουνού (*Sideritis syriaca*) και το τεύκριο ή στομαχοβότανο (*Teucrium polium*), τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως ως αφεψήματα και φύονται στην Ήπειρο.

### 1. Το τσάι του βουνού (*Sideritis*)

Το τσάι του βουνού είναι γνωστό στην Ελλάδα από την αρχαιότητα και αναφέρεται από τον Θεόφραστο (372-287 π.Χ) και το Διοσκουρίδη (10 μΧ αιώνα). Το επιστημονικό του όνομα *Sideritis* προέρχεται από την λέξη σίδηρος εξαιτίας της ικανότητας του να θεραπεύει πληγές που προκαλούνταν από σιδερένια αντικείμενα. Σύμφωνα με μια άλλη εκδοχή, το όνομα του σχετίζεται με το ότι αποτελεί πηγή σιδήρου καθώς τα αφεψήματά του είναι πλούσια σε σίδηρο. Μια τρίτη άποψη υποστηρίζει ότι η

ονομασία του οφείλεται στο σχήμα των δοντιών του κάλυκα, που μοιάζουν με αιχμηρή λόγχης (Καββαδάς, 1964).

Το γένος *Sideritis* περιλαμβάνει περισσότερα από 140 είδη και υποείδη που ευδοκιμούν κυρίως στο βόρειο ημισφαίριο, ιδιαίτερα στις παραμεσόγειες περιοχές όπως στην Ισπανία, ιδιαίτερα στα Κανάρια νησιά, στη Γαλλία, στην Ιταλία, στη Βαλκανική χερσόνησο, στη Κύπρο, στη Μικρά Ασία, στο Καύκασο και στα παράλια της Βορείου Αφρικής (Αλγερία, Μαρόκο και Αίγυπτο). Μερικά είδη του γένους απαντούν επίσης στο Μεξικό, στο Περού και στην Ιαπωνία. Η Ελλάδα είναι ιδιαίτερα πλούσια σε ενδημικά είδη του φυτού και μάλιστα ποικίλλουν κατά γεωγραφικά διαμερίσματα από τη Μακεδονία έως τη Κρήτη και κατά υψόμετρο, που κυμαίνεται από 500 έως 2000 μέτρα. Τα φυτά ευδοκιμούν σε ξηρά πετρώδη, ασβεστολιθικά και γενικά υποβαθμισμένα εδάφη, σε διάφορες περιοχές της χώρας, όπως στην Ήπειρο, τη Μακεδονία, τη Κρήτη, τα Ιόνια νησιά, τη Μεσσηνία, το Πήλιο και την Εύβοια (Papanikolaou and Kokkini, 1983).

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκε το υποείδος *Sideritis syriaca* που είναι γνωστό και ως Μαλοτήρα ή Καλοκοιμηθιά. Είναι πολυετής πόα, ύψους μέχρι 50 εκατοστά. Έχει βλαστό ισχυρό, τετράγωνο, όρθιο, απλό, που σκεπάζεται με πυκνό και λευκό χνούδι. Τα φύλλα του έχουν χρώμα λευκοπράσινο, καλύπτονται με πυκνό χνούδι, είναι επιμήκη-λογχοειδή, ακέραια ή πριονωτά, τα κατώτερα με μίσχο και τα ανώτερα άμισχα. Ο κάλυκας είναι σωληνοειδής που καταλήγει σε δόντια και σκεπάζεται από μακρύ και πυκνό τρίχωμα. Τα πέταλα του άνθους έχουν χρώμα κίτρινο. Αυτοφύεται κυρίως στα ψηλά βουνά της Κρήτης και κυρίως στα Λευκά Όρη και τον Ψηλορείτη, σε ύψος 1300-2000 μέτρα.

Μια σειρά μελετών έχουν διεξαχθεί κατά καιρούς τόσο σε φυτικά εκχυλίσματα του γένους *Sideritis* όσο και σε ενώσεις που απομονωθήκαν από αυτά προκειμένου να εκτιμηθούν οι θεραπευτικές τους ιδιότητες. Η πιο ισχυρά αποδεδειγμένη δράση τους είναι η αντιφλεγμονώδης, η οποία αποδίδεται κυρίως στα φλαβονοειδή αλλά και στις διτερπενικές ενώσεις (Villar, *et al.*, 1984, Yesilado and Ezer, 1989). Εκτός από την αντιφλεγμονώδη δράση, βρέθηκε ότι είδη του γένους *Sideritis* εμφανίζουν και άλλες όπως αντι-μικροβιακή έναντι Gram θετικών βακτηρίων (Diaz, *et al.*, 1988), δράση κατά του καταρράκτη (Tomas-Barberan, *et al.*, 1987), αντιθρομβωτική (Villar, *et al.*, 1985) και αντιυπερτασική δράση (Paya, *et al.*, 1985).

Όσον αφορά τη σύσταση των εκχυλισμάτων του φυτού, προηγούμενες φυτοχημικές μελέτες έδειξαν ότι τα φυτά του γένους *Sideritis* είναι πλούσια σε αιθέρια έλαια (Kirimer, *et al.*, 2008, Ozel, *et al.*, 2008) και διτερπένια, όπως είναι η μποτζαρτριόλη (bojartriol) που εμφανίζει ισχυρή αντι-φλεγμονώδες δράση, η σιδηριδιόλη (sideridiol), και η λινεαρόλη (linearol) (Tomas-Barberan, *et al.*, 1987, Sahin, *et al.*, 2006, Kilic, 2006). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν και τα φλαβονοειδή με τους αντίστοιχους γλυκοζίτες τους. Έχουν αναφερθεί ότι απομονώθηκαν γλυκοζίτες της ισοσκουτελλαρεΐνης (isoscutellarein) και ο 8-*O*-D-γλυκοζίτης της υπολαετίνης (hypolaetin-8-*O*-D-glucose), που σε πολλά είδη του φυτού αποτελεί το κύριο συστατικό του φαινολικού κλάσματος (Alcaraz and Tordera, 1988, Palomino, *et al.*, 1996, Janeska, *et al.*, 2007, Armata, *et al.*, 2008). Έχει παρατηρηθεί ότι τα φλαβονοειδή που φέρουν στις θέσεις 3', 4' ή στις θέσεις 7, 8 της δομής τους υδροξυλομάδες (-OH) εμφανίζουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση ενώ η γλυκοσιλίωση στη θέση 7 έχει μάλλον αρνητική επίδραση. Ακόμη παρατηρείται ότι όταν το σάκχαρο είναι η 6''''-ακετυλοπυρανοσυλο(1→2) γλυκοπυρανόση, η ένωση εξακολουθεί να παραμένει δραστική με μια μικρή μόνο μείωση της δραστικότητας. Η παρουσία της 6''''-ακετυλομάδας στο σάκχαρο αυξάνει την αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με τον απλό γλυκοζίτη, κάτι το οποίο παρατηρείται στα φλαβονοειδή που απαντούν στο σιδηρίτη (Rios, *et al.*, 1992).

## 2. Τεύκριο ή στομαχοβότανο (*Teucrium*)

Το όνομα του γένους προέρχεται από τον επικό ηρώα Τεύκρο και περιλαμβάνει περίπου 300 είδη αειθαλών και φυλλοβόλων θάμνων και πολυετών ποωδών φυτών με φύλλα που περιέχουν αρωματικά έλαια. Ευδοκίμει κυρίως στην Μεσόγειο και στη Μέση Ανατολή και έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στην παραδοσιακή ιατρική για την αντιμετώπιση πολλών ασθενειών.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκε το υποείδος *Teucrium Polium*, που είναι γνωστό με διάφορες ονομασίες όπως αμάραντος, πόλιο, ασπρόχορτο, λιβανόχορτο, στομαχοβότανο, παναγιόχορτο, βότανο της Παναγιάς, λαγοκοιμηθιά, και ύσσωπος. Πρόκειται για μια πολυετής πόα με βλαστούς 6-45 εκατοστά με μικρά άνθη



χρώματος από ροζ έως λευκό που χρησιμοποιούνται ευρέως ως αφέψημα (Strid and Tan, 1991). Στη Γαλλία, κάψουλες που περιέχουν εκχυλίσμα του φυτού αυτού είναι εμπορικά διαθέσιμες και χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο του σωματικού βάρους. Στις Η.Π.Α χρησιμοποιείται ως ενισχυτικό γεύσης σε αλκοολούχα ποτά, παρόλα αυτά υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι προϊόντα που προκύπτουν από το φυτό αυτό εμφανίζουν ισχυρή ηπατοτοξική δράση. Ενδεικτικό είναι ότι στην Γαλλία το 1992 απαγορεύτηκε η χρήση του παρεμφερούς φαρμακευτικού φυτού *Teucrium Chamaedrys* (germander), που χρησιμοποιήθηκε ως απισχναντικό, μετά από 30 περιπτώσεις ηπατίτιδας που αποδόθηκαν στη χρήση του (Sundaresan, *et al.*, 2006). Παρόμοια οδηγία εκδόθηκε και από τον Ελληνικό Οργανισμό Φαρμάκων (Ε.Ο.Φ) που προειδοποιούσε για τον κίνδυνο από την χρήση του φυτού *Teucrium Polium*, καθώς υπήρχαν αρκετές περιπτώσεις καταναλωτών που νοσηλεύτηκαν με τοξική ηπατίτιδα.

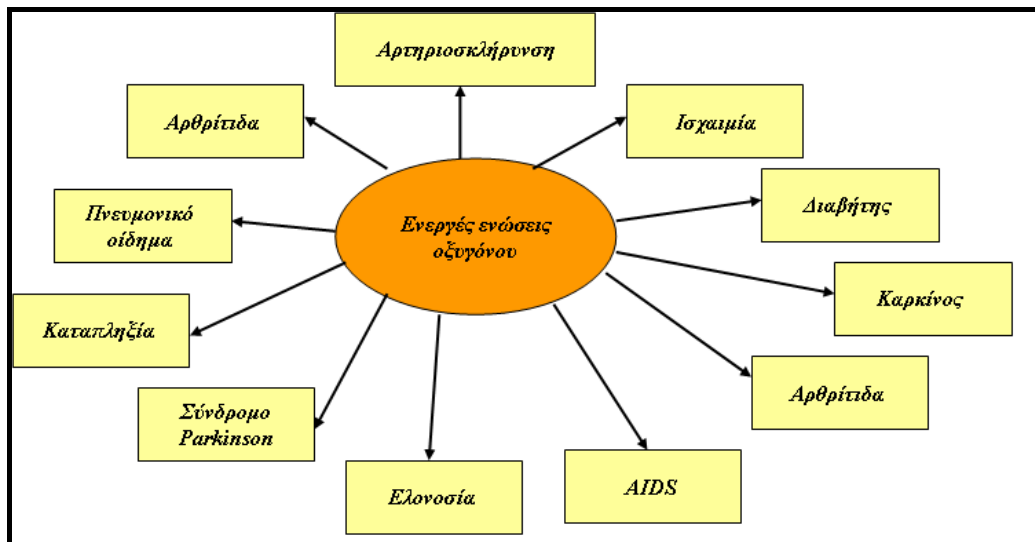
Το *Teucrium Polium* είναι γνωστό εδώ και 2000 χρόνια ως φαρμακευτικό φυτό και τα εκχυλίσματα του χρησιμοποιούνται για τις διουρητικές, τονωτικές, διεγερτικές, αντιπυρετικές, αναλγητικές, αντιφλεγμονικές και αντιβακτηριδιακές τους ιδιότητες (Bedir, *et al.*, 2003, Sundaresan, *et al.*, 2006, Hasani, *et al.*, 2007,). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ισχυρή ηπατοπροστατευτική δράση (Panovska, *et al.*, 2007), και αναφέρονται επίσης οι αντι-σπασμωδικές και αντισηπτικές του ιδιότητες (Baluchnejadmojarad, *et al.*, 2005, Parsaee, *et al.*, 2006). Τέλος, δοκιμές σε πειραματόζωα απέδειξαν ινσουλινοτροπική και αντιυπεργλυκαιμική δράση των εκχυλισμάτων του *Teucrium Polium* (Esmaili, *et al.*, 2004).

Τα εκχυλίσματα του *Teucrium Polium* είναι πηγή διτερπενίων, όπως είναι η τευκρίνη Α (Teucrin A) στα οποία έχει αποδοθεί η ηπατική δράση αλλά συνάμα θεωρούνται υπεύθυνα και για τη τοξικότητα των εκχυλισμάτων (Kouzi, *et al.*, 1994). Η παρουσία των φλαβονοειδών στο φυτό αυτό είναι κάτι παραπάνω από αισθητή και χαρακτηρίζονται από την παρουσία μεθοξυ-φλαβονών όπως η σιρσιλιόλη (cirsiliol), η σιρσιμαριτίνη (cirsimaritin), η σαλβιογενίνη (salvigenin) και η διοσμίνη (diosmin) (Harborne, *et al.*, 1986, Oganessian, 2007, Stefova, *et al.*, 2007). Οι πιο ενδιαφέρουσες ενώσεις που απαντούν στα φυτά του γένους *Teucrium* είναι οι φαινυλοπροπιονικές ενώσεις όπως είναι ο τευκριοζίτης (teucrioside) (Gross, *et al.*, 1988, Bedir, *et al.*, 2003), ο τευκροζίτης (teucroside) (El-Mousallamy, *et al.*, 2000), ο βερμπασκοζίτης (Oganessian, *et*

*al.*, 1992, Serrilli, *et al.*, 2007), ο πολιομοζίτης (poliumoside) (Andary, *et al.*, 1985) και ο τευπολιοζίτης (teupolioside) (Oganessian, *et al.*, 1992). Σύμφωνα με τους Sundaresan και Oualidi συχνά η παρουσία τους χαρακτηριζόμενη και μπορεί να βοηθήσει στην ταυτοποίηση ενός υποείδους του.

### 1.3 Εκτίμηση της βιοδραστικότητας των φυτικών εκχυλισμάτων

Στην προσπάθεια αναζήτησης νέων βιοενεργών ενώσεων ή/και κλασμάτων εκτός από τη μελέτη της σύστασης των εκχυλισμάτων και το χαρακτηρισμό των ενώσεων, απαραίτητη κρίνεται και η ανάπτυξη μεθοδολογίας για μια πρώτη, γρήγορη εκτίμηση της βιοδραστικότητάς τους. Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας έχει αποδειχτεί ότι μπορεί να αποτελέσει ένα ιδιαίτερα χρήσιμο «δείκτη» για την βιοδραστικότητα ενός εκχυλίσματος (Pietta, 2000, Stevenson και Hurst, 2007). Και αυτό γιατί σύμφωνα με την θεωρία των ελευθέρων ριζών, πολλές ασθένειες του ανθρώπινου οργανισμού πιστεύεται ότι προκαλούνται από την επίδραση ενεργών ενώσεων οξυγόνου.



Σχήμα 1.7: Ασθένειες του ανθρώπινου οργανισμού πιστεύεται ότι προκαλούνται από την επίδραση ενεργών ενώσεων οξυγόνου.

Σήμερα πιστεύεται ότι οι αντιδράσεις ελευθέρων ριζών λαμβάνουν χώρα σε μια σειρά από παθοφυσιολογικές καταστάσεις όπως στις πνευμονικές παθήσεις, στις τοξικές ή και στις θεραπευτικές ιδιότητες διαφόρων φαρμάκων, σε χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις, σε φωτοοξειδωτικά φαινόμενα στον οφθαλμό κατά τη δημιουργία του καταρράκτη, στις ασθένειες Parkinson και Alzheimer, κ.α. Ακόμη, υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι οι ελεύθερες ρίζες εμπλέκονται σε διαδικασίες μετάδοσης του σήματος στα κύτταρα ως δεύτεροι διαμεσολαβητές και ως εκ τούτου παίζουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της κυτταρικής ανάπτυξης, στη γήρανση, στη καρκινογέννηση και το AIDS (Melidou, *et al.*, 2005, Γαλάρης, 2008).

Όπως γίνεται αντιληπτό από τα παραπάνω η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων και των ενώσεων είναι ιδιαίτερη χρήσιμη. Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί είναι ότι η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας αποτελεί μια σημαντική ένδειξη για πιθανή βιολογική δράση, και για τους ερευνητές που ασχολούνται με την απομόνωση των ενώσεων ή/ και το χαρακτηρισμό των εκχυλισμάτων είναι ένα ιδιαίτερα χρήσιμο εργαλείο.

#### **1.4 Σκοπός της διδακτορικής διατριβής**

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται διεθνώς μια στροφή στη χρήση φυσικών προϊόντων ιδιαίτερα στον τομέα των φαρμάκων, καλλυντικών και τροφίμων. Είναι χαρακτηριστικό το γεγονός ότι μεγάλο μέρος των φαρμακευτικών σκευασμάτων που κυκλοφορούν στο εμπόριο περιέχουν συστατικά φυτικής προέλευσης. Παράλληλα με τη συστηματική και σε βάθος έρευνα για τη μελέτη της χημικής σύστασης, της βιολογικής δράσης ή της βελτίωσης της ποιότητας των γνωστών φυσικών προϊόντων, γίνεται ιδιαίτερη προσπάθεια σε διεθνή κλίμακα για την ανακάλυψη νέων φυτών - πηγών διαφόρων συστατικών - που μπορεί να έχουν φαρμακευτική χρήση. Η λαϊκή εμπειρία στη θεραπευτική χρήση των φυτών αποτελεί πηγή γνώσης που παρέχει πλούσιο υλικό στη σύγχρονη επιστημονική έρευνα.

Η αναζήτηση φυτοχημικών με ποικίλες βιολογικές δράσεις, όπως η αντιοξειδωτική είναι μια εξαιρετικά δύσκολη και επίπονη διαδικασία, εξαιτίας της πολυπλοκότητάς τους. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει συνήθως το διαχωρισμό και απομόνωση των συστατικών με χρωματογραφικές μεθόδους και το χαρακτηρισμό και τη μελέτη της δομής τους με φασματοσκοπικές τεχνικές. Η παραπάνω προσέγγιση είναι χρονοβόρα και δεν οδηγεί πάντα στο επιθυμητό αποτέλεσμα. Τις τελευταίες δεκαετίες αναφέρεται στη διεθνή βιβλιογραφία η ανάπτυξη και η εφαρμογή συνδυαστικών τεχνικών και συγκεκριμένα υγροχρωματογραφικών τεχνικών σε συνδυασμό με τη φασματομετρία μαζών (Liquid chromatography - Mass Spectrometry, LC-MS) καθώς και υγροχρωματογραφικών τεχνικών με τη φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Liquid chromatography-Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, LC-NMR), που απαλλάσσουν τους

ερευνητές από τη χρονοβόρα και επίπονη απομόνωση κάθε συστατικού του προς ανάλυση δείγματος, καθώς επιτρέπουν την ταυτοποίηση των συστατικών ενός φυτικού εκχυλίσματος χωρίς να προηγηθεί καμιά διαδικασία διαχωρισμού ή απομόνωσης. Αναμφισβήτητα, η συνδυαστική τεχνική LC-NMR, η οποία έχει ευρεία εφαρμογή στην ανάλυση φαρμακευτικών προϊόντων, φυσικών προϊόντων, βιολογικών υγρών κ.α., κατέχει ξεχωριστή και δεσπόζουσα θέση ανάμεσα σε αυτές και αποτελεί την πιο πρόσφατη και πολλά υποσχόμενη συνδυαστική τεχνική.

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η ανάπτυξη της συνδυαστικής τεχνικής LC-NMR, η μελέτη των βέλτιστων συνθηκών λειτουργίας της για την ανάλυση φαινολικών ενώσεων και η εφαρμογή της στην ανάλυση βιοενεργών συστατικών σε φυσικά προϊόντα. Οι κατηγορίες βιοενεργών συστατικών που μελετήθηκαν είναι κυρίως φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή και παράγωγά τους, αλλά και σύνθετες μορφές αυτών. Τα εκχυλίσματα των φυτών που χρησιμοποιήθηκαν προέκυψαν από εκχύλιση με πολικούς κυρίως διαλύτες προκειμένου να παραληφθούν τα περισσότερο πολικά συστατικά. Η διαλυτότητα στο νερό είναι απαραίτητη προϋπόθεση ενός συστατικού που είναι πιθανό να αποτελέσει πρόδρομη ένωση για την παρασκευή φαρμακευτικού σκευάσματος (Morelock, *et al.*, 1994, Wexler, *et al.*, 2005). Επιπλέον, τα υδατικά εκχυλίσματα προσομοιάζουν περισσότερο τα αφεψήματα δηλαδή τον τύπο του εκχυλίσματος που καταναλώνεται από τον άνθρωπο. Η πρώτη εκτίμηση της σύστασης των εκχυλισμάτων έγινε με τη χρήση δισδιάστατων μεθοδολογιών της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού χωρίς τον προηγούμενο διαχωρισμό τους.

Παράλληλα έγινε μια προσπάθεια σύζευξης υγροχρωματογραφικών τεχνικών διαχωρισμού των συστατικών και τεχνικών που θα επιτρέψουν την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκλουόμενων συστατικών χωρίς να απαιτείται η απομόνωση τους. Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των επιμέρους συστατικών των εκχυλισμάτων είναι γενικά μια δύσκολη διαδικασία δεδομένου ότι πολλές ενώσεις αποικοδομούνται ταχύτατα και η απομόνωσή τους δεν είναι πάντοτε δυνατή. Επομένως, η σύζευξη τεχνικών που επιτρέπουν διαχωρισμό και παράλληλη ένδειξη της αντιοξειδωτικής ικανότητας των συστατικών παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον και αποτελεί μέρος της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

## 2. Θεωρητικό Μέρος

### 2.1 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)

#### 2.1.1 Το φαινόμενο του Πυρηνικού Μαγνητισμού

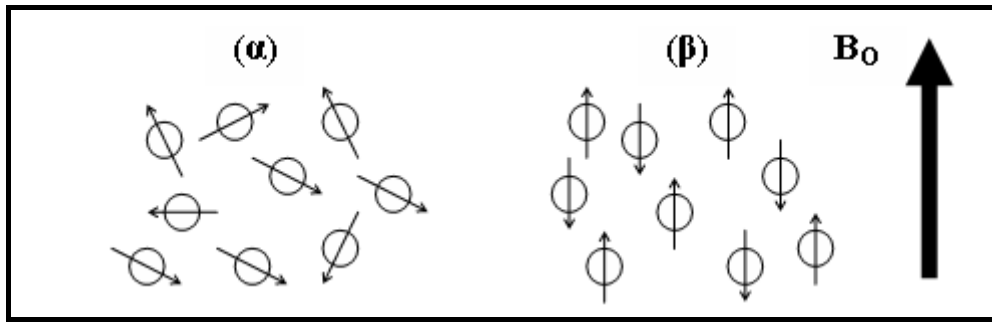
Πολλά σωματίδια εμφανίζουν στροφορμή από αυτοστροφή, δηλαδή spin και δημιουργούν ένα μικρό μαγνητικό δίπολο με μαγνητική ροπή  $m$  ίδιας διεύθυνσης με το άνυσμα της στροφορμής  $p$ . Το πυρηνικό spin είναι η συνιστώσα των spin των πρωτονίων και νετρονίων, είναι πολλαπλάσιο του  $h/2\pi$  (όπου  $h$  η σταθερά του Plank) και χαρακτηρίζεται από τον κβαντικό αριθμό πυρηνικού spin  $I$  ( $I=0, 1/2, 1, 3/2, \dots$ ), όπως περιγράφεται από την σχέση [2.1].

$$P = h/2\pi \sqrt{I(I+1)} \quad [2.1]$$

Η περιστροφή του πυρήνα γύρω από τον άξονα του σε συνδυασμό με το θετικό φορτίο του έχουν αποτέλεσμα να συμπεριφέρεται ως ένας μικροσκοπικός μαγνήτης, το μέγεθος του οποίου εκφράζεται με την πυρηνική μαγνητική ροπή  $\mu$ . Η μαγνητική ροπή συσχετίζεται με το πυρηνικό spin μέσω του γυρομαγνητικού λόγου  $\gamma$ , που είναι χαρακτηριστικός για κάθε πυρήνα και εκφράζει την ευαισθησία του πυρήνα κατά την εφαρμογή ενός μαγνητικού πεδίου.

$$\mu = \gamma \hbar I \quad [2.2]$$

Εκτός μαγνητικού πεδίου το άνυσμα της στροφορμής μπορεί να έχει οποιοδήποτε προσανατολισμό(εκφυλισμένες καταστάσεις). Εντός του πεδίου οι προσανατολισμοί του ανύσματος είναι ορισμένοι και ίσοι με  $2I+1$ , όπως φαίνεται και στο σχήμα 2.1.



Σχήμα 2.1. (α) Τυχαίος προσανατολισμός των ανυσμάτων της μαγνητικής ροπής πυρήνα με  $I=1/2$  απουσία μαγνητικού πεδίου (β) Με την επίδραση του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου  $B_0$  τα ανύσματα της μαγνητικής ροπής αποκτούν προσανατολισμό παράλληλο ή αντιπαράλληλο της έντασης του πεδίου  $B_0$ .

Η ενέργεια κάθε προσανατολισμού (ενεργειακή στάθμη) δίνεται από την σχέση [2.3]:

$$E = (\hbar/2\pi) \gamma B_0 I \quad [2.3]$$

Όπου  $B_0$  η ένταση του μαγνητικού πεδίου. Η αλληλεπίδραση της μαγνητικής ροπής με το πεδίο  $B_0$  καλείται αλληλεπίδραση *Zeeman*. Τα φάσματα *NMR* οφείλονται σε διεγέρσεις μεταξύ γειτονικών σταθμών ενέργειας  $\Delta E = | \dots |$  και η συχνότητα της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας  $\nu$  βρίσκεται στην περιοχή των ραδιοκυμάτων ή μικροκυμάτων. Απαραίτητη προϋπόθεση για την ύπαρξη συντονισμού είναι  $I \neq 0$ . πυρήνες με άρτιο μαζικό και άρτιο ατομικό αριθμό έχουν  $I=0$ . Πυρήνες με περιττό μαζικό αριθμό έχουν ημιακέραιο spin:  $1/2, 3/2, \dots$ . Πυρήνες με άρτιο μαζικό αριθμό και περιττό ατομικό αριθμό έχουν ακέραιες τιμές spin:  $1, 2, \dots$

Εάν πυρήνες υδρογόνου με  $I=1/2$  τεθούν σε μαγνητικό πεδίο το άνυσμα του spin της στροφικής του ορμής έχει δύο προσανατολισμούς σε σχέση με τη διεύθυνση του εξωτερικού πεδίου. Ο παράλληλος προσανατολισμός με  $I = +1/2$ , που αποτελεί τη βασική κατάσταση και ο αντιπαράλληλος με  $I = -1/2$ , που περιγράφει τη διεγερμένη. Η διαφορά ενέργειας  $\Delta E$  αντιστοιχεί σε συχνότητα  $\nu$  και δίνεται από την σχέση [2.4]:

$$\Delta E = h\nu = \mu B_0 / I = \gamma \hbar B_0 / 2\pi \quad [2.4]$$

Συνεπώς σε πυρήνες υδρογόνου εάν επιδράσει ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία συχνότητας  $\nu$  τότε επέρχεται συντονισμός με απορρόφηση ενέργειας και τα πρωτόνια θα διεγερθούν μεταβαίνοντας από τη βασική στη διεγερμένη κατάσταση (Hore, 1995, Τρογκάνης, 2003).

### 2.1.2 Πορείες αποδιέγερσης

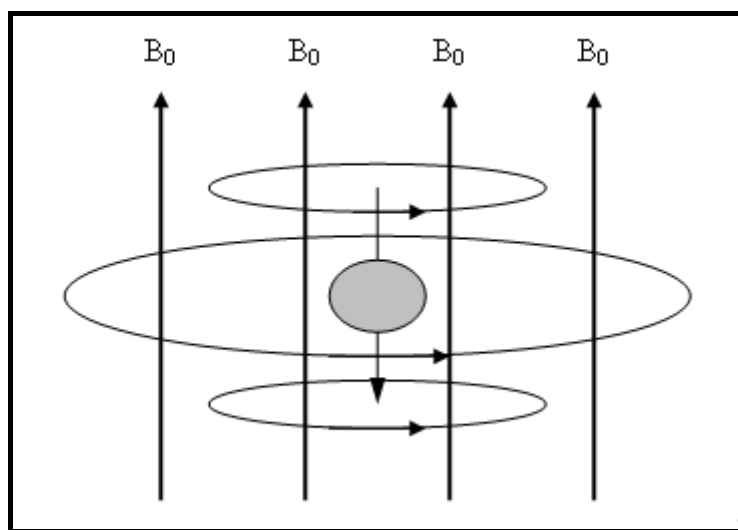
Η διαφορά ενέργειας  $\Delta E$  που αντιστοιχεί στις διεγέρσεις των πυρήνων είναι πολύ μικρή. Για αυτό το λόγο υπάρχει μικρή περίσσεια των πυρήνων που βρίσκονται στη βασική κατάσταση σε σχέση με αυτά που βρίσκονται στη διεγερμένη. Η πιθανότητα μετάβασης από τη στάθμη χαμηλής στη στάθμη υψηλή ενέργειας και το αντίστροφο είναι η ίδια. Αν εφαρμοστεί στο σύστημα ραδιοσυχνότητα ίση με την συχνότητα συντονισμού τότε οι πληθυσμοί στις δυο στάθμες θα εξισωθούν. Για να υπάρχει σήμα στο NMR θα πρέπει το σύστημα να επανέλθει στην αρχική του ισορροπία χωρίς απόδοση ακτινοβολίας. Οι μηχανισμοί αυτοί καλούνται μηχανισμοί αποκατάστασης ή αποδιέγερσης και υπάρχουν δυο βασικοί τύποι. Ο μηχανισμός spin-πλέγματος, που ονομάζεται επιμήκης αποδιέγερση (longitudinal relaxation), οφείλεται στην αλληλεπίδραση του διπόλου του πυρηνικού spin με τυχαία ταλαντούμενα πεδία που δημιουργούνται από τη κίνηση περιβαλλόντων διπόλων και χαρακτηρίζεται από το χρόνο  $T_1$ . Η δεύτερη πορεία αποδιέγερσης, που καλείται και εγκάρσια αποδιέγερση (transverse relaxation), είναι ο μηχανισμός spin-spin, οφείλεται στην αλληλεπίδραση ομοειδών πυρήνων γειτονικών μεταξύ τους που ανταλλάσσουν ενέργεια και χαρακτηρίζεται από το χρόνο  $T_2$  (Becker, 1971, Γεροθανάσης, Ι.Π., 1999, Akitt, 2000, Τρογκάνης, 2003).

### 1.3 Χημική Μετατόπιση

Η σπουδαιότητα της φασματοσκοπίας NMR βασίζεται στη δυνατότητα διαφοροποίησης κάθε πυρήνα ανάλογα με το χημικό του περιβάλλον. Αυτό σημαίνει ότι η συχνότητα συντονισμού ενός πυρήνα επηρεάζεται από την κατανομή των ηλεκτρονίων στους χημικούς δεσμούς του μορίου. Ο πυρήνας δηλαδή υφίσταται τη λεγόμενη ηλεκτρονιακή προστασία που είναι τόσο μεγαλύτερη όσο μεγαλύτερη είναι η ηλεκτρονιακή πυκνότητα γύρω από τον πυρήνα υδρογόνου (Gerothanassis και



Kalodimos, 1996). Η ένταση του πεδίου  $B_0$  που πραγματικά εφαρμόζεται στον πυρήνα είναι  $B_\pi = B_0 (1-\sigma)$



Σχήμα 2.2. Η ηλεκτρονική προστασία του πυρήνα (Hore, 1995)

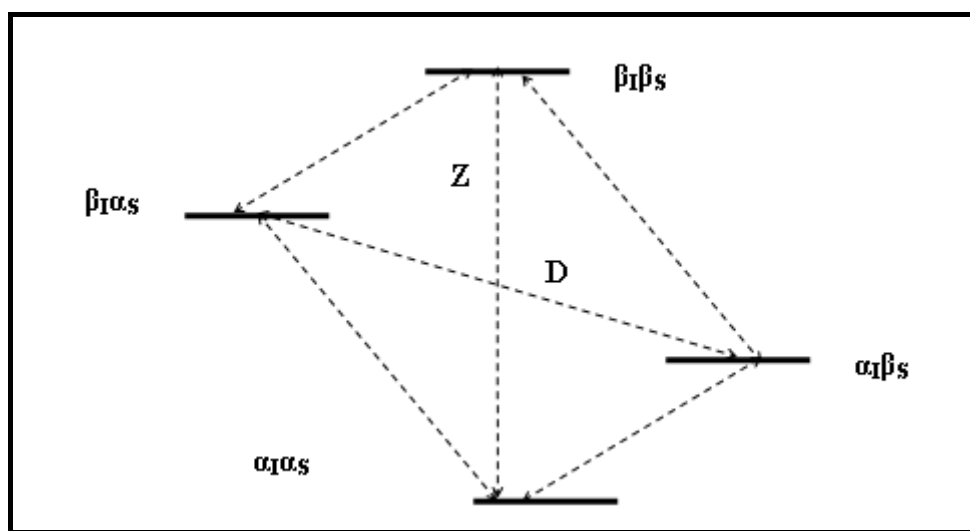
Συνεπώς η τιμή της συχνότητας συντονισμού εξαρτάται από τη μοριακή δομή και το φαινόμενο αυτό αποκαλείται χημική μετατόπιση. Η χημική μετατόπιση εκτός από τη μοριακή δομή και κατά συνέπεια και την ηλεκτρονική πυκνότητα του πυρήνα εξαρτάται και από άλλους παράγοντες, από τους οποίους σημαντικότερος όλων είναι η μαγνητική ανισοτροπία.

#### 2.1.4 Σταθερές Σύζευξης

Τα σήματα συντονισμού πρωτονίων που γειτνιάζουν με άλλα πρωτόνια ή άλλους μαγνητικούς πυρήνες εμφανίζονται με την μορφή πολλαπλών κορυφών, οι οποίες έχουν ορισμένη κανονικότητα και συμμετρία. Η πολλαπλότητα αυτή των σημάτων συντονισμού καλείται σύζευξη spin-spin και οφείλεται στη μέσω δεσμών αλληλεπίδραση με τα spin των γειτονικών μαγνητικών πυρήνων. Χαρακτηριστικό των πολλαπλών κορυφών είναι ότι ισαπέχουν μεταξύ τους κατά μια σταθερά  $J$  που καλείται σταθερά σύζευξης και είναι ανεξάρτητη από την ένταση του πεδίου  $B_0$ . Η σταθερά σύζευξης έχει τόσο μεγαλύτερη τιμή όσο πλησιέστερα βρίσκονται οι πυρήνες που αλληλεπιδρούν και όσο περισσότερο διαφορετικό χημικό περιβάλλον έχουν. Η σταθερά  $J$  διακρίνεται ανάλογα με τον αριθμό των δεσμών που χωρίζουν τους πυρήνες που συζευγνύονται ( $^nJ$ , όπου  $n$  ο αριθμός των δεσμών) (Αλεξάνδρου 1992, Βαλαβανίδης, 2006).

### 2.1.5 Το Φαινόμενο NOE (Nuclear Overhauser Effect, NOE)

Βασική προϋπόθεση για την παρατήρηση του σήματος συντονισμού ενός πυρήνα είναι η δυνατότητα επαναφοράς του από τη διεγερμένη στη βασική κατάσταση (αποδιέγερση) και ο πιο σημαντικός μηχανισμός για την αποδιέγερση spin-πλέγμα είναι η αλληλεπίδραση διπόλου-διπόλου. Το φαινόμενο Overhauser (NOE) παρέχει πληροφορίες για την αλληλεπίδραση διπόλου-διπόλου μέσω χώρου. Έστω δύο πυρήνες I και S που βρίσκονται αρκετά κοντά μέσω χώρου ο ένας με τον άλλο ώστε να αλληλεπιδράσουν. Η παρουσία του δεύτερου πυρήνα εισάγει δύο ακόμη ενεργειακές στάθμες, όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.1.3.



Σχήμα 2.1.3. Ενεργειακό διάγραμμα των πιθανών μεταπτώσεων των υπό αλληλεπίδραση πυρήνων I και S ( $\alpha$  = βασική κατάσταση,  $\beta$  = διεγερμένη κατάσταση). Οι πιθανές μεταπτώσεις των δύο πυρήνων παριστάνονται από τα βέλη.

Παρατηρείται ότι υπάρχουν δύο μεταπτώσεις που συνοδεύονται από μεταβολή του μαγνητικού κβαντικού αριθμού και των δύο πυρήνων. Αυτές οι μεταπτώσεις  $\alpha\alpha \leftrightarrow \beta\beta$  και  $\alpha\beta \leftrightarrow \beta\alpha$  που συνοδεύονται από μεταβολή του μαγνητικού κβαντικού αριθμού κατά  $\Delta m = \pm 2$  (μετάβαση διπλού κβάντου, D) και  $\Delta m = \pm 0$  (μετάβαση μηδενικού κβάντου, Z) είναι απαγορευμένες, αλλά θεμελιώδεις για το φαινόμενο NOE, διότι σε αυτές ακριβώς οφείλεται η ύπαρξη του. Οι δύο αυτές μεταβάσεις λαμβάνουν χώρα κατά την διαδικασία αποδιέγερσης.

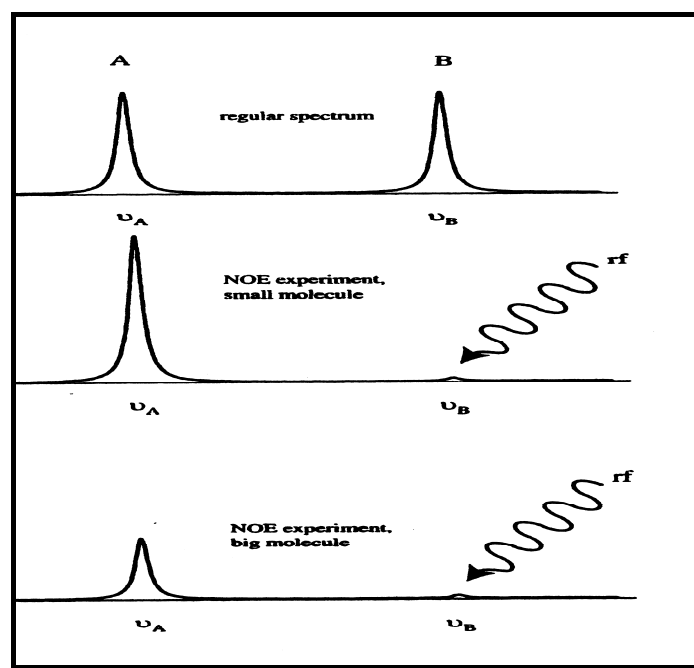
Έτσι όταν μεταξύ δύο γειτονικών πυρήνων ο ένας διεγερθεί με ραδιοσυχνότητα ώστε να βρεθεί σε κατάσταση κορεσμού, τότε προκαλείται αύξηση της έντασης του σήματος συντονισμού του δεύτερου πυρήνα. Αυτή η μεταφορά

ενέργειας από τον ένα πυρήνα στον άλλο που εκδηλώνεται με την αύξηση της έντασης  $\eta$  του σήματος συντονισμού, καλείται φαινόμενο Overhauser (Nuclear Overhauser Effect, NOE) και δίνεται από τη σχέση:

$$\eta = \frac{1}{2} \frac{\gamma_1}{\gamma_2}$$

Η ενίσχυση του σήματος επιτυγχάνεται με την αποδιέγερση διπόλου-διπόλου που λαμβάνει χώρα κυρίως μέσω χώρου. Η ενίσχυση αυτή είναι συνάρτηση της απόστασης των πυρήνων στο χώρο ( $1/r^6$ ) και συνεπώς οι γειτονικοί στο χώρο πυρήνες ως προς εκείνον που ακτινοβολείται θα παρουσιάζουν μεγαλύτερη ενίσχυση του σήματος συντονισμού. Η παρατήρηση λοιπόν του φαινομένου NOE αποτελεί ένδειξη για την απόσταση δύο πυρήνων μεταξύ τους. Αν η απόσταση μεταξύ τους είναι μικρότερη των 5 Å τότε κατά την διέγερση ενός πυρήνα με έντονη ραδιοσυχνότητα ώστε να βρεθεί σε κατάσταση κορεσμού, ενισχύεται η ένταση του σήματος συντονισμού του άλλου πυρήνα. Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατή η συλλογή δομικών πληροφοριών των μορίων, αφού η απόσταση των πυρήνων στο χώρο μπορεί να μελετηθεί σε κατάσταση διαλύματος (Keeler, 2005).

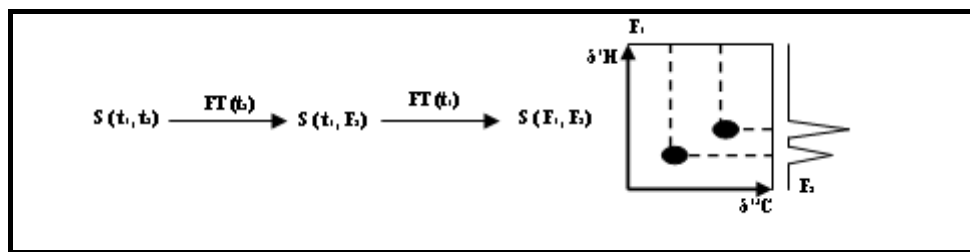
Ένας τύπος πειράματος NOE είναι αυτός που περιγράφεται στο παρακάτω σχήμα και αφορά την εκλεκτική συνεχή ακτινοβολή ενός πυρήνα και την αλληλεπίδραση των πυρήνων A και B κατά τη διάρκεια της ακτινοβολήσης (steady state NOE).



Σχήμα 2.1.4.: Το πείραμα NOE (Gerothanassis, et al. 2002)

### 2.1.6 Φασματοσκοπία NMR δυο διαστάσεων

Αναμφισβήτητα, η τεχνική των δυοδιάστατης φασματοσκοπίας (2D-NMR) έδωσε τεράστια ώθηση στην φασματοσκοπία NMR και απέκτησε πλήθος εφαρμογών. Τα φάσματα αυτά παρέχονται από φασματόμετρα παλμών και αντί μια συχνότητας περιλαμβάνουν δυο συχνότητες  $\nu_1$ ,  $\nu_2$  ή  $F_1$ ,  $F_2$ , που προκύπτουν από δυο μετασχηματισμούς Fourier μετά την συλλογή δεδομένων εκπομπής σε σειρές χρόνων  $t_1$ ,  $t_2$  μετά την εφαρμογή ηλεκτρομαγνητικών παλμών.



Σχήμα 2.1.5. Διεργασία μετασχηματισμού Fourier για τη λήψη 2D-NMR (Αλεξάνδρου, 1992).

Ο χρόνος  $t_2$  είναι ο συνήθης χρόνος συλλογής δεδομένων (FID), ενώ ο χρόνος  $t_1$  καλείται χρόνος εξέλιξης (evolution) είναι μεταβαλλόμενος μεταξύ 0,5-500 ms και παριστάνει την χρονική διάρκεια μεταξύ δυο παλμών, στην οποία γίνεται η αλληλεπίδραση μεταξύ των διάφορων μαγνητικών πυρήνων. Για τη λήψη ενός φάσματος NMR μιας διάστασης εφαρμόζεται ο κατάλληλος ηλεκτρομαγνητικός παλμός, π.χ  $90^\circ$ , και μετά ακολουθεί η συλλογή δεδομένων (FID) σε χρόνο  $t$ , οπότε το φάσμα χρόνου μετατρέπεται με το μετασχηματισμό Fourier στο φάσμα συχνοτήτων  $F_1$  ενός μόνου πυρήνα. Στην περίπτωση των δυοδιάστατων φασμάτων NMR εφαρμόζονται δυο ή περισσότεροι παλμοί ανάλογα με την εφαρμοζόμενη τεχνική μεταξύ των οποίων μεσολαβεί μεταβαλλόμενος χρόνος  $t_1$  στη διάρκεια του οποίου γίνεται αλληλεπίδραση των μαγνητικών πυρήνων. Στη συνέχεια γίνεται σε χρόνο  $t_2$  η καταγραφή του σήματος εκπομπής (FID), οπότε συλλέγεται ποικιλία σημάτων FID που αντιστοιχούν στους μεταβαλλόμενους χρόνους  $t_1$ . Κατόπιν, ακολουθούν δυο μετασχηματισμοί Fourier με το χρόνο  $t_2$  και το χρόνο  $t_1$  οπότε προκύπτει το φάσμα 2D-NMR.

Το σημαντικότερο πλεονέκτημα της δυσδιάστατης φασματοσκοπίας NMR είναι η εύρεση του τρόπου σύνδεσης (connectivity) μεταξύ των μαγνητικών πυρήνων. Ανάλογα με την αλληλουχία των παλμών και τους χρόνους εξέλιξης και ανάμειξης των μαγνητικών πυρήνων που έχουν επιλέγει, είναι δυνατή η συλλογή ενός πλήθους πληροφοριών για τους τρόπους σύζευξης των πυρήνων μεταξύ τους.

Η δυσδιάστατη φασματοσκοπία NMR μπορεί να διακριθεί στις παρακάτω βασικές κατηγορίες ανάλογα με το περιβάλλον που επιλέγεται για τους υπό μελέτη πυρήνες μέσω των παλμικών ακολουθιών:

(α) φασματοσκοπία ανάλυσης-J (J-resolved spectroscopy) στην οποία οι χημικές μετατοπίσεις παρουσιάζονται στη μια διάσταση ( $F_2$ ) ενώ στη δεύτερη διάσταση ( $F_1$ ) απεικονίζονται οι συζεύξεις των πυρήνων μέσω δεσμών.

(β) φασματοσκοπία συσχέτισης, η οποία αποκαλύπτει τους πυρήνες που βρίσκονται σε σύζευξη μέσω δεσμών (Correlated spectroscopy-COSY, Heteronuclear Multiple Quantum Coherence-HMQC), ή διαδοχικών συζεύξεων όλου του συστήματος των spin μορίου (Total Correlated Spectroscopy-TOCSY).

(γ) φασματοσκοπία διπολικής συσχέτισης με την οποία αποκαλύπτονται συζεύξεις μεταξύ πυρήνων που βρίσκονται αρκετά κοντά ώστε να αλληλεπιδρούν μέσω χώρου. Τέτοιες τεχνικές πετυχαίνουν την μελέτη φαινόμενων NOE σε όλους τους πυρήνες ενός μορίου ταυτόχρονα (Nuclear Overhauser Effect Correlation Spectroscopy-TOCSY).

Επιπλέον, η δυσδιάστατη φασματοσκοπία μπορεί να διακριθεί στην ομοπυρηνική, στην οποία αποκαλύπτεται ο τρόπος σύνδεσης μεταξύ ομοειδών μαγνητικών πυρήνων (π.χ  $^1\text{H}-^1\text{H}$ ), και στην ετεροπυρηνική στην οποία είναι δυνατή η παρατήρηση του τρόπου σύνδεσης μεταξύ διαφορετικών μαγνητικών πυρήνων (π.χ  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ ) (Brey, 1988, Carlson, 1994).

### 2.1.7 Μελέτη φυσικών προϊόντων με χρήση NMR: βασικές παράμετροι και μεθοδολογίες.

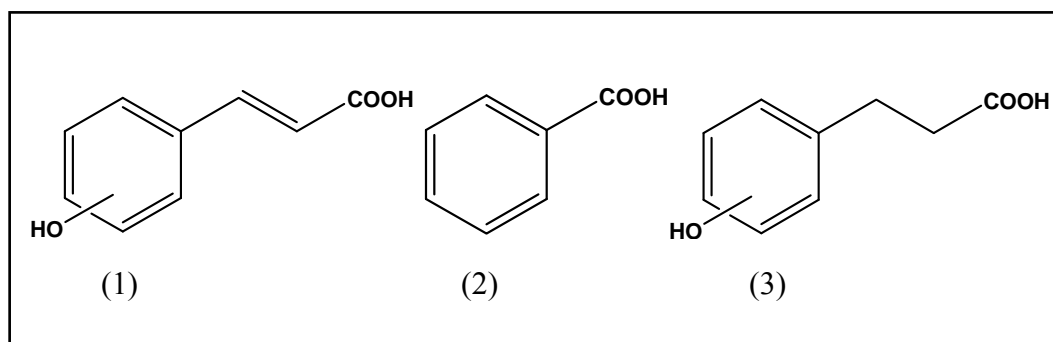
Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) είναι ιδιαίτερα χρήσιμη και αποτελεσματική μέθοδος για τη διερεύνηση της δομής πολύπλοκων

οργανικών ενώσεων παρόλο που εμφανίζει το μειονέκτημα της χαμηλής ευαισθησίας. Η αποσαφήνιση της δομής πραγματοποιείται με βάση τη χημική μετατόπιση, τις σταθερές σύζευξης τους λόγους ολοκλήρωσης των σημάτων συντονισμού καθώς επίσης και από τα εξειδικευμένα πειράματα δυο διαστάσεων όταν η συγκέντρωση της υπό μελέτη ένωσης κρίνεται αρκετή.

Τελευταία όλο και πιο συχνά γίνονται προσπάθειες να αναπτυχθούν μεθοδολογίες NMR για το χαρακτηρισμό φαινολικών ενώσεων χωρίς να έχει προηγηθεί διαχωρισμός ή απομόνωση του συστατικού από το φυτικό εκχύλισμα. Για τα φαινολικά οξέα και τα φλαβονοειδή που απαντούν στα φυτά, είτε σε ελεύθερη μορφή είτε συζευγμένα με αλλά μόρια όπως αυτό της γλυκόζης, έχουν ήδη αναπτυχθεί τέτοιες μεθοδολογίες και μερικές από αυτές παρουσιάζονται ενδεικτικά παρακάτω. Κοινό χαρακτηριστικό όλων αυτών των μεθοδολογιών είναι ότι αρχικά μελετάται το χαρακτηριστικό spin σύστημα των προτύπων ενώσεων και κατηγοριοποιούνται τα σήματα συντονισμού ανάλογα με τη δομή των ενώσεων (Liu and Lindon, 2001, Reynolds and Enriquez, 2002, Pauli, *et al.*, 2005, Bross-Walch, *et al.*, 2005, Boskou, *et al.*, 2006, Fukushi, 2006).

#### 2.1.6.1 Φαινολικά οξέα

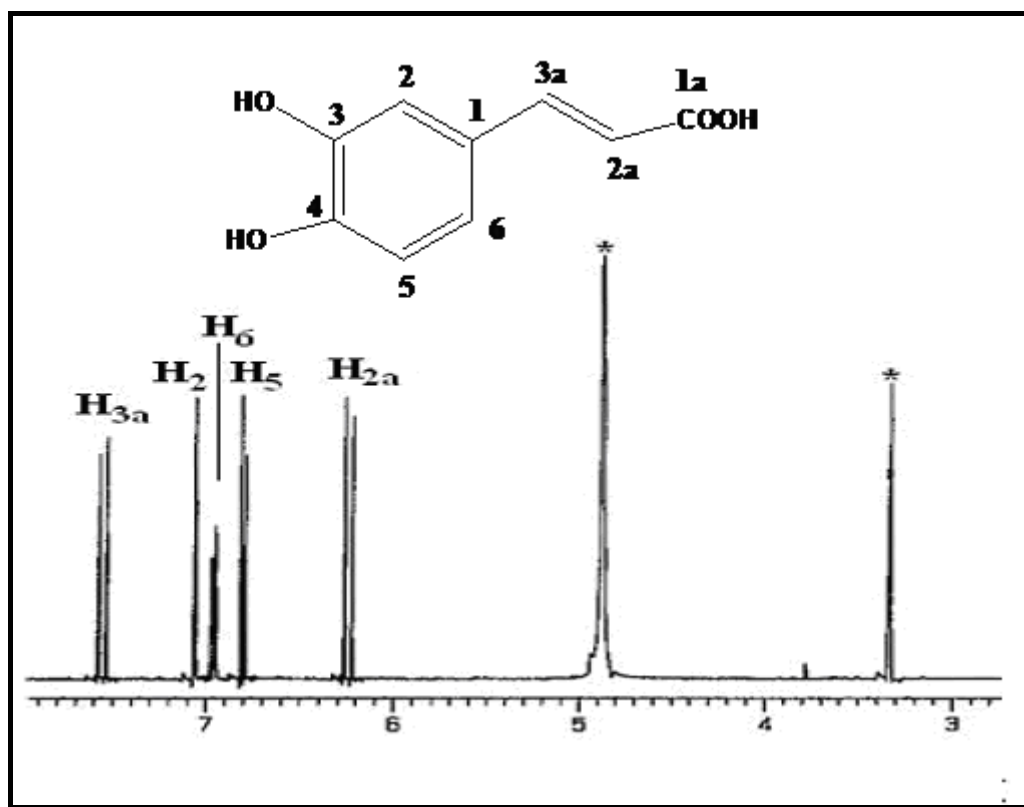
Τα φαινολικά οξέα όπως ήδη έχει αναφερθεί είναι παράγωγα του υδροξυκιναμωμικού(1), του υδροξυβενζοϊκού(2) και υδροξυφαινυλακετικού οξέος(3). Οι δομές του φαίνονται στο σχήμα 2.1.6



Σχήμα 2.1.6.: Δομές των τριών κατηγοριών φαινολικών οξέων

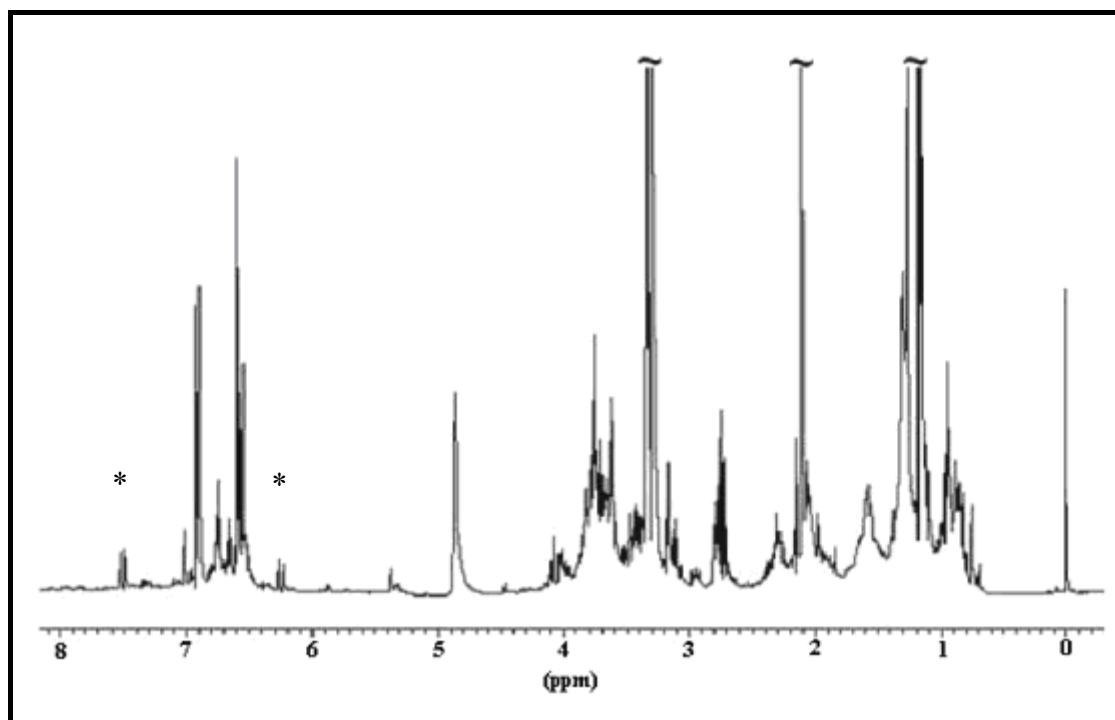
Η ταυτοποίηση και διάκριση των φαινολικών οξέων με τη φασματοσκοπία NMR αποτέλεσε αντικείμενο συστηματικής μελέτης από την ερευνητική μας ομάδα στο παρελθόν. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η λήψη ενός αριθμού φασμάτων NMR μιας διάστασης προτύπων φαινολικών οξέων και των τριών κατηγοριών με σκοπό να αποδοθούν τα σήματα συντονισμού στα αντίστοιχα πρωτόνια που τα προκαλούν. Στο

Σχήμα 2.1.7 απεικονίζεται το φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του καφεϊκού οξέος (3,4-διυδροξυ-κινναμωμικό οξύ) σε δευτεριωμένη μεθανόλη ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ). Τα πιο σημαντικά σήματα συντονισμού εμφανίζονται στα  $\sim 6,2$  και  $\sim 7,5$  ppm με σταθερά σύζευξης  $J= 15.8$  Hz, τα οποία αποδίδονται στα  $\text{H}_{2a}$  και  $\text{H}_{3a}$  αντιστοίχως. Η σταθερά σύζευξης υποδεικνύει την παρουσία του *trans*- ισομερούς.



Σχήμα 2.1.7. Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του καφεϊκού οξέος (3,4-διυδροξυ-κινναμωμικό οξύ) σε  $\text{CD}_3\text{OD}$  ( $NS=16$ ,  $T=295$  K) με τη χρήση φασματογράφου  $\text{NMR}$  400 MHz. Με αστερίσκο σημειώνονται οι κορυφές που αντιστοιχούν στα πρωτόνια της μεθανόλης.

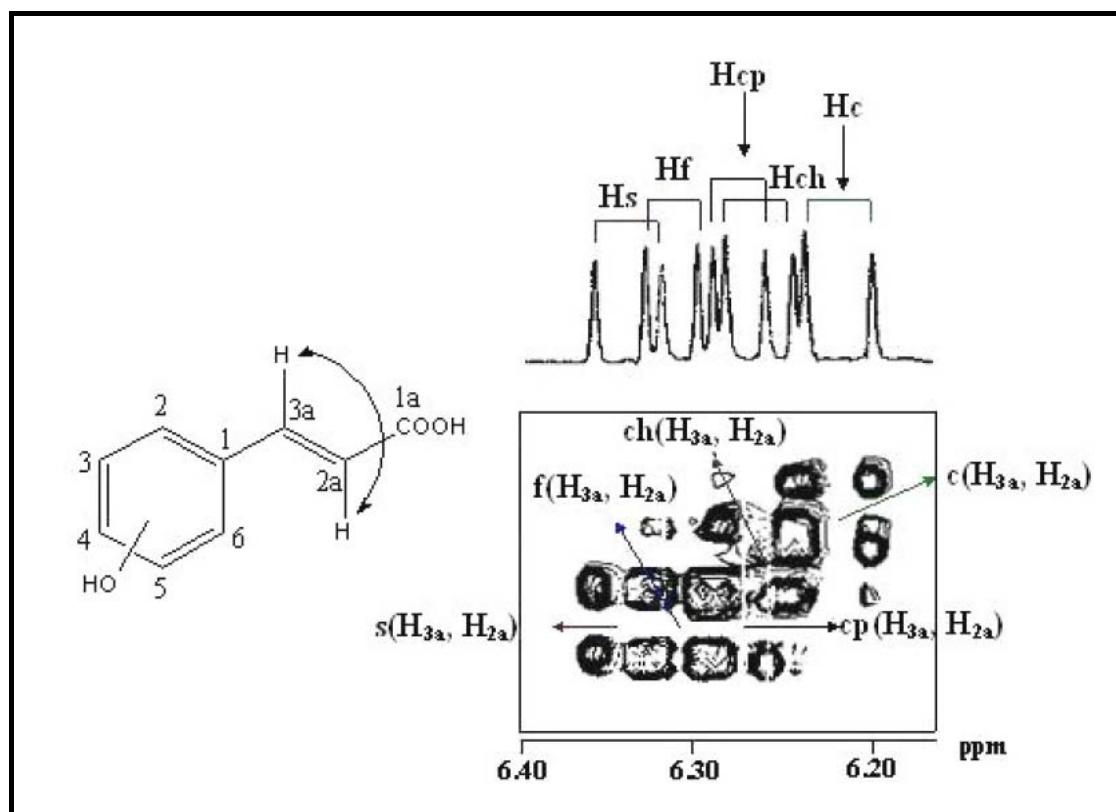
Πιο εκτεταμένη μελέτη των υδροξυκινναμωμικών οξέων με τη φασματοσκοπία  $\text{NMR}$  απέδειξε ότι οι διπλές κορυφές στα  $\sim 6,2$  και  $\sim 7,5$  ppm με σταθερά σύζευξης  $J= \sim 16$  Hz είναι χαρακτηριστικές της δομής κινναμωμικού τύπου και έχουν διαγνωστική αξία για την ταυτοποίηση αυτών των μορίων. Έτσι η παρουσία ενώσεων κινναμωμικού τύπου στο αιθανολικό εκχύλισμα του φυτού *Origanum vulgare* διακρίνεται εύκολα στο πρωτονιακό φάσμα του (Σχήμα 2.1.8).



Σχήμα 2.1.8. Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του αιθανολικού εκχυλίσματος *Origanum vulgare* σε  $\text{CD}_3\text{OD}$  ( $NS=16$ ,  $T=295\text{ K}$ ) με τη χρήση φασματογράφου  $\text{NMR } 400\text{ MHz}$ . Με αστερίσκο υποδηλώνονται οι διπλές κορυφές διαγνωστικής αξίας που αποκαλύπτουν την παρουσία ενώσεων κινναμωμικού τύπου.

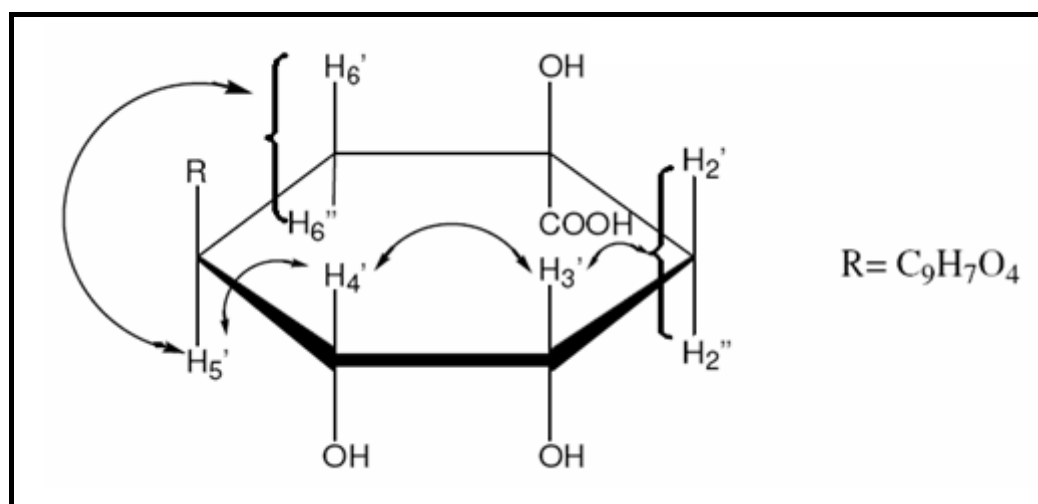
Ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη του φάσματος ενός μίγματος φαινολικών οξέων στο οποίο αναμένεται να υπάρχει έντονη αλληλεπικάλυψη στην περιοχή από 6.00 με 8.00 ppm. Για παράδειγμα, η χαρακτηριστική διπλή κορυφή του πρωτονίου  $\text{H}_{2a}$  του ενώσεων υδροξυκινναμωμικού τύπου εμφανίζει διασπορά χημικών μετατόπισεων σε τιμές από 6,20 έως 6,53 ppm (Geothanassis, *et al.*, 1998). Στην περίπτωση αυτή η δισδιάστατη φασματοσκοπία φαίνεται να είναι η μέθοδος που θα δώσει την λύση στο πρόβλημα της αλληλεπικάλυψης. Το πλεονέκτημα της χρήσης δυσδιάστατης φασματοσκοπίας  $\text{NMR}$  σχετίζεται με την εξαγωγή των πληροφοριών εκείνων που περιγράφουν τις αλληλεπιδράσεις των πρωτονίων μεταξύ τους αλλά και με άλλα άτομα (C, N, P) (Wuthrich, 1986, Derome, 1987). Στο Σχήμα 2.1.9 παρουσιάζεται επιλεγμένη περιοχή του φάσματος  $^1\text{H-}^1\text{H COSY}$  του μίγματος 12 φαινολικών οξέων. Η αντιστοίχιση των κορυφών διασταύρωσης με τα πρωτόνια που τις προκαλούν οδηγούν στην αποσαφήνιση της δομής των ενώσεων και φανερώνει τη χρησιμότητα της τεχνικής. Με την βοήθεια του πειράματος  $\text{COSY}$  διακρίνονται το χαρακτηριστικό σύστημα spin των κινναμωμικών οξέων.





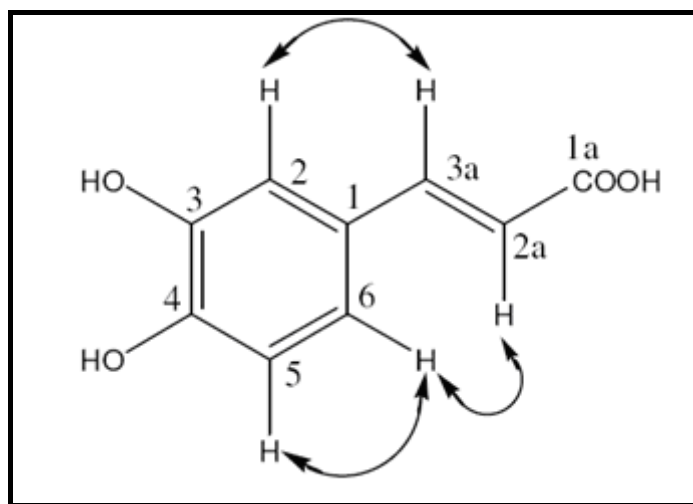
Σχήμα 2.1.9. Επιλεγμένη περιοχή του φάσματος  $^1\text{H}-^1\text{H}$  COSY του μίγματος 12 φαινολικών οξέων σε φασματογράφο NMR 400 MHz. Στο Σχήμα απεικονίζονται οι κορυφές διασταύρωσης των κινναμωμικών οξέων (s: σιναπικό οξύ, f: φερονλικό οξύ, cp: p-κουμαρικό οξύ, c: καφεϊκό οξύ και ch: χλωρογενικό οξύ). Τα αντίστοιχα πρωτόνια του ο-κουμαρικού οξέος δεν παρατηρούνται στην περιοχή αυτή αλλά σε χημικές μετατοπίσεις  $H_{2a}=6.53$  ppm και  $H_{3a}=7.96$ .

Όταν η χρήση των πειραμάτων COSY δεν αρκεί για την ταυτοποίηση μιας ένωσης τότε είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν τα πειράματα ολικώς συσχετιζόμενης δισδιάστατης τεχνικής (Total Correlated Spectroscopy, TOCSY) για να αποκαλύψουν συσχετίσεις ατόμων που απέχουν περισσότερους δεσμούς με την χρήση ενός spin-locking παλμού (Davis and Bax, 1985). Στο πείραμα αυτό, παρουσιάζονται κορυφές διασταύρωσης ανάμεσα στα spin i και k, που δεν συζευγνούνται απευθείας αλλά συζεύγνυνται από κοινού με έναν άλλο πυρήνα s. Στο Σχήμα 2.1.10 απεικονίζονται όλες οι πιθανές συσχετίσεις των πρωτονίων του κυκλικού μορίου του χλωρογενικού οξέος όπως παρατηρούνται από το πείραμα TOCSY. Το πείραμα TOCSY χρησιμοποιείται με μεγάλη επιτυχία στην περίπτωση του μίγματος των φαινολικών οξέων παρέχοντας επιπρόσθετες πληροφορίες για το spin coupling network (Gerothanassis, *et al.*, 1998).



Σχήμα 2.1.10. Απεικόνιση των συζεύξεων που παρατηρούνται μέσω πειραμάτων TOCSY στο κυκλικό μόριο του χλωρογενικού οξέος.

Το επόμενο βήμα για μια ολοκληρωμένη μελέτη της δομής ενός μορίου είναι η πραγματοποίηση πειραμάτων που να συνυπολογίζουν και το φαινόμενο NOE, το οποίο παρέχει πληροφορίες για την αλληλεπίδραση διπόλου -διπόλου μέσω χώρου. Η παρατήρηση του φαινομένου NOE οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το ζευγάρι των πρωτονίων που αλληλεπιδρά μέσα στο μόριο βρίσκεται σε αρκετά κοντινή απόσταση όχι μεγαλύτερη των 5 Å, πληροφορία που μπορεί να αποδειχθεί ιδιαίτερα χρήσιμη για τη δομή του μορίου. Η σημασία του φαινομένου γίνεται ακόμη μεγαλύτερη δεδομένου ότι οι αλληλεπιδράσεις μέσω χώρου δεν είναι δυνατόν να παρατηρηθούν με τα πειράματα COSY και TOCSY (Noggle, 1971, Neuhaus, 2000). Τα φαινορικά οξέα που φέρουν ως υποκατάστατες ομάδες όπως  $-\text{CH}=\text{CHCOOH}$  και  $-\text{OCH}_3$  αποτελούν ιδανική κατηγορία ενώσεων στην οποία μπορεί να παρατηρηθεί το φαινόμενο NOE. Η χρησιμότητα του φαινομένου έγκειται στο γεγονός ότι η συσχέτιση του συστήματος spin των παραπάνω υποκαταστατών με το σύστημα spin των πρωτονίων του δακτυλίου δεν είναι εφικτή με άλλο τρόπο. Στο Σχήμα 2.1.11, που ακολουθεί, φαίνονται οι αλληλεπιδράσεις NOE στο μόριο του καφεϊκού οξέος.

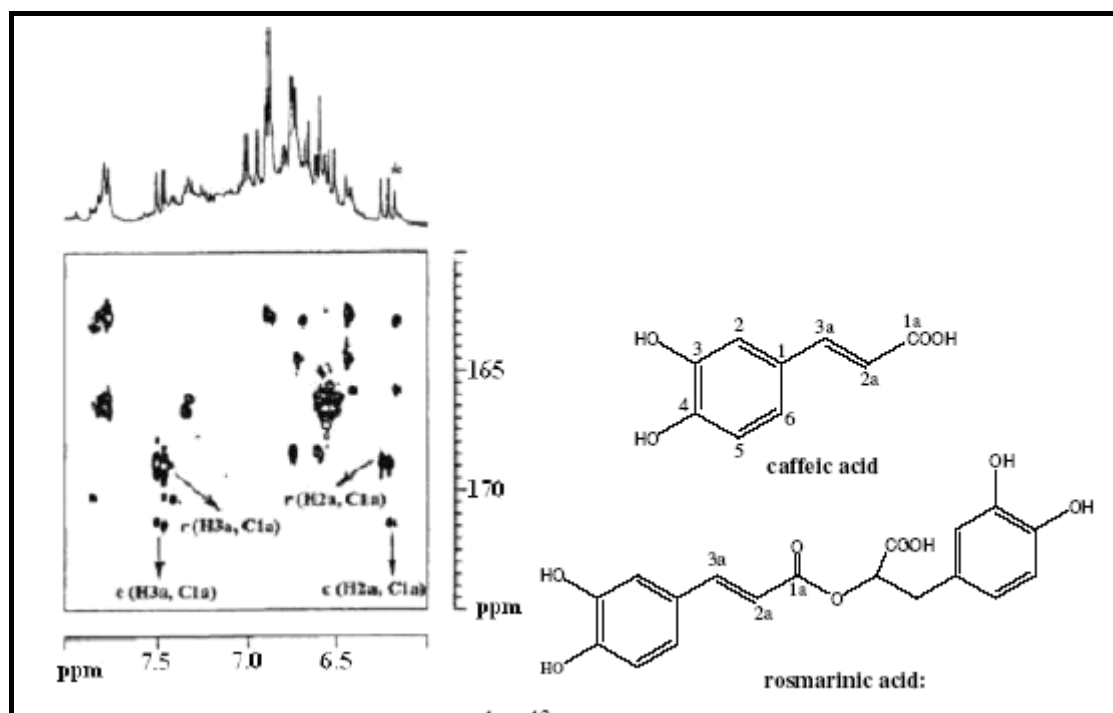


Σχήμα 2.1.11. Οι αλληλεπιδράσεις NOE στο μόριο του καφεϊκού οξέος.

Πρακτικά, ο συνδυασμός των πειραμάτων COSY/TOCSY και NOESY είναι απαραίτητος για τη πλήρη διερεύνηση των συσχετίσεων τόσο μέσω δεσμών όσο και μέσω χώρου. Για παράδειγμα, η ολοκληρωμένη ταυτοποίηση του καφεϊκού οξέος απαιτεί τη χρήση των COSY και NOESY συσχετίσεων. Η ανάλυση των διαγραμμάτων συσχέτισης NOESY- COSY αρχίζει με την COSY κορυφή διασταύρωσης των πρωτονίων ( $H_{3a}$ ,  $H_{2a}$ ). Οι NOESY κορυφές διασταύρωσης ( $H_{2a}$ ,  $H_6$ ) και  $H_{3a}$ ,  $H_2$ ) συνδέουν τον υποκατάστατη  $-\text{CH}=\text{CHCOOH}$  με το δακτύλιο του μορίου. Τέλος, μια COSY και NOESY κορυφή διασταύρωσης υποδηλώνουν την αλληλεπίδραση ( $H_5$ ,  $H_6$ ) και σε συνδυασμό μια COSY κορυφή διασταύρωσης ( $H_2$ ,  $H_6$ ) ολοκληρώνουν τη μελέτη του spin συστήματος του καφεϊκού οξέος.

Προκειμένου να ολοκληρωθεί η μελέτη του συστήματος spin μιας ένωσης απαραίτητη προϋπόθεση είναι η εύρεση του τρόπου σύνδεσης των πυρήνων πρωτονίου και άνθρακα στο μόριο. Έτσι απαιτείται η καταγραφή δισδιάστατων φασμάτων ετεροπυρηνικής φασματοσκοπίας όπως η ετεροπυρηνική φασματοσκοπία  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  πολλαπλού κβάντου (Hetermolecular Multiple-Quantum Coherence, HMQC), η οποία αποκαλύπτει πυρήνες πρωτονίου που συνδέονται άμεσα (μέσω ενός δεσμού) με πυρήνες άνθρακα, και η ετεροπυρηνική φασματοσκοπία  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  μέσω πολλαπλών δεσμών (Hetermolecular Multiple-Bond Correlation, HMBC), που αποκαλύπτει πυρήνες πρωτονίου που συνδέονται έμμεσα με πυρήνες άνθρακα μέσω δύο ή περισσότερων δεσμών (από 2-4 δεσμούς). Στην περίπτωση των συστημάτων spin πρωτονίων που διακόπτονται από άτομα C, που δε φέρουν πρωτόνια, τα πειράματα HMBC είναι ιδιαίτερα σημαντικά διότι συνδέουν τα επιμέρους συστήματα spin

μεταξύ τους. Τα δυο παραπάνω πειράματα έχουν χρησιμοποιηθεί στη μελέτη μιγμάτων φαινολικών οξέων με παραπλήσια δομή όπως το καφεϊκό και ροσμαρινικό οξύ, όπου με βάση τη διαφορά χημικής μετατόπισης του εστερικού άνθρακα C<sub>1a</sub> του ροσμαρινικού, που συντονίζεται στα 168,7 ppm, από τον αντίστοιχο καρβοξυλικό του καφεϊκού στα 174,1 ppm επιτεύχθηκε η διάκριση τους σε μίγμα αυτών (Boskou, *et al.*, 2006).

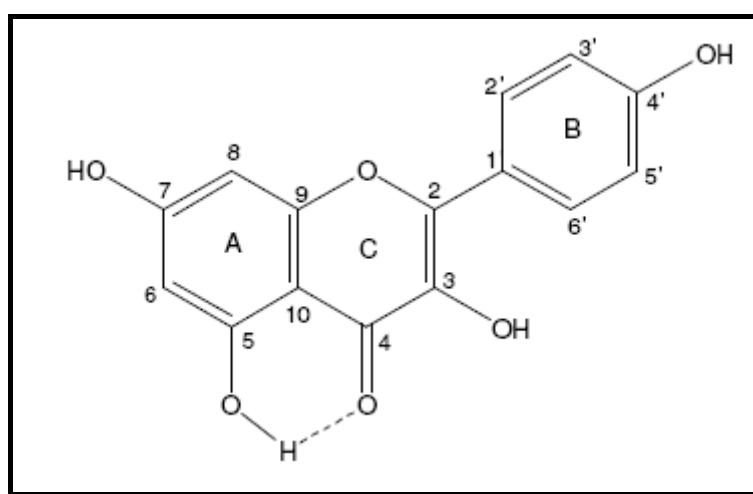


Σχήμα 2.1.12. Επιλεγμένη περιοχή δυοδιάστατου φάσματος  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  HMBSC μεθανολικού εκχυλίσματος του *O. Onites* σε θερμοκρασία 298 K. Τα βέλη επισημαίνουν τις κορυφές διασταύρωσης  $r(\text{H}_{3a}, \text{C}_{1a})$ ,  $r(\text{H}_{2a}, \text{C}_{1a})$ ,  $c(\text{H}_{3a}, \text{C}_{1a})$  και  $c(\text{H}_{2a}, \text{C}_{1a})$ . (NS=316,  $\text{expt}=28\text{h}$ ).

Συμπερασματικά, η ομοπυρηνική και η ετεροπυρηνική φασματοσκοπία δυο διαστάσεων είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για το χαρακτηρισμό των φαινολικών οξέων που απαντώνται σε φυτικά εκχυλίσματα χωρίς να προαπαιτείται η απομόνωση του οξέος. Αν και σε πολλές περιπτώσεις τα σήματα συντονισμού αλληλεπικαλύπτονται με την επιλογή των ενδεδειγμένων πειραμάτων οι δυσκολίες μειώνονται σημαντικά και προκύπτουν αρκετά συμπεράσματα αποφεύγοντας τις χρονοβόρες διαδικασίες απομόνωσης του κάθε συστατικού.

### 2.1.6.2 Φλαβόνες και Φλαβονόλες

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των φλαβονοειδών είναι καλά τεκμηριωμένη και άρρηκτα συνδεδεμένη με τη δομή τους. Από τις πιο συχνά απαντώμενες ενώσεις είναι εκείνες που φέρουν υδροξυλομάδες σε θέση *ortho* 3, 4 στο δακτύλιο B όπως η λουτεολίνη και η κερκετίνη, και σε θέση *meta* 5, 7 στο δακτύλιο A όπως η λουτεολίνη, η κερκετίνη και η καιμπερόλη (Σχήμα 2.13). Η αντιοξειδωτική ικανότητα φαίνεται να επηρεάζεται από τη θέση των παραπάνω υδροξυλομάδων, την ύπαρξη διπλού δεσμού μεταξύ των ανθράκων C<sub>2</sub> και C<sub>3</sub>, σε συνδυασμό με την κετομάδα στην θέση 4 καθώς επίσης και την υδροξυλομάδα στη θέση 3 (Rice- Evans, *et al.*, 1996, Tsimogiannis and Oreopoulou, 2006).



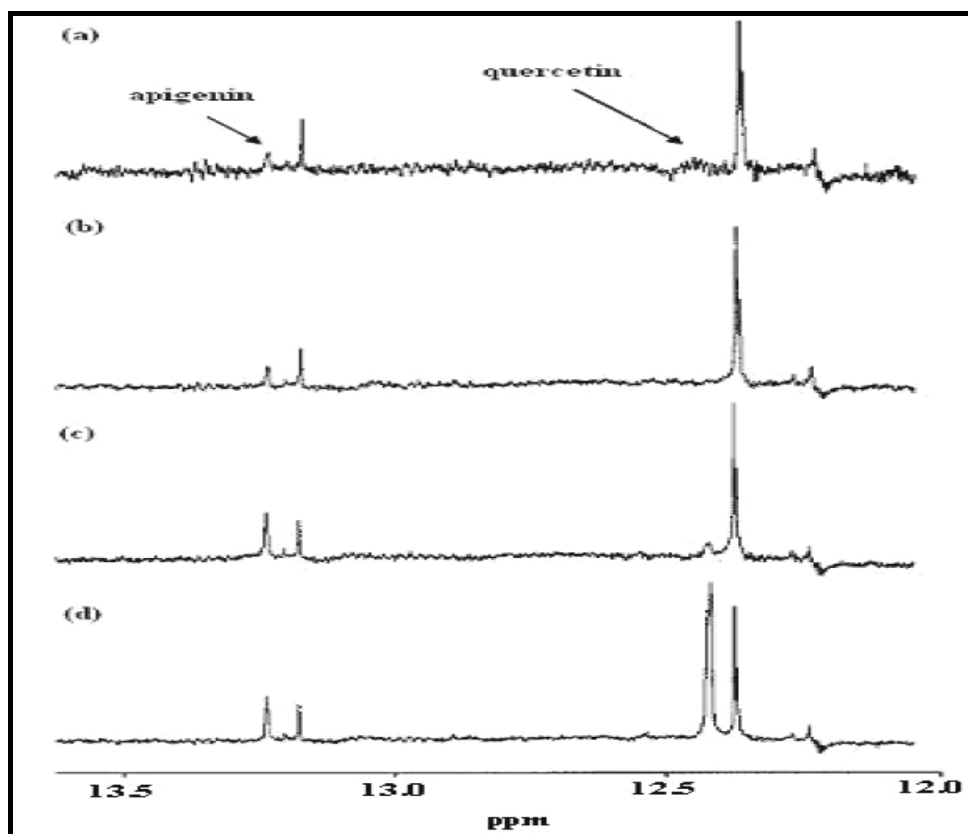
Σχήμα 2.13. Τυπική απεικόνιση φλαβονοειδών.

Γενικά, τα φλαβονοειδή μπορούν εύκολα να ταυτοποιηθούν με πρωτονιακή φασματοσκοπία με βάση το χαρακτηριστικό τους σύστημα spin των πρωτονίων των δακτυλίων A και B. Η *o*-διυδροξυ δομή του δακτυλίου B μπορεί να διακριθεί χωρίς δυσκολία από την αντίστοιχη μόνο-υδροξυ. Για παράδειγμα η απουσία της υδροξυλομάδας στη θέση C<sub>3'</sub> οδηγεί σε σύστημα τύπου AA'XX', ενώ στη *o*-διυδροξυ δομή του δακτυλίου B αντιστοιχεί ένα τυπικό σύστημα 1,2,4-τριυποκατεστημένου βενζολίου. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η αρωματική περιοχή του φάσματος NMR-<sup>1</sup>H ενός φυτικού εκχυλίσματος είναι αρκετά πολύπλοκη ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση των φλαβονοειδών. Αντίθετα η περιοχή από 11 έως 14 ppm είναι σχετικά απλή και χαρακτηριστική για τα φλαβονοειδή, δεδομένου ότι στην περιοχή αυτή απορροφά το πρωτόνιο του υδροξυλίου που βρίσκεται στη θέση 5 του δακτυλίου A. Το OH(5) συμμετέχει σε ισχυρό ενδομοριακό δεσμό

υδρογόνου με το άτομο του οξυγόνου του CO(4) και επομένως αποπροστατεύεται και συντονίζεται στην περιοχή από 11-14 ppm (Exarchou, *et al.*, 2002a, Exarchou, *et al.*, 2002b), όπως απεικονίζεται και Σχήμα 2.13. Η παραπάνω περιοχή είναι εξαιρετικά χρήσιμη διότι εμφανίζονται πολύ λιγότερα σήματα συντονισμού συγκριτικά με την αρωματική περιοχή.

Η ταυτοποίηση των φλαβονοειδών δεν απαιτεί τη χρήση δυσδιάστατης φασματοσκοπίας καθώς τα πρωτονιακά φάσματα μιας διάστασης είναι συνήθως αρκετά πλούσια σε πληροφορίες. Αξίζει να σημειωθεί ότι το σήμα συντονισμού του πρωτονίου OH(5) είναι περισσότερο αποπροστατευμένο στις φλαβόνες από τις φλαβονόλες. Αυτό συμβαίνει διότι η παρουσία της ομάδας OH(3) στις φλαβονόλες προκαλεί μείωση της ηλεκτρονικής πυκνότητας στο άτομο του οξυγόνου της ομάδας CO(4) με αποτέλεσμα να είναι λιγότερο ισχυρός ο ενδομοριακός δεσμός υδρογόνου. Όπως γίνεται αντιληπτό με το παραπάνω τρόπο επιτυγχάνεται η διάκριση των φλαβονών και φλαβονολών.

Αξίζει να σημειωθεί πως η θερμοκρασία λήψης του φάσματος αποτελεί μία σημαντική παράμετρο στην ταυτοποίηση των φλαβονοειδών με NMR-<sup>1</sup>H. Συγκεκριμένα, η θερμοκρασία λήψης του φάσματος θα πρέπει να ελεγχθεί και να ρυθμιστεί στην κατάλληλη τιμή ώστε να αποφευχθεί η ανεπιθύμητη διεύρυνση των σημάτων συντονισμού των OH. Έτσι θα πρέπει να πραγματοποιηθεί η λήψη των φασμάτων των εκχυλισμάτων σε διάφορες θερμοκρασίες. Με την εφαρμογή κατάλληλης θερμοκρασίας και με τη μέθοδο της επιμόλυνσης με πρότυπες ενώσεις (spiking) ανιχνεύτηκαν οι φλαβόνες λουτεολίνη, απιγενίνη και η φλαβονόλη κερκετίνη στο αιθανολικό και ακετονικό εκχύλισμα Ελληνικού φασκόμηλου (Exarchou, *et al.*, 2002a). Στο Σχήμα 2.14 απεικονίζεται ενδεικτικά η επιλεγμένη περιοχή του φάσματος <sup>1</sup>H NMR ακετονικού εκχυλίσματος *S. hortensis* στους 240 K.

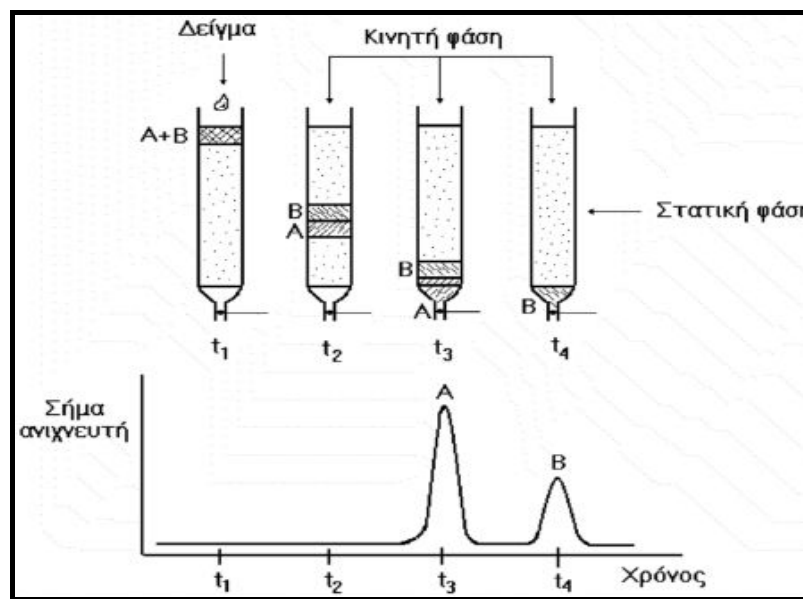


Σχήμα 2.14. (a) επιλεγμένη περιοχή του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR ακετονικού εκχυλίσματος *S. hortensis* στους 240 K. Το ίδιο φάσμα μετά από spiking (b) με 0.01 mmol απιγενίνης, (c) με 0,03 mmol απιγενίνης και 0,02 mmol κερκετίνης, (d) με 0,06 mmol κερκετίνης (NS=2048, expT≈4h) (Boskou et al., 2006).

## 2.2 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

### 2.2.1 Γενικές αρχές υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης

Ο διαχωρισμός των συστατικών ενός μίγματος με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), βασίζεται στη διαφορετική κατανομή τους μεταξύ μιας στατικής και μιας κινητής φάσης. Κατά την εισαγωγή του δείγματος τα συστατικά του αλληλεπιδρούν με το υλικό πλήρωσης της στήλης (στατική φάση) και τα ασθενώς συγκρατούμενα σωματίδια εκκλούνται πιο γρήγορα από τα πιο ισχυρά συγκρατούμενα σωματίδια. Η έκλυση των υπό διαχωρισμό ενώσεων μπορεί να γίνει είτε με σταθερή σύσταση διαλυτών (ισοκρατική έκλυση), είτε με βαθμιαία μεταβολή της σύστασης των διαλυτών (βαθμωτή έκλυση). Η ταχύτητα και αποτελεσματικότητα του διαχωρισμού των συστατικών ενός μίγματος μπορούν να ρυθμιστούν με τροποποιήσεις και μεταβολές της κινητής φάσης όπως η σύσταση και αναλογία διαλυτών, η ταχύτητα ροής, η θερμοκρασία της στήλης καθώς και με αλλαγές των χαρακτηριστικών της στατικής φάσης, όπως το υλικό πλήρωσης και οι διαστάσεις της χρωματογραφικής στήλης.



Σχήμα 2.15. Απεικόνιση του τρόπου διαχωρισμού των ενώσεων



Η χρωματογραφία ανάλογα με το υλικό της στατικής φάσης που χρησιμοποιείται διαχωρίζεται σε δυο κατηγορίες:

α) χρωματογραφία κανονικής φάσης (Normal Phase Chromatography), στην οποία το υλικό πλήρωσης της στήλης είναι πολικό και οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται ως εκλουστικό σύστημα είναι λιγότερο πολικοί με αποτέλεσμα τα πολικά συστατικά του δείγματος να κατακρατούνται περισσότερο ισχυρά στη στήλη.

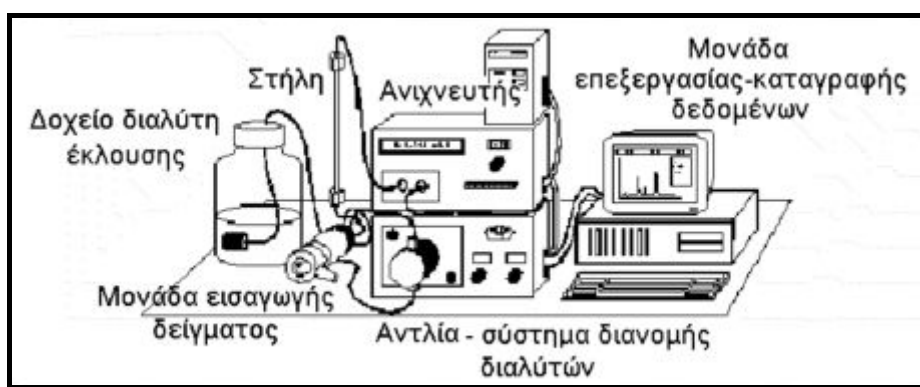
β) χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (Reversed Phase Chromatography), στην οποία η στατική φάση είναι λιγότερο πολική από την κινητή με αποτέλεσμα τα πιο πολικά συστατικά του δείγματος να συγκρατούνται ασθενώς και να εκλούνται σε μικρότερους χρόνους. Αξίζει να σημειωθεί ότι το 99% των υδροχρωματογραφικών διαχωρισμών πραγματοποιούνται με χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (Snyder and Kirkland, 1979, Hanai, 1999).

### 2.2.2 Χαρακτηριστικά απόδοσης χρωματογραφικού διαχωρισμού.

Ο σκοπός μιας χρωματογραφικής μεθόδου είναι πάντοτε ο επιτυχής διαχωρισμός των συστατικών ενός μίγματος. Η ικανότητα αυτή ενός χρωματογραφικού συστήματος εκφράζεται και αποδίδεται ποσοτικά με ορισμένες παραμέτρους όπως είναι ο χρόνος συγκράτησης ή ανάσχεσης (Retention Time,  $t_R$ ), που ορίζεται σαν το χρόνο που μεσολαβεί από την είσοδο του δείγματος στη στήλη, μέχρι τη στιγμή της εμφάνισης του μέγιστου της αντίστοιχης χρωματογραφικής κορυφής. Ένα άλλο χαρακτηριστικό της λειτουργίας ενός χρωματογραφικού συστήματος είναι η αποτελεσματικότητα της στήλης (column efficiency), η οποία αποτελεί μέτρο της ικανότητας της να δίνει οξείες κορυφές ανεξάρτητα από το χρόνο συγκράτησης. Αυτή εκφράζεται με τον αριθμό των θεωρητικών πλακών  $N$  (plate number). Οι παραπάνω παράμετροι αφορούν την περίπτωση ενός μόνο προσδιοριζόμενου συστατικού. Παρόλα αυτό είναι σημαντικό να γνωρίζει κανείς και να αποδίδει ποσοτικά την επιτυχία το διαχωρισμού περισσότερων συστατικών. Έτσι εισάγεται η διακριτική ικανότητα (resolution) των δυο κορυφών, που εξαρτάται από την μεταξύ τους απόσταση και από το εύρος τους. Για ικανοποιητική διάκριση των κορυφών θα πρέπει η διακριτική ικανότητα να παίρνει τιμές μεγαλύτερες από 1.5.

### 2.2.3 Οργανολογία

Μια τυπική διάταξη HPLC περιλαμβάνει τα δοχεία αποθήκευσης των διαλυτών, την αντλία που χαρακτηρίζεται ως η «καρδιά» του συστήματος, το σύστημα εισαγωγής του δείγματος, τη στήλη, τον ανιχνευτή και έναν καταγραφέα. Το δείγμα εισάγεται μέσω καταλλήλου συστήματος στη ροή της κινητής φάσης, η οποία διανέμεται με τη βοήθεια αντλία υψηλής πίεσης και μεταφέρεται μέσα στην στήλη, όπου λαμβάνει χώρα ο διαχωρισμός. Στην έξοδο της στήλης τα εκλούόμενα συστατικά ανιχνεύονται και ο διαχωρισμός τους καταγράφεται ως χρωματογράφημα με το κατάλληλο σύστημα καταγραφής δεδομένων (Sadek, 2002) (Σχήμα 2.16).



Σχήμα 2.16. Τυπική διάταξη Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης

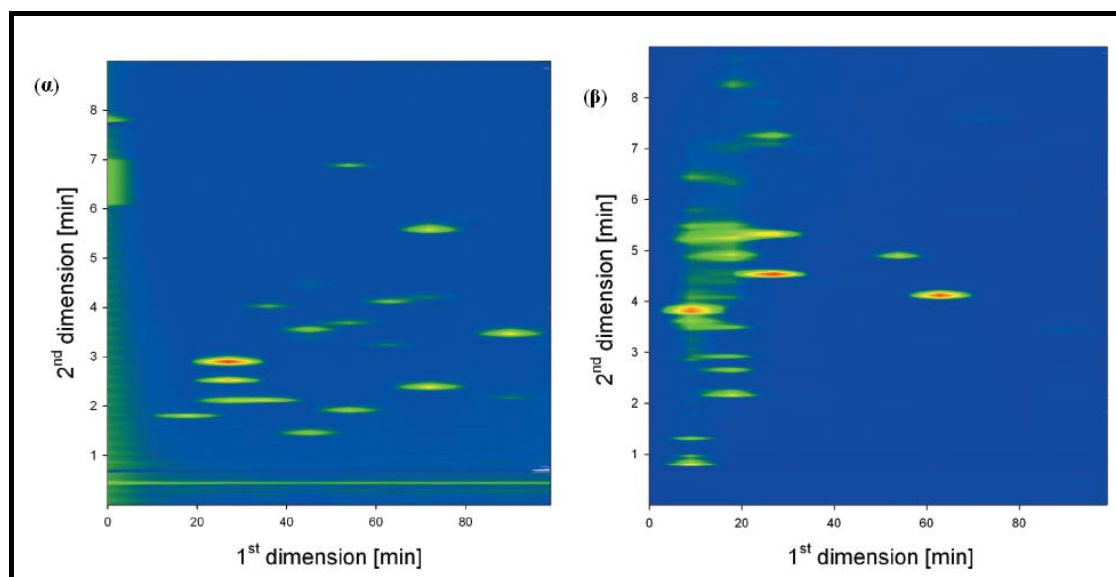
### 2.2.4 Μελέτη φυσικών προϊόντων με χρήση HPLC

Τα τελευταία είκοσι χρόνια η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) έχει κυριαρχήσει ως αναλυτική τεχνική στο διαχωρισμό και χαρακτηρισμό των συστατικών των φυτικών εκχυλισμάτων. Οι υγροχρωματογραφικές τεχνικές επιτρέπουν τον επιτυχή διαχωρισμό όλων των συστατικών ταυτόχρονα, ακόμη κι αν συνυπάρχουν πιθανά παράγωγα ή προϊόντα αποικοδόμησης. Σε αρκετές περιπτώσεις, είναι δυνατός ο προσδιορισμός των αναλυόμενων ουσιών που βρίσκονται σε χαμηλή συγκέντρωση παρουσία παρεμποδιστικών ενώσεων ή ενώσεων που συνεκλούνται. Η χρήση της HPLC για τη μελέτη φαινολικών συστατικών σε φυτικά εκχυλίσματα ή βιολογικά δείγματα συγκεντρώνει πλήθος πλεονεκτημάτων και ιδιαίτερα αυξημένο

ενδιαφέρον εξαιτίας: (α) του διαφορετικού τύπου στηλών που είναι εμπορικά διαθέσιμες, (β) τη δυνατότητα σύζευξης δυο στηλών, (γ) τη δυνατότητα σύζευξης με διάφορους ανιχνευτές όπως συστοιχίας διόδων λυχνιών DAD, φασματογράφο μάζας MS και φασματογράφο πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR (Stalikas, 2007).

**Στήλες:** Για τον υδροχρωματογραφικό διαχωρισμό φαινολικών συστατικών που βρίσκονται σε φυτικά προϊόντα και εκχυλίσματα αυτών χρησιμοποιείται χρωματογραφία αντίστροφης φάσης με υλικά πλήρωσης  $C_8$  ή  $C_{18}$ . Σπανιότερα χρησιμοποιούνται και άλλες φάσεις όπως οι ρητίνες τύπου Sephadex και πολυαμιδικά υλικά (de Rijke, *et al.*, 2006). Οι στήλες, που συνήθως χρησιμοποιούνται έχουν μήκος από 100 έως 250 mm και εσωτερική διάμετρο από 3,9 έως 4,6 mm ενώ το μέγεθος των σωματιδίων τους κυμαίνεται από 3 έως 10  $\mu\text{m}$ . Στην περίπτωση της συνδυαστικής τεχνικής LC-MS ενδείκνυται και η χρήση στήλης εσωτερικής διαμέτρου 2 mm με τις κατάλληλες προσαρμογές π.χ κυψελίδα μικρότερου όγκου, μικρότερος εναίσμιος όγκος κτλ (Ryan, *et al.*, 1999, Lee, 2000, Stalikas, 2007). Ο διαχωρισμός λαμβάνει χώρα συνήθως σε θερμοκρασία δωματίου ενώ δεν είναι και λίγες οι φορές που πραγματοποιούνται σε θερμοκρασία έως 40  $^{\circ}\text{C}$  για την μείωση του χρόνου ανάλυσης (Rehova, *et al.*, 2004).

Πρόσφατα, αναφέρθηκε στη βιβλιογραφία η χρήση χρωματογραφικών συστημάτων με δυο στήλες που βελτιώνει ακόμη περισσότερο το διαχωρισμό των συστατικών που περιέχονται σε πολύπλοκα δείγματα. Χαρακτηριστικός είναι ο διαχωρισμός που φαίνεται στο Σχήμα 2.17 ο οποίος επιτυγχάνεται από ένα σύστημα με δύο στήλες συνδεδεμένες σε σειρά, μια στήλη  $C_{18}$  και μια στήλη PEG(PolyEthylene Glycol phase). Από τα χρωματογραφήματα διαπιστώνεται εύκολα ότι υπάρχει σημαντική βελτίωση του διαχωρισμού των φαινολικών συστατικών σε δείγματα μπίρας συγκριτικά με τον αντίστοιχο υδροχρωματογραφικό διαχωρισμό με τη χρήση μιας  $C_{18}$  στήλης (Blahova, *et al.*, 2006, Jandera 2006).



Σχήμα 2.17. Ενδεικτικό φάσμα δυο διαστάσεων PEG-C<sub>18</sub> για το διαχωρισμό (α) μίγματος πρότυπων φαινολικών ενώσεων και (β) φαινολικού κλάσματος από δείγμα μπίρας (Jandera 2006)

**Κινητή φάση:** Για την έκλυση των φαινολικών ενώσεων χρησιμοποιείται είτε ισοκρατική είτε βαθμωτή έκλυση. Η επιλογή εξαρτάται από τον αριθμό και το είδος των μορίων αλλά από την φύση του δείγματος. Το ακετονιτρίλιο και η μεθανόλη είναι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι οργανικοί διαλύτες και σε πολλές περιπτώσεις η χρήση ακετονιτριλίου πλεονεκτεί έναντι της μεθανόλης διότι οδηγεί σε καλύτερη διαχωριστική ικανότητα σε μικρότερο χρόνο και οι κορυφές του χρωματογραφήματος είναι λιγότερο ευρείες. Παρόλα αυτά, η μεθανόλη συχνά προτιμάται γιατί είναι λιγότερο τοξική και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μεγαλύτερο ποσοστό στην κινητή φάση. Η χρήση τετραυδροφουρανίου και 2-ισοπροπανόλης ως λιγότερο πολικών διαλυτών με σημαντική εκλουστική ικανότητα αναφέρεται περιστασιακά.

Σημαντικό ρόλο στον επιτυχή διαχωρισμό των αναλυόμενων ουσιών παίζει η επιλογή του οξέος που θα προστεθεί στην κινητή φάση. Τα περισσότερα φαινολικά οξέα παρουσιάζουν pK<sub>a</sub> περίπου στο 4, ενώ τα φλαβονοειδή περιέχουν υδροξυλομάδες που εύκολα μπορούν να ιονιστούν. Είναι σημαντικό κατά τη διάρκεια μιας ανάλυσης να αποφευχθεί ο ιονισμός των υπό ανάλυση ενώσεων για να επιτευχθεί καλή διαχωριστική ικανότητα και επαναληψιμότητα στους χρόνους κατακράτησης. Για το λόγο αυτό συνίσταται η ρύθμιση του pH σε τιμές από 2 έως 4. Αυτό επιτυγχάνεται με την προσθήκη μικρής ποσότητας οξέων στο διαλύτη όπως οξικό, μυρμιγκικό, φωσφορικό οξύ και σπανιότερα υπερχλωρικό. Μερικές φορές προτιμάται και η χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων φωσφορικών ή κιτρικών. Η χρήση

φωσφορικών ως ρυθμιστικά διαλύματα είναι χρήσιμο να αποφεύγεται στην περίπτωση που χρησιμοποιείται ως ανιχνευτής η φασματομετρία μαζών διότι προκαλούν πρόβλημα στην πηγή ιόντων (dreaded contamination) (Dalluge, *et al.*, 1998, Stalikas, 2007).

**Ανιχνευτές:** Ένα από το πιο σημαντικά τμήματα του συστήματος της υγρής χρωματογραφίας είναι οι ανιχνευτές. Οι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται πιο συχνά βασίζονται στην απορρόφηση στο υπεριώδες-ορατό. Οι ενώσεις φαινολικού τύπου αποτελούνται τουλάχιστον από έναν αρωματικό δακτύλιο με αποτέλεσμα να απορροφούν στο υπεριώδες-ορατό. Απλοί υποκατάστατες όπως μεθυλομάδες, μεθόξυ-ομάδες και non-dissociated υδροξυλομάδες επηρεάζουν ελάχιστα τα μέγιστα απορρόφησης. Τα φλαβονοειδή εμφανίζουν συγκεκριμένα φάσματα με δύο μέγιστα. Το πρώτο μέγιστο που βρίσκεται στα 240 με 280 nm οφείλεται στο δακτύλιο A ενώ το δεύτερο μέγιστο που εμφανίζεται στα 300-550 nm και εξαρτάται από τους υποκατάστατες του δακτυλίου C (Mabry, *et al.*, 1970). Η φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού ήταν εδώ και δεκαετίες ένα χρήσιμο εργαλείο στη ταυτοποίηση των φαινολικών ενώσεων και ειδικότερα με την ανάπτυξη και ευρεία χρήση του ανιχνευτή συστοιχίας διόδων λυχνιών έγινε το κύριο εργαλείο για τον ποιοτικό και ποσοτικό τους προσδιορισμό.

Η χρησιμότητα της φασματοφωτομετρίας στην υγρή χρωματογραφία δεν εξαντλείται στις απλές φαινολικές ενώσεις αλλά είναι το ίδιο αποτελεσματική και στις αντίστοιχες συζευγμένες με μόρια σακχάρων, οξικούς ή μηλονικούς εστέρες φαινολικές ενώσεις. Αν χρησιμοποιείται ένας απλός ανιχνευτής υπεριώδους-ορατού θα πρέπει να ελεγχθεί η ύπαρξη μεγίστων στα 240, 265, 280, 340, 370 nm και επιπροσθέτως στα 500-525 nm στην περίπτωση που υπάρχουν ανθοκυάνες (Merken *and* Beecher, 2000). Όσον αφορά το όριο ανίχνευσης επανειλημμένως έχει αναφερθεί ότι έχουν ανιχνευθεί φαινολικές ενώσεις σε συγκεντρώσεις 1-10 ng (ενέσιμη ποσότητα συστατικού) (Huck, *et al.*, 2001, Molnar-Perl *and* Fuzfai, 2005).

Εκτός από τους ανιχνευτές υπεριώδους-ορατού υπάρχουν και οι ανιχνευτές φθορισμού αλλά με περιορισμένη χρήση καθώς είναι περιορισμένος ο αριθμός των φαινολικών ενώσεων που φθορίζουν. Τέτοιες ενώσεις είναι οι ισοφλαβόνες (Rijke, *et al.*, 2002) και φλαβονοειδή που έχουν υδροξυλομάδα στη θέση 3 όπως η κατεχίνη (trans-3,3',4',5,7 πενταυδρόξυ-φλαβόνη) (Stoggl, *et al.*, 2004). Ακόμη και στην περίπτωση των ισοφλαβονών η θέση της υδροξυλομάδας παίζει καθοριστικό ρόλο στην ένταση του φθορισμού. Για τον προσδιορισμό των φαινολικών ενώσεων έχει

αναφερθεί και η χρήση ηλεκτροχημικού ανιχνευτή καθώς οι περισσότερες από αυτές τις ενώσεις είναι ηλεκτροενεργές δεδομένης της δυνατότητας οξείδωσης της φαινυλομάδας (Rijke, *et al.*, 2002).

### 2.2.5 Συζευγμένες τεχνικές υγρής χρωματογραφίας

Η φασματομετρία μαζών βασίζεται στη δημιουργία μοριακού ιόντος και ιοντικών θραυσμάτων, κυρίως κατιόντων, κατά τον βομβαρδισμό μιας ένωσης με δέσμη ηλεκτρονίων μεγάλης ενέργειας (70eV~1500 Kcal/mol). Με αυτόν τον τρόπο δημιουργείται η κατιονική ρίζα που αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν  $M^+$ . το μοριακό ιόν λόγω της μεγάλης ενέργειας που έχει διασπάται σε επιμέρους ιόντα, η ένταση των οποίων εξαρτάται από την σχετική σταθερότητα. Τα θυγατρικά ιόντα μπορούν να δώσουν νέα ιόντα τα οποία αφού διαχωριστούν καταγράφονται στο φασματογράφο. Αυτό που κάνει εξαιρετικά χρήσιμη αυτή την τεχνική είναι ότι ο τρόπος θραυσματοποίησης είναι χαρακτηριστικός για κάθε ένωση και με παρόμοιο τρόπο θραυσματοποιούνται και οι υπόλοιπες ένωσης της ομόλογης σειράς που ανήκει (Charman, 1993, Γεροθανάσης, 1998).

Στην ανάλυση φυσικών προϊόντων η φασματομετρία μαζών (MS) αποτελεί βασικό εργαλείο για τους ερευνητές και τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται όλο και πιο συχνά σε σύζευξη με την υγρή χρωματογραφία. Για την ανάλυση των φαινολικών ενώσεων με LC-MS χρησιμοποιούνται κυρίως φασματογράφοι μαζών τύπου α) χημικού ιοντισμού ατμοσφαιρικής πίεσης (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI) και β) ηλεκτροψεκασμού (Electrospray Ionization, ESI). Για τον ιοντισμό της ένωσης χρησιμοποιείται τόσο αρνητική όσο και θετική τάση (Justesen, 2001, Boue, *et al.*, 2003). Τελευταία έχουν αναφερθεί και άλλοι τρόποι ιοντισμού των φαινολικών ενώσεων όπως ο ιοντισμός μέσω βομβαρδισμού με ταχεία άτομα (Fast Atom Bombardment, FAB) (Ma, *et al.*, 2000) και ιοντισμός εκρόφησης με λείζερ υποβοηθούμενος από τη μήτρα (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization, MALDI) (Wang and Sporns, 1999, Wang and Sporns, 2000a, Wang and Sporns, 2000b). Στη μελέτη φαινολικών ενώσεων χρησιμοποιούνται κυρίως φασματογράφοι ηλεκτροψεκασμού (ESI) διότι ο ηλεκτρονικός ιοντισμός (EI) επιτρέπει την ανάλυση πτητικών, θερμικά σταθερών μικρού μοριακού βάρους ενώσεων. Με την τεχνική ESI

είναι εφικτή η ανάλυση μαζών σχεδόν οποιουδήποτε ιόντος σε διάλυμα, συμπεριλαμβανομένου από ανόργανα άλατα έως μεγαλομόρια, όπως πρωτεΐνες και νουκλεικά οξέα.

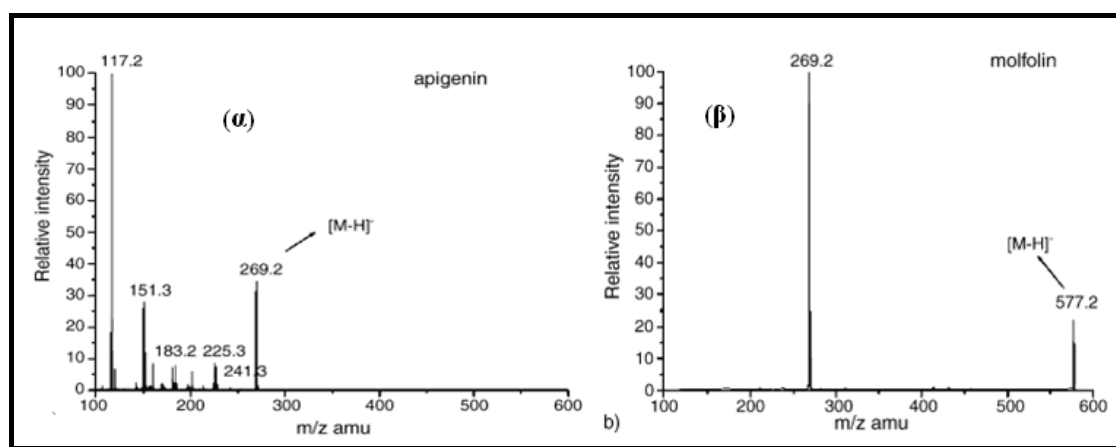
Στα πλεονεκτήματα της μεθόδου περιλαμβάνεται η ηπιότητα της διαδικασίας του ηλεκτροψεκασμού όπου επεκτείνει τα όρια της πολικότητας των αναλυόμενων ενώσεων πολύ περισσότερο από ότι οι προγενέστερες τεχνικές MS. Το σημαντικότερο πλεονέκτημα της τεχνικής ESI-MS σε σχέση με άλλες τεχνικές ήπιου ιοντισμού, όπως οι FAB και MALDI, είναι η συμβατότητα του με την υγρή χρωματογραφία. Η σύζευξη της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με την φασματομετρία μαζών ιοντισμού ηλεκτροψεκασμού αποτελεί τον συνδυασμό ενός συστήματος υψηλού διαχωρισμού με μία ευαίσθητη φασματοσκοπική τεχνική. Ο μηχανισμός διαχωρισμού βασιζόμενος στην υδροφοβικότητα των ενώσεων με την υψηλή διαχωριστική ικανότητα για μια πληθώρα χημικών ενώσεων και η χρήση πτητικών πρόσθετων στην κινητή φάση που υποστηρίζει την δημιουργία ιόντων σε στο διάλυμα, καθιστούν ευκολότερη τη συμβατότητα της HPLC με φασματογράφους ESI-MS.

Αξίζει να σημειωθεί ότι θα πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στην επιλογή διαλυτών και ρυθμιστικών διαλυμάτων για να μην παρουσιάζονται προβλήματα κατά την ανάλυση των ενώσεων στο φασματογράφο μάζας. Στην ανάλυση φλαβονοειδών προστίθενται αρκετά συχνά οξικό οξύ (Grayer, *et al.*, 2000), φορμικό οξύ (Andlauer, *et al.*, 1999), μυρμηκικό αμμώνιο και οξικό αμμώνιο (Hansen, *et al.*, 1999, de Rijke, *et al.*, 2003). Έχει αναφερθεί επίσης και η χρήση τριφθοροξικού οξέος αν και εμποδίζει τον ιοντισμό των ενώσεων (da Costa, *et al.*, 2000) και αφήνει ίχνος που δύσκολα εξαλείφεται από το φασματογράφο.

Για την ανάλυση των φαινολικών ενώσεων χρησιμοποιούνται φασματογράφοι τετραπόλου ή φασματογράφοι εφοδιασμένοι με «παγίδα ιόντων» (ion trap). Αν και τα δυο είδη φασματογράφων παρουσιάζουν αρκετές ομοιότητες στη μελέτη φυσικών προϊόντων, εμφανίζουν διαφορές στην αφθονία των ιόντων και στις ενώσεις προσθήκης που χρησιμοποιούνται (de Rijke, *et al.*, 2003).

Όπως γίνεται αντιληπτό η συνδυαστική τεχνική LC-MS είναι εξαιρετικά χρήσιμη για την ταυτοποίηση των φαινολικών ενώσεων αλλά και για την αποσαφήνιση της δομής άγνωστων φαινολικών ενώσεων. Στις μέρες μας έχει κερδίσει έδαφος η χρήση της συζευγμένης φασματομετρίας μαζών (tandem mass spectroscopy), η οποία βασίζεται σε ένα σύστημα με συζευγμένους αναλυτές μαζών

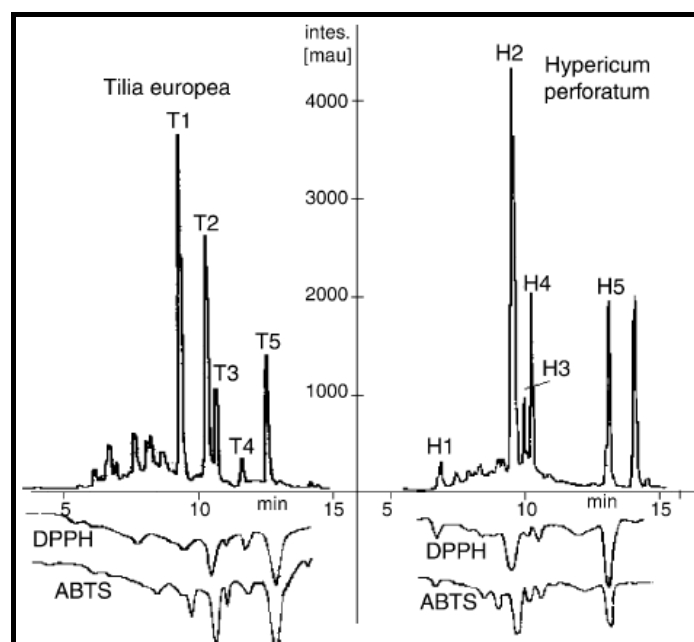
και με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται μεγαλύτερη διαχωριστικότητα παραπλήσιων μοριακών θραυσμάτων. Ένα σύστημα LC-UV-MS μας δίνει μια ολοκληρωμένη εικόνα για την άγνωστη ένωση καθώς μας δίνει και επιπρόσθετες πληροφορίες όπως είναι η απορρόφηση στο UV και ο χρόνος κατακράτησης. Συνεπώς, με σχετική ευκολία είναι δυνατόν κανείς να κατατάξει την άγνωστη ένωση και σε συνδυασμό με τη συνδυαστική τεχνική LC-NMR να χαρακτηρίσει πλήρως τη δομή της (Wolfender et al., 1998, Tsao and Deng, 2004). Στο Σχήμα 2.18 απεικονίζεται ενδεικτικά η ανίχνευση της απιγενίνης και η μολφολίνης σε εκχύλισμα φύλλων *Adinandra nitida* με την τεχνική LC-UV-MS (Zhang, et al., 2005).



Σχήμα 2.18. Χαρακτηριστικά φάσματα μαζών (α) της απιγενίνης ( $M.B=270$ ) και (β) της μολφολίνης ( $M.B=578$ ) που βρέθηκαν σε εκχύλισμα φύλλων *Adinandra nitida* με την τεχνική LC-UV-MS (Zhang, et al., 2005).

Εκτός από την υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μαζών (LC-MS) τα τελευταία χρόνια έχει κερδίσει σημαντικό έδαφος και η χρήση άλλων συνδυαστικών τεχνικών όπως η υγρή χρωματογραφία-φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (LC-NMR), η οποία θα περιγράψει διεξοδικά σε επόμενο κεφάλαιο. Έντονο ενδιαφέρον παρουσιάζουν και χρωματογραφικά συστήματα που με κατάλληλες μετατροπές επιτρέπουν την *on line* παρακολούθηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκλουόμενων συστατικών (Koleva, et al., 2001, Exarchou, et al., 2006).





Σχήμα 2.19. Χρωματογραφική ανάλυση και on line παρακολούθηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκλούμενων συστατικών με τις ρίζες DPPH και ABTS των εκχυλισμάτων *Tilia europea* και *Hypericum perforatum* (Exarchou et al., 2006).

### 2.3 Συνδυαστική τεχνική υγρής χρωματογραφίας- φασματοσκοπίας NMR (LC-NMR)

#### 2.3.1 Εισαγωγικά

Αναμφισβήτητα, τα τελευταία χρόνια κερδίζει όλο και περισσότερο έδαφος η αναζήτηση νέων βιοδραστικών ενώσεων στο φυτικό βασίλειο. Στην προσπάθεια αναζήτησης νέων ενώσεων με βιολογικές δράσεις, τα φυτικά εκχυλίσματα υποβάλλονται σε διαδικασίες κλασμάτωσης και απομόνωσης καθαρών ενώσεων για τη διευκρίνιση των δομών τους (Colquhoun and Goodfellow, 1994, Shahildi, 1997). Τα φυτικά εκχυλίσματα, συχνά, περιέχουν μεγάλο αριθμό ενώσεων που παρουσιάζουν χημική συνάφεια. Οι δομές των συστατικών των εκχυλισμάτων και οι συγκεντρώσεις τους παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία με αποτέλεσμα η απομόνωση και ταυτοποίηση τους να είναι ιδιαίτερα χρονοβόρες διαδικασίες και με αυξημένο κόστος. Έτσι τις τελευταίες δυο δεκαετίες πραγματοποιήθηκε η σύζευξη διαχωριστικών τεχνολογιών με φασματοσκοπικές μεθόδους ώστε να είναι δυνατή η

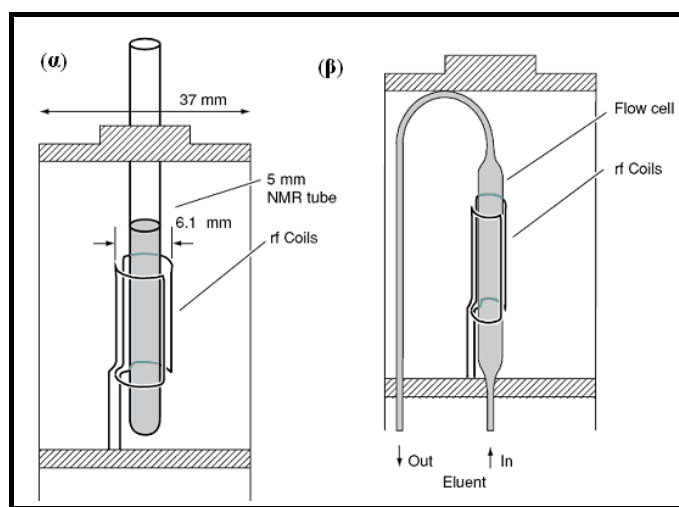
αναζήτηση νέων ενώσεων στο φυτικό εκχύλισμα χωρίς να προηγηθεί καμιά διαδικασία διαχωρισμού ή απομόνωσης.

Είναι γνωστό ότι η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) είναι ένα εξαιρετικά χρήσιμο εργαλείο στη διερεύνηση της δομής πολύπλοκων οργανικών ενώσεων, αλλά η περιορισμένη ευαισθησία της μεθόδου αρκετά συχνά είναι ανυπέβλητο εμπόδιο. Η αποσαφήνιση της δομής των ενώσεων πραγματοποιείται με βάση τις χημικές μετατοπίσεις, τις σταθερές σύζευξης, τους λόγους των ολοκληρωμάτων των σημάτων συντονισμού αλλά και με τη βοήθεια των πειραμάτων δυο διαστάσεων όταν η συγκέντρωση της αναλυόμενης ουσίας το επιτρέπει. Η ανάλυση πολύπλοκων μιγμάτων με τη φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) χωρίς προηγούμενο διαχωρισμό υποδεικνύει την παρουσία ή μη ορισμένων κατηγοριών ενώσεων, αλλά αδυνατεί να παρέχει σαφείς δομικές πληροφορίες για κάθε ένα από τα επιμέρους συστατικά. Έτσι η σύζευξη της υγρής χρωματογραφίας με τη φασματοσκοπία NMR ήταν κάτι παραπάνω από αναγκαία. Η σύζευξη LC-NMR επιτεύχθηκε σχεδόν πριν τριάντα χρόνια (Watanabe, *et al.*, 1978, Haw, *et al.*, 1980, Bayer, *et al.*, 1984, Albert, *et al.*, 1989). Όμως την τελευταία δεκαετία, οι τεχνικές LC-NMR και LC-NMR/MS αποτελούν χρήσιμα εργαλεία για αναλύσεις ρουτίνας σε πολλούς εργαστηριακούς χώρους κυρίως εξαιτίας της ανάπτυξης της τεχνολογίας. Προς αυτήν την κατεύθυνση βοήθησαν: (α) η δυνατότητα κατασκευής ισχυρότερων μαγνητικών πεδίων, (β) η ανάπτυξη και βελτιστοποίηση υποδοχέων συνεχούς ροής (flow probe), (γ) η ανάπτυξη μεθοδολογιών για την καταστολή των σημάτων συντονισμού των διαλυτών και (δ) τα πλεονεκτήματα που προκύπτουν από την εξέλιξη των χρωματογραφικών και φασματοσκοπικών τεχνικών (Spraul, *et al.*, 1993, Smallcombe, *et al.*, 1995, Neuhaus, *et al.*, 1996).

### 2.3.2 Οργανολογία για το LC-NMR και τρόποι λειτουργίας του

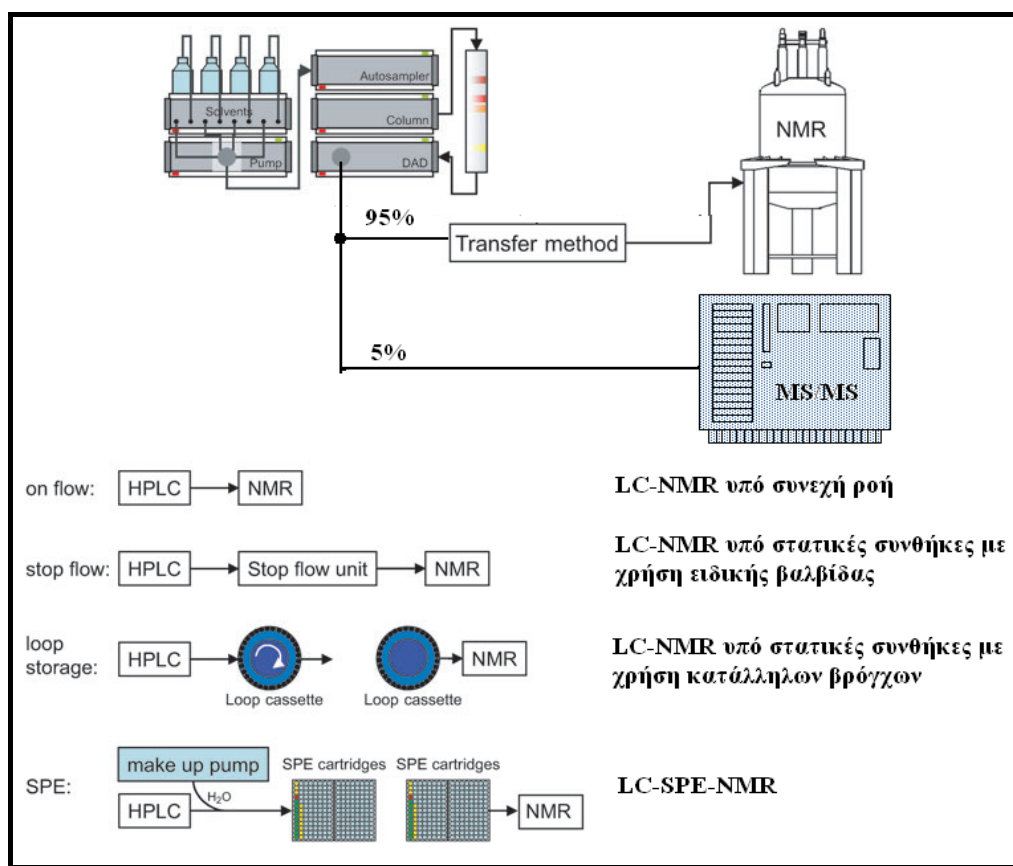
Μια τυπική διάταξη LC-NMR αποτελείται από μια συμβατική αντλία LC, μια χρωματογραφική στήλη και ανιχνευτές UV, που συνδυάζονται με ένα φασματογράφο NMR, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 2.21. Είναι φανερό ότι η σύζευξη των δυο μεθόδων απαιτεί την ανάπτυξη τεχνικών στοιχείων του συστήματος, όπως της αποτελεσματικής και ευέλικτης διασύνδεσης των επιμέρους στοιχείων του

συστήματος (interface), το σχεδιασμό υποδοχέα συνεχούς ροής (flow probe), τη ανάπτυξη παλμικών ακολουθιών καταστολής του σήματος συντονισμού του διαλύτη καθώς και νέων αυτοματοποιημένων λογισμικών που θα ελέγχουν το σύστημα. Χαρακτηριστικό είναι ότι οι συμβατικοί NMR υποδοχείς (NMR-probe) έπρεπε να τροποποιηθούν ώστε να επιτρέπουν τη συνεχή ροή του υπό μελέτη διαλύματος. Πρόσφατα, κατασκευάστηκαν υποδοχείς με ενεργούς όγκους 20-120  $\mu\text{L}$  που προσφέρουν μεγαλύτερη ευαισθησία σε σχέση με τους συμβατικούς υποδοχείς (Jaroszewski, 2005a).



Σχήμα 2.20. Σχηματική απεικόνιση (α) συμβατικού και (β) συνεχούς ροής υποδοχέα NMR (Albert 2002).

Στο Σχήμα 2.21 φαίνεται ότι ο φασματογράφος μαζών (MS) και ο φασματογράφος NMR συνδέονται με το σύστημα της υγρής χρωματογραφίας μετά τον ανιχνευτή UV. Ο πιο συνηθισμένος τρόπος σύνδεσης των φασματογράφων είναι η παράλληλη σύνδεση τους κατά την οποία τα συστατικά που εκλύονται από τη στήλη διαχωρίζονται σε 2 παράλληλες ροές. Επειδή η φασματοσκοπία NMR είναι λιγότερο ευαίσθητη συγκριτικά με τη φασματομετρία MS, ένας τυπικός λόγος ροών που χρησιμοποιείται είναι 95:5 αντίστοιχα (Exarchou, et al., 2005). Αξίζει να σημειωθεί, ότι ο φασματογράφος μαζών οφείλει να τοποθετείται σε απόσταση τέτοια από τον μαγνήτη που να εξασφαλίζεται η ομαλή λειτουργία του. Σήμερα διατίθενται μαγνήτες ειδικού τύπου που το μαγνητικό πεδίο τους περιμετρικά περιορίζεται σημαντικά (Wilson, 2000). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αισθητή μείωση της απόστασης μεταξύ φασματογράφου μαζών (MS) και μαγνήτη.



Σχήμα 2.21. Σχηματική αναπαράσταση των συστημάτων LC-NMR.

Στο σημείο αυτό ίσως είναι χρήσιμο να αναφερθεί ότι υπάρχουν διάφοροι τρόποι χρήσης του συστήματος LC-NMR και είναι δυνατόν να τους διακρίνει κανείς με βάση την κατάσταση του δείγματος τη στιγμή της μέτρησης. Για παράδειγμα, στην περίπτωση της συνεχούς ροής το υπό ανάλυση δείγμα περνά διαμέσου του κατάλληλου υποδοχέα με συνεχή ροή ενώ ταυτόχρονα καταγράφεται το φάσμα της στο φασματογράφο NMR. Στη συνέχεια περιγράφονται τα συστήματα LC-NMR και οι εφαρμογές τους στα φυτικά προϊόντα.

### **LC-NMR υπό συνεχή ροή**

Στην περίπτωση αυτή ο φασματογράφος NMR λειτουργεί ακριβώς όπως ένας ανιχνευτής UV ή ένας φασματογράφος μαζών και το δείγμα παραμένει στην κυψελίδα του υποδοχέα για αυστηρά καθορισμένο χρόνο, που κυμαίνεται από μερικά δευτερόλεπτα έως λεπτά. Ο χρόνος παραμονής του δείγματος στην κυψελίδα του υποδοχέα εξαρτάται από τον όγκο της κυψελίδας αλλά και από την ταχύτητα ροής με την οποία λαμβάνει χώρα ο χρωματογραφικός προσδιορισμός (Albert, 2002). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ένα σύνολο φασμάτων NMR μιας διάστασης, που

καλύπτουν ολόκληρο το χρωματογράφημα και συνήθως αποτυπώνονται ως ένα διάγραμμα δυο διαστάσεων κατά το οποίο απεικονίζεται το φάσμα NMR συναρτήσει του χρόνου κατακράτησης, όπως δηλαδή συμβαίνει και στην περίπτωση ενός συστήματος LC-DAD (Albert, 2002).

Ο τρόπος αυτός ενδείκνυται για μια γρήγορη εκτίμηση των κυρίων συστατικών ενός μίγματος με χρήση μονοδιάστατης φασματοσκοπίας. Συχνά αυτό το πείραμα αποτελεί το πρώτο βήμα στη μελέτη ενός πολύπλοκου μίγματος και χρησιμεύει στον καθορισμό των κύριων συστατικών του. Ο περιορισμένος χρόνος παραμονής της αναλυόμενης ουσίας στην κυψελίδα του υποδοχέα αποτελεί σοβαρό μειονέκτημα καθώς επηρεάζει αρνητικά την ποιότητα του φάσματος και την ευαισθησία της μεθόδου. Τα πειράματα αυτά ήταν τα πρώτα που πραγματοποιήθηκαν και συνεχίζουν να πραγματοποιούνται μέχρι και σήμερα αλλά με μικρότερη συχνότητα (Jaroszewski, 2005a).

Στα περισσότερα πειράματα LC-NMR υπό συνεχή ροή για τον υδροχρωματογραφικό διαχωρισμό χρησιμοποιούνται ως διαλύτες το μίγμα  $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$  είτε με ισοκρατική ή με βαθμωτή έκλουση (Jaroszewski, 2005a). Όταν επιλέγεται η βαθμωτή έκλουση οι χημικές μετατοπίσεις των σημάτων συντονισμού του διαλύτη και της αναλυόμενης ένωσης μεταβάλλονται συνεχώς, ανάλογα με την σύσταση των διαλυτών (Griffiths, 1995). Στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί μελέτες φυτικών εκχυλισμάτων με την χρήση πειραμάτων LC-NMR υπό συνεχή ροή καθώς και ποσοτικές αναλύσεις αυτών (Godejohann, *et al.*, 1998, Saito, *et al.*, 2003).

### **LC-NMR υπό στατικές συνθήκες**

Η λήψη φασμάτων NMR δυο διαστάσεων επιβάλλει την ανάλυση του δείγματος υπό στατικές συνθήκες. Υπάρχουν δύο μέθοδοι με τις οποίες η λήψη των φασμάτων NMR μπορεί να γίνει υπό στατικές συνθήκες: (α) με τη χρήση βαλβίδας για την διακοπή της έκλουσης όταν το υπό μελέτη συστατικό βρεθεί στην κυψελίδα ροής εντός του πηνίου, και ονομάζεται λειτουργία διακοπτόμενης ροής (stopped-flow mode), ή (β) με τη χρήση ειδικών βρόχων για την αποθήκευση των επιμέρους ενώσεων έτσι όπως προέρχονται από τον υδροχρωματογραφικό διαχωρισμό και τη μετέπειτα ανάλυση τους (Exarchou, *et al.*, 2005).

Στις μετρήσεις διακοπτόμενης ροής ο χρωματογραφικός διαχωρισμός ελέγχεται μέσω του ανιχνευτή UV και το προς ανάλυση συστατικό καθορίζει το χρόνο καθυστέρησης  $t_d$ . Ως χρόνος καθυστέρησης ( $t_d$ ) ορίζεται ο χρόνος που

απαιτείται για να μεταφερθεί η προς ανάλυση ουσία από την κυψελίδα του ανιχνευτή (συνήθως UV) στη βέλτιστη θέση εντός της κυψελίδας ροής του φασματογράφου NMR. Ο χρόνος καθυστέρησης εξαρτάται από την ταχύτητα ροής της χρωματογραφίας, και τις διαστάσεις (μήκος, διάμετρος) του τριχοειδούς που χρησιμοποιείται για να συνδέσει τον ανιχνευτή UV με την κυψελίδα του υποδοχέα NMR. Αρχικά, πρέπει να υπολογιστεί για κάθε LC-NMR σύστημα ο χρόνος καθυστέρησης,  $t_d$  και κατόπιν με τη βοήθεια κατάλληλου λογισμικού διακόπτεται αυτόματα ο χρωματογραφικός διαχωρισμός σε χρόνο  $t_d$  από τη στιγμή που η αναλύομενη ουσία βρεθεί στον ανιχνευτή UV. Με την ολοκλήρωση λήψης του φάσματος NMR η χρωματογραφική μελέτη ξαναρχίζει. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται τόσες φορές όσα και τα συστατικά του μίγματος που πρέπει να αναλυθούν. Εντούτοις, θεωρείται ότι οι συχνές διακοπές επηρεάζουν αρνητικά την ποιότητα του χρωματογραφικού διαχωρισμού κι ακόμη είναι πιθανό τα συστατικά που βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις να επιμολύνουν την κυψελίδα προκαλώντας σφάλματα στις μετρήσεις που ακολουθούν (memory effect). Έτσι, τα πειράματα διακοπτόμενης ροής επιλέγονται για τα μίγματα με περιορισμένο αριθμό συστατικών (Exarchou, *et al.*, 2006b). Αξίζει να σημειωθεί ότι ο συνδυασμός μετρήσεων συνεχόμενης και διακοπτόμενης ροής έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς στο πεδίο των φυσικών προϊόντων (Pusecker, *et al.*, 1999, Hansen, *et al.*, 1999, Bringmann, *et al.*, 2000, Queiroz, *et al.*, 2002).

Στα πειράματα LC-NMR υπό στατικές συνθήκες που χρησιμοποιούνται βρόχοι αποθήκευσης η χρωματογραφική ανάλυση δε διακόπτεται και κάθε κορυφή του χρωματογραφήματος αποθηκεύεται σε ξεχωριστό κάθε φορά τριχοειδή βρόχο για τη λήψη φάσματος NMR σε επόμενη φάση. Στην περίπτωση αυτή πρέπει να προσδιοριστούν και να ρυθμιστούν τόσο ο χρόνος καθυστέρησης  $t_d$ , όσο και ο χρόνος καθυστέρησης  $t_{FC}$ , που αντιστοιχεί στη μεταφορά της προς ανάλυση ουσίας από τον βρόχο στην κυψελίδα του υποδοχέα του NMR. Με αυτήν την τεχνική αποφεύγονται προβλήματα στην χρωματογραφική ανάλυση που προκύπτουν από τις συχνές διακοπές της ροής.

Απαραίτητη προϋπόθεση για την εφαρμογή αυτής της τεχνικής είναι η σταθερότητα των αναλυόμενων ουσιών κατά την παραμονή τους στους βρόχους αποθήκευσης. Μετά από κάθε μέτρηση ο βρόγχος αποθήκευσης και η κυψελίδα του υποδοχέα πλένονται αυτόματα με κατάλληλο διαλύτη. Αυτή η λειτουργία έχει χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση περισσότερο πολύπλοκων μιγμάτων όπως είναι και

τα φυτικά εκχυλίσματα (Strohschein, *et al.*, 1999, Tseng, *et al.*, 2000, Bailey, *et al.*, 2000, Bringmann, *et al.*, 2001, Dachtler, *et al.*, 2001, Andrade, *et al.*, 2002, Loudon, *et al.*, 2002).

### LC-NMR/MS

Η συγκεκριμένη τεχνολογία εμφανίζει το πλεονέκτημα της ταχύτητας και ευαισθησίας της τεχνικής της φασματομετρίας μαζών, η οποία μπορεί να ανιχνεύσει συγκεκριμένες ενώσεις σε πολύπλοκα μίγματα/εκχυλίσματα και να ακολουθήσει περαιτέρω ανάλυση με τη φασματοσκοπία NMR. Ο πιο συχνός τρόπος σύζευξης της υγρής χρωματογραφίας μαζί με τη φασματομετρία μαζών MS και τη φασματοσκοπία NMR είναι η παράλληλη λειτουργία όπου η κινητή φάση διαιρείται σε δύο ροές μετά την έξοδο από το σύστημα χρωματογραφίας. Η συγκεκριμένη ισορροπία μεταξύ των δύο διαχωριζόμενων ροών ρυθμίζεται με συγκεκριμένο εξάρτημα (splitter). Από τη στιγμή που το NMR είναι λιγότερο ευαίσθητο σε σχέση με το MS, ένας τυπικός λόγος ροής που χρησιμοποιείται είναι 95:5 αντίστοιχα. Η τεχνική LC-NMR/MS μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο σε δυναμικές όσο και σε στατικές συνθήκες, αν και στη δεύτερη περίπτωση ο φασματογράφος μάζας θα είναι αδρανής όσο θα καταγράφονται τα φάσματα NMR. Λόγω της υψηλής ευαισθησίας και της ταχύτητας ανάλυσης των φασματογράφων μαζών, τις περισσότερες φορές μπορεί να γίνεται αυτόματα λήψη δεδομένων περαιτέρω θραυσματοποίησης MS<sup>n</sup> κατά τη διάρκεια της χρωματογραφικής ανάλυσης (Albert, 2002).

Η πρώτη εφαρμογή του LC-NMR/MS σε φυσικά προϊόντα παρουσιάστηκε το 1999 (Wilson, *et al.*, 1999). Από τότε αυτή η εκτεταμένη σύζευξη έχει χρησιμοποιηθεί πολλές φορές στην ανάλυση δευτερογενών μεταβολιτών φυτών και σύντομα έγινε αντιληπτό ότι ο συνδυασμός NMR και MS είναι το πλέον ισχυρό αναλυτικό εργαλείο στην ανάλυση φυτικών εκχυλισμάτων (Lommen, *et al.*, 2000, Sandvoss, *et al.*, 2001, Fritsche, *et al.*, 2002, Loudon, *et al.*, 2002). Παράλληλα με τις απαιτούμενες τεχνικές βελτίωσης και αναβάθμισης, μια πληθώρα αυτοματοποιημένων διαδικασιών και ειδικών λογισμικού είναι διαθέσιμη για τις τεχνικές LC-NMR και LC-NMR/MS, επιτρέποντας την ακριβείς και επαναλήψιμες αναλύσεις.

### **Κρυογενική τεχνολογία στο LC-NMR**

Η εφαρμογή της κρυογενικής τεχνολογίας στο σύστημα LC-NMR είναι μία από τις τεχνολογικές αναβαθμίσεις που εφαρμόστηκαν για την αύξηση της ευαισθησίας της φασματοσκοπίας NMR. Είναι ήδη γνωστό ότι η ψύξη του πηνίου ραδιοσυχνότητας αλλά και των ηλεκτρονικών του προ-ενισχυτή σε κρυογενικές θερμοκρασίες ενώ το δείγμα βρίσκεται σε θερμοκρασία δωματίου, εξαλείφει τον θερμοηλεκτρικό θόρυβο που σχετίζεται με τα αρχικά στάδια καταγραφής του σήματος και αυξάνει τον παράγοντα ποιότητας του πηνίου (coil quality factor) (Styles, *et al.*, 1984, Stules, *et al.*, 1989, Black, *et al.*, 1993). Η χρήση της παραπάνω τεχνολογίας οδηγεί σε αύξηση του λόγου σήματος προς θόρυβο (S/N ratio) κατά ένα παράγοντα 3-4 (Flynn, *et al.*, 2000, Exarchou, *et al.*, 2005). Η πρώτη εφαρμογή κρυογενικού υποδοχέα με κυψελίδα ροής για LC-NMR (cryogenic probe with flow cell in LC-NMR) αναφέρεται 2003, και δείχνει τη δυνατότητα συνδυασμού της κρυογενικής τεχνολογίας και της χρήσης σε συνθήκες ροής (Spraul, *et al.*, 2003). Η περαιτέρω χρήση της κρυογενικής τεχνολογίας στο σύστημα LC-SPE-NMR/MS επέτρεψε για πρώτη φορά την απευθείας παρατήρηση του φάσματος  $^{13}\text{C}$  φυσικών προϊόντων με LC-NMR probe (Exarchou, *et al.*, 2003). Η ευαισθησία που επιτευχθηκε ήταν αποτέλεσμα της συνδυασμένης χρήσης της κρυογενικής τεχνολογίας σε συνθήκες ροής, της εισαγωγής μονάδας εκχύλισης στερεάς φάσης στο σύστημα LC-NMR και της διαδικασίας της πολλαπλής παγίδευσης, που θα αναλυθούν στη συνέχεια.

### **CapLC-NMR or microflow NMR**

Εκτός από την εφαρμογή της κρυογενικής τεχνολογίας, μία σημαντική εξέλιξη στο σχεδιασμό των NMR υποδοχέων συνεχούς ροής είναι η χρήση υποδοχέων με σωληνοειδή μικροπηνία, η οποία εγγυάται την αυξημένη ευαισθησία (Olsen, *et al.*, 1998). Η πρώτη προσπάθεια κατασκευής τέτοιων μικροπηνίων έγινε με βάση τα τυπικά χρησιμοποιούμενα πηνία (πηνία Helmholtz ή τύπου saddle) (Benhke, *et al.*, 1996). Όμως προκύπτει αυξημένη δυσκολία για παραγωγή λειτουργικών μικροπηνίων τύπου saddle με αυξημένη ευαισθησία καθώς μειώνονται οι διαστάσεις τους. Η αλλαγή του υποδοχέα σε ένα οριζόντιο σωληνοειδές μικροπηνίο προσανατολισμένο κάθετα ως προς το μαγνητικό πεδίο φαίνεται να οδηγεί σε μια πολλαπλάσια αύξηση

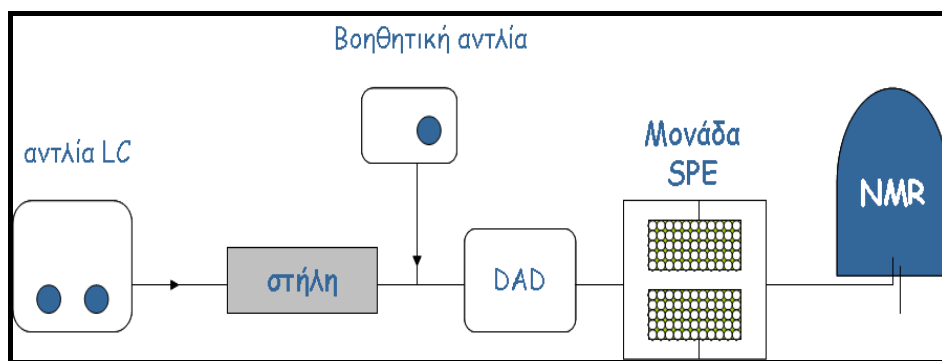


της ευαισθησίας (Olson, *et al.*, 1995). Σε αυτούς τους υποδοχείς το πηνίο ανίχνευσης είναι τυλιγμένο με τριχοειδές από τηγμένη silica σε επιδεικτικό υγρό (fused capillary and submerged in a susceptibility-matching fluid). Η συγκεκριμένη προσέγγιση οδηγεί σε μια δραματική αύξηση στον παράγοντα πλήρωσης του υποδοχέα (filling factor) και επομένως στην ευαισθησία μάζας. Τα σωληνοειδή μικροπηνία έχουν έναν ενεργό όγκο ανίχνευσης της τάξης του 1.5  $\mu\text{L}$  φθάνοντας το όριο ανίχνευσης στην κλίμακα των νανογραμμαρίων για μεταβολίτες μικρού μοριακού βάρους. Ο μικρός όγκος ανίχνευσης είναι ιδανικός για τους όγκους έκλουσης των κορυφών μετά από τον τριχοειδή υδροχρωματογραφικό διαχωρισμό (περίπου 2  $\mu\text{L}$ ). Επομένως η χρήση μικροϋποδοχέα (microprobe) με σωληνοειδές πηνίο ραδιοσυχνότητας είναι προτιμώμενη για χρήση σε συστήματα τριχοειδούς υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης συζευγμένη με NMR (capillary high-performance liquid chromatography NMR, capLC-NMR) (Krucker, *et al.*, 2004), τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης συζευγμένη με NMR (capillary electrophoresis NMR CE-NMR) (Jayawickrama and Sweedler, 2003) τριχοειδούς ηλεκτροχρωματογραφίας συζευγμένη με NMR (capillary electrochromatography NMR CEC-NMR), και τριχοειδούς ισοταχυφόρησης συζευγμένη με NMR (capillary isotachopheresis NMR (cITP-NMR) (Wolters, *et al.*, 2002). Οι μικροδιαχωριστικές τεχνικές συζευγμένες στο NMR πλεονεκτούν επίσης σε ευαισθησία διότι οι υδροχρωματογραφικοί διαχωρισμοί σε τριχοειδείς στήλες έχουν υψηλότερη αποτελεσματικότητα και πιο οξείες κορυφές με αυξημένες συγκεντρώσεις των εκλούμενων συστατικών στο μέγιστο των χρωματογραφικών διαχωρισμών. Επιπρόσθετα η χαμηλή κατανάλωση δευτεριωμένων διαλυτών μειώνει το κόστος χρήσης και περιορίζει την ανάγκη για καταστολή του σήματος του διαλύτη κατά τη λήψη του φάσματος NMR. Για την πλήρη αξιοποίηση των πλεονεκτημάτων της συγκεκριμένης τεχνολογίας, θα πρέπει τα υπό μελέτη συστατικά να έχουν μεγάλες τιμές διαλυτότητας και τα πληρωτικά υλικά των στηλών μεγάλη χωρητικότητα. Η προεργασία του δείγματος και οι χρωματογραφικές τεχνικές είναι το πιο απαιτητικό μέρος της ανάλυσης με αυτά τα συστήματα.

### **LC-SPE-NMR**

Ένα από τα πιο σημαντικά προβλήματα της τεχνικής LC-NMR είναι το υψηλό κόστος της ανάλυσης λόγω της χρήσης δευτεριωμένων διαλυτών κατά τον χρωματογραφικό διαχωρισμό. Για το σκοπό αυτό δοκιμάστηκε η εισαγωγή μονάδας Εκχύλισης Στερεάς Φάσης (Solid Phase Extraction, SPE) στο σύστημα LC-NMR. Η εκχύλιση στερεάς φάσης είναι μια ταχεία και επαναλήψιμη τακτική που χρησιμοποιείται συνήθως για την προκατεργασία του δείγματος (Thurman, *et al.*, 1998). Ταυτόχρονα, αποτελεί και ένα απλό τρόπο αύξησης της ευαισθησίας της τεχνικής LC-NMR καθώς η μονάδα SPE επιτρέπει την προσυγκέντρωση των συστατικών και την αύξηση της διαθέσιμης προς ανάλυση συγκέντρωσης. Υπάρχει ένας σχετικά μεγάλος αριθμός μελετών για την απευθείας αυτοματοποιημένη σύζευξη σε σειρά της μονάδας SPE με σύστημα LC-UV (Slobodnik, *et al.*, 1993 Mattina, *et al.*, 1994), αποσκοπώντας στην αύξηση της συγκέντρωσης του δείγματος πριν τον υγροχρωματογραφικό διαχωρισμό. Εναλλακτικά, έχει αναφερθεί η χρήση μιας προστατευτικής στήλης στην έξοδο της χρωματογραφικής στήλης για την συμπύκνωση των εκλούμενων συστατικών πριν την ανάλυση με NMR (Griffiths and Horton, 1998). Τέλος, έχει περιγραφεί και η πολλαπλή παγίδευση των εκλούμενων συστατικών με χρήση μικροστηλών SPE ώστε να επιτευχθεί αύξηση της ευαισθησίας του LC-NMR (Nyberg, *et al.*, 2001).

Σε ένα σύστημα LC-SPE-NMR, τα διαχωριζόμενα συστατικά που εκλούνται από τη στήλη παγιδεύονται αυτόματα σε μη πολικές μικροστήλες SPE. Για το σκοπό αυτό όπως φαίνεται και στο Σχήμα 2.22 προστίθεται στα συστατικά που εκλούνται από τη στήλη νερό μέσω μιας επιπλέον ισοκρατικής αντλίας, ώστε να μεταβληθεί η εκλουστική δύναμη και να επιτευχθεί η παγίδευση των συστατικών στις μικροστήλες. Ακολουθεί ξήρανση των μικροστηλών με αέριο άζωτο για να απομακρυνθούν οι πρωτονιωμένοι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη χρωματογραφική ανάλυση. Τέλος, τα συστατικά που παγιδεύτηκαν ανακτώνται με τη βοήθεια δευτεριωμένου διαλύτη της επιλογής μας (συνήθως δευτεριωμένο ακετονιτρίλιο και σπανιότερα μεθανόλη χλωροφόρμιο) και μεταφέρονται στον υποδοχέα NMR για τη λήψη φασμάτων.

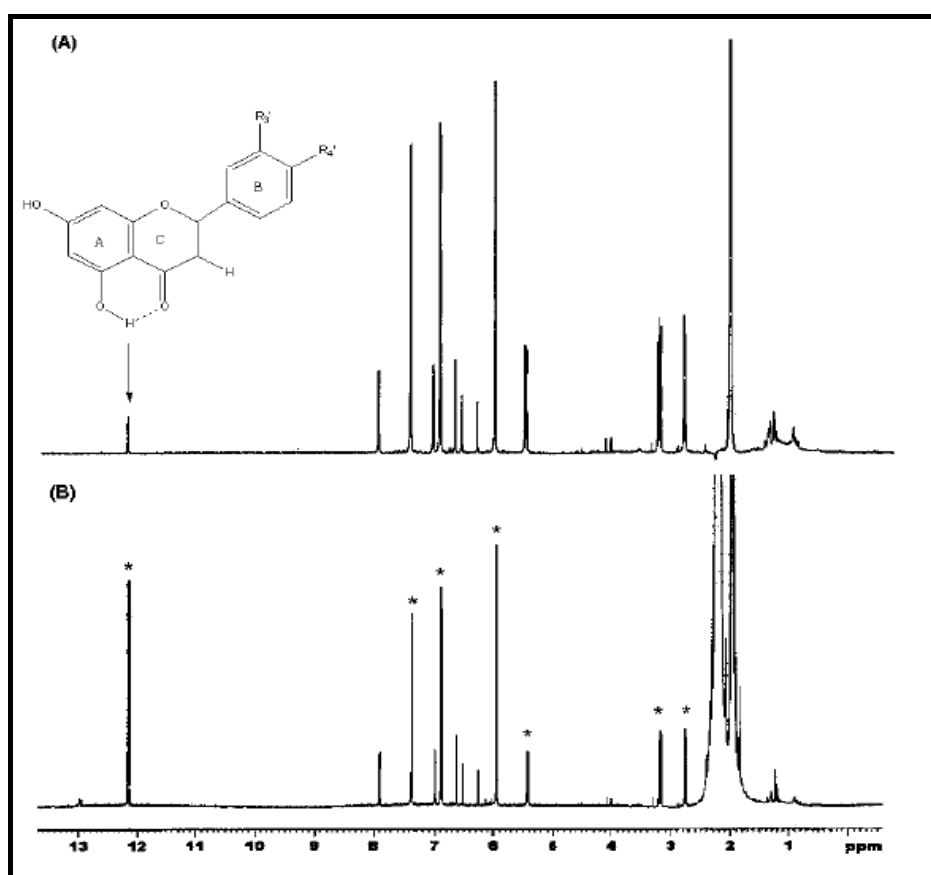


Σχήμα 2.22. Τυπική οργανολογική διάταξη LC-SPE-NMR

Η συζευγμένη τεχνική LC-SPE-NMR επιτρέπει τη χρήση συμβατικών διαλυτών υγρής χρωματογραφίας για το χρωματογραφικό μέρος της ανάλυσης και επομένως η ανάγκη για καταστολή του σήματος του διαλύτη (Yang, 2006) κατά τη λήψη του φάσματος NMR είναι λιγότερο επιτακτική. Η επέκταση της τεχνικής με τη χρήση φασματογράφου μάζας σε LC-SPE-NMR/MS προσφέρει τη δυνατότητα πλήρους ταυτοποίησης των συστατικών ενός πολύπλοκου μίγματος. Αξίζει να σημειωθεί ότι η δυνατότητα της πολλαπλής παγίδευσης του ίδιου συστατικού στην ίδια μικροστήλη με συνεχόμενες ενέσεις στο χρωματογραφικό σύστημα μπορεί να λύσει και το πρόβλημα της χαμηλής συγκέντρωσης ορισμένων συστατικών του μίγματος (Miliauskas, *et al.*, 2006). Για την επίλυση του ίδιου προβλήματος έχει αναφερθεί και η χρήση ημι-παρασκευαστικής στήλης. Το πρώτο πλήρως αυτοματοποιημένο σύστημα LC-SPE-NMR χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη ακετονικού εκχυλίσματος Ελληνικής ρίγανης από την ερευνητική μας ομάδα (Exarchou, *et al.*, 2003). Στην συνέχεια η μεθοδολογία αυτήν χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη διαφόρων φυτικών εκχυλισμάτων όπως σε εκχυλίσματα *Rhaponticum carthanoides* (Miliauskas, *et al.*, 2005), *Kanaria laniflora* (Clarkson, *et al.*, 2005), *Harpagophytum procumbens* (Seger, *et al.*, 2005), *Smirnowia iranica* (Lambert, *et al.*, 2005), *Olea Europea* (Goulas, *et al.*, 2009) αλλά και σε εμπορικά δείγματα δεντρολίβανου (Pukalskas, *et al.*, 2005) και κλάσματος ελαιολάδου (Christoforidou, *et al.*, 2005).

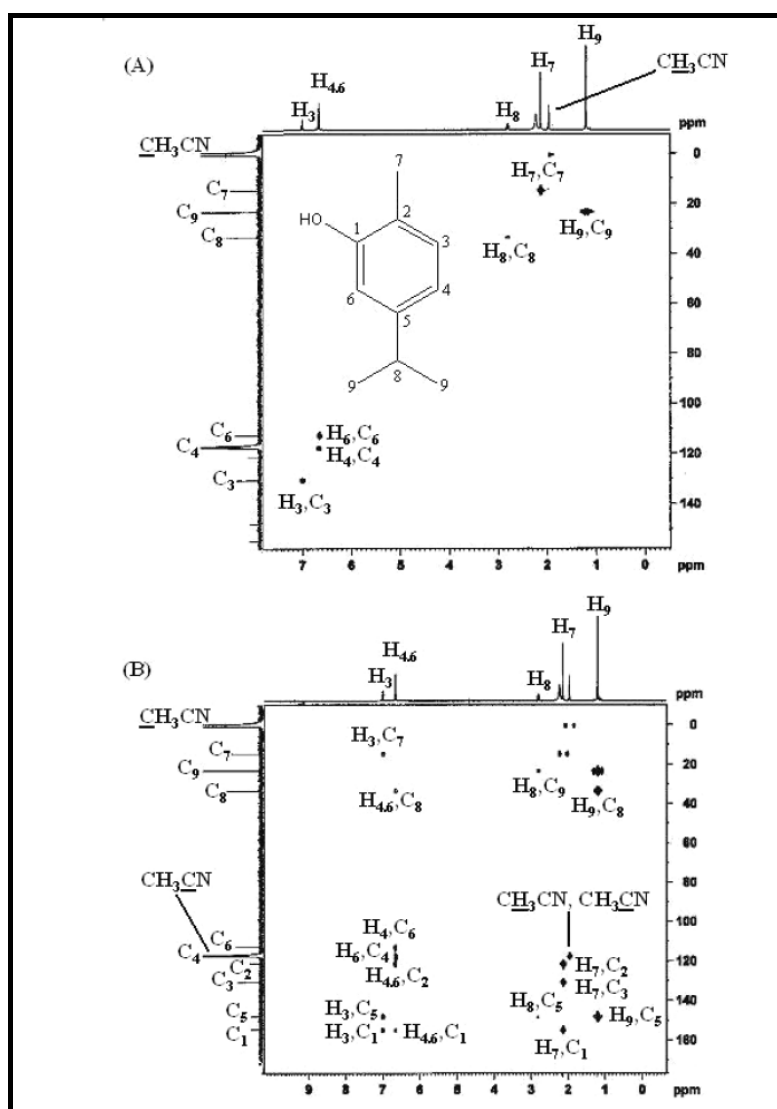
Είναι φανερό, λοιπόν, ότι η τεχνική LC-SPE-NMR είναι εξαιρετικά χρήσιμη στη μελέτη φυτικών εκχυλισμάτων. Η εφαρμογή της κρυογενικής τεχνολογίας στην παραπάνω τεχνική αυξάνει ακόμη περισσότερο την ευαισθησία της, όπως περιγράφηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο. Για παράδειγμα στο Σχήμα 2.23 απεικονίζεται το φάσμα NMR-<sup>1</sup>H μιας κορυφής από το ακετονικό εκχύλισμα

ελληνικής ρίγανης, που παγιδεύτηκε τρεις φορές στην ίδια μικροστήλη και αναλύθηκε σε φασματογράφο 600MHz εφοδιασμένο με υποδοχέα κρυογενικής τεχνολογίας (ενεργός όγκος 20  $\mu\text{L}$ ). Η λήψη του φάσματος πραγματοποιήθηκε με 32 παλμούς και ο χρόνος του πειράματος δεν ξεπερνά τα δυο λεπτά. Στο Σχήμα 2.23β παρατίθεται το ίδιο φάσμα χωρίς την εφαρμογή της παλμικής ακολουθίας καταστολής του σήματος του διαλύτη (Exarchou, *et al.*, 2003).



Σχήμα 2.23. Το φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  μιας κορυφής από το ακετονικό εκχύλισμα ελληνικής ρίγανης, που παγιδεύτηκε τρεις φορές στην ίδια μικροστήλη σε φασματόμετρο 600MHz. (A) με χρήση παλμικής ακολουθίας καταστολής του σήματος του διαλύτη, (B) χωρίς τη χρήση παλμικής ακολουθίας καταστολής του σήματος του διαλύτη, με 32 παλμούς και σε θερμοκρασία δωματίου.

Στην ίδια εργασία φάσματα μιας και δυο διαστάσεων της καρβακρόλης ληφθήκαν σε λιγότερο από μια ώρα. Η κρυογενική τεχνολογία σε συνδυασμό με τη χρήση της μονάδας SPE και την πολλαπλή παγίδευση της προς ανάλυση ουσίας στην ίδια μικροστήλη, επέτρεψαν την καταγραφή φασμάτων  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H-}^{13}\text{C}$  HMQC και  $^1\text{H-}^{13}\text{C}$  HMBC της καρβακρόλης σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα με την τεχνική του LC-NMR, όπως φαίνεται παρακάτω (Σχήμα 2.24).



Σχήμα 2.24. (A)  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC και (B)  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC φάσματα καρβακρόλης σε φασματογράφο 600-MHz κατόπιν τριπλής παγίδευσης της στην ίδια μικροστήλη

Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι τα τελευταία χρόνια έγιναν προσπάθειες να αξιολογηθούν οι παράγοντες που επηρεάζουν την λειτουργία ενός συστήματος LC-SPE-NMR. Τα αποτελέσματα των προσπαθειών αυτών δεν ήταν ιδιαίτερα εντυπωσιακά καθώς φαίνεται ότι δεν είναι δυνατόν να εξαχθούν κανόνες και οδηγίες για την αποτελεσματικότερη χρήση του συστήματος γενικά, αλλά θα πρέπει κάθε φορά να ελέγχονται οι παράμετροι του συστήματος καθώς φέρονται να επηρεάζονται άμεσα από το δείγμα. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η διαδικασία της «παγίδευσης» στις μικροστήλες και η ανάκτηση από αυτές. Έτσι μερικές από τις παραμέτρους που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα του συστήματος είναι το είδος του πληρωτικού υλικού των μικροστηλών, ο δευτεριωμένος διαλύτης

ανάκτησης και η διαλυτότητα των προς ανάλυση ενώσεων και ο λόγος των ροών των δυο αντλιών του συστήματος (Miliauskas, *et al.*, 2006, Clarkson, *et al.*, 2007).

### 3. Πειραματικό Μέρος

#### 3.1 Αντιδραστήρια-Υλικά

Οι πρότυπες ενώσεις καφεϊκό οξύ, *ο*-κουμαρικό οξύ, γλωρογενικό οξύ, ροσμαρινικό οξύ, φερουλικό οξύ, κινναμωμικό οξύ, σιναπικό οξύ, χρυσίνη, απιγενίνη, ρουτίνη, εσπεριδίνη και κερκετίνη αγοράστηκαν από την Fluka (Buchs, Switzerland) ενώ η λουτεολίνη και ο 7-*O*-γλυκοζίτης της λουτεολίνης από την Extasynthese (Genay, France). Η λήψη των φασμάτων NMR πραγματοποιήθηκαν με δευτεριωμένη μεθανόλη (MeOH-*d*<sub>4</sub>) και δευτεριωμένο ακετονιτρίλιο (ACN-*d*<sub>3</sub>) που προμηθεύτηκαν από τη Deutero (Kastellaun, Germany). Για την εκχύλιση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε εξάνιο, οξικός αιθυλεστέρας και μεθανόλη από την Riedel de Haen (Seelze, Germany). Για την υδροχρωματογραφική μελέτη των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκαν ακετονιτρίλιο και νερό βαθμού ανάλυσης HPLC από την Scharlau (Barcelona, Spain). Για την ρύθμιση του pH στην υγρή χρωματογραφία χρησιμοποιήθηκε οξικό οξύ της εταιρείας Merck (Darmstadt, Germany). Τέλος, για την εκτίμηση της ικανότητας δέσμευσης ελευθέρων ριζών χρησιμοποιήθηκε 2,2-διφαινυλο-1-πικρυλυδραζύλιο DPPH, που προμηθεύτηκε από την Sigma-Aldrich (Steinheim, Switzerland).

#### 3.2 Δείγματα

##### 3.2.1 Συλλογή φυτικού υλικού

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκαν φυτικά εκχυλίσματα των φυτών *Sideritis syriaca* και *Teucrium polium*. Η συλλογή του φυτικού υλικού πραγματοποιήθηκε το καλοκαίρι του 2007 την περίοδο της ανθοφορίας τους στον ορεινό όγκο των Δυτικών Τζουμέρκων. Πιο συγκεκριμένα, το φυτό *Sideritis syriaca*

κοινώς «τσάι του βουνού» συλλέχθηκε βόρεια του χωριού Προσηλίου σε υψόμετρο που υπερβαίνει τα 1100 μέτρα στις 15 Ιουνίου 2007 (Εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1. Τόπος συλλογής *Sideritis syriaca*.

Η συλλογή του *Teucrium polium* πραγματοποιήθηκε στις 26 Ιουλίου 2007 ανατολικά του οικισμού Προσηλίου σε υψόμετρο περίπου 900 μέτρων. Και τα δυο φυτά φύονται σε εδάφη ξηρά και πετρώδη. Μετά την συλλογή τους αποξηράθηκαν σε σκοτεινό δωμάτιο και αφού λειοτριβήθηκαν φυλάχτηκαν σε γυάλινα δοχεία μέχρι την αναλυθούν.



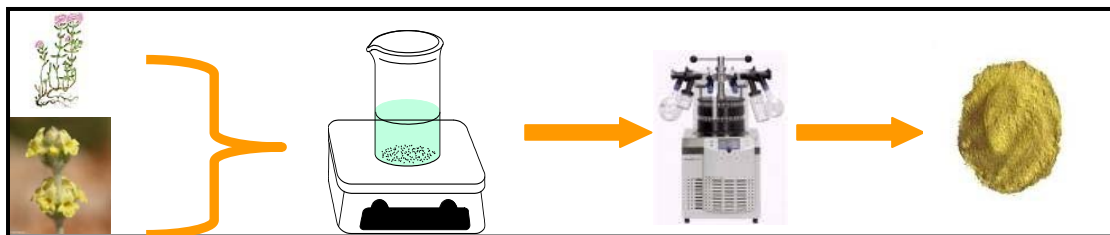


Εικόνα 3.2. Τόπος συλλογής *Teucrium polium*

### 3.2.2 Προετοιμασία εκχυλισμάτων.

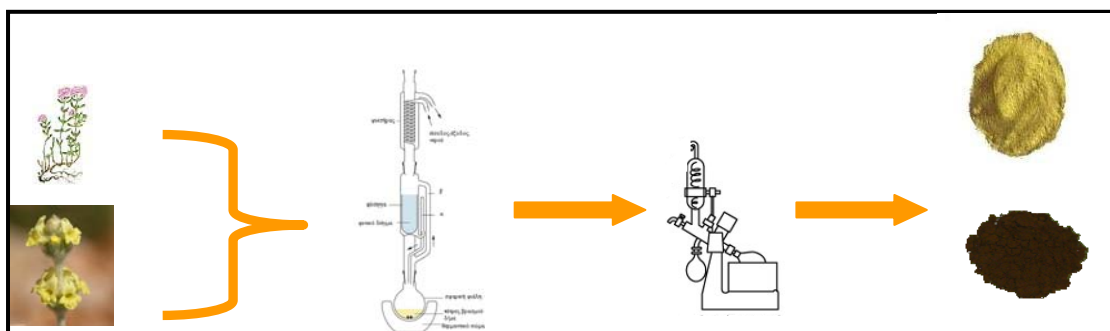
Για τα δυο φυτά ακολουθήθηκε κοινή πορεία ανάλυσης, η οποία περιλάμβανε τρεις διαφορετικές εκχυλίσεις. Η πρώτη εκχύλιση περιλάμβανε βρασμό του φυτού με νερό, μια διαδικασία εκχύλισης που προσομοιάζει με εκείνη των αφεισημάτων που χρησιμοποιούνται στη λαϊκή ιατρική. Ο δεύτερος τρόπος παραλαβής εκχυλίσματος είναι εκχύλιση Soxhlet με διαλύτη μεθανόλη που συνδυάζει τις καλές διαλυτικές ικανότητες της μεθανόλης και τις έντονες συνθήκες παραλαβής των συστατικών. Παράλληλα, πραγματοποιείται και ο τρίτος τρόπος παραλαβής εκχυλισμάτων με διαδοχικές εκχυλίσεις Soxhlet με διαλύτες αυξανόμενης πολικότητας τόσο για συγκριτικούς λόγους ώστε και να απλοποιηθεί η ανάλυση των παραλαμβανόμενων εκχυλισμάτων.

**Πρώτος τρόπος παραλαβής εκχυλίσματος:** Είκοσι γραμμάρια (20g) δείγματος ζυγίζονται και μεταφέρονται ποσοτικά σε ποτήρι ζέσεως όπου προσθέτονται 100 ml απιονισμένου νερού και το μίγμα βράζεται για μια ώρα. Αφού ψυχθεί το μίγμα ακολουθεί διήθηση υπό κενό και το διήθημα λυοφιλοποιείται για την παραλαβή ξηρού εκχυλίσματος. Η παραπάνω διαδικασία απεικονίζεται γραφικά στο Σχήμα 3.3.



Σχήμα 3.3. Παραλαβή υδατικού εκχυλίσματος με βρασμό.

**Δεύτερος τρόπος παραλαβής εκχυλίσματος:** Δέκα γραμμάρια (10g) δείγματος ζυγίζονται και μεταφέρονται ποσοτικά σε ειδική φύσιγγα από διηθητικό χαρτί. Το δείγμα καλύπτεται με βαμβάκι και η φύσιγγα τοποθετείται σε εκχυλιστήρα Soxhlet. Σε προζυγισμένη εσφυρισμένη σφαιρική φιάλη που φέρει πέτρες βρασμού προστίθεται επαρκής ποσότητα μεθανόλης (~200 ml). Η φιάλη με το διαλύτη θερμαίνεται, οπότε ο διαλύτης αποστάζει και οι ατμοί του φτάνουν ως τον ψυκτήρα όπου υγροποιούνται. Οι σταγόνες του υγρού διαλύτη πέφτουν στον εκχυλιστήρα και παραλαμβάνουν ένα μέρος της εκχυλιζόμενης ουσίας. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται για έξι σιφωνισμούς και η τυπική διάρκεια εκχύλισης είναι περίπου έξι ώρες.



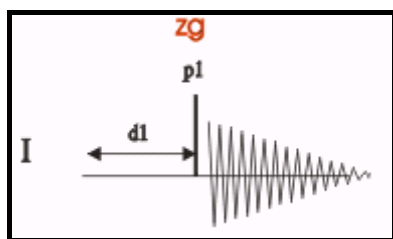
Σχήμα 3.4. Παραλαβή εκχυλίσματος με εκχύλιση Soxhlet

**Τρίτος τρόπος παραλαβής εκχυλίσματος:** η διαδικασία εκχύλισης είναι όμοια με την προηγούμενη με τη διαφορά ότι χρησιμοποιείται αρχικά ως διαλύτης εξάνιο για την απομάκρυνση κυρίως χλωροφυλλών (δυο σιφωνισμοί). Κατόπιν, συνεχίζεται η εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα για τρεις σιφωνισμούς για την παραλαβή μη πολικών ενώσεων. Η διαδικασία ολοκληρώνεται με εκχύλιση με μεθανόλη για έξι σιφωνισμούς. Με την εκχύλιση αυτή προκύπτουν τρία εκχυλίσματα κάθε φορά που η σύσταση του μεθανολικού εκχυλίσματος είναι η ίδια ή απλούστερη με εκείνη που προκύπτει από το δεύτερο τρόπο εκχύλισης.

### 3.3 Μελέτη της σύστασης των εκχυλισμάτων με τη χρήση φασματοσκοπίας NMR μιας (1D) και δυο (2D) δυο διαστάσεων

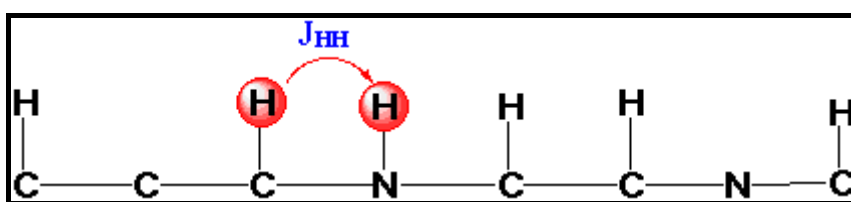
Η λήψη φασμάτων NMR των εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε στο φασματογράφο NMR Bruker AV-500 του Κέντρου Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Η λήψη και η επεξεργασία των φασμάτων έγινε με τη βοήθεια του λογισμικού TopSpin 1.3. Για την ετοιμασία του δείγματος 20 mg εκχυλίσματος διαλύθηκαν σε 500  $\mu\text{L}$  δευτεριωμένου ακετονιτριλίου ( $\text{CD}_3\text{CN}$ ). Για τη λήψη φασμάτων NMR μιας διάστασης, και δυο διαστάσεων χρησιμοποιήθηκαν οι κατάλληλες παλμικές ακολουθίες που περιγράφονται παρακάτω.

**Φασματοσκοπία  $^1\text{H}$ :** Από την πρωτονιακή φασματοσκοπία προκύπτουν πληροφορίες που σχετίζονται με τις χημικές μετατοπίσεις, την πολλαπλότητα, τις σταθερές σύζευξης και τα ολοκληρώματα όλων των πρωτονίων. Για την λήψη ενός φάσματος  $^1\text{H}$  απαιτείται η εφαρμογή ενός παλμού και ακολουθεί η συλλογή των δεδομένων (Σχήμα 3.5).



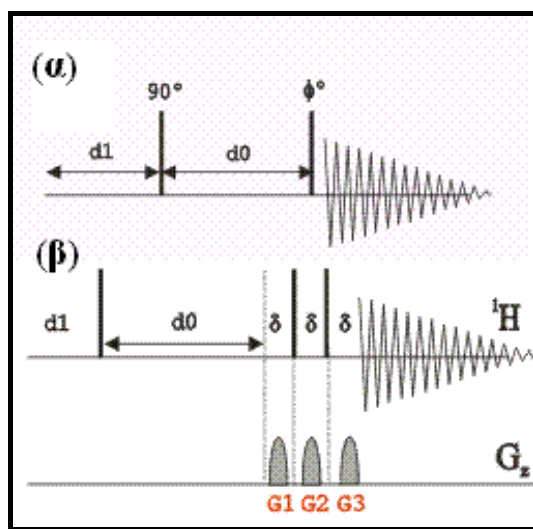
Σχήμα 3.5. Σχηματική απεικόνιση της παλμικής ακολουθίας για τη λήψη πρωτονιακού φάσματος.

**Ομοπυρηνική Φασματοσκοπία συσχέτισης  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (COSY):** Με την τεχνική αυτή παρατηρούνται κορυφές διασταύρωσης που οφείλονται στην μεταφορά μαγνήτισης μεταξύ μόνο συζευγμένων μέσω δεσμών συστημάτων (Σχήμα 3.4). Με τον τρόπο αυτό προκύπτει ένας δισδιάστατος χάρτης που παρέχει σχετικά με τα πρωτόνια που βρίσκονται σε μεταξύ τους σύζευξη.



Σχήμα 3.6. Σχηματική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων λόγω σταθερών σύζευξης με την εφαρμογή της φασματοσκοπίας COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ .

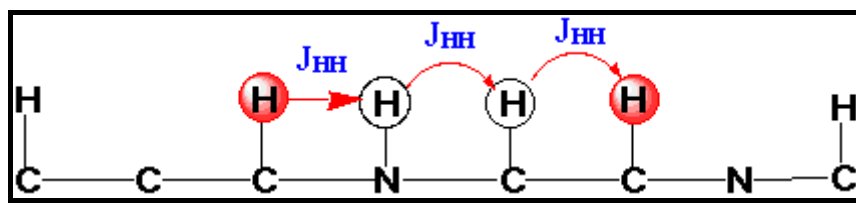
Η παλμική ακολουθία ενός φάσματος COSY παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.7α. και αποτελείται από ένα παλμό  $90^\circ$  και μετά την παρέλευση του χρόνου εξέλιξης  $t_1$  εφαρμόζεται ένας δεύτερος παλμός, ο οποίος συνήθως είναι  $90^\circ$  ή  $45^\circ$ . Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται για διαφορετικούς χρόνους εξέλιξης. Σε ένα τυπικό φάσμα COSY λαμβάνονται μετρήσεις σε 1024 διαφορετικούς χρόνους,  $t_1$ , (increments), που λαμβάνουν τιμές από 3 ms έως 500 ms. Η ελεύθερη επαγόμενη απόσβεση που προκύπτει είναι διαφορετική για καθένα από τα 1024 βήματα (Bovey, 1988). Γενικά, ένα φάσμα COSY- $45^\circ$  είναι περισσότερο ευδιάκριτο, αλλά ένα φάσμα COSY- $90^\circ$  έχει μεγαλύτερη ευαισθησία.



Σχήμα 3.7. Σχηματική απεικόνιση της παλμικής ακολουθίας (α) για τη λήψη τυπικού φάσματος COSY και (β) για λήψη φάσματος COSY με χρήση βαθμωτού πεδίου.

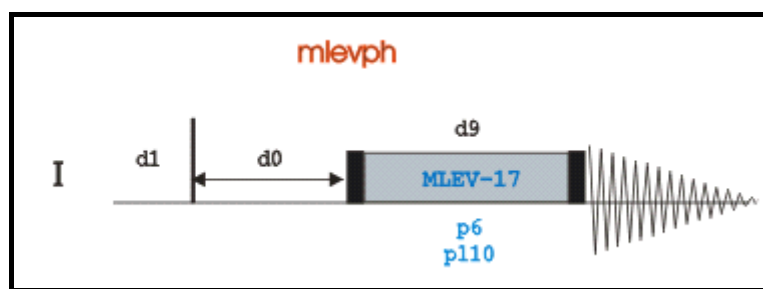
Για την απλοποίηση ενός πολύπλοκου δισδιάστατου φάσματος συσχέτισης έχουν αναπτυχθεί αρκετές τεχνικές με σκοπό την μείωση των έντονων κορυφών της διαγωνίου με αποτέλεσμα την αποκάλυψη διασταυρούμενων κορυφών που επικαλύπτονται από τη διαγώνιο. Μια από αυτές είναι η φασματοσκοπία συσχέτισης διπλού κβάντου (Double Quantum Filter Correlated Spectroscopy), κατά την οποία προστίθεται ένας επιπλέον παλμός στην παλμική ακολουθία της τεχνικής COSY. Τα φάσματα που προκύπτουν από μια τέτοια παλμική ακολουθία έχουν μειωμένη ευαισθησία σε σχέση με ένα τυπικό COSY κατά ένα παράγοντα 2 αλλά είναι σημαντικά μειωμένος ο χρόνος του πειράματος.

**Ομοπυρηνική Φασματοσκοπία Ολικής συσχέτισης  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (TOCSY):** Πρόκειται για τεχνική που χρησιμοποιείται εναλλακτικά ή σε συνδυασμό με την ομοπυρηνική φασματοσκοπία συσχέτισης COSY. Η παλμική ακολουθία που εφαρμόζεται στη φασματοσκοπία TOCSY αποκαλύπτει συσχετίσεις πυρήνων μέσω δεσμών, που δεν συζεύγγονται άμεσα μεταξύ τους, αλλά συζεύγγονται από κοινού με έναν τρίτο πυρήνα.



Σχήμα 3.8. Σχηματική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων λόγω σταθερών σύζευξης με την εφαρμογή της φασματοσκοπίας TOCSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ .

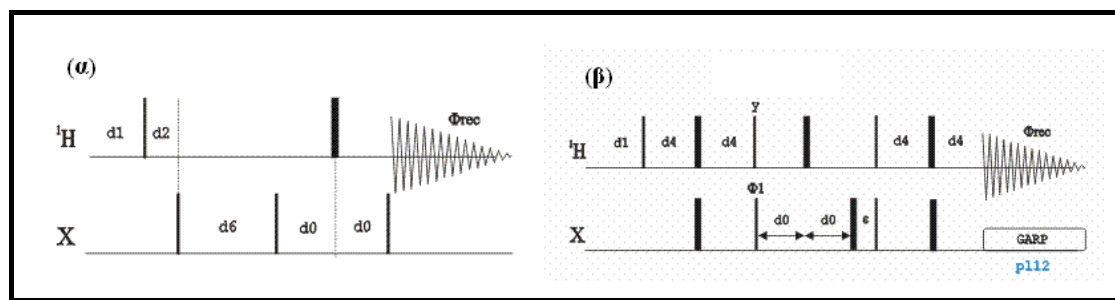
Η παλμική ακολουθία του πειράματος TOCSY (Σχήμα 3.8) αποτελείται από ένα παλμό  $90^\circ$  και μετά την παρέλευση του χρόνου εξέλιξης  $t_1$  εφαρμόζεται ο παλμός «κλειδώματος» των spin (spin locking pulse). Κατά τη διάρκεια αυτού του παλμού οι πυρήνες αντιλαμβάνονται την ύπαρξη μόνο του πεδίου  $\mathbf{B}_1$  ως αποτελεσματικού παλμού και οι διαφορές των χημικών μετατοπίσεων γίνονται αμελητέες (Braun, *et al.*, 1998). Με τις πειραματικές αυτές συνθήκες η μαγνήτιση ενός πυρήνα διαχέεται στους γειτονικούς πυρήνες που συνδέονται μεταξύ τους μέσω δεσμών. Η «επικοινωνία» των πυρήνων εξαρτάται από τη διάρκεια του παλμού κλειδώματος των spin. Μικρή διάρκεια παλμού (της τάξης των 30 ms) παρέχει συνήθως τις ίδιες πληροφορίες με ένα φάσμα COSY. Ενώ, η μεγάλη διάρκεια του παλμού κλειδώματος των spin έχει ως αποτέλεσμα την επιθυμητή ολική συσχέτιση. Πρακτικά, πραγματοποιείται η λήψη φασμάτων TOCSY με διάρκεια παλμού από 20 έως 120 ms και ερμηνεύονται οι εμφανιζόμενες διασταυρούμενες κορυφές (Croasmun and Clarson, 1994, Rahman and Choudhary, 1996).



Σχήμα 3.9. Σχηματική απεικόνιση της παλμικής ακολουθίας για τη λήψη φάσματος TOCSY.

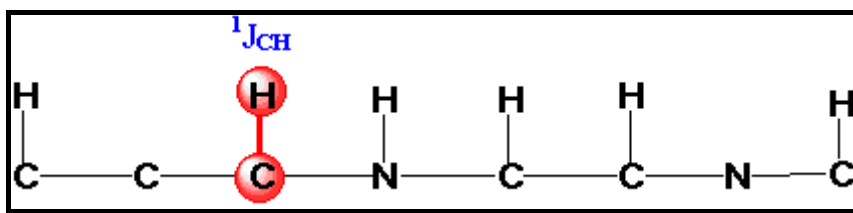


**Ετεροπυρηνική Φασματοσκοπία συσχέτισης πολλαπλού κβάντου  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (HMQC) και συσχέτισης μέσω πολλαπλών δεσμών  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (HMBC):** Στην ετεροπυρηνική φασματοσκοπία συσχέτισης είναι δυνατή η παρατήρηση του τρόπου σύνδεσης μεταξύ διαφορετικών μαγνητικών πυρήνων (πχ  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ). Η ετεροπυρηνική φασματοσκοπία εμφανίζει περιορισμένη ευαισθησία εξαιτίας της μικρής περιεκτικότητας σε  $^{13}\text{C}$  και του μικρού γυρομαγνητικού του λόγου. Αύξηση της ευαισθησίας του  $^{13}\text{C}$  είναι δυνατόν να επιτευχθεί με την παρατήρηση του μέσω της επίδρασης που ασκεί στον πυρήνα του πρωτονίου, που εμφανίζει μεγαλύτερη ευαισθησία. Στα πειράματα HMQC και HMBC η ανίχνευση και η καταγραφή του σήματος γίνεται μέσω του πρωτονίου και οι παλμικές ακολουθίες τους φαίνονται στο Σχήμα 3.10 (Sanders and Hunder, 1993, Croasmun and Clarson, 1994).



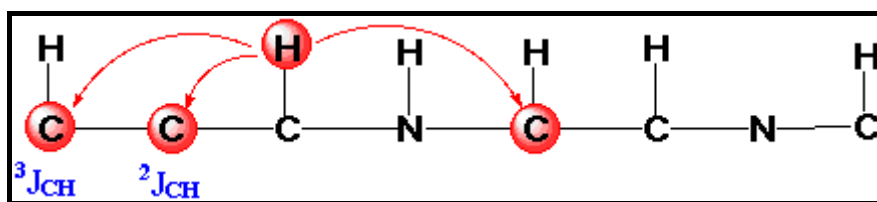
Σχήμα 3.10. Σχηματική απεικόνιση της παλμικής ακολουθίας για τη λήψη φάσματος (α) HMQC και (β) HMBC.

Η φασματοσκοπία HMQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  συσχετίζει πυρήνες άνθρακα που βρίσκονται σε άμεση σύζευξη με πυρήνες πρωτονίου ( $^1J_{\text{CH}}$ ) (Σχήμα 3.11). Αν κανείς χωρίσει αυθαίρετα την παλμική ακολουθία αυτού του πειράματος σε δυο στάδια τότε θα παρατηρήσει ότι στο πρώτο στάδιο λαμβάνει χώρα μεταφορά ενέργειας από τον πυρήνα του πρωτονίου στο πυρήνα του άνθρακα με την εφαρμογή παλμών  $90^\circ$  και στους δυο πυρήνες. Κατά τα στάδια αυτό πραγματοποιείται ταυτόχρονα και η καταστολή των σημάτων συντονισμού όλων των πυρήνων πρωτονίου που δεν συζεύγονται με πυρήνες άνθρακα. Στο δεύτερο στάδιο η ενέργεια μεταφέρεται από τον πυρήνα του άνθρακα στον πυρήνα του πρωτονίου και ανιχνεύεται ώστε να προκύψει ο δισδιάστατος χάρτης που αποτελείται μόνο από διασταυρούμενες κορυφές  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  που σχετίζονται μεταξύ τους μέσω σταθεράς σύζευξης ( $^1J_{\text{CH}}$ ) (Gunter, 1995).



Σχήμα 3.11. Σχηματική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων  $^1H-^{13}C$  μέσω σταθεράς σύζευξης ( $^1J_{CH}$ ) για τη φασματοσκοπία  $HMQC$ .

Η φασματοσκοπία HMBC παρέχει πληροφορίες σχετικά με την αλληλεπίδραση πυρήνων άνθρακα που συζεύγονται με πυρήνες πρωτονίου, οι οποίοι απέχουν από δυο έως τέσσερις δεσμούς ( $^{2-4}J_{CH}$ ) (σχήμα 3.12).



Σχήμα 3.12. Σχηματική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων  $^1H-^{13}C$  μέσω σταθεράς σύζευξης ( $^{2-4}J_{CH}$ ) για τη φασματοσκοπία  $HMBC$ .

Η παλμική ακολουθία του πειράματος HMBC (Σχήμα 3.10) περιλαμβάνει αρχικά ένα παλμό  $90^\circ$  με τη βοήθεια του οποίου αποφεύγονται οι ανεπιθύμητες συζεύξεις  $^1J_{CH}$  έτσι ώστε οι διασταυρούμενες κορυφές να προκύπτουν αποκλειστικά από συζεύξεις  $^{2-4}J_{CH}$ . Ο δεύτερος παλμός  $90^\circ$  για τον πυρήνα του άνθρακα δημιουργεί μεταπτώσεις μηδενικού και διπλού κβάντου, οι οποίες ανταλλάσσονται με την επίδραση του παλμού  $180^\circ$  για τον πυρήνα του πρωτονίου. Τέλος, με την εφαρμογή του τρίτου παλμού  $90^\circ$  για τον πυρήνα του άνθρακα και την καταγραφή του φάσματος προκύπτει ο διδιάστατος χάρτης του HMBC (Rahman and Choudhary, 1996).

### 3.4 Μελέτη της σύστασης των εκχυλισμάτων με τη χρήση Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

Ο υγροχρωματογραφικός διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε σε σύστημα Agilent G13311A. Η καταγραφή των χρωματογραφημάτων έγινε με την χρήση ανιχνευτή φωτοдиодων Bruker DAD (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Germany). Η ψηφιοποίηση του σήματος του ανιχνευτή καθώς και ο έλεγχος όλου του συστήματος

γίνεται μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή με λογισμικό HyStar 3.1 της Agilent. Για τον επιτυχή διαχωρισμό των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε αναλυτική στήλη Discovery C18 (25cm x 4,6mm, 5μm) και βαθμωτή έκλυση με χρήση δυο διαλυτών: (A) υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 0.1%, (B) ακετονιτρίλιο, με ταχύτητα ροής 0.6 mL/min όπως φαίνεται στο Πίνακα 3.1. Το οξικό οξύ προστέθηκε για να αποφευχθεί η διάσταση των όξινων –OH των φλαβονοειδών και των ομάδων –COOH των φαινολικών οξέων. Οι διαλύτες υποβάλλονται σε καθαρισμό με ειδικά φίλτρα και διαδικασία απομάκρυνσης του αέρα με ειδική συσκευή απαέρωσης πριν την είσοδο τους στην χρωματογραφία. Ο ενέσιμος όγκος του δείγματος κάθε φορά ήταν 20 μL. Για την υγροχρωματογραφική ανάλυση των εκχυλισμάτων 1mg του κάθε εκχυλίσματος διαλύθηκε σε 1 mL μίγματος νερού-ακετονιτριλίου (50:50).

**Πίνακας 3.1. Σύσταση κινητής φάσης για την μελέτη εκχυλισμάτων *Sideritis syriaca* και *Teucrium polium*.**

Βαθμωτή Έκλυση Εκχυλισμάτων			
<i>Sideritis syriaca</i>		<i>Teucrium polium</i>	
Χρόνος (min)	Διαλύτης B %	Χρόνος (min)	Διαλύτης B %
0	5	0	15
20	25	20	15
40	50	30	40
50	80	40	80
60	5	45	80
		55	15

### 3.5 Μελέτη της σύστασης των εκχυλισμάτων με τη χρήση της συνδυαστικής τεχνικής LC-MS

Η ανάλυση των εκχυλισμάτων με την συνδυαστική τεχνική υγρής χρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών πραγματοποιήθηκε στο Κέντρο Φασματομετρίας Μαζών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Το χρωματογραφικό σύστημα που χρησιμοποιήθηκε ήταν Agilent 1100 το οποίο ήταν εφοδιασμένο με ανιχνευτή φωτοδιόδων Agilent G1315B DAD και φασματογράφο μάζας με ανιχνευτή



παγίδευσης ιόντων (ion trap mass). Ο φασματογράφος μαζών ήταν Agilent G2455A και ήταν τεχνολογίας ηλεκτροψεκασμού, που επιτρέπει την ανάλυση πτητικών, θερμικά σταθερών μικρού μοριακού βάρους ενώσεων. Για τον ιονισμό των φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων επιλέχθηκε η αρνητική τάση 4.5 kV και η σάρωση για την ανίχνευση των ιόντων πραγματοποιήθηκε για τιμές του λόγου m/z από 50 έως 1200. Ο έλεγχος του συστήματος και η επεξεργασία των φασμάτων μάζας έγινε με το λογισμικό της Agilent (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Όσον αφορά το χρωματογραφικό διαχωρισμό χρησιμοποιήθηκαν οι συνθήκες που περιγράφονται στην παράγραφο 3.3 με τη μόνη διαφοροποίηση ότι ο ενέσιμος όγκος ήταν 10  $\mu$ L έναντι των 20  $\mu$ L.

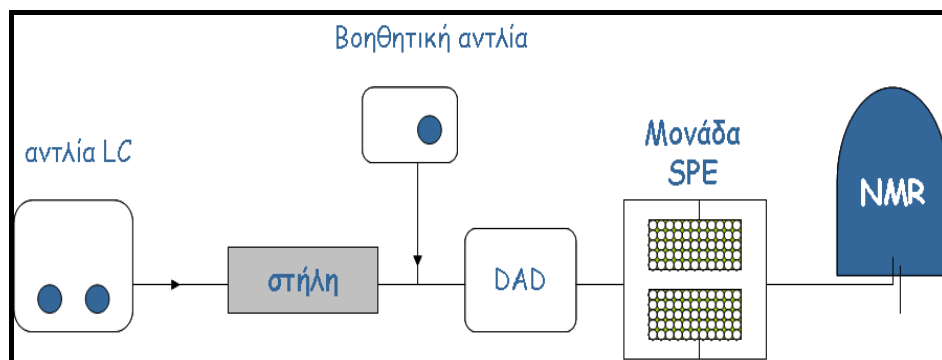
### ***3.6 Μελέτη της σύστασης των εκχυλισμάτων με τη χρήση της συνδυαστικής τεχνικής LC-SPE-NMR***

Η αρχή λειτουργίας της συνδυαστικής τεχνικής LC-SPE-NMR βασίζεται στη δυνατότητα «αποθήκευσης» των εκκλουόμενων ενώσεων από την χρωματογραφική στήλη σε κατάλληλες μικροστήλες SPE. Κάθε ένωση παγιδεύεται σε μια μικροστήλη ξεχωριστά. Η παγίδευση τους επιτυγχάνεται με τη συνεχή προσθήκη νερού μέσω αντλίας στην έξοδο της στήλης, που έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της εκκλουστικής δύναμης και τη κατακράτηση τους στις μικροστήλες. Για την επίτευξη μεγαλύτερων συγκεντρώσεων που θα επιτρέψει τη λήψη φασμάτων NMR δυο διαστάσεων χρησιμοποιήθηκε η διαδικασία πολλαπλής παγίδευσης. Ακολουθεί διαβίβαση ρεύματος αερίου αζώτου για την απομάκρυνση των διαλυτών της χρωματογραφίας. Στη συνέχεια οι «παγιδευμένες» ενώσεις ανακτώνται και μεταφέρονται με δευτεριωμένο διαλύτη στην κυψελίδα συνεχής ροής του υποδοχέα του φασματογράφου NMR για τη λήψη φασμάτων των ενώσεων.

#### **3.6.1 Οργανολογία**

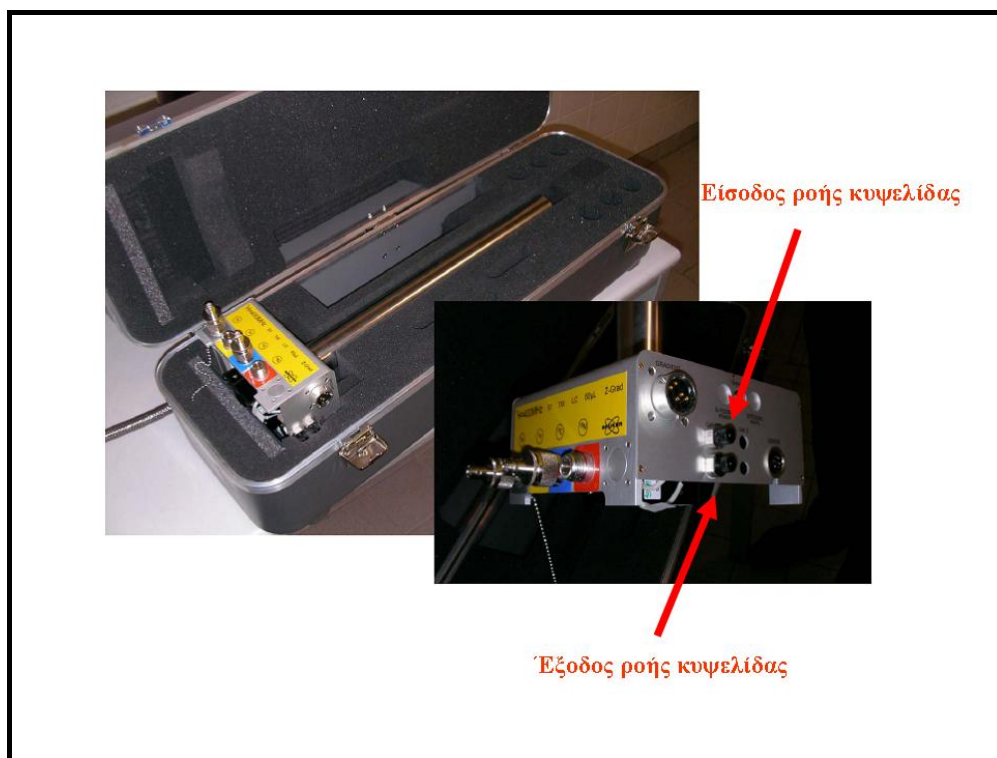
Η μελέτη της σύστασης των φυτικών εκχυλισμάτων με την τεχνική LC-SPE-NMR πραγματοποιήθηκε σε όργανο LC-NMR της εταιρείας Bruker. Το σύστημα υγρής χρωματογραφίας αποτελείται από αντλία προώθησης διαλυτών Agilent

G13311A και τον ανιχνευτή διόδου λυχνιών Bruker DAD UV detector (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Germany). Για την έγχυση του δείγματος χρησιμοποιήθηκε αυτόματος δειγματολήπτης Agilent G1311A με βρόγχο, που μπορεί να εισάγει από 0 έως 100  $\mu\text{L}$ .



Σχήμα 3.13. Τυπική οργανολογική διάταξη LC-SPE-NMR.

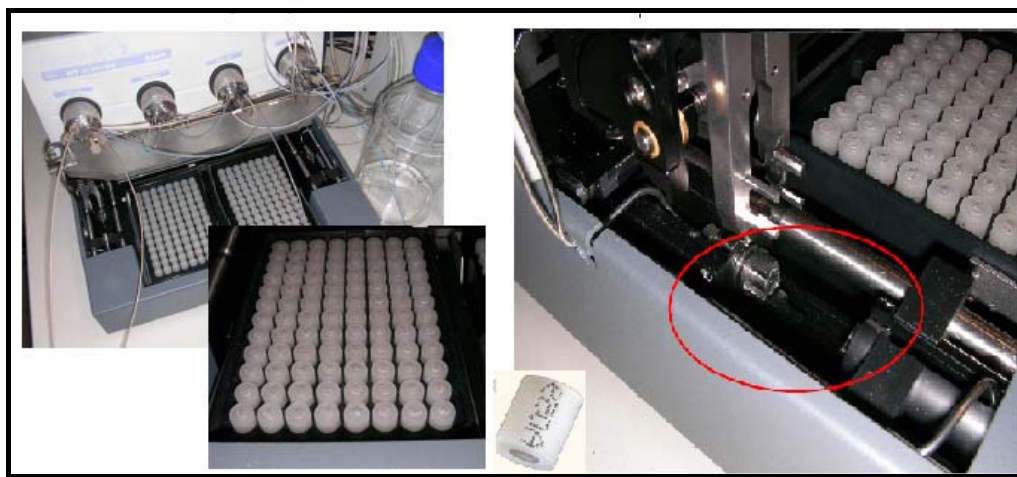
Για την αυτόματη παγίδευση των κορυφών χρησιμοποιήθηκε η συσκευή εκχύλισης στερεάς φάσης Bruker/Spark Prospect 2 (Bruker BioSpin and Spark, Emmen, The Netherlands) εφοδιασμένη με μικροστήλες Hysphere, που φέρουν πληρωτικά υλικά διαφόρων τύπων. Η προσθήκη νερού για την κατακράτηση των ενώσεων στις μικροστήλες έγινε με χρήση ισοκρατικής αντλίας Knauer K 120 (Berlin, Germany). Τα παγιδευμένα συστατικά του εκχυλίσματος μετά την ξήρανση τους μεταφέρονται με 380  $\mu\text{L}$  δευτεριωμένου διαλύτη ( $\text{ACN-}d_3$  ή  $\text{MeOH-}d_4$ ) σε φασματογράφο Bruker AV-500 NMR, εξοπλισμένο με υποδοχέα συνεχούς ροής LC-SEI 4mm  $^1\text{H-}^{13}\text{C}$  με ενεργό όγκο κυψελίδας ανίχνευσης 60  $\mu\text{L}$  (Εικόνα 3.12).



Σχήμα 3.12. Υποδοχέας NMR ενδιάμεσης ροής LC-SEI 4mm  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$

### 3.6.2 Σύστημα Εκχύλισης Στερεής Φάσης ( Solid Phase Extraction, SPE)

Η εισαγωγή του συστήματος SPE στο σύστημα LC-NMR ήταν καθοριστική καθώς συγκεντρώνει πλήθος πλεονεκτημάτων αλλά ταυτόχρονα αποτελεί και το πιο κρίσιμο σημείο της τεχνικής LC-SPE-NMR, δεδομένου ότι κατά την παγίδευση και ανάκτηση των συστατικών στις μικροστήλες λαμβάνουν χώρα αρκετές φυσικοχημικές διεργασίες. Όπως αναφέρθηκε προηγούμενα στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκε συσκευή εκχύλισης στερεάς φάσης Bruker/Spark Prospect 2 (Bruker BioSpin and Spark, Emmen, The Netherlands) (Εικόνα 3.4).



Εικόνα 3.4. Συσκευή εκχύλισης στερεάς φάσης Bruker/Spark Prospect 2

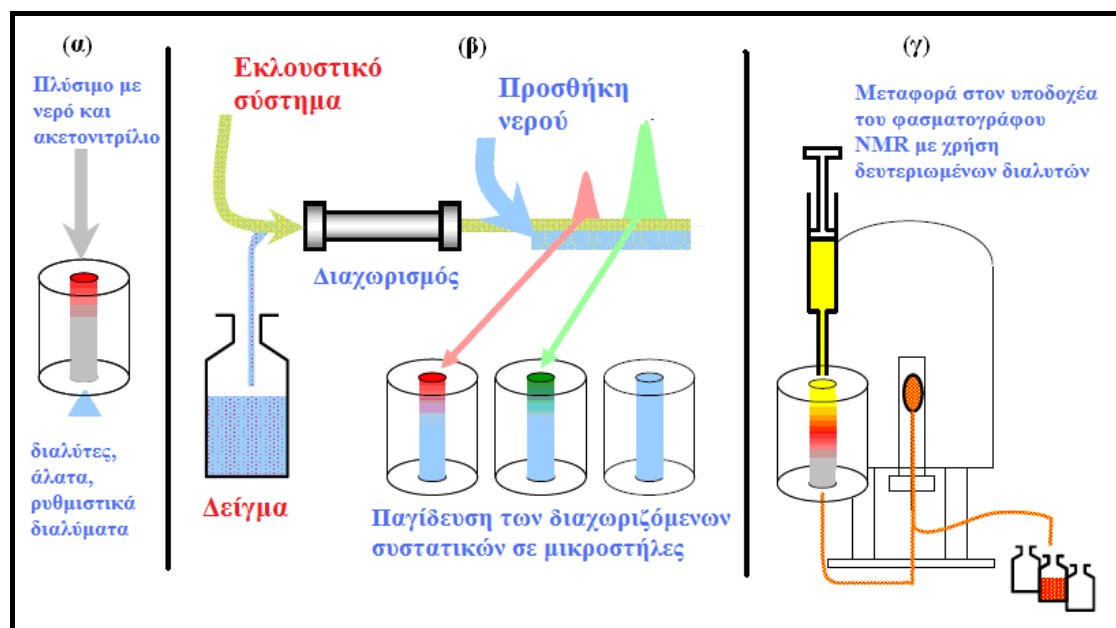
Το πρώτο βήμα που αφορά τη χρήση της μονάδας SPE στο σύστημα LC-SPE-NMR είναι η επιλογή του τύπου του πληρωτικού υλικού των μικροστηλών που εξαρτάται από το είδος της υπό ανάλυση ενώσεων. Το σύστημα περιέχει οκτώ διαφορετικά είδη μικροστηλών που διαφέρουν ως προς τον τύπο του πληρωτικού υλικού, το μέγεθος των σωματιδίων των μικροστηλών και άλλα τεχνικά χαρακτηριστικά που αναφέρονται στον Πίνακα 3.2. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή κατόπιν βελτιστοποίησης των συνθηκών παγίδευσης για τα φαινολικά οξέα και τα φλαβονοειδή επιλέχθηκε ως καταλληλότερη φάση η ρητίνη GP.

Πίνακας 3.2. Τύποι πληρωτικού υλικού των μικροστηλών του συστήματος SPE.

Πληρωτικό υλικό	Περιγραφή	Μέγεθος σωματιδίου	Εμβαδόν επιφάνειας (m <sup>2</sup> /g)	Όγκος πόρου (mL/g)	Μέση διάμετρος πόρου (Å)	Περιεκτικότητα σε C (%)
CN	Silica-based cyanopropyl phase	8 μm, σφαιρικά	156	0,75	132	3,9
C2	Silica-based ethyl phase	8 μm, σφαιρικά	156	0,75	132	2,8
C8	Silica-based octyl phase	8 μm, σφαιρικά	177	0,66	128	6,5
C8 (EC)	Silica-based octyl phase, end-capped	8 μm, σφαιρικά	185	0,79	138	6,5
C18	Silica-based	8 μm,	182	0,77	140	10,6

	octadecyl phase, end-capped	σφαιρικά				
C18 (ED)	Silica-based octadecyl phase with high loading (high density), end-capped	7 μm, σφαιρικά	420-460	1,0-1,1	92-104	14,0-15,5
Ρητίνη GP	General purpose resin, modified divinylbenzene polymer	5-15 μm, σφαιρικά		0,37-0,49	100	
Ρητίνη SH	Strong hydrophobic resin, modified styrene-divinylbenzene polymer, highly porous	15-25 μm, σφαιρικά				

Το επόμενο βήμα είναι η προετοιμασία των μικροστηλών ώστε να μπορούν να κατακρατήσουν τις υπό ανάλυση ενώσεις με τη μέγιστη δυνατή απόδοση. Για το λόγο αυτό πλένονται αυτόματα με 1 mL ακετονιτριλίου με ταχύτητα ροής 1 mL/min και κατόπιν εξισορροπούνται με 1 mL ύδατος με ταχύτητα ροής 1 mL/min, πριν από κάθε χρήση (Σχήμα 3.15 α).



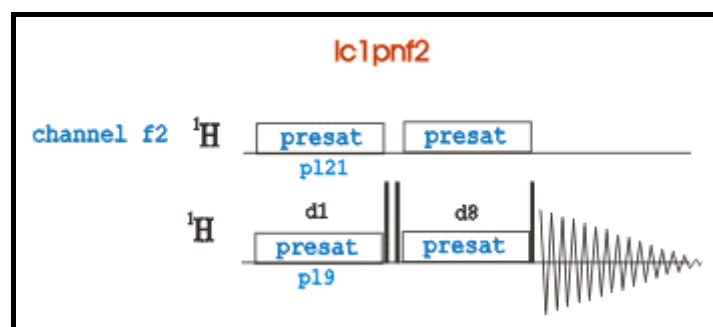
Σχήμα 3.15. Γραφική απεικόνιση της διαδικασίας (α) πλυσίματος και εξισορρόπησης των μικροστηλών πριν την χρήση τους, (β) χρωματογραφικού διαχωρισμού και παγίδευσης των ενώσεων στις μικροστήλες, (γ) ανάκτησης των ενώσεων από τις μικροστήλες και μεταφορά τους στο φασματογράφο NMR.

Στην συνέχεια πραγματοποιείται ο υγροχρωματογραφικός διαχωρισμός των συστατικών των εκχυλισμάτων όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 3.3 με τη μόνη διαφοροποίηση ότι ο μετά την στήλη έχουμε την συνεχή προσθήκη ύδατος με ταχύτητα ροής 1 ml/min (Σχήμα 3.15 β). Με το τέλος της παγίδευσης των ενώσεων και της απομάκρυνσης των πρωτονιωμένων διαλυτών με διαβίβαση αερίου αζώτου, ακολουθεί η ανάκτηση με κατάλληλους δευτεριωμένους διαλύτες. Για το σύστημα που χρησιμοποιήθηκε απαιτούνται 380  $\mu$ L δευτεριωμένου διαλύτη. Η ποσότητα είναι αυστηρά καθορισμένη και εξαρτάται από τον όγκο της κυψελίδας ανίχνευσης του υποδοχέα αλλά και από το μήκος του σωλήνα (tube) που μεταφέρει την υπό μελέτη ένωση στην κυψελίδα.

### 3.6.3 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

Για τη λήψη φασμάτων NMR μιας διάστασης και δυο διαστάσεων ομοπυρηνικά χρησιμοποιήθηκαν οι παλμικές ακολουθίες που περιγράφονται αναλυτικά στην παράγραφο 3.5. Επιπρόσθετα, χρησιμοποιήθηκε η παλμική ακολουθία της Bruker «lc1pnf2» για την ταυτόχρονη καταστολή των σημάτων του

νερού και του ακετονιτριλίου. Πρόκειται για μια ακολουθία τύπου NOESY από την οποία προκύπτει πρωτονιακό φάσμα μιας διάστασης με διπλή καταστολή των σημάτων συντονισμού των διαλυτών όπως φαίνεται και στο Σχήμα 3.16.



Σχήμα 3.16. Σχηματική απεικόνιση της παλμικής ακολουθίας lc1pnf2 για τη λήψη φάσματος  $^1\text{H}$  με διπλή καταστολή των σημάτων συντονισμού των διαλυτών

### 3.7 Εκτίμηση βιοδραστικότητας των εκχυλισμάτων

Εκτός από την μελέτη της σύστασης αντικειμενικός σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν και η εκτίμηση της πιθανής βιοδραστικότητας των εκχυλισμάτων αλλά και των συστατικών τους. Για αυτό τον λόγο πραγματοποιήθηκαν μια σειρά από δοκιμασίες που περιγράφονται αναλυτικά στη συνέχεια.

#### 3.7.1 Φωτομετρικός Προσδιορισμός ολικών φαινολικών των εκχυλισμάτων

Ο προσδιορισμός των ολικών φαινολικών συστατικών με την μέθοδο Folin-Ciocalteu βασίζεται στην οξείδωση των φαινολικών συστατικών σε αλκαλικό περιβάλλον με μίγμα φωσφοβολφραμικού και φωσφομολυβδαινικού οξέος. Αποτέλεσμα της αντίδρασης είναι ο σχηματισμός κυανών προϊόντων. Η ένταση του κυανού χρώματος με μέγιστο στα 725 nm είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των φαινολικών. Έτσι σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL φέρονται 0.2 ml δείγματος, 4.8 ml απεσταγμένου νερού, 0.5 ml αντιδραστήριου Folin-Ciocalteu και αφήνονται για 3 λεπτά. Στη συνέχεια φέρονται στην ίδια ογκομετρική φιάλη 1 mL κεκορεσμένου διαλύματος  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  και το μίγμα συμπληρώνεται με νερό έως όγκου 10 mL. Μετά από αναμονή 1 ώρας σε σκοτεινό χώρο μετράται η απορρόφηση στα 725 nm (Nenadis, *et al.*, 2007, Papoti and Tsimidou, 2009).

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών στα εκχυλίσματα *Sideritis syriaca* και *Teucrium polium* κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς με πρότυπο γαλλικό οξύ. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από 50 έως 400 mg/ kg και οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε φασματόμετρο UV/Vis Jenway 6505 (Essex, England).

### 3.7.2 Εκτίμηση αντιοξειδωτικής δράσης με τη δοκιμή της σταθερή ρίζα DPPH

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ικανότητα των αντιοξειδωτικών να δεσμεύουν την σταθερή ρίζα DPPH<sup>•</sup> και αποδίδεται στην ικανότητά τους να δίδουν το υδρογόνο του φαινολικού υδροξυλίου στην ελεύθερη ρίζα. Με την πρόσληψη του ατόμου υδρογόνου από την DPPH<sup>•</sup> η ρίζα αποχρωματίζεται και από τη διαφορά της απορρόφησης, που συνδέεται με το ποσοστό δέσμευσης της ρίζας εκτιμάται η αντιοξειδωτική ικανότητα (Choi, *et al.*, 2002, Goulas, *et al.*, 2009).

Η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε έχει ως εξής. Σε μια κυψελίδα φέρονται 2 mL εκχυλίσματος ή πρότυπης ένωσης και προστίθενται 1 mL δ/τος ρίζας 0.3mM DPPH<sup>•</sup> σε MeOH και αφήνονται να αντιδράσουν για 30 λεπτά. Στη συνέχεια μετράται η απορρόφηση στα 517 nm και εκφράζεται η % ικανότητα δέσμευσης της ρίζας με βάση την εξίσωση:

$$\% \text{ Αντιοξειδ. Ικανότητα} = 100 - [(Ab \text{ δείγματος} - Ab \text{ of τυφλού}) \times 100 / Ab \text{ μάρτυρα}]$$

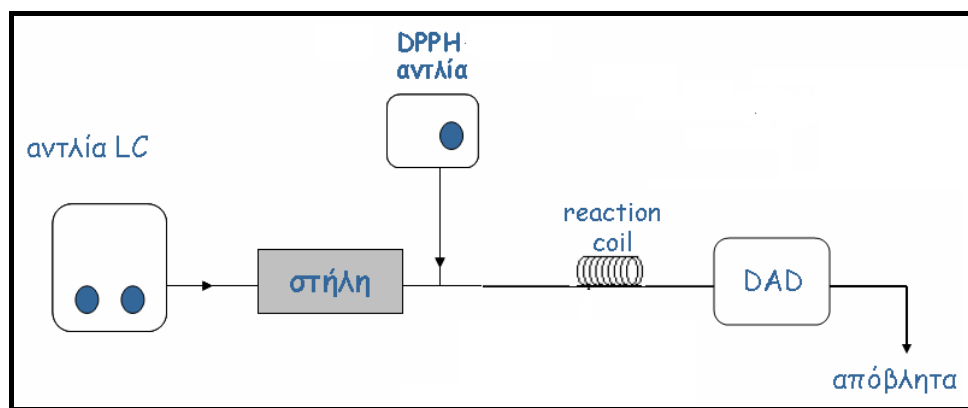
Για κάθε εκχύλισμα ή πρότυπη ένωση προκύπτει το EC<sub>50</sub> που αντιστοιχεί στην ποσότητα που προκαλεί το 50% της αντιοξειδωτικής δράσης. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε φασματόμετρο UV/Vis Jenway 6505 (Essex, England).

### 3.7.3 Αυτοματοποιημένη εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των συστατικών των εκχυλισμάτων

Με την παραπάνω κλασική μέθοδο που αναφέρθηκε στην προηγούμενη παράγραφο είναι δυνατή η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του εκχυλίσματος συνολικά και όχι των επιμέρους συστατικών τους. Με την προσθήκη μιας ισοκρατικής αντλίας και κατάλληλου ελικοειδή αντιδραστήρα είναι δυνατό να εκτιμηθεί ποιοτικά η αντιοξειδωτική ικανότητα των επιμέρους συστατικών του



εκχυλίσματος. Η οργανολογία για τη δοκιμή αυτή εύκολα μπορεί να προκύψει αν στο χρωματογραφικό σύστημα, που περιγράφηκε στην παράγραφο 3.3, προστεθεί μια ισοκρατική αντλία που εισάγει μετά τη χρωματογραφική στήλη διάλυμα DPPH ( $5 \cdot 10^{-5}$  mM) με σταθερή ταχύτητα ροής (0.2 mL/min), (Σχήμα 3.17). Το μήκος του ελικοειδή αντιδραστήρα που χρησιμοποιήθηκε ήταν 15 μέτρα για να υπάρχει ο απαραίτητος χρόνος για την πραγματοποίηση της αντίδρασης και η εσωτερική του διάμετρος δεν ξεπερνούσε τα 0.30 mm για να αποφευχθεί η διεύρυνση των κορυφών λόγω φαινομένων διάχυσης (Koleva, *et al.*, 2000). Ο ανιχνευτής UV-Vis καταγράφει το λαμβανόμενο σήμα στα 517 nm και το χρωματογράφημα που προκύπτει εμφανίζει αρνητικές κορυφές εξαιτίας της μείωσης της απορρόφησης που προκαλεί το κάθε συστατικό που εκλύεται από την στήλη.



Σχήμα 3.17. Γραφική απεικόνιση της οργανολογικής διάταξης που χρησιμοποιήθηκε για το on-line DPPH.

## 4. Ανάπτυξη μεθοδολογίας συνδυαστικής τεχνικής LC-SPE-NMR: Προσδιορισμός βέλτιστων συνθηκών ανάλυσης φυτοχημικών

### 4.1 Εισαγωγή

Η χρήση συνδυαστικών τεχνικών αποκτά ολοένα και μεγαλύτερο ενδιαφέρον λόγω της ευρύτατης εφαρμογής τους στην ανάλυση βιολογικών, περιβαλλοντικών, φαρμακευτικών και φυτικών δειγμάτων. Αναμφίβολα, η συνδυαστική τεχνική LC-NMR είναι ιδιαίτερα σημαντική, διότι συνδυάζει τα πλεονεκτήματα της διαχωριστικής τεχνικής LC και της σημαντικής φασματοσκοπικής τεχνικής NMR. Έτσι, η τεχνική LC-NMR επιτρέπει το διαχωρισμό και τη γρήγορη ταυτοποίηση γνωστών ενώσεων και κυρίως το χαρακτηρισμό νέων, δεδομένου ότι η φασματοσκοπία NMR παρέχει όλες τις απαραίτητες πληροφορίες για την αποσαφήνιση της δομής μιας ένωσης (Exarchou, *et al.*, 2005, Jaroszewski, 2005a, Wolfender, *et al.*, 2006). Η χρήση όμως της τεχνικής LC-NMR παρουσιάζει σημαντικές δυσκολίες λόγω της χρήσης πρωτονιωμένων διαλυτών στην υγρή χρωματογραφία και της περιορισμένης ευαισθησίας της φασματοσκοπίας NMR. Παρόλα αυτά, η δυνατότητα κατασκευής ισχυρότερων μαγνητικών πεδίων και η ανάπτυξη και βελτιστοποίηση των υποδοχέων συνεχούς ροής (flow probes) με μικρότερους ενεργούς όγκους σε συνδυασμό με την ανάπτυξη της κρυογενικής τεχνολογίας, επιτρέπουν πλέον την ανίχνευση ενώσεων σε συγκεντρώσεις μικρότερες του μικρογραμμαρίου (για ενώσεις που το μοριακό τους βάρος δεν υπερβαίνει τα 1000 g/mol) (Kovacs, *et al.*, 2005, Webb, 2005, Hentshel, *et al.*, 2005, Lewis, *et al.*, 2005).

Αξίζει να αναφερθεί, ότι η εισαγωγή της μονάδας Εκχύλισης Στερεής Φάσης (Solid Phase Extraction, SPE) οδήγησε στην πιο επιτυχημένη έως σήμερα σύζευξη υγρής χρωματογραφίας και φασματοσκοπίας NMR, καθώς επιτρέπει τη χρήση συμβατικών πρωτονιωμένων διαλυτών στην υγρή χρωματογραφία και ταυτόχρονα την αύξηση της συγκέντρωσης των υπό μελέτη ενώσεων. Ως αποτέλεσμα επέρχεται σημαντική περαιτέρω αύξηση της ευαισθησίας της τεχνικής LC-NMR (Exarchou, *et al.*, 2003, Lambert, *et al.*, 2005, Seger, *et al.*, 2005, Clarkson, *et al.*, 2006, Exarchou,

*et al.*, 2006, Tatsis, *et al.*, 2007, Sorensen, *et al.*, 2007). Η συνδυαστική τεχνική LC-SPE-NMR παρουσιάζει ένα σημαντικό μειονέκτημα που πρέπει να ληφθεί υπόψη, καθώς στην πραγματικότητα εισάγεται ένα ακόμη στάδιο χρωματογραφίας με τις δυσκολίες και τα προβλήματα που συνεπάγεται μια τέτοια διαδικασία. Συγκεκριμένα, η διαδικασία παγίδευσης στις μικροστήλες του συστήματος SPE είναι ανάλογη με τη διαδικασία εκχύλισης στερεής φάσης σε ένα συμβατικό σύστημα SPE, που χρησιμοποιείται είτε για τον καθαρισμό ενός δείγματος είτε για την αύξηση της συγκέντρωσης μιας ουσίας. Με άλλα λόγια, η διαδικασία της παγίδευσης πραγματοποιείται κάτω από συνήθεις συνθήκες χρωματογραφίας και η αποτελεσματικότητά της επηρεάζεται από ένα σύνολο παραμέτρων που είναι χρήσιμο να προσδιορίζονται ή να ελέγχονται κάθε φορά. Οι παράμετροι αυτοί μεταξύ άλλων σχετίζονται με το είδος της στατικής φάσης των μικροστηλών, τη σύσταση και τον όγκο της κινητής φάσης και τη συγκέντρωση των ενώσεων, που μελετώνται (Miliauskas, *et al.*, 2006, Clarkson, *et al.*, 2007). Αξίζει να αναφερθεί, ότι ο αριθμός των πληρωτικών υλικών και των διαλυτών που έχουν χρησιμοποιηθεί στην τεχνική LC-SPE-NMR είναι αρκετά περιορισμένος και έως σήμερα έχουν βρει εφαρμογή μόνο μηχανισμοί κατακράτησης αντίστροφης φάσης.

Παρά το γεγονός ότι το σύστημα SPE έχει καθοριστικό ρόλο για την επιτυχή σύζευξη του LC-SPE-NMR υπάρχει ένας σημαντικά περιορισμένος αριθμός μελετών στις οποίες ελέγχονται οι παράμετροι παγίδευσης και ανάκτησης των ενώσεων. Συγκεκριμένα, στη διεθνή βιβλιογραφία μόνο δυο εργασίες αναφέρονται στη μελέτη των παραμέτρων αυτών και ένας μικρός αριθμός εργασιών ασχολείται με τη μελέτη της επίδραση μόνο μίας εκ των παραμέτρων. Στις περισσότερες περιπτώσεις ελέγχεται η γραμμικότητα της διαδικασίας της πολλαπλής παγίδευσης (Sandvoss, *et al.*, 2005, Lambert, *et al.*, 2005, Miliauskas, *et al.*, 2006, Clarkson, *et al.*, 2006a), ενώ σε δυο μόνο περιπτώσεις συγκρίνεται η επίδραση του δευτεριωμένου διαλύτη ανάκτησης (Seger, *et al.*, 2005, Clarkson, *et al.*, 2006a). Τέλος, υπάρχει μικρός αριθμός εργασιών που ασχολείται με την επίδραση της στατικής φάσης των μικροστηλών (Seger, *et al.*, 2005, Lambert, *et al.*, 2005, Miliauskas, *et al.*, 2006, Lee, *et al.*, 2007).

Είναι γνωστό ότι η ικανότητα παγίδευσης και ανάκτησης των ενώσεων από το πληρωτικό υλικό των μικροστηλών δεν είναι εύκολο να προβλεφθεί (Poole, *et al.*, 2000). Έτσι, στην παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε η μελέτη των παραμέτρων που σχετίζονται με την παγίδευση και ανάκτηση των ενώσεων για μια

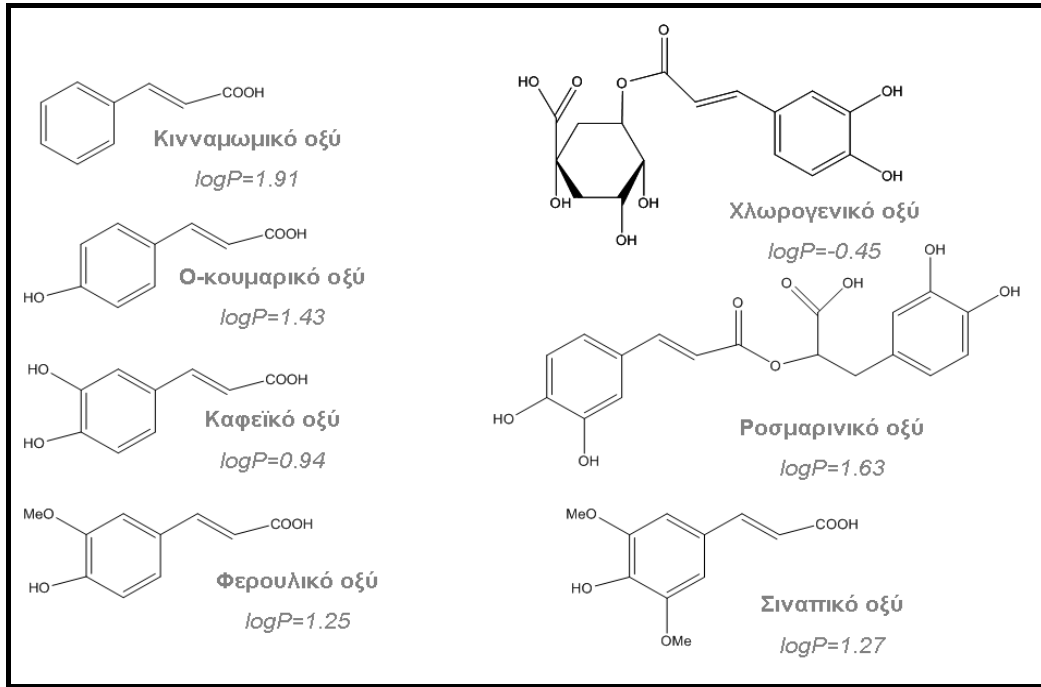
σειρά πρότυπων ενώσεων που συνήθως απαντώνται στα εκχυλίσματα φυτών, με στόχο τη εξαγωγή συμπερασμάτων για τις βέλτιστες συνθήκες ανάλυσής τους. Ως πρότυπες ενώσεις χρησιμοποιήθηκαν φλαβονοειδή και φαινολικά οξέα που απαντώνται στα φυτά (κυρίως της οικογένειας *Lamiaceae*) και τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την παραπάνω διαδικασία λήφθηκαν υπόψη στη μελέτη της σύστασης των φυτικών εκχυλισμάτων *Sideritis syriaca* και *Teucrium Polium* με τη συνδυαστική τεχνική LC-SPE-NMR.

Προκειμένου να ελεγχθεί η επίδραση των παραμέτρων που αναφέρονται πιο πάνω στη συνολική απόδοση του συστήματος LC-SPE-NMR, τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως συνάρτηση του λόγου του σήματος προς το θόρυβο (S/N). Για τις ενώσεις που μελετήθηκαν καθορίστηκαν αυστηρά το σήμα συντονισμού που χρησιμοποιείται ως αναφορά και η περιοχή στην οποία προσδιορίζεται ο θόρυβος 9-9.5 ppm. Στην περίπτωση των φαινολικών οξέων χρησιμοποιήθηκε το σήμα συντονισμού H<sub>2a</sub> στα 6.2 ppm περίπου και στα φλαβονοειδή το σήμα συντονισμού του πρωτονίου H<sub>3</sub> του δακτυλίου C στα ~6.5 ppm. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.

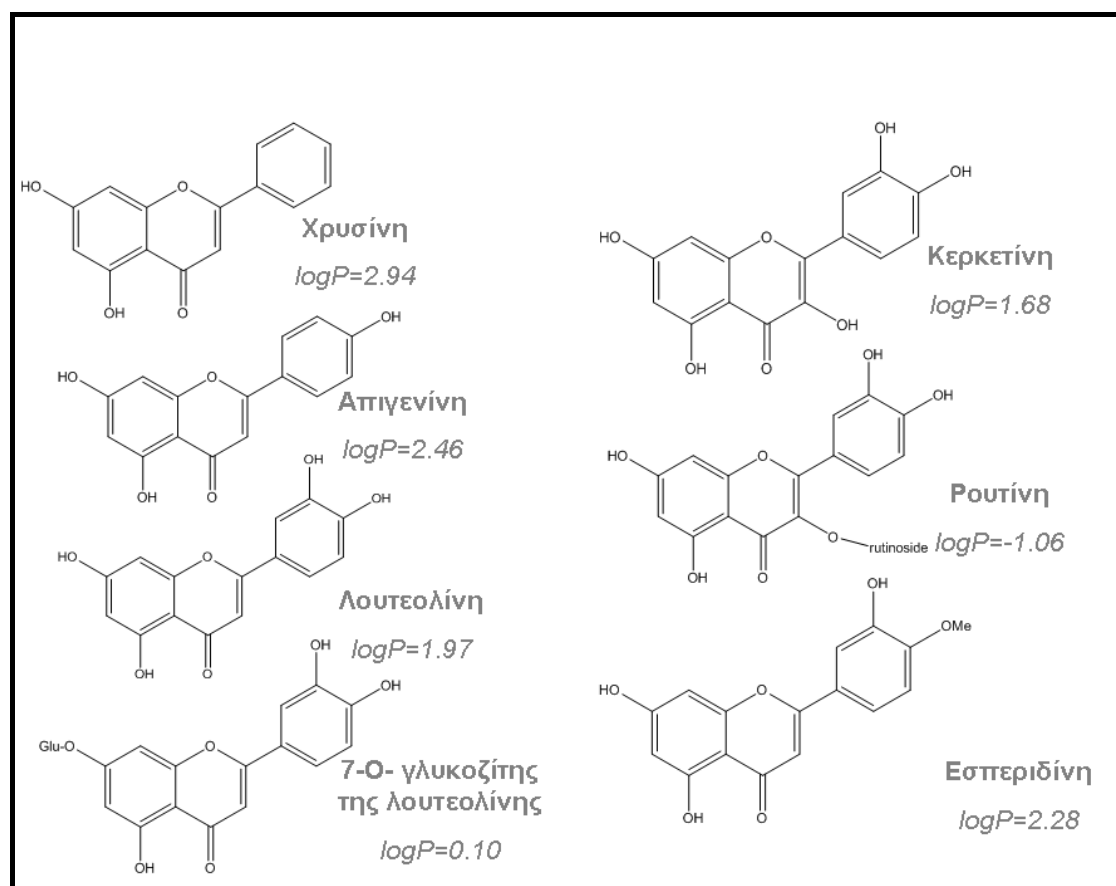
#### 4.2 Επιλογή των ενώσεων

Με βάση την υπάρχουσα βιβλιογραφία είναι σαφές, ότι η διαδικασία παγίδευσης και ανάκτησης στο στάδιο SPE της τεχνικής LC-SPE-NMR εξαρτάται άμεσα από τις φυσικές και χημικές ιδιότητες των προς ανάλυση ενώσεων. Στην προσπάθεια μελέτης των βέλτιστων συνθηκών ανάλυσης επιλέχθηκαν φυτοχημικές ενώσεις που ανήκουν στην οικογένεια των φλαβονοειδών και των φαινολικών οξέων. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν επτά φλαβονοειδή και επτά φαινολικά οξέα που διαφέρουν σημαντικά ως προς τη μοριακή μάζα και την πολικότητά τους. Η πολικότητα τους εκφράστηκε με το λόγο κατανομής τους σε διφασικό σύστημα οκτανόλης/ νερού και υπολογίστηκε ως  $\log P$  με χρήση κατάλληλου λογισμικού miLogP2.2 (Molinspiration Cheminformatics). Η τιμή του όρου  $\log P$  αντιστοιχεί στο λόγο των συγκεντρώσεων μιας ένωσης που βρίσκεται κατανεμημένη σε σύστημα οκτανόλης/ νερού, σε θερμοκρασία 25 °C ( $\log P = \log([X]_{\text{oct}}/[X]_{\text{aq}})$ ). Στην πραγματικότητα, ο όρος  $\log P$  χρησιμοποιείται για να περιγράψει πόσο υδρόφοβη ή υδρόφιλη είναι μια ένωση. Οι δομές των πρότυπων ενώσεων που χρησιμοποιήθηκαν απεικονίζονται στα Σχήματα 4.1 και 4.2 και επιλέχθηκαν με τέτοιο τρόπο ώστε να

είναι δυνατή η εκτίμηση της επίδρασης συγκεκριμένων δομικών χαρακτηριστικών (όπως μιας υδροξυλ-ομάδας ή μιας μεθοξυ-ομάδας ή ενός μορίου σακχάρου) στη διαδικασία της παγίδευσής τους στις μικροστήλες και ανάκτησης από αυτές.



Σχήμα 4.1. Οι δομές των φαινολικών οξέων που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη της μεθοδολογίας LC-SPE-NMR.



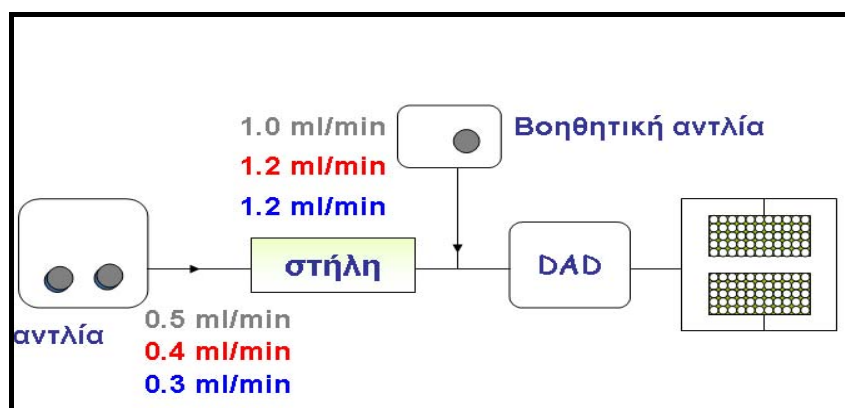
Σχήμα 4.2. Οι δομές των φλαβονοειδών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη της μεθοδολογίας LC-SPE-NMR.

### 4.3 Η επίδραση του οργανικού διαλύτη

Η διαδικασία της παγίδευσης των υπό μελέτη ενώσεων στις μικροστήλες ακολουθεί τους κανόνες που διέπουν την υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης. Η ικανότητα των μικροστηλών να κατακρατούν τις ενώσεις εξαρτάται σημαντικά από τη σύσταση της κινητής φάσης. Γενικά, η αύξηση της παρουσίας του οργανικού διαλύτη προκαλεί σημαντική μείωση του ποσοστού κατακράτησης των ενώσεων από το πληρωτικό υλικό των μικροστηλών. Στα πειράματα LC-SPE-NMR ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος οργανικός διαλύτης είναι το ακετονιτρίλιο και το % ποσοστό του κατά την παγίδευση καθορίζεται: α) από το σύστημα έκλουσης στο στάδιο του διαχωρισμού του μίγματος με HPLC και β) από την ποσότητα νερού που εισάγεται από την βοηθητική αντλία. Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση του οργανικού διαλύτη στην παγίδευση των επιλεγμένων φυτοχημικών, ετοιμάζονται διαλύματα κατάλληλης συγκέντρωσης και εισάγονται στη στήλη χρωματογραφίας. Μετά την έκλουση τους από τη στήλη μεταβάλλεται το % ποσοστό του ακετονιτρίλιου,

λαμβάνει χώρα η παγίδευση και ακολουθεί ξήρανση, ανάκτηση, μεταφορά των ενώσεων στον υποδοχέα NMR και καταγραφή του φάσματος NMR-<sup>1</sup>H. Η μεταβολή του % ποσοστού του ακετονιτριλίου γίνεται μεταβάλλοντας το λόγο των ταχυτήτων ροής των δυο αντλιών της HPLC και της βοηθητικής αντλίας του συστήματος LC-SPE-NMR.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η ταχύτητα ροής της βοηθητικής αντλίας δεν είναι δυνατόν να αυξηθεί απεριόριστα καθώς δημιουργούνται σοβαρά προβλήματα στη λειτουργία του συστήματος λόγω αύξησης της πίεσης του (back pressure) (Xu and Alexander, 2005, Miliuskas, *et al.*, 2006). Λαμβάνοντας υπόψη ότι στο σύστημα LC-SPE-NMR το άθροισμα των ταχυτήτων ροής δεν μπορεί να υπερβαίνει τα 1.8 mL/min, οι ταχύτητες ροής των δυο αντλιών επιλέχθηκαν με τέτοιο τρόπο ώστε να προκύψουν λόγοι των ταχυτήτων ροής 1:2, 1:3 και 1:4 με αποτέλεσμα να διαφοροποιείται η εκατοστιαία αναλογία του ακετονιτριλίου, όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.3. Για την μελέτη της επίδρασης της παρουσίας του ακετονιτριλίου χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα συγκέντρωσης 7 mM των ενώσεων του καφεϊκού οξέος, χλωρογενικού οξέος, λουτεολίνης και 7-Ο-γλυκοζίτη της λουτεολίνης. Οι ενώσεις αυτές παγιδεύτηκαν σε μικροστήλες με πληρωτικό υλικό τύπου GP και ανακτήθηκαν με 380  $\mu$ L δευτεριωμένου ακετονιτριλίου μετά την ξήρανση των μικροστηλών.



Σχήμα 4.3. Χρήση διαφορετικών ταχυτήτων ροής στην τεχνική LC-SPE-NMR.

Στον Πίνακα 4.1, που ακολουθεί αναγράφεται το % ποσοστό του ακετονιτριλίου τη στιγμή της παγίδευσης των επιμέρους ενώσεων στις μικροστήλες και το αποτέλεσμα της μείωσης της παρουσίας του οργανικού διαλύτη εκφρασμένο σε όρους S/N.

Πίνακας 4.1. Το % ποσοστό του ακετονιτριλίου τη στιγμή της παγίδευσης των επιμέρους ενώσεων στις μικροστήλες και το αποτέλεσμα της μείωσης της παρουσίας του οργανικού διαλύτη εκφρασμένο σε όρους S/N.

	0,5/1,0 (ml/min)		0,4/1,2 (ml/min)		0,3/1,2 (ml/min)	
	% ACN	S/N	% ACN	S/N	% ACN	S/N
<b>Καφεϊκό οξύ</b>	10,0	63	7,5	68	6,0	72
<b>Χλωρογενικό οξύ</b>	10,8	74	10,0	74	9,6	76
<b>Λουτεολίνη</b>	16,7	148	15,8	155	10,0	186
<b>7-O- γλυκοζίτης της λουτεολίνης</b>	14,7	22	13,7	23	12,0	25

Στον Πίνακα 4.1 η μείωση του % ποσοστού του ακετονιτριλίου είναι αποτελεσματική για τις περισσότερο υδρόφοβες ενώσεις ενώ για τις πολικές ενώσεις όπως ο 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης δεν επιφέρει τα επιθυμητά αποτελέσματα. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής επιβεβαιώνουν την αρχική υπόθεση ότι η αύξηση του % ποσοστού του ακετονιτριλίου τη στιγμή της παγίδευσης οδηγεί σε μειωμένη κατακράτηση των ενώσεων στις μικροστήλες. Οι πολικές ενώσεις φαίνεται να επηρεάζονται περισσότερο από την παρουσία του οργανικού διαλύτη καθώς οι ενώσεις που παγιδεύονται αλληλεπιδρούν ασθενώς με το πληρωτικό υλικό των μικροστηλών (Clarkson, *et al.*, 2007). Η περιορισμένη μεταβολή του λόγου των ταχυτήτων ροής έχει ως αποτελέσματα την περιορισμένη διακύμανση του ποσοστού του ακετονιτριλίου. Για αυτό το λόγο δεν παρατηρείται σημαντική αύξηση της κατακράτησης των πολικών ενώσεων που μελετήθηκαν. Τα ευρήματα αυτά γίνονται πιο ενδιαφέροντα στις λιγότερο πολικές ενώσεις καθώς η μείωση της παρουσίας του ακετονιτριλίου από 16.7% σε 10% κατά την παγίδευση της λουτεολίνης προκαλεί αύξηση του λόγου S/N κατά 25 % περίπου. Αντίστοιχα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και κατά την παγίδευση του καφεϊκού οξέος καθώς η μείωση της παρουσίας του ακετονιτριλίου κατά 4% οδηγεί σε αύξηση του λόγου S/N κατά 14 % περίπου.

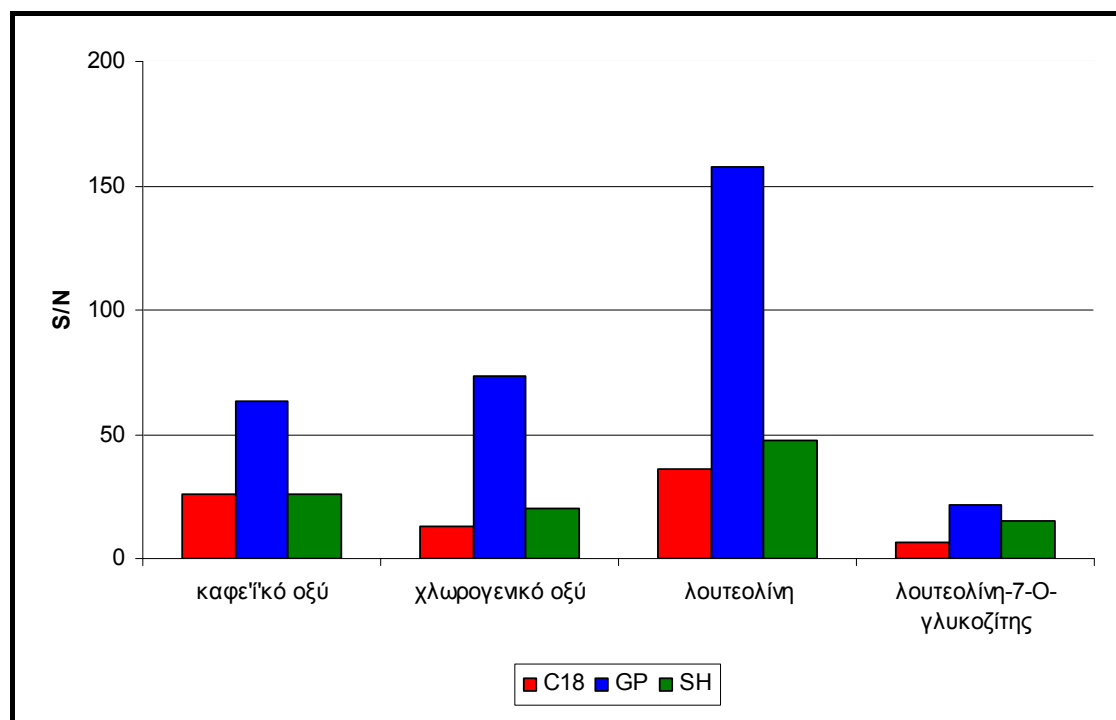
Συνοψίζοντας, με δεδομένο ότι ο λόγος των ταχυτήτων ροής των δυο αντλιών δεν μπορεί να αυξηθεί σημαντικά στα πειράματα LC-SPE-NMR, το % ποσοστό του ακετονιτριλίου τη στιγμή της παγίδευσης δεν είναι δυνατόν να διαφοροποιηθεί αρκετά. Για το λόγο αυτό, η αύξηση του λόγου των ταχυτήτων ροής των δυο αντλιών



δεν μπορεί να βελτιώσει ικανοποιητικά την κατακράτηση των ενώσεων και να αποτελέσει καθοριστικό παράγοντα. Με δεδομένο ότι στα εκχυλίσματα φυτών τα φαινολικά οξέα και τα φλαβονοειδή απαντώνται συνήθως με τη μορφή γλυκοζιτών τους, επιλέχθηκε η αναλογία 1:2 των ταχυτήτων ροής καθώς οι ροές 1:3 και 1:4 δεν θα επέφεραν σημαντική βελτίωση στην κατακράτηση για τις περισσότερες ενώσεις.

#### **4.4 Η επίδραση της στατικής φάσης των μικροστηλών**

Η επιλογή της στατικής φάσης των μικροστηλών στην παγίδευση των ενώσεων έχει διερευνηθεί περισσότερο από κάθε άλλη παράμετρο (Seger, *et al.*, 2005, Lambert, *et al.*, 2005, Miliauskas, *et al.*, 2006, Clarkson, *et al.*, 2007, Lee, *et al.*, 2007). Ειδικότερα, στις μελέτες των Miliauskas *et al.*, 2006, και Clarkson *et al.*, 2007 διερευνήθηκε η σπουδαιότητα της ορθής επιλογής της στατικής φάσης των μικροστηλών στη ανάλυση φυσικών προϊόντων. Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία προτείνονται ως πληρωτικό υλικό των μικροστηλών για την μελέτη φυσικών προϊόντων οι τροποποιημένες ρητίνες. Εξαιρετική αποτελεί η μελέτη αλκαλοειδών και γλυκοζιτών του ιριδοειδών, που προτείνεται η χρήση της πυριτίας (silica C<sub>18</sub>) (Seger, *et al.*, 2005, Lee, *et al.*, 2007). Στην παρούσα διατριβή εκτιμήθηκε η ικανότητα κατακράτησης καφεϊκού οξέος, χλωρογενικού οξέος, λουτεολίνης και 7-Ο-γλυκοζίτη της λουτεολίνης σε τρία διαφορετικά υλικά πλήρωσης. Μετά την παγίδευση των ενώσεων και την ξήρανση των μικροστηλών ακολούθησε η ανάκτηση τους με 380  $\mu$ L δευτεριωμένου ακετονιτριλίου, η μεταφορά των ενώσεων στον υποδοχέα NMR και τέλος η καταγραφή του φάσματος <sup>1</sup>H-NMR. Τα πληρωτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η silica C<sub>18</sub>, το πολυμερές διβινυλοβενζολίου GP και το συμπολυμερές στυρολίου/διβινυλοβενζολίου SH. Στο Σχήμα 4.4 παρουσιάζεται διαγραμματικά η επίδραση του πληρωτικού υλικού στο S/N του φάσματος NMR-<sup>1</sup>H των ενώσεων που αναλύθηκαν. Παρατηρείται, ότι η χρήση της στατικής φάσης GP των μικροστηλών πλεονεκτεί έναντι των άλλων δύο, παρέχοντας υψηλότερες τιμές S/N. Το αποτέλεσμα αυτό βρίσκεται σε συμφωνία με προηγούμενη μελέτη που αναφέρει ισχυρότερη κατακράτηση των φαινολικών οξέων στις ρητίνες (Clarkson, *et al.*, 2007).



*Σχήμα 4.4. Εκτίμηση της ικανότητας κατακράτησης τεσσάρων προτύπων ενώσεων σε τρία διαφορετικά υλικά πλήρωσης των μικροστηλών.*

Η μειωμένη κατακράτηση των προτύπων ενώσεων στη silica C<sub>18</sub> δεν προκαλεί ιδιαίτερη έκπληξη, καθώς η κατακράτηση των ενώσεων αυτών σε αυτό το υλικό οφείλεται κυρίως στις ασθενείς ελκτικές δυνάμεις μεταξύ των δεσμών C-H των πρότυπων ενώσεων και των αντίστοιχων δεσμών των υδρόφοβων ομάδων της σιλανοποιημένης επιφάνειας της πυριτίας (δυνάμεις Van der Waals ή δυνάμεις διασποράς). Αντίθετα, θα ανέμενε κανείς ισχυρότερη κατακράτηση των ενώσεων στη στατική φάση τύπου SH λόγω ισχυρών ηλεκτροστατικών δυνάμεων. Η μη ικανοποιητική κατακράτηση μπορεί να αποδοθεί στο μεγάλο μέγεθος των σωματιδίων του πληρωτικού υλικού SH, που κυμαίνεται από 15 έως 25 μm. Τέλος, αξίζει να αναφερθεί η μειωμένη κατακράτηση του 7-O-γλυκοζίτη της λουτεολίνης σε όλα τα πληρωτικά υλικά των μικροστηλών που δοκιμάστηκαν. Μια πιθανή εξήγηση είναι η περιορισμένη διαλυτότητα του γλυκοζίτη στο ακετονιτρίλιο που επηρεάζει την ανάκτηση του γλυκοζίτη από τις μικροστήλες.

Στο σημείο αυτό τονίζεται πως η τελική μέτρηση του S/N αφορά την απόδοση των διεργασιών της παγίδευσης και της ανάκτησης συνολικά. Έτσι η κατακράτηση των ενώσεων στις στατικές φάσεις που χρησιμοποιήθηκαν είναι ίσως ισχυρότερη αλλά η ποσοτική ανάκτηση των ενώσεων θεωρείται περιορισμένη. Αντίστοιχες

μελέτες των παραμέτρων που επηρεάζουν την παγίδευση των προς ανάλυση συστατικών καταφεύγουν σε οργανολογικές τροποποιήσεις με εισαγωγή δεύτερου ανιχνευτή UV μετά το στάδιο της παγίδευσης. Στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκε η έκφραση των αποτελεσμάτων σε όρους S/N προκειμένου η βελτιστοποίηση να λάβει χώρα κάτω από τις συνθήκες ανάλυσης των πραγματικών δειγμάτων. Για παράδειγμα, η πληροφορία ότι σε ένα πληρωτικό υλικό παγιδεύεται αποτελεσματικά μία ένωση που μπορεί όμως να μην ανακτάται εύκολα από αυτό, μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένη επιλογή πληρωτικού υλικού. Για το λόγο αυτό επιλέχθηκε να εκφραστούν τα τελικά αποτελέσματα σε όρους S/N, ώστε να ελεγχθεί η απόδοση της τεχνικής LC-SPE-NMR συνολικά.

#### **4.5 Επίδραση του χρόνου ξήρανσης των μικροστηλών**

Η διαδικασία της ξήρανσης των μικροστηλών πραγματοποιείται με διαβίβαση αερίου αζώτου και έχει ως στόχο την απομάκρυνση των πρωτονιωμένων διαλυτών που χρησιμοποιούνται κατά το χρωματογραφικό διαχωρισμό. Με τον τρόπο αυτό αποφεύγεται η χρήση δευτεριωμένων διαλυτών στο στάδιο της χρωματογραφίας και γίνεται ευκολότερη η καταγραφή των φασμάτων NMR. Αναλυτικά, στην περίπτωση που τα σήματα συντονισμού των διαλυτών είναι έντονα, απαιτείται η χρήση ειδικών παλμικών ακολουθιών που τα καταστέλλουν και αναδεικνύουν τις κορυφές απορρόφησης των υπό μελέτη ενώσεων. Η χρήση τέτοιων παλμικών ακολουθιών που καταστέλλουν τα σήματα συντονισμού του νερού και του ακετονιτριλίου εμφανίζουν το μειονέκτημα ότι μπορεί να καταστείλουν κι άλλα σήματα συντονισμού που βοηθούν σημαντικά στην αποσαφήνιση μιας δομής. Επιπλέον, με τη χρήση αυτών των μεθοδολογιών μειώνεται η ευαισθησία των λαμβανόμενων φασμάτων. Το φαινόμενο αυτό παρατηρήθηκε κατά τη λήψη φασμάτων NMR μιας διάστασης με χρήση της παλμικής ακολουθίας «*lc1pnf2*» για την ταυτόχρονη καταστολή των σημάτων νερού και ακετονιτριλίου. Παρατηρήθηκε ότι ο λόγος S/N είναι αισθητά μικρότερος στα φάσματα που λαμβάνονται με τη χρήση της παλμικής ακολουθίας «*lc1pnf2*» έναντι εκείνων που λαμβάνονται με την παλμική ακολουθία «*zg*». Επομένως, η αποτελεσματική απομάκρυνση των πρωτονιωμένων διαλυτών από τις μικροστήλες θεωρείται σημαντική.

Για τον καθορισμό του βέλτιστου χρόνου ξήρανσης των μικροστηλών η πρότυπη ένωση καφεϊκού οξέος παγιδεύτηκε σε πέντε μικροστήλες στατικής φάσης

GP, σε καθμία από αυτές διαβιβάστηκε αέριο άζωτο για χρονικό διάστημα 5, 10, 20, 30 και 60 λεπτών και ακολούθησε ανάκτηση με 380  $\mu\text{L}$  δευτεριωμένου ακετονιτριλίου, μεταφορά της ένωσης στον υποδοχέα NMR και καταγραφή του φάσματος NMR- $^1\text{H}$ .

**Πίνακας 4.2. Μελέτη της επίδρασης του χρόνου ξήρανσης των μικροστηλών.**

	Χρόνος Ξήρανσης μικροστηλών				
	5 min	10 min	20 min	30 min	60 min
S/N Καφεϊκού οξέος	19	23	44	64	71

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η διαβίβαση αερίου αζώτου διάρκειας έως και 10 λεπτών είναι αναποτελεσματικός καθώς και ο λόγος σήματος-θορύβου είναι αρκετά μειωμένος και η κορυφή του νερού στο πρωτονιακό φάσμα είναι εξαιρετικά έντονη. Αύξηση του χρόνου ξήρανσης στα 30 λεπτά οδηγεί σε αύξηση του λόγου σήματος-θορύβου ενώ περαιτέρω διαβίβαση αερίου αζώτου δεν συνεπάγεται αντίστοιχη αύξηση του λόγου S/N, γεγονός που υποδηλώνει ότι η ξήρανση για 30 λεπτά είναι αρκετή για να απομακρυνθούν οι πρωτονιωμένοι διαλύτες.

#### **4.6 Η επίδραση του δευτεριωμένου διαλύτη ανάκτησης**

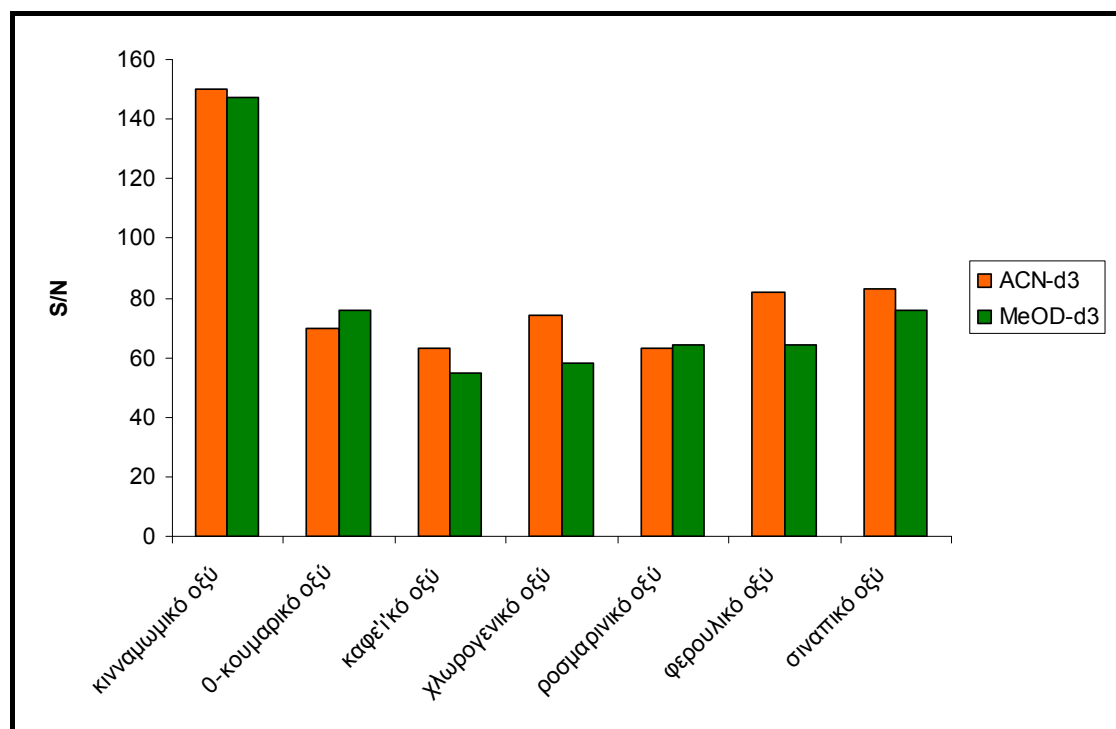
Από τα παραπάνω είναι φανερό ότι η ισχυρή κατακράτηση των ενώσεων στις μικροστήλες είναι εξίσου σημαντική με την αποτελεσματική ανάκτησή τους από αυτές με την χρήση κατάλληλου δευτεριωμένου διαλύτη. Παρόλα αυτά, δεν έχει αξιολογηθεί έως σήμερα η σπουδαιότητα της επιλογής του δευτεριωμένου διαλύτη στην ποσοτική ανάκτηση των παγιδευμένων ενώσεων. Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν μόνο δυο μελέτες που αναλύουν την επίδραση αυτής της παραμέτρου σε έναν αρκετά περιορισμένο, όμως αριθμό ενώσεων. Πιο αναλυτικά, στη πρώτη μελέτη συγκρίνεται η ικανότητα ανάκτησης τεσσάρων γλυκοζιτών ιριδοειδών από μικροστήλες με υλικό πλήρωσης GP, με χρήση  $\text{ACN-}d_3$  και  $\text{MeOH-}d_4$ , με το δευτεριωμένο ακετονιτρίλιο να είναι περισσότερο αποτελεσματικό (Sege, *et al.*, 2005). Αντίθετα, στην εργασία των Clarkson *et al.*, 2006b, που μελετάται η ικανότητα ανάκτησης του ακτεοζίτη και ενός διτερπενίου από μικροστήλες με

πληρωτικό υλικό GP, η χρήση της MeOH- $d_4$  ως διαλύτη ανάκτησης πλεονεκτεί έναντι εκείνης του ACN- $d_3$  και CDCl<sub>3</sub>.

Για την πληρέστερη μελέτη της επίδρασης του δευτεριωμένου διαλύτη στην ανάκτηση των φυτοχημικών από τις μικροστήλες, χρησιμοποιήθηκαν επτά φαινολικά οξέα και επτά φλαβονοειδή, που παγιδεύτηκαν σε μικροστήλες τύπου GP, και μετά την ξήρανση τους ανακτήθηκαν από δυο δευτεριωμένους διαλύτες το ACN- $d_3$  και την MeOD- $d_3$ . Όπως φαίνεται στον Πίνακα 4.2 και στο Σχήμα 4.5 η χρήση δευτεριωμένου ακετονιτριλίου πλεονεκτεί έναντι της δευτεριωμένης μεθανόλης στη μελέτη φαινολικών οξέων με την συνδυαστική τεχνική LC-SPE-NMR.

*Πίνακας 4.3. Συγκριτική μελέτη της επίδρασης του δευτεριωμένου διαλύτη ανάκτησης των φαινολικών οξέων.*

	M.B	logP	S/N			S/N		
			ACN- $d_3$			MeOD- $d_3$		
Ένωση			1 <sup>η</sup>	2 <sup>η</sup>	M.O	1 <sup>η</sup>	2 <sup>η</sup>	M.O
Κινναμωμικό οξύ	148	1,91	154	146	150	133	161	147
ο-Κουμαρικό οξύ	164	1,43	73	67	70	77	75	76
Καφεϊκό οξύ	180	0,94	64	62	63	47	63	55
Χλωρογενικό οξύ	354	-0,45	75	73	74	56	60	58
Ροσμαρινικό οξύ	360	1,63	56	70	63	61	67	64
Φερουλικό οξύ	194	1,25	83	81	82	70	58	64
Σιναπικό οξύ	224	1,27	83	83	83	73	79	76

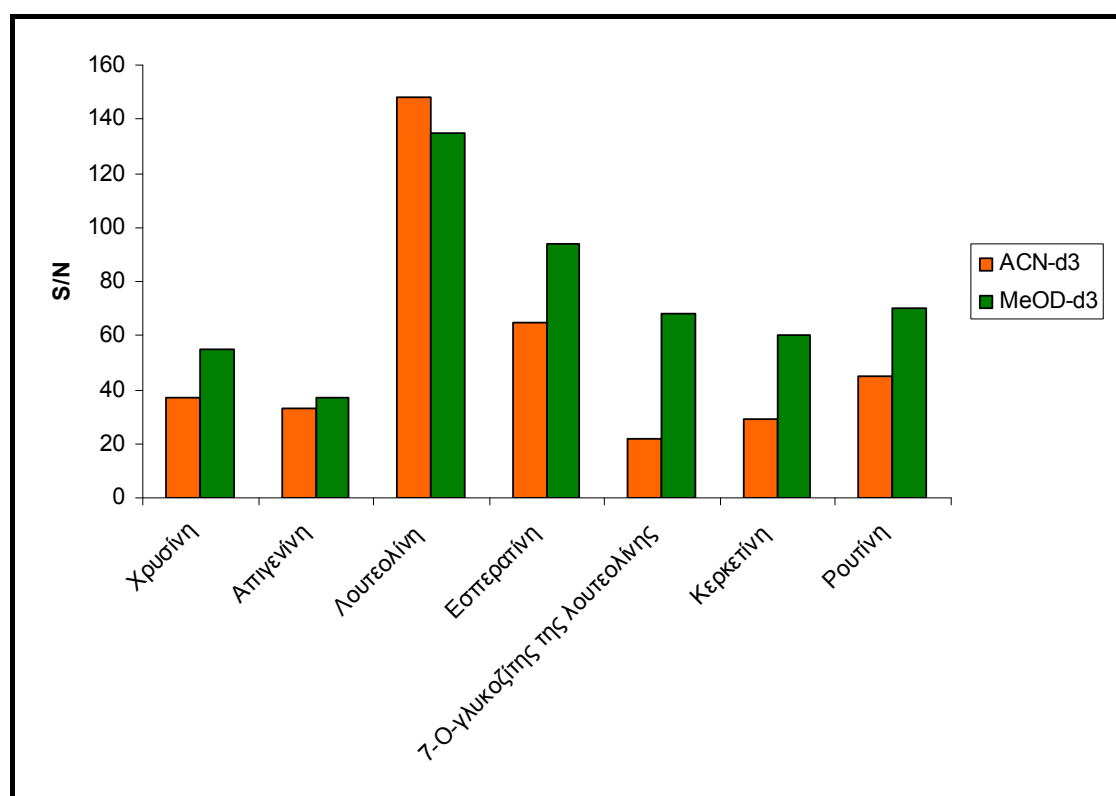


Σχήμα 4.5. Συγκριτική μελέτη για την επίδραση των δευτεριωμένων διαλυτών ανάκτησης για τα φαινόλικά οξέα.

Αντίθετα, η χρήση του δευτεριωμένου ακετονιτριλίου δεν προκρίνεται για τη μελέτη φλαβονοειδών με την συνδυαστική τεχνική του LC-SPE-NMR καθώς φαίνεται ότι η δευτεριωμένη μεθανόλη είναι περισσότερο αποτελεσματική και μπορεί πιο εύκολα να ανακτήσει τα φλαβονοειδή από το πληρωτικό υλικό των μικροστηλών. Στον Πίνακα 4.3 και στο Σχήμα 4.6 παρουσιάζεται διαγραμματικά η επίδραση του δευτεριωμένου διαλύτη στην ανάκτηση των φλαβοοειδών από τις μικροστήλες.

Πίνακας 4.4. Συγκριτική μελέτη της επίδρασης του δευτεριωμένου διαλύτη ανάκτησης των φλαβονοειδών.

Ένωση	M.B	logP	ACN-d <sub>3</sub>			MeOD-d <sub>3</sub>		
			1 <sup>η</sup>	2 <sup>η</sup>	M.O	1 <sup>η</sup>	2 <sup>η</sup>	M.O
Χρυσίνη	254	2,94	42	32	37	43	67	55
Απιγενίνη	270	2,46	33	33	33	47	27	37
Λουτεολίνη	286	1,97	156	140	148	129	141	135
Εσπερατίνη	302	2,28	62	68	65	91	97	94
7-O- γλυκοζίτης της λουτεολίνης	448	-0,10	19	25	22	68	68	68
Κερκετίνη	302	1,68	27	31	29	51	69	60
Ρουτίνη	610	-1,06	47	43	45	67	73	70



Σχήμα 4.6. Συγκριτική μελέτη για την επίδραση των δευτεριωμένων διαλυτών ανάκτησης για τα φλαβονοειδή.

Με βάση τα παραπάνω γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι η ορθή επιλογή του δευτεριωμένου διαλύτη για την ανάκτηση των ενώσεων από τις μικροστήλες

αποτελεί ένα κρίσιμο στοιχείο για την επιτυχημένη εφαρμογή της τεχνικής LC-SPE-NMR. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η περίπτωση του 7-Ο-γλυκοζίτη της λουτεολίνης που η ανάκτησή του με δευτεριωμένο ακετονιτρίλιο είναι εξαιρετικά περιορισμένη (Πίνακας 4.2, Σχήμα 4.6).

Αξίζει να σημειωθεί ότι η ταχύτητα ροής του δευτεριωμένου διαλύτη μειώθηκε από 220  $\mu\text{L}/\text{min}$  σε 110  $\mu\text{L}/\text{min}$  χωρίς να παρατηρηθεί μεταβολή στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$ . Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε η σταδιακή ανάκτηση των ενώσεων χωρίς να μεταβληθεί ο λόγος S/N (Clarkson et al., 2006).

Συνοψίζοντας, για τη μελέτη ενός μίγματος φαινολικών οξέων και φλαβονοειδών ή ενός φυτικού εκχυλίσματος η χρήση της δευτεριωμένης μεθανόλης υπερέχει ελάχιστα, όπως υποδηλώνουν οι Πίνακες 4.2 και 4.3 και τα Σχήματα 4.5 και 4.6. Στην περίπτωση των φαινολικών οξέων οι τιμές S/N είναι σχεδόν παραπλήσιες για τους δύο διαλύτες ενώ στην περίπτωση των φλαβονοειδών οι τιμές S/N είναι μεγαλύτερες όταν η ανάκτηση γίνεται με δευτεριωμένη μεθανόλη. Παρόλα αυτά, για την ανάπτυξη της μεθοδολογίας LC-SPE-NMR στη μελέτη φυσικών προϊόντων προτιμήθηκε η χρήση του ACN- $d_3$  για τις καλές διαλυτικές του ικανότητες, το χαμηλό ιξώδες που επιτρέπει την εύκολη απομάκρυνσή του από την κυψελίδα του υποδοχέα και τέλος η κορυφή του στο πρωτονιακό φάσμα βρίσκεται περίπου στα 2 ppm που δεν υπάρχουν χαρακτηριστικές κορυφές των φυσικών προϊόντων.

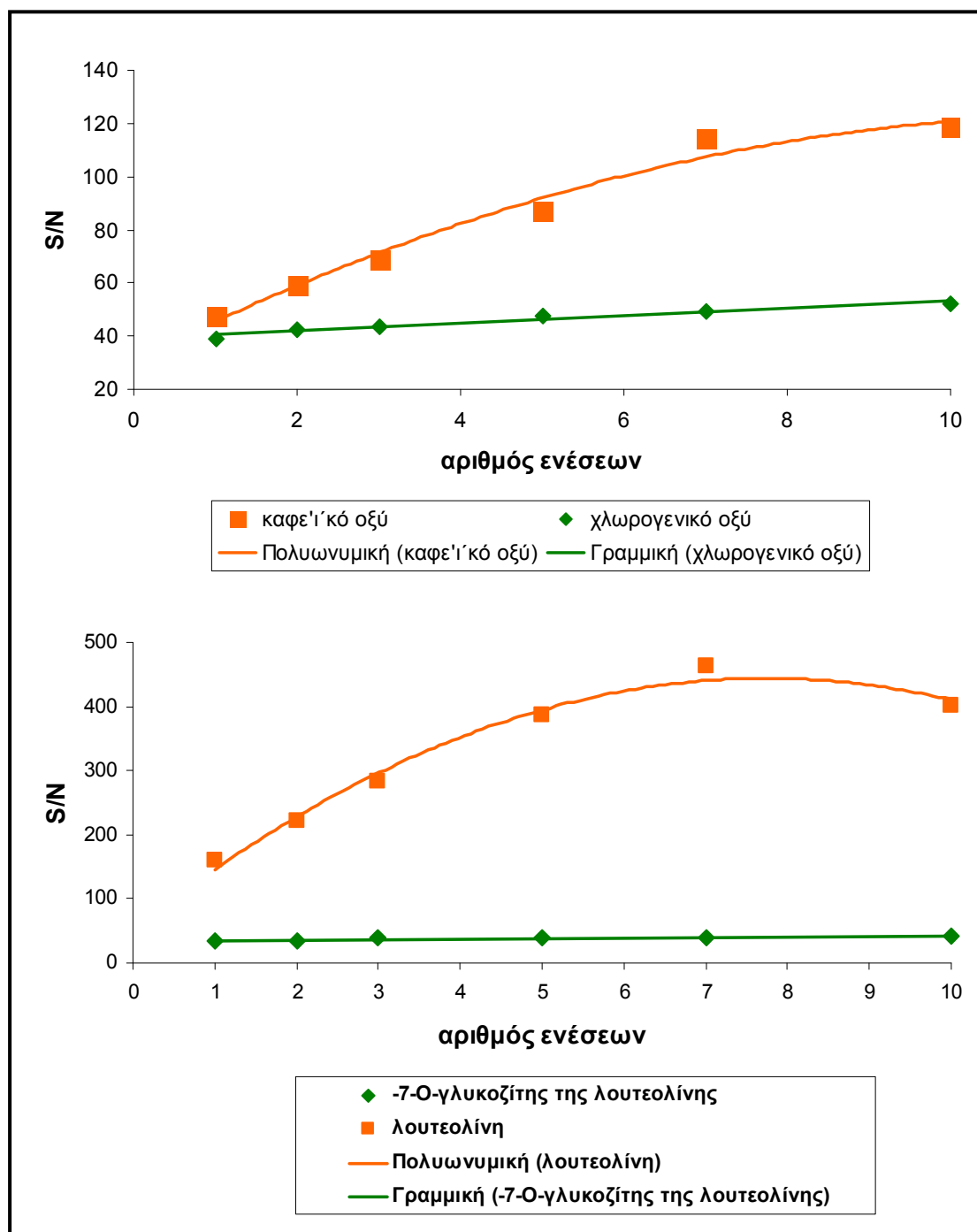
#### **4.7 Η διαδικασία της πολλαπλής παγίδευσης (*multiple trapping*)**

Ένα από τα βασικότερα πλεονεκτήματα των πειραμάτων LC-SPE-NMR έναντι των άλλων τεχνικών LC-NMR είναι η δυνατότητα του συστήματος να επιτρέπει την αύξηση της συγκέντρωσης της ένωσης που αναλύεται μέσω της πολλαπλής παγίδευσής της στην ίδια μικροστήλη μετά από επαναλαμβανόμενες ενέσεις (Jaroszewski, 2005α, Jaroszewski, 2005β, Exarchou, et al., 2005). Για να γίνει αντιληπτή η σημασία του παραπάνω πλεονεκτήματος αρκεί να αναφερθεί ότι η συγκέντρωση των συστατικών των φυσικών προϊόντων είναι συνήθως χαμηλή και κυμαίνεται από 1 έως 50  $\mu\text{g}$  ανά ένεση. Με τη δυνατότητα της πολλαπλής παγίδευσης είναι δυνατή μελέτη των δομών των ενώσεων που βρίσκονται σε ίχνη στα υπό μελέτη δείγματα και η καταγραφή φασμάτων που δεν θα ήταν δυνατή κάτω από άλλες συνθήκες. Η διαδικασία αποκτά ακόμη μεγαλύτερη σπουδαιότητα αν ληφθεί υπόψη



ότι η κάθε μικροστήλη μπορεί να παγιδεύσει ποσότητες μέχρι το 10% του βάρους του και σύμφωνα με τον κατασκευαστή το υλικό πλήρωσης των μικροστηλών είναι ~13.5 mg. Σε μια μικροστήλη, επομένως, είναι δυνατόν να παγιδευτεί λίγο περισσότερο από 1 mg ουσίας (Clarkson, *et al.*, 2007). Έτσι είναι δυνατόν να συσσωρευτεί ποσότητα που να επιτρέπει τη λήψη ομοπυρηνικών και ετεροπυρηνικών φασμάτων δύο διαστάσεων. Η διαδικασία της πολλαπλής παγίδευσης για τις υδροφοβικές ενώσεις είναι εξαιρετικά αποτελεσματική και έχει συζητηθεί εκτενώς (Lambert, *et al.*, 2005α, Sandvoss, *et al.*, 2005, Lambert, *et al.*, 2005β, Clarkson, *et al.*, 2006α, Miliauskas, *et al.*, 2006), ενώ για τις περισσότερο πολικές ενώσεις η αύξηση της συγκέντρωσης των ενώσεων στις μικροστήλες δεν είναι το ίδιο ικανοποιητική (Lambert, *et al.*, 2005α, Sandvoss, *et al.*, 2005, Miliauskas, *et al.*, 2006).

Στην παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε έλεγχος της αποτελεσματικότητας της διαδικασίας της πολλαπλής παγίδευσης των ενώσεων καφεϊκού οξέος, χλωρογενικού οξέος, λουτεολίνης και του αντίστοιχου γλυκοζίτη της. Οι ενώσεις αυτές επιλέχθηκαν ώστε να διαφέρουν σημαντικά ως προς την πολικότητα τους για να μελετηθεί η αποτελεσματικότητα της διαδικασίας για περισσότερο ή λιγότερο υδροφοβικές και πολικές ενώσεις. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.7 οι επαναλαμβανόμενες ενέσεις οδηγούν σε ανάλογη αύξηση της συγκέντρωσης στην περίπτωση των λιγότερο πολικών ενώσεων. Για τις περισσότερο πολικές ενώσεις όπως το χλωρογενικό οξύ και τον 7-Ο-γλυκοζίτη της λουτεολίνης η πολλαπλή παγίδευση δεν συμβάλει το ίδιο στην αύξηση της συγκέντρωσης των ενώσεων στις μικροστήλες και κατά συνέπεια στην αύξηση του λόγου σήματος- θορύβου και αυτό συμβαίνει είτε γιατί κατά τη διαδικασία παγίδευσης της επόμενης ένεσης εκλύεται η ποσότητα που ήδη έχει κατακρατηθεί λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε νερό του εκλούσματος, είτε γιατί κατακρατείται αλλά είναι αδύνατη η ανάκτηση μεγαλύτερης ποσότητας των ενώσεων με το δευτεριωμένο ακετονιτρίλιο. Είναι φανερό ότι για το καφεϊκό οξύ και τη λουτεολίνη παρατηρείται γραμμική αύξηση του λόγου σήματος- θορύβου έως και επτά επαναλαμβανόμενες ενέσεις ενώ περαιτέρω προσπάθεια αύξησης της συγκέντρωσης των ενώσεων δεν επιφέρει τα επιθυμητά αποτελέσματα. Στην περίπτωση της λουτεολίνης προκαλεί έκπληξη η πτώση της ευθείας για αριθμό ενέσεων από επτά έως δέκα αλλά είναι κάτι που έχει αναφερθεί στη περίπτωση του γαλλικού οξέος (Miliauskas, *et al.*, 2006).



Σχήμα 4.7. Έλεγχος της αποτελεσματικότητας της πολλαπλής παγίδευσης για ενόσεις διαφορετικής πολικότητας.

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να σημειωθεί ότι αν πραγματοποιηθούν επτά επαναλαμβανόμενες ενέσεις δεν συνεπάγεται και αύξηση του λόγου σήματος-θορύβου κατά ένα παράγοντα 7. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 4.4 επτά επαναλαμβανόμενες παγιδεύσεις της λουτεολίνης στην ίδια μικροστήλη οδηγούν σε αύξηση του S/N κατά ένα παράγοντα ~3, ενώ στην περίπτωση του καφεΐκού η αύξηση του S/N που καταγράφεται είναι περίπου 2,5 φορές παραπάνω. Γενικά, όσο

λιγότερο πολική είναι η ένωση τόσο περισσότερο αποτελεσματική φαίνεται να είναι η διαδικασία της πολλαπλής παγίδευσης.

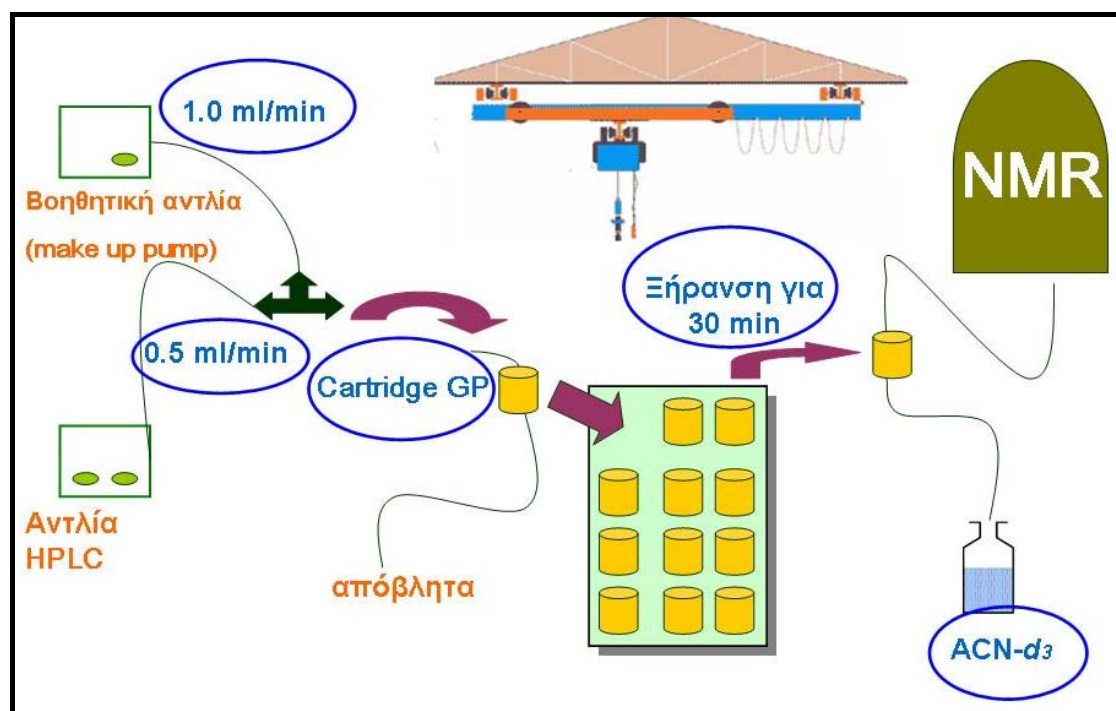
**Πίνακας 4.5. Έλεγχος της αποτελεσματικότητας της πολλαπλής παγίδευσης για ενώσεις διαφορετικής πολικότητας.**

	<i>logP</i>	Αριθμός ενέσεων					
		1	2	3	5	7	10
Καφεϊκό οξύ	0,94	48	59	69	87	114	119
Χλωρογενικό οξύ	-0,45	39	43	44	48	49	52
Λουτεολίνη	1,97	160	221	283	386	464	403
7-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης	0,10	34	35	39	39	41	42

#### **4.8 Προσδιορισμός βέλτιστων συνθηκών ανάλυσης φυτοχημικών με την τεχνική LC-SPE-NMR**

Η ολοκλήρωση του ελέγχου μιας σειράς παραμέτρων, που αφορούν την λειτουργία του συστήματος LC-SPE-NMR οδήγησε στην ανάπτυξη μεθοδολογίας για την ανάλυση φυτοχημικών σε μίγματα ή φυτικά εκχυλίσματα. Ο έλεγχος και προσδιορισμός των βέλτιστων συνθηκών ανάλυσης είναι απολύτως απαραίτητος καθώς η επιλογή των συνθηκών ανάλυσης είναι δυνατό να επηρεάσει δραματικά την αποτελεσματικότητα της μεθοδολογίας. Για παράδειγμα, η λανθασμένη επιλογή πληρωτικού υλικού των μικροστηλών μπορεί να οδηγήσει σε περιορισμένη ή και καθόλου κατακράτηση των υπό ανάλυση φυτοχημικών, που να καθιστά την ανάλυση τους με την τεχνική LC-SPE-NMR ανέφικτη.

Έτσι, συνυπολογίζοντας όλα τα παραπάνω αποτελέσματα για την μελέτη της σύστασης φυτικών εκχυλισμάτων με την τεχνική LC-SPE-NMR ο χρωματογραφικός διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε με ταχύτητα ροής 0.5 ml/ min, με προσθήκη νερού μέσω βοηθητικής αντλίας (make-up pump) με ταχύτητα ροής 1,0 ml/ min. Η χρήση ταχυτήτων ροών με λόγους 1/3 και 1/4 θα οδηγούσε σε επιμήκυνση του χρόνου ανάλυσης χωρίς να προκύπτουν οφέλη για την αποτελεσματικότητα της μεθοδολογίας στα μελετώμενα πολικά εκχυλίσματα.



Σχήμα 4.8. Προσδιορισμός βέλτιστων συνθηκών ανάλυσης φυτοχημικών με την τεχνική LC-SPE-NMR.

Για την κατακράτηση των φυτοχημικών οι μικροστήλες τροποποιημένης ρητίνης τύπου GP είναι οι πλέον κατάλληλες καθώς η υπεροχή τους είναι σαφής έναντι των υπολοίπων πληρωτικών υλικών που προτείνονται στη βιβλιογραφία και δοκιμάστηκαν στην παρούσα διατριβή. Στη συνέχεια, για την απομάκρυνση των πρωτονιωμένων διαλυτών από τις μικροστήλες διαβιβάστηκε αέριο άζωτο για 30 λεπτά, όπως προτείνεται στο αντίστοιχο υποκεφάλαιο. Τέλος, η ανάκτηση των ενώσεων από τις μικροστήλες και η μεταφορά τους στην κυψελίδα του υποδοχέα του φασματογράφου NMR έγινε με δευτεριωμένο ακετονιτρίλιο. Το δευτεριωμένο ακετονιτρίλιο προτιμήθηκε λόγω των φυσικοχημικών του ιδιοτήτων και της εμφάνισης των σημάτων του στο φάσμα NMR- $^1\text{H}$  σε περιοχή που δεν υπάρχουν κορυφές διαγνωστικής αξίας.

## 5. Μελέτη εκχυλισμάτων φυτών της οικογένειας *Lamiaceae*

### 5.1 Μελέτη εκχυλισμάτων του φυτού *Teucrium polium*

#### 5.1.1 Εισαγωγή

Τα εκχυλίσματα του φυτού *Teucrium polium* έχουν μελετηθεί εκτενώς, και ένα πλήθος βιολογικών δράσεων έχει αποδοθεί σε αυτά σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, όπως αναλυτικά αναφέρθηκε στο Κεφάλαιο 1. Επιπλέον, τα εκχυλίσματα του φυτού *T. polium* έχουν μελετηθεί ως προς τη σύστασή τους με τις κλασικές μεθόδους απομόνωσης και μελέτης της δομής των επιμέρους συστατικών. Τα τελευταία χρόνια τα εκχυλίσματα του φυτού έχουν αποκτήσει μεγαλύτερο ενδιαφέρον καθώς συμπληρώματα διατροφής και κάψουλες για τη μείωση του σωματικού βάρους, που περιέχουν κλάσματα του φυτού αυτού, είναι εμπορικά διαθέσιμα. Επιπλέον, το φυτό *Teucrium polium* χρησιμοποιείται στις Η.Π.Α ως φυσικό ενισχυτικό γεύσης σε αλκοολούχα ποτά (Sandaresan *et al.*, 2006). Η χρήση πολλών σκευασμάτων τέτοιου είδους έχει απαγορευτεί σε πολλές χώρες λόγω πιθανής ισχυρής ηπατοτοξικής δράσης, που ενδέχεται να εμφανίζουν μερικά από αυτά. Στη χώρα μας έχουν αναφερθεί περιστατικά που η κατανάλωση αφεψημάτων *Teucrium polium* οδήγησε σε τοξική ηπατίτιδα (Savvidou *et al.*, 2007) γεγονός που ανάγκασε τον Ε.Ο.Φ να εκδώσει σχετική οδηγία ([www.eof.gr](http://www.eof.gr)). Παρόλα αυτά στη διεθνή βιβλιογραφία δεν υπάρχει, έως σήμερα, συστηματική φυτοχημική μελέτη των εκχυλισμάτων του φυτού.

Στην παρούσα διατριβή έγινε συστηματική μελέτη της σύστασης των εκχυλισμάτων του φυτού *Teucrium polium* χωρίς προεργασία του δείγματος, με στόχο την ταυτοποίηση των συστατικών τους. Για την παραλαβή των εκχυλισμάτων ακολουθήθηκαν οι τρόποι εκχύλισης που περιγράφονται στο Κεφάλαιο 3.2.3 και προέκυψαν τα εκχυλίσματα που αναφέρονται στον Πίνακα 5.1. Αρχικά, εκτιμήθηκε η ικανότητα δέσμευσης των ελευθέρων ριζών (δοκιμή DPPH·) και τα επίπεδα των φαινολικών συστατικών στα εκχυλίσματα (μέθοδος Folin- Ciocalteu). Σύμφωνα με τον Πίνακα 5.1, τα μεθανολικά εκχυλίσματα METP1 και METP3 φαίνεται να παρουσιάζουν την ισχυρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα και ακολουθεί το υδατικό εκχύλισμα ΑΕΤΡ. Αντίθετα, το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα ΕΕΤΡ3 δεν

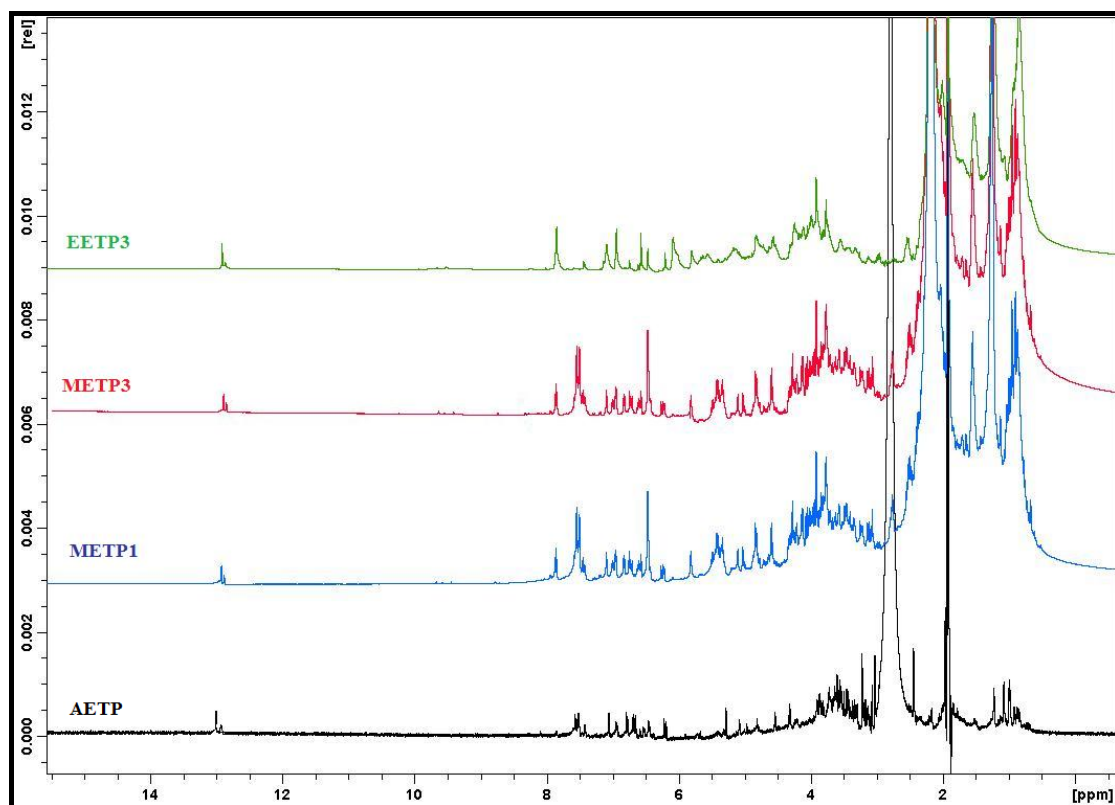
εμφανίζει σημαντική αντιοξειδωτική δράση συγκριτικά με τα υπόλοιπα εκχυλίσματα, γεγονός που εξηγείται με βάση τη σχετικά μειωμένη περιεκτικότητά του σε φαινολικά συστατικά.

**Πίνακας 5.1. Προσδιορισμός ολικών φαινολικών συστατικών και εκτίμηση της ικανότητας δέσμευσης των ελευθέρων ριζών των εκχυλισμάτων του φυτού *Teucrium polium*.**

Εκχύλισμα	μg γαλλικού οξέος/mg εκχυλίσματος	EC <sub>50</sub> (μg/mL)
ΑΕΤΡ (Aqua Extract <i>Teucrium Polium</i> )	164	74
ΜΕΤΡ1 (Methanolic Extract <i>Teucrium Polium</i> 1)	144	52
ΜΕΤΡ3 (Methanolic Extract <i>Teucrium Polium</i> 3)	149	58
ΕΕΤΡ3 (Ethyl acetate Extract <i>Teucrium Polium</i> 3)	92	212

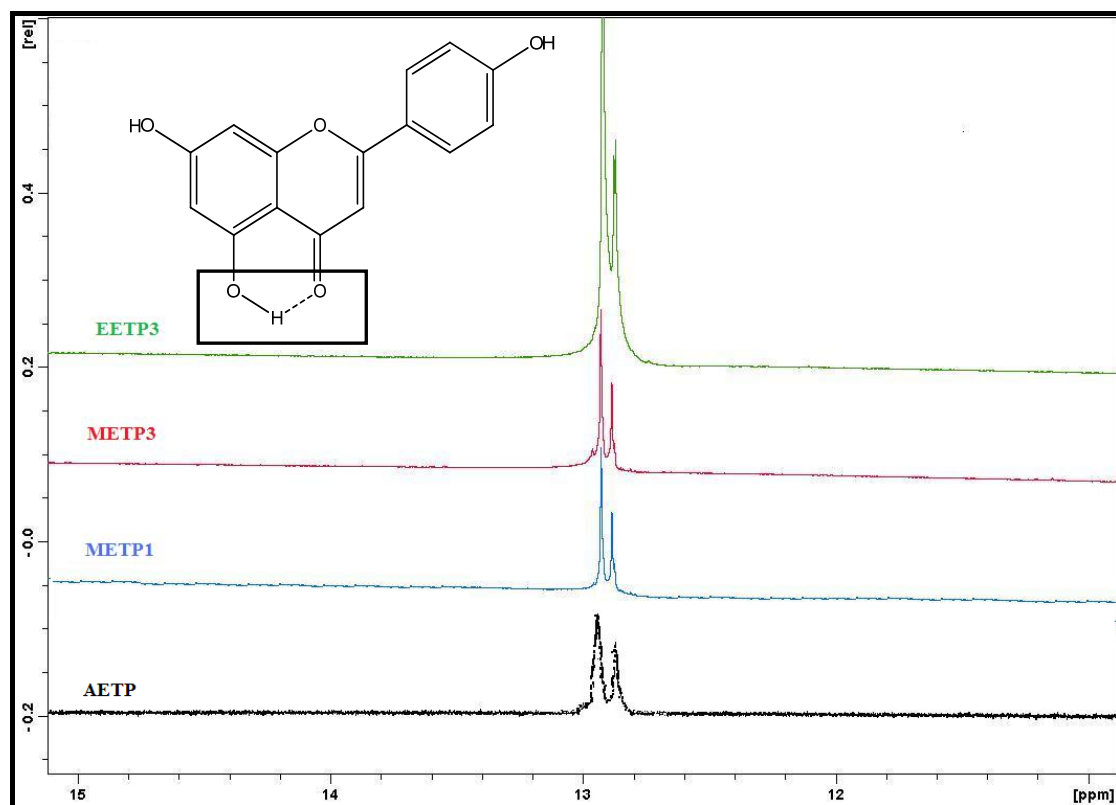
### 5.1.2 Μελέτη της σύστασης των εκχυλισμάτων *Teucrium polium* με τη χρήση φασματοσκοπίας NMR μιας (1D) και δυο (2D) δυο διαστάσεων

Αρχικά, για την ανάλυση των εκχυλισμάτων του φυτού *Teucrium polium* χρησιμοποιήθηκε η φασματοσκοπία NMR μιας και δυο διαστάσεων. Οι συνθήκες λήψης των φασμάτων και οι παράμετροι λήψης και επεξεργασίας τους περιγράφονται στο Κεφάλαιο 3.3. Από τα φάσματα <sup>1</sup>H-NMR των εκχυλισμάτων παρατηρείται ότι το υδατικό εκχύλισμα ΑΕΤΡ και τα δυο μεθανολικά εκχυλίσματα ΜΕΤΡ1 και ΜΕΤΡ3 εμφανίζουν παρόμοια σύσταση ενώ το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα ΕΕΤΡ3 διαφοροποιείται σημαντικά (Σχήμα 5.1).



Σχήμα 5.1. Φάσματα NMR-<sup>1</sup>H των τεσσάρων φυτικών εκχυλισμάτων του *Teucrium polium* σε διαλύτη ACN-d<sub>3</sub> (NS=1024, T= 298 K).

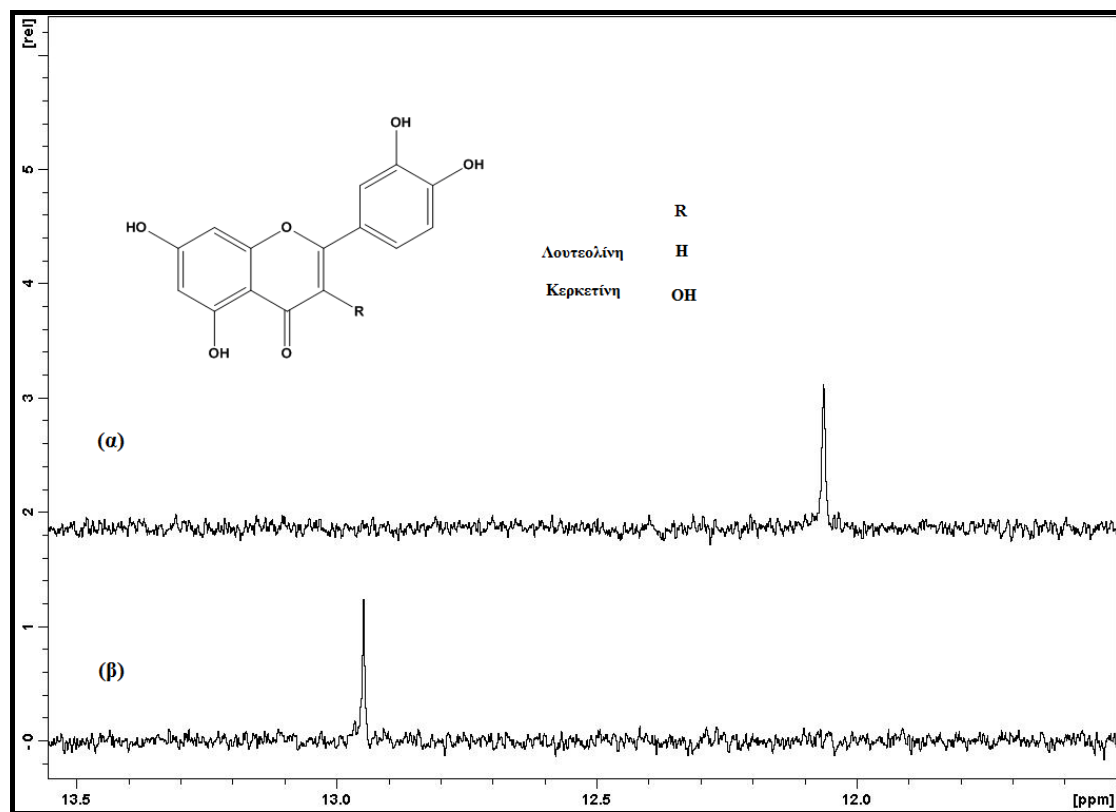
Η φασματοσκοπία NMR χρησιμοποιείται ολοένα και περισσότερο στη μελέτη φυσικών προϊόντων και τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί μεθοδολογίες για τον χαρακτηρισμό ενώσεων χωρίς προηγούμενο διαχωρισμό (Reynolds *et al.*, 2002, Pauli *et al.*, 2005, Sandusky 2007,). Αξιοποιώντας την προηγούμενη εμπειρία του εργαστηρίου, δόθηκε ιδιαίτερη προσοχή σε δυο διαφορετικές περιοχές του φάσματος. Αρχικά, έγινε προσπάθεια να αξιολογηθούν οι πληροφορίες που προκύπτουν από τη μελέτη του φάσματος στην περιοχή 11 έως 13 ppm (Σχήμα 5.2).



Σχήμα 5.2. Επιλεγμένη περιοχή(11-15 ppm) των φασμάτων NMR-<sup>1</sup>H των τεσσάρων φυτικών εκχυλίσματων του *Teucrium polium* σε διαλύτη MeCN-d<sub>3</sub> (NS=1024, T= 298 K).

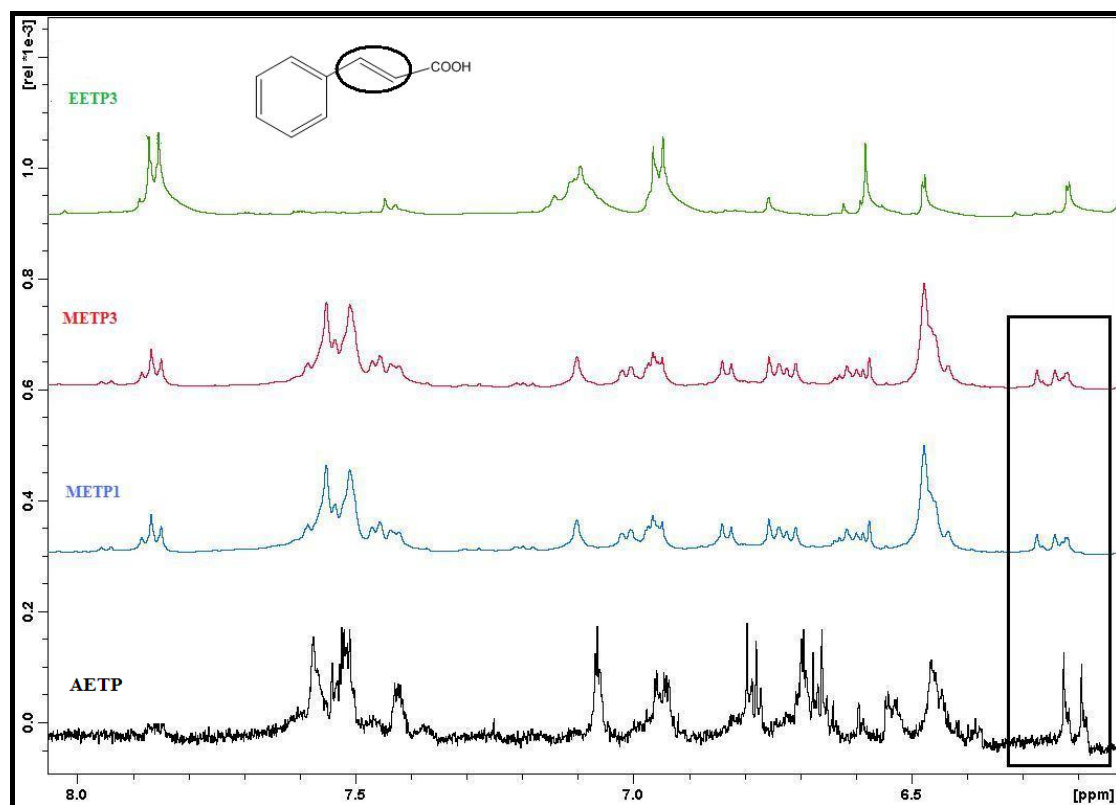
Η περιοχή αυτή είναι χαρακτηριστική της ύπαρξης φλαβονοειδών και είναι διαγνωστικής αξίας καθώς ο αριθμός των σημάτων συντονισμού, που εμφανίζονται στην περιοχή αυτή, είναι σημαντικά μικρότερος από τον αντίστοιχο αριθμό σημάτων της αρωματικής περιοχής. Οι κορυφές απορρόφησης που εμφανίζονται στα 11-13 ppm αποδίδονται στο αποπροστατευμένο πρωτόνιο του υδροξυλίου που βρίσκεται στη θέση 5 του δακτυλίου A, το οποίο συμμετέχει σε έναν ισχυρό ενδομοριακό δεσμό υδρογόνου με το οξυγόνο του CO(4). Επιπλέον, η εμφάνιση των σημάτων στα 13 ppm περίπου υποδηλώνει την παρουσία φλαβονών στα εκχυλίσματα, δεδομένου ότι το σήμα συντονισμού του πρωτονίου OH(5) είναι περισσότερο αποπροστατευμένο στις φλαβόνες συγκριτικά με το αντίστοιχο σήμα των φλαβονολών που εμφανίζεται στα 12 ppm. Αυτό συμβαίνει διότι η παρουσία της ομάδας OH(3) στις φλαβονόλες προκαλεί μείωση της ηλεκτρονικής πυκνότητας στο άτομο του οξυγόνου της ομάδας του CO(4) με αποτέλεσμα να είναι λιγότερο ισχυρός ο ενδομοριακός δεσμός υδρογόνου (Σχήμα 5.3). Όπως γίνεται αντιληπτό με τον παραπάνω τρόπο επιτυγχάνεται η διάκριση των φλαβονών και φλαβονολών (Exarchou *et al.*, 2002a, Exarchou *et al.*, 2002b).





Σχήμα 5.3. Διάκριση φλαβονών και φλαβονολών με χρήση φασματοσκοπίας  $\text{NMR-}^1\text{H}$ . Επιλεγμένη περιοχή των φασμάτων  $\text{NMR-}^1\text{H}$  (α) κερκετίνης(φλαβονόλη) και (β) λουτεολίνης (φλαβόνη) σε διαλύτη δευτεριωμένο ακετονιτρίλιο,  $\text{CD}_3\text{CN}$  στους 298 K ( $NS=64$ ).

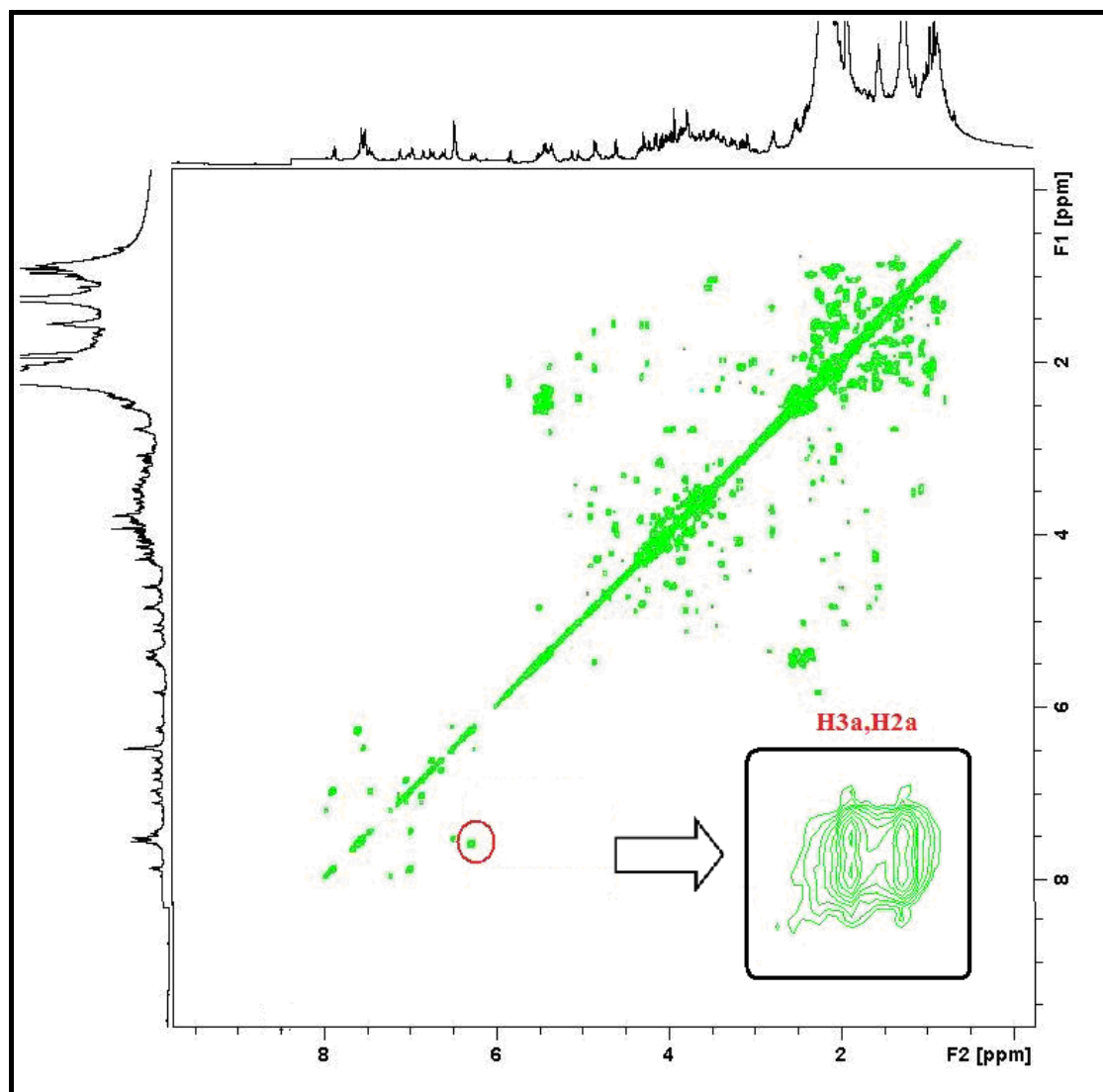
Η επόμενη περιοχή των φασμάτων  $\text{NMR-}^1\text{H}$  των φυτικών εκχυλισμάτων του *Teucrium polium* που μελετήθηκε ήταν η περιοχή από 6-8 ppm που εμφανίζονται τα σήματα συντονισμού των αρωματικών πρωτονίων. Αναμένεται ότι η περιοχή αυτή θα είναι ιδιαίτερα πολύπλοκη εξαιτίας της αλληλεπικάλυψης των σημάτων συντονισμού. Παρόλα αυτά είναι συνήθως δυνατή η διάκριση χαρακτηριστικών διπλών κορυφών απορρόφησης με σταθερά σύζευξης 16 Hz στα  $\sim 6,2$  ppm και  $\sim 7,5$  ppm, οι οποίες αντιστοιχούν στα βινυλικά πρωτόνια παραγώγων του κινναμωμικού οξέος (Gerothanassis *et al.*, 1998, Exarchou *et al.*, 2001). Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 5.4 στα φάσματα  $\text{NMR}$  του υδατικού και των δυο μεθανολικών εκχυλισμάτων διακρίνονται οι συγκεκριμένες διπλές κορυφές ενώ απουσιάζουν στο φάσμα του εκχυλίσματος του οξικού αιθυλεστέρα.



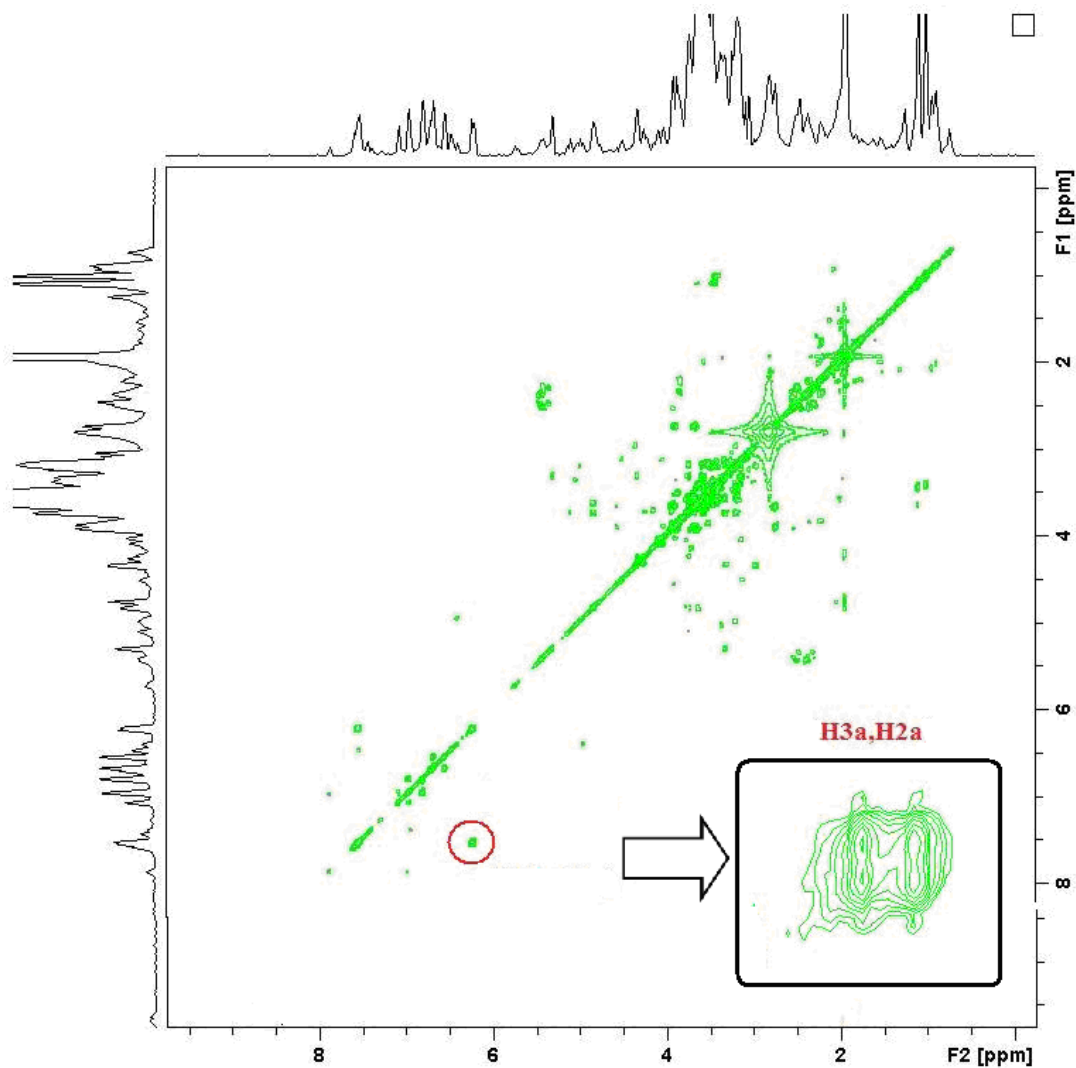
Σχήμα 5.4. Επιλεγμένη περιοχή(6-8 ppm) των φασμάτων NMR-<sup>1</sup>H των τεσσάρων φυτικών εκχυλισμάτων του *Teucrium polium* σε διαλύτη ACN-*d*<sub>3</sub> (NS=1024, T= 298 K).

Για την πληρέστερη μελέτη της σύστασης των εκχυλισμάτων ακολούθησε η λήψη διδιάστατων φασμάτων ομοπυρηνικής φασματοσκοπίας συσχέτισης (<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H Correlated Spectroscopy, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY). Με την εισαγωγή της δεύτερης διάστασης αποκαλύπτονται περισσότερες κορυφές που λόγω αλληλεπικάλυψης ήταν αδύνατο να διακριθούν στο αντίστοιχο φάσμα μιας διάστασης. Έτσι, στα φάσματα <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY των εκχυλισμάτων METP1, METP3 και AETP διαπιστώθηκε η παρουσία δύο διασταυρούμενων κορυφών στα 6,2 και 7,5 ppm με σταθερά σύζευξης 16 Hz (Σχήματα 5.5, και 5.6) ενώ στο αντίστοιχο 1D φάσμα NMR-<sup>1</sup>H δεν είναι δυνατή η διάκρισή τους.

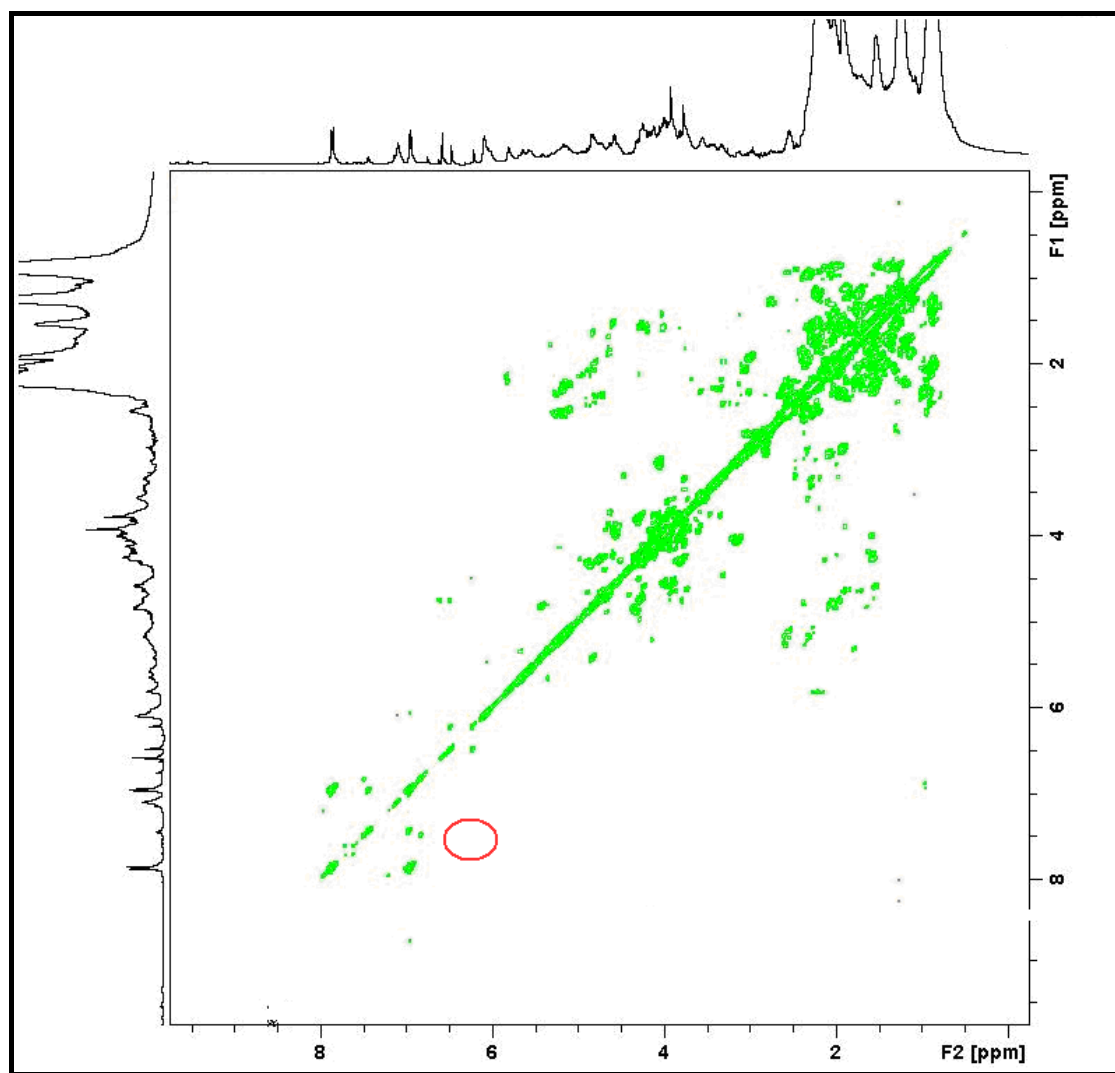
Η αλειφατική περιοχή των φασμάτων NMR-<sup>1</sup>H ήταν εξαιρετικά πλούσια, γεγονός που υποδηλώνει την ύπαρξη πολλών γλυκοζιτών. Η παραπάνω υπόθεση επιβεβαιώνεται και από την φασματοσκοπία δυο διαστάσεων COSY και TOCSY καθώς στο διδιάστατο χάρτη υπάρχει σημαντικός αριθμός κορυφών διασταύρωσης που οφείλονται σε συζεύξεις πρωτονίων που ανήκουν σε μόρια σακχάρου (Σχήματα 5.5, 5.6 και 5.7).



Σχήμα 5.5. Δισδιάστατος χάρτης του φάσματος COSY  $^1\text{H}-^1\text{H}$  του μεθανολικού εκχυλίσματος METP3 στους 298 K ( $NS=32$ ,  $t_{\text{exp}}=5\text{h}$ ). Στο φάσμα σημειώνονται οι δυο χαρακτηριστικές κορυφές που αντιστοιχούν στη δομική μονάδα κινναμωμικού τύπου.



Σχήμα 5.6. Δισδιάστατος χάρτης του φάσματος  $\text{COSY } ^1\text{H}-^1\text{H}$  του υδατικού εκχυλίσματος AETP στους 298 K ( $NS=32$ ,  $t_{\text{exp}}=5\text{h}$ ). Στο φάσμα φαινεται οι δυο χαρακτηριστικές κορυφές που αντιστοιχούν στη δομική μονάδα κινναμωμικού τύπου.



Σχήμα 5.7. Δισδιάστατος χάρτης του φάσματος COSY  $^1\text{H}-^1\text{H}$  του εκχυλίσματος του οξικού αιθυλεστέρα EETP3 στους 298 K ( $NS=32$ ,  $t_{exp}=5h$ ). Στο φάσμα σημειώνεται η απουσία των χαρακτηριστικών κορυφών που αντιστοιχούν στη δομική μονάδα κινναμωμικού τύπου.

Συμπερασματικά, από τη μελέτη των φασμάτων 1D και 2D NMR των εκχυλισμάτων είναι δυνατή η διάκριση ενώσεων

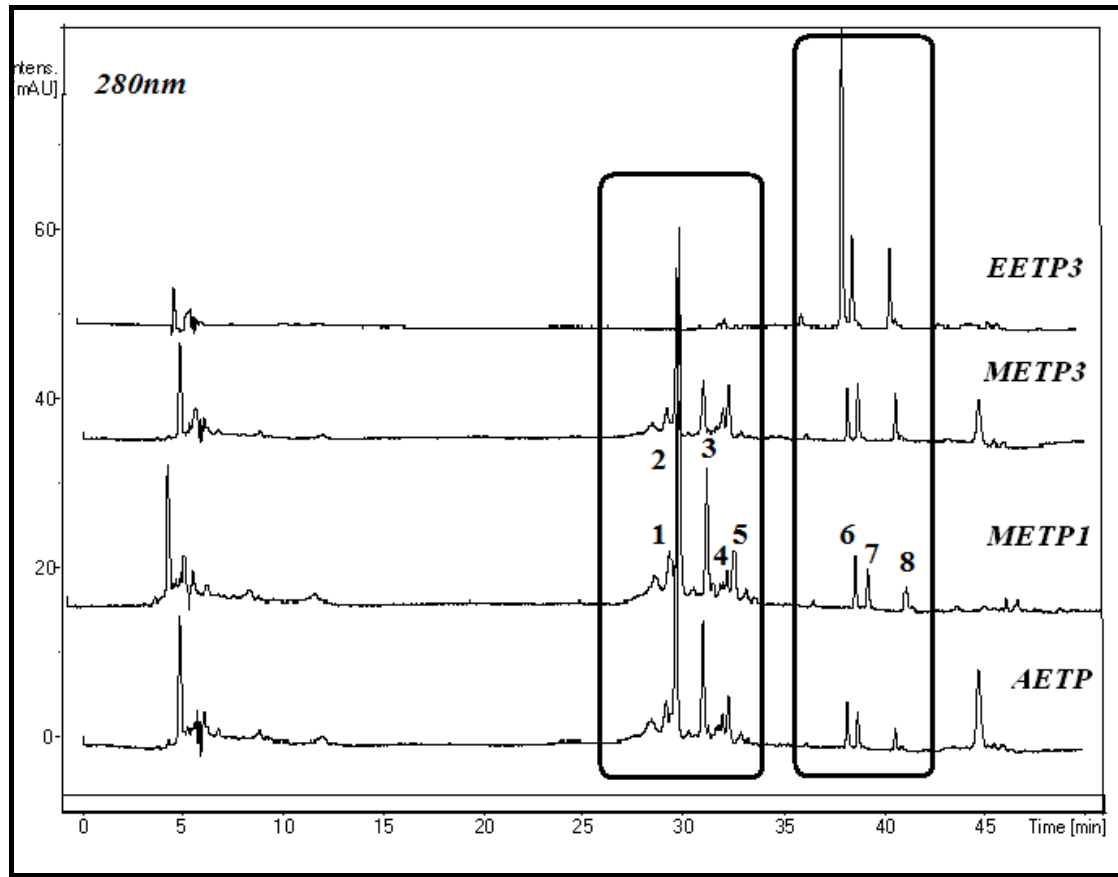
- που ανήκουν στην οικογένεια των φλαβονοειδών και συγκεκριμένα των φλαβονών,
- φαινολικού οξέος κινναμωμικού τύπου, που είναι το κύριο συστατικό του εκχυλίσματος,
- και γλυκοζιτών.

Χαρακτηριστικές είναι επίσης οι διαφορές του υδατικού και μεθανολικών εκχυλισμάτων από το αντίστοιχο εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα. Έτσι, με την καταγραφή και μελέτη των φασμάτων NMR 1D και 2D που λαμβάνει χώρα σε

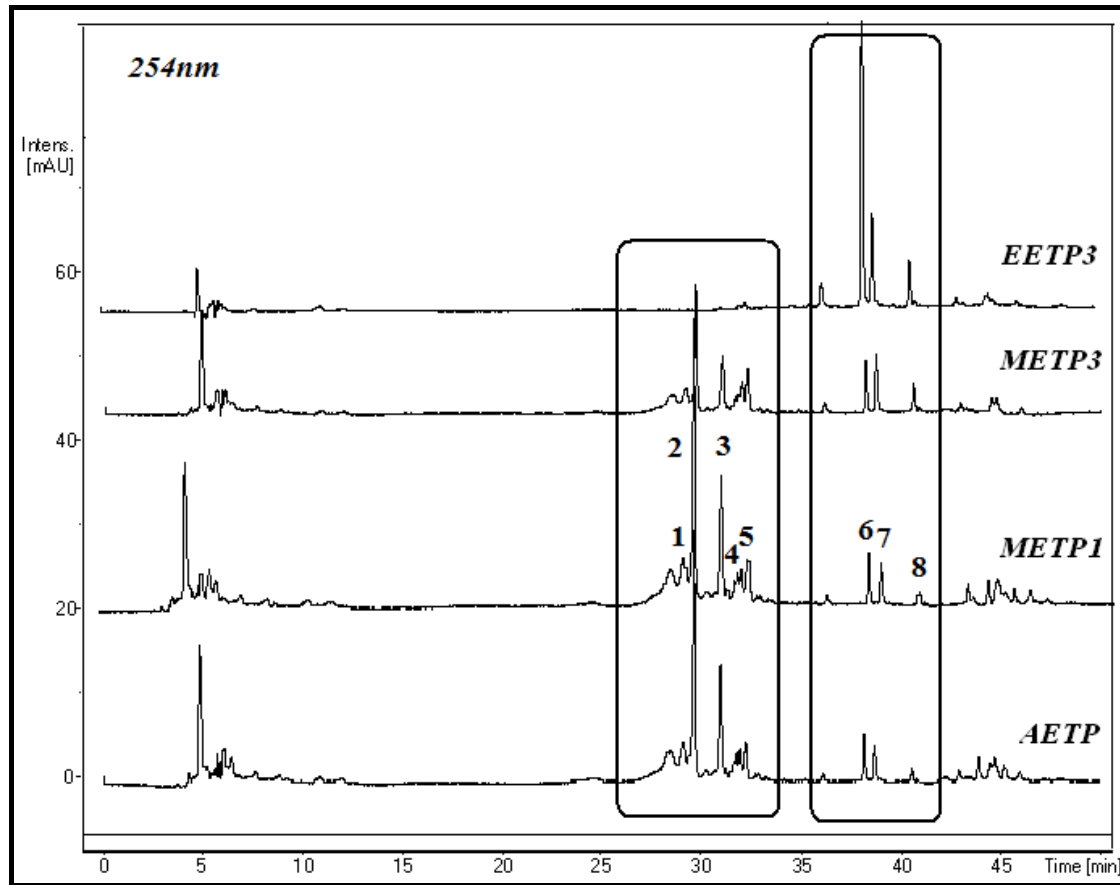
σύντομο χρονικό διάστημα, είναι δυνατός ο αρχικός χαρακτηρισμός των εκχυλισμάτων και η εξαγωγή χρήσιμων συμπερασμάτων για τη σύσταση τους.

### 5.1.3 Μελέτη της σύστασης των εκχυλισμάτων *Teucrium polium* με τη χρήση Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

Για την ανάλυση εκχυλισμάτων ή/και κλασμάτων του φυτού *Teucrium polium* ή άλλων φυτών του ίδιου γένους υπάρχουν περιορισμένα δεδομένα στη βιβλιογραφία. Οι σχετικές μελέτες αφορούν στην ανάπτυξη μεθοδολογίας για την ταυτοποίηση μιας σειράς προτύπων ενώσεων σε διάφορα φυτικά εκχυλίσματα συμπεριλαμβανομένου και του εκχυλίσματος του φυτού *Teucrium polium* (Panovska *et al.*, 2005, Proestos *et al.*, 2006). Με δεδομένη την ευρεία κατανάλωση των εκχυλισμάτων του φυτού, η ανάπτυξη μια μεθοδολογιών μελέτης όλων των επιμέρους συστατικών του κρίνεται σημαντική. Η προσπάθεια χρωματογραφικού διαχωρισμού στηρίχθηκε σε προηγούμενη μεθοδολογία για τον διαχωρισμό φλαβονοειδών και άλλων φαινολικών συστατικών σε φύλλα ελιάς και με τις απαραίτητες τροποποιήσεις περιγράφεται στο Κεφάλαιο 3.4 (Goulas, *et al.*, 2009). Για την καταγραφή των χρωματογραφημάτων χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής διόδων λυχνιών και το ενδιαφέρον μας επικεντρώθηκε στο χρωματογραφικό προφίλ στα μήκη κύματος 254nm, 280nm και 340 nm. Όπως αποτυπώνεται και στα Σχήματα 5.8-5.10 τα μεθανολικά εκχυλίσματα και το υδατικό εκχύλισμα εμφανίζουν παρόμοιο χρωματογραφικό προφίλ και διαφέρουν κυρίως ως προς τα επίπεδα συγκέντρωσης των συστατικών τους. Η παρατήρηση αυτή βρίσκεται σε συμφωνία με τη μελέτη των εκχυλισμάτων με τη φασματοσκοπία NMR-<sup>1</sup>H. Στο εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα EETP3 εκχυλίζονται οι λιγότερο πολικές ενώσεις και όπως φαίνεται από τα χρωματογραφήματα το εκχύλισμα περιέχει κυρίως φλαβονοειδή των οποίων συγκέντρωση είναι αισθητά αυξημένη έναντι των υπολοίπων εκχυλισμάτων του φυτού *Teucrium polium*.

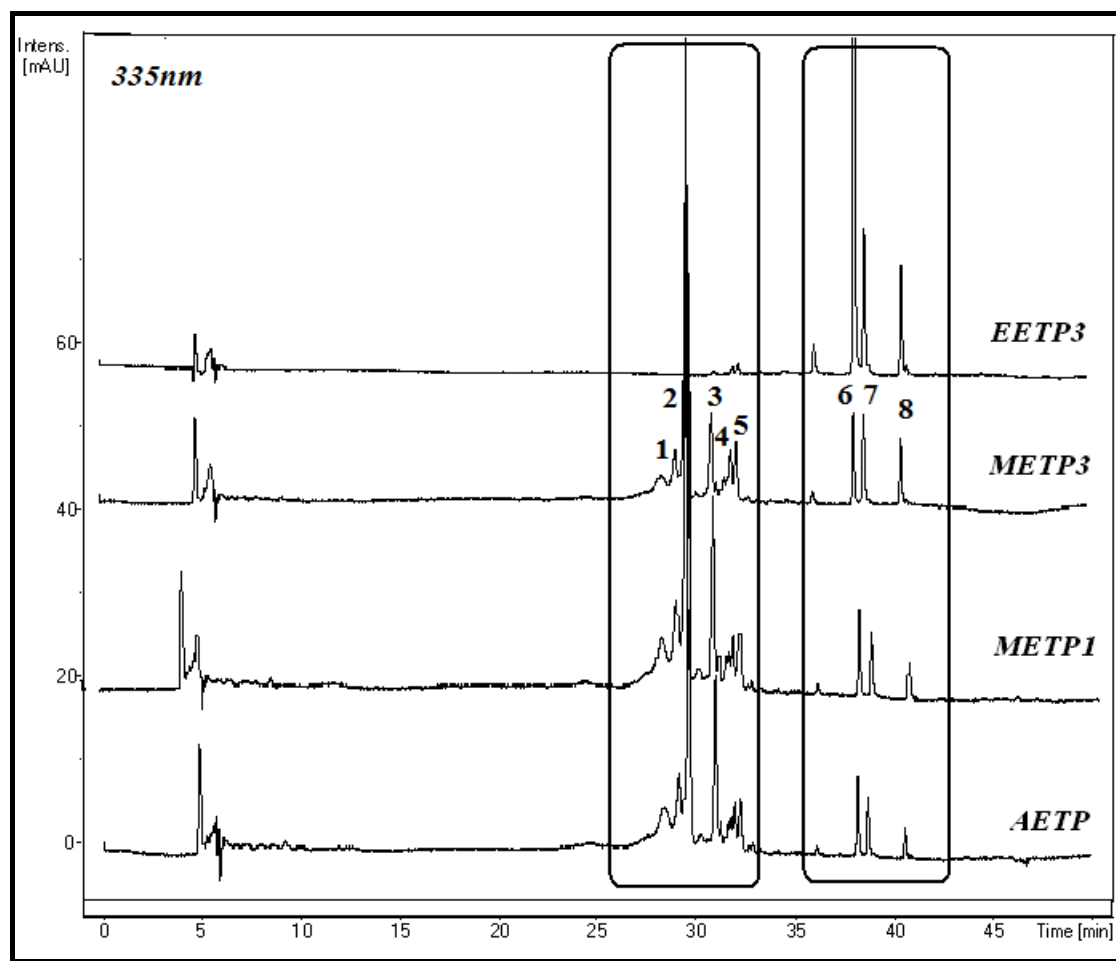


Σχήμα 5.8. Σύγκριση των χρωματογραφικών προφίλ των εκχυλισμάτων του φυτού *Teucrium polium* στα 280 nm.



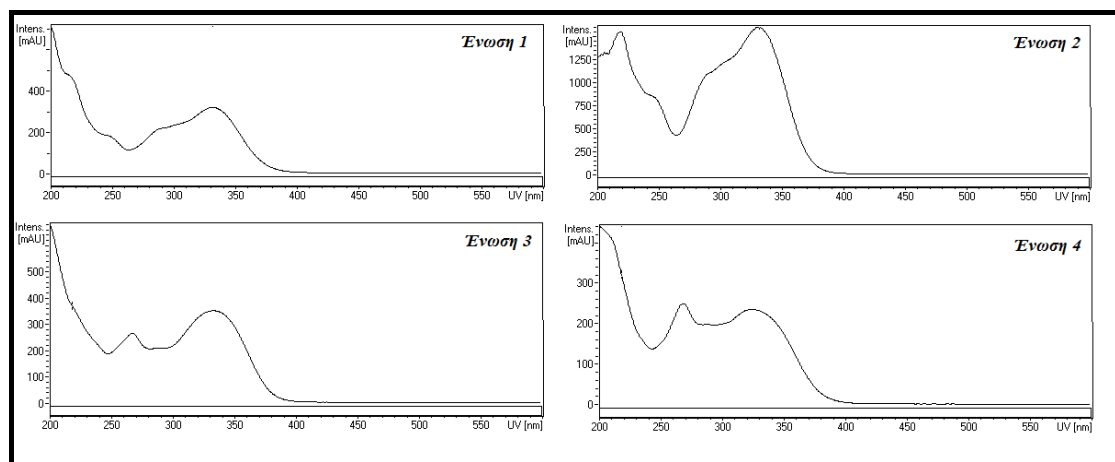
Σχήμα 5.9. Σύγκριση των χρωματογραφικών προφίλ των εκχυλισμάτων του φυτού *Teucrium polium* στα 254 nm.



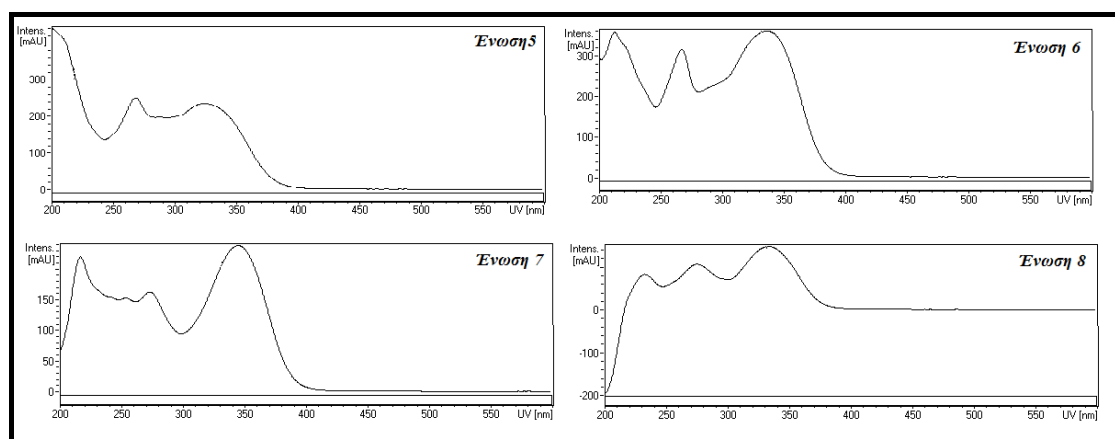


Σχήμα 5.10. Σύγκριση των χρωματογραφικών προφίλ των εκχυλισμάτων του φυτού *Teucrium polium* στα 340 nm.

Η χρήση του ανιχνευτή διόδων λυχνιών επιτρέπει την καταγραφή των φασμάτων UV-Vis κάθε κορυφής του χρωματογραφήματος. Ο περιορισμένος αριθμός διαθέσιμων προτύπων ενώσεων για σύγκριση των χρόνων κατακράτησης και των UV-Vis φασμάτων τους καθώς επίσης και η πολυπλοκότητα των δομών των συστατικών των εκχυλισμάτων καθιστούν τον χαρακτηρισμό τους ιδιαίτερα δύσκολο. Παρόλα αυτά η μελέτη των φασμάτων UV-Vis των εκλουόμενων συστατικών μπορεί να οδηγήσει στην κατηγοριοποίηση των επιμέρους συστατικών των δειγμάτων. Έτσι από τα Σχήματα 5.11 και 5.12 είναι φανερό ότι οι κορυφές 3-8 εμφανίζουν το χαρακτηριστικό φάσμα UV-Vis των φλαβονοειδών με μέγιστα στα 260-270 nm και στα 340-350 nm. Το πρώτο μέγιστο στα 270 έως 280 nm οφείλεται στον αρωματικό δακτύλιο A ενώ το μέγιστο απορρόφησης στα 340-350 οφείλεται στο δακτύλιο C και το μήκος κύματος που εμφανίζεται εξαρτάται από τους υποκαταστάτες του δακτυλίου C και από τον βαθμό συζυγίας του με το δακτύλιο B (Rijke *et al.*, 2006).

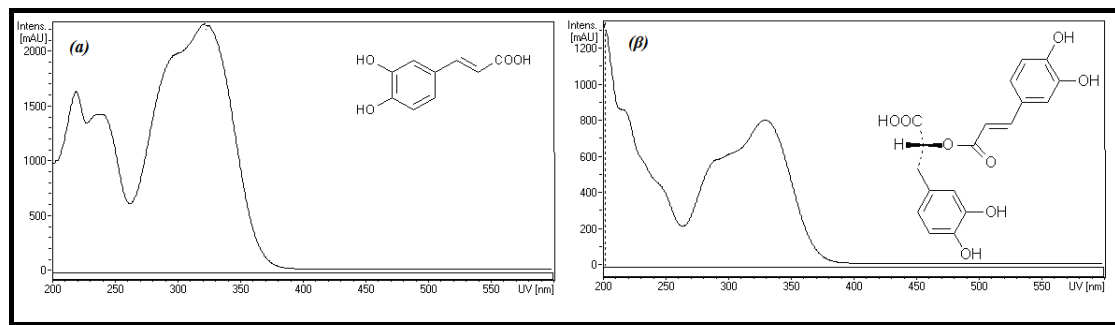


**Σχήμα 5.11.** Τα αντίστοιχα φάσματα UV-Vis των αριθμημένων κορυφών 1 έως 4 όπου φαίνονται και τα μέγιστα των απορροφήσεων τους.



**Σχήμα 5.12.** Τα αντίστοιχα φάσματα UV-Vis των αριθμημένων κορυφών 5 έως 8 όπου φαίνονται και τα μέγιστα των απορροφήσεων τους.

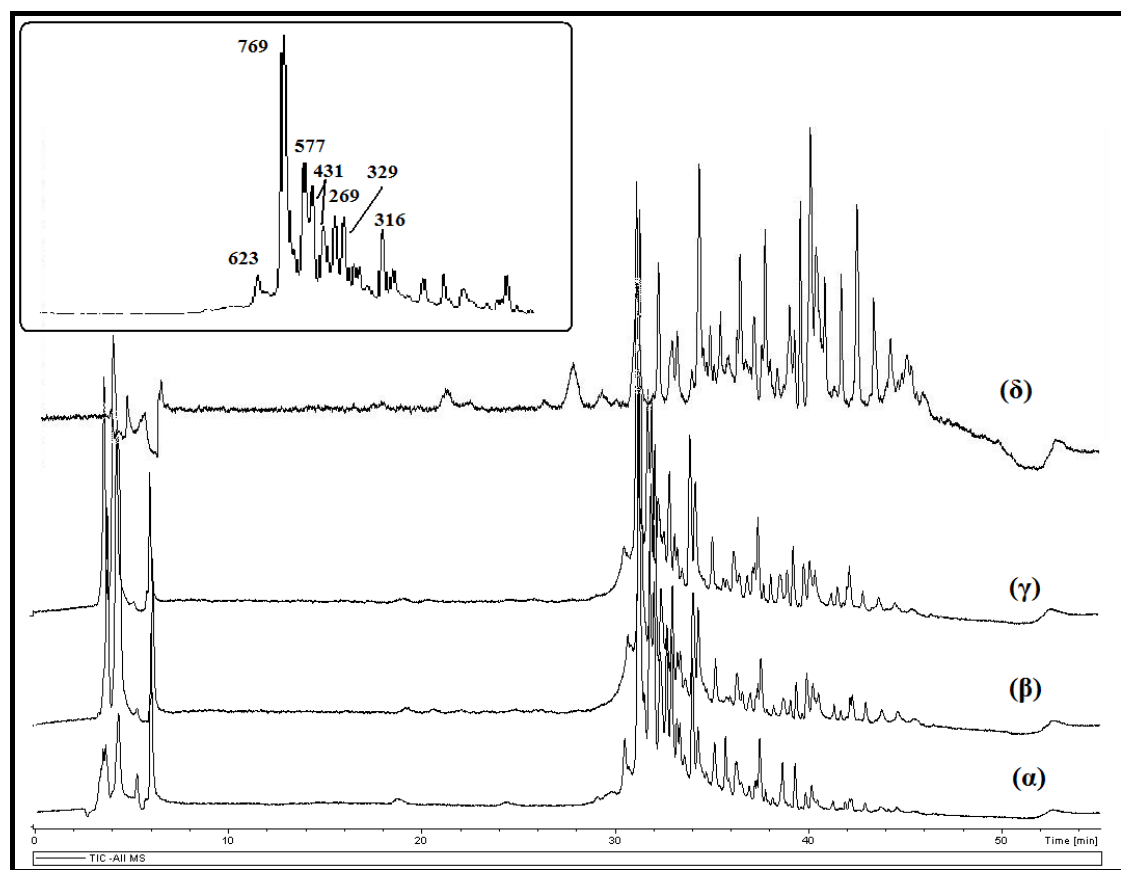
Οι ενώσεις 1 και 2 εμφανίζουν φάσματα UV-Vis με μέγιστο στα 340 nm (Σχήμα 5.11). Οι απορροφήσεις αυτές των φασμάτων υποδηλώνουν την παρουσία αρωματικού δακτυλίου με εκτεταμένη συζυγία. Πιο επισταμένη μελέτη των φασμάτων αυτών και σύγκρισή τους με τα αντίστοιχα του καφεϊκού και του ροσμαρινικού οξέος οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι ενώσεις 1 και 2 είναι παράγωγα του κινναμωμικού οξέος (Σχήμα 5.13). Το συμπέρασμα αυτό βρίσκεται σε συμφωνία με τα δεδομένα της φασματοσκοπίας NMR στα οποία, όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, είναι πιθανή η παρουσία κινναμωμικών παραγώγων (χαρακτηριστικές διπλές κορυφές με σταθερά σύζευξης 16 Hz).



Σχήμα 5.13. Τα φάσματα UV-Vis των ενώσεων (α) καφεϊκού οξέος και (β) ροσμαρινικού οξέος.

#### 5.1.4 Μελέτη της σύστασης των εκχυλισμάτων *Teucrium polium* με τη χρήση της συνδυαστικής τεχνικής LC-MS

Το σύστημα του χρωματογραφικού διαχωρισμού των συστατικών των εκχυλισμάτων του φυτού *Teucrium polium* χρησιμοποιήθηκε και για την μελέτη της σύστασης των εκχυλισμάτων αυτών με την συνδυαστική τεχνική LC-MS. Η καταγραφή του μοριακού ιόντος σε συνδυασμό με το χρόνο κατακράτησης των ενώσεων και τα φάσματα UV-Vis, είναι δυνατόν να προσφέρει εξαιρετικά χρήσιμες δομικές πληροφορίες για τα επιμέρους συστατικά των εκχυλισμάτων. Από την εφαρμογή της τεχνικής αυτής επιβεβαιώνεται ότι στα εκχύλισματα του φυτού *Teucrium polium* απαντώνται τα ίδια συστατικά με μικρές διαφοροποιήσεις ως προς τα επίπεδα συγκέντρωσής τους. Το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα EETP3 εμφανίζει σημαντικές διαφορές από τα υπόλοιπα όπως φαίνεται και από το Σχήμα 5.14.



Σχήμα 5.14. Τα χρωματογραφήματα συνολικού ιοντος (TIC) των εκχυλισμάτων (α) υδατικού ΑΕΤΡ, (β) μεθανολικών ΜΕΤΡ1, (γ) ΜΕΤΡ3 και (δ) οξικού αιθυλεστέρα ΕΕΤΡ3. Στο χρωματογράφημα σημειώνεται τα μοριακά θραύσματα  $[M-H]^-$  των κυριότερων κορυφών.

Η κορυφή 1 εμφανίζει μοριακό ιόν  $[M-H]^-$  623 και σε συνδυασμό με το φάσμα UV-Vis, υποδηλώνει την ύπαρξη κινναμωμικού παραγώγου στα εκχυλίσματα. Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, θα μπορούσε να αποδοθεί στο βερμπασκοζίτη ή στην ισομερή ένωση ακτεοζίτη (Oganessian, *et al.*, 1992, Serrilli, *et al.*, 2007). Το φάσμα UV-Vis της κορυφής 2 είναι παρόμοιο εκείνου της κορυφής 1 (Σχήμα 5.11) και το μοριακό θραύσμα  $[M-H]^-$  στα 769,6 amu είναι χαρακτηριστικό της παρουσίας του πολιομοζίτη ή τευπολιουζίτη ή του τευκριοζίτη. Η παρουσία των ενώσεων του τύπου αυτού είναι χαρακτηριστική στα εκχυλίσματα των φυτών του γένους *Teucrium* και είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί για τον χαρακτηρισμό τους (Andary, *et al.*, 1985, Oganessian, *et al.*, 1992, El-Mousallamy, *et al.*, 2000, Bedir, *et al.*, 2003).

Όπως ήδη έχει αναφερθεί οι κορυφές 3 έως 8 είναι φλαβονοειδή καθώς στα φάσματα UV-Vis παρατηρούνται οι χαρακτηριστικές απορροφήσεις των φλαβονοειδών. Το μητρικό ιόν  $[M-H]^-$  με τιμή 269,2 της κορυφής 6 είναι

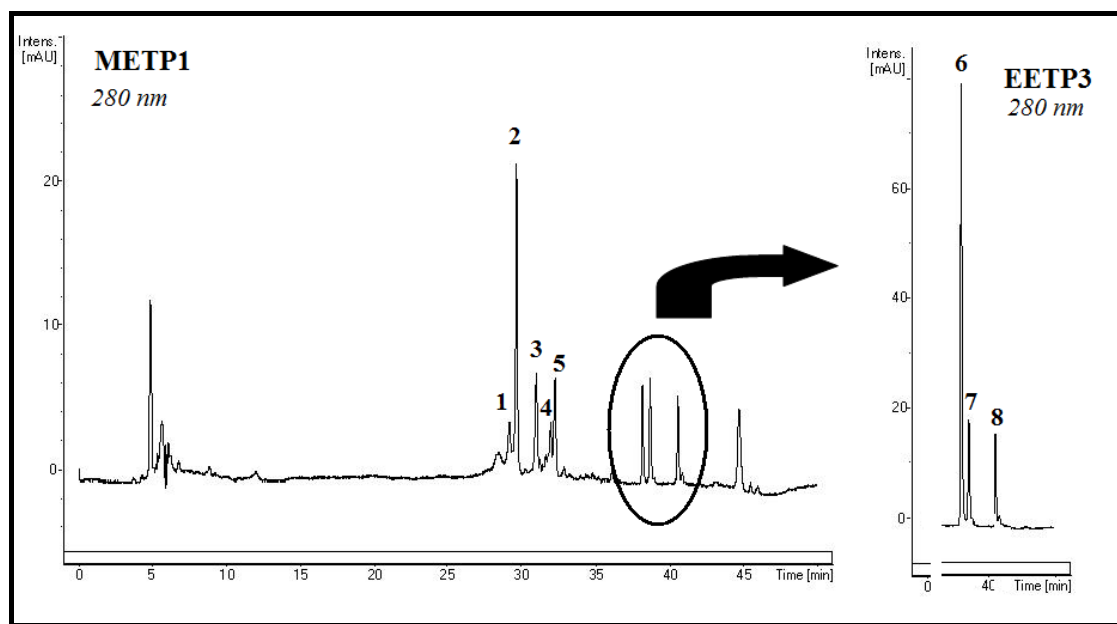
χαρακτηριστικό της φλαβόνης απιγενίνη (Sanchez-Rabaneda, *et al.*, 2003, Exarchou *et al.*, 2003), της οποίας η παρουσία στα εκχυλίσματα του φυτού *Teucrium polium* έχει ήδη αναφερθεί (Tomas-Barberan, *et al.*, 1990, Stefova, *et al.*, 2007). Οι κορυφές 4 και 5 εμφανίζουν το ίδιο μοριακό ιόν  $[M-H]^-$  με τιμή 431,6 που πιθανόν αντιστοιχεί σε κάποιον γλυκοζίτη της απιγενίνης (Svehlikova, *et al.*, 2004). Με βάση τους χρόνους κατακράτησης και τα βιβλιογραφικά δεδομένα των εκχυλισμάτων του *Teucrium* η κορυφή 4 πρέπει να είναι ο 7-*O*-γλυκοζίτης της απιγενίνης και η κορυφή 5 είναι ο 4'-*O*-γλυκοζίτης της απιγενίνης, (Harborne, *et al.*, 1986, Hassani, *et al.*, 2007, Kawashty, *et al.*, 1999). Επίσης, η κορυφή 3 που έχει κύριο μοριακό ιόν στα 577 amu και δευτερεύον θραύσμα στα 269,2 amu αποδίδεται στο ρουτινοζίτη της απιγενίνης που έχει αναφερθεί στα εκχυλίσματα του φυτού *Teucrium polium* (Harborne, *et al.*, 1986, Zhou, *et al.*, 2008). Τέλος, οι ενώσεις 7 και 8 που από τα φάσματα UV-Vis έχουν χαρακτηριστεί ως φλαβονοειδή και αντιστοιχούν στα μοριακά ιόντα  $[M-H]^-$  329,5 amu και 313,5 amu, δεν έχουν αναφερθεί ότι περιέχονται στα εκχυλίσματα του φυτού *Teucrium polium*. Η τιμή των μοριακών ιόντων σε συνδυασμό με το χρόνο κατακράτησης και τη σύσταση της κινητής φάσης κατά την έκλουση τους (70% ACN -30% H<sub>2</sub>O) οδηγούν στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για μη γλυκοζυλιωμένα φλαβονοειδή που φέρουν χαρακτηριστικές ομάδες (π.χ.μεθοξυ-ομάδες). Τα εκχυλίσματα του φυτού *Teucrium polium* χαρακτηρίζονται από την παρουσία μεθοξυ-φλαβονών που αρκετά συχνά χρησιμοποιούνται για το βοτανικό χαρακτηρισμό των ειδών του γένους *Teucrium* (Harborne *et al.*, 2006, Oganessian, 2007, Stefova *et al.*, 2007).

### 5.1.5 Μελέτη της σύστασης των εκχυλισμάτων *Teucrium polium* με τη χρήση της συνδυαστικής τεχνικής LC-SPE-NMR

Από τα παραπάνω γίνεται φανερό, πως για την πλήρη ταυτοποίηση των επιμέρους συστατικών των εκχυλισμάτων του φυτού *Teucrium polium* απαιτείται η συλλογή περισσότερων πληροφοριών. Η κλασική προσέγγιση για τη μελέτη των φυσικών προϊόντων αφορά το διαχωρισμό και απομόνωση των συστατικών και το πλήρη χαρακτηρισμό τους με φασματοσκοπικές τεχνικές. Η χρήση της συνδυαστικής τεχνικής LC-SPE-NMR είναι μια εξελιγμένη διαδικασία επίλυσης τέτοιων προβλημάτων με το σημαντικό πλεονέκτημα ότι αποφεύγονται οι χρονοβόρες και πολυδάπανες διαδικασίες απομόνωσης των επιμέρους συστατικών.

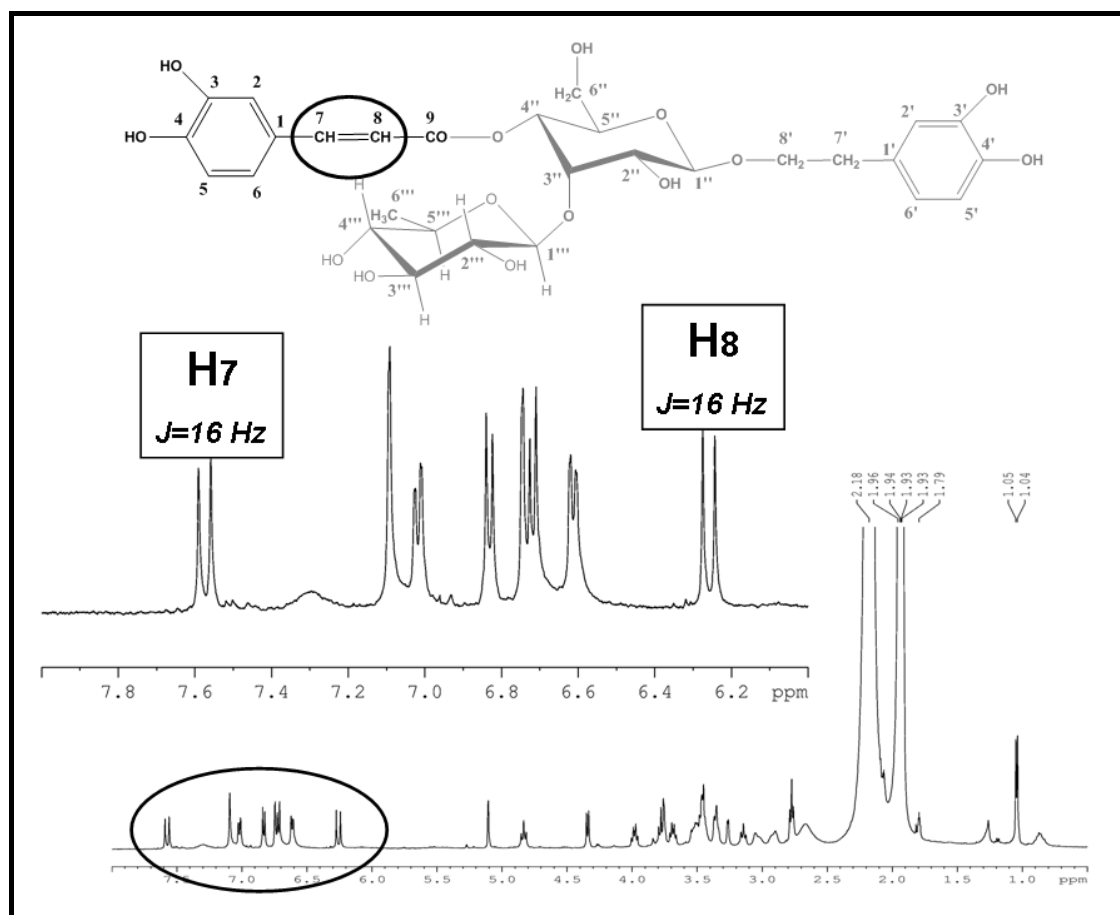
Για τη μελέτη της σύστασης των εκχυλισμάτων του φυτού *Teucrium polium* με τη συνδυαστική τεχνική LC-SPE-NMR χρησιμοποιήθηκε η μεθοδολογία με τις βελτιστοποιημένες παραμέτρους που αναπτύχθηκαν στο Κεφάλαιο 4. Η οργανολογική διάταξη και ορισμένες παράμετροι του συστήματος περιγράφονται στο Κεφάλαιο 3.6. Βασική επιδίωξη κατά τη χρήση της τεχνικής ήταν να διατηρηθεί το ίδιο χρωματογραφικό προφίλ του εκχυλίσματος, ώστε τα αποτελέσματα να αλληλοσυμπληρώνονται με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την τεχνική LC-MS. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε η ίδια στήλη διαχωρισμού και στα δύο χρωματογραφικά συστήματα. Μετά τη λήψη των φασμάτων NMR, κάθε ένωση απομακρύνεται από την κυψελίδα του υποδοχέα ροής του φασματογράφου NMR και συλλέγεται σε φιαλίδιο για να ακολουθήσει απευθείας έγχυσή του στο φασματογράφο μάζας.

Κατά τον χρωματογραφικό διαχωρισμό των εκχυλισμάτων του φυτού παρατηρήθηκε ότι στο μεθανολικό εκχύλισμα METP1 τα συστατικά 1 έως 5 βρίσκονται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση και έτσι το εκχύλισμα αυτό επιλέχθηκε για την ανάλυση αυτών των ενώσεων με LC-SPE-NMR. Επίσης, στο εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα EETP3 τα συστατικά 6-8 βρίσκονται σε συγκέντρωση τρεις φορές μεγαλύτερη περίπου σε σύγκριση με τα υπόλοιπα εκχύλισηματα όποτε το εκχύλισμα EETP3 χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των συστατικών 6-8 με την τεχνική LC-SPE-NMR (Σχήμα 5.15).



Σχήμα 5.15. Χρωματογραφικά προφίλ των εκχυλισμάτων METP1 και EETP3 στα 280 nm που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των συστατικών με LC-SPE-NMR.

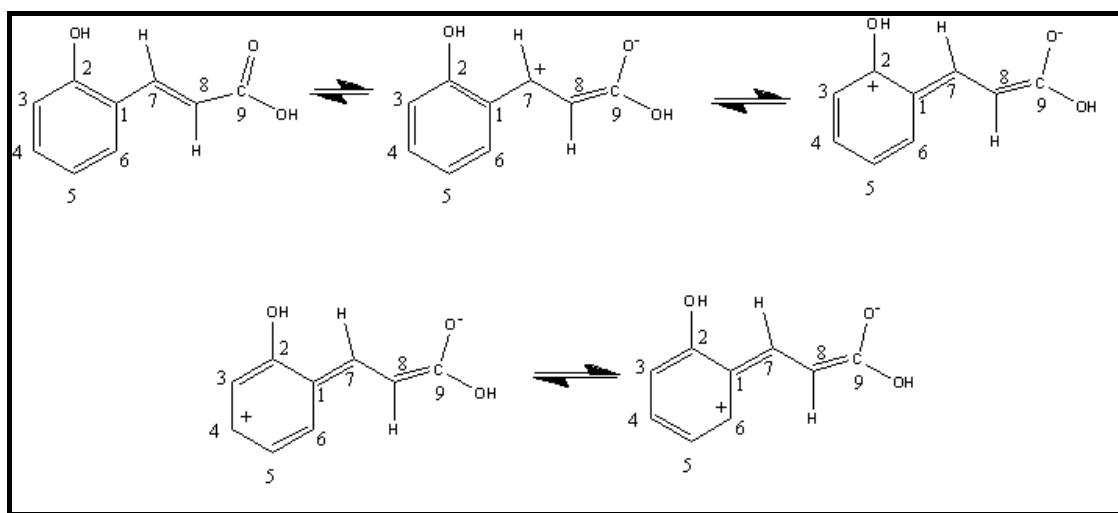
Με βάση τα δεδομένα της φασματοσκοπίας NMR μιας και δύο διαστάσεων και της τεχνικής LC-MS το συστατικό 1 του εκχυλίσματος METP1 πολύ πιθανόν αντιστοιχεί στην ένωση του βερμπασκοζίτη. Ο βερμπασκοζίτης είναι φαινολοπροπανοειδές που απαντάται στα φυτά της οικογένειας *Lamiaceae* και η παρουσία του στα εκχυλίσματα του *Teucrium polium* έχει αναφερθεί (Oganessian et al., 1992, Avula, et al., 2003, Serrilli et al., 2007). Ο τρόπος θραυσματοποίησης του κατά τον αρνητικό ιονισμό του συμφωνεί με τα βιβλιογραφικά δεδομένα (Ryan et al., 1999, Nenadis et al., 2007).



Σχήμα 5.16. Φάσμα NMR-<sup>1</sup>H του βερμπασκοζίτη (κορυφή 1) σε ACN-d<sub>3</sub>. Επιλεγμένη περιοχή του ίδιου φάσματος που σημειώνονται οι χαρακτηριστικές διπλές κορυφές των βινυλικών πρωτονίων του καφεϊκού τμήματος του βερμπασκοζίτη.

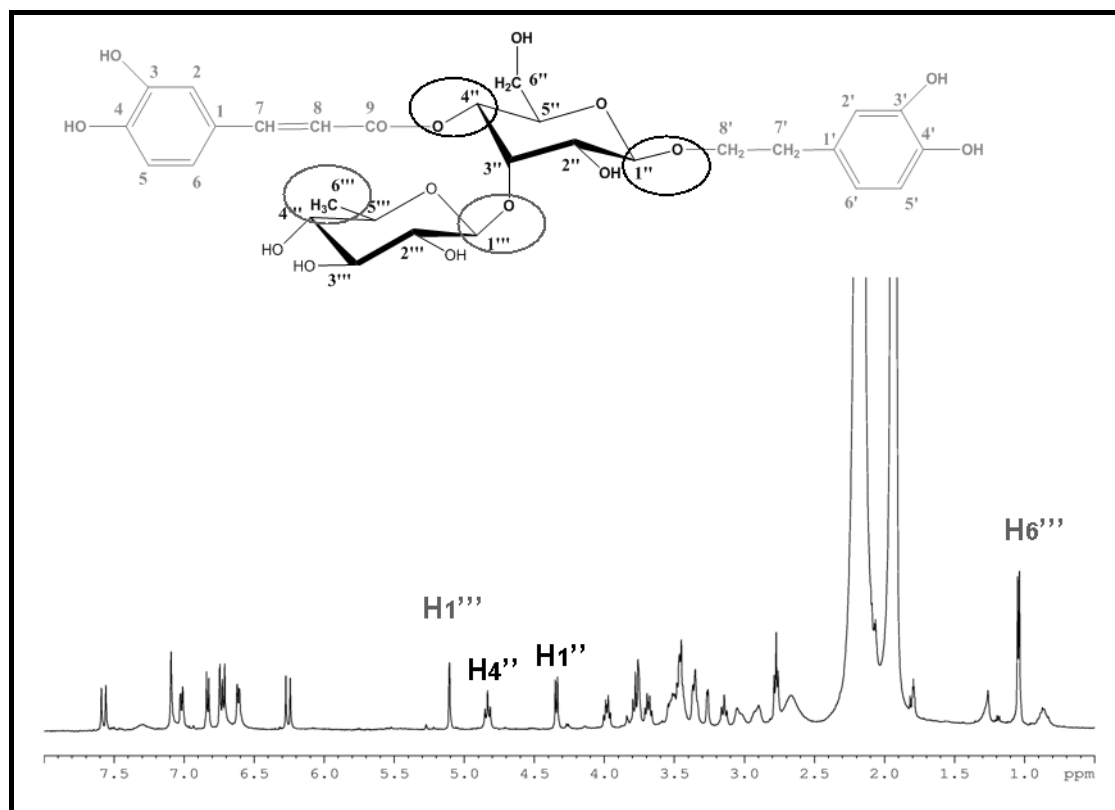
Όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.16 στην αρωματική περιοχή του πρωτονιακού φάσματος εμφανίζονται οι χαρακτηριστικές διπλές κορυφές με σταθερά σύζευξης  $J=15.8$  Hz στα 7,6 και 6,3 ppm που οφείλονται στα βινυλικά πρωτόνια H-7 και H-8 αντίστοιχα. Το πρωτόνιο H-7 δίνει κορυφή σε υψηλότερη συχνότητα από το H-8, που εξηγείται από τις δομές συντονισμού που παρουσιάζονται στο Σχήμα 5.17. Ο άνθρακας C-7 εμφανίζει μερικό θετικό φορτίο και έλκει τα ηλεκτρόνια του δεσμού C-7 – H-7 αποπροστατεύοντας με αυτόν τρόπο το πρωτόνιο H-7. Τέλος, η τιμή αυτή της σταθεράς σύζευξης υποδηλώνει την παρουσία του *trans* ισομερούς.





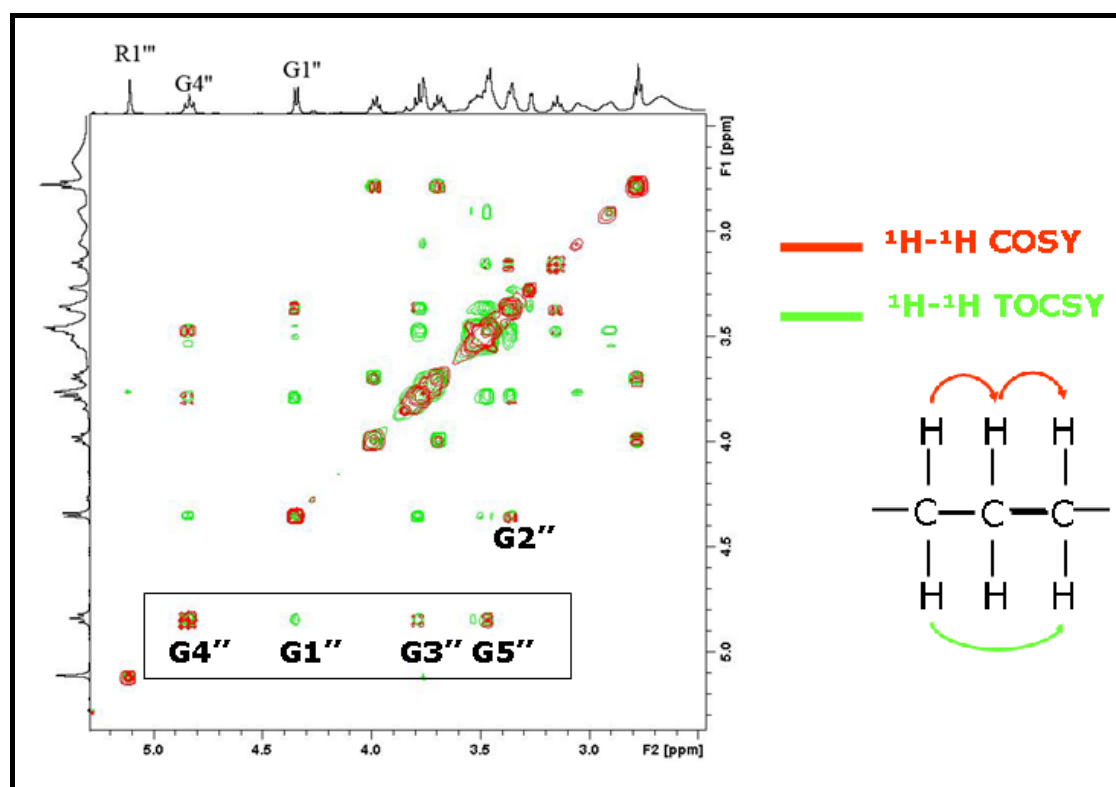
Σχήμα 5.17. Οι δομές συντονισμού του *ο*-κουμαρικού οξέος που εξηγούν την διαφορά στην χημική μετατόπιση των βινυλικών πρωτονίων H-7 και H-8.

Η αλειφατική περιοχή του πρωτονιακού φάσματος είναι αρκετά πολύπλοκη και είναι εξαιρετικά δύσκολο να ταυτοποιηθούν τα αντίστοιχα πρωτόνια χωρίς την χρήση διδιάστατων πειραμάτων COSY και TOCSY. Χαρακτηριστική, όμως, είναι η διπλή κορυφή στα 1,06 ppm με σταθερά σύζευξης  $J=6,1$  Hz και ολοκλήρωμα που υποδηλώνει ότι αντιστοιχεί σε τρία πρωτόνια. Η κορυφή αυτή σύμφωνα και με την βιβλιογραφία είναι χαρακτηριστική για το μόριο του ραμνόζης (Andary *et al.*, 1985, Oganesyan *et al.*, 1992, Yamasaki *et al.*, 2007). Οι κορυφές που παρουσιάζονται στη περιοχή από 4 έως 5,5 ppm είναι διαγνωστικής αξίας και είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν για τη διάκριση του ανωμερικού υδρογόνου των σακχάρων. Γενικά, υψηλές τιμές στη χημική μετατόπιση με τιμές σταθεράς σύζευξης από 0 έως 2,5 Hz οφείλονται σε ανωμερικά υδρογόνα σακχάρων που ακολουθούν την  $\alpha$ -διαμόρφωση, ενώ στα  $\beta$ -ανωμερή το ανωμερικό πρωτόνιο συντονίζεται σε χαμηλότερες τιμές συχνοτήτων και η σταθερά σύζευξης τους είναι 8 Hz περίπου. Στο φάσμα του βερμπασκοζίτη (Σχήμα 5.18) το ανωμερές υδρογόνο H-1'' εμφανίζεται στα 4.4 ppm με σταθερά σύζευξης  $J=7,9$  Hz που υποδηλώνει ότι σάκχαρο πιθανότατα βρίσκεται σε  $\beta$ -διαμόρφωση. Αντίθετα, το ανωμερές υδρογόνο H-1''' που απορροφά στα 5,2 ppm και έχει σταθερά σύζευξης  $J=0,8$  Hz υποδηλώνει  $\alpha$ -διαμόρφωση για το σάκχαρο.



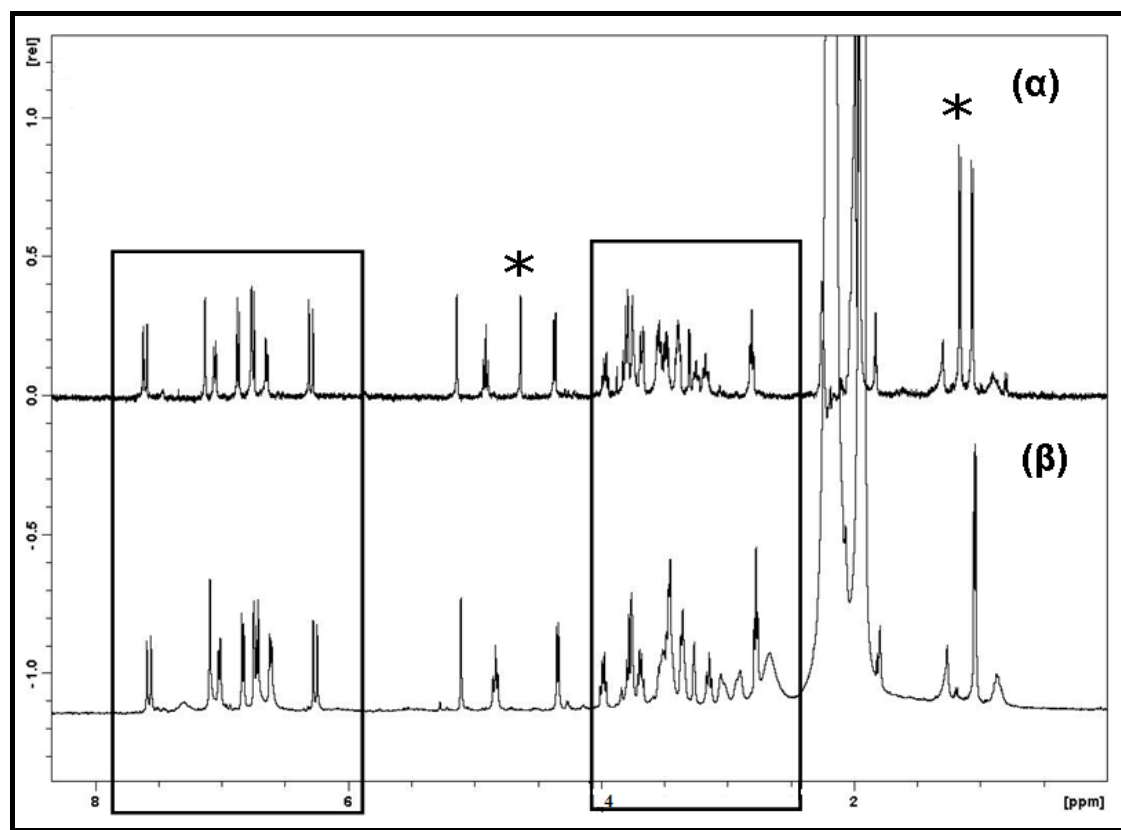
Σχήμα 5.18. Φάσμα NMR-<sup>1</sup>H του βερμπασκοζίτη (κορυφή 1) σε ACN-*d*<sub>3</sub>. Επιλεγμένη περιοχή του ίδιου φάσματος που σημειώνονται οι χαρακτηριστικές κορυφές των ανωμερικών υδρογόνων για την διάκριση της διαμόρφωσης των σακχάρων. Επιπλέον, σημειώνονται και χαρακτηριστικές κορυφές για την ταυτοποίηση των σακχάρων.

Για την πλήρη ταυτοποίηση των σακχάρων του μορίου είναι απαραίτητη η συνδυαστική μελέτη των φασμάτων δυο διαστάσεων COSY και TOCSY. Η μελέτη των φασμάτων αυτών έδειξε ότι τα σάκχαρα που υπάρχουν στο μόριο είναι η γλυκόζη με  $\beta$ -διαμόρφωση και η ραμνόζη με  $\alpha$ -διαμόρφωση. Η ταυτοποίηση όλων των σημάτων συντονισμού του βερμπασκοζίτη απεικονίζεται στον Πίνακα 5.1 και βρίσκονται σε συμφωνία με τα βιβλιογραφικά δεδομένα (Ackos *et al.*, 1999, Mmatli *et al.*, 2007).



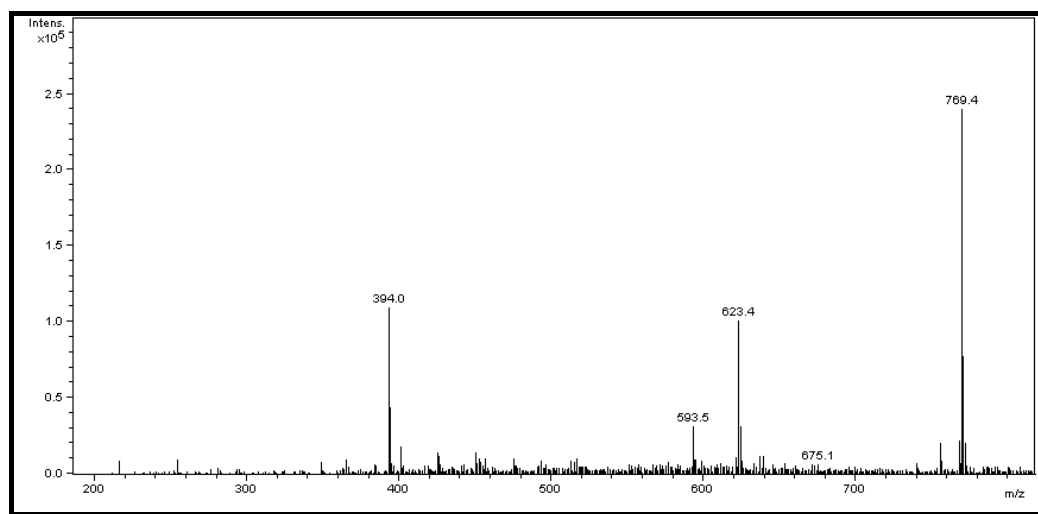
Σχήμα 5.19. Η αλειφατική περιοχή των φασμάτων COSY και TOCSY του βερμπασκοζίτη (κορυφή 1), όπου παρουσιάζονται οι κορυφές διασταύρωσης της γλυκόζης.

Στην συνέχεια μελετήθηκε η κορυφή 2 (Σχήμα 5.15), που αποτελεί το κύριο συστατικό του υδατικού εκχυλίσματος αλλά και των δύο μεθανολικών εκχυλισμάτων του φυτού *Teucrium polium*. Η κορυφή 2 αποδόθηκε στο πολιουμοζίτη (poliumoside) που η παρουσία του χαρακτηρίζει τα εκχυλίσματα του είδους *polium* (Andary *et al.*, 1985, Oganesyanyan, *et al.*, 1992, Bedir *et al.*, 1999, Sharififar *et al.*, 2009). Αρχικά μελετήθηκε το φάσμα NMR- $^1\text{H}$  της ένωσης, όπου είναι φανερή η ομοιότητα με το αντίστοιχο φάσμα του βερμπασκοζίτη. Η βασική διαφορά των δύο φασμάτων είναι η ύπαρξη μια επιπρόσθετης διπλής κορυφής στα 1,16 ppm με  $J=6,2$  Hz, που οφείλεται στην ύπαρξη μιας δεύτερης ραμνόζης στο μόριο του πολιουμοζίτη. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται και από την δεύτερη βασική διαφορά του φάσματος NMR- $^1\text{H}$  που είναι η παρουσία μιας ακόμη κορυφής στην περιοχή που συντονίζονται τα ανωμερή υδρογόνα και πιο συγκεκριμένα στα 4,64 ppm (d,  $J=1,1$  Hz).



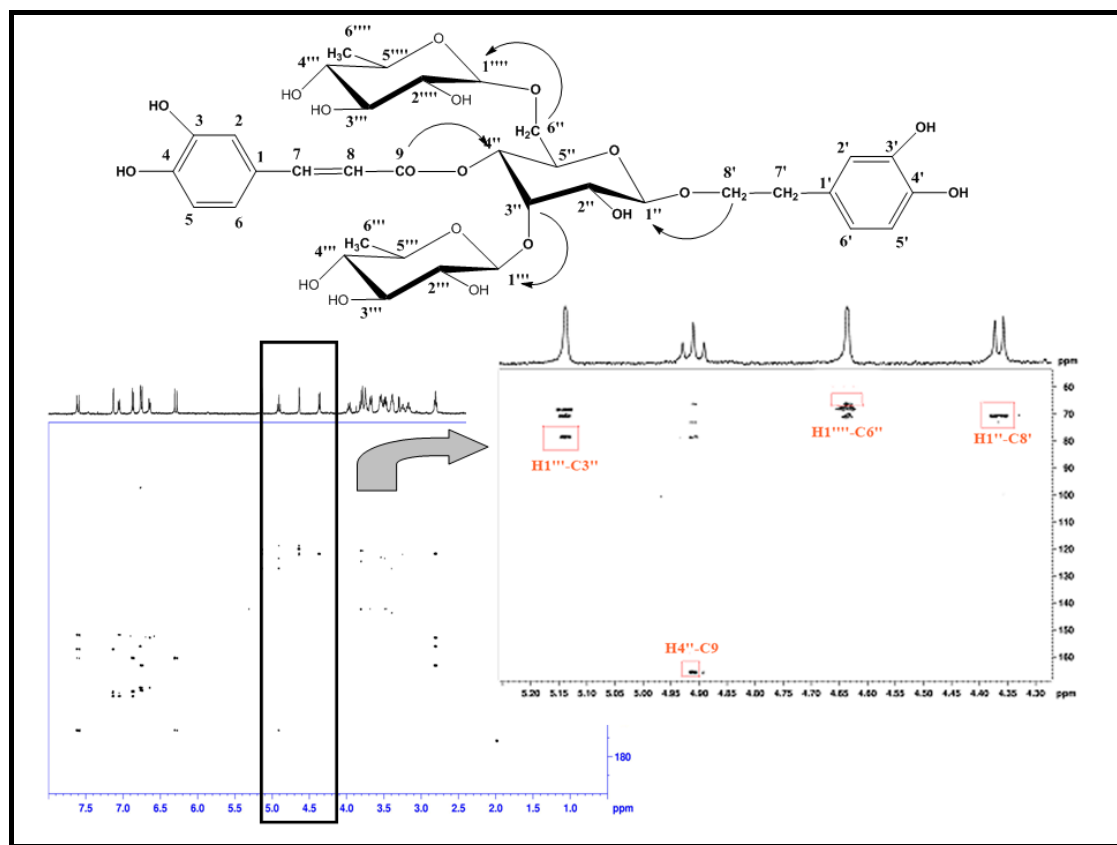
Σχήμα 5.20. Φάσματα  $\text{NMR-}^1\text{H}$  των ενώσεων (α) πολιοινοζίτη και (β) βερμπασκοζίτη σε  $\text{ACN-}d_3$ . Με αστερίσκο σημειώνονται οι βασικές διαφορές των φασμάτων που εμφανίζουν διαγνωστική αξία.

Η παραπάνω υπόθεση επιβεβαιώνεται και από τα αποτελέσματα της φασματομετρίας μαζών. Στο φάσμα μαζών του πολιοινοζίτη εμφανίζεται το θραύσμα με τιμή 623,4 amu που αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν του βερμπασκοζίτη και προκύπτει με απώλεια ενός μορίου ραμνόζης



Σχήμα 5.21. Φάσμα μαζών MS του πολιοινοζίτη (κορροφή 2).

Η ταυτοποίηση όλων των πρωτονίων της γλυκόζης και των δυο μορίων ραμνόζης πραγματοποιήθηκε με την ανάλυση των δισδιάστατων χαρτών COSY και TOCSY, όπως και στην περίπτωση του βερμπασκοζίτη. Το ενδιαφέρον επικεντρώθηκε στην εύρεση της θέσης σύνδεσης της δεύτερης ραμνόζης. Σύμφωνα με την σχετική βιβλιογραφία η δεύτερη ραμνόζη είναι δυνατό να συνδεθεί μέσω της υδροξυλομάδας του άνθρακα C-6'' της γλυκόζης οπότε προκύπτει ο πολιομουζίτης, που είναι ήδη μια γνωστή ένωση ή μέσω της υδροξυλομάδας του άνθρακα C-2''' της ραμνόζης οπότε προκύπτει μια καινούρια ένωση. Η σύνδεση μέσω της ραμνόζης έχει αναφερθεί στην ένωση τευκριοζίτης (teucrioside) όπου αντί της ραμνόζης συνδέεται μια λυξόζη (Gross *et al.*, 1988, Bedir *et al.*, 2003). Για το λόγο αυτό κρίθηκε σκόπιμο να επαναληφθεί η διαδικασία της πολλαπλής παγίδευσης για περισσότερες φορές ώστε να συγκεντρωθεί η απαραίτητη ποσότητα και να είναι δυνατή η λήψη φάσματος HMBC που θα φανερώσει τον τρόπο σύνδεσης των σακχάρων και θα οδηγήσει στον αδιαμφισβήτητο χαρακτηρισμό της ένωσης.



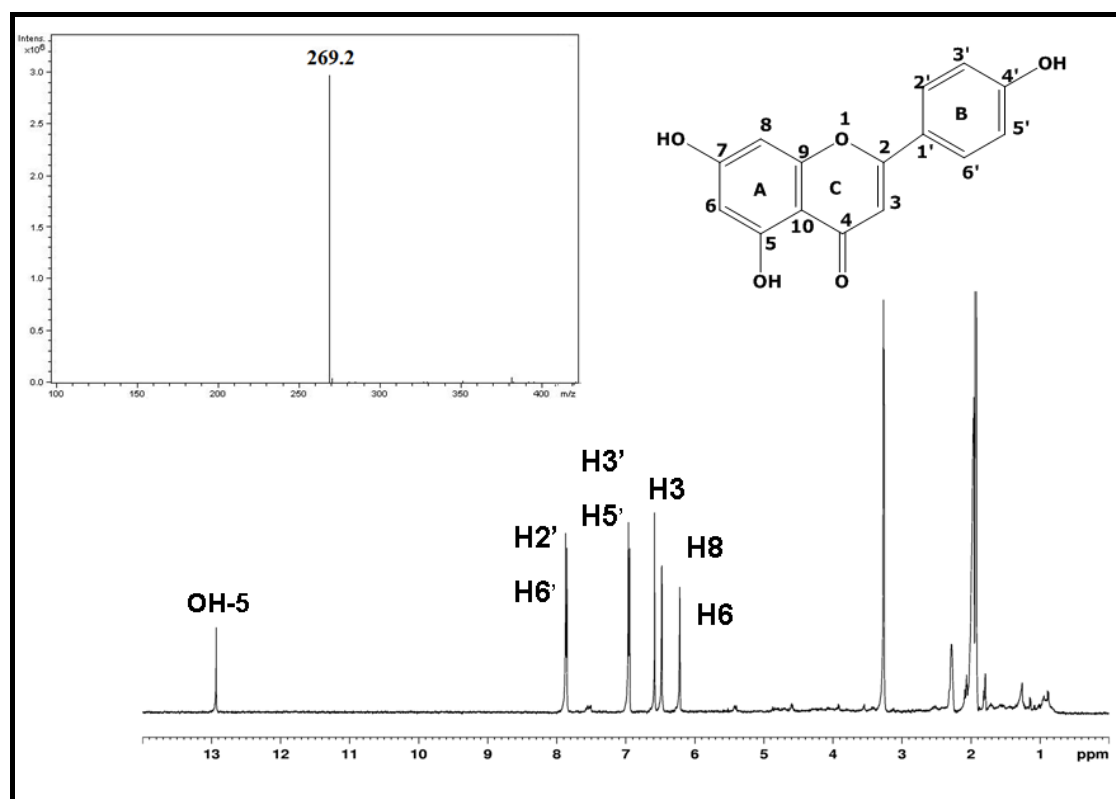
Σχήμα 5.22. Δισδιάστατος χάρτης φάσματος HMBC  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  του πολιομουζίτη και επιλεγμένη περιοχή του ίδιου φάσματος, που σημειώνονται οι διασταυρούμενες κορυφές που φανερώνουν τη δομή της ένωσης.

Η ανάλυση του φάσματος HMBC μας οδήγησε στην απόδοση της κορυφής 2 στην ένωση του πολιοουμοζίτη. Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 5.22 το ανωμερικό υδρογόνο H-1'''' της δεύτερης ράμνοζης δίνει κορυφή διασταύρωσης με τον άνθρακα C-6'' της γλυκόζης. Με το φάσμα αυτό επιβεβαιώθηκε και ο τρόπος σύνδεσης όλων των σακχάρων όπως φαίνεται στην επιλεγμένη περιοχή του φάσματος HMBC. Η ταυτοποίηση όλων των πρωτονίων της ένωσης παρατίθεται στον Πίνακα 5.2.

Πίνακας 5.2. Χημικές μετατοπίσεις και σταθερές σύζευξης για τον βερμπασκοζίτη και τον πολιοινομοζίτη σε διαλύτη ACN- $d_3$ .

Πρωτόνιο	Βερμπασκοζίτης	Πολιοινομοζίτης
<b>Καφεϊκό οξύ</b>		
H-2	7,13 <i>d(1,82)</i>	7,13 <i>d(1,82)</i>
H-5	6,87 <i>d(8,30)</i>	6,87 <i>d(8,30)</i>
H-6	7,06 <i>dd(8,26/1,82)</i>	7,06 <i>dd(8,26/1,82)</i>
H-7	7,61 <i>d(15,80)</i>	7,61 <i>d(15,80)</i>
H-8	6,29 <i>d(15,80)</i>	6,29 <i>d(15,80)</i>
<b>Άγλυκο</b>		
H-2'	6,78 <i>d(1,98)</i>	6,77 <i>d(1,98)</i>
H-5'	6,76 <i>d(7,98)</i>	6,75 <i>d(7,98)</i>
H-6'	6,66 <i>dd(7,98/1,98)</i>	6,66 <i>dd(7,98/1,98)</i>
H-7'	2,81 <i>t(7,08)</i>	2,81 <i>t(7,08)</i>
H-8'a	3,73 <i>dd(9,64/2,54)</i>	3,68 <i>dd(9,64/2,54)</i>
H-8'b	4,02 <i>dd(9,64/2,54)</i>	3,97 <i>dd(9,64/2,54)</i>
<b>Γλυκόζη</b>		
H-1''	4,38 <i>d(7,78)</i>	4,37 <i>d(7,78)</i>
H-2''	3,30 <i>d(8,44)</i>	3,38
H-3''	3,81 <i>m</i>	3,79 <i>m</i>
H-4''	4,88 <i>t(9,54)</i>	4,92 <i>t(9,60)</i>
H-5''	3,49	3,66
H-6''	3,56	3,67/3,49
<b>Ραμνόζη I</b>		
H-1'''	5,15 <i>d(0,88)</i>	5,14 <i>d(0,88)</i>
H-2'''	3,80 <i>m</i>	3,76 <i>m</i>
H-3'''	3,48	3,38
H-4'''	3,18 <i>d(9,54)</i>	3,15 <i>m</i>
H-5'''	3,40 <i>d(8,44)</i>	3,46 <i>m</i>
H-6'''	1,06 <i>d(6,22)</i>	1,06 <i>d(6,20)</i>
<b>Ραμνόζη II</b>		
H-1''''	-	4,64 <i>d(1,20)</i>
H-2''''	-	3,74
H-3''''	-	3,53
H-4''''	-	3,23 <i>m</i>
H-5''''	-	3,52 <i>m</i>
H-6''''	-	1,16 <i>d(6,20)</i>

Το επόμενο συστατικό που μελετήθηκε είναι η κορυφή 6, που όπως φαίνεται από το Σχήμα 5.15 βρίσκεται σε μεγάλη συγκέντρωση. Το φάσμα μαζών της 6 δίνει ένα μητρικό ιόν  $[M-H]^-$  στα 269,2 amu που είναι χαρακτηριστικό θραύσμα της απιγενίνης. Το φάσμα NMR- $^1H$  επιβεβαιώνει ότι πρόκειται για μια φλαβόνη καθώς παρατηρείται κορυφή απορρόφησης στα 13 ppm περίπου που οφείλεται στο αποπροστατευμένο πρωτόνιο του υδροξυλίου της θέσης 5. Η εμφάνιση του σήματος συντονισμού στα 13 ppm είναι χαρακτηριστική των φλαβονών όπως ήδη έχει αναφερθεί προηγουμένως (Σχήμα 5.23).



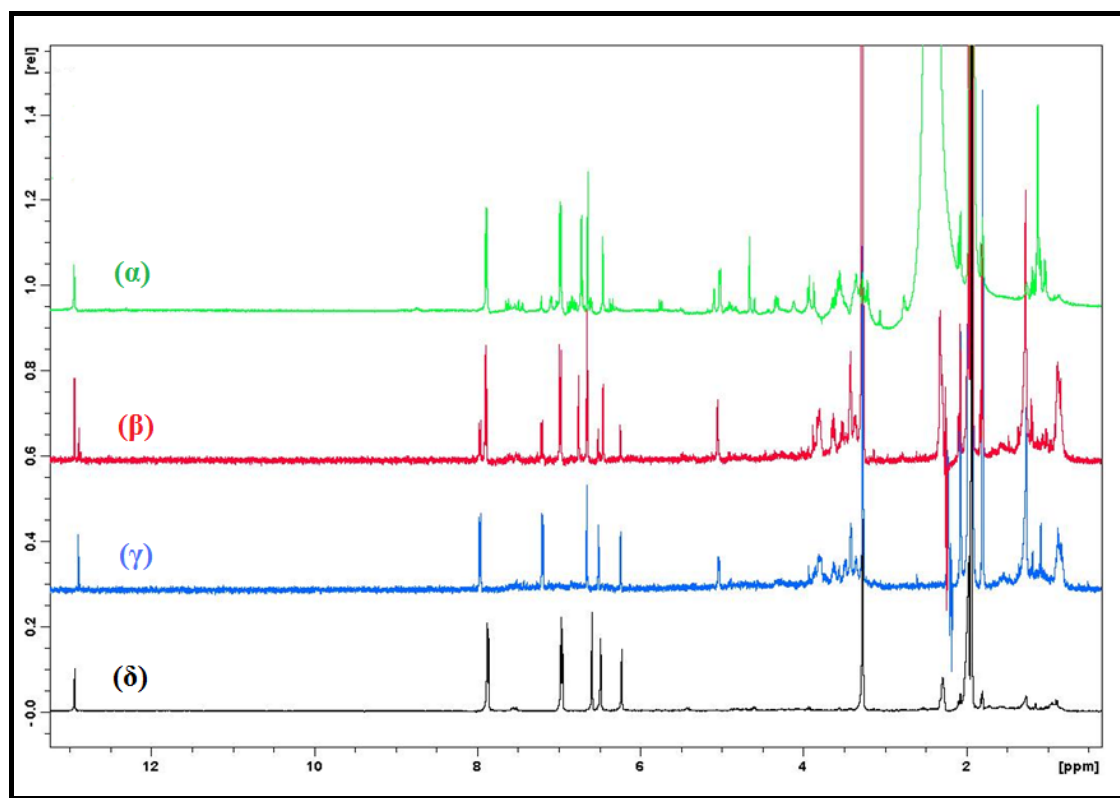
Σχήμα 5.23. Φάσμα NMR- $^1H$  της απιγενίνης σε  $ACN-d_3$  και φάσμα μαζών της ίδιας ένωσης.

Στην αρωματική περιοχή εμφανίζεται σύστημα spin που αντιστοιχεί σε φλαβονοειδές. Η παρουσία της υδροξυλομάδας στο άνθρακα C-4' του δακτυλίου B εύκολα διακρίνεται καθώς παρατηρείται φάσμα τύπου AA'XX'. Αντίθετα, η υποκατάσταση σε *ortho* θέση στο δακτύλιο B θα οδηγούσε σε ένα τυπικό φάσμα 1,2,4- τριποκατεστημένου βενζολίου (Clarkson *et al.*, 2005, Exarchou *et al.*, 2006).

Η ανάλυση των φασμάτων NMR των κορυφών 3, 4 και 5 πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονα καθώς από τα φάσματα μαζών αναμένεται να είναι γλυκοζίτες της απιγενίνης. Οι κορυφές 4 και 5 δίνουν κύρια μοριακά ιόντα  $[M-H]^-$  431,2 και 431,5



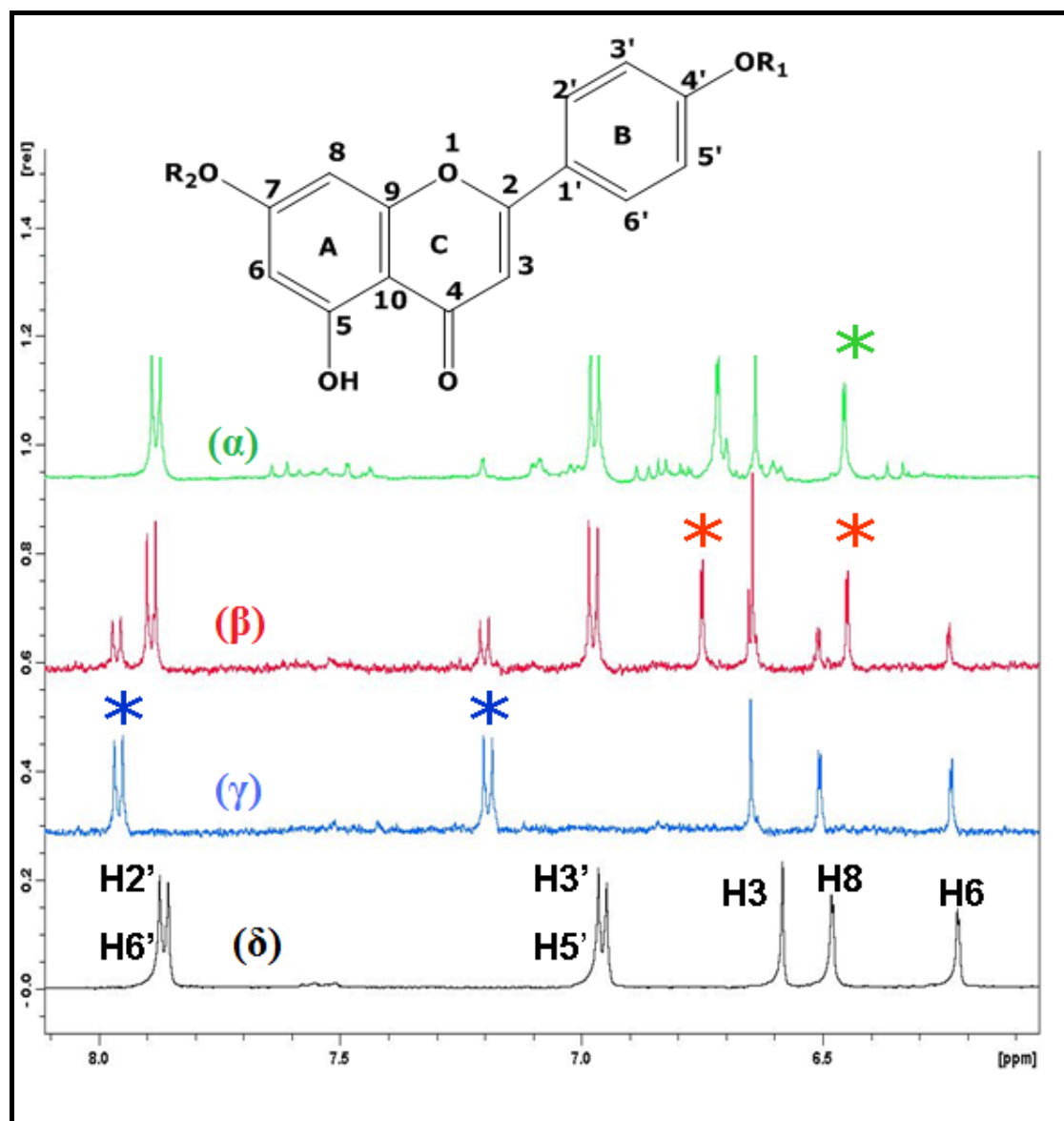
amu που αντιστοιχούν σε γλυκοζίτες της απιγενίνης ενώ η κορυφή 3 έχει ως κύριο μοριακό ιόν  $[M-H]^-$  577,1 amu, που από τη σχετική βιβλιογραφία αποδίδεται στον ρουτινοζίτη της απιγενίνης. Τα σάκχαρα μπορούν να συνδεθούν στις ελεύθερες υδροξυλομάδες στις θέσεις 4' στο δακτύλιο B και στη θέση 7 στον δακτύλιο A. Η θέση 5 του δακτυλίου A αποκλείεται καθώς στο φάσμα NMR- $^1H$  η κορυφή στα 13 ppm διατηρείται όπως φαίνεται και στο Σχήμα 5.24.



Σχήμα 5.24. Φάσματα NMR- $^1H$  σε ACN- $d_3$  των ενώσεων (α) 7-O-ρουτινοζίτη της απιγενίνης, (β) 7-O-γλυκοζίτη της απιγενίνης, (γ) 4'-O-γλυκοζίτη της απιγενίνης και (δ) της απιγενίνης.

Συγκριτική μελέτη των αρωματικών περιοχών των φασμάτων NMR των τεσσάρων αυτών ενώσεων οδηγεί εύκολα στη διάκριση της θέσης που συνδέεται το σάκχαρο με την απιγενίνη. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.25 τα πρωτόνια του δακτυλίου που υφίσταται τη γλυκοζιλίωση μετατοπίζονται σε μεγαλύτερες τιμές συχνοτήτων λόγω του επαγωγικού φαινομένου. Έτσι, για τις κορυφές 4 και 5, που η σύνδεση του σακχάρου γίνεται στο δακτύλιο A, παρατηρείτε μετατόπιση των πρωτονίων H-6 και H-8 σε μεγαλύτερες τιμές ppm, ενώ στην ένωση που αντιστοιχεί στην κορυφή 5 παρατηρείται μετατόπιση σε μεγαλύτερες τιμές ppm των πρωτονίων H-2', H-3', H-5' και H-6', εξαιτίας της γλυκοσιλίωσης στο δακτύλιο B. Επιπλέον, τα

πρωτόνια που βρίσκονται σε *ortho* θέση ως προς τη σύνδεση με το μόριο σακχάρου υφίστανται μεγαλύτερη επίδραση.



Σχήμα 5.25. Επιλεγμένη περιοχή φασμάτων NMR-<sup>1</sup>H σε ACN-*d*<sub>3</sub> των ενώσεων (α) 7-Ο-ρουτινοζίτη της απιγενίνης, (β) 7-Ο-γλυκοζίτη της απιγενίνης, (γ) 4'-Ο-γλυκοζίτη της απιγενίνης και (δ) της απιγενίνης.

Όσον αφορά στην διαμόρφωση των σακχάρων στους γλυκοζίτες της απιγενίνης προτείνεται η β-διαμόρφωση για τα μόρια της γλυκόζης, καθώς το ανωμερικό υδρογόνο απορροφά στα 5 ppm περίπου με σταθερά σύζευξης  $J=7,6$  Hz. Για τον ρουτινοζίτη της απιγενίνης το μόριο της ραμνόζης έχει α- διαμόρφωση, καθώς το αντίστοιχο πρωτόνιο συντονίζεται σε μεγαλύτερες συχνότητες και η σταθερά σύζευξης δεν υπερβαίνει την τιμή 2 Hz. Στον Πίνακα 5.2 αναγράφονται οι χημικές μετατοπίσεις και οι σταθερές σύζευξης των πρωτονίων των ενώσεων 3-6.

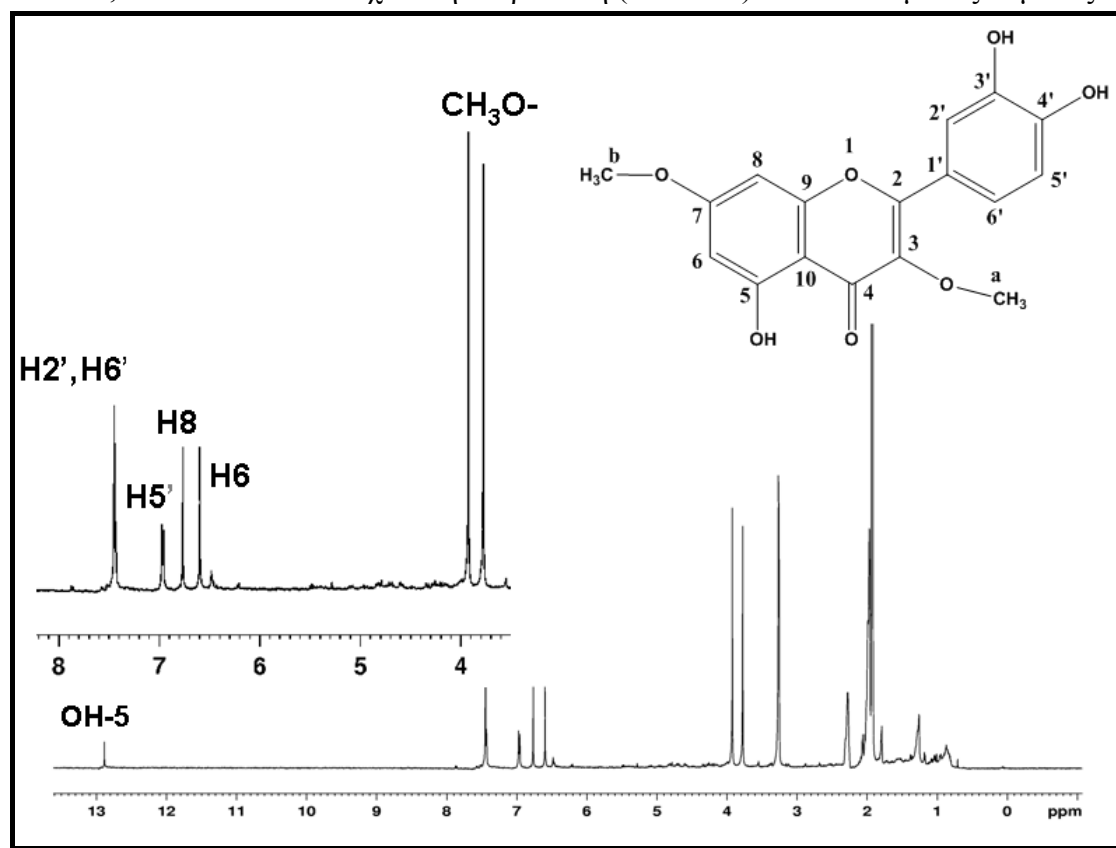
Πίνακας 5.3. Χημικές μετατοπίσεις και σταθερές σύζευξης για τον την απιγενίνη, τον 4'-Ο-γλυκοζίτη της απιγενίνης, τον 7- Ο- γλυκοζίτη της απιγενίνης και τον 7- Ο- ρουτινοζίτη της απιγενίνης σε διαλύτη ACN-d<sub>3</sub>

Πρωτόνιο	Απιγενίνη	Γλυκοζίτης-4'- Ο-απιγενίνης	Γλυκοζίτης-7-Ο- απιγενίνης	Ρουτινοζίτης-7- Ο-απιγενίνης
3	6,58 s	6,65 s	6,65 s	6,64 s
6	6,22 d(1,98)	6,23 d(2,20)	<b>6,45</b> d(2,10)	<b>6,46</b> d(1,98)
8	6,48 d(1,92)	6,50 d(2,20)	<b>6,75</b> d(2,36)	<b>6,72</b> d(2,36)
2'	7,87 d(8,80)	7,97 d(9,10)	7,90 d(8,88)	7,89 d(8,88)
3'	6,96 d(8,80)	<b>7,20<sup>a</sup></b> d(9,10)	6,98 d(8,88)	6,98 d(8,88)
5'	6,96 d(8,80)	<b>7,20</b> d(9,10)	6,98 d(8,88)	6,98 d(8,88)
6'	7,87 d(8,80)	7,97 d(9,10)	7,90 d(8,88)	7,89 d(8,88)
Γλυκόζη-1	-	5,03 d(7,56)	5,04 d(7,62)	5,01 d(7,54)
Ραμνόζη-1	-	-	-	4,65 d(1,12)
Ραμνόζη-6	-	-	-	1,12 d(6,34)
σάκχαρα	-	4,0-3,3	4,0-3,3	4,4-3,1
OH-5	12,93	12,89	12,93	12,94

<sup>a</sup> οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων που επηρεάζονται σημαντικά από την γλυκοσίωση σε σύγκριση με τις χημικές μετατοπίσεις της απιγενίνης.

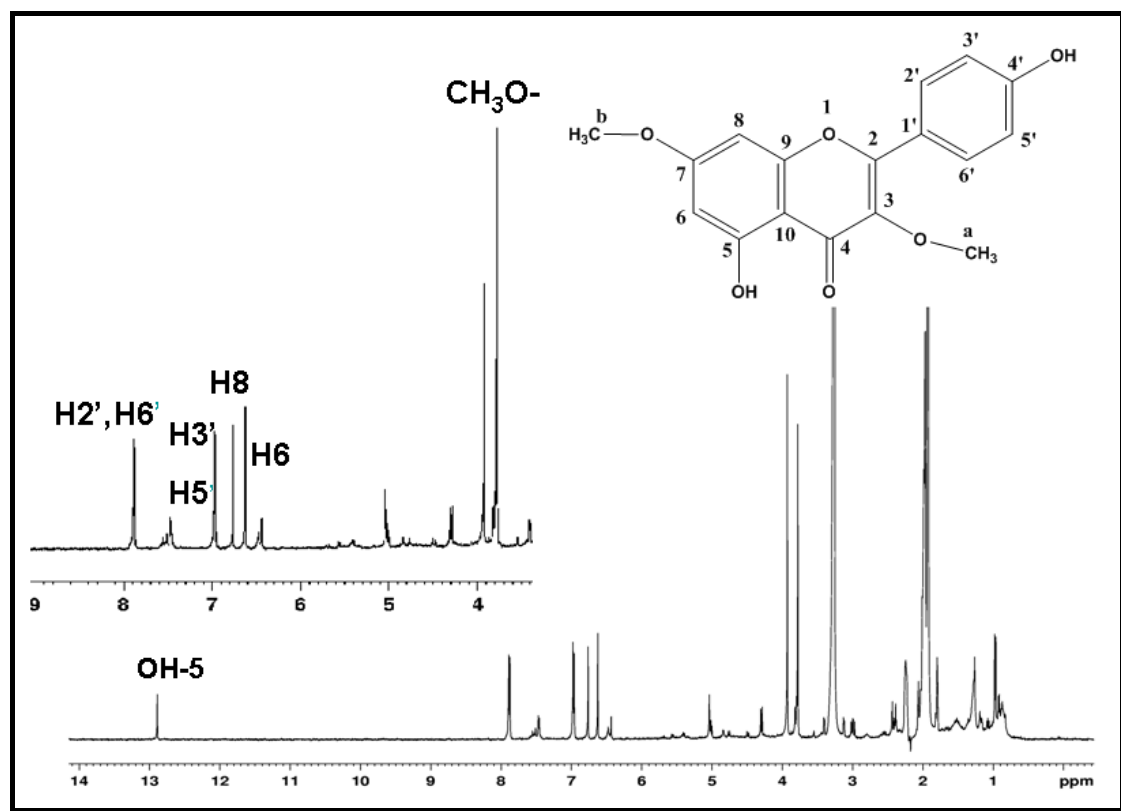
Η κορυφή 7 ταυτοποιήθηκε ως η 3,7-διμεθοξυ-κερκετίνη. Χαρακτηριστική περιοχή του φάσματος NMR, είναι η περιοχή που συντονίζονται τα πρωτόνια των μεθοξυ-ομάδων. Η χαρακτηριστική κορυφή διαγνωστικής αξίας για τα φλαβονόλες, όπως η κερκετίνη, βρίσκεται στα 12 ppm, αλλά η μετατροπή της υδροξυλομάδας στον άνθρακα C-3 σε μεθύξυ ομάδα, αποπροστατεύει το υδροξυλικό πρωτόνιο της θέσης 5, που συντονίζεται στα ~13 ppm. Τα δεδομένα της φασματομετρίας μαζών

επιβεβαιώνουν την παραπάνω υπόθεση, καθώς η ένωση εμφανίζει μητρικό ιόν  $[M-H]^-$  στα 329,4 amu που αντιστοιχεί στην κερκετίνη (M.B 301) και σε δυο μεθόξυ ομάδες.



Σχήμα 5.26. Φάσμα  $NMR-^1H$  σε  $ACN-d_3$  της 3,7-διμεθοξυ-κερκετίνης.

Ανάλογη δομή έχει και η ένωση που αντιστοιχεί στην κορυφή 8. Η ένωση αυτή είναι η 3,7-διμεθοξυ-καιμφερόλη. Η χαρακτηριστική κορυφή του πρωτονίου της OH-5 βρίσκεται στα 13 ppm λόγω της μεθοξυ-ομάδας στην θέση C-3 και οι κορυφές των μεθόξυ ομάδων εμφανίζονται στα 4 ppm περίπου, όπως και στην περίπτωση της 3,7-διμεθοξυ-κερκετίνης. Η διαφοροποίηση στο φάσμα  $NMR-^1H$  της ένωσης εντοπίζεται στην αρωματική περιοχή που το σύστημα spin-spin παραπέμπει σε φάσμα τύπου AA'XX'.



Σχήμα 5.27. Φάσμα  $NMR-^1H$  σε  $ACN-d_3$  της 3,7-διμεθοξυ-καμπερόλης.

Η δομή της ένωσης επιβεβαιώνεται και από το φάσμα μαζών, στο οποίο εμφανίζεται το μητρικό ιόν  $[M-H]^-$  στα 313,4 amu και αντιστοιχεί στην καμπερόλη (MB=285) και σε δυο μεθόξυ ομάδες. Οι χημικές μετατοπίσεις και οι σταθερές σύζευξης για τις ενώσεις 7 και 8 αναγράφονται στον Πίνακα 5.3.

Πίνακας 5.4. Χημικές μετατοπίσεις και σταθερές σύζευξης για την 3,7-διμεθοξυ-κερκετίνη και την 3,7-διμεθοξυ-καιμπερόλη σε διαλύτη ACN- $d_3$ .

Πρωτόνιο	3,7-διμεθοξυ-κερκετίνη	3,7-διμεθοξυ-καιμπερόλη
6	6,60 <i>s</i>	6.62 <i>s</i>
8	6,76 <i>s</i>	6.76 <i>s</i>
2'	7,45 <i>s</i>	7.88 <i>d (8.68)</i>
3'	-	6.97 <i>d (8.68)</i>
5'	6,96 <i>d (8,56)</i>	6.97 <i>d (8.68)</i>
6'	7.43 <i>s</i>	7.88 <i>d (8.68)</i>
3-OCH <sub>3</sub>	3.77 <i>s</i>	3.77 <i>s</i>
7-OCH <sub>3</sub>	3.93 <i>s</i>	3.93 <i>s</i>
OH-5	12.89 <i>s</i>	12.89 <i>s</i>

## 5.2 Μελέτη εκχυλισμάτων του φυτού *Sideritis syriaca*

### 5.2.1 Εισαγωγή

Τα υπέργεια τμήματα του φυτού *Sideritis syriaca* καθώς και των υπολοίπων ειδών του γένους *Sideritis* είναι ευρέως γνωστά στην Ελλάδα ως «τσάι του βουνού». Στην παραδοσιακή ιατρική των λαών της λεκάνης της Μεσογείου, τα αφεψημάτα αυτού του φυτού αποτελούν τα πιο κοινά ροφήματα και χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση του κοινού κρυολογήματος, αλλά και πλήθους ασθενειών λόγω των βιολογικών δράσεων που έχουν ήδη αναφερθεί (Κεφάλαιο 1) (Gabrieli, *et al.*, 2005, Kureli, *et al.*, 2007). Οι βιολογικές δράσεις που αναφέρονται στα φυτά του γένους *Sideritis* έχουν αποδοθεί κυρίως στην παρουσία φλαβονοειδών (Villar, *et al.*, 1984, Yesilada and Ezer, 1989, Rios, *et al.*, 1992, De Las Heras, *et al.*, 1994). Παρόλα αυτά, δεν υπάρχει συστηματική φυτοχημική μελέτη των υδατικών εκχυλισμάτων του φυτού *Sideritis syriaca* έως σήμερα. Μόλις, το 2008 και παράλληλα με την παρούσα διατριβή δημοσιεύτηκε μια εργασία που εξετάζει τα πολικά- υδρόφιλα συστατικά των εκχυλισμάτων. Πιο συγκεκριμένα επιχειρήθηκε η μελέτη των πολικών συστατικών εκχυλίζοντας τα υπέργεια μέρη του φυτού με διαδοχικούς διαλύτες πετρελαϊκό αιθέρα, διχλωρομεθάνιο και μεθανόλη (Armata, *et al.*, 2008).

Για το λόγο αυτό στην παρούσα διατριβή μελετήθηκαν τα υδρόφιλα συστατικά του υδατικού εκχυλίσματος του φυτού *Sideritis syriaca*, χωρίς προεργασία, προκειμένου να ταυτοποιηθούν τα επιμέρους συστατικά του. Αξίζει να αναφερθεί, ότι τα μεθανολικά εκχυλίσματα του φυτού εμφανίζουν ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση. Έτσι, η σύσταση και άλλων εκχυλισμάτων του φυτού μελετήθηκε παράλληλα με το υδατικό για συγκριτικούς κυρίως λόγους, καθώς η διαφοροποίηση τους τόσο ως προς την ικανότητα δέσμευσης των ελευθέρων ριζών όσο και ως προς τα επίπεδα των φαινολικών συστατικών ήταν αρκετά ενδιαφέροντα. Για την παραλαβή των εκχυλισμάτων ακολουθήθηκαν οι τρόποι εκχύλισης που περιγράφονται στο Κεφάλαιο 3.2.3 και τα εκχυλίσματα που πρόεκυψαν αναγράφονται στον Πίνακα 5.5.

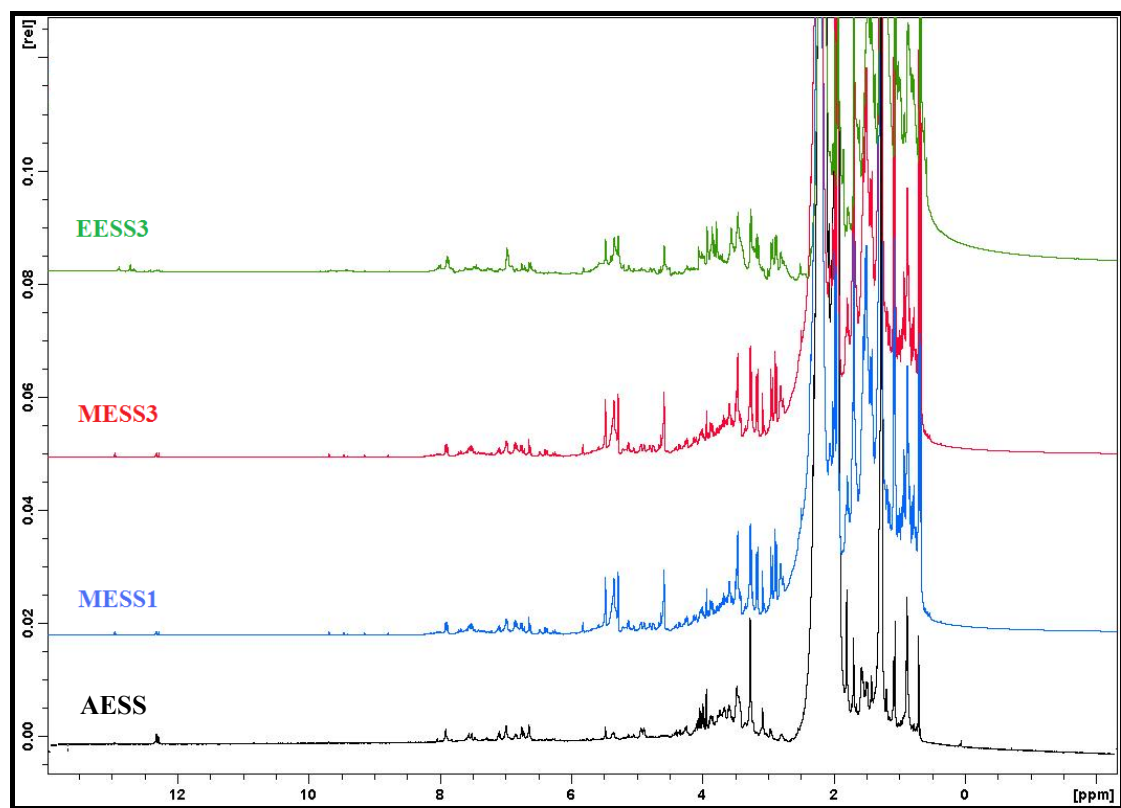
**Πίνακας 5.5. Προσδιορισμός ολικών φαινολικών συστατικών και εκτίμηση της ικανότητας δέσμευσης των ελευθέρων ριζών των εκχυλισμάτων του φυτού *Sideritis syriaca*.**

Εκχύλισμα	μg γαλλικού οξέος/mg εκχυλίσματος	EC <sub>50</sub> (μg/ml)
AESS (Aqua Extract Sideritis Syriaca)	136	64
MESS1 (Methanolic Extract Sideritis Syriaca 1)	153	47
MESS3 (Methanolic Extract Sideritis Syriaca 3)	165	57
EESS3 (Ethyl acetate Extract Sideritis Syriaca 3)	99	254

### 5.2.2 Μελέτη της σύστασης των εκχυλισμάτων *Sideritis syriaca* με τη χρήση φασματοσκοπίας NMR μιας (1D) και δυο (2D) διαστάσεων

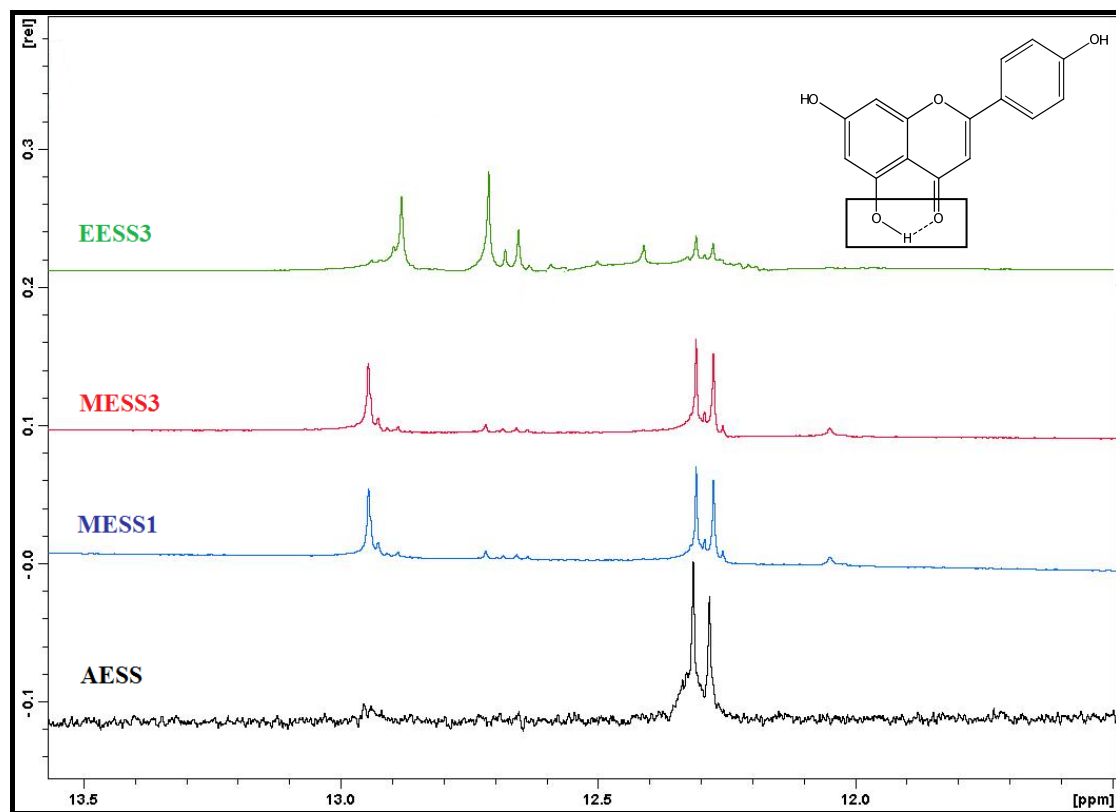
Για την μελέτη της σύστασης των εκχυλισμάτων του φυτού *Sideritis syriaca* ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο εργασίας που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των φυτικών εκχυλισμάτων του *Teucrium polium*. Έτσι, αρχικά πραγματοποιήθηκε η λήψη φασμάτων NMR μίας και δύο διαστάσεων. Είναι εμφανές, ότι τα δυο μεθανολικά εκχυλίσματα MESS1 και MESS3 εμφανίζουν πολλές ομοιότητες ως προς την σύστασή τους. Η αρωματική περιοχή του φάσματος του υδατικού εκχυλίσματος AESS παρουσιάζει ομοιότητες με εκείνες των μεθανολικών εκχυλισμάτων ενώ το εκχύλισμα του οξικού αιθυλέστερα EESS3 διαφέρει σημαντικά στο σύνολό του.





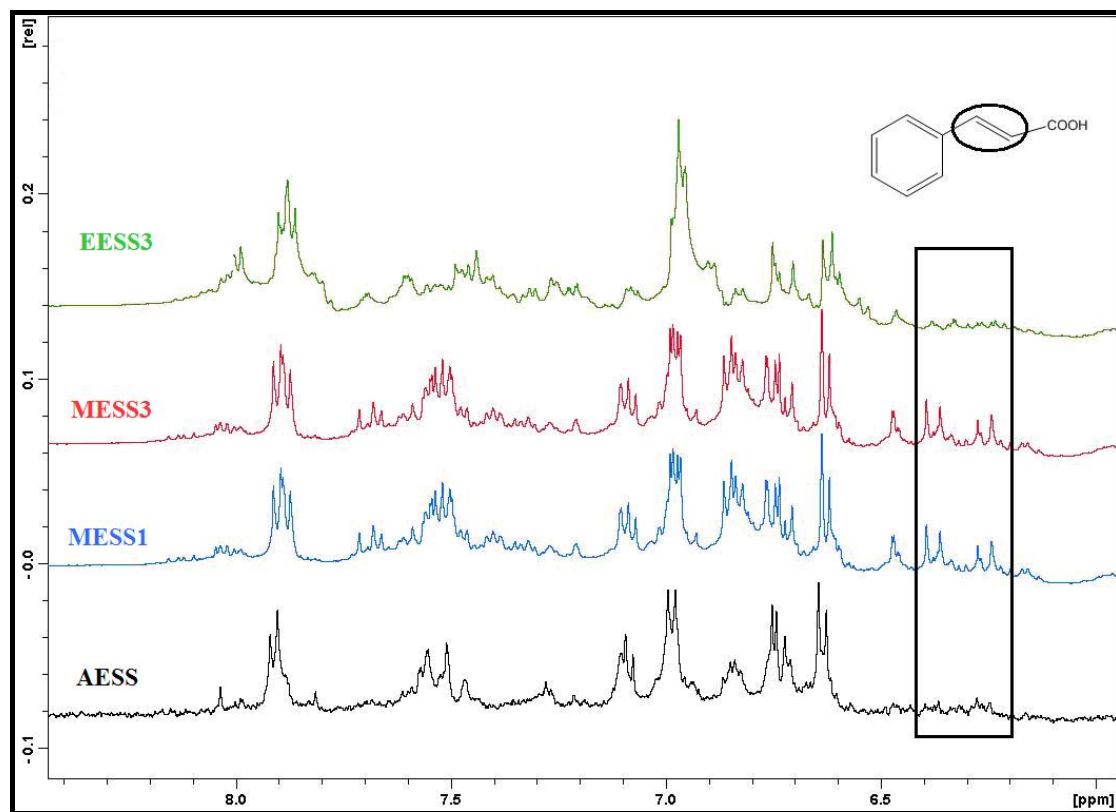
Σχήμα 5.28. Φάσματα NMR- $^1\text{H}$  των τεσσάρων φυτικών εκχυλισμάτων του *Sideritis syriaca* σε διαλύτη  $\text{MeCN-d}_3$  ( $NS=1024$ ,  $T=298\text{ K}$ ).

Τα εκχυλίσματα των φυτών του γένους *Sideritis* χαρακτηρίζονται από την παρουσία των φλαβονοειδών για αυτόν τον λόγο η μελέτη της περιοχής 11 έως 13 ppm αποκτά ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 5.29, στο υδατικό εκχύλισμα είναι πιθανό να περιέχονται δυο φλαβονόλες. Στα μεθανολικά εκχυλίσματα MESS1 και MESS3 εκτός των δυο φλαβονολών φαίνεται να περιέχεται και μια φλαβόνη στην ίδια περίπου συγκέντρωση. Στο εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα EESS3 ο αριθμός των φλαβονοειδών είναι μεγαλύτερος και φαίνεται να βρίσκονται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση ορισμένα φλαβονοειδή που στα μεθανολικά εκχυλίσματα βρίσκονται σε ίχνη. Στο εκχύλισμα αυτό οι φλαβόνες βρίσκονται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση από τις φλαβονόλες και αυτό αποδίδεται στο γεγονός ότι ο οξικός αιθυλεστέρας παραλαμβάνει ποσοτικά τις λιγότερες πολικές ενώσεις. Οι φλαβονόλες περιέχουν μια υδροξυλομάδα επιπλέον από τις αντίστοιχες φλαβόνες που τις καθιστά λιγότερο υδροφοβικές σε σύγκριση με τις φλαβόνες.



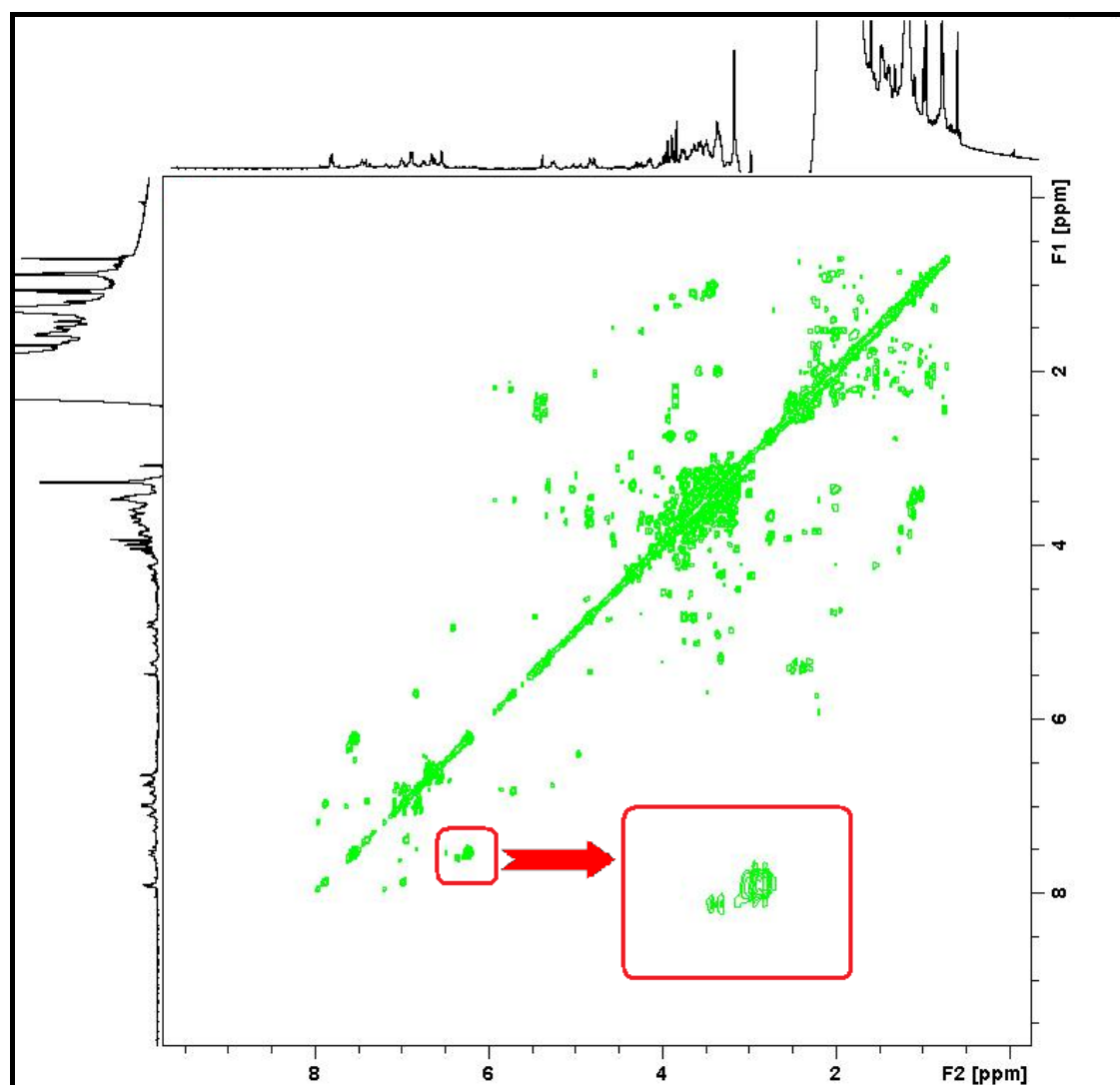
Σχήμα 5.29. Επιλεγμένη περιοχή (11-15 ppm) των φασμάτων NMR-<sup>1</sup>H των τεσσάρων φυτικών εκχυλισμάτων του *Sideritis syriaca* σε διαλύτη MeCN-d<sub>3</sub> (NS=1024, T= 298 K).

Στην αρωματική περιοχή των φασμάτων, υπάρχουν οι χαρακτηριστικές κορυφές με διαγνωστική αξία. Πρόκειται για τις διπλές κορυφές με σταθερά σύζευξης 16 Hz που συντονίζονται στα 6.2 και 7.5 ppm περίπου. Στο υδατικό εκχύλισμα AESS και στο εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα EESS3 δεν εμφανίζονται αυτές οι κορυφές. Στα μεθανολικά εκχυλίσματα MESS1 και MESS3 παρατηρούνται δυο διπλές κορυφές με  $J=16$  Hz που εμφανίζονται στα 6.20 και 6.35 ppm περίπου. Η μετατόπιση της διπλής χαρακτηριστικής κορυφής από 6.20 στα 6.35 ppm μας οδηγεί στην υπόθεση ότι πρόκειται για μόριο κινναμωμικού τύπου και πιθανώς του φερουλικού οξέος ή κάποιου παραγώγου του.



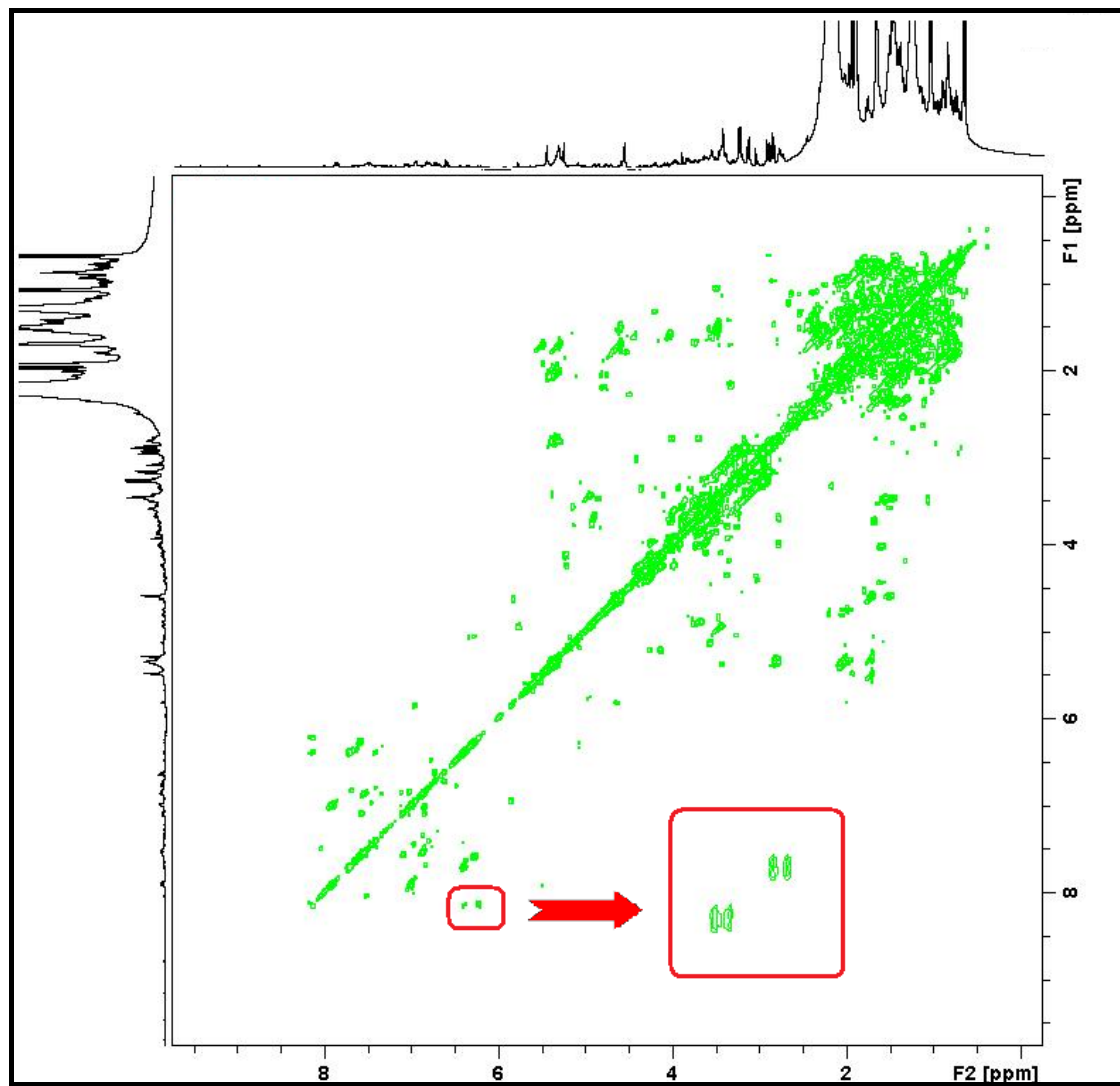
Σχήμα 5.30. Επιλεγμένη περιοχή (6-8 ppm) των φασμάτων  $\text{NMR-}^1\text{H}$  των τεσσάρων φυτικών εκχυλισμάτων του *Sideritis syriaca* σε διαλύτη  $\text{MeCN-d}_3$  ( $NS=1024$ ,  $T=298\text{ K}$ ).

Στο φάσμα  $\text{NMR-}^1\text{H}$  μιας διάστασης, οι χαρακτηριστικές διπλές κορυφές στα 6.20 ppm των πρωτονίων  $\text{H}_{2a}$  των παραγώγων του υδροξυκινναμωμικού οξέος διακρίνονται με δυσκολία, ενώ στο δισδιάστατο χάρτη του φάσματος  $\text{COSY } ^1\text{H-}^1\text{H}$  οι κορυφές διασταύρωσης είναι ευδιάκριτες. Με τον τρόπο αυτό γίνεται σαφής η διάκριση κορυφών που αντιστοιχούν σε παράγωγα του υδροξυκινναμωμικού οξέος και κορυφών που πιθανό να αντιστοιχούν σε παράγωγα του φερουλικού οξέος.

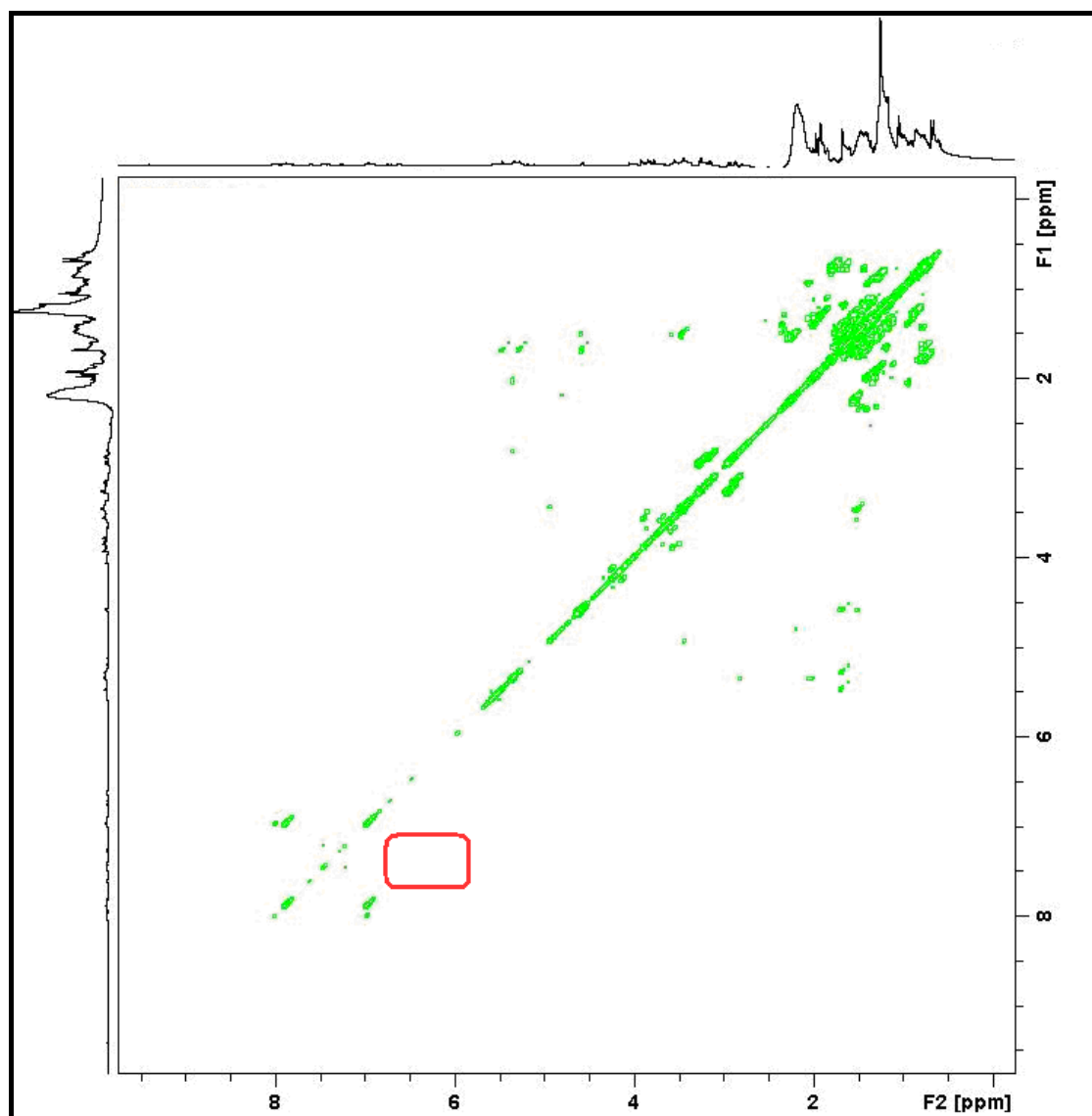


Σχήμα 5.31. Δισδιάστατος χάρτης του φάσματος COSY  $^1\text{H}-^1\text{H}$  του υδατικού εκχυλίσματος AESS στους 298 K ( $NS=32$ ,  $t_{\text{exp}}=5\text{h}$ ). Στο φάσμα μεγεθύνεται η περιοχή που συντονίζονται τα πρωτόνια  $\text{H}_{2a}$  των παραγώγων του υδροξυκιναμωμικού οξέος.

Στο μεθανολικό εκχύλισμα MESS1 η διάκριση των πρωτονίων  $\text{H}_{2a}$  είναι ακόμη πιο σαφής, καθώς βρίσκονται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση σε σύγκριση με το υδατικό εκχύλισμα, όπως φαίνεται και στο αντίστοιχο πρωτονιακό φάσμα. Αντίστοιχο φάσμα δυο διαστάσεων προκύπτει και για το μεθανολικό εκχύλισμα MESS3. Στο φάσμα COSY  $^1\text{H}-^1\text{H}$  του εκχυλίσματος του οξικού αιθυλεστέρα απουσιάζουν κορυφές διασταύρωσης που αποδίδονται στα πρωτόνια  $\text{H}_{2a}$ . Η απουσία υδροξυκιναμωμικών παραγώγων παρατηρήθηκε και στο εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα του *Teucrium polium* γεγονός που σημαίνει η παραλαβή των φαινολικών οξέων με εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα δεν είναι δυνατή ή τουλάχιστον αποτελεσματική.



Σχήμα 5.32. Δισδιάστατος χάρτης του φάσματος  $COSY\ ^1H-^1H$  του μεθανολικού εκχυλίσματος *MESS1* στους 298 K ( $NS=32$ ,  $t_{exp}=5h$ ). Στο φάσμα μεγεθύνεται η περιοχή που συντονίζονται τα πρωτόνια  $H_{2a}$  των παραγώγων του υδροξυκινναμωμικού οξέος.

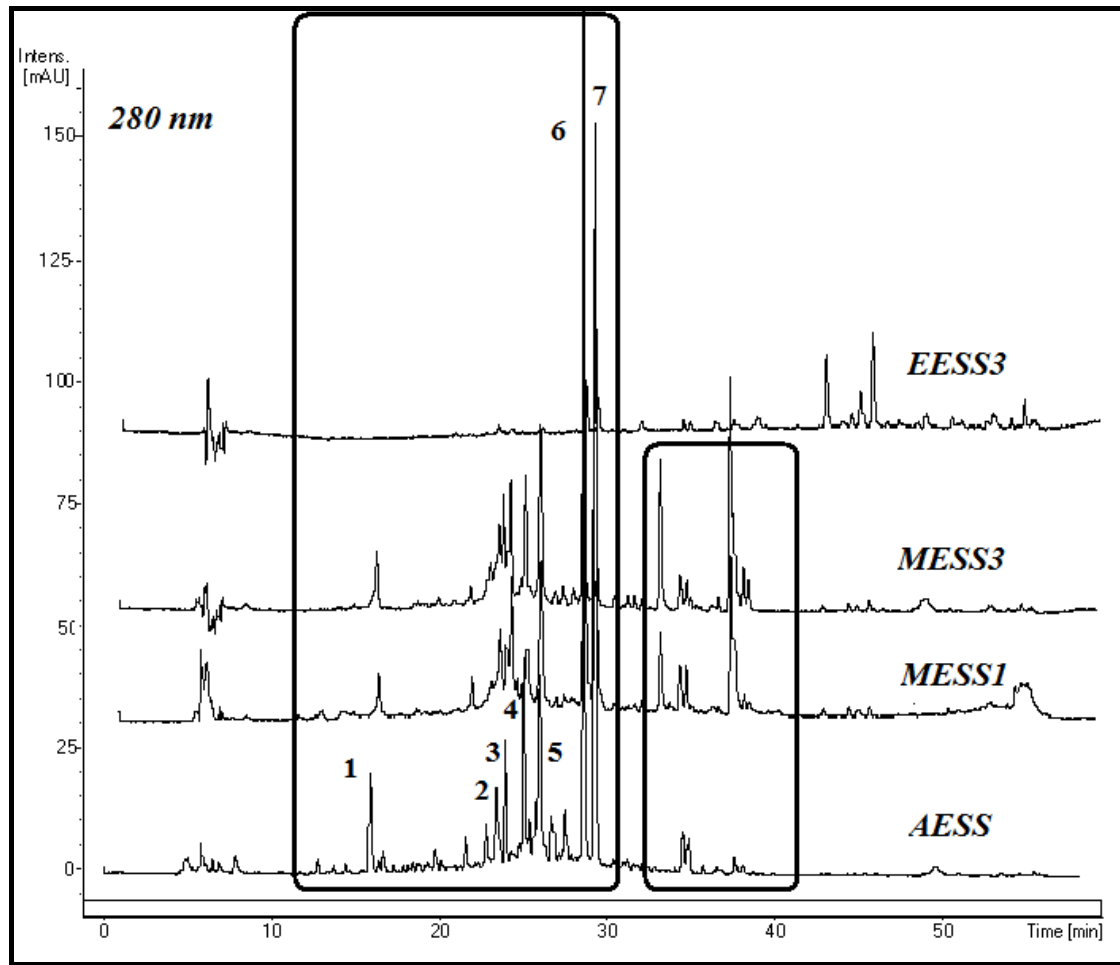


Σχήμα 5.33. Δισδιάστατος χάρτης του φάσματος COSY  $^1\text{H}-^1\text{H}$  του εκχυλίσματος του οξικού αιθυλεστέρα EESS3 στους 298 K ( $NS=32$ ,  $t_{exp}=5h$ ). Στο φάσμα σημειώνεται η απουσία των πρωτονίων  $H_{2a}$  των παραγώγων του υδροξυκιναμωμικού οξέος στην περιοχή που θα έπρεπε να συντονίζονται.

### 5.2.3 Μελέτη της σύστασης των εκχυλισμάτων *Sideritis syriaca* με την χρήση Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

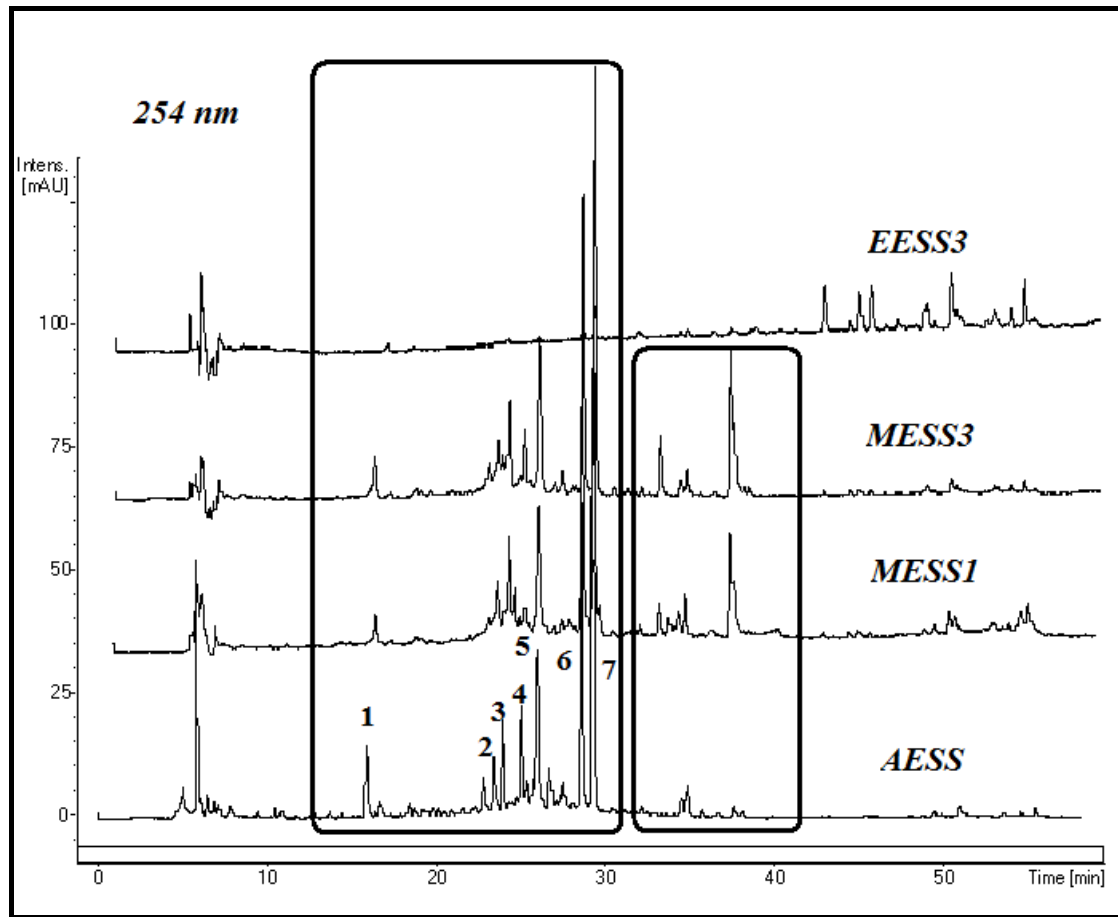
Για την ανάλυση εκχυλισμάτων ή/ και κλασμάτων του φυτού *Sideritis syriaca* ή άλλων φυτών του ίδιου γένους με χρήση της υγρής χρωματογραφίας υπάρχουν σημαντικές πληροφορίες κυρίως από ερευνητικές ομάδες των Βαλκανίων. Οι συνθήκες διαχωρισμού που σύμφωνα με τη βιβλιογραφία χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη των εκχυλισμάτων του φυτού *Sideritis* είναι κυρίως μεθανόλη στην κινητή

φάση με αποτέλεσμα τη δυσκολία σύγκρισης των αποτελεσμάτων (Palonino, *et al.*, 1996, Koleva, *et al.*, 2002, Aboutabl., *et al.*, 2002, Gabrieli, *et al.*, 2005, Janseka, *et al.*, 2005, Armata, *et al.*, 2008). Η χρήση της μεθανόλης στην κινητή φάση δημιουργεί σοβαρές δυσκολίες, γιατί στο μεταγενέστερο στάδιο της μελέτης των εκχυλισμάτων με LC-SPE-NMR η μεθανόλη απομακρύνεται δυσκολότερα από το ακετονιτρίλιο. Για αυτό το λόγο, ο υδροχρωματογραφικός διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε με την μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό φλαβονοειδών και άλλων φαινολικών συστατικών σε φύλλα ελιάς και περιγράφεται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 3.4 (Goulas, *et al.*, 2009) με τις κατάλληλες τροποποιήσεις. Για την καταγραφή των χρωματογραφημάτων χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής διόδου λυχνιών και το ενδιαφέρον μας επικεντρώθηκε στα μήκη κύματος 254nm, 280nm και 340 nm. Όπως εύκολα διακρίνεται από τα Σχήματα 5.34-5.36, το υδατικό και τα μεθανολικά εκχυλίσματα εμφανίζουν παρόμοιο χρωματογραφικό προφίλ και διαφέρουν μόνο ως προς την συγκέντρωση των συστατικών τους. Η παρατήρηση αυτή βρίσκεται σε συμφωνία και με τις παρατηρήσεις από την μελέτη των εκχυλισμάτων αυτών με φασματοσκοπία NMR- <sup>1</sup>H.

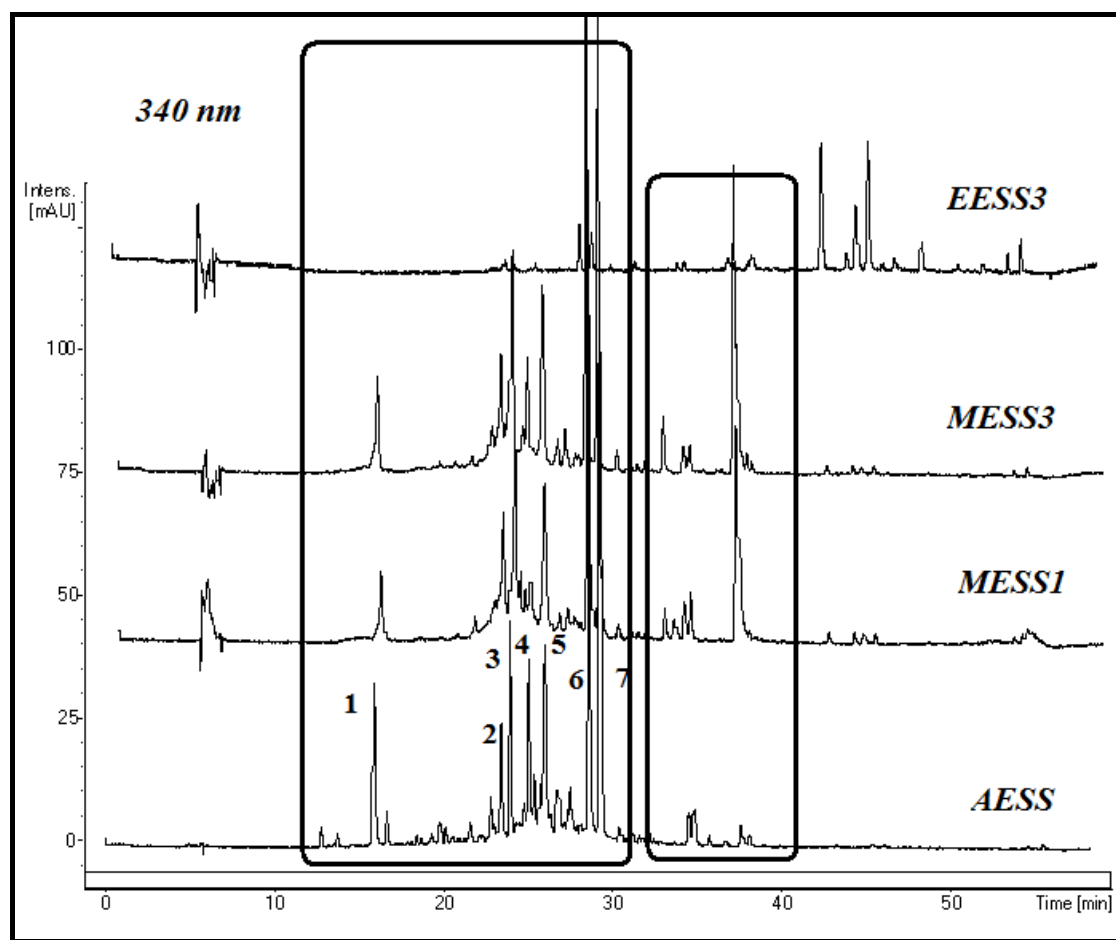


Σχήμα 5.34. Σύγκριση των χρωματογραφικών προφίλ των εκχυλισμάτων του φυτού *Sideritis syriaca* στα 280 nm.



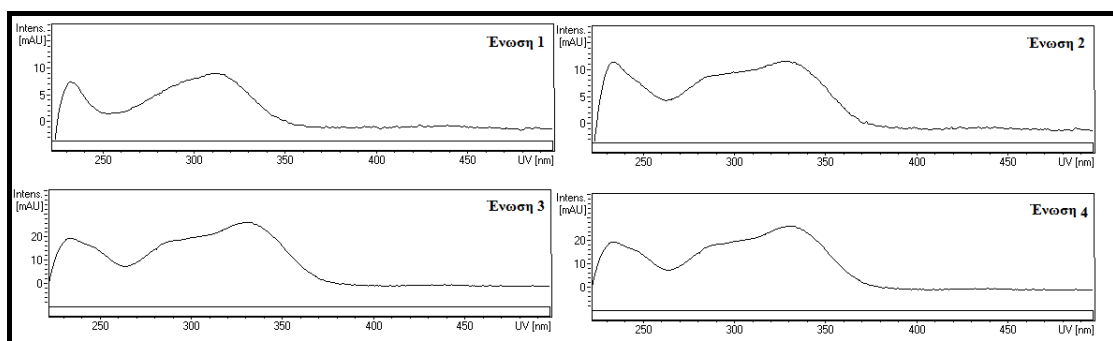


Σχήμα 5.35. Σύγκριση των χρωματογραφικών προφίλ των εκχυλισμάτων του φυτού *Sideritis syriaca* στα 254 nm.

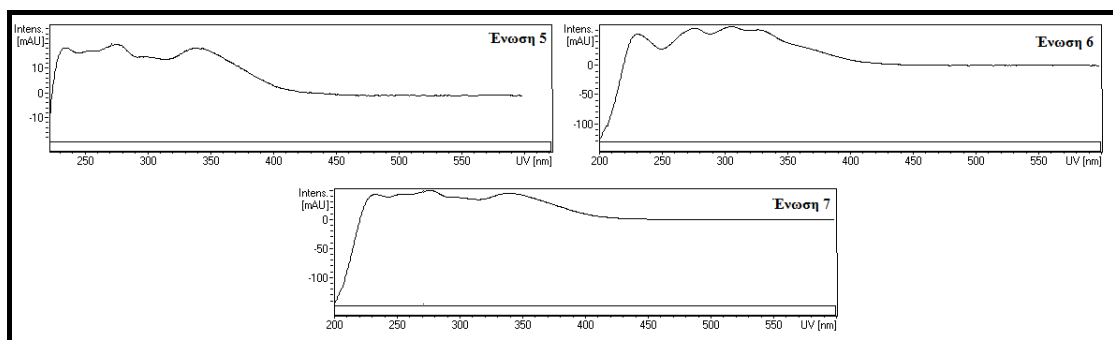


Σχήμα 5.36. Σύγκριση των χρωματογραφικών προφίλ των εκχυλισμάτων του φυτού *Sideritis syriaca* στα 340 nm.

Όπως αναφέρθηκε στην ανάλυση των εκχυλισμάτων του φυτού *Teucrium polium* η μελέτη των φασμάτων UV δεν είναι συνήθως αρκετή για την ταυτοποίηση των συστατικών, αλλά δίνει τις απαραίτητες πληροφορίες για την κατηγοριοποίηση των συστατικών σε επιμέρους τάξεις ενώσεων. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.37 οι ενώσεις 1 έως 4, εμφανίζουν μέγιστο απορρόφησης στα 340 nm. Οι απορροφήσεις αυτές, όπως έχει ήδη τονιστεί σε προηγούμενα κεφάλαια, υποδηλώνουν την παρουσία αρωματικού δακτυλίου με εκτεταμένη συζυγία και είναι χαρακτηριστικά των παραγώγων του υδροξυκινναμωμικού οξέος. Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώνεται τα ευρήματα της φασματοσκοπίας COSY  $^1\text{H}-^1\text{H}$ , με την οποία διακρίθηκαν δυο παράγωγα του υδροξυκινναμωμικού οξέος και δυο παράγωγα του φερουλικού οξέος. Αντίθετα, οι ενώσεις 5,6 και 7 εμφανίζουν το χαρακτηριστικό φάσμα UV-Vis των φλαβονοειδών με μέγιστα στα 260-270 nm και στα 340-350 nm.



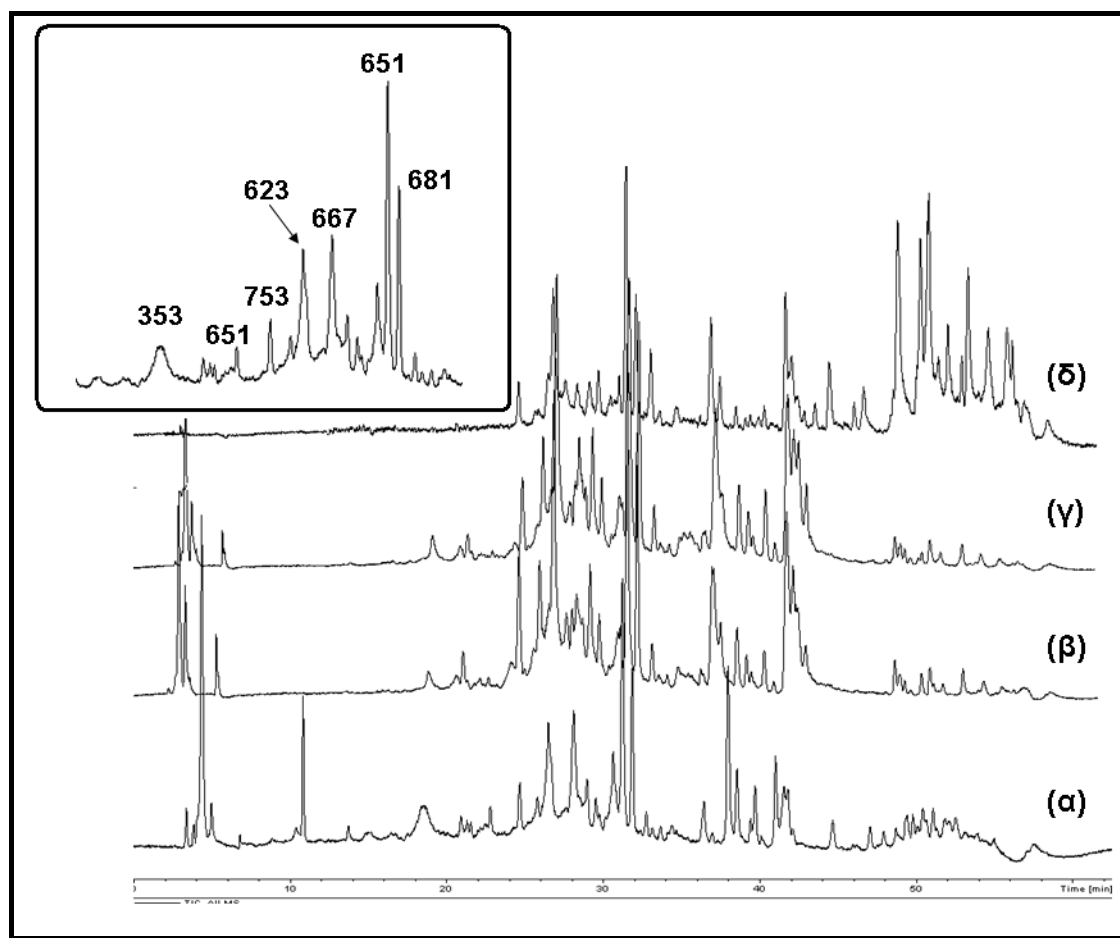
Σχήμα 5.37. Τα αντίστοιχα φάσματα UV-Vis των αριθμημένων κορυφών 1 έως 4 όπου φαίνονται και τα μέγιστα των απορροφήσεων.



Σχήμα 5.38. Τα αντίστοιχα φάσματα UV-Vis των αριθμημένων κορυφών 5, 6 και 7 όπου φαίνονται και τα μέγιστα των απορροφήσεων.

#### 5.2.4 Μελέτη της σύστασης των εκχυλισμάτων *Sideritis syriaca* με την χρήση της συνδυαστικής τεχνικής LC-MS

Τα χρωματογραφήματα συνολικού ιόντος (TIC) των δειγμάτων φανερώνουν ότι τα προφίλ του υδατικού και των μεθανολικών εκχυλισμάτων εμφανίζουν σημαντικές ομοιότητες ενώ η σύσταση του εκχυλίσματος του οξικού αιθυλεστέρα EESS3 είναι διαφορετικό (Σχήμα 5.40).



Σχήμα 5.39. Τα χρωματογραφήματα συνολικού ιοντος (TIC) των εκχυλισμάτων (α) υδατικού AESS, (β) μεθανολικών MESS1, (γ) MESS3 και (δ) οξικού αιθυλεστέρα EESS3. Στο χρωματογράφημα σημειώνονται τα μοριακά θραύσματα  $[M-H]^-$  των κυριότερων κορυφών.

Από το Σχήμα 5.40 προκύπτουν μερικά χαρακτηριστικά θραύσματα για την ταυτοποίηση των συστατικών των εκχυλισμάτων, όπως αυτό της κορυφής 1 με μοριακό ιόν  $[M-H]^-$  και τιμή 353.9 amu, που φανερώνει την παρουσία του χλωρογενικού οξέος (Armata, *et al.*, 2008). Το μοριακό ιόν  $[M-H]^-$  της ένωσης 4 με τιμή 623.4 amu είναι επίσης γνωστό και αντιστοιχεί στον βερμπασκοζίτη που σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία έχει αναφερθεί ως συστατικό των φυτών του γένους *Sideritis* (Ackos, *et al.*, 1999, Sahin, *et al.*, 2004). Τα φάσματα UV-Vis των κορυφών 3 και 4 προσομοιάζουν με εκείνο του βερμπασκοζίτη (Σχήμα 5.37). Το μοριακό της θραύσμα  $[M-H]^-$  στα 753.3 amu με δευτερεύον θραύσμα στα 623.4 amu είναι δυνατόν να αποδοθεί στο λαβαντουλιφολιζίτη (Ackos, *et al.*, 1999) ή σε κάποιο άλλο φαινυλοπροπανοειδές, δεδομένου ότι στα εκχυλίσματα του φυτού *Sideritis* απαντώνται πολλές ισομερείς ενώσεις τέτοιου τύπου. Η κορυφή 3 εμφανίζει

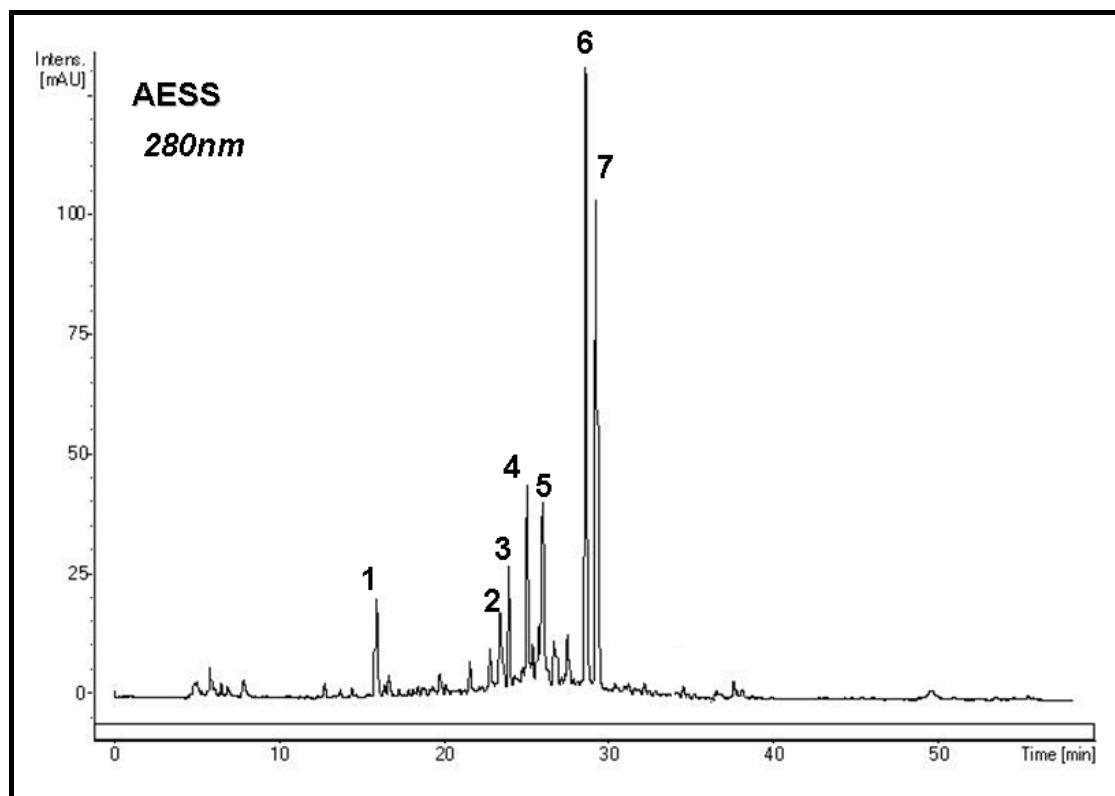
μοριακό ιόν  $[M-H]^-$  με τιμή ίση με 651.1 amu και από την υπάρχουσα βιβλιογραφία δεν αντιστοιχεί σε κάποια από τις γνωστές ενώσεις.

Οι κορυφές 5, 6 και 7 μπορούν να ταυτοποιηθούν ως φλαβονοειδή με βάση τα φάσματα UV-Vis. Στη φασματομετρία μαζών δίνουν τα μοριακά ιόντα 667.5 amu, 651.5 amu και 681.5 αντίστοιχα. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα φλαβονοειδή είναι η πιο πολυμελετημένη ομάδα ενώσεων στα φυτά του γένους *Sideritis* και επομένως τα παραπάνω θραύσματα αντιστοιχούν σε γνωστές από τη βιβλιογραφία ενώσεις. Συγκεκριμένα, τα μοριακά αυτά ιόντα αποδίδονται σε διγλυκοζίτες της υπολαετίνης και της ισοσκουτελλαρεΐνης. Η πλήρης ταυτοποίηση των κορυφών με την φασματομετρία μαζών δεν είναι εύκολο να πραγματοποιηθεί καθώς στα εκχυλίσματα του φυτού *Sideritis* οι παραπάνω ενώσεις απαντώνται σε πολλά ισομερή (Abdel-Sattar, *et al.*, 1993, Venturella, *et al.*, 1995, Aboutabl, *et al.*, 2004, Sahin, *et al.*, 2004, Gabrieli, *et al.*, 2005, Armata, *et al.*, 2008). Η φασματοσκοπία NMR σε αυτές τις περιπτώσεις δίνει την αδιαμφισβήτητη λύση, αλλά απαιτείται η χρονοβόρα και επίπονη διαδικασία της απομόνωσης ή η χρήση της τεχνικής LC-SPE-NMR που αναφέρεται στη συνέχεια.

### 5.2.5 Μελέτη της σύστασης των εκχυλισμάτων *Sideritis syriaca* με την χρήση της συνδυαστικής τεχνικής LC-SPE-NMR

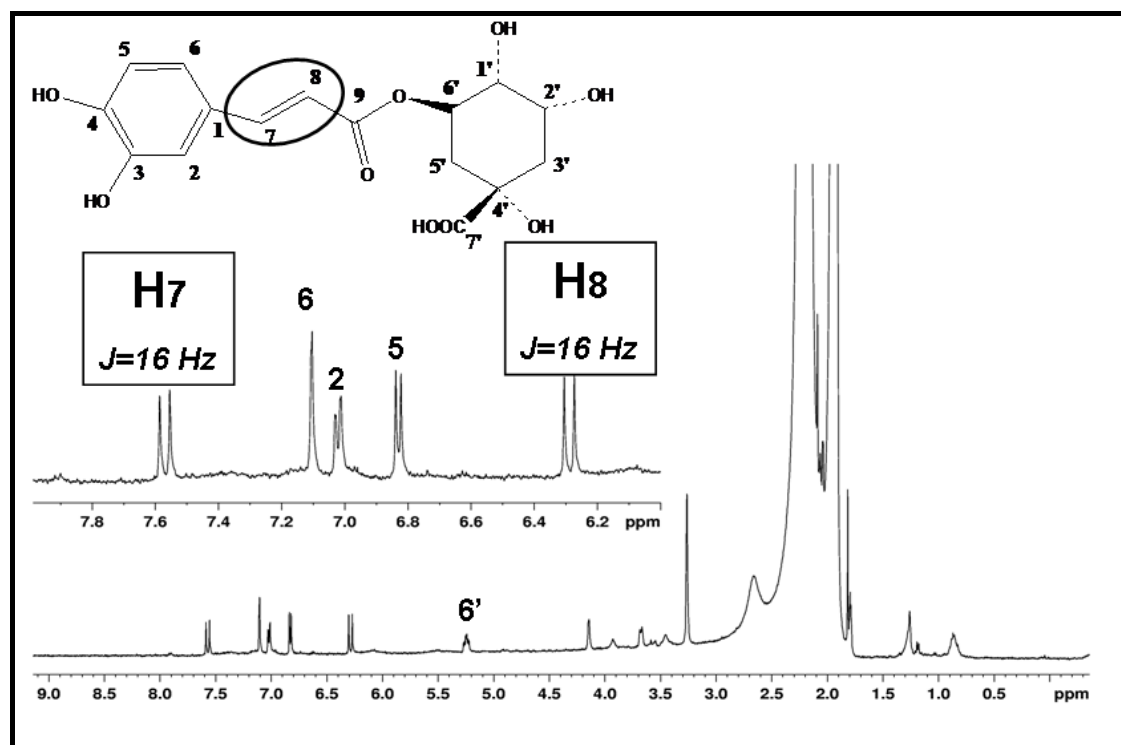
Για τη μελέτη της σύστασης των εκχυλισμάτων του φυτού *Sideritis syriaca* με τη συνδυαστική τεχνική LC-SPE-NMR χρησιμοποιήθηκε η μεθοδολογία με τις βελτιστοποιημένες παραμέτρους που εφαρμόστηκε με επιτυχία και στα εκχυλίσματα του *Teucrium polium*. Όπως έχει ήδη αναφερθεί μετά την λήψη των φασμάτων NMR κάθε ένωσης, το κάθε συστατικό συλλέγεται σε φιαλίδιο και ακολουθεί η απευθείας έγχυση σε φασματογράφο μάζας.

Κατά το χρωματογραφικό διαχωρισμό των εκχυλισμάτων του φυτού παρατηρήθηκε, ότι το υδατικό και τα δυο μεθανολικά εκχυλίσματα παρουσιάζουν ομοιότητες στα χρωματογραφικά προφίλ τους. Στην παρούσα διατριβή επιλέχθηκε να μελετηθεί το υδατικό εκχύλισμα AESS δεδομένου ότι η φυτοχημική μελέτη του υδατικού εκχυλίσματος του φυτού δεν έχει πραγματοποιηθεί, παρά το γεγονός ότι ο τρόπος εκχύλισης προσομοιάζει τον τρόπο παρασκευής των αφεψημάτων που χρησιμοποιούνται ευρέως.



Σχήμα 5.40. Χρωματογραφικό προφίλ του υδατικού εκχυλισμάτος AESS στα 280 nm που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση με την τεχνική του LC-SPE-NMR.

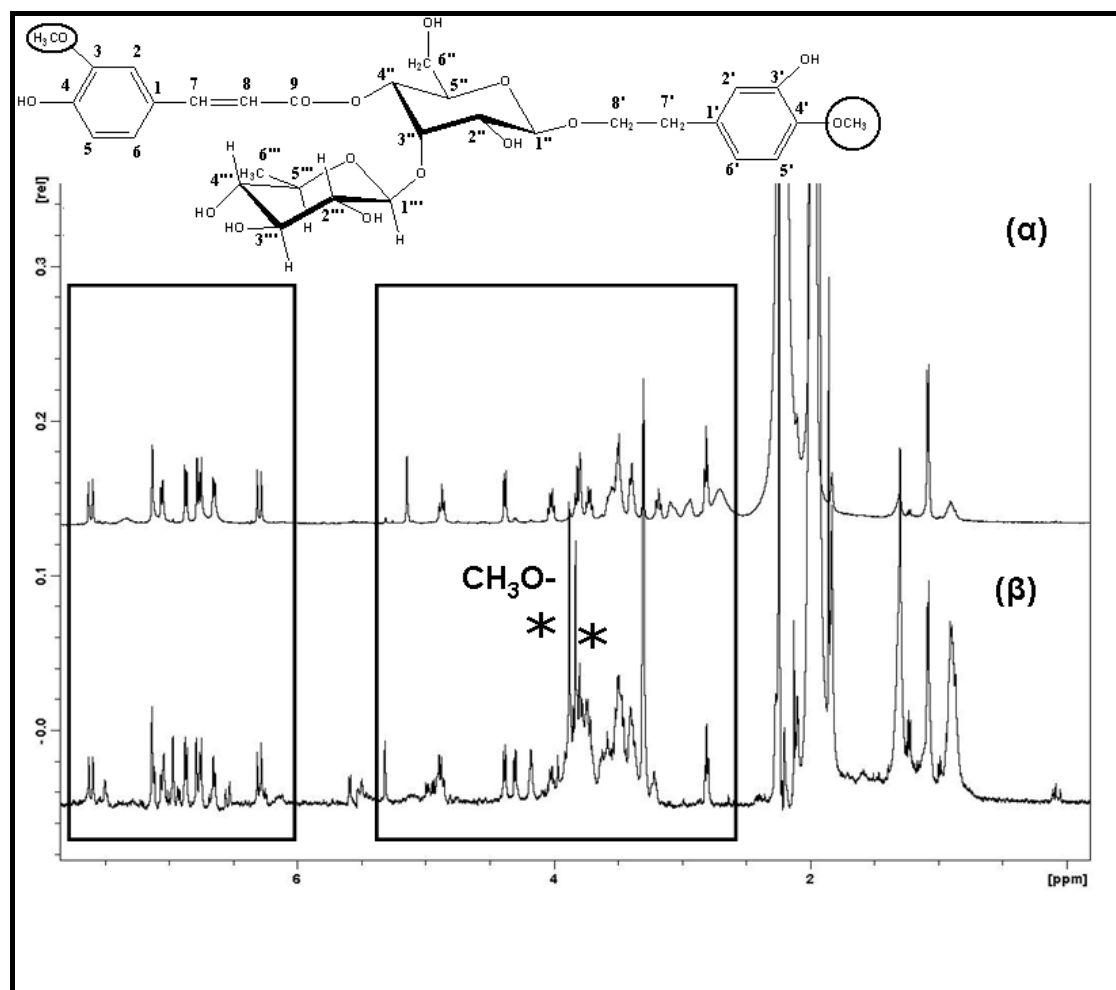
Το φάσμα NMR- $^1\text{H}$  της κορυφής 1 επιβεβαίωσε τα δεδομένα της φασματοσκοπίας UV-Vis και της φασματομετρίας μαζών, ότι το συστατικό αυτό είναι το χλωρογενικό οξύ. Η ταυτοποίηση των κορυφών του φάσματος NMR πρωτονίου είναι σε συμφωνία με τα βιβλιογραφικά δεδομένα (Exarchou, *et al.*, 2006, Armatas, *et al.*, 2008). Στο Σχήμα 5.41 παρουσιάζεται συνοπτικά το φάσμα NMR- $^1\text{H}$  και οι χαρακτηριστικές του κορυφές.



Σχήμα 5.41. Φάσμα NMR-<sup>1</sup>H του χλωρογενικού οξέος (κορυφή 1) σε ACN-*d*<sub>3</sub>. Επιλεγμένη περιοχή του ίδιου φάσματος που αποδίδονται τα αρωματικά πρωτόνια.

Η κορυφή 4 αποδίδεται στο βερμπασκοζίτη. Στον Πίνακα 5.2 παρουσιάζονται οι χημικές μετατοπίσεις και οι σταθερές σύζευξης του βερμπασκοζίτη.

Το φάσμα NMR-<sup>1</sup>H της κορυφή 2 παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα με το αντίστοιχο του βερμπασκοζίτη. Η μοναδική σημαντική διαφορά είναι η ύπαρξη δυο κορυφών στα 3.89 και 3.86 ppm, που με βάση τη χημική τους μετατόπιση και την τιμή των ολοκληρωμάτων τους αντιστοιχούν σε ομάδες CH<sub>3</sub>O<sup>-</sup>. Η παρουσία δυο μεθόξυ ομάδων επιβεβαιώνεται και από την φασματομετρία μαζών καθώς παρουσιάζει μητρικό ιόν ίσο με 651. 5 amu ενώ το αντίστοιχο του βερμπασκοζίτη είναι 623.5 amu. Η διαφορά 28 amu οφείλεται στην παρουσία δυο ομάδων CH<sub>3</sub> αντί του πρωτονίου των υδροξυλομάδων (Kırmızıbekmez, *et al.*, 2005).



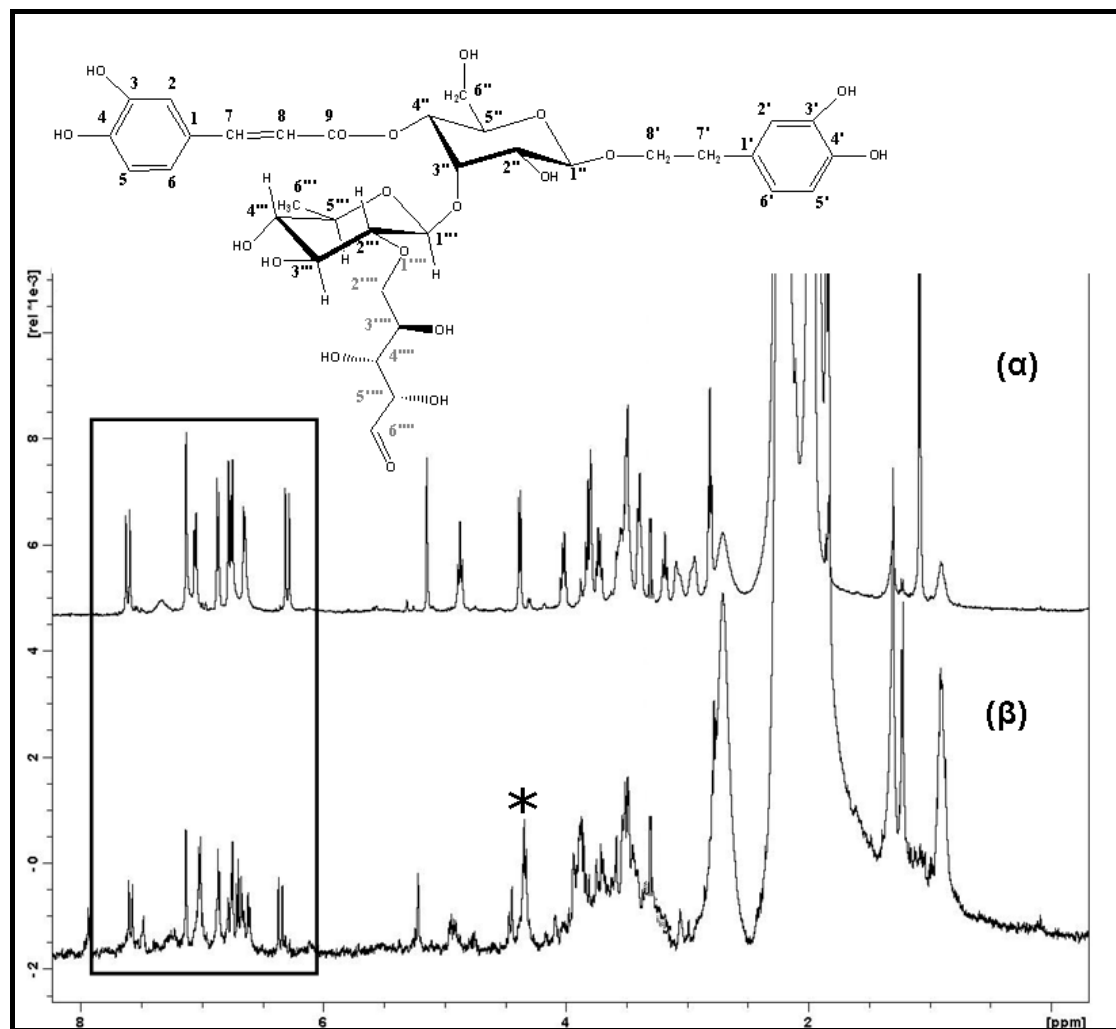
Σχήμα 5.42. Φάσματα NMR-<sup>1</sup>H των ενώσεων (α) μαρτυνοζίτη και (β) βερμπασκοζίτη σε ACN-d<sub>3</sub>. Με αστερίσκο σημειώνονται οι βασικές διαφορές των φασμάτων που εμφανίζουν διαγνωστική αξία.

Έτσι, η κορυφή 2 αντιστοιχεί στο μαρτυνοζίτη και η παρουσία του στα εκχυλίσματα του φυτού *Sideritis* έχει αναφερθεί (Akcós, *et al.*, 1999). Στο σημείο αυτό θα πρέπει να διευκρινιστεί η διαμόρφωση του μορίου καθώς στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί η ύπαρξη του *cis*-μαρτυνοζίτη και του *trans* ισομερούς του. Η σταθερά σύζευξης <sup>3</sup>J (HC=CH) της κορυφής 2 έχει τιμή 15.9 Hz που υποδηλώνει την ύπαρξη *trans*-μαρτυνοζίτη. Σε αντίθετη περίπτωση η τιμή της σταθεράς σύζευξης <sup>3</sup>J (HC=CH) δεν θα ξεπερνούσε τα 13 Hz και τα ολεφινικά πρωτόνια θα συντονιζόταν σε μικρότερες τιμές ppm (Skrzypek, *et al.*, 1999).

Το πρωτονιακό φάσμα της κορυφής 3 επιβεβαιώνει την παρουσία του λαβαντουλιφολιοζίτη. Η αρωματική περιοχή του φάσματος NMR-<sup>1</sup>H της κορυφής 3 είναι πανομοιότυπη με την αντίστοιχη περιοχή του βερμπασκοζίτη, ενώ η αλειφατική της περιοχή φαίνεται να είναι πιο πλούσια λόγω της παρουσίας ενός ακόμη σακχάρου, όπως προκύπτει και από το φάσμα μάζας της ένωσης (Σχήμα 5.43). Η

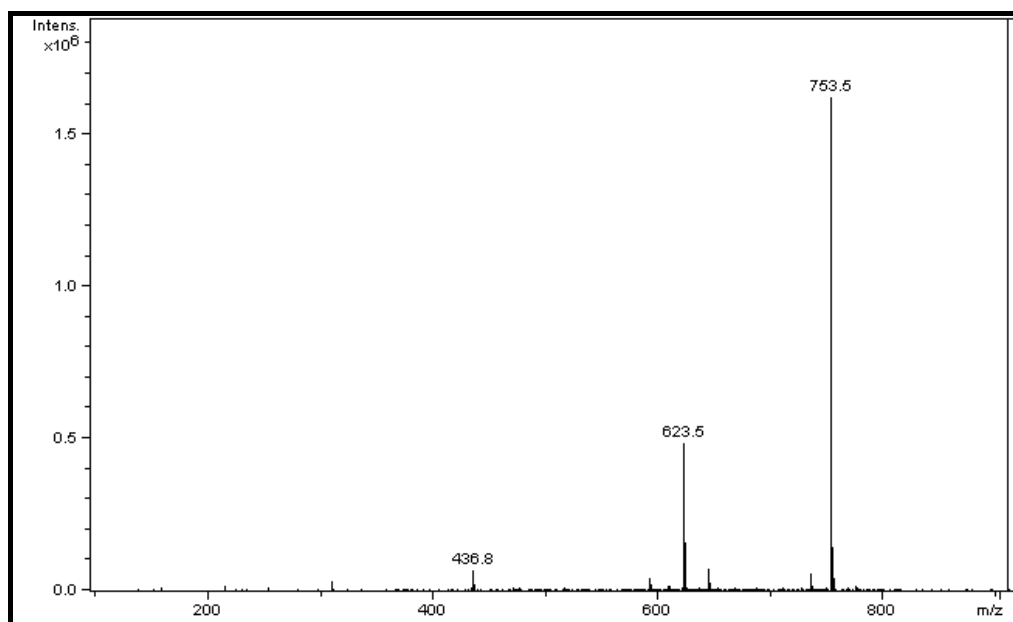


διπλή κορυφή στα 4.35 ppm με σταθερά σύζευξης  $J=8.02$  Hz αποτελεί τη βασικότερη και πιο ευδιάκριτη διαφορά των δυο φασμάτων και αποδίδεται στο ανωμερικό υδρογόνο H-1''' της αραβινόζης. Οι χημικές μετατοπίσεις και οι σταθερές σύζευξης του λαβαντουλιφολιοζίτη όπως και των βερμπασκοζίτη και μαρτυνοζίτη αναγράφονται στο Πίνακα 5.4.



Σχήμα 5.43. Φάσματα NMR-<sup>1</sup>H των ενώσεων (α) βερμπασκοζίτη και (β) λαβαντουλιφολιοζίτη σε ACN-d<sub>3</sub>. Με αστερίσκο σημειώνεται η βασική διαφορά των φασμάτων που εμφανίζει διαγνωστική αξία.

Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 5.44 το κύριο μοριακό ιόν  $[M-H]^-$  της κορυφής 3 είναι τα 753.5 amu που αντιστοιχεί στο ιόν του λαβαντουλιφολιοζίτη. Η ύπαρξη δευτερεύοντος θραύσματος στα 623.5 amu οφείλεται στην απόσπαση του μορίου της αραβινόζης από το μόριο του λαβαντουλιφολιοζίτη (Basaran, *et al.*, 1988, Calis, *et al.*, 1992, Ackos, *et al.*, 1999).

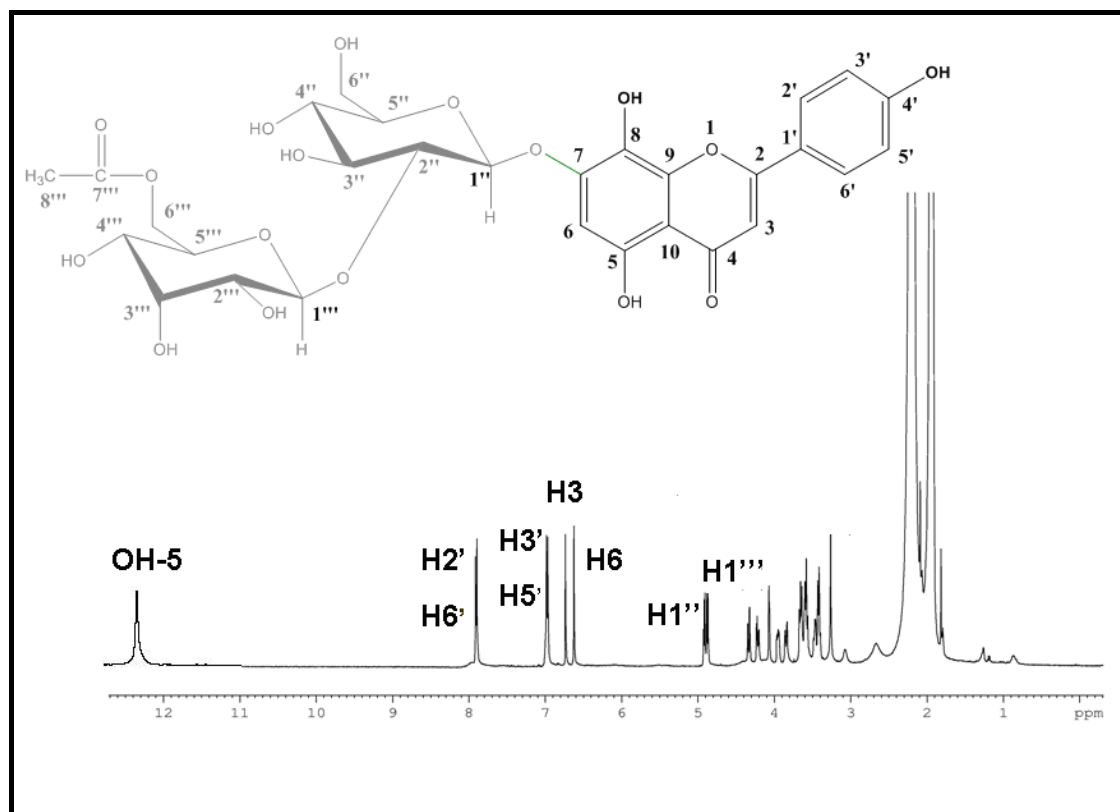


Σχήμα 5.44. Φάσμα μαζών MS του λαβαντολιφολιοζίτη (κορυφή 3).

Πίνακας 5.6. Χημικές μετατοπίσεις και σταθερές σύζευξης για τον βερμπασκοζίτη, τον μαρτυνοζίτη και τον λαβαντουλιοφολιοζίτη σε διαλύτη ACN- $d_3$ .

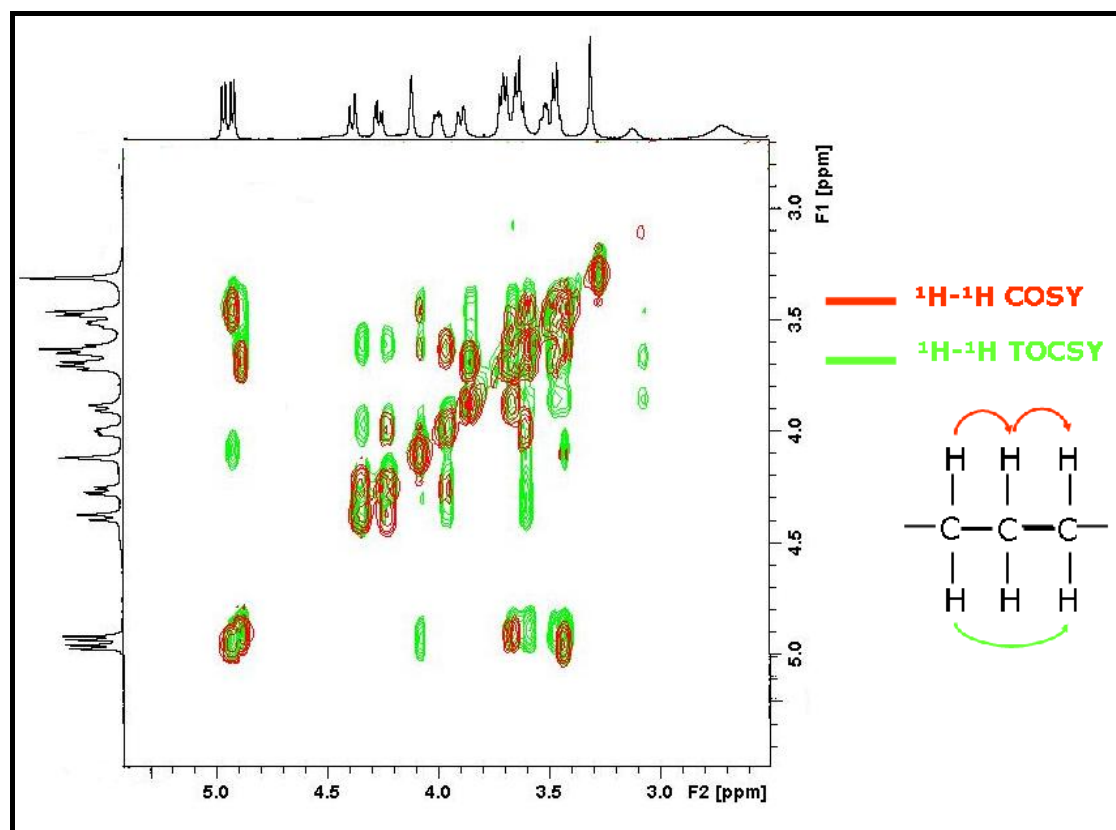
Πρωτόνιο	Βερμπασκοζίτης	Μαρτυνοζίτης	Λαβαντουλιοφολιοζίτης
<b>Καφεϊκό οξύ</b>			
H-2	7.13 <i>d(1.82)</i>	7.13 <i>d(1.82)</i>	7.13 <i>d(1.82)</i>
H-5	6.87 <i>d(8.30)</i>	6.87 <i>d(8.30)</i>	6.87 <i>d(8.30)</i>
H-6	7.06 <i>dd(8.26,1.82)</i>	7.06 <i>dd(8.26,1.82)</i>	7.06 <i>dd(8.26,1.82)</i>
H-7	7.61 <i>d(15.80)</i>	7.60 <i>d(15.80)</i>	7.61 <i>d(15.80)</i>
H-8	6.29 <i>d(15,80)</i>	6.29 <i>d(15,80)</i>	6.29 <i>d(15,80)</i>
OMe		3.87	-
<b>Άγλυκο</b>			
H-2'	6.78 <i>d(1.98)</i>	6.78 <i>d(1.98)</i>	
H-5'	6.76 <i>d(7.98)</i>	6.75 <i>d(7.98)</i>	6.76 <i>d(7.98)</i>
H-6'	6.66 <i>dd(7.98/1.98)</i>	6.64 <i>dd(7.98/1.98)</i>	6.66 <i>dd(7.98/1.98)</i>
H-7'	2.81 <i>t(7.08)</i>	2.81 <i>t(7.08)</i>	2.81 <i>t(7.08)</i>
H-8'a	3.73 <i>dd(9.64/2.54)</i>	3.73 <i>dd(9.64/2.54)</i>	3.73 <i>dd(9.64/2.54)</i>
H-8'b	4.02 <i>dd(9.64/2.54)</i>	4.02 <i>dd(9.64/2.54)</i>	4.02 <i>dd(9.64/2.54)</i>
OMe	-	3.82	-
<b>Γλυκόζη</b>			
H-1''	4.38 <i>d(7.78)</i>	4.38 <i>d(7.78)</i>	4.31 <i>d(7.78)</i>
H-2''	3.30 <i>d(8.44)</i>	3.30 <i>d(8.44)</i>	3.30 <i>d(8.44)</i>
H-3''	3.81 <i>m</i>	3.81 <i>m</i>	3.81 <i>m</i>
H-4''	4.88 <i>t(9.54)</i>	4.88 <i>t(9.54)</i>	4.88 <i>t(9.54)</i>
H-5''	3.49	3.49	3.49
H-6''	3.56	3.56	3.56
<b>Ραμνόζη</b>			
H-1'''	5.15 <i>d(0.88)</i>	5.29 <i>d(0.88)</i>	5.19 <i>d(0.88)</i>
H-2'''	3.80 <i>m</i>	3.80 <i>m</i>	3.80 <i>m</i>
H-3'''	3.48	3.48	3.48
H-4'''	3.18 <i>d(9.54)</i>	3.18 <i>d(9.54)</i>	3.18 <i>d(9.54)</i>
H-5'''	3.40 <i>d(8.44)</i>	3.40 <i>d(8.44)</i>	3.40 <i>d(8.44)</i>
H-6'''	1.06 <i>d(6.22)</i>	1.06 <i>d(6.22)</i>	1.05 <i>d(6.22)</i>
<b>Αραβινόζη</b>			
H-1''''	-	-	4.34

Οι κορυφές 6 και 7 αποτελούν τα κύρια συστατικά του υδατικού εκχυλίσματος AESS. Σύμφωνα με τα δεδομένα που ήδη έχουν προκύψει από τη χρήση άλλων φασματοσκοπικών τεχνικών (MS, UV), τα συστατικά 5, 6 και 7 είναι φλαβονοειδή που φέρουν δυο μόρια σακχάρου. Αρχικά μελετήθηκε η κορυφή 6 που είναι το συστατικό με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση στο εκχύλισμα. Στην αρωματική περιοχή του φάσματος NMR-<sup>1</sup>H είναι σαφής η υποκατάσταση στο δακτύλιο B στην θέση C-4' καθώς εύκολα διακρίνεται ένα σύστημα spin τύπου AA'XX' με κορυφές συντονισμού που εμφανίζονται στα 7.95 (d,  $J= 8.8$  Hz, H-2', H-6') και στα 7.02 ppm (d,  $J= 8.8$  Hz, H-3', H-5'). Επιπλέον, στην αρωματική περιοχή υπάρχουν δυο ακόμη απλές κορυφές στα 6.78 και στα 6.67 ppm. Αν στο δακτύλιο A υπήρχε υποκατάσταση στις θέσεις 5 και 7 οι κορυφές στα 6.78 και στα 6.67 ppm θα έπρεπε να ήταν διπλές (με σταθερά σύζευξης 2Hz), συνεπώς στην ένωση που αντιστοιχεί στην κορυφή 6 υπάρχει τρις-υποκατεστημένος δακτύλιος A στις θέσεις 5, 7 και 8. Η απλή κορυφή στα 6.67 ppm αποδίδεται στο H-6 και η απλή κορυφή στα 6.78 ppm αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-3 και επομένως πρόκειται για μια φλαβόνη (Σχήμα 5.45). Αυτό προκαλεί έκπληξη καθώς το σήμα συντονισμού του πρωτονίου OH (5) βρίσκεται στα 12.36 ppm. Η διαφορά αυτή εξηγείται από την παρουσία της υδροξυλομάδας στον άνθρακα C-8 που βρίσκεται σε θέση *para* ως προς την OH-5 και λόγω του συζυγιακού φαινομένου το σήμα συντονισμού του πρωτονίου της OH-5 μετατοπίζεται σε μεγαλύτερες τιμές ppm.



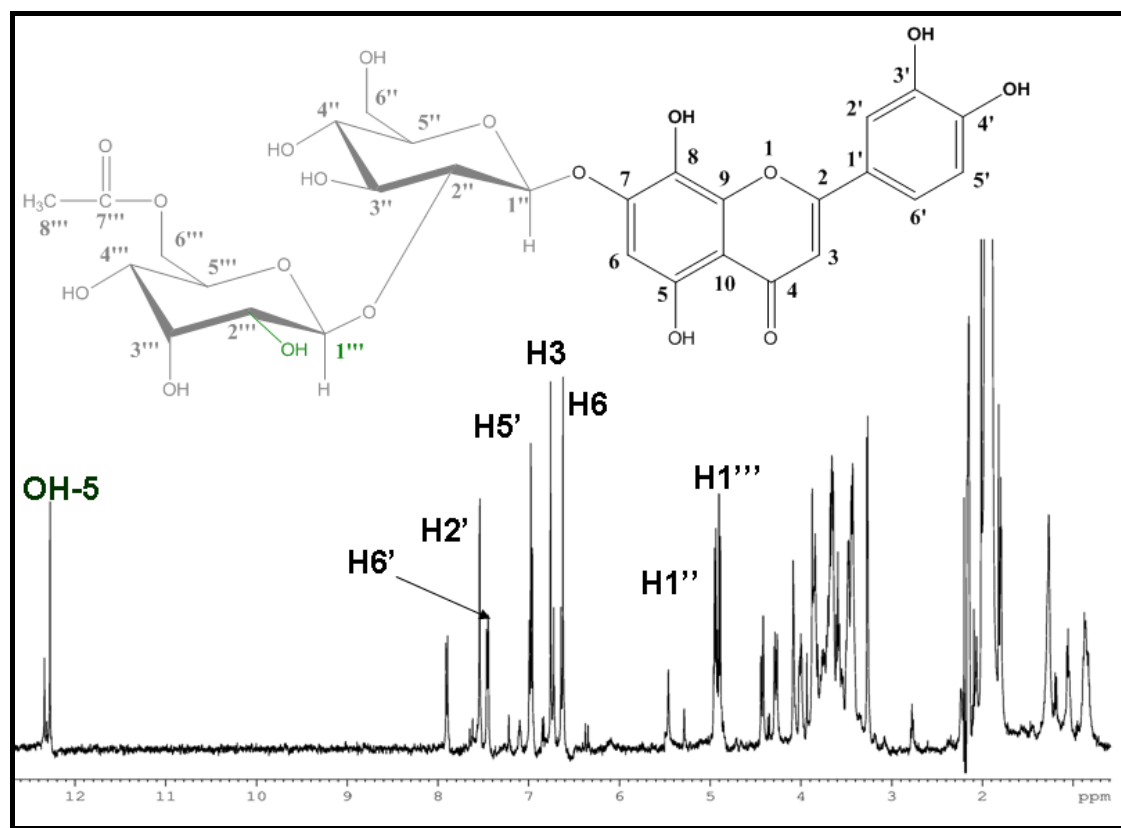
Σχήμα 5.45. Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του 7-Ο-δγλκκοζίτη της ισοσκουτελλαρεΐνης (κορυφή 6) σε διαλύτη  $\text{ACN-d}_3$ .

Η ταυτοποίηση όλων των πρωτονίων των σακχάρων που είναι συζευγμένα με την ισοσκουτελλαρεΐνη πραγματοποιήθηκε με την λήψη φασμάτων δυο διαστάσεων COSY και TOCSY σε συνδυασμό με την φασματομετρία μαζών και βιβλιογραφικά δεδομένα. Η κορυφή 6 ταυτοποιήθηκε ως 7-Ο-[6'''-Ο-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοζυλ-(1→2)-β-D-γλυκοπυρανοζίτης] της ισοσκουτελλαρεΐνης. Τα ανωμερικά πρωτόνια συντονίζονται στα 4.92 ppm (d,  $J=8.2$  Hz) και στα 4.88 ppm (d,  $J=7.8$  Hz) και ανήκουν στη γλυκόζη και στον ακετυλο-αλλοπυρανοζίτη αντίστοιχα. Οι χημικές μετατοπίσεις και οι σταθερές σύζευξης όλων των πρωτονίων της ένωσης παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα 5.5 και βρίσκονται σε πλήρη συμφωνία με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας (Lenherr, *et al.*, 1984, Rodriguez-Lyon, *et al.*, 2000, Sahin, *et al.*, 2006). Αξίζει να σημειωθεί ότι η κορυφή της ακετοξυμεθυλομάδας του αλλοπυρανοζίτη επικαλύπτεται από την ευρεία και έντονη κορυφή στα 2 ppm και η ταυτοποίηση της πραγματοποιήθηκε από τα φάσματα μάζας και σε σύγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα (Lenherr, *et al.*, 1984, El-Ansari, *et al.*, 1991, Gabrieli, *et al.*, 2005).



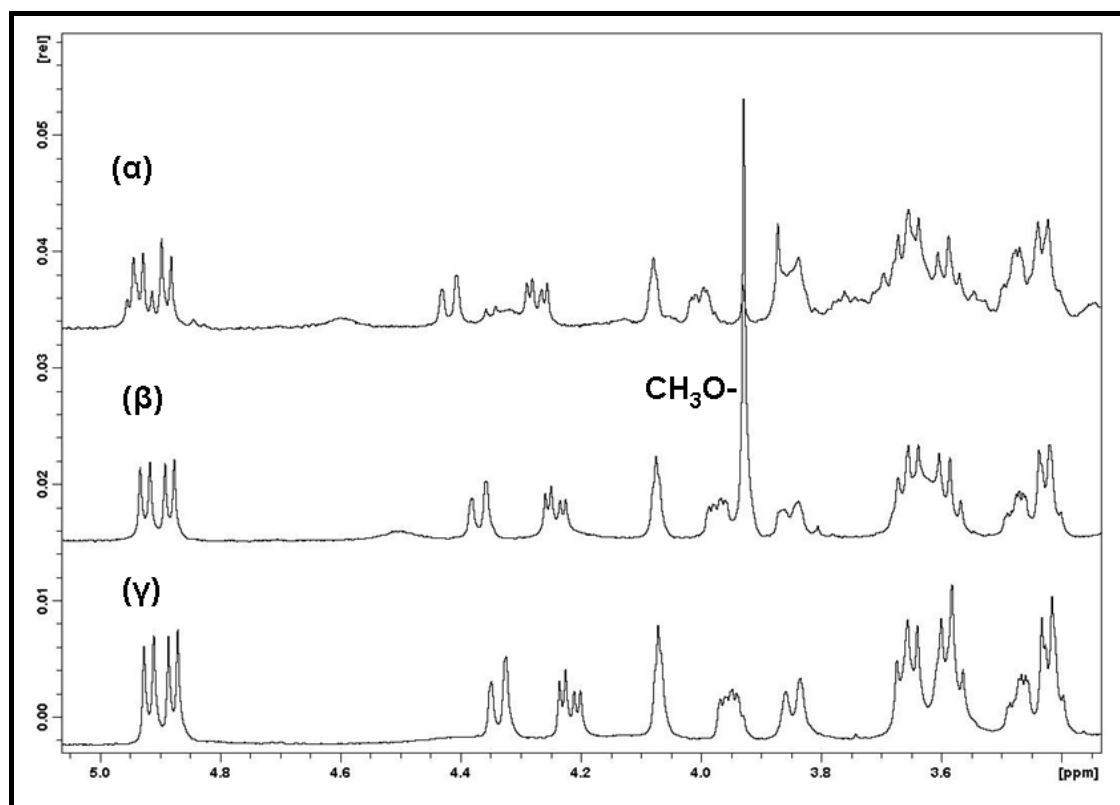
Σχήμα 5.46. Επιλεγμένη περιοχή των φασμάτων COSY και TOCSY του 7-Ο-δγλυκοζίτη της ισοσκουτελλαρεΐνης (κορυφή 6) σε διαλύτη ACN- $d_3$ .

Η κορυφή 5 χαρακτηρίστηκε ως 7-Ο-[6'''-Ο-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοζυλ-(1→2) -β-D-γλυκοπυρανοζίτης] της υπολαετίνης. Η αρωματική περιοχή του φάσματος NMR- $^1\text{H}$  (φάσμα τύπου ABX) φανερώνει την ύπαρξη υποκατεστημένου δακτυλίου Β με σήματα συντονισμού στα 7.53 ppm (d,  $J= 1.9$  Hz, H-2'), στα 7.45 ppm (dd,  $J= 2.1, 8.4$ Hz, H-6') και στα 6.97 ppm (s, H-5'). Η αρωματική περιοχή υποδηλώνει ότι πρόκειται για μια φλαβόνη με 5, 7, 8-υποκατάσταση στο δακτύλιο Α καθώς εμφανίζονται δυο απλές κορυφές στα 6.75 ppm και στα 6.51 ppm. Και σε αυτήν την περίπτωση παρατηρείται το σήμα συντονισμού του υδροξυλικού πρωτονίου της OH-5 της φλαβόνης στα 12.28 ppm.



Σχήμα 5.47 Φάσμα NMR-<sup>1</sup>H του 7-Ο-διγλυκοζίτη της υπολαετίνης (κορυφή 5) σε διαλύτη ACN-d<sub>3</sub>.

Από το Σχήμα 5.47 είναι ξεκάθαρο ότι η ένωση 5 συνεκλύεται μαζί με άλλη ένωση. Η φασματοσκοπία NMR παρέχει τη δυνατότητα ταυτοποίησης της ένωσης αυτής, καθώς τα ολοκληρώματα των κορυφών των δυο ενώσεων διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους. Όσον αφορά στον χαρακτηρισμό των δυο μορίων σακχάρου που είναι συνδεδεμένα με την υπολαετίνη επιτεύχθηκε όπως και στην περίπτωση της κορυφής 6 με χρήση της δισδιάστατης φασματοσκοπίας και της φασματομετρίας μαζών. Η ταυτοποίηση όλων των πρωτονίων ήταν πιο εύκολη διαδικασία στην περίπτωση αυτή καθώς οι ενώσεις 5 και 6 φέρουν τα ίδια σάκχαρα. Συνεπώς τόσο τα φάσματα NMR-<sup>1</sup>H όσο και οι δισδιάστατοι χάρτες COSY και TOCSY είναι πανομοιότυποι (Σχήμα 5.48). Το σύνολο των χημικών μετατοπίσεων των πρωτονίων της ένωσης 5 παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.5 και βρίσκονται σε συμφωνία με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας (Lenherr, *et al.*, 1984, El-Ansari, *et al.*, 1991, Gabrieli, *et al.*, 2005).

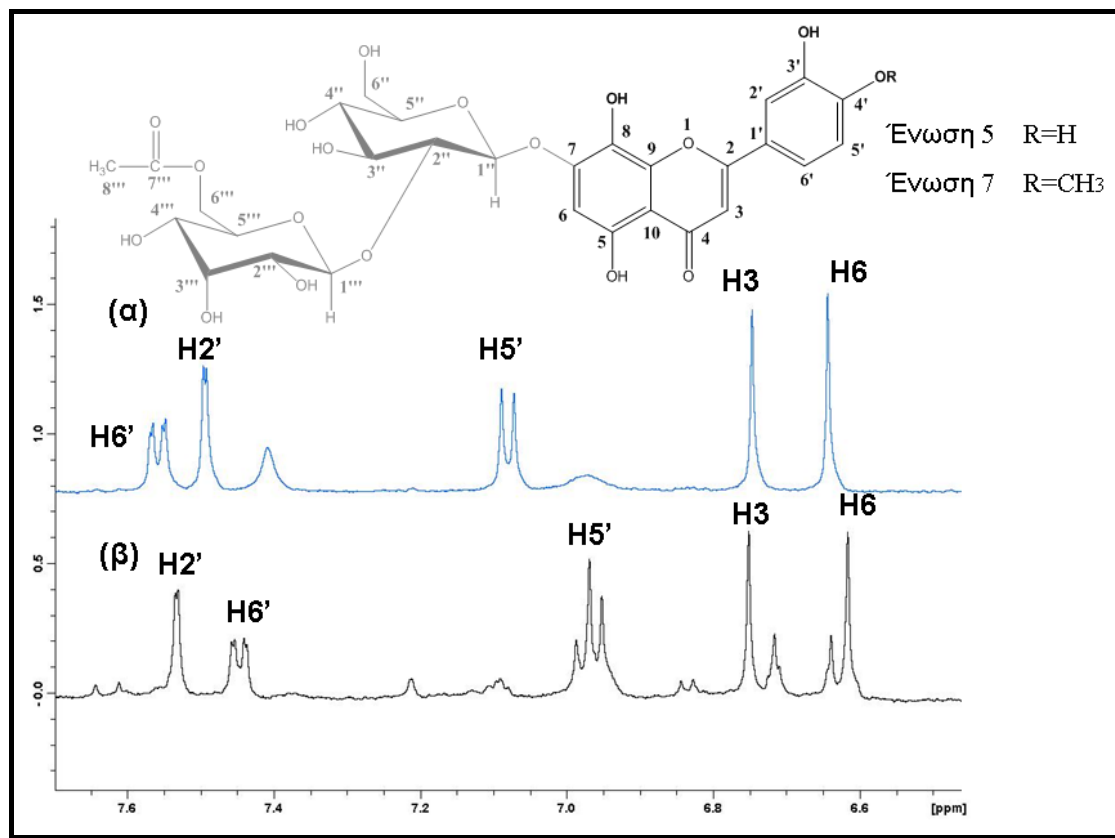


Σχήμα 5.48. Επιλεγμένη περιοχή των φασμάτων NMR-<sup>1</sup>H των ενώσεων (α) 7-O-[6'''-O-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοζυλ-(1→2)-β-D-γλυκοπυρανοζίτης] της υπολαετίνης, (β) 7-O-[6'''-O-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοζυλ-(1→2)-β-D-γλυκοπυρανοζίτης] της 4'-μεθοξυ-υπολαετίνης και (γ) 7-O-[6'''-O-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοζυλ-(1→2)-β-D-γλυκοπυρανοζίτης] της ισοσκουτελλαρεΐνης σε ACN-d<sub>3</sub>.

Η ταυτοποίηση της κορυφής 7 ως 7-O-[6'''-O-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοζυλ-(1→2)-β-D-γλυκοπυρανοζίτη] της 4'-μεθοξυ-υπολαετίνης ήταν σημαντικά ευκολότερη εξαιτίας της προηγούμενης ταυτοποίησης των κορυφών 5 και 6. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.48 τα δυο σάκχαρα και ο τρόπος με τον οποίο συνδέονται στο άγλυκο τμήμα του μορίου είναι όμοιος με εκείνο των ενώσεων 5 και 6. Στην αλειφατική περιοχή της ένωσης 7 υπάρχει μια σημαντική διαφορά καθώς εμφανίζεται μια κορυφή στα 3.93 ppm που οφείλεται στην παρουσία μιας μεθοξυ-ομάδας, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από την τιμή του ολοκληρώματος της κορυφής. Η αρωματική περιοχή αποκαλύπτει μια φλαβόνη αντίστοιχη με την υπολαετίνη με μικρή μετατόπιση των πρωτονίων του δακτυλίου B, που οφείλεται στη μετατροπή της υδροξυλομάδας στην θέση C-4' σε μεθόξυ ομάδα. Η μεθόξυ ομάδα προτείνεται ότι βρίσκεται στην θέση C-4' και όχι στην θέση C-3' καθώς παρατηρείται μεγαλύτερη μετατόπιση του σήματος συντονισμού του πρωτονίου H-5', που βρίσκεται σε *ortho* θέση ως προς τη θέση μεθυλίωσης. Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώνεται και από τα



βιβλιογραφικά δεδομένα των χημικών μετατοπίσεων των δυο ισομερών (Gabrieli, *et al.*, 2005).



Σχήμα 5.49. Σύγκριση της αρωματικής περιοχής των φασμάτων NMR-<sup>1</sup>H των ενώσεων (α) 7-O-[6'''-O-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοζυλ-(1→2) -β-D-γλυκοπυρανοζίτη] της 4'-μεθοξυ-υπολαετίνης, (β) 7-O-[6'''-O-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοζυλ-(1→2) -β-D-γλυκοπυρανοζίτη] της υπολαετίνης σε διαλύτη ACN-d<sub>3</sub>.

Πίνακας 5.7. Χημικές μετατοπίσεις και σταθερές σύζευξης για τον 7-O-[6'''-O-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοζυλ-(1→2)-β-D-γλυκοπυρανοζίτη] της 4'-μεθοξυ-υπολαετίνης, 7-O-[6'''-O-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοζυλ-(1→2)-β-D-γλυκοπυρανοζίτη] της υπολαετίνης και 7-O-[6'''-O-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοζυλ-(1→2)-β-D-γλυκοπυρανοζίτη] της ισοσκοουτελλαρεΐνης σε διαλύτη ACN-d<sub>3</sub>.

Πρωτόνιο	Δι-γλυκοζίτης της ισοσκοουτελλαρεΐνης	Δι-γλυκοζίτης της υπολαετίνης	Δι-γλυκοζίτης της 4'-μεθοξυυπολαετίνης
H-3	6.78 <i>s</i>	6.75 <i>s</i>	6.75 <i>s</i>
H-6	6.67 <i>s</i>	6.62 <i>s</i>	6.64 <i>s</i>
H-2'	7.96	7.53 <i>d</i> (1.90)	7.49 <i>d</i> (1.90)
H-3'	7.03 <i>s</i>	-	-
H-5'	7.01 <i>s</i>	7.08 <i>d</i> (8.50)	7.08 <i>d</i> (8.50)
H-6'	7.94	7.45 <i>dd</i> (1.90/8.50)	7.56 <i>dd</i> (1.90/8.50)
OH-5	12.35	12.27	12.28
OMe	-	-	3.93 <i>s</i>
<b>Γλυκόζη</b>			
H-1	4.92 <i>d</i> (8.24)	4.92 <i>d</i> (8.24)	4.92 <i>d</i> (8.24)
H-2	3.42 <i>d</i> (8.56)	3.42 <i>d</i> (8.56)	3.42 <i>d</i> (8.56)
H-3	3.08	3.08	3.08
H-4	3.58 <i>t</i> (8.85)	3.58 <i>t</i> (8.85)	3.58 <i>t</i> (8.85)
H-5	3.57	3.57	3.57
H-6a	3.85 <i>d</i> (11.94)	3.85 <i>d</i> (11.94)	3.85 <i>d</i> (11.94)
H-6b	4.07	4.07	4.07
<b>Αλλόζη</b>			
H-1	4.88 <i>d</i> (7.72)	4.88 <i>d</i> (7.72)	4.88 <i>d</i> (7.72)
H-2	3.47 <i>m</i>	3.47 <i>m</i>	3.47 <i>m</i>
H-3	4.20 <i>d</i> (5.02)	4.20 <i>d</i> (5.02)	4.20 <i>d</i> (5.02)
H-4	3.66 <i>t</i> (9.50)	3.66 <i>t</i> (9.50)	3.66 <i>t</i> (9.50)
H-5	3.95	3.95	3.95
H-6a	4.34 <i>d</i> (11.94)	4.34 <i>d</i> (11.94)	4.34 <i>d</i> (11.94)
H-6b	4.23 <i>d</i> (5.24)	4.23 <i>d</i> (5.24)	4.23 <i>d</i> (5.24)

\* Οι απορροφήσεις των πρωτονίων της ακετυλομάδας της αλλόζης δεν επικαλύπτονται από την απορρόφηση του ακετονιτριλίου.

### 5.3 Συμπεράσματα

Στην παρούσα διατριβή παρουσιάστηκε ένα ολοκληρωμένο πρωτόκολλο εργασίας για τη μελέτη της σύστασης των φυτικών εκχυλισμάτων. Με το πρωτόκολλο αυτό εργασίας προτάθηκαν μεθοδολογίες φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού μιας και δυο διαστάσεων, υγρής χρωματογραφίας υψηλής αποδόσεως και υγρής χρωματογραφίας- φασματομετρίας μαζών που επιτρέπουν την συστηματική φυτοχημική μελέτη των εκχυλισμάτων. Κατόπιν εφαρμόστηκε με σημαντική επιτυχία η τεχνική LC-SPE-NMR για την ταυτοποίηση των φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων των φυτών *Teucrium polium* και *Sideritis syriaca*, που εμφανίζουν σημαντική αντιοξειδωτική ικανότητα. Η τεχνική LC-SPE-NMR με τις βελτιστοποιημένες συνθήκες λειτουργίας για την μελέτη φαινολικών οξέων και флаβονοειδών ήταν εξαιρετικά αποτελεσματική. Η τεχνική αυτή επιτρέπει την αποσαφήνιση και των πιο πολύπλοκων δομών των φυτικών προϊόντων, χωρίς να προηγηθεί διαδικασία κλασμάτωσης ή απομόνωσης των ενώσεων. Έτσι ταυτοποιήθηκαν στα εκχυλίσματα του *Teucrium polium* τα φαινολοπροπανοειδή βερμπασκοζίτης και πολιουμοζίτης, που αποτελούν και το κύριο συστατικό των μεθανολικών και του υδατικού εκχυλίσματος. Η παρουσία του βερμπασκοζίτη είναι γνωστή για τα εκχυλίσματα όλων των γενών του είδους *Teucrium* (Gross, *et al.*, 1988, Avula, *et al.*, 2003, Poli, *et al.*, 2007, Serrilli, *et al.*, 2007) ενώ ο πολιουμοζίτης είναι συστατικό που χαρακτηρίζει το φυτό *Teucrium polium* στο οποίο οφείλει και το όνομα του (Andary, *et al.*, 1985, Oganesyan, *et al.*, 1991, El-Oualldi, *et al.*, 2003). Τα εκχυλίσματα του *Teucrium polium* περιέχουν флаβονοειδή όπως και όλα τα φυτά της οικογένειας *Lamiaceae*. Τα флаβονοειδή που απαντώνται φέρουν χαρακτηριστικές μεθόξυ ομάδες. Στα εκχυλίσματα, που μελετήθηκαν ταυτοποιήθηκαν οι ενώσεις 5,3',4'-τριϋδροξυ-3,7-διμεθοξυ-φλαβόνη (διμεθοξυκερκετίνη) και η 5,4'-διϋδροξυ-3,7-διμεθοξυ-φλαβόνη (διμεθοξυκαμπερόλη). Οι ενώσεις αυτές είναι γνωστές και έχουν βρεθεί σε φυτά της οικογένειας *Lamiaceae*, αλλά η παρουσία τους στα εκχυλίσματα του *Teucrium polium* δεν έχει αναφερθεί (Tomas-Barberan and Woolenweber, 1990). Τέλος, στα εκχυλίσματα ταυτοποιήθηκαν οι ενώσεις απιγενίνη, 7-*O*-ρουτινοζίτης, 7-*O*-γλυκοζίτης και 4'-*O*-γλυκοζίτης της απιγενίνης. Αξίζει να σημειωθεί, ότι ο ρουτινοζίτης της απιγενίνης και ο 4'-*O*-γλυκοζίτης αναφέρονται για

πρώτη φορά σε εκχυλίσματα του *Teucrium polium*, ενώ η παρουσία της απιγενίνης και του 7-O- γλυκοζίτης είναι γνωστή (Hasani, *et al.*, 2007, Hawas, *et al.*, 2008, Sharififar, *et al.*, 2009).

Με την τεχνική LC-SPE-NMR ταυτοποιήθηκαν και τα συστατικά του υδατικού εκχυλίσματος AESS1 που εμφανίζει σημαντική αντιοξειδωτική ικανότητα. Η βιολογική δράση των εκχυλισμάτων του *Sideritis* έχει αποδοθεί κυρίως στα φλαβονοειδή και για το λόγο αυτό ο χαρακτηρισμός των φλαβονοειδών αποκτά μεγαλύτερη σπουδαιότητα. Τα κύρια συστατικά του εκχυλίσματος είναι τα φλαβονοειδή 7-O-[6'''-O-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοζυλ-(1→2)-β-D-γλυκοπυρανοζίτης] της 4'-μεθοξυ-υπολαετίνης και 7-O-[6'''-O-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοζυλ-(1→2)-β-D-γλυκοπυρανοζίτης] της ισοσκουτελλαρεΐνης. Σε μικρότερη συγκέντρωση απαντάται ο 7-O-[6'''-O-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοζυλ-(1→2)-β-D-γλυκοπυρανοζίτης] της υπολαετίνης. Η ύπαρξη των τριών αυτών φλαβονοειδών στα εκχυλίσματα του *Sideritis* έχει αναφερθεί (Rios, *et al.*, 1992, Sattar, *et al.*, 1993, Palomino, *et al.*, 1996, Rodriguez-Lyon, *et al.*, 2000, Aboutabl, *et al.*, 2002, Gabrieli, *et al.*, 2005). Άλλη κατηγορία ενώσεων που βρέθηκε στα εκχυλίσματα του *Sideritis* είναι τα φαινυλοπροπανοειδή, όπως και στην περίπτωση των εκχυλισμάτων του *Teucrium polium*. Πιο συγκεκριμένα, ταυτοποιήθηκαν ο βερμπασκοζίτης, ο μαρτυνοζίτης και ο λαβαντουλιφολιοζίτης. Τα φαινυλοπροπανοειδή αυτά παρουσιάζουν μικρές δομικές διαφοροποιήσεις μεταξύ τους και η παρουσία τους έχει αναφερθεί σε άλλα είδη του *Sideritis* αλλά όχι στο είδος *syriaca* (Ackos, *et al.*, 1999, Sahin, *et al.*, 2004, Sahin, *et al.*, 2006, Kupeli, *et al.*, 2007, Charami, *et al.*, 2008). Αυτό, ίσως οφείλεται στο γεγονός ότι το είδος αυτό φύεται στην Ελλάδα και κυρίως στον ορεινό όγκο της Κρήτης. Τέλος, στα εκχυλίσματα του *Sideritis syriaca* επιβεβαιώθηκε η παρουσία του χλωρογενικού οξέος που είναι χαρακτηριστική για το είδος αυτό (Armata, *et al.*, 2008).

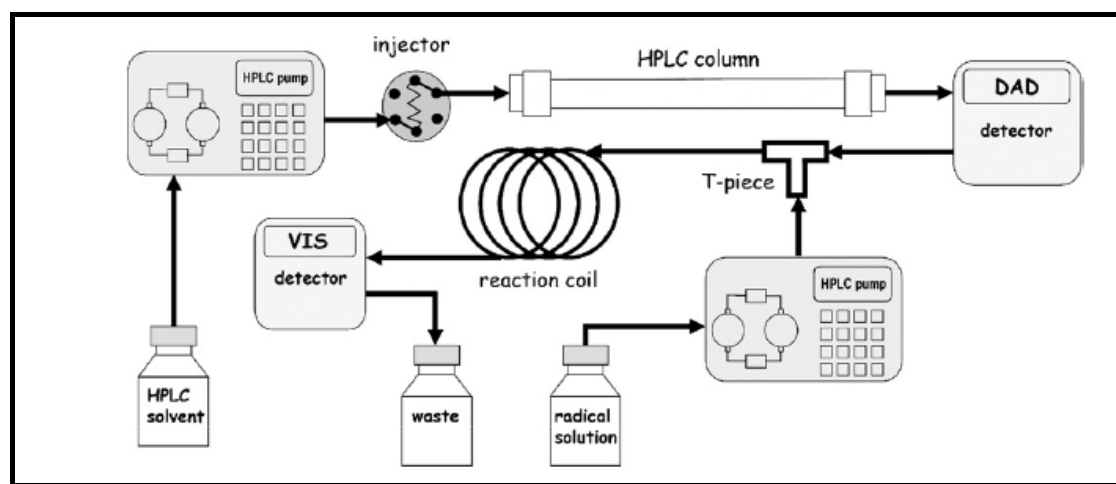
## 6. On line παρακολούθηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των φυτικών εκχυλισμάτων

### 6.1 Εισαγωγή

Τα τελευταία χρόνια η χρήση και η κατανάλωση φυσικών αντιοξειδωτικών αποκτά ολοένα και μεγαλύτερο ενδιαφέρον, καθώς τα φυσικά αντιοξειδωτικά φέρονται να προασπίζουν την ανθρώπινη υγεία έναντι πολλών ασθενειών, όπως ο καρκίνος, η αρτηριοσκλήρυνση, η νόσος Alzheimer, η νόσος Parkinson, το άσθμα, η γήρανση κ.ά (Sies, 1991, Halliwell and Cuttidge, 1996, Esposito, *et al.* 2004, Valko, *et al.*, 2007, Tomasset, *et al.*, 2007). Ως συνέπεια τα αντιοξειδωτικά και η (βιο)-χημεία τους βρίσκονται στο επίκεντρο του ενδιαφέροντος της επιστημονικής κοινότητας (Sies, 1991, Bast, *et al.*, 1991). Έτσι, έχει αρχίσει η συστηματική αναζήτηση αντιοξειδωτικών τόσο σε συστήματα *in vivo* (Halliwell and Whiteman, 2004) όσο και συνθήκες *in vitro* (Halliwell, 1995). Για το λόγο αυτό έχουν αναπτυχθεί διάφορες δοκιμές που ελέγχουν την αντιοξειδωτική ικανότητα ενώσεων ή εκχυλισμάτων φυσικών προϊόντων (Huang, *et al.*, 2005). Είναι γεγονός, ότι η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μεμονωμένων αντιοξειδωτικών ή η συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα μιγμάτων ή/και εκχυλισμάτων φυσικών προϊόντων είναι μια σχετική απλή διαδικασία. Εντούτοις, ο προσδιορισμός της συνεισφοράς των επιμέρους συστατικών των μιγμάτων στη συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα είναι εξαιρετικά δύσκολος.

Για να αποφευχθούν οι χρονοβόρες και ιδιαίτερα επίπονες εργασίες κλασμάτωσης και απομόνωσης των επιμέρους ενώσεων ώστε να εκτιμηθεί η αντιοξειδωτική ικανότητα τους, αναπτύχθηκαν οι τεχνικές αναζήτησης αντιοξειδωτικών υψηλής διακριτικής ικανότητας (High Resolution Screening, HRS) (Niederlander *et al.*, 2008). Οι τεχνικές αυτές συνδυάζουν μια αποτελεσματική τεχνική διαχωρισμού όπως η αέριος χρωματογραφία (GC) ή υγρή χρωματογραφία υψηλής αποδόσεως (HPLC) με μια διαδικασία (βιο)-χημικής ανίχνευσης που λαμβάνει χώρα αμέσως μετά το διαχωρισμό. Η υγρή χρωματογραφία υψηλής αποδόσεως (HPLC) έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για το σκοπό αυτό, σε συνδυασμό με διάφορες τεχνικές προσδιορισμού της ικανότητας δέσμευσης ελευθέρων ριζών

(Drijfhout, *et al.*, 2002). Στο Σχήμα 6.1 παρουσιάζεται μια τυπική οργανολογική διάταξη των τεχνικών αυτών. Η μεγαλύτερη δυσκολία των τεχνικών αναζήτησης αντιοξειδωτικών υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRS), είναι η εύρεση μιας δοκιμής αντιοξειδωτικής ικανότητας, η οποία να είναι συμβατή με τη λειτουργία της υγρής χρωματογραφίας. Τα τελευταία δέκα χρόνια έχουν αναπτυχθεί αρκετές τεχνικές ελέγχου αντιοξειδωτικών υψηλής διακριτικής ικανότητας (Ingkaninan, *et al.*, 2000, Schobel, *et al.*, 2001, van Elswijk and Irth, 2003, Schenk, *et al.*, 2003, Jeurissen, *et al.*, 2007).



*Σχήμα 6.1. Σχηματική αναπαράσταση των τεχνικών ελέγχου αντιοξειδωτικών υψηλής διακριτικής ικανότητας με χρήση της HPLC ως τεχνική διαχωρισμού. Η οργανολογική διάταξη είναι δυνατό να διαφοροποιηθεί χρησιμοποιώντας δυο αντλίες μετά την στήλη ή δυο βρόγχους υστέρησης για ενζυμικές κυρίως αντιδράσεις. Τέλος, ως ανιχνευτές είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν οι ELSD, MS ή το NMR.*

Για την ανάπτυξη των τεχνικών ελέγχου αντιοξειδωτικών υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRS), έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες δοκιμές ελέγχου της αντιοξειδωτικής ικανότητας, που μπορούν να χωριστούν στις τρεις ακόλουθες κατηγορίες :

- Μεθοδολογίες που βασίζονται σε δραστικές μορφές οξυγόνου που οξειδώνουν το υπόστρωμα
- Μεθοδολογίες που βασίζονται σε μια σχετικά σταθερή ρίζα
- Δοκιμές ελέγχου που συσχετίζουν την αντιοξειδωτική ικανότητα με την ηλεκτροχημική συμπεριφορά των υπό ανάλυση ενώσεων

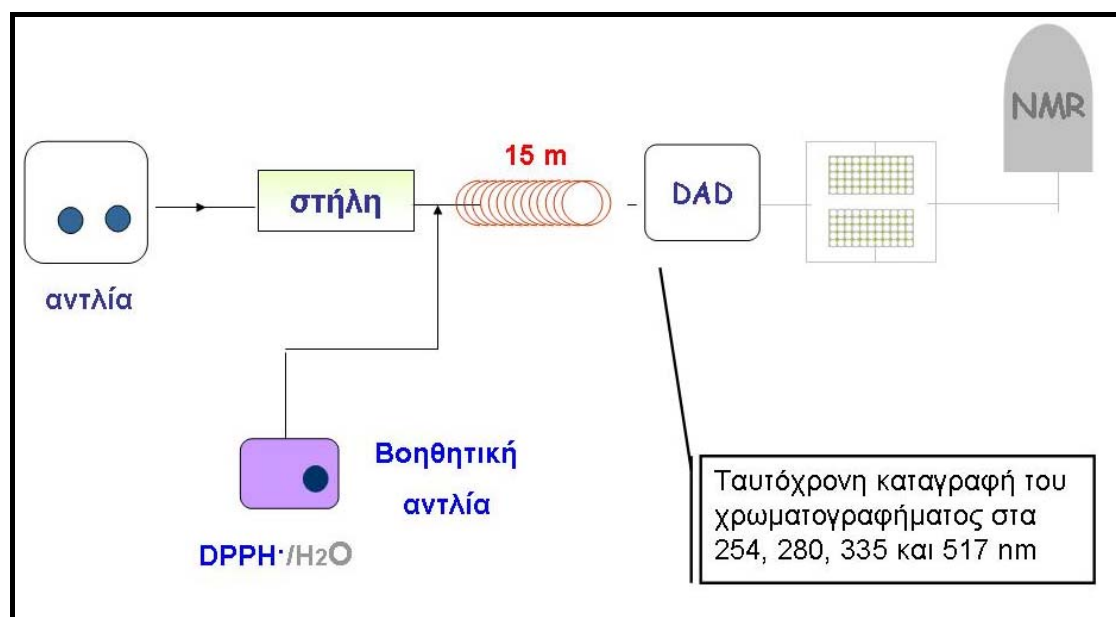
Η πρώτη απόπειρα για την ανάπτυξη μιας τέτοιας τεχνικής πραγματοποιήθηκε το 1996 (Cao, *et al.*, 1996) και από τότε έχουν ακολουθήσει άλλες 45 περίπου προσπάθειες για την on line παρακολούθηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας φυτικών εκχυλισμάτων, τροφίμων και αφεψημάτων. Η πλειοψηφία των τεχνικών αυτών χρησιμοποιεί ένα έγχρωμο σχετικά σταθερό ρίζα όπως το DPPH (1,1-διφαινυλο-2-πικρυλυδραζύλιο) και το ABTS (2,2'-διαζινο-(3-αιθυλοβενζυλοθιαζόνη-6-σουλφονικό οξύ)) που προστίθεται στην κινητή φάση και αντιδρά με τα συστατικά που διαχωρίζονται στη στήλη χρωματογραφίας. Η παρουσία των αντιοξειδωτικών υποδηλώνεται από τη μείωση της απορρόφησης σε συγκεκριμένο μήκος κύματος, που οφείλεται στην μετατροπή της ρίζας σε άχρωμο παράγωγο (Darkevicious, *et al.*, 2000, Antolovich, *et al.*, 2002, Koleva, *et al.*, 2002, Potterat and Hamburger, 2006).



## **6.2 Οργανολογία για την on line παρακολούθηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων**

Όπως, έχει ήδη αναφερθεί για την on line παρακολούθηση της ικανότητας δέσμησης των ελευθέρων ριζών απαιτείται ένα τυπικό σύστημα HPLC, μια ισοκρατική αντλία που εισάγει το διάλυμα της σταθερής ρίζας DPPH μέσω της οποίας αποκαλύπτεται η ικανότητα δέσμησης των ελευθέρων ριζών των συστατικών των φυτικών εκχυλισμάτων και ένας επιπλέον ανιχνευτής. Για την αποτίμηση της μείωσης της απορρόφησης στα 517 nm που επιφέρει η ανάμειξη της έγχρωμης σταθερής ρίζας με το αντιοξειδωτικό χρησιμοποιείται συνήθως ένας δεύτερος ανιχνευτής UV. Η παρουσία των αντιοξειδωτικών εκδηλώνεται με την εμφάνιση αρνητικών κορυφών απορρόφησης στο UV. Η παραπάνω οργανολογία αποτελεί την πιο συνηθισμένη οργανολογική διάταξη για την on line παρακολούθηση της ικανότητας δέσμησης των ελευθέρων ριζών των συστατικών των εκχυλισμάτων ή άλλων πολύπλοκων μιγμάτων (Koleva, *et al.*, 2000, Bandoniene, *et al.*, 2002, Bandoniene, and Murkovic, 2002, Kosar, *et al.*, 2004, Perez-Bonilla, *et al.*, 2006, Cakir, *et al.*, 2007, Wu, *et al.*, 2008). Με κατάλληλες μετατροπές στην οργανολογική διάταξη έχει επιτευχθεί η σύζευξη της τεχνικής αυτής με την τεχνική LC-MS (Nuengchammong, *et al.*, 2005) και με την τεχνική LC-SPE-NMR (Pukalskas, *et al.*, 2005, Exarchou, *et al.*, 2006), με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας και περισσότερο πολύπλοκων ενώσεων.

Στην παρούσα διατριβή για την ανάπτυξη της μεθοδολογίας αυτής χρησιμοποιήθηκε η οργανολογική διάταξη του LC-SPE-NMR με τις κατάλληλες μετατροπές. Συγκεκριμένα, η ισοκρατική αντλία που στην τεχνική LC-SPE-NMR εισάγει νερό στο σύστημα για την επίτευξη της παγίδευσης των ενώσεων στις μικροστήλες, εισάγει την έγχρωμη ρίζα DPPH. Ένας ελικοειδής αντιδραστήρας 15 μέτρων (PEEK tubing, 0.30 mm i.d) προσαρμόζεται μέσω ενός συνδέσμου T που συνενώνει τις ροές της χρωματογραφικής στήλης και του αντιδραστηρίου DPPH (Σχήμα 6.2). Αξίζει να σημειωθεί ότι είναι η πρώτη φορά που πραγματοποιείται on line παρακολούθηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας με την χρήση ενός μόνο ανιχνευτή UV.



Σχήμα 6.2. Μετατροπή της διάταξης LC-SPE-NMR σε διάταξη που επιτρέπει την *on line* παρακολούθηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων. Οι μαύρες γραμμές δείχνουν τη διάταξη της τεχνικής HRS ενώ οι γκρι γραμμές αντιστοιχούν στη διάταξη του LC-SPE-NMR και δεν χρησιμοποιούνται.

Βασικό πλεονέκτημα της χρήσης ενός μόνο ανιχνευτή DAD που να καταγράφει ταυτόχρονα σε διάφορα μήκη κύματος, είναι ότι δεν παρατηρείται μετατόπιση των αρνητικών κορυφών στα 517 nm σε σχέση με τις κορυφές των συστατικών στα 254, 280, 335 nm. Στις διατάξεις που έχουν περιγραφεί έως σήμερα που φέρουν δυο ανιχνευτές UV παρουσιάζεται μια χρονική απόκλιση των αρνητικών κορυφών ίση, με τον χρόνο αντίδρασης του μίγματος στον ελικοειδή αντιδραστήρα. Η διεύρυνση των κορυφών οφείλεται σε γεωμετρικά και υδροδυναμικά χαρακτηριστικά του συστήματος που συνεισφέρουν στη διασπορά των κορυφών.

### 6.3 Επιλογή των παραμέτρων για την ανάπτυξη της *on line* παρακολούθησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων.

Από τις τεχνικές HRS αναζήτησης αντιοξειδωτικών εκείνη, που χρησιμοποιεί την σταθερή ρίζα του DPPH, επιτρέπει τον άμεσο εντοπισμό των αντιοξειδωτικών σε ένα φυτικό εκχύλισμα ή σε ένα πολύπλοκο μίγμα. Η τεχνική αυτή βασίζεται στην μείωση της απορρόφησης στα 517 nm που προκαλείται από την κατανάλωση του αντιδραστηρίου του DPPH από το αντιοξειδωτικό. Η σταθερή ρίζα DPPH εμφανίζει μέγιστο  $\lambda_{\max}$  στα 517 nm, ενώ η ανηγμένη του μορφή DPPH-H, που προκύπτει με την μεταφορά ενός πρωτονίου από το αντιοξειδωτικό στην ρίζα δεν παρουσιάζει σημαντική απορρόφηση πάνω από τα 400 nm. Στην πραγματικότητα, η αντίδραση του αντιοξειδωτικού με την ρίζα του DPPH οδηγεί στην εμφάνιση μιας αρνητικής κορυφής. Η ένταση της αρνητικής κορυφής εξαρτάται από μια σειρά παραμέτρων, που είναι χρήσιμο να συνυπολογίζονται κατά την ανάπτυξη και εφαρμογή της τεχνικής. Πιο συγκεκριμένα, η ένταση της αρνητικής κορυφής εξαρτάται από:

- (α) τη συγκέντρωση του διαλύματος DPPH, που χρησιμοποιείται,
- (β) τη σύσταση και το pH της κινητής φάσης της υγρής χρωματογραφίας,
- (γ) το χρόνο αντίδρασης του αντιοξειδωτικού και της ρίζας DPPH,
- (δ) τη δομή και τη συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού.

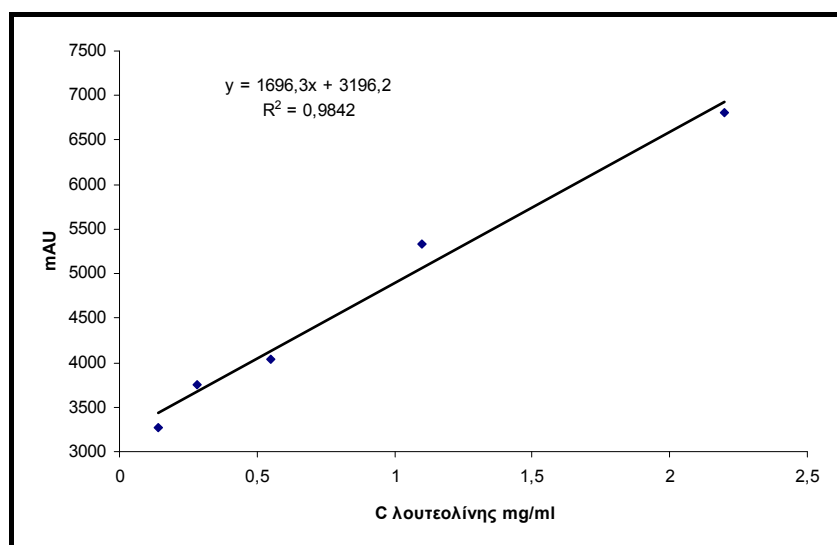
Για την επιλογή της συγκέντρωσης του διαλύματος DPPH δοκιμάστηκαν τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις  $10^{-4}$ ,  $5 \cdot 10^{-5}$ ,  $10^{-5}$  και  $10^{-6}$  M. Αύξηση της συγκέντρωσης του DPPH υψηλότερης του  $5 \cdot 10^{-5}$  M έχει ως αποτέλεσμα την σημαντική αύξηση των επιπέδων του θορύβου, ιδιαίτερα στις περιοχές του χρωματογραφήματος που αντιστοιχούν σε σύσταση κινητής φάσης με 5 % έως 20 % νερό. Μείωση της συγκέντρωσης της σταθερής ρίζας στην τιμή  $10^{-6}$  M δεν επέφερε περαιτέρω μείωση του θορύβου. Η παρατήρηση αυτή βρίσκεται σε συμφωνία με ανάλογη μελέτη για την επίδραση της συγκέντρωσης του διαλύματος DPPH (Koleva, *et al.*, 2000). Για τον εντοπισμό των αντιοξειδωτικών σε εκχυλίσματα δεντρολίβανου και μιγμάτων πέντε αντιοξειδωτικών χρησιμοποιήθηκε συγκέντρωση δ/ματος DPPH  $10^{-4}$  M (Pukalskas, *et al.*, 2005, Bartasiute, *et al.*, 2007), ενώ για τον χαρακτηρισμό αντιοξειδωτικών συστατικών σε εκχυλίσματα του φυτού *Sideritis scardica*, των φρούτων της μουριάς και κλασμάτων του ελαιοδέντρου χρησιμοποιήθηκε δ/μα DPPH

συγκέντρωσης  $10^{-5}$  M (Koleva, *et al.*, 2000, Oki, *et al.*, 2006, Perez-Bonilla, *et al.*, 2006).

Είναι γνωστό, ότι η αντίδραση του DPPH με το αντιοξειδωτικό εξαρτάται άμεσα από τον διαλύτη. Σε πειράματα *off line* της ρίζας DPPH με φλαβονόλες έχουν προταθεί διαφορετικοί μηχανισμοί αντίδρασης και έχουν απομονωθεί διαφορετικά προϊόντα ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο διαλύτη, ακετονιτρίλιο ή μεθανόλη (Hvattum, *et al.*, 2004). Ανάλογα συμπεράσματα προέκυψαν και από την μελέτη της αντίδρασης του DPPH με το πρωτοκατεχικό οξύ και τους εστέρες του σε αιθανόλη και ακετόνη (Saito, *et al.*, 2004). Επιπλέον έχει αναφερθεί, ότι η απορρόφηση της ρίζας του DPPH στα 517 nm εξαρτάται από το διαλύτη και το pH και είναι δυνατό να μειωθεί η απορρόφηση αν η ρίζα εκτεθεί στο φως ή στο οξυγόνο (Ozcelic, *et al.*, 2003). Έτσι γίνεται φανερό, ότι σε μια *on line* τεχνική για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των συστατικών ενός μίγματος είναι σημαντική η σύσταση της κινητής φάσης. Έχει αποδειχθεί σε πειράματα *on line* ότι ο μηχανισμός της αντίδρασης διαφέρει σημαντικά όταν η κινητή φάση περιέχει 60% μεθανόλη - 40% νερό σε σχέση με την κινητή φάση που περιέχει αποκλειστικά μεθανόλη (Schlesier, *et al.*, 2002). Η παρουσία του νερού στην αντίδραση έχει σημαντική επίδραση. Η αντίδραση της ρίζας DPPH με το αντιοξειδωτικό σε μεθανόλη 100% παρουσιάζει αργή κινητική και η αντίδραση είναι ποσοτική (Bartasiute, *et al.*, 2007, Sanchez-Moreno, 2002). Αντίθετα, όταν η αντίδραση πραγματοποιείται σε συστήματα που περιέχουν νερό, αμέσως αποκαθίσταται δυναμική ισορροπία. Συνεπώς, τα αποτελέσματα της *on line* δοκιμασίας HPLC-DPPH εξαρτώνται από τη θερμοδυναμική και την κινητική της αντίδρασης (Bartasiute, *et al.*, 2007). Για το λόγο αυτό, είναι χρήσιμο η κινητή φάση να περιέχει οργανικό διαλύτη σε εκατοστιαία αναλογία από 10% έως 90 % . Επιπροσθέτως έχει αποδειχθεί, ότι η απορρόφηση της ρίζας στα 517 nm μειώνεται σημαντικά όταν βρεθεί σε διάλυμα pH μικρότερο από 3 και προτείνεται η χρήση κατάλληλων ρυθμιστικών διαλυμάτων (Koleva, *et al.*, 2000). Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των συστατικών των φυτικών εκχυλισμάτων που μελετήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, δεν έγινε χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων, αλλά προσθήκη οξικού οξέος στο νερό (0.1%). Κατά τη διάρκεια των αναλύσεων το pH ήταν μεγαλύτερο από 3 και δεν υπέρβαινε την τιμή 6. Τέλος, πραγματοποιήθηκε καταγραφή της βασικής γραμμής (baseline acquisition) παρουσία δ/τος DPPH που ήταν σταθερή στο μήκος κύματος καταγραφής του χρωματογραφικού προφίλ.

Σχετικά με το βρόγχο υστέρησης, σημειώνεται ότι παρόλο που στην τεχνική της *on line* HPLC-DPPH η αντίδραση της ρίζας με τα περισσότερα αντιοξειδωτικά θεωρείται ότι πραγματοποιείται σε ελάχιστα δευτερόλεπτα λόγω της παρουσίας του νερού στο βρόγχο, προτείνεται η χρήση βρόγχου μήκους 15 μέτρων, με δεδομένο ότι το μήκος του καθορίζει το χρόνο αντίδρασης της ρίζας με το αντιοξειδωτικό.

Όπως αναφέρθηκε στο υποκεφάλαιο 6.2 η οργανολογική διάταξη με την χρήση ενός μόνο ανιχνευτή DAD παρουσιάζεται για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία. Για αυτό κρίθηκε σκόπιμο να καθοριστεί το όριο ανίχνευσης της μεθοδολογίας και να συγκριθεί με τα όρια ανίχνευσης των μεθοδολογιών που χρησιμοποιούν δυο ανιχνευτές UV. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το φλαβονοειδές, λουτεολίνη και το όριο ανίχνευσης του αντιοξειδωτικού προσδιορίστηκε στα 1.7  $\mu\text{g/ml}$ . Η τιμή αυτή βρίσκεται σε συμφωνία με τα όρια ανίχνευσης των προηγούμενων μεθοδολογιών καθώς για την κερκετίνη το όριο ανίχνευσης της έχει καθοριστεί στα 0.33  $\mu\text{g/ml}$ , για την ρουτίνη 2.2  $\mu\text{g/ml}$  και για την καιμπερόλη 2.3  $\mu\text{g/ml}$  (Koleva, *et al.*, 2000).



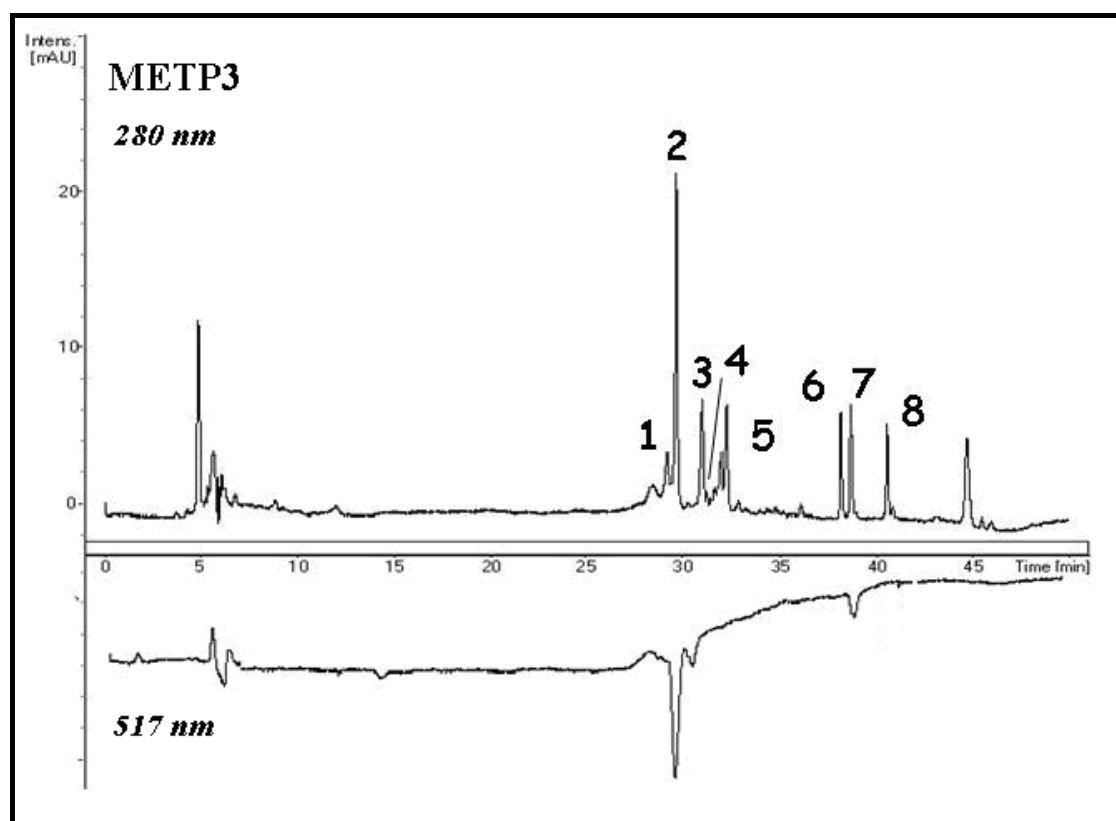
Σχήμα 6.3. Γραφική των ολοκληρωμάτων των αρνητικών κορυφών της λουτεολίνης συναρτήσει της συγκέντρωσης της.

Τέλος, έχει επανειλημμένως προταθεί, ότι η *on line* HPLC-DPPH μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για τον ποσοτικό προσδιορισμό των αντιοξειδωτικών σε εκχυλίσματα ή πολύπλοκα μίγματα (Koleva, *et al.*, 2000, Bandoniene and Murkovic, 2002, Bandoniene, *et al.*, 2002). Η παραπάνω πρόταση επαληθεύτηκε και για την συγκεκριμένη μεθοδολογία, κατασκευάζοντας καμπύλη αναφοράς για τη λουτεολίνη. Η γραφική παράσταση της συγκέντρωσης της λουτεολίνης και των ολοκληρωμάτων

των αρνητικών κορυφών παρουσιάζει γραμμικότητα ( $R^2=0.98$ ), που υποδηλώνει ότι όσο αυξάνει η συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού τόσο μεγαλώνει το ολοκλήρωμα της αρνητικής κορυφής.

#### **6.4 On line εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των συστατικών των εκχυλισμάτων του *Teucrium polium*.**

Το υδατικό και τα μεθανολικά εκχυλίσματα του φυτού *Teucrium polium* εμφανίζουν σημαντική αντιοξειδωτική ικανότητα, όπως έχει ήδη αναφερθεί στο Κεφάλαιο 5.1.1. Η μελέτη της σύστασης των εκχυλισμάτων αυτών έδειξε, ότι κύριο συστατικό τους είναι το φαινυλοπροπανοειδές πολιουμοζίτης, για το οποίο δεν υπάρχει συγκεκριμένη πληροφορία που να σχετίζεται με την ικανότητά του να δεσμεύει ελεύθερες ρίζες, καθώς δεν είναι εμπορικά διαθέσιμο και η απομόνωσή του είναι ιδιαίτερα δύσκολη. Όπως γίνεται αντιληπτό, η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του συστατικού αυτού παρουσιάζει ενδιαφέρον. Με την χρήση της *on line* HPLC-DPPH τεχνικής είναι δυνατός ο έλεγχος της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πολιουμοζίτη και ταυτόχρονα η αξιολόγηση της συνεισφοράς όλων των επιμέρους συστατικών στην αντιοξειδωτική ικανότητα την οποία εμφανίζουν συνολικά τα εκχυλίσματα του *Teucrium polium*. Στα Σχήματα 6.4 και 6.5 που ακολουθούν παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα των εκχυλισμάτων METP3 και EETP3 στα 280 nm και 517 nm μετά την αντίδραση των συστατικών τους με την ρίζα DPPH.

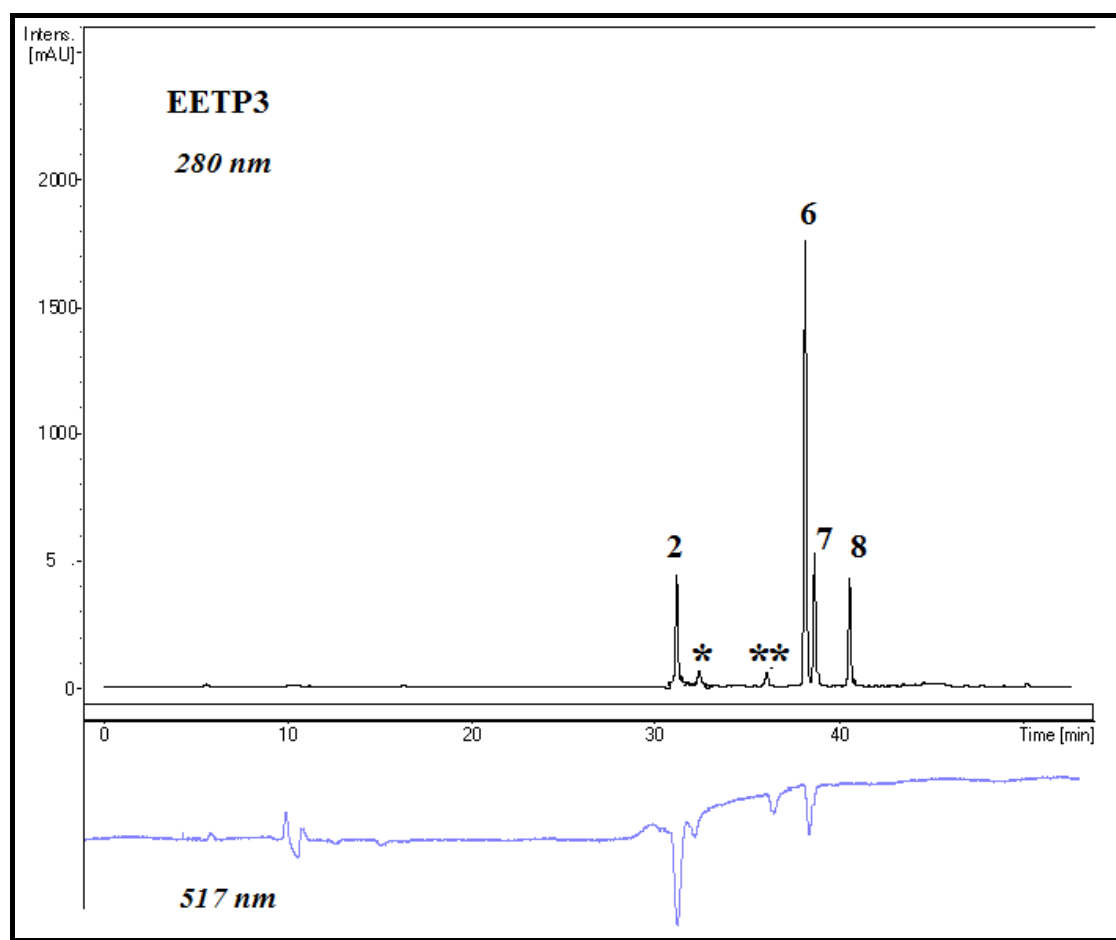


Σχήμα 6.4. Χρωματογράφημα στα 280 nm και 517 nm που λήφθηκαν με αυτοματοποιημένο σύστημα HPLC-DPPH για το μεθανολικό εκχύλισμα METP3. Με τους αριθμούς 1-8 σημειώνονται τα συστατικά του εκχυλίσματος. Πιο συγκεκριμένα 1: βερμπασκοζίτης, 2: πολιομοζίτης, 3: 7-Ο-ρουτινοζίτης της απιγενίνης, 4: 7-Ο-γλυκοζίτης της απιγενίνης, 5: 4'-Ο-γλυκοζίτης της απιγενίνης, 6: απιγενίνη, 7: 3,7-διμεθοξυκερκετίνη, 8: 3,7-διμεθοξυκαιμπερόλη.

Από τα αντίστοιχα χρωματογραφήματα των δυο μεθανολικών εκχυλισμάτων και του υδατικού εκχυλίσματος φαίνεται ότι ο πολιομοζίτης παρουσιάζει σημαντική αντιοξειδωτική ικανότητα. Η ικανότητα αυτή αποδίδεται στην ύπαρξη δυο αρωματικών δακτυλίων που φέρουν υδροξυλομάδες σε θέσεις 3, 4 (Cao, *et al.*, 1997). Η απιγενίνη και τα παράγωγα της (κορυφές 4, 5 και 6) δεν παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση, όπως φαίνεται και στα αντίστοιχα χρωματογραφήματα. Η πρόταση αυτή βρίσκεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα από τις αντίστοιχες *off line* μετρήσεις που δείχνουν ότι η απιγενίνη δεν παρουσιάζει σημαντική αντιοξειδωτική ικανότητα, κυρίως λόγω της ύπαρξης μόνο μιας υδροξυλομάδας στο δακτύλιο C. Επιπλέον, η κινητική της αντίδρασης με τη σταθερή ρίζα είναι εξαιρετικά αργή. Χαρακτηριστικά είναι 10.000 φορές πιο αργή από την αντίστοιχη αντίδραση της κερκετίνης με την ρίζα του DPPH (Butkovic, *et al.*, 2004). Για επιβεβαίωση των παραπάνω, η πρότυπη ένωση απιγενίνη μελετήθηκε με την ίδια *on*

*line* μεθοδολογία. Στην περίπτωση αυτή ακόμη και σε υψηλές συγκεντρώσεις δεν παρατηρήθηκε αρνητική κορυφή στο χρωματογράφημα στα 517 nm. Η κορυφή 7, που αντιστοιχεί στην 3,7-διμεθοξύ-κερκετίνη φαίνεται να αντιδρά ικανοποιητικά με την ρίζα DPPH. Η σημαντική αυτή αρνητική απορρόφηση ήταν αναμενόμενη καθώς η κερκετίνη είναι γνωστή για τις ισχυρή αντιοξειδωτική της ικανότητα. Επιπλέον, η 3,7-διμεθοξύ-καιμφορόλη δεν εμφανίζει την ικανότητα να δεσμεύει τις ελεύθερες ρίζες. Το γεγονός αυτό εξηγείται από την απουσία στο δακτύλιο C υδροξυλομάδων σε *ortho* θέση, όπως και στην περίπτωση της απιγενίνης. Τέλος, από τα Σχήματα 6.4-6.7 φαίνεται ότι ο 7-O-ρουτινοζίτης της απιγενίνης αντιδρά ισχυρά με την ρίζα DPPH, που έρχεται σε αντίθεση με τα όσα είναι γνωστά για την απιγενίνη και την αντίδραση της με το ρίζα DPPH. Μελετώντας πιο προσεκτικά τα χρωματογραφήματα και το φάσμα UV της κορυφής διαπιστώθηκε ότι ταυτόχρονα με την ένωση 7-O-ρουτινοζίτη της απιγενίνης συνεκλουέται και ένα ακόμη συστατικό, του οποίου το φάσμα UV μοιάζει αρκετά με το αντίστοιχο του βερμπασκοζίτη και του πολιουμοζίτη. Η συγκέντρωση του συστατικού είναι αρκετά μικρότερη από την συγκέντρωση του 7-O-ρουτινοζίτη της απιγενίνης, αλλά η ένταση της αρνητικής κορυφής υποδηλώνει ότι πρόκειται για ένωση με ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα.





Σχήμα 6.5. Χρωματογραφήματα στα 280 nm και στα 517 nm που λήφθηκαν με το on line σύστημα HPLC-DPPH για το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα EETP3. Στο χρωματογράφημα με τους αριθμούς σημειώνονται τα συστατικά του εκχυλίσματος. Πιο συγκεκριμένα 2: πολιοουμολίνη, 6: απαγενίνη, 7: 3,7-διμεθοξυκερκετίνη, 8: 3,7-διμεθοξοκαμφορόλη, \* άγνωστη ένωση 1, \*\* άγνωστη ένωση 2.

Με την τεχνική αυτή εκτός από τον εντοπισμό των συστατικών των εκχυλισμάτων με αντιοξειδωτική ικανότητα, είναι δυνατό να εκτιμηθεί και η συνεισφορά του κάθε συστατικού στη συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων (Bandoniene και Murkovic, 2002). Η συνεισφορά κάθε συστατικού των εκχυλισμάτων υπολογίστηκε από το ολοκλήρωμα των αρνητικών χρωματογραφικών κορυφών. Όσο πιο υψηλή είναι η τιμή του ολοκληρώματος της αρνητικής κορυφής, τόσο μεγαλύτερη είναι η συνεισφορά του συστατικού στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα. Στον Πίνακα 6.1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του υπολογισμού της εκατοστιαίας συνεισφοράς καθενός από τα συστατικά των εκχυλισμάτων του φυτού *Teucrium polium*.

**Πίνακας 6.1. Η εκατοστιαία συνεισφορά των συστατικών στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα των εκ εκχυλισμάτων του φυτού *Teucrium polium*.**

Δείγμα	% Συνεισφορά των συστατικών στην αντιοξειδωτική ικανότητα				
	Βερμπασκο-ζίτης	Πολιουμο-ζίτης	Διμεθοξυ-κερκετίνη	Άγνωστη Ένωση 1	Άγνωστη Ένωση 2
ΑΕΤΡ	13.42	65.08	-	21.50	-
ΜΕΤΡ1	11.12	67.45	4.82	16.61	-
ΜΕΤΡ3	12.33	66.77	2.92	17.98	-
ΕΕΤΡ3	-	56.56	23.04	10.26	10.14

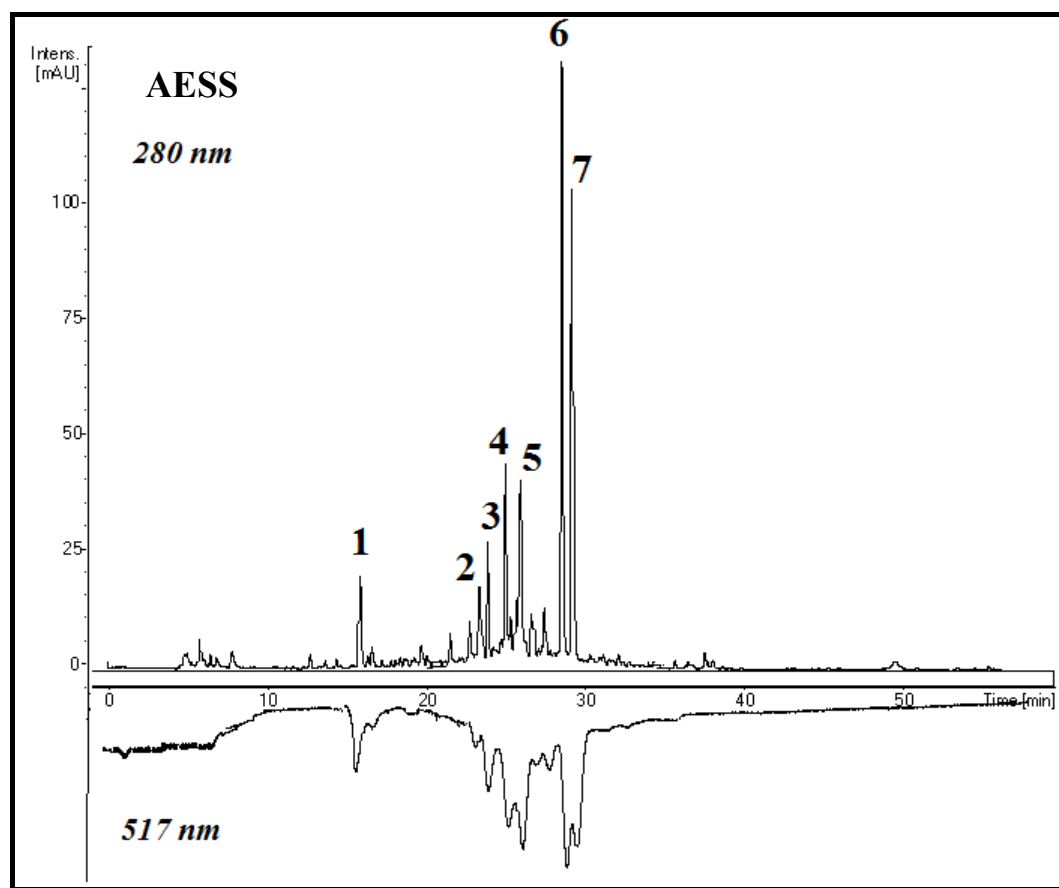
(-) οι ενώσεις αυτές δεν περιέχονται στα εκχυλίσματα.

Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι σε όλα τα εκχυλίσματα του φυτού *Teucrium polium* το μεγαλύτερο ποσοστό της αντιοξειδωτικής δράσης οφείλεται στον πολιουμοζίτη. Στα εκχυλίσματα ΑΕΤΡ, ΜΕΤΡ1 και ΜΕΤΡ3 η συνεισφορά του πολιουμοζίτη στην αντιοξειδωτική ικανότητα είναι περίπου στο 65 %, ενώ και η συνεισφορά του βερμπασκοζίτη που είναι περίπου στο 12% είναι σχεδόν σταθερή. Τα φλαβονοειδή, που περιέχονται σε αυτά τα εκχυλίσματα δεν εμφανίζουν αντιοξειδωτική ικανότητα και αν συνυπολογιστεί και η άγνωστη ένωση 1, τότε η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα είναι δυνατό να αποδοθεί εξ' ολοκλήρου στα φαινυλοπροπανοειδή συστατικά των εκχυλισμάτων. Στην περίπτωση του εκχυλίσματος του οξικού αιθυλεστέρα ΕΕΤΡ3, που η σύσταση του είναι αρκετά διαφορετική από τα υπόλοιπα εκχυλίσματα του φυτού *Teucrium polium*, διαφοροποιείται ως εξής: η συνεισφορά της 3,7-διμεθοξυκερκετίνης και της άγνωστης ένωσης 2, της οποίας το φάσμα UV είναι χαρακτηριστικό φλαβονοειδούς, υπερβαίνει το 30 % της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του εκχυλίσματος.

### **6.5 On line εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των συστατικών των εκχυλισμάτων του *Sideritis syriaca*.**

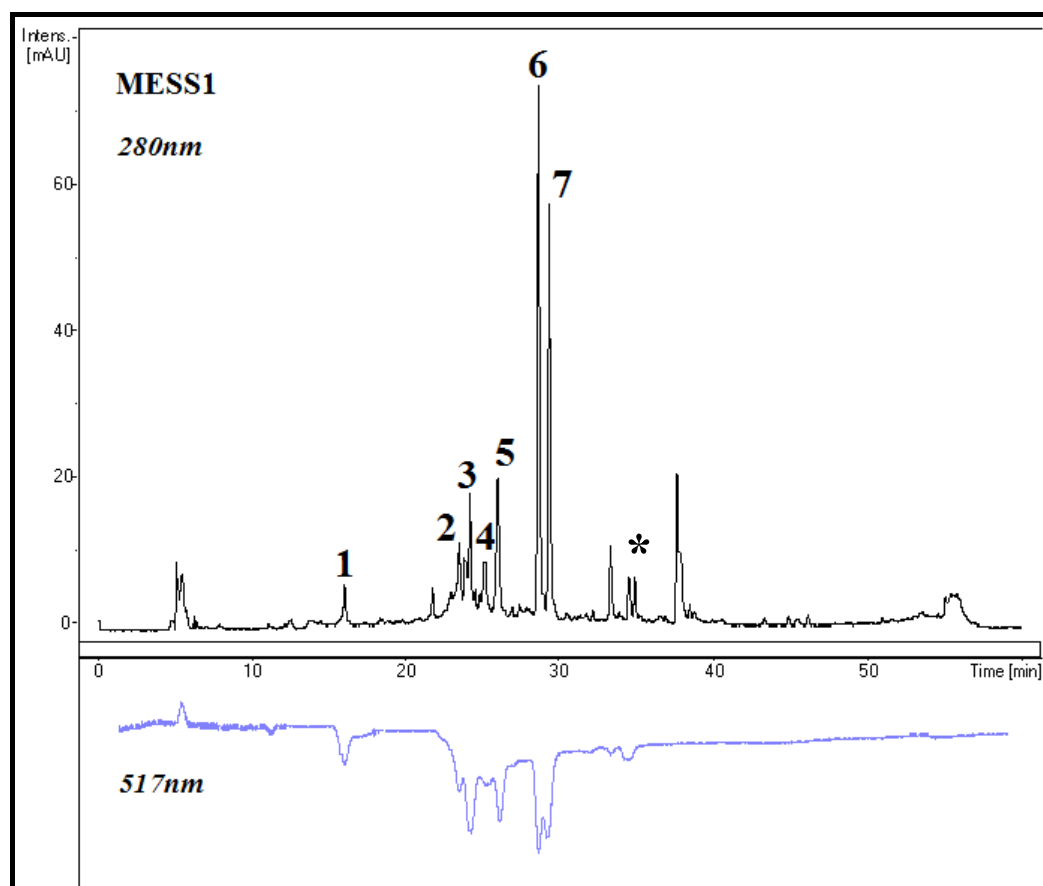
Το υδατικό εκχύλισμα του φυτού *Sideritis syriaca*, που ο τρόπος παραλαβής του προσομοιάζει με εκείνο των αφεψημάτων που χρησιμοποιούνται ευρέως στην λαϊκή ιατρική εμφανίζει αξιοσημείωτη αντιοξειδωτική ικανότητα ( $EC_{50}=64 \mu\text{g/ml}$ ). Τα μεθανολικά εκχυλίσματα του ίδιου φυτού έχουν ακόμη ισχυρότερη

αντιοξειδωτική ικανότητα, όπως έχει αναφερθεί εκτενώς στο Κεφάλαιο 5.1.2. Η σύσταση των εκχυλισμάτων αυτών μελετήθηκε με την συνδυαστική τεχνική LC-SPE-NMR και τα κύρια συστατικά τους είναι φλαβονοειδή, παράγωγα της υπολαετίνης και της ισοσκουτελαρεΐνης. Στα εκχυλίσματα αυτά σημαντική είναι και η παρουσία των φαινυλοπροπανοειδών, όπως του βερμπασκοζίτη. Στα εκχυλίσματα του φυτού *Teucrium polium* αποδείχθηκε ότι τα φαινυλοπροπανοειδή έχουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων αποδόθηκε σε αυτά τα συστατικά. Η εκτίμηση της συνεισφοράς των φλαβονοειδών και των φαινυλοπροπανοειδών στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων του φυτού *Sideritis syriaca* παρουσιάζει ενδιαφέρον. Επιπρόσθετα, με τη χρήση της *on line* HPLC-DPPH τεχνικής θα αξιολογηθεί η αντιοξειδωτική ικανότητα των συστατικών των εκχυλισμάτων αυτών για τα οποία δεν υπάρχει σχετικά πληροφορία στη διεθνή βιβλιογραφία. Στα Σχήματα 6.6 και 6.7 παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα των εκχυλισμάτων AESS και MESS3 στα 280 nm και στα 517 nm.



Σχήμα 6.6. Χρωματογραφήματα στα 280 nm και 517 nm που λήφθηκαν με το on line σύστημα HPLC-DPPH για το υδατικό εκχύλισμα AESS. Στο χρωματογράφημα με τους αριθμούς σημειώνονται τα συστατικά του εκχυλίσματος. Πιο συγκεκριμένα 1: χλωρογενικό οξύ, 2: μαρτυνοζίτης, 3: λαβαντουλιφολιοζίτης, 4: βερμπασκοζίτης, 5: 7-O-[6'''-O-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοζυλ-(1→2)-β-D-γλυκοπυρανοζίτης] της υπολαετίνης, 6: 7-O-[6'''-O-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοζυλ-(1→2)-β-D-γλυκοπυρανοζίτης] της ισοσκουτελαρεΐνης, 7: 7-O-[6'''-O-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοζυλ-(1→2)-β-D-γλυκοπυρανοζίτης] της 4'-μεθοξυ-υπολαετίνης, \* άγνωστη ένωση.

Όπως φαίνεται από τα Σχήματα 6.6 και 6.7 τα γλυκοζυλιωμένα παράγωγα της υποελαετίνης και της ισοσκουτελαρεΐνης εμφανίζουν σημαντική αντιοξειδωτική ικανότητα. Αξίζει να σημειωθεί, ότι για τις τρεις αυτές ενώσεις δεν έχει προσδιοριστεί η αντιοξειδωτική τους ικανότητα, παρότι έχει μελετηθεί η ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα εκχυλισμάτων του *Sideritis* (Gabrieli, *et al.*, 2005). Η αντιοξειδωτική τους ικανότητα αποτελεί ίσως έκπληξη καθώς απουσιάζουν από τις δομές δι-υδροξυλομάδες σε θέση *ortho*. Παρόλα αυτά, εικάζεται ότι η υδροξυλομάδα στη θέση C-8 συνεισφέρει στη σημαντική αντιοξειδωτική ικανότητα των μορίων αυτών. Ακόμη, η παρουσία της 6'''-ακετυλομάδας στο σάκχαρο πιθανό να αυξάνει την αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με τον απλό γλυκοζίτη (Rios, *et al.*, 1992).



Σχήμα 6.7. Χρωματογραφήματα στα 280 nm και 517 nm που λήφθηκαν με το on line σύστημα HPLC-DPPH για το μεθανολικό εκχύλισμα MESS1. Στο χρωματογράφημα με τους αριθμούς σημειώνονται τα συστατικά του εκχυλίσματος. Πιο συγκεκριμένα 1: χλωρογενικό οξύ, 2: μαρτυνοζίτη, 3: λαβαντουλιφολιοζίτη, 4: βερμπασκοζίτη, 5: 7-O-[6'''-O-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοζυλ-(1→2)-β-D-γλυκοπυρανοζίτης] της υπολαετίνης, 6: 7-O-[6'''-O-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοζυλ-(1→2)-β-D-γλυκοπυρανοζίτης] της ισοσκουτελλαρεΐνης, 7: 7-O-[6'''-O-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοζυλ-(1→2)-β-D-γλυκοπυρανοζίτης] της 4'-μεθοξυ-υπολαετίνης, \* άγνωστη ένωση.

Η ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα του βερμπασκοζίτη επιβεβαιώνεται και στα εκχυλίσματα του *Sideritis syriaca*. Η αντιοξειδωτική ικανότητα του βερμπασκοζίτη είναι καλά τεκμηριωμένη, καθώς απαντάται σε πολλά φυτά της οικογένειας *Lamiaceae*, αλλά και της οικογένειας *Oleaceae*. Η αντιοξειδωτική ικανότητα του λαβαντουλιφολιοζίτη, όπως και στην περίπτωση του βερμπασκοζίτη, αποδίδεται στην παρουσία της ομάδας του καφεϊκού οξέος και της ο-διυδροξυφαινυλομάδας. Η σπουδαιότητα της ύπαρξης διυδροξυλομάδων σε θέση *ortho* για την αντιοξειδωτική ικανότητα μιας ένωσης καταδεικνύεται στην περίπτωση του μαρτυνοζίτη, όπου η μεθυλίωση των ελεύθερων υδροξυλομάδων οδηγεί σε περιορισμένη αντιοξειδωτική ικανότητα (Charami, *et al.*, 2008). Τέλος, στα

χρωματογραφήματα των εκχυλισμάτων του *Sideritis syriaca* (Σχήματα 6.6 και 6.7) φαίνεται ότι οι αρνητικές κορυφές που οφείλονται στην αντίδραση της ρίζας DPPH με το χλωρογενικό είναι αρκετά έντονες, παρά τη μικρή σχετικά συγκέντρωση του χλωρογενικού οξέος στα εκχυλίσματα αυτά. Αυτό οφείλεται στη σημαντική αντιοξειδωτική ικανότητα, καθώς το ολοκλήρωμα της αρνητικής κορυφής εξαρτάται από την συγκέντρωση και την ικανότητα του αντιοξειδωτικού να δεσμεύει την ρίζα. Το χλωρογενικό οξύ ως εστέρας του καφεϊκού οξέος έχει μελετηθεί εκτενώς και η αντιοξειδωτική ικανότητα του έχει προσδιοριστεί (Rice-Evans, *et al.*, 1996, Balasundram, *et al.*, 2006, Scherer and Godoy, 2009).

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία η αντιοξειδωτική και η αντιφλεγμονώδης δράση των εκχυλισμάτων του *Sideritis*, αποδίδεται κυρίως στα флаβονοειδή που περιέχονται στα εκχυλίσματα (Villar, *et al.*, 1984, Yesilado and Ezer, 1989). Με την χρήση της *on line* HPLC-DPPH τεχνικής είναι δυνατό να εκτιμηθεί η συνεισφορά των επιμέρους συστατικών των εκχυλισμάτων του φυτού *Sideritis syriaca*, όπως περιγράφηκε και στην περίπτωση των εκχυλισμάτων του φυτού *Teucrium polium* (υποκεφάλαιο 6.4). Με βάση τα ολοκληρώματα των αρνητικών κορυφών που οφείλονται στα флаβονοειδή, προκύπτει ότι η συνεισφορά των флаβονοειδών στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα κυμαίνεται από 55% έως 65%. Συνεπώς τα флаβονοειδή προσδίδουν στα εκχυλίσματα ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα. Δεν πρέπει να παραβλέψει όμως κανείς και την σημαντική συνεισφορά των φαινυλοπροπανοειδών παρόλο, ότι η συγκέντρωσή τους είναι αρκετά μικρότερη από εκείνη των флаβονοειδών, όπως φαίνεται και από τα αντίστοιχα χρωματογραφήματα. Στον Πίνακα 6.2, που ακολουθεί συνοψίζονται τα αποτελέσματα του υπολογισμού της εκατοστιαίας συνεισφοράς του κάθε συστατικού στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων του φυτού *Sideritis syriaca*.

**Πίνακας 6.2. Η εκατοστιαία συνεισφορά των συστατικών στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα των εκ εκχυλισμάτων του φυτού *Sideritis syriaca*.**

Δείγμα	% Συνεισφορά των συστατικών στην αντιοξειδωτική ικανότητα							
	Φαινολοπροπανοειδή				Φλαβονοειδή			
	1	2	3	4	5	6	7	8
AES	10.31	1.56	5.76	16.70	15.36	23.81	21.98	4.39
MESS1	7.79	4.32	12.23	16.18	11.28	25.18	18.75	4.27
MESS3	8.02	3.11	13.56	20.50	9.96	23.66	16.77	4.42

*Παρατήρηση: Οι αριθμοί υποδηλώνουν τις αντίστοιχες ενώσεις που σημειώνονται στα χρωματογραφήματα. Η ένωση 8 στο χρωματογράφημα σημειώνεται με αστερίσκο (\*), δεν έχει ταυτοποιηθεί αλλά από το φάσμα UV προκύπτει ότι πολύ πιθανόν πρόκειται για φλαβονοειδές.*

## **6.6 On line εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των συστατικών των εκχυλισμάτων του *Olea europaea* L.**

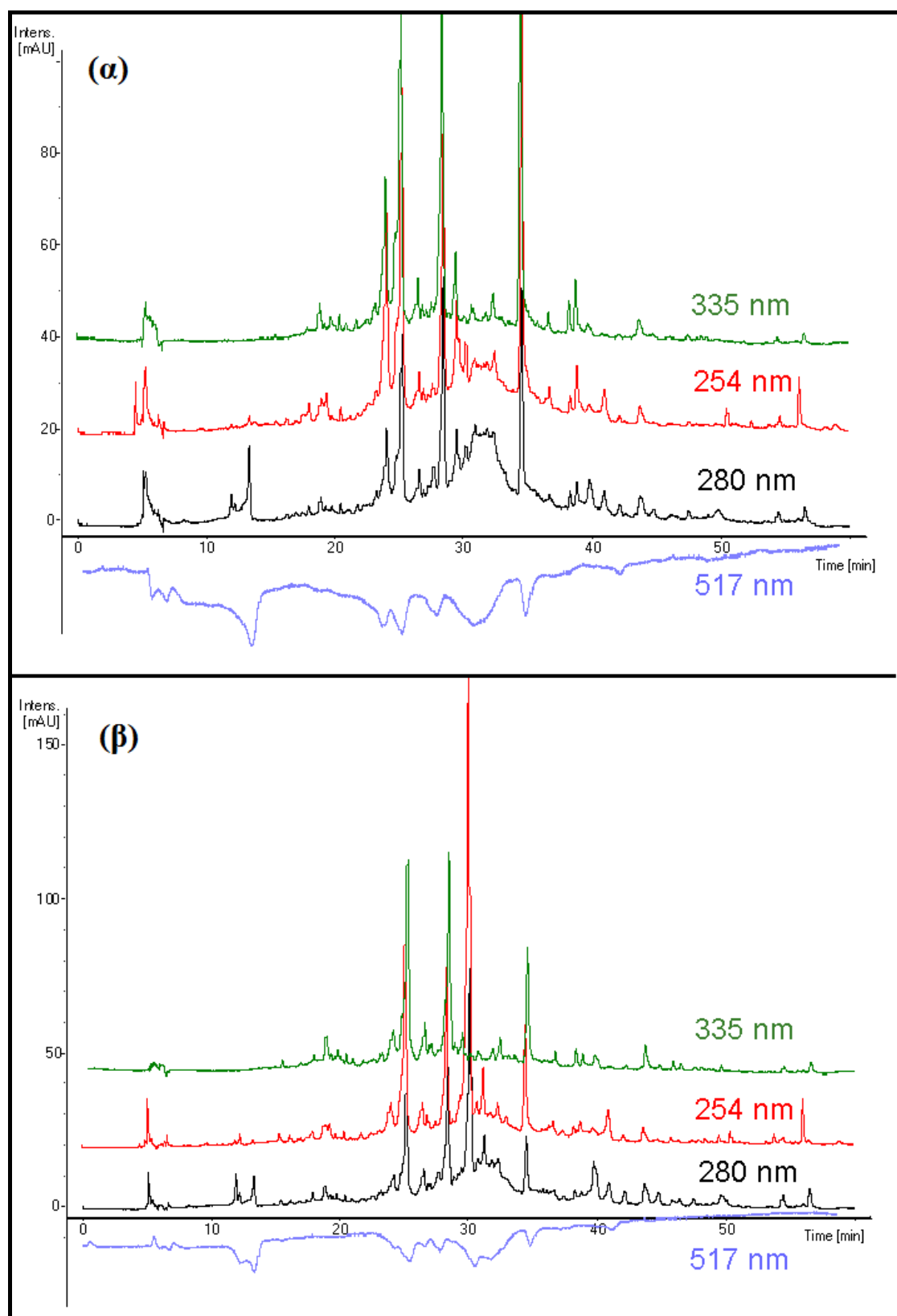
Τα τελευταία χρόνια, το ελαιόδεντρο και τα προϊόντα του, έχουν βρεθεί στο επίκεντρο του επιστημονικού ενδιαφέροντος, καθώς αποτελούν τη βάση της Μεσογειακής διατροφής. Η έρευνα έχει εστιαστεί κυρίως στην μελέτη της σύστασης του ελαιολάδου και στις ευεργετικές του ιδιότητες για την ανθρώπινη υγεία (Mateos, *et al.*, 2003, Torre-Carbot, *et al.*, 2007). Οι προσπάθειες αυτές, σχετικά πρόσφατα, επεκτάθηκαν και στη διερεύνηση της σύστασης των φύλλων ελιάς, που περιέχουν τις ίδιες βιοδραστικές ενώσεις, κυρίως λόγω της εύκολης διαθεσιμότητας τους και του σχετικά χαμηλού κόστους (Briante, *et al.*, 2002, Meirinhos, *et al.*, 2005). Η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων των φύλλων ελιάς είναι πλέον καλά αποδεδειγμένη και συχνά αποτελούν βασικό συστατικό συμπληρωμάτων διατροφής (Visioli and Galli, 1994, Hlubocky, *et al.*, 2007). Έτσι, στα πλαίσια συνεργασίας με την ερευνητική ομάδα της Αν. Καθ. Μ. Τσιμίδου (συνεργαζόμενος φορέας, Τμήμα Χημείας, Α.Π.Θ) μελετήθηκαν με την τεχνική HPLC-DPPH μεθανολικά εκχυλίσματα φύλλων ελιάς. Τα εκχυλίσματα αυτά προέρχονταν από φύλλα ελαιοδένδρων διαφορετικών ποικιλιών (Αδραματιανή, Αμφίσσης, Βασιλικάδα, Κορωνέικη, Χονδρολιά Χαλκιδικής) που αναπτύχθηκαν στο ίδιο περιβάλλον και συλλέχθηκαν σε δυο διαφορετικές χρονικές περιόδους (Δεκέμβριος 2006, Φεβρουάριος 2008) από τα ίδια δένδρα. Σύμφωνα με τα ευρήματα της διδακτορικής διατριβής της Β. Παπώτη (2009) τα εκχυλίσματα αυτά ήταν καλή και σταθερή πηγή αντιοξειδωτικών παρά τις σημαντικές διαφορές που παρατηρήθηκαν στα επίπεδα των επιμέρους φαινολικών συστατικών τους.

Αρχικά, όλα τα εκχυλίσματα αναλύθηκαν με την συνδυαστική τεχνική υγρής χρωματογραφίας- φασματομετρίας μαζών (LC-MS) και ταυτοποιήθηκαν τα κυριότερα συστατικά τους. Στα εκχυλίσματα ανιχνεύθηκαν δυο βασικές κατηγορίες ενώσεων τα σεκοϊριδοειδή και τα φλαβονοειδή. Τα δεδομένα για την αντιοξειδωτική ικανότητα των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν είναι γνωστά, αλλά έχει μεγάλο ενδιαφέρον να καθοριστεί η συνεισφορά των φλαβονοειδών στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων των φύλλων ελιάς, καθώς στη



βιβλιογραφία αναφέρεται ότι η αντιοξειδωτική δράση τους οφείλεται κυρίως στην ελαιοευρωπαϊνή και τα παράγωγά της.

Στην συνέχεια, κρίθηκε σκόπιμο να διερευνηθεί η αντίδραση των κυριότερων ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν με την τεχνική LC-MS, με την σταθερή ρίζα DPPH. Για τον σκοπό αυτό επιλέχθηκε να μελετηθεί ισομοριακό μίγμα υδροξυτυροσόλης, ελαιοευρωπαϊνης, ρουτίνης, λουτεολίνης και των γλυκοζιτών της, με την μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε για την *on line* παρακολούθηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων των φυτών *Teucrium polim* και *Sideritis syriaca*. Χρησιμοποιώντας ισομοριακό μίγμα των προτύπων ενώσεων, το ολοκλήρωμα της αρνητικής κορυφής εξαρτάται μόνο από την αντιοξειδωτική ικανότητα της ένωσης. Έτσι, προέκυψε η ακόλουθη σειρά αντιοξειδωτικής ικανότητας: υδροξυτυροσόλη (1995 mAU) > ρουτίνη (1922 mAU) > λουτεολίνη (1783 mAU) > 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης (1485 mAU) > ελαιοευρωπαϊνή (1437 mAU) > 4'-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης (0 mAU). Η κατάταξη αυτή δεν βρίσκεται σε πλήρη αντιστοιχία με τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τις *off line* μετρήσεις της αντιοξειδωτικής ικανότητας των ενώσεων αυτών και αυτό οφείλεται κυρίως στο ότι οι ενώσεις αυτές έχουν διαφορετικό μηχανισμό αντίδρασης με την ρίζα DPPH και οι ταχύτητες της αντιδράσεων διαφέρουν σημαντικά. Αξίζει να σημειωθεί ότι 4'-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης αν και σε *off line* μετρήσεις εμφανίζει αντιοξειδωτική ικανότητα (Goulas, *et al.*, 2009), με την τεχνική HPLC-DPPH φαίνεται ότι δεν παρουσιάζει αντιοξειδωτική ικανότητα. Αυτό πιθανόν οφείλεται στην γλυκοζυλίωση στη θέση C-4', που έχει σαν αποτέλεσμα να μην υπάρχουν διϋδροξυλομάδες σε θέση *ortho*. Ανάλογη συμπεριφορά εμφανίζει και η απιγενίνη στην οποία η κινητική είναι εξαιρετικά αργή.



Σχήμα 6.8. Χρωματογραφήματα στα 280 nm, 254 nm, 335 nm και 517 nm που λήφθηκαν με το on line σύστημα HPLC-DPPH εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς των ποικιλιών (α) Κορωνέϊκη 2006 και (β) Βασιλικάδα 2006.

Σε επόμενο στάδιο τα εκχυλίσματα των φύλλων ελιάς μελετήθηκαν με την τεχνική HPLC-DPPH και υπολογίστηκε η εκατοστιαία συνεισφορά των συστατικών τους στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων. Για την εξαγωγή πιο χρήσιμων συμπερασμάτων, υπολογίζεται κάθε φορά η συνεισφορά των σεκοϊριδοειδών και των φλαβονοειδών στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα 6.3.

*Πίνακας 6.3. Η εκατοστιαία συνεισφορά των συστατικών στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων των φύλλων ελιάς (Olea europaea L.)*

<b>ΧΟΝΔΡΟΛΙΑ ΧΑΛΚΙΔΙΚΗΣ 2006</b>		
<i>Συστατικό</i>	<i>Αρνητικό Ολοκλήρωμα (mAU)</i>	<i>% Συνεισφορά στην ολική A.I<sup>a</sup></i>
Υδροξυτυροσόλη	1964	24.18
Βερμπασκοζίτης	645	7.91
Οξικός εστέρας της υδροξυτυροσόλης	478	5.88
Ελαιοευρωπαϊνή	887	10.92
Παράγωγα ελαιοευρωπαϊνης <sup>b</sup>	2142	26.37
Άγλυκο ελαιοευρωπαϊνης	242	2.98
<b>ΣΕΚΟΪΡΙΔΟΕΙΔΗ</b>	<b>6368</b>	<b>78.24</b>
7-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης	1130	13.41
7-Ο-ρουτινοζίτης της απιγενίνης	152	1.87
Λουτεολίνη	486	5.98
<b>ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ</b>	<b>1768</b>	<b>21.26</b>
<b>ΚΟΡΩΝΕΪΚΗ 2006</b>		
<i>Συστατικό</i>	<i>Αρνητικό Ολοκλήρωμα (mAU)</i>	<i>% Συνεισφορά στην ολική A.I</i>
Γλυκοζίτης της υδροξυτυροσόλης	698	5.90
Υδροξυτυροσόλη	2384	20.17
Ελαιοευρωπαϊνή	1363	11.53
Παράγωγα ελαιοευρωπαϊνης	3191	27.00
Άγλυκο ελαιοευρωπαϊνης	464	3.92
<b>ΣΕΚΟΪΡΙΔΟΕΙΔΗ</b>	<b>8100</b>	<b>68.52</b>
Ρουτίνη	948	8.02
7-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης	1396	11.81

Λουτεολίνη	847	7.17
<b>ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ</b>	<b>3191</b>	<b>27.00</b>
Άγνωστη ένωση 1 <sup>γ</sup>	529	4.47
<b>ΒΑΣΙΛΙΚΑΔΑ 2006</b>		
<i>Συστατικό</i>	<i>Αρνητικό Ολοκλήρωμα (mAU)</i>	<i>% Συνεισφορά στην ολική Α.Ι</i>
Γλυκοζίτης της υδροξυτυροσόλης	562	6.90
Υδροξυτυροσόλη	1045	14.15
Ελαιοευρωπαϊνή	1617	21.88
Παράγωγα ελαιοευρωπαϊνης	1713	23.18
Άγλυκο ελαιοευρωπαϊνης	300	4.06
<b>ΣΕΚΟΪΡΙΔΟΕΙΔΗ</b>	<b>5237</b>	<b>70.17</b>
7-Ο-ρουτινοζίτης της λουτεολίνης	350	3.75
7-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης	943	12.76
7-Ο-ρουτινοζίτης της απιγενίνης	178	2.41
Λουτεολίνη	377	5.10
<b>ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ</b>	<b>1848</b>	<b>24.02</b>
Άγνωστη ένωση 1	303	4.11
<b>ΑΔΡΑΜΑΤΙΑΝΗ 2006</b>		
<i>Συστατικό</i>	<i>Αρνητικό Ολοκλήρωμα (mAU)</i>	<i>% Συνεισφορά στην ολική Α.Ι</i>
Υδροξυτυροσόλη	2044	25.74
Βερμπασκοζίτης	798	10.05
Ελαιοευρωπαϊνή	722	9.09
Παράγωγα ελαιοευρωπαϊνης	2807	35.34
<b>ΣΕΚΟΪΡΙΔΟΕΙΔΗ</b>	<b>6371</b>	<b>80.22</b>
7-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης	874	11.01
Λουτεολίνη	367	4.63
<b>ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ</b>	<b>1241</b>	<b>15.64</b>
Άγνωστη ένωση 1 <sup>δ</sup>	329	4.15
<b>ΑΜΦΙΣΣΗΣ 2006</b>		
<i>Συστατικό</i>	<i>Αρνητικό Ολοκλήρωμα</i>	<i>% Συνεισφορά στην</i>

	(mAU)	ολική A.I
Γλυκοζίτης της υδροξυτυροσόλης	147	3.77
Υδροξυτυροσόλη	396	10.15
Βερμπασκοζίτης	680	17.43
Ελαιοευρωπαϊνή	1369	34.81
Ελαιοευροζίτης	273	6.99
Άγλυκο της ελαιοευρωπαϊνης	322	8.55
<b>ΣΕΚΟΪΡΙΔΟΕΙΔΗ</b>	<b>3187</b>	<b>81.7</b>
7-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης	309	7.90
7-Ο-ρουτινοζίτης της λουτεολίνης	176	4.51
<b>ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ</b>	<b>485</b>	<b>12.41</b>

<sup>a</sup> A.I= Αντιοξειδωτική ικανότητα

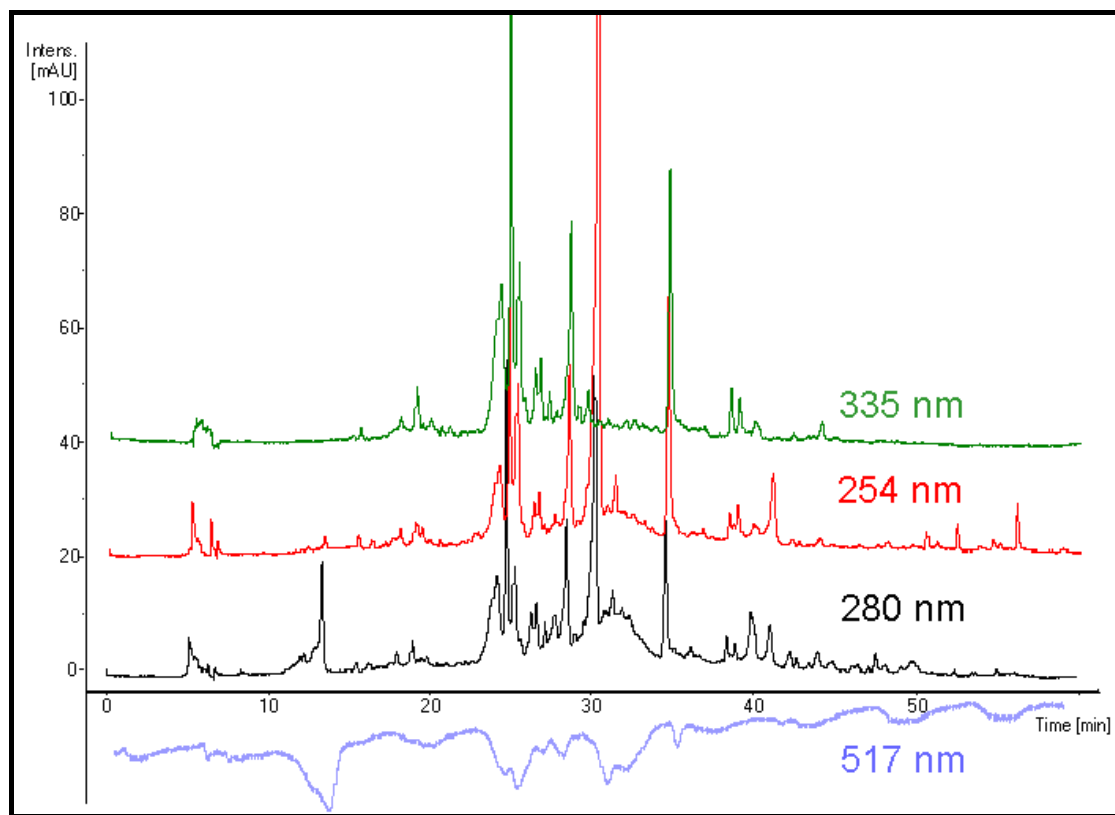
<sup>b</sup> παράγωγα ελαιοευρωπαϊνης: πρόκειται για ομάδα ενώσεων που στο χρωματογράφημα εμφανίζονται μετά την ελαιοευρωπαϊνή, έχουν αντίστοιχα φάσματα UV και μοριακό  $m/z=539$ .

<sup>γ</sup> άγνωστη ένωση 1: πρόκειται για ένωση που συνεκλύεται με τον 4'-Ο- γλυκοζίτη της λουτεολίνης.

<sup>δ</sup> άγνωστη ένωση 2: η ένωση αυτή απαντάται μόνο στο δείγμα «κίτρινα 2007» με χρόνο κατακράτησης 18.5 min, μοριακό θραύσμα  $m/z=325.5$  και το φάσμα UV δείχνει φαινολικό οξύ ή παράγωγο του.

Από τον Πίνακα 6.3 προκύπτει, ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα των φύλλων ελιάς οφείλεται στην παρουσία των σεκοϊριδοειδών και πιο συγκεκριμένα στην ελαιοευρωπαϊνή και τα παράγωγά της. Διαπιστώθηκε ότι η συνεισφορά των σεκοϊριδοειδών στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή κυμαίνεται από 70 έως 80 %. Αντίστοιχα, υπολογίστηκε η συνεισφορά των φλαβονοειδών να είναι από 20 έως 30 %. Το συμπέρασμα αυτό είναι ιδιαίτερης σημασίας δεδομένου ότι η σύσταση των εκχυλισμάτων σε αρκετές περιπτώσεις διαφέρει σημαντικά. Οι ενώσεις με μεγάλη δομική ομοιότητα δεν εμφανίζουν μεγάλες διαφορές στην ικανότητά τους να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες ( $EC_{50}$ ). Η ύπαρξη συγκεκριμένων βιοσυνθετικών μονοπατιών για τα σεκοϊριδοειδή και τα φλαβονοειδή ίσως εξηγεί ικανοποιητικά τη σχετικά σταθερή συνεισφορά των δυο αυτών ομάδων ενώσεων στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων, παρόλη τη διαφορετική τους σύσταση. Η διαπίστωση αυτή βρίσκεται σε συμφωνία με τα δεδομένα της διδακτορικής διατριβής της κ. Β. Παπώτης, που πραγματοποιείται στο Εργαστήριο του συνεργαζόμενου φορέα και δείχνει ότι είναι δυνατή η αξιοποίηση εκχυλισμάτων

φύλλων ελιάς με ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα ανεξάρτητα από παράγοντες όπως το περιβάλλον ανάπτυξης και την ποικιλία των ελαιόδένδρων, την ηλικία των φύλλων (νέα, ώριμα, παλιά, κίτρινα) ή την εποχή συλλογής τους.



Σχήμα 6.9. Χρωματογραφήματα στα 280 nm, 254 nm, 335 nm και 517 nm που λήφθηκαν με το on line σύστημα HPLC-DPPH εκχυλίσματων φύλλων ελιάς των ποικιλιών Χονδρολιά Χαλκιδικής 2006.

## **Παράρτημα Ι: Το ελαιόδεντρο**

### **1.Μορφολογικά στοιχεία**

Η ελιά (*Olea europaea L.*) ανήκει στην οικογένεια *Oleaceae* και κατατάσσεται μεταξύ των αρχαιότερων καλλιεργειών στον κόσμο. Η καταγωγή της βρίσκεται στη λεκάνη της Μεσογείου όπου συναντάται και η μεγαλύτερη διάδοση της.

Το δέντρο παρουσιάζει παραπάνω από 600 γένη με σημαντικότερο όλων το γένος *Olea* και το είδος *Olea Europaea*, που απαντάται κυρίως στην Ευρώπη, που παρουσιάζει ιδιαίτερο οικονομικό ενδιαφέρον. Το κύριο χαρακτηριστικό του είναι η μακροζωία και η διατήρηση της παραγωγικότητας για αιώνες, όταν τα δέντρα υφίστανται την απαραίτητη περιποίηση και κλαδεύονται κατά τον ενδεδειγμένο τρόπο. Ανάλογα με την ποικιλία και τις περιβαλλοντικές συνθήκες το ύψος του δένδρου κυμαίνεται από 3 έως 20 μέτρα.

Το είδος *Olea Europaea* υπάρχει σε δύο παραλλαγές: την άγρια (ποικιλία *Oleaster*) και την ήμερη ποικιλία (ποικιλία *Sativa*). Οι ποικιλίες της ελιάς είναι πολλές και δημιουργήθηκαν είτε από την προσαρμογή του δένδρου στις ειδικές εδαφοκλιματολογικές συνθήκες κάθε τόπου, είτε από μεταλλάξεις που έγιναν με την πάροδο του χρόνου κατά τον φυσικό πολλαπλασιασμό ή την επέμβαση του ανθρώπου. Οι ποικιλίες που εμφανίζουν χαμηλή ελαιοπεριεκτικότητα και υψηλή συγκέντρωση σακχάρων χρησιμοποιούνται ως επιτραπέζιες, είναι εκείνες με υψηλή περιεκτικότητα για την παραγωγή του ελαιόλαδου.

### **2. Σύσταση εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς**

Στην βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετές μελέτες που αφορούν τη σύσταση των εκχυλισμάτων των φύλλων ελιάς και το ενδιαφέρον τους εστιάζεται κυρίως στις κατηγορίες ενώσεων στις οποίες έχουν αποδοθεί οι διαφορές βιολογικές δράσεις. Η σύσταση των εκχυλισμάτων φαίνεται να εξαρτάται όχι μόνο από τις συνθήκες εκχύλισης, όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω αλλά και από την ποικιλία του ελαιόδένδρου, τον χρόνο συλλογής των φύλλων, και από την παρειαυτοφορία. Όσον αφορά το χρόνο συλλογής, οι Paiva-Martins και Gordon (2001) παρατήρησαν ότι η περιεκτικότητα σε σεκοϊριδοειδή των φύλλων που συλλέχθηκαν τον Απρίλιο ήταν πολύ μικρότερη από εκείνης των φύλλων που συλλέχθηκαν τον Οκτώβριο. Η

περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες είναι πιθανό να εξαρτάται από τις καιρικές συνθήκες. Περίοδοι ηλιοφάνειας πριν τη συλλογή μπορεί να επιφέρουν αύξηση της βιοσύνθεσης των πολυφαινολών στα φύλλα. Ακόμη, η ηλικία του δέντρου είναι πολύ πιθανό να επηρεάζει το ποσοστό των ολικών φαινολών.

Η σύσταση των εκχυλισμάτων φύλλων ελαιόδένδρου εξαρτάται και από το μέρος του δέντρου από το οποίο συλλέγονται τα φύλλα όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα σχετικής μελέτης των Ryan *et al.* (2002). Οι διαφορές, ήταν ποσοτικές και όχι ποιοτικές. Σημαντικές διαφορές στη σύσταση εκχυλισμάτων φύλλων ελαιόδένδρου διαπιστώθηκαν για τις διάφορες ποικιλίες (Savournin, *et al.*, 2001, Guinda, *et al.*, 2002, Meirinhos, *et al.*, 2005, Agalias, *et al.*, 2005).

#### **Σεκοϊριδοειδή:**

Τα φύλλα της ελιάς μπορούν να θεωρηθούν ως μια από τις πιο σημαντικές πηγές για την απομόνωση της ελαιοευρωπαϊνης, όπως προκύπτει και από πλήθος πατεντών που χρησιμοποιούν φύλλα ελιάς για την παρασκευή εκχυλισμάτων πλούσιων σε ελαιοευρωπαϊνή. Η ελαιοευρωπαϊνή είναι ο εστέρας του ελενολικού οξέος συνδεδεμένος με γλυκόζη και υδρόξυτυροσόλη. Το ποσοστό στα φύλλα μπορεί να φτάσει και τα 60-90 mg / g ξηρού βάρους (Le Tutour και Guedon, 1992). Η ελαιοευρωπαϊνή ανήκει σε μια ειδική ομάδα ενώσεων, όμοια με αυτή των κουμαρινών, που ονομάζονται σεκοϊριδοειδή. Τα σεκοϊριδοειδή ανήκουν στην οικογένεια των ιριδοειδών, είναι προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού των τερπενίων, ως πρόδρομες ενώσεις διαφόρων αλκανοειδών ινδολίου και απαντούν με τη μορφή γλυκοζίτη (Soler-Rivas, *et al.*, 2000).

#### **Φαινολικά Συστατικά:**

Τα φύλλα ελιάς είναι πλούσια, εκτός από την ελαιοευρωπαϊνή και τα παράγωγά της, και σε φαινολικές ενώσεις των οποίων η περιεκτικότητα ποικίλει ανάλογα με την ποικιλία του ελαιόδένδρου και την εποχή του έτους. Αυτές οι ενώσεις είναι συνήθως υδροξυλιωμένα παράγωγα του κινναμωμικού και του βενζοϊκού οξέος.

Η ισχυρή αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς έχει αποδοθεί και στα φλαβονοειδή που περιέχουν. Τα φλαβονοειδή ανήκουν στην ευρύτερη ομάδα των φαινολικών συστατικών και αποτελούν μια πλούσια τάξη ενώσεων που περιλαμβάνει κυρίως τις φλαβανόλες, φλαβόνες, φλαβανόνες, φλαβανονόλες, ισοφλαβόνες, ανθοκυανιδίνες και χαλκόνες. Στα φύλλα ελιάς απαντούν κυρίως οι φλαβόνες (λουτεολίνη) και οι φλαβανόλες (ρουτίνη).



**Παράρτημα ΙΙ: Το ελαιόδεντρο**

<b>ΧΟΝΔΡΟΛΙΑ ΧΑΛΚΙΔΙΚΗΣ 2006</b>		
<i>Συστατικό</i>	<i>Αρνητικό Ολοκλήρωμα (mAU)</i>	<i>% Συνεισφορά στην ολική Α.Γ<sup>α</sup></i>
Υδροξυτυροσόλη	1964	24.18
Βερμπασκοζίτης	645	7.91
Οξικός εστέρας της υδροξυτυροσόλης	478	5.88
Ελαιοευρωπαϊνή	887	10.92
Παράγωγα ελαιοευρωπαϊνης <sup>β</sup>	2142	26.37
Άγλυκο ελαιοευρωπαϊνης	242	2.98
<b>ΣΕΚΟΪΡΙΔΟΕΙΔΗ</b>	<b>6368</b>	<b>78.24</b>
7-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης	1130	13.41
7-Ο-ρουτινοζίτης της απιγενίνης	152	1.87
Λουτεολίνη	486	5.98
<b>ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ</b>	<b>1768</b>	<b>21.26</b>
<b>ΚΟΡΩΝΕΪΚΗ 2006</b>		
<i>Συστατικό</i>	<i>Αρνητικό Ολοκλήρωμα (mAU)</i>	<i>% Συνεισφορά στην ολική Α.Γ</i>
Γλυκοζίτης της υδροξυτυροσόλης	698	5.90
Υδροξυτυροσόλη	2384	20.17
Ελαιοευρωπαϊνή	1363	11.53
Παράγωγα ελαιοευρωπαϊνης	3191	27.00
Άγλυκο ελαιοευρωπαϊνης	464	3.92
<b>ΣΕΚΟΪΡΙΔΟΕΙΔΗ</b>	<b>8100</b>	<b>68.52</b>
Ρουτίνη	948	8.02
7-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης	1396	11.81
Λουτεολίνη	847	7.17
<b>ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ</b>	<b>3191</b>	<b>27.00</b>
Άγνωστη ένωση 1 <sup>γ</sup>	529	4.47
<b>ΒΑΣΙΛΙΚΑΔΑ 2006</b>		
<i>Συστατικό</i>	<i>Αρνητικό Ολοκλήρωμα (mAU)</i>	<i>% Συνεισφορά στην ολική Α.Γ</i>

Γλυκοζίτης της υδροξυτυροσόλης	562	6.90
Υδροξυτυροσόλη	1045	14.15
Ελαιοευρωπαϊνή	1617	21.88
Παράγωγα ελαιοευρωπαϊνης	1713	23.18
Άγλυκο ελαιοευρωπαϊνης	300	4.06
<b>ΣΕΚΟΪΡΙΔΟΕΙΔΗ</b>	<b>5237</b>	<b>70.17</b>
7-Ο-ρουτινοζίτης της λουτεολίνης	350	3.75
7-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης	943	12.76
7-Ο-ρουτινοζίτης της απιγενίνης	178	2.41
Λουτεολίνη	377	5.10
<b>ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ</b>	<b>1848</b>	<b>24.02</b>
Άγνωστη ένωση 1	303	4.11
<b>ΑΔΡΑΜΑΤΙΑΝΗ 2006</b>		
<i>Συστατικό</i>	<i>Αρνητικό Ολοκλήρωμα (mAU)</i>	<i>% Συνεισφορά στην ολική A.I</i>
Υδροξυτυροσόλη	2044	25.74
Βερμπασκοζίτης	798	10.05
Ελαιοευρωπαϊνή	722	9.09
Παράγωγα ελαιοευρωπαϊνης	2807	35.34
<b>ΣΕΚΟΪΡΙΔΟΕΙΔΗ</b>	<b>6371</b>	<b>80.22</b>
7-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης	874	11.01
Λουτεολίνη	367	4.63
<b>ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ</b>	<b>1241</b>	<b>15.64</b>
Άγνωστη ένωση 1	329	4.15
<b>ΑΔΡΑΜΑΤΙΑΝΗ 2008</b>		
<i>Συστατικό</i>	<i>Αρνητικό Ολοκλήρωμα (mAU)</i>	<i>% Συνεισφορά στην ολική A.I</i>
Υδροξυτυροσόλη	2388	23.66
Βερμπασκοζίτης	1306	12.94
Ελαιοευρωπαϊνή	1363	13.51
Παράγωγα ελαιοευρωπαϊνης	2537	25.14
<b>ΣΕΚΟΪΡΙΔΟΕΙΔΗ</b>	<b>7594</b>	<b>75.25</b>

7-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης	1290	12.79
Λουτεολίνη	338	3.35
Άγνωστη ένωση 4	266	2.63
<b>ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ</b>	<b>1894</b>	<b>18.77</b>
Άγνωστη ένωση 1	604	5.98
<b>ΑΜΦΙΣΣΗΣ 2006</b>		
<i>Συστατικό</i>	<i>Αρνητικό Ολοκλήρωμα (mAU)</i>	<i>% Συνεισφορά στην ολική Α.Ι</i>
Γλυκοζίτης της υδροξυτυροσόλης	147	3.77
Υδροξυτυροσόλη	396	10.15
Βερμπασκοζίτης	680	17.43
Ελαιοευρωπαϊνή	1369	34.81
Ελαιοευροζίτης	273	6.99
Άγλυκο της ελαιοευρωπαϊνης	322	8.55
<b>ΣΕΚΟΪΡΙΔΟΕΙΔΗ</b>	<b>3187</b>	<b>81.7</b>
7-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης	309	7.90
7-Ο-ρουτινοζίτης της λουτεολίνης	176	4.51
<b>ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ</b>	<b>485</b>	<b>12.41</b>
Άγνωστη ένωση 1	242	6.19
<b>ΚΟΡΩΝΕΪΚΗ 2008</b>		
<i>Συστατικό</i>	<i>Αρνητικό Ολοκλήρωμα (mAU)</i>	<i>% Συνεισφορά στην ολική Α.Ι</i>
Γλυκοζίτης της υδροξυτυροσόλης	303	6.49
Υδροξυτυροσόλη	1514	32.42
Παράγωγα ελαιοευρωπαϊνης	1562	33.44
<b>ΣΕΚΟΪΡΙΔΟΕΙΔΗ</b>	<b>3379</b>	<b>72.35</b>
Ρουτίνη	408	8.74
7-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης	487	10.42
Λουτεολίνη	197	4.21
<b>ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ</b>	<b>1092</b>	<b>23.37</b>
Άγνωστη ένωση 1	200	4.29
<b>ΒΑΣΙΛΙΚΑΛΑ 2008</b>		

<i>Συστατικό</i>	<i>Αρνητικό Ολοκλήρωμα (mAU)</i>	<i>% Συνεισφορά στην ολική A.I</i>
Γλυκοζίτης της υδροξυτυροσόλης	518	14.65
Υδροξυτυροσόλη	698	19.75
Βερμπασκοζίτης	315	8.92
Ελαιοευρωπαϊνή	1356	38.41
<b>ΣΕΚΟΪΡΙΔΟΕΙΔΗ</b>	<b>2887</b>	<b>81.73</b>
7-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης	332	9.40
Λουτεολίνη	211	5.98
<b>ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ</b>	<b>543</b>	<b>15.38</b>
Άγνωστη ένωση 1	103	2.91
<b>ΧΟΝΔΡΟΛΙΑ ΧΑΛΚΙΔΙΚΗΣ 2008</b>		
<i>Συστατικό</i>	<i>Αρνητικό Ολοκλήρωμα (mAU)</i>	<i>% Συνεισφορά στην ολική A.I</i>
Υδροξυτυροσόλη	2561	25.35
Βερμπασκοζίτης	1116	11.04
Ελαιοευρωπαϊνή	2086	20.65
Παράγωγα ελαιοευρωπαϊνης	1939	19.19
<b>ΣΕΚΟΪΡΙΔΟΕΙΔΗ</b>	<b>7702</b>	<b>76.23</b>
7-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης	1378	13.63
Λουτεολίνη	517	5.11
<b>ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ</b>	<b>1895</b>	<b>18.74</b>
Άγνωστη ένωση 1	507	5.02

**ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- Aboutabl, E.A., Nassar, M.I., Elsakhawy, F.M., Maklad, Y.A., Osman, A.F., El-Khrisy, E.A.M., *J.of Ethnopharmacology*, **2002**, *82*, 177-184.
- Ackos, Y., Ezer, N., Calis, I., Demirdamar, R., Tel, B.C., *Pharm. Biol.*, **1999**, *37(2)*, 118-122.
- Agalias, A., Melliou, E., Magiatis, P., Mitaku, S., Gikas, E., Tsaibopoulos, A., *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.*, **2005**, *28 (10)*, 1557-1571.
- Akitt, J.W., *NMR and chemistry: an introduction to modern NMR spectroscopy*, **2000**, Stanley thornes, Cheltenham.
- Albert, K., Kunst, M., Bayer, E., Spraul, M., Bermel, W. J. *Chromatogr.*, **1989**, *463*, 355-363.
- Albert, K., *On-line LC/NMR and Related Techniques*, **2002**, Wiley: Chichester
- Alcaraz, M.J., Tordera, M., *Phytoth. Res.*, **1988**, *2 (2)*, 85-88.
- Andary, C, Wylde, R., Heitz, A., Rascol, G.P., Roussel, J.L., Laffitte, C., *Phytochemistry*, **1985**, *24(2)*, 362-364.
- Andlauer, W., Martena, M.J., Furst, P., *J. Chromatogr. A*, **1999**, *849(2)*, 341-348.
- Andrade, F.D.P., Santos, L.C., Datchler, M., Albert, K., Vilegas, W., *J. Chromatogr. A*, **2002**, *953 (1-2)*, 287-293.
- Antolovich, M., Prenzler, P.D., Patsalides, E., McDonald, S., Robards, K., *Analyst*, **2002**, *127*, 183.
- Armata, M., Gabrieli, C., Zervou, M., Kokkalou, E., *Food Chem.*, **2008**, *111*, 179-186.
- Avula, B., Manyam, R.B., Bedir, E., Khan, I.A., *J. Chromatogr.*, **2003**, *58 (11-12)*, 751-754.
- Badisa, R.B., Tzakou, O., Couladis, M., Pilarinou, E., *Phytoth. Res.*, **2003**, *17 (5)*, 472-476.
- Bailey, N.J.C., Cooper, P., Hadfield, S.T., Lenz, E.M., Lindon, J.C., Nicholson, J.K., Stanley, P.D., Wilson, I.D., Wright, B., Taylor, S.D., *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, *48 (1)*, 42-46.
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S., *Food Chem.*, **2006**, *99*, 191-203.
- Baluchnejadmojarad, T., Roghani, M., Roghani-Dehkordi, F., *J. Ethnopharmacology*,

**2005**, 97 (2), 207-210.

Bandoniene, D., Murkovic, M., *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, 2482-2487.

Bandoniene, D., Murkovic, M., Pfannhauser, W., Venskutonis, P.R., Gruzdiene, D., *Eur. Food Res. Technol.*, **2002**, 214, 143-147.

Bartasiute, A., Westerink, B.H.C., Verpoorte, E., Niederlander, H.A.G., *Free Radic. Biol. Med.*, **2007**, 42, 413.

Basaran, A.A., Calis, I., Anclin, C., Nishibe, S., Sticher, O., *Helv. Chim. Acta*, **1988**, 71, 1483-1490.

Bast, A., Haenen, G.R.M.M., Doleman, C.J.A., *Am. J. Med.*, **1991**, 91, 2S.

Bayer, E., Albert, K. *J. Chromatogr.*, **1984**, 312, 91-97.

Becker, E.D., *Pulse and Fourier transform NMR: introduction to theory and methods*, **1971**, Academic Press, New York.

Bedir, E., Tasdemir, D., Calis, I., Zerbe, O., Sticher, O., *Phytochemistry*, **1999**, 51, 921-925.

Bedir, E., Manyam, R., Khan, I.A., *Phytochemistry*, **2003**, 63, 977-983.

Behnke, B., Schlotterbeck, G., Tallarek, U., Strohschein, S., Tseng, L.H., Keller, T., Albert, K., Bayer, E., *Anal. Chem.*, **1996**, 68, 1110.

Black, R.D., Early, T.A., Roemer, P.B., Mueller, O.M., Mogro-Campero, A., Turner, L.G., Johnson, G.A., *Science*, **1993**, 259 (5096), 793-795.

Blahova, E., Jandera, P., Cacciola, F., Mondello, L., *J. Sep. Sci.*, **2006**, 29, 555-556.

Bohlmann, J., Keeling, J.P., *The Plant Journal*, **2008**, 54 (4), 656-669.

Boskou, D., Gerothanassis, I.P., Kefalas, P., *ANTIOXIDANT PLANT PHENOLS. Sources, Structure-Activity Relationship, Current Trends in Analysis and Characterization*, **2006**, Research Singpost, Kerala, India.

Boue, S.M., Carter-Wientjes, C.H., Shih, B.Y., Cleveland, T.E., *J. Chromatogr. A*, **2003**, 991, 61.

Bovey F. A., *In Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, **1996**, Academic Press, California.

Braun, S.; Kalinowski, S.; Berger, S. *In 150 and more basic NMR experiments*, **1998**, Wiley, New York.

Brey, W.S., *Pulse methods in 1D and 2D liquid-phase NMR*, **1988**, Academic Press, London.

Briante, R., Patumi, M., Terenziani, S., Bismuto, E., Febbraio, F., Nucci, R., *J Agric.*

- Food Chem.* **2002**, *50*, 4934-4940.
- Bringmann, G., Wohlfarth, M., Heubes, M., *J. Chromatogr. A*, **2000**, *904* (2), 243-249.
- Bringmann, G., Wohlfarth, M., Rischer, H., Heubes, M., Saeb, W., Diem, S., Herderich, M., Schlauer, J., *Anal. Chem.*, **2001**, *73* (11), 2571-2577.
- Bross-Walch, N., Kuhn, T., Moskau, D., Zerbe, O., *Chem. & Biodiversity*, **2005**, *2* (2), 147-177.
- Bruneton J., *Pharmacognosy - Phytochemistry Medicinal plants*, **1996**, 265-311, Technique and Documentation - Lavoisier, Paris.
- Butkovic, V., Klasinc, L., Bors, W., *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, *52*, 2816-2820.
- Cakir, E., Sweet, V., Tang, J., Powers, J.R., in *233<sup>rd</sup> ACS National Meeting Am. Chem. Soc.*, **2007**.
- Calis, I., Ersoz, T., Tasdemir, D., Ruedi, P., *Phytochemistry*, **1992**, *31*(1), 357-359.
- Cao, G., Sofic, E., Prior, R.L., *J. Agric. Food Chem.*, **1996**, *44*, 3426.
- Cao, G., Sofic, E., Prior, R.L., *Free Radic. Biol. Med.*, **1997**, *22* (5), 749-760.
- Capecka, E., Mareczek, A., Leja, M., *Food Chem.*, **2005**, *93*, 223-226.
- Carlson, R.M.K., *Two-dimensional NMR spectroscopy : applications for chemists and biochemists*, **1994**, Cambridge: VCH, New York.
- Chapman J.R., *Practical Organic Mass Spectroscopy*, *2<sup>nd</sup> ed.*, **1993**, Willey, Chichester.
- Charami, M. T., Lazari, D., Karioti, A., Skaltsa, H., Hadjipavlou-Latina, D., Souleies, C., *Phytoth. Res.*, **2008**, *22* (4), 450-454.
- Choi, C.W., Kim, C.S., Hwang, S.S., Choi, B.K., Ahn, H.J., Lee, M.Y., Park, S.H., Kim, S.K., *Plant Sci.*, **2002**, *163*, 1161-1168.
- Christoforidou, S., Dais, P., Tseng, L.H., Spraul, M., *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, *53*, 4667-4679.
- Chung, Y.-K., Heo, H.-J., Kim, E.-K., Kim, H.-K., Huh, T.-L., Lim, Y., Kim, S.-K., Shin, D.-H., *Molecules and Cells*, **2001**, *11* (2), 137-142.
- Clarkson, C., Staerk, D., Hansen, S.H., Jaroszewski, J.W., *Anal. Chem.*, **2005**, *77*, 3547-3553.
- Clarkson, C., Staerk, D., Hansen, S.H., Smith, P.J., Jaroszewski, J.W. *J. Nat. Prod.*, **2006**, *69*, 527 (a).
- Clarkson, C., Staerk, D., Hansen, S.H., Smith, P.J., Jaroszewski, J.W. *J. Nat. Prod.*,

**2006**, 69, 1280-1288 (b).

Clarkson, C., Sibum, M., Mensen, R., Jaroszewski, J.W., *J. Chromatogr. A*, **2007**, 1165, 1-9.

Colquhoun, L.J., Goodfellow, B.J. *Spectroscopic Techniques for food analysis*, **1994**, Wilson, R.H (Ed.), VCH Publishers.

Croasmun, W.R., Clarson, R.M.K., *In Two-Dimensional NMR Spectroscopy. Applications for Chemists and Biochemists*, **1994**, Wiley, New York.

da Costa, C.T., Dalluge, J.J., Welch, M.J., Coxon, B., Margolis, S.A., Horton, D., *J. Mass Spectrom.*, **2000**, 35(4), 540-549.

Dachtler, M., Glaser, T., Kohler, K., Albert, K., *Anal. Chem.*, **2001**, 73 (3), 667-674.

Dalluge, J.J., Nelson, B. C., Thomas, J. B., Sander, L. C., *J. Chromatogr.A*, **1998**, 793, 265 – 274.

Dapkevicius, A., Koleva, I., Pukalskas, A., Niederlander, H.A.G., van Beek, T.A., *Proc. Phytochem. Soc. Eur.*, **2000**, 46, 187.

Davis, D.G., Bax, A., *J. Magn. Reson.*, **1985**, 64 (3), 533-535.

Davis, D.G., Bax, A., *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, 107 (24), 7197-7198.

De Las Heras, B., Vivas, J.M., Villar, A., *J. Ethnopharmacology*, **1994**, 41, 15-17.

de Rijke, E., Joshi, H.C., Sanderse, H.R., Ariese, F., Brinkman, U.A.Th., Gooijer, C., *Anal. Chim. Acta*, **2002**, 468, 3.

de Rijke, E., Zappey, H., Ariese, F., Gooijer, C., Brinkman, U.A.Th., *J. Chromatogr. A*, **2003**, 984 (1), 45-58.

de Rijke, E., Out, P., Niessen, P.W.A., Ariese, F., Gooijer, C., Brinkmann, U.A.T., *J. Chromatograph. A*, **2006**, 1112 (1-2), 31-63.

Derome, A.E., *Modern NMR techniques for chemistry research*, **1987**, Pergamon Press, New York.

Diaz, R.M., Garcia-Granados, A., Moreno, E., Parra, A., Queredo-Sarmiento, J., Saenz de Buruaga, A., Saenz de Buruaga, J. M., *Planta Med.*, **1989**, 54, 301-304.

El Ouallidi, J., Rascol, J.P., Martin, A., Puech, S. *Biochem. Syst. Ecol.* **1996**, 24 (3), 261-272.

El-Ansari, M.A., Barron, D., Abdalla, M.F., Saleh, N.A., Le Quere, J.L., *Phytochemistry*, **1991**, 30 (4), 1169-1173.

El-Mousallamy, A.M.D., Hawas, U.W., Hussein, S.A.M., *Phytochemistry*, **2000**, 55, 927-931.



- Esmaeili, M.A., Yazdanparast, R., *J. Ethnopharmacology*, **2004**, *95* (1), 27-30.
- Esposito, K., Marfella, R., Ciotola, M., Di Palo, C., *JAMA*, **2004**, *292*, 1440-1446.
- Exarchou, V., Troganis, A., Gerothanassis, I.P., Tsimidou, M., Boskou, D., *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, *490*, 2-8.
- Exarchou, V., Nenadis, N., Tsimidou, M., Gerothanassis, I.P., Troganis, A., Boskou, D., *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, *50*, 5294-5299 (a).
- Exarchou, V., Nenadis, N., Tsimidou, M., Gerothanassis, I.P., Troganis, A., Boskou, D., *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, *50*, 5294-5299.(b)
- Exarchou, V., Godejohann, M., Van Beek, T.A. Gerothanassis, I.G., Vervoort, J., *Anal. Chem.*, **2003**, *75*, 6288-6294.
- Exarchou, V., Knucker, M., Van Beek, T.A., Vervoort, J., Gerothanassis, I.P., Albert, K., *Magn. Reson. Chem.*, **2005**, *43*, 681-687.
- Exarchou, V., Fiamegos, Y.C., van Beek, T.A., Nanos, C., Vervoort, J., *J. Chromatogr. A*, **2006**, *1112*, 293-302.
- Flynn, P.F., Mattiello, D.L., Hill, H.D.W., Wand, A.J., *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 4823.
- Fritsche, J., Angoelal, P., Dachtler, M., *J. Chromatogr., A*, **2002**, *972* (2), 195-203.
- Fukushi, E., *Biosc. Biotechnol. Biochem.*, **2006**, *70* (8), 1803-1812.
- Gabrieli, C.N., Kefalas, P.G., Kokkalou, E.L., *J. Ethnopharmacology*, **2005**, *96*, 423-428.
- Gerothanassis, I.P., Exarchou, V., Lagouri, V., Troganis, A., Tsimidou, M., Boskou, D., *J. Agric. Food Chem.*, **1998**, *46*, 4185-4192.
- Gerothanassis, I.P., Kalodimos, C.G., *J. Chem. Educ.*, **1996**, *73* (8), 801-804.
- Gerothanassis, I.P., Troganis, A., Exarchou, V., Barbarossou, K., *Chem. Educ. Res. Pract. Eur.*, **2002**, *3*, 229.
- Godejohann, M., Preiss, A., Mügge, C., *Anal. Chem.*, **1998**, *70* (3), 590-595.
- Goulas V., Exarchou V., Troganis A., Psomiadou E., Briassoulis E., Fotsis T., Gerothanassis I.P., *Mol. Nutr. Food Res.*, **2009**.
- Gragg G., Newman D., *J. Ethnopharmacology*, **2005**, *100*, 72-79.
- Gragg G., Newman D., Snader K., *J. Nat. Prod.*, **1997**, *60*, 52-60.
- Gragg G., Newman D., Yang S., *J. Nat. Prod.*, **2006**, *69*, 488-498.
- Grayer, R.J., Kite, G.C., Abou-Zaid, M., Archer, L.J., *Phytochem. Anal.*, **2000**, *11*, 257.

- Griffiths, L., *Anal. Chem.*, **1995**, 67 (22), 4091-4095.
- Griffiths, L., Horton, R., *Magn. Reson. Chem.*, **1998**, 36, 104.
- Grijfhout, E.P., Groot, A.T., Posthumus, M.A., van Beek, T.A., deGroot, A.E., *Chemoecology*, **2002**, 12, 113.
- Gross, G.A., Lahloub, F.M., Anclin, C., Schulten, H.R., Sticher, O., *Phytochemistry*, **1988**, 27(5), 1459-1463.
- Guinda, A., Lanzon, A., Rios, J.J., Albi, T., *Grasas y Aceites*, **2002**, 53 (4), 419-422.
- Gunter, H., *In NMR Spectroscopy. Basic Principle, Concepts, and Applications in Chemistry*, **1995**, John Wiley & Sons, Chichester.
- Halliwell, B., Cuttidge, J.M.C., *Free Radical in Biology and Medicine*, **1999**, Oxford University Press, Oxford.
- Halliwell, B., Whiteman, M., *Br. J. Pharmacol.*, **2004**, 142, 231.
- Hanai, T., *HPLC : a practical guide*, **1999**, Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Hansen, S.H., Jensen, A.G., Cornett, C., Bjornsdottir, I., Taylor, S., Wright, B., Wilson, I.D., *Anal. Chem.*, **1999**, 71 (22), 5235-5241.
- Hansen, S.H., Jensen, A.G., Cornett, C., Bjornsdottir, I., Taylor, S., Wright, B., Wilson, I.D., *Anal. Chem.*, **1999**, 71(22), 5235-5242.
- Harborne, J.F., Tomas-Barberan, F.A., Williams, C.A., Gil, M.I., *Phytochemistry*, **1986**, 25(12), 2811-2816.
- Hassani, P., Yasa, N., Vosough-Ghanbari, S., Mohammadirad, A., Dehghan, G., Abdollahi, M., *Acta Pharm.*, **2007**, 57, 123-127.
- Haw, J.F., Glass, T.E., Hausler, D.W., Motell, E., Dorn, H.C., *Anal. Chem.*, **1980**, 52 (7), 1135-1140.
- Hawas, U.W., Sharaf, M., El-Ansari, M.A. *Curr. Chem. Biol.*, **2008**, 2, 174-177.
- Hentschel, P., Knucker, M., Grynbaum, M.D., Putzbach, K., Bischoff, R., Albert, K., *Magn. Reson. Chem.*, **2005**, 43, 747.
- Hlubocky, F.J., Ratain, M.J. Wen, M., Daugherty, C.K., *J. Clin. Oncol.* **2007**, 25, 548-554.
- Hore, P.J., *Nuclear Magnetic Resonance*, **1995**, Oxford University Press, Oxford.
- Huang, D., Boxin, O.U., Prior, R.I., *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 1841.
- Huck, C.W., Buchmeiser, M.R., Bonn, G.K., *J. Chromatogr. A*, **2001**, 943, 33
- Hvattum, E., Stenstrom, Y., Ekeberg, D., *J. Mass Spectrom.*, **2004**, 39, 1570-1581.
- Ikan R., *NATURAL PRODUCTS, a laboratory guide*, **1991**, chapter: acetogennins, 1-8

Jerusalem.

Ingkanunan, K., de Best, C.M., van der Heijden, R., Hofte, A.J.P. Karabatak, B., Irth, H., Tjaden, U.R., van der Greef, J., Verpoorte, R., *J. Chromatogr. A.*, **2000**, 872, 61.

Janeska, B., Stefova, M., Apilieva, K., *Acta Pharm.*, **2005**, 57, 371-377.

Jandera, P., *J. Sep. Sci.*, **2006**, 29, 1763 – 1783.

Janeska, B., Stefova, M., Alipieva, K., *Acta Pharm.*, **2007**, 57 (3), 371-377.

Jaroszewski, J.W. *Planta Med.*, **2005**, 71, 691-700 (a).

Jaroszewski, J.W. *Planta Med.*, **2005**, 71, 795-802 (b).

Jayawickrama, D.A., Sweedler, J.V., *J. Chromatogr., A*, **2003**, 1000, 819.

Jeurissen, S.M.F., Claasen, F.W., Havlik, J., Bouwmans, E.E., Cnubben, N.H.P., Sudholter, E.J.R., Rietjens, I.C.M., van Beek, T.A., *J. Chromatogr. A.*, **2007**, 1141, 81.

Justesen, U., *J. Mass Spectrom.*, **2001**, 36(2), 169-178.

Kaileh, M., Berghe, W.V., Boone, E., Essawi, T., Haegeman, G., *J. Ethnopharmacology*, **2007**, 113, 510-516.

Kawashty, S.A., El-Din, E.M.G., Saleh, N.A.M., *Biochem. Sys. Ecol.*, **1999**, 27, 657-660.

Keeler, J., *Understanding NMR spectroscopy*, **2005**, Wiley, Chichester, England.

Kilic, T., *Molecules*, **2006**, 11 (4), 257-262.

Kirimer, N., Demirci, B., Iscan, G., Baser, K.H.C., Duman, H., *Chem. Nat. Comp.*, **2008**, 44 (1), 121-123.

Kırmızıbekmez, H., Montoro, P., Piacente, S., Pizza, C., Donmez, A., Calis, I., *Phytoch. Anal.*, **2005**, 16, 1-6.

Kokkini S., Vokou, D., Karousou, R., *Botanica Chronica*, **1991**, 10, 337

Koleva, I.I., Niederlander, H.A.G., van Beek, T.A., *Anal. Chem.*, **2000**, 72, 2323-2328.

Koleva, I.I., Niederlander, H.A.G., van Beek, T.A., *Anal. Chem.*, **2001**, 73 (14,) 3373-3381.

Koleva, I.I., Van Beek, T.A., Linssen, J.P.H., De Groot, A., Evstatieva, L.N., *Phytochem. Anal.*, **2002**, 13, 8-17.

Kosar, M., Dorman, H.J.D., Baser, K.H.C., Hiltunen, R., *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 52, 5004-5010.

Kouzi, S.A., McMurtry, R.J., Nelson, S.D., *Chem. Res. Toxicol.*, **1994**, 7 (6), 850-856.

- Kovacs, H., Moskau, D., Spraul, M., *Prog. Nucl. Magn. Res. Sp.*, **2005**, *46*, 131.
- Krucker, M., Lienau, A., Putzbach, K., Grynbaum, M.D., Schuler, P., Albert, K., *Anal. Chem.*, **2004**, *76*, 2623.
- Kupeli, E., Orhan, I., Yesilada, E., *Pharm. Biol.*, **2007**, *45* (7), 547-555.
- Kupeli, E., Sahin, F.P., Yesilada, E., Calis, I., Ezer, N., *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, **2007**, *62* (7-8), 519-525.
- Kupeli, E., Sahin, F.P., Yesilada, E., Ezer, N., *J. Ethnopharmacology*, **2007**, *112* (2), 356-360.
- Lambert, M., Staerk, D., Hansen, S.H., Jaroszewski, J.W., *Magn. Reson. Chem.*, **2005**, *43*, 771 (b).
- Lambert, M., Staerk, D., Hansen, S.H., Siarafianpour, M., Jaroszewski, J.W., *J. Nat. Prod.*, **2005**, *68*, 1500-1509.
- Le Tutour, B., Guedon, D., *Phytochemistry*, **1992**, *31* (4), 1173-1178.
- Lee, H.S., in: Nollet, L.M.L. (Ed.), *Food Analysis by HPLC*, **2000**, 2nd Ed., Marcel Dekker, 775 – 824, Inc., New York.
- Lee, S.S., Lai, Y.C., Chen, C.K., Tseng, L.H., Wang, C.Y., *J. Nat. Prod.*, **2007**, *70*, 637.
- Lenherr, A., Lahloub, M.F., Sticher, O. *Phytochemistry*, **1984**, *23* (10), 2323-2345.
- Lewis, R.J., Bernstein, M.A., Duncan, S.J., Sleight, C.J., *Magn. Reson. Chem.*, **2005**, *43*, 783.
- Liu, M., Lindon, J.C., *Curr. Org. Chem.*, **2001**, *5* (3), 351-371.
- Lommen, A., Godejohann, M., Venema, D.P., Hollman, P.C., Spraul, M., *Anal. Chem.* **2000**, *72* (8), 1793-1797.
- Louden, D., Handley, A., Lafont, R., Taylor, S., Sinclair, I., Lenz, E., Orton, T., Wilson, I.D., *Anal. Chem.*, **2002**, *74* (1), 288-294.
- Ma, Y.L., Vedernikova, I., van den Heuvel, H., Claeys, M., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2000**, *11*(2), 136-144.
- Mabry, T.J., Markham, K.R., Thomas M.B., *The Systematic Identification of Flavonoids*, **1970**, Springer-Verlag, New York, NY, USA.
- Makham K.R., *Techniques of flavonoid identification*. Petone, **1982**, 19-21, Academic Press, New Zealand.
- Mateos, R., Dominguez, M.M., Espartero, J.L., Cert, A., *J Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 7170-7175.

- Matkowski, A., Piotrowska, M., *Fitoterapia*, **2006**, *77*, 346-353.
- Mattina, M.J.I., MacEachern, G.J., *J. Chromatogr. A*, **1994**, *679*, 269.
- Meirinhos, J., Silva, B. M., Valentao, P., Seabra, R.M., Pereira, J.A., Dias, A., Andrade, P.B., Ferreres, F., *Nat Prod. Res.* **2005**, *19*, 189-195.
- Meister, A., Bernhardt, G., Christoffel, V., Buschauer, A., *Planta Medica*, **1999**, *65*(6), 512-516.
- Melidou, M., Riganakos, K., Galaris, D., *Free Radic. Biol. Med.*, **2005**, *39* (12), 1591-1600.
- Merken, H.M., Beecher, G.R., *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, *577*, 48.
- Miliauskas, G., van Beek, T.A., de Waard, P., Venskutonis, R.P., Sudhölter, E.J.R., *J. Nat. Prod.*, **2005**, *68*, 168-172.
- Miliauskas, G., Van Beek, T.A., de Waard, P., Venskutonis, R.P., Sudholter, E.J.R., *J. Chromatogr. A*, **2006**, *1112*, 276-284.
- Mmatli, E.E. Malerod, H., Wilson, S.R., Abegaz, B., Greibrokk, T., Lundanes, E., Malterud, K.E., Peterson, D., Rise, F., *Anal. Chim. Acta*, **2007**, *597*, 24-31.
- Molnar-Perl, I., Fuzfai, Z., *J. Chromatogr. A*, **2005**, *1073*, 201.
- Morelock, M. M.; Choi, L. L.; Bell, G. L.; Wright, J. L., *J. Pharm. Sci.*, **1994**, *83*, 948-952.
- Nenadis, N., Lazaridou, O., Tsimidou, M., *J. Agric. Food Chem.*, **2007**, *55*, 5452-5460.
- Nenadis, N., Vervoort, J., Boeren, S., Tsimidou, M., *J. Sci. Food Agric.*, **2007**, *87*, 160-166.
- Neuhaus, D., Ismail, I.M., Chung, C.W. J., *Magn. Reson. A*, **1996**, *118* (2), 256-263.
- Neuhaus, D., *The nuclear Overhauser effect in structural and conformational analysis*, **2000**, Wiley, New York.
- Newman D., Gragg G., *J. Nat. Prod.*, **2007**, *70*, 461-470.
- Noggle, J.H., *The Nuclear Overhauser effect : chemical applications*, **1971**, Academic Press, New York.
- Nuengchampong, N., de Jong, C.F., Bruyneel, B., Niessen, W.M.A., Irth, H., Ingkaninan, K., *Phytochem. Anal.*, **2005**, *16*, 422-428.
- Nyberg, N.T., Baumann, H., Kenne, L., *Magn. Reson. Chem.*, **2001**, *39*, 236.
- Oganesyanyan, G.B., Galstyan, A.M., Mnatsakanyan, V.A., Shashkov, A.S., Agababyan, P.V., *Chem. Of Nat. Prod.*, **1992**, *27*(5), 556-559.

- Oganesyan, G.B., *Chem. Of Nat. Prod.* **2007**, *43* (4), 474-475.
- Oki, T., Kobayashi, M., Nakamura, T., Okuyama, M., Masuda, M., Shiratsuchi, H., Suda, I., *J. Food Sci.*, **2006**, *71*, C18.
- Olson, D.L., Peck, T.L., Webb, A.G., Magin, R.L., Sweedler, J.V., *Science*, **1995**, *270*, 1967.
- Olson, D.L., Lacey, M.E., Sweedler, J.V., *Anal. Chem.*, **1998**, *70*, 645
- Ozcelic, B., Lee, J.H., Min, D.B., *J. Food Sci.*, **2003**, *68*, 487-490.
- Ozel, M.Z., Lewis, A.C., Gogus, F., *J. Essential Oil-Bearing Plants*, **2008**, *11* (1), 22-29.
- Ozgen, U., Mavi, A., Terzi, Z., Yildirim, A., Coskun, M., Houghton, P.J., *Pharm. Biol.*, **2006**, *44* (2), 107-112.
- Paiva-Martins, F., Gordon, M.H., *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, *49* (9), 4214-4219.
- Palomino, O.M., Gomez- Serranillos, Carratero, E., Villar, A., *J. Chromatogr. A.*, **1996**, *731*, 103-108.
- Panovska, T., K., Kulevanova, S., Stefova, M., *Acta Pharm.*, **2005**, *55*, 207-214.
- Panovska, T.K., Kulevanova, S., Gjorgoski, I., Bogdanova, M., Petrushevaska, G., *Acta Pharm.*, **2007**, *57* (2), 241-248.
- Papanicolaou K, Kokkini S., in "Aromatic Plants", Margaris N, Koedam A, Vokou D (eds) Vol III, Martinus Nijhoff Publ, The Hague **1982**, p. 101.
- Papoti, V., Tsimidou, M., *Food Chem.*, **2009**, *112* (1), 246-252.
- Parsaee, H., Shafiee-Nick, R., *Ir. Biomed. J.*, **2006**, *10* (3), 145-149.
- Pauli, G.F., Jaki, B.U., Lankin, D.C., *J. Nat. Prod.*, **2005**, *68* (2), 133-149.
- Paya, M., Terencio, M. C., Villar. A., *Acta Argon. Acad. Sci. Hung.*, **1985**, *34*, 90.
- Perez-Bonilla, M., Salido, S., van Beek, T.A., Linares-Palomino, P.J., Altarejos, J., Souda, M., *J. Chromatogr. A*, **2006**, *1112*, 311.
- Pietta, P.G., *J. Nat. Prod.*, **2000**, *63* (7), 1035-1042.
- Poli, F., Serrilli, A.M., Scartezzini, P., Muzzoli, M., Maxia, A., Ballero, M., Serafini, M., Bianco, A., *Nat. Prod. Res.*, **2007**, *21* (12), 1061-1066.
- Poole, C.F., Gunantileka, A.D., Sethuraman, R., *J. Chromatogr. A*, **2000**, *885*, 17
- Poterrat, O., Hamburger, M., *Curr. Org. Chem.*, **2006**, *10*, 899.
- Proestos, C., Sereli, D., Komaitis, M., *Food Chemistry*, **2006**, *95*, 44-52.
- Pukalskas, A., van Beek, T.A., de Waard, P., *J. Chromatogr. A*, **2005**, *1074*, 81-88.
- Pusecker, K., Albert, K., Bayer, E., *J. Chromatogr. A*, **1999**, *836* (2), 245-252.

- Queiroz, E.F., Wolfender, J.L., Atindehou, K.K., Traore, D., Hostettmann, K., *J. Chromatogr. A*, **2002**, 974 (1-2), 123-134.
- Rahman, A., Choudhary, M.I., *In solving problems with NMR spectroscopy*, **1996**, Academic Press, California.
- Rehova, L., Skerikova, V., Jandera, P., *J. Sep. Sci.*, **2004**, 27, 1345–1359.
- Reynolds, W.F., Enriquez, R.G., *J. Nat. Prod.*, **2002**, 65 (2), 221-244.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., *Free Radic. Biol. Med.*, **1996**, 20 (7), 933-956.
- Rios, J.L., Mañez, S., Paya, M., Alcaraz, M.J., *Phytochemistry*, **1992**, 31 (6), 1947-1950.
- Rodriguez-Lyon, M.L., Diaz-Lanza, A.M., Bernabe, M., Villaescusa-Castillo, L., *Magn. Reson. Chem.*, **2000**, 38, 684-687.
- Ryan, D., Robards, K., Lavee, S., *J. Chromatogr. A.*, **1999**, 832, 87-96.
- Ryan, D., Antolovich, M., Hertl, T., Prenzler, P.D., Lavee, S., Robards, K., *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50 (23), 6716-6724.
- Sadek, P.C., *The HPLC solvent guide*, **2002**, Wiley-Interscience, New York.
- Sahin, F.P., Ezer, N., Calis, I., *Phytochemistry*, **2004**, 65, 2095-2099.
- Sahin, F. P., Ezer, N., Calis, I., *Turk. J. Chem.*, **2006**, 30 (4), 495-504.
- Saito, T., Iwasawa, R., Ihara, T., Kinugasa, S., Nomura, A., Maeda, T., *J. Chromatography*, **2003**, 24, 117.
- Saito, S., Okamoto, Y., Kawabata, J., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2004**, 68, 1221-1227.
- Salminen, A., Lehtonen, M., Suuronen, T., Kaarninta, K., Huuskonen, J., *Cell. Mol. Life Sci.*, **2008**, 65, 2979-2999.
- Sanchez-Moreno, C., *Food Sci. Technol. Int.*, **2002**, 8, 121.
- Sanchez-Rabaneda, F., Jauregui, O., Casals, I., Andres-Lacueva, C., Izquierdo-Pulido, M., Lamuela-Raventos, R.M., *J. Mass Spectrom.*, **2003**, 38, 35-42.
- Sandaresan P.R., Slavoff, S.A., Grundel, E., White, K.D., Mazzola, E., Koblenz, D., Rader, J.I. *Phytochem. Anal.* **2006**, 17, 243-250.
- Sanders, J.K.M., Hunder, B.K., *The Second Dimension. In Modern NMR Spectroscopy*, **1993**, Oxford University Press, Oxford.
- Sandusky, P. *J. Nat. Prod.* **2007**, 6705, 1895-1900.
- Sandvoss, M., Weltring, A., Preiss, A., Levsen, K., Wuensch, G., *J. Chromatogr., A*,

**2001**, 917 (1-2), 75-86.

Sandvoss, M., Bardsley, B., Beck, T.L., Lee-Smith, E., North, S.E., Moore, P.J., Edwards, A.J., Smith, R.J., *Magn. Reson. Chem.*, **2005**, 43, 762

Sattar, A., Bankova, V., Spassov, S., Duddek, H., *Fitoterapia*, **1994**, 64 (3), 278-279.

Savournin, C., Baghdikian, B., Elias, R., Dargouth-Kesraoui, F., Boukef, K., Balansard, G., *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, 49 (2), 618-621.

Savvidou, S., Goulis, J., Giavazis, I., Patsiaoura, K., Hytioglou, P., Arvanitakis, C., *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, **2007**, 19, 507-511.

Schenk, T., Breel, G.J., Koevoets, P., van der Berg, S., Hogenboom, A.C., Irth, H., Tjaden, U.R., van der Greef, J., *J. Biomol. Screening*, **2001**, 8, 421.

Scherer, R., Godoy, H.T., *Food Chem.*, **2009**, 112, 654-658.

Schlesier, K., Haewat, M., Bohm, V., Bitsch, R., *Free Radic. Res.*, **2002**, 36, 177.

Schobel, U., Frenay, M., van Elswijk, D.A., McAndrews, J.M., Long, K.R., Olson, L.M., Bobzin, S.C., Irth, H., *J. Biomol. Screening*, **2001**, 6, 291.

Seger, C., Godejohann, M., Tseng, L.H., Spraul, M., Girtler, A., Sturm, S., Stuppner, H., *Anal. Chem.*, **2005**, 77, 878-885.

Seger, C., Godejohann, M., Spraul, M., Stuppner, H., Hadacek, F., *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1136, 82.

Seis, H., *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants*, **1991**, Academic Press, London.

Serrilli, A.M., Ramunno, A., Rullo, R., Ballero, M., Serafini, M., Bianco, A., *Nat. Prod. Res.* **2007**, 21(9), 814-818.

Shahidi, F.E., *Natural Antioxidants: Chemistry, Health Effects, and Applications*, **1997**, AOCS Press: Champaign, IL.

Sharififar, F., Dehghan-Nudeh, G., Mirtajaldini, M., *Food Chem.*, **2009**, 112, 885-888.

Skrzypek, Z., Wysokinska, H., Swiatek, L., Wroblewski, A.E., *J. Nat. Prod.*, **1999**, 62, 127-129.

Slobodnik, J., Groenewegen, M.G.M., Brouwer, E.R., Lingeman, H., Brinkman, U.A.T., *J. Chromatogr. A*, **1993**, 642, 359.

Smallcombe, S.H., Patt, S.L., Keifer, P.A. *J. Magn. Reson. A*, **1995**, 117, 295.

Snyder, L.R., Kirkland, J.J., *Introduction in Modern Liquid Chromatography*, **1979**, Wiley, New York.



- Snyder, L.R., Kirkland, J.J., *Practical HPLC method development*, **1997**, John Wiley & Sons, New York.
- Soler-Rivas, C., Espiñ, J.C., Wichers, H.J., *J. Sci. Food Agric.*, **2000**, *80* (7), 1013-1023.
- Sorensen, D., Raditsis, A., Trimble, L.A., Blackwell, B.A., Sumarach, M.W., Miller, J.D., *J. Nat. Prod.*, **2007**, *70*, 121.
- Spraul, M., Hofmann, M., Dvortsak, P., Nicholson, J.K., Wilson, I.D. *Anal. Chem.*, **1993**, *65* (4), 327-330.
- Spraul, M., Freund, A.S., Nast, R.E., Withers, R.S., Maas, W.E., Corcoran, O., *Anal. Chem.*, **2003**, *75*, 1536.
- Stalikas, C.D., *J. Sep. Sc.*, **2007**, *30* (18), 3268-3295.
- Stefova, M., Stafilov, T., Kulevanova, S., Stefkov, G., Bankova, V.S., *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* **2007**, *30*, 1035-1049.
- Stevenson, D.E., Hurst, R.D., *Cell. Molecul. Life Sc.*, **2007**, *64* (22), 2900-2916.
- Stoggl, W.M., Huck, C.W., Bonn, G.K., *J. Sep. Sci.*, **2004**, *27*, 524.
- Strid, A., Tan, K., *Mountain flora of Greece*, **1991**, 2, Edinburgh University Press.
- Strohschein, S., Rentel, C., Lacker, T., Bayer, E., Albert, K., *Anal. Chem.*, **1999**, *71* (9), 1780-1785.
- Styles, P., Soffe, N.F., Scott, C.A., Cragg, D.A., Row, R., White, DJ, White, PC. *J. Magn. Reson.*, **1984**, *60* (3), 397-404.
- Styles, P.S., Soffe, N.F., *J. Magn. Reson.*, **1989**, *84* (2), 376-378.
- Svehlikova, V., Bennett, R.N., Mellon, F.A., Needs, P.W., Piacente, S., Kroon, P.A., Bao, Y., *Phytochemistry*, **2004**, *65*, 2323-2332.
- Tatsis, E.C., Boeren, S., Exarchou, V., Troganis, A.N., Vervoort, J., Gerothanassis, I.P., *Phytochemistry*, **2007**, *68*, 383.
- Thomasset, S. C., Berry, D. P., Garcea, G., Marczylo, T., *Int. J. Cancer* **2007**, *120*, 451-458.
- Thurman, E.M., Mills, M.S., *Solid-Phase Extraction. In Chemical Analysis: A Series of Monographs on Analytical Chemistry and its Application*, **1998**, John Wiley, New York.
- Tomas-Barberan, T. F., Manez, S., Villar A., *J. Nat. Prod.*, **1987**, *48* (1), 28-32.
- Tomas-Barberan, F. A., Lopez-Gomez C, Villar, A., Tomas Lorente, F., *Planta Med.*,

1988, 52, 239.

Tomas-Barberan, F.A., Woolenweber, E., *Pl. Sys. Evol.*, **1990**, 173, 109-118.

Torre Carbot, K., Chavez-Servin, J. L., Jauregui, O., Castellote, A.I., Lamuela-Raventos, R. M., Fito, M., Covas, M.I., Munoz-Aguayo, D., Lopez-Sabater, M.C., *Anal. Chim. Acta* **2007**, 583, 402-410.

Tsao, R., Deng, Z., *J. Chromatogr. B*, **2004**, 812 (1-2), 85-99.

Tseng, L.H., Braumann, U., Godejohann, M., Lee, S.S., Albert, K., *J. Chin. Chem. Soc.*, **2000**, 47 (6), 1231-1236.

Tsimogiannis, D.I., Oreopoulou, V., *Innov. Food Sci. Emerging Technol.*, **2006**, 7 (1-2), 140-146.

U. Justesen, *J. Mass Spectrom.*, **2001**, 36, 169.

Unal, E.L., Mavi, A., Kara, A.A., Cakir, A., Sengül, M., Yildirim, A., *Pharm. Biol.*, **2008**, 46 (3), 207-224.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J., *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **2007**, 39, 44.

Van Elswijk, D.A., Irth, H., *Phytochem. Rev.*, **2003**, 1, 447.

Venturella, P., Bellino, A., Marino M.L., *Phytochemistry*, **1995**, 38(2), 527-530.

Villar A., Gasco M.A., Alcaraz M.J., *J Pharm. Pharmacol.*, **1984**, 36, 820-823.

Villar, A., Gasco, M.A., Alcaraz, M. J. *Planta Med.*, **1985**, 51,455.

Visioli, F., Galli, C., *Life Sci.*, **1994**, 55, 1965-1971.

Vokou, D., Katradi, K., Kokkini, S., *J. Ethnopharmacology*, **1993**, 39 (3), 187-196.

Wallace, S., *Pulse Methods in 1D and 2D liquid phase NMR*, **1988**, Academic Press, London.

Wang, J., Sporns, P., *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, 47, 2009-2015.

Wang, J., Sporns, P., *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48, 1657-1662. a

Wang, J., Sporns, P., *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48, 5887-5892. b

Watanabe, N., Niki, E., *Proc. Jpn. Acad., Ser.B.*, **1978**, 54, 194.

Watson, L., Dalwitz, M. J., *The grass genera of the world*, **1992**, CAB International, Wallingford, Oxon.

Webb, A.G., *J. Pharm. Biomol. Anal.* **2005**, 38, 892.

Wexler, D. S., Gao, L., Anderson, F., Ow, A., Nadasdi, L., McAlorum, A., Urfer, R., Huang, S.-G., *J. Biomol. Screening*, **2005**, 10, 383-390.

Wilson, I.D., *J. Chromatogr. A*, **2000**, 892 (1-2), 315-327.

- Wilson, I.D., Morgan, E.D., Lafont, R., Shokor, J.P., Lindon, J.C., Nicholson, J.K., Wright, B., *Chromatographia*, **1999**, *49*, 374
- Wolfender, J.L., Rodriguez, S., Hostettmann, J. *Chromatogr. A*, **1998**, *794* (1-2), 299-316.
- Wolfender, J., Queiroz, E.F., Hostettman, K., *Expert Opin. Drug Discov.*, **2006**, *1*, 237
- Wolters, A.M., Jayawickrama, D.A., Larive, C.K., Sweedler, J.V., *Anal. Chem.*, **2002**, *74*, 2306.
- Wu, J.H., Huang, C.U., Tung, Y.T., Chang, S.T., *J. Agric. Food Chem.*, **2008**, *56*, 328.
- Wuthrich, K., *NMR of proteins and nucleic acids*, **1986**, Chichester : Wiley, New York.
- Xu, F., Alexander, A.J., *Magn. Reson. Chem.*, **2005**, *43*, 776.
- Yamasaki, T., Masuoka, C., Nohara, T., Ono, M., *J. Nat. Med.*, **2007**, *61*, 318-322.
- Yang, Z., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2006**, *40*, 516.
- Yesilado, E., Ezer, N., *Int. J. crude drug res.* **1989**, *27*, 38-40.
- Zhang, J., Yang, J., Duan, J., Liang, Z., Zhang, L., Huo, Y., Zhang, Y., *Anal. Chim. Acta*, **2005**, *532* (1), 97-104.
- Zhou, Y., Wang, Y., Wang, R., Guo, F., Yan, C., *J. Sep. Sci.*, **2008**, *31*, 2388-2394.
- Αλεξάνδρου, Ν.Ε., *Γενική Οργανική Χημεία, Δομή- Φάσματα- Μηχανισμοί*, **1992**, Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη.
- Βαλαβανίδης, Α.Π. *Φασματοσκοπία Οργανικών Ενώσεων*, **2006**, Εκδόσεις Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα.
- Γαλάρης Δ., *Ελεύθερες ρίζες: Χημεία- Βιοχημεία*, **1998**, 11-21, Ιωάννινα.
- Γεροθανάσης Ι.Π., *Φασματοσκοπία Οργανικών Ενώσεων*, **1998**, Εκδόσεις Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα.
- Γεροθανάσης Ι.Π., *Εργαστήριο Φασματοχημικών και Φυσικοχημικών Τεχνικών*, **1999**, Εκδόσεις Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα.
- Καββαδά Δημ. Σ., *Εικονογραφημένο Βοτανικόν Φυτολογικόν Λεξικόν*, **1964**, Τόμος Η - Τεύχος 120, 3614-3617, Αθήνα.
- Ραγκούση-Ιγναντιάδου Β., *Χημεία φυσικών προϊόντων*, **1996**, 51-60, Αθήνα.
- Τρογκάνης, Α.Ν., *Φυσικοχημεία Βιολογικών Συστημάτων*, **2003**, Εκδόσεις Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα.

