

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΦΥΛΛΩΝ *LIGUSTRUM***  
***LUCIDUM* ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΒΙΟΕΝΕΡΓΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕ ΤΗ**  
**ΧΡΗΣΗ ΣΥΝΔΥΑΣΤΙΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΝΟΡΓΑΝΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ**

**ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ Α. ΝΕΡΑΝΤΖΑΚΗ**  
**ΧΗΜΙΚΟΣ, MSc**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2010**

Ημερομηνία αίτησης της κ. Αλεξάνδρας Νεραντζάκη: 16-09-05

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής Γ.Σ.Ε.Σ.: 614Α/16-09-05

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

**Επιβλέπων:**

**Γεροθανάσης Ιωάννης**

**Μέλη:**

**Σταλίκας Κωνσταντίνος**

**Τρογκάνης Αναστάσιος**

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 06-1-09

**Θέμα:** «Μελέτη της σύστασης εκχυλισμάτων φύλλων *Ligustrum Lucidum* ως προς την παρουσία βιοενεργών ενώσεων με τη χρήση συνδυαστικών τεχνικών ενόργανης ανάλυσης»

**ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ Γ.Σ.Ε.Σ.: 795<sup>Α</sup>/4-6-10**

1. Γεροθανάσης Ιωάννης, Καθηγητής Τμήματος Χημείας Παν/μίου Ιωαννίνων
2. Σταλίκας Κωνσταντίνος, Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Χημείας Παν/μίου Ιωαννίνων
3. Τρογκάνης Αναστάσιος, Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών Παν/μίου Ιωαννίνων
4. Αλμπάνης Τριαντάφυλλος, Καθηγητής Τμήματος Χημείας Παν/μίου Ιωαννίνων
5. Βαρβούνης Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Χημείας Παν/μίου Ιωαννίνων
6. Πηλίδης Γεώργιος, Καθηγητής Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών Παν/μίου Ιωαννίνων
7. Τζάκος Ανδρέας, Λέκτορας Τμήματος Χημείας Παν/μίου Ιωαννίνων

**Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «άριστα» στις 11-02-2011**

ΠΡΑΚΤΙΚΟ ΤΗΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΡΙΣΗ  
ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

της υποψήφιας διδάκτορος κ. Αλεξάνδρας Νεραντζάκη  
του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Η επταμελής εξεταστική επιτροπή που ορίστηκε σύμφωνα με το άρθρο 13 του Νόμου 2083/92 και υπ' αριθμό 795<sup>Α</sup>/ 4-6-10 απόφαση της Γενικής Συνέλευσης του Τμήματος Χημείας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την κρίση της διδακτορικής διατριβής της κ. Αλεξάνδρας Νεραντζάκη, συνήλθε σε συνεδρίαση σήμερα Παρασκευή 11 Φεβρουαρίου 2011 και ώρα 18.00 στην αίθουσα συνεδριάσεων του Τμήματος Χημείας (Χ2-092) στη Δουρούτη, και παρακολούθησε τη δημόσια παρουσίαση της διατριβής της υποψηφίας με τίτλο:

«Μελέτη της σύστασης εκχυλίσμάτων φύλλων *Ligustrum lucidum* ως προς την παρουσία βιοενεργών ενώσεων με τη χρήση συνδυαστικών τεχνικών ενόργανης ανάλυσης».

Μετά την προφορική παρουσίαση της διατριβής, τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής έθεσαν ερωτήσεις στην υποψήφια σχετικές με το θέμα της διδακτορικής διατριβής. Στην συνέχεια και μετά την αποχώρηση του ακροατηρίου και της υποψήφιας ακολούθησε διεξοδική συζήτηση μεταξύ των μελών της επιτροπής.

Τα μέλη της επιτροπής δήλωσαν ότι η παρούσα διατριβή είναι πρωτότυπη, προάγει την επιστήμη και ότι η προφορική παρουσίαση ήταν...αψογήσαν και ..... επιπέδου.

Η επιτροπή μετά από ψηφοφορία έκρινε...ομόφωνα..... ότι η διατριβή της κ. Αλεξάνδρας Νεραντζάκη παρουσιάζει πρωτοτυπία και ότι αποτελεί ουσιαστική συμβολή στην επιστήμη, η δε υποψήφια απέκτησε τόσο τις γνώσεις όσο και την επιστημονική κατάρτιση ώστε να προσεγγίζει με ωριμότητα σύγχρονα ερευνητικά προβλήματα του επιστημονικού πεδίου.

Στην συνέχεια η επιτροπή αποφάσισε ομόφωνα να απονέμει το βαθμό αριστα.....

1. Γεροθανάσης Ιωάννης, Καθηγητής Τμήματος Χημείας Παν/μίου Ιωαννίνων  
(Επιβλέπων Καθηγητής)

2. Σταλίκας Κωνσταντίνος, Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Χημείας Παν/μίου Ιωαννίνων (Μέλος Συμβουλευτικής Επιτροπής)

3. Τρογκάνης Αναστάσιος, Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών Παν/μίου Ιωαννίνων (Μέλος Συμβουλευτικής Επιτροπής)

4. Αλμπάνης Τριαντάφυλλος,  
Καθηγητής Τμήματος Χημείας Παν/μίου Ιωαννίνων

5. Βαρβούνης Γεώργιος,  
Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Χημείας Παν/μίου Ιωαννίνων

6. Πηλίδης Γεώργιος,  
Καθηγητής Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών Παν/μίου Ιωαννίνων

7. Τζάκος Ανδρέας,  
Λέκτορας Τμήματος Χημείας Παν/μίου Ιωαννίνων

*Στην οικογένεια μου,  
Αδάμ, Δήμητρα, Δάφνη και Θοδωρή*

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η διδακτορική διατριβή με θέμα «Μελέτη της σύστασης εκχυλισμάτων φύλλων *Ligustrum lucidum* ως προς την παρουσία βιοενεργών ενώσεων με τη χρήση συνδυαστικών τεχνικών ενόργανης ανάλυσης» που ακολουθεί, πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Φασματοσκοπίας Οργανικών Ενώσεων του Τμήματος Χημείας υπό την επίβλεψη του Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων Ι.Π. Γεροθανάση. Η τριμελής Συμβουλευτική επιτροπή συμπληρώνεται από τον Αναπληρωτή Καθηγητή Κ. Σταλικά του Τμήματος Χημείας και τον Επίκουρο Καθηγητή Α. Τρογκάνη του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθ. Ι.Π. Γεροθανάση, για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος και την πολύτιμη καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής. Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στον Επ. Καθ. Α. Τρογκάνη για την πολύτιμη βοήθειά του σχετικά με τη λήψη και ερμηνεία των φασμάτων NMR. Ευχαριστώ θερμά τον Αν. Καθ. Κ. Σταλικά για την βοήθειά του σε θέματα χρωματογραφίας. Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω και στα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, τον Καθ. Τ. Αλμπάνη, τον Αν. Καθ. Γ. Βαρβούνη και τον Λέκτορα Α. Τζάκο του Τμήματος Χημείας καθώς και στον Καθ. Γ. Πηλίδη του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για τη συνεργασία που είχαμε.

Ευχαριστώ ιδιαίτερος την Λέκτορα του Τμήματος Χημείας κ. Α. Μπαδέκα, που ως υπεύθυνη του Κέντρου Μάζας μου παρείχε κάθε δυνατή πρόσβαση στη χρήση του οργάνου. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα το μέλος ΕΙΔΠ Δρ. Β. Εξάρχου και τον Δρ. Κ. Τσιαφούλη, υπευθύνους του Κέντρου NMR του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για τη συνεργασία μας κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συναδέλφους μου στο Εργαστήριο Φασματοσκοπίας Οργανικών Ενώσεων του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων Δρ. Βλάσιο Γούλα, κ. Παντελή Χαρισιάδη, κ. Αλεξάνδρα Πριμοικύρη και ιδιαίτερα την Δρ. Βασιλική Κοντογιάννη για την ξεχωριστή φιλία μας και την άριστη συνεργασία μας.

Ευχαριστώ ολόψυχα το Θοδωρή για την υπομονή, τη διαρκή στήριξη και ενθάρρυνση όλα αυτά τα χρόνια. Τέλος, εκφράζω ευγνωμοσύνη στον πατέρα μου Αδάμ, στη μητέρα μου Δήμητρα και στην αδερφή μου Δάφνη για τη συνεχή υποστήριξη και ηθική συμπαράσταση που μου πρόσφεραν και όλους όσους ήταν κοντά μου.

Αλεξάνδρα Α. Νεραντζάκη

Ιωάννινα, Μάϊος 2010

## Πρόλογος

## Περιεχόμενα

### 1. Θεωρητικό Μέρος

|                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Εισαγωγή                                                                                     | 2  |
| <b>1.1 Φαινολικές ενώσεις – Φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή και σεκοϊριδοειδή</b>                | 4  |
| 1.1.1 Φαινολικά οξέα - Αντιοξειδωτική δράση φαινολικών οξέων                                 | 7  |
| 1.1.2 Φλαβονοειδή - Βιολογικές δράσεις φλαβονοειδών                                          | 10 |
| 1.1.3. Σεκοϊριδοειδή - Βιολογικές δράσεις σεκοϊριδοειδών                                     | 14 |
| <b>1.2 <i>Ligustrum lucidum</i> ως πηγή βιοενεργών συστατικών</b>                            | 17 |
| 1.2.1 Φαινολικά συστατικά του <i>Ligustrum lucidum</i>                                       | 19 |
| 1.2.1.α Αντιοξειδωτική ικανότητα φύλλων <i>L. lucidum</i>                                    | 22 |
| 1.2.1.β Μέθοδοι παραλαβής φαινολικών συστατικών φύλλων <i>L. lucidum</i>                     | 23 |
| <b>1.3 Μέθοδοι ανάλυσης φαινολικών ενώσεων</b>                                               | 25 |
| 1.3.1 Χρωματομετρικές μέθοδοι ανάλυσης φαινολικών ενώσεων                                    | 25 |
| 1.3.1.α Προσδιορισμός ολικών φαινολών                                                        | 25 |
| 1.3.1.β Προσδιορισμός ολικών φλαβονοειδών, ολικών τανινών, καφεϊκού οξέος και παραγώγων του  | 25 |
| 1.3.2 Χρωματογραφικές μέθοδοι ανάλυσης φαινολικών ενώσεων                                    | 26 |
| 1.3.3 Φασματοσκοπία NMR <sup>1</sup> H και φαινολικές ενώσεις                                | 32 |
| 1.3.4 Συζευγμένη τεχνική LC-MS και φαινολικές ενώσεις                                        | 34 |
| 1.3.5 Συζευγμένη τεχνική LC-NMR και φαινολικές ενώσεις                                       | 38 |
| Σκοπός της διδακτορικής διατριβής                                                            | 46 |
| <b>2. Πειραματικό μέρος</b>                                                                  |    |
| <b>2.1 Δείγματα φύλλων <i>L. lucidum</i></b>                                                 | 48 |
| <b>2.2 Πρότυπες ενώσεις</b>                                                                  | 48 |
| <b>2.3 Διαλύτες</b>                                                                          | 49 |
| <b>2.4 Αντιδραστήρια</b>                                                                     | 49 |
| <b>2.5 Όργανα – Συσκευές</b>                                                                 | 49 |
| <b>2.6 Μέθοδοι</b>                                                                           | 51 |
| 2.6.1 Παρασκευή εκχυλισμάτων                                                                 | 51 |
| 2.6.2 Μελέτη της σύστασης των εκχυλισμάτων                                                   | 56 |
| 2.6.2.1 Μελέτη της σύστασης των εκχυλισμάτων με αναλυτική υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης | 56 |

|                                                                                                   |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.6.2.2 Μελέτη της σύστασης των εκχυλισμάτων με τη συζευγμένη τεχνική LC-DAD-ESI-MS               | 57 |
| 2.6.2.3 Μελέτη της σύστασης με την συζευγμένη τεχνική LC-DAD-SPE-NMR                              | 59 |
| 2.6.2.4 Μελέτη της σύστασης των εκχυλισμάτων με φασματοσκοπία NMR- <sup>1</sup> H                 | 60 |
| 2.6.3 Χρωματομετρικός προσδιορισμός ολικών φαινολικών συστατικών                                  | 61 |
| 2.6.4 Χρωματομετρικός προσδιορισμός ολικών φλαβονοειδών συστατικών                                | 62 |
| 2.6.5 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης με τη δοκιμή σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH <sup>•</sup> | 63 |

### **3, 4, 5 Αποτελέσματα και Συζήτηση**

#### **3. Συγκριτική μελέτη της επίδρασης της περιοχής και του χρόνου συλλογής στη σύσταση εκχυλισμάτων φύλλων *Ligustrum lucidum* με τη χρήση της συζευγμένης τεχνικής LC-ESI-MS<sup>n</sup> και NMR-<sup>1</sup>H**

|                                                                                                                                                                                             |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.1 Εισαγωγή                                                                                                                                                                                | 65  |
| 3.2 Μελέτη της επίδρασης της περιοχής και του χρόνου συλλογής στη σύσταση των ολικών φαινολών, ολικών φλαβονοειδών και εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων                 | 66  |
| 3.3 Στατιστική μελέτη της επίδρασης της περιοχής και του χρόνου συλλογής στη σύσταση των ολικών φαινολών, ολικών φλαβονοειδών και της εκτίμησης της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων | 70  |
| 3.4 Μελέτη της σύστασης των εκχυλισμάτων με τη χρήση φασματοσκοπίας NMR <sup>1</sup> H                                                                                                      | 74  |
| 3.5 Μελέτη της σύστασης των εκχυλισμάτων με τη χρήση συζευγμένης τεχνικής LC-ESI-MS <sup>n</sup>                                                                                            | 80  |
| 3.5.1 Συγκριτική μελέτη των υδατικών εκχυλισμάτων από τα Ιωάννινα                                                                                                                           | 93  |
| 3.5.2 Συγκριτική μελέτη των μεθανολικών εκχυλισμάτων από τα Ιωάννινα                                                                                                                        | 96  |
| 3.5.3. Συγκριτική μελέτη των υδατικών εκχυλισμάτων από την Κάριανη                                                                                                                          | 101 |
| 3.5.4. Συγκριτική μελέτη των μεθανολικών εκχυλισμάτων από την Κάριανη                                                                                                                       | 104 |
| 3.5.5. Στατιστική ανάλυση ομαδοποίησης των αποτελεσμάτων της συζευγμένης τεχνικής LC-ESI-MS <sup>n</sup>                                                                                    | 106 |

#### **4. Συγκριτική μελέτη της επίδρασης της μεθόδου εκχύλισης στη σύσταση εκχυλισμάτων φύλλων *Ligustrum lucidum* και ταυτοποίηση των κυριοτέρων συστατικών με τη χρήση της συζευγμένης τεχνικής LC-ESI-MS<sup>n</sup> και LC-SPE-NMR**

|                                                                                                                                                                         |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.1 Εισαγωγή                                                                                                                                                            | 111 |
| 4.2 Παραλαβή εκχυλισμάτων με διαφορετικές μεθόδους εκχύλισης                                                                                                            | 112 |
| 4.3 Επίδραση των συνθηκών εκχύλισης στη σύσταση των ολικών φαινολών, ολικών φλαβονοειδών και εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων                       | 113 |
| 4.4 Στατιστική μελέτη της επίδραση των συνθηκών εκχύλισης στη σύσταση των ολικών φαινολών, ολικών φλαβονοειδών και εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων | 115 |
| 4.5 Μελέτη της σύστασης των εκχυλισμάτων με τη χρήση της συζευγμένης τεχνικής LC-ESI-MS <sup>n</sup>                                                                    | 122 |
| 4.5.1 Συγκριτική μελέτη των υδατομεθανολικών εκχυλισμάτων L.K.M.MeOH/H <sub>2</sub> O 24h - L.K.M.MeOH/H <sub>2</sub> O u.s.b - L.K.M.MeOH/H <sub>2</sub> O 1 month     | 123 |
| 4.5.2 Συγκριτική μελέτη των εκχυλισμάτων L.K.M.MeOH 1 week και L.K.M.Aq                                                                                                 | 132 |
| 4.5.3 Συγκριτική μελέτη των αιθανολικών εκχυλισμάτων L.K.M.EtOH 24h και L.K.M.EtOH 1week                                                                                | 135 |
| 4.5.4 Συγκριτική μελέτη των εκχυλισμάτων με soxhlet L.K.M.MeOH soxhlet και L.K.M.EtOAc soxhlet                                                                          | 137 |
| 4.6 Μελέτη της σύστασης του εκχυλίσματος του οξικού αιθυλεστέρα με τη χρήση της συζευγμένης τεχνικής LC-DAD-SPE-NMR και LC-ESI-MS <sup>n</sup>                          | 142 |
| <b>5. Ανάπτυξη μεθοδολογίας προσδιορισμού ολικών φαινολών με τη χρήση φασματοσκοπίας NMR <sup>1</sup>H μιας διάστασης σε φυτικά εκχυλίσματα</b>                         |     |
| 5.1 Εισαγωγή                                                                                                                                                            | 154 |
| 5.2 Προσδιορισμός ολικών φαινολικών σε πρότυπες ενώσεις φαινολικών οξέων και φλαβονοειδών με τη χρήση φασματοσκοπίας NMR- <sup>1</sup> H                                | 155 |
| 5.3 Σύγκριση φασματοσκοπίας NMR <sup>1</sup> H με τη χρωματομετρική μέθοδο Folin-Ciocalteau (FC) για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολών                               | 160 |
| 5.4 Εφαρμογή της μεθόδου NMR- <sup>1</sup> H σε ακατέργαστα (crude) φυτικά εκχυλίσματα                                                                                  | 162 |
| <b>Βιβλιογραφία</b>                                                                                                                                                     | 167 |
| <b>Κατάλογος Σχημάτων</b>                                                                                                                                               | 185 |

**Κατάλογος Πινάκων**

192

**Abstract**

194

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

## ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## Εισαγωγή

### Φυσικά προϊόντα - Φυτικά εκχυλίσματα

Αν και ο όρος φυσικά προϊόντα ετοιμολογικά αναφέρεται σε όλες τις χημικές ενώσεις, ανόργανες και οργανικές, που βρίσκονται στη φύση, εντούτοις έχει καθιερωθεί η έννοια αυτή να περιορίζεται μόνο σε ενώσεις που αποτελούν τους ζωντανούς οργανισμούς ή παράγονται από αυτούς. Επίσης, ο όρος χρησιμοποιείται για την περιγραφή εκχυλισμάτων ή εκκριμάτων οργανισμών, καθώς και καθαρών ενώσεων που έχουν απομονωθεί από φυτά ή ζώα. Σήμερα, ο όρος φυσικά προϊόντα αναφέρεται στα προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού, που δημιουργούνται τόσο στο φυτικό όσο και στο ζωικό βασίλειο (Ιγνατιάδου-Ραγκούση, 1996).

Για πολλά χρόνια τα φυτά/ φυτικά εκχυλίσματα χρησιμοποιούνταν ως η μόνη διαθέσιμη θεραπευτική αγωγή για τους ανθρώπους. Το φυτικό βασίλειο εξακολουθεί να είναι μία ανεξάντλητη και ανεκμετάλλευτη πηγή νέων μορίων με πολύ σημαντικό θεραπευτικό ενδιαφέρον και μόνο ένα σχετικά μικρό ποσοστό, περίπου 60.000 γνωστά είδη φυτών έχουν μελετηθεί φυτοχημικά και φαρμακολογικά από τα 750.000 που εκτιμώνται ότι υπάρχουν. Εξίσου σημαντική και απεριόριστη πηγή νέων μορίων με μικροβιακή δράση αποτελεί το θαλάσσιο περιβάλλον το οποίο είναι ελάχιστα εκμεταλλεύσιμο. Συγκεκριμένα, λιγότερο από το 1% των ειδών βακτηριδίων και το 5% των ειδών μυκήτων είναι γνωστά σήμερα (Wolfender *et al.*, 2006). Η πλούσια ποικιλία δομών αλλά και η πολυπλοκότητα των φυσικών προϊόντων ώθησε τους επιστήμονες στη σύνθεση αυτών στο εργαστήριο με σκοπό τη θεραπευτική τους χρήση. Πολλά φαρμακευτικά σκευάσματα που χρησιμοποιούνται σήμερα προέρχονται ή βασίζονται σε κάποιο φυσικό προϊόν. Φαρμακολογικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί αποδεικνύουν την βιοδραστικότητα των συστατικών που προέρχονται από τα φυτά και πάνω από το 40% αυτών είναι ήδη καταχωρημένα φάρμακα (Newman & Cragg, 2007). Επίσης, από στατιστικές μελέτες τόσο στα φυσικά όσο και στα συνθετικά συστατικά των φυσικών προϊόντων αποδεικνύεται ότι εξακολουθούν να αντιπροσωπεύουν μία σημαντική πηγή του μηχανισμού εύρεσης νέων φαρμάκων (Henkel *et al.* 1999; Butler, 2004). Τα *Melissa Officinalis*, *St. John's Wort*, *Garlic*, *Ginger*, *Ginseng* είναι κάποια δημοφιλή βότανα η φαρμακευτική χρήση των οποίων είναι επιστημονικά αποδεδειγμένη.

Εκτός από τη φαρμακευτική αξία των φυσικών προϊόντων εξίσου σημαντική είναι η παρουσία τους στη διατροφή του ανθρώπου. Επιδημιολογικές μελέτες των τελευταίων δεκαετιών έχουν οδηγήσει στη σύνδεση συγκεκριμένων συστατικών των τροφίμων με τη χαμηλή εμφάνιση διαφόρων νοσημάτων με αποτέλεσμα μία νέα αντίληψη για τη σχέση διατροφής-υγείας.

Η συνεχώς αυξανόμενη γνώση και πληροφόρηση των καταναλωτών ως προς τα φυτικά δραστικά συστατικά που περιέχονται στις φυτικές τροφές ώθησε τη βιομηχανία τροφίμων στη χρησιμοποίηση αυτών ως πρόσθετα. Η ζήτηση φυσικά ενισχυμένων προϊόντων διατροφής ή αλλιώς λειτουργικών τροφίμων (functional food) συνεχώς αυξάνεται. Γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα, μαργαρίνες, σούπες, ποτά, έλαια, αφεψήματα είναι μερικά από τα προϊόντα διατροφής στα οποία προστίθενται βιοδραστικές φυσικές ουσίες.

Στις μέρες μας, το μεγάλο ενδιαφέρον των επιστημόνων για τον τομέα των φυσικών προϊόντων, με στόχο την ανακάλυψη νέων βιοδραστικών συστατικών από φυτικά εκχυλίσματα ή εκχυλίσματα από άλλες φυσικές πηγές, έχει ως συνέπεια, εντυπωσιακά αποτελέσματα ως προς τον αριθμό νέων φυτικών δραστικών ουσιών καθώς και την ακριβή διερεύνησή τους. Για το σκοπό αυτό τα φυτικά εκχυλίσματα υποβάλλονται ταυτόχρονα τόσο σε χημικό όσο και σε βιολογικό ή φαρμακευτικό έλεγχο. Ο χημικός έλεγχος αυτών, καθώς και το μεταβολικό τους προφίλ, στοχεύει στη διάκριση μεταξύ ήδη γνωστών συστατικών και νέων μορίων απευθείας σε ακατέργαστα εκχυλίσματα. Το μεταβολικό προφίλ σε ακατέργαστα εκχυλίσματα δεν είναι μία εύκολη διαδικασία καθώς τα φυσικά προϊόντα εμφανίζουν σημαντικές διαφορές στις δομές των ενώσεών τους (Wolfender *et al.*, 2006). Επομένως, η ανάπτυξη εξειδικευμένων τεχνικών απομόνωσης και ταυτοποίησης, όπως η τεχνική της υγρής χρωματογραφίας σε σύζευξη με φασματοσκοπικές τεχνικές π.χ. φασματομετρία μάζας (MS) και φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) μπορεί να αποδειχθεί πολύτιμη στην έρευνα φυσικών προϊόντων, καθώς, τις περισσότερες φορές δίνει τη δυνατότητα αποτελεσματικού διαχωρισμού και πλήρη χαρακτηρισμό των επιμέρους συστατικών (Jaroszewski, 2005a; Jaroszewski, 2005b; Wolfender *et al.*, 2006).

## 1.1 Φαινολικές ενώσεις – Φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή και σεκοϊριδοειδή

Κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας, πολυάριθμες επιστημονικές εργασίες αναδεικνύουν το ρόλο και τις ιδιότητες, συστατικών από διάφορα φυσικά προϊόντα με ευεργετικές ιδιότητες για την ανθρώπινη υγεία. Τα ευεργετικά για την υγεία συστατικά καλούνται συχνά λειτουργικά συστατικά (*functional ingredients*), «*neutraceuticals*» (από τις λέξεις *nutrients* και *pharmaceuticals*) και βιοδραστικές ενώσεις (*bioactive compounds*). Πρόκειται για συστατικά που απαντούν σε φυτά ή και σε ζωικούς οργανισμούς σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις. Η ικανότητά τους να δρουν ως αντιοξειδωτικά, να ενεργοποιούν ένζυμα που αποτοξινώνουν το συκώτι, να εμποδίζουν τη δράση βακτηρίων ή ενζύμων, να παρεμποδίζουν την απορρόφηση της χοληστερόλης κ.ά. συσχετίζεται άμεσα με τη μείωση του κινδύνου εμφάνισης ορισμένων ασθενειών (Pennington, 2002). Στον Πίνακα 1.1 ενδεικτικά παρατίθενται παραδείγματα βιοδραστικών ενώσεων μαζί με τις σημαντικότερες πηγές τους αλλά και τα αποτελέσματα που θεωρείται ότι επιφέρουν στην υγεία του καταναλωτή.

**Πίνακας 1.1.** Πηγές και πιθανά αποτελέσματα φαινολικών ενώσεων στην υγεία<sup>a</sup>

| Βιοδραστική ένωση                                                                                                                                                                                 | Πηγή                                                                                                                                                                                           | Πιθανά αποτελέσματα στην υγεία                                                                                                                                                  |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Φλαβονοειδή</b><br>φλαβονόλες (κερκετίνη)<br>φλαβόνες (λουτεολίνη)<br>φλαβανόνες (ναριγκενίνη)<br>φλαβαν-3-όλες (κατεχίνες)<br>(προανθοκυανιδίνες)<br>ανθοκυανίνες<br>ισοφλαβόνες (γενιστεΐνη) | κρεμμύδι, μπρόκολο, μούρα<br>μαϊντανός, σέλινο, κίτρο,<br>πρόπολη, τσάι, σοκολάτα,<br>όσπρια, ροδάκινο, σταφύλι,<br>φιστίκια, αμύγδαλο,<br>μελιτζάνα, μούρα, κεράσι,<br>σόγια και προϊόντα της | δέσμευση ενεργών μορφών<br>οξυγόνου που καταστρέφουν<br>τα κύτταρα, μείωση<br>πιθανότητας εμφάνισης<br>καρκίνου                                                                 |
| <b>Φαινολικά οξέα</b><br>υδροξυκινναμωμικά<br>(καφεϊκό)<br>υδροξυβενζοϊκά (γαλλικό,<br>πρωτοκατεχικό)                                                                                             | μούρα, ακτινίδιο, μήλο,<br>καφές, αγκινάρα, φράουλα                                                                                                                                            | δέσμευση ενεργών μορφών<br>οξυγόνου που καταστρέφουν<br>τα κύτταρα, μείωση<br>πιθανότητας εμφάνισης<br>καρκίνου                                                                 |
| <b>Ταννίνες</b>                                                                                                                                                                                   | μούρα, κακάο, σοκολάτα                                                                                                                                                                         | μείωση πιθανότητας<br>εμφάνισης καρδιαγγειακών<br>παθήσεων                                                                                                                      |
| <b>Καροτενοειδή</b><br>β-καροτένιο<br>β-κρυπτοξανθίνη<br>λουτεΐνη<br>ζεαξανθίνη<br>λικοπένιο                                                                                                      | μπρόκολο, σπανάκι<br>καλαμπόκι, γκρέιπφρουτ<br>πράσινο λάχανο,<br>ντομάτα και προϊόντα της<br>(κέτσαπ, σως κ.α.)                                                                               | δέσμευση ενεργών μορφών<br>οξυγόνου που καταστρέφουν<br>τα κύτταρα, διατήρηση<br>υγιούς όρασης και υγιούς<br>δέρματος, μείωση<br>πιθανότητας εμφάνισης<br>καρκίνου του προστάτη |

<sup>a</sup> Pennington, 2002; Kris-Etherton *et al.*, 2002; Manach *et al.*, 2004; Boskou, 2006; Webb, 2006.

Τα φυτικής προέλευσης συστατικά ονομάζονται συχνά και φυτοχημικά (*phytochemicals*). Πρόκειται για δευτερογενείς μεταβολίτες που απαντούν σε διάφορα φυτά και παίζουν σημαντικό ρόλο στις μηχανικές ιδιότητες των ιστών, στην άμυνα απέναντι σε έντομα, ζώα, μικρόβια, στην υπεριώδη ακτινοβολία, στην έλξη εντόμων για λόγους γονιμοποίησης αλλά δρουν και ως αντιοξειδωτικά (Harborne and Williams, 2000; Parr and Boldwell, 2000; Webb, 2006). Από δομική άποψη, στα φυτοχημικά ανήκουν φαινολικές ενώσεις (φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα, τερπενοειδείς ενώσεις, καροτενοειδή κ.ά), ενώσεις που φέρουν στο μόριό τους άτομα θείου και αζωτούχες βάσεις, κυρίως αλκαλοειδή (Webb, 2006). Τα φυτοχημικά συστατικά παρουσιάζουν μεγάλο εύρος φυσικών και χημικών ιδιοτήτων με σημαντικότερη την ικανότητά τους να παρεμποδίζουν αντιδράσεις οξείδωσης στους φυτικούς ιστούς, στα τρόφιμα καθώς και σε βιολογικά συστήματα.

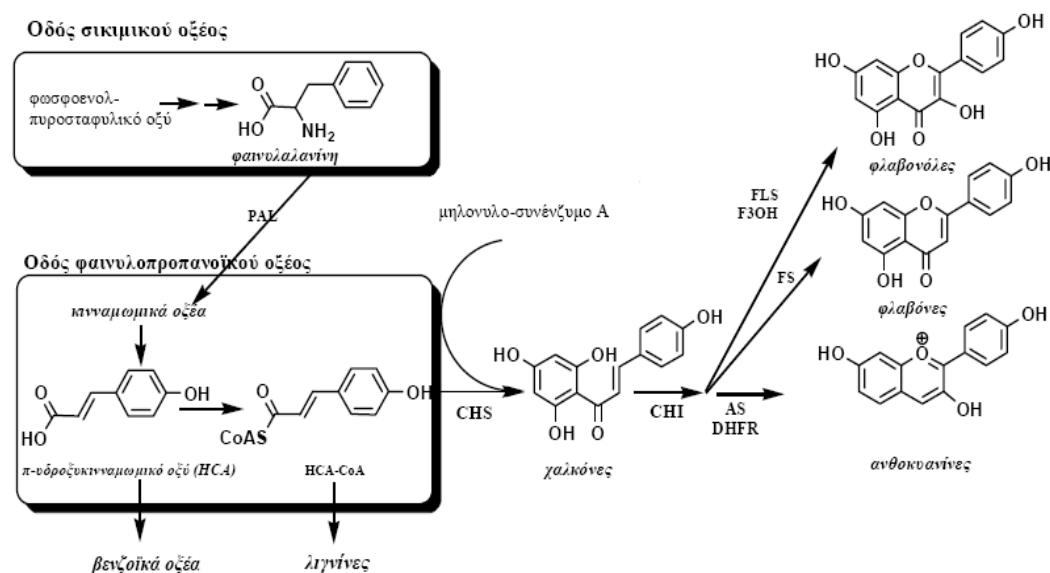
Οι φαινολικές ενώσεις εντοπίζονται σε όλα τα τμήματα των φυτών, από τις ρίζες μέχρι τα φύλλα και τους καρπούς τους, συζευγμένες μέσω εστερικών, αιθερικών ή ακεταλικών δεσμών κυρίως με σάκχαρα και οργανικά οξέα (γλυκόζη, τρυγικό οξύ, κ.ά). Για παράδειγμα, τα φλαβονοειδή απαντούν στη φύση κυρίως ως γλυκοζίτες που διαφοροποιούνται ως προς το είδος του σακχάρου π.χ. γλυκόζη, ραμνόζη, γαλακτόζη, αραβινόζη, ρουτινόζη (Harborne, 1989, Heim, 2002,). Μόνο πολύ μικρό ποσοστό τους απαντά σε ελεύθερη μορφή πιθανώς λόγω αυξημένης τοξικότητας η οποία αποδίδεται σε δυνατότητα ιονισμού των φαινολικών υδροξυομάδων και μεταφοράς πρωτονίων. Επιπλέον, οι συζευγμένες μορφές αυτών των μεταβολιτών είναι περισσότερο υδατοδιαλυτές, συγκρατώνται καλύτερα σε ενδοκυτταρικά σωματίδια, ενώ ανάλογα με το είδος τους φαίνεται να επηρεάζουν και τη βιοδιαθεσιμότητα των ενώσεων που απαντούν σε εδώδιμα φυτά (Parr και Boldwell, 2000).

Η παρουσία τους είναι τόσο διαδεδομένη στο φυτικό βασίλειο που πρακτικά είναι αδύνατο να απομονωθούν και να ταυτοποιηθούν όλα τα μέλη των φαινολικών ενώσεων που απαντούν στη φύση (Cheynier, 2005, Boskou, 2006). Η έλλειψη τυποποιημένων και εκλεκτικών μεθόδων παραλαβής των συστατικών καθιστά δυσκολότερο τον προσδιορισμό τους σε φυτικά είδη (Naczk and Shahidi, 2006).

Το ενδιαφέρον για νέες πηγές αντιοξειδωτικών εξηγεί τον τεράστιο αριθμό επιστημονικών εργασιών με αντικείμενο την αξιολόγηση του περιεχομένου παντός

είδους φυτικού υλικού σε αντιοξειδωτικές ενώσεις και στη συνέχεια την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής συμπεριφοράς τους.

Η βιοσύνθεση των φαινολικών ενώσεων περιλαμβάνει αρχικά σχηματισμό του *trans*-κινναμωμικού οξέος από το αρωματικό αμινοξύ L-φαινυλαλανίνη μέσω της οδού του σικιμικού οξέος και της γενικής μεταβολικής οδού των φαινυλοπροπανοειδών (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>). Από το *trans*-κινναμωμικό οξύ προκύπτουν στη συνέχεια οι κουμαρίνες, τα διάφορα υδροξυκινναμωμικά οξέα, οι πιο πολύπλοκες χαλκόνες και τα στιλβένια. Περαιτέρω βιομετατροπές των χαλκόνων οδηγούν στη σύνθεση ανώτερων φλαβονοειδών, ενώ από μεθοξυλιωμένα παράγωγα των υδροξυκινναμωμικών οξέων προκύπτουν οι λιγνίνες και οι λιγνάνες. Με εξαίρεση το γαλλικό οξύ, τα υπόλοιπα υδροξυβενζοϊκά οξέα προκύπτουν με αποικοδόμηση της πλευρικής αλυσίδας των αντίστοιχων υδροξυκινναμωμικών οξέων. Αντίθετα, η βιοσύνθεση του γαλλικού θεωρείται ότι γίνεται με ενζυμική μετατροπή του 3-διυδροσικιμικού οξέος, ενδιάμεσου προϊόντος της σικιμικής οδού (Parr & Bolwell, 2000; Sakihama *et al.*, 2002; Robbins, 2003). Κύρια στάδια της βιοσυνθετικής οδού των φαινολικών ενώσεων φαίνονται στο Σχήμα 1.1.



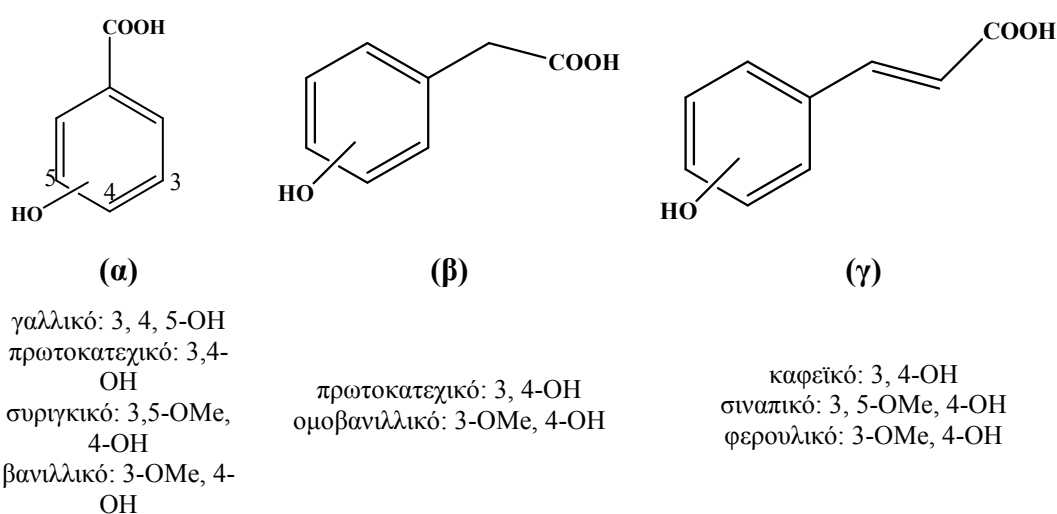
**Σχήμα 1.1.** Κύρια στάδια βιοσυνθετικής οδού των φαινολικών ενώσεων (Sakihama *et al.*, 2002)

Τα τελευταία χρόνια έχει διαμορφωθεί η αντίληψη ότι οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν τη σπουδαιότερη κατηγορία φυσικών αντιοξειδωτικών (Pokorny, 2001). Πρόκειται για την πολυπληθέστερη κατηγορία φυτοχημικών που αριθμεί περίπου

8000 μέλη τα οποία χαρακτηρίζονται από την παρουσία ενός τουλάχιστον αρωματικού δακτυλίου με έναν ή περισσότερους υδροξυ-υποκαταστάτες στο μόριό τους (Manach *et al.*, 2004; Balasundram *et al.*, 2006).

### 1.1.1 Φαινολικά οξέα – Αντιοξειδωτική δράση φαινολικών οξέων

Τα φαινολικά οξέα, τα απλούστερα μέλη των φαινολικών ενώσεων, χαρακτηρίζονται από την παρουσία καρβοξυλικής ομάδας που είτε είναι άμεσος υποκαταστάτης του δακτυλίου (υδροξυβενζοϊκά οξέα, C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>) είτε αποτελεί τελική χαρακτηριστική ομάδα της πλευρικής ανθρακικής αλυσίδας (φαινυλοξικά, C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>, φαινυλοπροπανοϊκά, κινναμωμικά οξέα, C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>) (Σχήμα 1.2) (Harborne, 1989; Rice-Evans *et al.*, 1996; Robbins, 2003). Στις τάξεις των φαινολικών οξέων περιλαμβάνονται και οι αντίστοιχες φαινόλες με αλδεϋδική ομάδα (π.χ. βανιλίνη, κινναμωμική αλδεϋδη) (Robbins, 2003).



**Σχήμα 1.2.** Δομές υδροξυλιωμένων παραγώγων: (α) βενζοϊκού οξέος, (β) φαινυλοξικού οξέος και (γ) κινναμωμικού οξέος

Οι κύριες δομικές διαφορές μεταξύ των ενώσεων αυτών αφορούν στον αριθμό και τη θέση των υδροξυ- ή/και μεθοξυ- υποκαταστατών καθώς και στα χαρακτηριστικά της πλευρικής αλυσίδας. Έτσι, η παρουσία δεύτερης υδροξυ-ομάδας σε *ορθο*- ή *παρα*- θέση ως προς το φαινολικό OH παίζει καθοριστικό ρόλο στην ικανότητα απόδοσης ατόμου υδρογόνου τόσο της απλής φαινόλης όσο και των μονο-υδροξυβενζοϊκών οξέων (Cuvelier *et al.*, 1992). Επιπλέον υδροξυ-ομάδες επηρεάζουν την αντιοξειδωτική ικανότητα της ένωσης, ανάλογα βέβαια με τη σχετική θέση τους

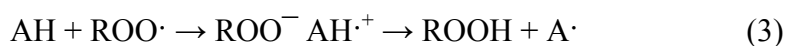
ως προς τους υπόλοιπους υποκαταστάτες. Για παράδειγμα, η παρουσία τρίτης υδροξυ-ομάδας σε *ορθο*- θέση θεωρείται ως το αποτελεσματικότερο δομικό χαρακτηριστικό φαινολών και υδροξυβενζοϊκών οξέων αφού τόσο η πυρογαλλόλη όσο και το γαλλικό οξύ είναι οι ισχυρότεροι παρεμποδιστές οξείδωσης στις αντίστοιχες τάξεις ενώσεων. Αντίθετα, η παρουσία υδροξυ- ομάδων σε *μετα*- θέση δεν έχει σημαντικό ρόλο στην αντιοξειδωτική ικανότητα. Περισσότεροι από τρεις υδροξυ-υποκαταστάτες δεν ενισχύουν τη δραστηριότητα των ενώσεων (Shahidi & Wanasundara, 1992). Η παρουσία μεθοξυ- ομάδας σε *ορθο*- θέση ως προς το φαινολικό OH είναι ευνοϊκή για τη δραστηριότητα των μονοφαινολικών ενώσεων καθώς εισάγει στο δακτύλιο παρόμοια ηλεκτρονιακά φαινόμενα με εκείνα της υδροξυ-ομάδας. Επίσης, η παρουσία δεύτερης μεθοξυ-ομάδας σε *ορθο*- θέση επιφέρει καλύτερα αποτελέσματα.

Η παρουσία  $-COOH$  ομάδας ως άμεσου υποκαταστάτη του φαινολικού δακτυλίου μειώνει τη δραστηριότητα των απλών φαινολών λόγω της ισχυρά ηλεκτραρνητικής φύσης του (Burton *et al.*, 1985; Hansch *et al.*, 1991). Ωστόσο, η συγκεκριμένη θεώρηση δεν επαληθεύεται σε όλες τις πειραματικές συνθήκες. Η αντιοξειδωτική ικανότητα των υδροξυβενζοϊκών οξέων επηρεάζεται και από τη σχετική θέση της  $-COOH$  ως προς τις υδροξυ-ομάδες. Άλλωστε, η γειτνίαση  $-OH$  και  $-COOH$  ομάδων σε μια φαινολική ένωση αφενός ευνοεί το σχηματισμό ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου και αφετέρου παρεμποδίζει στερεοχημικά την προσέγγιση άλλου μορίου με αποτέλεσμα η ένωση να καθίσταται ιδιαίτερα σταθερή (Wright *et al.*, 2001; Korth *et al.*, 2002; Bohm *et al.*, 2004). Τέλος, τα *μ*-υδροξυβενζοϊκά οξέα αναμένεται να είναι περισσότερο δραστικά από τα αντίστοιχα *ο*- και *π*-ισομερή καθώς σ' αυτή τη θέση δεν επηρεάζεται η ισχύς του δεσμού O-H από τα ηλεκτρονιακά φαινόμενα της καρβοξυλικής ομάδας (Rice-Evans *et al.*, 1996).

Είναι γενικά αποδεκτή η άποψη ότι τα υδροξυκινναμωμικά οξέα είναι ισχυρότεροι παρεμποδιστές οξείδωσης σε σχέση με τα αντίστοιχα υδροξυβενζοϊκά οξέα (Dziedzic & Hudson, 1984; Cuvelier *et al.*, 1992; Marinova & Yanishlieva, 1992; Rice-Evans *et al.*, 1996; Natella *et al.*, 1999). Η μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα των υδροξυκινναμωμικών αποδίδεται αφενός στην παρουσία διπλού δεσμού στην πλευρική ανθρακική αλυσίδα ( $-CH=CH-COOH$ ) που επιτρέπει τη σταθεροποίηση της φαινοξυ-ρίζας με περισσότερες δομές συντονισμού και

αφετέρου στην ασθενέστερη ηλεκτραρνητική ισχύ της ομάδας –COOH λόγω μεγαλύτερης απόστασης από τον αρωματικό δακτύλιο (Clifford, 2001).

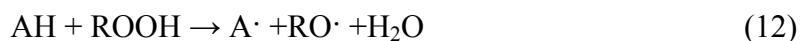
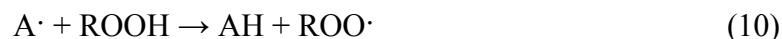
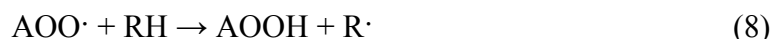
Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες των υδροξυκιναμωμικών και των υδροξυβενζοϊκών οξέων έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών τις δύο τελευταίες δεκαετίες. Μολονότι, δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί ο ρόλος των φαινολικών οξέων στα φυτά, η παρουσία τους έχει συνδεθεί με ποικίλες λειτουργίες, όπως την πρόσληψη θρεπτικών συστατικών, τη σύνθεση πρωτεϊνών, την ενζυματική δράση, την φωτοσύνθεση. Τα φαινολικά οξέα και γενικά οι φαινολικές ενώσεις δρουν δεσμεύοντας ελεύθερες ρίζες, ενώ τα ίδια καταναλώνονται καθώς μετατρέπονται σε σταθερά προϊόντα. Δύο μηχανισμοί αναφέρονται για την εξήγηση της δράσης τους. Σύμφωνα με τον πρώτο, η δέσμευση των ελευθέρων ριζών που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια του σταδίου έναρξης γίνεται με προσφορά ατόμου H από τα φαινολικά υδροξύλια προς τις υπερόξυ- (**ROO•**) (1) ή αλκόξυ- (**RO•**) (2) ρίζες. Ενώ, σύμφωνα με το δεύτερο μηχανισμό πραγματοποιείται αναγωγή **ROO•** προς το αντίστοιχο ανιόν και περαιτέρω μετατροπή του ανιόντος σε υδροϋπεροξειδίο (3).



Επίσης οι ρίζες  $A\cdot$  των ισχυρών αντιοξειδωτικών αντιδρούν με ομοειδείς ή άλλου τύπου ελεύθερες ρίζες προς σχηματισμό σταθερών προϊόντων (4, 5, 6)

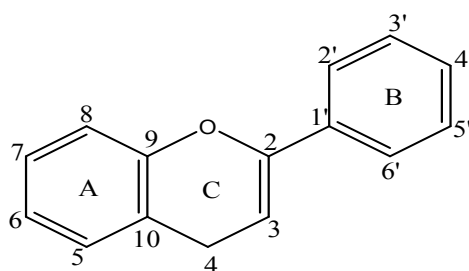


Κάτω από ορισμένες συνθήκες μπορούν να λάβουν χώρα και άλλες αντιδράσεις κατά τις οποίες η παρουσία του αντιοξειδωτικού έχει ανασταλτική δράση (Shahidi, 1997).

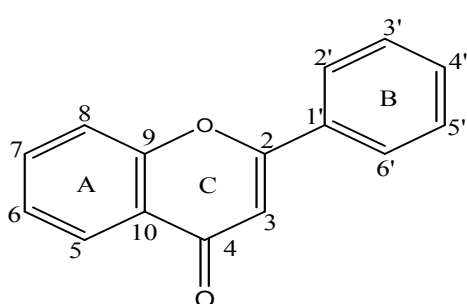


### 1.1.2 Φλαβονοειδή – Βιολογικές δράσεις φλαβονοειδών

Τα φλαβονοειδή, η πολυπληθέστερη τάξη φυτικών φαινολικών ενώσεων, είναι φυσικές χρωστικές, ο βασικός δομικός σκελετός των οποίων περιλαμβάνει δύο αρωματικούς δακτυλίους (A και B) συνδεδεμένους μεταξύ τους μέσω ενός ετεροκυκλικού πυρανικού δακτυλίου. Οι περισσότερες διαδεδομένες κατηγορίες φλαβονοειδών είναι οι φλαβόνες, οι φλαβονόλες, οι φλαβανόνες, οι φλαβανονόλες, οι χαλκόνες, οι ισοφλαβόνες, οι φλαβαν-3-όλες και οι ανθοκυανιδίνες (Σχήμα 1.3).

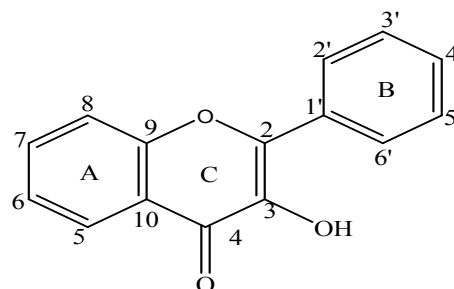


**Βασική δομή**



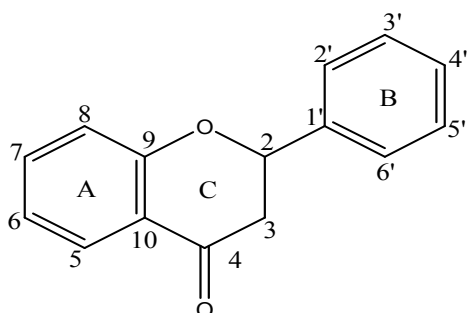
**Φλαβόνη**

λουντεολίνη: 5, 7, 3', 4'-OH  
απιγενίνη: 5, 7, 4'-OH



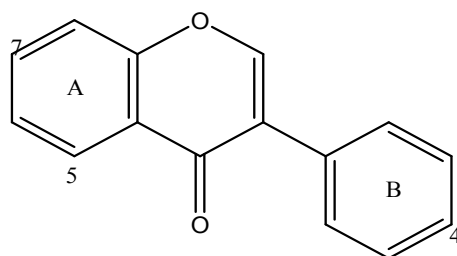
**Φλαβονόλη**

μυρικετίνη: 5, 7, 3', 4', 5'-OH  
κερκετίνη: 5, 7, 3', 4'-OH  
μορίνη: 5, 7, 2', 4'-OH



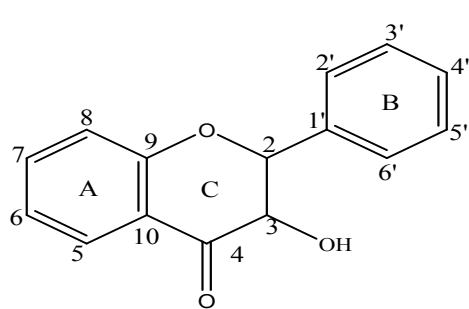
**Φλαβανόνη**

εριοδικτυόλη: 5, 7, 3', 4'-OH  
ναριγκενίνη: 5, 7, 4'-OH  
εσπερίτίνη: 5, 7, 3'-OH, 4'-OMe



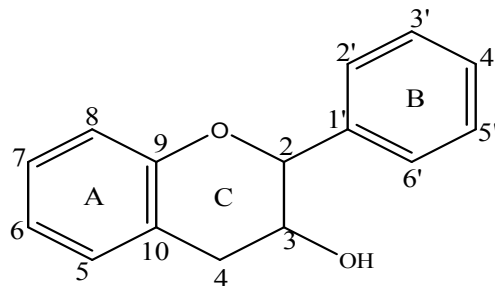
**Ισοφλαβόνη**

γενιστεΐνη: 5, 7, 4'-OH  
δαιδζεΐνη: 7, 4'-OH



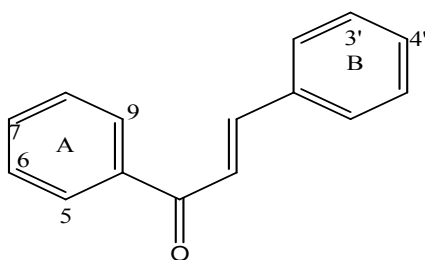
**Φλαβανονόλη**

ταξιφολίνη: 5, 7, 3', 4'-OH



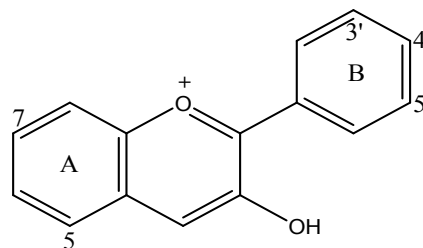
**Φλαβαν-3-όλες**

(-)-επιγαλλοκατεχίνη: 5, 7, 3', 4', 5'-OH  
(+)-κατεχίνη/(-)-επικατεχίνη: 5, 7, 3', 4'-OH



**Χαλκόνη**

Βουτεΐνη: 5, 7, 3', 4'-OH  
Ισολκιριτιγενίνη: 7, 9, 4'-OH  
Οκανίνη: 5, 6, 7, 3', 4'-OH



**Ανθοκυανιδίνη**

δελφινιδίνη: 5, 7, 3', 4', 5'-OH  
κυανιδίνη: 5, 7, 3', 4'-OH  
μαλβιδίνη: 5, 7, 4'-OH, 3', 5'-OMe

**Σχήμα 1.3.** Κύρια δομικά χαρακτηριστικά διαφορετικών τάξεων φλαβονοειδών

Τα φλαβονοειδή που απαντώνται στα φυτά τις περισσότερες φορές είναι μίγματα διαφορετικών τάξεων ενώσεων και είναι συνήθως υπό μορφή *O*-γλυκοζιτών, όπου μια ή περισσότερες υδροξυλομάδες του φλαβονοειδούς σχηματίζουν ημιακεταλικούς δεσμούς (Ιγνατιάδου-Ραγκούση, 1996). Η γλυκοζυλίωση καθιστά τα φλαβονοειδή λιγότερο δραστικά και περισσότερο υδατοδιαλυτά. Κάθε υδροξυλομάδα μπορεί να γλυκοζυλωθεί, αλλά ορισμένες θέσεις προτιμώνται, για παράδειγμα η 7-υδροξυλομάδα στις φλαβόνες, φλαβανόνες και ισοφλαβόνες, τα υδροξύλια στη θέση 3 και 7 των φλαβονολών και φλαβανολών και τα υδροξύλια στις θέσεις 3 και 5 είναι οι πιο συνηθισμένες θέσεις γλυκοζυλίωσης.

Η γλυκόζη είναι το σάκχαρο που συναντάται πιο συχνά, αλλά και η γαλακτόζη, ραμνόζη, ξυλόζη και αραβινόζη επίσης απαντώνται σε διάφορα φυτά, ενώ η μαννόζη, φρουκτόζη, γλυκουρονικό και γαλακτουρονικό οξύ είναι πιο σπάνια. Έχουν περιγραφεί από μονογλυκολυζωμένα έως και πενταγλυκοζυλιωμένα φλαβονοειδή. Επίσης, ανευρίσκονται και ως *C*-γλυκοζιτικά παράγωγα, όπου το σάκχαρο ενώνεται απευθείας με τον πυρήνα του φλαβονοειδούς με δεσμό C - C. Οι *C*-γλυκοζίτες είναι

σπανιότεροι από τους *O*-γλυκοζίτες. Οι *C*-γλυκοζίτες φλαβονοειδών διακρίνονται στους μονο-*C*-γλυκοζίτες φλαβονοειδών, δι-*C*-γλυκοζίτες φλαβονοειδών και *C*-γλυκοζίτη-*O*-γλυκοζίτη φλαβονοειδών. Μέχρι σήμερα, η *C*-γλυκοζυλίωση έχει βρεθεί μόνο στις θέσεις C-6 και C-8 της βασικής δομής των φλαβονοειδών (Andersen & Markham, 2006).

Τα κύρια δομικά χαρακτηριστικά κάθε τάξης φλαβονοειδών καθώς και εκείνα που συνεισφέρουν περισσότερο σε αποτελεσματική δράση αυτών των ενώσεων παρατίθενται παρακάτω:

- 1) Από τους τρεις δακτυλίους που απαντώνται στο δομικό σκελετό των φλαβονοειδών ο δακτύλιος A είναι ο λιγότερο σημαντικός. Ο δακτύλιος B αποτελεί κύριο στόχο των ελευθέρων ριζών (Bors *et al.*, 1990). Η παρουσία δύο υδροξυ-ομάδων σε *ορθο*- θέση (δομή κατεχόλης) συμβάλλει καθοριστικά στην αύξηση της δραστηριότητας π.χ. η κερκετίνη είναι δραστικότερη της καιμπερόλης (Cao *et al.*, 1993; Silva *et al.*, 2002). Ωστόσο, η παρουσία μεγαλύτερου αριθμού υδροξυ-ομάδων δεν ευνοεί πάντα μια αύξηση της δραστηριότητας π.χ. η μυρικετίνη δεν είναι δραστικότερη της κερκετίνης (Rice-Evans *et al.*, 1996).
- 2) Η παρουσία δύο υδροξυ-ομάδων σε *μετα*- θέσεις του δακτυλίου B (2' και 4') είναι λιγότερο αποτελεσματική π.χ. η μορίνη είναι λιγότερο δραστική από την κερκετίνη (Hotta *et al.*, 2002; Nenadis *et al.*, 2004). Η παρουσία μεθοξυ-ομάδων στις θέσεις 3' ή/ και 5' δεν φαίνεται να ενισχύει την ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών π.χ. η μαλβιδίνη είναι λιγότερο δραστική από τη δελφινιδίνη (Pannala, 2001). Παρόλα αυτά, η παρουσία δύο διμεθοξυ-ομάδων σε *ορθο*- θέση στο δακτύλιο B πιθανώς να είναι πιο σημαντική απ' όσο αυτή μιας υδροξυ-ομάδας στη θέση 4' (Dugas *et al.*, 2000).
- 3) Η παρουσία υδροξυ- ομάδας στη θέση 3 του δακτυλίου C συμβάλλει σημαντικά στη συνολική δράση της ένωσης π.χ. η κερκετίνη είναι δραστικότερη της λουτεολίνης (Rice-Evans *et al.*, 1996; Heijnen *et al.*, 2001; Hotta *et al.*, 2002).
- 4) Η παρουσία του διπλού δεσμού στις θέσεις 2 και 3 καθώς και η παρουσία οξο-ομάδας στη θέση 4 θεωρούνται σημαντικά χαρακτηριστικά όσον αφορά τη σταθεροποίηση της ρίζας του φλαβονοειδούς π.χ. η ρίζα της κερκετίνης είναι σταθερότερη αυτής της κατεχίνης (Silva *et al.*, 2002; Vaya *et al.*, 2003). Ωστόσο,

η συμβολή τους είναι σημαντική εφόσον ικανοποιούνται τα προηγούμενα δομικά κριτήρια (π.χ. δακτύλιος B με δομή κατεχόλης). Για το λόγο αυτό, διαφορές στη δραστικότητα της απιγενίνης και της ναριγκενίνης είναι δύσκολο να διαπιστωθούν (Pannala, 2001; Hotta *et al.*, 2002).

- 5) Οι γλυκοζίτες ενός φλαβονοειδούς (κυρίως 3-*O* ή 7-*O*) έχουν συνήθως ασθενέστερη δράση σε σχέση με το μη δεσμευμένο φλαβονοειδές, αν και η σχετική δραστικότητα μπορεί να εξαρτάται από τον τύπο του σακχάρου (Cos *et al.*, 1998).

Όλες οι προϋποθέσεις για ισχυρή δραστικότητα έναντι των ελευθέρων ριζών φαίνεται να ικανοποιούνται από την κερκετίνη (Bors *et al.*, 1990). Η δομή κατεχόλης στο δακτύλιο B είναι καθοριστική ακόμα και για την ικανότητα συμπλοκοποίησης μετάλλων. Σε ότι αφορά στη συμπλοκοποίηση των φλαβονοειδών με μεταλλικά ιόντα, αναφέρεται ότι οι πιθανές θέσεις δέσμευσης του μετάλλου είναι οι δύο *όρθο*-υδροξυλομάδες στις θέσεις -3' και -4' στο δακτύλιο B, και οι 4 κετο- και 3-υδροξυ- ομάδες του δακτυλίου C ή 4-κετο- και 5-υδροξυ- του δακτυλίου A.

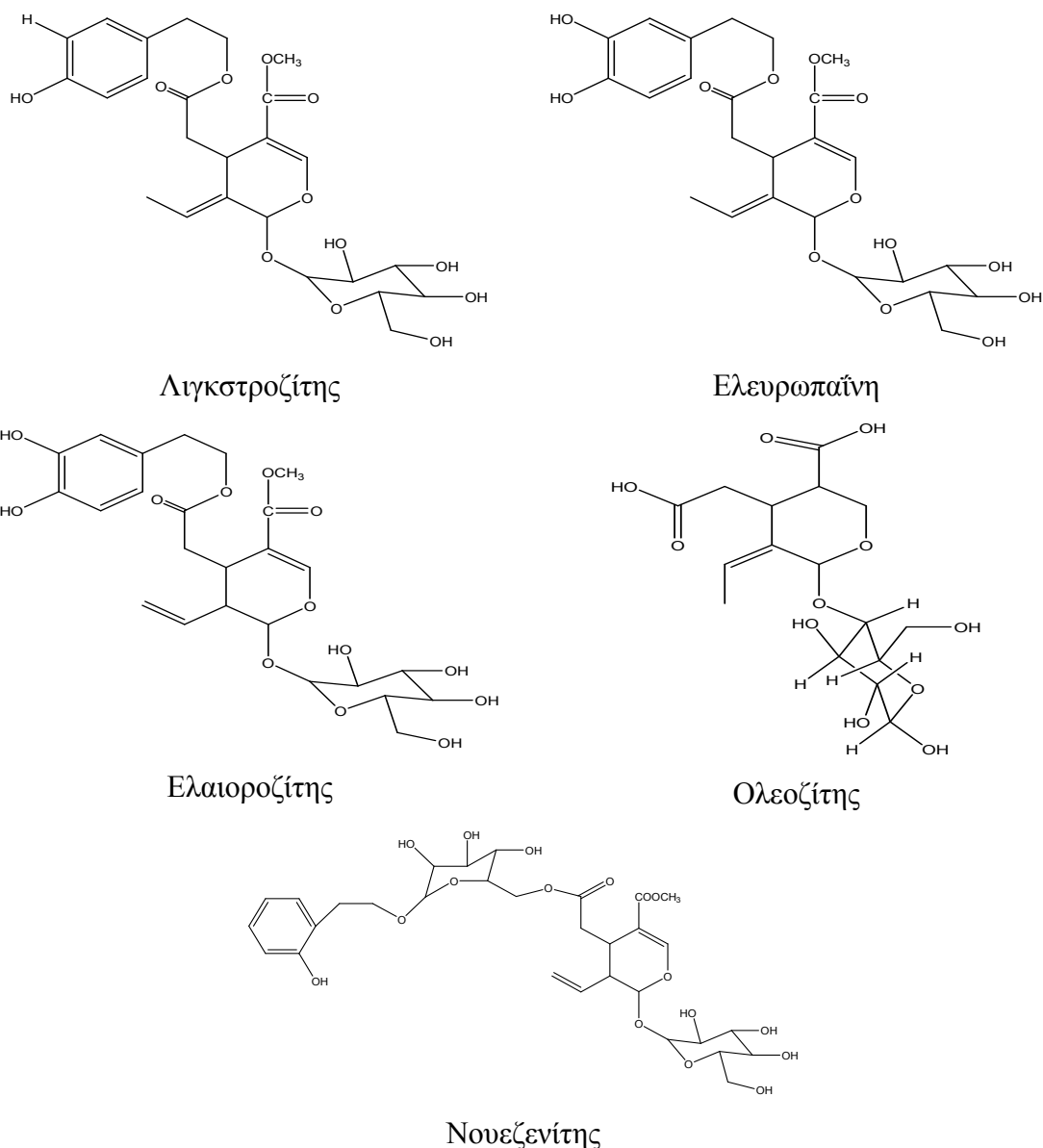
Τα φλαβονοειδή αποτελούν σημαντικά στοιχεία της ανθρώπινης διαίτας, αν και γενικά θεωρούνται ως μη θεραπευτικά συστατικά. Η πρώτη αναφορά σε βιολογική δράση των φλαβονοειδών έγινε από τους Rusznyak και Szent-Györgyi το 1936, οι οποίοι ανέφεραν ότι τα φλαβονοειδή του φλοιού των κίτρων εμποδίζουν την αιμορραγία και ευθραυστότητα των τριχοειδών αγγείων (Lorenz & Arnold, 2006). Από τότε πολλές φαρμακολογικές δράσεις έχουν αποδοθεί στα φλαβονοειδή, μεταξύ των οποίων αντιφλεγμονώδης, αντι-ηπατοτοξική, αντικαρκινική, αντιμικροβιακή, αντιμυκητιακή, αντι-ική, ανασταλτική σε ένζυμα και αντιοξειδωτική (Pietta, 2000; Rauha *et al.*, 2000; Ren *et al.* 2003)

Εξαιτίας των αντιοξειδωτικών και αντικαρκινικών ιδιοτήτων τους, τα φλαβονοειδή που βρίσκονται σε τρόφιμα και φυτικά εκχυλίσματα έχουν τύχει ιδιαίτερης προσοχής τις τελευταίες δεκαετίες. Οι μηχανισμοί οι οποίοι ευθύνονται για τα θετικά αποτελέσματα των φλαβονοειδών είναι μερικά μόνο κατανοητοί. Η αντιοξειδωτική δράση των φλαβονοειδών υπήρξε από τους πρώτους μηχανισμούς που μελετήθηκαν, με βάση τις προστατευτικές τους επιδράσεις έναντι των καρδιαγγειακών παθήσεων. Φλαβονοειδή που έχουν απομονωθεί από διάφορα φυτά, έχει παρατηρηθεί ότι μπορούν α) να δεσμεύουν διάφορες δραστικές μορφές οξυγόνου

(ROS) (παγιδεύουν τις ελεύθερες ρίζες, κυρίως τις ρίζες ανιόντος υπεροξειδίου, με τα φαινορικά OH εμποδίζοντας έτσι την καταστροφή των φωσφολιπιδίων των κυτταρικών μεμβρανών (Jovanovic *et al.*, 1994) β) να δεσμεύουν χηλικά μέταλλα (σχηματίζουν χηλικές ενώσεις με τα ιόντα σιδήρου και εμποδίζουν τον σχηματισμό ελευθέρων ριζών (Afanas'ev *et al.*, 1989), και γ) να επάγουν ορισμένα ένζυμα της φάσης II του μεταβολισμού, βοηθώντας έτσι στην απέκκριση διάφορων οξειδωμένων μορίων.

### 1.1.3. Σεκοϊριδοειδή - Βιολογικές δράσεις σεκοϊριδοειδών

Τα σεκοϊριδοειδή θεωρούνται ότι προέρχονται από τα ιριδοειδή κυρίως μέσω της οδού του μεβαλονικού οξέος και διάνοιξη του δακτυλίου του κυκλοπεντανίου των ιριδοειδών. Τόσο τα ιριδοειδή όσο και τα σεκοϊριδοειδή είναι συνήθως γλυκοζιτικές ενώσεις. Στην οικογένεια Oleaceae, τα σεκοϊριδοειδή παράγονται συνήθως από γλυκοζίτες (ολεοζίτες) σε συνδυασμό του ελενολικού οξέος με ένα σάκχαρο (Soler-Rivas *et al.*, 2000; Servili & Montedoro, 2002). Χαρακτηριστική ένωση αυτής της κατηγορίας αποτελεί η ελευρωπαϊνή ένας εστέρας του ελενολικού οξέος συνδεδεμένος με γλυκόζη και υδροξυτυροσόλη. Η ελευρωπαϊνή και τα παράγωγά της απαντούν αποκλειστικά σε γένη της οικογένειας *Oleaceae*, (*Olea europaea*, *Syringa vulgaris*, *Ligustrum lovalifolium*, *L. vulgare*, *L. lucidum*, *Osmanthus asiaticus*, *Phillyrea latifolia*) (Soler-Rivas *et al.*, 2000). Άλλα σεκοϊριδοειδή είναι τα άγλυκα της ελευρωπαϊνης και του λιγκστροζίτη (ligstroside) καθώς και τα παράγωγά τους, η διαλδεϋδική μορφή της ελευρωπαϊνης, το άγλυκο της αποκαρβοξυλιωμένης και απομεθυλιωμένης ελευρωπαϊνης, ο ελαιοροζίτης, ο ολεοζίτης, ο νουζενίτης (nuzhenide) κ.α. (Kuwajima *et al.*, 1988) (Σχήμα 1.4).



**Σχήμα 1.4.** Δομές από σεκοΐριδοειδών ενώσεων που απαντώνται στο φυτό *Ligustrum lucidum*.

Ένας από τους ευρέως γνωστούς κύριους αντιπροσώπους των σεκοΐριδοειδών είναι η ελευρωπαΐνη. Η ένωση αυτή έχει μελετηθεί από πολλούς ερευνητές και έχει δείξει πολλές φαρμακολογικές ιδιότητες μεταξύ αυτών αντιοξειδωτική (Visioli *et al.*, 2002), αντιφλεγμονώδη (Visioli *et al.*, 1998), αντι-αθηροματογόνο (Carluccio *et al.*, 2003), αντικαρκινική (Owen *et al.*, 2000), αντιμικροβιακή (Tropoli *et al.*, 2005), αντιϊκή (Ma *et al.*, 2001) και αντιγηραντική (Kimura & Sumiyoshi, 2009). Η ικανότητα της ελευρωπαΐνης να δεσμεύει ελεύθερες ρίζες είναι ευρέως γνωστή και ανάλογα με τις πειραματικές συνθήκες παρουσιάζει δράση άλλοτε μικρότερη, άλλοτε

ισοδύναμη και άλλοτε μεγαλύτερη από εκείνη της υδροξυτυροσόλης (Saija, 1998; Gordon *et al.*, 2001).

Εξαιτίας περιορισμένου αριθμού πειραματικών δεδομένων των σεκοϊριδοειδών τα διαθέσιμα στοιχεία όσον αφορά τη σχέση δομής-δραστικότητας αυτών και των παραγώγων τους είναι ελάχιστα. Σύμφωνα με αυτά κυρίως τα υδροξυτυροσολικά παράγωγα είναι δραστικά αντιοξειδωτικά (Paiva-Martins & Gordon, 2001; Servili *et al.*, 2004). Σεκοϊριδοειδή όπως ο λιγκστροζίτης και συναφή παράγωγα, τυροσολικά παράγωγα, επειδή στερούνται δομής κατεχολικών ομάδων δεν αναμένεται να παρουσιάζουν ιδιαίτερη δράση (Servilli *et al.*, 2004).

## 1.2 *Ligustrum lucidum* ως πηγή βιοενεργών συστατικών

Μεταξύ των διαφόρων πηγών φαινολικών συστατικών, τα φυτά της οικογένειας *Oleaceae* (*Ligustrum*, *Fraxinus*, *Olea*, *Jasminum*, *Osmanthus*, *Phillyrea*, *Syringa*) κατέχουν σημαντική θέση, καθώς έχουν βρεθεί φλαβονοειδή και σεκοϊριδοειδή με καλά αποδεδειγμένες βιοενεργές ιδιότητες. Στο γένος *Ligustrum* spp. υπάρχουν 50 περίπου διαφορετικά είδη τα οποία συναντώνται στην Ευρώπη, Βόρεια Αφρική, Ασία αλλά και Αμερική. Τα πιο γνωστά είναι: *Ligustrum amurense* (Carr.): Amur privet, *Ligustrum japonicum* (Thun.): Japanese privet, *Ligustrum lucidum* (Ait.f.): Tree privet ή glossy privet, *Ligustrum obtusifolium* (Sieb. και Zucc.): Blunt-leaved privet ή border privet, *Ligustrum ovalifolium* (Hassk.): California privet ή waxy-leaved privet, *Ligustrum quihoui* (Carr.): Wax-leaf privet, *Ligustrum sinense* (Lour.): Chinese privet, *Ligustrum vulgare* (L.): European privet ή common privet.

Στον Ελλαδικό χώρο συνήθως απαντώνται το *Ligustrum japonicum*, *Ligustrum lucidum* και το *Ligustrum vulgare*. Το φυτό *Ligustrum lucidum* (Ait.f.) ονομάζεται διαφορετικά και tree privet ή glossy privet ή αλλιώς κινέζικη αγριομυρτιά. Είναι ένα καταπράσινο με γυαλιστερά φύλλα μικρό δέντρο (αναπτύσσεται μέχρι ύψος 8 μέτρων) αλλά και θάμνος που αναπτύσσεται πολύ γρήγορα (Σχήμα 1.5). Το φυτό αυτό είναι αρκετά διαδεδομένο στην Ελλάδα, παρόλο που χώρα προέλευσης είναι η Κίνα, όπου κοσμεί τους δρόμους αλλά και τους φράχτες σπιτιών. Η ανθοφορία του φυτού ξεκινά το μήνα Μάιο και διαρκεί μέχρι και τον Ιούλιο ενώ η καρποφορία διαρκεί από το φθινόπωρο μέχρι την άνοιξη. Είναι ελάχιστα απαιτητικό και ιδιαίτερα ανθεκτικό σε όλες τις συνθήκες. Το χαμηλό κόστος, η διαθεσιμότητα αλλά και η γρήγορη ανάπτυξη του φυτού έχει συντελέσει στην εξάπλωσή του σε πολλά μέρη του κόσμου.

Εξαιτίας του μεγάλου επιστημονικού αλλά και βιομηχανικού ενδιαφέροντος όσον αφορά τα παραπροϊόντα της ελαιοκαλλιέργειας, ιδίως επειδή περιέχουν Ελευρωπαΐνη, υδροξυτυροσόλη αλλά και άλλα συστατικά με βιοενεργές δράσεις, η μελέτη των φύλλων του φυτού *Ligustrum lucidum* ήταν ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα. Η χημική συγγένεια των δύο φυτών αλλά και η εύκολη διάθεση φύλλων *Ligustrum lucidum* στον ελλαδικό χώρο, αποτέλεσε ισχυρό κίνητρο για την περαιτέρω μελέτη του φυτού.



Σχήμα 1.5. Το δέντρο *Ligustrum lucidum*, ανθοί και καρποί του φυτού.

### 1.2.1 Φαινολικά συστατικά του *Ligustrum lucidum*

Από τα βιοενεργά συστατικά του φυτού *Ligustrum lucidum*, το κύριο ενδιαφέρον των ερευνητών έχει επικεντρωθεί στις φαινολικές ενώσεις (απλές φαινόλες, φαινολικά οξέα, σεκοϊριδοειδή και φλαβονοειδή), ενώ το περιεχόμενό τους σε τερπενοειδείς και άλλες ενώσεις έχει μελετηθεί σε μικρότερο βαθμό. Επιπλέον, οι περισσότερες μελέτες αφορούν την σύσταση του καρπού του φυτού ενώ περιορισμένες είναι αυτές που αναφέρονται την σύσταση των φύλλων. Τα συστατικά των φύλλων είναι είτε δευτερογενείς μεταβολίτες είτε παράγωγά τους, που προκύπτουν λόγω βιομετατροπών κατά τη διάρκεια διαχείρισης του φυτικού υλικού (ξήρανση, αποθήκευση και εκχύλιση).

Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα, όσον αφορά το περιεχόμενο κλασμάτων φύλλων του *L. lucidum* σε ολικά φαινολικά είναι δύσκολο να δοθούν. Η δυσκολία οφείλεται στον περιορισμένο αριθμό εργασιών που αφορά ποσοτικά δεδομένα αλλά και στον διαφορετικό τρόπο έκφρασης των αποτελεσμάτων. Επιπλέον, οι διαφορετικές συνθήκες ξήρανσης, αποθήκευσης, εκχύλισης του φυτικού υλικού δυσχεραίνουν την εξαγωγή γενικευμένων συμπερασμάτων.

Λαμβάνοντας υπόψη τα διαθέσιμα βιβλιογραφικά δεδομένα μεταξύ των φαινολικών συστατικών των φύλλων, κύρια είναι η παρουσία φλαβονοειδών, όπως της ομάδας της φλαβόνης (απιγενίνη και λουτεολίνη) και γλυκοζίτες αυτής καθώς και, σε μικρότερα επίπεδα, η φλαβονόλη κερκετίνη. Σεκοϊριδοειδή όπως η ελευρωπαΐνη βρίσκονται σε χαμηλά ποσοστά, αλλά, ισομερή του λιγκστροζίτη και το άγλυκο αυτού καθώς και ο ελαιοροζίτης είναι από τα κύρια συστατικά. Ο νουεζενίτης και η ελευρωπαΐνη θεωρούνται τα κύρια σεκοϊριδοειδή του καρπού. Φαινολικά οξέα (γαλλικό, καφεϊκό, φερουλικό) υπάρχουν σε μικρότερα επίπεδα και αναφέρονται ως συστατικά του καρπού (Πίνακας 1.2).

Στη βιβλιογραφία, η ελευρωπαΐνη αναφέρεται ως ένα από τα κύρια συστατικά του καρπού του φυτού. Όσον αφορά τα φύλλα, το άγλυκο συστατικό της καθώς και ισομερή του λιγκστροζίτη υπερέχουν ποσοτικά. Η απουσία ή τα χαμηλά επίπεδα της ελευρωπαΐνης ως συστατικό των φύλλων πιθανό να αποδίδεται πέραν των αναμενόμενων αλληλομετατροπών μεταξύ των διαφόρων βασικών συστατικών και στο γεγονός πως το συγκεκριμένο σεκοϊριδοειδές μπορεί να παρίσταται και με άλλες

ελαφρώς διαφοροποιημένες μορφές ή ως τμήμα πιο σύνθετων ενώσεων (Paiva-Martins & Gordon, 2001; Ryan *et al.*, 2003)

Τα φύλλα του *L. lucidum* περιέχουν εκτός από φαινολικά και άλλα βιοενεργά συστατικά με κυριότερα τις τερπενοειδείς ενώσεις. Μεταξύ αυτών, έχει αναφερθεί η παρουσία ολεανολικού και ουρσολικού οξέος. Επίσης έχει αναφερθεί και η ύπαρξη διαφόρων σακχάρων (γλυκόζη, μανιτόλη, φλουκτόζη κ.α.). Στον Πίνακα 1.2 που ακολουθεί παρουσιάζονται συνοπτικά δημοσιευμένα αποτελέσματα για τα συστατικά που απαντούν στο φυτό *L. lucidum*.

**Πίνακας 1.2.** Δημοσιευμένα αποτελέσματα για τα συστατικά που απαντούν στο φυτό *L. lucidum*

| Ένωση                                                                                                                                                                                                                                               | Αναλυτικές τεχνικές                                                                                                        | Τμήμα φυτού | Βιβλιογραφική αναφορά      |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|----------------------------|
| Ουρσολικό οξύ (ursolic acid, ολεανολικό οξύ (oleanolic acid)                                                                                                                                                                                        | μικκυλιακή ηλεκτροκινητική χρωματογραφία τριχοειδούς (micellar electrokinetic capillary chromatography (MECC)              | καρπός      | Liu <i>et al.</i> , 2003   |
| Νουεζενίτης (nüzhenide), ελευρωπαΐνη (oleuropein)                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                            | καρπός      | Inouye and Nishioka, 1972  |
| 10-υδρόξυ ανάλογο της ελευρωπαΐνης (10-hydroxy-analogue of oleuropein), λιγκουσταλοζίτης A (ligustalose A), λιγκουσταλοζίτης B (ligustalose B)                                                                                                      | Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC), χρωματογραφία στήλης (CC), χρωματογραφία κατ'αντιρροή (CCC)                           | φύλλα       | Inoue <i>et al.</i> , 1982 |
| λιγκουσταλοζίτης A, λιγκουσταλοζίτης B, επικινγκιζίτης (epikingside), κινγκιζίτης (kingside), Iso-8-epikingside, 8-επικινγκιζίτης (8-epikingside), 10-υδροξυλιγκοστροζίτης (10-hydroxyligstroside) 8-διμεθυλο-κετολογανίνη (8-demethyl-ketologanin) |                                                                                                                            | φύλλα       | Kikuchi and Kakuda, 1999   |
| λιγκοστροζίτης, ισονουεζενίτης (isonuezhenide), νουεζενίτης, ολεοζίτης, νεονουεζενίτης (neonuezhenide), λουσινομοζίτης A (lucidoside A), λουσινομοζίτης B (lucidoside B), λουσινομοζίτης C (lucidoside C), λουσινομοζίτης D (lucidoside D)          | Χρωματογραφία στήλης: silica gel, ODS, D-101, Sephadex LH-20, TLC, <sup>1</sup> H-NMR, <sup>13</sup> C-NMR HMBC, NOESY, MS | καρπός      | He <i>et al.</i> , 2001a,b |
| λουσινομοζίτης C, λουσινομοζίτης A, διμεθυλοεστεράς του ολεοζίτη (oleoside dimethylester, νεονουεζενίτης, ελευρωπαΐνη, λιγκοστροζίτης                                                                                                               | Χρωματογραφία στήλης: silica gel, ODS, D-101, Sephadex LH-20, TLC                                                          | καρπός      | Ma <i>et al.</i> , 2001    |
| Σαλιντροζίτης (salidroside), σπενουεζενίτης                                                                                                                                                                                                         | RP-HPLC                                                                                                                    | καρπός      | Shi <i>et al.</i> , 1998   |

|                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                           |               |                              |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|---------------|------------------------------|
| (specnuezhenide)                                                                                                                                                                                                                                    |                                                           |               |                              |
| Γαλλικό οξύ, καφεϊκό οξύ, φερουλικό οξύ, ελαγικό οξύ, μυρικετίνη (myricetin), κερκετίνη, ρουτίνη, επικατεχίνη (epicatechin), ουρσολικό οξύ, ολεανολικό οξύ                                                                                          | RP-HPLC                                                   | καρπός        | Wang <i>et al.</i> , 2009    |
| Απιγενίνη, κοσμοσιίνη (cosmosiin), 7-O-ακετυλο-γλυκοζίτης της απιγενίνης (apigenin-7-O-acetyl-glucoside), 7-O-ρουτινοζίτης της απιγενίνης (apigenin-7-O-rutinoside), λουτεολίνη, 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης (luteolin-7-O-glucoside), κερκετίνη | silica gel and sephadex LH-20                             | καρπός        | Xu <i>et al.</i> , 2007      |
| Ουρσολικό οξύ, ολεανολικό οξύ, νουεζενίτης                                                                                                                                                                                                          | GC, HPLC, MS, <sup>1</sup> H-NMR, <sup>13</sup> C-NMR     | καρπός        | Niikawa <i>et al.</i> , 1993 |
| Μανιτόλη, σουκρόζη, γλυκόζη, φρουκτόζη                                                                                                                                                                                                              | ηλεκτροφόρηση-τριχοειδούς (capillary electrophoresis- CE) | καρπός, φύλλα | Chen <i>et al.</i> , 2005    |

### 1.2.1.α Αντιοξειδωτική ικανότητα φύλλων *L. lucidum*

Ο καρπός κυρίως, αλλά και τα φύλλα, κατέχουν σημαντική θέση στην παραδοσιακή φαρμακοποιία και ιατρική κυρίως της Κίνας και Ιαπωνίας. Οι καρποί του φυτού χρησιμοποιούνται και για την παρασκευή αφεψήματος λόγω των τονωτικών δράσεων που πιστεύεται ότι προσφέρει. Σύγχρονες φαρμακολογικές μελέτες έχουν δείξει την αντιδιαβητική και αντιοξειδωτική δράση του καρπού του φυτού (Gao *et al.* 2009). Γενικά θεωρείται ότι τονώνει το ανοσοποιητικό σύστημα, μειώνει τις φλεγμονές και προστατεύει το ήπαρ. Στην παραδοσιακή Κινέζικη ιατρική το *Ligustrum* συνδυάζεται συχνά με το φυτό *Astragalus*. Αν και χρησιμοποιείται για μεγάλο χρονικό διάστημα σε ανθρώπους με κατάθλιψη ή καρκίνο, ωστόσο χρειάζεται να γίνουν περισσότερες μελέτες για τη χρήση του φυτού *ligustrum*. (Leung & Foster, 1996).

Η αντιοξειδωτική ικανότητα φύλλων *L. lucidum* έχει αποδοθεί στα διάφορα συστατικά που περιέχει αλλά και σε πιθανή συνεργιστική δράση αυτών. Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, υπάρχουν μελέτες που αναφέρουν την δραστηριότητα ενώσεων συγγενούς δομής με την ελευρωπαΐνη όπως το άγλυκο αυτής και η

διαλδεϋδική της μορφή (Paiva-Martins & Gordon, 2001). Επίσης, η υδροξυτυροσόλη και ο γλυκοζίτης αυτής έχουν μελετηθεί για την αντιοξειδωτική τους δράση και έχουν αποδειχθεί καλοί παράγοντες δέσμευσης ριζών (Chatterjee et al., 2007). Επιπλέον ικανοποιητική είναι και η ικανότητα του εστέρα της ένωσης να δεσμεύει ελεύθερες ρίζες (Gordon et al., 2001). Ο 7-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, η λουτεολίνη και η κερκετίνη έχει αποδειχθεί ότι είναι αποτελεσματικά μέσα δέσμευσης ελευθέρων ριζών (Kosar et al., 2004).

Σύμφωνα με τα πειραματικά αποτελέσματα (Κεφάλαιο 3, 4) η παρουσία του βερμπασκοζίτη ως συστατικό των φύλλων του *L. lucidum* δεν θα πρέπει να υποτιμηθεί. Στη δομή του βερμπασκοζίτη υπάρχουν δύο κατεχολικές ομάδες και σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα η ένωση αυτή έχει διάφορες ευεργετικές δράσεις, όπως αντιφλεγμονώδη, αντιοξειδωτική, ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών και ενεργών μορφών οξυγόνου καθώς και προληπτική δράση ενάντια σε διαφόρους τύπους καρκίνου (Cayuella et al., 2006). Επίσης, η ένωση βρίσκεται χρησιμότητα σε θεραπευτικές αγωγές έναντι νευροεκφυλιστικών ασθενειών όπως το Parkinson (Sheng et al., 2002).

#### **1.2.1.β Μέθοδοι παραλαβής φαινολικών συστατικών φύλλων *L. lucidum***

Τα κριτήρια επιλογής διαλυτών για την παραλαβή φαινολικών συστατικών από φύλλα *L. lucidum* δεν διαφέρουν εκείνων που χρησιμοποιούνται ευρέως για την παραλαβή παρόμοιων συστατικών και στηρίζονται στη φύση και στα χαρακτηριστικά του μέσου εκχύλισης (πολικότητα, πτητικότητα, σημείο βρασμού, pH) και των συστατικών (διαλυτότητα, θερμική ευαισθησία).

Οι συνήθεις διαλύτες που χρησιμοποιούνται για την παραλαβή φαινολικών συστατικών είναι νερό, αιθανόλη, μεθανόλη αλλά και υδατοαλκοολικά μίγματα αυτών (Bouaziz και Sayadi, 2005; Innocenti et al., 2007). Η χρήση αλκοολούχων διαλυμάτων έχει συσχετιστεί με τη διάρρηξη των φυτικών κυτταρικών μεμβρανών (Robards, 2003). Η προσθήκη νερού στο μέσο εκχύλισης οδηγεί σε αύξηση της απόδοσης της εκχύλισης αλλά και σε περιορισμένη παραλαβή χρωστικών ουσιών (χλωροφύλλες και καροτενοειδή) (Pérez-Jiménez et al., 2008). Επίσης, χρησιμοποιούνται ακετόνη, οξικός αιθυλεστέρας αλλά και διαδοχική χρήση

διαφόρων διαλυτών αυξανόμενης πολικότητας. Μη πολικοί διαλύτες (εξάνιο, χλωροφόρμιο, πετρελαϊκος αιθέρας) χρησιμοποιούνται για την απομάκρυνση μη πολικών συστατικών ή λιγότερο πολικών (στερόλες, λιπίδια, χλωροφύλλες, καροτενοειδή). Αναγκαία είναι η χρήση θρυμματισμένου ή κονιοποιημένου ξηρού υλικού πριν τη χρησιμοποίηση του μέσου εκχύλισης

Όσον αφορά τις τεχνικές εκχύλισης η χρήση υπερήχων, μικροκυμάτων ή ρευστών σε υπερκρίσιμη κατάσταση κερδίζουν συνέχεια έδαφος (Wang & Weller, 2006; Rada *et al.*, 2007). Άλλες τεχνικές που χρησιμοποιούνται ευρέως είναι αυτή της εκχύλισης στερεού-υγρού όπου πραγματοποιείται ανάμιξη του διαλύτη εκχύλισης με το φυτικό υλικό και είτε ακολουθεί παραμονή είτε ανακίνηση είτε συνεχής διαβροχή του φυτικού υλικού για ορισμένο χρόνο (Paiva- Martins και Gordon, 2001; Shoemaker *et al.*, 2005; Di Donna *et al.*, 2007; Kalia *et al.*, 2008). Παρόλο που εκτεταμένοι χρόνοι εκχύλισης αυξάνουν την πιθανότητα εμφάνισης φαινομένων οξείδωσης ή υδρόλυσης, εντούτοις μεγάλα χρονικά διαστήματα εκχύλισης βρίσκουν συχνή εφαρμογή (Naczki & Shahidi, 2004; Cayela *et al.*, 2006).

### **1.3 Μέθοδοι ανάλυσης φαινολικών ενώσεων**

Η ανάλυση φαινολικών ενώσεων μπορεί να ποικίλει, από μία απλή χρωματομετρική δοκιμή έως τη χρήση πολύπλοκων οργανολογικών τεχνικών για απομόνωση, ποσοτικοποίηση και χαρακτηρισμό των επιμέρους συστατικών.

#### **1.3.1 Χρωματομετρικές μέθοδοι ανάλυσης φαινολικών ενώσεων**

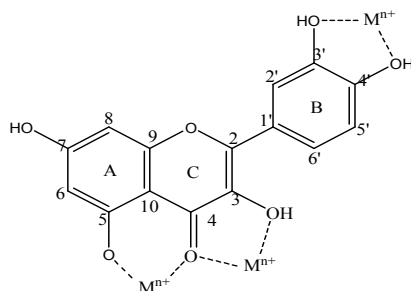
##### **1.3.1.α Προσδιορισμός ολικών φαινολών**

Η χρωματομετρική δοκιμή Folin-Ciocalteu (F-C) είναι αυτή που χρησιμοποιείται σχεδόν αποκλειστικά για την εκτίμηση του φαινολικού περιεχομένου φυτικών εκχυλισμάτων (Singleton *et al.*, 1989, Visioli & Galli, 2002, Nacz & Shahidi, 2004, Carrasco-Pancorbo *et al.*, 2005). Ο προσδιορισμός, που λαμβάνει χώρα σε αλκαλικό περιβάλλον, στηρίζεται στην αντίδραση του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu με τις λειτουργικές υδροξυ-ομάδες των φαινολικών ενώσεων, οπότε λαμβάνει χώρα οξείδωση των φαινολών και αναγωγή του αντιδραστηρίου σε μίγμα έγχρωμων οξειδίων ( $W_8O_{23}$  &  $Mo_8O_{23}$ , μπλε χρώμα). Η επιλογή του προτύπου και η σχετική συγκέντρωση των επιμέρους φαινολών στο αναλυόμενο δείγμα μπορούν να επηρεάσουν ουσιαστικά το αποτέλεσμα, καθώς η μοριακή απορρόφηση ανά δραστική ομάδα φαινολών διαφοροποιείται (Blekas *et al.*, 2002). Το ουσιαστικότερο μειονέκτημα της δοκιμής είναι η μικρή εκλεκτικότητά της, καθώς η παρουσία αναγόντων σακχάρων, ασκορβικού οξέος, διοξειδίου του θείου, αμινοξέων, ιόντων σιδήρου και ψευδαργύρου, αλκαλοειδών, πρωτεϊνών μπορεί να παρεμποδίσουν τον προσδιορισμό και επιπρόσθετα απαιτείται αρκετός χρόνος για την ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων. Παρόλα τα μειονεκτήματα που παρουσιάζει αυτή η ευρέως χρησιμοποιούμενη δοκιμή, δεν έχει επιτευχθεί αντικατάστασή της με άλλη τεχνική.

##### **1.3.1.β Προσδιορισμός ολικών φλαβονοειδών, ολικών τανινών, καφεϊκού οξέος και παραγώγων του**

Τα ολικά φλαβονοειδή προσδιορίζονται με σχηματισμό συμπλόκου μεταξύ του ιόντος αργιλίου  $Al(III)$  και των καρβονυλικών και υδροξυλικών ομάδων των φλαβονοειδών. Τα έγχρωμα προϊόντα της συμπλοκοποίησης μπορούν εύκολα να προσδιοριστούν χρωματομετρικά (Harborne, 1999, Nacz & Shahidi, 2004). Σε ένα φλαβονοειδές τα πιθανά κέντρα συμπλοκοποίησης είναι οι κατεχολικές ομάδες του

δακτυλίου B και οι 3- ή 5-υδροξυ 4-καρβονυλο-ομάδες των δακτυλίων A και C (Pietta, 2000). (Σχήμα 1.6).



**Σχήμα 1.6.** Κέντρα συμπλοκοποίησης φλαβονοειδών-μετάλλων

Στην περίπτωση υποστρωμάτων με ταυτόχρονη παρουσία φλαβονοειδών και άλλων ενώσεων που έχουν συγγενή δομικά και χημικά χαρακτηριστικά με αυτά των φλαβονοειδών (π.χ. κατεχολικές ομάδες) εμπεριέχεται κίνδυνος εσφαλμένων εκτιμήσεων (συμπροσδιορισμός). Στη βιβλιογραφία, η εκτίμηση των ολικών φλαβονοειδών ενός φυτικού υλικού πραγματοποιείται κυρίως μέσω δύο δοκιμών συμπλοκοποίησης μετάλλων-φλαβονοειδών (Naczek & Shahidi, 2006). Η διαφοροποίηση των δοκιμών έγκειται στην απουσία ή παρουσία του αντιδραστηρίου  $\text{NaNO}_2$  (Zhishen *et al.*, 1999) και την ύπαρξη ή όχι οξέος.

Το συνολικό καφεϊκό οξύ μετριέται με προσθήκη διαλύματος  $\text{AlCl}_3$  σε μεθανολικό εκχύλισμα φαινολικών, ρύθμιση του pH στο 4.8 με διάλυμα  $\text{NH}_4\text{Cl}$  και στη συνέχεια μέτρηση της απορρόφησης αυτού. Ο προσδιορισμός των ανθοκυανινών πραγματοποιείται με προσθήκη  $\text{Al(III)}$  σε όξινο pH (pH = 1 - 3.5) (Serra-Bonvehí *et al.* 2001).

Παρά το γεγονός ότι συνιστώνται τέτοιου τύπου χρωματομετρικές δοκιμές, η εκλεκτικότητά τους θεωρείται συχνά αμφισβητήσιμη στην περίπτωση σύνθετων υποστρωμάτων όπως είναι τα φυτικά εκχυλίσματα (Malešev & Kuntić, 2007).

### 1.3.2 Χρωματογραφικές μέθοδοι ανάλυσης φαινολικών ενώσεων

Κλασικές τεχνικές χρωματογραφίας όπως χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (thin layer chromatography, TLC), χρωματογραφία στήλης (column chromatography, CC) και χρωματογραφία χάρτου (paper chromatography, PC) χρησιμοποιούνται ευρέως μέχρι σήμερα για το διαχωρισμό φαινολικών ενώσεων εξαιτίας της ευκολίας

που παρουσιάζουν ως μέθοδοι και του χαμηλού τους κόστους. Η χρωματογραφία TLC είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για μία γρήγορη ανάλυση φυτικών εκχυλισμάτων για βιοενεργά συστατικά πριν την σε βάθος ανάλυσή τους με οργανολογικές τεχνικές. Χρωματογραφία TLC, CC και PC χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό και την ταυτοποίηση φαινολικών οξέων και φλαβονοειδών σε εκχυλίσματα φυτών της οικογένειας *Cruciferae* (Emam *et al.*, 2009). Οι συμβατικές χρωματογραφικές τεχνικές (PC, TLC, CC) γενικά στερούνται της ευαισθησίας και της διακριτικής ικανότητας που συχνά απαιτείται για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό ενώσεων που βρίσκονται σε ίχνη.

Η υψηλής ταχύτητας χρωματογραφία κατ' αντιστροφή (high speed counter-current chromatography- HSCCC) έχει χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό πολυφαινολών από πράσινο και μαύρο τσάι (Degenhardt *et al.*, 2000a; Degenhardt *et al.*, 2000b). Είναι σχετικά μια νέα μέθοδος και είναι η πιο εξελιγμένη μορφή χρωματογραφίας κατ' αντιστροφή (counter-current chromatography- CCC όσον αφορά την απόδοση κατανομής και το χρόνο διαχωρισμού. Η HSCCC είναι μία παρασκευαστική υγρή χρωματογραφική τεχνική βασιζόμενη στην κατανομή συστατικών μεταξύ δύο μη αναμίξιμων υγρών φάσεων. Σε αντίθεση με άλλες χρωματογραφικές τεχνικές, στη χρωματογραφία HSCCC δεν χρησιμοποιείται στερεή υποστήριξη όπως η στατική φάση, γι' αυτό και έχει πολλά πλεονεκτήματα σε σύγκριση με τη συμβατική χρωματογραφία. Χρωματογραφία HSCCC εφαρμόστηκε και για το διαχωρισμό κατεχινών, ταννίνων, προανθοκυανιδίων, καροτενοειδών, και γλυκοζιτών των φλαβονολών (Degenhardt *et al.*, 2000b). Είναι πολύ ευέλικτη τεχνική και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την κλασμάτωση ακατέργαστων φυτικών εκχυλισμάτων ή για τα τελικά στάδια καθαρισμού (Marston, 2007).

Η αέρια χρωματογραφία (gas chromatography, GC) χρησιμοποιείται περιορισμένα για την ανάλυση φαινολικών, παρά την υψηλή διακριτική ικανότητα και ευαισθησία της, εξαιτίας του γεγονότος ότι η πλειοψηφία των φαινολικών ενώσεων δεν είναι πτητικές ενώσεις. Η εφαρμογή της επίσης περιορίζεται εξαιτίας της δυσκολίας που παρουσιάζει για το διαχωρισμό και καθαρισμό σε μεγάλης κλίμακας αναλύσεις. Για να πραγματοποιηθεί ανάλυση σε μη πτητικές ενώσεις θα πρέπει αυτές να παραγωγοποιηθούν με διάφορα σιλιανοποιημένα μέσα. Η χρωματογραφία GC χρησιμοποιείται ευρέως για το διαχωρισμό αιθέριων ελαίων από βότανα, όπως η καρβακρόλη και η θυμόλη. Ιδιαίτερα, η χρωματογραφία GC όταν

συνδέεται με φασματομετρία μαζών προσφέρει εξαιρετική ευαισθησία και εκλεκτικότητα. Όπως προαναφέρθηκε, πριν από τη χρωματογραφία τα φαινολικά συστατικά συνήθως μετατρέπονται σε περισσότερο πτητικά συστατικά με μεθυλίωση. Μια βελτιωμένη διαδικασία παραγωγοποίησης χρησιμοποιώντας παραγωγοποίηση-εκχύλιση σε φιαλίδιο (in-vial derivatisation-extraction) χρησιμοποιήθηκε από τους Fiamegos *et al.*, 2003, 2005 για τη ανάλυση μεθυλιωμένων φλαβονοειδών σε διάφορα δείγματα βοτάνων με την αέρια χρωματογραφία σε σύζευξη με φασματογράφο μάζας (gas chromatography-mass spectroscopy GC-MS). Επίσης, σε βιολογικά υγρά έχει αναφερθεί η ανάπτυξη μιας υπερ-ευαίσθητης μεθόδου GC-MS για τον ποσοτικό προσδιορισμό κατεχίνης, κουερσετίνης και ρεσβερατρόλης.

Επίσης, η χρωματογραφία υπερκρίσιμου ρευστού (supercritical fluid chromatography, SFC) αποτελεί ένα νέο επίτευγμα της τεχνολογίας και παρουσιάζει πολλές ομοιότητες με τη χρωματογραφία HPLC. Ωστόσο, λόγω της χρήσης υπερκρίσιμου ρευστού, όπως είναι το διοξείδιο του άνθρακα, έχει διάφορα πλεονεκτήματα έναντι της HPLC. Τα φαινολικά παρουσιάζουν μεγαλύτερη ικανότητα για διάχυση σε ένα υπερκρίσιμο ρευστό, γιατί ένα τέτοιο υγρό έχει μικρό ιξώδες, και έτσι βοηθάει στη πιο ομοιογενή διάχυση των συστατικών στα υλικά πλήρωσης, με αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη διαχωριστική ικανότητα και τον ταχύτερο χρόνο διαχωρισμού. Η θερμοκρασία, η πίεση και η σύσταση του ρευστού της κινητής φάσης μπορούν να αλλάξουν οπότε μπορεί πιο εύκολα να προκύψει καλύτερος διαχωρισμός. Οι περισσότερες αναφορές που υπάρχουν στη βιβλιογραφία για ανάλυση φαινολικών συστατικών με χρωματογραφία SFC σχετίζονται με το διαχωρισμό σχετικά λιπόφιλων αντιοξειδωτικών. Αυτό είναι αναμενόμενο, καθώς το CO<sub>2</sub>, που είναι μη-πολικό μόριο είναι το πιο δημοφιλές υπερκρίσιμο ρευστό.

Η ηλεκτροφόρηση-ηλεκτροχρωματογραφία τριχοειδούς (capillary electrophoresis, CE) όπως η χρωματογραφία HSCCC και η SFC, είναι σχετικά νέα τεχνική, ωστόσο αντιπροσωπεύει μια εναλλακτική μέθοδο για την ανάλυση διαφορετικών τάξεων-ομάδων ενώσεων αφού παρέχει υψηλής απόδοσης διαχωρισμό σε μικρούς χρόνους ανάλυσης. Διάφοροι μέθοδοι χρωματογραφίας CE είναι διαθέσιμες: (1) η ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδές (capillary zone electrophoresis, CZE), (2) η μικκυλιακή ηλεκτροκινητική χρωματογραφία (micellar electrokinetic chromatography, MEKC), (3) η ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς μέσω πηκτής (capillary gel electrophoresis, CGE), (4) ισοηλεκτρικής εστίασης σε τριχοειδές (capillary

isoelectric focusing), (5) η ηλεκτροχρωματογραφία σε τριχοειδές (capillary electrochromatography, CEC) και (6) η μη-υδατική CE. Η πιο απλή μέθοδος CE είναι η CZE, στην οποία ο διαχωρισμός των ενώσεων στην ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς στηρίζεται στις διαφορές του λόγου μάζα προς φορτίο των συστατικών και το σχηματισμό συμπλόκων με τετραβορικά μόρια, εφόσον το φαινολικό συστατικό διαθέτει ο-υδροξυ-ομάδες. Ο πρώτος διαχωρισμός πολικών συστατικών με τη μέθοδο CE πραγματοποιήθηκε από τους Terabe *et.al.*, 1984. Υπάρχουν διαφορετικοί τύποι στους διαχωρισμούς με CE. Η ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδές (capillary zone electrophoresis, CZE) έχει χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό ισοφλαβόνων σε σόγια (Mellenthin & Galensa, 1999). Ορισμένα από τα πλεονεκτήματα της CE είναι ότι δεν χρησιμοποιείται καθόλου ή μικρή ποσότητα, οργανικού διαλύτη, απαιτείται πολύ μικρή ποσότητα δείγματος και μικρότερος χρόνος ανάλυσης π.χ για το διαχωρισμό οκτώ ισοφλαβόνων χρειάστηκαν 8 λεπτά με τη CZE και 50 λεπτά με τη HPLC (Mellenthin & Galensa, 1999).

Οι Wulf και Nagel, 1976, χρησιμοποίησαν υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ανάστροφης φάσης (reverse phase high performance liquid chromatography, RP-HPLC) σε συνδυασμό με στήλη από silica gel και ισοκρατικό πρόγραμμα έκλουσης για το διαχωρισμό φαινολικών συστατικών. Από τότε η RP-HPLC είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για τον προσδιορισμό φαινολικών συστατικών. Η πολλαπλή χρησιμότητα της HPLC έχει να κάνει και με την ύπαρξη διαφορετικών τρόπων διαχωρισμού και μεθόδων ανίχνευσης, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγεται ο ανιχνευτής συστοιχίας διόδων (diode array detector, DAD) σε σύζευξη με φασματομετρία μαζών (mass spectroscopy, MS). Για το διαχωρισμό φαινολικών οξέων και φλαβονοειδών οι χρωματογραφικές συνθήκες μεθόδων HPLC περιλαμβάνουν τη χρήση, σχεδόν αποκλειστικά, μια στήλης C18 ανάστροφης φάσης, ανιχνευτή απορρόφησης UV-vis συστοιχίας διόδων (DAD) και ένα δυαδικό σύστημα διαλυτών που αποτελείται από οξινισμένο νερό (διαλύτης A) και ένα πολικό οργανικό διαλύτη (διαλύτης B). Ο διαλύτης A συνήθως περιέχει υδατικά οξέα ή πρόσθετα, όπως φωσφορικά. Ο διαλύτης B είναι συνήθως καθαρή ή οξινισμένη μεθανόλη ή ακετονιτρίλιο.

Γενικά για τον υγροχρωματογραφικό διαχωρισμό φαινολικών συστατικών, όπως προαναφέρθηκε, χρησιμοποιείται χρωματογραφία ανάστροφης φάσης με στήλη C18 ή C8 (σπανιότερα). 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  $\mu\text{m}$ . Ο διαχωρισμός λαμβάνει χώρα συνήθως σε θερμοκρασία δωματίου και σπανιότερα σε υψηλές θερμοκρασίες. Η χρήση δυο στηλών βελτιώνει ακόμη περισσότερο το διαχωρισμό των συστατικών που περιέχονται σε πολύπλοκα δείγματα (Blahova, *et al.*, 2006, Jandera 2006). Για την έκλυση των φαινολικών ενώσεων χρησιμοποιείται είτε ισοκρατική είτε βαθμωτή έκλυση. Το ακετονιτρίλιο και η μεθανόλη είναι οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι οργανικοί διαλύτες και σε πολλές περιπτώσεις η χρήση ακετονιτρίλιου 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 τετραϋδροφουρανίου και 2-ισοπροπανόλης ως λιγότερο πολικών διαλυτών με σημαντική εκλουστική ικανότητα αναφέρεται περιστασιακά. Επίσης, σημαντικό ρόλο στον επιτυχή διαχωρισμό των αναλυόμενων ουσιών παίζει η επιλογή του οξέος που προστίθεται στην κινητή φάση. 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 όπως οξικό, μυρμιγκικό, φωσφορικό οξύ και σπανιότερα υπερχλωρικό. Μερικές φορές προτιμάται και η χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων φωσφορικών ή κιτρικών. Η χρήση φωσφορικών ως ρυθμιστικού διαλύματος είναι χρήσιμο να αποφεύγεται στην περίπτωση που χρησιμοποιείται ως ανιχνευτής η φασματομετρία μαζών διότι προκαλούν πρόβλημα στην πηγή ιόντων (Dalluge, *et al.*, 1998, Stalikas, 2007).

Τα φαινολικά συστατικά γενικά ανιχνεύονται με τη χρήση ανιχνευτών υπεριώδους/ορατού (UV/Vis), συστοιχίας φωτοδιόδων (PDA) και UV-φθορισμού. Οι ενώσεις φαινολικού τύπου αποτελούνται τουλάχιστον από έναν αρωματικό δακτύλιο με αποτέλεσμα να απορροφούν στο υπεριώδες-ορατό. Απλοί υποκατάστατες όπως μεθυλομάδες, μεθοξυ-ομάδες επηρεάζουν ελάχιστα τα μέγιστα απορρόφησης. Το μέγιστο μήκος κύματος  $\lambda_{\text{max}}$  για το κινναμωμικό οξύ και τα παράγωγά του είναι περίπου στα 320nm, και το αντίστοιχο για τα βενζοϊκά οξέα, τις φλαβαν-3-όλες (συμπεριλαμβάνονται και τα διμερή τους) και τις διϋδροχαλκόνες είναι περίπου στα

280 nm. Το μέγιστο μήκος κύματος  $\lambda_{\max}$  για τις φλαβονόλες είναι συνήθως γύρω στα 360 nm ενώ για τις ανθοκυανίνες στα 520 nm. Τα φλαβονοειδή εμφανίζουν συγκεκριμένα φάσματα με δύο μέγιστα. Το πρώτο μέγιστο που βρίσκεται στα 240-280 nm οφείλεται στο δακτύλιο A ενώ το δεύτερο μέγιστο που εμφανίζεται στα 300-550 nm εξαρτάται από τους υποκατάστατες του δακτυλίου C (Mabry, *et al.*, 1970). Άλλες μέθοδοι που έχουν αναφερθεί για την ανίχνευση φαινολικών συστατικών περιλαμβάνουν ανιχνευτή συστοιχίας ηλεκτροχημικής κουλομετρίας, τεχνικών ανίχνευσης χημικής αντίδρασης κ.α.

Όλες οι παραπάνω χρωματογραφίες TLC, HPLC, GC και CE είναι χρήσιμες μέθοδοι για την ανάλυση φυσικών προϊόντων. Η χρωματογραφία HPLC, παρότι χαρακτηρίζεται ως τεχνική με ικανοποιητική ακρίβεια και αναπαραγωγιμότητα, απαιτεί παρατεταμένη προκατεργασία των δειγμάτων για την απομάκρυνση καταλοίπων στερεών υλικών. Ωστόσο, η ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς εξελίσσεται ολοένα και αναγνωρίζεται ως μια γρήγορη και αποτελεσματική αναλυτική τεχνική διαχωρισμού, αλλά η αναπαραγωγιμότητα και η εκλεκτικότητά της είναι κατώτερες της HPLC.

Στις παραπάνω μεθόδους διαχωρισμού (HPLC, CE, SFC, HSCCC) συνήθως χρησιμοποιούνται οι ίδιες τεχνικές ανίχνευσης και ιδιαίτερα ανιχνευτές UV-Vis-DAD και MS. Η φασματοφωτομετρία UV-Vis έχει εκτενώς χρησιμοποιηθεί για ποσοτικοποίηση οργανικών ενώσεων που απορροφούν στην υπεριώδη και ορατή περιοχή του φωτός (ηλεκτρομαγνητικού φάσματος). Τα περισσότερα φαινολικά που παρουσιάζουν και αντιοξειδωτική δράση έχουν πολλούς συζυγιακούς διπλούς δεσμούς ή αρωματικά συστήματα που απορροφούν σε αυτή την περιοχή του φωτός. Η εφαρμογή του ανιχνευτή UV-Vis και συγκεκριμένα ο συνδυασμός της χρωματογραφίας HPLC και του ανιχνευτή DAD, παίζει σημαντικό ρόλο στην ταυτοποίηση φαινολικών ενώσεων.

Παρότι οι ανιχνευτές UV-vis και DAD παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες για την ταυτοποίηση φαινολικών ενώσεων σε φυτικά εκχυλίσματα, η χρήση τους περιορίζεται όταν τα δείγματα περιέχουν πολλές παρόμοιες ενώσεις. Για την πλήρη ταυτοποίηση της δομής τους, είναι συνήθως απαραίτητες άλλες τεχνικές όπως η συζευγμένη τεχνική υγρής χρωματογραφίας με φασματομετρία MS και αυτή με φασματοσκοπία NMR.

### 1.3.3 Φασματοσκοπία NMR $^1\text{H}$ και φαινολικές ενώσεις

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (nuclear magnetic resonance, NMR) είναι μια από τις πιο σημαντικές και ευρέως διαδεδομένες αναλυτικές μεθόδους για την επίλυση της δομής των ενώσεων. Η μεγάλη ανάπτυξη των μεθόδων NMR στην ανάλυση φυτικών εκχυλισμάτων οφείλεται σε διάφορους λόγους. Σχετικά με την προετοιμασία του δείγματος, τις περισσότερες φορές η εκχύλιση του προσδιοριζόμενου συστατικού και ο καθαρισμός του δεν είναι απαραίτητα. Για παράδειγμα, υγρά τρόφιμα, όπως το κρασί, ο χυμός φρούτων και το ξίδι μπορούν να αναλυθούν χωρίς κάποια επεξεργασία παρά μόνο με την προσθήκη δευτεριωμένου διαλύτη και εσωτερικού προτύπου, αλλά και λίπη και έλαια μπορούν επίσης να αναλυθούν μετά τη διάλυση τους σε κατάλληλο δευτεριωμένο διαλύτη, κυρίως  $\text{CDCl}_3$ . Επίσης, έχει πραγματοποιηθεί ανάλυση παρθένου ελαιολάδου με φασματοσκοπία NMR, για τον προσδιορισμό της γεωγραφικής προέλευσης και της πιθανής νοθείας του (Hidalgo and Zamora, 2003, Christophoridou and Dais, 2006). Πειράματα για τον χαρακτηρισμό του κρασιού (Orgnic *et al.*, 2001), τσαγιού (Le Gall *et al.*, 2004) και ντοματοχυμού (Sobolev *et al.*, 2003) έχουν πραγματοποιηθεί με τη φασματοσκοπία NMR  $^1\text{H}$ . Σε άλλη μελέτη, δείγματα πράσινου τσαγιού διαφοροποιήθηκαν ανάλογα με τη χώρα προέλευσης τους (Le Gall *et al.*, 2004). Η ανάλυση με τη φασματοσκοπία NMR  $^1\text{H}$  δεν προκαλεί καταστροφή του δείγματος και των συστατικών του, ούτε και χρειάζεται κάποιο στάδιο παραγωγοποίησης για την ανίχνευση αυτών, καθώς κάθε μόριο που έχει υδρογόνα μπορεί να ανιχνευθεί με την πρωτονιακή φασματοσκοπία NMR  $^1\text{H}$ . Σύμφωνα με τους Caligianni *et al.*, 2007 η πρωτονιακή φασματοσκοπία NMR με τον κορεσμό των σημάτων του νερού επιτρέπει το γρήγορο και ταυτόχρονο προσδιορισμό υδατανθράκων (γλυκόζης και φρουκτόζης), οργανικών οξέων (οξικού, φορμικού, λακτικού, μαλικού, κιτρικού, συκκινικού και ταρταρικού οξέος), αλκοολών και πολυολών (αιθανόλης, ακετοΐνης, 2,3-βουτανεδιόλης, υδροξυμεθυλφουρφουράλης) και πτητικών συστατικών (οξικού αιθυλεστέρα) σε δείγματα ξυδιού. Σε εκχυλίσματα ginger, μαύρου πιπεριού και σκόνης τσίλι ταυτοποιήθηκαν και προσδιορίστηκαν ποσοτικά τα πτητικά τους συστατικά με φασματοσκοπία NMR  $^1\text{H}$  (Catchpole *et al.*, 2003). Οι Exarchou *et al.*, 2002b εφαρμόζοντας φασματοσκοπία NMR  $^1\text{H}$  μιας διάστασης προσδιόρισαν την παρουσία των φλαβόνων λουτεολίνης, και απιγενίνης και της φλαβονόλης κερκετίνης σε διάφορα μεθανολικά φυτικά εκχυλίσματα της οικογένειας *Lamiaceae*. Επίσης,

ταυτοποιήθηκε ποιοτικά και ποσοτικά η παρουσία υπερικίνης και ψευδοϋπερικίνης σε εκχυλίσματα βάλαμου και σε συμπληρώματα διατροφής που έχουν ως βάση το βάλαμο (Tatsis *et al.*, 2007).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η εφαρμογή της φασματοσκοπίας NMR  $^1\text{H}$  στη μελέτη της σύστασης βιολογικών υγρών, όπως αίματος και ούρων, αιωρημάτων κυττάρων ακόμη και ιστών. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα εφαρμογής της στην ανάλυση βιολογικών υγρών, έγκειται στο ότι, σε μια και μόνο μέτρηση είναι δυνατή η ανάλυση σχεδόν όλων των οργανικών ενώσεων που περιέχονται σε αυτά σε ανιχνεύσιμες συγκεντρώσεις. Επιτρέπει δηλαδή, τον ακριβή και ταυτόχρονο ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό σχεδόν όλων των μεταβολιτών που υπάρχουν στο προς ανάλυση δείγμα ενώ παράλληλα μεγιστοποιεί και την πιθανότητα να αναγνωριστούν σημαντικοί αλλά μη αναμενόμενοι ή ακόμη και άγνωστοι μεταβολίτες.

Στο φάσμα NMR  $^1\text{H}$  παρατηρείται αναπόφευκτα επικάλυψη των σημάτων συντονισμού, επειδή υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός συστατικών που συνεισφέρουν. Κάθε διαφορετικό από χημικής άποψης άτομο υδρογόνου ή ομάδα ατόμων υδρογόνου εμφανίζει τη δική του χημική μετατόπιση, η οποία αυξάνει τη διασπορά των σημάτων κατά μήκος του φάσματος. Η πολυπλοκότητα των πρωτονιακών φασμάτων αυξάνεται λόγω των συζεύξεων spin-spin, παρότι και αυτές αποτελούν σημαντικές πηγές πληροφοριών όσον αφορά τη δομή των μορίων. Διάφοροι διαλύτες και μίγματα διαλυτών έχουν χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση φυτών, ανάλογα με το αν το ενδιαφέρον της μελέτης στρέφεται σε πολικά ή μη συστατικά ή και τα δύο. Μια προζυγισμένη ποσότητα δείγματος (συνήθως 15-30 mg λυοφιλιωμένου ξηρού δείγματος) διαλύεται σε δευτεριωμένο διαλύτη (400- 750  $\mu\text{l}$ ) μεταφέρεται σε ένα σωληνάριο NMR και αμέσως γίνεται η λήψη του φάσματος. Ως αποτέλεσμα η όλη διαδικασία είναι μια από τις πιο εύκολες διαδικασίες προετοιμασίας για την ανάλυση ενός δείγματος.

Η χρήση της φασματοσκοπίας NMR  $^1\text{H}$  εμφανίζει μεγάλο αριθμό πλεονεκτημάτων όπως είναι η επαναληψιμότητα και η μη καταστρεπτική φύση της μεθόδου. Ένα από τα κύρια πλεονεκτήματα όμως της μεθόδου είναι ότι η ένταση κάθε σήματος-κορυφής NMR (ή της περιοχής κάτω από το σήμα), ανεξάρτητα από τη χημική του μετατόπιση, είναι ανάλογη του αριθμού των πυρήνων που είναι υπεύθυνοι για το σήμα αυτό. Ένα ακόμη από τα πλεονεκτήματα της φασματοσκοπίας NMR

είναι η μεγάλη ευαισθησία της σε μικρές αλλαγές της μοριακής δομής μιας ένωσης. Αυτό το γεγονός σε συνδυασμό με την εξαιρετικά υψηλή διακριτική ικανότητα των μοντέρνων οργάνων εξασφαλίζει την παρατήρηση διακριτών κορυφών που αποδίδονται σε μεμονωμένες χαρακτηριστικές ομάδες μορίων, οι οποίες μπορούν να ολοκληρωθούν ανεξάρτητα από άλλες απορροφήσεις του φάσματος. Το κρίσιμο όμως πλεονέκτημα της φασματοσκοπίας NMR έναντι χρωματογραφικών μεθόδων είναι το γεγονός ότι δεν απαιτείται σημαντικός χρόνος προετοιμασίας. Ωστόσο, ένα από τα βασικά μειονεκτήματα της φασματοσκοπίας NMR  $^1\text{H}$  είναι η χαμηλή ευαισθησία της καθώς και ότι ο ποσοτικός προσδιορισμός είναι δυνατός μόνο στην περίπτωση που τα σήματα που ολοκληρώνονται διαχωρίζονται καλά. Η αλληλοεπικάλυψη σημάτων συντονισμού είναι ένας από τους κύριους περιορισμούς της μεθόδου.

#### **1.3.4 Συζευγμένη τεχνική LC-MS και φαινολικές ενώσεις**

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 σκοπό την παροχή πληροφοριών για την ταυτοποίηση της δομής των ενώσεων. Υπάρχουν δυο κύριοι τύποι τεχνικών ιονισμού για τις φαινολικές ενώσεις, οι τεχνικές ιοντισμού-ψεκασμού όπως ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (electrospray ionization, ESI), (Σχήμα 1.7), θερμοψεκασμό (thermospray) και χημικό ιοντισμό ατμοσφαιρικής πίεσης (atmospheric pressure chemical ionization, APCI) και οι τεχνικές ιοντισμού-εκρόφησης που περιλαμβάνουν τον ιοντισμό μέσω βομβαρδισμού με ταχεία άτομα (fast atom bombardment, FAB), τον ιοντισμό εκρόφησης πλάσματος (plasma desorption, PD) και τον ιοντισμό εκρόφησης με λέιζερ υποβοηθούμενο από τη μήτρα (matrix-assisted laser desorption ionization, MALDI).

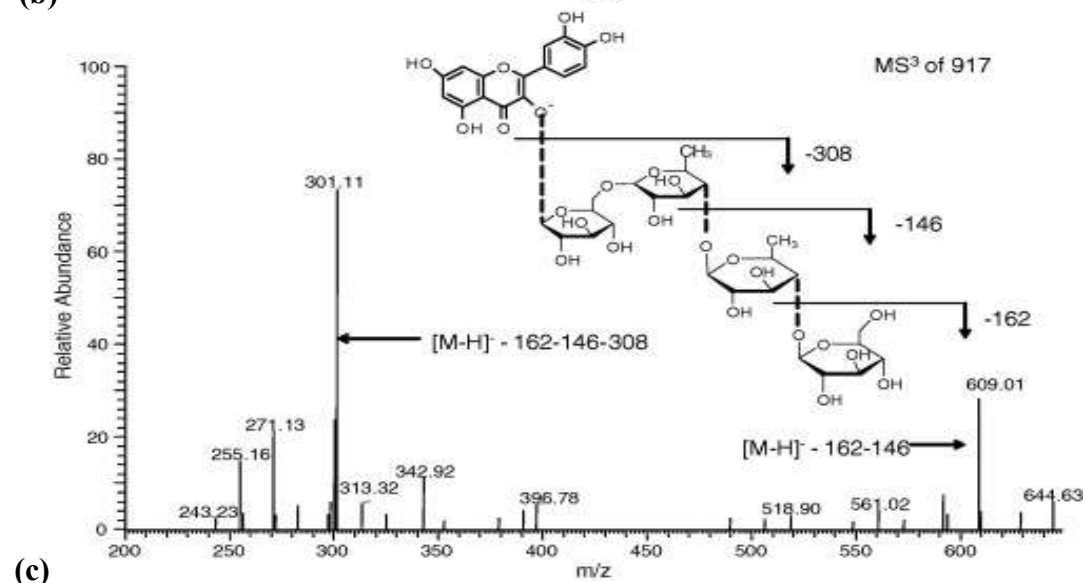
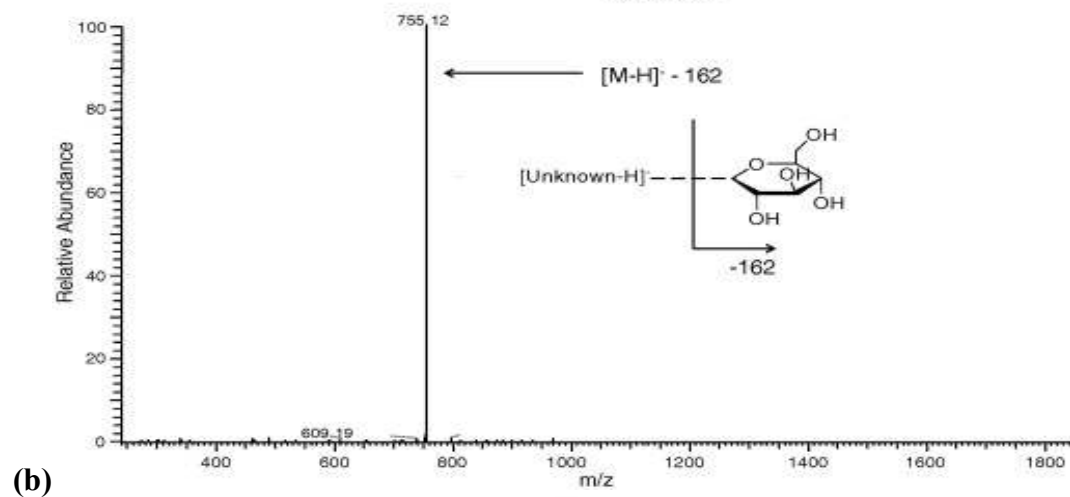
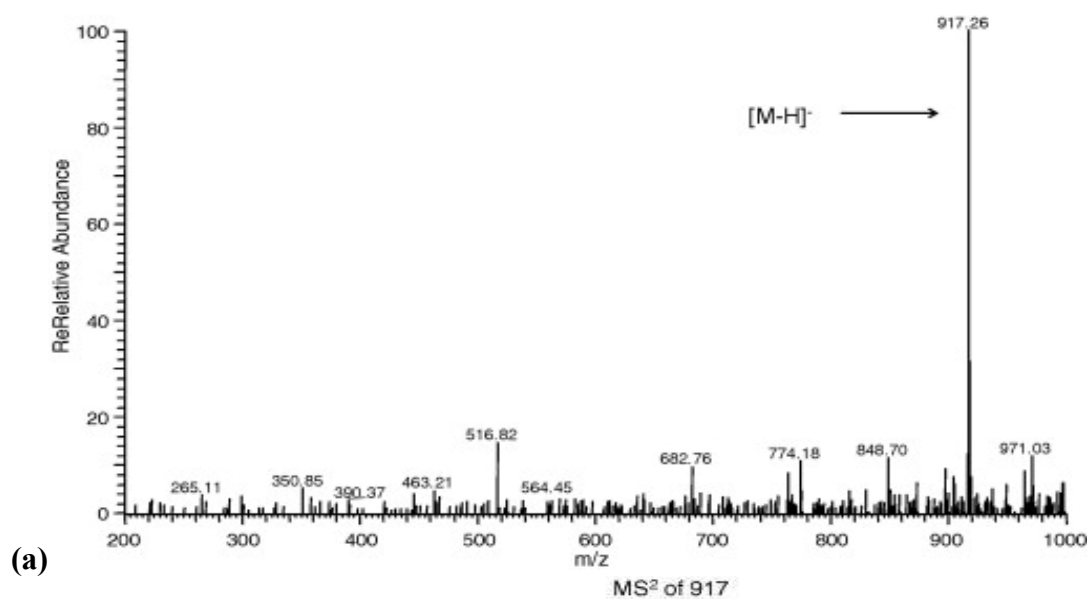


**Σχήμα 1.7.** Σύστημα υγρής χρωματογραφίας σε σύζευξη με φασματογράφο μάζας με ιοντισμό με ηλεκτροψεκασμό ( LC-ESI- MS).

Οι μέθοδοι ESI και APCI είναι οι ευρέως διαδεδομένες μέθοδοι ιοντισμού και τα περισσότερα εμπορικά όργανα χρωματογραφίας σε σύζευξη με φασματομετρία μαζών μπορούν να προσαρμόσουν και τις δυο τεχνικές. Η τεχνική ESI χρησιμοποιείται πιο συχνά για τον ιοντισμό αντιοξειδωτικών μορίων που είναι πολικά μόρια ενώ η τεχνική APCI χρησιμοποιείται για λιγότερο πολικά και μη-ιοντικά αντιοξειδωτικά. Η εκλεκτικότητα και η ευαισθησία της ανίχνευσης μπορεί να αυξηθεί χρησιμοποιώντας συζευγμένη φασματομετρία μαζών (tandem mass spectrometry), π.χ. σύστημα με δυο (MS-MS) ή περισσότερους (MS<sup>n</sup>) συζευγμένους αναλυτές μαζών σε σειρά για επίτευξη διαχωριστικότητας παραπλήσιων λόγων m/z. Τα συστήματα MS-MS και MS<sup>n</sup> παράγουν μεγαλύτερη θραυσματοποίηση του κύριου-πρόδρομου ιόντος και των θυγατρικών ιόντων, παρέχοντας πρόσθετες δομικές πληροφορίες για την ταυτοποίηση των ενώσεων. Σε μελέτη του Flamini, 2003, σε εκχυλίσματα σταφυλιών και κρασιού επισημαίνεται ότι οι τεχνικές LC-MS θεωρούνται οι πιο αποτελεσματικές για τη μελέτη της δομής ανθοκυανίνων και ειδικότερα η μέθοδος MS-MS επιτρέπει το χαρακτηρισμό των άγλυκων των ανθοκυανίνων αλλά και των γλυκοζιτών αυτών.

Η φασματομετρία μαζών βασίζεται στη δημιουργία μοριακού ιόντος ( $M^{\cdot-}$  ή  $M^+$ ) το οποίο, 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 στη συνέχεια και νέα. 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 (Chapman, 1993). Στη συνέχεια παρατίθεται παράδειγμα δακτυλικού αποτυπώματος γλυκοζιλιωμένου φλαβονοειδούς με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας σε σύζευξη με φασματογράφο μάζας LC-ESI-MS (Ding *et al.*, 2008). Σύμφωνα με το Σχήμα 1.8 το φάσμα μάζας της υπό εξέταση κορυφής παρουσιάζει κύριο θραύσμα στα  $[M-H]^-$  917 m/z. Στο δευτερογενές φάσμα μάζας  $MS^2$  του μοριακού ιόντος παρατηρείται ένα κύριο θραύσμα  $[M-H-162]^-$  ( $[M-H-γλυκόζη]^-$ ) στα 755 m/z, υποδεικνύοντας την παρουσία ενός μορίου γλυκόζης. Το τριτογενές φάσμα μάζας  $MS^3$  έδειξε την παρουσία ενός θραύσματος  $[M-H-146]^-$  ( $[M-H-ραμνόζη]^-$ ) στα 609 m/z, δηλώνοντας την παρουσία ενός μορίου ραμνόζης και ενός  $[M-H-308]^-$  ( $[M-H-ρουτινιζίτη]^-$ ) στα 301 m/z, δηλώνοντας την παρουσία ενός μορίου ρουτινοζίτη. Σύμφωνα με το μονοπάτι θραυσματοποίησης η κορυφή αυτή ταυτοποιήθηκε ως 2-Rhamnosyl-2-glucosyl quercetin.



**Σχήμα 1.8.** Φάσματα (a) MS και (b) MS<sup>2</sup> και (c) MS<sup>3</sup> της ένωσης 2-Rhamnosyl-2-glucosyl quercetin (Ding et al., 2008).

Ένα ιδιαίτερο πλεονέκτημα της συνδυαστικής τεχνικής LC-MS είναι η ικανότητά της να προσδιορίζει τόσο ελεύθερες όσο και συζυγιακές μορφές μορίων. Τόσο η χρωματογραφία GC όσο και η τεχνική GC-MS δεν μπορούν να ανταγωνιστούν την ταχύτητα της τεχνικής LC-MS(/MS) και τη δυνατότητα στην εξέταση πλήθους δειγμάτων γνωστών και αγνώστων συστατικών. Επιπλέον, αντίθετα με τη μέθοδο GC-MS, η ανάλυση με LC-MS δεν προϋποθέτει απαραίτητα, κάποια διαδικασία εκχύλισης. Τέλος, η σύνδεση της micro και/ ή nano-LC με συζευγμένα όργανα MS διευκολύνει την ανάλυση μικροσκοπικών δειγμάτων. Για μια πιο λεπτομερή διευκρίνιση της δομής μορίων, οι συμπληρωματικές πληροφορίες που προκύπτουν από μια LC-NMR ανάλυση είναι πρωταρχικής σημασίας. Για μεγάλης κλίμακας αναλύσεις η χρήση της UPLC σε σύζευξη με MS, εμφανίστηκε ως μια εναλλακτική μέθοδος των παραδοσιακών τεχνικών HPLC (Stalikas, 2007.) Στα πλεονεκτήματα της μεθόδου περιλαμβάνεται και η ηπιότητα της διαδικασίας του ηλεκτροψεκασμού. Το σημαντικότερο πλεονέκτημα της τεχνικής ESI-MS σε σχέση με άλλες τεχνικές ήπιου ιοντισμού, όπως οι FAB και MALDI, είναι η συμβατότητα 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.

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. Ένα σύστημα LC-UV-MS δίνει μια ολοκληρωμένη εικόνα για την άγνωστη ένωση καθώς 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).

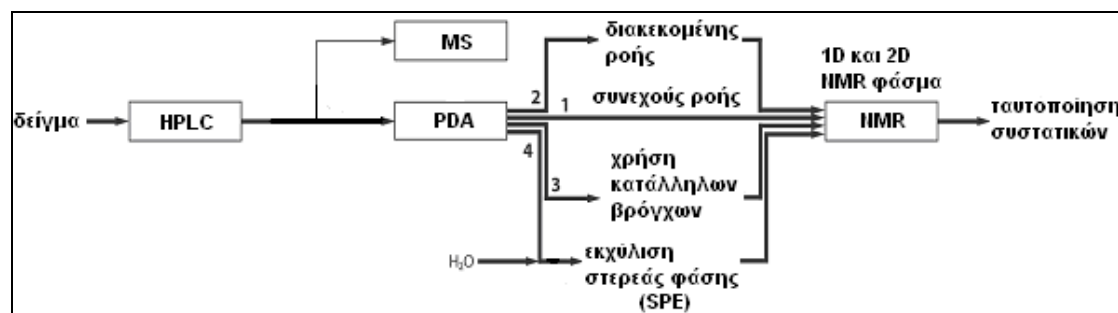
### **1.3.5 Συζευγμένη τεχνική LC-NMR και φαινολικές ενώσεις**

Εκτός από την συζευγμένη τεχνική υγρής χρωματογραφίας - φασματοσκοπίας μάζας (LC-MS) τα τελευταία χρόνια έχει κερδίσει σημαντικό έδαφος και η χρήση άλλων συνδυαστικών τεχνικών όπως της υγρής χρωματογραφίας- φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (LC-NMR). Στις μέρες μας, οι συζευγμένες

μέθοδοι LC-NMR και LC-NMR-MS έχουν εξελιχθεί σε αναλυτικά όργανα ρουτίνας σε πολλά εργαστήρια.

Η άμεση σύνδεση της LC με τη φασματοσκοπία NMR, προτάθηκε 20 χρόνια πριν (Albert, *et al.*, 1989). Ωστόσο η επιτυχής και πρακτική σύζευξη LC-NMR επιτεύχθηκε την τελευταία δεκαετία, ως αποτέλεσμα μιας σειράς τεχνικών εξελίξεων, όπως: (i) η αύξηση ισχύος του μαγνητικού πεδίου των φασματογράφων NMR, (ii) η ανάπτυξη και η βελτιστοποίηση των υποδοχέων δειγμάτων (probe), (iii) η ανάπτυξη μεθοδολογιών για επαρκή καταστολή των σημάτων των διαλυτών και (iv) εξελίξεις που αφορούν τη σύνδεση των οργάνων LC και NMR.

Συνήθως, η οργανολογία LC-NMR αποτελείται από αντλίες LC, στήλες και ανιχνευτές UV, τα οποία συνδέονται «on-line» με ένα φασματόμετρο NMR, όπως φαίνεται στο Σχήμα 1.9. Η άμεση σύζευξη απαιτεί την ανάπτυξη καταλλήλων διασυνδέσεων, διατάξεων «flow-probe», αποτελεσματικών παλμικών ακολουθιών για την καταστολή των σημάτων του διαλύτη, και νέου αυτοματοποιημένου λογισμικού. Επίσης, είναι διαθέσιμοι διάφοροι υποδοχείς ροής (flow-probes) με δραστικό όγκο 20-120  $\mu\text{L}$  που προσφέρουν καλύτερη ευαισθησία μάζας σε σχέση με τους συμβατικούς υποδοχείς NMR. Ο πιο συνηθισμένος τρόπος σύνδεσης της LC και με τους δυο ανιχνευτές NMR και MS είναι ο παράλληλος τρόπος, όπου το εκλουόμενο διάλυμα διαμοιράζεται ώστε να ακολουθήσει δυο παράλληλες ροές. Η ισορροπία μεταξύ των δυο χωρισμένων ροών μπορεί να ρυθμιστεί χρησιμοποιώντας ένα μεταβλητό διαμοιραστή (variable splitter). Επειδή η φασματοσκοπία NMR είναι λιγότερο ευαίσθητη από τη φασματοσκοπία MS, η συνήθης αναλογία κατανομής είναι 95:5 για το NMR έναντι του MS.



**Σχήμα 1.9.** Σχηματική αναπαράσταση των συστημάτων LC-NMR-MS

Σε μια συνεχούς ροής (on-flow) διάταξη, ο φασματογράφος NMR λειτουργεί ως ανιχνευτής UV ή MS σε ένα χρωματογραφικό σύστημα, και το δείγμα παραμένει στον υποδοχέα ροής (flow-probe) μόνο για ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, της τάξεως μερικών δευτερολέπτων έως μερικών λεπτών. Ο χρόνος παραμονής εξαρτάται από τον όγκο του υποδοχέα ροής (flow-probe) και από την ταχύτητα ροής που χρησιμοποιείται στο διαχωρισμό. Το αποτέλεσμα συνήθως απεικονίζεται ως δισδιάστατο (2D) διάγραμμα χρόνου-συχνότητας (ppm), που αποτελείται από το φάσμα μιας διάστασης (frequency domain) έναντι του χρόνου κατακράτησης, παρόμοιο με ένα διάγραμμα LC-DAD. Παρά τον περιορισμένο χρόνο παραμονής του προσδιοριζόμενου συστατικού στον υποδοχέα ροής NMR (flow-probe), που επηρεάζει αρνητικά την ποιότητα και την ευαισθησία του φάσματος, τα πειράματα συνεχούς ροής (on-flow) ήταν τα πρώτα πειράματα LC-NMR που πραγματοποιήθηκαν και εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται ακόμη συχνά. Το μοντέλο συνεχούς ροής (on-flow) είναι το πιο απλό, κατάλληλο για ένα γρήγορο έλεγχο, παρέχοντας το φάσμα NMR  $^1\text{H}$  ενός μίγματος και έχει σημασία κυρίως για τα μεγαλύτερης έντασης σήματα συντονισμού των κύριων συστατικών. Οι πιο διαδεδομένοι διαλύτες που χρησιμοποιούνται είναι  $\text{CH}_3\text{CN-D}_2\text{O}$ , που έχουν χρησιμοποιηθεί τόσο σε ισοκρατική όσο και σε βαθμωτή έκλουση. Όταν χρησιμοποιείται βαθμωτή έκλουση για τον διαχωρισμό LC, οι χημικές μετατοπίσεις NMR των πρωτονίων του διαλύτη και του προσδιοριζόμενου συστατικού εξαρτώνται από τη σύσταση του διαλύτη και διαρκώς μεταβάλλονται καθώς καταγράφεται το φάσμα κατά τη διάρκεια της χρωματογραφικής ροής. Οι *Wolfender et al.*, περιγράφουν πολυάριθμες εφαρμογές του LC-NMR συνεχούς ροής (on-flow) στην ανάλυση φυτικών εκχυλισμάτων.

Προκειμένου να διεξαχθούν δισδιάστατα πειράματα NMR 2D και να διευκρινιστούν οι δομές όλων των συστατικών, το δείγμα θα πρέπει να αναλυθεί υπό στατικές συνθήκες. Υπάρχουν δυο μέθοδοι με τις οποίες μπορούν να πραγματοποιηθούν πειράματα NMR υπό συνθήκες μη συνεχούς ροής (non-flowing): (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

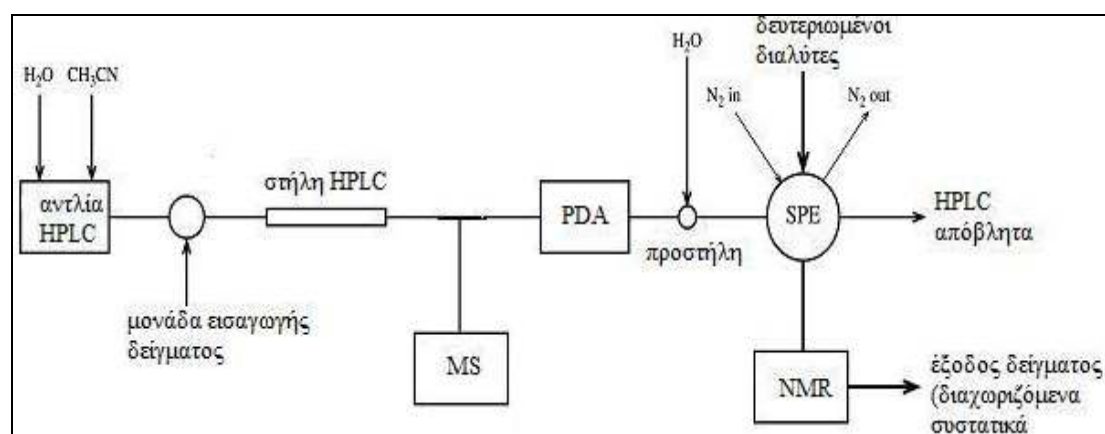
υγροχρωματογραφικό διαχωρισμό και τη μετέπειτα ανάλυση τους (Exarchou, *et al.*, 2005).

Στο μοντέλο διακεκομμένης ροής (stopped flow) ο ανιχνευτής UV που παρακολουθεί το διαχωρισμό, καθοδηγεί τον αναλυτή να προσδιορίσει το χρόνο υστέρησης,  $t_d$ , που αντιστοιχεί στο χρόνο που απαιτείται για τη μεταφορά του προσδιοριζόμενου συστατικού από την κυψελίδα UV στη βέλτιστη θέση μέσα στον υποδοχέα ροής NMR (flow-probe). Αυτός ο χρόνος υστέρησης εξαρτάται από την ταχύτητα ροής του χρωματογραφικού διαχωρισμού και το μήκος και τη διάμετρο της σωλήνωσης που χρησιμοποιείται για να συνδέει τον ανιχνευτή UV με την κυψελίδα ροής NMR (flow-cell). Μόλις ο χρόνος  $t_d$  έχει καθοριστεί για το διαθέσιμο υλισμικό (hardware), το λογισμικό μπορεί να ρυθμιστεί ώστε να σταματάει αυτόματα η ροή της χρωματογραφικής έκλουσης στο χρόνο  $t_d$ , αφότου το προσδιοριζόμενο συστατικό έχει περάσει από τον ανιχνευτή LC. Μετά την καταγραφή των δεδομένων NMR, η χρωματογραφική ροή ξεκινά ξανά και η διαδικασία επαναλαμβάνεται για το επόμενο προσδιοριζόμενο συστατικό. Ωστόσο, οι συχνές διακοπές μπορεί να διαταράξουν την ποιότητα του διαχωρισμού και συστατικά που βρίσκονται σε υψηλή συγκέντρωση μπορεί να παραμείνουν στην κυψελίδα ανίχνευσης NMR (επίδραση μνήμης-memory effect). Κατά συνέπεια το μοντέλο διακεκομμένης ροής (stopped flow) συνιστάται για την ανάλυση μιγμάτων που αποτελούνται από περιορισμένο αριθμό συστατικών. Στο πεδίο των φυσικών προϊόντων ο συνδυασμός των διατάξεων συνεχούς ροής (on-flow) και διακεκομμένης ροής (stopped flow) έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα.

Στο μοντέλο βρόχου-αποθήκευσης (loop-storage) η χρωματογραφική ροή δεν διακόπτεται αλλά κάθε κορυφή του χρωματογραφήματος που αντιστοιχεί σε ένα προσδιοριζόμενο συστατικό αποθηκεύεται σε ένα μεμονωμένο τριχοειδή βρόχο για τη μεταγενέστερη καταγραφή των δεδομένων NMR σε ένα επόμενο στάδιο. Με τη χρήση της τεχνικής βρόχου-αποθήκευσης, προβλήματα που οφείλονται στις πολλές διακοπές της ροής μπορούν να αποφευχθούν. 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; Bringmann, *et al.*, 2001; Dachtler, *et al.*, 2001; Louden, *et al.*, 2002).

Ένα από τα πιο σοβαρά μειονεκτήματα της μεθόδου LC-NMR είναι το γεγονός ότι είναι αναγκαία η χρήση δευτεριωμένων διαλυτών στο χρωματογραφικό διαχωρισμό, το οποίο αυξάνει σημαντικά το κόστος της ανάλυσης. Προκειμένου να μειωθεί η κατανάλωση των ακριβών δευτεριωμένων διαλυτών, μια μονάδα εκχύλισης στερεάς φάσης θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί και να προκύψει η διάταξη LC-SPE-NMR (Σχήμα 1.10).

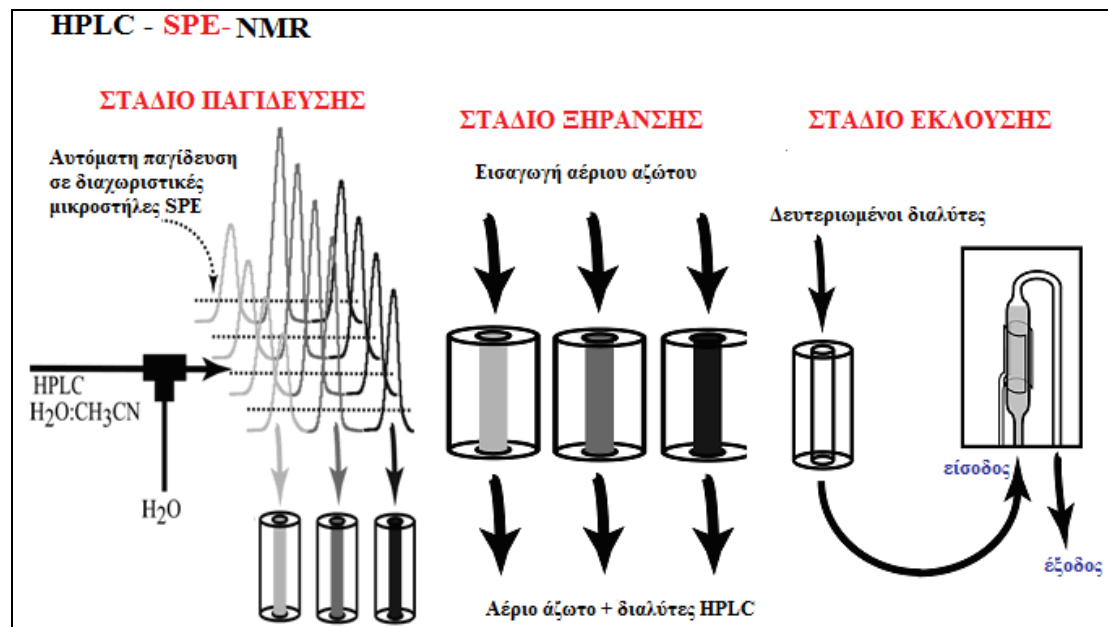


**Σχήμα 1.10.** Τυπική οργανολογική διάταξη LC-SPE-NMR- MS (Jaroszewski, 2005)

Η εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) είναι μια εξαιρετικά αποτελεσματική τεχνική για την επαναληπτική, γρήγορη και εκλεκτική προετοιμασία δείγματος. Υπάρχουν διάφορες τεχνικές για την «on-line» σύζευξη της SPE με τις τεχνικές LC-UV, LC-MS και LC-NMR, οι οποίες έχουν ως σκοπό τη συμπύκνωση του δείγματος πριν τον διαχωρισμό LC. Εναλλακτικά, έχει αναφερθεί η χρήση μιας προστατευτικής στήλης-προστήλης μετά τον διαχωρισμό LC, για τη συμπύκνωση του εκλουόμενων ενώσεων πριν την ανάλυση με τη φασματοσκοπία NMR, αλλά και η χρήση μιας SPE διαχωριστικής μικροστήλης (cartridge) που μπορεί να αντικατασταθεί και είναι συνδεδεμένη με έναν υποδοχέα ροής NMR (flow-probe), που έχει σκοπό την αύξηση της ευαισθησίας της τεχνικής LC-NMR.

Στην πειραματική διάταξη LC-SPE-NMR, η μονάδα SPE τοποθετείται «on-line» ανάμεσα στη στήλη LC και στον υποδοχέα ροής NMR (flow-probe). Τα προσδιοριζόμενα συστατικά, που διαχωρίζονται στο στάδιο της LC, αραιώνονται με νερό μετά τη στήλη και παγιδεύονται αυτόματα σε μη πολικές διαχωριστικές μικροστήλες SPE. Στη συνέχεια στο στάδιο ξήρανσης με άζωτο απομακρύνονται όλοι

οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται στο χρωματογραφικό διαχωρισμό. Τέλος, τα προσδιοριζόμενα συστατικά μεταφέρονται με δευτεριωμένους διαλύτες που έχουν επιλεχθεί (π.χ. μεθανόλη, ακετονιτρίλιο ή χλωροφόρμιο) στον υποδοχέα ροής NMR (flow-probe) για την καταγραφή του φάσματος (Σχήμα 1.11).



**Σχήμα 1.11.** Σχηματική απεικόνιση του σταδίου παγίδευσης, ξήρανσης και μεταφοράς στον υποδοχέα ροής NMR (flow-probe) των προσδιοριζόμενων συστατικών.

Η πολλαπλή παγίδευση του ίδιου προσδιοριζόμενου συστατικού από επανειλημμένες εγχύσεις LC στην ίδια διαχωριστική μικροστήλη, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μερική λύση του προβλήματος της χαμηλής συγκέντρωσης αυτού. Εναλλακτικά, αντί της πολλαπλής-παγίδευσης (multi-trapping) προτάθηκε η χρήση ημι-παρασκευαστικών στηλών HPLC σε συνδυασμό με μονάδα SPE. Οι πρώτες αυτοματοποιημένες μετρήσεις «on-line» LC-SPE-NMR πραγματοποιήθηκαν σε ένα ακετονικό εκχύλισμα ελληνικής ρίγανης (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* (Seeger, *et al.*, 2005), *Smirnowia iranica* (Lambert, *et al.*, 2005), σε εμπορικά δείγματα δεντρολίβανου (Pukalskas, *et al.*, 2005) και κλάσματος ελαιολάδου (Christoforidou, *et al.*, 2005).

Η πειραματική διάταξη LC-SPE-NMR είναι παρόμοια με τη διάταξη βρόχου-αποθήκευσης LC-NMR, αλλά έχει ορισμένα πλεονεκτήματα έναντι του βρόχου-αποθήκευσης και άλλων μεθόδων. Η τεχνική LC-SPE-NMR επιτρέπει τη λειτουργία του διαχωρισμού LC με μια μη-δευτεριωμένη κινητή φάση και στη συνέχεια τη χρήση δευτεριωμένου διαλύτη για τη μεταφορά των προσδιοριζόμενων συστατικών από τη μονάδα SPE στον υποδοχέα ροής NMR (flow-probe). Ως συνέπεια, περιορίζεται το κόστος της μεθόδου, αφού δεν χρησιμοποιούνται πλέον μεγάλες ποσότητες δευτεριωμένων διαλυτών. Επίσης, η χρήση τεχνικών καταστολής των σημάτων συντονισμού του διαλύτη, που μπορούν να οδηγήσουν σε απώλεια των σημάτων του προσδιοριζόμενου συστατικού, περιορίζεται σημαντικά ή δεν είναι πλέον απαραίτητη. Από την άλλη πλευρά, τα φάσματα που λαμβάνονται σε καθαρό  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$  ή  $\text{CD}_3\text{CN}$  είναι πιο εύκολο να συγκριθούν με βιβλιογραφικά δεδομένα σε σύγκριση με τα φάσματα της μεθόδου διακεκομμένης ροής (stopped flow) LC-NMR που λαμβάνονται σε μίγματα  $\text{D}_2\text{O}$  και  $\text{CH}_3\text{CN}$ . Επέκταση της τεχνικής σε LC-SPE-NMR-MS θα μπορούσε να οδηγήσει στη αδιαμφισβήτητη ταυτοποίηση των συστατικών ενός πολύπλοκου μίγματος. Τέλος, πρόσφατα αναφέρθηκε η δυνατότητα της πιθανής συνένωσης του διαχωρισμού LC με μια προστήλη «on-line» ανίχνευσης ενώσεων, που έχουν την ιδιότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών, η οποία στηρίζεται σε κάποιο πρότυπο σύστημα οξειδωσης (όπως παρακολούθηση της ελάττωσης των ριζών DPPH<sup>•</sup> ή ABTS<sup>•+</sup>) (Boskou *et al.*, 2006).

Είναι φανερό ότι η τεχνική LC-SPE-NMR είναι μια καινούργια σημαντική αναλυτική τεχνική για την ανάλυση φυτικών εκχυλισμάτων. Για την μεγαλύτερη βελτίωση της συνολική ευαισθησίας του συστήματος μπορεί να χρησιμοποιηθεί υποδοχέας ροής NMR (flow-probe) κρυογεννητικής τεχνολογίας (cryogenically cooled). Η μεθοδολογία αυτή οδηγεί σε βελτίωση της αναλογίας σήματος/ θόρυβο (S/N) στο φάσμα NMR κατά ένα παράγοντα από 3 έως 5 για διαλύτες χαμηλής διηλεκτρικής σταθεράς. Επίσης, μια από τις πιο πολλά υποσχόμενες εξελίξεις στη σχεδίαση των υποδοχέων NMR, εκτός από τους υποδοχείς κρυογεννητικής τεχνολογίας που εγγυώνται βελτιωμένη ευαισθησία, είναι η καθιέρωση μικροσκοπικών σωληνοειδών μικροπηνίων (miniaturized solenoidal microcoils). Αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μικροσκοπικά συζευγμένα συστήματα, όπως είναι το σύστημα υγρής χρωματογραφίας τριχοειδούς σε σύζευξη με πυρηνικό μαγνητικό συντονισμό (capillary high-performance liquid chromatography NMR,

(capLC-NMR), το σύστημα ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς σε σύζευξη με πυρηνικό μαγνητικό συντονισμό (capillary electrophoresis NMR, (CE-NMR), το σύστημα ηλεκτροχρωματογραφία τριχοειδούς σε σύζευξη με πυρηνικό μαγνητικό συντονισμό (capillary electrochromatography-NMR, (CEC-NMR) και το σύστημα CITP-NMR (capillary isotachopheresis-NMR, (Exarchou *et al.*, 2005, Boskou *et al.*, 2006). Στην περίπτωση του CAP-NMR η ίδια διαδικασία μικροκλασμάτωσης όπως αυτή που περιγράφεται στη μέθοδο LC-SPE-NMR μπορεί να χρησιμοποιηθεί, με εξαίρεση ότι τα δείγματα δεν παγιδεύονται σε SPE, αλλά ξηραίνονται σε μικροκλάσματα LC. Μειονέκτημα αυτής της διαδικασίας είναι ότι απαιτείται περισσότερο δείγμα σε σύγκριση με την συνεχούς ροής (on-flow) διαδικασία, αλλά τα φάσματα NMR που λαμβάνονται είναι καλύτερης ποιότητας, ενώ άλλες πληροφορίες όπως δεδομένα UV και MS μπορούν να καταγραφούν «on-line» κατά τη διάρκεια της μικροκλασμάτωσης.

Όπως προκύπτει από τα παραπάνω, οι συζευγμένες τεχνικές LC έχουν διαρκώς και σημαντικότερο ρόλο στη μελέτη νέων βιοδραστικών ενώσεων από φυσικά προϊόντα. Οι πληροφορίες που προκύπτουν από το συνδυασμό των μεθόδων LC-UV-DAD, LC-MS καθώς και LC-NMR είναι πολύ διαφωτιστικές για την αποκρυπτογράφηση της δομής των μορίων σε ένα φυτικό εκχύλισμα.

## **Σκοπός της διδακτορικής διατριβής**

Η μελέτη της σύστασης φυτικών εκχυλισμάτων αποτελεί έναν τομέα έρευνας με έντονη δραστηριότητα. Μεταξύ των παραγόντων που επηρεάζουν τη σύσταση σε βιοενεργά συστατικά θεωρείται ο χρόνος συλλογής, η προκατεργασία του φυτού αλλά και ο τρόπος εκχύλισης. Για την ανάλυση, ταυτοποίηση και μελέτη των φυτικών εκχυλισμάτων απαιτείται διαχωρισμός, απομόνωση και χαρακτηρισμός των συστατικών με διάφορες τεχνικές. Η υγρή χρωματογραφία θεωρείται η πιο αποτελεσματική μέθοδος διαχωρισμού των συστατικών, ενώ με τη φασματοσκοπία μάζας και τη φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού επιτυγχάνεται η ταυτοποίηση αυτών. Από τις πλέον σύγχρονες μεθοδολογίες για τη γρήγορη ανάλυση μιγμάτων φυσικών προϊόντων είναι η απευθείας σύζευξη της υγρής χρωματογραφίας με φασματομετρία μάζας (LC-MS) καθώς και με φασματογράφο πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (LC-NMR). Συνεπώς, είναι ιδιαίτερα επιθυμητή η ανάπτυξη μεθοδολογιών για την άμεση, γρήγορη και ακριβή ταυτοποίησή αυτών σε πολύπλοκα φυτικά εκχυλίσματα χωρίς τον προηγούμενο χρωματογραφικό διαχωρισμό τους.

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η συγκριτική μελέτη της επίδρασης της περιοχής, του χρόνου συλλογής και της μεθόδου εκχύλισης στα φαινολικά συστατικά εκχυλισμάτων φύλλων *Ligustrum lucidum* χωρίς περαιτέρω κατεργασία του αρχικού εκχυλίσματος με τη χρήση συζευγμένων τεχνικών LC-MS και LC-NMR, καθώς και η ανάπτυξη μεθοδολογίας προσδιορισμού ολικών φαινολών με τη χρήση πρωτονιακής φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού μιας διάστασης (NMR  $^1\text{H}$ ). Αξίζει να σημειωθεί ότι είναι η πρώτη φορά που μελετάται η συγκεκριμένη ποικιλία του φυτού, *Ligustrum lucidum*, που φύεται στον ελλαδικό χώρο καθώς και ο αριθμός των εργασιών σχετικά με τη σύσταση των φύλλων είναι πολύ περιορισμένος.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2**

### **ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## 2.1 Δείγματα φύλλων *Ligustrum lucidum*

Για την μελέτη της σύστασης και της αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλισμάτων φύλλων *Ligustrum lucidum* χρησιμοποιήθηκαν φύλλα που συλλέχθηκαν από δύο διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές της Ελλάδος (Ιωάννινα: βορειοδυτική Ελλάδα, Κάριανη: βόρεια Ελλάδα) σε τέσσερις διαφορετικές χρονικές περιόδους (Φεβρουάριο, Μάιο: περίοδος ανθοφορίας, Ιούλιο και Νοέμβριο: περίοδος καρποφορίας) κατά το έτος 2006 (Πίνακας 2.1). Τα φύλλα χαρακτηρίστηκαν βοτανικά στο Εργαστήριο Βοτανικής του τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων από τον Επ. Καθηγητή Α. Κυπαρίσση.

**Πίνακας 2.1.** Στοιχεία γεωγραφικής προέλευσης και συλλογής φύλλων *Ligustrum lucidum*

|                   | Γεωγραφική περιοχή<br>προέλευσης | Χρονολογία και μήνας<br>συλλογής |
|-------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Ligustrum lucidum | Ιωάννινα                         | Φεβρουάριος 2006                 |
|                   |                                  | Μάιος 2006                       |
|                   |                                  | Ιούλιος 2006                     |
|                   |                                  | Νοέμβριος 2006                   |
|                   | Κάριανη                          | Φεβρουάριος 2006                 |
|                   |                                  | Μάιος 2006                       |
|                   |                                  | Ιούλιος 2006                     |
|                   |                                  | Νοέμβριος 2006                   |

## 2.2 Πρότυπες ενώσεις

Οι πρότυπες ενώσεις απιγενίνη-7-γλυκοζίτης, ρουτίνη και ροσμαρινικό οξύ αγοράστηκαν από τη Fluka(Steinheim, Germany), λουτεολίνη, λουτεολίνη-7-γλυκοζίτης, ισοροϊφολίνη (απιγενίνη-7-ρουτινοζίτης) από την Extrasynthese (Genay, Γαλλία), απιγενίνη (95%), κερκετίνη (2H<sub>2</sub>O), καφεϊκό (98%) και γαλλικό και από την Aldrich (Steinheim, Germany).

## 2.3 Διαλύτες

Οι αναλυτικώς καθαροί διαλύτες μεθανόλη, *n*-εξάνιο, και οξικός αιθυλεστέρας που χρησιμοποιήθηκαν για την εκχύλιση των φύλλων *Ligustrum*, αγοράστηκαν από τη Lab-Scan, (Dublin, Ireland) και η απόλυτη αιθανόλη από τη Sigma (Steinheim, Germany). Οι υψηλής καθαρότητας διαλύτες ακετονιτρίλιο, μεθανόλη και νερό κατάλληλοι για χρωματογραφική χρήση (HPLC-grade), αγοράστηκαν από τη Merck, (Darmstadt, Germany). Το οξικό οξύ (glacial) αναλυτικώς καθαρό ήταν της Merck (Darmstadt, Germany). Οι μετρήσεις NMR έγιναν με δευτεριωμένους διαλύτες ακετονιτρίλιο-d<sub>3</sub> (99,8%) (CD<sub>3</sub>CN) της Deutero (Kastellaun, Germany) και διμεθυλοσουλφοξείδιο-d<sub>6</sub> (99,9%) (DMSO) της Aldrich (Steinheim, Germany).

## 2.4 Αντιδραστήρια

Για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολών των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu που αγοράστηκε από τη Fluka (Steinheim, Switzerland) και το ανθρακικό νάτριο από τη Riedel de Haen (Seelze, Germany). Για τον προσδιορισμό των ολικών φλαβονοειδών χρησιμοποιήθηκε το τριχλωριούχο αργίλιο της Fluka (Steinheim, Switzerland). Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε η σταθερή ρίζα 2,2-διφαινυλο-1-πικρυλυδραζύλιο (DPPH<sup>•</sup>) (~90%) της Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

## 2.5 Όργανα - Συσκευές

Η μελέτη της σύστασης των εκχυλισμάτων φύλλων *Ligustrum lucidum* για την παρουσία φαινολικών ενώσεων πραγματοποιήθηκε με συσκευή υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (RP-HPLC) Shimadzu (Tokyo, Japan) συστήματος μεταφοράς τεσσάρων διαλυτών FCV-10AL VP, αντλίας LC-10AD VP, ελεγκτή συστήματος SCL-10A VP συνδεδεμένων με ανιχνευτή συστοιχίας διόδων λυχνιών SPD-M10A VP και κλασματοσυλλέκτη FRC-10A Ver 3. Η εισαγωγή του δείγματος επιτυγχάνεται με βαλβίδα εισαγωγής Rheodyne 7125 (CA), LP με βρόγχο όγκου 20 μl. Η θερμοστάτηση της στήλης έγινε σε φούρνο CTO-10AS (Shimadzu, Tokyo, Japan). Ο υγροχρωματογραφικός διαχωρισμός των φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε σε αναλυτική στήλη

ODS Supelco C18 (25cm×4,6mm), 5μm. Η επεξεργασία των χρωματογραφημάτων πραγματοποιήθηκε σε λογισμικό CLASS-VP.

Η ανάλυση των εκχυλισμάτων με την τεχνική LC-MS πραγματοποιήθηκε σε σύστημα Agilent 1100 Technologies LC/MSD Trap SL, (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) αποτελούμενο από αντλία Agilent G1312A, αυτόματο δειγματολήπτη Agilent G1313A, απαερωτή Agilent G1379A, ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού Agilent G1315B και φασματογράφο μάζας τύπου Agilent G2445A (LC/MSD Trap SL ion trap mass spectrometer) με πηγή ιονισμού ηλεκτροψεκασμού (ESI). Ο έλεγχος και η επεξεργασία των δεδομένων γίνεται μέσω H/Y και του προγράμματος Agilent Chemstation Software 2003. Ο υγροχρωματογραφικός διαχωρισμός εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε σε αναλυτική στήλη Altima C18 (25cm x 4.6 mm i.d.), 5 μm της Altech (Deerfield, USA). Αέριο άζωτο N<sub>2</sub> χρησιμοποιείται ως εκνεφωτής σε πίεση 10 psi και η ροή ρυθμίστηκε στα 4 L/min. Η θερμοκρασία και το δυναμικό του τριχοειδούς ρυθμίστηκαν στους 325 °C και 3.5 kV, αντίστοιχα. Η λήψη φάσματος μάζας MS πραγματοποιήθηκε σε ένα εύρος τιμών 50 έως 800 m/z.

Η ανάλυση του εκχυλίσματος του οξικού αιθυλεστέρα με την εφαρμογή της συνδυαστικής τεχνικής LC-SPE-NMR πραγματοποιήθηκε στο νεοαποκτηθέν όργανο LC-NMR του Κέντρου Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων της εταιρείας Bruker. Το σύστημα υγρής χρωματογραφίας αποτελείται από αντλία υγρής χρωματογραφίας Agilent G13311A, ανιχνευτή διόδου λυχνιών Bruker DAD (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Germany) και έναν αυτόματο δειγματολήπτη Agilent G1311A με βρόγχο εναίσιμου όγκου 100 μl. Για την αυτόματη παγίδευση των κορυφών του χρωματογραφήματος χρησιμοποιήθηκε η συσκευή εκχύλισης στερεάς φάσης Bruker/Spark Prospect 2 με μικροστήλες Hysphere GP με διάμετρο 2 mm και μέγεθος σωματιδίων 5-15 μm. Η προσθήκη ύδατος για την μείωση της εκλουστικής ικανότητας των μικροστηλών και την αποτελεσματική κατακράτηση των εκλούμενων από τη στήλη της υγρής χρωματογραφίας ενώσεων έγινε με τη χρήση της αντλίας HPLC Knauer K 120 (Berlin, Germany). Τα παγιδευμένα συστατικά μετά την ξήρανση με αέριο άζωτο εκλούνται και μεταφέρονται με δευτεριωμένο ακετονιτρίλιο σε φασματογράφο NMR Bruker AV-500 εξοπλισμένο με υποδοχέα ενδιάμεσης ροής LC-SEI 4mm <sup>1</sup>H- <sup>13</sup>C (flow probe) με όγκο 60 μL (Bruker, BioSpin, Rheinstetten, Germany). Ο υγροχρωματογραφικός διαχωρισμός του εκχυλίσματος πραγματοποιήθηκε σε αναλυτική στήλη Discovery

C18, (250mm x 4.6mm i.d.), 5μm της Supelco. Η επεξεργασία των χρωματογραφημάτων πραγματοποιήθηκε σε λογισμικό HyStar ενώ των φασμάτων σε λογισμικό TopSpin 1.3 και τα δύο της Bruker.

Η λήψη των φασμάτων NMR πραγματοποιήθηκε στο Κέντρο Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων σε φασματογράφο NMR Bruker AV-400 εξοπλισμένο με μονάδα βαθμίδωσης πεδίου z (field gradient) και σε φασματογράφο NMR Bruker AV-500 εξοπλισμένο με TXI cryoprobe. Η επεξεργασία των φασμάτων έγινε με τη βοήθεια του λογισμικού TopSpin 2.1 της Bruker.

Η απομάκρυνση του διαλύτη στα υδατικά εκχυλίσματα πραγματοποιήθηκε σε λυοφιλιωτή Christ, μοντέλου Alpha 1-2 (Germany). Στα εκχυλίσματα που παραλήφθηκαν με οργανικούς διαλύτες, η απομάκρυνση των διαλυτών πραγματοποιήθηκε σε περιστροφικό εξατμιστήρα Buchi, μοντέλο R-114, συνδεδεμένο με υδατόλουτρο, μοντέλο B-480 και με ρυθμιστή κενού, μοντέλο V-800.

Για την παρασκευή των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκαν συσκευή υπερήχων μοντέλο Elma S30 (Germany), θερμοστατούμενο υδατόλουτρο SWB 5020 (Bioline Scientific, Greece) και συσκευή φυγοκέντρωσης Mikro 12-24 (Hettich zentrifugen, Germany).

Στους φασματοφωτομετρικούς προσδιορισμούς χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο Advanced Seconam της Anthelie (France).

## **2.6 Μέθοδοι**

### **2.6.1 Παρασκευή εκχυλισμάτων**

#### **α. Προκατεργασία φύλλων**

Φρέσκα φύλλα *Ligustrum lucidum* πλύθηκαν πρώτα με νερό της βρύσης και μετά με απεσταγμένο νερό για την απομάκρυνση σκόνης και εντομοκτόνων. Ακολούθησε ξήρανση αυτών σε θερμοκρασία δωματίου και αποθήκευση σε καταψύκτη.

#### **β. Παρασκευή εκχυλισμάτων**

- **Εμποτισμός σε μεθανόλη και αιθανόλη για 1 εβδομάδα (1 week)**

Για την παραλαβή του μεθανολικού και αιθανολικού εκχυλίσματος λυοτριβημένα φύλλα *Ligustrum lucidum* (30 g) εμποτίστηκαν σε 150 ml μεθανόλης/

αιθανόλης αντίστοιχα και αφέθηκαν για μια εβδομάδα (7 ημέρες) στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε διήθηση υπό κενό με χωνί Buchner για την παραλαβή του εκχυλίσματος και ο διαλύτης απομακρύνθηκε με εξάτμιση υπό κενό. Το στερεό ή ελαιώδες εκχύλισμα που προέκυψε αποθηκεύτηκε σε καταψύκτη.

- **Εμποτισμός σε μίγμα μεθανόλης-νερού για 1 μήνα (1 month)**

Για την παραλαβή του μεθανολικού-υδατικού εκχυλίσματος λυοτριβημένα φύλλα *Ligustrum lucidum* (30 g) εμποτίστηκαν σε 150 ml μίγματος μεθανόλης-νερού (4:1, v/v) και αφέθηκαν για ένα μήνα στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε διήθηση υπό κενό με χωνί Buchner για την παραλαβή του εκχυλίσματος και ο διαλύτης απομακρύνθηκε με εξάτμιση υπό κενό. Το ελαιώδες εκχύλισμα που προέκυψε αποθηκεύτηκε σε καταψύκτη.

- **Εκχύλιση σε λουτρό υπερήχων για 30 λεπτά**

Για την παραλαβή του μεθανολικού-υδατικού εκχυλίσματος λυοτριβημένα φύλλα *Ligustrum lucidum* (30 g) αναμίχθηκαν με 150 ml μίγματος μεθανόλης-νερού (4:1, v/v). Ακολούθησε ανάδευση του μίγματος και η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε σε λουτρό υπερήχων για χρονικό διάστημα 30 min. Ακολούθησε διήθηση υπό κενό με χωνί Buchner για την παραλαβή του εκχυλίσματος και ο διαλύτης απομακρύνθηκε με εξάτμιση υπό κενό. Το στερεό εκχύλισμα που προέκυψε αποθηκεύτηκε σε καταψύκτη.

- **Εκχύλιση με ανάδευση σε υδατόλουτρο για 24 ώρες (24h)**

Για την παραλαβή του αιθανολικού και μεθανολικού-υδατικού εκχυλίσματος λυοτριβημένα φύλλα *Ligustrum lucidum* (30 g) αναμίχθηκαν με 150 ml αιθανόλης και μίγματος μεθανόλης-νερού (4:1, v/v) αντίστοιχα. Ακολούθησε ανάδευση αυτών σε υδατόλουτρο για 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε διήθηση υπό κενό με χωνί Buchner για την παραλαβή του εκχυλίσματος και απομάκρυνση του διαλύτη σε περιστροφικό εξατμιστήρα υπό κενό. Το στερεό ή ελαιώδες εκχύλισμα που προέκυψε αποθηκεύτηκε σε καταψύκτη.

- **Εκχύλιση με απεσταγμένο νερό για 1 ώρα στους 100 °C**

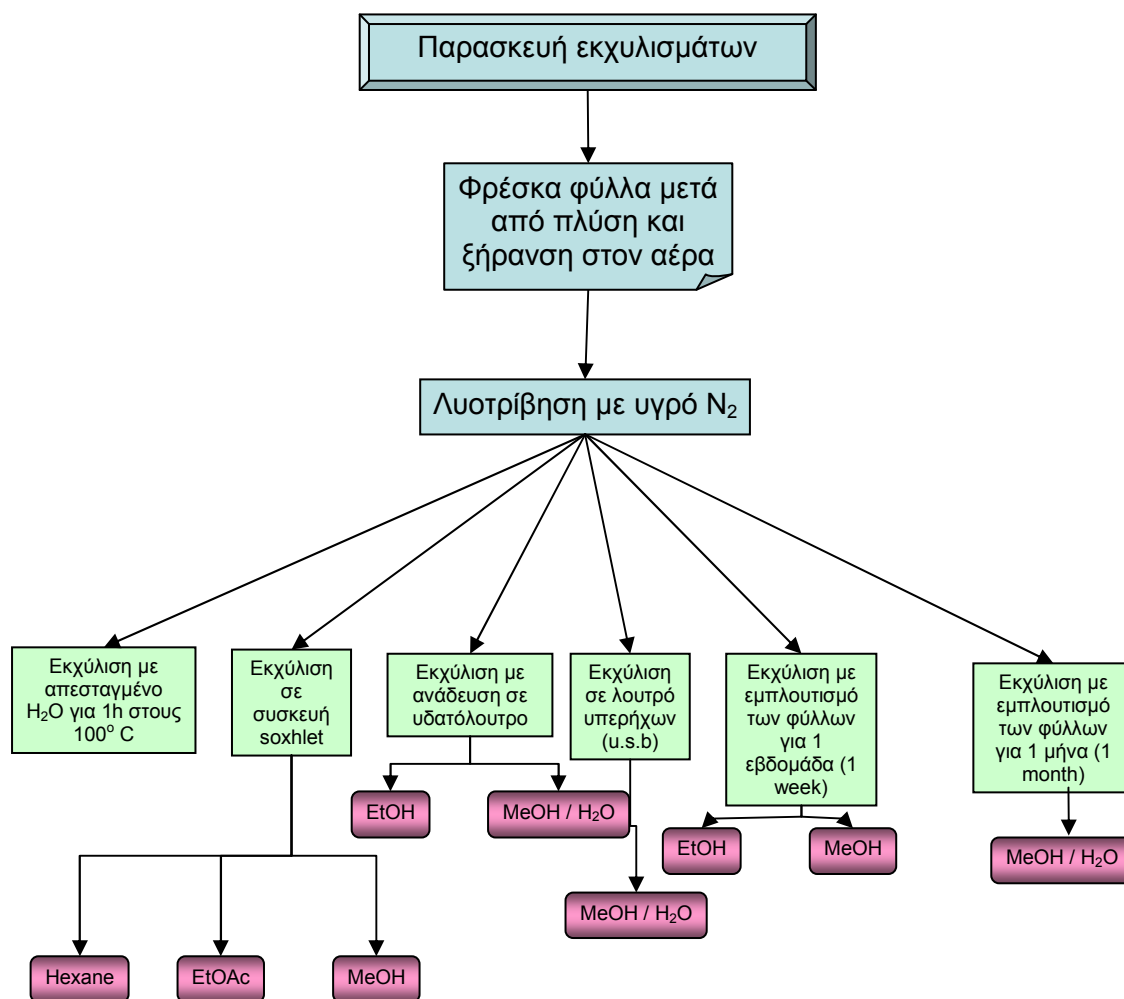
Για την παραλαβή του υδατικού εκχυλίσματος λυοτριβημένα φύλλα *Ligustrum lucidum* (30 g) αναμίχθηκαν με 150 ml απεσταγμένου νερού για 1 ώρα στους 100 °C. Ακολούθησε διήθηση υπό κενό με χωνί Buchner για την παραλαβή του

εκχυλίσματος και απομάκρυνση του νερού με λυοφιλίωση. Τα δείγματα που προέκυψαν ήταν υπό μορφή σκόνης και αποθηκεύτηκαν σε καταψύκτη.

- **Εκχύλιση σε συσκευή Soxhlet**

40 g λυοτριβιμένων φύλλων *Ligustrum lucidum* εκχυλίστηκαν διαδοχικά με διαλύτες αυξανόμενης κάθε φορά πολικότητας που ήταν κατά σειρά: εξάνιο, οξικός αιθυλεστέρας και μεθανόλη σε συσκευή Soxhlet για 8 h. Ακολούθησε διήθηση υπό κενό με χωνί Buchner για την παραλαβή των εκχυλισμάτων και απομάκρυνση των διαλυτών σε περιστροφικό εξατμιστήρα υπό κενό. Τα στερεά εκχυλίσματα που προέκυψαν αποθηκεύτηκαν σε καταψύκτη. Πριν από κάθε υδροχρωματογραφική ανάλυση μέρος του εκχυλίσματος φυγοκεντρείται και κατόπιν πραγματοποιείται διήθηση αυτού με φίλτρο 0.45μm.

Στο Σχήμα 2.1 δίνεται διάγραμμα παρασκευής των εκχυλισμάτων και στον Πίνακα 2.2 αναγράφονται συγκεντρωτικά τα δείγματα που παρασκευάστηκαν με τις μεθόδους που προαναφέρθηκαν.



**Σχήμα 2.1.** Διάγραμμα παρασκευής εκχυλισμάτων

**Πίνακας 2.2.** Συγκεντρωτικός πίνακας των εκχυλισμάτων που παρασκευάστηκαν

| A/a | Κωδικός εκχυλισμάτων                    | Περιγραφή εκχυλισμάτων                                                              |
|-----|-----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| 1   | <b>L.K.M.MeOH/H<sub>2</sub>O u.s.b.</b> | Υδατομεθανολικό εκχύλισμα από την Κάριανη, τον μήνα Μάιο με χρήση λουτρού υπερήχων  |
| 2   | <b>L.K.M.EtOH 24h</b>                   | Αιθανολικό εκχύλισμα από την Κάριανη, τον μήνα Μάιο με ανάδευση σε υδατόλουτρο      |
| 3   | <b>L.K.M.EtOH 1week</b>                 | Αιθανολικό εκχύλισμα από την Κάριανη, τον μήνα Μάιο με εμποτισμό μιας εβδομάδας     |
| 4   | <b>L.K.M.MeOH/H<sub>2</sub>O 24h</b>    | Υδατομεθανολικό εκχύλισμα από την Κάριανη, τον μήνα Μάιο με ανάδευση σε υδατόλουτρο |
| 5   | <b>L.K.M.MeOH/H<sub>2</sub>O 1month</b> | Υδατομεθανολικό εκχύλισμα από την Κάριανη, τον μήνα Μάιο με εμποτισμό ενός μήνα     |
| 6   | <b>L.K.M.MeOH soxhlet</b>               | Μεθανολικό εκχύλισμα με συσκευή soxhlet από την Κάριανη κατά τον μήνα Μάιο          |
| 7   | <b>L.K.M.EtOAc soxhlet</b>              | Οξικού αιθυλεστέρα εκχύλισμα με συσκευή soxhlet από την Κάριανη κατά τον μήνα Μάιο  |
| 8   | <b>L.K.M.Hex. soxhlet</b>               | Εξανικό εκχύλισμα με συσκευή soxhlet από την Κάριανη κατά τον μήνα Μάιο             |
| 9   | <b>L.I.M.Aq</b>                         | Υδατικό εκχύλισμα από τα Ιωάννινα κατά τον μήνα Μάιο                                |
| 10  | <b>L.I.J.Aq</b>                         | Υδατικό εκχύλισμα από τα Ιωάννινα κατά τον μήνα Ιούλιο                              |
| 11  | <b>L.I.F.Aq</b>                         | Υδατικό εκχύλισμα από τα Ιωάννινα κατά τον μήνα Φεβρουάριο                          |
| 12  | <b>L.I.N.Aq</b>                         | Υδατικό εκχύλισμα από τα Ιωάννινα κατά τον μήνα Νοέμβριο                            |
| 13  | <b>L.I.M.MeOH</b>                       | Μεθανολικό εκχύλισμα από τα Ιωάννινα κατά τον μήνα Μάιο                             |
| 14  | <b>L.I.J.MeOH</b>                       | Μεθανολικό εκχύλισμα από τα Ιωάννινα κατά τον μήνα Ιούλιο                           |
| 15  | <b>L.I.F.MeOH</b>                       | Μεθανολικό εκχύλισμα από τα Ιωάννινα κατά τον μήνα Φεβρουάριο                       |
| 16  | <b>L.I.N.MeOH</b>                       | Μεθανολικό εκχύλισμα από τα Ιωάννινα κατά τον μήνα Νοέμβριο                         |
| 17  | <b>L.K.M.Aq</b>                         | Υδατικό εκχύλισμα από την Κάριανη κατά τον μήνα Μάιο                                |
| 18  | <b>L.K.J.Aq</b>                         | Υδατικό εκχύλισμα από την Κάριανη κατά τον μήνα Ιούλιο                              |
| 19  | <b>L.K.F.Aq</b>                         | Υδατικό εκχύλισμα από την Κάριανη κατά τον μήνα Φεβρουάριο                          |
| 20  | <b>L.K.N.Aq</b>                         | Υδατικό εκχύλισμα από την Κάριανη κατά τον μήνα Νοέμβριο                            |
| 21  | <b>L.K.M.MeOH</b>                       | Μεθανολικό εκχύλισμα από την Κάριανη κατά τον μήνα Μάιο                             |
| 22  | <b>L.K.J.MeOH</b>                       | Μεθανολικό εκχύλισμα από την Κάριανη κατά τον μήνα Ιούλιο                           |
| 23  | <b>L.K.F.MeOH</b>                       | Μεθανολικό εκχύλισμα από την Κάριανη κατά τον μήνα Φεβρουάριο                       |
| 24  | <b>L.K.N.MeOH</b>                       | Μεθανολικό εκχύλισμα από την Κάριανη κατά τον μήνα Νοέμβριο                         |

όπου: L= Ligustrum lucidum, K= Κάριανη, I=Ιωάννινα, M=Μάιος, J=Ιούλιος, N=Νοέμβριος, F=Φεβρουάριος, Aq= H<sub>2</sub>O

## 2.6.2 Μελέτη της σύστασης των εκχυλισμάτων

### 2.6.2.1 Μελέτη της σύστασης των εκχυλισμάτων με αναλυτική υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

Ο υγροχρωματογραφικός διαχωρισμός των εκχυλισμάτων των φύλλων *Ligustrum lucidum* έγινε με χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (RP-HPLC). Για την ανάλυση των εκχυλισμάτων ετοιμάστηκαν διαλύματα συγκέντρωσης 1mg/ml σε μεθανόλη.

Η κινητή φάση αποτελούνταν από υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 0.1% (διαλύτης A) και από ακετονιτρίλιο (διαλύτης B). Το σύστημα βαθμωτής έκλουσης καθώς και οι παράμετροι λειτουργίας της αναλυτικής μεθόδου που χρησιμοποιήθηκαν δίνονται στον Πίνακα 2.3.

**Πίνακας 2.3.** Πειραματικές παράμετροι της αναλυτικής μεθόδου HPLC για την ανάλυση των εκχυλισμάτων των φύλλων *Ligustrum lucidum*

|                             |                                                                          |              |              |
|-----------------------------|--------------------------------------------------------------------------|--------------|--------------|
| Στατική φάση                | Altima C18, 25cm x 4.6 mm i.d., 5 μm<br>ODS Supelco C18, 25cm×4.6mm, 5μm |              |              |
| Κινητή φάση                 | Διαλύτης A: νερό (0.1% οξικό οξύ)<br>Διαλύτης B: ακετονιτρίλιο           |              |              |
| Σύσταση κινητής φάσης       | Χρόνος (min)                                                             | % διαλύτης A | % διαλύτης B |
|                             | 0                                                                        | 95           | 5            |
|                             | 20                                                                       | 75           | 25           |
|                             | 40                                                                       | 50           | 50           |
|                             | 50                                                                       | 20           | 80           |
|                             | 60                                                                       | 95           | 5            |
| Ταχύτητα ροής κινητής φάσης | 1 ml/min                                                                 |              |              |
| Ενέσιμος όγκος              | 20 μl                                                                    |              |              |
| Θερμοκρασία στήλης          | 25 °C                                                                    |              |              |

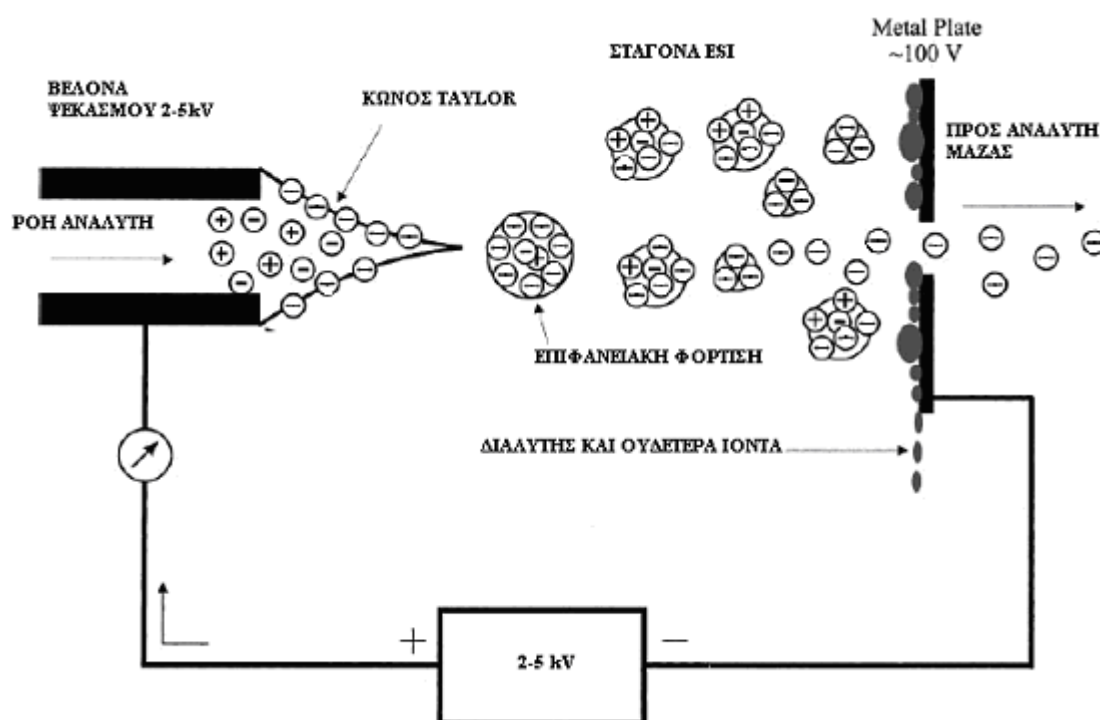
#### 2.6.2.2 Μελέτη της σύστασης των εκχυλισμάτων με τη συζευγμένη τεχνική LC-DAD-ESI-MS

Ο υγροχρωματογραφικός διαχωρισμός των εκχυλισμάτων με την συζευγμένη τεχνική LC-MS πραγματοποιήθηκε σε αναλυτική στήλη Altima C18 (25cm x 4.6 mm i.d.), 5  $\mu$ m. Για την έκλουση των συστατικών από την στήλη χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιοι διαλύτες με το ίδιο πρόγραμμα βαθμωτής μεταβολής της σύστασης των διαλυτών με την HPLC με ταχύτητα ροής 0.6 ml/min. Ο ενέσιμος όγκος του δείγματος ήταν 20  $\mu$ l.

Οι μετρήσεις μάζας έγιναν χρησιμοποιώντας την τεχνική του ηλεκτροψεκασμού με αρνητικό δυναμικό. Κατά τον ηλεκτροψεκασμό διαλύματος, τα εντός του διαλύματος ιόντα της προσδιοριζόμενης ουσίας μεταβαίνουν στην αέρια κατάσταση. Η τεχνική του ηλεκτροψεκασμού χρησιμοποιείται ευρέως στην ανάλυση πολικών ενώσεων. Επίσης, καθιστά δυνατή την ανάλυση θερμικά ασταθών ενώσεων ή ενώσεων υψηλού μοριακού βάρους, οι οποίες παρουσιάζουν προβλήματα στην ανάλυσή τους με τη συνήθη τεχνική της φασματομετρίας μάζας. Η διαδικασία του ηλεκτροψεκασμού μπορεί να χωριστεί βασικά σε τρία στάδια: στο σχηματισμό σταγόνας, στη συρρίκνωση της σταγόνας και στην παραγωγή ιόντων στην αέρια φάση. Το διάλυμα της προσδιοριζόμενης ένωσης απελευθερώνεται στην άκρη της βελόνας ηλεκτροψεκασμού, όπου εφαρμόζεται ισχυρό ηλεκτρικό πεδίο. Μόλις το διάλυμα υποστεί το ισχυρό ηλεκτρικό πεδίο σχηματίζεται ένα νέφος από σταγόνες ισχυρά φορτισμένες στην επιφάνειά τους. Αν θεωρήσουμε ότι εφαρμόζεται αρνητικό δυναμικό, τα εντός του διαλύματος αρνητικά ιόντα συσσωρεύονται στην επιφάνεια με τέτοιο τρόπο ώστε σχηματίζουν έναν κώνο (Taylor cone). Σε αρκούντως ισχυρό πεδίο, ο κώνος παράγει αρνητικά φορτισμένες σταγόνες όταν η εφαρμοζόμενη ηλεκτροστατική δύναμη υπερβεί την επιφανειακή τάση του διαλύτη. Η διάμετρος της σταγόνας εξαρτάται από το εφαρμοζόμενο δυναμικό, την ταχύτητα ροής του διαλύματος και τη φύση του διαλύτη. Καθώς το νέφος από σταγόνες διασχίζει μια βαθμωτή μεταβολή της πίεσης προς την κατεύθυνση του αναλυτή μάζας, κατ' αρχάς λαμβάνει χώρα εξάτμιση του διαλύτη από τις αρχικά σχηματιζόμενες σταγόνες, η οποία επιφέρει μια μείωση στη διάμετρο της σταγόνας με ταυτόχρονη αύξηση της πυκνότητας φορτίου στην επιφάνεια κάθε σταγόνας. Η πυκνότητα φορτίου στην επιφάνεια κάθε σταγόνας αυξάνει συνεχώς μέχρι ενός κρίσιμου σημείου, πού είναι γνωστό ως όριο Rayleigh. Στο κρίσιμο αυτό σημείο, λαμβάνει χώρα η σχάση της

σταγόνες (σχάση Coulomb) σε μικρότερα σταγονίδια διότι η ηλεκτροστατική άπωση έχει υπερβεί την επιφανειακή τάση που κρατάει ενωμένη τη σταγόνα. Στη συνέχεια λαμβάνει χώρα περαιτέρω εξάτμιση του διαλύτη και σχάσεις κ.ο.κ., με αποτέλεσμα το σχηματισμό τελικά πολύ μικρών σταγονιδίων από τα οποία εκτινάσσονται τα ιόντα της εξεταζόμενης ένωσης στην αέρια κατάσταση λόγω της ηλεκτροστατικής άπωσης. Για την ευκολότερη εκνέφωση του διαλύματος καθώς αυτό εξέρχεται από τη βελόνα ηλεκτροψεκασμού, συνήθως διαβιβάζεται αέριο (sheath gas). Παράλληλα, το αέριο αυτό διευκολύνει και την εξάτμιση του διαλύτη από τις σταγόνες (auxiliary gas).

Στο Σχήμα 2.2 δίνεται σχηματική παράσταση των σπουδαιότερων φαινομένων τα οποία λαμβάνουν χώρα κατά τον ηλεκτροψεκασμό διαλύματος.



**Σχήμα 2.2.** Σχηματισμός σταγόνων κατά τον ηλεκτροψεκασμό διαλύματος

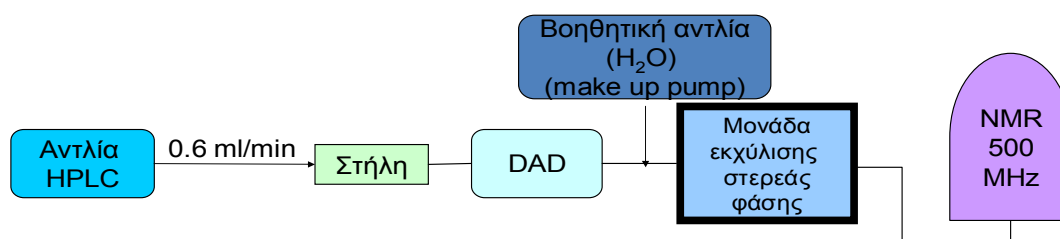
Στην προκειμένη περίπτωση, ως αέριο ξήρανσης (βοηθητικό αέριο, auxiliary gas) καθώς και ως αέριο εκνέφωσης (sheath gas) χρησιμοποιήθηκε άζωτο. Στη γεννήτρια αζώτου παρέχεται αέρας από έναν αεροσυμπιεστή (compressor) όπου διατηρείται ο αέρας υπό ατμοσφαιρική πίεση.

Μία σάρωση δύο γεγονότων χρησιμοποιείται για τις μετρήσεις του φάσματος μάζας. Στο πρώτο γεγονός γίνεται η λήψη φάσματος μάζας MS με ένα εύρος 200-800

m/z. Ενώ στο δεύτερο γεγονός πραγματοποιείται μία μέτρηση MS/MS του ιόντος με την μεγαλύτερη ένταση.

### 2.6.2.3 Μελέτη της σύστασης με την συζευγμένη τεχνική LC-DAD-SPE-NMR

Από την μελέτη της σύστασης των εκχυλισμάτων με υγρή χρωματογραφία και φασματομετρία μάζας επιλέχθηκε το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα για μελέτη με τη χρήση της συνδυαστικής τεχνικής LC-SPE-NMR. Η αρχή λειτουργίας της τεχνικής αυτής βασίζεται στην δυνατότητα αποθήκευσης εκλουόμενων ενώσεων από μια χρωματογραφική στήλη σε μικροστήλες εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE) (Σχήμα 2.3).



**Σχήμα 2.3.** Διαγραμματική αναπαράσταση του LC-SPE-NMR

Μετά το διαχωρισμό από το χρωματογράφο HPLC και τον ανιχνευτή, οι εκλούόμενες ενώσεις μεταφέρονται στη μονάδα εκχύλισης στερεάς φάσης όπου και παγιδεύονται σε ξεχωριστές μικροστήλες. Στην πραγματικότητα αυτή η μονάδα εκχύλισης είναι ένας τροποποιημένος χρωματογράφος στερεάς φάσης, ο οποίος έχει κατασκευαστεί κατά τέτοιο τρόπο, ώστε να αποτελεί έναν ενδιάμεσο αυτοματοποιημένο κρίκο για τη σύζευξη του συστήματος HPLC με το φασματογράφο NMR. Η μονάδα SPE παγιδεύει αυτόματα στις μικροστήλες τις συγκεκριμένες ενώσεις (κορυφές), οι οποίες εξέρχονται από τον ανιχνευτή UV μετά το χρωματογραφικό διαχωρισμό στο σύστημα HPLC. Στη συνέχεια, οι παγιδευμένες κορυφές στις μικροστήλες ανακτώνται με τη προσθήκη νερού. Για τη λήψη των φασμάτων NMR το νερό εξατμίζεται με αέριο άζωτο, και οι παγιδευμένες ενώσεις μεταφέρονται εκλούόμενες με δευτεριωμένο διαλύτη στην κυψελίδα ανίχνευσης του υποδοχέα ενδιάμεσης ροής φασματογράφου πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού. Όλες οι παραπάνω διαδικασίες είναι αυτοματοποιημένες.

Ο υγροχρωματογραφικός διαχωρισμός του εκχυλίσματος του οξικού αιθυλεστέρα πραγματοποιήθηκε σε αναλυτική στήλη Discovery C18, (250mm x 4.6mm i.d.), 5μm. Για την έκλουση των συστατικών από την στήλη χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιοι διαλύτες με το ίδιο πρόγραμμα βαθμωτής μεταβολής της σύστασης των διαλυτών με την HPLC με ταχύτητα ροής 0.6 ml/min και ενέσιμο όγκο δείγματος 20 μl. Κατά τη διάρκεια του υγροχρωματογραφικού διαχωρισμού γίνεται προσθήκη μετά τη στήλη στο έκλουσμα, υδατικού διαλύματος οξικού οξέος 0.1% με ροή 1 ml/min με τη χρήση βοηθητικής αντλίας (make-up pump). Αυτό θεωρείται απαραίτητο με σκοπό την μείωση της εκλουστικής δύναμης των αναλυτών έτσι ώστε να υπάρχει αποτελεσματική κατακράτησή τους κατά τη διέλευσή τους από την μικροστήλη SPE και την αποτελεσματική τους παγίδευση.

Για την παγίδευση των αναλυτών στις μικροστήλες εκχύλισης στερεάς φάσης επιλέχθηκε η διαδικασία πολλαπλής παγίδευσης του αναλύτη στην ίδια μικροστήλη SPE έπειτα από επαναλαμβανόμενες υγροχρωματογραφικές αναλύσεις με σκοπό τον εμπλουτισμό των υπό μελέτη ενώσεων και την αύξηση της συγκέντρωσής τους στην κυψελίδα ροής του NMR. Το δείγμα αναλύθηκε επτά φορές και κάθε ένωση παγιδεύτηκε στην ίδια μικροστήλη μετά από κάθε υγροχρωματογραφικό διαχωρισμό με αποτέλεσμα τον εμπλουτισμό των αναλυτών πριν τη λήψη φάσματος NMR. Στη συνέχεια έγινε διαβίβαση αέριου αζώτου για την απομάκρυνση των διαλυτών της χρωματογραφίας. Οι αναλύτες εκλούνται με δευτεριωμένο ακετονιτρίλιο όπου ο συνολικός όγκος για την έκλουση και μεταφορά του δείγματος ήταν 380 μl. Όλες οι μικροστήλες μετά τη χρήση επανεγκλιματίζονται αυτόματα με διαβίβαση 1 ml ακετονιτρίλιου με ροή 1 ml/min και εξισορροπούνται με 1 ml νερού με ροή 1 ml/min. Η λήψη των φασμάτων NMR  $^1\text{H}$  πραγματοποιήθηκε σε φασματογράφο Bruker AV-500. Για την καταστολή του σήματος του διαλύτη και του νερού χρησιμοποιήθηκε η παλμική ακολουθία "1c1pnf2", η οποία βασίζεται στην παλμική ακολουθία της μονοδιάστατης έκδοσης της ακολουθίας NOESY και επιτρέπει τη διπλή καταστολή των σημάτων συντονισμού νερού και ακετονιτρίλιου.

#### **2.6.2.4 Μελέτη της σύστασης των εκχυλισμάτων με φασματοσκοπία NMR- $^1\text{H}$**

Ποσότητα στερεού ακατέργαστου εκχυλίσματος (20 mg) διαλύθηκε σε 500 μl δευτεριωμένου διαλύτη διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO- $d_6$ ) ή δευτεριωμένου ακετονιτρίλιου (CD<sub>3</sub>CN). Η μέτρηση των χημικών μετατοπίσεων έγινε με βάση την

ένωση αναφοράς τετραμεθυλοσιλυλοπροπιονικό άλας του Na (TMSP- $d_4$ ). Η λήψη και η επεξεργασία των φασμάτων έγινε με τη χρήση του λογισμικού TopSpin 2.1.

Για τη μέθοδο προσδιορισμού των ολικών φαινολών, συγκεκριμένη ποσότητα από φαινολικά οξέα (2.5-12 mM), φλαβονοειδή (2.5-20 mM) και εκχυλίσματα (5 mg) διαλύθηκε σε δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO- $d_6$ ) μέχρι όγκου 500  $\mu$ l και τοποθετήθηκε σε κατάλληλο σωληνάριο NMR. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό αυτών πραγματοποιήθηκε προσθήκη συγκεκριμένης ποσότητας διαλύματος TMSP- $d_4$  (1.451mM) σε δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο. Εφαρμόστηκε πρωτονιακή φασματοσκοπία και η τεχνική της ακτινοβολήσης στο σήμα συντονισμού του νερού. Προσδιορίστηκε η παράμετρος  $T_1$  για τις πρότυπες ενώσεις και το μίγμα χρησιμοποιώντας τη μέθοδο «μηδενικού σημείου» (null point method). Η τιμή του  $T_1$  βρέθηκε από 0.3 έως 0.5s και έτσι η τιμή του χρόνου καταγραφής (acquisition time) συν το χρόνο αποδιέγερσης (relaxation delay) τέθηκε περισσότερο από πέντε φορές μεγαλύτερη.

### 2.6.3 Χρωματομετρικός προσδιορισμός ολικών φαινολικών συστατικών

Ο προσδιορισμός των ολικών φαινολών με την μέθοδο Folin-Ciocalteu βασίζεται στην οξειδωση 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 συστατικών.

Για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών συστατικών ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία: σε ογκομετρική φιάλη των 10 ml φέρονται 0,2 ml δείγματος ή πρότυπου διαλύματος. Ακολουθεί προσθήκη 4,8 ml απεσταγμένου νερού. Προστίθενται 0,5 ml δ/τος Folin-Ciocalteu και μετά από 3 min προστίθεται 1,0 ml κορεσμένου διαλύματος  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  και συμπληρώνεται ο όγκος στη φιάλη με νερό. Μετά από παραμονή 1h σε σκοτεινό χώρο μετράται η απορρόφηση σε μήκος κύματος 725 nm (Gutfinger et al., 1981).

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών στα εκχυλίσματα φύλλων *Ligustrum lucidum* κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς με

πρότυπο καφεϊκό οξύ. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από 50 έως 400 mg/ kg και για τον προσδιορισμό ακολουθήθηκε η παραπάνω διαδικασία.

#### 2.6.4 Χρωματομετρικός προσδιορισμός ολικών φλαβονοειδών συστατικών

Η αρχή της χρωματομετρικής αυτής μεθόδου βασίζεται στη δυνατότητα του  $\text{AlCl}_3$  να σχηματίζει σταθερά σύμπλοκα με την καρβονυλομάδα στη θέση 4 και τις υδροξυλομάδες στη θέση 3 του ίδιου δακτυλίου και στη θέση 5 του δακτυλίου Α των φλαβονών και φλαβονολών. Επιπρόσθετα, το  $\text{AlCl}_3$  σχηματίζει ασταθή σύμπλοκα με τις *ορθο*-δι-υδροξυλομάδες των δακτυλίων Α και Β των φλαβονοειδών (Chang *et al.*, 2002). Αποτέλεσμα της αντίδρασης αυτής είναι ο σχηματισμός κίτρινων προϊόντων. Η ένταση του χρώματος με μέγιστο στα 415 nm είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των φλαβονοειδών.

Ο προσδιορισμός των ολικών φλαβονοειδών συστατικών πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο των Miliuskas *et al.*, 2004 και ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία: σε ογκομετρική φιάλη των 25 ml φέρονται 1 ml εκχυλίσματος σε μεθανόλη (10 mg/ml) και 1 ml αιθανολικού εκχυλίσματος  $\text{AlCl}_3$  (20 mg/ml) και συμπληρώνεται ο όγκος στη φιάλη με αιθανόλη. Μετά από παραμονή 40min σε υδατόλουτρο στους 20°C μετράται η απορρόφηση σε μήκος κύματος 415 nm. Για τον τυφλό προσδιορισμό χρησιμοποιήθηκε 1 ml εκχυλίσματος, μία σταγόνα οξικού οξέος και συμπληρώθηκε μέχρι τα 25 ml με αιθανόλη.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των φλαβονοειδών στα εκχυλίσματα φύλλων *Ligustrum lucidum* κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς με πρότυπη ένωση ρουτίνη κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από 25 έως 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Η περιεκτικότητα σε φλαβονοειδή στα εκχυλίσματα υπολογίζεται σύμφωνα με την εξίσωση:

$$X = (A \times m_0 \times 10) / (A_0 \times m)$$

όπου: X είναι η περιεκτικότητα σε φλαβονοειδή σε  $\text{mg}/\text{g}$  εκχυλίσματος, A η απορρόφηση του διαλύματος του εκχυλίσματος στα 415 nm,  $A_0$  η απορρόφηση του διαλύματος της πρότυπης ρουτίνης στα 415 nm, m το βάρος του εκχυλίσματος σε g και  $m_0$  το βάρος της ρουτίνης στο διαλυμα σε g.

### 2.6.5 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης με τη δοκιμή σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH<sup>•</sup>

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ικανότητα των αντιοξειδωτικών για δέσμευση της ρίζας DPPH<sup>•</sup> και οφείλεται στην ικανότητά τους να δίνουν το φαινολικό υδρογόνο στην ελεύθερη ρίζα. Με την πρόσληψη του φαινολικού υδρογόνου από την ρίζα DPPH<sup>•</sup> προκαλείται αποχρωματισμός αυτής και από τη μείωση της απορρόφησης, που εξαρτάται με το ποσοστό δέσμευσης της ρίζας, εκτιμάται η αντιοξειδωτική ικανότητα.

Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων των φύλλων έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο των Choi *et al.*, 2002. Διαλύματα (1,0 mg/ ml) των στερεών εκχυλισμάτων σε μεθανόλη αραιώνονται με μεθανόλη σε τελικές συγκεντρώσεις των 500, 250, 100, 50 και 10 μg/ ml. Σε μια κυβελίδα φέρονται με την βοήθεια αυτόματης πιπέτας 1 ml μεθανολικού δ/τος ρίζας DPPH<sup>•</sup> 0,3 mM και 2 ml διαλύματος εκχυλίσματος διαφορετικών συγκεντρώσεων. Αφήνονται να αντιδράσουν σε θερμοκρασία δωματίου και μετά από 30 min μετράται η απορρόφηση στα 517 nm. Η αντιοξειδωτική δράση υπολογίζεται σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\text{Αντιοξειδωτική δράση \% (scavenging capacity)} = 100 - [(A_{\text{δείγματος}} - A_{\text{τυφλού}}) * 100 / A_{\text{μάρτυρα}}]$$

όπου A είναι η απορρόφηση στα 517 nm

Για τον τυφλό προσδιορισμό χρησιμοποιήθηκε 1,0 ml MeOH και 2,0 ml διάλυμα εκχυλίσματος. Για τον μάρτυρα χρησιμοποιήθηκε δ/μα ρίζας DPPH<sup>•</sup> και MeOH αντίστοιχα. Για την έκφραση της αντιοξειδωτικής δράσης χρησιμοποιείται ο συντελεστής SC<sub>50</sub> που ορίζεται ως η συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού ή του εκχυλίσματος στην οποία παρατηρείται το 50% της δέσμευσης της ρίζας όπως μετράται από τη μείωση της απορρόφησης στα 517 nm. Για τον υπολογισμό του SC<sub>50</sub> έγιναν αραιώσεις ενός πυκνού διαλύματος εκχυλίσματος στις οποίες προστέθηκε σταθερή ποσότητα διαλύματος ρίζας, μετρήθηκε η απορρόφηση αυτών μετά από 30 min και οι τιμές απορρόφησης με τις συγκεντρώσεις τοποθετήθηκαν σε διάγραμμα από το οποίο υπολογίστηκε το SC<sub>50</sub>.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

**ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ  
ΚΑΙ ΤΟΥ ΧΡΟΝΟΥ ΣΥΛΛΟΓΗΣ ΣΤΗ ΣΥΣΤΑΣΗ  
ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΦΥΛΛΩΝ *LIGUSTRUM LUCIDUM* ΜΕ ΤΗ  
ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ LC-ESI-MS<sup>n</sup> ΚΑΙ  
NMR <sup>1</sup>H.**

### 3.1 Εισαγωγή

Τα βιβλιογραφικά δεδομένα που σχετίζονται με την ανάλυση και ταυτοποίηση της σύστασης των εκχυλισμάτων *Ligustrum lucidum* περιορίζονται σε μελέτες του που αφορούν τον καρπό του φυτού. Οι μελέτες αυτές πραγματοποιήθηκαν κυρίως από Κινέζους ερευνητές, και ένα μεγάλο πλήθος ενώσεων έχει απομονωθεί και ταυτοποιηθεί. Στις περισσότερες αναφορές ο διαχωρισμός περιορίζεται σε κλάσματα του φυτού πλούσια σε ενώσεις με βιολογική δράση όπως αναφέρεται στο θεωρητικό τμήμα της διατριβής.

Ο σχεδιασμός των πειραμάτων βασίστηκε σε προηγούμενη εμπειρία του εργαστηρίου μας στη μελέτη φυτικών εκχυλισμάτων (Exarchou *et al.*, 2002a; Tatsis *et al.*, 2007; Goulas *et al.*, 2009; Kontogianni *et al.*, 2009) που αφορά την ταυτοποίηση ενώσεων με βιολογική δράση. Το φυτό *Ligustrum lucidum* επιλέχτηκε γιατί όπως και το ελαιόδεντρο ανήκουν στην ίδια οικογένεια (*Oleaceae*), και σύμφωνα με τη βιβλιογραφία εμφανίζουν παρόμοιες ομάδες ενώσεων. Συγκεκριμένα, η μελέτη φύλλων ελαιόδεντρου έδειξε την παρουσία της Ελευρωπαΐνης, ενός σεκοϊριδοειδούς με σημαντική βιολογική δράση. Έτσι, η μελέτη της σύστασης των φύλλων του φυτού *Ligustrum lucidum* θεωρήθηκε ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα κυρίως λόγω της βιολογικής σημασίας των σεκοϊριδοειδών και γενικά των φαινολικών ενώσεων που αναμένεται να περιλαμβάνει.

Στόχος αυτού του κεφαλαίου είναι η συγκριτική μελέτη της επίδρασης της περιοχής και του χρόνου συλλογής στα φαινολικά συστατικά των φύλλων *Ligustrum lucidum* και η ανάλυση των κυριοτέρων (χωρίς καμία προηγούμενη κατεργασία του αρχικού μεθανολικού και υδατικού εκχυλίσματος), με τη χρήση της φασματοσκοπίας NMR  $^1\text{H}$  και της συνδυαστικής τεχνικής LC-ESI-MS<sup>n</sup>. Για το σκοπό αυτό, παρασκευάστηκε σειρά εκχυλισμάτων από δείγματα φύλλων τα οποία συλλέχθηκαν από δύο διαφορετικές περιοχές της Ελλάδος (Ιωάννινα: βορειοδυτική Ελλάδα και Κάριανη: βόρεια Ελλάδα) σε 4 διαφορετικές χρονικές περιόδους (Φεβρουάριο- Μάιο- Ιούλιο και Νοέμβριο). Τα δείγματα αυτά εκχυλίστηκαν με μεθανόλη και απεσταγμένο νερό, βασιζόμενοι σε μελέτες φυτικών εκχυλισμάτων πλούσιων σε βιοενεργά συστατικά (Paiva- Martins και Gordon, 2001; Lee-Huang *et al.*, 2003; Shoemaker *et al.*, 2005; Goulas *et al.*, 2009).

### 3.2 Μελέτη της επίδρασης της περιοχής και του χρόνου συλλογής στη σύσταση των ολικών φαινολών, ολικών φλαβονοειδών και εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων

Η επίδραση της περιοχής και του χρόνου συλλογής στη σύσταση σε φαινολικά συστατικά και στην αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων φύλλων *Ligustrum lucidum* μελετήθηκε χρησιμοποιώντας φύλλα τα οποία συλλέχθηκαν από δύο διαφορετικές περιοχές της Ελλάδος (Ιωάννινα: βορειοδυτική Ελλάδα και Κάριανη: βόρεια Ελλάδα) σε 4 διαφορετικές χρονικές περιόδους (Φεβρουάριο- Μάιο- Ιούλιο και Νοέμβριο) κατά το έτος 2006. Η παραλαβή των υδατικών εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μελέτη των Lee-Huang *et al.*, (2003) και Shoemaker *et al.*, (2005) ενώ των μεθανολικών σύμφωνα με τη μελέτη των Paiva-Martins και Gordon, (2001) με κάποιες τροποποιήσεις. Με τον τρόπο αυτό αναφέρεται ότι προκύπτουν εκχυλίσματα πλούσια σε φαινολικά συστατικά (περιγράφονται αναλυτικά στο πειραματικό μέρος). Στα 16 συνολικά εκχυλίσματα που προέκυψαν (8 μεθανολικά και 8 υδατικά) δόθηκαν κωδικοί ονομασίας για την γρήγορη και εύκολη περιγραφή τους (Πίνακας 2.2 του πειραματικού μέρους).

Ο προσδιορισμός των ολικών φαινολών και ολικών φλαβονοειδών των εκχυλισμάτων έγινε χρωματομετρικά και η συγκέντρωσή τους υπολογίστηκε από καμπύλη αναφοράς που κατασκευάστηκε με πρότυπο διάλυμα καφεϊκού οξέος και ρουτίνης αντίστοιχα και εκφράσθηκε ως mg καφεϊκού οξέος- ρουτίνης /g στερεού εκχυλίσματος. Τα αποτελέσματα δίνονται στον Πίνακα 3.1. Στον ίδιο Πίνακα δίνεται η αντιοξειδωτική δράση ως  $SC_{50}$  που αντιστοιχεί στη συγκέντρωση του εκχυλίσματος σε  $\mu\text{g/ml}$  στην οποία παρατηρείται το 50% της δέσμευσης της ρίζας DPPH $\cdot$  και ισχύει ότι όσο μικρότερη είναι η τιμή αυτή τόσο καλύτερη αντιοξειδωτική δράση παρουσιάζει το εκχύλισμα ή η πρότυπη ένωση.

**Πίνακας 3.1.** Επίδραση των συνθηκών εκχύλισης στην περιεκτικότητα των ολικών φαινολών, των ολικών φλαβονοειδών και στην αντιοξειδωτική δράση εκχυλισμάτων φύλλων *Ligustrum lucidum*

| A/α | Εκχυλίσματα φύλλων<br><i>Ligustrum lucidum</i> | Ολικές φαινόλες<br>(mg καφεϊκού<br>οξέος /g στερεού<br>εκχυλίσματος) | Ολικά<br>φλαβονοειδή<br>(mg ρουτίνης /g<br>στερεού<br>εκχυλίσματος) | *SC <sub>50</sub><br>(μg/ml) |
|-----|------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|------------------------------|
| 1   | <b>L.I.M.Aq</b>                                | 71.4                                                                 | 38.7                                                                | 275.6                        |
| 2   | <b>L.I.J.Aq</b>                                | 46.1                                                                 | 22.3                                                                | 397.1                        |
| 3   | <b>L.I.F.Aq</b>                                | 77.1                                                                 | 25.0                                                                | 359.4                        |
| 4   | <b>L.I.N.Aq</b>                                | 29.3                                                                 | 16.9                                                                | 439.7                        |
| 5   | <b>L.I.M.MeOH</b>                              | 56.7                                                                 | 14.7                                                                | 405.8                        |
| 6   | <b>L.I.J.MeOH</b>                              | 47.3                                                                 | 29.9                                                                | 353.7                        |
| 7   | <b>L.I.F.MEOH</b>                              | 83.9                                                                 | 35.2                                                                | 303.2                        |
| 8   | <b>L.I.N.MeOH</b>                              | 21.6                                                                 | 11.9                                                                | 480.4                        |
| 9   | <b>L.K.M.Aq</b>                                | 68.9                                                                 | 23.9                                                                | 317.6                        |
| 10  | <b>L.K.J.Aq</b>                                | 16.8                                                                 | 4.5                                                                 | 512.3                        |
| 11  | <b>L.K.F.Aq</b>                                | 61.5                                                                 | 21.1                                                                | 314.5                        |
| 12  | <b>L.K.N.Aq</b>                                | 19.2                                                                 | 5.4                                                                 | 490.1                        |
| 13  | <b>L.K.M.MeOH</b>                              | 89.4                                                                 | 42.3                                                                | 281.9                        |
| 14  | <b>L.K.J.MeOH</b>                              | 45.4                                                                 | 28.0                                                                | 395.7                        |
| 15  | <b>L.K.F.MeOH</b>                              | 68.7                                                                 | 24.9                                                                | 400.2                        |
| 16  | <b>L.K.N.MeOH</b>                              | 28.1                                                                 | 9.4                                                                 | 505.5                        |

\*SC<sub>50</sub> είναι η συγκέντρωση του εκχυλίσματος (μg/ ml) στην οποία παρατηρείται το 50% της δέσμευσης της ρίζας DPPH\*

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 3.1 προκύπτει ότι οι τιμές των εκχυλισμάτων σε ολικές φαινόλες κυμαίνονται από 16.8 έως 89.4 mg καφεϊκού οξέος/g στερεού εκχυλίσματος. Πλουσιότερο σημειώθηκε ότι είναι το μεθανολικό εκχύλισμα από την Κάριανη το μήνα Μάιο (L.K.M.MeOH) και αυτό από τα Ιωάννινα το μήνα Φεβρουάριο (L.I.F.MeOH). Το υδατικό της Κάριανης το μήνα Ιούλιο (L.K.J.Aq) ήταν το φτωχότερο όλων και ακολουθούν τα μεθανολικά και υδατικά του Νοεμβρίου και από τις δύο περιοχές (L.I.N.MEOH, L.K.N.MeOH, L.K.N.Aq). Επίσης, παρατηρείται ότι κατά τους μήνες Μάιο και Φεβρουάριο οι συγκεντρώσεις των ολικών φαινολών είναι υψηλότερες σε σχέση με αυτές κατά τους μήνες Ιούλιο και Νοέμβριο. Σε παρόμοια αποτελέσματα κατέληξαν και οι Bouaziz *et al.*, 2004 οι οποίοι σύγκριναν το περιεχόμενο σε ολικές φαινόλες του ελαιοκάρπου σε διάφορες χρονικές περιόδους και παρατήρησαν ότι ο χρόνος συλλογής επηρεάζει το ποσοστό αυτό. Συγκεκριμένα, τα υψηλότερα ποσοστά ολικών φαινολών σημειώθηκαν κατά τη περίοδο του Φεβρουαρίου.

Διαφορές επίσης στο περιεχόμενο των ολικών φαινολών παρατήρησαν και οι Lima *et al.*, 2005 οι οποίοι μελέτησαν την επίδραση των σταδίων ωρίμανσης και των κλιματολογικών συνθηκών στον καρπό ασερόλα. Η έρευνα αυτή έδειξε ότι σε περιόδους με βροχόπτωση το περιεχόμενο σε ολικά φαινολικά ήταν αρκετά μικρότερο σε σχέση με αυτό σε περιόδους ξηρασίας. Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 3.1 προκύπτει ότι και για τα εκχυλίσματα φύλλων *Ligustrum lucidum* τα χαμηλότερα ποσοστά ολικών φαινολών παρατηρήθηκαν το μήνα Νοέμβριο, περίοδο έντονων βροχοπτώσεων.

Συγκρίνοντας τα μεθανολικά εκχυλίσματα από την Κάριανη με τα αντίστοιχα υδατικά, παρατηρείται ότι πλουσιότερα σε ολικές φαινόλες ήταν τα μεθανολικά. Το ίδιο παρατηρήθηκε και στα εκχυλίσματα από τα Ιωάννινα, όπου οι συγκεντρώσεις των μεθανολικών τις περισσότερες φορές ήταν μεγαλύτερες από αυτές των υδατικών. Μεταξύ των υδατικών εκχυλισμάτων, αυτά από τα Ιωάννινα παρουσίασαν υψηλότερες συγκεντρώσεις σε ολικά φαινολικά σε σχέση με αυτές από την Κάριανη:

#### **L.I.Aq > L.K.Aq**

Μεταξύ, όμως, των μεθανολικών εκχυλισμάτων, η Κάριανη έδωσε υψηλότερες τιμές σε σχέση με τα Ιωάννινα:

#### **L.K.MeOH > L.I.MeOH**

Όσον αφορά το περιεχόμενο σε ολικά φλαβονοειδή το δείγμα που παρουσίασε το υψηλότερο ποσοστό είναι το μεθανολικό εκχύλισμα από την Κάριανη το μήνα Μάιο (L.K.M.MeOH) και έπεται το υδατικό από τα Ιωάννινα κατά την ίδια χρονική περίοδο (L.I.M.Aq). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Πίνακα 3.1 το φτωχότερο όλων είναι το υδατικό της Κάριανης του Ιουλίου (L.K.J.Aq). Οι τιμές των εκχυλισμάτων σε ολικά φλαβονοειδή κυμαίνονται από 5.4 έως 42.3 mg ρουτίνης/g στερεού εκχυλίσματος.

Το μεθανολικό εκχύλισμα από τα Ιωάννινα το μήνα Φεβρουάριο (L.I.F.MeOH) αλλά και το υδατικό του Μαΐου (L.I.M.Aq) σημειώνεται ότι είναι τα πλουσιότερα σε ολικά φλαβονοειδή εκχυλίσματα της περιοχής αυτής με 35.2 και 38.7 mg ρουτίνης/g στερεού εκχυλίσματος αντίστοιχα. Ενώ από την Κάριανη, τα μεθανολικά εκχυλίσματα του Μαΐου (L.K.M.MeOH) και του Ιουλίου (L.K.J.MeOH)

φαίνεται ότι έδωσαν τις υψηλότερες τιμές 42.3 και 28 mg ρουτίνης/g στερεού εκχυλίσματος αντίστοιχα.

Συγκρίνοντας τα υδατικά εκχυλίσματα και από τις δύο περιοχές παρατηρείται ότι αυτά από την περιοχή των Ιωαννίνων έδωσαν υψηλότερες τιμές σε ολικά φλαβονοειδή:

### **L.I.Aq > L.K.Aq**

Η σύγκριση των μεθανολικών έδειξε ότι αυτό της Κάριανης το Μάιο έδωσε την υψηλότερη τιμή όλων και παρόμοιες τιμές για τα υπόλοιπα των δύο περιοχών.

Η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων, που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη, βρέθηκε μεγαλύτερη για το υδατικό εκχύλισμα από τα Ιωάννινα το Μάιο (L.I.M.Aq) με συγκέντρωση 275.6 µg/ml καθώς και για το μεθανολικό από την Κάριανη την ίδια χρονική περίοδο (L.K.M.MeOH) με 281.9 µg/ml. Τη χαμηλότερη τιμή όλων παρουσίασε το υδατικό εκχύλισμα του Ιουλίου (512 µg/ml) και το μεθανολικό του Νοεμβρίου (505.5 µg/ml) και τα δύο από την περιοχή της Κάριανης. Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 3.1 όσον αφορά την αντιοξειδωτική δράση των υδατικών εκχυλισμάτων από τα Ιωάννινα, αυτή του Μαΐου (L.I.M.Aq) ήταν η ισχυρότερη ενώ από την Κάριανη κατά τους μήνες Φεβρουάριου (L.K.F.Aq) και Μάιο (L.K.M.Aq) παρατηρήθηκαν οι υψηλότερες τιμές. Η σύγκριση των μεθανολικών εκχυλισμάτων και από τις δύο περιοχές έδειξε ότι το μεθανολικό της Κάριανης του Μαΐου (L.K.M.MeOH) και το μεθανολικό των Ιωαννίνων το Φεβρουάριο (L.I.F.MeOH) ήταν τα μεγαλύτερα.

Οι Nagy *et al.*, 2006 μελέτησαν την αντιοξειδωτική δράση φύλλων *Ligustrum vulgare* και *L. delavayanum* χρησιμοποιώντας διαφορετικούς οργανικούς διαλύτες εκχύλισης. Τα μεθανολικά τους εκχυλίσματα παρουσίασαν παρόμοιες τιμές με αυτές του Πίνακα 3.1. Συγκεκριμένα, το μεθανολικό εκχύλισμα του *Ligustrum vulgare* είχε την τιμή 221.6 µg/ml εκφραζόμενο ως προς SC<sub>50</sub>, ενώ η τιμή του *L. Delavayanum* ήταν πολύ μεγαλύτερη (1300.9 µg/ml).

Μία πρόσφατη μελέτη των She *et al.*, 2008 εκτίμησης της αντιοξειδωτικής δράσης φύλλων *Ligustrum purpurascens* με τη δοκιμή DPPH', έδειξε ότι το μεθανολικό εκχύλισμα παρουσίασε ισχυρή δράση με τιμή SC<sub>50</sub> = 45 µg/ml. Το φυτό

αυτό είναι πολύ γνωστό στη νότιο Κίνα, έχει παρόμοια γεύση με το τσάι και πίνεται ως αφέψημα.

Ωστόσο όμως, είναι δύσκολη η σύγκριση της αντιοξειδωτικής δράσης φύλλων *Ligustrum lucidum* με δεδομένα της βιβλιογραφίας γιατί οι περισσότερες βιβλιογραφικές αναφορές που υπάρχουν αναφέρονται στον καρπό ή σε άλλα υποείδη του φυτού αυτού. Επιπρόσθετα, η ποιότητα των φυτικών εκχυλισμάτων και η αντιοξειδωτική τους δράση εξαρτάται από την ποιότητα του αρχικού φυτού, τη γεωγραφική προέλευση του, τις κλιματολογικές συνθήκες, τη χρονική περίοδο και τις συνθήκες συλλογής καθώς και τις συνθήκες διατήρησης του (Cuvelier *et al.*, 1996). Επίσης, η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων εκφράζεται και με διαφορετικές παραμέτρους κάθε φορά ανάλογα με τη μέθοδο που χρησιμοποιείται.

### **3.3 Στατιστική μελέτη της επίδρασης της περιοχής και του χρόνου συλλογής στη σύσταση των ολικών φαινολών, ολικών φλαβονοειδών και της εκτίμησης της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων**

Ο στατιστικός έλεγχος που πραγματοποιήθηκε για τη σύγκριση των μέσων όρων των συγκεντρώσεων των ολικών φλαβονοειδών, των ολικών φαινολών και της εκτίμησης της αντιοξειδωτικής δράσης ( $SC_{50}$ ) βασίστηκε στην Ανάλυση Διακύμανσης Τριών Παραγόντων (3-way Analysis of Variance – ANOVA). Οι εξεταζόμενοι παράγοντες σε κάθε περίπτωση ήταν η μέθοδος εκχύλισης (μεθανόλη-απεσταγμένο νερό), η περιοχή συλλογής (Ιωάννινα-Κάριανη) και η χρονική περίοδος (Μάιος, Ιούλιος, Νοέμβριος, Φεβρουάριος). Πριν τη διενέργεια κάθε ελέγχου Ανάλυσης Διακύμανσης τα δείγματα ελέγχθηκαν για την ύπαρξη κανονικότητας και ομοιογένειας διακυμάνσεων οι οποίες βρέθηκαν να ισχύουν σε κάθε περίπτωση.

Όσον αφορά τις συγκεντρώσεις των ολικών φλαβονοειδών των εκχυλισμάτων, η στατιστική ανάλυση έδειξε πως αυτές δεν μεταβάλλονται σημαντικά με κάποιον από τους εξεταζόμενους παράγοντες (μέθοδος εκχύλισης, περιοχή συλλογής και χρονική περίοδος). Η τιμή P για τους παράγοντες αυτούς ήταν 0.440, 0.480 και 0.093 αντίστοιχα, τιμές μεγαλύτερες του επιπέδου λάθους 0.05. Επισημαίνεται, ότι στατιστικά σημαντικές διαφορές για επίπεδο εμπιστοσύνης 95% των μέσων όρων υπάρχουν όταν η τιμή P είναι μικρότερη του 0.05. Επομένως,

στατιστικά, οι συγκεντρώσεις των ολικών φλαβονοειδών δεν επηρεάζονται από τους μελετηθέντες παράγοντες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 3.2.

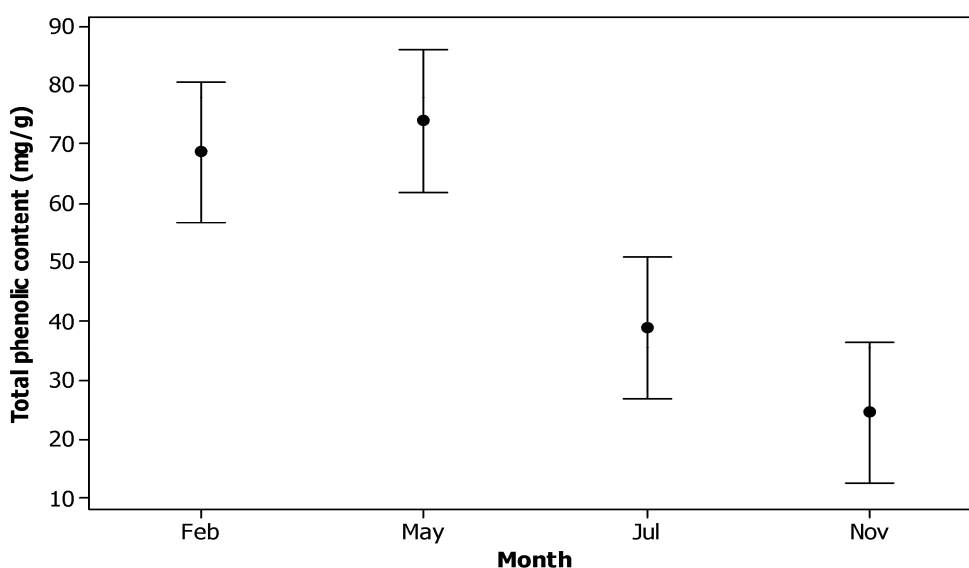
**Πίνακας 3.2.** Τιμές της πιθανότητας σημαντικότητας P της ανάλυσης διακύμανσης τριών παραγόντων στα ολικά φλαβονοειδή, στις ολικές φαινόλες και στην εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης εκφραζόμενη ως προς SC<sub>50</sub>

| Εξεταζόμενες χημικές μεταβλητές<br>(Chemical compounds) | Παράγοντες<br>(Factor) | Πιθανότητα<br>σημαντικότητας<br>(P-value) |
|---------------------------------------------------------|------------------------|-------------------------------------------|
| Ολικά φλαβονοειδή                                       | Μέθοδος εκχύλισης      | 0.440                                     |
|                                                         | Περιοχή συλλογής       | 0.480                                     |
|                                                         | Χρονική περίοδος       | 0.093                                     |
| Ολικές φαινόλες                                         | Μέθοδος εκχύλισης      | 0.608                                     |
|                                                         | Περιοχή συλλογής       | 0.545                                     |
|                                                         | Χρονική περίοδος       | <b>&lt;0.001</b>                          |
| SC <sub>50</sub>                                        | Μέθοδος εκχύλισης      | 0.929                                     |
|                                                         | Περιοχή συλλογής       | 0.379                                     |
|                                                         | Χρονική περίοδος       | <b>0.009</b>                              |

Οι παράγοντες μέθοδος εκχύλισης και περιοχή συλλογής, σύμφωνα με τον Πίνακα 4.2 δεν επηρεάζουν στατιστικά τη μεταβλητή ολικές φαινόλες. Η τιμή της πιθανότητας σημαντικότητας είναι  $P=0.608$  για τις διαφορετικές μεθόδους εκχύλισης και  $P=0.545$  για τις δύο περιοχές συλλογής. Αντίθετα όμως, υπάρχει σημαντική στατιστική μεταβολή της συγκέντρωσης των ολικών φαινολών με το χρόνο συλλογής ( $P<0.001$ ). Από το Σχήμα 3.1 φαίνεται ότι οι φαινολικές ενώσεις των φύλλων *Ligustrum lucidum* βρίσκονται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση τους μήνες Φεβρουάριο και Μάιο ενώ τον Ιούλιο και το Νοέμβριο παρουσιάζουν χαμηλότερες τιμές. Επίσης παρατηρείται ότι οι συγκεντρώσεις μεταξύ του Μαΐου και του Φεβρουαρίου στατιστικά δεν διαφέρουν. Παρομοίως, και οι συγκεντρώσεις του Ιουλίου και του

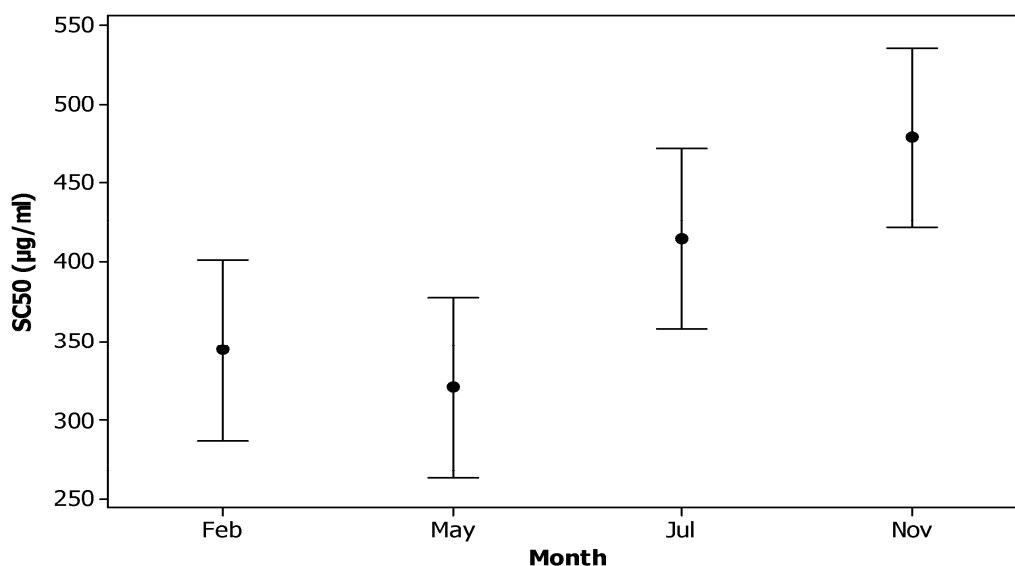
Νοεμβρίου δεν παρουσιάζουν στατιστική διαφορά. Σημαντική όμως μεταβολή φαίνεται να υπάρχει μεταξύ Φεβρουαρίου-Ιουλίου και Φεβρουαρίου-Νοεμβρίου με τα εκχυλίσματα του Φεβρουαρίου να περιέχουν υψηλότερες συγκεντρώσεις ολικών φαινολών. Ομοίως, συγκρίνοντας τα εκχυλίσματα του Μαΐου-Ιουλίου και Μαΐου-Νοεμβρίου παρατηρείται ότι εκείνα του Μαΐου είναι πλουσιότερα ακολουθώντας την εξής σειρά:

$$L.M. \approx L.F. > L.J. \approx L.N.$$



**Σχήμα 3.1.** Επίδραση του χρόνου συλλογής στην περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά (οι κάθετες ευθείες παριστούν τα όρια εμπιστοσύνης 95% των μέσων τιμών των ολικών φαινολών)

Γενικά για τα γραφήματα μέσων όρων οι γραμμές που εκτείνονται πάνω και κάτω από τον μέσο όρο είναι τα όρια εμπιστοσύνης 95% του μέσου όρου. Όταν τα όρια εμπιστοσύνης ενός μέσου όρου επικαλύπτουν κάποιο άλλο μέσο όρο, τότε αυτοί οι δύο μέσοι όροι δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά. Αν δεν υπάρχει επικάλυψη των ορίων εμπιστοσύνης μεταξύ δύο μέσων όρων, τότε αυτοί διαφέρουν σημαντικά (όπως συμβαίνει στην περίπτωση του Μαΐου και του Ιουλίου). Αν υπάρχει μερική επικάλυψη, τότε δεν είναι δυνατόν μόνο από το γράφημα να εξαχθεί συμπέρασμα. Όσο μικρότερη είναι η επικάλυψη, τόσο μεγαλύτερη πιθανότητα υπάρχει να διαφέρουν οι δύο μέσοι όροι.



**Σχήμα 3.2.** Επίδραση του χρόνου συλλογής των φύλλων *Ligustrum lucidum* στην εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης (οι κάθετες ευθείες παριστούν τα όρια εμπιστοσύνης 95% των μέσων τιμών του SC<sub>50</sub>)

Οι συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων όσον αφορά την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης (SC<sub>50</sub>) δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά χρησιμοποιώντας διαφορετική μέθοδο εκχύλισης ( $P=0.929$ ) και περιοχή συλλογής ( $P=0.379$ ). Αντίθετα, υπάρχει σημαντική μεταβολή της συγκέντρωσής τους σε σχέση με την περίοδο συλλογής ( $P=0.009$ ). Όπως φαίνεται από το Σχήμα 3.2, η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων τους μήνες Φεβρουάριο και Μάιο είναι υψηλότερη από αυτή κατά τους μήνες Ιούλιο και Νοέμβριο. Από τις τιμές του SC<sub>50</sub> παρατηρείται ότι ο Φεβρουάριος και ο Μάιος στατιστικά δεν διαφέρουν, όπως και ο Ιούλιος με το Νοέμβριο. Συγκρίνοντας τα εκχυλίσματα Φεβρουαρίου- Ιουλίου και Φεβρουαρίου- Νοεμβρίου φαίνεται ότι η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων του Φεβρουαρίου είναι ισχυρότερη. Ομοίως, η σύγκριση των εκχυλισμάτων Μαΐου- Ιουλίου και Μαΐου-Νοεμβρίου έδειξε ότι αυτό του Μαΐου έχει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση ακολουθώντας την εξής σειρά:

$$\mathbf{L.M. \approx L.F. > L.J. \approx L.N}$$

Συμπερασματικά, δείγματα της ίδιας ποικιλίας, συλλεγμένα σε διαφορετικές χρονικές περιόδους και από διαφορετικές περιοχές παρουσιάζουν ομοιότητα στα συστατικά τους η οποία κυμαίνεται από 21% έως 79%. Εξαίρεση αποτελούν τα

δείγματα του Φεβρουαρίου τα οποία δεν παρουσιάζουν καμία στατιστική ομοιότητα ως προς τα συστατικά τους με τα δείγματα των υπόλοιπων μηνών.

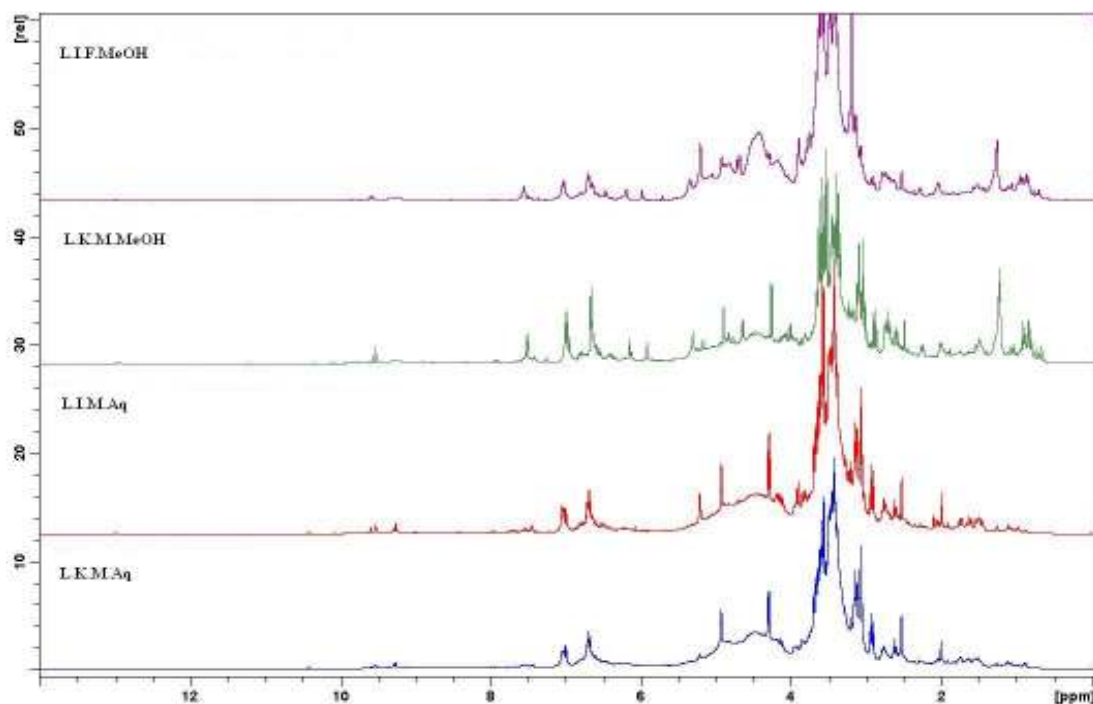
Γενικά, από τη στατιστική μελέτη των εκχυλισμάτων εξάγεται το συμπέρασμα ότι η περιοχή συλλογής των φύλλων *Ligustrum lucidum* δεν επηρεάζει τις συγκεντρώσεις των ολικών φαινολών, ολικών φλαβονοειδών και την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης. Επίσης, οι διαλύτες και οι συγκεκριμένες μέθοδοι εκχύλισης που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των εκχυλισμάτων έδειξαν παρόμοια συμπεριφορά. Αντίθετα όμως, ο χρόνος συλλογής των φύλλων φαίνεται να επηρεάζει τόσο τις συγκεντρώσεις των ολικών φαινολών όσο και την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων. Παρατηρείται ωστόσο, ότι όσον αφορά τις συγκεντρώσεις των ολικών φλαβονοειδών αυτές δεν παρουσιάζουν σημαντική στατιστική διαφορά με το χρόνο.

### **3.4 Μελέτη της σύστασης των εκχυλισμάτων με τη χρήση φασματοσκοπίας NMR <sup>1</sup>H**

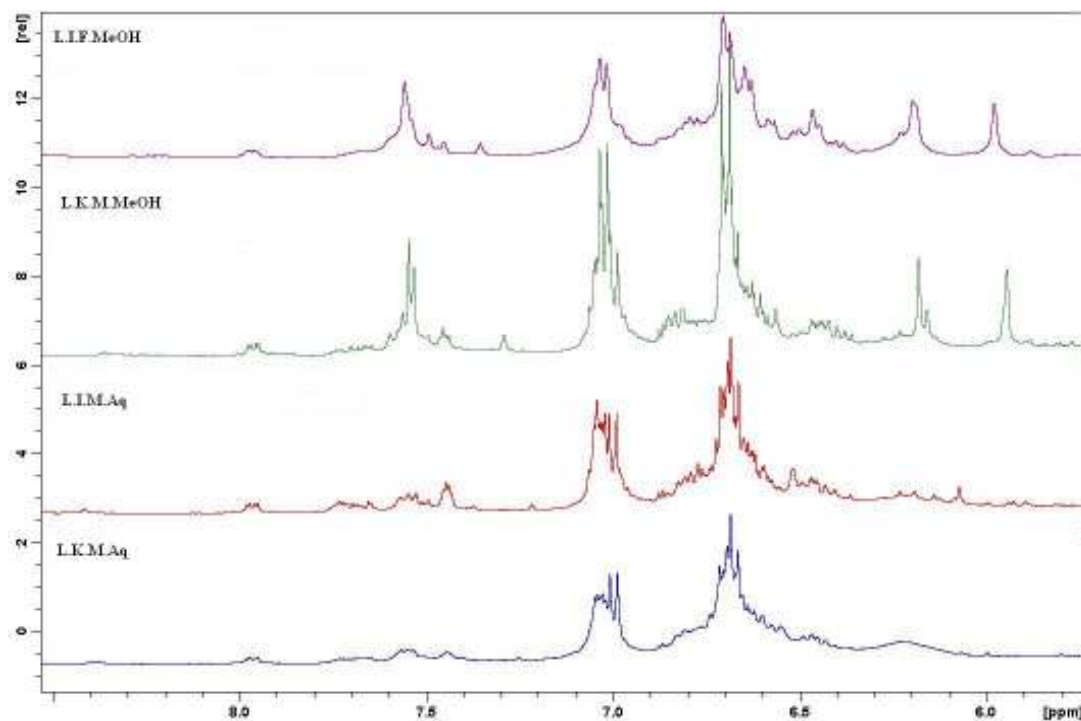
Από προηγούμενη εμπειρία του εργαστηρίου μας αλλά και από τη διεθνή βιβλιογραφία, έχει αποδειχθεί ότι με τη χρήση διαφόρων τεχνικών πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού είναι εφικτή η απευθείας ταυτοποίηση ενώσεων σε φυτικά εκχυλίσματα χωρίς προηγούμενο χρωματογραφικό διαχωρισμό (Fan, 1996; Gerothanassis *et al.*, 1998; Exarchou *et al.*, 2001; Exarchou *et al.*, 2002a, 2002b; Pauli *et al.*, 2005; Tatsis *et al.*, 2007; Politi *et al.*, 2008; Valverde & This, 2008; Kontogianni *et al.*, 2009). Έτσι λοιπόν, στην αρχική μας προσπάθεια για ανάλυση των εκχυλισμάτων και χαρακτηρισμό των ενώσεων των φύλλων *Ligustrum lucidum* χρησιμοποιήθηκε η φασματοσκοπία NMR <sup>1</sup>H απευθείας στο ακατέργαστο εκχύλισμα.

Παρασκευάστηκαν 16 εκχυλίσματα, 8 υδατικά και 8 μεθανολικά, από την περιοχή της Κάριανης και των Ιωαννίνων σε διαφορετικές χρονικές περιόδους και σε μια προκαταρκτική μελέτη εξετάστηκε η δυνατότητα εφαρμογής της φασματοσκοπίας NMR <sup>1</sup>H μιας διάστασης για το χαρακτηρισμό των κύριων ενώσεών τους. Οι κύριες τάξεις ενώσεων που απαντώνται σε εκχυλίσματα του γένους *Ligustrum* (οικογένεια: Oleaceae) είναι αυτή των απλών φαινολών, των φαινολικών οξέων, των σεκοιριδοειδών και των φλαβονοειδών. Με την κατεργασία και τις πειραματικές συνθήκες που αναφέρονται στο κεφάλαιο 2 της διατριβής έγινε η λήψη φασμάτων

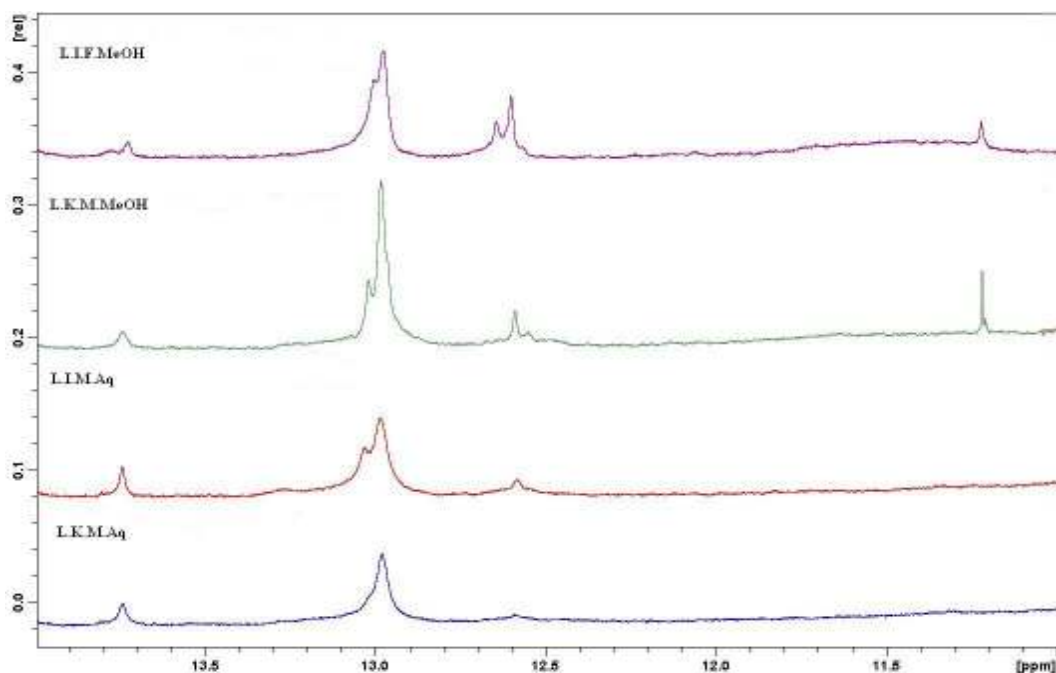
NMR  $^1\text{H}$  σε όλα τα φυτικά εκχυλίσματα. Στη συνέχεια παρουσιάζονται επιλεκτικά πρωτονικά φάσματα εκχυλισμάτων .



**Σχήμα 3.3.** Φάσματα NMR  $^1\text{H}$  υδατικών και μεθανολικών εκχυλισμάτων από τα Ιωάννινα και την Κάριανη σε διαλύτη  $\text{DMSO}-d_6$  (NS= 2k, T=298K,  $t_{\text{exp}}$ =2h & 28min)

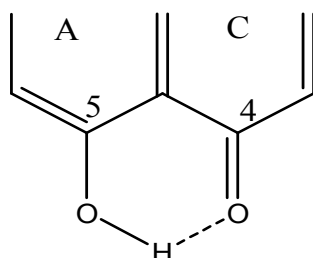


**Σχήμα 3.4.** Επιλεγμένη περιοχή του φάσματος NMR  $^1\text{H}$  (αρωματική περιοχή) σε διαλύτη  $\text{DMSO}-d_6$  (NS= 2k, T=298K,  $t_{\text{exp}}$ =2h & 28min)



**Σχήμα 3.5.** Περιοχή απορρόφησης των πρωτονίων OH(5) των φλαβονοειδών που σχηματίζουν ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου των φασμάτων του Σχήματος 3.3

Από τα φάσματα NMR- $^1\text{H}$  των υδατικών και μεθανολικών εκχυλισμάτων (Σχήμα 3.3-3.5) προκύπτει ότι όσον αφορά την αρωματική περιοχή των φασμάτων αυτή χαρακτηρίζεται από εξαιρετική πολυπλοκότητα. Το ίδιο όμως δεν ισχύει στην περίπτωση των σημάτων συντονισμού από 11.5 έως 14 ppm. Η περιοχή αυτή αποδεικνύεται εξαιρετικής διαγνωστικής αξίας για την ταυτοποίηση φλαβονοειδών σε φυτικά εκχυλίσματα, μεθοδολογία που αναπτύχθηκε από τους Exarchou *et al.*, 2002a, 2002b. Η μεθοδολογία στηρίζεται στο γεγονός ότι το υδροξύλικό πρωτόνιο OH(5) (Σχήμα 3.6) των φλαβονοειδών συμμετέχει σε ενδομοριακό δεσμό υδρογόνου με το καρβονυλικό οξύγονο στη θέση 4 του δακτυλίου C, με αποτέλεσμα να αποπροστατεύεται ισχυρά και το σήμα συντονισμού να μετατοπίζεται στην περιοχή του φάσματος πάνω από 11 ppm.



**Σχήμα 3.6.** Σχηματισμός ισχυρού ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου στα φλαβονοειδή.

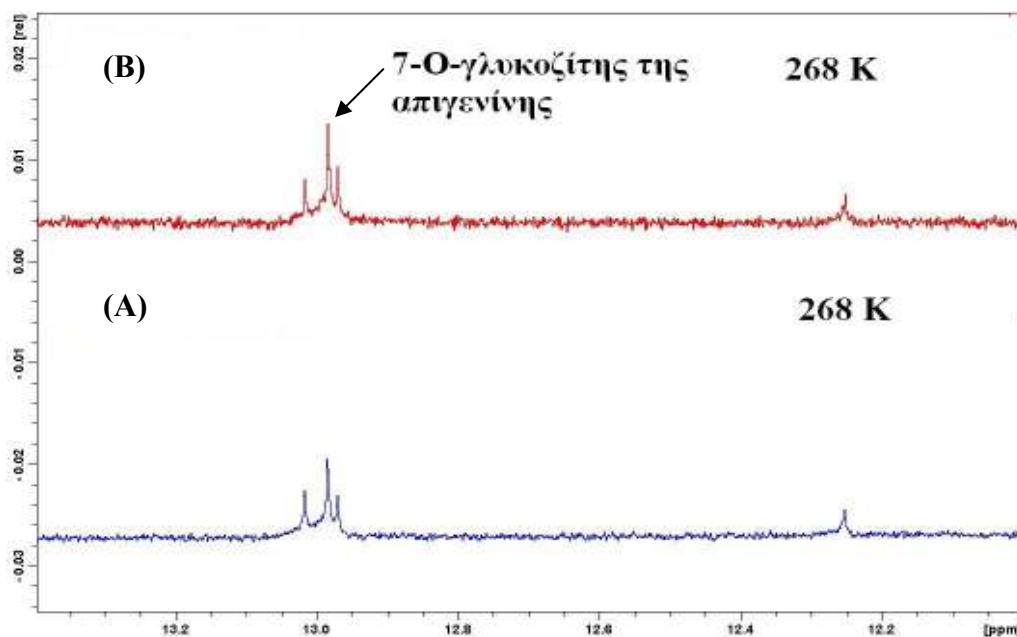
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της σχετικής μελέτης είναι δυνατή η διάκριση των φλαβονοειδών και των παραγώγων τους με τη φασματοσκοπία NMR  $^1\text{H}$  και συγκεκριμένα της κερκετίνης και του γλυκοζίτη αυτής τη ρουτίνη, καθώς και των φλαβονολών (π.χ. κερκετίνη) από τις φλαβόνες (π.χ. απιγενίνη). Αυτό οφείλεται στο ότι η χημική μετατόπιση του πρωτονίου OH(5) επηρεάζεται από την παρουσία της υδροξυλομάδας στη θέση 3 του δακτυλίου C. Όσον αφορά το OH(3) στις φλαβονόλες αυτό εξασθενίζει την ηλεκτρονική πυκνότητα του καρβονυλικού οξυγόνου CO(4) και, επομένως, μειώνει την ισχύ του ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου OH(5)···CO(4). Όπως φαίνεται από το Σχήμα 3.5 στην περιοχή των ~12.98 ppm, πιθανώς να υπάρχουν δύο ή και περισσότερα σήματα συντονισμού που αλληλεπικαλύπτονται τα οποία θα μπορούσαν να ανήκουν στην τάξη των φλαβονών αλλά και των *O*-γλυκοζιτών αυτών καθώς και μία ή δύο κορυφές στα ~13.75 ppm, που θα μπορούσαν να ανήκουν στην τάξη των *C*-γλυκοζιτών των φλαβονών. Η *C* γλυκοζυλίωση στη θέση 8 και 6 έχει ως συνέπεια το πρωτόνιο της υδροξυλομάδας της θέσης 5 να απορροφά σε υψηλότερες τιμές ppm σε σχέση με την *O* γλυκοζυλίωση σε διαλύτη δευτεριωμένο DMSO- $d_6$  (Xie *et al.*, 2003).

Επίσης, παρατηρούνται δύο κορυφές στα ~12.6 ppm, που θα μπορούσαν να ανήκουν στην τάξη των φλαβονολών. Αυτό που παρατηρείται σε όλα τα εκχυλίσματα είναι ότι οι απορροφήσεις συντονισμού των υδροξυλικών πρωτονίων εμφανίζονται διευρυμένες σε θερμοκρασία δωματίου με αποτέλεσμα την αλληλεπικάλυψη κορυφών. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στην ευκινησία των υδροξυλικών πρωτονίων και στη γρήγορη, για την κλίμακα χρόνου του NMR, ανταλλαγή τους με τα πρωτόνια πρωτικών διαλυτών ή με τα ίχνη ύδατος σε μη πρωτικούς διαλύτες. Ωστόσο όμως, έχει αποδειχθεί ότι με πειράματα μεταβλητής θερμοκρασίας μπορεί να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των σημάτων συντονισμού. Με τη λήψη φάσματος σε χαμηλή θερμοκρασία μειώνεται η ταχύτητα ανταλλαγής των υδροξυλικών πρωτονίων και οι κορυφές συντονισμού εμφανίζονται οξείες. Οι Exarchou *et al.*, 2002a, 2002b, μελέτησαν με πειράματα μεταβλητής θερμοκρασίας το διαχωρισμό των φλαβόνων απιγενίνης και λουτεολίνης και στη συνέχεια ταυτοποίησαν τα φλαβονοειδή αυτά σε φυτικά εκχυλίσματα με τη λήψη φασμάτων NMR  $^1\text{H}$  μεταβλητής θερμοκρασίας.

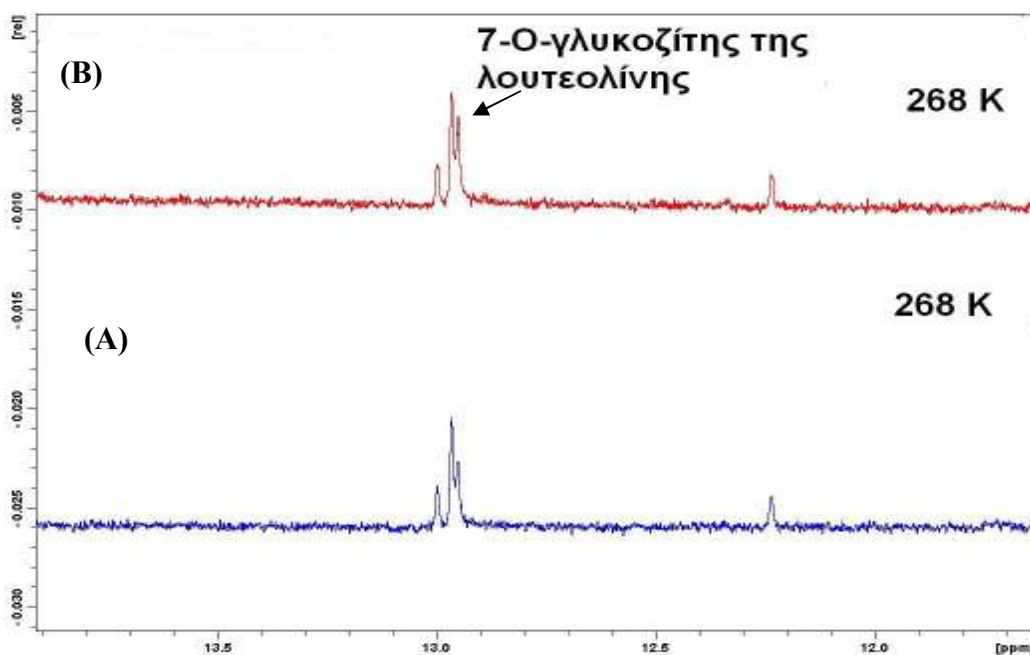
Με βάση τα παραπάνω, ακολούθησε η λήψη φασμάτων μεταβλητής θερμοκρασίας του μεθανολικού εκχυλίσματος από τα Ιωάννινα το μήνα Φεβρουάριο (L.I.F.MeOH) για ένα εύρος τιμών θερμοκρασίας από 298 έως 258 K σε

δευτεριωμένο ακετονιτρίλιο. Με την ελάττωση της θερμοκρασίας οι κορυφές γίνονται πιο οξείες και παρατηρούνται στην περιοχή των ~12.98 ppm τρία σήματα συντονισμού που πριν με διαλύτη DMSO- $d_6$  αλληλεπικαλυπτόταν, και πιθανώς αντιστοιχούν στις απορροφήσεις των πρωτονίων των υδροξυλομάδων στη θέση 5 των φλαβονών ή των *O*-γλυκοζιτών αυτών. Παρατηρείται επίσης, ότι σε διαλύτη ακετονιτρίλιο δεν υπάρχει το σήμα συντονισμού στα ~13.75 ppm των πιθανόν *C*-γλυκοζιτών των φλαβονών. Τα σήματα συντονισμού των πιθανών φλαβονολών στα ~12.6 ppm σε διαλύτη DMSO- $d_6$ , δεν παρατηρήθηκαν σε διαλύτη ακετονιτρίλιο πιθανόν λόγω καταβύθισης.

Με υπέρθεση του φάσματος NMR  $^1\text{H}$  του εκχύλισματος σε DMSO- $d_6$  με τα αντίστοιχα πρότυπων εμπορικά διαθέσιμων ενώσεων φλαβονών (7-*O*-γλυκοζίτη της απιγενίνης, 7-*O*-ρουτινοζίτη της απιγενίνης και 7-*O*-γλυκοζίτη της λουτεολίνης που ελήφθησαν στο ίδιο όργανο και με τις ίδιες συνθήκες), συμπεραίνεται ότι το εκχύλισμα ενδέχεται να περιέχει τις ενώσεις αυτές. Εξαιτίας όμως της περιορισμένης διαλυτότητας του 7-*O*-ρουτινοζίτη της απιγενίνης σε ακετονιτρίλιο δεν ήταν εφικτή η λήψη φάσματος αυτού και η σύγκρισή του με το εκχύλισμα. Όσον αφορά τον 7-*O*-γλυκοζίτη της απιγενίνης η διαλυτότητά του σε ακετονιτρίλιο ήταν ικανοποιητική, και προκειμένου να διαπιστωθεί η παρουσία του προστέθηκε μικρή ποσότητα διαλύματός του στο εκχύλισμα για την ενίσχυση του σήματος (μέθοδος spiking) και ακολούθησε η λήψη φασμάτων σε εύρος τιμών θερμοκρασίας από 298 έως 258 K. Στο Σχήμα 3.7 παρουσιάζεται η επιλεγμένη περιοχή του φάσματος NMR  $^1\text{H}$  εκχύλισματος L.I.F.MeOH πριν και μετά την προσθήκη του 7-*O*-γλυκοζίτη της απιγενίνης στους 268 K. Λιγότερο διαλυτή στο ακετονιτρίλιο από τον 7-*O*-γλυκοζίτη της απιγενίνης είναι η ένωση 7-*O*-γλυκοζίτης της λουτεολίνης όπου με τη μέθοδο του spiking ταυτοποιήθηκε στο εκχύλισμα (Σχήμα 3.8).



**Σχήμα 3.7.** (A) Επιλεγμένη περιοχή του φάσματος NMR- $^1\text{H}$  εκχυλίσματος L.I.F.MeOH σε δευτεριωμένο ακετονιτρίλιο, (B) το φάσμα μετά την προσθήκη 7-*O*-γλυκοζίτη της απιγενίνης. Η ταυτοποίηση του *O* γλυκοζίτη υποδηλώνεται με το βέλος (NS= 512, T=268 $^\circ\text{K}$ ,  $t_{\text{exp}}$ =36min & 53sec).



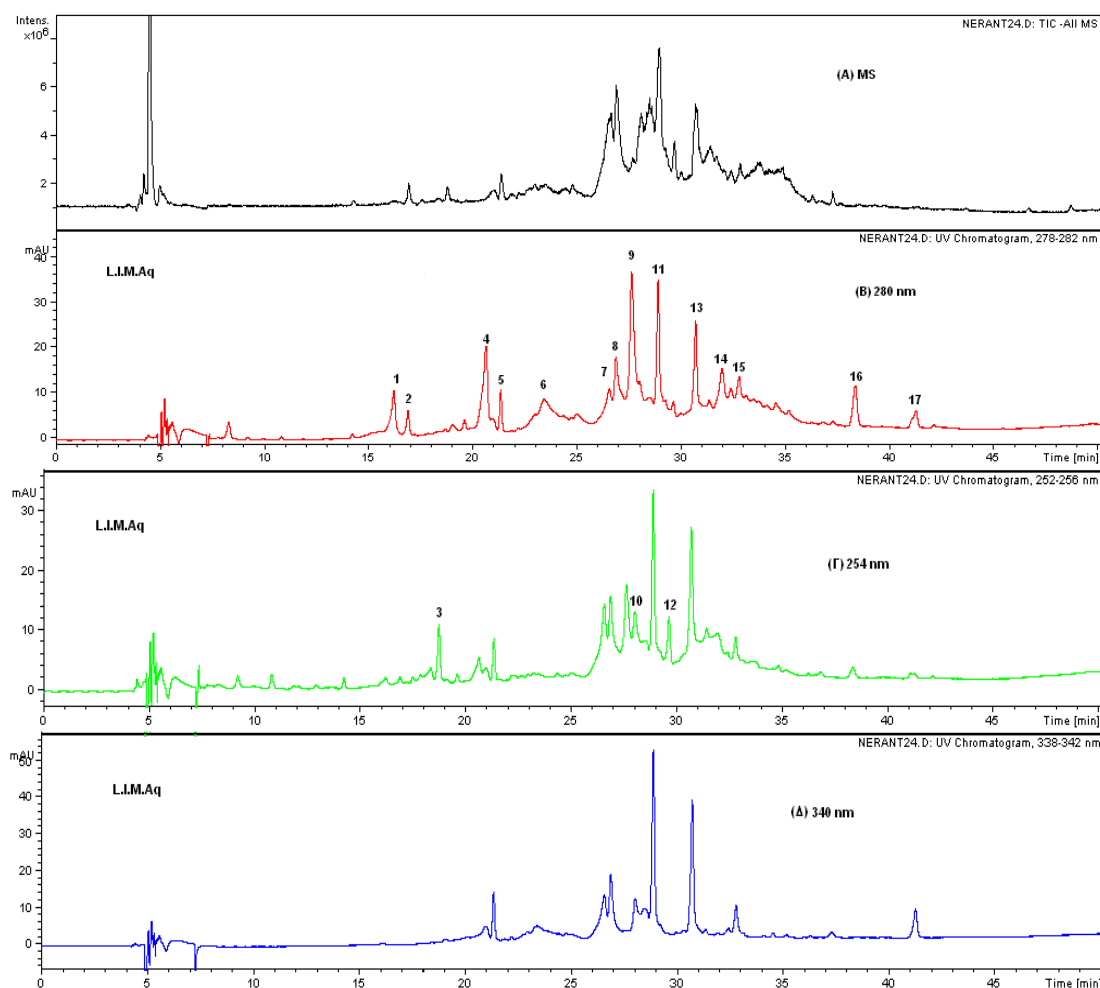
**Σχήμα 3.8.** (A) Επιλεγμένη περιοχή του φάσματος NMR- $^1\text{H}$  εκχυλίσματος L.I.F.MeOH σε δευτεριωμένο ακετονιτρίλιο, (B) το φάσμα μετά την προσθήκη 7-*O*-γλυκοζίτη της λουτεολίνης. Η ταυτοποίηση του *O* γλυκοζίτη υποδηλώνεται με το βέλος (NS= 512, T=268K,  $t_{\text{exp}}$ =36min & 53sec).

### 3.5 Μελέτη της σύστασης των εκχυλισμάτων με τη χρήση συζευγμένης τεχνικής LC-ESI-MS<sup>n</sup>

Προκειμένου να ταυτοποιηθούν όσο το δυνατόν περισσότερα συστατικά των φύλλων του φυτού *Ligustrum lucidum* στα εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκε σύστημα RP-HPLC με ανιχνευτές συστοιχίας διόδων λυχνιών και φασματοσκοπίας μαζών. Στην παρούσα μελέτη ο διαχωρισμός των φαινολικών συστατικών έγινε με βαθμωτή έκλυση σε στήλη Altima C18 η οποία χρησιμοποιήθηκε και για τον ποσοτικό προσδιορισμό των φλαβονοειδών. Τα χρωματογραφικά προφίλ των εκχυλισμάτων καταγράφηκαν σε 3 μήκη κύματος 254, 280 και 340 nm και παρατίθενται στα παρακάτω σχήματα μαζί με τα φάσματα μαζών. Η επιλογή των τριών αυτών μηκών κύματος οφείλεται στο γεγονός ότι ένας μεγάλος αριθμός φαινολικών ενώσεων παρουσιάζει ισχυρή απορρόφηση σε αυτά. Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 3.1, διαπιστώθηκε ότι το πλουσιότερο μεθανολικό εκχύλισμα ήταν αυτό του Μαΐου από την Κάριανη (L.K.M.MeOH) μαζί με αυτό του Φεβρουαρίου από τα Ιωάννινα (L.I.F.MeOH) και αντίστοιχα το πλουσιότερο υδατικό αυτό από τα Ιωάννινα κατά το μήνα Μάιο (L.I.M.Aq). Τα εκχυλίσματα L.K.M.MeOH και L.I.M.Aq επιλέχθηκαν ως αντιπροσωπευτικά και στη συνέχεια παρουσιάζεται η λεπτομερής ανάλυσή τους με LC-ESI-MS<sup>n</sup>.

#### ➤ L.I.M.Aq

Στο Σχήμα 3.9 παρουσιάζεται το χρωματογραφικό προφίλ του υδατικού εκχυλίσματος από τα Ιωάννινα με κωδικό **L.I.M.Aq** στα τρία μήκη κύματος 254, 280 και 340 nm καθώς και εκείνου από τον φασματογράφο μάζας.

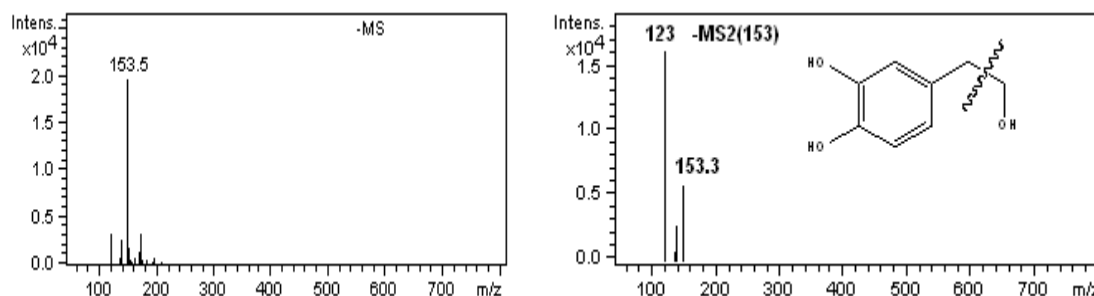


**Σχήμα 3.9.** (Α) Χρωματογράφημα μάζας, (Β) Χρωματογραφικό προφίλ στα 280 nm, (Γ) 254 nm και (Δ) 340 nm του φυτικού εκχυλίσματος **L.I.M.Aq**

Ο 7-*O*-ρουτινοζίτης της απιγενίνης και 7-*O*-γλυκοζίτης της απιγενίνης ταυτοποιήθηκαν ως τα κυριότερα συστατικά του εκχυλίσματος. Με βάση τα φάσματα MS και MS<sup>2</sup> τα κυριότερα φαινολικά συστατικά που ταυτοποιήθηκαν στο εκχύλισμα είναι τα εξής: υδροξυτυροσόλη, γλυκοζίτης της τυροσόλης, ολεοζίτης, 6,8-δι-*C*-γλυκοζίτης της απιγενίνης, υδροξυ-βερμπασκοζίτης, βερμπασκοζίτης, 7-*O*-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, παράγωγο του λιγκστροζίτη, ελευρωπαΐνη και ο 7-*O*-γλουκουρονίτης της απιγενίνης. Στον Πίνακα 3.3 παρουσιάζονται συνοπτικά τα χρωματογραφικά και φασματοσκοπικά δεδομένα των κυριοτέρων συστατικών του εκχυλίσματος φύλλων **L.I.M.Aq** μετά την ανάλυση του δείγματος με LC-ESI-MS<sup>n</sup>.

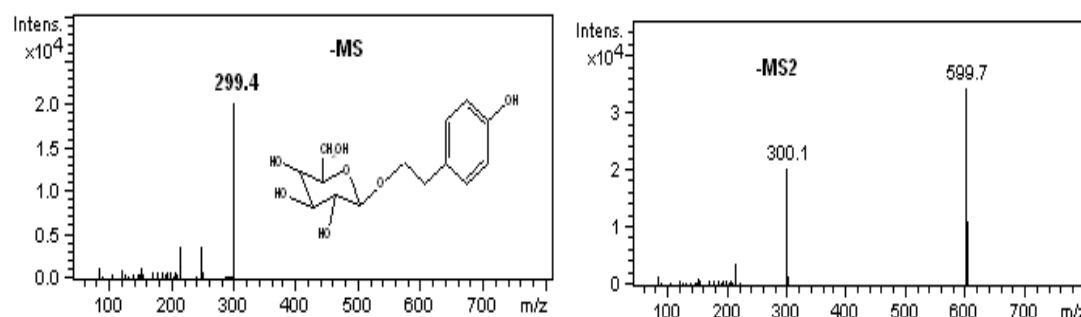
Η **κορυφή 1** του χρωματογραφήματος αποδίδεται στην υδροξυτυροσόλη (hydroxytyrosol) με βάση την τιμή *m/z* του μοριακού ιόντος [M-H]<sup>-</sup> στα 153 *m/z* στο φάσμα μαζών. Στο δευτερογενές φάσμα μάζας MS<sup>2</sup> του μοριακού ιόντος

παρατηρείται ένα θραύσμα στα 123 m/z εξαιτίας της απώλειας της ομάδας CH<sub>2</sub>OH (De la Torre-Carbot *et al.*, 2005), (Σχήμα 3.12).



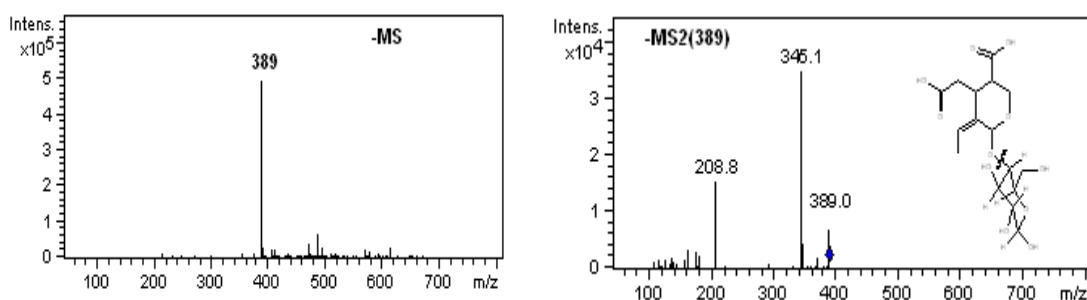
**Σχήμα 3.10.** Φάσματα MS και MS<sup>2</sup> της υδροξυτυροσόλης

Η **κορυφή 2** του χρωματογραφήματος παρουσιάζει μοριακό ιόν [M-H]<sup>-</sup> στα 299 m/z στο φάσμα μαζών. Στο δευτερογενές φάσμα μάζας MS<sup>2</sup> του μοριακού ιόντος παρατηρούνται δύο θραύσματα στα [M-H]<sup>-</sup> 300 m/z και [2M-H]<sup>-</sup> 599 m/z αντίστοιχα (Σχήμα 3.13). Το θραύσμα στα 599 αντιστοιχεί στο διμερές του μοριακού ιόντος. Έτσι, η κορυφή 2 με βάση το φάσμα μαζών και βιβλιογραφικά δεδομένα (Obied *et al.*, 2007) ταυτοποιήθηκε ως ο γλυκοζίτης της τυροσόλης (Salidroside).



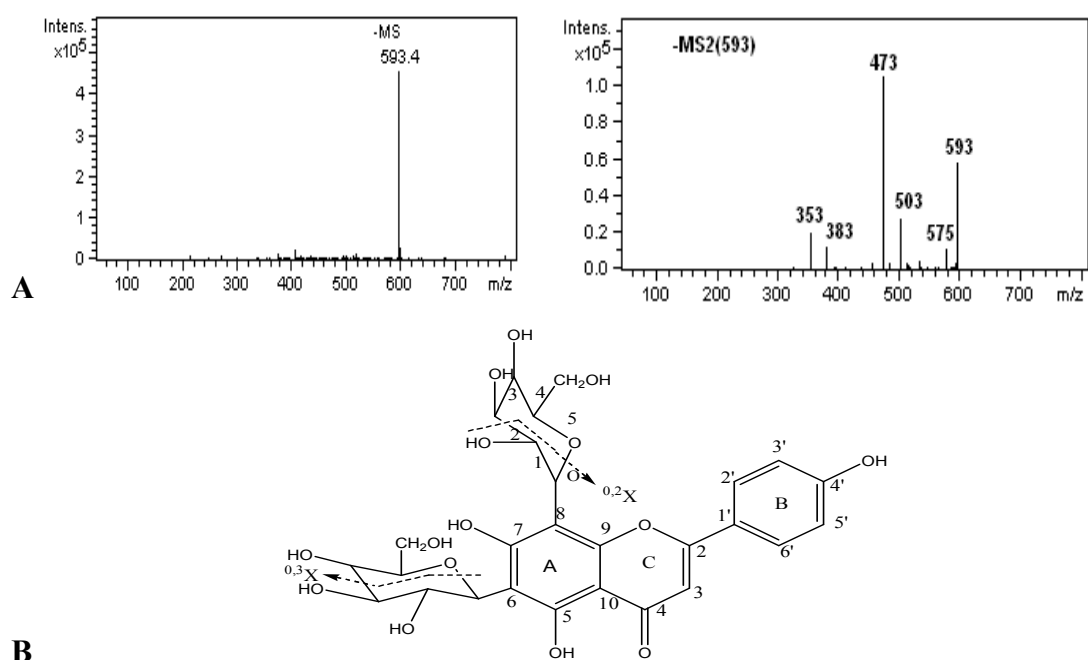
**Σχήμα 3.11.** Φάσματα MS και MS<sup>2</sup> του γλυκοζίτη της τυροσόλης

Η **κορυφή 3** του χρωματογραφήματος εμφανίζει στο φάσμα μαζών μοριακό ιόν [M-H]<sup>-</sup> στα 389 m/z. Στο δευτερογενές φάσμα μάζας MS<sup>2</sup> του μοριακού ιόντος παρατηρούνται δύο θραύσματα στα [M-H-44]<sup>-</sup> 345 m/z και [M-H-180]<sup>-</sup> 209 m/z αντίστοιχα. Το θραύσμα στα 345 δικαιολογείται από την απώλεια ενός μορίου CO<sub>2</sub> της καρβοξυλικής ομάδας και αυτό στα 209 από την απώλεια μιας εξόξης (Σχήμα 3.12). Έτσι, η κορυφή 3 με βάση το φάσμα μαζών και βιβλιογραφικά δεδομένα (Cardoso *et al.*, 2005) ταυτοποιήθηκε ποιοτικά ως ο ολεοζίτης (oleoside).



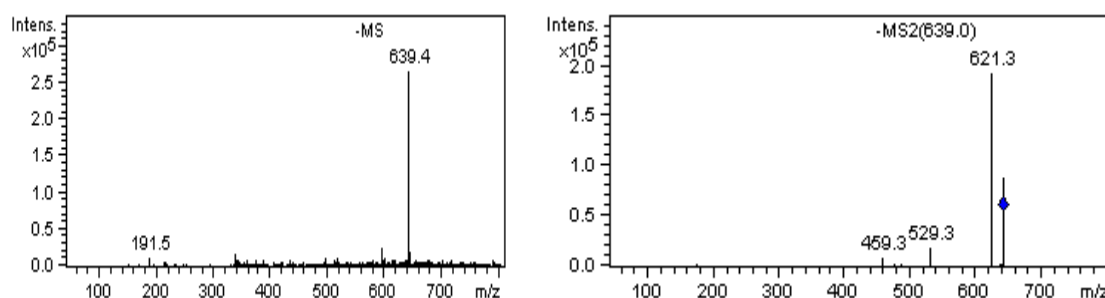
**Σχήμα 3.12:** Φάσματα MS και MS<sup>2</sup> του ολεοζίτη

Η **κορυφή 5** του χρωματογραφήματος εμφανίζει κύριο μοριακό ιόν [M-H]<sup>-</sup> στα 593 m/z. Το δευτερογενές φάσμα μάζας MS<sup>2</sup> εμφανίζει κορυφές στα [M-H-18]<sup>-</sup> 575 m/z, [M-H-90]<sup>-</sup> 503 m/z (<sup>0,3</sup>X), [M-H-120]<sup>-</sup> 473 m/z (<sup>0,2</sup>X), [M-H-210]<sup>-</sup> 383 m/z, [M-H-240]<sup>-</sup> 353 m/z χαρακτηριστικά ιόντα των di-C-γλυκοζυλιωμένων φλαβόνων (Cuyckens και Claeys, 2004). Στο φάσμα MS<sup>2</sup> δεν παρατηρήθηκε το μοριακό ιόν [M-H-60]<sup>-</sup> στα 533 m/z το οποίο δηλώνει ότι το τμήμα του ζαχάρου που είναι συνδεδεμένο στις θέσεις 6 και 8 είναι εξόζη και όχι πεντόζη (Bakhtiar *et al.*, 1994; Cuyckens και Claeys, 2004) (Σχήμα 3.13). Με βάση λοιπόν το μονοπάτι θραυσματοποίησης του κύριου μοριακού ιόντος, η ένωση 5 χαρακτηρίστηκε ως 6,8-δι-C-γλυκοζίτης της απιγενίνης (apigenin-6,8-di-C-glucoside). Γενικά, στους C-γλυκοζίτες των φλαβονοειδών το σάκχαρο συνδέεται απευθείας με τον άνθρακα του φλαβονοειδούς.



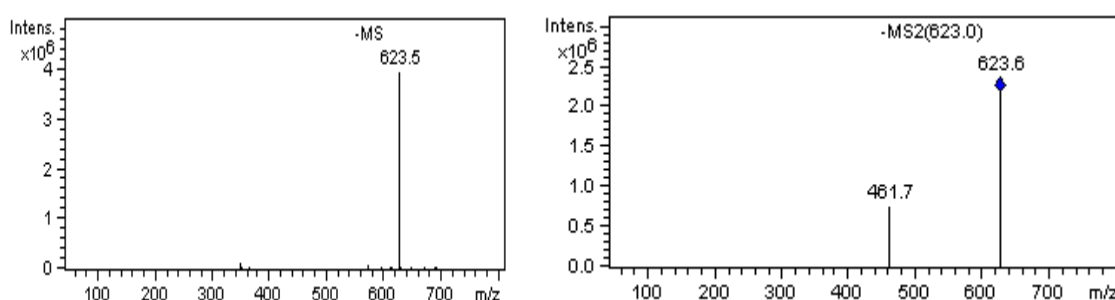
**Σχήμα 3.13:** Α.Φάσματα MS και MS<sup>2</sup> του 6,8-δι-C-γλυκοζίτη της απιγενίνης Β. Σχάση των γλυκοζιτικών μορίων

Η **κορυφή 6** του χρωματογραφήματος εμφανίζει κύριο μοριακό ιόν  $[M-H]^-$  στα 639 m/z. Το δευτερογενές φάσμα μάζας  $MS^2$  εμφανίζει κορυφές στα  $[M-H-18]^-$  621 m/z,  $[M-H-110]^-$  529 m/z,  $[M-H-18-162]^-$  459 m/z (Σχήμα 3.14). Το θραύσμα στα 621 m/z δικαιολογείται από την απώλεια ενός μορίου  $H_2O$  και αυτό στα 459 από την απώλεια ενός μορίου νερού και μιας εξόζης. Έτσι, η κορυφή 6 με βάση το φάσμα μαζών και βιβλιογραφικά δεδομένα (Mulinacci *et al.*, 2005) ταυτοποιήθηκε ποιοτικά ως υδροξυ-βερμπασκοζίτη (hydroxy-verbascoside).



**Σχήμα 3.14.** Φάσματα MS και  $MS^2$  του υδροξυ-βερμπασκοζίτη

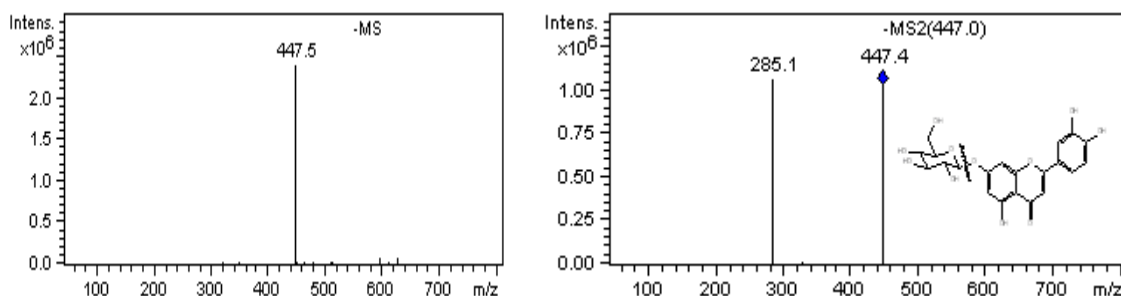
Οι **κορυφές 7 και 8** του χρωματογραφήματος εμφανίζουν κύριο μοριακό ιόν  $[M-H]^-$  στα 623 m/z. Το δευτερογενές φάσμα μάζας  $MS^2$  εμφανίζει κορυφή στα  $[M-H-162]^-$  461 m/z (Σχήμα 3.15) το οποίο δικαιολογείται από την απώλεια ενός μορίου γλυκόζης. Έτσι, οι κορυφές 7 και 8 με βάση το φάσμα μαζών και βιβλιογραφικά δεδομένα (Ryan *et al.*, 1999; Mulinacci *et al.*, 2005) ταυτοποιήθηκαν ποιοτικά ως δύο ισομερή του βερμπασκοζίτη (verbascoside).



**Σχήμα 3.15.** Φάσματα MS και  $MS^2$  του βερμπασκοζίτη

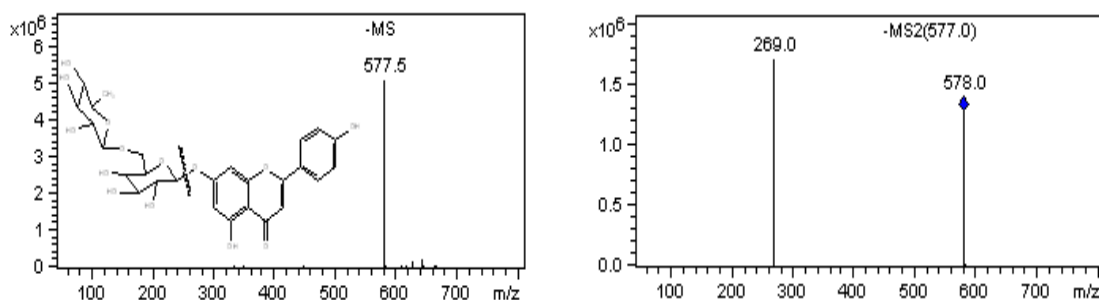
Η **κορυφή 10** εμφανίζει κύριο μοριακό ιόν στα  $[M-H]^-$  447 m/z. Στο φάσμα  $MS^2$  παρατηρείται ένα ιόν  $[M-H-162]^-$  στα 285 m/z το οποίο δηλώνει την ύπαρξη ενός μορίου γλυκόζης (Σχήμα 3.16). Συγκρίνοντας τον χρόνο κατακράτησης και το φάσμα μάζας της κορυφής 10 με αυτά της πρότυπης ένωσης του 7-Ο-γλυκοζίτη της

λουτεολίνης (luteolin-7-*O*-glucoside) συμπεραίνεται ότι η κορυφή 10 είναι ο 7-*O*-γλυκοζίτης της λουτεολίνης.



**Σχήμα 3.16:** Φάσματα MS και MS<sup>2</sup> του 7-*O*-γλυκοζίτη της λουτεολίνης

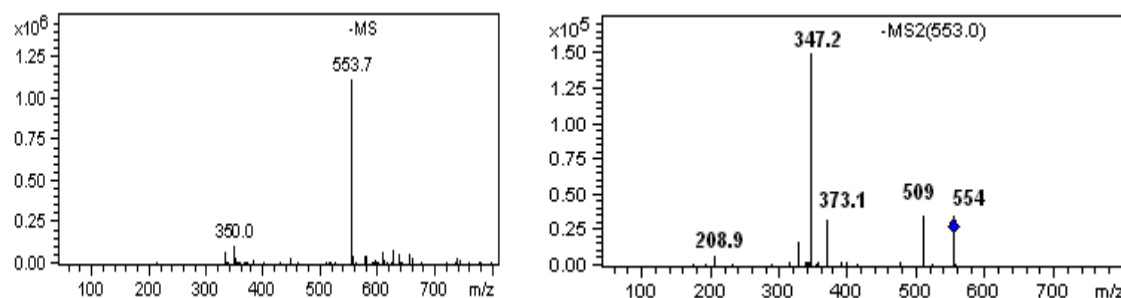
Το φάσμα μάζας της **κορυφής 11** παρουσιάζει κύριο θραύσμα στα [M-H]<sup>-</sup> 577 m/z. Στο δευτερογενές φάσμα μάζας MS<sup>2</sup> του μοριακού ιόντος παρατηρείται ένα κύριο θραύσμα [M-H-308]<sup>-</sup> ([M-H-ραμνόζη-γλυκόζη]<sup>-</sup>) στα 269 m/z (Σχήμα 3.17), υποδεικνύοντας, όπως και στην κορυφή 10, την παρουσία ενός μορίου ραμνόζης και γλυκόζης, όπου η απουσία ενδιάμεσου ιόντος στο φάσμα μάζας MS<sup>2</sup> δηλώνει έναν 1→6 διαγλυκοζιτικό δεσμό (Cuyckens *et al.*, 2001). Έτσι, η κορυφή 11 χαρακτηρίστηκε ως ο 7-*O*-ρουτινοζίτης της απιγενίνης (apigenin-7-*O*-rutinoside) και αυτό επιβεβαιώθηκε με σύγκριση την με πρότυπη ένωση.



**Σχήμα 3.17:** Φάσματα MS και MS<sup>2</sup> του 7-*O*-ρουτινοζίτη της απιγενίνης

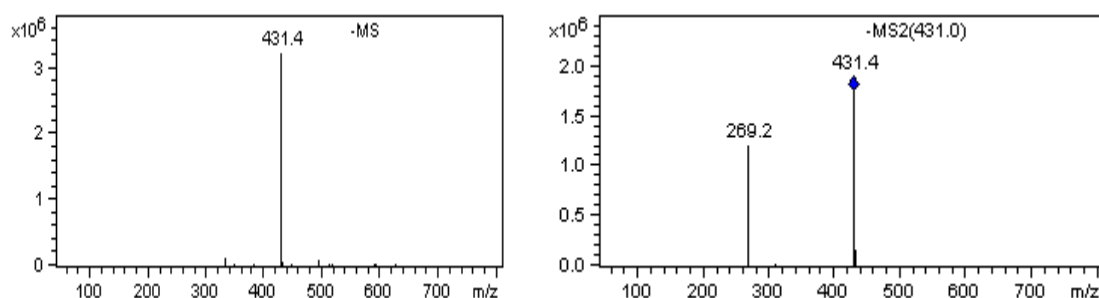
Η **κορυφή 12** παρουσιάζει κύριο θραύσμα στο φάσμα μάζας στα [M-H]<sup>-</sup> 553 m/z. Στο φάσμα μάζας MS<sup>2</sup> παρατηρούμε κορυφές [M-H-44]<sup>-</sup> στα 509 m/z, [M-H-18-162]<sup>-</sup> στα 373 m/z, [M-H-206]<sup>-</sup> στα 347 m/z (Σχήμα 3.18). Το θραύσμα στα 509 m/z δικαιολογείται από την απώλεια ενός μορίου CO<sub>2</sub> της καρβοξυλικής ομάδας και αυτό στα 373 δικαιολογείται από την απώλεια ενός μορίου νερού και ενός μορίου γλυκόζης (De la Torre-Carbot *et al.*, 2005). Έτσι, η κορυφή 12 με βάση το φάσμα

μαζών και βιβλιογραφικά δεδομένα ταυτοποιήθηκε ποιοτικά πιθανώς ως παράγωγο του λιγκστροζίτη (ligstroside).



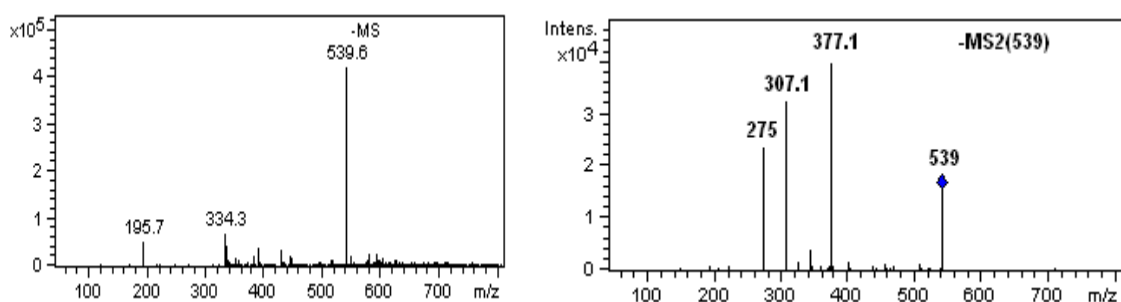
**Σχήμα 3.18:** Φάσματα MS και MS<sup>2</sup> παράγωγου του λιγκστροζίτη

Η **κορυφή 13** παρουσιάζει κύριο θραύσμα στο φάσμα μάζας στα  $[M-H]^-$  431  $m/z$ . Στο φάσμα μάζας MS<sup>2</sup> παρατηρούμε ένα κύριο ιόν  $[M-H-162]^-$  στα 269  $m/z$  δηλώνοντας την ύπαρξη ενός γλυκοζιτικού μορίου (Σχήμα 3.19). Η κορυφή 13 χαρακτηρίστηκε ως ο 7-Ο-γλυκοζίτης της απιγενίνης (apigenin-7-Ο-glucoside) και αυτό επιβεβαιώθηκε με σύγκριση με την πρότυπη ένωση.



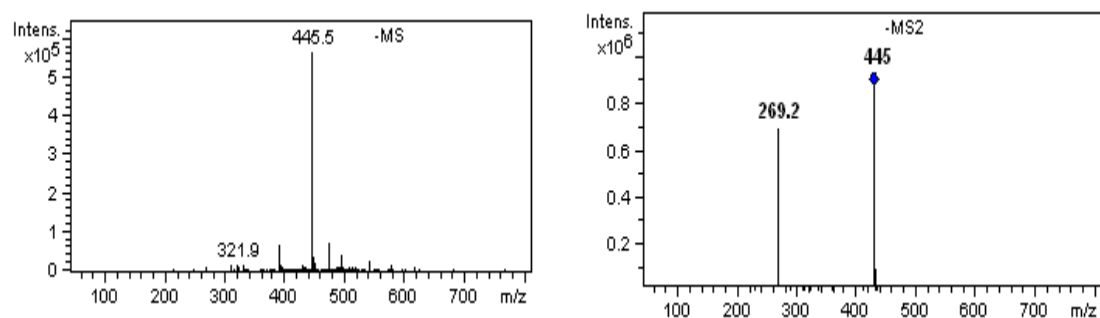
**Σχήμα 3.19.** Φάσματα MS και MS<sup>2</sup> του 7-Ο-γλυκοζίτη της απιγενίνης

Η **κορυφή 14** παρουσιάζει κύριο θραύσμα στο φάσμα μάζας στα  $[M-H]^-$  539  $m/z$ . Στο φάσμα μάζας MS<sup>2</sup> παρατηρούμε κορυφές  $[M-H-162]^-$  στα 377  $m/z$ ,  $[M-H-232]^-$  στα 307  $m/z$  και  $[M-H-264]^-$  στα 275  $m/z$  (Σχήμα 3.20). Το θραύσμα στα 377 δικαιολογείται από την απώλεια ενός μορίου γλυκόζης, στα 307 από την απώλεια ενός μορίου C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O (Caruso *et al.*, 2000) και αυτό στα 275 ίσως να προέρχεται από την αναδιάταξη των θραυσμάτων (De la Torre-Carbot *et al.*, 2005). Η κορυφή 14 χαρακτηρίστηκε ως ελευρωπαΐνη (oleuropein) και αυτό επιβεβαιώθηκε με σύγκριση με την πρότυπη ένωση.



**Σχήμα 3.20.** Φάσματα MS και MS<sup>2</sup> της ελευρωπαΐνης

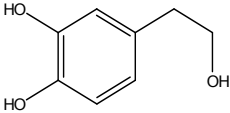
Η **κορυφή 15** παρουσιάζει κύριο θραύσμα στο φάσμα μάζας στα [M-H]<sup>-</sup> 445 m/z. Στο φάσμα μάζας MS<sup>2</sup> παρατηρούμε ένα κύριο ιόν [M-H-176]<sup>-</sup> στα 269 m/z (Σχήμα 3.21) δηλώνοντας πιθανώς την ύπαρξη ενός μορίου γλυκοζιτικού οξέος. Έτσι, η κορυφή 15 χαρακτηρίστηκε πιθανή ως 7-Ο-γλουκουρονίτης της απιγενίνης (apigenin-7-Ο-glucuronide)

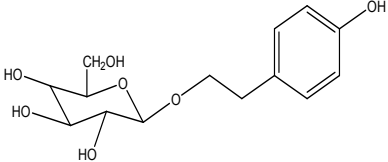
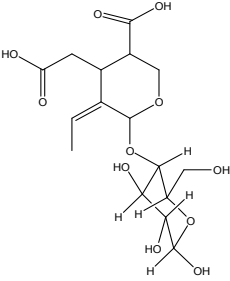
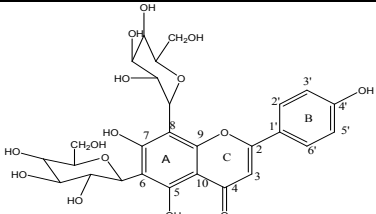
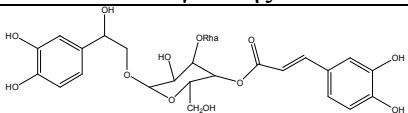
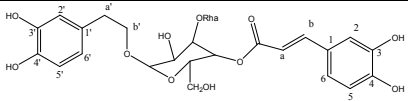
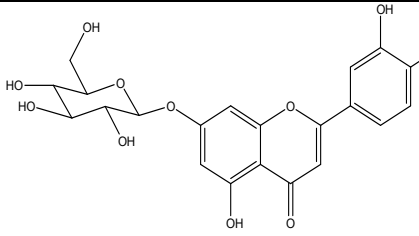
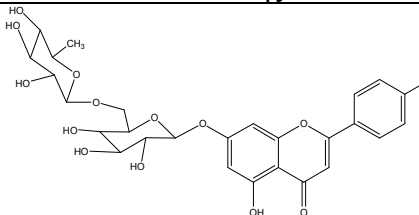


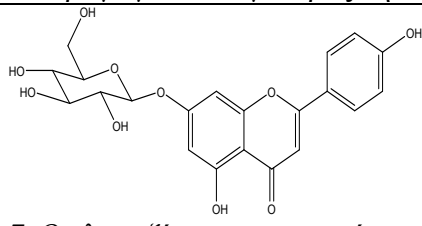
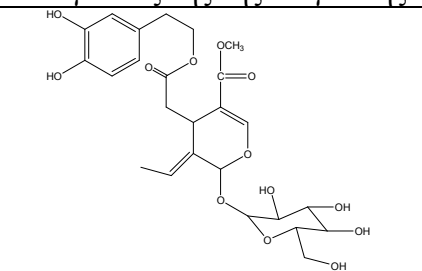
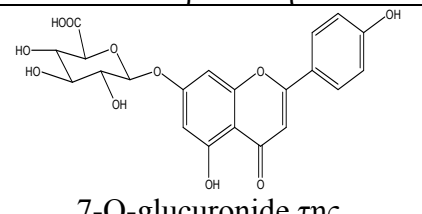
**Σχήμα 3.21:** Φάσματα MS και MS<sup>2</sup> του 7-Ο-γλουκουρονίτη της απιγενίνης

Στον Πίνακα 3.3 παρουσιάζονται συνοπτικά τα χρωματογραφικά και φασματοσκοπικά δεδομένα των κυριότερων συστατικών του εκχυλίσματος φύλλων **L.I.M.Aq** μετά την ανάλυση του δείγματος με LC-ESI-MS<sup>n</sup>.

**Πίνακας 3.3.** Χρωματογραφικά και φασματοσκοπικά δεδομένα του εκχυλίσματος φύλλων **L.I.M.Aq** με LC-ESI-MS

| <b>L.I.M.Aq</b>      |                                                |                              |              |                                                                                                                |
|----------------------|------------------------------------------------|------------------------------|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>N<sup>o</sup></b> | <b>Χρόνος κατακράτησης t<sub>R</sub> (min)</b> | <b>ESI(-)</b>                |              | <b>Ένωση</b>                                                                                                   |
|                      |                                                | <b>[M-H]<sup>-</sup> m/z</b> | <b>MS/MS</b> |                                                                                                                |
| 1                    | 16.2                                           | 153                          | 123          | <br><b>Υδροξυτυροσόλη</b> |

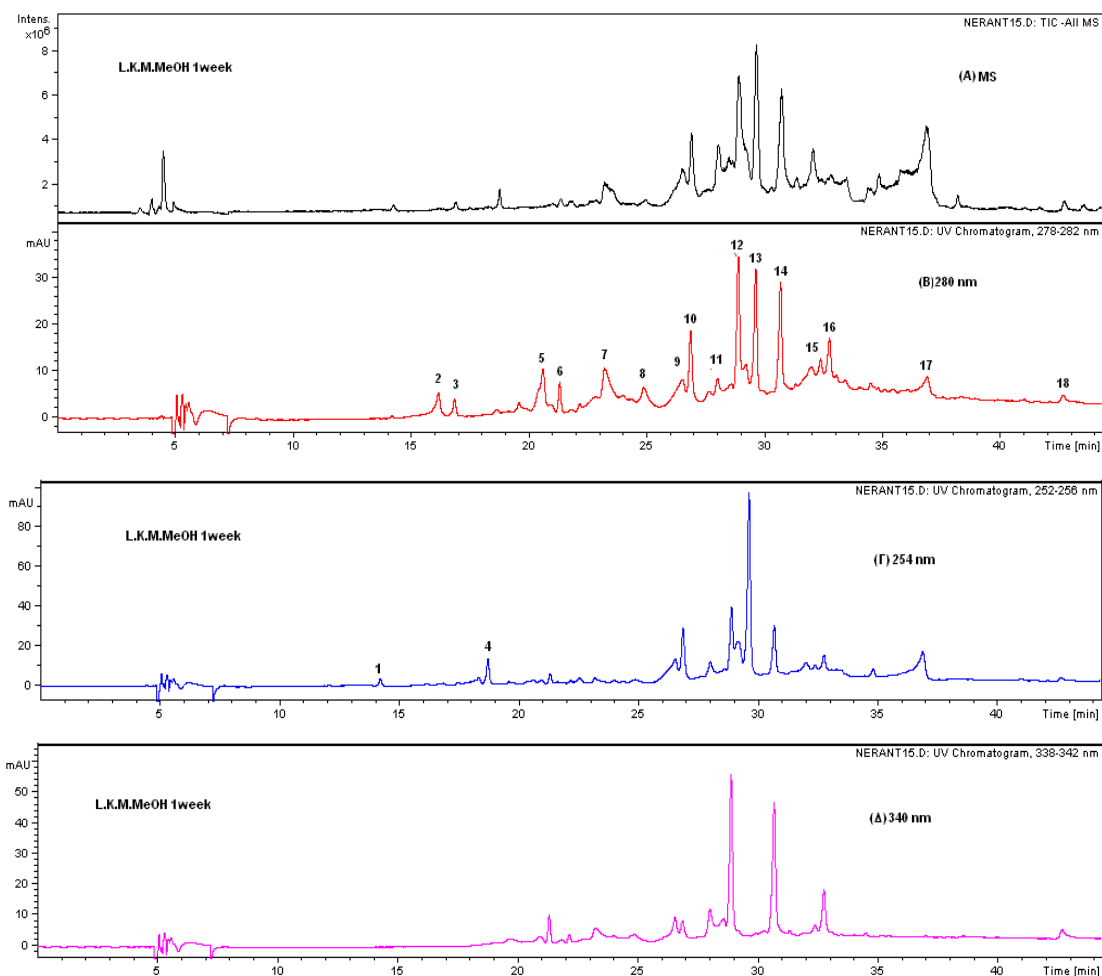
|    |      |     |                            |                                                                                                                                          |
|----|------|-----|----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2  | 16.9 | 299 | 599,299                    |  <p>Γλυκοζίτης της τυροσόλης<br/>(Salidroside)</p>     |
| 3  | 18.8 | 389 | 345, 209                   |  <p>Ολεοζίτης</p>                                     |
| 4  | 20.5 | -   |                            | Δ.Ι.                                                                                                                                     |
| 5' | 21   | 593 | 575, 503, 473,<br>383, 353 | 6,8-δι- <i>C</i> -γλυκοζίτης της<br>απιγενίνης (ισομερές)                                                                                |
| 5  | 21.3 | 593 | 575, 503, 473,<br>383, 353 |  <p>6,8-δι-<i>C</i>-γλυκοζίτης της<br/>απιγενίνης</p> |
| 6  | 23.5 | 639 | 621,529,459                |  <p>Υδροξυ- βερμπασκοζίτης</p>                       |
| 7  | 26.6 | 623 | 461                        | Βερμπασκοζίτης (ισομερές)                                                                                                                |
| 8  | 26.9 | 623 | 461                        |  <p>Βερμπασκοζίτης</p>                               |
| 9  | 27.6 | -   |                            | Δ.Ι.*                                                                                                                                    |
| 10 | 28   | 447 | 285                        |  <p>7-<i>O</i>-γλυκοζίτης της<br/>λουτεολίνης</p>    |
| 11 | 28.9 | 577 | 269                        |                                                      |

|    |      |     |               |                                                                                                                          |
|----|------|-----|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    |      |     |               | 7-Ο-ρουτινοζίτης της<br>απιγενίνης                                                                                       |
| 12 | 29.6 | 553 | 347, 509, 373 | Παράγωγο του λιγκστροζίτη                                                                                                |
| 13 | 30.7 | 431 | 269           | <br>7-Ο-γλυκοζίτης της απιγενίνης      |
| 14 | 31.9 | 539 | 377, 307, 275 | <br>Ελευρωπαΐνη                        |
| 15 | 32.8 | 445 | 269           | <br>7-O-glucuronide της<br>απιγενίνης |
| 16 | 38.3 | -   |               | Δ.Ι.                                                                                                                     |
| 17 | 41.2 | -   |               | Δ.Ι.                                                                                                                     |

\*Δ.Ι.= Δεν ιονίζεται

### ➤ L.K.M.MeOH

Στο Σχήμα 3.22 παρουσιάζεται το χρωματογραφικό προφίλ του μεθανολικού εκχυλίσματος από την Κάριανη με κωδικό **L.K.M.MeOH** στα τρία μήκη κύματος 254, 280 και 340 nm καθώς και εκείνου από τον φασματογράφο μάζας.

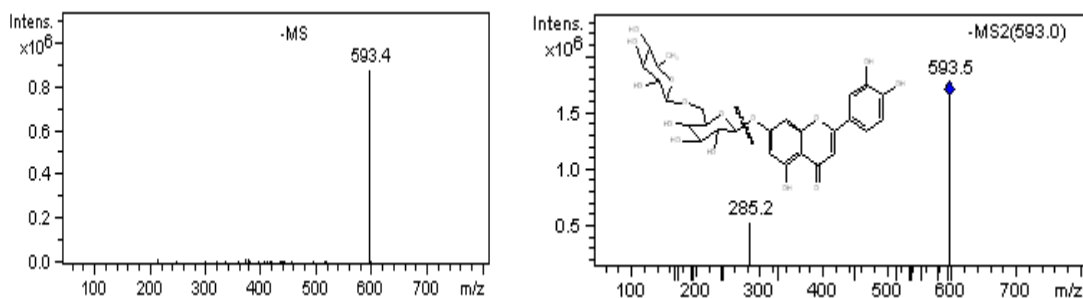


**Σχήμα 3.22.** (Α) Χρωματογράφημα μάζας, (Β) Χρωματογραφικό προφίλ στα 280 nm, (Γ) 254 nm και (Δ) 340 nm του φυτικού εκχυλίσματος **L.K.M.MeOH**

Ο 7-Ο-ρουτινοζίτης της απιγενίνης, 7-Ο-γλυκοζίτης της απιγενίνης και το παράγωγο του λιγκστροζίτη ταυτοποιήθηκαν ως τα κυριότερα συστατικά του εκχυλίσματος. Με βάση τα φάσματα MS και MS<sup>2</sup> τα κυριότερα φαινολικά συστατικά που ταυτοποιήθηκαν στο εκχύλισμα είναι τα εξής: υδροξυτυροσόλη, γλυκοζίτης της τυροσόλης, ολεοζίτης, 6,8-δι-*C*-γλυκοζίτης της απιγενίνης, 7-Ο-ρουτινοζίτης της λουτεολίνης, βερμπασκοζίτης, 7-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, ελευρωπαΐνη, 7-Ο-γλουκουρονίτης της απιγενίνης και η απιγενίνη.

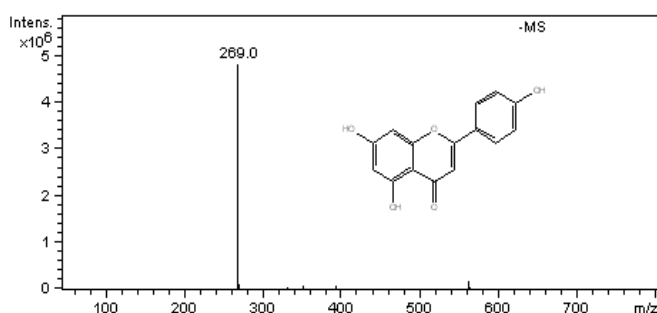
Συγκρίνοντας τα χρωματογραφήματα και τα φάσματα μαζών των εκχυλισμάτων **L.I.M.Aq** και **L.K.M.MeOH** παρατηρείται ότι τα περισσότερα συστατικά είναι κοινά και στα δύο εκχύλιστα. Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα φάσματα μάζας δύο ενώσεων οι οποίες βρέθηκαν μόνο στο μεθανολικό εκχύλισμα **L.K.M.MeOH**.

Το φάσμα μάζας της **κορυφής 9**, παρουσιάζει κύριο θραύσμα στα  $[M-H]^-$  593 m/z. Στο δευτερογενές φάσμα μάζας  $MS^2$  του μοριακού ιόντος παρατηρείται ένα κύριο θραύσμα  $[M-H-308]^-$  ( $[M-H-ραμνόζη-γλυκόζη]^-$ ) στα 285 m/z, υποδεικνύοντας την παρουσία της μορίου ραμνόζης και γλυκόζης. Επιπρόσθετα, η απουσία ενδιάμεσου ιόντος στο φάσμα μάζας  $MS^2$  δηλώνει έναν 1→6 διαγλυκοζιτικό δεσμό (Cuycckens *et al.*, 2001), (Σχήμα 3.23). Επομένως, η κορυφή 9 χαρακτηρίστηκε ως ο 7-Ο-ρουτινοζίτης της λουτεολίνης (luteolin-7-Ο-rutinoside).



**Σχήμα 3.23:** Φάσματα MS και  $MS^2$  του 7-Ο-ρουτινοζίτη της λουτεολίνης

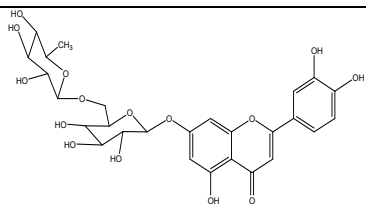
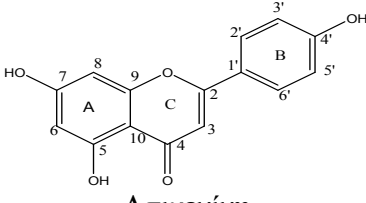
Η **κορυφή 18** έδωσε ένα κύριο θραύσμα στο φάσμα μάζας στα  $[M-H]^-$  269 m/z. Συγκρίνοντας τον χρόνο κατακράτησης και το φάσμα μάζας με αυτά της πρότυπης της απιγενίνης συμπεραίνεται ότι η κορυφή 18 είναι η απιγενίνη (apigenin), (Σχήμα 3.24).



**Σχήμα 3.24:** Φάσμα  $MS^-$  της απιγενίνης

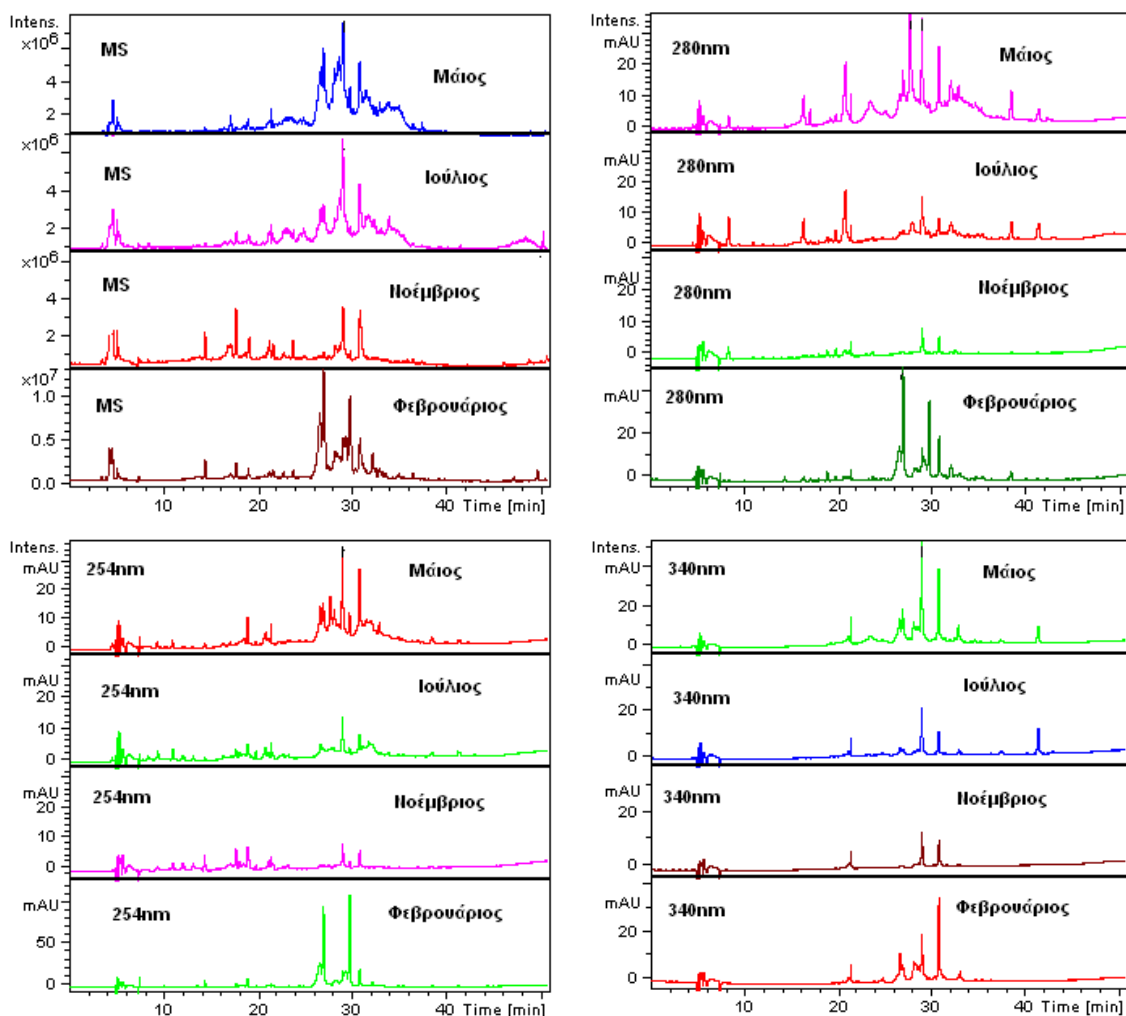
Στον Πίνακα 3.4 παρουσιάζονται συνοπτικά τα χρωματογραφικά και φασματοσκοπικά δεδομένα των κυριοτέρων συστατικών του εκχυλίσματος φύλλων **L.K.M.MeOH** μετά την ανάλυση του δείγματος με LC-ESI- $MS^n$

**Πίνακας 3.4.** Χρωματογραφικά και φασματοσκοπικά δεδομένα του εκχυλίσματος φύλλων **L.K.M.MeOH** με LC-ESI-MS

| <b>L.K.M.L.MeOH</b> |                                                |                              |                         |                                                                                                                                  |
|---------------------|------------------------------------------------|------------------------------|-------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>N°</b>           | <b>Χρόνος κατακράτησης t<sub>R</sub> (min)</b> | <b>ESI(-)</b>                |                         | <b>Ένωση</b>                                                                                                                     |
|                     |                                                | <b>[M-H]<sup>-</sup> m/z</b> | <b>MS/MS</b>            |                                                                                                                                  |
| 1                   | 14.2                                           | 390                          | -                       | -                                                                                                                                |
| 2                   | 16.2                                           | 153                          | 123                     | Υδροξυτυροσόλη                                                                                                                   |
| 3                   | 16.9                                           | 300                          | 599,299                 | Γλυκοζίτης της τυροσόλης (Salidroside)                                                                                           |
| 4                   | 18.7                                           | 389                          | 345, 209                | Ολεοζίτης                                                                                                                        |
| 5                   | 20.5                                           | -                            | -                       | Δ.Ι                                                                                                                              |
| 6'                  | 20.9                                           | 593                          | 575, 503, 473, 383, 353 | 6,8-δι- <i>C</i> -γλυκοζίτης της απιγενίνης (ισομερές)                                                                           |
| 6                   | 21.3                                           | 593                          | 575, 503, 473, 383, 353 | 6,8-δι- <i>C</i> -γλυκοζίτης της απιγενίνης                                                                                      |
| 7                   | 23.2                                           | 337                          | -                       | -                                                                                                                                |
| 8                   | 24.9                                           | 338                          | -                       | -                                                                                                                                |
| 9                   | 26.5                                           | 593                          | 285                     | <br>7- <i>O</i> -ρουτινοζίτης της λουτεολίνης |
| 10                  | 26.9                                           | 623                          | 461                     | Βερμπασκοζίτης                                                                                                                   |
| 11                  | 28                                             | 447                          | 285                     | 7- <i>O</i> -γλυκοζίτης της λουτεολίνης                                                                                          |
| 12                  | 28.9                                           | 577                          | 269                     | 7- <i>O</i> -ρουτινοζίτης της απιγενίνης                                                                                         |
| 13                  | 29.6                                           | 553                          | 329, 347, 373, 509      | Παράγωγο του λιγκστροζίτη                                                                                                        |
| 14                  | 30.7                                           | 431                          | 269                     | 7- <i>O</i> -γλυκοζίτης της απιγενίνης                                                                                           |
| 15                  | 32                                             | 539                          | 377, 307, 275           | Ελευρωπαΐνη                                                                                                                      |
| 16                  | 32.8                                           | 445                          | 269                     | 7- <i>O</i> -γλουκουρονίτης της απιγενίνης                                                                                       |
| 17                  | 36.8                                           | 391                          | -                       | -                                                                                                                                |
| 18                  | 42.7                                           | 269                          | 269                     | <br>Απιγενίνη                                |

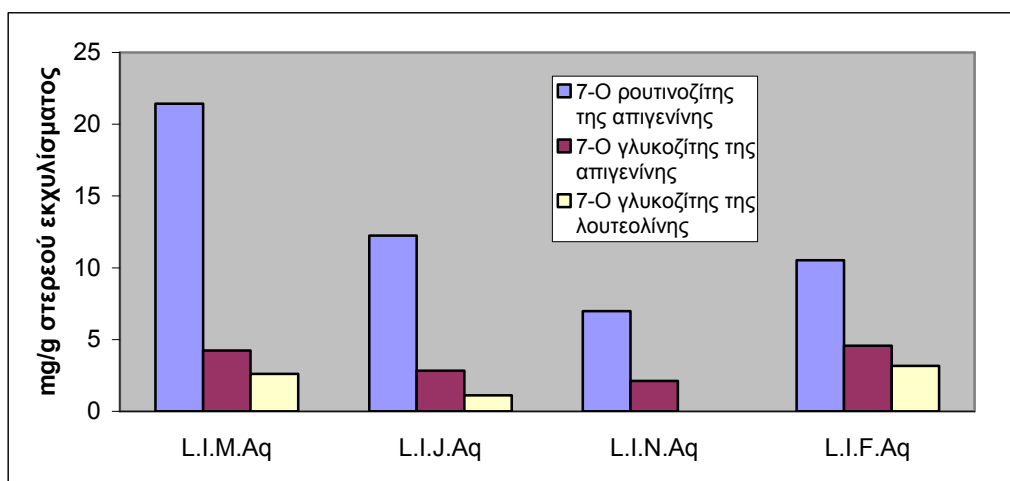
### 3.5.1 Συγκριτική μελέτη των υδατικών εκχυλισμάτων από τα Ιωάννινα

Στο Σχήμα 3.25 παρουσιάζεται το χρωματογραφικό προφίλ των υδατικών εκχυλισμάτων από τα Ιωάννινα **L.I.M.Aq**, **L.I.J.Aq**, **L.I.N.Aq** και **L.I.F.Aq** στα τρία μήκη κύματος 254, 280, 340 nm καθώς και εκείνο του φασματογράφου μάζας.



**Σχήμα 3.25.** Χρωματογράφημα μάζας και χρωματογραφικό προφίλ στα 254 nm, 280 nm και 340 nm των υδατικών εκχυλισμάτων **L.I.M.Aq**, **L.I.J.Aq**, **L.I.N.Aq** και **L.I.F.Aq**

Από τα χρωματογραφικά προφίλ των εκχυλισμάτων (Σχήμα 3.25) προκύπτει ότι τα υδατικά εκχυλίσματα του Μαΐου και του Φεβρουαρίου είναι πλουσιότερα σε φαινολικά συστατικά σε σχέση με αυτά του Ιουλίου και του Νοεμβρίου. Το εκχύλισμα του Νοεμβρίου φαίνεται ότι είναι το φτωχότερο όλων. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε η χαμηλότερη συγκέντρωση του 7-Ο-ρουτινοζίτη της απιγενίνης (2.11 mg/g στερεού εκχυλίσματος) (Σχήμα 3.26).



**Σχήμα 3.26.** Γραφική παράσταση της μεταβολής των συγκεντρώσεων 3 φλαβονοειδών ως συνάρτηση με το χρόνο για τα υδατικά εκχυλίσματα από τα Ιωάννινα.

Σύμφωνα με το Σχήμα 3.25 και τον Πίνακα 3.5 προκύπτει ότι τα φλαβονοειδή: 6,8-δι-*C*-γλυκοζίτης της απιγενίνης, 7-*O*-γλυκοζίτης της απιγενίνης και 7-*O*-ρουτινοζίτης της απιγενίνης και το σεκοϊριδοειδές ολεοζίτης είναι τα κοινά συστατικά των υδατικών εκχυλισμάτων από τα Ιωάννινα. Σε όλα τα εκχυλίσματα, με εξαίρεση αυτό του Φεβρουαρίου, ο 7-*O*-ρουτινοζίτης της απιγενίνης είναι το κύριο συστατικό του οποίου υψηλότερη τιμή σημειώθηκε το μήνα Μάιο (21.43 mg/g στερεού εκχυλίσματος), ενώ παρόμοιες είναι οι τιμές για τους μήνες Φεβρουάριο και Ιούλιο (10.52 και 12.25 mg/g στερεού εκχυλίσματος). Όσον αφορά τα δύο άλλα φλαβονοειδή, 7-*O*-γλυκοζίτη της απιγενίνης και 7-*O*-γλυκοζίτη της λουτεολίνης οι τιμές των συγκεντρώσεων τους ήταν υψηλότερες το Φεβρουάριο (4.58 και 3.17 mg/g στερεού εκχυλίσματος, αντίστοιχα) και μικρότερες τον Ιούλιο (2.83 και 1.12 mg/g).

Η υδροξυτυροσώλη απαντάται μόνο στα δείγματα του Μαΐου και Ιουλίου ενώ ο γλυκοζίτης της τυροσώλης και ο υδροξυ-βερμπασκοζίτης μόνο σε αυτό του Μαΐου. Γενικά, το μήνα Μάιο όπως φαίνεται από τον Πίνακα 3.5 απαντώνται οι περισσότερες ενώσεις, πιθανώς, εξαιτίας του ότι το Μάιο αρχίζει η ανθοφορία του φυτού. Ο βερμπασκοζίτης, ένα κιναιμωμικού τύπου οξύ, καθώς και το ισομερές του βρέθηκαν σε όλα τα εκχυλίσματα εκτός από εκείνο του Νοεμβρίου. Παρόμοια συμπεριφορά εμφάνισαν η ελεωρωπαϊνή και ο 7-*O*-γλουκουρονίτης της απιγενίνης. Το παράγωγο του λιγκστροζίτη, το κύριο συστατικό του Φεβρουαρίου, βρέθηκε σε όλα τα δείγματα εκτός από αυτό του Ιουλίου.

Τα αποτελέσματα από τα χρωματογραφικά προφίλ των εκχυλισμάτων είναι σε συμφωνία με αυτά των μετρήσεων των ολικών φαινολών και ολικών φλαβονοειδών του προηγούμενου κεφαλαίου, όπου στα δείγματα του Μαΐου και του Φεβρουαρίου σημειώθηκαν οι υψηλότερες συγκεντρώσεις.

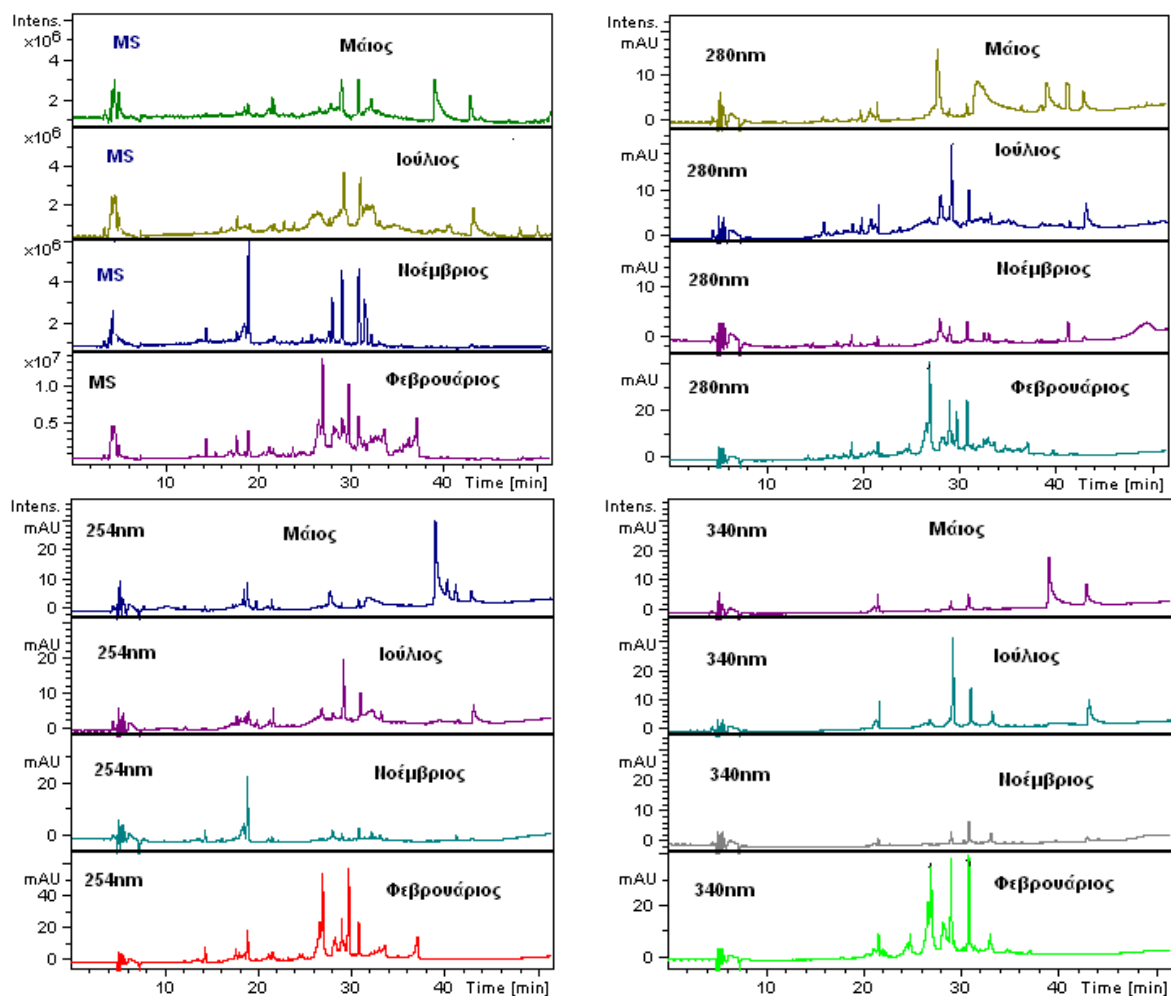
Στον Πίνακα 3.5 παρουσιάζονται συνοπτικά τα κυριότερα συστατικά των υδατικών εκχυλισμάτων από τα Ιωάννινα μετά την ανάλυση των δειγμάτων με LC-ESI-MS<sup>n</sup>.

**Πίνακας 3.5.** Μοριακά ιόντα των υδατικών εκχυλισμάτων από τα Ιωάννινα και η απόδοσή τους στην αντίστοιχη ένωση

| Ένωση                                     | MS (MS <sup>2</sup> )         | L.I.M.Aq | L.I.J.Aq | L.I.N.Aq | L.I.F.Aq |
|-------------------------------------------|-------------------------------|----------|----------|----------|----------|
| Υδροξυτυροσόλη                            | 153 (123)                     | √        | √        | -        | -        |
| Γλυκοζίτης της τυροσόλης                  | 299 (599, 299)                | √        | -        | -        | -        |
| <b>Ολεοζίτης</b>                          | 389 (345, 209)                | √        | √        | √        | √        |
| <b>6,8-δι-C-γλυκοζίτης της απιγενίνης</b> | 593 (575, 503, 473, 383, 353) | √        | √        | √        | √        |
| Υδροξυ-βερμπασκοζίτης                     | 639 (621, 529, 459)           | √        | -        | -        | -        |
| Ισομερές του βερμπασκοζίτη                | 623 (461)                     | √        | √        | -        | √        |
| Βερμπασκοζίτης                            | 623 (461)                     | √        | √        | -        | √        |
| 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης            | 447 (285)                     | √        | -        | -        | √        |
| <b>7-O-ρουτινοζίτης της απιγενίνης</b>    | 577 (269)                     | √        | √        | √        | √        |
| Παράγωγο του λιγκστροζίτη                 | 553 (509, 373, 347)           | √        | -        | √        | √        |
| <b>7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης</b>      | 431 (269)                     | √        | √        | √        | √        |
| Ελευρωπαΐνη                               | 539 (377, 307, 275)           | √        | √        | -        | √        |
| 7-O-γλουκουρονίτης της απιγενίνης         | 445 (269)                     | √        | √        | -        | √        |

### 3.5.2 Συγκριτική μελέτη των μεθανολικών εκχυλισμάτων από τα Ιωάννινα

Στο Σχήμα 3.27 παρουσιάζεται το χρωματογραφικό προφίλ των μεθανολικών εκχυλισμάτων από τα Ιωάννινα **L.I.M.MeOH**, **L.I.J.MeOH**, **L.I.N.MeOH** και **L.I.F.MeOH** στα τρία μήκη κύματος 254, 280, 340 nm καθώς και εκείνο του φασματογράφου μάζας.

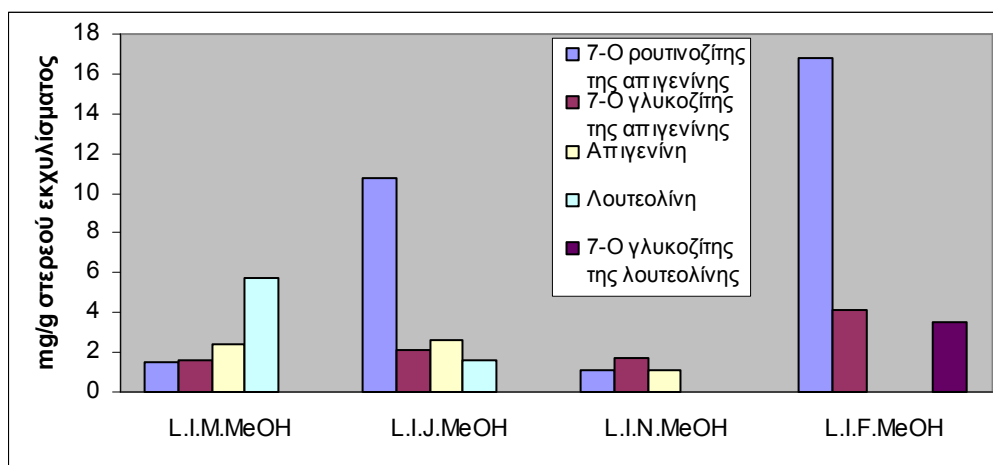


**Σχήμα 3.27.** Χρωματογράφημα μάζας και χρωματογραφικό προφίλ στα 254 nm, 280 nm και 340 nm των μεθανολικών εκχυλισμάτων από τα Ιωάννινα **L.I.M.MeOH**, **L.I.J.MeOH**, **L.I.N.MeOH** και **L.I.F.MeOH**

Από το χρωματογραφικό προφίλ των μεθανολικών εκχυλισμάτων από την περιοχή των Ιωαννίνων (Σχήμα 3.27) προκύπτει ότι το δείγμα του Φεβρουαρίου ήταν το πλουσιότερο σε φαινολικά συστατικά. Όπως και στα υδατικά εκχυλίσματα έτσι και στα μεθανολικά το φτωχότερο όλων ήταν αυτό του Νοεμβρίου. Τα δείγματα του

Μαΐου και Ιουλίου παρουσίασαν φτωχότερο φαινολικό προφίλ σε σχέση με το αντίστοιχο υδατικό.

Τα κοινά συστατικά των μεθανολικών εκχυλίσμάτων από τα Ιωάννινα σύμφωνα με τον Πίνακα 3.6 είναι τα φλαβονοειδή 6,8-δι-*C*-γλυκοζίτης της απιγενίνης, 7-*O*-γλυκοζίτης της απιγενίνης, 7-*O*-ρουτινοζίτης της απιγενίνης και τα σεκοϊριδοειδή ολεοζίτης και ελευρωπαΐνη. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις του 7-*O*-ρουτινοζίτη της απιγενίνης και του 7-*O*-γλυκοζίτη σημειώθηκαν το Φεβρουάριο (16.81 και 4.08 mg/g στερεού εκχυλίσματος αντίστοιχα), αλλά σημαντικά υψηλές ήταν και οι τιμές τον Ιούλιο (10.71 και 2.1 mg/g στερεού εκχυλίσματος) (Σχήμα 3.28). Η λουτεολίνη βρέθηκε μόνο στα μεθανολικά εκχυλίσματα τους μήνες Μάιο, όπου σημειώνεται η υψηλότερη συγκέντρωση, και Ιούλιο με τιμές 5.73 και 1.62 mg/g στερεού εκχυλίσματος. Ομοίως η λουτεολίνη και η απιγενίνη βρέθηκαν μόνο στα μεθανολικά εκχυλίσματα με υψηλότερες συγκεντρώσεις το Μάιο και Ιούλιο (2.45 και 2.64 mg/g στερεού εκχυλίσματος) ενώ μικρότερη είναι αυτή του Νοεμβρίου (1.11 mg/g στερεού εκχυλίσματος). Ο 6,8-δι-*C*-γλυκοζίτης της απιγενίνης παρουσιάζει παρόμοιες συγκεντρώσεις τους μήνες Μάιο, Ιούλιο, Φεβρουάριο και μικρότερη το Νοέμβριο. Ο ολεοζίτης απαντά σε όλα τα εκχυλίσματα, ενώ σύμφωνα με τα χρωματογραφήματα το Νοέμβριο παρατηρείται η υψηλότερη συγκέντρωση.



**Σχήμα 3.28.** Γραφική παράσταση της μεταβολής των συγκεντρώσεων των 5 φλαβονοειδών ως συνάρτηση με το χρόνο σε μεθανολικά εκχυλίσματα από τα Ιωάννινα.

Συγκρίνοντας τα υδατικά με τα μεθανολικά εκχυλίσματα από τα Ιωάννινα παρατηρείται ότι οι ενώσεις υδροξυτυροσόλη, ολεοζίτης, 6,8-δι-*C*-γλυκοζίτης της

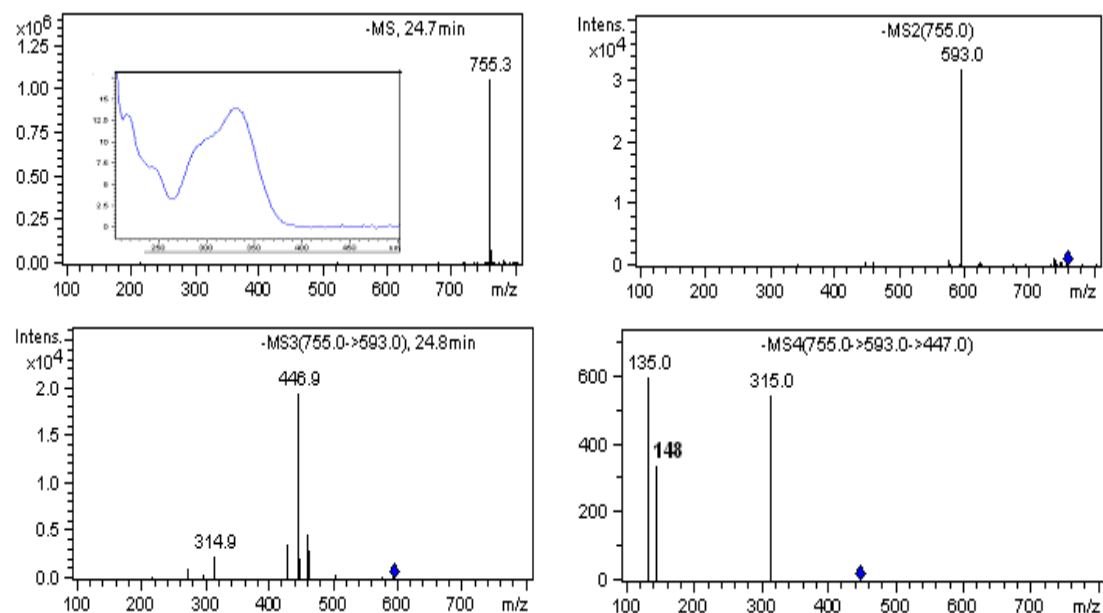
απιγενίνης, 7-Ο-γλυκοζίτης της απιγενίνης και ο 7-Ο-ρουτινοζίτης της απιγενίνης απαντώνται τις ίδιες χρονικές περιόδους τόσο στα υδατικά όσο και στα μεθανολικά εκχυλίσματα. Όσον αφορά τις συγκεντρώσεις, αυτές ποικίλουν ανάλογα με την περίοδο και τον διαλύτη εκχύλισης. Γενικά, υψηλές συγκεντρώσεις για τα υδατικά εκχυλίσματα παρατηρήθηκαν το Μάιο και Φεβρουάριο ενώ για τα μεθανολικά το Φεβρουάριο.

Για τα υπόλοιπα συστατικά που ταυτοποιήθηκαν στα εκχυλίσματα παρατηρείται ότι ο γλυκοζίτης της τυροσόλης και ο υδροξυ-βερμπασκοζίτης απαντώνται μόνο στα υδατικά εκχυλίσματα ενώ οι ενώσεις απιγενίνη και λουτεολίνη μόνο στα μεθανολικά.

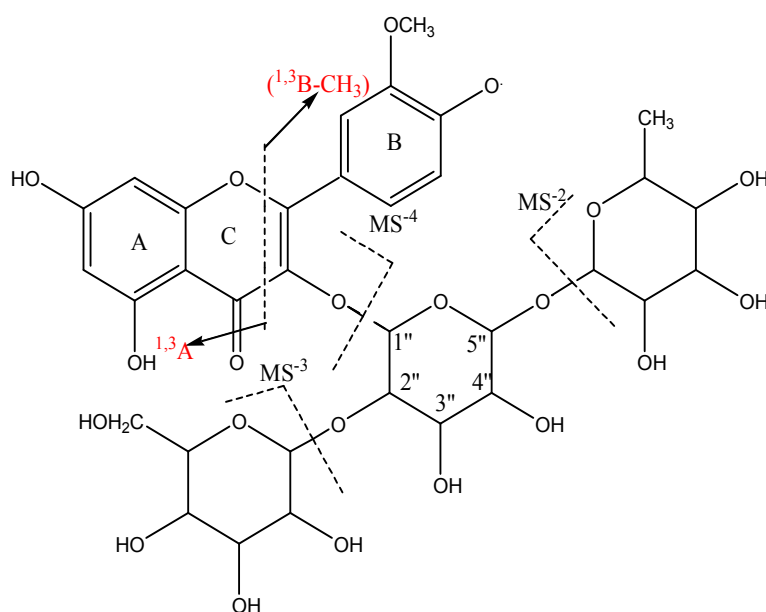
Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το εκχύλισμα του Φεβρουαρίου όπου στο χρωματογραφικό προφίλ στα 340 nm παρατηρείται μία διπλή κορυφή με χρόνο έκλουσης  $t_R = 23.7-24.8$  min. Η κορυφή αυτή με μέγιστη απορρόφηση στα 246, 290sh και 336 nm στο φάσμα UV ταυτοποιήθηκε μόνο στο συγκεκριμένο εκχύλισμα και δεν παρατηρείται τους υπόλοιπους μήνες. Το φάσμα μάζας της διπλής κορυφής παρουσιάζει το ίδιο κύριο θραύσμα στα  $[M-H]^-$  755 m/z. Στο δευτερογενές φάσμα μάζας  $MS^2$  του μοριακού ιόντος παρατηρείται ένα κύριο θραύσμα  $[M-H-162]^-$  ( $[M-H-γλυκόζη]^-$ ) στα 593 m/z, υποδεικνύοντας την παρουσία ενός μορίου εξόξης. Το τριτογενές φάσμα μάζας  $MS^3$  έδειξε την παρουσία ενός κύριου θραύσματος  $[M-H-146]^-$  ( $[M-H-ραμνόζη]^-$ ) στα 447 m/z, δηλώνοντας την παρουσία ενός μορίου ραμνόξης. Στη συνέχεια, το τεταρτοταγές φάσμα μάζας παρουσίασε θραύσμα  $[M-H-132]^-$  ( $[M-H-πεντόζη]^-$ ) στα 315 m/z, στα 135 m/z  $[^{1,3}A]^-$  (διασταυρούμενη διάσπαση 1,3 του δακτυλίου A) και στα 148 m/z  $[^{1,3}B-CH_3]^-$  (διασταυρούμενη διάσπαση 1,3 του δακτυλίου B) (Cuyckens και Claeys, 2004) υποδεικνύοντας την παρουσία ενός μορίου πεντόξης και μιας μεθοξυ-ομάδας στον δακτύλιο B. Σύμφωνα με το μονοπάτι θραυσματοποίησης πιθανώς η κορυφή αυτή είναι μία μεθοξυ-κερκετίνη υποκατεστημένη στη θέση 3 από τους παραπάνω γλυκοζίτες (Ferrerres *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2008). Από την πορεία θραυσματοποίησης στο φάσμα μάζας της διπλής κορυφής, για κάθε μία κορυφή ξεχωριστά, παρατηρείται ότι τα θραύσματα των κορυφών είναι πανομοιότυπα με αποτέλεσμα οι ενώσεις που αντιστοιχούν στην διπλή κορυφή να είναι μεταξύ τους ισομερή. Πιθανώς η ένωση που εκλύεται πρώτη να έχει ένα γαλακτοζίτη ως ομάδα εξόξης και αυτή που εκλύεται δεύτερη ως εξόξη να έχει γλυκοζίτη (Lin και Harnly, 2007; Lin *et al.*, 2008) .

Στο Σχήμα 3.29 παρουσιάζονται η πορεία θραυσματοποίησης στο φάσμα μάζας ( $MS^{-1}$ ,  $MS^{-2}$ ,  $MS^{-3}$ ,  $MS^{-4}$ ), το φάσμα UV της ένωσης και η πιθανή της δομή.

**A.**



**B.**



**Σχήμα 3.29.** Α. Μονοπάτι θραυσματοποίησης στο φάσμα μάζας και φάσμα UV Β. Πιθανή δομή της ένωσης 3-*O*-(2'',5''-*O*-εξόζης,ραμνοζίτης-πεντόζης) της ισοραμνετίνης (isorhamnetin 3-*O*-2'',5''-*O*-hexosylrhamnosylpentoside)

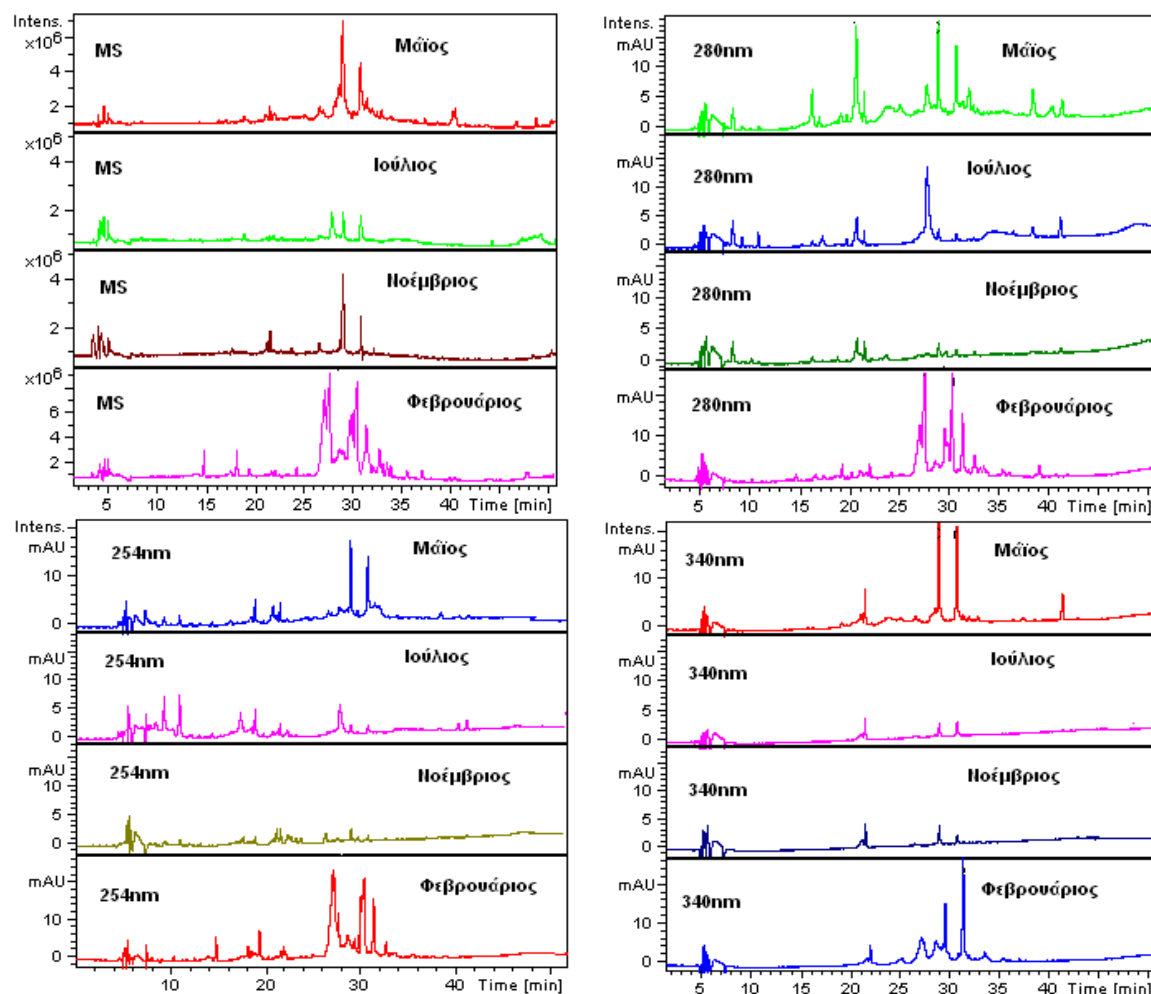
Στον Πίνακα 3.6 παρουσιάζονται συνοπτικά τα κυριότερα συστατικά των μεθανολικών εκχυλισμάτων από τα Ιωάννινα μετά την ανάλυση των δειγμάτων με LC-ESI-MS<sup>n</sup>.

**Πίνακας 3.6.** Μοριακά ιόντα των μεθανολικών εκχυλισμάτων από τα Ιωάννινα και η ταυτοποίησή τους στην αντίστοιχη ένωση

| Ένωση                                                                  | MS (MS <sup>2</sup> )                                                            | L.I.M.MeOH | L.I.J.MeOH | L.I.N.MeOH | L.I.F.MeOH. |
|------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|------------|------------|------------|-------------|
| Υδροξυτυροσόλη                                                         | 153 (123)                                                                        | √          | √          | -          | -           |
| Παράγωγο του ολεοζίτη                                                  | 433 (389, 356, 270, 220, 176)                                                    | -          | √          | -          | √           |
| Ισομερές του ολεοζίτη                                                  | 389 (345, 209, 165, 121)                                                         | -          | -          | √          | -           |
| <b>Ολεοζίτης</b>                                                       | 389 (345, 209)                                                                   | √          | √          | √          | √           |
| <b>Ισομερές του 6,8-δι-C-γλυκοζίτης της απιγενίνης</b>                 | 593 (575, 503, 473, 383, 353)                                                    | √          | √          | √          | √           |
| <b>6,8-δι-C-γλυκοζίτης της απιγενίνης</b>                              | 593 (575, 503, 473, 383, 353)                                                    | √          | √          | √          | √           |
| 3-O-(2'',5''-O-εξόλης,ραμνοζίτης-πεντόζης) της ισοραμενίνης (ισομερές) | 755 (MS <sup>2</sup> 593), (MS <sup>3</sup> 447) (MS <sup>4</sup> 315, 148, 135) | -          | -          | -          | √           |
| 3-O-(2'',5''-O-εξόλης,ραμνοζίτης-πεντόζης) της ισοραμενίνης            | 755 (MS <sup>2</sup> 593), (MS <sup>3</sup> 447) (MS <sup>4</sup> 315, 148, 135) | -          | -          | -          | √           |
| Ισομερές του βερμπασκοζίτη                                             | 623 (461)                                                                        | -          | -          | -          | √           |
| Βερμπασκοζίτης                                                         | 623 (461)                                                                        | -          | √          | -          | √           |
| 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης                                         | 447 (285)                                                                        | -          | -          | -          | √           |
| <b>7-O-ρουτινοζίτης της απιγενίνης</b>                                 | 577 (269)                                                                        | √          | √          | √          | √           |
| Παράγωγο του λιγκστροζίτη                                              | 553 (509, 373, 347, 329)                                                         | -          | -          | -          | √           |
| <b>7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης</b>                                   | 431 (269)                                                                        | √          | √          | √          | √           |
| <b>Ελευροπαΐνη</b>                                                     | 539 (377, 307, 275)                                                              | √          | √          | √          | √           |
| 7-O-glucuronide της απιγενίνης                                         | 445 (269)                                                                        | -          | √          | -          | √           |
| Λουτεολίνη                                                             | 285                                                                              | √          | √          | -          | -           |
| Απιγενίνη                                                              | 269                                                                              | √          | √          | √          | -           |

### 3.5.3. Συγκριτική μελέτη των υδατικών εκχυλισμάτων από την Κάριανη

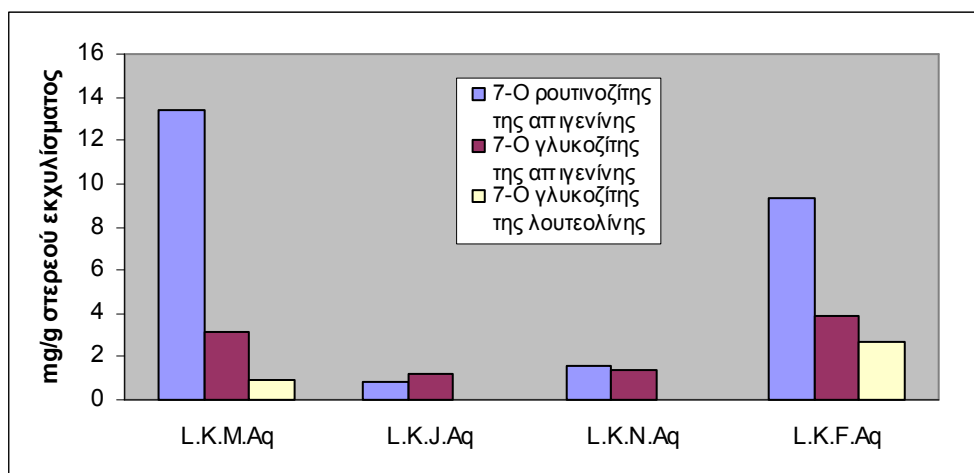
Στο Σχήμα 3.30 παρουσιάζεται το χρωματογραφικό προφίλ των υδατικών εκχυλισμάτων από την Κάριανη **L.K.M.Aq**, **L.K.J.Aq**, **L.K.N.Aq** και **L.K.F.Aq** στα τρία μήκη κύματος 254, 280, 340 nm καθώς και εκείνο του φασματογράφου μάζας



**Σχήμα 3.30.** Χρωματογράφημα μάζας και χρωματογραφικό προφίλ στα 254 nm, 280 nm και 340 nm των υδατικών εκχυλισμάτων από την Κάριανη **L.K.M.Aq**, **L.K.J.Aq**, **L.K.N.Aq** και **L.K.F.Aq**

Από το χρωματογραφικό προφίλ των εκχυλισμάτων (Σχήμα 3.30) προκύπτει ότι τα υδατικά εκχυλίσματα του Μαΐου και του Φεβρουαρίου είναι πλουσιότερα σε φαινολικά συστατικά σε σχέση με αυτά του Ιουλίου και του Νοεμβρίου. Στο δείγμα του Μαΐου παρατηρείται η υψηλότερη συγκέντρωση του 7-*O*-ρουτινοζίτη της απιγενίνης (13.41 mg/g στερεού εκχυλίσματος) ενώ σε αυτό του Φεβρουαρίου σημειώνεται η μεγαλύτερη του 7-*O*-γλυκοζίτη της απιγενίνης (3.93 mg/g στερεού

εκχυλίσματος) (Σχήμα 3.31). Όσον αφορά τον 7-Ο-γλυκοζίτη της λουτεολίνης, ταυτοποιήθηκε μόνο στα δείγματα του Μαΐου και Φεβρουαρίου.



**Σχήμα 3.31.** Γραφική παράσταση της μεταβολής των συγκεντρώσεων 3 φλαβονοειδών ως συνάρτηση με το χρόνο των υδατικών εκχυλισμάτων από την Κάριανη.

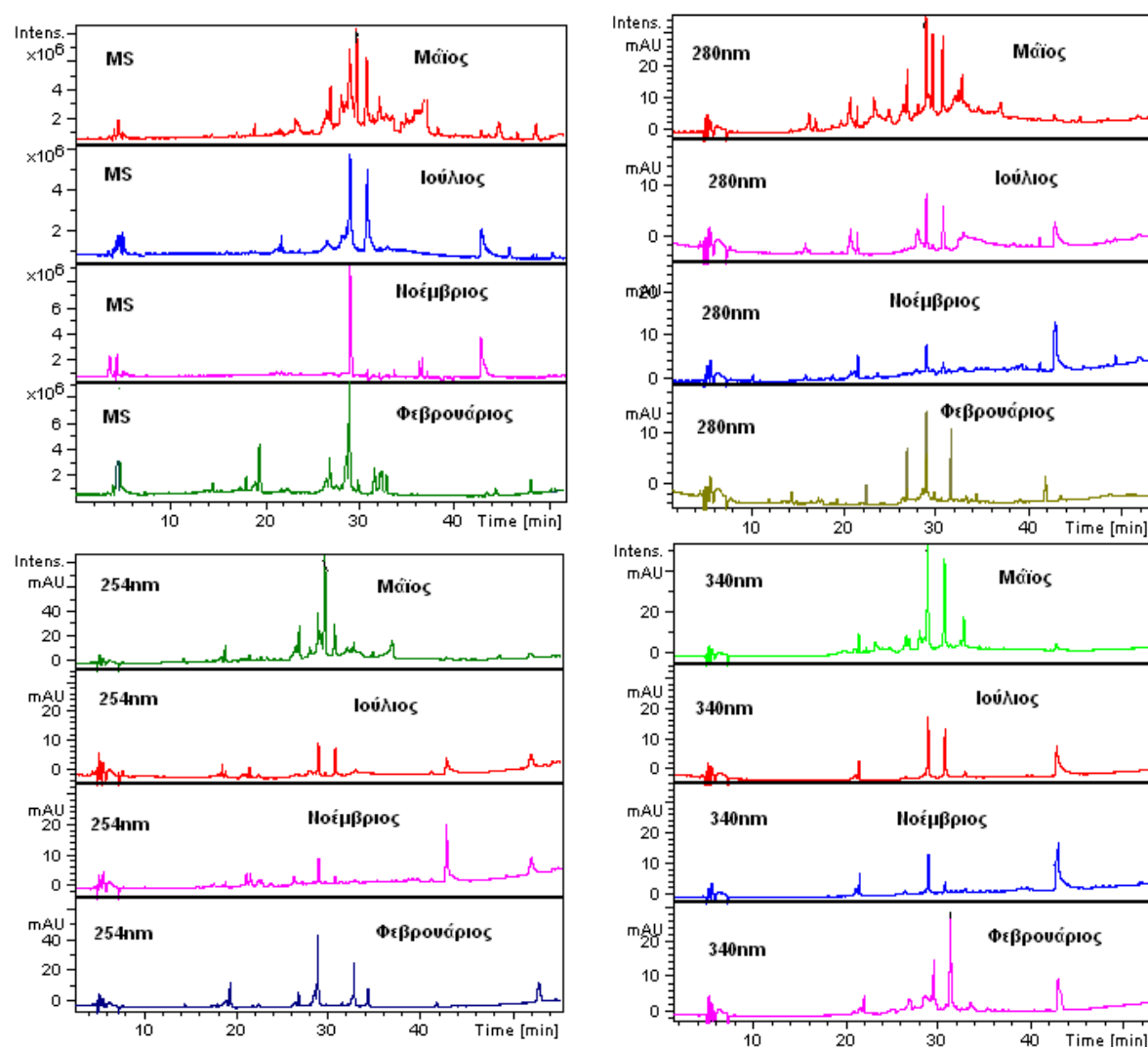
Σύμφωνα με το Πίνακα 3.7 τα κοινά συστατικά των υδατικών εκχυλισμάτων από την Κάριανη είναι ο ολεοζίτης, 6,8-δι-*C*-γλυκοζίτης της απιγενίνης, 7-Ο-ρουτινοζίτης της απιγενίνης και 7-Ο-γλυκοζίτης της απιγενίνης. Τα τέσσερα αυτά συστατικά σύμφωνα με τα προηγούμενα αποτελούν εξίσου τα κοινά συστατικά των υδατικών εκχυλισμάτων από τα Ιωάννινα. Όσον αφορά το κύριο συστατικό του κάθε υδατικού εκχυλίσματος προκύπτει ότι αυτό είναι το ίδιο και για τις δύο περιοχές, με εξαίρεση τα δείγματα του Ιουλίου, όπου ο 7-Ο-ρουτινοζίτης της απιγενίνης αποτελεί το κύριο συστατικό των Ιωαννίνων και όχι της Κάριανης. Συγκρίνοντας τα Σχήματα 3.26 και 3.31, συμπεραίνεται ότι οι συγκεντρώσεις των φλαβονοειδών (7-Ο-ρουτινοζίτη της απιγενίνης, 7-Ο-γλυκοζίτη της απιγενίνης και ο 7-Ο-γλυκοζίτη της λουτεολίνης) στα υδατικά εκχυλίσματα των Ιωαννίνων είναι μεγαλύτερες από αυτές της Κάριανης. Γενικά, από τα χρωματογραφήματα των υδατικών εκχυλισμάτων και των δύο περιοχών διαπιστώνεται ότι τα δείγματα από τα Ιωάννινα είναι πλουσιότερα σε επιμέρους φαινολικά συστατικά από αυτά της Κάριανης. Επίσης, τα κύρια συστατικά των εκχυλισμάτων των δύο περιοχών είναι ποιοτικά παρόμοια αλλά όχι και ποσοτικά.

**Πίνακας 3.7.** Μοριακά ιόντα των υδατικών εκχυλισμάτων από την Κάριανη και η ταυτοποίησή τους στην αντίστοιχη ένωση

| Ένωση                                                  | MS (MS <sup>2</sup> )         | L.K.M.Aq | L.K.J.Aq | L.K.N.Aq | L.K.F.Aq |
|--------------------------------------------------------|-------------------------------|----------|----------|----------|----------|
| Υδροξυτυροσόλη                                         | 153 (123)                     | √        | -        | -        | -        |
| Γλυκοζίτης της τυροσόλης                               | 299 (599, 299)                | √        | -        | -        | -        |
| Παράγωγο του ολεοζίτη                                  | 433 (389, 345, 271, 220, 176) | -        | √        | -        | √        |
| <b>Ολεοζίτης</b>                                       | 389 (345, 209)                | √        | √        | √        | √        |
| 6,8-δι- <i>C</i> -γλυκοζίτης της απιγενίνης (ισομερές) | 593 (575, 503, 473, 383, 353) | √        | √        | √        | √        |
| <b>6,8-δι-<i>C</i>-γλυκοζίτης της απιγενίνης</b>       | 593 (575, 503, 473, 383, 353) | √        | √        | √        | √        |
| Υδροξυ-βερμπασκοζίτης                                  | 639 (621, 529, 459)           | √        | -        | √        | -        |
| Ισομερές του βερμπασκοζίτη                             | 623 (461)                     | -        | -        | -        | √        |
| Βερμπασκοζίτης                                         | 623 (461)                     | -        | -        | -        | √        |
| 7- <i>O</i> -ρουτινοζίτης της λουτεολίνης              | 593 (285)                     | √        | √        | √        | -        |
| 7- <i>O</i> -γλυκοζίτης της λουτεολίνης                | 447 (285)                     | √        | -        | -        | √        |
| <b>7-<i>O</i>-ρουτινοζίτης της απιγενίνης</b>          | 577 (269)                     | √        | √        | √        | √        |
| Παράγωγο του λιγκστροζίτη                              | 553 (509, 373, 347)           | -        | -        | -        | √        |
| <b>7-<i>O</i>-γλυκοζίτης της απιγενίνης</b>            | 431 (269)                     | √        | √        | √        | √        |
| Ελευρωπαΐνη                                            | 539 (377, 307, 275)           | √        | -        | -        | √        |

### 3.5.4. Συγκριτική μελέτη των μεθανολικών εκχυλισμάτων από την Κάριανη

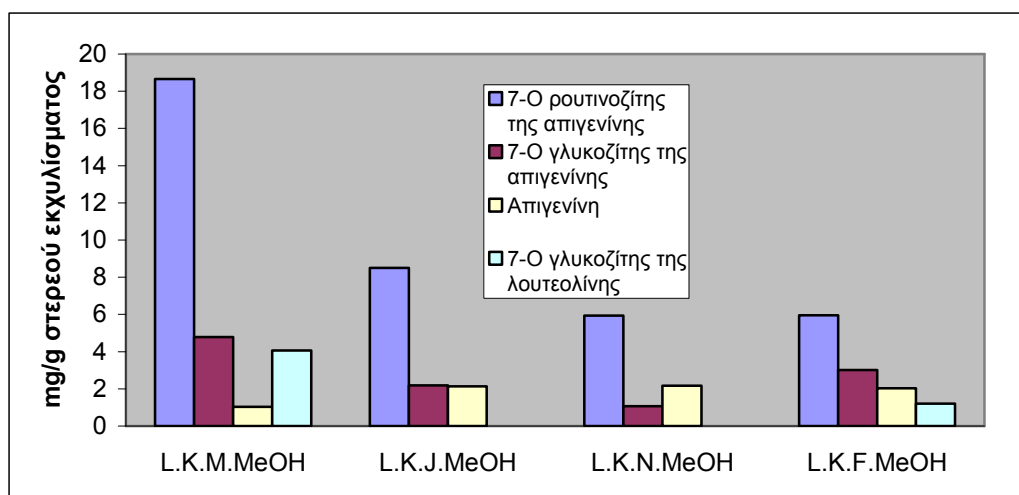
Στο Σχήμα 3.32 παρουσιάζεται το χρωματογραφικό προφίλ των μεθανολικών εκχυλισμάτων από την Κάριανη **L.K.M.MeOH**, **L.K.J.MeOH**, **L.K.N.MeOH** και **L.K.F.MeOH** στα τρία μήκη κύματος 254, 280, 340 nm καθώς και εκείνο του φασματογράφου μάζας



**Σχήμα 3.32.** Χρωματογράφημα μάζας και χρωματογραφικό προφίλ στα 254 nm, 280 nm και 340 nm των μεθανολικών εκχυλισμάτων από την Κάριανη **L.K.M.MeOH**, **L.K.J.MeOH**, **L.K.N.MeOH** και **L.K.F.MeOH**

Από το χρωματογραφικό προφίλ των μεθανολικών εκχυλισμάτων (Σχήμα 3.32) και τον Πίνακα 3.8 προκύπτει ότι τα δείγματα του Μαΐου και του Φεβρουαρίου είναι πλουσιότερα σε φαινολικές ενώσεις από αυτά του Νοεμβρίου και του Ιουλίου. Τα κοινά συστατικά των εκχυλισμάτων είναι τα 6,8-δι-*C*-γλυκοζίτης της απιγενίνης,

7-Ο-ρουτινοζίτης της απιγενίνης, 7-Ο-γλυκοζίτης της απιγενίνης, απιγενίνη και ολεοζίτης. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις του 7-Ο-ρουτινοζίτη και του 7-Ο-γλυκοζίτη της απιγενίνης καθώς και του 7-Ο-γλυκοζίτη της λουτεολίνης παρατηρούνται το Μάιο (18.65, 4.78 και 4.07 mg/g στερεού εκχυλίσματος αντίστοιχα), ενώ το δείγμα του Νοεμβρίου έδωσε τη μεγαλύτερη συγκέντρωση σε απιγενίνη (2.17 mg/g στερεού εκχυλίσματος), η οποία αποτελεί και το κύριο συστατικό του εκχυλίσματος (Σχήμα 3.33).



**Σχήμα 3.33.** Γραφική παράσταση της μεταβολής των συγκεντρώσεων των 4 φλαβονοειδών ως συνάρτηση με το χρόνο των μεθανολικών εκχυλισμάτων από την Κάριανη.

Από τη σύγκριση των μεθανολικών εκχυλισμάτων από την Κάριανη με τα αντίστοιχα υδατικά διαπιστώνεται ότι τα μεθανολικά εκχυλίσματα είναι πλουσιότερα σε φαινολικές ενώσεις. Συγκεκριμένα όσον αφορά τις ενώσεις των φλαβονοειδών που πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός, οι τιμές αυτών στα μεθανολικά εκχυλίσματα είναι υψηλότερες από τις αντίστοιχες στα υδατικά εκχυλίσματα. Με εξαίρεση την απιγενίνη η οποία ταυτοποιήθηκε μόνο στα μεθανολικά εκχυλίσματα, συμπεραίνεται ότι τα κοινά συστατικά των μεθανολικών και υδατικών εκχυλισμάτων της Κάριανης ήταν παρόμοια.

Από το χρωματογραφικό προφίλ των μεθανολικών εκχυλισμάτων των δύο περιοχών προκύπτει ότι τα εκχυλίσματα της Κάριανης είναι πλουσιότερα σε φαινολικά συστατικά σε σχέση με αυτά των Ιωαννίνων. Συγκεκριμένα, για τα φλαβονοειδή που πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός παρατηρείται ότι οι συγκεντρώσεις αυτών στην περιοχή της Κάριανης είναι μεγαλύτερες από αυτές των

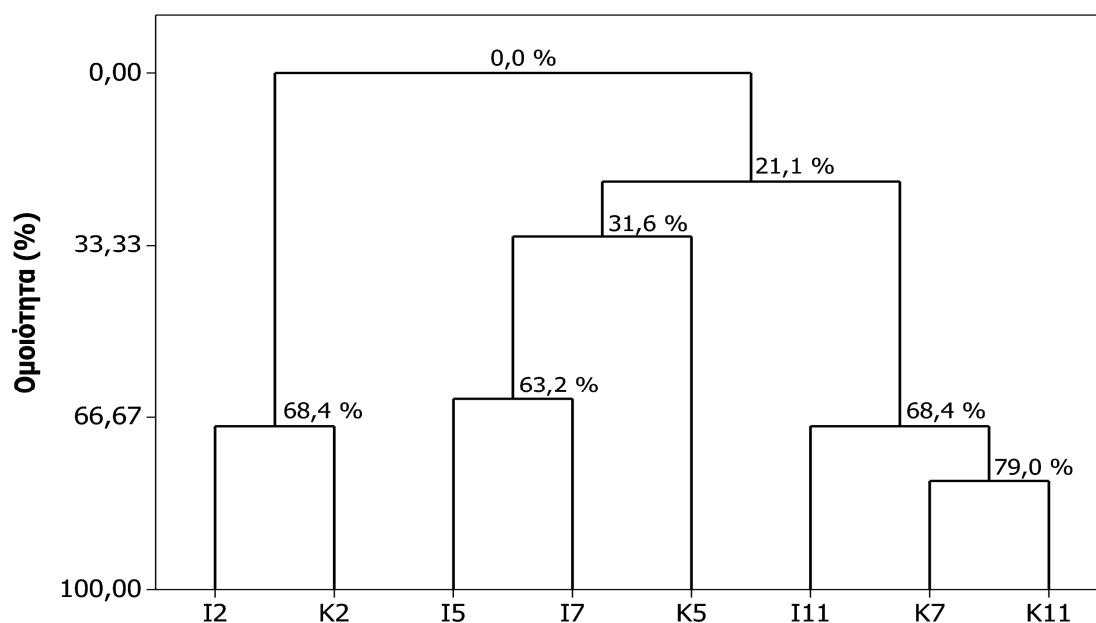
Ιωαννίνων. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το συστατικό 7-*O*-ρουτινοζίτης της απιγενίνης το οποίο στα μεθανολικά εκχυλίσματα των Ιωαννίνων έχει τις υψηλότερες συγκεντρώσεις τον Ιούλιο και Φεβρουάριο ενώ σε όλα τα άλλα δείγματα το Μάιο και Φεβρουάριο. Ωστόσο, παρόμοια ήταν τα κοινά συστατικά των δειγμάτων και από τις δύο περιοχές, τα οποία όπως και στην περίπτωση των υδατικών διαφέρουν ως προς τις συγκεντρώσεις τους.

**Πίνακας 3.8.** Μοριακά ιόντα των μεθανολικών εκχυλισμάτων από την Κάριανη και η ταυτοποίησή τους στην αντίστοιχη ένωση

| Ένωση                                                  | MS (MS <sup>2</sup> )         | L.K.M.MeOH | L.K.J.MeOH | L.K.N.MeOH | L.K.F.MeOH. |
|--------------------------------------------------------|-------------------------------|------------|------------|------------|-------------|
| Υδροξυτυροσόλη                                         | 153 (123)                     | √          | -          | -          | -           |
| Γλυκοζίτης της τυροσόλης                               | 299 (599, 300)                | √          | -          | -          | -           |
| <b>Ολεοζίτης</b>                                       | 389 (345, 209)                | √          | √          | √          | √           |
| 6,8-di- <i>C</i> -γλυκοζίτης της απιγενίνης (ισομερές) | 593 (575, 503, 473, 383, 353) | √          | √          | √          | √           |
| <b>6,8-di-<i>C</i>-γλυκοζίτης της απιγενίνης</b>       | 593 (575, 503, 473, 383, 353) | √          | √          | √          | √           |
| 7- <i>O</i> -ρουτινοζίτης της λουτεολίνης              | 593 (285)                     | √          | √          | √          | -           |
| Βερμπασκοζίτης                                         | 623 (461)                     | √          | -          | -          | √           |
| 7- <i>O</i> -γλυκοζίτης της λουτεολίνης                | 447 (285)                     | √          | -          | -          | √           |
| <b>7-<i>O</i>-ρουτινοζίτης της απιγενίνης</b>          | 577 (269)                     | √          | √          | √          | √           |
| Παράγωγο του λιγκστροζίτη                              | 553 (509, 373, 347, 329)      | √          | -          | -          | √           |
| <b>7-<i>O</i>-γλυκοζίτης της απιγενίνης</b>            | 431 (269)                     | √          | √          | √          | √           |
| Ελευρωπαΐνη                                            | 539 (377, 307, 275)           | √          | √          | -          | √           |
| 7- <i>O</i> -γλουκουρονίτης της απιγενίνης             | 445 (269)                     | √          | √          | -          | -           |
| <b>Απιγενίνη</b>                                       | 269                           | √          | √          | √          | √           |

### 3.5.5. Στατιστική ανάλυση ομαδοποίησης των αποτελεσμάτων της συζευγμένης τεχνικής LC-ESI-MS<sup>n</sup>

Για τα αποτελέσματα της συγκριτικής μελέτης τόσο των υδατικών όσο και των μεθανολικών εκχυλισμάτων από τις περιοχές των Ιωαννίνων και της Κάριανης τους μήνες Μάιο, Ιούλιο, Νοέμβριο και Φεβρουάριο με τη συνδυαστική τεχνική LC-ESI-MS<sup>n</sup> πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση ομαδοποίησης (cluster analysis) (Σχήμα 3.34).



**Σχήμα 3.34.** Δενδρόγραμμα ανάλυσης ομαδοποίησης (cluster analysis) περιοχών (I: Ιωάννινα, K: Κάριανη) και μηνών (2:Φεβρουάριος, 5:Μάιος, 7:Ιούλιος, 11:Νοέμβριος)

Από το δενδρόγραμμα ανάλυσης ομαδοποίησης (Σχήμα 3.36) παρατηρείται ότι μεγαλύτερο ρόλο στην ομαδοποίηση έχουν οι μήνες σε σχέση με τις περιοχές, (οι οποίες όμως είναι και αυτές σημαντικοί παράγοντες). Τα δείγματα Ιουλίου και Νοεμβρίου από την Κάριανη (K7 και K11) παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη ομοιότητα σε φαινορικά συστατικά, σε ποσοστό 79%. Στη συνέχεια, οι δύο αυτοί μήνες εμφανίζουν ομοιότητα ίση με 68,4% με το δείγμα από τα Ιωάννινα το μήνα Νοέμβριο. Ίδια ομοιότητα ως προς τα φαινορικά συστατικά τους (68,4%) παρατηρείται στα δείγματα του Φεβρουαρίου και από τις δύο περιοχές (I2 και K2). Τα συγκεκριμένα δείγματα ωστόσο διαφοροποιούνται σε μεγάλο βαθμό από όλους τους υπόλοιπους συνδυασμούς (Σχήμα 3.36). Όσον αφορά τα δείγματα από τα Ιωάννινα κατά τους μήνες Μάιο και Ιούλιο, αυτά παρουσιάζουν ομοιότητα ίση με 63,2% και 31,6% με το δείγμα της Κάριανης το μήνα Μάιο. Τα δείγματα του Μαΐου και από τις δύο περιοχές καθώς και του Ιουλίου από τα Ιωάννινα (I5, K5, I7) παρουσιάζουν ομοιότητα ίση με 21,1% με τα δείγματα του Νοεμβρίου από τις δύο περιοχές και αυτό του Ιουλίου από την Κάριανη (I11, K11, K7).

### Συμπερασματικά:

➤ Δείγματα της ίδιας ποικιλίας, συλλεγμένα σε διαφορετικές χρονικές περιόδους και από διαφορετικές περιοχές παρουσιάζουν ομοιότητα στα συστατικά τους η οποία κυμαίνεται από 21% έως 79%. Εξαίρεση αποτελούν τα δείγματα του Φεβρουαρίου τα οποία δεν παρουσιάζουν στατιστική ομοιότητα ως προς τα συστατικά τους με τα δείγματα των υπόλοιπων μηνών.

➤ Η σύγκριση των εκχυλισμάτων των φύλλων *Ligustrum lucidum* τις διάφορες χρονικές περιόδους έδειξε ότι κατά τους μήνες Μάιο και Φεβρουάριο έχουμε τα υψηλότερα ποσοστά φαινολικών ενώσεων. Επίσης, παρατηρείται μία μικρή ποιοτική διαφοροποίηση μεταξύ των συστατικών αλλά με μία αξιοσημείωτη ποσοτική διαφορά. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με εκείνα των Termentzi *et al.*, 2008, οι οποίοι μελέτησαν το φαινολικό προφίλ του καρπού του φυτού *Sorbus domestica* στις διάφορες φάσεις ωρίμανσης. Τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής έδειξαν ότι το φαινολικό προφίλ των διαφόρων εκχυλισμάτων δεν άλλαζε ποιοτικά ως προς την παρουσία των ενώσεων, αλλά μόνο ποσοτικά. Ανάλογα, όμως, την περίοδο συγκομιδής οι τιμές των συγκεντρώσεων των συστατικών διέφεραν.

➤ Συγκρίνοντας τις δύο περιοχές, ως προς τη σύσταση των φαινολικών τους ενώσεων διαπιστώνεται ότι η διαφορετική περιοχή καλλιέργειας του φυτού δεν επηρεάζει το φαινολικό προφίλ του, εφόσον η ποικιλία παραμένει η ίδια. Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με αυτά των Vinha *et al.*, 2005, οι οποίοι μελέτησαν το φαινολικό προφίλ του ελαιοκάρπου διαφόρων ποικιλιών από διαφορετικές περιοχές. Οι παραπάνω ερευνητές έδειξαν ότι δείγματα από την ίδια ποικιλία αλλά διαφορετικού σταδίου ωρίμανσης και συλλεγμένα από διαφορετική περιοχή έχουν παρόμοιο φαινολικό προφίλ για τα κύρια συστατικά, τονίζοντας τη μεγάλη σημασία της ποικιλίας στο προφίλ του φυτού.

➤ Γενικά, συγκρίνοντας τα χρωματογραφικά προφίλ των εκχυλισμάτων και από τις δύο περιοχές παρατηρείται ότι δεν μεταβάλλονται δραστικά ως προς το περιεχόμενο των συστατικών τους και ιδιαίτερα των φλαβονοειδών. Ο 6,8-δι-C-γλυκοζίτης της απιγενίνης, 7-O-ρουτινοζίτης της απιγενίνης και 7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης είναι τα φλαβονοειδή τα οποία ταυτοποιήθηκαν σε όλα τα δείγματα, οι συγκεντρώσεις των οποίων ποικίλουν ανάλογα με την περίοδο συγκομιδής. Η

παρουσία των ενώσεων αυτών σε όλα τα δείγματα μπορεί να θεωρηθεί ως χαρακτηριστική για το προφίλ των φλαβονοειδών των φύλλων *Ligustrum lucidum*, και επομένως μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως κριτήριο ποιότητας (quality control index). Οι Meirinhos *et al.*, 2005 αναφέρουν παρόμοιες μεταβολές στις συγκεντρώσεις των φλαβονοειδών στα εκχυλίσματα φύλλων ελαιοδέντρου. Οι διαφοροποιήσεις στις συγκεντρώσεις ήταν αναμενόμενες, καθώς πολλοί παράγοντες όπως ο χρόνος συλλογής, το κλίμα, η ποικιλία και η φύση του εδάφους επηρεάζουν το ποσοστό των ενώσεων (Esti *et al.*, 1998; Romani *et al.*, 1999; Botía *et al.*, 2001, Damak *et al.*, 2008). Κατά το μήνα Μάιο (περίοδος ανθοφορίας) και Φεβρουάριο (περίοδος καρποφορίας) παρατηρείται αύξηση στο ποσοστό των φαινολικών εξαιτίας πιθανόν του σταδίου ανάπτυξης του φυτού (Ranalli *et al.*, 2006).

Επίσης, τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μελέτη των εκχυλισμάτων με τη συνδυαστική τεχνική LC-ESI-MS<sup>n</sup> εξετάστηκαν συγκριτικά με εκείνα που προέκυψαν από τη χρήση φασματοσκοπίας NMR <sup>1</sup>H. Η σύγκριση αυτή εξαιτίας της πολυπλοκότητας των φασμάτων NMR στην αρωματική περιοχή περιορίστηκε μόνο στις φλαβονοειδείς ενώσεις. Από τα πρωτονιακά φάσματα NMR προκύπτει ότι στα εκχυλίσματα πιθανώς να υπάρχουν φλαβόνες, *O* ή *C*-γλυκοζίτες αυτών καθώς και φλαβανόλες. Από την ανάλυση με την τεχνική LC-ESI-MS<sup>n</sup> ταυτοποιήθηκαν τα περισσότερα φλαβονοειδή. Πράγματι, η κύρια τάξη των φλαβονοειδών είναι οι φλαβόνες και συγκεκριμένα η απιγενίνη, η λουτεολίνη και τα γλυκοζυλιωμένα παράγωγά τους. Συγκεκριμένα, οι *O*-γλυκοζίτες αυτών: 7-*O*-γλυκοζίτης της απιγενίνης, 7-*O*-ρουτινοζίτης της απιγενίνης, 7-*O*-γλουκουρονίτης της απιγενίνης, 7-*O*-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, 7-*O*-ρουτινοζίτης της λουτεολίνης καθώς και το δι-*C* γλυκοζυλιωμένο παράγωγο της απιγενίνης. Επίσης ενδιαφέρον παρουσιάζει και το παράγωγο της ισοραμενίνης.

Η δυσκολία ταυτοποίησης των συγκεκριμένων φλαβονοειδών στο φάσμα NMR <sup>1</sup>H με τη μέθοδο του spiking έγκειται στο γεγονός ότι ενώσεις όπως είναι η απιγενίνη και τα παράγωγά της, παρουσιάζουν παρόμοιες τιμές στις απορροφήσεις συντονισμού του υδροξυλικού πρωτονίου OH(5) καθώς και η μερική διαλυτοποίησή τους σε διαλύτη ακετονιτρίλιο.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

**ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ  
ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΣΤΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΦΥΛΛΩΝ  
*LIGUSTRUM LUCIDUM* ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ  
ΚΥΡΙΟΤΕΡΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΗΣ  
ΤΕΧΝΙΚΗΣ LC-ESI-MS<sup>n</sup> ΚΑΙ LC-SPE-NMR**

#### 4.1 Εισαγωγή

Με βάση τη συγκριτική μελέτη της σύστασης και της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων φύλλων *Ligustrum lucidum*, που αναπτύχθηκε στο τρίτο κεφάλαιο, διαπιστώθηκε ότι το πλουσιότερο εκχύλισμα σε δραστικά συστατικά προέκυψε από τα φύλλα που συλλέχθηκαν από την περιοχή της Κάριανη το μήνα Μάιο. Σε αυτή τη διαπίστωση βασίστηκε η επιλογή των δειγμάτων που μελετώνται παρακάτω. Στόχος του κεφαλαίου αυτού είναι η μελέτη της επίδρασης του διαλύτη εκχύλισης και της μεθόδου εκχύλισης τόσο ως προς τη σύσταση των φαινολικών συστατικών όσο και ως προς την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων.

Τα εννέα διαφορετικά εκχυλίσματα, που παρασκευάστηκαν για το σκοπό αυτό, μελετήθηκαν ως προς τη σύστασή τους σε φαινολικά συστατικά με τη χρωματομετρική μέθοδο Folin-Ciocalteu και με τη χρήση της συνδυαστικής τεχνικής LC-ESI-MS<sup>n</sup>. Επιπλέον, μελετήθηκε η αντιοξειδωτική δράση όλων των εκχυλισμάτων καθώς και το περιεχόμενό τους σε ολικά φλαβονοειδή.

Το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα επιλέχθηκε, εξαιτίας της υψηλής περιεκτικότητας σε φλαβονοειδή, να μελετηθεί και με τη συνδυαστική τεχνική LC-SPE-NMR. Μέχρι σήμερα, δεν υπάρχει αναφορά στη βιβλιογραφία η οποία να συσχετίζει τις διαφορετικές συνθήκες εκχύλισης με το περιεχόμενο σε φαινολικά συστατικά στα φύλλα του φυτού *Ligustrum lucidum*.

## 4.2 Παραλαβή εκχυλισμάτων με διαφορετικές μεθόδους εκχύλισης

Η επίδραση του διαλύτη εκχύλισης στη σύσταση και την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων μελετήθηκε χρησιμοποιώντας φύλλα *Ligustrum lucidum* τα οποία συλλέχθηκαν το Μάιο του 2006 από την περιοχή της Κάριανης (βόρεια Ελλάδα). Η επιλογή του χρόνου και της περιοχής συλλογής προέκυψε από τα αποτελέσματα της συγκριτικής μελέτης των εκχυλισμάτων όπως αναφέρεται στο 3<sup>ο</sup> κεφαλαίο. Σύμφωνα με αυτά, τα εκχυλίσματα της Κάριανης κατά το μήνα Μάιο έχουν πλούσιο χρωματογραφικό προφίλ, υψηλές συγκεντρώσεις σε φαινολικά και φλαβονοειδή καθώς και ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με τα υπόλοιπα εκχυλίσματα. Χρησιμοποιήθηκαν μέθοδοι και διαλύτες εκχύλισης που συνήθως αναφέρονται στην βιβλιογραφία για την μελέτη φαινολικών ενώσεων σε φυτικά εκχυλίσματα. Οι εκχυλίσεις πραγματοποιήθηκαν σε λουτρό υπερήχων (Di Donna *et al.*, 2007; Kalia *et al.*, 2008), σε αναδευόμενο υδατόλουτρο (Nenadis *et al.*, 2007), σε συσκευή Soxhlet, με εμποτισμό για μία εβδομάδα ή ένα μήνα και με βρασμό (Paiva-Martins και Gordon, 2001; Shoemaker *et al.*, 2005; Kalia *et al.*, 2008). Ως διαλύτες χρησιμοποιήθηκαν μεθανόλη, αιθανόλη (Innocenti *et al.*, 2007), μίγμα μεθανόλης-νερού (4:1 v/v) (Bouaziz και Sayadi, 2005), απεσταγμένο νερό, οξικός αιθυλεστέρας και εξάνιο (Kosar *et al.*, 2008). Οι συνδυασμοί διαλυτών και μεθόδων εκχύλισης φαίνονται αναλυτικότερα στο Πειραματικό μέρος. Στον Πίνακα 4.1 δίνεται η % απόδοση της εκχύλισης σε στερεό εκχύλισμα.

**Πίνακας 4.1.** Απόδοση εκχύλισης φύλλων *Ligustrum lucidum* με χρήση διαφορετικών διαλυτών

| A/a | Μέθοδος Εκχύλισης                  | Ποσότητα<br>Εκχυλίσματος (g) | Απόδοση<br>Εκχύλισης ( % ) |
|-----|------------------------------------|------------------------------|----------------------------|
| 1   | L.K.M.MeOH/H <sub>2</sub> O u.s.b. | 1.75                         | 5.83                       |
| 2   | L.K.M.EtOH 24h                     | 1.75                         | 5.84                       |
| 3   | L.K.M.EtOH 1week                   | 1.99                         | 6.64                       |
| 4   | L.K.M.MeOH/H <sub>2</sub> O 24h    | 1.94                         | 6.45                       |
| 5   | L.K.M.MeOH/H <sub>2</sub> O 1month | 1.85                         | 6.15                       |
| 6   | L.K.M.MeOH soxhlet                 | 1.76                         | 4.39                       |
| 7   | L.K.M.EtOAc soxhlet                | 0.46                         | 1.13                       |
| 8   | L.K.M.Hex. soxhlet                 | 0.26                         | 0.66                       |
| 9   | L.K.M.Aq                           | 1.74                         | 5.81                       |
| 10  | L.K.M.MeOH 1week                   | 2.05                         | 6.83                       |

Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα του Πίνακα 4.1 η μεγαλύτερη απόδοση εκχύλισης αντιστοιχεί σε διαλύτη μεθανόλη και έπειτα σε αιθανόλη με μέθοδο

εκχύλισης αυτή του εμποτισμού. Παρατηρείται επίσης, ότι υψηλή τιμή απόδοσης εκχύλισης έχουν το υδατομεθανολικό με εμποτισμό για ένα μήνα και αυτό σε αναδευόμενο υδατόλουτρο για 24 ώρες. Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, οι παραπάνω διαλύτες αποτελούν τους πιο συχνά χρησιμοποιούμενους για παραλαβή φαινολικών συστατικών από φυτά.

#### 4.3 Επίδραση των συνθηκών εκχύλισης στη σύσταση των ολικών φαινολών, ολικών φλαβονοειδών και εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων

Ο προσδιορισμός των ολικών φαινολών και ολικών φλαβονοειδών των εκχυλισμάτων έγινε χρωματομετρικά και η συγκέντρωσή τους υπολογίστηκε από καμπύλη αναφοράς που κατασκευάστηκε με πρότυπο διάλυμα καφεϊκού οξέος και ρουτίνης αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mg καφεϊκού οξέος ή ρουτίνης/g στερεού εκχυλίσματος (Πίνακα 4.2). Στον ίδιο Πίνακα δίνεται η αντιοξειδωτική δράση ως  $SC_{50}$  που αντιστοιχεί στη συγκέντρωση του εκχυλίσματος σε  $\mu\text{g/ml}$  στην οποία παρατηρείται το 50% της δέσμευσης της ρίζας DPPH $^{\circ}$ .

**Πίνακας 4.2.** Επίδραση των συνθηκών εκχύλισης στην περιεκτικότητα των ολικών φαινολών, των ολικών φλαβονοειδών και την αντιοξειδωτική δράση εκχυλισμάτων φύλλων *Ligustrum lucidum*

| A/a | Εκχυλίσματα φύλλων <i>Ligustrum lucidum</i> / πρότυπη ένωση | Ολικές φαινόλες (mg καφεϊκού οξέος/g στερεού εκχυλίσματος) | Ολικά φλαβονοειδή (mg ρουτίνης/g στερεού εκχυλίσματος) | * $SC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ ) |
|-----|-------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|----------------------------------|
| 1   | L.K.M.MeOH/H <sub>2</sub> O u.s.b.                          | 56.9                                                       | 28.1                                                   | 541.3                            |
| 2   | L.K.M.EtOH 24 h                                             | 63.9                                                       | 25.5                                                   | 495.5                            |
| 3   | L.K.M.MeOH/H <sub>2</sub> O 24h                             | 51.2                                                       | 22.9                                                   | 225.8                            |
| 4   | L.K.M.MeOH 1 week                                           | 89.4                                                       | 52.3                                                   | 381.9                            |
| 5   | L.K.M.MeOH/H <sub>2</sub> O 1month                          | 65.6                                                       | 39.1                                                   | 176.2                            |
| 6   | L.K.M.MeOH soxhlet                                          | 35.8                                                       | 18.8                                                   | 445.3                            |
| 7   | L.K.M.EtOH 1week                                            | 44.4                                                       | 32.3                                                   | 432.5                            |
| 8   | L.K.M.EtOAc soxhlet                                         | 87.2                                                       | 54.8                                                   | 345.3                            |
| 9   | L.K.M.Aq                                                    | 68.9                                                       | 23.9                                                   | 317.6                            |

\* $SC_{50}$  είναι η συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού ( $\mu\text{g/ml}$ ) ή του εκχυλίσματος στην οποία παρατηρείται το 50% της δέσμευσης της ρίζας DPPH $^{\circ}$

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 4.2 προκύπτει ότι όσον αφορά τη σύσταση των εκχυλισμάτων, πλουσιότερο σε φαινολικές ενώσεις είναι το μεθανολικό εκχύλισμα μιας εβδομάδας (L.K.M.MeOH 1 week) και αυτό του οξικού αιθυλεστέρα (L.K.M.EtOAc soxhlet). Το μεθανολικό εκχύλισμα της soxhlet ήταν το φτωχότερο όλων και ακολουθεί αυτό της αιθανόλης μιας εβδομάδας. Το μεθανολικό εκχύλισμα της soxhlet παρουσίασε χαμηλές τιμές εξαιτίας του τρόπου εκχύλισης. Οι διαδοχικές εκχυλίσεις με διαλύτες αυξανόμενης πολικότητας είχαν ως αποτέλεσμα οι περισσότερες φαινολικές ενώσεις να εκχυλιστούν στο διαλύτη οξικό αιθυλεστέρα. Το υδατομεθανολικό των 24 ωρών (L.K.M.MeOH/H<sub>2</sub>O 24h) παρουσιάζει ανάλογες τιμές με αυτό του λουτρού υπερήχων (L.K.M.MeOH/H<sub>2</sub>O u.s.b.). Ανάλογη εργασία πραγματοποιήθηκε από τους Torcu *et al.*, 2007, οι οποίοι μελέτησαν την επίδραση του διαλύτη στο περιεχόμενο των ολικών φαινολών και φλαβονοειδών στον καρπό του φυτού *Pistacia terebinthus* (Anacardiaceae) και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το μεθανολικό εκχύλισμα έδωσε τα υψηλότερα αποτελέσματα.

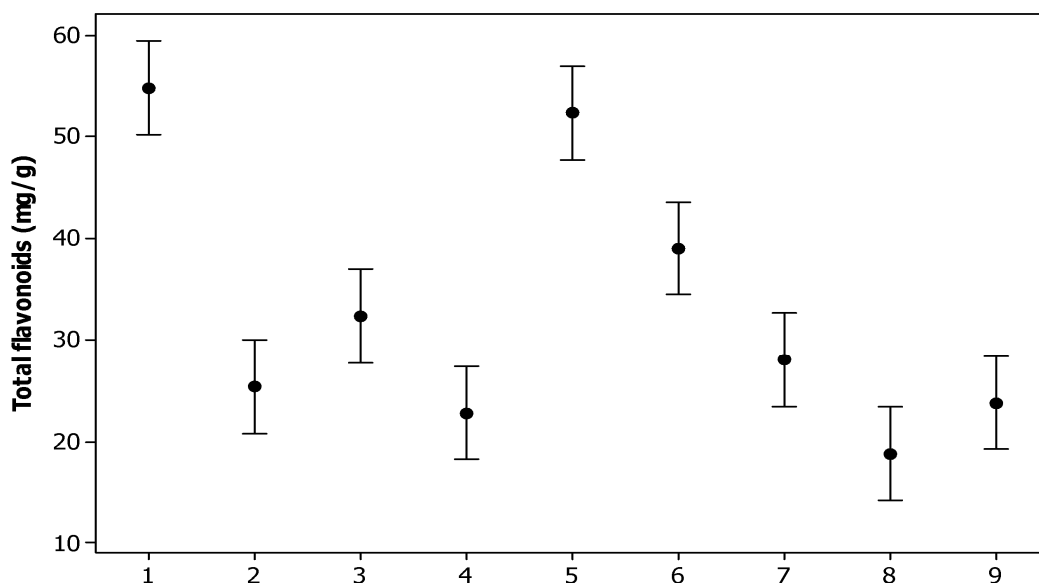
Το δείγμα που παρουσίασε το υψηλότερο ποσοστό σε ολικά φλαβονοειδή είναι αυτό του οξικού αιθυλεστέρα και έπειτα το μεθανολικό μιας εβδομάδας. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Πίνακα 4.2 το φτωχότερο όλων είναι το μεθανολικό της soxhlet (εξαιτίας των διαδοχικών εκχυλίσεων) και το υδατομεθανολικό του αναδευόμενου υδατόλουτρου. Σε πρόσφατη δημοσίευση των Kalia *et al.*, 2008, αναφέρεται ότι η μέθοδος εκχύλισης με soxhlet στο φυτό *Potentilla atrosanguinea* Lodd. (Rosaceae) που ευδοκίμει στα Ιμαλάια και πίνεται ως αφέψημα, έδωσε καλύτερα αποτελέσματα όσον αφορά το περιεχόμενο σε ολικές φαινόλες και ολικά φλαβονοειδή σε σχέση με άλλες μεθόδους εκχύλισης όπως το λουτρό υπερήχων και ο εμποτισμός.

Η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων βρέθηκε μεγαλύτερη για το υδατομεθανολικό του ενός μήνα με τη μέθοδο του εμποτισμού και μικρότερη για το υδατομεθανολικό που εκχυλίστηκε σε λουτρό υπερήχων. Το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα της soxhlet παρά την υψηλή περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά και ολικά φλαβονοειδή παρουσίασε χαμηλή αντιοξειδωτική δράση. Σε αντίθετα αποτελέσματα από αυτά κατέληξαν οι Kalia *et al.*, 2008, οι οποίοι παρατήρησαν ότι την πιο ισχυρή αντιοξειδωτική δράση έχει το εκχύλισμα της soxhlet σε σχέση με αυτά του εμποτισμού και του λουτρού υπερήχων. Είναι προφανές, ότι η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων εξαρτάται τόσο από το διαλύτη όσο και από τη μέθοδο

εκχύλισης. Οι Moure *et al.*, 2001 μελέτησαν την αντιοξειδωτική δράση εκχυλισμάτων των φυτών *Gevuina avellana* και *Rosa rubiginosa* σε διάφορους διαλύτες και παρατήρησαν ότι τα μεθανολικά εκχυλίσματα έδωσαν την καλύτερη αντιοξειδωτική δράση. Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 4.2 παρατηρείται ότι ο συσχετισμός μεταξύ αντιοξειδωτικής δράσης και ολικών φαινολών δεν είναι ο αναμενόμενος. Οι Kähkönen *et al.*, 1999, έδειξαν ότι δεν είναι απαραίτητο να συσχετίζεται η αντιοξειδωτική δράση με υψηλό ποσοστό ολικών φαινολών. Παρομοίως, υψηλό ποσοστό φλαβονοειδών δεν σημαίνει απαραίτητα υψηλή αντιοξειδωτική δράση. Θα πρέπει να τονιστεί ότι ο χρωματομετρικός προσδιορισμός των ολικών φλαβονοειδών με  $AlCl_3$  δεν αφορά όλα τα φλαβονοειδή. Συγκεκριμένα φλαβόνες και φλαβονόλες αντιδρούν με το  $Al(III)$ , ενώ φλαβανόνες και φλαβανόλες δεν αντιδρούν με τον ίδιο βαθμό (Chang *et al.*, 2002).

#### **4.4 Στατιστική μελέτη της επίδραση των συνθηκών εκχύλισης στη σύσταση των ολικών φαινολών, ολικών φλαβονοειδών και εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων**

Ο στατιστικός έλεγχος των μετρήσεων έγινε με την Ανάλυση Διακύμανσης Ενός Παράγοντα (One-way ANOVA), λόγω του ότι τα δείγματα ήταν από μία συγκεκριμένη περιοχή (Κάριανη) και συλλεγμένα την ίδια χρονική περίοδο (Μάιο). Στατιστικά, σημαντικές διαφορές για επίπεδο εμπιστοσύνης 95% υπάρχουν όταν η τιμή  $P$  είναι μικρότερη του 0.05. Στα εκχυλίσματά μας, όσον αφορά τις συγκεντρώσεις των φλαβονοειδών μεταξύ των δειγμάτων η τιμή  $P$  ήταν μικρότερη του 0.001 ( $P < 0.001$ ). Στο Σχήμα 4.1 παρουσιάζεται η ανάλυση ANOVA ενός παράγοντα, όπου εξετάζεται η επίδραση των διαφορετικών συνθηκών εκχύλισης στην περιεκτικότητα σε ολικά φλαβονοειδή



**Σχήμα 4.1.** Επίδραση των διαφορετικών συνθηκών εκχύλισης στην περιεκτικότητα σε ολικά φλαβονοειδή. Οι κάθετες ευθείες παριστούν τα όρια εμπιστοσύνης 95% των μέσων τιμών ολικών φλαβονοειδών (όπου 1-9 τα εκχυλίσματα που προέκυψαν με διαφορετικές συνθήκες εκχύλισης 1: EtOAc soxhlet, 2: EtOH 24h, 3: EtOH 1 week, 4: MeOH/H<sub>2</sub>O 24h, 5: MeOH 1 week, 6: MeOH/H<sub>2</sub>O 1 month, 7: MeOH/H<sub>2</sub>O usb, 8: MeOH soxhlet, 9: Aq)

Από το Σχήμα 4.1 συμπεραίνεται ότι τα εκχυλίσματα του EtOAc soxhlet και της MeOH 1 week παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη συγκέντρωση σε ολικά φλαβονοειδή, ενώ την μικρότερη αυτά του MeOH/H<sub>2</sub>O 24h, της MeOH soxhlet και του Aq. Πιο συγκεκριμένα, τα φύλλα που εκχυλίστηκαν με τον ίδιο διαλύτη EtOH αλλά με διαφορετική μέθοδο εκχύλισης (εμποτισμός για μία εβδομάδα και σε αναδευόμενο υδατόλουτρο για 24 ώρες) δεν παρουσίασαν διαφορές στη συγκέντρωση των ολικών φλαβονοειδών. Αντίθετα όμως, τα φύλλα που εκχυλίστηκαν με MeOH/H<sub>2</sub>O αλλά με διαφορετική μέθοδο εκχύλισης (εμποτισμός για ένα μήνα, αναδευόμενο υδατόλουτρο για 24 ώρες και λουτρό υπερήχων) παρουσίασαν διαφορές. Το υδατομεθανολικό εκχύλισμα ενός μήνα έδωσε την υψηλότερη τιμή σε ολικά φλαβονοειδή ενώ αυτά σε αναδευόμενο υδατόλουτρο και σε λουτρό υπερήχων παρουσίασαν μικρότερες αλλά παρόμοιες τιμές. Ως εκ τούτου το εκχύλισμα με κωδικό MeOH/H<sub>2</sub>O 1 month είναι το πλουσιότερο μεταξύ αυτών σε ολικά φλαβονοειδή. Στα εκχυλίσματα αυτά, η επίδραση της μεθόδου εκχύλισης στα ολικά φλαβονοειδή είναι εμφανής. Σημαντική επίσης διαφορά στο περιεχόμενο το

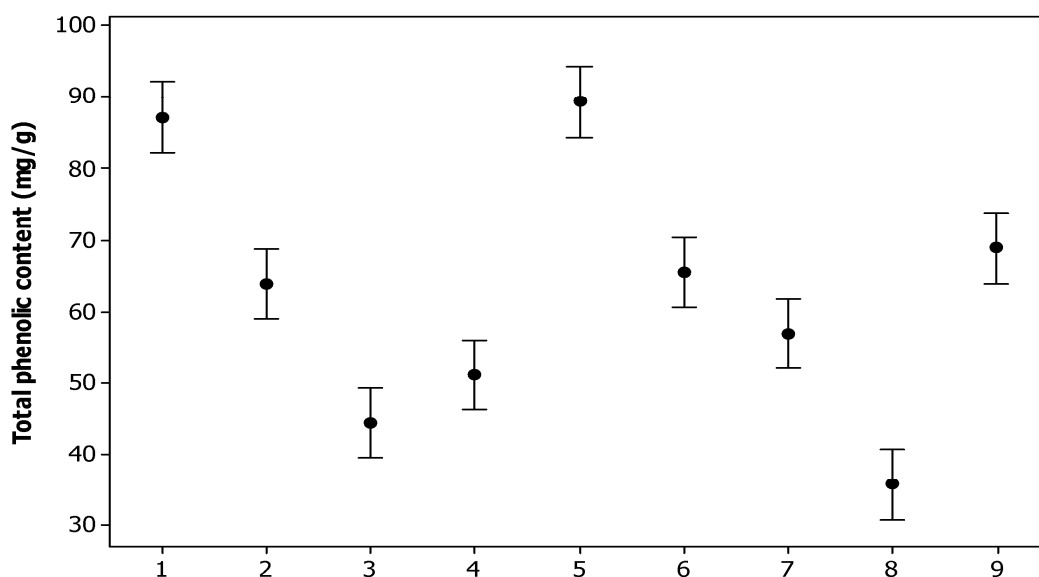
φλαβονοειδών παρουσίασαν τα μεθανολικά δείγματα που εκχυλίστηκαν με διαφορετικές μεθόδους (εμποτισμός για μία εβδομάδα και εκχύλιση με soxhlet). Περίπου τρεις φορές μεγαλύτερη ήταν η συγκέντρωση του εκχυλίσματος με κωδικό MeOH 1 week από αυτή του MeOH soxhlet, δηλώνοντας ξανά τη σημασία της μεθόδου εκχύλισης στη μεταβολή των τιμών σε ολικά φλαβονοειδή.

Όσον αφορά τα φύλλα που εκχυλίστηκαν με την ίδια μέθοδο εκχύλισης αλλά σε διαφορετικούς διαλύτες παρατηρήθηκαν διαφορετικές συμπεριφορές. Πιο συγκεκριμένα, στα φύλλα που πραγματοποιήθηκε εμποτισμός αυτών για μία εβδομάδα σε δύο διαφορετικούς διαλύτες παρατηρήθηκε ότι ο διαλύτης μεθανόλη έδωσε υψηλότερες τιμές σε ολικά φλαβονοειδή σε σχέση με το διαλύτη αιθανόλη. Αξιοσημείωτη είναι η διαφορά στα δείγματα που εκχυλίστηκαν με soxhlet. Το εκχύλισμα του EtOAc παρουσίασε πολύ μεγαλύτερη συγκέντρωση από αυτή του μεθανολικού (σχεδόν τρεις φορές μεγαλύτερη). Από τα αποτελέσματα αυτά συμπεραίνεται ότι ο διαλύτης εκχύλισης παίζει σημαντικό ρόλο στο περιεχόμενο των φλαβονοειδών. Σε αυτό το συμπέρασμα όμως δεν καταλήξαμε από τη σύγκριση δύο άλλων δειγμάτων που εκχυλίστηκαν με την ίδια μέθοδο (σε αναδευόμενο υδατόλουτρο για 24 ώρες) χρησιμοποιώντας διαφορετικούς διαλύτες (αιθανόλη και μίγμα μεθανόλης-νερού). Τα εκχυλίσματα αυτά έδωσαν παρόμοιες τιμές σε ολικά φλαβονοειδή δηλώνοντας ότι η εκχύλιση σε υδατόλουτρο με τους συγκεκριμένους διαλύτες δεν επηρεάζει τη συγκέντρωση των φλαβονοειδών.

Με βάση το Σχήμα 4.1 η συγκέντρωση των ολικών φλαβονοειδών των εκχυλισμάτων ακολουθεί τη σειρά:

**EtOAc soxhlet  $\approx$  MeOH 1 week > MeOH/H<sub>2</sub>O 1 month > EtOH 1week,  
MeOH/H<sub>2</sub>O usb  $\approx$  EtOH 24h  $\approx$  Aq.  $\approx$  MeOH/H<sub>2</sub>O 24h > MeOH soxhlet**

Στατιστική επίσης μελέτη, πραγματοποιήθηκε στα δείγματα όσον αφορά το περιεχόμενό τους σε ολικά φαινολικά. Παρατηρήθηκε, ότι τα εκχυλίσματα είχαν διαφορετικές συγκεντρώσεις φαινολικών μεταξύ των δειγμάτων ( $P < 0.001$ ). Στο Σχήμα 4.2 παρουσιάζεται η ανάλυση ANOVA ενός παράγοντα, όπου εξετάζεται η επίδραση των διαφορετικών συνθηκών εκχύλισης στην περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά.



**Σχήμα 4.2.** Επίδραση των διαφορετικών συνθηκών εκχύλισης στην περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά. Οι κάθετες ευθείες παριστούν τα όρια εμπιστοσύνης 95% των μέσων τιμών ολικών φαινολικών (όπου 1-9 τα εκχυλίσματα που προέκυψαν με διαφορετικές συνθήκες εκχύλισης 1: EtOAc soxhlet, 2: EtOH 24h, 3: EtOH 1 week, 4: MeOH/H<sub>2</sub>O 24h, 5: MeOH 1 week, 6: MeOH/H<sub>2</sub>O 1 month, 7: MeOH/H<sub>2</sub>O usb, 8: MeOH soxhlet, 9: Aq)

Σύμφωνα με το Σχήμα 4.2 τα εκχυλίσματα με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση σε φαινολικά είναι του EtOAc σε συσκευή soxhlet και της MeOH μιας εβδομάδας (1 week), ενώ αυτό που είχε τη μικρότερη ήταν το MeOH σε συσκευή soxhlet ακολουθώντας τη σειρά:

**MeOH 1 week  $\approx$  EtOAc soxhlet > MeOH/H<sub>2</sub>O 1 month  $\approx$  Aq.  $\approx$  EtOH 24h > MeOH/H<sub>2</sub>O usb  $\approx$  MeOH/H<sub>2</sub>O 24h > EtOH 1week > MeOH soxhlet**

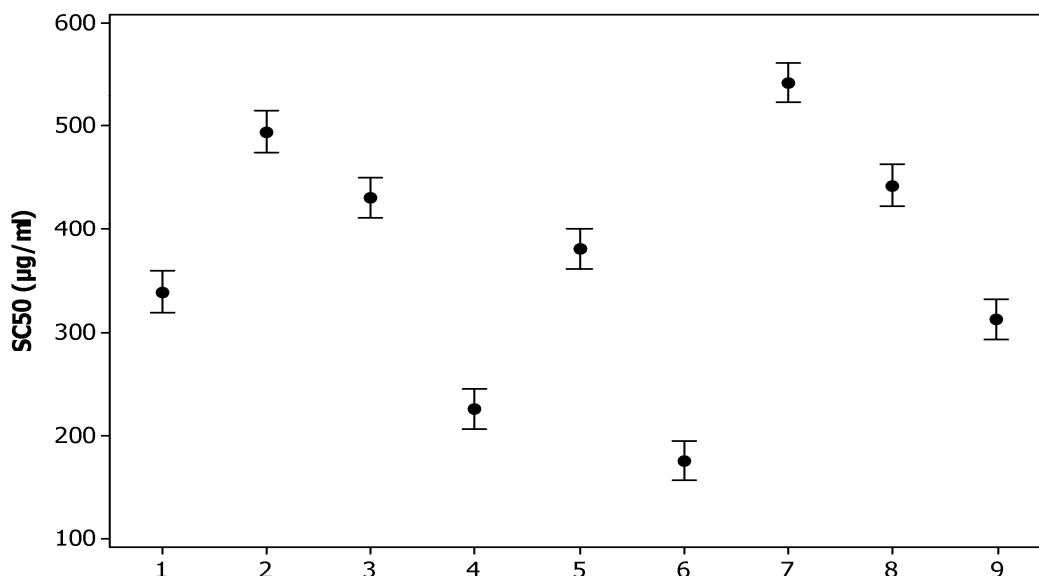
Από το παραπάνω σχήμα, συμπεραίνεται ότι δείγματα που εκχυλίστηκαν με τον ίδιο διαλύτη αλλά με διαφορετικές συνθήκες εκχύλισης παρουσίασαν σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωσή τους σε φαινολικά. Αναλυτικότερα, φύλλα που εκχυλίστηκαν με διαλύτη αιθανόλη είτε με εμποτισμό για μία εβδομάδα είτε σε αναδευόμενο υδατόλουτρο για 24 ώρες, παρουσίασαν διαφορετική συγκέντρωση σε ολικά φαινολικά, με αυτό της EtOH 24h να δίνει την υψηλότερη τιμή. Σημαντική επίσης διαφορά στη συγκέντρωση σε φαινολικά παρουσίασαν το μεθανολικό εκχύλισμα με εμποτισμό για μία εβδομάδα που έδωσε την υψηλότερη συγκέντρωση

όλων μαζί με αυτό του οξικού αιθυλεστέρα με soxhlet, ενώ το μεθανολικό της soxhlet (MeOH soxhlet) τη μικρότερη όλων. Όσον αφορά τα υδατομεθανολικά εκχυλίσματα αυτό που προέκυψε από τον εμποτισμό για ένα μήνα παρουσίασε υψηλότερη συγκέντρωση σε φαινολικά σε σχέση με αυτά του αναδεδυόμενου υδατόλουτρου για 24 ώρες και του λουτρού υπερήχων. Είναι εμφανές λοιπόν, ότι οι μεταβολές στις συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων σε φαινολικά εξαρτώνται κάθε φορά από τη μέθοδο εκχύλισης που πραγματοποιείται.

Από τα Σχήμα 4.2 συμπεραίνεται επίσης ότι τα δείγματα που εκχυλίστηκαν με την ίδια μέθοδο εκχύλισης αλλά σε διαφορετικούς διαλύτες παρουσίασαν διαφορές στις συγκεντρώσεις σε φαινολικά. Συγκρίνοντας το μεθανολικό εκχύλισμα με εμποτισμό για μία εβδομάδα (MeOH 1 week) με το αντίστοιχο αιθανολικό (EtOH 1 week) προκύπτει ότι η συγκέντρωση σε φαινολικά του μεθανολικού είναι πολύ μεγαλύτερη (περίπου η διπλάσια) από αυτή του αιθανολικού. Η μέθοδος του αναδεδυόμενου υδατόλουτρου για 24 ώρες έδωσε υψηλότερη συγκέντρωση σε φαινολικά για διαλύτη αιθανόλη (EtOH 24h) παρά για μίγμα μεθανόλης-νερού (MeOH/H<sub>2</sub>O 24h). Αξιοσημείωτη είναι η διαφορά στη συγκέντρωση των φαινολικών μεταξύ των εκχυλισμάτων της soxhlet. Το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα παρουσίασε πολύ υψηλότερη συγκέντρωση σε σχέση με το αντίστοιχο μεθανολικό. Από τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνεται ότι ο διαλύτης εκχύλισης παίζει σημαντικό ρόλο στο περιεχόμενο των φλαβονοειδών.

Όσον αφορά το περιεχόμενο σε ολικά φαινολικά και φλαβονοειδή παρατηρείται παρόμοια συμπεριφορά από τη στατιστική μελέτη. Πιο συγκεκριμένα, τα δείγματα που παρουσίασαν υψηλή συγκέντρωση σε φαινολικά ήταν τα ίδια που παρουσίασαν και υψηλή συγκέντρωση σε φλαβονοειδή. Ομοίως, το φτωχότερο σε φαινολικά ήταν και το φτωχότερο σε φλαβονοειδή.

Όσον αφορά την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης πραγματοποιήθηκε και σε αυτή την περίπτωση στατιστικός έλεγχος. Τα εκχυλίσματα είχαν διαφορετικές συγκεντρώσεις SC<sub>50</sub> μεταξύ των δειγμάτων ( $P < 0.001$ ). Στο Σχήμα 4.3 που ακολουθεί παρουσιάζεται η ανάλυση ANOVA ενός παράγοντα, όπου εξετάζεται η επίδραση των διαφορετικών συνθηκών εκχύλισης στην εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης.



**Σχήμα 4.3.** Επίδραση των διαφορετικών συνθηκών εκχύλισης στην εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης. Οι κάθετες ευθείες παριστούν τα όρια εμπιστοσύνης 95% των μέσων τιμών του SC<sub>50</sub> (όπου 1-9 τα εκχυλίσματα που προέκυψαν με διαφορετικές συνθήκες εκχύλισης 1: EtOAc soxhlet, 2: EtOH 24h, 3: EtOH 1 week, 4: MeOH/H<sub>2</sub>O 24h, 5: MeOH 1 week, 6: MeOH/H<sub>2</sub>O 1 month, 7: MeOH/H<sub>2</sub>O usb, 8: MeOH soxhlet, 9: Aq)

Από το Σχήμα 4.3 προκύπτει ότι όσον αφορά την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων που εκφράζεται με την τιμή της παραμέτρου SC<sub>50</sub>, το δείγμα με την ισχυρότερη δράση ήταν το υδατομεθανολικό του ενός μήνα (MeOH/H<sub>2</sub>O 1 month), ενώ αυτό με την ασθενέστερη το MeOH/H<sub>2</sub>O usb και το EtOH 24h. ακολουθώντας την εξής σειρά:

**MeOH/H<sub>2</sub>O 1 month > MeOH/H<sub>2</sub>O 24h > EtOAc soxhlet ≈ Aq. > MeOH 1 week  
> EtOH 1week ≈ MeOH soxhlet > EtOH 24h ≈ MeOH/H<sub>2</sub>O usb**

Συγκρίνοντας την αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος με κωδικό EtOH 24h με αυτή του EtOH 1 week συμπεραίνουμε ότι η μέθοδος εκχύλισης επηρεάζει την τιμή της παραμέτρου SC<sub>50</sub>, όπου το εκχύλισμα με εμποτισμό μιας εβδομάδας δίνει καλύτερη αντιοξειδωτική δράση. Ομοίως, και το μεθανολικό εκχύλισμα μιας εβδομάδας με εμποτισμό (MeOH 1 week) δίνει καλύτερη αντιοξειδωτική δράση από αυτό της soxhlet (MeOH soxhlet). Στα υδατομεθανολικά εκχυλίσματα παρατηρείται ότι αυτό με εμποτισμό ενός μήνα (MeOH/H<sub>2</sub>O 1 month) έδωσε τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση ακολουθούμενο από αυτό του αναδευόμενου υδατόλουτρου

για 24 ώρες (MeOH/H<sub>2</sub>O 24h) και τέλος αυτό του λουτρού υπερήχων που παρουσίασε τη μικρότερη αντιοξειδωτική δράση όλων των εκχυλισμάτων. Από τη σύγκριση των παραπάνω εκχυλισμάτων είναι εμφανές ότι η μέθοδος εκχύλισης επηρεάζει την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης.

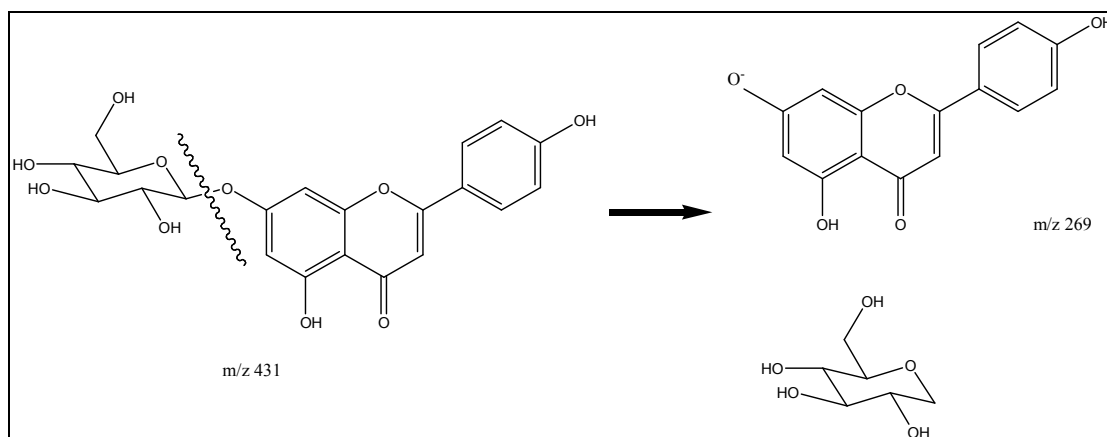
Όπως προκύπτει από το Σχήμα 4.3 η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων επηρεάζεται και από τον διαλύτη εκχύλισης. Συγκεκριμένα τα εκχυλίσματα που προέκυψαν από εμποτισμό για μία εβδομάδα παρουσίασαν καλύτερη δράση όταν χρησιμοποιήθηκε διαλύτης μεθανόλη (MeOH 1 week) αντί αιθανόλη (EtOH 1 week). Η σύγκριση των δύο δειγμάτων που προήλθαν από εκχύλιση σε αναδευόμενο υδατόλουτρο για 24 ώρες έδειξε ότι το υδατομεθανολικό εκχύλισμα (MeOH/H<sub>2</sub>O 24h) είχε μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση από το αντίστοιχο αιθανολικό (EtOH 24h). Τέλος, τα εκχυλίσματα που προέκυψαν με τη μέθοδο της soxhlet παρουσίασαν μεγαλύτερη δράση με διαλύτη εκχύλισης οξικό αιθυλεστέρα (EtOAc soxhlet) αντί μεθανόλης (MeOH soxhlet).

Γενικά, από την στατιστική μελέτη των εκχυλισμάτων συμπεραίνεται ότι η μέθοδος εκχύλισης που έδωσε τα πιο πλούσια εκχυλίσματα ήταν αυτή της soxhlet και του εμποτισμού και οι πλέον καταλληλότεροι διαλύτες είναι μεθανόλη, μίγμα μεθανόλης-νερού και οξικός αιθυλεστέρας.

#### 4.5 Μελέτη της σύστασης των εκχυλισμάτων με τη χρήση της συζευγμένης τεχνικής LC-ESI-MS<sup>n</sup>

Η μέθοδος HPLC που χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό των φαινολικών συστατικών των υπό μελέτη εκχυλισμάτων στηρίχθηκε στο σύστημα ανάλυσης βαθμωτής έκλουσης των φαινολικών συστατικών με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (RP-HPLC) των Benavente-Garcia *et al.*, 2000, με ανιχνευτή συστοιχίας διόδων λυχνιών, όπου ρυθμίστηκε για την καταγραφή του χρωματογραφικού προφίλ σε μήκος κύματος 254, 280 και 340nm για ανίχνευση σεκοιριδοειδών, φαινολικών οξέων και φλαβονοειδών. Επίσης χρησιμοποιήθηκε και το σύστημα σύζευξης υγρής χρωματογραφίας (LC) με ανιχνευτή φασματοφωτομετρίας μαζών ιονισμού ηλεκτροψεκασμού (ESI/MS). Οι περισσότερες μελέτες στην βιβλιογραφία, για τη σύσταση του φυτού *Ligustrum lucidum*, αναφέρουν αναλύσεις συγκεκριμένων ομάδων ενώσεων ή κλασμάτων των εκχυλισμάτων (Shi *et al.*, 1998; He *et al.*, 2001a; He *et al.*, 2001b; Liu *et al.*, 2003) και πολύ σπάνια αναλύσεις σε ακατέργαστο εκχύλισμα με μόνη προεργασία του δείγματος τον καθαρισμό με φυγοκέντρηση και ακολούθως με διήθηση.

Η τεχνική LC-ESI-MS έχει εφαρμοστεί επιτυχώς για τον προσδιορισμό συστατικών σε φυτικά εκχυλίσματα όπως φλαβονοειδή και πολυφαινόλες. Όσον αφορά το πρώτης τάξεως φάσμα μάζας, αυτό δίνει περιορισμένες πληροφορίες για τη δομή του μορίου, εκτός από αυτή της μοριακής μάζας. Για το λόγο αυτό, για την ταυτοποίηση των περισσότερων ενώσεων είναι απαραίτητη η περαιτέρω θραυσματοποίηση του κύριου μοριακού ιόντος. Τις περισσότερες φορές το μονοπάτι της θραυσματοποίησης οδηγεί στην ακριβή δομή του μορίου. Παράδειγμα αυτού, παρουσιάζεται στο Σχήμα 4.4 όπου η σχάση του γλυκοζιτικού δεσμού από το κύριο μοριακό ιόν συνεπάγεται τη δημιουργία του ιόντος του άγλυκου μέρους.



**Σχήμα 4.4.** Σχάση του γλυκοζιτικού δεσμού γλυκοζυλιωμένου παραγώγου της απιγενίνης κατά την θραυσματοποίηση  $MS^2$  του μοριακού ιόντος (7-*O*-γλυκοζίτης της απιγενίνης).

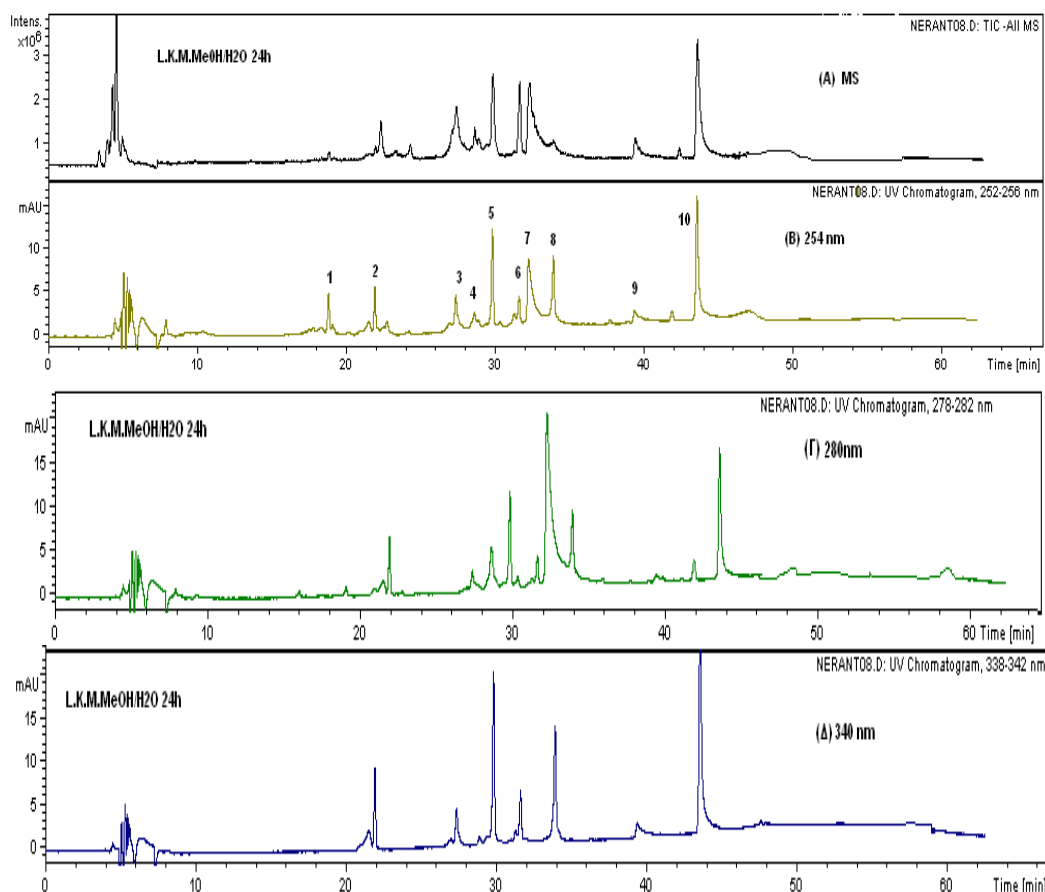
Στη συνέχεια αναλύονται τα εννέα διαφορετικά εκχυλίσματα που προέκυψαν σύμφωνα με τις διαφορετικές συνθήκες εκχύλισης, με την τεχνική του ηλεκτροψεκασμού της φασματομετρίας μαζών.

#### 4.5.1 Συγκριτική μελέτη των υδατομεθανολικών εκχυλισμάτων

**L.K.M.MeOH/H<sub>2</sub>O 24h-L.K.M.MeOH/H<sub>2</sub>O u.s.b -**

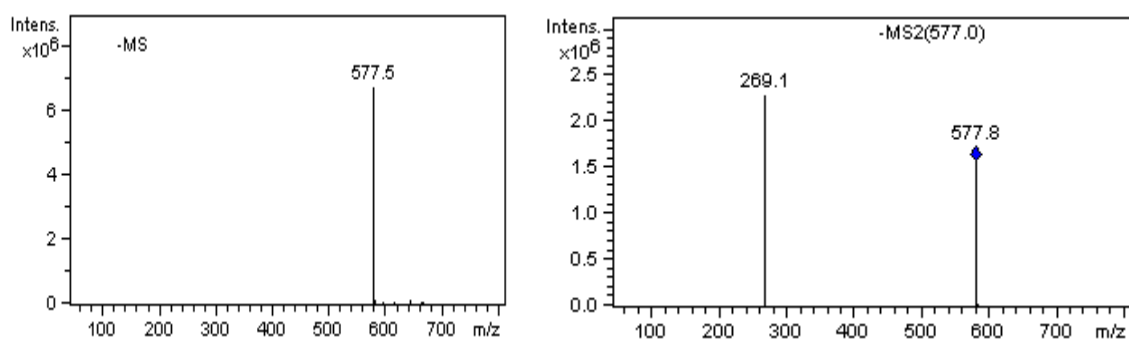
**L.K.M.MeOH/H<sub>2</sub>O 1 month**

Στο Σχήμα 4.5 παρουσιάζεται το χρωματογραφικό προφίλ του εκχυλίσματος **L.K.M.MeOH/H<sub>2</sub>O 24h** στα τρία μήκη κύματος 254, 280 και 340 nm καθώς και εκείνο από τον φασματογράφο μάζας.



**Σχήμα 4.5.** (Α) Χρωματογράφημα μάζας, (Β) Χρωματογραφικό προφίλ στα 254 nm, (Γ) 280 nm και (Δ) 340 nm του φυτικού εκχυλίσματος **L.K.M.MeOH/H<sub>2</sub>O 24h**

Η απιγενίνη και ο 7-Ο-ρουτινοζίτης της απιγενίνης (ισοροϊφολίνη) ταυτοποιήθηκαν ως τα κυριότερα συστατικά του εκχυλίσματος. Το φάσμα μάζας της ισοροϊφολίνης και το κυριότερο θραύσμα της στο φάσμα μάζας MS<sup>2</sup> παρουσιάζονται στο Σχήμα 4.6.



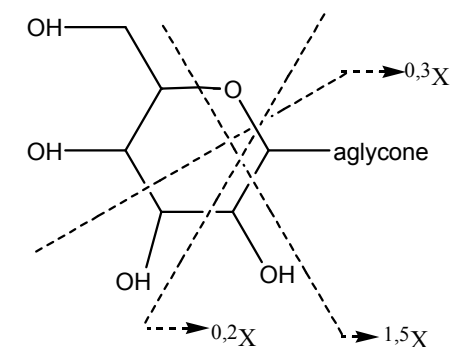
**Σχήμα 4.6:** Φάσματα μαζών MS και MS<sup>2</sup> της ισοροϊφολίνης

Με βάση τα φάσματα MS και MS<sup>2</sup> τα κυριότερα φαινολικά συστατικά που ταυτοποιήθηκαν στο εκχύλισμα είναι οι ενώσεις: ολεοζίτης, 6,8-δι-*C*-γλυκοζίτης της

απιγενίνης, 7-*O*-ρουτινοζίτης της λουτεολίνης, 7-*O*-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, 7-*O*-ρουτινοζίτης της απιγενίνης, 7-*O*-γλυκοζίτης της απιγενίνης, 7-*O*-γλουκουρονίτης της απιγενίνης, λουτεολίνη και η απιγενίνη.

Η **κορυφή 1** εμφανίζει φάσμα UV με μέγιστα στα 225 και 280 nm και η κορυφή του μοριακού ιόντος  $[M-H]^-$  έχει τιμή 389 m/z στο φάσμα μαζών. Στο δευτερογενές φάσμα μάζας  $MS^2$  του μοριακού ιόντος παρατηρούνται δύο θραύσματα στα  $[M-H-44]^-$  345 m/z και  $[M-H-180]^-$  209 m/z αντίστοιχα. Το θραύσμα στα 345 δικαιολογείται από την απώλεια ενός μορίου  $CO_2$  της καρβοξυλικής ομάδας και αυτό στα 209 από την απώλεια μιας εξόξης. Έτσι, η κορυφή 1 με βάση το φάσμα μαζών και βιβλιογραφικά δεδομένα (Cardoso *et al.*, 2005) ταυτοποιήθηκε ποιοτικά ως ο ολεοζίτης (oleoside).

Η **κορυφή 2** εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση στα 270 και 340 nm στο φάσμα UV και η τιμή του κύριου μοριακού ιόντος  $[M-H]^-$  είναι 593 m/z. Το δευτερογενές φάσμα μάζας  $MS^2$  εμφάνισε κορυφές στα  $[M-H-18]^-$  575 m/z,  $[M-H-90]^-$  503 m/z,  $[M-H-120]^-$  473 m/z,  $[M-H-210]^-$  383 m/z και  $[M-H-240]^-$  353 m/z χαρακτηριστικά ιόντα των δι-*C*-εξόξη φλαβόνων (Cuyckens και Claeys, 2004). Επειδή στο φάσμα  $MS^2$  δεν παρατηρήθηκε το μοριακό ιόν  $[M-H-60]^-$  στα 533 m/z, συμπεραίνουν ότι το τμήμα του ζαχάρου που είναι συνδεδεμένο στις θέσεις 6 και 8 είναι εξόξη και όχι πεντόξη προτείνοντας τη παρουσία της απιγενίνης (απιγενίνη (270) + γλυκόζη (162) + γλυκόζη (162), συνολικό μοριακό βάρος M.B.= 594) (Bakhtiar *et al.*, 1994; Cuyckens και Claeys, 2004). Με βάση το μονοπάτι θραυσματοποίησης του κύριου μοριακού ιόντος, η ένωση 2 χαρακτηρίστηκε ως η απιγενίνη-6,8-δι-*C*-γλυκοζίτης (arigenin-6,8-di-*C*-glucoside). Γενικά, στους *C*-γλυκοζίτες των φλαβονοειδών το σάκχαρο συνδέεται απευθείας με τον άνθρακα του φλαβονοειδούς. Τα κύρια μονοπάτια θραυσματοποίησης αφορούν διασταυρούμενες διασπάσεις στο δακτύλιο του σακχάρου όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.7 (Cuyckens και Claeys, 2004) και απώλεια μορίων νερού μεταξύ του 2'-υδροξυλίου του σακχάρου στις θέσεις σύνδεσης C6 και/ή C8 με το υδροξύλιο στη θέση 5 και/ή 7 του άγλυκου τμήματος, Σχήμα 4.8. Σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, η ένωση αυτή έχει ταυτοποιηθεί σε άλλα είδη φυτών (Engelhardt *et al.*, 1993; Gil-Izquierdo *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2007) αλλά για πρώτη φορά αναφέρεται ως ένα από τα συστατικά του είδους *Ligustrum*, και ιδιαίτερα των φύλλων του *Ligustrum lucidum*.

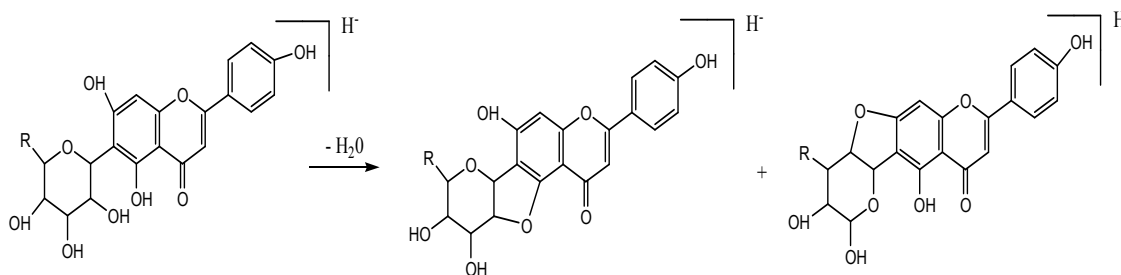


$$0,2X : [M - H - 120]$$

$$0,3X : [M - H - 90]$$

$$1,5X : [M - H - 134]$$

**Σχήμα 4.7.** Χαρακτηριστικά παραγόμενα ιόντα σχηματιζόμενα από διασταυρούμενες διασπάσεις του δακτυλίου της εξόξης



**Σχήμα 4.8.** Απώλεια μορίων νερού για τα 6 C-γλυκοζυλιωμένα φλαβονοειδή μεταξύ του 2''-υδροξυλίου του σακχάρου στις θέσεις σύνδεσης C6 και/ή C8 με το υδροξύλιο στη θέση 5 και/ή 7 του άγλυκου τμήματος

Το φάσμα μάζας της **κορυφής 3**, με μέγιστη απορρόφηση στα 252, 267 και 350 nm στο φάσμα UV, παρουσιάζει κύριο θραύσμα στα  $[M-H]^-$  593 m/z. Στο δευτερογενές φάσμα μάζας  $MS^2$  του μοριακού ιόντος παρατηρείται ένα κύριο θραύσμα  $[M-H-308]^-$  ( $[M-H-ραμνόζη-γλυκόζη]^-$ ) στα 285 m/z, υποδεικνύοντας την παρουσία ενός μορίου ραμνόζης και γλυκόζης. Επιπρόσθετα, η απουσία ενδιάμεσου ιόντος στο φάσμα μάζας  $MS^2$  δηλώνει έναν 1→6 διαγλυκοζιτικό δεσμό (Cuyckens *et al.*, 2001). Επομένως, η κορυφή 3 χαρακτηρίστηκε ως ο 7-O-ρουτινοζίτης της λουτεολίνης (luteolin-7-O-rutinoside) η οποία δεν έχει αναφερθεί ως συστατικό των φύλλων *Ligustrum lucidum* στη διεθνή βιβλιογραφία.

Η **κορυφή 4**, εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση στα 265 και 351 nm στο φάσμα UV με ένα κύριο ιόν στα  $[M-H]^-$  447 m/z στο φάσμα μάζας. Στο φάσμα  $MS^2$

παρατηρείται ένα ιόν  $[M-H-162]^-$  στα 285 m/z το οποίο δηλώνει την ύπαρξη ενός γλυκοζιτικού μορίου. Συγκρίνοντας τον χρόνο κατακράτησης και το φάσμα μάζας της κορυφής 4 με αυτόν της πρότυπης του 7-*O*-γλυκοζίτη της λουτεολίνης διαπιστώνεται ότι αυτά συμπίπτουν. Συνεπώς η κορυφή 4 είναι ο 7-*O*-γλυκοζίτης της λουτεολίνης (luteolin-7-*O*-glucoside), η οποία έχει βρεθεί ότι περιέχεται στον καρπό του φυτού (Xu *et al.*, 2007) αλλά όχι στα φύλλα.

Το φάσμα μάζας της **κορυφής 5**, με μέγιστη απορρόφηση στα 266 και 340 nm στο φάσμα UV, παρουσιάζει κύριο θραύσμα στα  $[M-H]^-$  577 m/z. Στο δευτερογενές φάσμα μάζας MS<sup>2</sup> του μοριακού ιόντος παρατηρείται ένα κύριο θραύσμα  $[M-H-308]^-$  ( $[M-H-ραμνόζη-γλυκόζη]^-$ ) στα 269 m/z, υποδεικνύοντας, όπως και στην κορυφή 3, την παρουσία ενός μορίου ραμνόζης και γλυκόζης, όπου η απουσία ενδιάμεσου ιόντος στο φάσμα μάζας MS<sup>2</sup> δηλώνει έναν 1→6 διαγλυκοζιτικό δεσμό (Cuyckens *et al.*, 2001). Έτσι, η κορυφή 5 χαρακτηρίστηκε ως ο 7-*O*-ρουτινοζίτης της απιγενίνης (apigenin-7-*O*-rutinoside) και αυτό επιβεβαιώθηκε με σύγκριση με την πρότυπη ένωση. Η ένωση αυτή έχει αναφερθεί ότι υπάρχει στον καρπό του φυτού αυτού από τους Xu *et al.*, 2007 αλλά όχι στα φύλλα του φυτού.

Η **κορυφή 6** παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στα 265 και 339 nm στο φάσμα UV με κύριο θραύσμα στο φάσμα μάζας στα  $[M-H]^-$  431 m/z. Στο φάσμα μάζας MS<sup>2</sup> παρατηρούμε ένα κύριο ιόν  $[M-H-162]^-$  στα 269 m/z δηλώνοντας την ύπαρξη ενός γλυκοζιτικού μορίου. Η κορυφή 6 χαρακτηρίστηκε ως ο 7-*O*-γλυκοζίτης της απιγενίνης (apigenin-7-*O*-glucoside) και αυτό επιβεβαιώθηκε με σύγκριση ως προς την πρότυπη ένωση. Η ένωση αυτή είναι γνωστό ότι περιέχεται στον καρπό του φυτού (Xu *et al.*, 2007) αλλά δεν έχει αναφερθεί στα φύλλα.

Το φάσμα μάζας της **κορυφής 7**, με μέγιστη απορρόφηση στα 275 και 345 nm στο φάσμα UV, παρουσιάζει κύριο θραύσμα  $[M-H]^-$  στα 321 m/z. Στο δευτερογενές φάσμα μάζας MS<sup>2</sup> του μοριακού ιόντος παρατηρείται ένα κύριο θραύσμα  $[M-H-148]^-$  στα 173 m/z. Οι πληροφορίες αυτές δεν είναι αρκετές για την πλήρη ταυτοποίηση της ένωσης (η ένωση αυτή θα μελετηθεί με τη συζευγμένη τεχνική LC-SPE-NMR όπως αναλύεται παρακάτω).

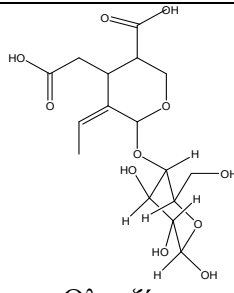
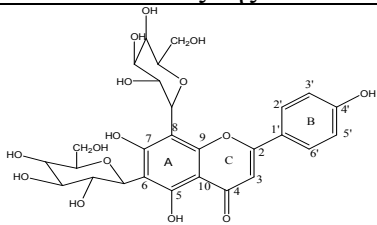
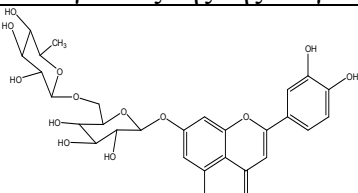
Η **κορυφή 8** παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στα 262 και 338 nm στο φάσμα UV με κύριο θραύσμα στο φάσμα μάζας  $[M-H]^-$  στα 445 m/z. Στο φάσμα μάζας MS<sup>2</sup> παρατηρείται ένα κύριο ιόν  $[M-H-176]^-$  στα 269 m/z δηλώνοντας πιθανώς

την ύπαρξη ενός μορίου γλυκοζιτικού οξέος (apigenin-7-O-glucuronide). Έτσι, η κορυφή 8 χαρακτηρίστηκε πιθανά ως 7-O-γλυκοζιτικό οξύ της απιγενίνης.

Οι κορυφές 9 και 10 με μέγιστη απορρόφηση στα 252, 268, 348 και 265, 341 nm στο φάσμα UV αντίστοιχα, έδωσαν κύρια θραύσματα στο φάσμα μάζας  $[M-H]^-$  στα 285 m/z και  $[M-H]^-$  269 m/z. Συγκρίνοντας τον χρόνο κατακράτησης και το φάσμα μάζας των κορυφών με δεδομένα των προτύπων της απιγενίνης και της λουτεολίνης καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η κορυφή 9 είναι η λουτεολίνη (luteolin) και η κορυφή 10 η απιγενίνη (apigenin). Οι ενώσεις αυτές έχουν αναφερθεί στον καρπό του φυτού (Xu *et al.*, 2007) αλλά όχι στα φύλλα.

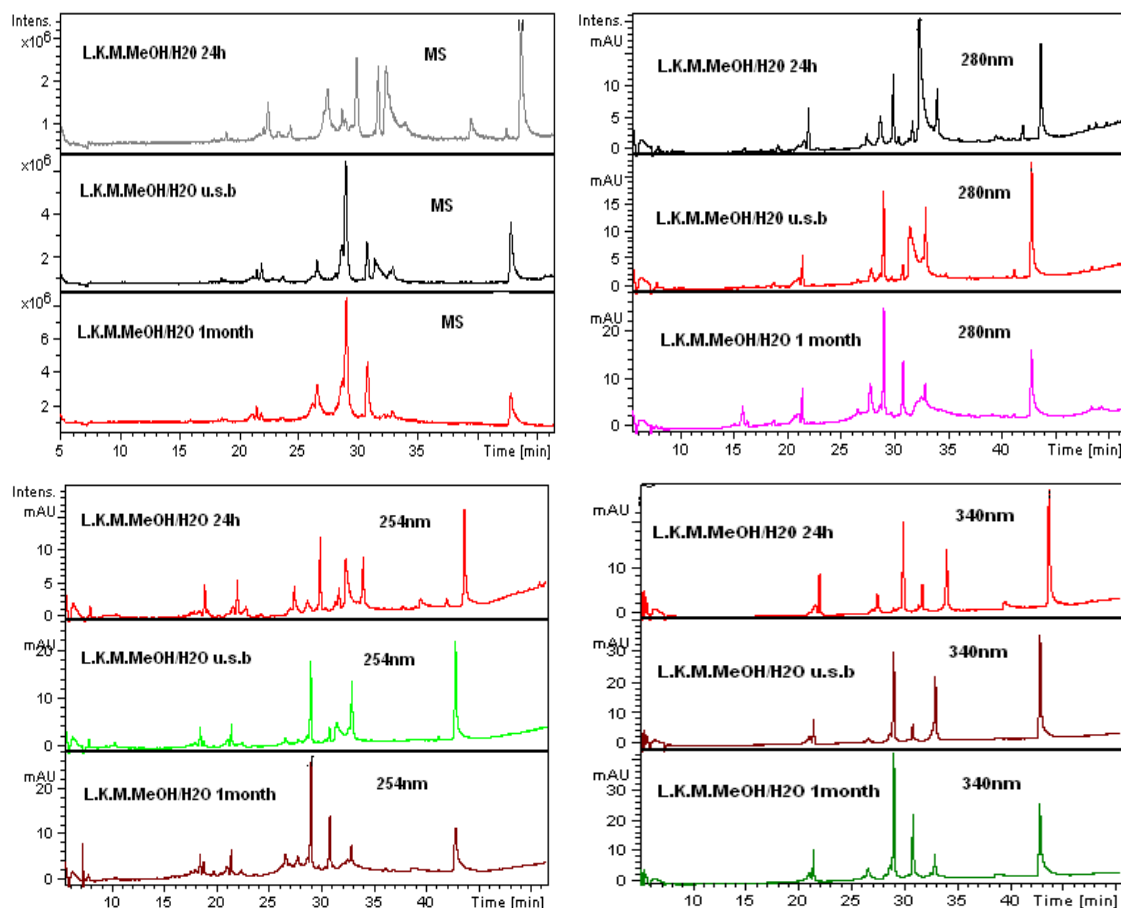
Στον Πίνακα 4.3 παρουσιάζονται συνοπτικά τα χρωματογραφικά και φασματοσκοπικά δεδομένα των κυριότερων συστατικών του εκχυλίσματος φύλλων **L.K.M.MeOH/H<sub>2</sub>O 24h** μετά την ανάλυση του δείγματος με LC-ESI-MS<sup>n</sup>.

**Πίνακας 4.3.** Χρωματογραφικά και φασματοσκοπικά δεδομένα του εκχυλίσματος φύλλων **L.K.M.MeOH/H<sub>2</sub>O 24h** με LC-ESI-MS.

| <b>L.K.M.MeOH/H<sub>2</sub>O 24h</b> |                                                |                              |                         |                                                                                                                            |
|--------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------|-------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>N<sup>o</sup></b>                 | <b>Χρόνος κατακράτησης t<sub>R</sub> (min)</b> | <b>ESI(-)</b>                |                         | <b>Ένωση</b>                                                                                                               |
|                                      |                                                | <b>[M-H]<sup>-</sup> m/z</b> | <b>MS/MS</b>            |                                                                                                                            |
| 1                                    | 18.8                                           | 389                          | 345, 209                | <br>Ολεοζίτης                         |
| 2                                    | 21.9                                           | 593                          | 575, 503, 473, 383, 353 | <br>6,8-δι-C-γλυκοζίτης της απιγενίνης |
| 3                                    | 27.4                                           | 593                          | 285                     |                                        |

|    |      |     |     |                                         |
|----|------|-----|-----|-----------------------------------------|
|    |      |     |     | 7-O-ρουτινοζίτης της λουτεολίνης        |
| 4  | 28.9 | 447 | 285 | <p>7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης</p>   |
| 5  | 29.8 | 577 | 269 | <p>7-O-ρουτινοζίτης της απιγενίνης</p>  |
| 6  | 31.6 | 431 | 269 | <p>7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης</p>    |
| 7  | 32.3 | 321 | 173 | -                                       |
| 8  | 33.8 | 445 | 269 | <p>7-O-γλυκουρονίτης της απιγενίνης</p> |
| 9  | 39.4 | 285 |     | <p>Λουτεολίνη</p>                       |
| 10 | 43.5 | 269 |     | <p>Απιγενίνη</p>                        |

Στο Σχήμα 4.9 παρουσιάζεται το χρωματογραφικό προφίλ των υδατομεθανολικών εκχυλισμάτων **L.K.M.MeOH/H<sub>2</sub>O 24h**, **L.K.M.MeOH/H<sub>2</sub>O u.s.b.** και **L.K.M.MeOH/H<sub>2</sub>O 1 month** στα τρία μήκη κύματος 254, 280 και 340 nm καθώς και εκείνο του φασματογράφου μάζας.



**Σχήμα 4.9.** Χρωματογράφημα μάζας και χρωματογραφικό προφίλ στα 254 nm, 280 nm και 340 nm των υδατομεθανολικών εκχυλισμάτων **L.K.M.MeOH/H<sub>2</sub>O 24h**, **L.K.M.MeOH/H<sub>2</sub>O u.s.b.** και **L.K.M.MeOH/H<sub>2</sub>O 1 month**

Η απιγενίνη και ο 7-Ο-ρουτινοζίτης της απιγενίνης (ισοροϊφολίνη) ταυτοποιήθηκαν ως τα κυριότερα συστατικά των υδατομεθανολικών εκχυλισμάτων. Με βάση τα φάσματα MS και MS<sup>2</sup> τα κυριότερα φαινολικά συστατικά των εκχυλισμάτων είναι τα ακόλουθα: ολεοζίτης, υδροξυτυροσόλη, 6,8-δι-*C*-γλυκοζίτης της απιγενίνης, 7-Ο-ρουτινοζίτης της λουτεολίνης, 7-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, 7-Ο-ρουτινοζίτης της απιγενίνης, γλυκοζίτης της ελευρωπαΐνης, 7-Ο-γλυκοζίτης της απιγενίνης, 7-Ο-γλυκοζιτικό οξύ της απιγενίνης, λουτεολίνη και η απιγενίνη.

Στον Πίνακα 4.4 παρουσιάζονται συνοπτικά τα κυριότερα συστατικά των υδατομεθανολικών εκχυλισμάτων μετά την ανάλυση των δειγμάτων με LC-ESI-MS<sup>n</sup>.

**Πίνακας 4.4.** Μοριακά ιόντα των υδατομεθανολικών εκχυλισμάτων και η ταυτοποίησή τους στην αντίστοιχη ένωση

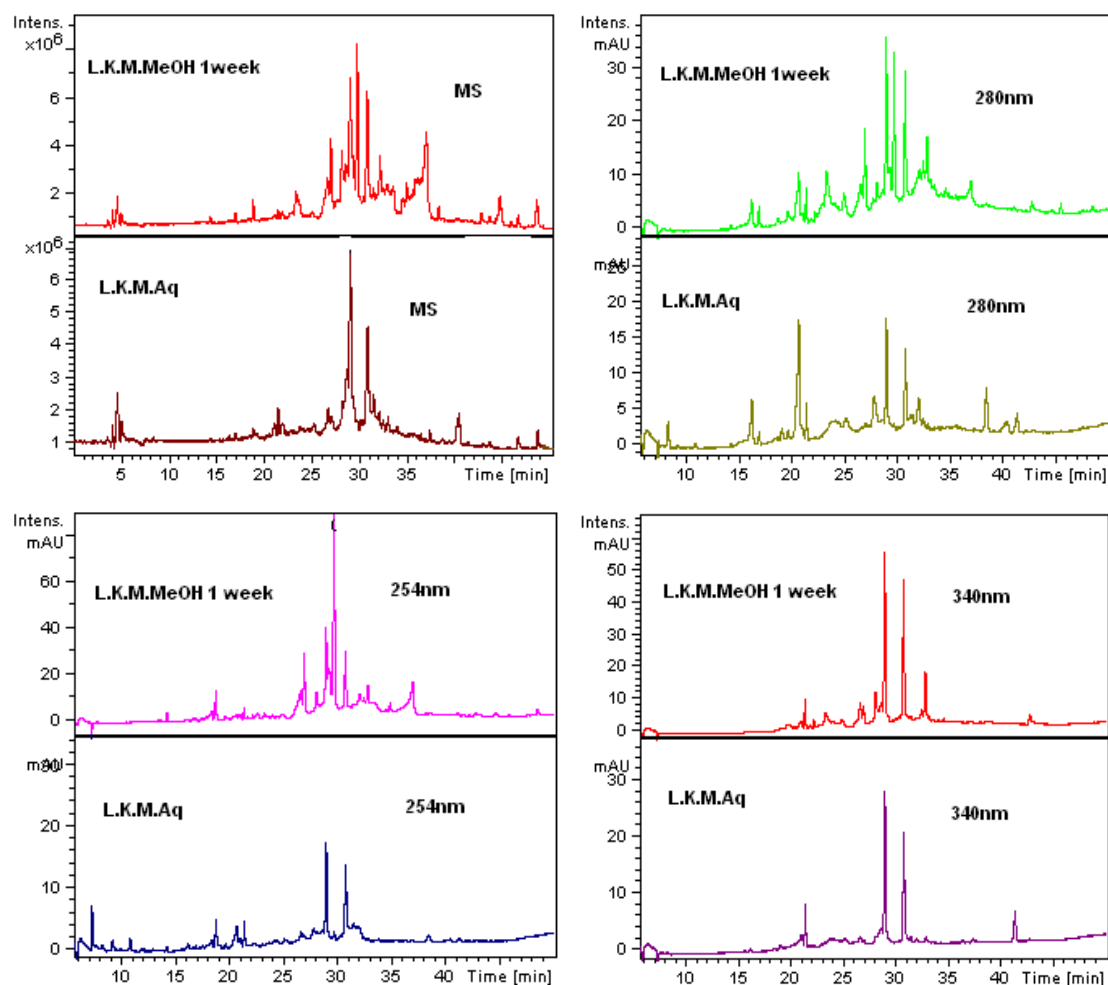
| Ένωση                                         | MS (MS <sup>2</sup> )            | L.K.M.MeOH/H <sub>2</sub> O<br>24h | L.K.M.MeOH/H <sub>2</sub> O<br>u.s.b | L.K.M.MeOH/H <sub>2</sub> O<br>1 month |
|-----------------------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------------|
| Υδροξυτυροσόλη                                | 153                              | -                                  | -                                    | √                                      |
| <b>Ολεοζίτης</b>                              | 389 (345, 209)                   | √                                  | √                                    | √                                      |
| <b>6,8-δι-C-γλυκοζίτης της<br/>απιγενίνης</b> | 593 (575, 503, 473,<br>383, 353) | √                                  | √                                    | √                                      |
| <b>7-O-ρουτινοζίτης της<br/>λουτεολίνης</b>   | 593 (285)                        | √                                  | √                                    | √                                      |
| 7-O-γλυκοζίτης της<br>λουτεολίνης             | 447 (285)                        | √                                  | √                                    | -                                      |
| <b>7-O-ρουτινοζίτης της<br/>απιγενίνης</b>    | 577 (269)                        | √                                  | √                                    | √                                      |
| <b>7-O-γλυκοζίτης της<br/>απιγενίνης</b>      | 431 (269)                        | √                                  | √                                    | √                                      |
| -                                             | 321 (173)                        | √                                  | √                                    | -                                      |
| Γλυκοζίτης της<br>ελευρωπαΐνης                | 701 (539, 377, 307)              | -                                  | -                                    | √                                      |
| <b>7-O-γλουκουρονίτης της<br/>απιγενίνης</b>  | 445 (269)                        | √                                  | √                                    | √                                      |
| Λουτεολίνη                                    | 285                              | √                                  | -                                    | -                                      |
| <b>Απιγενίνη</b>                              | 269                              | √                                  | √                                    | √                                      |

Από το χρωματογραφικό προφίλ των υδατομεθανολικών εκχυλισμάτων (L.K.M.MeOH/H<sub>2</sub>O 24h, L.K.M.MeOH/H<sub>2</sub>O u.s.b. και L.K.M.MeOH/H<sub>2</sub>O 1 month) των φύλλων *Ligustrum lucidum* προκύπτει ότι τα εκχυλίσματα δεν παρουσιάζουν σημαντικές ποιοτικές διαφορές στη σύστασή τους αλλά ποσοτικές. Παρατηρείται ότι, τα δύο κύρια συστατικά των τριών εκχυλισμάτων είναι τα ίδια: απιγενίνη και 7-O-ρουτινοζίτης της απιγενίνης. Επίσης η απιγενίνη, ο 7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης, ο 7-O-ρουτινοζίτης της απιγενίνης, ο 6,8-δι-C-γλυκοζίτης της απιγενίνης και ο 7-O-ρουτινοζίτης της λουτεολίνης είναι τα φλαβονοειδή που απαντώνται και στα τρία εκχυλίσματα. Στον Πίνακα 4.9 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του ποσοτικού προσδιορισμού των εμπορικά διαθέσιμων φλαβονοειδών με την RP-HPLC στα 340 nm.

Όσον αφορά τα εκχυλίσματα L.K.M.MeOH/H<sub>2</sub>O 24h, L.K.M.MeOH/H<sub>2</sub>O u.s.b, αυτά παρουσιάζουν παρόμοιο χρωματογραφικό προφίλ με μία μικρή διαφορά στις συγκεντρώσεις των συστατικών. Το εκχύλισμα όμως L.K.M.MeOH/H<sub>2</sub>O 1 month παρουσίασε λίγο διαφορετικό χρωματογραφικό προφίλ εξαιτίας της ύπαρξης επιπλέον συστατικών καθώς και σημαντική διαφορά στις συγκεντρώσεις των φλαβονοειδών. Συγκρίνοντας τα τρία υδατομεθανολικά εκχυλίσματα παρατηρείται ότι το πιο πλούσιο σε φαινολικές ενώσεις και φλαβονοειδή είναι αυτό του εμποτισμού για ένα μήνα L.K.M.MeOH/H<sub>2</sub>O 1 month, το οποίο συμπίπτει και με τα χρωματομετρικά αποτελέσματα των ολικών φαινολών και φλαβονοειδών. Επίσης, το εκχύλισμα αυτό εμφανίζει την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση.

#### **4.5.2 Συγκριτική μελέτη των εκχυλισμάτων L.K.M.MeOH 1 week και L.K.M.Aq**

Στο Σχήμα 4.10 παρουσιάζεται το χρωματογραφικό προφίλ των εκχυλισμάτων L.K.M.MeOH 1week και L.K.M.Aq στα τρία μήκη κύματος 254, 280 και 340 nm καθώς και εκείνο του φασματογράφου μάζας. Η επιλογή για τη σύγκριση αυτών των δύο εκχυλισμάτων βασίστηκε στην διαφορετική φύση των διαλυτών, οργανικός διαλύτης και υδατικός, και κατά συνέπεια στις διαφορετικές ενώσεις που εκχυλίζονται κάθε φορά.



**Σχήμα 4.10.** Χρωματογράφημα μάζας και χρωματογραφικό προφίλ στα 254 nm, 280 nm, και 340 nm των εκχυλισμάτων L.K.M.MeOH 1week και L.K.M.Aq

Το παράγωγο του λιγκστροζίτη και ο 7-*O*-ρουτινοζίτης της απιγενίνης ταυτοποιήθηκαν ως τα κυριότερα συστατικά του εκχυλίσματος L.K.M.MeOH 1week, ενώ για το υδατικό εκχύλισμα ο 7-*O*-ρουτινοζίτης της απιγενίνης ήταν το κύριο συστατικό. Με βάση τα φάσματα MS και MS<sup>2</sup> τα κυριότερα φαινολικά συστατικά που ταυτοποιήθηκαν στα εκχυλίσματα είναι τα εξής: υδροξυτυροσόλη, ο γλυκοζίτης της τυροσόλης, ολεοζίτης, 6,8-δι-*C*-γλυκοζίτης της απιγενίνης, υδροξυ-βερμπασκοζίτης, 7-*O*-ρουτινοζίτης της λουτεολίνης, βερμπασκοζίτης, 7-*O*-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, 7-*O*-ρουτινοζίτης της απιγενίνης, ελευρωπαΐνη, 7-*O*-γλυκοζίτης της απιγενίνης, 7-*O*-γλυκοζιτικό οξύ της απιγενίνης και η απιγενίνη.

Στον Πίνακα 4.5 παρουσιάζονται συνοπτικά τα κυριότερα συστατικά των εκχυλισμάτων μετά την ανάλυση των δειγμάτων με LC-ESI-MS<sup>n</sup>.

**Πίνακας 4.5.** Μοριακά ιόντα των εκχυλισμάτων L.K.M.MeOH 1week και L.K.M.Aq και η ταυτοποίησή τους στην αντίστοιχη ένωση

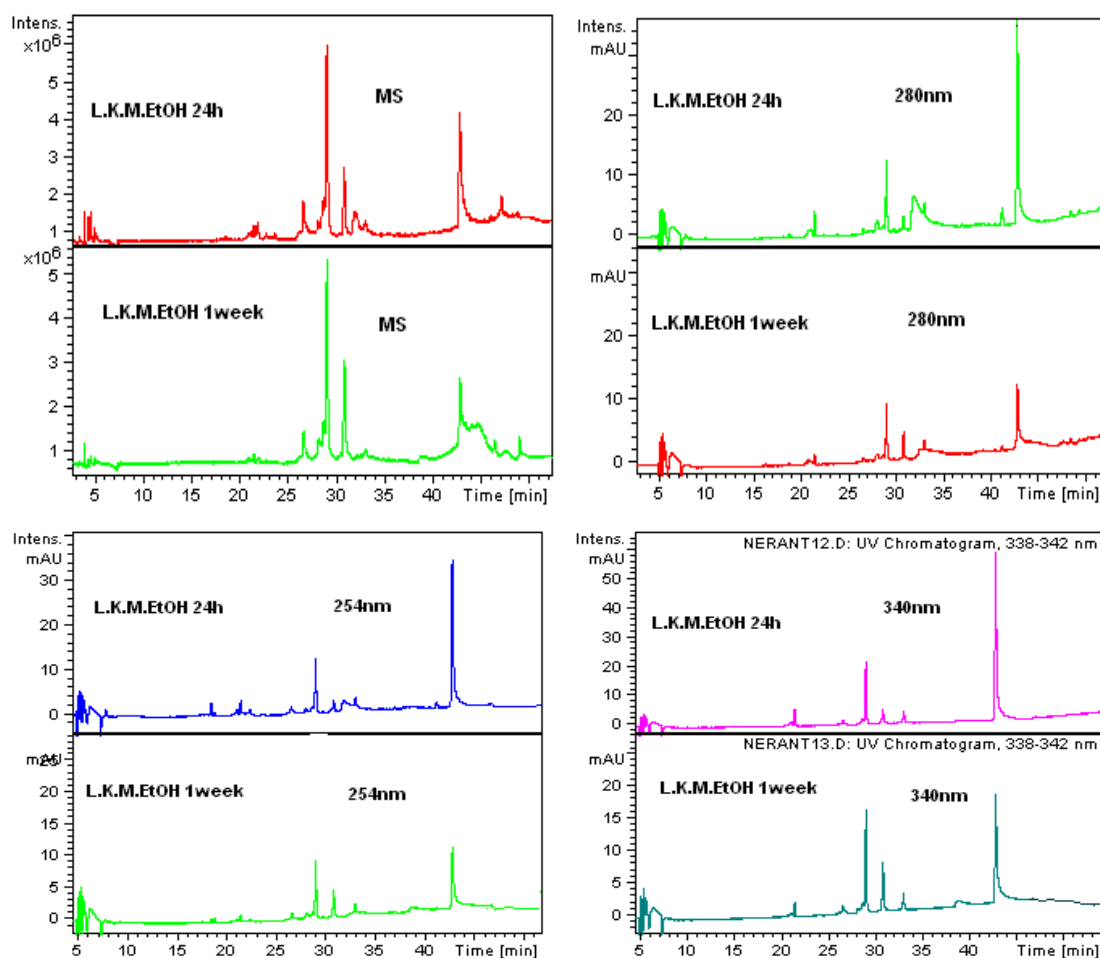
| Ένωση                                  | MS (MS <sup>2</sup> )         | L.K.M.MeOH 1week | L.K.M.Aq |
|----------------------------------------|-------------------------------|------------------|----------|
| Υδροξυτυροσόλη                         | 153                           | √                | √        |
| Γλυκοζίτης της τυροσόλης (Salidroside) | 599 (299)                     | √                | √        |
| Ολεοζίτης                              | 389 (345, 209)                | √                | √        |
| 6,8-δι-C-γλυκοζίτης της απιγενίνης     | 593 (575, 503, 473, 383, 353) | √                | √        |
| Υδροξυβερμπασκοζίτης                   | 639 (623)                     | -                | √        |
| 7-O-ρουτινοζίτης της λουτεολίνης       | 593 (285)                     | √                | -        |
| Βερμπασκοζίτης                         | 623 (461)                     | √                | -        |
| 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης         | 447 (285)                     | √                | √        |
| 7-O-ρουτινοζίτης της απιγενίνης        | 577 (269)                     | √                | √        |
| Παράγωγο του λιγκστροζίτη              | 553 (347, 373, 509)           | √                | -        |
| 7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης          | 431 (269)                     | √                | √        |
| Ελευρωπαΐνη                            | 539 (377, 307, 275)           | √                | √        |
| 7-O-γλουκουρονίτης της απιγενίνης      | 445 (269)                     | √                | -        |
| Απιγενίνη                              | 269                           | √                | -        |

Από το χρωματογραφικό προφίλ των εκχυλισμάτων παρατηρείται ότι το μεθανολικό εκχύλισμα είναι πιο πλούσιο από ότι το υδατικό. Τα κοινά συστατικά των δύο εκχυλισμάτων είναι η υδροξυτυροσόλη, ο γλυκοζίτης της τυροσόλης, ο 6,8-δι-C-γλυκοζίτης της απιγενίνης, ο 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, ο 7-O-ρουτινοζίτης της απιγενίνης, ο 7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης και ελευρωπαΐνη. Από το Σχήμα 4.10 και τον Πίνακα 4.8 είναι εμφανής η ποσοτική διαφορά των ενώσεων εφόσον οι συγκεντρώσεις των μετρούμενων φλαβονοειδών στο μεθανολικό εκχύλισμα είναι διπλάσιες. Επίσης, η απιγενίνη και ο βερμπασκοζίτης ταυτοποιήθηκαν μόνο στο μεθανολικό εκχύλισμα και ο υδροξυβερμπασκοζίτης μόνο στο υδατικό.

Στον Πίνακα 4.8 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των παραμέτρων για την δημιουργία των πρότυπων καμπυλών αναφοράς ενώ στον Πίνακα 4.9 αυτά του ποσοτικού προσδιορισμού, των εμπορικά διαθέσιμων φλαβονοειδών, που απαντώνται στα εκχυλίσματα από φύλλα του φυτού *Ligustrum lucidum* με την RP-HPLC στα 340 nm.

### 4.5.3 Συγκριτική μελέτη των αιθανολικών εκχυλισμάτων L.K.M.EtOH 24h και L.K.M.EtOH 1week

Στο Σχήμα 4.11 παρουσιάζεται το χρωματογραφικό προφίλ των αιθανολικών εκχυλισμάτων L.K.M.EtOH 24h και L.K.M.EtOH 1week στα τρία μήκη κύματος 254, 280 και 340 nm καθώς και εκείνο του φασματογράφου μάζας



**Σχήμα 4.11.** Χρωματογράφημα μάζας και χρωματογραφικό προφίλ στα 254 nm, 280 nm, και 340 nm των αιθανολικών εκχυλισμάτων L.K.M.EtOH 24h και L.K.M.EtOH 1week

Για το εκχύλισμα L.K.M.EtOH 24h η απιγενίνη ταυτοποιήθηκε ως το κυριότερο συστατικό, ενώ για το L.K.M.EtOH 1week ο 7-*O*-ρουτινοζίτης της απιγενίνης και η απιγενίνη ήταν τα κυριότερα συστατικά. Με βάση τα φάσματα MS και MS<sup>2</sup> τα κυριότερα φαινολικά συστατικά των εκχυλισμάτων είναι τα εξής: ολεοζίτης, 6,8-δι-*C*-γλυκοζίτης της απιγενίνης, 7-*O*-ρουτινοζίτης της λουτεολίνης, 7-

*O*-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, *7-O*-ρουτινοζίτης της απιγενίνης, *7-O*-γλυκοζίτης της απιγενίνης, *7-O*-γλυκοζιτικό οξύ της απιγενίνης, λουτεολίνη και η απιγενίνη.

Στον Πίνακα 4.6 παρουσιάζονται συνοπτικά τα κυριότερα συστατικά των αιθανολικών εκχυλισμάτων μετά την ανάλυση των δειγμάτων με LC-ESI-MS<sup>n</sup>.

**Πίνακας 4.6.** Μοριακά ιόντα των αιθανολικών εκχυλισμάτων και η ταυτοποίησή τους στην αντίστοιχη ένωση

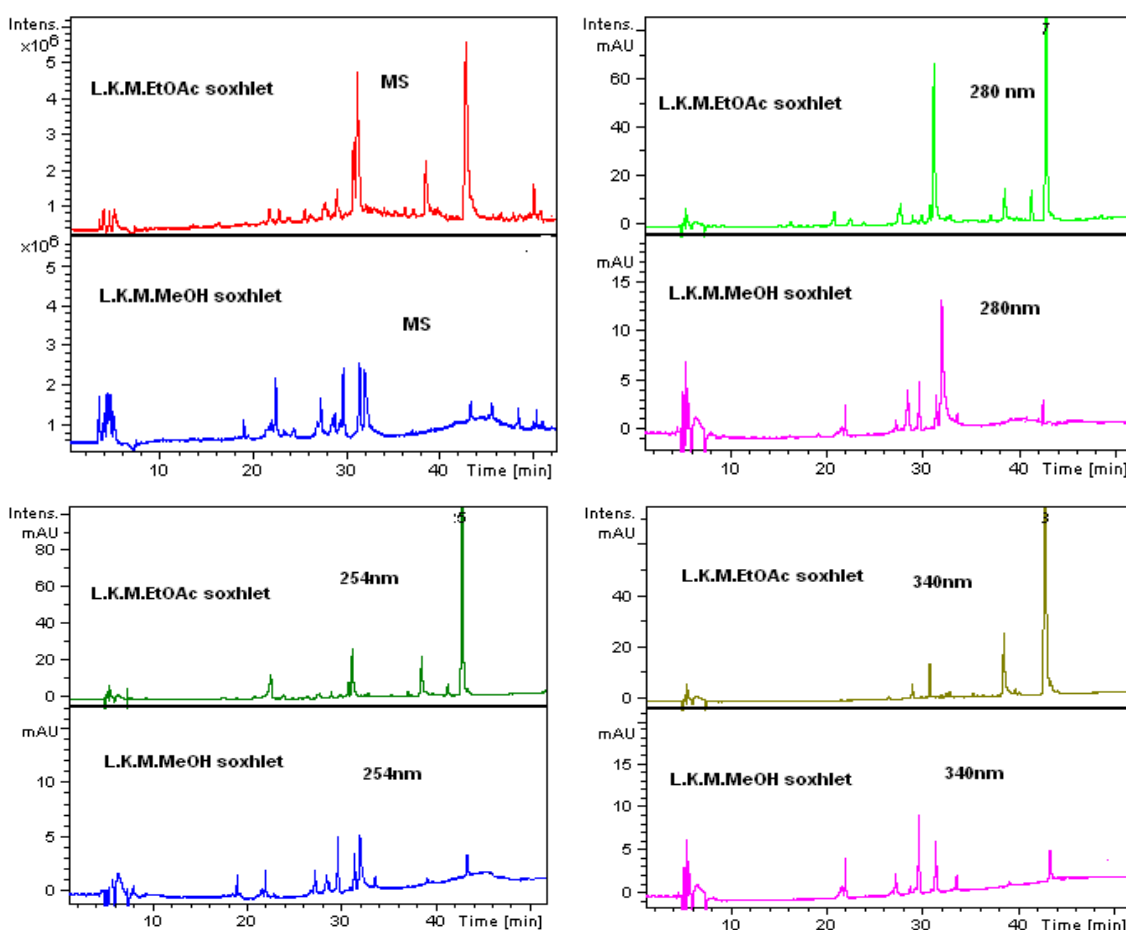
| Ένωση                                            | MS (MS <sup>2</sup> )         | L.K.M.EtOH 24h | L.K.M.EtOH 1 week |
|--------------------------------------------------|-------------------------------|----------------|-------------------|
| <b>Ολεοζίτης</b>                                 | 389 (345, 209)                | √              | √                 |
| <b>6,8-δι-<i>C</i>-γλυκοζίτης της απιγενίνης</b> | 593 (575, 503, 473, 383, 353) | √              | √                 |
| <b>7-<i>O</i>-ρουτινοζίτης της λουτεολίνης</b>   | 593 (285)                     | √              | √                 |
| <b>7-<i>O</i>-γλυκοζίτης της λουτεολίνης</b>     | 447 (285)                     | √              | √                 |
| <b>7-<i>O</i>-ρουτινοζίτης της απιγενίνης</b>    | 577 (269)                     | √              | √                 |
| <b>7-<i>O</i>-γλυκοζίτης της απιγενίνης</b>      | 431 (269)                     | √              | √                 |
| -                                                | 321 (173)                     | √              | -                 |
| <b>7-<i>O</i>-γλουκουρονίτης της απιγενίνης</b>  | 445 (269)                     | √              | √                 |
| Λουτεολίνη                                       | 285                           | -              | √                 |
| Απιγενίνη                                        | 269                           | √              | √                 |

Τα αιθανολικά εκχυλίσματα παρουσιάζουν όπως και στην περίπτωση των υδατομεθανολικών παρόμοιο χρωματογραφικό προφίλ ως προς την παρουσία φαινολικών ενώσεων. Ο ολεοζίτης, η απιγενίνη και τα γλυκοζυλιωμένα παράγωγα αυτής και της λουτεολίνης αποτελούν τα κοινά συστατικά των δύο εκχυλισμάτων. Από τον Πίνακα 5.8 παρατηρείται ότι οι συγκεντρώσεις αυτών διαφέρουν και το εκχύλισμα L.K.M.EtOH 24h εμφανίζεται πλουσιότερο σε σχέση με το L.K.M.EtOH 1week. Αναλυτικότερα η συγκέντρωση της απιγενίνης στο εκχύλισμα των 24h βρέθηκε διπλάσια από αυτή του εκχυλίσματος 1week. Μεγαλύτερη ήταν και αυτή του *7-O*-ρουτινοζίτη της απιγενίνης ενώ παρόμοιες ήταν οι τιμές του *7-O*-γλυκοζίτη της απιγενίνης. Από τα ποσοτικά αποτελέσματα των φλαβονοειδών είναι εμφανές ότι η μέθοδος εκχύλισης επηρεάζει τις συγκεντρώσεις των συστατικών αυτών. Επίσης παρατηρείται ότι και ο διαλύτης επηρεάζει τις συγκεντρώσεις των φλαβονοειδών. Συγκεκριμένα, στον υδατομεθανολικό διαλύτη η συγκέντρωση του *7-O*-ρουτινοζίτη της απιγενίνης ήταν υψηλότερη σε σχέση με τον αιθανολικό διαλύτη ενώ η υψηλότερη συγκέντρωση σε απιγενίνη παρατηρείται σε αιθανολικό διαλύτη.

Συγκρίνοντας τα χρωματογραφικά προφίλ των αιθανολικών και των υδατομεθανολικών εκχυλισμάτων παρατηρείται ότι πλουσιότερα εκχυλίσματα σε φαινολικές ενώσεις είναι τα υδατομεθανολικά εκχυλίσματα.

#### 4.5.4 Συγκριτική μελέτη των εκχυλισμάτων με soxhlet L.K.M.MeOH soxhlet και L.K.M.EtOAc soxhlet

Στο Σχήμα 4.12 παρουσιάζεται το χρωματογραφικό προφίλ των εκχυλισμάτων με soxhlet L.K.M.MeOH soxhlet και L.K.M.EtOAc soxhlet στα τρία μήκη κύματος 254, 280 και 340 nm καθώς και εκείνο του φασματογράφου μάζας.



**Σχήμα 4.12.** Χρωματογράφημα μάζας και χρωματογραφικό προφίλ στα 254 nm, 280 nm, και 340 nm των εκχυλισμάτων L.K.M.MeOH soxhlet και L.K.M.EtOAc soxhlet

Η απιγενίνη ταυτοποιήθηκε ως το κυριότερο συστατικό του εκχυλίσματος L.K.M.EtOAc soxhlet ενώ τα κυριότερα συστατικά του L.K.M.MeOH soxhlet ήταν ο 7-Ο-ρουτινοζίτης της απιγενίνης και η κορυφή με μοριακό ιόν  $[M-H]^-$  321 m/z. Με

βάση τα φάσματα MS και MS<sup>2</sup> τα κυριότερα φαινορικά συστατικά που ταυτοποιήθηκαν στο εκχύλισμα είναι τα εξής: ο ολεοζίτης, η υδροξυτυροσόλη, το ελενολικό οξύ, 6,8-δι-C-γλυκοζίτης της απιγενίνης, το άγλυκο της ελαιευρωπαϊνης, ο 7-O-ρουτινοζίτης της λουτεολίνης, ο 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, ο 7-O-ρουτινοζίτης της απιγενίνης, ο 7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης, η λουτεολίνη και η απιγενίνη.

Στον Πίνακα 4.7 παρουσιάζονται συνοπτικά τα κυριότερα συστατικά των εκχυλισμάτων μετά την ανάλυση των δειγμάτων με LC-ESI-MS<sup>n</sup>.

**Πίνακας 4.7.** Μοριακά ιόντα των εκχυλισμάτων L.K.M.MeOH soxhlet και L.K.M.EtOAc soxhlet και η ταυτοποίησή τους στην αντίστοιχη ένωση

| Ένωση                                  | MS (MS <sup>2</sup> )         | L.K.M.EtOAc<br>soxhlet | L.K.M.MeOH<br>soxhlet |
|----------------------------------------|-------------------------------|------------------------|-----------------------|
| Υδροξυτυροσόλη                         | 153                           | √                      | -                     |
| Ολεοζίτης                              | 389 (345, 209)                | -                      | √                     |
| Ελενολικό οξύ                          | 241                           | √                      | -                     |
| 6,8-δι-C-γλυκοζίτης της απιγενίνης     | 593 (575, 503, 473, 383, 353) | -                      | √                     |
| Άγλυκο της Ελευρωπαϊνης                | 377                           | √                      | -                     |
| Άγλυκο της Ελευρωπαϊνης (ισομερές)     | 377                           | √                      | -                     |
| 7-O-ρουτινοζίτης της λουτεολίνης       | 593 (285)                     | -                      | √                     |
| 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης         | 447 (285)                     | -                      | √                     |
| <b>7-O-ρουτινοζίτης της απιγενίνης</b> | 577 (269)                     | √                      | √                     |
| <b>7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης</b>   | 431 (269)                     | √                      | √                     |
| -                                      | 321 (173)                     | √                      | √                     |
| Λουτεολίνη                             | 285                           | √                      | -                     |
| <b>Απιγενίνη</b>                       | 269                           | √                      | √                     |

Από το χρωματογραφικό προφίλ των εκχυλισμάτων παρατηρείται ότι τα εκχυλίσματα αυτά διαφέρουν ως προς τη σύστασή τους σε φαινορικά. Στον διαλύτη οξικό αιθυλεστέρα όπως αναμενόταν ότι διαλύονται ενώσεις λιγότερο πολικές από ότι στον διαλύτη μεθανόλη. Όσον αφορά το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα η συγκέντρωση σε απιγενίνη είναι η υψηλότερη όλων σε σχέση με αυτή της μεθανόλης. Από το χρωματογραφικό προφίλ στα 340 nm διαπιστώνεται ότι στο εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα υπάρχει μόνο η απιγενίνη, ο 7-O-ρουτινοζίτης της απιγενίνης, ο 7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης και η λουτεολίνη ενώ σε αυτό της μεθανόλης υπάρχουν περισσότερα φλαβονοειδή όπως ο 6,8-δι-C-γλυκοζίτης της απιγενίνης, ο 7-

*O*-ρουτινοζίτης της λουτεολίνης και ο 7-*O*-γλυκοζίτης της λουτεολίνης. Επίσης, οι ενώσεις υδροξυτυροσόλη, ελενολικό οξύ και το άγλυκο της Ελευρωπαϊνης υπάρχουν μόνο στο εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα. Τα κοινά συστατικά των δύο αυτών εκχυλισμάτων είναι η απιγενίνη, ο 7-*O*-ρουτινοζίτης της απιγενίνης, ο 7-*O*-γλυκοζίτης της απιγενίνης, συστατικά που επαναλαμβάνονται σε όλα τα εκχυλίσματα ανεξαρτήτως της μεθόδου εκχύλισης ή του διαλύτη.

**Πίνακας 4.8.** Παράμετροι των καμπυλών αναφοράς των πρότυπων φλαβονοειδών με την RP-HPLC στα 340 nm.

| Ένωση                                       | Εύρος τιμών<br>(μg/mL) | Εξίσωση γραφήματος<br>( $y = ax + \beta$ ) | Τιμή $R^2$<br>γραφήματος |
|---------------------------------------------|------------------------|--------------------------------------------|--------------------------|
| 7- <i>O</i> -ρουτινοζίτης<br>της απιγενίνης | 1-50                   | $y = 13,034x + 17,869$                     | $R^2 = 0,9938$           |
| 7- <i>O</i> -γλυκοζίτης<br>της απιγενίνης   | 1-25                   | $y = 90,899x - 56,475$                     | $R^2 = 0,9977$           |
| Απιγενίνη                                   | 1-50                   | $y = 110,74x - 79,541$                     | $R^2 = 0,9949$           |
| 7- <i>O</i> -γλυκοζίτης<br>της λουτεολίνης  | 1-16                   | $y = 57,228x - 34,508$                     | $R^2 = 0,9906$           |
| Λουτεολίνη                                  | 1-15                   | $y = 110,54x - 114,68$                     | $R^2 = 0,9975$           |

**Πίνακας 4.9.** Ποσοτικός προσδιορισμός φλαβονοειδών των εκχυλισμάτων με την RP-HPLC στα 340 nm.

| A/a | Κωδικοί<br>εκχυλισμάτων   | 7-Ο-<br>ρουτινοζίτης<br>της<br>απιγενίνης<br>(mg/g) | 7-Ο-<br>γλυκοζίτης<br>της<br>απιγενίνης<br>(mg/g) | Απιγενίνη<br>(mg/g) | 7-Ο-<br>γλυκοζίτης<br>της<br>λουτεολίνης<br>(mg/g) | Λουτεολίνη<br>(mg/g) |
|-----|---------------------------|-----------------------------------------------------|---------------------------------------------------|---------------------|----------------------------------------------------|----------------------|
| 1   | L.K.M.EtOAc<br>(soxhlet)  | 2,52                                                | 2,34                                              | 41,73               |                                                    | 4,92                 |
| 2   | L.K.M.MeOH<br>(soxhlet)   | 4,25                                                | 3,00                                              | 2,17                | 2,29                                               |                      |
| 3   | L.K.M.MeOH/H2O<br>24h     | 11,65                                               | 2,98                                              | 4,51                | 1,01                                               | 2,88                 |
| 4   | L.K.M.MeOH/H2O<br>u.s.b   | 18,66                                               | 2,90                                              | 6,15                |                                                    |                      |
| 5   | L.K.M.EtOH 24h            | 13,37                                               | 1,49                                              | 8,86                |                                                    |                      |
| 6   | L.K.M.EtOH 1<br>week      | 9,42                                                | 1,91                                              | 4,17                |                                                    | 2,81                 |
| 7   | L.K.M.MeOH 1<br>week      | 18,65                                               | 4,78                                              | 2,17                | 4,07                                               |                      |
| 8   | L.K.M.MeOH/H2O<br>1 month | 27,40                                               | 3,39                                              | 5,43                |                                                    | 2,79                 |
| 9   | L.K.M.Aq                  | 13,41                                               | 3,35                                              |                     | 1,11                                               |                      |

\*οι τιμές που αναγράφονται προέκυψαν από τους μέσους όρους 2 μετρήσεων

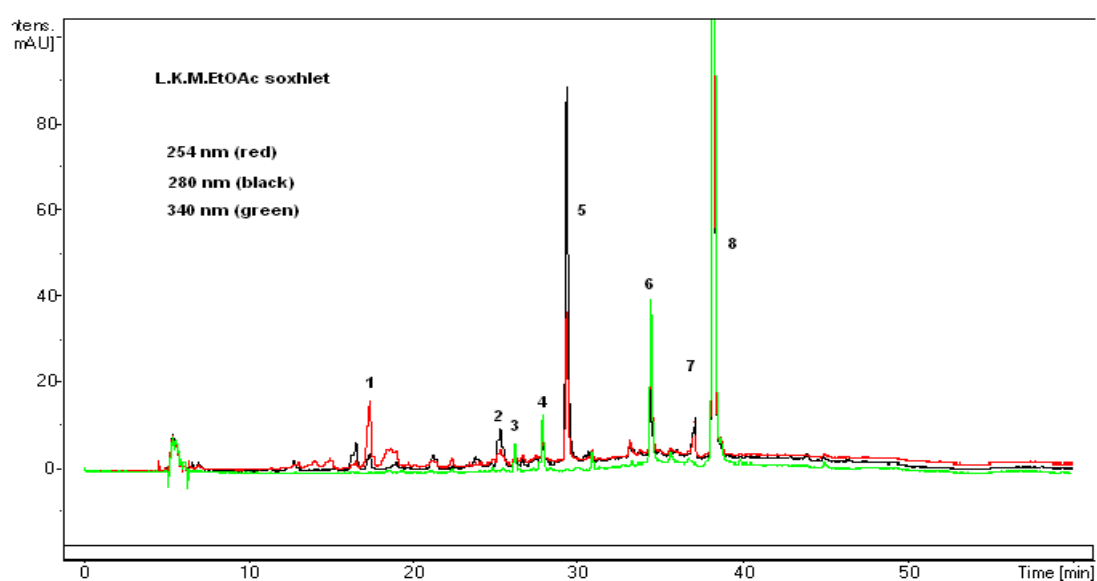
Συμπερασματικά, από τη σύγκριση των εννέα εκχυλισμάτων διαπιστώνεται ότι τα κοινά συστατικά όλων είναι τα εξής: ο 7-Ο-ρουτινοζίτης της απιγενίνης και ο 7-Ο-γλυκοζίτης της απιγενίνης. Οι ενώσεις αυτές όπως προκύπτει από τον Πίνακα 4.9 έχουν διαφορετικές τιμές συγκεντρώσεων ανάλογα με το διαλύτη εκχύλισης και τη μέθοδο εκχύλισης. Η μέθοδος εκχύλισης με εμποτισμό φαίνεται ότι δίνει πλούσια εκχυλίσματα σε φαινολικές ενώσεις, φλαβονοειδή και την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις του 7-Ο-ρουτινοζίτη της απιγενίνης (35.38 και 27.40 mg/g) και του 7-Ο-γλυκοζίτη της απιγενίνης (6.05 και 3.39 mg/g) βρέθηκαν στα εκχυλίσματα L.K.M.MeOH 1 week και L.K.M.MeOH/H2O 1 month. Το ίδιο όμως δεν παρατηρήθηκε και για την απιγενίνη, η οποία στο εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα έδωσε πολύ υψηλή τιμή (41.73 mg/g). Όσον αφορά τον 7-Ο-γλυκοζίτη της λουτεολίνης και τη λουτεολίνη παρατηρείται η ίδια συμπεριφορά, δηλαδή η υψηλότερη συγκέντρωση του γλυκοζίτη (4.26 mg/g) βρέθηκε στο εκχύλισμα με εμποτισμό και της λουτεολίνης (4.92 mg/g) σε αυτό του οξικού αιθυλεστέρα.

Από τα χρωματογραφικά προφίλ των εκχυλισμάτων φαίνεται ότι το μεθανολικό μιας εβδομάδας, το υδατομεθανολικό του ενός μήνα και του οξικού αιθυλεστέρα της soxhlet είναι τα πιο πλούσια σε φαινολικά και флаβονοειδή ενώ το μεθανολικό της soxhlet και το αιθανολικό των 24 ωρών τα φτωχότερα. Σε αυτό το συμπέρασμα καταλήξαμε και από τη στατιστική μελέτη των ολικών φαινολών, ολικών флаβονοειδών και της εκτίμησης της αντιοξειδωτικής δράσης. Επομένως, όσον αφορά εκχυλίσματα από φύλλα του φυτού *Ligustrum lucidum* η καταλληλότερη μέθοδος εκχύλισης για παραλαβή πλούσιων δειγμάτων είναι αυτή του εμποτισμού και της soxhlet.

#### 4.6 Μελέτη της σύστασης του εκχυλίσματος του οξικού αιθυλεστέρα με τη χρήση της συζευγμένης τεχνικής LC-DAD-SPE-NMR και LC-ESI-MS<sup>n</sup>

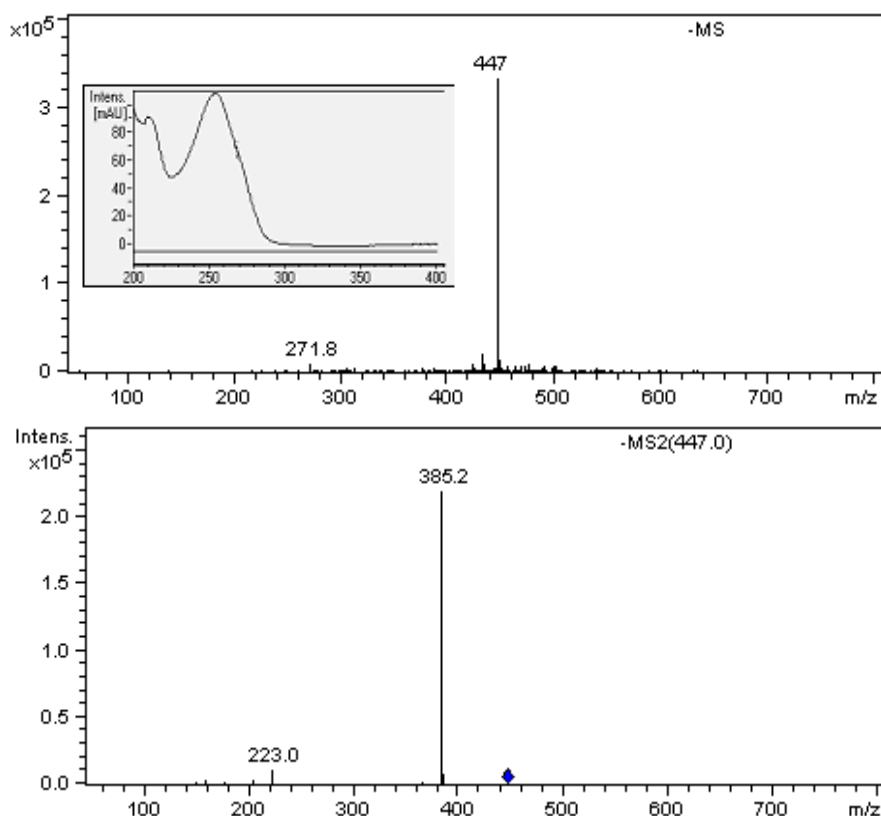
Με βάση το υδροχρωματογραφικό προφίλ των εκχυλισμάτων, τη σύστασή τους σε ολικές φαινόλες και σε φλαβονοειδή καθώς και των αποτελεσμάτων της εκτίμησης της αντιοξειδωτικής δράσης, επιλέχθηκε το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα να μελετηθεί με τη συνδυαστική μεθοδολογία LC-DAD-SPE-NMR.

Στο Σχήμα 4.13 παρουσιάζεται το υδροχρωματογραφικό προφίλ του εκχυλίσματος **L.K.M.EtOAc soxhlet** στα τρία μήκη κύματος 254, 280 και 340 nm.



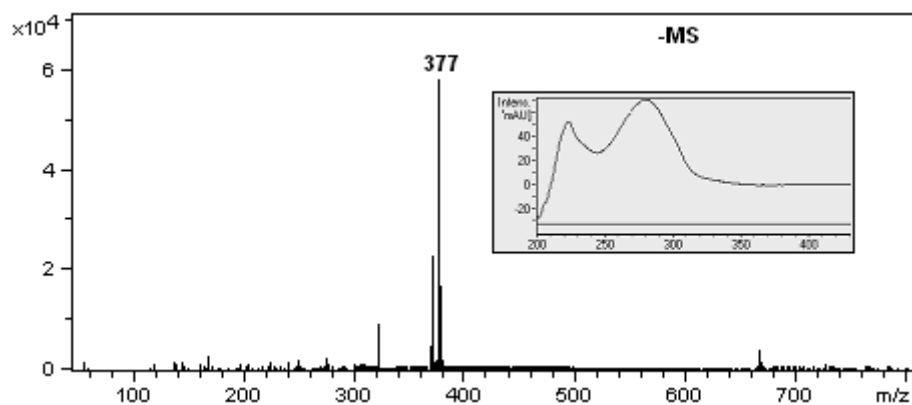
**Σχήμα 4.13** Χρωματογραφικό προφίλ στα 254 (κόκκινο), 280 (μαύρο) και 340 (πράσινο) nm του φυτικού εκχυλίσματος **L.K.M.EtOAc soxhlet** με LC-DAD-SPE-NMR

Η **κορυφή 1** εμφανίζει φάσμα UV με μέγιστο στα 255 nm και το σήμα του μοριακού ιόντος  $[M-H]^-$  έχει τιμή 447 m/z στο πρώτης τάξεως φάσμα μάζας. Στο δευτερογενές φάσμα μάζας  $MS^2$  του μοριακού ιόντος παρατηρούνται δύο κορυφές  $[M-H-62]^-$  ( $[M-H-CO_2-H_2O]^-$ ) στα 385 και  $[M-H-62-162]^-$  στα 223 m/z (Σχήμα 4.14). Συνεπώς η κορυφή 1, είναι με μία ένωση η οποία έχει μία ομάδα γλυκόζης και ένα οξύ. Από τα δεδομένα του φάσματος NMR  $^1H$  δεν κατέστη εφικτή η ταυτοποίηση της ένωσης εξαιτίας της χαμηλής συγκέντρωσης που παγιδεύτηκε στις μικροστήλες.



**Σχήμα 4.14.** Φάσματα UV, MS και MS<sup>2</sup> της κορυφής 1

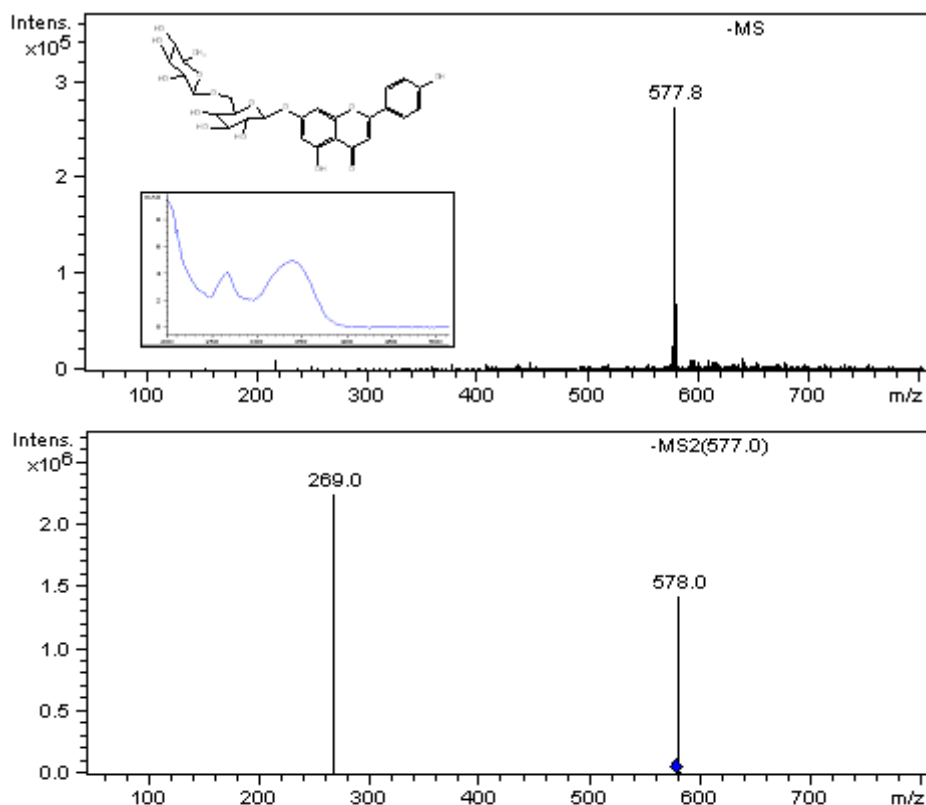
Η **κορυφή 2** εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση στα 285 nm και η τιμή του κύριου μοριακού ιόντος [M-H]<sup>-</sup> είναι 377 m/z. Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα (Cardoso *et al.*, 2005) η κορυφή 2 χαρακτηρίζεται ως το άγλυκο της ελευρωπαΐνης (Σχήμα 4.15).



**Σχήμα 4.15.** Φάσματα UV και MS του άγλυκου της ελευρωπαΐνης

Το φάσμα μάζας της **κορυφής 3**, με μέγιστη απορρόφηση στα 266 και 340 nm, παρουσιάζει κύριο θραύσμα [M-H]<sup>-</sup> στα 577 m/z. Στο δευτερογενές φάσμα μάζας

MS<sup>2</sup> του μοριακού ιόντος παρατηρείται ένα κύριο θραύσμα [M-H-308]<sup>-</sup> ([M-H-ραμνόζη-γλυκόζη]) στα 269 m/z, υποδεικνύοντας την παρουσία ενός μορίου ραμνόζης και ενός γλυκόζης (Σχήμα 4.16).

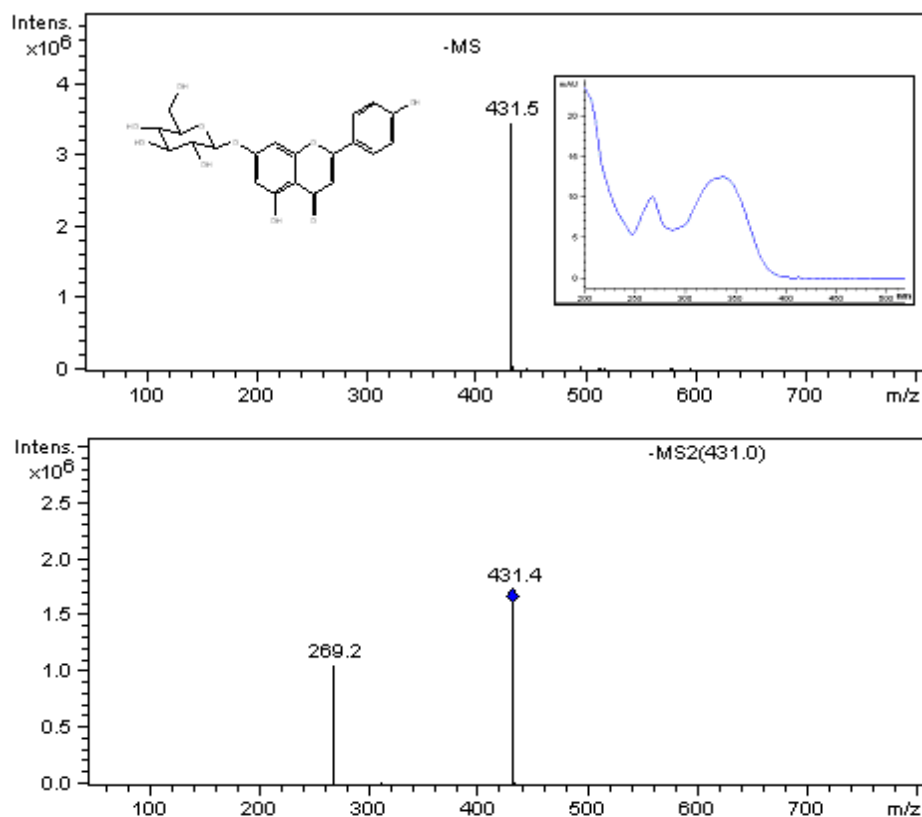


**Σχήμα 4.16.** Φάσματα UV, MS και MS<sup>2</sup> του 7-Ο-ρουτινοζίτη της απιγενίνης

Η κορυφή 3 λόγω της περιορισμένης ποσότητάς της στο δείγμα ήταν αδύνατο να ταυτοποιηθεί με φασματοσκοπία NMR παρά τον εμπλουτισμό της στις μικροστήλες με πολλαπλή παγίδευση. Επομένως, ο χαρακτηρισμός της ένωσης 3 ως ο 7-Ο-ρουτινοζίτης της απιγενίνης βασίστηκε στα δεδομένα UV και MS καθώς και στην σύγκρισή της με πρότυπη ένωση.

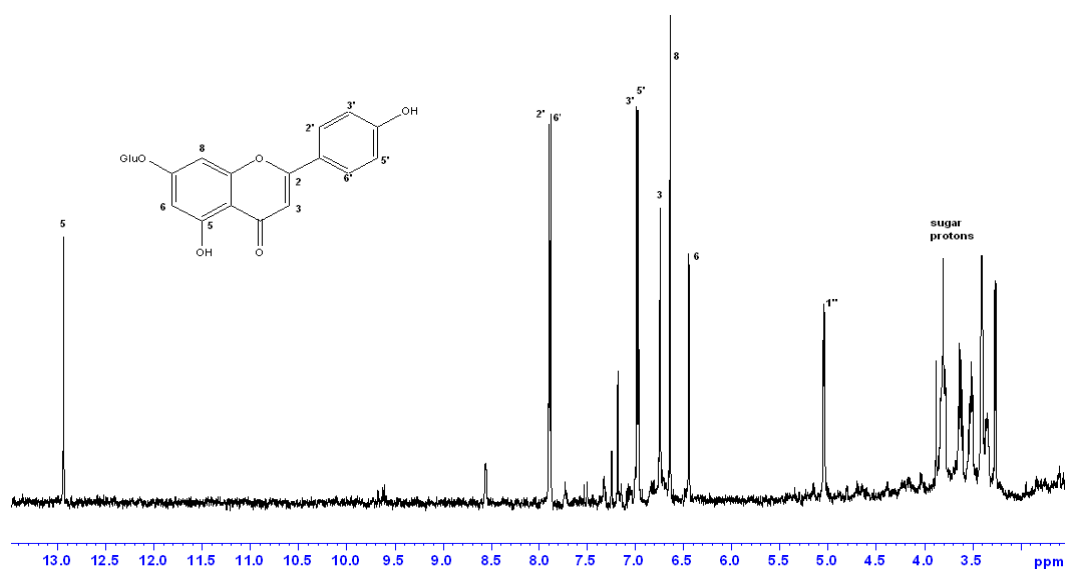
Η **κορυφή 4** παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στα 265 και 339 nm στο φάσμα UV δηλώνοντας την ύπαρξη φλαβονοειδούς. Από το φάσμα NMR <sup>1</sup>H πιστοποιείται η ύπαρξη φλαβονοειδούς εξαιτίας της κορυφής στα 13 ppm, η οποία είναι χαρακτηριστική του πρωτονίου OH(5) που συμμετέχει σε ισχυρό ενδομοριακό δεσμό υδρογόνου (Exarchou *et al.*, 2002). Επιπλέον, στο φάσμα NMR <sup>1</sup>H παρατηρείται το χαρακτηριστικό αποτύπωμα της δομής της απιγενίνης. Το κύριο θραύσμα στο φάσμα μάζας είναι [M-H]<sup>-</sup> στα 431 m/z ενώ στο φάσμα μάζας MS<sup>2</sup>

παρατηρείται ένα κύριο ιόν  $[M-H-162]^-$  στα 269 m/z δηλώνοντας την πιθανή ύπαρξη ενός γλυκοζιτικού μορίου (Σχήμα 4.17)



**Σχήμα 4.17.** Φάσματα UV, MS και MS<sup>2</sup> του 7-Ο-γλυκοζίτη της απιγενίνης

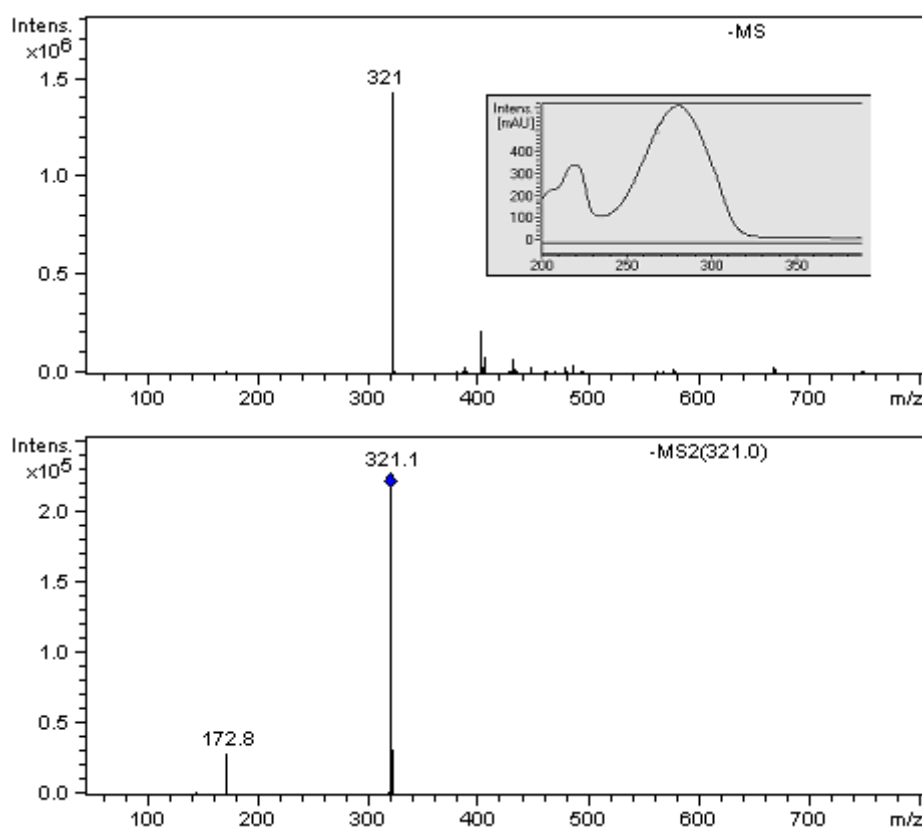
Η ταυτοποίηση του γλυκοζίτη έγινε με βάση τη σταθερά σύζευξης και της χημικής μετατόπισης στα 5.05 ppm (d,  $J=7.40$  Hz) του χαρακτηριστικού ανωμερικού πρωτονίου (H1'') του γλυκοζιτικού μέρους υποδεικνύοντας την παρουσία του *βήτα* ανωμερούς της γλυκόζης. Η κορυφή 4, επομένως, χαρακτηρίστηκε ως ο 7-Ο-γλυκοζίτης της απιγενίνης και αυτό επιβεβαιώθηκε με σύγκριση με την πρότυπη ένωση (Σχήμα 4.18).



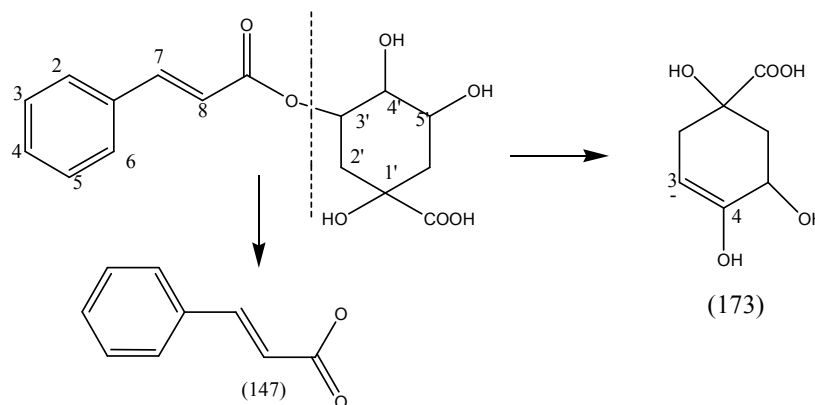
**Σχήμα 4.18.** Φάσμα  $\text{NMR-}^1\text{H}$  του 7-Ο-γλυκοζίτη της απιγενίνης σε  $\text{CD}_3\text{CN}$  σε φασματογράφο AV-500MHz (NS= 1k, T= 298K,  $t_{\text{exp}}$ = 1h & 5min)

Το φάσμα μάζας της **κορυφής 5**, με μέγιστη απορρόφηση στα 283 nm στο φάσμα UV, παρουσιάζει κύριο θραύσμα  $[\text{M-H}]^-$  στα 321 m/z. Στο δευτερογενές φάσμα μάζας  $\text{MS}^2$  του μοριακού ιόντος παρατηρείται ένα κύριο θραύσμα  $[\text{M-H-148}]^-$  στα 173 m/z (Σχήμα 4.19)

(A)

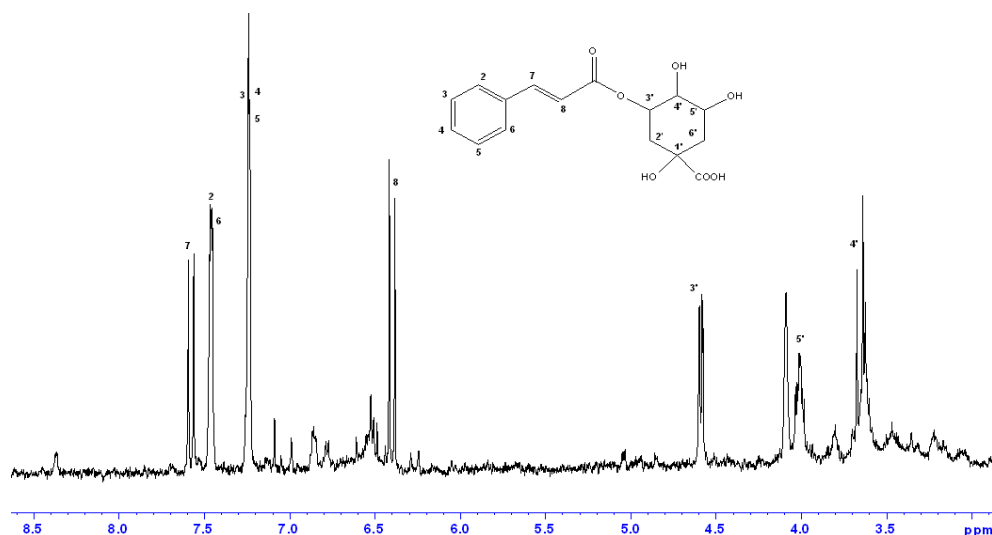


(B)



**Σχήμα 4.19.** (A) Φάσματα UV, MS και MS<sup>2</sup> του 3-Ο-κινamoϋλκουνικό οξέος και (B) Πορεία θραυσματοποίησης του 3-Ο-κινamoϋλκουνικό οξέος

Από το φάσμα NMR <sup>1</sup>H πιστοποιείται η ύπαρξη ενός κινωμικού (cinnamoyl) και ενός κουνικού (quinic acid) υποκαταστάτη. Η μεγάλη σταθερά σύζευξης ( $J=16$  Hz) μεταξύ των πρωτονίων του διπλού δεσμού της κινωμικής ομάδας αποδεικνύει την trans διαμόρφωση του μορίου (Σχήμα 4.20).

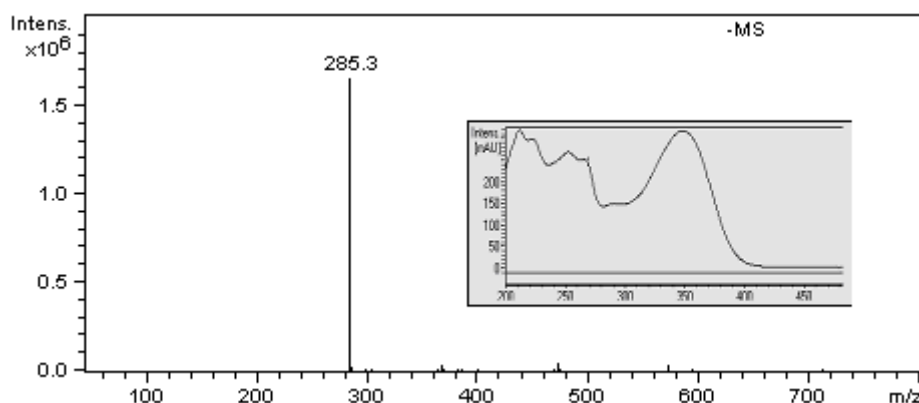


**Σχήμα 4.20.** Φάσμα NMR-<sup>1</sup>H του 3-Ο-κιναμοϋλκουινικό οξέος σε CD<sub>3</sub>CN σε φασματογράφο AV-500MHz (NS= 1k, T= 298K, t<sub>exp</sub>= 1h & 5min)

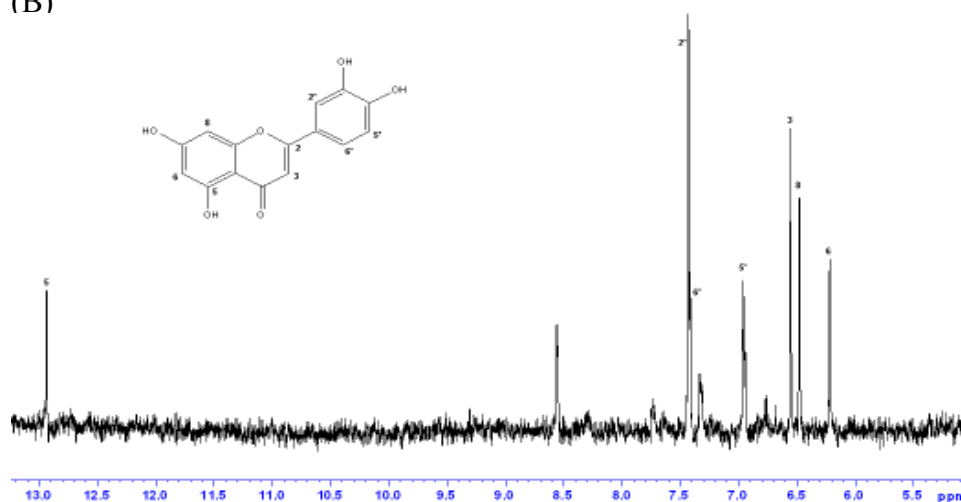
Η κορυφή 5 χαρακτηρίστηκε ως το 3-Ο-κιναμοϋλκουινικό οξύ (Tolonen *et al.*, 2002; Lin και Harnly, 2007). Σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, η ένωση αυτή για πρώτη φορά αναφέρεται ως ένα από τα συστατικά του είδους *Ligustrum* και ιδιαίτερα των φύλλων του *Ligustrum lucidum*.

Η **κορυφή 6** με μέγιστη απορρόφηση στα 252, 268 και 348 nm στο φάσμα UV, έδωσε ένα κύριο θραύσμα στο φάσμα μάζας [M-H]<sup>-</sup> στα 285 m/z (Σχήμα 4.21 Α). Από το φάσμα NMR <sup>1</sup>H παρατηρείται το χαρακτηριστικό αποτύπωμα της δομής της λουτεολίνης (Σχήμα 4.21 Β).

(A)



(B)



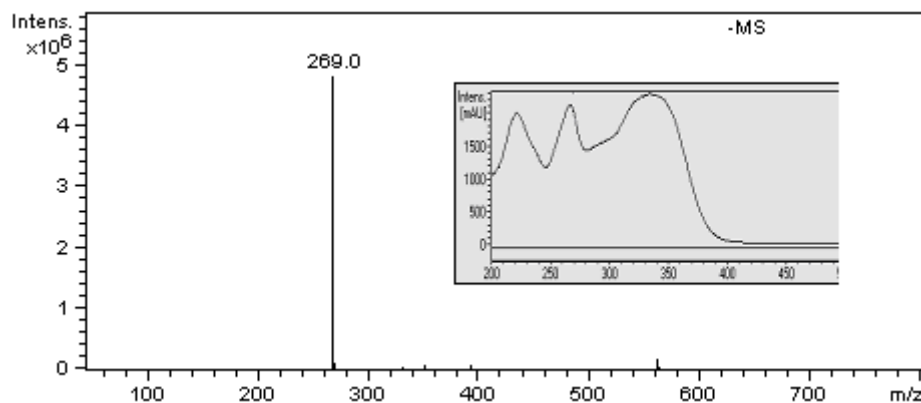
**Σχήμα 4.21.** (A) Φάσματα UV και MS της λουτεολίνης και (B) NMR- $^1\text{H}$  της λουτεολίνης σε  $\text{CD}_3\text{CN}$  σε φασματογράφο AV-500MHz (NS= 1k, T= 298K,  $t_{\text{exp}}$ = 1h & 5min)

Από τη σύγκριση του χρόνου κατακράτησης του φάσματος μάζας και του φάσματος NMR  $^1\text{H}$  της κορυφής αυτής με αυτών της πρότυπης λουτεολίνης, προκύπτει ότι η κορυφή 6 είναι η λουτεολίνη.

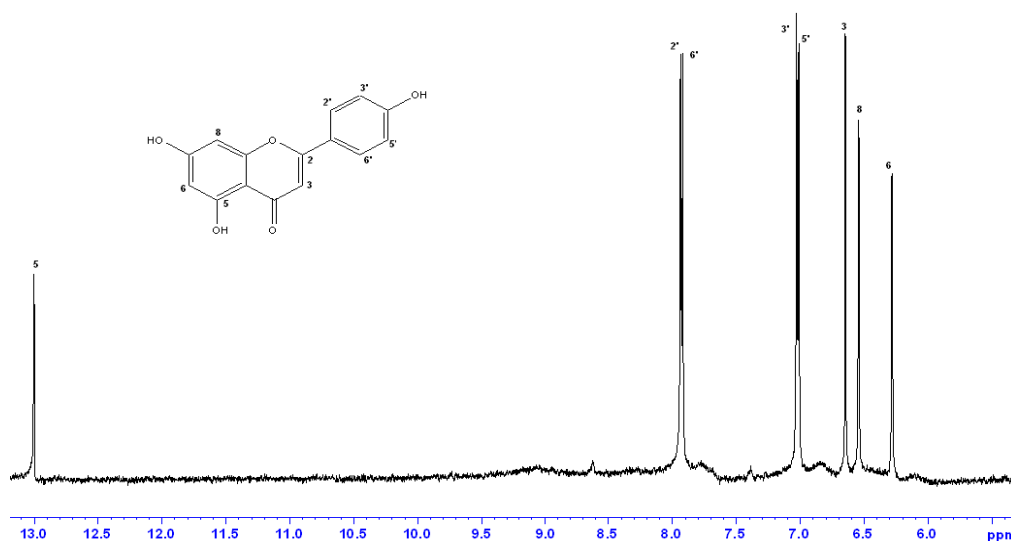
Η **κορυφή 7** με μέγιστη απορρόφηση στα 280 nm στο φάσμα UV δεν έδωσε κύριο θραύσμα στο φάσμα μάζας. Πιθανώς, η ένωση αυτή στις συνθήκες του πειράματος να μη μπορεί να ιονιστεί ή γενικώς να μην ιονίζεται. Από τα δεδομένα του φάσματος NMR  $^1\text{H}$  δεν ήταν εφικτός ο χαρακτηρισμός της ένωσης εξαιτίας της περιορισμένης ποσότητας στο δείγμα.

Η κορυφή **8** με μέγιστη απορρόφηση στα 265 και 341 nm στο φάσμα UV, έδωσε ένα κύριο θραύσμα στο φάσμα μάζας  $[M-H]^-$  στα 269 m/z. Από το φάσμα NMR- $^1H$  παρατηρείται το χαρακτηριστικό αποτύπωμα της δομής της απιγενίνης (Σχήμα 4.22).

(A)



(B)

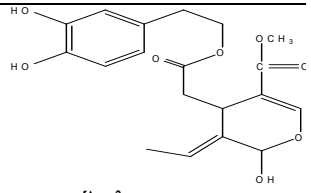
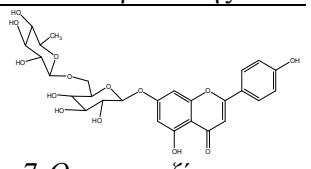
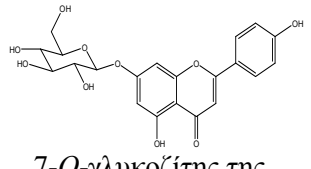
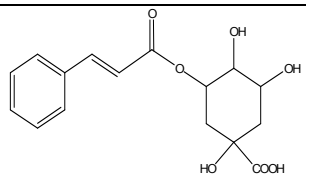
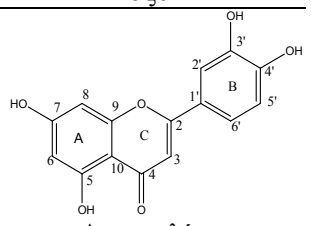


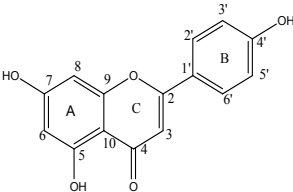
**Σχήμα 4.22.** (A) Φάσματα UV και MS της απιγενίνης και (B) NMR- $^1H$  της απιγενίνης σε  $CD_3CN$  σε φασματογράφο AV-500MHz (NS= 1k, T= 298K,  $t_{exp}$ = 1h & 5min)

Από τη σύγκριση του χρόνου κατακράτησης, του φάσματος μάζας και του φάσματος NMR  $^1H$  προκύπτει ότι η κορυφή **9** είναι η απιγενίνη.

Στον Πίνακα 4.10 παρουσιάζονται συνοπτικά τα χρωματογραφικά, φασματοσκοπικά δεδομένα και οι δομές των κυριοτέρων συστατικών του εκχυλίσματος φύλλων **L.K.M.EtOAc soxhlet**.

**Πίνακας 4.10.** Χρωματογραφικά και φασματοσκοπικά δεδομένα των κυριοτέρων συστατικών του εκχυλίσματος φύλλων **L.K.M.EtOAc soxhlet** από την ανάλυση με LC-DAD-SPE-NMR και LC-ESI-MS

| N° | t <sub>R</sub> (min) | ESI(-)                    |          | <sup>1</sup> H-NMR (acetonitrile-d <sub>3</sub> ), δppm                                                                                                                                              | Ένωση-δομή                                                                                                                      |
|----|----------------------|---------------------------|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    |                      | [M-H] <sup>-</sup><br>m/z | MS/MS    |                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                 |
| 1  | 17.35                | 447                       | 385, 223 |                                                                                                                                                                                                      | Άγνωστο                                                                                                                         |
| 2  | 25.06                | 377                       |          | -                                                                                                                                                                                                    |  <p>Άγλυκο της<br/>ελευρωπαΐνης</p>          |
| 3  | 26.17                | 577                       | 269      | -                                                                                                                                                                                                    |  <p>7-Ο-ρουτινοζίτης της<br/>απιγενίνης</p> |
| 4  | 27,71                | 431                       | 269      | 12.93 (s, OH-5), 7.89 (d, J=8.84Hz, H-2', H-6'), 6.98 (d, J=8.79Hz, H-3', H-5'), 6.74 (d, J=1.87Hz, H-3), 6.63 (s, H-8), 6.44 (d, J=2.19Hz, H-6), 5.05 (d, J=7.40Hz, H-1''), 3.4-4.3 (sugar protons) |  <p>7-Ο-γλυκοζίτης της<br/>απιγενίνης</p>  |
| 5  | 29,09                | 321                       | 173      | 7.61 (d, J=16,30Hz, H-7), 7.46 (m, H-2, H-5, 6), 6.24 (m, H-3, H-4, H-5), 6.41 (d, J=16.21Hz, H-8), 4.5 (dd, H-3'), 4.02 (m, H-5'), 3.63 (m, H-4')                                                   |  <p>3-Ο-κινναμοϋλκουινικό<br/>οξύ</p>      |
| 6  | 34,13                | 285                       |          | 12.94 (s, OH-5), 7.42 (d, J=2.2Hz, H-2'), 7.41 (d, J=2.2Hz, H-6'), 6.95 (d, J=8.52Hz, H-5'), 6.55 (s, H-3), 6.48 (s, H-8), 6.22 (s, H-6)                                                             |  <p>Λουτεολίνη</p>                         |

|   |       |     |                                                                                                                              |                                                                                                  |
|---|-------|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 7 | 36.73 | -   | -                                                                                                                            | Άγνωστο                                                                                          |
| 8 | 37,80 | 269 | 13 (s, OH-5), 7.91 (d, J=9.1Hz, H-2',H-6'),<br>7.02 (d, J=8.29Hz, H-3',H-5'), 6.67 (s, H-3),<br>6.64 (s, H-8), 6.29 (s, H-6) | <br>Απιγενίνη |

Από το χρωματογραφικό προφίλ των εκχυλισμάτων παρατηρείται ότι τα συγκεκριμένα δείγματα είναι κυρίως πλούσια σε φλαβονοειδή και βάση τα αποτελέσματα από την ανάλυση με LC-SPE-NMR και LC-MS χαρακτηρίστηκαν οι περισσότερες ενώσεις. Αξίζει να τονιστεί ότι οι ενώσεις 6,8 δι-C- γλυκοζίτης της απιγενίνης, 7-O- ρουτινοζίτης της απιγενίνης, παράγωγα της κερκετίνης και το 3-O- κινναμοϋλκουινικό οξύ για πρώτη φορά αναφέρονται ως συστατικά φύλλων του φυτού του *Ligustrum lucidum* (apigenin 6,8-di-C-glucoside, apigenin-7-O-rutinoside, quercetin derivative, cinnamoylquinic acid).

Τα φλαβονοειδή που απαντούν στα φύλλα *Ligustrum lucidum* είναι κυρίως φλαβόνες σε ελεύθερη και σε γλυκοζυλιωμένη μορφή και συγκεκριμένα παράγωγα της απιγενίνης και της λουτεολίνης. Γενικά, η συνδυαστική τεχνική LC-NMR και LC-MS<sup>n</sup> είναι ένα πολύτιμο εργαλείο για την γρήγορη και αξιόπιστη ανάλυση φυτικών εκχυλισμάτων με βιολογικό και φαρμακευτικό ενδιαφέρον.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5**

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΟΛΙΚΩΝ  
ΦΑΙΝΟΛΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ NMR <sup>1</sup>H Ή ΜΙΑΣ  
ΔΙΑΣΤΑΣΗΣ ΣΕ ΦΥΤΙΚΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ**

## 5.1 Εισαγωγή

Η εκτίμηση εκχυλισμάτων φυσικών προϊόντων σε ολικές φαινόλες είναι από τους πιο συνήθεις και χρήσιμους προσδιορισμούς για την αξιολόγηση ενός υλικού ως προς τον αντιοξειδωτικό του χαρακτήρα. Τέτοιου τύπου μελέτες, σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, είναι ηλεκτροχημικές (Kong *et al.*, 2001; Sheev *et al.*, 2004; Dejmekova *et al.*, 2009;), φασματοφωτομετρικές (Doka *et al.*, 2004; Zahri *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008; Papoti *et al.*, 2009) και ενζυμικές (Stevanato *et al.*, 2004; Girelli *et al.*, 2009). Ωστόσο η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την εκτίμηση του φαινολικού περιεχομένου στα φυτικά εκχυλίσματα είναι η χρωματομετρική δοκιμή Folin-Ciocalteu (F-C) παρά τα γνωστά της μειονεκτήματα (Singleton *et al.*, 1999). Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στον αναγωγικό χαρακτήρα των φαινολικών ενώσεων. Άλλη απλή μέθοδος που να στηρίζεται σε κάποια γενική φυσική ή χημική ιδιότητα των φαινολικών ενώσεων δεν έχει αξιοποιηθεί μέχρι τώρα.

Η φασματοσκοπία NMR  $^1\text{H}$  αποκτά ολοένα και μεγαλύτερο ενδιαφέρον στην ανάλυση φυτικών εκχυλισμάτων χωρίς προηγούμενο διαχωρισμό (Gerothanassis *et al.*, 1998; Exarchou *et al.*, 2001; Exarchou *et al.*, 2002a; Caligiani *et al.*, 2007; Tatsis *et al.*, 2008; Christophoridou & Dais 2009; Kontogianni *et al.*, 2009; Hatzakis *et al.*, 2010; Charisiadis *et al.*, 2010). Η σημασία της φασματοσκοπίας NMR  $^1\text{H}$  αναγνωρίζεται ολοένα και περισσότερο από τους επιστήμονες εξαιτίας της ταχύτητας και της ευαισθησίας της για ευρείες κατηγορίες συστατικών με τη χρήση μίας μόνο μέτρησης χωρίς προηγούμενη επεξεργασία.

Όλα τα παραπάνω, οδήγησαν στην προσπάθεια αντικατάστασης της χρωματομετρικής δοκιμής Folin-Ciocalteu από μία πιο εύχρηστη και αξιόπιστη διαδικασία βασιζόμενη στην περιοχή απορρόφησης των ομάδων  $-\text{OH}$  με φασματοσκοπία NMR- $^1\text{H}$  μιας διάστασης. Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν πειράματα προσδιορισμού των ολικών φαινολών σε πρότυπες ενώσεις και μίγματα αυτών και στη συνέχεια η μέθοδος εφαρμόστηκε σε φυτικά εκχυλίσματα. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν με την εφαρμογή μεθοδολογιών NMR εξετάστηκαν συγκριτικά με εκείνα που προέκυψαν από τον χρωματομετρικό προσδιορισμό με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu.

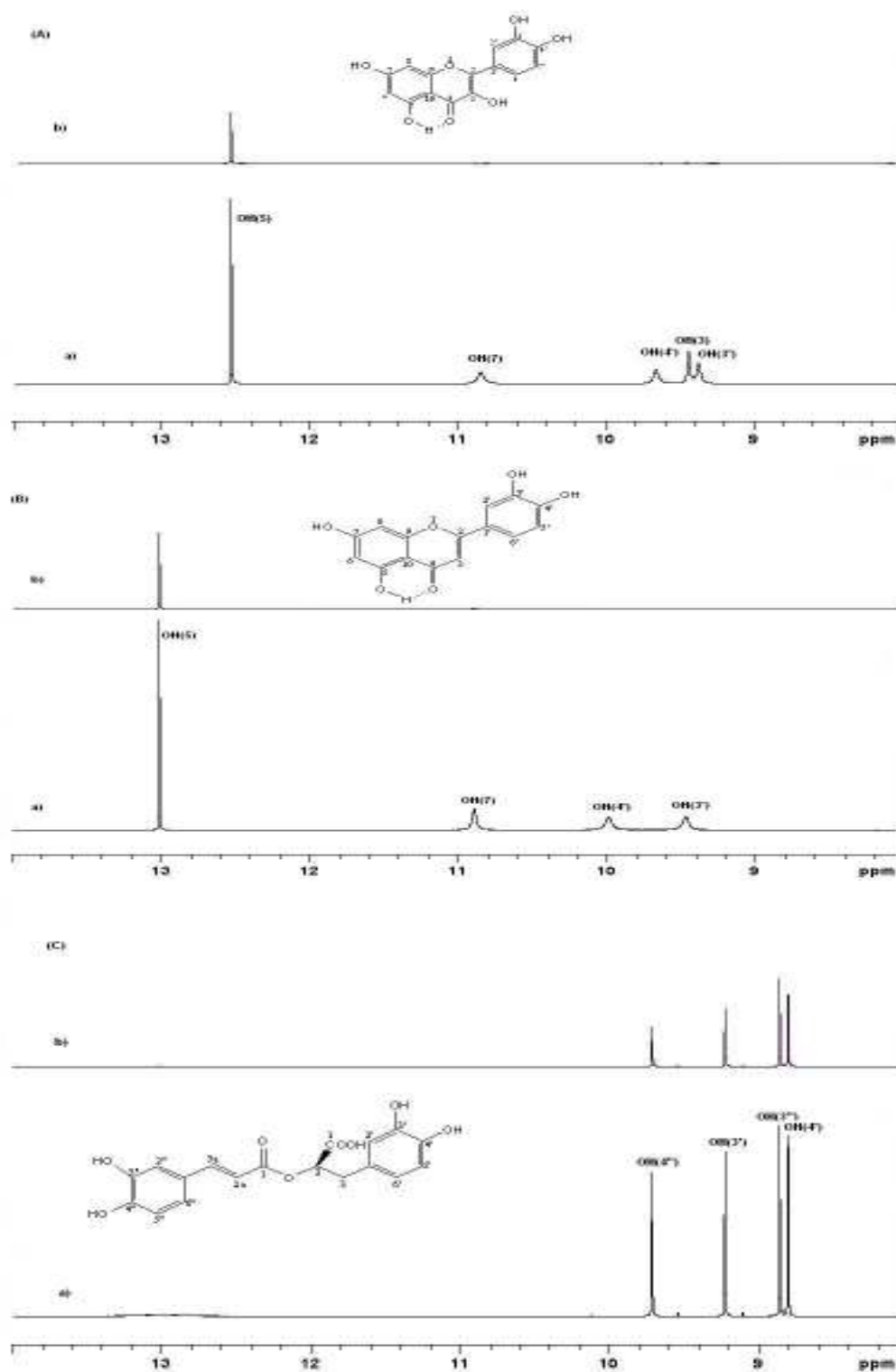
## 5.2 Προσδιορισμός ολικών φαινολικών σε πρότυπες ενώσεις φαινολικών οξέων και φλαβονοειδών με τη χρήση φασματοσκοπίας NMR $^1\text{H}$

Όπως προαναφέρθηκε, μια από τις σημαντικότερες τάξεις φυσικών προϊόντων είναι οι φαινολικού τύπου ενώσεις με ομάδες  $-\text{OH}$  στο μόριό τους. Χαρακτηριστικοί εκπρόσωποι αυτών των ενώσεων είναι τα φαινολικά οξέα και τα φλαβονοειδή που υπάρχουν σε φυτικά εκχυλίσματα.

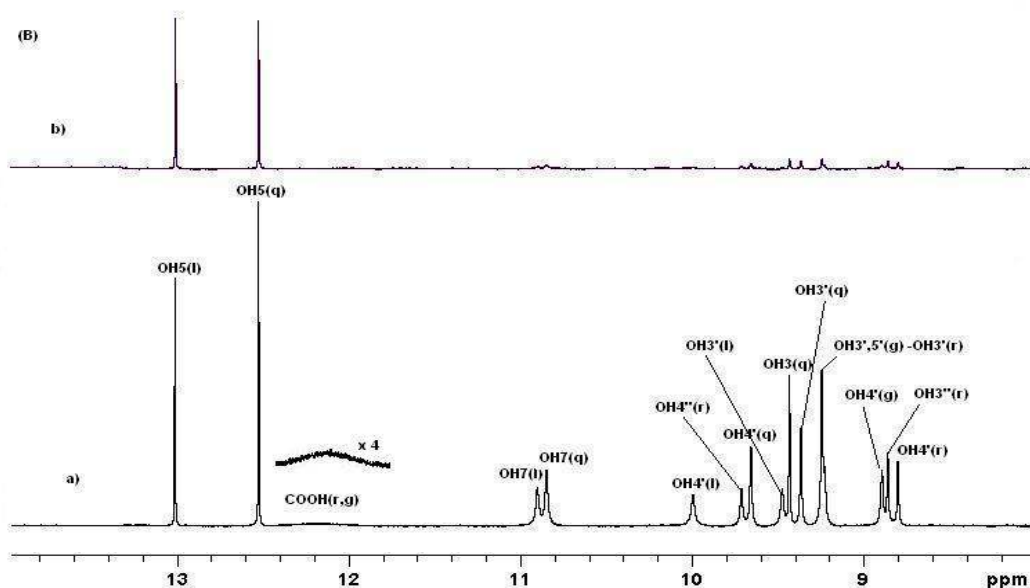
Για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολών, επιλέχθηκαν από την κατηγορία των φαινολικών οξέων το γαλλικό και το ροσμαρινικό οξύ και από την κατηγορία των φλαβονοειδών η κερκετίνη, η λουτεολίνη και ο 7-*O*-γλυκοζίτης της λουτεολίνης και πραγματοποιήθηκε λήψη φασμάτων NMR  $^1\text{H}$  σε διαλύτη  $\text{DMSO}-d_6$ . Η χρήση  $\text{DMSO}-d_6$  ως απρωτικού και μεγάλης διηλεκτρικής σταθεράς διαλύτη επιτρέπει την παρατήρηση των ευκίνητων υδροξυλικών πρωτονίων ακόμη και σε θερμοκρασία δωματίου. Το φαινόμενο αυτό της μείωσης του εύρους των κορυφών οφείλεται στην μείωση της ταχύτητας ανταλλαγής πρωτονίων, λόγω επιδιαλύτωσης των ομάδων  $-\text{OH}$  με τα πρωτόνια του διαλύτη.

Το φάσμα NMR  $^1\text{H}$  των φλαβονοειδών δείχνει την παρουσία χαρακτηριστικά αποπροστατευμένων σημάτων συντονισμού ( $\Delta\nu < 3\text{Hz}$ ) στην περιοχή φάσματος 12-13.5 ppm. Τα σήματα σε αυτή την περιοχή αποδίδονται στο υδροξυλικό πρωτόνιο  $\text{OH}(5)$  των φλαβονοειδών που συμμετέχει σε ισχυρό ενδομοριακό δεσμό υδρογόνου με το καρβονυλικό οξυγόνο στη θέση 4 του δακτυλίου C (Exarchou *et al.*, 2002b). Επιπρόσθετα, τα σήματα συντονισμού των άλλων  $-\text{OH}$  ομάδων των φαινολικών ενώσεων εμφανίζονται σχετικώς διευρυμένα σε θερμοκρασία δωματίου εξαιτίας της ανταλλαγής των υδροξυλικών πρωτονίων με αυτά του  $\text{H}_2\text{O}$  που περιέχεται σε διάλυμα με  $\text{DMSO}-d_6$  (Σχήμα 5.1 A(a); B(a); C(a) και Σχήμα 5.2 A(a)).

Η ακτινοβολήση του σήματος συντονισμού του  $\text{H}_2\text{O}$  κρίθηκε απαραίτητη εξαιτίας της μείωσης που προκαλεί στα σήματα συντονισμού των  $-\text{OH}$  ομάδων, τα οποία έτσι ξεχωρίζουν από σήματα συντονισμού άλλων πρωτονίων (π.χ. αλδεϋδικα) όσον αφορά πολύπλοκα δείγματα (Σχήμα 5.1 A(b); B(b); C(b) και Σχήμα 5.2 A(b)). Στα Σχήματα 5.1 και 5.2 παρουσιάζονται τα φάσματα NMR  $^1\text{H}$  του ροσμαρινικού οξέος, της κερκετίνης, της λουτεολίνης καθώς και του μίγματος γαλλικού και ροσμαρινικού οξέος, κερκετίνης και λουτεολίνης.

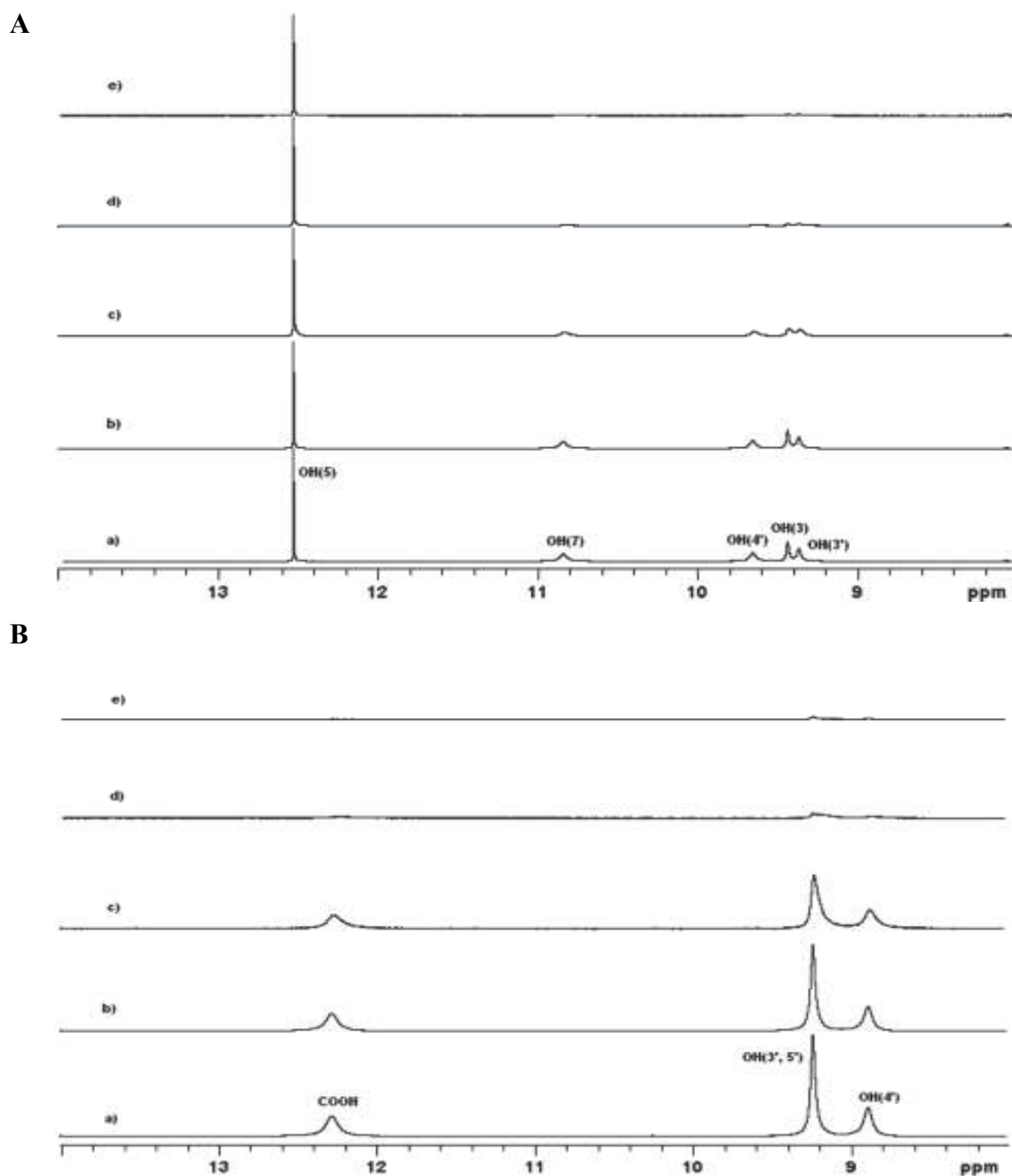


**Σχήμα 5.1.** Περιοχή απορρόφησης των πρωτονίων των ομάδων –OH και –COOH: (A) κερκετίνης (C= 20 mM), (B) λουτεολίνης (C= 4.66 mM) και (C) ροσμαρινικού οξέος (C= 5.55 mM) ( $T = 295$  K, αριθμός παλμών = 8, πειραματικός χρόνος = 54 sec): (a) πριν και (b) μετά την ακτινοβόληση του σήματος συντονισμού του H<sub>2</sub>O σε DMSO-*d*<sub>6</sub> (Nerantzaki *et al.*, 2011).



**Σχήμα 5.2.** Περιοχή απορρόφησης των πρωτονίων των ομάδων  $-OH$  και  $-COOH$  μίγματος ροσμαρινικού οξέος ( $C = 2.77 \text{ mM}$ ), γαλλικού οξέος ( $C = 2.94 \text{ mM}$ ), κερκετίνης ( $C = 2.95 \text{ mM}$ ) και λουτεολίνης ( $C = 2.33 \text{ mM}$ ) ( $T = 295 \text{ K}$ , αριθμός παλμών = 8, πειραματικός χρόνος = 54 sec): (a) πριν και (b) μετά την ακτινοβολήση του σήματος συντονισμού του  $H_2O$  σε  $DMSO-d_6$  (Nerantzaki *et al.*, 2011).

Για την καλύτερη κατανόηση της επίδρασης της ισχύος ακτινοβολήσης στην ένταση των σημάτων συντονισμού των φαινολικών πρωτονίων πραγματοποιήθηκε μία σειρά πειραμάτων τόσο σε φαινολικά οξέα όσο και σε φλαβονοειδή (Σχήμα 5.3). Όπως αναμενόταν, η ένταση των σημάτων συντονισμού των υδροξυλικών φαινολικών πρωτονίων μειώθηκε με την αύξηση της ισχύος της ακτινοβολήσης, η οποία κυμάνθηκε από 110 έως 60 db. Η ολοκλήρωση των σημάτων συντονισμού στην περιοχή του φάσματος 8-13.5 ppm, η ένταση των οποίων μερικώς ή ολικώς μειώθηκε λόγω της ακτινοβολήσης της απορρόφησης του νερού, δίνει την απευθείας μέτρηση των ολικών  $-OH$  και  $-COOH$  ομάδων. Στο Σχήμα 5.3 παρουσιάζεται η ένταση των σημάτων συντονισμού των  $-OH$  και  $-COOH$  πρωτονίων της κερκετίνης και του γαλλικού οξέος ως συνάρτηση της μεταβολής της ισχύος της ακτινοβολήσης.

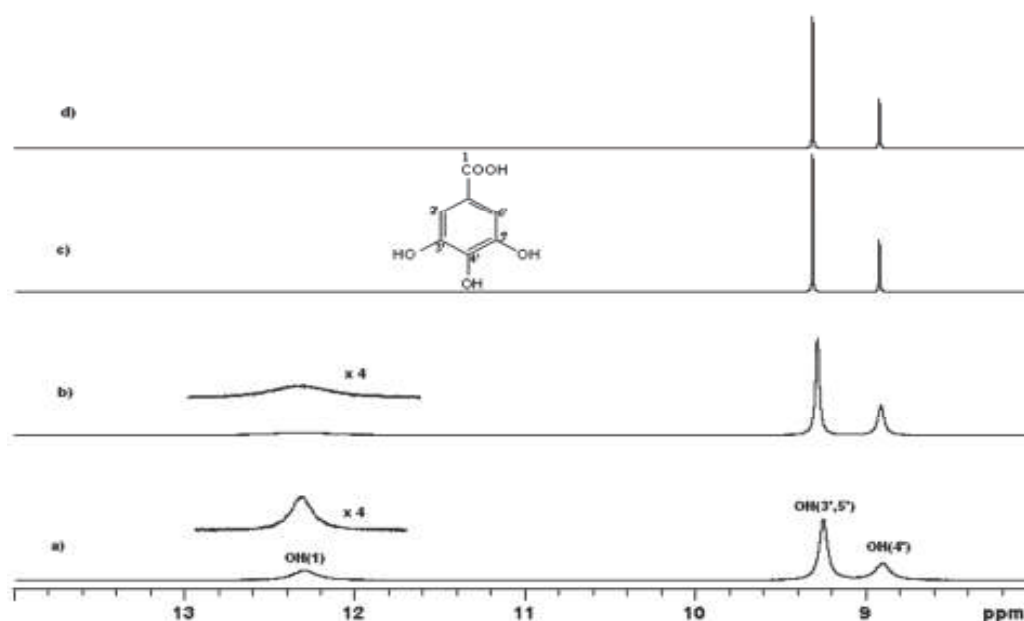


**Σχήμα 5.3.** Περιοχή απορρόφησης των πρωτονίων των ομάδων –OH και –COOH: (A) κερκετίνης ( $C = 20 \text{ mM}$ ) και του (B) γαλλικού οξέος ( $C = 11.76 \text{ mM}$ ) σε  $\text{DMSO-}d_6$  ( $T = 295 \text{ K}$ , αριθμός παλμών = 8, πειραματικός χρόνος = 54 sec): (a) πριν την ακτινοβόληση και (b) με ακτινοβόληση ισχύος παλμού  $p19 = 110 \text{ dB}$ , (c)  $p19 = 90 \text{ dB}$ , (d)  $p19 = 70 \text{ dB}$ , (e)  $p19 = 60 \text{ dB}$ .

Το σήμα συντονισμού της ομάδας –COOH εμφανίζεται, πάνω από τα 10 ppm, ως μία ευρεία κορυφή εξαιτίας της γρήγορης ανταλλαγής με τα πρωτόνια του νερού του διαλύτη. Σ' αυτή την περίπτωση η διάκριση μεταξύ υδροξυλικού πρωτονίου και καρβοξυλικού είναι δύσκολη και για να αποφευχθεί σφάλμα στην διαδικασία της

ολοκλήρωσης και, κατά συνέπεια, στην ποσοτικοποίηση των ολικών φαινολών θα πρέπει να γίνει διάκριση και ταυτοποίηση του σήματος συντονισμού της ομάδας –COOH. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση μιας νέας μεθόδου η οποία βασίζεται στην σταδιακή προσθήκη αυξανόμενης ποσότητας υδατικού διαλύματος KOH ή NaHCO<sub>3</sub>. Με μια αναλογία συγκεντρώσεων C<sub>(NaHCO<sub>3</sub>)</sub> ή KOH / C<sub>πρότυπης</sub> που κυμαίνεται από 1:100 έως 1:75 και από 1:100 έως 1:33 αντίστοιχα για το KOH και NaHCO<sub>3</sub> παρατηρείται ότι το σήμα συντονισμού του καρβοξυλικού πρωτονίου μειώνεται. Η προσθήκη NaHCO<sub>3</sub> προτιμάται σε σχέση με αυτή του KOH γιατί η αποτελεσματική αναλογία συγκεντρώσεων μεταξύ της πρότυπης ένωσης και του NaHCO<sub>3</sub> είναι μεγαλύτερη.

Στο Σχήμα 5.4 παρουσιάζεται το φάσμα NMR-<sup>1</sup>H της πρότυπης ένωσης του γαλλικού οξέος σε DMSO-*d*<sub>6</sub> με σταδιακή προσθήκη αυξανόμενης ποσότητας υδατικού διαλύματος NaHCO<sub>3</sub> (11.60 mM). Η προσθήκη του NaHCO<sub>3</sub> έχει ως αποτέλεσμα την εξαφάνιση του σήματος συντονισμού στα 12 ppm που αποδίδεται στο πρωτόνιο του καρβοξυλίου και αύξηση της διαχωριστικής ικανότητας (resolution) των φαινολικών –OH ομάδων.



**Σχήμα 5.4.** Περιοχή απορρόφησης των πρωτονίων των –OH ομάδων του γαλλικού οξέος (C= 11.76 mM) σε DMSO-*d*<sub>6</sub> (T= 295 K, number of scans = 8, experimental time = 54 sec) και η επίδραση αυξανόμενης ποσότητας NaHCO<sub>3</sub>: (a) πριν την προσθήκη NaHCO<sub>3</sub> και μετά την προσθήκη NaHCO<sub>3</sub> σε αναλογία C<sub>(gallic acid)</sub>/C<sub>(NaHCO<sub>3</sub>)</sub> = 100 (b), 50 (c), και 33 (d) αντίστοιχα.

### 5.3 Σύγκριση φασματοσκοπίας NMR $^1\text{H}$ με τη χρωματομετρική μέθοδο Folin-Ciocalteu (FC) για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολών

Ο προσδιορισμός των ολικών φαινολών με τη μέθοδο της πρωτονιακής φασματοσκοπίας NMR σε πρότυπες ενώσεις (κερκετίνη, λουτεολίνη, 7-Ο-γλυκοζίτη της λουτεολίνης, γαλλικό και ροσμαρινικό οξύ) και σε μίγμα αυτών, πραγματοποιήθηκε με την ολοκλήρωση των φαινολικών ομάδων  $-\text{OH}$ . Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με εκείνα που προέκυψαν από την ευρέως χρησιμοποιούμενη φωτομετρική δοκιμή με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu.

Για τη συσχέτιση των αποτελεσμάτων των δύο μεθόδων απαραίτητη προϋπόθεση είναι η έκφραση αυτών στις ίδιες μονάδες μέτρησης. Τα αποτελέσματα από τη μέθοδο F-C αναφέρονται ως ισοδύναμα καφεϊκού οξέος και εκφράστηκαν ως mg CAE/g ενώ αυτά της μεθόδου NMR  $^1\text{H}$  σε mg/g. Επομένως, είναι αναγκαία η μετατροπή των αποτελεσμάτων της μεθόδου F-C σε moles/g. Αυτό πραγματοποιήθηκε διαιρώντας το συνολικό αριθμό των moles των φαινολικών υδροξυλίων που προέκυψαν από τη μέθοδο F-C (αναφέρονται σε ένα υδροξύλιο) με τον αριθμό των υδροξυλίων της ένωσης που χρησιμοποιήθηκε ως ισοδύναμο (στην παρούσα μελέτη είναι δύο, λόγω έκφρασης σε καφεϊκό οξύ το οποίο έχει δύο  $-\text{OH}$  ομάδες). Το όριο ανίχνευσης (LOD) ( $S/N = 3$ ) για το μίγμα προτύπων βρέθηκε 0.17 mgCAE/g μίγματος. Για τις πρότυπες ενώσεις καφεϊκό οξύ, κερκετίνη, λουτεολίνη, γαλλικό οξύ και ροσμαρινικό οξύ το όριο ανίχνευσης υπολογίσθηκε ότι είναι 0.38, 0.70, 0.30, 0.17 και 0.37 mgCAE/g πρότυπης αντίστοιχα.

Στον Πίνακα 5.1 που ακολουθεί παρουσιάζονται τα αποτελέσματα προσδιορισμού των ολικών φαινολών όπως προέκυψαν από τις δύο μεθοδολογίες που χρησιμοποιήθηκαν.

**Πίνακας 5.1.** Προσδιορισμός των ολικών φαινολών με τη χρήση του αντιδραστηρίου FC και NMR-<sup>1</sup>H

| Δείγμα                         | Ολικά φαινολικά / mg g <sup>-1</sup> CAE |                                  |
|--------------------------------|------------------------------------------|----------------------------------|
|                                | FC <sup>a</sup>                          | NMR- <sup>1</sup> H <sup>b</sup> |
| Κερκετίνη                      | 1290±30                                  | 1343                             |
| Λουτεολίνη                     | 1260±20                                  | 1360                             |
| Γαλλικό οξύ                    | 1081±37                                  | 1559                             |
| Ροσμαρινικό οξύ                | 980±60                                   | 1068                             |
| 7-O γλυκοζίτης της λουτεολίνης | 514±28                                   | 591                              |
| Μίγμα                          | 1111±45                                  | 1174                             |

<sup>a</sup> P = 0.95, n = 3    <sup>b</sup> % rsd = 2%, n = 3

Τα διαφορετικά αποτελέσματα που προέκυψαν για το γαλλικό οξύ μπορούν να ερμηνευθούν λόγω της μείωσης των δραστικών/αντιδρώντων ομάδων. Σύμφωνα με τους Singleton *et al.*, 1999, από τα τρία φαινολικά υδροξύλια του γαλλικού οξέος τα δύο είναι δραστικές/αντιδρώσες ομάδες με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu και για την περίπτωση της κερκετίνης από πέντε φαινολικά υδροξύλια οι δραστικές/αντιδρώσες ομάδες είναι 3+. Σε αντίθεση, συνεπώς, με την μέθοδο F-C με την οποία προσδιορίζονται τα δραστικά ολικά φαινολικά υδροξύλια, η μεθοδολογία NMR <sup>1</sup>H προσδιορίζει όλα τα φαινολικά υδροξύλια, το οποίο αποτελεί ένα επιπρόσθετο πλεονέκτημα της μεθόδου. Συμπερασματικά, σύμφωνα με τα αποτελέσματα των δύο μεθόδων μπορεί να οριστεί ένας πειραματικός παράγοντας δραστικότητας  $A_e$ , σύμφωνα με την εξίσωση (1).

$$A_e = (TP_{NMR}) \times (TP_{FC})^{-1} = (TP_h) \times (T_{RP})^{-1} \quad (1)$$

όπου  $TP_{NMR}$  είναι η τιμή των ολικών φαινολικών σύμφωνα με τη μέθοδο NMR <sup>1</sup>H,  $TP_{FC}$  είναι η τιμή που προκύπτει χρησιμοποιώντας τη μέθοδο FC,  $TP_h$  τα ολικά φαινολικά υδροξύλια και  $T_{RP}$  τα ολικά δραστικά/αντιδρώντα φαινολικά υδροξύλια.

Η τιμή  $A_e$  είναι δείκτης δραστικότητας ενός συστατικού. Πιο συγκεκριμένα, για  $A_e > 1$  ο αριθμός των δραστικών υδροξυλομάδων είναι μικρότερος από τις ολικές υδροξυλικές ομάδες που έχει ένα συστατικό. Επιπλέον, ο παράγοντας  $TP_h$  μπορεί να προσδιοριστεί από την προτεινόμενη μέθοδο NMR <sup>1</sup>H εφόσον μπορούν να υπολογιστούν τα moles του συστατικού που μελετώνται. Το κλάσμα των moles των

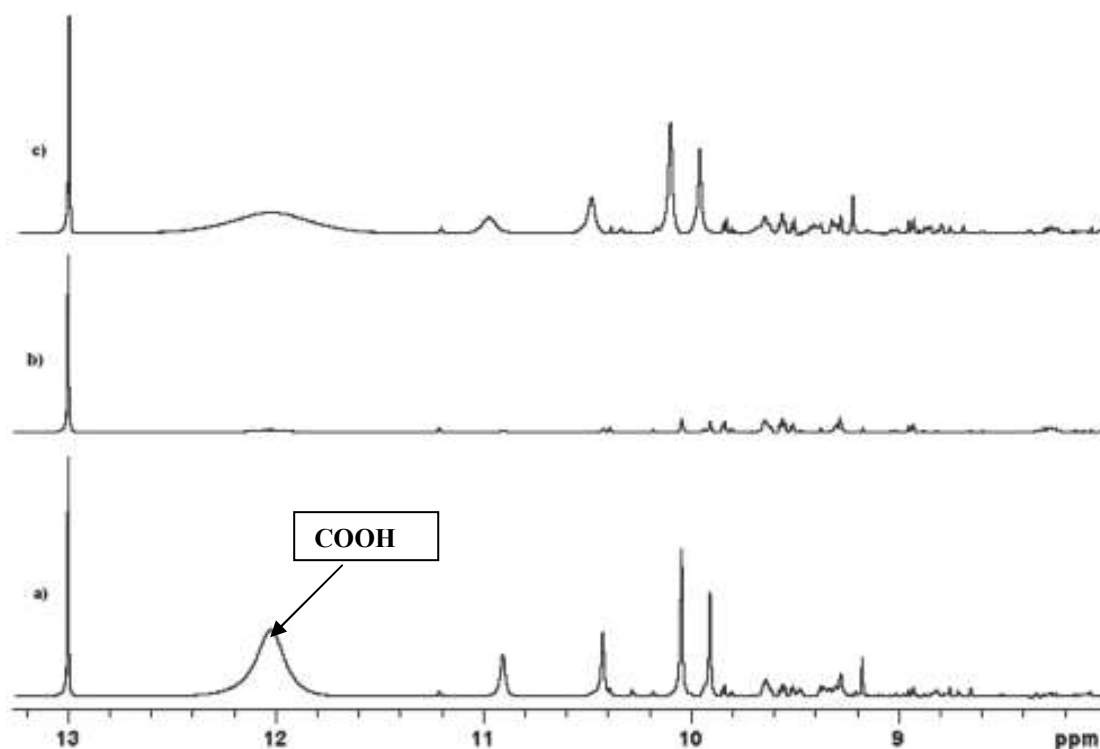
ολικών φαινολών προς τα moles του συστατικού δείχνει τον αριθμό των ολικών φαινολικών υδροξυλομάδων. Εφαρμογή της εξίσωσης (1) επιτρέπει τον προσδιορισμό της σχετικής δραστηρότητας των φαινολικών υδροξυλομάδων. Για παράδειγμα, με εφαρμογή της εξίσωσης (1) στο γαλλικό οξύ προκύπτει η τιμή  $A_e = 1.44$ . Η πειραματική τιμή χρησιμοποιώντας τη μέθοδο NMR  $^1\text{H}$  των ολικών φαινολικών υδροξυλίων είναι  $TP_h = 2.94$  και επομένως οι δραστικές/αντιδρώσες ομάδες υπολογίζονται ότι είναι  $TRP = 2.94 \times 1.44^{-1} = 2.04$ . Η τιμή αυτή είναι σε εξαιρετική συμφωνία με αυτή των Singleton *et al.*, 1999. Συνεπώς, η τιμή του πειραματικού παράγοντα  $A_e$  επιτρέπει τον προσδιορισμό της ικανότητας των υδροξυλίων ενός υποστρώματος να συμμετέχουν στην αντίδραση με το αντιδραστήριο της FC.

#### 5.4 Εφαρμογή της μεθόδου NMR $^1\text{H}$ σε ακατέργαστα (crude) φυτικά εκχυλίσματα

Η μέθοδος NMR  $^1\text{H}$  εφαρμόστηκε και στην περίπτωση των φυτικών εκχυλισμάτων για τον προσδιορισμό του περιεχομένου τους σε φαινολικές ενώσεις. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκαν το ακετονικό εκχύλισμα ρίγανης, τα εκχυλίσματα σε οξικό αιθυλεστέρα φασκόμηλου, δεντρολίβανου, *L. Lucidum* και επιπλέον το μεθανολικό και υδατικό του *L. Lucidum*.

Στο Σχήμα 5.5 που ακολουθεί απεικονίζεται η επίδραση της ακτινοβολίας του σήματος συντονισμού του  $\text{H}_2\text{O}$  και της προσθήκης συγκεκριμένης ποσότητας  $\text{NaHCO}_3$  στην περιοχή απορρόφησης των φαινολικών ομάδων  $-\text{OH}$  και  $-\text{COOH}$  εκχυλίσματος του οξικού αιθυλεστέρα του *L. Lucidum*. Το σήμα συντονισμού στα 13 ppm, όπως είναι γνωστό αποδίδεται στο πρωτόνιο της  $-\text{OH}(5)$  που συμμετέχει σε ισχυρό ενδομοριακό δεσμό υδρογόνου με το καρβονυλικό οξυγόνο στη θέση 4 του δακτυλίου C (Exarchou *et al.* 2002a; Exarchou *et al.* 2002b). Τα υπόλοιπα σήματα είναι επίσης εν δυνάμει απορροφήσεις των φαινολικών ομάδων  $-\text{OH}$ . Στο Σχήμα 5.5(b) παρατηρείται ότι με ισχύ παλμού  $p19 = 60 \text{ db}$  προκαλείται ελάττωση ή και εξαφάνιση κορυφών, οι οποίες αποδίδονται σε σήματα συντονισμού των ομάδων  $-\text{OH}$ . Ωστόσο, παρόμοια μείωση προκαλείται και στο σήμα συντονισμού της ευρείας απορρόφησης στα 12 ppm η οποία αποδίδεται στην ομάδα  $-\text{COOH}$ . Γι' αυτό το λόγο, η εκτέλεση επιπλέον πειραμάτων με προσθήκη μικρής ποσότητας  $\text{NaHCO}_3$  κρίθηκε

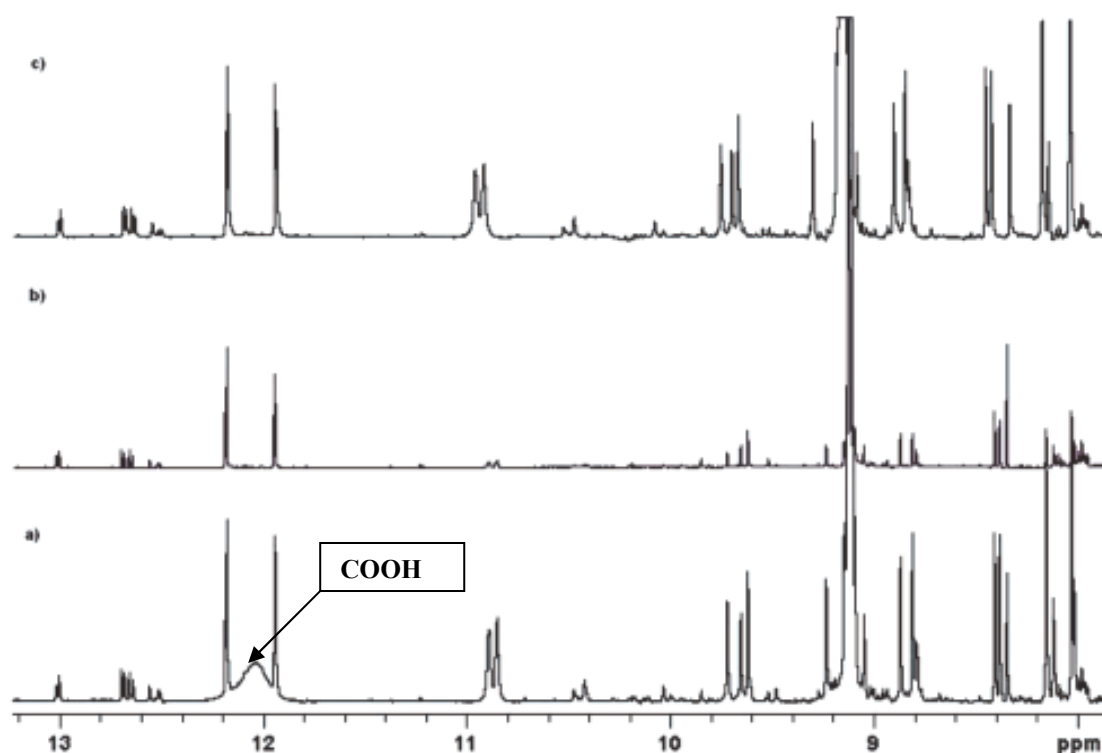
απαραίτητη. Από το Σχήμα 5.5(c) φαίνεται ότι η αντίδραση του  $\text{NaHCO}_3$  με το  $\text{COOH}$  προκάλεσε μία σημαντική διεύρυνση στο σήμα συντονισμού του οξέος. Διεύρυνση ωστόσο παρατηρήθηκε και στις υπόλοιπες κορυφές, που αποδίδεται στη μεταβολή του pH του διαλύματος, η οποία όμως δεν επηρεάζει την περαιτέρω ολοκλήρωση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των ολικών φαινολών.



**Σχήμα 5.5.** Περιοχή απορρόφησης των πρωτονίων των ομάδων  $-\text{OH}$  και  $-\text{COOH}$  εκχυλίσματος οξικού αιθυλεστέρα του *Ligustrum lucidum* ( $T = 295 \text{ K}$ , αριθμός παλμών = 1024, πειραματικός χρόνος = 1 h 57 sec) σε: (a)  $\text{DMSO}-d_6$ , (b) το ίδιο διάλυμα μετά την ακτινοβόληση του σήματος συντονισμού του  $\text{H}_2\text{O}$  και (c) με την προσθήκη  $5.7 \mu\text{L NaHCO}_3$ ,  $11.90 \text{ mM}$  (Nerantzaki *et al.*, 2011).

Συμπερασματικά, όπως και στην περίπτωση των πρότυπων ενώσεων, η ακτινοβόληση του σήματος συντονισμού του  $\text{H}_2\text{O}$  προκαλεί μείωση στα σήματα συντονισμού των φαινολικών ομάδων  $-\text{OH}$  και στα ακατέργαστα φυτικά εκχυλίσματα. Με την ολοκλήρωση των κορυφών του φάσματος πάνω από τα  $8 \text{ ppm}$  που είτε εξαφανίζονται είτε μειώνονται επιτυγχάνεται ο απευθείας προσδιορισμός των ομάδων  $-\text{OH}$  υπό την προϋπόθεση της αφαίρεσης του σήματος συντονισμού του  $-\text{COOH}$ .

Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και για τα υπόλοιπα εκχυλίσματα. Η παρασκευή αραιωμένων διαλυμάτων ακατέργαστων εκχυλισμάτων σε διαλύτη DMSO- $d_6$  σε συνδυασμό με τη χρήση υποδοχέα κρυογενικής τεχνολογίας (που επιφέρει σημαντική αύξηση της ευαισθησίας), η τεχνική της ακτινοβολήσης του σήματος συντονισμού του  $H_2O$  του διαλύτη καθώς και η προσθήκη  $NaHCO_3$  είχαν ως αποτέλεσμα τη λήψη φασμάτων με εξαιρετική διακριτική ικανότητα (Σχήμα 5.6)



**Σχήμα 5.6.** Περιοχή απορρόφησης των πρωτονίων των ομάδων  $-OH$  και  $-COOH$  του ακετονικού εκχυλίσματος ελληνικής ρίγανης ( $T = 295$  K, αριθμός παλμών = 1024, πειραματικός χρόνος = 1 h 57 sec) σε: (a) DMSO- $d_6$  (b) το ίδιο διάλυμα μετά την επίδραση ακτινοβολήσης στο σήμα συντονισμού του  $H_2O$  και (c) με την προσθήκη 6  $\mu L$   $NaHCO_3$ , 1.19 mM (Nerantzaki *et al.*, 2011).

Συγκρίνοντας τα Σχήματα 5.5 και 5.6 παρατηρείται ότι η προσθήκη  $NaHCO_3$  στο ακετονικό εκχύλισμα της ελληνικής ρίγανης δεν προκάλεσε διεύρυνση στα σήματα συντονισμού των ομάδων  $-OH$  σε σχέση με το εκχύλισμα του *Ligustrum lucidum*. Αυτό εξηγείται, γιατί η ποσότητα του  $NaHCO_3$  που προστέθηκε στο ακετονικό εκχύλισμα ρίγανης είχε πολύ μικρότερη συγκέντρωση από αυτή που προστέθηκε στο εκχύλισμα *Ligustrum lucidum*, με αποτέλεσμα μικρότερη μεταβολή του pH του διαλύματος.

Όσον αφορά την επίδραση της μήτρας του υποστρώματος (matrix effect) στον προσδιορισμό των ολικών φαινολών, με τη μέθοδο FC, πραγματοποιήθηκαν πειράματα σταθερής προσθήκης (standard addition method) με σκοπό τη μείωσή της. Στον Πίνακα 5.2 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα αυτής της μεθόδου στα φυτικά εκχυλίσματα που μελετήθηκαν. Για το μεθανολικό και υδατικό εκχύλισμα του *Ligustrum lucidum* οι τιμές της σχετικής ανάκτησης χρησιμοποιώντας τη μέθοδο FC υπολογίστηκαν σε 153% και 146% αντίστοιχα, ενώ με τη μέθοδο NMR  $^1\text{H}$  ήταν 100% για το μεθανολικό. Για τα εκχυλίσματα της ρίγανης, του φασκόμηλου, του δεντρολίβανου αλλά και αυτό του οξικού αιθυλεστέρα του *Ligustrum lucidum* οι ανακτήσεις με τη μέθοδο FC υπολογίστηκαν 107%, 124%, 122% και 110% αντίστοιχα. Η τιμή των ολικών φαινολών του φασκόμηλου και του *Ligustrum lucidum* με τη μέθοδο FC ήταν μεγαλύτερη από αυτή με τη μέθοδο NMR  $^1\text{H}$  ακόμη και μετά τη διόρθωση σύμφωνα με τις υπολογιζόμενες σχετικές ανακτήσεις. Οι παρεμποδιστές της FC μεθόδου είναι τριών τύπων ανασταλτικοί, προσθετικοί και αυξητικοί με αποτέλεσμα οι υψηλές τιμές των εκχυλισμάτων να προέρχονται από πιθανή αυξητική επίδραση διαφόρων συστατικών (π.χ ασκορβικό οξύ). Η υψηλή ανάκτηση του μεθανολικού και υδατικού εκχυλίσματος του *Ligustrum lucidum* μπορεί επίσης να αποδοθεί στην προσθετική επίδραση διαφόρων συστατικών όπως για παράδειγμα των σακχάρων (Wang *et al.*, 2003). Οι διαφορετικοί τρόποι εκχύλισης φαίνεται επίσης να επηρεάζουν την ποσότητα των σακχάρων στα εκχυλίσματα, τα οποία πιθανόν να αντιδρούν με το αντιδραστήριο FC και να δίνουν υψηλότερες τιμές ολικών φαινολών σε σχέση με αυτές που προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο NMR  $^1\text{H}$ . Σύμφωνα με τους Chen *et al.*, 2005 το φυτό *Ligustrum lucidum* περιέχει σημαντικές ποσότητες σακχάρων. Για τα υπόλοιπα εκχυλίσματα οι διορθωμένες τιμές της FC μεθόδου είναι μικρότερες από αυτές της μεθόδου NMR  $^1\text{H}$ . Αυτό μπορεί να αποδοθεί στην παρουσία συστατικών με μικρότερο αριθμό δραστικών/αντιδρώντων φαινολικών υδροξυλίων.

**Πίνακας 5.2.** Ολικά φαινολικά και παράγοντας δραστικότητας  $A_e$  όπως προσδιορίστηκαν στα φυτικά εκχυλίσματα με τη χρήση των μεθόδων FC και NMR- $^1H$ .

| Δείγμα                                             | Ολικά φαινολικά/ $mg\ g^{-1}$ CAE |                        | $A_{e_{\text{corr}}}$ <sup>c</sup> |
|----------------------------------------------------|-----------------------------------|------------------------|------------------------------------|
|                                                    | FC <sup>a</sup>                   | NMR $^1H$ <sup>b</sup> |                                    |
| Φασκόμηλο <sup>d</sup>                             | 82±8                              | 55                     | 0.83                               |
| Δεντρολίβανο <sup>d</sup>                          | 97±9                              | 135                    | 1.69                               |
| Ρίγανη                                             | 211±10                            | 274                    | 1.39                               |
| <i>L. lucidum</i><br>(MeOH εκχύλισμα)              | 61±4                              | 35                     | 0.88                               |
| <i>L. lucidum</i><br>(H <sub>2</sub> O εκχύλισμα). | 65±3                              | 15                     | 0.33                               |
| <i>L. lucidum</i> <sup>d</sup>                     | 98±8                              | 115                    | 1.29                               |

<sup>a</sup> (P = 0.95, n = 3)

<sup>b</sup> % rsd = 2%, n = 3

<sup>c</sup> Διορθωμένες τιμές FC όσον αφορά τις τιμές ανάκτησης

<sup>d</sup> Εκχυλίσματα οξικού αιθυλεστέρα

Συμπερασματικά, η χρήση της μεθοδολογίας NMR  $^1H$  αποτελεί μία εναλλακτική και πρωτότυπη αναλυτική τεχνική που επιτρέπει τον ακριβή προσδιορισμό των ολικών φαινολών σε οποιοδήποτε υπόστρωμα και παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα σε σύγκριση με την κλασική φωτομετρική μέθοδο F-C τα οποία συνοψίζονται παρακάτω. 1) Όσον αφορά την ποσοτικοποίηση αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί χωρίς καμπύλη αναφοράς. 2) Η προκατεργασία του δείγματος είναι ελάχιστη και καμία χημική αντίδραση δεν απαιτείται για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών, με εξαίρεση την εξουδετέρωση τυχόν οξέων που μπορεί να συνυπάρχουν στο υπό εξέταση δείγμα. 3) Η μέθοδος είναι γρήγορη, χρειάζονται ~10 λεπτά (τρία φάσματα του ενός λεπτού) για τη λήψη φάσματος ενός φλαβονοειδούς συγκέντρωσης ~1 mmol/L ενώ με τη μέθοδο F-C απαιτείται τουλάχιστον μία ώρα. Επιπλέον, με τη μέθοδο F-C προσδιορίζονται τα δραστικά ολικά φαινολικά υδροξύλια ενώ με τη μεθοδολογία NMR  $^1H$  προσδιορίζονται όλα τα φαινολικά υδροξύλια. Συνεπώς, η μέθοδος NMR  $^1H$  αποτελεί σημαντικό εργαλείο προσδιορισμού ολικών φαινολικών σε άγνωστα εκχυλίσματα, τρόφιμα αλλά και σε βιολογικά δείγματα.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Afanas'ev**, I.B.; Dcrozko, A.I.; Brodskii, A.V.; Kostyuk, V.A.; Potapovitch, A.I. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation *Biochem. Pharmacol.* **1989**, *38*, *11*, 1763-1769.
- Albert**, K., Kunst, M., Bayer, E., Spraul, M., Bermel, W. Reversed-phase high-performance liquid chromatography nuclear magnetic resonance on-line coupling with solvent non-excitation *J. Chromatogr. A*, **1989**, *463*, 355-363.
- Andersen**, Q. M.; Markham, K.R. Flavonoids, chemistry, biochemistry and applications. CRC Press Taylor & Francis Group: London, **2006**.
- Bakhtiar**, A.; Gleye, J.; Moulis, C.; Fouraste, I. Desorption chemical ionization mass spectrometry of C-glycosylflavones. *Phytochem. Anal.* **1994**, *5*, *2*, 86 - 89.
- Balasundram**, N., Sundram, K., Samman, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial byproducts, Antioxidant activity, occurrence, and potential uses *Food Chem.* **2006**, *99*, 191–203
- Benavente-García**, O.; Castello, J.; Morente, J.; Ortuno, A.; Del Rio, J. A. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chem.* **2000**, *68*, 457-462.
- Blahova**, E.; Jandera, P.; Cacciola, F.; Mondello, L. Two-dimensional and serial column reversed-phase separation of phenolic antioxidants on octadecyl-, polyethyleneglycol-, and pentafluorophenylpropyl-silica columns *J. Sep. Sci.*, **2006**, *29*, 555-556.
- Blekas**, G.; Psomiadou, E.; Tsimidou, M.; Boskou, D. On the importance of total polar phenols to monitor the stability of Greek virgin olive oil *Eur. J. Lipid Sci.* **2002**, *104*, 340–346.
- Bohm**, S.; Fiedler, P.; Exner, O. Analysis of the ortho effect, acidity of 2-substituted benzoic acids *New J. Chem.* **2004**, *28*, 67-74.
- Bors**, W.; Heller, W.; Michel, C.; Saran, M. Flavonoids as antioxidants, determination of radicalscavenging efficiencies. *Methods Enzymol.* **1990**, *186*, 343-355.
- 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.
- Boskou**, D. Sources of natural phenolic antioxidants *Trends Food Sci. Tech.* **2006** *17*, 505–512

- Botía, J. M.;** Ortuño, A.; Benavente-García, O.; Báidez, A.G.; Frías, J.; Marcos, D.; Del Río, J. A. Modulation of the biosynthesis of some phenolic compounds in *Olea europaea* L. fruits: their influence on olive oil quality *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 355-358
- Bouaziz, M.;** Sayadi, S. Isolation and evaluation of antioxidants from leaves of a Tunisian cultivar olive tree. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2005**, *107*, 497-504.
- Bringmann, G.;** Wohlfarth, M.; Rischer, H.; Heubes, M.; Saeb, W.; Diem, S.; Herderich, M.; Schlauer, A photometric screening method for dimeric naphthylisoquinoline alkaloids and complete on-line structural elucidation of a dimer in crude plant extracts, by the LC-MS/LC-NMR/LC-CD triad. *Anal. Chem.*, **2001**, *73 (11)*, 2571-2577.
- Burton, G.W.;** Doba, T.; Gabe, E.J.; Hughes, L.; Lee, F.L.; Prasad L.; Ingold, K.U. Autoxidation of biological molecules.4. Maximizing the antioxidant activity of phenols. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 7053-7065.
- Butler, M.S.** The role of natural product chemistry in drug discovery *J. Nat. Prod.*, **2004**, *67, 12*, 2141-2153
- Caligianni, A. ;** Acquotti, D. ; Palla, G. ; Bocchi, V. Identification and quantification of the main organic components of vinegars by high resolution <sup>1</sup>H NMR spectroscopy *Anal. Chim. Acta*, **2007**, *585*, 110.
- Cao, G.;** Alessio, H.M.; Cutler, R.G. Oxygen-Radical Absorbance Capacity Assay for antioxidants *Free Rad. Biol.Med.* **1993**, *14*, 303-311
- Cardoso, S.M.;** Guyot, S.; Marnet, N.; A Lopes-da-Silva, J.; Renard, C.MGC; Coimbra, M.A.; Characterisation of phenolic extracts from olive pulp and olive pomace by electrospray mass spectrometry *J. Sci. Food Agri* **2005** *85, 1*, 21 - 32
- Carluccio, M.A.;** Siculella, L.; Ancora, M.A.; Massaro, M.; Scoditti, E.; Storelli, C. Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of mediterranean diet phytochemicals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2003**, *23*, 622-629
- Carrasco-Pancorbo, A.;** Cerretani, L.; Bendini A.; Segura-Carretero A.; Gallina-Toschi, T.; Fernández-Gutiérrez, A. Analytical determination of polyphenols in olive oils. *J. Sep. Sci.* **2005**, *28*, 837-858.
- Caruso, D.;** Colombo, R.; Patelli, R.; Giavarini, F.; Galli, G. Rapid evaluation of phenolic component profile and analysis of oleuropein aglycon in olive oil by

atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry (APCI-MS), *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 1182–1185

**Catchpole**, O.J.; Grey, J.B.; Perry, N.B.; Burgess, E.J.; Redmond, W.A.; Porter, N.G. Extraction of cilli, black pepper and ginger with near-critical CO<sub>2</sub>, propane, and dimethyl ether: Analysis of the extracts by quantitative nuclear magnetic resonance. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 4853.

**Cayuela**, J. A.; Rada, M.; Rios, J.J.; Albi, T.; Guinda, A. Changes in phenolic composition induced by *Pseudomonas savastanoi* pv. *Savastanoi* infection in olive tree: presence of large amounts of verbascoside in nodules of tuberculosis disease *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, *54*, 15, 5363–5368

**Chang**, C.-C.; Yang, M.-H.; Wen, H.-M. Chern, J.-C. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J. Food Drug Anal.* **2002**, *10*, 3, 178-182.

**Chapman** J.R. *Practical Organic Mass Spectroscopy*, 2<sup>nd</sup> ed., **1993**, Willey, Chichester.

**Charisiadis** P.; Exarchou, V.; Troganis, A. N.; Gerothanassis, I. P. Exploring the “forgotten” –OH NMR spectral region in natural products *Chem. Commun.* **2010**, in press.

**Chatterjee**, S.; Niaz, Z.; Gautam, S.; Adhikari, S.; Variyara, P.S.; Sharma, A. Antioxidant activity of some phenolic constituents from green pepper (*Piper nigrum* L.) and fresh nutmeg mace (*Myristica fragrans*) *Food Chem* , **2007**, *101*, 2, 515-523

**Chen**, G.; Zhang, L.; Wu, X.; Ye, J. Determination of mannitol and three sugars in *Ligustrum lucidum* Ait. by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Anal. Chim. Acta* **2005**, *530*, 15 - 21.

**Cheyrier**, V. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *81*, 223S–9S.

**Choi**, C.W.; Kim, S.C.; Hwang, S.S.; Choi, B.K.; Ahn, H.J.; Lee, M.Y.; Park, S.H.; Kim, S.K. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Sci.* **2002**, *163*, 1161

**Christophoridou**, S.; Dais, P.; Tseng, L.H.; Spraul, M. Separation and identification of phenolic compounds in olive oil by coupling high performance liquid chromatography with postcolumn solid-phase extraction to nuclear magnetic

resonance spectroscopy (LC-SPE-NMR) *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, *53*, 4667-4679.

**Christophoridou, S.**; Dais, P. Novel approach to the detection and quantification of phenolic compounds in olive oil based on  $^{31}\text{P}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 656.

**Christophoridou, S.**; Dais, P. Detection and quantification of phenolic compounds in olive oil by high resolution  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy *Anal. Chim. Acta* **2009**, *633*, 283–292.

**Clarkson, C.**; Staerk, D.; Hansen, S.H.; Jaroszewski, J.W. Hyphenation of solid-phase extraction with liquid chromatography and nuclear magnetic resonance application of HPLC-DAD-SPE-NMR to identification of constituents of *Kanahia laniflora*. *Anal. Chem.*, **2005**, *77*, 3547-3553.

**Clifford, H.** Sources of natural antioxidants, Oilseeds, nuts, cereals, legumes, animal products and microbial sources. In antioxidants in food. Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M. (Eds), Woodhead Pbs. Ltd. Cambridge, UK, **2001**, Ch.3, pp. 160-166.

**Cos, P.**; Ying, L.; Calomme, M.; Hu, J.P.; Cimanga, K.; Van Poel, B.; Pieters, L.; Vlietinck, A.J.; Berghe, D.V. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 71-76.

**Cuvelier, M.E.**; Richard, H.; Berset, C. Comparison of the activity of some acid phenols, Structure-activity relationship. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1992**, *56*, 324-325.

**Cuvelier, M-E.**; Richard, H.; Berset, C. Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1996**, *73*, 645.

**Cuyckens, F.**; Rozenberg, R.; de Hoffmann, E.; Claeys, M. Structure characterization of flavonoid *O*-diglycosides by positive and negative nano-electrospray ionization ion trap mass spectrometry *J. Mass Spectrom.* **2001**, *36*, 1203–1210

**Cuyckens, F.** & Claeys, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *J. Mass Spectrom* **2004**, *39*, 1-15.

**Dachtler, M.**; Glaser, T.; Kohler, K.; Albert, K. Combined HPLC–MS and HPLC–NMR on-line coupling for the separation and determination of lutein and zeaxanthin stereoisomers in spinach and in retina. *Anal. Chem.*, **2001**, *73* (3), 667-674.

**Dalluge, J.J.**; Nelson, B. C.; Thomas, J. B.; Sander, L. C. Selection of column and

gradient elution system for the separation of catechins in green tea using high-performance liquid chromatography *J. Chromatogr.A*, **1998**, 793, 265 – 274.

**Damak**, N.; Bouaziz, M.; Ayadi, M.; Sayadi, S.; Damak, M. Effect of the Maturation Process on the Phenolic Fractions, Fatty Acids, and Antioxidant Activity of the Chétoui Olive Fruit Cultivar *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 1560–1566

**Degenhardt**, A.; Engelhardt, U. H.; Lakenbrink, C.; Winterhalter P. Preparative Separation of Polyphenols from Tea by High-Speed Countercurrent Chromatography *J. Agric. Food Chem.*, **2000a**, 48 (8),3425–3430

**Degenhardt**, A.; Engelhardt, U. H.; Wendt, A.-S.; Winterhalter, P. Isolation of Black Tea Pigments Using High-Speed Countercurrent Chromatography and Studies on Properties of Black Tea Polymers *J. Agric. Food Chem.*, **2000b**, 48 (11), 5200–5205

**Dejmkova**, H.; Scampicchio, M.; Zima, J.; Barek, J.; Mannino, S. Determination of Total Phenols in Foods by Boron Doped Diamond Electrode *Electroanal.* 2009, 21, 1014 – 1018.

**Ding**, S.; Dudley, E.; Plummer, S.; Tang, J.; Newton R.P.; Brenton, A.G. Fingerprint profile of *Ginkgo biloba* nutritional supplements by LC/ESI-MS/MS *Phytochemistry*, **2008** 69,7, 1555-1564

**Dóka**, O.; Bicanic, D. D.; Dicko, M. H.; Slingerland, M. A. Photoacoustic Approach to Direct Determination of the Total Phenolic Content in Red Sorghum Flours *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 2133–2136.

**Di Donna**, L.; Mazzotti, F.; Napoli, A.; Salerno, R.; Sajjad, A.; Sindona, G. Secondary metabolism of olive secoiridoids. New microcomponents detected in drupes by electrospray ionization and high-resolution tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, 21, 273-278.

**Dugas**, A.J.; Castaneda-Acosta, J.; Bonin, G.C.; Price, K.L.; Fischer, N.H.; Winston, G.W. Evaluation of the total peroxyl radical-scavenging capacity of flavonoids, structure–activity relationships. *J. Nat. Prod.* **2000**, 63, 327–331.

**Dziedzic**, S.Z.; Hudson, B.J.F. Phenolic acids and related compounds as antioxidants for edible oils. *Food Chem.* **1984**, 14, 45-51

**Emam** S. S.; Abd El-Moaty, H. I. Glucosinolates, Phenolic acids and Anthraquinones of *Isatis microcarpa* Boiss and *Pseuderucaria clavate* (Boiss&Reut.) family: *Cruciferae*. *J. Applied Sciences Research*, **2009**,5(12): 2315-2322

**Esti**, M.; Cinquanta, L.; La Notte, E. Phenolic Compounds in Different Olive

Varieties *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 32-35

**Exarchou**, V.; Troganis, A.; Gerothanassis, I.P. Identification and quantification of caffeic and rosmarinic acid in complex plant extracts by the use of variable-temperature two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 2.

**Exarchou**, V.; Nenadis, N.; Tsimidou, M.; Gerothanassis, I.P.; Troganis, A. and Boskou, D. Antioxidant activities and phenolic composition of extracts from Greek oregano, Greek sage and summer savory. *J. Agric. Food Chem.* **2002a**, *50*, 5294

**Exarchou**, V.; Troganis, A.; Gerothanassis, I.P. Do strong intramolecular hydrogen bonds persist in aqueous solution? Variable temperature gradient  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  GE-HSQC and GE-HMBC NMR studies of flavonols and flavones in organic and aqueous mixtures. *Tetrahedron*, **2002b**, *58*, 7423.

**Exarchou**, V.; Godejohann, M.; van Beek, T.A.; Gerothanassis, I.P.; Vervoort, J. LC-UV-solid-phase extraction-NMR-MS combined with cryogenic flow probe and its application to the identification of compounds present in Greek oregano. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 6288.

**Exarchou**, V.; Krucker, M.; van Beek, T.A.; Vervoort, J.; Gerothanassis, I.P.; Albert, K. LC-NMR coupling technology: recent advancements and applications in natural products analysis. *Magn. Reson. Chem.* **2005**, *43*, 681.

**Fan**, T. W.-M. Metabolite profiling by one- and two-dimensional NMR analysis of complex mixtures. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1996**, *28*, 161–219

**Fiamegos**, Y.C.; Konidari, C.N.; Stalikas, C.D. Cyanuric acid trace analysis by extractive methylation via phase-transfer catalysis and capillary gas chromatography coupled with flame thermoionic and mass-selective detection. Process parameter studies and kinetics. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 4034.

**Ferreres**, F.; Andrade, P.B.; Valentão, P.; Gil-Izquierdo, A. Further knowledge on barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves *O*-glycosyl-*C*-glycosyl flavones by liquid chromatography-UV diode-array detection-electrospray ionisation mass spectrometry *J. of Chromatogr A* **2008**, *1182*, *1*, 56-64

**Fiamegos**, Y.C.; Stalikas, C.D. Phase-transfer catalysis in analytical chemistry. *Anal. Chim. Acta*, **2005**, *550*, 1.

**Flamini**, R. Mass spectrometry in grape and wine chemistry. Part I: Polyphenols. *Mass Spec. Rev.* **2003**, *22*, 218.

- Le Gall, G.;** Colquhoun, I.J.; Defernez, M. Metabolite profiling using  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy for quality assessment of green tea, *Camellia sinensis* (L.). *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 692.
- Gao, D.;** Li, Q.; Li, Y.; Liu, Z.; Fan, Y.; Liu, Z.; Zhao, H.; Li, J.; Han, Z. Antidiabetic and antioxidant effects of oleanolic acid from *Ligustrum lucidum* Ait in alloxan-induced diabetic rats. *Phytother Res.* **2009**, *23*, (9), 1257-62
- Gerothanassis, I.P.;** Exarchou, V.; Lagouri, V.; Trogannis, A.; Tsimidou, M.; Boskou, D. Methodology for identification of phenolic acids in complex phenolic mixtures by high-resolution two-dimensional nuclear magnetic resonance. Application to methanolic extracts of two *Oregano* species. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 4185.
- Gil-Izquierdo, A.;** Riquelme, M.T.; Porras, I.; Ferreres, F. Effect of the Rootstock and Interstock Grafted in Lemon Tree (*Citrus limon* (L.) Burm.) on the Flavonoid Content of Lemon Juice *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, *52*, 2, 324–331
- Girelli, A.M.;** Giuliani, T.; Mattei, E.; Papaleo, D. Determination of an Antioxidant Capacity Index by Immobilized Tyrosinase Bioreactor *J. Agric. Food Chem.*, **2009**, *57* (12), 5178–5186
- Gordon H.M.;** Paiva-Martins F.; Almeida M. Antioxidant activity of hydroxytyrosol acetate compared with that of other olive oil polyphenols. *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, *49*, 2480-2485.
- Goulas, V.;** Exarchou, V.; Troganis, A.N.; Psomiadou, E.; Fotsis, T.; Briasoulis, E.; Gerothanassis, I.P. Phytochemicals in olive-leaf extracts and their antiproliferative activity against cancer and endothelial cells *Mol. Nutr. Food Res.* **2009**, *53*, 600-608
- Gutfinger, T.** Polyphenols in Olive Oils. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society* **1981**, *58*, *11*, 966 – 968.
- Hansch, C.;** Leo, A.; Taft, R. W. A survey of Hammett substituent constants and resonance and field parameters. *Chem. Rev.* **1991**, *91*, 165-195.
- Harborne, J.B.** Plant phenolics. In *Methods in plant biochemistry*. Dey, P.M., Harborne, J.B., (Eds), Academic Press, London, **1989**, Ch.1, pp. 1-27.
- Harborne, J.** The handbook of natural flavonoids 1999, 1, 543, New York: Wiley.
- Harborne, J.B.;** Williams, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochem.* **2000** *55*, 481-504
- Hatzakis, E.;** Dagounakis, G.; Agiomyrgianaki, A.; Dais, P. A Facile NMR Method

for the Quantification of Total, Free and Esterified Sterols in Virgin Olive Oil *Food Chem* **2010**, 122, 346-352.

**He, Z.-D.**; But, P. P.-H.; Chan, T.-W. D.; Dong, H.; Xu, H.-X.; Lau, C.-P.; Sun, H.-D. Antioxidative Glucosides from the fruits of *Ligustrum lucidum*. *Chem. Pharm. Bull* **2001a**, 49, 6, 780 – 784.

**He, Z.-D.**; Dong, H.; Xu, H.-X.; Ye, W.-C.; Sun, H.-D.; But, P.P.-H. Secoiridoid constituents from the fruits of *Ligustrum lucidum* *Phytochemistry* **2001b**, 56, 327 – 330.

**Heijnen, C.G.M.**; Haenen, G.R.M.M.; Vekemans, J.A.J.M; Bast, A. Peroxynitrite scavenging of flavonoids, structure-activity relationship *Env. Toxicol. Pharmacol.* **2001**, 10, 199-206.

**Heim, K.E.**; Tagliaferro, A.R.; Bobilya, D.J. Flavonoid antioxidants, chemistry, metabolism and structure-activity relationships *J. Nutr. Biochem.* **2002**, 13, 572–584.

**Henkel, T.**; Brunne, R.M.; Müller, H.; Reichel, F. Statistical investigation into the structural complementarity of natural products and synthetic compounds. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 5, 643-647

**Hidalgo, F.J.**; Zamora, R. Edible oil analysis by high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy: Recent advances and future perspectives *Trends Fut. Sc. Tech.* **2003**, 14, 499.

**Hotta, H.**; Nagano, S.; Ueda, M.; Tsujino, Y.; Koyama, J.; Osakai, T. Higher radical scavenging activities of polyphenolic antioxidants can be ascribed to chemical reactions following their oxidation. *Biochim. Biophys. Acta.* **2002**, 1572, 123-132.

**Ιγνατιάδου-Ραγκούση, Β.** Χημεία Φυσικών Προϊόντων, Αθήνα, **1996**.

**Innocenti, M.**; Michelozzi, M.; Giaccherini, C.; Ieri, F.; Vincieri, F.F.; Mulinacci, N. Flavonoids and biflavonoids in Tuscan berries of *Juniperus communis* L.: detection and quantitation by HPLC/DAD/ESI/MS *J. Agric. Food Chem.*, **2007**, 55, 16, 6596–6602

**Inoue, K.**; Nishioka, T.; Tanahashi, T.; Inouye, H. Three secoiridoid glucosides from *Ligustrum japonicum* *Phytochemistry* **1982**, 21, 9, 2305-2311

**Inouye, H.**; Nishioka, T. Über die monoterpenglucoside und verwandte naturstoffe-XIX. Über die struktur des nüzhenids, eines bitter schmeckenden glucosids aus *Ligustrum lucidum* sowie *Ligustrum japonicum* *Tetrahedron* **1972**, 28, 15, 4231

**Jandera, P.** Column selectivity for two-dimensional liquid chromatography *J. Sep.*

*Sci.*, **2006**, *29*, 1763 – 1783.

**Jaroszewski**, J.W. Hyphenated NMR Methods in Natural Products Research, Part 1: Direct Hyphenation *Planta Med.*, **2005**, *71*, 691-700 (a).

**Jaroszewski**, J.W. Hyphenated NMR Methods in Natural Products Research, Part 2: HPLC-SPE-NMR and Other New Trends in NMR Hyphenation *Planta Med.*, **2005**, *71*, 795-802 (b).

**Jovanovic**, S.B.; Steenken, S.; Tosic, M.; Marjanovic, B.; Simić, M.G. Flavonoids as antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 4846–4851

**Kahkonen**, M. P.; Hopia, A. I.; Vuorela, H. J.; Rauha, J.-P.; Pihlaja, K.; Kujala, T. S.; Heinonen, M. Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds *J. Agric. Food Chem* **1999**, *47*, 3954-3962.

**Kalia**, K.; Sharma, K.; Singh, H. P.; Singh, B. Effects of Extraction Methods on Phenolic Contents and Antioxidant Activity in Aerial Parts of *Potentilla atrosanguinea* Lodd. And Quantification of Its Phenolic Constituents by RP-HPLC *J. Agric. Food Chem.*, **2008**, *56*, 21, 10129–10134

**Kikuchi**, M.; Kakuda R. Studies on the constituents of Ligustrum species. XIX. Structures of iridoid glucosides from the leaves of Ligustrum lucidum AIT *Yakugaku Zasshi* **1999**, *119*, 6, 444-450

**Kimura**, Y. and Sumiyoshi, M. Olive leaf extract and its main component oleuropein prevent chronic ultraviolet B radiation induced skin damage and carcinogenesis in hairless mice. *J Nutr.* **2009**, *139*, *11*, 2079-2086.

**Kong**, Y. T.; Imabayashi, S. I.; Kano, K.; Ikeda, T.; Kakiuchi, T. Peroxidase-based amperometric sensor for the determination of total phenols using two-stage peroxidase reactions *Am. J. Enol. Vitic.* **2001**, *54*, 381-385.

**Kontogianni**, V.G.; Exarchou, V.; Troganis, A.; Gerothanassis, I.P. Rapid and novel discrimination and quantification of oleanolic and ursolic acids in complex plant extracts using two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy-Comparison with HPLC methods. *Anal. Chim. Acta*, **2009**, *635*, 188.

**Korth**, H.G.; de Heer, M.I.; Mulder, P. A DFT study on intramolecular hydrogen bonding in 2- substituted phenols, conformations, enthalpies, and correlation with solute parameters. *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 8779-8789.

**Koşar**, M.; Dorman, H. J.D.; Can Başer, K.H.; Hiltunen, R. Screening of free radical scavenging compounds in Water Extracts of *Mentha* Samples Using a Postcolumn

- Derivatization Method *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 52, 16, 5004–5010
- Koşar**, M.; Göger, F.; Hunsu Can Başer, K. In Vitro Antioxidant Properties and Phenolic Composition of *Salvia virgata* Jacq. From Turkey *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 2369–2374
- Kris-Etherton**, P.; Hecker, K.D.; Bonanome, A.; Coval, S.M.; Binkoski, A.E.; Hilpert, K.F.; Griel, A.E.; Etherton, T.D. Bioactive compounds in foods, Their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am. J. Med.* **2002** 113, 71S–88S
- Kuwajima** H.; Uemura T.; Takaishi K.; Inouet K.; Inouye H. A secoiridoid glucoside from *Olea Europaea*. *Phytochemistry*, **1988**, 27, 1757–1759.
- Lambert**, M.; Staerk, D.; Hansen, S.H.; Siarafianpour, M.; Jaroszewski, J.W. Rapid extract dereplication using HPLC-SPE-NMR: analysis of isoflavonoids from *Smirnowia iranica* *J. Nat. Prod.*, **2005**, 68, 1500–1509.
- Lee-Huang**, S.; Zhang L.; Huang, P.L.; Chang, Y.-T.; Huang, P.L. Anti-HIV activity of olive leaf extract (OLE) and modulation of host cell gene expression by HIV-1 infection and OLE treatment *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2003**, 307, 4, 1029–1037
- Leung**, A.Y.; Foster, S. *Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Foods, Drugs, and Cosmetics*, 2d ed. New York: John Wiley & Sons, 1996, 350–2
- Lima**, V.L.A.G.; Mélo, E. A.; Maciel, M.I. S.; Prazeres, F.G.; Musser, R.S.; Lima, D.E.S. Total phenolic and carotenoid contents in acerola genotypes harvested at three ripening stages *Food Chem.* **2005**, 90, 565–568
- Lin**, H. M.; Yen, F. L.; Ng, L. T.; Lin, C. C. Protective effects of lucidum fruit extract on acute butylated hydroxytoluene-induced oxidative stress in rats. *Journal of Ethnopharmacology* **2007**, 111, 129 – 136.
- Lin**, L.-Z.; Harnly, J. M. A screening method for the identification of glycosylated flavonoids and other phenolic compounds using a standard analytical approach for all plant materials. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55, 1084 – 1096
- Liu** , H.; Shi, Y.; Wang, D.; Yang, G.; Yu, A.; Zhang, H. MECC determination of oleanolic acid and ursolic acid isomers in *Ligustrum lucidum* Ait *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2003**, 32, 479–485
- Lorenz**, A. J.; Arnold L. J. Preparation and estimation of crude citrin solutions (vitamin P) from lemons *Journal of Food Science.* **2006**, 6, 2, 151–156.
- Louden**, D.; Handley, A.; Lafont, R.; Taylor, S.; Sinclair, I.; Lenz, E.; Orton, T.;

Wilson, I.D. HPLC analysis of ecdysteroids in plant extracts using superheated deuterium oxide with multiple on-line spectroscopic analysis (UV, IR, <sup>1</sup>H NMR, and MS) *Anal. Chem.*, **2002**, *74* (1), 288-294.

**Ma**, S.C.; He, Z.D.; Deng, X.L.; But, P.P.; Ooi, V.E.; Xu, H.X. In vitro evaluation of secoiridoid glucosides from the fruits of *Ligustrum lucidum* as antiviral agents. *Chem Pharm Bull.* **2001**, *49*, 1471-1473.

**Mabry**, T.J.; Markham, K.R.; Thomas, M.B. *The Systematic Identification of Flavonoids*, **1970**, Springer-Verlag, New York, NY, USA.

**Malešev** D.; Kuntić V. Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. *Journal of the Serbian Chemical Society* **2007**, *72*, *10*, 921-939

**Manach**, C.; Scalbert, A.; Morand, A.; Rémésy, A.; Jimenez, L. Polyphenols, food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, *79*, 727- 747.

**Marinova**, E.M.; Yanishlieva, N.V. Inhibited oxidation of lipids II. Comparison of the antioxidative properties of some hydroxyl derivatives of benzoic and cinnamic acids. *Fat. Sci. Technol.* **1992**, *94*, 428-432.

**Marston**, A. Role of advances in chromatographic techniques in phytochemistry. *Phytochemistry*, **2007**, *68*, 2785.

**Meirinhos**, J.; Silva, B.M.; Valentão, P.; Seabra, R.M.; Pereira, J.A.; Dias, A.; Andrade, P.B.; Ferreres, F. Analysis and quantification of flavonoidic compounds from Portuguese olive (*Olea Europaea* L.) leaf cultivars *Nat. Prod. Res.*, **2005**, *19*, *2*, 189–195

**Mellenthin** O.; Galensa, R. Analysis of Polyphenols Using Capillary Zone Electrophoresis and HPLC: Detection of Soy, Lupin and Pea Protein in Meat Products *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, *47* (2), pp 594–602

**Miliauskas**, G.; Venskutonis, P.R.; van Beek T.A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chem.* **2004**, *85*, 231.

**Miliauskas**, G.; Van Beek, T.A.; de Waard, P.; Venskutonis, R.P.; Sudholter, E.J.R. Comparison of analytical and semi-preparative columns for high-performance liquid chromatography–solid-phase extraction–nuclear magnetic resonance *J. Chromatogr. A*, **2006**, *1112*, 276-284.

**Moure**, A.; Cruz, J. M.; Franco, D.; Dominguez, J. M.; Sineiro, J.; Donguez, H.;Nunez, M. J.; Pajaro, J. C. Natural antioxidants from residual sources. *Food*

*Chem.* **2001**, 72, 145-171.

**Mulinacci**, N.; Innocenti, M.; La Marca, G.; Mercalli, E.; Giaccherini, C.; Romani, A.; Erica, S.; Vincieri, F. F. Solid olive residues: Insight into their phenolic composition *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53, 23, 8963–8969

**Naczek**, M.; Shahidi, F. Extraction and analysis of phenolics in food *J. Chromatogr. A* **2004**, 1054, 95–111

**Naczek**, M.; Shahidi, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables, Occurrence, extraction and analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, 41, 1523–1542.

**Nagy**, M.; Spilková, J.; Vrchovská, V.; Zuzana Kontšeková, Z.; Šeršeň, F.; Pavel Mučaji, P.; Grančai, D. Free radical scavenging activity of different extracts and some constituents from the leaves of *Ligustrum vulgare* and *L. delavayanum* *Fitoterapia* **2006**, 77, 5, 395-397

**Natella**, F.; Nardini, M.; De Felice, M.; Scaccini, C. Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants, Structure-activity relation. *J. Agric Food Chem.* **1999**, 47, 1453-1459.

**Nenadis**, N.; Wang, L.F.; Tsimidou, M.; Zhang, H.Y. Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS<sup>•+</sup> assay. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 4669-4674.

**Nenadis**, N.; Vervoort, V.; Boeren, S.; Tsimidou, M.Z. *Syringa oblata* Lindl var. *alba* as a source of oleuropein and related compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2006**, 87, 1, 160 – 166

**Nerantzaki** , A.A.; Tsiafoulis, C.G.; Charisiadis, P.; Kontogianni, V.G.; Gerothanassis I.P. Novel determination of the total phenolic content in crude plant extracts by the use of <sup>1</sup>H NMR of the –OH spectral region. *Analytica Chimica Acta* **2011**, 688, 54-60.

**Newman**, D.J.; Cragg, G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J. Nat. Prod.* **2007**, 70, 461.

**Obied**, H.K.; Bedgood Jr, D.R.; Prenzler, P.D.; Robards, K. Chemical screening of olive biophenol extracts by hyphenated liquid chromatography *Anal. Chim. Acta* **2007**, 603, 2, 176-189

**Orgnic**, N.; Kosir, I.J.; Kocjancic, M.; Kidric, J. Determination of authenticity, regional origin, and vintage of Slovenian wines using a combination of IRMS and SNIF-NMR analyses. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, 1432.

- Owen, R.W.;** Giacosa, A.; Hull, W.E.; Haubner,R.; Wurtele, G.; Spiegelhalder, B. Olive oil consumption and health: the possible role of antioxidants. *Lancet. Oncol.* **2000**, *1*,107-112.
- Paiva-Martins, F.;** Gordon, M.H. Isolation and characterization of the antioxidant component 3,4-Dihydroxyphenylethyl 4-formyl-3-formylmethyl-4-hexenoate from olive (*Olea europaea*) leaves *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, *49* (9), 4214-4219.
- Pannala, A.S.;** Chan, T.S.; O'Brien, P.J.; Rice-Evans, C.A. Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity, Fast reaction kinetics. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2001**, *282*, 1161–1168.
- Papoti, V. T.;** Tsimidou, M. Z. Looking through the qualities of a fluorimetric assay for the total phenol content estimation in virgin olive oil, olive fruit or leaf polar extract *Food Chem.* **2009**, *112*, 246–252.
- Parr, A.J.;** Boldwell, G.P. Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile, *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 985-1012
- Pauli, G.F.;** Jaki, B.U.; Lankin, D.C. Quantitative <sup>1</sup>H NMR: Development and potential of a method for natural products analysis. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 133.
- Pennington, J.A.T.** Food composition databases for bioactive food components *J. Food Comp. Anal.* **2002**, *15*, 419–434.
- Pérez-Jiménez, F. ;** Alvarez de Cienfuegos, G. ; Badimon, L. ; Barja, G. ; Battino, M. ; Blanco, A. International conference on the healthy effect of virgin olive oil. *Eur. J. Clin. Invest.* **2005**, *35*, 421-424
- Pietta, P.G.** Flavonoids as antioxidants. *J. nat. Prod.* **2000**, *63*, 1035.
- Pokorny, J.** Introduction In Antioxidants in food. Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M. (Eds), Woodhead Pbs. Ltd. Cambridge, UK, **2001**, Ch.1, pp. 1-3.
- Politi, M.;** Pesche, W.; Wilson, N.; Zloh, M.; Prieto, J.M.; Heinrich, M. Direct NMR analysis of cannabis water extracts and tinctures and semi-quantitative data on  $\Delta^9$ -THC and  $\Delta^9$ -THC-acid *Phytochemistry*, **2008**, *69*, 2, 562-570
- Pukalskas, A.;** van Beek, T.A.; de Waard, P. Development of a triple hyphenated HPLC–radical scavenging detection–DAD–SPE–NMR system for the rapid identification of antioxidants in complex plant extracts *J. Chromatogr. A*, **2005**, *1074*, 81-88.
- Rada, M.;** Guinda, A.; Cayuela, J. Solid/liquid extraction and isolation by molecular

distillation of hydroxytyrosol from *Olea europaea* L. leaves *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2007**, *109*, 1071–1076

**Ranalli**, A.; Contento, S.; Lucera, L.; Di Febo, M.; Marchegiani, D.; Di Fonzo, V. Factors affecting the contents of iridoid oleuropein in olive leaves (*Olea europaea* L.) *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 434–440

**Rauha**, J.-P.; Remes, S.; Heinonen, M.; Hopia, A.; Kähkönen, M.; Kujala, T.; Pihlaja, K.; Vuorela, H.; Pia Vuorela, P. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds *International Journal of Food Microbiology*, **2000**, *56*, 1, 3–12.

**Ren**, W.; Qiao, Z.; Wang, H.; Zhu, L.; Zhang, L. Flavonoids: Promising anticancer agents *Medicinal Research Reviews*, **2003**, *23*, 4, 519–534

**Rice-Evans**, C.A.; Miller, N.J.; Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoid and phenolic acids. *Free Rad. Biol. Med.* **1996**, *20*, 933–956.

**Robards** K. Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. *J. Chromatogr A*, **2003**, *1000*, 657–691.

**Robbins**, R.J. Phenolic acids in foods. An overview of analytical methodology. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 2866–2887

**Romani**, A.; Mulinacci, N.; Pinelli, P.; Vincieri, F.F.; Cimato, A. polyphenolic content in five Tuscany cultivars of *Olea europaea* L. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 964–967

**Rusznayk** S.; Szent-Györgyi A. Vitamin P: flavonols as vitamins. *Nature* **1936**, *138*, 27.

**Ryan**, D.; Robards, K.; Prenzler, P.; Jardine, D.; Herlt, T.; Antolovich, M. Liquid chromatography with electrospray ionisation mass spectrometric detection of phenolic compounds from *Olea europaea*. *J. Chromatogr. A* **1999**, *855*, 529–537.

**Ryan** D.; Prenzler D. P.; Lavee S.; Antolovich M.; Robards K. Quantitative changes in phenolic content during physiological development of the olive (*Olea europaea*) cultivar Hardy's Mammoth. *Agric. Food Chem.*, **2003**, *51*, 2532–2538.

**Saija** A.; Trombetta D.; Tomaino A.; Lo Cascio R.; Princi P.; Uccella N.; Bonina F.; Castelli F. In vitro evaluation of the antioxidant activity and biomembrane interaction of the plant phenols oleuropein and hydroxytyrosol. *Int. J. Pharm.*, **1998**, *166*, 123–133.

**Sakihama**, Y.; Cohen, M.F.; Grace, S.C.; Yamasaki, H. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities, phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants *Toxicol.* **2002**, *177*, 67–80.

**Seger**, C.; Godejohann, M.; Spraul, M.; Stuppner, H.; Hadacek, F. Reaction product analysis by high-performance liquid chromatography-solid-phase extraction-nuclear magnetic resonance: Application to the absolute configuration determination of naturally occurring polyynes alcohols *J. Chromatogr. A*, **2006**, *1136*, 82.

**Serra Bonvehí**, J.; Soliva Torrentó, M.; Centelles Lorente, E. Evaluation of polyphenolic and flavonoid compounds in honeybee-collected Pollen produced in Spain *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, *49*, 4, 1848–1853

**Servili**, M.; Montedoro, G. Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2002**, *104*, 9-10, 602-613

**Servili**, M.; Selvaggini, R.; Esposto, S.; Taticchi, A.; Montedoro, G.; Morozzi, G. Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil *J. Chromatogr. A* **2004**, *1054*, 113–127

**Shahidi**, F.; Wanasundara, J.P.D. Phenolic antioxidants. *Crit. Rev. Food Sci. Nut.* **1992**, *32*, 67-103

**Shahidi**, F. (ED) In natural antioxidants chemistry, health effects and applications. AOCS Press: Champaign, Illinois, **1997**.

**She**, G.-M.; Wang, D.; Zeng, S.-F.; Yang, C.-R.; Zhang, Y.-J. New Phenylethanoid glycosides and sugar esters from Ku-Ding-Cha, a herbal tea produced from *Ligustrum purpurascens* *Journal of Food Science* **2008**, *73*, 6, C 476-481

**Sheng**, G.-Q.; Zhang, J.-R.; Pu, X.-P.; Ma, J.; Li, C.-L. Protective effect of verbascoside on 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced neurotoxicity in PC12 cells *Eur. J. Pharmac.* **2002**, *451*, 2, 119-124.

**Shi**, L.; Ma, Y.; Cai, Z. Quantitative determination of salidroside and specnuezhenide in the fruits of *Ligustrum lucidum* Ait by high performance liquid chromatography *Biomed. Chromatogr.* **1998**, *12* 1, 27 - 30

**Shleev**, S. V.; Chekanov, S. A.; Koroleva, O. V.; Stepanova E. V.; Telegin, Yu. A.; **Sen'kina**, Z. E. Determination of polyphenolic complex in wines by electrochemical methods and using the enzymes tyrosinase and laccase *Appl. Biochem. Microbiol.* **2004**, *40*, 304–309.

- Shoemaker**, M.; Hamilton, B.; Dairkee, S. H.; Cohen, I.; Campbell, M. J. In vitro anticancer activity of twelve Chinese medicinal herbs. *Phytother. Res.* **2005**, *19*, 649 – 651
- Singleton**, V. L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventos, R. M. *Methods Enzymol.* **1999**, *299*, 152–178
- Silva**, M.M., Santos, M.R., Caroco, G., Rocha, R., Justino, G., Mira, L. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids, A re-examination. *Free Rad. Res.* **2002**, *36*, 1219–1227.
- Sobolev**, A.P.; Brosio, E.; Gianferri, R.; Segre, A.; Metabolic profile of lettuce leaves by high-field NMR spectra. *Magn. Reson. Chem.* **2005**, *43*, 625.
- Soler-Rivas**, C.; Espín J.C.; Wichers, H.J. Oleuropein and related compounds, *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 1013–1023.
- Stalikas**, C.D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J. Sep. Sc.* **2007**, *30* (18), 3268-3295.
- Stevanato**, R.; Fabris, S.; Momo, F. New enzymatic method for the determination of total phenolic content in tea and wine *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 6287–6293.
- Strohschein**, S.; Rentel, C.; Lackner, T.; Bayer, E.; Albert, K. Separation and identification of tocotrienol isomers by HPLC–MS and HPLC–NMR coupling *Anal. Chem.*, **1999**, *71* (9), 1780-1785.
- Tatsis**, E.C.; Exarchou, V.; Troganis, A.; Gerothanassis, I.P. <sup>1</sup>H NMR determination of hypericin and pseudohypericin in complex natural mixtures by the use of strongly deshielded OH groups. *Anal. Chim. Acta*, **2007**, *607*, 219.
- Terabe**, S.; Otsuka, K.; Ichikawa, K.; Tsuchiya, A.; Ando, T. Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries *Anal. Chem.*, **1984**, *56* (1), pp 111–113
- Termentzi**, A.; Kefalas, P.; Kokkalou, E. LC–DAD–MS (ESI+) analysis of the phenolic content of *Sorbus domestica* fruits in relation to their maturity stage *Food Chem.* **2008**, *106*, 1234–1245
- Tolonen**, A.; Joutsamo, T.; Mattila, S.; Kamarainen, T.; Jalonen, J. Identification of Isomeric Dicafeoylquinic Acids from *Eleutherococcus senticosus* using HPLC-ESI/TOF/MS and <sup>1</sup>H-NMR Methods *Phytochem. Anal.* **2002**, *13*, 316–328
- Topçu**, G.; Ay, M.; Bilici, A.; Sarikurkcu, C.; Ozturk, M.; Ulubelen, A. A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus* *Food Chem.* **2007**, *103*, 816–

- De la Torre-Carbot**, K.; Jauregui, O.; Gimeno, E.; Castellote, A.I.; Lamuela-Raventós, R.M.; López-Sabater, M.C. Characterization and quantification of phenolic compounds in olive oils by solid-phase extraction, HPLC–DAD, and HPLC–MS/MS, *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4331–4340
- Tripoli**, E.; Giammanco, M.; Tabacchi, G.; DiMajo, D.; Giammanco, S. The phenolic composition of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutr Res Rev.* **2005**, *18*, 98-112.
- Tsao**, R.; Deng, Z. Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals *J. Chromatogr. B*, **2004**, *812* (1-2), 85-99.
- Tseng**, L.H.; Braumann, U.; Godejohann, M. Lee, S.S., Albert, K., Structure identification of aporphine alkaloids by on-line coupling of HPLC-NMR with loop storage *J. Chin. Chem. Soc.*, **2000**, *47* (6), 1231-1236.
- Valverde**, J.; This, H. <sup>1</sup>H NMR quantitative determination of photosynthetic pigments from green beans (*Phaseolus vulgaris*, L.). *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 314.
- Vaya**, J. Mahmood, S., Goldblum, A., Aviram, M., Volkova, N., Shaalan, A., Musa, R., Tamir, S. Inhibition of LDL oxidation by flavonoids in relation to their structure and calculated enthalpy. *Phytochem.* **2003**, *62*, 89–99.
- Vinha**, A. F.; Ferreres, F.; Silva, B. M.; Valentao, P.; Gonçalves, A.; Pereira, J. A.; Oliveira, M. B.; Seabra, R. M.; Andrade, P. B. Phenolic profiles of Portuguese olive fruits (*Olea europaea* L.): Influence of cultivar and geographical origin. *Food Chem.* **2005**, *89*, 561–568.
- Visioli**, F.; Bellosta, S.; Galli, C. Oleuropein, the bitter principles of olives, enhances nitric oxide production by mouse macrophages. *Life Sci.* **1998**, *62*, 541-546.
- Visioli**, F.; Poli, A.; Galli, C. Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Medicinal Research Reviews* **2002**, *22*, 65-75.
- Visioli**, F.; Galli, C. Biological properties of olive oil phytochemicals *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **2002**, *42*, 3, 209 – 221
- Wang**, Q.; Yu, H.; Zong, J.; He P.; Fang Y. Determination of the composition of Chinese ligustrum lucidum polysaccharide by capillary zone electrophoresis with amperometric detection *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2003**, *31*, 473-480.
- Wang** L.; Weller C.L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci. Technol.* **2006**, *17*, 300–312

- Wang**, Z-H.; Hsu, C-C.; Yin, M-C. Antioxidative characteristics of aqueous and ethanol extracts of glossy privet fruit *Food Chem.* **2009**, 112, 4, 914-918
- Webb**, G.P. Dietary supplements and functional foods. Blackwell Publishing, Ltd. Oxford, UK, **2006**, Ch. 5, p. 109-111, Ch. 8. p. 165-166.
- Wolfender**, J.L.; Rodriguez,S.; Hostettmann, K. Liquid chromatography coupled to mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy for the screening of plant constituents *J. Chromatogr. A*, **1998**,794 (1-2), 299-316.
- Wolfender**, J.-L.; Queiroz, E.F.; Hostettmann, K. The importance of hyphenated techniques in the discovery of new lead compounds from nature. *Expert Opin. Drug Discov.* **2006**, 1, 237.
- Wright**, J. S., Johnson E. R., DiLabio, G. A. Predicting the activity of phenolic antioxidants, theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 1173-1183.
- Wulf**, L.W.; Nagel, C.W. Analysis of phenolic acids and flavonoids by High-Pressure Liquid Chromatography *J. Chromatogr.*, **1976**, 116, 271-279
- Xie**, C.; Veitch, N.E.; Houghton, P.J.; Simmonds, M.S.J. Flavone C-glycosides from *Viola yedoensis* Makino *Chem. Pharm. Bull.* **2003**, 51, 10 1204-1207
- Xu**, Y.C.; Leung, S.W.S.; Yeung, D.K.Y.; Hu, L.H.; Chen, G.H.; Che, C.M.; Man, R.Y.K. Structure–activity relationships of flavonoids for vascular relaxation in porcine coronary artery *Phytochem.* **2007**, 68, 1179–1188
- Xu**, X.H.; Yang, N.Y.; Qian, S.H.; Xie, N.; Yu, M.Y.; Duan, J.A. Study on flavonoids in *Ligustrum lucidum* *Zhong yao cai = Zhongyaocai = Journal of Chinese medicinal materials* **2007**, 30, 5, 538-540
- Zahri**, S. Moubarik, A.; Charrier, F.; Bailleres, H.; Nepveu, G.; Charrier, B. Quantitative assessment of total phenol contents of European oak (*Quercus petraea* and *Quercus robur*) by diffuse reflectance NIR spectroscopy on solid wood surfaces *Holzforschung* **2008**, 62, 679-687
- Zhang**, C.; Shen, Y.; Chen, J.; Xiao, P.; Bao, J. Nondestructive Prediction of Total Phenolics, Flavonoid Contents, and antioxidant capacity of rice grain using near-infrared spectroscopy *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 8268-8272.
- Zhishen**, J.; Mengcheng, T.; Jianming, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals *Food Chem.* **1999**, 64, 4, 555-559

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

|                   |                                                                                                                                                                                                         |    |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Σχήμα 1.1</b>  | Κύρια στάδια βιοσυνθετικής οδού των φαινολικών ενώσεων (Sakihama <i>et al.</i> , 2002).                                                                                                                 | 6  |
| <b>Σχήμα 1.2</b>  | Δομές υδροξυλιωμένων παραγώγων: <b>(α)</b> βενζοϊκού οξέος, <b>(β)</b> φαινυλοξικού οξέος και <b>(γ)</b> κινναμωμικού οξέος.                                                                            | 7  |
| <b>Σχήμα 1.3</b>  | Κύρια δομικά χαρακτηριστικά διαφορετικών τάξεων φλαβονοειδών.                                                                                                                                           | 10 |
| <b>Σχήμα 1.4</b>  | Δομές σεκοϊριδοειδών ενώσεων που απαντώνται στο φυτό <i>Ligustrum lucidum</i> .                                                                                                                         | 15 |
| <b>Σχήμα 1.5</b>  | Το δέντρο <i>Ligustrum lucidum</i> , ανθοί και καρποί του φυτού.                                                                                                                                        | 18 |
| <b>Σχήμα 1.6</b>  | Κέντρα συμπλοκοποίησης φλαβονοειδών-μετάλλων.                                                                                                                                                           | 26 |
| <b>Σχήμα 1.7</b>  | Σύστημα υγρής χρωματογραφίας σε σύζευξη με φασματογράφο μάζας με ιοντισμό με ηλεκτροψεκασμό ( LC-ESI- MS).                                                                                              | 35 |
| <b>Σχήμα 1.8</b>  | Φάσματα <b>(α)</b> MS και <b>(β)</b> MS <sup>2</sup> και <b>(c)</b> MS <sup>3</sup> της ένωσης 2-Rhamnosyl–2-glucosyl quercetin (Ding et al., 2008).                                                    | 37 |
| <b>Σχήμα 1.9</b>  | Σχηματική αναπαράσταση των συστημάτων LC-NMR-MS.                                                                                                                                                        | 39 |
| <b>Σχήμα 1.10</b> | Τυπική οργανολογική διάταξη LC-SPE-NMR- MS.                                                                                                                                                             | 42 |
| <b>Σχήμα 1.11</b> | Σχηματική απεικόνιση του σταδίου παγίδευσης, ξήρανσης και μεταφοράς στην NMR «flow-probe» των προσδιοριζόμενων συστατικών.                                                                              | 43 |
| <b>Σχήμα 2.1</b>  | Διάγραμμα παρασκευής εκχυλισμάτων                                                                                                                                                                       | 54 |
| <b>Σχήμα 2.2</b>  | Σχηματισμός σταγόνων κατά τον ηλεκτροψεκασμό διαλύματος                                                                                                                                                 | 58 |
| <b>Σχήμα 2.3</b>  | Διαγραμματική αναπαράσταση του LC-SPE-NMR                                                                                                                                                               | 59 |
| <b>Σχήμα 3.1</b>  | Επίδραση του χρόνου συλλογής στην περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά (οι κάθετες ευθείες παριστούν τα όρια εμπιστοσύνης 95% των μέσων τιμών των ολικών φαινολών)                                         | 72 |
| <b>Σχήμα 3.2</b>  | Επίδραση του χρόνου συλλογής των φύλλων <i>Ligustrum lucidum</i> στην εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης (οι κάθετες ευθείες παριστούν τα όρια εμπιστοσύνης 95% των μέσων τιμών του SC <sub>50</sub> ) | 73 |

|                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                |    |
|--------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Σχήμα 3.3</b>   | Φάσματα NMR- <sup>1</sup> H υδατικών και μεθανολικών εκχυλισμάτων από τα Ιωάννινα και την Κάριανη σε διαλύτη DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> (NS= 2k, T=298K, <i>t</i> <sub>exp</sub> =2h & 28min)                                                                                                 | 75 |
| <b>Σχήμα 3.4</b>   | Επιλεγμένη περιοχή του φάσματος NMR- <sup>1</sup> H (αρωματική περιοχή) σε διαλύτη DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> (NS= 2k, T=298K, <i>t</i> <sub>exp</sub> =2h & 28min)                                                                                                                           | 75 |
| <b>Σχήμα 3.5</b>   | Περιοχή απορρόφησης των πρωτονίων OH(5) των φλαβονοειδών που σχηματίζουν ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου των φασμάτων του Σχήματος 3.3                                                                                                                                                         | 76 |
| <b>Σχήμα 3.6</b>   | Σχηματισμός ισχυρού ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου στα φλαβονοειδή.                                                                                                                                                                                                                             | 76 |
| <b>Σχήμα 3.7</b>   | (A) Επιλεγμένη περιοχή του φάσματος NMR- <sup>1</sup> H εκχυλίσματος L.I.F.MeOH σε δευτεριωμένο ακετονιτρίλιο, (B) το φάσμα μετά την προσθήκη 7-Ο-γλυκοζίτη της απιγενίνης. Η ταυτοποίηση του Ο γλυκοζίτη υποδηλώνεται με το βέλος (NS= 512, T=268°K, <i>t</i> <sub>exp</sub> =36min & 53sec). | 79 |
| <b>Σχήμα 3.8</b>   | (A) Επιλεγμένη περιοχή του φάσματος NMR- <sup>1</sup> H εκχυλίσματος L.I.F.MeOH σε δευτεριωμένο ακετονιτρίλιο, (B) το φάσμα μετά την προσθήκη 7-Ο-γλυκοζίτη της λουτεολίνης. Η ταυτοποίηση του Ο γλυκοζίτη υποδηλώνεται με το βέλος (NS= 512, T=268K, <i>t</i> <sub>exp</sub> =36min & 53sec). | 79 |
| <b>Σχήμα 3.9</b>   | (A) Χρωματογράφημα μάζας, (B) Χρωματογραφικό προφίλ στα 280 nm, (Γ) 254 nm και (Δ) 340 nm του φυτικού εκχυλίσματος <b>L.I.M.Aq</b>                                                                                                                                                             | 81 |
| <b>Σχήμα 3.10</b>  | Φάσματα MS και MS <sup>2</sup> της υδροξυτυροσόλης                                                                                                                                                                                                                                             | 82 |
| <b>Σχήμα 3.11</b>  | Φάσματα MS και MS <sup>2</sup> του γλυκοζίτη της τυροσόλης                                                                                                                                                                                                                                     | 82 |
| <b>Σχήμα 3.12</b>  | Φάσματα MS και MS <sup>2</sup> του ολεοζίτη                                                                                                                                                                                                                                                    | 83 |
| <b>Σχήμα 3.13</b>  | A. Φάσματα MS και MS <sup>2</sup> του 6,8-δι- <i>C</i> -γλυκοζίτη της απιγενίνης B. Σχάση των γλυκοζιτικών μορίων                                                                                                                                                                              | 83 |
| <b>Σχήμα 3.14</b>  | Φάσματα MS και MS <sup>2</sup> του υδροξυ-βερμπασκοζίτη                                                                                                                                                                                                                                        | 84 |
| <b>Σχήμα 3.15</b>  | Φάσματα MS και MS <sup>2</sup> του βερμπασκοζίτη                                                                                                                                                                                                                                               | 84 |
| <b>Εικόνα 3.16</b> | Φάσματα MS και MS <sup>2</sup> του 7-Ο-γλυκοζίτη της λουτεολίνης                                                                                                                                                                                                                               | 85 |
| <b>Εικόνα 3.17</b> | Φάσματα MS και MS <sup>2</sup> του 7-Ο-ρουτινοζίτη της απιγενίνης                                                                                                                                                                                                                              | 85 |

|                   |                                                                                                                                                                                                                                                             |     |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Σχήμα 3.18</b> | Φάσματα MS και MS <sup>2</sup> παράγωγου του λιγκστροζίτη                                                                                                                                                                                                   | 86  |
| <b>Σχήμα 3.19</b> | Φάσματα MS και MS <sup>2</sup> του 7- <i>O</i> -γλυκοζίτη της απιγενίνης                                                                                                                                                                                    | 86  |
| <b>Σχήμα 3.20</b> | Φάσματα MS και MS <sup>2</sup> της ελευρωπαΐνης                                                                                                                                                                                                             | 87  |
| <b>Σχήμα 3.21</b> | Φάσματα MS και MS <sup>2</sup> του 7- <i>O</i> -γλουκουρονίτη της απιγενίνης                                                                                                                                                                                | 87  |
| <b>Σχήμα 3.22</b> | (Α) Χρωματογράφημα μάζας, (Β) Χρωματογραφικό προφίλ στα 280 nm, (Γ) 254 nm και (Δ) 340 nm του φυτικού εκχυλίσματος <b>L.K.M.MeOH</b>                                                                                                                        | 90  |
| <b>Σχήμα 3.23</b> | Φάσματα MS και MS <sup>2</sup> του 7- <i>O</i> -ρουτινοζίτη της λουτεολίνης                                                                                                                                                                                 | 91  |
| <b>Σχήμα 3.24</b> | Φάσμα MS <sup>-</sup> της απιγενίνης                                                                                                                                                                                                                        | 91  |
| <b>Σχήμα 3.25</b> | Χρωματογράφημα μάζας και χρωματογραφικό προφίλ στα 254 nm, 280 nm και 340 nm των υδατικών εκχυλισμάτων <b>L.I.M.Aq, L.I.J.Aq, L.I.N.Aq και L.I.F.Aq</b>                                                                                                     | 93  |
| <b>Σχήμα 3.26</b> | Γραφική παράσταση της μεταβολής των συγκεντρώσεων 3 φλαβονοειδών ως συνάρτηση με το χρόνο για τα υδατικά εκχυλίσματα από τα Ιωάννινα.                                                                                                                       | 94  |
| <b>Σχήμα 3.27</b> | Χρωματογράφημα μάζας και χρωματογραφικό προφίλ στα 254 nm, 280 nm και 340 nm των μεθανολικών εκχυλισμάτων από τα Ιωάννινα <b>L.I.M.MeOH, L.I.J.MeOH, L.I.N.MeOH και L.I.F.MeOH</b>                                                                          | 96  |
| <b>Σχήμα 3.28</b> | Γραφική παράσταση της μεταβολής των συγκεντρώσεων των 5 φλαβονοειδών ως συνάρτηση με το χρόνο σε μεθανολικά εκχυλίσματα από τα Ιωάννινα.                                                                                                                    | 97  |
| <b>Σχήμα 3.29</b> | <b>A.</b> Μονοπάτι θραυσματοποίησης στο φάσμα μάζας και φάσμα UV <b>B.</b> Πιθανή δομή της ένωσης 3- <i>O</i> -(2'',5''- <i>O</i> -εξόξης, ραμνοζίτης- πεντόξης) της ισοραμνετίνης (isorhamnetin 3- <i>O</i> -2'',5''- <i>O</i> -hexosylrhamnosylpentoside) | 99  |
| <b>Σχήμα 3.30</b> | Χρωματογράφημα μάζας και χρωματογραφικό προφίλ στα 254 nm, 280 nm και 340 nm των υδατικών εκχυλισμάτων από την Κάριανη <b>L.K.M.Aq, L.K.J.Aq, L.K.N.Aq και L.K.F.Aq</b>                                                                                     | 101 |
| <b>Σχήμα 3.31</b> | Γραφική παράσταση της μεταβολής των συγκεντρώσεων 3 φλαβονοειδών ως συνάρτηση με το χρόνο των υδατικών εκχυλισμάτων από την Κάριανη.                                                                                                                        | 102 |
| <b>Σχήμα 3.32</b> | Χρωματογράφημα μάζας και χρωματογραφικό προφίλ στα 254                                                                                                                                                                                                      | 104 |

nm, 280 nm και 340 nm των μεθανολικών εκχυλισμάτων από την Κάριανη **L.K.M.MeOH**, **L.K.J.MeOH**, **L.K.N.MeOH** και **L.K.F.MeOH**

- Σχήμα 3.33** Γραφική παράσταση της μεταβολής των συγκεντρώσεων των 4 φλαβονοειδών ως συνάρτηση με το χρόνο των μεθανολικών εκχυλισμάτων από την Κάριανη. 105
- Σχήμα 3.34** Δενδρόγραμμα ανάλυσης ομαδοποίησης (cluster analysis) περιοχών (I: Ιωάννινα, K: Κάριανη) και μηνών (2:Φεβρουάριος, 5:Μάιος, 7:Ιούλιος, 11:Νοέμβριος) 107
- Σχήμα 4.1** Επίδραση των διαφορετικών συνθηκών εκχύλισης στην περιεκτικότητα σε ολικά φλαβονοειδή. Οι κάθετες ευθείες παριστούν τα όρια εμπιστοσύνης 95% των μέσων τιμών ολικών φλαβονοειδών (όπου 1-9 τα εκχυλίσματα που προέκυψαν με διαφορετικές συνθήκες εκχύλισης 1: EtOAc soxhlet, 2: EtOH 24h, 3: EtOH 1 week, 4: MeOH/H<sub>2</sub>O 24h, 5: MeOH 1 week, 6: MeOH/H<sub>2</sub>O 1 month, 7: MeOH/H<sub>2</sub>O usb, 8: MeOH soxhlet, 9: Aq) 116
- Σχήμα 4.2** Επίδραση των διαφορετικών συνθηκών εκχύλισης στην περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά. Οι κάθετες ευθείες παριστούν τα όρια εμπιστοσύνης 95% των μέσων τιμών ολικών φαινολικών (όπου 1-9 τα εκχυλίσματα που προέκυψαν με διαφορετικές συνθήκες εκχύλισης 1: EtOAc soxhlet, 2: EtOH 24h, 3: EtOH 1 week, 4: MeOH/H<sub>2</sub>O 24h, 5: MeOH 1 week, 6: MeOH/H<sub>2</sub>O 1 month, 7: MeOH/H<sub>2</sub>O usb, 8: MeOH soxhlet, 9: Aq) 118
- Σχήμα 4.3** Επίδραση των διαφορετικών συνθηκών εκχύλισης στην εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης. Οι κάθετες ευθείες παριστούν τα όρια εμπιστοσύνης 95% των μέσων τιμών του SC<sub>50</sub> (όπου 1-9 τα εκχυλίσματα που προέκυψαν με διαφορετικές συνθήκες εκχύλισης 1: EtOAc soxhlet, 2: EtOH 24h, 3: EtOH 1 week, 4: MeOH/H<sub>2</sub>O 24h, 5: MeOH 1 week, 6: MeOH/H<sub>2</sub>O 1 month, 7: MeOH/H<sub>2</sub>O usb, 8: MeOH soxhlet, 9: Aq) 120

|                   |                                                                                                                                                                                                                            |     |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Σχήμα 4.4</b>  | Σχάση του γλυκοζιτικού δεσμού γλυκοζυλιωμένου παραγώγου της απιγενίνης κατά την θραυσματοποίηση MS <sup>2</sup> του μοριακού ιόντος (7- <i>O</i> -γλυκοζίτης της απιγενίνης).                                              | 123 |
| <b>Σχήμα 4.5</b>  | (Α) Χρωματογράφημα μάζας, (Β) Χρωματογραφικό προφίλ στα 254 nm, (Γ) 280 nm και (Δ) 340 nm του φυτικού εκχυλίσματος L.K.M.MeOH/H <sub>2</sub> O 24h                                                                         | 124 |
| <b>Σχήμα 4.6</b>  | Φάσματα μαζών MS και MS <sup>2</sup> της ισοροϊφολίνης                                                                                                                                                                     | 124 |
| <b>Σχήμα 4.7</b>  | Χαρακτηριστικά παραγόμενα ιόντα σχηματιζόμενα από διασταυρούμενες διασπάσεις του δακτυλίου της εξόζης                                                                                                                      | 126 |
| <b>Σχήμα 4.8</b>  | Απώλεια μορίων νερού για τα 6 C-γλυκοζυλιωμένα φλαβονοειδή μεταξύ του 2''-υδροξυλίου του σακχάρου στις θέσεις σύνδεσης C6 και/ή C8 με το υδροξύλιο στη θέση 5 και/ή 7 του άγλυκου τμήματος                                 | 126 |
| <b>Σχήμα 4.9</b>  | Χρωματογράφημα μάζας και χρωματογραφικό προφίλ στα 254 nm, 280 nm και 340 nm των υδατομεθανολικών εκχυλισμάτων L.K.M.MeOH/H <sub>2</sub> O 24h, L.K.M.MeOH/H <sub>2</sub> O u.s.b. και L.K.M.MeOH/H <sub>2</sub> O 1 month | 130 |
| <b>Σχήμα 4.10</b> | Χρωματογράφημα μάζας και χρωματογραφικό προφίλ στα 254 nm, 280 nm, και 340 nm των εκχυλισμάτων L.K.M.MeOH 1week και L.K.M.Aq                                                                                               | 133 |
| <b>Σχήμα 4.11</b> | Χρωματογράφημα μάζας και χρωματογραφικό προφίλ στα 254 nm, 280 nm, και 340 nm των αιθανολικών εκχυλισμάτων L.K.M.EtOH 24h και L.K.M.EtOH 1week                                                                             | 135 |
| <b>Σχήμα 4.12</b> | Χρωματογράφημα μάζας και χρωματογραφικό προφίλ στα 254 nm, 280 nm, και 340 nm των εκχυλισμάτων L.K.M.MeOH soxhlet και L.K.M.EtOAc soxhlet                                                                                  | 137 |
| <b>Σχήμα 4.13</b> | Χρωματογραφικό προφίλ στα 254 (κόκκινο), 280 (μαύρο) και 340 (πράσινο) nm του φυτικού εκχυλίσματος <b>L.K.M.EtOAc soxhlet</b> με LC-DAD-SPE-NMR                                                                            | 142 |
| <b>Σχήμα 4.14</b> | Φάσματα UV, MS και MS <sup>2</sup> της κορυφής 1                                                                                                                                                                           | 143 |
| <b>Σχήμα 4.15</b> | Φάσματα UV και MS του άγλυκου της Ελευρωπαίνης                                                                                                                                                                             | 143 |
| <b>Σχήμα 4.16</b> | Φάσματα UV, MS και MS <sup>2</sup> του 7- <i>O</i> -ρουτινοζίτη της απιγενίνης                                                                                                                                             | 144 |

|                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |     |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Σχήμα 4.17</b> | Φάσματα UV, MS και MS <sup>2</sup> του 7- <i>O</i> -γλυκοζίτη της απιγενίνης                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 145 |
| <b>Σχήμα 4.18</b> | Φάσμα NMR- <sup>1</sup> H του 7- <i>O</i> -γλυκοζίτη της απιγενίνης σε CD <sub>3</sub> CN σε φασματογράφο AV-500MHz (NS= 1k, T= 298K, t <sub>exp</sub> = 1h & 5min)                                                                                                                                                                                                       | 146 |
| <b>Σχήμα 4.19</b> | (A) Φάσματα UV, MS και MS <sup>2</sup> του 3- <i>O</i> -κινναμοϋλκουνικό οξέος και (B) Πορεία θραυσματοποίησης του 3- <i>O</i> -κινναμοϋλκουνικό οξέος                                                                                                                                                                                                                    | 147 |
| <b>Σχήμα 4.20</b> | Φάσμα NMR- <sup>1</sup> H του 3- <i>O</i> -κινναμοϋλκουνικό οξέος σε CD <sub>3</sub> CN σε φασματογράφο AV-500MHz (NS= 1k, T= 298K, t <sub>exp</sub> = 1h & 5min)                                                                                                                                                                                                         | 148 |
| <b>Σχήμα 4.21</b> | (A) Φάσματα UV και MS της λουτεολίνης και (B) NMR- <sup>1</sup> H της λουτεολίνης σε CD <sub>3</sub> CN σε φασματογράφο AV-500MHz (NS= 1k, T= 298K, t <sub>exp</sub> = 1h & 5min)                                                                                                                                                                                         | 149 |
| <b>Σχήμα 4.22</b> | (A) Φάσματα UV και MS της απιγενίνης και (B) NMR- <sup>1</sup> H της απιγενίνης σε CD <sub>3</sub> CN σε φασματογράφο AV-500MHz (NS= 1k, T= 298K, t <sub>exp</sub> = 1h & 5min)                                                                                                                                                                                           | 150 |
| <b>Σχήμα 5.1</b>  | Περιοχή απορρόφησης των πρωτονίων των ομάδων –OH της (A) κερκετίνης (C= 20 mM), (B) λουτεολίνης (C= 4.66 mM) και (C) ροσμαρινικού οξέος (C= 5.55 mM) (T = 295 K, αριθμός παλμών = 8, πειραματικός χρόνος = 54 sec) (a) πριν και (b) μετά τη χρήση ακτινοβολήσης του σήματος συντονισμού του H <sub>2</sub> O σε DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>                               | 156 |
| <b>Σχήμα 5.2</b>  | Περιοχή απορρόφησης των πρωτονίων των ομάδων –OH του μίγματος ροσμαρινικού οξέος (C= 2.77 mM), γαλλικού οξέος (C= 2.94 mM), κερκετίνης (C= 2.95 mM) και λουτεολίνης (C= 2.33 mM) (T = 295 K, αριθμός παλμών = 8, πειραματικός χρόνος = 54 sec) (a) πριν και (b) μετά τη χρήση ακτινοβολήσης του σήματος συντονισμού του H <sub>2</sub> O σε DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> . | 157 |
| <b>Σχήμα 5.3</b>  | Περιοχή απορρόφησης των πρωτονίων των ομάδων –OH της (A) κερκετίνης (C= 20 mM) και του (B) γαλλικού οξέος (C= 11.76 mM) σε DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> (T = 295 K, αριθμός παλμών = 8, πειραματικός χρόνος= 54 sec): (a) πριν την ακτινοβολήση και                                                                                                                        | 158 |

(b) με ακτινοβολία ισχύος παλμού p19 = 110 db, (c) p19 = 90 db, (d) p19 = 70 db, (e) p19 = 60 db

- Σχήμα 5.4** Περιοχή απορρόφησης των πρωτονίων των –OH ομάδων του γαλλικού οξέος ( $C = 11.76 \text{ mM}$ ) σε  $\text{DMSO-}d_6$  ( $T = 295 \text{ K}$ , number of scans = 8, experimental time = 54 sec) και η επίδραση της αυξανόμενης ποσότητας του  $\text{NaHCO}_3$ : (a) πριν την προσθήκη  $\text{NaHCO}_3$  και μετά την προσθήκη  $\text{NaHCO}_3$  σε αναλογία  $C_{(\text{gallic acid})} / C_{(\text{NaHCO}_3)} =$  (b) 100, (c) 50 και (d) 33 αντίστοιχα. 159
- Σχήμα 5.5** Περιοχή απορρόφησης των πρωτονίων των –OH ομάδων του εκχυλίσματος του οξικού αιθυλεστέρα του *Ligustrum lucidum* ( $T = 295 \text{ K}$ , αριθμός παλμών = 1024, πειραματικός χρόνος = 1 h 57 sec) σε: (a)  $\text{DMSO-}d_6$ , (b) το ίδιο διάλυμα μετά την ακτινοβολία του σήματος συντονισμού του  $\text{H}_2\text{O}$  και (c) με την προσθήκη 5.7  $\mu\text{L}$   $\text{NaHCO}_3$ , (11.90 mM) 163
- Σχήμα 5.6** Περιοχή απορρόφησης των πρωτονίων των –OH ομάδων του ακετονικού εκχυλίσματος της ελληνικής ρίγανης ( $T = 295 \text{ K}$ , number of scans = 1024, experimental time = 1 h 57 sec) σε (a)  $\text{DMSO-}d_6$  (b) το ίδιο διάλυμα μετά την επίδραση ακτινοβολίας στο σήμα συντονισμού του  $\text{H}_2\text{O}$  και (c) με την προσθήκη 6  $\mu\text{L}$   $\text{NaHCO}_3$ , 1.19 mM 164

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

|                    |                                                                                                                                                                                                                |     |
|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Πίνακας 1.1</b> | Πηγές και πιθανά αποτελέσματα φαινολικών ενώσεων στην υγεία <sup>a</sup>                                                                                                                                       | 4   |
| <b>Πίνακας 1.2</b> | Δημοσιευμένα αποτελέσματα για τα συστατικά που απαντούν στο φυτό <i>L. lucidum</i>                                                                                                                             | 21  |
| <b>Πίνακας 2.1</b> | Στοιχεία γεωγραφικής προέλευσης και συλλογής φύλλων <i>Ligustrum lucidum</i>                                                                                                                                   | 48  |
| <b>Πίνακας 2.2</b> | Συγκεντρωτικός πίνακας των εκχυλισμάτων που παρασκευάστηκαν                                                                                                                                                    | 55  |
| <b>Πίνακας 2.3</b> | Πειραματικές παράμετροι της αναλυτικής μεθόδου HPLC για την ανάλυση των εκχυλισμάτων των φύλλων <i>Ligustrum lucidum</i>                                                                                       | 56  |
| <b>Πίνακας 3.1</b> | Επίδραση των συνθηκών εκχύλισης στην περιεκτικότητα των ολικών φαινολών, των ολικών φλαβονοειδών και στην αντιοξειδωτική δράση εκχυλισμάτων φύλλων <i>Ligustrum lucidum</i>                                    | 67  |
| <b>Πίνακας 3.2</b> | Τιμές της πιθανότητας σημαντικότητας P της ανάλυσης διακύμανσης τριών παραγόντων στα ολικά φλαβονοειδή, στις ολικές φαινόλες και στην εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης εκφραζόμενη ως προς SC <sub>50</sub> | 71  |
| <b>Πίνακας 3.3</b> | Χρωματογραφικά και φασματοσκοπικά δεδομένα του εκχυλίσματος φύλλων L.I.M.Aq με LC-ESI-MS                                                                                                                       | 87  |
| <b>Πίνακας 3.4</b> | Χρωματογραφικά και φασματοσκοπικά δεδομένα του εκχυλίσματος φύλλων L.K.M.MeOH με LC-ESI-MS                                                                                                                     | 92  |
| <b>Πίνακας 3.5</b> | Μοριακά ιόντα των υδατικών εκχυλισμάτων από τα Ιωάννινα και η απόδοσή τους στην αντίστοιχη ένωση                                                                                                               | 95  |
| <b>Πίνακας 3.6</b> | Μοριακά ιόντα των μεθανολικών εκχυλισμάτων από τα Ιωάννινα και η ταυτοποίησή τους στην αντίστοιχη ένωση                                                                                                        | 100 |
| <b>Πίνακας 3.7</b> | Μοριακά ιόντα των υδατικών εκχυλισμάτων από την Κάριανη και η ταυτοποίησή τους στην αντίστοιχη ένωση                                                                                                           | 103 |
| <b>Πίνακας 3.8</b> | Μοριακά ιόντα των μεθανολικών εκχυλισμάτων από την Κάριανη και η ταυτοποίησή τους στην αντίστοιχη ένωση                                                                                                        | 106 |

|                     |                                                                                                                                                                            |     |
|---------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Πίνακας 4.1</b>  | Απόδοση εκχύλισης φύλλων <i>Ligustrum lucidum</i> με χρήση διαφορετικών διαλυτών                                                                                           | 112 |
| <b>Πίνακας 4.2</b>  | Επίδραση των συνθηκών εκχύλισης στην περιεκτικότητα των ολικών φαινολών, των ολικών φλαβονοειδών και την αντιοξειδωτική δράση εκχυλισμάτων φύλλων <i>Ligustrum lucidum</i> | 113 |
| <b>Πίνακας 4.3</b>  | Χρωματογραφικά και φασματοσκοπικά δεδομένα του εκχυλίσματος φύλλων L.K.M.MeOH/H <sub>2</sub> O 24h με LC-ESI-MS.                                                           | 128 |
| <b>Πίνακας 4.4</b>  | Μοριακά ιόντα των υδατομεθανολικών εκχυλισμάτων και η ταυτοποίησή τους στην αντίστοιχη ένωση                                                                               | 131 |
| <b>Πίνακας 4.5</b>  | Μοριακά ιόντα των εκχυλισμάτων L.K.M.MeOH 1week και L.K.M.Aq και η ταυτοποίησή τους στην αντίστοιχη ένωση                                                                  | 134 |
| <b>Πίνακας 4.6</b>  | Μοριακά ιόντα των αιθανολικών εκχυλισμάτων και η ταυτοποίησή τους στην αντίστοιχη ένωση                                                                                    | 136 |
| <b>Πίνακας 4.7</b>  | Μοριακά ιόντα των εκχυλισμάτων L.K.M.MeOH soxhlet και L.K.M.EtOAc soxhlet και η ταυτοποίησή τους στην αντίστοιχη ένωση                                                     | 138 |
| <b>Πίνακας 4.8</b>  | Παράμετροι των καμπυλών αναφοράς των πρότυπων φλαβονοειδών με την RP-HPLC στα 340 nm.                                                                                      | 139 |
| <b>Πίνακας 4.9</b>  | Ποσοτικός προσδιορισμός φλαβονοειδών των εκχυλισμάτων με την RP-HPLC στα 340 nm                                                                                            | 140 |
| <b>Πίνακας 4.10</b> | Χρωματογραφικά και φασματοσκοπικά δεδομένα των κυριότερων συστατικών του εκχυλίσματος φύλλων L.K.M.EtOAc soxhlet από την ανάλυση με LC-DAD-SPE-NMR και LC-ESI-MS           | 151 |
| <b>Πίνακας 5.1</b>  | Προσδιορισμός των ολικών φαινολών με τη χρήση του αντιδραστηρίου FC και NMR- <sup>1</sup> H                                                                                | 161 |
| <b>Πίνακας 5.2</b>  | Ολικά φαινολικά και παράγοντας δραστηρότητας Ae όπως προσδιορίστηκαν στα φυτικά εκχυλίσματα με τη χρήση των μεθόδων FC και NMR- <sup>1</sup> H                             | 166 |

## Abstract

The aim of this thesis was to investigate the plant *Ligustrum lucidum* Ait. in order to unveil pharmacologically active substances. *Ligustrum lucidum*, a member of the *Oleaceae* family, is widely distributed providing an easily available natural material of low cost. In traditional medicine, extracts from different plant parts (leaves, fruits, and flowers) of *Ligustrum* spp. was considered to serve functions of nourishing liver, kidney and brightening eyes. Studies in modern medicine showed that its constituents are effective immunostimulants and excellent biological antioxidants. Due to the complexity of the plant extracts, it is rather difficult to characterize them chemically in one step. Usually, their study includes fractionation of the complex mixture, separation and isolation of the individual components with liquid chromatography, and structure elucidation using various spectroscopic methods (UV, IR, MS, NMR).

Hyphenated techniques are gaining popularity in analysis of biological, biomedical, environmental, and pharmaceutical samples. LC-MS and LC-SPE-NMR are used in routine analysis of plants extracts in most of the phytochemical laboratories, providing efficient data for structure analysis. The hyphenated technique of LC-MS represents a key technique for the online identification of natural products and has been widely used for profiling crude extracts and for dereplication purposes. Because of the high sensitivity and selectivity of LC-MS, natural products can be efficiently detected in the complex chromatograms obtained with crude extracts. The hyphenated of LC-NMR provides a definite advantage in terms of the detailed structural information obtained from NMR spectra. Here we report the chemical characterization of *Ligustrum lucidum* leaves extracts using hyphenated techniques, as a part of our search on bioactive compounds derived from plants.

As a first step, the methanolic and aqueous extracts of different geographical origin and different seasonally collected periods are investigated. The selected extracts were initially screened for their antioxidant activity using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH<sup>•</sup>) scavenging assay, their content of total phenolic compounds and flavonoids using colorimetrically methods. All crude extracts were dissolved in CD<sub>3</sub>CN and DMSO-d<sub>6</sub> and the <sup>1</sup>H- NMR, spectra were acquired. The <sup>1</sup>H-NMR spectra of the extracts demonstrate a very characteristic region between 11 to

13 ppm, which is of high diagnostic value for the presence of flavonoids. With the use of proper temperature and by spiking with standards, flavones were detected and the extracts were further analysed by HPLC-ESI-MS to identify the major components. Various compounds were tentatively identified belonging to the classes of flavonoids and secoiridoids. The comparison between different seasonally collected periods showed that there is a small, but significant qualitative differentiation between the phenolic content and clear quantitative differentiation. No qualitative differences in relation to the phenolic profile were observed when samples from different geographical origins were analysed, pointing to a strong influence of the cultivar.

The extraction efficiency with different methods and solvents of leaves of *Ligustrum lucidum* was also investigated. Fresh leaves of *Ligustrum lucidum* were extracted with different methods and solvents and the respected fractions were collected. The selected extracts were also screened for their antioxidant activity using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH<sup>•</sup>) scavenging assay. Furthermore, their content of total phenolic compounds and flavonoids using colorimetrically methods was also investigated. The technique of HPLC-ESI-MS was used to identify the major components. Based on the above results, ethyl acetate extract was chosen for the application of the HPLC-SPE-NMR technique. The results showed that *Ligustrum lucidum* extracts are rich in secoiridoids and flavonoids in both free and glucosidic form. Flavonoids which were identified in the extracts were referred for first time in the leaves of this plant (e.g. apigenin 6,8-di-*C*-glucoside, apigenin-7-*O*-rutinoside, quercetin derivative, cinnamoylquinic acid).

Finally, a novel method for the determination of total phenolic content using <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy in the –OH spectral region was investigated. The use of the aprotic and strongly solvating dimethyl sulfoxide-*d*<sub>6</sub>, allows the “appearance” of the phenolic hydroxyl protons. Determination of the integrals of the <sup>1</sup>H-NMR absorption bands in the region of phenol –OH groups which are eliminated or they are reduced in intensity upon irradiation of the residual water resonance in DMSO-*d*<sub>6</sub> allows the quantitation of the total phenolic content. A simple method was also applied which allows the discrimination of the phenolic OH signals of interest from the interference of the phenolic acid, COOH, groups. The <sup>1</sup>H-NMR method was shown to be rapid and accurate bearing the inherent advantages of the NMR spectroscopy and can be applied directly in complex extracts without the need of external calibration. Moreover, total

phenolics as determined by the proposed  $^1\text{H}$ -NMR method were compared with those obtained by the Folin-Ciocalteu (FC) reagent method. Differences of the  $^1\text{H}$ -NMR and FC method should be attributed to the fact that  $^1\text{H}$ -NMR refers to the total phenolic hydroxyl protons, whereas the FC method refers to the reacting phenolic hydroxyl protons. This demonstrates that the present  $^1\text{H}$ -NMR method is a new promising tool for the estimation of total phenolic content in a wide range of matrixes from crude plant extracts and food products.