

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
Τμήμα Χημείας
Τομέας Οργανικής Χημείας & Βιοχημείας



**Μελέτη της σύστασης φυτικών εκχυλισμάτων ως προς την παρουσία
βιοδραστικών ενώσεων με τη χρήση μοντέρνων συνδυαστικών
τεχνικών ενόργανης ανάλυσης**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Της Βασιλικής Κοντογιάννη
Χημικού, MSc
ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2009

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.1	5
Μέθοδοι μελέτης της σύστασης φυτικών εκχυλισμάτων	
1.1.1 Γενικές χρωματογραφικές τεχνικές (HPLC, GC κ.α.)	5
1.1.2 Συζευγμένες τεχνικές LC-NMR στην ανάλυση φυσικών προϊόντων	16
1.1.3 Σύγκριση συζευγμένων τεχνικών LC	23
1.1.4 Ανάλυση μιγμάτων με τη χρήση φασματοσκοπίας NMR (Nuclear Magnetic Resonance)	25
1.1.4.1 Ταυτοποίηση συστατικών σε μίγματα με τη χρήση φασματοσκοπίας NMR- ¹ H	25
1.1.4.2 Φασματοσκοπία NMR- ¹ H σε συνδυασμό με στατιστική ανάλυση ως τεχνική «δακτυλικού» αποτυπώματος (fingerprinting) και μελέτης προέλευσης φυσικών προϊόντων	27
1.1.4.3 Φασματοσκοπία NMR και μεταβονομική (metabonomics)	29
1.1.4.4 Ποσοτικός προσδιορισμός με τη χρήση φασματοσκοπίας NMR- ¹ H	30
1.1.4.5 Εφαρμογές της φασματοσκοπίας qHNMR σε τρόφιμα	37
1.1.4.6 Εφαρμογές της φασματοσκοπίας qHNMR σε συστατικά φυτικών εκχυλισμάτων	39
1.1.4.7 Ταυτοποίηση συστατικών σε μίγματα με τη χρήση διδιάστατης (2D) φασματοσκοπίας NMR και ποσοτικός προσδιορισμός τους	41
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.2	47
Κύριες κατηγορίες δευτερογενών μεταβολιτών-Τριτερπενοειδή και Διτερπένια	
1.2.1 Τριτερπενοειδή, χημικοί τύποι- Κυριότεροι εκπρόσωποι	47
1.2.2 Βιοσύνθεση τριτερπενοειδών- Σημασία για τα φυτά	48
1.2.3 Βιολογικές δράσεις τριτερπενοειδών (με έμφαση στο ολεανολικό και ουρσολικό οξύ)	51
1.2.4 Φυσικά προϊόντα πλούσια σε τριτερπενικά οξέα- αλκοόλες	52
1.2.5 Μέθοδοι προσδιορισμού τριτερπενικών οξέων- αλκοολών σε φυτικά εκχυλίσματα	53

1.2.6 Διτερπένια	55
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.3	57
Κύριες κατηγορίες δευτερογενών μεταβολιτών-Φλαβονοειδή και φαινολικά οξέα	
1.3.1 Φλαβονοειδή (γενικά, κυριότερες τάξεις, βιοσύνθεση)	57
1.3.2 Βιολογικές δράσεις φλαβονοειδών	61
1.3.3 Μέθοδοι ανάλυσης φλαβονοειδών	62
1.3.4 Φαινολικά οξέα	63
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	67
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	69
2.1 Δείγματα	69
2.2 Πρότυπες ενώσεις	69
2.3 Διαλύτες	69
2.4 Αντιδραστήρια	70
2.5 Όργανα-Συσκευές	70
2.6 Μέθοδοι	71
2.6.1 Παραλαβή εκχυλισμάτων από φυτικά προϊόντα	71
2.6.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων με τη δοκιμή σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH•	72
2.6.3 Φωτομετρικός προσδιορισμός ολικών φαινολικών συστατικών	73
2.6.4 Φωτομετρικός προσδιορισμός ολικών φλαβονοειδών συστατικών	74
2.6.5 Μελέτη της σύστασης των εκχυλισμάτων	75
2.6.5.1 Μελέτη της σύστασης των εκχυλισμάτων με τη χρήση NMR- 1D & 2D σε διαφορετικούς δευτεριωμένους διαλύτες	75
2.6.5.2 Μελέτη της σύστασης των εκχυλισμάτων με LC-ESI-MS	76
2.6.5.3 Μελέτη της σύστασης των εκχυλισμάτων με RP-HPLC για την παρουσία τριτερπενοειδών	77
ΚΕΦΑΛΑΙΑ 3,4,5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	79
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Μελέτη της σύστασης εκχυλισμάτων των οικογενειών <i>Lamiaceae</i>, <i>Oleaceae</i> και <i>Aprocynaceae</i>.	79
3.1 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής τους δράσης με τη δοκιμή σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH•, φωτομετρικός προσδιορισμός ολικών φαινολικών και φλαβονοειδών συστατικών	79

3.2 Μελέτη της σύστασης των εκχυλισμάτων με τη χρήση NMR-1D & 2D -	83
Ταυτοποίηση ομάδων ενώσεων κατηγοριοποιώντας περιοχές του φάσματος	
3.2.1 Εκχυλίσματα δεντρολίβανου	83
3.2.2 Εκχυλίσματα φασκόμηλου	100
3.2.3 Εκχυλίσματα θυμαριού	106
3.2.4 Εκχυλίσματα μαντζουράνας	115
3.2.5 Λοιπά εκχυλίσματα	119
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	123
4.1 Μελέτη της σύστασης με τη συνδυαστική τεχνική LC-ESI-MS	123
4.2 Σύγκριση μεταξύ των αποτελεσμάτων της τεχνικής LC-ESI-MS και των μεθοδολογιών NMR ως προς την παρουσία φλαβονοειδών	144
4.3 Ποσοτικός προσδιορισμός με HPLC των συστατικών των εκχυλισμάτων για τα οποία υπήρχαν πρότυπες ενώσεις	153
4.4 Ποσοτικός προσδιορισμός – Εκτίμηση των επιπέδων συγκέντρωσης του ροσμαρινικού οξέος με φασματοσκοπία NMR- ¹ H	157
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 Ταυτοποίηση-Διάκριση τριτερπενοειδών (τριτερπενικών οξέων και αλκοολών σε φυτικά εκχυλίσματα)	161
5.1 Διάκριση μίγματος ολεανολικού και ουρσολικού οξέος με λήψη φασμάτων NMR ¹ H & ¹³ C, HSQC ¹ H - ¹³ C & HMBC ¹ H - ¹³ C	161
5.2 Ταυτοποίηση του μίγματος OA και UA σε ακατέργαστα (crude) φυτικά εκχυλίσματα φασκόμηλου, θυμαριού, μαντζουράνας, φύλλων ελιάς και ροδοδάφνης	169
5.3 Διάκριση μίγματος μπετουλίνης, OA, UA και μπετουλινικού οξέος με λήψη φασμάτων HSQC ¹ H - ¹³ C & HMBC ¹ H - ¹³ C	173
5.4 Ταυτοποίηση του μίγματος B, OA, UA και BA σε ακατέργαστα (crude) φυτικά εκχυλίσματα δεντρολίβανου	176
5.5 Ταυτοποίηση μίγματος ερυθροδιόλης, ουβαόλης και OA με λήψη φασμάτων HSQC ¹ H - ¹³ C & HMBC ¹ H - ¹³ C	180
5.6 Ταυτοποίηση του μίγματος E, U και OA σε ακατέργαστο (crude) φυτικό εκχύλισμα φύλλων ελιάς	183
5.7 Ταυτοποίηση και ποσοτικός προσδιορισμός των τριτερπενοειδών με HPLC με τη χρήση κυκλοδεξτρίνων στην κινητή φάση	186
5.8 Ποσοτικός προσδιορισμός των τριτερπενοειδών με φασματοσκοπία NMR- ¹ H & HSQC ¹ H - ¹³ C	189

5.9 Σύγκριση των ποσοτικών αποτελεσμάτων με τις τεχνικές NMR και HPLC	192
Συμπεράσματα	195
Abstract	197
Βιβλιογραφία	201

Εισαγωγή

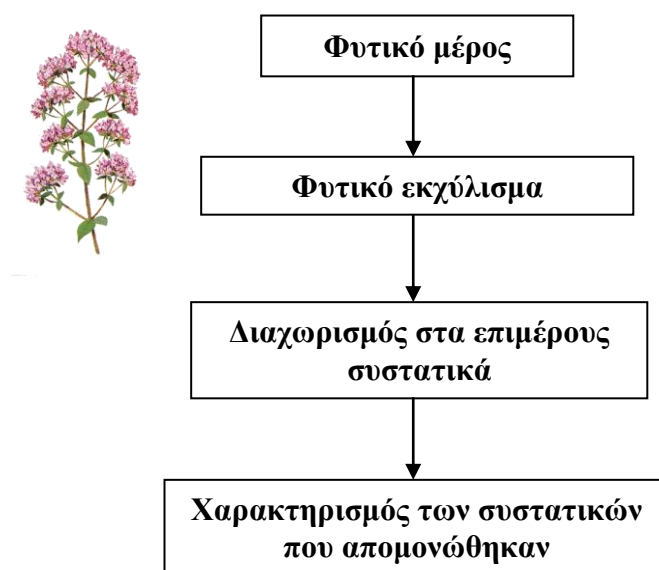
Πρόσφατες μελέτες αναφέρουν ότι υπάρχουν κατά προσέγγιση 500.000-750.000 είδη ανώτερων φυτών στη γη, από τα οποία ένα μικρό ποσοστό της τάξεως του 10% έχει ερευνηθεί ως προς τη σύσταση του. Πολλά από αυτά τα φυτά έχουν φαρμακευτικές ιδιότητες και είναι δεδομένο ότι από το σύνολο των φαρμάκων που κυκλοφορούν, σχεδόν τα μισά φάρμακα που έχουν σήμερα κλινικές χρήσεις έχουν φυσική προέλευση και το 50% των φαρμάκων κατά του καρκίνου είναι είτε φυσικά προϊόντα είτε προέρχονται άμεσα από αυτά (*Newman and Cragg, 2007*). Τα τελευταία χρόνια, πολλές έρευνες έδειξαν ότι δίαιτες που περιέχουν υψηλά ποσοστά σε φυτοχημικά μπορούν να παρέχουν προστασία ενάντια σε διάφορες ασθένειες. Οι προστατευτικές δράσεις από την κατανάλωση φρούτων, λαχανικών, καρυκευμάτων και βοτάνων, έχουν διαπιστωθεί όχι μόνο για την περίπτωση του καρκίνου αλλά και για άλλες χρόνιες ασθένειες, όπως οι καρδιαγγειακές παθήσεις.

Τα φυσικά προϊόντα είναι ανεξάντλητη πηγή βιοδραστικών συστατικών και η εμφάνιση στη χημεία των φυσικών προϊόντων παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της πολυπλοκότητας των χημικών δομών τους και των πολύ ιδιαίτερων χαρακτηριστικών λειτουργικών ομάδων τους. Πολλές μελέτες εστιάζονται στη χημεία και τη βιοδραστικότητα αυτών των φυσικών προϊόντων, που προώθησαν την ανακάλυψη φαρμάκων από φυσικές πηγές. Ωστόσο, λίγα είναι γνωστά για τους μηχανισμούς δράσης τους και ακόμα λιγότερα για τις φαρμακολογικές ιδιότητές τους, εξαιτίας εν μέρει της απουσίας, συγκεκριμένων και ευαίσθητων αναλυτικών μεθόδων.

Αν και ο όρος φυσικά προϊόντα ετυμολογικά 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 αφορούν τους ζωντανούς οργανισμούς ή παράγονται από αυτούς, κάτι το οποίο παραδοσιακά χαρακτήριζε τις οργανικές ενώσεις. Από άποψη δομής, οι τάξεις των ενώσεων που παραδοσιακά συνδέθηκαν με τη χημεία των φυσικών προϊόντων είναι: α) υδατάνθρακες, α-αμινοξέα, πρωτεΐνες, λίπη, νουκλεϊνικά οξέα κ.λπ., που ορίζονται ως προϊόντα πρωτογενούς μεταβολισμού και είναι θεμελιώδη λειτουργικά συστατικά όλων πρακτικά των οργανισμών και β) φαινολικές ενώσεις (ανθοκυάνες,

φλαβονοειδή), τερπένια, στεροειδή, αλκαλοειδή και πολλά ετεροκυκλικά παράγωγα, που ορίζονται ως προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού και χαρακτηρίζουν το είδος που τα παράγει χωρίς να συμμετέχουν στη βασική οργανική του λειτουργία. Σήμερα, ο όρος φυσικά προϊόντα αναφέρεται στα προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού, που δημιουργούνται τόσο στο φυτικό όσο και στο ζωικό βασίλειο. Από τις τάξεις των ενώσεων που αναφέρθηκαν παραπάνω, τα τερπένια, τα αλκαλοειδή και διάφορες φαινολικές ουσίες απομονώνονται κυρίως από τα φυτά, ενώ τα στεροειδή και οι φερομόνες είναι κυρίως συστατικά των ζωικών οργανισμών (Ιγνατιάδου-Ραγκούση, 1996).

Η διαδικασία που ακολουθείται συνήθως για τη μελέτη της σύστασης ενός φυτικού εκχυλίσματος περιλαμβάνει το στάδιο της εκχύλισης με διάφορους διαλύτες, του φυτικού παρασκευάσματος, οι οποίοι εκλεκτικά παραλαμβάνουν τα συστατικά του ανάλογα με τη δομή τους και στη συνέχεια το στάδιο της απομόνωσης και του καθαρισμού των επιμέρους συστατικών με κλασμάτωση ή/και με χρωματογραφικές τεχνικές. Ακολουθεί η συλλογή δεδομένων που θα οδηγήσουν στο χαρακτηρισμό των απομονωμένων ενώσεων, όπως η καταγραφή των φασμάτων υπερύθρου (IR), υπεριώδους (UV), μάζας (MS), πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR-¹H, NMR-¹³C καθώς και NMR δυο διαστάσεων, και ο προσδιορισμός των φυσικών τους σταθερών προκειμένου να γίνει η πλήρης ταυτοποίησή τους. Η διαδικασία περιγράφεται σχηματικά παρακάτω (Σχήμα 1).



Σχήμα 1. Η διαδικασία που ακολουθείται συνήθως για τη μελέτη της σύστασης ενός φυτικού εκχυλίσματος.

Η ανάπτυξη κατάλληλων αναλυτικών τεχνικών που θα παρέχουν γρήγορη μελέτη νέων πηγών γνωστών ή και νέων φυτοχημικών μπορεί να αποδειχθεί πολύτιμη στην έρευνα φυσικών προϊόντων. Αυτές οι τεχνικές κυρίως περιλαμβάνουν χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (RP-HPLC) με τη χρήση διάφορων ανιχνευτών, αλλά έχουν αναπτυχθεί και άλλες τεχνικές (Κεφάλαιο 1.1.1). Επίσης, η υγρή χρωματογραφία σε σύζευξη με τη φασματομετρία μαζών (LC-MS) έχει ευρέως χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση φυσικών προϊόντων, αλλά και για τον μεταβολισμό και τη φαρμακοκινητική τους μελέτη, εξαιτίας της εξαιρετικής ευαισθησίας, της εκλεκτικότητας και της ταχύτητας που παρουσιάζει ως τεχνική (Κεφάλαιο 1.1.1). Στην ίδια κατεύθυνση η ανάπτυξη νέων συζευγμένων LC-NMR τεχνικών, έδωσε νέα ώθηση στην ταυτοποίηση νέων συστατικών από φυτοχημικά (Κεφάλαιο 1.1.2). Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear magnetic resonance, NMR) χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο ως μέθοδος εύρεσης του δακτυλικού αποτυπώματος («fingerprinting») φυσικών προϊόντων, για τη μελέτη μιγμάτων διαφόρων συστατικών που ανήκουν στην ίδια ή σε διαφορετικές χημικές τάξεις χωρίς προηγούμενο διαχωρισμό τους, κ.α. (Κεφάλαιο 1.2).

Η Ελλάδα θεωρείται προνομιούχα χώρα από την άποψη της πολυπλοκότητας και μοναδικότητας που παρουσιάζει η χλωρίδα της, καθώς περίπου 6000 φυτά έχουν ταυτοποιηθεί, πολλά από τα οποία είναι φαρμακευτικά. Κατά την αρχαιότητα είχαν δημιουργηθεί διάφορα γνωστά θεραπευτικά κέντρα, ενώ σε μεταγενέστερες εποχές η περιοχή του Ζαγορίου κατείχε εξέχουσα θέση στον τομέα αυτό. Συγκεκριμένα, κατά τον 17^ο-19^ο αιώνα αναδείχτηκε ως το δημοφιλέστερο κέντρο παραδοσιακής ιατρικής της Βαλκανικής χερσονήσου. Σε ένα τέτοιο περιβάλλον προικισμένο με φυσική ομορφιά και βιοποικιλότητα αναπτύχθηκε και άνθησε η τέχνη της βοτανοθεραπευτικής. Μάλιστα, οι παραδοσιακοί θεραπευτές-πρακτικοί που προερχόταν από αυτή την περιοχή ονομαζόταν «Βικογιατροί» ή «κομπογιαννίτες». Συνιστούσαν, λίγο πολύ, μια αδελφότητα που χρησιμοποιούσε συγκεκριμένη διάλεκτο για να επικοινωνούν και να αναγνωρίζονται μεταξύ τους. Προερχόταν όλοι από την περιοχή του Ζαγορίου και προμηθευόταν τα βότανα που χρησιμοποιούσαν στις συνταγές τους από την ίδια περιοχή: τη χαράδρα του Βίκου, το φαράγγι του Αώου και τα γύρω βουνά. Σύμφωνα με σχετική μελέτη κατεγράφησαν πάνω από 500

φαρμακευτικά ή πιθανά φαρμακευτικά φυτικά είδη (medicinal plant taxa) στην περιοχή του Ζαγορίου (Vokou et al., 1993).

Συνεπώς, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η ανάπτυξη και εφαρμογή αναλυτικών μεθόδων που θα παρέχουν γρήγορη μελέτη συστατικών εκχυλισμάτων φαρμακευτικών φυτών, όπως είναι για παράδειγμα φυτά που ανήκουν στην οικογένεια *Lamiaceae*. Η οικογένεια *Lamiaceae* περιλαμβάνει 200 γένη και 3500 περίπου είδη φυτών, που φύονται κυρίως στη Μεσόγειο. Τα φυτά της οικογένειας αυτής χρησιμοποιούνται ευρέως από την αρχαιότητα ως αρτύματα, αφεψήματα ή ακόμη και ως «φάρμακα». Από τα κυριότερα μέλη της οικογένειας είναι το δεντρολίβανο, το φασκόμηλο, το θυμάρι, η μαντζουράνα κ.α. Κυριότερα συστατικά των εκχυλισμάτων αυτών των φυτών είναι τα φλαβονοειδή και τα φαινολικά οξέα (Κεφάλαιο 1.3), τα τριτερπενοειδή και τα διτερπένια (Κεφάλαιο 1.4). Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκε η σύσταση ενός είδους από τα παραπάνω φυτά της οικογένειας *Lamiaceae*, αλλά και ως προς την παρουσία τριτερπενοειδών μελετήθηκε, εκχύλισμα φύλλων ελιάς της οικογένειας *Oleaceae* και εκχύλισμα φύλλων ροδοδάφνης της οικογένειας *Aprocynaceae*.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η διδακτορική διατριβή με θέμα «Μελέτη της σύστασης φυτικών εκχυλισμάτων ως προς την παρουσία βιοδραστικών ενώσεων με τη χρήση μοντέρνων συνδυαστικών τεχνικών ενόργανης ανάλυσης» που ακολουθεί, πραγματοποιήθηκε με Επιβλέποντα τον Καθηγητή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων Ι.Π. Γεροθανάση. Την τριμελή Συμβουλευτική Επιτροπή απαρτίζουν ο Καθ. Ι.Π. Γεροθανάσης και οι Αν. Καθ. Κ. Σταλίκας του Τμήματος Χημείας και Αν. Καθ. Ε. Μπριασούλης του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθ. Ι.Π. Γεροθανάση, για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος και την πολύτιμη καθοδήγηση του κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω ιδιαίτερα το μέλος ΕΙΔΠΙ κ. Β. Εξάρχου, υπεύθυνη του Κέντρου NMR του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την συνεχή καθοδήγηση και συμπαράσταση της 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 ιδιαίτερος την Λέκτορα του Τμήματος Χημείας κ. Α. Μπαδέκα, που ως υπεύθυνη του Κέντρου Μάζας μου παρείχε κάθε δυνατή βοήθεια κατά τη λήψη των πειραμάτων.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα επίσης να εκφράσω στα μέλη της τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπή, τον Αν. Καθ. Κ. Σταλίκας του Τμήματος Χημείας και τον Αν. Καθ. Ε. Μπριασούλη του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, καθώς και στα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, στον Καθ. Τ. Αλμπάνη, στον Αν. Καθ. Γ. Βαρβούνη και στον Λέκτορα Α. Τζάκο του Τμήματος Χημείας καθώς και στον Καθ. Δ. Γαλάρη του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για τις υποδείξεις και διορθώσεις που πρότειναν στην παρούσα διδακτορική διατριβή.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συναδέλφους μου στο Εργαστήριο Φασματοσκοπίας Οργανικών Ενώσεων του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, τον Δρ. Βλάσιο Γούλα, τον κ. Παντελή Χαρισιάδη και ιδιαίτερα την υποψήφια διδάκτορα κ. Αλεξάνδρα Νεραντζάκη για την άριστη συνεργασία μας και την πολύτιμη φιλία της.

Κοντογιάννη Βασιλική

Ιούνιος 2009

Σκοπός της διδακτορικής διατριβής

Τα φυσικά προϊόντα είναι ανεξάντλητη πηγή βιοενεργών συστατικών που αποκτούν ολοένα αυξανόμενο ενδιαφέρον για τη χρήση τους στη θεραπευτική και τη βιοτεχνολογία. Πρόσφατη μελέτη αναφέρει ότι περίπου το 50% των φαρμάκων κατά του καρκίνου είναι είτε φυσικά προϊόντα είτε προέρχονται άμεσα από αυτά. Η αναζήτηση συστατικών με ποικίλες δράσεις σε φυσικά προϊόντα και η εκτίμηση της δράσης των επιμέρους συστατικών των εκχυλισμάτων είναι μια εξαιρετικά δύσκολη και επίπονη διαδικασία, εξαιτίας της πολυπλοκότητάς τους. Συνεπώς, είναι ιδιαίτερα επιθυμητή η ανάπτυξη μεθοδολογιών για την άμεση, γρήγορη και ακριβή ταυτοποίησή τους σε πολύπλοκα φυτικά εκχυλίσματα χωρίς τον προηγούμενο χρωματογραφικό διαχωρισμό τους. Η χρήση της φασματοσκοπίας NMR στην ανάλυση πολύπλοκων μιγμάτων όπως τα φυτικά εκχυλίσματα, πλεονεκτεί έναντι των άλλων μεθόδων ανάλυσης καθώς απαιτείται η ελάχιστη δυνατή προκατεργασία του δείγματος και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτόχρονη ανίχνευση διαφορετικών τάξεων ενώσεων.

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η διερεύνηση του βέλτιστου τρόπου εργασίας για την ανάλυση (η ανάπτυξη ενός πρωτόκολλου ανάλυσης) διαφορετικών τάξεων ενώσεων σε φυτικά εκχυλίσματα με τη χρήση μεθοδολογιών Πυρηνικού μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) 1D και 2D, χωρίς τον προηγούμενο διαχωρισμό τους. Συγκεκριμένα, οργανικά εκχυλίσματα φυτών που ανήκουν στις οικογένειες *Lamiaceae*, *Oleaceae*, *Rutaceae* & *Apocynaceae* επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε δευτεριωμένους διαλύτες και έγινε μια προσπάθεια ταυτοποίησης και, σε ορισμένες περιπτώσεις, ποσοτικού προσδιορισμού των κύριων συστατικών τους, που ανήκουν στις κατηγορίες των δι- και τριτερπενίων, των φαινολικών οξέων και των φλαβονοειδών.

Για σύγκριση των αποτελεσμάτων εφαρμόστηκε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης και για την περαιτέρω διαπίστωση της πολυπλοκότητας των εκχυλισμάτων υγρή χρωματογραφία σε σύζευξη με φασματομετρία μαζών. Τέλος, έγινε εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων και φωτομετρικός προσδιορισμός των ολικών φαινολών, φλαβονοειδών και φλαβονών τους.

Abstract

Natural environment and especially plants continue to provide a dynamic research area in the field of drug discovery, since phytochemicals can be possible starting materials of novel bioactive compounds. In the present drug discovery programmes, natural products or compounds derived from natural products account for > 40% of the new registered drugs. In order to discover new bioactive compounds, extracts from plants or other natural sources should be submitted at the same time to chemical screening and various biological or pharmacological targets. 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). Our experience in studying antioxidants that are present in plant extracts revealed that 1D and 2D NMR spectroscopy can be used as an alternative analytical technique to provide insight into mixtures without any previous separation of the individual components.

The aim of this thesis was to use different 1D and 2D NMR methodologies for the characterization of different classes of secondary metabolites in plant extracts without any previous separation and isolation of the individual components. The crude plant extracts, belonging in the *Lamiaceae*, *Oleaceae* and *Apocynaceae* families, were dissolved in deuterated solvents (CD_3CN and pyridine- d_5) and an attempt was made for the identification, and in some cases, the quantification of their main components, belonging to the classes of flavonoids and phenolic acids, diterpenes and triterpenoids. Ground leaves of *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*, *Thymus vulgaris*, *Origanum majorana*, *Olea europaea* and *Nerium oleander* were subsequently extracted with *n*-hexane and ethyl acetate. The extracts were concentrated in rotary evaporator and kept into sealed flasks.

As a first step, extracts were investigated for their radical scavenging activity using DPPH \cdot assay and the content of total phenolic compounds and flavonoids was measured in plant extracts. Because of their strong radical scavenging activity (of most of the extracts) and the high amounts of total phenolic compounds and flavonoids of the ethyl acetate extracts, their composition was further investigated. All crude extracts were dissolved in CD_3CN and the 1H - NMR, 1H - 1H COSY, 1H - ^{13}C HSQC and HMBC spectra were acquired. In the 1H - NMR spectrum of the extracts a very characteristic region between 11 to 13 ppm, which is of high diagnostic value for the presence of flavonoids, was observed. The highly deshielded signals in this region are attributed to the hydroxyl protons OH(5), which participate in a strong intramolecular hydrogen bond, formed between the hydroxyl and the carbonyl group at CO(4). As a rule the 1H - NMR resonances of the -OH groups appear at room temperature as broad signals especially in protic solvents, owing to the mobility of the hydrogen and its fast exchange, on the NMR time scale, with the protons of the

solvent. However, by decreasing the temperature, the proton exchange rate is reduced and the –OH peaks are revealed as sharp peaks. With the use of proper temperature and by spiking with standards, certain flavones, flavonols and flavanones were detected in ethyl acetate extracts.

Also in the ^1H - NMR spectrum of the ethyl acetate extracts of the *Lamiaceae* family two doublets resonating at ~ 6.2 and ~ 7.5 ppm respectively ($J = 15.8$ Hz), were observed. Their coupling constant indicates the presence of the *trans*-isomer of the hydroxycinnamic acid derivative. In ^1H - ^1H COSY spectrum the strongest cross-peaks ($\text{H}_{3\alpha}$, $\text{H}_{2\alpha}$), ($\text{H}_{3\alpha}$, $\text{H}_{3\beta}$) και (H_2 , $\text{H}_{3\alpha,\beta}$) are diagnostic of the caffeic acid moiety. Moreover in the ^1H - ^{13}C HSQC spectrum certain very strong cross-peaks indicate a coupling network that can be attributed to rosmarinic acid. Both proton and carbon-13 chemical shifts of rosmarinic and caffeic acid are almost the same, but there is a significant difference in the ^{13}C shielding and the number of cross-peaks of the –COOR and –COOH carbons, in the ^1H - ^{13}C HMBC spectrum, which offers the solution to the problem of the unequivocal assignment of them. The high resolution of the 2D ^1H - ^{13}C HMBC spectrum allowed us to determine unambiguously the individual cross-peaks of the spin system of rosmarinic acid $r(\text{H}_{3\alpha}$, $\text{C}_{1\alpha})$, $r(\text{H}_{2\alpha}$, $\text{C}_{1\alpha})$, even at room temperature. In addition, in the hexane and ethyl acetate extracts of sage and rosemary, using a combination of ^1H - ^{13}C HSQC and ^1H - ^{13}C HMBC NMR spectroscopy, the diterpenes carnosic acid and carnosol were identified.

In order to confirm the results from the identification of compounds with 1D and 2D NMR spectroscopy and to ascertain the complexity or not of the composition of crude plant extracts, they were dissolved in methanol and analyzed with LC-ESI-MS. Various compounds were tentatively identified and for some of them using standards were identified, belonging to the classes of flavonoids and phenolic acid (rosmarinic acid), diterpenes, simple phenols and triterpenic acids. The presence of compounds identified using 1D and 2D NMR spectroscopy was confirmed with the LC-ESI-MS analysis. The quantification of the standard compounds that were commercially available was achieved using seven point calibration curves. The levels of rosmarinic acid in the extracts were also examined by the use of ^1H - NMR spectroscopy and were in good agreement with those obtained by HPLC.

Finally, a novel strategy for NMR analysis of mixtures of oleanolic (OA) and ursolic acids (UA) that occur in natural products was described. The combination of ^1H - ^{13}C HSQC and ^1H - ^{13}C HMBC techniques allows the connection of the proton and carbon-13 spins across the molecular backbone resulting in the identification and, thus, discrimination of OA and UA without resorting to physicochemical separation of the components. The methodology was extended and to other triterpenoids (betulinic acid, betulin, erythrodiol and uvaol) that were identified in some of the above extracts. The quantitative results provided by 2D ^1H - ^{13}C HSQC NMR data were obtained within a short period of time (~ 14 min) and were in excellent

agreement with those obtained by HPLC (using modified cyclodextrins in the mobile phase), which supported the efficiency of the suggested methodology.

1.1 Μέθοδοι μελέτης της σύστασης φυτικών εκχυλισμάτων

1.1.1 Γενικές χρωματογραφικές τεχνικές (HPLC, GC, κ.α.)

Τα τελευταία 100 χρόνια η χρωματογραφία έχει αναπτυχθεί από μια υποτυπώδη αναλυτική τεχνική διαχωρισμού χρωστικών σε ένα σύνολο τεχνικών ικανών να αντιμετωπίσουν τα πιο πολύπλοκα προβλήματα που ανακύπτουν όσον αφορά την ανάλυση και τον καθαρισμό ενώσεων από πολύπλοκα μίγματα. Στον Πίνακα 1.1 δίνεται μια λίστα από τις χρωματογραφικές τεχνικές που εφαρμόζονται συχνότερα στην ανάλυση φυτοχημικών.

Πίνακας 1.1: Οι κύριες χρωματογραφικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται στη φυτοχημεία (Marston, 2007)

Χρωματογραφική τεχνική	Μηχανισμός Διαχωρισμού
Χρωματογραφία υγρού –στερεού	Απορρόφηση
Χάρτου	(Απορρόφηση), Κατανομή
Χρωματογραφία αέριου-υγρής φάσης (GLC)	Απορρόφηση, Κατανομή
Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC)	Απορρόφηση, Κατανομή
Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)	Απορρόφηση, Κατανομή
Υγρή χρωματογραφία υπερυψηλής απόδοσης (ultra-performance liquid chromatography- UPLC)	Απορρόφηση, Κατανομή
Χρωματογραφία υπερκρίσιμου ρευστού (SFC)	Απορρόφηση, Κατανομή
Χρωματογραφία υγρού-υγρού (LLC)	Κατανομή
Χρωματογραφία κατ' αντιρροή (CCC)	Κατανομή
Χρωματογραφία ιονανταλλαγής (IEC)	Ιονανταλλαγή (Ion-exchange)
Ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδές	Φορτίο
Χρωματογραφία ιοντικού ζεύγους	Διαμόρφωση ιοντικού ζεύγους, ιοντική αλληλεπίδραση
Χρωματογραφία υδροφοβικής αλληλεπίδρασης (HIC)	Κατανομή
Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC)	Μέγεθος προσδιοριζόμενου συστατικού
Χρωματογραφία (χημικής) συγγένειας	Βιολογική συγγένεια

Μια από τις παλαιότερες τεχνικές είναι η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (thin-layer chromatography- TLC), που είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για ένα γρήγορο έλεγχο (screening) φυτικών εκχυλισμάτων για φαρμακολογικά δραστικά συστατικά. Συνήθως η τεχνική αυτή προηγείται της σε βάθος ανάλυσης των εκχυλισμάτων με οργανολογικές τεχνικές, εξαιτίας της ικανότητάς της να χρησιμοποιείται μεγάλος όγκος δείγματος. Μαζί με την ανοιχτή χρωματογραφία στήλης (column chromatography- CC) χρησιμοποιούνται έως σήμερα για το διαχωρισμό φυσικών προϊόντων εξαιτίας της ευκολίας που παρουσιάζουν ως μέθοδοι, του χαμηλού τους κόστους, της δυνατότητας που προσφέρουν για τον ταυτόχρονο διαχωρισμό και την ανίχνευση ενός αξιόλογου αριθμού δειγμάτων αλλά και εξαιτίας της διαθεσιμότητας νέων στατικών φάσεων. Η TLC έχει χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό και την ταυτοποίηση φαινολικών οξέων και φλαβονοειδών σε υδατικά εκχυλίσματα αρωματικών φυτών της οικογένειας *Lamiaceae* (Triantaphyllou et al., 2001).

Πολλές καινούργιες τεχνικές έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια όσον αφορά την χρωματογραφία TLC που περιλαμβάνουν: (1) μεθόδους που παρέχουν μια σταθερή και βέλτιστη ταχύτητα κινητής φάσης (αναγκαστική ροή και κινούμενη-ηλεκτροωσμωτικά ροή), (2) βιντεοσκοπημένη οπτική πυκνομετρία για καταγραφή πολυδιάστατων χρωματογραφημάτων, (3) φασματομετρία μάζας και (4) παρακολούθηση βιοδραστικότητας, για εκλεκτική ανίχνευση. Αυτές οι τεχνικές, σε συνδυασμό με διδιάστατες τεχνικές- 2D, πολλαπλής ανάπτυξης και συζευγμένες τεχνικές διαχωρισμού στήλης- στιβάδας μπορούν να αυξήσουν σε μεγάλο βαθμό τη χρήση της χρωματογραφίας TLC για το χαρακτηρισμό πολύπλοκων μιγμάτων όπως είναι τα φυτικά εκχυλίσματα.

Πολλά πτητικά συστατικά υπόκεινται άμεσα σε ανάλυση με αέρια χρωματογραφία (gas chromatography- GC), μια τεχνική με εξαιρετικές δυνατότητες διαχωρισμού. Ιδιαίτερα όταν συνδέεται με φασματομετρία μαζών (mass spectrometry-MS) προσφέρει ως τεχνική εξαιρετική ευαισθησία και εκλεκτικότητα. Οι περισσότερες GC-MS μελέτες πραγματοποιούνται με ιοντισμό (μορίου) με σύγκρουση με ηλεκτρόνιο (electron impact ionization mode). Η χρωματογραφία GC είναι μια από τις κύριες χρωματογραφικές τεχνικές που εφαρμόζεται για την ανάλυση ιδιαίτερα φαινολικών οξέων σε φυτά. Πριν από την ανάλυση με χρωματογραφία GC τα φαινολικά συστατικά συνήθως μετατρέπονται σε περισσότερο πτητικά συστατικά

με μεθυλίωση. Μια βελτιωμένη διαδικασία παραγωγοποίησης, χρησιμοποιώντας παραγωγοποίηση-εκχύλιση-σε φιαλίδιο (in-vial derivatisation-extraction), προτάθηκε από τους *Fiamegos et al., 2003, 2005* για τη GC-MS ανάλυση μεθυλιωμένων φλαβονοειδών σε διάφορα δείγματα βοτάνων. Επίσης, σε βιολογικά υγρά έχει αναφερθεί η ανάπτυξη μιας υπέρ-ευαίσθητης GC-MS μεθόδου για τον ποσοτικό προσδιορισμό κατεχίνης, κερκετίνης και ρεσβερατρόλης. Όσον αφορά τους γλυκοζίτες φλαβονοειδών είναι ιδιαίτερα δύσκολη η ανάλυσή τους με συμβατική χρωματογραφία GC ακόμα και μετά την παραγωγοποίησή τους (*Stalikas, 2007*).

Παρατηρείται μια συνεχώς αυξανόμενη ανάγκη να γνωρίζουμε τα προφίλ των φυτοχημικών συστατικών σε διαφορετικά φυτά, αλλά και μεταξύ διαφορετικών ποικιλιών του ίδιο φυτού. Όμως, οι συμβατικές χρωματογραφικές τεχνικές (TLC, CC) γενικά στερούνται την ευαισθησία και τη διακριτική ικανότητα που συχνά απαιτείται για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό συστατικών που βρίσκονται σε ίχνη. Η χρωματογραφία GC παρότι πληροί αυτές τις προϋποθέσεις έχει περιορισμένη χρήση καθώς οι περισσότερες ενώσεις δεν είναι πτητικές. Είναι καθολικά αποδεκτό ότι η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (high performance liquid chromatography-HPLC) είναι το πιο δημοφιλές και αξιόπιστο σύστημα μεταξύ όλων των τεχνικών χρωματογραφικού διαχωρισμού για τον διαχωρισμό συστατικών φυτικών εκχυλισμάτων. 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 φωτοδιόδων (diode array detector-DAD) σε σύζευξη με φασματομετρία μαζών (MS) (*Tsao and Deng, 2004*).

Οι τεχνικές HPLC προσφέρουν μια μοναδική ευκαιρία για τον ταυτόχρονο διαχωρισμό όλων των υπό ανάλυση συστατικών μαζί με πιθανά παράγωγα τους ή τα προϊόντα αποικοδόμησης τους. Η χρωματογραφία HPLC είναι η καταλληλότερη τεχνική για τον αποδοτικό διαχωρισμό ακατέργαστων εκχυλισμάτων, όπως αναφέρουν οι *Sakakibara et al., 2003*, που ανέπτυξαν μια μέθοδο για τον ποσοτικό προσδιορισμό κάθε πιθανής πολυφαινόλης που ανευρίσκεται σε λαχανικά, φρούτα και δείγματα τσαγιού. Η χρωματογραφία HPLC χρησιμοποιείται σε αναλύσεις ρουτίνας στο πεδίο της φυτοχημείας για την «καθοδήγηση» («pilot») της παρασκευαστικής απομόνωσης φυσικών προϊόντων (τη βελτιστοποίηση των πειραματικών συνθηκών, τον έλεγχο των διαφορετικών κλασμάτων καθ' όλη τη

διάρκεια του διαχωρισμού) και τον έλεγχο της καθαρότητας των ενώσεων που απομονώθηκαν. Πέρα από την αναλυτική HPLC υπάρχει και η παρασκευαστική HPLC, στην οποία χρησιμοποιούνται μεγαλύτερες στήλες και υλικά πλήρωσης. Σκοπός της είναι να απομονωθούν και να καθαριστούν οι διάφορες ενώσεις, ενώ στην αναλυτική HPLC σκοπός είναι να προκύψουν πληροφορίες για το δείγμα (Marston, 2007).

Η κατασκευή στηλών ανάστροφης φάσης (reversed phase, RP) έχει βελτιώσει σημαντικά το διαχωρισμό με HPLC διαφορετικών τάξεων φαινολικών συστατικών. Σχεδόν αποκλειστικά χρησιμοποιούνται στήλες RP C₁₈ φάσης, το μήκος των οποίων βρίσκεται μεταξύ 100 έως 250 mm, με εσωτερική διάμετρο 3.9 έως 4.6 mm και μέγεθος πόρων 3-10 μm. Ένα δυαδικό σύστημα διαλυτών που αποτελείται από οξινομένο νερό (διαλύτης A) και ένα πολικό οργανικό διαλύτη (διαλύτης B) χρησιμοποιείται ως κινητή φάση, ενώ τόσο η ισοκρατική όσο και η βαθμωτή έκλυση έχει εφαρμοστεί στην ανάλυση φαινολικών συστατικών. Είναι σημαντικό να αποφευχθεί ο ιοντισμός των προσδιοριζόμενων συστατικών κατά τη διάρκεια της ανάλυσης για να βελτιωθεί η διαχωριστική ικανότητα και η αναπαραγωγιμότητα των χαρακτηριστικών κατακράτησης. Έτσι κατά την ανάλυση με HPLC, το pH θα πρέπει να διατηρείται σταθερό σε μια συγκεκριμένη περιοχή τιμών, που για τα φαινολικά συστατικά είναι pH 2-4. Για τον έλεγχο του pH προστίθεται μικρή ποσότητα κάποιου οξέος στο μίγμα νερού- οργανικού διαλύτη, που μπορεί να είναι οξικό, φορμικό ή φωσφορικό οξύ και σπάνια υπερχλωρικό οξύ. Εναλλακτικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί κάποιο ρυθμιστικό διάλυμα σε χαμηλό pH, όπως φωσφορικών ή κιτρικών ιόντων (Stalikas, 2007).

Η χρωματογραφία κατ' αντιρροή (counter-current chromatography- CCC) αποτελεί ένα ακόμα επίτευγμα της προόδου του 20^{ου} αιώνα, που έχει τεράστιες συνέπειες στην ανάλυση φυτοχημικών ενώσεων. Η χρωματογραφία κατ' αντιρροή (ή χρωματογραφία κεντρομόλου κατανομής, όπως είναι επίσης γνωστή) είναι μια τεχνική διαχωρισμού αποκλειστικά υγρού (all-liquid) που στηρίζεται στην κατανομή ενός δείγματος μεταξύ δύο μη αναμίξιμων διαλυτών. Συγκεκριμένα, οι σχετικές αναλογίες της διαλυμένης ουσίας που περνάει σε κάθε μια από τις δυο φάσεις προσδιορίζονται από τους αντίστοιχους συντελεστές κατανομής. Είναι πολύ ευέλικτη τεχνική και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την κλασμάτωση ακατέργαστων φυτικών

εκχυλισμάτων ή στα τελικά στάδια καθαρισμού (Marston, 2007). Η υψηλής ταχύτητας CCC (high-speed CCC- HSCCC) είναι η πιο εξελιγμένη μορφή CCC όσον αφορά την απόδοση κατανομής και το χρόνο διαχωρισμού. 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. Έχουν αναφερθεί αρκετές αναφορές στη βιβλιογραφία, όπου εφαρμόστηκε χρωματογραφία HSCCC για το διαχωρισμό και την προετοιμασία δραστικών συστατικών από παραδοσιακά φαρμακευτικά φυτά. Για παράδειγμα έχει χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό ταννίνων, προανθοκυανιδίων, χλωρογενικού οξέος, καροτενοειδών κ.α. (Tsao and Deng, 2004).

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 που είναι τα παρακάτω:

(1) Η χρήση υπερκρίσιμου ρευστού όπως το διοξείδιο του άνθρακα μειώνει σημαντικά τη σπατάλη διαλυτών και διευκολύνει την απομάκρυνση του διαλύτη όταν χρησιμοποιείται για τη συλλογή κλασμάτων.

(2) Τα φυτοχημικά συστατικά 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.

(3) Παράμετροι όπως, η θερμοκρασία, η πίεση και η σύσταση του ρευστού της κινητής φάσης μπορούν να μεταβληθούν οπότε μπορεί πιο εύκολα να προκύψει καλύτερος διαχωρισμός.

Οι περισσότερες αναφορές που υπάρχουν στη βιβλιογραφία για ανάλυση φυτοχημικών συστατικών με χρωματογραφία SFC σχετίζονται με το διαχωρισμό σχετικά λιπόφιλων αντιοξειδωτικών. Αυτό είναι αναμενόμενο, καθώς το διοξείδιο του άνθρακα, που είναι μη-πολικό μόριο είναι το πιο δημοφιλές υπερκρίσιμο ρευστό. Για

παράδειγμα έχει χρησιμοποιηθεί η χρωματογραφία SFC για τον ταυτόχρονο διαχωρισμό *cis*- και *trans*- α - και β - καροτενοειδών.

Παρότι, η χρωματογραφία HPLC παραμένει η πιο κυρίαρχη τεχνική διαχωρισμού για τα αντιοξειδωτικά φυτοχημικά συστατικά, η ηλεκτροφόρηση-ηλεκτροχρωματογραφία τριχοειδούς (capillary electrophoresis- CE) κερδίζει συνεχώς σε δημοτικότητα. Όπως η χρωματογραφία HSCCC και SFC, η CE είναι και αυτή σχετικά νέα τεχνική, ωστόσο αντιπροσωπεύει μια εναλλακτική τεχνική για την ανάλυση διαφορετικών ομάδων φυτοχημικών. Η τεχνική CE έχει ορισμένα μοναδικά πλεονεκτήματα σε σύγκριση με την HPLC:

- (1) Απαιτεί πολύ μικρή ποσότητα δείγματος.
- (2) Έχει μεγάλη απόδοση εξαιτίας του μη παραβολικού προσανατολισμού (non-parabolic fronting) της.
- (3) Με αυτή τη μέθοδο απαιτείται μικρότερος χρόνος ανάλυσης.
- (4) Έχει μικρότερο κόστος, ιδιαίτερα όταν χρησιμοποιείται ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδές (capillary zone electrophoresis-CZE) και τριχοειδές τηγμένης πυριτίας (fused-silica capillary).
- (5) Δεν χρησιμοποιείται καθόλου ή χρησιμοποιείται μικρή ποσότητα οργανικού διαλύτη, οπότε περιορίζεται η σπατάλη διαλυτών.

Διάφορες μέθοδοι χρωματογραφίας CE είναι διαθέσιμες: (1) η ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδές (CZE), (2) η μικκυλιακή ηλεκτροκινητική χρωματογραφία (micellar electrokinetic chromatography- MEKC), (3) η ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς μέσω πηκτής (capillary gel electrophoresis-CGE), (4) η ισοηλεκτρική εστίαση σε τριχοειδές (capillary isoelectric focusing), (5) «capillary isotachopheresis», (6) η ηλεκτροχρωματογραφία σε τριχοειδές (capillary electrochromatography-CEC) και (7) η μη-υδατική CE. Η πιο απλή και ευέλικτη μέθοδος CE είναι η CZE, στην οποία ο διαχωρισμός στηρίζεται σε διαφορές αναλογίας φορτίου-προς-μάζα και οι προσδιοριζόμενες ενώσεις μεταναστεύουν εντός ξεχωριστών ζωνών με διαφορετικές ταχύτητες. Τα ανιόντα και τα κατιόντα διαχωρίζονται με τη μέθοδο CZE με

ηλεκτροφορητική μετανάστευση και ηλεκτρο-ωσμωτική ροή (electro-osmotic flow-EOF), ενώ τα ουδέτερα είδη συνεκλούνται με την EOF (Tsao and Deng, 2004).

Όπως προαναφέρθηκε, μια άλλη τεχνική που έχει αναπτυχθεί για το διαχωρισμό φυτοχημικών είναι η MEKC στην οποία χρησιμοποιούνται επιφανειοδραστικές ουσίες, όπως δωδεκυλοθειϊκό νάτριο (sodium dodecyl sulfate- SDS) το οποίο σχηματίζει οργανωμένα σφαιρικά μικκύλια σε συγκεντρώσεις πάνω από την κρίσιμη μικκυλιακή συγκέντρωση (critical micellar concentration-CMC), με τις λιποφιλές «ουρές»-άκρες προς το εσωτερικό τμήμα και τις υδρόφιλες άκρες στην επιφάνεια του μικκυλίου. Αυτό δημιουργεί ένα πρόσθετο μηχανισμό διαχωρισμού δια μέσου της κατανομής. Έτσι, συστατικά με διαφορετικές τιμές- K μπορούν να κατανεμηθούν διαφορετικά μεταξύ των μικκυλίων και της κινητής φάσης. Αυτή η τεχνική είναι ιδιαίτερα σημαντική για το διαχωρισμό ουδέτερων αντιοξειδωτικών. Αντιοξειδωτικές ενώσεις από δεντρολίβανο προσδιορίστηκαν με μια νέα μέθοδο MEKC, της οποίας το κύριο πλεονέκτημα ήταν η μεγάλη ταχύτητα διαχωρισμού.

Στις παραπάνω τεχνικές διαχωρισμού που συζητήθηκαν (HPLC, CE, SFC, HSCCC) συνήθως χρησιμοποιούνται οι ίδιες τεχνικές ανίχνευσης και ιδιαίτερα ανιχνευτές UV-vis (υπεριώδους-ορατού), DAD και MS. Η φασματοφωτομετρία UV-vis έχει εκτενώς χρησιμοποιηθεί στην ποσοτικοποίηση οργανικών ενώσεων που απορροφούν στην υπεριώδη και ορατή περιοχή του φωτός (ηλεκτρομαγνητικού φάσματος). Τα περισσότερα φυτοχημικά 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 στις τεχνικές διαχωρισμού, συγκεκριμένα ο συνδυασμός της χρωματογραφίας HPLC και του ανιχνευτή DAD, έχει παίξει σημαντικό ρόλο στην ταυτοποίηση φυτοχημικών με αντιοξειδωτική δράση, όπως στην ταυτοποίηση πολυφαινολικών συστατικών και καροτενοειδών.

Τα δεδομένα του φάσματος UV-vis όλων των κορυφών που εκλούνται από ένα δείγμα μπορούν να σαρωθούν, να αποθηκευθούν και αργότερα να ανακτηθούν για σύγκριση με βιβλιοθήκη δεδομένων. Η αντιστοίχιση τόσο του φάσματος UV-vis όσο και του χρόνου κατακράτησης μπορεί να οδηγήσει στη σίγουρη ταυτοποίηση ενός φυτοχημικού. Ο ανιχνευτής DAD έχει ακόμη τη δυνατότητα να ανιχνεύει και να

καταγράφει χρωματογραφήματα ταυτόχρονα σε διαφορετικά μήκη κύματος. Αυτό το χαρακτηριστικό αυξάνει σημαντικά την απόδοση του συστήματος διαχωρισμού, ιδιαίτερα όταν συνυπάρχουν διαφορετικές ομάδες φυτοχημικών σε ένα δείγμα. Όταν επιλέγονται κατάλληλα μήκη κύματος, π.χ. στο μέγιστο των απορροφήσεων, όλες οι ομάδες των φυτοχημικών μπορούν να ανιχνευθούν με τη μεγαλύτερη ευαισθησία. Παρότι οι ανιχνευτές UV-vis και DAD παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες για την ταυτοποίηση φυτοχημικών, η χρήση συμβατικών προσεγγίσεων που βασίζονται σε φάσματα συχνά περιορίζεται όταν τα δείγματα περιέχουν πολλές παρόμοιες ενώσεις. Για την πλήρη ταυτοποίηση της δομής τους, είναι συνήθως απαραίτητες άλλες τεχνικές όπως η φασματομετρία MS και η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).

Όσον αφορά τις πολυφαινόλες, συγκεκριμένες υποομάδες που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία μπορούν να αναγνωριστούν με παρακολούθηση της απορρόφησής τους σε διαφορετικά μέγιστα απορρόφησης UV-vis (λ_{\max}). Το μέγιστο μήκος κύματος λ_{\max} για το κινναμωμικό οξύ και τα παράγωγά του είναι κοντά στα 320nm, και το αντίστοιχο για τα βενζοϊκά οξέα, για τις φλαβαν-3-όλες (στις οποίες συμπεριλαμβάνονται και τα διμερή τους) και για τις διϋδροχαλκόνες είναι περίπου στα 280nm. Το μέγιστο μήκος κύματος λ_{\max} για τις φλαβονόλες είναι συνήθως γύρω στα 360nm. Μεταξύ των φλαβονοειδών, οι ανθοκυανίνες είναι η πιο χαρακτηριστική υποομάδα γιατί απορροφούν στο ορατό φως περίπου στα 520nm, όταν τα μόρια βρίσκονται στην κατιονική μορφή του φλαβυλίου (flavylium cation status) (όταν το pH είναι χαμηλό). Αυτό το χαρακτηριστικό του φάσματος δίνει στις ανθοκυανίνες πλεονεκτήματα όσον αφορά την ανίχνευσή τους, καθώς αυτή δεν παρεμποδίζεται από την παρουσία άλλων ομάδων φυτοχημικών.

Η φασματομετρία μαζών (MS) μπορεί να εφαρμοστεί «on-line» συζευγμένη με χρωματογραφικές ή ηλεκτροφορητικές τεχνικές, είτε «off line» ως ένα ξεχωριστό και αυτόνομο όργανο. Ωστόσο, στην πρώτη περίπτωση παρέχει εξαιρετικές δυνατότητες στην ταυτοποίηση και στη διεκρίνιση της δομής των φυτοχημικών. Υπάρχουν δυο κύριοι τύποι τεχνικών ιοντισμού για τις φυτοχημικές ενώσεις, οι τεχνικές ιοντισμού-ψεκασμού όπως ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (electrospray ionization-ESI), ο θερμοψεκασμός (thermospray) και ο χημικός ιοντισμός ατμοσφαιρικής πίεσης (atmospheric pressure chemical ionization-APCI) και οι τεχνικές ιοντισμού-

εκρόφησης που περιλαμβάνουν τον ιοντισμό βομβαρδισμού με άτομα μεγάλης ταχύτητας (fast atom bombardment-FAB), ο ιοντισμός εκρόφησης πλάσματος (plasma desorption-PD) και ο ιοντισμός εκρόφησης με λέιζερ με τη βοήθεια υλικού μήτρας (matrix-assisted laser desorption ionization-MALDI). Οι τεχνικές ESI και APCI είναι οι πιο ευρέως διαδεδομένες τεχνικές ιοντισμού για τα φυτοχημικά και τα περισσότερα εμπορικά όργανα χρωματογραφίας σε σύζευξη με φασματομετρία μαζών (LC-MS) μπορούν να προσαρμόσουν και τις δυο τεχνικές. Η τεχνική ESI χρησιμοποιείται πιο συχνά για τον ιοντισμό αντιοξειδωτικών μορίων, όπως είναι οι ανθοκυανίνες που είναι πολικά μόρια και σε υδατικά διαλύματα βρίσκονται ως ιόντα. Η τεχνική APCI χρησιμοποιείται για λιγότερο πολικά και μη-ιοντικά αντιοξειδωτικά, όπως τα καροτενοειδή.

Η χρήση του φασματομέτρου μαζών, ως ανιχνευτή, είναι κρίσιμη για την ταυτοποίηση φυτοχημικών, εξαιτίας των πολύπλοκων και ποικίλων δομών τους αλλά και της μικρής συγκέντρωσης με την οποία υπάρχουν στα φυτά. 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 (MSⁿ) συζευγμένους αναλυτές μαζών σε σειρά για επίτευξη διαχωριστικότητας παραπλήσιων λόγων m/z. Τα συστήματα MS-MS και MSⁿ παράγουν μεγαλύτερη θραυσματοποίηση του κύριου ιόντος και των θυγατρικών ιόντων, παρέχοντας πρόσθετες δομικές πληροφορίες για την ταυτοποίηση φυτοχημικών.

Σε σχετική μελέτη του *Flamini, 2003*, συνοψίζονται οι μελέτες όπου χρησιμοποιείται η χρωματογραφία LC-MS για την ταυτοποίηση πολυφαινολών σε εκχυλίσματα σταφυλιών και σε κρασί. Συγκεκριμένα, επισημαίνεται ότι οι τεχνικές LC-MS θεωρούνται οι πιο αποτελεσματικές για τη μελέτη της δομής ανθοκυανίνων και ειδικότερα η μέθοδος MS-MS που επιτρέπει το χαρακτηρισμό των άγλυκων των ανθοκυανίνων αλλά και του τμήματος των σακχάρων τους, στους γλυκοζίτες τους. Παρότι ο θετικός ιοντισμός (PI-MS) χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση διαφόρων φυτοχημικών, διαπιστώθηκε ότι ο αρνητικός ιοντισμός (NI-MS) τόσο με την τεχνική APCI όσο και με την ESI έδωσε άριστα αποτελέσματα στην ανάλυση φλαβονοειδών, όσον αφορά την ευαισθησία και τις σαφείς δομικές πληροφορίες που παρείχε (*Tsao and Deng, 2004*).

Ούτε η αέρια χρωματογραφία ούτε η τεχνική GC-MS μπορούν να ανταγωνιστούν την ταχύτητα των άμεσων διαδικασιών LC-MS(/MS) και τη δυνατότητα στην εξέταση πλήθους δειγμάτων για στοχευμένα προσδιοριζόμενα συστατικά αλλά και άγνωστα συστατικά. Επιπλέον, αντίθετα με την τεχνική GC-MS, η ανάλυση με LC-MS δεν προϋποθέτει απαραίτητα, πάντα, κάποια διαδικασία εκχύλισης. Τέλος, η σύνδεση της micro και/ ή nano-LC με συζευγμένα όργανα MS διευκολύνει την ανάλυση μικροσκοπικών δειγμάτων. Για μεγάλης κλίμακας αναλύσεις η χρήση της υγρής χρωματογραφίας «υπερυψηλής» απόδοσης (ultra-performance liquid chromatography –UPLC) σε σύζευξη με MS, εμφανίστηκε ως μια εναλλακτική των παραδοσιακών HPLC τεχνικών. Ο διαχωρισμός με χρωματογραφία UPLC στηρίζεται στις βασικές χρωματογραφικές αρχές, με τη διαφορά ότι χρησιμοποιούνται στήλες πακτωμένες με μικρότερο μέγεθος πόρων και μεγαλύτερες ταχύτητες ροής που οδηγούν σε μικρότερους χρόνους ανάλυσης και καλύτερη ευαισθησία. Οι τεχνικές CEK και MEKC έχουν αποδειχθεί συμπληρωματικές των τεχνικών LC (Stalikas, 2007).

Ένα από τα μειονεκτήματα της τεχνικής LC-MS-MS είναι ότι συχνά οι κορυφές LC εκλούνται πολύ γρήγορα για να πραγματοποιηθούν όλα τα απαραίτητα πειράματα MS κατά τη διάρκεια του προγράμματος έκλουσης, ακόμα και με τις εξελίξεις στα νέας γενιάς φασματομέτρα μαζών. Συνεπώς, ο χαρακτηρισμός της δομής μεταβολιτών απαιτεί και νέες αναλύσεις για την καταγραφή υψηλής ποιότητας, πολλαπλών σταδίων φάσματος MS ή την καταγραφή σε διάφορα φασματομέτρα μαζών για τα ορθά δεδομένα μάζας. Στη χημεία φυσικών προϊόντων τα φάσματα MS-MS είναι κυρίως χρήσιμα για το τμηματικό καθορισμό της αλληλουχίας των σακχάρων διαφόρων γλυκοζιτών, για την ανίχνευση χαρακτηριστικών απωλειών όπως των φαινυλιωμένων ενώσεων και τη χαρακτηριστική θραυσματοποίηση φλαβονοειδών ή σχετιζόμενων με αυτά ενώσεων για τον προσδιορισμό των υποκαταστατών του Α- ή Β-δακτυλίου (αλλά και για τη διαφοροποίηση των ισομερών).

Η ερμηνεία των φασμάτων MS-MS συχνά προϋποθέτει την ανάλυση πολλών σχετιζόμενων προϊόντων ώστε να εξαχθούν σχετικές με τη δομή πληροφορίες. Για την ανάλυση εντελώς άγνωστων φυσικών προϊόντων αυτή η τεχνική από μόνη της δεν μπορεί να παρέχει αρκετές πληροφορίες για την πλήρη εξακρίβωση της δομής.

Εξαιτίας της έλλειψης επαρκών διαθέσιμων βάσεων δεδομένων, ιδιαίτερα για τη σύγκριση φασμάτων LC-MS-MS, συχνά απαιτούνται πρόσθετες φασματοσκοπικές πληροφορίες για την εξακρίβωση της ταυτότητας γνωστών φυσικών προϊόντων ή τη μερική ταυτοποίηση αγνώστων μεταβολιτών. Από αυτή την άποψη, η μέθοδος LC-NMR παρέχει σημαντικές συμπληρωματικές δομικές πληροφορίες ή, σε ορισμένες περιπτώσεις, παρέχει την πλήρη απόδοση της δομής ενός φυσικού προϊόντος «on line» (Wolfender et al., 2006).

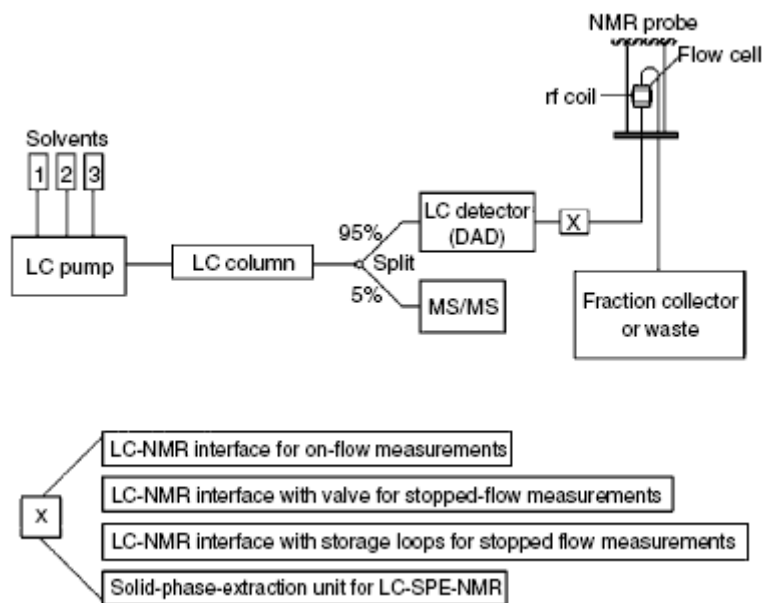
Ορισμένα παραδείγματα από τις πιο σύγχρονες εξελίξεις στην ανάπτυξη καινούργιων ή βελτιωμένων τεχνικών ανάλυσης φυσικών προϊόντων δίνονται στη συνέχεια. Αρχικά, έχει αναπτύχθηκε η δισδιάστατη HPLC, που αποκαλείται και περιεκτική LC ή LC x LC. Πολλαπλοί ανιχνευτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν, ανάμεσα τους και ο ανιχνευτής MS. Επίσης, η δισδιάστατη GC (GC x GC) είναι ακόμα πιο ισχυρή τεχνική από την LC x LC και θεωρητικά είναι ικανή να διαχωρίσει > 10.000 πτητικά συστατικά. Αυτή η τεχνική ταιριάζει καλύτερα στην ανάλυση αιθέριων ελαίων, όπου η αλληλοεπικάλυψη μεταξύ των κορυφών είναι συχνή. Στην παρασκευαστική HPLC, έχει προταθεί η συλλογή κλασμάτων στηριζόμενη σε φάσματα-MS αντί για φάσματα-UV, κάνοντας εφικτή την εκλεκτική συλλογή του επιθυμητού μεταβολίτη σε ποσότητες υποδιαιρέσεων των mg ακόμη και αν μεγαλύτερες ποσότητες ανεπιθύμητων ενώσεων συνεκκλούνται.

Παράλληλα, η άμεση διασύνδεση της HPTLC με φασματομετρία μαζών MS ήταν πάντα δύσκολη, στις μέρες μας όμως έγινε πραγματοποιήσιμη, όπως και η χρωματογραφία υπέρλεπτης στιβάδας (ultra-thin layer chromatography-UTLC) που μπορεί και αυτή να συνδυαστεί με φασματομετρία μαζών MS. Ακόμη, η τεχνική ιοντισμού εκρόφησης ηλεκτροψεκασμού DESI-MS (desorption electrospray ionization) είναι μια σχετικά καινούργια τεχνική που μπορεί να συνδυαστεί με τη HPTLC. Τέλος έχει προταθεί η χρήση μονολιθικών υλικών ως στατική φάση για χρωματογραφικές στήλες ή ως ευέλικτες μήτρες για τη συνένωση συγκεκριμένων ομάδων για τη χρωματογραφία (χημικής) συγγένειας (Van Beek et al., 2009).

1.1.2 Συζευγμένες τεχνικές LC-NMR στην ανάλυση φυσικών προϊόντων

Η φασματοσκοπία NMR θεωρείται μια μη εκλεκτική και ανεξάρτητη από τις ενώσεις που αναλύονται τεχνική και για αυτό το λόγο η σύζευξη της με την υγρή χρωματογραφία (LC), ήταν αναπόφευκτη. Η άμεση σύνδεση της LC με τη φασματοσκοπία NMR, προτάθηκε ήδη 30 χρόνια πριν. Ωστόσο η επιτυχής και πρακτική σύζευξη LC-NMR επιτεύχθηκε την τελευταία δεκαετία, ως αποτέλεσμα μιας σειράς σταδίων και τεχνικών εξελίξεων, όπως: (i) η αύξηση της ισχύος του μαγνητικού πεδίου των φασματογράφων NMR, (ii) η ανάπτυξη και η βελτιστοποίηση των υποδοχέων «flow-through probes», (iii) η ανάπτυξη μεθόδων για επαρκή καταστολή των σημάτων των διαλυτών και (iv) εξελίξεις που αφορούν τη σύνδεση των οργάνων LC και NMR. Στις μέρες μας οι συζευγμένες τεχνικές LC-NMR και LC-NMR/MS έχουν εξελιχθεί σε αναλυτικά όργανα ρουτίνας σε πολλά εργαστήρια.

Συνήθως, η οργανολογία LC-NMR αποτελείται από συμβατικές αντλίες LC, στήλες και ανιχνευτές UV, τα οποία συνδέονται «on-line» με το φασματογράφο NMR, όπως φαίνεται στο Σχήμα 1.1. Είναι φανερό ότι αυτή η άμεση σύζευξη απαιτεί την ανάπτυξη τεχνικών χαρακτηριστικών όπως καταλλήλων διασυνδέσεων, διατάξεων υποδοχέων «flow-probe» και υλισμικού (hardware), αποτελεσματικών παλμικών ακολουθιών για την καταστολή των σημάτων του διαλύτη, και νέου αυτοματοποιημένου λογισμικού. Κατά συνέπεια, ο παραδοσιακός υποδοχέας NMR θα πρέπει να τροποποιηθεί ώστε να επιτρέπει τη συνεχή ροή του υπό μελέτη διαλύματος. Πρόσφατα, είναι διαθέσιμοι διάφοροι υποδοχείς συνεχούς ροής «flow-probes» με δραστικό όγκο 20-120 μL που προσφέρουν καλύτερη ευαισθησία μάζας σε σχέση με τους συμβατικούς υποδοχείς NMR. Στο σύστημα που φαίνεται στο Σχήμα 1.1, και ο φασματογράφος NMR και το φασματόμετρο MS συνδέονται με την έξοδο του ανιχνευτή UV. Ο πιο συνηθισμένος τρόπος διασύνδεσης του 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 φασματομετρία MS, η συνήθης αναλογία κατανομής είναι 95:5 για το NMR έναντι του MS.



Σχήμα 1.1: Οργανολογία LC-NMR-MS (Exarchou et al., 2006)

Σε μια διάταξη «συνεχούς ροής» («on-flow») ο φασματογράφος NMR λειτουργεί ως ανιχνευτής UV ή MS σε ένα χρωματογραφικό σύστημα, και το δείγμα παραμένει στον υποδοχέα NMR μόνο για ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, της τάξεως μερικών δευτερολέπτων έως μερικών λεπτών. Ο χρόνος παραμονής εξαρτάται από τον όγκο του υποδοχέα και από την ταχύτητα ροής που χρησιμοποιείται κατά το χρωματογραφικό διαχωρισμό. Το αποτέλεσμα συνήθως απεικονίζεται ως ένα δυο-διαστάσεων (2D) διάγραμμα χρόνου-συχνότητας (ppm), που αποτελείται από το μιας-διάστασης φάσμα (frequency domain) έναντι του χρόνου κατακράτησης, παρόμοιο με ένα διάγραμμα LC-DAD. Παρά τον περιορισμένο χρόνο παραμονής του προσδιοριζόμενου συστατικού στον υποδοχέα NMR που επηρεάζει αρνητικά την ποιότητα και την ευαισθησία του φάσματος, τα «on-flow» πειράματα ήταν τα πρώτα πειράματα LC-NMR που πραγματοποιήθηκαν και χρησιμοποιούνται ακόμη συχνά. Συνήθως, αυτό το πείραμα αποτελεί το πρώτο βήμα για τον προσδιορισμό των κύριων ενώσεων ενός πολύπλοκου μίγματος, ενώ πρόσθετη εργασία απαιτείται για την ανάλυση όλων των μεμονωμένων συστατικών.

Οι πιο διαδεδομένοι διαλύτες που χρησιμοποιούνται είναι το μίγμα $\text{CH}_3\text{CN}-\text{D}_2\text{O}$, και στα «on-flow» πειράματα που έχουν αναφερθεί στην ανάλυση φυτικών εκχυλισμάτων, έχει χρησιμοποιηθεί τόσο ισοκρατική όσο και βαθμωτή έκλυση.

Όταν χρησιμοποιείται βαθμωτή έκλυση 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. Η ομάδα των *Wolfender et al.*, περιγράφουν πολυάριθμες εφαρμογές του «on-flow» LC-NMR στην ανάλυση εκχυλισμάτων από τα φυτά *Swertia calacina*, *Monotes engleri*, φύλλα *Orophea enneandra*, *Cordia linnaei*, *Erythrina vogelii*, *Erythroxylum vacciniifolium*, και εκχυλίσματα του είδους *Potamogeton*. Εκτός από τις μελέτες σε φυτικά εκχυλίσματα που αφορούν τη συλλογή πληροφοριών όσον αφορά τη σύστασή τους, έχουν αναφερθεί και προσπάθειες που σχετίζονται με ποσοτικές μετρήσεις.

Προκειμένου να διεξαχθούν δισδιάστατα πειράματα NMR (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 NMR πειράματα υπό στατικές συνθήκες: (α) με τη χρήση βαλβίδας που σταματάει την έκλυση όταν το προσδιοριζόμενο συστατικό φθάσει και γεμίσει το χώρο του υποδοχέα συνεχούς ροής μέσα στο πηνίο ανίχνευσης (detection coil), το αποκαλούμενο μοντέλο διακοπόμενης ροής «stopped flow», ή (β) με τη χρήση βρόχων δείγματος για την αποθήκευση μεμονωμένων κλασμάτων των προσδιοριζόμενων συστατικών, που προκύπτουν από το χρωματογραφικό διαχωρισμό. Και στις δυο περιπτώσεις απαιτείται μια πρόσθετη συσκευή, μια βαλβίδα ή ένα σύστημα αποτελούμενο από τριχοειδείς βρόχους.

Στο μοντέλο «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 NMR. Αυτός ο χρόνος υστέρησης εξαρτάται από την ταχύτητα ροής του χρωματογραφικού διαχωρισμού καθώς και το μήκος και τη διάμετρο της σωλήνωσης που χρησιμοποιείται για να συνδέσει τον ανιχνευτή UV με το υποδοχέα NMR. Μόλις καθοριστεί ο χρόνος t_d για το διαθέσιμο υλισμικό, το λογισμικό μπορεί να ρυθμιστεί ώστε να σταματάει αυτόματα η ροή της χρωματογραφικής έκλυσης στο χρόνο t_d , αφότου το προσδιοριζόμενο συστατικό έχει περάσει από τον ανιχνευτή UV. 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 τα συστατικά που βρίσκονται σε υψηλή συγκέντρωση μπορεί να παραμείνουν στον υποδοχέα NMR (επίδραση μνήμης- memory effect). Κατά συνέπεια το μοντέλο διακοπτόμενης ροής συνιστάται για την ανάλυση μιγμάτων που αποτελούνται από ένα σχετικά μικρό αριθμό χρωματογραφικά διαλυτών συστατικών. Στο πεδίο των φυσικών προϊόντων ο συνδυασμός των διατάξεων «on-flow» και «stopped flow» έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα.

Στο μοντέλο αποθήκευσης σε βρόχους (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 επόμενο στάδιο. Σε αυτή την περίπτωση, η υστέρηση t_d μεταξύ του ανιχνευτή UV και της συσκευής αποθήκευσης σε βρόχους- και η υστέρηση t_{FC} για τη μεταφορά από το βρόχο στον υποδοχέα NMR θα πρέπει να ληφθεί υπόψη. Με τη χρήση της τεχνικής αποθήκευσης σε βρόχους, προβλήματα που οφείλονται στις πολλές διακοπές της ροής μπορούν να αποφευχθούν. Μια βασική προϋπόθεση χρήσης της, είναι ότι τα αποθηκευμένα προσδιοριζόμενα συστατικά θα πρέπει να είναι σταθερά κατά την εκτεταμένη περίοδο της ανάλυσης NMR. Μετά από τις μετρήσεις που λαμβάνονται για κάθε προσδιοριζόμενο συστατικό, ο βρόχος αποθήκευσης και ο υποδοχέας NMR μπορούν αυτόματα να πλυθούν με ένα κατάλληλο διαλύτη. Αυτή η διάταξη, επίσης έχει χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση πιο πολύπλοκων μιγμάτων που λαμβάνονται από φυτικά εκχυλίσματα.

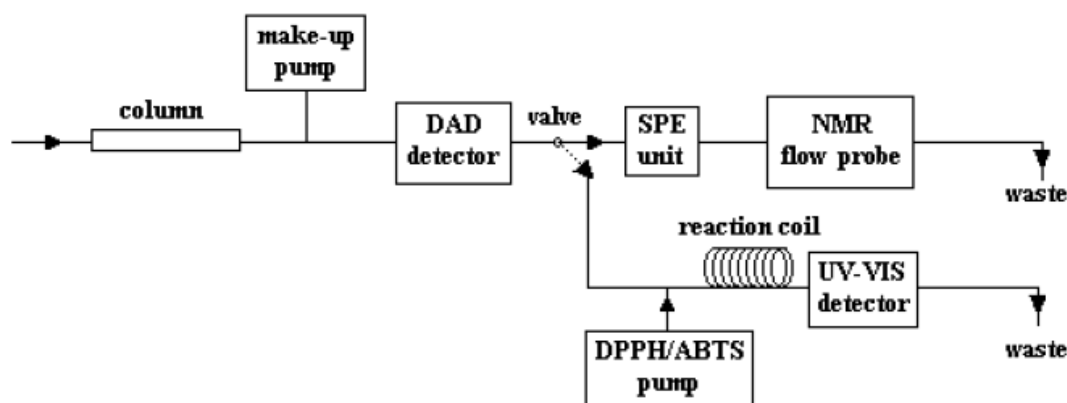
Ένα από τα πιο σοβαρά μειονεκτήματα της τεχνικής LC-NMR είναι το γεγονός ότι είναι αναγκαία η χρήση δευτεριωμένων διαλυτών στο χρωματογραφικό διαχωρισμό, το οποίο αυξάνει σημαντικά το κόστος της ανάλυσης. Προκειμένου να μειωθεί η κατανάλωση των ακριβών δευτεριωμένων διαλυτών, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μια μονάδα εκχύλισης στερεάς φάσης (solid phase extraction-SPE) και να προκύψει η διάταξη LC-SPE-NMR. Η εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) είναι μια εξαιρετικά αποτελεσματική τεχνική για την επαναληπτική, γρήγορη και εκλεκτική προετοιμασία δείγματος. Υπάρχουν διάφορες μελέτες για την «on-line» σύζευξη της SPE με LC-UV, LC-MS και LC-NMR τεχνικές, η οποία έχει ως σκοπό

τη συμπύκνωση του δείγματος πριν τον διαχωρισμό LC. Εναλλακτικά, έχει αναφερθεί η χρήση μιας προστατευτικής στήλης-προστήλης μετά τον LC διαχωρισμό για τη συμπύκνωση του εκλούμενων ενώσεων πριν την ανάλυση με τη φασματοσκοπία NMR, αλλά και η χρήση μιας SPE διαχωριστικής μικροστήλης (cartridge) που είναι συνδεδεμένη πριν τον υποδοχέα NMR, με 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 NMR. 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 επιλεγεί (π.χ. μεθανόλη, ακετονιτρίλιο ή χλωροφόρμιο) στον υποδοχέα NMR για την καταγραφή του φάσματος.

Η πειραματική διάταξη LC-SPE-NMR είναι παρόμοια με τη διάταξη LC-NMR αποθήκευσης σε βρόχους, αλλά έχει ορισμένα πλεονεκτήματα έναντι αυτής 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 NMR. 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 CDCl_3 , CD_3OD ή CD_3CN είναι πιο εύκολο να συγκριθούν με τα αντίστοιχα βιβλιογραφικών δεδομένων, σε σύγκριση με τα φάσματα της μεθόδου «stop-flow» LC-NMR που λαμβάνονται σε μίγματα D_2O και CH_3CN . Τέλος η επέκταση της τεχνικής σε LC-SPE-NMR/MS μπορεί να οδηγήσει στη αδιαμφισβήτητη ταυτοποίηση των συστατικών ενός πολύπλοκου μίγματος. Εφόσον η χρωματογραφία διεξάγεται με καθιερωμένους διαλύτες LC, η ερμηνεία των πληροφοριών που εξάγονται από τα φάσματα μαζών γίνεται ευκολότερη.

Παράλληλα, 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*). Η μέθοδος LC-SPE-NMR χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση αντιοξειδωτικών ενώσεων σε εμπορικά διαθέσιμο εκχύλισμα δεντρολίβανου και σε εκχυλίσματα *Raponticum carthamoides*. Διάφορα φυτικά εκχυλίσματα έχουν πρόσφατα αναλυθεί με την παραπάνω τεχνική, όπως εκχύλισμα *Harpagophytum procumbens*, διάφορα μέρη του φυτού *Kanaria laniflora*, ένα ακατέργαστο φυτικό εκχύλισμα από *Smirnowia iranica*, ένα εκχύλισμα από τη ρίζα του φυτού *Croton membranaceus*, το φαινολικό κλάσμα ελαιολάδου και εκχύλισμα του φυτού *Phyllanthus urinaria*. Η πειραματική διάταξη LC-SPE-NMR φαίνεται στο Σχήμα 1.2. Τέλος, πρόσφατα αναφέρθηκε η δυνατότητα της πιθανής συνένωσης της διάταξης LC με μια επιπλέον αντλία παροχής κατάλληλου αντιδραστήριου, π.χ. διαλύματος σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH, με στόχο την εκτίμηση της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας από το κάθε συστατικό που εκλύεται από τη στήλη. Η αντίδραση των εκλούομενων συστατικών με τη σταθερή ελεύθερη ρίζα λαμβάνει χώρα μέσα σε κατάλληλο σωλήνα αντίδρασης μεγάλου μήκους και η ικανότητα δέσμευσης τους εκτιμάται με βάση την ελάττωση της απορρόφησης της ρίζας στο ορατό λόγω της κατανάλωσης της από τα εκλούομενα αντιοξειδωτικά. Εναλλακτικά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα συστήματα οξείδωσης, όπως παρακολούθηση της αναστολής της αλκαλικής οξείδωσης λουμινόλης-luminol-chemiluminescence ή της ελάττωσης της ρίζας ABTS^{•+}.



Σχήμα 1.2: Πειραματική διάταξη LC-SPE-NMR και διάταξη LC-UV- DPPH/ABTS⁺ για τη στοχευμένη ανάλυση αντιοξειδωτικών ενώσεων που δρουν δεσμεύοντας ελεύθερες ρίζες (Exarchou et al., 2006)

Είναι φανερό ότι η παραπάνω τεχνική LC-SPE-NMR είναι μια καινούργια σημαντική αναλυτική τεχνική για την ανάλυση φυτικών εκχυλισμάτων. Για την μεγαλύτερη βελτίωση της συνολική ευαισθησίας του συστήματος μπορούν να χρησιμοποιηθούν υποδοχείς κρυογενικής τεχνολογίας (cryogenically cooled). Η χρήση αυτών οδηγεί σε βελτίωση της αναλογίας σήματος/ θόρυβο (S/N) στο φάσμα NMR κατά ένα παράγοντα από 3 έως 5 για διαλύτες χαμηλής αγωγιμότητας. Επίσης, μια από τις πιο πολλά υποσχόμενες εξελίξεις στη σχεδίαση των υποδοχέων NMR, εκτός από τους υποδοχείς κρυογενικής 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 τριχοειδές HPLC NMR (capillary high-performance liquid chromatography NMR- capLC-NMR), το σύστημα ηλεκτροφόρησης τριχοειδούς NMR (capillary electrophoresis NMR-CE-NMR), κ.α. (Exarchou et al., 2005, 2006).

Αναλυτικά, στην περίπτωση του CAP-NMR η ίδια διαδικασία μικροκλασμάτωσης όπως αυτή που περιγράφεται στην τεχνική LC-SPE-NMR μπορεί να χρησιμοποιηθεί, με εξαίρεση ότι τα δείγματα δεν παγιδεύονται σε SPE, αλλά ξηραίνονται σε μικροκλάσματα LC. Το μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι απαιτείται ο χειρισμός περισσότερου δείγματος σε σύγκριση με τη «on-flow» διαδικασία, αλλά τα φάσματα NMR που λαμβάνονται είναι καλύτερης ποιότητας σε πρότυπους

δευτεριωμένους διαλύτες με μικρό κόστος, ενώ άλλες πληροφορίες όπως δεδομένα UV και MS μπορούν να καταγραφούν «on-line» κατά τη διάρκεια της μικροκλασμάτωσης. Αυτή η τεχνική είναι ακόμη πολύ σημαντική για τον εξέταση της χημικής καθαρότητας φυσικών προϊόντων στα προγράμματα φαρμακευτικού ελέγχου. Περαιτέρω μπορούν να εξαχθούν πληροφορίες όσον αφορά τις χημικές μετατοπίσεις ^{13}C από πειράματα ανάστροφης αντίχενυσης (HSQC και HMBC), που είναι εφικτά και παρέχουν πολλές πολύτιμες δομικές πληροφορίες για τον «*de novo*» προσδιορισμό της δομής φυσικών προϊόντων (Wolfender et al., 2006).

1.1.3 Σύγκριση συζευγμένων τεχνικών LC

Όπως φαίνεται, οι συζευγμένες τεχνικές LC παίζουν ένα ολοένα και σημαντικότερο ρόλο στην αναζήτηση νέων βιοδραστικών ενώσεων από φυσικά προϊόντα. Οι πληροφορίες που προκύπτουν από το συνδυασμό των τεχνικών LC-UV-DAD και LC-MS είναι πολύ διαφωτιστικές, σε ένα πρώτο στάδιο ανάλυσης, ιδιαίτερα όταν αυτή η πληροφορία συνδυάζεται με βοτανικές και χημειοταξονομικές μελέτες για διασταυρωμένη αναζήτηση σε βάσεις δεδομένων φυσικών προϊόντων. Από αυτή την άποψη, η καταγραφή φασμάτων LC-MS-MS παρέχει συμπληρωματικές πληροφορίες θραυσματοποίησης, αλλά η χρήση αυτών των δεδομένων περιορίζεται από το γεγονός ότι δεν είναι εμπορικά διαθέσιμες βάσεις δεδομένων LC-MS-MS. Επιπλέον, η ερμηνεία φασμάτων MS-MS παρέχει ακριβείς δομικές πληροφορίες μόνο εάν έχουν αναλυθεί σημαντικές σειρές σχετιζόμενων ενώσεων και εάν μπορούν να εξακριβωθούν πρότυπες πορείες θραυσματοποίησης για μια συγκεκριμένη τάξη ενώσεων. Οι διαφορές που δημιουργούνται για τα φάσματα MS-MS μεταξύ των διαφορετικών τύπων οργάνων δυσχεραίνουν επίσης την δημιουργία μιας γενικής βάσης δεδομένων, τουλάχιστον για την αναγνώριση της χαρακτηριστικής πορείας θραυσματοποίησης.

Για την σε βάθος διερεύνηση της δομής φυσικών προϊόντων, συχνά θα πρέπει να αποσαφηνιστεί η κατάταξη των ατόμων και οι στερεοχημικές τους διευθετήσεις και γι' αυτό είναι υποχρεωτική η χρήση της φασματοσκοπίας NMR. Η άμεση σύζευξη της φασματοσκοπίας NMR μπορεί να λειτουργήσει με την «on-flow» μέθοδο ή ως συμπληρωματική αναλυτική τεχνική στη διαδικασία LC-UV-MS σε

ξεχωριστές αναλύσεις. Η τεχνική LC-NMR παίζει ένα ουσιαστικό ρόλο και επιτρέπει την «on-line» καταγραφή πολύτιμων συμπληρωματικών δομικών πληροφοριών όταν τα δεδομένα από την LC-UV-MS ανάλυση είναι ανεπαρκή για την αδιαμφισβήτητη ταυτοποίηση των κορυφών του χρωματογραφήματος. Οι τεχνικές LC-SPE-NMR και CAP-NMR είναι πολύτιμες τεχνικές για την γρήγορη «on-line» ταυτοποίηση φυσικών προϊόντων. Αυτές οι τεχνικές απαιτούν περισσότερη επεξεργασία του δείγματος και μεγαλύτερο αυτοματισμό από ότι η άμεση σύζευξη με το NMR, αλλά αυτό αντιστοιχεί μόνο σε ένα μικρό μέρος του χρόνου που απαιτείται για τη λήψη των χρονοβόρων δισδιάστατων NMR πειραμάτων. Με αυτές τις «on-line» τεχνικές η συνολική σειρά δισδιάστατων NMR πειραμάτων μπορεί να καταγραφεί με μερικές δεκάδες μικρογραμμάριων (μg) των συστατικών, μόνο με ελάχιστες ποσότητες δευτεριωμένων διαλυτών. Η τεχνική SPE-NMR απαιτεί καλή βελτιστοποίηση των παραμέτρων παγίδευσης, αλλά έχει το πλεονέκτημα ότι μπορεί να αυτοματοποιηθεί πλήρως σε εμπορικά διαθέσιμα συστήματα. Η τεχνική CAP-NMR έχει το πλεονέκτημα να είναι εφικτή η πλήρως ελεύθερη επιλογή δευτεριωμένου διαλύτη, καθώς τα δείγματα ξηραίνονται και ακόμη ότι η ευαισθησία της είναι βελτιωμένη για εφαρμογές όπου χρησιμοποιούνται περιορισμένες ποσότητες δειγμάτων (*Wolfender et al., 2006*).

1.1.4 Ανάλυση μιγμάτων με τη χρήση φασματοσκοπίας NMR (Nuclear Magnetic Resonance)

1.1.4.1 Ταυτοποίηση συστατικών σε μίγματα με τη χρήση φασματοσκοπίας NMR- ¹H

Η αναζήτηση τεχνικών για τη γρήγορη και άμεση ανάλυση πολύπλοκων μιγμάτων υπήρξε πάντοτε ένα από τα κύρια ερευνητικά πεδία, ιδιαίτερα της χημείας τροφίμων και της ανάλυσης φυτικών συστατικών. Ο έλεγχος (screening) των φυτικών εκχυλισμάτων για φυσικά προϊόντα με βιολογικές δράσεις είναι μια από τις πιο αποτελεσματικά προσανατολισμένες πορείες στην εύρεση καινούργιων φαρμάκων. Επίσης, στις μέρες μας μεγάλη μερίδα ενδιαφέροντος έχει στραφεί στα «μη-θρεπτικά» αλλά βιολογικώς δραστικά συστατικά τροφίμων που έχουν ως βάση τους τα φυτά. Οι αναλυτικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο ποιότητας και τα τεστ σταθερότητας φυσικών προϊόντων, είναι συνήθως χρωματογραφικές τεχνικές υψηλής διακριτικής ικανότητας, όπως η χρωματογραφία HPLC, HPTLC, GC, η ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς, η χρωματογραφία LC-MS, GC-MS και η μέθοδος LC-NMR, όπως αναφέρθηκαν αναλυτικά στα Κεφάλαια 1.1.1, 1.1.2 και 1.1.3.

Όλες αυτές οι αναλυτικές τεχνικές θεωρούνται πολύ σημαντικές για το πεδίο των φυσικών προϊόντων, αλλά συχνά δεν είναι εύκολο να αναπτυχθεί ένας απλός και γρήγορος χρωματογραφικός διαχωρισμός των συστατικών, π.χ. ενός φυτικού εκχυλίσματος, εξαιτίας των διαφορών που παρουσιάζουν αυτά ως προς τη διαλυτότητά τους σε διάφορους διαλύτες, την πολικότητα κ.α. Ωστόσο, το χρωματογραφικό προφίλ που λαμβάνεται είναι γενικά αρκετά πολύπλοκο λόγω της παρουσίας πολλών παρόμοιων συστατικών, όπως ισομερών, επιμερών και διαμορφομερών ή γλυκοζιτών που αποτελούνται από διαφορετικές γλυκοζιτικές αλυσίδες. Τέλος, τα χρωματογραφικά προφίλ μπορεί να γίνουν ιδιαίτερα πολύπλοκα λόγω σημάτων αποικοδόμησης με εκείνα των συστατικών.

Η φασματοσκοπία NMR είναι μια από τις πιο σημαντικές και ευρέως διαδεδομένες αναλυτικές μεθόδους στην ακαδημαϊκή και βιομηχανική έρευνα. Τα τελευταία 15-20 χρόνια παρατηρείται μια συνεχής και εκτεταμένη χρήση της φασματοσκοπίας NMR στην επιστήμη των τροφίμων. Η μεγάλη ανάπτυξη των μεθόδων NMR στον χαρακτηρισμό και έλεγχο των τροφίμων 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 δευτεριωμένο χλωροφόρμιο, CDCl_3 . Επίσης, δεν απαιτείται κάποιο στάδιο παραγωγοποίησης για την ανίχνευση των προσδιοριζόμενων συστατικών, καθώς κάθε μόριο που έχει υδρογόνα μπορεί να ανιχνευθεί με την πρωτονιακή φασματοσκοπία NMR- ^1H .

Η ανάλυση με τη φασματοσκοπία NMR- ^1H , δεν προκαλεί καταστροφή του δείγματος και των συστατικών του. Ως τεχνική, αποτελεί ένα πανίσχυρο εργαλείο για τον προσδιορισμό της δομής μορίων, και έτσι μπορεί να βοηθήσει στην κατανόηση της δομής των συστατικών ενός πολύπλοκου συστήματος, όπως είναι τα τρόφιμα. Άλλες εφαρμογές περιλαμβάνουν για παράδειγμα, την ανάλυση παρθένου ελαιολάδου με υψηλής διακριτικής ικανότητας φασματοσκοπία NMR, για τον προσδιορισμό της γεωγραφικής προέλευσης και της πιθανής νοθείας του (*Hidalgo and Zamora, 2003, Christophoridou and Dais, 2006*). Παρακάτω αναφέρονται αναλυτικά ορισμένες από αυτές όσον αφορά την ταυτοποίηση συστατικών τροφίμων και φυτικών εκχυλισμάτων με τη φασματοσκοπία NMR μίας (1D) και δυο (2D) διαστάσεων, τον ποσοτικό προσδιορισμό τους, κ.α.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η εφαρμογή της φασματοσκοπίας NMR στη μελέτη της σύστασης βιολογικών υγρών, όπως αίματος και ούρων, αιωρημάτων κυττάρων ακόμη και ιστών. Οι διαρκώς αυξανόμενες ανάγκες σε εξειδικευμένες αναλύσεις μεγάλης διαγνωστικής σημασίας για τη θεραπεία των ασθενών, καθιστούν αναγκαία τη χρήση της φασματοσκοπίας NMR με σκοπό την αποτελεσματική και, σε ορισμένες περιπτώσεις, ταχεία ανάλυση με τη μικρότερη δυνατή κατεργασία του δείγματος. 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.

1.1.4.2 Φασματοσκοπία NMR-¹H σε συνδυασμό με στατιστική ανάλυση ως τεχνική «δακτυλικού» αποτυπώματος (fingerprinting) και μελέτης προέλευσης φυσικών προϊόντων

Η ανάλυση βιολογικών δειγμάτων, όπως είναι τα ακατέργαστα εκχυλίσματα, με τη φασματοσκοπία NMR-¹H, χωρίς κάποιο προκαταρκτικό στάδιο διαχωρισμού, είναι γνωστή ως εύρεση του «δακτυλικού» αποτυπώματος «fingerprinting» ή του προφίλ «profiling» αυτών. Συγκεκριμένα η ευρεία εφαρμογή της στην επιστήμη τροφίμων σχετίζεται κυρίως με την ποιοτική απόδοση των φασμάτων NMR δειγμάτων τροφίμων. Τα φυτικά εκχυλίσματα αλλά και τα τρόφιμα παρουσιάζουν μεγάλη πολυπλοκότητα ως προς τη σύστασή τους και, στην περίπτωση που εξετάζονται πολλά δείγματα, είναι δύσκολο να γίνει ουσιαστική σύγκριση μεγάλου αριθμού φασμάτων μόνο οπτικά. Στη κατεύθυνση αυτή μπορούν να φανούν εξαιρετικά χρήσιμες οι πολυδιάστατες στατιστικές μέθοδοι, καθώς μπορούν να συμπίεσουν τα δεδομένα σε μια μορφή που μπορεί πιο εύκολα να χρησιμοποιηθεί. Αυτό μπορεί να βοηθήσει στην κατανόηση του πως ένα συγκεκριμένο δείγμα συνδέεται με άλλα δείγματα.

Πολλά παραδείγματα έχουν αναφερθεί στη διεθνή βιβλιογραφία στα οποία λαμβάνει χώρα ο χαρακτηρισμός κρασιού (*Organic et al., 2001*), εκχυλισμάτων μαρουλιού (*Sobolev et al., 2005*), τσαγιού (*Le Gall et al., 2004*) και ντοματοχυμού (*Sobolev et al., 2003*) με τη φασματοσκοπία NMR-¹H. Επίσης, η φασματοσκοπία NMR-¹H εφαρμόστηκε για τον έλεγχο ποιότητας και την εξακρίβωση της αυθεντικότητας ελαιολάδου (*Hidalgo and Zamora, 2003*). Τις τελευταίες δεκαετίες, ένας αριθμός τεχνικών έχουν εφαρμοστεί για την ανάπτυξη της φασματοσκοπίας NMR ως ένα εργαλείο που παρέχει το δακτυλικό αποτύπωμα για την απόδοση και ποιοτική εκτίμηση βιομηχανικών και φυσικών προϊόντων σε συνδυασμό με πολυδιάστατες τεχνικές αναγνώρισης αποτυπώματος, όπως η πολύ διαδεδομένη Ανάλυση Βασικών Συνιστωσών (principal component analysis-PCA). Η φασματοσκοπία NMR-¹H σε συνδυασμό με την τεχνική PCA χρησιμοποιήθηκε για

την εύρεση του προφίλ μεταβολιτών (metabolomic profiling) διάφορων ειδών κρασιού (*Brescia et al., 2002*), καφέ (*Charlton et al., 2002*), χυμού (*Vogels et al., 1996*), μπύρας (*Duarte et al., 2002*) και διάφορων φυτών (*Nord et al., 2001*).

Στη ίδια κατεύθυνση οι *Choi et al., 2004* εφάρμοσαν τις παραπάνω τεχνικές σε 12 καλλιεργήσιμες μορφές κάνναβης, με σκοπό τη διάκριση των καλλιεργειών κάνναβης με βάση την ποικιλία των μεταβολιτών. Μέθοδοι πολυδιάστατης στατιστικής εφαρμόστηκαν σε δεδομένα 2D NMR (^1H - ^{13}C) εκχυλισμάτων πολυφαινόλων από κλώνους αμπελιού. Μια ανάλυση διακύμανσης εντόπισε τις πιο χαρακτηριστικές συσχετίσεις (correlation volumes) του φάσματος NMR, που χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια για να πραγματοποιηθεί η ανάλυση PCA και να διαφοροποιηθούν οι κλώνοι ανάλογα με την καλλιέργεια. Στις μέρες μας, η φασματοσκοπία δυο διαστάσεων (NMR 2D) είναι, ίσως, το μόνο αναλυτικό εργαλείο που μπορεί να διαφοροποιήσει κλώνους αμπελιού. Θα μπορούσε, κατ' αυτόν τον τρόπο να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο της ταυτότητας ειδών, καλλιεργειών ή κλώνων αμπελιού, αλλά και για κάθε άλλο φυτό που παράγει πολυφαινόλες (*Forveille et al., 1996*).

Επίσης, πραγματοποιήθηκε ανάλυση «δακτυλικού» αποτυπώματος (fingerprinting analysis) σε δείγμα φρέσκου «ginseng» σύμφωνα με την ηλικία της ρίζας, χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία NMR- ^1H και τεχνικές πολυδιάστατης ανάλυσης, που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί και για την εξακρίβωση της αυθεντικότητας και τον έλεγχο της ποιότητας του (*Shin et al., 2007*). Η ίδια μεθοδολογία χρησιμοποιήθηκε για να μειωθεί η πολυπλοκότητα του συνόλου των δεδομένων του πρωτονιακού φάσματος NMR δειγμάτων πράσινου τσαγιού αλλά και για την ποιοτική αξιολόγησή του (*Tarachiwin et al., 2007*). Σε άλλη μελέτη δείγματα πράσινου τσαγιού διαφοροποιήθηκαν ανάλογα με τη χώρα προέλευσης τους (*Le Gall et al., 2004*). Τέλος, βρέθηκε ότι η χημική σύσταση δειγμάτων πρόπολης χαρτογραφήθηκε πολύ καλά σύμφωνα με τη γεωγραφική προέλευση των δειγμάτων που εξετάστηκαν με το συνδυασμό φασματοσκοπίας NMR- ^1H και ανάλυσης PCA (*Watson et al., 2006*).

1.1.4.3 Φασματοσκοπία NMR και μεταβιονομική (metabonomics).

Τα τελευταία χρόνια παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον η χρήση της φασματοσκοπίας NMR για την σε βάθος ανάλυση πολύπλοκων βιολογικών διεργασιών σε μεταβολικό επίπεδο. Αυτές οι μελέτες, που αναφέρονται ως μεταβιονομική «metabonomics», δίνουν έμφαση στη εύρεση βιοδεικτών «biomarker» ή την κατάταξη ασθενειών και επικεντρώνονται συνήθως σε βιολογικά υγρά που δεν έχουν υποστεί κλασμάτωση ή σε εκχυλίσματα ιστών. Η χρήση της φασματοσκοπίας NMR στη μεταβιονομική έχει πλεονεκτήματα αλλά και περιορισμούς. Η προετοιμασία δείγματος είναι συνήθως απλή και γρήγορη, οι πειραματικοί χρόνοι είναι μικροί και εύκολα αυτοματοποιημένοι, ενώ είναι διαθέσιμες διάφορες προηγμένες μέθοδοι ανάλυσης δεδομένων. Όπως συμβαίνει και με τις γνωστές ενώσεις (π.χ. που έχουν ταυτοποιηθεί από βάση δεδομένων) το φάσμα NMR πολύπλοκων μιγμάτων μπορεί να δώσει επαρκείς πληροφορίες για τις δομές αγνώστων συστατικών, που μπορούν να εξαχθούν από το φάσμα NMR του μίγματος ως έχει, είτε μετά από καθαρισμό. Η ευαισθησία της ως τεχνική είναι μικρή σε σύγκριση με τη φασματομετρία MS και έτσι ανιχνεύονται συστατικά των οποίων η συγκέντρωση βρίσκεται συνήθως στην περιοχή συγκεντρώσεων από μερικά μM έως mM .

Στο φάσμα NMR- ^1H 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 φυτικών ιστών, ανάλογα με το αν το ενδιαφέρον της μελέτης στρέφεται στα πολικά ή τα μη- πολικά συστατικά ή και τα δύο. Μια προζυγισμένη ποσότητα δείγματος (συνήθως 15- 30 mg λυοφιλιωμένου ξηρού δείγματος- σκόνης) διαλύεται σε δευτεριωμένο διαλύτη (~ 1ml) με ανάδευση, με τη βοήθεια αναδευτήρα περιδίνησης (vortexing) ή με υπερήχηση (sonication). Μετά από φυγοκέντριση μια συγκεκριμένη ποσότητα του υπερκείμενου διαλύματος (400- 750 μl) 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 με μεταβονομική.

Πολλά σήματα είναι δυνατόν να ταυτοποιηθούν με σύγκριση με βιβλιοθήκες δεδομένων ή με πρότυπες ενώσεις ή με τη χρήση της φασματοσκοπίας NMR δύο διαστάσεων. Διάφοροι πίνακες που δείχνουν την ταυτοποίηση των σημάτων συντονισμού έχουν δημοσιευτεί για ένα μεγάλο αριθμό δειγμάτων φυτικής προέλευσης, όπως για παράδειγμα μήλου, μάνγκο, πορτοκαλιού, ντομάτας (του καρπού και της ρίζας), πατάτας, φράουλας, φύλλων *Arabidopsis* και φύλλων μαρουλιού. Τα περισσότερα από τα παραπάνω αναφέρονται σε υδατικά δείγματα ή πολικά εκχυλίσματα και πολλά συστατικά είναι κοινά για όλα τα δείγματα (π.χ. αμινοξέα, οργανικά οξέα, απλά σάκχαρα). Για παράδειγμα οι κύριοι δευτερογενείς μεταβολίτες, όπως φαινυλπροπανοειδή (phenylpropanoids) και glucosinolates σε δείγμα *Arabidopsis* ταυτοποιήθηκαν απευθείας (Colquhoun, 2007).

1.1.4.4 Ποσοτικός προσδιορισμός με τη χρήση φασματοσκοπίας NMR- ¹H

Έξι δεκαετίες μετά την ανακάλυψή της η φασματοσκοπία NMR μπορεί να θεωρηθεί ως το κύριο μη καταστρεπτικό αναλυτικό εργαλείο για την ανάλυση της δομής μακρομορίων. Παρόλο που χαίρει σχεδόν καθολικής αποδοχής ως μια σημαντικότερη μέθοδος για την ανάλυση τρισδιάστατων μοριακών δομών δεν είναι και τόσο δημοφιλής μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού, λόγω της σχετικά μικρής της ευαισθησίας. 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. Η γραμμική σχέση μεταξύ της έντασης του σήματος συντονισμού I και του αριθμού των πυρήνων που παρατηρούνται (στην περίπτωση διέγερσης απλού παλμού) είναι:

$$I = c_s \times M \text{ (Εξίσωση 1)}$$

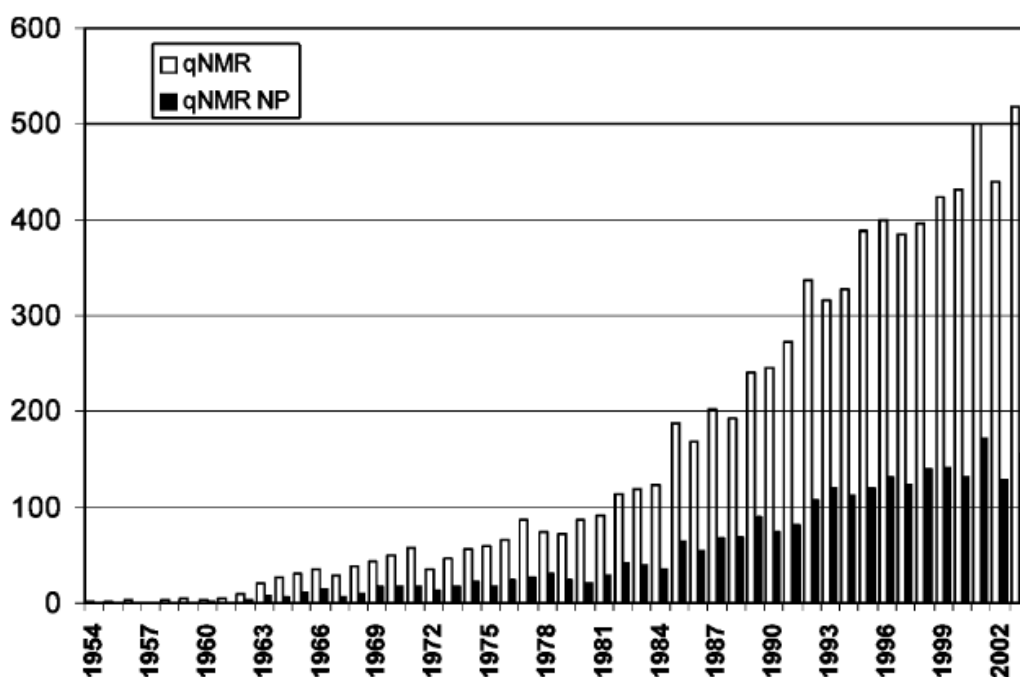
Η σταθερά αναλογίας c_s προκύπτει από τις παραμέτρους του φασματογράφου, αναφερόμενη και ως «σταθερά φασματογράφου» και από το δείγμα. Η επαναληψιμότητα με την οποία λαμβάνονται τα ολοκληρώματα προσδιορίζει την

ακρίβεια του ποσοτικού προσδιορισμού, που εξαρτάται από: (α) το επίπεδο του θορύβου του φάσματος, (β) τη μορφή της κορυφής- σήματος, (γ) την ποιότητα της ομογενοποίησης (shimming), (δ) την επιλογή μαθηματικών συναρτήσεων επεξεργασίας του φάσματος (window function) και (ε) τις διορθώσεις της φάσης, ως προς τη γραμμική βία και της ολίσθησης (μονοκατευθυνόμενη μεταβολή σήματος-drift).

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 ότι, στις περισσότερες περιπτώσεις, παρατηρούνται διακριτές κορυφές που αποδίδονται σε μεμονωμένες χαρακτηριστικές ομάδες μορίων, οι οποίες μπορούν να ολοκληρωθούν ανεξάρτητα από άλλες απορροφήσεις του φάσματος. Τέλος, υπάρχει μια μεγάλη ποικιλία NMR ισοτόπων κατάλληλων για μετρήσεις ώστε δεν είναι απαραίτητο η ανάλυση να στηρίζεται μόνο στη πρωτονιακή φασματοσκοπία (παρόλο που είναι η περισσότερο ευαίσθητη και ευρέως χρησιμοποιούμενη). Εφόσον τα ολοκληρώματα των εντάσεων των απορροφήσεων των πρωτονίων είναι ανάλογα με τον αριθμό των πρωτονίων μέσα στο μόριο (ενδομοριακό περιβάλλον), είναι λογικό να υποθέσουμε ότι η ίδια προσέγγιση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση απλών ή πολύπλοκων μιγμάτων ή για τον προσδιορισμό προσμίξεων σε ενώσεις που απομονώθηκαν από φυτικά εκχυλίσματα.

Γενικά, η φασματοσκοπία NMR αναφέρεται ως ποσοτικό NMR (qNMR) στις περιπτώσεις που χρησιμοποιείται ως αναλυτικό εργαλείο για τον ποσοτικό προσδιορισμό. Καταρχήν, ο όρος qNMR εφαρμόζεται σε όλους τους ευαίσθητους NMR πυρήνες και δεν περιορίζεται όσον αφορά τις διαστάσεις. Βέβαια προκειμένου να αποφευχθεί σύγχυση με την ετεροπυρηνική φασματοσκοπία, ο όρος qNMR θα χρησιμοποιείται ως γενική συντεταγμένη λέξη για τον ποσοτικό προσδιορισμό με τη φασματοσκοπία NMR και ο όρος qHNMR για τη πρωτονιακή φασματοσκοπία NMR. Η χρήση της qHNMR φασματοσκοπίας εμφανίζει ένα μεγάλο αριθμό πλεονεκτημάτων, όπως είναι η ευαισθησία, η καθολικότητα, η επαναληψιμότητα, η ελάττωση ή αντικατάσταση άλλων μεθόδων και φυσικά δεν πρέπει να παραλείπεται η μη καταστρεπτική φύση της μεθόδου.

Οι αρχικές αναφορές σχετικά με την επαναληψιμότητα της μεθόδου που είναι δυνατόν να επιτευχθεί ως προς τον ποσοτικό προσδιορισμό είναι αντιφατικές και ορισμένες τείνουν να υπολογίσουν το σφάλμα στην περιοχή του 10%. Επιπλέον, η απουσία ενός ακριβούς και λεπτομερούς πρωτόκολλου τόσο της διαδικασίας μέτρησης αλλά και της επεξεργασίας και εκτίμησης του φάσματος είναι υπεύθυνη για το φαινόμενο κατά το οποίο ποσοτικές μετρήσεις πανομοιότυπων δειγμάτων σε διαφορετικά εργαστήρια μπορεί να διαφέρουν σημαντικά. Ωστόσο, πρόσφατες εξελίξεις στο πεδίο αυτό αποδεικνύουν ότι η φασματοσκοπία NMR μπορεί να εξελιχθεί σε ένα ακριβές εργαλείο για τον ποσοτικό προσδιορισμό. Όπως φαίνεται στην Σχήμα 1.3, παρατηρείται ένα σταθερά αυξανόμενο ενδιαφέρον για τη φασματοσκοπία qNMR, με βάση τον αριθμό των δημοσιεύσεων στο πεδίο αυτό (Pauli et al., 2005).



Σχήμα 1.3: Η εξέλιξη της χρήσης της φασματοσκοπίας qNMR μεταξύ 1953 και 2003 όπως υπολογίστηκε από τις καταχωρήσεις των δημοσιεύσεων από τον κατάλογο της ACS's Chemical Abstracts ($N_{tot}=7981$). Το σύνολο των δημοσιεύσεων που σχετίζονται με τα φυσικά προϊόντα απεικονίζεται από συμπαγείς ράβδους (qNMR-NP, $N=2610$) (Pauli et al., 2005).

Παρά την περιορισμένη του ακρίβεια μέχρι τώρα, ο ποσοτικός προσδιορισμός με τη χρήση φασματοσκοπίας NMR- ^1H και ^{13}C σε υγρά έχει χρησιμοποιηθεί στη φαρμακευτική για την ταυτοποίηση φαρμάκων και προσμίξεων αλλά και για τον ποσοτικό προσδιορισμό, στη γεωργία, στην επιστήμη υλικών, για στρατιωτικούς σκοπούς κ.α., όπου η καθαρότητα και ο προσδιορισμός του περιεχομένου των συστατικών είναι ιδιαίτερης σημασίας. Η ανάπτυξη στον τομέα αυτό επιταχύνθηκε από τη βελτίωση της ευαισθησίας και της ομοιογένειας υψηλού- πεδίου φασματογράφων NMR αλλά και τη δημιουργία σύγχρονων λογισμικών πακέτων που επιτρέπουν την ακριβή και με επαναληψιμότητα συλλογή και επεξεργασία δεδομένων. Το 1998 η επιτροπή χημικών μετρήσεων (Comite Consultatif pour la Quantite de Matiere, CCQM) συζήτησε την πιθανότητα το qNMR να θεωρηθεί βασική-πρωταρχική μέθοδος σύμφωνα με τον ορισμό της CCQM (*Malz and Jancke, 2005*).

Οι παράγοντες που περιορίζουν την εφαρμογή της φασματοσκοπίας NMR για ποσοτικούς προσδιορισμούς, είναι κυρίως η ευαισθησία και η ακρίβεια. Άλλοι παράγοντες που αποτρέπουν την εφαρμογή για αναλύσεις ρουτίνας σχετίζονται με το πλήθος των παραμέτρων, όπως το εύρος του παλμού rf, τους χρόνους αποδιέγερσης, την ψηφιακή διαχωριστική ικανότητα (digital resolution) και παραμέτρους που σχετίζονται με τη λήψη και επεξεργασία των φασμάτων (*Evilia, 2001*). Προκειμένου το ολοκλήρωμα της έντασης ενός σήματος σε ένα φάσμα 1D NMR να είναι ακριβές και επαναλήψιμα ανάλογο του αριθμού των πυρήνων που παρατηρούνται, ένας αριθμός παραμέτρων που σχετίζονται με τη συλλογή των δεδομένων θα πρέπει να βελτιστοποιηθούν με προσοχή. Επειδή η φασματοσκοπία qHNMR θέτει ορισμένες κρίσιμες απαιτήσεις όσον αφορά τις παραμέτρους, θα πρέπει να δοθεί προσοχή στις λεπτομέρειες των κατάλληλων πειραματικών συνθηκών για τον ποσοτικό προσδιορισμό. Στον Πίνακα 1.2 παρουσιάζονται οι «βέλτιστες τιμές» ορισμένων παραμέτρων που πρέπει να ληφθούν υπόψη κατά τη λήψη ενός φάσματος NMR- ^1H που χρησιμοποιείται για ποσοτικό προσδιορισμό ενώσεων.

Οι σημαντικότεροι παράγοντες για τον ποσοτικό προσδιορισμό είναι ο δείκτης αναλογικότητας (achievement of proportionality) και η μέθοδος ολοκλήρωσης. Θα πρέπει να τονιστεί ότι και οι δύο παράγοντες αντιπροσωπεύουν μια δίπτυχη προσέγγιση που είναι απαραίτητη για να γίνει η φασματοσκοπία NMR ένα

επαναλήψιμο αναλυτικό εργαλείο. Ιδιαίτερη σημασία θα πρέπει να δοθεί στα εξής: (i) στις «πειραματικές συνθήκες ποσοτικού προσδιορισμού», που περιλαμβάνουν επιλογή καταλλήλων παραμέτρων, όπως είναι ο χρόνος αποδιέγερσης (relaxation delay), η ψηφιοποίηση του σήματος (digitization) και ο σχεδιασμός παλμικής ακολουθίας και (ii) στην επιλογή κατάλληλων παραμέτρων επεξεργασίας μετά τη λήψη του φάσματος για τη βέλτιστη ολοκλήρωση του φάσματος. Ανώτερος σκοπός, βέβαια, είναι να πραγματοποιηθεί ένα πείραμα qHNMR μέσα σε εύλογο χρονικό διάστημα χωρίς να αλλοιώνονται οι ποσοτικές πληροφορίες εξαιτίας κορεσμού ή ελλιπούς αποδιέγερσης των πυρήνων στο δείγμα. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα των εφαρμογών του qHNMR που έχουν αναφερθεί βρίσκεται στην περιοχή του 0.5-3%.

Πίνακας 1.2: Γενικές οδηγίες για την επιλογή των παραμέτρων για τη λήψη και επεξεργασία ενός φάσματος NMR που χρησιμοποιείται για qHNMR (Pauli et al., 2005).

Παράμετρος	Προτεινόμενη τιμή	Σχόλια
<i>Λήψη φάσματος</i> Χρόνος καταγραφής (<i>aq</i>)	2-4 s	Ποικίλει ανάλογα με το δείγμα- επιλέξτε μικρές τιμές για «inverse-gated decoupled» qHNMR
Χρόνος Υστέρησης (<i>d1</i>)	3-10 s	Θα πρέπει να αντιστοιχεί σε 5 φορές τη μεγαλύτερη τιμή της T_1 . Μικρότερες τιμές μπορεί να είναι αποδεκτές μόνο σε ειδικές περιπτώσεις
Εύρος παλμού (<i>pw</i>)	15-45°	Ιδανική είναι η χρήση της γωνίας του Ernst που προσδιορίζεται για κάθε δείγμα
«Time domain»	64k	Μέσω της διαδικασίας «zero-filled»
Εύρος φάσματος (<i>sw</i>)	Το «spectral window» του δείγματος ± 3 ppm σε κάθε άκρη	Εξαρτάται από τον τύπο του πυρήνα που χρησιμοποιείται
«Transmitter offset» (<i>o1</i>)	Η μέση του εύρους του φάσματος	Τίθεται αυτόματα από το φασματογράφο
«Receiver gain»	Οριακά χαμηλότερα της υψηλότερης πιθανής καθορισμένης τιμής	Τίθεται αυτόματα από το φασματογράφο
Αριθμός των scans/transients	128-1024	Εξαρτάται από τη μοριακή συγκέντρωση του δείγματος, την επιθυμητή τιμή του S/N και του επιπέδου του ποσοτικού προσδιορισμού που επιθυμείται
Επεξεργασία Εκθετική πολλαπλότητα	$1b = 0.1-0.3$	Άλλες λειτουργίες του παραθύρου μπορούν να εξεταστούν (Gaussian, TRAF), αλλά συνήθως έχουν μη γραμμικά αποτελέσματα
Διόρθωση της φάσης	Χειρονακτικά	Εξακολουθεί να είναι ο καλύτερος τρόπος
Διόρθωση της γραμμής της βάσης	Πολυωνυμική τάξης <i>n</i> th	Η βελτιστοποίηση γίνεται χειρονακτικά

Εκτός από τις παραπάνω παραμέτρους που θα πρέπει να ρυθμιστούν στη φασματοσκοπία qHNMR, είναι απαραίτητη η χρήση ενώσεων αναφοράς για την εσωτερική και εξωτερική ποσοτική βαθμονόμηση. Μια ιδανική ένωση αναφοράς για μετρήσεις ακρίβειας θα πρέπει να είναι εύκολα διαθέσιμη και να βρίσκεται σε μορφή υψηλής καθαρότητας, να είναι σταθερή και χημικά αδρανής, να μην είναι πτητική ένωση και υγροσκοπική και να διαλύεται στους περισσότερους διαλύτες NMR που

χρησιμοποιούνται συνήθως. Το φάσμα NMR- ^1H θα πρέπει να είναι απλό και τα σήματα συντονισμού να μην αλληλεπικαλύπτονται με εκείνα των προσδιοριζόμενων συστατικών. Η περισσότερο ευρύτατα διαδεδομένη ένωση αναφοράς είναι το μαλαϊκό οξύ, επίσης έχουν χρησιμοποιηθεί η *tert*-βουτυλ-αλκοόλη, το 1,4-δινιτροβενζόλιο, το εξαμεθοξυκυκλοτρισιλοξάνιο, η μεθенаμίνη, το τετραμεθυλοσιλυλοπροπιονικό άλας του Na κ.α. (Pauli et al., 2005).

Ωστόσο, όπως προαναφέρθηκε ένα από τα βασικά μειονεκτήματα της φασματοσκοπίας qHNMR είναι η χαμηλή ευαισθησία που στηρίζεται στη μικρή διαφορά στην πληθυσμιακή κατανομή των spin μεταξύ των καταστάσεων α- και β-. Η πληθυσμιακή κατανομή των spin καθορίζεται από την κατανομή κατά Boltzmann:

$$\frac{N_{\alpha}}{N_{\beta}} = \exp\left(\frac{-\gamma h B_0}{2\pi k T}\right) \text{ (Εξίσωση 2)}$$

όπου N_{α} και N_{β} είναι ο πληθυσμός του spin στη χαμηλότερη και την υψηλότερη στάθμη ενέργειας αντίστοιχα, k η σταθερά του Boltzmann (ίση με $1,38066 \cdot 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$) και T η απόλυτη θερμοκρασία του δείγματος.

Καθώς η πληθυσμιακή διαφορά $N_{\alpha} - N_{\beta}$ εξαρτάται από την ισχύ του μαγνητικού πεδίου σε ένα πεδίο 60 MHz η πληθυσμιακή περίσσεια είναι μόνο 0.001% και σε ένα πεδίο 600 MHz είναι 0.01%. Εκτός από την μεγάλη ισχύ πεδίου η χαμηλή ευαισθησία μπορεί να βελτιωθεί με:

1. Αύξηση του αριθμού των παλμών που οδηγεί σε μεγαλύτερη αναλογία σήματος-προς-θόρυβο (S/N).
2. Ακριβείς (gradient) τεχνικές ομογενοποίησης βαθμιδωτής που βελτιώνουν την ποιότητα του φάσματος.
3. Χρήση ανάστροφων υποδοχέων (inverse probes) και κρυογενικής τεχνολογίας που αυξάνουν την αναλογία (S/N) (κατά ένα παράγοντα περίπου 10), π.χ για μετρήσεις ^1H .
4. Μεγιστοποίηση της συγκέντρωσης και βελτιστοποίηση του όγκου του διαλύτη (τεχνολογία μικροπηνίου, π.χ. nano-NMR υποδοχείς ή micro-κρυογενικής τεχνολογίας).

Ο ποσοτικός προσδιορισμός είναι δυνατός μόνο στην περίπτωση που τα σήματα που ολοκληρώνονται διαχωρίζονται καλά. Σε αντίθεση με τις χρωματογραφικές τεχνικές υπάρχει μικρή μόνο πιθανότητα να επηρεαστεί αυτός ο διαχωρισμός γιατί οι χημικές μετατοπίσεις σχετίζονται άμεσα με τη μοριακή δομή. Βέβαια, αλλάζοντας το είδος του διαλύτη, την τιμή του pH ή προσθέτοντας βοηθητικά αντιδραστήρια-αντιδραστήρια μετατόπισης (shift reagents), συχνά επιτυγχάνεται καλύτερος διαχωρισμός των σημάτων. Η αλληλοεπικάλυψη σημάτων συντονισμού είναι ένας από τους κύριους περιορισμούς της μεθόδου. Σε ορισμένες περιπτώσεις, η θερμοκρασία επηρεάζει το διαχωρισμό των σημάτων συντονισμού.

Το κρίσιμο πλεονέκτημα της φασματοσκοπίας NMR έναντι χρωματογραφικών και ηλεκτροφορετικών τεχνικών είναι το γεγονός ότι δεν απαιτείται σημαντικός χρόνος προετοιμασίας. Ενώ στην HPLC θα πρέπει να δαπανηθεί πολύς χρόνος για την εξισορρόπηση της στήλης ή την παραγωγοποίηση των προσδιοριζόμενων ενώσεων στην περίπτωση ανίχνευσης με απορρόφηση UV, φθορισμό ή με ηλεκτροχημική ανίχνευση, στο φασματογράφο NMR ο πειραματικός χρόνος που απαιτείται για τη λήψη φασμάτων εξαρτάται από τη συγκέντρωση της προσδιοριζόμενης ένωσης και τον πειραματικό τρόπο λειτουργίας του οργάνου και μόνο. Έτσι με τη πρωτονιακή φασματοσκοπία προκύπτει ένας μεγάλος αριθμός πληροφοριών και ποσοτικών δεδομένων από ένα και μόνο πείραμα, το οποίο καταγράφεται μέσα σε 5-10 λεπτά. Το κάθε συστατικό θα πρέπει να διαλυθεί σε ένα κατάλληλο δευτεριωμένο διαλύτη, ο όγκος του οποίου θα πρέπει να είναι περίπου 0.5-0.7ml. Έτσι αντισταθμίζεται το υψηλότερο κόστος των δευτεριωμένων διαλυτών με τις μεγαλύτερες ποσότητες διαλυτών που απαιτούνται στην HPLC. Η ποσότητα του δείγματος που απαιτείται είναι περίπου 2mg προκειμένου να επιτευχθεί μια καλή αναλογία σήματος-προς-θόρυβο (S/N) σε ένα εύλογο πειραματικό χρόνο (*Holzgrabe et al., 2005*).

1.1.4.5 Εφαρμογές της φασματοσκοπίας qHNMR σε τρόφιμα

Παρότι η φασματοσκοπία NMR δεν έχει χρησιμοποιηθεί σε μεγάλο βαθμό για το ποσοτικό προσδιορισμό συστατικών δειγμάτων τροφίμων, αξίζει να σημειωθεί ότι η μεθοδολογία κλασμάτωσης φυσικού ισοτόπου (SNIF-NMR) εξελίχθηκε στην πρώτη επίσημη μέθοδο σταθερού ισοτόπου που υιοθετήθηκε για την ανάλυση

κρασιού από την Ευρωπαϊκή Ένωση το 1990, επιτρέποντας τη διάκριση μεταξύ φυσικών και εμπλουτισμένων κρασιών και τη διαφοροποίηση τους όσον αφορά τη γεωγραφική τους προέλευση. Επίσης, πραγματοποιήθηκε διαφοροποίηση ανάλογα με το είδος και τη μάρκα της μύρας, ανάλογα με το προφίλ μόνο- και ολιγοσακχαριτών και των αρωματικών συστατικών με qHNMR (Pauli et al., 2005).

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, υδροξυμεθυλφουρουράλης) και πτητικών συστατικών (οξικού αιθυλεστέρα) σε δείγματα ξυδιού. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα παραδοσιακών τεχνικών (GC-MS, ογκομέτρηση) και διαπιστώθηκε καλή συμφωνία μεταξύ τους. Η μέθοδος εφαρμόστηκε σε διαφορετικά δείγματα ξυδιού, επιτρέποντας και τη διάκριση μεταξύ απλού ξυδιού και βαλσαμικού. Ενώ σε παλαιότερη μελέτη προσδιορίστηκαν με qHNMR δείκτες παλαίωσης βαλσαμικού ξυδιού, συμπληρώνοντας τις μεθόδους αποτίμησης της ποιότητάς του (Consonni and Gatti, 2004).

Η φασματοσκοπία NMR- ^1H εφαρμόστηκε επίσης, για τον ποσοτικό προσδιορισμό μαλικού και κιτρικού οξέος σε χυμούς μήλου, βερίκοκου, πορτοκαλιού, φράουλας, ανανά και ακτινίδιου (Del Campo et al., 2006) και φορμικού οξέος σε χυμούς μήλων (Berregi et al., 2007). Για την ανάλυση χυμού και πολτού ντομάτας χρησιμοποιήθηκε πρωτονιακή φασματοσκοπία και ένας συνδυασμός πειραμάτων 2D για τον προσδιορισμό κάθε συστήματος spin και για το διαχωρισμό των συστατικών των πολύπλοκων αποτυπωμάτων που παρατηρούνται στο πρωτονιακό φάσμα. Επίσης, η qHNMR χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό συστατικών τους (Sobolev et al., 2003). Με χρήση πρωτονιακής φασματοσκοπίας NMR (1D και 2D) αναλύθηκαν δυο είδη φωτοσυνθετικών χρωστικών (χλωροφύλλες και παράγωγα τους και καροτενοειδή) «πράσινων φασολιών» και πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός τους με qHNMR (Valverde and This, 2008).

Η φασματοσκοπία NMR- ^1H χρησιμοποιήθηκε ως μια γρήγορη και ευέλικτη μέθοδος για την ανάλυση του πολικού φάσματος του παρθένου ελαιολάδου, που περιέχει διάφορες τάξεις φαινολικών ενώσεων. Στη συγκεκριμένη αναλυτική τεχνική δεν ήταν απαραίτητη η χρήση προτύπων ενώσεων, που μπορεί να μην είναι και εμπορικώς διαθέσιμες, καθώς και η παραγωγοποίηση, που χρησιμοποιήθηκε σε προηγούμενη μελέτη των ίδιων συστατικών στηριζόμενη στη φασματοσκοπία NMR- ^{31}P (Christophoridou and Dais, 2006). Η ανίχνευση των φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου στηρίχθηκε στις χημικές μετατοπίσεις ενός μεγάλου αριθμού πρότυπων ενώσεων για τα οποία έγινε η απόδοση του αποτυπώματος τους με τη χρήση φασματοσκοπίας NMR 1D και 2D. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των φαινολικών ενώσεων έγινε χρησιμοποιώντας 1,2,3-τριαζίνη ως ένωση αναφοράς. Με τον τρόπο αυτό ανιχνεύθηκαν και προσδιορίστηκαν ποσοτικά δεκαεννέα συστατικά του φαινολικού-πολικού κλάσματος του ελαιολάδου (Christophoridou and Dais, 2009).

1.1.4.6 Εφαρμογές της φασματοσκοπίας qHNMR σε συστατικά φυτικών εκχυλισμάτων

Υπάρχουν αρκετές αναφορές στη βιβλιογραφία που αφορούν τον ποσοτικό προσδιορισμό συστατικών εκχυλισμάτων φαρμακευτικών φυτών και βοτάνων με φασματοσκοπία qHNMR. Μια μέθοδος που στηρίζεται στη φασματοσκοπία NMR- ^1H , αναπτύχθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό καθαρών κανναμπινοειδών (cannabinoids) και σε κανναμπινοειδή που υπήρχαν σε εκχύλισμα του φυτού *Cannabis sativa*, χωρίς τον προηγούμενο χρωματογραφικό διαχωρισμό τους. Ο ποσοτικός προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε με τον υπολογισμό της σχετικής αναλογίας της περιοχής της κορυφής επιλεγμένου πρωτονιακού σήματος των προσδιοριζομένων συστατικών με γνωστή ποσότητα εσωτερικού προτύπου, ανθρακενίου (Hazecamp et al., 2004). Στην ίδια κατεύθυνση στον τομέα των φαρμακευτικών φυτών η ομάδα των van Beek et al., 1993 χρησιμοποίησαν τη μέθοδο qHNMR για τον προσδιορισμό τριτερπενικών τριλακτόνων σε εκχύλισμα *Ginkgo biloba*.

Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό των κύριων συστατικών αιθέριου ελαίου του φαρμακευτικού φυτού *Brickellia Veronicaefolia*,

χωρίς την προηγούμενη απομόνωσή τους, με απώτερο σκοπό την ανάπτυξη διαδικασιών ποιοτικού ελέγχου για το ακατέργαστο (crude) φάρμακο και τις παρασκευές του βοτάνου (*Rivero-Cruz et al., 2006*). Στην ίδια κατεύθυνση, σε εμπορικά διαθέσιμο εκχύλισμα *Hypericum perforatum* L. με τη χρήση 1D και 2D NMR ταυτοποιήθηκαν συστατικά τριών τάξεων ενώσεων φλαβονολών, φλωρογλουκινολών (phloroglucinols) και ναφθοδιανθρόνων (naphthodianthrones) (*Bilia et al., 2001*). Ενώ σε εκχυλίσματα ginger, μαύρου πιπεριού και σκόνης τσίλι ταυτοποιήθηκαν και προσδιορίστηκαν ποσοτικά τα πτητικά τους συστατικά με φασματοσκοπία NMR- ^1H (*Catchpole et al., 2003*).

Η ερευνητική μας ομάδα έχει προηγούμενη εμπειρία στη μελέτη αντιοξειδωτικών ενώσεων που υπάρχουν σε φυτικά εκχυλίσματα χωρίς τον προηγούμενο διαχωρισμό και απομόνωση των μεμονωμένων συστατικών τους, με τη χρήση φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR μιας και δυο διαστάσεων. Συγκεκριμένα, έχει χρησιμοποιηθεί ο συνδυασμός πειραμάτων NMR μιας και δυο διαστάσεων (COSY*/TOCSY* ^1H - ^1H και NOESY ^1H - ^1H) [με * συμβολίζονται οι συντομογραφίες που δίνονται στο τέλος του κεφαλαίου] για την ταυτοποίηση φαινολικών οξέων σε διάφορα μεθανολικά φυτικά εκχυλίσματα της οικογένειας *Lamiaceae* (*O. Vulgare*, *O. Onites*, *O. Thymbra*, *C. Capitatus*, *O. Dictamnus*) (*Gerothanassis et al., 1998*). Επιπλέον, μελετήθηκε η εφαρμογή δισδιάστατων τεχνικών NMR (DQF-COSY* ^1H - ^1H , και HMQC* ^1H - ^{13}C) μεταβλητής θερμοκρασίας στην ταυτοποίηση και στην εκτίμηση των επιπέδων συγκέντρωσης του καφεϊκού και ροσμαρινικού οξέος σε φυτά της ίδιας οικογένειας (*Exarchou et al., 2001*) καθώς και η παρουσία των φλαβόνων λουτεολίνης, και απιγενίνης και της φλαβονόλης κερκετίνης εφαρμόζοντας τη φασματοσκοπία μιας διάστασης NMR- ^1H (*Exarchou 2002b*). Ακόμη ταυτοποιήθηκε ποιοτικά και ποσοτικά η παρουσία υπερίκινης και ψευδοϋπερίκινης με qHNMR σε εκχυλίσματα βάλαμου και σε συμπληρώματα διατροφής που έχουν ως βάση το βάλαμο (*Tatsis et al., 2007*).

1.1.4.7 Ταυτοποίηση συστατικών σε μίγματα με τη χρήση δισδιάστατης (2D) φασματοσκοπίας NMR και ποσοτικός προσδιορισμός τους

Όπως προαναφέρθηκε, η φασματοσκοπία qHNMR θεωρείται ως μια αξιόπιστη μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού σε μια μεγάλη κλίμακα ερευνητικών πεδίων, από την ανάλυση φαρμάκων (Holzgrabe *et al.*, 2005) έως την ανάλυση φυσικών προϊόντων (Pauli *et al.*, 2005). Ωστόσο, η ακριβής και επαναλήψιμη ποσοτική ανάλυση πολύπλοκων μιγμάτων γίνεται συχνά δύσκολη από την παρουσία ισχυρής αλληλοεπικάλυψης μεταξύ των κορυφών. Διάφορες μέθοδοι στην επεξεργασία του φάσματος, όπως η αφαίρεση φασμάτων (deconvolution) ή άλλες μέθοδοι (singular value decomposition methods), μπορούν να βοηθήσουν ως ένα βαθμό. Η φασματοσκοπία NMR 2D προσφέρει μια ενδιαφέρουσα εναλλακτική μεθοδολογία, καθώς επιφέρει βελτίωση της διακριτικής ικανότητας που είναι απαραίτητη για την ποσοτική μελέτη πολύπλοκων φασμάτων. Στην περίπτωση αυτή η αλληλοεπικάλυψη των κορυφών περιορίζεται σε σημαντικό βαθμό και οι διασταυρούμενες κορυφές που είναι μοναδικές για συγκεκριμένα ζεύγη spin συζευγμένων πυρήνων χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση συγκεκριμένων μορίων.

Στα πειράματα NMR μιας διάστασης, η καταγραφή του φάσματος του χρόνου (FID) λαμβάνει χώρα αμέσως μετά την εφαρμογή του παλμού. Αν το ηλεκτρικό σήμα δεν καταγραφεί αμέσως μετά τον παλμό αλλά μετά από ένα ορισμένο χρονικό διάστημα (t_1), είναι εφικτή η αλληλεπίδραση των πυρήνων μεταξύ τους κατά τη διάρκεια αυτού του χρόνου με ποικίλους τρόπους, που καθορίζονται από τις παλμικές ακολουθίες που εφαρμόζονται. Στη δισδιάστατη φασματοσκοπία συλλέγονται δεδομένα σε σειρές χρόνων t_1 και t_2 κατά την εφαρμογή ηλεκτρομαγνητικών παλμών. Ο χρόνος t_2 είναι ο καθορισμένος χρόνος συλλογής δεδομένων (FID), ενώ ο t_1 , που καλείται χρόνος εξέλιξης (evolution time), είναι μεταβαλλόμενος και παριστάνει το χρονικό διάστημα μεταξύ δυο παλμών στο οποίο γίνεται η αλληλεπίδραση των διάφορων μαγνητικών πυρήνων μεταξύ τους. Το αποτέλεσμα είναι η συλλογή ποικιλίας σημάτων FID, που αντιστοιχούν σε μεταβαλλόμενους χρόνους t_1 . Η διαφορά μεταξύ των πειραμάτων NMR μιας και δυο διαστάσεων είναι ουσιαστικά η εισαγωγή της δεύτερης παραμέτρου του χρόνου, δηλαδή του χρόνου εξέλιξης t_1 , και η εφαρμογή δυο ή περισσότερων παλμών αντί του ενός (ανάλογα με την εφαρμοζόμενη τεχνική). Τα φάσματα που συλλέγονται εξαρτώνται από δυο μεταβλητές χρόνου (t_1 ,

t_2). Απαιτούνται επομένως δυο μετασχηματισμοί Fourier, ως προς το χρόνο t_2 και στη συνέχεια ως προς το χρόνο t_1 , για τη μετατροπή του φάσματος χρόνου σε φάσμα συχνοτήτων οπότε προκύπτει ένα δισδιάστατο φάσμα σε δυο άξονες συχνοτήτων (ν_1 , ν_2).

Το σημαντικότερο πλεονέκτημα της δισδιάστατης φασματοσκοπίας NMR είναι η εύρεση του τρόπου σύνδεσης (connectivity) μεταξύ των μαγνητικών πυρήνων. Ανάλογα με την αλληλουχία των παλμών και τους χρόνους εξέλιξης και ανάμιξης των μαγνητικών πυρήνων που έχουν επιλεγεί, είναι δυνατή η συλλογή ενός πλήθους πληροφοριών για τους τρόπους σύζευξης των πυρήνων μεταξύ τους. Τα πειράματα δύο διαστάσεων (2D), όπως τα COSY ^1H - ^1H , HMBC, και HMQC/HSQC* ^1H - ^{13}C έχουν αποδειχθεί οι πιο σημαντικές μέθοδοι για τη διευκρίνιση της δομής και υπάρχουν διαθέσιμα πολλά άρθρα ανασκόπησης και δημοσιεύσεις για την χρήση του NMR ως εργαλείου διευκρίνισης της δομής φυσικών προϊόντων. Τα πειράματα 2D NMR, συνήθως αναπαρίστανται ως τοπογραφικά σχεδιαγράμματα, στα οποία η ένταση των σημάτων είναι η τρίτη διάσταση, και αρχικά αποτιμάται ως ένας καθοριστικός παράγοντας της επαρκούς αναλογίας σήματος/ θόρυβο (S/N) (*Rahman and Choudhary, 1996*).

Ελάχιστα άρθρα έχουν πρόσφατα εστιάσει στις δυνατότητες εφαρμογής της φασματοσκοπίας NMR 2D για ποσοτική ανάλυση, παρά τις πολλές προοπτικές της. Οι κύριοι περιορισμοί εφαρμογής της είναι δύο. Ο πρώτος οφείλεται στη μεγάλη διάρκεια λήψης των φασμάτων, που κυμαίνεται από μερικά λεπτά έως μερικές ώρες, εξαιτίας της απαραίτητης αύξησης του χρόνου εξέλιξης t_1 . Επιπλέον, το μέγεθος- η μορφή (volumes) των 2D κορυφών επηρεάζεται από ένα πλήθος παραγόντων, όπως είναι οι σταθερές σύζευξης J ή οι χρόνοι εγκάρσιας αποδιέγερσης (T_2), που αν δεν ρυθμιστούν σωστά θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε μη ακριβή αποτελέσματα. Επιπλέον είναι απαραίτητη η κατασκευή καμπύλης αναφοράς, χρησιμοποιώντας διάφορα μίγματα με διαφορετικές αναλογίες συγκέντρωσης, μια μάλλον χρονοβόρα διαδικασία λόγω της διάρκειας των πειραμάτων. Όμως νέες μέθοδοι που αναπτύχθηκαν πρόσφατα, όπως αυτή των *Frydman et al., 2003*, που ονομάζεται «ultrafast 2D NMR» και έχει να κάνει με εφαρμογή επιλεγμένων παλμικών ακολουθιών συγχρονισμένων με εναλλασσόμενες βαθμιδώσεις μαγνητικού πεδίο (alternating magnetic field gradients synchronized with selective, frequency-swept rf

pulses), επιτρέπουν την πολύ γρήγορη λήψη φασμάτων. Οι *Giraudeau et al., 2009* χρησιμοποίησαν για πρώτη φορά τη συγκεκριμένη προσέγγιση για τον ποσοτικό προσδιορισμό ενός απλού μίγματος προτύπων ενώσεων.

Επίσης, με τις δυο-διαστάσεων επεροπυρηνικής συσχέτισης (two dimensional heteronuclear shift-correlated) μεθόδους (HMBC, και HMQC/HSQC ^1H - ^{13}C) μπορεί να προκύψει ικανοποιητική διάκριση των απορροφήσεων. Επειδή, αυτές οι μέθοδοι βασίζονται στη μεταφορά πόλωσης (polarization transfer) μέσω σταθεράς σύζευξης J ενός ή πολλαπλών δεσμών οι παράγοντες που επηρεάζουν τη ποσοτικοποίηση είναι πολύ πιο πολύπλοκοι. Οι εντάσεις (ή όγκοι) των διασταυρούμενων κορυφών 2D επηρεάζονται από μεγαλύτερο αριθμό μεταβλητών (π.χ. άνιση διέγερση, ανομοιόμορφη αποδιέγερση, χρόνους εξέλιξης, χρόνους ανάμιξης, κ.α.) σε σύγκριση με τις κορυφές ενός μονοδιάστατου φάσματος NMR. Σε σχετική μελέτη (*Heikkinen et al., 2003*) διερεύνησης της χρήσης της φασματοσκοπίας 2D HSQC για ποσοτικό προσδιορισμό ελέγχθηκαν διάφοροι παράμετροι. Σε ένα συμβατικό πείραμα HSQC ^1H - ^{13}C χρησιμοποιούνται δυο περίοδοι υστέρησης μεταφοράς πόλωσης (polarization transfer delay period) ώστε να μεταφερθεί η μαγνήτιση μεταξύ των πυρήνων ^1H και ^{13}C . Σε φυσιολογικές συνθήκες, επιλέγεται μόνο μια τιμή της σταθεράς σύζευξης $^1J_{\text{CH}}$ κατά τη λήψη του φάσματος, βελτιστοποιημένη συνήθως για μια μέση τιμή σταθεράς σύζευξης $^1J_{\text{CH}}$ 145 Hz ($\Delta = 1 / (2^1J_{\text{CH}}) = 3.45$ ms).

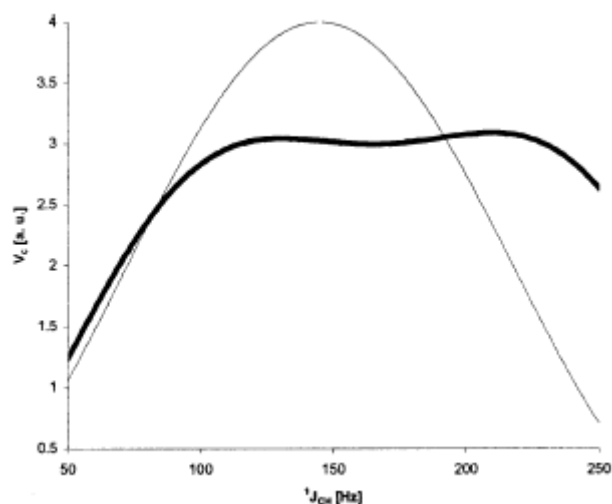
Η διάρκεια του χρόνου μεταφοράς πόλωσης (polarization transfer delay), $\Delta = 1 / (2^1J_{\text{CHtune}})$, βελτιστοποιείται με τη χρήση μιας μέσης τιμής της σταθεράς $^1J_{\text{CH}}$ που αναμένεται στο μόριο. Παρόλα αυτά ο όγκος της διασταυρούμενης κορυφής HSQC (ένταση των σημάτων V_c) εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη σχέση του χρόνου Δ και της πραγματικής $^1J_{\text{CHtune}}$. Η σχέση φαίνεται από την παρακάτω εξίσωση:

$$V_c \propto \sin^2(\pi\Delta^1J_{\text{CHtune}}) \text{ (Εξίσωση 3)}$$

Αυτό σημαίνει ότι η βέλτιστη μεταφορά πόλωσης μπορεί να επιτευχθεί για μια μόνο τιμή της σταθεράς $^1J_{\text{CH}}$ θέτοντας $\Delta = 1 / (2^1J_{\text{CHtune}})$. Συνήθως, αυτό δεν αποτελεί πρόβλημα όταν ένα φάσμα HSQC χρησιμοποιείται για λόγους απόδοσης της δομής μορίων, καθώς θέτοντας μια μέση τιμή στη σταθερά $^1J_{\text{CHtune}}$, συχνά οδηγεί στη λήψη ενός φάσματος 2D όπου όλες οι διασταυρούμενες κορυφές μπορούν να ανιχνευθούν.

Από την άλλη πλευρά όμως σε ποσοτικές αναλυτικές μελέτες, η εξάρτηση του ημιτόνου στο τετράγωνο (Εξίσωση 3) θα πρέπει να ληφθεί υπόψη, γιατί το ολοκλήρωμα της διασταυρούμενης κορυφής δεν αντικατοπτρίζει μόνο τον αριθμό των πρωτονίων που είναι υπεύθυνα για τη διασταυρούμενη κορυφή αλλά επίσης και τη μη σύμπτωση (mismatch) μεταξύ των τιμών $^1J_{\text{CHtune}}$ και $^1J_{\text{CHtrue}}$. Γεγονός που θα αποτελούσε πρόβλημα αν η περιοχή των τιμών σταθερών ετεροπυρηνικής σύζευξης είναι μεγάλη, όπως στην περίπτωση των σταθερών σύζευξης $^1J_{\text{CH}}$ ενός τυπικού μορίου που έχει αλειφατικούς και αρωματικούς άνθρακες. Για παράδειγμα οι διασταυρούμενες κορυφές ζευγών $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ με μεγάλη απόκλιση της $^1J_{\text{CH:s}}$ από τη $^1J_{\text{CHtune}}$ θα παρουσιάζουν σημαντικά μειωμένο όγκο διασταυρούμενης κορυφής. Το αποτέλεσμα της ολοκλήρωσης θα μπορούσε, γενικά, να διορθωθεί αν οι τιμές των $^1J_{\text{CH}}$ των μορίων είναι γνωστές. Αυτό όμως με τη σειρά του θα απαιτούσε τον πρόσθετο προσδιορισμό των σταθερών $^1J_{\text{CH}}$.

Εναλλακτικά, θα μπορούσε να σχεδιαστεί ένα πείραμα όπου η ένταση των σημάτων (V_c) είναι ομοιόμορφη μέσα σε μια αναμενόμενη περιοχή τιμών $^1J_{\text{CH:s}}$. Αυτό μπορεί να γίνει υπολογίζοντας το μέσο όρο φασμάτων HSQC που καταγράφηκαν με κατάλληλα επιλεγμένες τιμές Δ (Σχήμα 1.4). Οι *Heikkinen et al., 2003*, πρότειναν, αντί να γίνεται η καταγραφή ξεχωριστών φασμάτων HSQC με διαφορετικές τιμές- Δ και να ακολουθεί στη συνέχεια η προθήκη των 2D-φασμάτων, μια καλύτερη και πιο άμεση προσέγγιση είναι να καταγράφεται ένα πείραμα HSQC με τέτοιο τρόπο ώστε η λίστα των τιμών- Δ να επαναλαμβάνεται περιοδικά για κάθε ξεχωριστό στάδιο σε ένα κύκλο φάσης (phase cycle). Έτσι, προσδιορίστηκαν οι σχετικές αναλογίες επιλεγμένων διασταυρούμενων κορυφών λιγνίνης προς την ένωση αναφοράς (arocypol). Είναι δυνατόν, λοιπόν, να χρησιμοποιηθεί ένα φάσμα HSQC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ για ποσοτικό προσδιορισμό, ρυθμίζοντας τους χρόνους υστέρησης μεταφοράς πόλωσης (polarization transfer delays) του πειράματος HSQC, λαμβάνοντας υπόψη τις επιδράσεις της αποδιέγερσης και των ομοπυρηνικών συζεύξεων. Σε επόμενη μελέτη της ίδιας ερευνητικής ομάδας (*Koskela et al., 2005*) διαπιστώθηκε ότι είναι δυνατό να αποφευχθεί η επίδραση των συζεύξεων J_{HH} αντικαθιστώντας τα στάδια μεταφοράς πόλωσης με διαφορετικού τύπου παλμικές ακολουθίες (ακολουθίες τύπου- CPMG).



Σχήμα 1.4: Εξομοίωση της εξάρτησης σταθεράς J σε ένα συμβατικό πείραμα HSQC (λεπτή γραμμή) και ένα πείραμα Q-HSQC (παχιά γραμμή) (Heikkinen *et al.*, 2003).

Οι Lewis *et al.*, 2007 εφάρμοσαν μια στρατηγική NMR 2D ^1H - ^{13}C για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό ~40 μεταβολιτών που βρίσκονται σε αφθονία σε βιολογικά υγρά. Για τις πρότυπες ενώσεις μεταβολιτών κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς τριών σημείων, εκφράζοντας τις απόλυτες εντάσεις του μέσου όρου επιλεγμένων διασταυρούμενων κορυφών ως συνάρτηση της γνωστής τους συγκέντρωσης. Επιλέχθηκαν για κάθε μεταβολίτη δυο διασταυρούμενες κορυφές που βρίσκονται σε απόσταση (διαχωρισμένες ικανοποιητικά). Η μέθοδος είναι ακριβής και επιτρέπει τη λήψη φασμάτων 2D εντός ~12 min, χρησιμοποιώντας υποδοχέα κρυογενικής τεχνολογίας. Σύμφωνα με τη μέθοδο απαιτείται να ταυτοποιούνται όλοι οι υπό ανάλυση μεταβολίτες και η λήψη των φασμάτων 2D NMR ^1H - ^{13}C των προτύπων ενώσεων να γίνεται κάτω από τις ίδιες- συγκρίσιμες συνθήκες.

Συντομογραφίες

COSY ^1H - ^1H : «Homonuclear correlation spectroscopy- Ομοπυρηνική φασματοσκοπία συσχέτισης»

TOCSY ^1H - ^1H : «Total correlation spectroscopy- Ομοπυρηνική φασματοσκοπία ολικής συσχέτισης»

NOESY ^1H - ^1H : «Nuclear Overhauser effect correlation spectroscopy»

DQF-COSY ^1H - ^1H : «Double quantum filter spectroscopy- Ομοπυρηνική φασματοσκοπία συσχέτισης διπλού κβάντου»

HMBC ^1H - ^{13}C : «Heteronuclear multiple bond coherence- Ετεροπυρηνική φασματοσκοπία συσχέτισης μέσω πολλαπλών δεσμών»

HMQC ^1H - ^{13}C : «Heteronuclear multiple quantum coherence- Ετεροπυρηνική φασματοσκοπία συσχέτισης πολλαπλού κβάντου»

HSQC ^1H - ^{13}C : «Heteronuclear single quantum coherence- Ετεροπυρηνική φασματοσκοπία συσχέτισης απλού κβάντου»

1.2 Κύριες κατηγορίες δευτερογενών μεταβολιτών-Τριτερπενοειδή και διτερπένια

1.2.1 Τριτερπενοειδή, χημικοί τύποι-Κυριότεροι εκπρόσωποι

Μια πολύ μεγάλη ποικιλία ενώσεων, οι περισσότερες από τις οποίες απαντώνται στο φυτικό βασίλειο και έχουν κοινή βιοσυνθετική προέλευση, χαρακτηρίζεται με τον όρο ισοπρενοειδή, τερπενοειδή ή τερπένια. Πρόκειται για ενώσεις που αποτελούνται από δομικές μονάδες πέντε ατόμων άνθρακα, οι οποίες με κατάλληλο συνδυασμό οδηγούν σε σκελετούς με C_5 , C_{10} , C_{15} , ..., C_{40} . Ανευρίσκονται σε όλα τα μέρη των ανώτερων φυτών (ρίζες, λουλούδια, φύλλα, σπέρματα, κορμός), σε μύκητες, φύκη, λειχήνες αλλά και σε εκκρίματα εντόμων. Ανάλογα με τον αριθμό των μονάδων ισοπρενίου που περιέχουν στο μόριο τους, τα τερπενοειδή ταξινομούνται στις παρακάτω κατηγορίες:

2 Μονάδες ισοπρενίου C_{10} Μονοτερπένια

3 » » C_{15} Σεσκιτερπένια

4 » » C_{20} Διτερπένια

5 » » C_{25} Σεστερτερπένια

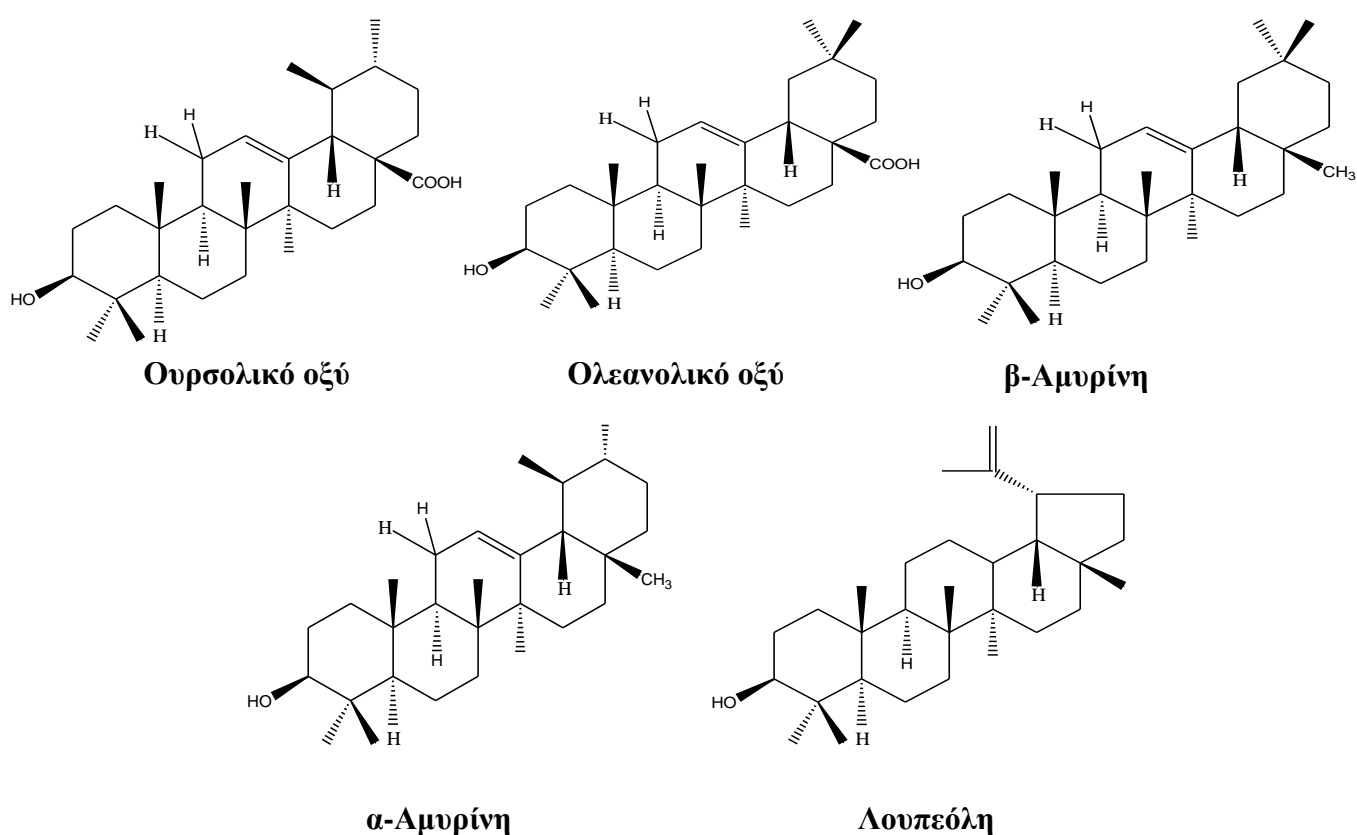
6 » » C_{30} Τριτερπένια

8 » » C_{40} Τετρατερπένια

$C > 40$ Πολυτερπένια

Έχει αποδειχθεί ότι δρουν ως αυξητικοί παράγοντες των φυτών, ως φερομόνες εντόμων, ως φυσικά εντομοκτόνα (μηχανισμός άμυνας φυτών), ως αμυντικές ουσίες ψαριών κ.λ.π. Η συμμετοχή τους στις αλληλεπιδράσεις φυτού-φυτού, φυτού-εντόμου καθώς και σε άλλες ανάλογες, αποτέλεσε τη βάση της χημικής οικολογίας. Ο αριθμός των τερπενίων, που έχουν απομονωθεί και προσδιοριστεί, ξεπερνάει σήμερα τις 18000 και καθημερινά αυξάνεται. Οι εφαρμογές τους στην καθημερινή ζωή ως βασικών συστατικών καλλυντικών, ειδών υγιεινής αλλά και αρωματικών τροφίμων, οδήγησε στην ανάγκη παραγωγής τους σε μεγάλη κλίμακα και τη διάθεση τους για την παρασκευή προϊόντων ευρείας κατανάλωσης.

Τα τριτερπένια, τα οποία αποτελούν τη μεγαλύτερη τάξη τερπενίων, είναι ευρύτατα διεσπαρμένα στο φυτικό βασίλειο σε ελεύθερη κατάσταση ή ως γλυκοζίδες, ενώ λίγα μέλη ανευρίσκονται στα ζώα. Χαρακτηριστικοί εκπρόσωποι των πεντακυκλικών τριτερπενίων είναι οι α- και β-αμυρίνες, τα αντίστοιχα οξέα ουρσολικό και ολεανολικό καθώς και η λουπεόλη (Σχήμα 1.5). Αυτά και ανάλογα μόρια είναι πολύ διαδεδομένα στους φυτικούς ιστούς και στους μύκητες. Ανευρίσκονται στην επιδερμίδα των φύλλων και στο φλοιό των φρούτων όπως του μήλου και του αχλαδιού, όπου παίζουν προφυλακτικό ρόλο κατά των μικροβιακών προσβολών και επίσης δρουν ως αποθητικά των εντόμων (Ιγνατιάδου-Ραγκούση, 1996).

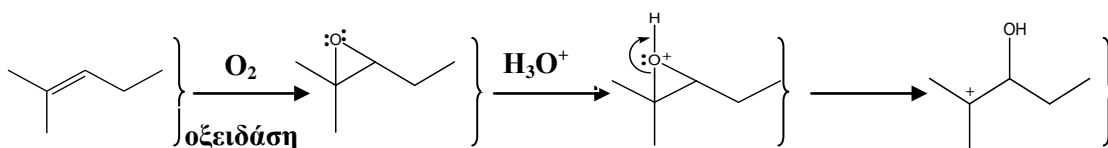


Σχήμα 1.5: Χημικοί τύποι χαρακτηριστικών εκπροσώπων των πεντακυκλικών τριτερπενίων

1.2.2 Βιοσύνθεση τριτερπενοειδών- Σημασία για τα φυτά

Το μόριο των τριτερπενίων περιλαμβάνει τριάντα άτομα άνθρακα, δηλαδή έξη ισοπρενικές μονάδες και προκύπτει βιοσυνθετικά από το C₃₀ υδρογονάνθρακα

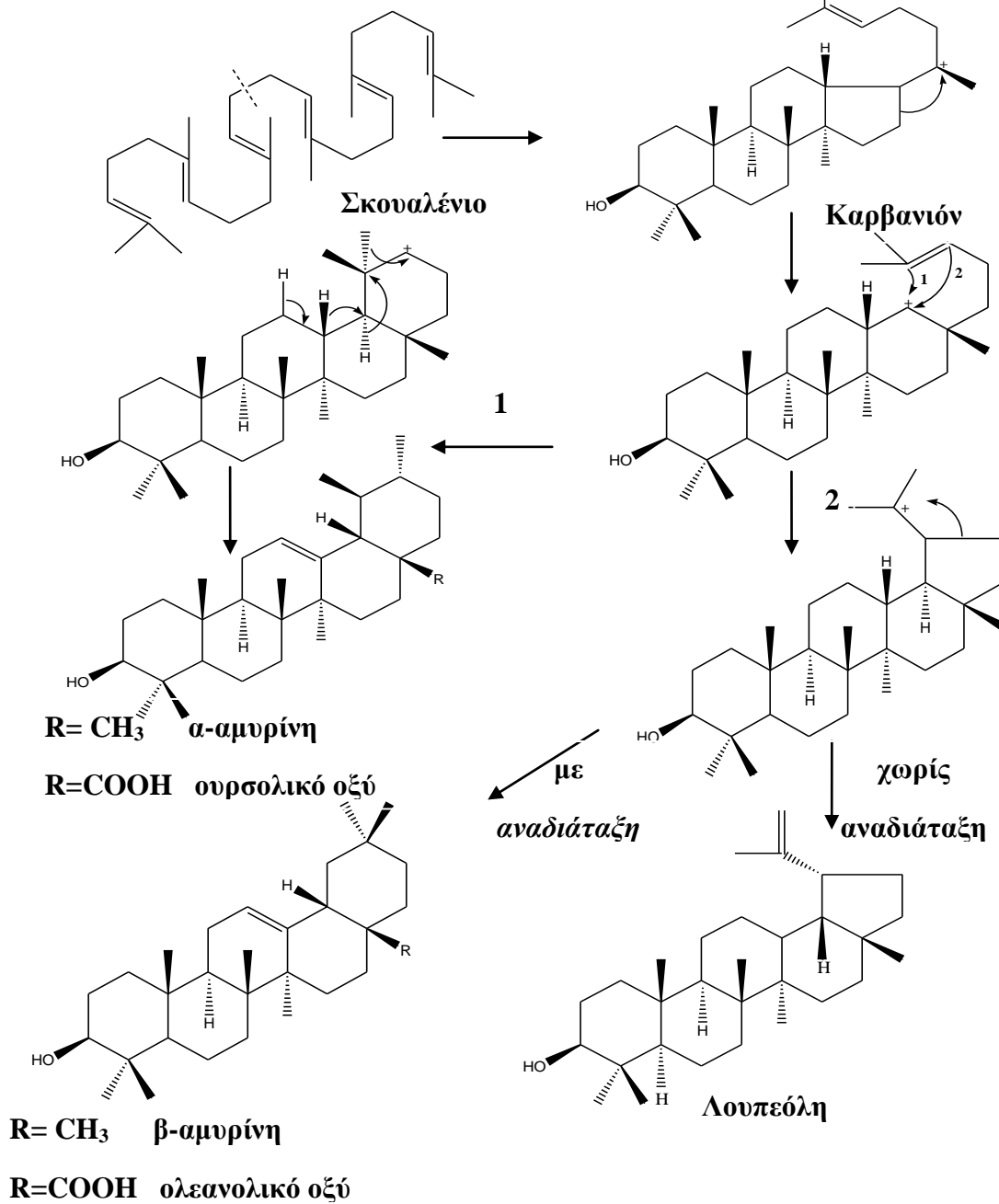
σκουαλένιο. Ο βιοσυνθετικός του ρόλος είναι εξαιρετικά σημαντικός, διότι το σκουαλένιο είναι πρόδρομος των στερολών καθώς και όλων των τετρακυκλικών και πεντακυκλικών φυσικών τριτερπενίων και των στεροειδών. Ένα αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό του μορίου των τριτερπενίων είναι η παρουσία σε όλα ενός ισημερινού υδροξυλίου στο C₃. Η υδροξυλομάδα στη θέση αυτή προκύπτει από το άνοιγμα ενός εποξειδίου. Αυτό επιτυγχάνεται με τον εξής βιοσυνθετικό μηχανισμό: στα κύτταρα των ζωικών οργανισμών το σκουαλένιο οξειδώνεται, παρουσία μιας εποξειδάσης, προς εποξείδιο σε ένα τελικό διπλό δεσμό. Πρωτονίωση του εποξειδίου οδηγεί σε άνοιγμα του δακτυλίου και στη δημιουργία αφενός του C₃ – OH και αφετέρου ενός καρβονιόντος, που αποτελεί το σημείο έναρξης των κυκλοποιήσεων (Σχήμα 1.6).



Σχήμα 1.6: Δημιουργία καρβανιόντος

Κυκλοποιήσεις, που αρχίζουν από άνοιγμα ενός εποξειδίου, είναι σπάνιες στα κατώτερα τερπένια, ενώ αποτελούν σχεδόν κανόνα στα τριτερπένια. Η κατιονική κυκλοποίηση που ξεκινάει από το άνοιγμα του εποξειδίου, συνεχίζεται με προσβολή του πρώτου καρβονιόντος από το διπλανό του διπλό δεσμό και οδηγεί στη δημιουργία ενός καρβονιόντος, το οποίο προσβάλλεται από το διπλανό διπλό δεσμό και ούτω καθεξής, σύμφωνα πάντα με τη γνωστή πορεία του βιογενετικού κανόνα. Η πορεία αυτή οδηγεί τελικά σε ένα σύστημα τεσσάρων ή πέντε δακτυλίων. Αντίθετα προς τα μονοτερπένια και τα σεσκιτερπένια, όπου ενζυματικά δημιουργείται μια μεγάλη ποικιλία σκελετών, στα τριτερπένια οι κυκλοποιήσεις εμφανίζουν περιορισμένους συνδυασμούς με σχετικά μικρό αριθμό αντιπροσωπευτικών σκελετών. Εκτός από μερικές εξαιρέσεις, η κυκλοποίηση αρχίζει πάντα από τον τελικό διπλό δεσμό, ο οποίος είναι εποξειδιωμένος και οι δακτύλιοι Α, Β και Γ, που προκύπτουν είναι εξαμελείς.

Το είδος των προϊόντων, που προκύπτουν από την κυκλοποίηση του σκουαλενίου, εξαρτάται από τη διατάξη του μορίου πριν από την κυκλοποίηση. Οι σημαντικότερες διατάξεις που απαντώνται είναι: α) ανάκλιτρο-λουτήρας-ανάκλιτρο-λουτήρας και β) ανάκλιτρο-ανάκλιτρο-ανάκλιτρο-λουτήρας. Η διάταξη ανάκλιτρο-ανάκλιτρο-ανάκλιτρο-λουτήρας στο άκυκλο μόριο του σκουαλενίου μπορεί να οδηγήσει, μέσω του καρβανιόντος και με συμμετοχή στην κυκλοποίηση και του τελικού διπλού δεσμού του μορίου, στο σχηματισμό των πεντακυκλικών τριτερπενίων (Σχήμα 1.7) (Ιγνατιάδου-Ραγκούση, 1996).



Σχήμα 1.7: Μηχανισμός κυκλοποίησης σκουαλενίου

1.2.3 Βιολογικές δράσεις τριτερπενοειδών (με έμφαση στο ολεανολικό και ουρσολικό οξύ)

Συνεχώς αυξάνεται η χρήση φαρμάκων, που προέρχονται από εκχυλίσματα βοτάνων, για τη θεραπεία πολλών και διάφορων ασθενειών, παρότι υπάρχουν λίγα σχετικά στοιχεία για τους μηχανισμούς δράσης τους. Τα τριτερπένια παρουσιάζουν ποικίλες βιολογικές δράσεις, όπως αντιφλεγμονώδη, αντικαρκινική και άλλες. Από τα τριτερπενικά οξέα, το ολεανολικό και ουρσολικό οξύ είναι από τα πιο συχνά απαντώμενα συστατικά των φυτών. Παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον εξαιτίας των φαρμακολογικών δράσεων που παρουσιάζουν, οι περισσότερες από αυτές είναι κοινές, λόγω της ομοιότητας των χημικών δομών τους. Διαθέτουν αντιοξειδωτικές (Hung and Yen, 2001) και γαστροπροστατευτικές ιδιότητες (Rodriguez et al., 2003) και πρόσφατα υποστηρίχθηκε ότι εμφανίζουν μη-ενζυματικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Yin and Chan, 2007). Είναι σχετικά μη-τοξικές ουσίες και έχουν χρησιμοποιηθεί σε καλλυντικά και προϊόντα υγείας.

Έχει αποδειχτεί ότι διαθέτουν αντιμικροβιακή (Gbaguidi et al., 2005), αντιφλεγμονώδη (Sosa et al., 2005) και αντικαρκινική δράση (Ovesna et al., 2006), δράση κατά του ιού του AIDS (Kashiwada et al., 1998), καθώς και υπογλυκαιμικές (Ali et al., 2006), διουρητικές, αντιυπερτασικές, αντιαθηρωγόνες και υπολιπιδαιμικές ιδιότητες (Liu, 2005). Θεωρούνται καρδιοτονωτικοί και αντιαρρυθμικοί παράγοντες (Somona et al., 2004) και έχουν χαρακτηριστεί ως χημειοπροστατευτικές ενώσεις (chemoprotective agent) φυτικής προέλευσης. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι το μπετουλινικό και πλατανικό οξύ δρουν ως δυναμικοί (potent) και εκλεκτικοί αναστολείς του ιού HIV-1. Η παρουσία της καρβοξυλομάδας (-COOH) στις τριτερπενοειδείς ενώσεις φαίνεται να σχετίζεται με την ιδιότητα αυτή (Kashiwada et al., 1998). Το μπετουλινικό οξύ μάλιστα βρίσκεται στο στάδιο προκλινικών δοκιμών για την αντικαρκινική και αντι-HIV ιδιότητά του.

Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι ο πολτός του ελαιολάδου (pomace διφασικό σύστημα) είναι το ίδιο αποτελεσματικός με το ελαιόλαδο, όσον αφορά την δράση του κατά της υπεροξειδωσης των λιπιδίων. Μια δράση που μπορεί μερικά να αποδοθεί στην παρουσία των τριτερπενοειδών ερυθροδιόλης και ολεανολικού οξέος (Perona et al., 2005). Επίσης, το μασλινικό οξύ υπάρχει και αυτό στον πολτό του ελαιολάδου

και η δομή του διαφέρει από αυτή του ολεανολικού οξέος στην παρουσία μιας πρόσθετης υδροξυλομάδας στον άνθρακα στη θέση 2. Έχει αναφερθεί ότι διαθέτει αντιοξειδωτικές ιδιότητες, δρα προστατεύοντας το πλάσμα και τις κυτταρικές μεμβράνες από το οξειδωτικό «stress» (Montilla et al., 2003), και δρα ως ανταγωνιστής της πρωτεάσης HIV-1 (Xu et al., 1996). Τριτερπενοειδή που ανευρίσκονται στη φύση, όπως η νομιλίνη (nomilin), το ολεανολικό, ουρσολικό και γλυκυρρhiζικό οξύ (glycyrrhizic acid) δρουν προστατεύοντας το ανοσοποιητικό σύστημα, σύμφωνα με τα αποτελέσματα σχετικής μελέτης (Raphael and Kuttan, 2007).

1.2.4 Φυσικά προϊόντα πλούσια σε τριτερπενικά οξέα-αλκόολες

Όπως προαναφέρθηκε τα τριτερπενοειδή είναι πολύ διαδεδομένα στους φυτικούς ιστούς και στους μύκητες και ανευρίσκονται στην επιδερμίδα των φύλλων και στο φλοιό των φρούτων. Όσον αφορά ο ολεανολικό οξύ βρίσκεται σε μεγάλη έκταση στο φυτικό βασίλειο. Σε σχετική βάση δεδομένων όσον αφορά την παρουσία φυτοχημικών αναφέρεται η παρουσία του ολεανολικού οξέος σε περισσότερα από 100 διαφορετικά φυτά. Βρίσκεται σε μεγάλη έκταση στο φύλλο του ελαιοδένδρου, ~3% επί ξηρού φύλλου του φυτού, γι' αυτό απομονώθηκε από φύλλα ελιάς και παρασκευάστηκαν έλαια στα οποία και προστέθηκε (Guinda et al., 2004). Άλλα τριτερπενοειδή επίσης απομονώθηκαν από φύλλα ελιάς, όπως η β-αμυρίνη, η ερυθροδιόλη, το μασλινικό οξύ και το ουρσολικό οξύ (Somona et al., 2003).

Το ολεανολικό και ουρσολικό οξύ βρίσκονται σε πολλά φυτά που ανήκουν στην οικογένεια *Lamiaceae*. Υψηλά ποσοστά από τα δυο οξέα βρίσκονται σε διάφορα είδη *Salvia* (*Salvia officinalis*, *Salvia lavandulifolia* κ.α.) και με ελάχιστες εξαιρέσεις το ουρσολικό οξύ βρίσκεται σε υψηλότερα ποσοστά από ότι το ολεανολικό οξύ (Janicsak et al., 2006). Άλλο πεντακυκλικό οξύ που ανιχνεύεται συχνά στο φυτικό βασίλειο είναι το μπετουλινικό οξύ, το οποίο βρίσκεται σε σημαντικά ποσοστά στον εξωτερικό φλοιό πολλών ειδών δέντρων που είναι πολύτιμα για λόγους ξυλείας. Ένα στενά σχετιζόμενο συστατικό με το παραπάνω οξύ είναι η μπετουλίνη, που είναι το κύριο συστατικό δέντρων σημύδας λευκής-φλούδας (ειδών *Betula*) και μπορεί να φτάσει σε ποσοστά έως και 22% (ξηρού βάρους).

Στο ελαιόλαδο και στην ελιά απαντούν δύο τριτερπενικές διαλκοόλες, η ερυθροδιόλη και η ουβαόλη, οι οποίες βρίσκονται σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται μεταξύ 10 και 200 mg/kg ελαίου. Η σχετική συγκέντρωση των δύο αυτών τριτερπενικών διαλκοολών είναι διαφορετική σε ελαιόλαδα διαφορετικής προέλευσης. Το πυρηνέλαιο περιέχει περισσότερη ερυθροδιόλη και ουβαόλη σε σχέση με το παρθένο ελαιόλαδο. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της ερυθροδιόλης και της ουβαόλης με αεριοχρωματογραφική ανάλυση αποτελεί τη βάση για τη διαφοροποίηση του ελαιολάδου από το πυρηνέλαιο. Επίσης, η α- και β-αμυρίνη ταυτοποιήθηκαν στο ελαιόλαδο, των οποίων η συγκέντρωση κυμαίνεται από 100 έως 150 mg/ 100g ελαιολάδου. Στο ελαιόλαδο έχει βρεθεί και το ολεανολικό οξύ, το οποίο έχει μάλιστα συσχετισθεί με την οξειδωτική σταθερότητα του ελαιολάδου. Βρίσκεται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στα φύλλα απ' ότι στον ελαιόκαρπο, αλλά και στο πυρηνέλαιο απ' ότι στο ελαιόλαδο. Το οξύ αυτό προκαλεί πολλές φορές θολότητα στο πυρηνέλαιο. Άλλα τριτερπενικά οξέα που απαντούν σε ίχνη είναι το μασλινικό και το ουρσολικό (Κυριτσάκης, 2007)

1.2.5 Μέθοδοι προσδιορισμού τριτερπενικών οξέων- αλκοολών σε φυτικά εκχυλίσματα

Η εκχύλιση των τριτερπενοειδών από φυτικά δείγματα συνήθως πραγματοποιείται με εμποτισμό, απόσταξη με υδρατμούς και με συσκευή soxhlet χρησιμοποιώντας διάφορους διαλύτες όπως εξάνιο, χλωροφόρμιο, ακετόνη, αιθανόλη, μεθανόλη, οξικό αιθυλεστέρα και άλλους. Συνήθως, τα φυτικά εκχυλίσματα κλασματώνονται και ο χαρακτηρισμός των τριτερπενοειδών πραγματοποιείται μετά την απομόνωση των μεμονωμένων συστατικών χρησιμοποιώντας διάφορες φασματοσκοπικές μεθόδους ή διαχωρίζονται σε τάξεις ενώσεων χρησιμοποιώντας χρωματογραφικές τεχνικές και ταυτοποιούνται με GC-IR, GC-MS ή HPLC-MS μετά από κάποιο στάδιο προκατεργασίας ή παραγωγοποίησης. Όσον αφορά το ολεανολικό και ουρσολικό οξύ που είναι ισομερή θέσης, ο ταυτόχρονος προσδιορισμός τους είναι μάλλον δύσκολος. Οι χημικές δομές τους στερούνται της παρουσίας χρωμοφόρων ομάδων που απορροφούν στο UV, κάτι που περιορίζει το χρωματογραφικό διαχωρισμό τους με HPLC χρησιμοποιώντας

ανιχνευτή UV ή φθορισμού. Οι προς μελέτη ενώσεις παρουσιάζουν χαμηλή απορρόφηση στο UV, για αυτό προτιμάται το ακετονιτρίλιο-νερό ως κινητή φάση καθώς προσφέρει καλύτερη διαπερατότητα σε χαμηλά μήκη κύματος στο υπεριώδες που είναι το μήκος κύματος που ανιχνεύονται (210 nm).

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι HPLC που περιγράφονται στη βιβλιογραφία αλλά μπορεί να μην είναι κατάλληλες για όλα τα φυτικά εκχυλίσματα, γιατί τα δυο τριτερπενικά οξέα εκλούνται με πολύ κοντινούς χρόνους κατακράτησης και μπορεί να μη διαχωρίζονται ικανοποιητικά από άλλα συστατικά. Η μικρή εκλεκτικότητα του ολεανολικού και ουρσολικού οξέος μπορεί να εξηγηθεί από τις παρόμοιες τιμές log P τους (6.648 και 6.647, αντίστοιχα). Η προσθήκη κυκλοδεξτρινών στην κινητή φάση (Claude *et al.*, 2004), αλλά και H₃PO₄ (Chen *et al.*, 2003) έχει προταθεί για τη βελτίωση του διαχωρισμού τους. Η ανάλυση με LC-MS μπορεί να αποδειχθεί πολλά υποσχόμενη τεχνική, αλλά προϋποθέτει επίσης ένα καλό διαχωρισμό τόσο μεταξύ τους όσο και με τα υπόλοιπα συστατικά, καθώς παρουσιάζουν το ίδιο κύριο ιόν και έχουν μικρές διαφορές στις σχετικές εντάσεις ορισμένων θραυσμάτων τους (Gbaguidi *et al.*, 2005). Οι μέθοδοι ανάλυσης και ποσοτικού προσδιορισμού που χρησιμοποιούνται, κυρίως για το ολεανολικό και ουρσολικό οξύ, είναι μέθοδοι αέριας χρωματογραφίας. Έχει χρησιμοποιηθεί αέρια χρωματογραφία μετά από σιλανοποίηση (silylation) (Janicsak *et al.* 2003, 2006) ή μεθυλίωση (Takeoka *et al.*, 2000) με ανιχνευτές ιοντισμού φλόγας ή φασματόμετρο μαζών (Razborssek *et al.*, 2007, Sanchez Avila *et al.*, 2007). Λόγω της μικρής πτητικότητας και του μεγάλου μοριακού τους βάρους, είναι απαραίτητο ένα στάδιο παραγωγοποίησης πριν την ανάλυση με αέρια χρωματογραφία.

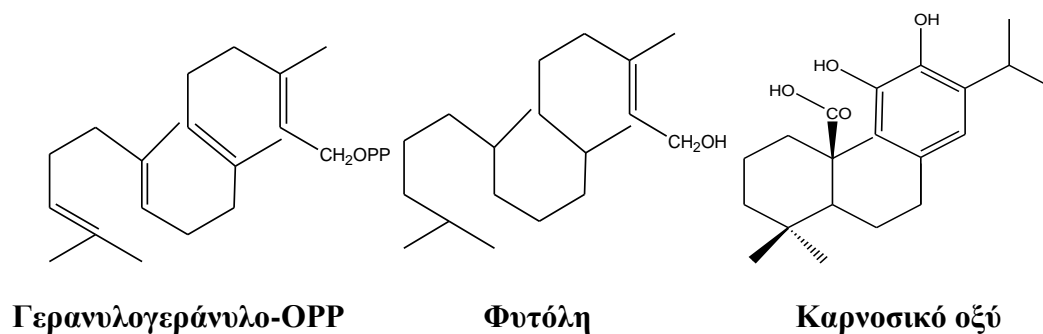
Άλλες μέθοδοι που έχουν αναφερθεί για την ανάλυση του ολεανολικού και ουρσολικού οξέος σε φυτικά εκχυλίσματα, είναι ένα σύστημα υγρής χρωματογραφίας που χρησιμοποιεί πορώδη άνθρακα «graphitic» και ανίχνευση με σκέδαση φωτός (evaporative light scattering) (Berangere *et al.*, 2004), χρωματογραφία υπερκρίσιμου ρευστού σε τριχοειδές (capillary supercritical fluid chromatography) (Tavares *et al.*, 2001), μικκυλιακή ηλεκτροκινητική χρωματογραφία (Liu *et al.*, 2003) και τροποποιημένη με κυκλοδεξτρίνες μικκυλιακή ηλεκτροκινητική χρωματογραφία (Zhang G *et al.*, 2005). Ακόμη, αναφέρθηκε ο ταυτόχρονος διαχωρισμός τους με μη υδατική ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδές (NACE) (Qi *et al.*, 2006). Πρόσφατα,

χρησιμοποιήθηκε η δισδιάστατη φασματοσκοπία Raman ως μια απλή και γρήγορη μεθοδολογία για τη διάκριση των πρότυπων ενώσεων ολεανολικού και ουρσολικού οξέος (Mello *et al.*, 2006), όπως και η «micro»-φασματοσκοπία Raman για τον προσδιορισμό της σχετικής αναλογίας τους σε μίγμα (Yu *et al.*, 2007). Τέλος, προτάθηκε η υψηλής-απόδοσης χρωματογραφία λεπτής στιβάδας μετά από παραγωγοποίηση με ιώδιο για το διαχωρισμό τους (Wojciak-Kosior, 2007).

Όσον αφορά την ανάλυση του μπετουλινικού οξέος, λίγες αναφορές είναι διαθέσιμες στη βιβλιογραφία. Έχει χρησιμοποιηθεί χρωματογραφία HPLC για τον προσδιορισμό του σε φυτικά εκχυλίσματα (de Oliveira, 2002), GC-MS μετά από παραγωγοποίηση (Calgon *et al.*, 1999), αλλά και HPLC-MS για τον προσδιορισμό του σε βιολογικά υγρά κατά τη διάρκεια φαρμακολογικών τεστ (Shin *et al.*, 1999). Επίσης, για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό του μπετουλινικού οξέος και της μπετουλίνης σε φλοιό σημύδας εφαρμόστηκε HPLC ανάλυση με ανιχνευτή UV (Zhao *et al.*, 2007). Τέλος, ο προσδιορισμός των τριτερπενικών αλκοολών ερυθροδιόλης και ουβαόλης, όπως προαναφέρθηκε χρησιμοποιείται για την διάκριση των παρθένων ελαιολάδων από τα πυρηνέλαια. Ο προσδιορισμός τους, που γίνεται μαζί με τις στερόλες του ελαιολάδου, επιτυγχάνεται με αέρια χρωματογραφία GC-FID ή GC-MS (Cunha *et al.*, 2006), ενώ έχει αναφερθεί και ανάλυσή τους με LC-MS (Martinez-Vidal *et al.*, 2007)

1.2.6 Διτερπένια

Τα διτερπένια είναι μια ομάδα ενώσεων με 20 άτομα άνθρακα, δηλαδή τέσσερις μονάδες ισοπρενίου. Βιογενετικά προέρχονται από τον πυροφωσφορικό εστέρα της γερανυλογερανιόλης (Σχήμα 1.8). Παρά το γεγονός ότι ο αριθμός των κυκλικών δομών, που θα ήταν δυνατό να σχηματισθούν από τον άκυκλο βασικό σκελετό, είναι εξαιρετικά μεγάλος, εντούτοις λίγοι μόνο αντιπροσωπευτικοί σκελετοί έχουν βρεθεί στη φύση. Ανεύρισκονται στα ανώτερα φυτά και τους μύκητες, όμως κύρια πηγή τους είναι οι ρητίνες των κωνοφόρων δέντρων, απ' όπου παραλαμβάνονται στο κλάσμα που δεν αποστάζει με υδρατμούς (κολοφώνιο). Χαρακτηριστικό των διτερπενίων, εκτός από την περιορισμένη ποικιλία των σκελετών τους, είναι η ανεύρεση στη φύση και των δύο στερεοχημικών αντιπόδων.



Σχήμα 1.8: Δομές διτερπενίων

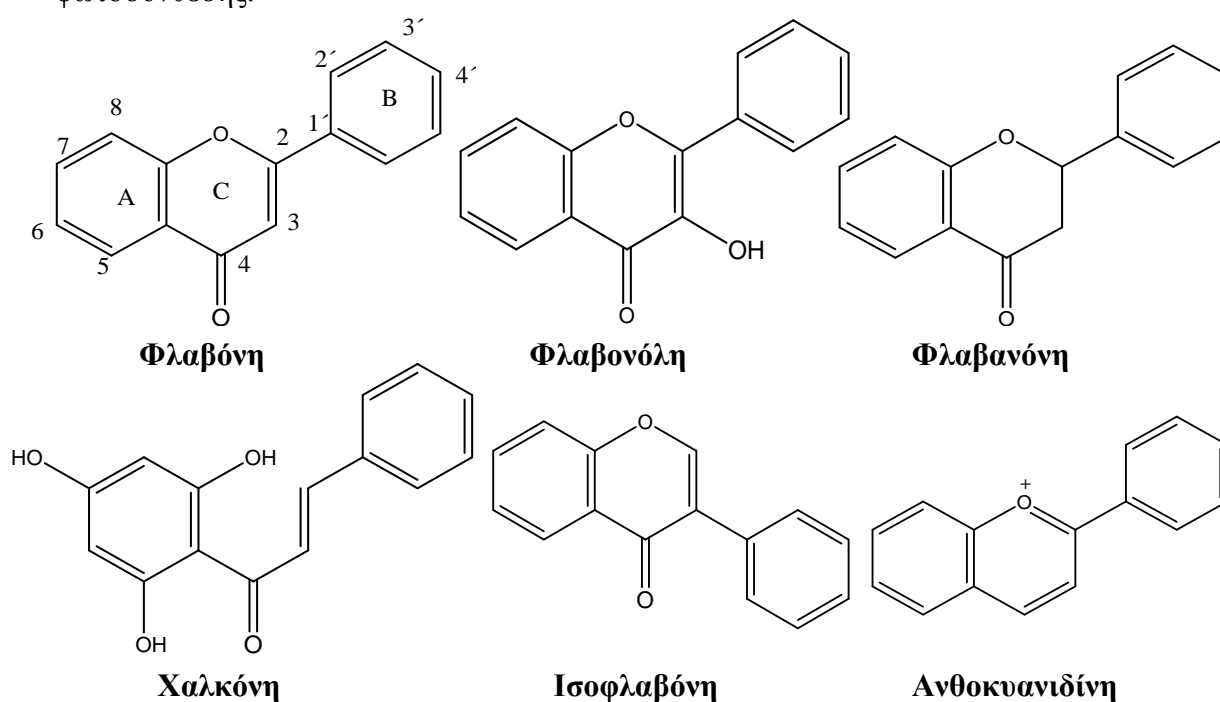
Τα διτερπένια, ανάλογα με τον αριθμό των δακτυλίων που περιέχει ο σκελετός τους, διακρίνονται σε άκυκλα, μονοκυκλικά, δικυκλικά, τρικυκλικά και τετρακυκλικά. Ο σημαντικότερος εκπρόσωπος των άκυκλων διτερπενίων είναι η φυτόλη (Σχήμα 1.8), που είναι ευρέως διαδεδομένη στη φύση διότι αποτελεί τμήμα του μορίου της χλωροφύλλης, με την οποία συνδέεται υπό μορφή εστέρα. Η φυτόλη επίσης αποτελεί τμήμα της βιταμίνης K_1 . Το σημαντικότερο μέλος στην τάξη των μονοκυκλικών διτερπενίων είναι η βιταμίνη Α ή ρετινόλη. Σημαντικά παράγωγα των δικυκλικών διτερπενίων και τρικυκλικών διτερπενίων είναι συστατικά των ρητινών. Επίσης, σημαντικό παράγωγο της κατηγορίας των τετρακυκλικών διτερπενίων, το οποίο τα τελευταία χρόνια μελετήθηκε πολύ λόγω της εξαιρετικά ενδιαφέρουσας αντικαρκινικής του δράσης, είναι η ταξόλη (Ιγνατιάδου-Ραγκούση, 1996).

Στα φυτά της οικογένειας *Lamiaceae* η τάξη των διτερπενίων αποτελεί μια από τις κύριες τάξεις δευτερογενών μεταβολιτών τους. Το κύριο φαινολικό διτερπένιο εκχυλισμάτων δεντρολίβανου και φασκόμηλου είναι το καρνοσικό οξύ το οποίο οξειδώνεται σε διάφορες γ - και δ -λακτόνες (Σχήμα 1.8). Θεωρείται μάλλον ασταθές συστατικό, το οποίο οξειδώνεται σε καρνοσόλη και μέσω αυτής δίνει ροσμανόλη, επιροσμανόλη, ισοροσμανόλη κ.α (Schawrz and Ternes, 1992). Οι συγκεκριμένες ενώσεις έχουν μελετηθεί σε μεγάλη έκταση όσον αφορά τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες σε διάφορα υποστρώματα (όπως λινολεϊκό οξύ, λαρδί) (Nakatani and Inatani, 1984) και με διάφορες μεθόδους (ferric thyoocyanate) (Inatani et al., 1982).

1.3 Κύριες κατηγορίες δευτερογενών μεταβολιτών- Φλαβονοειδή και φαινολικά οξέα

1.3.1 Φλαβονοειδή (γενικά, κυριότερες τάξεις, βιοσύνθεση)

Τα φλαβονοειδή είναι μια από τις πιο διαδεδομένες ομάδες των δευτερογενών μεταβολιτών των φυτών. Εκτιμάται ότι περίπου το 2% από όλο τον άνθρακα που φωτοσυντίθεται από τα φυτά μετατρέπεται σε φλαβονοειδή ή σε σχετιζόμενα με αυτά συστατικά. Είναι η πολυπληθέστερη τάξη φυσικών φαινολικών ενώσεων, κυρίως χρωστικών των φυτών, που προσδίδουν όμως και χαρακτηριστική γεύση καθώς και άρωμα σε τρόφιμα και ποτά φυτικής προέλευσης. Από άποψη δομής ανήκουν σε δύο μεγάλες ομάδες α) τα παράγωγα της φλαβόνης και β) τις ανθοκυανίνες. Στη φύση ανευρίσκονται δέκα περίπου διαφορετικές τάξεις παραγώγων της φλαβόνης. Οι περισσότερο διαδεδομένες είναι οι φλαβόνες, οι φλαβονόλες, οι φλαβανόνες, οι χαλκόνες και οι ισοφλαβόνες (Σχήμα 1.9). Εξαιτίας των ελκυστικών χρωμάτων τους οι φλαβόνες, οι φλαβονόλες και οι ανθοκυανιδίνες μπορούν να λειτουργήσουν ως οπτικά σήματα για τα έντομα που πραγματοποιούν την επικονίαση. Οι κατεχίνες και άλλες φλαβονόλες μπορούν να δράσουν ως αμυντικό σύστημα εναντίον εντόμων επιβλαβών για τα φυτά. Επίσης, τα φλαβονοειδή δρουν ως καταλύτες της φωτοσύνθεσης.



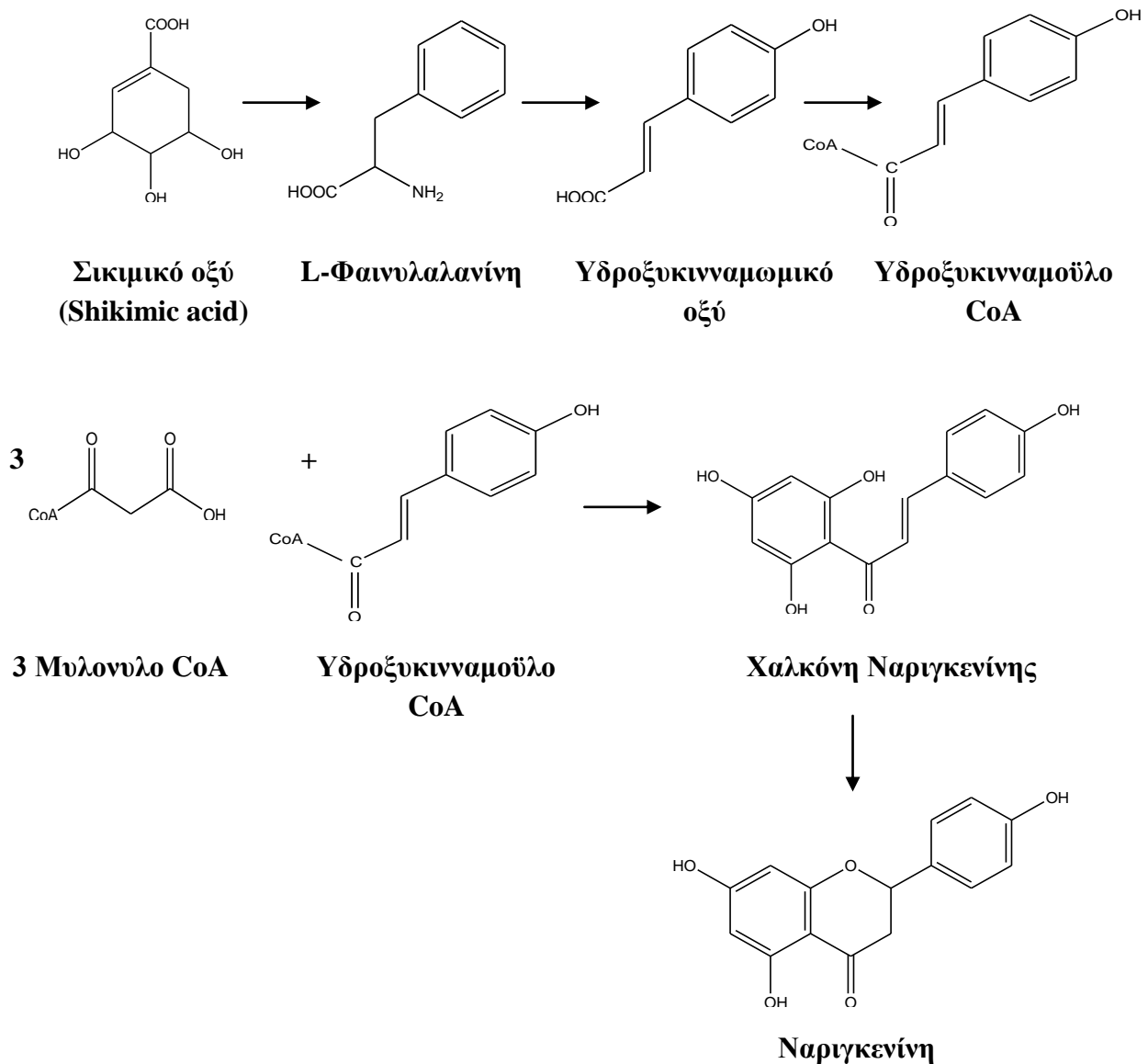
Σχήμα 1.9: Δομές των κύριων τάξεων των φλαβονοειδών

Είναι πολύ σπάνιο να υπάρχει ένα μόνο φλαβονοειδές στον φυτικό ιστό. Τις περισσότερες φορές απαντώνται ως μίγματα ενώσεων, από την ίδια ή από διαφορετικές τάξεις. Τα φλαβονοειδή απαντούν συνήθως στα φυτά ενωμένα με σάκχαρα ως *O*-γλυκοζίτες, όπου μια ή περισσότερες υδροξυλομάδες του φλαβονοειδούς αντιδρούν με ένα ή περισσότερα σάκχαρα σχηματίζοντας ημιακεταλικούς δεσμούς (*Ιγνατιάδου- Ραγκούση, 1996*). Η γλυκοζυλίωση καθιστά τα φλαβονοειδή λιγότερο δραστικά και περισσότερο υδατοδιαλυτά, έτσι μπορεί να θεωρηθεί ως μια επιπρόσθετη μορφή προστασίας των φυτών, εμποδίζοντας την κυτταροπλασματική καταστροφή και αποθηκεύοντας τα φλαβονοειδή ασφαλή στα κυτταρικά χυμοτόπια. Κάθε υδροξυλομάδα μπορεί να γλυκοζυλιωθεί, 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 βρίσκονται σε διάφορα φυτά, ενώ η μαννόζη, φρουκτόζη, γλυκουρονικό και γαλακτουρονικό οξύ είναι πιο σπάνια. Έχουν περιγραφεί από μονογλυκολυζιωμένα έως και πενταγλυκοζυλιωμένα φλαβονοειδή. Ανευρίσκονται επίσης 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*-γλυκοζιτη-*O*-γλυκοζιτη φλαβονοειδών. Μέχρι σήμερα, η *C*-γλυκοζυλίωση έχει βρεθεί μόνο στις θέσεις *C*-6 και *C*-8 της βασικής δομής των φλαβονοειδών (*Andersen and Markham, 2006*) .

Τα φλαβονοειδή είναι επίπεδα μόρια που σχηματίζονται από τα αρωματικά αμινοξέα φαινυλαλανίνη, τυροσίνη και μηλονικό. Η κύρια δομή φλαβονοειδούς είναι ο πυρήνας «φλαβαν», που αποτελείται από 15 άτομα άνθρακα διευθετημένα σε τρεις δακτυλίους (*C*₆-*C*₃-*C*₆), που χαρακτηρίζονται *A*, *B* και *C*. Σχηματίζονται από μια αλληλουχία αντιδράσεων συμπύκνωσης μεταξύ υδροξυκιναμωμικού οξέος (*B*-δακτύλιος και άτομα άνθρακα 2,3 και 4 από τον *C*-δακτύλιο) και κατάλοιπων μηλονυλο- ομάδας (*A*-δακτύλιος), δίνοντας μια κύρια δομή *C*₆ - *C*₃ - *C*₆ (Σχήμα

1.10). Η γέφυρα των τριών- ανθράκων μεταξύ των φαινυλικών δακτυλίων συνήθως κυκλοποιείται για να σχηματίσει ένα τρίτο δακτύλιο (C-δακτύλιο). Ανάλογα με την κυκλοποίηση και το βαθμό ακορεστότητας και οξείδωσης του τμήματος των τριών ανθράκων, κατατάσσονται σε διάφορες ομάδες.



Σχήμα 1.10: Βιοσύνθεση φλαβονοειδών

Οι φλαβόνες είναι υδροξυλιωμένα παράγωγα της μητρικής ουσίας φλαβόνη, συνήθως στις θέσεις 5 και 7 και σε μία ή περισσότερες από τις θέσεις 3', 4' ή 5'.

υδροξύλια στις θέσεις 3' και 5' είναι συχνά μεθυλιωμένα. Οι φλαβονόλες προκύπτουν από τις φλαβόνες με την εισαγωγή ενός υδροξυλίου στη θέση C₃. Αυτή η απλή διαφοροποίηση στη δομή, έχει πολύ μεγάλη σημασία στη βιοσύνθεση και τη φυσιολογία τους. Ο σπουδαιότερος εκπρόσωπος των φλαβονόλων είναι η κερκετίνη. Ελεύθερη ή ως γλυκοζίτης βρίσκεται στο τσάι, στα φύλλα του γαρύφαλλου, στα κόκκινα τριαντάφυλλα κ.λ.π. Με μικρότερη συχνότητα συναντάται στα ανώτερα φυτά η κεμπφερόλη. Έχει αποδειχθεί ότι το περιεχόμενο ενός φυτού σε φλαβονοειδή παρέχει σαφή ένδειξη της εξελικτικής του κατάστασης και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για γενετικές μελέτες. Ιδιαίτερα οι τάξεις των φλαβονών και φλαβονολών, που είναι οι ευρύτερα διεσπαρμένες σε όλα τα ανώτερα φυτά της γης, στα φύλλα ή τα λουλούδια, παρουσιάζουν σημαντικότατο βοτανολογικό ενδιαφέρον και χρησιμοποιούνται για την χημειοταξινόμηση των φυτών (ταξονομικοί δείκτες).

Οι φλαβανόνες, προκύπτουν από τις αντίστοιχες φλαβόνες με ανόρθωση του διπλού δεσμού Δ². Χαρακτηριστικοί εκπρόσωποι της κατηγορίας αυτής είναι η εσπεριτίνη, η οποία συναντάται ως γλυκοζίτης στα πράσινα εσπεριδοειδή και η ναριγκενίνη. Οι χαλκόνες είναι φλαβονοειδή με ανοικτή ανθρακική αλυσίδα, όπου οι δυο αρωματικοί δακτύλιοι ενώνονται μεταξύ τους με ένα ακόρεστο καρβονυλικό σύστημα. Η παρουσία τους σπανίζει, διότι πολύ εύκολα ισομερίζονται προς φλαβανόνες. Οι ισοφλαβόνες είναι υδροξυλιωμένα παράγωγα της μητρικής ουσίας ισοφλαβόνη, η οποία μπορεί να είναι και μερικώς αλκυλιωμένη. Απαντώνται στα φυτά είτε ελεύθερες είτε ενωμένες ως γλυκοζίτες. Οι φλαβανόνες, χαλκόνες και ισοφλαβόνες, λόγω της πολύ μικρής εξάπλωσής τους στο φυτικό βασίλειο, θεωρούνται δευτερεύοντα φλαβονοειδή. Σε βιολογικά υγρά (ορό, πλάσμα και ούρα), τα φλαβονοειδή απαντώνται ως συζυγιακά γλυκουρονίδια καιθειικά παράγωγα (glucuronide and sulphate conjucates) (Ιγνατιάδου-Ραγκούση, 1996).

1.3.2 Βιολογικές δράσεις φλαβονοειδών

Τα φλαβονοειδή, παρότι δεν θεωρούνται θρεπτικά συστατικά είναι πολύ σημαντικά συστατικά της ανθρώπινης διαίτας. Η ημερήσια πρόσληψη φλαβονοειδών κυμαίνεται μεταξύ 50 έως 800 mg, ανάλογα με τη διαίτα που ακολουθείται- την κατανάλωση λαχανικών, φρούτων, κόκκινου κρασιού, τσαγιού κ.λ.π. Παρουσιάζουν ιδιαίτερη σημασία εξαιτίας των πολλών βιολογικών τους δράσεων. Εξαιτίας των αντιοξειδωτικών και αντικαρκινικών ιδιοτήτων τους, τα φλαβονοειδή που βρίσκονται σε τρόφιμα και φυτικά εκχυλίσματα έχουν τύχει ιδιαίτερης προσοχής τις τελευταίες δεκαετίες. Διάφορες δράσεις αποδίδονται σε αυτά, π.χ. αντιοξειδωτικές, ως δεσμευτές ελευθέρων ριζών (*Rice-Evans et al., 1996*), αντιμεταλλαξιογόνες, αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινικές. Όμως η διερεύνηση των αντιοξειδωτικών δράσεων παραμένει το κύριο θέμα πολλών ερευνών τα τελευταία χρόνια. Αρκετές μελέτες έχουν συσχετίσει τη λήψη τροφίμων και ποτών πλούσιων σε φλαβονοειδή και την αντιοξειδωτική τους ικανότητα με την πρόληψη διαφόρων ασθενειών που σχετίζονται με καρδιαγγειακές παθήσεις και καρκίνο (*Hollman et al., 1997*). Επίσης, αντιδρούν με διάφορα ενζυματικά συστήματα, π.χ. αναστέλλουν τα ένζυμα κυκλοοξυγενάση και λιποοξυγενάση.

Η σημαντικότερη δράση τους, όπως προαναφέρθηκε, είναι η αντιοξειδωτική δράση. Εξαιτίας των μικρότερων δυναμικών οξειδοαναγωγής τους, έχουν τη δυνατότητα να μειώνουν σημαντικά τις οξειδωτικές ελεύθερες ρίζες σχηματίζοντας λιγότερο δραστικές ρίζες φλαβονοειδών. Με αυτό τον τρόπο αποτρέπουν για παράδειγμα την υπεροξειδωση των λιπιδίων, μια από τις πιο σημαντικές δράσεις των ελευθέρων ριζών που οδηγεί στην καταστροφή των κυτταρικών μεμβρανών και τελικά στον κυτταρικό θάνατο (*Pietta, 2000*). Τα φλαβονοειδή ακόμη, έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν μονοξειδίο του αζώτου το οποίο σχηματίζει σε συνδυασμό με ελεύθερες ρίζες σουπεροξειδίων τα ιδιαίτερα καταστρεπτικά υπεροξυνιτρόδη, και να αναστέλλουν την οξειδάση της ξανθίνης (xanthine oxidase), μια σημαντική πηγή ριζών σουπεροξειδίων (*Cos et al., 1998*). Οι ρίζες σουπεροξειδίων μπορούν να αντιδράσουν με υπεροξειδίο του υδρογόνου δίνοντας ακόμη πιο τοξικές ρίζες υδροξυλίων. Αυτή η αντίδραση, που ονομάζεται αντίδραση Fenton, καταλύεται από σίδηρο και μπορεί να παρεμποδιστεί από την κερκετίνη, που μπορεί να σχηματίσει χηλικές ενώσεις με το σίδηρο.

1.3.3 Μέθοδοι ανάλυσης φλαβονοειδών

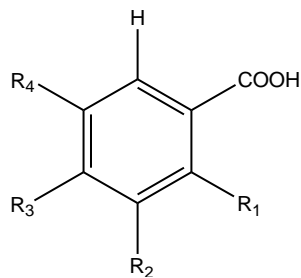
Πολλά φλαβονοειδή έχουν απομονωθεί από διάφορα φυτικά εκχυλίσματα, τρόφιμα κ.α. και έχουν χαρακτηριστεί με φασματοσκοπία NMR ^1H και ^{13}C . Διάφορες χρωματογραφικές μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί για τον διαχωρισμό και την ταυτοποίηση φλαβονοειδών. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι η χρωματογραφία TLC έχει χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό και την ταυτοποίηση φαινολικών οξέων και φλαβονοειδών σε υδατικά εκχυλίσματα αρωματικών φυτών της οικογένειας *Lamiaceae* (*Triantaphyllou et al., 2001*). Ευρύτατα, έχει εφαρμοστεί η χρωματογραφία HPLC με ανιχνευτή DAD αλλά και άλλους ανιχνευτές, για την ταυτοποίησή και τον ποσοτικό προσδιορισμό τους. Χρησιμοποιώντας στήλη RP C_{18} και 5% υδατικό φορμικό οξύ και μεθανόλη, διαχωρίστηκαν 141 φλαβονοειδή, από πολικούς τριγλυκοζίτες έως και μη πολικές πολυμεθοξυλιωμένες αγλυκόνες που ανήκουν στις τάξεις των φλαβόνων, φλαβονόλων και φλαβανόνων (*vandde Castele et al., 1982*). Επίσης, διάφορες μέθοδοι ηλεκτροφόρησης σε τριχοειδές (capillary zone electrophoresis-CZE) έχουν αναπτυχθεί για το διαχωρισμό πολυφαινόλων, όπως η επικατεχίνη, η κατεχίνη, η κερκετίνη, το γεντιστικό, το καφεϊκό και γαλλικό οξύ και η *trans*- ρεσβερατρόλη, η μυρικετίνη και η ρουτίνη σε δείγματα κρασιού και σταφυλιών (*Kulomaa et al., 1997, Arce et al., 1998*).

Μια βελτιωμένη διαδικασία παραγωγοποίησης χρησιμοποιώντας παραγωγοποίηση-εκχύλιση-σε φιαλίδιο (in-vial derivatisation-extraction) προτάθηκε από τους *Fiamegos et al., 2003, 2005* για την ανάλυση GC-MS μεθυλιωμένων φλαβονοειδών σε διάφορα δείγματα βοτάνων. Όσον αφορά τους γλυκοζίτες φλαβονοειδών είναι ιδιαίτερα δύσκολη η ανάλυσή τους με συμβατική χρωματογραφία GC ακόμα και μετά την παραγωγοποίησή τους. Επιπλέον, η φασματοσκοπία NMR σε συνδυασμό με FAB/MS/MS φασματομετρία μαζών (*Borges et al., 2001*) αλλά και με HPLC-MS χρησιμοποιήθηκε για το χαρακτηρισμό φλαβονοειδών και γλυκοζιτών τους (*Hansen et al., 1999*). Σύστημα NMR σε σύζευξη με HPLC-UV-SPE-MS χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση των φλαβονοειδών ταξιφολίνης, αρομαντετρίνης, εριοδικτυόλης, ναριγκενίνης και απιγενίνης σε εκχύλιμα Ελληνικής ρίγανης (*Exarchou et al., 2003*).

Επίσης, προτάθηκε η χρήση τη φασματοσκοπίας NMR ^{13}C ως μια απλή μέθοδος πρόγνωσης της απόδοσης των χημικών μετατοπίσεων των ανθράκων των φλαβονοειδών. Στη συγκεκριμένη μεθοδολογία πραγματοποιήθηκε η ταυτοποίηση των χημικών μετατοπίσεων ^{13}C μονοϋδροξυ-φλαβόνων και συγκρίθηκε με την ταυτοποίηση φλαβόνων ώστε να αναπτυχθεί ένα εργαλείο πρόγνωσης των φασμάτων NMR ^{13}C πολυϋδροξυλιωμένων φλαβονολών και των γλυκοζυλιωμένων αναλόγων τους. Έτσι αυτή η μεθοδολογία μπορεί να φανεί χρήσιμη στη γρήγορη ταυτοποίηση των φασμάτων NMR ^{13}C των φλαβονοειδών αλλά και για την ταυτοποίηση του αποτυπώματος υποκατάστασης νέων φλαβονοειδών που απομονώνονται (*Burns et al., 2007*). Σε παλαιότερες μελέτες, επίσης έγινε η καταγραφή των φασμάτων NMR ^{13}C μεγάλου αριθμού πολυϋδροξυλιωμένων φλαβόνων και φλαβονολών που απομονώθηκαν από φυτικά εκχυλίσματα είτε συντέθηκαν, προκειμένου να εκτιμηθούν οι επιδράσεις των υποκαταστατών στις χημικές μετατοπίσεις ^{13}C τους και μέσω των φασμάτων τους να γίνει η απόδοση των δομών τους (*Roitman and James, 1985, Horie et al., 1998*).

1.3.4 Φαινολικά οξέα

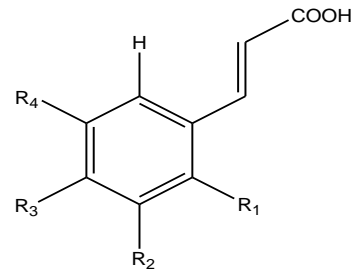
Τα φαινολικά οξέα είναι δευτερογενείς φυτικοί μεταβολίτες ιδιαίτερα διαδεδομένοι στο φυτικό βασίλειο. Τα φαινολικά οξέα που απαντώνται στη φύση μπορούν να έχουν δυο χαρακτηριστικές δομές ανθράκων: τις δομές υδροξυκιναμμωμικού και υδροξυβενζοϊκού οξέος (Σχήμα 1.11). Παρόλο που ο βασικός σκελετός παραμένει ο ίδιος, ο αριθμός και οι θέσεις των υδροξυλομάδων στον αρωματικό δακτύλιο προκαλούν σημαντικές διαφορές και ευθύνονται για τη μεγάλη ποικιλία των φαινολικών οξέων. Το καφεϊκό, το *p*-κουμαρικό, το βανιλλικό, το φερουλικό και το πρωτοκατεχικό οξύ είναι ορισμένα από τα φαινολικά οξέα που βρίσκονται σχεδόν σε όλα τα φυτά. Διάφορα φαινολικά οξέα έχουν ανιχνευθεί κατά τα διαφορετικά στάδια ωρίμανσης των φυτών, ενώ οι καλλιεργητικές συνθήκες είναι γνωστό ότι επιδρούν στις συγκεντρώσεις αυτών.



Υδροξυβενζοϊκά οξέα

R₁ : H, OH

R₂, R₃, R₄: H, OH, OCH₃



Υδροξυκινναμωμικά οξέα

R₁, R₃: H, OH

R₂: H, OH, OCH₃, R₄: H, OCH₃

Σχήμα 1.11: Δομές των υδροξυβενζοϊκών και υδροξυκινναμωμικών οξέων.

Πολλά από τα φαινολικά οξέα, όπως παράγωγα του κινναμωμικού και βενζοϊκού οξέος υπάρχουν σε όλα τα φυτά και σε τρόφιμα που προέρχονται από αυτά (π.χ. φρούτα, λαχανικά και σιτηρά). Ωστόσο, ένα μικρό κλάσμα τους παραμένει σε μορφή ελεύθερου οξέος. Το μεγαλύτερο κλάσμα τους είναι ενωμένο μέσω εστερικών, αιθερικών και ακεταλικών δεσμών με την κυτταρίνη, πρωτεΐνες, λιγνίνες, φλαβονοειδή, γλυκόζη, τερπένια κ.α. Αυτή η ποικιλομορφία είναι ένας από τους παράγοντες που συμβάλλουν στην πολυπλοκότητα της ανάλυσης των φαινολικών οξέων. 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. Καθώς είναι ευρύτατα διαδεδομένα σε τρόφιμα που προέρχονται από φυτά, οι άνθρωποι καταναλώνουν φαινολικά οξέα σε ημερήσια βάση. Η ημερήσια κατανάλωσή τους εκτιμάται μεταξύ 25 mg με 1g, ανάλογα τη δίαιτα που ακολουθείται (φρούτα, λαχανικά, σιτηρά, τσάι, καφέ, καρυκεύματα κ.α.) (Stalikas, 2007).

Τα φαινολικά οξέα είναι πιθανόν να εμποδίζουν την οξειδωση των λιπιδικών υποστρωμάτων με δυο μηχανισμούς:

A) Την παγίδευση της υπεροξειδικής ρίζας (**ROO[•]**), που σχηματίζεται στο στάδιο της έναρξης της οξειδωσης, με άτομο υδρογόνου του φαινολικού υδροξυλίου, προς

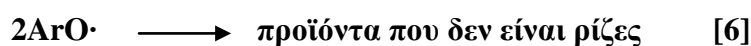
δημιουργία μιας φαινολικής ή γενικά μιας αρυλοξυ-ρίζας (αντίδραση [2]) που είναι σταθερή.



B) Την αντίδραση δυο ριζών προς σχηματισμό προϊόντων που δεν είναι ρίζες (αντίδραση [4]).



Η αρυλοξυ-ρίζα που σχηματίζεται είναι πιθανόν να δημιουργήσει νέες ελεύθερες ρίζες, όπως απεικονίζεται στις αντιδράσεις [5] και [7].



Επισημαίνεται ότι η ταχύτητα σχηματισμού των προϊόντων των αντιδράσεων [4] και [6], υπερέρχει κατά πολύ των [5] και [7] με συνολικό αποτέλεσμα την αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών οξέων (*Shahidi, 1997*)

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Δείγματα

Τα φυτικά δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν άνηκαν στις οικογένειες *Lamiaceae*, *Oleaceae* και *Aprocynaceae*, ως ακολούθως:

- *Lamiaceae*: δείγματα *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*, *Thymus vulgaris*, και *Origanum majorana*.
- *Oleaceae*: δείγμα φύλλων ελιάς (*Olea europaea*).
- *Aprocynaceae*: δείγμα φύλλων *Nerium oleander*.

Τα αποξηραμένα δείγματα δεντρολίβανου, θυμαριού, φασκόμηλου και μαντζουράνας ήταν εμπορικώς διαθέσιμα. Τα φύλλα ελιάς συλλέχθηκαν από την περιοχή της Αλβανίας τον Οκτώβριο του 2005. Τα φύλλα ροδοδάφνης ελήφθησαν από κήπο από την περιοχή Ιωαννίνων.

2.2 Πρότυπες ενώσεις

Οι πρότυπες ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή καμπύλων αναφοράς είναι οι ακόλουθες: ουρσολικό (90%) και μπετουλινικό οξύ (90%) της Aldrich (Steinheim, Germany), ολεανολικό οξύ (97%), μπετουλίνη (98%) και ουβαόλη (98.4%) της Sigma (Steinheim, Germany), ερυθροδιόλη (97%) της Fluka (Steinheim, Germany), καφεϊκό οξύ (98%) της Aldrich (Steinheim, Germany) και ροσμαρινικό οξύ της Fluka (Steinheim, Germany). Επίσης καρνοσικό οξύ (91%) καρνοσόλη, ναριγκενίνη (95%), θυμόλη (99.5%) της Sigma (Steinheim, Germany), καρβακρόλη (98%) Aldrich (Steinheim, Germany), ταξιφολίνη (85%) της Biochemica (Steinheim, Germany), εσπεριτίνη, εριοδικτυόλη (95%) και εσπεριδίνη (90%) της Fluka (Steinheim, Germany) και τζενκουανίνη από την Extrasynthese (Genay, France). Το τετραμεθυλοσιλυλοπροπιονικό άλας του Na (TMSP- d_4) λήφθηκε από την Cambridge Isotope Laboratories Inc. (Cambridge, MA).

2.3 Διαλύτες

Οι αναλυτικώς καθαροί διαλύτες μεθανόλη και *n*-εξάνιο, που χρησιμοποιήθηκαν για την εκχύλιση, αγοράστηκαν από τη Scharlau (Barcelona, Spain), ο οξικός αιθυλεστέρας από τη Lab-Scan, (Dublin, Ireland) και η απόλυτη αιθανόλη από τη Sigma-Aldrich (Hellas). Οι υψηλής καθαρότητας διαλύτες, κατάλληλοι για χρωματογραφική χρήση, ακετονιτρίλιο, μεθανόλη και νερό

αγοράστηκαν από τη Merck, (Darmstadt, Germany), τη Scharlau (Barcelona, Spain) και την ACROS ORGANICS (UK). Το οξικό οξύ (glacial) αναλυτικώς καθαρό και το δις-όξινο φωσφορικό κάλιο (Pro Analysis) ήταν της Merck (Darmstadt, Germany) και το ορθο-φωσφορικό οξύ 85% από τη Riedel-de Haen (Seelze, Germany). Η υδροξυπροπυλ-γ-κυκλοδεξτρίνη, που προστέθηκε στην κινητή φάση στην υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, αγοράστηκε από την Aldrich (Steinheim, Germany). Οι δευτεριωμένοι διαλύτες ακετονιτρίλιο (99,8%) και πυριδίνη (99.0%) που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση με φασματοσκοπία NMR προερχόταν από την Sigma-Aldrich (Hellas) και τη Deutero GmbH (Kastellaum, Germany).

2.4 Αντιδραστήρια

Για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολών το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu αγοράστηκε από τη Fluka (Switzerland), το ανθρακικό νάτριο από τη Riedel de Haen (Seelze, Germany) και η σταθερή ρίζα 2,2-διφαινυλο-1-πικρυλυδραζύλιο (DPPH[•]) (~90%) από τη Sigma-Aldrich (Hellas).

2.5 Όργανα - Συσκευές

Για τους φασματομετρικούς προσδιορισμούς χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο Advanced Seconam της Anthelie (France).

Η μελέτη της σύστασης των φυτικών εκχυλισμάτων για την παρουσία τριτερπενικών οξέων, πραγματοποιήθηκε με σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (RP-HPLC) Shimadzu (Tokyo, Japan) αποτελούμενο από σύστημα μεταφοράς τεσσάρων διαλυτών FCV-10AL VP, αντλία LC-10AD VP, ελεγκτή συστήματος SCL-10A VP συνδεδεμένων με ανιχνευτή συστοιχίας διόδων 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 και τριτερπενικών συστατικών των εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε σε αναλυτική στήλη ODS HYPERSIL C18 (25cm×4,6mm), 5μm. Η επεξεργασία των χρωματογραφημάτων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό CLASS-VP.

Επίσης, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα υγρής χρωματογραφίας οργάνου LC-NMR της εταιρείας Bruker, το οποίο αποτελείται από αντλία προώθησης διαλυτών Agilent G13311A και ανιχνευτή διόδων Bruker DAD UV detector (Bruker BioSpin,

Rheinstetten, Germany). Για την έγχυση του δείγματος χρησιμοποιήθηκε αυτόματος δειγματολήπτης Agilent G1311A με βρόγχο μεταβλητού όγκου (0 έως 100 μ l).

Στα εκχυλίσματα που παραλήφθηκαν με οργανικούς διαλύτες, η απομάκρυνση των διαλυτών πραγματοποιήθηκε σε περιστροφικό εξατμιστήρα Büchi, μοντέλο R-114, συνδεδεμένου με υδρόλουτρο, μοντέλο B-480 και με ρυθμιστή κενού, μοντέλο V-800.

Τα πειράματα NMR μιας και δυο διαστάσεων πραγματοποιήθηκαν στο Κέντρο Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, σε φασματογράφο τύπου AV-400 και LC-NMR AV-500, της Brüker. Η επεξεργασία των φασμάτων έγινε με τη βοήθεια του λογισμικού TOP SPIN της Brüker.

Η ανάλυση των εκχυλισμάτων με την τεχνική LC-MS πραγματοποιήθηκε με το 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 και ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού Agilent G1315B. Το φασματόμετρο μαζών ήταν τύπου Agilent G2445A (LC/MSD Trap SL ion trap mass spectrometer) εφοδιασμένο με σύστημα ηλεκτροψεκασμού ιόντος (ESI). Ο έλεγχος και η επεξεργασία των δεδομένων γίνεται μέσω H/Y και του προγράμματος Agilent Chemstation Software 2003. Ο υγροχρωματογραφικός διαχωρισμός των φαινολικών συστατικών πραγματοποιήθηκε σε αναλυτική στήλη Altima C18, 25cm x 4.6 mm i.d., 5 μ m της Alltech (Deerfield, USA). Αέριο άζωτο N_2 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.

2.6 Μέθοδοι

2.6.1 Παραλαβή εκχυλισμάτων από φυτικά προϊόντα

Όλα τα φυτικά δείγματα αρχικά ξηράθηκαν με υγρό N_2 , στη συνέχεια ακολούθησε λιοτρίβηση των φύλλων σε πορσελάνινο γουδί, ζύγιση και διαδοχική εκχύλιση σε συσκευή συνεχούς λειτουργίας τύπου Soxhlet με διαλύτες εξάνιο και οξικό αιθυλεστέρα (Somova *et al.*, 2003). Σε προζυγισμένη εσμουρισμένη σφαιρική φιάλη που φέρει πέτρες βρασμού, προστέθηκε επαρκής ποσότητα διαλύτη εκχύλισης (200 ml). Η διάρκεια εκχύλισης για το εξάνιο ήταν περίπου 2 ώρες (4 σιφωνισμοί)

και για τον οξικό αιθυλεστέρα περίπου 4 ώρες (10 σιφωνισμοί). Οι διαλύτες απομακρύνθηκαν μέχρι ξηρού, υπό κενό σε περιστροφικό εξατμιστήρα και τα ξηρά εκχυλίσματα που προέκυψαν διατηρήθηκαν σε κλειστά φιαλίδια στην κατάψυξη και προέκυψαν δώδεκα εκχυλίσματα. Στον Πίνακα 2.1 αναγράφονται συγκεντρωτικά τα εκχυλίσματα που παρασκευάστηκαν με τους κωδικούς με τους οποίους εμφανίζονται στα επόμενα κεφάλαια.

Πίνακας 2.1: Συγκεντρωτικός πίνακας των εκχυλισμάτων που παρασκευάστηκαν με τους κωδικούς τους.

A/a	Κωδικός	Περιγραφή Εκχυλίσματος
1	Δεντ.ΟΑ	Εκχύλισμα Οξικού Αιθυλεστέρα Δεντρολίβανου
2	Δεντ.Ε	Εξανικό Εκχύλισμα Δεντρολίβανου
3	Φασκ.ΟΑ	Εκχύλισμα Οξικού Αιθυλεστέρα Φασκόμηλου
4	Φασκ.Ε	Εξανικό Εκχύλισμα Φασκόμηλου
5	Θυμ.ΟΑ	Εκχύλισμα Οξικού Αιθυλεστέρα Θυμαριού
6	Θυμ.Ε	Εξανικό Εκχύλισμα Θυμαριού
7	Μαντζ.ΟΑ	Εκχύλισμα Οξικού Αιθυλεστέρα Μαντζουράνας
8	Μαντζ.Ε	Εξανικό Εκχύλισμα Μαντζουράνας
9	Φ.Ε.ΟΑ	Εκχύλισμα Οξικού Αιθυλεστέρα Φύλλων Ελιάς
10	Φ.Ε.Ε	Εξανικό Εκχύλισμα Φύλλων Ελιάς
11	Ροδ.ΟΑ	Εκχύλισμα Οξικού Αιθυλεστέρα Ροδοδάφνης
12	Ροδ.Ε	Εξανικό Εκχύλισμα Ροδοδάφνης

2.6.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων με τη δοκιμή σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH*

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ικανότητα των αντιοξειδωτικών για δέσμευση της ρίζας DPPH* και οφείλεται στην ικανότητά τους να αποδίδουν το φαινολικό υδρογόνο στην ελεύθερη ρίζα. Ως συνέπεια, η ρίζα αποχρωματίζεται 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 διαλύματος ρίζας DPPH[•] 0,3 mM και 2 ml μεθανολικού 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 $A_{\text{δείγματος}}$ = η απορρόφηση του δείγματος στα 517 nm

Για τον τυφλό προσδιορισμό χρησιμοποιήθηκε 1,0 ml MeOH και 2,0 ml διάλυμα εκχυλίσματος. Για τον μάρτυρα χρησιμοποιήθηκε διάλυμα ρίζας DPPH[•] και MeOH αντίστοιχα. Για την έκφραση της αντιοξειδωτικής δράσης χρησιμοποιείται ο συντελεστής SC_{50} 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_{50} 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_{50} .

2.6.3 Φωτομετρικός προσδιορισμός ολικών φαινολικών συστατικών

Ο προσδιορισμός των ολικών φαινολών με την μέθοδο Folin-Ciocalteu βασίζεται στην οξείδωση των φαινολικών συστατικών σε αλκαλικό περιβάλλον με μίγμα φωσφοβολφραμικού και φωσφομολυβδαινικού οξέος. Αποτέλεσμα της αντίδρασης είναι ο σχηματισμός κυανών προϊόντων. Η ένταση του κυανού χρώματος, με μέγιστο στα 725 nm είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των φαινολικών 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 διαλύματος Folin-Ciocalteu και μετά από 3 min προστίθεται 1,0

ml κορεσμένου διαλύματος Na_2CO_3 και συμπληρώνεται ο όγκος στη φιάλη με νερό. Μετά από παραμονή για 1 h σε σκοτεινό χώρο, μετράται η απορρόφηση σε μήκος κύματος 725 nm.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών στα εκχυλίσματα φύλλων ελιάς κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς με πρότυπο καφεϊκό οξύ. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από 50 έως 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ και για τον προσδιορισμό ακολουθήθηκε η παραπάνω διαδικασία.

2.6.4 Φωτομετρικός προσδιορισμός ολικών φλαβονοειδών συστατικών

Η αρχή της χρωματομετρικής αυτής μεθόδου βασίζεται στη δυνατότητα του 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 AlCl_3 σχηματίζει ασταθή σύμπλοκα με τις *ορθο*-δι-υδροξυλομάδες των δακτυλίων Α και Β των φλαβονοειδών. 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 *Miliauskas 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 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 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 mg/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 mg και m₀ το βάρος της ρουτίνης στο διάλυμα σε g.

2.6.5 Μελέτη της σύστασης των εκχυλισμάτων

2.6.5.1 Μελέτη της σύστασης των εκχυλισμάτων με τη χρήση NMR-1D & 2D σε διαφορετικούς δευτεριωμένους διαλύτες

Τα ακατέργαστα εξανικά εκχυλίσματα και τα εκχυλίσματα οξικού αιθυλεστέρα των φυτών *Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinallis*, *Salvia officinallis*, *Origanum majorana*, *Nerium oleander* και *Olea europaea* (20 & 50 mg) διαλύθηκαν σε 500 μl ολικώς δευτεριωμένου ακετονιτριλίου (CD₃CN) και πυριδίνης (Pyr-d₅), που περιείχαν ως ένωση αναφοράς το τετραμεθυλοσιλυλοπροπιονικό άλας του Na (TMSP-d₄) και τοποθετήθηκαν σε κατάλληλο σωληνάριο NMR. Ακολούθησε η λήψη φασμάτων μιας και δυο διαστάσεων, καθώς και η αποτίμηση τους.

Για την ταυτοποίηση φλαβονοειδών, φαινολικών οξέων και διτερπενίων τα εκχυλίσματα διαλύθηκαν σε ολικώς δευτεριωμένο ακετονιτρίλιο (20 mg), ακολούθησε φυγοκέντρηση και το υπερκείμενο διάλυμα αφού συμπληρώθηκε με διαλύτη μέχρι τα 500 μl τοποθετήθηκε σε κατάλληλο σωληνάριο NMR. Για την ανίχνευση φλαβονοειδών ελήφθησαν φάσματα NMR-¹H, ενώ για τις υπόλοιπες τάξεις φάσματα ομοπυρηνικής φασματοσκοπίας συσχέτισης (COSY ¹H-¹H), ετεροπυρηνικής φασματοσκοπίας συσχέτισης απλού κβάντου (HSQC ¹H-¹³C) και ετεροπυρηνικής φασματοσκοπίας συσχέτισης μέσω πολλαπλών δεσμών (HMBC ¹H-¹³C).

Για την διάκριση αρχικά των τριτερπενικών οξέων, ολεανολικού και ουρσολικού οξέος, παρασκευάστηκε μίγμα τους 2:1 (6 mg : 3 mg) σε δευτεριωμένη πυριδίνη και ελήφθησαν φάσματα NMR-¹H, HSQC ¹H-¹³C, HMBC ¹H-¹³C. Σε πρώτο στάδιο έγινε μια προσπάθεια εφαρμογής της πρωτονιακής φασματοσκοπίας NMR για τον ποσοτικό προσδιορισμό των οξέων. Παρασκευάστηκαν μίγματα 1:1 των οξέων, σε μια περιοχή συγκεντρώσεων από 2-10 mg/ ml (4.4-22.0 mM) με την προσθήκη σταθερής ποσότητας διαλύματος TMSP-d₄ (0.012M) σε δευτεριωμένη πυριδίνη. Κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς, πέντε σημείων, τοποθετώντας στον άξονα των y την αναλογία του ολοκληρώματος του σήματος συντονισμού του πρωτονίου H18 του ολεανολικού και του ουρσολικού οξέος προς το ολοκλήρωμα του εσωτερικού προτύπου. Προκειμένου να εξασφαλιστεί η πλήρης-επαρκής αποδιέγερση των πρωτονίων που χρησιμοποιούνται για τον ποσοτικό προσδιορισμό (H18 για το

OA & UA), προσδιορίστηκε η παράμετρος T_1 χρησιμοποιώντας τη μέθοδο «μηδενικού σημείου» (null point method). Η τιμή του T_1 βρέθηκε 0.8 s και έτσι η τιμή του χρόνου καταγραφής (acquisition time) συν το χρόνο αποδιέγερσης (relaxation delay) τέθηκε περισσότερο από πέντε φορές μεγαλύτερη. Σε κάποια εκχυλίσματα, λόγω αλληλοεπικάλυψης των σημάτων συντονισμού στην περιοχή ολοκλήρωσης, δεν ήταν δυνατόν να εφαρμοστεί η συγκεκριμένη μεθοδολογία.

Εφαρμόστηκε η ακόλουθη μεθοδολογία με βάση τους *Lewis et al., 2007*. Παρασκευάστηκαν διαλύματα των οξέων σε μια περιοχή συγκεντρώσεων από 2-14 mg/ ml (4.4-30.6 mM) και έγινε η λήψη φασμάτων HSQC ^1H - ^{13}C στον ελάχιστο δυνατό χρόνο ($n_s = 2$, $t_{exp} = 14$ min). Κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς, έξι σημείων, τοποθετώντας στον άξονα y τον μέσο όρο της τιμής της απόλυτης έντασης δυο διασταυρούμενων κορυφών που βρίσκονται σε απόσταση (π.χ. συζεύξεις C18-H18 & C12-H12 για OA & UA) και στον άξονα x την συγκέντρωση. Μέσω του μέσου όρου της απόλυτης έντασης των ίδιων διασταυρούμενων κορυφών και της εξίσωσης της ευθείας υπολογίστηκε η άγνωστη συγκέντρωση των οξέων στα εκχυλίσματα. Η ίδια πορεία πειραμάτων και μεθοδολογία ποσοτικού προσδιορισμού εφαρμόστηκε και για την μετεουλίνη, το μετεουλινικό οξύ, την ερυθροδιόλη και την ουβαόλη. Στην περίπτωση αυτών των ενώσεων κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς τριών σημείων, σε μια περιοχή συγκεντρώσεων από 2- 6 mg/ ml (4.4-13.2 mM).

2.6.5.2 Μελέτη της σύστασης των εκχυλισμάτων με LC-ESI-MS

Για την ταυτοποίηση των διαφόρων τάξεων των ενώσεων (φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή, διτερπένια και τριτερπένια) χρησιμοποιήθηκε σύστημα LC-MS, εφοδιασμένο με σύστημα ηλεκτροψεκασμού ιόντος συνδεδεμένο και με ανιχνευτή συστοιχίας διόδων. Εφαρμόστηκε θετικός και αρνητικό ιονισμός, αλλά στις συνθήκες του πειράματος προέκυψαν καλύτερα αποτελέσματα σε συνθήκες αρνητικού ιονισμού. Επίσης, πραγματοποιήθηκε θραυσματοποίηση των κύριων θραυσμάτων (MS^2). Η ταυτοποίηση των ενώσεων έγινε με βάση βιβλιογραφικά δεδομένα φασμάτων μαζών και το χρόνο κατακράτησης και σε σύγκριση με όσες πρότυπες ενώσεις ήταν εμπορικά διαθέσιμες.

Το πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης που εφαρμόστηκε, προέκυψε με σκοπό να διαχωριστούν οι διάφορες τάξεις ενώσεων, που υπήρχαν στα δεδομένα εκχυλίσματα. Συγκεκριμένα για τα τριτερπενοειδή συνήθως χρησιμοποιείται ισοκρατική έκλυση, γι' αυτό και τα τελευταία 15 λεπτά εφαρμόστηκε αναλογία διαλυτών 90:10%

ακετονιτρίλιο: νερό (0.1% οξικό οξύ), προκειμένου να διαχωριστούν και να ανιχνευθούν. Για την ανάλυση των εκχυλισμάτων παρασκευάστηκαν διαλύματα συγκέντρωσης 1 mg/ mL σε μεθανόλη και αραιώσεις αυτών. Τα διαλύματα πριν την ανάλυση διηθήθηκαν από φίλτρο μεμβράνης 0.45 μ .

Η κινητή φάση αποτελούνταν από δύο διαλύτες τον διαλύτη A (ακετονιτρίλιο) και τον διαλύτη B (νερό με οξικό οξύ 0.1 %, v/v). Το σύστημα βαθμωτής έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε δίνεται στον Πίνακα 2.2.

Πίνακας 2.2: Σύστημα βαθμωτής έκλουσης

Χρόνος (min)	% διαλύτης A	% διαλύτης B
0	20	80
15	60	40
20	75	25
45	85	15
50	90	10
65	90	10
70	20	80

Η ροή του διαλύτη έκλουσης ήταν 0,6 ml/ min και ο ενέσιμος όγκος 10 μ l. Η καταγραφή του φάσματος έγινε μεταξύ 200 και 400 nm. Τα μήκη κύματος που επιλέχθηκαν για την παρακολούθηση των χρωματογραφημάτων ήταν τα 210, 230, 254, 280 και 330 nm. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου. Η ανάλυση των προτύπων ενώσεων έγινε εις διπλούν ενώ των εκχυλισμάτων εις τριπλούν. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ενώσεων κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς έξι σημείων.

2.6.5.3 Μελέτη της σύστασης των εκχυλισμάτων με RP-HPLC για την παρουσία τριτερπενοειδών

Αρχικά έγινε μια προσπάθεια διαχωρισμού και ταυτοποίησης των τριτερπενικών οξέων, ολεανολικού και ουρσολικού στα φυτικά εκχυλίσματα και εφαρμόστηκαν χρωματογραφικές συνθήκες που αναφέρθηκαν στη βιβλιογραφία. Για την υγροχρωματογραφική ανάλυσή τους, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία,

χρησιμοποιείται ισοκρατική έκλυση με μίγμα οργανικού διαλύτη, μεθανόλη ή ακετονιτρίλιο, και νερού, με αναλογία ως προς τον οργανικό διαλύτη να βρίσκεται σε μια περιοχή από 80-90%. Παρότι εφαρμόστηκαν διάφορες αναλογίες διαλυτών δεν επιτεύχθηκε ικανοποιητικός διαχωρισμός των ενώσεων, οι οποίες σχεδόν συνεκλούσαν. Γι' αυτό και προστέθηκε κυκλοδεξτρίνη στην κινητή φάση (νερό), η οποία σύμφωνα με τους *Claude et al., 2004*, σχηματίζει σύμπλοκη ένωση με τα οξέα και κάθε σύμπλοκη ένωση έχει διαφορετικό χρόνο κατακράτησης.

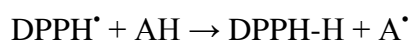
Το σύστημα διαλυτών αποτελούνταν από: ακετονιτρίλιο (Διαλύτης Α) και 0.02M φωσφορικό buffer (pH 3.5) με 7,5mM γ-υδροξυπροπυλ-κυκλοδεξτρίνη (Διαλύτης Β) με αναλογία 55: 45%, (v/v). Η ανίχνευση των ενώσεων έγινε στα 210 nm με ροή διαλύτη 1,0 ml/ min και ενέσιμο όγκο 20 μl. Η στήλη θερμοστατήθηκε στους 25°C. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των τριτερπενοειδών παρασκευάστηκε μητρικό διάλυμα σε αναλογία 1 mg/ ml σε μεθανόλη. Για την ανάλυση των εκχυλισμάτων παρασκευάστηκαν διαλύματα συγκέντρωσης 1 mg/ ml σε μεθανόλη και αραιώσεις αυτών. Στην περίπτωση των εξανικών εκχυλισμάτων επειδή είχαν μικρές συγκεντρώσεις σε τριτερπενοειδή ετοιμάστηκαν διαλύματα 5 αλλά και 10 mg/ ml σε μεθανόλη. Τα διαλύματα πριν την ανάλυση διηθήθηκαν από φίλτρο μεμβράνης 0.45 μ.

Η ταυτοποίηση των τριτερπενοειδών έγινε με σύγκριση με τους χρόνους κατακράτησης των προτύπων και από τα φάσματα UV. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ενώσεων κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς επτά σημείων. Με την ίδια αναλογία διαλυτών πραγματοποιήθηκε και η ανάλυση για την παρουσία μπετουλίνης και μπετουλινικού οξέος, ενώ για την ερυθροδιόλη και ουβαόλη η βέλτιστη αναλογία βρέθηκε Διαλύτης Α: Διαλύτης Β 65:45%, (v/v). Η συγκεκριμένη μεθοδολογία χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά στην ανάλυση φυτικών εκχυλισμάτων και για την ανίχνευση μπετουλίνης, ερυθροδιόλης και ουβαόλης.

3. Μελέτη της σύστασης εκχυλισμάτων των οικογενειών *Lamiaceae*, *Oleaceae* και *Aprocyneae*.

3.1 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής τους δράσης με τη δοκιμή σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH[•], φωτομετρικός προσδιορισμός ολικών φαινολικών και φλαβονοειδών συστατικών.

Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε η δοκιμή σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH[•]. Πρόκειται για μια σταθερή ρίζα που παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης στα 515 nm. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ικανότητα των αντιοξειδωτικών (AH) για δέσμευση της ρίζας DPPH[•] και αποδίδεται στην ικανότητά τους να δίδουν το φαινολικό υδρογόνο στην ελεύθερη ρίζα. Έτσι με την πρόσληψη του φαινολικού υδρογόνου, η ρίζα αποχρωματίζεται και από τη μείωση της απορρόφησης, που εξαρτάται από το ποσοστό δέσμευσης της ρίζας εκτιμάται η αντιοξειδωτική ικανότητα. Η πορεία δέσμευσης της ρίζας μπορεί να περιγραφεί από την παρακάτω αντίδραση.



Επειδή πρόκειται για μια εύκολη και απλή αντίδραση, έχει εφαρμοστεί ευρύτατα στην εκτίμηση της ικανότητας δέσμευσης ελευθέρων ριζών διαφόρων εκχυλισμάτων.

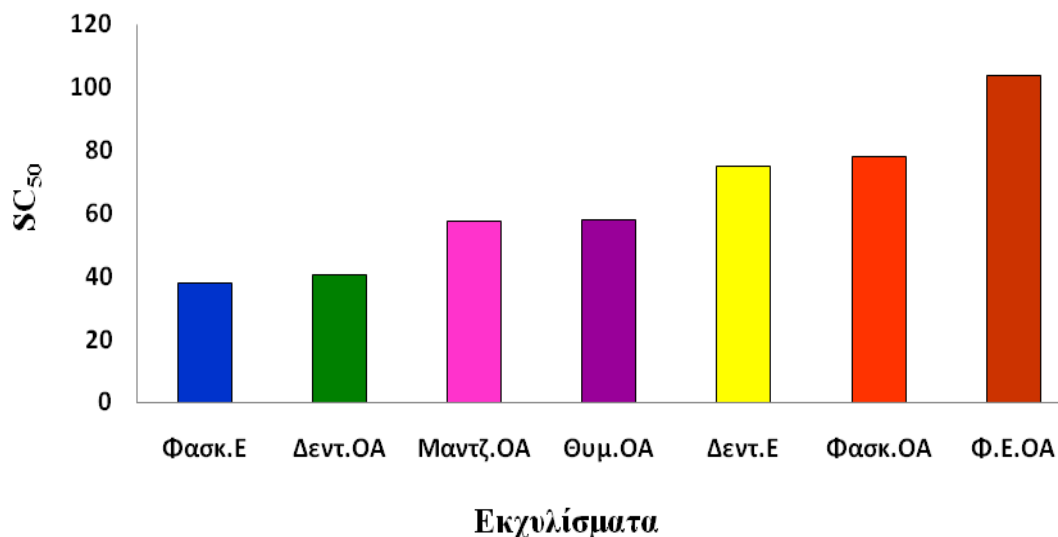
Τα αποτελέσματα που αφορούν την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1. Η αντιοξειδωτική δράση εκφράζεται με το συντελεστή SC₅₀, που ορίζεται ως η συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού (μg/ml) ή του εκχυλίσματος στην οποία παρατηρείται το 50% της δέσμευσης της ρίζας DPPH[•]. Όσο μικρότερη είναι η τιμή αυτή τόσο καλύτερη αντιοξειδωτική δράση παρουσιάζει το εκχύλισμα ή η πρότυπη ένωση. Στον ίδιο πίνακα φαίνονται και τα ποσοστά των ολικών φαινολών και φλαβονοειδών των εκχυλισμάτων. Ο προσδιορισμός των ολικών φαινολών έγινε φωτομετρικά και η συγκέντρωσή τους υπολογίστηκε από καμπύλη αναφοράς που κατασκευάστηκε με πρότυπο διάλυμα καφεϊκού οξέος και εκφράστηκε ως mg καφεϊκού οξέος / g στερεού εκχυλίσματος. Όμοια και ο προσδιορισμός των ολικών φλαβονοειδών έγινε φωτομετρικά και η συγκέντρωσή τους προέκυψε από καμπύλη αναφοράς που κατασκευάστηκε με πρότυπο διάλυμα ρουτίνης και εκφράστηκε ως mg ρουτίνης / g στερεού εκχυλίσματος.

Πίνακας 3.1: Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων και φωτομετρικός προσδιορισμός των ολικών φαινόλικών και φλαβονοειδών συστατικών.

Φυτικά Εκχυλίσματα	*SC₅₀ (μg/ml)	Ολικές Φαινόλες (mg καφεϊκού οξέος/g στερεού εκχυλίσματος)	Ολικά Φλαβονοειδή (mg ρουτίνης/g στερεού εκχυλίσματος)
Φασκ. _{ΟΑ}	78.0 ± 1.7	73.7 ± 2.6	39.3 ± 5.3
Φασκ. _Ε	37.9 ± 0.9	6.9 ± 1.0	5.7 ± 0.8
Δεντ. _{ΟΑ}	40.6 ± 2.6	54.6 ± 2.2	24.6 ± 5.0
Δεντ. _Ε	75.1 ± 3.3	4.8 ± 0.1	2.5 ± 0.4
Θυμ. _{ΟΑ}	57.8 ± 1.3	130.2 ± 4.2	51.9 ± 4.2
Θυμ. _Ε	150.7 ± 1.7	12.3 ± 4.2	5.8 ± 0.5
Μαντζ. _{ΟΑ}	57.3 ± 0.8	145.3 ± 10.9	88.1 ± 2.8
Μαντζ. _Ε	1003.6 ± 3.6	2.1 ± 0.2	1.0 ± 0.3
Φ.Ε. _{ΟΑ}	103.6 ± 2.5	75.5 ± 4.8	68.2 ± 8.8
Φ.Ε. _Ε	896.0 ± 3.5	2.2 ± 0.3	1.4 ± 0.6
Ροδ. _{ΟΑ}	400.5 ± 5.7	22.8 ± 0.3	20.3 ± 3.8

* SC₅₀ = η συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού (μg/ ml) ή του εκχυλίσματος στην οποία παρατηρείται το 50% της δέσμευσης της ρίζας DPPH[•].

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 3.1 προκύπτει ότι καλύτερη αντιοξειδωτική δράση παρουσιάζουν το εκχύλισμα Φασκ._Ε και το εκχύλισμα Δεντ._{ΟΑ}. Στο Σχήμα 3.1 απεικονίζονται διαγραμματικά οι τιμές της παραμέτρου SC₅₀ για τα εκχυλίσματα που παρουσιάζουν την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση. (ΟΑ: οξικού αιθυλεστέρα, Ε: Εξανικό). Τα εκχυλίσματα Φασκ._Ε και Δεντ._{ΟΑ} εμφανίζουν ιδιαίτερα καλή αντιοξειδωτική δράση, ενώ η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων Θυμ._{ΟΑ} και Μαντζ._{ΟΑ} βρίσκεται στα ίδια επίπεδα.



Σχήμα 3.1: Τα επίπεδα της παραμέτρου SC_{50} ορισμένων εκχυλισμάτων (όσο μικρότερη είναι η τιμή της παραμέτρου τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική δράση).

Εκχυλίσματα της οικογένειας *Lamiaceae* έχουν μελετηθεί εκτεταμένα όσον αφορά την αντιοξειδωτική τους δράση με διάφορες μεθόδους και σε διάφορα υποστρώματα- λιπαρά και υδατικά συστήματα (Cuvelier *et al.*, 1994, Zheng and Wang 2001, Pizzale *et al.*, 2002, Dorman *et al.*, 2004, Shan *et al.*, 2005, Yanishlieva *et al.*, 2006). Τόσο τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, όσο και εκείνα προηγούμενων μελετών έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα βοτάνων της οικογένειας *Lamiaceae* παρουσιάζουν γενικά ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Η αντιοξειδωτική δράση εκχυλισμάτων δεντρολίβανου και φασκόμηλου, κυρίως οφείλεται στην παρουσία διτερπενίων που περιέχουν δυο υδροξυλομάδες σε ο-θέση (C₁₁- C₁₂), όπως το καρνοσικό οξύ και η καρνοσόλη και σε άλλα περισσότερο οξειδωμένα διτερπένια, αλλά και στο ροσμαρινικό οξύ (Cuvelier *etl.*, 1996, Ibanez *et al.*, 2003, Almela *et al.*, 2006, Erkan *et al.*, 2008).

Διάφορα φλαβονοειδή που έχουν απομονωθεί από εκχυλίσματα θυμαριού παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση (Miura and Nakatani, 1989, Wang *et al.*, 1998), όπως και η παρα-κυμεν-2,3-διόλη που απομονώθηκε από εξανικό εκχύλισμα, η οποία αναστέλλει την οξείδωση λιπαρών υλών (Schwarz and Ernst, 1996). Στην παρουσία κυρίως του ροσμαρινικού οξέος και φλαβονοειδών, όπως η εριοδικτυόλη (eriodictyol) και η ταξιφολίνη (taxifolin), αποδόθηκε η αντιοξειδωτική δράση εκχυλισμάτων μαντζουράνας (Al-Bandak and Oreopoulou,

2007). Γενικά, η ποιότητα των φυτικών εκχυλισμάτων και η αντιοξειδωτική τους δράση εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως η ποιότητα του αρχικού φυτού, η γεωγραφική προέλευση, οι κλιματολογικές συνθήκες, η ημερομηνία και οι συνθήκες συλλογής, οι συνθήκες διατήρησης- διαφύλαξης του (Cuvelier *et al.*, 1996).

Όσον αφορά τα ποσοστά των ολικών φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων, μεγαλύτερα ποσοστά παρουσίασε το εκχύλισμα Μαντζ.ΟΑ, ακολουθεί με μικρή διαφορά το εκχύλισμα Θυμ.ΟΑ, τα εκχυλίσματα Φ.Ε.ΟΑ και Φασκ.ΟΑ και τέλος το εκχύλισμα Δεντ.ΟΑ. Σε συμφωνία βρίσκονται και τα ποσοστά των ολικών φλαβονοειδών συστατικών των εκχυλισμάτων, με μικρές μόνο διαφορές. Όπως αναμένεται, τα εξανικά εκχυλίσματα έχουν πολύ μικρά ποσοστά ολικών φαινολικών και φλαβονοειδών συστατικών.

Τα διάφορα είδη ρίγανης έχει αναφερθεί ότι έχουν ιδιαίτερα υψηλό φαινολικό περιεχόμενο και υψηλή αντιοξειδωτική δράση, όπως και τα εκχυλίσματα θυμαριού (Zheng and Wang 2001). Σε συγκριτική μελέτη για τα ποσοστά των ολικών φαινολικών συστατικών και την αντιοξειδωτική δράση πολλών εκχυλισμάτων βοτάνων, μεταξύ των οποίων ήταν και εκείνα ρίγανης, θυμαριού, φασκόμηλου και δεντρολίβανου, βρέθηκε ότι τα μεγαλύτερα επίπεδα φαινολικών ενώσεων εμφάνισε η ρίγανη (10.17 g γαλλικού οξέος /100g εκχυλίσματος= 101.7 mg/ g εκχ.), στη συνέχεια το φασκόμηλο (5.30 g γαλ. ο. /100g εκχ =53.0 mg/ g εκχ.), το δεντρολίβανο (5.07 g γαλ. ο. /100g εκχ =50.7 mg/ g εκχ.) και το θυμάρι (4.52 g γαλ. ο. /100g εκχ =45.2 mg/ g εκχ.) (Shan *et al.*, 2005).

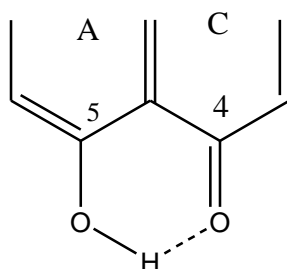
Λόγω της ισχυρής αντιοξειδωτικής δράσης που εμφάνισαν τα εκχυλίσματα οξικού αιθυλεστέρα της οικογένειας *Lamiaceae* αλλά και τα εκχυλίσματα Φασκ.ΟΑ και Δεντ.ΟΑ και του υψηλού ποσοστού τους σε ολικά φαινολικά (εκχυλίσματα ΟΑ) και ολικά φλαβονοειδή συστατικά, θα παρουσίαζε ενδιαφέρον η μελέτη της σύστασής τους με φασματοσκοπία NMR 1D και 2D.

3.2 Μελέτη της σύστασης των εκχυλισμάτων με τη χρήση NMR-1D & 2D-Ταυτοποίηση ομάδων ενώσεων κατηγοριοποιώντας περιοχές του φάσματος

3.2.1 Εκχυλίσματα δεντρολίβανου

Τις τελευταίες δεκαετίες παρατηρείται μια συνεχώς διευρυνόμενη χρήση της φασματοσκοπίας NMR στην άμεση ανάλυση τροφίμων και ποτών (*Caligiani et al., 2007*), φυτικών εκχυλισμάτων (*Gerothanassis et al., 1998, Exarchou et al., 2002a, 2002b, Pauli et al., 2005, Tatsis et al., 2007*) και μεταβολιτών (*Lewis et al., 2007*), χωρίς τον προηγούμενο χρωματογραφικό διαχωρισμό τους ή κάποια προκαταρτική διεργασία. Ως συνέχεια των ερευνητικών μας δραστηριοτήτων στην άμεση ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό αντιοξειδωτικών ενώσεων σε φυτικά εκχυλίσματα, έγινε μια προσπάθεια, εφαρμόζοντας συνδυαστικές τεχνικές NMR μίας και δύο διαστάσεων, να ταυτοποιηθούν τα κύρια συστατικά διάφορων τάξεων ενώσεων φυτικών εκχυλισμάτων των οικογενειών *Lamiaceae*, *Oleaceae* και *Aprocyneae*.

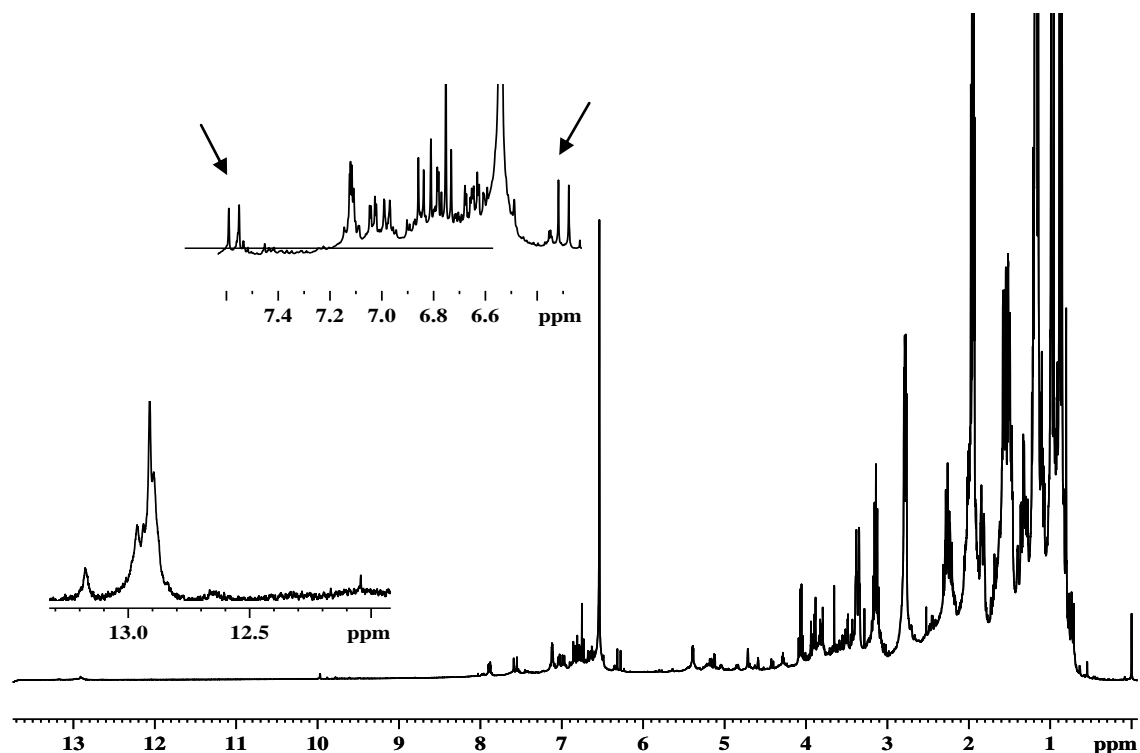
Όπως προαναφέρθηκε, παρασκευάστηκαν εκχυλίσματα δεντρολίβανου και φασκόμηλου και σε μια προκαταρτική μελέτη εξετάστηκε η δυνατότητα εφαρμογής της φασματοσκοπίας NMR- ¹H μιας διάστασης για το χαρακτηρισμό των κύριων ενώσεών τους. Οι κύριες τάξεις ενώσεων που απαντώνται σε εκχυλίσματά τους είναι αυτή των δι- και τριτερπενίων, των φαινολικών οξέων και των φλαβονοειδών. Διάφορα φλαβονοειδή έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί σε εκχυλίσματα δεντρολίβανου και φασκόμηλου σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, όπως η ομοπλανταγινίνη (*homoplantagin*), η ησπιδουλίνη (*hispidulin*), η τζενκουανίνη (*genkwanin*), η απιγενίνη, η εσπεριτίνη (*hesperetin*), η σκουτελαρεΐνη (*scutellarein*) και διάφοροι γλυκοζίτες τους (*Cuvelier et al., 1994, 1996, Areias et al., 2000, Ibanez et al., 2003, Almela et al., 2006*). Για την περίπτωση της ταυτοποίησης της τάξης των φλαβονών και των φλαβονολών έχει αναπτυχθεί, από προηγούμενη μελέτη της ερευνητικής μας ομάδας (*Exarchou et al., 2002a, 2002b*) μεθοδολογία που στηρίζεται στη φασματοσκοπία NMR. Η μεθοδολογία στηρίζεται στο γεγονός ότι το υδροξύλικό πρωτόνιο OH (5) (Σχήμα 3.2) αυτών των ενώσεων αποπροστατεύεται ισχυρά και το σήμα συντονισμού του μετατοπίζεται στην περιοχή του φάσματος πάνω από 11 ppm. Το συγκεκριμένο πρωτόνιο συμμετέχει σε ενδομοριακό δεσμό υδρογόνου με το καρβονυλικό οξυγόνο στη θέση 4 του δακτυλίου C, γεγονός που ερμηνεύει την ισχυρή αποπροστασία που εμφανίζει.



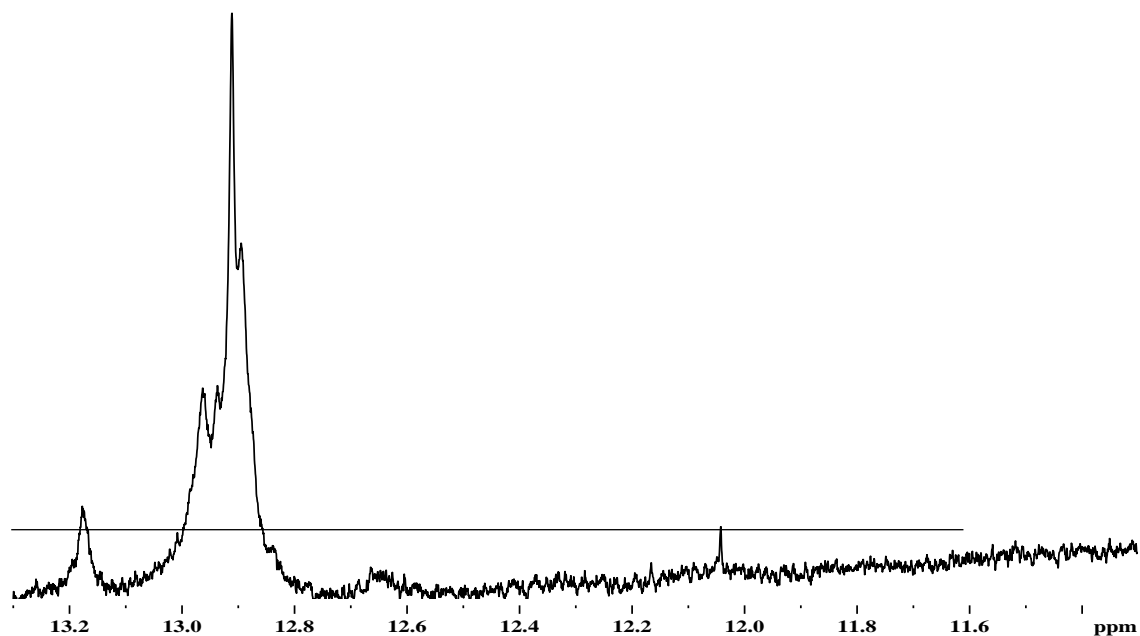
Σχήμα 3.2: Σχηματισμός ισχυρού ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου μεταξύ του υδροξυλικού πρωτονίου **OH (5)** του δακτυλίου **A** με το καρβονυλικό **CO (4)** του δακτυλίου **C** φλαβονοειδών.

Η εμφάνιση του σήματος συντονισμού των υδροξυλικών πρωτονίων OH (5) στην περιοχή από 12 έως 13 ppm παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, διότι στα φάσματα NMR ^1H των εκχυλισμάτων των υπό μελέτη φυτών, η παραπάνω περιοχή δεν είναι τόσο πολύπλοκη όσο η περιοχή όπου συντονίζονται τα αρωματικά πρωτόνια. Επιπλέον είναι δυνατή η διάκριση των φλαβονολών από τις φλαβόνες. Αυτό οφείλεται στο ότι η χημική μετατόπιση του πρωτονίου OH (5) επηρεάζεται από την παρουσία της υδροξυλομάδας στη θέση 3 του δακτυλίου C. Η ομάδα OH (3) στις φλαβονόλες εξασθενίζει την ηλεκτρονική πυκνότητα του καρβονυλικού οξυγόνου CO (4) και, επομένως, μειώνει την ισχύ του ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου OH(5)···CO (4), πιθανώς λόγω της εν μέρει συμμετοχής της σε ενδομοριακό δεσμό υδρογόνου με το CO (4). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της σχετικής μελέτης ήταν δυνατή η διάκριση των φλαβονοειδών και των παραγώγων τους με τη φασματοσκοπία NMR ^1H και συγκεκριμένα της κερκετίνης και του γλυκοζίτη της, ρουτίνη. Διαπιστώθηκε η διάκριση των δυο σημάτων συντονισμού των πρωτονίων OH (5) αφού η διαφορά των χημικών τους μετατοπίσεων ήταν ~0.2 ppm.

Στο Σχήμα 3.3 απεικονίζεται το φάσμα NMR ^1H του εκχυλίσματος Δεντ.οΑ, το οποίο χαρακτηρίζεται από εξαιρετική πολυπλοκότητα, ιδιαίτερα στην αρωματική περιοχή του φάσματος. Στο Σχήμα 3.4 δίνεται η επιλεγμένη περιοχή του ίδιου φάσματος στην περιοχή από 11.3 έως 13.2 ppm.



Σχήμα 3.3: Φάσμα NMR-¹H εκχυλίσματος Δεντ._{0A} σε δευτεριωμένο ακετονιτρίλιο, CD₃CN (NS= 2k, T=298K, t_{exp}=2h & 48min, 400 MHz). Τα βέλη υποδεικνύουν τις διπλές κορυφές που είναι χαρακτηριστικές της παρουσίας παραγώγων του κινναμωμικού οξέος.



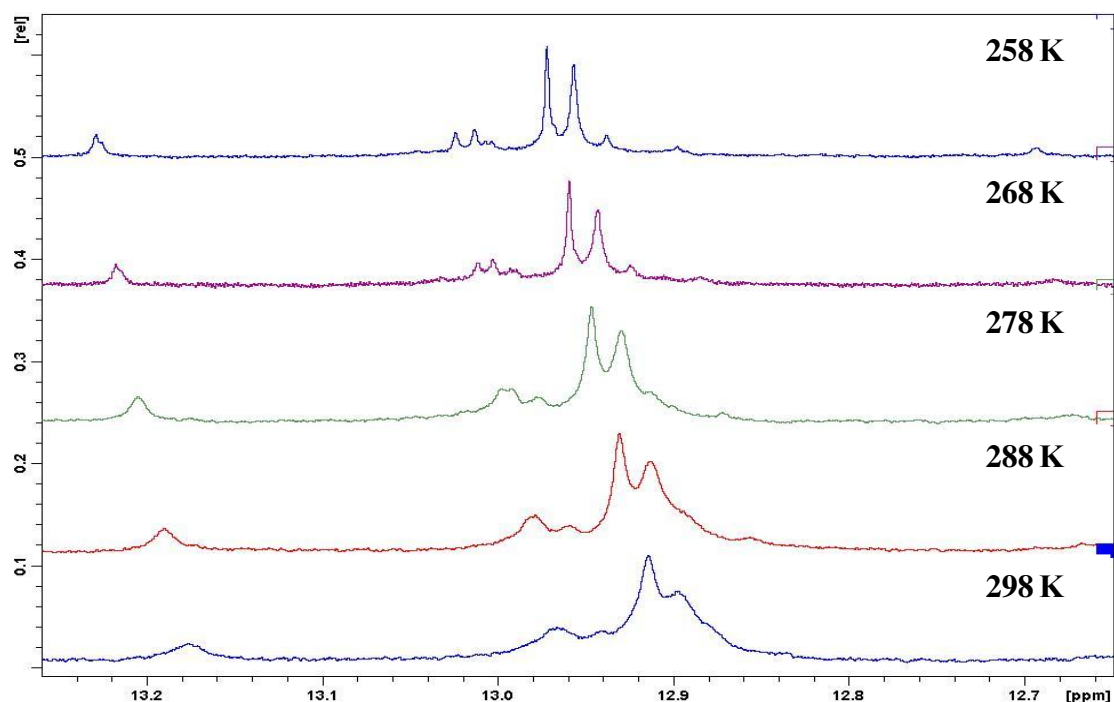
Σχήμα 3.4: Επιλεγμένη περιοχή φάσματος NMR-¹H του Σχήματος 3.3.

Όπως φαίνεται από το Σχήμα 3.4 υπάρχουν στην περιοχή των ~12.9 ppm, πιθανώς τέσσερα σήματα συντονισμού που αλληλεπικαλύπτονται και μια κορυφή στα 13.18 ppm, που πιθανόν ανήκουν στην τάξη των φλαβονών. Επίσης, παρατηρείται μια κορυφή στα 12.04 ppm, που πιθανόν ανήκει σε μια φλαβονόλη, που βρίσκεται σε ίχνη στο εκχύλισμα. Ίσως με ένα πείραμα μεταβλητής θερμοκρασίας να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των σημάτων συντονισμού.

Γενικά, στη φασματοσκοπία NMR ^1H οι απορροφήσεις συντονισμού των υδροξυλικών πρωτονίων εμφανίζονται διευρυμένες στη θερμοκρασία δωματίου, ιδιαίτερα όταν το φάσμα ληφθεί σε πρωτικό διαλύτη. 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. Εντούτοις, με τη λήψη φάσματος σε χαμηλή θερμοκρασία μειώνεται η ταχύτητα ανταλλαγής των υδροξυλικών πρωτονίων και οι κορυφές συντονισμού εμφανίζονται οξείες. Σε προηγούμενη μελέτη της ερευνητικής μας ομάδας (*Exarchou et al., 2002a, 2002b*) μελετήθηκε ο διαχωρισμός των φλαβονών απιγενίνης και λουτεολίνης με λήψη φασμάτων μεταβλητής θερμοκρασίας του μίγματος των δυο φλαβονών σε διαλύτη CD_3OH , και διαπιστώθηκε ότι με τη λήψη του φάσματος στην κατάλληλη θερμοκρασία ο διαχωρισμός τους είναι εφικτός στο μίγμα των πρότυπων ενώσεων. Επίσης, πραγματοποιήθηκε η ταυτοποίηση της απιγενίνης, λουτεολίνης και κερκετίνης σε φυτικά εκχυλίσματα με τη λήψη φασμάτων NMR ^1H μεταβλητής θερμοκρασίας.

Με βάση τα παραπάνω ακολούθησε η λήψη φασμάτων μεταβλητής θερμοκρασίας του εκχυλίσματος Δεντ.οΑ για ένα εύρος τιμών θερμοκρασίας από 298- 258 K. Στο Σχήμα 3.5 φαίνεται η επίδραση της θερμοκρασίας στη μορφή των σημάτων συντονισμού. Όπως φαίνεται με την ελάττωση της θερμοκρασίας οι κορυφές γίνονται πιο οξείες και στους 258 K παρατηρούνται, στην περιοχή των ~12.9 ppm, πέντε σήματα συντονισμού που πριν αλληλεπικαλύπτονταν και πιθανώς αντιστοιχούν στις απορροφήσεις των πρωτονίων των υδροξυλομάδων στη θέση 5 φλαβονών ή *O*-γλυκοζιτών φλαβονών. Επίσης, στα ~13.18 ppm στους 258 K διακρίνονται δυο σήματα συντονισμού που πιθανώς αντιστοιχούν στις απορροφήσεις των πρωτονίων των υδροξυλομάδων της θέσης 5 παραγώγων-σακχάρων φλαβονών (*C*-γλυκοζιτών φλαβονών). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η γλυκοζυλίωση στη θέση 8 έχει ως συνέπεια τα πρωτόνια των υδροξυλομάδων της θέσης 5 του 8*C*-β-*D*-γλυκοζίτη της λουτεολίνης (οριεντίνη-orientin) και του 8*C*-β-

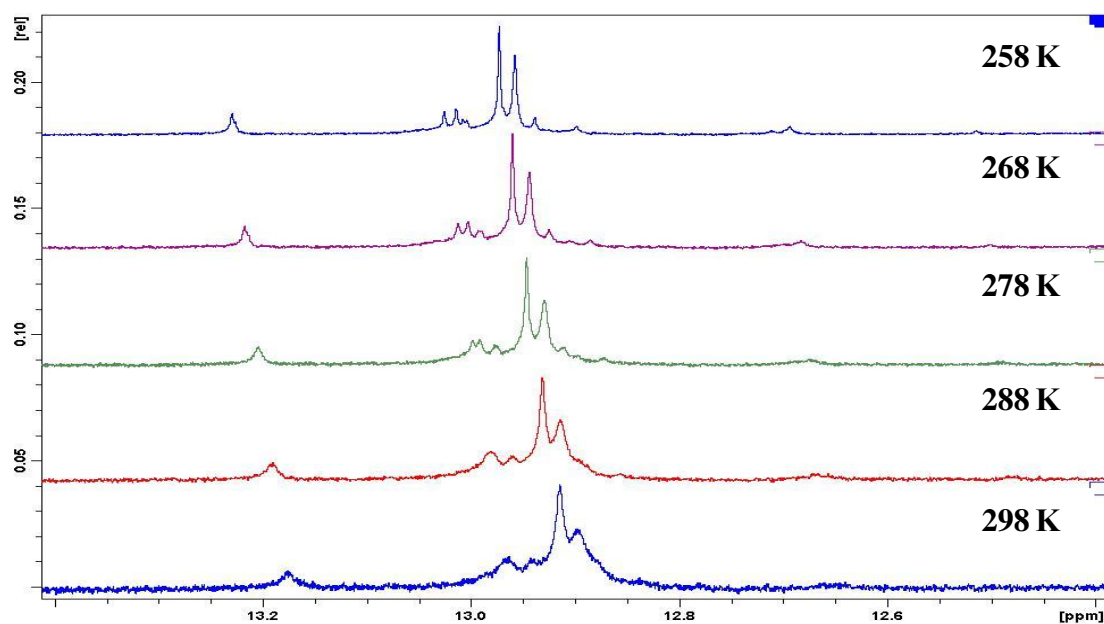
D-γλυκοζίτη της απιγενίνης (βιτεξίνη-vitexin) να απορροφούν στα 13.15- 13.17 ppm σε διαλύτη δευτεριωμένο DMSO- d_6 (διμεθυλσουλφοξείδιο), ενώ η γλυκοζυλίωση στη θέση 6 έχει ως συνέπεια το αντίστοιχο πρωτόνιο του 6C-β-D-γλυκοζίτη της λουτεολίνης (ομοοριεντίνη- homoorientin) να απορροφά στα 13.56 ppm (Burns et al., 2007, Zhou et al., 2005).



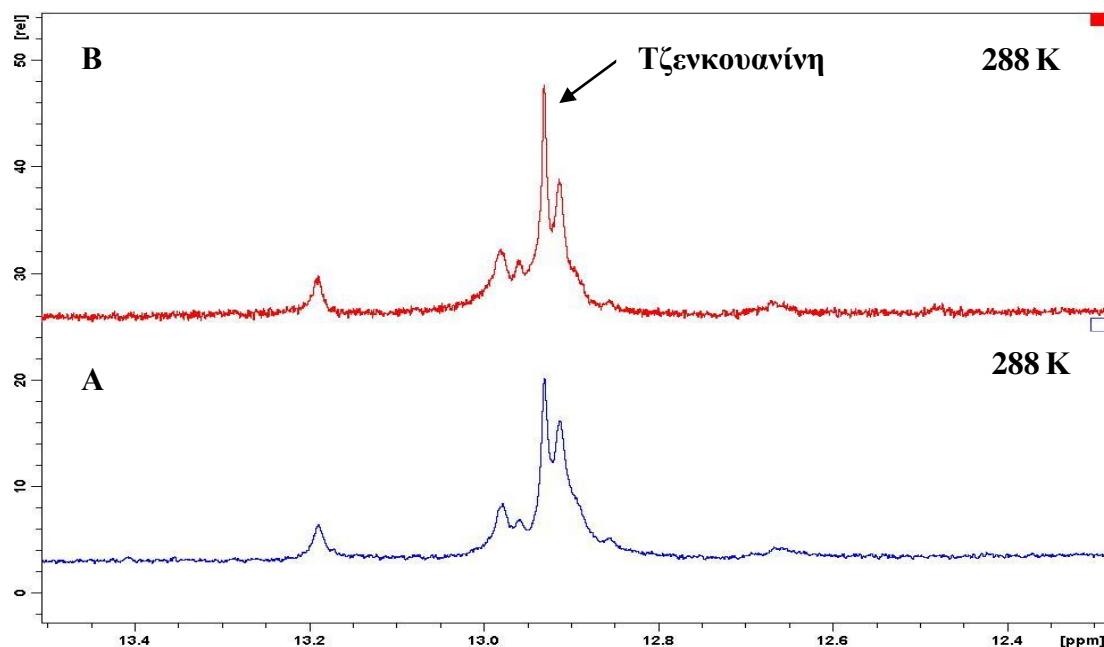
Σχήμα 3.5: Επιλεγμένη περιοχή φάσματος NMR- ^1H εκχυλίσματος Δεντ. $_{0A}$ σε CD_3CN σε διαφορετικές θερμοκρασίες ($NS=1k$, $T=258-298\text{K}$, $t_{exp}=1h$ & $24min$, 400MHz).

Με υπέρθεση του φάσματος NMR ^1H του εκχυλίσματος με τα αντίστοιχα πρότυπων ενώσεων φλαβονών (που ελήφθησαν στο ίδιο όργανο και με τις ίδιες συνθήκες), οι οποίες έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία ως συστατικά εκχυλισμάτων δεντρολίβανου διαπιστώθηκε ότι, πιθανώς, η τζενκουανίνη υπάρχει στο εκχύλισμα. Προκειμένου να ταυτοποιηθεί η παρουσία της κατά τρόπο αδιαμφισβήτητο, προστέθηκε μικρή ποσότητα διαλύματός της, σε δευτεριωμένο ακετονιτρίλιο, στο εκχύλισμα για την ενίσχυση του σήματος (μέθοδος spiking) και ακολούθησε η λήψη των φασμάτων σε εύρος τιμών θερμοκρασίας από 298- 258 K (Σχήμα 3.6). Στο Σχήμα 3.7 παρουσιάζεται επιλεγμένη περιοχή του φάσματος NMR ^1H του εκχυλίσματος Δεντ. $_{0A}$ πριν και μετά την προσθήκη της τζενκουανίνης

στους 288 K. Η αύξηση της έντασης της απορρόφησης στα ~12.92 ppm υποδεικνύει την παρουσία της τζενκουανίνης.



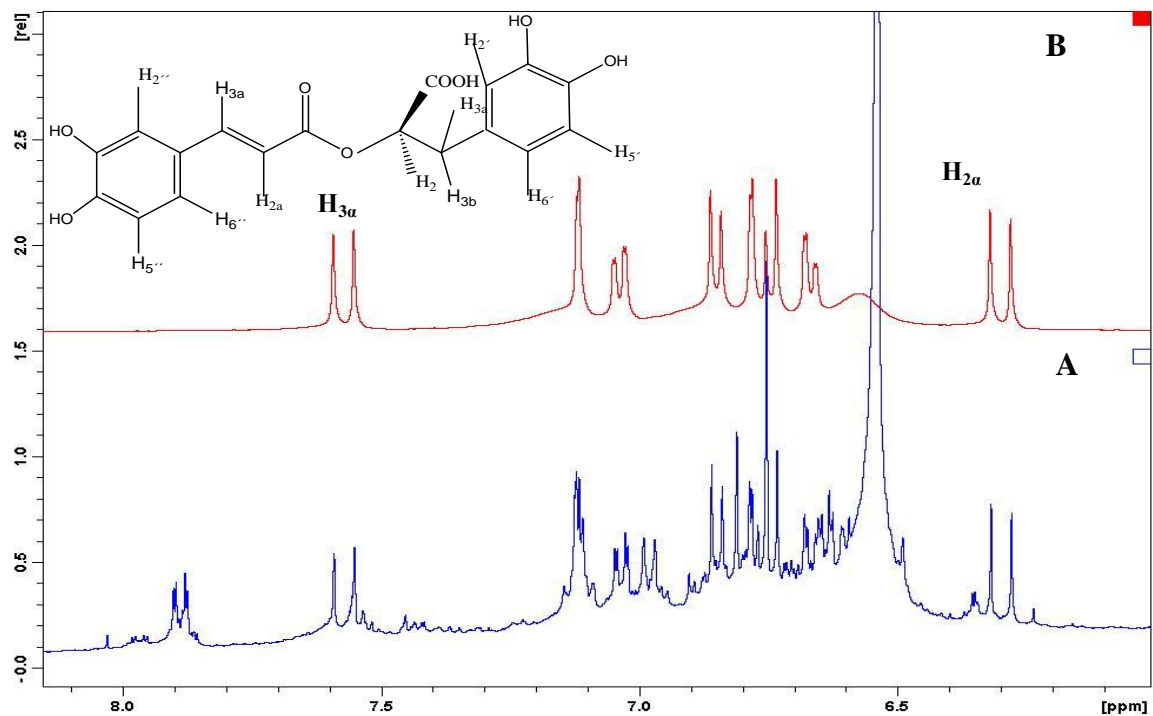
Σχήμα 3.6: Επιλεγμένη περιοχή φάσματος NMR-¹H εκχυλίσματος Δεντ._{0A} με την προσθήκη τζενκουανίνης σε CD₃CN, σε διαφορετικές θερμοκρασίες (NS= 1k, T=258-298 K, t_{exp}=1h & 24min, 400 MHz).



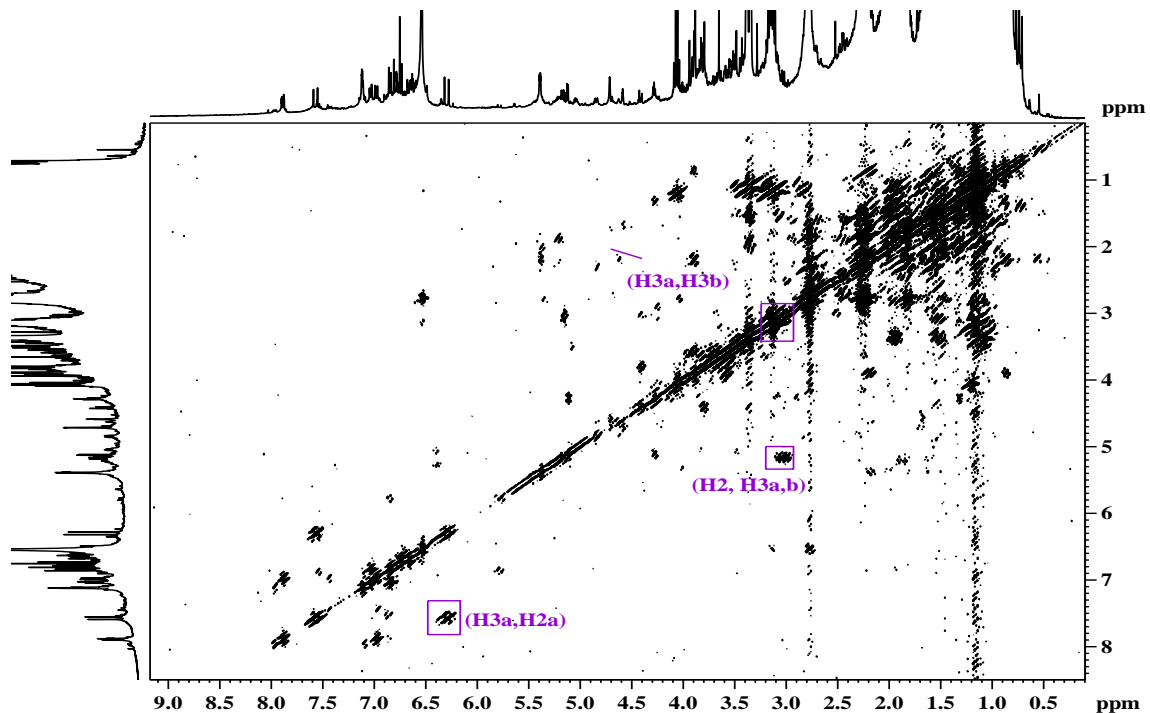
Σχήμα 3.7: Επιλεγμένη περιοχή φάσματος NMR-¹H εκχυλίσματος Δεντ._{0A} σε CD₃CN (A), το ίδιο φάσμα μετά την προσθήκη τζενκουανίνης (B). Η ταυτοποίηση της φλαβόνης υποδηλώνεται με το βέλος (NS= 1k, T=288 K, t_{exp}=1h & 24min, 400 MHz).

Διάφορα φαινολικά οξέα έχουν ταυτοποιηθεί στο δεντρολίβανο, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, όπως το βανιλλικό, το καφεϊκό, το φερουλικό και το ροσμαρινικό οξύ (*Cuvelier et al., 1996, Almela et al., 2006*). Όπως φαίνεται από το Σχήμα 3.3 είναι δυνατή η διάκριση των διπλών κορυφών απορρόφησης στα ~7.5 και ~6.2 ppm με σταθερά σύζευξης $\sim J=16$ Hz, που υποδηλώνονται με βέλη και οι οποίες είναι ιδιαίτερης διαγνωστικής αξίας για την περίπτωση παραγώγων του κινναμωμικού οξέος. Σύμφωνα με προηγούμενη μελέτη της ερευνητικής μας ομάδας εφαρμόστηκε ομοπυρηνική μεθοδολογία COSY/TOCSY και NOESY/ROESY $^1\text{H}-^1\text{H}$ για την ταυτοποίηση των φαινολικών οξέων (*Gerotheranassis et al., 1998*) και για τη διάκριση καφεϊκού και ροσμαρινικού οξέος εφαρμόστηκαν οι τεχνικές DQF-COSY $^1\text{H}-^1\text{H}$, HMQC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ μεταβλητής θερμοκρασίας και HMBC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ (*Exarchou et al., 2001*).

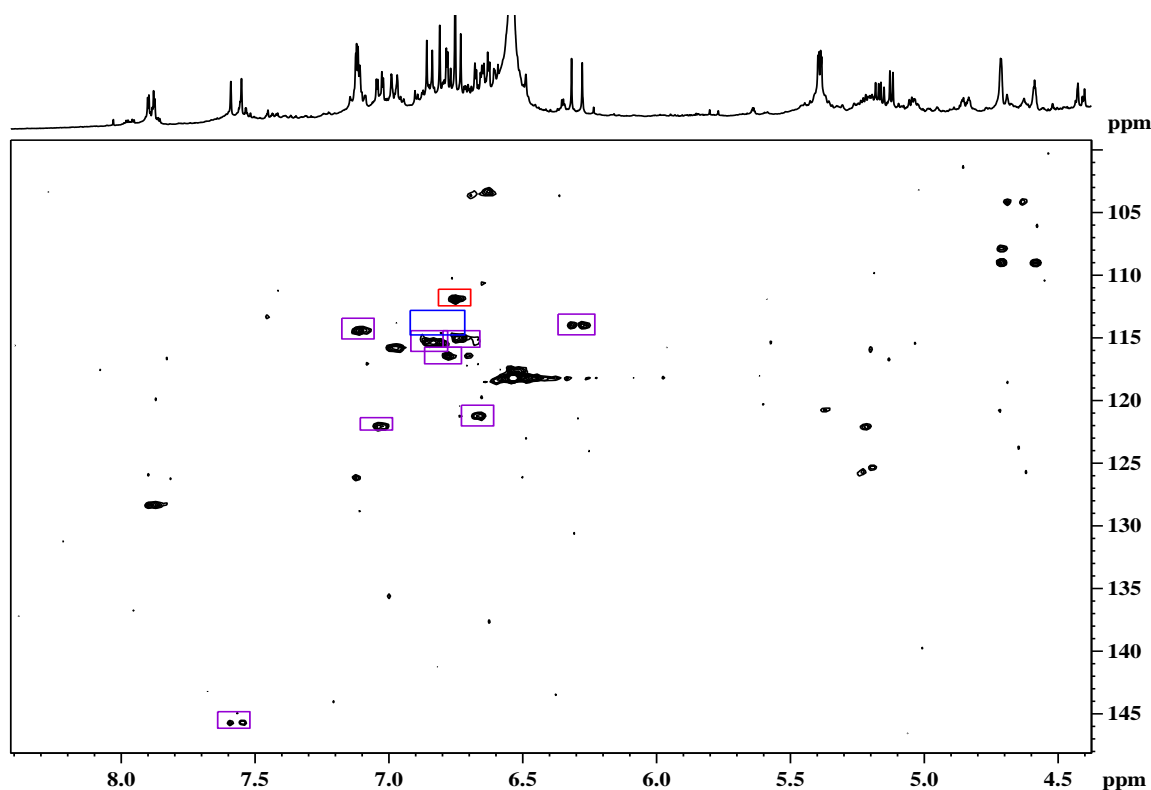
Στο Σχήμα 3.8 παρουσιάζεται επιλεγμένη περιοχή του φάσματος NMR ^1H του ροσμαρινικού οξέος (3.8B) και του εκχυλίσματος Δεντ._{OA} (3.8A). Είναι φανερό ότι αυτό το οξύ υπάρχει στο εκχύλισμα σε υψηλά ποσοστά. Στο Σχήμα 3.9 παρουσιάζονται επιλεγμένες περιοχές του φάσματος COSY $^1\text{H}-^1\text{H}$ του εκχυλίσματος Δεντ._{OA} στην οποία διακρίνεται το σύστημα spin του ροσμαρινικού οξέος. Διαπιστώνεται η παρουσία των διασταυρούμενων κορυφών (H_{3a} , H_{2a}), (H_{3a} , H_{3b}) και (H_2 , $\text{H}_{3a,b}$) του ροσμαρινικού οξέος. Η πιο σημαντική αλληλεπίδραση θεωρήθηκε αυτή μεταξύ των πρωτονίων H_{3a} και H_{2a} των παραγώγων του υδροξυκινναμωμικού οξέος που έχει ιδιαίτερη διαγνωστική αξία, δεδομένου ότι τα οξέα αυτά απαντώνται σε όλα σχεδόν τα φυτά. Στην περιοχή αυτή δεν φαίνονται οι χαρακτηριστικές διασταυρούμενες κορυφές άλλων φαινολικών οξέων. Επίσης, στο Σχήμα 3.10 παρουσιάζεται επιλεγμένη περιοχή του φάσματος HSQC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ του ίδιου εκχυλίσματος, όπου και πάλι υποδηλώνονται οι συζεύξεις του ροσμαρινικού οξέος.



Σχήμα 3.8: Επιλεγμένη περιοχή φάσματος NMR- ^1H εκχυλίσματος Δεντ. $_{0A}$ σε CD_3CN ($NS=2k$, $T=298\text{ K}$, $t_{\text{exp}}=2\text{ h}$ & 48 min , 400 MHz) (A), και του φάσματος NMR- ^1H του ροσμαρινικού οξέος (B).

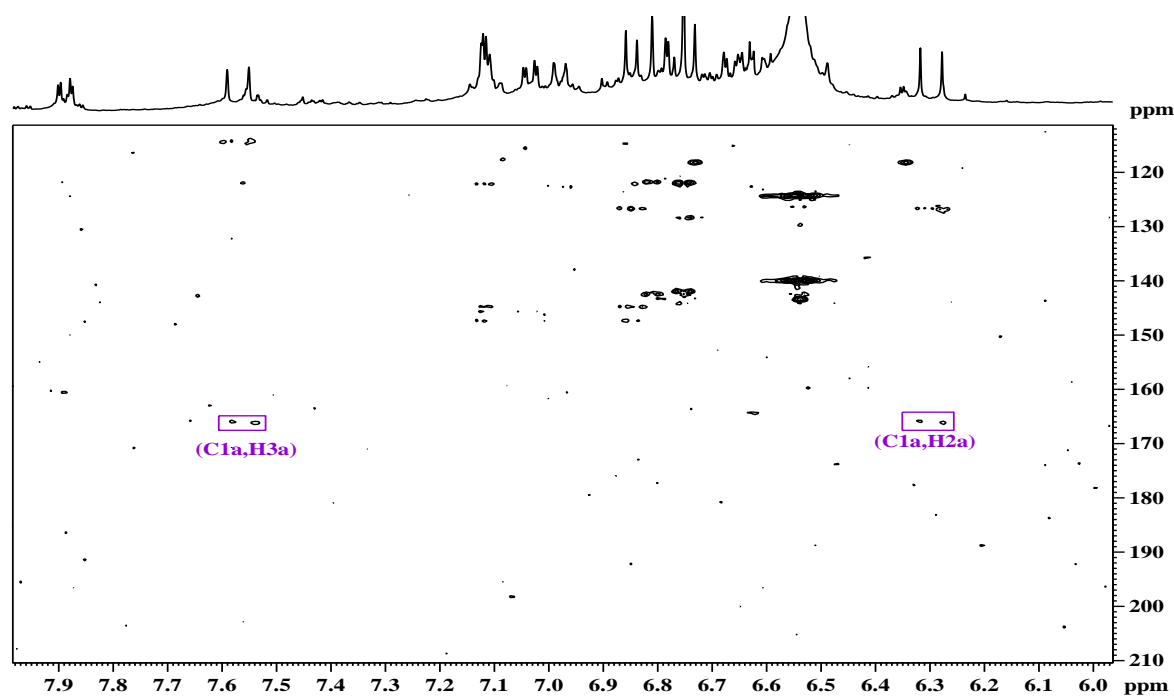


Σχήμα 3.9: Επιλεγμένη περιοχή φάσματος COSY ^1H - ^1H εκχυλίσματος Δεντ. $_{0A}$. Σε μωβ πλαίσιο φαίνονται οι διασταυρούμενες κορυφές των πυρήνων του ροσμαρινικού οξέος ($T=298\text{ K}$, $NS=32$, $t_{\text{exp}}=5\text{ h}$ & 2 min , 400 MHz).



Σχήμα 3.10: Επιλεγμένη περιοχή φάσματος HSQC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ εκχυλίσματος Δεντ. $_{\text{OA}}$. Σε μωβ πλαίσιο φαίνονται οι διασταυρούμενες κορυφές των πυρήνων του ροσμαρινικού οξέος (σε κόκκινο της καρνοσόλης και σε μπλε του καρνοσικού οξέος) ($T=298\text{K}$, $NS=64$, $t_{\text{exp}}=15\text{h} \ \& \ 30\text{min}$, 400MHz).

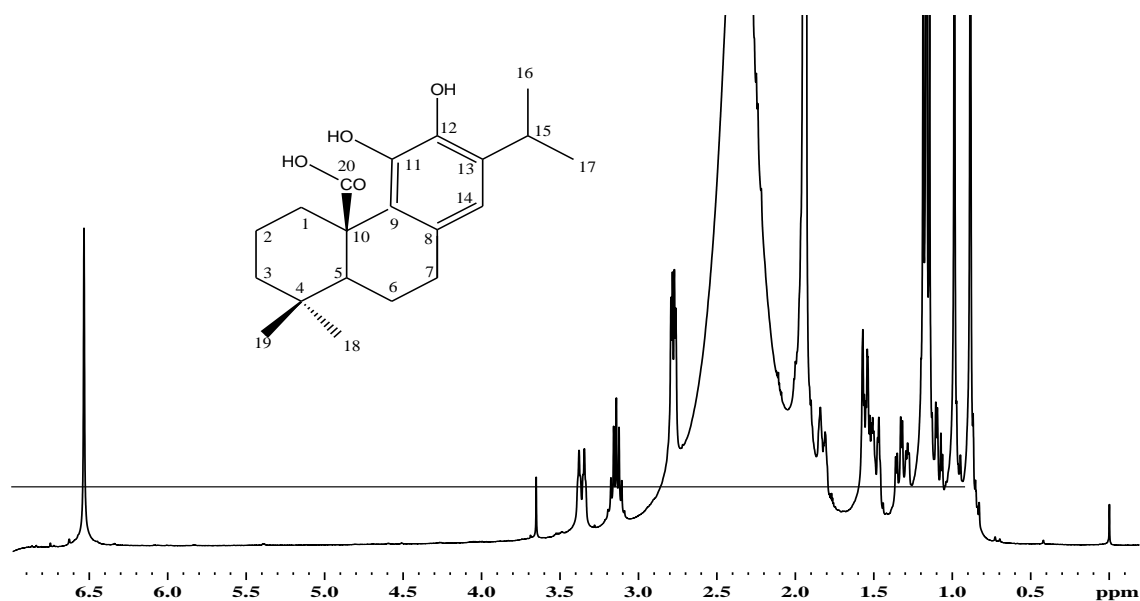
Βέβαια το ροσμαρινικό οξύ, λόγω της παρουσίας δυο φαινολικών δακτυλίων του τύπου του καφεϊκού οξέος, παρουσιάζει τις ίδιες σχεδόν χημικές μετατοπίσεις με το καφεϊκό οξύ τόσο στη φασματοσκοπία NMR ^1H όσο και στη φασματοσκοπία NMR ^{13}C . Στο Σχήμα 3.11 παρουσιάζεται επιλεγμένη περιοχή του φάσματος HMBC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ εκχυλίσματος Δεντ. $_{\text{OA}}$, όπου φαίνεται ότι υπάρχει μόνο το ροσμαρινικό οξύ. Σύμφωνα με τους *Exarchou et al., 2001* η διαφορά των χημικών μετατοπίσεων του εστερικού και του καρβονυλικού άνθρακα $\text{C}_{1\text{a}}$ των δυο οξέων κατά $\sim 3\text{ppm}$, επιφέρει τη σαφή διάκριση των διασταυρούμενων κορυφών ($\text{H}_{2\text{a}}$, $\text{C}_{1\text{a}}$) και ($\text{H}_{3\text{a}}$, $\text{C}_{1\text{a}}$) του καφεϊκού και ($\text{H}_{2\text{a}}$, $\text{C}_{1\text{a}}$) και ($\text{H}_{3\text{a}}$, $\text{C}_{1\text{a}}$) του ροσμαρινικού οξέος, ακόμη και στη θερμοκρασία περιβάλλοντος.



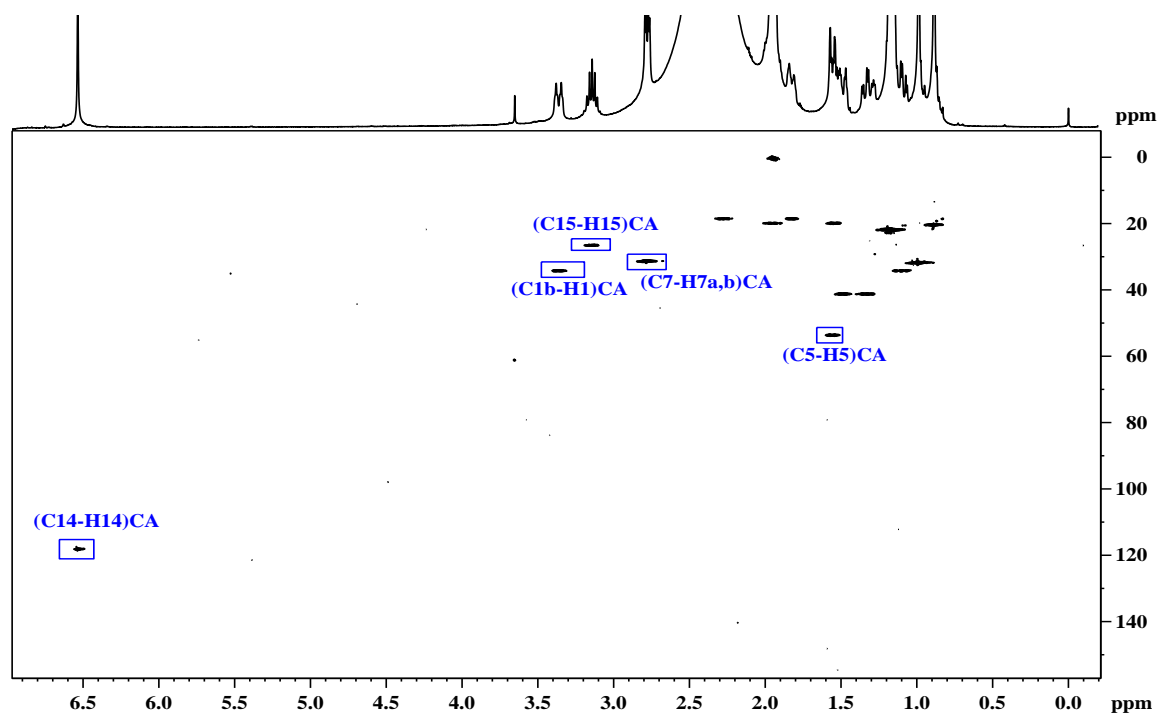
Σχήμα 3.11: Επιλεγμένη περιοχή φάσματος HMBC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ εκχυλίσματος Δεντ.ο.Α, όπου φαίνονται οι διασταυρούμενες κορυφές των (H_{2a} , C_{1a}) και (H_{3a} , C_{1a}) του ροσμαρινικού οξέος ($T=298\text{ K}$, $NS=64$, $t_{exp}=17\text{ h} \ \& \ 42\text{ min}$, 400 MHz).

Έχει αναφερθεί ότι κύρια συστατικά του δεντρολίβανου είναι το καρνοσικό οξύ που το ποσοστό του βρίσκεται μεταξύ 1.7-3.9% των ξηρών φύλλων δεντρολίβανου και η καρνοσόλη που το ποσοστό της φτάνει το 0.2-0.4%, αντίστοιχα (Richheimer et al., 1994). Αρχικά, εφαρμόστηκε η φασματοσκοπία NMR ^1H , HSQC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ και HMBC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ σε πρότυπες ενώσεις καρνοσικού οξέος και καρνοσόλης, προκειμένου να αναγνωριστούν οι διαγνωστικής αξίας κορυφές και διασταυρούμενες κορυφές για την ταυτοποίησή τους στα εκχυλίσματα. Στα Σχήματα 3.12, 3.13 και 3.14 απεικονίζονται τα φάσματα NMR ^1H , HSQC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ και HMBC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$, αντίστοιχα του καρνοσικού οξέος. Στο διδιάστατο χάρτη HSQC υποδηλώνονται οι χαρακτηριστικές διασταυρούμενες κορυφές που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την ταυτοποίηση του καρνοσικού οξέος σε ένα εκχύλισμα (οι συζεύξεις των πρωτονίων H_{14} , $\text{H}_{1\beta}$, $\text{H}_{7\alpha,\beta}$, H_5 και H_{15} με τους αντίστοιχους άνθρακες). Στο διδιάστατο χάρτη HMBC, διαγνωστικής σημασίας είναι οι συζεύξεις μέσω πολλαπλών δεσμών των πρωτονίων H_{14} , H_7 και H_{15} . Το πρωτόνιο H_{14} που συντονίζεται στα 6.54 ppm συζεύγνυται μέσω τριών δεσμών με τους άνθρακες C_{15} (26.0 ppm), C_7 (31.3 ppm), C_9 (123.9 ppm), C_{12} (139.7 ppm). Το πρωτόνιο H_{15} που συντονίζεται στα 3.16 ppm συζεύγνυται μέσω δύο δεσμών με

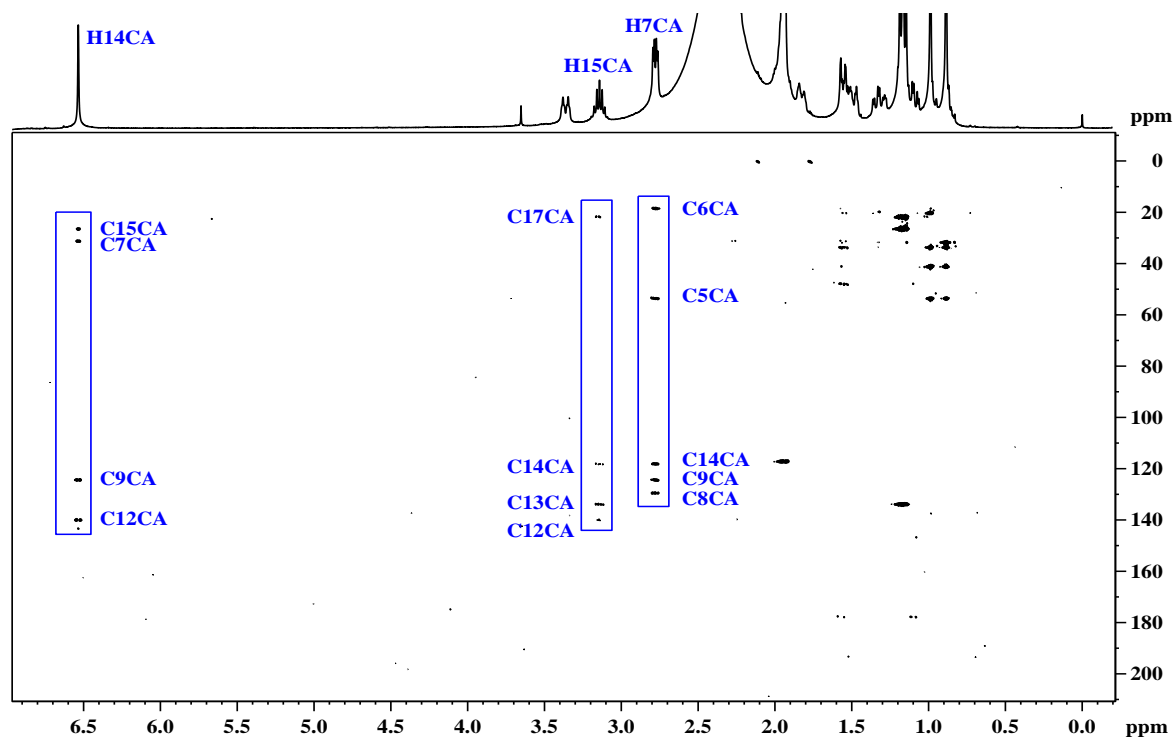
τους πυρήνες C₁₇ (21.9 ppm) και C₁₃ (134.3 ppm) και μέσω τριών δεσμών με τους πυρήνες C₁₄ (118.1 ppm) και C₁₂ (139.7 ppm).



Σχήμα 3.12: Φάσμα NMR-¹H του καρνοσικού οξέος σε CD₃CN (NS= 512, T=298 K, t_{exp}= 1h & 6min, 400 MHz).

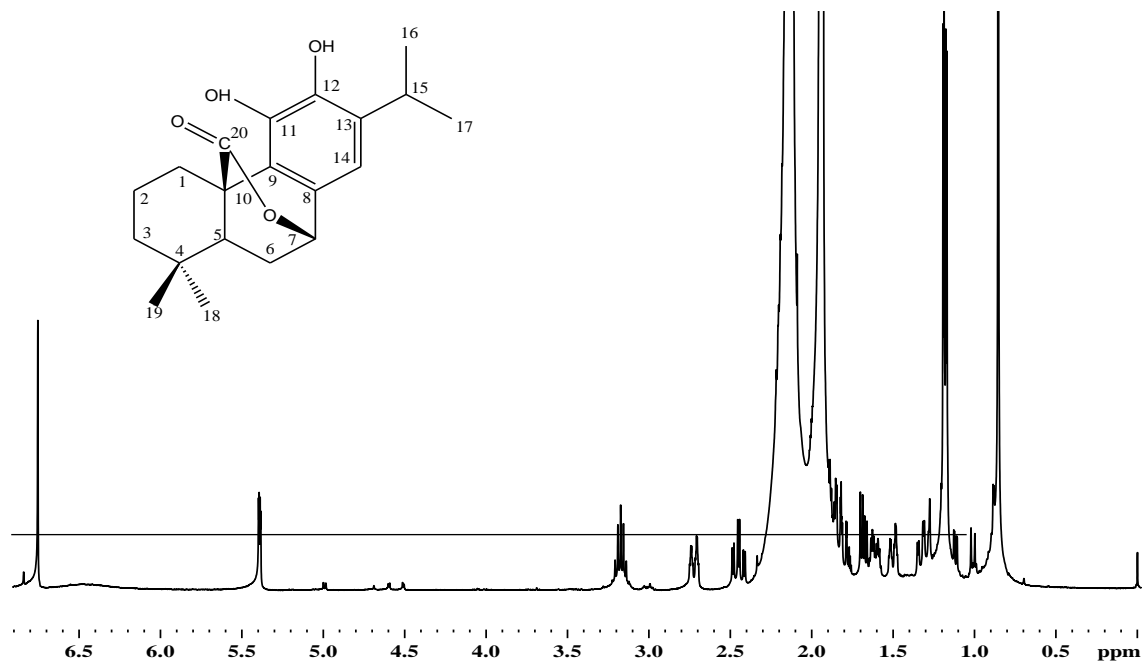


Σχήμα 3.13: Φάσμα HSQC ¹H-¹³C του καρνοσικού οξέος σε CD₃CN (NS= 8, T=298 K, t_{exp}=2h & 8min, 400 MHz).

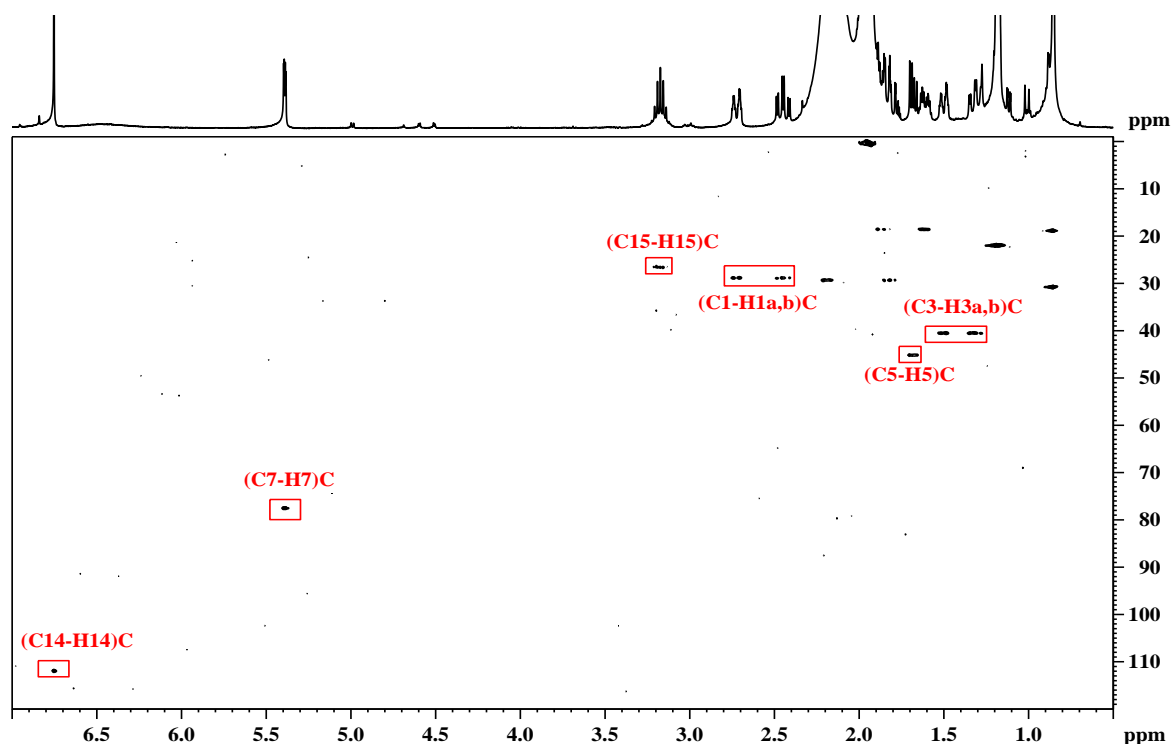


Σχήμα 3.14: Φάσμα HMBC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ του καρνοσικού οξέος σε CD_3CN ($NS=16$, $T=298\text{ K}$, $t_{\text{exp}}=5\text{ h \& 14min}$, 400 MHz).

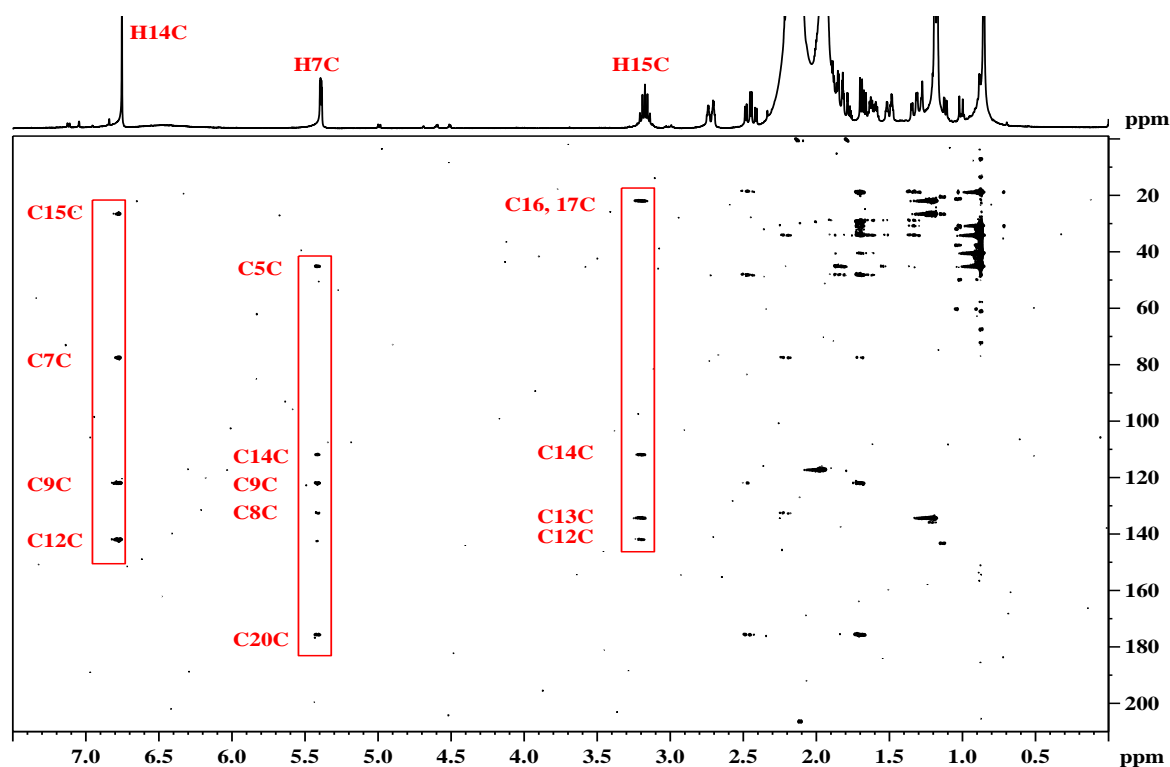
Παρομοίως, στα Σχήματα 3.15, 3.16 και 3.17 απεικονίζονται τα φάσματα NMR ^1H , HSQC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ και HMBC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$, αντίστοιχα της καρνοσόλης. Στο δισδιάστατο χάρτη HSQC υποδηλώνονται οι χαρακτηριστικές διασταυρούμενες κορυφές που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την ταυτοποίηση της καρνοσόλης σε ένα εκχύλισμα. Και αυτές είναι οι συζεύξεις των πρωτονίων H_{14} , $\text{H}_{1\alpha,\beta}$, H_7 , H_5 , $\text{H}_{3\alpha,\beta}$ και H_{15} με τους αντίστοιχους άνθρακες. Στο δισδιάστατο χάρτη HMBC, διαγνωστικής σημασίας είναι οι συζεύξεις μέσω πολλαπλών δεσμών των πρωτονίων H_{14} και H_7 . Το πρωτόνιο H_{14} που συντονίζεται στα 6.75 ppm συζεύγνυται μέσω τριών δεσμών με τους άνθρακες C_{15} (26.3 ppm), C_7 (77.3 ppm), C_9 (121.8 ppm), C_{12} (141.9 ppm). Το πρωτόνιο H_7 που συντονίζεται στα 5.39 ppm συζεύγνυται μέσω τριών δεσμών με τους άνθρακες C_5 (45.2 ppm), C_{14} (111.9 ppm), C_9 (121.8 ppm) και μέσω δύο δεσμών με τους άνθρακες C_8 (132.9 ppm), C_{20} (176.3 ppm).



Σχήμα 3.15: Φάσμα NMR-¹H της καρνοσόλης σε CD₃CN (NS= 256, T=298 K, t_{exp}= 30min, 400 MHz).

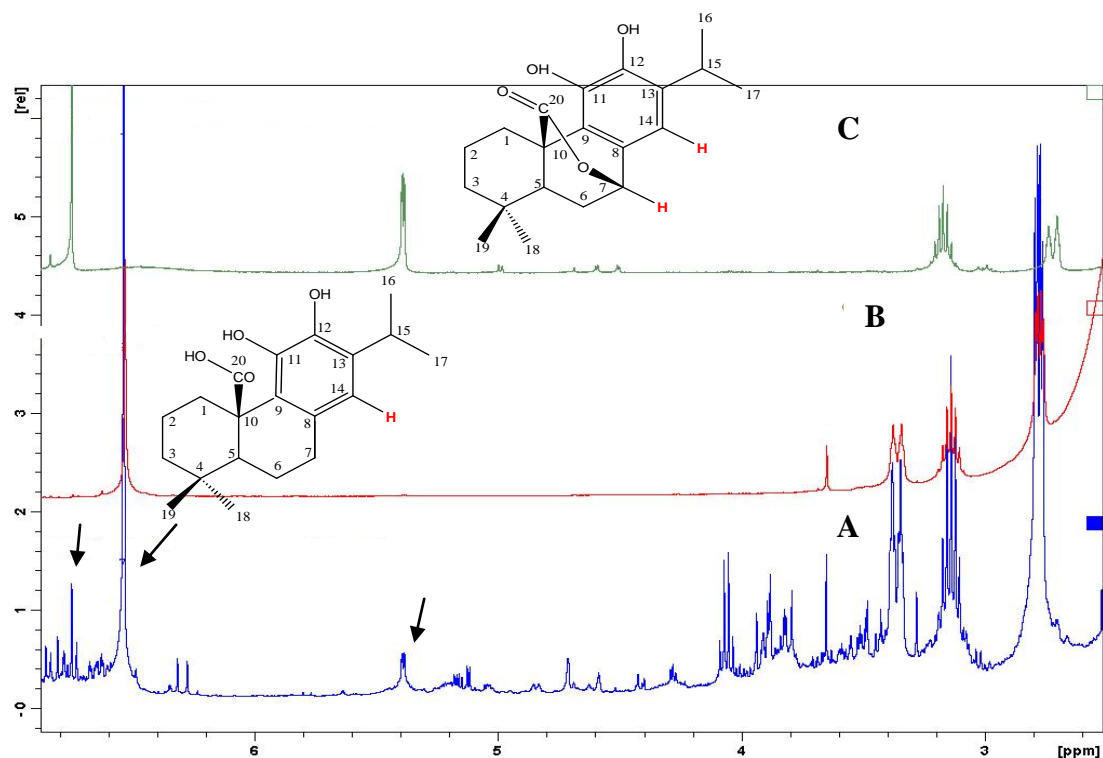


Σχήμα 3.16: Φάσμα HSQC ¹H-¹³C της καρνοσόλης σε CD₃CN (NS= 16, T=298 K, t_{exp}= 4h & 12min, 400 MHz).

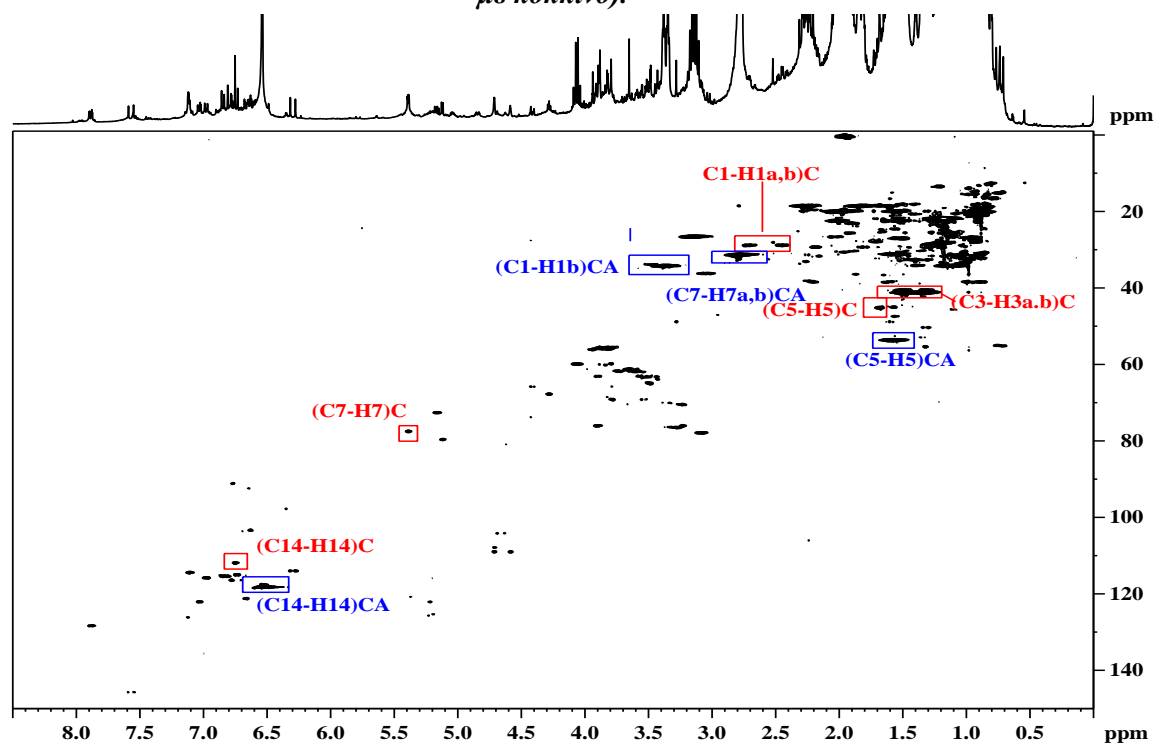


Σχήμα 3.17: Φάσμα HMBC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ της καρνοσόλης σε CD_3CN ($NS=24$, $T=298\text{K}$, $t_{exp}=7\text{h} \ \& \ 36\text{min}$, 400MHz).

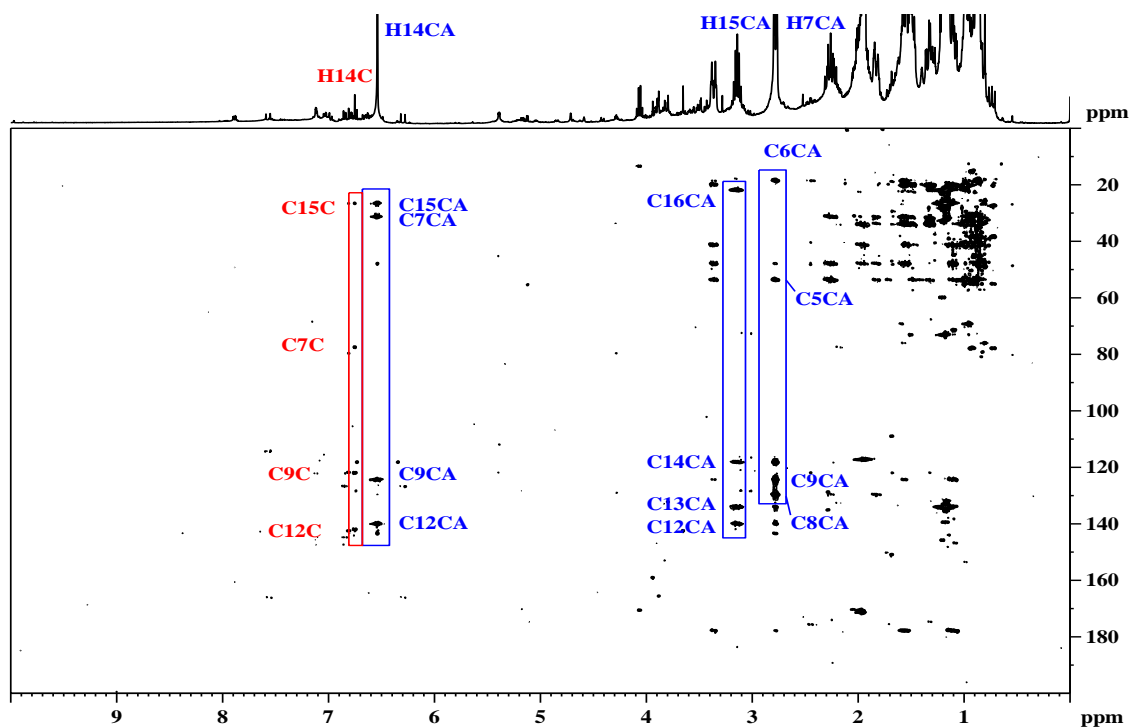
Στο Σχήμα 3.18 παρουσιάζεται επιλεγμένη περιοχή του φάσματος NMR- ^1H του εκχυλίσματος Δεντ.ΟΑ, όπου φαίνεται ότι υπάρχουν οι χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις του πρωτονίου H_{14} , που υποδηλώνεται με βέλος (Σχήμα 3.18B) του καρνοσικού οξέος, καθώς και του πρωτονίου H_{14} και H_7 της καρνοσόλης (Σχήμα 3.18C). Είναι φανερό ότι το καρνοσικό οξύ είναι το κύριο συστατικό του εκχυλίσματος, αλλά και η καρνοσόλη βρίσκεται σε σημαντικά ποσοστά. Η παρουσία τους εντοπίζεται εύκολα στο διδιάστατο χάρτη HSQC και HMBC του εκχυλίσματος (Σχήμα 3.19 & 3.20). Οι συγκεκριμένες συζεύξεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ταυτοποίηση αυτών των ενώσεων σε εκχυλίσματα και σε περίπτωση απουσίας των προτύπων ενώσεων.



Σχήμα 3.18: Επιλεγμένη περιοχή φάσματος $NMR-^1H$ εκχυλίσματος Δεντ. $_{OA}$ σε CD_3CN ($NS= 2k$, $T=298 K$, $t_{exp}= 2h$ & $48min$, $400 MHz$) (A), του φάσματος $NMR-^1H$ του καρνοσικού οξέος (B) και της καρνοσόλης (C). Τα βέλη υποδεικνύουν τις χαρακτηριστικές κορυφές των δύο διστερεών στο εκχύλισμα (στις δομές τα πρωτόνια με κόκκινο).

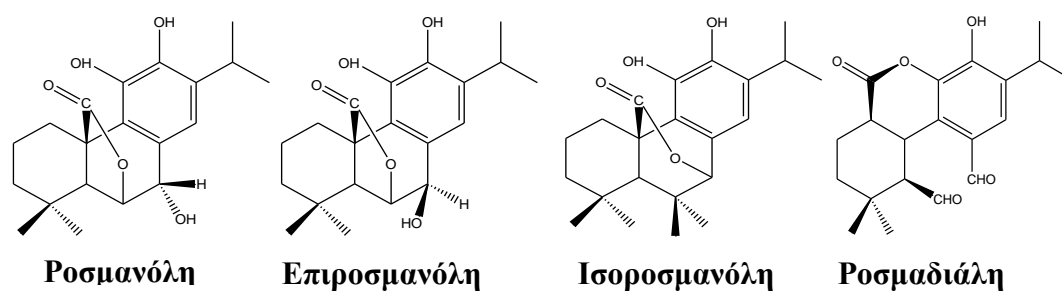


Σχήμα 3.19: Φάσμα $HSQC$ $^1H-^{13}C$ εκχυλίσματος Δεντ. $_{OA}$ σε CD_3CN ($NS= 64$, $T=298 K$, $t_{exp}= 15h$ & $30min$, $400 MHz$).



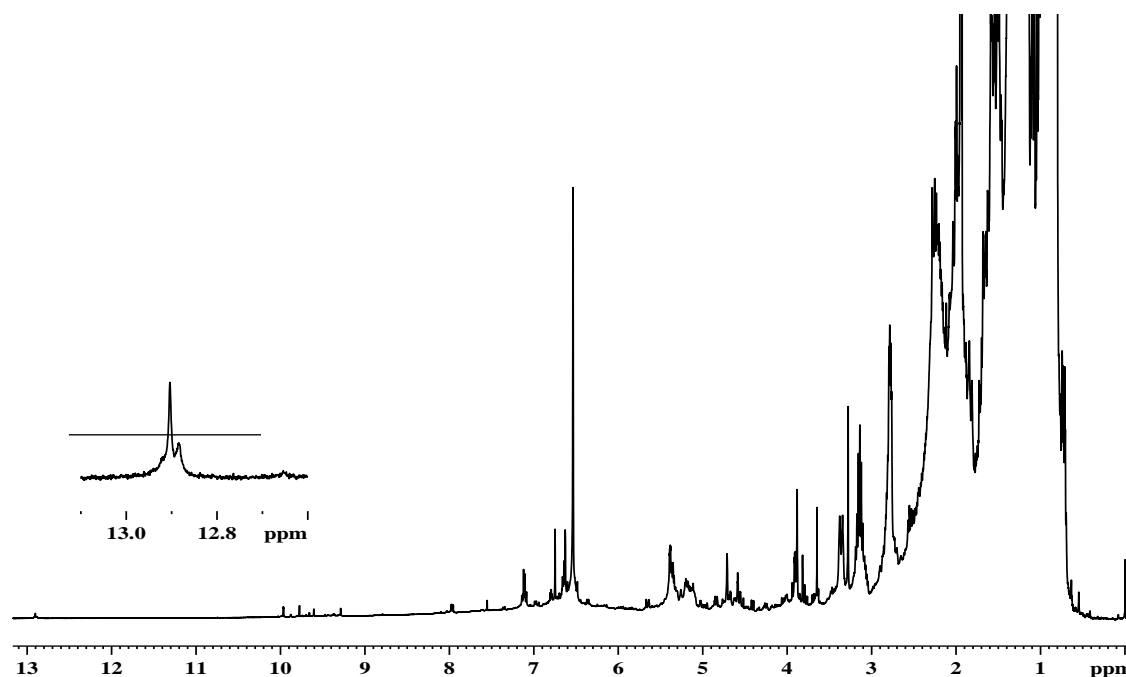
Σχήμα 3.20: Φάσμα HMBC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ εκχυλίσματος Δεντ.οΑ σε CD_3CN ($NS=64$, $T=298\text{ K}$, $t_{\text{exp}}=17\text{ h \& 42min}$, 400 MHz).

Διάφορα άλλα φαινολικά διτερπένια έχουν απομονωθεί από εκχυλίσματα δεντρολίβανου και φασκόμηλου, με δομή γ - και δ - λακτόνης, τα οποία έχει προταθεί ότι προκύπτουν από τη μετατροπή του καρνοσικού οξέος. Για παράδειγμα έχει απομονωθεί και χαρακτηριστεί η ροσμανόλη (Inatani *et al.*, 1982), η επιροσμανόλη και ισοροσμανόλη (Nakatani and Inatani, 1984), η ροσμαδιάλη (Nakatani and Inatani, 1983) και άλλες ενώσεις (Σχήμα 3.21). Οι περισσότερες από αυτές είναι ισομερείς ενώσεις, αλλά εκτός αυτού, τα πρωτοιακά τους NMR φάσματα είναι εξαιρετικά πολύπλοκα, αφού τα περισσότερα πρωτόνια τους συντονίζονται στην περιοχή των μεθυλικών πρωτονίων. Ορισμένες χημικές μετατοπίσεις που βρίσκονται στην αρωματική περιοχή θα μπορούσαν να είναι διαγνωστικής αξίας, αλλά η αρωματική περιοχή του συγκεκριμένου εκχυλίσματος, λόγω και των σημάτων συντονισμού του ροσμαρινικού οξέος παρουσιάζει μεγάλη επικάλυψη.



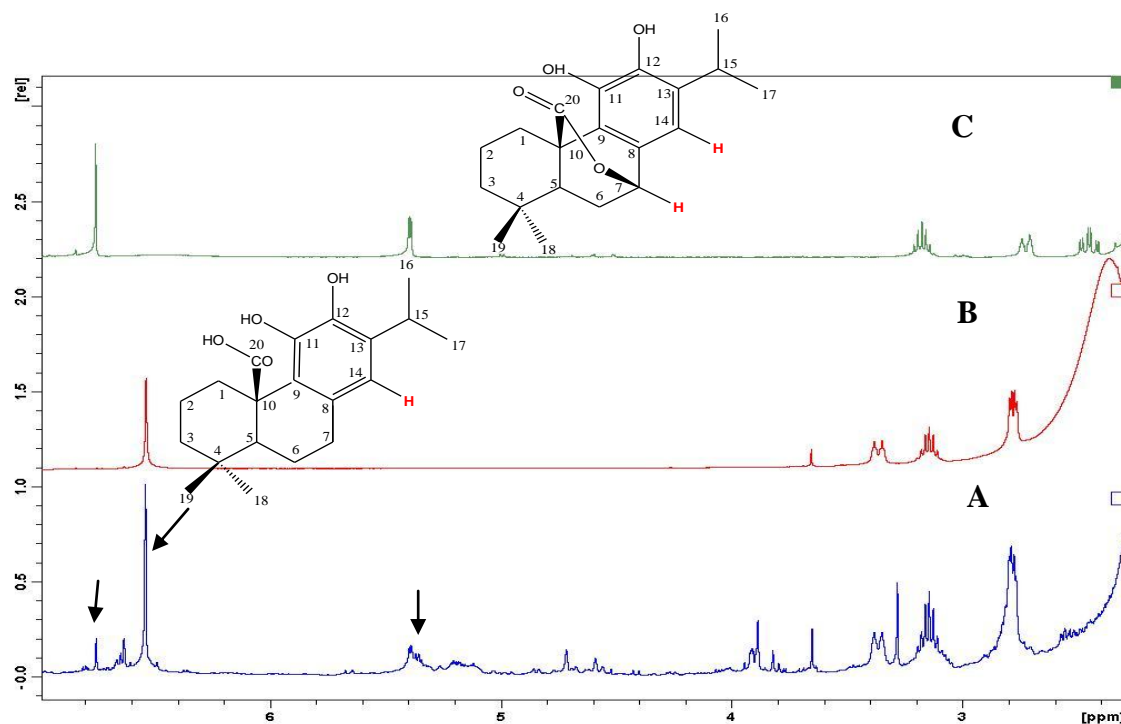
Σχήμα 3.21: Χημικοί τύποι φαινολικών διτερπενίων

Επίσης, μελετήθηκε και το εκχύλισμα Δεντ._E, το οποίο με βάση βιβλιογραφικά δεδομένα αναμένεται να είναι ιδιαίτερα πλούσιο σε διτερπένια. Έγινε η λήψη, αρχικά του φάσματος NMR-¹H μιας διάστασης για το χαρακτηρισμό των κύριων ενώσεων (Σχήμα 3.22). Όπως φαίνεται υπάρχουν στην περιοχή των ~12.9 ppm, πιθανώς δύο σήματα συντονισμού, που θα μπορούσαν να ανήκουν στην τάξη των φλαβονών και των *O*-γλυκοζιτών φλαβόνων. Όπως θα αναμενόταν είναι ήσσονα συστατικά, ενώ το ροσμαρινικό οξύ απουσιάζει από το εκχύλισμα.



Σχήμα 3.22: Φάσμα NMR-¹H εκχυλίσματος Δεντ._E σε CD₃CN (NS= 2k, T=298 K, t_{exp}=2h & 48min, 400 MHz).

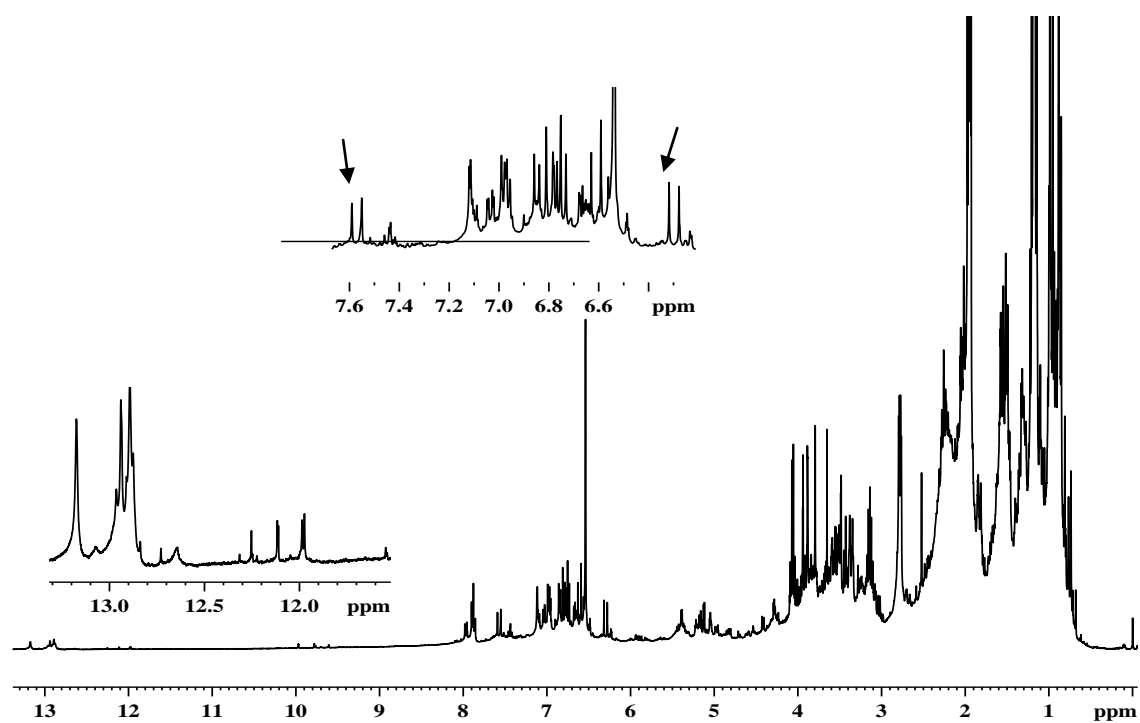
Στο Σχήμα 3.23 παρουσιάζεται επιλεγμένη περιοχή του φάσματος NMR-¹H του εκχυλίσματος Δεντ._Ε, όπου φαίνεται ότι υπάρχουν οι χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις του πρωτονίου H₁₄, που υποδηλώνεται με βέλος (Σχήμα 3.23B) του καρνοσικού οξέος, καθώς και του πρωτονίου H₁₄ και H₇ της καρνοσόλης (Σχήμα 3.23C).



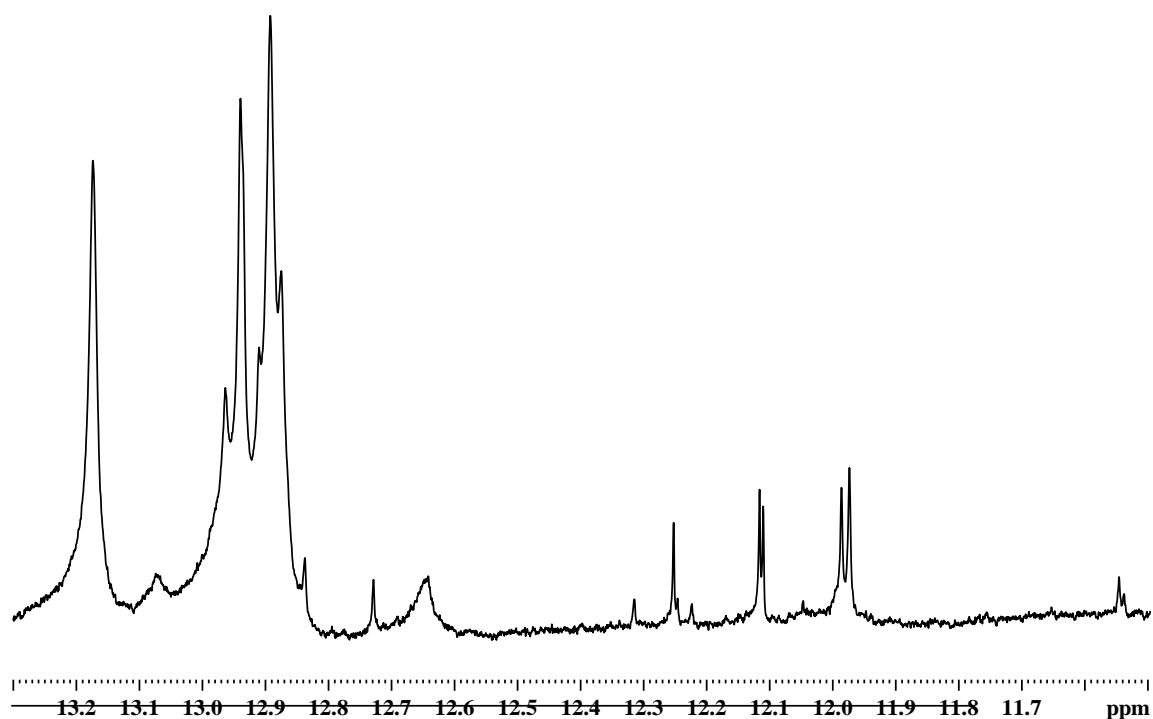
Σχήμα 3.23: Επιλεγμένη περιοχή φάσματος NMR-¹H εκχυλίσματος Δεντ._Ε σε CD₃CN (NS= 2k, T=298 K, t_{exp}= 2h & 48min, 400 MHz) (A), του φάσματος NMR-¹H του καρνοσικού οξέος (B) και της καρνοσόλης (C). Τα βέλη υποδεικνύουν τις χαρακτηριστικές κορυφές των δύο διτερπενίων στο εκχύλισμα (στις δομές τα πρωτόνια απεικονίζονται με κόκκινο).

3.2.2 Εκχυλίσματα φασκόμηλου

Στο Σχήμα 3.24 απεικονίζεται το φάσμα NMR -¹H του εκχυλίσματος Φασκ._{ΟΑ}. Στο Σχήμα 3.25 παρουσιάζεται η επιλεγμένη περιοχή του ίδιου φάσματος στην περιοχή από 11.5 έως 13.3 ppm.

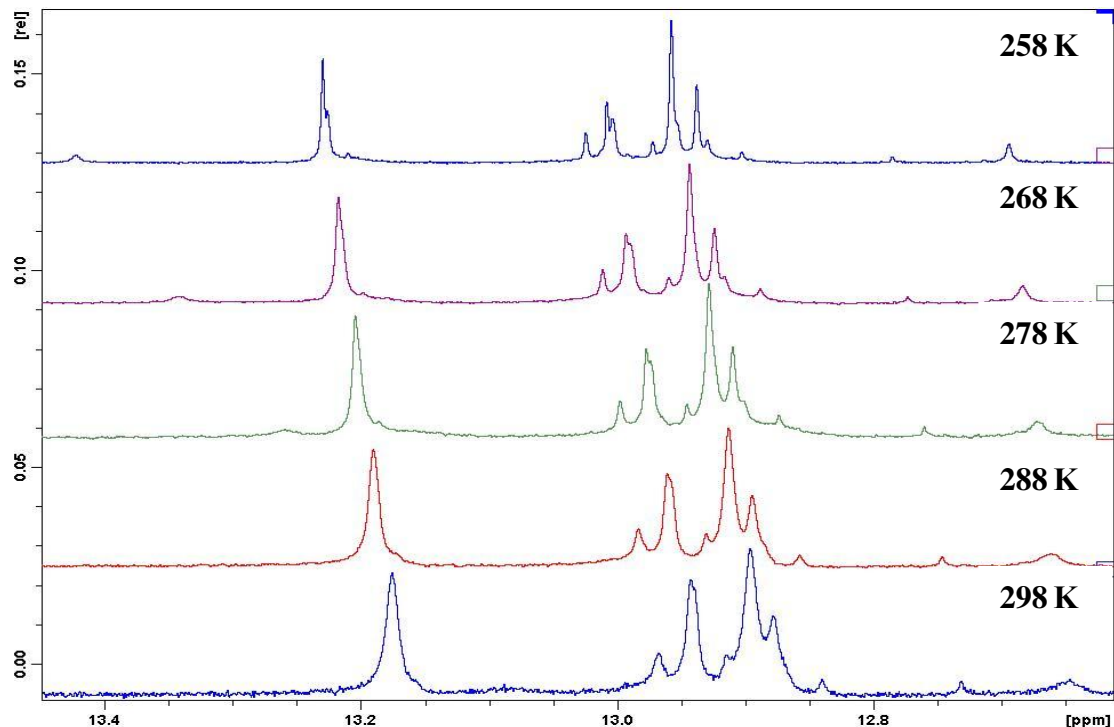


Σχήμα 3.24: Φάσμα NMR-¹H εκγυλίσματος Φασκ.οΑ σε CD₃CN (NS= 2k, T=298 K, t_{exp}= 2h & 46min, 400 MHz). Τα βέλη υποδεικνύουν τις διπλές κορυφές που είναι χαρακτηριστικές της παρουσίας παραγώγων του κινναμωμικού οξέος.

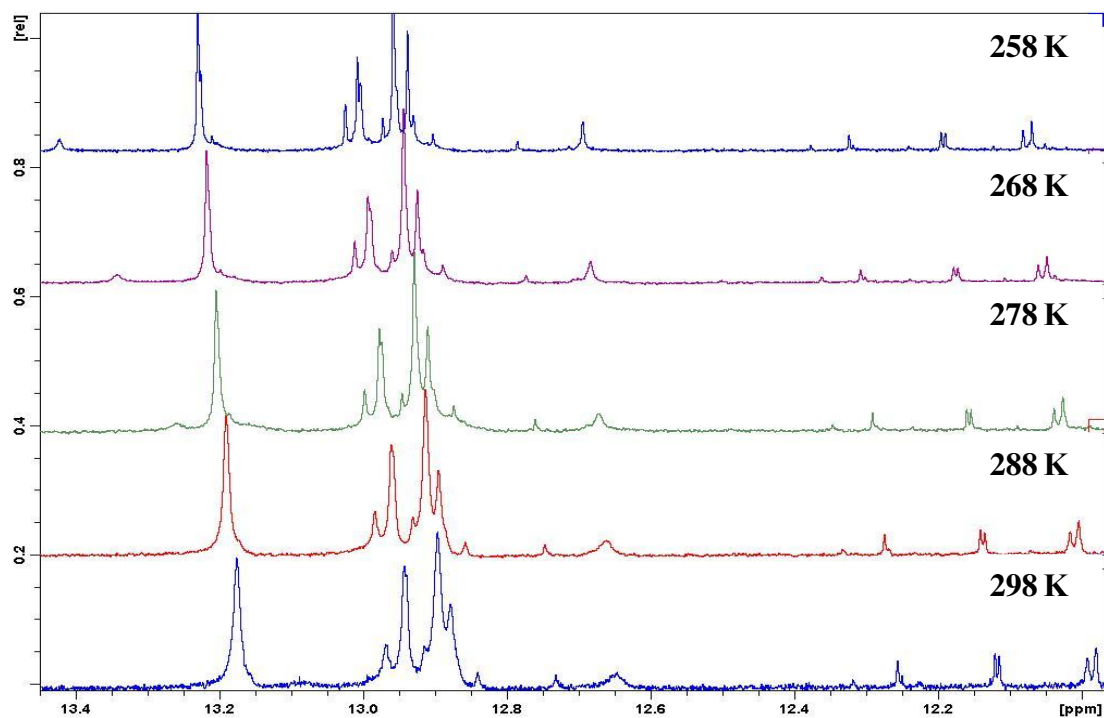


Σχήμα 3.25: Επιλεγμένη περιοχή του φάσματος NMR-¹H του Σχήματος 3.24.

Όπως φαίνεται από το Σχήμα 3.25 υπάρχουν στην περιοχή των ~12.9 ppm, πιθανώς τέσσερα σήματα συντονισμού που αλληλεπικαλύπτονται και μια κορυφή στα 13.17 ppm, που θα μπορούσαν να ανήκουν στην τάξη των φλαβονών. Επίσης, παρατηρούνται δυο διπλές κορυφές στα 11.99 και 12.11 ppm και μια απλή στα 12.32 ppm, που θα μπορούσαν να ανήκουν σε φλαβονόλες και φλαβανόνες. Ακολούθησε η λήψη φασμάτων μεταβλητής θερμοκρασίας του εκχυλίσματος Φασκ._{0A} για ένα εύρος τιμών θερμοκρασίας από 298- 258 K. Στα Σχήματα 3.26 και 3.27 φαίνεται η επίδραση της θερμοκρασίας στη μορφή των σημάτων συντονισμού. Όπως φαίνεται με την ελάττωση της θερμοκρασίας οι κορυφές γίνονται πιο οξείες και στους 258 K παρατηρούνται, στην περιοχή των ~12.9 ppm, επτά σήματα συντονισμού που πριν αλληλεπικαλυπτόταν και πιθανώς αντιστοιχούν στις απορροφήσεις των πρωτονίων των υδροξυλομάδων στη θέση 5 φλαβόνων ή *O*-γλυκοζιτών φλαβόνων. Επίσης, στα ~13.18 ppm στους 258 K διακρίνονται δυο σήματα συντονισμού που πιθανώς αντιστοιχούν στις απορροφήσεις των πρωτονίων των υδροξυλομάδων της θέσης 5 παραγώγων-σακχάρων φλαβόνων (*C*-γλυκοζιτών φλαβόνων).

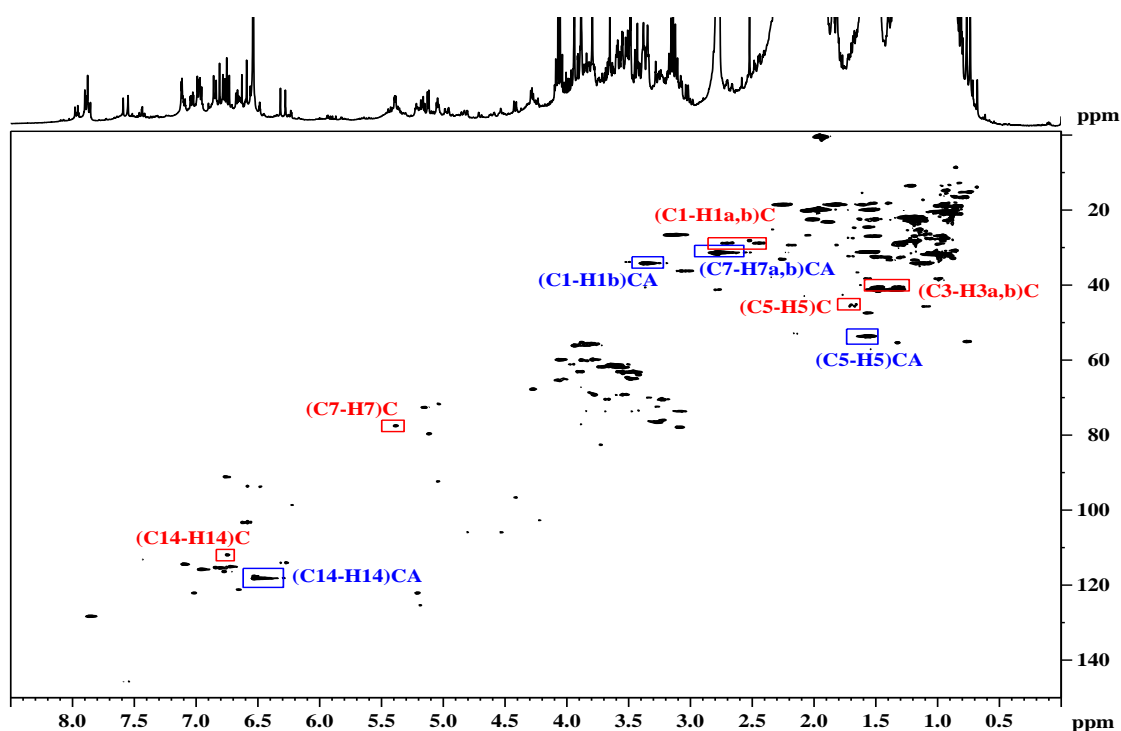


Σχήμα 3.26: Επιλεγμένη περιοχή φάσματος NMR-¹H εκχυλίσματος Φασκ._{0A} σε CD₃CN σε διαφορετικές θερμοκρασίες (NS= 256, T=258- 298 K, *t*_{exp}=21min, 400 MHz).

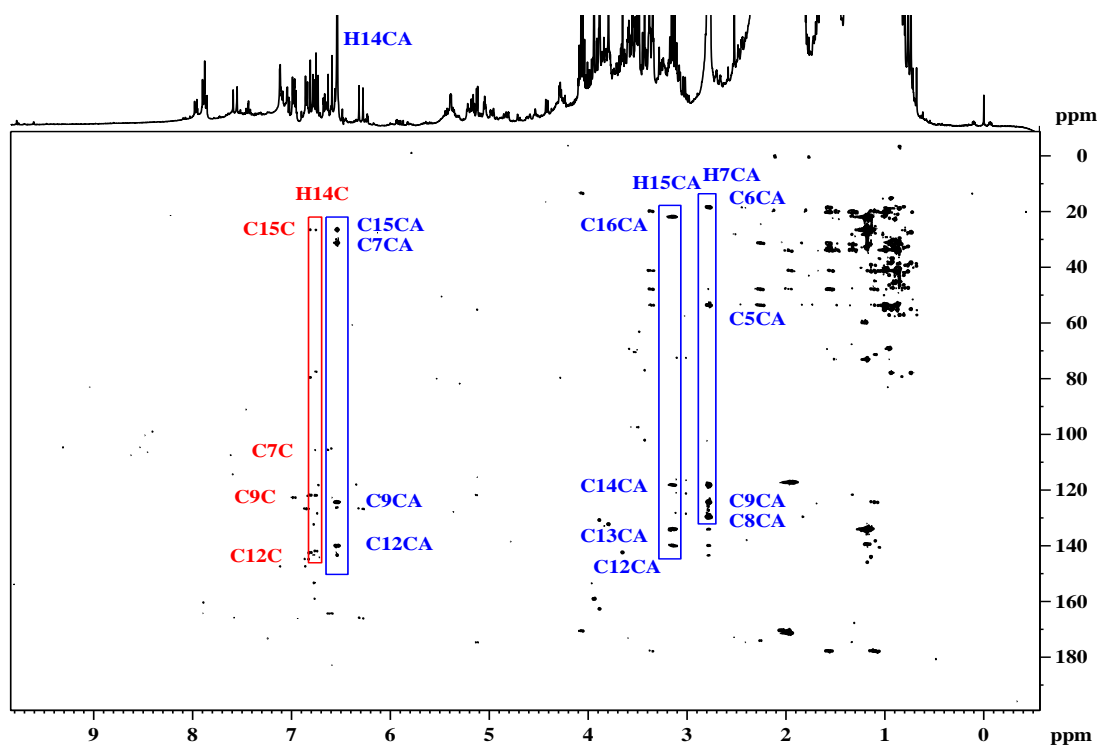


Σχήμα 3.27: Επιλεγμένη περιοχή φάσματος NMR- ^1H εκχυλίσματος Φασκ. $_{0.4}$ σε CD_3CN σε διαφορετικές θερμοκρασίες ($NS=256$, $T=258-298\text{ K}$, $t_{exp}=21\text{ min}$, 400 MHz).

Οι δυο διπλές κορυφές στα 11.99 και 12.11 ppm και η απλή στα 12.32 ppm δεν φαίνεται να επηρεάζονται από την ελάττωση της θερμοκρασίας. Αντίθετα η ευρεία κορυφή στα 12.7 ppm, γίνεται πιο οξεία με αποτέλεσμα να διακρίνεται καλύτερα. Επίσης, στο Σχήμα 3.24 φαίνονται οι χαρακτηριστικές διπλές κορυφές του ροσμαρινικού οξέος. Αλλά και από τις σχετικές περιοχές του φάσματος COSY $^1\text{H}-^1\text{H}$, HSQC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$, HMBC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ αποδεικνύεται ότι είναι το μοναδικό φαινολικό οξύ στο συγκεκριμένο εκχύλισμα. Όσον αφορά τα διτερπένια καρνοσόλη και καρνοσικό οξύ και εδώ βρίσκονται σε υψηλά ποσοστά, όπως προκύπτει από το δισδιάστατο χάρτη HSQC και HMBC του εκχυλίσματος, όπου εντοπίζονται οι χαρακτηριστικές κορυφές διασταύρωσης. (Για το καρνοσικό οξύ ταυτοποιήθηκαν οι συζεύξεις των H_{14} , $\text{H}_{1\beta}$, $\text{H}_{7\alpha,\beta}$, H_5 και H_{15} με τους αντίστοιχους άνθρακες στον χάρτη HSQC και του H_{14} με τους C_{15} , C_7 , C_9 , C_{12} και του H_{15} με τους C_{17} , C_{13} , C_{14} , C_{12} στον χάρτη HMBC. Για την καρνοσόλη ταυτοποιήθηκαν οι συζεύξεις των H_{14} , $\text{H}_{1\alpha,\beta}$, H_7 , H_5 , $\text{H}_{3\alpha,\beta}$ και H_{15} με τους αντίστοιχους άνθρακες στον χάρτη HSQC, και του H_{14} με τους C_{15} , C_7 , C_9 , C_{12} στον αντίστοιχο χάρτη HMBC) (Σχήμα 3.28 & 3.29).

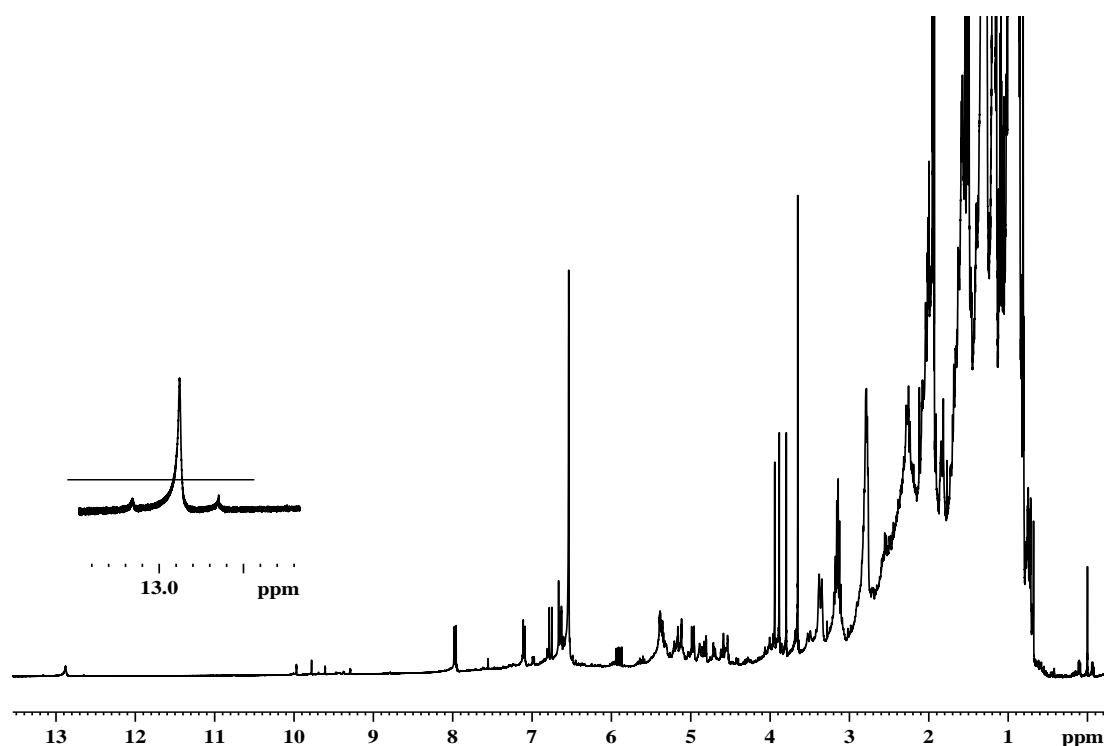


Σχήμα 3.28: Φάσμα HSQC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ εκχυλίσματος Φασκ.ο_A σε CD_3CN ($NS=40$, $T=298\text{ K}$, $t_{\text{exp}}=9\text{ h \& 40min}$, 400 MHz).



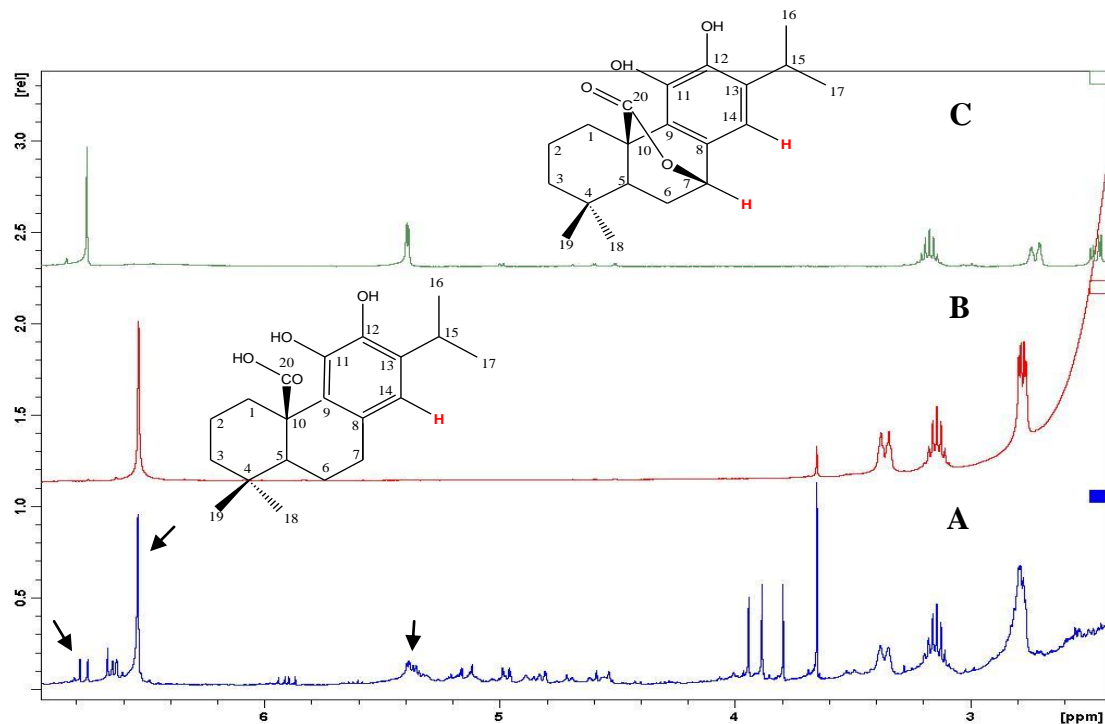
Σχήμα 3.29: Φάσμα HMBC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ εκχυλίσματος Φασκ.ο_A σε CD_3CN ($NS=40$, $T=298\text{ K}$, $t_{\text{exp}}=11\text{ h \& 2 min}$, 400 MHz).

Επιπλέον, μελετήθηκε και το εκχύλισμα Φασκ._E, το οποίο με βάση βιβλιογραφικά δεδομένα αναμένεται να είναι ιδιαίτερα πλούσιο σε διτερπένια. Αρχικά, έγινε η λήψη του φάσματος NMR-¹H μιας διάστασης για το χαρακτηρισμό των κύριων ενώσεων (Σχήμα 3.30). Στην περιοχή των ~12.9 ppm υπάρχει ένα σήμα συντονισμού και εκατέρωθεν αυτού δυο πολύ μικρά, που θα μπορούσαν να ανήκουν στην τάξη των φλαβονών ή των *O*-γλυκοζιτών φλαβόνων. Το ροσμαρινικό οξύ απουσιάζει από το εκχύλισμα.



Σχήμα 3.30: Φάσμα NMR-¹H εκχυλίσματος Φασκ._E σε CD₃CN (NS= 2k, T=298 K, t_{exp} =2h & 46min, 400 MHz).

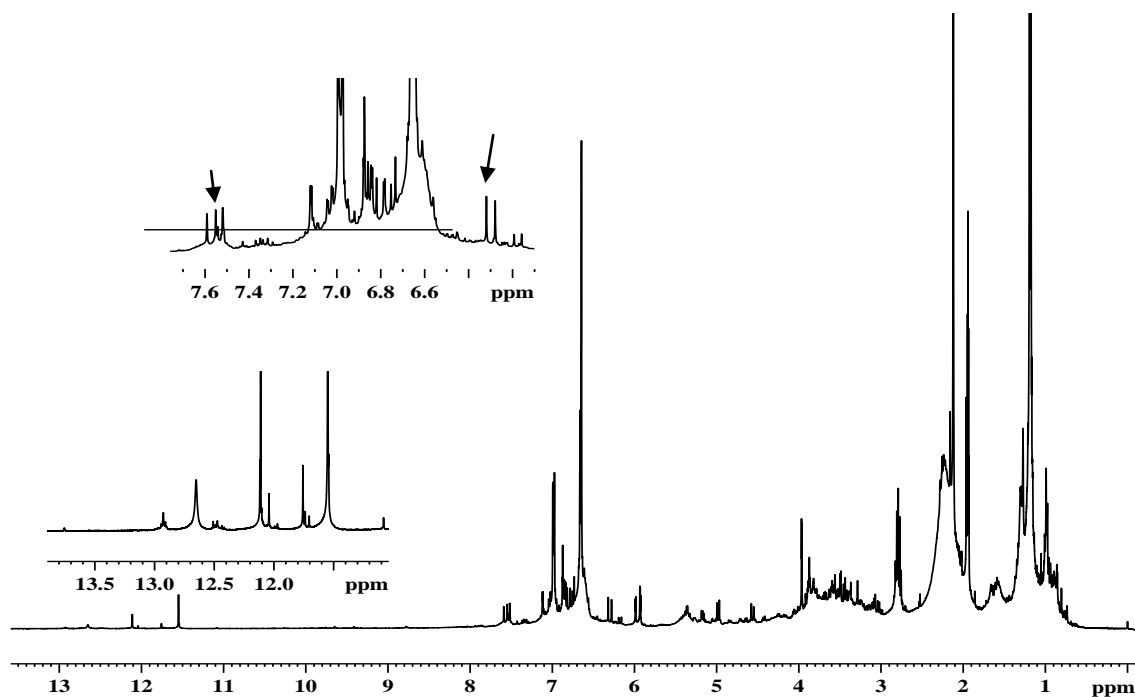
Στο Σχήμα 3.31 παρουσιάζεται επιλεγμένη περιοχή του φάσματος NMR-¹H του εκχυλίσματος Φασκ._E, όπου φαίνεται ότι υπάρχουν οι χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις του πρωτονίου H₁₄, που υποδηλώνεται με βέλος (Σχήμα 3.31B) του καρνοσικού οξέος, καθώς και του πρωτονίου H₁₄ και H₇ της καρνοσόλης (Σχήμα 3.31C).



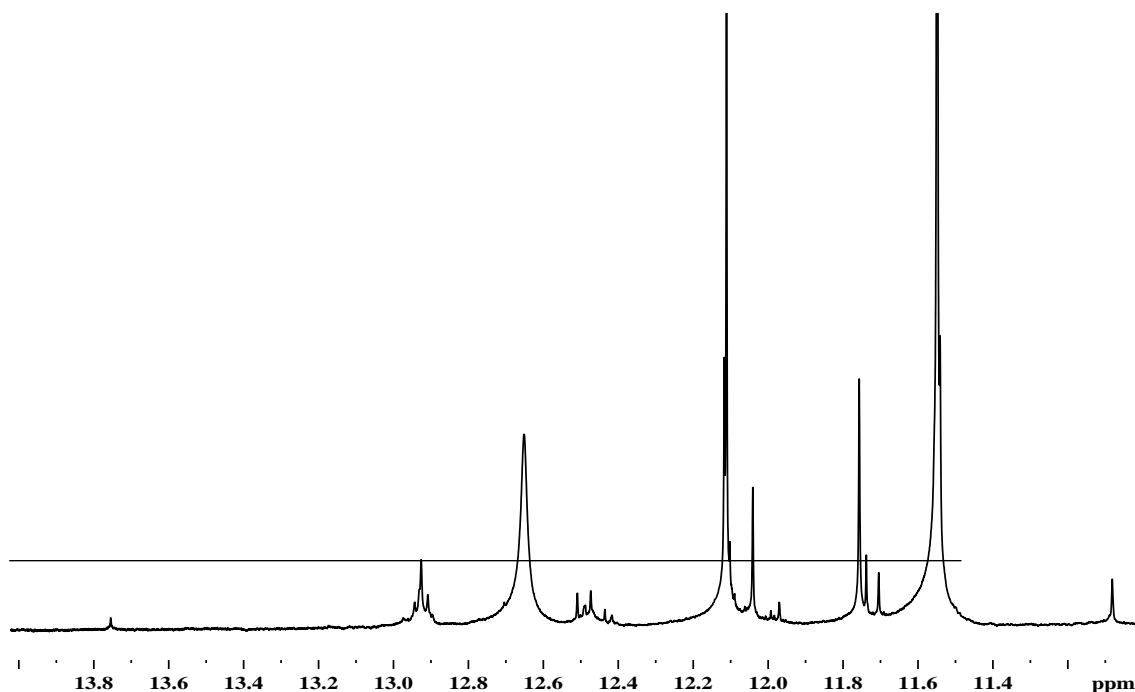
Σχήμα 3.31: Επιλεγμένη περιοχή φάσματος $NMR\text{-}^1H$ εκχυλίσματος Φασκ._E σε CD_3CN ($NS=2k$, $T=298\text{ K}$, $t_{exp}=2h \ \& \ 48min$, 400 MHz) (A), φάσματος $NMR\text{-}^1H$ του καρνοσικού οξέος (B) και της καρνοσόλης (C). Τα βέλη υποδεικνύουν τις χαρακτηριστικές κορυφές των δύο διτερπενίων στο εκχύλισμα (στις δομές τα πρωτόνια υποδηλώνονται με κόκκινο).

3.2.3 Εκχυλίσματα θυμαριού

Τα εκχυλίσματα θυμαριού είναι ιδιαίτερα πλούσια σε φλαβονοειδή, όπως η εριοδικτυόλη (eriodictyol), η ναριγκενίνη (naringenin), η λουτεολίνη, η απιγενίνη και διάφορα παράγωγα τους, η κιρσιμαριτίνη (cirsimaritin), η εσπεριτίνη (hesperetin), η εσπεριδίνη (hesperidin), η κιρσιλινεόλη (cirsilineol) και άλλα (Van den Broucke et al., 1982, Schwarz and Ernst, 1996, Wang et al., 1998). Στο Σχήμα 3.32 απεικονίζεται το φάσμα $NMR\text{-}^1H$ του εκχυλίσματος Θυμ._{ΟΑ} και στο Σχήμα 3.33 δίνεται η επιλεγμένη περιοχή του ίδιου φάσματος στην περιοχή από 11.1 έως 14.0 ppm.

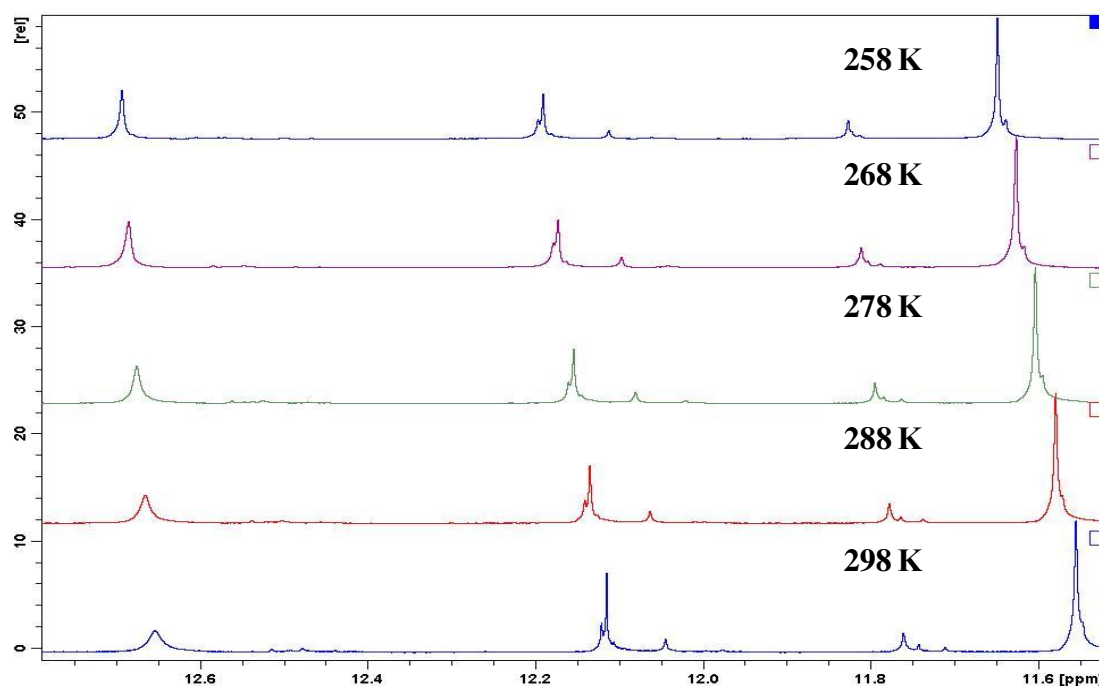


Σχήμα 3.32: Φάσμα $NMR-^1H$ εκχυλίσματος Θυμ.οΑ σε CD_3CN ($NS= 2k$, $T=298 K$, $t_{exp}= 2h \ \& \ 45 \ min$, $400 \ MHz$). Τα βέλη υποδεικνύουν τις διπλές κορυφές που είναι χαρακτηριστικές της παρουσίας παραγώγων του κινναμωμικού οξέος.

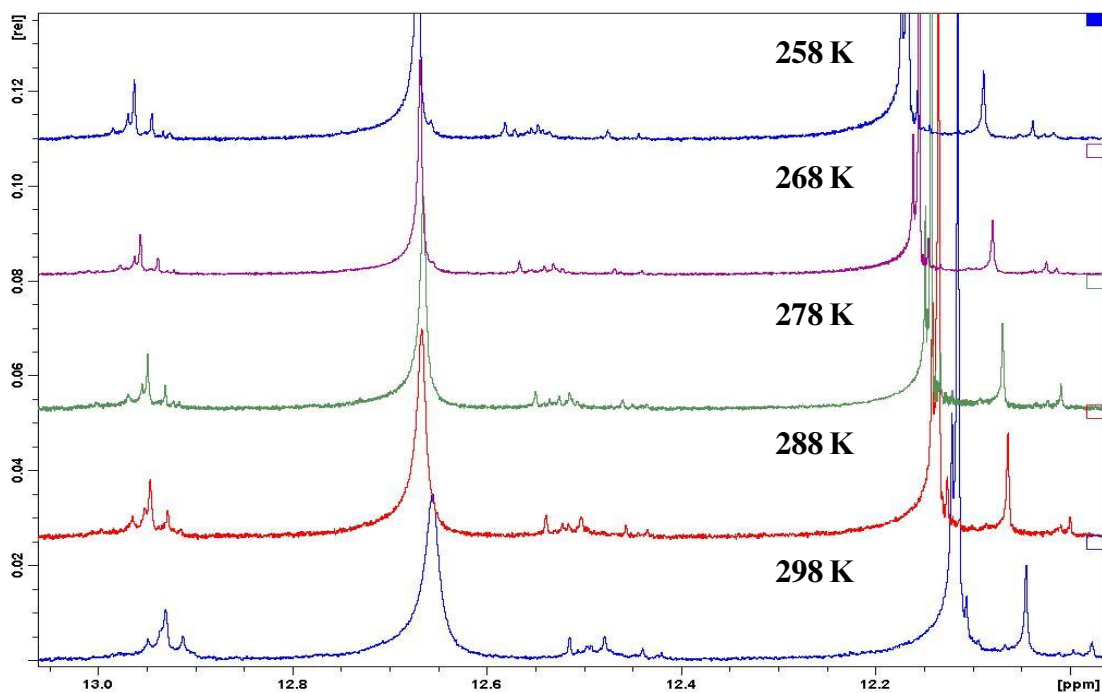


Σχήμα 3.33: Επιλεγμένη περιοχή φάσματος $NMR-^1H$ του Σχήματος 3.32.

Όπως φαίνεται από το Σχήμα 3.33 υπάρχουν διάφορα φλαβονοειδή στο εκχύλισμα, φλαβονόλες και φλαβόνες. Ακολούθησε η λήψη φασμάτων μεταβλητής θερμοκρασίας του εκχυλίσματος Θυμ._{0A} για ένα εύρος τιμών θερμοκρασίας από 298- 258 K. Στα Σχήματα 3.34 και 3.35 φαίνεται η επίδραση της θερμοκρασίας στη μορφή των σημάτων συντονισμού. Όπως αναμένεται με την ελάττωση της θερμοκρασίας οι κορυφές γίνονται πιο οξείες. Τα σήματα συντονισμού στην περιοχή των ~12.15 ppm δεν φαίνονται να διαχωρίζονται καλύτερα με την ελάττωση της θερμοκρασίας ενώ στα ~11.8 ppm στους 258 K παρατηρείται ακόμα μια μικρή κορυφή που πριν αλληλεπικαλυπτόταν.



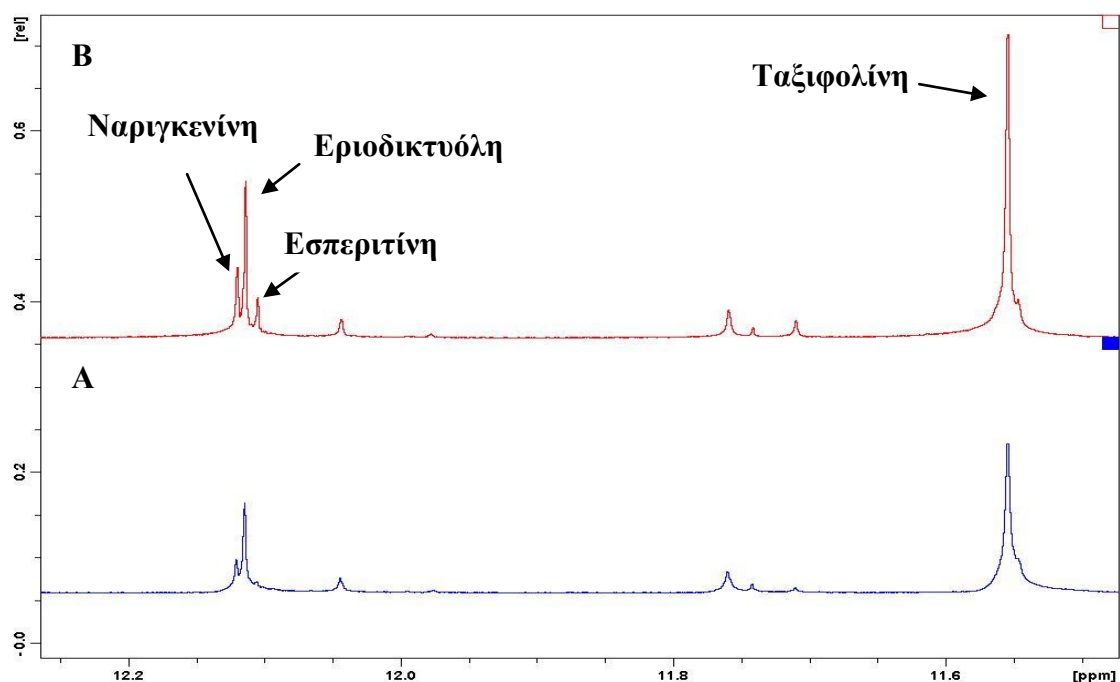
Σχήμα 3.34: Επιλεγμένη περιοχή φάσματος NMR-¹H εκχυλίσματος Θυμ._{0A} σε CD₃CN σε διαφορετικές θερμοκρασίες (NS= 256, T=258- 298 K, t_{exp} =21min, 400 MHz).



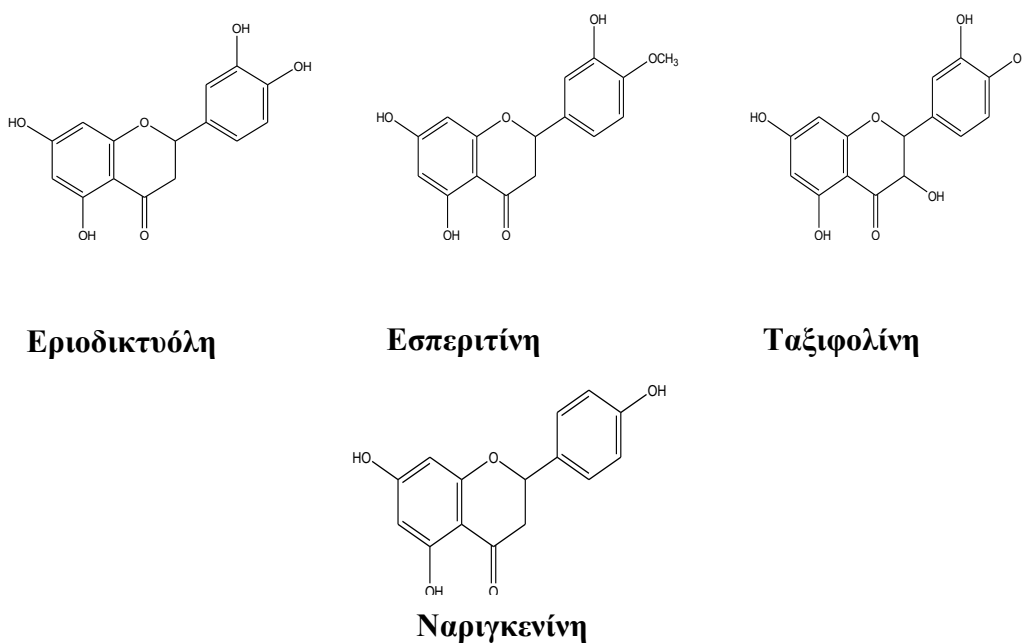
Σχήμα 3.35: Επιλεγμένη περιοχή φάσματος NMR-¹H εκχυλίσματος Θυμ._{OA} σε CD₃CN σε διαφορετικές θερμοκρασίες (NS= 256, T=258- 298 K, t_{exp} =21min, 400 MHz).

Με υπέρθεση του φάσματος NMR -¹H του εκχυλίσματος με τα αντίστοιχα πρότυπων ενώσεων φλαβονοειδών (που ελήφθησαν στο ίδιο όργανο και με τις ίδιες συνθήκες), οι οποίες έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία ως συστατικά εκχυλισμάτων θυμαριού διαπιστώθηκε ότι, πιθανώς, η εριοδικτυόλη, η εσπεριτίνη, η ναριγκενίνη και η ταξιφολίνη υπάρχουν στο εκχύλισμα. Επειδή οι απορροφήσεις των πρωτονίων των υδροξυλομάδων στη θέση 5 της εριοδικτυόλης, εσπεριτίνης και ναριγκενίνης είναι πολύ κοντά παρασκευάστηκε μίγμα τους (σε αναλογία 1:2:4 αντίστοιχα) και έγινε η λήψη του φάσματος NMR -¹H του σε διαφορετικές θερμοκρασίες (T= 305- 258 K), με σκοπό να διαπιστωθεί αν είναι εφικτός ο διαχωρισμός και η ανίχνευσή τους σε μίγμα. Προκειμένου να διαπιστωθεί η παρουσία τους, προστέθηκε μικρή ποσότητα διαλύματός τους, σε δευτεριωμένο ακετονιτρίλιο, στο εκχύλισμα για την ενίσχυση του σήματος (μέθοδος «spiking») και ακολούθησε η λήψη των φασμάτων σε εύρος τιμών θερμοκρασίας από 298- 258 K. Εκτός από την ταξιφολίνη που προστέθηκε μαζί με την εριοδικτυόλη, οι υπόλοιπες προστέθηκαν μία κάθε φορά, καθώς οι απορροφήσεις της συγκεκριμένης υδροξυλομάδας τους είναι πολύ κοντά. Στο Σχήμα 3.36 παρουσιάζεται επιλεγμένη περιοχή του φάσματος NMR -¹H του εκχυλίσματος Θυμ._{OA} πριν και μετά την

προσθήκη της εσπεριτίνης, εριοδικτυόλης, ναριγκενίνης και ταξιφολίνης στους 298 Κ. Στο σχήμα 3.37 απεικονίζονται οι χημικοί τύποι των флаβονοειδών.

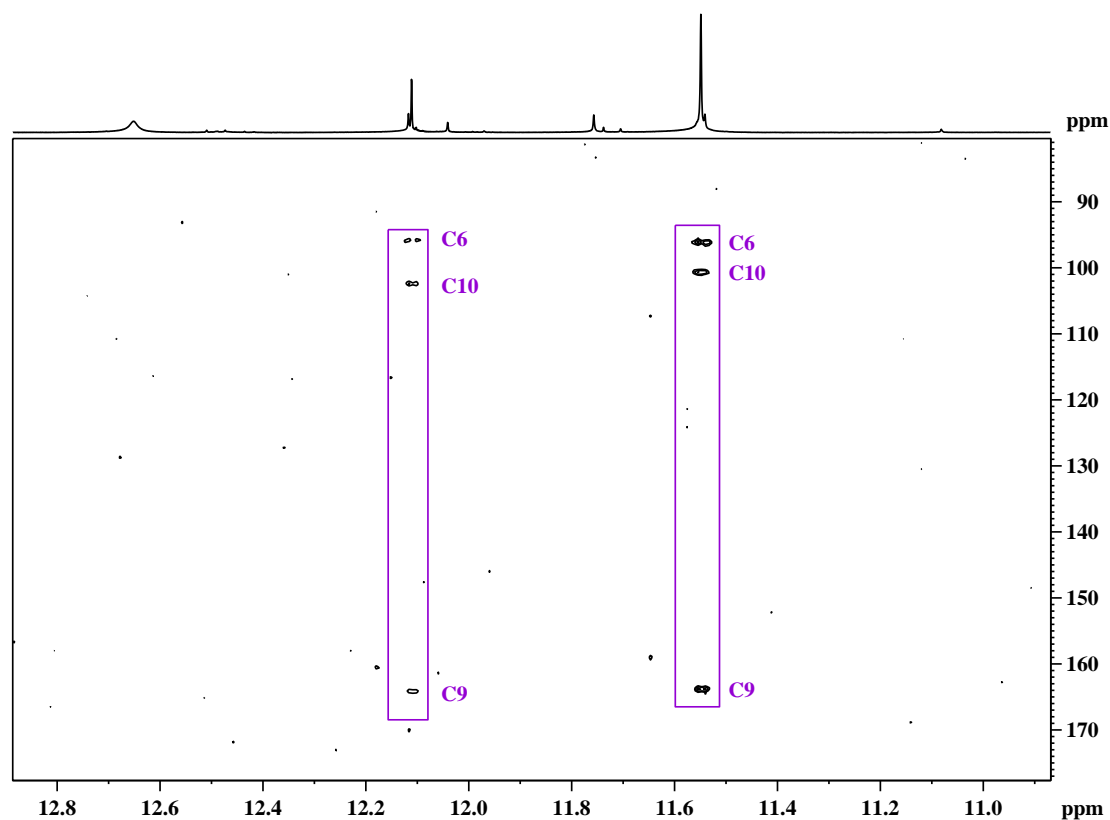


Σχήμα 3.36: Επιλεγμένη περιοχή φάσματος $NMR-^1H$ εκχυλίσματος $\Theta\upsilon\mu.0A$ σε CD_3CN (A), το ίδιο φάσμα μετά την προσθήκη εσπεριτίνης, εριοδικτυόλης, ναριγκενίνης και ταξιφολίνης (B). Η ταυτοποίηση των флаβονοειδών υποδηλώνεται με το βέλος (NS= 256, T=298 K, t_{exp} =21min, 400 MHz).



Σχήμα 3.37: Χημικοί τύποι флаβονοειδών που ταυτοποιήθηκαν στο εκχύλισμα $\theta\upsilon\mu\alpha\rho\iota\upsilon\delta\upsilon$.

Η παρουσία της ταξιφολίνης και της εριοδικτυόλης, που όπως υποδεικνύεται και από το ύψος των αντίστοιχων κορυφών (5- OH ομάδας) βρίσκονται σε σημαντικά επίπεδα σε σχέση με τα άλλα συστατικά, μπορεί να επιβεβαιωθεί και από το φάσμα HMBC του εκχυλίσματος (Σχήμα 3.38). Στο δισδιάστατο χάρτη HMBC η υδροξυλομάδα στη θέση 5 στα ~12.11 ppm της εριοδικτυόλης εμφανίζει σύζευξη 2J με έναν άνθρακα στα 95.6 ppm που αντιστοιχεί στον C₆, ένα τεταρτοταγές άτομο άνθρακα στα 102.3 ppm που αντιστοιχεί στον C₁₀ και σύζευξη 3J με έναν άνθρακα στα 164.12 ppm που αντιστοιχεί στον άνθρακα C₉. Αντίστοιχα, η υδροξυλομάδα στη θέση 5 στα 11.56 ppm της ταξιφολίνης εμφανίζει σύζευξη 2J με έναν άνθρακα στα 95.6 ppm που αντιστοιχεί στον C₆, ένα άτομο άνθρακα στα 99.9 ppm που αντιστοιχεί στον C₁₀ και σύζευξη 3J με έναν άνθρακα στα 164.12 ppm που αντιστοιχεί στον C₉.

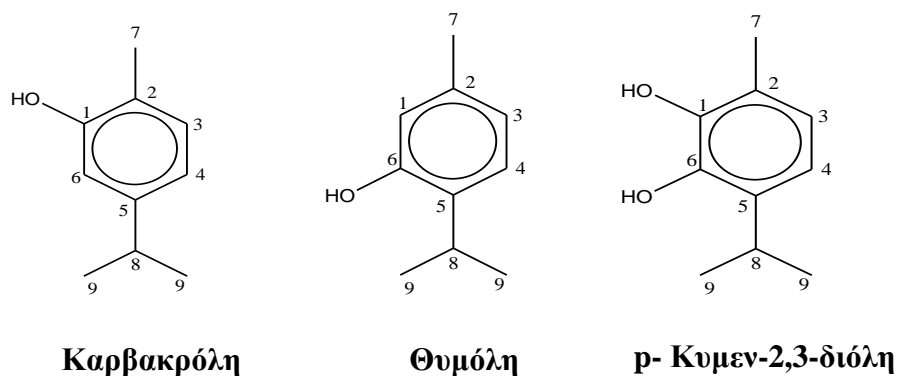


Σχήμα 3.38: Επιλεγμένη περιοχή φάσματος HMBC ^1H - ^{13}C εκχυλίσματος Θυμ.οΑ σε CD_3CN ($NS=32$, $T=298\text{ K}$, $t_{\text{exp}}=8\text{ h \& } 49\text{ min}$, 400 MHz).

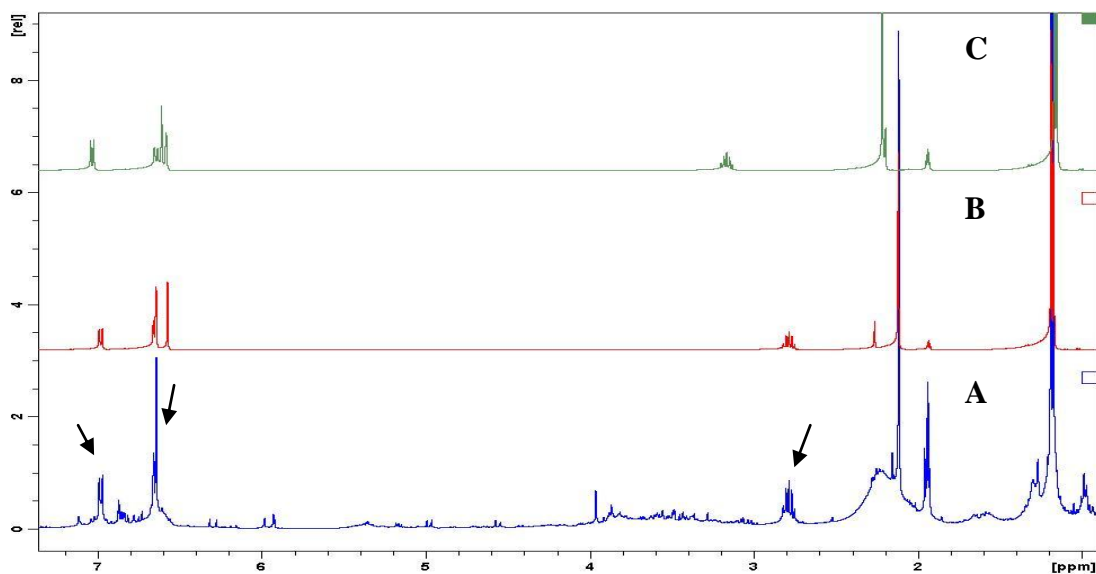
Στο Σχήμα 3.32 φαίνονται οι χαρακτηριστικές διπλές κορυφές του ροσμαρινικού οξέος. Επίσης, από τις σχετικές περιοχές του φάσματος COSY ^1H -

^1H , HSQC ^1H - ^{13}C , HMBC ^1H - ^{13}C αποδεικνύεται ότι είναι το μοναδικό φαινολικό οξύ στο συγκεκριμένο εκχύλισμα.

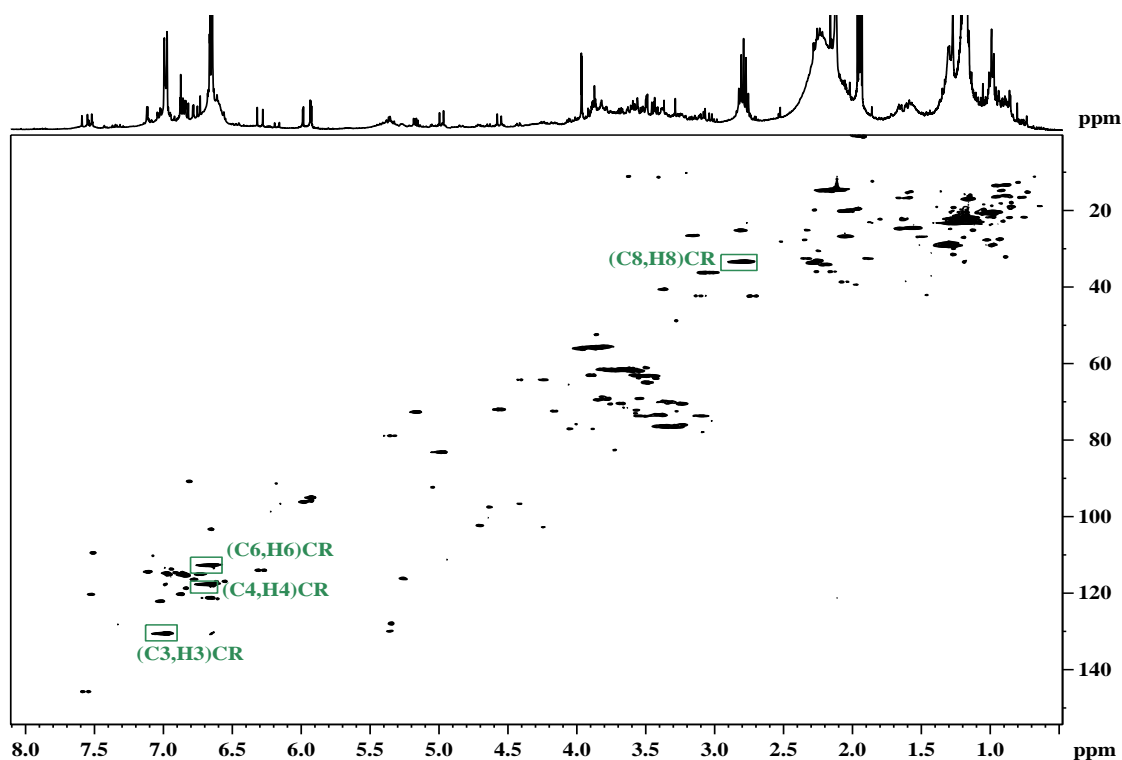
Κύρια συστατικά του αιθέριου ελαίου θυμαριού είναι η καρβακρόλη και η θυμόλη, που είναι ισομερή θέσης, ενώ έχει απομονωθεί και η *para*-κυμεν-2,3-διόλη (Σχήμα 3.39). Τα αιθέρια έλαια, διακρίνονται σε δυο κατηγορίες, πλούσια σε καρβακρόλη ή σε θυμόλη (Schwarz and Ernst, 1996). Η καρβακρόλη φαίνεται να είναι το κύριο συστατικό του εκχυλίσματος Θυμ.ΟΑ, όπως προκύπτει μετά από σύγκριση του φάσματος NMR ^1H με τα αντίστοιχα της καρβακρόλης και θυμόλης (Σχήμα 3.40) αλλά και από το δισδιάστατο χάρτη HSQC του εκχυλίσματος όπου φαίνονται οι χαρακτηριστικές συζεύξεις μεταξύ των πυρήνων πρωτονίου και άνθρακα της καρβακρόλης (Σχήμα 3.41).



Σχήμα 3.39: Χημικοί τύποι συστατικών θυμαριού

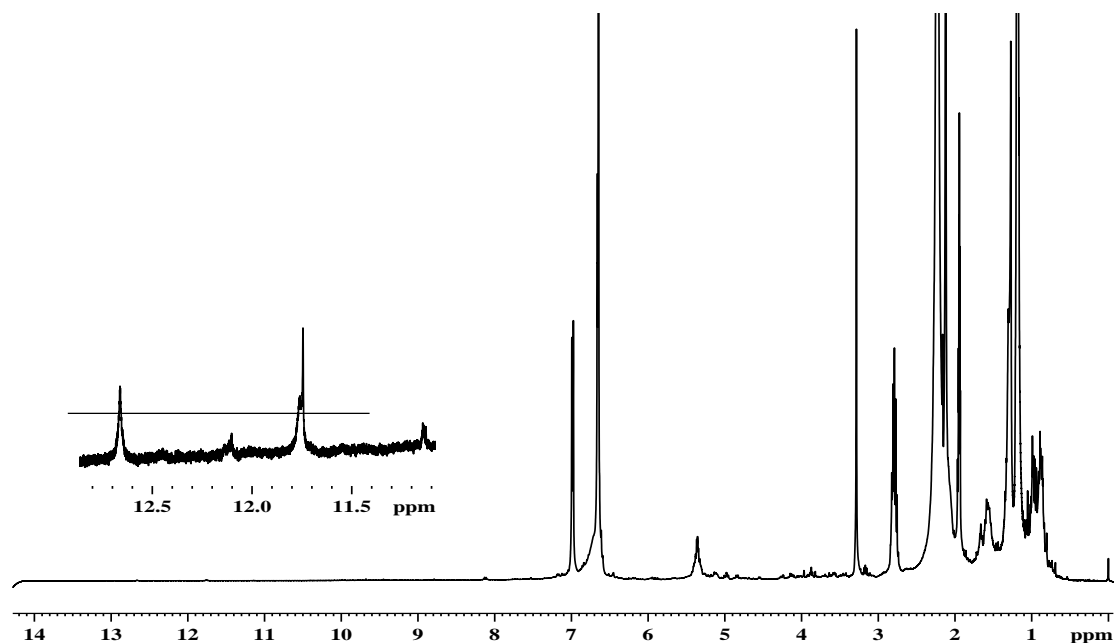


Σχήμα 3.40: Επιλεγμένη περιοχή φάσματος NMR- ^1H εκχυλίσματος Θυμ.οΑ σε CD_3CN ($NS=2k$, $T=298\text{K}$, $t_{\text{exp}}=2\text{h} \ \& \ 45\text{min}$, 400MHz) (A), του φάσματος NMR- ^1H της καρβακρόλης (B) και της θυμόλης (C). Τα βέλη υποδεικνύουν τις χαρακτηριστικές κορυφές της καρβακρόλης στο εκχύλισμα.

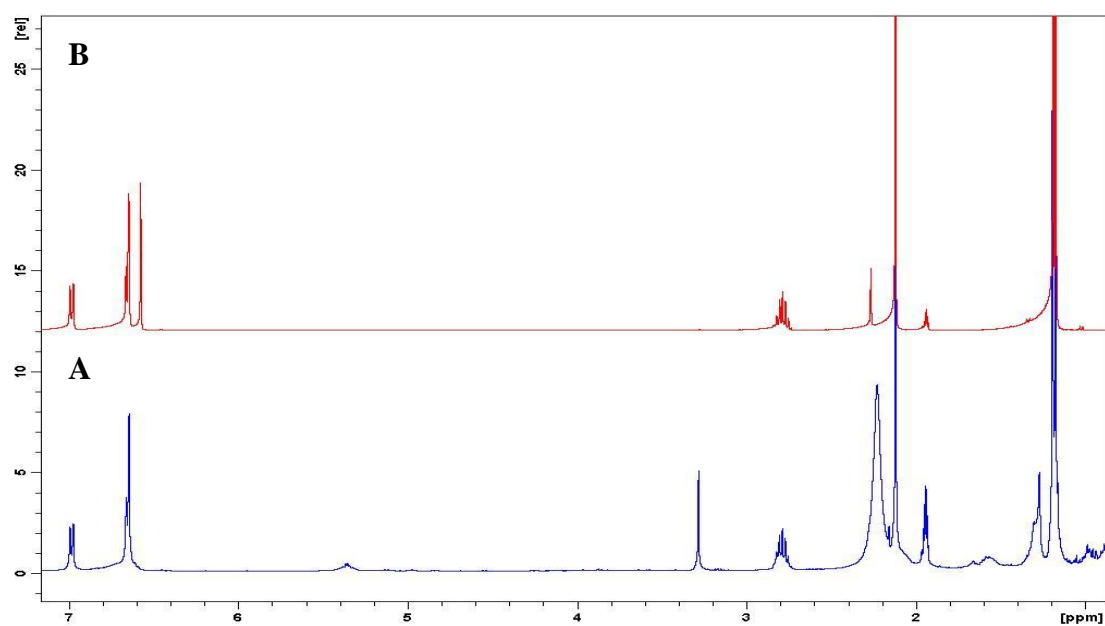


Σχήμα 3.41: Φάσμα HSQC ^1H - ^{13}C εκχυλίσματος Θυμ.οΑ σε CD_3CN ($NS=32$, $T=298\text{K}$, $t_{\text{exp}}=7\text{h} \ \& \ 44\text{min}$, 400MHz).

Επιπλέον, μελετήθηκε και το εκχύλισμα Θυμ.Ε. Αρχικά, έγινε η λήψη του φάσματος NMR- ^1H μιας διάστασης για το χαρακτηρισμό των κύριων ενώσεων (Σχήμα 3.42). Όπως αναμένεται τα φλαβονοειδή είναι ήσσονα συστατικά, ενώ το ροσμαρινικό οξύ απουσιάζει από το εκχύλισμα. Σχεδόν αποκλειστικό συστατικό του είναι η καρβακρόλη (Σχήμα 3.43).



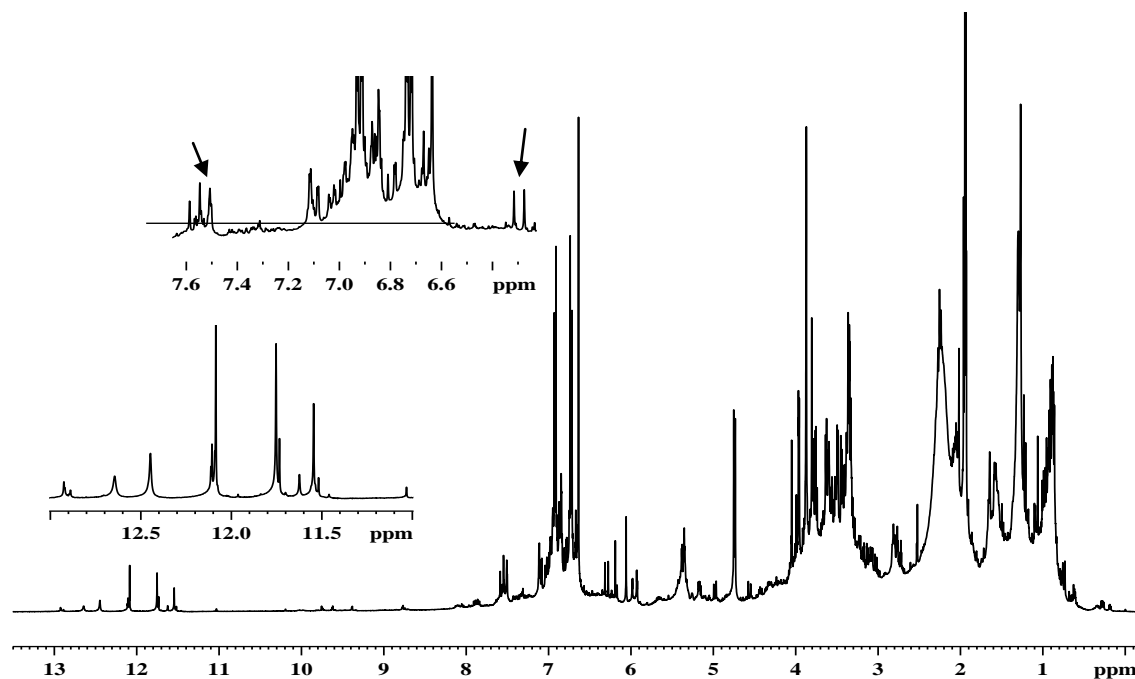
Σχήμα 3.42: Φάσμα NMR- ^1H εκχυλίσματος Θυμ.Ε σε CD_3CN ($NS=2k$, $T=298\text{ K}$, $t_{exp}=2h$ & 45min , 400 MHz).



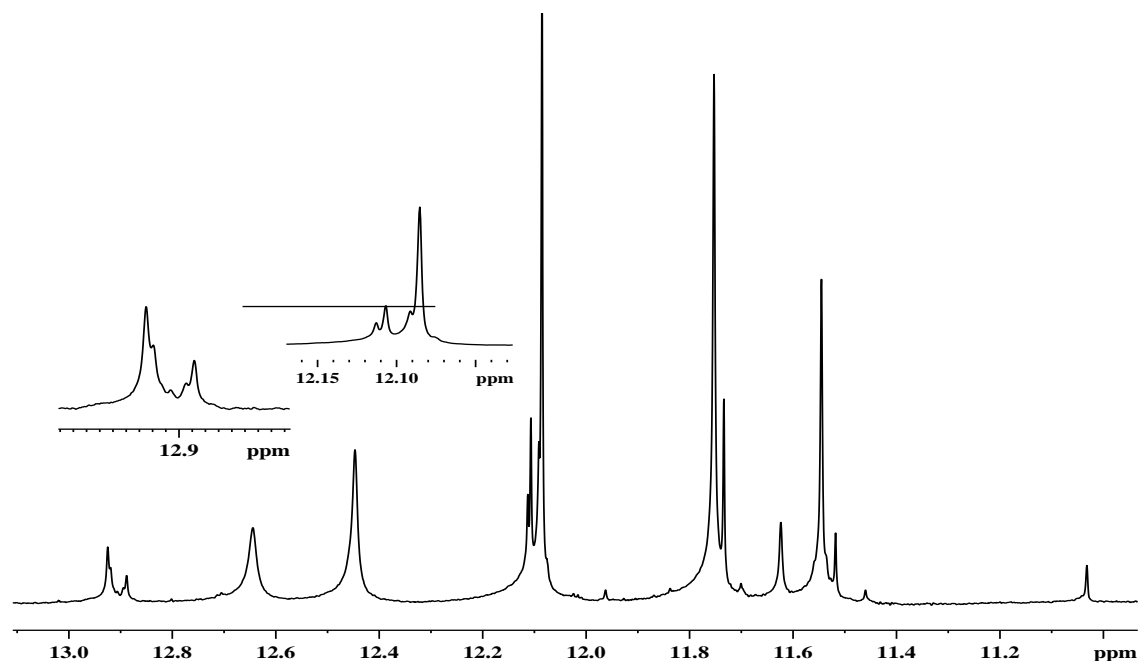
Σχήμα 3.43: Επιλεγμένη περιοχή φάσματος NMR- ^1H που παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.42(A) και του φάσματος NMR- ^1H της καρβακρόλης (B).

3.2.4 Εκχυλίσματα μαντζουράνας

Στο Σχήμα 3.44 απεικονίζεται το φάσμα NMR ^1H εκχυλίσματος Μαντζ.οΑ και στο Σχήμα 3.45 δίνεται η επιλεγμένη περιοχή του ίδιου φάσματος στην περιοχή από 11.4 έως 13.0 ppm.

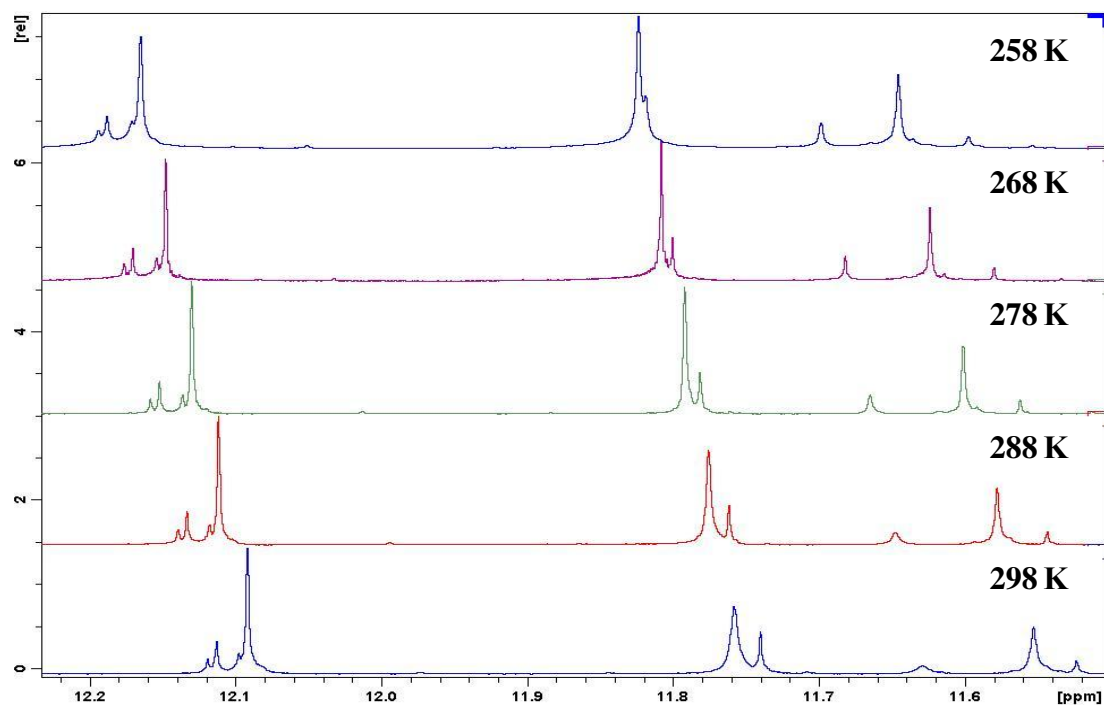


Σχήμα 3.44: Φάσμα NMR- ^1H εκχυλίσματος Μαντζ.οΑ σε CD_3CN ($NS=2k$, $T=298\text{K}$, $t_{\text{exp}}=2\text{h} \ \& \ 44\text{min}$, 400MHz).

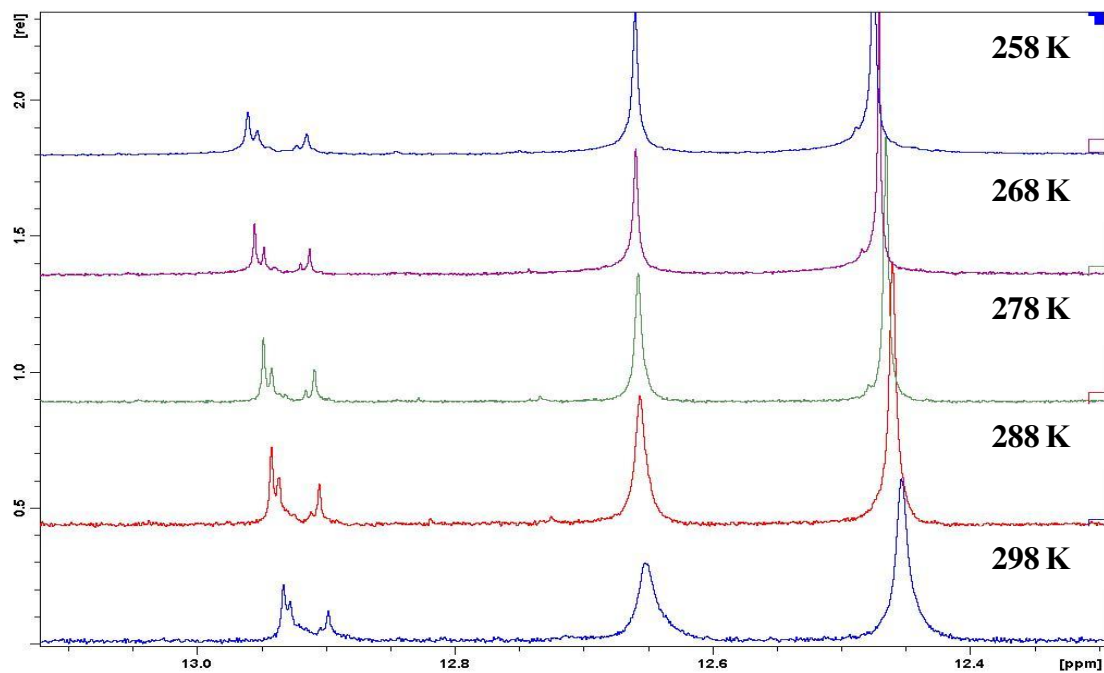


Σχήμα 3.45: Επιλεγμένη περιοχή φάσματος NMR- ^1H του Σχήματος 3.44.

Το εκχύλισμα είναι ιδιαίτερα πλούσιο σε φλαβονοειδή. Τα κύρια συστατικά των διάφορων γενών *Origanum* είναι φλαβονοειδή, όπως λουτεολίνη, απιγενίνη, κερκετίνη και διάφορα παράγωγα τους (Dorman et al., 2004, Al-Bandak and Oreopoulou, 2007). Ακολούθησε η λήψη φασμάτων μεταβλητής θερμοκρασίας του εκχυλίσματος Μαντζ._{ΟΑ} για ένα εύρος τιμών θερμοκρασίας από 298- 258 K. Στα Σχήματα 3.46 και 3.47 φαίνεται η επίδραση της θερμοκρασίας στη μορφή των σημάτων συντονισμού. Όπως αναμένεται με την ελάττωση της θερμοκρασίας οι κορυφές γίνονται πιο οξείες. Τα σήματα συντονισμού στην περιοχή των ~12.1 ppm δεν φαίνεται να διαχωρίζονται καλύτερα, ενώ στα ~11.76 ppm οι κορυφές μάλλον πλησιάζουν με την ελάττωση της θερμοκρασίας.



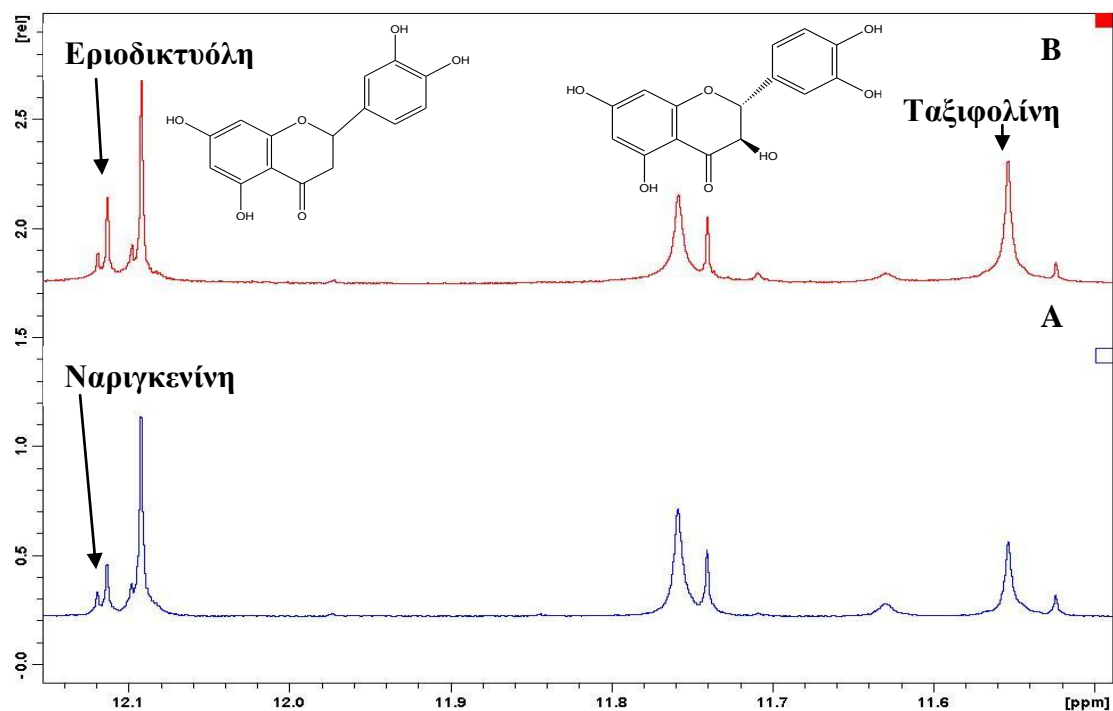
Σχήμα 3.46: Επιλεγμένη περιοχή φάσματος NMR-¹H εκχυλίσματος Μαντζ._{ΟΑ} σε CD₃CN σε διαφορετικές θερμοκρασίες (NS= 128, T=258- 298 K, t_{exp}=10min, 400 MHz).



Σχήμα 3.47: Επιλεγμένη περιοχή φάσματος NMR- ^1H εκχυλίσματος Μαντζ. $_{0A}$ σε CD_3CN σε διαφορετικές θερμοκρασίες ($NS=128$, $T=258\text{-}298\text{ K}$, $t_{exp}=10\text{ min}$, 400 MHz).

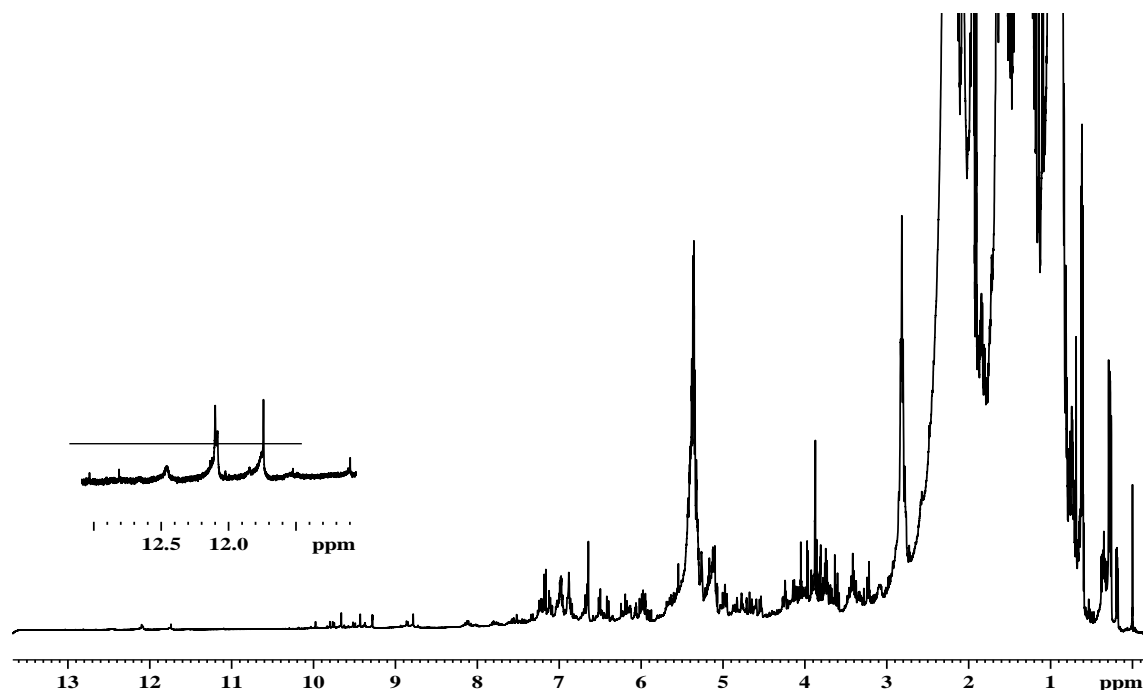
Με υπέρθεση του φάσματος NMR ^1H του εκχυλίσματος με τα αντίστοιχα πρότυπων ενώσεων φλαβονοειδών (που ελήφθησαν στο ίδιο όργανο και με τις ίδιες συνθήκες), οι οποίες έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία ως συστατικά εκχυλισμάτων θυμαριού διαπιστώθηκε ότι, πιθανώς, η εριοδικτυόλη, η ναριγκενίνη και η ταξιφολίνη υπάρχουν στο εκχύλισμα. Προκειμένου να διαπιστωθεί η παρουσία τους, προστέθηκε μικρή ποσότητα διαλύματός τους, σε δευτεριωμένο ακετονιτρίλιο, στο εκχύλισμα για την ενίσχυση του σήματος (μέθοδος spiking) και ακολούθησε η λήψη των φασμάτων σε εύρος τιμών θερμοκρασίας από 298- 258 K. Στο Σχήμα 3.48 παρουσιάζεται επιλεγμένη περιοχή του φάσματος NMR ^1H εκχυλίσματος Μαντζ. $_{0A}$ πριν και μετά την προσθήκη της εριοδικτυόλης, και ταξιφολίνης στους 298 K. Είναι προφανές ότι η εριοδικτυόλη, ναριγκενίνη και ταξιφολίνη υπάρχουν στο εκχύλισμα.

Επίσης, στο Σχήμα 3.44 φαίνονται οι χαρακτηριστικές διπλές κορυφές του ροσμαρινικού οξέος. Από τις σχετικές περιοχές του φάσματος COSY $^1\text{H}-^1\text{H}$, HSQC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$, HMBC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ αποδεικνύεται ότι είναι το μοναδικό φαινολικό οξύ στο εκχύλισμα.



Σχήμα 3.48: Επιλεγμένη περιοχή φάσματος NMR-¹H εκχύλισματος Μαντζ._{0A} σε CD₃CN (A), το ίδιο φάσμα μετά την προσθήκη εριοδικτιόλης και ταξιφολίνης (B). Η ταυτοποίηση της φλαβονοειδών υποδηλώνεται με το βέλος (NS= 128, T=298 K, $t_{exp}=10min$, 400 MHz).

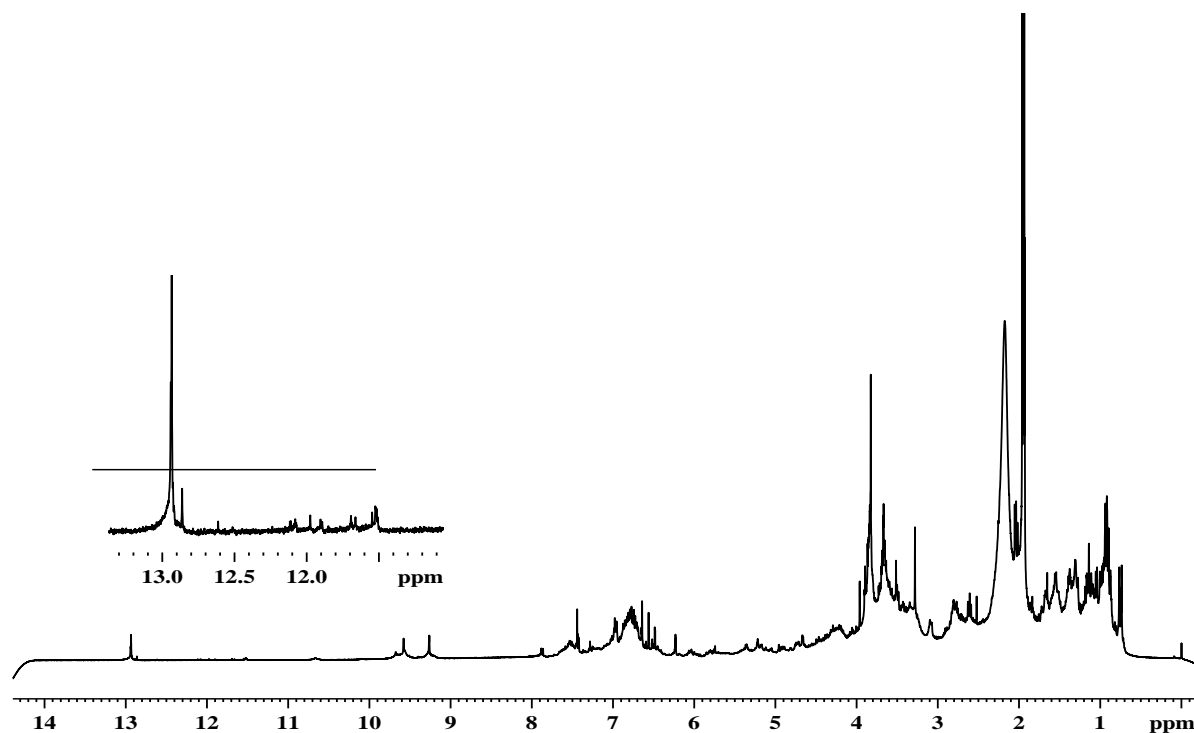
Επιπλέον, μελετήθηκε και το εκχύλισμα Μαντζ._E. Αρχικά, έγινε η λήψη του φάσματος NMR-¹H μιας διάστασης για το χαρακτηρισμό των κύριων ενώσεων (Σχήμα 3.49). Όπως αναμένεται τα φλαβονοειδή είναι ήσσονα συστατικά, ενώ το ροσμαρινικό οξύ απουσιάζει από το εκχύλισμα.



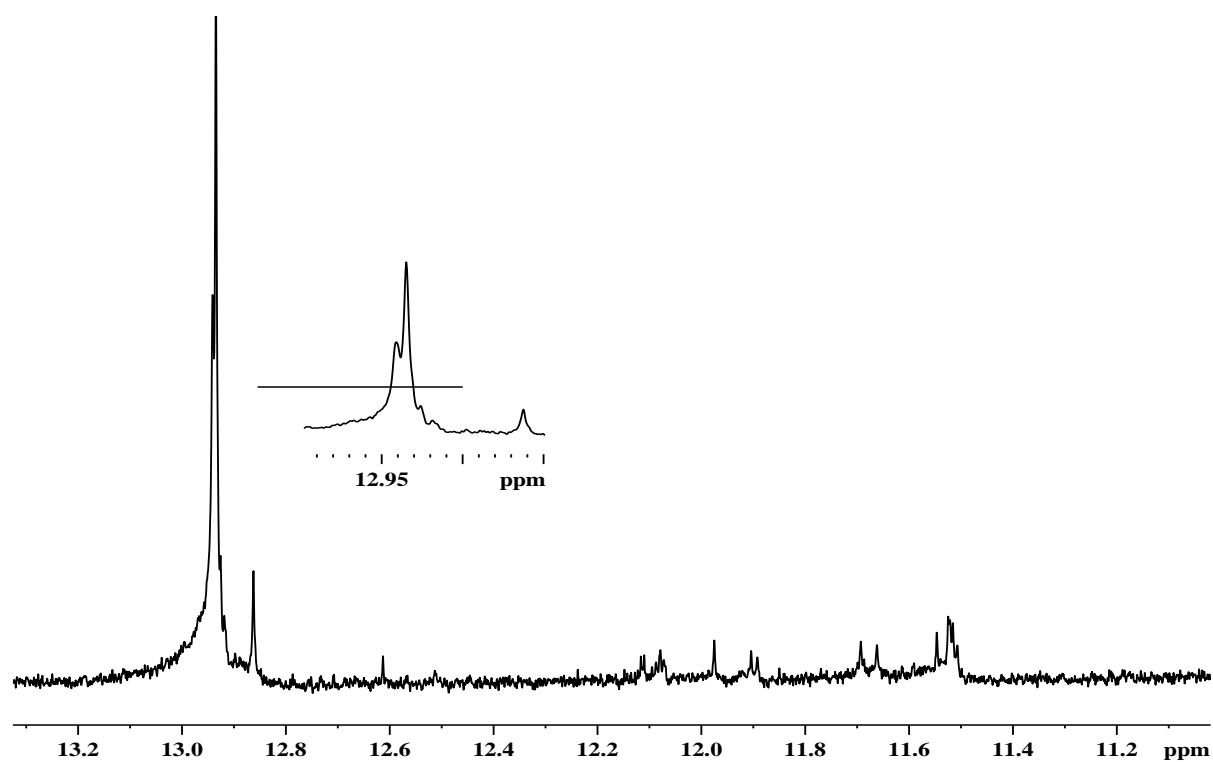
Σχήμα 3.49: Φάσμα NMR- ^1H εκχυλίσματος Μαντζ. $_E$ σε CD_3CN ($NS=3k$, $T=298\text{ K}$, $t_{exp}=4h \ \& \ min$, 400 MHz).

3.2.5 Λοιπά εκχυλίσματα

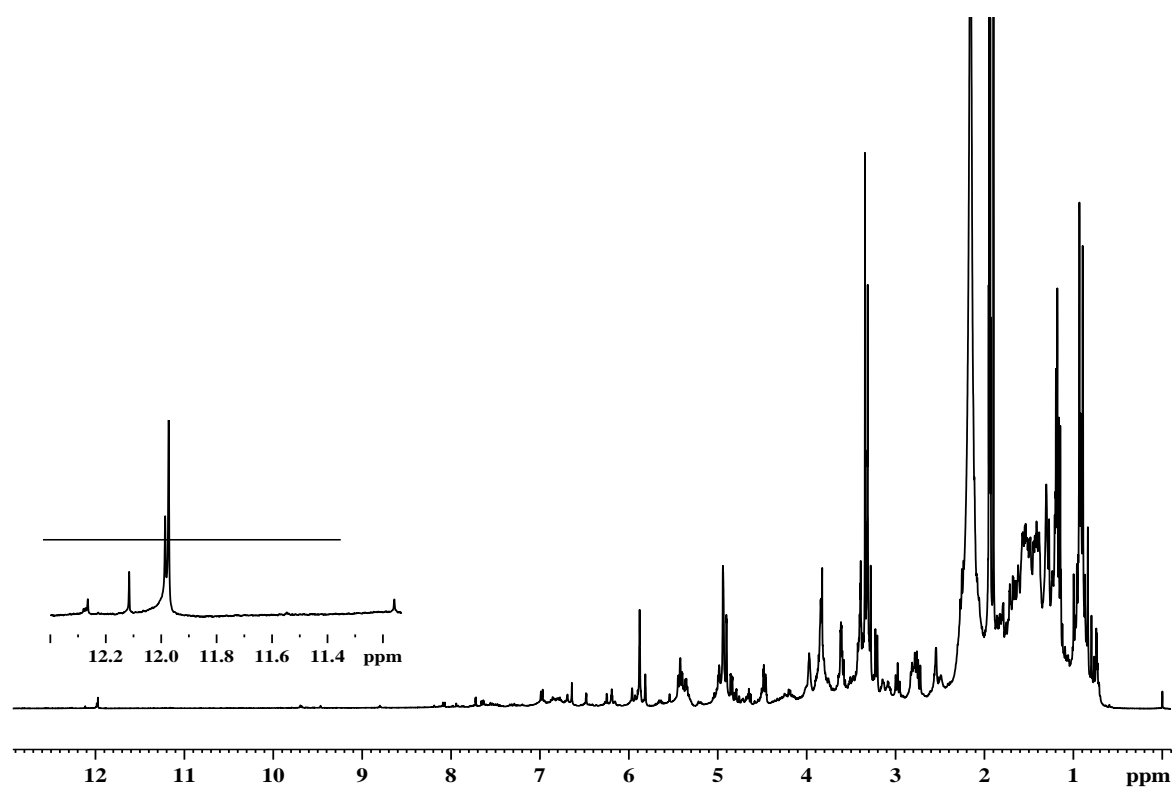
Στο εκχύλισμα των Φ.Ε. $_{\text{OA}}$ μπορούν να αναγνωριστούν κάποια φλαβονοειδή, ενώ δεν υπάρχουν φαινολικά οξέα (Σχήματα 3.50, 3.51). Σε αυτό το σημείο δεν θα δοθεί ιδιαίτερη έμφαση στην ταυτοποίηση συστατικών του εκχυλίσματος, καθώς εκχυλίσματα φύλλων ελιάς έχουν μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό σε προηγούμενες μελέτες της ερευνητικής μας ομάδας (Κοντογιάννη, 2005, *Μεταπτυχιακή διατριβή, Τσιούτσιας, 2005, Μεταπτυχιακή διατριβή*). Το φάσμα NMR ^{-1}H εκχυλίσματος Ροδ. $_{\text{OA}}$ σε δευτεριωμένο ακετονιτρίλιο, στο οποίο μπορούν να αναγνωριστούν ορισμένα σήματα συντονισμού στην περιοχή των φλαβονοειδών απεικονίζεται στα Σχήματα 3.52, 3.53.



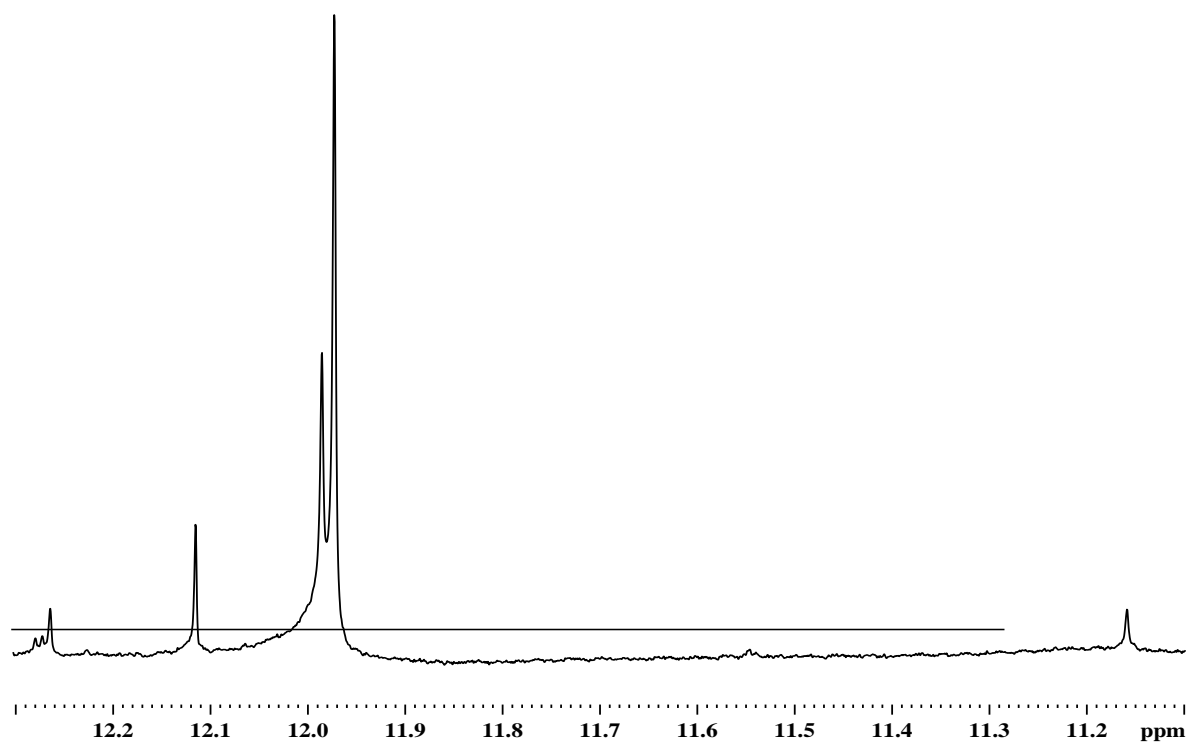
Σχήμα 3.50: Φάσμα $NMR-^1H$ εκχυλίσματος $\Phi.E.O_A$ σε CD_3CN ($NS=2k$, $T=298\text{ K}$, $t_{exp}=2\text{ h \& 44min}$, 400 MHz).



Σχήμα 3.51: Επιλεγμένη περιοχή φάσματος $NMR-^1H$ του Σχήματος 3.50.



Σχήμα 3.52: Φάσμα $NMR-^1H$ εκγυλισματος Ροδ.0Α σε CD_3CN ($NS=2k$, $T=298\text{ K}$, $t_{exp}=2\text{ h \& 44min}$, 400 MHz).

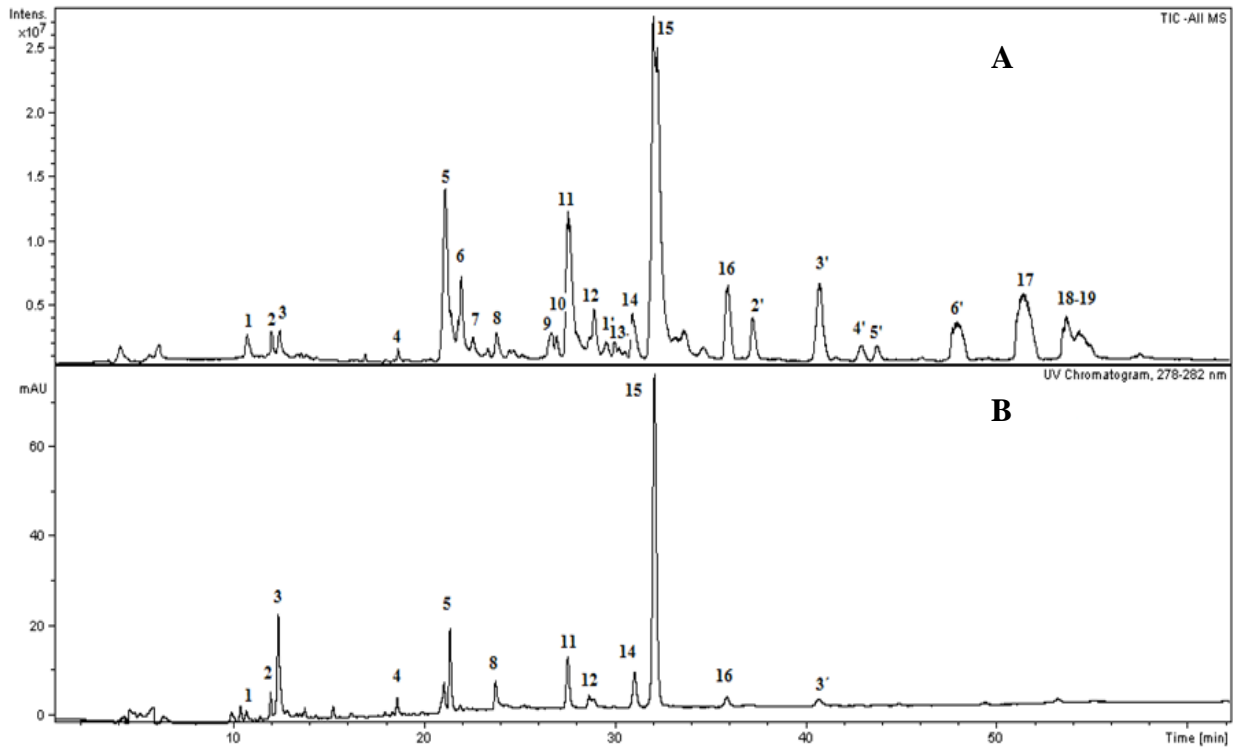


Σχήμα 3.53: Επιλεγμένη περιοχή φάσματος $NMR-^1H$ του Σχήματος 3.52.

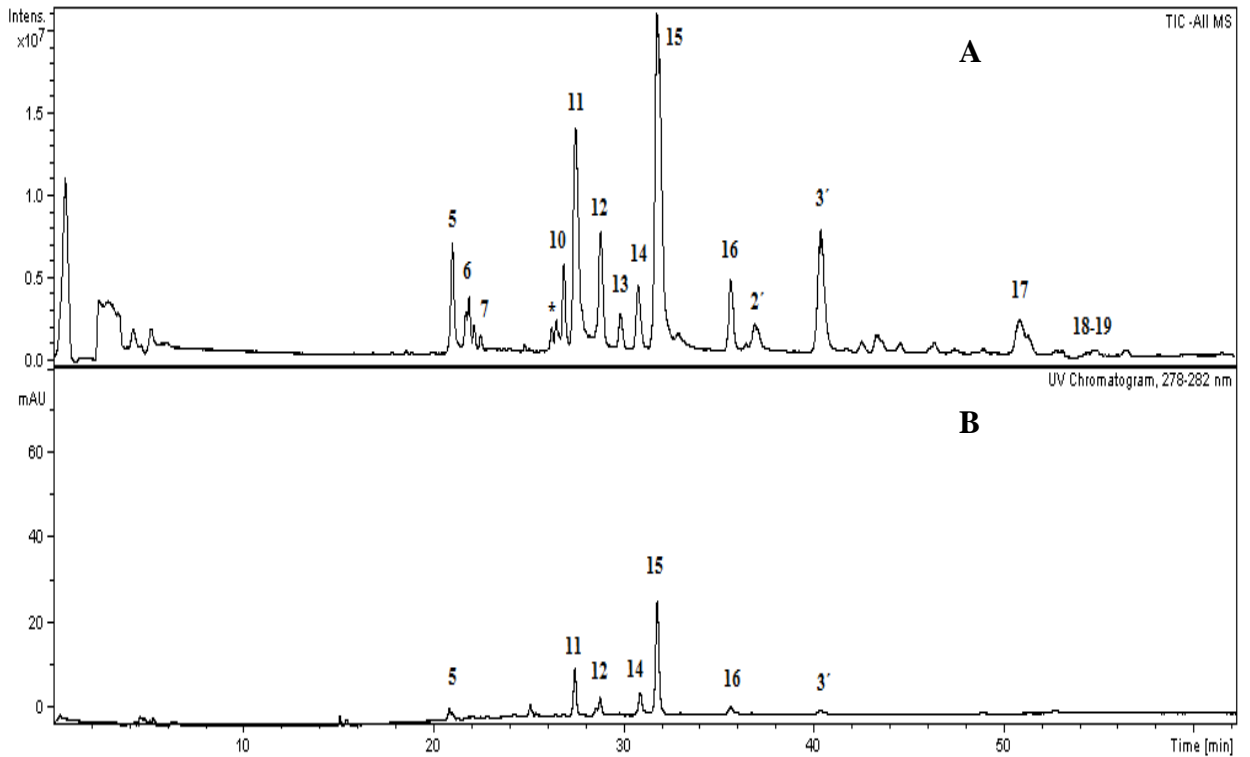
4.1 Μελέτη της σύστασης με τη συνδυαστική τεχνική LC-ESI-MS

Η σύσταση των εξανικών εκχυλισμάτων και των εκχυλισμάτων οξικού αιθυλεστέρα μελετήθηκε με υγρή χρωματογραφία σε σύζευξη με φασματομετρία μαζών. Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την ανάλυση φαινολικών ενώσεων είναι η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (RP-HPLC) με τη χρήση μίγματος οργανικού πολικού διαλύτη (μεθανόλη, ακετονιτρίλιο) και νερού ως κινητή φάση. Το pH θα πρέπει να είναι όξινο προκειμένου να αποφευχθεί ο ιονισμός των υπό ανάλυση ενώσεων. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ακετονιτρίλιο: νερό (0.1 % οξικό οξύ). Ως ανιχνευτής χρησιμοποιήθηκε φασματόμετρο μαζών, που λειτουργεί με ιοντισμό με ηλεκτροψεκάσμο. Η συγκεκριμένη τεχνική είναι ήπια, που τις περισσότερες φορές παράγει σταθερά ιόντα και χαμηλά ποσοστά στιγμιαίων θραυσμάτων, ώστε τα αντίστοιχα κύρια ιόντα παραμένουν σε υψηλή αναλογία. Χρησιμοποιήθηκε αρνητικός και θετικός ιοντισμός, στις συγκεκριμένες όμως συνθήκες ανάλυσης, καλύτερα αποτελέσματα προέκυψαν από τον αρνητικό ιοντισμό και καταγράφηκε και το δευτερογενές φάσμα μάζας MS² των μοριακών ιόντων. Τα χρωματογραφήματα καταγράφηκαν με ανιχνευτή συστοιχίας διόδων και επιλέχθηκαν τέσσερα μήκη κύματος για παρακολούθηση, στα 210, 254, 280 και 330 nm.

Στα Σχήματα 4.1.A και 4.2.A απεικονίζονται τα συνολικά ιόντα μαζών (total mass ion) και στα Σχήματα 4.1.B και 4.2.B τα χρωματογραφήματα των εκχυλισμάτων Δεντ._{ΟΑ} και Δεντ._Ε στα 280 nm, αντίστοιχα. Όπως φαίνεται έχουν κοινά συστατικά, αν και το εκχύλισμα Δεντ._{ΟΑ} είναι πιο πολύπλοκο από πλευράς σύστασης και πιο πλούσιο από πλευράς συγκέντρωσης. Η ταυτοποίηση των ενώσεων έγινε με βάση τα φάσματα μάζας, σε σύγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα (*Cuvelier et al., 1996, Herrero et al., 2005, Almela et al., 2006*) και σε περίπτωση ύπαρξης προτύπων ενώσεων, με σύγκριση του χρόνου κατακράτησης και του φάσματος μάζας αυτών. Στον Πίνακα 4.1 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα δεδομένα που προέκυψαν για τα συστατικά των δύο εκχυλισμάτων με τη φασματομετρία μαζών.



Σχήμα 4.1: Το συνολικό φάσμα μάζας (A) και το χρωματογράφημα στα 280 nm (B) εκχυλίσματος Δεντ.οΑ.



Σχήμα 4.2 : Το συνολικό φάσμα μάζας (A) και το χρωματογράφημα στα 280 nm (B) εκχυλίσματος Δεντ.Ε.

Πίνακας 4.1: Χρόνοι κατακράτησης και κύρια μοριακά ιόντα των ενώσεων εκχυλισμάτων Δεντ._{ΟΑ} και Δεντ._Ε καθώς και η ταυτοποίηση τους με ενώσεις σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα.

Ν ^ο	Χρόνος Κατακράτησης (min)	Κύριο μοριακό ιόν m/z [M-H] ⁻ (MS ²)	Ένωση
1	10.7	477.5 (315.7)	7-Ο-γλυκοζίτης της 6-μεθόξυλουτεολίνης
2	12.1	461.5 (299.5)	Όμοπλανταγινίνη
3	12.4	359.4	Ροσμαρινικό οξύ
4	18.6	299.7	Ησπιδουλίνη
5	21.0	345.5	Τετραυδροξυδιμεθοξυφλαβόνη
6	21.9	345.5	Ροσμανόλη
7	22.5	345.7	Έπιροσμανόλη
8	23.8	283.5	Τζενκουανίνη
9	26.6	345.8	Επίσοροσμανόλη
10	26.9	359.6	Μεθυλικός αιθέρας της Έπιροσμανόλης
11	27.5	329.4	Καρνοσόλη
12	28.8	343.5	Ροσμαδιάλη
1'	29.5	472.1	N.I.*
13	29.9	343.9	Κιρσιλινεόλη ή Ευπατορίνη
14	30.9	315.6	Ροσμαριδιφαινόλη
15	31.9	331.5	Καρνοσικό οξύ
16	35.9	345.5	Καρνοσικός Μεθυλεστέρας
2'	37.2	318.1	N.I.
3'	40.7	317.2	N.I.
4'	42.9	495.7	N.I.
5'	43.6	300.1	N.I.
6'	47.8	453.7	N.I.
17	51.3	455.7	Μπετουλινικό οξύ
18	53.6	456.2	Ολεανολικό οξύ
19	54.2	455.7	Ουρσολικό οξύ

N.I.*: Συμβολίζονται τα συστατικά που δεν ταυτοποιήθηκαν

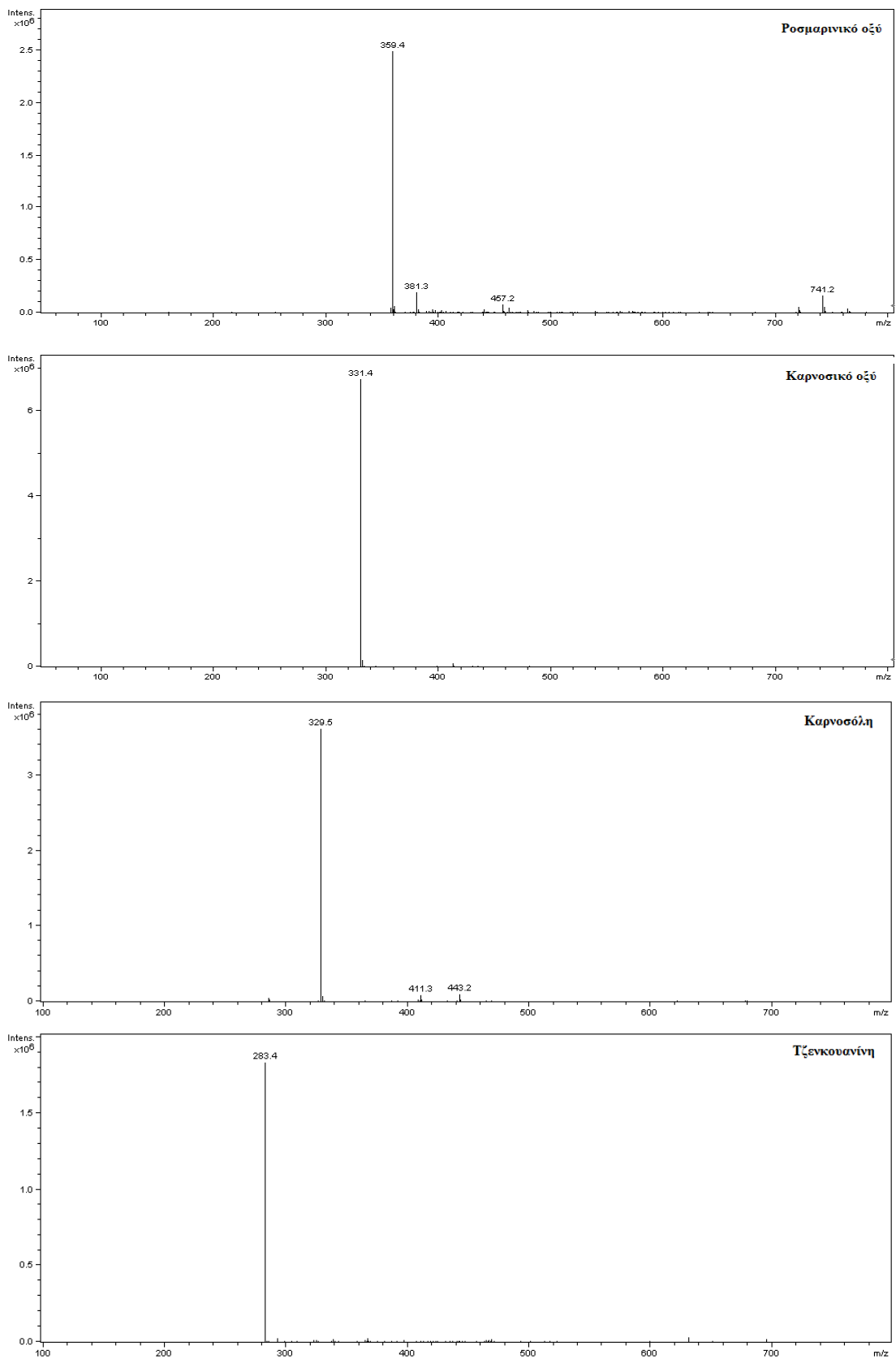
Τα συστατικά των εκχυλισμάτων δεντρολίβανου μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις κατηγορίες ενώσεων: διτερπένια, φλαβονοειδή και φαινολικά οξέα και τριτεπενοειδή. Οι δομές των διτερπενίων σχετίζονται με αυτή του καρνοσικού οξέος, ενώ τα φλαβονοειδή προέκυψαν από δυο κοινές φλαβόνες την απιγενίνη και τη λουτεολίνη. Το ροσμαρινικό οξύ είναι το μόνο φαινολικό οξύ που ταυτοποιήθηκε. Αναλυτικά, το φάσμα μάζας που αντιστοιχεί στην κορυφή 1 του συνολικού φάσματος μάζας παρουσιάζει κύριο θραύσμα στα 477.5 m/z , το οποίο θα μπορούσε να αποδοθεί στον 7-γλυκουρονίτη της 6-υδροξυλουτεολίνης (Lu and Foo, 2000) ή στον 7-

γλυκοζίτη της 6-μεθοξυλουτεολίνης. Στο δευτερογενές φάσμα μάζας MS² του μοριακού ιόντος παρατηρείται ένα κύριο ιόν [M-H-162]⁻ στα 315 m/z δηλώνοντας την ύπαρξη ενός γλυκοζιτικού μορίου. Το ιόν στα 315 m/z αντιστοιχεί στο [M-H]⁻ της μεθοξυλουτεολίνης, συνεπώς η κορυφή θα μπορούσε να αντιστοιχεί στον 7-O-γλυκοζίτη της 6-μεθοξυλουτεολίνης. Το αντίστοιχο φάσμα μάζας που αντιστοιχεί στην κορυφή 2 παρουσιάζει κύριο θραύσμα στα 461.5 m/z και σε συνθήκες θετικού ιοντισμού στα 463.1 m/z, το οποίο θα μπορούσε να αποδοθεί στην ομοπλανταγινίνη ή στον 7-γλυκουρονίτη της λουτεολίνης. Στο φάσμα μάζας MS² παρατηρούμε ένα κύριο ιόν στα [M-H-162]⁻ στα 299.6 m/z δηλώνοντας την ύπαρξη ενός γλυκοζιτικού μορίου. Το ιόν στα 299.6 m/z αντιστοιχεί στο [M-H]⁻ της ησπιδουλίνης, συνεπώς η κορυφή θα μπορούσε να αποδοθεί στην ομοπλανταγινίνη. Το φάσμα μάζας που αντιστοιχεί στην κορυφή 3 παρουσιάζει κύριο θραύσμα στα 359.4 m/z, που θα μπορούσε να αποδοθεί στο ροσμαρινικό οξύ. Το αποτέλεσμα επιβεβαιώθηκε και από το χρόνο κατακράτησης, καθώς και από το φάσμα μάζας πρότυπης ένωσης ροσμαρινικού οξέος (Σχήμα 4.3), για το οποίο έγινε και ποσοτικός προσδιορισμός.

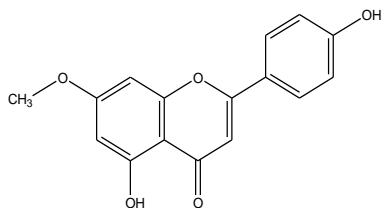
Το κύριο θραύσμα στα 299.9 m/z ($t_R = 18.6$ min) θα μπορούσε να αποδοθεί στην ησπιδουλίνη, ενώ το αντίστοιχο στα 343.9 m/z ($t_R = 29.9$ min) θα μπορούσε να αντιστοιχεί σε φλαβονοειδή, όπως η κίρσιρινεόλη (cirsirineol) ή η ευπατορίνη (eupatorin) (Lu and Foo, 2000). Το κύριο θραύσμα στα 345.5 m/z, ανιχνεύθηκε σε διάφορους χρόνους κατακράτησης και μπορεί να αντιστοιχεί στη ροσμανόλη και τα ισομερή της επιροσμανόλη και επίσοροσμανόλη, στον καρνοσικό μεθυλεστέρα, αλλά και στην τετραυδροξυδιμεθοξυφλαβόνη. Η κορυφή που εκλύεται στα $t_R = 21.0$ min παρουσιάζει μέγιστα στο φάσμα μάζας της στα 210, 288 και 346 nm, ενώ η ροσμανόλη στα 209, 226 και 282 nm (Inatani et al., 1982). Θα μπορούσε, συνεπώς, η κορυφή να αποδοθεί σε κάποια τετραυδροξυδιμεθοξυφλαβόνη, όπως η 5,6,2',6'-τετραυδροξυ-7,8-διμεθοξυφλαβόνη, η 5,8,3',4',-τετραυδροξυ-6,7-διμεθοξυφλαβόνη ή η 5,7,3',4'-τετραυδροξυ-6,8-διμεθοξυφλαβόνη, που έχουν απομονωθεί από εκχυλίσματα φυτών της οικογένειας Labiatae (Harborne and Baxter, 1999). Η απόδοση των κύριων θραυσμάτων στις αντίστοιχες ενώσεις έγινε με βάση τη σειρά εκλουσής τους στο χρωματογράφημα, σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα (Cuvelier et al., 1996, Almela et al., 2006). Το ίδιο ισχύει και για το μεθυλικό αιθέρα της επιροσμανόλης και τη ροσμαδιάλη που παρουσιάζουν ψευδομοριακά αποπρωτονιωμένα ιόντα [M-H]⁻ με $m/z = 359.6$ και 343.5, αντίστοιχα.

Το καρνοσικό οξύ, με ψευδομοριακό ιόν $m/z=331.5$, και η καρνοσόλη, με $m/z=329.4$ και κύριο θραύσμα σε συνθήκες θετικού ιοντισμού στα $331.3 m/z$, ταυτοποιήθηκαν επίσης και από τους χρόνους κατακράτησης και το φάσμα μάζας (Σχήμα 4.3) προτύπων ενώσεων τους. Το ίδιο ισχύει και για την τζενκουανίνη, το μπετουλινικό, ολεανολικό και ουρσολικό οξύ. Για όλες τις εμπορικά διαθέσιμες ενώσεις, πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός, με εξαίρεση το τριτερπενικά οξέα που μελετήθηκαν ξεχωριστά. Στο Σχήμα 4.4 απεικονίζονται οι χημικοί τύποι όλων των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν. Όσον αφορά τα μοριακά ιόντα τα οποία δεν αποδόθηκαν σε γνωστές ενώσεις, το $m/z=317.2$ έχει αναφερθεί και σε προηγούμενη μελέτη (Ibanez *et al.*, 2003), το $m/z=315.6$ θα μπορούσε να αντιστοιχεί στη ροσμαριδιφαινόλη (Houlihan *et al.*, 1984) και το $m/z=453.7$ θα μπορούσε να αντιστοιχεί στο μικρομερικό οξύ (Altinier *et al.*, 2007). Το συστατικό με μοριακό βάρος 318 έχει αναφερθεί από τους Schwarz *et al.*, 1992, οι οποίοι το απομόνωσαν και διερευνώντας τη δομή του με NMR διαπίστωσαν ότι σχετίζεται με την καρνοσόλη.

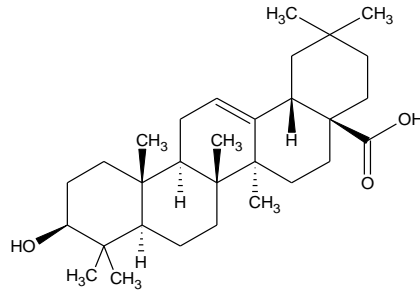
Όπως προκύπτει από το χρωματογράφημα, κύρια συστατικά του εκχυλίσματος Δεντ.ΟΑ είναι το καρνοσικό οξύ, το ροσμαρινικό οξύ και η καρνοσόλη. Το καρνοσικό οξύ θεωρείται ότι είναι η πρόδρομη ένωση των φαινολικών διτερπενίων με δομή δ- ή γ- λακτόνης (Schwarz *et al.*, 1992). Κύρια συστατικά και του εκχυλίσματος Δεντ.Ε είναι το καρνοσικό οξύ και η καρνοσόλη, σε μικρότερα ποσοστά. Τα προφίλ τους είναι σχεδόν όμοια στην περιοχή των διτερπενίων, ενώ όπως αναμενόταν από το εκχύλισμα Δεντ.Ε απουσιάζει το πολικό μόριο ροσμαρινικό οξύ και τα φλαβονοειδή. Τα περισσότερα συστατικά εκχυλισμάτων δεντρολίβανου ανήκουν στην τάξη των διτερπενίων και παράγονται από τη μετατροπή του καρνοσικού οξέος, που οδηγεί σε μια γ-λακτόνη (ροσμανόλη, επιροσμανόλη, μεθυλικός αιθέρας της επιροσμανόλης) ή δ-λακτόνη (καρνοσόλη, επισοροσμανόλη, μεθυλικός αιθέρας της επισοροσμανόλης). Άλλα συστατικά που έχουν ανιχνευθεί σε εκχυλίσματα δεντρολίβανου, σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα, είναι φαινολικά οξέα όπως το βανιλλικό, το καφεϊκό και το φερουλικό οξύ και φλαβονοειδή, όπως η εσπεριτίνη, η απιγενίνη, η 4'-μεθοξυτεκτοχρυσίνη, η κισσιμαριτίνη, η σκουτελλαρεΐνη, η 4',5,7,8-τετραυδροξυφλαβόνη και ο 7-γλυκοζίτης της 6-υδροξυλουτεολίνης (Cuvelier *et al.*, 1996, Almela *et al.*, 2006).



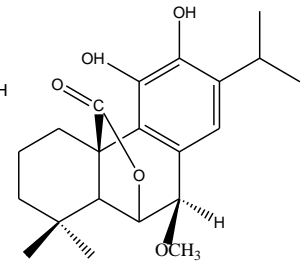
Σχήμα 4.3: Φάσματα μάζας [M-H] των προτύπων ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν σε εκχυλίσματα δεντρολίβανου.



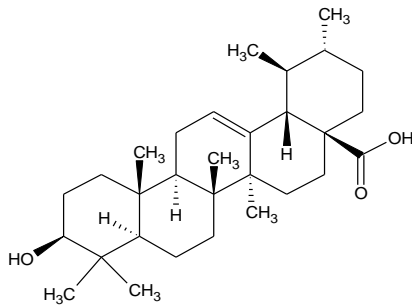
Τζενκουανίνη



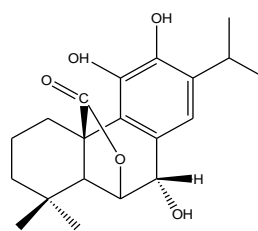
Ολεανολικό οξύ



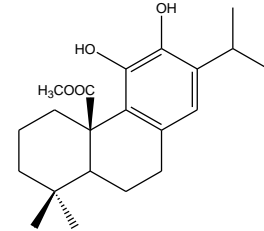
**Μεθυλικός αιθέρας της
Επιροσμανόλης**



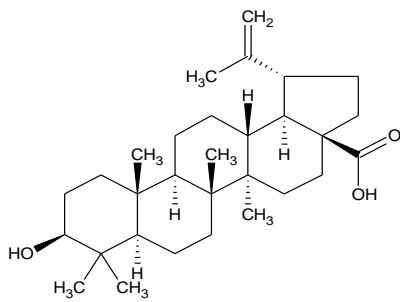
Ουρσολικό οξύ



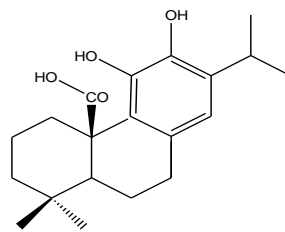
Ροσμανόλη



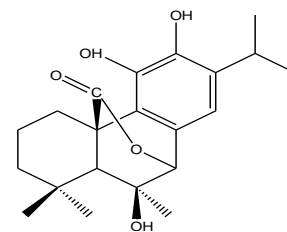
Καρνοσικός Μεθυλεστέρας



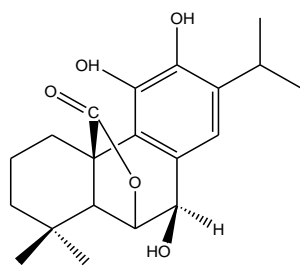
Μπετουλινικό οξύ



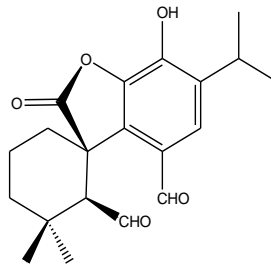
Καρνοσικό οξύ



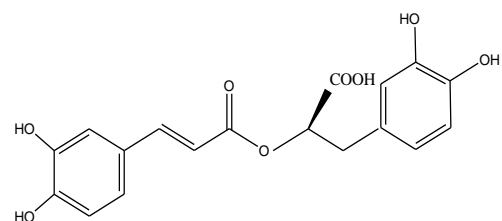
Ισοροσμανόλη



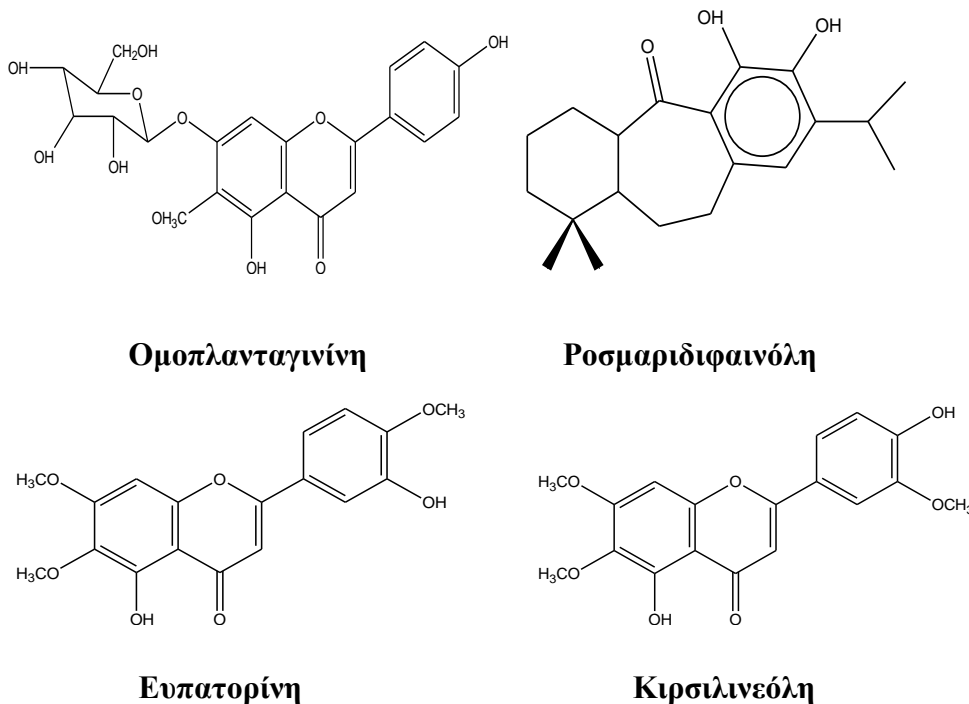
Επιροσμανόλη



Ροσμαδιάλη

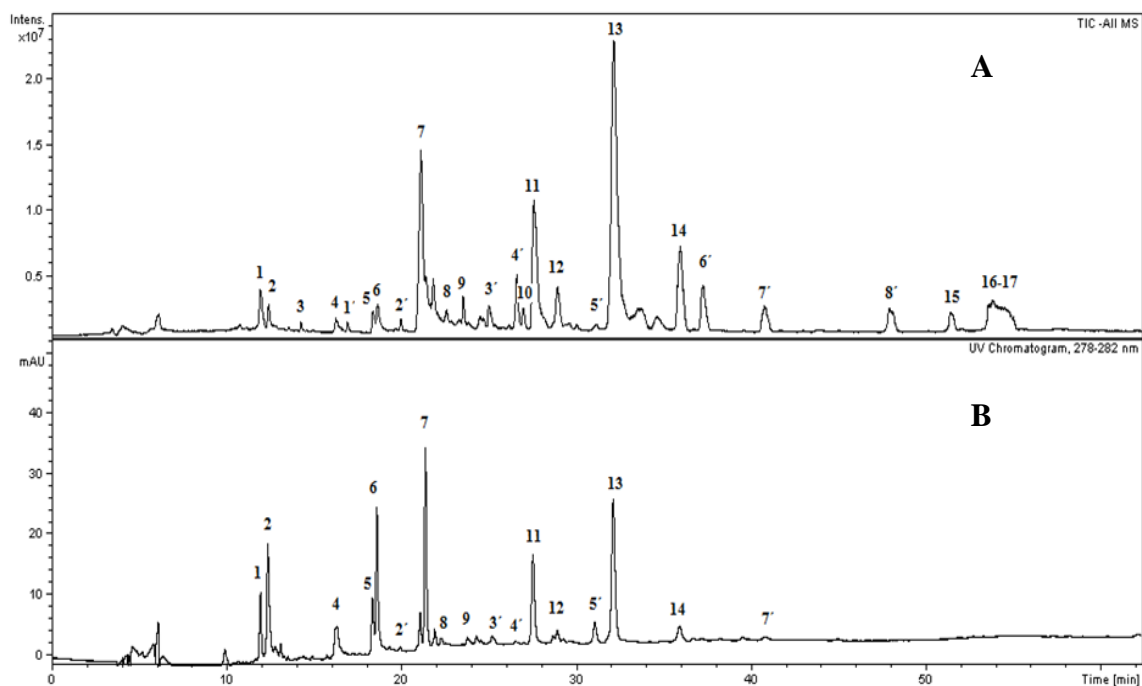


Ροσμαρινικό οξύ

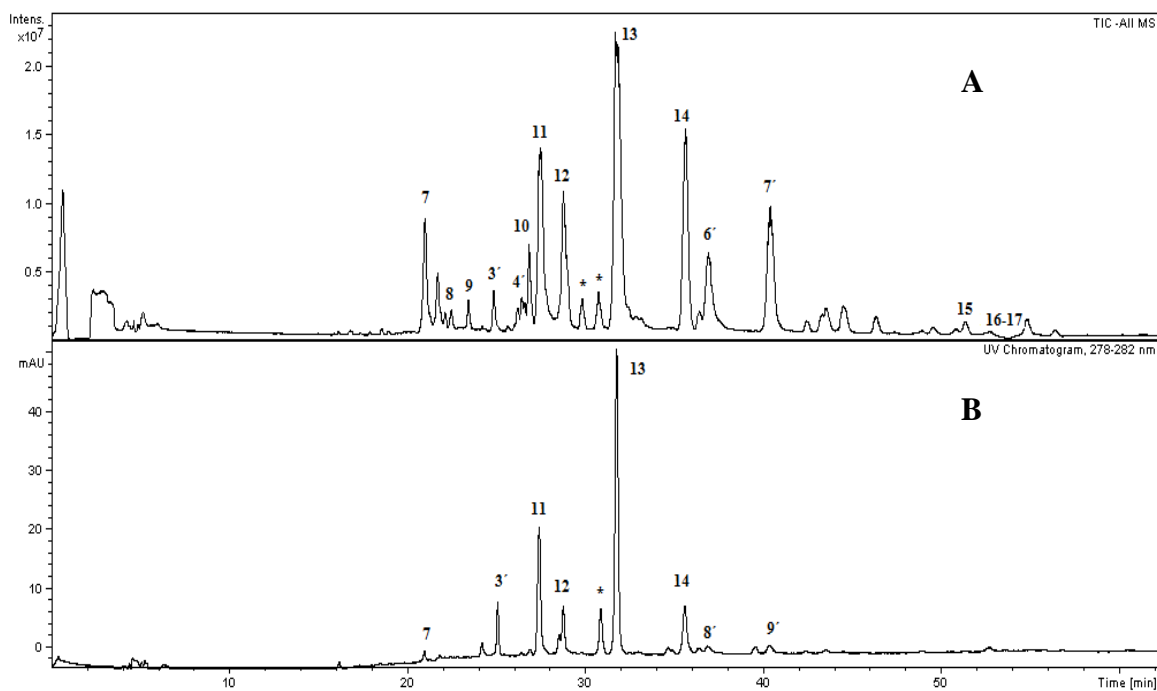


Σχήμα 4.4: Χημικοί τύποι των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στα εκχυλίσματα δεντρολίβανου.

Στο Σχήματα 4.5.A και 4.6.A απεικονίζονται τα συνολικά ιόντα μαζών (total mass ion) και στα 4.5.B και 4.6.B τα χρωματογραφήματα των εκχυλισμάτων Φασκ._{ΟΑ} και Φασκ._Ε στα 280 nm, αντίστοιχα. Όπως φαίνεται έχουν κοινά συστατικά, αν και το εκχύλισμα Φασκ._{ΟΑ} είναι πιο πολύπλοκο. Η ταυτοποίηση των ενώσεων έγινε με βάση τα φάσματα μάζας, σε σύγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα (Cuvelier *et al.*, 1996, Herrero *et al.*, 2005, Almela *et al.*, 2006, Lu and Foo, 2000) και σε περίπτωση ύπαρξης προτύπων ενώσεων, με σύγκριση του χρόνου κατακράτησης και του φάσματος μάζας αυτών. Τα δεδομένα που προέκυψαν για τα συστατικά των δύο εκχυλισμάτων με τη φασματομετρία μαζών δίνονται συγκεντρωτικά στον Πίνακα 4.2. Όπως φαίνεται παρουσιάζει πολλά κοινά συστατικά με το δεντρολίβανο. Διαφέρουν όμως ως προς την παρουσία της απιγενίνης, που παρουσιάζει κύριο θραύσμα στα 269.3 και ταυτοποιήθηκε και με βάση το χρόνο κατακράτησης πρότυπης ενώσης, της ενώσης με 473.8 *m/z*, που πιθανώς αντιστοιχεί στον ακετυλ-γλυκουροζίτη της και της ενώσης με 387.9 *m/z*, που πιθανώς αντιστοιχεί στην 3,7,8,2',4'-πενταμεθοξυφλαβόνη.



Σχήμα 4.5: Το συνολικό φάσμα μάζας (A) και το χρωματογράφημα στα 280 nm (B) εκχυλίσματος Φασκ.ΟΑ.



Σχήμα 4.6 : Το συνολικό φάσμα μάζας (A) και το χρωματογράφημα στα 280 nm (B) εκχυλίσματος Φασκ.Ε.

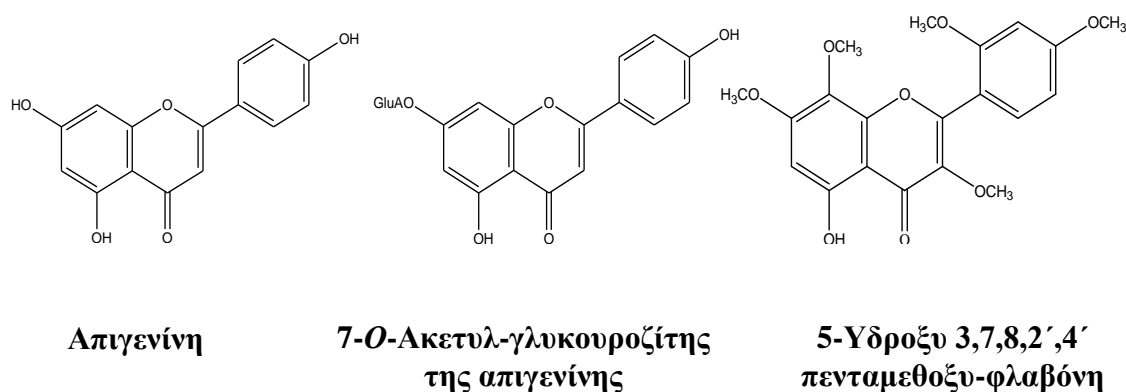
Πίνακας 4.2: Χρόνοι κατακράτησης και κύρια μοριακά ιόντα των ενώσεων εκχυλισμάτων Φασκ._{ΟΑ} και Φασκ._Ε καθώς και η ταυτοποίηση τους με ενώσεις σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα.

N ^ο	Χρόνος Κατακράτησης (min)	Κύριο μοριακό ιόν m/z [M-H] ⁻ (MS ²)	Ένωση
1	11.9	461.5 (299.5)	Όμοπλανταγινίνη
2	12.4	359.7	Ροσμαρινικό οξύ
3	14.2	473.8 (269.1)	7-Ο-ακετυλ-γλυκουροζίτης της Απιγενίνης
4	16.2	315.7	Ισοραμνετίνη
1'	16.9	347.9	N.I.*
5	18.3	269.3	Απιγενίνη
6	18.6	299.4	Ησπιδουλίνη
2'	19.9	404.0 (359.2, 341.4, 281.5, 241.2)	N.I.
7	21.0	345.5	Τετραυδροξυδιμεθοξυφλαβόνη
8	22.5	345.4	Επιροσμανόλη
9	23.5	387.9 (343.7, 283.8)	5-υδροξυ-3,7,8,2',4'-πενταμεθοξυφλαβόνη
3'	25.0	389.8 (346.3)	N.I.
4'	26.5	687.5 (299.1)	N.I.
10	26.9	359.7	Μεθυλικός αιθέρας της Επιροσμανόλης
11	27.5	329.4	Καρνοσόλη
12	28.9	343.5	Ροσμαδιάλη
5'	31.0	364.9	N.I.
13	32.1	331.4	Καρνοσικό οξύ
14	35.9	345.5	Καρνοσικός Μεθυλεστέρας
6'	37.1	317.9	N.I.
7'	40.8	315.9	N.I.
8'	47.9	454.1	N.I.
15	51.4	456.3	Μπετουλινικό οξύ
16	53.6	455.9	Ολεανολικό οξύ
17	54.2	455.7	Ουρσολικό οξύ

N.I.*: Συμβολίζονται τα συστατικά που δεν ταυτοποιήθηκαν

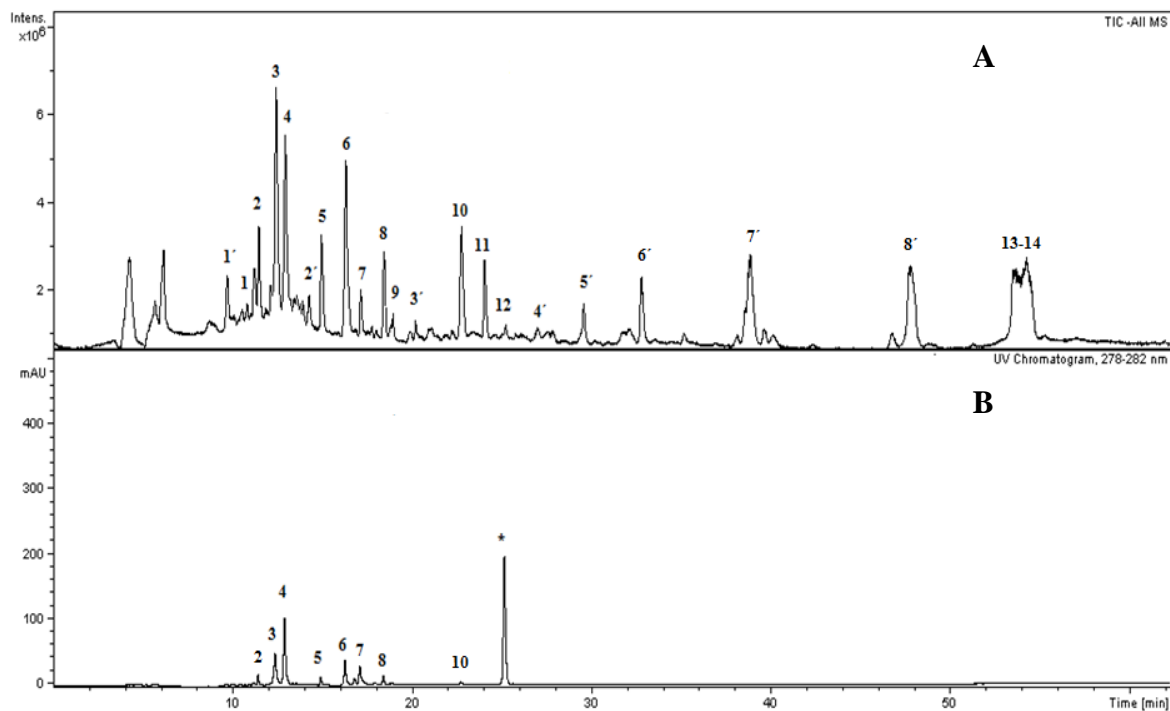
Κύρια συστατικά του εκχυλίσματος Φασκ._{ΟΑ} πιθανώς είναι η τετραυδροξυδιμεθοξυφλαβόνη, η ησπιδουλίνη και το καρνοσικό οξύ, ενώ του Φασκ._Ε το καρνοσικό οξύ και η καρνοσόλη. Η κορυφή 3 με χρόνο κατακράτησης $t_R = 14.2$ min παρουσιάζει κύριο θραύσμα στα 473.8 m/z . Στο φάσμα MS² παρατηρείται ένα ιόν [M-H-204]⁻ στα 269.1 m/z . Το κύριο ιόν στα [M-H-176]⁻ δηλώνει την ύπαρξη ενός μορίου γλυκουρονικού οξέος και με την προσθήκη μιας ακετυλομάδας προκύπτει το ιόν [M-H-204]⁻. Συνεπώς, η κορυφή θα μπορούσε να αντιστοιχεί στον

7-Ο-ακετυλ-γλυκουροζίτη της απιγενίνης. Η κορυφή 4 με χρόνο κατακράτησης $t_R=16.2$ min παρουσιάζει κύριο θραύσμα στα $315.7 m/z$, που θα μπορούσε να αντιστοιχεί στην ισοραμενίνη (isormamnetin-quercetin 3'-methyl ether) ή κάποιο ισομερές της, που έχει αναφερθεί ως συστατικό του φασκόμηλου (Lu and Foo, 2000). Στο Σχήμα 4.7 απεικονίζονται οι χημικοί τύποι των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στα εκχυλίσματα και δεν είναι κοινές με τα αντίστοιχα του δεντρολίβανου. Το φασκόμηλο, θεωρείται ως πλούσια πηγή δι- και τριτερπενίων, φαινολικών οξέων και φλαβονοειδών. Το καρνοσικό οξύ, η καρνοσόλη και το ροσμαρινικό οξύ έχει διαπιστωθεί ότι είναι τα κυριότερα συστατικά εκχυλισμάτων του, και σε αυτά πιθανώς αποδίδεται η αντιοξειδωτική τους δράση (Cuvelier et al., 1994, 1996, Schwarz et al., 1992, Schwarz and Ternes, 1992). Άλλα συστατικά που έχουν ανιχνευθεί σε εκχυλίσματα του, σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα, είναι το καφεϊκό οξύ, η λουτεολίνη και ο 7-Ο-γλυκοζίτης της, η κίρσιμαριτίνη, η τζενκουανίνη, και ο 7-Ο-γλυκοζίτης της ισοσκουτελαρεΐνης (isoscuteallarein) (Cuvelier et al., 1994, Areias et al., 2000).

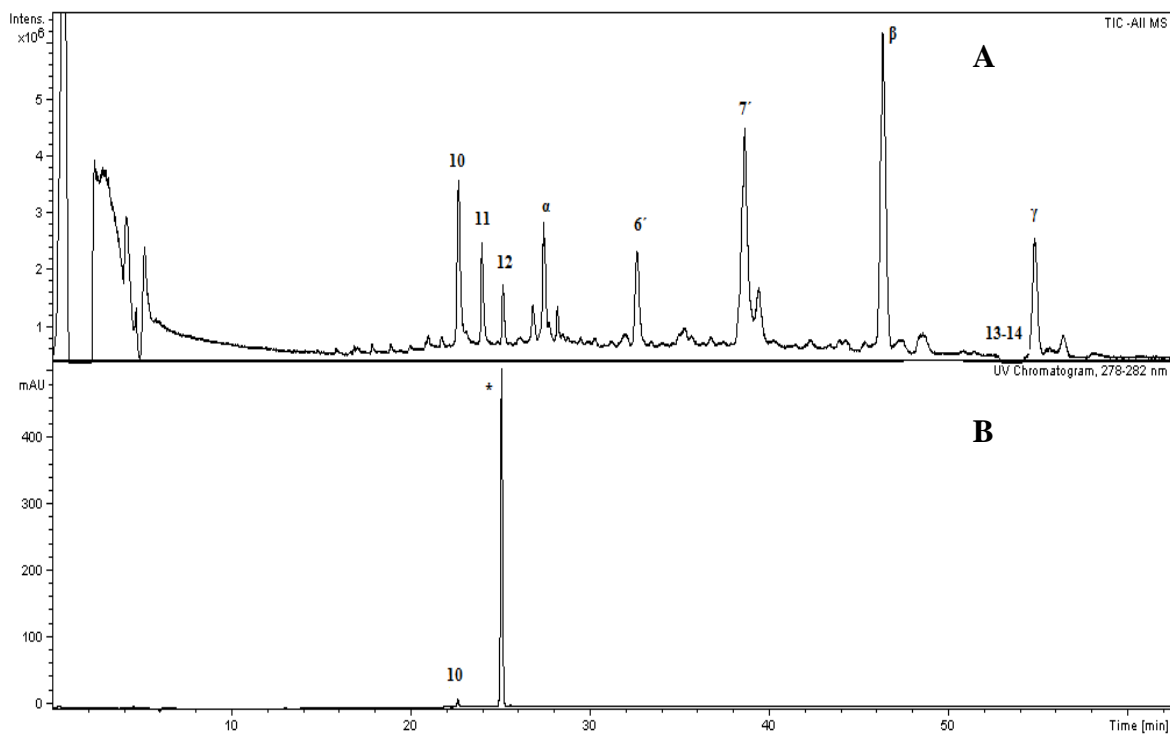


Σχήμα 4.7: Χημικοί τύποι των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στα εκχυλίσματα φασκόμηλου.

Στο Σχήματα 4.8.A και 4.9.A απεικονίζονται τα συνολικά ιόντα μαζών (total mass ion) και στα Σχήματα 4.8.B και 4.9.B τα χρωματογραφήματα των εκχυλισμάτων θυμαριού στα 280 nm και στον Πίνακα 4.3 τα δεδομένα που προέκυψαν για τα συστατικά τους.



Σχήμα 4.8 : Το συνολικό φάσμα μάζας (A) και το χρωματογράφημα στα 280nm (B) εκχυλίσματος *Θυμ.ΟΑ.*



Σχήμα 4.9 : Το συνολικό φάσμα μάζας (A) και το χρωματογράφημα στα 280nm (B) εκχυλίσματος *Θυμ.Ε.*

Πίνακας 4.3: Χρόνοι κατακράτησης και κύρια μοριακά ιόντα των ενώσεων των εκχυλισμάτων Θυμ._{ΟΑ} και Θυμ._Ε καθώς και η ταυτοποίησή τους με ενώσεις σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα.

N ^ο	Χρόνος Κατακράτησης (min)	Κύριο μοριακό ιόν m/z [M-H] ⁻	Ένωση
1'	9.7	655.5	N.I.*
1	10.8	577.7 (269.1)	7-Ο-Ρουτινοζίτης της απιγενίνης
2	11.4	609.5 (301.2)	Εσπεριδίνη
3	12.4	359.6	Ροσμαρινικό οξύ
4	12.9	303.4	Ταξιφολίνη
2'	14.2	679.4-409.4	N.I.
5	14.9	287.3	Αρομαντετρίνη
6	16.3	287.3, 575.3	Εριοδικτυόλη
7	17.1	329.6	Θυμουσίνη
8	18.4	271.1	Ναριγκενίνη
9	18.9	301.9	Εσπερετίνη
3'	20.1	452.3	N.I.
10	22.7	164.9	p-Κυμενι-2,3-διόλη
11	24.0	329.5	Ισοθυμουσίνη
12	25.2	314.8	Νεπετίνη ή πενταλιτίνη
4'	26.9	440.5	N.I.
5'	29.5	472.5	N.I.
6'	32.7	313.7	N.I.
7'	38.8	313.5	N.I.
8'	47.7	454.0	N.I.
13	53.6	455.9	Ολεανολικό οξύ
14	54.2	455.7	Ουρσολικό οξύ

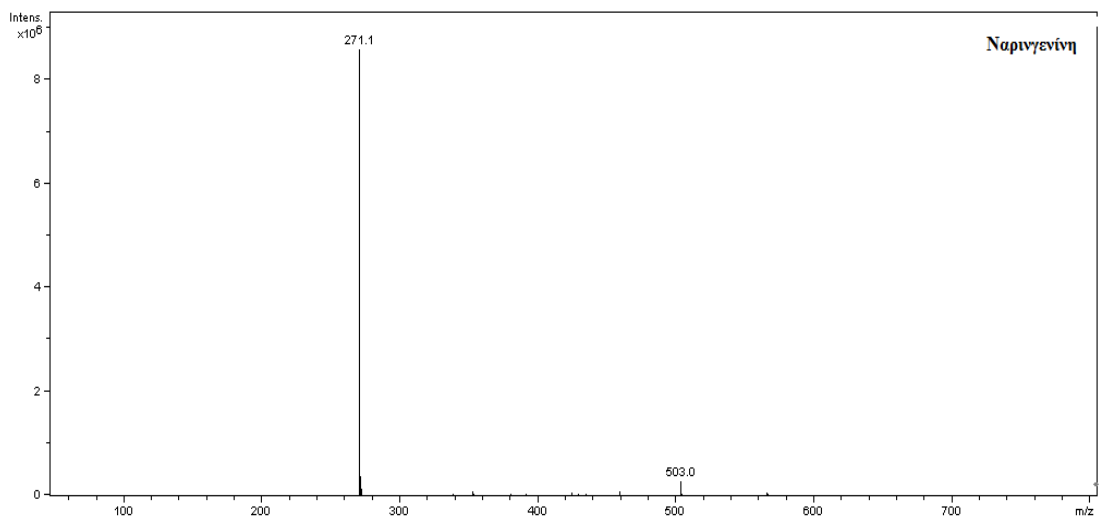
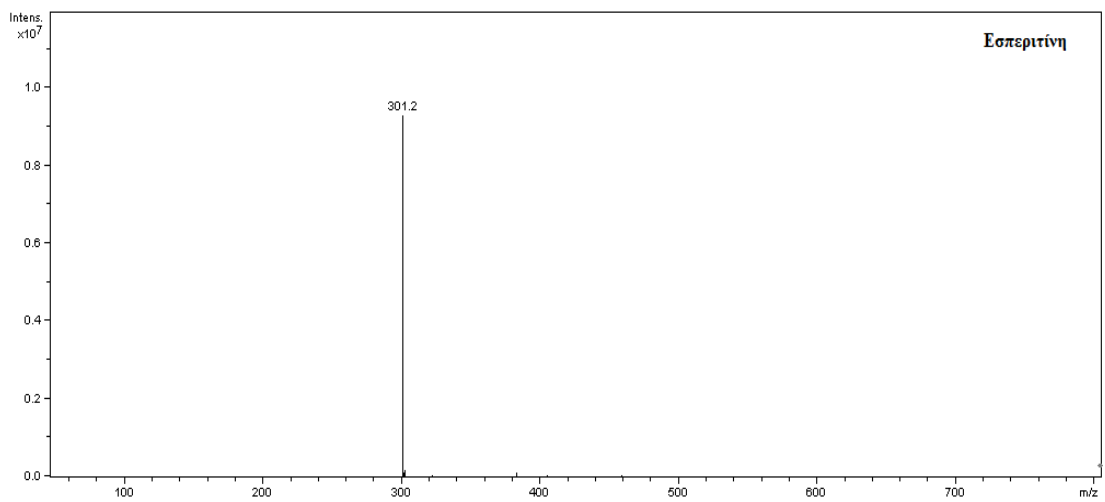
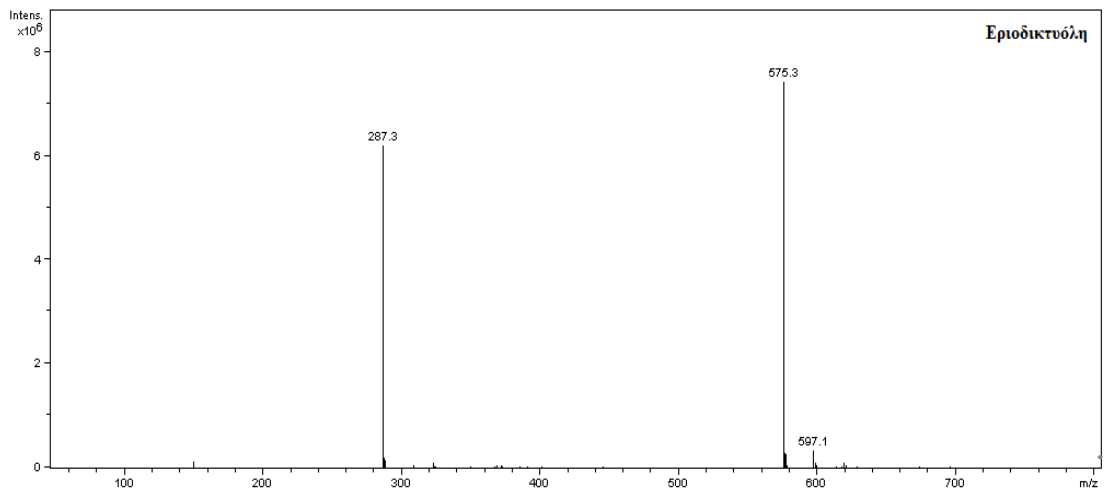
N.I.*: Συμβολίζονται τα συστατικά που δεν ταυτοποιήθηκαν

Από τα χρωματογραφήματα τους φαίνεται ότι το συστατικό που αντιστοιχεί στην υψηλότερη κορυφή με χρόνο κατακράτησης $t_R = 25.0$ min (κορυφή *) είναι κοινό και για τα δύο, καθώς και η κορυφή 10 με $t_R = 22.7$ min. Πριν από την κορυφή 10 λείπουν από το εκχύλισμα Θυμ._Ε τα συστατικά που ανιχνεύονται στο αντίστοιχο Θυμ._{ΟΑ}, κάτι που είναι αναμενόμενο, καθώς πρόκειται για φαινολικά συστατικά που είναι πολικά μόρια. Υπάρχουν και κοινές κορυφές στο συνολικό φάσμα μάζας, που είναι όμως ήσσονα συστατικά τους. Η κορυφή με χρόνο κατακράτησης $t_R = 25.0$ min δεν ιοντίζεται, γι' αυτό η ταυτοποίησή της έγινε με βάση το χρόνο κατακράτησης πρότυπων ενώσεων που συνέπεσε με αυτό της καρβακρόλης και της θυμόλης. Από τα

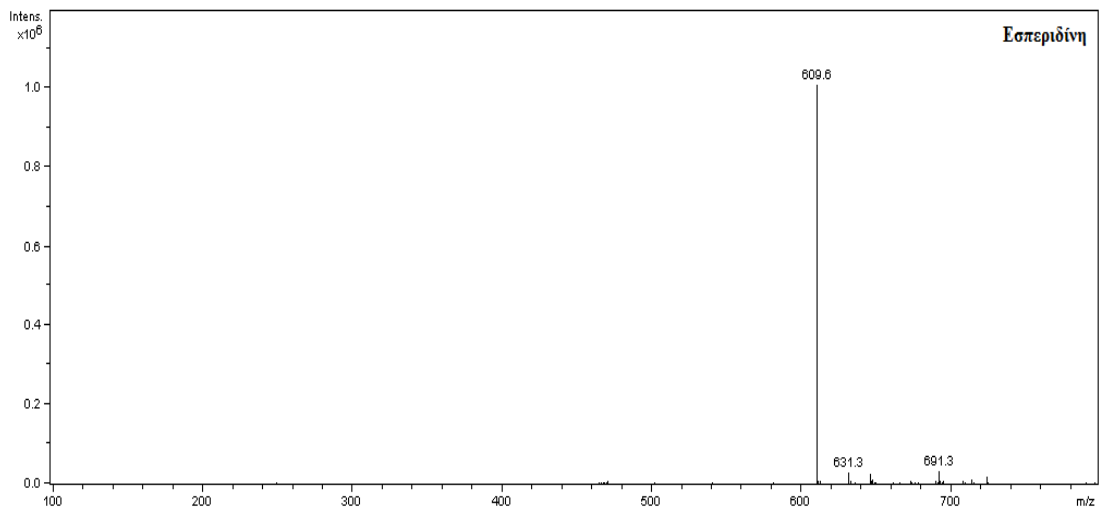
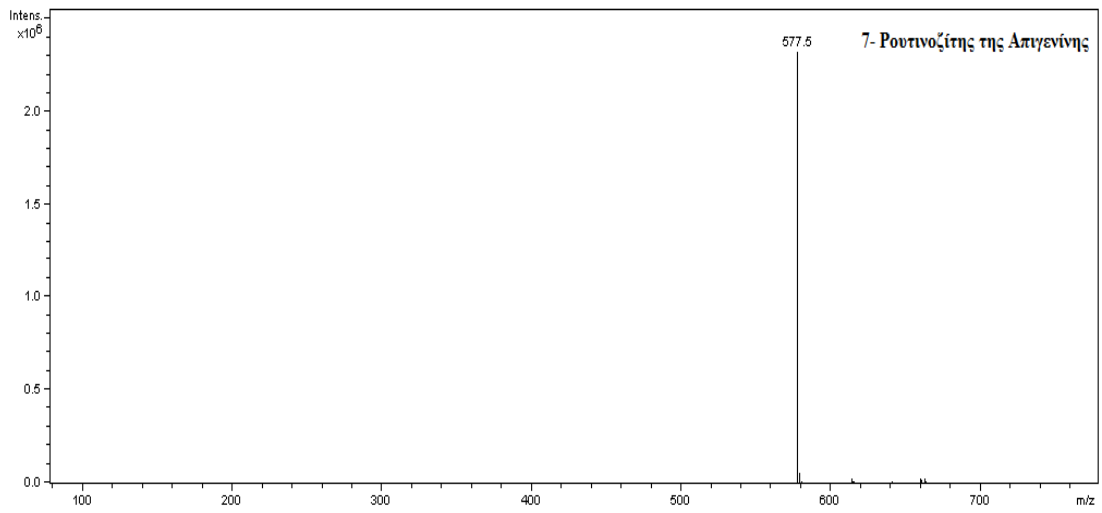
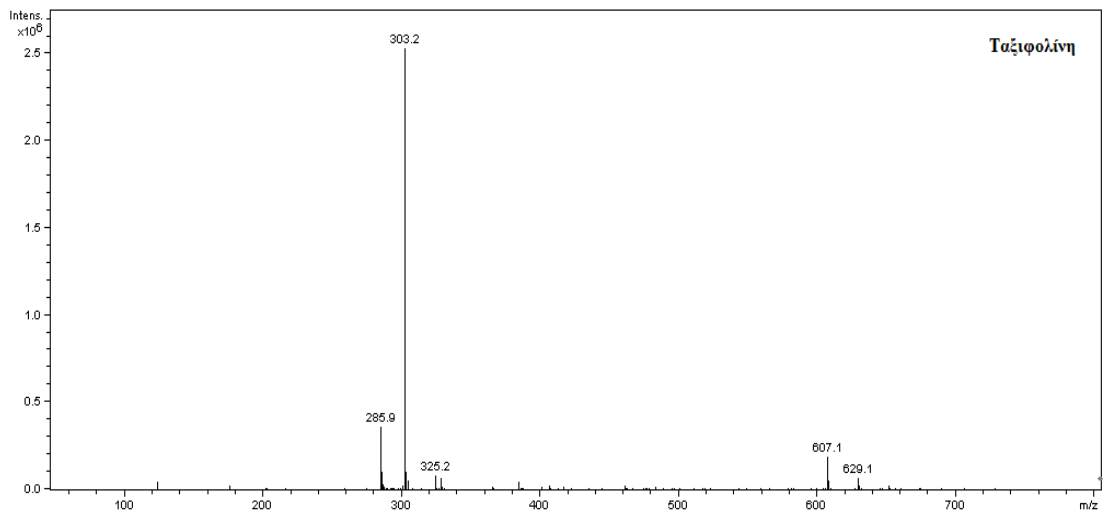
αποτελέσματα της ανάλυσης με τη φασματοσκοπία NMR, αποδείχθηκε ότι είναι η καρβακρόλη.

Η ταυτοποίηση των ενώσεων έγινε με βάση τα φάσματα μάζας, σε σύγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα και στην περίπτωση ύπαρξης προτύπων ενώσεων, με σύγκριση του χρόνου κατακράτησης και του φάσματος μάζας αυτών. Για τα περισσότερα συστατικά υπήρχαν διαθέσιμες πρότυπες ενώσεις, τα φάσματα μάζας των οποίων δίνονται στα Σχήματα 4.10, 4.11. Για τα υπόλοιπα (θυμουσίνη-thymusin, p-κυμεν-2,3-διόλη, ισοθυμουσίνη-isothymusin) έγινε μια πιθανή ταυτοποίηση τους στις συγκεκριμένες ενώσεις, που έχουν απομονωθεί από εκχυλίσματα θυμαριού σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (*Van den Broucke et al., 1982, Schwarz and Ernst, 1996, Wang et al., 1998*) αλλά και από τους χρόνους κατακράτησης τους με βάση βιβλιογραφικά δεδομένα (*Dapkevicius et al., 2002*).

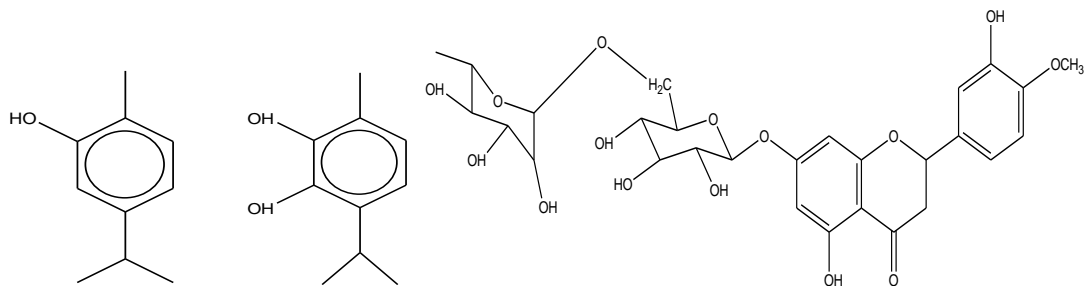
Η κορυφή 5 με χρόνο κατακράτησης $t_R=14.9$ min πιθανώς να αντιστοιχεί στην αρομαντετρίνη (aromadendrin), που με βάση βιβλιογραφικά δεδομένα εκλούεται πριν την εριοδικτυόλη (eriodictyol) (*Exarchou et al., 2003*). Γενικότερα, οι περισσότερες μελέτες έχουν γίνει για το αιθέριο έλαιο και δεν υπάρχουν μελέτες ανάλυσης εκχυλισμάτων θυμαριού με υγρή χρωματογραφία σε σύζευξη με φασματομετρία μαζών. Άλλα φλαβονοειδή που έχουν αναφερθεί ως συστατικά του θυμαριού είναι η απιγενίνη, η θυμονίνη (thymonin), η 5,4'-διυδροξυ-6,7,8,3'-τετραμεθοξυφλαβόνη (*Van den Broucke et al., 1982*), η λουτεολίνη, ο 7-O-β-γλυκοζίτης, ο 7-O-β-γλυκοπυρανοζίτης και ο 7-διγλυκοζίτης της, η υδροξυλουτεολίνη και ο 7-O-ρουτινοζίτης της εριοδικτυόλης, (*Wang et al., 1998*). Στο Σχήμα 4.12 απεικονίζονται οι χημικοί τύποι των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στα εκχυλίσματα θυμαριού.



Σχήμα 4.10: Φάσματα μάζας [M-H] των προτύπων ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν σε εκχυλίσματα θυμαριού.



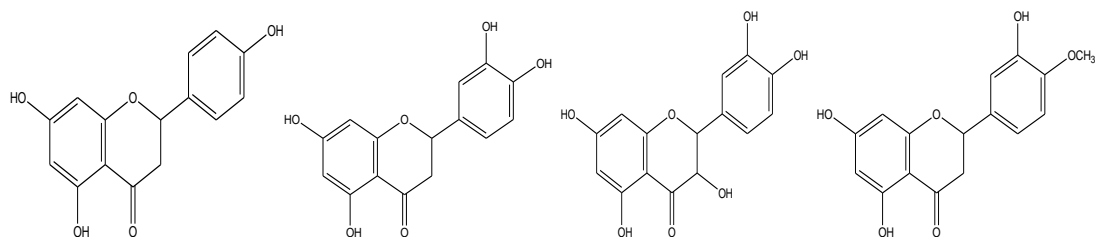
Σχήμα 4.11: Φάσματα μάζας $[M-H]$ των προτύπων ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν σε εκχυλίσματα θυμαριού.



Καρβακρόλη

p-Κυμεν-2,3-διόλη

Εσπεριδίνη

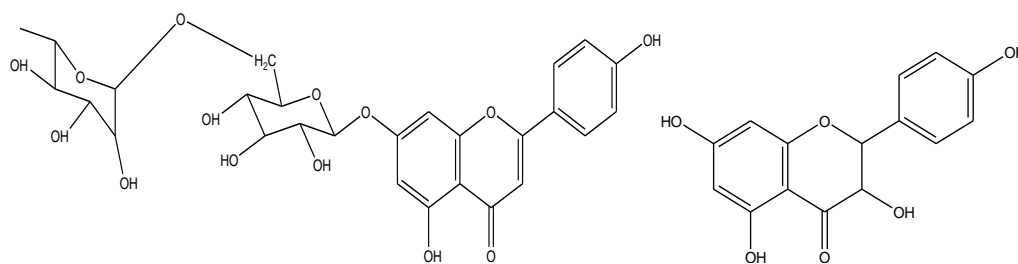


Ναριγκενίνη

Εριοδικτυόλη

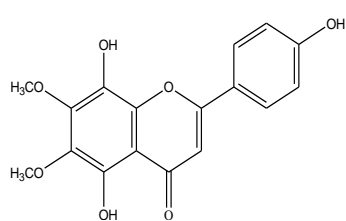
Ταξιφολίνη

Εσπεριτίνη

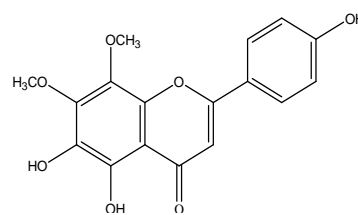


7-O-Ρουτινοζίτης της απιγενίνης

Αρομαντετρίνη



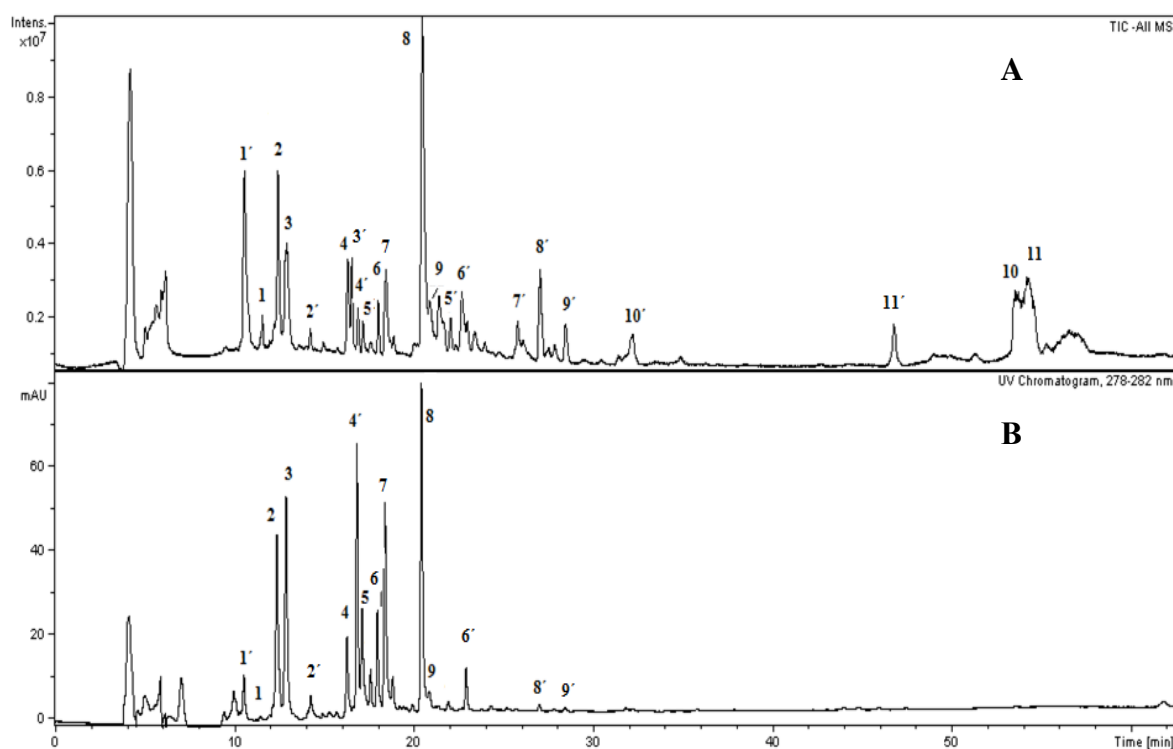
Ισοθυμουσίνη



Θυμουσίνη

Σχήμα 4.12: Χημικοί τύποι των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στα εκχ. θυμαριού.

Επίσης, από την οικογένεια *Lamiaceae* παρασκευάστηκαν εκχυλίσματα μαντζουράνας. Το εκχύλισμα Μαντζ_Ε είναι πολύ φτωχό σε συστατικά και δεν μελετήθηκε περαιτέρω. Στο Σχήματα 4.13.A και 4.13B απεικονίζονται το συνολικό ιόν μάζας (total mass ion) και το χρωματογράφημα αντίστοιχα, του εκχυλίσματος Μαντζ_{ΟΑ} στα 280 nm και στον Πίνακα 4.4 τα δεδομένα που προέκυψαν για τα συστατικά του. Τα κυριότερα συστατικά των διάφορων γενών ρίγανης είναι φλαβονοειδή, όπως η λουτεολίνη, η απιγενίνη, η διοσμετίνη, η ναριγκενίνη, η κερκετίνη, η ταξιφολίνη, η εριοδικτυόλη, και ορισμένοι γλυκοζίτες του, και φαινολικά οξέα, όπως το καφεϊκό και το ροσμαρινικό οξύ (*Dorman et al., 2004, Al-Bandak and Oreopoulou, 2007*). Οι περισσότερες μελέτες που υπάρχουν για το φυτό της μαντζουράνας αφορούν το αιθέριο έλαιο και όχι τα υπόλοιπα συστατικά της.



Σχήμα 4.13 : Το συνολικό φάσμα μάζας (A) και το χρωματογράφημα στα 280nm (B) εκχυλίσματος Μαντζ_{ΟΑ}.

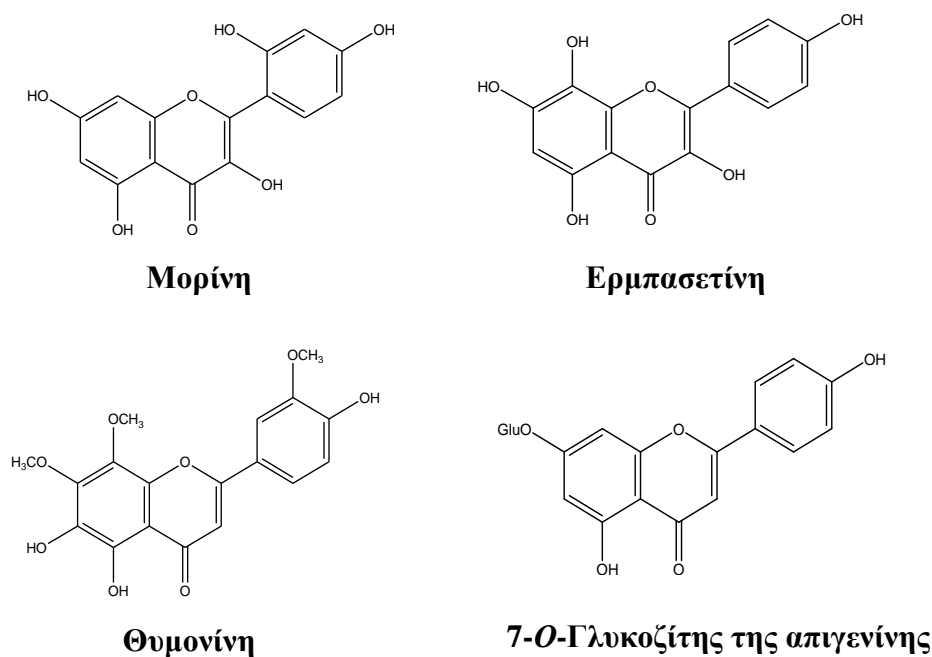
Πίνακας 4.4: Χρόνοι κατακράτησης και κύρια μοριακά ιόντα καθώς και η ταυτοποίησή τους με ενώσεις σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα.

N ^o	Χρόνος Κατακράτησης (min)	Κύριο μοριακό ιόν m/z [M-H] ⁻ (MS ²)	Ένωση
1'	10.5	433.0 (323.8, 161.2)	N.I.*
1	11.5	431.6 (269.1)	7-Ο-Γλυκοζίτης της απιγενίνης
2	12.4	359.4	Ροσμαρινικό οξύ
3	12.9	303.6	Ταξιφολίνη
2'	14.2	575.6 (515.2)	N.I.
4	16.3	287.5	Εριοδικτυόλη
3'	16.5	328.5	N.I.
4'	16.8	685.4	N.I.
5	17.1	329.6	Θυμουσίνη
6	18.0	331.6	5,7,8,3', 4'-πενταυδροξυ-6-μεθοξυφλαβόνη
7	18.4	271.1 & 359.5	Ναριγκενίνη & θυμονίνη
8	20.4	301.5, 603.3	Μορίνη ή Ερμπασετίνη ή 3' ή 7-μεθοξυ-Εριοδικτυόλη
9	20.8	299	Κρισσοεριόλη
5'	21.3	312.0	N.I.
6'	22.6	326.1	N.I.
7'	25.8	558.7 (495.3)	N.I.
8'	27.0	439.6 (412.2)	N.I.
9'	28.4	439.7 (302.1, 178.8)	N.I.
10'	32.1	424.6 (287.4)	N.I.
11'	46.7	278.0	N.I.
10	53.5	455.9	Ολεανολικό οξύ
11	54.2	455.9	Ουρσολικό οξύ

N.I.*: Συμβολίζουντα τα συστατικά που δεν ταυτοποιήθηκαν

Για τις ενώσεις 7-Ο-γλυκοζίτη της απιγενίνης, ροσμαρινικό οξύ, ταξιφολίνη, εριοδικτυόλη, ναριγκενίνη, ολεανολικό και ουρσολικό οξύ που ταυτοποιήθηκαν στο παραπάνω εκχύλισμα, χρησιμοποιήθηκε εκτός από το φάσμα μάζας και ο χρόνος κατακράτησης πρότυπων ενώσεων. Για τα υπόλοιπα συστατικά έγινε μια πιθανή ταυτοποίηση τους στις συγκεκριμένες ενώσεις. Η μεγαλύτερη κορυφή του χρωματογραφήματος με χρόνο κατακράτησης $t_R=20.4$ min και κύριο θραύσμα στα 301.5 m/z θα μπορούσε να αντιστοιχεί στη μορίνη (morin) ή την ερμπασετίνη (herbacetin) (Lin and Harnly, 2007) ή την 3'-ή 7-μεθόξυ εριοδικτυόλη. Κύριο θραύσμα στα 301.2 m/z έχει και η κερκετίνη, η οποία έχει αναφερθεί ως συστατικό των διαφόρων γενών ρίγανης, αλλά έχει διαφορετικό χρόνο έκλουσης στο

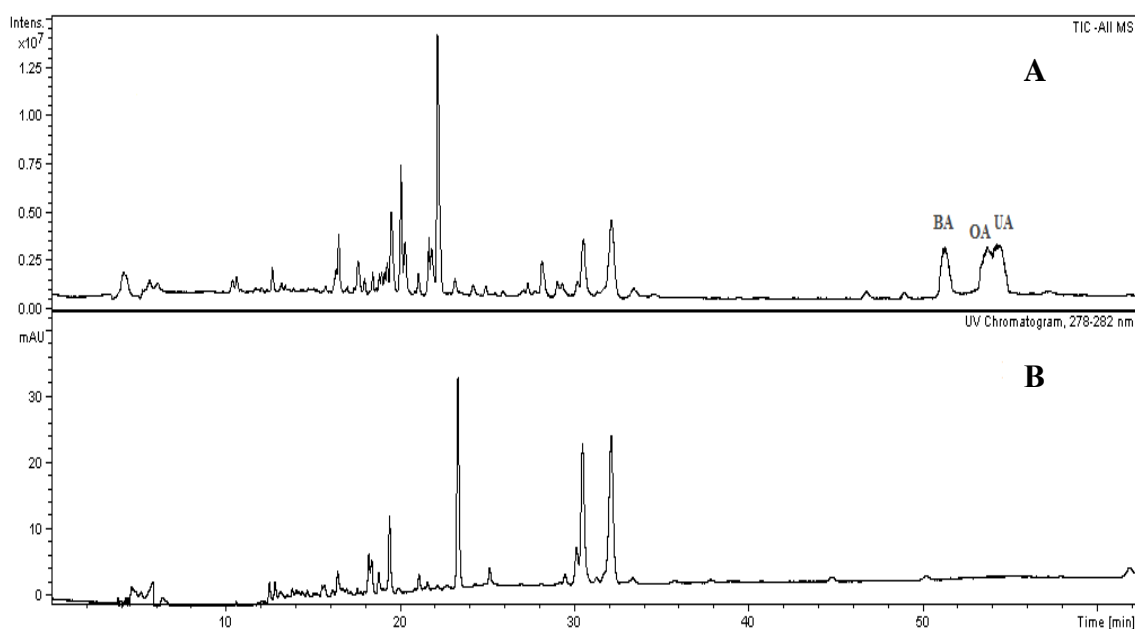
συγκεκριμένο πρόγραμμα ($t_R=16.3$ min). Επειδή είναι ένα από τα κύρια φλαβονοειδή του εκχυλίσματος συνδυάζοντας το φάσμα μάζας με τα δεδομένα της φασματοσκοπίας NMR μιας και δυο διαστάσεων, θα μπορούσε η ταυτοποίησή της να γίνει με μεγαλύτερη σιγουριά. Επίσης, και για την κορυφή με χρόνο κατακράτησης $t_R=16.8$ min και κύριο θραύσμα στα 685.4 m/z , που δεν αποδόθηκε με βάση τα βιβλιογραφικά δεδομένα σε κάποια γνωστή ένωση, η φασματοσκοπία NMR μπορεί να δώσει κάποιες πληροφορίες ως προς τη δομή της. Ομοιότητες ως προς τη σύστασή τους παρατηρούνται μεταξύ των εκχυλισμάτων Θυμ.ΟΑ και Μαντζ.ΟΑ, όπως για παράδειγμα η κοινή κορυφή με χρόνο κατακράτησης $t_R=17.1$ min και φάσμα μάζας στα 329.6 m/z , που πιθανώς αντιστοιχεί στην θυμουσίνη. Τέλος, η κορυφή 7 με χρόνο κατακράτησης $t_R=18.4$ min παρουσιάζει δυο κύρια θραύσματα στα 271.1 & 359.5 m/z , που θα μπορούσε να οφείλεται στο γεγονός ότι συνεκλούνται δυο συστατικά. Αυτά είναι η ναριγκενίνη, για την οποία υπήρχε διαθέσιμη και πρότυπη ένωση, και πιθανώς και η θυμονίνη (thymonin), που έχει αναφερθεί ως συστατικό των γενών ρίγανης (Skoula et al., 2008). Στο Σχήμα 4.14 απεικονίζονται οι χημικοί τύποι των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στο εκχύλισμα μαντζουράνας.



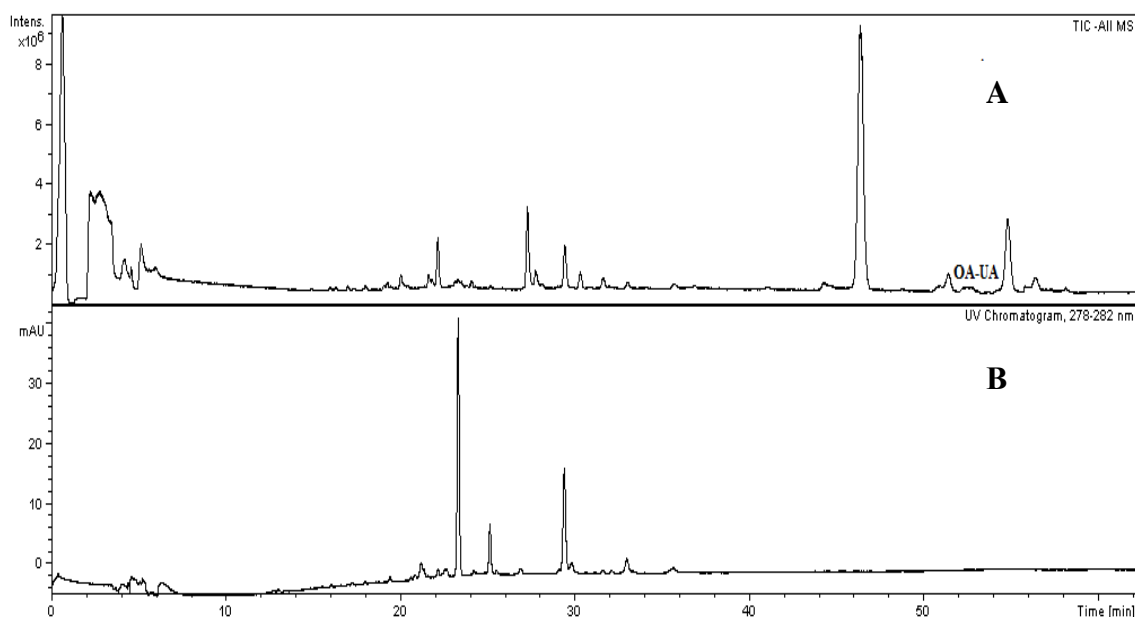
Σχήμα 4.14: Χημικοί τύποι των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στο εκχύλισμα Μαντζ.ΟΑ.

Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή παρασκευάστηκαν και εκχυλίσματα φύλλων ελιάς. Το εκχύλισμα Φ.Ε.Ε ήταν ιδιαίτερα φτωχό σε φαινολικά συστατικά. Στο

εκχύλισμα Φ.Ε._{ΟΑ} ταυτοποιήθηκαν ορισμένα φλαβονοειδή, όπως ο 7-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης ($t_R=10.9$ min, 447.6 m/z), η λουτεολίνη ($t_R=16.2$ min, 285.3 m/z) και η απιγενίνη ($t_R=18.4$ min, 269.7 m/z), για τα οποία υπήρχαν και πρότυπες ενώσεις, και πιθανώς ο 3-Ο-γλυκοζίτης της κυανιδίνης (cyanidin 3-glucoside) ($t_R=12.1$ min, 448.1 m/z) που έχει αναφερθεί ως συστατικό εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς (Ryan *et al.*, 2002) καθώς και κάποια σεκοειριδοειδή. Εκχυλίσματα φύλλων ελιάς έχουν μελετηθεί, ως προς τη σύστασή τους αλλά και ως προς την αντιοξειδωτική και αντικαρκινική τους δράση, σε μεγάλο βαθμό από την ερευνητική μας ομάδα (Κοντογιάννη, 2005, Μεταπτυχιακή διατριβή, Τσιούτσιας, 2005, Μεταπτυχιακή διατριβή, Goulas *et al.*, 2009), γι αυτό και δεν δόθηκε ιδιαίτερη έμφαση στην ανάλυσή τους. Και στα δύο εκχυλίσματα διαπιστώθηκε η παρουσία του ολεανολικού οξέος. Τέλος, παρασκευάστηκαν εκχυλίσματα ροδοδάφνης (*Nerium Oleander*), των οποίων τα συστατικά δεν ήταν δυνατόν να αποδοθούν σε γνωστές ενώσεις, με βάση βιβλιογραφικά δεδομένα. Στα Σχήματα 4.15.A και 4.16.B απεικονίζονται τα συνολικά ιόντα μάζας (total mass ion) και το χρωματογράφημα των εκχυλισμάτων ροδοδάφνης στα 280 nm. Και στα δύο εκχυλίσματα διαπιστώθηκε η παρουσία του ολεανολικού και ουρσολικού οξέος.



Σχήμα 4.15 : Το συνολικό φάσμα μάζας (A) και το χρωματογράφημα στα 280nm (B) εκχυλίσματος Ροδ._{ΟΑ}.



Σχήμα 4.16 : Το συνολικό φάσμα μάζας (A) και το χρωματογράφημα στα 280nm (B) εκχυλίσματος Ροδ.Ε.

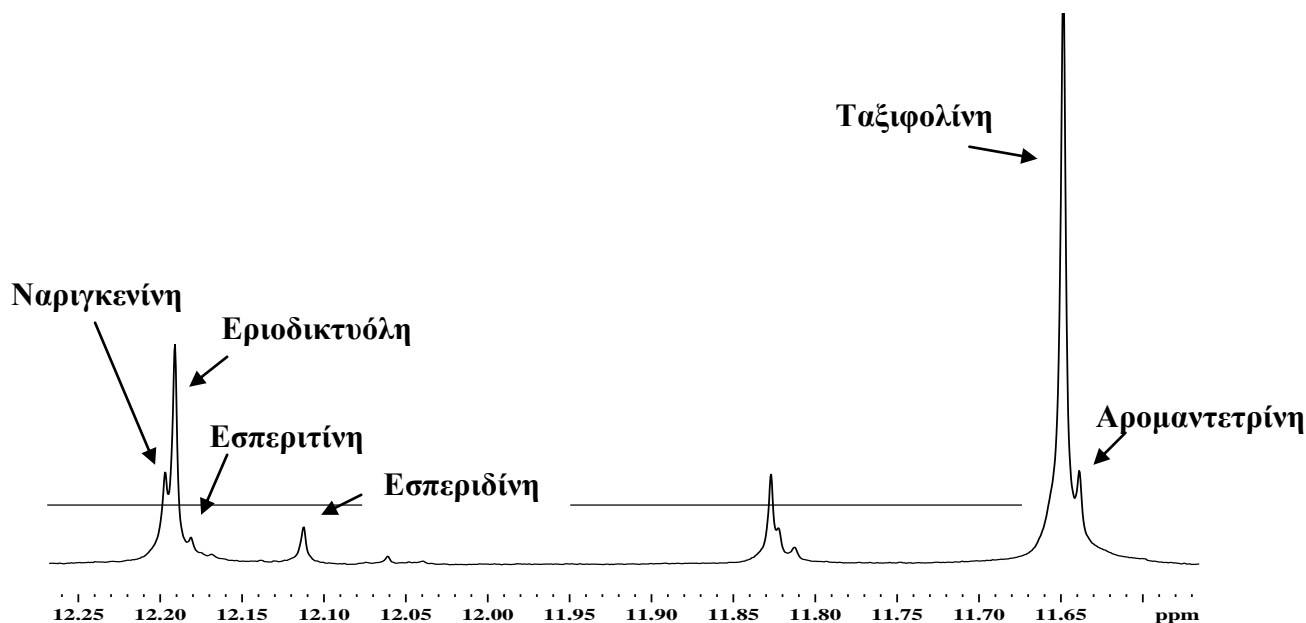
4.2 Σύγκριση μεταξύ των αποτελεσμάτων της τεχνικής LC-ESI-MS και των μεθοδολογιών NMR ως προς την παρουσία φλαβονοειδών.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την εφαρμογή της μεθοδολογίας NMR-¹H εξετάστηκαν συγκριτικά με εκείνα που προέκυψαν από την τεχνική LC-ESI-MS ως προς την παρουσία φλαβονοειδών ενώσεων στα υπό μελέτη εκχυλίσματα. Όπως αναφέρθηκε στο Κεφάλαιο 3.2, στο εκχύλισμα Δεντ.ΟΑ από το φάσμα NMR-¹H στους 258 K προκύπτει ότι πιθανώς υπάρχουν 5 φλαβόνες ή *O*-γλυκοζίτες φλαβόνων, εκ των οποίων μια είναι η τζενκουανίνη, και 2 *C*-γλυκοζίτες φλαβόνων (με τη γλυκοζυλίωση στη θέση 8). Από την ανάλυση με την τεχνική LC-ESI-MS έγινε μια πιθανή απόδοση κάποιων κορυφών στις εξής φλαβόνες: τζενκουανίνη, ησπιδουλίνη, τετραυδροξυδιμεθοξυφλαβόνη, κισιλινεόλη ή ευπατορίνη. Όπως επίσης, και στους εξής γλυκοζίτες φλαβόνων: τον 7-*O*-γλυκοζίτη της 6-μεθοξυλουτεολίνης και την ομοπλανταγινίνη. Όσον αφορά το εκχύλισμα Δεντ.Ε, με βάση το φάσμα NMR-¹H πιθανώς υπάρχουν 2 φλαβόνες που από τα φάσματα μάζας, θα μπορούσαν να αποδοθούν στη τετραυδροξυδιμεθοξυφλαβόνη και στη κισιλινεόλη ή ευπατορίνη.

Στο εκχύλισμα Φασκ.ΟΑ προκύπτει ότι πιθανώς υπάρχουν 7 φλαβόνες ή *O*-γλυκοζίτες φλαβόνων και 2 *C*-γλυκοζίτες φλαβόνων με βάση το φάσμα NMR-¹H στους 258 K. Από τα φάσματα μάζας των διάφορων κορυφών έγινε η πιθανή

απόδοση στις εξής φλαβόνες: απιγενίνη, ησπιδουλίνη, τετραυδροξυδιμεθοξυφλαβόνη, 5-υδροξυ-3,7,8,2',4'-πενταμεθοξυ-φλαβόνη και στους εξής γλυκοζίτες φλαβόνων: ομοπλανταγινίνη και 7-*O*-ακετυλ-γλυκουροζίτη της απιγενίνης. Επίσης, στο φάσμα NMR- ¹H παρατηρούνται δυο διπλές κορυφές στα ~11.99 και 12.11 ppm και μια απλή στα ~12.32 ppm, που θα μπορούσαν να ανήκουν σε φλαβονόλες και φλαβανόνες. Από τα φάσματα μάζας των διαφόρων κορυφών μια φλαβονόλη πιθανώς ταυτοποιήθηκε ως η ισοραμενίνη, αλλά υπάρχουν και άγνωστα συστατικά (1', 2', 3', 4') που θα μπορούσαν να αντιστοιχούν σε φλαβονοειδή. Στο αντίστοιχο εκχύλισμα Δεντ._E στο φάσμα NMR- ¹H υπάρχει ένα σήμα συντονισμού στην περιοχή των ~12.9 ppm, που πιθανώς αντιστοιχεί σε μια φλαβόνη και εκατέρωθεν αυτού δύο πολύ μικρά. Από την ανάλυση των φασμάτων μάζας φαίνεται ότι πιθανώς υπάρχουν η τετραυδροξυδιμεθοξυφλαβόνη και η 5-υδροξυ-3,7,8,2',4'-πενταμεθοξυφλαβόνη.

Στο εκχύλισμα Θυμ._{OA} ταυτοποιήθηκαν 3 φλαβανόνες, η εριοδικτυόλη, η εσπεριτίνη και η ναριγκενίνη και μια φλαβανονόλη, η ταξιφολίνη με βάση το φάσμα NMR- ¹H και την προσθήκη μικρής ποσότητας πρότυπων ενώσεων στο εκχύλισμα για την ενίσχυση του σήματος. Επίσης, υπάρχουν τα σήμα συντονισμού στα ~11.75 ppm, ~12.05 ppm, ~12.65 ppm και 3 κορυφές στην περιοχή των ~12.95 ppm οι οποίες θα πρέπει να αντιστοιχούν σε φλαβόνες ή *O*-γλυκοζίτες φλαβόνων. Από τα φάσματα μάζας των διάφορων κορυφών ταυτοποιήθηκαν από την τάξη των φλαβανόνων, η εριοδικτυόλη, η εσπεριτίνη, η εσπεριδίνη και η ναριγκενίνη· από την τάξη των φλαβανονόλων η ταξιφολίνη και πιθανώς η αρομαντετρίνη· από τις φλαβόνες, πιθανώς η θυμουσίνη και η ισοθυμουσίνη και από τους γλυκοζίτες φλαβόνων, ο 7-*O*-ρουτινοζίτης της απιγενίνης. Συνδυάζοντας τα αποτελέσματα των δυο τεχνικών αλλά και σε συμφωνία με βιβλιογραφικά δεδομένα η μικρή κορυφή πριν την αντίστοιχη της ταξιφολίνης στα 11.55 ppm, που διαχωρίζεται στους 258 K, θα πρέπει να αντιστοιχεί στην αρομαντετρίνη (*Exarchou et al., 2003*) και η κορυφή στα 12.05 ppm στην εσπεριδίνη (*Ferreira et al., 2000*) (Σχήμα 4.17). Στο εκχύλισμα Θυμ._E στο φάσμα NMR- ¹H φαίνονται δυο πολύ μικρές κορυφές στα ~11.75 ppm και ~12.65 ppm, που δεν είναι δυνατόν να αποδοθούν σε γνωστές ενώσεις.



Σχήμα 4.17: Επιλεγμένη περιοχή φάσματος NMR-¹H εκχυλίσματος Θυμ._{0A} σε CD₃CN όπου υποδηλώνεται η ταυτοποίηση των φλαβονοειδών (NS= 256, T=258 K, *t*_{exp}=21min, 400MHz).

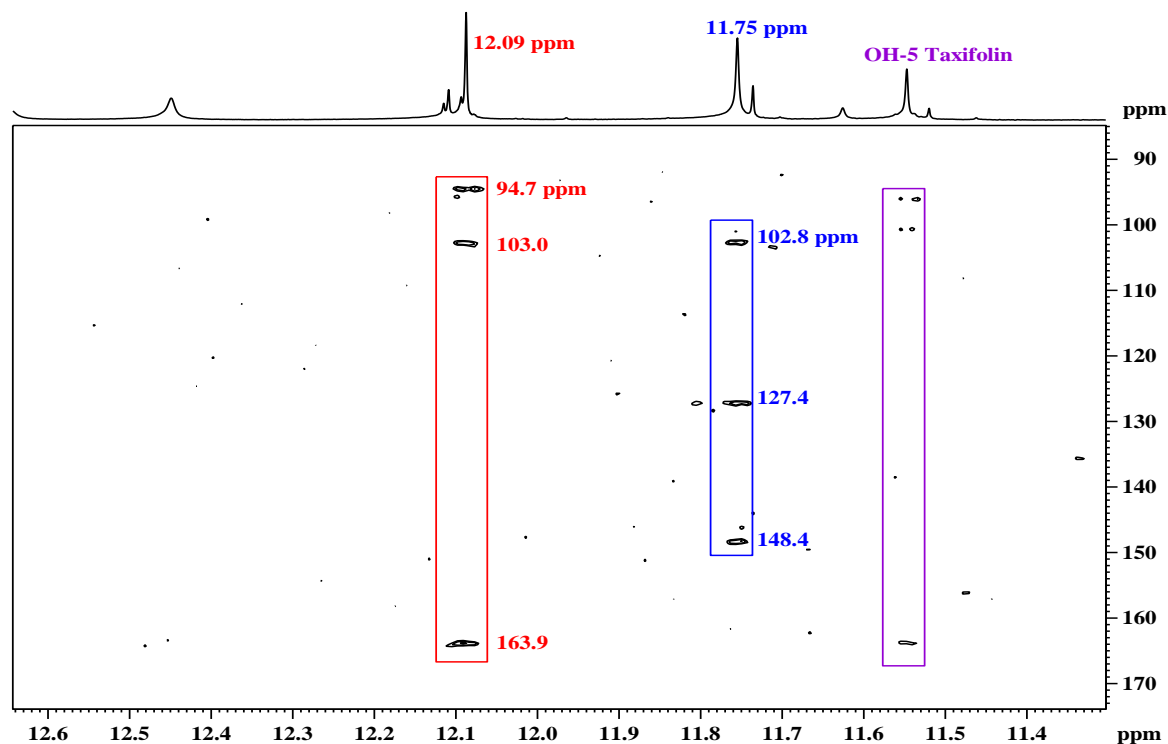
Στο εκχύλισμα Μαντζ._{0A} ταυτοποιήθηκαν 2 φλαβανόνες, η εριοδικτυόλη και η ναριγκενίνη και μια φλαβανονόλη η ταξιφολίνη με βάση το φάσμα NMR- ¹H και την προσθήκη μικρής ποσότητας πρότυπων ενώσεων. Επίσης, υπάρχουν και τα σήματα συντονισμού στα ~11.52, 11.63, 11.74, 11.75, 12.09, 12.45, 12.65 ppm και 4 κορυφές στην περιοχή των ~12.95 ppm οι οποίες θα πρέπει να αντιστοιχούν σε φλαβόνες ή *O*-γλυκοζίτες φλαβόνων. Από τα φάσματα μάζας των διάφορων κορυφών ταυτοποιήθηκαν από την τάξη των φλαβανόνων, η εριοδικτυόλη και η ναριγκενίνη από την τάξη των φλαβανονόλων η ταξιφολίνη από τις φλαβόνες, πιθανώς η θυμουσίνη, η θυμονίνη και η κρισοεριοόλη και από τα φλαβονοειδή συνδεδεμένα με σάκχαρο, ο 7-*O*-γλυκοζίτης της απιγενίνης.

Ένα από τα κύρια συστατικά του εκχυλίσματος που εκλύεται σε *t*_R= 20.4 min και παρουσιάζει κύριο θραύσμα στα 301.5 *m/z* θα μπορούσε να αντιστοιχεί στη μορίνη (morin) ή την ερμπασετίνη (herbacetin) (φλαβονόλες) ή στη 3'-ή 7-μεθοξυ-εριοδικτυόλη (φλαβανανόνη). Η απορρόφηση του πρωτονίου της υδροξυλομάδας της θέσης 5 της κύριας κορυφής είναι στα 12.09 ppm. Το συγκεκριμένο πρωτόνιο της μορίνης απορροφά στα 12.83 ppm (Lianda and Castro, 2008), του 4'-μεθοξυ αιθέρα της ερμπασετίνης στα 11.9 ppm (Wollenweber et al., 1994) και της 3'-μεθοξυ-εριοδικτυόλης στα 12.16 ppm (Stevens et al., 1999), σε διαλύτη DMSO-*d*₆ και σε

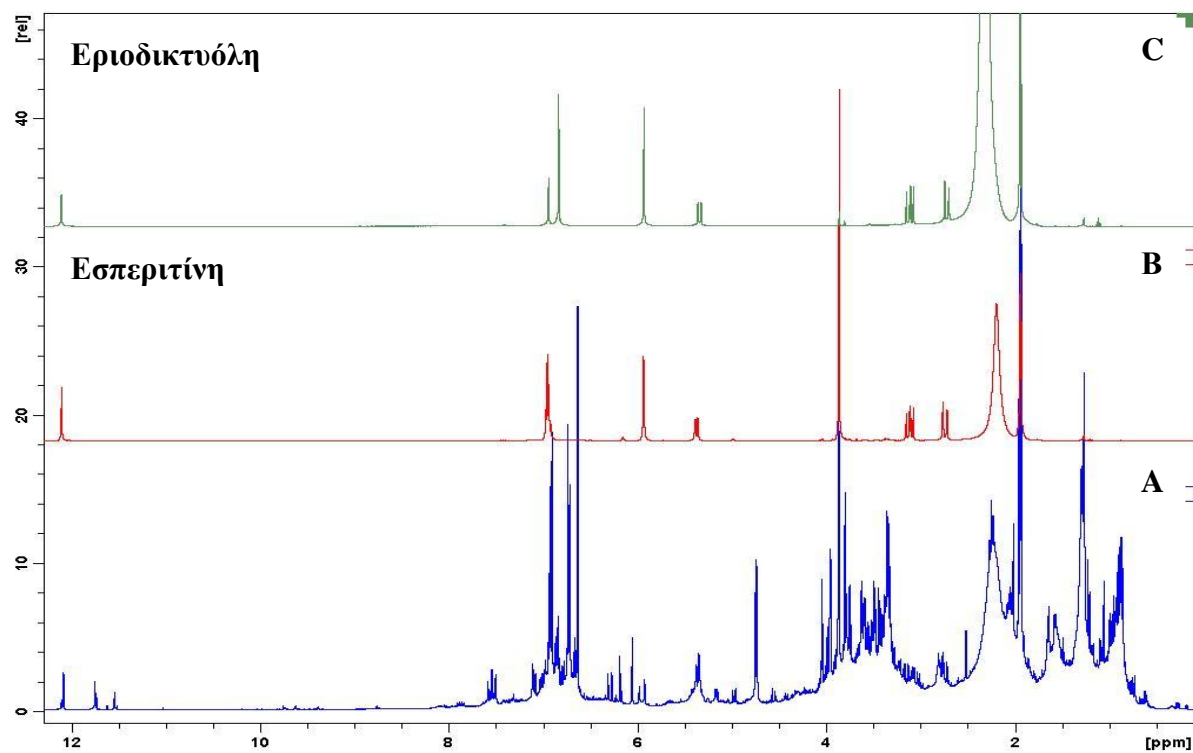
θερμοκρασία δωματίου. Πιθανόν, οι συζεύξεις μέσω πολλαπλών δεσμών του συγκεκριμένου πρωτονίου να μπορούν να δώσουν χρήσιμες πληροφορίες, προκειμένου να γίνει η πιθανή απόδοση της δομής του.

Οι συζεύξεις μέσω πολλαπλών δεσμών με τους άνθρακες στα 94.7, 103.0 και 163.9 ppm, θα πρέπει να αντιστοιχούν στους C₆, C₁₀ και C₉, αντίστοιχα (Σχήμα 4.18). Σύμφωνα με τους *Zeilinska et al.*, 2008, οι αντίστοιχες συζεύξεις της μορίνης είναι με τους άνθρακες στα 101.6 (C₆), 103.0 (C₁₀) και 155.8 ppm (C₉), σε διαλύτη DMSO-*d*₆. Για άλλες φλαβονόλες, όπως η γαλανγίνη (galangin), κεμπφερόλη, κερκετίνη και μυρικετίνη (myricetin) έχουν αναφερθεί παρόμοιες χημικές μετατοπίσεις των C₆ και C₁₀, με διαφορά ~1 ppm, ενώ η αντίστοιχη χημική μετατόπιση για τους C₉ είναι ~156.1-157.3ppm (*Wawer and Zeilinska*, 2001, σε διαλύτη DMSO-*d*₆). Για τις φλαβανόνες εσπεριτίνη και ναριγκενίνη οι αντίστοιχες συζεύξεις είναι στα ~96 (C₆), 102 (C₁₀) και 163 (C₉) ppm (*Wawer and Zeilinska*, 2001, σε διαλύτη DMSO-*d*₆). Τέλος, οι αντίστοιχες συζεύξεις πρότυπης ένωσης εριοδικτυόλης βρέθηκαν στα 95.6 (C₆), 102.3 (C₁₀) και 164.1 ppm (C₉) και της εσπεριτίνης (4'-μεθοξυ- εριοδικτυόλη) στα 95.9 (C₆), 102.4 (C₁₀) και 164.2 ppm (C₉), σε διαλύτη CD₃CN.

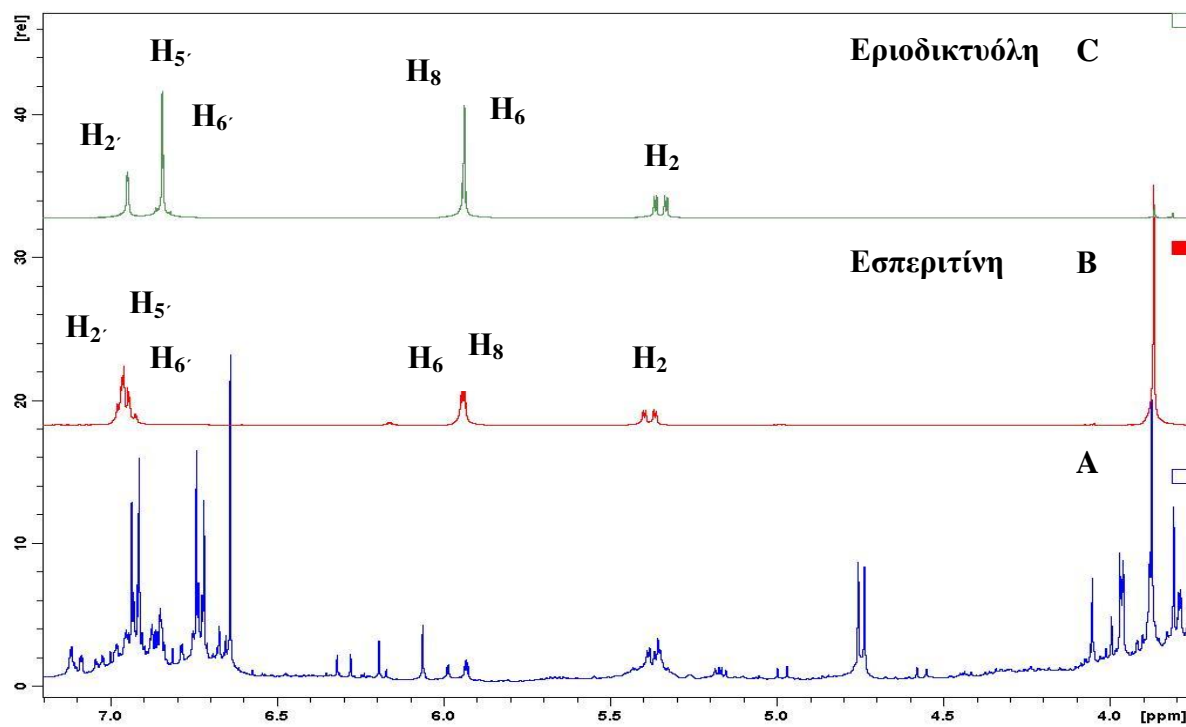
Συγκρίνοντας τα πρωτονιακά φάσματα NMR του εκχυλίσματος Μαντζ.ΟΑ με τα αντίστοιχα της εριοδικτυόλης και εσπεριτίνης (Σχήμα 4.19, 4.20) παρατηρούμε ομοιότητες. Στο Σχήμα 4.21 και 4.22 απεικονίζονται τα φάσματα HSQC ¹H-¹³C και HMBC ¹H-¹³C του εκχυλίσματος και στον Πίνακα 4.5 τα δεδομένα του εκχυλίσματος και, για συγκριτικούς λόγους, τα αντίστοιχα της εριοδικτυόλης και της εσπεριτίνης.



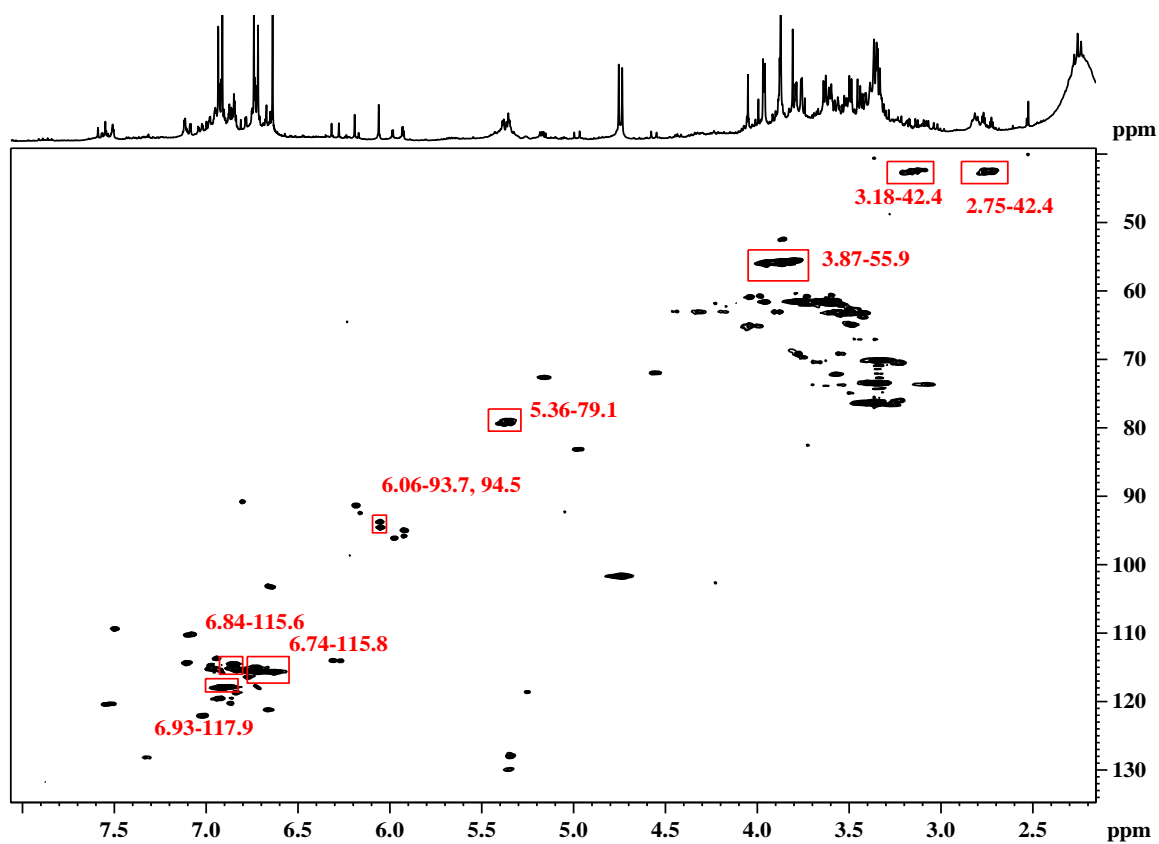
Σχήμα 4.18: Επιλεγμένη περιοχή φάσματος HMBC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ εκχυλίσματος Μαντζ.οΑ σε CD_3CN ($NS=40$, $T=298\text{ K}$, $t_{\text{exp}}=11\text{ h \& 3min}$, 400 MHz).



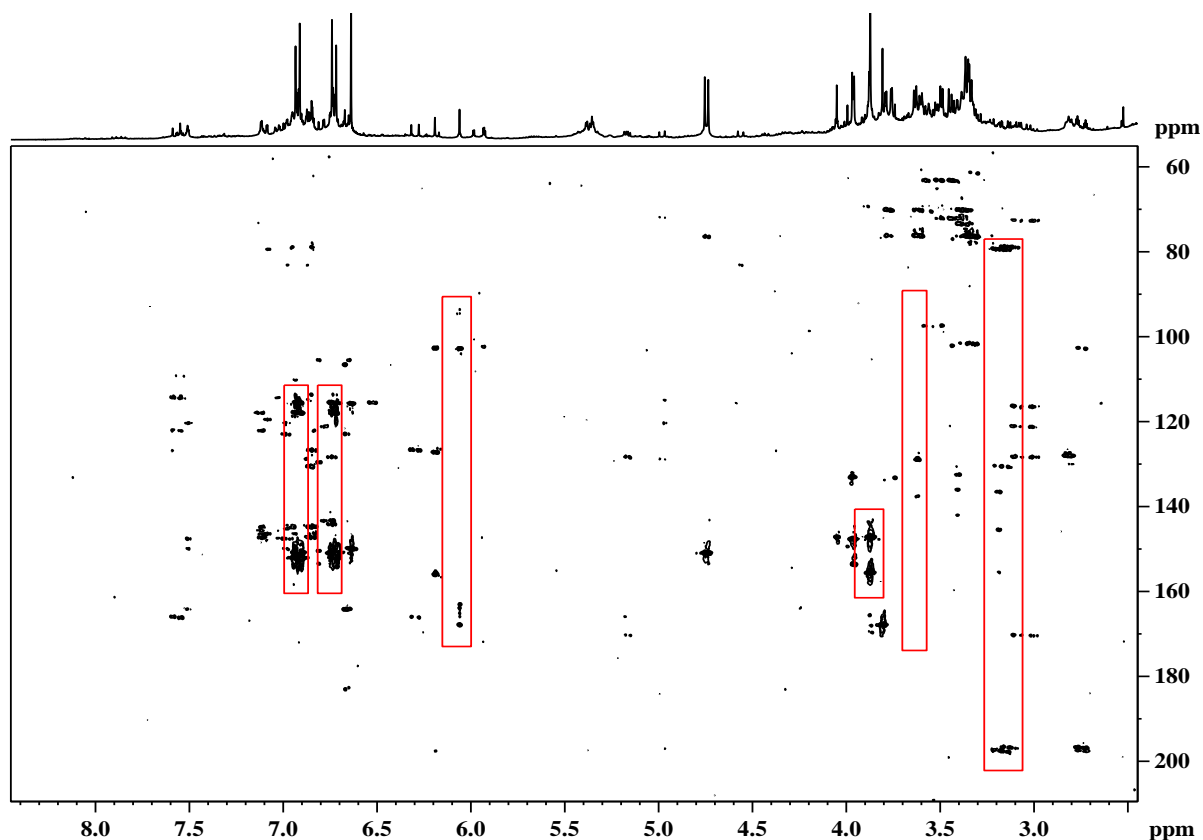
Σχήμα 4.19: Επιλεγμένη περιοχή φάσματος NMR- ^1H εκχυλίσματος Μαντζ. σε CD_3CN ($NS=2k$, $T=298\text{ K}$, $t_{\text{exp}}=2\text{ h \& 44min}$, 400 MHz)(A), της εσπεριτίνης (B) και της εριοδικτυόλης (C).



Σχήμα 4.20: Επιλεγμένη περιοχή φάσματος NMR- ^1H του Σχήματος 4.19.



Σχήμα 4.21: Επιλεγμένη περιοχή φάσματος HSQC ^1H - ^{13}C εκχυλίσματος Μαντζ.οΑ σε CD_3CN ($NS=32$, $T=298\text{ K}$, $t_{\text{exp}}=7\text{ h \& }45\text{ min}$, 400 MHz).



Σχήμα 4.22: Επιλεγμένη περιοχή φάσματος $HMBC\ ^1H-^{13}C$ εκχυλίσματος *Μαντζ.οΑ* σε CD_3CN ($NS=40$, $T=298\ K$, $t_{exp}=11h\ \&\ 3min$, $400\ MHz$).

Στο Σχήμα 4.21 φαίνονται οι διασταυρούμενες κορυφές των πρωτονίων και των αντίστοιχων ανθράκων τους που θα μπορούσαν να αποδοθούν στο συγκεκριμένο άγνωστο συστατικό και στο Σχήμα 4.22 οι συζεύξεις μέσω πολλαπλών δεσμών των συγκεκριμένων πρωτονίων. Στον Πίνακα 4.5 παρουσιάζονται τα δεδομένα που προκύπτουν από τα φάσματα.

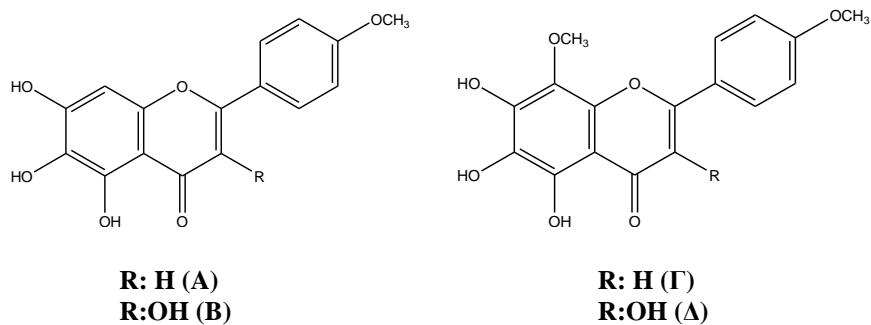
Πίνακας 4.5: Οι χημικές μετατοπίσεις NMR-¹H και ¹³C (δ, ppm) της εριοδικτύλης, της εσπεριτίνης και του άγνωστου συστατικού και οι συζεύξεις τους μέσω πολλαπλών δεσμών.

C	Εριοδικτύλη			Εσπεριτίνη			Άγνωστο συστατικό		
	δ C	δ H	Συζεύξεις μέσω πολλαπλών δεσμών	δ C	δ H	Συζεύξεις μέσω πολλαπλών δεσμών	δ C	δ H	Συζεύξεις μέσω πολλαπλών δεσμών
2	79.0	5.34	C3(42.8) C2'(113.7), C6'(118.6), C1'(130.7), C9(164.1), C4(196.3)	78.6	5.36	C3(42.8) C2'(111.4), C6'(118.2), C1'(130.7), C9(164.2), C4(196.2)	79.1	5.36	
3	42.3	2.70 3.11	C2(79.0), C10(102.3), C1'(130.7), C4(196.3)	42.3	2.72 3.08	C2(78.6), C10(102.4), C1'(130.7), C4(196.2)	42.4	2.76 3.17	(79.1), (103.0), (130.1), (196.0)
6	95.6	5.94	C10(102.3), C7(166.1)	95.9	5.94	C10(102.4), C7(166.0)	94.7	6.06	(103.0), (168.0)
8	94.8	5.94	C6(95.6), C10(102.3), C7(166.1), C9(164.1), C4(196.3)	94.9	5.94	C6(95.9), C10(102.4), C7(166.0), C9(164.2), C4(196.2)	93.7	6.06	(94.7), (103.0), (168.0), (163.9)
2'	113.7	6.95	C2(79.0), C6'(118.6), C1'(130.7), C3',4'(144.7)	111.4	6.95	C2(78.6), C6'(118.2), C1'(130.7), C3',4'(145.3)	115.6	6.85	
5'	115.1	6.84	C1'(130.7), C3',4'(144.7)	113.1	6.97	C1'(130.7), C3',4'(145.3)	115.8	6.74	(115.5), (118.1), (150.4), (151.2), (151.9)
6'	118.6	6.84	C2(79.0), C2'(113.7), C1'(130.7), C4'(144.7)	118.2	6.95	C2(78.6), C2'(111.4), C5'(113.1), C1'(130.7), C4'(145.3)	117.9	6.92	(115.5), (118.1), (150.4), (151.2), (151.9)
OH5		12.11	C6(95.6), C10(102.3), C9(164.1), C7(166.1)		12.10	C6(95.9), C10(102.4), C9(164.2), C7(166.0)	12.09		(94.7), (103.0), (163.9), (168.0)
OCH ₃				55.7	3.87	C3'(145.3)	55.9	3.87	(147.3), (155.0)

Από το δισδιάστατο χάρτη HMBC του Σχήματος 4.18 είναι προφανείς οι συζεύξεις μέσω πολλαπλών δεσμών του πρωτονίου που απορροφά στα 11.75 ppm με τους άνθρακες στα 102.8 (C_{10}), 127.4 (C_6) και 148.4 ppm (C_9). Με βάση την απορρόφηση του πρωτονίου, η ένωση θα μπορούσε να ανήκει πιθανώς στην τάξη των φλαβανονών ή των φλαβονολών. Επειδή είναι από τα κύρια συστατικά του εκχυλίσματος θα μπορούσε να είναι το άγνωστο συστατικό που εκλύεται στα $t_R=16.8$ min και έχει κύριο θραύσμα στα 685.4 m/z .

Σύμφωνα με τους *Horie et al., 1998*, που εξέτασαν συστηματικά τα φάσματα NMR- ^{13}C πολυυδροξυφλαβόνων (70 δείγματα που είχαν δακτύλιο Β 4-μεθοξυφαινόλιο, όπως 5,6,7-, 5,7,8 και 5,6,8-τριυδροξυγονωμένες-trioxygenated και 5,6,7,8-τετραοξυγονωμένες φλαβόνες και φλαβονόλες), τα σήματα των ανθράκων στις θέσεις 2-, 3- και 4- στο δακτύλιο C δεν επηρεάζονται από τους υποκαταστάτες του δακτυλίου Α, εκτός από αυτούς στη θέση 5. Οι απορροφήσεις μετατοπίζονται συστηματικά με την προσθήκη μιας μεθοξυ- ή υδροξυ-ομάδας στη θέση 3. Όσον αφορά τα σήματα των ανθράκων στις θέσεις 5 έως και 10 του δακτυλίου Α, επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από τους υποκαταστάτες και τις θέσεις των υδροξυλομάδων του δακτυλίου Α και παρουσιάζουν το αντίστοιχο χαρακτηριστικό αποτύπωμα αντικατοπτρίζοντας τους υποκαταστάτες του δακτυλίου Α, χωρίς τις επιδράσεις των υποκαταστατών στους δακτυλίους Β και C. Έτσι μπορεί να γίνει εκτίμηση των επιδράσεων που έχουν οι υποκαταστάτες στο δακτύλιο Α από τα δεδομένα του φάσματος. Κάτι που συνεπάγεται ότι μπορούν να προσδιοριστούν σωστά οι δομές των πολυυδροξυφλαβόνων από την απόδοση των σημάτων του φάσματος NMR- ^{13}C .

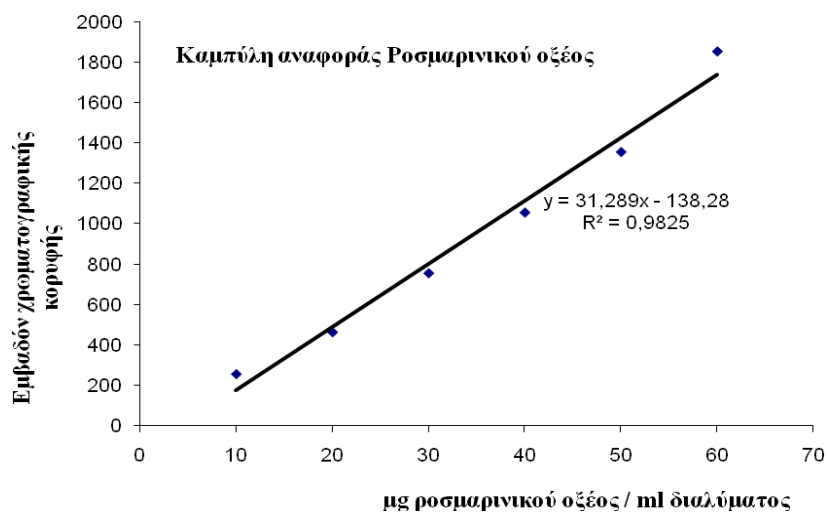
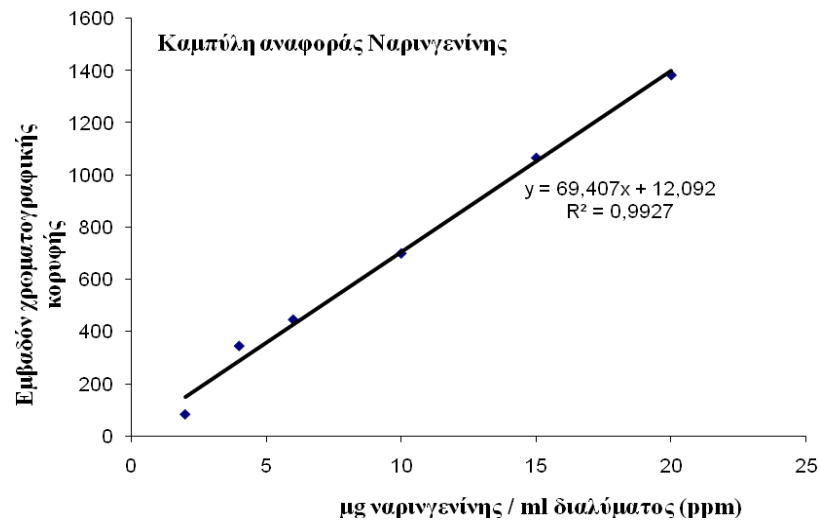
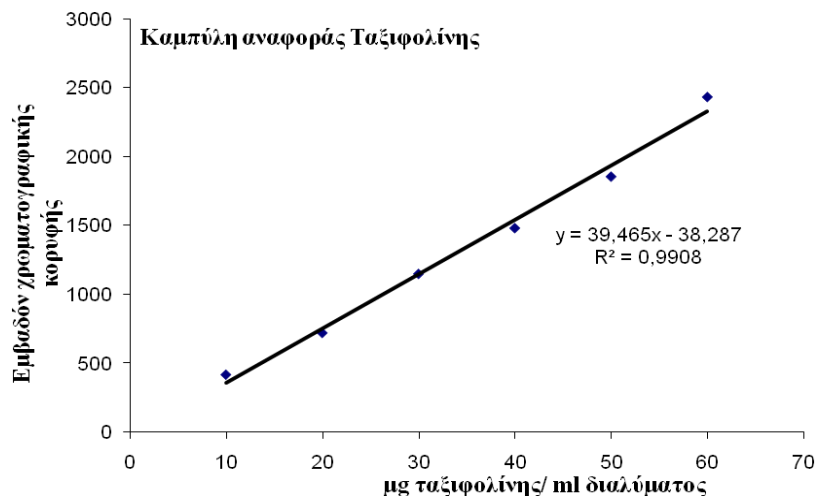
Για παράδειγμα η 5,6,7-τριυδροξυ 4'-μεθοξυφλαβόνη (Α) παρουσιάζει χημικές μετατοπίσεις στα 129.1, 149.6 και 104.0 ppm και η 5,6,7-τριυδροξυ 4'-μεθοξυφλαβονόλη (Β) στα 128.5, 148.8 και 103.3 ppm, για τους αντίστοιχους άνθρακες C_6 , C_9 και C_{10} . Όμοια, η 5,6,7-τριυδροξυ 4',8-διμεθοξυφλαβόνη (Γ) παρουσιάζει χημικές μετατοπίσεις στα 129.5, 142.4 και 102.8 ppm και η 5,6,7-τριυδροξυ 4',8-διμεθοξυφλαβονόλη (Δ) στα 128.8, 141.7 και 102.2 ppm, για τους αντίστοιχους άνθρακες C_6 , C_9 και C_{10} σε διαλύτη DMSO- d_6 (*Horie et al., 1998*) (Σχήμα 4.23). Συνδυάζοντας τα παραπάνω δεδομένα με τις συζεύξεις μέσω πολλαπλών δεσμών του πρωτονίου που απορροφά στα 11.75 ppm, θα μπορούσε πιθανώς ο C_6 και ο C_7 να είναι ενωμένοι με υδροξύλιο.



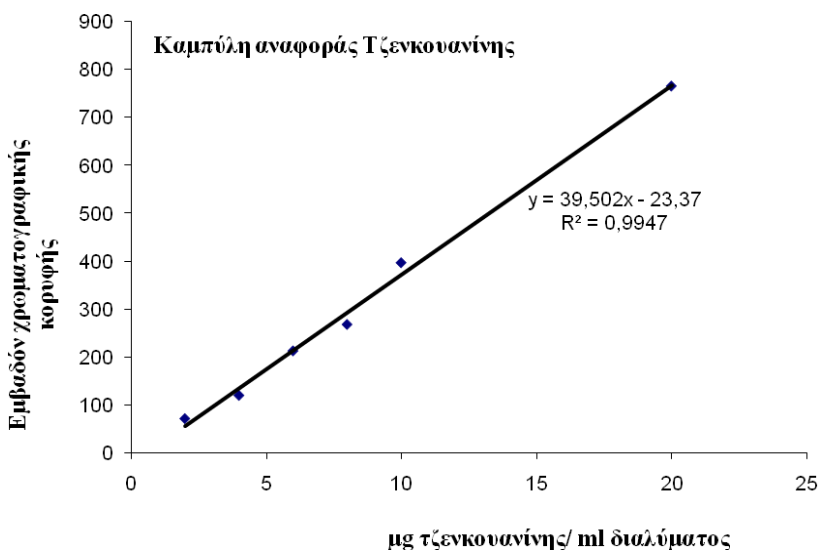
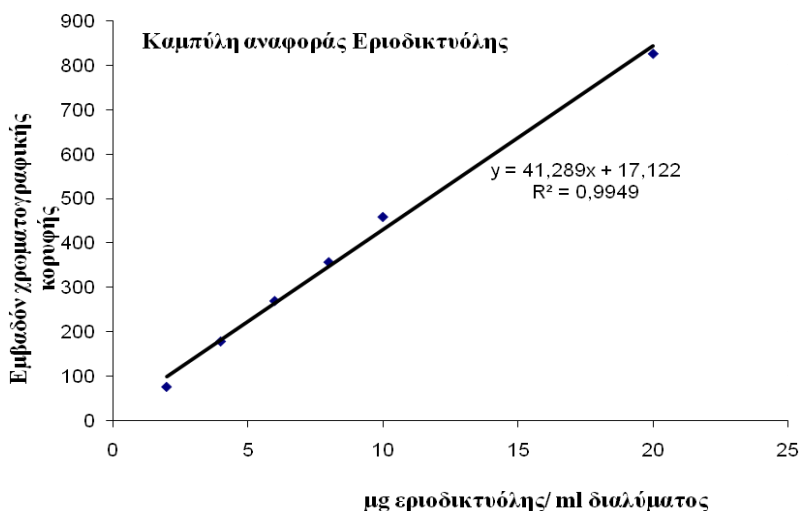
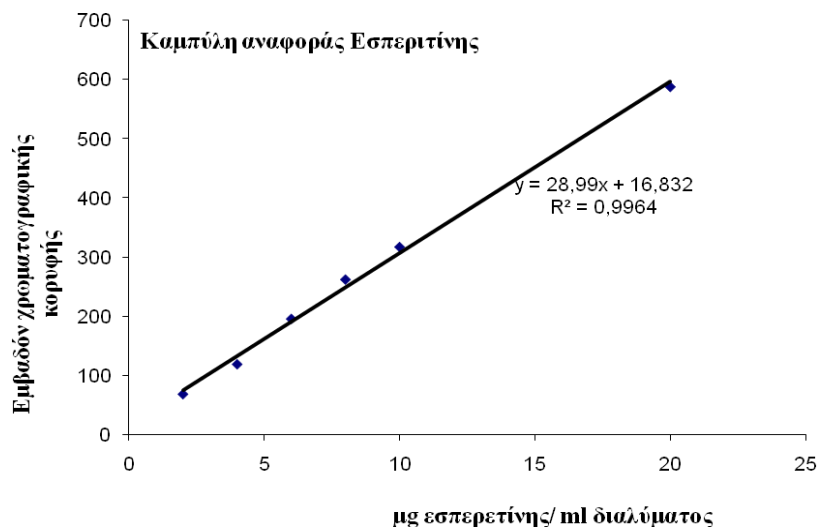
Σχήμα 4.23 Χημικοί τύποι πολυδροξυφλαβόνων

4.3 Ποσοτικός προσδιορισμός με HPLC των συστατικών των εκχυλισμάτων για τα οποία υπήρχαν πρότυπες ενώσεις

Στα Σχήματα 4.24 και 4.25 δίνονται οι καμπύλες αναφοράς της ταξιφολίνης, ναριγκενίνης, ροσμαρινικού οξέος, εσπεριτίνης, εριοδικτυόλης και τζενκουανίνης. Οι διάφορες συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή των καμπύλων αναφοράς και οι εξισώσεις που τις περιγράφουν αναγράφονται στις αντίστοιχες γραφικές παραστάσεις. Η επεξεργασία των χρωματογραφήμάτων έγινε στα 280 nm και στην περίπτωση του ροσμαρινικού οξέος στα 330 nm. Στον Πίνακα 4.6 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του ποσοτικού προσδιορισμού των παραπάνω ενώσεων με την HPLC. Η συγκεντρωσή τους εκφράζεται σε mg ουσίας/ g εκχυλίσματος.



Σχήμα 4.24: Καμπύλες αναφοράς της ταξιφολίνης, ναριγκενίνης και του ροσμαρινικού οξέος.



Σχήμα 4.25: Καμπύλες αναφοράς της εσπεριτίνης, εριοδικτυόλης και της τζενκουανίνης.

Παρατηρείται ότι σύμφωνα με τα αποτελέσματα της υγρής χρωματογραφίας το εκχύλισμα Θυμ._{ΟΑ} είναι πιο πλούσιο σε ροσμαρινικό οξύ και ακολουθούν τα εκχυλίσματα Μαντζ._{ΟΑ}, Δεντ._{ΟΑ} και Φασκ._{ΟΑ}. Εκτός από την ταξιφολίνη, στα εκχυλίσματα Θυμ._{ΟΑ} και Μαντζ._{ΟΑ}, τα άλλα φλαβονοειδή βρίσκονται σε πολύ μικρά ποσοστά. Η ναριγκενίνη στο εκχύλισμα Μαντζ._{ΟΑ} δεν προσδιορίστηκε ποσοτικά διότι συνεκλύεται και με άλλο συστατικό.

Τα αποτελέσματα συμφωνούν με τα αντίστοιχα προηγούμενης μελέτης, που αναφέρουν ότι τα φλαβονοειδή που ταυτοποιήθηκαν και προσδιορίστηκαν ποσοτικά, ήταν ήσσονα συστατικά εκχυλισμάτων βοτάνων της οικογένειας *Lamiaceae*. Παρότι ορισμένα φλαβονοειδή είναι πιθανά αντιοξειδωτικά μόρια, λόγω της μικρής τους συγκέντρωσης έχουν μάλλον μικρή συνεισφορά στη συνολική αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων (*Shan et al., 2005*). Βέβαια αναφέρονται σημαντικές διαφορές μεταξύ των αποτελεσμάτων των διαφόρων μελετών που οφείλονται πιθανώς: α) στις γενοτυπικές και περιβαλλοντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών ειδών των φυτών, β) στην επιλογή των επιμέρους μερών του φυτού που εξετάζονται, γ) στο χρόνο συλλογής του δείγματος και δ) στις μεθόδους προσδιορισμού που εφαρμόζονται κάθε φορά.

4.4 Ποσοτικός προσδιορισμός-Εκτίμηση των επιπέδων συγκέντρωσης του ροσμαρινικού οξέος με τη φασματοσκοπία NMR-¹H

Όπως είναι γνωστό η ένταση των σημάτων συντονισμού στη φασματοσκοπία NMR είναι ανάλογη του αριθμού των πυρήνων στα οποία αντιστοιχούν. Η μέτρηση των εντάσεων, δηλαδή του εμβαδού των κορυφών, γίνεται με τη χρήση ηλεκτρονικών ολοκληρωτών. Η ολοκλήρωση των κορυφών ενός φάσματος παρέχει πολύτιμες πληροφορίες τόσο για την ταυτοποίηση μιας ένωσης όσο και για την ποσοτική εκτίμησή της. Για τη σωστή ολοκλήρωση των απορροφήσεων, όμως, θα πρέπει οι συνθήκες λήψης του φάσματος να είναι τέτοιες ώστε να επιτευχθεί η πλήρης αποκατάσταση μέσω πορειών αποδιέγερσης όλων των πυρήνων των οποίων οι απορροφήσεις πρόκειται να ολοκληρωθούν. Επιπλέον, οι προς ολοκλήρωση κορυφές θα πρέπει να διαχωρίζονται σαφώς.

Η εκτίμηση των επιπέδων συγκέντρωσης του ροσμαρινικού οξέος στα εκχυλίσματα οξικού αιθυλεστέρα των φυτών πραγματοποιήθηκε με την απευθείας ολοκλήρωση της κορυφής συντονισμού του οξέος, σε σχέση με το ολοκλήρωμα της

κορυφής του TMSP-*d*₄ γνωστής συγκέντρωσης (1.4 mM) που χρησιμοποιήθηκε ως ένωση αναφοράς. Για την ποσοτική εκτίμηση χρησιμοποιήθηκε το ολοκλήρωμα του πρωτονίου H_{2α} του ροσμαρινικού οξέος, λόγω του εμφανούς διαχωρισμού του, ακόμα και σε θερμοκρασία δωματίου στα συγκεκριμένα εκχυλίσματα. Τα αποτελέσματα της ποσοτικής εκτίμησης αναγράφονται στον Πίνακα 4.7 και για συγκριτικούς λόγους δίνονται και τα αποτελέσματα που προέκυψαν και από την υγρή χρωματογραφία. Προκειμένου να συγκριθούν τα αποτελέσματα των δύο μεθόδων πραγματοποιήθηκε στατιστικό «test» σημαντικότητας (*t*_{test}).

Πίνακας 4.7 Ποσοτική εκτίμηση του ροσμαρινικού οξέος στα υπό μελέτη εκχυλίσματα οξικού αιθυλεστέρα.

Φυτικά Εκχυλίσματα	Περιεκτικότητα σε ροσμαρινικό οξύ (mg/ g εκχυλίσματος) ^a	
	HPLC	NMR- ¹ H
Δεντ.οΑ	11.6 ± 1.2	8.2 ± 0.9
Φασκ.οΑ	9.3 ± 0.9	7.8 ± 0.7
Θυμ.οΑ	18.2 ± 2.2	21.1 ± 3.7
Μαντζ.οΑ	13.9 ± 1.7	16.0 ± 1.9

^aΟι τιμές που αναγράφονται προκύπτουν από τους μέσους όρους 3 μετρήσεων (± η τυπική απόκλιση). Με έντονα γράμματα στον πίνακα δίνονται οι τιμές των οποίων οι διαφορές είναι στατιστικά σημαντικές για *a* = 0.05.

Παρατηρείται πως το ροσμαρινικό οξύ περιέχεται σε μεγαλύτερη ποσότητα στο εκχύλισμα Θυμ.οΑ και στη συνέχεια στο εκχύλισμα Μαντζ.οΑ. Επίσης, παρατηρείται καλή συμφωνία μεταξύ των αποτελεσμάτων με τις δυο τεχνικές. Σύμφωνα με αποτελέσματα προηγούμενων μελετών το ροσμαρινικό οξύ είναι από τα κύρια φαινολικά συστατικά, που ταυτοποιήθηκε σε ακετονικά εκχυλίσματα φασκόμηλου, ρίγανης και θυμαριού (Cuvelier *et al.*, 1996, Zheng and Wang, 2001, Exarchou *et al.*, 2002a, Shan *et al.*, 2005).

Έγινε μια προσπάθεια εκτίμησης της συγκέντρωσης καρνοσικού οξέος και καρνοσόλης στα εκχυλίσματα δεντρολίβανου και φασκόμηλου. Διαπιστώθηκε, όμως, ότι στα εξανικά εκχυλίσματά τους, προκαλείται αλληλομετατροπή του καρνοσικού οξέος σε καρνοσόλη, κάτι που δε συνέβαινε στα αντίστοιχα του οξικού αιθυλεστέρα.

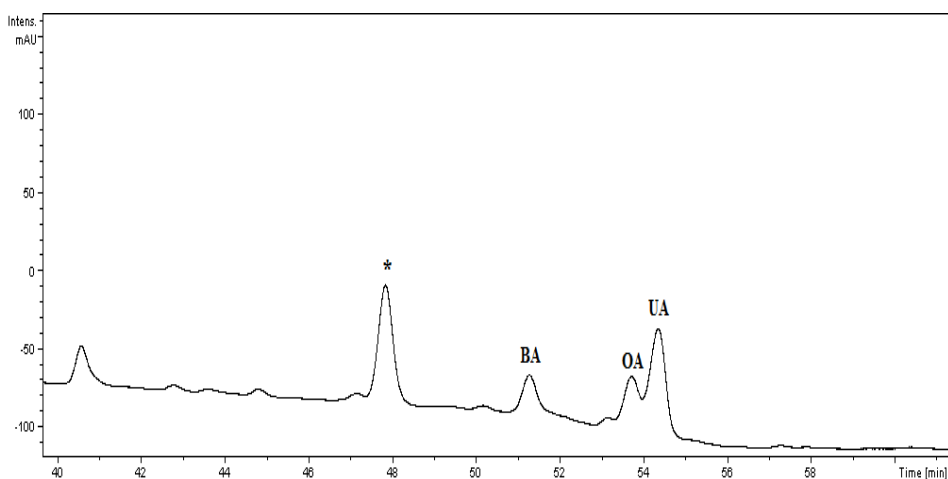
Σύμφωνα με τους *Schwarz and Ternes, 1992* απομονωμένο καρνοσικό οξύ σε διάλυμα μεθανόλης αποικοδομείται σχηματίζοντας καρνοσόλη, η οποία με τη σειρά της αποσυντίθεται προς σχηματισμό γ -λακτόνων, ροσμανόλης, επιροσμανόλης και 7-μεθυλο-επιροσμανόλης, παρουσία οξυγόνου. Σε σχετική μελέτη σταθερότητάς τους σε διάφορους διαλύτες [μεθανόλη, DMSO, DMSO-ακετονιτρίλιο (10:90%), οξικό αιθυλεστέρα-ακετονιτρίλιο (10:90%)], βρέθηκε ότι η καθαρή καρνοσόλη (95%) είναι πολύ ασταθής σε όλους τους παραπάνω διαλύτες, ενώ η σταθερότητα του καρνοσικού οξέος είναι καλή σε DMSO. Βέβαια, με πείραμα ανάκτησης βρέθηκε ότι και τα δύο συστατικά που υπήρχαν σε διάλυμα εκχυλίσματος εμπορικά διαθέσιμου δεντρολίβανου ήταν απολύτως σταθερά (διαλύτης DMSO) (*Thorsen and Hildebrandt, 2003*). Τέλος, σύμφωνα με τους *Okamura et al., 1994*, η αύξηση της θερμοκρασίας και η παρουσία φωτός επιταχύνουν την αποικοδόμηση του καρνοσικού οξέος.

5. Ταυτοποίηση- Διάκριση τριτερπενοειδών (τριτερπενικών οξέων και αλκοολών σε φυτικά εκχυλίσματα)

5.1 Διάκριση μίγματος ολεανολικού και ουρσολικού οξέος με λήψη φασμάτων NMR ^1H & ^{13}C , HSQC ^1H - ^{13}C & HMBC ^1H - ^{13}C .

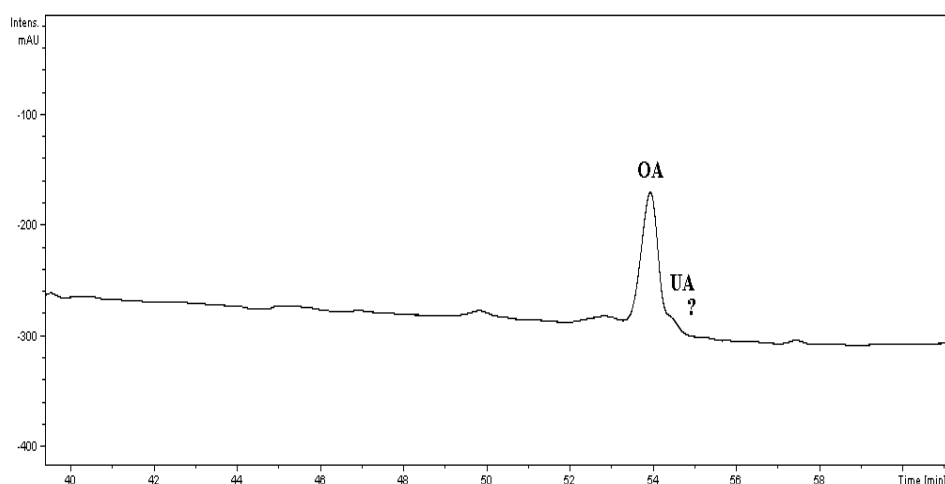
Όπως προαναφέρθηκε, μια από τις σημαντικότερες τάξεις των φυσικών προϊόντων είναι τα τερπένια ή ισοπρενοειδή ή τερπενοειδή και μεταξύ αυτών τα τριτερπένια. Χαρακτηριστικοί εκπρόσωποι των πεντακυκλικών τριτερπενίων είναι τα οξέα ουρσολικό (UA) και ολεανολικό (OA), που είναι ισομερή θέσης και η μόνη σκελετική τους διαφορά είναι η θέση μιας μεθυλομάδας στον δακτύλιο E. Με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχει ένας περιορισμένος αριθμός μελετών σχετικά με την ανάλυση των βιοδραστικών αυτών ενώσεων, UA και OA, και γενικότερα των τριτερπενικών οξέων. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην έλλειψη μεθόδων προσδιορισμού τους. Η πλειοψηφία των άρθρων βασίζεται στην ανάλυσή τους με χρωματογραφικές τεχνικές. Γενικά, οι χρωματογραφικές μέθοδοι ανάλυσης των τριτερπενοειδών είναι μεγάλης διάρκειας και παρουσιάζουν μικρή ευαισθησία. Ενώ εξαιτίας της μικρής απορρόφησής τους στο υπεριώδες και της παρουσίας και άλλων συστατικών, όπως συμβαίνει σε φυτικά εκχυλίσματα, ο διαχωρισμός τους είναι μια ιδιαίτερα δύσκολη διαδικασία (*Berangere et al., 2004*), αλλά και η ανάλυσή τους με αέρια χρωματογραφία απαιτεί μια αρχική διαδικασία παραγωγοποίησης (*Janicsak et al., 2003*). Συνεπώς, είναι ιδιαίτερα επιθυμητή η ανάπτυξη μεθοδολογιών για την άμεση, γρήγορη και ακριβή ταυτοποίησή τους σε πολύπλοκα φυτικά εκχυλίσματα χωρίς τον προηγούμενο χρωματογραφικό διαχωρισμό τους.

Όπως αναφέρθηκε στο Κεφάλαιο 4, τόσο στα εξανικά όσο και στα εκχυλίσματα του οξικού αιθυλεστέρα ανιχνεύθηκε η παρουσία OA και UA και σε ορισμένα μπετουλινικού οξέος (BA) με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας σε σύζευξη με φασματομετρία μαζών. Η ταυτοποίηση έγινε από το κύριο μοριακό ιόν αλλά και με σύγκριση με τους χρόνους κατακράτησης προτύπων ενώσεων. Στις συγκεκριμένες συνθήκες ανάλυσης το OA και UA σχεδόν συνεκλούνται, όπως φαίνεται ενδεικτικά, από επιλεγμένη περιοχή του χρωματογραφήματος του εκχυλίσματος Δεντ.OA στα 210 nm (Σχήμα 5.1). Επίσης, φαίνεται η παρουσία του BA καθώς και μιας κορυφής που συμβολίζεται με αστερίσκο και πιθανώς αντιστοιχεί σε κάποιο άλλο τριτερπενοειδές.



Σχήμα 5.1: Επιλεγμένη περιοχή του χρωματογραφήματος του εκχυλίσματος Δεντ.οΑ στα 210 nm.

Στην περίπτωση του εκχυλίσματος Φ.Ε.οΑ, από το χρωματογράφημα στα 210 nm, δεν μπορούν να προκύψουν σαφείς πληροφορίες για την παρουσία ή όχι του UA (Σχήμα 5.2). Πιθανώς με την τεχνική «spiking» να ήταν δυνατή η ανίχνευσή του, αν και η συγκεκριμένη μεθοδολογία είναι προφανές ότι δεν είναι επιτυχής για τον ποιοτικό, και πολύ περισσότερο, για τον ποσοτικό προσδιορισμό του OA και UA. Στόχος, λοιπόν ήταν η ανάπτυξη και εφαρμογή μεθοδολογιών NMR για τη σαφή και γρήγορη ανάλυση τριτερπενικών ενώσεων σε εκχυλίσματα φυτικών προϊόντων.



Σχήμα 5.2: Επιλεγμένη περιοχή του χρωματογραφήματος του εκχυλίσματος Φ.Ε.οΑ στα 210 nm.

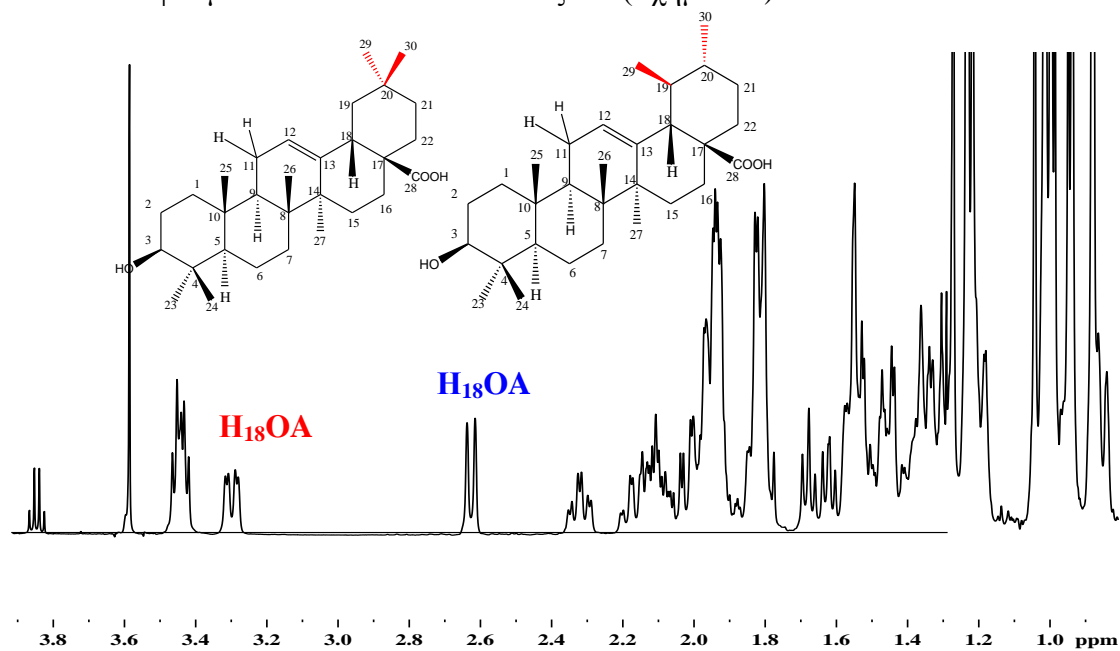
Η γρήγορη ταυτοποίηση των πεντακυκλικών τριτερπενικών οξέων με χρήση φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού δεν έχει επιτευχθεί διότι οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων του OA και UA είναι σχεδόν ταυτόσημες και

παρατηρείται έντονη αλληλεπικάλυψη στην περιοχή των μεθυλικών πρωτονίων. Για το λόγο αυτό ο πλήρης προσδιορισμός των χημικών μετατοπίσεων τους με λήψη φασμάτων NMR -1D & 2D έχει, μόλις, πρόσφατα δημοσιευτεί (*Seebacher et al., 2003*).

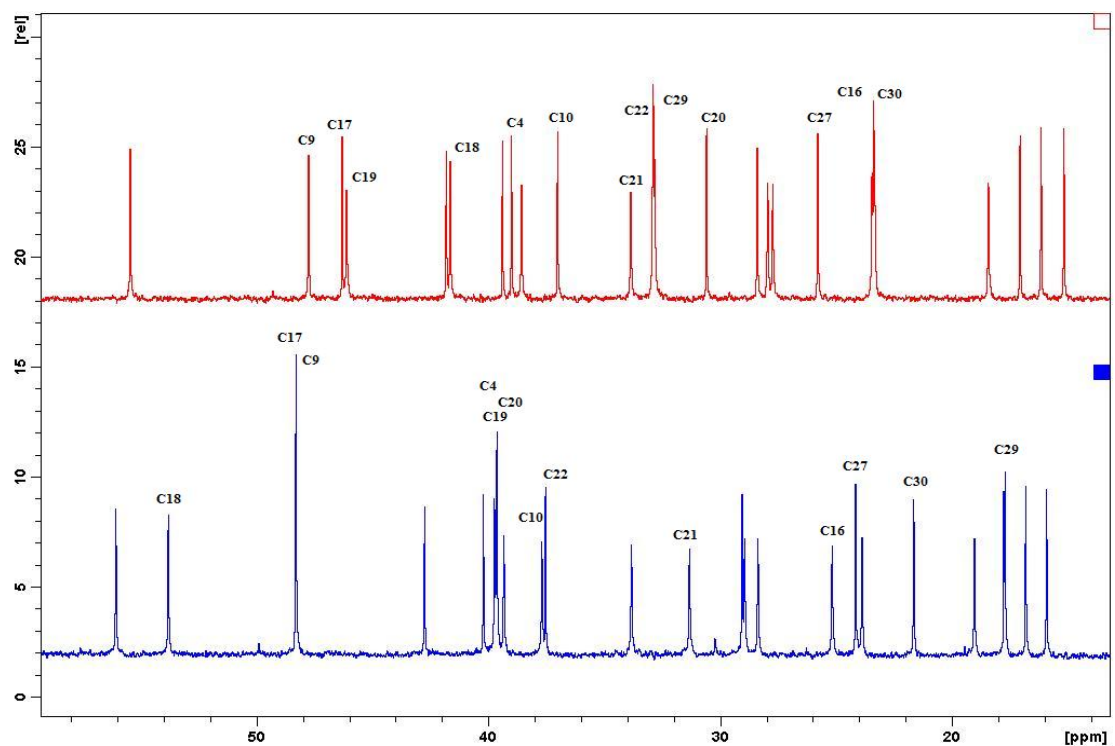
Τα οξέα OA και UA ανήκουν στις τάξεις των ολεαν-12-ένων (olean-12-enes) και ουρσ-12-ένων (urs-12-enes), αντίστοιχα και όσον αφορά τις σκελετικές διαφορές τους, στην πρώτη τάξη υπάρχουν έξι ενώ στη δεύτερη πέντε τεταρτοταγή άτομα άνθρακα. Οι χημικές μετατοπίσεις των ολεφινικών ανθράκων C₁₂ και C₁₃ φαίνεται να έχουν διαγνωστική αξία. Επίσης, σχετικά μεγάλες διαφορές στις χημικές μετατοπίσεις μεταξύ των δυο σειρών είναι προφανείς για τα σήματα συντονισμού του C₁₈, C₁₉, C₂₀, παρότι όλες οι τιμές των χημικών μετατοπίσεων των ανθράκων όσον αφορά τον δακτύλιο E θα αναμενόταν να διαφοροποιούνται από το ολεανένιο (oleanene) στο ισομερές του ουρσίνιο (ursine) (*Doddrell et al., 1974*). Παρουσιάζει ενδιαφέρον, λοιπόν, η προσπάθεια ανάπτυξης ενός συνδυασμού προηγμένων μεθοδολογιών NMR που μπορούν να οδηγήσουν στην ταυτοποίηση των συγκεκριμένων βιοδραστικών ενώσεων χωρίς τον προηγούμενο χρωματογραφικό διαχωρισμό των συστατικών πολύπλοκων μιγμάτων, όπως είναι τα φυτικά εκχυλίσματα.

Αρχικά, έγινε η λήψη μονοδιάστατων πρωτονιακών φασμάτων του μίγματος των δυο οξέων OA και UA και τα φάσματα NMR-¹³C και DEPT 135 μεμονωμένων των οξέων, προκειμένου να διαπιστωθεί αν με τη χρήση της μονοδιάστατης φασματοσκοπίας μπορεί να γίνει η διάκριση και ταυτοποίηση αυτών σε πολύπλοκα μίγματα, όπως είναι τα φυτικά εκχυλίσματα. Όπως φαίνεται από το φάσμα NMR-¹H (Σχήμα 5.3), παρατηρείται αλληλοεπικάλυψη κορυφών στην περιοχή των μεθυλικών πρωτονίων και ιδιαίτερης διαγνωστικής αξίας είναι οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων H₁₈ (OA 3.3 ppm, UA 2.6 ppm) των οξέων. Στα φάσματα NMR-¹³C (Σχήμα 5.4) διαφορές, μεταξύ των δυο, εντοπίζονται στις χημικές μετατοπίσεις των ανθράκων που ανήκουν στον δακτύλιο E. Πιο σημαντικές διαφορές παρουσιάζουν οι χημικές μετατοπίσεις των C₂₉ ~16 ppm (OA 33.5 ppm, UA 17.7 ppm) και των C₁₈ ~11 ppm (OA 42.4 ppm, UA 53.8 ppm). Κατά περίπου ~8 ppm διαφέρουν οι χημικές μετατοπίσεις των C₁₉ (OA 46.7 ppm, UA 39.7 ppm) και C₂₀ (OA 31.5 ppm, UA 39.6 ppm) των δυο οξέων. Σε μικρότερο βαθμό, από ~2- 5 ppm, επηρεάζονται οι χημικές

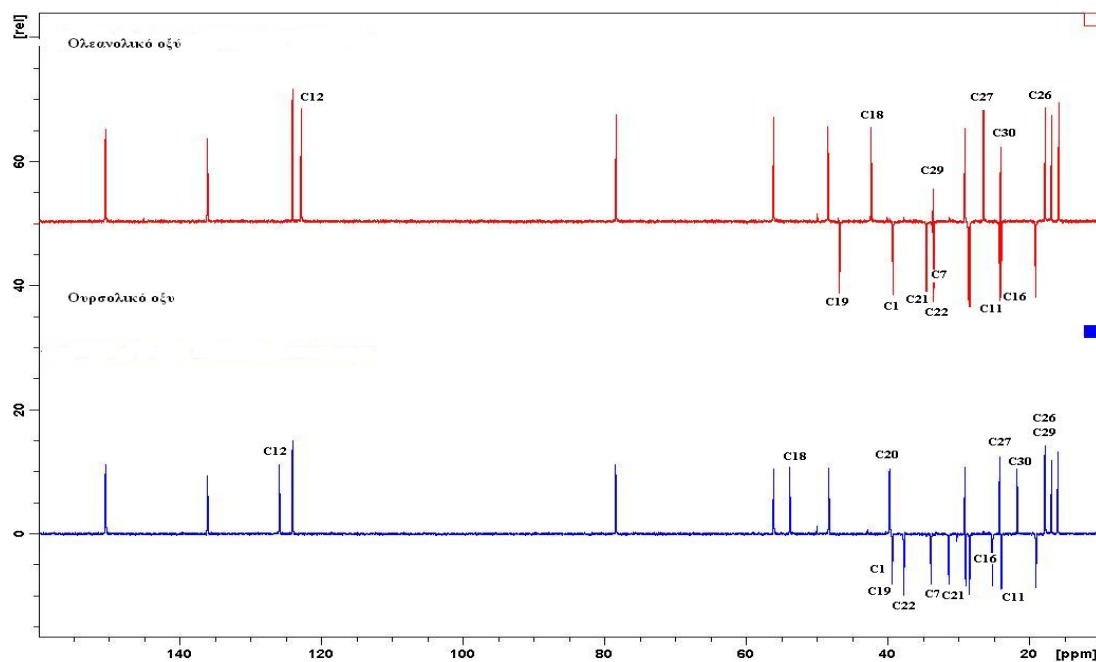
μετατοπίσεις των C₁₂, C₁₃, C₂₁, C₂₂, C₂₇ και C₃₀. Οι ίδιες παρατηρήσεις προκύπτουν και από τα φάσματα DEPT 135 των δύο οξέων (Σχήμα 5.5).



Σχήμα 5.3: Φάσμα NMR-¹H του μίγματος OA και UA σε Pyr-d₅ (T= 298K, NS= 64, t_{exp}= 7 min, 500 MHz).



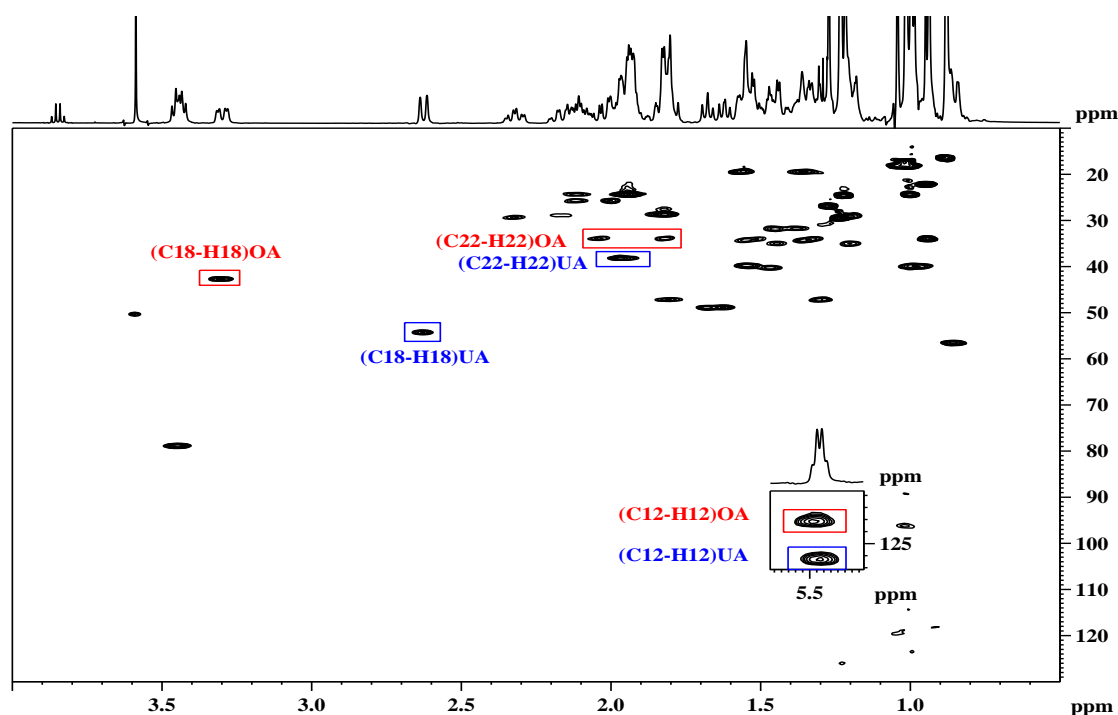
Σχήμα 5.4: Φάσμα NMR-¹³C του OA (πάνω) και του UA (κάτω) σε Pyr-d₅ (T= 298K, NS= 4k, t_{exp}= 2 h & 15 min, 500 MHz).



Σχήμα 5.5: Φάσμα DEPT-135 του OA (πάνω) και του UA (κάτω) σε Pyr- d_5 ($T=298K$, $NS=4k$, $t_{exp}=2\text{ h \& 15 min}$, 500 MHz).

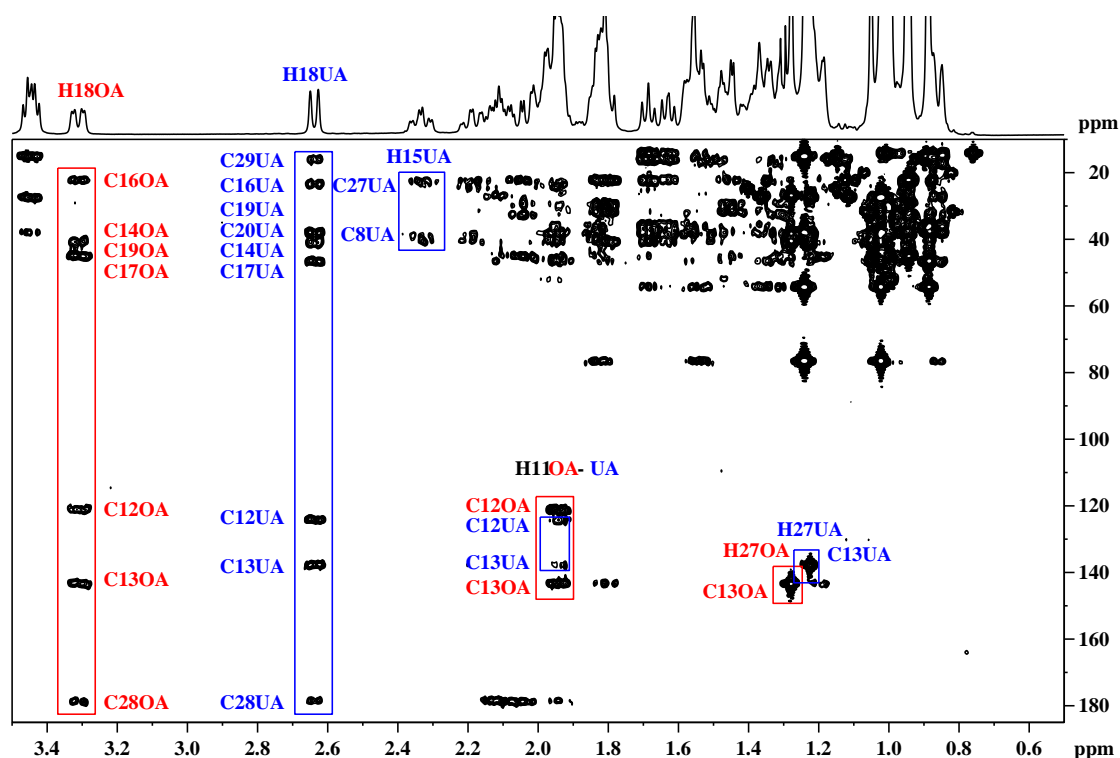
Μια σχετική ενίσχυση της ευαισθησίας προκύπτει όταν πυρήνες με χαμηλό γυρομαγνητικό λόγο, όπως ο ^{13}C , ανιχνεύονται μέσω των επιδράσεών τους σε πιο ευαίσθητους πυρήνες όπως το ^1H . Έχει προταθεί, λοιπόν η χρήση της ετεροπυρηνικής φασματοσκοπίας συσχέτισης, με την οποία είναι δυνατή η παρατήρηση του τρόπου σύνδεσης μεταξύ πυρήνων άνθρακα και πρωτονίων που βρίσκονται σε σύζευξη. Η φασματοσκοπία συσχέτισης απλού κβάντου (HSQC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$) συσχετίζει πυρήνες ανθράκων που βρίσκονται σε άμεση σύζευξη με πυρήνες πρωτονίου. Η παλμική ακολουθία που εφαρμόζεται έχει ως τελικό αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός διδιάστατου χάρτη που αποτελείται μόνο από διασταυρούμενες κορυφές, οι οποίες αντιστοιχούν σε πυρήνες $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ που συσχετίζονται μεταξύ τους μέσω σταθεράς σύζευξης J^1 . Σε αντίθεση, η τεχνική φασματοσκοπίας συσχέτισης μέσω πολλαπλών δεσμών (HMBC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$) παρέχει πληροφορίες σχετικά με την αλληλεπίδραση πυρήνων ^{13}C που συζευγνύονται με πυρήνες πρωτονίου οι οποίοι απέχουν από δύο έως τέσσερις δεσμούς (με σταθερές σύζευξης $J^2- J^4$), και έτσι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη σύνδεση πρωτονιακών συστημάτων spin που παρεμβάλλονται από τεταρτοταγή άτομα άνθρακα, αλλά και για τον εντοπισμό των τεταρτοταγών ατόμων άνθρακα.

Προκειμένου να διαπιστωθεί αν είναι δυνατή η διάκριση και η ταυτοποίηση των δύο οξέων, έγινε η λήψη των φασμάτων HSQC ^1H - ^{13}C και HMBC ^1H - ^{13}C του μίγματός τους. Όπως φαίνεται από το δισδιάστατο χάρτη HSQC (Σχήμα 5.6) οι περισσότερες συζεύξεις μέσω ενός δεσμού του OA και UA αλληλεπικαλύπτονται, ωστόσο παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στις διασταυρούμενες κορυφές των C_{12} με το H_{12} , C_{18} με το H_{18} και C_{22} με το H_{22} . Είναι φανερό ότι η διαφορά στις χημικές μετατοπίσεις του πρωτονίου αλλά και του άνθρακα, 0.7 ppm για τα H_{18} και 6 ppm για τους C_{18} , είναι πολύ ουσιαστική και μεγάλης διαγνωστικής σημασίας για την ταυτοποίηση του OA και UA. Επίσης, υπάρχουν διασταυρούμενες κορυφές, όπως αυτές των C_{12} με τα H_{12} , που είναι διαγνωστικές λόγω της διαφοράς στις χημικές μετατοπίσεις του άνθρακα (~ 3 ppm), ενώ τα αντίστοιχα πρωτόνια απορροφούν στην ίδια συχνότητα και για τα δυο οξέα. Η εισαγωγή της δεύτερης διάστασης απλοποιεί το αποτύπωμα του φάσματος, ακόμα και σε περιοχές όπου στο αντίστοιχο φάσμα μίας διάστασης υπάρχει αλληλοεπικάλυψη. Για παράδειγμα, οι συζεύξεις των C_{22} με τα H_{22} μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διάκριση των τριτερπενικών οξέων, παρότι αυτό είναι αδύνατο να γίνει από το φάσμα NMR- ^1H μίας διάστασης.



Σχήμα 5.6: Φάσμα HSQC ^1H - ^{13}C του μίγματος 1:1 του OA και του UA (8 mg/ml) σε Pyr- d_5 ($T=298\text{K}$, $NS=2$, $t_{exp}=14\text{ min}$, 500 MHz) (Kontogianni et al., 2009).

Στο Σχήμα 5.7 δίνεται το φάσμα HMBC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ του μίγματος OA και UA. Εστιάζοντας στις συσχετίσεις μέσω πολλαπλών δεσμών του αλληλικού πρωτονίου H_{18} του OA και UA, μπορούν να παρατηρηθούν δυο διακριτές «στήλες» διασταυρούμενων κορυφών που βρίσκονται κατά μήκος των απορροφήσεων των πρωτονίων H_{18} στα 3.3 και 2.6 ppm, αντίστοιχα. Καθώς οι δακτύλιοι D και E διαμοιράζονται τον άνθρακα C_{18} , τα αντίστοιχα πρωτόνια H_{18} παρουσιάζουν συσχετίσεις μέσω πολλαπλών δεσμών με ένα σημαντικό αριθμό ανθράκων, όπως είναι οι άνθρακες C_{13} , C_{17} και C_{19} (αλληλεπίδραση μέσω δύο δεσμών) και οι άνθρακες C_{12} , C_{14} , C_{16} και C_{28} (αλληλεπίδραση μέσω τριών δεσμών). Στην περίπτωση του UA, οι συζεύξεις μέσω πολλαπλών δεσμών επεκτείνονται και στους άνθρακες C_{20} και C_{29} , όπως φαίνεται από το δισδιάστατο χάρτη. Περαιτέρω, διαγνωστικής αξίας θα μπορούσαν να θεωρηθούν οι διασταυρούμενες κορυφές του πρωτονίου $\beta\text{-H}_{15}$ με τον άνθρακα C_{27} και C_8 , που παρατηρούνται για το UA, και του πρωτονίου H_{27} με τον άνθρακα C_{13} αλλά και του πρωτονίου H_{11} με τον άνθρακα C_{12} και C_{13} και για τα δύο οξέα (Πίνακας 5.1). Έτσι, η συνδυαστική μεθοδολογία των πειραμάτων HSQC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ και HMBC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ μπορεί να αποδειχθεί ένα χρήσιμο εργαλείο για τη διάκριση του OA και UA σε ένα τεχνητό μίγμα τους. Συνεπώς, θα ήταν ιδιαίτερης σημασίας η εφαρμογή της συγκεκριμένης μεθοδολογίας σε πολύπλοκα ακατέργαστα-«crude» φυτικά εκχυλίσματα.



Σχήμα 5.7: Φάσμα HMBC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ του μίγματος 2:1 του OA και του UA (6 mg/ml & 3 mg/ml, αντίστοιχα) σε Pyr- d_5 ($T=298\text{K}$, $NS=8$, $t_{exp}=1\text{ h}$, 500 MHz) (Kontogianni et al., 2009).

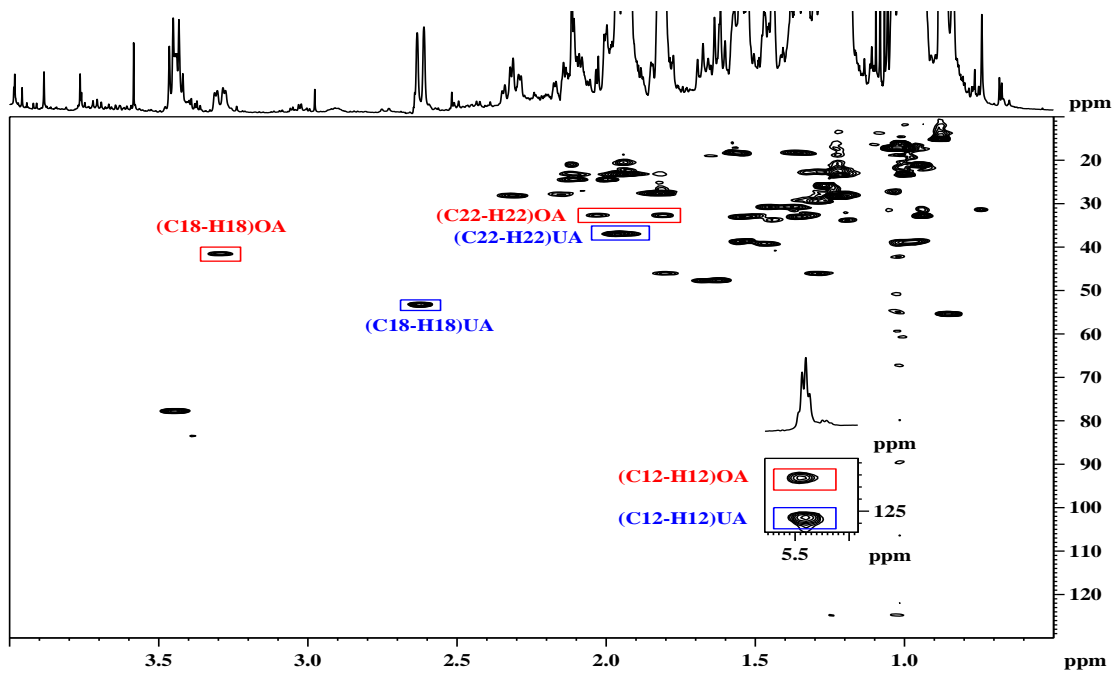
Πίνακας 5.1: Οι χημικές μετατοπίσεις NMR- ^1H και ^{13}C (δ , ppm) του OA και του UA και οι συζεύξεις τους μέσω πολλαπλών δεσμών που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίησή τους

Ολεανολικό οξύ				Ουρσολικό οξύ		
C	$\delta\text{ C}$	$\delta\text{ H}$	Συζεύξεις μέσω πολλαπλών δεσμών	$\delta\text{ C}$	$\delta\text{ H}$	Συζεύξεις μέσω πολλαπλών δεσμών
11		1.93	C12 (122.7), C13 (145.0)		1.93	C12 (125.8), C13 (139.4)
12	122.7	5.47		125.8	5.46	
15					2.31 β	C27 (24.2), C8 (40.2)
18	42.2	3.33	C16 (24.0), C14 (42.3), C19 (46.7), C17 (46.7), C12 (122.7), C13 (145.0), C28 (180.4)	53.8	2.62	C29 (17.7), C16 (25.2), C20 (39.6), C19 (39.7), C14 (42.7), C17 (48.1), C12 (125.8), C13 (139.4), C28 (180.2)
22	33.5	1.83 α 2.05 β		37.5	1.93 1.93	
27		1.25	C13 (145.0)		1.22	C13 (139.4)

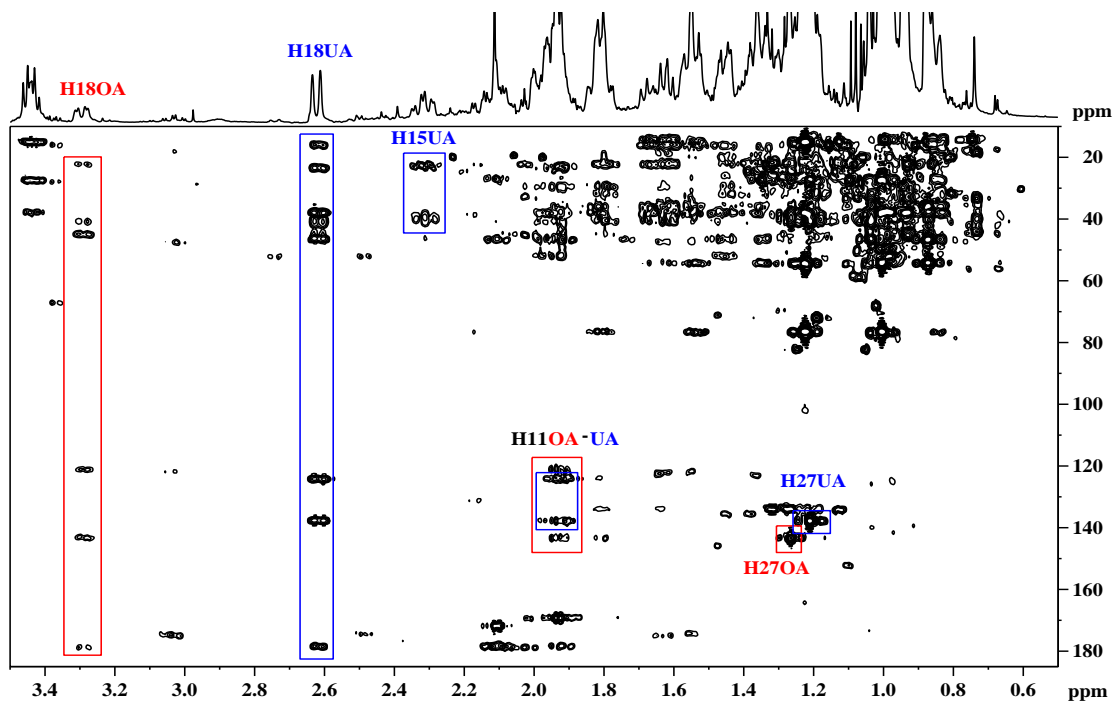
5.2 Ταυτοποίηση του μίγματος OA και του UA σε ακατέργαστα (crude) φυτικά εκχυλίσματα φασκόμηλου, θυμαριού, μαντζουράνας, φύλλων ελιάς και ροδοδάφνης.

Στην προκαταρκτική μελέτη καταγράφηκαν φάσματα NMR- ^1H των φυτικών εκχυλισμάτων χωρίς προηγούμενο χρωματογραφικό διαχωρισμό, σε μια προσπάθεια να διαπιστωθεί η πολυπλοκότητα και ποικιλία των συστατικών τους. Η προσεκτική παρατήρηση στην περιοχή των 3.3 και 2.6 ppm, που απορροφούν τα πρωτόνια H_{18} (OA και UA, αντίστοιχα), αποκαλύπτει την παρουσία τους σε όλα τα εκχυλίσματα οξικού αιθυλεστέρα. Στα εξανικά, με εξαίρεση το εξανικό εκχύλισμα των φύλλων ελιάς που έχει μόνο OA και θα το εξετάσουμε ξεχωριστά παρακάτω, παρατηρείται έντονη αλληλοεπικάλυψη στις περιοχές αυτές και έτσι δεν μπορούν να εξαχθούν σαφή συμπεράσματα. Ωστόσο, η πολυπλοκότητα των φασμάτων NMR- ^1H , εξαιτίας της αλληλοεπικάλυψης των χημικών μετατοπίσεων των διαφορετικών συστατικών, καθιστά επιτακτική την ανάγκη εφαρμογής συνδυαστικών δισδιάστατων τεχνικών NMR για την ακριβή ταυτοποίηση τους.

Στα Σχήματα 5.8 και 5.9 απεικονίζονται τα φάσματα HSQC ^1H - ^{13}C και HMBC ^1H - ^{13}C , αντίστοιχα, του εκχυλίσματος Φασκ.ΟΑ. Οι διαγνωστικής αξίας «στήλες» διασταυρούμενων κορυφών που βρίσκονται κατά μήκος των αντίστοιχων απορροφήσεων των πρωτονίων H_{18} των OA και UA στο δισδιάστατο χάρτη HMBC και οι σημαντικές διασταυρούμενες κορυφές στο χάρτη HSQC, που αναφέρθηκαν για την ταυτοποίηση των δυο οξέων παραπάνω, γίνονται εύκολα διακριτές οδηγώντας στη σαφή ταυτοποίηση των απορροφήσεων των δυο οξέων.

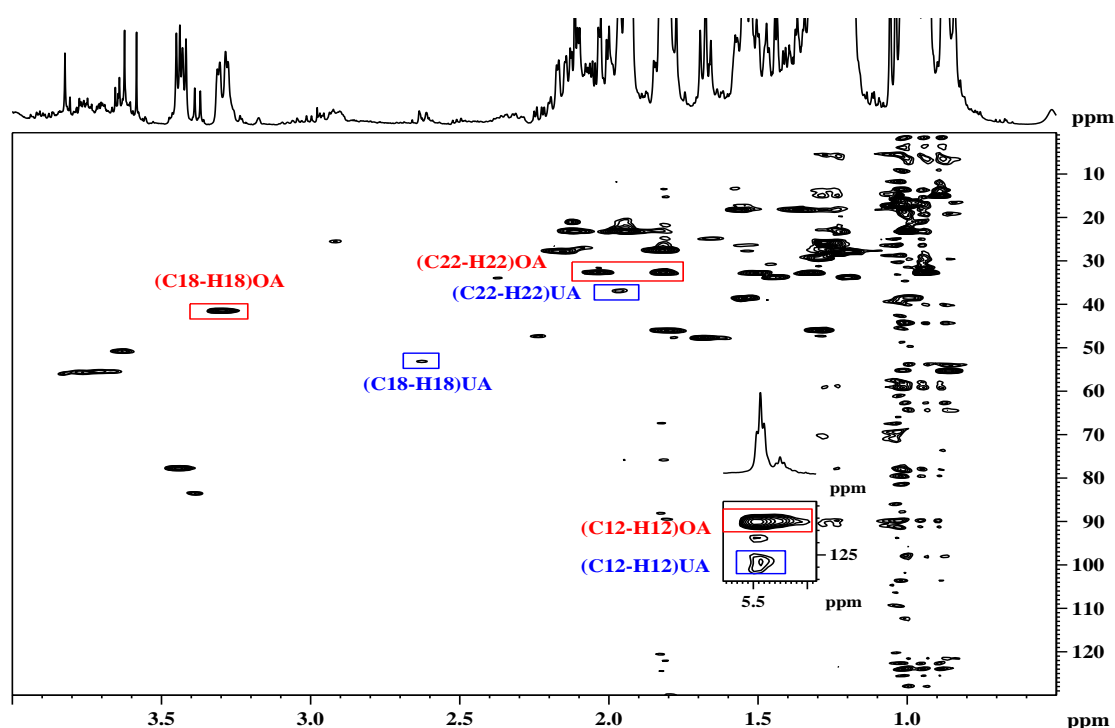


Σχήμα 5.8: Φάσμα HSQC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ εκχυλίσματος Φασκ. $_{\text{OA}}$ (40 mg/ml) σε Pyr- d_5 ($T=298\text{K}$, $NS=2$, $t_{\text{exp}}=14\text{ min}$, 500 MHz) (Kontogianni et al., 2009).

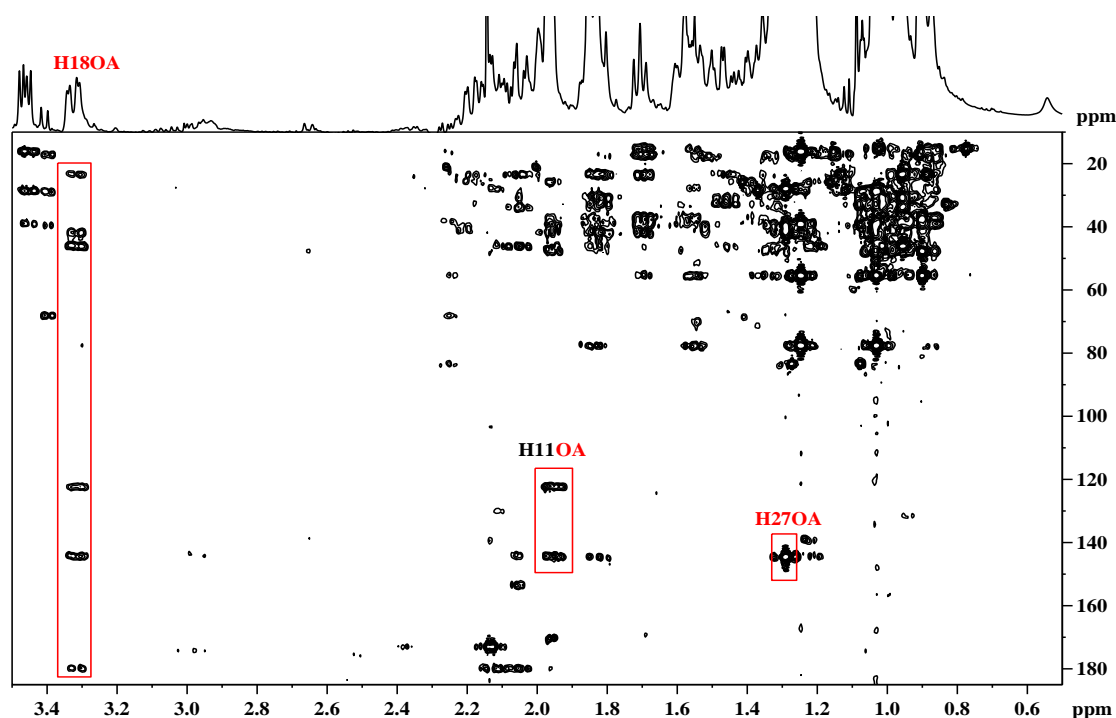


Σχήμα 5.9: Φάσμα HMBC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ εκχυλίσματος Φασκ. $_{\text{OA}}$ (40 mg/ml) σε Pyr- d_5 ($T=298\text{K}$, $NS=64$, $t_{\text{exp}}=4\text{h}$, 500 MHz) (Kontogianni et al., 2009).

Η εφαρμογή της συγκεκριμένης στρατηγικής στα εκχυλίσματα Θυμ._{OA}, Φ.Ε._{OA} και Μαντζ._{OA} ήταν πιο πολύπλοκη. Στο φάσμα NMR-¹H φαίνονται σήματα συντονισμού στην περιοχή των 3.3 και 2.6 ppm, που θα μπορούσαν να αποδοθούν στα πρωτόνια H₁₈ του OA και UA. Όμως, στο φάσμα HMBC ¹H- ¹³C του εκχυλίσματος Φ.Ε._{OA} στο Σχήμα 5.11, οι διαγνωστικής αξίας «στήλες» διασταυρούμενων κορυφών του UA, είχαν πολύ μικρή ένταση γι' αυτό και δεν μπορούσαν να ταυτοποιηθούν. Το ίδιο παρατηρήθηκε και για τις αντίστοιχες «στήλες» διασταυρούμενων κορυφών του OA στο διδιάστατο χάρτη HMBC ¹H- ¹³C των εκχυλισμάτων Θυμ._{OA} και Μαντζ._{OA}. Βέβαια, χρησιμοποιώντας μεγαλύτερη ποσότητα στερεού εκχυλίσματος (50 mg στερεού εκχ./ 0.5 ml, με συγκεντρώσεις ≥ 5 mM) και μεγαλύτερους χρόνους συλλογής δεδομένων NMR, οι διαγνωστικής αξίας «στήλες» διασταυρούμενων κορυφών του OA και UA, έγιναν διακριτές.



Σχήμα 5.10: Φάσμα HSQC ¹H-¹³C εκχυλίσματος Φ.Ε._{OA} (40 mg/ml) σε Pyr-*d*₅ (T= 298K, NS= 2, *t*_{exp}= 14 min, 500 MHz) (Kontogianni et al., 2009).



Σχήμα 5.11: Φάσμα HMBC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ εκχυλίσματος $\Phi.Ε.Ο_A$ (40 mg/ml) σε $\text{Pyr}-d_5$ ($T=298\text{K}$, $NS=16$, $t_{\text{exp}}=1\text{h}$, 500 MHz) (Kontogianni et al., 2009).

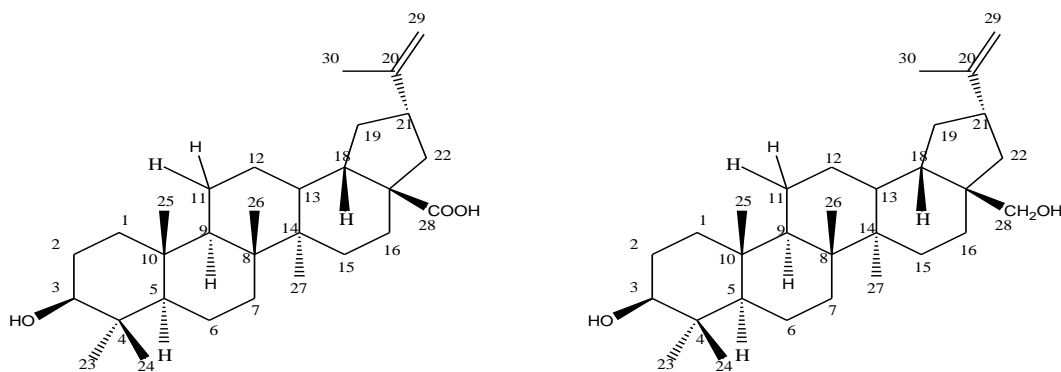
Στο σημείο αυτό θα πρέπει να τονιστεί το γεγονός ότι η μέθοδος HMBC είναι, εξ υπαρχής, λιγότερο ευαίσθητη από την τεχνική HSQC. Λεπτομερέστερα, η ένταση του σήματος εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη σταθερά σύζευξης J (J coupling). Το μέγεθος του σήματος είναι ανάλογο του $\sin(\pi J\tau)$ το οποίο γίνεται μέγιστο όταν $\tau = 1/2J$ [δεδομένου ότι $\sin(\pi J\tau) = 1 = \sin(\pi/2J\tau)$]. Στην περίπτωση του πειράματος HSQC η σταθερά σύζευξης J^1 παίρνει τιμές μεταξύ 130 και 200 Hz. Για την πειραματική τιμή $\tau = 3.2 \times 10^{-3}$ s, ($J = 160$ Hz) ο όρος $\sin(\pi J\tau)$ βρίσκεται μεταξύ 0.8 και 1.0. Στο πείραμα HMBC το J^2 ή το J^3 βρίσκονται μεταξύ 0 και 10 Hz. Για την πειραματική τιμή $\tau = 50 \times 10^{-3}$ s, (J^2 ή $J^3 = 10$ Hz), ο όρος $\sin(\pi J\tau)$ παίρνει τιμές μεταξύ 0 και 1.0. Συνεπώς, η ένταση του σήματος HSQC είναι κατά πολύ μεγαλύτερη από εκείνη του HMBC. Περαιτέρω, στο πείραμα HSQC η αποσύζευξη ευρείας ζώνης (broadband) δίνει οξείες απλές κορυφές (sharp singlets), ενώ στο πείραμα HMBC τα σήματα σχάζονται σύμφωνα με τη σταθερά σύζευξης J (J coupling) ελαττώνοντας την έντασή τους (Bax and Summers, 1986).

Με προσεκτική μελέτη των φασμάτων HSQC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$, διαπιστώθηκε η παρουσία και των δυο οξέων σε όλα τα εκχυλίσματα, παρότι οι διαγνωστικές διασταυρούμενες κορυφές του ΟΑ ήταν μικρής έντασης στα φάσματα των

εκχυλισμάτων Θυμ.ΟΑ και Μαντζ.ΟΑ και οι αντίστοιχες του UA, εμφάνιζαν ομοίως μικρή ένταση στο φάσμα του εκχυλίσματος Φ.Ε.ΟΑ. Επίσης, πολύ μικρής έντασης ήταν οι διασταυρούμενες κορυφές και των δυο οξέων στα εκχυλίσματα Μαντζ.Ε, Θυμ.Ε, Φασκ.Ε και Ροδ.Ε· ενώ δεν ήταν ορατές οι διαγνωστικής αξίας «στήλες» διασταυρούμενων κορυφών τους στα φάσματα HMBC ^1H - ^{13}C , λόγω της πολύ μικρής συγκέντρωσής τους. Από τα παραπάνω αποδεικνύεται ότι ο συνδυασμός των δεδομένων που παρέχονται από την ανάλυση των φασμάτων HSQC ^1H - ^{13}C και HMBC ^1H - ^{13}C μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μια εναλλακτική και πρωτότυπη αναλυτική τεχνική για τον ποιοτικό προσδιορισμό του OA και UA.

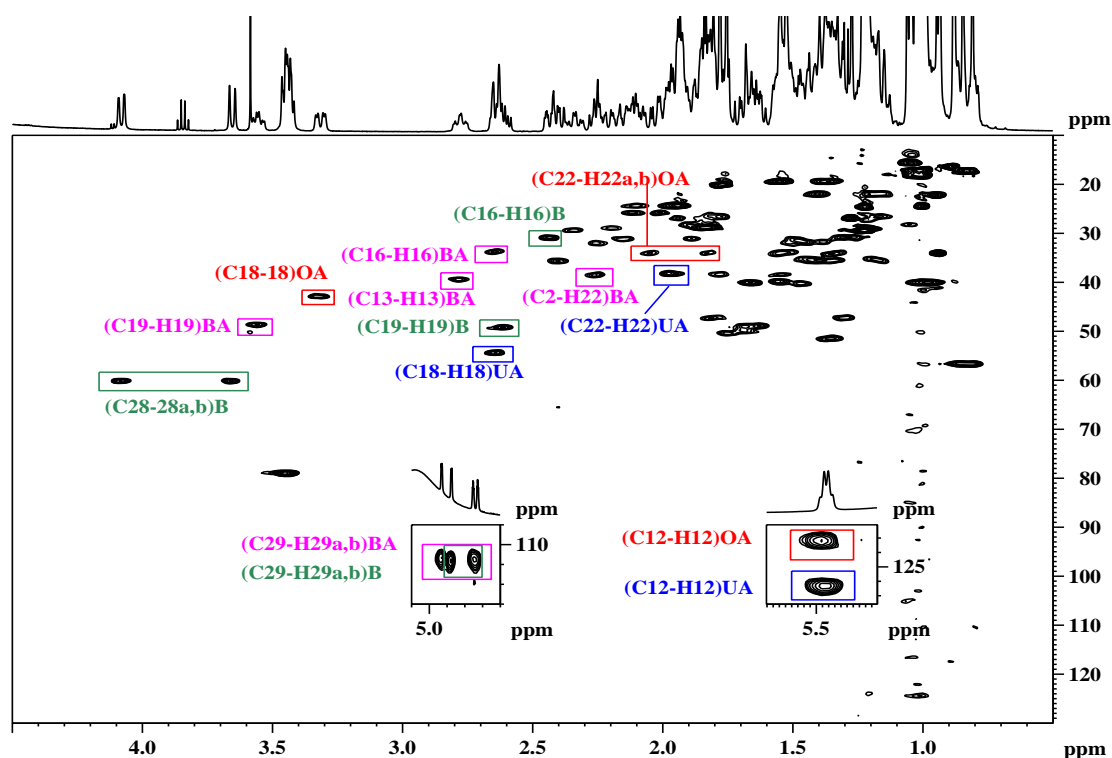
5.3 Διάκριση μίγματος μπετουλίνης, OA, UA και μπετουλινικού οξέος με λήψη φασμάτων HSQC ^1H - ^{13}C & HMBC ^1H - ^{13}C .

Η μεθοδολογία αυτή, όπως αναπτύχθηκε παραπάνω, είναι δυνατό να εφαρμοστεί για τη διάκριση και ταυτοποίηση ενός μίγματος περισσότερων τριτερπενοειδών; Για παράδειγμα, από φύλλα δεντρολίβανου έχει απομονωθεί ολεανολικό, ουρσολικό και μπετουλινικό οξύ και έχει μελετηθεί η δράση τους κατά διαφόρων ασθενειών (Abe *et al.*, 2002). Για το σκοπό αυτό παρασκευάστηκε μίγμα OA, UA, μπετουλινικού οξέος (BA) και μπετουλίνης (B), της αντίστοιχης αλκοόλης του, (1:1:1:1) και έγινε η λήψη των φασμάτων HSQC ^1H - ^{13}C και HMBC ^1H - ^{13}C του μίγματος. Οι δομές του μπετουλινικού οξέος και της αλκοόλης του δίνονται στο Σχήμα 5.12.



Σχήμα 5.12: Οι δομές του μπετουλινικού οξέος (BA) και της μπετουλίνης (B).

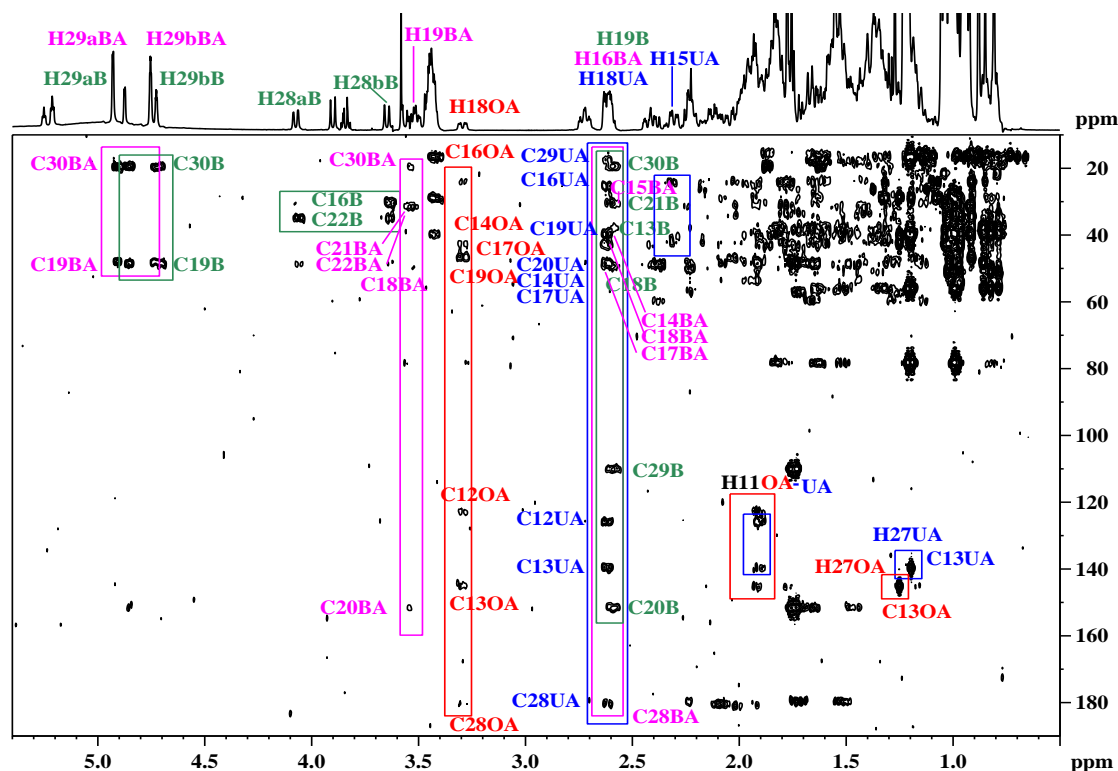
Όπως φαίνεται από το διδιάστατο χάρτη HSQC (Σχήμα 5.13) οι περισσότερες συζεύξεις μέσω ενός δεσμού των τριτερπενοειδών αλληλεπικαλύπτονται. Ωστόσο παρατηρούνται οι χαρακτηριστικές διασταυρούμενες κορυφές που αναφέρθηκαν για το OA και UA και για το BA και B παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στις διασταυρούμενες κορυφές των C_{29a,b} με τα H_{29a,b}, C₁₉ με το H₁₉ και C₁₆ με το H₁₆. Επίσης διαγνωστικές είναι οι διασταυρούμενες κορυφές των C_{28a,b} με τα H_{28a,b} για τη B και του C₁₃ με το H₁₃ και του C₂₂ με το H₂₂ για το BA. Οι χημικές μετατοπίσεις του H₁₈ του UA, του H₁₆ του BA και του H₁₉ της B αλληλεπικαλύπτονται (όλα τα πρωτόνια απορροφούν στα ~2.6 ppm), η εισαγωγή όμως της δεύτερης διάστασης απλοποιεί το αποτύπωμα του φάσματος, όπου είναι ευδιάκριτες οι διαφορές στις διασταυρούμενες κορυφές τους.



Σχήμα 5.13: Φάσμα HSQC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ του μίγματος 1:1:1 του OA, UA, BA και B (2 mg/ml) σε Pyr- d_5 ($T=298\text{ K}$, $NS=2$, $t_{exp}=14\text{ min}$, 500 MHz).

Στο Σχήμα 5.14 δίνεται το φάσμα HMBC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ του μίγματος OA, UA, BA και B. Εστιάζοντας στις συσχετίσεις μέσω πολλαπλών δεσμών των αλληλικών πρωτονίων H_{28a,b} του BA και της B, μπορούν να παρατηρηθούν δυο διακριτές «στήλες» διασταυρούμενων κορυφών που βρίσκονται κατά μήκος των απορροφήσεων των πρωτονίων H_{29a,b} στα 4.93 και 4.76 ppm για το BA και 4.89 και

4.73 ppm για τη B, αντίστοιχα. Τα αντίστοιχα πρωτόνια $H_{29a,b}$ παρουσιάζουν συσχετίσεις από απόσταση με τους άνθρακες C_{19} (αλληλεπίδραση μέσω τριών δεσμών) και C_{30} (αλληλεπίδραση μέσω δύο δεσμών). Περαιτέρω, διαγνωστικής αξίας θα μπορούσαν να θεωρηθούν οι διασταυρούμενες κορυφές των πρωτονίων $H_{28a,b}$ με τον άνθρακα C_{22} και C_{16} , που παρατηρούνται για τη B, και του πρωτονίου H_{19} με τον άνθρακα C_{30} , C_{21} , C_{22} , C_{18} και C_{20} , που παρατηρούνται για το BA (Πίνακας 5.2). Τέλος, για τις συσχετίσεις μέσω πολλαπλών δεσμών των πρωτονίων που αλληλεπικαλύπτονται στα ~ 2.6 ppm ($H_{16\beta}$ BA, H_{18} UA και H_{19} B) παρατηρείται συνωστισμός για την περιοχή από $\sim 15-50$ ppm, ενώ ευδιάκριτες είναι οι διασταυρούμενες κορυφές του H_{19} με τους C_{29} και C_{20} της B και του H_{18} με τους C_{12} και C_{13} του UA. Έτσι, η συνδυαστική μεθοδολογία των πειραμάτων HSQC 1H - ^{13}C και HMBC 1H - ^{13}C μπορεί να αποδειχθεί ένα χρήσιμο εργαλείο για τη διάκριση του OA, UA, BA και B σε ένα μίγμα τους. Είναι συνεπώς μεγάλου ενδιαφέροντος να εφαρμοστεί η μεθοδολογία αυτή και σε φυτικά εκχυλίσματα.



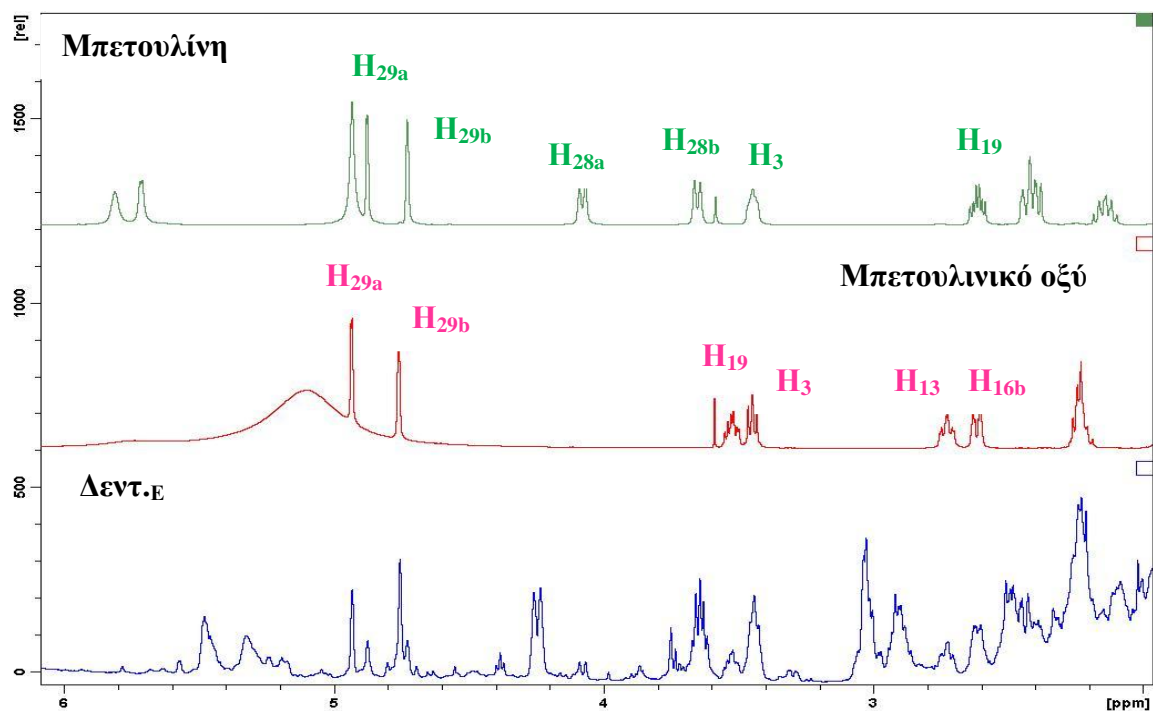
Σχήμα 5.14: Φάσμα HMBC 1H - ^{13}C του μίγματος 1:1:1:1 του OA, UA, BA και B (2 mg/ml) σε Pyridine- d_5 ($T = 298$ K, $NS = 32$, $t_{exp} = 2$ h & 8 min, 500 MHz)

Πίνακας 5.2: Οι χημικές μετατοπίσεις NMR-¹H και ¹³C (δ, ppm) του BA και της B και οι συζεύξεις τους μέσω πολλαπλών δεσμών που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίησή τους.

Μπετουλινικό οξύ				Μπετουλίνη		
C	δ C	δ H	Συζεύξεις μέσω πολλαπλών δεσμών	δ C	δ H	Συζεύξεις μέσω πολλαπλών δεσμών
13	39.3	2.73				
16	33.6	2.61 β	C15(30.9), C14 (42.8), C18 (50.5), C17 (56.6), C28 (178.7)			
19	48.5	3.52	C30 (20.2), C21 (31.9), C22 (38.3), C18 (50.5), C20 (151.2)	47.6	2.62	C30 (18.7), C21 (29.8), C13 (36.9), C18 (48.4), C29 (109.2), C20 (151.3)
22	38.3	2.24 β				
28				59.0	4.09 α 3.66 β	C22 (34.2), C16 (29.4)
29	109.2	4.93 α 4.76 β	C19 (48.5), C30 (20.2)	109.2	4.89 α 4.73 β	C19 (47.6), C30 (18.7)

5.4 Ταυτοποίηση του μίγματος B, OA, UA και BA σε ακατέργαστα (crude) φυτικά εκχυλίσματα δεντρολίβανου.

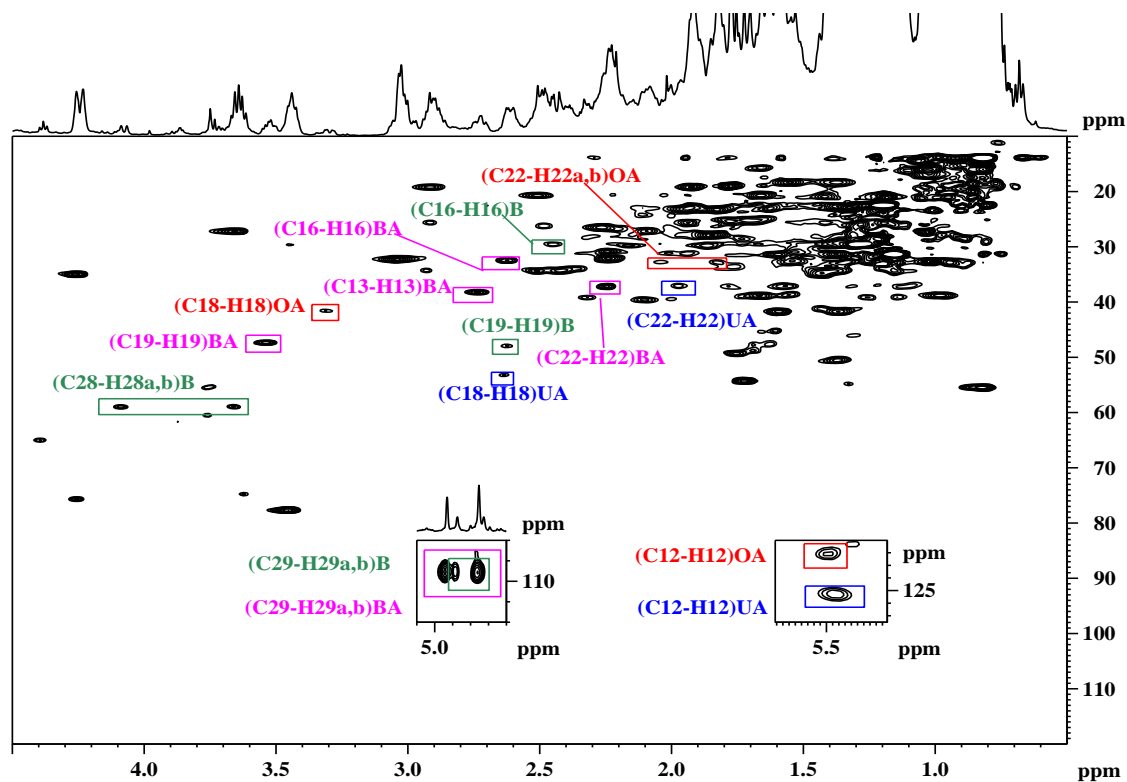
Στην προκαταρκτική μελέτη καταγράφηκαν τα φάσματα NMR-¹H των εκχυλισμάτων Δεντ._{OA} και Δεντ._E χωρίς προηγούμενο χρωματογραφικό διαχωρισμό τους. Προσεκτική παρατήρηση στην περιοχές που απορροφούν τα πρωτόνια H₁₈ του OA και UA, H_{29a,b} του BA και B, H₁₉ και H₁₃ του BA θα μπορούσε να αποκαλύψει την παρουσία τους στο εκχύλισμα Δεντ._E (Σχήμα 5.15). Ωστόσο, η πολυπλοκότητα των φασμάτων NMR-¹H, εξαιτίας της αλληλοεπικάλυψης των χημικών μετατοπίσεων των διαφορετικών συστατικών, καθιστά επιτακτική την ανάγκη εφαρμογής συνδυαστικών δισδιάστατων τεχνικών NMR για την ακριβή ταυτοποίηση τους.



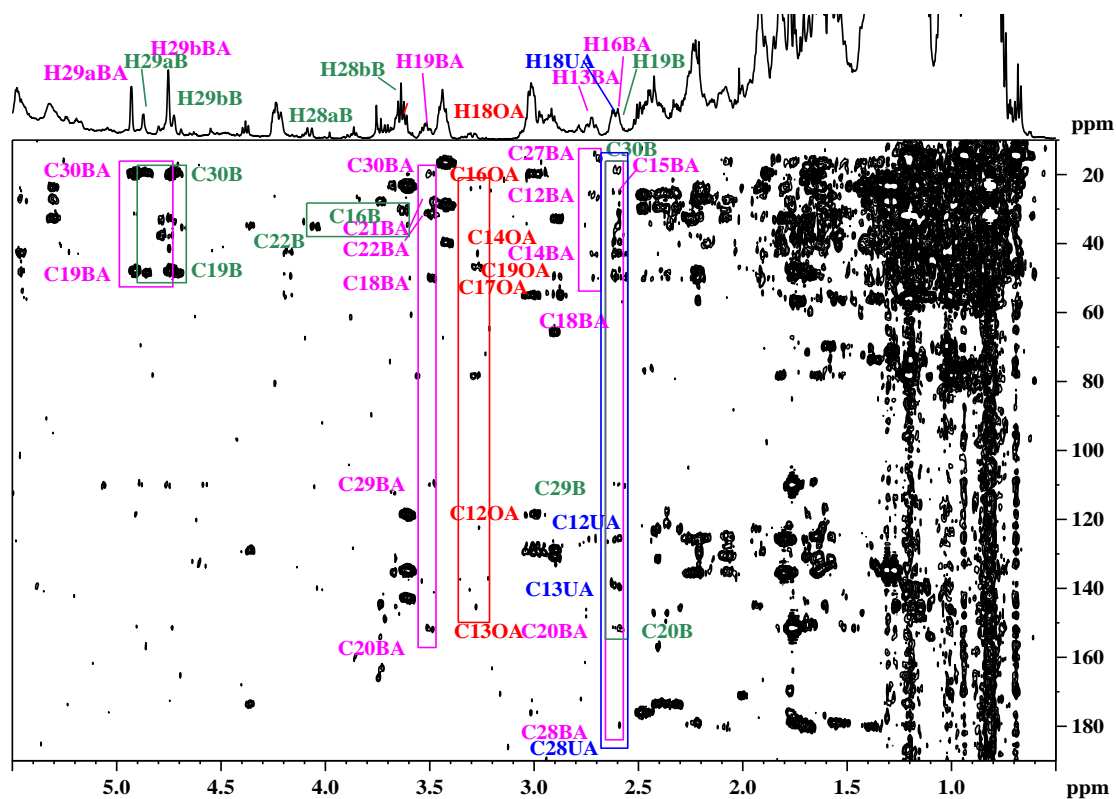
Σχήμα 5.15: Φάσμα NMR ^1H εκχυλίσματος Δεντ.Ε (40 mg/ml) σε Pyr- d_5 ($T = 298\text{ K}$, $NS = 64$, $t_{\text{exp}} = 7\text{ min}$, 500 MHz).

Στα Σχήματα 5.16 και 5.17 απεικονίζονται τα φάσματα HSQC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ και HMBC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$, αντίστοιχα, του εκχυλίσματος Δεντ.Ε. Οι σημαντικές διασταυρούμενες κορυφές στο χάρτη HSQC, που αναφέρθηκαν παραπάνω για την ταυτοποίηση των τεσσάρων ενώσεων, γίνονται εύκολα διακριτές. Οι διαγνωστικής αξίας «στήλες» διασταυρούμενων κορυφών στο δισδιάστατο χάρτη HMBC έχουν πολύ μικρή ένταση για την περίπτωση του OA και UA, λόγω της μικρής συγκέντρωσης στο εκχύλισμα.

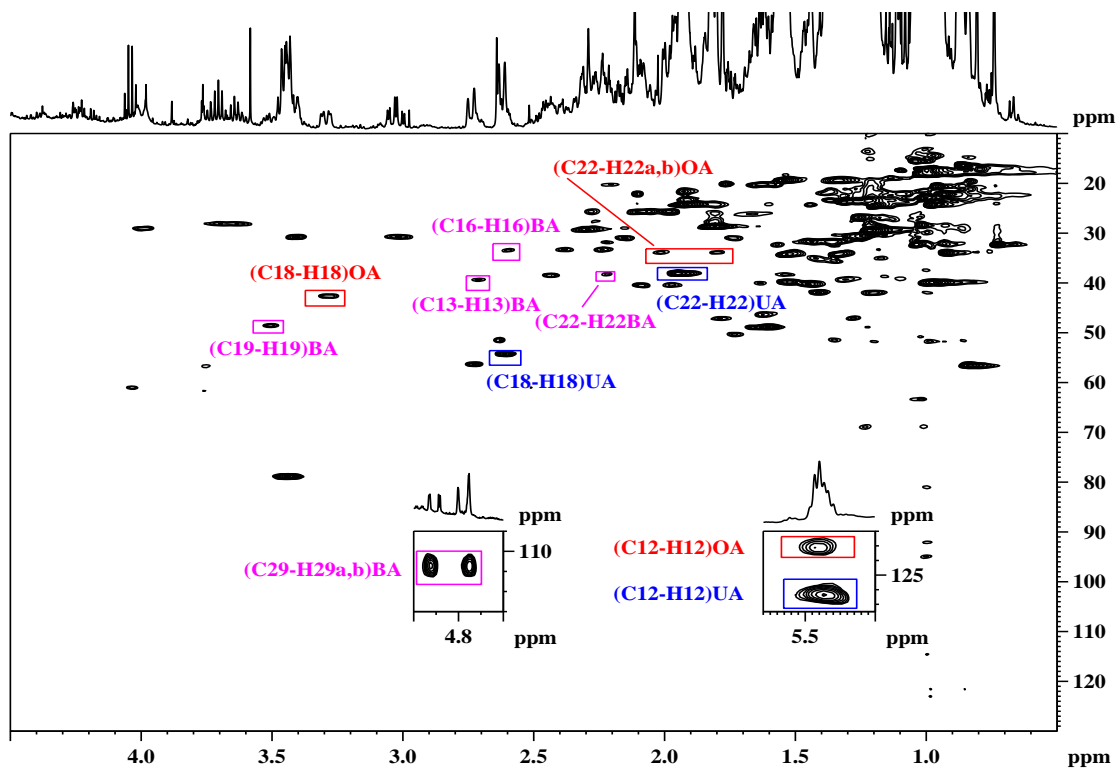
Στο Σχήμα 5.18 και 5.19 απεικονίζονται τα φάσματα HSQC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ και HMBC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$, αντίστοιχα, του εκχυλίσματος Δεντ.ΟΑ. Από τη μελέτη των φασμάτων προκύπτει ότι συστατικά των εκχυλισμάτων είναι το OA, UA και BA. Οι σημαντικές διασταυρούμενες κορυφές στο χάρτη HSQC γίνονται εύκολα διακριτές, ενώ οι διαγνωστικής αξίας «στήλες» διασταυρούμενων κορυφών στο δισδιάστατο χάρτη HMBC για την περίπτωση του OA έχουν και πάλι πολύ μικρή ένταση.



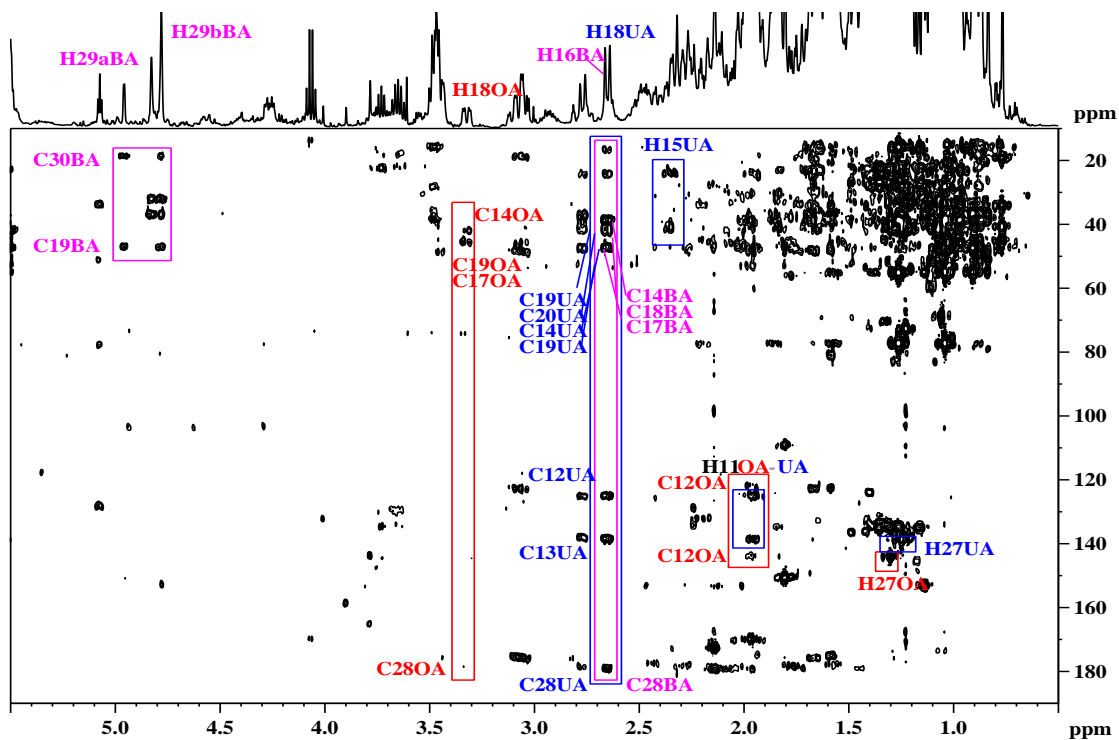
Σχήμα 5.16: Φάσμα HSQC ^1H - ^{13}C εκχυλίσματος Δεντ._E (40 mg/ml) σε Pyr- d_5 ($T = 298\text{ K}$, $NS = 2$, $t_{exp} = 14\text{ min}$, 500 MHz).



Σχήμα 5.17: Φάσμα HMBC ^1H - ^{13}C εκχυλίσματος Δεντ._E (40 mg/ml) σε Pyr- d_5 ($T = 298\text{ K}$, $NS = 168$, $t_{exp} = 11\text{ h} \ \& \ 13\text{ min}$, 500 MHz).



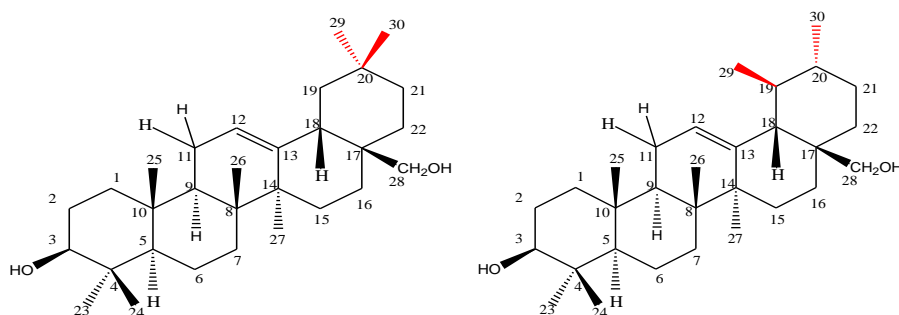
Σχήμα 5.18: Φάσμα HSQC ^1H - ^{13}C εκχυλίσματος Δεντ. $_{\text{OA}}$ (40 mg/ml) σε Pyr- d_5 ($T=298\text{ K}$, $NS=2$, $t_{\text{exp}}=14\text{ min}$, 500 MHz).



Σχήμα 5.19: Φάσμα HMBC ^1H - ^{13}C εκχυλίσματος Δεντ. $_{\text{OA}}$ (40 mg/ml) σε Pyr- d_5 ($T=298\text{ K}$, $NS=64$, $t_{\text{exp}}=4\text{ h \& }16\text{ min}$, 500 MHz).

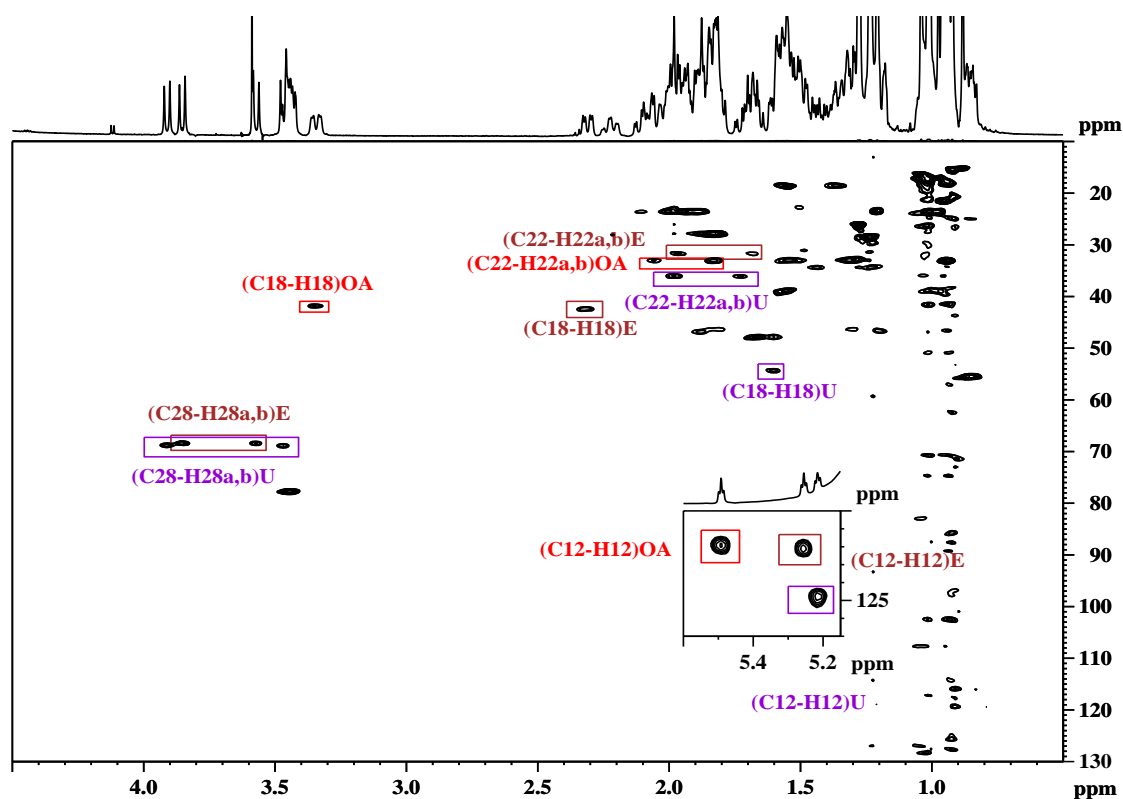
5.5 Ταυτοποίηση μίγματος ερυθροδιόλης, ουβαόλης και ΟΑ με λήψη φασμάτων HSQC ^1H - ^{13}C & HMBC ^1H - ^{13}C .

Στην προσπάθεια να επεκταθεί η εφαρμογή της μεθοδολογίας και σε άλλα τριτερπενοειδή παρασκευάστηκε μίγμα ερυθροδιόλης (E), ουβαόλης (U) και ΟΑ (1:1:1) και ελήφθησαν τα φάσματα HSQC ^1H - ^{13}C και HMBC ^1H - ^{13}C του μίγματος. Οι ενώσεις αυτές έχουν απομονωθεί από φύλλα ελιάς και είναι συστατικά του ελαιολάδου. Συγκεκριμένα έχει διαπιστωθεί ότι η σχετική συγκέντρωση των δύο αυτών τριτερπενικών διαλκοολών είναι διαφορετική σε ελαιόλαδα διαφορετικής προέλευσης. Το πυρηνέλαιο περιέχει περισσότερη E και U σε σχέση με το παρθένο ελαιόλαδο. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της E και U με αεριοχρωματογραφική ανάλυση αποτελεί τη βάση για τη διαφοροποίηση του ελαιολάδου από το πυρηνέλαιο. Οι δομές της E και U δίνονται στο Σχήμα 5.20.



Σχήμα 5.20: Οι δομές της ερυθροδιόλης (E) και της ουβαόλης (U).

Όπως φαίνεται από το δισδιάστατο χάρτη HSQC (Σχήμα 5.21) οι περισσότερες συζεύξεις μέσω ενός δεσμού των τριτερπενοειδών αλληλεπικαλύπτονται, ωστόσο παρατηρούνται οι χαρακτηριστικές διασταυρούμενες κορυφές που αναφέρθηκαν για το ΟΑ. Για την E και U παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στις διασταυρούμενες κορυφές των $\text{C}_{28\text{a,b}}$ με τα $\text{H}_{28\text{a,b}}$, C_{18} με το H_{18} , C_{12} με το H_{12} και $\text{C}_{22\text{a,b}}$ με τα $\text{H}_{22\text{a,b}}$.



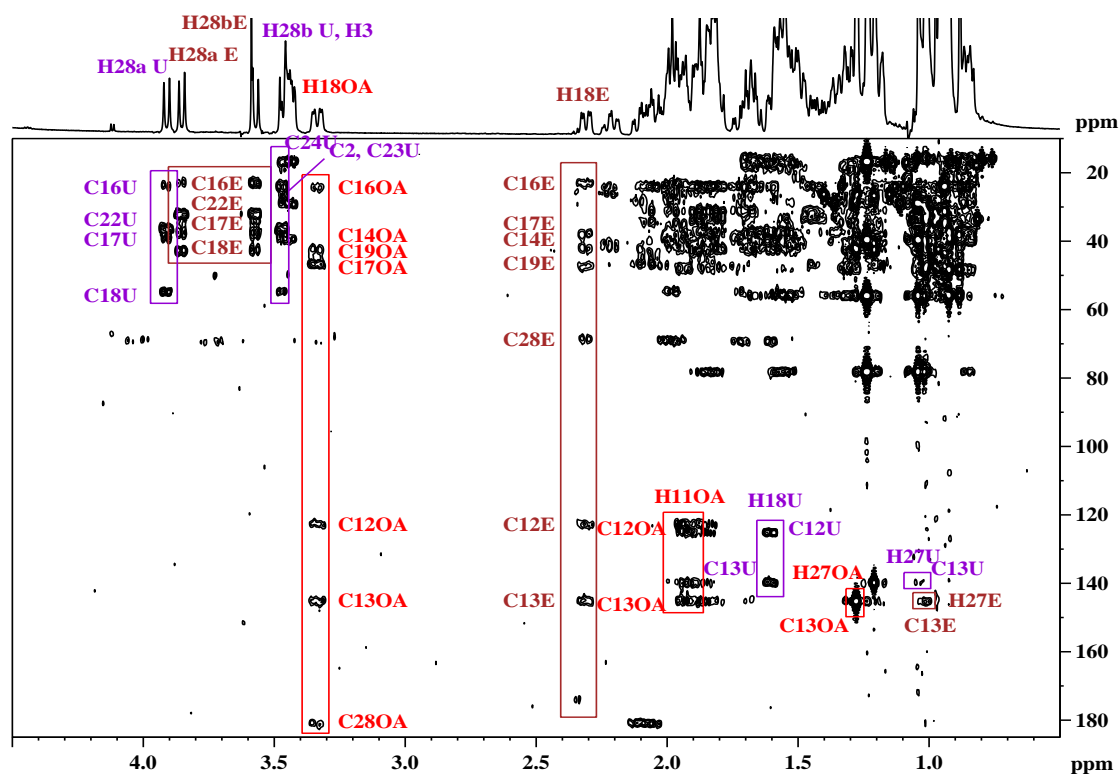
Σχήμα 5.21: Φάσμα HSQC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ του μίγματος 1:1:1 του OA, της U και E (2 mg/ml) σε Pyr- d_5 ($T=298\text{ K}$, $NS=2$, $t_{exp}=14\text{ min}$, 500 MHz).

Στο Σχήμα 5.22 δίνεται το φάσμα HMBC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ του μίγματος OA, E και U. Εστιάζοντας στις συσχετίσεις μέσω πολλαπλών δεσμών των πρωτονίων $\text{H}_{28a,b}$ της E και της U, μπορούν να παρατηρηθούν δυο διακριτές «στήλες» διασταυρούμενων κορυφών που βρίσκονται κατά μήκος των απορροφήσεων των πρωτονίων $\text{H}_{28a,b}$ στα 3.46 και 3.91 ppm για την U και 3.57 και 3.84 ppm για την E, αντίστοιχα (Πίνακας 5.3). Τα αντίστοιχα πρωτόνια $\text{H}_{28a,b}$ παρουσιάζουν συσχετίσεις μέσω πολλαπλών δεσμών με τους άνθρακες C_{16} , C_{22} , C_{18} (αλληλεπίδραση μέσω τριών δεσμών) και C_{17} (αλληλεπίδραση μέσω δύο δεσμών). Οι απορροφήσεις των H_{28b} της U και των H_3 της E και U στα 3.46 ppm, αλληλεπικαλύπτονται και έτσι στη διακριτή «στήλη» διασταυρούμενων κορυφών κατά μήκος των απορροφήσεων αυτών φαίνονται και οι συσχετίσεις των H_3 με τους C_{24} , C_2 και C_{23} . Χαρακτηριστική, επίσης, είναι η «στήλη» διασταυρούμενων κορυφών κατά μήκος της απορρόφησης του H_{18} της E. Το συγκεκριμένο πρωτόνιο παρουσιάζει συσχετίσεις μέσω πολλαπλών δεσμών με τους άνθρακες C_{16} , C_{17} , C_{14} , C_{19} , C_{28} , C_{12} και C_{13} , ενώ το αντίστοιχο πρωτόνιο H_{18} της U

επειδή απορροφά σε μια περιοχή που χαρακτηρίζεται από μεγάλο συνωστισμό διασταυρούμενων κορυφών, (1.62 ppm) μόνο οι συσχετίσεις του με τους C₁₃ και C₁₂ είναι διαγνωστικής αξίας. Περαιτέρω, διαγνωστικής αξίας θα μπορούσαν να θεωρηθούν οι διασταυρούμενες κορυφές του πρωτονίου H₂₇ με τον άνθρακα C₁₃ και για τις δυο ενώσεις. Έτσι, η συνδυαστική μεθοδολογία των πειραμάτων HSQC ¹H-¹³C και HMBC ¹H-¹³C μπορεί να αποδειχθεί ένα χρήσιμο εργαλείο για τη διάκριση των ενώσεων OA, U και E σε ένα μίγμα τους. Παρουσιάζει ως εκ τούτου ενδιαφέρον η εφαρμογή της μεθοδολογίας και σε φυτικά εκχυλίσματα.

Πίνακας 5.3: Οι χημικές μετατοπίσεις NMR-¹H και ¹³C (δ, ppm) της E και U και οι συζεύξεις τους μέσω πολλαπλών δεσμών που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίησή τους.

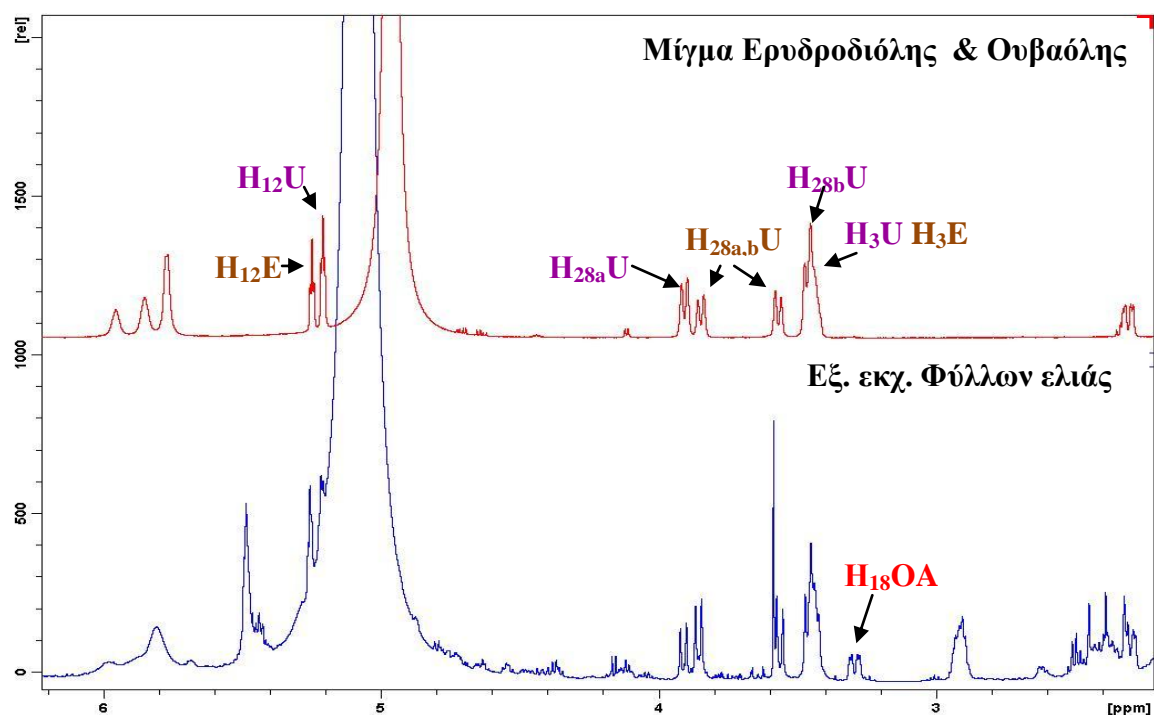
Ερυθροδιόλη				Ουβαόλη		
C	δ C	δ H	Συζεύξεις μέσω πολλαπλών δεσμών	δ C	δ H	Συζεύξεις μέσω πολλαπλών δεσμών
12	122.1	5.24		125.8	5.22	
18	42.4	2.32	C16 (22.6), C17 (36.6), C14 (41.7), C19 (46.8), C28 (68.2) C12 (122.1), C13 (144.0)	55.5	1.62	C12 (125.8), C13 (139.7)
22	31.5	1.69 α 1.98 β		37.0	1.73 α 2.00 β	
27		1.01	C13 (144.0)		1.04	C13 (139.7)
28	68.2	3.84 α 3.57 β	C16 (22.6), C22 (31.5), C17 (36.6), C18 (42.4)	70.0	3.91 α 3.46 β	C16 (24.5), C22 (37.0), C17 (36.7), C18 (55.5)



Σχήμα 5.22: Φάσμα HMBC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ του μίγματος 1:1:1 του OA, U και E και B (2 mg/ml) σε Pyr- d_5 ($T=298\text{ K}$, $NS=16$, $t_{exp}=1\text{ h}$, 500 MHz).

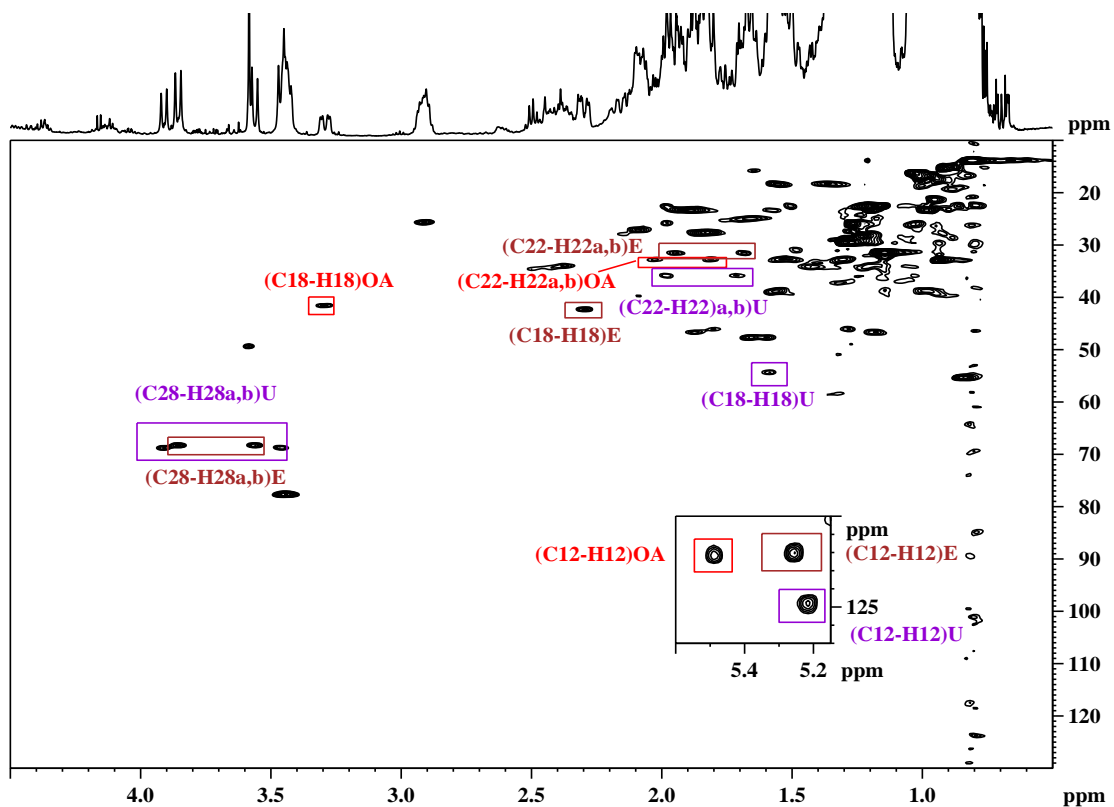
5.6 Ταυτοποίηση του μίγματος E, U και OA σε ακατέργαστο (crude) φυτικό εκχύλισμα φύλλων ελιάς.

Στην προκαταρκτική μελέτη καταγράφηκε τα φάσμα NMR- ^1H του εκχυλίσματος Φ.Ε.Ε, χωρίς προηγούμενο χρωματογραφικό διαχωρισμό. Προσεκτική μελέτη στις περιοχές που απορροφούν τα πρωτόνια H_{18} του OA και $\text{H}_{28a,b}$ των E και U θα μπορούσε να αποκαλύψει την παρουσία των ενώσεων αυτών στο συγκεκριμένο εκχύλισμα (Σχήμα 5.23). Ωστόσο, η πολυπλοκότητα των φασμάτων NMR- ^1H , εξαιτίας της αλληλοεπικάλυψης των χημικών μετατοπίσεων των διαφορετικών συστατικών, καθιστά επιτακτική την ανάγκη εφαρμογής συνδυαστικών δισδιάστατων τεχνικών NMR για την ακριβή ταυτοποίησή τους.

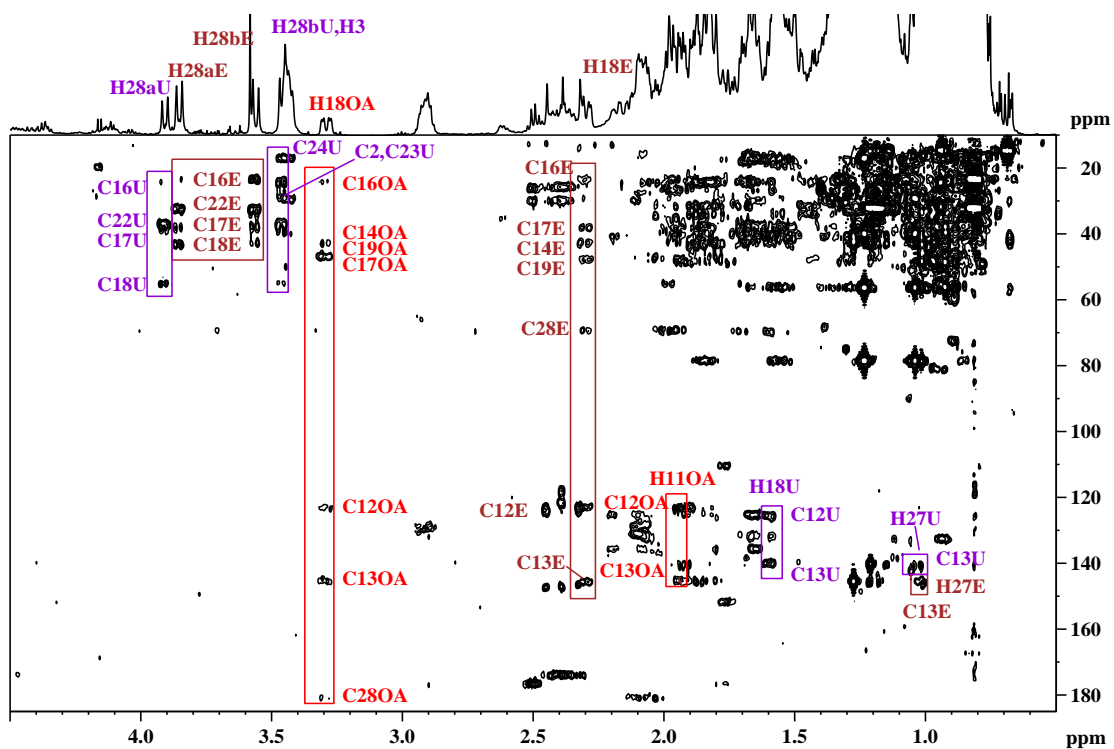


Σχήμα 5.23: Φάσμα NMR ^1H εκχυλίσματος Φ.Ε.Ε (40 mg/ml)(κάτω) & του μίγματος E και U (πάνω) σε Pyr- d_5 ($T=298\text{ K}$, $NS=64$, $t_{exp}=7\text{ min}$, 500 MHz).

Στα Σχήματα 5.24 και 5.25 απεικονίζονται τα φάσματα HSQC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ και HMBC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$, αντίστοιχα, του εκχυλίσματος Φ.Ε.Ε. Οι σημαντικές διασταυρούμενες κορυφές στο χάρτη HSQC και οι διαγνωστικής αξίας «στήλες» διασταυρούμενων κορυφών στο δισδιάστατο χάρτη HMBC, που αναφέρθηκαν παραπάνω για την ταυτοποίηση των παραπάνω ενώσεων, γίνονται εύκολα διακριτές οδηγώντας στη σαφή ταυτοποίηση των απορροφήσεων.



Σχήμα 5.24: Φάσμα HSQC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ εκχυλίσματος $\Phi.E.E$ (40 mg/ml) σε $\text{Pyr}-d_5$ ($T = 298\text{ K}$, $NS = 2$, $t_{exp} = 14\text{ min}$, 500 MHz).

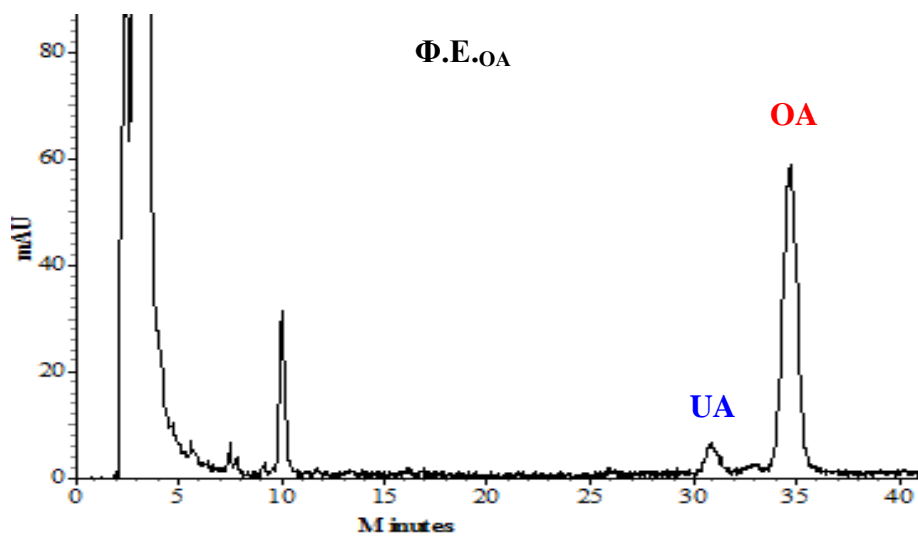
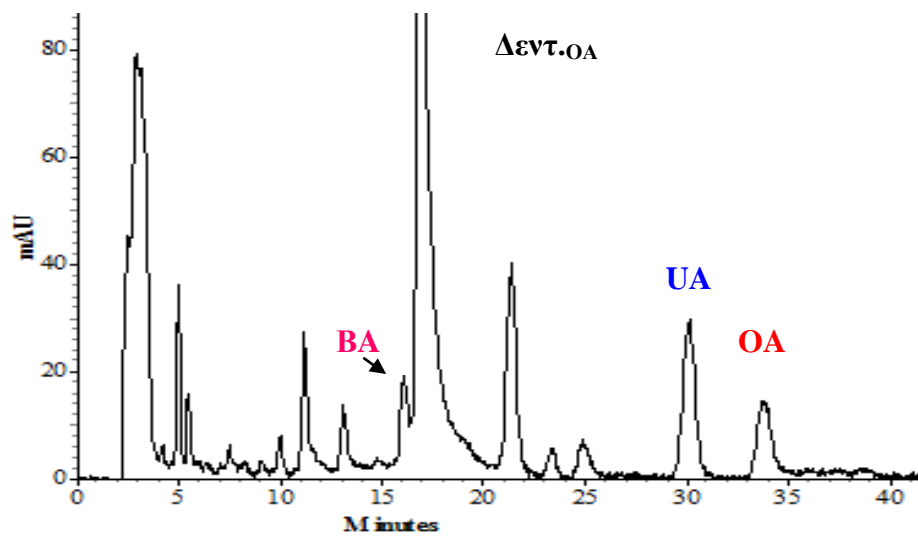
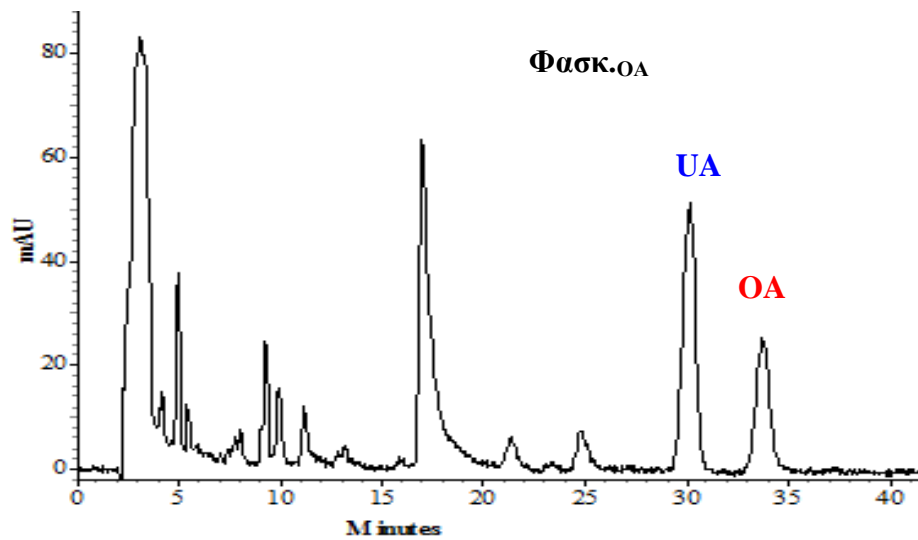


Σχήμα 5.25: Φάσμα HMBC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ εκχυλίσματος $\Phi.E.E$ (40 mg/ml) σε $\text{Pyr}-d_5$ ($T = 298\text{ K}$, $NS = 64$, $t_{exp} = 4\text{ h} \ \& \ 16\text{ min}$, 500 MHz).

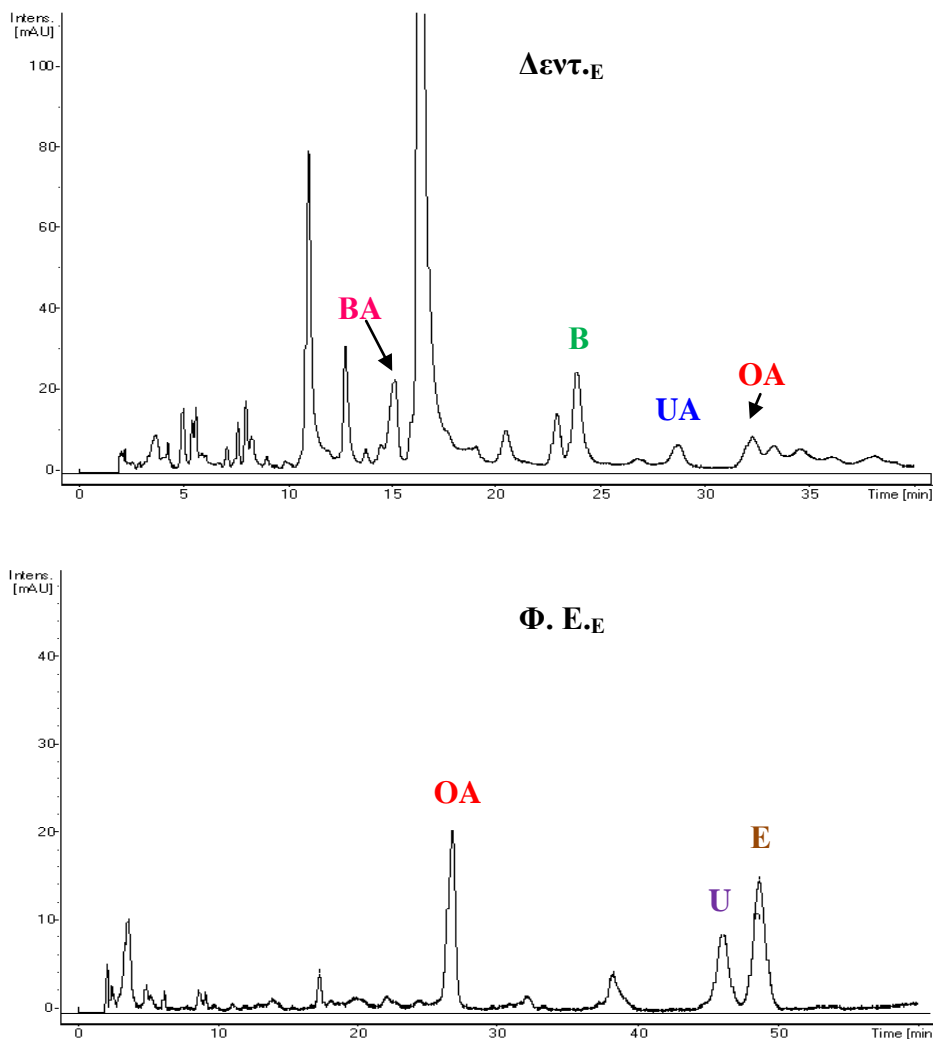
5.7 Ταυτοποίηση & ποσοτικός προσδιορισμός των τριτερπενοειδών με HPLC με τη χρήση κυκλοδεξτρίνων στην κινητή φάση.

Για την ανάλυση των ενώσεων OA και UA με HPLC εφαρμόστηκαν διάφορες μέθοδοι που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία, ωστόσο τα τριτερπενικά οξέα σχεδόν συνεκλούσαν σε όλες τις περιπτώσεις και ο διαχωρισμός τους ήταν πολύ δυσχερής. Η προσθήκη όμως παραγωγοποιημένων κυκλοδεξτρίνων (γ -υδροξυπροπυλ-κυκλοδεξτρίνης HP- γ -CD) σε ρυθμιστικό διάλυμα ακετονιτρίλιου-φωσφορικών τελικά οδήγησε στη βελτίωση του διαχωρισμού τους. Η προσθήκη αυτή οδηγεί στο σχηματισμό υδρόφιλων συμπλόκων εγκλεισμού (inclusion complexes) μεταξύ της κυκλοδεξτρίνης και του τριτερπενικού οξέος. Ο σχηματισμός συμπλόκων μπορεί να θεωρηθεί ως στάδιο παραγωγοποίησης, καθώς με την HPLC ουσιαστικά προσδιορίζονται τα σύμπλοκα εγκλεισμού τριτερπενικού οξέος-κυκλοδεξτρίνης. Το φαινόμενο της συμπλοκοποίησης αυξάνει τη διαλυτότητα των προσδιοριζόμενων συστατικών στην κινητή φάση με αποτέλεσμα να μειώνεται ο χρόνος κατακράτησής τους μέσα στη στήλη. Η σταθερότητα των συμπλόκων εξαρτάται από το μέγεθος και την προσαρμογή των τριτερπενικών οξέων αλλά και από το μέγεθος του υδρόφοβου εσωτερικού τμήματος των κυκλοδεξτρίνων (Claude *et al.*, 2004).

Οι Claude *et al.*, 2004 εφάρμοσαν τη συγκεκριμένη μέθοδο για το διαχωρισμό των πρότυπων ενώσεων τριτερπενικών οξέων OA, UA και BA. Η χρήση των κυκλοδεξτρίνων για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό του OA και UA, σε φυτικά εκχυλίσματα, αλλά και για το διαχωρισμό της B με το BA και της E με τη U και τον προσδιορισμό τους σε φυτικά εκχυλίσματα δεν έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία. Χρησιμοποιώντας ταχύτητα ροής 1.0 ml/min και συνθήκες ισοκρατικής έκλουσης με αναλογία 55/45%, v/v ακετονιτρίλιο και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών στο οποίο είχε προστεθεί γ -υδροξυπροπυλ-κυκλοδεξτρίνη, ο χρόνος κατακράτησης t_R των ενώσεων UA, OA, BA και B ήταν 30.2, 33.5, 15.8 και 24.2 min, αντίστοιχα. Επειδή οι ενώσεις E και U εκλουόταν πολύ αργά με την παραπάνω αναλογία διαλυτών, μετά από κάποιες δοκιμές επιλέχθηκε η αναλογία 60/40%, v/v με την οποία ο χρόνος κατακράτησης της t_R U και E ήταν 46.0 και 48.7 min, αντίστοιχα. Στα Σχήματα 5.26 και 5.27 απεικονίζονται ενδεικτικά χρωματογραφήματα των φυτικών εκχυλισμάτων.



Σχήμα 5.26: Χρωματογραφήματα των φωτικών εκχυλισμάτων οξικού αιθολεστέρα στα 210 nm



Σχήμα 5.27: Χρωματογραφήματα των εξανικών φυτικών εκχυλίσμάτων στα 210 nm

Οι ενώσεις OA και UA ταυτοποιήθηκαν σε όλα τα εξανικά εκχυλίσματα και τα εκχυλίσματα οξικού αιθυλεστέρα, εκτός από το Φ.Ε.Ε που είχε μόνο OA. Η περίπτωση του εκχυλίσματος Φ.Ε.ΟΑ παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς η συγκέντρωση του OA είναι σχεδόν 10 φορές μεγαλύτερη από εκείνη του UA. Εξαιτίας αυτού, το UA δεν μπορούσε να ταυτοποιηθεί χωρίς τη χρήση των κυκλοδεξτρινών αφού η κορυφή του αποκρύπτεται από την έντονη κορυφή του OA. Το BA ανιχνεύθηκε στα εκχυλίσματα δεντρολίβανου και η B μόνο στο Δεντ.Ε. Οι ενώσεις OA και UA φαίνεται ότι είναι σε πολύ χαμηλά επίπεδα στο παραπάνω εκχύλισμα (Σχήμα 5.27) και παρότι χρησιμοποιήθηκε και μεγαλύτερη ποσότητα αρχικού στερεού εκχυλίσματος (5mg/ ml) δε βελτιώθηκε η μορφή των κορυφών. Παρότι στο Κεφάλαιο 4 αναφέρθηκε ότι ανιχνεύθηκε μπετουλινικό οξύ στα

εκχυλίσματα φασκόμηλου και στο εκχύλισμα Ροδ._{ΟΑ}, δεν διαπιστώθηκε η παρουσία του με την υγρή χρωματογραφία ή με τη μεθοδολογία NMR, γιατί πιθανώς βρίσκεται σε ίχνη. Οι ενώσεις Ε και U ανιχνεύθηκαν μόνο στο εκχύλισμα Φ.Ε._Ε. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ενώσεων κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς επτά σημείων. Οι εξισώσεις που περιγράφουν τις καμπύλες αναφοράς και οι τιμές των συντελεστών παλινδρόμησης R^2 είναι για το ΟΑ $y = 11051x - 60369, 0,999$, για το UΑ $y = 9566,4x - 39617, 0,997$, για το ΒΑ $y = 6306,7x - 7086,6, 0,999$, για τη Β $y = 5,27x + 68,946, 0,989$, για τη Ε $y = 10,791x - 0,1, 0,996$ και για τη U $y = 7,796x - 114,49, 0,989$, αντίστοιχα. Τα ποσοτικά αποτελέσματα δίνονται στον Πίνακα 5.4 στο Κεφάλαιο 5.9, όπου γίνεται σύγκριση των αποτελεσμάτων με τις δυο τεχνικές. Ένα από τα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι το μεγάλο εύρος των κορυφών των τριτερπενοειδών, το οποίο αντιστοιχεί σε ένα μήκος έκλουσης (elution length) 2 min, κάτι που θα μπορούσε να επηρεάσει την ακρίβεια του ποσοτικού προσδιορισμού.

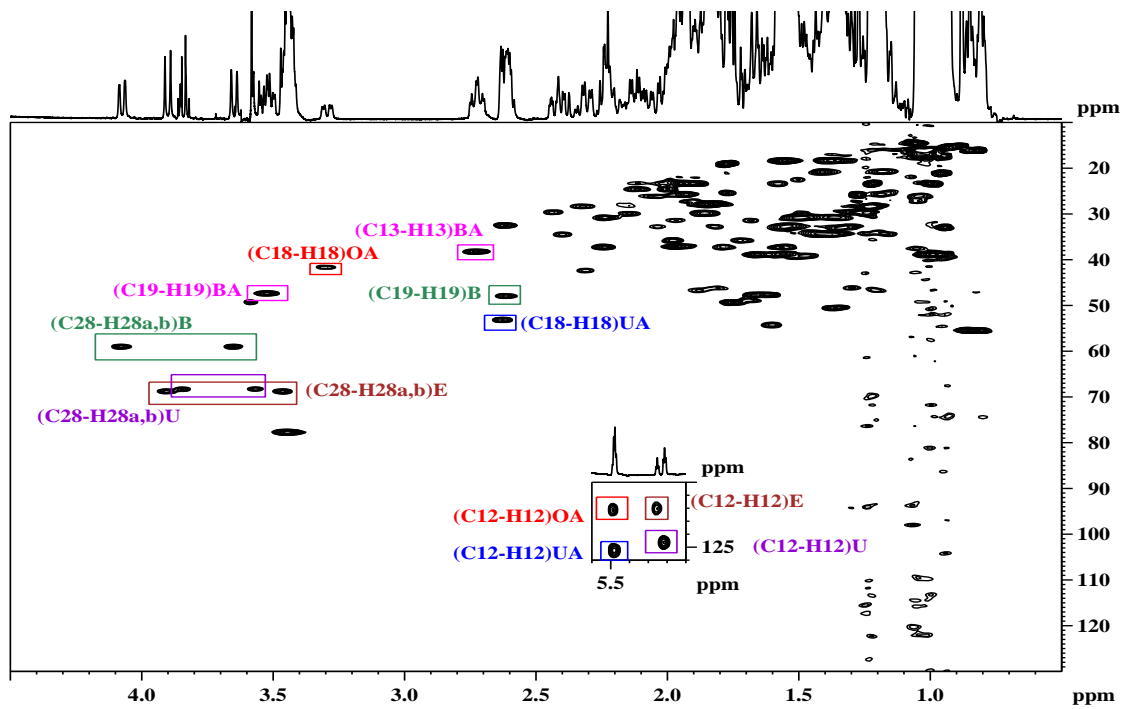
5.8 Ποσοτικός προσδιορισμός των τριτερπενοειδών με φασματοσκοπία NMR- ^1H & HSQC ^1H - ^{13}C .

Αρχικά, έγινε μια προσπάθεια να χρησιμοποιηθεί για τον ποσοτικό προσδιορισμό η φασματοσκοπία NMR- ^1H . Κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς της αναλογίας των ολοκληρωμάτων μεταξύ των σημάτων του ΟΑ και UΑ ως προς το ολοκλήρωμα του σήματος του εσωτερικού προτύπου. Επειδή η συγκέντρωση του εσωτερικού προτύπου TMSP-*d*₄ ήταν πάντα σταθερή, τόσο για τα πρότυπα όσο και για τα διαλύματα των εκχυλισμάτων, η καμπύλη αναφοράς κατασκευάστηκε τοποθετώντας κάθε φορά στον άξονα των y την αναλογία του ολοκληρώματος του σήματος συντονισμού του πρωτονίου H₁₈ για το ΟΑ και UΑ προς το ολοκλήρωμα του εσωτερικού προτύπου. Παρατηρήθηκε γραμμική εξάρτηση για μια περιοχή συγκεντρώσεων 2-10 mg/ml (4.4–21.9 mM) για το ΟΑ και UΑ (οι εξισώσεις που περιγράφουν τις καμπύλες αναφοράς και οι τιμές των συντελεστών παλινδρόμησης R^2 είναι για το ΟΑ $y = 0,1224x - 0,1488, 0,987$, για το UΑ $y = 0,2801x - 0,1488, 0,993$). Το όριο ανίχνευσης βρέθηκε οπτικά να είναι 8.8 μM (για S/N = 3) (ns = 1k) και το όριο ποσοτικού προσδιορισμού είναι 26.0 μM (για S/N = 10) και για τα δυο τριτερπενικά οξέα. Η μέθοδος είναι άμεση, καθώς δεν χρειάζεται κάποιο προκαταρτικό στάδιο παραγωγοποίησης και γρήγορη, αφού για τη λήψη του

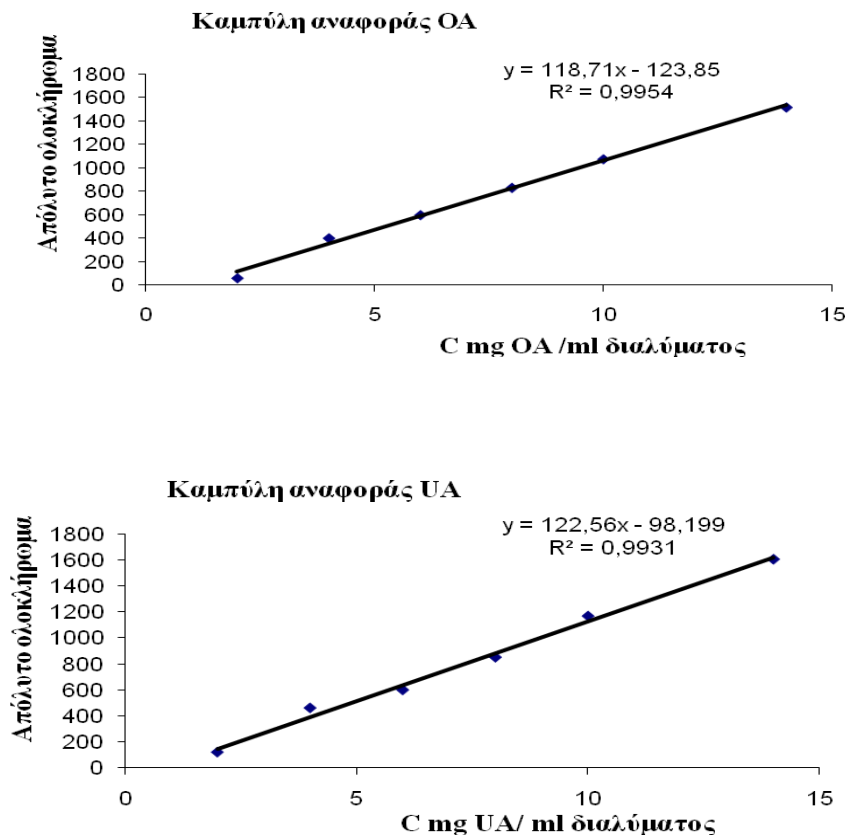
φάσματος NMR- ^1H τόσο των εκχυλισμάτων όσο και για των πρότυπων διαλυμάτων απαιτούνται ~7 min.

Σε κάποια εκχυλίσματα παρατηρήθηκε αλληλοεπικάλυψη των κορυφών στην περιοχή που απορροφούν τα πρωτόνια H_{18} του OA και UA στο φάσμα μιας διάστασης και έτσι δεν είναι δυνατό να εφαρμοστεί η συγκεκριμένη μεθοδολογία. Εναλλακτικά, μια καθιερωμένη τεχνική για τη μείωση της αλληλοεπικάλυψης των σημάτων συντονισμού είναι η φασματοσκοπία δυο διαστάσεων NMR και συγκεκριμένα εφαρμόστηκε η στρατηγική δυο διαστάσεων NMR ^1H - ^{13}C για τον ποσοτικό προσδιορισμό, σύμφωνα με τους *Lewis et al., 2007*. Καταγράφηκαν τα φάσματα HSQC ^1H - ^{13}C του OA και UA για διάφορες συγκεντρώσεις και τα ολοκληρώματα των εντάσεων των κορυφών, επιλεγμένων διασταυρούμενων κορυφών, εκφράστηκαν ως συνάρτηση της συγκέντρωσης. Τα ολοκληρώματα των εντάσεων των κορυφών υπολογίστηκαν ως η μέση τιμή των ολοκληρωμάτων των απόλυτων εντάσεων των διασταυρούμενων κορυφών του C_{18} με το H_{18} και του C_{12} με το H_{12} του OA και UA.

Οι αντίστοιχες διασταυρούμενες κορυφές που χρησιμοποιήθηκαν για τον ποσοτικό προσδιορισμό του BA είναι του C_{13} με το H_{13} και του C_{19} με το H_{19} . της B είναι των $\text{C}_{28a,b}$ με τα $\text{H}_{28a,b}$ και του C_{19} με το H_{19} . και των E και U είναι οι διασταυρούμενες κορυφές των $\text{C}_{28a,b}$ με τα $\text{H}_{28a,b}$ και των C_{12} με τα H_{12} . Στο Σχήμα 5.28 απεικονίζεται το φάσμα HSQC ^1H - ^{13}C του μίγματος των έξι τριτερπενοειδών και οι επιλεγμένες διασταυρούμενες κορυφές που χρησιμοποιήθηκαν για τον ποσοτικό προσδιορισμό τους. Παρατηρήθηκε γραμμική εξάρτηση για μια περιοχή συγκεντρώσεων 2-14 mg/ ml (4.4–30.7 mM) για το OA και UA. Στο Σχήμα 5.27 απεικονίζονται οι καμπύλες αναφοράς των OA και UA με τις εξισώσεις που τις περιγράφουν. Για τις ενώσεις B , E και U κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς τριών σημείων σε μια περιοχή συγκεντρώσεων 2-6 mg/ ml (4.5–13.6 mM) και για το BA 2-6 mg/ ml (4.4–13.1 mM). Τα ποσοτικά αποτελέσματα δίνονται στον Πίνακα 5.4 στο Κεφάλαιο 5.9, όπου γίνεται σύγκριση των αποτελεσμάτων με τις δυο τεχνικές. Ποσοτικά αποτελέσματα μπορούν να προκύψουν με τη λήψη φασμάτων HSQC ^1H - ^{13}C με χρόνο συλλογής δεδομένων 14 min. Το όριο ποσοτικού προσδιορισμού βρέθηκε να είναι 3 mM, το οποίο θα πρέπει να συγκριθεί με το αντίστοιχο όριο συγκέντρωσης 1 mM των *Lewis et al., 2007*.



Σχήμα 5.28: Φάσμα HSQC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ του μίγματος των έξι τριτερπενοειδών σε Pyridine-d_5 ($T=298\text{ K}$, $NS=2$, $t_{\text{exp}}=14\text{ min}$, 500 MHz).



Σχήμα 5.29: Καμπύλες αναφοράς του OA και UA

5.9 Σύγκριση των ποσοτικών αποτελεσμάτων με τις τεχνικές NMR και HPLC

Στον Πίνακα 5.4 δίνονται τα ποσοτικά αποτελέσματα της παρουσίας των τριτερπενοειδών σε όλα τα εκχυλίσματα με τη χρήση των τεχνικών NMR HSQC ^1H - ^{13}C και HPLC. Όπως προαναφέρθηκε, αρχικά, έγινε μια προσπάθεια χρήσης της μονοδιάστατης φασματοσκοπίας NMR για τον ποσοτικό προσδιορισμό των OA και UA στα εκχυλίσματα οξικού αιθυλεστέρα, όμως λόγω αλληλοεπικάλυψης των κορυφών στην περιοχή ολοκλήρωσης χρησιμοποιήθηκε η φασματοσκοπία HSQC ^1H - ^{13}C . Οι συγκεντρώσεις των OA και UA στο εκχύλισμα Φ.Ε.ΟΑ όπως προσδιορίστηκαν με μετρήσεις 1D NMR (338.0 & 35.3 mg/ g εκχ., αντίστοιχα) είναι σε καλή συμφωνία με τα αντίστοιχα επίπεδα συγκέντρωσης που βρέθηκαν με τη HPLC (366.2 και 39.0 mg/ g εκχ.). Συγκρίνοντας τα ανάλογα αποτελέσματα των μετρήσεων 2D NMR (362.8 & 37.7 mg/ g εκχ., αντίστοιχα), παρατηρούμε ακόμα καλύτερη συμφωνία με εκείνα της HPLC. Το ίδιο παρατηρείται και στην περίπτωση του εκχ. Φασκ.ΟΑ, όπου το περιεχόμενο του OA προσδιορίστηκε με μετρήσεις 2D NMR να είναι 171.9 mg/ g εκχ., με τη HPLC 178.8 mg/ g εκχ. και με μετρήσεις 1D NMR 151.7 mg/ g εκχ., ενώ το περιεχόμενο του UA ήταν 358.8, 349.7 και 312.8 mg/ g εκχ., αντίστοιχα.

Στα εκχυλίσματα Θυμ.ΟΑ και Μαντζ.ΟΑ, η χημική μετατόπιση στα 3.3 ppm δεν μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για ολοκλήρωση, λόγω έντονης αλληλοεπικάλυψης των κορυφών. Για αυτά τα εκχυλίσματα ο προσδιορισμός των επιπέδων συγκέντρωσης βασίστηκε μόνο στα αποτελέσματα του φάσματος HSQC ^1H - ^{13}C . Το περιεχόμενο του OA στο εκχύλισμα Θυμ.ΟΑ βρέθηκε 48.9 mg/ g εκχ. και στο Μαντζ.ΟΑ, 37.0 mg/ g εκχ. τα οποία είναι σε καλή συμφωνία με εκείνα της HPLC (Πίνακας 5.4). Στα εξανικά εκχυλίσματα όπως και στα εκχυλίσματα του δεντρολίβανου, λόγω έντονης αλληλοεπικάλυψης χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό μόνο η φασματοσκοπία 2D NMR. Αποκλίσεις στα αποτελέσματα της HPLC και τους HSQC ^1H - ^{13}C , παρατηρούνται στην περίπτωση του εκχυλίσματος Δεντ.Ε για τις συγκεντρώσεις του OA και UA. Όμως όπως προκύπτει και από το χρωματογράφημα, από τη μορφή των αντίστοιχων κορυφών (Σχήμα 5.27), τα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας NMR είναι περισσότερο αξιόπιστα σε σύγκριση με της HPLC. Για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων των δυο μεθόδων πραγματοποιήθηκε στατιστικό «test» σημαντικότητας (t_{test}).

Τα εκχυλίσματα ήταν σχετικά πλούσια σε τερπενοειδή, ώστε 20 mg/ 0.5 ml Pyg-*d*₅ στερεού εκχυλίσματος ήταν αρκετή ποσότητα ώστε να προκύψουν σήματα NMR που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για ποσοτικό προσδιορισμό μέσα σε 14 min. Η καταγραφή φασμάτων με συνολικό χρόνο συλλογής δεδομένων 28 min, έδωσε τα ίδια αποτελέσματα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτά η μεθοδολογία 2D HSQC ¹H- ¹³C είναι άμεση και γρήγορη. Ο πειραματικός χρόνος για τη λήψη ενός φάσματος NMR ¹H είτε των προτύπων διαλυμάτων είτε των εκχυλισμάτων είναι ~7 min. Για τη λήψη ενός φάσματος HSQC ¹H- ¹³C τόσο για τα πρότυπα όσο και για τα εκχυλίσματα απαιτούνται 14 min. Οι πειραματικοί αυτοί χρόνοι θα πρέπει να συγκριθούν με το χρονικό διάστημα ~1 h που απαιτείται για την ανάλυση με την HPLC των εκχυλισμάτων και ~40 – 55 min για τις πρότυπες ενώσεις.

Συμπεράσματα

Με τη χρήση ενός συνδυασμού πειραμάτων μονοδιάστατης και δισδιάστατης φασματοσκοπίας NMR σε ένα ακατέργαστο (crude) εκχύλισμα, χωρίς τον προηγούμενο χρωματογραφικό διαχωρισμό των επιμέρους συστατικών του, είναι δυνατόν να ταυτοποιηθούν τα κύρια συστατικά του εκχυλίσματος. Συγκεκριμένα, σε εκχυλίσματα οξικού αιθυλεστέρα δεντρολίβανου, φασκόμηλου, θυμαριού και μαντζουράνας με δευτεριωμένο ακετονιτρίλιο ταυτοποιήθηκε από την τάξη των φαινολικών οξέων το ροσμαρινικό οξύ και από την τάξη των φλαβονοειδών διάφορες φλαβόνες (π.χ. απιγενίνη, τζενκουανίνη), φλαβανόνες (π.χ. εριοδικτυόλη, ναρινγενίνη, εσπερετίνη) κ.α. Στα εκχυλίσματα οξικού αιθυλεστέρα και στα εξανικά δεντρολίβανου και φασκόμηλου ταυτοποιήθηκαν από την τάξη των διτερπενίων το καρνοσικό οξύ και η καρνοσόλη. Ενώ στα αντίστοιχα εκχυλίσματα θυμαριού, κύριο συστατικό ήταν η απλή φαινόλη καρβακρόλη.

Για την επιβεβαίωση των παραπάνω αποτελεσμάτων, αλλά και προκειμένου να διαπιστωθεί η πολυπλοκότητα ή μη της σύστασης των παραπάνω εκχυλισμάτων, έγινε ανάλυσή τους με LC-MS. Εκτός από τις παραπάνω τάξεις ενώσεων ανιχνεύθηκαν και τα τριτερπενικά οξέα ολεανολικό (OA), ουρσολικό (UA) και μπετουλινικό (BA) στα εκχυλίσματα. Επειδή οι υπάρχουσες μέθοδοι ταυτοποίησης και ποσοτικού προσδιορισμού των τριτερπενικών οξέων εμφάνισαν αρκετά κενά, δόθηκε έμφαση στην ανάπτυξη αναλυτικής μεθόδου ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού τους με τη φασματοσκοπία NMR. Αποδείχθηκε ότι ο συνδυασμός των φασμάτων HSQC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ και HMBC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μια εναλλακτική και πρωτότυπη αναλυτική τεχνική για τον ποιοτικό προσδιορισμό του OA και UA. Επίσης εφαρμόστηκε μια μεθοδολογία που στηρίζεται στη φασματοσκοπία 2D NMR HSQC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ (Lewis *et al.*, 2007) για τον ποσοτικό προσδιορισμό τους, που χρησιμοποιείται για πρώτη φορά σε φυτικά εκχυλίσματα και είναι άμεση και γρήγορη (για τη λήψη ενός φάσματος HSQC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ τόσο για τα πρότυπα όσο και για τα εκχυλίσματα απαιτούνται 14 min).

Για σύγκριση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε ανάλυση των εκχυλισμάτων με HPLC με προσθήκη κυκλοδεξτρίνων στην κινητή φάση. Τα οξέα OA και UA ταυτοποιήθηκαν σε όλα τα εκχυλίσματα εξανικά και οξικού αιθυλεστέρα

(δεντρολίβανου, φασκόμηλου, θυμαριού μαντζουράνας και φύλλων ελιάς). Η παραπάνω μεθοδολογία επεκτάθηκε και στην ταυτοποίηση τριτερπενικών αλκοολών. Αναλυτικά στο εξανικό εκχύλισμα δεντρολίβανου ταυτοποιήθηκε η μεπετουλίνη και το μεπετουλινικό οξύ, στο εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα μόνο το μεπετουλινικό οξύ, ενώ στο εξανικό εκχύλισμα φύλλων ελιάς ταυτοποιήθηκε η ερυθροδιόλη και ουβαόλη. Παράλληλα χρησιμοποιήθηκε η παραπάνω μεθοδολογία 2D NMR HSQC ^1H - ^{13}C για τον ποσοτικό προσδιορισμό τους. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να τονιστεί ότι οι παραπάνω αλκοόλες δεν ανιχνεύθηκαν με τη χρωματογραφία LC-MS, στις συγκεκριμένες συνθήκες ανάλυσης και δεν έχει αναφερθεί ξανά στη βιβλιογραφία η ανάλυσή τους με HPLC με προσθήκη κυκλοδεξτρινών στην κινητή φάση. Τα ποσοτικά αποτελέσματα των δύο μεθόδων είναι σε καλή συμφωνία. Ως κύριο μειονέκτημα της παραπάνω 2D NMR μεθοδολογίας, θα πρέπει να αναφερθεί η χαμηλή σχετικά ευαισθησία της, καθώς το όριο ποσοτικού προσδιορισμού της προσδιορίστηκε ~ 3 mM.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abe, F.; Yamauchi, T.; Nagao, T.; Kinjo, J.; Okare, H.; Higo, H.; Akahane, H. Ursolic acid as a trypanocidal constituent in rosemary. *Biol. Pharm. Bull.* **2002**, *25*, 1485.
- Al-Bandak, G.; Oreopoulou, V. Antioxidant properties and composition of *Majorana syriaca* extracts. *Eur. J. Lipid Sci. Tecnnol.* **2007**, *109*, 247.
- Ali, H.; Houghton, P.J.; Soumyanath, A. α -Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. *J. Ethnopharmacol.* **2006**, *107*, 449.
- Almela, L.; Sanchez-Munoz, B.; Fernandez-Lopez, J.A.; Roca, M.J.; Rabe, V. Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. *J. Chrom. A*, **2006**, *1120*, 221.
- Altinier, G.; Sosa, S.; Aquino, R.P; Mencherini, T.; Della Loggia, R.; Tubaro, A. Characterization of tropical anti-inflammatory compounds in *Rosmarinus officinalis* L. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 1718.
- Andersen, Q. M.; Markham, K.R. Flavonoids, Chemistry, Biochemistry and Applications. CRC Press Taylor & Francis Group: London, **2006**.
- Arce, L.; Tena, M.T.; Rios, A.; Valcarcel, M. Determination of *trans*-resveratrol and other polyphenols in wines by a continuous flow sample clean-up system followed by capillary electrophoresis separation. *Anal. Chim. Acta*, **1998**, *359*, 27.
- Areias, F.; Valentao, P.; Andrade, P.B., Ferreres, F.; Seabra, R.M. Flavonoids and phenolic acids of sage: Influence of some agricultural factors. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 6081.
- Bax, A.; Summers, M. F. ^1H and ^{13}C assignments from sensitive-enhanced detection heteronuclear multiple-bond connectivity by 2D multiple quantum NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 2094.
- van Beek, T.A.; van Veldhuizen, A.; Lelyverd, G.P.; Piron, I. Quantitation of bilobalide and ginkgolides A, B, C and J by means of nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Phytochem. Anal.* **1993**, *4*, 261.
- van Beek, T.A.; Tetala, K.K.R.; Koleva, I.I.; Dapkevicius, A.; Exarchou, V.; Jeurissen, S.M.F.; Claassen, F.W.; van der Klift E.J.C. Recent developments in the rapid analysis of plants and tracking their bioactive constituents. *Phytochem. Rev.* **2009**,

Berangere, C.; Caussarieu, N.; Morin, P.; Morin-Allory, L.; Lafosse, M. Rapid analysis of triterpenic acids by liquid chromatography using porous graphitic carbon and evaporative light scattering detection. *J. Sep. Sci.* **2004**, *27*, 964.

Berregi, I.; del Campo, G.; Caracena, R.; Miranda, J.I. Quantitative determination of formic acid in apple juices by ^1H NMR spectroscopy. *Talanta*, **2007**, *72*, 1049.

Bilia, A.R.; Bergonzi, M.C.; Mazzi, G.; Vincieri, F.F. Analyses of plant complex matrices by use of nuclear magnetic resonance spectroscopy: St John's wort extract. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 2115.

Borges, C.; Martinho, P.; Martins, A.; Rauter, A.P.; Almoester Ferreira, M.A. Structural characterization of flavonoids and flavonoid-O-glucosides extracted from *Genista tenera* by fast-atom bombardment tandem mass spectrometry. *Rap. Comm. Mass Spec.* **2001**, *15*, 1760.

Brescia, M.A.; Caldarola, V.; De Giglio, A.; Benedetti, D.; Fanizzi, F.P.; Sacco, A. Characterization of geographical origin of Italian red wines based on traditional and nuclear magnetic resonance spectrometric determinations. *Anal. Chim. Acta*, **2002**, *458*, 177.

van den Broucke, C.; Dommissie, R.A.; Esmans, E.L.; Lemli, J.A. Three methylated flavones from *Thymus vulgaris*. *Phytochemistry*, **1982**, *21*, 2581.

Burns, D.C.; Ellis, D.A.; March, R.E. A predictive tool for assessing ^{13}C NMR chemical shifts of flavonoids. *Magn. Reson. Chem.* **2007**, *45*, 835.

Calgon, T.; Hoke, D.; Drager, B. Identification and quantification of betulinic acid. *Phytochem. Anal.* **1999**, *10*, 187.

Caligiannini, A.; Acquotti, D.; Palla, G.; Bocchi, V. Identification and quantification of the main organic components of vinegars by high resolution ^1H NMR spectroscopy. *Anal. Chim. Acta*, **2007**, *585*, 110.

del Campo, G.; Berregi, I.; Caracena, R.; Santos, J.I. Quantitative analysis of malic and citric acids in fruit juices using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Anal. Chim. Acta*, **2006**, *556*, 462.

Vande Castele, K.; Geiger, H.; Van sumere, F.C. Separation of flavonoids by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **1982**, *201*, 81.

Catchpole, O.J.; Grey, J.B.; Perry, N.B.; Burgess, E.J.; Redmond, W.A.; Porter, N.G. Extraction of chilli, black pepper and ginger with near-critical CO_2 , propane, and

dimethyl ether: Analysis of the extracts by quantitative nuclear magnetic resonance. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 4853.

Charlton, A.J.; Farrington, W.H.H.; Brereton, P. Application of ^1H NMR and multivariate statistics for screening complex mixtures: quality control and authenticity of instant coffee. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 3098.

Chen, J. H.; Xia, Z. H.; Tan, R. X. High-performance liquid chromatographic analysis of bioactive triterpenes in *Perilla frutescens*. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2003**, *32*, 1175.

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.

Choi, Y.H.; Kim, H.K.; Hazekamp, A.; Erkelens, A.; Lefeber, A.W.M.; Verpoorte, R. Metabolomic differentiation of *Cannabis sativa* cultivars using ^1H NMR spectroscopy and principal component analysis. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 953.

Christophoridou, S.; Dais, P. Novel approach to the detection and quantification of phenolic compounds in olive oil based on ^{31}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 ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Anal. Chim. Acta*, **2009**, *633*, 283.

Claude, B.; Morin, P.; Lafosse, M.; Andre, P. Evaluation of apparent formation constants of pentacyclic triterpene acids complexes with derivatized β - and γ -cyclodextrins by reversed phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **2004**, *1049*, 37.

Colquhoun, I.J. Use of NMR for metabolic profiling in plant systems. *J. Pestic. Sci.* **2007**, *32*, 200.

Consonni, R.; Gatti, A. ^1H NMR studies on Italian balsamic and traditional balsamic vinegars. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 3446.

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

Cunha, S.S.; Fernandez, J.O.; Oliviera, B.P.P. Quantification of free and esterified sterols in Portuguese olive oils by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **2006**, *1128*, 200.

Cuvelier, M-E.; Berset, C.; Richard, H. Antioxidant constituents in sage (*Salvia officinalis*). *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 665.

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.

Dapkevicius, A.; van Beek, T.A., Lelyveld, G.P.; van Veldhuizen, A.; de Groot A.; Linssen, J.P.H.; Venskutonis, R. Isolation and structure elucidation of radical scavengers from *Thymus vulgaris* Leaves. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 892.

Doddrell, D. M.; Khong, P. W.; Lewis, K. G. Stereochemical dependence of ^{13}C chemical shifts in olean-12-enes and urs-12-enes as an aid to structural assignment. *Tetrahedron Lett.* **1974**, *15*, 2381.

Dorman, H.J.D.; Bachmayer, O.; Kosar, M.; Hultimen, R. Antioxidant properties of aqueous extracts from selected Lamiaceae species grown in Turkey. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 762.

Duarte, I.; Barros, A.; Belton, P.S.; Richelato, R.; Spraul, M.; Humpfer, E.; Gil, A.M. High-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy and multivariate analysis for the characterization of beer. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 2475.

Erkan, N.; Ayranci, G.; Ayranci, E. Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chem.* **2008**, *110*, 76.

Evilia, R.F. Quantitative NMR spectroscopy. *Anal. Lett.* **2001**, *34*, 2227.

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 ^1H , ^1H - ^{13}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.

Exarchou, V.; Gerothanassis, I.P.; Vervoort, J.; van Beek, T. Antioxidant plant phenols. Sources, structure-activity relationship, current trends in analysis and characterization. Research Singpost: Kerala, India, **2006**.

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.

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.

Forveille, L.; Vercauteren, J.; Rutledge, D.N. Multivariate statistical analysis of two-dimensional NMR data to differentiate grapevine cultivars and clones. *Food Chem.* **1996**, 53, 441.

Frydman, L.; Lupulescu, A.; Scherf, T. Principles and features of single-scan two dimensional NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 9204.

le Gall, G.; Colquhoun, I.J.; Defernez, M. Metabolite profiling using ¹H NMR spectroscopy for quality assessment of green tea, *Camellia sinensis* (L.). *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 692.

Gbaguidi, F.; Accrombessi, G.; Moudachirou, M.; Quetin-Leclercq, J. HPLC quantification of two isomeric triterpenic acids isolated from *Mitracarpus scaber* and antimicrobial activity on *Dermatophylus congolensis*. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, 39, 990.

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.

Giraudeau, P.; Remaud, G.S.; Akoka, S. Evaluation of ultrafast 2D NMR for quantitative analysis. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 479.

Goulas, V.; Exarchou, V.; Troganis, A.N.; Psomaidou, 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

Guinda, A.; Albi, T.; Perez-Camino, M.C.; Lanzon, A. Supplementation of oils with oleanolic acid from the olive leaf (*olea europaea*). *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2004**, *106*, 22.

Hansen, S.H.; Jensen, A.G.; Cornett, C.; Bjornsdottir, I.; Taylor, S.; Wright, B.; Wilson, I.D. High-performance liquid chromatography on-line coupled to high-field NMR and mass spectrometry for structure elucidation of constituents of *Hypericum perforatum* L. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 5235.

Harborne, J.B.; Baxter, H. The handbook of natural flavonoids. Wiley: New York, **1999**.

Hazecamp, A.; Choi, Y.H.; Verpoorte, R. Quantitative analysis of cannabinoids from *Cannabis sativa* using ¹H-NMR. *Chem. Pharm. Bull.* **2004**, *52*, 718.

Heikkinen, S.; Toikka, M.M.; Karhunen, P.T.; Kilpelainen, I.A. Quantitative 2D HSQC (Q-HSQC) via suppression of *J*-dependence of polarization transfer in NMR spectroscopy: Application to wood lignin. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4362.

Herrero, M.; Arraez-Roman, D.; Segura, A.; Kenndler, E.; Gius, B.; Raggi, M.A.; Ibanez, E.; Cifuentes, A. Pressurized liquid extraction-capillary electrophoresis-mass spectrometry for the analysis of polar antioxidants in rosemary extracts. *J. Chrom. A*, **2005**, *1084*, 54.

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.

Hollman, P.C.H.; Katan, M.B. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomed. Pharmacother.* **1997**, *51*, 305.

Holzgrabe, U.; Deubner, R.; Schollmayer, C.; Waibel, B. Quantitative NMR spectroscopy- applications in drug analysis. *J. Pharm Biomed. Anal.* **2005**, *38*, 806.

- Horie, T.; Ohtsuru, Y.; Shibata, K.; Yamashita, K.; Tsukayama, M.; Kawamura, Y. ¹³C NMR spectral assignment of the A-ring of polyoxygenated flavones. *Phytochemistry*, **1998**, *47*, 865.
- Houlihan, C.M.; Ho, C.-T.; Chang, S.S. Elucidation of the chemical structure of a novel antioxidant, rosmaridiphenol, isolated from rosemary. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1984**, *61*, 1036.
- Hung, C.-Y.; Yen, G.-C. Extraction and identification of antioxidative components of Hsian-tsoa (*Mesona procumbens* Hemsl.). *Lebensm.-Wiss. u. -Technol.* **2001**, *34*, 306.
- Ibanez, E.; Kubatova, A.; Senorans, J.F.; Cavero, S.; Reglero, G.; Hawthorne, S.B. Supercritical water extraction of antioxidant compounds from rosemary plants. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 375.
- Ιγνατιάδου-Ραγκούση, Β. Χημεία Φυσικών Προϊόντων, Αθήνα, **1996**.
- Inatani, R.; Nakatani, N.; Fuwa, H.; Seto, H. Structure of a new antioxidative phenolic diterpene isolated from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Agric. Biol. Chem.* **1982**, *46*, 1661.
- Janicsak, G.; Veres, K.; Kallai, M.; Mathe, I. Gas chromatographic method for routine determination of oleanolic and ursolic acids in medicinal plants. *Chromatographia*, **2003**, *58*, 392.
- Janicsak, G.; Veres, K.; Kakasy, A.Z.; Mathe, I. Study of the oleanolic and ursolic acid contents of some species of the Lamiaceae. *Biochem. Syst. Ecol.* **2006**, *34*, 392.
- Kashiwada, Y.; Wang, H.-K.; Nagao, T.; Kitanaka, S.; Yasuda, I.; Fujioka, T.; Yamagishi, T.; Cosentino, L.M.; Kozuka, M.; Okabe, H.; Ikeshiro, Y.; Hu, C.-Q.; Yeh, E.; Lee, K.-H. Anti-AIDS agents 30. Anti-HIV activity of oleanolic acid, pomolic acid and structurally related triterpenoids. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 1090.
- Κοντογιάννη Β. Μεταπτυχιακή διατριβή: «Μελέτη της σύστασης και της αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλισμάτων φύλλων ελαιοδένδρου.» Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, **2005**.
- 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.
- Koskela, H.; Kilpelainen, I.; Heikkinen, S. Some aspects of quantitative 2D NMR. *J. Magn. Reson.* **2005**, *174*, 237.

- Kulomaa, A.; Siren, H.; Riekkola, M.-L. Identification of antioxidant compounds in plant beverages by capillary electrophoresis with the marker index technique. *J. Chromatogr. A*, **1997**, 781, 523.
- Κυριτσάκης, Α. Ελαιόλαδο: Συμβατικό και βιολογικό, βρώσιμη ελιά-πάστα ελιάς. Λ. Ακριτίδη Ο.Ε., Θεσσαλονίκη, **2007**.
- Lewis, I.A.; Schommer, S.C.; Hodis, B.; Robb, K.A.; Tonelli, M.; Westler, W.M.; Sussman, M.R.; Markley, J.L. Method for determining molar concentrations of metabolites in complex solutions from two-dimensional ^1H - ^{13}C NMR J.L. *Anal. Chem.* **2007**, 79, 9385.
- Lianda, R.L.P.; Castro R.N. Isolation and identification of morin in Brazilian honey from *Apis mellifera*. *Quim. Nova*, **2008**, 31, 1472.
- 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.
- 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.
- Liu, H. Oleanolic and ursolic acid : Research perspectives. *J. Ethnoph.* **2005**, 100, 92.
- Lu, Y.; Foo, Y. Flavonoid and phenolic glycosides from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry*, **2000**, 55, 263.
- Lu, Y.; Foo, Y. Polyphenolics of *Salvia*- a review. *Phytochemistry*, **2002**, 59, 117.
- Malz, F.; and Jancke, H. Validation of quantitative NMR. *J. Pharm Biomed. Anal.* **2005**, 38, 813.
- Marston, A. Role of advances in chromatographic techniques in phytochemistry. *Phytochemistry*, **2007**, 68, 2785.
- Martinez-Vidal, J.L.; Garrido-Frenich, A.; Escobar-Garcia, M.A.; Romero-Gonzalez, R. LC-MS determination of sterols in olive oil. *Chromatographia*, **2007**, 65, 695.
- Mello, C.; Crotti, A.E.M.; Vessecchi, R.; Cunha, W.R. 2D Raman spectroscopy as an alternative technique for distinguishing oleanoic acid and ursolic acid. *J. Mol. Struct.* **2006**, 799, 141.
- 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.
- Miura, R.; Nakatami, N. Antioxidant activity of flavonoids from thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Agric. Biol. Chem.* **1989**, 53, 3043.

Montilla, M.P.; Agil, A.; Navarro, M.C.; Jimenez, M.I.; Garcia-Granados, A.; Parra, A.; Cabo, M.M. Antioxidant activity of maslinic acid, a triterpene derivative obtained from *Olea europaea*. *Planta Medica*. **2003**, *69*, 472.

Nakatani, N.; Inatani, R. A new diterpene lactone, rosmadial, from rosemary *Agric. (Rosmarinus officinalis L.)*. *Biol. Chem.* **1983**, *47*, 353.

Nakatani, N.; Inatani, R. Two antioxidative diterpenes from rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*) and a revised structure for rosmanol. *Agric. Biol. Chem.* **1984**, *48*, 2081.

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

Nord, L.I.; Kennel, L.; Jacobsson, S.P. Multivariate analysis of ¹H NMR spectra for saponins from *Quillaja saponaria Molina*. *Anal. Chim. Acta*, **2001**, *446*, 199.

Okamura, N.; Fujimoto, Y.; Kuwabara, S.; Yagi, A. High-performance liquid chromatographic determination of carnosic acid and carnosol in *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*. *J. Chrom. A*, **1994**, *679*, 381.

de Oliviera, B.H.; Santos, C.A.M.; Espindola, A.P.D.M. Determination of the triterpenoid betulinic acid, in *Doliocarpus schottianus* by HPLC. *Phytochem. Anal.* **2002**, *13*, 95.

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.

Ovesna, Z.; Kozics, K.; Slamenova, D. Protective effects of ursolic acid and oleanolic acid in leukemic cells. *Mutation Res.* **2006**, *600*, 131.

Pauli, G.F.; Jaki, B.U.; Lankin, D.C. Quantitative ¹H NMR : Development and potential of a method for natural products analysis. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 133.

Perona, J.S.; Arcemis, C.; Ruiz-Gutierrez, V.; Catala, A. Effect of dietary high oleic-acid oils that are rich in antioxidants on microsomal lipid peroxidation in rats. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 730.

Pietta, P.G. Flavonoids as antioxidants. *J. nat. Prod.* **2000**, *63*, 1035.

Pizzale, L.; Bortolomeazzi, R.; Vichi, S.; Uberegger, E.; Conte, L.S. Antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* and *S fruticosa*) and oregano (*Origanum onites* and *O indercedens*) extracts related to their phenolic compound content. *J. Sci. Food Agric.* **2002**, *82*, 1645.

Qi, S.; Ding, L.; Tian, K.; Chen, X.; Hu, Z. Novel and simple nonaqueous capillary electrophoresis separation and determination bioactive triterpenes in Chinese herbs. *J. Pharm Biomed. Anal.* **2006**, *40*, 35.

Rahman, A.; Chouldhary, M.I. In solving problems with NMR spectroscopy. Academic Press: California, **1996**.

Raphael, T.J.; Kuttam, G. Effect of naturally occurring triterpenoids glycyrrhizic acid, ursolic acid, oleanolic acid and nomilin on the immyne system. *Phytomedicine*, **2003**, *10*, 483.

Razborsek, M.I.; Voncina, D.B.; Dolecek, V.; Voncina, E. Determination of major phenolic diterpenes and triterpenes in rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) by gas chromatography and mass spectrometry. *Acta Chim. Slov.* **2007**, *54*, 60.

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

Richheimer, S.L.; Bernart, M.W.; King, G.A.; Kent, M.C.; Bailey, D.T. Antioxidant activity of lipid-soluble phenolic diterpenes from rosemary. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1994**, *73*, 507.

Rivero-Gruz, B.; Rivero-Gruz, I.; Rodriguez, J.M.; Cerda-Garcia-Rojas, C.M.; Mata, R. Qualitative and quantitative analysis of the active components of the essential oil from *Brickellia veronicaefolia* by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 1172.

Rodriguez, J.A.; Astudillo, L.; Schmeda-Hirschmann, G. Oleanolic acid promotes healing of chronic gastric lesions acetic acid-induced in rats. *Pharm. Res.* **2003**, *48*, 291.

Roitman, N.J.; James, F.L. Chemistry of toxic range plants. Highly oxygenated flavonol methyl ethers from *Gutierrezia microcephala*. *Phytochemistry*, **1985**, *24*, 835.

Ryan, D.; Antolovich, M.; Herlt, T.; Prenzler, D.P.; Lavee, S.; Robards, K. Identification of phenolic compounds in tissues of the novel olive cultivar Hardy' s Mammoth. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 6716.

Sakakibura, Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits and teas. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 571.

Sanchez Avila, N.; Priego Capote, F.; Luque de Castro, M.D. Ultrasound-assisted extraction and silylation prior to gas chromatography-mass spectrometry for the

characterization of the triterpenic fraction in olive leaves. *J. Chrom. A*, **2007**, *1165*, 158.

Schwarz, K.; Ternes, W.; Schmauderer, E. Antioxidative constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*. III Stability of phenolic diterpenes of rosemary extracts under thermal stress as required for technological processes. *Z Lebensm Unnters Forsch.* **1992**, *195*, 104.

Schwarz, K.; Ternes, W. Antioxidative constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*. I Determination of phenolic diterpenes with antioxidative activity amongst tocochromanols using HPLC. *Z Lebensm Unnters Forsch.* **1992**, *195*, 99.

Schwarz, K.; Ernst, H. Evaluation of antioxidative constituents from thyme. *J. Sci. Food Agric.* **1996**, *70*, 217.

Seebacher, W.; Simic, N.; Weis, R.; Saf, R.; Kunert, O. Complete assignments of ^1H and ^{13}C resonances of oleanolic acid, 18 alpha-oleanolic acid, ursolic acid and their 11-oxo derivatives. *Magn. Reson. Chem.* **2003**, *41*, 636.

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

Shan, B.; Cai, Y.Z.; Sun, M.; Corke, H. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 7749.

Shin, Y.G.; Cho, K.H.; Chung, S.M.; Graham, J.; Gupta, T.K.D.; Pezzuto, J.M. Determination of betulinic acid in mouse blood, tumour and tissue homogenates by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, **1999**, *732*, 331.

Shin, Y.-S.; Bang, K.-H.; In, D.-S.; Kim, O.-T.; Hyun, D.-Y.; Ahm, I.-O.; Ku, B.S.; Kim, S.-W.; Seong, N.-S.; Cha, S.-W.; Lee, D.; Choi, H.-K. Fingerprinting analysis of fresh ginseng roots of different ages using ^1H - NMR spectroscopy and principal component analysis. *Arch. Pharm. Res.* **2007**, *30*, 1625.

Skoula, M.; Grayer, R.J.; Kite, G.C.; Veitch, N.C. Exudate flavones and flavanones in *Origanum* species and their interspecific variation. *Biochem. System. & Eco.* **2008**, *36*, 646.

Sobolev, A.P.; Segre, A.; Lamanna, R. Proton high-field NMR study of tomato juice. *Magn. Reson. Chem.* **2003**, *41*, 237.

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.

Somova, I.L.; Shode, O.F.; Ramnanan, P.; Nadar, A. Antihypertensive, antiatherosclerotic, and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *Olea europaea*, subspecies *africana* leaves. *J. Ethnopharmacol.* **2003**, *84*, 299.

Somova, I.L.; Shode, O.F.; Mipando, M. Cardiogenic and antidysrhythmic effects of oleanolic and ursolic acids, methyl maslinate and uvaol. *Phytomedicine*, **2004**, *11*, 121.

Sosa, S.; Altinier, G.; Politi, M.; Braca, A.; Morelli, I.; Della Loggia, R. Extracts and constituents of *Lavandula multifida* with topical anti-inflammatory activity. *Phytomedicine*, **2005**, *12*, 271.

Stalikas, C.D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J. Sep. Sci.* **2007**, *30*, 3268.

Stevens, J.F.; Wollenweber, E.; Ivancic, M.; Hsu, V.L.; Sundberg, S.; Deinzer, M.L. Leaf surface flavonoids of *Chrysothamnus*. *Phytochemistry*, **1999**, *51*, 771.

Takeoka, G.; Dao.; Teranishi, R.; Wong, R.; Flessa, I.; Harden, L.; Edwards, R. Identification of three triterpenoids in almond hulls. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 3437.

Tarachiwin, L.; Ute, K.; Kobayashi, A.; Fukusaki, E. ¹H NMR based metabolic profiling in the evaluation of Japanese green tea quality. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 9330.

Tatsis, E.C.; Exarchou, V.; Troganis, A.; Gerothanassis, I.P. ¹H NMR determination of hypericin and pseudohypericin in complex natural mixtures by the use of strongly deshielded OH groups. *Anal. Chim. Acta*, **2007**, *607*, 219.

Tavares, M.C.H.; Yariwake Vilegas, J.H.; Lancas, F.M. Separation of underivatized triterpene acids by capillary supercritical fluid chromatography. *Phytochem. Anal.* **2001**, *12*, 134.

Thorsen, M.A.; Hildebrandt, K.S. Quantitative determination of phenolic diterpenes in rosemary extracts. Aspects of accurate quantification. *J. Chrom. A*, **2003**, *995*, 119.

Triantaphyllou, K.; Blekas, G.; Boskou, D. Antioxidative properties of water extracts obtained from herbs of the species Lamiaceae. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2001**, *52*, 313.

Tsao, R.; Deng, Z. Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. *J. Chromatogr. B*, **2004**, *812*, 85.

Τσιούτσας Χ. Μεταπτυχιακή διατριβή: «Προσδιορισμός ελαιοευρωπαϊνης σε εκχυλίσματα φύλλων ελιάς με τη χρήση της φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)» Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, **2005**.

Vagi, E.; Rapavi, E.; Hadolin, M.; Peredi, K.V.; Balazs, A.; Blazovics, A.; Shimandi, B. Phenolic and triterpenoid antioxidants from *Origanum majorana* L. herb and extracts obtained with different solvents. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 17.

Valverde, J.; This, H. ¹H NMR quantitative determination of photosynthetic pigments from green beans (*Phaseolus vulgaris*, L.). *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 314.

Vokou, D.; Katradi, K.; Kokkini, S. Ethnobotanical survey of Zagori (Epirus, Greece), a renowned centre of folk medicine in the past. *J. Ethnopharmacol.* **1993**, *39*, 187.

Vogels, J.TW.E.; Ternel, L.; Tas, A.C.; Van der Berg, F.; Dukel, F.; Van der Greef, J. Detection of adulteration in orange juices by a new screening method using proton NMR spectroscopy in combination with pattern recognition techniques. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 175.

Wang, M.; Li, J.; Ho, G.S.; Peng, X.; Ho, C.-T. Isolation and identification of antioxidative flavonoid glycosides from thyme (*Thymus vulgaris* L.). *J. Food Lipids*, **1998**, *5*, 313.

Watson, D.G.; Peyfoon, E.; Zheng, L.; Lu, D.; Seidel, V.; Johnston, B.; Parkinson, J.A.; Fearnley, J. Application of principal component analysis to ¹H-NMR data obtained from propolis samples of different geographical origin. *Phytochem. Anal.* **2006**, *17*, 323.

Wawer, I.; Zielinska, A. ¹³C CP/MAS NMR studies of flavonoids. *Magn. Reson. Chem.* **2001**, *39*, 374.

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.

Wollenweber, E.; Armbruster, S.; Roitman, J.N. A herbacetin methyl-ether from the Farinose exudate of a pentagramma-triangularis hidrid. *Phytochemistry*, **1994**, *37*, 455.

Wojciak-Kosior, M. Separation and determination of closely related triterpenic acids by high performance thin-layer chromatography after iodine derivatization. *J. Pharm Biomed. Anal.* **2007**, *45*, 337.

Xu, H.X.; Zeng, F.Q.; Wan, M.; Sim, K.Y. Anti-HIV triterpene acids from *Geum japonicum*. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 643.

Yanishlieva, N.V.; Marinova, E.; Pokorny, J. Natural antioxidants from herbs and spices. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2006**, *108*, 776.

- Yin, M.-C.; Chan, K.-C. Nonenzymatic antioxidative and antiglycative effects of oleanolic acid and ursolic acid. *J. Agric. Food Chem.* **2007**.
- Yu, M.M.L.; Schulze, H.G.; Jetter, R.; Blades, M.W.; Turner, R.F.B. Raman microspectroscopic analysis of triterpenoids found in plant cuticles. *Applied Spectr.* **2007**, *61*, 32.
- Zhang, G.; Qi, Y.; Lou, Z.; Liu, C.; Wu, X.; Chai, Y. Determination of oleanolic acid and ursolic acid in cornel by cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography. *Biomed. Chromatogr.* **2005**, *19*, 529.
- Zhao, G.; Yan, W.; Cao, D. Simultaneous determination of betulin and betulinic acid in white birch bark using RP-HPLC. *J. Pharm Biomed. Anal.* **2007**, *43*, 959.
- Zheng, W.; Wang, S.Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 5165.
- Zielinka, A.; Paradowska, K.; Jakowski, J.; Wawer, I. ¹³C CP MAS NMR and GIAO-DFT calculations of flavonoids: Morin, kaempferol, tricetin, genistein, formononetin and 3,7-dihydroxyflavone. *J. Mol. Struc.* **2008**, *873*, 109.
- Zhou, X.; Peng, J.Y.; Fan, G.R.; Wu, Y.T. Determination of oleanolic acid, ursolic acid and amygdalin in the flower of *Eriobotria japonica* Lindl. by HPLC. *J. Chromatogr. A*, **2005**, *1092*, 216.