

ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑΣ-ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ

ΚΑΡΑΚΟΥΣΗ ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΧΡΙΣΤΙΝΑ

ΠΤΥΧΙΟΥΧΟΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΧΗΜΙΚΟΥ

Φυτοχημική ανάλυση του φυτού *Indigofera hirsuta* (Leguminosae) και έλεγχοι  
αντιοξειδωτικής δράσης και αναστολής της ALR-1, ALR-2

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2017

ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑΣ-ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ

ΚΑΡΑΚΟΥΣΗ ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΧΡΙΣΤΙΝΑ

ΠΤΥΧΙΟΥΧΟΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΧΗΜΙΚΟΥ

Φυτοχημική ανάλυση του φυτού *Indigofera hirsuta* (Leguminosae) και έλεγχοι  
αντιοξειδωτικής δράσης και αναστολής της ALR-1, ALR-2

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας-Χημείας Φυσικών Προϊόντων, του  
Τομέα Φαρμακογνωσίας-Φαρμακολογίας, του Τμήματος Φαρμακευτικής, Αριστοτέλειο  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Καθηγητής Ευγένιος Κοκκάλου, Επιβλέπων Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής Α.Π.Θ

Καθηγήτρια Δήμητρα Χατζηπαύλου-Λίτινα, Τμήμα Φαρμακευτικής Α.Π.Θ, Μέλος Τριμ. Συμβ. Επιτρ.

Αναπλ. Καθηγήτρια Διαμάντω Λάζαρη, Τμήμα Φαρμακευτικής, Α.Π.Θ Μέλος Τριμ. Συμβ. Επιτρ.

Καθηγητής Βασίλειος Ρούσσης, Τμήμα Φαρμακευτικής ΕΚΠΑ, εξεταστής

Καθηγήτρια Όλγα Τζάκου, Τμήμα Φαρμακευτικής ΕΚΠΑ, εξετάστρια

Επικ. Καθηγήτρια Αναστασία Καριώτη, Τμήμα Φαρμακευτικής Α.Π.Θ, εξετάστρια

Επικ. Καθηγήτρια Ευσταθία Ιωάννου Τμήμα Φαρμακευτικής ΕΚΠΑ, εξετάστρια

ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑΣ-ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ

ΚΑΡΑΚΟΥΣΗ ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΧΡΙΣΤΙΝΑ

ΠΤΥΧΙΟΥΧΟΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΧΗΜΙΚΟΥ

Φυτοχημική ανάλυση του φυτού *Indigofera hirsuta* (Leguminosae) και έλεγχοι  
αντιοξειδωτικής δράσης και αναστολής της ALR-1, ALR-2

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας-Χημείας Φυσικών Προϊόντων, του  
Τομέα Φαρμακογνωσίας-Φαρμακολογίας, του Τμήματος Φαρμακευτικής, Αριστοτέλειο  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Καθηγητής Ευγένιος Κοκκάλου, Επιβλέπων Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής Α.Π.Θ

Καθηγήτρια Δήμητρα Χατζηπαύλου-Λίτινα, Τμήμα Φαρμακευτικής Α.Π.Θ, Μέλος Τριμ. Συμβ. Επιτρ.

Αναπλ. Καθηγήτρια, Διαμάντω Λάζαρη, Τμήμα Φαρμακευτικής, Α.Π.Θ, Μέλος Τριμ. Συμβ. Επιτρ.

Καθηγητής Βασίλειος Ρούσσης, Τμήμα Φαρμακευτικής ΕΚΠΑ, εξεταστής

Καθηγήτρια Όλγα Τζάκου, Τμήμα Φαρμακευτικής ΕΚΠΑ, εξετάστρια

Επικ. Καθηγήτρια Αναστασία Καριώτη, Τμήμα Φαρμακευτικής Α.Π.Θ, εξετάστρια

Επικ. Καθηγήτρια Ευσταθία Ιωάννου Τμήμα Φαρμακευτικής ΕΚΠΑ, εξετάστρια

Η επταμελής εξεταστική επιτροπή που διορίστηκε για την κρίση της διδακτορικής διατριβής της κα. Χριστίνας Βασιλικής Καρακούσης, πτυχιούχου Φαρμακευτικής και Χημικού, συνήλθε σε συνεδρίαση στο Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης την 4<sup>η</sup> Ιουλίου 2017, όπου παρακολούθησε την υποστήριξη της διατριβής της με τίτλο «Φυτοχημική ανάλυση του φυτού *Indigofera hirsuta* (Leguminosae) και έλεγχοι αντιοξειδωτικής δράσης και αναστολής των ALR-1 και ALR-2»

Τα μέλη της επταμελούς Επιτροπής έκριναν ομόφωνα ότι η διατριβή είναι πρωτότυπη και αποτελεί ουσιαστική συμβολή στην επιστήμη.

#### ΤΑ ΜΕΛΗ ΤΗΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Ευγένιος Κοκκάλου, Καθηγητής ΑΠΘ (Επιβλέπων)



Δήμητρα Χατζηπαύλου-Λίτινα, Καθηγήτρια ΑΠΘ (Συμβουλευτική Επιτροπή)



Διαμάντω Λάζαρη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΑΠΘ (Συμβουλευτική Επιτροπή)



Βασίλειος Ρούσσης, Καθηγητής ΕΚΠΑ (Εξεταστική Επιτροπή)



Ολγα Τζάκου, Καθηγήτρια ΕΚΠΑ (Εξεταστική Επιτροπή)



Αναστασία Καριώτη, Επίκουρη Καθηγήτρια ΑΠΘ (Εξεταστική Επιτροπή)



Ευσταθία Ιωάννου, Επίκουρη Καθηγήτρια ΕΚΠΑ (Εξεταστική Επιτροπή)





## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας-Χημείας Φυσικών Προϊόντων του Τομέα Φαρμακογνωσίας-Φαρμακολογίας, του Τμήματος Φαρμακευτικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.

Ευχαριστώ εγκάρδια τον Καθηγητή κο Ευγένιο Κοκκάλου, επιβλέποντα της παρούσας διδακτορικής διατριβής για την υπόδειξη του θέματος, την ουσιώδη και ανεκτίμητη συμβολή του και τη δυνατότητα ενασχόλησής μου με το αντικείμενο της Φαρμακογνωσίας.

Ευχαριστώ θερμά την Καθηγήτρια Δήμητρα Χατζηπαύλου-Λίτινα, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Διαμάντω Λάζαρη, στην Επίκουρη Καθηγήτρια Αναστασία Καριώτη του Τμήματος Φαρμακευτικής ΑΠΘ, μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για τις εποικοδομητικές παρατηρήσεις και συμβουλές κατά τη διάρκεια της επιμέλειας της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Ευχαριστώ ιδιαίτερως, τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής που απαρτίζεται από τους Καθηγητές κ.κ Ευγένιο Κοκκάλου, Δήμητρα Χατζηπαύλου-Λίτινα (Τμήματος Φαρμακευτικής ΑΠΘ), Βασίλειο Ρούσση, Όλγα Τζάκου (Τμήματος Φαρμακευτικής ΕΚΠΑ), την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Διαμάντω Λάζαρη (Τμήματος Φαρμακευτικής ΑΠΘ), την Επίκουρη Καθηγήτρια Αναστασία Καριώτη (Τμήματος Φαρμακευτικής ΑΠΘ), την Επίκουρη Καθηγήτρια Ευσταθία Ιωάννου (Τμήματος Φαρμακευτικής ΕΚΠΑ) για την αξιολόγηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή Φαρμακευτικής Χημείας του ΑΠΘ κο Βασίλειο Δημόπουλο για τη συνεργασία κατά την εκτίμηση της αναστολής του ενζύμου αναγωγάση της αλδόξης και αλδεϋδης και την Καθηγήτρια Φαρμακευτικής Χημείας του ΑΠΘ κα Δήμητρα Χατζηπαύλου-Λίτινα για την εκτίμηση της ανασταλτικής δράσης επί της λιποξυγονάσης φυτικής προέλευσης.

Αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω ιδιαίτερως θερμά την Δρ. Χρυσή Γαβριέλη, ΕΕΔΙΠ του εργαστηρίου Φαρμακογνωσίας του ΑΠΘ για την πολύτιμη καθοδήγηση και συμβολή της στη διευκρίνιση των δομών των ενώσεων κατά την διάρκεια της φυτοχημικής ανάλυσης του φυτού καθώς και για την καίρια συμβολή της στην συγγραφή της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Ευχαριστώ θερμά τον ερευνητή του Μεσογειακού Αγρονομικού Ινστιτούτου Χανίων, Δρ. Παναγιώτη Κεφάλα, για τη λήψη των φασμάτων με την τεχνική LC-DAD-MS.

Πολλές ευχαριστίες στην ερευνήτρια του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών, Δρ. Μαρία Ζερβού και τον Δρ. Αποστόλη Φωτόπουλο του τμήματος Χημικών Μηχανικών του ΑΠΘ για τη λήψη φασμάτων Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού, την Δρ. Ελένη Σιάπη και την Ερευνήτρια Κατερίνα Γαβριήλ Τμήματος Χημικών Μηχανικών του ΑΠΘ για τη λήψη των φασμάτων μάζης.

Θερμές ευχαριστίες στην Δρ. Πολυξένη Αλεξίου και την M.Sc Μαρκέλλα Κωνσταντινίδου για την συμμετοχή τους στα πειράματα αξιολόγησης της αναστολής της αναγωγής της αλδόζης και της αναστολής της λιποξυγονάσης φυτικής προέλευσης αντίστοιχα, καθώς και τα παιδιά του εργαστηρίου Φαρμακογνωσίας.

Τέλος θα ήθελα να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου και τον αδερφό μου Αλέξανδρο για την αμέριστη στήριξη και συμπαράσταση καθ' όλη τη διάρκεια αυτής της πορείας.

Στους γονείς μου

Κωνσταντίνο και Γκόλφω

και στον αδερφό μου

Αλέξανδρο

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	12
ABSTRACT.....	13
ΣΚΟΠΟΣ.....	15
1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	16
1.1. Βοτανικά χαρακτηριστικά του φυτού <i>Indigofera</i> .....	16
1.2. Φυτά του γένους <i>Indigofera</i> .....	16
1.3. Το είδος <i>Indigofera hirsuta</i> .....	19
1.4. Ιστορικά στοιχεία.....	20
1.5. Εξαγωγή της χρωστικής <i>Indigo</i> .....	21
1.6. Φαρμακολογικές ιδιότητες που έχουν βρεθεί σε διάφορα είδη του γένους <i>Indigofera</i> .....	24
1.7. Δρογοχημεία του γένους <i>Indigofera</i> .....	41
2. ΑΛΚΑΛΟΕΙΔΗ ΤΟΥ ΙΝΔΟΛΙΟΥ.....	56
3. ΣΤΕΡΟΕΙΔΗ.....	58
4. ΚΥΚΛΙΤΟΛΕΣ.....	59
4.1. Πινιτόλη ως υπογλυκαιμικός παράγοντας.....	60
5. ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ.....	62
5.1. Κατηγορίες φλαβονοειδών.....	62
5.2. Βιοσύνθεση των φλαβονοειδών.....	65
5.3. Ρόλος των φλαβονοειδών στα φυτά.....	72
5.4. Φαρμακολογικές δράσεις των φλαβονοειδών.....	73
5.4.1. Αντιοξειδωτική δράση.....	73
5.4.2. Προοξειδωτική δράση.....	78
5.4.3. Αντικαρκινική δράση.....	81
5.4.4. Αντιφλεγμονώδη δράση.....	84
5.4.5. Αντιμικροβιακή δράση.....	86
5.4.6. Αντιμυκητιασική δράση.....	87
5.4.7. Αντιϊική δράση.....	87
6. ΛΙΠΟΞΥΓΟΝΑΣΗ.....	89
6.1. Η οδός της λιποξυγονάσης.....	91
6.2. Η οδός της κυκλοξυγονάσης.....	93
6.3. Ρόλος των λευκοτριενίων σε φλεγμονώδεις ασθένειες.....	94
6.4. Αναστολείς της λιποξυγονάσης.....	95
6.5. Φυσικά προϊόντα ως αναστολείς της λιποξυγονάσης.....	100
7. IN VITRO ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ.....	102
7.1. Δοκιμή σάρωσης ελευθέρων ριζών με τη χρήση της μεθόδου του DPPH.....	102
8. ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΑΝΑΓΩΓΑΣΗΣ ΤΗΣ ΑΛΔΟΖΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΝΑΓΩΓΑΣΗΣ ΤΗΣ ΑΛΔΕΥΔΗΣ.....	105
8.1. Σακχαρώδης διαβήτης.....	105
8.2. Αναγωγή της αλδόζης (ALR2).....	109
8.3. Αναγωγή της αλδεΐδης (ALR1).....	113
8.4. Αναστολείς της αναγωγής της αλδόζης.....	114
8.5. Αναστολείς της αναγωγής της αλδόζης που απομονώθηκαν από φυσικές πηγές.....	116
9. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΓΕΝΙΚΟ.....	122

9.1. Υλικά και Μεθοδοι.....	122
9.1.1. Διαλύτες και αντιδραστήρια για τη βιολογική αποτίμηση.....	122
9.1.2. Χρωματογραφικές μέθοδοι .....	123
9.1.3. Φασματοσκοπικές μέθοδοι.....	124
10. ΣΥΝΔΥΑΣΤΙΚΗ ΤΕΧΝΙΚΗ LC-DAD-MS (ESI+).....	125
11. ΚΛΑΣΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΕΝΩΣΕΩΝ.....	126
11.1. Υπόλειμμα πετρελαϊκού αιθέρα (INDP).....	128
11.2. Εκχύλισμα βουτανόλης (INDB).....	133
11.3. Εκχύλισμα διαιθυλαιθέρα (INDE).....	144
11.4. Υδατικό υπόλειμμα (INDW).....	148
12. LC-DAD-MS (ESI+) ΑΝΑΛΥΣΗ.....	151
12.1. Εκχύλισμα διαιθυλαιθέρα.....	152
12.1.1. Ένωση 1.....	153
12.1.2. Ένωση 2.....	155
12.1.3. Ένωση 3.....	156
12.1.4. Ένωση 4.....	158
12.1.5. Ένωση 5.....	160
12.1.6. Ένωση 6.....	161
12.1.7. Ένωση 7.....	163
12.2. Εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα.....	165
12.2.1. Ένωση 8.....	166
12.2.2. Ένωση 9.....	168
12.3. Εκχύλισμα βουτανόλης.....	169
12.3.1. Ένωση 10.....	170
12.3.2. Ένωση 11.....	172
13. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ.....	174
13.1. Κλάσμα βουτανόλης.....	174
13.1.1. Ένωση X1A.....	174
13.1.2. Ένωση X1B.....	186
13.1.3. Ένωση X2.....	191
13.1.4. Ένωση X3.....	200
13.1.5. Ένωση X4.....	209
13.1.6. Ένωση X5.....	218
13.1.7. Ένωση X6.....	225
13.1.8. Ένωση X7.....	235
13.2. Εκχύλισμα διαιθυλαιθέρα.....	245
13.2.1. Ένωση X8.....	245
13.2.2. Ένωση X9.....	249
13.2.3. Ένωση X10.....	251
13.2.4. Ένωση X11 & Ένωση X12.....	258
13.3. Υπόλειμμα πετρελαϊκού αιθέρα.....	268
13.3.1. Ένωση X13.....	268
13.3.2. Ένωση X14 & Ένωση X15.....	278
13.4. Υδατικό κλάσμα.....	297

13.4.1. Ένώσεις X16, X17 X18, X19.....	297
14. <i>IN VITRO</i> ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ.....	309
14.1. Ικανότητα σάρωσης ελευθέρων ριζών με την μέθοδο του DPPH.....	309
14.1.1. Εκχύλισμα διαιθυλαιθέρα.....	312
14.1.2. Εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα.....	314
14.1.3. Εκχύλισμα βουτανόλης.....	316
14.1.4. Υδατικό κλάσμα.....	318
15. <i>IN VITRO</i> ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΗΣ ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΟΥΣ ΔΡΑΣΗΣ.....	322
15.1. Ικανότητα αναστολής της λιποξυγονάσης φυτικής προέλευσης.....	322
16. ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΑΝΑΓΩΓΑΣΗΣ ΤΗΣ ΑΛΔΟΖΗΣ (ALR2) ΚΑΙ ΑΛΔΕΥΔΗΣ (ALR1).....	324
16.1. <i>In vitro</i> μελέτη της ικανότητας αναστολής της αναγωγάσης της αλδόζης (ALR2).....	324
16.1.1. Εκχύλισμα διαιθυλαιθέρα.....	327
16.1.2. Εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα.....	329
16.1.3. Εκχύλισμα βουτανόλης.....	331
16.1.4. Υδατικό κλάσμα.....	333
16.2. <i>In vitro</i> μελέτη της ικανότητας αναστολής της αναγωγάσης της αλδεΐδης (ALR1).....	336
16.2.1. Εκχύλισμα διαιθυλαιθέρα.....	339
16.2.2. Εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα.....	340
16.2.3. Εκχύλισμα βουτανόλης.....	341
16.2.4. Υδατικό κλάσμα.....	342
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	345
ΠΙΝΑΚΑΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ.....	348
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	350



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το γένος *Indigofera* (Leguminosae) εκπροσωπείται από 700 είδη θάμνων, ενδημικά τροπικών και υποτροπικών περιοχών με ευρεία εξάπλωση στην κεντρική Αφρική, Ινδία, Ταϊλάνδη, Κίνα, Αυστραλία, και Λατινική Αμερική. Το είδος αυτό χρησιμοποιείται στην παραδοσιακή θεραπευτική για την αντιμετώπιση του διαβήτη, της λέπρας, της φυματίωσης, των μολύνσεων, ως αντίδοτο σε δάγκωμα φιδιού καθώς και για την θεραπεία της ελονοσίας. Επίσης διάφορα είδη του γένους αυτού επιδεικνύουν ηπατοπροστατευτική, αντιφλεγμονώδη και αντικαρκινική δράση. Διάφορα χημικά συστατικά έχουν απομονωθεί από το γένος αυτό όπως φλαβονοειδή, πτεροκαρπάνια, ροτενοειδή, φαινολικά οξέα, και αλειφατικές νιτροενώσεις. Ο σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας ήταν η απομόνωση χημικών συστατικών των διαφόρων εκχυλισμάτων, η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης αυτών των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο του DPPH•. Επιπλέον *in vitro* πειράματα διεξήχθησαν για την αποτίμηση της αντιφλεγμονώδους δράσης μέσω της αναστολής του ενζύμου της λιποξυγονάσης LOX• καθώς και την εκτίμηση της αναστολής του ενζύμου της αναγωγάσης της αλδόζης (ALR2) και της αναγωγάσης της αλδεΰδης (ALR1). Η αναγωγάσης της αλδόζης (ALR2) αποτελεί ένζυμο της οδού των πολυολών και είναι άμεσα σχετιζόμενη με την αιτιολογία των δευτερογενών επιπλοκών του διαβήτη τύπου II.

Το αποξηραμένο φυτικό υλικό εκχυλίστηκε εξαντλητικά με πετρελαϊκό αιθέρα, διχλωρομεθάνιο και μεθανόλη. Η εξάτμιση του μεθανολικού εκχυλίσματος υπό κενό, έδωσε ξηρό υπόλειμμα βάρους (27.63 g), το οποίο στη συνέχεια διαλύθηκε σε ζέον ύδωρ, ακολούθησε δε εκχύλιση διαδοχικά με διαιθυλαιθέρα, οξικό αιθυλεστέρα και βουτανόλη καθώς και συλλογή του εναπομείναντος υδατικού εκχυλίσματος.

Η ποιοτική ανάλυση των εκχυλισμάτων του διαιθυλαιθέρα, του οξικού αιθυλεστέρα, της βουτανόλης και του υδατικού κλάσματος διεκπεραιώθηκε μέσω της χρήσης του συστήματος LC-DAD-MS (ESI+). Η απομόνωση των βασικών συστατικών διεξήχθη με τη χρήση τεχνικών όπως η υγρή χρωματογραφία στήλης (CC), η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC) και η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Η αποτίμηση της χημικής δομής επιτεύχθηκε με τη βοήθεια διαφόρων τεχνικών Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (φάσματα NMR) και HR-MS/MS.

Ακολούθησε φυτοχημική ανάλυση με χρωματογραφικές τεχνικές καθώς και με την τεχνική του LC-DAD-MS. Οι απομονωμένες ενώσεις ανήκουν στις κατηγορίες των υδροξυβενζοϊκών



οξέων, των υδροξυ-κινναμωμικών οξέων, των φλαβονοειδών γλυκοζιτών, ενός ινδολικού παραγώγου, ενός στεροειδούς, δύο εστέρων της τριακυλογλυκερόλης, των σακχάρων και μιας κυκλιτόλης. Μερικές από τις ενώσεις απομονώθηκαν για πρώτη φορά από το γένος *Indigofera*. Οι ενώσεις που διευκρινίστηκαν μέσω του συστήματος LC-DAD-MS (ESI+), ανήκουν στις κατηγορίες των υδροξυ-κινναμωμικών οξέων, των εστέρων του κινικού οξέος με υδροξυ-κινναμωμικά οξέα και των γλυκοζιτών των φλαβονοειδών.

Η μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης έδειξε ότι το εκχύλισμα που εμφάνισε την ισχυρότερη ικανότητα σάρωσης ελευθέρων ριζών ήταν το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα, ενώ η μελέτη της ικανότητας αναστολής του ενζύμου της λιποξυγονάσης οδήγησε στο συμπέρασμα ότι το εκχύλισμα με την ισχυρότερη αντιφλεγμονώδη δράση ήταν το βουτανολικό (κοντά στο 65%), με δεύτερο το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα που εμφάνισε 58% αναστολή. Τα αποτελέσματα από την ικανότητα αναστολής των ενζύμων της αναγωγής της αλδόζης και της αναγωγής της αλδεΐδης έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα που εμφάνισαν την ισχυρότερη δράση ήταν του οξικού αιθυλεστέρα και του διαιθυλαιθέρα. Η προαναφερθείσα αναστολή κυμάνθηκε από 85% μέχρι 93%. Επιπροσθέτως και το υδατικό εκχύλισμα εμφάνισε ικανότητα αναστολής του ενζύμου.

Η παρούσα εργασία είναι η πρώτη φυτοχημική μελέτη των εκχυλισμάτων του διαιθυλαιθέρα, του οξικού αιθυλεστέρα, του βουτανολικού εκχυλίσματος, του εκχυλίσματος του πετρελαϊκού αιθέρα και του υδατικού κλάσματος, η πρώτη *in vitro* μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων, η πρώτη *in vitro* μελέτη της αντιφλεγμονώδους δράσης με τη μέθοδο της LOX και η πρώτη *in vitro* μελέτη της αναστολής των ενζύμων της αναγωγής της αλδόζης (ALR2) και της αναγωγής της (ALR1).

## ABSTRACT

The genus *Indigofera* (Leguminosae) is represented by 700 species of shrubs indigenous in tropical and sub-tropical regions vastly distributed in the parts of Africa, India, Thailand, China, Australia and Latin America. These plants are used in traditional medicine for the treatment of diabetes, leprosy, tuberculosis, infections, snake bite and in the management of malaria. They also exhibit hepatoprotective, anti-inflammatory and anticancer properties. Various compounds have been isolated from these species such as flavonoids, pterocarpanes, rotenoids, phenolic acids and aliphatic nitro compounds. The objective of the present research on the aerial parts of *Indigofera hirsuta* (Leguminosae) was the determination of the chemical composition of various extracts, the evaluation of their antiradical potential by the

DPPH• assay and their capacity in inhibiting the lipoxygenase enzyme through the LOX test. Further in vitro tests were conducted in order to determine the extracts ability to inhibit both the aldose reductase enzyme (ALR2) and the aldehyde reductase enzyme (ALR1). Aldose reductase enzyme of the polyol metabolic pathway is implicated in the etiology of the secondary complications of diabetes (type II).

Air-dried and powdered aerial parts were exhaustively extracted with petroleum ether, dichloromethane and methanol consecutively. Evaporation under vacuum leads to a residue (27.63 g) which was dissolved in hot water and extracted with petroleum ether, diethyl ether, ethyl acetate and butanol, successively with the further collection of the aqueous extract.

The qualitative analysis of the extracts obtained was conducted with the LC-DAD-MS (ESI+) system. Furthermore, isolation of the major compounds was determined by the utilization of various preparative techniques such as Column Chromatography (CC), High-Pressure Liquid Chromatography (HPLC) and Thin Layer Chromatography (TLC). Structure elucidation and clarification were obtained by the use of Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and High-Resolution MS/MS spectra.

The phytochemical analysis resulted to the elucidation compounds, isolated with chromatographic techniques and analyzed by the LC-DAD-MS analysis. Isolated compounds belong to the categories of hydroxybenzoic acids, hydroxycinnamic acids, flavonoid glucosides, one indole alkaloid, a steroid, esters of triacylglycerol, carbohydrates and one cyclitol. Some of the compounds have been isolated for the first time in the genus *Indigofera*. Compounds determined qualitatively by means of the LC-DAD-MS (ESI+) system belong to derivatives of hydroxybenzoic acids, hydroxycinnamic acids, esters of quinic acids with hydroxycinnamic acids, flavonoid derivatives.

The study of antioxidant activity resulted in the determination of the ethyl acetate extract being the one having the highest antioxidant potential according to the DPPH• assay. The study of the LOX inhibition capacity showed that the butanol extract exhibited the highest percentage of anti inflammatory inhibition activity which was 65% with the second highest percentage of inhibition activity belonging to the ethyl acetate of 58%. The study results of aldose reductase (ALR2) and aldehyde reductase (ALR1) inhibition capacity showed that all extracts were strong inhibitors of the enzymes. The extracts which showed the highest inhibition capacity of aldose reductase (ALR2) were those of ethyl acetate and diethyl ether

where the inhibitory activity was ranging from 85% to 93% while the water extract exhibited also a strong capacity of inhibition.

This research work is the first phytochemical study of the hexane, diethyl ether, ethyl acetate, butanol extracts, the first scientific establishment of the strong in vitro inhibitory activity against ALR2 /ALR1 enzymes of all extracts and the good in vitro anti-inflammatory activity against LOX, particularly of the butanol extract. The inhibition of ALR2 of the aerial parts of *Indigofera hirsuta* proved to be in accordance with the actual use of the plant for the treatment of the long term diabetic complications.

## ΣΚΟΠΟΣ

Το αντικείμενο της παρούσας διδακτορικής διατριβής εντάσσεται στο επιστημονικό πεδίο των φυσικών προϊόντων, με στόχο την φυτοχημική ανάλυση των υπέργειων τμημάτων του φυτού *Indigofera hirsuta* το οποίο χρησιμοποιείται ως υπογλυκαιμικός παράγοντας στη λαϊκή θεραπευτική. Μολονότι στο γένος *Indigofera* αποδίδεται υπερπληθώρα εφαρμογών και δράσεων, ωστόσο το συγκεκριμένο είδος θεωρείται ότι κατέχει υπογλυκαιμικές ιδιότητες. Για το λόγο αυτό, γίνεται ευρεία χρήση αφηρημάτων του συγκεκριμένου φυτού σε συνδυασμό με το είδος *Tephrosia humilis* ως υπογλυκαιμικού παράγοντα από ασθενείς με γονιδιακό διαβήτη τύπου II στην Κεντροαφρικανική Δημοκρατία.

Με στόχο να ελεγχθούν οι ιδιότητες που παραδοσιακά αποδίδονται στο φυτό, εκχυλίσματα της δρόγης δοκιμάστηκαν με δυο διαφορετικές μεθόδους μέτρησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας, της αντιφλεγμονώδους δράσης και της ικανότητας αναστολής της αναγωγής της αλδόζης και της αλδεΐδης. Τα δύο ανωτέρω ένζυμα εμπλέκονται στην εκδήλωση των δευτερογενών επιπλοκών σε ασθενείς με διαβήτη τύπου II, νόσος που συνοδεύεται από παραγωγή ελευθέρων ριζών.

## 1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 1.1 Βοτανικά χαρακτηριστικά του γένους *Indigofera*

Τα φυτά του γένους *Indigofera* είναι δικοτυλήδονα και έχουν τα εξής χαρακτηριστικά:

Φέρουν πενταμερή κάλυκα και πενταμερή στεφάνη με πέταλα ανομοιόμορφα, από τα οποία το ένα ονομάζεται πέτασος, τα δύο πλευρικά ονομάζονται πτέρυγες και τα υπόλοιπα δύο αποτελούν την τρόπιδα. Τα πέταλα είναι διαφορετικά σε μέγεθος και σχήμα και δημιουργούν μαζί με τα άλλα μέρη της στεφάνης ένα έντονο ζυγόμορφο άνθος.

Οι στήμονες είναι 10, από τους οποίους οι εννέα συχνά συμφύονται και ο ένας παραμένει ελεύθερος.

Φέρουν ένα καρπόφυλλο, που καταλήγει σε ύπερο και περικλείεται από την τρόπιδα.

Είναι εντομογαμή φυτά και η παραπάνω κατασκευή του άνθους, που είναι του γενικού τύπου  $K_{(5)}\Sigma_{(5)}A_{(9)+1}$  ή  $A_{(10)}\Gamma_1$  εξυπηρετεί αυτόν τον τρόπο επικονίασης.

Ο καρπός που σχηματίζεται από ένα καρπόφυλλο, είναι χαρακτηριστικός και ονομάζεται χέδρωπας (*legumen*), ανοίγει δε κατά την ξήρανση από την ραχιαία και κοιλιακή ραφή.

Τα φύλλα είναι σύνθετα πτεροειδή, με πολλά φυλλάρια και περιπτόλικτα. (Μπαμπαλώνας – Κοκκίνη 2004)

### 1.2 Φυτά του γένους *Indigofera*

Στο γένος *Indigofera* απαντούν 700 είδη που είναι ποώδη φυτά κατά το μεγαλύτερο ποσοστό ενώ κάποια μπορεί να εξελιχθούν σε μικρά δέντρα τα οποία μπορούν να φτάσουν σε ύψος τα 5 με 6 μέτρα. Στον Πίνακα 1 αναφέρονται μερικά από τα είδη που απαντούν στο γένος *Indigofera*.



Εικ1: *Indigofera hirsuta*  
Frederick Polydore Nodder

Πίνακας 1: είδη του γένους *Indigofera*

<i>Indigofera adenocarpa</i>	<i>Indigofera langebergensis</i>
<i>Indigofera adenoides</i>	<i>Indigofera laxeracemosa</i>
<i>Indigofera alopecuroides</i>	<i>Indigofera lespedezioides</i>
<i>Indigofera alpina</i>	<i>Indigofera leucotricha</i>
<i>Indigofera alternans</i>	<i>Indigofera lindheimeriana</i>
<i>Indigofera amblyantha</i>	<i>Indigofera linifolia</i>
<i>Indigofera argentea</i>	<i>Indigofera linnaei</i>
<i>Indigofera argentea</i>	<i>Indigofera litoralis</i>
<i>Indigofera angustata</i>	<i>Indigofera livingstoniana</i>
<i>Indigofera angustifolia</i>	<i>Indigofera longebarbata</i>
<i>Indigofera antunesiana</i>	<i>Indigofera longepedicellata</i>
<i>Indigofera aquae-nitensis</i>	<i>Indigofera longeracemosa</i>
<i>Indigofera arenophila</i>	<i>Indigofera lupatana</i>
<i>Indigofera argentea</i>	<i>Indigofera lyallii</i>
<i>Indigofera arrecta</i>	<i>Indigofera macrophylla</i>
<i>Indigofera articulata</i>	<i>Indigofera maritima</i>
<i>Indigofera aspalathoides</i>	<i>Indigofera marmorata</i>
<i>Indigofera asperan</i>	<i>Indigofera mauritanica</i>
<i>Indigofera asperifolia</i>	<i>Indigofera melanadenia</i>
<i>Indigofera astragalina</i>	<i>Indigofera meyeriana</i>
<i>Indigofera atriceps</i>	<i>Indigofera microcarpa</i>
<i>Indigofera atropurpurea</i>	<i>Indigofera mimosoides</i>
<i>Indigofera auricoma</i>	<i>Indigofera miniata</i>
<i>Indigofera australis</i>	<i>Indigofera mischocarpa</i>
<i>Indigofera bainesii</i>	<i>Indigofera mollicoma</i>
<i>Indigofera boviparda</i>	<i>Indigofera monantha</i>
<i>Indigofera brachynema</i>	<i>Indigofera nebrowniana</i>
<i>Indigofera brachyodon</i>	<i>Indigofera nephrocarpoides</i>
<i>Indigofera brachystachya</i>	<i>Indigofera nigrescens</i>
<i>Indigofera brevicalyx</i>	<i>Indigofera nigromontana</i>
<i>Indigofera brevidens</i>	<i>Indigofera nummulariifolia</i>
<i>Indigofera brevipes</i>	<i>Indigofera oblongifolia</i>
<i>Indigofera bungeana</i>	<i>Indigofera omissa</i>
<i>Indigofera burchellii</i>	<i>Indigofera ormocarpoides</i>
<i>Indigofera candicans</i>	<i>Indigofera ovata</i>
<i>Indigofera candolleana</i>	<i>Indigofera oxalidea</i>
<i>Indigofera capillaris</i>	<i>Indigofera oxytropis</i>
<i>Indigofera carlesii</i>	<i>Indigofera oxytropoides</i>
<i>Indigofera caroliniana</i>	<i>Indigofera paniculata</i>
<i>Indigofera cassioides</i>	<i>Indigofera parkesii</i>
<i>Indigofera cecili</i>	<i>Indigofera parodiana</i>
<i>Indigofera charlierana</i>	<i>Indigofera pascuorum</i>
<i>Indigofera chuniana</i>	<i>Indigofera pendula</i>
<i>Indigofera circinnella</i>	<i>Indigofera pilosa</i>
<i>Indigofera circinnata</i>	<i>Indigofera podophylla</i>
<i>Indigofera colutea</i>	<i>Indigofera poliotes</i>
<i>Indigofera comosa</i>	<i>Indigofera pongolana</i>
<i>Indigofera cooperi</i>	<i>Indigofera porrecta</i>
<i>Indigofera cordifolia</i>	<i>Indigofera potaninii</i>
<i>Indigofera cryptantha</i>	<i>Indigofera pratensis</i>
<i>Indigofera cuneata</i>	<i>Indigofera praticola</i>
<i>Indigofera cuneifolia</i>	<i>Indigofera pretoriana</i>
<i>Indigofera cylindracea</i>	<i>Indigofera procumbens</i>
<i>Indigofera cylindrica</i>	<i>Indigofera prostrata</i>
<i>Indigofera cytisoides</i>	<i>Indigofera pseudotinctoria</i>
<i>Indigofera daleoides</i>	<i>Indigofera psoraloides</i>
<i>Indigofera decora</i>	<i>Indigofera pulchra</i>
<i>Indigofera delagoaensis</i>	<i>Indigofera purpurea</i>
<i>Indigofera demissa</i>	<i>Indigofera rautanenii</i>
<i>Indigofera dendroides</i>	<i>Indigofera reducta</i>
<i>Indigofera denudata</i>	<i>Indigofera rehmannii</i>
<i>Indigofera dielsiana</i>	<i>Indigofera reticulata</i>
<i>Indigofera digitata</i>	<i>Indigofera rhynchocarpa</i>
<i>Indigofera dimidiata</i>	<i>Indigofera rhytidocarpa</i>
<i>Indigofera diphylla</i>	<i>Indigofera ripae</i>

<i>Indigofera disjuncta</i>	<i>Indigofera rostrata</i>
<i>Indigofera dosua</i>	<i>Indigofera rothii</i>
<i>Indigofera dregeana</i>	<i>Indigofera sabulicola</i>
<i>Indigofera dyeri</i>	<i>Indigofera sanguinea</i>
<i>Indigofera egens</i>	<i>Indigofera saxicola</i>
<i>Indigofera emarginella</i>	<i>Indigofera schimperii</i>
<i>Indigofera erecta</i>	<i>Indigofera secundiflora</i>
<i>Indigofera eriocarpa</i>	<i>Indigofera semitrijuga</i>
<i>Indigofera erythrogamma</i>	<i>Indigofera senegalensis</i>
<i>Indigofera evansiana</i>	<i>Indigofera sessiliflora</i>
<i>Indigofera eylesiana</i>	<i>Indigofera sessilifolia</i>
<i>Indigofera fanshawei</i>	<i>Indigofera setiflora</i>
<i>Indigofera filicaulis</i>	<i>Indigofera simplicifolia</i>
<i>Indigofera filifolia</i>	<i>Indigofera sokotrana</i>
<i>Indigofera filiformis</i>	<i>Indigofera sordida</i>
<i>Indigofera filipes</i>	<i>Indigofera sphaerocarpa</i>
<i>Indigofera flabellata</i>	<i>Indigofera spicata</i>
<i>Indigofera flavicans</i>	<i>Indigofera splendens</i>
<i>Indigofera foliosa</i>	<i>Indigofera stachyoides</i>
<i>Indigofera fortunei</i>	<i>Indigofera stenophylla</i>
<i>Indigofera frutescens</i>	<i>Indigofera strobilifera</i>
<i>Indigofera fulvopilosa</i>	<i>Indigofera suaveolens</i>
<i>Indigofera gairdnerae</i>	<i>Indigofera subcorymbosa</i>
<i>Indigofera galegoides</i>	<i>Indigofera subulifera</i>
<i>Indigofera garckeana</i>	<i>Indigofera suffruticosa</i>
<i>Indigofera glandulosa</i>	<i>Indigofera sulcata</i>
<i>Indigofera glaucescens</i>	<i>Indigofera swaziensis</i>
<i>Indigofera glomerata</i>	<i>Indigofera tenuis</i>
<i>Indigofera goetzei</i>	<i>Indigofera tenuissima</i>
<i>Indigofera griseoides</i>	<i>Indigofera tinctoria</i>
<i>Indigofera hamiltonii</i>	<i>Indigofera tomentosa</i>
<i>Indigofera hebeptala</i>	<i>Indigofera torulosa</i>
<i>Indigofera hedyantha</i>	<i>Indigofera trifoliata</i>
<i>Indigofera hendecaphylla</i>	<i>Indigofera tristis</i>
<i>Indigofera heterantha</i>	<i>Indigofera tristoides</i>
<i>Indigofera heterophylla</i>	<i>Indigofera trita</i>
<i>Indigofera heterotricha</i>	<i>Indigofera velutina</i>
<i>Indigofera heudelotii</i>	<i>Indigofera vicioides</i>
<i>Indigofera hewittii</i>	<i>Indigofera viscidissima</i>
<i>Indigofera hilaris</i>	<i>Indigofera vohemarensis</i>
<i>Indigofera himalayensis</i>	<i>Indigofera volkensii</i>
<i>Indigofera hirsuta</i>	<i>Indigofera wildiana</i>
<i>Indigofera hispida</i>	<i>Indigofera williamsonii</i>
<i>Indigofera hochstetteri</i>	<i>Indigofera woodii</i>
<i>Indigofera holubii</i>	<i>Indigofera zeyheri</i>
<i>Indigofera humifusa</i>	<i>Indigofera zollingeriana</i>
<i>Indigofera ichangensis</i>	
<i>Indigofera incana</i>	
<i>Indigofera ingrata</i>	
<i>Indigofera inhambanensis</i>	
<i>Indigofera kirilowii</i>	

Germplasm Resources Information Network

Κάποια από τα ανωτέρω είδη θα σχολιαστούν στην συνέχεια ως προς τα συστατικά που περιέχουν και τη δράση τους.

### 1.3 Το είδος *Indigofera hirsuta*

#### Βοτανική κατάταξη του φυτού *Indigofera*

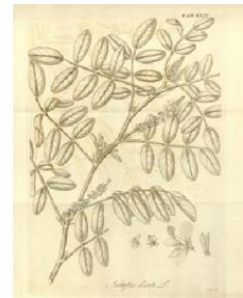
- Κατηγορία: *Eucaryota*
- Βασίλειο: *Plantae*
- Υποβασίλειο: *Viridaeplantae*
- Κατηγορία- διαίρεση: *Magnoliophyta*
- Υποκατηγορία: *Euphyllophytina*
- Υπερκλάση: *Radiatopses*
- Κλάση: *Magnoliopsida*
- Υποκλάση: *Rosidae*
- Υπερ-τάξη: *Fabanae*
- Τάξη: *Fabales*
- Οικογένεια: *Leguminosae*
- Υποοικογένεια: *Faboidae*
- Φυλή: *Indigoferaeae*
- Γένος: *Indigofera*
- Είδος: *I. hirsuta*
- Υποείδος: *hirsuta*
- Κοινή ονομασία: *rough hairy indigo*



Εικ 2: *Indigofera hirsuta*

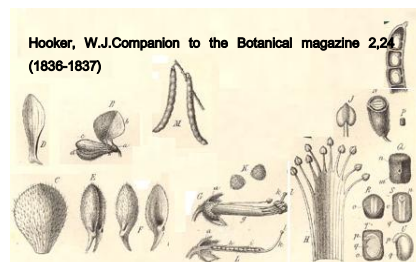
Πρόκειται για φυτό μονοετές, πωώδες ή θαμνώδες που μπορεί να φτάσει το 1,5 m σε ύψος. Ολόκληρο το φυτό καλύπτεται από εμφανείς τρίχες χρώματος καφέ. Τα κλαδιά είναι όρθια, φέρουν ραβδώσεις και στην ωρίμανσή τους γίνονται ξυλώδη. Τα φύλλα του είναι σύνθετα πτεροειδή και περιπτόλικτα.

Εικ 3: Λεπτομέρεια περιγραφής φύλλων (Hooker, W.J. Companion to the Botanical magazine 2, 24 (1836-1837))

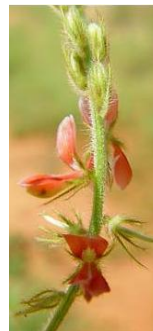


Τα παράφυλλα είναι τριγωνικά και έχουν μήκος 10-12 mm. Η ταξιανθία είναι βοτρυώδης, τα βράκτια φύλλα είναι ευθεία τριγωνικά και έχουν μήκος 4 mm. Ο μίσχος έχει μήκος 3 cm και ο ποδίσκος φτάνει τα 2 mm. Τα άνθη έχουν μήκος 6 mm ενώ ο κάλυκας 4 mm και φέρει σκληρές καφέ τρίχες. Τα πέταλα είναι κόκκινου ή ροζ χρώματος ενώ το πάνω μέρος του πετάλου είναι ελλειπτικό και μυτερό στις άκρες με διαστάσεις 4-5 mm x 2-2,5 mm. Τα σέπαλα έχουν

Εικ 4: Λεπτομέρεια περιγραφής ταξιανθίας



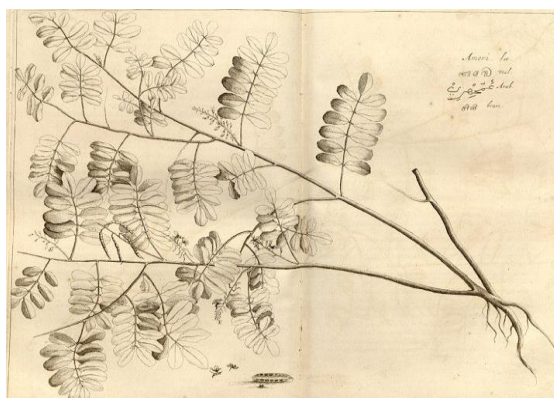
διαστάσεις 4-5 mm ×1,5 mm και εμφανίζουν μικρά τριχίδια στην επιφάνειά τους. Οι στήμονες είναι 10 εκ των οποίων οι 9 συμφύονται και ο ένας παραμένει ελεύθερος. Η ανθοδόχη έχει μήκος 4,5 mm και η ωθήκη εμφανίζεται να έχει λεπτά τριχίδια στην επιφάνειά της. Ο καρπός είναι χαρακτηριστικός, ονομάζεται χέδρωπας, έχει διαστάσεις 1-2 cm×1-2,5 mm και είναι καλυμμένος από τριχίδια. Ανοίγει κατά την ξήρανση από την ραχιαία και κοιλιακή ραφή. (Plant Resources of south-East Asia No 11:Auxilliary plants.)



Εικ 5: G.Byrne

#### 1.4 Ιστορικά στοιχεία

Η ονομασία του γένους *Indigofera* προέρχεται από τη λέξη Indigo (ινδικό, λουλάκι) που στα σανσκριτικά σημαίνει σκούρο μπλε χρώμα. Το χρησιμοποιούσαν στην Ανατολή σαν βαφή και σαν θεραπευτικό μέσο. Απαντάται στην *Indigofera tinctoria* και στην *Indigofera suffruticosa*. Η σπουδαιότητά του στο



Εικ 6:Hooker, W.J., Companion to the Botanical magazine, vol. 2t. 24 (1836-1837)

εμπόριο καταδεικνύεται από το συνώνυμό του στα σανσκριτικά «ο φίλος του εμπόρου». Η έναρξη της διακίνησής του ως εμπορικό αγαθό χρονολογείται από το 30 π.Χ. Αυτό που ο Διοσκουρίδης ονομάζει Indicon και ο Πλίνιος Indicum ήταν μια μπλε χρωστική με προέλευση από την Ινδία που χρησιμοποιούνταν στη ζωγραφική και τη βαφική. Μετά από κονιοποίηση, έδινε μια μαύρη σκόνη και σε επαφή με το νερό προέκυπτε μίγμα μπλε- μωβ χρώματος. Το Indigo θεωρείται η παλαιότερη βαφή της αρχαιότητας. Φαίνεται ότι χρησιμοποιήθηκε τουλάχιστον από το 3000 π.Χ και χαρακτηρίστηκε ως ο βασιλιάς των αρχαίων βαφών. Η χρωστική αξιοποιήθηκε για καλλωπιστικούς σκοπούς, σε θρησκευτικές τελετές και ως σύμβολο κοινωνικού και πολιτικού status σε όλα τα μήκη και πλάτη του τότε γνωστού κόσμου. Έδινε μπλε χρώμα μεγάλης αντοχής. Η βασική χρωστική είναι η ινδικοτίνη. Περιέχεται σε πολλά ινδικοφόρα δέντρα ή φυτά, όπως η γνωστή ευρωπαϊκή Ισάτις («κυανός»), που ήταν διαδεδομένη στην Ελλάδα αλλά και στη Δύση γενικότερα. Μετά από αιώνες χρήσεως στην Ανατολή, η βαφή διαδόθηκε στην Αίγυπτο, τη Συρία και αργότερα στην Ελλάδα, όπου θεωρήθηκε ανόργανη βαφή λόγω της κρυσταλλικής της εμφάνισης.

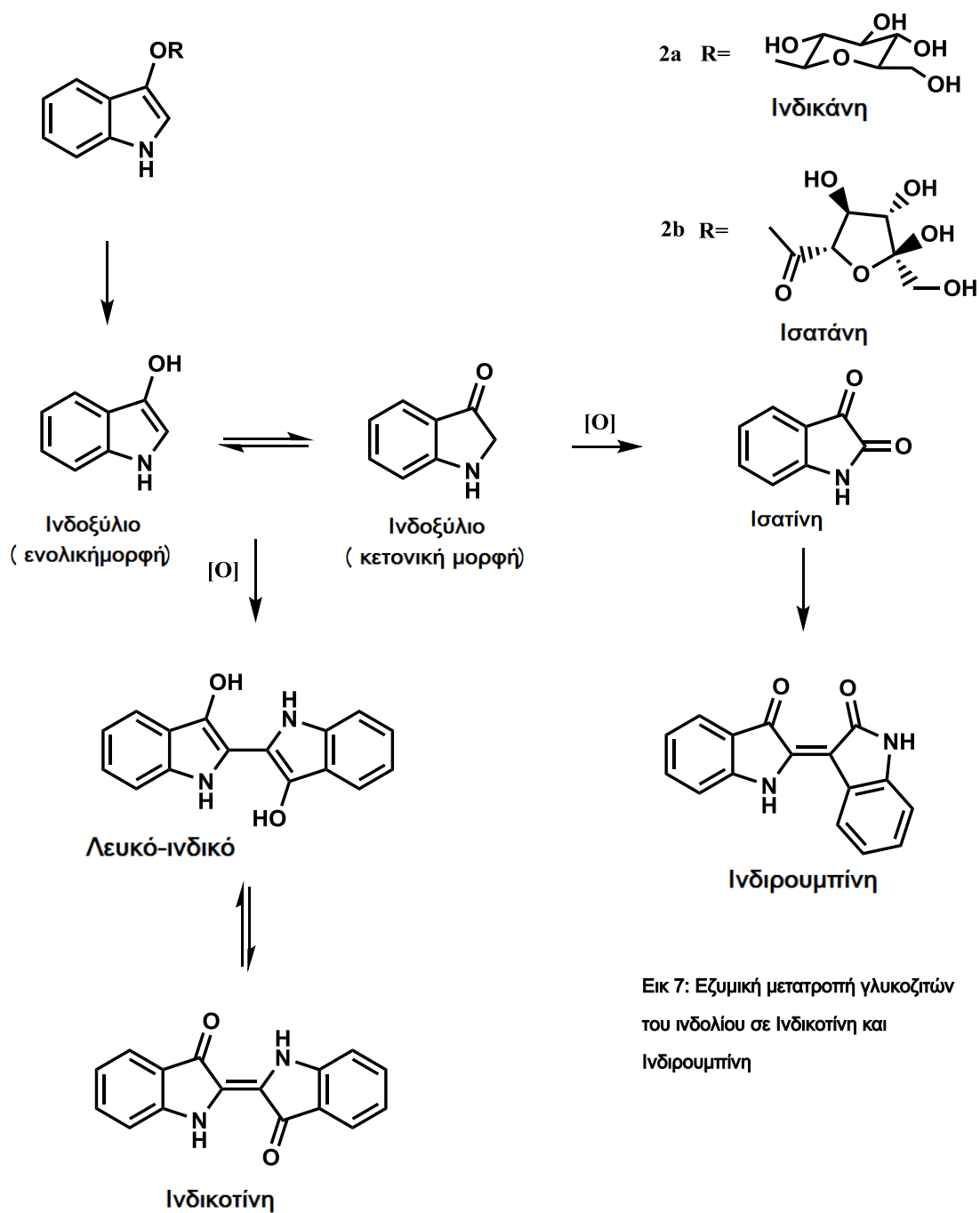


Στα αρχαία χρόνια θεωρούσαν το Indigo στυπτικό. Επίσης το χρησιμοποιούσαν σε έλκη και φλεγμονές καθώς και στον καθαρισμό και επούλωση των πληγών. Οι πρώτοι Άραβες γιατροί το χρησιμοποίησαν υπό την ονομασία Nil. Τον 13<sup>ο</sup> αιώνα, ο Μάρκο Πόλο περιγράφει τη διαδικασία της προετοιμασίας του Indigo για τη χρήση του ως βαφή. Το φυτό δεν ήταν γνωστό στην Ευρώπη μέχρι τα τέλη του 19<sup>ου</sup> αιώνα. Τόσο οι Ινδοί όσο και οι Άραβες θεωρούσαν ότι το φυτό κατείχε θεραπευτική δράση. Το συνταγογραφούσαν σε περιπτώσεις βήχα, λοιμώξεων των πνευμόνων και των νεφρών, διόγκωσης σπλήνα και ήπατος. Η εφαρμογή στο ομφαλό των παιδιών θεωρείτο ότι ήταν ευεργετική σε παθήσεις του εντέρου, ενώ στο υπογάστριο βοηθητική της λειτουργίας της ουροδόχου κύστης. Τα φύλλα τα αξιοποιούσαν στη μορφή καταπλάσματος ή εμπλάστρου σε διάφορες δερματικές παθήσεις καθώς και σε έλκη και αιμορροΐδες. Εφαρμογή τους σε δαγκώματα και τσιμπήματα δηλητηριωδών εντόμων και ερπετών, καθώς και σε εγκαύματα μετρίαζαν τον πόνο. Το φυτό έχει εξαιρετική φήμη σε κάποιες περιοχές της Ινδίας ως προφυλακτικός παράγοντας ενάντια στην υδροφοβία ως σύμπτωμα της λύσσας. Ένα ποτήρι του κρασιού χυμός από τα φύλλα χορηγείται το πρωί, με ή χωρίς γάλα, για τρεις ημέρες, μετά από δάγκωμα σκύλου. Οι ασθενείς δεν εμφανίζουν ανεπιθύμητες ενέργειες πέραν του πονοκεφάλου. Με χορήγηση μεγαλύτερης δόσης δρα ως καθαρτικό. Επιπροσθέτως της συστηματικής χορήγησης, τα φύλλα εφαρμόζονται καθημερινά στη περιοχή του δαγκώματος υπό μορφή καταπλάσματος. Τα σπέρματα των φυτών μετά από κονιοποίηση και εμφύσηση σε αλκοολικό διάλυμα παράγαν ένα βάμμα κατάλληλο για την καταπολέμηση των φειρών (<http://www.payer.de/amarakosa/amara206.htm>). Το 1897 η ποσότητα του Indigo που παραγόταν από φυτικές πηγές ανέρχονταν σε 19000 τόνους. Η ανάπτυξη της οργανικής χημείας οδήγησε στη συνθετική παραγωγή της χρωστικής που μείωσε αυτή την εξαγωγή του από τα φυτά σε 1000 τόνους το 1914, βαίνοντας με συνεχώς μειούμενο ρυθμό. Σήμερα φυτά του γένους *Indigofera* συνεχίζουν να έχουν ευρεία χρήση στη εξαγωγή χρωστικών για βαφή υφασμάτων με γνωστότερο όλων το denim που χρησιμοποιείται στην παραγωγή των blue jeans, ενώ οι συνεχείς έρευνες αποκαλύπτουν πλήθος συστατικών με πιθανή φαρμακολογική δράση.

### 1.5 Εξαγωγή της χρωστικής *Indigo*

Το χρωμοφόρο συστατικό του φυτού *Indigofera tinctoria* (True indigo) είναι η ινδικοτίνη η οποία βρίσκεται στα φύλλα και είναι παράγωγο του ινδολίου. Κατά την διάρκεια της ζύμωσης οι γλυκοζίτες του ινδολίου μετατρέπονται μέσω ενζυμικής υδρόλυσης σε ινδοξυλικό παράγωγο ενός ταυτομερούς μίγματος κετο- και ενολικής μορφής το οποίο οξειδώνεται από την επαφή του με τον αέρα πρώτα στο λευκο-ινδικό και τέλος στην ινδικοτίνη. Αυτή η λουλακί χρωστική στη

συνέχεια συλλέγεται και χρησιμοποιείται ως βαφή. Ως παράπλευρη αντίδραση κατά τη διάρκεια της ζύμωσης είναι και η περαιτέρω οξείδωση του μίγματος της κετο- και ενολικής μορφής σε ισατίνη η οποία συμπυκνώνεται με ένα ακόμα μόριο ινδοξυλικού παραγώγου για να δώσει την ινδιρουμπίνη, μια κόκκινη χρωστική (Ferreira et al., 2004).



Εικ 7: Εξυμική μετατροπή γλυκοζυτών του ινδολίου σε Ινδικοτίνη και Ινδιρουμπίνη

Η διαδικασία της εξαγωγής της χρωστικής περιλαμβάνει τα εξής στάδια:



Καλλιέργεια επιμ φωτός



Ευλογή και τεμαχισμός



Indigo cake



Δεξαμενή και αναμικτήρας



Συμπίεση



Εισαγωγή νερού σε διάλυμα βακτηριακής καλλιέργειας



Προσθήκη νερού και βρασμός



Χρωστική



Ζύμωση

Ανάδευση



Ευλογή χρωστικής



Αποστράγγιση νερού

Καθίμηση της χρωστικής



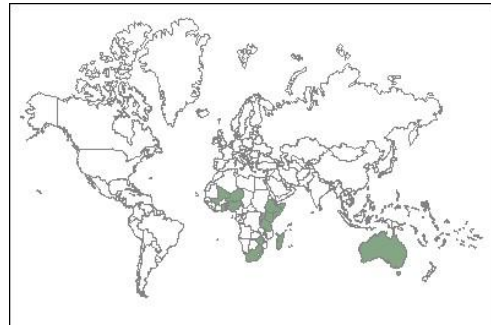
## 1.6 Φαρμακολογικές ιδιότητες του γένους *Indigofera*

Τα φυτά του γένους *Indigofera* έχουν ευρεία γεωγραφική εξάπλωση όντας ενδημικά των τροπικών και υποτροπικών περιοχών.

([http://zipcodezoo.com/Plants/I/Indigofera\\_hebepetala/Default.asp](http://zipcodezoo.com/Plants/I/Indigofera_hebepetala/Default.asp))

### ■ *Indigofera arrecta* (Bengal Indigo)

**Γεωγραφική κατανομή:** Αυστραλία, Μπενίν, Μπουρουντί, Αιθιοπία, Γκάνα, Κένυα, Μαδαγασκάρη, Μάλι, Νίγηρας, Νιγηρία, Ρουάντα, Σομαλία, Νότια Αφρική, Τανζανία, Ουγκάντα, Ζιμπάμπουε.



**Υπογλυκαιμική δράση:** Κλινικές εργαστηριακές μελέτες διεξήχθησαν σε διαβητικούς ασθενείς στο Κέντρο επιστημονικών Ερευνών Φυτικής Ιατρικής Centre for Scientific Research into Plant Medicine (CSRPM) προκειμένου να αξιολογηθεί η θεραπευτική και η πιθανή τοξική δράση του φυτού το οποίο χρησιμοποιείται από το (CSRPM) για τον έλεγχο του διαβήτη τύπου II. Τα επίπεδα της γλυκόζης και της τριακυλογλυκερόλης του πλάσματος χρησιμοποιήθηκαν ως θεραπευτικοί δείκτες. Ως ηπατοτοξικοί δείκτες χρησιμοποιήθηκαν οι πρωτεΐνες του ορού, η χολερυθρίνη, η χοληστερόλη, τα ένζυμα γ-γλουταμυλο τρανσφεράση, η αλκαλική φωσφατάση, και οι αμινοτρανσφεράσες. Ως δείκτες νεφροτοξικότητας χρησιμοποιήθηκαν τα επίπεδα της ουρίας του αίματος, η κρεατινίνη του ορού και η κάθαρση της κρεατινίνης, ενώ μετρήθηκαν και οι αιματολογικοί δείκτες. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων έδειξαν ότι η από του στόματος χορήγηση υδατικού εκχυλίσματος υπέργειων τμημάτων του φυτού *I.Arrecta* προκάλεσε αξιοσημείωτη μείωση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα, κατά τη διάρκεια των δυο πρώτων βδομάδων που μεσολάβησαν από τη λήψη του. Τα επίπεδα της τριακυλογλυκερόλης και της ασπαρτικής αμινοτρανσφεράσης (AST) μειώθηκαν σε σημαντικό βαθμό κατά την διάρκεια θεραπείας 12 εβδομάδων (Addy et al., 1988). Η ασπαρτική αμινοτρανσφεράση, είναι ένζυμο που βρίσκεται φυσιολογικά στον ορό και σε διάφορους ιστούς του σώματος, κυρίως στην καρδιά και στο ήπαρ. Απελευθερώνεται στον ορό σαν αποτέλεσμα της ιστικής καταστροφής, συνεπώς η συγκέντρωσή του σε αυτόν μπορεί να αυξηθεί στο έμφραγμα του μυοκαρδίου ή στην οξεία καταστροφή των ηπατοκυττάρων. Η σημαντική ελάττωση της κρεατινίνης του πλάσματος η οποία συνοδεύτηκε από μείωση του

ρυθμού κάθαρσης της κρεατινίνης έδειξε ότι ο μηχανισμός δράσης του φυτικού εκχυλίσματος δεν σχετίζεται πρωταρχικά με την μείωση της γλυκόζης του αίματος αλλά με το γεγονός ότι η *I.Arrecta* είναι ινσουλινοτροπικός παράγοντας που απαιτεί λειτουργικά β κύτταρα για να εμφανίσει φαρμακολογική δράση (Addy et al., 1992). Το εκχύλισμα χορηγήθηκε σε υγιείς κατοίκους της Γκάνα που υποβλήθηκαν σε προκαταρκτικές εξετάσεις προ και μετά την χορήγηση του εκχυλίσματος. Μετρήθηκαν η αρτηριακή και η συστολική πίεση, η επίδραση του εκχυλίσματος στα επίπεδα της γλυκόζης του αίματος κατά τη διάρκεια της νηστείας, διάφοροι αιματολογικοί δείκτες, καθώς και η ηπατική και νεφρική λειτουργία. Τέλος μετρήθηκε ο όγκος των ούρων και η συγκέντρωση της κρεατινίνης. Μολονότι η χορήγηση του εκχυλίσματος δεν προκάλεσε αλλαγή στα παραπάνω, εντούτοις προκάλεσε την κατακρήμνιση ερυθροκυττάρων και την ελάττωση των λεμφοκυττάρων στο αίμα. Το γεγονός αυτό καταδεικνύει ότι το εκχύλισμα της *I.Arrecta* μπορεί να μην προκαλεί τοξικές παράπλευρες αντιδράσεις όμως υπάρχουν ενδείξεις ότι μπορεί να επηρεάσει το ανοσοποιητικό σύστημα (Sittie et al., 1988).

**Αντιβακτηριακή δράση:** Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι μικροοργανισμοί *Bacillus cereus*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhi*, *Serratia marcescens*, και *Escherichia coli*. Το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα ανέστειλε την ανάπτυξη της *Escherichia coli* και του *Serratia marcescens* ενώ τα εκχύλισματα του εξανίου και της βουτανόλης ανέστειλαν το *Bacillus cereus*. Το υδατικό εκχύλισμα ανέστειλε την ανάπτυξη των *Salmonella typhi*, *Bacillus cereus* και *Escherichia coli*. (Ngule et al., 2014). Στη παραδοσιακή θεραπευτική το φυτό χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση της φυματίωσης (Madikizela et al., 2013). Το αιθανολικό εκχύλισμα των φύλλων του *I. Arrecta* κατέδειξε ισχυρή ανασταλτική δράση απέναντι στους μικροοργανισμούς *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, και το *Mycobacterium aurum A+* που είναι υπεύθυνοι για την εμφάνιση αναπνευστικών λοιμώξεων. Άλλες χρήσεις της παραδοσιακής θεραπευτικής είναι η αντιμετώπιση της ελονοσίας (Stangeland et al., 2011) και των στομαχικών διαταραχών (Muthee et al., 2011).

## ■ *Indigofera aspalathoides* (Wiry Indigo)

**Γεωγραφική κατανομή:** Ινδία



**Αντιφλεγμονώδης δράση:** Το φυτό *I. aspalathoides* έχει μελετηθεί από παλιά για την αντιφλεγμονώδη του δράση (Amala et al., 1982). Το αλκοολικό εκχύλισμα αναστέλλει το οίδημα που προκαλεί η καραγενίνη στο πέλμα επίμοις, ενώ φαίνεται να είναι αποτελεσματικό ακόμη και στο αλλεργικό κοκκίωμα (Rajkaroor et al., 2003). Από το χλωροφορμιακό κλάσμα του φυτού απομονώθηκε ένα πτεροκαρπάνιο, το ινδικοκαρπάνιο και ένα γνωστό ισοφλαβάνιο η μουκρονουλατόλη. Το ινδικοκαρπάνιο έδειξε σημαντική ανασταλτική δράση έναντι της COX-1 και η *in vivo* αντιφλεγμονώδης δράση φάνηκε να είναι ανάλογη της ιβουπροφαίνης (Selvam et al., 2004). Το αιθανολικό εκχύλισμα μελετήθηκε ως προς την αντιφλεγμονώδη δράση η οποία βρέθηκε να είναι ισχυρότερη σε σχέση με τη δράση της ινδομεθακίνης στην αντιμετώπιση του επαγόμενου από καραγενίνη οιδήματος του ποδιού επίμοις (Boorala et al., 2013).

**Αντικαρκινική δράση:** Μετά από *in vivo* ενδοπεριτοναϊκή ένεση αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *I. aspalathoides* σε ελβετικούς ποντικούς Albino παρατηρήθηκε παράταση της ζωής τους. Αξιοσημείωτη ήταν η μείωση των καρκινικών κυττάρων, και η ελάττωση του βάρους των ποντικών οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι το φυτό έχει προστατευτική δράση έναντι του ασκητικού λεμφώματος του Dalton (Christina et al., 2003). *In vivo* πειράματα σε ποντικούς που έπασχαν από το λέμφωμα του Ehrlich έδειξε ότι η από του στόματος χορήγηση αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού είναι ικανή να παρατείνει την διάρκεια ζωής και να αυξήσει τον αριθμό των φυσιολογικών περιτοναϊκών κυττάρων. Οι αιματολογικοί παράγοντες, οι πρωτεΐνες και ο όγκος των αιμοσφαιρίων του αίματος που διαταράχθηκαν μετά από την πρόκληση του όγκου, επανήλθαν στα φυσιολογικά επίπεδα. Ο όγκος των καρκινικών κυττάρων μειώθηκε αισθητά γεγονός που αποτελεί σοβαρή ένδειξη της αξιοσημείωτης αντικαρκινικής δράσης του αιθανολικού εκχυλίσματος (Rajkaroor et al., 2004). Η από του στόματος χορήγηση του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *I. aspalathoides* ανέστειλε αποτελεσματικά την επέκταση του όγκου που προκλήθηκε μετά από χορήγηση

νιτροζοδιαιθυλαμίνης σε ποντίκια, όπως φάνηκε από την μείωση των επιπέδων της πυροσταφυλικής τρανσαμινάσης του γλουταμινικού οξέος (SGPT) του ορού, της οξαλοξικής τρανσαμινάσης του γλουταμινικού οξέος (SGOT) στον ορό, της αλκαλικής φωσφατάσης (ALP), της ολικής χολερυθρίνης, της τρανσπεπτιδάσης του γ-γλουταμινικού οξέος (GGTP), της λιπιδικής υπεροξειδάσης (LPO), της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (Gpx) και της S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST). Σημειώθηκε επίσης ταυτόχρονη αύξηση των επιπέδων των αντιοξειδωτικών ενζύμων υπεροξειδική δισμουτάση και καταλάση (Rajkaroor et al., 2005). Από το κλάσμα του οξικού αιθυλεστέρα που προήλθε από το αλκοολικό εκχύλισμα του βλαστού του φυτού απομονώθηκε ο 7-O-ραμνοζίτης της 5,4'-διυδροξυ 6,8-διμεθοξυφλαβόνης (Rajkaroor et al., 2007). Η ένωση αυτή ελέγχθηκε για την κυτοτοξική της δράση έναντι σε 57 ανθρώπινα καρκινικά στελέχη αντιπροσωπευτικά της λευχαιμίας, του καρκίνου του πνεύμονα, του εντέρου, του κεντρικού νευρικού συστήματος, των μελανωμάτων, και των όγκων του προστάτη, των ωοθηκών, και του μαστού. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η φλαβόνη έχει κυτταροτοξική δράση έναντι ανθρωπίνων καρκινικών κυτταρικών σειρών (Balasubramanian et al., 2007). Το αιθανολικό εκχύλισμα της *I. aspalathoides* βρέθηκε ότι ασκεί χημειοπροστατευτικό ρόλο σε καρκίνωμα προκληθέν από 7,12-διμεθυλβενζοανθρακένιο (DMBA). Η χορήγηση του αιθανολικού εκχυλίσματος οδήγησε σε μείωση των επιπέδων των ενζύμων της ηπατικής φάσης I σε σχέση με τα επίπεδα των ενζύμων της ηπατικής φάσης II, γεγονός που μπορεί να εξηγήσει την εμφάνιση της προστατευτικής δράσης (Abraham et al., 2010). Το υδατοαλκοολικό εκχύλισμα του φυτού μελετήθηκε ως προς την χημειοπροστατευτική του δράση έπειτα από επαγόμενη καρκινογένεση προκληθείσα από 20-μεθυλοχολανθρένιο σε ποντίκια. Στην περίπτωση αυτή βρέθηκε ότι μπορεί να μειώσει τις επιπτώσεις του σαρκώματος. Οι αιματολογικές παράμετροι αιμοσφαιρίνη (Hb), λευκά αιμοσφαίρια (WBC), ερυθρά αιμοσφαίρια (RBC), καθώς και οι βιοχημικές παράμετροι λιπιδική υπεροξειδάση, ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), θείο-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST), υπεροξειδοδισμουτάση (SOD), και καταλάση (CAT) αποκαταστάθηκαν στα φυσιολογικά επίπεδα, γεγονός που αποδεικνύει την χημειοπροστατευτική δράση του εκχυλίσματος. Η ανωτέρω δράση αποδίδεται στις αντιοξειδωτικές και αποτοξινωτικές ιδιότητες που παρουσιάζει το εκχύλισμα (Halder et al., 2010). Ακόμη, το υδατικό εκχύλισμα του φυτού χορηγήθηκε σε ποντίκια albino που έπασχαν από ινωδοσάρκωμα και παρατηρήθηκε ελάτπωση του όγκου ενώ παράλληλα εκτιμήθηκε πως η ρύθμιση των επιπέδων του κυτοχρώματος C στο ήπαρ και στα νεφρά, του κυτοχρώματος P450 και του κυτοχρώματος b5 στα ηπατικά μικροσωμάτια, παίζει σημαντικό ρόλο στην θεραπευτική αποτελεσματικότητα του φυτού *I. aspalathoides* κατά του ινωδοσαρκώματος. Εξίσου σημαντική είναι και η ρύθμιση των επιπέδων των βιομετατρεπτικών



ενζύμων της φάσης I, δηλαδή του NADPH-κυτοχρώματος P450, του NADPH-κυτοχρώματος b5, της υδροξυλάσης της ανιλίνης αλλά και των ενζύμων της φάσης II, όπως η θειο-τρανσφεράση της γλουταθειόνης και η UDP-γλουκουρονυλ τρανσφεράση (Kumar et al., 2010). Το υδατικό εκχύλισμα του φυτού ανέστειλε αποτελεσματικά το ινωδοσάρκωμα που προκλήθηκε από το χημικό καρκινογόνο 20-μεθυλοχολανθραίνιο. Τα επίπεδα της ουρίας, του ουρικού οξέος και της κρεατινίνης, και των λισσωματικών ενζύμων όπως η N-ακετυλο-β-D-γλουκουρονιδάση και τα επίπεδα των γλυκονεογενετικών ενζύμων όπως η 6-φωσφατάση της γλυκόζης και φρουκτόζης, η 1,6-διφωσφατάση μεταβλήθηκαν χαρακτηριστικά. Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύουν την άποψη ότι το εκχύλισμα εμφανίζει αντινεοπλασματική δράση έναντι του συγκεκριμένου είδους ινωδοσαρκώματος (Selva et al., 2011). Σε μια πιο πρόσφατη έρευνα εκτιμήθηκαν τα επίπεδα της λιπιδικής υπεροξειδωσής και των μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών όπως η ανηγμένη γλουταθειόνη, η βιταμίνη C, η βιταμίνη E, οι ολικές θειόλες στο ήπαρ και στα νεφρά. Τα παραπάνω εμφάνισαν χαρακτηριστικές μεταβολές, γεγονός που αποδεικνύει την αντινεοπλασματική δράση του εκχυλίσματος απέναντι στο επαγόμενο ινωδοσάρκωμα το οποίο προκλήθηκε σε αρσενικούς albino επίμους μετά από χορήγηση 20-μεθυλοχολανθραίνιου (Kumar, et al., 2011). Το αιθανολικό εκχύλισμα της ρίζας του φυτού *I. aspalathoides* εμφανίζει προστατευτική δράση στην ηπατοκυτταρική καρκινογένεση που προκαλείται από χορήγηση N-νιτροζοδιαιθυλαμίνης στους επίμους. Η χορήγηση του εκχυλίσματος για τρεις εβδομάδες παρουσίασε σαφή βελτίωση της ιστικής βλάβης του ήπατος. Οι πλασματικοί δείκτες ιστικής βλάβης του ήπατος όπως η αμινοτρανσφεράση του ασπαρτικού οξέος, η αλκαλική φωσφατάση και η ολική χολερυθρίνη μειώθηκαν αισθητά. Η προστατευτική δράση του εκχυλίσματος επιβεβαιώθηκε από το γεγονός ότι τα υψηλά ποσοστά των πρωτεϊνών του πλάσματος επανήλθαν στις φυσιολογικές τιμές γεγονός που αποδείχτηκε από ηλεκτροφόρηση με γέλη N-δωδεκυλ-S-πολυακρυλαμιδίου. Ιστολογικές μελέτες έδειξαν καθαρά τη μείωση του όγκου (Clamer et al., 2012). Τα παραπάνω επιβεβαιώθηκαν με επιπλέον μελέτες όπου σημειώθηκε βελτίωση σε παραμέτρους όπως το βάρος των επίμους, το βάρος του ήπατος και των νεφρών, το βάρος του όγκου, ο μέσος όρος ζωής, η βελτίωση της συμπεριφοράς, τα επίπεδα στο αίμα της γλυκόζης, του γλυκογόνου και των ενζυμικών δεικτών όπως η αμινοτρανσφεράση της αλανίνης (ALT), η ασπαρτική αμινοτρανσφεράση (AST), η αλκαλική φωσφατάση (ALP), η οξική φωσφατάση (ACP) και η 5'-νουκλεοτιδάση (5'-NT) στο πλάσμα. Βελτίωση σημειώθηκε στα επίπεδα της ολικής χοληστερόλης, των φωσφολιπιδίων, και των ελεύθερων λιπαρών οξέων στα νεφρά και στο ήπαρ (Kumar et al., 2011). Ο 5-O-β-D-γλυκοκυρανοζίτης της καιμφορόλης που απομονώθηκε από το μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού μελετήθηκε ως προς την ανοσοτροποποιητική του δράση σε albino ποντίκια τα οποία



υποβλήθηκαν σε επαγόμενη μυελοκαταστολή με κυκλοφωσφαμίδιο. Η χορήγηση του έδειξε σημαντική αύξηση του φαγοκυταρικού δείκτη και ιδιαίτερη προστασία έναντι στην επαγόμενη από το κυκλοφωσφαμίδιο ουδετεροπενία. Παρατηρήθηκε επίσης δοσοεξαρτώμενη αύξηση στην παραγωγή T λεμφοκυττάρων (CD3 και CD19) και Th 1 κυτοκινών (IL-2, IFN- $\gamma$  και IL-4) (Swarnalatha et al.,2015).

**Αντιαρθρική δράση:** Το αιθανολικό εκχύλισμα εξετάστηκε ως προς την ικανότητα εμφάνισης αντιαρθρικής δράσης στην επαγόμενη από ανοσοενισχυτικό του Freund αρθρίτιδα σε αρουραίους στους οποίους στη συνέχεια μετρήθηκαν παράμετροι όπως η ασπαρτική τρανσαμινάση του ορού (AST), η αμινοτρανσφεράση της αλανίνης (ALT), η αλκαλική φωσφατάση (ALP), η ολική χολιστερόλη και τα τριγλυκαιρίδια. Μετρήθηκαν αντιοξειδωτικά ένζυμα όπως η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) και η λιπιδική υπεροξειδάση (LPO) στο ήπαρ και στα νεφρά φυσιολογικών, αρθρικών αρουραίων και αρουραίων που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με το αιθανολικό εκχύλισμα. Η από του στόματος χορήγηση του εκχυλίσματος βρέθηκε ότι αναστέλλει ικανοποιητικά το οίδημα του ποδιού στα αρθρικά ποντίκια με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Το αιθανολικό εκχύλισμα προκάλεσε σημαντική αλλαγή στα επίπεδα της (LPO), (SOD), της καταλάσης και της GPx όταν έγινε σύγκριση τους με την πρότυπη ένωση αναφοράς, επιβεβαιώνοντας την αντιαρθρική του δράση (Rajkaroor et al., 2009).

**Υπογλυκαιμική δράση:** Η υπογλυκαιμική δράση του υδατικού εκχυλίσματος μελετήθηκε έπειτα από χορήγησή του σε ποντίκια με φυσιολογικά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα και σε διαβητικά ποντίκια με διαβήτη επαγόμενο από τη χορήγηση του νικοτιναμιδίου της στρεπτοζοτοσίνης (STZ). Η χορήγηση του εκχυλίσματος σε φυσιολογικά ποντίκια επέφερε αξιοσημείωτη ποσοστιαία μείωση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα (Rajendran et al., 2013).

### *Indigofera endecaphylla*

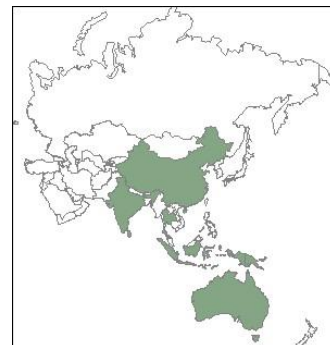
**Γεωγραφική κατανομή:** Ταιβάν, Χαβάη

Το ιπταγενικό οξύ, η πρώτη ουσία που απομονώθηκε από το φυτό, χαρακτηρίστηκε από την υψηλή τοξικότητά της που οδηγούσε σε θάνατο κοπάδια που βοσκούνταν στη Χαβάη (Morris et al.,1954). Ακόμη βρέθηκε ότι το φυτό περιέχει ένα υψηλό ποσοστό αζωτούχων ενώσεων εκ των οποίων το  $\beta$ -νιτροπροπανοϊκό οξύ εμφάνιζε υψηλή τοξικότητα (Cooke 1955). Η βρώση του προκαλούσε ηπατοτοξικότητα σε αιγοπρόβατα, αγελάδες και λαγούς και οδηγούσε σε αποβολές κυημάτων εγκύων ζώων (Hegarty and Pound, 1968). Οι Hutton et al., 1958, παρατήρησαν ότι τα φύλλα και οι σπόροι ήταν ηπατοτοξικοί σε κουνέλια και ποντίκια και ότι το

$\beta$ -νιτροπροπανοϊκό οξύ που συναντάται μόνο στα φύλλα ευθύνονταν για την εμφάνιση της ηπατοτοξικότητας σε πουλερικά .Η ινδοσπικίνη (2-άμινο-6-αμιδινο-εξανοϊκό οξύ) ένα ακόμη συστατικό που απομονώθηκε από τα σπέρματα του φυτού, είναι ένα αμινοξύ με ηπατοτοξική και τερατογόνο δράση (Miller et., 1973). Σε μια μελέτη που έγινε από τους (Alston et al.,1977) βρέθηκε ότι το 3-νιτροπροπανοϊκό οξύ, ένα ισοηλεκτρικό ανάλογο του ηλεκτρικού οξέος, δρα ως απενεργοποιητής αυτοκτονίας της ηλεκτρικής δεϋδρογονάσης. Κατά την οξειδωση του ηλεκτρικού οξέος στα μιτοχόνδρια του ποντικού, παρουσία του καρβανιόντος του 3-νιτροπροπανοϊκού οξέος ο ρυθμός κατανάλωσης του οξυγόνου τείνει εκθετικά στο μηδέν. Η σταθερά της ενζυμικής αντίδρασης είναι πρώτης τάξης και η αναστολή του ενζύμου μη αναστρέψιμη. Ο αναστολέας του ενζύμου, το καρβανιόν του 3-νιτροπροπανοϊκού οξέος εμφανίζει υψηλή εκλεκτικότητα και έχει ως αποτέλεσμα την πρόκληση χρόνο-εξαρτώμενης μη αναστρέψιμης αναστολής της ηλεκτρικής δεϋδρογονάσης. Ο μηχανισμός αναστολής του ενζύμου εκείνη την εποχή δεν είχε διαλευκανθεί πλήρως λόγω των ελλειπών στοιχείων σχετικά με τη δομή του ενζύμου. Μια πρώτη υπόθεση ήθελε το καρβανιόν να σχηματίζει ένα προϊόν προσθήκης μέσω ομοιοπολικού δεσμού με το N-5 στο ενεργό κέντρο της φλαβίνης. Επομένως η εμφάνιση της τοξικότητας στα θηλαστικά μπορεί να οφείλεται στη μη αντιστρεπτή αναστολή του κύκλου του Krebs από το καρβανιόν του 3-νιτροπροπανοϊκού οξέος. Από το εκχύλισμα των φύλλων και των βλαστών του φυτού απομονώθηκαν ενώσεις όπως το 3-νιτροπροπανοϊκό οξύ και οι ενδεκαφυλλίνες που είναι γλυκοζιπικοί πολυεστέρες του 3-νιτροπροπανοϊκού οξέος. (Finnegan et al., 1965).

#### ■ *Indigofera linnaei* (Birdsville Indigo)

**Γεωγραφική κατανομή:** Αυστραλία, Κίνα, Ινδία, Ινδονησία, Παπούα-Νέα Γουινέα, Σρι Λάνκα, Ταϊλάνδη



**Αντιοξειδωτική δράση:** Το μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού μελετήθηκε ως προς την ικανότητα σάρωσης ελευθέρων ριζών με την μέθοδο της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH, και της κατιονικής ABTS, την ικανότητα σάρωσης της ρίζας του υπεροξειδίου του υδρογόνου, του οξειδίου του αζώτου, της υπεροξειδικής ρίζας και της υδροξυλικής ρίζας. Το εκχύλισμα έδειξε ισχυρή δράση έναντι στην ικανότητα αναγωγής του σιδήρου. Η αντιοξειδωτική ικανότητα

συγκρίθηκε με γνωστές ενώσεις αναφοράς που εκδηλώνουν αντιοξειδωτική δράση όπως το ασκορβικό οξύ και η ρουτίνη. Βρέθηκε πως το εκχύλισμα είναι πλούσιο σε φαιολικά συστατικά και φλαβονοειδή και μάλιστα στην παρουσία αυτών των συστατικών οφείλεται και η αυξημένη αντιοξειδωτική δράση. Επομένως το εκχύλισμα του φυτού μπορεί να θεωρηθεί μια καλή πηγή αντιοξειδωτικών συστατικών με πιθανή θεραπευτική δράση (Kumar et al., 2011).

**Αντικαρκινική δράση:** Το μεθανολικό εκχύλισμα της *Indigofera linnaei* εξετάστηκε ως προς την *in vitro* τοξικότητα στις εξής καρκινικές σειρές ανθρωπίνων κυττάρων: α) HeLa (καρκίνωμα του τραχήλου της μήτρας), β) Hep-2 (καρκίνωμα του λάρυγγα), γ) HepG-2 (ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα), δ) MCF-7 (καρκίνωμα του μαστού), ε) HT-29 (αδενοκαρκίνωμα του εντέρου). Η από του στόματος χορήγηση του εκχυλίσματος σε ποντίκια, προκάλεσε δόσο-εξαρτώμενη αναστολή της ενδοπεριτοναϊκής αύξησης από ασκίτη λόγω του σαρκώματος του Ehrlich (EAC) και ασκίτη λόγω του λεμφώματος του Dalton (DLA). Επίσης οδήγησε σε αύξηση του μέσου όρου ζωής και είχε προστατευτική δράση του αιμοποιητικού συστήματος. (Kumar et al., 2011).

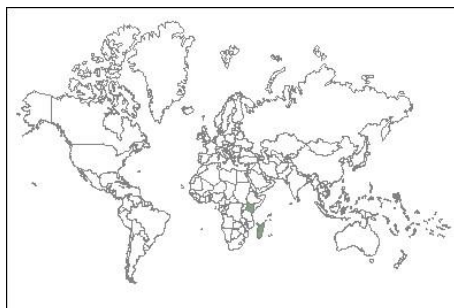
**Αντιφλεγμονώδη δράση:** Οι (Kumar et al., 2016), μελέτησαν τα ευεργετικά αποτελέσματα του μεθανολικού εκχυλίσματος ολόκληρου του φυτού κατά τη διάρκεια της φλεγμονώδους απόκρισης και της απόκρισης αλγαισθησίας σε τρωκτικά. Μελετήθηκε ταυτοχρόνως η *in vitro* αναστολή της ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου, της λιποξυγονάσης (LOX) και της κυκλοξυγονάσης (COX) και βρέθηκε να είναι δόσοεξαρτώμενη. Το εκχύλισμα εμφάνισε εκλεκτική αναστολή της COX-2. Έγινε σύγκριση των αποτελεσμάτων με το αναλγητικό ασεκλοφενάκη. Το μεθανολικό εκχύλισμα εμφάνισε αποτελεσματικότερη αναλγητική δράση σε σύγκριση με την ασπιρίνη που χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπη ένωση αναφοράς.

#### *Indigofera linifolia*

**Ηπατοπροστατευτική δράση:** Το εκχύλισμα του φυτού βρέθηκε ότι έχει ευεργετική επουλωτική δράση στον ηπατικό ιστό έπειτα από χορήγηση του σε albino ποντίκια που είχαν υποστεί ηπατική βλάβη με ταυτόχρονη αύξηση στον ορό της γλουταμινο οξαλοξικής τρανσαμινάσης (GOT), της γλουτάμινο πυροσταφυλικής τρανσαμινάσης (GPT) και της ενεργότητας της αλκαλικής φωσφατάσης (ALP) έπειτα από ενδοπεριτοναϊκή ένεση CCl<sub>4</sub> (Katewa and Arora 2001). Στη **παραδοσιακή θεραπευτική** το εκχύλισμα και το αφέψημα του φυτού με την χορήγησή από το στόμα χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση εμπύρετων καταστάσεων που συνοδεύονται από δερματικές αλλοιώσεις, ενώ τοπικά δρα ως επουλωτικό πληγών (Mahmood et al., 2013).

### ■ *Indigofera longiracemosa* (Manga)

**Γεωγραφική κατανομή:** Κένυα, Κομόρες,  
Μαδαγασκάρη.



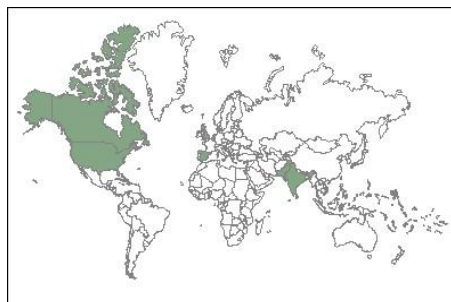
**Αντιελκωτική δράση:** Τα εκχυλίσματα πετρελαϊκού αιθέρα, βενζολίου, χλωροφορμίου, οξικού αιθυλεστέρα και μεθανόλης από τη ρίζα του φυτού εμφάνισαν αντιελκωτική δράση σε ποντίκια (Thangadurai and Viswanathan 2000).

**Αντιφυματική και αντιμικροβιακή δράση:** Από τους μίσχους των ανθέων απομονώθηκε το ινιγγοφεραβιετάνιο ένα νέο διτερπενικό αβιετάνιο το οποίο ελεγχθηκε ως προς την ικανότητα αναστολής του *Mycobacterium tuberculosis* και της *Candida albicans*. Τα αποτελέσματα ήταν αξιοσημείωτα ικανοποιητικά ενώ παρουσίασε και αντιμικροβιακή δράση κατά των στελεχών *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris* και *Escherichia coli* (Thangadurai et al., 2002). Τα εκχυλίσματα του πετρελαϊκού αιθέρα, του χλωροφορμίου και της αιθανόλης έδειξαν δόσοεξαρτώμενη αντιμικροβιακή δράση στα περισσότερα εξεταζόμενα βακτήρια. Οι μελέτες οδήγησαν στο συμπέρασμα πως από το φυτό μπορεί να προκύψει θεραπευτικό σκεύασμα για την καταπολέμηση λοιμωδών νοσημάτων (Premalatha et al., 2014).

Στην ινδική παραδοσιακή θεραπευτική η ρίζα του φυτού χρησιμοποιείται ως αντίδοτο στο δάγκωμα των φιδιών. Τα εκχυλίσματα της ρίζας του φυτού χορηγούνται για την αντιμετώπιση γαστρικού πυλωρο-εξαρτώμενου έλκους. Ο μηχανισμός της αντιελκωτικής δράσης ίσως να οφείλεται στη μείωση της έκκρισης HCl – πεψίνης ή στην αύξηση της έκκρισης της βλεννίνης, ενός βλεννοπολυσακχαρίτη που είναι κύριο συστατικό της βλέννης (Thangadurai et al., 2000).

### ■ *Indigofera heterantha* (Himalayan Indigo)

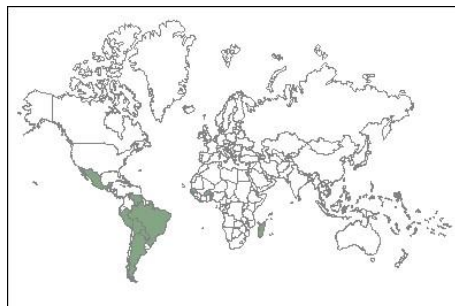
**Γεωγραφική κατανομή:** Βέλγιο, Ινδία, Ολλανδία,  
Πακιστάν, Ισπανία, Ηνωμένο Βασίλειο, Ηνωμένες  
Πολιτείες.



**Αντιμυκητιασική δράση:** Σε *in vitro* πειράματα δεν παρατηρήθηκε κάποια αντιβακτηριακή δράση του εξανικού εκχυλίσματος, του οξικού αιθυλεστέρα, και του υδατικού εκχυλίσματος έναντι των *Trichophyton longifusus*, *Candida albicans*, *Aspergillus flavus*, *Microsporum canis*, *Fusarium solani*, *Candida glabrata* εκτός του μεθανολικού εκχυλίσματος που έδειξε μια μέτρια δράση έναντι του *M. Canis*. Παρατηρήθηκε χαμηλή εντομοκτόνος δράση και μια μέτρια φυτοτοξικότητα (Ghiasuddin et al., 2011). Στην **παραδοσιακή θεραπευτική** του Πακιστάν το φυτό και συγκεκριμένα το εκχύλισμα της ρίζας χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση αλλεργιών του δέρματος, δυσεντερίας, κονδυλωμάτων, λέπρας και ως αντικαρκινική αγωγή (Kayani et al., 2015).

#### ■ *Indigofera microcarpa* (Tsilavondrivotra)

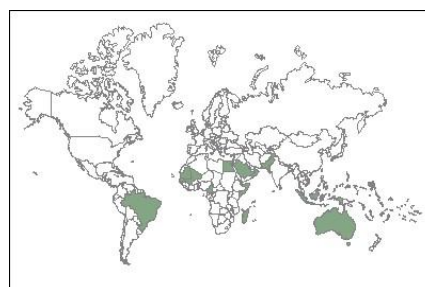
**Γεωγραφική κατανομή:** Αργεντινή, Μπενίν, Βολιβία, Βραζιλία, Μπουρκίνα Φάσο, Κούβα, Δομινικανή Δημοκρατία, Γαλλική Γουιάνα, Μαδαγασκάρη, Μέξικο, Παραγουάη, Περού, Σενεγάλη, Βενεζουέλα



**Αντιμικροβιακή δράση:** Έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία ότι το μεθανολικό εκχύλισμα των φύλλων του φυτού παρουσιάζει έντονη αντιμικροβιακή δράση η οποία σχετίζεται με τα βενζοφουράνια (3-αρυλ-3-μεθυλο βενζοφουράνια) που απαντούν στο φυτό (De Moraes et al., 1991). Η φαρμακογνωστική μελέτη της ανατομίας των φύλλων, των ανθέων και των ριζών, καθώς και η φυτοχημική μελέτη φανερώνει την ύπαρξη φαινολών, ταννινών, φλαβονονών, στεροειδών, τερπενοειδών, σαπωνινών και αλάτων (De Lima et al., 2003). Το αιθέριο έλαιο των φύλλων του φυτού περιέχει β-βουρβονένιο, β-καρσοφυλλένιο, α-χουμουλένιο, α-σελινένιο, δ-καδινένιο, D-4-γερμακρεν-όλη, οξειδίο του καρσοφυλλενίου, εποξειδίο II του χουμουλενίου και (E)-σεσκιλαβανδουλόλη (Arriaga et al., 2008).

#### ■ *Indigofera oblongifolia* (Ingitrala)

**Γεωγραφική κατανομή:** Αυστραλία, Βραζιλία, Καμερούν, Αίγυπτος, Ινδονησία, Μαδαγασκάρη, Μάλι, Μαυριτανία, Ομάν, Πακιστάν, Σαουδική Αραβία, Σενεγάλη, Σομαλία.



**Αντιβακτηριακή δράση:** Το υδατικό εκχύλισμα των φύλλων του φυτού παρουσιάζει αξιοσημείωτη αντιβακτηριακή δράση έναντι των gram (+) και των gram (-) βακτηριδίων. Η παρουσία μικρών πεπτιδίων και πρωτεϊνών που απομονώθηκαν από τα φύλλα του φυτού έδειξαν αντιβακτηριακή δράση έναντι των *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Kl. pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* και *Bacillus subtilis* καθώς και μέτρια αντιμυκητιασική δράση έναντι στους *A. niger*, *A. fumigatus* and *A. flavus* (Dahot, 1999).

**Ηπατοπροστατευτική δράση:** Μελετήθηκε η ικανότητα του εκχυλίσματος ως προς την ηπατοπροστασία επίμυων στους οποίους προκλήθηκε ηπατοτοξικότητα μετά τη χορήγηση CCl<sub>4</sub>. Ο CCl<sub>4</sub> δρα ως παράγοντας επαγωγής ηπατοτοξικότητας και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της δραστηριότητας της ασπαρτικής αμινοτρανσφεράσης, της αλκαλικής φωσφατάσης και της γαλακτικής δεϋδρογονάσης στο πλάσμα των επίμυων. Οι επίμυες παρουσίασαν σημαντική αύξηση στα επίπεδα της γλουταθιόνης (GSH) και μείωση της δράσης της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD), της καταλάσης (CAT), και της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GSx). Η προστατευτική δράση της *I.oblongifolia* ήταν εμφανής από τη μείωση των σηματοδοτικών ενζύμων στο πλάσμα την διατήρηση της αντιοξειδωτικής κατάστασης στο ήπαρ, τα μειωμένα επίπεδα των TBARS, την αύξηση των επιπέδων της GSH καθώς και την αυξημένη δράση των SOD, CAT και GPx (Shahjahan et al., 2005).

**Αντιφλεγμονώδης δράση:** Η ιντιγκίνη, ένα αλκυλιωμένο ξανθένιο και το ιντιγκοφερικό οξύ τα οποία απομονώθηκαν για πρώτη φορά σε αυτό το είδος έδειξαν να έχουν αξιοσημείωτη ανασταλτική δράση έναντι του ενζύμου λιποξυγονάση, ενώ το ιντιγκοφερικό οξύ έδειξε ανασταλτική δράση έναντι της βουτυρυλο χολυνεστεράσης BChE η οποία βρίσκεται σε αυξημένες συγκεντρώσεις στις αμυλοειδείς πλάκες κατά τη νόσο του Alzheimer (Sharif, et al., 2005). Μελετήθηκε επίσης η αντιφλεγμονώδης δράση του μεθανολικού εκχυλίσματος των ριζών του φυτού σε επίμυες στους οποίους είχε προκληθεί οίδημα μετά από χορήγηση καραγενίνης. Το οίδημα μειώθηκε κατά 32-40% κατά την από του στόματος χορήγηση του εκχυλίσματος (Urwar et al., 2011).

**Ανθελονοσιακή δράση:** Παρότι τα φύλλα του φυτού βρίσκουν εφαρμογή στην παραδοσιακή θεραπευτική της Σαουδικής Αραβίας για την αντιμετώπιση της ελονοσίας, δεν έχουν γίνει εργαστηριακές μελέτες όσον αφορά την αποτελεσματικότητα και την πιθανή τοξικολογική δράση του φυτού. Όμως η μελέτη που διεξήχθη από τους (Dkhil. et al., 2015) επικεντρώθηκε στην ανθελονοσιακή δράση και στην προστατευτική δράση του σπλήνα των ποντικών των οποίων τα ερυθρά αιμοσφαίρια είχαν προσβληθεί από το *Plasmodium chabaudi*. Βρέθηκε αυξημένη ικανότητα αναστολής της παρασιταϊμίας με ταυτόχρονη ανάπτυξη του σπληνικού

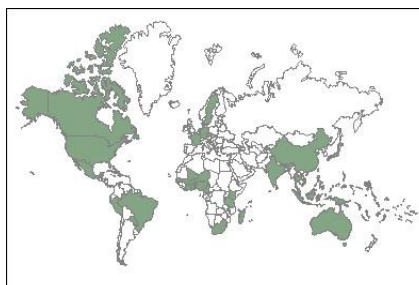
επιθήλιου και μείωση των επιπέδων των αποπτωτικών κυττάρων. Το εκχύλισμα είχε την ικανότητα να επιδράσει στην έκφραση των γονιδίων στα προσβεβλημένα σπληνικά επιθηλιακά κύτταρα. Κατά την έβδομη μέρα της προσβολής παρατηρήθηκε έκφραση γονιδίων Ccl8, Saa3, Cd209a και Cd209b, γεγονός που αποδεικνύει την προστατευτική δράση στο σπληνικό επιθήλιο, έπειτα από προσβολή του οργανισμού από το *Plasmodium chabaudi*. Η προσβολή του ποντικού από το πλασμώδιο αυτό οδήγησε σε οξειδωτικό stress με διαταραχή των επιπέδων των νιτροδών/νιτρικών, της μηλονικής αλδεΐδης και της καταλάσης, αποδιοργάνωση του λευκού και ερυθρού πολφού και εμφάνιση κοκκίων αιμοσιδηρίνης (hemozoin). Παράλληλα ενισχύθηκε η γονιδιακή έκφραση των κυτοκινών, της ιντερλευκίνης-1β, ιντερλευκίνης-6, και του TNF-α. Το εκχύλισμα του φυτού μείωσε ενεργά την έκφραση αυτών των γονιδίων (Lubbad et al., 2015).

**Αντιοξειδωτική δράση:** Σε πρόσφατη έρευνα από τους (Dkhill et al., 2016) έχει βρεθεί ότι το εκχύλισμα του φυτού προλαμβάνει το επαγόμενο οξειδωτικό stress και την απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων των όρχεων που προκαλείται από δηλητηρίαση από μόλυβδο. Ο μόλυβδος είναι γνωστό ότι προκαλεί τη γένεση ελευθέρων ριζών οι οποίες εξαντλούν τα αποθέματα αντιοξειδωτικών του οργανισμού με αποτέλεσμα την εμφάνιση ιστικής βλάβης. Η χορήγηση μολύβδου σε ποντίκια είχε ως αποτέλεσμα την σημαντική ελάττωση του σωματικού τους βάρους και του βάρους των όρχεων τους. Επιπλέον σημειώθηκε αύξηση της λιπιδικής υπεροξειδωσίας και των επιπέδων της ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου καθώς και εξάντληση των αποθεμάτων της γλουταθειόνης. Η χορήγηση του εκχυλίσματος επανέφερε τις παραμέτρους κοντά στα φυσιολογικά επίπεδα. Η ίδια χορήγηση πριν από την επαγωγή της δηλητηρίασης με μόλυβδο, μείωσε αισθητά της τοξικολογικές επιπτώσεις του μολύβδου όπως γίνεται αντιληπτό από την ενίσχυση της έκφρασης της κασπάσης-3 και της πρωτεΐνης Bax. Επομένως το εκχύλισμα του φυτού αποτελεί ελπιδοφόρο παράγοντα προστασίας από το οξειδωτικό stress και την απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων των όρχεων που προκαλείται κατά την επαγόμενη δηλητηρίαση από μόλυβδο σε ποντίκια. Στην περίπτωση επαγόμενης νεφροτοξικότητας με οξικό μόλυβδο σε ποντίκια, το αποτέλεσμα ήταν παρόμοιο, με αύξηση της λιπιδικής υπεροξειδωσίας, διατάραξη των επιπέδων νιτροδών/νιτρικών, εξάντληση των αποθεμάτων της γλουταθειόνης, διατάραξη του οξειδοαναγωγικού δυναμικού και ιστολογικές αλλοιώσεις στα νεφρά. Η χορήγηση του μεθανολικού εκχυλίσματος οδήγησε σε επαναφορά των παθολογικών καταστάσεων κοντά στα φυσιολογικά επίπεδα (Dkhill et al., 2016b). Έχει αναφερθεί επίσης ότι τα φύλλα του φυτού βρίσκουν εφαρμογή στην **παραδοσιακή θεραπευτική** για την αντιμετώπιση των φλεγμονωδών καταστάσεων του ουροποιητικού

συστήματος και την ουρολιθίαση. Επίσης χρησιμοποιείται ως αντιβηχικό και στις φλεγμονές του δέρματος (Ali et al., 2001).

### ■ *Indigofera tinctoria* (East Asian Indigo Plant)

**Γεωγραφική κατανομή:** Αντίλλες, Αυστραλία, Μπελίζε, Μπενίν, Βραζιλία, Μπουρκίνα Φάσο, Καμερούν, Κίνα, Κομόρες, Κόστα Ρίκα, Ακτή Ελεφαντοστού, Κούβα, Τσεχία, Δομινικανή Δημοκρατία, Ελ Σαλβαδόρ, Γαλλία, Γερμανία, Γκάνα, Ινδία, Ινδονησία, Τζαμάικα, Ιαπωνία, Κένυα, Μαδαγασκάρη, Μαλαισία, Μάλι, Μαυρίκιος, Μέξικο, Ολλανδία, Ολλανδικές Αντίλλες, Νίγηρας, Νιγηρία, Παπούα- Νέα Γουινέα, Παραγουάη, Περού, Φιλιππίνες, Σενεγάλη, Νότια Αφρική, Σρι Λάνκα, Σουηδία, Τανζανία, Ταϊλάνδη, Τόγκο, ΗΠΑ.



**Ηπατοπροστατευτική δράση:** Τα πρώτα άρθρα που δημοσιεύτηκαν σχετικά με το φυτό, αναφέρουν την προστατευτική δράση του αλκοολικού εκχυλίσματός του έναντι στην επαγόμενη καταστροφή ήπατος σε ποντίκια (Anand et al., 1979). Ιστολογικές μελέτες που ακολούθησαν την επαγόμενη από τετραχλωράνθρακα ηπατοτοξικότητα, οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι το εκχύλισμα του φυτού ασκεί ηπατοπροστατευτική δράση (Anand et al., 1981). Το εκχύλισμα χορηγήθηκε σε ποντίκια που έπασχαν από επαγόμενη ηπατική βλάβη από D-γαλακτοζαμίνη και τετραχλωράνθρακα. Παρόλο που σημειώθηκε απώλεια των LDH λιποπρωτεϊνών, μείωση στα επίπεδα της ουρίας και ελάττωση στην έκκριση της χολής, ωστόσο η χορήγηση του εκχυλίσματος οδήγησε σε βελτίωση αυτών των αρνητικών επιπτώσεων επιβεβαιώνοντας έτσι την ηπατοπροστατευτική του δράση (Sreepriya et al., 2001). Ακόμη, μελετήθηκε η επίδραση της χορήγησης του εκχυλίσματος του φυτού *Indigofera tinctoria* στην αντιοξειδωτική αμυντική ικανότητα του ήπατος αρσενικών albino ποντικών όταν αυτά είχαν προσβληθεί από οξεία επαγόμενη από γαλακτοσαμίνη/ενδοτοξίνη LPS ηπατίτιδα. Είχε προηγηθεί μελέτη της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως η υπεροξειδική δισμουτάση, η καταλάση, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, και η S τρανφεράση της γλουταθειόνης καθώς επίσης και τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης στο ήπαρ ενός φυσιολογικού ποντικού. Μελετήθηκαν επίσης τα επίπεδα των μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών όπως είναι η κερουλοπλασμίνη, ο σίδηρος και η φερριτίνη. Δεδομένου ότι η λιπιδική υπεροξειδωση είναι στενά συνυφασμένη με την επαγόμενη ηπατοτοξικότητα, μετρήθηκαν τα επίπεδα της λιπιδικής υπεροξειδάσης και χρησιμοποιήθηκαν ως δείκτης οξειδωτικού στρες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ηπατική βλάβη εκδηλώθηκε με αξιοσημείωτη μείωση της



δραστικότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων, μείωση των επιπέδων της γλουταθειόνης και αύξηση των επιπέδων των λιπιδικών υπεροξειδασών. Η χορήγηση του εκχυλίσματος της *Indigofera tinctoria* έδειξε αυξημένη δυνατότητα ηπατοπροστασίας από το επαγόμενο οξειδωτικό στρες με ταυτόχρονη αύξηση των επιπέδων των αντιοξειδωτικών ενζύμων και παράλληλη μείωση των λιπιδικών υπεροξειδασών (Malarvannan et al., 2003). Το εκχύλισμα των σπόρων του φυτού παρουσίασε ινωδολυτική δράση στο ανθρώπινο ινωδογόνο (Gurta et al., 1982). Από το εκχύλισμα του πετρελαϊκού αιθέρα των υπέργειων τμημάτων του φυτού, απομονώθηκε ένα βιοενεργό κλάσμα η ινιγκτόνη το οποίο παρουσίασε σημαντική δόσοεξαρτώμενη ηπατοπροστατευτική δράση έναντι στην επαγόμενη από CCl<sub>4</sub> νέκρωση του ιστού του ήπατος σε ποντίκια (Singh et al., 2001). Η αντιοξειδωτική κατάσταση του ήπατος των ποντικών που προσβλήθηκε από CCl<sub>4</sub> βελτιώθηκε με την χορήγηση του εκχυλίσματος (Niraiikulam et al., 2009). Τα επίπεδα των τρανσαμινασών, αλκαλικών φωσφατασών και της γαλακτικής δεϋδρογονάσης απέδειξαν την προστατευτική δράση που ασκεί το εκχύλισμα στο ήπαρ (Niraiikulam et al., 2010). Περαιτέρω έρευνα του εκχυλίσματος έφερε στο φως την ύπαρξη του trans-τετρακισ-15-ενοϊκού οξέος (TCA), συστατικού του βιοενεργού κλάσματος της ινιγκτόνης. Η ένωση αυτή παρουσίασε σημαντική ηπατοπροστατευτική δράση έναντι στην επαγόμενη από CCl<sub>4</sub> και παρακεταμόλη ηπατοτοξικότητα σε ποντίκια. (Singh et al., 2006).

**Ανθελμινθική δράση:** Τα ροτενοειδή που περιέχονται στο φυτό εμφάνισαν προστατευτική δράση κατά του Δρακοντίου γένους νηματωδών σκωλήκων που είναι ευρέως διαδεδομένο στην Ινδία, στην Αφρική και στην αραβική χερσόνησο και αποικίζει τους υποδόριους και μυϊκούς ιστούς του ανθρώπου και άλλων ζώων (Dorland's Pocket Medical Dictionary 24<sup>th</sup> edition),(Kamal et al., 1987). Τα *in vivo* και *in vitro* πειράματα που ακολούθησαν με τα ροτενοειδή που περιέχονται στο φυτό επέδειξαν βιολογική δράση κατά της προνύμφης *Anopheles stephensi* (Kamal et al., 1993).

**Αντισπασμωδική δράση:** Το αιθανολικό εκχύλισμα βρέθηκε να είναι αποτελεσματικό στην αντιμετώπιση επαγόμενων από πιλοκαρπίνη και λίθιο επιληπτικών σπασμών σε επίμυες (Asuntha et al., 2010). Το μεθανολικό εκχύλισμα έδειξε αξιοσημείωτη καθυστέρηση στην εμφάνιση τονικοκλονικών σπασμών επαγόμενων από πεντυλενοτετραζόλη επίσης σε επίμυες (Kumar et al., 2009). Μελετήθηκε το εκχύλισμα των φύλλων του φυτού ως προς την αντιβακτηριακή, αντιοξειδωτική και κυτταροτοξική δράση. Η φυτοχημική ανάλυση με GC-MS απέδειξε την παρουσία φλαβονοειδών, σαπωνινών, ταννινών, στεροειδών τερπενίων, φαινολών, και ανθρακινονών.

**Αντιβακτηριακή δράση:** Το εκχύλισμα προκάλεσε αναστολή της ανάπτυξης των gram (+) βακτηριδίων *Bacillus pumilus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* αλλά δεν προκάλεσε αναστολή στα gram (-) βακτηρίδια *Escherichia coli* και *Pseudomonas aeruginosa*. Η αντιοξειδωτική δράση μελετήθηκε ως προς το πρότυπο ασκορβικό οξύ και ήταν ισχυρότερη. Το μεθανολικό εκχύλισμα των φύλλων του φυτού έδειξε κυτοτοξική δράση για την καρκινική σειρά κυττάρων NCI-H69 του καρκινώματος των πνευμόνων προκαλώντας απόπτωση *in vitro* (Renukadevi et al., 2011). Ανάλογη απόπτωση των κυττάρων προκλήθηκε από κλάσμα που περιείχε φλαβονοειδή σε καλλιέργεια της καρκινικής σειράς A549 (καρκίνωμα του πνεύμονα) (Kameswaran et al., 2008). Η κυτταροτοξική αυτή δράση οφείλεται στην αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>.

**Αντιεπιληπτική δράση:** Το αιθανολικό εκχύλισμα του φυτού μελετήθηκε ως προς την αντιεπιληπτική δράση που ασκεί η από του στόματος χορήγησή του σε αρουραίους *Albino* οι οποίοι εμφάνισαν τονικοκλωνικούς σπασμούς έπειτα από χορήγησή πεντυλενοτετραζόλης (PTZ) και πρόκλησης σπασμών μέσω ηλεκτροσόκ. Καταγράφηκε η έναρξη και η διάρκεια των τονικοκλωνικών σπασμών, τα επίπεδα των GABA νευροδιαβιβαστών και των GABA τρανσαμινασών. Το αιθανολικό εκχύλισμα καθυστέρησε την έναρξη των σπασμών και μείωσε την διάρκειά τους κατά τρόπο δόσοεξαρτώμενο. Παρατηρήθηκε αύξηση των GABA νευροδιαβιβαστών του εγκεφάλου γεγονός που μπορεί να αποδοθεί στην ικανότητα του εκχυλίσματος να διευκολύνει την μετάδοση σήματος των GABAεργικών υποδοχέων. Σε υψηλότερες δόσεις παρατηρήθηκε αισθητή μείωση των επιπέδων των GABA τρανσαμινασών (Garbharu et al., 2011).

**Ευεργετική επίδραση στη νόσο Alzheimer:** Η ικανότητα μείωσης του οξειδωτικού στρες μελετήθηκε σε ποντίκια ευαισθητοποιημένα με το β-αμυλοειδές πεπτίδιο (25-35) και βρέθηκε σημαντική μείωση στα επίπεδα των ενζύμων υπεροξειδική δισμουτάση, καταλάση, υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και ρεδοκτάση της γλουταθειόνης μετά από χορήγηση μεθανολικού εκχυλίσματος των φύλλων του φυτού. Σημαντική μείωση καταγράφηκε και στα επίπεδα της λιπιδικής υπεροξειδωσης. Βελτίωση εικόνας παρουσίασαν και οι νευρώνες του εγκεφάλου μέσω της μείωσης των επιπέδων νευροεκφύλισης (Balamurugan et al., 2010).

**Αντιλιπιδαιμική δράση:** Τα φουρανο-φλαβονοειδή που απομονώθηκαν από το αιθανολικό εκχύλισμα του υπέργειου τμήματος του φυτού, κατέδειξαν σαφή μείωση των τριγλυκεριδίων του πλάσματος, της συνολικής χοληστερόλης, της γλυκερόλης και των ελευθέρων λιπαρών οξέων. Τα τρία φουρανοφλαβονοειδή που απομονώθηκαν μαζί με έναν φλαβονο-γλυκοζίτη από τα αέρια τμήματα του φυτού έδειξαν μείωση των επιπέδων των τριγλυκεριδίων στο

πλάσμα καθώς επίσης και της ολικής χοληστερόλης, της γλυκερόλης, των ελεύθερων λιπαρών οξέων και των λιποπρωτεϊνών υψηλής μοριακής πυκνότητας (Narender et al., 2006). Αναφέρθηκε ακόμη ότι η ψευδοσεμιγλαβρίνη και η σεμιγλαβρίνη είναι ανταγωνιστές της συγκόλλησης των αιμοπεταλίων διότι παρουσίασαν ανασταλτική δράση έναντι της επαγόμενης προσέλευσης των αιμοπεταλίων από το θρομβοξανομιμικό φάρμακο U46619 (Jonathan et al., 1990).

**Υπογλυκαιμική / νεφροπροστατευτική δράση.** Το αιθανολικό και το χλωροφορμικό εκχύλισμα του φυτού μελετήθηκε ως προς την υπογλυκαιμική δράση σε επίμυες έπειτα από επαγόμενο διαβήτη προκληθέντα από στρεπτοζοτοσίνη ενώ ταυτόχρονα έγινε μελέτη αυτών των εκχυλισμάτων ως προς την νεφροπροστατευτική τους δράση (Bangar et al., 2011).

**Αναλγητική δράση:** Το αιθανολικό εκχύλισμα του φυτού άσκησε περιφερική αναλγητική δράση σε ποντίκια κατά τη διάρκεια προκαλούμενου από οξικό οξύ κοιλιακού πόνου η οποία μπορεί να αποδοθεί στην αναστολή της απελευθέρωσης των προσταγλανδινών (Kumar et al., 2009). Έξι ροτενοειδή απομονώθηκαν από την *Indigofera tinctoria* εκ των οποίων η ροτενόλη εμφάνισε αντιπαρασιτική δράση έναντι του *Callosobruchus chinensis* (Sahu et al., 2010).

Επιπλέον η *Indigofera tinctoria* χρησιμοποιείται στην ινδική παραδοσιακή θεραπευτική για την αντιμετώπιση επιληπτικών διαταραχών, νευρικών διαταραχών καθώς και στην αντιμετώπιση της βρογχίτιδας. Τα εκχυλίσματά της χρησιμοποιούνται εκτενώς στην συμπτωματική αντιμετώπιση διαταραχών του ήπατος.

### Χρήση του φυτού *Indigofera hirsuta*

Ακολουθεί μια συνταγή που συνταγογραφείται στην Κεντροαφρικανική Δημοκρατία για ασθενείς που εμφανίζουν γονιδιακό διαβήτη τύπου II όταν φτάσουν στο τεσσαρακοστό έτος της ηλικίας τους. Η παρακάτω αγωγή έχει ως αποτέλεσμα την μείωση των επιπέδων του σακχάρου στο αίμα.

#### Συνταγή:

- ❖ αποξηραμένα φύλλα φυτών

*Indigofera hirsuta* (Mabo) 6,5 gr

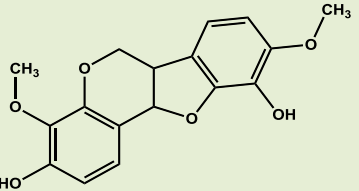
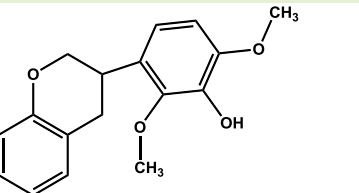
*Tephrosia humilis* (Yakoro) 3,4 gr

- ❖ ανάμειξη των δρογών
- ❖ εμποτισμός με νερό
- ❖ βρασμός για 15 λεπτά
- ❖ επαναφορά στη θερμοκρασία περιβάλλοντος
- ❖ Χορήγηση 200 ml τρεις φορές την ημέρα για 7 μέρες, αιματολογικός έλεγχος

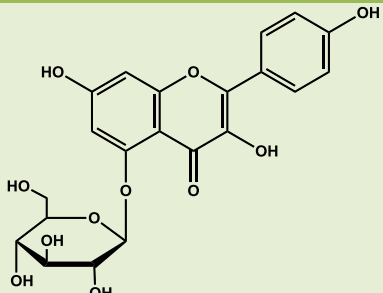
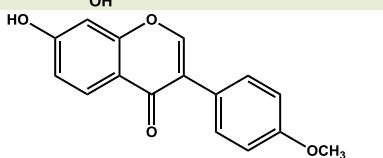
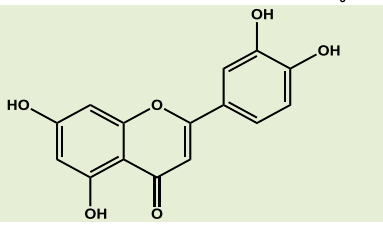
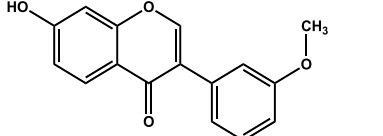
## 1.7 Δρογοχημεία του γένους *Indigofera*

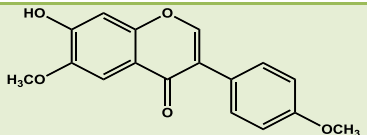
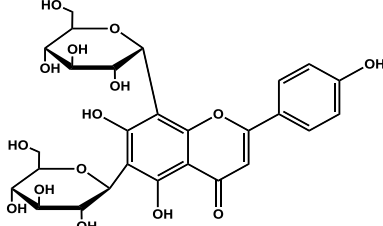
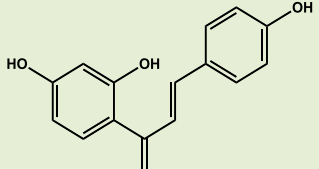
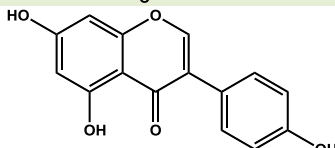
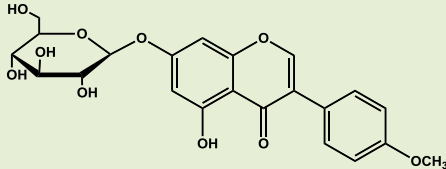
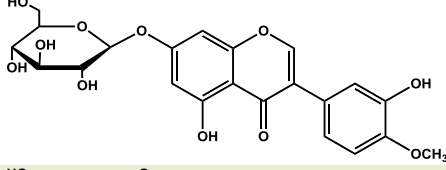
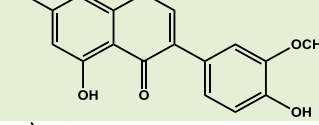
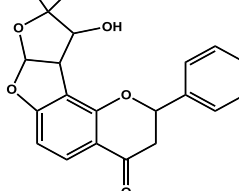
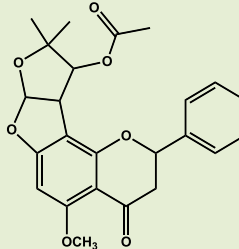
Πίνακας 2: Ενώσεις που απομονώθηκαν από τα διάφορα είδη *Indigofera*

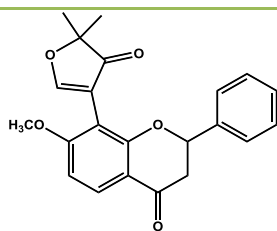
### Πτεροκαρπάνια

	Ινδικοκαρπάνιο	<i>I. aspalathoides</i> (Selvam et al., 2004)
	Μουκρονουλατόλη	<i>I. aspalathoides</i> (Selvam et al., 2004)

### Φλαβονοειδή

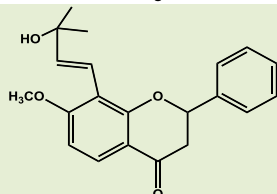
	5-Ο-β-D- Γλυκοπυρανοζίτης της Καιμφερόλης	<i>I. aspalathoides</i> (Swarnalatha et al., 2015)
	Φορμονονετίνη	<i>I. heterantha</i> (Rahman et al., 2014)
	Κερκετίνη	<i>I. heterantha</i> (Rahman et al., 2014)
	7-υδροξυ-3'- μεθοξυϊσοφλαβόνη	<i>I. heterantha</i> (Rahman et al., 2015)

	<b>Αφρομοσίνη</b>	<i>I. pseudotinctoria</i> (Wen and Liang 2010)
	<b>Βικενίνη-2</b>	<i>I. pseudotinctoria</i> (Wen and Liang 2010)
	<b>Ισολικουίριπγενίνη</b>	<i>I. pseudotinctoria</i> (Wen and Liang 2010)
	<b>Γενιστεΐνη</b>	<i>I. pseudotinctoria</i> (Wen and Liang 2010)
	<b>7-Ο-β-D-γλυκοζιτης της Φορμονονετίνης</b>	<i>I. pseudotinctoria</i> (Wen and Liang 2010)
	<b>7-Ο-β-D-γλυκοζιτης της Καλικοσίνης</b>	<i>I. pseudotinctoria</i> (Wen and Liang 2010)
	<b>7,4'-διϋδροξυ-3'-μεθοξυ-ισοφλαβόνη</b>	<i>I. pseudotinctoria</i> (Wen and Liang 2010)
	<b>(+)-5''-διακετυλο-πυρπουρίνη</b>	<i>I. spicata</i> (Bueno et al., 2013)
	<b>(+)-5''-μεθοξυπυρπουρίνη</b>	<i>I. spicata</i> (Bueno et al., 2013)



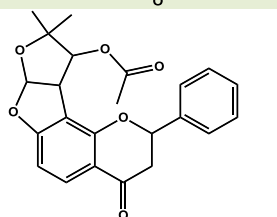
(2S)-2,3-  
διϋδροτεφρογκλαμπρίνη

*I. spicata*  
(Bueno et al.,  
2013)



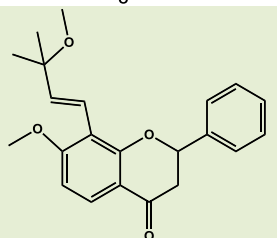
(2S)-2,3-  
Διϋδροτεφροαπολλίνη

*I. spicata*  
(Bueno et al.,  
2013)



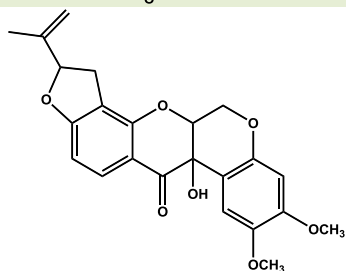
(+)-Πουρπουρίνη

*I. spicata*  
(Bueno et al.,  
2013)



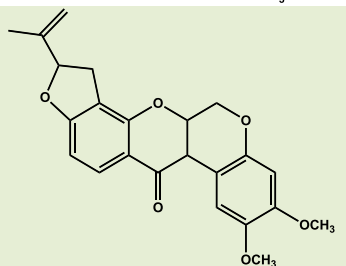
(2S)-7-μεθοξυ-8-(3-μεθοξυ-  
3-μεθυλο-βουτ-1-  
ενυλ)φλαβανόνη

*I. spicata*  
(Bueno et al.,  
2013)



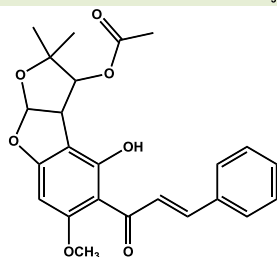
cis-(6α,β,12α,β)-  
υδροξυροστενόνη

*I. spicata*  
(Bueno et al.,  
2013)



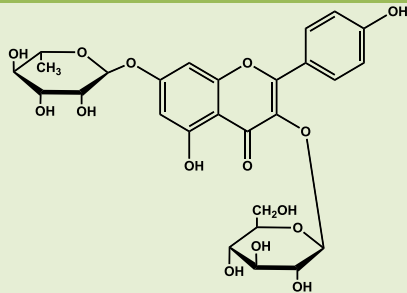
Ροτενόνη

*I. spicata*  
(Bueno et al.,  
2013)



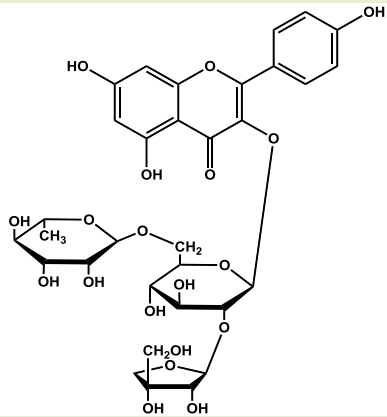
(+)-τεφροπουρπουρίνη

*I. spicata*  
(Bueno et al.,  
2013)



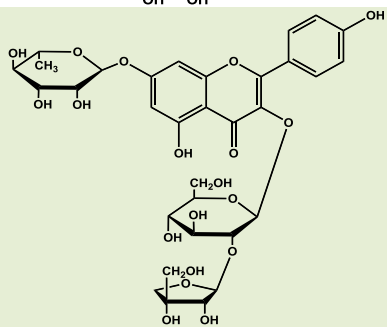
**3-Ο-γλυκοζίτης-7-Ο-  
ραμνοζίτης της  
καιφερόλης**

*I. zollingeriana*  
(Hisaeda et al.,  
2011)



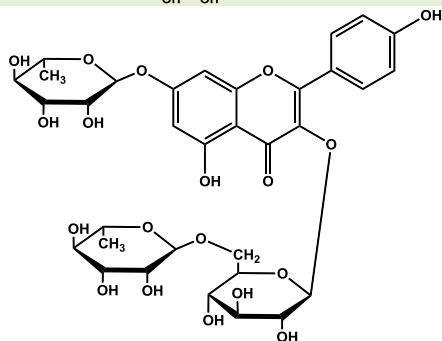
**(2'-Ο-αποφουρανοζυλο-  
3-Ο-ρουτινοζίτης της  
καιφερόλης**

*I. zollingeriana*  
(Hisaeda et al.,  
2011)



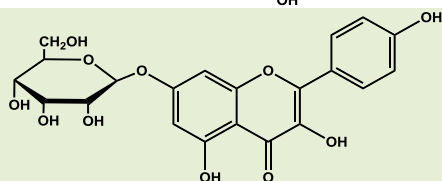
**3-Ο-β-D-(2''-Ο-β-D-  
αποφουρανοζίτης-7-Ο-α-  
L-ραμνοπυρανοζίτης της  
καιφερόλης**

*I. zollingeriana*  
(Hisaeda et al.,  
2011)



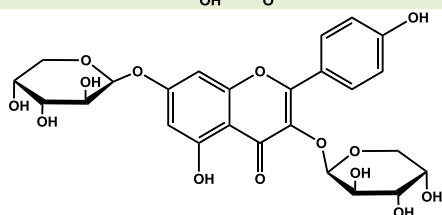
**3-Ο-ρουτινοζίτης-7-Ο-  
ραμνοζίτης της  
καιφερόλης**

*I. zollingeriana*  
(Hisaeda et al.,  
2011)



**7-Ο-αλλοζίτης της  
καιφερόλης**

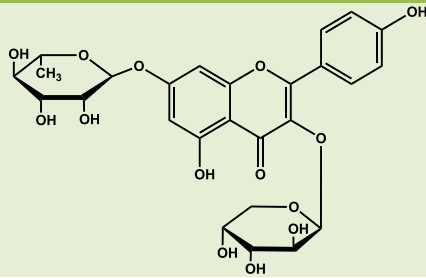
*I. hebetata*  
(Hasan et al.,  
1993)



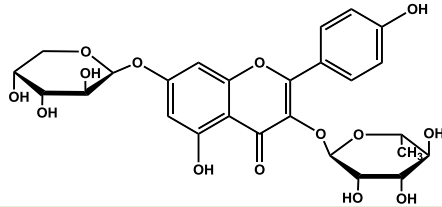
**3,7-διαραβινοζίτης της  
καιφερόλης**

*I. hebetata*  
(Hasan et al.,  
1993)

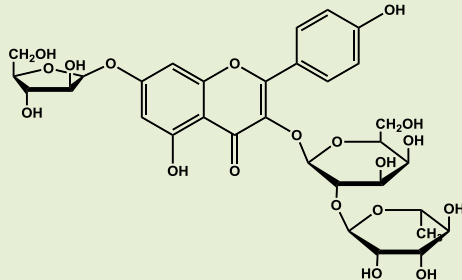




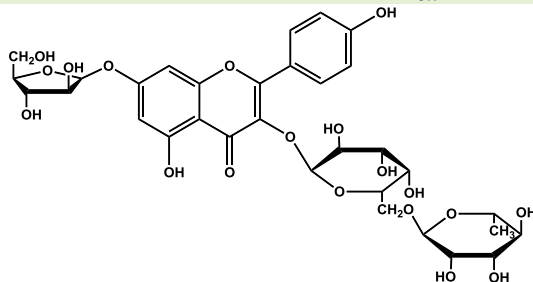
**3-O- $\alpha$ -L-αραβινοζιτης-7-O- $\alpha$ -L-ραμνοζιτης της καιμπερόλης** *I. hebetata* (Hasan et al., 1993)



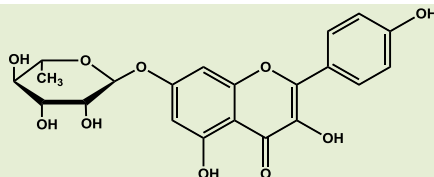
**3-O- $\alpha$ -L-ραμνοοζιτης-7-O- $\alpha$ -L-αραβινοζιτης της καιμπερόλης** *I. hebetata* (Hasan et al., 1993)



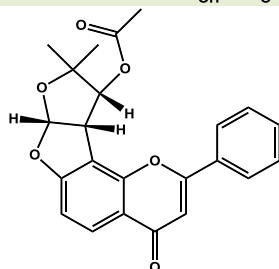
**3-O- $\alpha$ -L-ραμνοζιτης (1-2)- $\beta$ -D-γαλακτοζιτης-7-O- $\alpha$ -L-αραβινοφουρανοζιτης της καιμπερόλης** *I. hebetata* (Hasan et al., 1996)



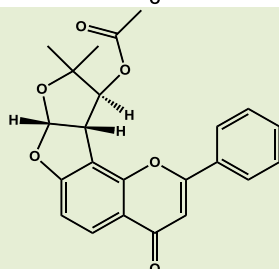
**3-O- $\alpha$ -L-ραμνοζιτης (1-6)- $\beta$ -D-γαλακτοζιτης-7-O- $\alpha$ -L-αραβινοφουρανοζιτης της καιμπερόλης** *I. hebetata* (Hasan et al., 1996)



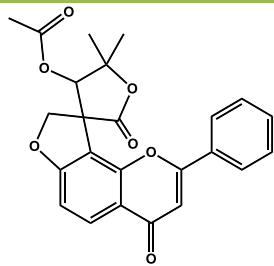
**7-ραμνοζιτης της καιμπερόλης** *I. hebetata* (Hasan et al., 1996)



**Ψευδοημιγλαβρίνη** *I. tinctoria* (Narender et al., 2006)

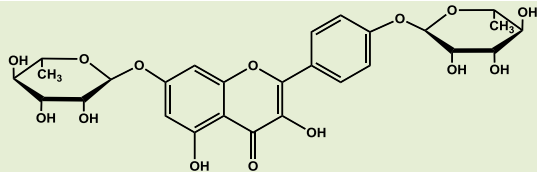


**Ημιγλαβρίνη** *I. tinctoria* (Narender et al., 2006)



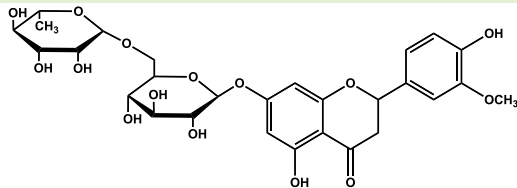
Γλαβρετεφρίνη

*I. tinctoria*  
(Narender et al.,  
2006)



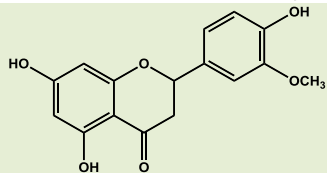
4',7-δυραμνοζίτης της  
καιφερόλης

*I. tinctoria*  
(Narender et al.,  
2006)



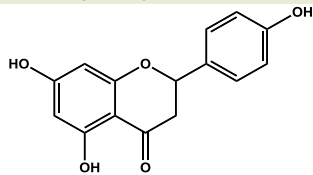
Εσπεριδίνη

*I. tinctoria*  
(Narender et al.,  
2006)



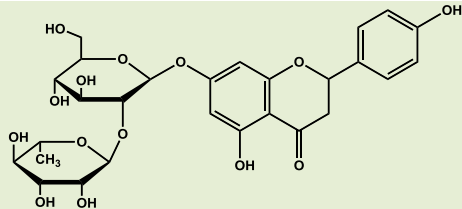
Εσπερετίνη

*I. tinctoria*  
(Narender et al.,  
2006)



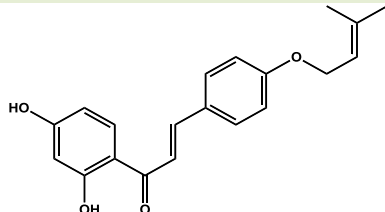
Ναριγγενίνη

*I. tinctoria*  
(Narender et al.,  
2006)



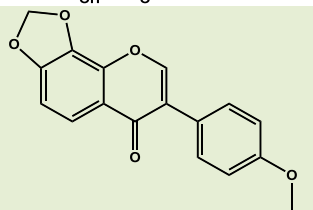
Ναριγγίνη

*I. tinctoria*  
(Narender et al.,  
2006)



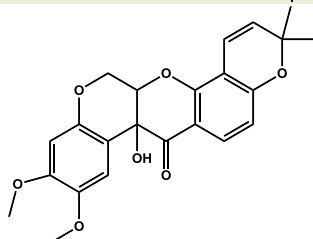
2',4'-διϋδροξυ-4-  
πρενυλοξυ-χαλκόνη

*I. pulchra*  
(Musa et al.,  
2011)



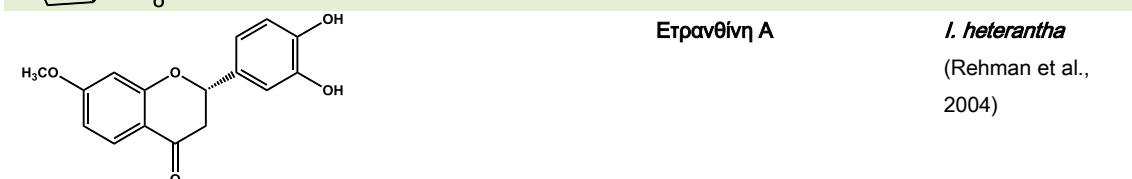
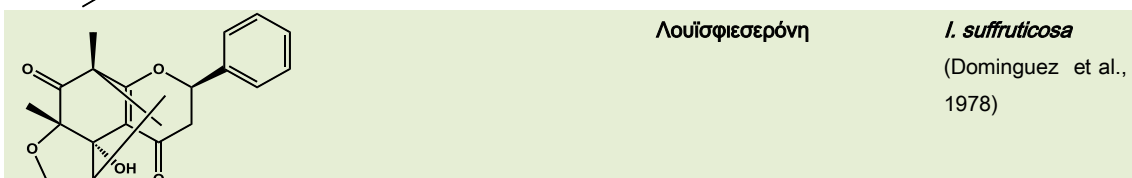
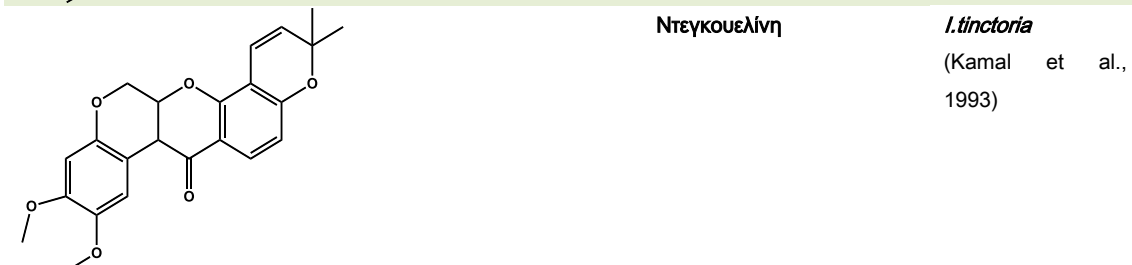
7,8-μεθυλενοδιόξυ-4'-  
μεθοξυισοφλαβόνη

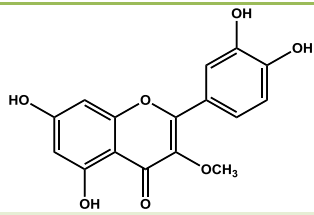
*I. linnaei*  
(Prasad et al.,  
2004)



Τεφροζίνη

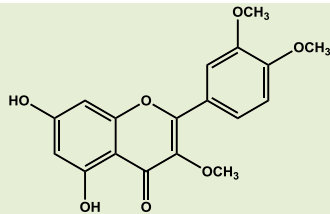
*I. tinctoria*  
(Kamal et al.,  
1993)





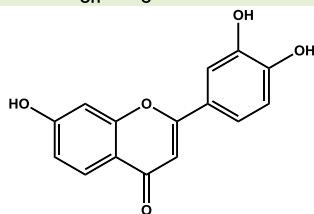
3-Ο-Μεθυλαιθέρας της  
κερκετίνης

*I. secundiflora*  
(Ahmadu et al.,  
2011)



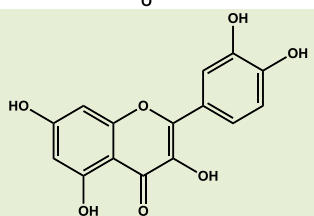
3,3',4'-τριμεθυλαιθέρας της  
κερκετίνης

*I. secundiflora*  
(Ahmadu et al.,  
2011)



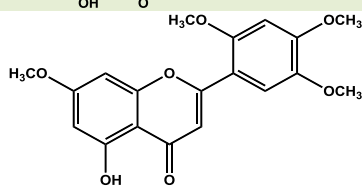
7,3',4'-  
τριϋδροξυφλαβανόνη

*I. heterantha*  
(Rehman et al.,  
2004)



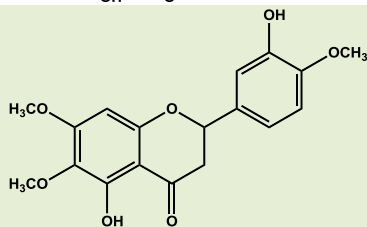
3,5,7,3',4'-  
πενταϋδροξυφλαβανόνη

*I. heterantha*  
(Rehman et al.,  
2004)



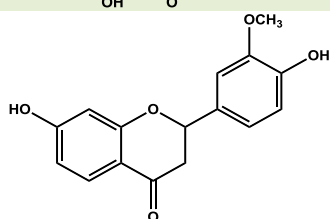
5-ϋδροξυ-2',4',5',7'-  
τετραμεθοξυφλαβόνη

*I. heterantha*  
(Rehman  
et al., 2005)



3',5-διϋδροξυ-4',6,7-  
τριμεθοξυφλαβανόνη

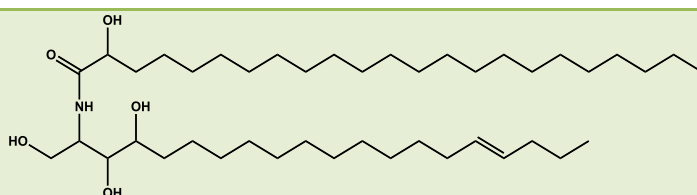
*I. heterantha*  
(Rehman  
et al., 2005)



4',7-διϋδροξυ-3'-  
μεθοξυφλαβανόνη

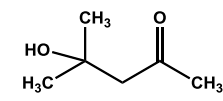
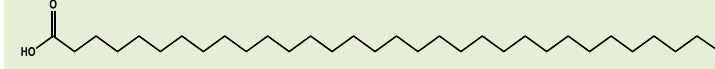
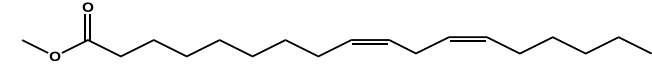
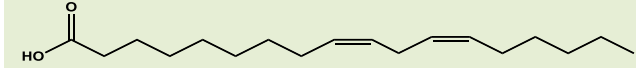
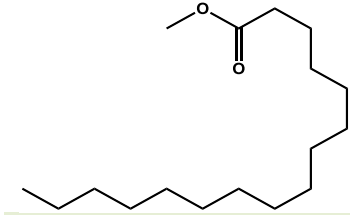
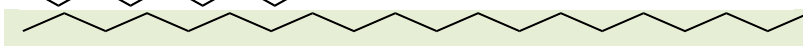
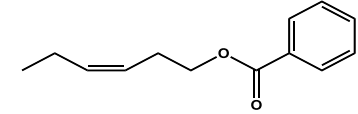
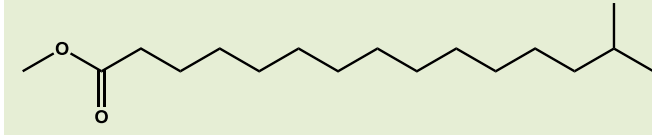
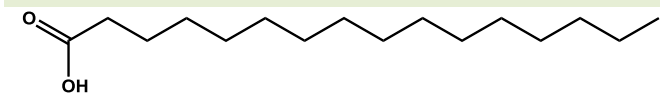
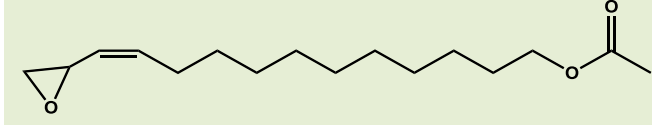
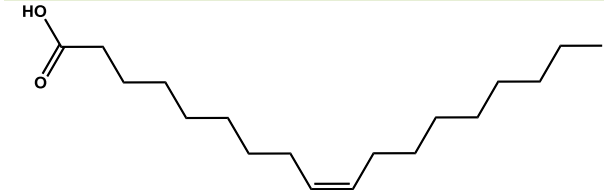
*I. heterantha*  
(Rehman  
et al., 2005)

## Άλλες ενώσεις

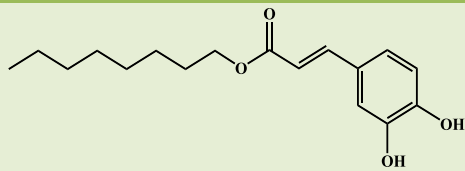


Ινγκοφερ  
αμίδιο

*I. heterantha*  
(Rahman et al.,  
2014)

	4-υδροξυ-4-μεθυλοπεντανόνη	<i>I. heterantha</i> (Rahman et al., 2014)
	Τριακονταν οϊκό οξύ	<i>I. heterantha</i> (Rahman et al., 2014)
	Λινολεϊκός μεθυλεστέρας	<i>I. suffruticosa</i> (Arriaga et al., 2013)
	Λινολεϊκό οξύ	<i>I. suffruticosa</i> (Arriaga et al., 2013)
	Δεκαεξανοϊκός μεθυλεστέρας	<i>I. suffruticosa</i> (Arriaga et al., 2013)
	Εικοσπρία νιο	<i>I. suffruticosa</i> (Arriaga et al., 2013)
	(z)-3-Εξενυλβενζοϊκός εστέρας	<i>I. suffruticosa</i> (Arriaga et al., 2013)
	14-μεθυλοδεκαπεντανοϊκός μεθυλεστέρας	<i>I. suffruticosa</i> (Vijisara et al., 2014)
	Δεκαεξανοϊκό οξύ	<i>I. suffruticosa</i> (Vijisara et al., 2014)
	Οξικός αθυλεστέρας της z-[13,14-επόξυ] δεκατεσσερανοϊκ-11-εν-1-ολης	<i>I. suffruticosa</i> (Vijisara et al., 2014)
	Ολεϊκό οξύ	<i>I. suffruticosa</i> (Vijisara et al., 2014)

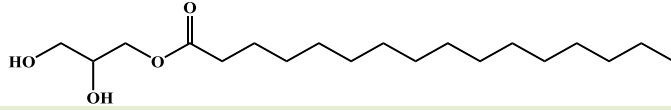
	[z]-2-υδροξυ-1-μεθυλοαιθυλεστέρα ς του 9-δεκαοκτανοϊκού οξέος	<i>I. suffruticosa</i> (Vijisarl et al., 2014)
	Εστέρας του εικοσιδυοεπτανοϊκού οξέος	<i>I. suffruticosa</i> (Vijisarl et al., 2014)
	7-υδροξυ-μεθυλεστέρας του 9-δεκαοκτανοϊκού οξέος	<i>I. suffruticosa</i> (Vijisarl et al., 2014)
	6-δεκαοκταεν οϊκό οξύ	<i>I. suffruticosa</i> (Vijisarl et al., 2014)
	Μεθυλεστέρας του 8-δεκαοκταενοϊκού οξέος	<i>I. suffruticosa</i> (Vijisarl et al., 2014)
	Φυτόλη	<i>I. suffruticosa</i> (Vijisarl et al., 2014)
	trans-τετρακισ-δεκαπενταν οϊκό οξύ	<i>I. tinctoria</i> (Singh et al., 2006)
	Εικοσπετρανοϊκος εστέρας του καφεϊκού οξέος	<i>I. kirilowii</i> (Lü et al., 2009)
	Εικοσανοϊκος εστέρα του καφεϊκού οξέος	<i>I. kirilowii</i> (Lü et al., 2009)
	δεκαοκτανοϊκος εστέρα του καφεϊκού οξέος	<i>I. kirilowii</i> (Lü et al., 2009)



**Δοδεκανοϊκ  
ος εστέρα  
του  
καφεϊκού  
οξέος**

*I. kirilowii*

(Lü et al., 2009)

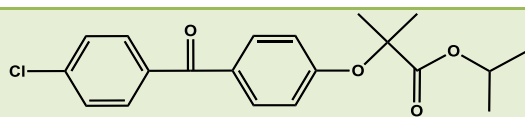


**Μono-  
παλμίνη**

*I. kirilowii*

(Lü et al., 2009)

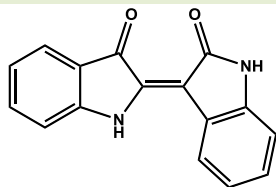
### Παράγωγα Ινδολίου και φαινολικές ενώσεις



**Φενοφιβράτη**

*I. tinctoria*

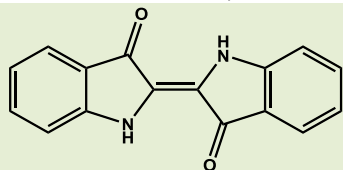
(Narender et al., 2006)



**Ιντιρουμπίνη**

*I. tinctoria*

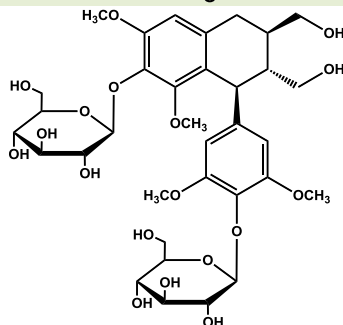
(Nittaya et al., 2002)



**Ιντιγκοτίνη**

*I. tinctoria*

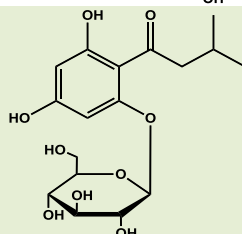
(Warjeet et al., 2011)



**4,4'-δις-Ο-β-D-  
γλυκοπυρανοζίτης της  
(+)-λυονιρεσινόλης**

*I. heterantha*

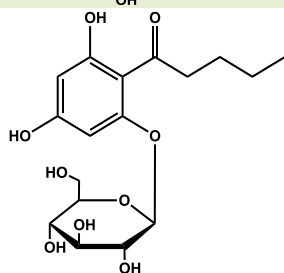
(Rehman et al., 2004)



**1-[(3-  
μεθυλοβουτανούλο)  
φλουορογλικινυλ]-β-D-  
γλυκοπυρανοζίτης**

*I. heterantha*

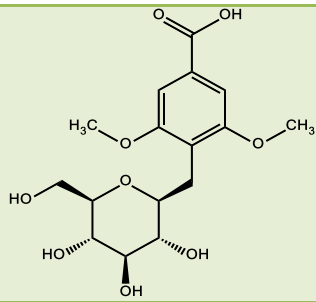
(Rehman et al., 2005)



**1-[(πεντανούλο)  
φλουορολυκινυλ]-β-D-  
γλυκοπυρανοζίτης**

*I. heterantha*

(Rehman et al., 2005)

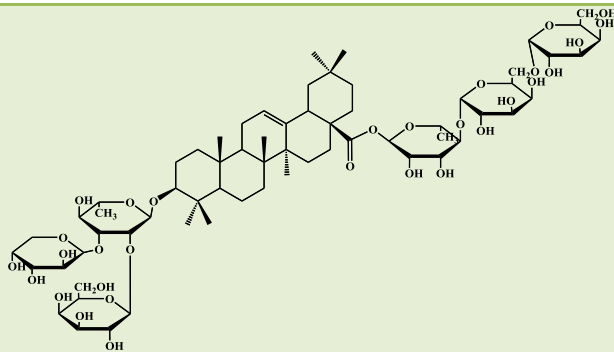


Γλυκοσυριγικό οξύ

*I.kirilowii*

(Lü et al., 2009)

Τερπενοειδή

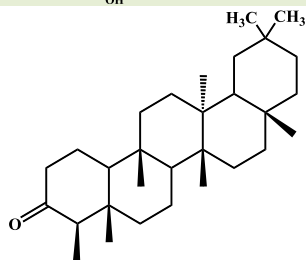


28-O-α-L-

ραμνοπυρανοζυλο-(1-4)-  
β-D-γλυκοπυρανοζυλο-(1-  
6)-β-D-γλυκοπυρανοζυλο  
εστέρας του 3-O-α-L-  
ραμνοζυλο-(1-2)-[β-D-  
γαλακτοπυρανοζυλο-(1-  
3)]-α-L-αραβινοζυλο  
ολεανικού οξέος

*I.carlesii*

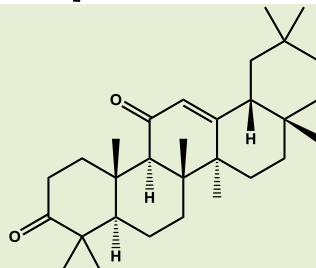
(Lü et al., 2009)



Φριεντελίνη

*I.carlesii*

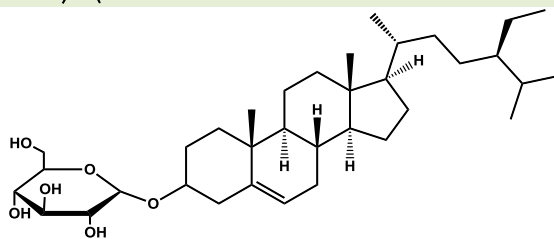
(Lü et al., 2009)



Ολεαν-12-εν-3,11-διόνη

*I.pseudotinctoria*

(Wen and  
Liang 2010)

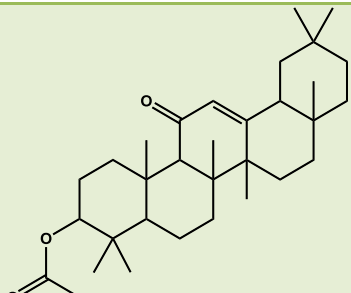
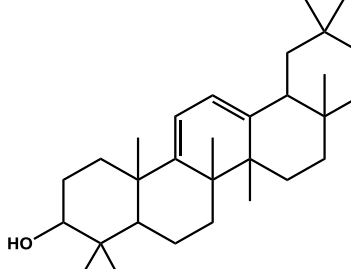
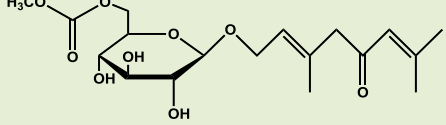
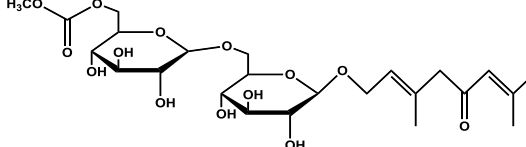
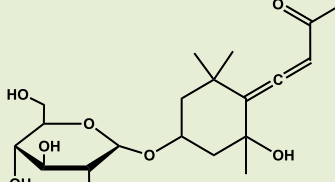
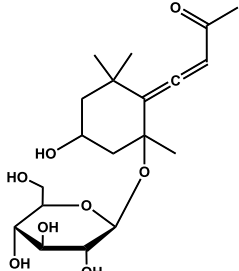
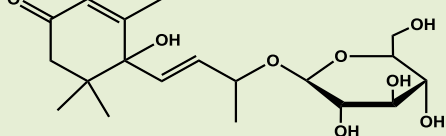


Νταουκοστερόλη

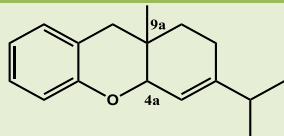
*I.pseudotinctoria*

(Wen and  
Liang 2010)



	<p>3β-ακέτοξυ-12-ολεαν-εν-11-όνη</p>	<p><i>I. pseudotinctoria</i> (Wen and Liang 2010)</p>
	<p>3β-υδρόξυ-ολεανεν-9(11):12-διένιο</p>	<p><i>I. pseudotinctoria</i> (Wen and Liang 2010)</p>
	<p>3,7-διμεθυλο-2-(E),6-οκταδιέν-5-ονη-1-O-[β-D-6-O-ακετυλογλυπιρανοζιτης</p>	<p><i>I. heterantha</i>, (Sajid et al., 2008)</p>
	<p>3,7-διμεθυλο-2-(E), 6-οκταδιεν-5-ονη-1-O-[β-D-6'-O-ακετυλογλυκοπιρανοσυλο (1'→6')-β-D-γλυκοπιρανοζιτης</p>	<p><i>I. heterantha</i>, (Sajid et al., 2008)</p>
	<p>Κιτροζιτης A</p>	<p><i>I. zollingeriana</i> (Hisaeda et al., 2011)</p>
	<p>Κιτροζιτης A</p>	<p><i>I. zollingeriana</i> (Hisaeda et al., 2011)</p>
	<p>Ροζεοζιτης</p>	<p><i>I. zollingeriana</i> (Hisaeda et al., 2011)</p>

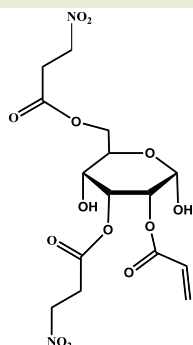
Ξανθένια



3-ισοπροπυλο-9α-  
μεθυλο-1,2,4α,9α-  
τετραϋδροξανθένιο

*I.  
longeracemosa*  
(Thangadurai et  
al., 2001)

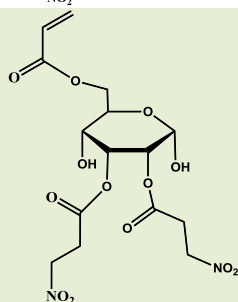
## Νιπροενώσεις



2-Ο-ακρυλ-3,6-δι-Ο-(3-  
νιτροπροπανουλο)-α-D-  
γλυκοπυρανοζίτης

*Indigofera carlesii*

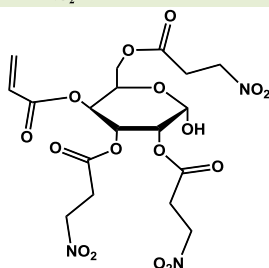
(Zhang et al., 2006)



6-Ο-ακρυλ-2,3-δι-Ο-(3-  
νιτροπροπανουλ)-α-D-  
γλυκοπυρανοζίτης

*Indigofera carlesii*

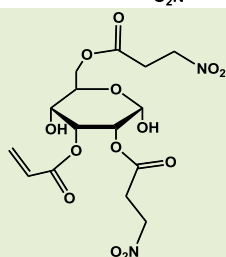
(Zhang et al., 2006)



Κυριλοϋίνη C

*Indigofera kirilowii*

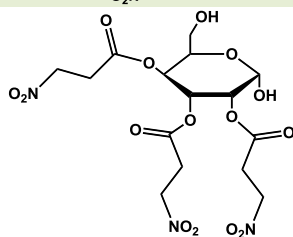
(Su et al., 2008)



Κυριλοϋίνη D

*Indigofera kirilowii*

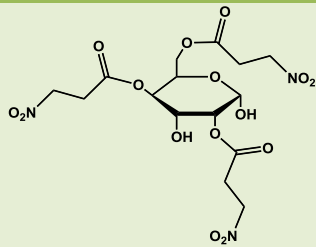
(Su et al., 2008)



Κυριλοϋίνη E

*Indigofera kirilowii*

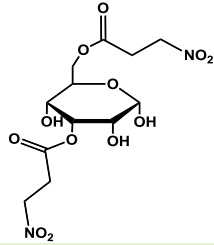
(Su et al., 2008)



Κυριλοουίνη F

*Indigofera kirilowii*

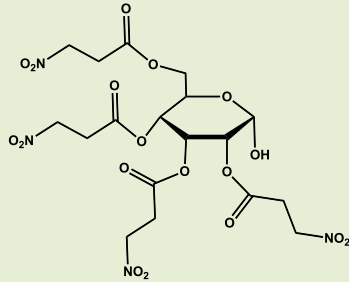
(Su et al., 2008)



Κυριλοουίνη G

*Indigofera kirilowii*

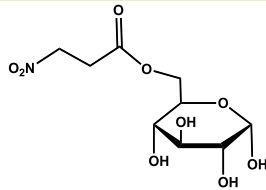
(Su et al., 2008)



2,3,4,6-τέτρα (3-  
νιτροπροπανουλο)-α-D-  
γλυκοκυρανόζη

*I. suffruticosa*

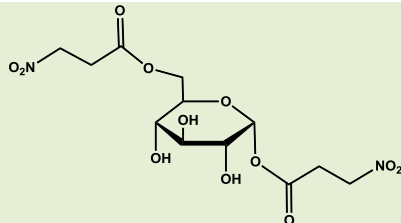
(Garcez, et al., 1989)



6-O[3-νιτροπροπανούλο]-αβ-D-  
γλυκοκυρανόζη

*I. suffruticosa*

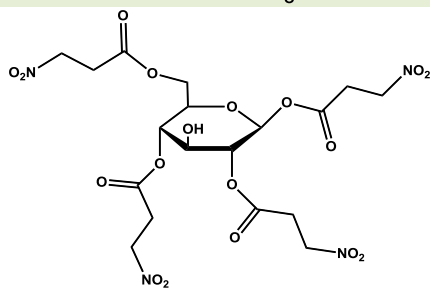
(Garcez et al., 2003)



2,6-δι-O[3-νιτροπροπανούλο]-α-  
D-γλυκοκυρανόζη

*I. suffruticosa*

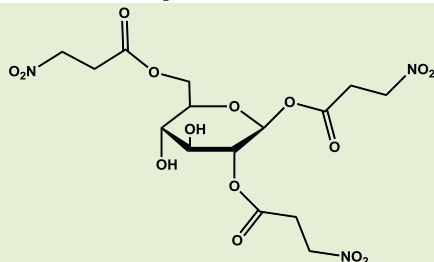
(Garcez et al., 2003)



1,2,4,6-τετρα-  
(νιτροπροπανουλο)-β-D-  
γλυκοκυρανόζη

*I. linnaei*

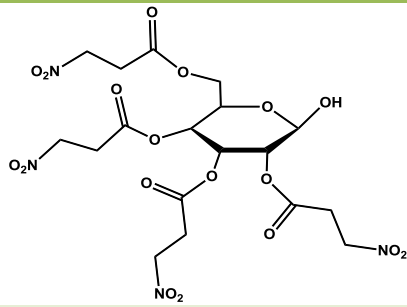
(Majak et al., 1994)



1,2,6-τρι-O(νιτροπροπανούλο)-  
β-D-γλυκοκυρανόζη

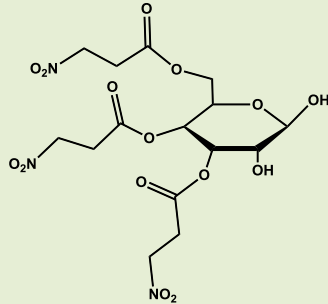
*I. linnaei*

(Majak et al., 1994)



2,3,4,6-τετρα-  
(νιτροπροπανόυλο)-β-D-  
γλυκοπυρανόζη

*I.linnæi*  
(Majak et al., 1994)

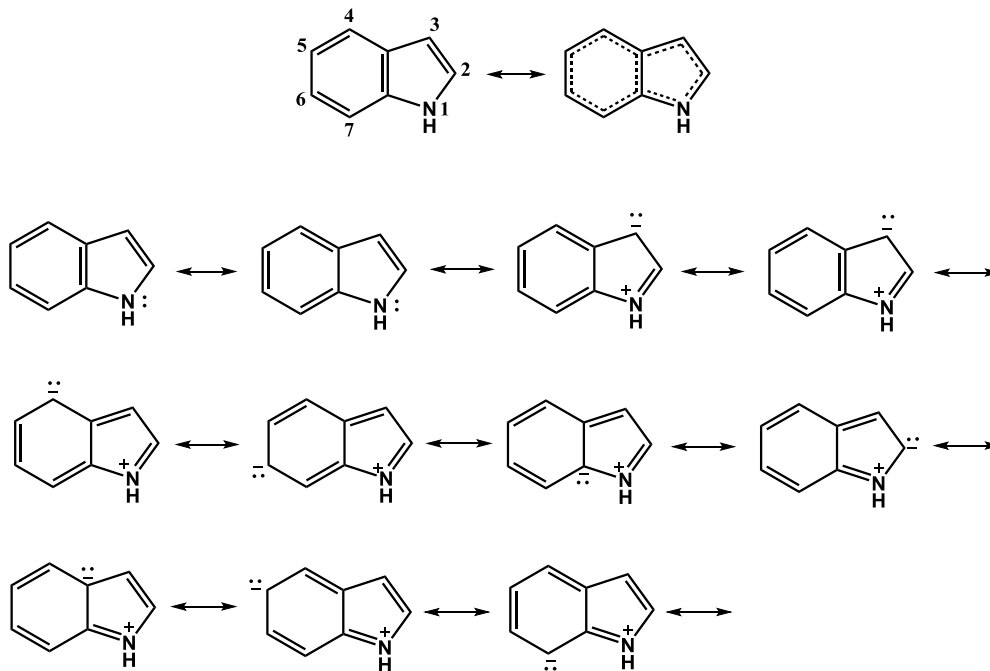


3,4,6-τρι-Ο-(νιτροπροπανόυλο)-  
β-D-γλυκοπυρανόζη

*I.linnæi*  
(Majak et al., 1994)

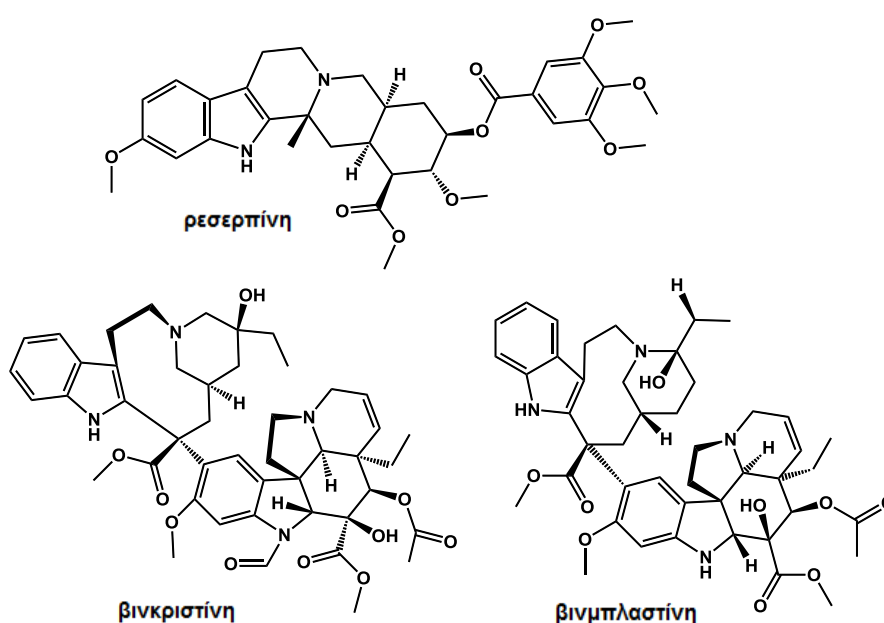
## 2. ΑΛΚΑΛΟΕΙΔΗ ΤΟΥ ΙΝΔΟΛΙΟΥ

Το ινδόλιο (βενζο[*b*]πυρρόλιο) το οποίο προέρχεται από τη φυσική χρωστική ινδικό είναι ένα επίπεδο ετεροαρωματικό μόριο με 10π ηλεκτρόνια. Ο απεντοπισμός του ηλεκτρονιακού ζεύγους από το άτομο του αζώτου στο π ηλεκτρονιακό σύστημα μειώνει την ηλεκτρονιακή πυκνότητα του αζώτου και για το λόγο αυτό το ινδόλιο είναι μια ασθενής βάση ( $pK_b = -3.63$ ) (Sundberg, 1970).



Εικ 8: Δομές συντονισμού του Ινδολίου

Η παρουσία του αζώτου στον πυρρολικό δακτύλιο είναι υπεύθυνη για την εμφάνιση βασικών ιδιοτήτων των αλκαλοειδών του ινδολίου και προσδίδει σε αυτά πλήθος φαρμακολογικών ιδιοτήτων (El-Sayed and Verroorte 2007). Τα αλκαλοειδή του ινδολίου είναι ευρέως διαδεδομένα στο φυτικό βασίλειο και ιδιαίτερα στις οικογένειες *Apocynaceae*, *Loganiaceae*, *Rubiaceae* και *Nyssaceae*. Ένα πολύ σημαντικό αλκαλοειδές με αντιυπερτασικές ιδιότητες ήταν η ρεσερπίνη που απομονώθηκε από το φυτό *Rauvolfia serpentina* (Sagi et al 2016). Η βινκριστίνη και η βινβλαστίνη που απομονώθηκαν από το φυτό *Catharanthus roseus* (El-Sayed and Verroorte 2007) είναι ενώσεις με ισχυρές αντικαρκινικές ιδιότητες. Τα αλκαλοειδή του ινδολίου σχετίζονται με την λειτουργία των G-πρωτεϊνικών υποδοχέων και συγκεκριμένα παίζουν ρόλο στην αγωγή σήματος μέσω των υποδοχέων της σεροτονίνης (5-HT, 5-υδροxyτρυπταμίνης). Πρόκειται για ενώσεις δότες πρωτονίων, που μπορούν να σχηματίζουν δεσμούς H μέσω του δεσμού N-H, ενώ η παρουσία επιπεδότητας στο π-ηλεκτρονιακό σύστημα τις καθιστά ικανές να αλληλεπιδρούν με πυρηνόφιλες πρωτεΐνες στόχους (de Sa et al., 2009, Shimazaki et al., 2009).

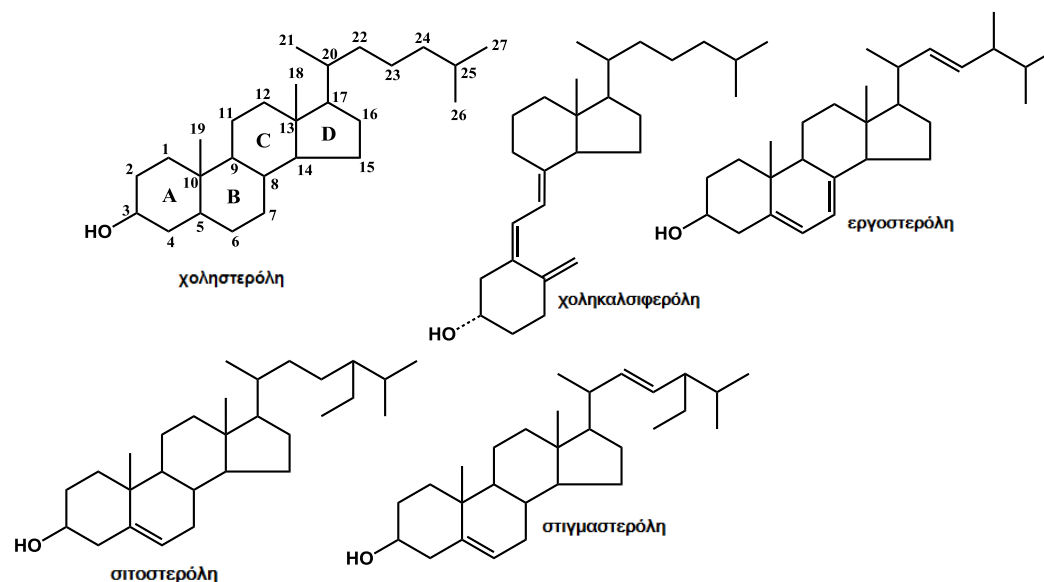


Εικ 9: Χαρακτηριστικά παραδείγματα των αλκαλοειδών του Ινδολίου

Η σεροτονίνη είναι βασικός νευροδιαβιβαστής του εγκεφάλου υπεύθυνος για την λειτουργία του. Προσδέεται σε ειδικούς πρωτεϊνικούς υποδοχείς της οικογένειας των G πρωτεϊνών με επακόλουθο βραχυπρόθεσμες και μακροπρόθεσμες βιοχημικές μεταβολές στη λειτουργία των νευρώνων. Η ομοιότητα των αλκαλοειδών του ινδολίου με τους ενδογενείς νευροδιαβιβαστές τύπου σεροτονίνης βοηθά στην πρόβλεψη τυχόν νευρολογικής δράσης αυτών των μορίων (Kochanowska and Hamann 2010).

### 3. ΣΤΕΡΟΕΙΔΗ

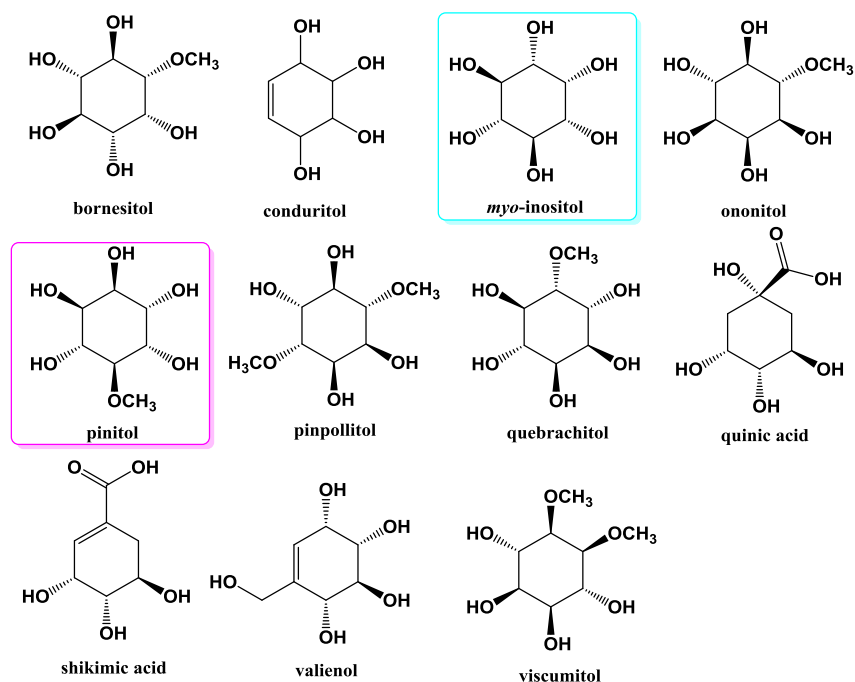
Τα στεροειδή αναφέρονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες που χαρακτηρίζονται από έναν ανθρακικό σκελετό C-17. Είναι πολύ σημαντικά για την λειτουργία των φυτικών κυττάρων και βασικός εκπρόσωπος αυτών είναι η χοληστερόλη, πρόδρομο μόριο για τη βιοσύνθεση άλλων στεροειδών.



Εικ 10: Χαρακτηριστικά παραδείγματα των στεροειδών

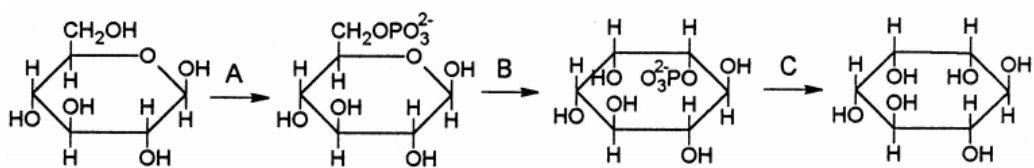
Ο ρόλος των στερολών στα φυτά είναι κατά κύριο λόγο η διατήρηση της δομής των κυτταρικών μεμβρανών ως μηχανισμός στήριξης αυτών (Ribeiro et al., 2007), ( Schaeffer, et al., 2001). Η στιγμαστερόλη και η σιτοστερόλη είναι σημαντικές στην εμβρυϊκή ανάπτυξη των φυτικών κυττάρων (Schaller 2004), (Schrick et al., 2002). Οι στερόλες είναι καθοριστικές για τη δημιουργία ετερογενών περιοχών στην πλασματική μεμβράνη καθώς είναι πλούσιες σε σφιγγολιπίδια και χοληστερόλη. Οι περιοχές αυτές συνιστούν ένα μοντέλο «λιπιδικής σχεδίας» (lipid raft) που συμβάλλει καθοριστικά σε βιολογικές διεργασίες όπως οι μηχανισμοί σηματοδότησης, η καλύτερη κυτταρική οργάνωση, το πακετάρισμα περιοχών της κυτταρικής μεμβράνης, η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού, καθώς και ο αμυντικός ρόλος σε φλεγμονώδεις καταστάσεις (Simons et al., 2000, 2002). Οι φυτικοί οργανισμοί καλούνται να αντιμετωπίσουν σημαντικές αυξομειώσεις της θερμοκρασίας σε σχέση με τους λοιπούς ευκαρυωτικούς οργανισμούς στους οποίους βασικός δομικός λίθος είναι η χοληστερόλη. Οι δύο φυτοστερόλες η στιγμαστερόλη και η σιτοστερόλη που περιέχουν μια επιπλέον αιθυλική ομάδα ως διακλάδωση στον C-24, προσδίδουν μεγαλύτερη συνεκτικότητα στην μεμβράνη με αποτέλεσμα τη μείωση της ευαισθησίας της στις αυξομειώσεις της θερμοκρασίας (Dufourc Erick 2008).

## 4. ΚΥΚΛΙΤΟΛΕΣ

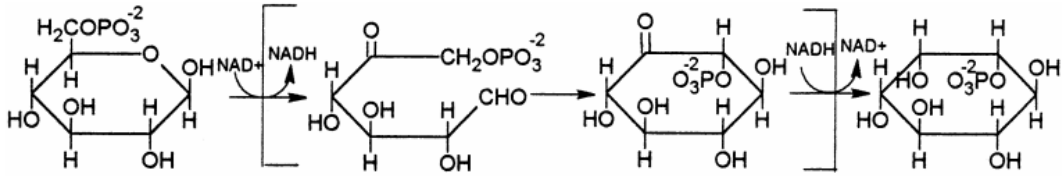


Εικ 11: Χαρακτηριστικά παραδείγματα των κυκλιτολών

Ο όρος *κυκλιτόλη* εισήχθει από τον Micheel το 1932 για να δηλώσει παράγωγα του κυκλοεξανίου τα οποία φέρουν υδροξύλια στον ανθρακικό τους σκελετό με σημαντικότερα τα εξα-υδροξυ-κυκλοεξάνια ή ινοσιτόλες. Η πρώτη από τις ινοσιτόλες η οποία ανακαλύφθηκε ήταν η *meso*-ινοσιτόλη ή *myo*-ινοσιτόλη από τους (Fletcher et al., 1951) και (Posternak et al., 1962). Η βασική ιδιότητα της *myo*-ινοσιτόλης είναι πιθανότατα η λειτουργία της ως δομικός λίθος των φωσφοϊνοζιτιδίων. Επίσης παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των φυτικών οργανισμών. Ο βιοσυνθετικός μετασχηματισμός της D-γλυκόζης σε ελεύθερη *myo*-ινοσιτόλη περιλαμβάνει τρία ενζυμικά στάδια όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα: A: φωσφορυλίωση της γλυκόζης προς D-6-φωσφορική γλυκόζη. B: κυκλοποίηση της D-6-φωσφορικής γλυκόζης σε 3-φωσφορική ινοσιτόλη. C: απώλεια φωσφορικής ομάδας με σχηματισμό της ελευθέρης *myo*-ινοσιτόλης.

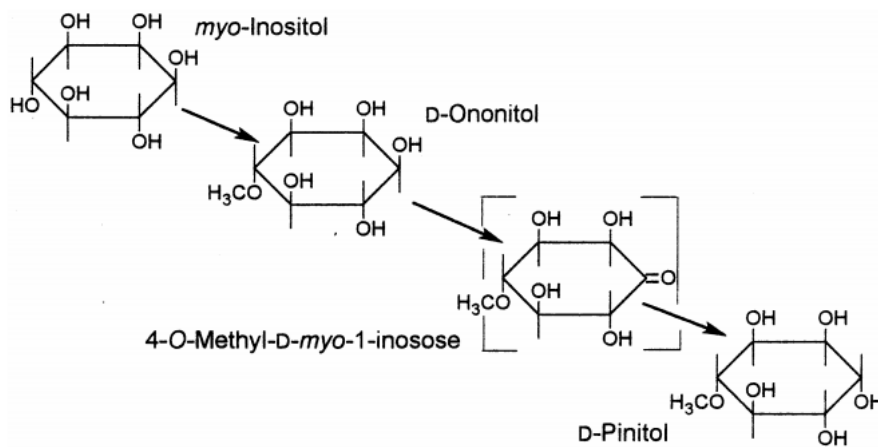


Εικ 12: Μετατροπή της D-γλυκόζης σε *myo*-ινοσιτόλη (MI): (A) Εξοκίνηση; (B) Ins(3) P<sub>1</sub> συνθάση; (C) MI μονοφωσφατάση.



Εικ13:Ενζυμική μετατροπή μέσω της 1L-MI-1-φωσφορικής συνθάσης

Η μετατροπή της *myo*-ινοσιτόλης σε D-πινιτόλη επιτυγχάνεται μέσω διαδοχικών οδών μετατροπής της σε D-ονονιτόλη και 4-O-Μεθυλ-D-*myo*-1-ινοσόζη (Loewus et al., 2000).



Εικ 14: Μετατροπή της *myo*-ινοσιτόλης σε D-πινιτόλης

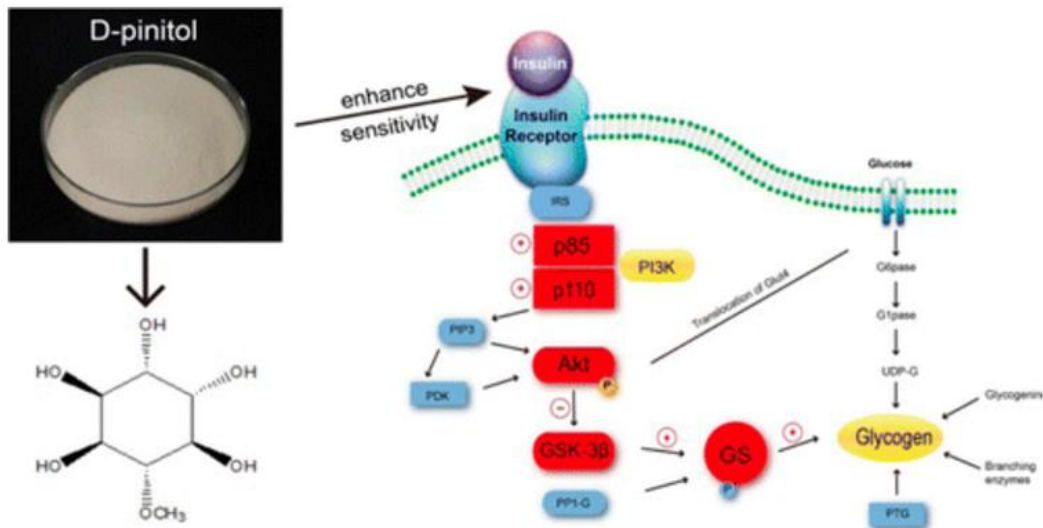
Η πινιτόλη αποτελεί χημειοταξονομικό δείκτη της οικογένειας Leguminosae (Farzana Panhwar, 2005). Έχει βρεθεί ότι κατέχει αντιδιαβητική (Bates et al., 2000) (Kim et al., 2007), αντιμικροβιακή (Agnese et al., 2001) και αντιφλεγμονώδη δράση (Singh et al., 2001).

#### 4.1. Πινιτόλη ως υπογλυκαιμικός παράγοντας

Παρά το γεγονός ότι η D-πινιτόλη είναι γνωστή για τις ινσουλινομιμικές ιδιότητές της και την υπογλυκαιμική της δράση που έχει αναγνωριστεί τα τελευταία χρόνια, εντούτοις δεν διεκρινίστηκε ακόμη ο μηχανισμός δράσης της στη θεραπεία του διαβήτη τύπου II. Σε μια σειρά πειραμάτων αποδείχθηκε ότι έχει την ικανότητα να προάγει την έκφραση την κινάσης της τριφωσφορικής φωσφατιδυλ-ινοσιτόλης (PI3K), της ρυθμιστικής υπομονάδας p85 και της καταλυτικής υπομονάδας p110. Ταυτόχρονα προκαλεί την ενεργοποίηση της κινάσης σερίνης/θρεονίνης AKT/PKB που δρα ως διαβιβαστής σήματος και συμβάλλει σε μεταβολικές δράσεις της ινσουλίνης. Παράλληλα η D-πινιτόλη αναστέλλει την έκφραση της κινάσης της συνθετάσης του γλυκογόνου-3 (GSK3) ενώ ρυθμίζει την έκφραση της συνθετάσης του



γλυκογόνου (GS) με αποτέλεσμα την επιτάχυνση της σύνθεσης του γλυκογόνου. Πρωτίστως η D-πινιτόλη δρα θετικά στην ινσουλινο-επαγόμενη επαναπρόσληψη της γλυκόζης από το ήπαρ μέσω της ενεργοποίησης της σηματοδοτικής οδού της κινάσης της τριφωσφορικής φωσφατιδυλ-ινοσιτόλης (PI3K) (Gao et al., 2015).

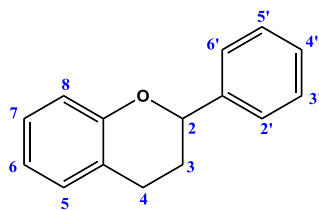


Εικ 15: Μηχανισμός δράσης της πινιτόλης ως υπογλυκαιμικός παράγοντας

## 5 ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ

### 5.1 Κατηγορίες φλαβονοειδών

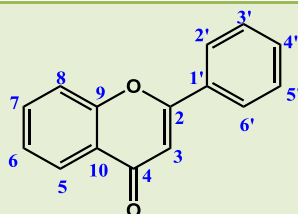
Τα φλαβονοειδή είναι πολυφαινολικές ενώσεις ευρέως διαδεδομένες στα φυτά. Είναι υπεύθυνες για το χρώμα των καρπών και των ανθέων. Το όνομα φλαβονοειδές προέρχεται από το λατινικό *flavus* που σημαίνει ξανθός. Απαντούν σε όλα τα τμήματα του φυτού (φύλλα, άνθη, καρπούς, στελέχη, ρίζες). Ο βασικός δομικός σκελετός περιλαμβάνει δύο αρωματικούς δακτυλίους (Α και Β) οι οποίοι συνδέονται μέσω ενός ετεροκυκλικού πυρανικού δακτυλίου. Η χημική δομή των φλαβονοειδών βασίζεται σε έναν σκελετό 15 ατόμων άνθρακα, το φαινυλβενζοπυράνιο.



φαινυλβενζοπυράνιο

Πίνακας 3: Κυριότερα φλαβονοειδή

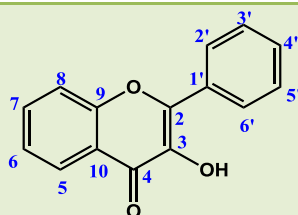
#### Φλαβόνες



Υποκατάσταση

Όνομα	5	6	7	8	3'	4'
Μπαϊκαλεΐνη	OH	OH	OH	H	H	H
Μπαϊκαλίνη	OH	OH	Γλουκουρονίδιο	H	H	H
Χρυσίνη	OH	H	OH	H	H	H
Απιγενίνη	OH	H	OH	H	H	OH
Λουτεολίνη	OH	H	OH	H	OH	OH

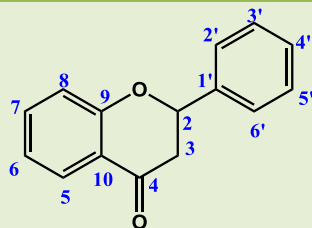
#### Φλαβονόλες



Υποκατάσταση

Όνομα	3	5	7	2'	3'	4'	5'
Καιμφερόλη	OH	OH	OH	H	H	H	OH
Κερκετίνη	OH	OH	OH	H	OH	OH	H
Μορίνη	OH	OH	OH	OH	H	OH	OH
Υπεροζίτης	Galactoside	OH	OH	H	OH	OH	H
Ρουτινοζίτης	-Rha-Glc	OH	OH	H	OH	OH	H

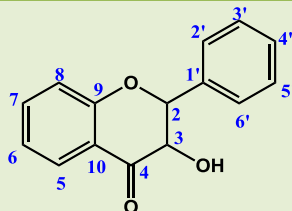
### Φλαβανόνες



#### Υποκατάσταση

Όνομα	5	7	8	2'	3'	4'	5'
Ναριγκενίνη	OH	OH	H	H	H	OH	H
Εριοδικπόλη	OH	OH	H	H	OH	OH	H
Εσπερετίνη	OH	OH	H	H	OH	OMe	H
Ναριγκίνη	OH	-Rha-Glc	H	H	H	OH	H
Εσπεριδίνη	OH	-Rha-Glc	H	H	OH	OMe	H

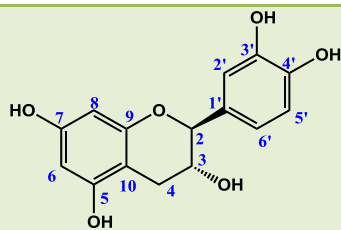
### Φλαβανονόλες



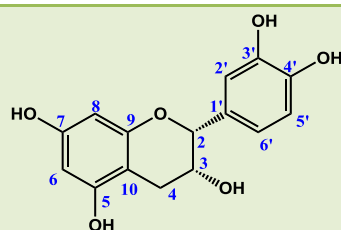
#### Υποκατάσταση

Όνομα	3	5	7	3'	4'	5'
Φουστίνη	OH	H	OH	OH	OH	H
Ταξιφολίνη	OH	OH	OH	OH	OH	H
Αμελοψίνη	OH	OH	OH	OH	OH	OH

### Φλαβανόλες



(+)-κατεχίνη  
(2R,3S)

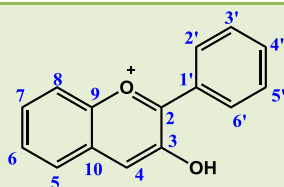


(-)-επικατεχίνη  
(2R,3R)

#### Υποκατάσταση

Όνομα	3	5'
(+)-Κατεχίνη	OH	H
(+)-Γαλλοκατεχίνη	OH	OH
(+)-3-ΟΓαλλοϋλο-γαλλοκατεχίνη	Galloyl	OH
(-)-Επικατεχίνη	OH	H
(-)-Επιγαλλοκατεχίνη	Galloyl	H
(-)-Γαλλοϋλο επικατεχίνη	OH	OH
(-)-Γαλλοϋλο επιγαλλοκατεχίνη	Galloyl	OH
Προκυανιδίνη B2	Διμερές της (-)-Επικατεχίνης	
Προκυανιδίνη C1	Τριμερές της (-)-Επικατεχίνης	
Τετραμερές προανθοκυανιδίνη	Τετραμερές της (-)Επικατεχίνης	
Προκυανιδίνη B4	(+)Κατεχίνη-(4 <sup>a</sup> -8)-(-)Επικατεχίνη	

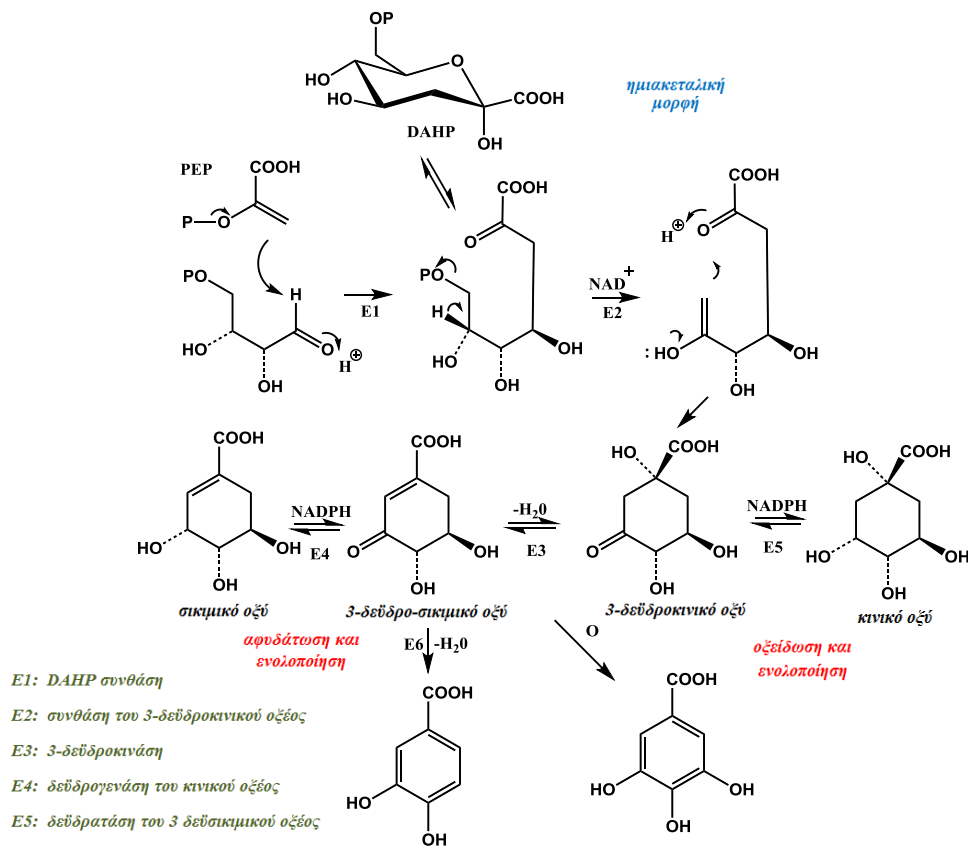
### Ανθοκυανιδίνες



Υποκατάσταση

Όνομα	3	5	7	3'	4'	5'
Πελαργονιδίνη	OH	OH	OH	H	OH	H
Κυανιδίνη	OH	OH	OH	OH	OH	H
Δελφινιδίνη	OH	OH	OH	OH	OH	OH

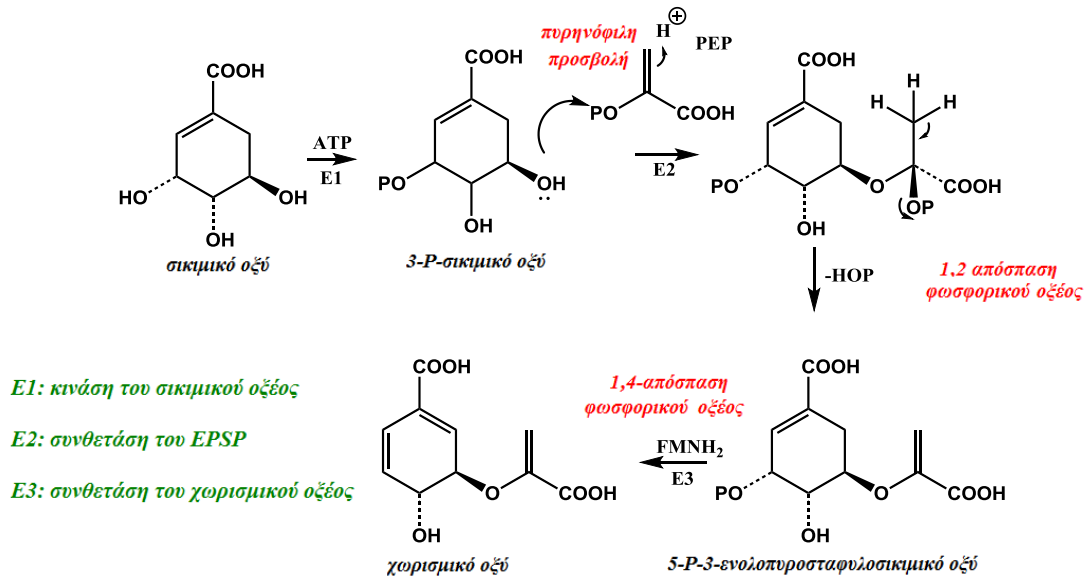
## 5.2. Βιοσύνθεση των φλαβονοειδών



Εικ 16: Μεταβολική οδός του σικιμικού οξέος

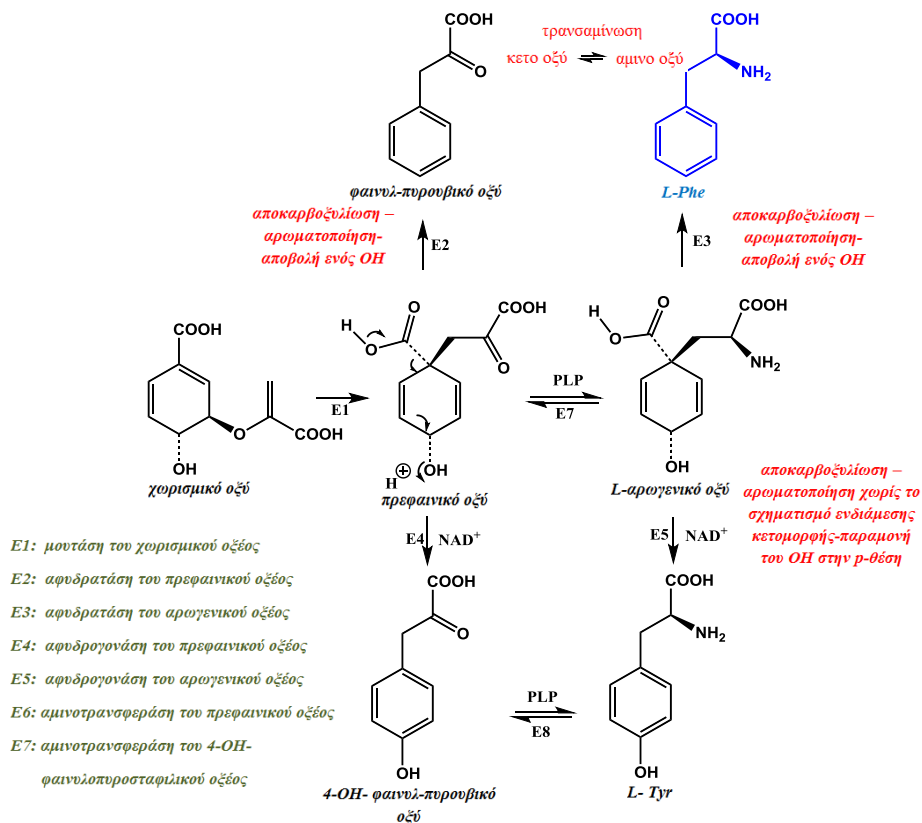
Ο βασικός ανθρακικός σκελετός των φλαβονοειδών προέρχεται από το συνδυασμό δυο μεταβολικών οδών, τη μεταβολική οδό του *σικιμικού οξέος* και τη μεταβολική οδό του *μηλονικού οξέος*. Η πρώτη ξεκινάει με τη συμπύκνωση δύο μορίων: της 4-φωσφοερυθρόζης που αποτελεί προϊόν της μεταβολικής οδού των φωσφοπεντοζών και του φωσφοενολπυροσταφυλικού οξέος, προϊόν της μεταβολικής οδού της γλυκόλυσης. Κατά την αλδολικού τύπου συμπύκνωση αυτών των δύο μορίων προκύπτει το 7-φωσφορο-3-δεοξυ-D-αραβινοεππουλοσονικό οξύ (DAHP). Η αντίδραση καταλύεται από την συνθάση του DAHP με αποβολή ενός μορίου φωσφορικού οξέος. Ακολουθεί μια ενδομοριακή αλδολική συμπύκνωση με αποβολή ενός δεύτερου μορίου φωσφορικού οξέος, παρουσία ενός μορίου NAD<sup>+</sup> το οποίο οξειδώνει το ελεύθερο υδροξύλιο. Σχηματίζεται το πρώτο κυκλικό ενδιάμεσο το 3-δεϋδροξυ-κινικό οξύ με την βοήθεια του ενζύμου συνθάση του 3-δεϋδροξυ-κινικού οξέος. Το κυκλικό ενδιάμεσο μπορεί να αναχθεί περαιτέρω προς κινικό οξύ. Το σικιμικό οξύ παράγεται από το 3-

δεϋδρο-κινικό οξύ μέσω του 3-δεϋδρο-σικιμικού οξέος που προκύπτει από την αφυδάτωση του πρώτου με την βοήθεια της 3-δεϋδροκινάσης. Η τελική αντίδραση καταλύεται από την δεϋδρογονάση του σικιμικού οξέος.



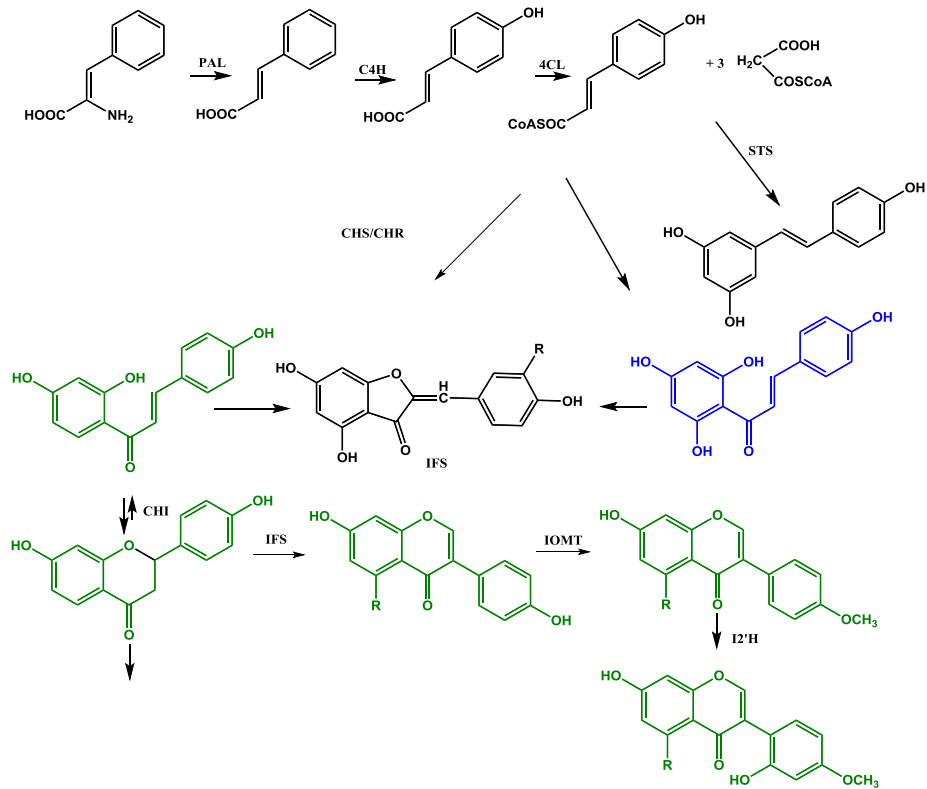
Εικ 17: Μετατροπή του σικιμικού οξέος σε 5-P-3-ενολοπυροσταφυλοσικιμικό οξύ

Μετά από μια σειρά αντιδράσεις, το σικιμικό οξύ μετατρέπεται σε χωρισμικό οξύ με την προσβολή ενός ακόμη μορίου φωσφοενολοπυροσταφυλικού οξέος ως πλευρική αιθερική αλυσίδα. Αρχικά το σικιμικό οξύ μετατρέπεται σε 3-P-σικιμικό οξύ μέσω ATP-εξαρτώμενης φωσφορυλίωσης και ακολουθεί αντίδραση προσθήκης-απόσπασης ενός μορίου φωσφοενολοπυροσταφυλικού οξέος (PEP) που οδηγεί στο σχηματισμό του 5-P-3-ενολοπυροσταφυλοσικιμικού οξέος (EPSP). Αυτή η αντίδραση καταλύεται από την συνθάση του EPSP. Η μετατροπή του τελευταίου σε χωρισμικό οξύ γίνεται μέσω μηχανισμού 1,4 απόσπασης ενός μορίου φωσφορικού οξέος με τη βοήθεια του φλαβινομονονουκλεοτιδίου (FNM). Το σικιμικό οξύ μετά από μια σειρά αντιδράσεων αποκαρβοξυλίωσης και τρανσαμίνωσης μετατρέπεται τελικά στο αμινοξύ φαινυλαλανίνη (Dewick M. Pau Third Edition).



**Εικ 18: Μετατροπή του χωρισμικού οξέος σε 4-OH φαινυλο-πυροσταφυλικό οξύ**

Οι δακτύλιοι Β και C προέρχονται από τη βιοχημική οδό του σικιμικού οξέος, από την φαινυλαλανίνη και το ρ-κουμαρικό οξύ. Ο δακτύλιος Α προέρχεται από τρία μόρια μηλονυλο-CoA. Το τελευταίο προέρχεται από το ακετυλο-CoA και το CO<sub>2</sub> (μεταβολική οδός του μηλονικού οξέος). Η αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο καρβοξυλάση του ακετυλο-CoA (ACC). Το ρ-κουμαροϋλο-CoA προέρχεται από τη φαινυλαλανίνη μετά από μια σειρά αντιδράσεων (οδός του φαινυλοπυροσταφυλικού οξέος). Από τη συμπύκνωση ενός μορίου ρ-κουμαροϋλο-CoA με τρία μόρια μαλονυλο-CoA σχηματίζεται η χαλκόνη της ναριγγενίνης η οποία μετατρέπεται εύκολα στην φλαβανόνη ναριγκενίνη. Το ένζυμο κλειδί σε αυτό το πρώτο στάδιο της βιοσύνθεσης των φλαβονοειδών αποδείχτηκε ότι είναι η συνθετάση της χαλκόνης (CHS) που καταλύει τη συμπύκνωση σε περισσότερα από ένα στάδια, τριών μορίων οξικού οξέος. Το τελευταίο προέρχεται από το μαλονυλο-CoA παρουσία ενός ενεργοποιημένου παραγώγου του κινναμικού οξέος που δεν είναι άλλο από το ρ-κουμαροϋλο-CoA με συνέπεια το σχηματισμό της χαλκόνης 4,2',4',6'-τετρα-υδροξυ-χαλκόνης από την οποία θα προκύψουν μετέπειτα οι διαφορετικές δομές των φλαβονοειδών.



Εικ 19: Σχηματισμός της 4,2',4'-3OH-χαλκόνης και της της 4,2',4'-3OH-χαλκόνης από τη συνθεάση της χαλκόνης (CHS)

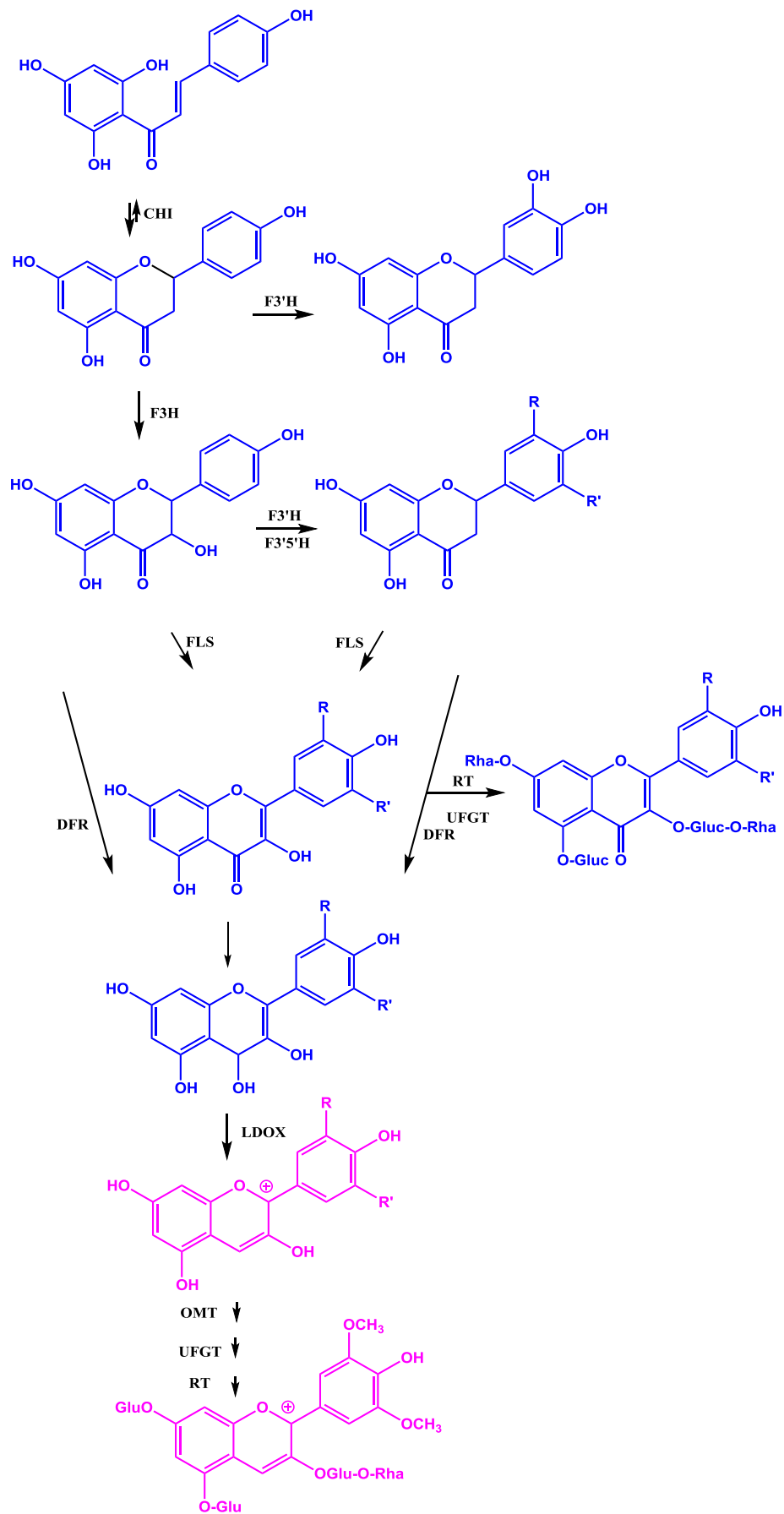
Η συνθεάση της χαλκόνης (CHS) σε συνδυασμό με την NADPH- εξαρτώμενη ρεδοκτάση του πολυκετιδίου (PKR) καταλύει το σχηματισμό της 4,2',4'-3-υδροξυ-χαλκόνης (6'-διοξυχαλκόνης = ισολικοιριπιγενίνης) και της αντίστοιχης της 4,2',4'-3-υδροξυ-χαλκόνης (λικοιριπιγενίνη) πάντα με τη χρήση των μαλονυλο-CoA και p-κουμαροϋλο-CoA. Η τετραϋδροξυ-χαλκόνη και η 6'-δεοξυχαλκόνη αποτελούν πρόδρομα μόρια για την βιοσύνθεση των αουρονών. Στα επόμενα στάδια της βιοσύνθεσης οι χαλκόνες, οι φλαβανόνες, οι διϋδροφλαβονόλες και οι φλαβαν-3,4-διόλες δρουν ως πρόδρομες ουσίες για την βιοσύνθεση των ανθοκυανινών, ενώ οι οδοί που οδηγούν στο σχηματισμό των φλαβονονών και φλαβονολών αποτελούν παρακλάδια των αρχικών σταδίων της βιοσύνθεσης των φλαβονοειδών. Η φλαβανόνη που προκύπτει από την στερεοεκλεκτική μετατροπή της χαλκόνης με τη βοήθεια του ενζύμου ισομεράση της χαλκόνης (CHI) αποτελεί ένα από τα βασικότερα σημεία διακλάδωσης στην πορεία της βιοσύνθεσης. Η ναριγγενίνη (5-υδροξυ-φλαβανόνη) λειτουργεί ως ενδιάμεσο στη βιοσύνθεση των ισοφλαβονονών, των φλαβονών, των διϋδροφλαβονολών και των φλαβαν-4-ολών. Η λικοιριπιγενίνη (5-δεοξυ-φλαβανόνη) λειτουργεί ως πρόδρομη ένωση στη βιοσύνθεση των ισοφλαβονονών ενώ παραμένει να αποδειχτεί η μετατροπή της σε άλλα 5-δεοξυ-φλαβονοειδή (φλαβονοειδή στα οποία λείπει το υδροξύλιο στον C5) και τα οποία είναι κοινά στο γένος *Leguminosae*. Ο σχηματισμός των



ισοφλαβονονών μέσω της οξειδωτικής αναδιάταξης της φλαβανόνης περιλαμβάνει μια μετάθεση (shift) 2-3 της αρυλικής ομάδας. Η αντίδραση καταλύεται από την συνθάση της 2-υδροξυφλαβανόνης (IFS) με την βοήθεια μιας αφυδρατάσης που αποσπά ένα μόριο  $H_2O$ . Η IFS μπορεί να έχει ως υποστρώματα τις 5-υδροξυ-φλαβανόνες και τις 5-δεϋδροξυφλαβανόνες. Η γενιστεΐνη και η δαΐσδεΐνη με τη σειρά τους αποτελούν ενδιάμεσα στη βιοσύνθεση όλων των άλλων ισοφλαβονοϊδών συμπεριλαμβανομένου και των περοκαρπανίων. Η εισαγωγή ενός διπλού δεσμού μεταξύ του C2 και του C3 της φλαβανόνης οδηγεί στο σχηματισμό των φλαβονών, μια αντίδραση που καταλύεται από δυο διαφορετικού τύπου συνθετάσες: τις FSI και FSII από τις οποίες η πρώτη χρειάζεται ως συμπαράγοντες το 2-οξυγλουταρικό οξύ,  $Fe^{2+}$  και ασκορβικό οξύ, ενώ η δεύτερη συνθάση χρειάζεται για να δράσει το συνένζυμο NADPH, και  $O_2$ . Η υδροξυλίωση της φλαβανόνης στον C3 οδηγεί στο σχηματισμό των διϋδροφλαβονολών, σε μια αντίδραση που καταλύεται από την 3-υδροξυλάση της φλαβανόνης (FHT) η οποία αναλογικά με την FNSI είναι μια εξαρτώμενη διοξυγενάση του 2-οξυγλουταρικού οξέος. Οι διϋδροφλαβονόλες είναι τα άμεσα υποστρώματα στη σύνθεση των φλαβονολών. Η σύνθεση αυτή καταλύεται από μια συνθάση της φλαβονόλης (FLS) μαζί με ακόμη μία εξαρτώμενη διοξυγενάση του 2-οξυγλουταρικού οξέος και των φλαβαν-3,4-διολών (λευκοκυανιδίνες). Οι διϋδροφλαβονόλες είναι επίσης τα ενδιάμεσα μόρια στην βιοσύνθεση των κατεχινών (φλαβαν-3-ολών), των προανθοκυανιδινών (διμερή και ολιγομερή των φλαβαν-3-ολών) και των ανθοκυανιδινών. Η στερεοεκλεκτική αναγωγή στην θέση 4 των διϋδροφλαβονολών καταλύεται από μια ρεδουκτάση της 4-διϋδροφλαβονόλης (DFR) με συνένζυμο το NADPH οδηγεί στο σχηματισμό των λευκοανθοκυανιδινών. Ένα ένζυμο ανάλογο με την DFR, η ρεδουκτάση της 4-φλαβανόνης καταλύει την NADPH-εξαρτώμενη αναγωγή του καρβονυλίου στη θέση 4 της φλαβανόνης με συνέπεια το σχηματισμό των φλαβαν-4-ολών που είναι τύπος λευκοκυανιδινών που αποτελούν τα άμεσα πρόδρομα μόρια της απιγενινιδίνης και της λουτεολιδίνης οι οποίες είναι 3-δεοξυανθοκυανιδίνες. Οι λευκοανθοκυανιδίνες αποτελούν τα άμεσα πρόδρομα μόρια στη σύνθεση των κατεχινών και των προανθοκυανιδινών. Οι κατεχίνες παράγονται μετά από αναγωγή στη θέση 4 της λευκοανθοκυανιδίνης η οποία καταλύεται από την ρεδουκτάση της 4-λευκοανθοκυανιδίνης (LAR). Υπάρχουν εν τέλει αποδείξεις ότι οι λευκοανθοκυανιδίνες είναι άμεσα πρόδρομα μόρια των ανθοκυανινών. Είναι πιθανόν πως κατά την αλληλουχία αυτών των αντιδράσεων, μια δεοξυγενάση δημιουργεί διπλό δεσμό μεταξύ του C2 και του C3 της λευκοανθοκυανιδίνης. Το προϊόν που προκύπτει είναι μια 2-φλαβεν-3,4-*cis*-διόλη η οποία μπορεί να υποστεί ισομερίωση προς ένα σταθερότερο θερμοδυναμικά προϊόν την 3-φλαβεν-2,3-διόλη η οποία χάνει αυθόρμητα ένα μόριο νερού δίνοντας έτσι την ανθοκυανιδίνη. Η γλυκοσυλίωση στη θέση

3 της ανθοκυανιδίνης θα πρέπει να είναι και το τελικό στάδιο της όλης βιοσυνθετικής διαδικασίας μιας και οι ανθοκυανιδίνες είναι ασταθείς στις φυσιολογικές συνθήκες του φυτικού κυττάρου.

Σε αυτήν την αλληλουχία ενζύμων θα πρέπει να προστεθούν και μια σειρά από άλλα ένζυμα τα οποία μπορούν να προκαλέσουν αλλαγές στο βασικό σκελετό των φλαβονοειδών μέσω αντιδράσεων υδροξυλίωσης, γλυκοσυλίωσης, ακυλίωσης, οι οποίες έχουν σκοπό να προσδώσουν στα μόρια σταθερότητα και υδροφιλικότητα. Από την άλλη, οι αντιδράσεις μεθυλίωσης και πρενυλίωσης προσδίδουν στα μόρια χαρακτήρα λιπόφιλο και αντιμικροβιακή δράση. Η προσθήκη υδροξυλίου στις θέσεις 3' και 5' καταλύεται από την 3'-υδροξυλάση των φλαβονοειδών (F3'H) και την 3',5'-υδροξυλάση των φλαβονοειδών (F3',5'H) που χρησιμοποιούν τα φλαβονοειδή ως υποστρώματα. Η μετέπειτα μεθυλίωση αυτών των υδροξυλίων καταλύεται από ειδικές μεθυλοτρανσφεράσες. Καταλήγοντας αξίζει να ειπωθεί ότι το *p*-κουμαροϋλο-CoA αντιπροσωπεύει το κύριο υπόστρωμα πάνω στο οποίο θα δράσει η CHS και θα προκύψουν τα 4'-υδροξυ-φλαβονοειδή. Τα φλαβονοειδή μπορεί να είναι υδροξυλιωμένα στις θέσεις 3,5,7,3',4' και 5'. Μερικά από αυτά τα OH μπορεί να είναι είτε μεθυλιωμένα είτε ακετυλιωμένα είτε σουλφονυλιωμένα. Στην περίπτωση που είναι γλυκοζυλιωμένα, ο γλυκοζιτικός δεσμός θα βρίσκεται είτε στη θέση 3 είτε στη θέση 7. Τα σάκχαρα που απαντώνται είναι η L-ραμνόζη, η D-γλυκόζη, η γλυκοραμνόζη, η γαλακτόζη ή η αραβινόζη. Μπορεί να παρατηρηθεί και πρενυλίωση σε άτομο του αρωματικού δακτυλίου. Παρακάτω απεικονίζεται η βιοσυνθετική οδός που ξεκινάει από την οδό του φαινυλοπροπανοϊκού οξέος και καταλήγει στη σύνθεση των φλαβονοειδών (Winkel-Shirley, B. 2002).



Εικ 20 : Σύνθεση των φλαβονοειδών

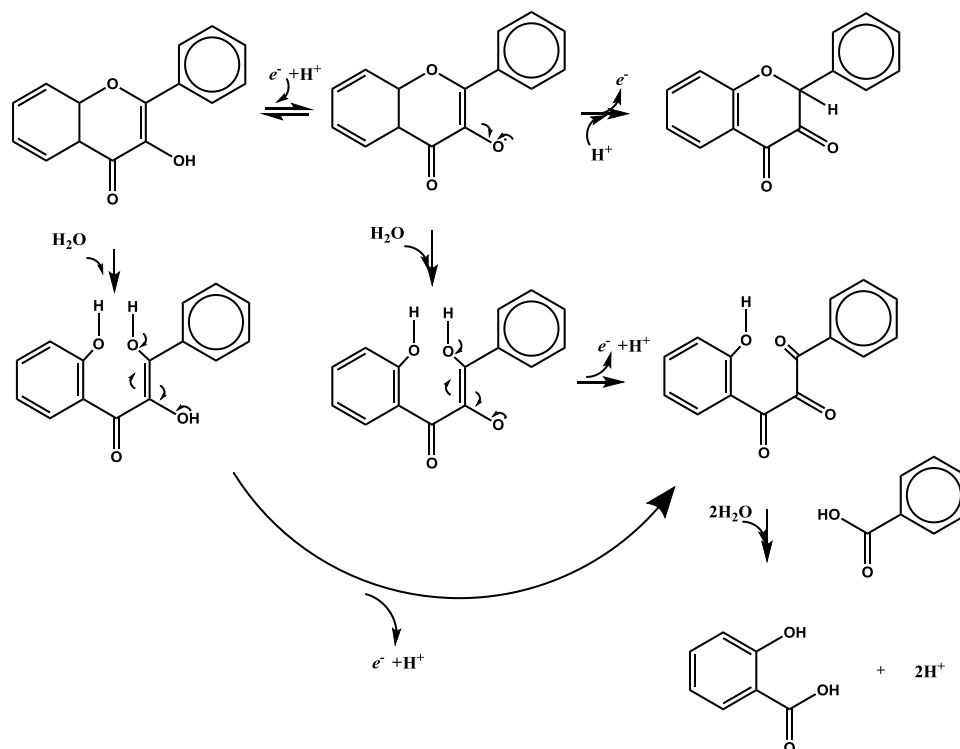
### 5.3. Ο Ρόλος των φλαβονοειδών στα φυτά

Τα φυτά έχουν πολλούς ρυθμιστικούς μεταβολίτες που ελέγχουν το χρώμα των ανθέων, τη γονιμοποίηση, την ωρίμανση των σπόρων, την ανάπτυξη καθώς και την αντιμετώπιση των συνθηκών του βιοτικού και του αβιοτικού στρες. Τα φλαβονοειδή παίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορα στάδια ανάπτυξης του φυτού καθώς και στην αντοχή του έναντι του περιβαλλοντικού στρες. Είναι εξαιρετικά ισχυροί αναστολείς των ενεργών ριζών οξυγόνου, αντιμαχόμενα διαρκώς τις συνθήκες της μολυσμένης ατμόσφαιρας. Αυτοί οι μεταβολίτες είναι αποτελεσματικοί στην αντιμετώπιση του στρες που προκαλείται από τη μεταβολή της θερμοκρασίας που οδηγεί στην καταστροφή των κυτταρικών μεμβρανών λόγω ψύχους, ξηρασίας και ασυνήθιστης αλατότητας. Τα φλαβονοειδή δρουν σαν μεταβιβαστές ασκώντας προστατευτική δράση έναντι μικροβιακών προσβολών. Επίσης είναι υπεύθυνα για τα μοναδικά χρώματα των ανθέων και καρπών τα οποία με τη σειρά τους είναι απαραίτητα για τη γονιμοποίηση και την αναπαραγωγή. Συμπερασματικά, η σπουδαιότητα των φλαβονοειδών στη φυσιολογία των φυτών είναι κεφαλαιώδης και για το λόγο αυτό συνεχείς προσπάθειες καταβάλλονται για τη καλύτερη κατανόηση της βιοσύνθεσης και των μηχανισμών δράσεώς τους.

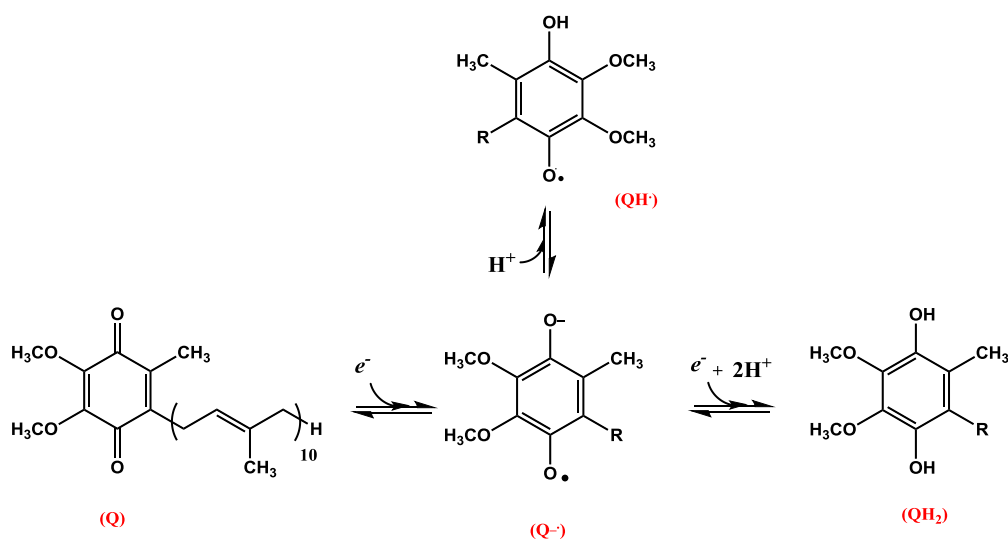
## 5.4. Φαρμακολογικές δράσεις των φλαβονοειδών

### 5.4.1 Αντιοξειδωτική δράση

Τα φλαβονοειδή και οι φαινολικές ενώσεις γενικότερα, αποτελούν φυσικούς παρεμποδιστές της οξειδωσης δρώντας αποτελεσματικά στην πρόληψη ασθενειών και στην αντιμετώπιση δυσμενών καταστάσεων που σχετίζονται με την δράση των ελευθέρων ριζών.



Εικ 21α: Φλαβονοειδή: σαρωτές ελευθέρων ριζών

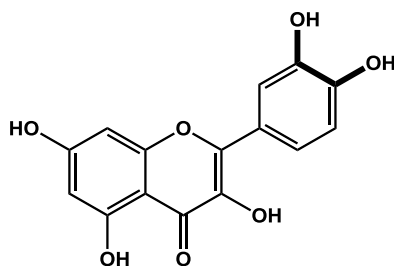


Εικ 21β: Ουβικινόλη: σαρωτής ελευθέρων ριζών

Στα παραπάνω δυο σχήματα καταδεικνύεται η ομοιότητα της δράσης των φλαβονοειδών με αυτή της ουβικινόνης, ως σαρωτές ελευθέρων ριζών. Τα φλαβονοειδή προστατεύουν τον οργανισμό με την ικανότητά τους να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες (Uma Devi et al., 1999; Re et al., 1999; Merati et al., 1992). Η ουβικινόνη (συνένζυμο Q) είναι ένας μηχανισμός άμυνας του οργανισμού και αποτελεί έναν από τους δύο μεταφορείς  $e^-$  στην αναπνευστική αλυσίδα. Η ουβικινόνη δεν εξουδετερώνει μονάχα ελεύθερες ρίζες αλλά συμπεριφέρεται και ως αναγωγικό, δυο ιδιότητες ταυτόσημες με αυτές των φλαβονοειδών. Τα  $e^-$  μεταφέρονται από το NADH στο  $O_2$  μέσω μιας αλυσίδας τριών μεγάλων πρωτεϊνικών συμπλόκων τα οποία ονομάζονται οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH-Q (Σύμπλοκο I), οξειδοαναγωγή του ζεύγους Q-κυτοχρώματος c (Σύμπλοκο III) και οξειδάση του κυτοχρώματος c (Σύμπλοκο IV). Η αναγωγή του ζεύγους ηλεκτρικού- Q (Σύμπλοκο II) δεν αντλεί πρωτόνια. Το συνένζυμο Q είναι ένα παράγωγο κινόνης με μια μακριά ισοπρενοειδή αλυσίδα. Η συνηθέστερη μορφή στα θηλαστικά περιέχει 10 μονάδες ισοπρενίου ( $Q_{10}$ ). Οι κινόνες υπάρχουν σε τρεις καταστάσεις οξειδωσης, στην πλήρως οξειδωμένη μορφή (Q), το συνένζυμο Q έχει δύο κετονικές ομάδες. Η προσθήκη ενός  $e^-$  και ενός  $H^+$  οδηγεί στη μορφή της ημικινόνης ( $QH\cdot$ ) η οποία μπορεί εύκολα να αποπρωτονιωθεί σχηματίζοντας το ανιόν της ρίζας της ημικινόνης ( $Q\cdot^-$ ). Η προσθήκη ενός δευτέρου  $H^+$  οδηγεί στην ουβικινόλη ( $QH_2$ ), την πλήρως ανηγμένη μορφή του συνενζύμου Q.

### Ρόλος του B δακτυλίου

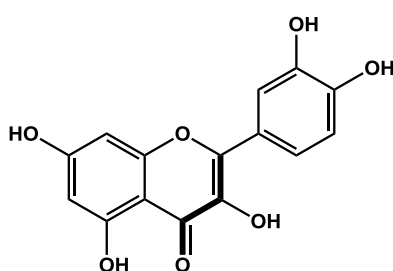
Σύμφωνα με τον (Bors 1990) ο δακτύλιος B αποτελεί κύριο στόχο των ελευθέρων ριζών. Η απαραίτητη προϋπόθεση που πρέπει να πληροί αυτός ο δακτύλιος είναι η παρουσία δομής της κατεχόλης με δύο υδροξυ- ομάδες σε ο-θέση η οποία και αποτελεί τον κύριο στόχο των ριζών στην περίπτωση φλαβονοειδών με 2,3 διπλό δεσμό φλαβάν-3-όλες, φλαβανόνες. Η δομή της κατεχόλης προσφέρει μια σταθερότητα στην αρυλική ρίζα που σχηματίζεται και συμμετέχει στον απεντοπισμό των ηλεκτρονίων.



Η παρουσία και τρίτης υδροξυλομάδας σε ο- θέση δεν οδηγεί στο ίδιο αποτέλεσμα, πράγμα το οποίο συμβαίνει και στην περίπτωση που τα δύο ΟΗ βρίσκονται σε μ- θέση μεταξύ τους όπου και παρατηρείται μείωση της δραστηριότητας.

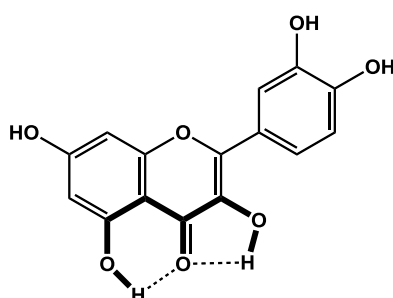
### Ρόλος του C δακτυλίου

Ο 2,3 διπλός δεσμός που βρίσκεται σε συζυγία με το καρβονύλιο της θέσης 4 συμμετέχει στον απεντοπισμό των ηλεκτρονίων του δακτυλίου B.

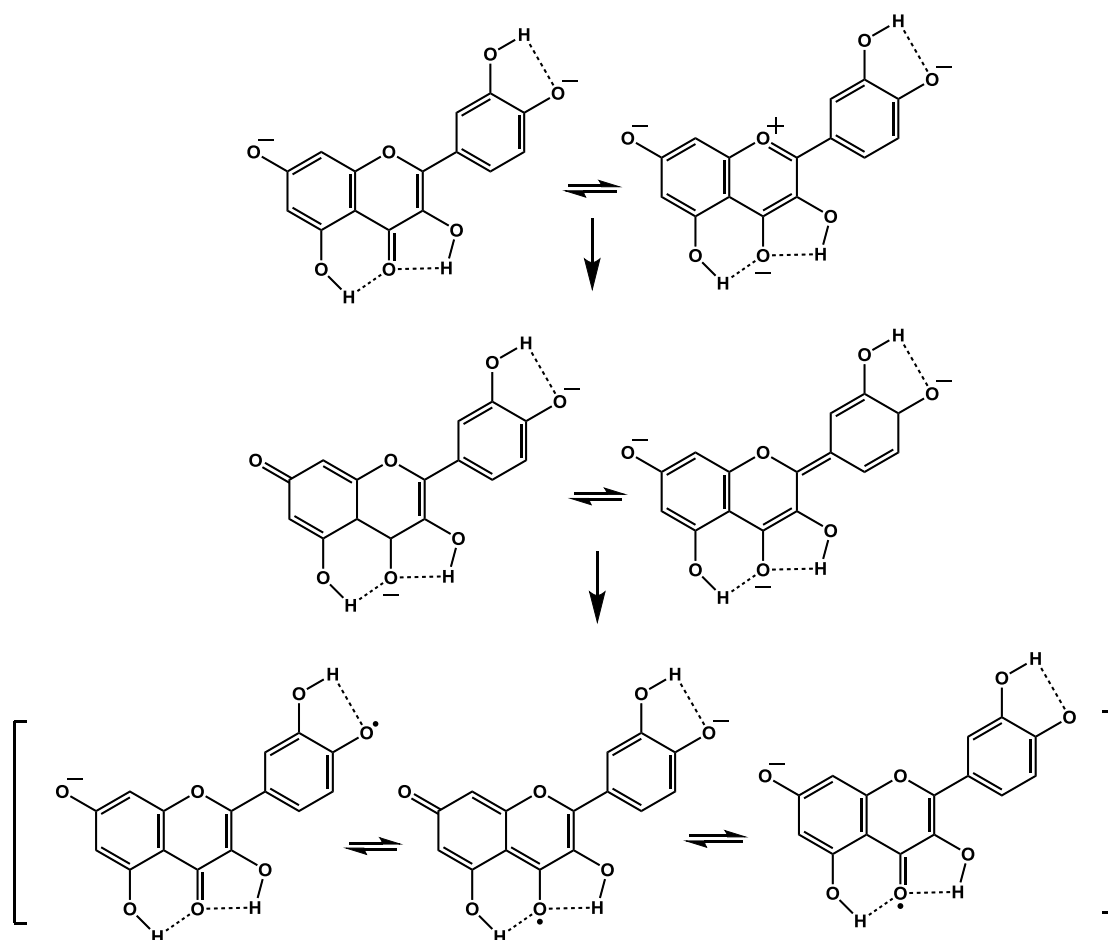


### Ρόλος του A δακτυλίου

Η επιπλέον παρουσία των 3- και 5- ΟΗ έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της ικανότητας σάρωσης των ελευθέρων ριζών.



Παρακάτω φαίνεται το μόριο της κερκετίνης με τον απεντοπισμό της ρίζας στους τρεις δακτυλίους.



Εικ 22: Απεντοπισμός της ρίζας στους τρεις δακτυλίους της κερκετίνης

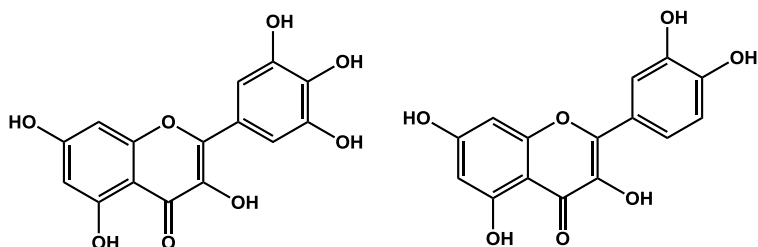
**Συμπερασματικά προκύπτουν τα εξής**

- α) η δομή της κατεχόλης στον Β δακτύλιο έχει την τάση να σταθεροποιήσει την ρίζα
- β) η συζυγία του Β δακτυλίου με το καρβονύλιο της θέσης 4 επιτρέπει τον απεντοπισμό της ρίζας από τον Β δακτύλιο
- γ) οι 3- και 5- OH ομάδες συμβάλλουν στον απεντοπισμό της ρίζας από το καρβονύλιο και στους δύο υποκαταστάτες

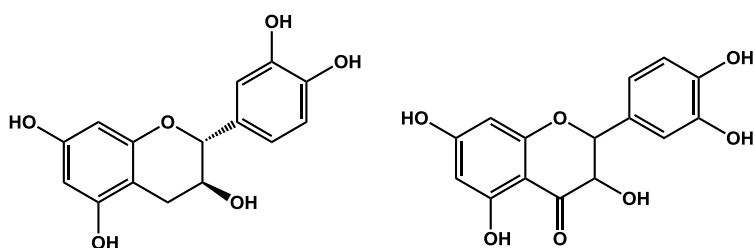
Ο συνδυασμός όλων αυτών των δομικών χαρακτηριστικών συμβάλλει στον εκτενέστερο απεντοπισμό της αρυλικής ρίζας και στη σταθεροποίηση της. (Silva et al., 2002). Συγκεκριμένα, όταν σπάει ο δεσμός O-H με το σχηματισμό της ρίζας, σχηματίζεται ένας δεσμός H μεταξύ της ρίζας και του διπλανού OH που σταθεροποιεί τη ρίζα και την ενθαλπία ιονισμού του δεσμού O-H. Στην περίπτωση που ο δακτύλιος Β έχει τη δομή της πυρογαλλόλης



(3',4',5'-OH) ο δεσμός O-H του κεντρικού υδροξυλίου είναι ο πιο ασθενής λόγω της παρουσίας των δύο OH σε *o*-θέση τα οποία μπορούν να σχηματίσουν δυο δεσμούς H με τη ρίζα. Σύμφωνα με αυτά η μυρικετίνη εμφανίζει μεγαλύτερη δραστικότητα από την κερκετίνη.



Η φλαβανόλη κατεχίνη και η φλαβανόνη ταξιφολίνη οι οποίες έχουν τον ίδιο βαθμό υδροξυλίωσης, εμφάνισαν αντιοξειδωτική δράση παρόμοια με αυτή της κερκετίνης.



Η κατεχίνη στερείται του καρβονυλίου στη θέση 4 καθώς και του διπλού δεσμού στη θέση 2,3 ενώ στην ταξιφολίνη παρατηρείται έλλειψη του διπλού δεσμού.

Η κερκετίνη, η ταξιφολίνη, η κατεχίνη με διαφορετικές βασικές δομές αλλά με τον ίδιο βαθμό υδροξυλίωσης σε κοινά άτομα άνθρακα (3,5,7,3',4'-OH) παρουσίασαν παρόμοια αντιοξειδωτική ικανότητα. Οι δομές αυτών των φλαβονοειδών είχαν ως κοινό χαρακτηριστικό την δομή της κατεχόλης στο B δακτύλιο (3',-4'-OH). Η καιμφερόλη (3,5,7,4'-OH) αν και δεν χαρακτηρίζεται από την παρουσία της κατεχόλης, μολταύτα παρουσιάζει υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα γεγονός που μπορεί να αποδοθεί τόσο στην παρουσία του OH στη θέση 3 όσο και του διπλού δεσμού στη θέση 2,3. Επομένως η δομή της κατεχόλης στο B δακτύλιο παίζει καθοριστικό ρόλο αλλά στην περίπτωση που αυτή απουσιάζει τον ρόλο αναλαμβάνει η οξο ομάδα στη θέση 4 και ο διπλός δεσμός στη θέση 2,3.

## **Ρόλος της γλυκοσυλίωσης**

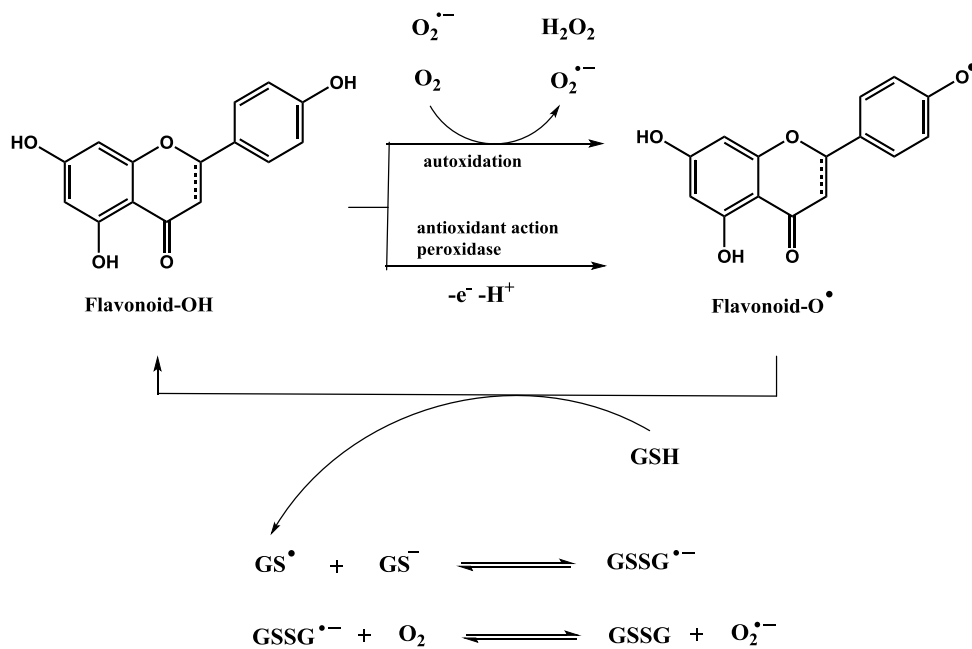
Τα άγλυκα μόρια παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση έναντι των αντίστοιχων γλυκοσυλιωμένων μορίων (Ratty et al., 1999),(Gao et al.,1999). Η αντιοξειδωτική δράση μειώνεται ακόμη περισσότερο όσο αυξάνεται ο βαθμός της γλυκοσυλίωσης. Επίσης σημαντικό ρόλο παίζει και η θέση της γλυκοσυλίωσης καθώς και η δομή του αντίστοιχου σακχάρου. Η γλυκοσυλίωση στην θέση 4' είναι πιο ευνοϊκή από την 3 και 7 θέση. Η C- γλυκοσυλίωση στο δακτύλιο A επίσης συμβάλλει στη μείωση της δραστηριότητας. Το γεγονός αυτό αποδίδεται στο ότι η O-γλυκοσυλίωση δεν επιτρέπει την επιπεδότητα του δακτυλίου B με το υπόλοιπο του μορίου με αποτέλεσμα να μην παρατηρείται ο απεντοπισμός της ρίζας από το B δακτύλιο στο υπόλοιπο του μορίου. (Van Acker et al., 1996),(Bors et al., 1990).

## **Ρόλος της O-μεθυλίωσης**

Παρόμοια στην περίπτωση της μεθυλίωσης, στερεοχημικοί παράγοντες είναι αυτοί που καθορίζουν την μείωση της δραστηριότητας προκαλώντας αλλαγές στην επιπεδότητα του μορίου. Η μεθυλίωση του B δακτυλίου επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό την αντιοξειδωτική δράση όπως φαίνεται στην περίπτωση της 4'Ο-μεθυλίωσης της κερκετίνης καθώς και του 3',4'-διμεθυλαιθέρα της καιμφερόλης όπου η αντιοξειδωτική δράση μειώνεται στο μισό.

### **5.4.2. Προοξειδωτική δράση**

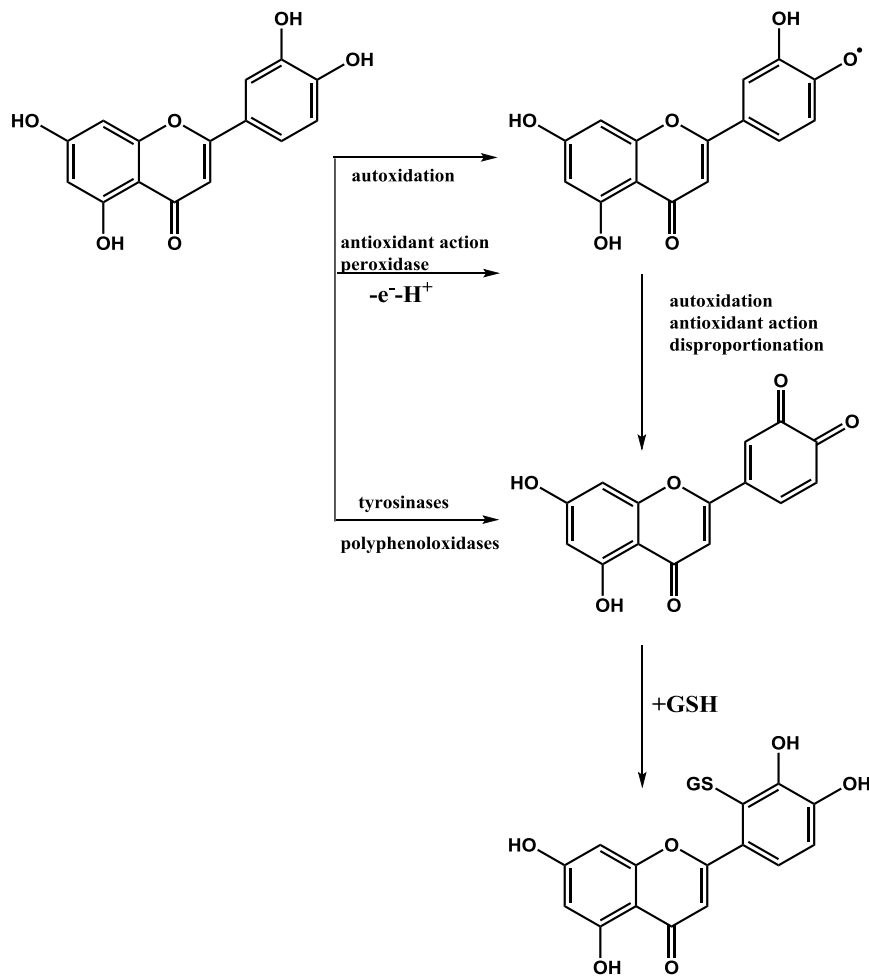
Τα φλαβονοειδή φαινολικού τύπου στον B δακτύλιο, όπως η απιγενίνη και η ναριγκενίνη, έχει βρεθεί ότι μπορούν να αυξήσουν το σχηματισμό ελευθέρων ριζών παρουσία της γλουταθειόνης και ενζύμων προερχόμενων από το θυρεοειδή αδένος και τον μυελό των οστών (Galati et al., 1999, 2001). Ειδικά αυτά τα φλαβονοειδή βρέθηκε ότι αυξάνουν το ρυθμό της λιπιδικής υπεροξειδωσης όταν διαφορετικού τύπου φλαβονοειδή με την αντιοξειδωτική τους δράση αναστέλλουν την λιπιδική υπεροξειδωση (Galati et al., 1999). Οι προοξειδωτικές ιδιότητες αυτών των φλαβονοειδών που οδηγούν σε οξειδοαναγωγικό κύκλο την γλουταθειόνη φαίνεται να σχετίζονται με το υψηλό οξειδωτικό δυναμικό της φαινοξυλικής ρίζας του φλαβονοειδούς (Sudhar and Armstrong,1990; Galati et al., 1999; Metodiewa et al.,1999). Ο μηχανισμός δράσης αυτού του είδους των φλαβονοειδών φαίνεται στο παρακάτω σχήμα:



Εικ 23: Μηχανισμός προοξειδωτικής δράσης των φλαβονοειδών φαινολικού τύπου στο Β δακτύλιο

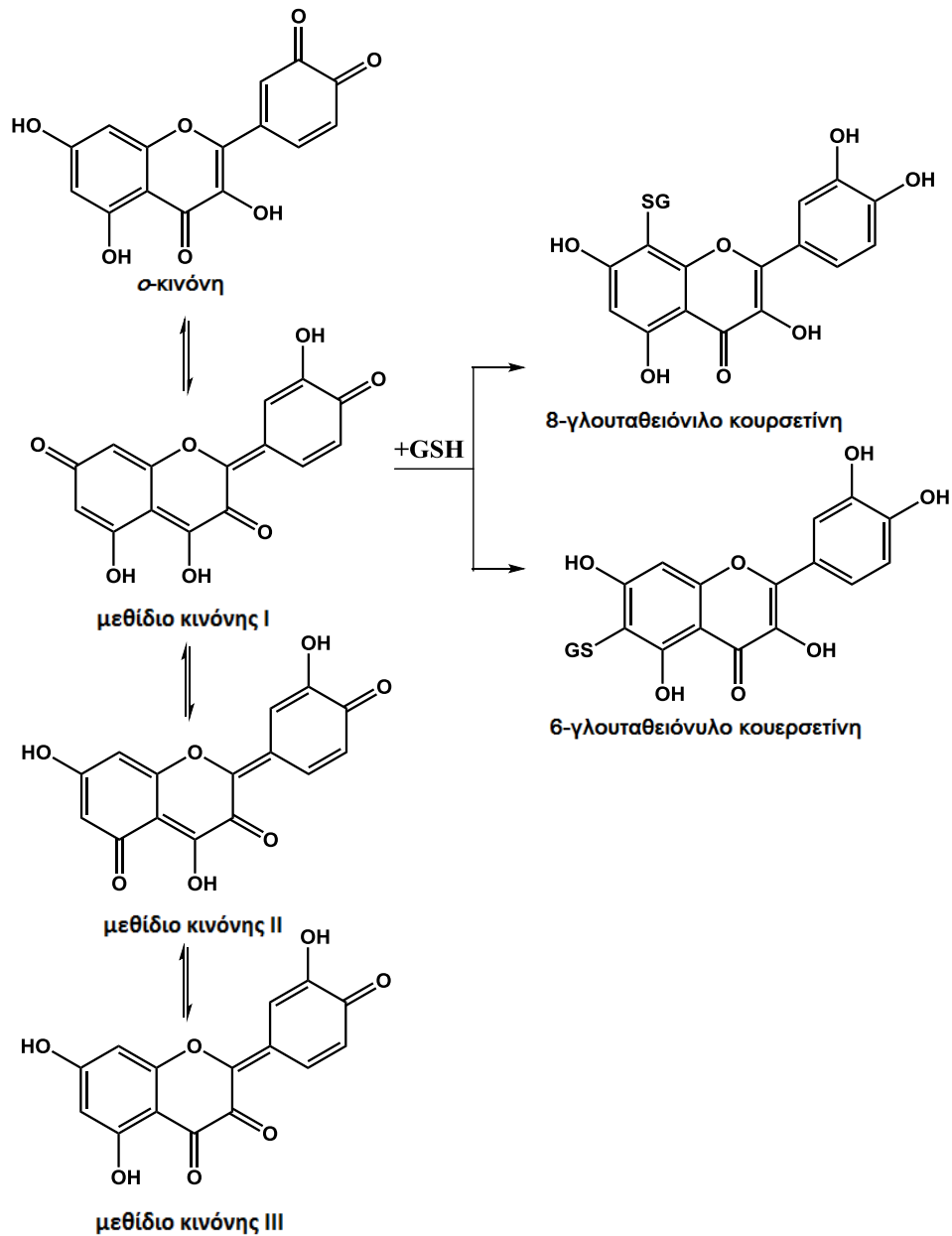
#### Προοξειδωτικές ιδιότητες φλαβονοειδών φαινολικού τύπου

Η ενζυμική αυτοοξειδωση του φλαβονοειδούς οδηγεί στο σχηματισμό ρίζας ημικινόνης η οποία σαρώνεται από τη γλουταθειόνη που στη συνέχεια είναι σε θέση να αναγεννήσει το φλαβονοειδές ταυτοχρόνως με τη δημιουργία της θειολο-ρίζας της γλουταθειόνης. Η θειολο-ρίζα ακολούθως μπορεί να αντιδράσει με τη γλουταθειόνη δημιουργώντας τη δισουλφιδική ρίζα η οποία ταχύτατα ανάγει το μοριακό οξυγόνο σε ρίζες του σουπεροξειδίου του υδρογόνου (Galati et al., 1999). Ο δεύτερος μηχανισμός προοξειδωτικής δράσης σχετίζεται με το σχηματισμό προϊόντων οξειδωσης τύπου κινόνης κυρίως στην περίπτωση φλαβονοειδών όπου ο Β δακτύλιος είναι 3',4'-κατεχόλης (κουερσετίνη, λουτεολίνη, φυσετίνη). Σε αυτού του είδους τα φλαβονοειδή δεν παρατηρήθηκε συνοξειδωση της γλουταθειόνης κατά την οξειδωσή τους σε ημικινόνη, γεγονός που μπορεί να αποδοθεί στο χαμηλότερο οξειδωτικό δυναμικό του ηλεκτρονίου (Galati et al., 1999).



Εικ 24: Ενζυμική αυτοοξειδωση φλαβονοειδούς με το σχηματισμό ρίζας ημικινόνης

Έχει βρεθεί ότι σε αυτή την περίπτωση σχηματίζονταν τοξικοί μεταβολίτες τύπου κινόνης, οι οποίοι σαρώνονται αυτή τη φορά όχι μέσω της αναγωγής της γλουταθειόνης αλλά μέσω του σχηματισμού προϊόντων προσθήκης με τη γλουταθειόνη (Boersma et al., 2000; Awad et al., 2000, 2001; Galati et al., 2001). Η οξείδωση των κατεχολών προς κινόνες και τα ισομερή μεθίδια κινόνης έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία πολύ ισχυρών ηλεκτρονιόφιλων που δύνανται να προκαλέσουν αλκυλίωση του DNA (Mac-Gregor and Jurd, 1978; Brown, 1980; Middleton and Kandaswami 1994). Αυτό που προξενεί ενδιαφέρον είναι ότι οι απαραίτητες προϋποθέσεις που πρέπει να πληρούνται για την εμφάνιση αντιοξειδωτικής δράσης είναι αντίστοιχες με τις προϋποθέσεις για εμφάνιση προ οξειδωτικής δράσης μέσω του σχηματισμού μεθιδίου κινόνης.

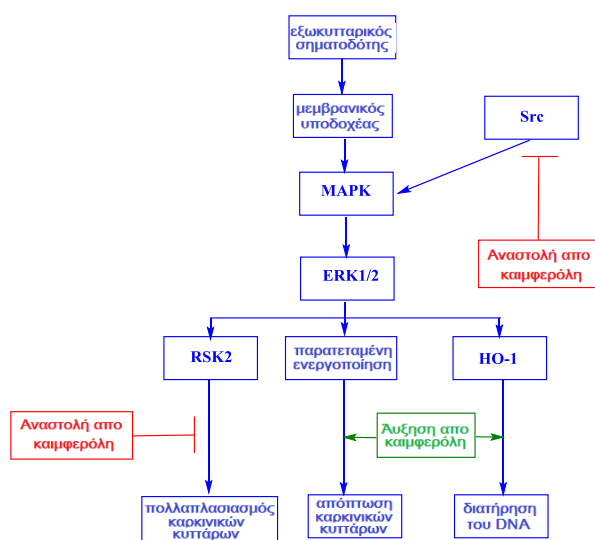


Εικ 25: Ενζυμική αυτοοξειδωση φλαβονοειδούς με Β δακτύλιο τύπου κατεχόλης με το σχηματισμό μεθιδίων

### 5.4.3. Αντικαρκινική δράση

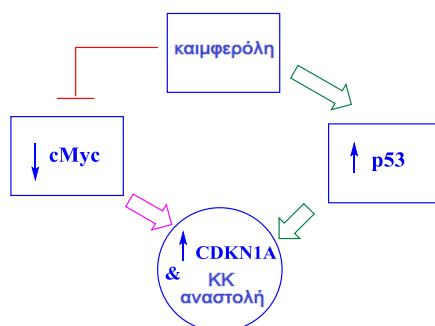
Η καιμφερόλη επιδρά στην διαδικασία της απόπτωσης και αναστέλλει την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων μέσω της οδού ERK-MAPK. Η οδός αγωγής σήματος ξεκινάει με την πρόσδεση ενός αγγελιοφόρου μορίου σε συγκεκριμένη μεμβρανική πρωτεΐνη. Η μεμβρανική πρωτεΐνη ενεργοποιεί την ενδοκυττάρια πρωτεΐνη RAS που στη συνέχεια ενεργοποιεί μια σειρά κινασών, εκκινώντας έτσι τον καταρράκτη φωσφορυλίωσης. Το μήνυμα φτάνει στον πυρήνα όπου μπορεί να επιφέρει αλλαγές στην μεταγραφή και τη μετάφραση. Η

ενεργοποίηση αυτής της οδού από την καιμφερόλη μπορεί να αποτρέψει την καταστροφή του DNA παρεμποδίζοντας τα κύτταρα να μετασχηματιστούν σε καρκινικά. Η παρουσία της καιμφερόλης βρέθηκε ότι αυξάνει την έκφραση του γονιδίου της οξυγενάσης της αίμης 1 το οποίο καταβολίζει την αίμη (HO)-1 και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της αντιοξειωτικής ικανότητας των κυττάρων (Hong al., 2009). Η χρήση της καιμφερόλης ενίσχυσε την βιωσιμότητα των κυττάρων ως απάντηση στο οξειδωτικό stress, λειτουργώντας ως σαρωτής ελευθέρων ριζών που τείνουν να καταστρέψουν το DNA. Το σημαντικότερο όλων είναι ότι η προστατευτική δράση της καιμφερόλης περιορίζεται μόνο στα φυσιολογικά κύτταρα ενώ η χορήγησή της σε καρκινικά κύτταρα ενισχύει το οξειδωτικό stress αυξάνοντας την παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου, με αποτέλεσμα τα καρκινικά κύτταρα να οδηγούνται σε απόπτωση. Εκτός αυτού η καιμφερόλη μεταβάλλει και κάποιες πρωτεΐνες που υπεισέρχονται σε αυτήν την οδό όπως είναι ο RSK2 αναστολέας κλειδί της απόπτωσης (Bonni al., 1999; Luo al., 2012). Έχει βρεθεί ότι η καιμφερόλη προσδένεται στην πρωτεΐνη RSK2 ειδικότερα στα αμινοξέα Val<sup>82</sup> και Lys<sup>100</sup> που σχετίζονται άμεσα με τη δράση της RSK2 (Choi al., 2009). Επιπλέον η καιμφερόλη εμφανίζεται να αναστέλλει την δράση της Src κινάσης (Lee al., 2010b) η οποία ενεργοποιεί την κινάση MAPK που με τη σειρά της ενεργοποιεί την COX-2 που είναι δείκτης ανάπτυξης καρκίνου του δέρματος (Athar et al., 2001). Η υπεριώδης ακτινοβολία διαδραματίζει πρωτεύοντα ρόλο στην δραστικότητα της Src κινάσης, ενώ από την άλλη η καιμφερόλη είναι ένας ισχυρός ανταγωνιστικός αναστολέας της κινάσης αυτής που χρειάζεται για τη δράση της ένα μόριο ATP. Η καιμφερόλη προσδένεται στην κινάση Src στο σημείο πρόσδεσης του ATP με αποτέλεσμα να δρα προστατευτικά έναντι της ανάπτυξης καρκίνου του δέρματος όπως φαίνεται από το παρακάτω σχήμα.



Εικ 26: Επίδραση της καιμφερόλης στην οδό MAPK (Adaptation pic. from A.Y. Chen, Y.C. Chen, 2013)

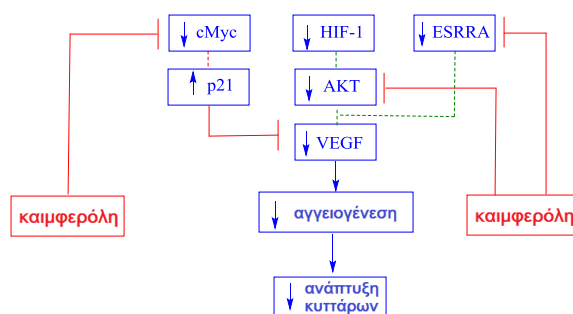
Για να καταστούν τα καρκινικά κύτταρα ικανά να πολλαπλασιαστούν, εισέρχονται στον κυτταρικό κύκλο ο οποίος ελέγχεται πολλαπλά. Ο παράγοντας ενεργοποίησης της μίτωσης (MPF) στο σημείο ελέγχου G<sub>2</sub>/M είναι ο κύριος ρυθμιστής της μετάβασης από τη φάση G<sub>2</sub> στη φάση M. Η καιμφερόλη έδειξε να μειώνει τα επίπεδα των κινασών που εξαρτώνται από κυκλίνες (CDK1) στα καρκινικά κύτταρα του μαστού MDA-MB-453 (Choi et al., 2009). Συγκεκριμένα η καιμφερόλη ήταν ικανή να αναστείλει τον πολλαπλασιασμό σταματώντας το κυτταρικό κύκλο στο στη φάση G<sub>2</sub>. Γενικά στα καρκινικά κύτταρα παρατηρείται υπερέκφραση του ογκογονιδίου cMyc (Jung, et al., 2008) και υπάρχουν ενδείξεις ότι τα αυξημένα επίπεδα της cMyc ανταγωνίζονται τον αναστολέα της κυκλινο-εξαρτώμενης κινάσης CDKN1A που αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο με την σύνδεσή της στην CDK. Όταν γίνει συγχορήγηση της καιμφερόλης με Cis-πλατίνη κατά τη διάρκεια της χημειοθεραπείας σε καρκίνο των ωοθηκών φαίνεται ότι μειώνονται τα επίπεδα του ογκογονιδίου cMyc και αυξάνονται τα επίπεδα της κυκλινο-εξαρτώμενης κινάσης CDKN1A. Η Cis-πλατίνη από μόνη της αποτυγχάνει να καταστρέψει τα καρκινικά κύτταρα, όμως παρουσία της καιμφερόλης προκαλεί απόπτωση μέσω της παρεμπόδισης του ογκογονιδίου cMyc. Η παρουσία της καιμφερόλης φαίνεται να προκαλεί μεγάλη αύξηση των επιπέδων του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 στα καρκινικά κύτταρα του μαστού MDA-MB-453 (Choi et al., 2009). Η καιμφερόλη προκαλεί φωσφορυλίωση του p53 στην σερίνη-15, ένα φαινόμενο συνδεδεμένο με την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων (Ito et al., 2004).



Εικ 27 : Επίδραση της καιμφερόλης στον κυτταρικό κύκλο (Adaptation pic. from A.Y. Chen, Y.C. Chen, 2013)

Πρόσφατα έχει μελετηθεί η αποτελεσματικότητα της καιμφερόλης να αναστέλλει την καρκινική αγγειογένεση τόσο σε *in vitro* όσο και σε *in vivo* μελέτες (Liu et al., 2009a, 2009b; Luo 2012a). Στα MDA καρκινικά κύτταρα του μαστού η καιμφερόλη αναστείλει την απελευθέρωση του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα VEGF (Schindler & Mentlein 2006). Η καιμφερόλη φαίνεται να αναστέλλει την έκφραση του παράγοντα VEGF και συνεπώς της αγγειογένεσης μέσω της οδού ERK-NFκB-cMyc-p21 (Luo et al., 2012a). Η

χορήγηση της καιμφερόλης αναστέλλει την φωσφορυλίωση της ERK και την έκφραση του παράγοντα NFκB και cMyc, η μείωση του οποίου όπως αναφέρθηκε προηγουμένως προάγει την έκφραση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p21. Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p21 ανταγωνίζεται την έκκριση του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα VEGF (Luo et al., 2012a). Καταστάσεις υποξίας ενεργοποιούν τον παράγοντα HIF-1 ο οποίος μέσω της οδού P13K/AKT διεγείρει την έκφραση του ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα VEGF (Luo et al., 2009). Παρόμοια η καιμφερόλη αναστέλλει τη δράση του ESRRA μειώνοντας τα επίπεδα mRNA. Ο ESRRA είναι ένας ξεχωριστός ρυθμιστής που σχετίζεται με την οιστρογονική δράση και θεωρείται ένας εκκινητής της καρκινογένεσης. Επομένως η καιμφερόλη είναι ένας διευρυμένος ανταγωνιστής του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα VEGF αναστέλλοντας την σύνθεσή του από όλες τις κατευθύνσεις όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα:



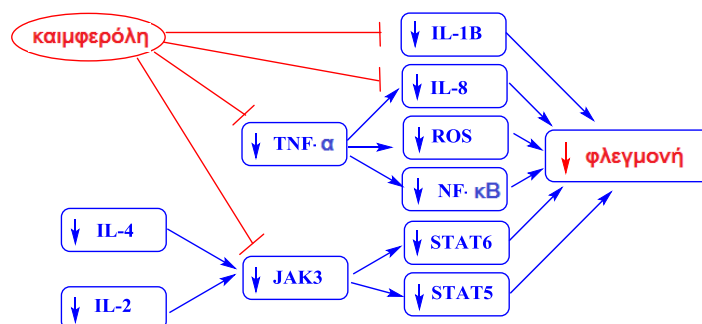
Εικ 28 : Επίδραση της καιμφερόλης στην αγγειογένεση (Adaptation pic. from A.Y. Chen, Y.C. Chen, 2013)

#### 5.4.4. Αντιφλεγμονώδη δράση

Έχει δειχθεί ότι η καιμφερόλη προκαλεί μείωση των επιπέδων της ιντερλευκίνης-6 στον ορό του αίματος (Bobe et al., 2010). Αυτή η μείωση των επιπέδων της ιντερλευκίνης IL-6 οδηγεί στη μείωση της πιθανότητας εμφάνισης αδενώματος. Κατά τη διάρκεια της φλεγμονώδους απόκρισης παράγονται ελεύθερες ρίζες οι οποίες δρουν ως αντιμικροβιακά (Hussain et al., 2003). Με τα ασύζευκτα ζεύγη ηλεκτρονίων οι ρίζες είναι ασταθή προϊόντα έτοιμα να βλάψουν το DNA και να επιταχύνουν τις διαδικασίες γήρανσης. Η υπερσυσσώρευσή τους στον οργανισμό μπορεί να οδηγήσει στην εξαλλαγή των κυττάρων. Από την άλλη πλευρά ο οργανισμός πρέπει να αντικαταστήσει τα κατεστραμμένα κύτταρα μέσα από την ενεργοποίηση σημάτων της φλεγμονής τα οποία μεταφέρονται στα εναπομείναντα κύτταρα για να ξεκινήσουν τη διαδικασία μίτωσης και αποκατάστασης των ιστών (Chen et al., 2003). Εάν έστω και ένα κύτταρο είναι καρκινικό, η φλεγμονή θα παρέχει το ιδανικό περιβάλλον για την ανάπτυξη του όγκου. *In vitro* μελέτες έδειξαν ότι η καιμφερόλη αναστέλλει την έκφραση της ιντερλευκίνης-1B



(IL-1B) και του παράγοντα νέκρωσης όγκου TNF (Kowalski et al., 2005). Αυτές οι δύο κυτοκίνες προάγουν την ενεργοποίηση συγκεκριμένων ενζύμων κλειδιά στην φλεγμονώδη απόκριση. Η καιμφερόλη μειώνει τα επίπεδα mRNA στις δύο κυτοκίνες αναστέλλοντας την μεταγραφή τους και μαζί τα επακόλουθα αποτελέσματα. Οι δύο αυτές ιντερλευκίνες σχετίζονται με την εκδήλωση πληθώρας αυτοάνοσων νοσημάτων όπως η σκλήρυνση κατά πλάκας. Η καιμφερόλη βρέθηκε ότι διαταράσσει πολλές επαγόμενες δράσεις του παράγοντα νέκρωσης όγκου TNF (Lee et al., 2009) ο οποίος προάγει την ενεργοποίηση της ιντερλευκίνης-8 (IL-8) επαγωγέα της αγγειογένεσης. Η καιμφερόλη αναστέλλει όχι μόνο την ενεργοποίηση της αλλά και του γονιδίου που την κωδικοποιεί (Qazi et al., 2011). Μια ακόμη λειτουργία του παράγοντα νέκρωσης όγκων TNF είναι και η ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ που επάγει την μεταγραφή πρωτεϊνών που σχετίζονται με τη φλεγμονή. Η χορήγηση καιμφερόλης ανέστειλε τη μετακίνηση του μεταγραφικού παράγοντα μέσα στο κύτταρο, αποτρέποντας έτσι την επαγωγή γονιδίων στόχων (Lee et al., 2009). Η διέγερση του παράγοντα νέκρωσης όγκων TNF φαίνεται να σχετίζεται με την αύξηση σε αριθμό των ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS). Η χορήγηση καιμφερόλης μείωσε δραματικά την παραγωγή ROS σε φυσιολογικά κύτταρα HEK 293 (Lee et al., 2009). Η ιντερλευκίνη-4 (IL-4) επάγει την διαφοροποίηση των Τ-λεμφοκυττάρων και σχετίζεται με αυτοάνοσα νοσήματα και με την απορρύθμιση της φλεγμονής (Finnegan et al., 2002). Η ιντερλευκίνη-4 (IL-4) φωσφορυλιώνει την JAK3, μια ενδοκυττάρια πρωτεϊνική κινάση της τυροσίνης που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, η οποία στη συνέχεια φωσφορυλιώνει τον STAT6, έναν μεταγραφικό παράγοντα υπεύθυνο για την σύνθεση πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην φλεγμονώδη απόκριση (Nelms et al., 1999). Η καιμφερόλη βρέθηκε να αναστέλλει αυτή τη σηματοδοτική οδό με ειδικό τρόπο στοχοποιώντας την δράση της JAK3 (Cortes et al., 2007). Η καιμφερόλη δύναται να διαταράξει και άλλες λειτουργίες επαγόμενες από την JAK3. Δεδομένου ότι η ιντερλευκίνη-2 (IL-2) χρησιμοποιεί την JAK3 για να ενεργοποιήσει τον STAT5 μεταγραφικό παράγοντα, η καιμφερόλη είναι ένας ισχυρός αναστολέας της IL-2.



Εικ 29 Αντιφλεγμονώδης δράση της καιμφερόλης (Adaptation pic. from A.Y. Chen, Y.C. Chen, 2013)

Οι γλυκοζίτες της καιμφερόλης, ο 3-Ο-ρουτινοσίδης και ο 3-Ο-γλυκοζίτης βρέθηκε ότι προστατεύουν από εγκεφαλική ισχαιμία μέσω της αναστολής του μεταγραφικού παράγοντα STAT3 και της αναστολής του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ (Lu Yu, et al., 2013).

#### 5.4.5. Αντιμικροβιακή δράση

Για αιώνες γίνονταν χρήση παραδοσιακών συνταγών που περιείχαν φλαβονοειδή ως κύρια δραστικά συστατικά για την αντιμετώπιση πληθώρας ασθενειών. Ένα από τα πολλά παραδείγματα είναι η πρόπολη για την οποία υπάρχουν αναφορές σε κείμενα της Παλαιάς Διαθήκης (The Bible, Jeremiah 8, verse 22; Jeremiah 46, verse 22; Jeremiah 46, verse 11; Jeremiah 51, verse 8). Το βάλαμο αυτό χορηγούνταν από τον Ιπποκράτη για την αντιμετώπιση πληγών και εγκαυμάτων (Fearnley 2001). Οι αντιμικροβιακές ιδιότητες της πρόπολης αποδίδονται στο υψηλό ποσοστό φλαβονοειδών που περιέχει και συγκεκριμένα στην γαλαγκίνη και την πινοσεμπρίνη (Bosio et al., 2000), (Pepejnjak et al., 1982). Ένα άλλο παράδειγμα είναι το φυτό *Scutellaria baicalensis* το οποίο χρησιμοποιείται στην Κίνα εδώ και χιλιάδες χρόνια για την αντιμετώπιση περιοδοντικών αποστημάτων και για την επούλωση πληγών της στοματικής κοιλότητας. Στο φλαβονοειδές βακαλεΐνη αποδίδονται οι αντιμικροβιακές δράσεις (Tsao et al., 1982). Τα πλούσια σε φλαβονοειδή εκχυλίσματα των φυτών *Hypericum* (Dall'Agnol et al., 2003), *Capsella*, *Chromolaena* (El-Abyad et al., 1990) έχει αναφερθεί ότι παρουσιάζουν αντιβακτηριακή δράση. Συγκεκριμένα είναι γνωστή η αντιβακτηριακή δράση της απιγενίνης (Torrenegra et al., 1989), (Park et al., 1998), της γαλαγκίνης (Afolayan & Meyer 1997) (Cushnie et al., 2003), της πινοσεμπρίνης (Fukui et al., 1988), (Huffort & Lasswell 1978), της ποντισρετίνης (Bae et al., 1999), (Kim et al., 1999), της γενγκαουανίνης (Palacios et al., 1983), της σοφοροφλαβόνης G και των παραγώγων της (Tsuchiya et al., 1996), (Sakagami et al., 1998), (Sato et al., 1995), (Tsuchiya et al., 1994), της ναριγγίνης και της ναριγγενίνης (Tsuchiya et al 1996), (Ng TB et al., 1996), (Ramaswamy et al., 1972), της λουτεολίνης και του 7-ο-γλυκοζίτη της λουτεολίνης (Bashir et al., 1994), (Miski et al., 1983) της κερκετίνης, της 3-Ο-μεθυλοκερκετίνης και διαφόρων γλυκοζιτών της κερκετίνης (Rauha et al., 2000), (Waage et al., 1985), και τέλος της καιμφερόλης και των παραγώγων της (Rauha et al., 2000), (Ramaswamy et al., 1972), (Waage et al., 1985). Διάφορες ισοφλαβόνες (Osawa et al., 1992), ισοφλαβάνες (Li et al., 1998), και φλαβονόλες (Kuroyanagi et al., 1999), (Simin et al., 2002) έχει αναφερθεί ότι παρουσιάζουν αντιβακτηριακή δράση.

#### 5.4.6. Αντιμυκητιασική δράση

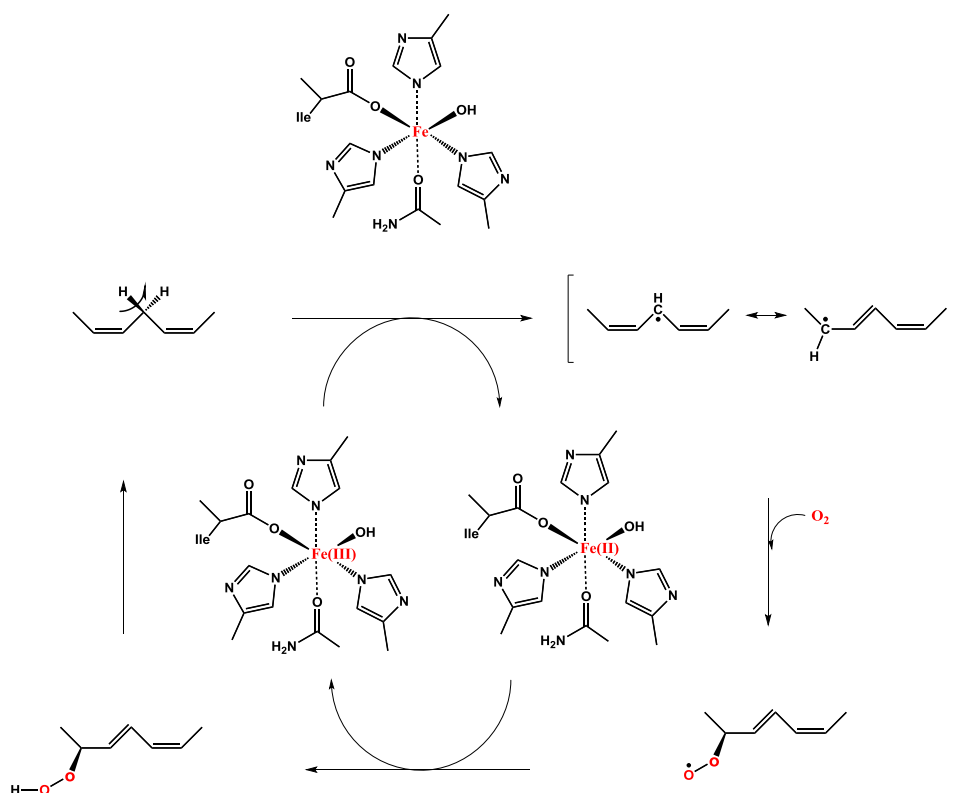
Ένα νέο ισοπρενυλιωμένο флаβονοειδές που απομονώθηκε από το φυτό *Eysenhardtia texana* η 5,7,4'-τριϋδροξυ-8-μεθυλο-6-(3-μεθυλο-[2-βουτενυλο])-(2S)-φλαβανόνη έδειξε αντιμικροβιακή δράση έναντι της *Candida albicans* (Wachter et al., 1999). Το 7-υδροξυ-3',4'-(μεθυλενοδιοξυ)-φλαβάνιο που απομονώθηκε από το φυτό *Terminalia ballerica* αποδείχθηκε και αυτό ότι είχε αντιμικροβιακή δράση έναντι της *Candida albicans* (Valsaraj et al., 1997). Η 6,7,4'-τριϋδροξυ-3',5'-διμεθοξυφλαβόνη και η 5,5'-διϋδροξυ-8,2',4'-τριμεθοξυφλαβόνη μαζί με την 5,7,4'-τριϋδροξυ-3',5'-διμεθοξυφλαβόνη εμφάνισε αντιμικροβιακή δράση έναντι του *Aspergillus flavus* (Zheng et al., 1996) ένα είδος μύκητα που προκαλεί εκτεταμένες λοιμώξεις σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα (Prescott et al., 1999). Η αποτελεσματικότητα της πρόπολης σε δερματοπάθειες και σε είδη *Candida* έχει αποδοθεί εν μέρει στο υψηλό ποσοστό флаβονοειδών που περιέχει (Cafarchia et al., 1999). Η γαλαγκίνη που απαντά στην πρόπολη βρέθηκε ότι έχει δράση έναντι των: *Aspergillus tamaris*, *A. flavus*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Penicillium digitatum* και *Penicillium italicum* (Afolayan & Meyer 1997).

#### 5.4.7. Αντιϊική δράση

Απεδείχθη ότι τα флаβονοειδή ασκούν προφυλακτική δράση στην είσοδο των ιών στον οργανισμό (Choi et al., 1999) (Uda et al., 1997; Thaisrivongs et al., 1996; Hagen et al., 1997; Tait et al., 1997). Ο μηχανισμός της αντιϊικής δράσης παραμένει αδιευκρίνιστος, όμως φαίνεται ότι οι PGs συμμετέχουν στην σύντηξη των μεμβρανών των ιών. Επίσης τα флаβονοειδή είναι αναστολείς της σύνθεσης των PGs και επομένως θα μπορούσε να υποθεθεί ότι αυτός είναι ένας τρόπος με τον οποίο εκδηλώνουν τη προστατευτική τους δράση έναντι των ιών (Nagai et al., 1995b; Carpenedo et al., 1969). Τα λυσοσώματα μπορεί να ενεργοποιηθούν και να οξινιστούν μόνο από την λειτουργία της αντλίας πρωτονίων η οποία αναστέλλεται από τα флаβονοειδή (Horisberg et al., 1991; Bertorello et al., 1991). Εάν τα νουκλεϊκά οξέα εισέλθουν στο κυτταρόπλασμα, είναι πολύ δύσκολο να αποφευχθεί η σύντηξη του ιϊκού DNA με το DNA του ξενιστή. Τα γονίδια του ιού τα οποία βρίσκονται εγκλωβισμένα μέσα στο πρωτεϊνικό καψίδιο είναι ακίνδυνα. Έχει βρεθεί ότι μερικά флаβονοειδή όπως η κερκετίνη, αναστέλλουν την ανάστροφη τρανσκριπτάση των RNA ιών (Ono et al., 1990; Wang et al., 1992) (Vecknestedt & Pusztai, 1981; Amoras et al., 1992a, 1992b). Αυτή η ιδιότητα είναι επιθυμητή διότι οι αναστολείς αυτού του ενζύμου όπως οι αραβινοζίτες και η ακυκλοβίρη, εμφανίζουν τοξικότητα όχι μόνο έναντι των προσβεβλημένων από τον ιό κυττάρων αλλά και έναντι των

υγιών. Ένα ακόμη πλεονέκτημα των φλαβονοειδών είναι ότι επάγουν την σύνθεση των ιντερφερονών (INF) (Veckenstedt et al., 1987; Wleklík et al., 1987) οι οποίες αυξάνουν την ανθεκτικότητα της κυτταρικής μεμβράνης, ενισχύοντας την έκκριση νουκλεασών που δρουν ενάντια στο ιϊκό γονιδίωμα. Ένα πρόσφατο πεδίο έρευνας είναι και η ανασταλτική δράση των φλαβονοειδών κατά του ιού της ανοσολογικής ανεπάρκειας HIV. *In vitro* μελέτες έχουν δείξει ότι το φλαβονοειδές βακαϊλίνη αναστέλλει την προσβολή και τον πολλαπλασιασμό του ιού HIV-1. Έχει αποδειχτεί η παρεμπόδιση της εισόδου του ιού μέσα στα κύτταρα που εκκρίνουν υποδοχείς των CD4 και των χυμιοκινών (Li et al., 2000). Επίσης απεδείχθη ότι το φλαβονοειδές βακαλεΐνη ανταγωνίζεται την ανάστροφη τρανσκριπτάση (Li et al., 1993). Το τελευταίο αυτό φλαβονοειδές (Ono et al., 1990) μαζί με την ρομπουσταφλαβόνη και την χινοκίφλαβόνη (Lin et al., 1997) φάνηκε να έχουν ανασταλτική δράση έναντι της ανάστροφης τρανσκριπτάσης του HIV-1. Έχει επίσης αποδειχτεί ότι μερικά φλαβονοειδή όπως η απομεθυλωμένη γκαρντενίνη Α και η 3,2'-διϋδροξυφλαβόνη αναστέλλουν την πρωτεΐνωση (Brinkworth et al., 1992) του HIV-1. Η ρομπινετίνη, η μυρικετίνη, η βακαϊλίνη, η κερκεταγενίνη (Fesen et al., 1994), ο 3-Ο-(2''-γαλλοϋλ)-α-L-αραβινοπυρανοζίτης της κερκετίνης (Kim et al., 1998) αναστέλλουν την ιντεγκράση του HIV-1 παρόλο που υπάρχουν απόψεις ότι η αναστολή της από την κερκεταγενίνη και την μυρικετίνη είναι μη ειδική (Ono et al., 1990). Έχει αναφερθεί ακόμη ότι η χρυσίνη, η ακακετίνη και η απιγενίνη, προλαμβάνουν την ενεργοποίηση του ιού HIV-1 μέσω ενός μηχανισμού που σχετίζεται πιθανώς με τη μεταγραφή του ιού (Critchfield et al., 1996). Η χρυσίνη βρέθηκε ότι έχει υψηλό θεραπευτικό δείκτη κατά του HIV-1 (Hu et al., 1994). Επιπροσθέτως, έχουν γίνει πολλές αναφορές σχετικά με τη σχέση δομής δράσης των φλαβονοειδών και την ικανότητά τους να αναστέλλουν τον ιό HIV-1 (Lin et al., 1997), (Brinkworth et al., 1992), (Fesen et al., 1994), (Ono et al., 1990), (Hu et al., 1994). Για κάποια φλαβονοειδή μάλιστα, έχει γίνει και αναφορά στο μηχανισμό δράσης (Brinkworth et al., 1992), (Fesen et al., 1994). Φλαβονοειδή όπως η κερκετίνη, η μορίνη, η ρουτίνη, η διϋδροκερκετίνη, η διϋδροφουσετίνη έχουν αντιϊκή δράση έναντι του ιού του έρπητα HSV. Έχουν αναφερθεί και πιθανοί μηχανισμοί δράσης όπως η αναστολή της πολυμεράσης του ιού και η σύνδεση στις πρωτεΐνες της κάψας (Selway et al., 1986).

## 6. ΛΙΠΟΞΥΓΟΝΑΣΗ

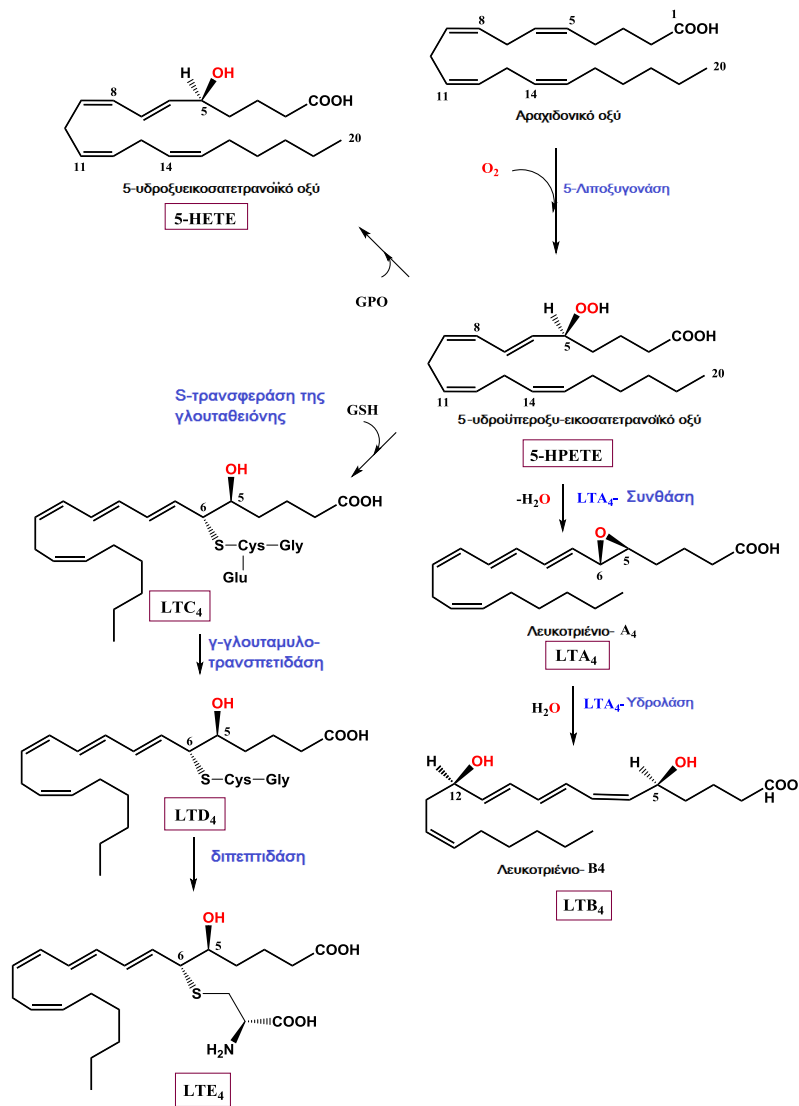


Εικ 30: Ενεργό κέντρο της Λιποξυγονάσης

Οι λιποξυγονάσες είναι μια οικογένεια διοξυγονασών που είναι συνδεδεμένες με σίδηρο (non heme) και καταλύουν την αντίδραση με οξυγόνο των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs PolyUnsaturated Fatty Acids) τα οποία περιέχουν ένα ή περισσότερα μόρια (1Z,4Z) πενταδιενίου για να καταλήξουν στη συνέχεια στα αντίστοιχα (1S,2E,4Z)-υδροϋπεροξειδία (Livanonchanka and Feussner, 2006). Οι λιποξυγονάσες είναι ευρύτατα διαδεδομένες στο ζωϊκό και φυτικό βασίλειο και μόνο προσφάτως έχει αναφερθεί η παρουσία τους σε μύκητες, κοράλια και βακτήρια (Andreou et al., 2009b; Oliw 2002). Τα υδροϋπεροξειδία υφίστανται περαιτέρω μετατροπή σε τζασμονίδια (jasmonates) στα φυτά (Mosblech et al., 2009), σε διόλες και λακτόνες στους μύκητες (Tsitsigiannis and Keller, 2007), ενώ στα θηλαστικά μετατρέπονται σε λιποξίνες και λευκοτριένια (Samuelsson et al., 1987). Αυτά τα μόρια παίζουν πρωτεύοντα ρόλο ως σήματα στην επούλωση πληγών και στο μηχανισμό άμυνας των φυτών, ενώ στα θηλαστικά σχετίζονται με τη φλεγμονή, το άσθμα και το καρδιαγγειακό σύστημα. Στους μύκητες ο ρόλος τους αφορά τη ρύθμιση της παραγωγής μυκοτοξινών και του κυτταρικού κύκλου (Tsitsigiannis and Keller, 2007). Η λιποξυγονάση είναι μονομερές μοριακού βάρους 90-110 kDa αποτελούμενη από δυο πρωτεϊνικές περιοχές και συνδέεται με Fe. Η N-τελική περιοχή μοριακού βάρους 25-30 kDa αποτελείται από ένα β-πτυχωτό βαρέλι με

άγνωστη έως σήμερα λειτουργία. Η C-τελική περιοχή του ενζύμου περικλείει το ενεργό κέντρο του που αποτελείται κυρίως από α-έλικες με μοριακό βάρος περίπου 55-65 kDa. Ο καταλυτικός Fe στο ενεργό κέντρο του ενζύμου είναι συναρμοσμένος με 5 κατάλοιπα αμινοξέων και ένα μόριο νερού στην 6<sup>η</sup> θέση συναρμογής. Στις φυτικές λιποξυγονάσες, ο Fe συναρμόζεται με τα άτομα N τριών ιστιδινών, το άτομο O μιας ασπαραγίνης και το C-τελικό άκρο μιας ισολευκίνης (Liavonchanka and Feussner 2006). Αρχικά γίνεται απόσπαση μιας ρίζας H• από το ενεργό κέντρο του ενζύμου που φέρει τρισθενή Fe ο οποίος ανάγεται. Στη συνέχεια λαμβάνει χώρα μετάθεση της ρίζας για να σχηματισθεί η πιο σταθερή αλλυλική ρίζα και ακολουθεί η αντιδρασή της ρίζας με μοριακό O<sub>2</sub> προς σχηματισμό ρίζας υπεροξειδίου. Τέλος λαμβάνει χώρα πρωτονίωση της ρίζας προς σχηματισμό του υπεροξυοξέος με ταυτόχρονη οξείδωση του Fe (Liavonchanka and Feussner 2006). Το αραχιδονικό οξύ αποτελεί ένα ακόρεστο λιπαρό οξύ με 20 άτομα άνθρακα και τέσσερις διπλούς δεσμούς, το οποίο προέρχεται από το λινολεϊκό οξύ της τροφής και απαντάται στο σώμα με την εστεροποιημένη του μορφή ως συστατικό των φωσφολιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης. Απελευθερώνεται από τα φωσφολιπίδια με τη βοήθεια φωσφολιπασών οι οποίες έχουν ενεργοποιηθεί από μηχανικά, χημικά, φυσικά ερεθίσματα ή από φλεγμονώδεις μεσολαβητές. Συγκεκριμένα η ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης A<sub>2</sub>S του κυτταροπλάσματος οδηγεί στην απελευθέρωση του αραχιδονικού οξέος το οποίο στη συνέχεια μπορεί να μεταβολισθεί μέσα από τρεις κύριες ενζυμικές οδούς: την οδό της *κυκλοοξυγονάσης* με την οποία διεγείρεται η σύνθεση των προσταγλανδινών και θρομβοξανών, την οδό της *λιποξυγονάσης* που οδηγεί στην παραγωγή λευκοτριενίων και λιποξινών και τέλος την οδό του κυτοχρώματος P450. Οι προσταγλανδίνες, τα θρομβοξανία, τα λευκοτριένια και οι λιποξίνες ανήκουν σε μια οικογένεια μεταβολιτών γνωστών ως εικοσανοειδή. Τα πέντε είδη λιποξυγονασών (LOXs) τα οποία απαντούν στα θηλαστικά σχηματίζουν υδροϋπεροξυ-εικοσατετρανοϊκά οξέα (HPETEs) τα οποία στη συνέχεια μετατρέπονται σε υδρόξυεικοσατετρανοϊκό οξύ (HETE) από την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης. Επομένως η 5-LOX οδηγεί στο σχηματισμό του 5(S)-HETE και λευκοτριενίων. Οι 12- και 15-LOXs μπορούν να σχηματίσουν 12(S)- και 15(S)-HETE από το αραχιδονικό οξύ.

## 6.1 Η οδός της λιποξυγονάσης



Εικ 31: Η οδός της λιποξυγονάσης

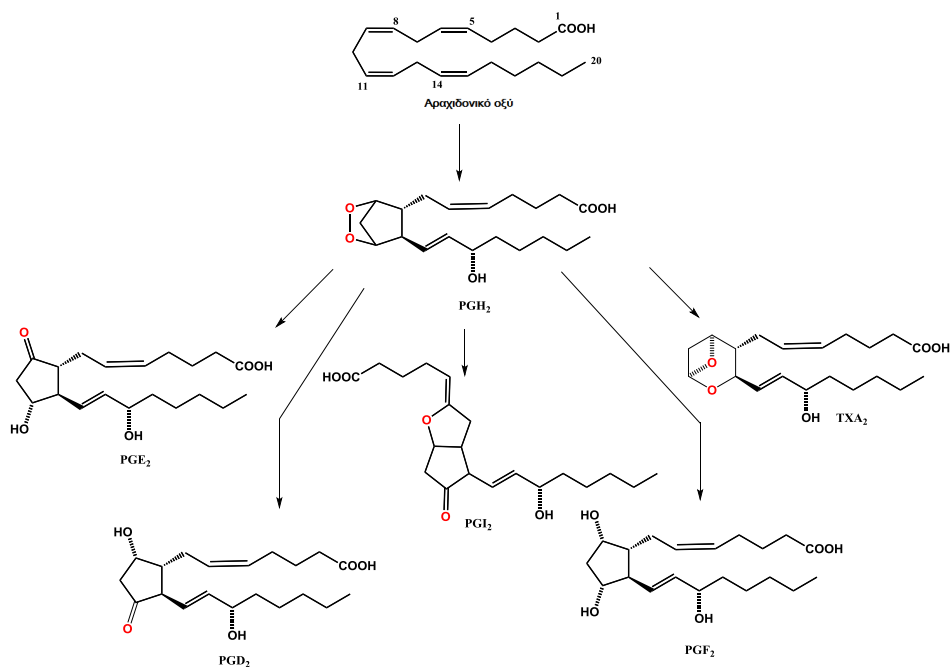
Σύμφωνα με την βιοσυνθετική οδό της λιποξυγονάσης, το αραχιδονικό οξύ που απελευθερώνεται όπως αναφέρθηκε παραπάνω από τα φωσφολιπίδια της μεμβράνης με τη βοήθεια της φωσφολιπάσης, μετατρέπεται στη συνέχεια μέσω της 5-λιποξυγονάσης, σε 5-υδροϋπεροξυ-εικοσατετρανοϊκό οξύ (5-HPETE). Η 5-λιποξυγονάση είναι το κύριο ένζυμο για το μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος στα ουδετερόφιλα. Το 5-HPETE είναι ασταθές και μπορεί να αναχθεί σε 5-υδροξυεικοσατετρανοϊκό οξύ (5-HETE) το οποίο είναι χημειοτακτικός παράγοντας για τα ουδετερόφιλα ή να μετατραπεί σε λευκοτριένια. Το πρώτο λευκοτριένιο που παράγεται από το 5-HPETE με αφυδάτωση είναι ένα εποξειδίο που ονομάζεται λευκοτριένιο A<sub>4</sub> (LTA<sub>4</sub>) το οποίο παίζει καίριο ρόλο ως ενδιάμεσο στη βιοσύνθεση φλεγμονωδών και αναφυλακτικών σημάτων. Η ενζυμική υδρόλυση του LTA<sub>4</sub> από την υδρολάση του LTA<sub>4</sub> οδηγεί

στο σχηματισμό του λευκοτριενίου  $LTB_4$ . Η συνθάση του  $LTC_4$  καταλύει τη σύζευξη του  $LTA_4$  με τη γλουταθειόνη προς σχηματισμό του λευκοτριενίου  $LTC_4$  το οποίο στη συνέχεια μπορεί να μετατραπεί σε  $LTE_4$  με τη βοήθεια μιας τρανσφεράσης και μιας πεπτιδάσης αντίστοιχα (Harizi and Nobert 2004). Τα λευκοτριένια τα οποία σχετίζονται με το άσθμα και τις αλλεργικές αντιδράσεις (Samuelsson 1983) παράγονται κυρίως από φλεγμονώδη κύτταρα όπως τα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα (Brock et al., 1996), τα ενεργοποιημένα μακροφάγα (Chensue et al., 1983) και τα μαστοκύτταρα (Ramos et al., 1991). Τα δενδριτικά κύτταρα είναι οι «κύριοι παίκτες» της μη ειδικής και ειδικής ανοσίας και εκτός από τον μείζονος σημασίας ρόλο τους να αναγνωρίζουν το αντιγόνο και να το παρουσιάζουν (APC antigen-presenting cells), εμπεριέχουν όλο εκείνο το ενζυμικό σύστημα που μπορεί να μετατρέψει το αραχιδονικό οξύ σε λευκοτριένια (Harizi et al., 2003), (Harizi et al., 2002), (Spanbroek et al., 1997). Συγκεκριμένα το λευκοτριένιο  $LTB_4$  κατά την παραγωγή από τα ουδετερόφιλα, επάγει την χημειοταξία, την προσκόλληση των λευκοκυττάρων, την έκκριση λυσοσωματικών ενζύμων, την παραγωγή της ρίζας υπεροξειδίου, την παραγωγή της ιντερλευκίνης-8 (IL-8), την έκφραση του υποδοχέα C3b και την επιστράτευση των λευκοκυττάρων στο σημείο της φλεγμονής. Όταν το λευκοτριένιο  $LTB_4$  παραχθεί από τα Β-κύτταρα προάγει την διαφοροποίησή τους, την έκκριση IgE μέσω της IL-4 και διεγείρει την έκφραση του αντιγόνου CD23. Τα κύτταρα διεγείρουν την παραγωγή της IFN- $\gamma$  και των ιντερλευκινών IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, τον πολλαπλασιασμό των CD4 κυττάρων, καθώς και τη μείωση του πολλαπλασιασμού των CD8 κυττάρων. Όταν παράγονται από τα δενδριτικά κύτταρα προάγουν την χημειοταξία και την παραγωγή της IL-6. Τέλος όταν παράγονται από τα NK-κύτταρα ενισχύουν τη δραστικότητά τους και διεγείρουν την έκφραση της IL-2R $\beta$  (Harizi and Nobert 2004). Τα λευκοτριένια  $LTC_4$ ,  $LTD_4$ ,  $LTE_4$  τα οποία απελευθερώνονται από τους ιστούς των πνευμόνων των ασθματικών ατόμων όταν έρθουν σε επαφή με ειδικά αλλεργιογόνα, προκαλούν παρατεταμένο βρογχόσπασμο, αυξάνουν την αγγειακή διαπερατότητα, αυξάνουν την έκκριση βλέννης και τέλος φαίνεται να παίζουν φυσιολογικό ρόλο στην άμεση υπερευαισθησία. Διαφορετικές λιποξυγονάσες 15-LOX και 12-LOX όταν επιδράσουν πάνω στο 5-HPETE μπορούν να παράγουν διαφορετικού τύπου εικοσανοειδή και συγκεκριμένα τριυδροξυ-εικοσατετρανοϊκά οξέα που χαρακτηρίζονται από τους τέσσερις διπλούς δεσμούς σε συζυγία και ονομάζονται λιποξίνες  $LXA_4$  και  $LXB_4$ . Η δράση τους είναι ανασταλτική της φλεγμονής διότι αναστέλλουν τη χημειοταξία των ουδετερόφιλων και την προσκόλληση τους στο ενδοθήλιο δρώντας με αυτόν τον τρόπο ως ενδογενείς ανταγωνιστές των λευκοτριενίων. Τα αιμοπετάλια τα οποία ενεργοποιούνται και προσκολλώνται στα λευκοκύτταρα είναι σημαντικές πηγές λιποξινών και παρότι δεν μπορούν από μόνα τους να συνθέσουν λιποξίνες  $LXA_4$  και  $LXB_4$  μπορούν να σχηματίσουν αυτούς τους



μεσολαβητές από ενδιάμεσα προϊόντα που προέρχονται από τα γειτονικά ουδετερόφιλα, μέσω μιας διακυτταρικής οδού βιοσύνθεσης. Με αυτόν τον μηχανισμό τα προϊόντα του αραχιδονικού οξέος μπορούν να διέλθουν από το ένα κύτταρο στο άλλο (Kumar et al., 2007). Οι λιποξίνες LXA<sub>4</sub> και LXB<sub>4</sub> προκαλούν χάλαση του ενδοθηλίου της αορτής και των πνευμονικών αρτηριών (Fiero and Serhan 2001). Σε μερικούς ιστούς μπορεί να επάγουν την παραγωγή προστακυκλινών από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και να προάγουν την αγγειοδιαστολή. Ακόμη μπορεί να διεγείρουν την παραγωγή ρίζας μονοξειδίου του αζώτου NO• και να συμβάλλουν στη ρύθμιση του τόνου των αγγείων (Tamaoki et al., 1995). Η δράση των λιποξινών διαφέρει από τους άλλους προφλεγμονώδεις μεσολαβητές όπως τα λευκοτριένια, ο παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF) και οι προσταγλανδίνες. Οι λιποξίνες είναι ισχυρά αντιρρυθμιστικά σήματα για τους ενδογενείς προφλεγμονώδεις μεσολαβητές όπως τα λευκοτριένια και τον PAF καθώς και των κιτοκινών (TNF-α, IL-6). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της εξαρτώμενης από τα λευκοτριένια φλεγμονής (Serhan 1997) την αναστολή της χημειοταξίας των ουδετερόφιλων (Lee et al., 1989) της διαφυγής διαμέσου των επιθηλιακών κυττάρων (Colgan et al., 1993) και της προσκόλλησης και διαφυγής μαζί με τα ενδοθηλιακά κύτταρα (Parayianni et al., 1996).

## 6.2. Η οδός της κυκλοξυγονάσης



Εικ 32: Η οδός της κυκλοξυγονάσης

Στα προϊόντα αυτής της οδού περιλαμβάνονται οι προσταγλανδίνες (προστακυκλίνες) E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), (PGD<sub>2</sub>), (PGF<sub>2</sub>) και (PGI<sub>2</sub>) και η θρομβοξάνη (TXA<sub>2</sub>). Η μετατροπή τους γίνεται με την βοήθεια ειδικών ενζύμων πάνω σε ένα ενδιάμεσο προϊόν. Ορισμένα από αυτά τα ένζυμα έχουν περιοριστική κατανομή στους ιστούς. Για παράδειγμα τα αιμοπετάλια περιέχουν το ένζυμο συνθετάση της θρομβοξάνης και ως εκ τούτου η TXA<sub>2</sub> είναι η κυριότερη προσταγλανδίνη που παράγουν τα κύτταρα αυτά που αποτελεί δραστικό παράγοντα συσώρευσης αιμοπεταλίων και αγγειοσυστολής (Kumar et al., 2007). Τα ενδοθηλιακά κύτταρα περιέχουν τη συνθετάση της προστακυκλίνης η οποία οδηγεί στην παραγωγή της PGI<sub>2</sub>. Η PGI<sub>2</sub> έχει δράση αντίθετη από την θρομβοξάνη δρώντας ανασταλτικά στη συσώρευση των αιμοπεταλίων και προκαλώντας αγγειοδιαστολή. Η προσταγλανδίνη (PGD<sub>2</sub>) είναι ο κύριος μεσολαβητής της οδού της κυκλοξυγονάσης στα σιτευτικά κύτταρα και μαζί με τις PGE<sub>2</sub> και PGF<sub>2α</sub> προκαλεί αγγειοδιαστολή και προάγει τη δημιουργία οιδήματος. Οι προσταγλανδίνες εμπλέκονται επίσης στην παθογένεια του άλγους και του πυρετού κατά τη φλεγμονή. Η PGE<sub>2</sub> αυξάνει την ευαισθησία στο άλγος που προκαλείται από ποικιλία ερεθισμάτων, ενώ παράλληλα αλληλεπιδρά με άλλες κυτταροκίνες με αποτέλεσμα την πρόκληση πυρετού (Kumar et al., 2007).

### 6.3. Ρόλος των λευκοτριενίων σε φλεγμονώδεις ασθένειες

Η υπερέκφραση των LOX και των προφλεγμονωδών μεσολαβητών τους, των λευκοτριενίων έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με οξείες και χρόνιες φλεγμονώδεις ασθένειες όπως είναι το άσθμα, η αρτηριοσκλήρυνση, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου, η δερματίτιδα και ο καρκίνος. Σε μερικές περιπτώσεις έχει βρεθεί ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της δράσης της λιποξυγονάσης και της οδού ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ (Wisastra and Dekker 2014) όπως περιγράφεται στον παρακάτω πίνακα:

**Πίνακας 4. Συσχέτιση δράσης λιποξυγονάσης και NF-κΒ σε συγκεκριμένες ασθένειες**

Ασθένεια	Παρατηρήσεις	Ref.
Άσθμα	Υπερέκφραση της 15-LOX επάγει την έκφραση του γονιδίου που ενεργοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κΒ στα επιθηλιακά κύτταρα.	Liu C.et al., 2009
Ασθένειες του καρδιαγγειακού	Αυξημένα επίπεδα των 5-LOX μεταβολιτών σε ασθενείς με αρτηριοσκλήρυνση. Ο μεταβολίτης της 15-LOX, ο 15-HETE ενεργοποιεί την οδό του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ και διεγείρει την έκφραση της 15-LOX με βρόχο θετικής ανατροφοδότησης.	Ylä-Herttua et al., 1991

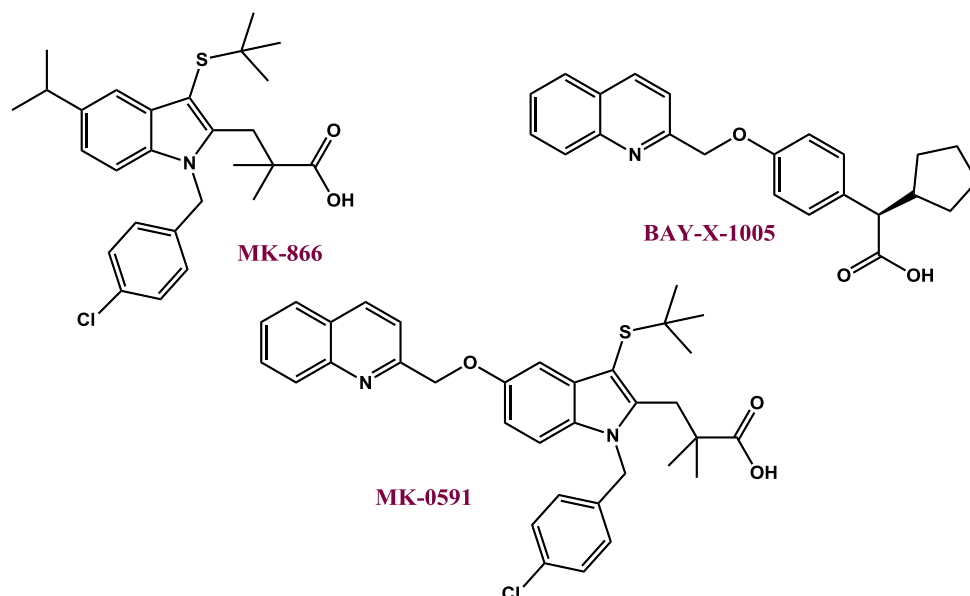
Ρευματοειδής Αρθρίτιδα	Ο μεταβολίτης της 15-LOX, ο 15-HETE, αυξάνει τον ρυθμό αποδόμησης του αναστολέα της οδού του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB.	Li J. et al., 2013
Καρκίνος	Ο μεταβολίτης της 5-LOX, το λευκοτριένιο LTB <sub>4</sub> είναι ικανός να ενεργοποιήσει τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κB σε καρκινικά κύτταρα.	Wu M. et al., 2012

Οι λιποξυγονάσες και τα καταλυτικά τους προϊόντα έχει βρεθεί ότι σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό, την εξαλλαγή και την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων (Wang and Dubois 2010). Στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη έχει παρατηρηθεί υπερέκφραση της 12-LOX των αιμοπεταλίων (p12-LOX), ενός σημαντικού παράγοντα ενεργοποίησης της αγγειογένεσης και της ανάπτυξης του καρκίνου (Pidgeon G.P et al., 2003). Ακόμη έχει παρατηρηθεί υπερέκφραση της 5-LOX και των υποδοχέων των λευκοτριενίων LTB<sub>4</sub> στον καρκίνο του παγκρέατος, ενώ τα επίπεδα της 5-LOX που ανιχνεύονται στον οργανισμό είναι χρήσιμοι δείκτες αρχικών νεοπλασματικών αλλοιώσεων (Hennig et al., 2005). Το λευκοτριένιο LTB<sub>4</sub> αποτελεί ισχυρό διεγερτικό για την αύξηση των καρκινικών κυττάρων και παίζει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία ROS ως απάντηση στην υποξία (Hennig et al., 2005; Steiner et al., 2001). Επίσης όπως περιγράφηκε πιο πάνω ο μεταβολίτης της 5-LOX, το λευκοτριένιο LTB<sub>4</sub> είναι ικανός να ενεργοποιήσει τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κB σε καρκινικά κύτταρα (Wu et al., 2012). Ο ρόλος των μεταβολιτών της 15-LOX θεωρείται σημαντικός στην ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού διότι προάγουν την είσοδο των καρκινικών κυττάρων στα λεμφαγγεία και τη μετάσταση στους λεμφαδένες (Kerjaschki et al., 2011). Στον καρκίνο του παχέος εντέρου η 15-LOX-1 είναι συνδεδεμένη με την ενίσχυση της δράσης του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB (Ylä-Herttuala et al., 1991) Συμπερασματικά μπορεί να ειπωθεί ότι οι λιποξυγονάσες αποτελούν μια αναδυόμενη ομάδα κυττάρων στόχου του καρκίνου.

#### 6.4. Αναστολείς της λιποξυγονάσης

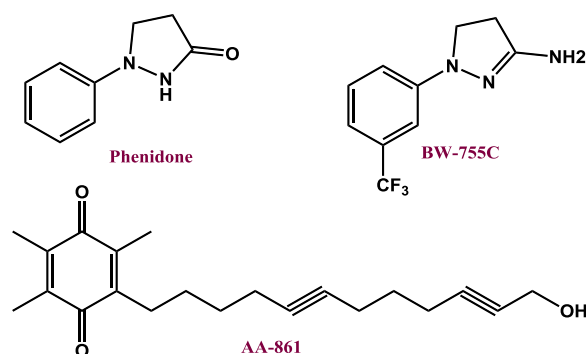
Αν ληφθεί υπόψη το γεγονός ότι οι λιποξυγονάσες καθώς και τα προϊόντα τα οποία παράγουν χαρακτηρίζονται από ισχυρή προ-φλεγμονώδη δράση, τότε μια ρύθμιση των οδών των λιποξυγονασών είναι ικανή να δώσει μια νέα προσέγγιση στη θεραπεία ποικίλων φλεγμονωδών ασθενειών και εν τέλει του καρκίνου (Wisastra and Dekker 2014). Έχουν δοκιμαστεί προς αυτήν την κατεύθυνση διαφορετικού τύπου συνθετικά και φυσικής προέλευσης μόρια ως αναστολείς των λιποξυγονασών όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.

## Ανταγωνιστές FLAP



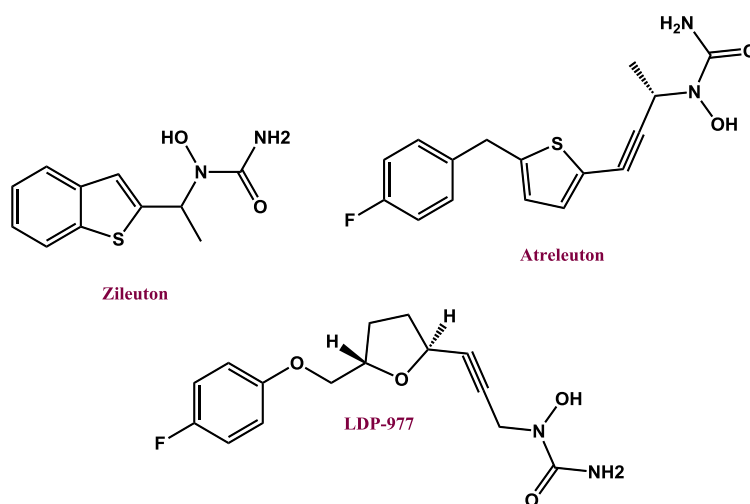
Πρόκειται για ανταγωνιστές της πρωτεΐνης ενεργοποίησης της 5-λιποξυγονάσης FLAP (5-Lipoxygenase activating protein) απαραίτητο συστατικό της οδού της 5-λιποξυγονάσης που οδηγεί στο σχηματισμό των λευκοτριενίων (Peters-Golden and Henderson William 2007). Η έκφραση της πρωτεΐνης ενεργοποίησης FLAP και της 5-λιποξυγονάσης λαμβάνει χώρα σε υποκατηγορίες λευκοκυττάρων, κυρίως των ουδετερόφιλων, των μακροφάγων, των εοσινόφιλων και των μαστοκυττάρων. Είναι μια δομική μεμβρανική πρωτεΐνη του πυρήνα καθώς και των ενδοκυτταρικών μεμβρανών τους. Ο ρόλος αυτής της πρωτεΐνης δεν έχει πλήρως κατανοηθεί όμως υπάρχουν ενδείξεις ότι μπορεί να διευκολύνει την πρόσδεση της 5-λιποξυγονάσης στην πυρηνική μεμβράνη και τη μεταφορά του αραχιδονικού οξέος στο ενεργό κέντρο του ενζύμου αμέσως μετά την απελευθέρωσή του από τα φωσφολιπίδια της μεμβράνης (Folco and Murphy 2006). Ένας από τους γνωστούς ανταγωνιστές FLAP είναι ο MK-866 ο οποίος γνωστοποιήθηκε από τους (Gillard et al., 1989) έχει την ικανότητα να αναστέλλει την πρωτεΐνη FLAP χωρίς όμως να επηρεάζει την 5-LOX ή την φωσφολιπάση κατά την οδό βιοσύνθεσης των λευκοτριενίων (Gillard et al., 1989; Evans et al., 2008) και είναι χρήσιμος στα πρώτα και τελευταία στάδια της ασθματικής απόκρισης σε αλλεργιογόνα (Friedman et al.; 1993). Οι άλλοι δύο ανταγωνιστές ο MK-0591 και ο Bay-X-1005 έχουν δείξει μια ανασταλτική δράση των λευκοτριενίων σε νανομοριακό επίπεδο (Fruchtman et al.; 1993; Mancini et al.; 1992). Παρόλα αυτά η παρουσία του αραχιδονικού οξέος και άλλων *cis*-ακόρεστων λιπαρών οξέων στο αίμα ανταγωνίζεται ως προς τη θέση πρόσδεσης στην πρωτεΐνη (Charleson et al., 1994).

## Οξειδοαναγωγικοί αναστολείς



Οι οξειδοαναγωγικοί αναστολείς μπορούν να δράσουν ως αντιοξειδωτικά στην οξειδωτική αντίδραση των λιποξυγονασών με κύριους εκπροσώπους τους Phenidone, BW755C και AA-861 (McMillan et al., 1992; Batt et al., 1990) για τους οποίους έχει αναγνωριστεί ότι εκτός από το υψηλό οξειδοαναγωγικό δυναμικό (Corey et al., 1989) η λιποφιλικότητα παίζει σημαντικό ρόλο (Batt et al., 1990). Επιπροσθέτως οι οξειδοαναγωγικοί ανταγωνιστές έχουν χαμηλή εκλεκτικότητα αναστολής της 5-LOX ως προς το βαθμό εκλεκτικότητας απέναντι στις COX (McMillan et al., 1992). Παρόλη την υψηλή ανασταλτική δράση που εμφανίζουν για τη βιοσύνθεση των λευκοτριενίων εμπλέκονται και σε άλλες βιολογικές οξειδοαναγωγικές διαδικασίες όπως είναι και ο σχηματισμός της μεθαιμοσφαιρίνης (Gillmor et al., 1997).

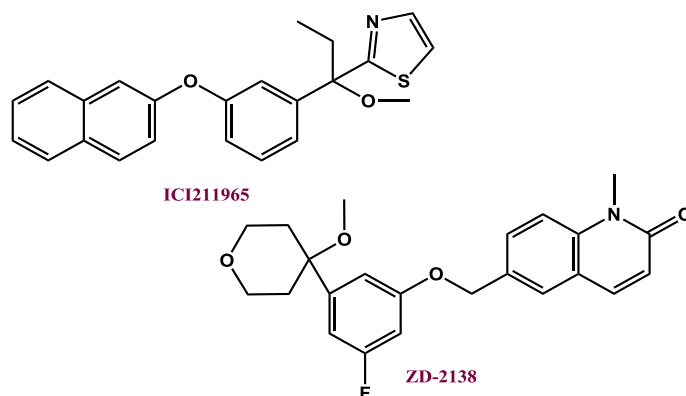
## Αναστολείς χηλικά σύμπλοκα Fe



Όπως προελέχθη ο σίδηρος non-heme της λιποξυγονάσης συναρμόζεται με κατάλοιπα αμινοξέων και με ένα μόριο νερού σχηματίζοντας ένα οκταεδρικό σύμπλοκο (Gillmor et al., 1997). Το συναρμοσμένο μόριο νερού στο ενεργό κέντρο σταθεροποιείται από ένα δεσμό H

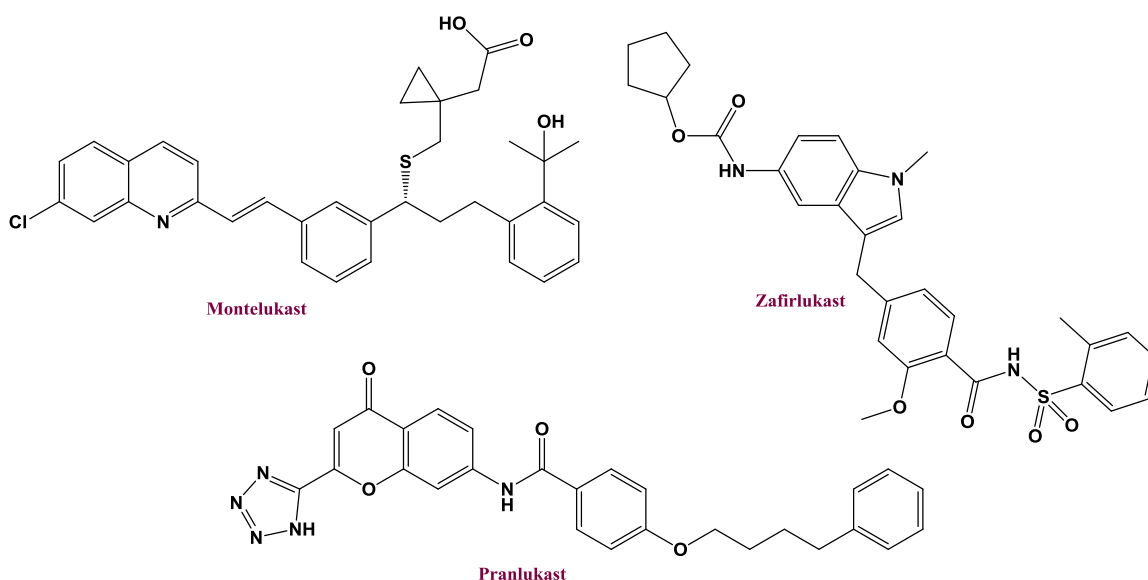
μεταξύ του καρβοξυλικού ανιόντος και του καταλοίπου ισολευκίνης. Το άτομο του Fe στο ενεργό κέντρο της 12-λιποξυγονάσης είναι πιο «τακτοποιημένο» σε σχέση με το άτομο Fe της 5-λιποξυγονάσης και της 15-λιποξυγονάσης. Το μόριο του νερού στην 5-λιποξυγονάση παρότι συναρμόζεται με το άτομο Fe βρίσκεται λίγο εκτός θέσεως ώστε να σχηματίσει ένα κανονικό οκτάεδρο, ενώ όσον αφορά την 15-λιποξυγονάση το άτομο Fe δεν συναρμόζεται με μόριο νερού στο ενεργό της κέντρο. Εκτός από την συναρμογή του Fe με ένα μόριο νερού, στην 5-λιποξυγονάση η συναρμογή ολοκληρώνεται με τρία κατάλοιπα ιστιδίνης και ένα κατάλοιπο ασπαραγίνης Asn ενώ στην περίπτωση της 12- και 15-λιποξυγονάσης, τέσσερα κατάλοιπα ιστιδίνης και ένα κατάλοιπο ασπαραγίνης είναι συναρμοσμένα με τον Fe (Xu et al., 2012). Η αναστολή της 5-λιποξυγονάσης μπορεί να επιτευχθεί με την αντικατάσταση του ενός συναρμωτή του Fe με ένα μικρό μόριο έτσι ώστε να σχηματιστεί ένα σύμπλοκο. Μόρια με συναρμοστικές ιδιότητες ως προς το Fe όπως το υδροξυκιναμωμικό οξύ ή η N-υδροξουρία είναι ισχυροί αναστολείς της 5-LOX (Connolly et al., 1999). Το Zileuton είναι ένας από τους ανταγωνιστές της 5-LOX οι οποίοι σχηματίζουν σύμπλοκα με Fe, το οποίο έχει βγει στην αγορά για την θεραπεία του άσθματος. Διάφορες κλινικές μελέτες, έχουν δείξει ότι το Zileuton βελτιώνει την αναπνευστική ικανότητα, μειώνει τα συμπτώματα του άσθματος, και την φλεγμονή στους αεραγωγούς. Παρόλη την αποτελεσματικότητά του το Zileuton δεν είναι η πρώτη επιλογή στη θεραπεία κατά του άσθματος λόγω παρενεργειών όπως η εκδήλωση ναυτίας και τα φαινόμενα ιδιοσυγκρασίας στο ήπαρ (Nelson et al., 2007). Το Atreleuton το οποίο εισήχθη στις κλινικές μελέτες για την αντιμετώπιση της αρτηριοσκλήρυνσης και των καρδιαγγειακών ασθενειών είναι ένας από τους κορυφαίους αναστολείς της 5-LOX στην κλινική έρευνα (Back 2009).

### Μη οξειδοαναγωγικοί αναστολείς



Οι μη οξειδοαναγωγικοί ανταγωνιστές δεν παρεμβαίνουν στην αντίδραση οξειδοαναγωγής της λιποξυγονάσης αλλά ούτε και χαρακτηρίζονται από την ιδιότητά τους να συμπλοκοποιούν τον Fe. Η αναστολή μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω ανταγωνιστικής πρόσδεσης στο ενεργό κέντρο ή προσδεσής τους σε αλλοστερικό τμήμα του ενζύμου το οποίο έχει την ικανότητα ρύθμισης της δράσης του. Το μεθοξυ-αλκυλο-θειαζόλιο (ICI211965) αναστέλλει εκλεκτικά την 5-LOX η οποία μειώνει την σύνθεση των λευκοτριενίων LTC<sub>4</sub> και LTB<sub>4</sub> σε δείγματα αίματος ζωϊκής και ανθρώπινης προέλευσης (Bird 1991). Το μεθοξυτετραϋδροπυράνιο (ZD-2138) δείχνει ισχυρότερη δράση μετά από *per os* χορήγηση συγκριτικά με το πρώτο όσον αφορά την αντιμετώπιση του άσματος και της αρθρίτιδας (Crawley et al., 1992). Παρόλα αυτά αποδείχθηκε ότι δεν ήταν τόσο αποτελεσματική η δράση του αναστολέα στην αντιμετώπιση της αρθρίτιδας (Young et al., 1999).

### Ανταγωνιστές των λευκοτριενίων



Οι ανταγωνιστές των λευκοτριενίων είναι μια τάξη με ανώτερες ιδιότητες ως προς την αναστολή της βιοσύνθεσης των λευκοτριενίων. Το Pranlukast, zafirlukast και το montelukast έχουν δείξει καλή αποτελεσματικότητα στην αντιμετώπιση του άσματος (Sorkness et al., 1997; Renzi 1999). Αυτά τα φάρμακα μπλοκάρουν τη σύνδεση του λευκοτριενίου D<sub>4</sub> και των λευκοτριενίων LTC<sub>4</sub> και LTE<sub>4</sub> στο κυστεϊνυλικό CysLTR1 των πνευμόνων και των βρόχων και αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της σύσπασης των αεραγωγών. Έχει αναφερθεί επίσης ότι το montelukast διαθέτει και δευτερεύουσες αντιφλεγμονώδεις δράσεις αναστολής της 5-LOX και των ακετυλασών των ιστονών (HATs) (Tintinger et al., 2010). Το montelukast αναστέλλει τη βιοσύνθεση των λευκοτριενίων αναστέλλοντας εκλεκτικά την 5-LOX δίχως να

έχει επίδραση σε άλλα ένζυμα που υπεισέρχονται στη βιοσύνθεση των λευκοτριενίων, όπως την υδρολάση του λευκοτριενίου LTA<sub>4</sub> και την συνθάση του λευκοτριενίου LTC<sub>4</sub> (Ramires et al., 2004). Επιπλέον το montelukast μεταβάλλει τη δραστικότητα του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB ο οποίος σχετίζεται με την δράση της εξαρτώμενης p65-ακετυλάσης των ιστονών HAT και μειώνει την έκφραση της διεγερόμενης από τον παράγοντα νέκρωσης όγκων α (TNF-α) ιντερλευκίνης IL-8 (Tahan et al., 2008). Παρόλα αυτά, έχει αναφερθεί ότι η χρήση αυτού του αναστολέα προκαλεί ανεπιθύμητες νευροψυχιατρικές διαταραχές.

## 6.5. Φυσικά προϊόντα ως αναστολείς λιποξυγονάσης

Έχει αποδειχθεί πρόσφατα ότι η Δ<sup>9</sup>-τετραυδροκανναβινόλη (Δ<sup>9</sup>-THC), ενεργό συστατικό του φυτού *cannabis sativa* έδειξε ικανοποιητική αναστολή της 15-λιποξυγονάσης (Takeda et al., 2011). Το νορδιϋδρογουαϊραετικό οξύ (NDGA) γνωστό αντιοξειδωτικό, αναστέλλει την 12-λιποξυγονάση και την 15-λιποξυγονάση (Whitman et al., 2002). Οι φλαβαν-3-ολες που απαντούν σε διάφορα προϊόντα του κακάο ανέστειλαν την ανθρώπινη ανασυνδυασμένη 5-LOX (EC 1.13.11.34)

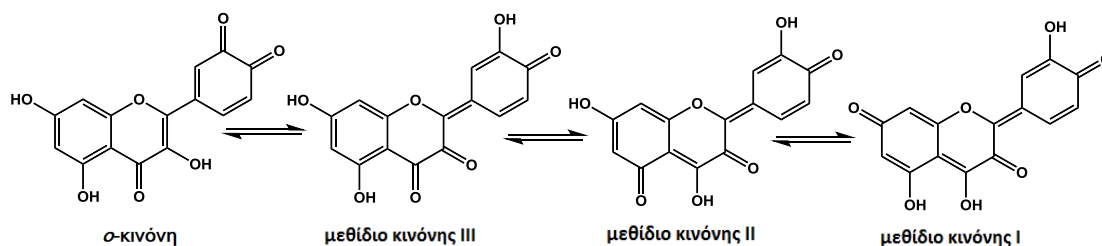
Έχουν γίνει μελέτες δομής-δράσης για τις φλαβόνες τις φλαβονόλες και τις φλαβανόλες με τα εξής συμπεράσματα:

- Όλα τα φλαβονοειδή ανέστειλαν την 15-λιποξυγονάση των κουνελιών
- Η πλειονότητα αυτών των φλαβονοειδών ανέστειλε τη λιποξυγονάση της σόγιας με ασθενέστερη σχετικά δράση
- Ακόμη και η φλαβόνη βρέθηκε να έχει ανασταλτική δράση, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η παρουσία των φαινολικών υδροξυλίων δεν είναι προαπαιτούμενο για την αναστολή
- Η παρουσία της διάταξης της κατεχόλης είτε στον δακτύλιο A (μπακαλεΐνη) είτε στον δακτύλιο B (κερκετίνη σε σχέση με τη μορίνη) ενισχύει την ανασταλτική δράση αλλά δεν είναι βασικό χαρακτηριστικό. Για τα φλαβονοειδή με τμήμα κατεχόλης υπήρχε μια αντίστροφη συσχέτιση ως προς τον συνολικό αριθμό των υδροξυλίων αν ληφθεί υπόψη η ενίσχυση της ανασταλτικής δράσης στην σειρά μυρικετίνη→κερκετίνη→λουτεολίνη/φισετίνη. Αυτή η συμπεριφορά έρχεται σε αντίθεση με την ικανότητα σάρωσης των ελευθέρων ριζών όπως εκφράζεται σε ισοδύναμα trolox στο πείραμα (TEAC), για την οποία έχει αναφερθεί ένα μέγιστο δραστικότητας για την κερκετίνη (Rice-Evans and Miller 1996).



- Η παρουσία μορίου σακχάρου έχει βρεθεί ότι μειώνει την ανασταλτική ισχύ όπως φαίνεται στο παράδειγμα της ρουτίνης στην οποία το 3-OH είναι συνδεδεμένο με ρουτινόζη, σε σχέση με το άγλυκο της κερκετίνης. Αυτό το γεγονός μπορεί να δικαιολογηθεί από την αυξημένη υδροφοβικότητα λόγω της ύπαρξης του γλυκοζίτη ο οποίος προσδίδει χαμηλότερη συγγένεια ως προς το ενεργό κέντρο της λιποξυγονάσης.
- Οι φλαβανόνες (ναριγγενίνη και εσπερετίνη), οι φλαβανόλες (επικατεχίνη) και οι 2,3-διϋδροφλαβονόλες = φλαβανολόνες (ταξιφολίνη) έχειδειχθεί ότι είναι λιγότερο δραστικές από την κερκετίνη. Το κοινό στοιχείο αυτών των μορίων είναι ο διπλός δεσμός στη θέση 2-3 του δακτυλίου C. Αυτός ο διπλός δεσμός μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο με έναν διπλό τρόπο. Πρώτον είναι μέρος μιας εκτεταμένης συζυγίας που συνδέει και τους τρεις δακτυλίους και με το καρβονύλιο του δακτυλίου C με αποτέλεσμα να σταθεροποιεί σύμπλοκα ή ενδιάμεσες ρίζες που σχηματίζονται από το μόριο του φλαβονοειδούς. Λόγω αυτής της εκτεταμένης συζυγίας τα φλαβονοειδή χαρακτηρίζονται από μεγάλη ικανότητα σάρωσης ελευθέρων ριζών (Bors et al., 1990). Δεύτερον προσδίδει στο μόριο μια επιπεδότητα έτσι ώστε να μπορέσει να παρεισφρήσει μεταξύ των αρωματικών ή ετεροαρωματικών κατάλοιπων αμινοξέων στο ενεργό κέντρο του ενζύμου της λιποξυγονάσης. Η κερκετίνη είναι αυτή που διαθέτει την πιο επίπεδη δομή στην προκειμένη περίπτωση, ενώ στη λουτεολίνη ο B δακτύλιος έχει μια γωνία στροφής περίπου 16 ° σε σχέση με το υπόλοιπο μόριο (van Acker SABE et al., 1997). Η μερικώς στραμμένη δομή της λουτεολίνης μαζί με τη δομή κατεχόλης του B δακτυλίου μπορεί να συνεισφέρει στην υψηλή ανασταλτική δράση έναντι της λιποξυγονάσης.

Εν κατακλείδι μπορεί να ειπωθεί ότι κατά την διάρκεια της ενζυμικής κατάλυσης σχηματίζονται προξειδωτικά ενδιάμεσα όπως υπεροξειδικές ρίζες λιπαρών οξέων (ROO•) (Schewe et al., 2002). Θα μπορούσε να υποθέσει κανείς ότι τα φλαβονοειδή συν-οξειδώνονται σε αυτό το ενζυμικό σύστημα σε μια ημικινόνη ή μια κινόνη (παρουσία δομής κατεχόλης στον δακτύλιο B του μορίου του φλαβονοειδούς) ή σε μια ρίζα φαινοξυλίου (για φλαβονοειδή που δεν διαθέτουν τη δομή κατεχόλης) τα οποία θα συνδεθούν ομοιοπολικά με τις σουλφιδριλικές ομάδες των αμινοξέων της λιποξυγονάσης έτσι ώστε να καθιστούν την αναστολή της μη αναστρέψιμη. Στην περίπτωση της κερκετίνης ο ενδιάμεσος σχηματισμός μεθιδίων κίνησης μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο (Awad et al., 2001).

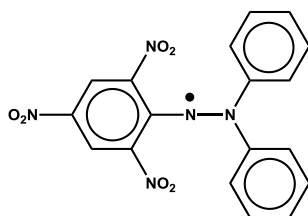


Εικ 33: Σχηματισμός μεθιδίων κινόνης από φλαβονειδή με δακτύλιο Β τύπου κατεχόλης

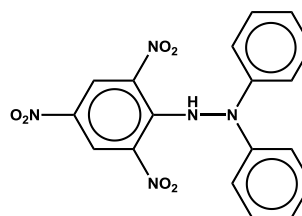
## 7. IN VITRO ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ

### 7.1. Δοκιμή σάρωσης ελευθέρων ριζών με τη χρήση της μεθόδου DPPH

Η μέθοδος για την μέτρηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων στηρίζεται στη χρήση της διφαινυλοπικρυλυδραζίνης (DPPH) που είναι μια από τις λίγες σταθερές ρίζες που είναι εμπορικά διαθέσιμες. Τα αντιοξειδωτικά που περιέχονται στο εκχύλισμα του φυτού δεσμεύουν αυτή τη σταθερή ελεύθερη ρίζα με αποτέλεσμα το αρχικό διάλυμα ιώδους χρώματος να αποχρωματίζεται. Η ελάττωση της απορρόφησης μετράται στα 515nm.

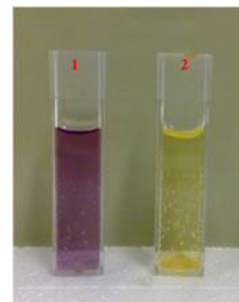
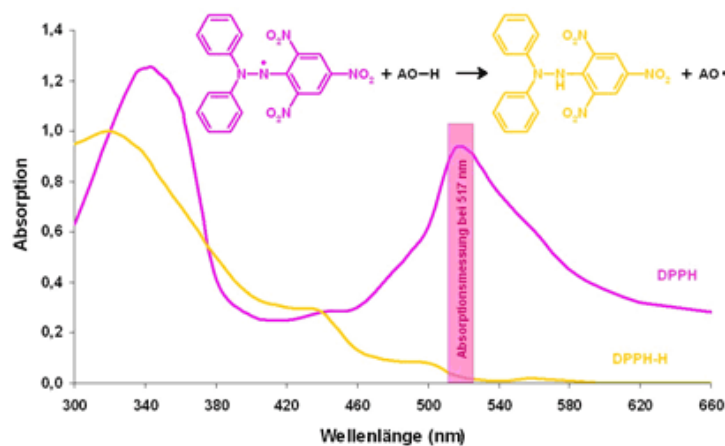


1,1 διφαινυλο-πικρυλ-υδραζύλιο

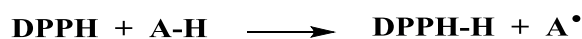


1,1 διφαινυλο-2-πικρυλ-υδραζίνη

Το μόριο του 1,1 διφαινυλο-2-πικρυλ-υδραζιίου (α,α-diphenyl-β-picryl hydrazyl, DPPH) είναι μια σταθερή ελεύθερη ρίζα λόγω του απεντοπισμού του μονήρους ηλεκτρονίου μέσα στο π-ηλεκτρονικό σύστημα των τριών φαινολικών δακτυλίων με αποτέλεσμα να μην διμερίζεται, όπως στην περίπτωση άλλων ριζών. Η ρίζα του DPPH• έχει βαθύ, ιώδες χρώμα λόγω του μονήρους  $e^-$  που εμφανίζει εκτεταμένη συζυγία. Όταν στο διάλυμα του DPPH προστεθεί ένωση δότης πρωτονίου, το DPPH αναγεται προς 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλ-υδραζίνη και παρατηρείται μεταβολή του χρώματος από ιώδες σε κίτρινο λόγω της πικρυλ-ομάδας.

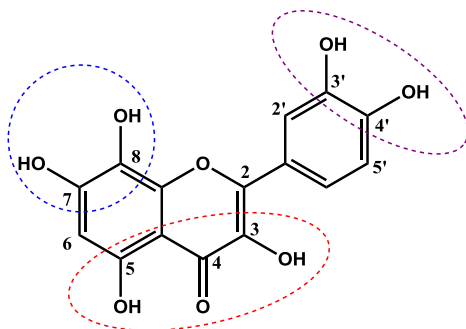


Η αντίδραση που λαμβάνει χώρα είναι η ακόλουθη, όπου A-H το μόριο-δότης υδρογόνου:

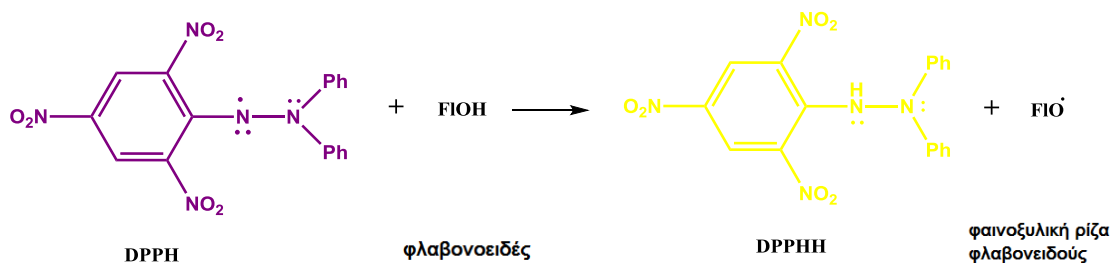


Όπως έχει ειπωθεί προηγουμένως τα φλαβονοειδή τα οποία χαρακτηρίζονται από αντιοξειδωτικές ιδιότητες έχουν την ικανότητα σάρωσης ελευθέρων ριζών λόγω της τάσης τους να προσδίδουν ένα πρωτόνιο σε αυτές. Η ικανότητα σάρωσης της ρίζας του 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλ-υδραζιλίου από τις φλαβόνες, φλαβονόλες και φλαβανόνες γενικά εξαρτάται από τη μοριακή δομή τους, από το βαθμό υποκατάστασης με υδροξυλικές ομάδες δηλαδή την διαθεσιμότητα των φαινολικών υδρογόνων και τη δυνατότητα σταθεροποίησης ρίζας φαινοξυλίου μέσω δεσμών υδρογόνου ή επέκτασης της συζυγίας (Bors et al., 1990), (Rice-Evans et al., 1996). Προηγούμενες μελέτες σχέσης δομής δράσης (SAR) των φλαβονοειδών έχουν επισημάνει τη σημασία του αριθμού και της θέσης σύνδεσης των υδροξυλικών ομάδων στο μόριο του φλαβονοειδούς που είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την αποτελεσματικότητα της ικανότητας σάρωσης ελευθέρων ριζών (Rice-Evans et al., 1996), (van Acker et al., 1996), (Chen et al., 1996), (Cao et al., 1997), (Arora et al., 1998), (Yokozawa et al., 1998), (Lien et al., 1999). Η απαραίτητη δομική προϋπόθεση είναι η ύπαρξη υδροξυλίου στις θέσεις 3' και 4' του B δακτυλίου ή ο-υδροξυ-υποκατάσταση ή δομή κατεχόλης στο B δακτύλιο. Το 3-OH του δακτυλίου C φαίνεται να παίζει επίσης σημαντικό ρόλο (van Acker et al., 1996). Η συζυγία του διπλού δεσμού στους C2-C3 με το καρβονύλιο της θέσης 4 βοηθά στον απεντοπισμό των ηλεκτρονίων του δακτυλίου B και ενισχύει την ικανότητα σάρωσης ριζών (Bors et al., 1990), (Sichel et al., 1991), (Rice-Evans et al., 1996), (van Acker et al., 1996), (Chen et al., 1996), (Jovanovic et al., 1996), (Cao et al., 1997). Ο κορεσμός του διπλού δεσμού στους C2-C3 φαίνεται να προκαλεί απώλεια δράσης (Rice-Evans et al., 1996). Η παρουσία του 3-OH και του 5-OH σε συνδυασμό με την καρβονυλική ομάδα στη θέση 4 και το διπλό δεσμό C2-C3 έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της ικανότητας σάρωσης ελευθέρων ριζών (Heijnen et al.,

2001). Στην περίπτωση απουσίας ο-υδροξυ-υποκατάστασης στο Β δακτύλιο, υποκαταστάσεις τύπου κατεχόλης στον δακτύλιο Α ήταν ικανές να αντισταθμίσουν την κατάσταση και να παίξουν σημαντικό ρόλο στην ικανότητα σάρωσης ελευθέρων ριζών των φλαβονοειδών (Aroga et al., 1998). Τα προαναφερόμενα απαραίτητα κριτήρια τα οποία πρέπει να πληροί ένα φλαβονοειδές για να είναι αποτελεσματικό στην ικανότητα σάρωσης ελευθέρων ριζών φαίνονται στο παρακάτω σχήμα.



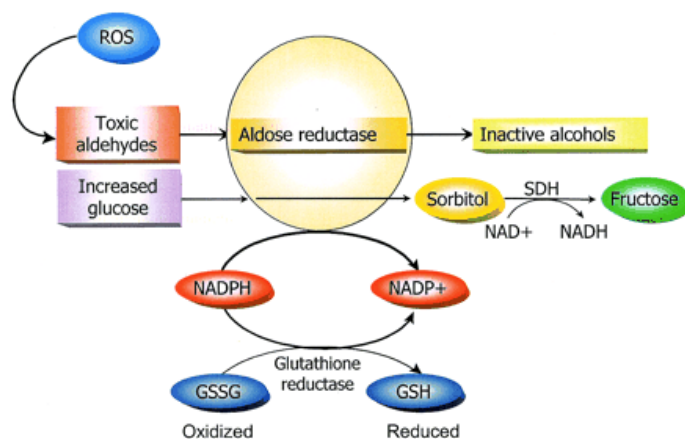
Εικόνα 34. Δομικά χαρακτηριστικά φλαβονοειδών με υψηλή ικανότητα σάρωσης ελευθέρων ριζών



Εικόνα 35. Αντίδραση φλαβονοειδούς με την ρίζα DPPH

## 8. ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΑΝΑΓΩΓΑΣΗΣ ΤΗΣ ΑΛΔΟΖΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΝΑΓΩΓΑΣΗΣ ΤΗΣ ΑΛΔΕΥΔΗΣ

### 8.1. Σακχαρώδης διαβήτης



Εικ 36: Ο ρόλος της αναγωγής της αλδόζης στην οδό των πολυολών

Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι μια μεταβολική νόσος η οποία χαρακτηρίζεται από αύξηση της συγκέντρωσης του σακχάρου στο αίμα (υπεργλυκαιμία) και διαταραχή του μεταβολισμού της γλυκόζης, είτε ως αποτέλεσμα ελαττωμένης έκκρισης ινσουλίνης είτε λόγω ελάττωσης της ευαισθησίας των κυττάρων-στόχων στην ινσουλίνη. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας αναγνωρίζει τρεις κύριους τύπους διαβήτη, τύπου I, τύπου II και διαβήτη της κύησης. Ο διαβήτης τύπου I (ινσουλινοεξαρτώμενος ή νεανικός διαβήτης), χαρακτηρίζεται από αυτοάνοση καταστροφή των β-κυττάρων του παγκρέατος, που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή ινσουλίνης, με αποτέλεσμα ολική έλλειψη ή ελάχιστη έκκριση ινσουλίνης. Ο τύπος αυτός αποτελεί την κυριότερη αιτία διαβήτη σε παιδιά, μπορεί όμως να προσβάλλει και τους ενήλικες. Υπολογίζεται ότι ένα ποσοστό 5-10% του πληθυσμού πάσχει από διαβήτη τύπου I. Ο διαβήτης τύπου II (μη ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης), χαρακτηρίζεται από το συνδυασμό ελαττωμένης έκκρισης ινσουλίνης και ελαττωμένης ευαισθησίας των κυττάρων στη δράση της (φαινόμενο που ονομάζεται αντοχή στην ινσουλίνη). Στα πρώτα στάδια της νόσου, η ελαττωμένη ευαισθησία στη γλυκόζη είναι η κύρια διαταραχή, ενώ τα επίπεδα ινσουλίνης στο αίμα είναι αυξημένα. Ο ΣΔ II είναι η συχνότερη αιτία διαβήτη στους ενήλικες. Ο διαβήτης της κύησης είναι παρόμοιος με το ΣΔ II ως προς το ότι χαρακτηρίζεται από ταυτόχρονη ελαττωμένη έκκριση ινσουλίνης και ελαττωμένη ευαισθησία των κυττάρων. Εμφανίζεται κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (Diabetes care 2006). Πρόσφατη επιδημιολογική μελέτη για τον σακχαρώδη διαβήτη αναφέρει ότι το 2.8% (171 εκατομμύρια ασθενείς) του παγκόσμιου

πληθυσμού έπασχε από τη νόσο το 2000 και το ποσοστό αυτό εκτιμάται πως θα φτάσει το 4,4% (366 εκατομμύρια ασθενείς) το 2030 (Wild et al., 2004) (Alexiou et al., 2008). Ο διαβητικός ασθενής εκτός από τις οξείες επιπλοκές (διαβητική κετοοξείδωση και μη κετονική υπεροσμωτική κατάσταση) που σχετίζονται άμεσα με την έλλειψη ινσουλίνης και τον αυξημένο κίνδυνο άνοιας, βρίσκεται αντιμέτωπος και με μακροπρόθεσμες επιπλοκές οι οποίες κατατάσσονται σε αγγειακές και σε μη αγγειακές. Οι αγγειακές επιπλοκές χωρίζονται σε *μικροαγγειακές* (μικροαγγειοπάθειες) όπως για παράδειγμα αμφιβληστροειδοπάθεια, νευροπάθεια και νεφροπάθεια και *μακροαγγειακές* (μακροαγγειοπάθειες) όπως στεφανιαία νόσος και περιφερική αγγειακή νόσος (Constantino et al., 1999). Σαν μη αγγειακές επιπλοκές αναφέρονται η καθυστερημένη κένωση στομάχου, οι δερματολογικές διαταραχές και η σεξουαλική δυσλειτουργία (Tripathi et al., 2006).

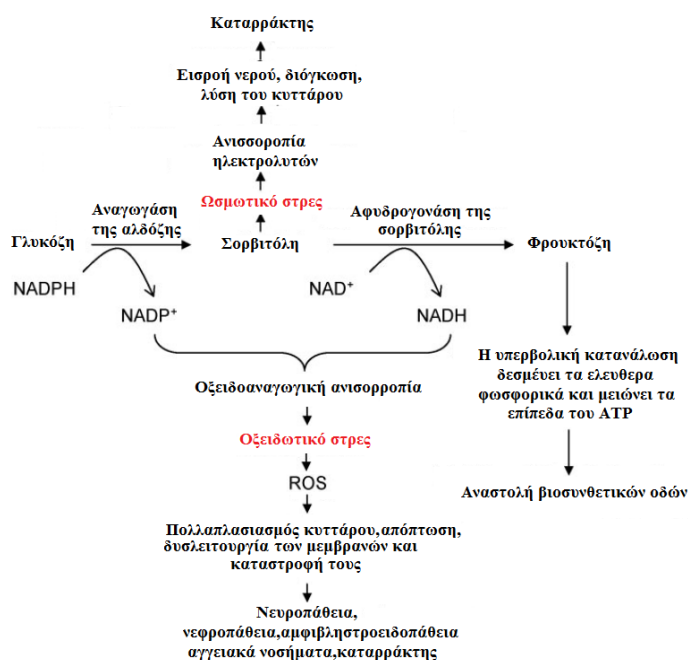
Ο συνδετικός κρίκος μεταξύ του διαβήτη και των μακροπροθέσμων επιπλοκών του είναι η υπεργλυκαιμία η οποία προκύπτει από την μη σωστή ρύθμιση της γλυκόζης (Rolo et al., 2006). Οι μηχανισμοί οι οποίοι εμπλέκονται στην παθογένεση των επιπλοκών του διαβήτη είναι η αυξημένη ροή της γλυκόζης διαμέσου της οδού των πολυολών με την μετατροπή τους σε σορβιτόλη, ο σχηματισμός τελικών προϊόντων γλυκοζυλίωσης των πρωτεϊνών (*advanced glycation end products, AGEs*), η ενεργοποίηση των κινάσων των πρωτεϊνών επαγόμενων από την γλυκόζη και η παραγωγή ROS (Nishikawa et al., 2007), (De Vriese et al., 2000). Η αυξημένη ροή της γλυκόζης μέσω της οδού των πολυολών προκαλεί καταστροφικές συνέπειες για τα κύτταρα όπως είναι: α) το ωσμωτικό στρες, β) το οξειδωτικό στρες γ) το αναγωγικό στρες δ) το γλυκοζιτικό στρες και ε) το στρες των PKC:

α) Το *ωσμωτικό στρες* προκαλείται από την ενδοκυττάρια αύξηση της σορβιτόλης, ένα υδρόφιλο μόριο που αδυνατεί να διέλθει από τις μεμβράνες του κυττάρου προκαλώντας ανισορροπία στα επίπεδα των ηλεκτρολυτών, είσοδο επιπλέον νερού στο κύτταρο, διόγκωση και λύση (Demopoulos et al., 2005),(Srivastava et al., 2005).

β) Το *οξειδωτικό στρες* πιστεύεται ότι προκαλείται από αξιοσημείωτη μείωση των επιπέδων του NADPH το οποίο χρησιμοποιείται από το κύτταρο σε βασικές μεταβολικές αναγωγικές διεργασίες όπως είναι για παράδειγμα το σύστημα της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (Vincent et al., 2004) που συμβάλλει στην εξουδετέρωση των ριζών του O<sup>2-</sup>. Η ικανότητα του κυττάρου να αντεπεξέλθει σε οξειδωτικά ερεθίσματα μειώνεται δραματικά. Το NADPH είναι ο συμπαράγοντας που χρησιμοποιείται στην καταλυτική αναγωγή της ALR2. Επιπλέον η

συσσώρευση της σορβιτόλης και το σχετικό ωσμωτικό στρες μπορούν επίσης να οδηγήσουν σε οξειδωτικό στρες (Vincent et al., 2004).

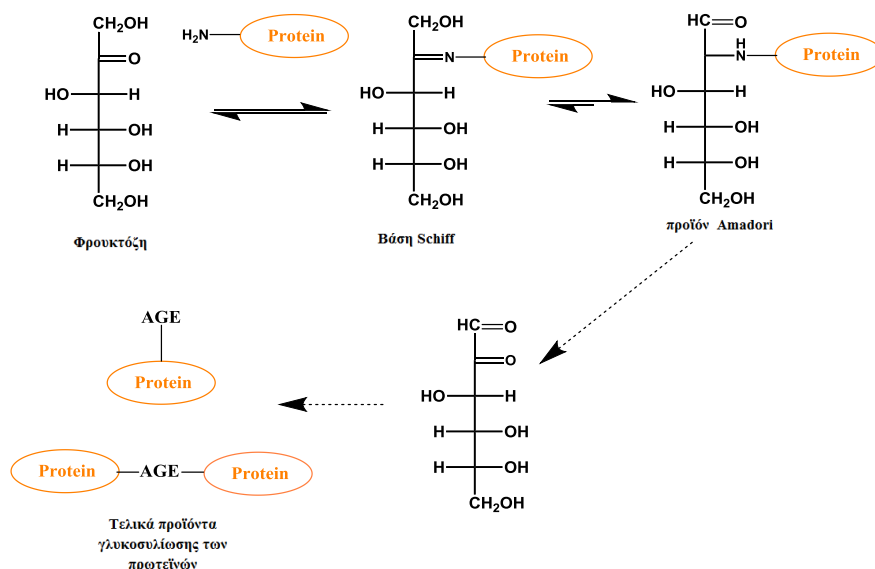
γ) Το **αναγωγικό στρες** ή αλλιώς **ψευδοϋποξία** παρατηρείται λόγω της εξάντλησης των αποθεμάτων του NAD<sup>+</sup> κατά την οξείδωση της σορβιτόλης προς φρουκτόζη μέσω της SDH. Δηλαδή κατά την διάρκεια της υπεργλυκαιμίας η κατανάλωση του NADPH από την αναγωγή της αλδόζης κατά την μετατροπή της γλυκόζης σε σορβιτόλη και η κατανάλωση του NAD<sup>+</sup> κατά την οξείδωση της σορβιτόλης σε φρουκτόζη από το ένζυμο αφυδρογονάση της σορβιτόλης έχει ως αποτέλεσμα αρχικά την μείωση του κλάσματος NADPH/ NADP<sup>+</sup> με αποτέλεσμα την εκδήλωση του **οξειδωτικού στρες** και στη συνέχεια την αύξηση του κλάσματος NADH/NAD<sup>+</sup> με αποτέλεσμα την εκδήλωση του **αναγωγικού στρες**.



Εικ 37: Οι καταστροφικές συνέπειες που παρατηρούνται στα κύτταρα λόγω της αύξησης της ροής της γλυκόζης μέσω της οδού των πολυολών

δ) Το **γλυκοζιτικό στρες** είναι μια διαδικασία η οποία σχετίζεται μερικώς με την είσοδο της γλυκόζης στην οδό των πολυολών. Η φρουκτόζη η οποία παράγεται μέσω της οδού των πολυολών μετατρέπεται μέσω της 3-φωσφοκινάσης σε 3-φωσφορική φρουκτόζη προκαλώντας έτσι τον σχηματισμό δικαρβονυλικών ενδιάμεσων όπως οι 3-δεοξυγλυκαζόνες (3-DG) από τις οποίες προκύπτουν τα τελικά προϊόντα γλυκοζυλίωσης των πρωτεϊνών (*advanced glycation end products AGEs*) (Yan et al., 2003). Επιπρόσθετα η φρουκτόζη λόγω της ιδιότητας να υιοθετεί την ανοιχτή διαμόρφωση, θεωρείται δραστικότερη της γλυκόζης με αποτέλεσμα να αντιδρά με ελεύθερες αμινομάδες πρωτεϊνών, οδηγώντας στη μη ενζυμική

γλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών μέσω του σχηματισμού βάσεων του Schiff. Επιπρόσθετες ανακατατάξεις και στερεοχημικές μετατροπές οδηγούν σε αντιδράσεις Maillard από τις οποίες τελικά θα προκύψουν τα τελικά προϊόντα γλυκοζυλίωσης των πρωτεϊνών (Khalifah et al., 1999),(Vinson et al., 1996).

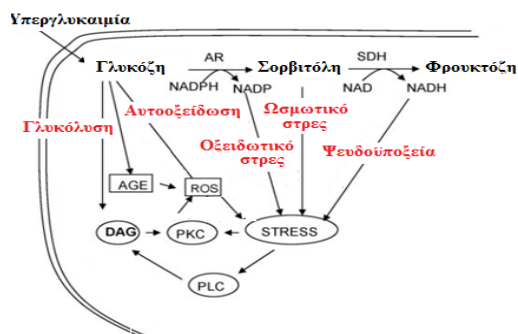


Εικ 38: Σχηματισμός των τελικών προϊόντων γλυκοζυλίωσης

Ο σχηματισμός των τελευταίων προϊόντων και η αλληλεπίδρασή τους με ειδικούς AGE υποδοχείς της μεμβράνης προκαλεί την έναρξη της πορείας μεταγωγής σήματος (Vincent et al., 2004) λόγω της ενεργοποίησης πλειοτροπικών μεταγραφικών παραγόντων όπως για παράδειγμα τον NF-κB με αποτέλεσμα την παραγωγή ROS και την έκφραση παθολογικών γονιδίων (Tripathi et al., 2006).

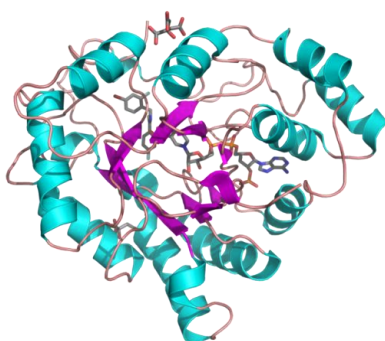
Το στρες των PKC συνδέεται άμεσα με την παθογένεση των μακροπρόθεσμων επιπλοκών του διαβήτη. Το αυξημένο κλάσμα NADH/NAD<sup>+</sup> λόγω της παρουσίας της SDH προκαλεί την αναγωγή της φωσφορικής διϋδροξυ-ακετόνης σε 3-φωσφορική γλυκερόλη η οποία είναι η πρόδρομος ένωση για την σύνθεση της διακυλογλυκερόλης (DAG) (Ramana et al., 2006). Τα αυξημένα επίπεδα της διακυλογλυκερόλης ενεργοποιούν διάφορες ισομορφές πρωτεϊνοκινάσων (Ramana et al., 2004) με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των MAPKs κινάσων οι οποίες με τη σειρά τους φωσφορυλιώνουν μεταγραφικούς παράγοντες οδηγώντας σε διαταραχή της γονιδιακής έκφρασης που μπορεί να οδηγήσει σε απόπτωση (Vincent et al., 2004).





Εικ 39: Σύνοψη μηχανισμών πρόκλησης των διαφόρων ειδών στρες

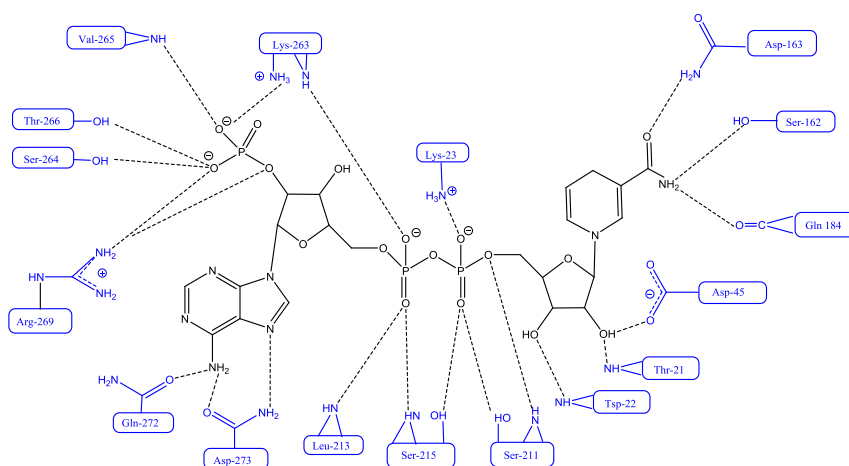
## 8.2 Αναγωγή της αλδόζης (ALR2)



Εικ 40: Τεταρτοπαγής δομή της αναγωγής της αλδόζης ( Howard EI, Sanishvili R, Cachau RE, *et al* (2004). Proteins 55 (4): 792–804)

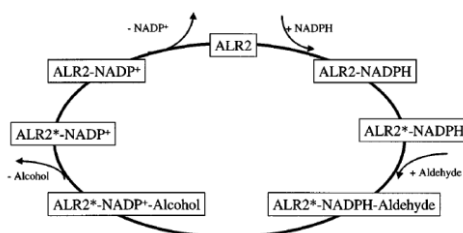
Το ένζυμο αναγωγή της αλδόζης (ALR2) είναι μέλος της οικογένειας των αλδο-κετο αναγωγασών (*aldo-keto reductases, AKRs*). Αποτελείται από 316 αμινοξέα (MB=36 KDa) και η πρωτοπαγής του δομή προσδιορίστηκε για πρώτη φορά σε φακούς οφθαλμών βοοειδών (Schade *et al.*, 1981) και επίμυων (Carper *et al.*, 1988), (Nishimura *et al.*, 1989). Η τεταρτοπαγής δομή της ALR2 αποτελείται από ένα α/β πτυχωτό βαρέλι με πυρήνα 8 παράλληλων β-πτυχωτών ελασμάτων που συνδέονται με 8 περιφερειακά α-ελικοειδή τμήματα. Το ενεργό κέντρο του ενζύμου εντοπίζεται στο C-τελικό άκρο των β-πτυχωτών ελασμάτων (Borhani *et al.*, 1992), (El-Kabbani *et al.*, 1991), (Rondeau *et al.*, 1992), (Wilson *et al.*, 1992). Για την καταλυτική δράση της ALR2 απαιτείται η παρουσία του συνενζύμου NADPH και συγκεκριμένα ο δακτύλιος του νικοτιναμιδίου ο οποίος συνδέεται στο κέντρο της κοιλότητας του ενεργού κέντρου. Η σύνδεση του NADPH πραγματοποιείται πριν την αλληλεπίδραση με το

υπόστρωμα το οποίο στην συνέχεια ανάγεται, και τελικά απελευθερώνεται το NADP<sup>+</sup> από το ενεργό κέντρο (Del Corso et al., 2008), (El-Kabbiani et al., 1998).



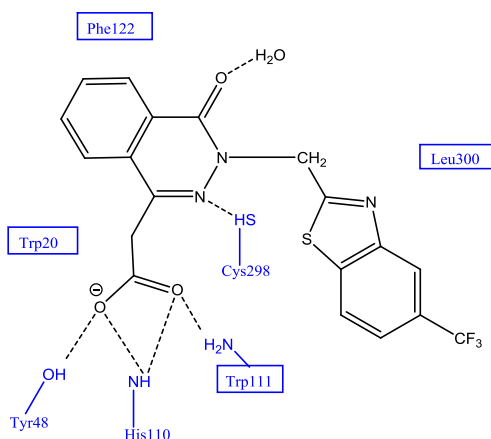
**Εικ 41:** Σύνδεση του NADPH στο ΕΚ της ALR2

Η σύνδεση του NADPH επάγει μια πρώτη αλλαγή της διαμόρφωσης του ενζύμου η οποία συμβαίνει πριν από τη σύνδεση του υποστρώματος. Το NADPH συνδέεται στο καρβοξυτελικό άκρο του ενζύμου της εκτεταμένης διαμόρφωσης σχηματίζοντας συνολικά 19 δεσμούς υδρογόνου και 3 γέφυρες άλατος με κατάλοιπα αμινοξέων σχηματίζοντας τη θέση πρόσδεσης του συμπαραγόντα. Στη συνέχεια η ALR2 όπως η ALR1 μεταφέρει στερεοειδικά το 4-H του καταλοίπου της προλίνης της πολυπεπτιδικής αλυσίδας με τη μορφή ιόντος υδριδίου από τον C4 του δακτυλίου του νικοτιναμιδίου στον καρβονυλικό άνθρακα του υποστρώματος. Το ενεργό κέντρο περιέχει το αμινοξύ τυροσίνη στη θέση 48 (Tyr48) ως δότη πρωτονίου κατά τη διάρκεια της αναγωγής της αλδεΐδης και το AA ιστιδίνη (His110), το οποίο είναι σημαντικό για τον προσανατολισμό του υποστρώματος. Μετά την αναγωγή της αλδεΐδης συμβαίνει μια δεύτερη αλλαγή στην διαμόρφωση του ενζύμου που σχετίζεται με την διάσταση του συμπλόκου ένζυμο-οξειδωμένο NADP<sup>+</sup>.



Ο καταλυτικός κύκλος της ALR2: Το ελεύθερο ένζυμο σε ένα πρώτο στάδιο προσδένει το NADPH, στη συνέχεια υφίσταται αλλαγή στη διαμόρφωση (ALR2-NADPH) → (ALR2\*-

NADPH). Το αλδεϋδικό υπόστρωμα προσδένεται στο ένζυμο σχηματίζοντας ένα τεταρτοταγές σύμπλοκο το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε αλκοολικό υπόστρωμα. Ακολουθεί η απελευθέρωση της αλκοόλης και το σύμπλοκο ενζύμου\*- NADP<sup>+</sup> οδηγείται σε αλλαγή της διαμόρφωσης (ALR2\*-NADP<sup>+</sup>) → (ALR2- NADP<sup>+</sup>) που συνοδεύει την απελευθέρωση του NADP<sup>+</sup>.

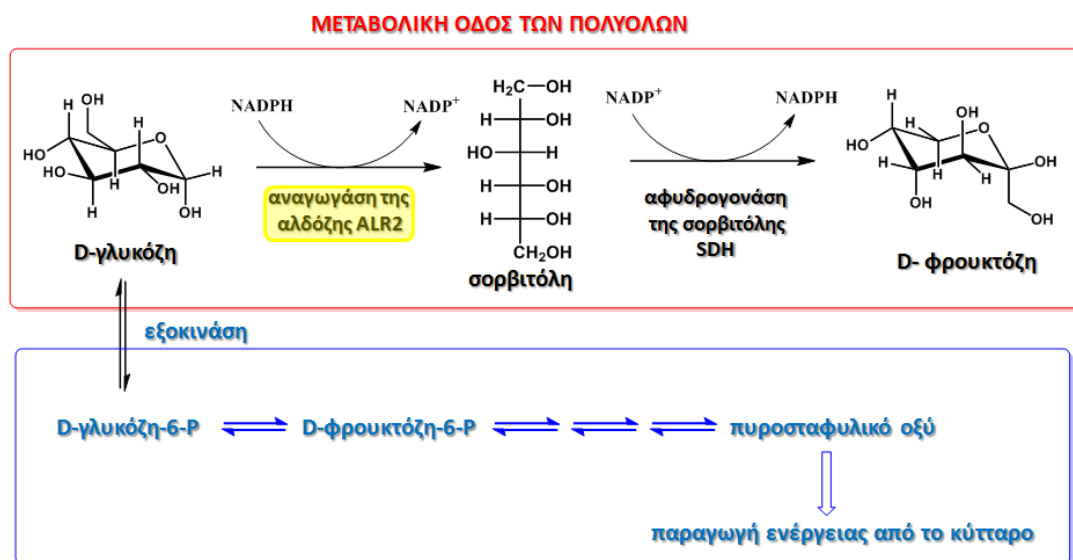


Εικ 42: Υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα κατάλοιπα των αμινοξέων της ALR2 και του Zopolrestat

Κρυσταλλογραφικές μελέτες του ενζύμου της ALR2, συμπλοκοποιημένου με τον αναστολέα Zopolrestat έδειξαν ότι ο τελευταίος συνδέεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου με την καρβοξυλική ομάδα να βρίσκεται κοντά στον C4 του νικοτιναμιδίου, σχηματίζοντας τρεις δεσμούς H με τα κατάλοιπα Tyr48, His110 και Trp111. Τα τελευταία κατάλοιπα σχηματίζουν ένα θετικά φορτισμένο σημείο πρόσδεσης με τον θετικά φορτισμένο δακτύλιο του νικοτιναμιδίου του οξειδωμένου συμπαραγόντα, το οποίο σημείο αναγνωρίζει και προσδένει αρνητικά φορτισμένα μόρια αναστολέων, όπως για παράδειγμα τα παράγωγα των καρβοξυλικών οξέων. Εκτός από τα πολικά κατάλοιπα Tyr48 και His110 το υπόλοιπο σημείο πρόσδεσης του συμπλόκου υποστρώματος-αναστολέα είναι εξαιρετικά υδρόφοβο εφόσον απαρτίζεται από κατάλοιπα Trp20, Trp79, Trp111, Phe122, Pro218, Trp219, Leu300 και Val47. Το Zopolrestat παρέχει έναν μεγάλο αριθμό υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων με τα πρωτεϊνικά κατάλοιπα κατά το σχηματισμό του συμπλόκου με την ALR2. Η πρόσδεση του Zopolrestat προκαλεί μια αλλαγή στην διαμόρφωση του ενζύμου κοντά στο καρβοξυ- τελικό άκρο έτσι ώστε να προσδεθεί κατάλληλα ο αναστολέας. Ο βενζοθειαζολικός υποκαταστάτης του αναστολέα συνδέεται στην υδρόφοβη θήκη (στην οποία βρίσκονται τα κατάλοιπα της Trp111 και της Leu300) η οποία είναι κλειστή στην κρυσταλλική δομή του αποενζύμου και ανοίγει μετά από αλλαγή στη διαμόρφωση μιας θηλιάς που σχηματίζεται από τα κατάλοιπα 121-135 και μιας μικρής αλληλουχίας που αποτελείται από τα κατάλοιπα 298-303. Στην

περίπτωση των φλαβονοειδών το 7-OH είναι απαραίτητο για την αναστολή της ALR2 λόγω σχηματισμού δεσμών H με τα κατάλοιπα Tyr48 και His110 (Constantino et al., 1999b). Η 2-βενζυλο υποκατάσταση λόγω της αρωματικής και λιπόφιλης φύσης καθώς και της ειδικής στερεοδιαμόρφωσης βρέθηκε να ταιριάζει στην υδρόφοβη θήκη του ενζύμου που περιέχει τα κατάλοιπα Trp111 και Leu300 (Urzumtzev et al., 1997). Το 4'-OH φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο διότι μπορεί να σχηματίσει δεσμό με το κατάλοιπο Thr113 (Constantino et al., 2000).

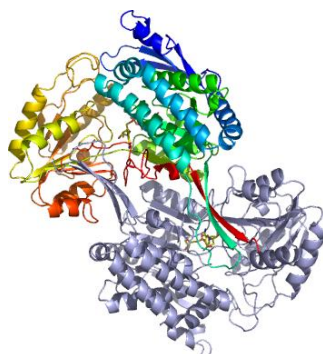
Σε φυσιολογικές συνθήκες, το μεγαλύτερο μέρος της γλυκόζης των κυττάρων φωσφορυλιώνεται σε 6-P-γλυκόζη από την εξοκινάση και μόνο ένα μικρό μέρος, της τάξης κάτω του 3% περνά στο μεταβολικό σύστημα των πολυολών για να μετατραπεί από την ALR2 σε σορβιτόλη. Αυτό συμβαίνει λόγω της μικρής σχέσης της αναγωγάσης της αλδόζης με τη γλυκόζη και τις υψηλότερης έλξης της εξοκινάσης προς τη γλυκόζη.



**ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΛΥΨΗ ΤΩΝ ΕΝΕΡΓΕΙΑΚΩΝ ΑΝΑΓΚΩΝ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΥ**

Ωστόσο σε καταστάσεις κορεσμού της εξοκινάσης λόγω υπερβολικής ποσότητας της γλυκόζης, όπως συμβαίνει στην περίπτωση του διαβήτη, το ένζυμο, το ένζυμο ALR2 παρουσία NADPH, μετατρέπει τη γλυκόζη σε σορβιτόλη σε ποσοστό άνω του 30%, η οποία στη συνέχεια μεταβολίζεται με βραδύτερο ρυθμό προς φρουκτόζη με τη βοήθεια του ενζύμου δεϋδρογονάση της σορβιτόλης, με παράλληλη αναγωγή του NAD<sup>+</sup>.

### 8.3. Αναγωγή της αλδεΐδης (ALR1)

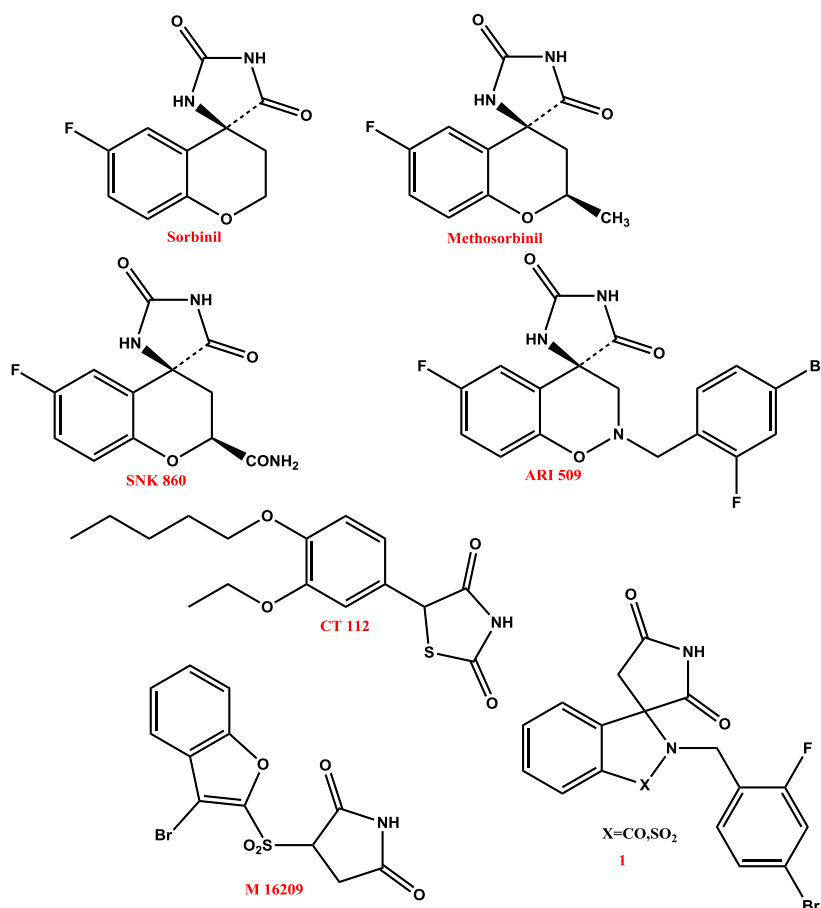


Εικ 43: Τεταρτοταγής δομή της αναγωγής της αλδεΐδης

Στην ίδια οικογένεια των αλδο-κετο αναγωγασών ανήκει και η αναγωγή της αλδεΐδης η οποία είναι παρούσα σε όλους τους ιστούς και διαδραματίζει ρόλο αποτοξίνωσης του οργανισμού δεδομένου ότι παρουσιάζει εξειδίκευση για υποστρώματα τοξικών αλδεϋδών όπως της 4-υδρόξυ-trans-2-ενεάλης (HNE), οι οποίες σχηματίζονται κατά την διάρκεια παθολογικών καταστάσεων που σχετίζονται με οξειδωτικό στρες, όπως η διαβητική υπεργλυκαιμία (Carper et al., 1989). Η ALR1 παρουσιάζει μεγαλύτερη συγγένεια για τις αρωματικές αλδεΐδες (El-Kabbani et al., 2007) παρά για τις αλειφατικές αλδεΐδες, ενώ σύμφωνα με μία δημοσίευση ανάγει και τη γλυκόζη προς σορβιτόλη στο φλοιό των νεφρών (Sato 1992). Η δραστηριότητα αυτή της ALR1 φαίνεται πάντως να αποδυναμώνει την υπόθεση για εκλεκτικότητα των ARI στην αναγωγή της αλδόζης. Τα ένζυμα ALR1 και ALR2 εμφανίζουν σημαντική ομολογία (65% ομοιότητα όσον αφορά στη αλληλουχία των αμινοξέων αλλά και στη τεταρτοταγή τους δομή) (El-Kabbani et al., 1998) (Steuber et al., 2008). Και τα δύο ομόλογα ένζυμα παρουσιάζουν ένα μοτίβο α/β βαρελιού, ενώ το ενεργό τους κέντρο αποτελείται από τρεις κοιλότητες (ανιονική, λιπόφιλη και κοιλότητα εκλεκτικότητας στο C-τελικό βρόχο του ενζύμου) (Tete-Favier et al., 1997). Κατά την αλληλεπίδραση της αναγωγής της αλδόζης με τον προσδέτη παρατηρείται αλλαγή της διαμόρφωσης του ενεργού κέντρου, φαινόμενο που δεν παρατηρείται κατά την αλληλεπίδραση του προσδέτη με την ALR1. Το ένζυμο της αναγωγής της αλδόζης ALR2 αποτελεί την κυρία αιτία της συσσώρευσης υψηλών συγκεντρώσεων σορβιτόλης και γαλακτινόλης σε φακούς επίμυων κατά την καταρακτογένεση λόγω σακχάρου (van Heyningen 1959). Βαση των παρατηρήσεων αυτών προτάθηκε ότι η συγκέντρωση πολυολών στους φακούς, οδηγεί σε αύξηση της ωσμωτικής πίεσης ενδοκυτταρικά με αποτέλεσμα την πρόσληψη επιπλέον ιόντων Na<sup>+</sup> και την απώλεια K<sup>+</sup> (Kinoshita et al., 1981).

## 8.4. Αναστολείς της αναγωγάσης της αλδόζης

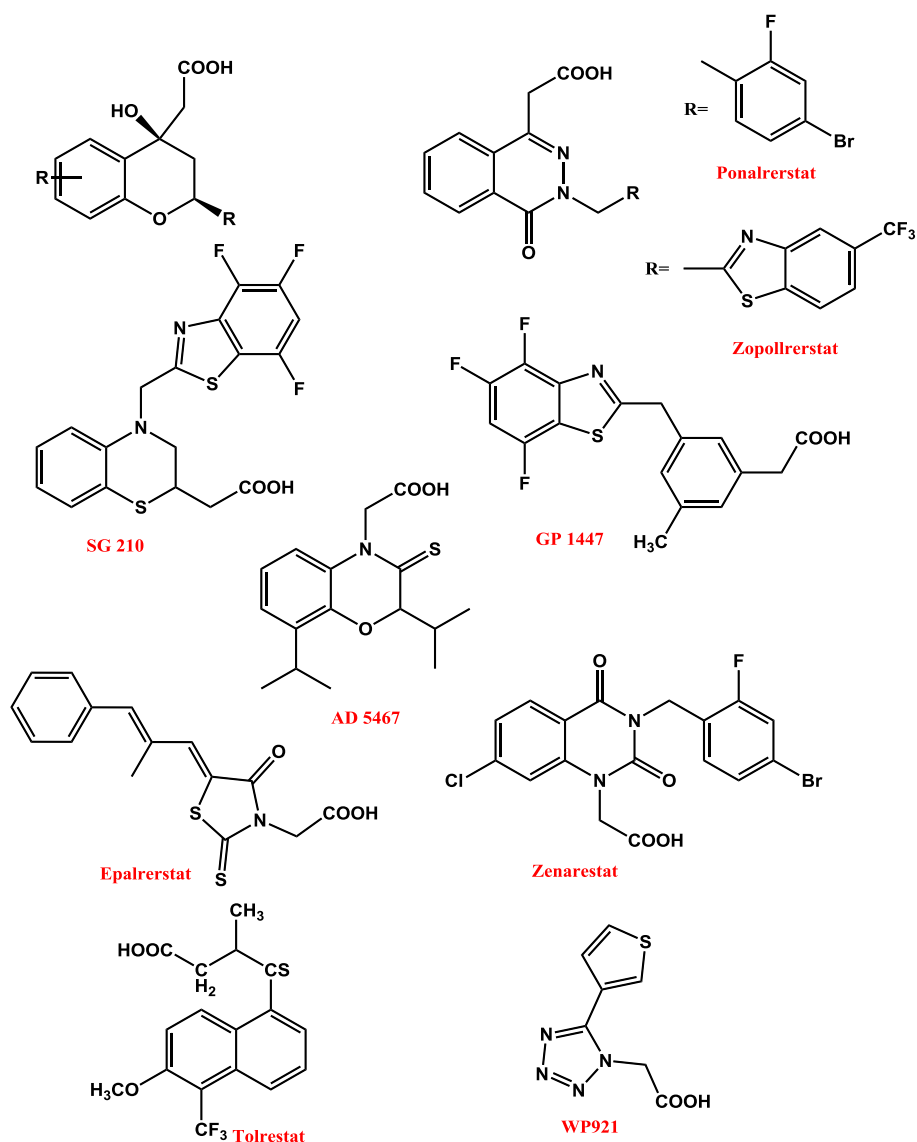
### Παράγωγα της υδαντοΐνης, κυκλικά ιμίδια



Μετά την ανακάλυψη του S (+) Sorbinil το 1978, ακολούθησε η σύνθεση διαφόρων παραγώγων με αυξημένη ισχύ. Δυστυχώς όμως οι *in vivo* μελέτες έδειξαν αντιδράσεις υπερευαισθησίας που οφείλονται πιθανά στον δακτύλιο της υδαντοΐνης. Η ανασταλτική δράση έναντι στην ALR2 οφείλεται στο εναντιομερές C-4S και στην περίπτωση που υπάρχει υποκαταστάτης στη θέση 2 του δακτυλίου του χρωμανίου αυτός θα πρέπει να βρίσκεται σε θέση *cis* σε σχέση με τον δεσμό C-N του δακτυλίου της υδαντοΐνης όπως στην περίπτωση του αναστολέα *SNK 860* και *Methosorbinil*. Το παράγωγο *SNK 860* αποδείχτηκε πως ήταν 10 φορές πιο ισχυρό από το *sorbinil* (Mealy & Castaner 1996) και το *ARI 509* (Malamas et al., 1994a) το οποίο έδειξε *in vitro* εναντιοεκλεκτικότητα με το (+) εναντιομερές να είναι 100 φορές πιο ισχυρό από το (-) εναντιομερές, ενώ και τα δύο εναντιομερή παρουσίασαν την ίδια *in vivo* δραστικότητα λόγω της ρακεμοποίησης που λαμβάνει χώρα (Malamas et al., 1994b). Ο

λιπόφιλος χαρακτήρας αυτών των μορίων φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην αναστολή της συσσώρευσης των πολυολών στους φακούς των οφθαλμών των επίμυων, χωρίς όμως να μπορεί να ειπωθεί το ίδιο και για το ισχιακό νεύρο. Το CT 112, ένα 2,4 θειαζολιδινενδιονικό παράγωγο μπορεί να χαρακτηριστεί ως ένας δυ-ϊσοεστέρας της υδαντοΐνης. Το M-16209 αποδείχτηκε ότι μπορεί να ελαττώσει την υπεργλυκαιμία σε επαγόμενο από στρεπτοζοτοσίνη διαβήτη σε ποντίκια προκαλώντας την έκκριση ινσουλίνης (Kato et al., 1991).

### Παράγωγα του καρβοξυλικού οξέος

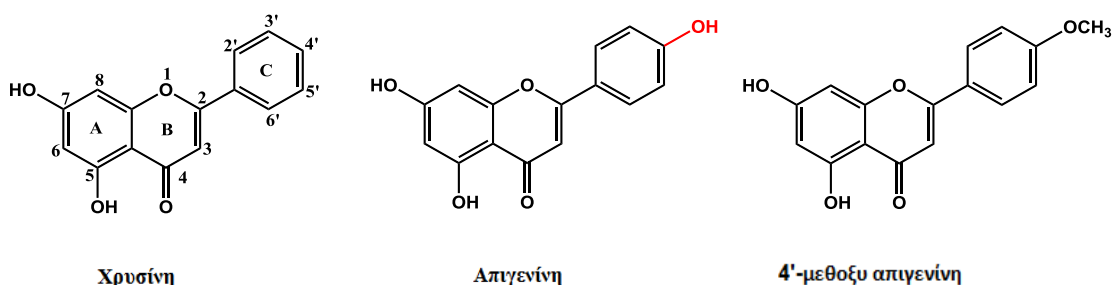


Στο παρόν στάδιο διάφορα παράγωγα καρβοξυλικών οξέων βρίσκονται υπό κλινικές μελέτες όπως για παράδειγμα το AD5467, το Epalrestat, το WP921, το Zenarestat και το Zopolrestat

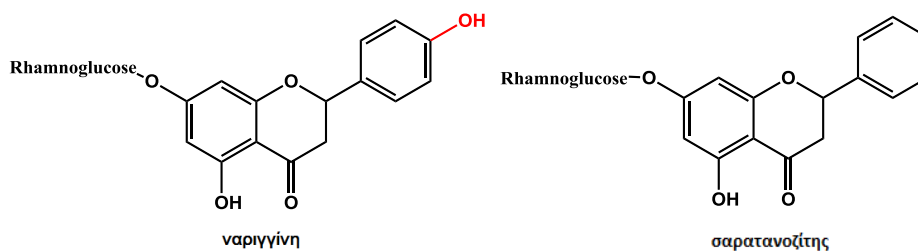
(Mealy & Castaner et al., 1996). Τα καλύτερα αποτελέσματα σημειώθηκαν με το Zopolrestat και άλλα ενεργά παράγωγα που χαρακτηρίζονται από την παρουσία του υποκαταστάτη του βενζοθειαζολίου. Τα ευρήματα αυτά οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι πρέπει να υπάρχει ένα σημείο πρόσδεσης στην ALR2 το οποίο έχει μεγάλη συγγένεια για το δακτύλιο του βενζοθειαζολίου (Mylari et al., 1992). Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώθηκε από την ανάλυση της κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου της ALR2 με το Zopolrestat (Wilson et al., 1993). Τα παράγωγα καρβοξυλικών οξέων παρουσιάζουν χαμηλή *in vivo* δραστικότητα και χαμηλή σταθερά pKa που οφείλεται στην παρουσία της καρβοξυλικής ομάδας στο μόριο τους η οποία δίσταται σε φυσιολογικό pH με αποτέλεσμα να μην μπορούν να διέλθουν από τις κυτταρικές μεμβράνες.

### 8.5. Αναστολείς της ALR2 που απομονώθηκαν από φυσικές πηγές

Το απλούστερο φλαβονοειδές που εξετάστηκε για την ικανότητά του να αναστέλλει το ένζυμο της αναγωγάσης της αλδόζης ήταν η χρυσίνη. Η απιγενίνη φέρει ένα επιπλέον υδροξύλιο στη θέση 4' του δακτυλίου B γεγονός που σηματοδοτεί την αύξηση της ανασταλτικής δράσης. Όμως η μεθυλίωση αυτού του υδροξυλίου έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της ανασταλτικής δράσης στην περίπτωση της 4'-μεθοξυ-απιγενίνης.

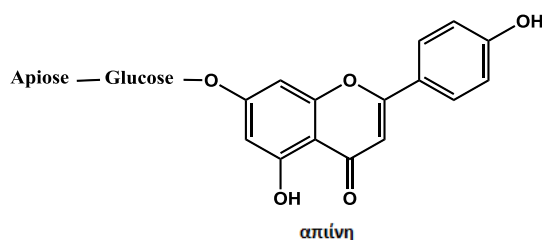


Το ίδιο ισχύει στην περίπτωση της ναριγγίνης τον 7-Ο-ραμνογλυκοζίτη της 2,7,4'-τριϋδροξυ-φλαβανόνης σε σχέση με τον σαρατανοζίτη (7-Ο-ραμνογλυκοζίτη της 5,7-διϋδροξυ φλαβανόνης).

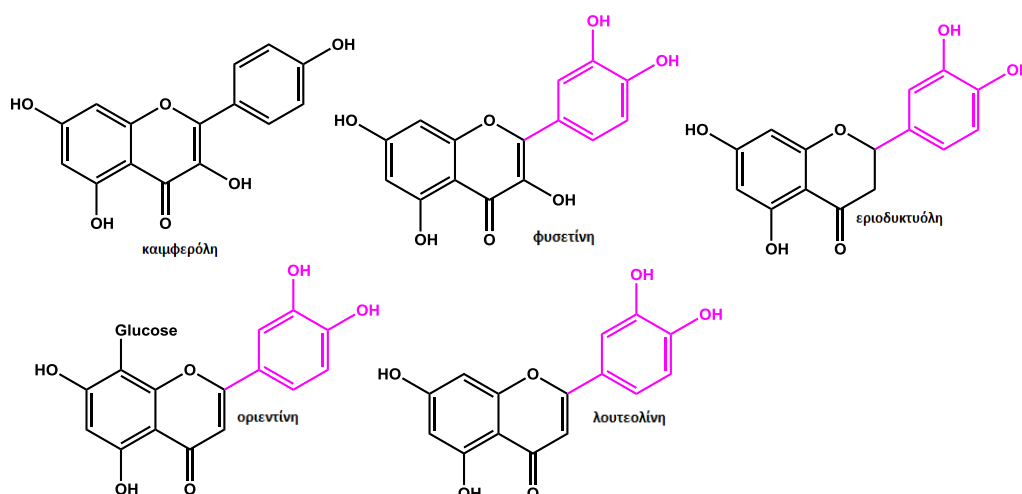




Η γλυκοζυλίωση του 7-OH είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της δράσης, όπως φαίνεται στην περίπτωση της απίνης, τον 7-γλυκοζίτη της απιγενίνης ο οποίος είναι λιγότερο δραστήσιος από την τελευταία.

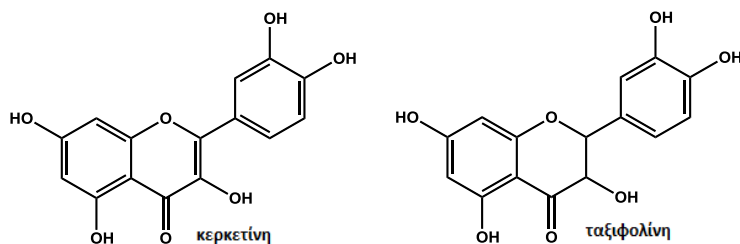


Η φυσετίνη, η εριοδικτυόλη, η οριεντίνη και η λουτεολίνη είναι δραστηριότερες από την καιμφερόλη λόγω της παρουσίας της κατεχόλης στον δακτύλιο B η οποία οδηγεί στην βελτίωση της ανασταλτικής δράσης.

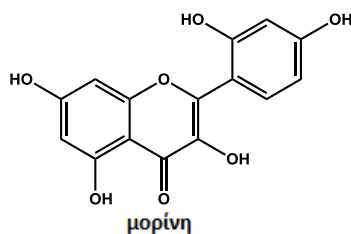


Η απώλεια του διπλού δεσμού μεταξύ του άνθρακα 2,3 οδηγεί σε απώλεια δράσης και αυτό φαίνεται στην περίπτωση της εριοδικτυόλης η οποία έχει λιγότερο ισχυρή δράση από την λουτεολίνη. Δεν μπορεί να εξαχθεί κάποιο συμπέρασμα για το τι επίδραση έχει η γλυκοζυλίωση στην ανασταλτική δράση του ενζύμου. Από πειράματα έχει εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η γλυκοζυλίωση του 3 υδροξυλίου και η C- γλυκοζυλίωση κυρίως του άνθρακα 8, δεν παίζουν κανένα ρόλο. Αυτό φαίνεται από το γεγονός ότι η δράση του 3-O-γλυκοζίτη της καιμφερόλης είναι παρόμοια με την δράση της καιμφερόλης, καθώς επίσης και του C-γλυκοζίτη της οριεντίνης είναι παρόμοια με αυτή της μη γλυκοζυλιωμένης λουτεολίνης. Οι πιο αποτελεσματικοί αναστολείς της αναγωγής της αλδόζης είναι οι πενταϋδροξυφλαβόνες και όλα τα παράγωγά τους. Από τα άγλυκα η κερκετίνη βρέθηκε να είναι ο ισχυρότερος αναστολέας. Η φλαβανόνη της κερκετίνης (2,3-διϋδροκερκετίνη) ή αλλιώς ταξιφολίνη, ήταν λιγότερο δραστήσια από τη κερκετίνη, επιβεβαιώνοντας το γεγονός ότι η

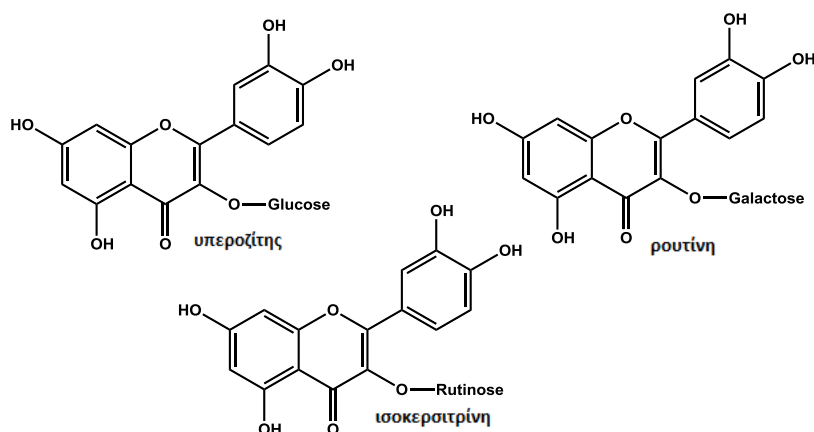
παρουσία του διπλού δεσμού μεταξύ των ατόμων άνθρακα 2,3 ισχυροποιεί την ανασταλτική δράση.



Όσον αφορά την δομή της κατεχόλης, και τη θέση των υδροξυλίων πάνω στο δακτύλιο C, η μορίνη μια πενταϋδροξυ-φλαβόνη του τύπου της ρεσορκινόλης με τα δύο υδροξύλια σε θέση *μετα*, είναι κατά έναν μεγάλο βαθμό λιγότερο ισχυρή από την κερκετίνη όπου τα δύο υδροξύλια βρίσκονται σε θέση *ορθο* και μοιάζουν με το μόριο της κατεχόλης.



Εκτός από την παρουσία του διπλού δεσμού στην θέση 2,3 του Β δακτυλίου και τη σχετική θέση των υδροξυλίων στον δακτύλιο Β, ένα άλλο σπουδαίο χαρακτηριστικό μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την ανασταλτική δράση και αυτό είναι η γλυκοζυλίωση. Σημαντική χαρακτηρίζεται όχι μόνο η θέση των υδροξυλίων που έχουν γλυκοζυλιωθεί, αλλά παίζει ρόλο και το είδος του σακχάρου. Η ρουτίνη (3-*O*-ρουτινοζίτης της κερκετίνης), στην οποία το 3-OH είναι γλυκοζυλιωμένο από τον δισακχαρίτη ρουτινόζη, ήταν κατά πολύ λιγότερο δραστήκη από το αντίστοιχο άγλυκο κερκετίνη. Από την άλλη πλευρά η ανασταλτική δράση της ισοκερσιπρίνης (3-*O*-γλυκοζίτης της κερκετίνης), ο υπεροζίτης (3-*O*-γαλακτοζίτης της κερκετίνης) και οι γλυκοζίτες προερχόμενοι από τους μονοσακχαρίτες είχαν ανασταλτική δράση που δεν διέφερε σημαντικά από το μητρικό φλαβονοειδές.



Τα συμπεράσματα που μπορούν να προκύψουν είναι τα εξής:

- ✘ Η παρουσία του καρβονυλίου στους αρωματικούς δακτυλίους δίνει την δυνατότητα σχηματισμού δεσμού υδρογόνου με τα κατάλοιπα της Tyr48 και της His110 στο ενεργό κέντρο του ενζύμου (Rastelli et al., 2002)
- ✘ Η απουσία του υδροξυλίου στη θέση 4' μειώνει δραστικά την ανασταλτική δράση, και αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι υπάρχει αλληλεπίδραση με το κατάλοιπο της Thr113 όταν ο φαινολικός υποκαταστάτης βρίσκεται σωστή εφαρμογή μέσα στην υδρόφοβη θηλιά του ενεργού κέντρου του ενζύμου που σχηματίζεται από τα κατάλοιπα της Trp111 και της Leu300
- ✘ Οι υδροξυ- και μεθοξυ- υποκαταστάτες στις θέσεις 5,6,7 και 8 παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανασταλτική δράση του ενζύμου
- ✘ Η 2,3',4'-διϋδροξυφλαβόνη, η 3',4',7-τριϋδροξυφλαβόνη, η λουτεολίνη και ο 7-*O*-β-D-γλυκοπυρανοζίτης της λουτεολίνης είναι οι πιο ισχυροί αναστολείς της αναγωγής της αλδόζης
- ✘ Η δράση των φλαβονών που δεν έχουν το 5-OH είναι παρόμοια με τη δράση των 5-OH φλαβονών, όπως για παράδειγμα η 7-υδροξυφλαβόνη που έχει παρόμοια δράση με την χρυσίνη και η 4',7-διϋδροξυφλαβόνη που έχει παρόμοια δράση με την απιγενίνη
- ✘ Η δράση των 7-*O*-γλυκοζυλο- φλαβονών είναι ασθενέστερη από τα άγλυκα όπως για παράδειγμα ο 7-*O*-β-D-γλυκοπυρανοζίτης της απιγενίνης που είναι λιγότερο δραστήσιος από την απιγενίνη και ο 7-*O*-β-D-γλυκοπυρανοζίτης της διοσμειτίνης είναι λιγότερο δραστήσιος από την διοσμειτίνη
- ✘ Η ανασταλτική δράση των φλαβονών με δακτύλιο κατεχόλης στον Β δακτύλιο είναι ισχυρότερη από τα μονοϋδροξυλιωμένα παράγωγα, τα μονο ή διμεθυλιωμένα παράγωγα. Απαραίτητα στοιχεία για τη δράση των φλαβονών και των φλαβονολών

είναι τα ακόλουθα: 1) ο Β δακτύλιος πρέπει να έχει τη δομή κατεχόλης 2) ο διπλός δεσμός 2-3 ενισχύει την δράση 3) οι ισοφλαβόνες και οι κατεχίνες εμφανίζουν λιγότερο ισχυρή ανασταλτική δράση από τις φλαβόνες 4) το ΟΗ στη θέση 5 δεν επηρεάζει την δραστικότητα 5) η 3-υδροξυλίωση και η 7-Ο-γλυκοζυλίωση μειώνουν τη δράση.

- ✦ Οι φλαβόνες και οι φλαβονόλες που έχουν τον δακτύλιο της κατεχόλης εμφανίζουν ισχυρότερη δράση από αυτές που έχουν την δομή της πυρογαλλόλης (Matsuda et al., 2002)

### Υδροξυ-κινναμωμικά οξέα

Τα απλά υδροξυκινναμωμικά οξέα έχουν ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι της αναγωγής της αλδεΐδης ALD2. Το φερουλικό οξύ έχει ασθενή ανασταλτική δράση έναντι της αλδόζης ALD1 (Yawadio et al., 2007), ενώ οι εστέρες του υδροξυκινναμωμικού οξέος έχουν ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι της αναγωγής της αλδεΐδης. Το σαλβιανολικό οξύ Α και Κ το λιθοσπερμικό οξύ Β και το και το ροσμαρινικό οξύ αναφέρεται ότι έχουν καλή ανασταλτική δράση έναντι της αναγωγής της αλδεΐδης ALD2 (Koukoulitsa et al., 2006; Du et al., 1995; Kasimou et al., 1998). Το χλωρογενικό οξύ (5-Ο-καφεϋλο κινικό οξύ) και το 3,5-δικαφεϋλο κινικό οξύ έδειξαν επίσης ανασταλτική δράση (Varma et al., 1976; Ravn et al., 1990; Terashima et al.;1990). Ένας από τους ισχυρότερους αναστολείς της αναγωγής της αλδεΐδης ALD2 ήταν το 4,5- δικαφεϋλο κινικό οξύ (Logendra et al., 2006).



## 9. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΓΕΝΙΚΟ

### 9.1 Υλικά και μέθοδοι

#### 9.1.1 Διαλύτες και αντιδραστήρια για τη βιολογική αποτίμηση

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι ακόλουθοι:

- Πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C Panreac, PA 13.1315
- Διχλωρομεθάνιο Panreac, PA 13.1254 και Carlo Erba (PA), UN1593
- Μεθανόλη, Carlo Erba (PA), UN1230
- Διαιθυλεθέρας, Carlo Erba (PA), No 447534
- Οξικός αιθυλεστέρας, Merck Art.9623
- κ-Βουτανόλη, Carlo Erba (PA), UN1120
- Εξάνιο

Για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο του DPPH• χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια:

- DPPH•, Sigma-Aldrich
- EDTA, Panreac

Τα απαιτούμενα αντιδραστήρια για το πείραμα αναστολής της ALR2 και ALR1 ήταν:

- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 0.067M (pH=6.2)
- S-ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (10mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων +2mM EDTA + 2mM 2-μερκαπτοαιθανόλη)
- S-ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων + σουκρόζη (10mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων + 2mM EDTA + 2.5mM 2-μερκαπτοαιθανόλη + 0.25M σουκρόζη)
- Διάλυμα NaDPH 0.104mM (τετρανατριούχο άλας, MW=833.4)
- Διάλυμα DL-γλυκεραλδεΐδης 10mM (MW=90.08)
- Διάλυμα του μερά νατρίου άλατος του γλυκουρονικού οξέος 600 mM
- Κορεσμένο διάλυμα (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- Διάλυμα NaHCO<sub>3</sub> 0.2M (MW=84.01)
- Φακοί (για ALR2) και νεφροί (για ALR1) από επίμυες Fischer-334 (αρσενικά και θηλυκά)
- Διαιθυλαμινοαιθυλο-κελουλόζη (DEAE-cellulose).

Τέλος τα αντιδραστήρια (Sigma-Aldrich Corporation) που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα αναστολής της LOX είναι:

- Διμέθυλο σουλφοξείδιο (DMSO)
- Άλας με νάτριο του λινελαϊκού οξέος (0.1mM) σε pH 9.00
- Φυτική λιποξυγονάση (σόγιας) ( $1.9 \times 10^4$  w/v σε φυσιολογικό ορό) (LOX)
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris pH=9.00 (Tris•HCl)

### 9.1.2. Χρωματογραφικές μέθοδοι

#### Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC)

- Πλάκες κυτταρίνης (20x20 cm), 0.1 mm (Merck, Art.5552)
- Πλάκες Kieselgel 60 F (20x20 cm), 0.2 mm (Merck, Art.5554)
- Πλάκες Kieselgel 60 F (20x20 cm), 0.2 mm (Merck, Art.5553)

Η μέθοδος της χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας χρησιμοποιήθηκε εκτεταμένα για παρασκευαστική και αναλυτική χρήση.

#### Διαλύτες ανάπτυξης TLC

- Σύστημα AcOH 15% o/o.
- Σύστημα EAW: Οξικός αιθυλεστέρας, Οξικό οξύ, νερό 4:1:2 (οργ.φάση)
- Σύστημα CAW: Διχλωρομεθάνιο, Οξικό οξύ, νερό σε αναλογία 50:45:5.
- Σύστημα BAW: n-Βουτανόλη, Οξικό οξύ, νερό 4:1:5 (οργ.φάση).

Διαλύτες ανάπτυξης, σε διάφορες αναλογίες, για πλάκες οξειδίου του πυριτίου:

- Εξάνιο
- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$
- EtOAc
- MeOH

Τα χρωματογραφήματα παρατηρήθηκαν στο υπεριώδες φώς (254 nm και 366 nm) προ και μετά την έκθεση στα παρακάτω αντιδραστήρια:

- Ατμοί αμμωνίας.
- Αντιδραστήριο Neu (Naturstoff reagenz A): (μεθανολικό διάλυμα 1% διφαινυλοβορικού αμινοαιθυλεστέρα).
- Αντιδραστήριο θειϊκής βανιλίνης (Vanillin 99%, ACROS Organics): (1. Μεθανολικό διάλυμα βανιλίνης 5%, 2. Διάλυμα θειϊκού οξέος 5% σε μεθανόλη. (Ισοι όγκοι από τα δυο διαλύματα). Ακολουθεί θέρμανση για 2 min περίπου στους 100°C.

### **Χρωματογραφία στήλης (Column Chromatography, CC)**

- Πολυαμίδιο CC6 Macherey-Nagel, 70-160 $\mu$ m, βαθμωτής έκλουσης (H<sub>2</sub>O→MeOH). Για χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, το πολυαμίδιο κατεργάστηκε προηγουμένως με απεσταγμένο νερό και μείγμα νερού-μεθανόλης προς απομάκρυνση των ολιγομερών του.
- Silica gel 60, 0.040-0.063 (Merck, Art.9385), βαθμωτής έκλουσης (Εξάνιο→CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>→MeOH).
- Sephadex LH-20 (Amersham Biosciences), με MeOH.
- Υπό κενό (VLC, Vacuum Liquid Chromatography), με υλικά πλήρωσης α. Πολυαμίδιο CC6 Macherey-Nagel, 70-160 $\mu$ m, βαθμωτής έκλουσης (H<sub>2</sub>O→MeOH).

### **Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC).**

Το σύστημα χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκε αποτελείται από αντλία HPLC Pump SSI Marathon III, σύστημα βαθμωτής έκλουσης Gradient SSI 232C και ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού Detector Variable UV-Vis SSI 500 με λογισμικό SSI 232 Clarity Lite).

Οι χρωματογραφικές στήλες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι παρακάτω:

- Προστήλη αντίστροφης φάσης: Apollo C-18 PrepGuard, (33mm x 7mm, με 5 $\mu$ m μέγεθος σωματιδίων).
- Ημιπαρασκευαστική στήλη αντίστροφης φάσης: Apollo C-18 Semi-prep (250mm x 5mm, με μέγεθος σωματιδίων 5 $\mu$ m).
- Προστήλη Silica: Econosphere Si, Prep-Guard, (33mmX7mm με 10 $\mu$ m μέγεθος σωματιδίων).
- Ημιπαρασκευαστική Silica: Econosphere Silica 10u (250mmx10mm με 10 $\mu$ m μέγεθος σωματιδίων)

### **9.1.3. Φασματοσκοπικές μέθοδοι**

#### **Φσματοφωτομετρία Υπεριώδους-Ορατού (UV-Vis Spectra)**

- Hitachi U-2000 Spectrometer με κυψελίδα χαλαζία 10mm QS
- Hitachi U-2001 Spectrometer με κυψελίδα χαλαζία 10mm QS

#### **Φσματοσκοπία Πυρηνικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR)**

- Φασματόμετρο Varian 500Mz (500 MHz για <sup>1</sup>H-NMR και 125MHz για <sup>13</sup>C-NMR)

Τα φάσματα ελήφθησαν με τους παρακάτω διαλύτες:

- CDC<sub>13</sub>
- CD<sub>3</sub>OD



### Φασματοσκοπία μάζης

- Φασματογράφος MS/MS TQ Detector-Ultra Performance LC (Acquity Waters)
- Φασματογράφος μάζας Shimadzu GC/MS QP 2010 (χρωματογράφο Shimadzu GC 2010-gas chromatograph)
- Φασματογράφος HR-MS LTQ Orbitrap velos (ThermoScientific)
- Φασματογράφος LC-MS (Shimadzu GC 2010)

## 10.ΣΥΝΔΥΑΣΤΙΚΗ ΤΕΧΝΙΚΗ LC-DAD-MS (ESI+)

Ο συνδυασμός του ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού σε σειρά (DAD) με τον φασματογράφο μάζας θετικού ιονισμού (ESI+) σε συνδυασμό με την υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC) με στήλη silica gel αντίστροφη φάσης (RP- 18) παρείχε μια ακριβή και σαφή μέθοδο για την ανάλυση των εκχυλισμάτων του φυτού *Indigofera hirsuta*. Με τις συνθήκες του θετικού ιονισμού που επιλέχθηκαν. Η αντλία για υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης ήταν Finnigan MAT Spectra System P4000, ο ανιχνευτής υπεριώδους-ορατού UV 6000LP και ο φασματογράφος μάζας Finnigan AQA. Ο διαχωρισμός των ουσιών επιτεύχθηκε σε στήλη Superspher 100-4 αντιστροφής φάσης RP-18 (Macherey-Nagel, 4μm μέγεθος σωματιδίων) διαστάσεων 125x2 mm. Η ροή ριθμήστηκε στα 0.33 ml/min. Η ανίχνευση καταγράφηκε στα 254, 278, 290, 340 και στα 365 ώστε να περιληφθούν όλοι οι τύποι φαινολικών ουσιών. Η φασματοσκοπία μάζης πραγματοποιήθηκε με θετικό ιονισμό (Electron Spray Ionization +) σε θερμοκρασία 450 °C , τάση 4,9 kV και αναλυτή μάζας από 130-1027amu στα 20 και 80eV. Το πρόγραμμα ανάλυσης που ακολουθήθηκε για το κλάσμα του διαιθυλαιθέρα ήταν: (A) AcOH (95%) και (B) MeOH 5% A για 2 min, 0% A στα 25 min, 0% A στα 30 min. Για το κλάσμα του οξικού αιθυλεστέρα το πρόγραμμα έκλουσης ήταν: (A) AcOH (90%) και (B) MeOH 10% A για 2 min, 0% A στα 37 min, 100% A στα 42 min, 100%. Για το κλάσμα της Βουτανόλης το πρόγραμμα που ακολουθήθηκε ήταν το ίδιο με του οξικού αιθύλεστέρα. Όλες οι δομές που θα περιγραφούν παρακάτω είναι προτεινόμενες με βάση βιβλιογραφικά δεδομένα.

## 11. ΚΛΑΣΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

Το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε αποτελείται από τα υπέργεια τμήματα του φυτού *Indigofera hirsuta* το οποίο συλλέχθηκε από την Κεντροαφρικανική Δημοκρατία τον Ιούλιο του 2006. Στην συνέχεια το φυτικό υλικό αφέθηκε να ξηρανθεί στον αέρα υπο σκιά κατόπιν πακεταρίστηκε σε ερμητικά κλειστά δοχεία και διατηρήθηκε για φυτοχημικές και βιολογικές μελέτες. Μετά τον καθαρισμό του διατηρήθηκε σε κατάψυξη, αποψύχθηκε και τεμαχίστηκε σε μικρά τμήματα πριν να αρχίσει η διαδικασία της εκχύλισης. Τοποθετήθηκαν 250 g της δρόγης σε συσκευή συνεχούς εκχύλισης Soxhlet και εκχυλίστηκαν εξαντλητικά με τους παρακάτω διαλύτες: πετρελαϊκό αιθέρα, διχλωρομεθάνιο και μεθανόλη.

### ■ Πετρελαϊκός αιθέρας

Μετά το πέρας της εκχύλισης και της εξάτμισης του διαλύτη, συλλέχθηκε στερεό πράσινο υπόλειμμα καθαρού βάρους 2.22 g.

### ■ Διχλωρομεθάνιο

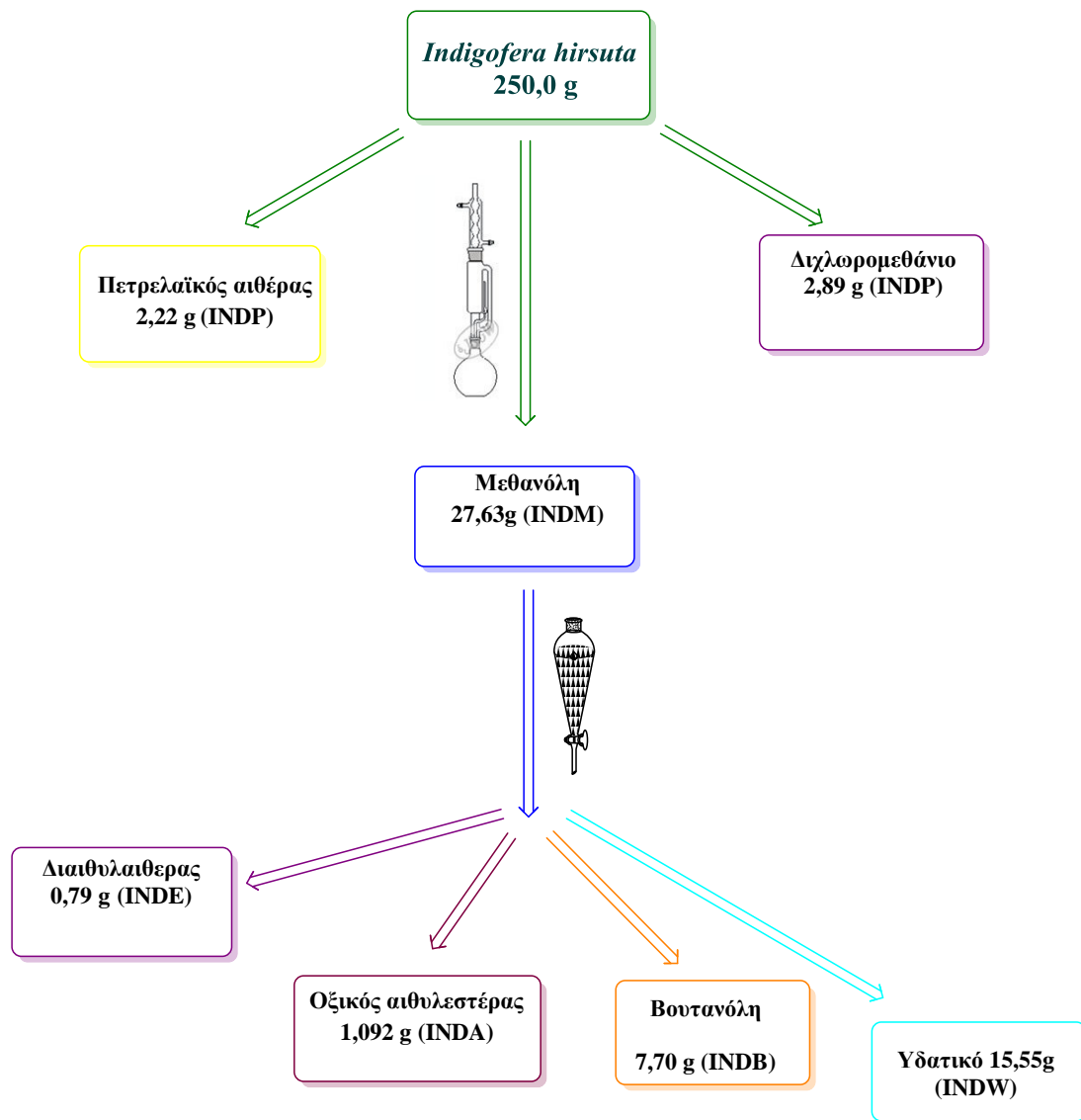
Ακολούθησε εκχύλιση με διαλύτη διχλωρομεθάνιο (Panreac, 131254, 1714, PA-ACS-150) και μετά την απομάκρυνση του διαλύτη συλλέχθηκε ίζημα βάρους 2,89 g.

### ■ Μεθανόλη

Η ποσότητα που συλλέχθηκε μετά την απομάκρυνση του διαλύτη είχε βάρος 27,63 g. Το στερεό υπόλειμμα που προέκυψε από την εκχύλιση με MeOH (27.63 g) διαλύθηκε σε 2 lt απεσταγμένου νερού το οποίο είχε προηγουμένως θερμανθεί μέχρι βρασμού, διηθήθηκε και εκχυλίστηκε σε διαχωριστική χροάνη με διαιθυλαιθέρα, οξικό αιθυλεστέρα και βουτανόλη. Μετά τη συμπύκνωση σε περιστροφικό εξάτμιστή κενού παρελήφθησαν τα παρακάτω στερεά υπολείμματα:

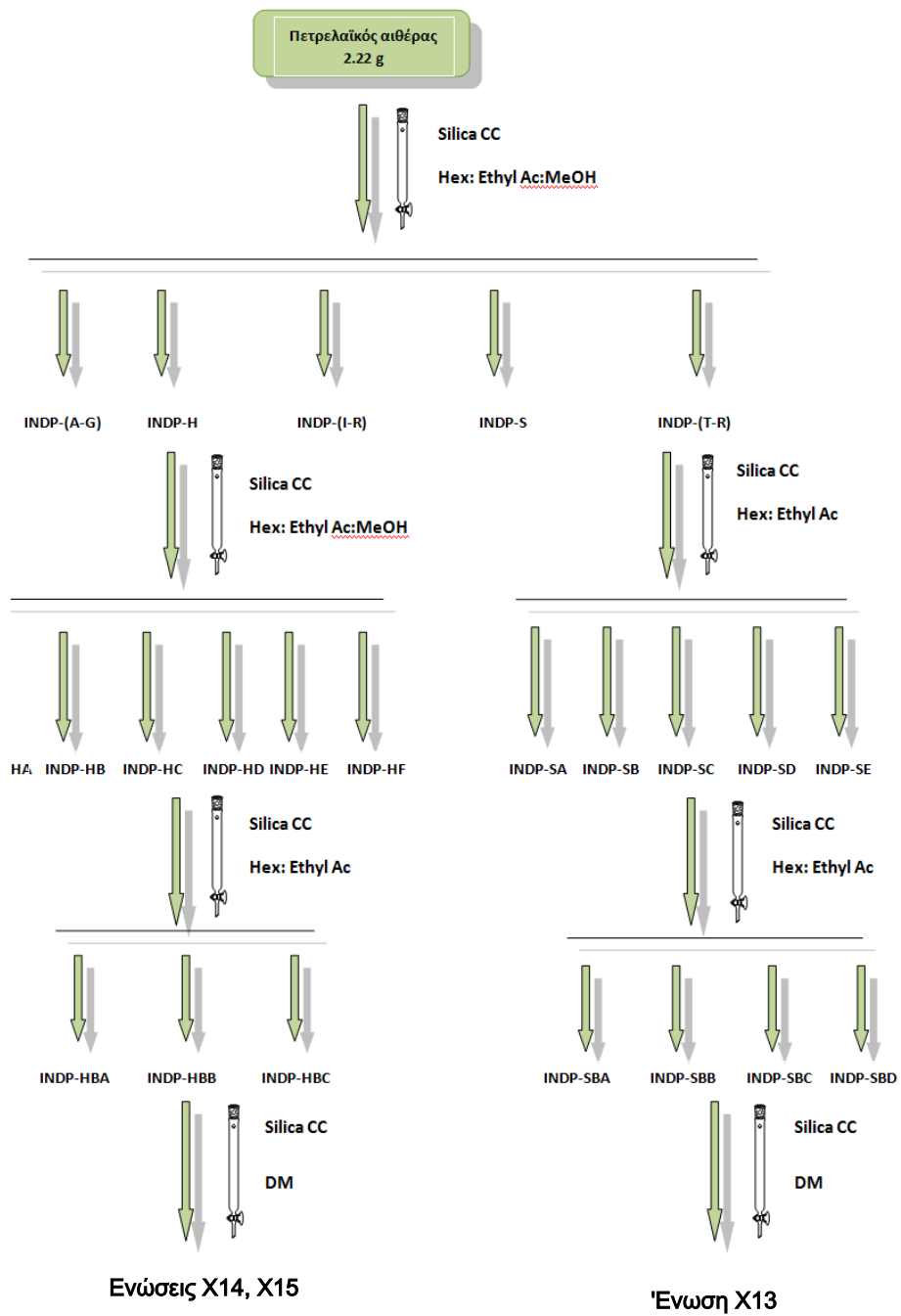
- A. Υπόλειμμα διαιθυλαιθέρα (INDE) : 0.79 g
- B. Υπόλειμμα οξικού αιθυλεστέρα (INDA) : 1.092 g
- C. Υπόλειμμα Βουτανόλης (INDB) : 7.70 g
- D. Υπόλειμμα υδατικό (INDW) : 15.55 g

Όλα τα στερεά υπολείμματα αποθηκεύτηκαν στους 4° C σε ατμόσφαιρα αζώτου.



Εικ 44: Πορεία εκχυλίσεων

## 11.1 Υπόλειμμα πετρελαϊκού αιθέρα: INDP (2,22 g)



Εικ 45: Κλασματοποίηση υπολείμματος πετρελαϊκού αιθέρα

Το υπόλειμμα του **πετρελαϊκού αιθέρα (INDP 2,22 g)** υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης Silica 7734 (40cm x 3.5 cm) με κινητή φάση μείγματα διαλυτών αυξανόμενης πολικότητας, εξάνιο→οξικό αιθυλεστέρα→μεθανόλη. Για τον έλεγχο των εκλουόμενων κλασμάτων χρησιμοποιήθηκε η αναλυτική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας επί γέλης πυριτίου (Merck, Art 5554) με αντιδραστήριο εμφάνισης τη θειική βανιλίνη. Τα κλάσματα συνενώθηκαν στις ακόλουθες ομάδες:

**Πίνακας 5: Συνενώσεις κλασμάτων του υπολείμματος του πετρελαϊκού αιθέρα**

Αριθμός κλασμάτων	Βάρος (mg)	Αναλογία διαλυτών	ονομασία
1-2	37.4	100% εξάνιο	INDP-A
3-8	1.0	100% εξάνιο	INDP-B
9-13	1.7	100% εξάνιο	INDP-C
14-15	0.5	100% εξάνιο	INDP-D
16-19	1.1	99% εξάνιο-1% οξικός αιθυλεστέρας	INDP-E
20-21	3.7	98% εξάνιο-2% οξικός αιθυλεστέρας	INDP-F
22	35.7	98% εξάνιο-2% οξικός αιθυλεστέρας	INDP-G
23	42.8	98% εξάνιο-2% οξικός αιθυλεστέρας	INDP-H
24	61.8	98% εξάνιο-2% οξικός αιθυλεστέρας	INDP-I
25	14,3	98% εξάνιο-2% οξικός αιθυλεστέρας	INDP-J
26-27	33.3	98% εξάνιο-2% οξικός αιθυλεστέρας	INDP-K
28-33	131.1	97% εξάνιο-3% οξικός αιθυλεστέρας	INDP-L
34	23.7	96% εξάνιο-4% οξικός αιθυλεστέρας	INDP-M
35-37	94.7	94% εξάνιο-6% οξικός αιθυλεστέρας	INDP-N
39-40	147.5	94% εξάνιο-6% οξικός αιθυλεστέρας	INDP-O
44	12.7	92% εξάνιο-8% οξικός αιθυλεστέρας	INDP-Q
45-51	162.5	90% εξάνιο-10% οξικός αιθυλεστέρας	INDP-R
52-59	44.1	88% εξάνιο-12% οξικός αιθυλεστέρας	INDP-S
60-63	40.5	86% εξάνιο-14% οξικός αιθυλεστέρας	INDP-T
64-66	23.3	86% εξάνιο-14% οξικός αιθυλεστέρας	INDP-U
67-69	20.5	82% εξάνιο-18% οξικός αιθυλεστέρας	INDP-W
70-72	15.4	82% εξάνιο-18% οξικός αιθυλεστέρας	INDP-X
73-75	34.2	82% εξάνιο-18% οξικός αιθυλεστέρας	INDP-Y

76-78	27.2	80% εξάνιο-20% οξικός αιθυλεστέρας	INDP-Z
79-80	5.8	80% εξάνιο-20% οξικός αιθυλεστέρας	INDP-A1
81-83	6.2	70% εξάνιο-30% οξικός αιθυλεστέρας	INDP-B1
84-90	33.3	70% εξάνιο-30% οξικός αιθυλεστέρας	INDP-C1
91-94	18.1	60% εξάνιο-40% οξικός αιθυλεστέρας	INDP-D1
95-97	18.5	60% εξάνιο-40% οξικός αιθυλεστέρας	INDP-E1
98-101	30.3	50% εξάνιο-50% οξικός αιθυλεστέρας	INDP-F1
98-101	30.3	50% εξάνιο-50% οξικός αιθυλεστέρας	INDP-G1
102-104	34.6	50% εξάνιο-50% οξικός αιθυλεστέρας	INDP-H1
102-104	34.6	50% εξάνιο-50% οξικός αιθυλεστέρας	INDP-I1
105-107	15.4	25% εξάνιο-75% οξικός αιθυλεστέρας	INDP-J1
108-111	15.7	25% εξάνιο-75% οξικός αιθυλεστέρας	INDP-K1
112-113	10.8	100% οξικός αιθυλεστέρας	INDP-L1
114-117	14.9	100% οξικός αιθυλεστέρας	INDP-M1
118-119	10.5	90% οξικός αιθυλεστέρας-10% μεθανόλη	INDP-N1
120	42.2	90% οξικός αιθυλεστέρας-10% μεθανόλη	INDP-O1
121-124	39.9	50% οξικός αιθυλεστέρας-50% μεθανόλη	INDP-P1
125-128	499.6	50% οξικός αιθυλεστέρας-50% μεθανόλη	INDP-Q1
129	25.4	50% οξικός αιθυλεστέρας-50% μεθανόλη	INDP-R1

Το κλάσμα **INDP-H (42.8 mg)** υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης Silica 7734 (20 cm x 3.5 cm) με κινητή φάση εξάνιο→οξικό αιθυλεστέρα→μεθανόλη. Για τον έλεγχο και ομαδοποίηση των εκλουόμενων κλασμάτων χρησιμοποιήθηκε η αναλυτική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας επί γέλης πυριτίου (Merck, Art 5554) με αντιδραστήριο εμφάνισης τη θειική βανιλίνη. Τα κλάσματα συνενώθηκαν στις ακόλουθες ομάδες:

Πίνακας 6: Συνενώσεις κλάσματος INDP-H

Αριθμός κλασμάτων	Βάρος (mg)	Αναλογία διαλυτών	ονομασία
1-5	37.4	100% εξάνιο	INDP-HA
6-15	1.0	90% εξάνιο-10% οξικός αιθυλεστέρας	INDP-HB
16-28	1.7	80% εξάνιο-20% οξικός αιθυλεστέρας	INDP-HC
29-35	0.5	70% εξάνιο-30% οξικός αιθυλεστέρας	INDP-HD
36-48	1.1	50% εξάνιο-50% οξικός αιθυλεστέρας	INDP-HE
49-58	10.7	50% οξικός αιθυλεστέρας 50% μεθανόλη	INDP-HF

Το κλάσμα INDP-HB (5.4 mg) υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης Silica 7734 (20cm x 3.5 cm) με κινητή φάση εξάνιο→οξικό αιθυλεστέρα. Για τον έλεγχο και ομαδοποίηση των εκλούμενων κλασμάτων χρησιμοποιήθηκε η αναλυτική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας επί γέλης πυριτίου (Merck, Art 5554) με αντιδραστήριο εμφάνισης τη θειική βανιλίνη. Τα κλάσματα συνενώθηκαν στις ακόλουθες ομάδες:

Πίνακας 7: Συνενώσεις κλάσματος INDP-H

Αριθμός κλασμάτων	Βάρος (mg)	Αναλογία διαλυτών	ονομασία
1-5	0.8	100% εξάνιο	INDP-HBA
6-15	2.8	90% εξάνιο-10% οξικός αιθυλεστέρας	INDP-HBB
16-28	1.7	80% εξάνιο-20% οξικός αιθυλεστέρας	INDP-HBC

Το κλάσμα INDP-HBB (2.8 mg) υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης Silica 7734 (10 cm x 1,5 cm) με διαλύτη έκλουσης διχλωρομεθάνιο συλλέχθηκαν τρία κλάσματα εκ των οποίων το δεύτερο κλάσμα INDP-HBB 1.8 mg αποτέλεσε το μίγμα ενώσεων (X14) Τριγυκεριδίο & (X15) Στιγμαστερόλη έγινε έλεγχος του κλάσματος με αναλυτική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας επί γέλης πυριτίου (Merck, Art 5554) με κινητή φάση διχλωρομεθάνιο και αντιδραστήριο εμφάνισης τη θειική βανιλίνη. Εμφανίστηκε κηλίδα χρώματος μπλέ βαθύ μετά τον ψεκάσμο με αντιδραστήριο βανιλίνης με Rf = 0.9.

Το κλάσμα INDP-S (44.1 mg) υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης Silica 7734 (20 cm x 3.5 cm) με κινητή φάση εξάνιο→οξικό αιθυλεστέρα→MeOH. Για τον έλεγχο των εκλούμενων κλασμάτων χρησιμοποιήθηκε η αναλυτική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας επί γέλης πυριτίου (Merck, Art 5554) με αντιδραστήριο εμφάνισης τη θειική βανιλίνη. Τα κλάσματα συνενώθηκαν στις ακόλουθες ομάδες:

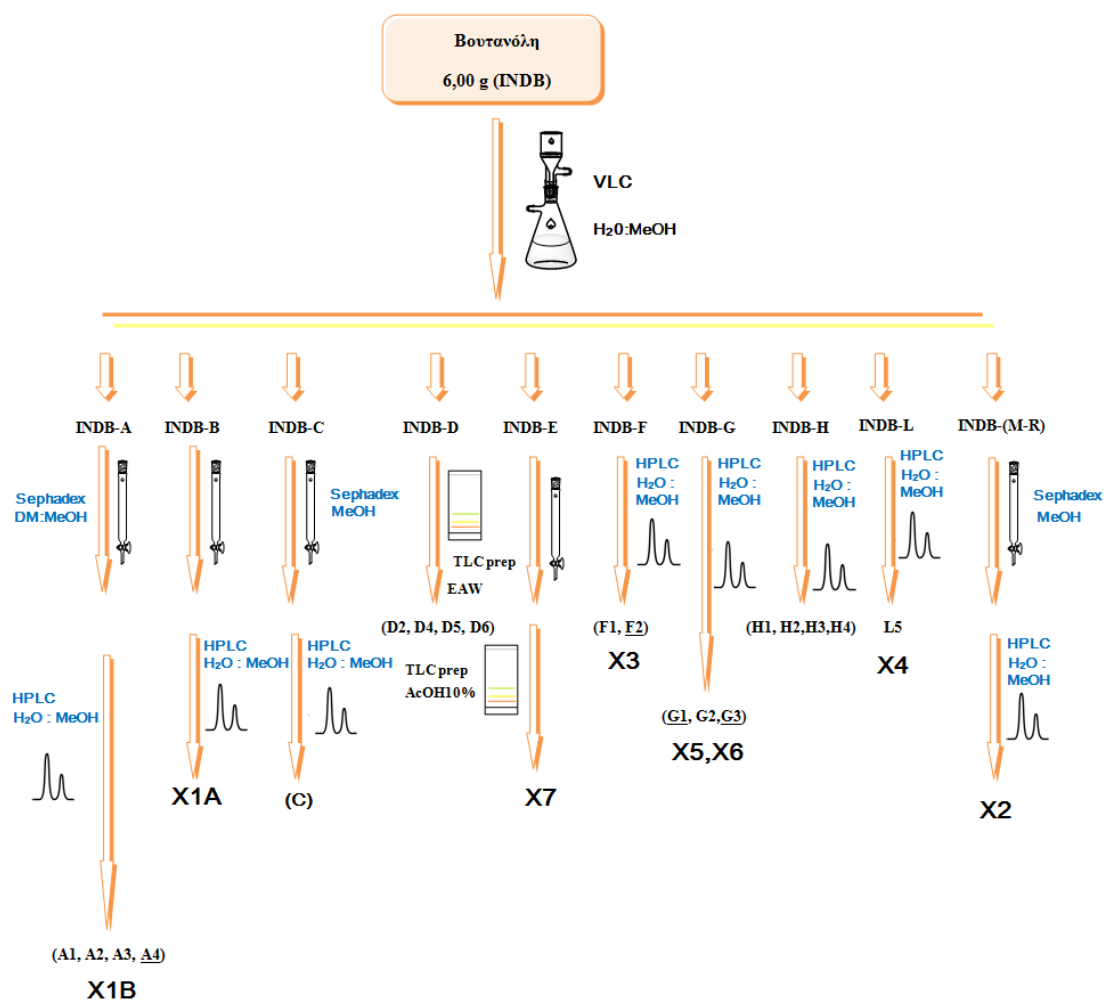
Πίνακας 8: Συνενώσεις κλάσματος INDP-P

Αριθμός κλασμάτων	Βάρος (mg)	Αναλογία διαλυτών	ονομασία
1-12	0.8	100% εξάνιο	INDP-SA
12-17	3.4	90% εξάνιο-10% οξικός αιθυλεστέρας	INDP-SB
18-25	1.7	80% εξάνιο-20% οξικός αιθυλεστέρας	INDP-SC
26-33	6.9	70% εξάνιο-30% οξικός αιθυλεστέρας	INDP-SD
34-42	8.6	50%οξικός αιθυλεστέρας 50% μεθανόλη	INDP-SE

Το κλάσμα **INDP-SB (3.4 mg)** υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης Silica 7734 (10 cm x 1.5 cm) με διαλύτη έκλουσης διχλωρομεθάνιο. Συλλέχθηκαν τέσσερα κλάσματα εκ των οποίων το δεύτερο κλάσμα **INDP-SBB 2.3 mg** αποτέλεσε την ένωση **X13** (Τριγλυκερίδιο) έγινε έλεγχος του κλάσματος με αναλυτική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας επί γέλης πυριτίου (Merck, Art 5554) με κινητή φάση εξάνιο-οξικός αιθυλεστέρας 9:1 με αντιδραστήριο εμφάνισης τη θειϊκή βανιλίνη.



## 11.2. Εκχύλισμα βουτανόλης INDB



Εικ 46: Κλασματοποίηση εκχυλίσματος βουτανόλης

Το υπόλειμμα της βουτανόλης **BUT (6.5 g)** υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης υπό κενό (V.L.C 10 cm x 6.0 cm) επί πολυαμιδίου (M.N Polyamid SC6/ Polyamid CC6/ Particle size < 0.06 mm) με υγρό έκλουσης μίγματα διαλυτών ελαττούμενης πολικότητας από H<sub>2</sub>O→MeOH. Χρησιμοποιήθηκαν 300 ml για κάθε κλάσμα. Συγκεντρώθηκαν 25 κλάσματα στα οποία έγινε έλεγχος με TLC κυτταρίνης και με συστήματα ανάπτυξης, EAW, CAW και AcOH 15% έγινε δε συνένωση κλασμάτων όπως φαίνεται στον πίνακα 9:

Πίνακας 9: Συνενώσεις κλασμάτων του εκχυλίσματος της βουτανόλης

Αριθμός κλασμάτων	Βάρος (mg)	Αναλογία διαλυτών	ονομασία
1	3800	100% νερό	INDB-A
2	115.8	100% νερό	INDB-B
3	70.5	95% νερό-5% μεθανόλη	INDB-C
4	19.6	90% νερό-10% μεθανόλη	INDB-D
5	27.3	85% νερό-15% μεθανόλη	INDB-E
6	37.5	80% νερό-20% μεθανόλη	INDB-F
7	36.3	75% νερό-35% μεθανόλη	INDB-G
8	33.8	70% νερό-30% μεθανόλη	INDB-H
9	29.6	65% νερό-35% μεθανόλη	INDB-I
10	34.8	60% νερό-40% μεθανόλη	INDB-K
11	43.3	55% νερό-45% μεθανόλη	INDB-L
12	71.0	50% νερό-50% μεθανόλη	INDB-M
13	130.3	45% νερό-55% μεθανόλη	INDB-N
14	321.8	40% νερό-60% μεθανόλη	INDB-O
15	726.7	35% νερό-65% μεθανόλη	INDB-P
16	49.9	30% νερό-70% μεθανόλη	INDB-Q
17	57.9	20% νερό-80% μεθανόλη 10% νερό-90% μεθανόλη	INDB-R

### Κλάσμα INDB-B (115.8 mg)

Το κλάσμα **INDB-B** υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης Sephadex (40 cm x 2.5 cm) με κινητή φάση μεθανόλη. Συλλέχθηκαν 19 κλάσματα με μέσο όγκο 50 ml, τα οποία στη συνέχεια ελέγχθηκαν με αναλυτική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) επί κελλουλόζης (Merck, Art 5554), χρησιμοποιώντας ως διαλύτη ανάπτυξης EAW όπως φαίνεται στον πίνακα 10.

Πίνακας 10: Συνενώσεις κλάσματος INDB-B

Αριθμός κλασμάτων	Βάρος (mg)	ονομασία
1-64	8	INDB-BA
65-75	6	INDB-BB
76-88	15	INDB-BC
89-125	58	INDB-BD
126-129	3	INDB-BE
130-145	9	INDB-BF
146-160	10	INDB-BG
161-210	2	INDB-BH
212-240	0.3	INDB-BI

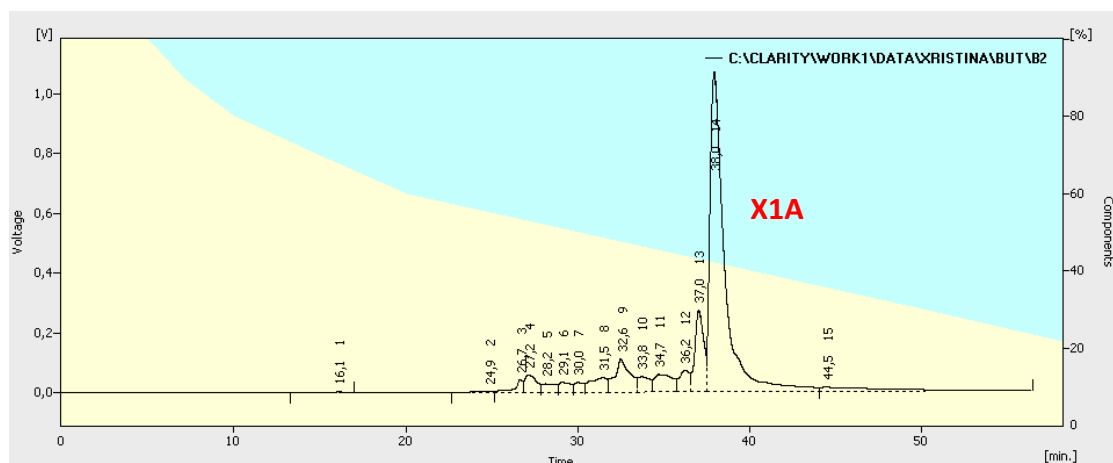
Το κλάσμα **INDB-BD (89-125)**,  $\lambda_{\max}$  =350nm στη συνέχεια υποβλήθηκε σε υγρή

Εικ47: πρόγραμμα έκλυσης κλάσματος INDB-C

Gradient Table				
	Time [min]	A [%]	B [%]	Flow [mL/min]
1	Initial	100,0	0,0	1,000
2	5,00	100,0	0,0	1,000
3	7,00	90,0	10,0	1,000
4	10,00	80,0	20,0	1,000
5	15,00	70,0	30,0	1,000
6	20,00	60,0	40,0	1,000
7	25,00	50,0	50,0	1,000
8	40,00	40,0	60,0	1,000
9	50,00	30,0	70,0	1,000
10	60,00	20,0	80,0	1,000
11	70,00	0,0	100,0	1,000
12	80,00	0,0	100,0	1,000
13	90,00	0,0	100,0	1,000
14	100,00	0,0	100,0	1,000
15				

χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με διαλύτη έκλυσης **H<sub>2</sub>O (A): MeOH (B)** Το κλάσμα **INDB-BD** διαλύθηκε σε H<sub>2</sub>O για HPLC με αναλογία 1mg/ml στο οποίο προστέθηκε μια σταγόνα MeOH για HPLC. Το πρόγραμμα έκλυσης φαίνεται στην εικόνα 46 όπου A [%] είναι το νερό-AcOH 1% ενώ B [%] είναι η μεθανόλη. Ο ανιχνευτής είχε ρυθμιστεί στα 350 nm. Παρελήφθη η **Ένωση X1A** 3-O-α-L- ραμνοπυρανοζυλο (1"<sup>'''</sup>→2") [α-L- ραμνοπυρανοζυλο(1"<sup>'''</sup>→6") ]- β-D- γαλακτοπυρανοζυλο-7-O-α-L- ραμνοπυρανοζυλο

ραμνοπυρανοζίτης της Καιμφερόλης με χρόνο κατακράτησης 38.01 min και m=2.8 mg:όπως φαίνεται στην εικόνα 47.



Εικ 48: Χρωματογράφημα του κλάσματος INDB-BD

### Κλάσμα INDB-A (3.8 g), $\lambda_{\max} = 278\text{nm}$

Το κλάσμα **INDB-A** υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης Sephadex (40 cm x 2.5 cm) με μίγμα διαλυτών διχλωρομεθάνιο:μεθανόλη (70:30) και συλλέχθηκαν 11 κλάσματα με μέσο όγκο 50 ml, τα οποία στη συνέχεια ελέγχθηκαν με αναλυτική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) επί γέλης πυριτίου (Merck, Art 5554), και με κινητή φάση διχλωρομεθάνιο:μεθανόλη:νερό (70:30:0.3) χρησιμοποιώντας ως αντιδραστήριο εμφάνισης θειική βανιλίνη. Τελικά συνενώθηκαν στις ακόλουθες ομάδες:

Πίνακας 11:ομαδοποίηση κλασμάτων προερχόμενων από το κλάσμα INDB-A

Κλάσμα	Φθορισμός (254nm)	Rf	Μάζα (g)
INDB-A <sub>1</sub>	Πορτοκαλί	0.00	0.15
INDB-A <sub>2</sub>	Πορτοκαλί	0.00	0.20
INDB-A <sub>3</sub>	Πορτοκαλί	0.00	0.38
	Κίτρινο	0.12	
	Γαλάζιο	0.31	
INDB-A <sub>4</sub>	Μπλε	0.4	0.45
	Πορτοκαλί	0.00	
	Κίτρινο	0.12	
	Γαλάζιο	0.31	
INDB-A <sub>5</sub>	Μπλε	0.56	0.28
	Κίτρινο	0.12	
	Γαλάζιο	0.31	
	Μπλε	0.4	
INDB-A <sub>6</sub>	Μπλε	0.56	0.54
	Μπλε	0.4	
	Γαλάζιο	0.31	
INDB-A <sub>7</sub>	Μπλε	0.56	0.39
	Κίτρινο	0.06	
	Γαλάζιο	0.31	
INDB-A <sub>8</sub>	Μπλε	0.4	0.34
	Μπλε	0.56	
	Πορτοκαλί	0.06	
	Μπλε	0.43	
INDB-A <sub>9</sub>	Μπλε	0.75	0.25
	Γαλάζιο	0.56	
	Πορτοκαλί	0.06	
	Γαλάζιο	0.56	

INDB-A <sub>10</sub>	Πορτοκαλί	0.06	0.26
	Γαλάζιο	0.31	
	Μπλε	0.56	
INDB-A <sub>11</sub>	Μπλε	0.69	0.25
	Γαλάζιο	0.31	
	Μπλε	0.5	

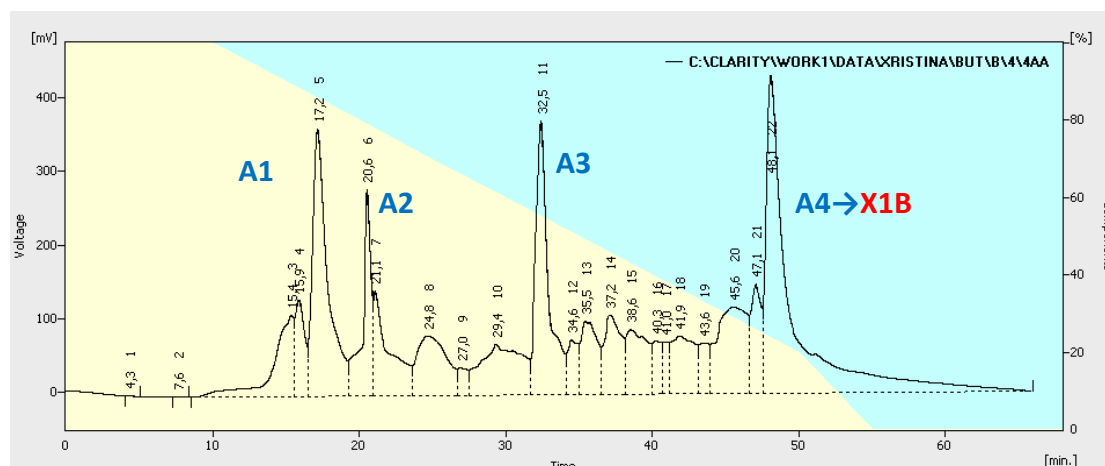
Το κλάσμα **INDB-A<sub>4</sub>** υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (**HPLC**) με διαλύτη έκλουσης **H<sub>2</sub>O (A) → MeOH (B)**. Το κλάσμα **INDB-A<sub>4</sub>** διαλύθηκε σε H<sub>2</sub>O για HPLC με αναλογία 1mg/ml με προσθήκη μιας σταγόνας MeOH για HPLC. Το πρόγραμμα έκλουσης

Εικ 49: πρόγραμμα έκλουσης κλάσματος INDB-C

Gradient Table				
	Time [min]	A [%]	B [%]	Flow [mL/min]
1	Initial	100,0	0,0	1,000
2	10,00	100,0	0,0	1,000
3	15,00	90,0	10,0	1,000
4	20,00	80,0	20,0	1,000
5	25,00	70,0	30,0	1,000
6	30,00	60,0	40,0	1,000
7	35,00	50,0	50,0	1,000
8	40,00	40,0	60,0	1,000
9	45,00	30,0	70,0	1,000
10	50,00	20,0	80,0	1,000
11	55,00	0,0	100,0	1,000
12	70,00	0,0	100,0	1,000
13				

φαίνεται στην εικόνα 47 όπου A [%] είναι το νερό-οξικό οξύ 1% ενώ B [%] είναι η μεθανόλη. Ο ανιχνευτής ρυθμίστηκε στα 278 nm. Παρελήφθησαν η κορυφή A1 με χρόνο κατακράτησης 17.25 min (m=1.2 mg), η A2 με χρόνο κατακράτησης 20.66 min (m=0.9 mg), η κορυφή A3 (m=1.2 mg), με χρόνο κατακράτησης 32.51 min και η κορυφή A4 48.12 min (m=1.6 mg) όπως αυτό προκύπτει από το χρωματογράφημα της εικόνας 36. Από αυτές τις κορυφές η A4 ταυτοποιήθηκε ως η Ένωση X1B: 3-O-α-L- ραμνοπυρανοζυλο (1->2)[α-L-

ραμνοπυρανοζυλο(1->6)[α-L- β-D-γαλακτοπυρανοζυλο-7-O-α-L-ραμνοπυρανοζιτης της Καιμφερόλης.



Εικ 50: Χρωματογράφημα του κλάσματος INDB-A<sub>4</sub>

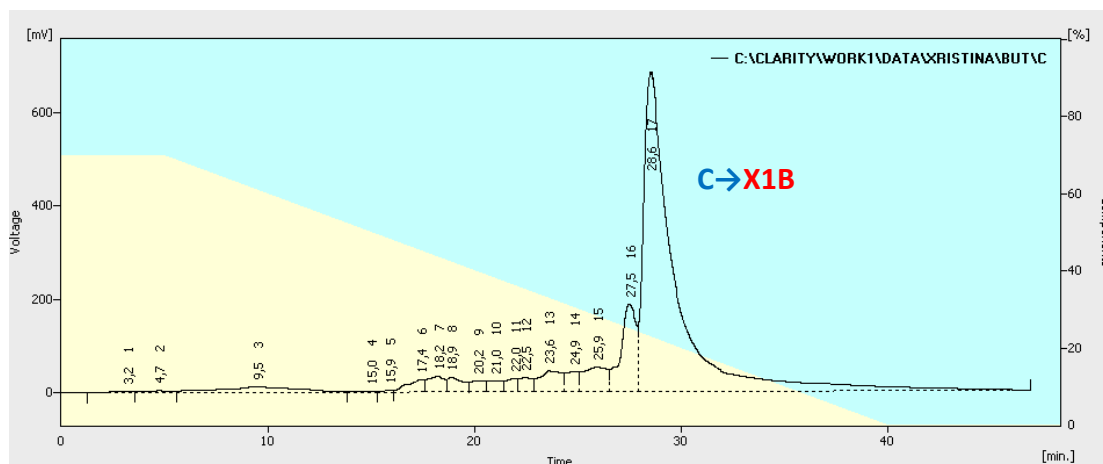
## Κλάσμα INDB-C (70.5 mg), $\lambda_{\max}$ =298nm

Υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με διαλύτη έκλουσης H<sub>2</sub>O (A): MeOH (B). Το κλάσμα INDB-C διαλύθηκε σε H<sub>2</sub>O για HPLC με αναλογία 1mg/ml στο

Εικ 51: πρόγραμμα έκλουσης κλάσματος INDB-C

Gradient Table				
	Time [min]	A [%]	B [%]	Flow [mL/min]
1	Initial	70,0	30,0	1,000
2	5,00	70,0	30,0	1,000
3	10,00	60,0	40,0	1,000
4	15,00	50,0	50,0	1,000
5	20,00	40,0	60,0	1,000
6	25,00	30,0	70,0	1,000
10	30,00	20,0	80,0	1,000
11	35,00	10,0	100,0	1,000
12	45,00	0,0	100,0	1,000
13	50,00	0,0	100,0	1,000
14	100,00	0,0	100,0	1,000

οποίο προστέθηκε μια σταγόνα MeOH για HPLC. Το πρόγραμμα έκλουσης φαίνεται στην εικόνα 49 όπου A [%] είναι το νερό- AcOH 1% ενώ B [%] είναι η μεθανόλη. Ο ανιχνευτής ρυθμίστηκε στα 298 nm. Παραελήφθει η κορυφή C με χρόνο κατακράτησης 28.6 min (m=3.3 mg) η οποία ταυτοποιήθηκε ως ο γλυκοζίτης της καιμφερόλης με τέσσερα άτομα σακχάρων ( 'Ένωση X1B) όπως φαίνεται στην εικόνα 50.



Εικ 52: Χρωματογράφημα του κλάσματος INDB-C

## Κλάσμα INDB-D (19.6 mg)

Για τον καθαρισμό του κλάσματος INDB-D χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της παρασκευαστικής χρωματογραφίας λεπτής σιβάδας κυτταρίνης με κινητή φάση EAW. Παρατηρήθηκαν 4 ζώνες ανάπτυξης που αντιστοιχούσαν στις ενώσεις D2 (m=2.1 mg), D4 (m=1.7 mg), D5 (m=1.3 mg) και D6 (m=2.3 mg) με  $R_f_{D2}$  =0.41 (πράσινος φθορισμός στα 356nm)  $R_f_{D4}$  =0.58,  $R_f_{D5}$  =0.26 (πράσινος φθορισμός στα 356nm) και  $R_f_{D6}$  =0.17 (πορτοκαλί φθορισμός στα 356nm). Η διεκρίνιση της δομής των ουσιών D4 και D5 δεν κατέστη δυνατή, λόγω της μικρής ποσότητας ενώ η D2 ήταν η 'Ένωση X4: Νεοεσπεριδοζίτης της απιγενίνης (Ροΐφολίνη) και η D6 ήταν ο γλυκοζίτης της καιμφερόλης με τέσσερα σάκχαρα ('Ένωση X1B).

### Κλάσμα INDB-F (37.5 mg), $\lambda_{\max}$ =278nm

Υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με διαλύτη έκλουσης  $H_2O$ :

Εικ 53: πρόγραμμα έκλουσης κλάσματος INDB-F

Gradient Table				
	Time [min]	A [%]	B [%]	Flow [mL/min]
1	Initial	50,0	50,0	1,000
2	20,00	50,0	50,0	1,000
3				

MeOH (1:1) ισοκρατικό πρόγραμμα και με flow rate

1 ml/min. Το κλάσμα INDB-F διαλύθηκε σε  $H_2O$  για

HPLC με αναλογία 1mg/ml με προσθήκη μίας

σταγόνας Μεθανόλης για HPLC. Το πρόγραμμα

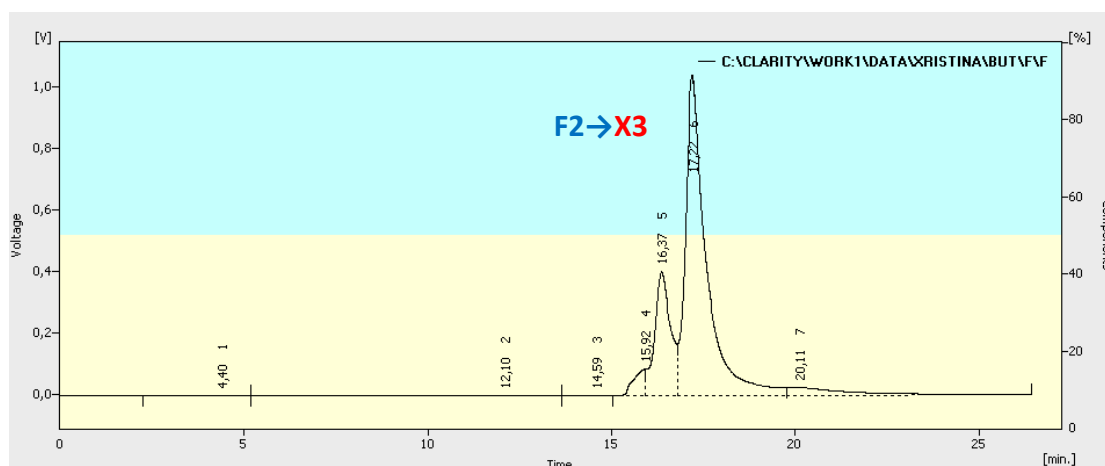
έκλουσης φαίνεται στην εικόνα 51 όπου A [%] είναι

το νερό με AcOH 1% ενώ B [%] είναι η μεθανόλη. Ο ανιχνευτής είχε ρυθμιστεί στα 278 nm.

Παρελήφθη η κορυφή F2 (m=2.7 mg) με χρόνο κατακράτησης 17.22 min, η οποία

ταυτοποιήθηκε ως ο νεοεσπεριδοσίτης της ναριγγενίνης, η ναριγγίνη **Ένωση X3**:

Νεοεσπεριδοζίτης της ναριγγενίνης – ναριγγίνη όπως φαίνεται στην εικόνα 52.



Εικ 54: Χρωματογράφημα του κλάσματος INDB-F

### Κλάσμα INDB-G (36.3 mg), $\lambda_{\max}$ =280nm

Υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με διαλύτη έκλουσης  $H_2O$

(A): MeOH (B). Το κλάσμα INDB-G διαλύθηκε σε

$H_2O$  για HPLC με αναλογία 1mg/ml και προστέθηκε

μια σταγόνα MeOH για HPLC. Το πρόγραμμα

έκλουσης φαίνεται στην εικόνα 53 όπου A [%] είναι

το νερό-AcOH 1% ενώ B [%] είναι η μεθανόλη. Ο

ανιχνευτής είχε ρυθμιστεί στα 298 nm.

Παρελήφθησαν τρεις κορυφές η G1 (m=1.8 mg), η

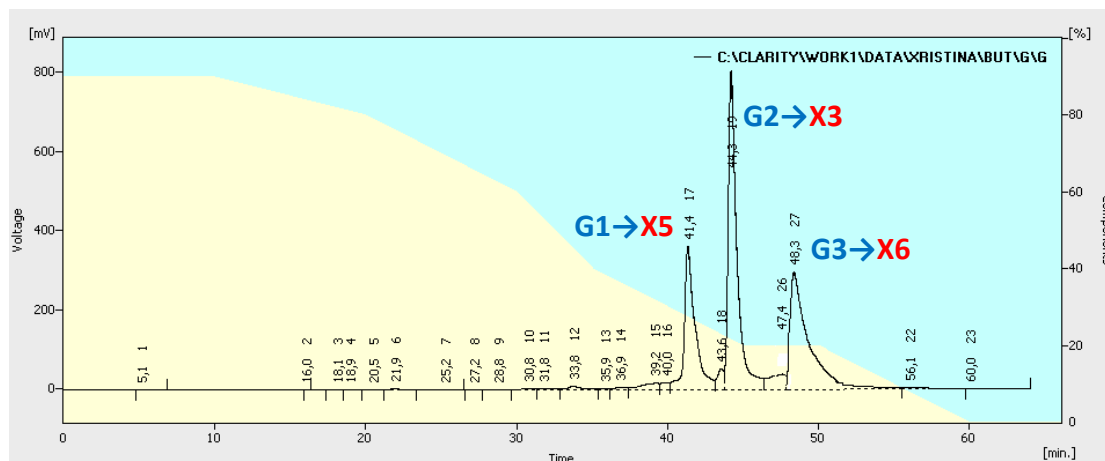
G2 (m=2.2 mg) και η G3 (m=2.5 mg) με αντίστοιχους χρόνους κατακράτησης 41.42 min,

44.32 min, 48.33 min οι οποίες αντιστοιχούν στις **ενώσεις X5**: 7-O-β-D-Νεοεσπεριδοζίτης της

Εικ 55: πρόγραμμα έκλουσης κλάσματος INDB-G

Gradient Table				
	Time [min]	A [%]	B [%]	Flow [mL/min]
1	Initial	90,0	10,0	1,000
2	10,00	90,0	10,0	1,000
3	20,00	80,0	20,0	1,000
4	30,00	60,0	40,0	1,000
5	35,00	40,0	60,0	1,000
6	40,00	30,0	70,0	1,000
7	45,00	20,0	80,0	1,000
8	50,00	20,0	80,0	1,000
9	60,00	0,0	100,0	1,000
10	70,00	0,0	100,0	1,000
11				

5,7,3',5' τετραϋδροξυ φλαβανόνης, **X3**: Νεοεσπεριδοζίτης της ναριγγενίνης – ναριγγίνη και **X6**: 3-O-α-L-ραμνοπυρανοζυλο-(1→6)-β-D-γαλακτοπυρανοζυλο-7-O-α-L-ραμνοπυρανοζίτης της Καιμφερόλης (Ρομπινίνη) όπως φαίνεται στην εικόνα 54.



Εικ 56: Χρωματογράφημα του κλάσματος INDB-G

### Κλάσμα INDB-H (33.8 mg), $\lambda_{max} = 280nm$

Υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με διαλύτη έκλουσης  $H_2O$

(A): MeOH (B). Το κλάσμα INDB-H διαλύθηκε σε  $H_2O$  για HPLC με αναλογία 1mg/ml με μια

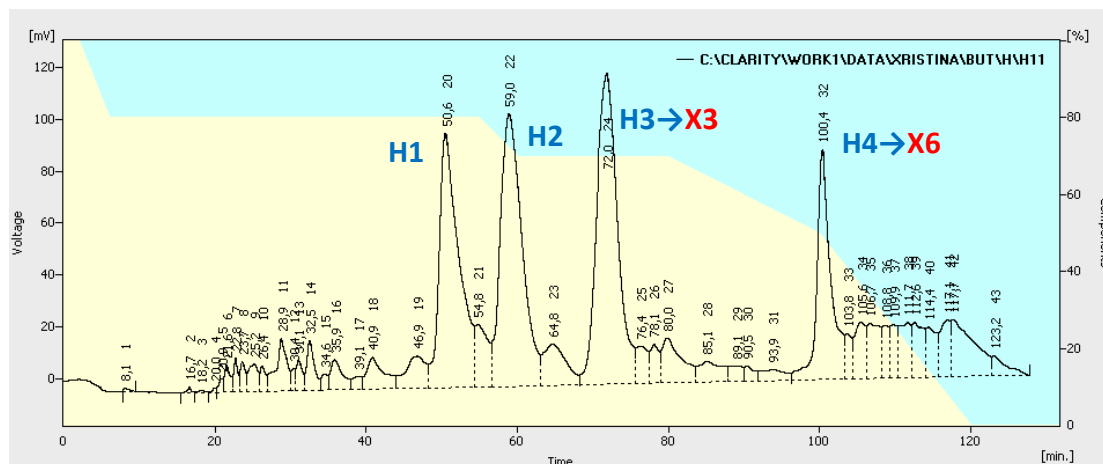
Εικ 57: πρόγραμμα έκλουσης κλάσματος INDB-H

Gradient Table				
	Time [min]	A [%]	B [%]	Flow [mL/min]
1	Initial	100.0	0.0	1.000
2	2.00	100.0	0.0	1.000
3	4.00	90.0	10.0	1.000
4	6.00	80.0	20.0	1.000
5	10.00	80.0	20.0	1.000
6	55.00	80.0	20.0	1.000
7	70.00	70.0	30.0	1.000
8	80.00	70.0	30.0	1.000
9	90.00	60.0	40.0	1.000
10	100.00	50.0	50.0	1.000
11	120.00	0.0	100.0	1.000
12	140.00	0.0	100.0	1.000
13				

σταγόνα MeOH για HPLC. Το πρόγραμμα έκλουσης φαίνεται στην εικόνα 55 όπου A [%] είναι το νερό- AcOH 1% ενώ B [%] είναι η μεθανόλη. Ο Ανιχνευτής είχε ρυθμιστεί στα 298 nm. Παρελήφθησαν τέσσερις κορυφές η H1 (m=0.9 mg), η H2 (m=1.0 mg), η H3 (m=1.9 mg) και η H4 (m=2.0 mg) με αντίστοιχους χρόνους κατακράτησης 50.62 min, 59.02 min, 72.02 min και 100.43 min όπως φαίνεται στην εικόνα 56 εκ των οποίων μόνο οι H3 και H4 κατέστη δυνατόν να

διευκρινιστούν και οι οποίες αντιστοιχούν στην **ένωση X3**: Νεοεσπεριδοζίτης της ναριγγενίνης – ναριγγίνη και στην **ένωση X5**: 3-O-α-L-ραμνοπυρανοζυλο-(1→6)-β-D-γαλακτοπυρανοζυλο-7-O-α-L-ραμνοπυρανοζίτης της Καιμφερόλης (Ρομπινίνη).





Εικ 58: Χρωματογράφημα του κλάσματος INDB-H

Η ένωση H2 με χρόνο κατακράτησης 59.02 min ήταν ένα καφεϊκό παράγωγο το οποίο δεν κατέστη δυνατό να διευκρινιστεί λόγω της μικρής ποσότητας.

### Κλάσμα INDB-L (43.3 mg), $\lambda_{\max} = 280\text{nm}$

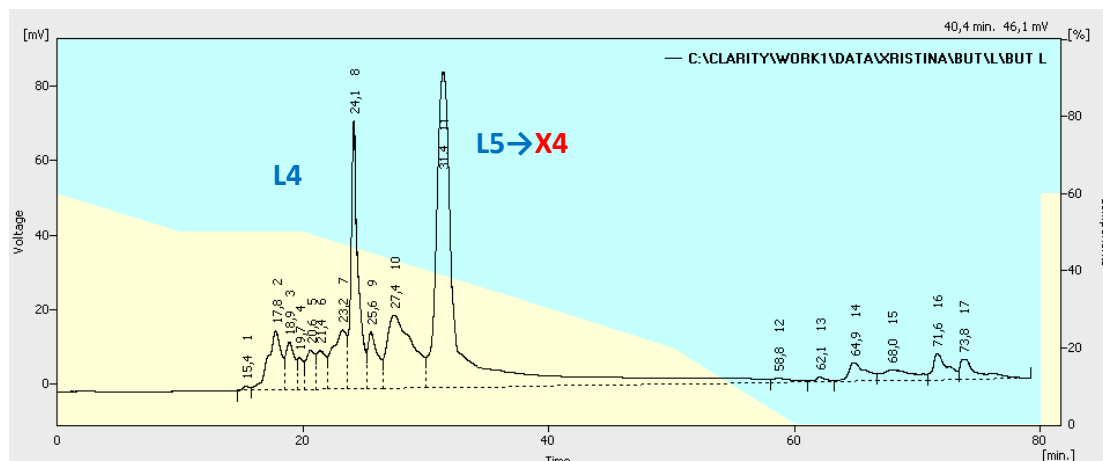
Το κλάσμα INDB-L 43.3 mg υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Εικ 59: πρόγραμμα έκλουσης κλάσματος INDB-L

Gradient Table				
	Time [min]	A [%]	B [%]	Flow [mL/min]
1	Initial	50,0	50,0	1,000
2	10,00	50,0	50,0	0,500
3	20,00	40,0	60,0	0,500
4	30,00	40,0	60,0	0,500
5	40,00	0,0	100,0	0,500
6	50,00	0,0	100,0	0,500
7				

με διαλύτη έκλουσης H<sub>2</sub>O (A): MeOH (B). Το κλάσμα INDB-LB διαλύθηκε σε H<sub>2</sub>O για HPLC με αναλογία 1mg/ml και προστέθηκε μια σταγόνα MeOH για HPLC. Το πρόγραμμα έκλουσης φαίνεται στο ακόλουθο σχήμα όπου A [%] είναι το νερό-AcOH 1% ενώ B [%] είναι η μεθανόλη. Ο ανιχνευτής είχε ρυθμιστεί στα 280 nm. Παρελήφθη μια κορυφή η L4 (m=0.7 mg) με

χρόνο κατακράτησης 24.10 min, και μια δεύτερη κορυφή η L5 (m=1.8 mg) με χρόνο κατακράτησης 31.4 min όπως φαίνεται στην εικόνα 58. Η τελευταία αντιστοιχεί στην Ένωση X4: Νεοεσπεριδοζίνης της απιγενίνης (Ροϊφολίνη), φθορισμό πράσινου χρώματος με Rf = 0.18, Rf= 0.20, Rf= 0.30 σε TLC πλάκες κυτταρίνης με διαλύτες ανάπτυξης CAW, EAW, AcOH 15% αντίστοιχα.



Εικ 60: Χρωματογράφημα του κλάσματος INDB-L

### Κλάσμα INDB-E (27.3 mg), $\lambda_{\max}$ =330nm

Για τον καθαρισμό του κλάσματος **INDB-E** χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της παρασκευαστικής χρωματογραφίας λεπτής σιβάδας κυτταρίνης με διαλύτη έκλουσης AcOH 15%. Απομονώθηκε η ζώνη ανάπτυξης με  $R_f$  =0.34 και καφέ φθορισμό. Η διεκρίνιση της δομής έγινε μέσω της φασμάτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού και βρέθηκε ότι πρόκειται για την απιίνη που αντιστοιχεί στην **Ενωση X7** μάζας  $m=3.1$  mg.

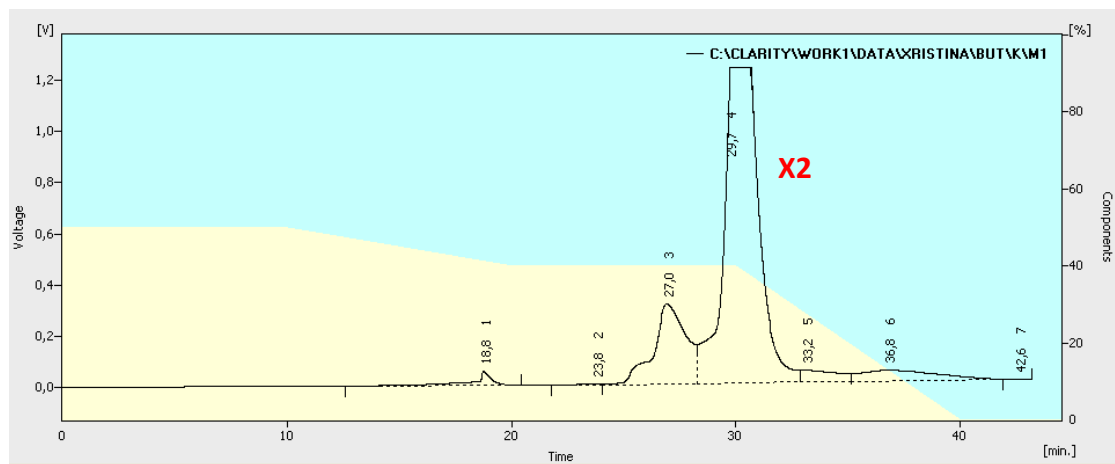
### Κλάσμα INDB-M (71.0 mg), $\lambda_{\max}$ =298nm

Το κλάσμα **INDB-M** υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης Sephadex CC (40 cm x 2,5 cm), **Εικ 61: πρόγραμμα έκλουσης κλάσματος INDB-L**

	Time [min]	A [%]	B [%]	Flow [mL/min]
1	Initial	50,0	50,0	1,000
2	10,00	50,0	50,0	0,500
3	20,00	40,0	60,0	0,500
4	30,00	40,0	60,0	0,500
5	40,00	0,0	100,0	0,500
6	50,00	0,0	100,0	0,500
7				

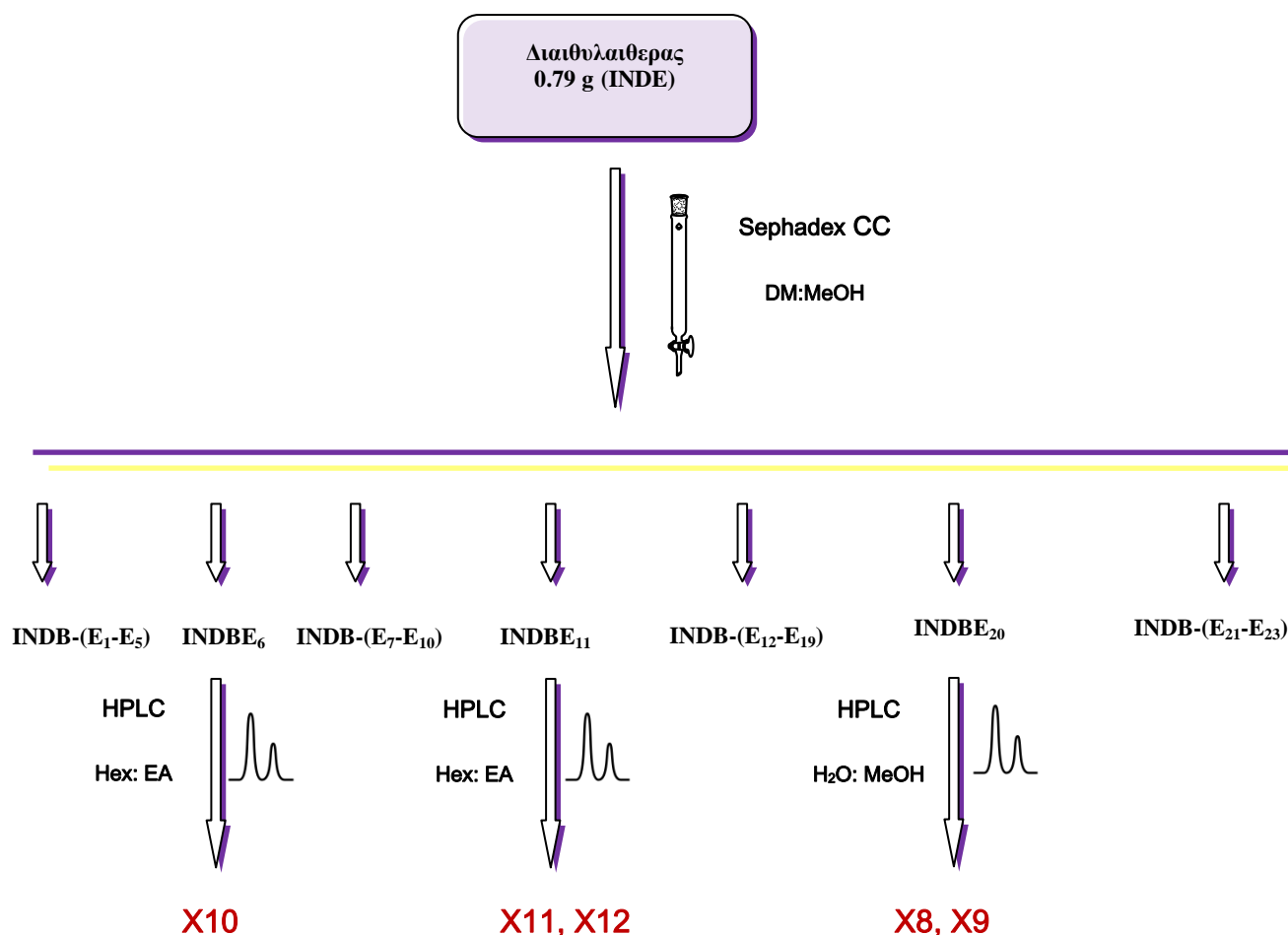
συλλέχτηκαν δύο κύρια κλάσματα **INDB-MA**, **INDB-MB** όγκου 80 ml το καθένα από τα οποία το κλάσμα **INDB-LB** υποβλήθηκε σε μια μικρότερη χρωματογραφία στήλης Sephadex CC (20 cm x 0.7 cm) από την οποία συλλέχτηκαν τρία κλάσματα **INDB-LB1**, **INDB-LB2**, **INDB-LB3** όγκου 50 ml. Το τελευταίο κλάσμα **INDB-LB3** 28.5 mg υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (**HPLC**)

με διαλύτη έκλουσης **H<sub>2</sub>O (A): MeOH (B)**. Το κλάσμα **INDB-LB3** διαλύθηκε σε H<sub>2</sub>O για HPLC με αναλογία 1mg/ml με προσθήκη μίας σταγόνας MeOH για HPLC. Το πρόγραμμα έκλουσης φαίνεται στην εικόνα 59 όπου A [%] είναι το νερό- AcOH 1% ενώ B [%] είναι η μεθανόλη. Ο ανιχνευτής είχε ρυθμιστεί στα 298 nm. Παρελήφθη μια κορυφή η **LB3** ( $m=2.8$  mg) με χρόνο κατακράτησης 29.7 min η οποία αντιστοιχεί στην **Ένωση X2**: 7-O-D-[6'''-O-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοζυλο-(1''''→2''')]-β-D-γλυκοπυρανοζιτης της 4'-O-μεθυλο υπολαετίνης μάζας.



Εικ 62: Χρωματογράφημα του κλάσματος INDB-M

### 11.3. Εκχύλισμα διαιθυλαιθέρα (INDE)



Εικ 63: Κλασματοποίηση εκχυλίσματος διαιθυλαιθέρα

Το κλάσμα του διαιθυλαιθέρα (INDE 0.79 g) υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης επί Sephadex CC (40 cm x 3,5 cm) χρησιμοποιώντας Διχλωρομεθάνιο→μεθανόλη από 60:40 έως 100% μεθανόλη. Ελήφθησαν 50 κλάσματα, τα οποία στη συνέχεια ομαδοποιήθηκαν μετά τον χρωματογραφικό έλεγχο με αναλυτική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας κυτταρίνης με αντιδραστήριο εμφάνισης Neu και γέλης πυριτίου (Merck, Art 5554), με αντιδραστήριο εμφάνισης βανιλίνη.

Πίνακας 12: ομαδοποίηση κλασμάτων εκχυλίσματος διαιθυλαιθέρα

ονομασία	Βάρος (mg)	Αναλογία διαλυτών
INDE <sub>1</sub>	95.7	Διχλωρομεθάνιο:μεθανόλη 60:40
INDE <sub>2</sub>	105.3	Διχλωρομεθάνιο:μεθανόλη 60:40
INDE <sub>3</sub>	21.8	Διχλωρομεθάνιο:μεθανόλη 60:40
INDE <sub>4</sub>	51.0	Διχλωρομεθάνιο:μεθανόλη 60:40
INDE <sub>5</sub>	60.0	Διχλωρομεθάνιο:μεθανόλη 60:40
INDE <sub>6</sub>	22.4	Διχλωρομεθάνιο:μεθανόλη 60:40
INDE <sub>7</sub>	48.6	Διχλωρομεθάνιο:μεθανόλη 60:40
INDE <sub>8</sub>	36.3	Διχλωρομεθάνιο:μεθανόλη 60:40
INDE <sub>9</sub>	47.5	Διχλωρομεθάνιο:μεθανόλη 60:40
INDE <sub>10</sub>	42.6	Διχλωρομεθάνιο:μεθανόλη 50:50
INDE <sub>11</sub>	7.7	Διχλωρομεθάνιο:μεθανόλη 50:50
INDE <sub>12</sub>	5.9	Διχλωρομεθάνιο:μεθανόλη 40:60
INDE <sub>13</sub>	0.9	Διχλωρομεθάνιο:μεθανόλη 40:60
INDE <sub>14</sub>	2.2	Διχλωρομεθάνιο:μεθανόλη 30:70
INDE <sub>15</sub>	10.4	Διχλωρομεθάνιο:μεθανόλη 30:70
INDE <sub>16</sub>	7.8	Διχλωρομεθάνιο:μεθανόλη 30:70
INDE <sub>17</sub>	13.8	Μεθανόλη 100%
INDE <sub>18</sub>	3.2	Μεθανόλη 100%
INDE <sub>19</sub>	2.2	Μεθανόλη 100%
INDE <sub>20</sub>	15.4	Μεθανόλη 100%
INDE <sub>21</sub>	1.5	Μεθανόλη 100%
INDE <sub>22</sub>	1.5	Μεθανόλη 100%
INDE <sub>23</sub>	1.4	Μεθανόλη 100%

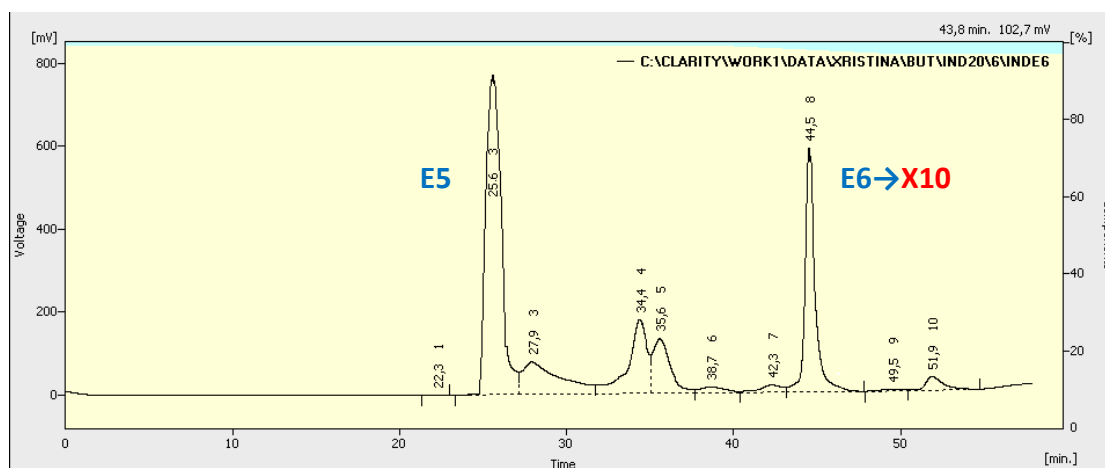
### Κλάσμα INDE<sub>6</sub> (22.4 mg), λ<sub>max</sub> =278nm

Το κλάσμα INDE<sub>6</sub> υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), με στήλη Silica και με διαλύτη έκλουσης Διχλωρομεθάνιο (A): Οξικό αιθυλεστέρα (B). Το κλάσμα INDE<sub>6</sub>

Εικ 64: πρόγραμμα έκλουσης κλάσματος INDB-L

Gradient Table				
	Time [min]	A [%]	B [%]	Flow [mL/min]
1	Initial	99,0	1,0	0,500
2	40,00	99,0	1,0	0,500
3	50,00	97,0	3,0	0,500
4	60,00	97,0	3,0	0,500
5	70,00	96,0	4,0	0,500
6	80,00	96,0	4,0	0,500
7				

διαλύθηκε σε Διχλωρομεθάνιο για HPLC με αναλογία 1mg/ml. Το πρόγραμμα έκλουσης φαίνεται στην εικόνα 62 όπου A [%] είναι το Διχλωρομεθάνιο ενώ B [%] είναι η ο οξικός αιθυλεστέρας. Ο ανιχνευτής είχε ρυθμιστεί στα 280 nm. Παρελήφθησαν δύο κορυφές η E5 (2.9 mg) και η E6 (2.6 mg) με χρόνο κατακράτησης 25.06 min και 44.5 min. Η κορυφή E6 αποτέλεσε την Ένωση X10:1,2-Δις(1 Η-ινδολ-3-υλ)αιθαν-1,2-διόνη.



Εικόνα 65: Χρωματογράφημα του κλάσματος INDE<sub>6</sub>

### Κλάσμα INDE<sub>11</sub> (7.7 mg), λ<sub>max</sub> =278nm

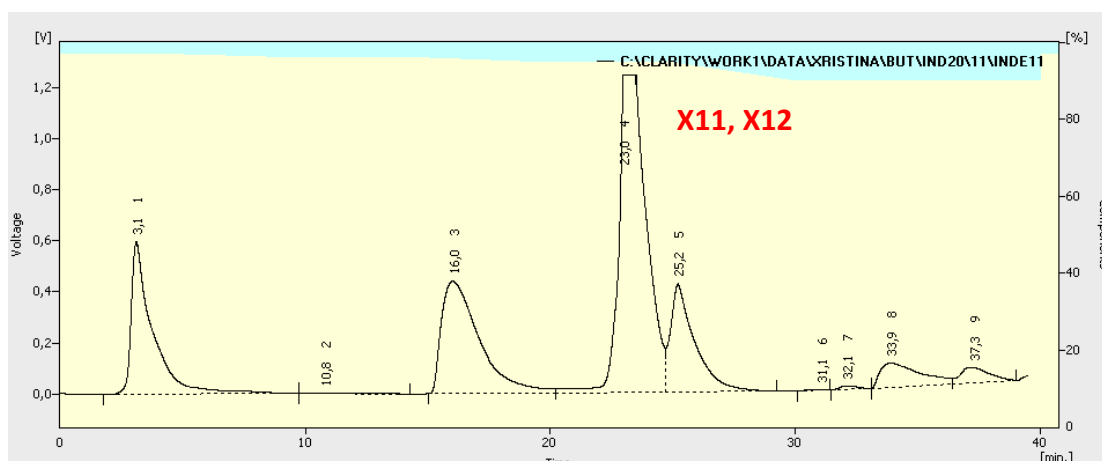
Το κλάσμα INDE<sub>11</sub> 22.4 mg υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με στήλη Silica και με διαλύτη έκλουσης Διχλωρομεθάνιο (A): Οξικό αιθυλεστέρα (B). Το

Εικ 66 πρόγραμμα έκλουσης κλάσματος INDE11

Gradient Table				
	Time [min]	A [%]	B [%]	Flow [mL/min]
1	Initial	97,0	3,0	0,500
2	5,00	97,0	3,0	0,500
3	10,00	96,0	4,0	0,500
4	15,00	96,0	4,0	0,500
5	20,00	95,0	5,0	0,500
6	25,00	95,0	5,0	0,500
7	30,00	90,0	10,0	0,500
8	40,00	90,0	10,0	0,500
9				

κλάσμα INDE<sub>11</sub> διαλύθηκε σε Διχλωρομεθάνιο για HPLC με αναλογία 1mg/ml. Το πρόγραμμα έκλουσης φαίνεται στο ακόλουθο σχήμα όπου A [%] είναι το Διχλωρομεθάνιο ενώ B [%] είναι ο οξικός αιθυλεστέρας. Ο ανιχνευτής είχε ρυθμιστεί στα 280 nm. Παρελήφθη μια κορυφή η E11 με χρόνο κατακράτησης 23.00 min μάζας m = 3.6 mg η οποία αντιστοιχεί στο μίγμα ισομερών των

Ενώσεων X11 και X12 Μίγμα *cis*, *trans* ισομερών του φερούλικού μεθυλεστέρα. Έγινε προσπάθεια απομόνωσης των δυο ισομερών με παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας κυτταρίνης με AcOH 15% η οποία απέτυχε καθώς ενώ υπήρχε διαχωρισμός των δύο ενώσεων, κάθε φορά ανιχνεύονταν μίγμα των ισομερών. Στη βιβλιογραφία περιγράφεται ο μετασχηματισμός από *trans* σε *cis* σε φαινυλοπροπανοϊκούς εστέρες και φλαβονοειδή (Matlawska et al, 1999).



Εικ 67: Χρωματογράφημα του κλάσματος INDE<sub>11</sub>

### Κλάσμα INDE<sub>20</sub> (15.4 mg), λ<sub>max</sub> =278nm

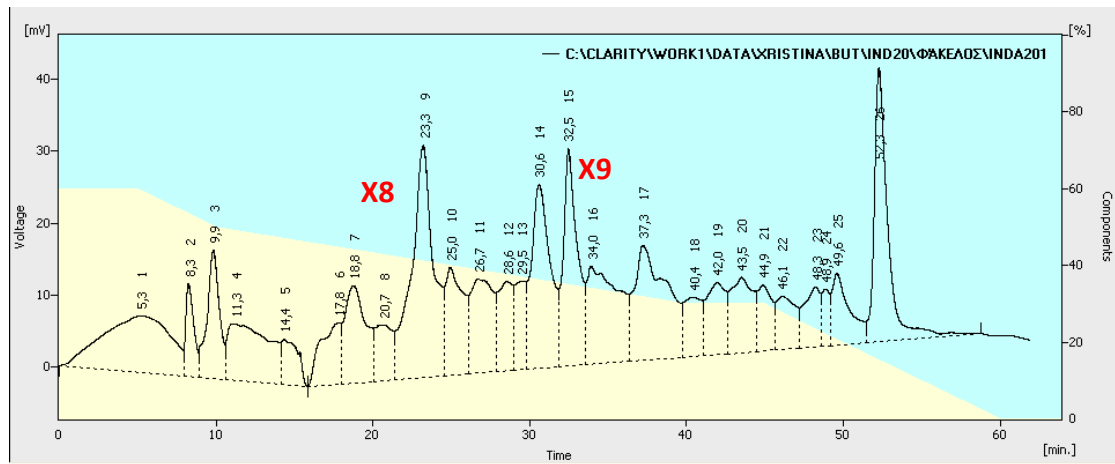
Το κλάσμα INDE<sub>20</sub> υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με διαλύτη έκλουσης H<sub>2</sub>O (A): MeOH (B). Το κλάσμα INDE<sub>20</sub> διαλύθηκε σε H<sub>2</sub>O για HPLC με

Εικ 68: πρόγραμμα έκλουσης κλάσματος INDE<sub>20</sub>

Gradient Table				
	Time [min]	A [%]	B [%]	Flow [mL/min]
1	Initial	60,0	40,0	1,000
2	5,00	60,0	40,0	1,000
3	10,00	50,0	50,0	1,000
4	25,00	40,0	60,0	1,000
5	40,00	30,0	70,0	1,000
6	45,00	30,0	70,0	1,000
7	50,00	20,0	80,0	1,000
8	60,00	0,0	100,0	1,000
9	65,00	0,0	100,0	1,000
10				

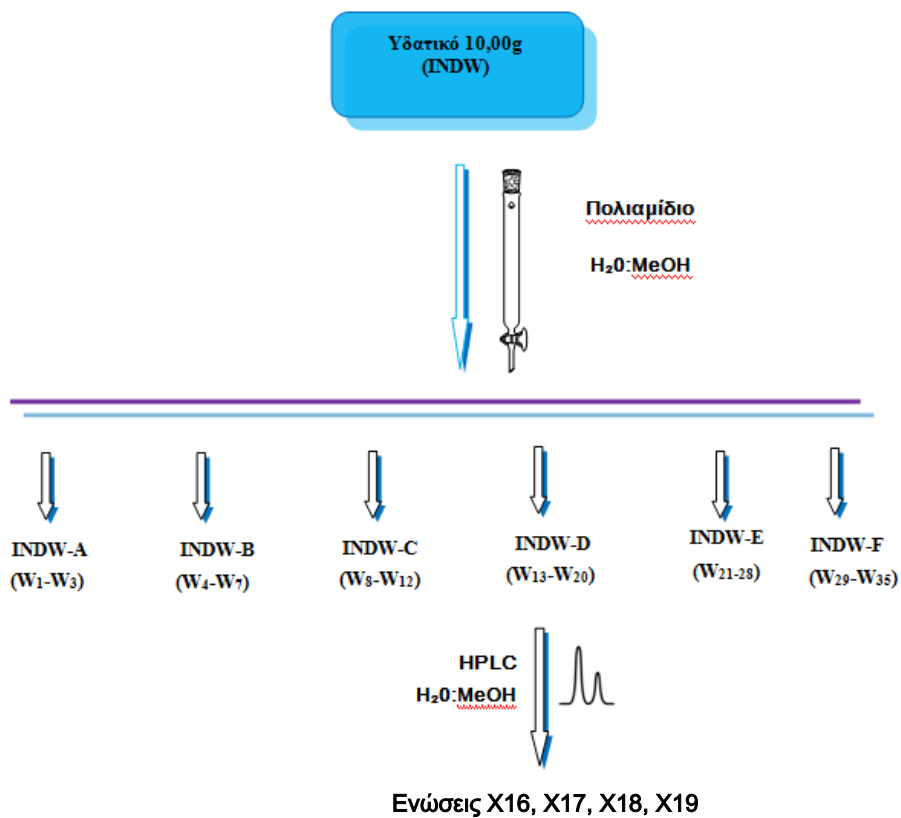
αναλογία 1mg/ml με προσθήκη μιας σταγόνας MeOH για HPLC. Το πρόγραμμα έκλουσης φαίνεται στην εικόνα 68 όπου A [%] είναι το νερό-AcOH 1% ενώ B [%] είναι η μεθανόλη. Ο ανιχνευτής είχε ρυθμιστεί στα 278 nm. Παρελήφθησαν τέσσερις κορυφές με χρόνους κατακράτησης 23.30 min, 30.60 min, 32.5 min και 52.3 min. Η κορυφή με χρόνο κατακράτησης 23.30 αντιστοιχεί στην ένωση X8 (m=1.0 mg)

Παρα-υδρόξυ Βενζοϊκό οξύ ενώ η κορυφή με χρόνο κατακράτησης 32.5 min αντιστοιχεί στην ένωση X9 (m=1.5 mg) Γαλλικό οξύ όπως φαίνεται στην εικόνα 69.



Εικ 69: Χρωματογράφημα του κλάσματος INDE<sub>20</sub>

#### 11.4.Υδατικό υπόλειμμα (INDW)



Εικ 70: Κλασματοποίηση υδατικού εκχυλίσματος



Τα 10 g από το υδατικό εκχύλισμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης πολυαμιδίου σε CC CC6 Macherey-Nagel, 70-160μm, (40 cm x 2,5 cm) βαθμωτής έκλουσης (H<sub>2</sub>O→MeOH). Για χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, το πολυαμίδιο κατεργάστηκε προηγουμένως με απεσταγμένο νερό και μείγμα νερού-μεθανόλης προς απομάκρυνση των ολιγομερών του. Συλλέχθηκαν 36 κλάσματα τα οποία συνενώθηκαν τελικά στα κλάσματα του πίνακα.

**Πίνακας 13:ομαδοποίηση κλασμάτων υπολείμματος υδατικού**

Αριθμός κλασμάτων	Βάρος(mg)	Αναλογία διαλυτών	ονομασία
1-3	4000	100% νερό	INDW-A
4-7	1000	95% νερό-5% μεθανόλη	INDW-B
8-12	100	90% νερό-10% μεθανόλη	INDW-C
13-20	180	70% νερό-30% μεθανόλη	INDW-D
21-28	75	50% νερό-50% μεθανόλη	INDW-E
29-35	60	100% μεθανόλη	INDB-F

### Κλάσμα INDW-D (180.0 mg)

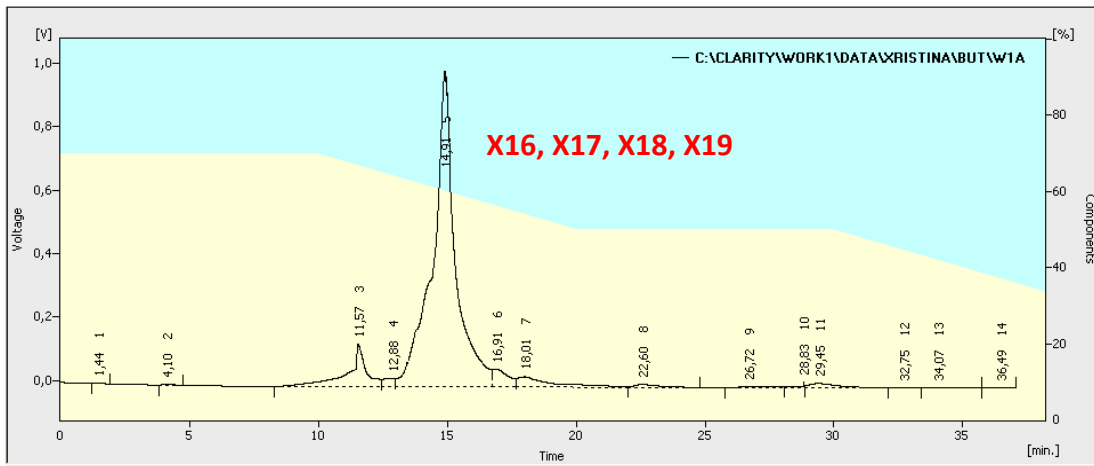
Το κλάσμα **INDW-D** υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης Sephadex CC (40 cm x 2,5 cm), συλλέχτηκαν τέσσερα κύρια κλάσματα **INDW-DA, INDW-DB, INDW-DC, INDW-DD** όγκου 50 ml το καθένα από τα οποία το κλάσμα **INDW-DB** 60.5 mg υποβλήθηκε σε υγρή

**Εικ 71: πρόγραμμα έκλουσης κλάσματος INDE20**

	Time [min]	A [%]	B [%]	Flow [mL/min]
1	Initial	70,0	30,0	1,000
2	10,00	70,0	30,0	1,000
3	20,00	50,0	50,0	1,000
4	30,00	50,0	50,0	1,000
5	40,00	30,0	70,0	1,000
6	50,00	0,0	100,0	1,000
7	60,00	0,0	100,0	1,000
8	70,00	0,0	100,0	1,000
9				

χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (**HPLC**) με διαλύτη έκλουσης **H<sub>2</sub>O (A): MeOH (B)**. Το κλάσμα **INDW-DB** διαλύθηκε σε H<sub>2</sub>O για HPLC με αναλογία 1mg/ml με προσθήκη μίας σταγόνας MeOH για HPLC. Το πρόγραμμα έκλουσης φαίνεται στην εικόνα 71 όπου A [%] είναι το νερό-AcOH 1% ενώ B [%] είναι η μεθανόλη. Ο ανιχνευτής είχε ρυθμιστεί στα 278 nm. Παρελήφθη μια κορυφή η **INDW-DBA1** με χρόνο

κατακράτησης 14.91 min η οποία αντιστοιχεί στο μείγμα **ενώσεων X16** Ουρακίλη, **X17**,1-μεθυλο-β-D-γλυκοπυρανόζη, **X18** πινιτόλη **X19** γλυκερόλη όπως φαίνεται στην εικόνα 72.



Εικ 72: Χρωματογράφημα του κλάσματος INDW-DBA1

## 12 . LC-DAD-MS (ESI+) ΑΝΑΛΥΣΗ

### 12.1. Εκχύλισμα διαιθυλαιθέρα

Παρακάτω παρατίθεται η ανάλυση του εκχυλίσματος του διαιθυλαιθέρα σε δύο διαφορετικά μήκη κύματος 278 και 340 nm. Οι ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν είχαν χρόνο κατακράτησης 14,38 και 16,29 min. Ακολουθήθηκε πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης με διαλύτες AcOH 2.5%/ MeOH τα χαρακτηριστικά του οποίου φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

#### Superspher 100-4, 4μl, (125x2mm) RP18 Macherey Nagel

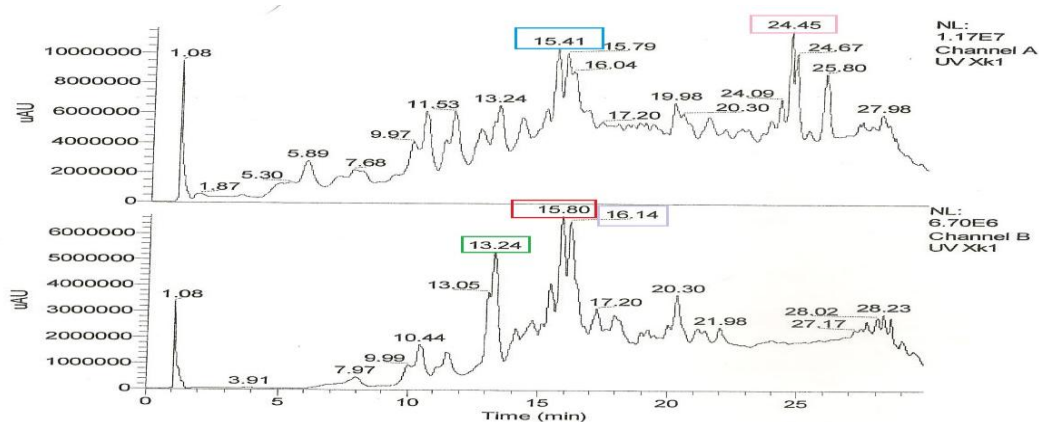
Πίνακας 14: Πρόγραμμα έκλουσης εκχύλίσματος διαιθυλαιθέρα

Time (min)	H <sub>2</sub> O (+2.0% AcOH)	MeOH
0.00	95	5
2.00	95	5
25.00	0	100
30.00	0	100

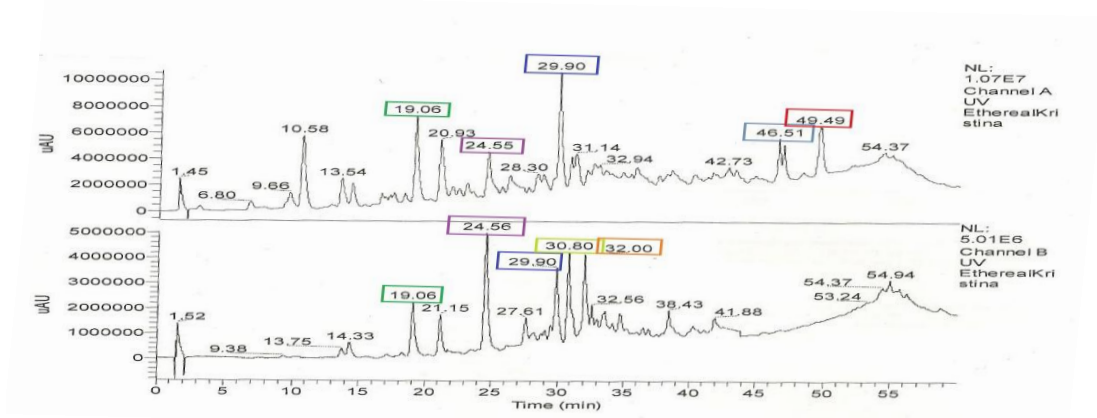
Πίνακας 15: Flow rate: 0.33ml/min; inj.vol: 4ul; DAD: 278,340 nm

<i>Ionization Mode:</i>	ESI+	<i>Ionization Mode:</i>	<i>Electrospray</i>
Capillary (vK):	4.9	None in use.	
Source Voltage (V):	40 °C	1 +ve 12	
Probe Temperature (°C):	400 °C	2 +ve 70	
RF Lens (V):	0.3	Scans per Second:	0.7
Ion Energy (eV):	1.0	Scan Range Start (amu):	121
Ion Energy Ramp (mV/amu):	0.5	Scan Range End (amu):	894
Detector Voltage (V):	650		
Low Mass Resolution:	12.0		
High Mass Resolution:	17.0		

### Χρωματογράφημα εκχύλισματος διαιθυλαιθέρα



Εικ 73: Χρωματογράφημα εκχύλισματος διαιθυλαιθέρα (12eV/70eV)



Εικ 74: Χρωματογράφημα εκχύλισματος διαιθυλαιθέρα (20eV/80eV)

Πίνακας 16. Χρόνοι Κατακράτησης  $R_t$  (min), μοριακά ιόντα  $[M+H]^+$ , θραύσματα μάζας στα 20 και στα 80 και στα στα 12 και στα 70 eV με τις σχετικές εντάσεις (RI%) και τα φάσματα υπεριώδους-ορατού UV-Vis (nm) των ενώσεων που βρέθηκαν στο εκχύλισμα του διαιθυλαιθέρα

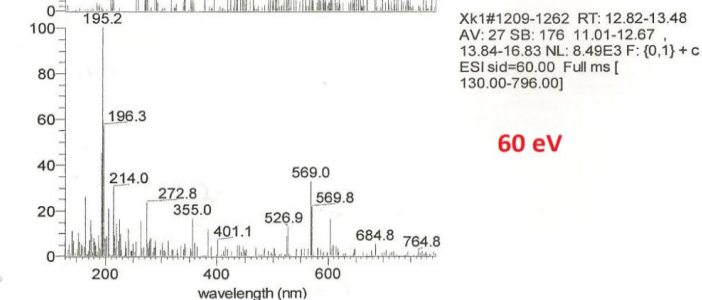
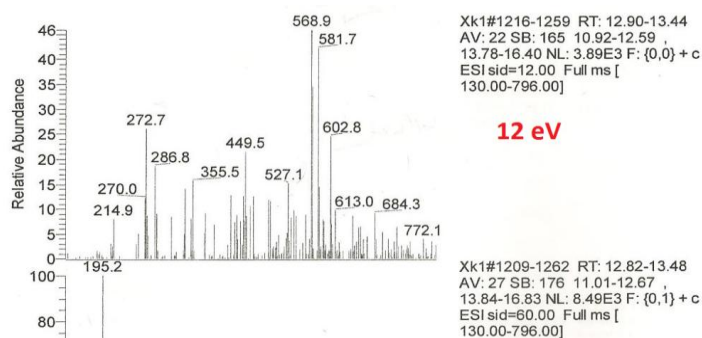
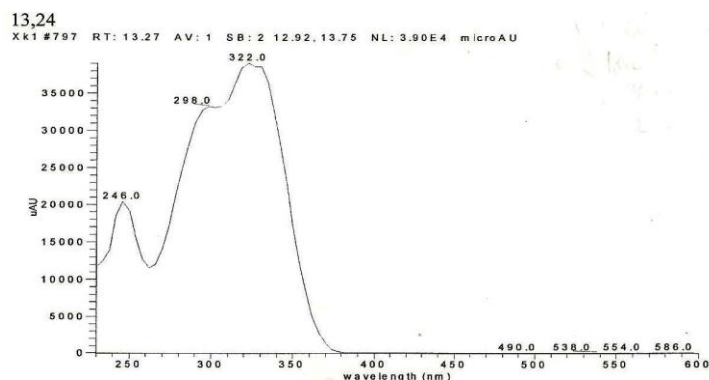
Εκχύλισμα διαιθυλαιθέρα (20eV-80eV)					
$R_t$ (min)	$[M+H]^+$	$m/z$ στα 20eV (%RI)	$m/z$ στα 80eV (%RI)	UV (nm)	Ένωση
13.24	771	684,613,603,581,569(100),	765,685,569,527,	246,298,322	1
		527,449,355,287,273,270	401,355,273,196,195,		
16.14		741,663,534,462,387	790,665,637,607,457,	242,334	2
		277,255	285,255,176		
Εκχύλισμα διαιθυλαιθέρα (12eV-70eV)					
$R_t$ (min)	$[M+H]^+$	$m/z$ στα 12eV (%RI)	$m/z$ στα 70eV (%RI)	UV (nm)	Ένωση
19.06		767,759,715,670,604,499,	754,658,561,551,528,	240,310	3
		493,409,357,339,324,269,	470,424,403,335,269		

218,206,197					
24.56	781	730,678,630,626,568,491 437,408,288,270,254,223	769,766,667,661,515, 437,171,147	240,320,328	4
29.90		737,669,569,549,501,427 409,387,351,269,247,187	731,698,663,643,582,567 483,427,371,345,307,269 205,143	310	5
30.80	771	713,667,597,587,515, 491,436,433,420,351,297 269,206	762,726,672,643,638, 629,576,506,449,381, 333,216,207	242,320,328	6
32.00	783	773,761,699,623,589, 541,524,419,405,393, 351,299,241,225,183	749,705,673,575,573 515,447,353,304,296, 241,154	254,322,332	7

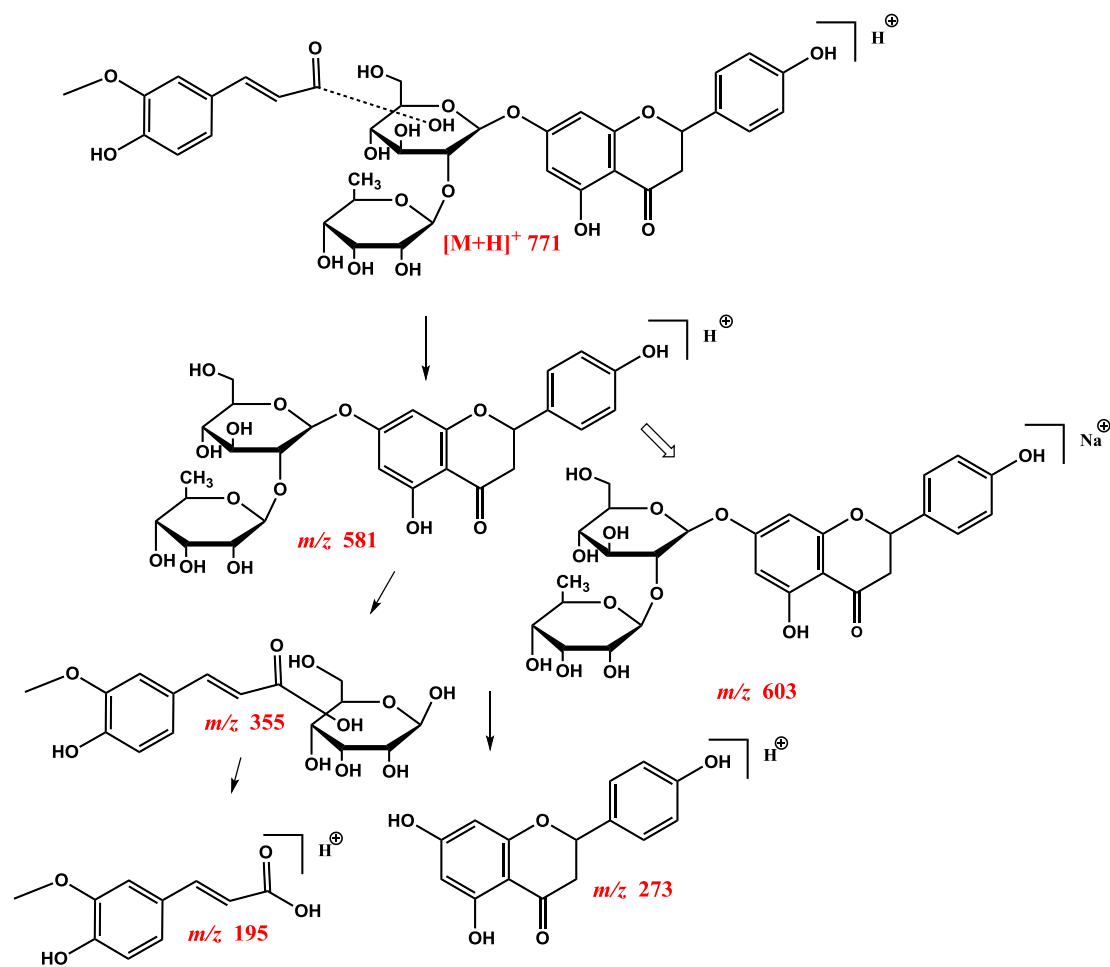
### 12.1.1. Ένωση 1: Νεοεσπεριδοζίτης της ναριγγενίνης εστεροποιημένος με φερουλικό ή ισοφερουλικό οξύ

Χρόνος κατακράτησης: **13.24 min**

Φασμα UV-Vis **246, 298, 322 nm** / Φάσμα μάζας: 12 eV, 60 eV



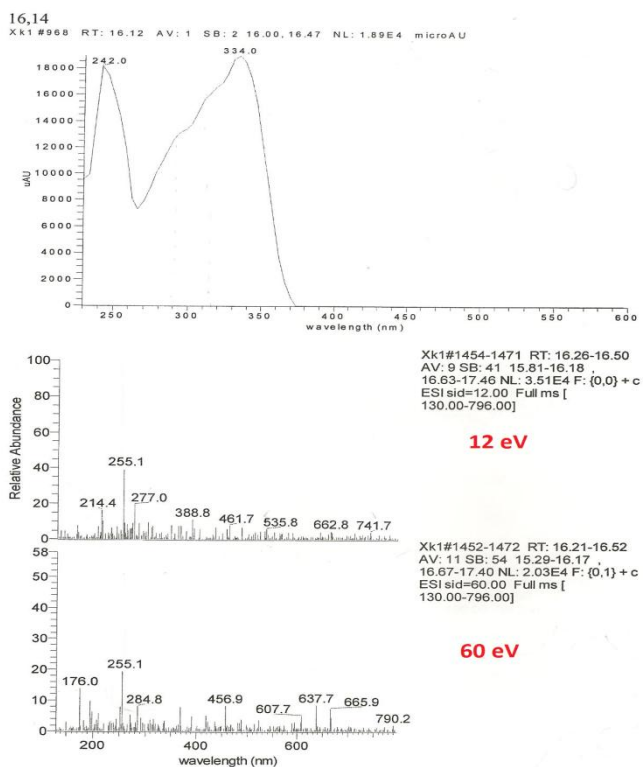
Το φάσμα απορρόφησης υπεριώδους ορατού έχει απορροφήσεις 246 nm, 298 nm, 322 nm και είναι χαρακτηριστικό παραγώγου υδροξυκιναμωμικού οξέος. Τόσο στα 12 eV όσο και στα 60 eV εμφανίζεται το θραύσμα  $m/z$  273 το οποίο αντιστοιχεί στο άγλυκο της ναριγγενίνης της οποίας το φάσμα υπεριώδους-ορατού θα απορροφούσε στα 282 nm γεγονός το οποίο δεν φαίνεται από το φάσμα υπεριώδους ορατού που ίσως καλύπτεται από το φάσμα του υδροξυκιναμωμικού οξέος. Το θραύσμα  $m/z$  195 αντιστοιχεί σε φερουλικό ή σε ισοφερουλικό οξύ ενώ το θραύσμα  $m/z$  196 αντιστοιχεί σε διϋδροφερουλικό οξύ. Στα 12eV παρατηρείται το χαρακτηριστικό θραύσμα  $m/z$  581 το οποίο αντιστοιχεί στον νεοεσπεριδοζίτη της ναριγγενίνης καθώς επίσης και το θραύσμα  $m/z$  603 το οποίο αποτελεί προϊόν σταθεροποίησης με  $\text{Na}^+$  του νεοεσπεριδοζίτη της ναριγγενίνης. Επομένως μια εκτίμηση πιθανούς δομής θα μπορούσε να είναι αυτή της ναριγγίνης εστεροποιημένης με ένα μόριο φερουλικού ή ισοφερουλικού οξέος με μοριακό ιόν  $[\text{M}+\text{H}]^+$  771 το οποίο είναι εμφανές μόνο στα 12 eV. Το θραύσμα  $m/z$  355 που παρατηρείται στις υψηλές τιμές πεδίου αντιστοιχεί στο φερουλικό οξύ συνδεδεμένο με τη γλυκόζη. Δεν είναι δυνατόν να καθορισθεί η θέση σύνδεσης του φερουλικού οξέος με τη γλυκόζη.



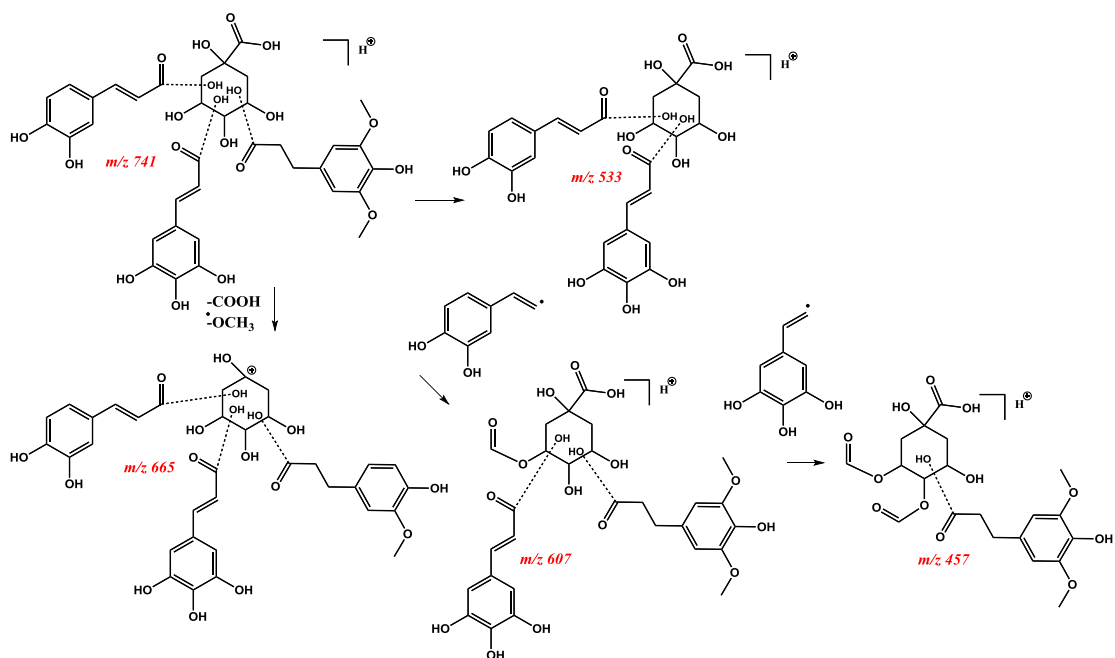
## 12.1.2. Ένωση 2: [Δεϋδροσιναποϋλο-τριϋδροξικινναμοϋλο-καφεοϋλο]-τριεστέρας του κινικού οξέος

Χρόνος κατακράτησης: 16.14 min

Φασμα UV-Vis 242, 234 nm / Φάσμα μάζας: 12 eV, 60 eV



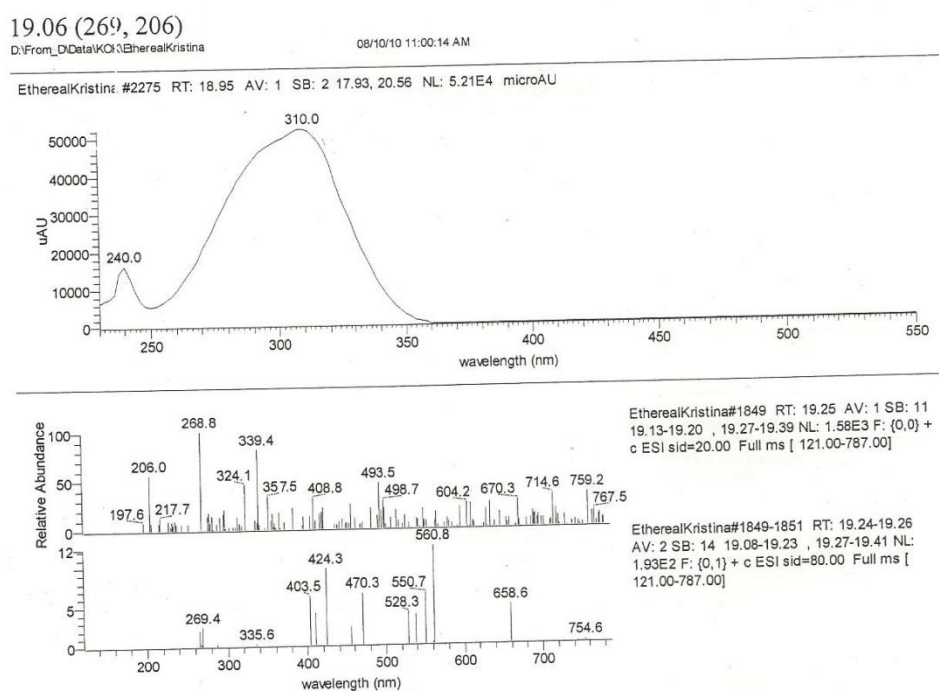
Το φάσμα υπεριώδους ορατού είναι χαρακτηριστικό για εστέρες υδροξικινναμωμικών οξέων με μέγιστη απορρόφηση στα 334nm. Μια προτεινόμενη δομή ενός από τα μεγαλύτερα θραύσματα τα οποία παρατηρούνται στο φάσμα είναι αυτή του  $m/z$  741 στα 12 eV. Πιθανόν το θραύσμα  $m/z$  741 να αντιστοιχεί σε έναν εστέρα του κινικού οξέος εστεροποιημένο με ένα μόριο δεϋδροσιναπικού οξέος, ένα μόριο καφεϊκού οξέος και ένα μόριο τριϋδροξικινναμωμικού οξέος. Το θραύσμα  $m/z$  533 το οποίο εμφανίζεται στα 12 eV προκύπτει μετά την απόσπαση της δεϋδροσιναποϋλο ομάδας από το θραύσμα  $m/z$  741. Το θραύσμα  $m/z$  665 που εμφανίζεται στα 60 eV προκύπτει από το θραύσμα  $m/z$  741 μετά από απόσπαση της καρβοξυλικής ρίζας του κινικού οξέος και μιας μεθοξυλικής ρίζας από την δεϋδροσιναποϋλο ομάδα. Το θραύσμα  $m/z$  607 το οποίο εμφανίζεται στα 60 eV θεωρείται ότι προκύπτει από το θραύσμα από την απόσπαση της ρίζας 3,4-διϋδροξυ στυρενίου. Ενώ το θραύσμα  $m/z$  457 το οποίο εμφανίζεται στα 60 eV πιθανόν να προκύπτει από το θραύσμα  $m/z$  607 μετά την απόσπαση τμήματος από το τριϋδροξικινναμωμικό οξύ.



### 12.1.3. Ένωση 3: [3,4-διυδροξυ-5-μεθοξικινναμούλο-σινναπούλο-μεθοξικουμαρούλο]-τριοξείρας του 3,4,5-τριυδροξυ κινναμωμικού οξέος

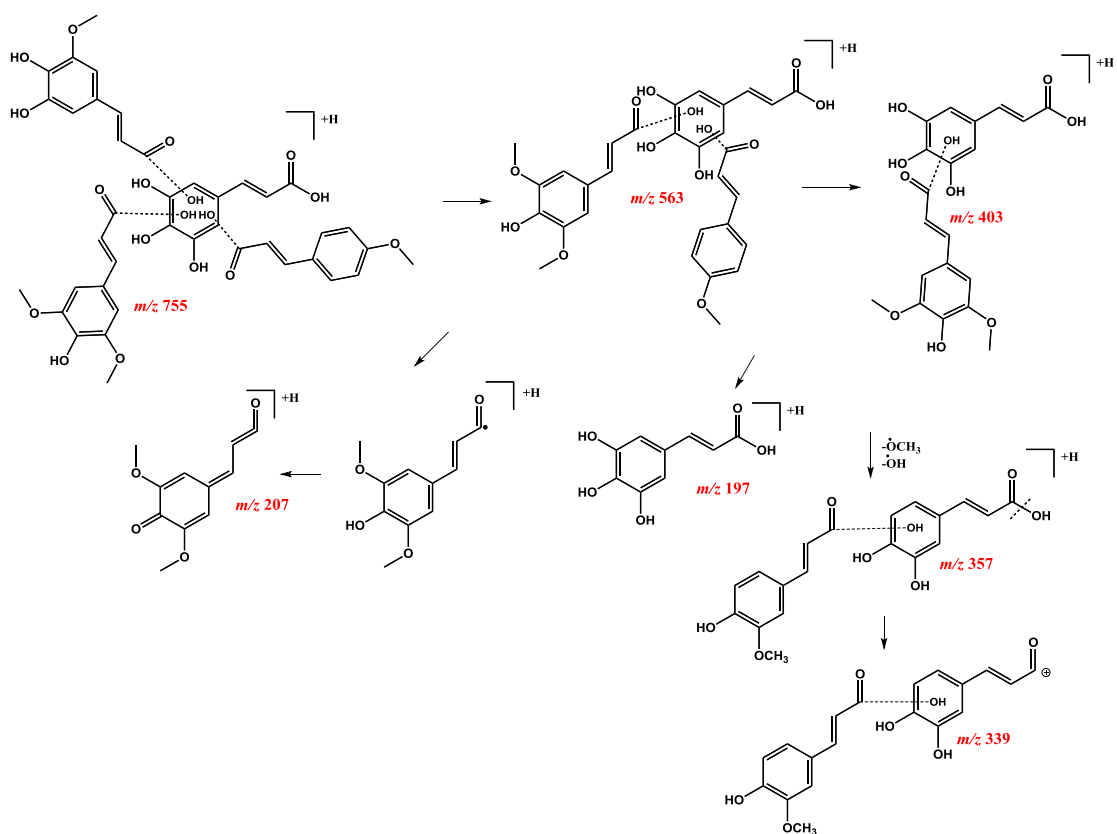
Χρόνος κατακράτησης: **19.06 min**

Φασμα UV-Vis **240, 310 nm** / Φάσμα μάζας:





Το φάσμα απορρόφησης της ένωσης είναι χαρακτηριστικό για εστέρες υδροξυκινναμωμικών οξέων με μια κορυφή στα 240 nm και μια στα 310 nm (Sanchez-Rabaneda et al., 2003; Sanchez-Rabaneda et al., 2004). Πιθανολογείται ότι πρόκειται για έναν εστέρα του 3,4,5-τριυδροξυ κινναμωμικού οξέος εστεροποιημένο με ένα με 3,4-διυδροξυ-5-μεθοξυκινναμωμικό οξύ, με ένα σιναπτικό οξύ και με ένα κουμαρικό οξύ στον οποίο δεν είναι δυνατόν να καθοριστούν οι θέσεις σύνδεσης των οξέων. Το θραύσμα το οποίο αντιστοιχεί σε αυτή τη δομή  $m/z$  755 είναι εμφανές στα 80 eV ενώ δεν μπορεί να καθορισθεί με σαφήνεια ποιο είναι το μοριακό ιόν από τον μεγάλο αριθμό θραυσμάτων. Το θραύσμα  $m/z$  339 παρόν στα 20 eV αντιστοιχεί στον εστέρα του καφεϊκού οξέος με φερουλικό οξύ μετά την απόσπαση μιας ρίζας  $\cdot\text{OH}$  (Daniels et al., 1963). Το θραύσμα  $m/z$  563 το οποίο εμφανίζεται στα 80 eV προκύπτει από το θραύσμα  $m/z$  755 μετά την αποχώρηση της ομάδας του με 3,4-διυδροξυ-5-μεθοξυκινναμωμικού οξέος ενώ το θραύσμα  $m/z$  403 το οποίο εμφανίζεται στα 80 eV θεωρείται ότι προκύπτει από την αποχώρηση της κουμαρούλο ομάδας από το θραύσμα  $m/z$  563. Το θραύσμα  $m/z$  207 ή  $m/z$  206 αντιστοιχεί στη συναπούλο ομάδα [συναπόύλο ομάδα- $\text{OH}+\text{H}$ ] $^+$  και το θραύσμα 197 αντιστοιχεί στο 3,4,5-τριυδροξυ κινναμωμικό οξύ.



#### 12.1.4. Ένωση 4: [φερουλοϋλο-κουμαροϋλο-καφεοϋλο-βενζοϋλο]-τετραεστέρας του κινικού οξέος

Χρόνος κατακράτησης: 24.56 min

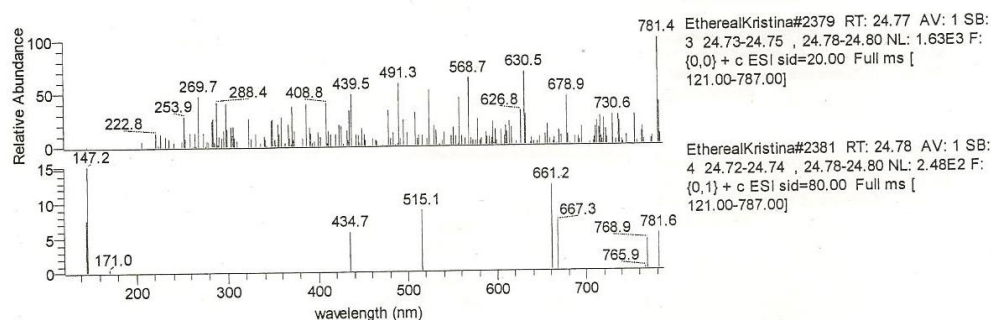
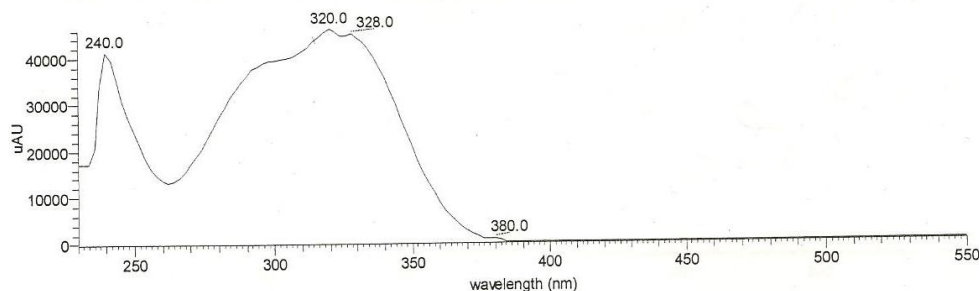
Φάσμα UV-Vis 240, 320, 328 nm / Φάσμα μάζας: 20 eV, 80 eV

24.56

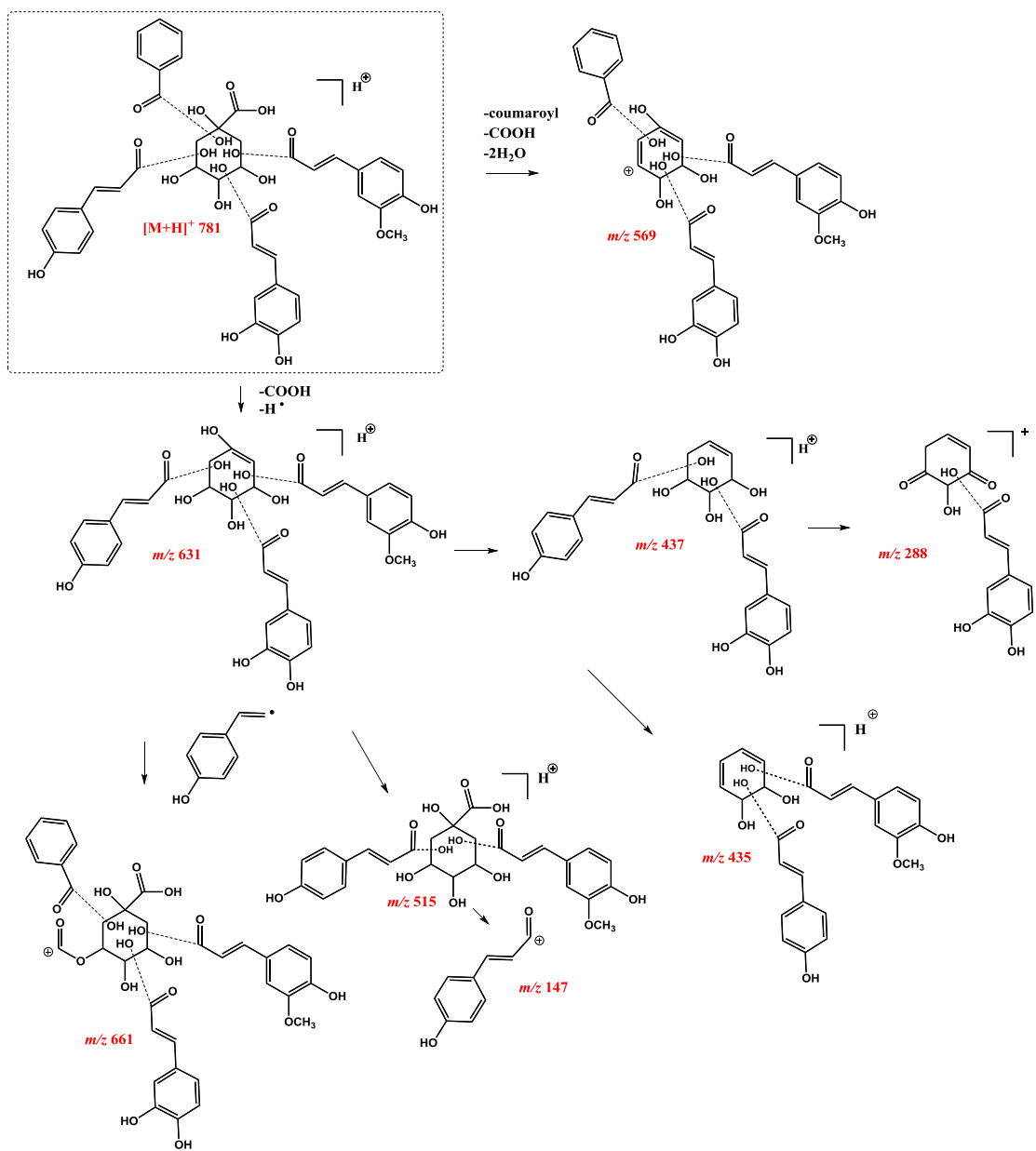
D:\From\_D\Data\KOK\EtherealKristina

08/10/10 11:00:14 AM

EtherealKristina #2948 RT: 24.56 AV: 1 SB: 11 24.04, 25.38-25.46 NL: 4.60E4 microAU



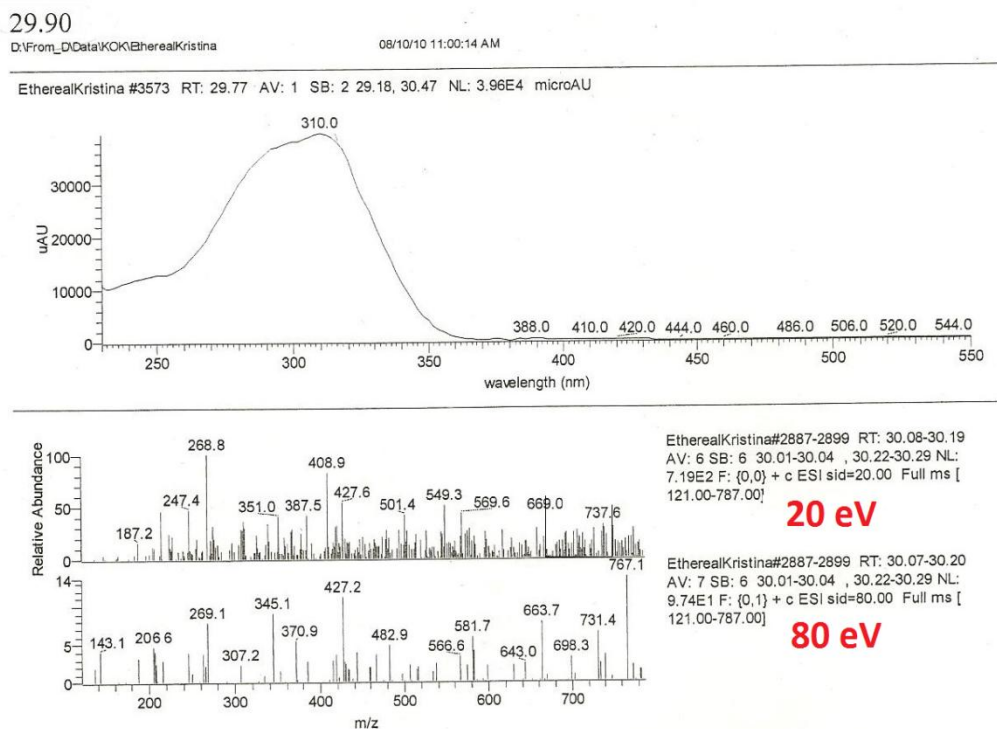
Πρόκειται για κινικό οξύ εστεροποιημένο με ένα μόριο καφεϊκού οξέος, ένα μόριο κουμαρικού οξέος, ένα μόριο φερουλικού οξέος, και ένα μόριο βενζοϊκού οξέος. Το φάσμα απορρόφησης της ένωσης είναι χαρακτηριστικό για εστέρες του κινικού με υδροξυκιναμωμικά οξέα με μια κορυφή στα 240 έναν ώμο στα 320 nm και μια απορρόφηση στα 328 nm (Sanchez-Rabaneda et al., 2003; Sanchez-Rabaneda et al., 2004). Από τα θραύσματα της ένωσης τόσο στις χαμηλές τιμές πεδίου όσο και στις υψηλές τιμές πεδίου δεν μπορεί να προκύψει άμεσα πιο είναι το μοριακό ιόν της ένωσης  $[M+H]^+$  διότι δεν παρατηρούνται ιόντα σταθεροποίησης τύπου  $[M+H+(H_2O)]^+$ ,  $[M+Na]^+$  και  $[2M+H]^+$ . Παρόλα αυτά υπάρχουν θραύσματα διαγνωστικά όπως είναι το θραύσμα  $m/z$  147 στα 80 eV το οποίο αντιστοιχεί στο  $[p\text{-κουμαρικό οξύ-OH}]^+$  και το θραύσμα  $m/z$  515 το οποίο αντιστοιχεί στον  $p\text{-μεθοξυκιναμικό-καφεϊκό διεστέρα}$  του κινικού οξέος για τον οποίο δεν είναι δυνατόν να διευκρινιστεί η θέση εστεροποίησης (Clifford et al., 2006; Del Rio et al., 2004). Για να μπορέσουν να προσδιοριστούν τα μοριακά θραύσματα με ευκολία θα θεωρήσουμε κατά αυθαίρετο τρόπο την παρακάτω σύνδεση των υδροξυκιναμωμικών στο μόριο του κινικού οξέος ενώ οι παρακάτω δομές είναι προτεινόμενες.



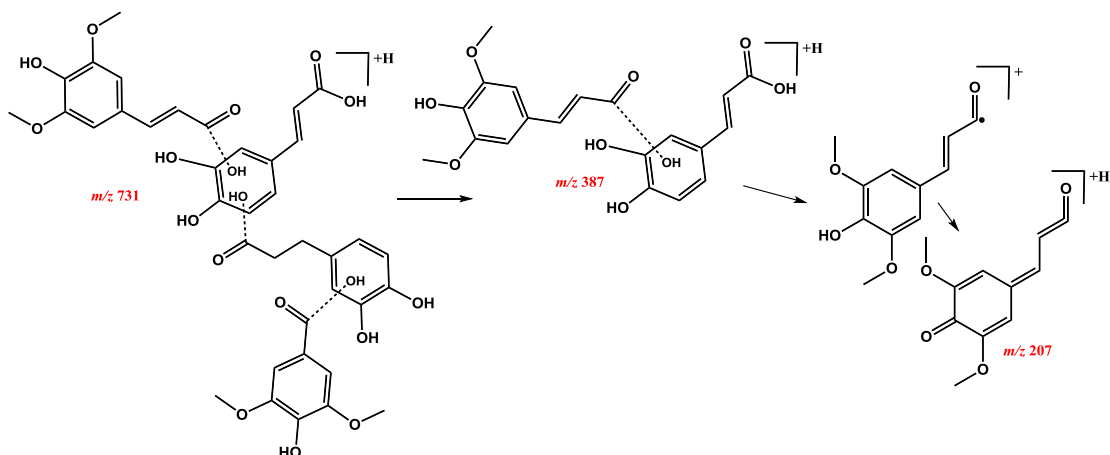
## 12.1.5. Ένωση 5: [σιναπούλο-καφεούλο-συριγγούλο]-τετραεστέρας του καφεϊκού οξέος

Χρόνος κατακράτησης: 29.90 min

Φάσμα UV-Vis: 310nm / Φάσμα μάζας:20eV,80eV



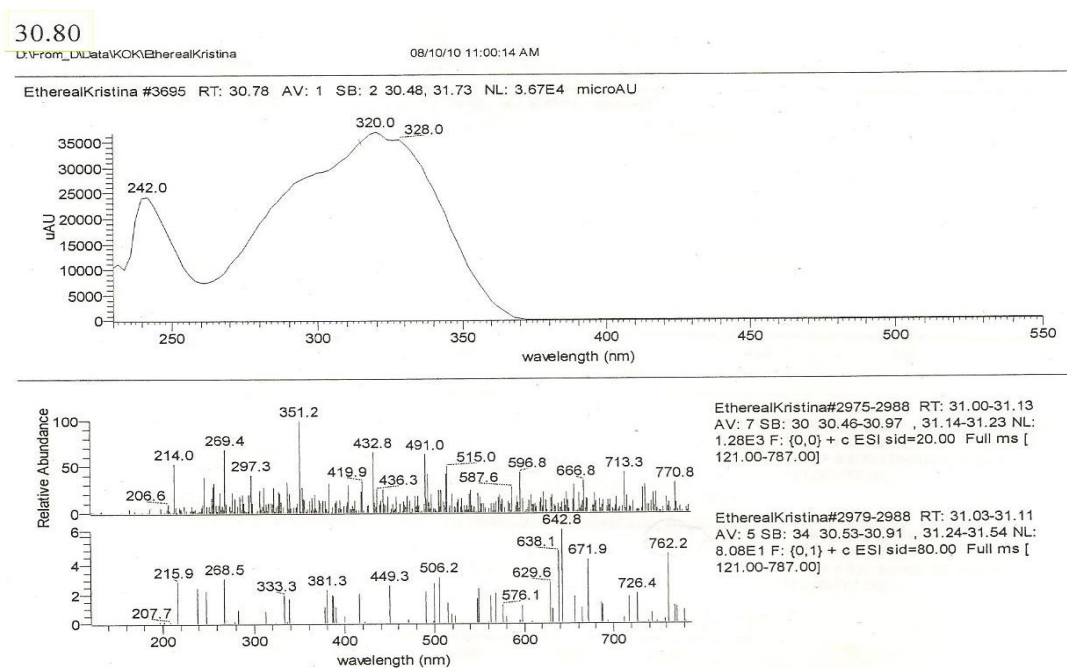
Το φάσμα απορρόφησης της ένωσης είναι χαρακτηριστικό για εστέρες υδροξυκινναμωμικών οξέων με μια κορυφή στα 310 nm (Sanchez-Rabaneda et al.,2003; Sanchez-Rabaneda et al., 2004). Λόγω της παρουσίας πληρώθας θραυσμάτων στο φάσμα μάζας ήταν αδύνατη εύρεση του μοριακού ιόντος. Το θραύσμα  $m/z$  731 το οποίο εμφανίζεται στα 80 eV πιθανών να μπορούσε να αποδωθεί σε έναν εστέρα του δεϋδροκαφεϊκού οξέος με σιναπικό οξύ, καφεϊκό οξύ και συριγγικό οξύ. Ενώ το θραύσμα  $m/z$  387 που παρατηρείται στα 20 eV θα μπορούσε να προκύψει από το θραύσμα  $m/z$  731 του δεϋδροκαφεϊκού οξέος και του συριγγικού οξέος. Το θραύσμα  $m/z$  207 αντιστοιχεί στην σιναπούλο ομάδα.



### 12.1.6. Ένωση 6: [σιναπούλο-δεϋδροσιναπούλο-δεϋδροκαφεούλο]-τριεστέρας του κινικού οξέος

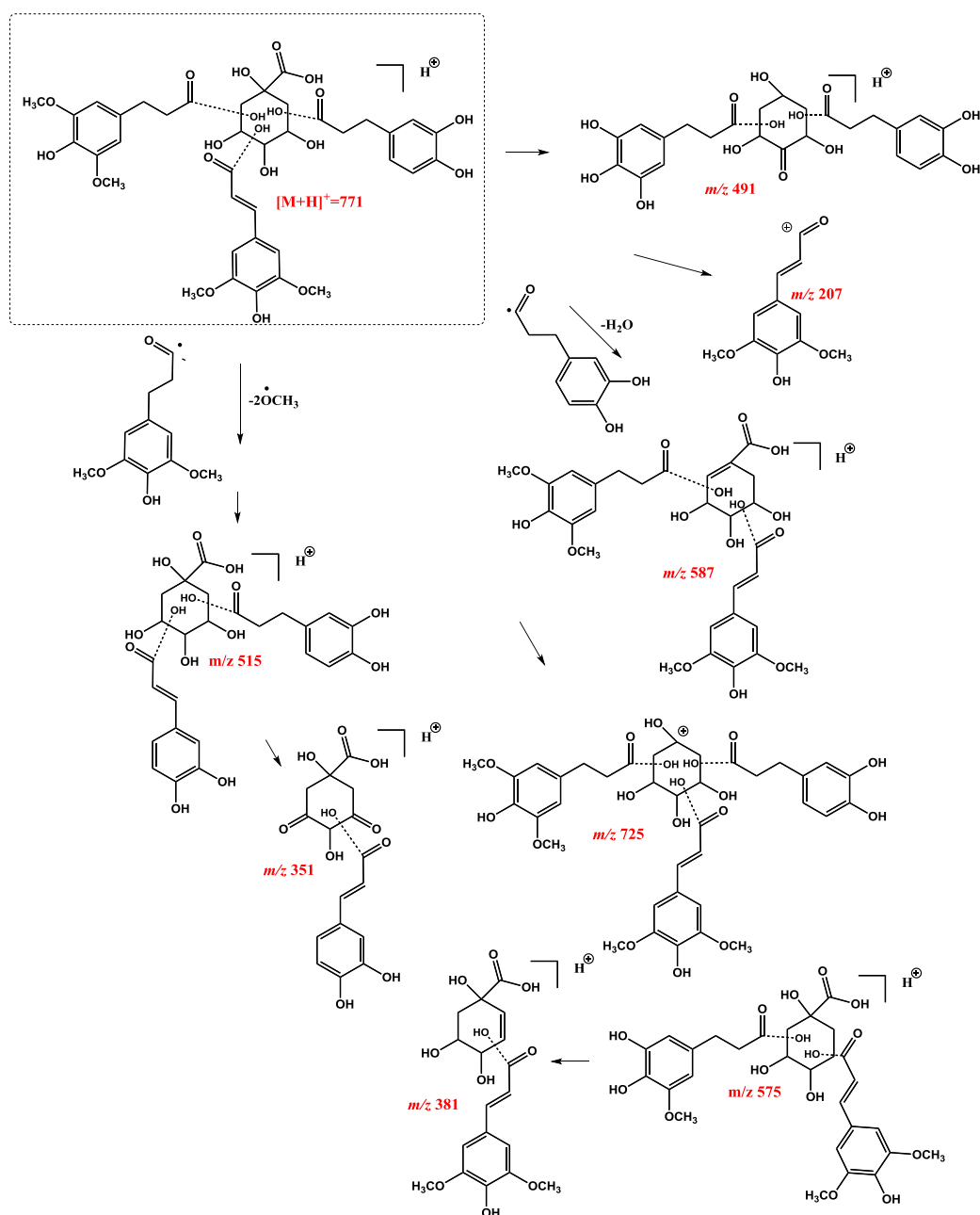
Χρόνος κατακράτησης: **30.80 min**

Φάσμα UV-Vis **240,320,328nm** / Φάσμα μάζας: 20 eV,80 eV



Το φάσμα απορρόφησης της ένωσης είναι χαρακτηριστικό για εστέρες του κινικού με υδροξυκινναμωμικά οξέα με μια κορυφή στα 242 nm μια κορυφή στα 320 nm και μια κορυφή στα 328 nm (Sanchez-Rabaneda et al.,2003; Sanchez-Rabaneda et al., 2004). Ο χρόνος κατακράτησης 30.80 min επιβεβαιώνει ότι πρόκειται για τριεστέρα του κινικού οξέος. Πρόκειται για έναν εστέρα του κινικού οξέος που φέρει μια

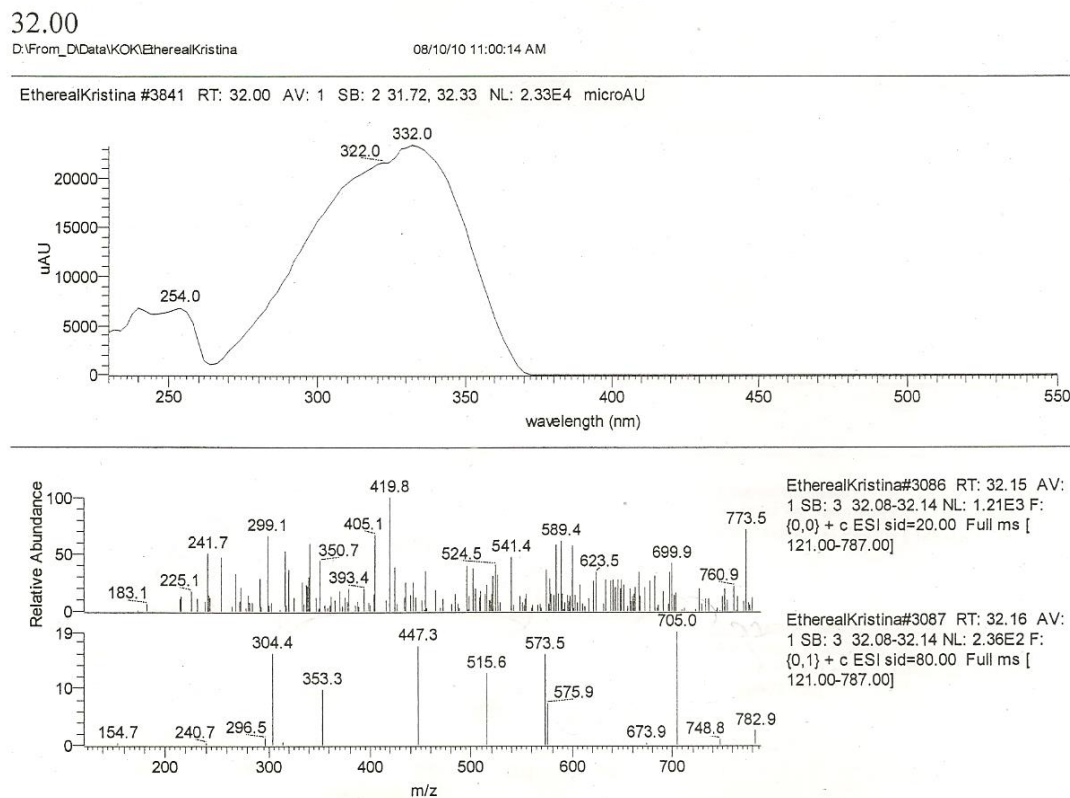
δεϋδροκαφεούλο ομάδα, μια δεϋδροσυναπόϋλο ομάδα και μια συναπόϋλο ομάδα για τις οποίες δεν μπορούν να καθοριστούν οι θέσεις σύνδεσης. Το μοριακό της ιόν είναι  $[M+H]^+$  771. Το χαρακτηριστικό θραύσμα  $m/z$  206 που προκύπτει τόσο στις χαμηλές τιμές πεδίου όσο και στις υψηλές τιμές πεδίου, αντιστοιχεί στη [συναπόϋλο ομάδα-OH] $^+$ , τα θραύσματα  $m/z$  351 και  $m/z$  515 αντιστοιχούν στον καφεϊκό εστέρα του κινικού οξέος και στον δικαφεϊκό διεστέρα του κινικού οξέος. Ακολουθεί η θραυσμάτωση τόσο στις χαμηλές τιμές πεδίου όσο και στις υψηλές τιμές πεδίου.



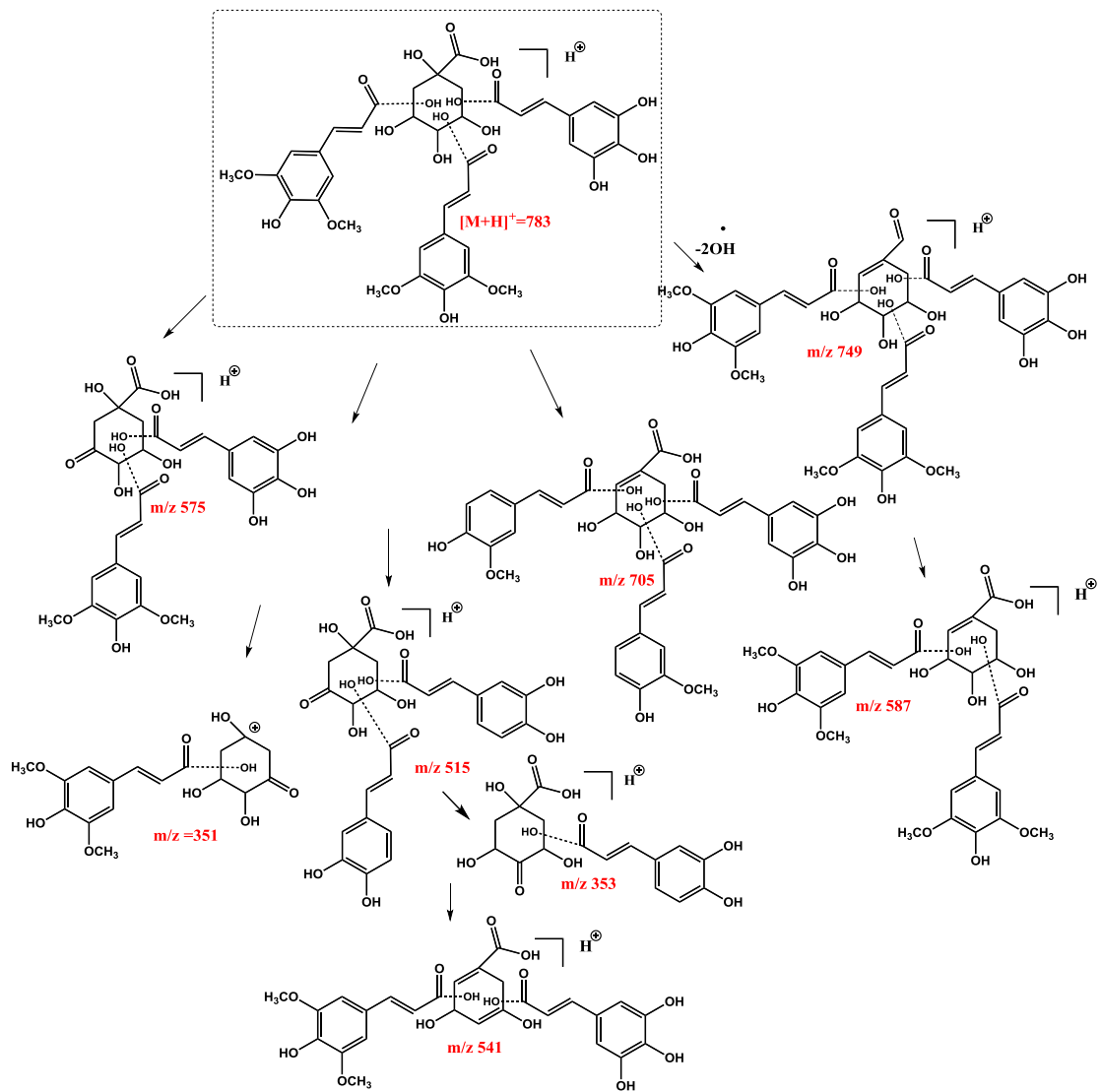
### 12.1.7. Ένωση 7: [δι-σιναπούλο-3,4,5-τριϋδροξυκινναμούλο]-τριεστέρας του κινικού οξέος

Χρόνος κατακράτησης: 32.00 min

Φάσμα UV-Vis 254,322,332nm / Φάσμα μάζας: 20eV,80eV



Το φάσμα απορρόφησης της ένωσης είναι χαρακτηριστικό για εστέρες του κινικού με υδροξυκινναμωμικά οξέα (Sanchez-Rabaneda et al.,2003; Sanchez-Rabaneda et al., 2004). Ο χρόνος κατακράτησης 32.00 min επιβεβαιώνει ότι πρόκειται για τριεστέρα του κινικού οξέος. Το μοριακό ιόν της ένωσης είναι το  $[M+H]^+ = 783$ , το οποίο εμφανίζεται στα 80 eV και είναι ένας εστέρας του κινικού οξέος εστεροποιημένος με δυο μόρια σιναπτικού οξέος και ένα μόριο τριϋδροξυκινναμωμικού οξέος. Διαγνωστικά θραύσματα αποτελούν τα  $m/z$  351 και  $m/z$  515 τα οποία αντιστοιχούν στον καφεϊκό εστέρα του κινικού οξέος και στον δικαφεϊκό διεστέρα του κινικού οξέος. Παρακάτω ακολουθεί ο μηχανισμός θραυσμάτωσης.



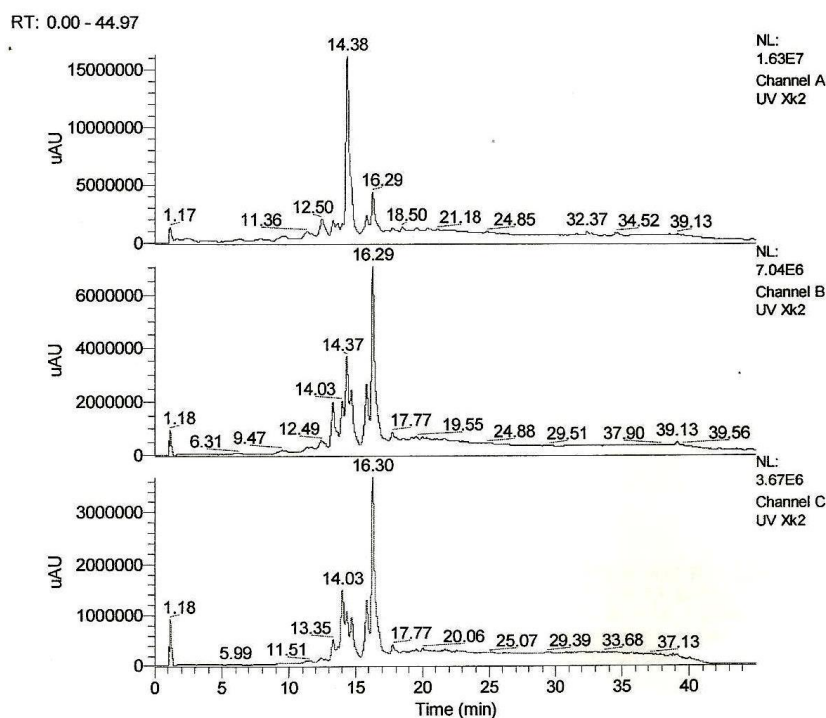


## 12.2. Εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα

Παρακάτω παρατίθεται η ανάλυση του εκχυλίσματος του οξικού αιθυλεστέρα σε τρία διαφορετικά μήκη κύματος 290, 340, 365nm. Οι δύο ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν είχαν χρόνο κατακράτησης 14,38 και 16,29 min. Ακολουθήθηκε πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης με διαλύτες AcOH 2.5%/ MeOH τα χαρακτηριστικά του οποίου φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 17. Πρόγραμμα έκλουσης εκχυλίσματος οξικού αιθυλεστέρα.

Time (min)	AcOH 2,5%	MeOH
0	90	10
2	90	10
37	100	0
42	100	0



Εικόνα 75: Χρωματογράφημα εκχυλίσματος οξικού αιθυλεστέρα

Στον παρακάτω πίνακα αναγράφονται τα μοριακά ιόντα των δυο ενώσεων,  $[M+H]^+$ , και τα αντίστοιχα θραύσματα που προκύπτουν από αυτά μαζί με τις σχετικές τους εντάσεις (R%) στις χαμηλές τιμές πεδίου των 20eV και στις υψηλές τιμές πεδίου των 80eV

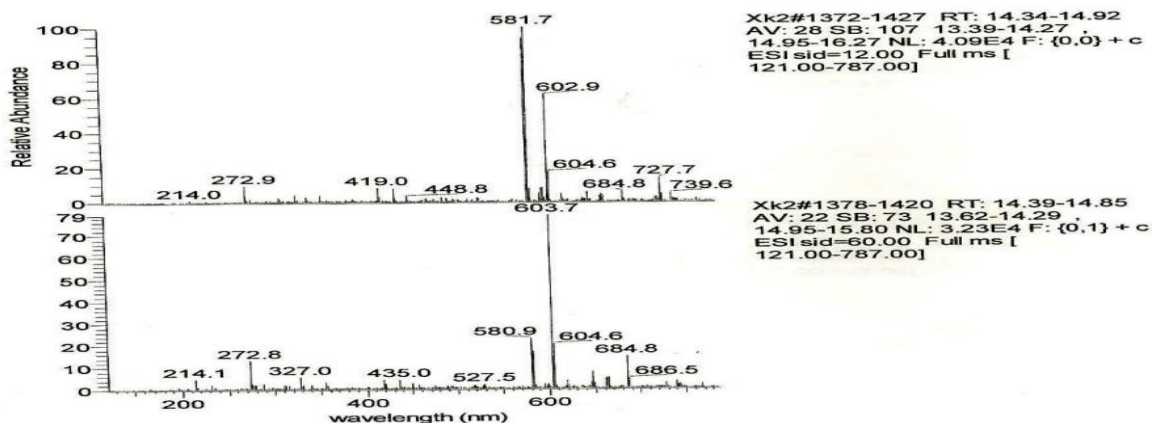
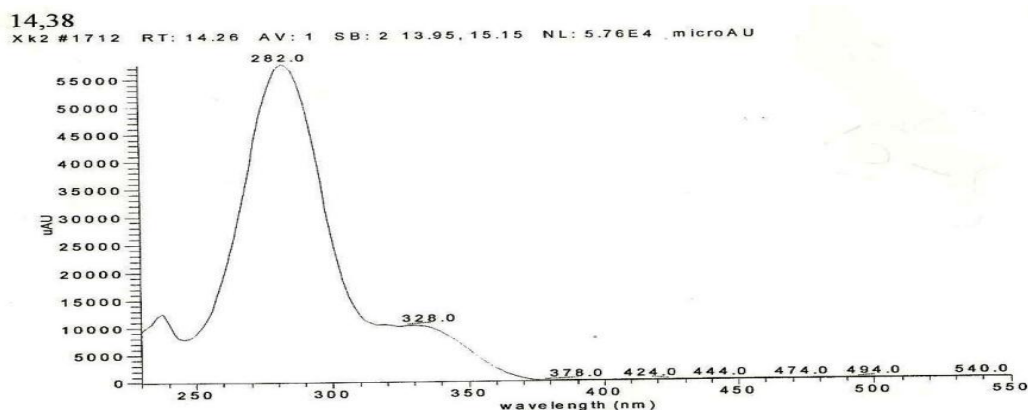
Πίνακας 18. Χρόνοι Κατακράτησης Rt (min), μοριακά ιόντα  $[M+H]^+$ , θραύσματα μάζας στα 20 και στα 80 eV με τις σχετικές εντάσεις (RI%) και τα φάσματα υπεριώδους-ορατού UV-Vis (nm) των ενώσεων που βρέθηκαν στο εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα.

Εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα					
Rt (min)	$[M+H]^+$	m/z στα 20eV (%RI)	m/z στα 80eV (%RI)	UV (nm)	Ένωση
14.38	581	728,685,604,603,582(100), 449,419,273(10),	686,685,604,603,581,527, 435,327,273,	282,328	8
16.30		683,601,579,463,327,271	683,603,579,463,327, 271,194	266,322,340	9

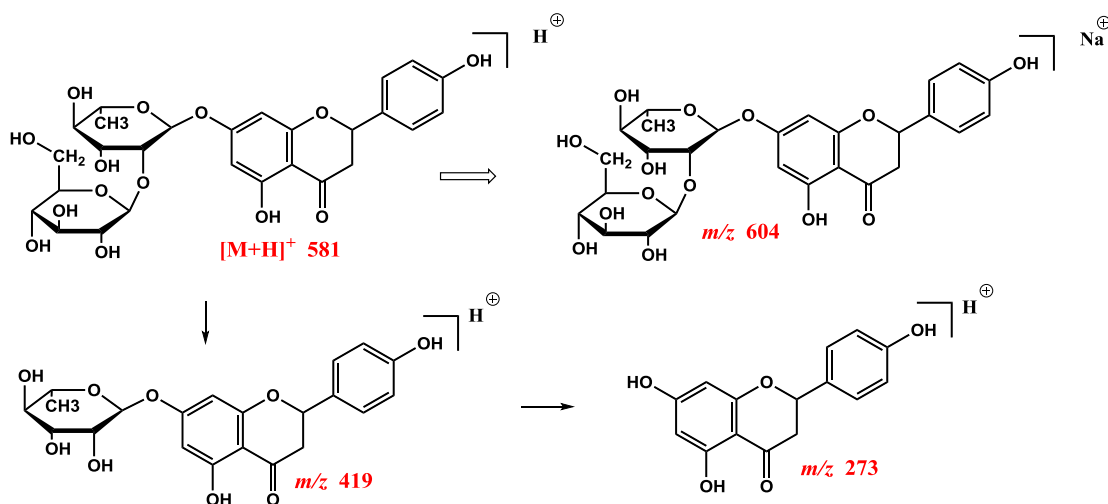
### 12.2.1. Ένωση 8: Δισακχαρίτης της Ναριγγενίνης

Χρόνος κατακράτησης: **14.38 min**

Φάσμα UV-Vis **282nm** / Φάσμα μάζας: 12eV,60eV



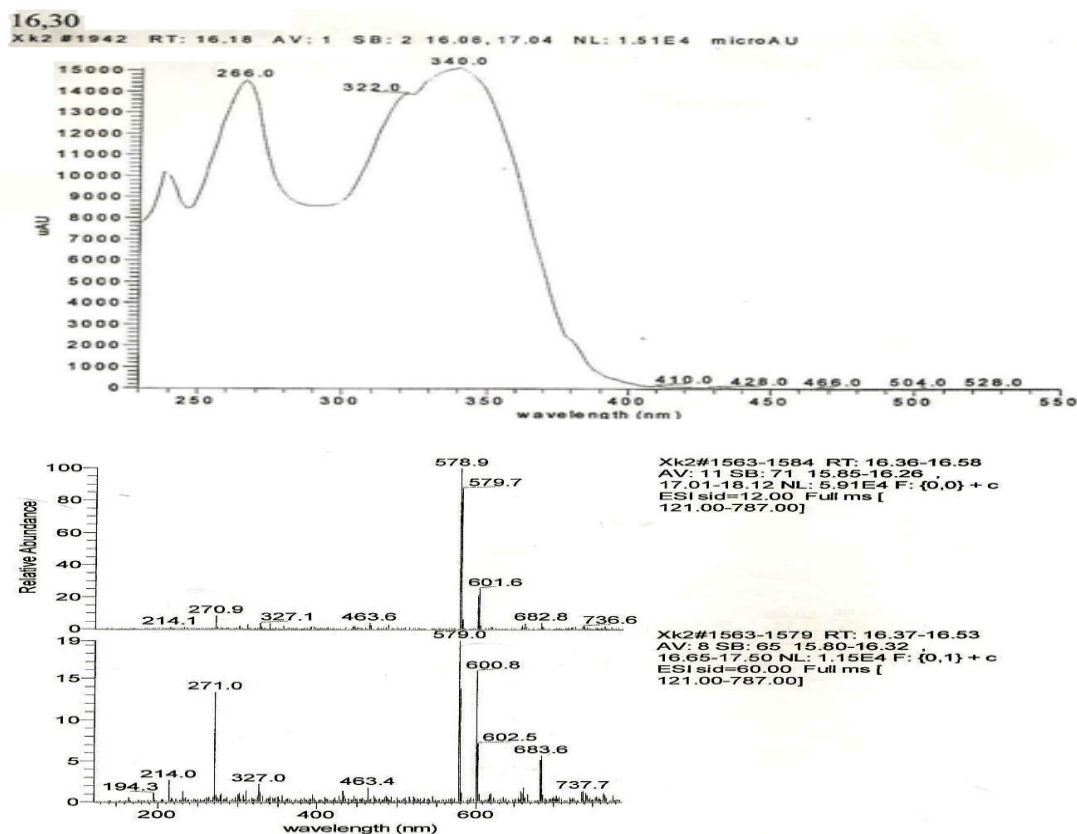
Ο χρόνος κατακράτησης της είναι 14.38 min ενώ από το φάσμα υπεριώδους ορατού φαίνεται ότι πρόκειται (Mabry et al., 1970) για χαρακτηριστικό φάσμα φλαβονόνης με απορρόφηση στα 282 nm και την εμφάνιση του χαρακτηριστικού ώμου λόγω της έλλειψης συζυγίας μεταξύ του Α και Β δακτυλίου που οφείλεται στην απουσία του διπλού δεσμού μεταξύ του άνθρακα 2 και 3. Είναι ένας δισακχαρίτης της ναριγγενίνης στον οποίο η ραμνόζη συνδέεται στη θέση 7 του Α δακτυλίου ενώ μια εξόζη συνδέεται με την ραμνόζη χωρίς να είναι δυνατόν να διευκρινιστεί η θέση σύνδεσης της εξόζης με τη ραμνόζη. Θεωρείται ότι το μοριακό ιόν είναι το θραύσμα  $[M+H]^+$  581 και ότι η εξόζη συνδέεται με τη ραμνόζη στη θέση 2. Το μοριακό ιόν το οποίο χαρακτηρίζεται και από τη μέγιστη σχετική ένταση (R%) αντιστοιχεί στο δισακχαρίτη της ναριγγενίνης. Το θραύσμα  $m/z$  603 αντιστοιχεί στον δισακχαρίτη με άλας νατρίου ενώ τα θραύσματα  $m/z$  419 και  $m/z$  273 αντιστοιχούν στον ραμνοζίτη της ναριγγενίνης και στο άγλυκο.



## 12.2.2. Ένωση 9: Δισακχαρίτης της Απιγενίνης εστεροποιημένος με φερουλικό οξύ

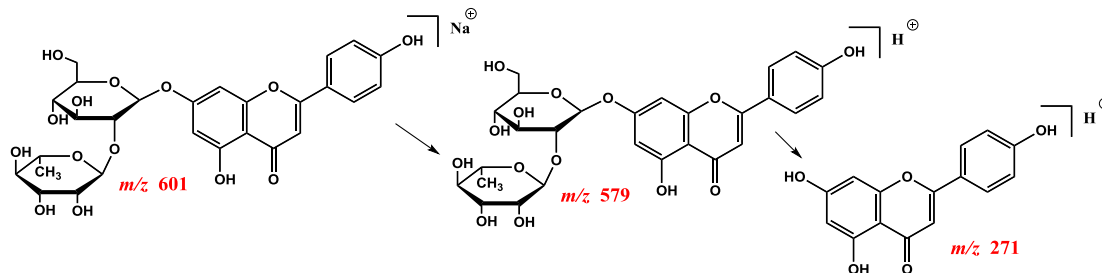
Χρόνος κατακράτησης: 16.30 min

Φασμα UV-Vis 266,322,340nm / Φάσμα μάζας: 12eV,60eV



Ο χρόνος κατακράτησης της ένωσης είναι 16.30 min ενώ από το φάσμα υπεριώδους ορατού συμπεραίνεται ότι πρόκειται για χαρακτηριστικό φάσμα φλαβόνης και συγκεκριμένα γλυκοζίτη της απιγενίνης με απορρόφηση στα 340 nm που οφείλεται στο Β δακτύλιο και την απορρόφηση στα 266 nm που οφείλεται στο βενζολικό δακτύλιο Α. Ο ώμος που διακρίνεται στα 322 nm υποδηλώνει την παρουσία φερουλικού ή ισοφερουλικού οξέος συνδεδεμένου κάπου στο μόριο. Από τα θραύσματα τα οποία σχηματίζονται τόσο στα 12 eV όσο και στα 60 eV δεν προκύπτει ξεκάθαρα ποια είναι η σειρά σύνδεσης των δύο σακχάρων. Στις υψηλές τιμές πεδίου εμφανίζεται το θραύσμα  $m/z$  194 το οποίο αντιστοιχεί στο φερουλικό ή στο ισοφερουλικό οξύ. Επειδή προκύπτουν μεγαλύτερα θραύσματα από το  $m/z$  579 που αντιστοιχεί στο δισακχαρίτη της απιγενίνης υπάρχει περίπτωση το φερουλικό οξύ να βρίσκεται συνδεδεμένο σε ένα από τα δύο σάκχαρα. Παρόλα αυτά τα θραύσματα που είναι ορατά είναι

του δισακχαρίτη  $m/z$  579 του δισακχαρίτη σταθεροποιημένο με ιοντα  $\text{Na}^+$   $m/z$  601 καθώς και το άγλυκο της απιγενίνης  $m/z$  271 το οποίο είναι παρόν και στις δύο τιμές πεδίου.



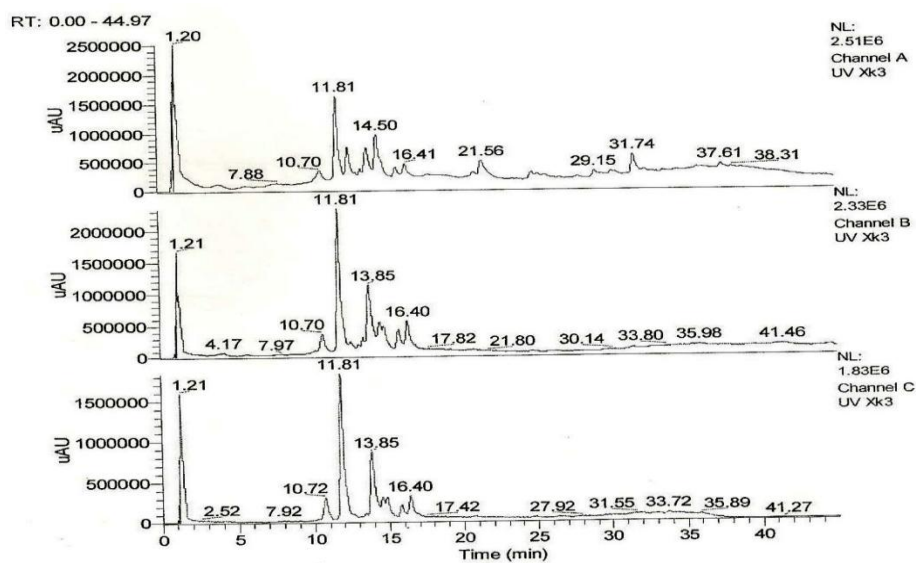
### 12.3. Εκχύλισμα Βουτανόλης

Παρακάτω παρατίθεται η ανάλυση του βουτανολικού εκχυλίσματος σε τρία διαφορετικά μήκη κύματος 290, 340, 365 nm. Οι δύο ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν είχαν χρόνο κατακράτησης 11,81 και 13,85 min.

Πίνακας 19. Πρόγραμμα έκλουσης εκχυλίσματος βουτανόλης.

Supersher 100-4, 4μl, (125x2mm) RP18 Macherey Nagel, 0.33 ml/min, 40 °C, 290, 340, 365nm. MS: 4kV, 400 °C (probe), 12 and 60 eV, 121-787 amu, 0.8 scans/sec

Time (min)	AcOH 2,5%	MeOH
0	90	10
2	90	10
37	100	0
42	100	0



Εικόνα 76: Χρωματογράφημα εκχύλισματος βουτανόλης

Στον παρακάτω πίνακα αναγράφονται τα μοριακά ιόντα των δυο ενώσεων,  $[M+H]^+$ , και τα αντίστοιχα θραύσματα που προκύπτουν από αυτά μαζί με τις σχετικές τους εντάσεις (R%) στις χαμηλές τιμές πεδίου των 20eV και στις υψηλές τιμές πεδίου των 80eV

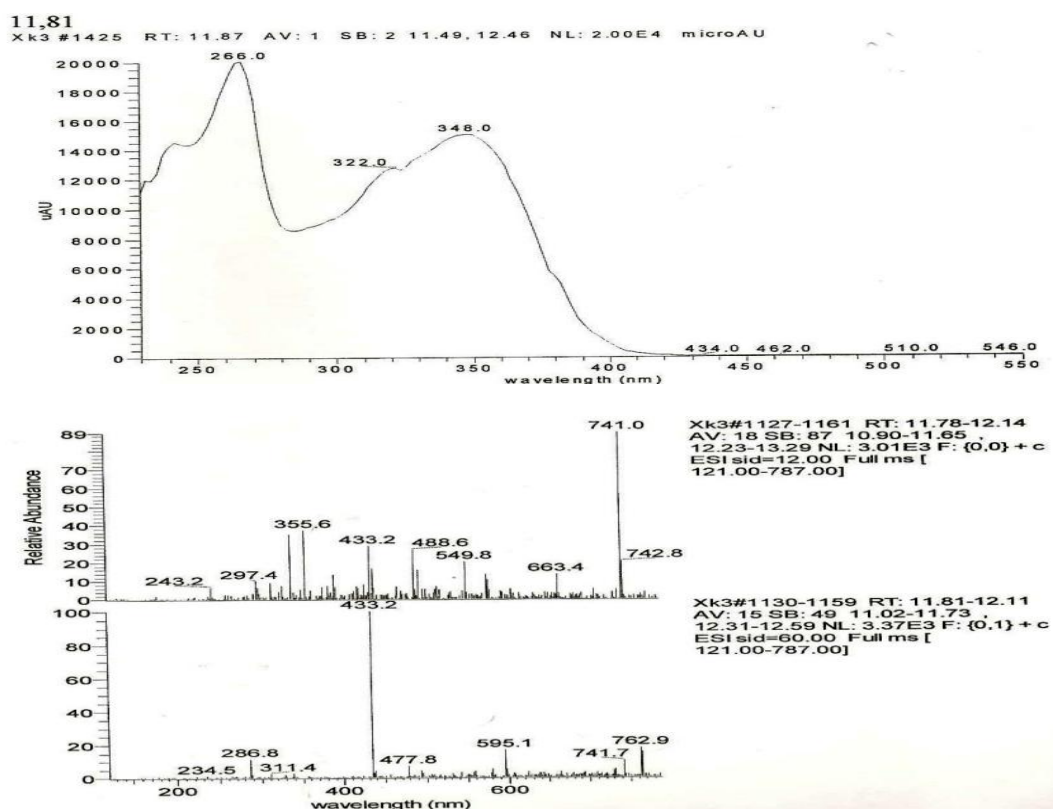
Πίνακας 20. Χρόνοι Κατακράτησης Rt (min), μοριακά ιόντα  $[M+H]^+$ , θραύσματα μάζας στα 20 και στα 80 eV με τις σχετικές εντάσεις (RI%) και τα φάσματα υπεριώδους-ορατού UV-Vis (nm) των ενώσεων που βρέθηκαν στο εκχύλισμα της βουτανόλης.

Εκχύλισμα βουτανόλης					
Rt (min)	$[M+H]^+$	<i>m/z</i> στα 20eV (%RI)	<i>m/z</i> στα 80eV (%RI)	UV (nm)	Ένωση
11.81	741	741(100),663,549,486, 433,355,297,243,	763,741,595,478,433,311, 286,234,	266,322,348	10
13.85		6,601,579,463,327,271	683,603,579,463,327, 271,194	256,284,348	11

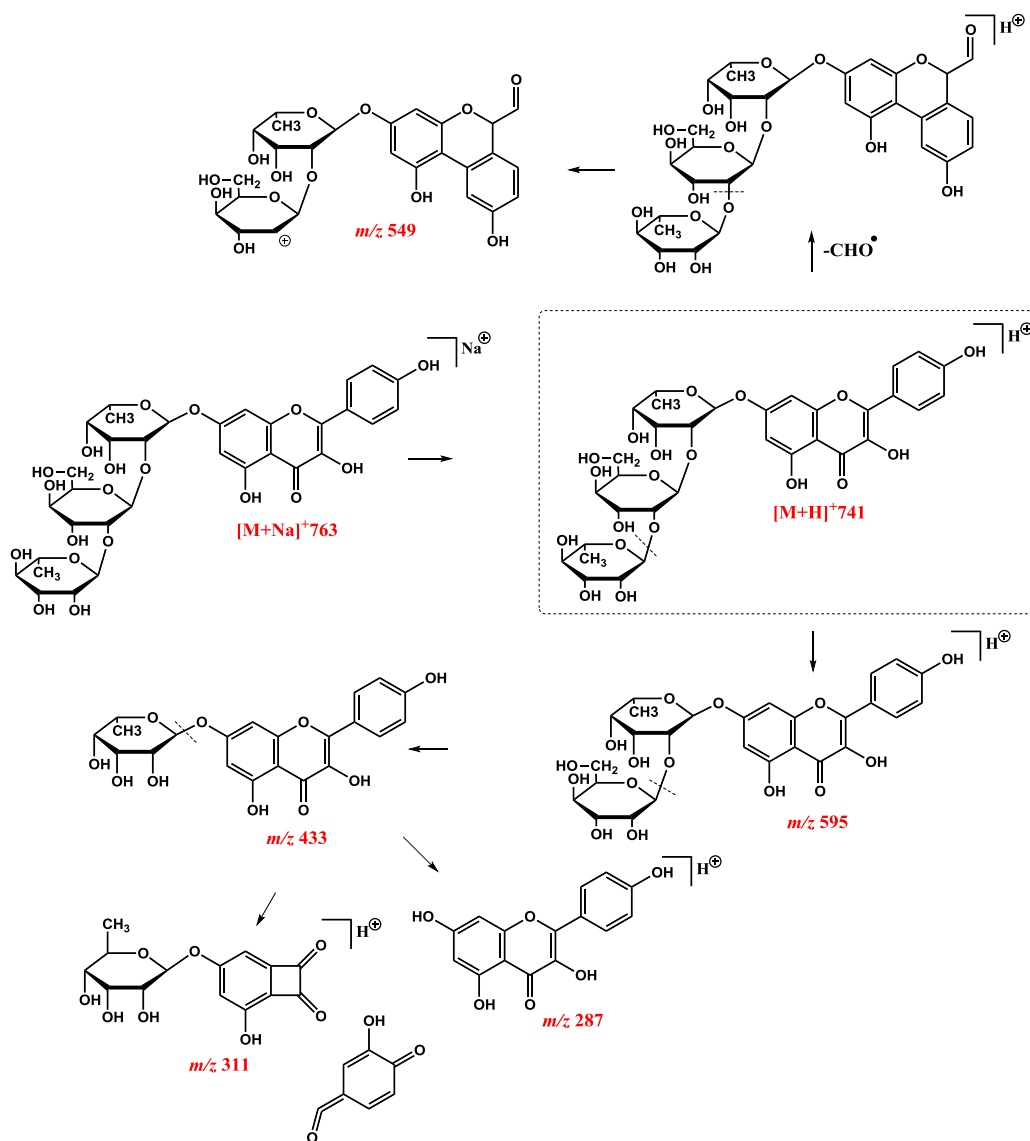
### 12.3.1. Ένωση 10: 7-O-L-ραμνοζίτης (2→1)-γλυκοζυλο (2→1)-ραμνοπυρανοζίτης της Καιμφερόλης

Χρόνος κατακράτησης: **11.81 min**

Φάσμα UV-Vis **266,322,348nm** / Φάσμα μάζας: 12eV,60eV



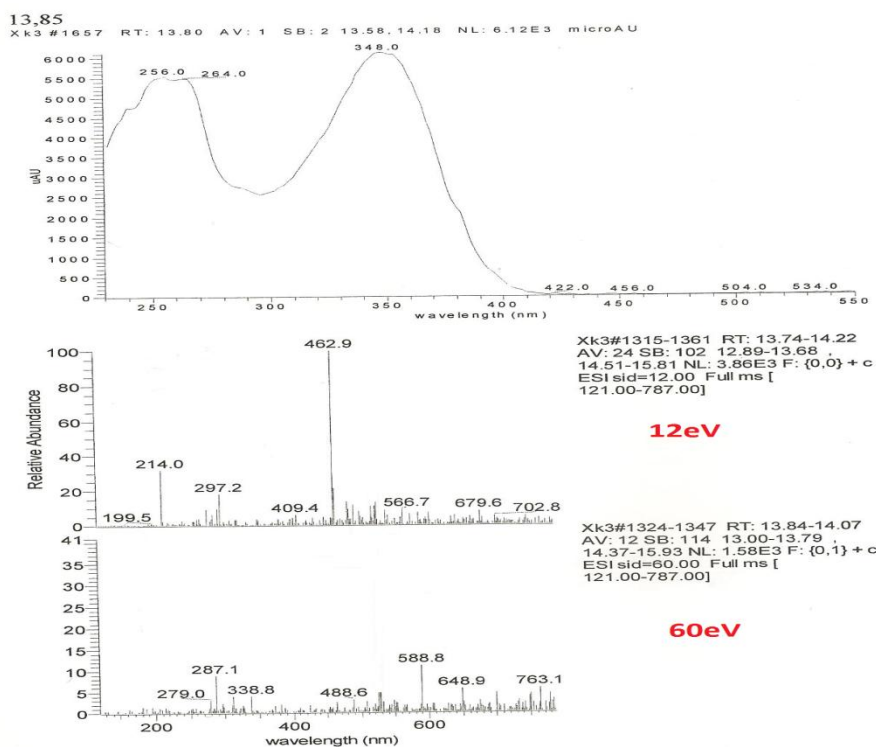
Ο χρόνος κατακράτισης της ένωσης είναι 11.81 min ενώ το φάσμα υπεριώδους ορατού είναι χαρακτηριστικό φλαβονόλης και συγκεκριμένα της καιμφερόλης. Η απορρόφηση στα 348 nm οφείλεται στο Β δακτύλιο και η απορρόφηση στα 266 nm οφείλεται στο βενζολικό δακτύλιο Α. Το μοριακό ιόν της ένωσης, το οποίο είναι ορατό σε χαμηλές τιμές πεδίου με την μέγιστη σχετική ένταση (R%) είναι το  $[M+H]^+$  741 και αντιστοιχεί σε τρισακχαρίτη της καιμφερόλης όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα. Το θραύσμα  $m/z$  763 το οποίο παρατηρείται σε υψηλές τιμές πεδίου αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν σταθεροποιημένο με ιόν νατρίου. Τα θραύσματα  $m/z$  595 και  $m/z$  433 και  $m/z$  286 αντιστοιχούν στην απόσπαση της γλυκόζης, της ραμνόζης και εν τέλει της ραμνόζης συνδεδεμένης στη θέση 7.



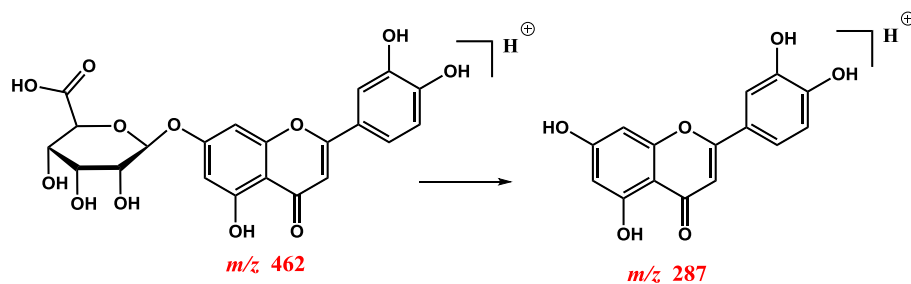
### 12.3.2. Ένωση 11: Παραγωγο σακχαρίτη της Λουτεολίνης

Χρόνος κατακράτησης: **13.85 min**

Φάσμα UV-Vis: **256,264,348nm** / Φάσμα μάζας: **12eV,60eV**



Ο χρόνος κατακράτησης της ένωσης είναι 13.85 min ενώ το φάσμα υπεριώδους ορατού είναι χαρακτηριστικό φλαβονόλης και συγκεκριμένα της λουτεολίνης. Η απορρόφηση στα 348 nm οφείλεται στο Β δακτύλιο ενώ οι δύο μικρές απορροφήσεις στα 256 nm και στα 264 nm που οφείλονται στο βενζολικό δακτύλιο Α είναι χαρακτηριστικές της λουτεολίνης. Από τα θραύσματα στις υψηλές τιμές πεδίου διακρίνεται το  $m/z$  287 το οποίο αντιστοιχεί στο άγλυκο της λουτεολίνης. Το θραύσμα  $m/z$  462 αντιστοιχεί στο γλουκουρονίδιο της λουτεολίνης.



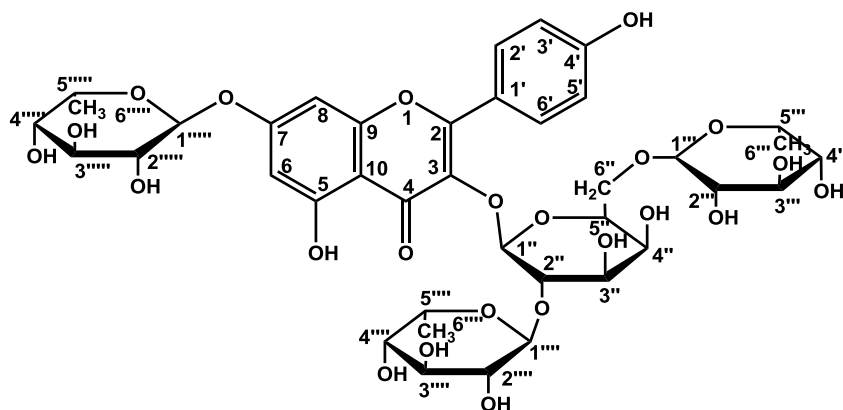




## 13. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΑΠΟΜΩΜΕΝΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

### 13.1 Εκχύλισμα βουτανόλης

#### 13.1.1. Ένωση X1A: 3-*O*- $\alpha$ -L- ραμνοπυρανοζυλο (1''' $\rightarrow$ 2'') [ $\alpha$ -L-ραμνοπυρανοζυλο(1''' $\rightarrow$ 6''')]- $\beta$ -D-γαλακτοπυρανοζυλο-7-*O*- $\alpha$ -L-ραμνοπυρανοζιτης της καιμφερόλης



Πρόκειται για ένωση χρώματος πορτοκαλί ενώ τα συστήματα που χρησιμοποιήθηκαν στην χρωματογραφία λεπτής σιβάδας ήταν το CAW: Rf=0.26, AcOH 10% : Rf= 0.76, EAW=0.13.

#### Φάσμα υπεριώδους-ορατού

Κατά τη φασματοφωτομετρική εξέταση της ουσίας ελήφθησαν χαρακτηριστικές καμπύλες με τα ακόλουθα μέγιστα (nm).

Πίνακας 21: Φάσματα υπεριώδους ορατού ένωσης X1A

	Κορυφή II		Κορυφή I		$\Delta\lambda$ I
MeOH	244.5	266.0	318.0	348.5	
MeONa	243.0	273.0 ( $\Delta\lambda$ =+7.0)	337.5	384.0	+35.5
AlCl <sub>3</sub>		273.5 ( $\Delta\lambda$ =+7.5)	300.5	357.0	+49.0
AlCl <sub>3</sub> /HCl		274.5 ( $\Delta\lambda$ =+8.5)	298.0	348.0	+47.0
AcONa		265.0 ( $\Delta\lambda$ =-1.0)		390.5	+42.0
AcONa/H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>		265.5 ( $\Delta\lambda$ =-0.5)	321.0	352.5	+4.0

Η μέγιστη απορρόφηση (κορυφή I) της ένωσης σε MeOH στα 348.5 nm δείχνει ότι πρόκειται για φλαβονόλη με υποκατεστημένο το υδροξύλιο της θέσης 3. Σ'αυτό συνηγορεί και το φάσμα πρωτονίου <sup>1</sup>H-NMR όπου παρατηρείται απουσία πρωτονίου της θέσης 3. Η βαθυχρωμική μετατόπιση της κορυφής I κατά 35.5 nm, σε σχέση με την αντίστοιχη σε MeOH που παρατηρείται αμέσως μετά την προσθήκη MeONa με αύξηση της έντασης αποδεικνύει ότι το

υδροξύλιο της θέσης 4' είναι ελεύθερο. Η προσθήκη  $AlCl_3$  στο μεθανολικό διάλυμα του φλαβονοειδούς προκαλεί μια βαθυχρωμική μετατόπιση της κορυφής I κατά 49.0 nm η οποία παραμένει μετά την προσθήκη HCl και δηλώνει ελεύθερο 5-OH και απουσία όρθο-υδροξυ συστήματος στον A ή στον B δακτύλιο. Το φάσμα που λήφθηκε μετά από την προσθήκη AcONa στο μεθανολικό διάλυμα της ουσίας χαρακτηρίζεται από απουσία βαθυχρωμικής μετατόπισης της κορυφής II σε σχέση με την αντίστοιχη σε MeOH, γεγονός που δείχνει ότι το 7-OH είναι δεσμευμένο. Η απουσία βαθυχρωμικής μετατόπισης της κορυφής I μετά από προσθήκη  $H_3BO_3$  στο διάλυμα του AcONa σε σχέση με την αντίστοιχη σε MeOH επιβεβαιώνει τη μη ύπαρξη ορθο-υδροξυ-συστήματος στον A ή τον B δακτύλιο (Mabry et al., 1970).

Πίνακας 22: Φάσμα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ένωσης X1A

$^1H$ -NMR ( $CD_3OD$ , 500 MHz) και $^{13}C$ -NMR* (*από HSQC και HMBC)				
Ταυτοποίηση	$\delta_H$ (ppm)	$J_{HH}$ (Hz)	Ταυτοποίηση	$\delta_C$ (ppm)
H-2' και H-6'	8.09 (d)	9.0	C-2', C-6'	130.86
H-3' και H-5'	6.91 (d)	9.0	C-3', C-5'	114.84
H-8	6.73 (d)	2.1	C-8	94.21
H-6	6.46 (d)	2.1	C-6	99.03
			C-2	157.72
			C-3	133.36
			C-5	161.72
			C-7	161.98
			C-9	156.42
			C-10	106.05
<b>3-Ο-Γαλακτόζη</b>			<b>3-Ο-Γαλακτόζη</b>	
H-1''	5.62 (d)	8.0	C-1''	99.38
H-2''	3.93 (dd)	9.5, 8.0	C-2''	76.20
H-3''	3.70 (dd)	9.5, 3.5	C-3''	74.22
H-4''	3.78 (m)		C-4''	69.12
H-5''	3.63 (m)		C-5''	74.08
H-6''	3.71 (m)		C-6''	65.84
	3.45 (m)			
<b>6''-Ο-Ραμνόζη</b>			<b>6''-Ο-Ραμνόζη</b>	
H-1'''	4.51 (d)	1.5	C-1'''	100.20
H-2'''	3.53 (dd)	2.0, 3.5	C-2'''	70.61
H-3'''	3.48 (m)		C-3'''	70.76
H-4'''	3.25 (t)	9.5	C-4'''	72.25
H-5'''	3.51 (m)		C-5'''	68.15
H-6'''	1.16 (d)	6.5	C-6'''	16.48
<b>2''-Ο-Ραμνόζη</b>			<b>2''-Ο-Ραμνόζη</b>	
H-1''''	5.21 (d)	1.5	C-1''''	101.16

H-2 <sup>'''</sup>	4.0 (dd)	1.8, 3.0	C-2 <sup>'''</sup>	70.95
H-3 <sup>'''</sup>	3.78 (m)		C-3 <sup>'''</sup>	70.75
H-4 <sup>'''</sup>	3.34 (t)	9.5	C-4 <sup>'''</sup>	72.59
H-5 <sup>'''</sup>	4.06 (dd)	6.5, 9.5	C-5 <sup>'''</sup>	68.30
H-6 <sup>'''</sup>	0.97 (d)	6.5	C-6 <sup>'''</sup>	16.10
7-ΟΡαμνόζη			7-ΟΡαμνόζη	
H-1 <sup>''''</sup>	5.56 (d)	1.5	C-1 <sup>''''</sup>	98.37
H-2 <sup>''''</sup>	4.02 (dd)	1.5, 3.0	C-2 <sup>''''</sup>	70.13
H-3 <sup>''''</sup>	3.82 (m)		C-3 <sup>''''</sup>	70.61
H-4 <sup>''''</sup>	3.47 (m)		C-4 <sup>''''</sup>	72.10
H-5 <sup>''''</sup>	3.60 (m)		C-5 <sup>''''</sup>	69.79
H-6 <sup>''''</sup>	1.26 (d)	6.0	C-6 <sup>''''</sup>	16.67

Η μελέτη του φάσματος <sup>1</sup>H-NMR έδειξε ότι πρόκειται για γλυκοσυλιωμένη φλαβονόλη, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τα δισδιάστατα φάσματα NMR της ένωσης.

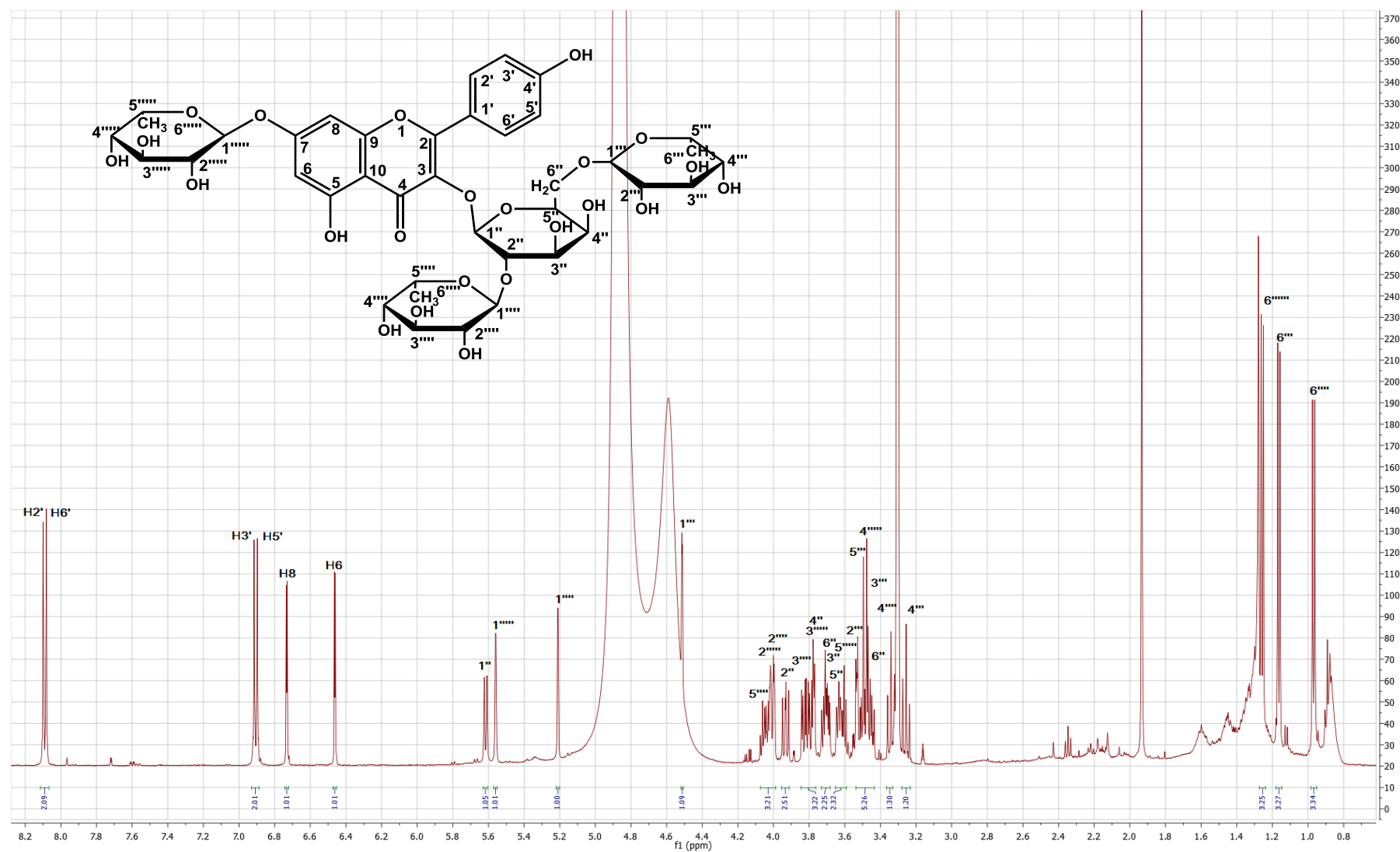
Στην αρωματική περιοχή του φάσματος <sup>1</sup>H NMR παρατηρείται η παρουσία συστήματος AA'BB'. Έτσι τα πρωτόνια H-2' και H-6' εμφανίζονται ως μια διπλή κορυφή σε δ<sub>H</sub> 8.09 με σταθερά σύζευξης  $J = 9.0$  Hz, ενώ τα H-3' και H-5' εμφανίζονται ως μια διπλή κορυφή σε δ<sub>H</sub> 6.91, με σταθερά σύζευξης  $J = 9.0$  Hz. Παρατηρούνται ακόμα στην αρωματική περιοχή δυο διπλές κορυφές συζεύγνυται σε δ<sub>H</sub> 6.73 ( $J = 2.1$  Hz) και δ<sub>H</sub> 6.46 ( $J = 2.1$  Hz) που συζεύγνυται μεταξύ τους υποδηλώνοντας *μετα* σύζευξη των πρωτονίων H-8 και H-6 αντίστοιχα. Οι κορυφές των πρωτονίων H-8 και H-6 είναι ελαφρώς αποθωρακισμένες και σε χαμηλότερες τιμές πεδίου σε σχέση με το άγλυκο της καιμφερόλης και αυτό υποδηλώνει την παρουσία σακχάρου στη θέση 7 (Mabry et al., 1970).

Στην περιοχή των σακχάρων εμφανίζονται τέσσερα ανωμερικά πρωτόνια σακχάρων (μια γαλακτόζη και τρεις ραμνόζες). Η παρουσία της β – γαλακτόζης επιβεβαιώνεται από το ανωμερικό πρωτόνιο σε δ<sub>H</sub> 5.62 ppm με σταθερά σύζευξης  $J = 8.0$  Hz, όσο και από το μέγεθος της σταθεράς σύζευξης του πρωτονίου H-3'' όπου φαίνεται να εμφανίζει την axial-equatorial σύζευξη  $J = 3.5$  Hz με το πρωτόνιο H-4'' και μια axial-axial σύζευξη με το πρωτόνιο H-2'' με  $J = 9.5$  Hz. Μεταξύ δ<sub>H</sub> 4.09 ppm και δ<sub>H</sub> 3.22 ppm εμφανίζονται τα υπόλοιπα πρωτόνια των σακχάρων. Τα πρωτόνια του μεθυλίου της ραμνόζης που συνδέεται στον άνθρακα 7 του φλαβονοειδούς εμφανίζονται σε δ<sub>H</sub> 1.26, σαν διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης  $J = 6.0$  Hz. Τα πρωτόνια του μεθυλίου της ραμνόζης το οποίο συνδέεται στη θέση 6 της γαλακτόζης εμφανίζονται στα δ<sub>H</sub> 1.16 σαν διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης  $J = 6.5$  Hz, ενώ τα πρωτόνια του μεθυλίου της ραμνόζης η οποία συνδέεται στη θέση 2 της γαλακτόζης εμφανίζονται στα δ<sub>H</sub> 0.97 σαν διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης  $J = 6.5$  Hz. Στον πίνακα 22

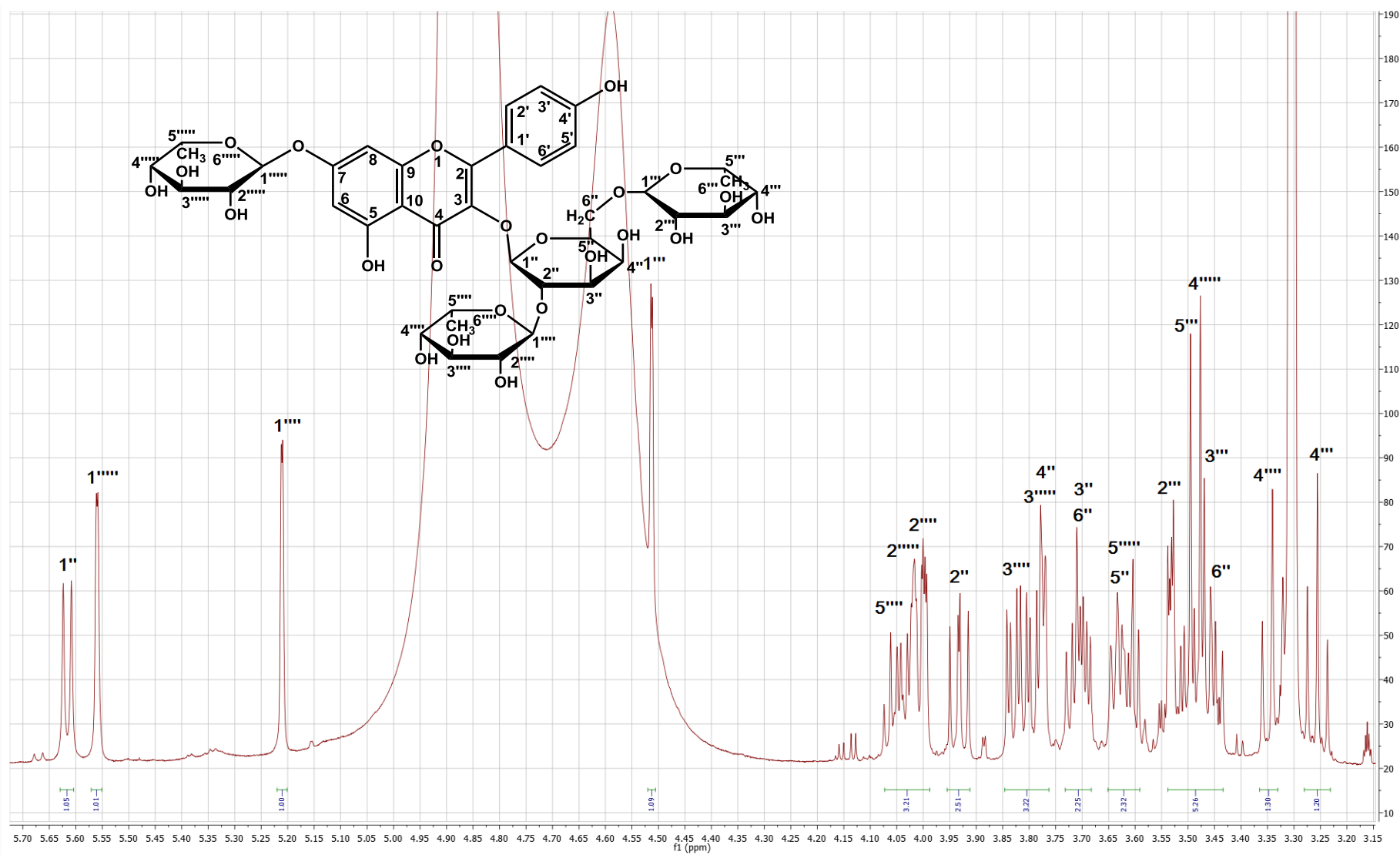
φαίνονται οι χημικές μετατοπίσεις και οι σταθερές σύζευξης των λοιπών πρωτονίων των δύο σακχάρων, όπως προκύπτουν από το φάσμα  $^1\text{H}$  NMR και τα δισδιάστατα φάσματα. Η ραμνόζη με ανωμερικό σε  $\delta_{\text{H}}$  5.56 είναι συνδεδεμένη στη θέση 7 του φλαβονοειδούς, όπως φαίνεται από το φάσμα HMBC, όπου το ανωμερικό πρωτόνιο H-1<sup>''''</sup> έχει ένα κοινό σήμα με τα πρωτόνια H-8 και H-6 του φλαβονοειδούς με τον άνθρακα σε  $\delta_{\text{C}}$  161.98 (άνθρακας C-7). Το ανωμερικό 1<sup>''</sup> της γαλακτόζης εμφανίζεται σε  $\delta_{\text{H}}$  5.62 και συνδέεται με τον άνθρακα C-3 του δακτυλίου C όπως φαίνεται από ασθενές σήμα που παρατηρείται στο HMBC με τον άνθρακα σε  $\delta_{\text{C}}$  133.36 που αντιστοιχεί στον άνθρακα C-3. Η ραμνόζη με ανωμερικό σε  $\delta_{\text{H}}$  5.21, συνδέεται με τον άνθρακα 2<sup>''</sup> της γαλακτόζης όπως φαίνεται από τη σύζευξη των πρωτονίων H-1<sup>''''</sup>, H-3<sup>''</sup> και H-4<sup>''</sup> με τον άνθρακα C-2<sup>''</sup> που παρατηρείται σε  $\delta_{\text{H}}$  76.20 από τα H-1<sup>''''</sup>, H-3<sup>''</sup> και H-4<sup>''</sup>. Η ραμνόζη με ανωμερικό σε  $\delta_{\text{H}}$  4.21 συνδέεται στη θέση 6<sup>''</sup> της γαλακτόζης όπως προκύπτει από το φάσμα HMBC όπου το ανωμερικό 1<sup>''''</sup> δίνει σήμα με τον άνθρακα 6<sup>''</sup> της γαλακτόζης σε  $\delta_{\text{C}}$  65.84.

Τα παραπάνω δεδομένα αλλά και η σύγκριση με τη βιβλιογραφία (Kite GC et al., 2007) επιβεβαιώνουν ότι πρόκειται για την ένωση 3-*O*- $\alpha$ -L- ραμνοπυρανοζυλο (1<sup>''''</sup> $\rightarrow$ 2<sup>''</sup>)[ $\alpha$ -L- ραμνοπυρανοζυλο(1<sup>''''</sup> $\rightarrow$ 6<sup>''</sup>)]- $\beta$ -D-γαλακτοπυρανοζυλο-7-*O*- $\alpha$ -ραμνοπυρανοζίτης της Καιμφερόλης. Η ένωση έχει απομονωθεί πρώτη φορά από τα φύλλα του *Styphnolobium japonicum* (*Leguminosae*) (Kite et al., 2007) και είναι η πρώτη φορά που απομονώνεται από το γένος *Indigofera*.

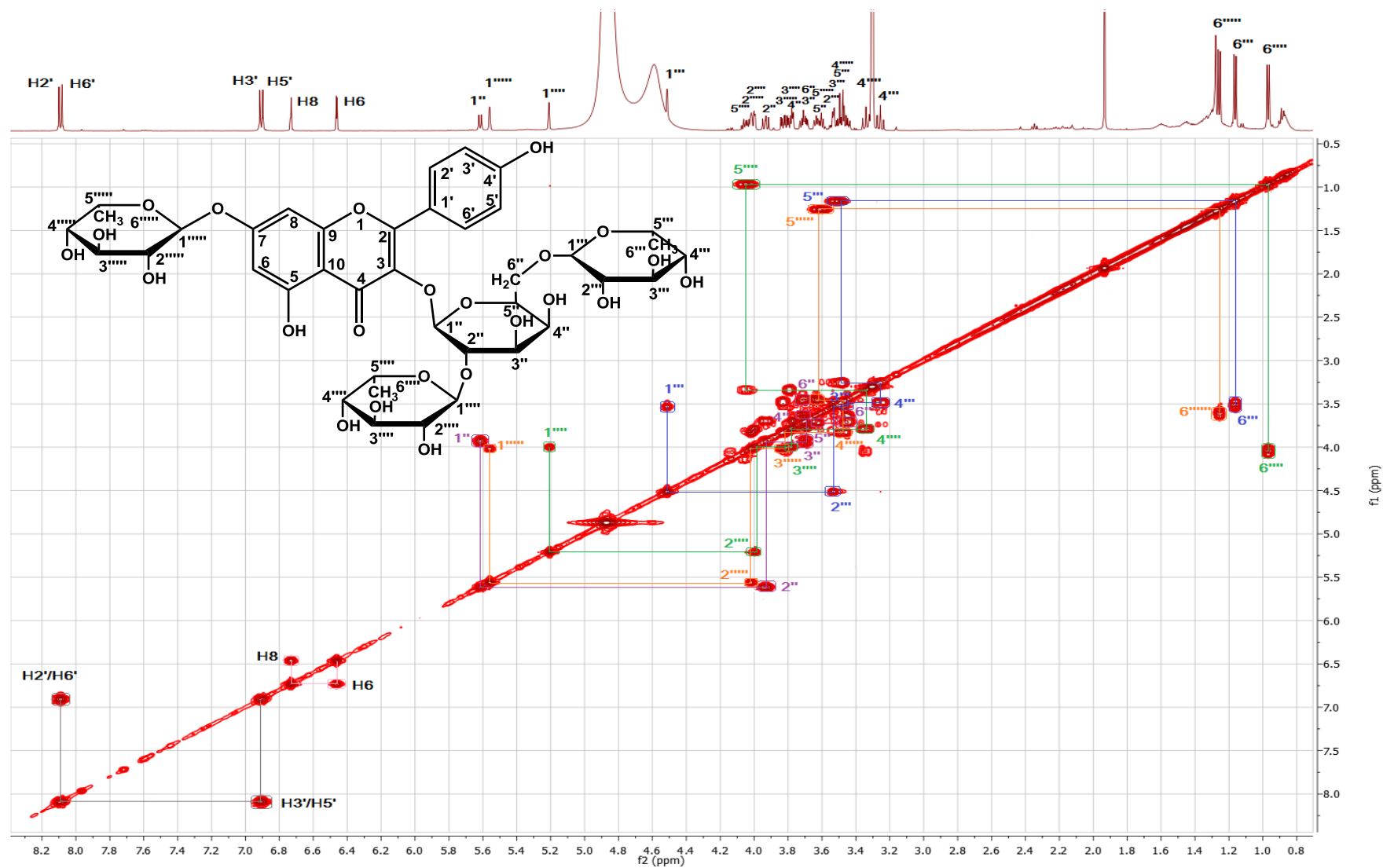
Φάσμα  $^1\text{H}$ -NMR της ένωσης X1A ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz)



Φάσμα  $^1\text{H}$ -NMR της ένωσης X1A ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) στην περιοχή των σακχάρων

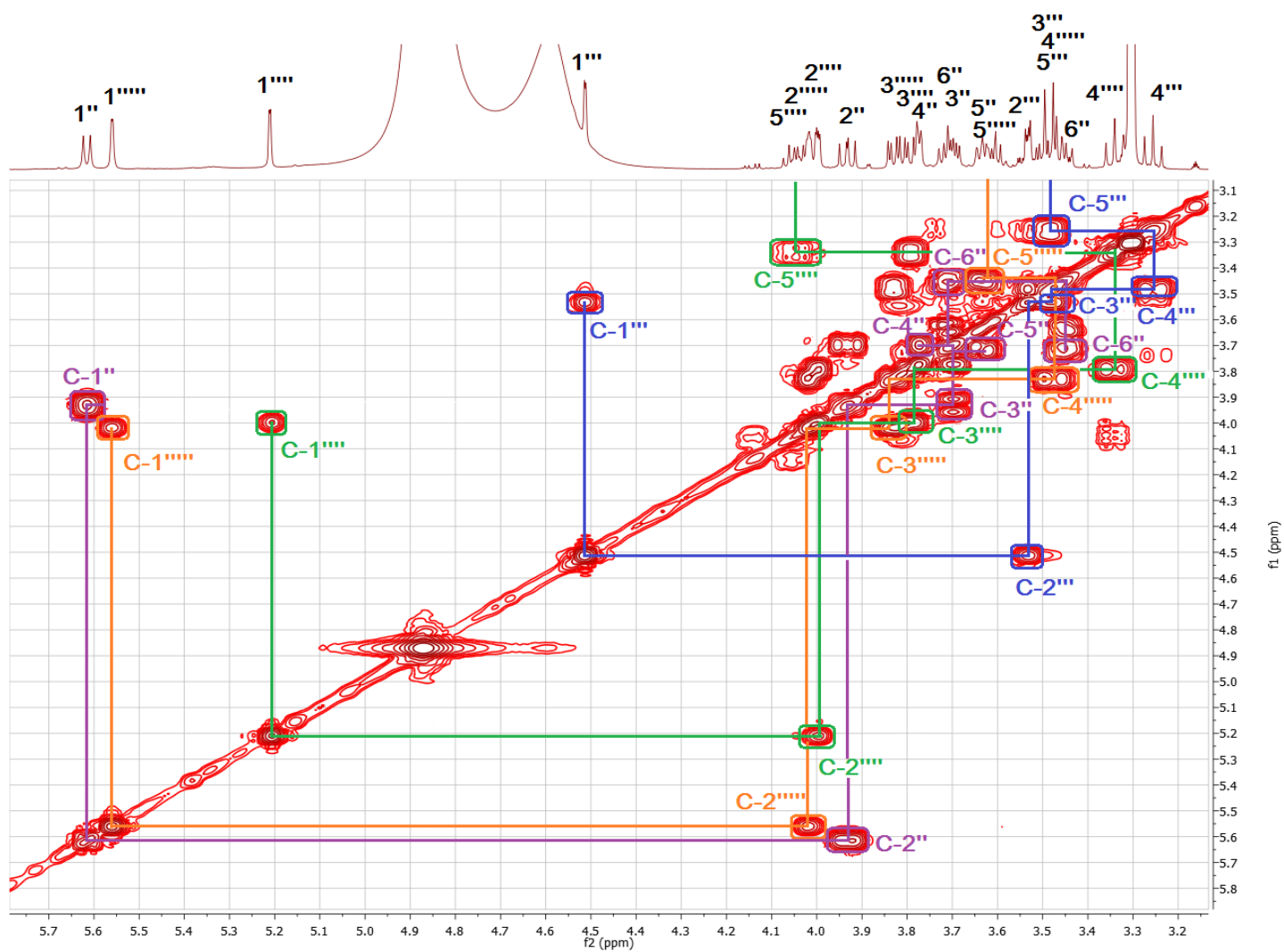


Φάσμα  $^1\text{H}$ -  $^1\text{H}$  COSY της ένωσης X1A ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz)

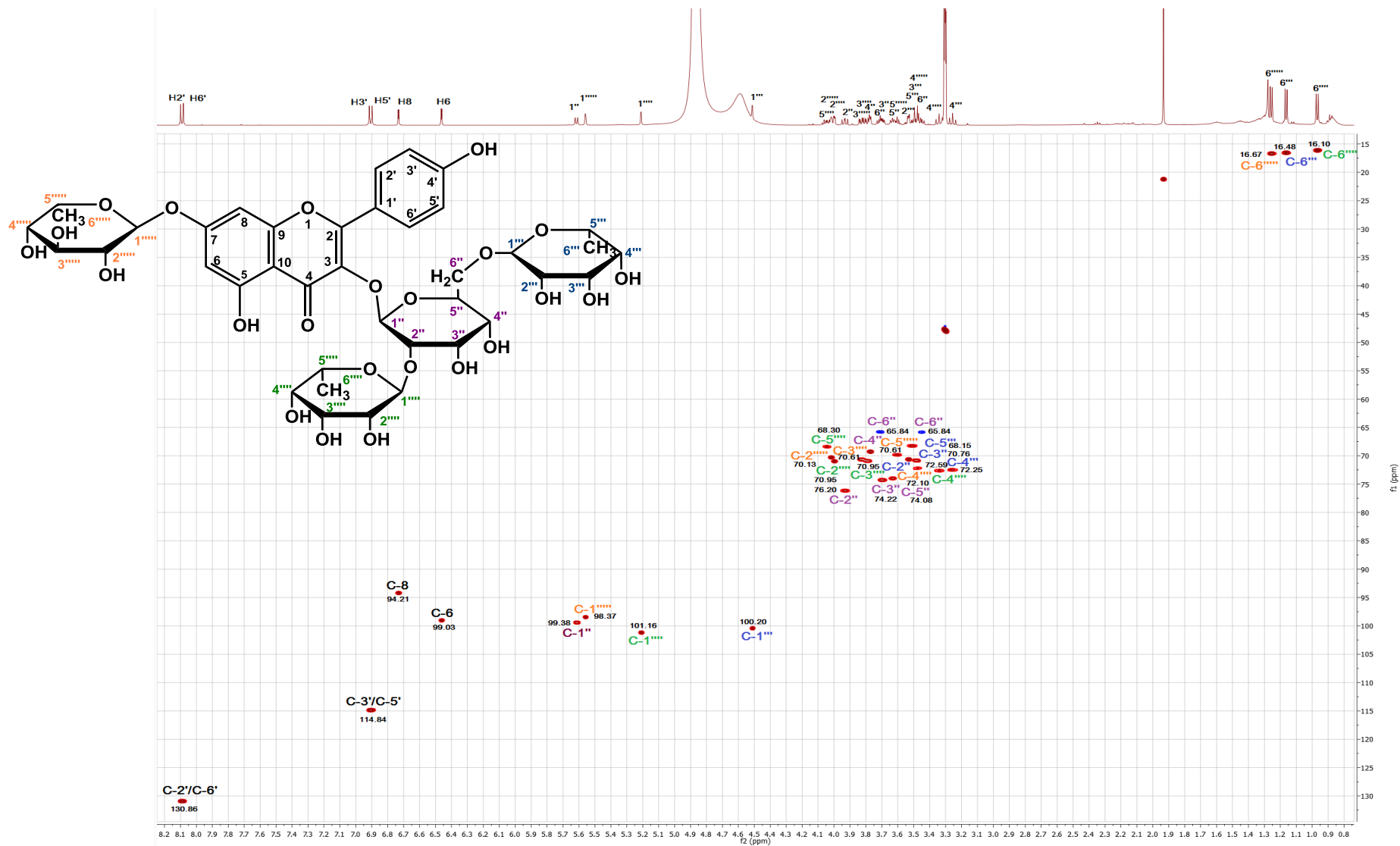




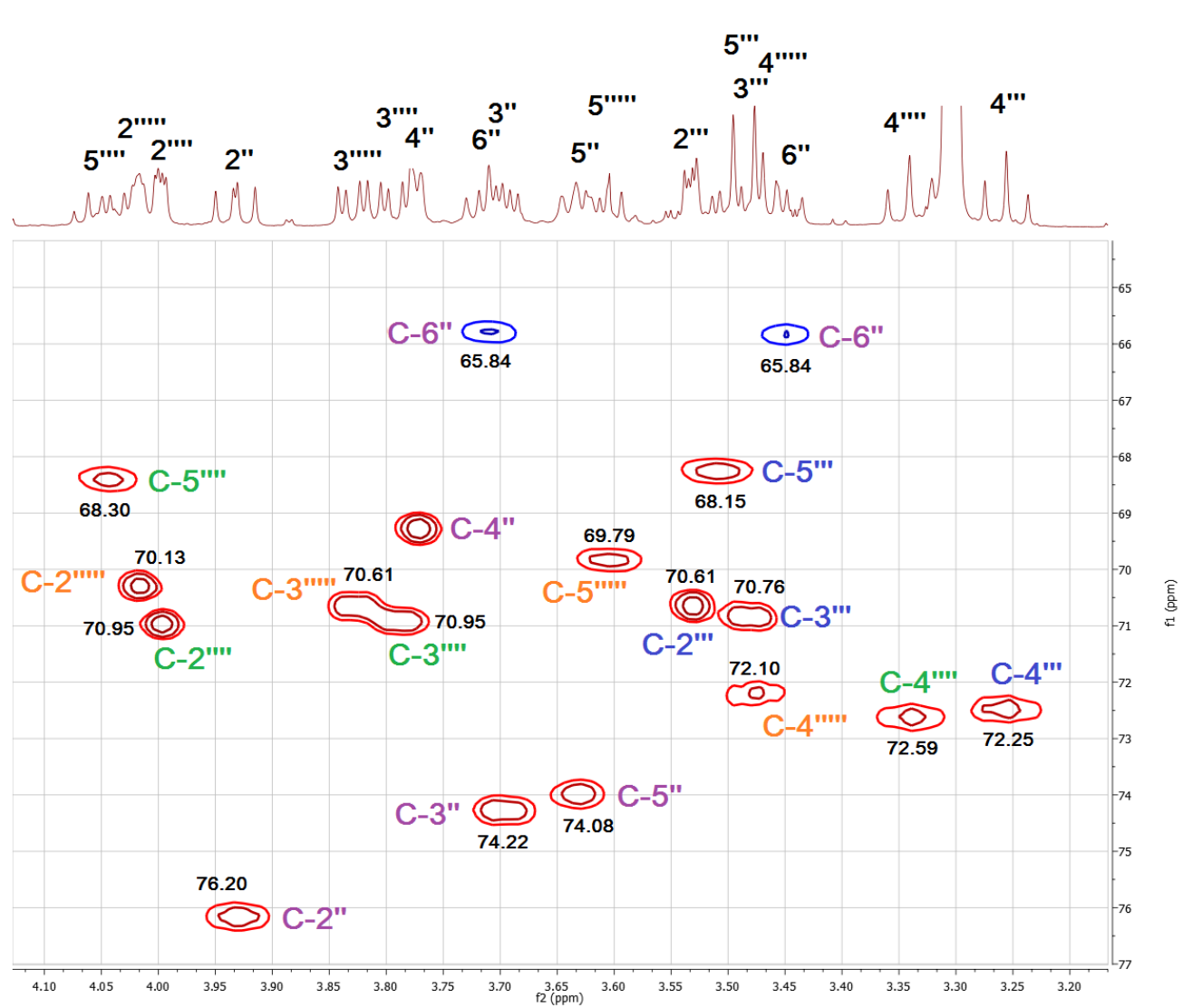
Φάσμα  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY της ένωσης X1A ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) στην περιοχή των σακχάρων



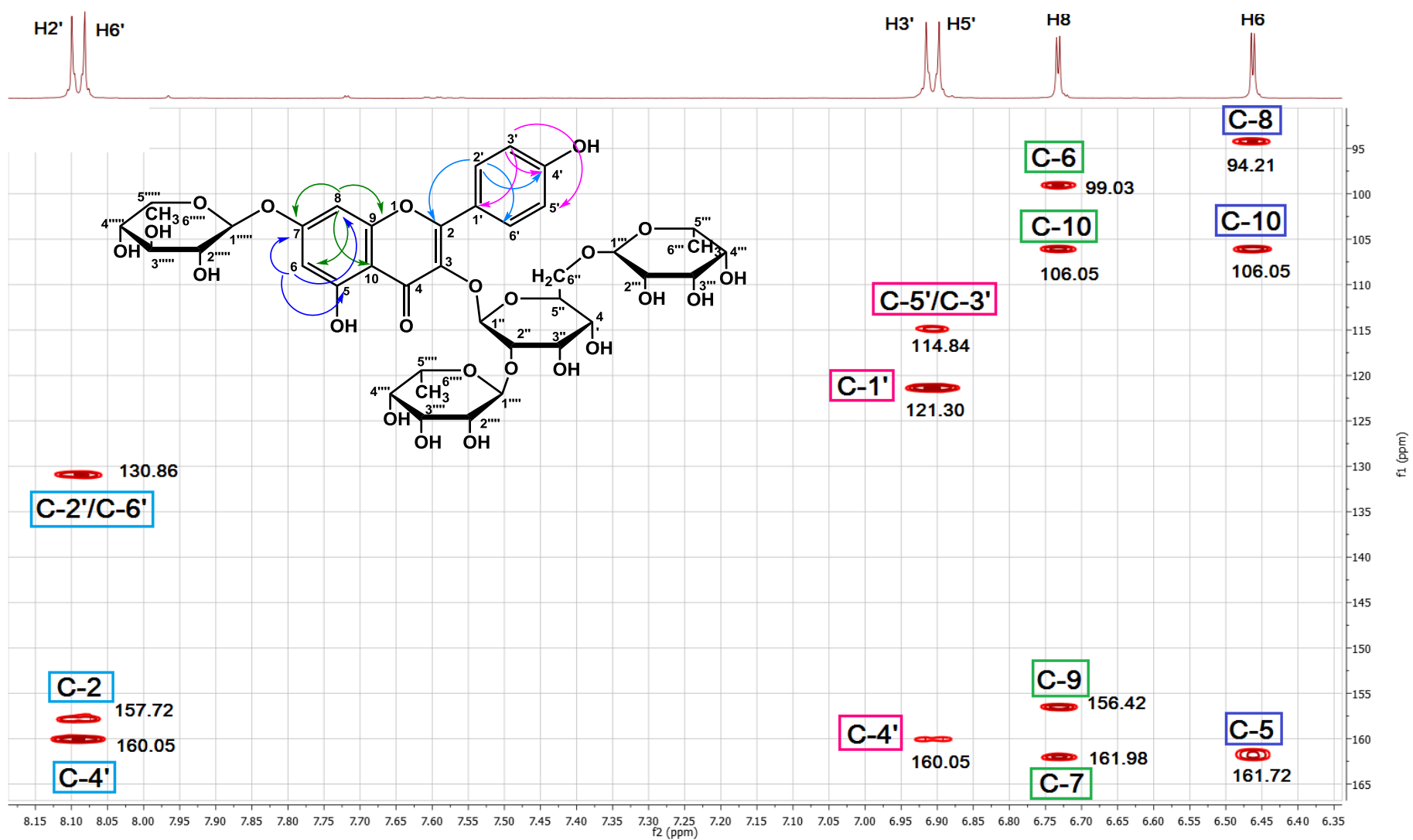
Φάσμα HSQC ένωσης X1A (CD<sub>3</sub>OD, 500MHz)



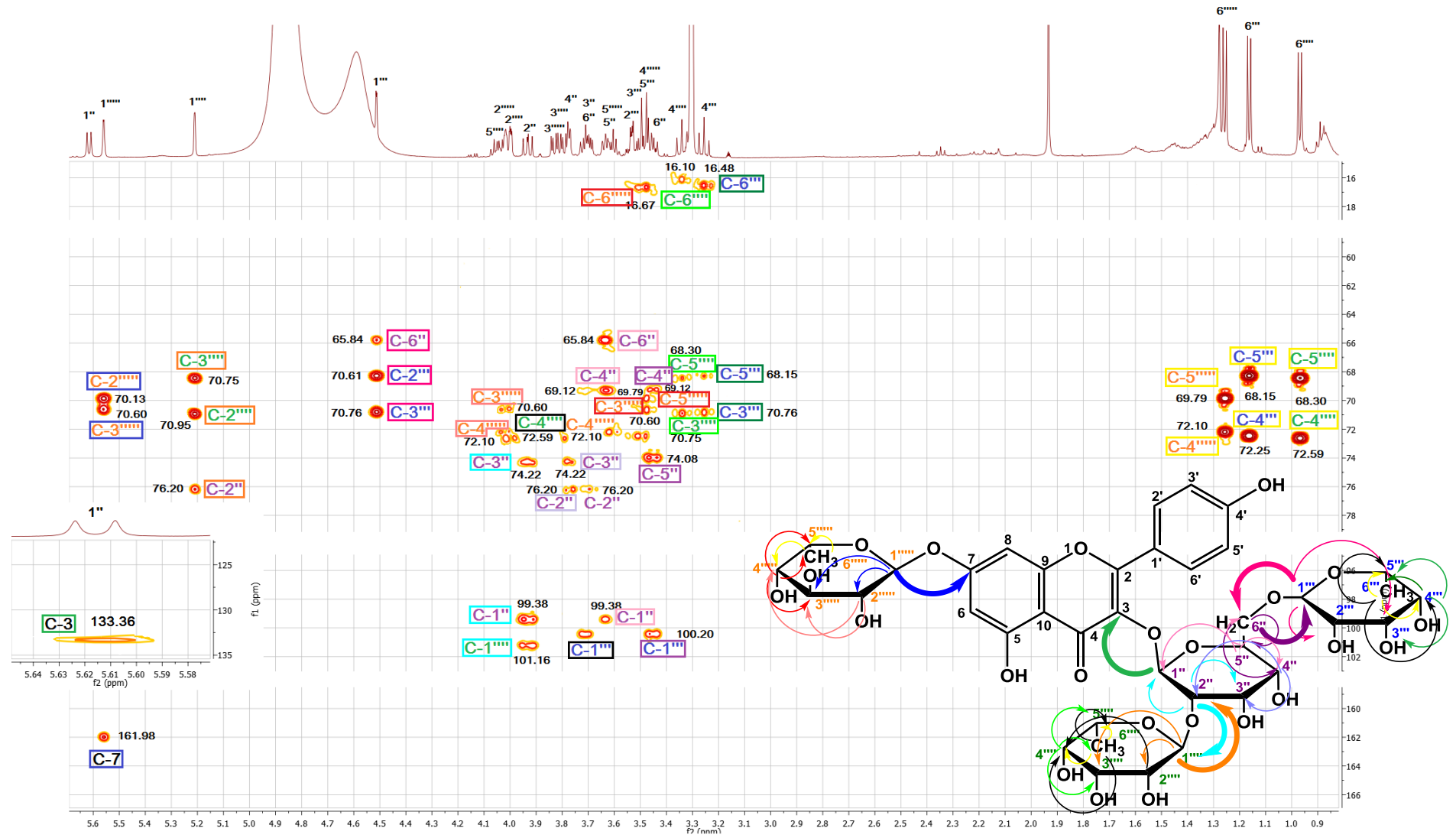
Φάσμα HSQC ένωσης X1A (CD<sub>3</sub>OD, 500MHz) στην περιοχή των σακχάρων



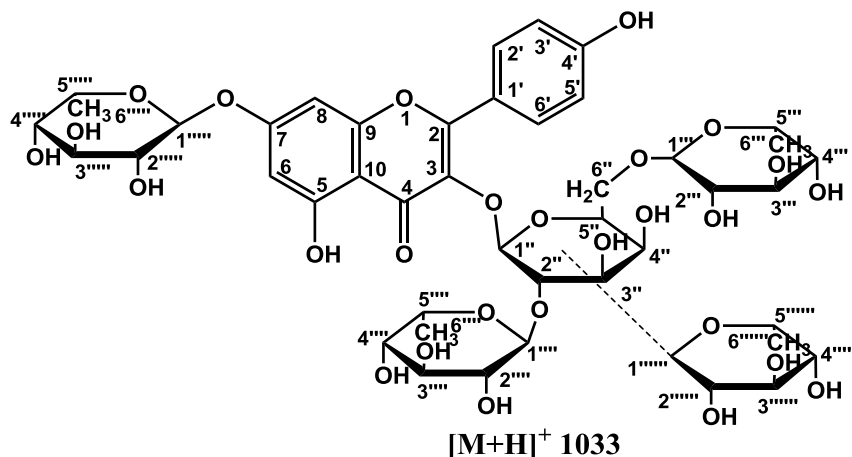
Φάσμα HMBC ένωσης X1A (CD<sub>3</sub>OD, 500MHz) στην περιοχή των αρωματικών πρωτονίων



Λεπτομέρεια φάσματος HMBC ένωσης X1A (CD<sub>3</sub>OD, 500MHz)



13.1.2. Ένωση (X1B) : 3-O-α-L- ραμνοπυρανοζυλο (1->2)[α-L-ραμνοπυρανοζυλο(1->6)]α-L-β-D-γαλακτοπυρανοζυλο-7-O-α-L-ραμνοπυρανοζυλο-ραμνοπυρανοζίτης της καιμφερόλης



#### Φάσμα υπεριώδους-ορατού

Κατά τη φασματοφωτομετρική εξέταση της ουσίας ελήφθησαν χαρακτηριστικές καμπύλες με τα ακόλουθα μέγιστα (nm).

Πίνακας 23: Φάσματα υπεριώδους ορατού ένωσης X1B

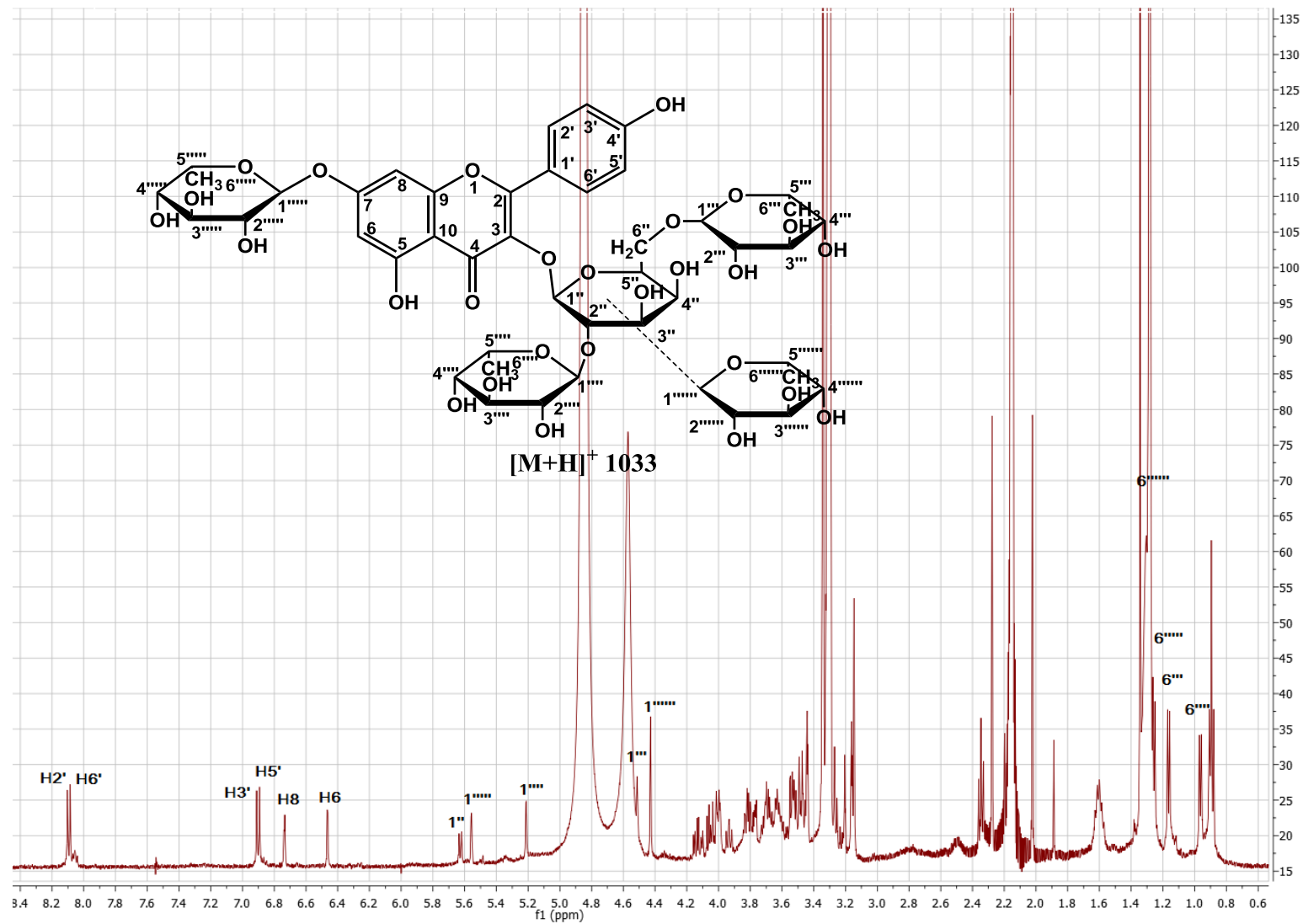
	Κορυφή II		Κορυφή I		Δλ I
MeOH		266.0		345.5	
MeONa	244.0	272.0 (Δλ=+6.0)	351.5	395.0	+49.5
AlCl <sub>3</sub>		274.0 (Δλ=+8.0)	301.5	358.5	+54.5
AlCl <sub>3</sub> /HCl		273.5 (Δλ=+7.5)	299.0	347.0	+51.5
AcONa		265.5 (Δλ=-0.5)		405.5	+60.0
AcONa/H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>		265.5 (Δλ=-0.5)	321.0	346.5	+1.0

Από την απορρόφηση σε MeOH στα 345.5 nm συμπεραίνεται ότι πρόκειται για φλαβονόλη με υποκατεστημένο το υδροξύλιο της θέσης 3. Σ'αυτό συνηγορεί και το φάσμα πρωτονίου <sup>1</sup>H-NMR όπου παρατηρείται απουσία πρωτονίου της θέσης 3. Η βαθυχρωμική μετατόπιση της κορυφής I κατά 49.5 nm, σε σχέση με την αντίστοιχη σε MeOH που παρατηρείται αμέσως μετά την προσθήκη MeONa με αύξηση της έντασης αποδεικνύει ότι το υδροξύλιο της θέσης 4' είναι ελεύθερο. Η προσθήκη AlCl<sub>3</sub> στο μεθανολικό διάλυμα του φλαβονοειδούς προκαλεί μια βαθυχρωμική μετατόπιση της κορυφής I κατά 54.5 nm η οποία παραμένει μετά την προσθήκη HCl και δηλώνει ελεύθερο 5-OH και απουσία όρθο διυδροξυ συστήματος στον A ή στον B δακτύλιο. Το φάσμα που ελήφθει μετά από την προσθήκη AcONa στο μεθανολικό διάλυμα της ουσίας χαρακτηρίζεται από απουσία βαθυχρωμικής μετατόπισης της κορυφής II σε σχέση με την αντίστοιχη σε MeOH, γεγονός που δείχνει ότι το 7-OH είναι δεσμευμένο. Η απουσία

βαθυχρωμικής μετατόπισης της κορυφής I μετά από προσθήκη  $H_3BO_3$  στο διάλυμα του  $AcONa$  σε σχέση με την αντίστοιχη σε  $MeOH$  επιβεβαιώνει τη μη ύπαρξη ορθο-υδροξυ-συστήματος στον Α ή τον Β δακτύλιο (Mabry et al., 1970).

Από το φάσμα πρωτονίου  $^1H$ NMR προκύπτει ότι πρόκειται για καιμφερόλη γλυκοσυλιωμένη με πέντε σάκχαρα, όπως φαίνεται από τα σήματα στην αρωματική περιοχή καθώς και τα σήματα πέντε ανωμερικών πρωτονίων. Σύγκριση του φάσματος πρωτονίου της ένωσης X1B με το αντίστοιχο φάσμα της X1A δείχνει να ταυτίζονται τα πρωτόνια της αρωματικής περιοχής, καθώς και τα ανωμερικά των τεσσάρων πρωτονίων, άρα η ένωση X1B ταυτίζεται με τη X1A, ενώ υπάρχει σ'αυτήν ένα επιπλέον μόριο σακχάρου. Το γεγονός ότι η X1B είναι πολικότερη από την X1A, λόγω ύπαρξης ενός επιπλέον μορίου σακχάρου, έρχεται σε συμφωνία και με τη σειρά έκλουσης των δύο ουσιών από την αρχική στήλη VLC πολυαμιδίου με νερό→μεθανόλη, όπου πρώτη εκλούσθηκε η ουσία X1B. Η λήψη φάσματος μάζας στον θετικό ιονισμό επιβεβαίωσε την ύπαρξη πέντε σακχάρων, μίας εξόζης και τεσσάρων μορίων ραμνόζης στο μόριο της καιμφερόλης. Στο φάσμα μάζας είναι ορατό το μοριακό ιόν  $[M+H]^+$  1033. Τα θραύσματα  $m/z$  887,  $m/z$  741 και  $m/z$  595 προκύπτουν από την διαδοχική απομάκρυνση τριών μορίων ραμνόζης. Στο φάσμα μάζας είναι ορατά και μεγαλύτερα θραύσματα όπως το  $m/z$  1277, το  $m/z$  1350 και το  $m/z$  1499 τα οποία ενδεχομένως να ανήκουν σε κάποια προσθετική ομάδα λιπαρού οξέος ακόρεστου ή κορεσμένου. Όμως η έλλειψη φασμάτων HSQC, HMBC δεν επιτρέπουν την περεταίρω λήψη πληροφοριών παρά μόνο την ταυτοποίηση καιμφερόλης με πέντε σάκχαρα.

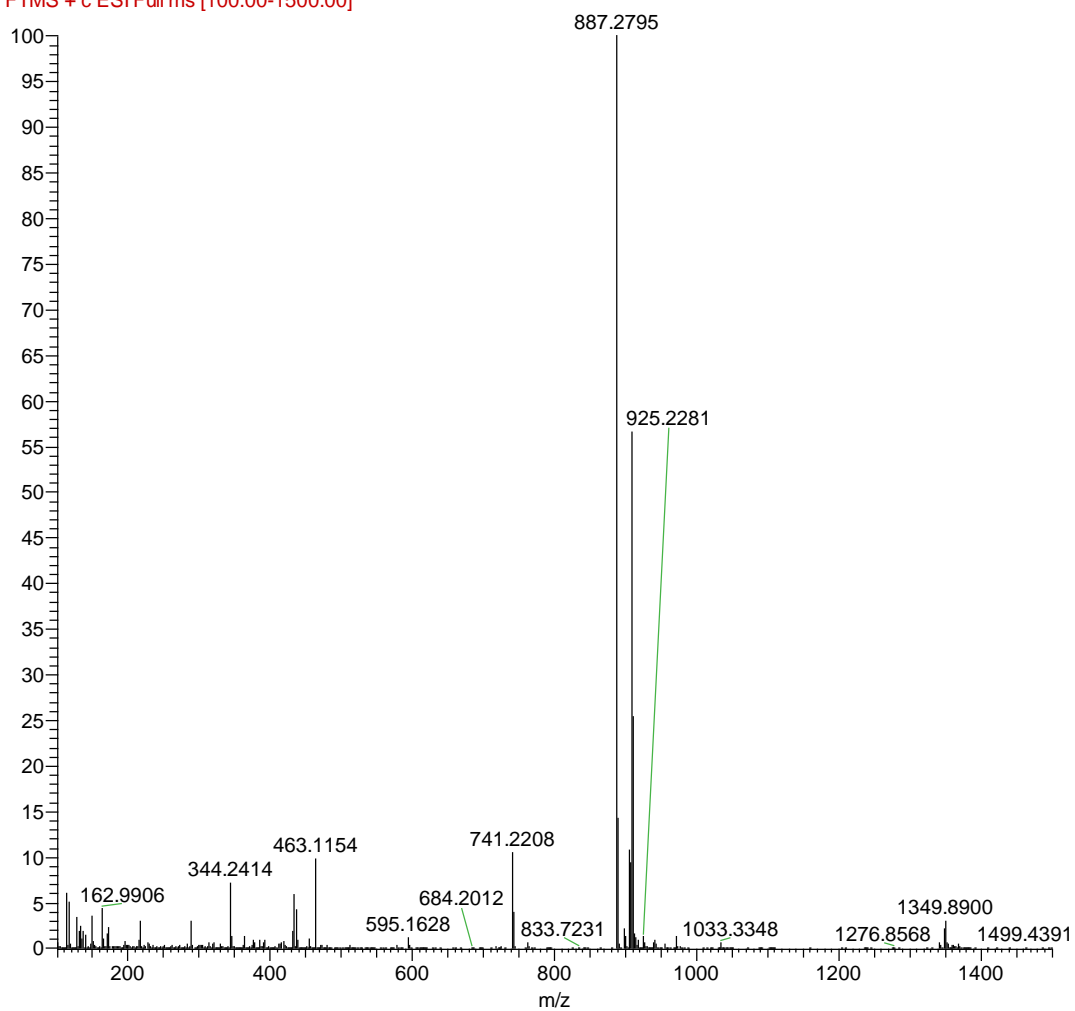
### Φάσμα <sup>1</sup>H- NMR της Ένωσης X1B (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)



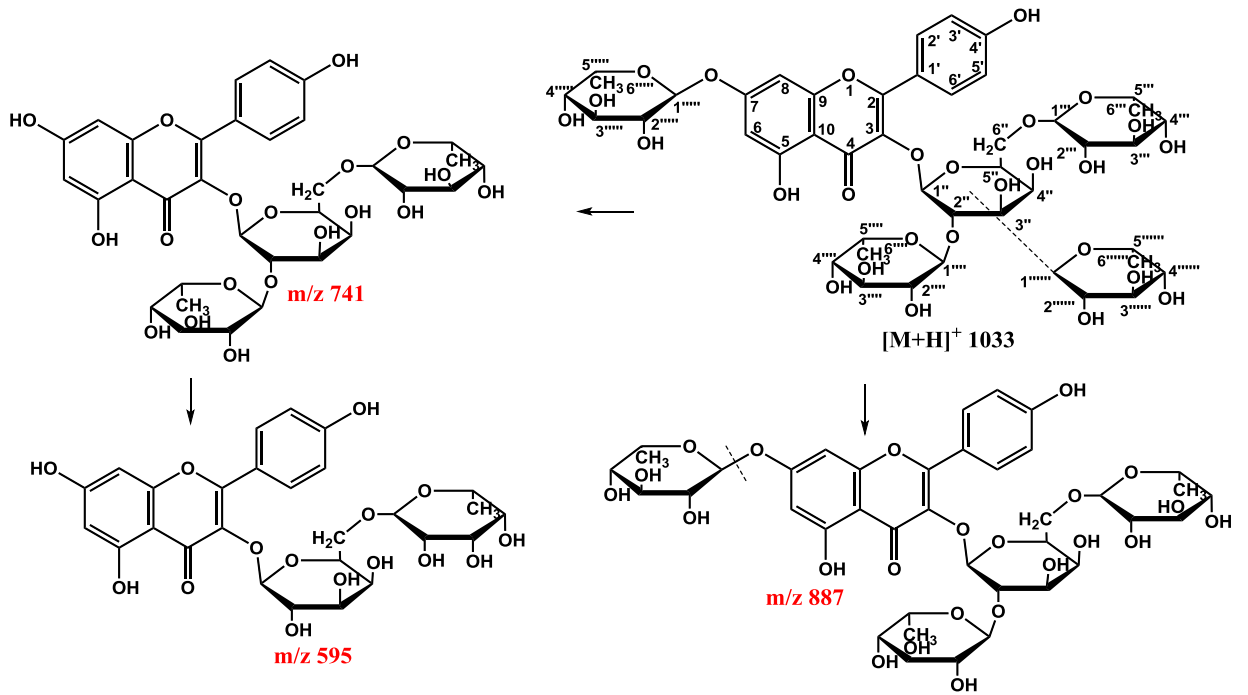


# Φάσμα μάζας της Ένωσης X1B

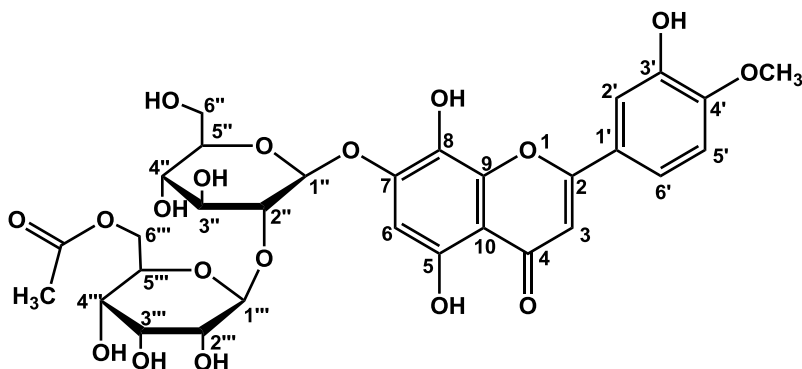
E8\_160412145035 #571 RT: 3.47 AV: 1 NL: 2.24E7  
F: FTMS + c ESI Full ms [100.00-1500.00]



Προτεινόμενος μηχανισμός θραυσματοποίησης



13.1.3. Ένωση X2 : 7-*O*-D-[6'''-*O*-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοζυλο-(1'''→2'')]-β-D-γλυκοπυρανοζίτης της 4'-*O*-μεθυλο υπολαετίνης



Η ένωση είναι κίτρινου χρώματος ενώ τα συστήματα που χρησιμοποιήθηκαν στην χρωματογραφία λεπτής στιβάδας ήταν το CAW: Rf=0.6, AcOH 10%, Rf= 0.40, EAW=0.44. Στα 254 nm και στα 356 nm εμφανίζεται κηλίδα καφέ χρώματος.

**Φάσμα υπεριώδους-ορατού**

Κατά τη φασματοφωτομετρική εξέταση της ουσίας ελήφθησαν χαρακτηριστικές καμπύλες με τα ακόλουθα μέγιστα (nm).

**Πίνακας 24: Φάσματα υπεριώδους ορατού ένωσης X2**

		Κορυφή II		Κορυφή I	Δλ I	
MeOH	252.5	277.5	297.0	337.0		
MeONa		270.5 (Δλ=+7.0)	313.5	372.5	380.5	+43.5
AlCl <sub>3</sub>	263.5	280.5 (Δλ=+3.0)	310.0	361.0	426.5	+24.0
AlCl <sub>3</sub> /HCl	261.0	281.5 (Δλ=+4.0)	327.0	352	424.0	+15
AcONa		276.5 (Δλ=-1.0)		332.0		
AcONa/H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>		279.5 (Δλ= 2.0)		330.5		-6.5

Στο φάσμα υπεριώδους-ορατού της ένωσης X2 σε μεθανόλη παρατηρούμε ότι η κορυφή I εμφανίζεται στα 337 nm και δείχνει ότι πρόκειται για φλαβόνη. Στο φάσμα της ένωσης με MeONa παρατηρείται μια βαθυχρωμική μετατόπιση της κορυφής I κατά 43.5 nm χωρίς αύξηση της έντασης, γεγονός που δείχνει ότι το υδροξύλιο της θέσης 4' είναι δεσμευμένο.

Η προσθήκη AlCl<sub>3</sub> στο μεθανολικό διάλυμα του φλαβονοειδούς προκαλεί μια βαθυχρωμική μετατόπιση της κορυφής I κατά 24.0 nm η οποία παραμένει μετά την προσθήκη HCl και δηλώνει ελεύθερο 5-OH και απουσία όρθο διυδροξυ συστήματος στον A ή στον B δακτύλιο. Το φάσμα που ελήφθει μετά από την προσθήκη AcONa στο μεθανολικό διάλυμα της ουσίας χαρακτηρίζεται από απουσία βαθυχρωμικής μετατόπισης της κορυφής II γεγονός που επιβεβαιώνει ότι το 7-OH είναι δεσμευμένο. Η προσθήκη τριών σταγόνων H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> στο

προηγούμενο διάλυμα του AcONa επιβεβαιώνει τη μη ύπαρξη ορθο-διυδροξυ-συστήματος στον Α ή τον Β δακτύλιο (Mabry et al., 1970).

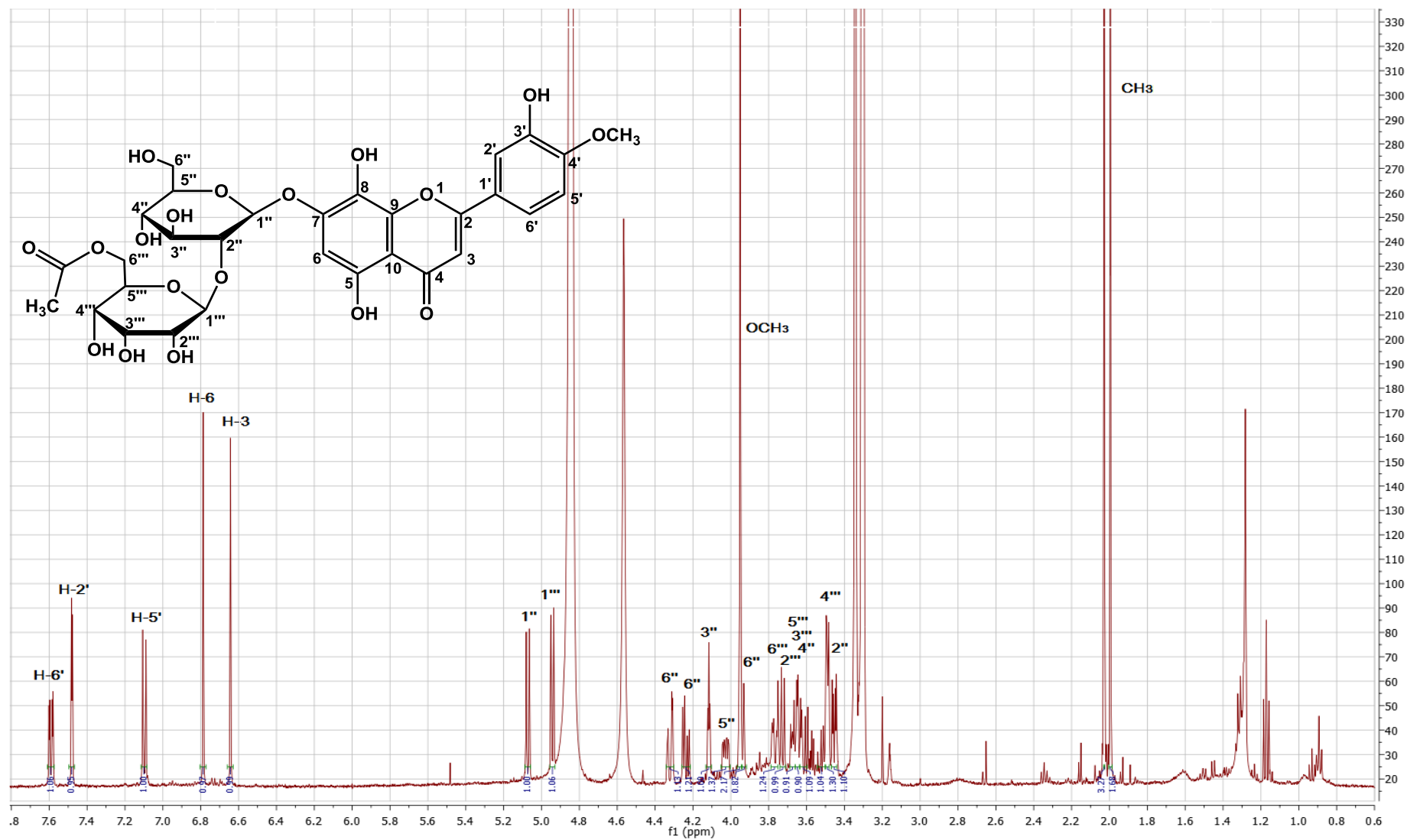
Πίνακας 25:Φάσμα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ένωσης X2

<sup>1</sup> H-NMR και <sup>13</sup> C-NMR (CD <sub>3</sub> OD, 500MHz)				
Ταυτοποίηση	δ <sub>H</sub> (ppm)	J <sub>HH</sub> (Hz)	Ταυτοποίηση	δ <sub>C</sub> (ppm)
H-6'	7.60 (dd)	8.5 2.3	C-6'	119.02
H-5'	7.10 (d)	8.5	C-2'	112.73
H-3	6.65 (s)		C-3	102.96
H-2'	7.48 (d)	(2.3)	C-5'	111.27
			C-8	128.34
H-6	6.79 (s)		C-6	100.33
			C-5	155.67
			C-4	183.30
			C-7	150.63
			C-10	106.32
			C-1'	123.50
			C-4'	151.41
			C-2	165.00
			C-3'	146.78
7-Ο-Γλυκόζη			7-Ο-Γλυκόζη	
H-1''	4.94 (d)	7.5	C-1''	101.51
H-2''	3.73 (dd)	7.6, 9.2	C-2''	82.25
H-3''	3.66 (m)		C-3''	76.11
H-4''	3.49 (m)		C-4''	77.05
H-5''	3.49 (m)		C-5''	69.36
H-6''	3.93-3.76 (m)		C-6''	60.82
2''-Ο-Αλλόζη			2''-Ο-Αλλόζη	
H-1'''	5.07 (d)	8.0	C-1'''	102.60
H-2'''	3.45 (dd)	2.5, 8.0	C-2'''	71.64
H-3'''	4.11 (t)	9.6, 3.0	C-3'''	71.17
H-4'''	3.63 (dd)	3.0,10.0	C-4'''	67.08
H-5'''	4.02 (ddd)	10.0,5.0,20	C-5'''	71.92
H-6''' <sub>α</sub>	4.32 (dd)	2.0,12.5	C-6'''	63.54
H-6''' <sub>β</sub>	4.23 (dd)	5.0,12.0		
OCH <sub>3</sub>	3.95 (s)		OCH <sub>3</sub>	55.10
CO CH <sub>3</sub>	1.90 (s)		CH <sub>3</sub>	19.43
CO CH <sub>3</sub>			CO	171.80

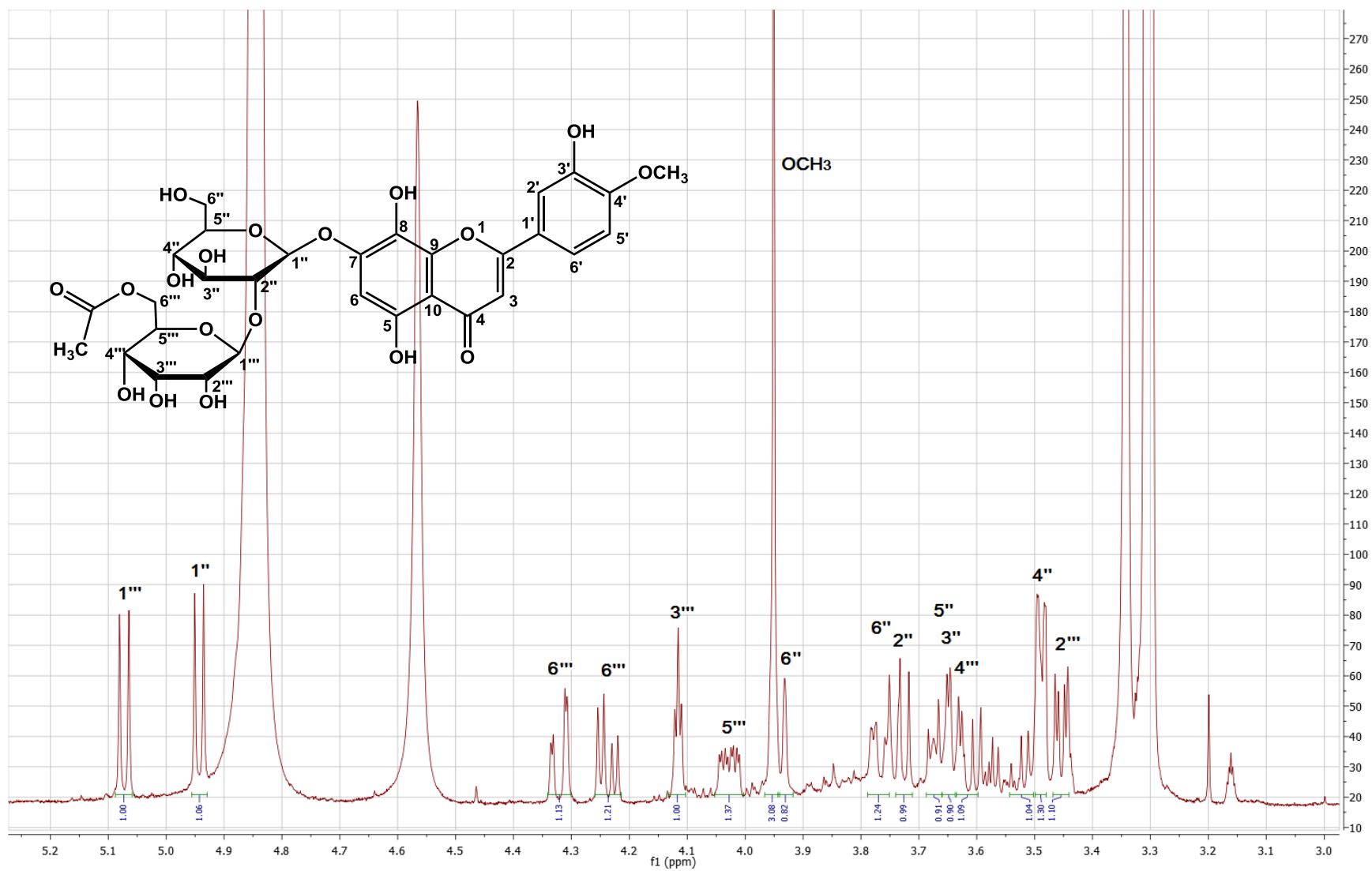
Η μελέτη του φάσματος <sup>1</sup>H-NMR έδειξε ότι πρόκειται για τον 7''-Ο-D-γαλακτοπυρανοζυλο-6'''-Ο-ακετυλο D-(1→2)-αλλοπυρανοζίτη της υπολαετίνης γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τα

δισδιάστατα φάσματα NMR της ένωσης, όπου παρατηρούνται τα ακόλουθα: Στην αρωματική περιοχή του φάσματος  $^1\text{H-NMR}$  παρατηρείται η ύπαρξη συστήματος ABX που αντιστοιχεί στο δακτύλιο B με μια διπλώς διπλή κορυφή στα  $\delta_{\text{H}}$  7.60 με σταθερά σύζευξης  $J=2.3$  Hz και  $J=8.5$  Hz που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-6', μια διπλή κορυφή στα  $\delta_{\text{H}}$  7.48 με σταθερά σύζευξης  $J=2.3$  Hz που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-2', καθώς και μία διπλή κορυφή στα  $\delta_{\text{H}}$  7.10 με σταθερά σύζευξης  $J=8.6$  Hz που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-5'. Το H-3 του δακτυλίου C και το πρωτόνιο H-6 του A δακτυλίου εμφανίζονται ως απλές κορυφές σε  $\delta_{\text{H}}$  6.65 και 6.79 αντίστοιχα. Το μεθοξύλιο της θέσης 4' εμφανίζεται στα 3.95. Στην περιοχή των σακχάρων παρατηρούνται δυο ανωμερικά πρωτόνια, ένα σε  $\delta_{\text{H}}$  4.94 με  $J=7.5$  Hz και ένα σε  $\delta_{\text{H}}$  5.07 με  $J=8.0$  Hz. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Rodríguez et al., 2000) αντιστοιχούν το πρώτο σε γλυκόζη και το δεύτερο σε αλλόζη. Η ύπαρξη της αλλόζης επιβεβαιώνεται και από τη axial-equatorial σύζευξη του πρωτονίου H-3''' με το πρωτόνιο H-2''' και το πρωτόνιο H-4''' με  $J_{2'''-3'''}=2.5$  Hz και  $J_{3'''-4'''}=3$  Hz. Από το φάσμα HMBC επιβεβαιώνεται η σύνδεση της γλυκόζης στη θέση 7 του φλαβονειδούς όπου το ανωμερικό της γλυκόζης εμφανίζει κοινό σήμα με τον άνθρακα 7 στα 152.64 ppm. Η θέση σύνδεσης του ακετυλίου με τον C-6 της αλλόζης επιβεβαιώνεται από το κοινό σήμα που εμφανίζει το πρωτόνιο H-6b της αλλόζης με τον άνθρακα του καρβονυλίου στα  $\delta_{\text{C}}$  171.80. Η αλλόζη συνδέεται στη θέση 2'' της γλυκόζης όπως φαίνεται στο φάσμα HMBC από το κοινό σήμα του ανωμερικού της αλλόζης με τον C-2'' της γλυκόζης στα 82.25 ppm και επιβεβαιώνεται από την παραμαγνητική αποθωράκιση του σήματος του C-2'' της γλυκόζης στα 82.25 (από τα περίπου 76 ppm που εμφανίζεται κανονικά). Από όλα τα παραπάνω καθώς και μετά από σύγκριση με τη βιβλιογραφία (Halfon et al., 2013), προκύπτει ότι η ένωση είναι ο 7-O-D-[6'''-O-ακετυλο-β-D-αλλοπυρα-νόζυλο-(1'''→2'')]β-D-γλυκοκυρανοζίτης της 4'-O-μεθυλο υπολαετίνης. Η ένωση είναι η πρώτη φορά που απομονώνεται από το γένος *Indigofera*.

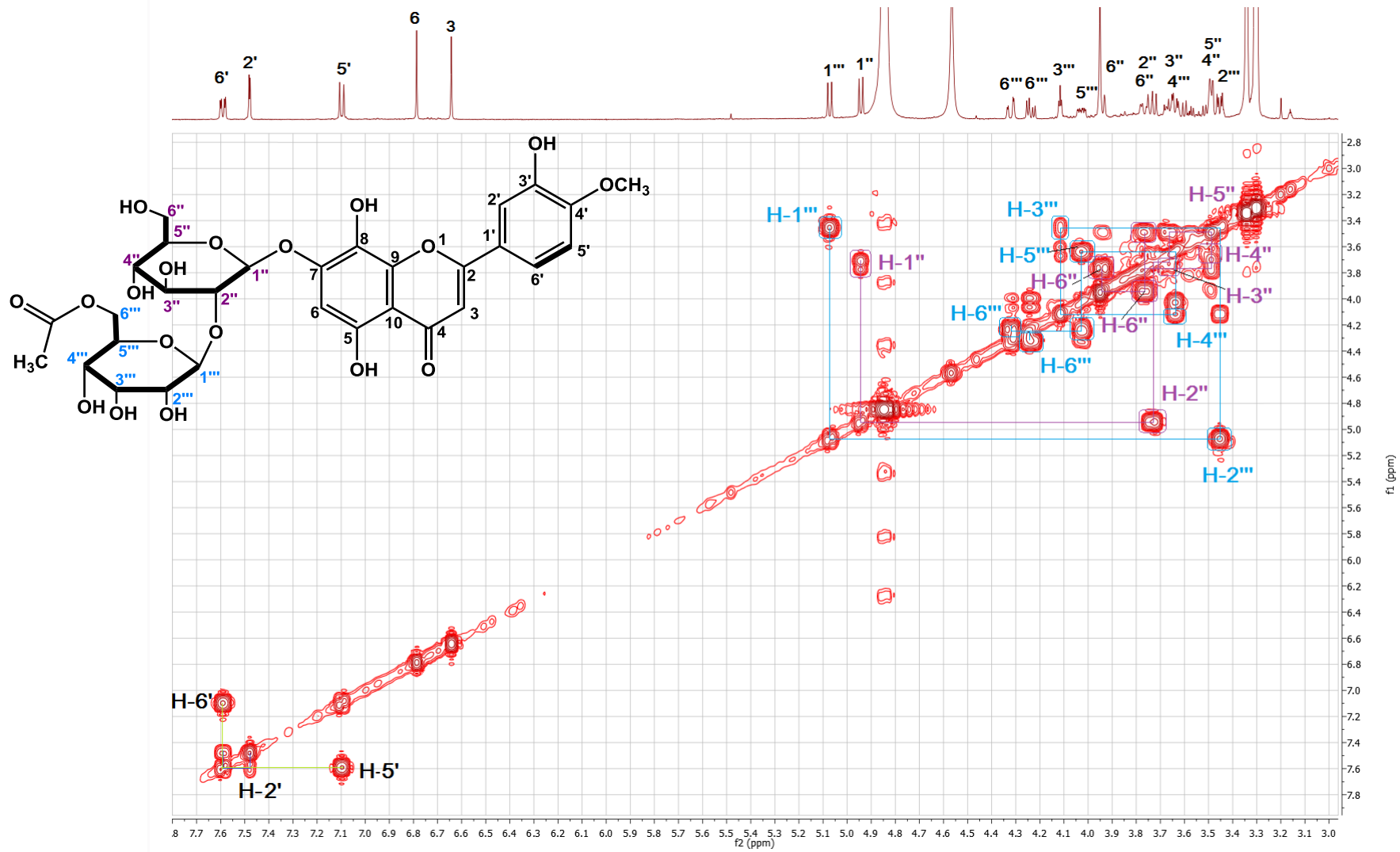
Φάσμα <sup>1</sup>H-NMR της ένωσης X2 (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)



Φάσμα  $^1\text{H}$ - NMR της ένωσης X2 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) στην περιοχή των σακχάρων

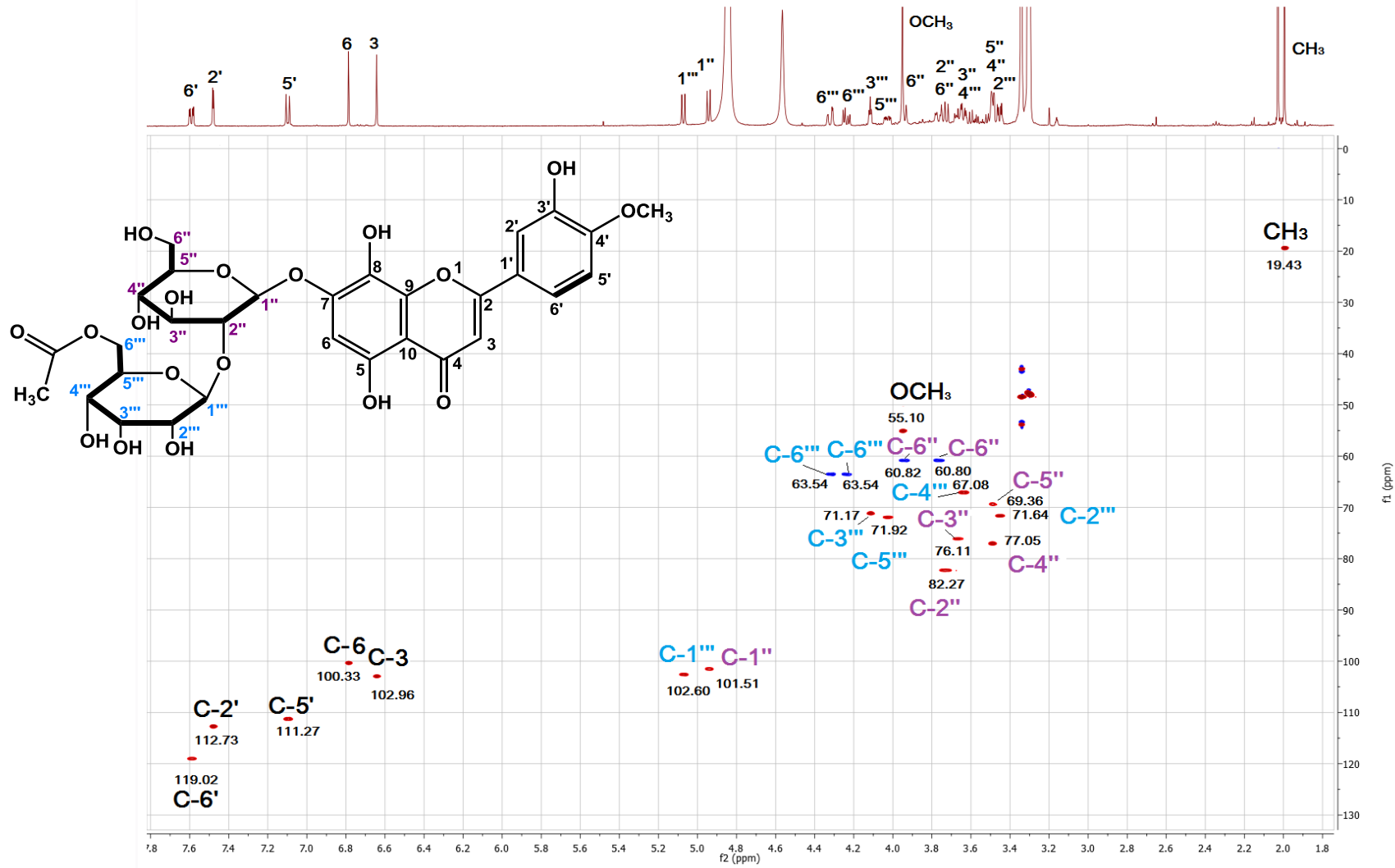


Φάσμα  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY της ένωσης X2 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz)

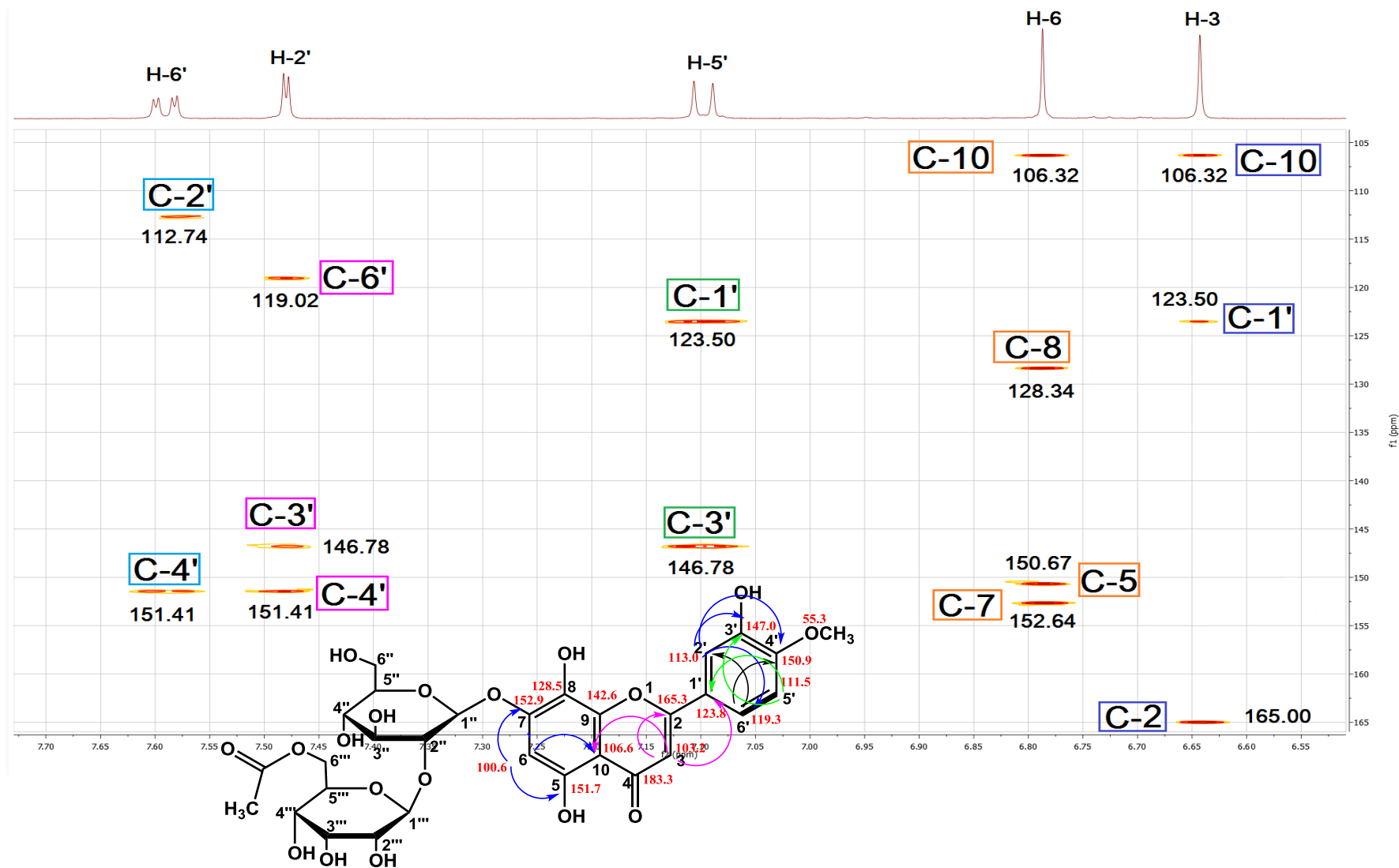




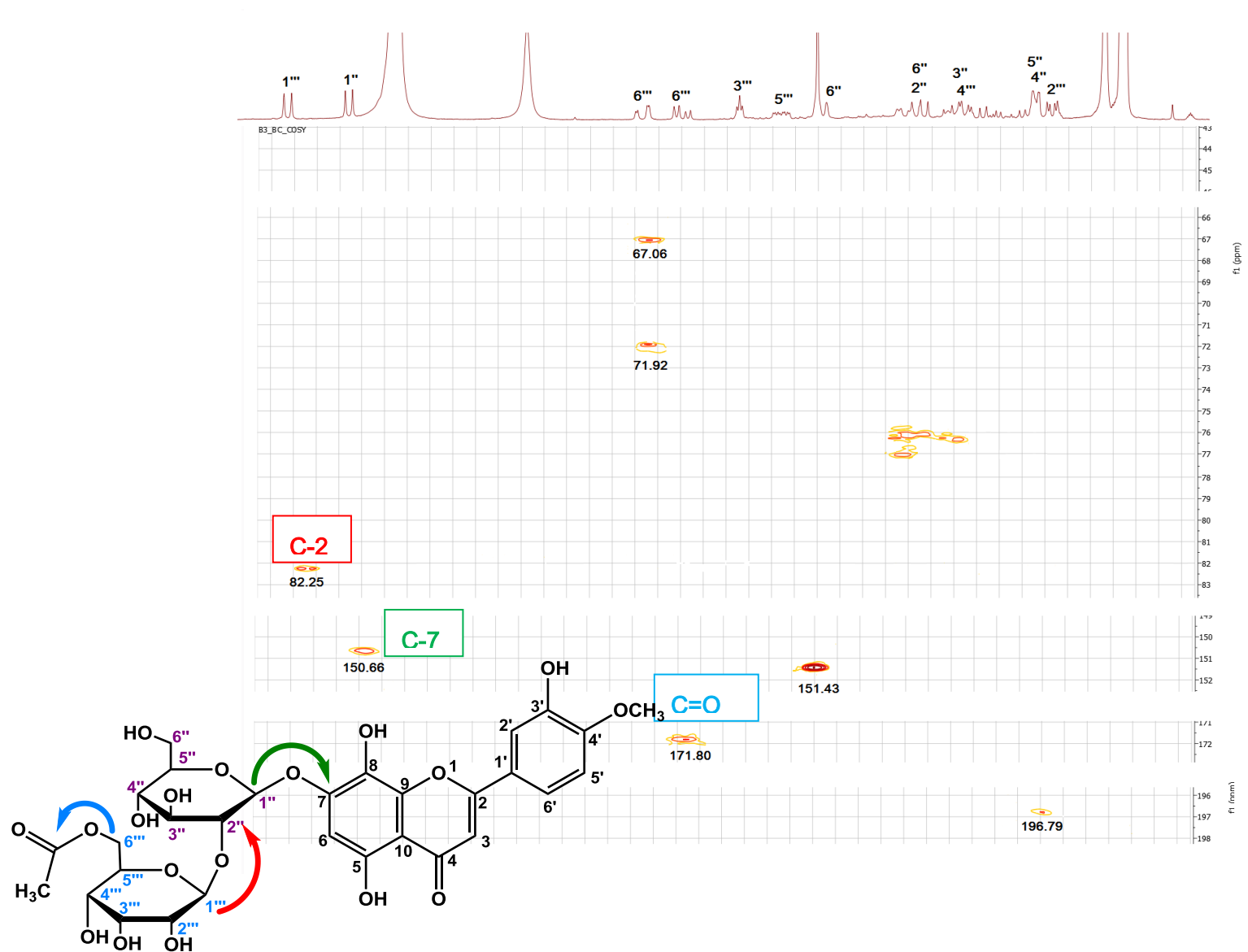
Φάσμα HSQC ένωσης X2 (CD<sub>3</sub>OD, 500MHz)



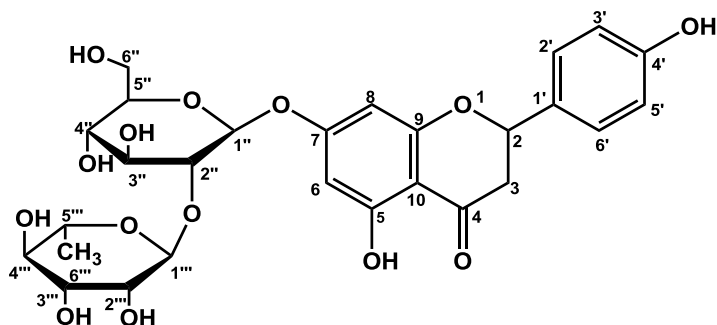
Φάσμα HMBC ένωσης X2 (CD<sub>3</sub>OD, 500MHz) στην περιοχή των αρωματικών πρωτονίων



Φάσμα HMBC ένωσης X2 (CD<sub>3</sub>OD, 500MHz) στην περιοχή σακχάρων



### 13.1.4. Ένωση X3: Νεοεσπεριδοζίτης της ναριγγενίνης – ναριγγίνη



Η ένωση είχε κίτρινο φθορισμό στη λάμπα υπεριώδους/ορατού και πράσινο μετά από έκθεση σε ατμούς αμμωνίας. Για τον έλεγχο καθαρότητας έγινε TLC σε πλάκες κυτταρίνης με συστήματα ανάπτυξης CAW:  $R_f=0.56$ , AcOH 15%,  $R_f= 0.83$ , EAW=0,75.

#### Φάσματα υπεριώδους-ορατού Ένωσης X3

Κατά τη φασματοφωτομετρική εξέταση της ουσίας ελήφθησαν χαρακτηριστικές καμπύλες με τα ακόλουθα μέγιστα (nm).

Πίνακας 26: Φάσματα υπεριώδους ορατού ένωσης X3

		Κορυφή II	Κορυφή I	$\Delta\lambda$ I
MeOH		282.0	332.0	
MeONa	242.5	286.0 ( $\Delta\lambda=+4.0$ )	362.0	+30.0
AlCl <sub>3</sub>		306.5 ( $\Delta\lambda=+24.5$ )	365.0	+33.0
AlCl <sub>3</sub> /HCl		304.5 ( $\Delta\lambda=+22.5$ )	367.0	+35.0
AcONa		282.5 ( $\Delta\lambda=+0.5$ )	332.0	
AcONa/H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>		282.0	332.5	+0.5

Από το φάσμα υπεριώδους-ορατού παρατηρούμε την ύπαρξη μιας έντονης κορυφής στα 282 nm καθώς και μιας χαμηλής έντασης κορυφής στα 332 nm χαρακτηριστικές φλαβονόνης, λόγω έλλειψης συζυγίας μεταξύ A και B δακτυλίου. Κατά την προσθήκη AlCl<sub>3</sub> παρατηρείται βαθυχρωμική μετατόπιση κατά 24.5 nm της κορυφής (II) και κατά 33 nm της κορυφής (I) οι οποίες παραμένουν σταθερές μετά από προσθήκη HCl γεγονός που δείχνει ότι το 5-OH είναι ελεύθερο και ότι δεν υπάρχει 6,7 ή 7,8 διϋδροξυ υποκατάσταση στον A δακτύλιο (Yuldashev et al., 1993). Η προσθήκη NaOAc στο μεθανολικό διάλυμα της φλαβονόνης, η οποία δεν συνοδεύεται από καμία βαθυχρωμική μετατόπιση της κορυφής II αποδεικνύει το γεγονός ότι το OH-7 είναι υποκατεστημένο (Mabry et al., 1970), ενώ η μη μετακίνηση της κορυφής (I) μετά την προσθήκη H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> κατά 10-15 nm επιβεβαιώνει την απουσία 6,7 όρθουδροξυ συστήματος στον A δακτύλιο.

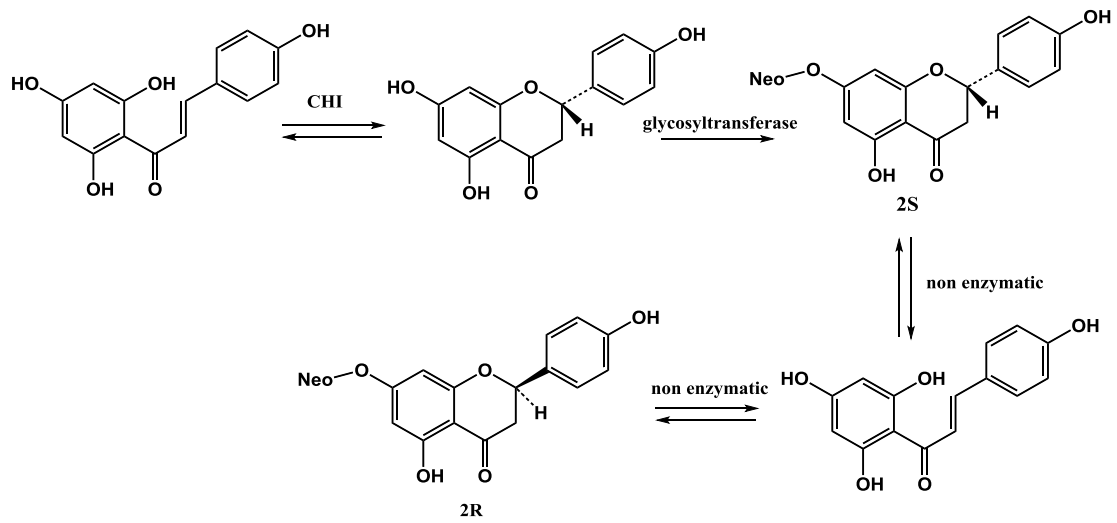
Πίνακας 27: Φάσμα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ένωσης X3

<sup>1</sup> H-NMR (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz) και <sup>13</sup> C-NMR (CD <sub>3</sub> OD*, 125 MHz) (*από HSQC και HMBC )				
Ταυτοποίηση	δ <sub>H</sub> (ppm)	J <sub>HH</sub> (Hz)	Ταυτοποίηση	δ <sub>C</sub> (ppm)
H-2'και H-6'	7.31 (d)	8.5	C-2', C-6'	127.69
H-3' και H-5'	6.81 (d)	8.5	C-3', C-5'	114.88
H-2	5.37 (2dd overlapped)	13.0, 12.5, 2.5, 2.0	C-2	79.21
H-3a	3.16 (2 dd overlapped)	17.0, 17.5, 13.0, 12.5	C-3	42.77
H-3b	2.75 (2 dd overlapped)	17.0, 17.5, 2.5, 2.0	C-3	42.77
H-6	6.15 (d)	2.0	C-6	96.60
H-8	6.17 (d)	2.5	C-8	95.11
			C-5	163.53
			C-7	165.19
			C-9	162.79
			C-10	103.41
			C-1'	129.33
			C-4'	157.69
			C-4	197.07
<b>7-Ο-Γλυκόζη</b>			<b>7-Ο-Γλυκόζη</b>	
H-1''	5.10 ,5.08 (2d)	8.5, 8.0	C-1''	97.89
H-2''	3.66 (dd)	7.5, 7.5	C-2''	77.78
H-3''	3.57 (m)		C-3''	77.43
H-4''	3.37 (m)		C-4''	69.68
H-5''	3.43 (m)		C-5''	76.69
H-6''	3.84 (dd)	11.0, 2.0	C-6''	60.82
	3.67 (m)			
<b>2''-Ο-Ραμνόζη</b>			<b>2''-Ο-Ραμνόζη</b>	
H-1'''	5.24 , 5.23 (2d)	1.00, 1.50	C-1'''	101.30
H-2'''	3.91 (m)		C-2'''	70.75
H-3'''	3.58 (m)		C-3'''	70.75
H-4'''	3.37 (m)		C-4'''	72.46
H-5'''	3.86 (m)		C-5'''	68.58
H-6'''	1.26 (2 d)	6.0, 5.5	C-6'''	16.81

Η μελέτη του φάσματος <sup>1</sup>H-NMR έδειξε ότι πρόκειται για γλυκοσυλιωμένη φλαβανόνη, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τα δισδιάστατα φάσματα NMR της ένωσης. Στην αρωματική περιοχή του φάσματος <sup>1</sup>H NMR, διαπιστώνεται η παρουσία συστήματος AA'BB'. Μια διπλή κορυφή σε δ<sub>H</sub> 7.31 (*J* = 8.5 Hz) αντιστοιχεί στα πρωτόνια H-2' και H-6' ενώ η διπλή κορυφή σε δ<sub>H</sub> 6.81 (*J* = 8.5 Hz) αντιστοιχεί στα πρωτόνια H-3'και H-5'. Παρατηρούνται ακόμα

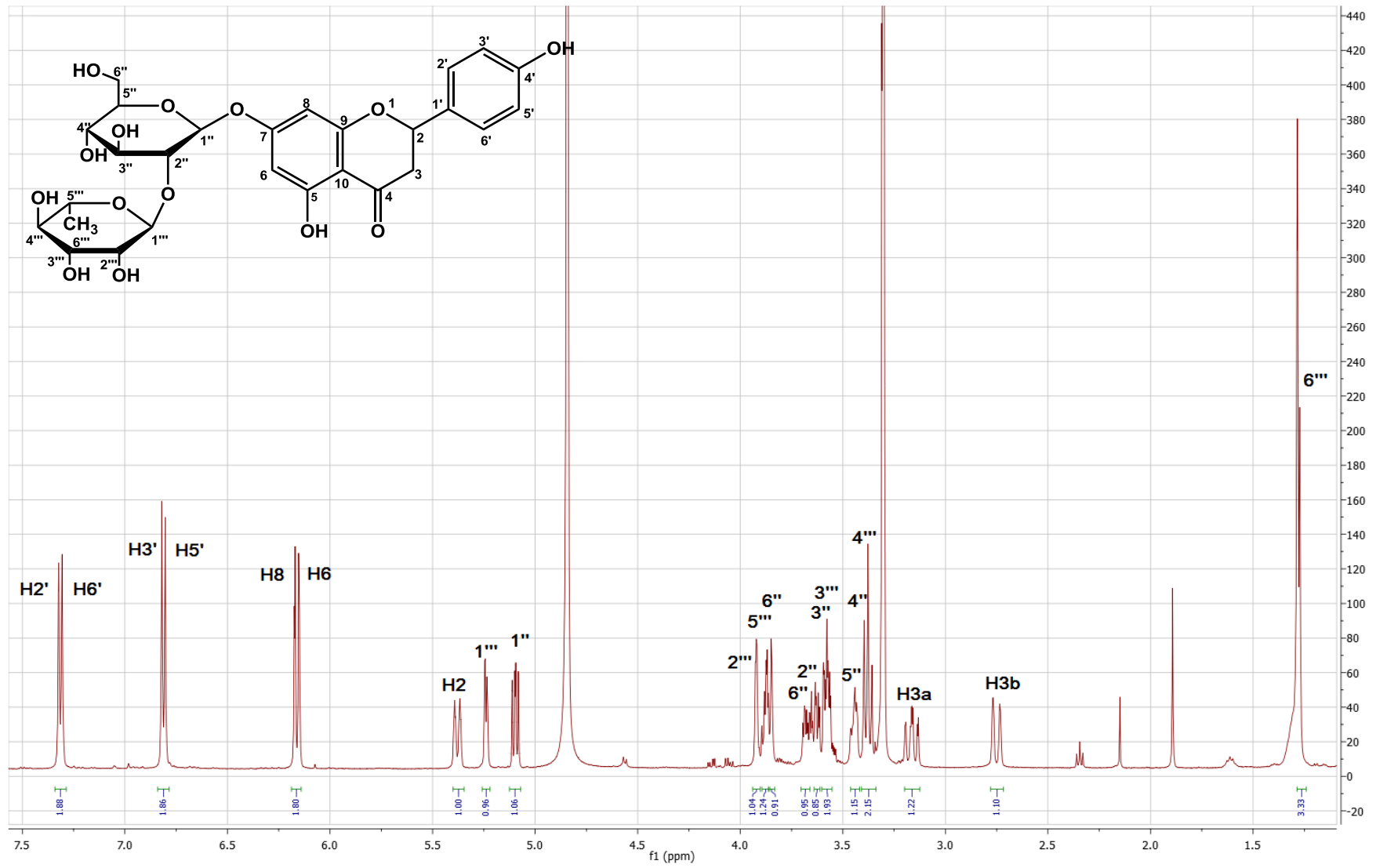
στην αρωματική περιοχή δύο διπλές κορυφές του ενός πρωτονίου σε  $\delta_H$  6.17 ( $J = 2.5$  Hz) και  $\delta_H$  6.15 ( $J = 2.0$  Hz) που συζεύγνυνται μεταξύ τους με σταθερά σύζευξης 2.0 Hz, υποδηλώνοντας *μετα*-σύζευξη και αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-8 και H-6 αντίστοιχα. Η διπλή κορυφή που αντιστοιχεί στο H-6 εμφανίζεται σε υψηλότερες τιμές πεδίου σε σχέση με τη διπλή κορυφή που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-8 (Mabry et al., 1970). Οι κορυφές των πρωτονίων H-8 και H-6 είναι ελαφρώς αποθωρακισμένες και σε χαμηλότερες τιμές πεδίου σε σχέση με τη ναριγγενίνη και αυτό υποδηλώνει την παρουσία σακχάρου στη θέση 7 (Mabry et al., 1970) όπως άλλωστε επιβεβαιώνεται και από την τιμή του άνθρακα της θέσεως 4' όπου εμφανίζεται αποθωρακισμένος σε 157.69 ppm, σύμφωνα με το φάσμα HMBC της ένωσης. Στην περιοχή του φάσματος  $^1\text{H NMR}$  από  $\delta_H$  5.50 έως 5.10 και από  $\delta_H$  3.16 έως 2.75 παρατηρούνται διπλά σήματα που δείχνουν την παρουσία μιας δεύτερης φλαβονόνης και συμπεραίνεται ότι πρόκειται για μίγμα δυο διαστερομερών φλαβονών (-S και -R) (Maltese et al., 2009). Έτσι το πρωτόνιο H-2 εμφανίζεται στα  $\delta_H$  5.37 ppm σαν δυο διπλές διπλών ( $J = 13.0, 12.5, 2.5, 2.0$  Hz) και όχι σαν μια που θα έπρεπε να εμφανίζεται εφόσον ήταν μια μόνο ένωση. Επιπροσθέτως τα πρωτόνια H-3a και H-3b με  $\delta_H$  3.16 και  $\delta_H$  2.75 εμφανίζονται ως δυο διπλές διπλών με σταθερές σύζευξης  $J = 17.0, 17.5, 13.0, 12.5$  Hz και  $J = 17.0, 17.5, 2.5, 2.0$  Hz αντίστοιχα. Στην κεντρική περιοχή του φάσματος  $^1\text{H NMR}$  εμφανίζονται δύο ανωμερικά πρωτόνια της γλυκόζης των δύο διαστερομερών R- και S- σε  $\delta_H$  5.10 και  $\delta_H$  5.08 με σταθερές σύζευξης  $J = 8.5$  και 8.0 Hz και τα δύο ανωμερικά της ραμνόζης σε  $\delta_H$  5.24 και 5.23 ppm. Από το φάσμα HMBC της ένωσης, επιβεβαιώνεται η θέση σύνδεσης της γλυκόζης στη θέση 7, όπου εμφανίζεται κοινό σήμα, των πρωτονίων H-1" (ανωμερικό της γλυκόζης), H-6 και H-8 του φλαβονοειδούς με τον C-7 στα 165.19 ppm. Τέλος, σήμα του H-2" της γλυκόζης με τον C-1" της ραμνόζης καθώς και σήμα του H-1" της ραμνόζης με τον C-2" της γλυκόζης, συνηγορούν για σύνδεση 1"→2" μεταξύ των δυο σακχάρων. Σύγκριση των τιμών  $^1\text{H NMR}$  και  $^{13}\text{C NMR}$  της ένωσης **X3** με τιμές που δίνονται στη βιβλιογραφία επιβεβαιώνει ότι η δομή της ένωσης είναι ο νεοεσπεριδοζίτης της ναριγγενίνης (Maltese et al., 2009), (Manorenjitha et al., 2016). Η ναριγγίνη έχει απομονωθεί στο γένος *Indigofera* και συγκεκριμένα στο είδος *Indigofera tinctoria* (Narendar et al., 2006) Δεν έχει όμως απομονωθεί με τη μορφή μίγματος δύο C-2 διαστεροισομερών. Ένα φαινόμενο που παρατηρήθηκε πρώτη φορά σε καρπούς γκρέιπφρουτ όπου κατά τη διάρκεια της ωρίμανσής τους η 2S-ναριγγίνη υπόκειται σε μη ενζυμική ρακεμοποίηση στον C-2 μέσω διάνοιξης του δακτυλίου, με αποτέλεσμα να προκύψει μίγμα και των δύο διαστερομερών με μια αναλογία 3:2 με το διαστερομερές S να απαντά σε μεγαλύτερη ποσότητα όπως εμφανίζεται ως επικρατέστερο στη φύση (Funari et al 2011),(Caccamese and Chillemi 2010). Είναι η δεύτερη φορά που απομονώνεται η ναριγγίνη

με τη μορφή διαστερεοισομερών S και R πρώτη φορά που απομονώθηκε στη συγκεκριμένη μορφή ήταν στο φυτό *Tephrosia humilis* (Plioukas et al., 2015).



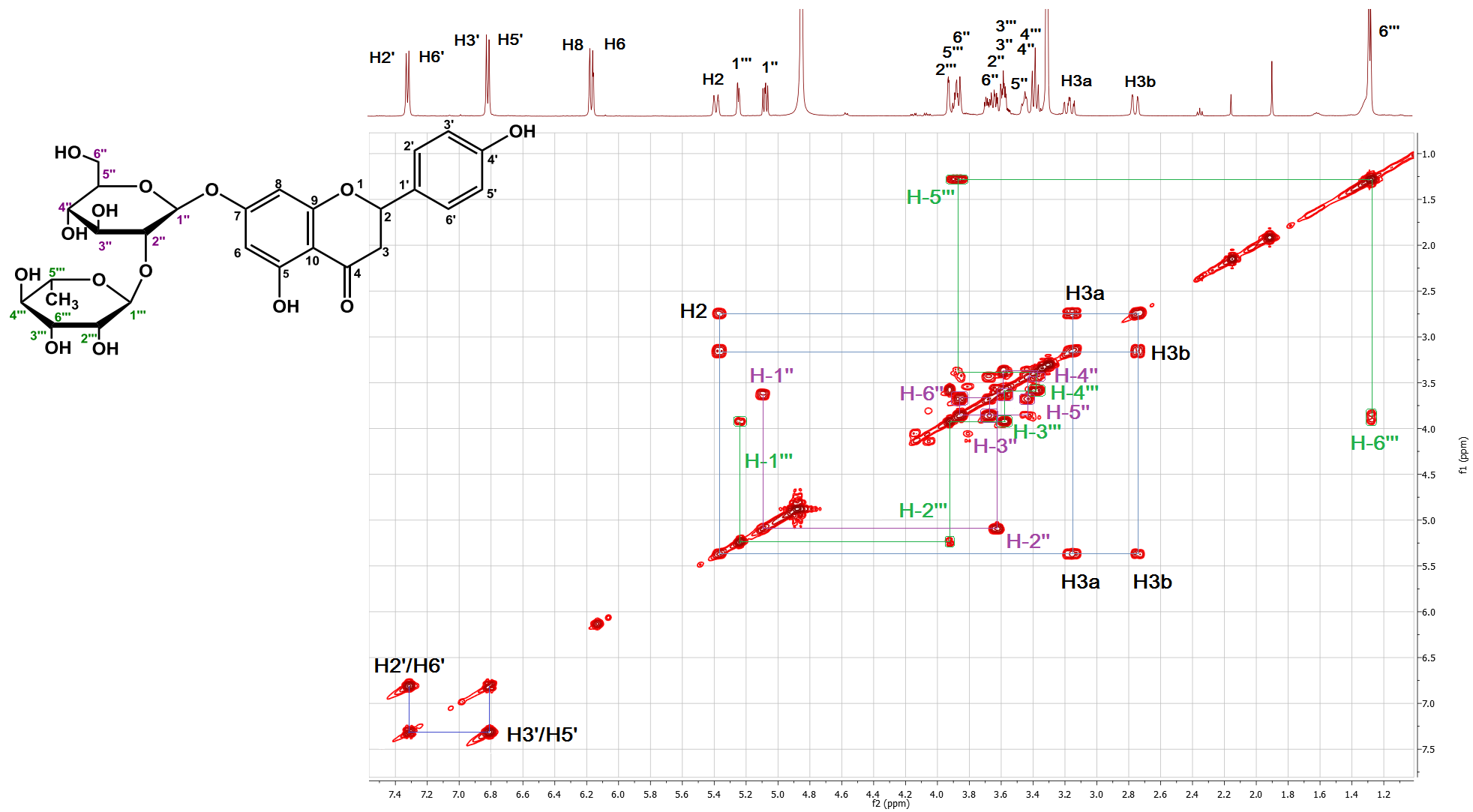
Εικ 50: Μη ενζυματικός επιμερισμός της ναριγγίνης

Φάσμα <sup>1</sup>H- NMR της ένωσης X3 (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)

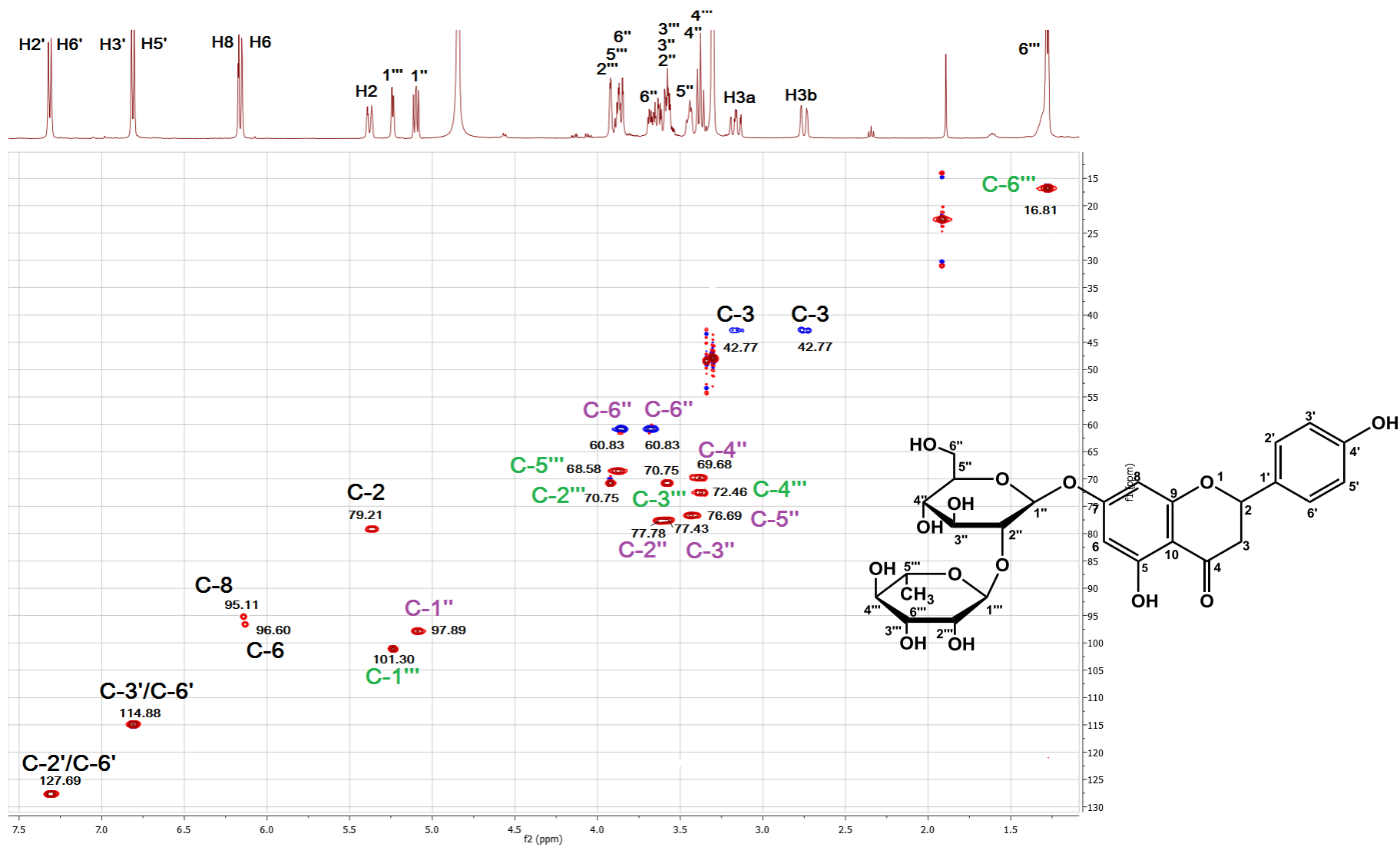




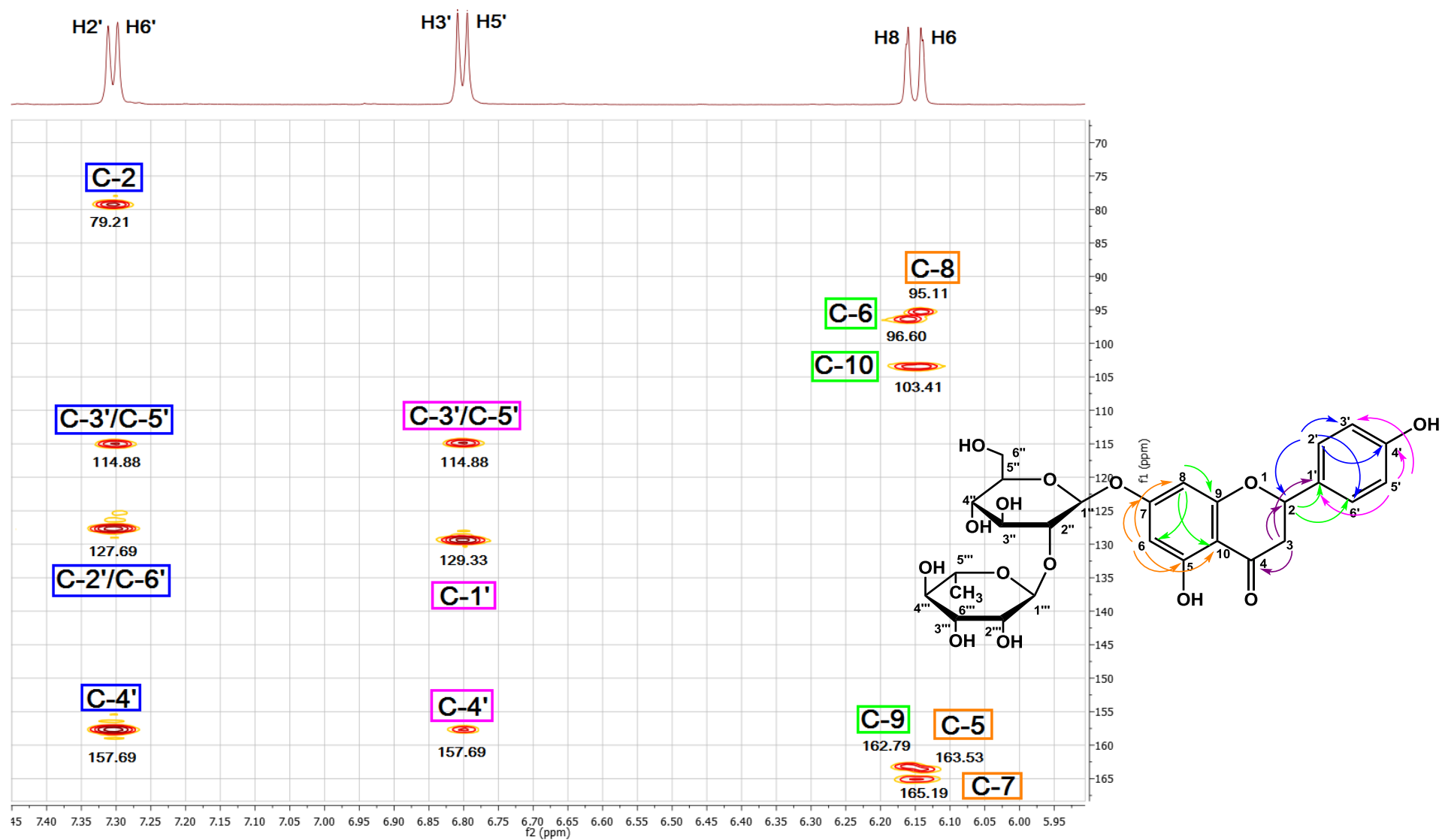
Φάσμα  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY της ένωσης X3 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz)



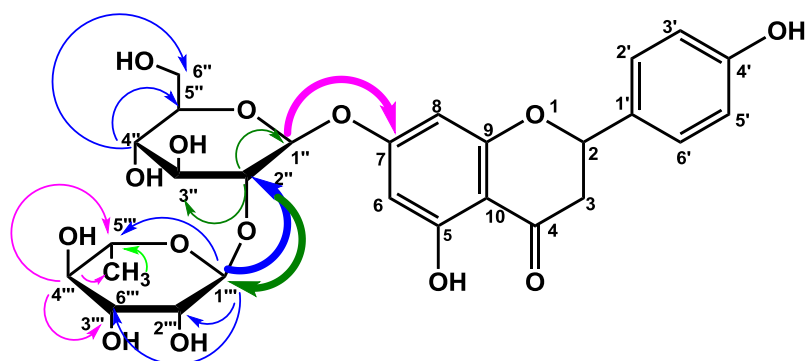
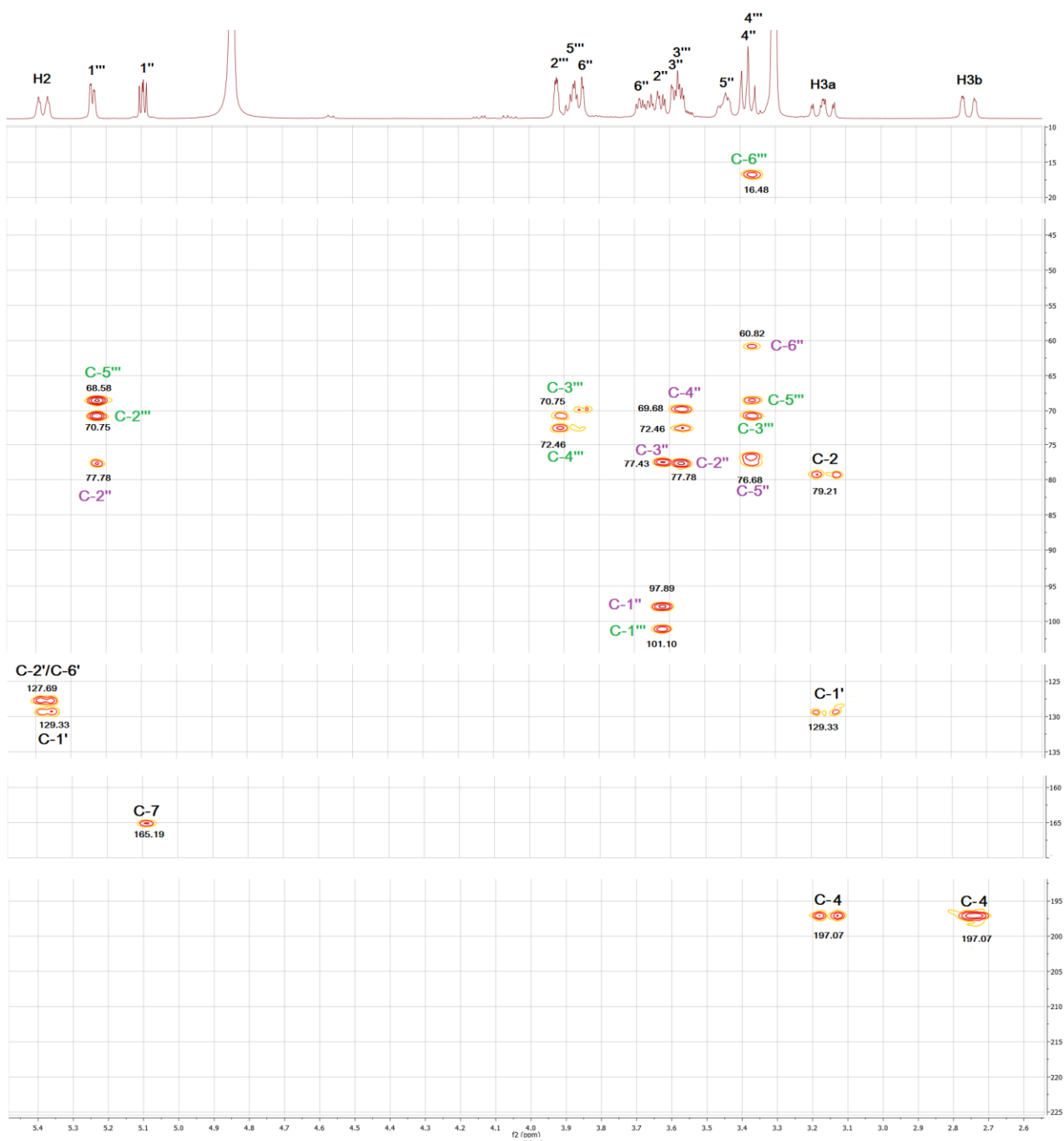
Φάσμα HSQC ένωσης X3 (CD<sub>3</sub>OD, 500MHz)



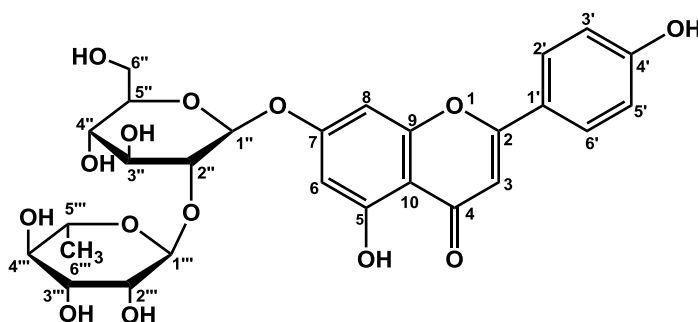
Φάσμα HMBC ένωσης X3 (CD<sub>3</sub>OD, 500MHz) στην περιοχή των αρωματικών πρωτονίων



Φάσμα HMBC ένωσης X3 (CD<sub>3</sub>OD, 500MHz) στην περιοχή σακχάρων



### 13.1.5. Ένωση X4: Νεοεσπεριδοζίτης της απιγενίνης (Ροϊφολίνη)



Η ένωση X4 είχε καφε-κίτρινο φθορισμό στη λάμπα υπεριώδους-ορατού και πράσινο μετά από έκθεση σε ατμούς αμωνίας. Για τον έλεγχο καθαρότητας έγινε TLC κυτταρίνης με συστήματα ανάπτυξης το CAW: Rf=0.56, AcOH 15%, Rf= 0.67, EAW=0.7.

#### Φάσματα υπεριώδους-ορατού Ένωσης X4

Πραγματοποιήθηκε φασματοφωτομετρική εξέταση της ουσίας στο υπεριώδες-ορατό κατά την οποία παρατηρήθηκαν οι παρακάτω χαρακτηριστικές κορυφές απορρόφησης.

Πίνακας 28: Φάσματα υπεριώδους ορατού ένωσης X4

	Κορυφή II		Κορυφή I		Δλ I
MeOH		267.5		331.5	
MeONa	241.5 sh	269.0 (Δλ=+1.5)	302.0	381.5	+49.5
AlCl <sub>3</sub>		275.0 (Δλ=+7.5)	298.5	346.5	382.0
AlCl <sub>3</sub> /HCl		275.5 (Δλ=+8.0)	298.0	340.0	381.5
AcONa		266.5 (Δλ=1.0)		382.0	+50.5
AcONa/H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>		267.5 (Δλ=0.0)		338.5	+7.0

Από την κορυφή I του φάσματος σε MeOH στα 331.5 nm συμπεραίνεται ότι πρόκειται για φλαβόνη. Η βαθυχρωμική μετατόπιση που παρατηρείται αμέσως μετά την προσθήκη MeONa κατά 49.5 nm ενώ ταυτόχρονα συντελείται και αύξηση της έντασης αποδεικνύει ότι το 4'-OH είναι ελεύθερο. Στο φάσμα της ένωσης το οποίο λήφθηκε μετά την προσθήκη AlCl<sub>3</sub> παρατηρείται βαθυχρωμική μετατόπιση της κορυφής I κατά 50.5 nm, η οποία παραμένει σταθερή μετά την προσθήκη HCl και αποδεικνύει ότι το υδροξύλιο της θέσης 5 είναι ελεύθερο, ενώ υπάρχει απουσία ορθο-διυδρόξυ συστήματος. Το φάσμα που λήφθηκε μετά από την προσθήκη AcONa χαρακτηρίζεται από έλλειψη βαθυχρωμικής μετατόπισης της κορυφής II επιβεβαιώνοντας την απουσία ελεύθερου OH στην 7 θέση. Η προσθήκη H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> στο διάλυμα

του AcONa επιβεβαιώνει τη μη ύπαρξη ορθο-συστήματος στον Α ή τον Β δακτύλιο (Mabry et al., 1970).

Πίνακας 29 .Φάσμα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ένωσης X4

<sup>1</sup> H-NMR (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz) και <sup>13</sup> C-NMR (από HSQC και HMBC )				
Ταυτοποίηση	δ <sub>H</sub> (ppm)	J <sub>HH</sub> (Hz)	Ταυτοποίηση	δ <sub>C</sub> (ppm)
H-2'και H-6'	7.90 (d)	8.5	C-2', C-6'	128.23
H-3'και H-5'	6.95 (d)	8.5	C-3', C-5'	115.80
H-8	6.81 (d)	1.5	C-8	94.49
H-6	6.48 (d)	1.5	C-6	99.58
H-3	6.68 (s)		C-3	102.53
			C-5	161.43
			C-7	163.29
			C-9	157.73
			C-10	105.56
			C-1'	121.30
			C-4'	162.23
<b>7-Ο-Γλυκόζη</b>			<b>7-Ο-Γλυκόζη</b>	
H-1"	5.21 (d)	7.5	C-1"	99.32
H-2"	3.67 (dd)	7.5 / 8.0	C-2"	77.63
H-3"	3.60 (m)		C-3"	77.59
H-4"	3.38 (t)	9.0 / 9.5	C-4"	69.92
H-5"	3.53 (m)		C-5"	76.86
H-6"	3.90 (m)		C-6"	60.96
	3.67			
<b>2"-Ο-Ραμνόζη</b>			<b>2"-Ο-Ραμνόζη</b>	
H-1""	5.29 (s)		C-1""	101.09
H-2""	3.92 (m)		C-2""	70.76
H-3""	3.58 (dd)	9.6, 3.0	C-3""	70.76
H-4""	3.38 (t)	9.6	C-4""	72.53
H-5""	3.92 (m)	3.92	C-5""	68.59
H-6""	1.31 (d)	6.0	C-6""	16.84

Η μελέτη του φάσματος <sup>1</sup>H-NMR έδειξε ότι πρόκειται για γλυκοσυλιωμένη φλαβόνη, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τα δισδιάστατα φάσματα NMR της ένωσης, όπου παρατηρούνται τα ακόλουθα:

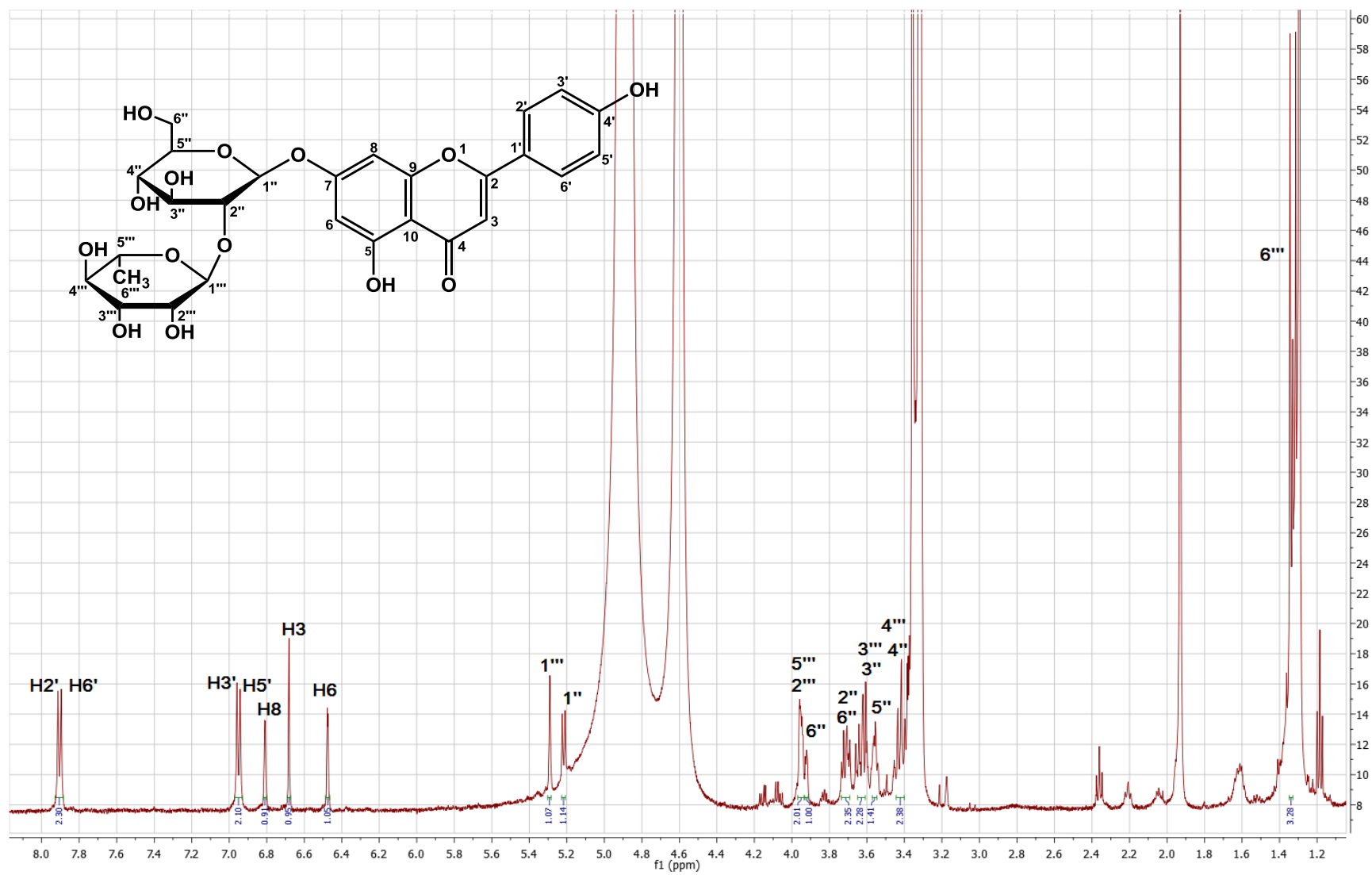
Στην αρωματική περιοχή του φάσματος <sup>1</sup>H NMR παρατηρείται η παρουσία συστήματος AA'BB'. Έτσι τα πρωτόνια H-2' και H-6' εμφανίζονται ως μια διπλή κορυφή σε δ<sub>H</sub> 7.90 με

σταθερά σύζευξης  $J = 8.5$  Hz, ενώ τα H-3' και H-5' εμφανίζονται ως μια διπλή κορυφή σε  $\delta_H$  6,95 με σταθερά σύζευξης  $J = 8.5$  Hz. Παρατηρούνται ακόμα στην αρωματική περιοχή δυο διπλές κορυφές του ενός πρωτονίου σε  $\delta_H$  6.81 ( $J = 1.5$  Hz) και  $\delta_H$  6.48 ( $J = 1.5$  Hz) που συζεύγγονται μεταξύ τους και αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-8 και H-6. Οι κορυφές των πρωτονίων H-8 και H-6 είναι ελαφρώς αποθωρακισμένες και σε χαμηλότερες τιμές πεδίου σε σχέση με την απιγενίνη και αυτό υποδηλώνει την παρουσία σακχάρου στη θέση 7 (Mabry et al., 1970). Το H-3 εμφανίζεται ως μια απλή κορυφή σε  $\delta_H$  6.68.

Στην περιοχή των σακχάρων εμφανίζονται δύο ανωμερικά πρωτόνια που αντιστοιχούν σε μια γλυκόζη και μια ραμνόζη. Το ανωμερικό της ραμνόζης εμφανίζεται ως ευρέως απλή κορυφή σε  $\delta_H$  5.29 με  $\delta_C$  101.09 ενώ το ανωμερικό της γλυκόζης εμφανίζεται ως διπλή σε  $\delta_H$  5.21 με σταθερά σύζευξης  $J = 7.5$  Hz και  $\delta_C$  99.32. Οι σταθερές σύζευξης των δύο σακχάρων είναι ενδεικτικές της  $\alpha$ -διαμόρφωσης για τη ραμνόζη και της  $\beta$ -διαμόρφωσης για τη γλυκόζη. Από τις μεγάλες σταθερές σύζευξης που εμφανίζουν τα πρωτόνια 2" και 4" με τα γειτονικά τους προκύπτει *trans*-αξονική διάταξη των πρωτονίων 2", 3", και 4" ενδεικτικό της παρουσίας της γλυκόζης. Σε  $\delta_H$  1.31 εμφανίζονται τα πρωτόνια του μεθυλίου της ραμνόζης σαν διπλή με  $J = 6.0$  Hz και  $\delta_C$  16.84. Στον πίνακα 29 φαίνονται οι χημικές μετατοπίσεις και οι σταθερές σύζευξης των λοιπών πρωτονίων των δύο σακχάρων, όπως προκύπτουν από το φάσμα  $^1H$  NMR και το δισδιάστατο φάσμα  $^1H$ - $^1H$ -COSY. Η γλυκόζη είναι συνδεδεμένη με το υδροξύλιο της θέσης 7 του φλαβονοειδούς, καθώς αυτό προκύπτει από το κοινό σήμα που εμφανίζουν στο φάσμα HMBC το ανωμερικό της γλυκόζης και τα πρωτόνια H-8 και H-6 στα 163.29 ppm. Η ραμνόζη είναι συνδεδεμένη με τον άνθρακα στη θέση 2 της γλυκόζης (σήματα H-1"/C-2" και H-2"/C-1" στο φάσμα HMBC)

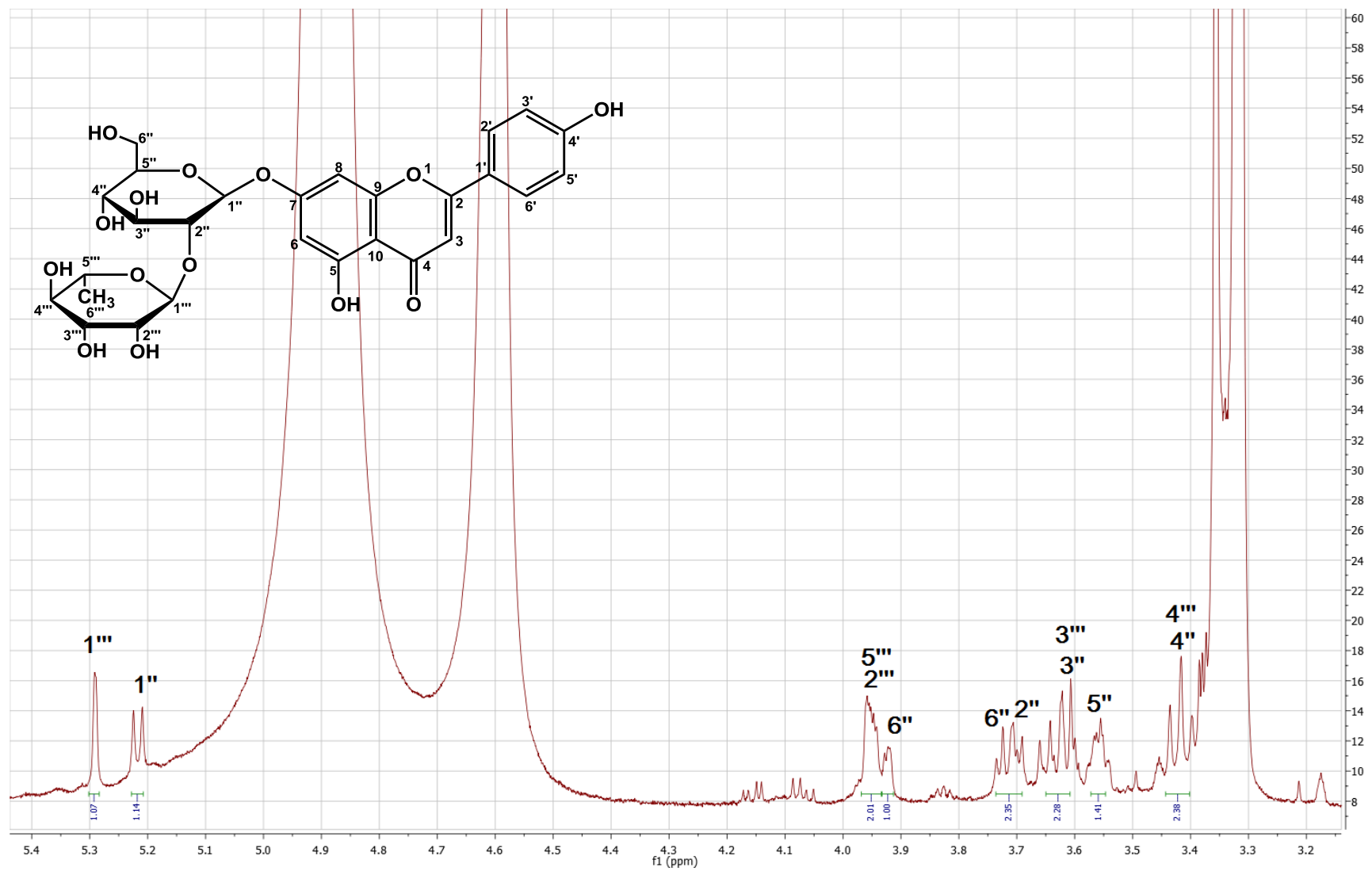
Τα παραπάνω δεδομένα συνηγορούν στο ότι πρόκειται για τον 7-*O*-νεοεσπεριδοζίτη της απιγενίνης την Ροϊφολίνη (Hyuk-Hwan Song et al., 2012). Η ροϊφολίνη είναι η πρώτη φορά που απομονώνεται από το γένος *Indigofera*.

Φάσμα <sup>1</sup>H-NMR της ένωσης X4 (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)

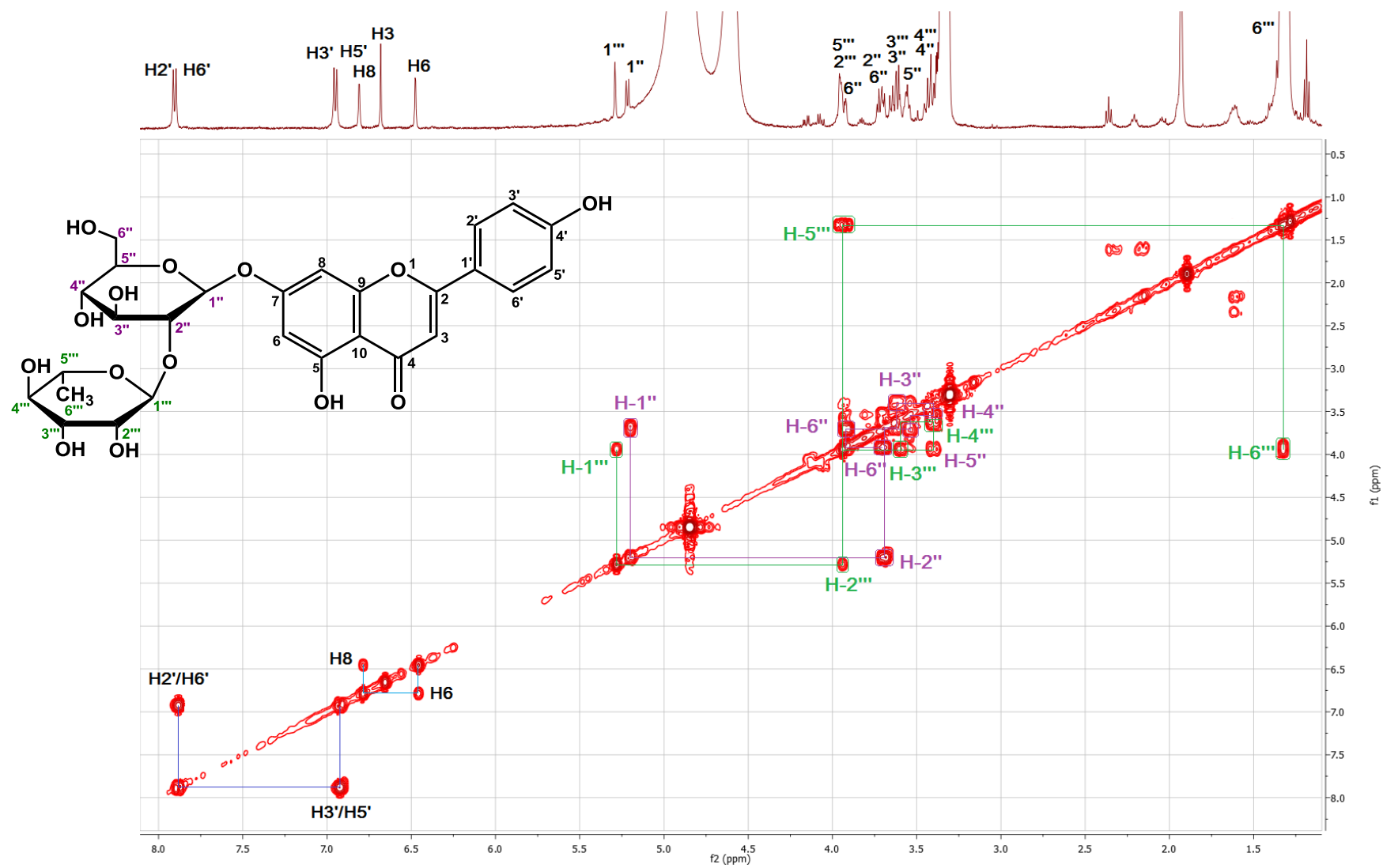




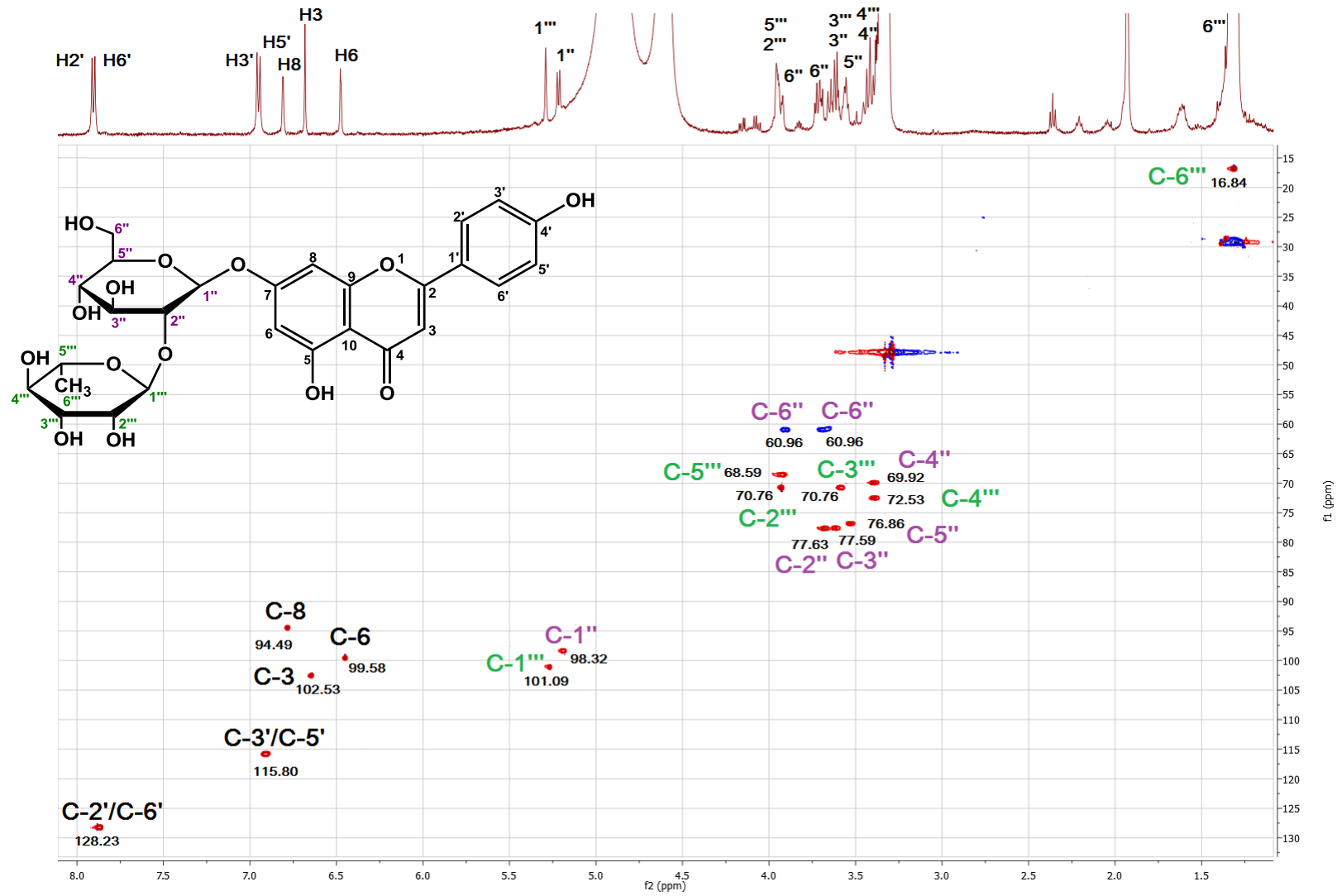
Φάσμα  $^1\text{H}$ -NMR της ένωσης X4 στην περιοχή των σακχάρων ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz)



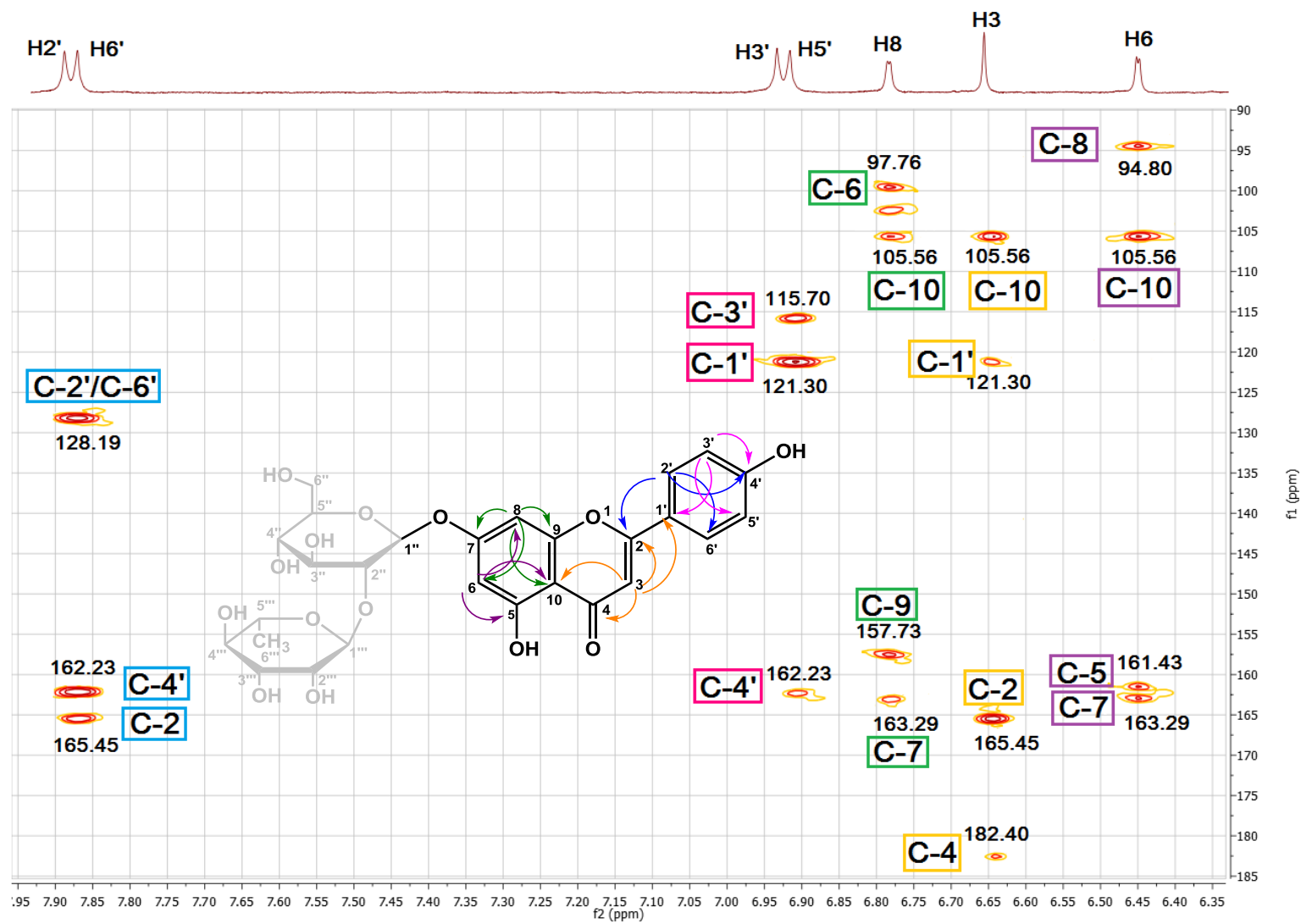
Φάσμα  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY της ένωσης X4 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz)



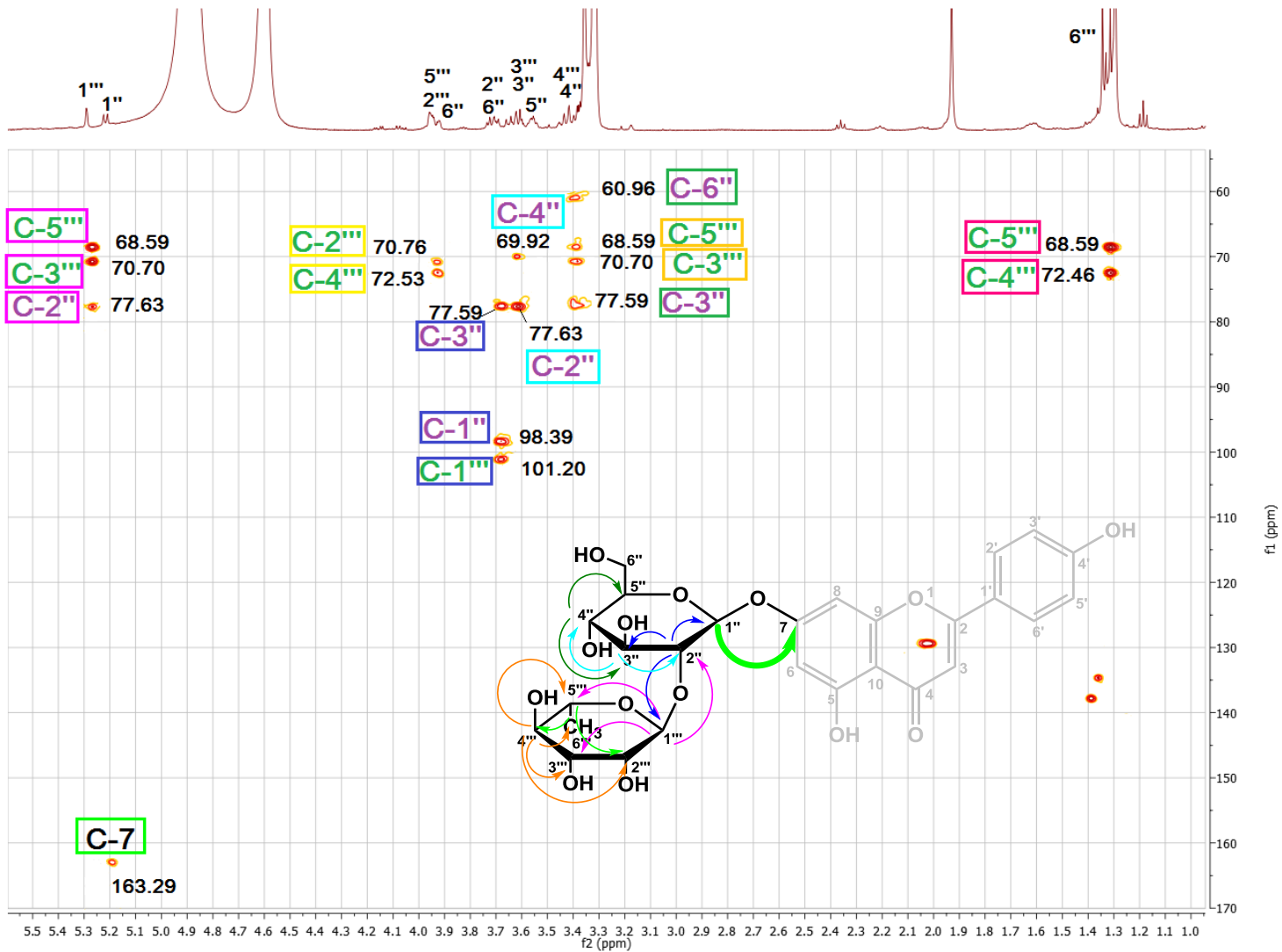
Φάσμα HSQC ένωσης X4 (CD<sub>3</sub>OD, 500MHz)



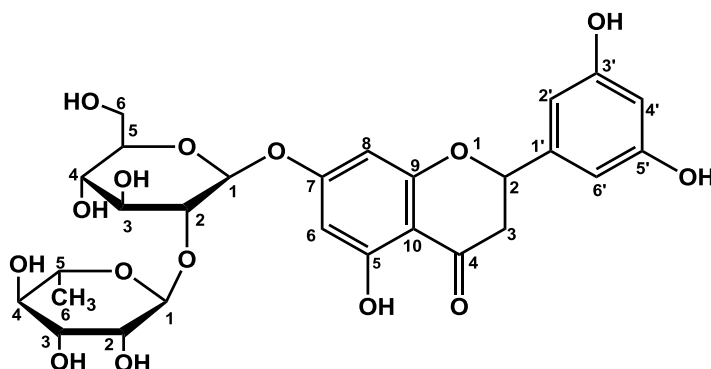
Φάσμα HMBC ένωσης X4 (CD<sub>3</sub>OD, 500MHz) στην περιοχή των αρωματικών πρωτονίων



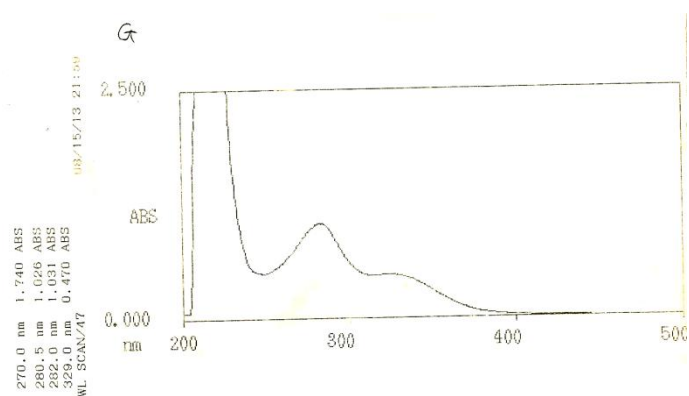
Φάσμα HMBC ένωσης X4 (CD<sub>3</sub>OD, 500MHz) στην περιοχή σακχάρων και αλειφατικών



### 13.1.6. Ένωση X5: 7-O-β-D-Νεοεσπεριδοζίνης της 5,7,3',5' τετραυδροξυ φλαβανόνης



#### Φάσμα UV Ένωσης X5 σε MeOH



Από τα μέγιστα των κορυφών της ένωσης X7 σε μεθανόλη (282 και 329 nm) στο φάσμα υπεριώδους-ορατού, διαπιστώνεται ότι πρόκειται για φλαβανόνη. Τα πειραματικά δεδομένα συμφωνούν και με την βιβλιογραφία (Uffe et al., 1998; Hashmi et al., 2014).

Πίνακας: 30: Φάσματα Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού της ένωσης X5

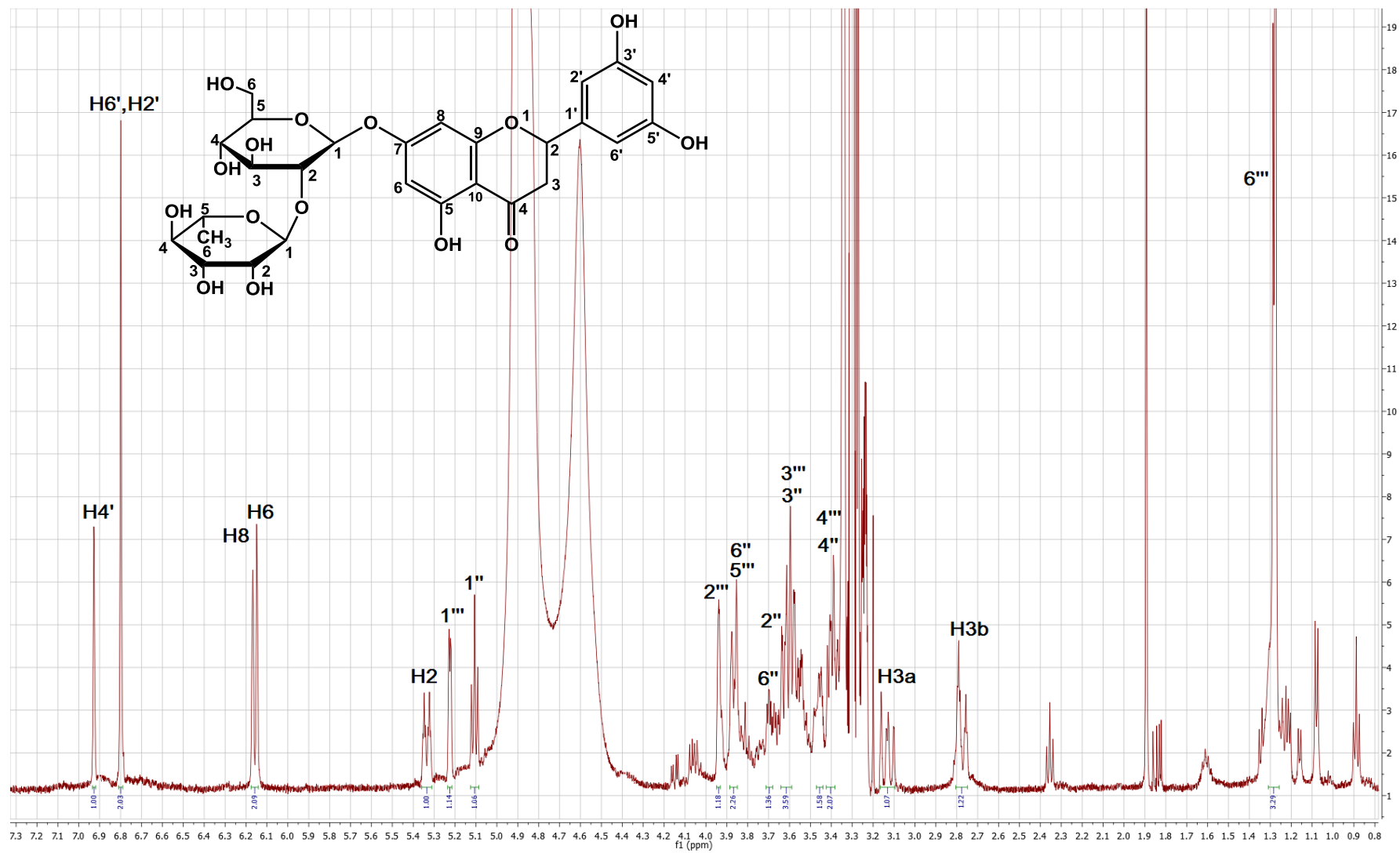
<sup>1</sup> H-NMR και <sup>13</sup> C-NMR (CD <sub>3</sub> OD, 500MHz)				
Ταυτοποίηση	δ <sub>H</sub> (ppm)	J <sub>HH</sub> (Hz)	Ταυτοποίηση	δ <sub>C</sub> (ppm)
H-2'	6.80 (s)		C-2'	115.26
H-4'	6.93 (s)		C-4'	113.26
H-6'	6.80 (s)		C-6'	118.15
H-8	6.15 (d)	2.0	C-8	95.37
H-6	6.15 (d)	2.0	C-6	96.37
H-2	5.33 (2dd)	13.5, 12.5, 2.5, 2.0	C-2	79.21
H3a	3.13 (2dd)	17.1, 16.5, 12.5, 13.5	C-3	45.35
H3b	2.77 (2dd)	17.1, 2.0, 16.6, 2.5	C-3	45.35
<b>7-O-Γλυκόζη</b>			<b>7-O-Γλυκόζη</b>	
H-1''	5.12, 5.09 (t)	8.5, 8.0	C-1''	97.70
H-2''	3.61 (dd)	8.0, 7.0	C-2''	77.58
H-3''	3.58 (m)	10.0, 9.0	C-3''	77.53
H-4''	3.39 (m)	10.0, 9.0	C-4''	69.55
H-5''	3.44 (m)	10.0, 6.0, 2.0	C-5''	76.58
H-6''	3.86 (brdd) 3.67 (m)	11.0, 2.0	C-6''	60.80
<b>2''-Ο-Ραμνόζη</b>			<b>2''-Ο-Ραμνόζη</b>	
H-1'''	5.24, 5.23 (d)	3.5	C-1'''	100.09
H-2'''	3.92 (m)		C-2'''	70.75
H-3'''	3.57 (m)		C-3'''	70.66
H-4'''	3.39 (m)		C-4'''	72.36
H-5'''	3.85 (m)		C-5'''	68.59
H-6'''	1.27 (d)	6.0	C-6'''	16.65

Σε αυτό συνηγορεί και το φάσμα NMR της ένωσης όπου παρατηρούνται τα παρακάτω: Στην αρωματική περιοχή του φάσματος <sup>1</sup>H NMR παρατηρούνται δύο ευρείες απλές κορυφές που αντιστοιχούν σε 3 πρωτόνια. Έτσι η απλή κορυφή στα δ<sub>H</sub> 6.93 αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-4' ενώ η απλή κορυφή στα δ<sub>H</sub> 6.80 αντιστοιχεί στα πρωτόνια H-2' και H-6' του Β δακτυλίου. Επιπλέον παρατηρείται μια διπλή κορυφή στα δ<sub>H</sub> 6.17 με σταθερά σύζευξης (*J* = 2.0 Hz) που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-8 του δακτυλίου Α και μια διπλή κορυφή στα δ<sub>H</sub> 6.15 με σταθερά σύζευξης (*J* = 2.0 Hz) αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-6. Στην περιοχή του φάσματος πρωτονίου

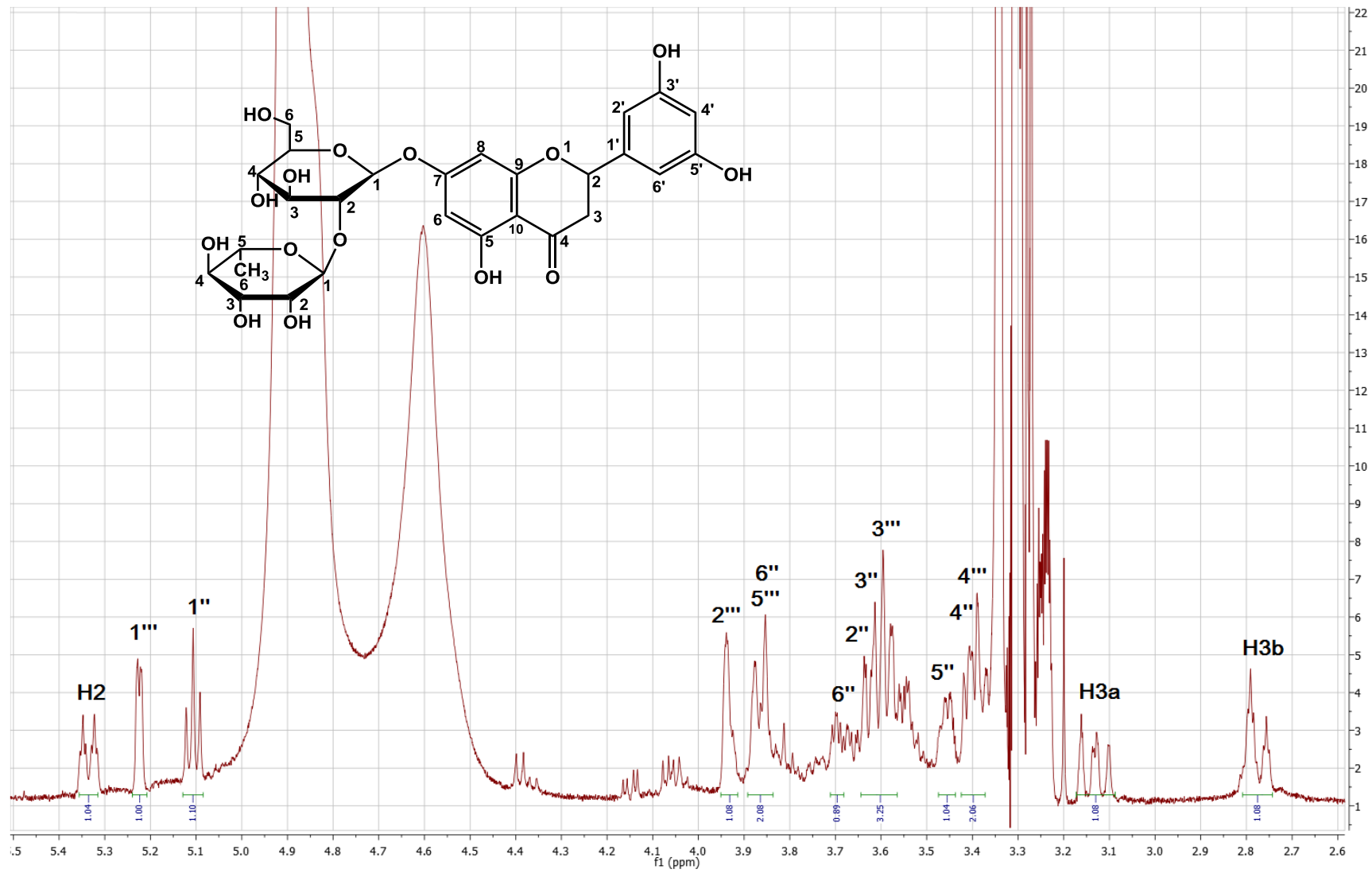
από δ<sub>H</sub> 5.50 έως δ<sub>H</sub> 2.60 παρατηρείται η ύπαρξη πλευρικών σημάτων που υποδεικνύουν την παρουσία μιας άλλης φλαβανόνης, καθώς πρόκειται για μίγμα δύο διαστερομερών φλαβανονών (S- και -R) (Maltese et al., 2009). Έτσι το πρωτόνιο H-2 στα δ<sub>H</sub> 5.33 εμφανίζεται σαν δυο διπλές διπλών ( $J=13.5, 12.5, 2.5, 2.0$  Hz) και όχι σαν διπλή διπλών που θα έπρεπε να εμφανίζεται εφόσον ήταν μια μόνο ένωση. Επιπροσθέτως τα πρωτόνια H-3a και H-3b με δ<sub>H</sub> 3.13 και δ<sub>H</sub> 2.77 εμφανίζονται ως δυο διπλές διπλών με σταθερές σύζευξης  $J = 12.5, 17.1, 13.5, 16.5$  Hz και  $J = 16.6, 17.1, 2.5, 2.0$  Hz αντίστοιχα. Στην κεντρική περιοχή του φάσματος <sup>1</sup>H NMR εμφανίζονται δύο ανωμερικά πρωτόνια της γλυκόζης των δύο διαστερομερών R- και S- σε δ<sub>H</sub> 5.12 και δ<sub>H</sub> 5.09 με σταθερές σύζευξης  $J = 8.5$  και  $8.0$  Hz και τα δύο ανωμερικά της ραμνόζης σε δ<sub>H</sub> 5.24 και 5.23. Τα πρωτόνια των σακχάρων βρίσκονται στην περιοχή μεταξύ δ<sub>H</sub> 3.95-3.35. Τα πρωτόνια του μεθυλίου της ραμνόζης βρίσκονται στα δ<sub>H</sub> 1.27 και εμφανίζονται ως διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης ( $J = 6.0$  Hz) στα δ<sub>C</sub> 16.65. Από το φάσμα δύο διαστάσεων COSY φαίνονται οι συσχετίσεις των πρωτονίων των σακχάρων και των υπολοίπων. Ενώ από το φάσμα δύο διαστάσεων HSQC φαίνονται οι αντίστοιχοι άνθρακες. Σύγκριση με την ένωση X-4 συνηγορεί ότι τα σάκχαρα είναι γλυκόζη και ραμνόζη. Η έλλειψη φάσματος άνθρακα ή HMBC λόγω χαμηλής ποσότητας της ουσίας δεν καθιστά δυνατή την διευκρίνιση των τεταρτοταγών ανθράκων της ένωσης. Σύγκριση των σημάτων των πρωτονίων H-6 και H-8 καθώς και των πρωτονίων των δυο σακχάρων με τα αντίστοιχα της ένωσης X-4 καθώς επίσης και των τιμών των αντίστοιχων ανθράκων μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η θέση σύνδεσης των σακχάρων στη φλαβανόνη είναι το OH του άνθρακα 7 και η σύνδεση μεταξύ των σακχάρων είναι 1-ραμνόζη→2-γλυκόζη γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τη βιβλιογραφία (Wang Xin-Luan et al., 2008). Η ένωση X5 απομονώνεται για πρώτη φορά από το γένος *Indigofera*. Είναι η πρώτη φορά που απομονώνεται μίγμα των δύο διαστεροισομερών S και R. Έχει απομονωθεί για πρώτη φορά από το φυτό *Drynaria fortunei* (KUNZE) (Wang Xin-Luan et al., 2008) όπου στη συγκεκριμένη περίπτωση απομονώθηκε μόνο το S διαστεροισομερές.



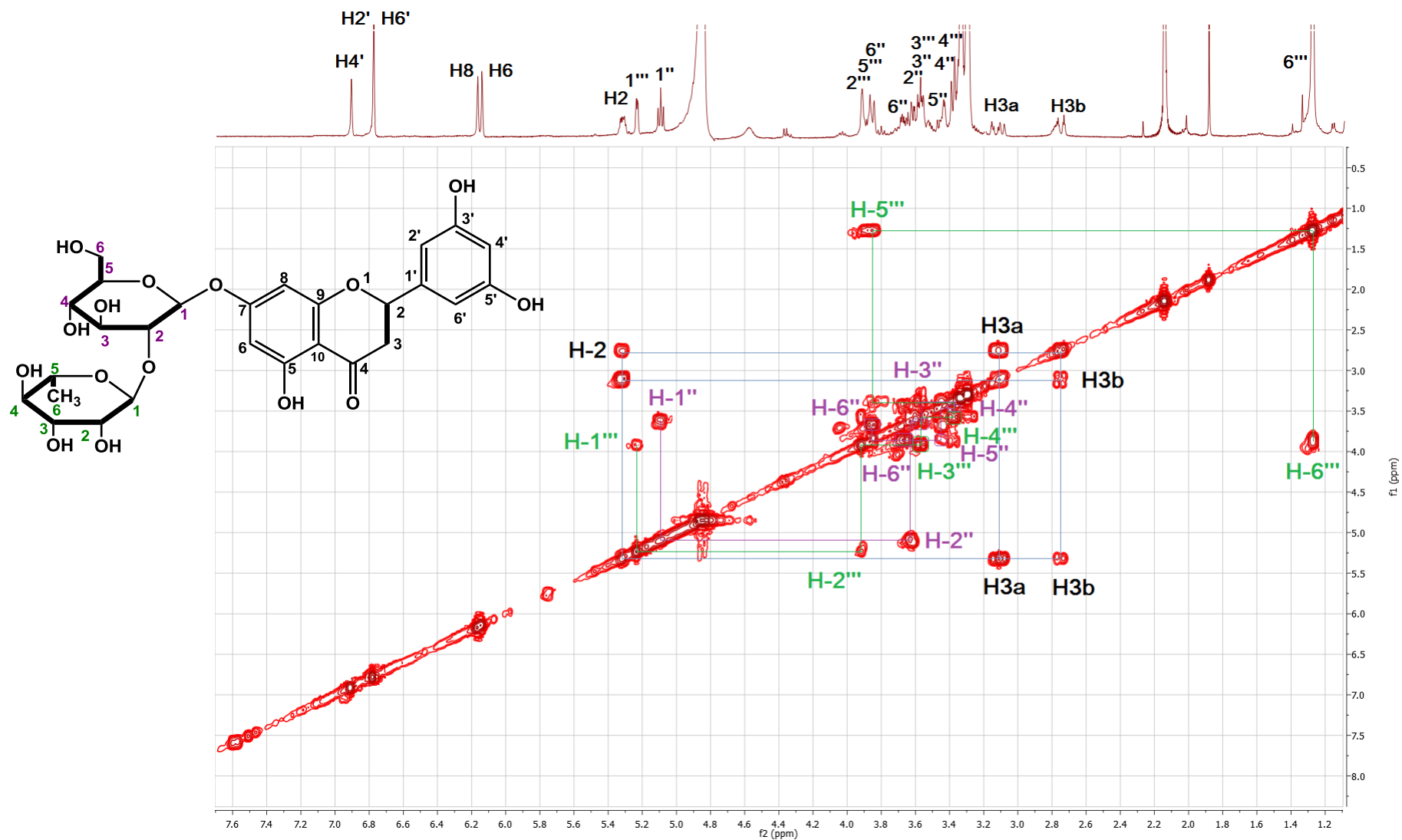
Φάσμα <sup>1</sup>H-NMR της ένωσης X5 (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)



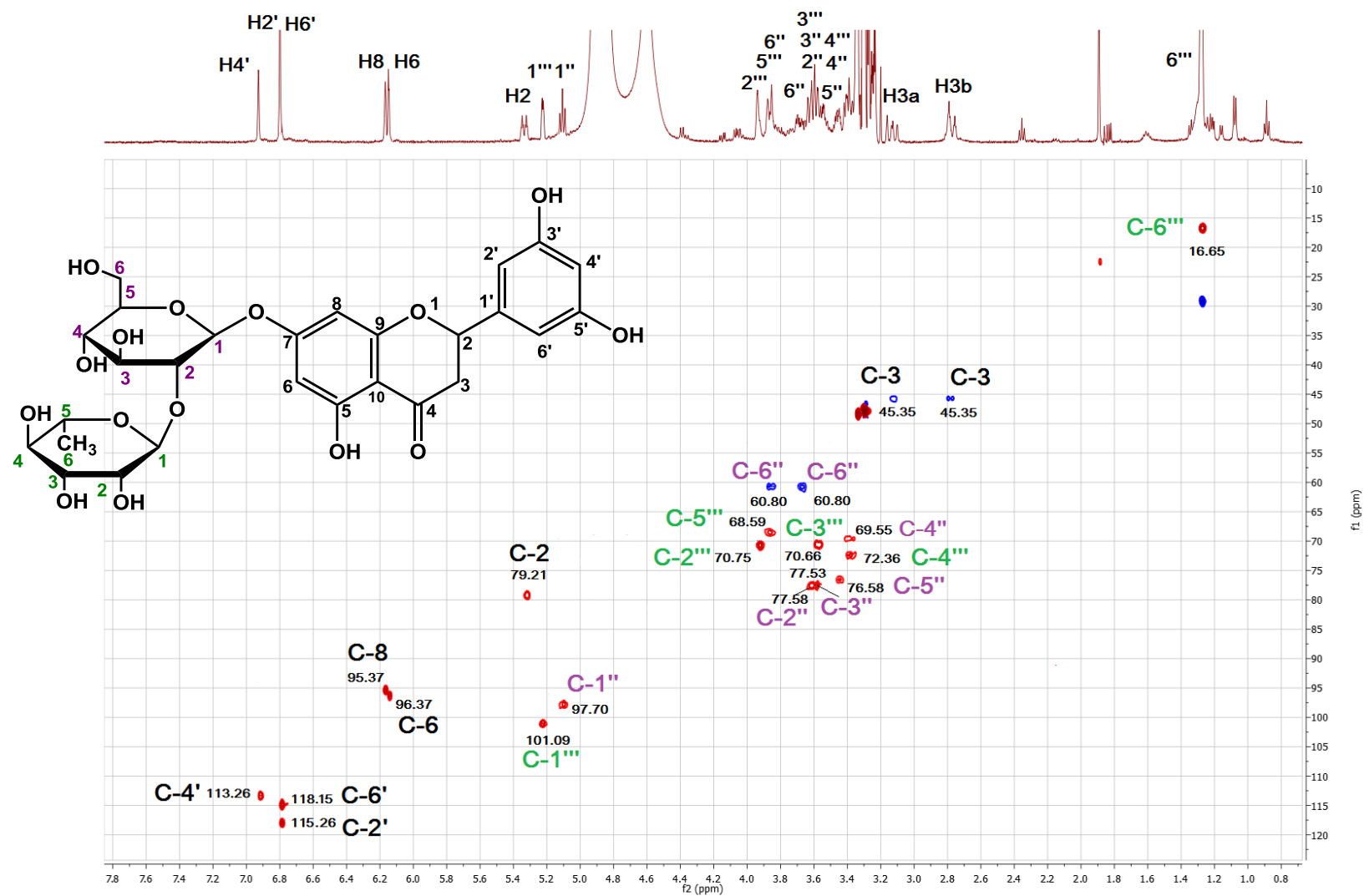
Φάσμα  $^1\text{H}$ - NMR της ένωσης X5 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) στην περιοχή των σακχάρων



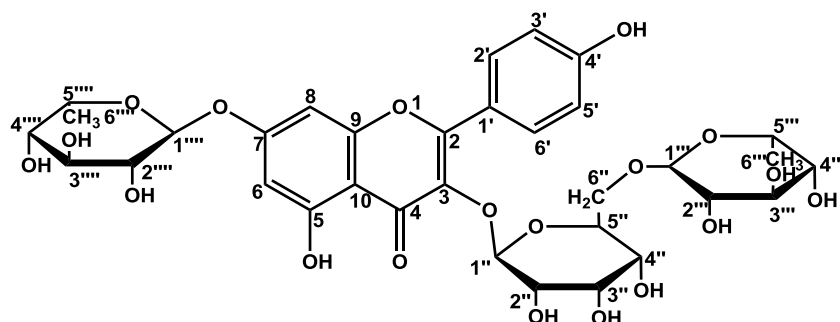
Φάσμα  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY της ένωσης X5 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz)



Φάσμα HSQC της ένωσης X5 (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)



13.1.7. Ένωση X6: 3-*O*- $\alpha$ -L-ραμνοπυρανοζυλο-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-γαλακτοπυρανοζυλο-7-*O*- $\alpha$ -L-ραμνοπυρανοζίτης της καιμφερόλης (Ρομπινίνη)



Η ένωση X6 εμφανίζεται σαν πορτοκαλί ίζημα, ενώ κάτω από το υπεριώδες/ορατό εμφανίζεται σαν καφέ-κίτρινη κηλίδα πριν και μετά από έκθεση σε ατμούς αμμωνίας. Για τον έλεγχο καθαρότητας έγινε TLC σε πλάκες κυτταρίνης με συστήματα ανάπτυξης CAW: Rf=0.40, AcOH 15%, Rf= 0.78, EAW=0.38.

**Φάσμα υπεριώδους-ορατού**

Κατά τη φασματοφωτομετρική εξέταση της ουσίας ελήφθησαν χαρακτηριστικές καμπύλες με τα ακόλουθα μέγιστα (nm).

**Πίνακας 31: Φάσματα Υπεριώδους-Ορατού ένωσης X6**

	Κορυφή II		Κορυφή I		$\Delta\lambda$ I
MeOH	244.0	266.5	315.0 sh	349.0	
MeONa	243.5	274.5 ( $\Delta\lambda$ = +8.0)	299.5	349.0	+54.0
AlCl <sub>3</sub>	233.0	274.0 ( $\Delta\lambda$ = +7.5)	302.5	354.5	+47
AlCl <sub>3</sub> /HCl		260.5 ( $\Delta\lambda$ = +6.0)	298.0	337.0	+38.5
AcONa		267.5 ( $\Delta\lambda$ = +1.0)	318.0 sh	362.5	+56
AcONa/H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>		267.0 ( $\Delta\lambda$ = 0.5)	280.0 sh	320.0 sh	+5

Η απορρόφηση της ένωσης σε MeOH στα 349.0 nm υποδηλώνει ότι πρόκειται για φλαβονόλη με υποκατεστημένο το υδροξύλιο της θέσης 3 γεγονός που συμφωνεί και με το φάσμα <sup>1</sup>HNMR που παρατηρείται απουσία πρωτονίου της θέσης 3. Η βαθυχρωμική μετατόπιση της κορυφής I κατά 54.0 nm (σε σχέση με την αντίστοιχη σε MeOH) που παρατηρείται αμέσως μετά την προσθήκη MeONa με αύξηση της έντασης, αποδεικνύει ότι το υδροξύλιο της θέσης 4' είναι ελεύθερο. Η προσθήκη AlCl<sub>3</sub> στο μεθανολικό διάλυμα του φλαβονοειδούς προκαλεί μια βαθυχρωμική μετατόπιση της κορυφής I κατά 47.0 nm η οποία παραμένει μετά την προσθήκη HCl και δηλώνει ελεύθερο 5-OH και απουσία όρθο διϋδρόξυ συστήματος στον A ή στον B δακτύλιο. Το φάσμα που λήφθηκε μετά από την προσθήκη AcONa στο μεθανολικό διάλυμα της ουσίας, χαρακτηρίζεται από απουσία βαθυχρωμικής μετατόπισης της κορυφής II γεγονός

που επιβεβαιώνει ότι το 7-OH είναι δεσμευμένο. Η προσθήκη τριών σταγόνων H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> στο προηγούμενο διάλυμα του AcONa επιβεβαιώνει τη μη ύπαρξη ορθο-διυδροξυ-συστήματος στον Α ή τον Β δακτύλιο (Mabry et al., 1970).

Πίνακας 32: Φάσματα Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού ένωσης X6

<sup>1</sup> H-NMR (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz) και <sup>13</sup> C-NMR (*από HSQC και HMBC )				
Ταυτοποίηση	δ <sub>H</sub> (ppm)	J <sub>HH</sub> (Hz)	Ταυτοποίηση	δ <sub>C</sub> (ppm)
H-2'και H-6'	8.11 (d)	9.0	C-2', C-6'	131.14
H-3'και H-5'	6.89 (d)	9.0	C-3', C-5'	114.79
H-8	6.76 d	1.5	C-8	94.30
H-6	6.48 d	1.5	C-6	99.22
			C-2	158.36
			C-3	135.38
			C-5	161.42
			C-7	161.98
			C-9	156.75
			C-10	106.05
			C-1'	121.08
			C-4'	160.36
<b>3-Ο-Γαλακτόζη</b>			<b>3-Ο-Γαλακτόζη</b>	
H-1''	5.11 (d)	8.0	C-1''	103.70
H-2''	3.79 (dd)	8.0, 9.5	C-2''	71.51
H-3''	3.61 (m)		C-3''	74.02
H-4''	3.76 (m)		C-4''	68.73
H-5''	3.53 (m)		C-5''	73.57
H-6''	3.71 (m)		C-6''	65.94
	3.40 (m)			
<b>6''-Ο-Ραμνόζη</b>			<b>6''-Ο-Ραμνόζη</b>	
H-1'''	4.50 (d)	1.5	C-1'''	100.50
H-2'''	3.56 (dd)	1.5, 3.5	C-2'''	70.64
H-3'''	3.48 (m)		C-3'''	70.84
H-4'''	3.27 (t)	9.5	C-4'''	72.47
H-5'''	3.52 (m)		C-5'''	68.26
H-6'''	1.17 (d)	6.0	C-6'''	16.58
<b>7-Ο-Ραμνόζη</b>			<b>7-Ο-Ραμνόζη</b>	
H-1''''	5.56 (d)	1.5	C-1''''	98.48
H-2''''	4.01 (dd)	1.5, 3.0	C-2''''	70.27
H-3''''	3.83 (m)		C-3''''	70.63
H-4''''	3.47 (m)		C-4''''	72.14
H-5''''	3.59 (m)		C-5''''	69.83
H-6''''	1.25 (d)	6.0	C-6''''	16.65

Η μελέτη του φάσματος  $^1\text{H-NMR}$  έδειξε ότι πρόκειται για γλυκοσυλιωμένη φλαβονόλη, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τα δισδιάστατα φάσματα NMR της ένωσης.

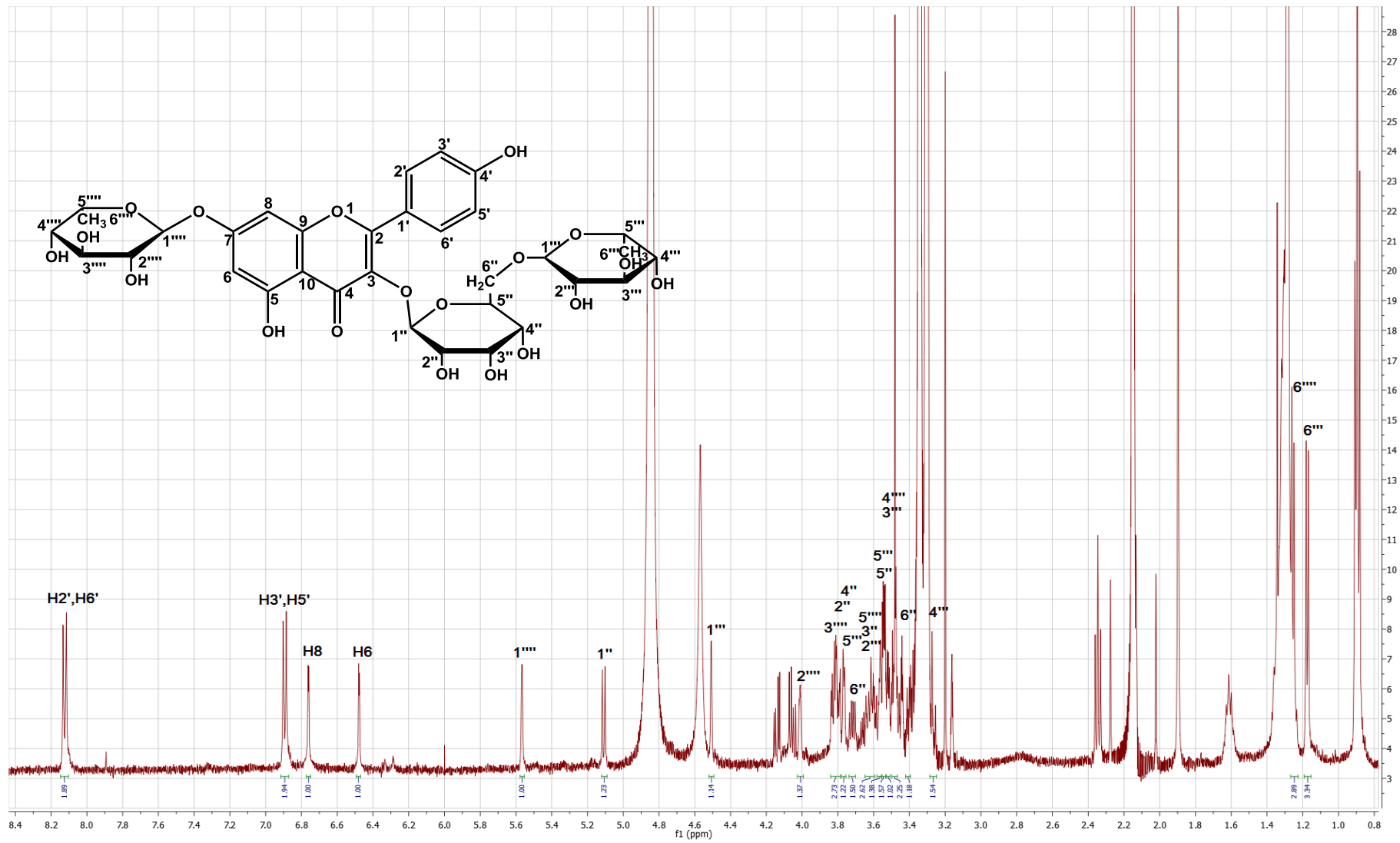
Στην αρωματική περιοχή του φάσματος  $^1\text{H NMR}$  παρατηρείται η παρουσία συστήματος  $\text{AA'BB'}$ . Τα πρωτόνια  $\text{H-2'}$  και  $\text{H-6'}$  εμφανίζονται ως μια διπλή κορυφή σε  $\delta_{\text{H}}$  8.11 με σταθερά σύζευξης  $J = 9.0 \text{ Hz}$  ενώ τα  $\text{H-3'}$  και  $\text{H-5'}$  εμφανίζονται ως μια διπλή κορυφή σε  $\delta_{\text{H}}$  6.89 με σταθερά σύζευξης  $J = 9.0 \text{ Hz}$ . Παρατηρούνται ακόμα στην αρωματική περιοχή δυο διπλές κορυφές του ενός πρωτονίου σε  $\delta_{\text{H}}$  6.76 ( $J = 1.5 \text{ Hz}$ ) και  $\delta_{\text{H}}$  6.48 ( $J = 1.5 \text{ Hz}$ ) που συζεύγνυνται μεταξύ τους υποδηλώνοντας *μετα* σύζευξη των πρωτονίων  $\text{H-8}$  και  $\text{H-6}$  αντίστοιχα. Οι κορυφές των πρωτονίων  $\text{H-8}$  και  $\text{H-6}$  είναι ελαφρώς αποθωρακισμένες και σε χαμηλότερες τιμές πεδίου σε σχέση με το άγλυκο της καιμφορόλης και αυτό υποδηλώνει την παρουσία σακχάρου στη θέση 7 (Mabry et al., 1970).

Στην περιοχή των σακχάρων εμφανίζονται τρία ανωμερικά πρωτόνια σακχάρων (μια γαλακτόζη και δυο ραμνόζες). Μεταξύ  $\delta_{\text{H}}$  4.03 με  $\delta_{\text{H}}$  3.27 εμφανίζονται τα υπόλοιπα πρωτόνια των σακχάρων. Τα  $6''''$  πρωτόνια του μεθυλίου της ραμνόζης που συνδέεται στον άνθρακα 7 του φλαβονοειδούς εμφανίζονται σε  $\delta_{\text{H}}$  1.25 με σταθερά σύζευξης  $J = 6.0 \text{ Hz}$ , τα  $6'''$  πρωτόνια του μεθυλίου της ραμνόζης το οποίο συνδέεται με τη γαλακτόζη με ( $1'''' \rightarrow 6''''$ ) εμφανίζεται στα  $\delta_{\text{H}}$  1.17 με σταθερά σύζευξης  $J = 6.0 \text{ Hz}$ . Στον πίνακα 32 φαίνονται οι χημικές μετατοπίσεις και οι σταθερές σύζευξης των λοιπών πρωτονίων των δύο σακχάρων, όπως προκύπτουν από το φάσμα  $^1\text{H NMR}$  και τα δισδιάστατα φάσματα και πιστοποιούν σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα ότι πρόκειται για γαλακτόζη και ραμνόζη. Μια από τις δύο ραμνόζες και συγκεκριμένα η ραμνόζη με ανωμερικό σε  $\delta_{\text{H}}$  5.56 είναι συνδεδεμένη στη θέση 7 του φλαβονοειδούς όπως φαίνεται από το φάσμα HMBC όπου το ανωμερικό πρωτόνιο  $1''''$  έχει ένα κοινό σήμα με τα πρωτόνια  $\text{H-8}$  και  $\text{H-6}$  του φλαβονοειδούς σε  $\delta_{\text{C}}$  161.98 με τον άνθρακα C-7. Το ανωμερικό  $1''$  της γαλακτόζης εμφανίζεται στα  $\delta_{\text{H}}$  5.11 και συνδέεται με τον άνθρακα C-3 του δακτυλίου C, όπως φαίνεται από ασθενές σήμα που παρατηρείται στο HMBC  $\text{H-1}''/\text{C-3}$  σε  $\delta_{\text{C}}$  135.38 που αντιστοιχεί στον άνθρακα C-3. Το ανωμερικό  $1''''$  της ραμνόζης με  $\delta_{\text{H}}$  4,50 συνδέεται στη θέση 6 της γαλακτόζης όπου παρατηρείται σήμα  $\text{H-1}''''/\text{C-6}''$  ( $\delta_{\text{C}}$  65.94). Αυτό επιβεβαιώνεται και από τη παραμαγνητική αποθωράκιση του άνθρακα  $6''$  της γαλακτόζης σε  $\delta_{\text{C}}$  65.94 ppm συγκρινόμενος με τον άνθρακα  $6''$  της γαλακτόζης χωρίς υποκατάσταση που εμφανίζεται σε  $\delta_{\text{C}}$  61.90 (Vieira et al., 2016). Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω καθώς και μετά από σύγκριση με τη βιβλιογραφία φαίνεται ότι η **ένωση X6** είναι η 3-*O*- $\alpha$ -L-ραμνοπυρανοζυλο-

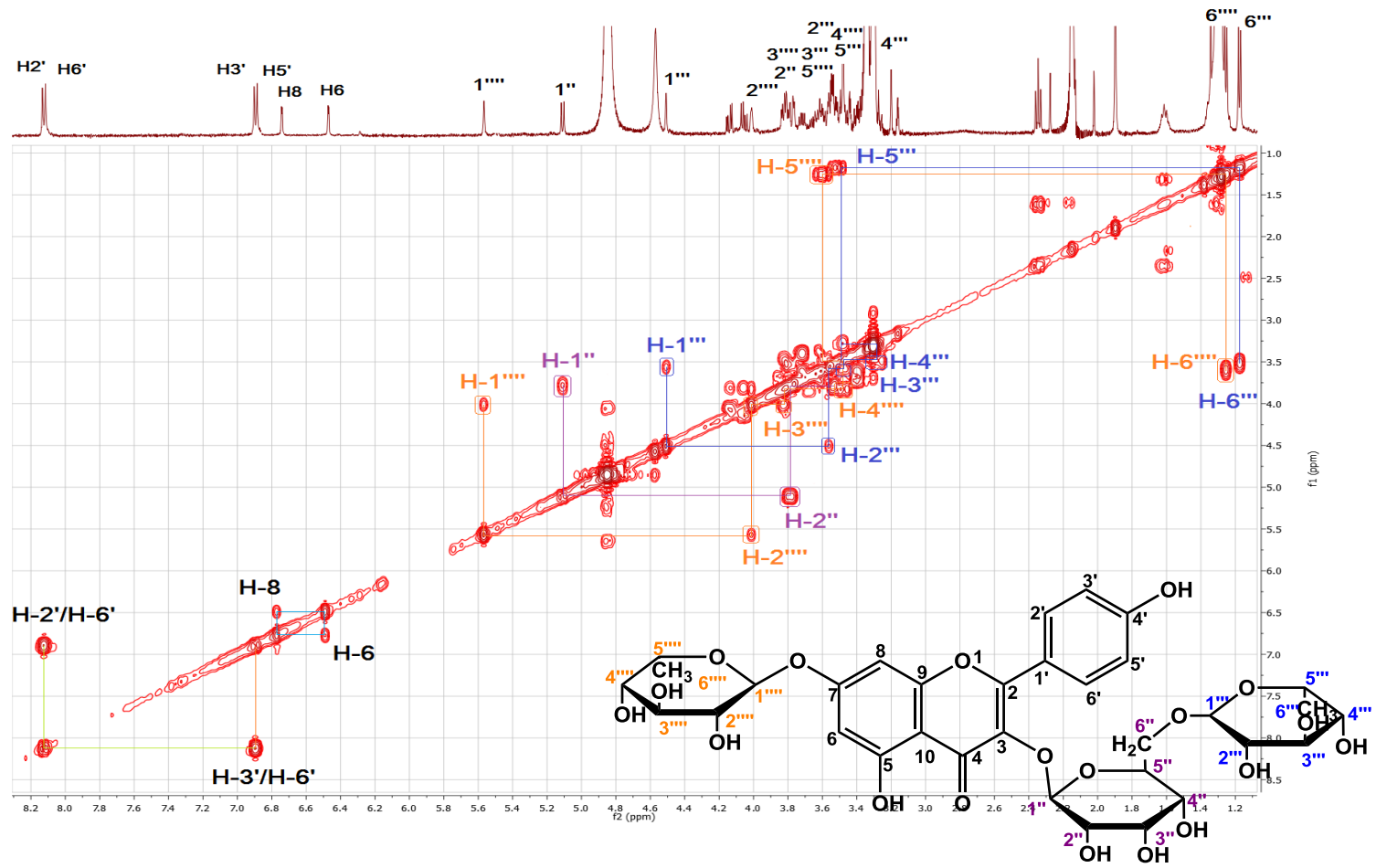
(1→6)-β-D-γαλακτοπυρανοζυλο-7-*O*-α-L-ραμνοπυρανοζίτης της καιμφερόλης (Ρομπινίνη) (Qin Liu et al., 1994).



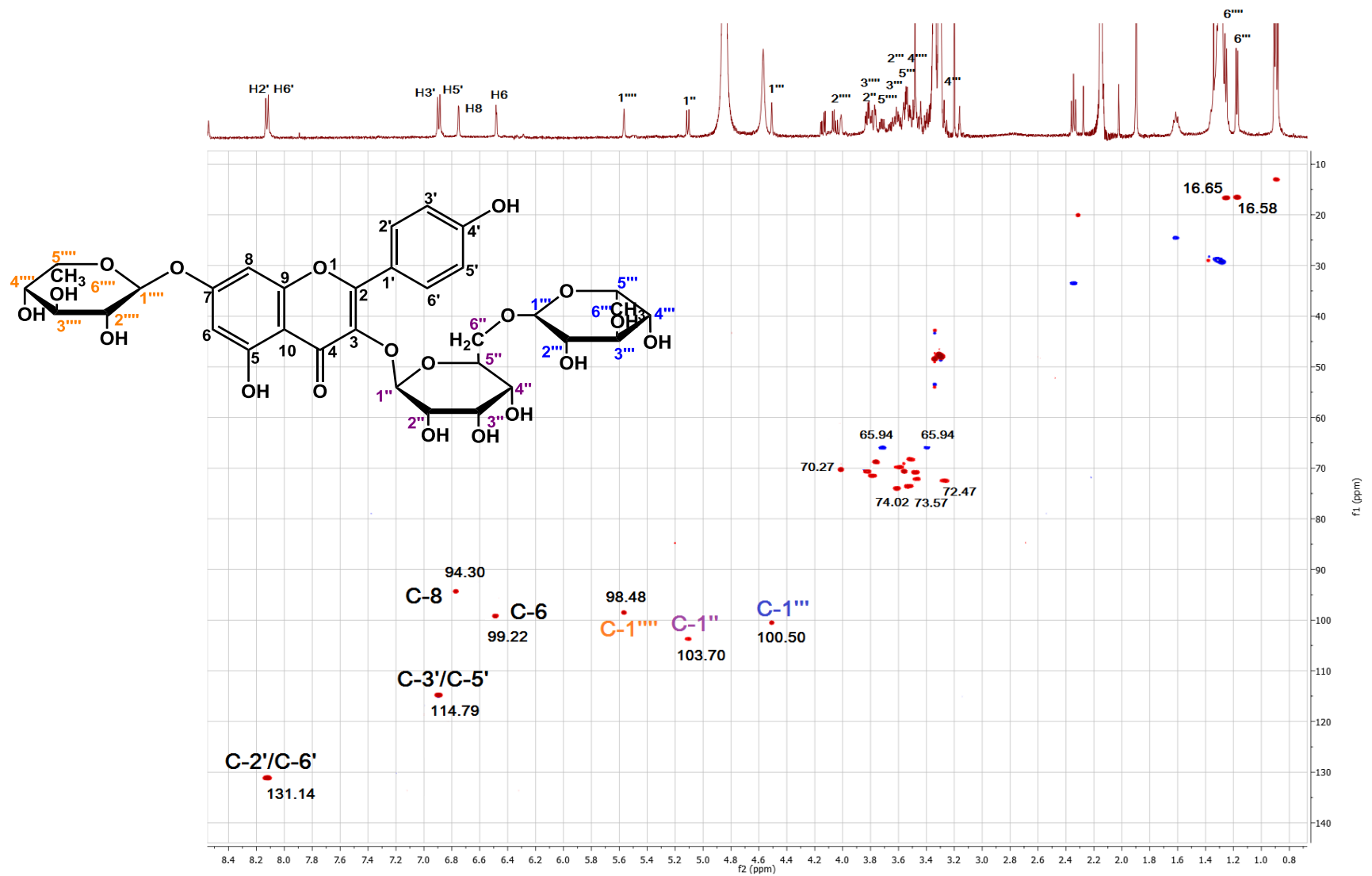
Φάσμα <sup>1</sup>H- NMR της ένωσης X6 (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)



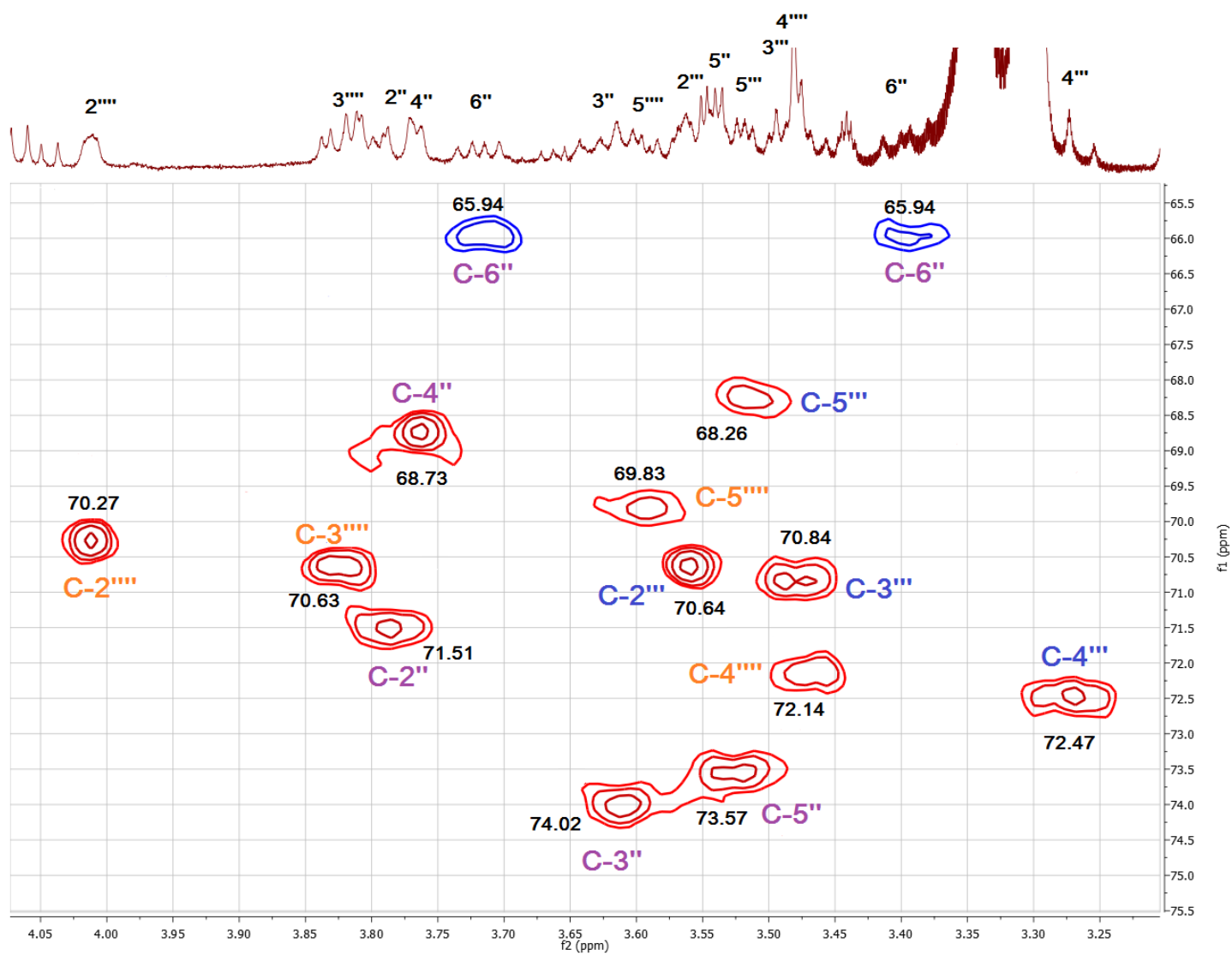
Φάσμα  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY της ένωσης X6 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz)



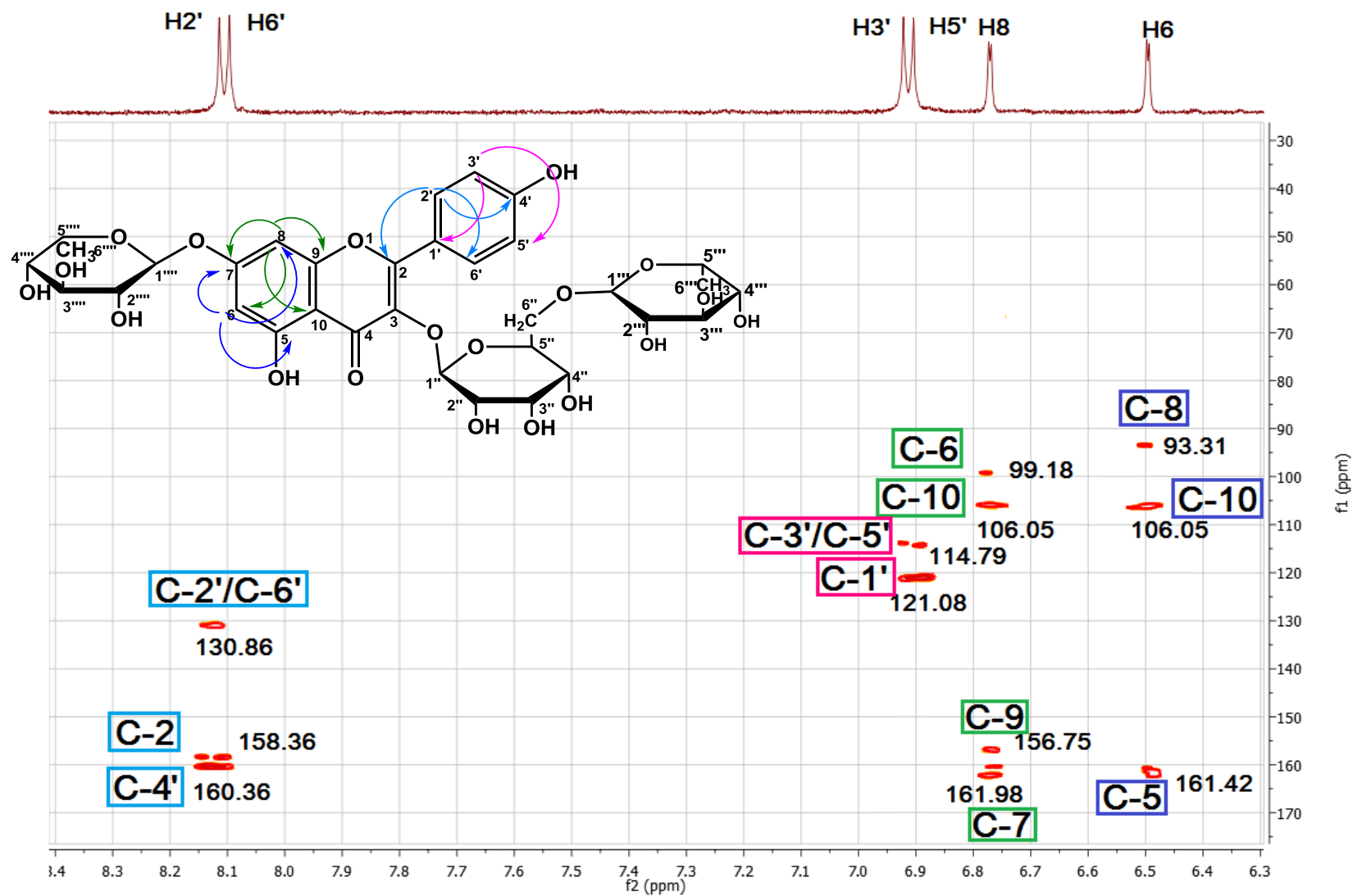
Φάσμα HSQC ένωσης X6 (CD<sub>3</sub>OD, 500MHz)



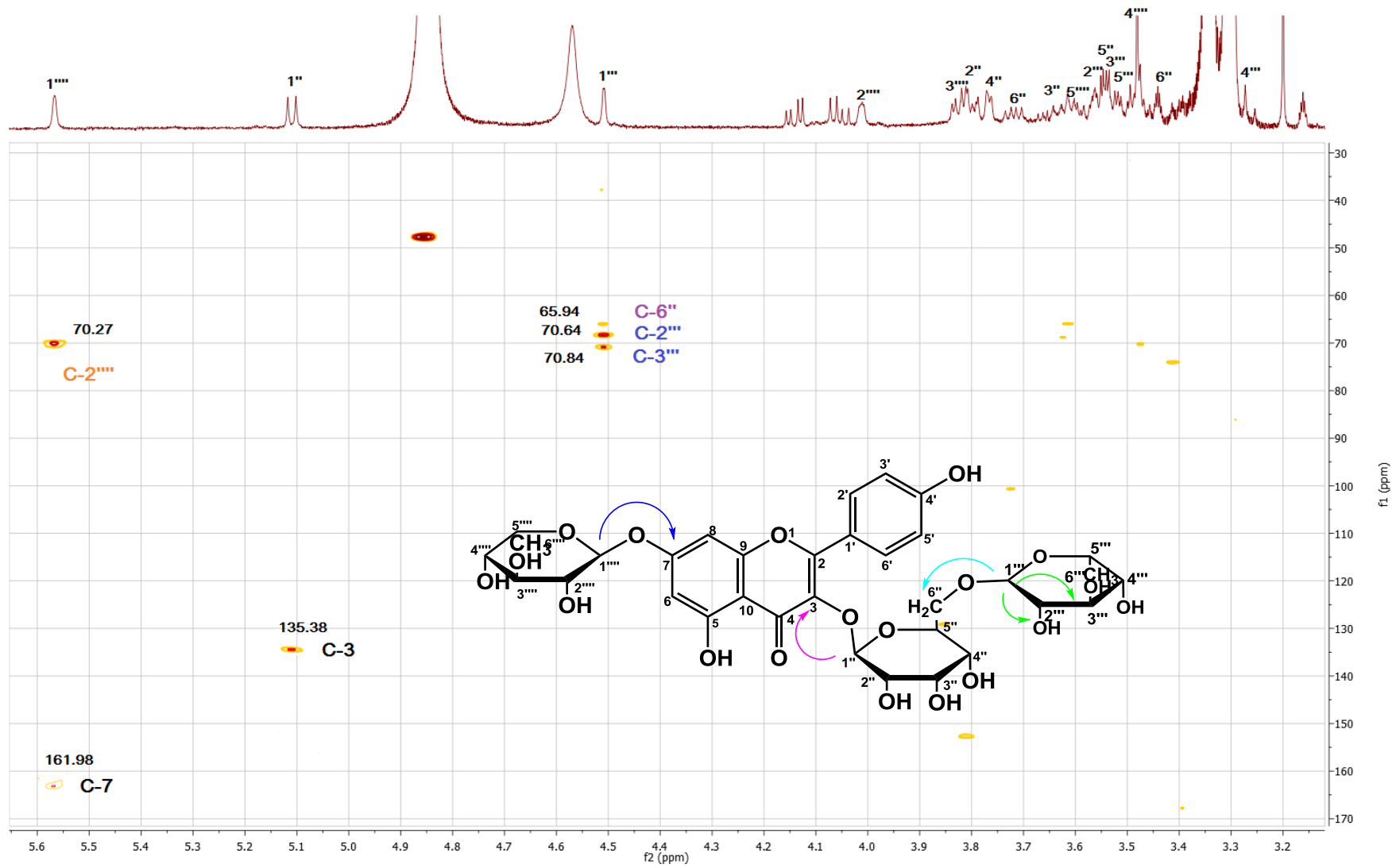
Λεπτομέρεια φάσματος HSQC ένωσης X6 (CD<sub>3</sub>OD, 500MHz) στην περιοχή των σακχάρων



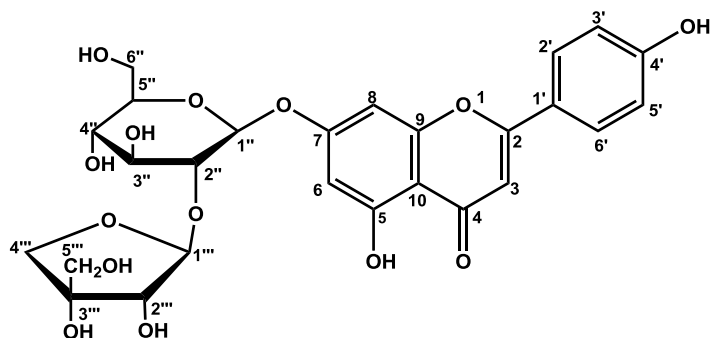
Λεπτομέρεια φάσματος HMBC ένωσης X6 (CD<sub>3</sub>OD, 500MHz) στην περιοχή των αρωματικών πρωτονίων



Φάσμα HMBC ένωσης X6 (CD<sub>3</sub>OD, 500MHz) στην περιοχή σακχάρων



### 13.1.8. Ένωση (X7) Απίννη



Η ένωση **X7** εμφανίζεται σαν κίτρινο ίζημα, ενώ κάτω από το υπεριώδες/ορατό εμφανίζεται σαν καφέ-κίτρινη κηλίδα πριν και μετά από έκθεση σε ατμούς αμμωνίας. Για τον έλεγχο καθαρότητας έγινε TLC σε πλάκες κυτταρίνης με συστήματα ανάπτυξης CAW: Rf=0.40, AcOH 15%, Rf= 0.22, EAW=0.52.

#### Φάσματα υπεριώδους-ορατού ένωσης X7

Πραγματοποιήθηκε φασματοφωτομετρική εξέταση της ουσίας στο υπεριώδες-ορατό κατά την οποία παρατηρήθηκαν οι παραπάνω χαρακτηριστικές κορυφές απορρόφησης.

Πίνακας 33: Φάσματα υπεριώδους ορατού ένωσης X7

	Κορυφή II		Κορυφή I		Δλ I	
MeOH	268.5		334.0			
MeONa	245.5 sh	271.0	301.5	345.5 sh	386.0	+52.0
AlCl <sub>3</sub>	274.0 (Δλ=+5.5)		298.0	345.5	385.5	+51.5
AlCl <sub>3</sub> /HCl	276.0 (Δλ=+7.5)		296.5	340.5	385.5	+51.5
AcONa	255.5 sh	267.0 (Δλ=-1.5)		355.0	387.5	+53.5
AcONa/H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	265.0 (Δλ=-3.5)		340.0			+6.0

Από την πρώτη κορυφή του φάσματος σε MeOH στα 334nm συμπεραίνεται ότι πρόκειται για φλαβόνη. Η βαθυχρωμική μετατόπιση που παρατηρείται αμέσως μετά την προσθήκη MeONa κατά 52.0 nm με ταυτόχρονη αύξηση της έντασης αποδεικνύει ότι το 4'-OH είναι ελεύθερο. Στο φάσμα της ένωσης μετά την προσθήκη AlCl<sub>3</sub> παρατηρείται βαθυχρωμική μετατόπιση της κορυφής I κατά 51.5 nm η οποία παραμένει σταθερή μετά την προσθήκη HCl και οφείλεται στο σχηματισμό συμπλόκου του AlCl<sub>3</sub> με την καρβονυλική ομάδα της θέσης 4 του δακτυλίου C και του OH στη θέση 5. Από τα παραπάνω δεδομένα συμπεραίνεται ότι το OH

της θέσης 5 είναι ελεύθερο ενώ υπάρχει απουσία ορθο-υδρόξυ συστήματος. Το τελευταίο επιβεβαιώνεται και από το φάσμα AcONa/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (Mabry et al., 1970). Από το φάσμα της ένωσης με AcONa φαίνεται ότι το OH της θέσης 7 είναι δεσμευμένο διότι δεν παρατηρείται βαθυχρωμική μετατόπιση της κορυφής II, σε σχέση με την αντίστοιχη σε MeOH.

**Πίνακας 34: Φάσματα Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού ένωσης X7**

<sup>1</sup> H-NMR (CD <sub>3</sub> OD, 500MHz) και <sup>13</sup> C-NMR (από HSQC και HMBC) ένωσης X7				
Ταυτοποίηση	δ <sub>H</sub> (ppm)	J <sub>HH</sub> (Hz)	Ταυτοποίηση	δ <sub>C</sub> (ppm)
H-2' και H-6'	7.88 (d)	9.0	C-2', C-6'	128.24
H-3' και H-5'	6.93 (d)	9.0	C-3', C-5'	115.66
H-8	6.79 (d)	2.0	C-8	94.51
H-3	6.65 (s)		C-3	102.67
H-6	6.46 (d)	2.0	C-6	99.61
			C-5	161.43
			C-7	163.21
			C-9	157.52
			C-10	105.67
			C-1'	121.64
			C-4'	161.60
			C-4	182.60
<b>7-O-Γλυκόζη</b>			<b>7-O-Γλυκόζη</b>	
H-1"	5.14 (d)	7.5	C-1"	98.78
H-2"	3.67 (t)	7.5/9.0	C-2"	77.22
H-3"	3.63 (t)	8.5/9.5	C-3"	77.02
H-4"	3.40 (t)	9.0/9.5	C-4"	69.84
H-5"	3.53 (m)		C-5"	76.87
H-6"	3.92 (dd)	12.5/2.0	C-6"	61.02
	3.71 (dd)	12.5/6.0		
<b>2"-Ο-Απόζη</b>			<b>2"-Ο-Απόζη</b>	
H-1'''	5.45 (d)	1.5	C-1'''	109.43
H-2'''	3.95 (d)	1.5	C-2'''	76.68
			C-3'''	79.29
H-4'''	4.03 (d)	9.5	C-4α'''	73.98
	3.81 (d)	9.5	C-4β'''	73.98
H-5'''	3.54 (s)		C-5α''', C-5β'''	64.51

Η μελέτη του φάσματος <sup>1</sup>H-NMR έδειξε ότι πρόκειται για γλυκοσυλιωμένη φλαβόνη, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τα δισδιάστατα φάσματα NMR της ένωσης.

Στην αρωματική περιοχή του φάσματος <sup>1</sup>H NMR παρατηρείται η παρουσία συστήματος AA'BB'. Έτσι τα πρωτόνια H-2' και H-6' εμφανίζονται ως μια διπλή κορυφή σε δ<sub>H</sub> 7,88 με

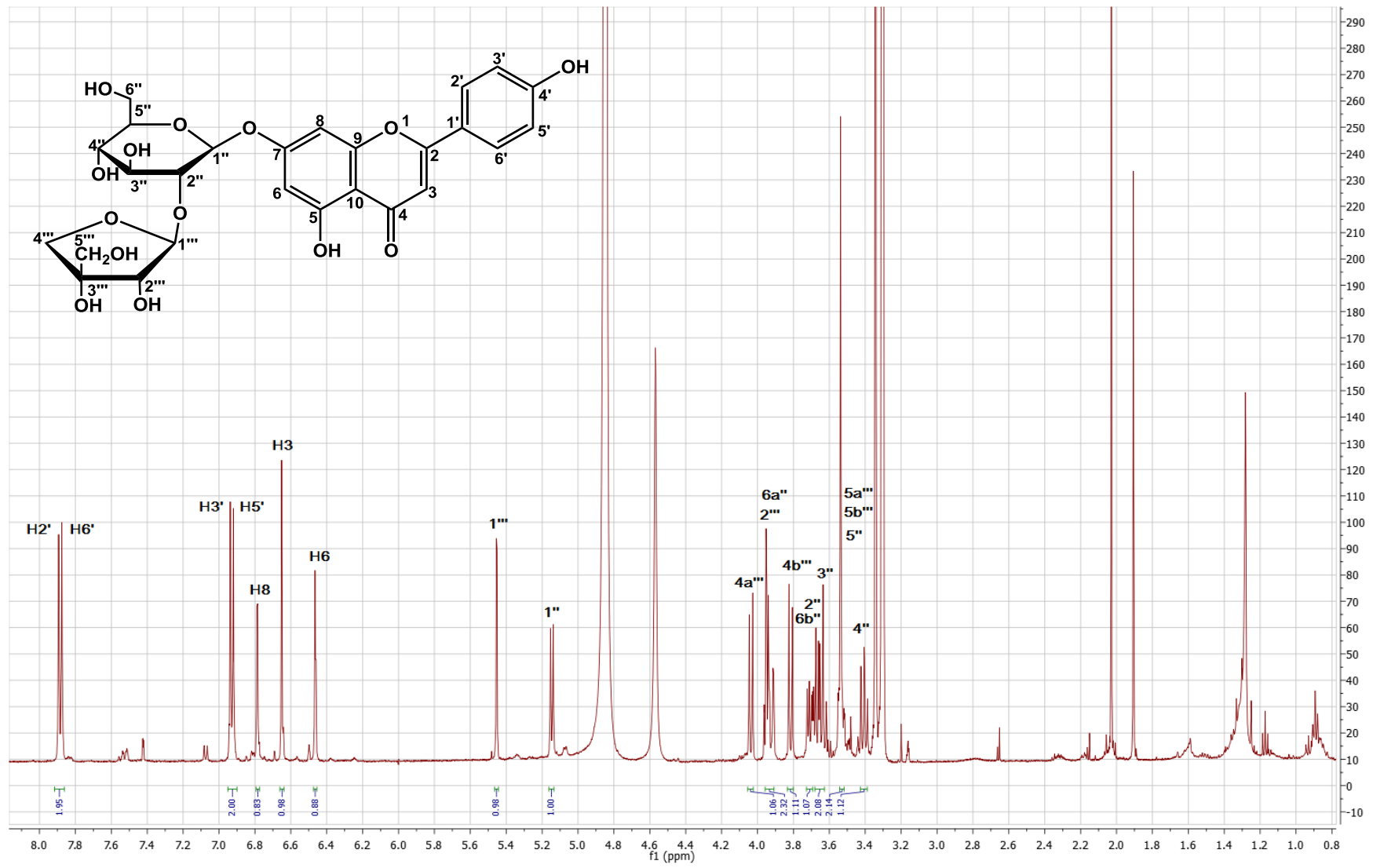


σταθερά σύζευξης  $J = 9.0$  Hz ενώ τα H-3' και H-5' εμφανίζονται ως μια διπλή κορυφή σε  $\delta_{\text{H}}$  6.93 με σταθερά σύζευξης  $J = 9.0$  Hz. Παρατηρούνται ακόμα στην αρωματική περιοχή δυο διπλές κορυφές του ενός πρωτονίου σε  $\delta_{\text{H}}$  6.79 ( $J = 2.00$  Hz) και  $\delta_{\text{H}}$  6.46 ( $J = 2.00$  Hz) που συζεύγνυνται μεταξύ τους υποδηλώνοντας *μετα* σύζευξη των πρωτονίων H-8 και H-6 αντίστοιχα. Οι κορυφές των πρωτονίων H-8 και H-6 είναι ελαφρώς αποθωρακισμένες και σε χαμηλότερες τιμές πεδίου σε σχέση με την απιγενίνη και αυτό υποδηλώνει την παρουσία σακχάρου στη θέση 7 (Mabry et al., 1970). Το H-3 εμφανίζεται ως μια απλή κορυφή σε  $\delta_{\text{H}}$  6.65 (s, 1H).

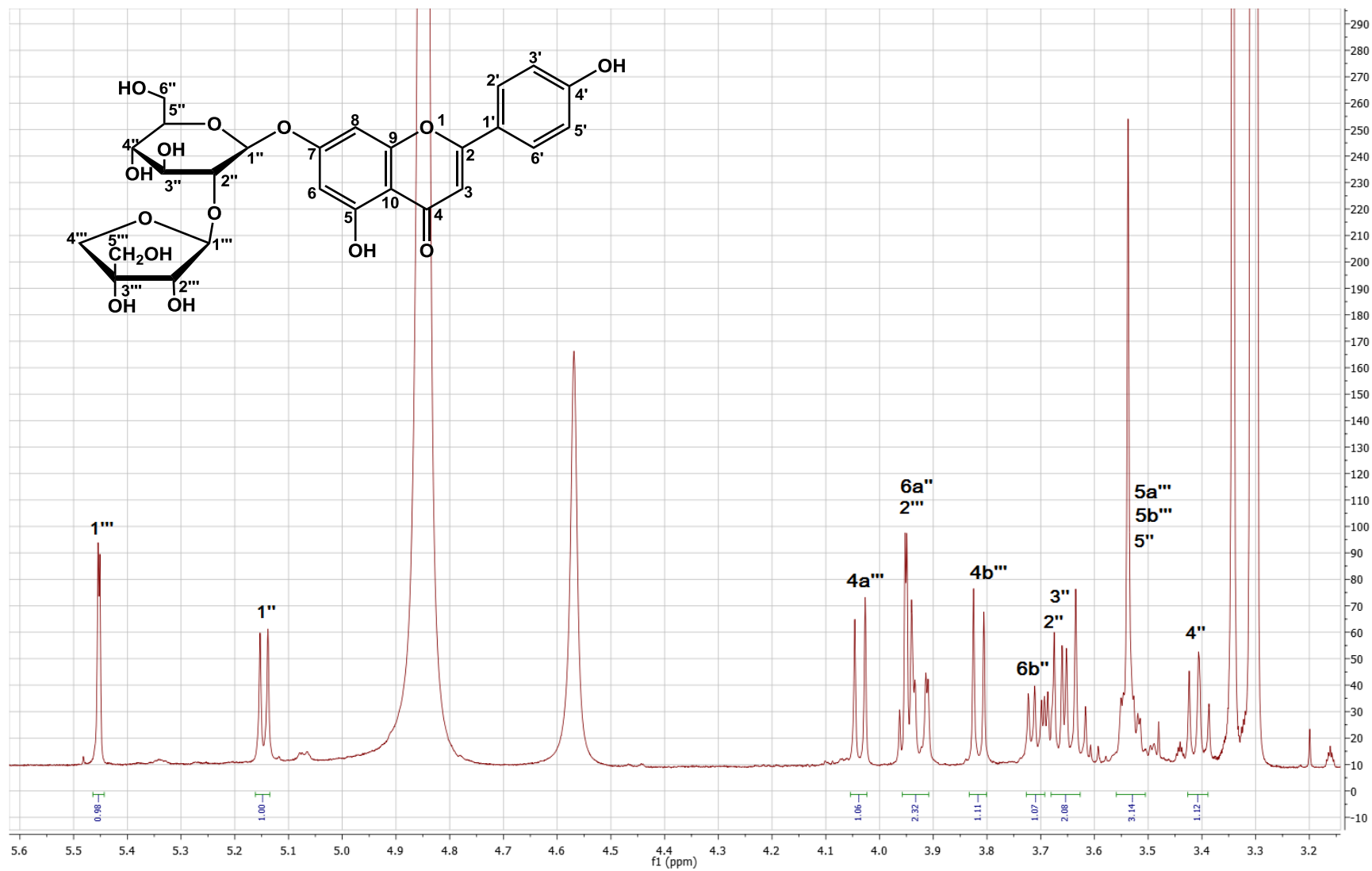
Στην περιοχή των σακχάρων εμφανίζονται δύο ανωμερικά πρωτόνια. Το ανωμερικό της απιόζης εμφανίζεται ως μια διπλή σε  $\delta_{\text{H}}$  5.45 με σταθερά σύζευξης  $J = 1.5$  Hz και  $\delta_{\text{C}}$  109.43 ενώ το ανωμερικό της γλυκόζης εμφανίζεται ως μια διπλή σε  $\delta_{\text{H}}$  5.14 με σταθερά σύζευξης  $J = 7.5$  Hz και  $\delta_{\text{C}}$  98.78. Από το φάσμα HSQC διακρίνονται στην αρωματική περιοχή οι άνθρακες C-2' και C-6' με  $\delta_{\text{C}}$  128.24 και οι άνθρακες C-3' και C-5' με  $\delta_{\text{C}}$  115.66 του δακτυλίου B. Διακρίνονται επίσης οι άνθρακες του δακτυλίου A, C-8 με  $\delta_{\text{C}}$  94.51 και C-6 με  $\delta_{\text{C}}$  99.61 καθώς και ο άνθρακας C-3 του δακτυλίου C με  $\delta_{\text{C}}$  102.67. Χαρακτηριστικές είναι και οι μεθυλενικές κορυφές της απιόζης των πρωτονίων H-4a'' και H-4b'' σε  $\delta_{\text{H}}$  4.03 και 3.81 με  $\delta_{\text{C}}$  73.98. Χαρακτηριστική είναι επίσης και η απλή κορυφή των μεθυλενικών πρωτονίων H-5a'' και H-5b'' που εμφανίζεται ως απλή στα 3.54 ppm. Στον πίνακα 34 φαίνονται οι χημικές μετατοπίσεις και οι σταθερές σύζευξης των λοιπών πρωτονίων των δύο σακχάρων, όπως προκύπτουν από το φάσμα  $^1\text{H}$  NMR, το  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY και τα φάσματα HSQC και HMBC και επιβεβαιώνουν ότι πρόκειται για γλυκόζη και απιόζη (Dini et al., 2004). Η γλυκόζη είναι συνδεδεμένη με το υδροξύλιο της θέσης 7 του φλαβονοειδούς, καθώς αυτό προκύπτει από το κοινό σήμα που εμφανίζουν στο φάσμα HMBC το ανωμερικό της γλυκόζης και τα πρωτόνια H-8 και H-6 με τον άνθρακα C-7 στα 163.21 ppm. Η απιόζη είναι συνδεδεμένη με το υδροξύλιο της θέσης 2 της γλυκόζης, όπως προκύπτει από το φάσμα HMBC όπου εμφανίζεται σήμα του ανωμερικού της απιόζης με τον άνθρακα 2 της γλυκόζης.

Όλα τα παραπάνω σε συνδιασμό και με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, συνηγορούν ότι η ένωση είναι η απίνη (Yoshikawa et al., 2000), (Lin et al., 2008).

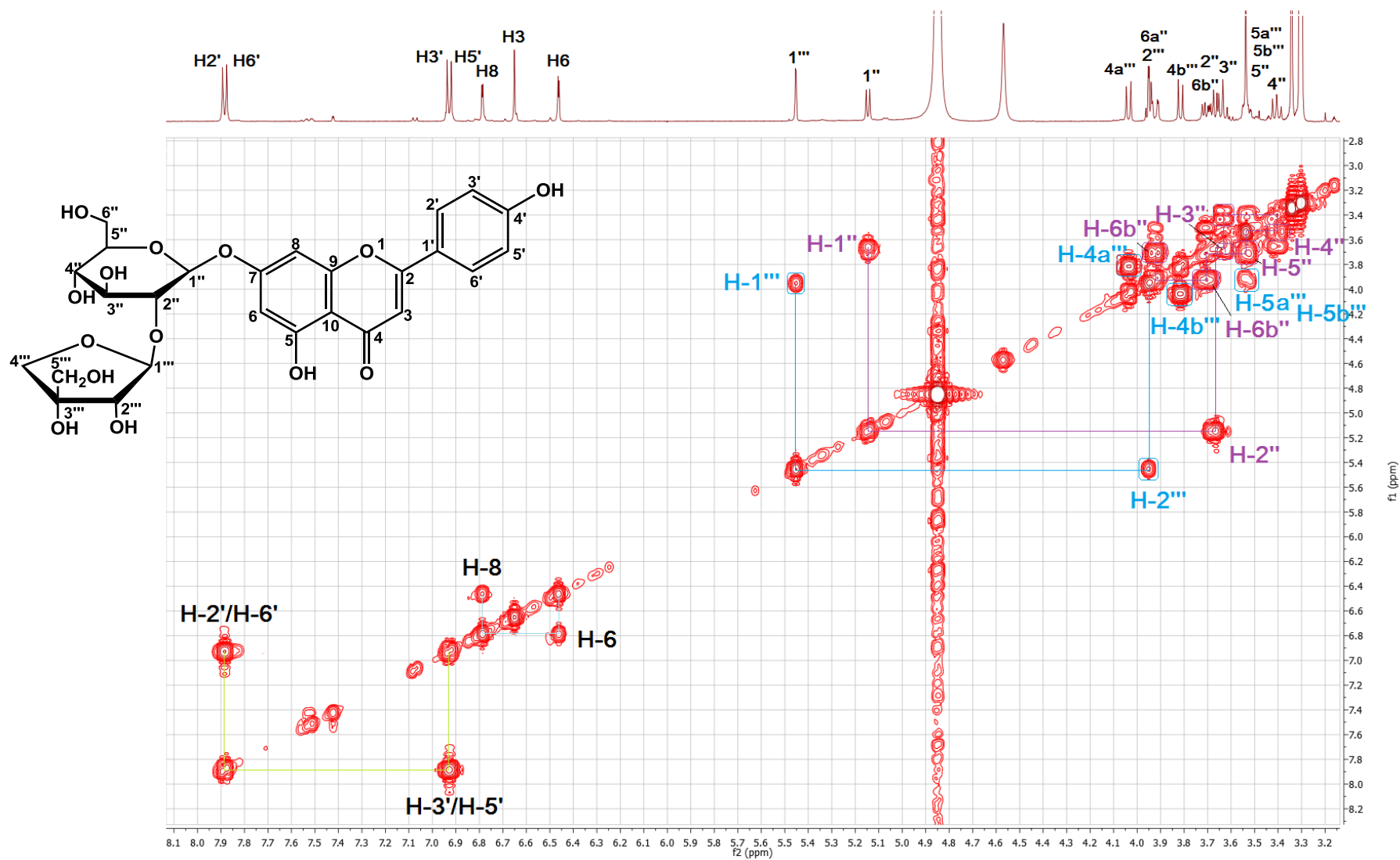
Φάσμα <sup>1</sup>H-NMR της Ένωσης X7 (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)



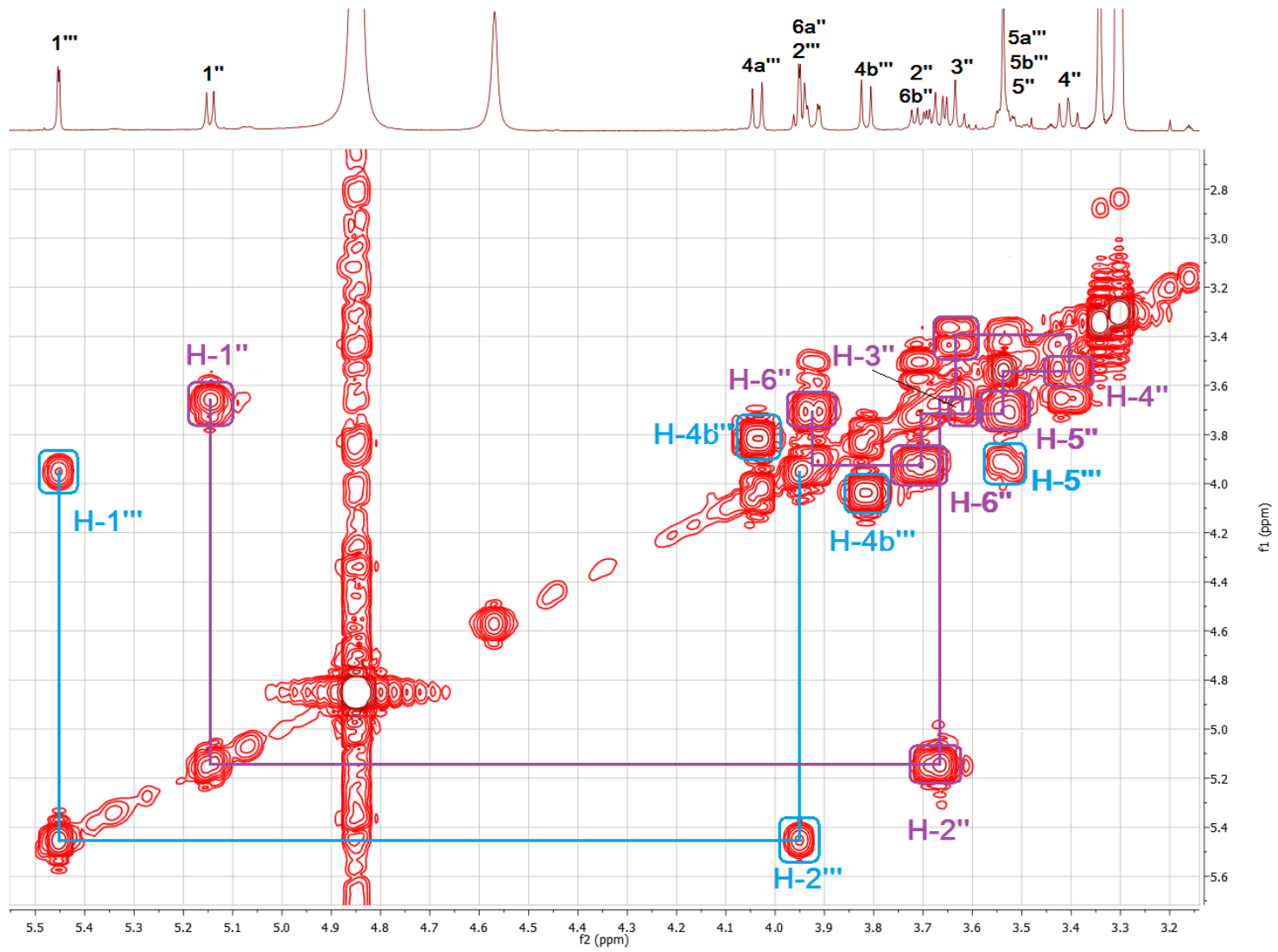
Φάσμα  $^1\text{H}$ -NMR της Ένωσης X7 στην περιοχή των σακχάρων ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz)



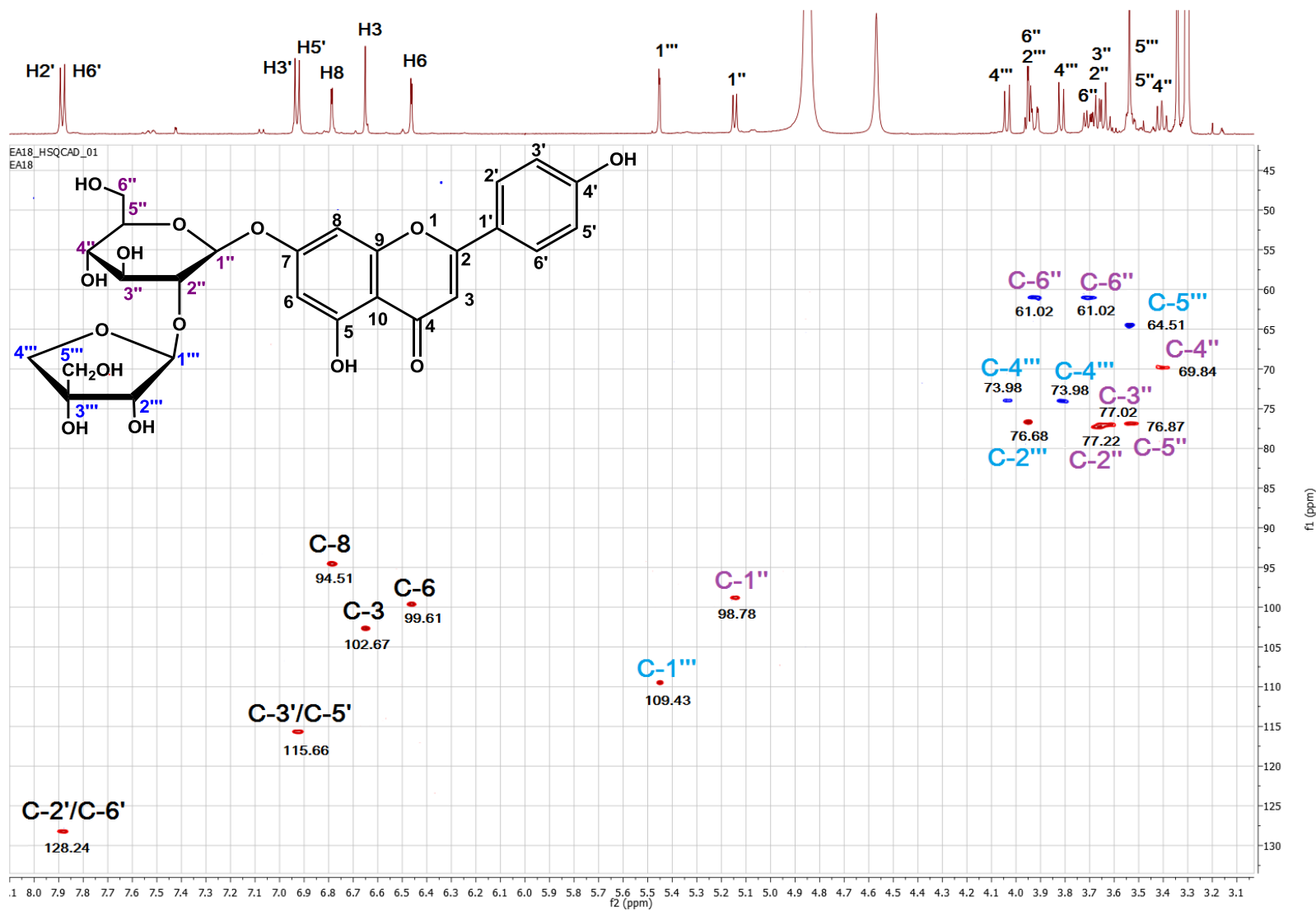
Φάσμα  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY της Ένωσης X7 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz)



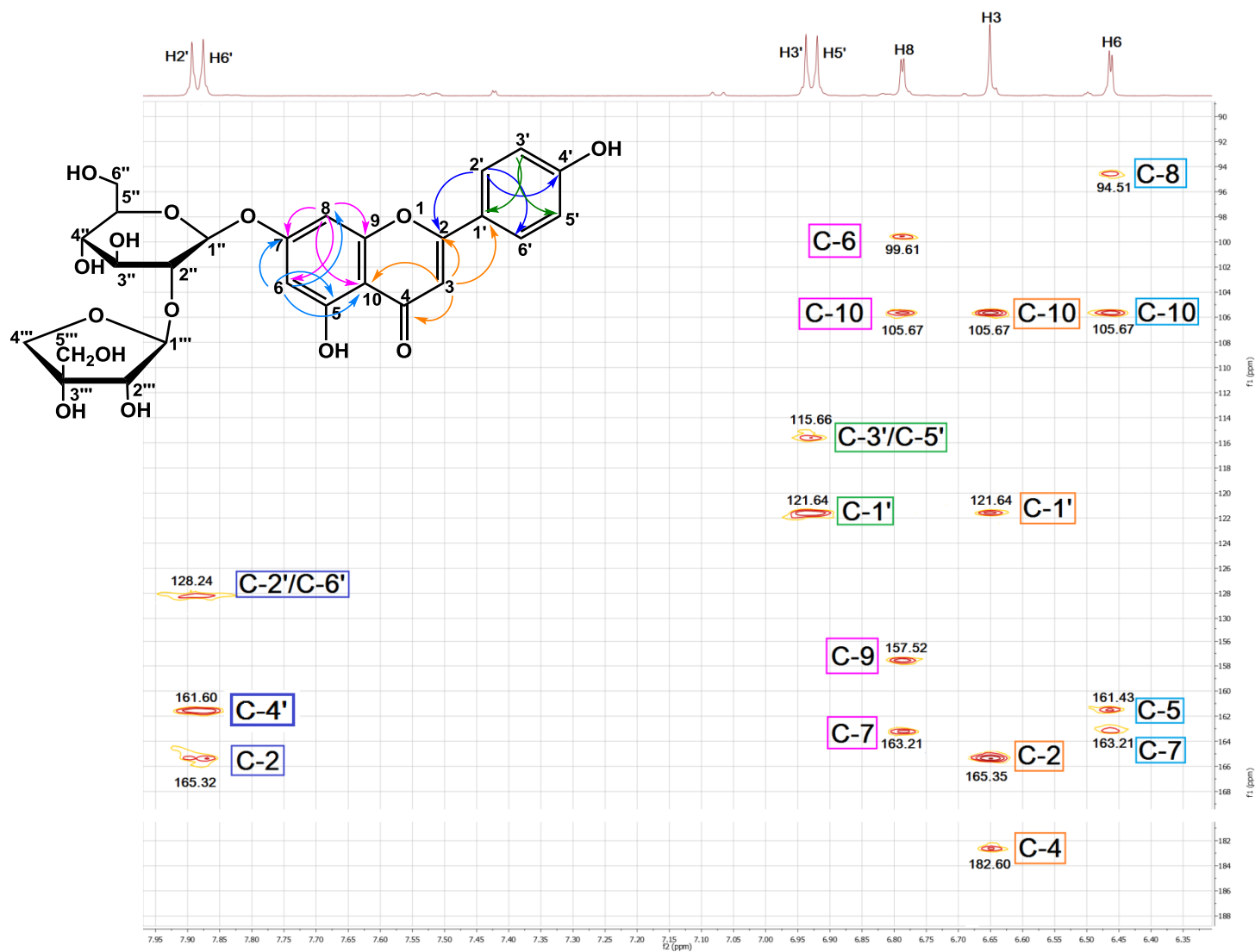
Φάσμα  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY της Ένωσης X7 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz) στην περιοχή των σακχάρων



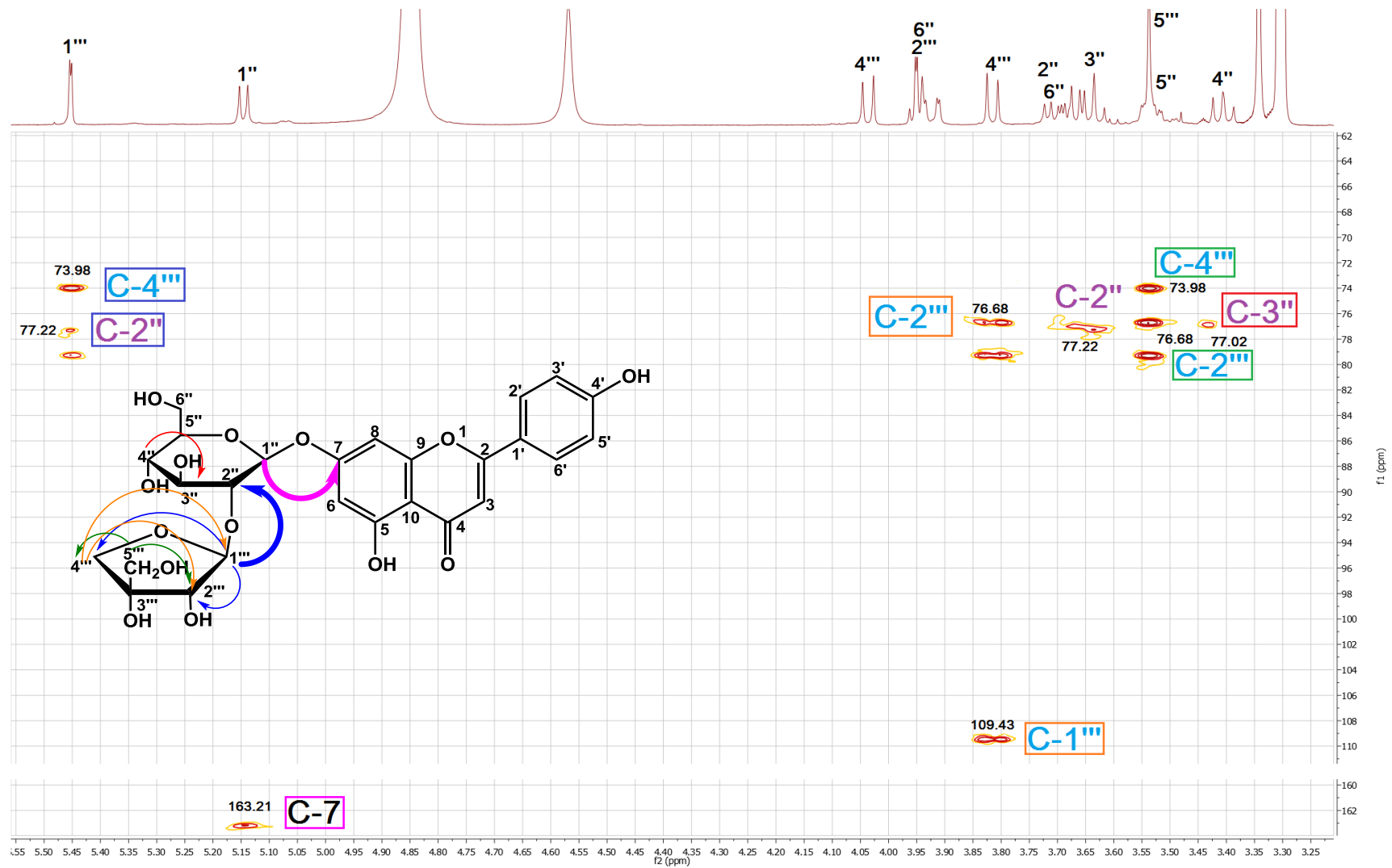
Φάσμα HSQC Ένωσης X7 (CD<sub>3</sub>OD, 600MHz)



Φάσμα HMBC της Ένωσης X7 (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz) στην περιοχή των αρωματικών πρωτονίων



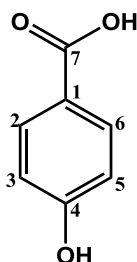
Φάσμα HMBC της Ένωσης X7 (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz) στην περιοχή των σακχάρων





## 13.2 Εκχύλισμα διαιθυλαιθέρα

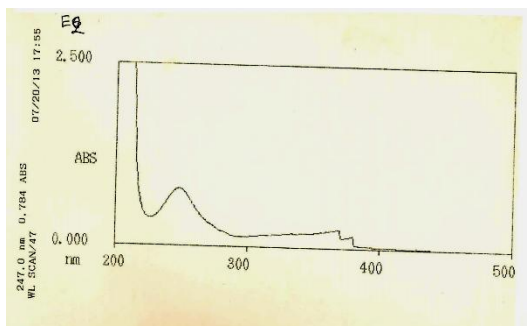
### 13.2.1. Ένωση (X8) Παρα-υδρόξυ Βενζοϊκό οξύ



Η ένωση **X8** εμφανίζεται σαν λευκή κρυσταλλική ουσία, ενώ κάτω από το υπεριώδες/ορατό εμφανίζεται σαν μωβ κηλίδα πριν και μετά από έκθεση σε ατμούς αμμωνίας. Για τον έλεγχο καθαρότητας έγινε TLC σε πλάκες κυτταρίνης με συστήματα ανάπτυξης CAW: Rf=0.80, AcOH 15%, Rf= 0.62, EAW=0.96.

### Φάσμα UV Ένωσης X8 σε MeOH

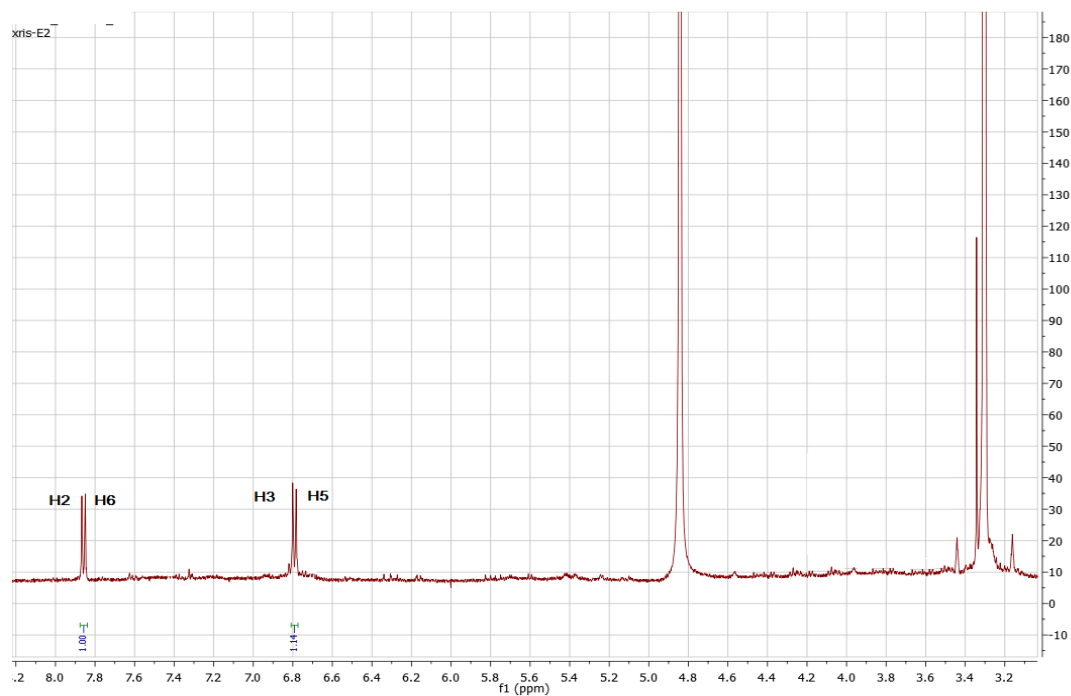
Από τα μέγιστα των κορυφών της ένωσης X8 σε μεθανόλη (247 nm) στο φάσμα υπεριώδους-ορατού, διαπιστώνεται ότι πρόκειται για βενζοϊκό οξύ. Σε αυτό συνηγορεί και το φάσμα NMR της ένωσης όπου παρατηρούνται τα παρακάτω: Στην αρωματική περιοχή του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR, διαπιστώνεται



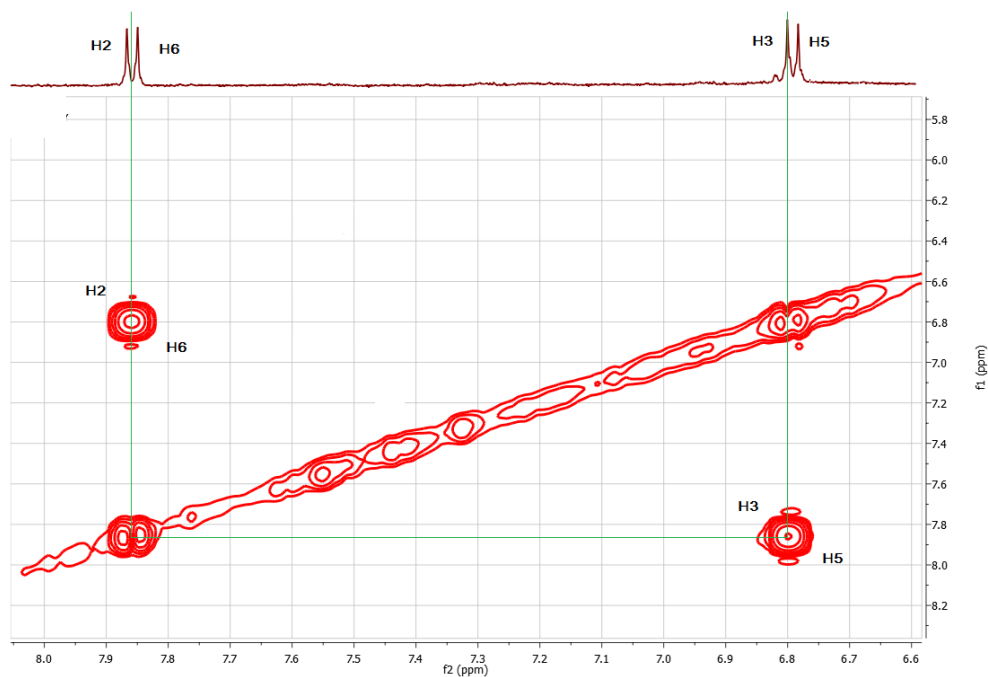
η παρουσία συστήματος AA'BB' το οποίο αντιστοιχεί σε *παρα*-υποκατάσταση του βενζολικού δακτυλίου. Τα πρωτόνια H-3 και H-5 εμφανίζονται ως διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης  $J = 9$  Hz που απαντούν σε  $\delta_{\text{H}}$  6.79. Τα πρωτόνια H-2 και H-6 εμφανίζονται ως διπλή κορυφή επίσης με σταθερά σύζευξης  $J = 9$  Hz που απαντούν σε  $\delta_{\text{H}}$  7.86. Από το φάσμα δύο διαστάσεων COSY φαίνεται η συσχέτιση του πρωτονίου H-2 με το πρωτόνιο H-3 καθώς και η συσχέτιση του πρωτονίου H-5 με το πρωτόνιο H-6. Ενώ από το φάσμα δύο διαστάσεων HSQC διακρίνονται οι άνθρακες C-3, C-5, με σήμα στα  $\delta_{\text{C}}$  131.40 και οι άνθρακες C-2, C-6, με σήμα στα 114.41 ppm ενώ από το φάσμα δύο διαστάσεων HMBC διακρίνονται οι συσχετίσεις με τους τεταρτοταγείς άνθρακες C-4 στα  $\delta_{\text{C}}$  161.43 και C-7 στα  $\delta_{\text{C}}$  122.64. Τα παραπάνω

δεδομένα σε συνδιασμό και με τη βιβλιογραφία συνηγορούν ότι η ένωση X8 είναι το παρα-υδροξυ Βενζοϊκό οξύ (Zhang et al., 2012) (Dhakal et al., 2008)

### Φάσμα $^1\text{H}$ - NMR της Ένωσης X8 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz)



### Φάσμα COSY της Ένωσης X8 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) στην περιοχή των αρωματικών πρωτονίων



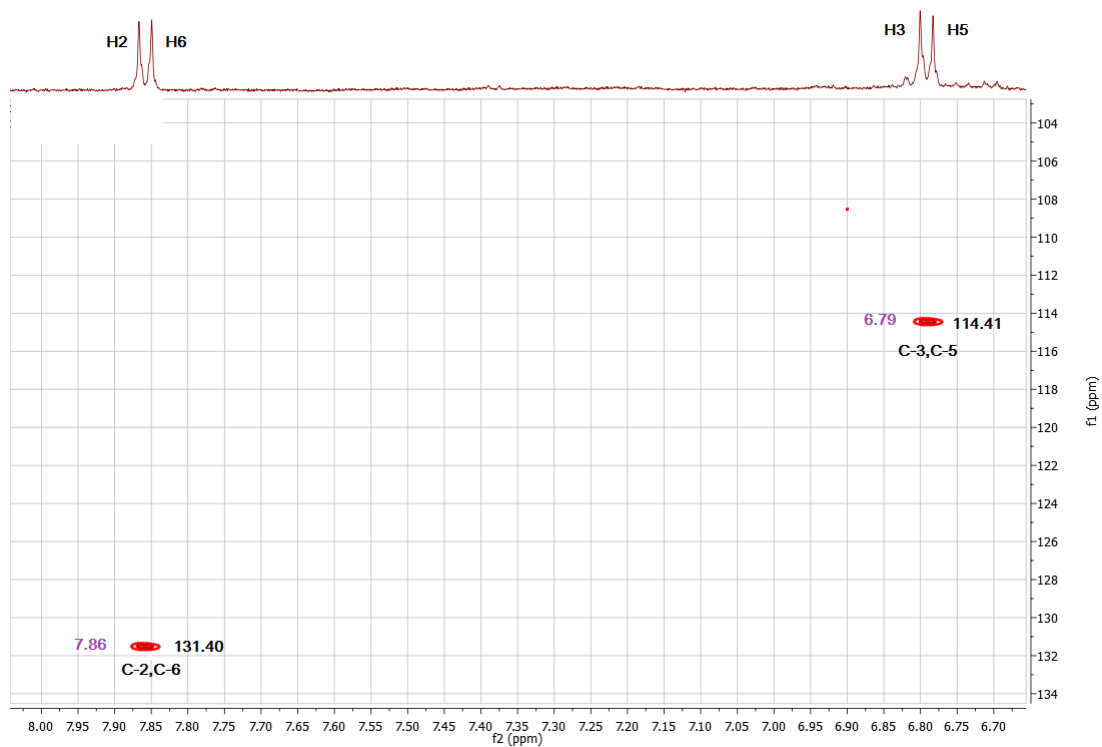
Πίνακας 35: <sup>1</sup>H-NMR Ένωσης X8 (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)

Ταυτοποίηση	Αριθμός H	Χημική μετατόπιση δ (ppm)	Πολλαπλότητα, J (Hz)
H-3, H-5	2	6.79	d (J=9 Hz)
H-2, H-6	2	7.86	d (J=9 Hz)

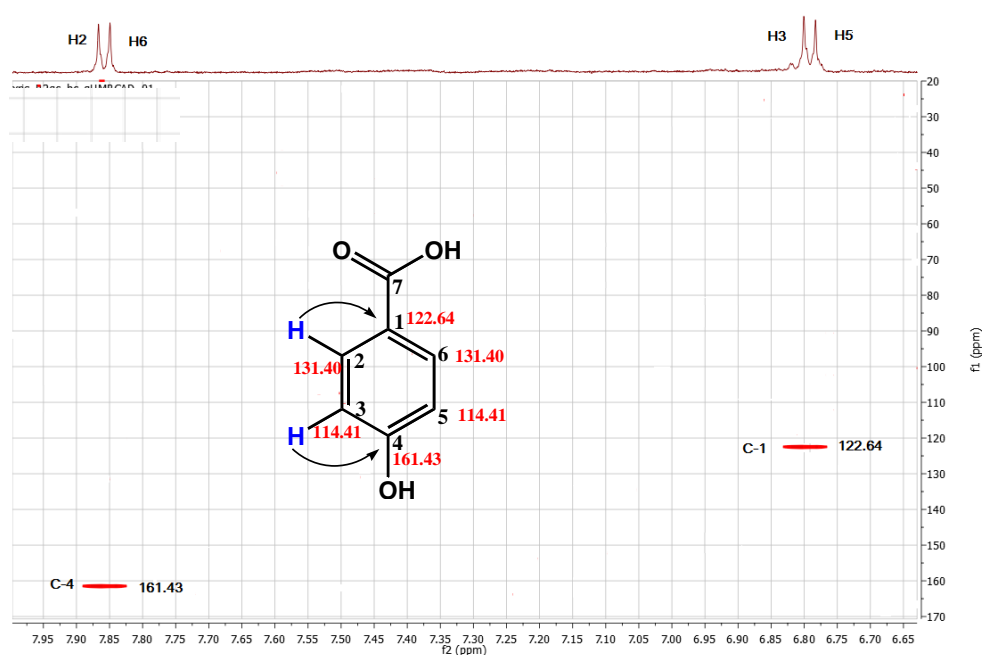
Πίνακας 36: <sup>13</sup>C-NMR Ένωσης X8 (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)

Ταυτοποίηση	Τύπος C	Χημική μετατόπιση δ (ppm)
C-1	C	122.64
C-2	C	114.41
C-3	C	131.40
C-4	C	161.43
C-5	C	131.40
C-6	C	114.41

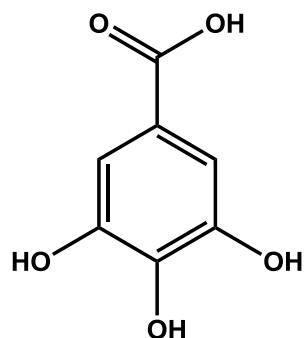
Φάσμα HSQC της Ένωσης X8 (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz) στην περιοχή των αρωματικών πρωτονίων



Φάσμα HMBC της Ένωσης X8 (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz) στην περιοχή των αρωματικών πρωτονίων



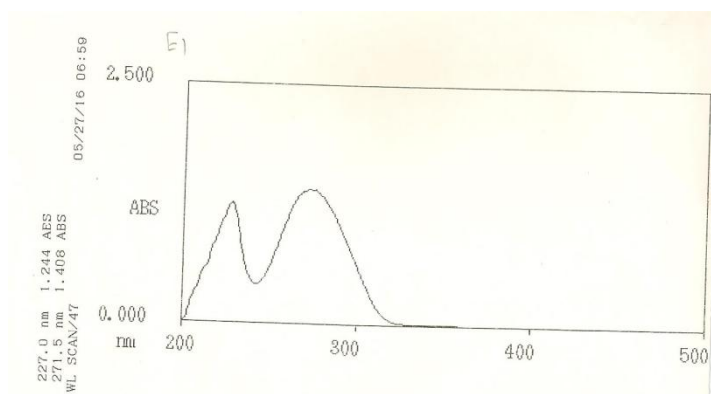
### 13.2.2. Ένωση (X9): Γαλλικό οξύ



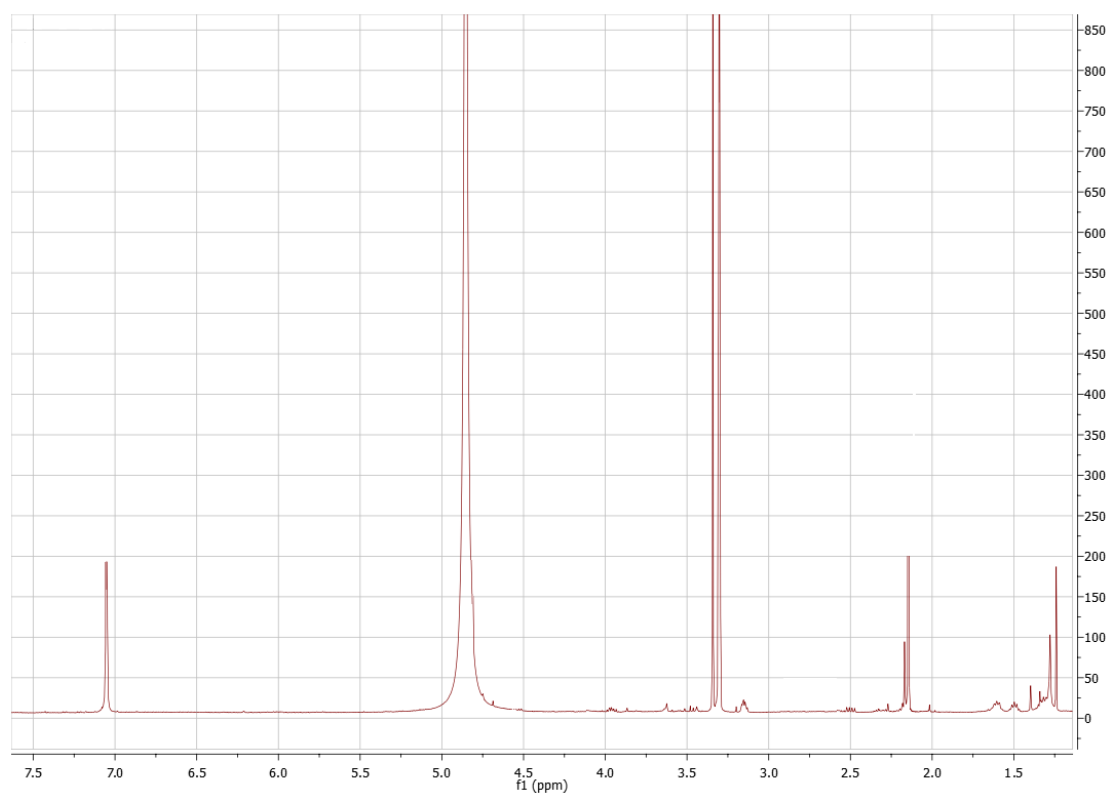
Η ουσία είχε ιώδη φθορισμό στη λάμπα υπεριώδους-ορατού και έντονο ιώδη φθορισμό μετά την έκθεση του σε ατμούς  $\text{NH}_3$ . Για τον έλεγχο καθαρότητας της ουσίας χρησιμοποιήθηκαν δυο συστήματα ανάπτυξης σε χρωματογραφία λεπτής στιβάδας σε πλάκες κυτταρίνης με συστήματα ανάπτυξης CAW:  $R_f=0.64$ , AcOH 15%,  $R_f= 0.57$ .

#### Φάσμα UV-Vis

Πρόκειται για χαρακτηριστικό φάσμα φαινολικών οξέων το οποίο εμφανίζει τη ζώνη II απορρόφησης της βενζοϊδούς ταινίας με μέγιστο στα 271.1 nm.

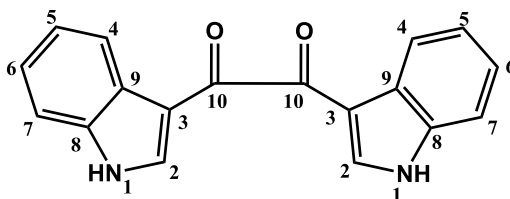


Φάσμα  $^1\text{H}$ - NMR της Ένωσης X9 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz)



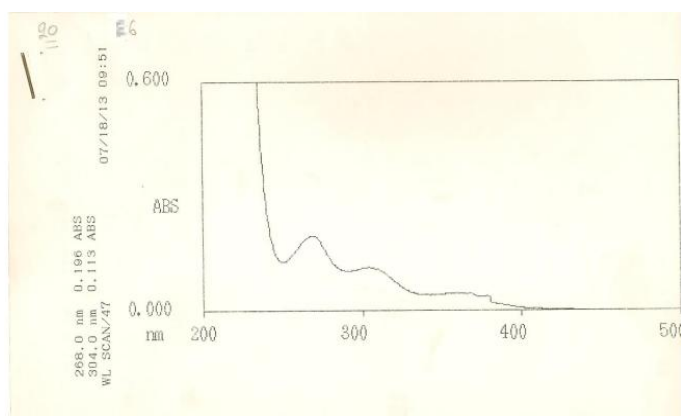
Στο φάσμα  $^1\text{H}$ - NMR παρατηρείται μια απλή κορυφή (s) στα  $\delta_{\text{H}}$  7.07 η οποία αντιστοιχεί στα ισοδύναμα πρωτόνια H-2 και H-6 του αρωματικού δακτυλίου. Η δομή επιβεβαιώθηκε και με δεδομένα της βιβλιογραφίας( Nawwar. et al., 1982).

### 13.2.3. Ένωση (X10): 1,2-Δις(1 Η-ινδολ-3-υλ)αιθαν-1,2-διόνη



Η ένωση ήταν κρυσταλλική καφε κόκκινου χρώματος και εμφανίζεται σαν ροζ κηλίδα στη λάμπα υπεριώδους/ορατού πριν και μετά από έκθεση σε ατμούς αμμωνίας. Για τον έλεγχο καθαρότητας έγινε TLC σε πλάκες κυτταρίνης με συστήματα ανάπτυξης CAW: Rf=0.99, AcOH 15%: Rf= 0.19, EAW: Rf=0.98.

#### Φάσμα UV Ένωσης X10 σε MeOH



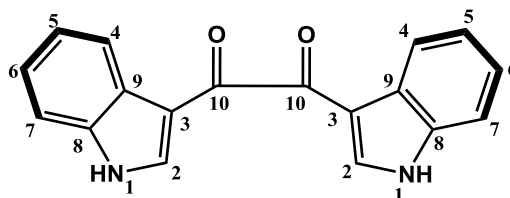
Από τα μέγιστα των κορυφών της ένωσης X10 στο φάσμα υπεριώδους ορατού σε μεθανόλη (268 και 304 nm), διαπιστώνεται ότι πρόκειται για καρβοξυλικό παράγωγο του ινδολίου. Σε αυτό συνηγορεί και το φάσμα NMR της ένωσης όπου παρατηρούνται τα παρακάτω:

Πίνακας 37: Φάσματα Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού ένωσης X10

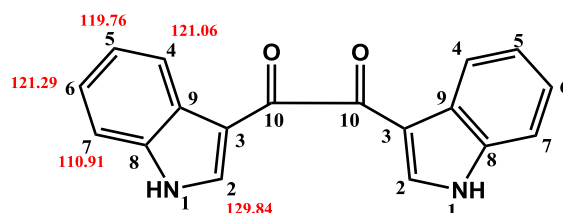
<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)/<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) της ένωσης X10

Ταυτοποίηση	δ <sub>H</sub> (ppm)	J <sub>HH</sub> (Hz)	Ταυτοποίηση	δ <sub>C</sub> (ppm)
H-2	7.79 (s)		C-2	129.84
			C-3	112.84
H-4	8.19 (d)	7.5	C-4	121.06
H-5	7.10 (m)		C-5	119.76
H-6	7.08 (m)		C-6	121.29
H-7	7.36 (d)	7.5	C-7	110.91
			C-8	136.63
			C-9	126.86
			C-10	183.62

Στην αρωματική περιοχή του φάσματος <sup>1</sup>H NMR παρατηρείται μια διπλή κορυφή στα δ<sub>H</sub> 8.19 με σταθερά σύζευξης (*J*=7.5 Hz) η οποία αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-4, μια απλή κορυφή στα δ<sub>H</sub> 7.79 η οποία αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-2. Η διπλή κορυφή στα δ<sub>H</sub> 7.36 με σταθερά σύζευξης (*J*=7.5 Hz) αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-7. Η πολλαπλή κορυφή στα δ<sub>H</sub> 7.08-7.10 που αντιστοιχεί στα πρωτόνια H-5 και H-6. Από το COSY προκύπτει η σύζευξη του πρωτονίου H-4 με το πρωτόνιο H-5 καθώς και η σύζευξη του πρωτονίου H-7 με τα πρωτόνια H-6. Επίσης είναι ορατή η συσχέτιση μεταξύ των πρωτονίων H-5, H-6.



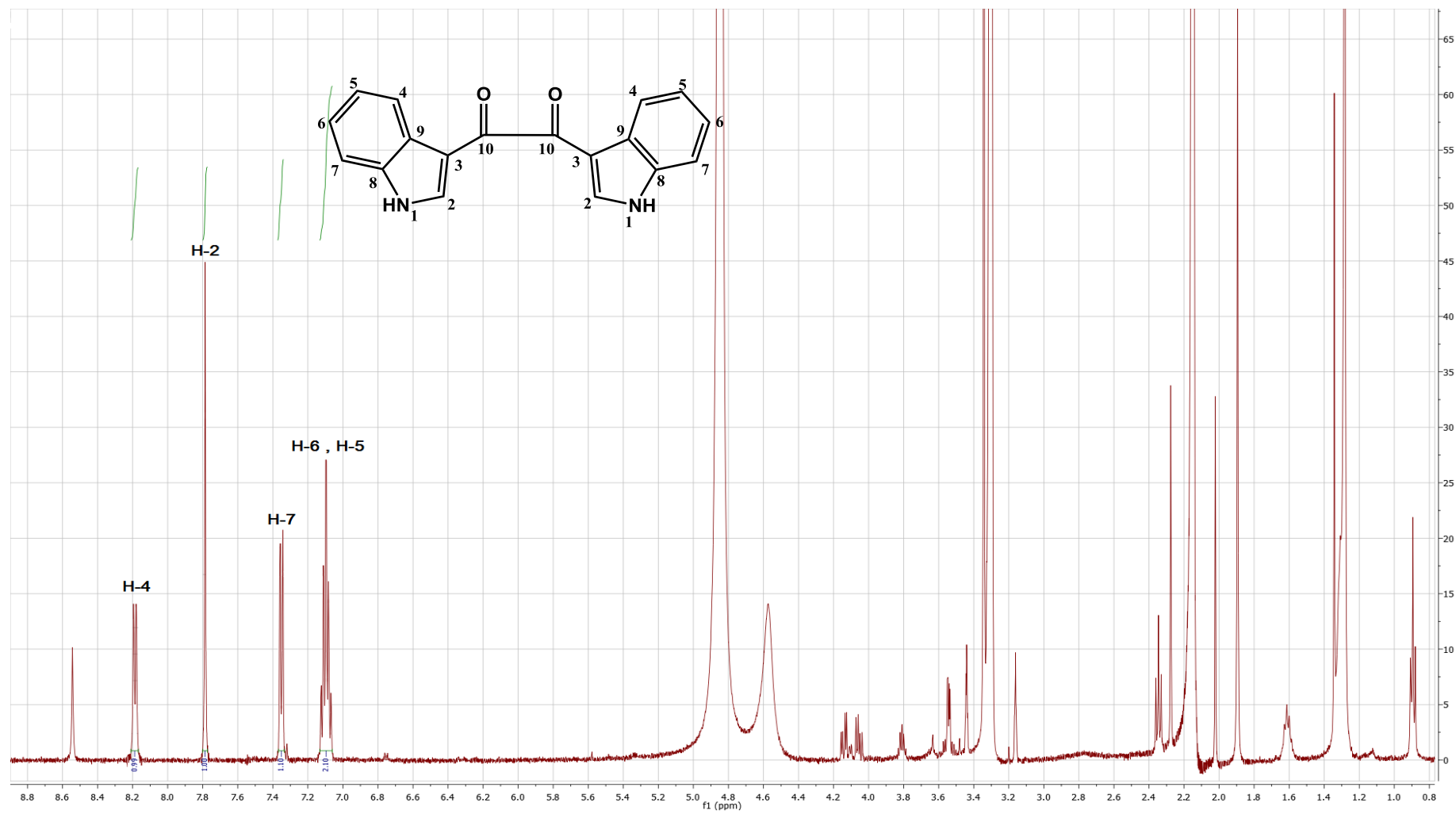
Από τα φάσματα HSQC παρατηρείται στα δ<sub>C</sub> 121.06 το σήμα του άνθρακα C-4, στα δ<sub>C</sub> 129.84 το σήμα του άνθρακα C-2, στα δ<sub>C</sub> 110.91 το σήμα του άνθρακα C-7, στα δ<sub>C</sub> 121.29 και στα δ<sub>C</sub> 119.76 το σήμα του άνθρακα C-6 και C-5.



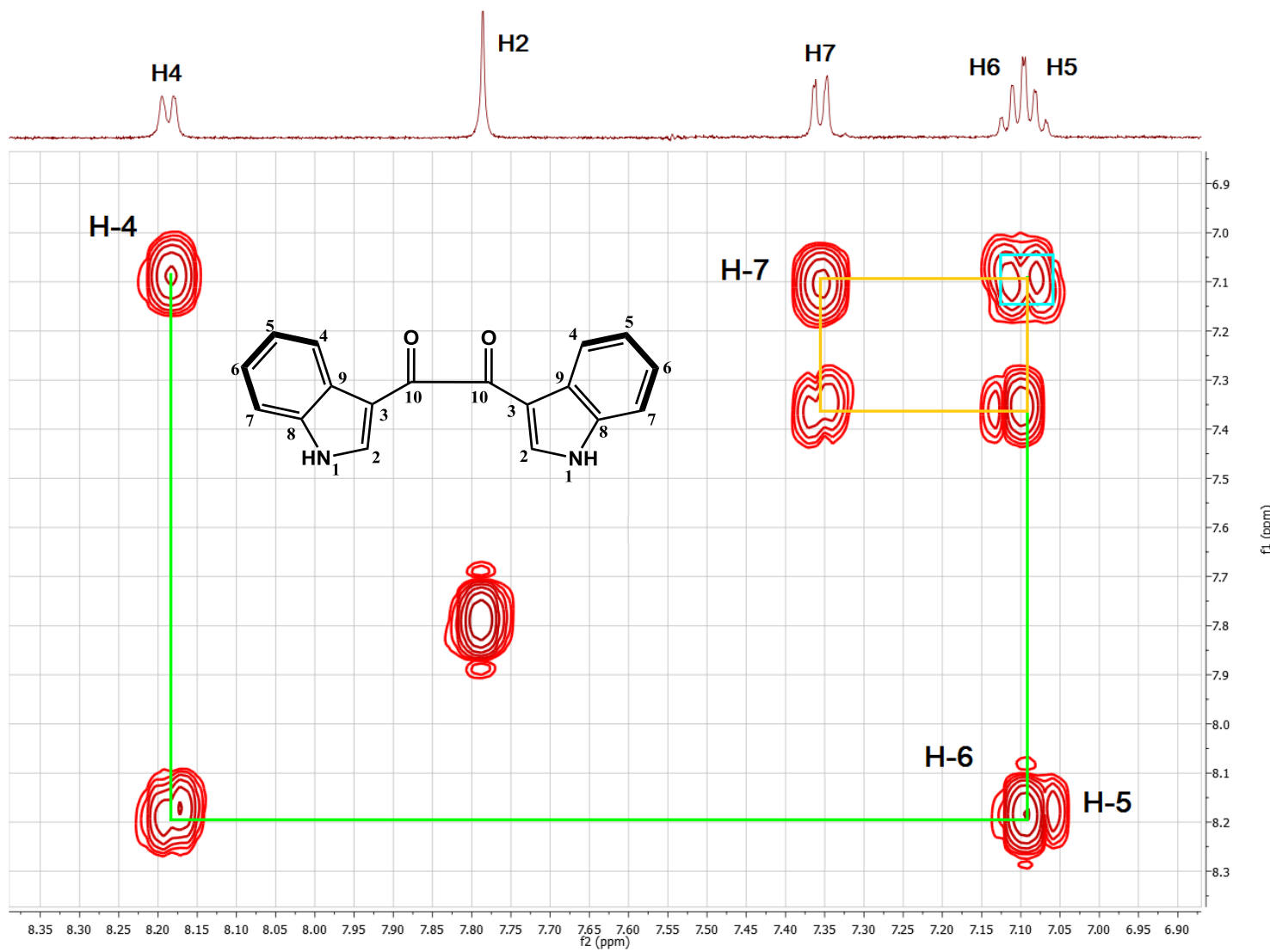


Όλα τα προηγούμενα και σε σύγκριση με τη βιβλιογραφία συνηγορούν στο ότι η ένωση **X11** είναι η 1,2-δισ (1 Η-ινδολ-3-υλ)αιθαν-1,2-διονη (Mc Kay et al 2002). Η 1,2-Δισ(1 Η-ινδολ-3-υλ)αιθαν-1,2-διόνη απομονώθηκε για πρώτη φορά από από το θαλάσσιο σφουγγάρι *Smenospongia Sp* (Mc Kay et al 2002) και είναι η πρώτη φορά που απαντάται στο γένος *Indigofera*. Ινδολικά παράγωγα απομονώθηκαν από το είδος *Indigofera tinctoria* όπως είναι η η ινδικοτίνη και η ινδιρουμπίνη (Ferreira et al., 2004).

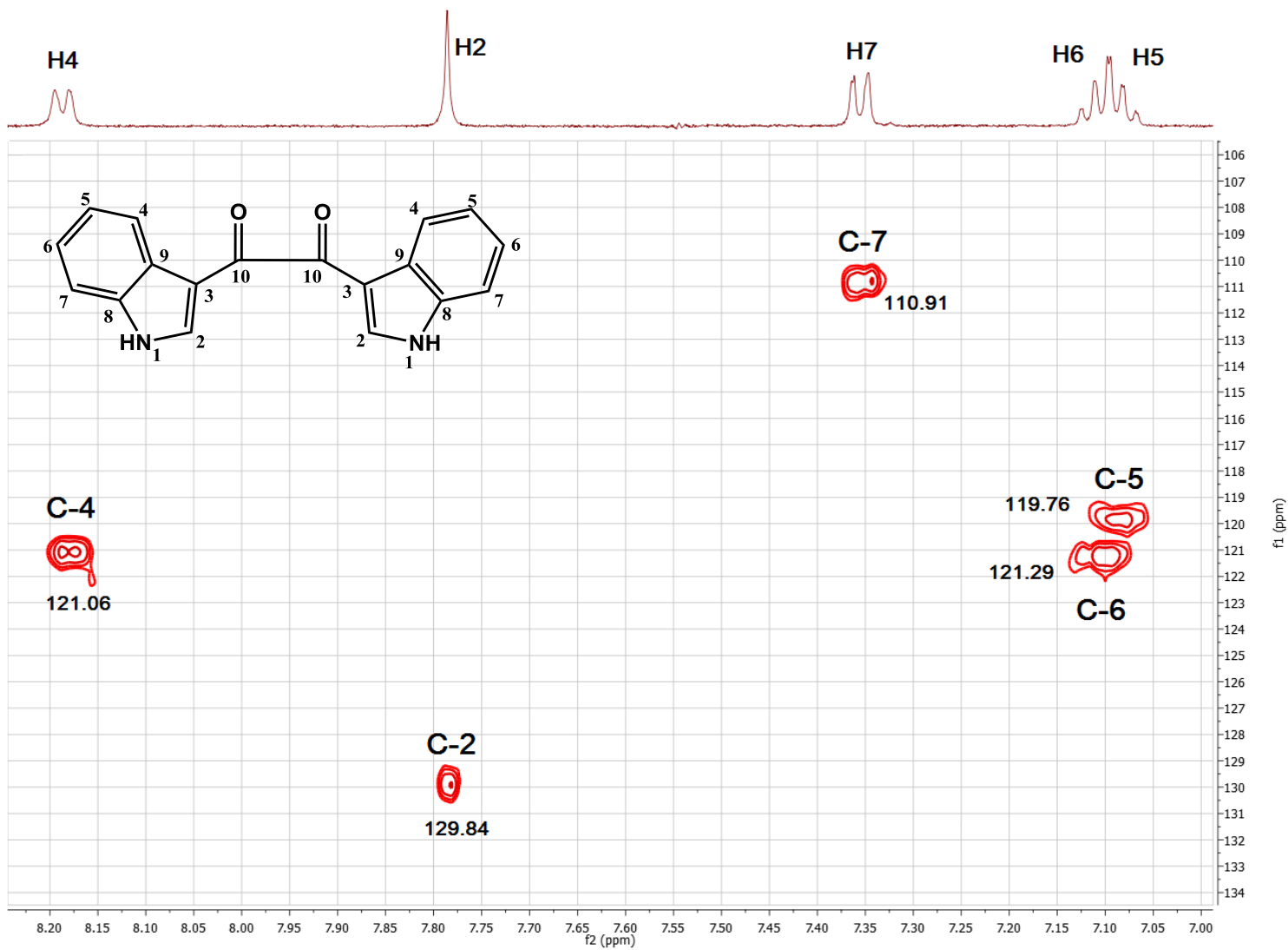
Φάσμα <sup>1</sup>H-NMR της ένωσης X10 (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)



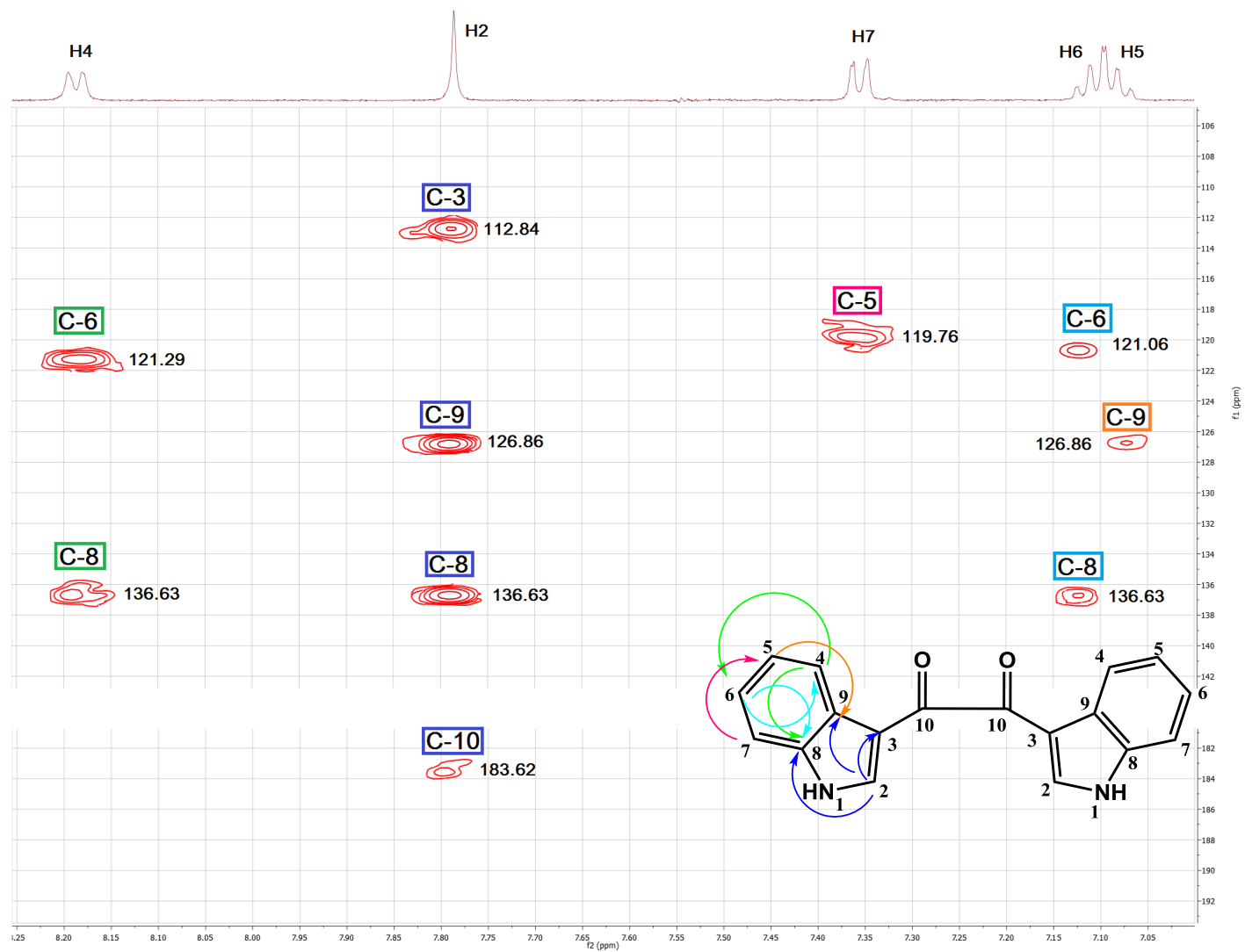
Φάσμα COSY της ένωσης X10 (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)



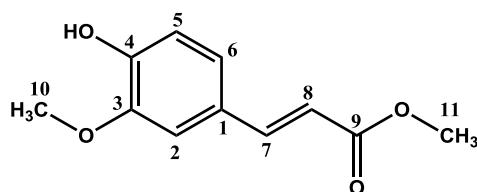
Φάσμα HSQC ένωσης X10 (CD<sub>3</sub>OD, 500MHz)



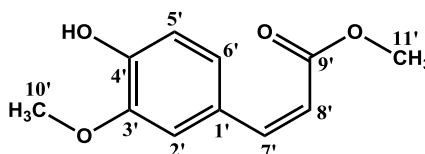
Φάσμα HMBC ένωσης X10 (CD<sub>3</sub>OD, 500MHz)



### 13.2.4. Ένωση X11, X12: Μίγμα *cis*, *trans* ισομερών του φερουλικού μεθυλεστέρα

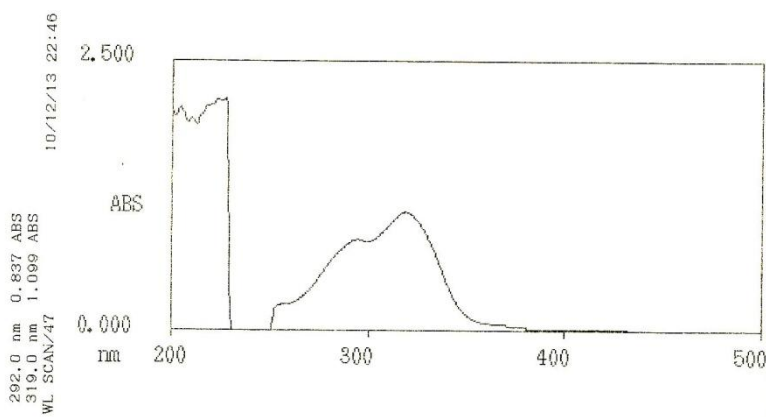


*trans*-φερουλικός μεθυλεστέρας



*cis*-φερουλικός μεθυλεστέρας

### Φάσμα UV Ένωσης X11, X12 σε MeOH



Από τα μέγιστα των κορυφών του μίγματος των ενώσεων X12, X13 σε μεθανόλη (292 και 319 nm) στο φάσμα υπεριώδους-ορατού, διαπιστώνεται ότι πρόκειται για παράγωγα κινναμωμικών οξέων. Ο έλεγχος με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας κυτταρίνης με AcOH 15% έδειξε ότι πρόκειται για μείγμα δύο ενώσεων οι οποίες δεν μπόρεσαν να διαχωριστούν, κατέστη δυνατή όμως η διευκρίνιση της δομής του από τα φάσματα NMR. Εξετάζοντας την ολοκλήρωση παρατηρήθηκε ότι βρίσκονται σε αναλογία περίπου 1:2,5. Το εάν οι *cis* φερουλικοί εστέρες σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της απομόνωσης (artefacts) ή παρευρίσκονται εξ αρχής στα φυτά δεν έχει διευκρινιστεί, αν και λόγω της μικρής και

μεταβλητής ποσότητάς τους τείνει να προταθεί ότι τα *trans* ισομερή είναι τα φυσικά συστατικά του φυτού. Από τη μελέτη των φασμάτων NMR των ενώσεων παρατηρήθηκαν τα παρακάτω. Στο υπεριώδες εμφανίστηκαν δύο κηλίδες γαλάζιου χρώματος ενώ τα συστήματα που χρησιμοποιήθηκαν στην χρωματογραφία λεπτής στιβάδας ήταν το CAW: Rf=0.99, AcOH 15%, Rf<sub>1</sub>= 0.44, και Rf<sub>2</sub>=0.71 EAW=0.99.

#### A) Ένωση X11

Στην αρωματική περιοχή <sup>1</sup>H NMR παρατηρούνται τα σήματα δυο διπλών κορυφών με *J*= 16.0 Hz σε δ<sub>H</sub> 7.61 και δ<sub>H</sub> 6.36 που αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-7 και H-8 του διπλού δεσμού αντίστοιχα. (Το μέγεθος της σταθεράς σύζευξης *J*=16 Hz δηλώνει ότι ο διπλός δεσμός είναι *trans*). Ακόμα παρατηρείται το σήμα μιας διπλής κορυφής στα δ<sub>H</sub> 7.18 με σταθερά σύζευξης (*J*= 2.0 Hz) η οποία αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-2. Η διπλή κορυφή στα δ<sub>H</sub> 6.80 με σταθερά σύζευξης (*J*= 8.5 Hz) αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-5. Η διπλώς διπλή κορυφή στα δ<sub>H</sub> 7.06 με σταθερές σύζευξης (*J*= 2.0 Hz και *J*= 8.5 Hz) αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-6. Τέλος σε δ<sub>H</sub> 3.80 (δ<sub>C</sub> 55.01) και σε δ<sub>H</sub> 3.76 (δ<sub>C</sub> 50.54) παρατηρούνται απλές κορυφές που η καθεμιά ολοκληρώνει για 3 πρωτόνια που αντιστοιχούν στα πρωτόνια των μεθοξυλίων των θέσεων 10 και 11.

#### B) Ένωση X12

Στην αρωματική περιοχή <sup>1</sup>H NMR παρατηρούνται τα σήματα δυο διπλών κορυφών με *J*=12.8 Hz, που σχάζονται μεταξύ τους σε δ<sub>H</sub> 6.84 και δ<sub>H</sub> 5.78 και αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-7' και H-8' του διπλού δεσμού. Το μέγεθος της σταθεράς σύζευξης δηλώνει την ύπαρξη ενός *cis* διπλού δεσμού. Σε δ<sub>H</sub> 7.78 παρατηρείται το σήμα μιας διπλής κορυφής με σταθερά σύζευξης (*J*=2.0 Hz) η οποία αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-2'. Η διπλή κορυφή στα δ<sub>H</sub> 6.75 με σταθερά σύζευξης (*J*=8.0 Hz) αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-5'. Η διπλώς διπλή κορυφή στα δ<sub>H</sub> 7.10 με σταθερές σύζευξης (*J*=2.0 Hz και *J*=8.0 Hz) αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-6'. Ακόμη παρατηρούνται δυο απλές κορυφές που η καθεμιά ολοκληρώνει για 3 πρωτόνια σε δ<sub>H</sub> 3.76 και 3.71 με δ<sub>C</sub> 54.91 και 50.34 που αντιστοιχούν στα πρωτόνια των μεθοξυλίων των θέσεων 10' και 11'. Τα πειραματικά δεδομένα των X11 και X12 συμφωνούν με τα δεδομένα από τη βιβλιογραφία (Balde et al., 1991).

Πίνακας 38: Φάσματα Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού ένωσης X11

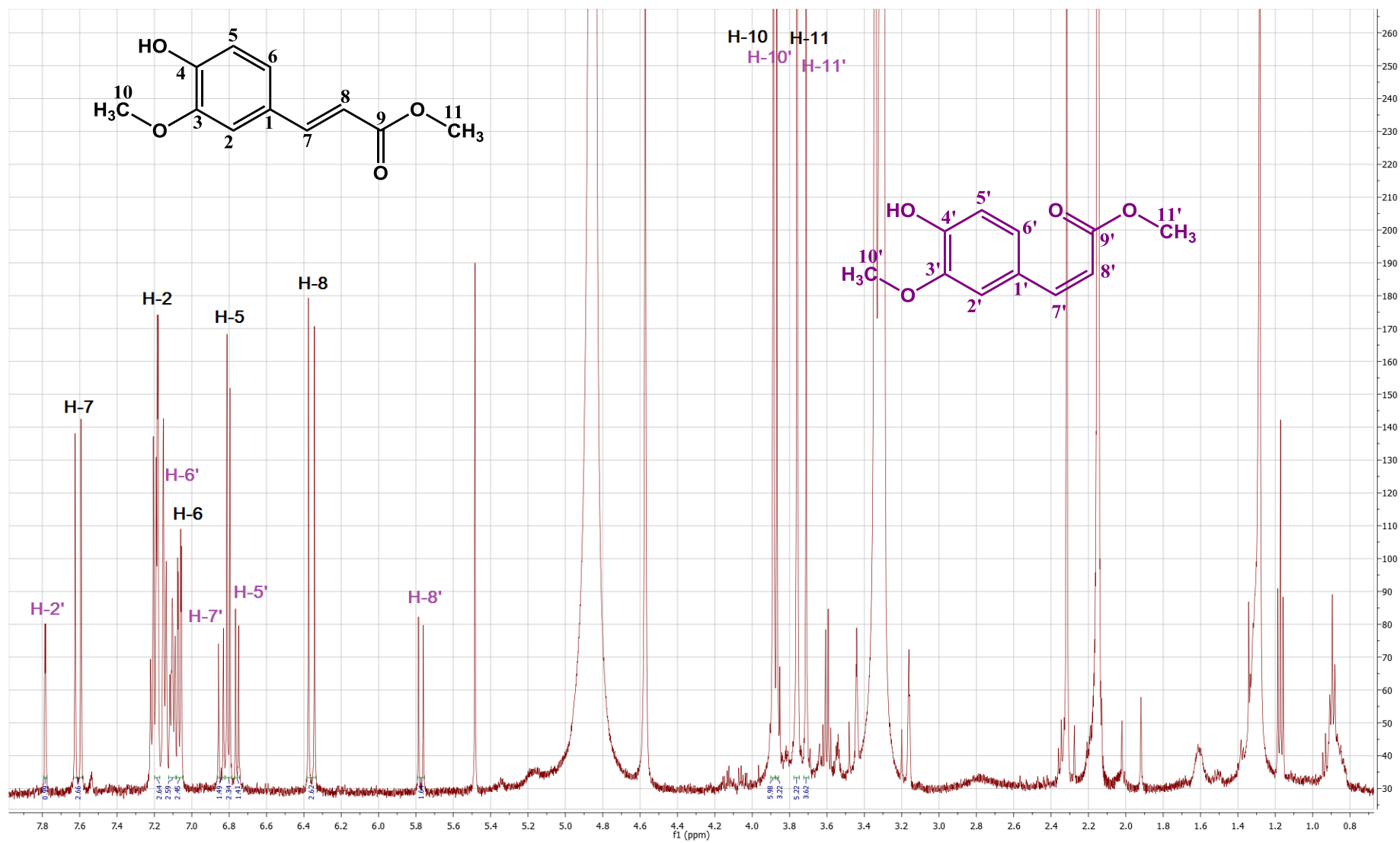
<sup>1</sup> H-NMR (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz) και <sup>13</sup> C-NMR (*από HSQC και HMBC )				
Ταυτοποίηση	δ <sub>H</sub> (ppm)	J <sub>HH</sub> (Hz)	Ταυτοποίηση	δ <sub>C</sub> (ppm)
			C-1	126.20
H-2	7.18 (d)	2.0	C-2	110.26
			C-3	147.99
			C-4	149.29
H-5	6.80 (d)	8.5	C-5	115.09
H-6	7.06 (dd)	2.0, 8.5	C-6	122.64
H-7	7.61 (d)	16.0	C-7	145.46
H-8	6.36 (d)	16.0	C-8	113.76
			C-9	168.18
H-10	3.80 (s)		C-10	54.98
H-11	3.76 (s)		C-11	50.54

Πίνακας 39: Φάσματα Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού ένωσης X12

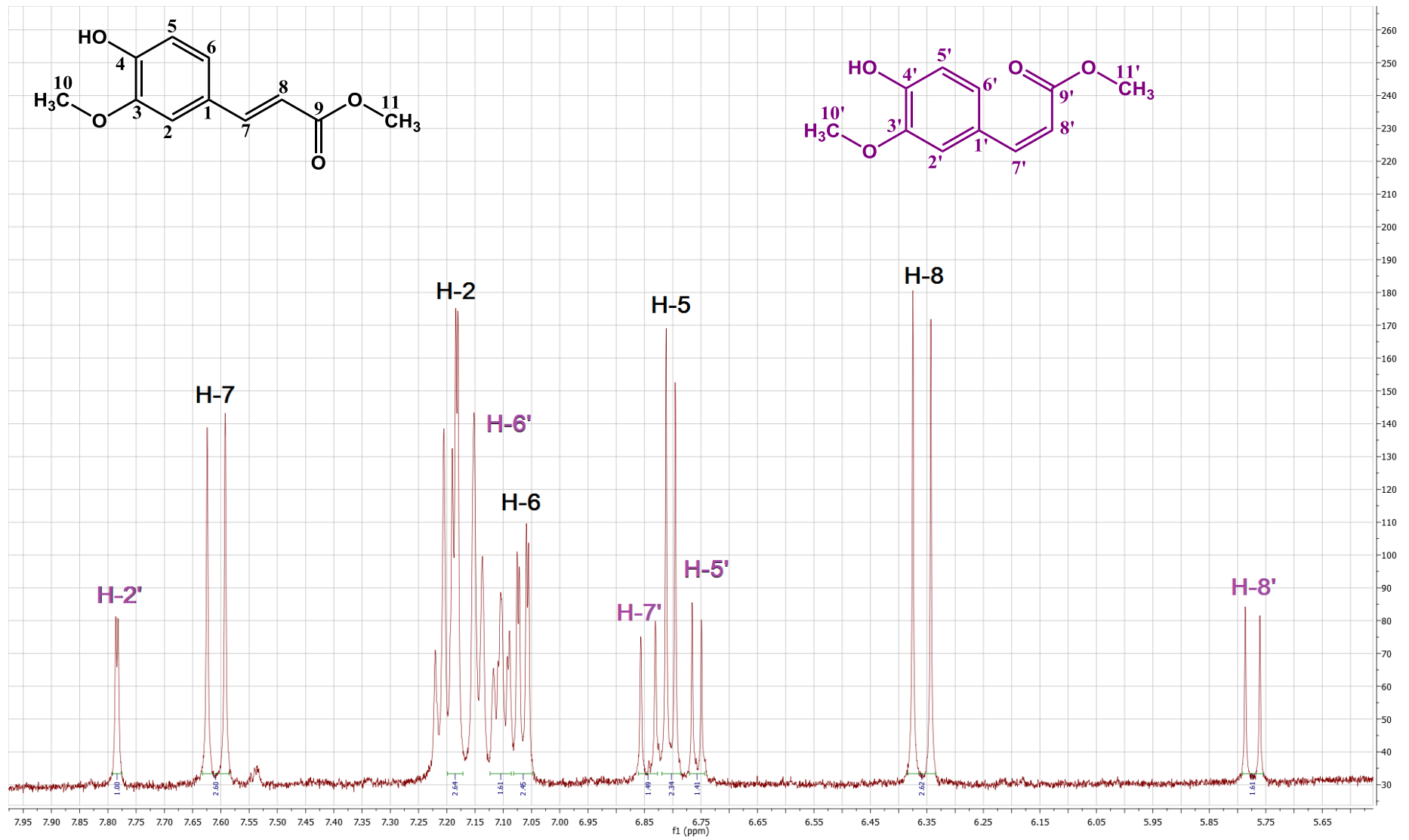
<sup>1</sup> H-NMR (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz) και <sup>13</sup> C-NMR (*από HSQC και HMBC )				
Ταυτοποίηση	δ <sub>H</sub> (ppm)	J <sub>HH</sub> (Hz)	Ταυτοποίηση	δ <sub>C</sub> (ppm)
			C-1'	126.69
H-2'	7.78 (d)	2.0	C-2'	113.48
			C-3'	147.21
			C-4'	148.02
H-5'	6.75 (d)	8.0	C-5'	114.23
H-6'	7.10 (dd)	2.0, 8.0	C-6'	125.41
H-7'	6.84 (d)	12.80	C-7'	143.96
H-8'	5.78 (d)	12.80	C-8'	114.98
			C-9'	167.55
H-10'	3.76 (s)		C-10'	54.85
H-11'	3.71 (s)		C-11'	50.34



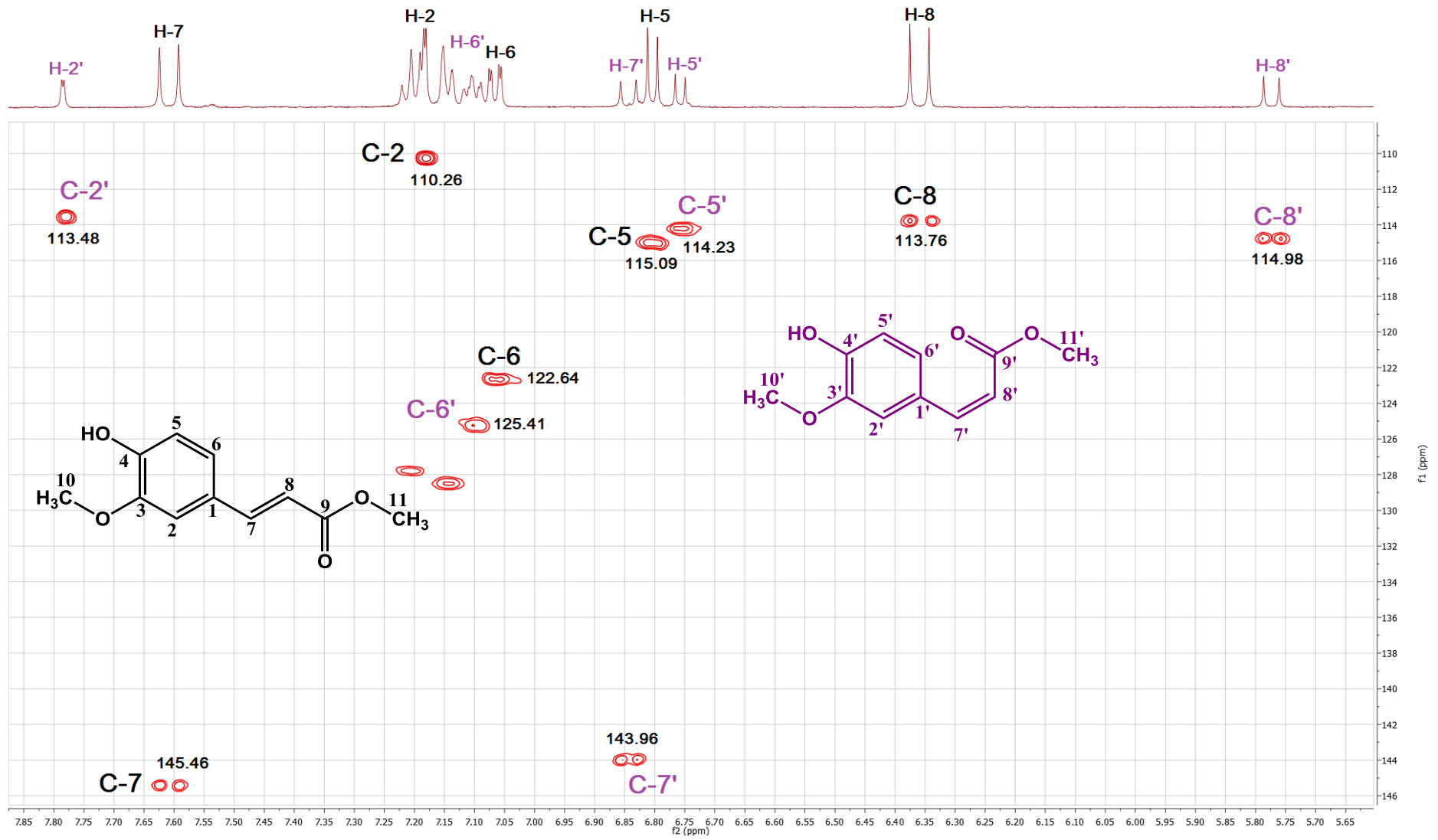
Φάσμα  $^1\text{H}$ -NMR των Ενώσεων X11, X12 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz)



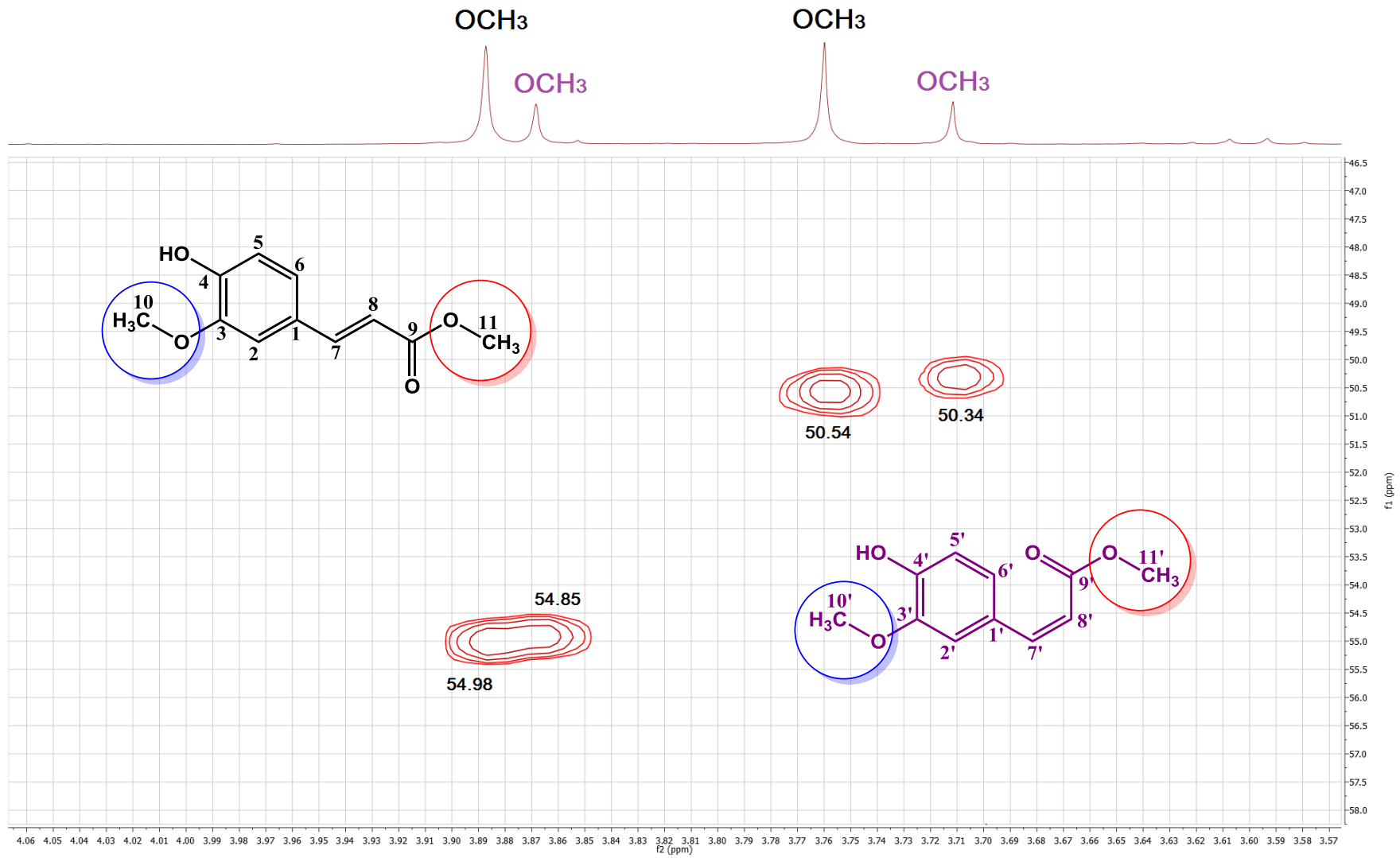
Φάσμα  $^1\text{H}$ - NMR των Ενώσεων X11, X12 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) στην περιοχή των αρωματικών πρωτονίων



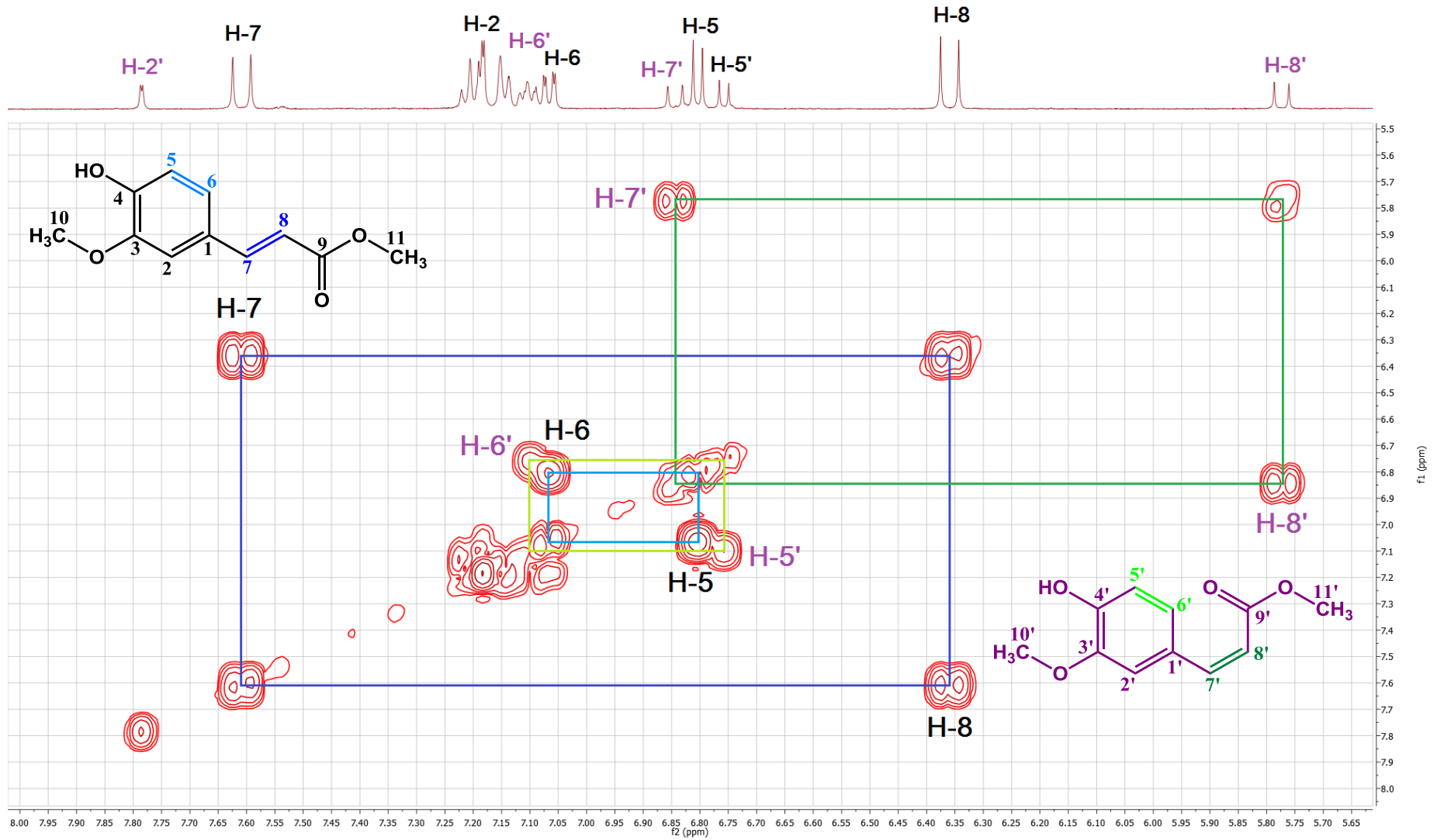
Φάσμα HSQC των Ενώσεων X11, X12 (CD<sub>3</sub>OD, 500MHz) στην περιοχή των αρωματικών πρωτονίων



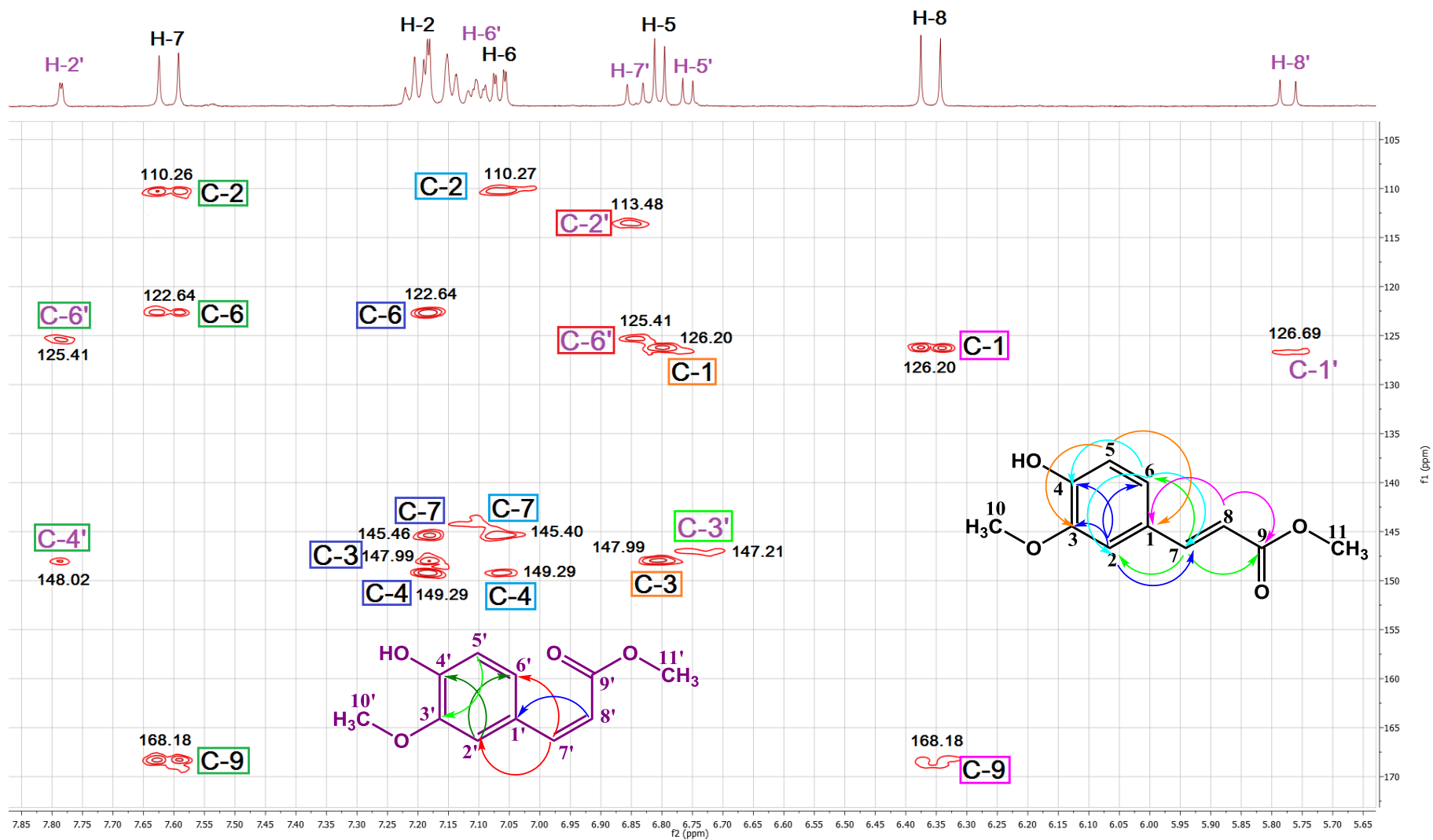
Λεπτομέρεια φάσματος HSQC των Ενώσεων X11, X12 (CD<sub>3</sub>OD, 500MHz)



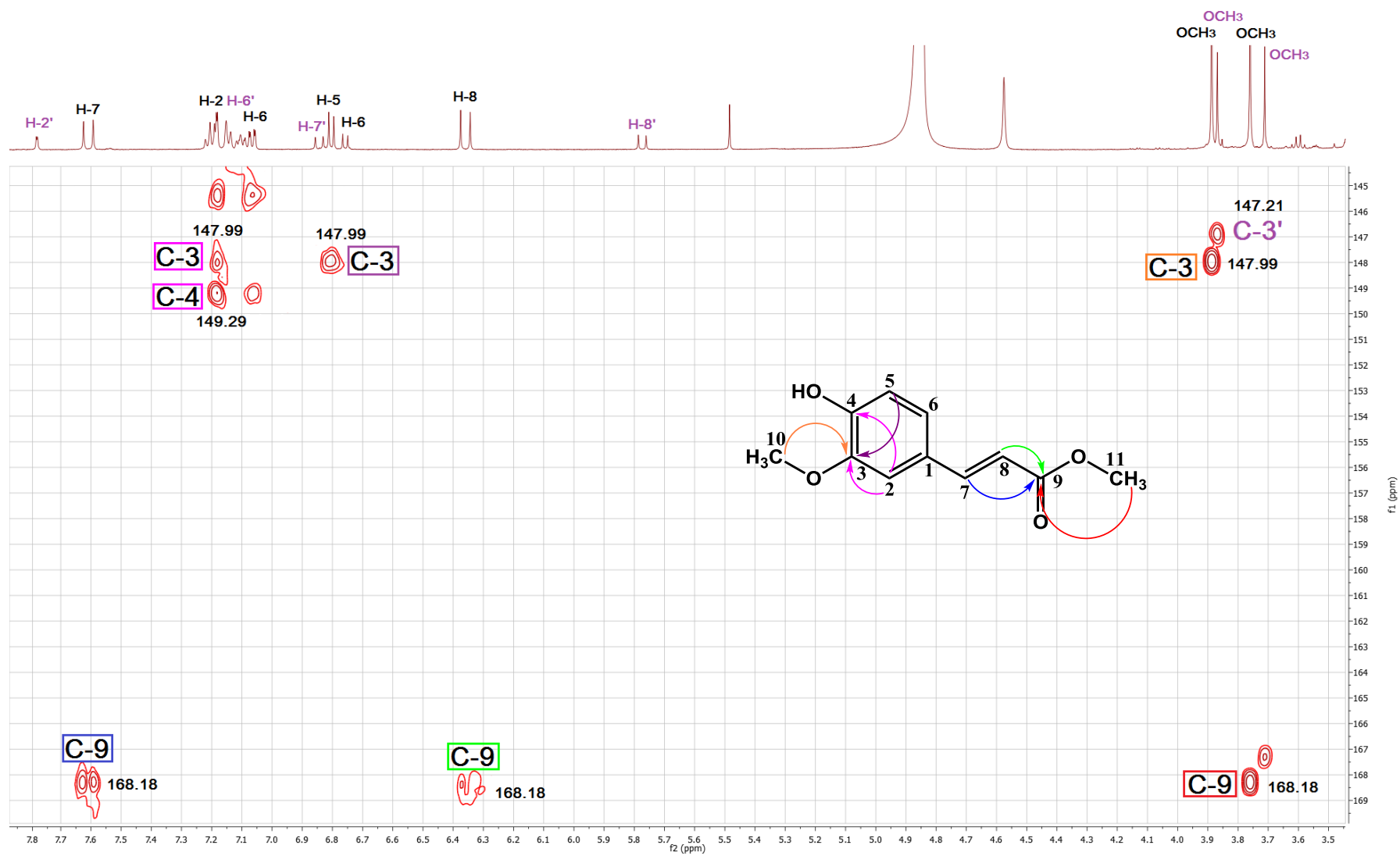
Φάσμα  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY των ενώσεων X11, X12 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz)



Λεπτομέρεια φάσματος HMBC των Ενώσεων X11, X12 (CD<sub>3</sub>OD, 500MHz) στην περιοχή των αρωματικών πρωτονίων

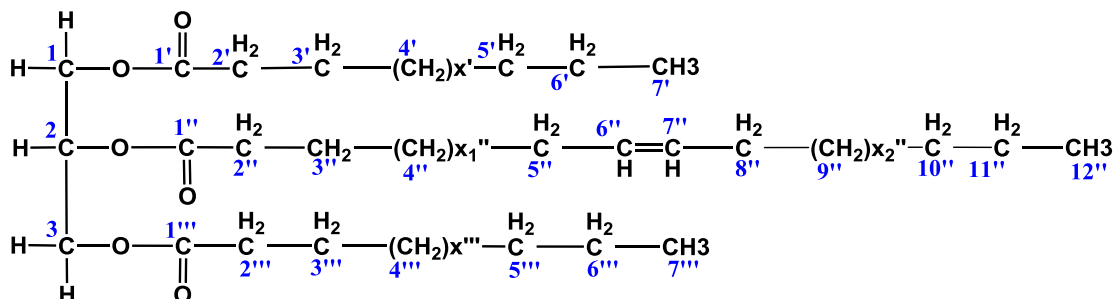


Λεπτομέρεια φάσματος HMBC των Ενώσεων X11, X12 (CD<sub>3</sub>OD, 500MHz)



### 13.3 Υπόλειμμα πετρελαϊκού αιθέρα

#### 13.3.1. Ένωση X13: Τριεστέρας της γλυκερόλης



Πίνακας 40: Φάσματα Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού Ένωσης X13

1 H-NMR (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz)/ <sup>13</sup> C-NMR (CDCl <sub>3</sub> , 125 MHz)				
Ταυτοποίηση	δ <sub>H</sub> (ppm)	J <sub>HH</sub> (Hz)	Ταυτοποίηση	δ <sub>C</sub> (ppm)
H-6''	5.34 (m)		C-6''	129.68
H-7''	5.34 (m)		C-7''	129.98
H-2	5.26 (m)		C-2	68.86
H-1a, H-3a	4.29 (dd)	12/5.5	C-1, C-3	62.06
H-1b, H-3b	4.14 (dd)	12/6.0		
H-2', H-2'', H-2'''	2.30 (m)		C-2', C-2'', C-2'''	34.04
H-5'', H-8''	2.01 (m)		C-5'', C-8''	27.16
H-3', H-3'', H-3'''	1.61 (m)		C-3', C-3'', C-3'''	24.83
H-6', H-11'', H-6'''	0.88 (t)	7.00	C-6', C-11'', C-6'''	14.07
H-4', H-4'', H-4'''	1.26-1.32 (m)		C-4', C-4'', C-4'''	29.08
H-5', H-5'''	1.25 (m)		C-5', C-5'''	29.61
H-10''	1.26 (m)		C-10''	31.92
H-5'', H-8''	2.01 (m)		C-5'', C-8''	27.16
			C-1', C-1'''	173.30
			C-1''	172.85
H-7', H-12'', H-7'''	0.88 (bt)		C-7', C-12'', C-7'''	14.07
H-9''	1.29 (m)		C-9''	22.69
H-10''	1.26 (m)		C-10''	31.92

Το φάσμα πρωτονίου <sup>1</sup>H-NMR αποτελεί χαρακτηριστικό φάσμα εστέρα της γλυκερόλης με ακόρεστο λιπαρό οξύ. Η πολλαπλή κορυφή (m) που παρατηρείται στα 5.26 ppm αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-2 της γλυκερόλης σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Mendes et al., 2015). Τα



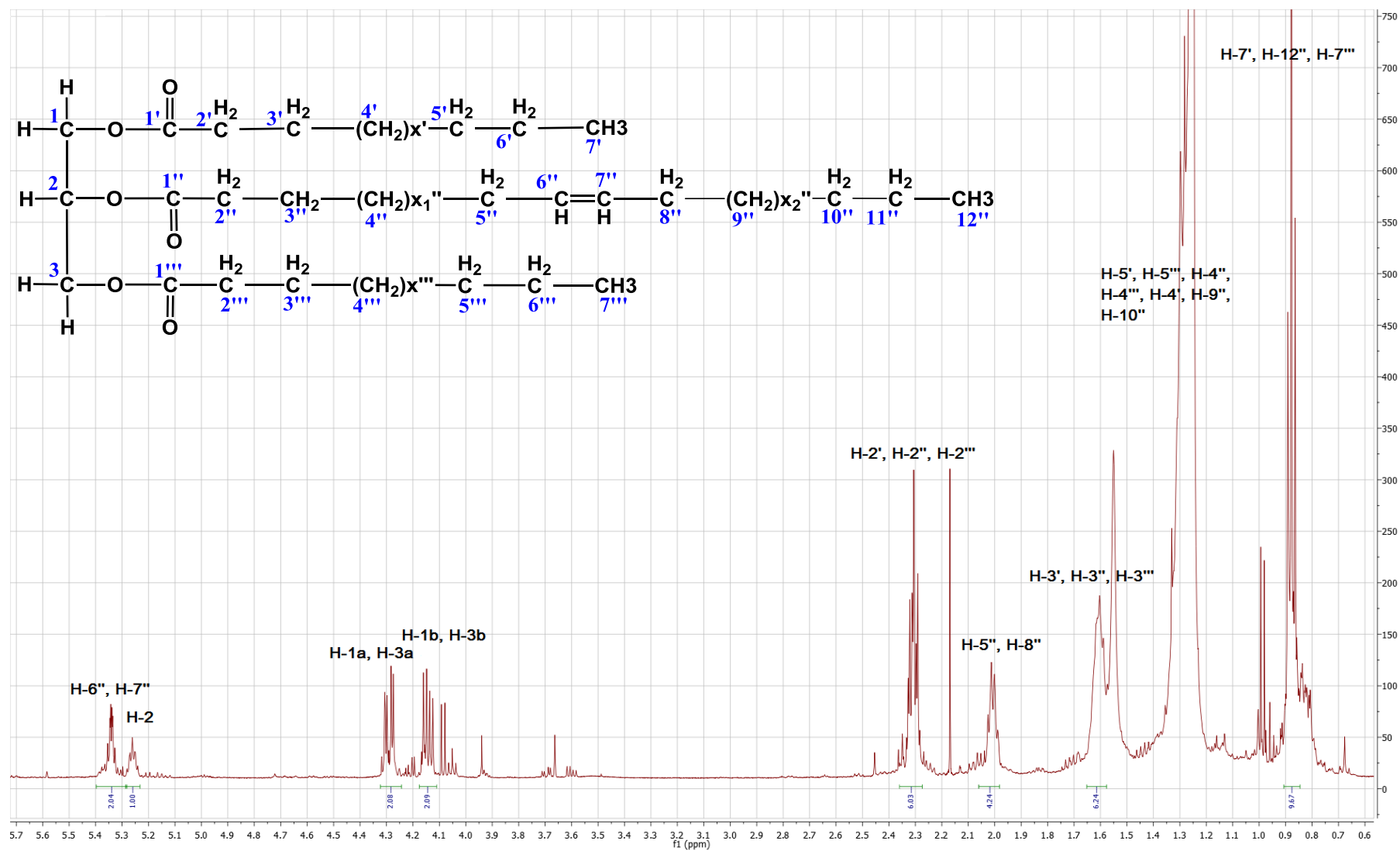
πρωτόνια H-1a, H-3a και H-1b, H-3b της γλυκερόλης συντονίζονται αντίστοιχα στα 4.29 και 4.14 ppm και εμφανίζονται ως διπλές διπλών (dd). Τα ολεφινικά πρωτόνια H-6", H-7" του ακόρεστου λιπαρού οξέος συντονίζονται στην περιοχή των 5.34 ppm με μορφή πολλαπλής κορυφής (m). Η ολοκλήρωση δείχνει 2 πρωτόνια γεγονός το οποίο οδηγεί στο συμπέρασμα ότι μόνο το ένα λιπαρό οξύ είναι ακόρεστο. Από τα φάσματα NMR δεν μπορεί να προσδιοριστεί η θέση εστεροποίησης του ακόρεστου οξέος, πλην όμως η δευτεροταγής ομάδα της γλυκερόλης θεωρείται η πιο πιθανή θέση εστεροποίησης (Bruneton et al., 1993). Τα αλλυλικά μεθυλένια H-8", H-5" εμφανίζονται στα 2.01 ppm ως μια πολλαπλή κορυφή ενώ τα μεθυλένια σε γεινίαση με το καρβονύλιο του τμήματος της γλυκερόλης H-2', H-2", H-2"" εμφανίζονται στα 2.31 ppm αντίστοιχα και αυτά ως πολλαπλή. Τα μεθυλένια H-3', H-3", H-3"" εμφανίζονται στα 1.60 ppm. Τα υπόλοιπα μεθυλένια εμφανίζονται σαν πολλαπλή κορυφή στα 1.26 -1.32 ppm. Τα μεθυλικά πρωτόνια εμφανίζονται ως τριπλές στα 0.88 με  $J = 7$  Hz και ολοκληρώνουν για 9 πρωτόνια γεγονός που συνηγορεί στην παρουσία τριών μεθυλίων όπως παρατηρείται παρακάτω από τα φάσματα πρωτονίου.

Από το φάσμα δύο διαστάσεων COSY παρατηρείται σύζευξη μεταξύ των μεθινικών πρωτονίων του διπλού δεσμού H-6", H-7" και των πρωτονίων H-5", H-8" ενώ τα τελευταία συζεύγνυνται με τα πρωτόνια H-4" και H-9". Τα πρωτόνια H-2', H-2", H-2"" συζεύγνυνται με τα πρωτόνια H-3', H-3", H-3"" που και αυτά στη συνέχεια συζεύγνυνται με τα πρωτόνια H-4', H-4", H-4"" ενώ τα μεθυλικά πρωτόνια συζεύγνυνται με τα πρωτόνια H-6', H-11", H-6"". Στο φάσμα δύο διαστάσεων HSQC είναι δυνατή η διάκριση των μεθινικών ανθράκων του διπλού δεσμού με αντίστοιχα σήματα στα 129.68 και 129.98 ppm. Από το φάσμα δύο διαστάσεων HMBC στα πρωτόνια του διπλού δεσμού H-6", H-7" διακρίνεται σήμα με τους άνθρακες C-5" και C-8" στα 27.16 ppm. Στο φάσμα δύο διαστάσεων HMBC το μεθινικό πρωτόνιο της γλυκερόλης H-2 εμφανίζει σήμα στα 62,29 ppm που αντιστοιχεί στους μεθυλενικούς άνθρακες C-1, C-3 εκατέρωθεν αυτού καθώς και σήμα στα 172.85 ppm που αντιστοιχεί στο καρβονύλιο C-1". Τα μεθυλενικά πρωτόνια H-1a, H-1b και H-3a, H-3b στα 4.29 και 4.14 ppm αντίστοιχα εμφανίζονται να έχουν σήμα στο φάσμα HMBC με τον μεθινικό άνθρακα του μορίου της γλυκερόλης C-2 στα 68.86 ppm, καθώς και με τα άμεσα συνδεδεμένα σε αυτά καρβονύλια C-1', C-3' στα 173.30 ppm.

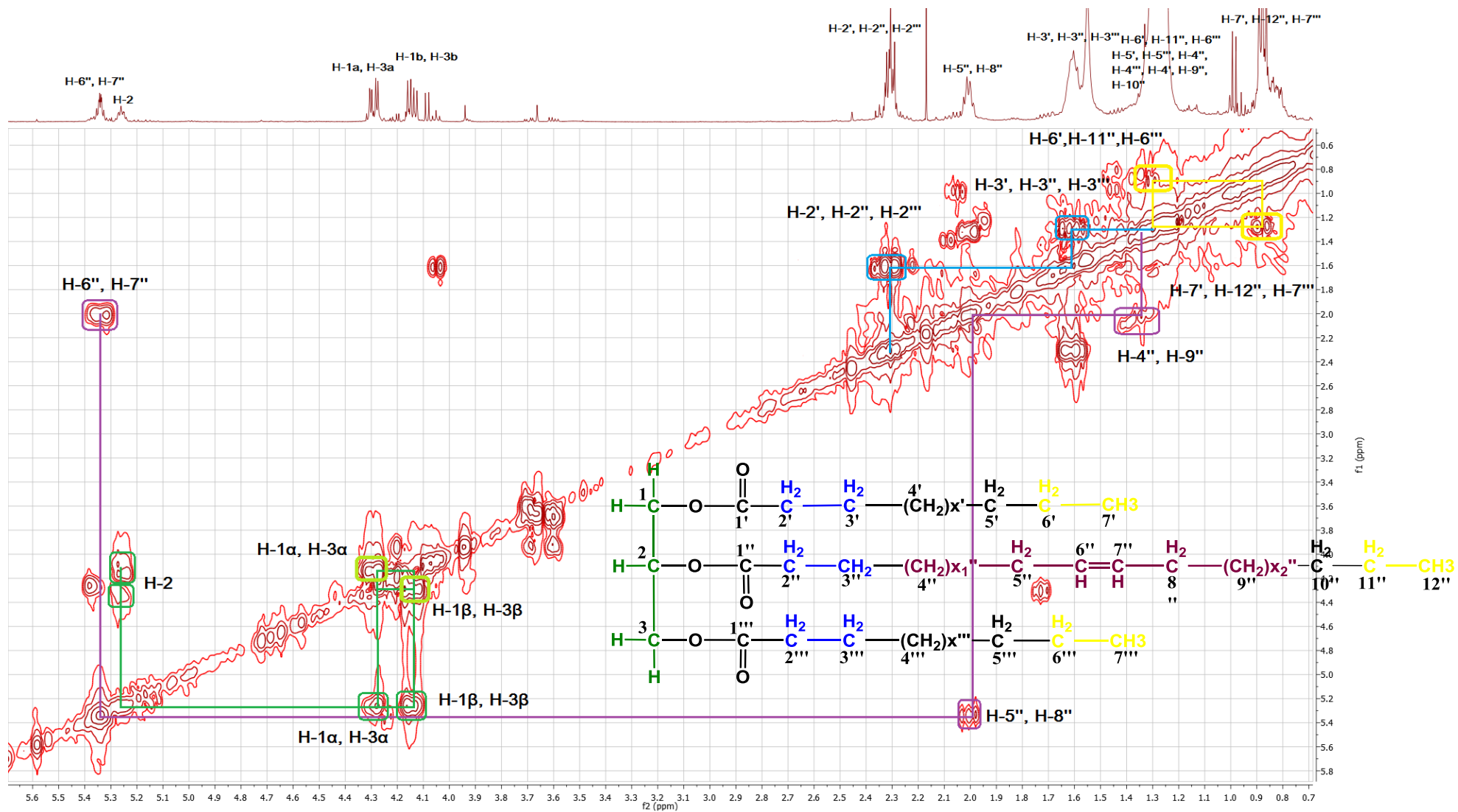
Τα μεθυλενικά πρωτόνια H-2', H-2", H-2"" στο φάσμα HMBC έχουν σήμα α) με τα καρβονύλια C-1" στα 172.77 και C-1', C-1"" στα 173.30 ppm, β) με τους C-3', C-3", C-3"" στα 24.83 ppm και γ) με τους άνθρακες C-4', C-4", C-4"" στα 29.08 ppm. Στο φάσμα HMBC τα πρωτόνια H-5", H-8" έχουν σήμα α) με τους άνθρακες του διπλού δεσμού C-6", C-7" στα 129.87 ppm β) με τους

άνθρακες των μεθυλενίων C-4" στα 29.08 ppm και γ) των μεθυλενίων C-9" στα 22.69 ppm. Στο φάσμα HMBC τα πρωτόνια σε  $\delta_H$  2.30 ppm (H-2', H-2'', H-2''') και  $\delta_H$  1.61 (H-3', H-3'', H-3''') συσχετίζονται με τους καρβονυλικούς άνθρακες επιβεβαιώνοντας ότι το τριγλυκερίδιο έχει εστεροποιημένες αλυσίδες λιπαρών οξέων. Από το φάσμα COSY της ένωσης παρατηρούμε ότι δεν υπάρχει σύζευξη μεταξύ των πρωτονίων H-5" και H-3" άρα μεταξύ τους παρεμβάλλονται και άλλες μεθυλενικές ομάδες (CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>. Τα μεθυλενικά πρωτόνια H-4', H-4" και H-4''' απαντούν σε μια ευρεία περιοχή από τα  $\delta_H$  1.34 και  $\delta_H$  1.22 για τα οποία δεν είναι δυνατόν να εξακριβωθεί ο αριθμός τους λόγω μη δυνατότητας λήψης φάσματος μάζας. Η παρουσία των δύο σημάτων ανθράκων σε  $\delta_C$  173.92 και  $\delta_C$  173.30 για τρεις εστέρες καρβονυλίων δείχνει ότι πρόκειται για συμμετρικό τριγλυκερίδιο του λιπαρού οξέος με ένα διπλό δεσμό.

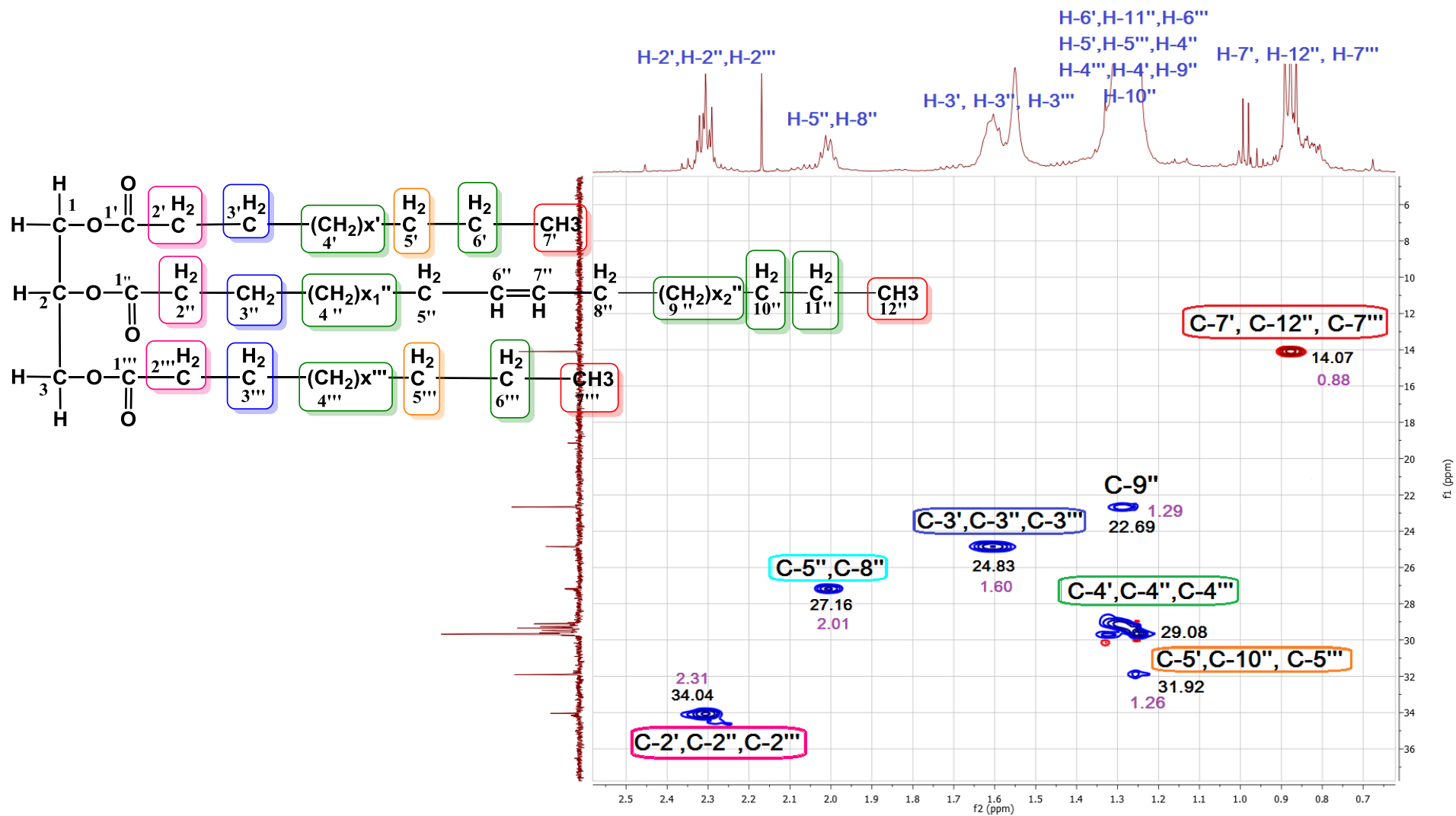
Φάσμα <sup>1</sup>H-NMR της ένωσης X13 (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)



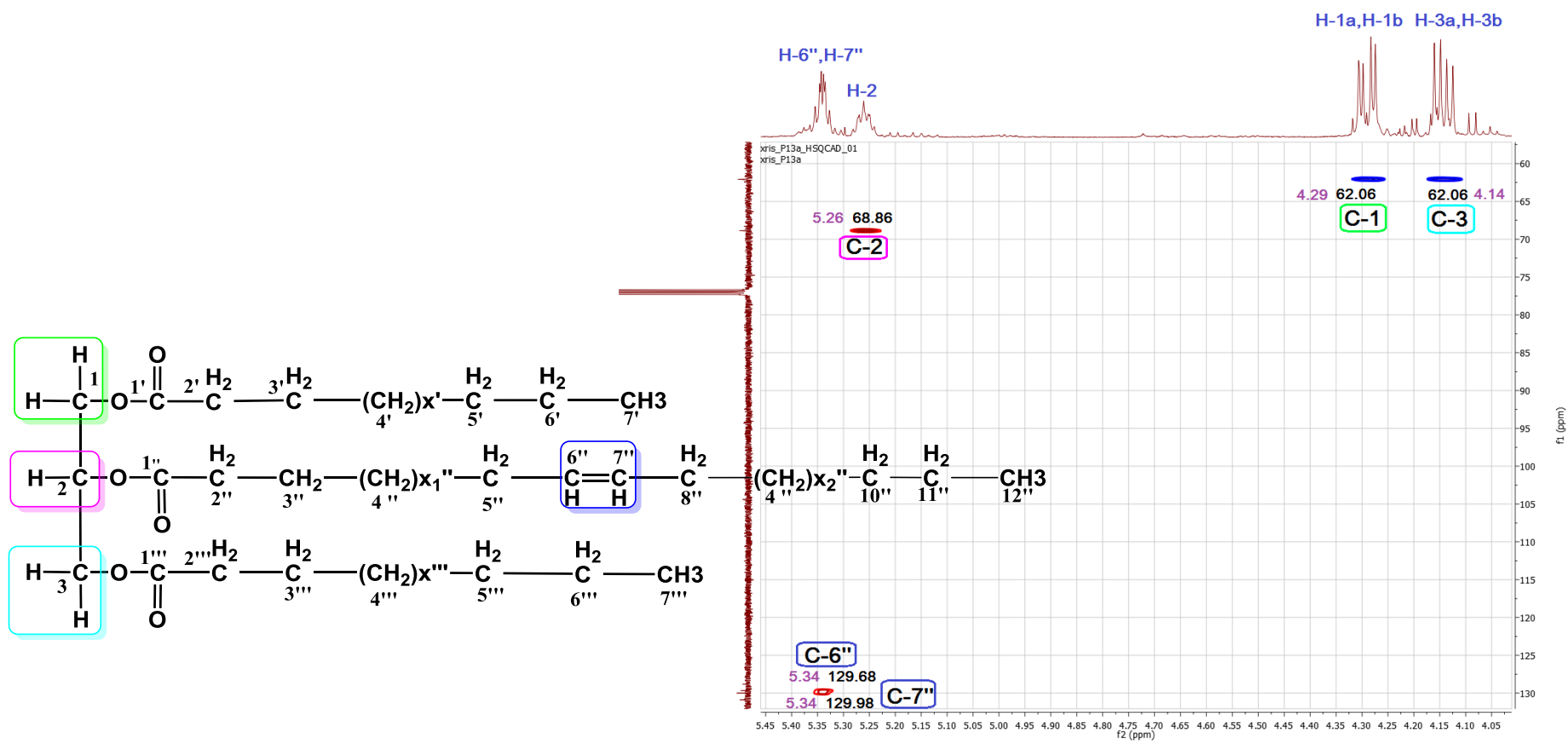
Φάσμα <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY της ένωσης X13 (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)



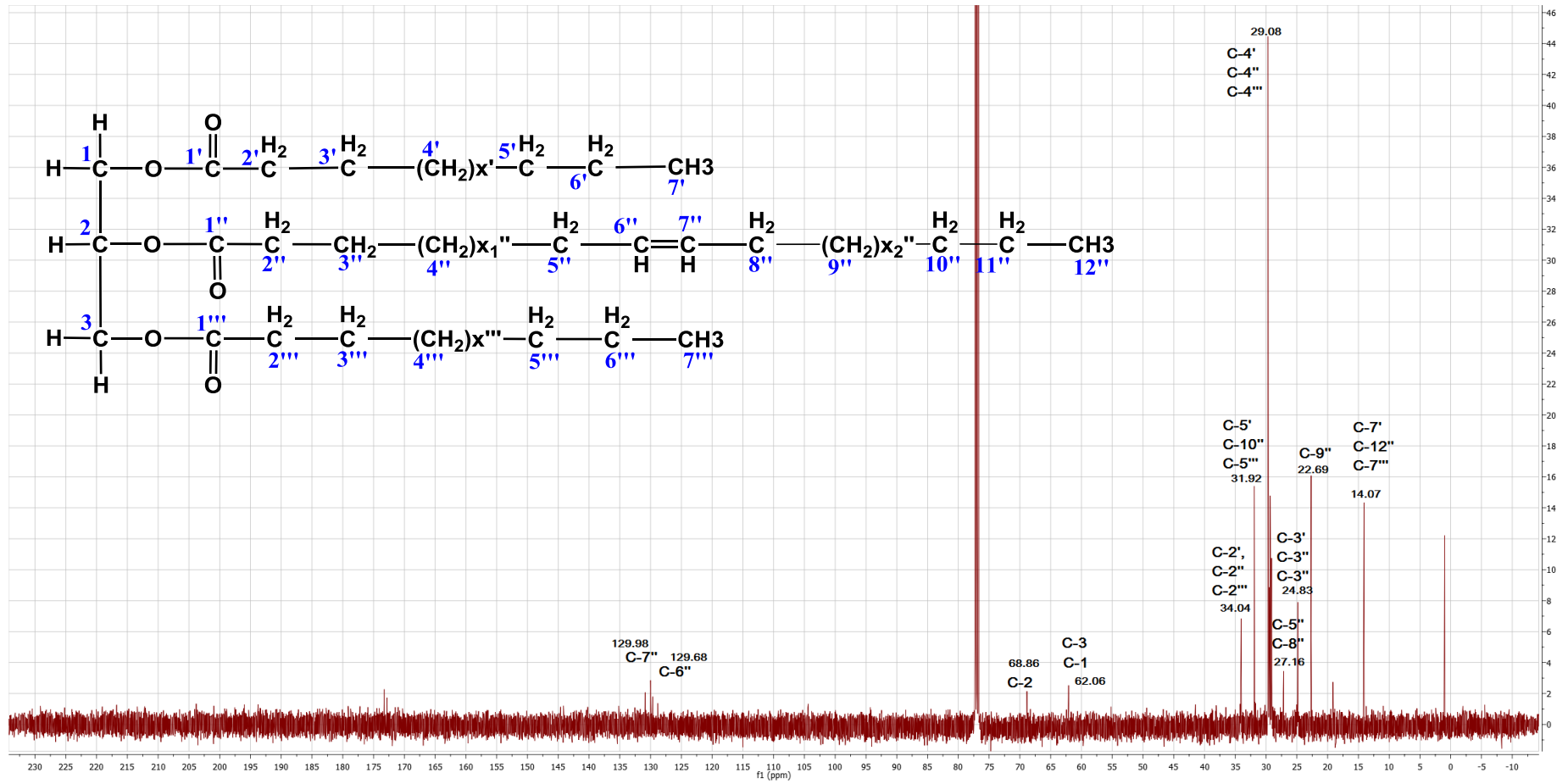
Λεπτομέρεια φάσματος HSQC της ένωσης X13 (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)



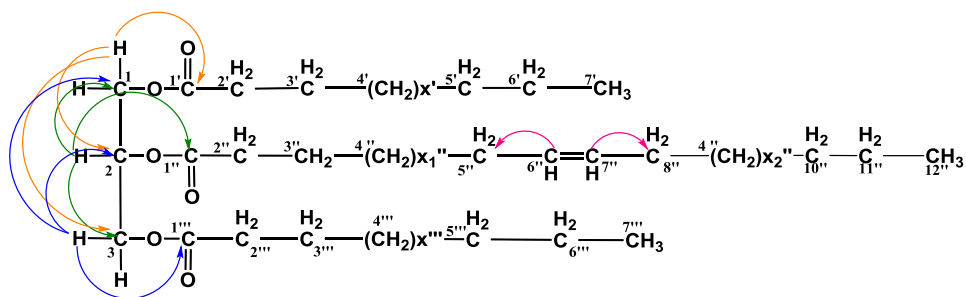
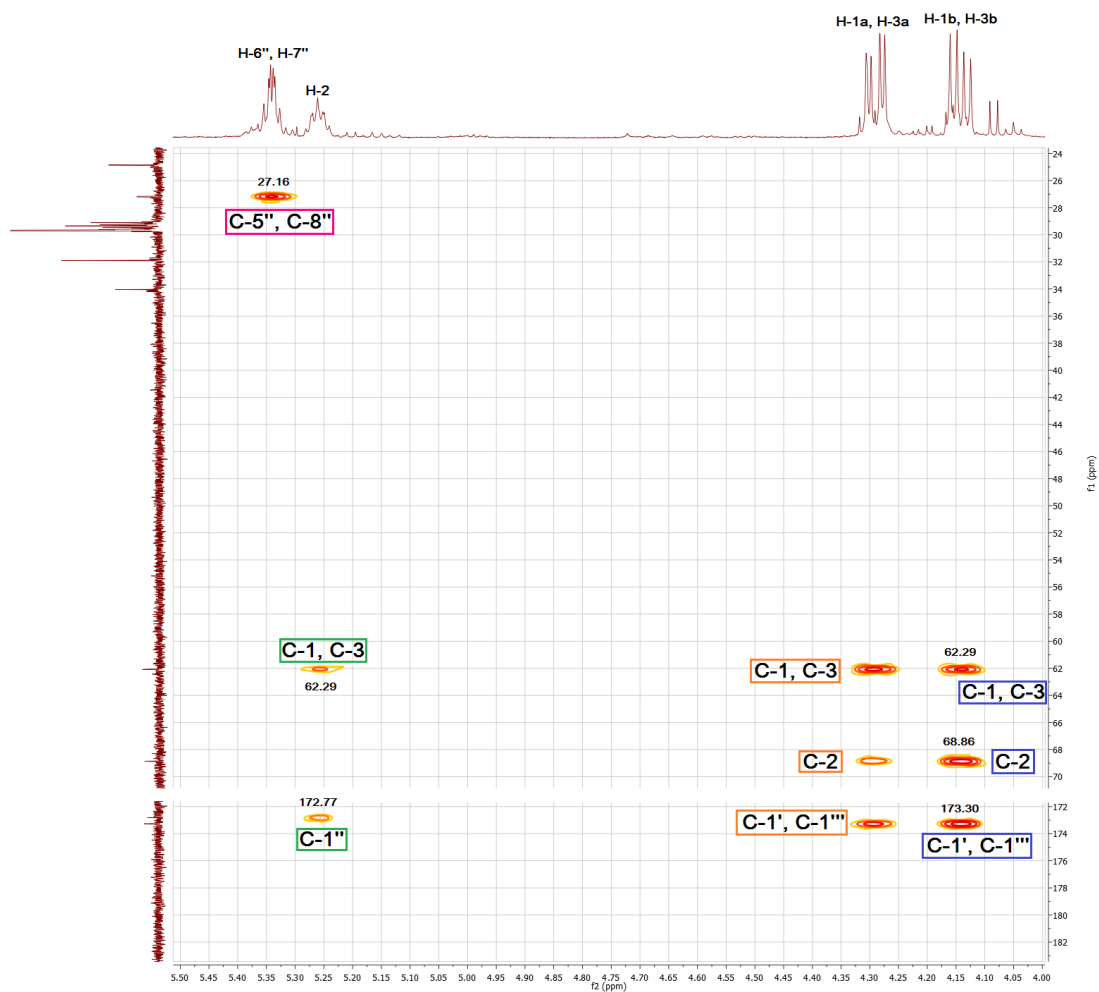
Λεπτομέρεια φάσματος HSQC της ένωσης X13 (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)



Φάσμα <sup>13</sup>CNMR της ένωσης X13 (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz)

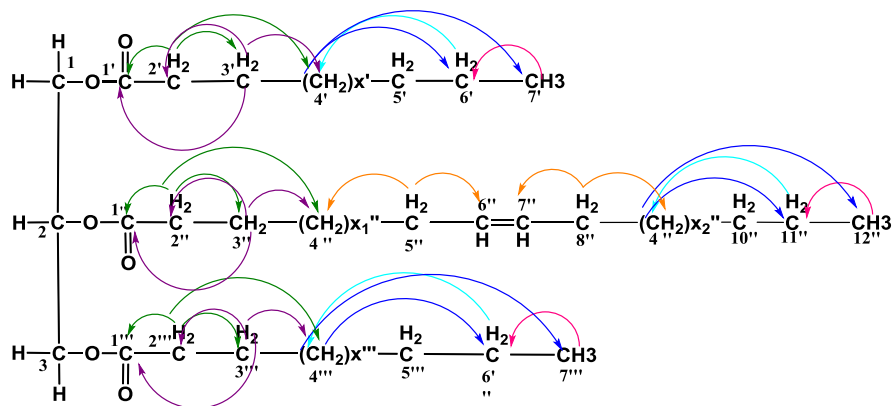
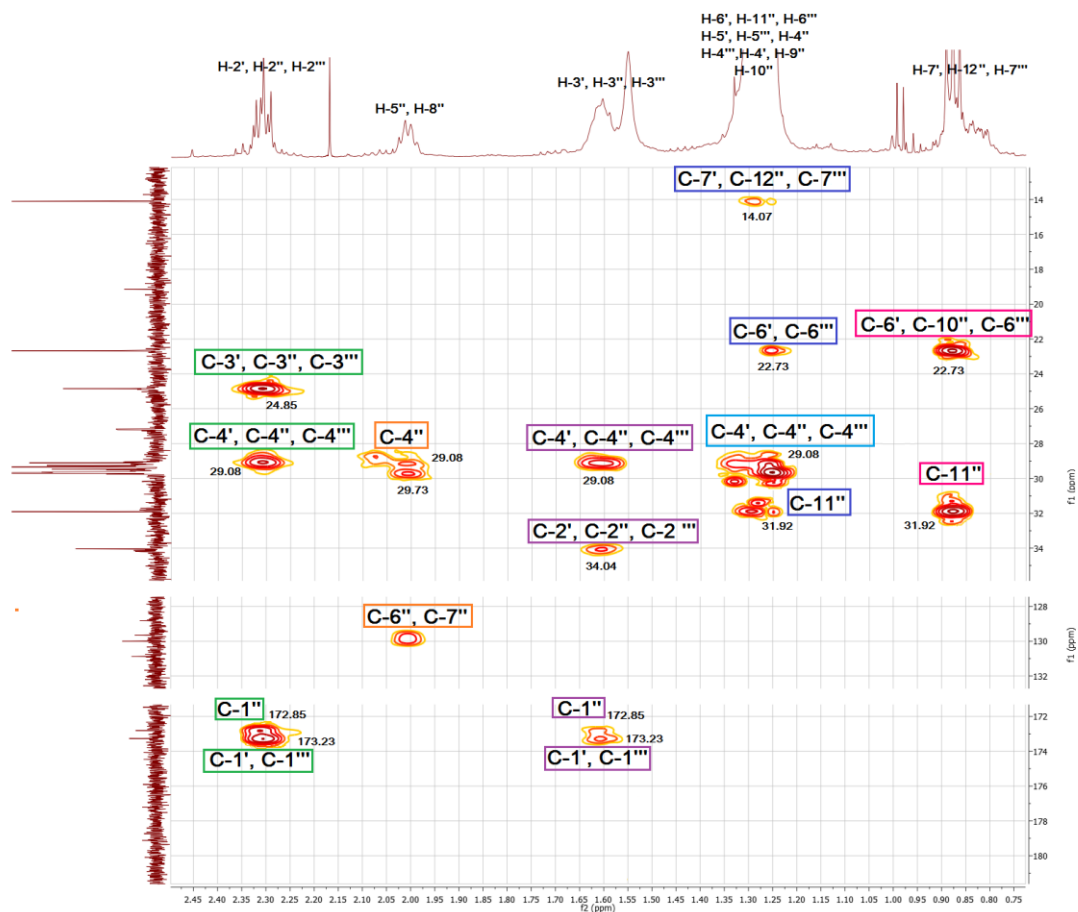


Λεπτομέρεια φάσματος HMBC της ένωσης X13 (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)

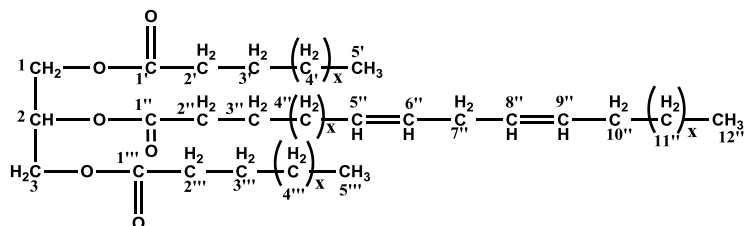




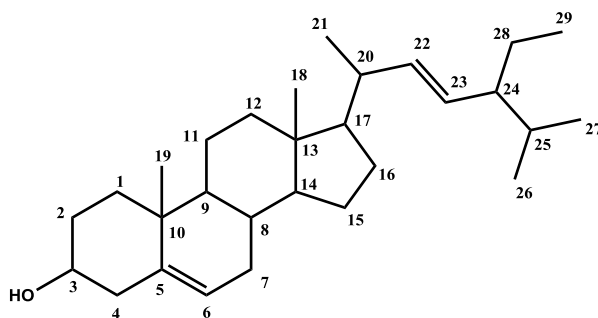
Λεπτομέρεια φάσματος HMBC της ένωσης X13 (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)



### 13.3.2. Ενώσεις X14 (Τριγλυκερίδιο) και X15 (Στιγμαστερόλη)



X14



X15

Πρόκειται για ένα μίγμα δύο ενώσεων ενός τριγλυκεριδίου και της στιγμαστερόλης. Στο φάσμα  $^1\text{H}$  NMR με τα μαύρα σήματα απεικονίζεται το τριγλυκερίδιο ενώ η στιγμαστερόλη με τα κόκκινα.

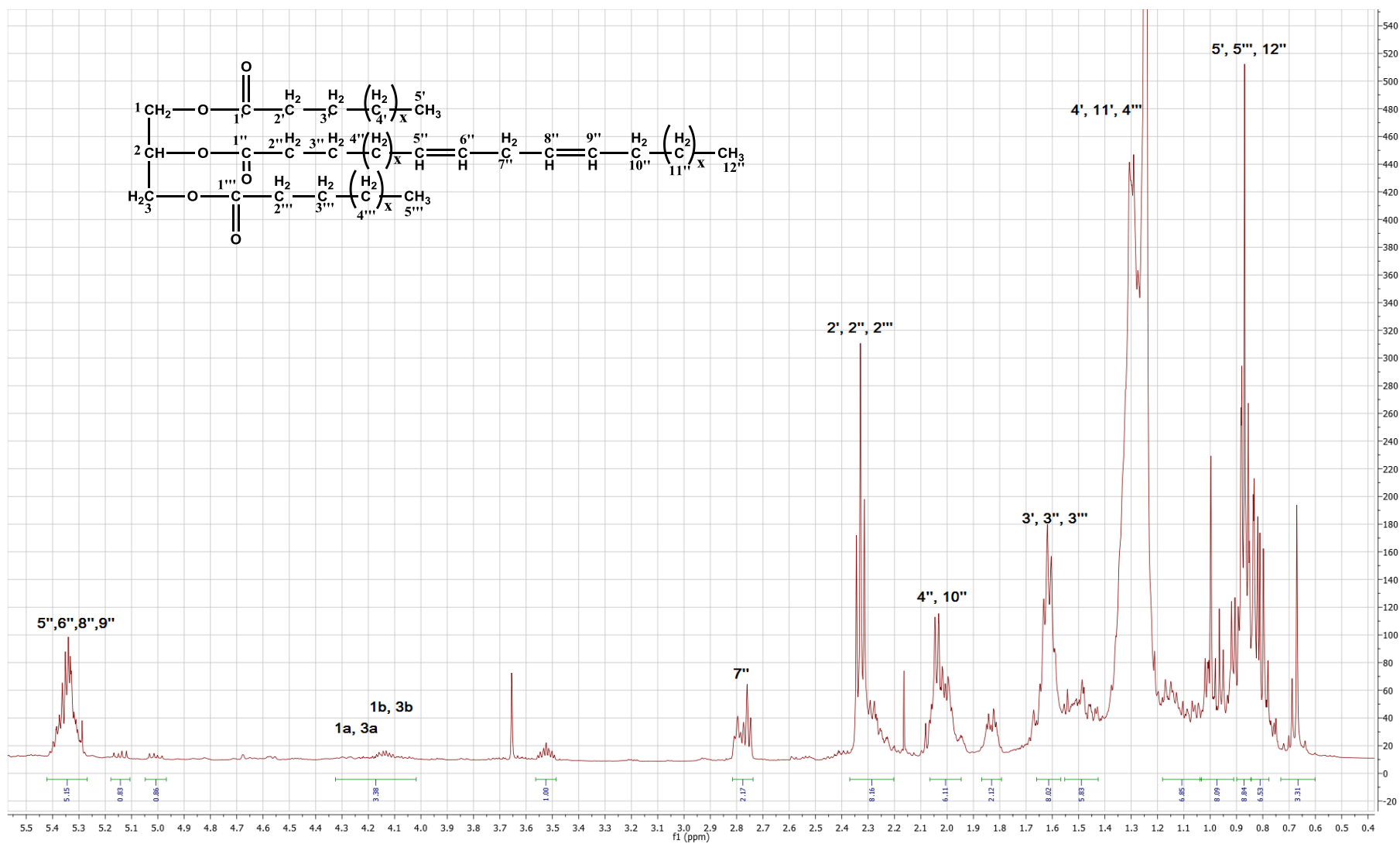
Πίνακας 41: Φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού Ένωσης X14

$^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 500MHz) και $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125MHz) ένωση X14				
Ταυτοποίηση	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$J_{\text{HH}}$ (Hz)	Ταυτοποίηση	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
H-1a, H-3a	4.10-4.17 m		C-1, C-3	62.02
H-1b, H-3b	4.28 m			
H-2	5.25 m		C-2	68.89
H-2', H-2'', H- 2'''	2.32 t	7.5	C-2', C-2'', C-2'''	34.00
H-3', H-3'', H-3'''	1.61 m		C-3', C-3'', C-3'''	24.66
H-4'', H-10''	2.03 m		C-4'', C-10''	27.10
H-4', H-4''', H-11''	1.22-1.34 m		C-4', C-4''', C-11''	22.80,29.29
H-5', H-12'', H-5'''	0.87 bt		C-5', C-12'', C-5'''	14.07
H-5'', H-6'', H-8'', H-9''	5.40-5.28 m		C-5'', C-6'', C-8'', C-9''	128.06, 130.18
H-7''	2.76 m		C-7''	25.61
			C-1', C-1'''	173.92
			C-1''	173.30

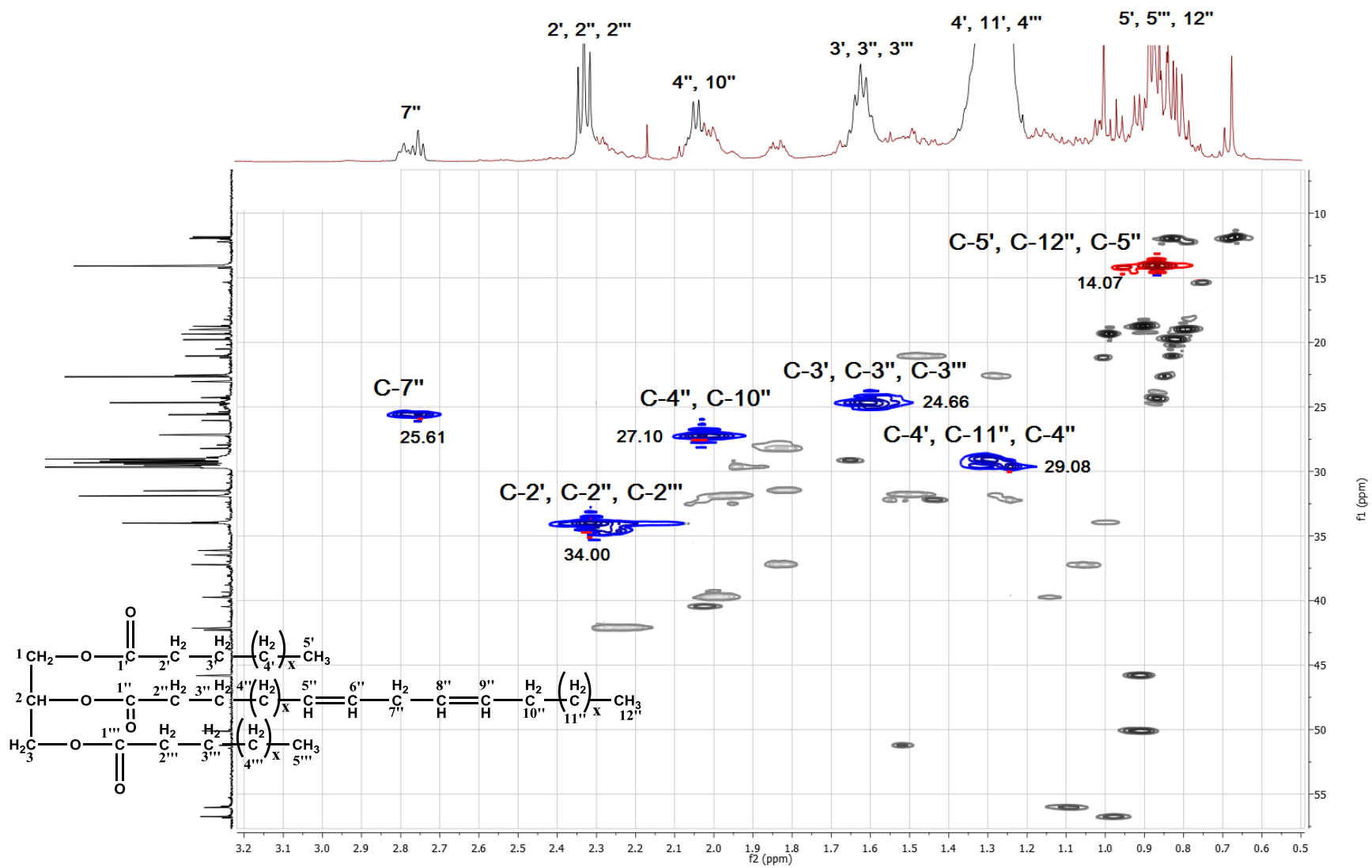
## A) Τριγλυκερίδιο

Στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της ένωσης παρατηρείται ο σκελετός τριγλυκεριδίου που αποτελείται από μια πολλαπλή κορυφή σε  $\delta_{\text{H}}$  4.10-4.28, που αντιστοιχεί στα πρωτόνια H-1a, H3a, H1b, H-3b και μια κορυφή σε  $\delta_{\text{H}}$  5.25 που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-2 του κεντρικού άνθρακα του σκελετού του τριγλυκεριδίου. Τα σήματα των τριών εστερικών καρβονυλίων εμφανίζονται σε  $\delta_{\text{C}}$  173.30 (C-1'') και  $\delta_{\text{C}}$  173.92 (C-1', C-1'''). Στο φάσμα HMBC οι καρβονυλικοί άνθρακες δείχνουν συσχέτιση με τα σήματα των πρωτονίων σε  $\delta_{\text{H}}$  2.32 (H-2', H-2'', H-2''') και  $\delta_{\text{H}}$  1.61 (H3', H-3'', H-3''') και επιβεβαιώνουν ότι το τριγλυκερίδιο έχει εστεροποιημένες αλυσίδες λιπαρών οξέων. Σε μια από αυτές παρατηρούνται δυο διπλοί δεσμοί, όπως φαίνεται από τα σήματα που εμφανίζονται στην περιοχή μεταξύ  $\delta_{\text{H}}$  5.40 και  $\delta_{\text{H}}$  5.28 (ολοκλήρωση για τέσσερα πρωτόνια) με σήματα ανθράκων  $\delta_{\text{C}}$  128.06 και 130.18. Σε  $\delta_{\text{H}}$  2.76 παρατηρείται η χαρακτηριστική κορυφή για πολυακόρεστα τριγλυκερίδια που αντιστοιχεί στα δύο αλληλικά πρωτόνια H-7'', ενώ σε  $\delta_{\text{H}}$  2.03 με  $\delta_{\text{C}}$  27.10 εμφανίζονται τα πρωτόνια H-4'' και H-10''. Στο φάσμα COSY της ένωσης παρατηρούμε ότι δεν υπάρχει σύζευξη μεταξύ των πρωτονίων H-5'' και H-3'' άρα μεταξύ τους παρεμβάλλονται και άλλες μεθυλενομάδες (CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>. Τα μεθυλενικά πρωτόνια H-4', H-4''' και H-11'' απαντούν σε μια ευρεία περιοχή από  $\delta_{\text{H}}$  1.34 έως  $\delta_{\text{H}}$  1.22 για τα οποία δεν είναι δυνατόν να εξακριβωθεί ο αριθμός τους λόγω μη δυνατότητα λήψης φάσματος μάζας. Οι διπλοί δεσμοί εντοπίζονται σε ένα λιπαρό οξύ, όπως προκύπτει από την κορυφή που εμφανίζεται στα  $\delta_{\text{H}}$  2.76 (μεθυλένιο μεταξύ δύο διπλών δεσμών) και ολοκληρώνεται για δυο πρωτόνια, ενώ από το COSY φαίνεται ότι συζεύγνυται μόνο με τα πρωτόνια του διπλού δεσμού. Η παρουσία τέλος δύο σημάτων άνθρακα σε  $\delta_{\text{C}}$  173.92 και  $\delta_{\text{C}}$  173.30 για τρεις εστέρες καρβονυλίων δείχνει ότι ο ένας άνθρακας διαφοροποιείται λόγω της ακόρεστης αλυσίδας. Το ακόρεστο λιπαρό οξύ είναι αυτό που έχει τη μεγαλύτερη πιθανότητα να συνδέεται με τη δευτεροταγή υδροξυλομάδα του τριγλυκεριδίου (Bruneton 1993). Τα πειραματικά δεδομένα συμφωνούν με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας (Swaroop et al., 2005).

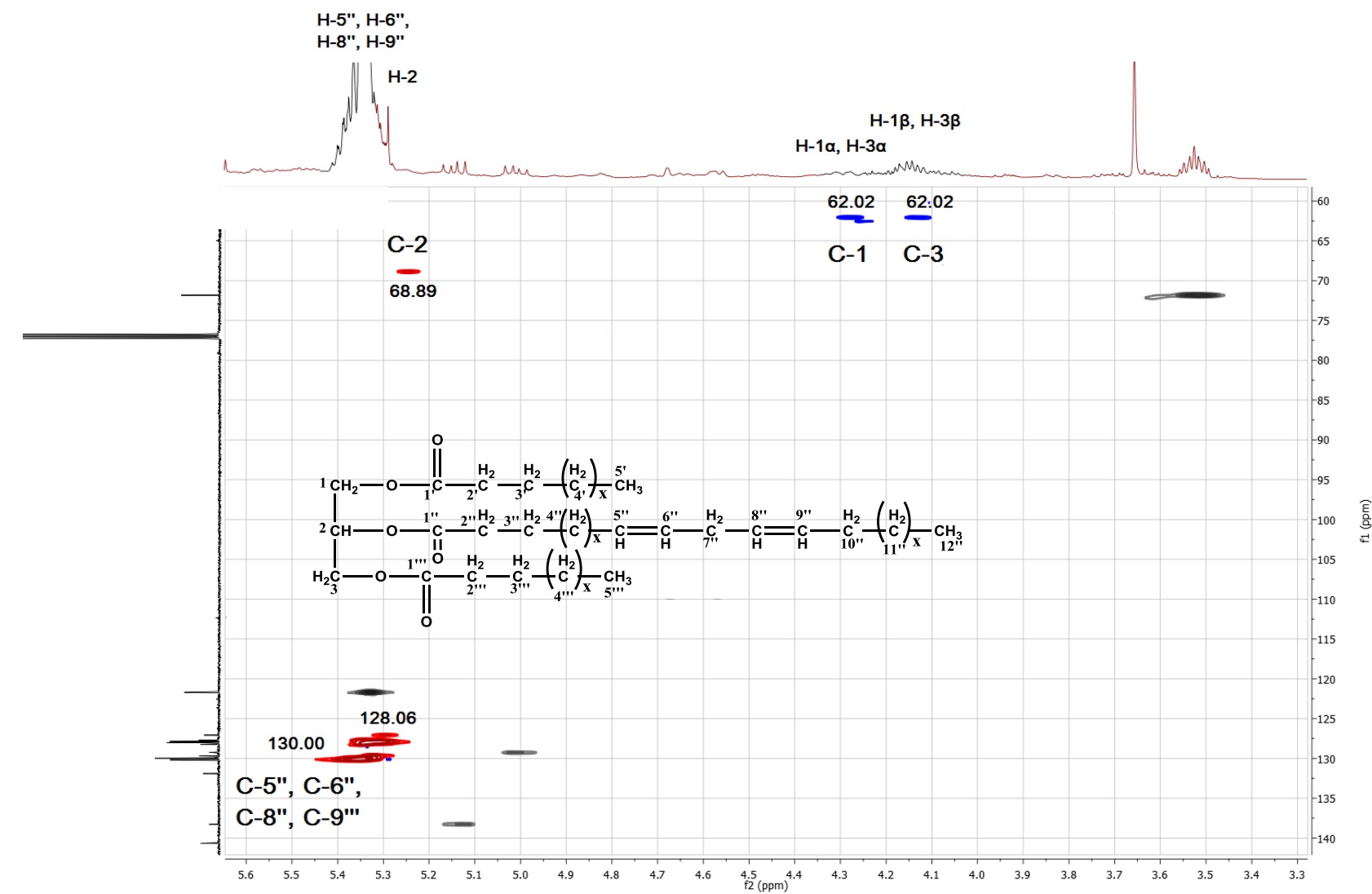
Φάσμα  $^1\text{H}$ NMR της ένωσης X14 ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)



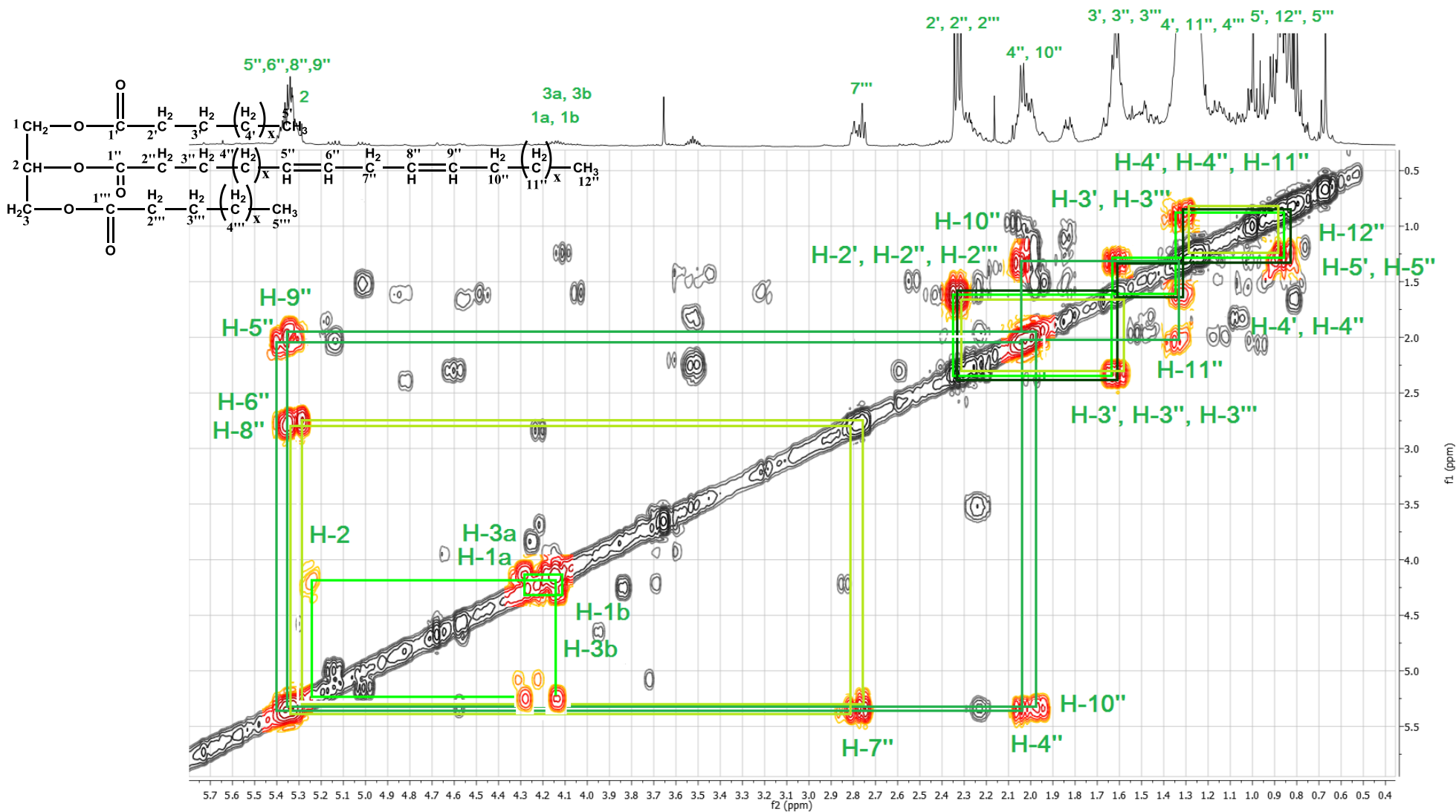
Λεπτομέρεια φάσματος HSQC της ένωσης X14 (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)



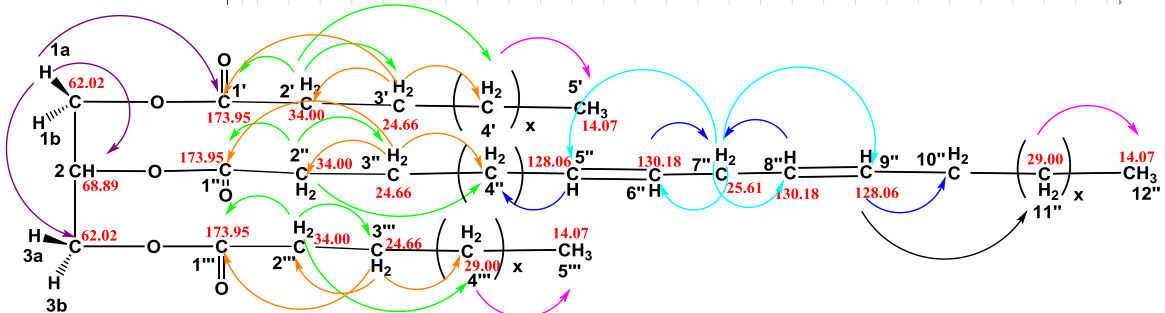
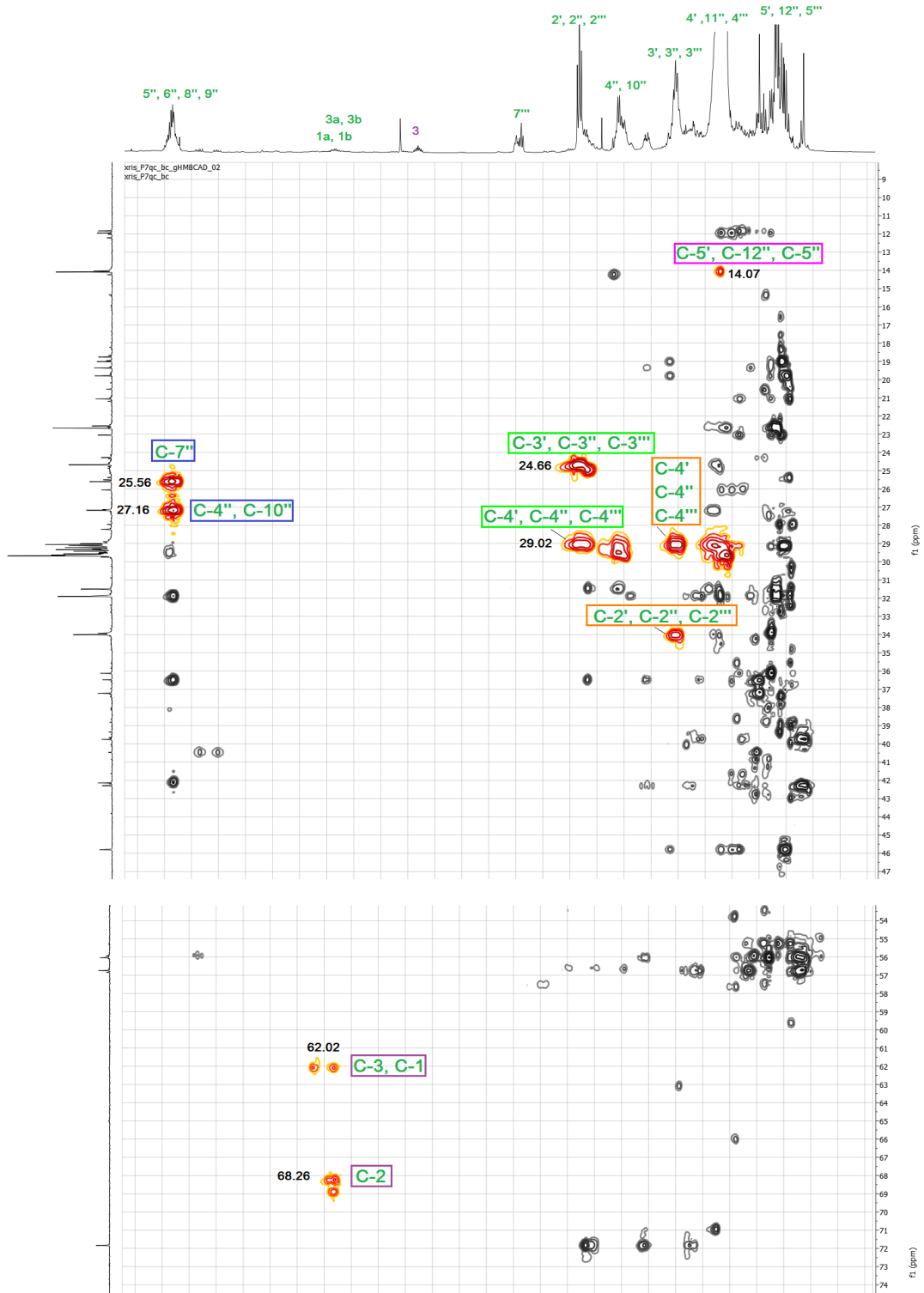
Λεπτομέρεια φάσματος HSQC της ένωσης X14 (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)



Συσχετίσεις πρωτονίων φάσματος COSY της ένωσης X14 (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)

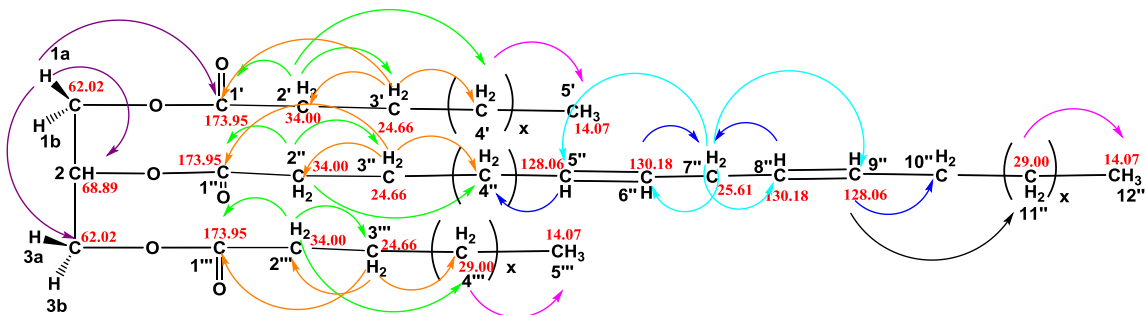
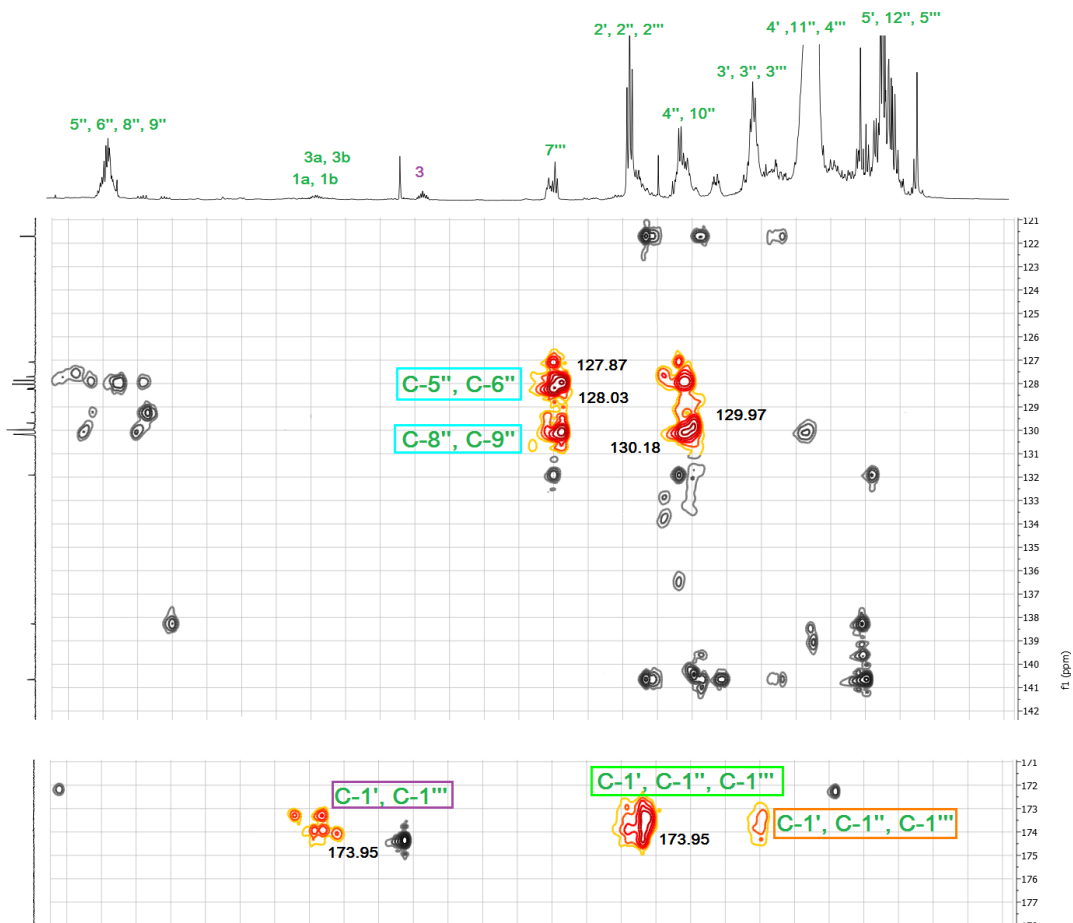


Φάσμα HMBC της ένωσης X14 (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)

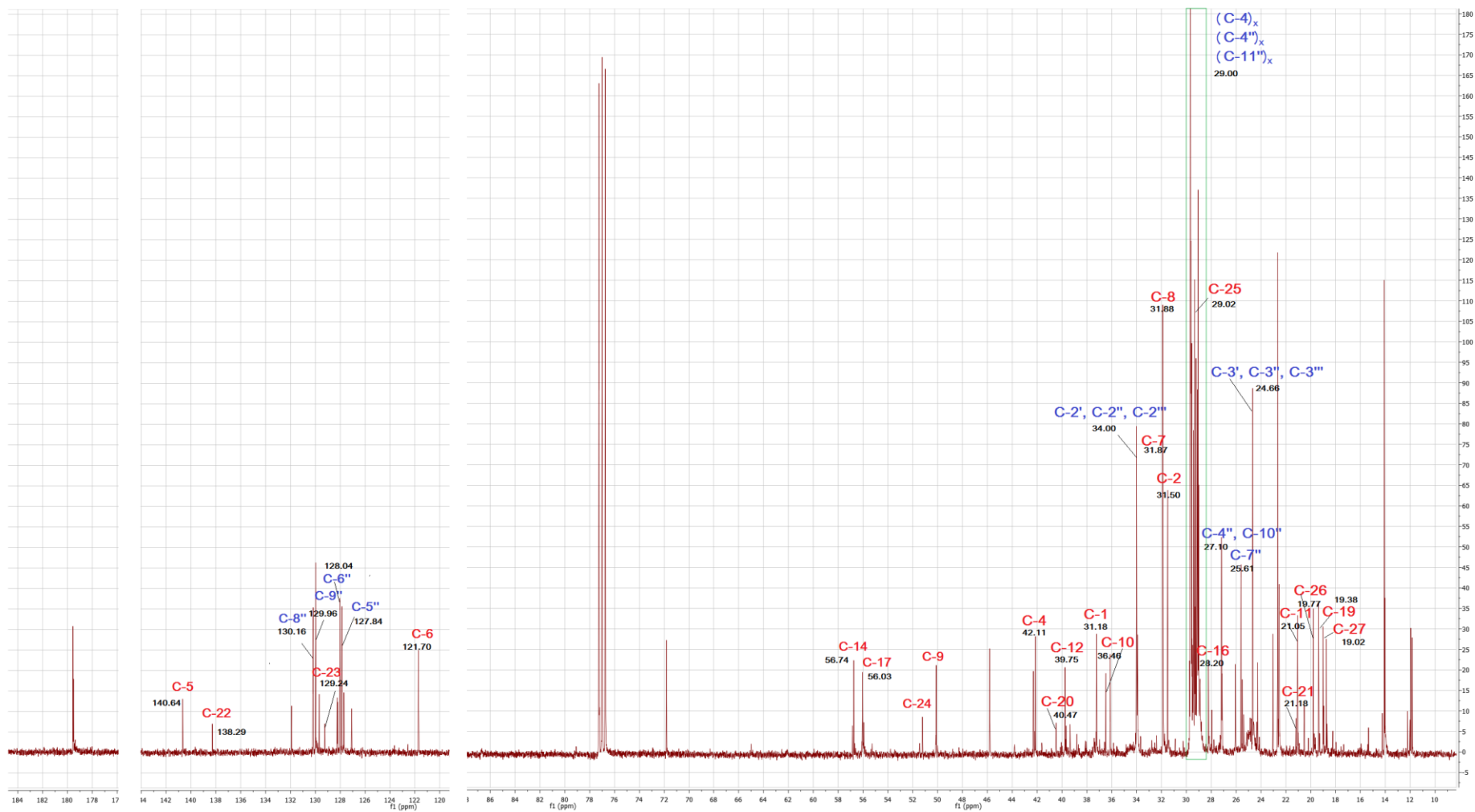




Συνέχεια Φάσματος HMBC της ένωσης X14 (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)

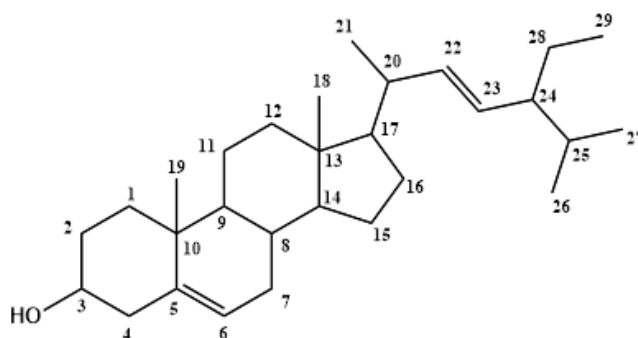


Φάσμα  $^{13}\text{C}$ NMR των ενώσεων X14 και X15 ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)



Πίνακας 42: Φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού Ένωσης X15

1H-NMR (CDCl <sub>3</sub> , 500MHz) και 13C-NMR (CDCl <sub>3</sub> , 125MHz) και συσχετίσεις HMBC Ένωσης X15					
Ταυτοποίηση	δ <sub>H</sub> (ppm)	J <sub>HH</sub> (Hz)	Ταυτοποίηση	δ <sub>C</sub> (ppm)	HMBC (H→C)
H-1a, H-1b	1.06,1.84 (m)		C-1	37.18	C-19, C-2, C-10, C-3, C-5,
H-2a, H-2b	1.51,1.82 (m)		C-2	31.50	C-1, C-3, C-4
H-3	3.52		C-3	71.83	
H-4a, H-4b	2.22, 2.27 (m)		C-4	42.11	C-2, C-10, C-3, C-6, C-5
H-6	5.33 (m)		C-6	121.70	C-4, C-10, C-8,
H-7a, H-7b	1.24,1.95 (m)		C-7	31.87	C-8, C-9, C-6, C-5
H-8	1.44 (m)		C-8	31.88	C-14, C-9, C-10, C-7
H-9	0.91 (m)		C-9	50.11	C-14
H-11a, H-11b	1.46,1.51 (m)		C-11	21.05	C-8, C-12, C-9
H-12a, H-12b	1.14,1.99 (m)		C-12	39.75	C-18, C-11, C-13, C-14
H-14	0.98 (m)		C-14	56.74	C-8, C-13
H-15a, H-15b	1.05,1.60 (m)		C-15	24.28	C-16, C-14, C-8, C-17
H-16a, H-16b	1.83 (m)		C-16	28.20	C-17, C-15
H-17	1.09 (m)		C-17	56.03	C-13, C-18, C-16
H <sub>3</sub> -18	0.67 (s)		C-18	11.83	C-12, C-17, C-14, C-13
H <sub>3</sub> -19	0.99 (s)		C-19	19.38	C-1, C-9, C-10, C-5
H-20	1.99 (m)		C-20	40.47	n.d
H <sub>3</sub> -21	1,00 (d)		C-21	21.18	C-22, C-20, C-17
H-22	5.15 (dd)	15/8.5	C-22	138.29	C-23, C-20, C-24, C-21
H-23	5.00 (dd)	15/8.5	C-23	129.24	C-22, C-20, C-25, C-28
H-24	1,51(m)		C-24	51.26	C-22
H-25	1.65	1.5	C-25	29.12	C-27, C-26
H <sub>3</sub> -26	0,82 (d)	6.6	C-26	19.77	C-25, C-24, C-27
H <sub>3</sub> -27	0.79 (d)	6.6	C-27	19.02	C-25, C-26, C-24
H-28a, H-28b			C-28	25.38	n.d
H <sub>3</sub> -29	0.83 t	7.0	C-29	12.04	
			C-10	36.46	
			C-13	41.63	
			C-5	140.64	



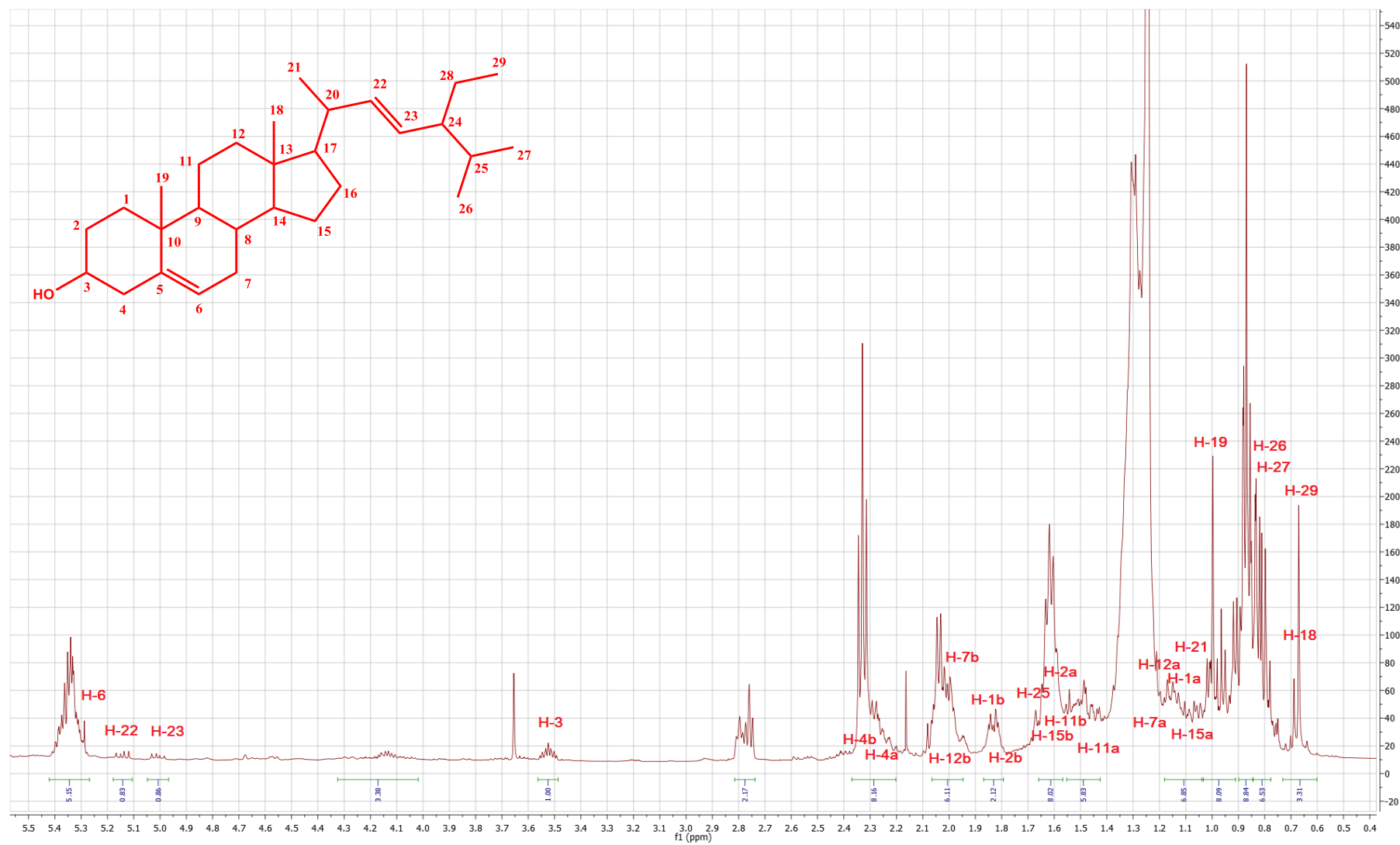
## B) Στιγμαστερόλη

Στο μόριο της Στιγμαστερόλης διακρίνονται στα  $\delta_H$  5.15  $\delta_C$  138.29 και στα  $\delta_H$  5.00  $\delta_C$  129.24 δυο διπλές διπλών που αντιστοιχούν στα μεθυρικά πρωτόνια του διπλού δεσμού του ισοπρενικού τμήματος του μορίου της στιγμαστερόλης. Το μεθυτικό πρωτόνιο 6 του διπλού δεσμού του στεροειδούς σκελετού βρίσκεται στα  $\delta_H$  5.33 μέσα στην περιοχή του μεταξύ  $\delta_H$  5.40 και  $\delta_H$  5.28 όπου επικαλύπτεται από τα σήματα των πρωτονίων 5",6" και 8",9" των διπλών δεσμών του τριγλυκεριδίου. Είναι φανερό όμως από το HSQC της ένωσης όπου εμφανίζεται ο άνθρακας C-6 στα  $\delta_C$  121.70. Στα  $\delta_H$  3.52 εμφανίζεται ως πολλαπλή κορυφή το πρωτόνιο της θέσης H-3 του μορίου της Στιγμαστερόλης στην οποία συνδέεται το OH. Στην περιοχή των αλειφατικών εμφανίζονται τα μεθυλικά πρωτόνια, τα μεθύλια του τμήματος του στεροειδούς και τα υπόλοιπα πρωτόνια της ισοπρενικής αλυσίδας της Στιγμαστερόλης.

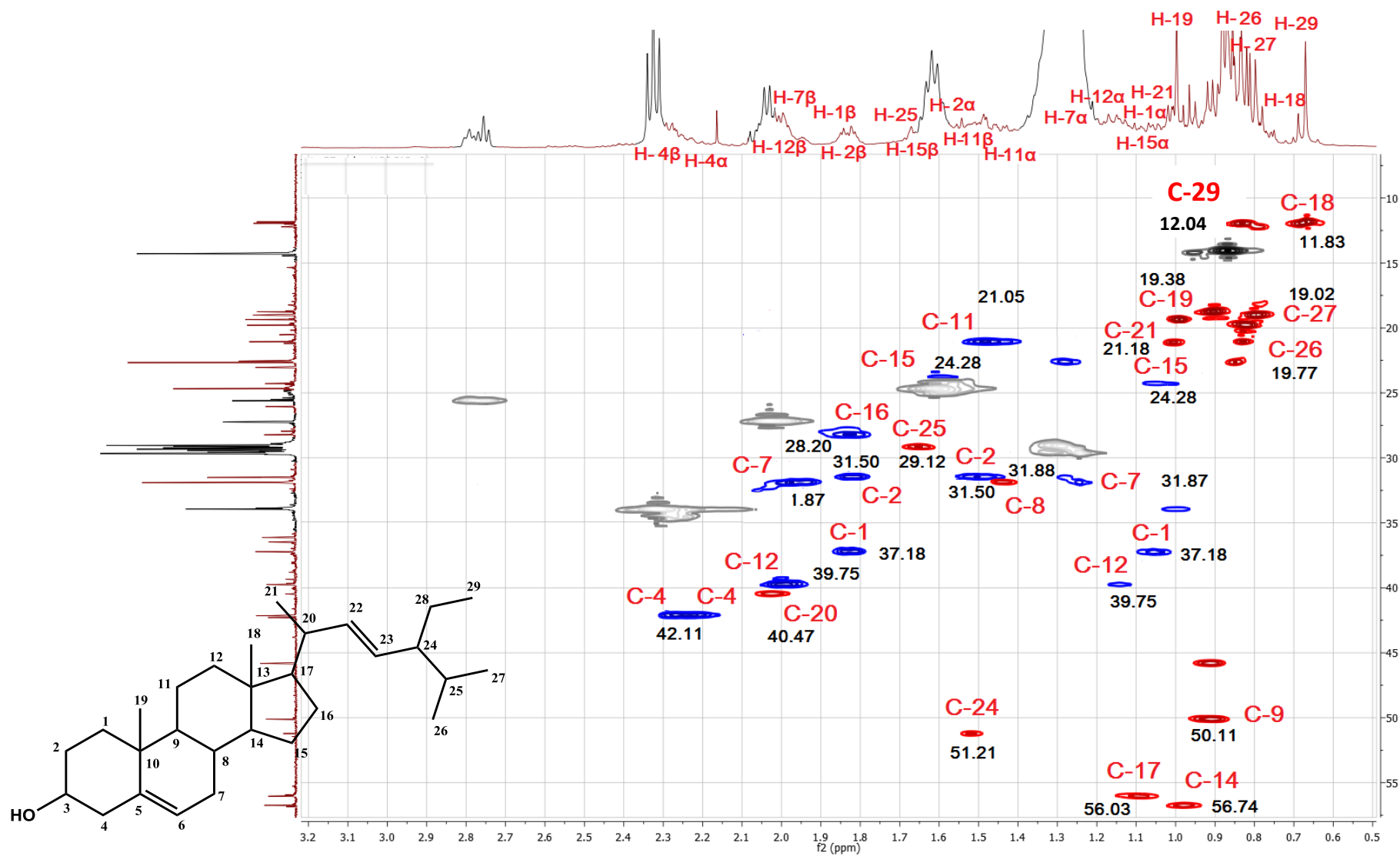
Στα  $\delta_H$  0.99 και 0.67 εμφανίζονται δύο απλές κορυφές τριων πρωτονίων εκάστη που αντιστοιχούν στα μεθύλια των θέσεων 19 και 18. Σε  $\delta_H$  1.00, 0.82 και 0.79 εμφανίζονται τρεις διπλές κορυφές που ολοκληρώνουν για τρία πρωτόνια εκάστη που αντιστοιχούν στα μεθύλια 21, 26 και 27, ενώ σε  $\delta_H$  0.79 εμφανίζεται η τριπλή κορυφή του μεθυλίου 29.

Από το φάσμα HSQC στην περιοχή των αλειφατικών μπορούμε να διακρίνουμε τους μεθυλениκούς, τους μεθυλικούς και μεθυλικούς άνθρακες του κυρίου μορίου της στιγμαστερόλης. Ενώ από το φάσμα HMBC παρατηρούμε τα σήματα τα οποία περιγράφονται στον πίνακα 42: Τα πειραματικά δεδομένα συμφωνούν με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας (Atiku et al., 2013), (Yahya et al., 2011), (Rajput and Rajput 2012).

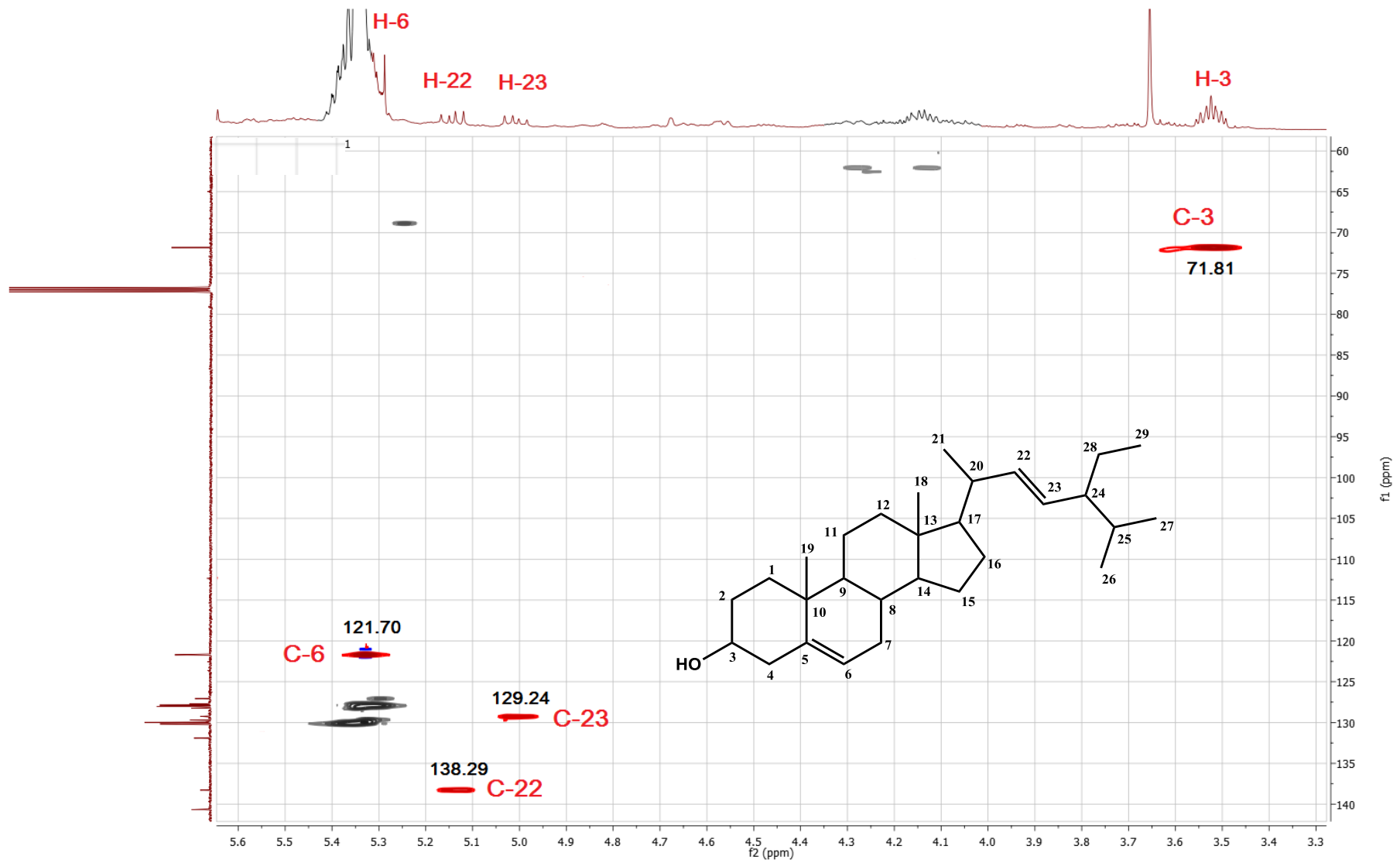
Φάσμα  $^1\text{H}$ NMR της ένωσης X15 ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)



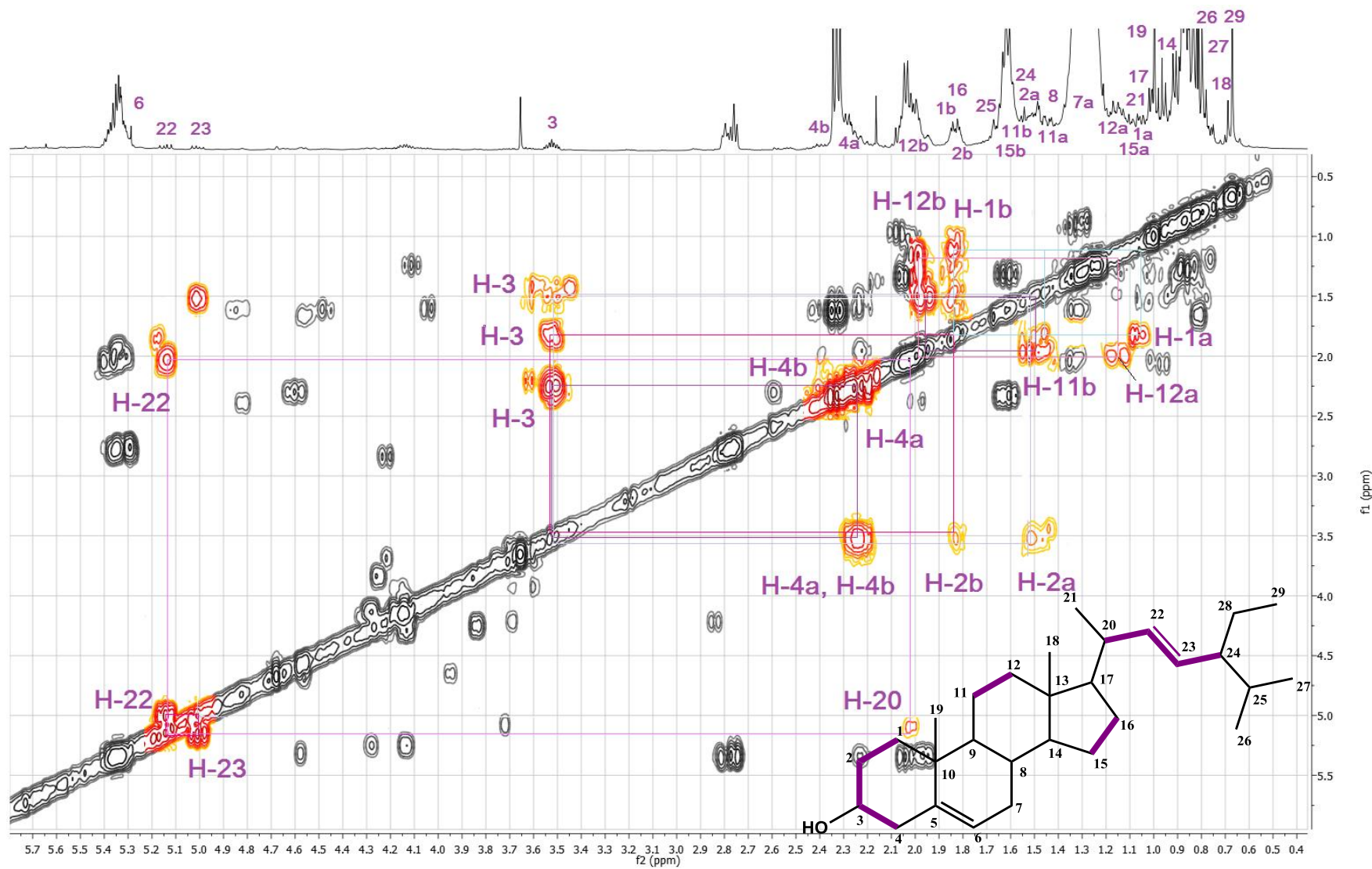
Λεπτομέρεια φάσματος HSQC της ένωσης X15 (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)



Λεπτομέρεια φάσματος HSQC της ένωσης X15 (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)

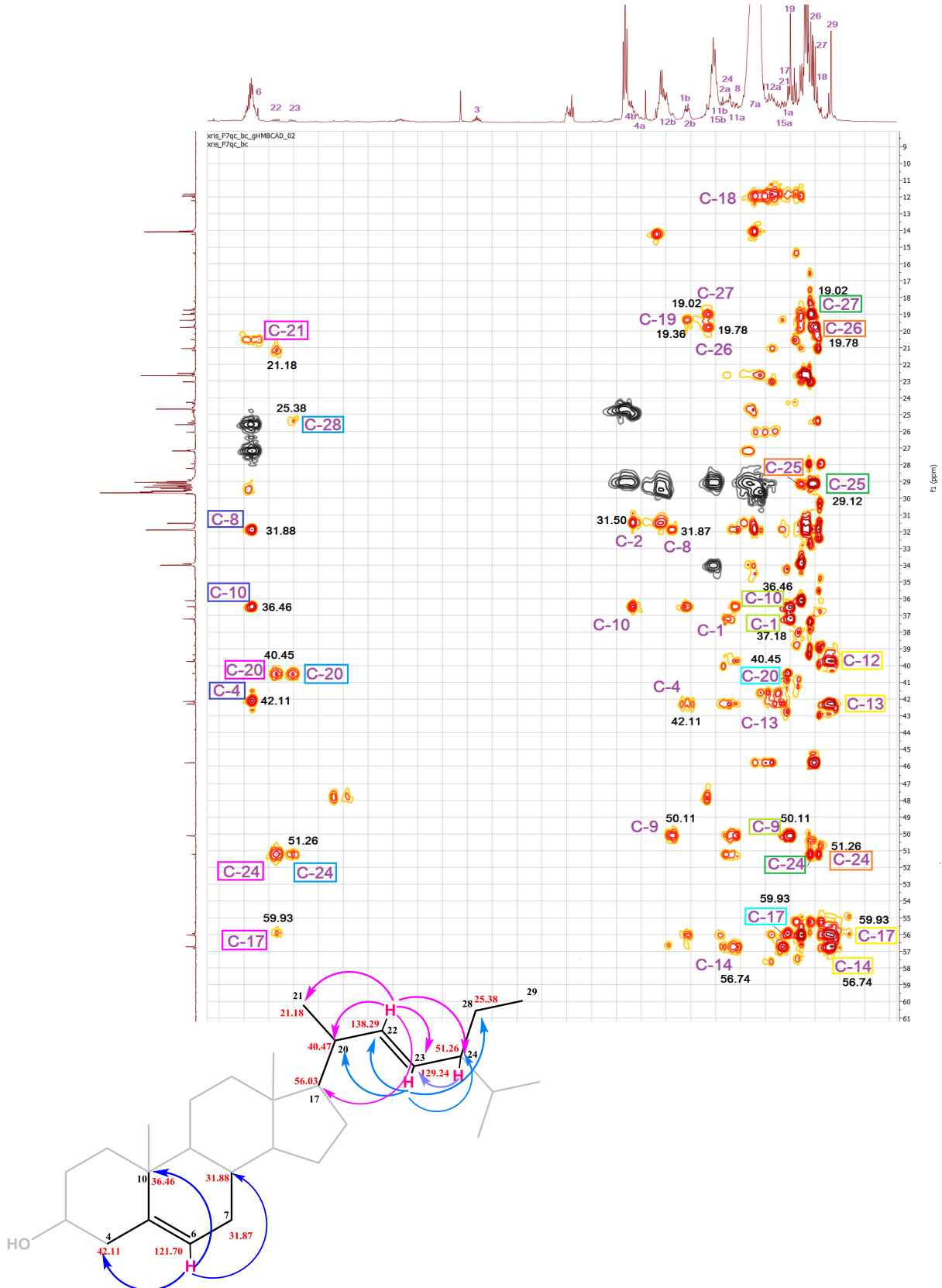


Συσχετίσεις πρωτονίων φάσματος COSY της ένωσης X15 (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)

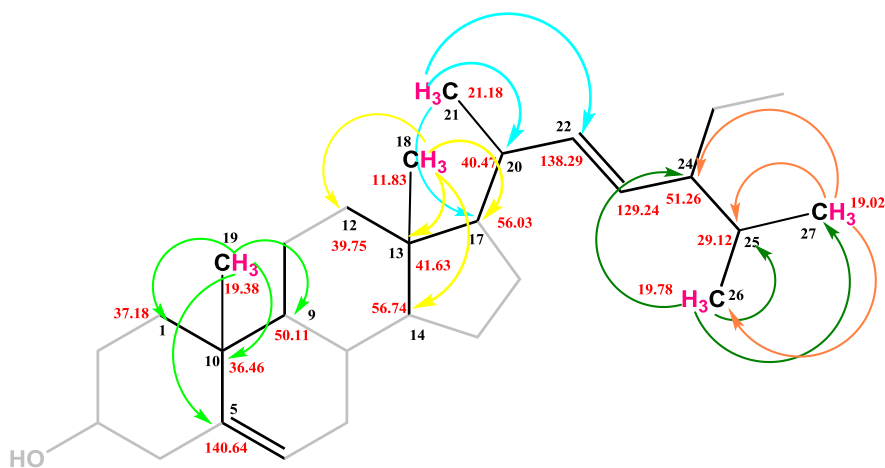
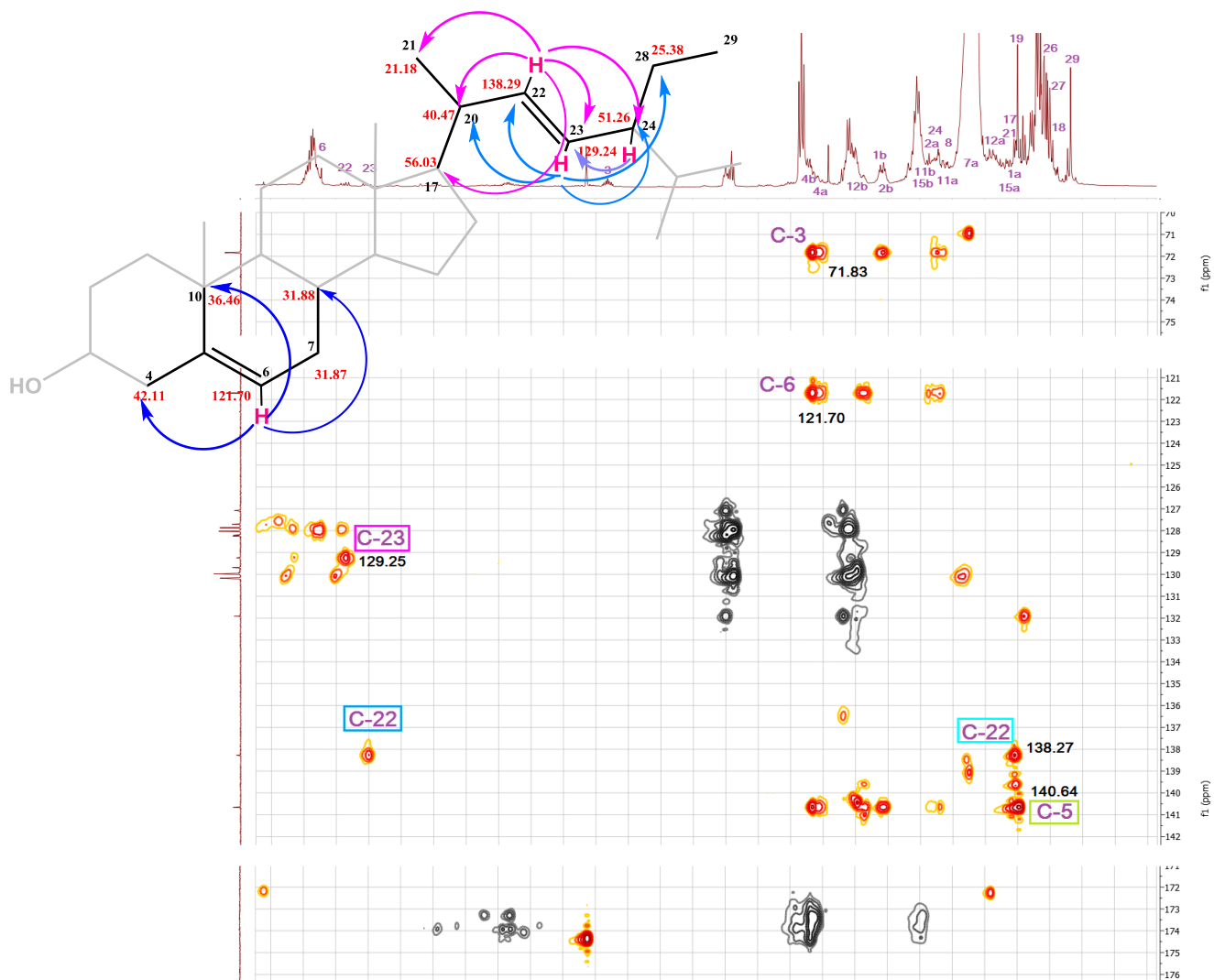




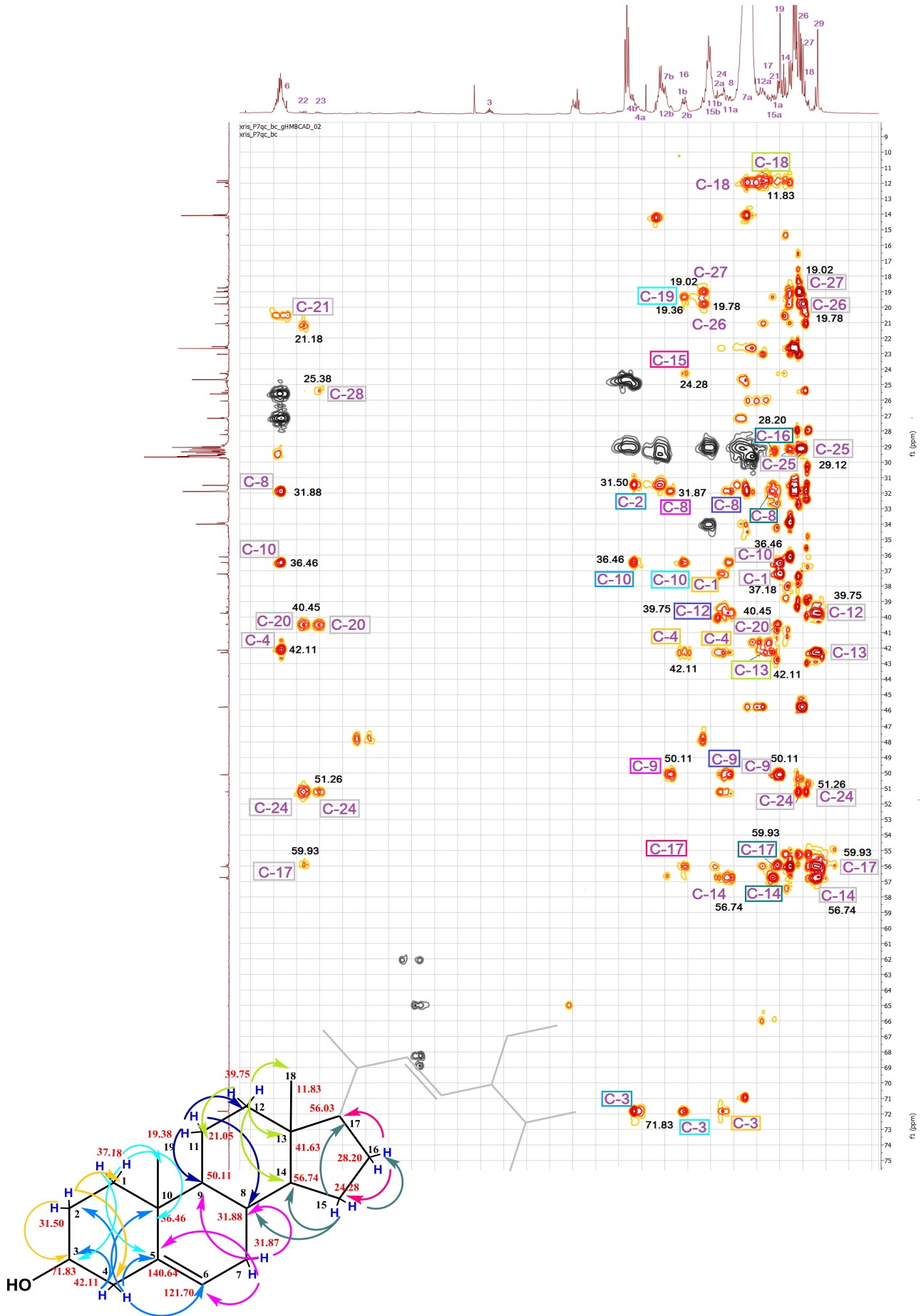
Φάσμα HMBC της ένωσης X15 (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)



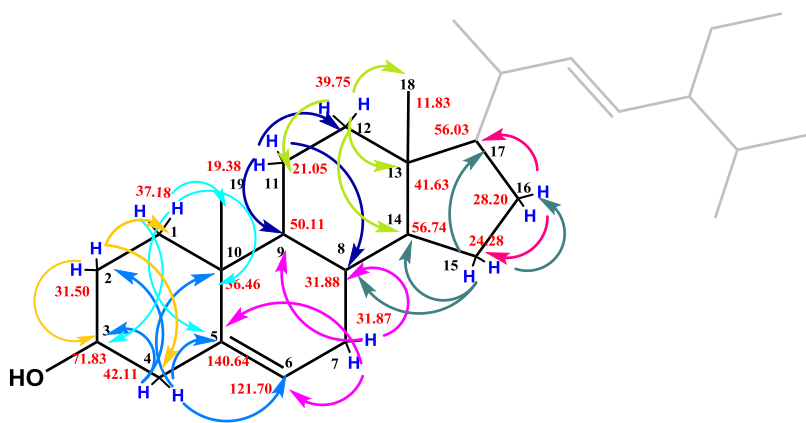
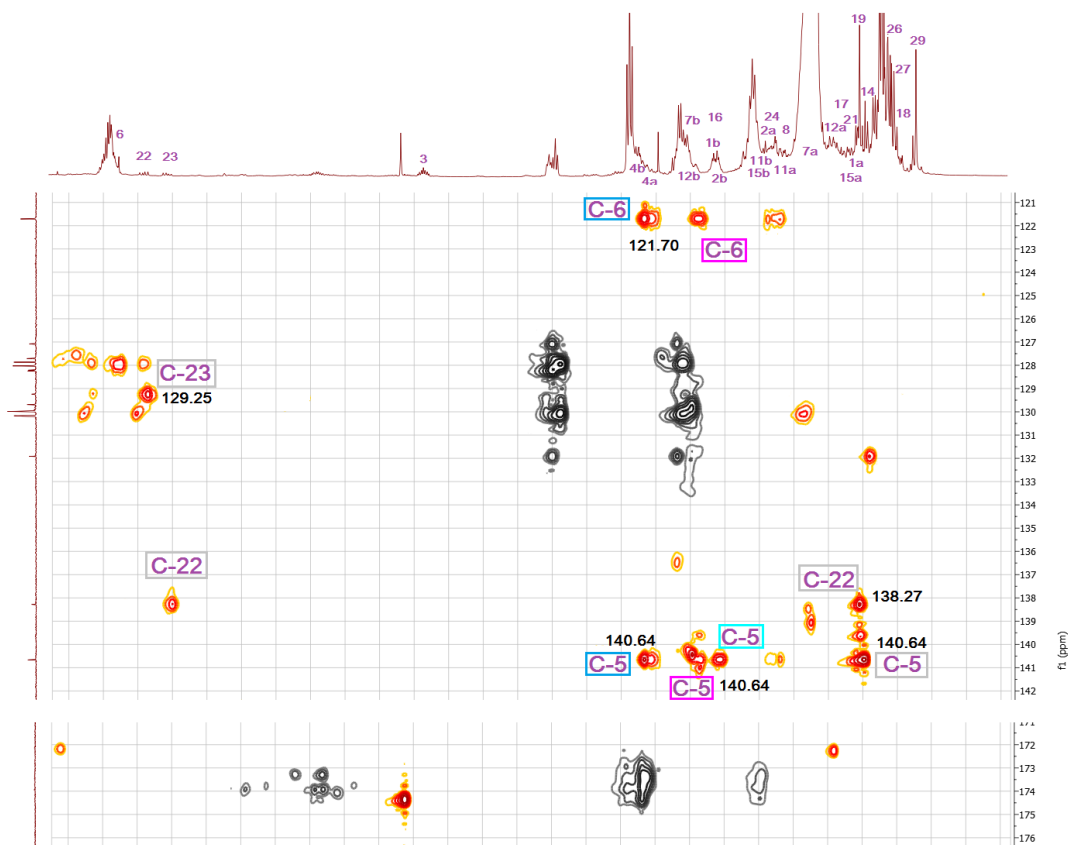
Συνέχεια φάσματος HMBC της ένωσης X15 (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)



Φάσμα HMBC της ένωσης X15 (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)

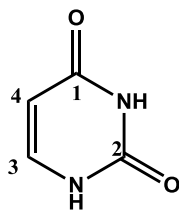


Συνέχεια φάσματος HMBC της ένωσης X15 (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)

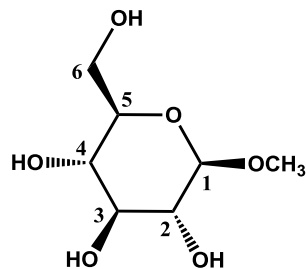


## 13.4 Υδατικό κλάσμα

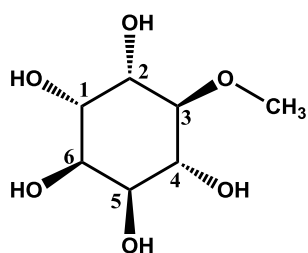
13.4.1. Ενώσεις X16, X17, X18, X19 Ουρακίλη, πινιτόλη, μεθυλο-β-D-γλυκοπυρανόζη, γλυκερόλη



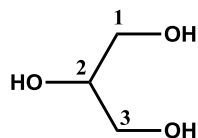
X16



X17



X18

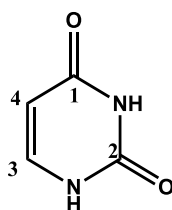


X19

### Φάσματα <sup>1</sup>H NMR των Ενώσεων X16, X17, X18, X19

Πρόκειται για ένα μίγμα τεσσάρων ενώσεων της ουρακίλης, μιας κυκλικής πολυόλης της πινιτόλης, της μεθυλο-β-D-γλυκοπυρανόζης και της γλυκερόλης, οι οποίες παραλήφθηκαν από το υδατικό εκχύλισμα σαν μείγμα και δεν κατέστη δυνατός ο διαχωρισμός τους. Η διευκρίνιση της δομής όλων των ενώσεων έγινε μετά από μελέτη των φασμάτων NMR (<sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, HSQC, HMBC, και COSY). Στο φάσμα <sup>1</sup>H NMR απεικονίζεται η ουρακίλη με μωβ χρώμα, η πινιτόλη με κόκκινο χρώμα, η μεθυλο-β-D-γλυκοπυρανόζη με μπλε χρώμα και η γλυκερόλη με πράσινοχρώμα.

## Ουρακίλη



X16

Πίνακας 43: Φάσμα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού Ένωσης X16

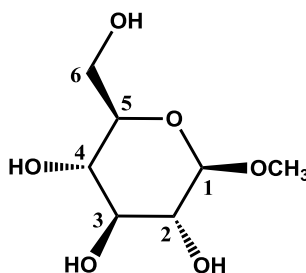
<sup>1</sup> H-NMR (CD <sub>3</sub> OD, 500MHz) και <sup>13</sup> C-NMR (CD <sub>3</sub> OD, 125MHz) Ένωσης X16				
Ταυτοποίηση	δ <sub>H</sub> (ppm)	J <sub>HH</sub> (Hz)	Ταυτοποίηση	δ <sub>C</sub> (ppm)
			C-1	166.03
			C-2	152.07
H-3	7.38 d	7.5	C-3	142.24
H-4	5.60 d	7.5	C-4	101.31

Στο φάσμα <sup>1</sup>H-NMR της ένωσης παρατηρείται ο σκελετός πυριμιδινικού δακτυλίου που αποτελείται από μια διπλή κορυφή στα δ<sub>H</sub> 7.38 ( $J=7.5$  Hz) που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-3 και μια διπλή κορυφή στα δ<sub>H</sub> 5.60 ( $J=7.5$  Hz) που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-4. Από το φάσμα HMBC προκύπτει ότι οι άνθρακες C-3, C-4 με δ<sub>C</sub> 142.24 και δ<sub>C</sub> 100.31 εμφανίζουν κοινό σήμα με δύο διαφορετικούς καρβονυλικούς άνθρακες, ο ένας στα δ<sub>C</sub> 152.07 και ο άλλος στα δ<sub>C</sub> 166.03 οι οποίοι συνδέονται άμεσα με τα ετεροάτομα το αζώτου. Από το φάσμα δύο διαστάσεων COSY δεν προκύπτει ότι ο πυριμιδινικός δακτύλιος συνδέεται είτε με την πινιτόλη είτε με την μεθυλο-β-D-γλυκοκυρανόζη. Η επιβεβαίωση ότι πρόκειται για την συγκεκριμένη ένωση αποδεικνύεται από τη βιβλιογραφία (Zhong et al., 2004).

## 1-μεθυλο β-D-γλυκοπυρανόζη και πιπιτόλη

Η μελέτη των φασμάτων  $^1\text{H}$  NMR και  $^{13}\text{C}$ -NMR έδειξε την παρουσία δυο σακχάρων (εμφάνιση πρωτονίων από 3.25 έως 3.87 ppm και ανθράκων από 62 έως 87 ppm) με παρουσία μόνο ενός ανωμερικού πρωτονίου ενδεικτικό της παρουσίας ενός μονοσακχαρίτη και μιας πολυόλης. Αυτά φαίνονται ότι δεν συνδέονται μεταξύ τους από την έλλειψη παραμαγνητικής αποθωράκισης που θα παρατηρούσαμε σε πιθανό σημείο σύνδεσης. Ο μονοσακχαρίτης ταυτοποιήθηκε σαν 1-μεθυλο β-D-γλυκοπυρανόζη ενώ η πολυόλη σαν πιπιτόλη.

### 1-μεθυλο β-D-γλυκοπυρανόζη



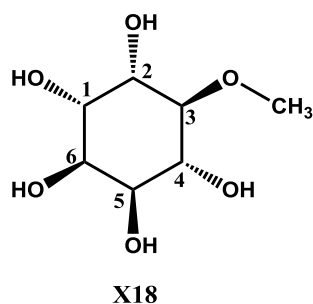
X17

Πίνακας 44: Φάσμα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού Ένωσης X17

$^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500MHz) και $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125MHz) Ένωση X17				
Ταυτοποίηση	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$J_{\text{HH}}$ (Hz)	Ταυτοποίηση	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
H-1	4.16 d	8.0	C-1	104.08
H-2	3.15 dd	8.0, 9.0	C-2	73.61
H-3	3.34 dd	9.0,9.0	C-3	76.64
H-4	3.27 m		C-4	70.19
H-5	3.26 m		C-5	76.42
H-6a, H-6b	3.66 m 3.86 m		C-6	61.28
<u>OCH<sub>3</sub></u>	3.25 s		<u>OCH<sub>3</sub></u>	56.09

Η μελέτη των φασμάτων  $^1\text{H}$  NMR και  $^{13}\text{C}$ -NMR της ένωσης έδειξε σκελετό σακχάρου και συγκεκριμένα του 1-μεθυλο-β-D-γλυκοπυρανόζης. Ενδεικτική είναι η παρουσία του ανωμερικού πρωτονίου στα  $\delta_{\text{H}}$  4,16 με σταθερά σύζευξης  $J = 8.0$  Hz. Η μεγάλη σταθερά σύζευξης πιστοποιεί την παρουσία της β-διαμόρφωσης. Στο φάσμα HMBC το ανωμερικό πρωτόνιο εμφανίζει κοινό σήμα με ένα μεθοξύλιο γεγονός που δεικνύει ότι το υδροξύλιο της θέσης 1 είναι μεθυλιωμένο. Αυτό συμφωνεί με το φάσμα HSQC όπου στα  $\delta_{\text{H}}$  3.5 εμφανίζεται ένας άνθρακας με  $\delta_{\text{C}}$  56.06 που αντιστοιχεί στο μεθοξύλιο της θέσης 1 του σακχάρου. Η δομή επιβεβαιώθηκε από δεδομένα της βιβλιογραφίας (Wei et al., 2003).

## Πινιτόλη



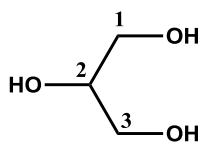
Πίνακας 45: Φάσμα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού Ένωσης X18

<sup>1</sup> H-NMR (CD <sub>3</sub> OD, 500MHz) και <sup>13</sup> C-NMR (CD <sub>3</sub> OD, 125MHz) Ένωση X18				
Ταυτοποίηση	δ <sub>H</sub> (ppm)	J <sub>HH</sub> (Hz)	Ταυτοποίηση	δ <sub>C</sub> (ppm)
H-1 και H-6	3.87 s		C-1	72.28
H-2	3.73 dd	10.2, 2	C-2	71.67
H-3	3.25 t	9.6	C-3	83.54
H-4	3.57 t	9.6	C-4	72.80
H-5	3.67 dd	10.2, 2	C-5	71.14
			C-6	71.97

Η μελέτη των φασμάτων <sup>1</sup>H NMR έδειξε την παρουσία πινιτόλης. Η πινιτόλη απομονώθηκε ακόμη μια φορά ως καθαρή ένωση από το κλάσμα του οξικού αιθυλεστέρα (Karakousi et al., 2013). Έτσι δυο διπλώς διπλές κορυφές ενός πρωτονίου εκάστη, σε δ<sub>H</sub> 3.73 και δ<sub>H</sub> 3.67 με ( $J = 9.6$  Hz και  $J = 2$  Hz) υποστηρίζουν την παρουσία δύο ζευγών συστημάτων HaxHaxHeq. Η παρουσία δυο τριπλών κορυφών σε δ<sub>H</sub> 3.57 (επικαλυπτόμενη εν μέρει από την κορυφή του μεθοξυλίου) και 3,25 ενός πρωτονίου εκάστη, με σταθερά σύζευξης  $J = 9.6$  Hz υποστηρίζουν την παρουσία δυο ζευγών συστημάτων HaxHaxHax. Η παραμαγνητική αποθωράκιση του C-3 σε δ<sub>C</sub> 83.54 δεικνύει την ύπαρξη της OCH<sub>3</sub> στη θέση 3. Αυτό βέβαια φαίνεται και από το φάσμα HMBC. Από το φάσμα δύο διαστάσεων <sup>1</sup>H -<sup>1</sup>H COSY φαίνεται το πρωτόνιο H-3 σε δ<sub>H</sub> 3.23 να σχάζεται με το πρωτόνιο H-4 σε δ<sub>H</sub> 3.58 καθώς και με το πρωτόνιο H-2 σε δ<sub>H</sub> 3.72. Το πρωτόνιο H-1 σε δ<sub>H</sub> 3.87 σχάζεται με το πρωτόνιο H-2 σε δ<sub>H</sub> 3.73 ενώ το πρωτόνιο H-6 σε δ<sub>H</sub> 3.87 σχάζεται με το πρωτόνιο H-5 σε δ<sub>H</sub> 3.67. Στο φάσμα HMBC φαίνεται ότι υπάρχει πλήρης αντιστοίχιση με τους άνθρακες που εμφανίζονται στο φάσμα του <sup>13</sup>C-NMR και φαίνεται ότι δεν υπάρχει άνθρακας χωρίς πρωτόνιο. Σύγκριση των δεδομένων με τη βιβλιογραφία (Renuka et al., 2007), (Gonzalez et al., 2008 ) συνηγορεί ότι πρόκειται για πινιτόλη.



## Γλυκερόλη



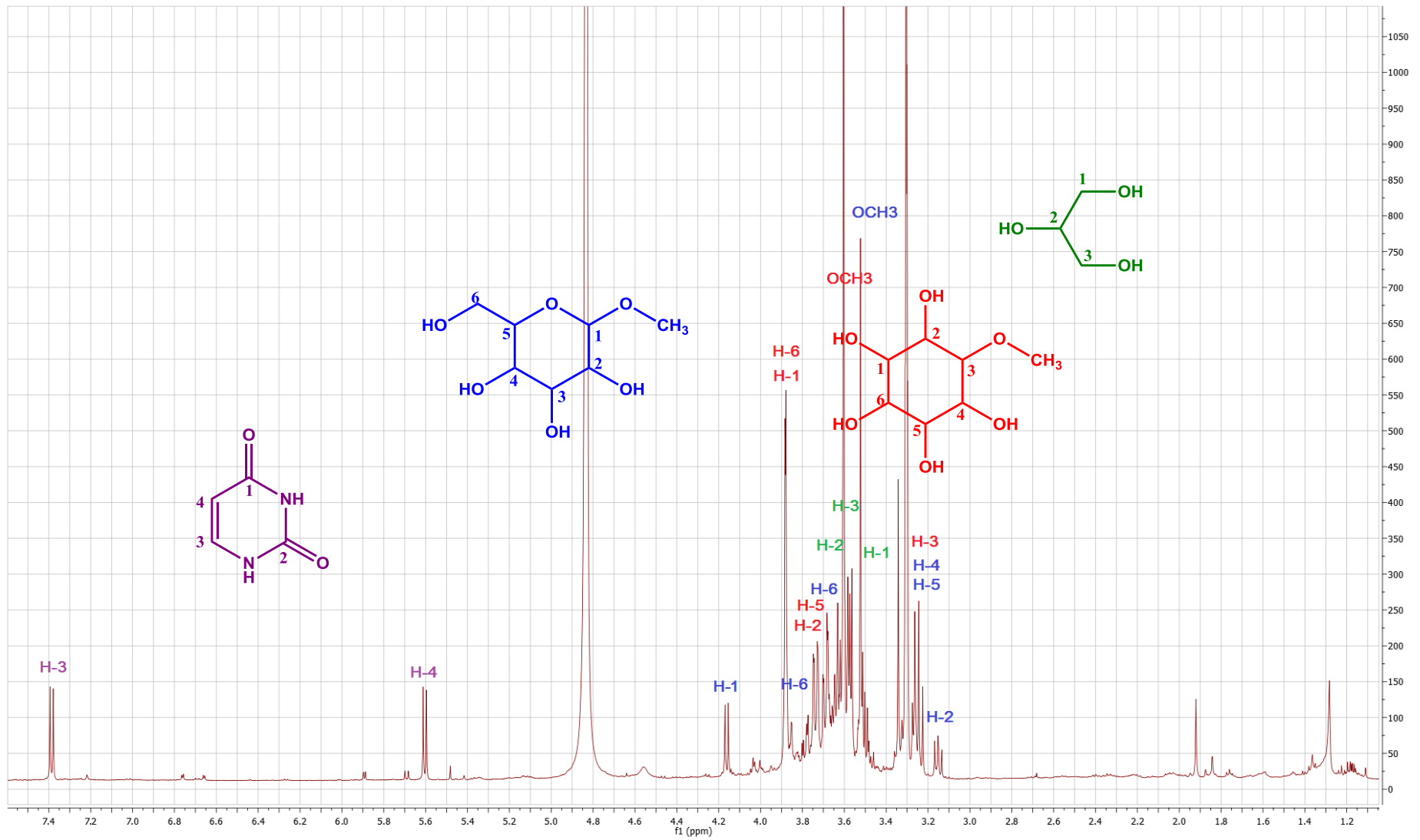
X19

Πίνακας 46: Φάσμα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού Ένωσης X19

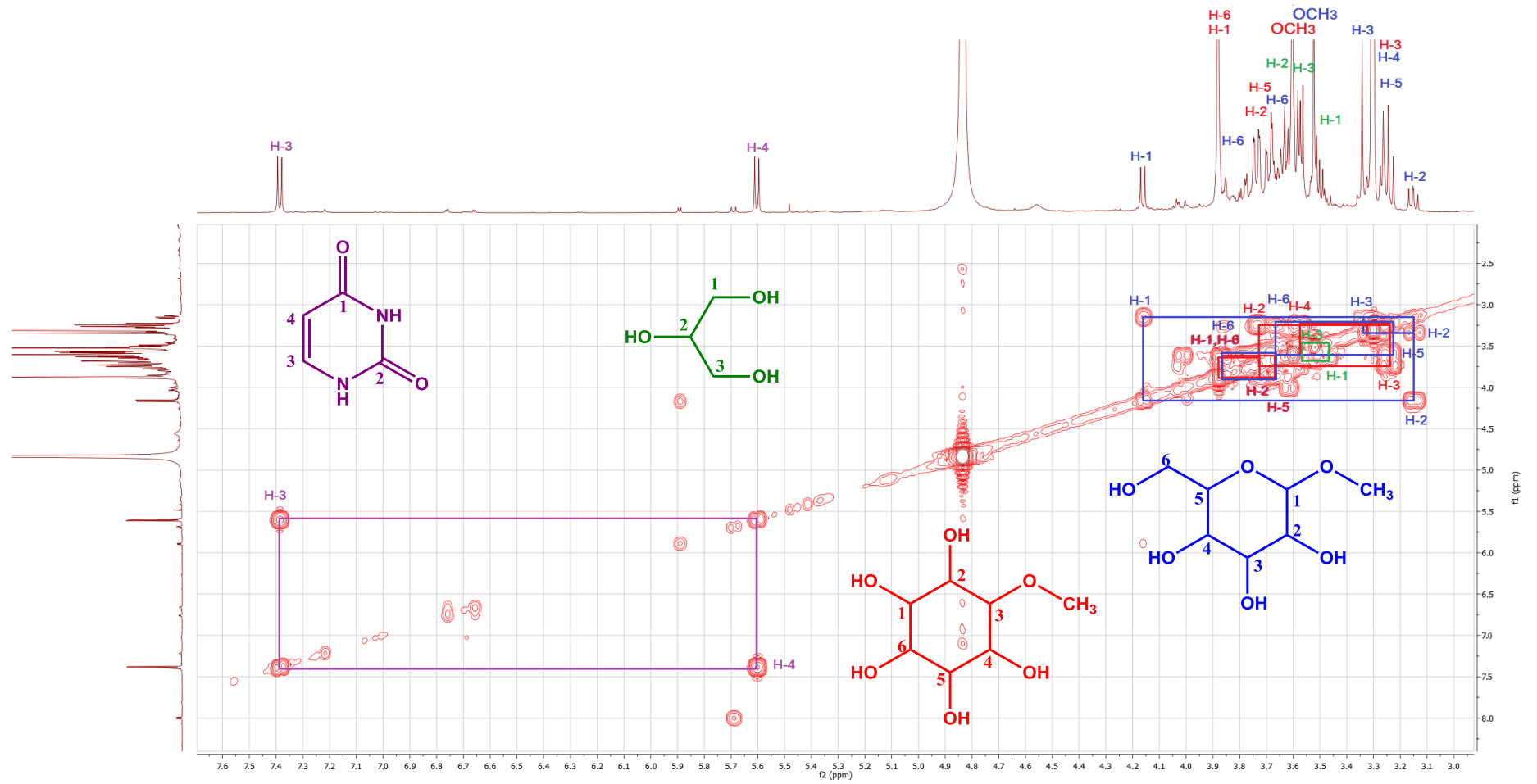
<sup>1</sup> H-NMR (CD <sub>3</sub> OD, 500MHz) και <sup>13</sup> C-NMR (CD <sub>3</sub> OD, 125MHz) Ένωση X19				
Ταυτοποίηση	δ <sub>H</sub> (ppm)	J <sub>HH</sub> (Hz)	Ταυτοποίηση	δ <sub>C</sub> (ppm)
H-1a, H-3a	3.50 dd	6.0	C-1	62.97
H-2	3.64 m	3.0	C-2	72.40
H-1b, H-3b	3.57 dd	9.6	C-3	62.97

Η μελέτη των φασμάτων <sup>1</sup>H NMR και <sup>13</sup>C-NMR της ένωσης έδειξε παρουσία δύο διπλών κορυφών σε δ<sub>H</sub> 3.5 και δ<sub>H</sub> 3.57 που αντιστοιχούν στα δύο μεθυλενικά πρωτόνια των ανθράκων C-1 και C-3 με αντίστοιχα δ<sub>C</sub> 62.97. Η μελέτη του φάσματος HMBC έδειξε ότι τα μεθυλενικά αυτά πρωτόνια εμφανίζουν κοινό σήμα με τον άνθρακα C-2 με αντίστοιχο δ<sub>C</sub> 72.40. Το πρωτόνιο του άνθρακα C-2 αντιστοιχεί σε πολλαπλή κορυφή σε δ<sub>H</sub> 3.64. Σύγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα έδειξε ότι πρόκειται για τη γλυκερόλη (Cagliani et al., 2014).

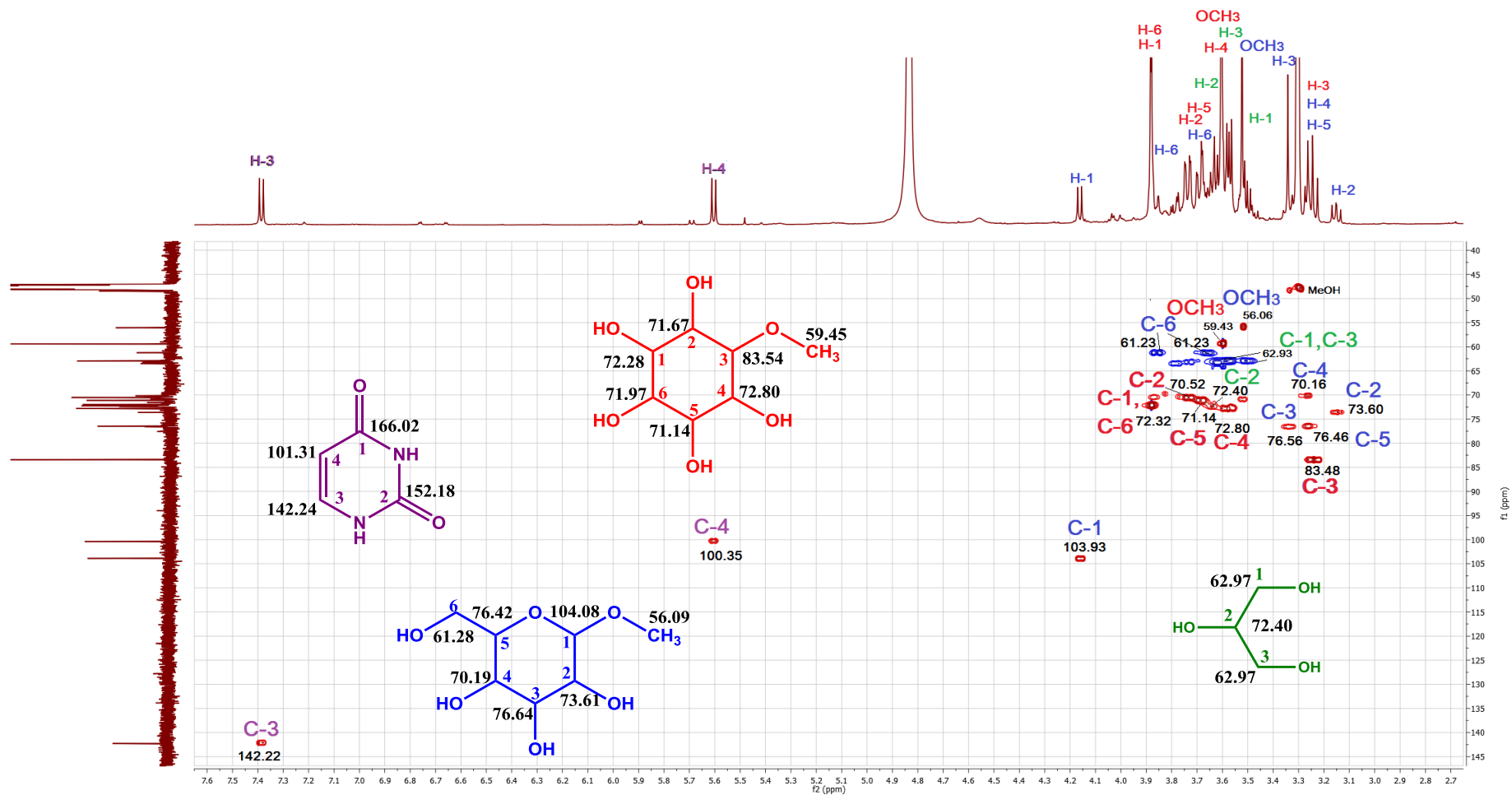
Φάσμα <sup>1</sup>HNMR των ενώσεων X16, X17, X18, X19 (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)



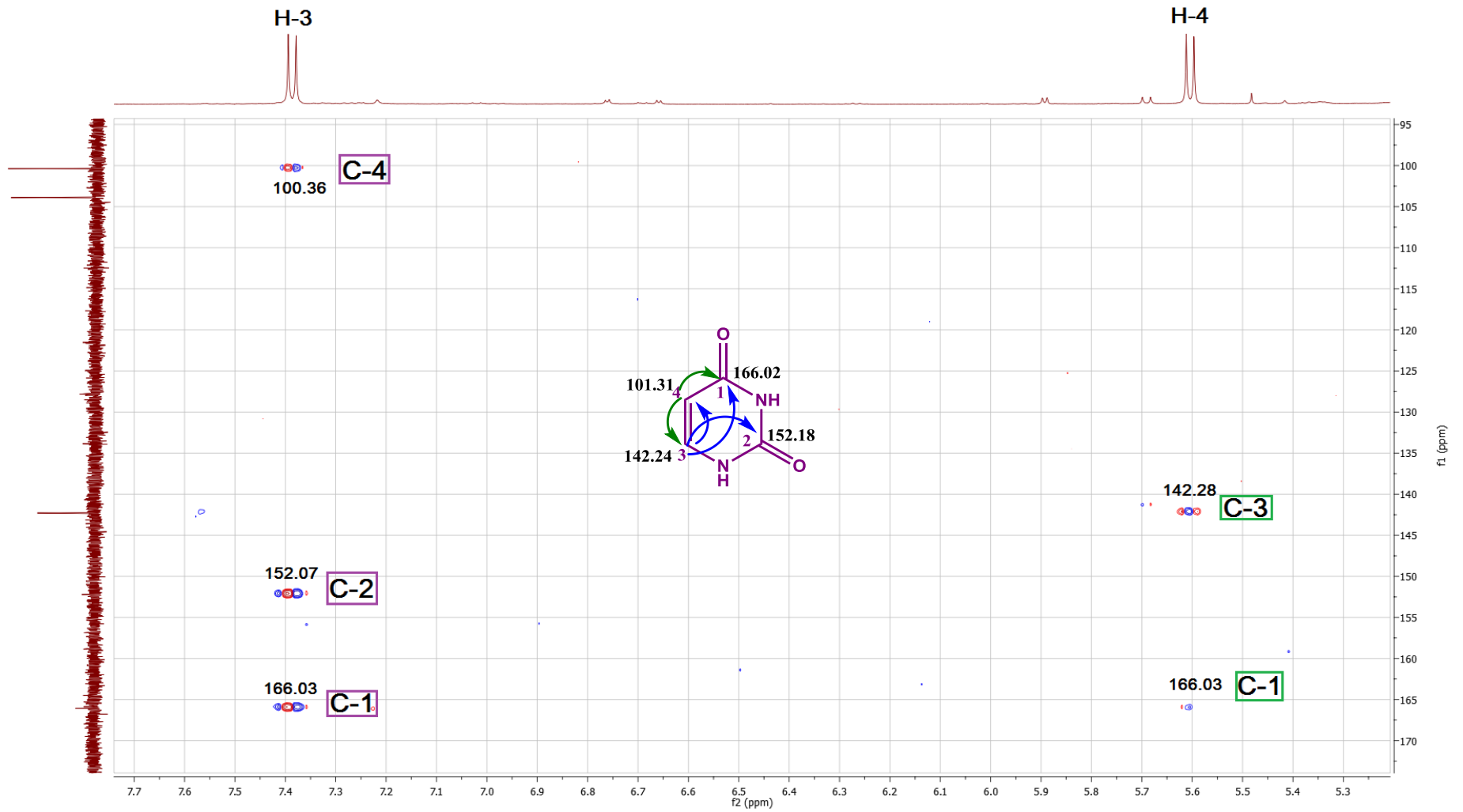
Συσχετίσεις πρωτονίων φάσματος COSY των ενώσεων X16, X17, X18, X19 (CD<sub>3</sub>OD) 500 MHz



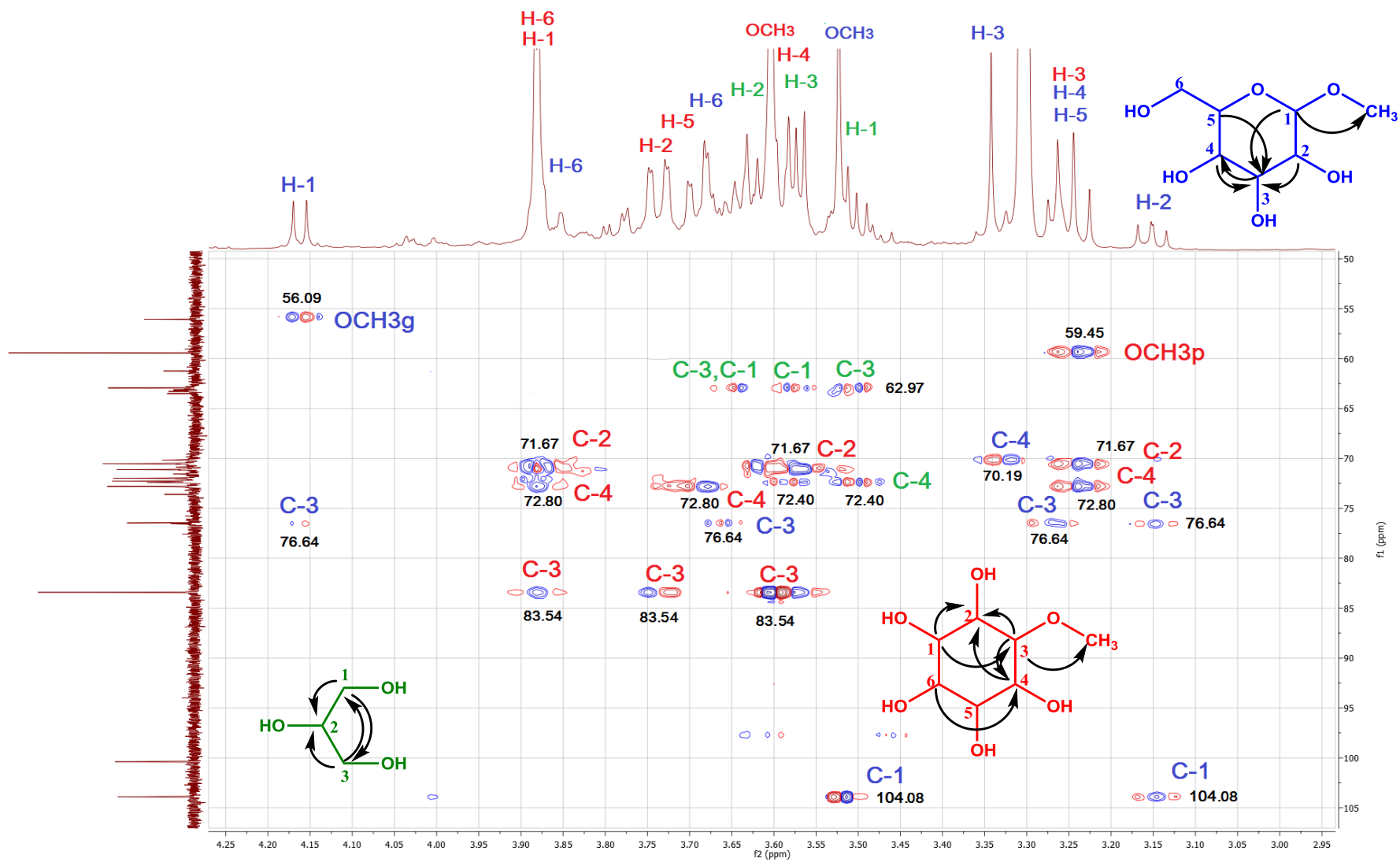
Φάσμα HSQC των ενώσεων X16, X17, X18, X19 (CD<sub>3</sub>OD)



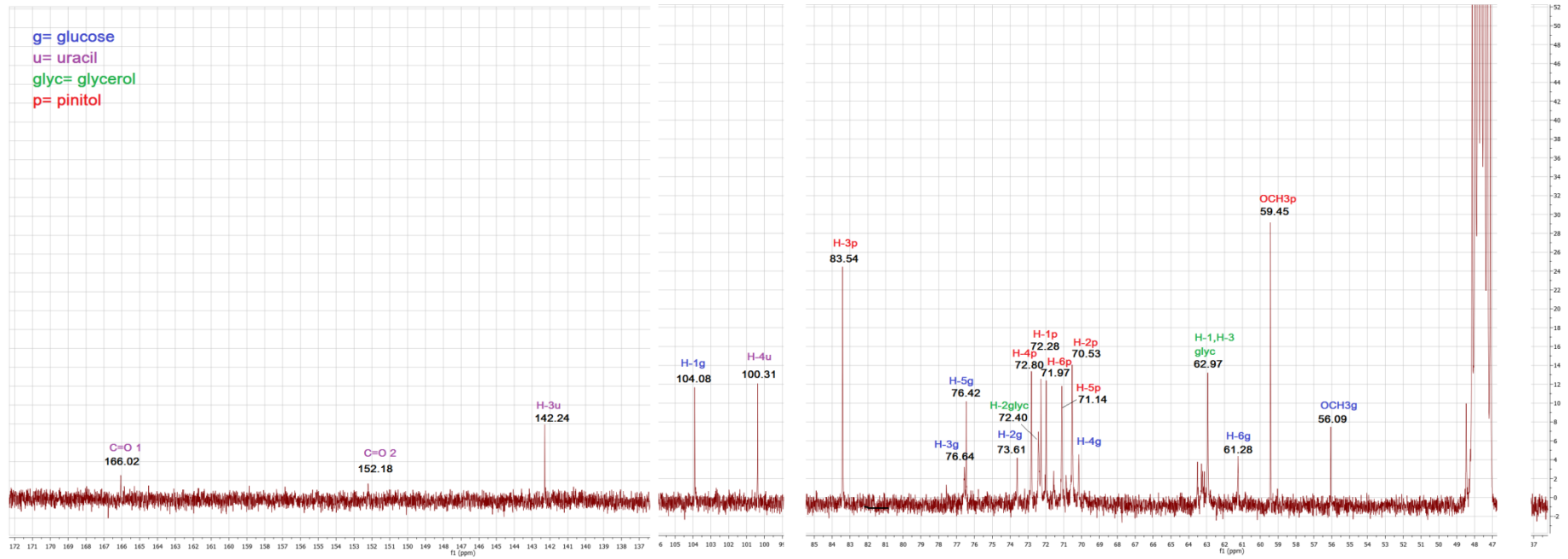
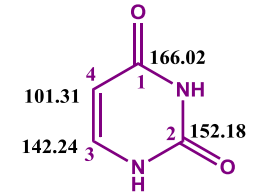
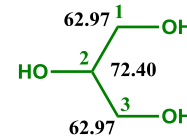
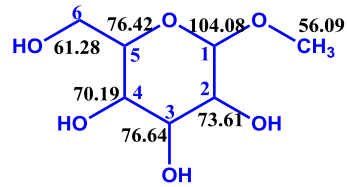
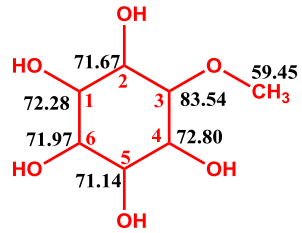
Λεπτομέρεια φάσματος HMBC των ενώσεων X16 (CD<sub>3</sub>OD)



Λεπτομέρεια φάσματος HMBC των ενώσεων X17, X18, X19 (CD<sub>3</sub>OD)



Φάσμα  $^{13}\text{C}$ NMR των ενώσεων X16, X17, X18, X19 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz)









## Πειραματική διαδικασία

Για την μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων του φυτού παρασκευάστηκαν διαλύματα από το βουτανολικό, το αιθερικό κλάσμα, το κλάσμα του οξικού αιθυλεστέρα και του νερού σύμφωνα με τη παρακάτω διαδικασία:

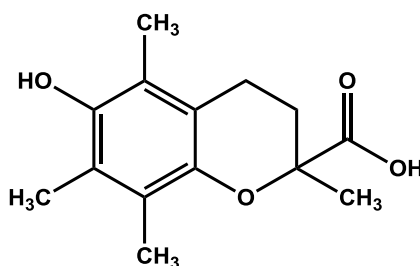
Τα εκχυλίσματα του διαιθυλεθέρα, του οξικού αιθυλεστέρα και της βουτανόλης αραιώθηκαν με μεθανόλη. Το υδατικό εκχύλισμα μη διαλυτό σε μεθανόλη αραιώθηκε σε νερό. Έγιναν δοκιμές με διάφορες αραιώσεις ώστε να καταλήξουμε στις συγκεντρώσεις που έδιναν απορροφήσεις εντός των ορίων γραμμικότητας της καμπύλης αναφοράς.

Μέσα σε *Eppendorf* έγινε τοποθέτηση με πιπέτα ακριβείας 25 μl από τα αραιωμένα δείγματα. Για όλα τα δείγματα, πλην υδατικού, που διαλύονται εντελώς σε μεθανόλη, χρησιμοποιήθηκε η μεθανόλη για το μηδενισμό του οργάνου (1000μl). Για την υδατική κατανομή που δεν διαλύεται σε μεθανόλη, χρησιμοποιήθηκαν 25 μl απεσταγμένου ύδατος. Σε 975 μl DPPH 0,06 mM προστέθηκαν στο Vortex.

Το υπο εξέταση δείγμα αφέθηκε να αντιδράσει για 30 min στο σκοτάδι.

Τοποθετήθηκαν τα δείγματα σε κυψελίδες και αμέσως ακολούθησε φωτομέτρηση στα 515 nm όταν η αντίδραση έφτασε σε plateau με τη χρήση ενός φασματοφωτομέτρου U-2000 HITACHI σε κυψελίδα quartz.

Παράλληλα κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς *Trolox* (ανάλογο της βιταμίνης E με ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH) και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ισοδύναμα Trolox.



Trolox

Η μέτρηση των δεδομένων βασίστηκε στη μείωση της απορρόφησης των δειγμάτων κατά την αναγωγή του DPPH<sup>•</sup>. Το αντιδρών DPPH<sup>•</sup> υπολογίστηκε βάσει της συνάρτησης  $A_{515nm} = 0,0174x[DPPH^{\bullet} \times (\text{mg/ml εκχυλίσματος})] + 0.0194$  ( $r^2 = 0.9996$ ). Το % ποσοστό του

εναπομείναντος DPPH· μετά τη λήξη της αντίδρασης, υπολογίστηκε από τη σχέση : % DPPH<sub>rem</sub> = [DPPH<sub>t=T</sub>]/[DPPH<sub>t=0</sub>], όπου Tα είναι ο χρόνος για να ολοκληρωθεί η αντίδραση και να φτάσει σε πλατώ. Η ποσότητα του αντιοξειδωτικού (δείγματος) που απαιτείται για να μειώσει κατά το ήμισυ την αρχική συγκέντρωση του DPPH· αντιστοιχεί στο EC<sub>50</sub> του κάθε δείγματος. Η αντίστοιχη αντιοξειδωτική δύναμη εκφράζεται ως AE=1/EC<sub>50</sub> (*Antiradical Efficiency*). Παρακάτω παρουσιάζονται τα αριθμητικά αποτελέσματα των μετρήσεων καθώς και ένα ραβδόγραμμα για την καλύτερη σύγκριση των αντιοξειδωτικών ικανοτήτων των δειγμάτων του φυτού.

**Σημείωση:** Πριν εκτελεστεί η φωτομέτρηση έγινε μηδενισμός του φωτομέτρου με δυο τυφλά δείγματα. Στα τυφλά δείγματα τοποθετήθηκε μόνο μεθανόλη. Αφού μηδενίστηκε το φωτόμετρο, αφαιρέθηκε το μπροστινό τυφλό δείγμα και σε εκείνη τη θέση τοποθετήθηκε το δείγμα που έπρεπε να φωτομετρηθεί. Παράλληλα έγινε φωτομέτρηση του διαλύματος του DPPH· που χρησιμοποιήθηκε ως αντιδραστήριο των πειραμάτων.

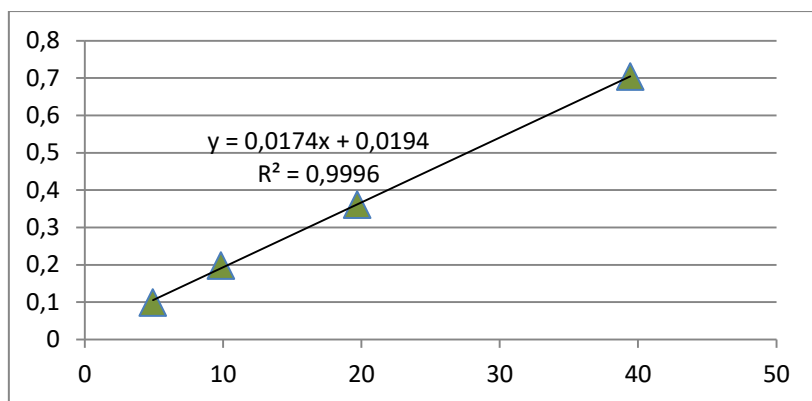
Οι μετρήσεις της αντιοξειδωτικής ικανότητας AE με τη μέθοδο αυτή έγινε σε σύγκριση με την αντιοξειδωτική ικανότητα προτύπων αντιοξειδωτικών.

- AE (Trolox) = 1.24 ± 0.48
- AE (Ascorbic acid) = 8.0 ± 0.7
- AE (Quercetin) = 14.5 ± 1.8

Κατά τη μελέτη των 4 εκχυλισμάτων (διαιθυλαιθέρα, οξικού αιθυλεστέρα, βουτανόλης, νερού), κατασκευάστηκε η καμπύλη αναφοράς.

mg/ml DPPH	Abs DPPH
C=39.44(μητρικό δ/μα)	0.704
19.700	0.361
9.850	0.198
4.925	0.099

Οι τιμές αυτές αντιστοιχούν στην ακόλουθη καμπύλη αναφοράς:



#### 14.1.1. Εκχύλισμα διαιθυλαιθέρα (EtOEt)

Οι απορροφήσεις των μαρτύρων στα 515nm στην περίπτωση όπου μελετήθηκε η κατανομή του διαιθυλαιθέρα (εις τριπλούν) ήταν: **0.167, 0.172, 0.174**. Εισάγοντας τις τιμές αυτές της απορρόφησης στην εξίσωση της παραπάνω καμπύλης αναφοράς (άξονας Y), λαμβάνουμε τη συγκέντρωση (μg DPPH/ml) του DPPH που περιέχεται στους μάρτυρες (τιμές άξονα X).

Αναλυτικότερα:

DPPH Abs Μάρτυρες	μgDPPH/ml
0.167	8.483
0.172	8.770
0.174	8.885
<b>MO</b>	8.713

Η αρχική συγκέντρωση του κλάσματος του διαιθυλαιθέρα ήταν **C<sub>s</sub> = 60μg/ml** (ή **0.0060 mg/ml**), **90μg/ml** και **120μg/ml** και μετά από προσθήκη του DPPH (25 μl δείγματος +950 μl) η τελική συγκέντρωση είναι **C<sub>c</sub> = C<sub>s</sub>\*25/1000** Συνεπώς η συγκέντρωση που μπαίνει στην κυψελίδα του φωτομέτρου είναι 40 φορές μικρότερη από τις αρχικές συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος που παρασκευάσαμε. Συνεπώς:

C <sub>s</sub> (μg/ml)	C <sub>c</sub> (μg/ml)
60	1.5
90	2.25
120	3.0

i)  $C_c=1.5 \mu\text{g/ml}$ :

Για τη συγκέντρωση αυτή, οι τρεις τιμές της απορρόφησης ήταν: 0.154, 0.152, 0.148 nm. Από την καμπύλη αναφοράς, θέτοντας τις παραπάνω τιμές (Y), λαμβάνουμε τη συγκέντρωση του DPPH• ( $\mu\text{g/ml}$ ) που απέμεινε στην κυψελίδα (δεν καταναλώθηκε) και διαιρώντας αυτές τις τιμές με τον μέσο όρο (M.O) της συγκέντρωσης που υπήρχε στους τρεις μάρτυρες (**8.713** στην προκειμένη περίπτωση), λαμβάνουμε το επί τοις (%) ποσοστό του DPPH• που απόμεινε (% rem DPPH•) από τη δράση του αντιοξειδωτικού για τη δεδομένη συγκέντρωση  $C_c$ . Αναλυτικότερα:

Απορρόφηση (Abs)	$\mu\text{gDPPH}\cdot/\text{ml}$	%remDPPH•
0.154	7.736	88.786
0.152	7.621	87.467
0.148	7.391	84.828

ii)  $C_c=1.8 \mu\text{g/ml}$ :

Ομοίως με την παραπάνω συγκέντρωση:

Απορρόφηση (Abs)	$\mu\text{gDPPH}\cdot/\text{ml}$	%remDPPH•
0.150	7.506	86.148
0.145	7.218	82.849
0.140	6.931	79.551

iii)  $C_c=3.0 \mu\text{g/ml}$ :

Απορρόφηση (Abs)	$\mu\text{gDPPH}\cdot/\text{ml}$	%remDPPH•
0,135	6,644	76,253
0,129	6,299	72,296
0,120	5,782	66,359

Στη συνέχεια διαιρούνται οι συγκεντρώσεις  $C_c$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) (**1.50, 1.80, 3.0**) με τον μέσο όρο της συγκέντρωσης των μαρτύρων (M.O =**8.713**) και προκύπτει ο λόγος  $X(C_{\text{sample}}/C_{\text{αρχDPPH}\cdot})$ . Οι τιμές που λαμβάνονται από αυτόν τον λόγο τοποθετούνται στον άξονα των (X), ενώ στον άξονα των (Y) η 1<sup>η</sup> τιμή κάθε φορά από το (%remDPPH•) από κάθε  $C_c$ .

Για παράδειγμα:

X(C <sub>sample</sub> /C <sub>αρχDPPH•</sub> )	Y(%remDPPH•)
0.172	88.786
0.207	86.148
0.344	76.253

X(C <sub>sample</sub> /C <sub>αρχDPPH•</sub> )	Y(%remDPPH•)
0.172	87.467
0.206	82.850
0.344	72.296

X(C <sub>sample</sub> /C <sub>αρχDPPH•</sub> )	Y(%remDPPH•)
0.172	84.828
0.207	79.551
0.345	66.359

Από τους τρεις πίνακες προκύπτουν τρία διαγράμματα από τα οποία αν θέσουμε όπου (Y) το 50 λαμβάνουμε τρεις τιμές EC<sub>50</sub> από τις οποίες εξάγουμε τον μέσο όρο. Τέλος η αντιοξειδωτική ικανότητα AE (antiradical efficiency) ορίζεται ως ο λόγος 1/EC<sub>50</sub>. Στην περίπτωση του υπολείμματος του διαθυλαϊθέρα είναι οι ακόλουθες:

$$y=103.4e^{-0.884x}, R^2=1/EC_{50}=0.822$$

$$y=104.41e^{-1.073x}, R^2=0,992/ EC_{50}= 0.686$$

$$y=107.08e^{-1.395x}, R^2=0.9958/ EC_{50}=0.546$$

Μέσος όρος EC<sub>50</sub>= 0.685±0,140 και AE= 1.461.

#### 14.1.2. Εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα (EtOAc)

Αντίστοιχα με την κατανομή του οξικού αιθυλεστέρα, οι απορροφήσεις των μαρτύρων στα 515nm (εις τριπλούν) ήταν: **0.194, 0.202, 0.204**. Εισάγοντας τις τιμές αυτές της απορρόφησης στην εξίσωση της παραπάνω καμπύλης αναφοράς (άξονας Y), λαμβάνουμε τη συγκέντρωση (μg DPPH•/ml) του DPPH• που περιέχεται στους μάρτυρες (τιμές άξονα X).

Αναλυτικότερα:

DPPH• Abs Μάρτυρες	μgDPPH•/ml
0.194	10.034
0.202	10.494
0.204	10.609
<b>ΜΟ</b>	10.379

Οι αρχικές συγκεντρώσεις του κλάσματος του οξικού αιθυλεστέρα ήταν  $C_s = 20\mu\text{g/ml}$  (ή  $0.0020\text{ mg/ml}$ ),  $60\mu\text{g/ml}$  και  $120\mu\text{g/ml}$ .

Συνεπώς:

$C_s(\mu\text{g/ml})$	$C_c(\mu\text{g/ml})$
20	0.5
60	1.5
120	3

i)  $C_c = 0.5\ \mu\text{g/ml}$ :

Απορρόφηση (Abs)	μgDPPH•/ml	%remDPPH•
0.168	8.540	82.281
0.152	7.621	73.422
0.157	7.908	76.190

$X(C_{\text{sample}}/C_{\text{αρχDPPH}\bullet})$	$Y(\%\text{remDPPH}\bullet)$
0.048	82.281
0.145	64.009
0.289	44.629

ii)  $C_c = 1.5\ \mu\text{g/ml}$ :

Απορρόφηση (Abs)	μgDPPH•/ml	%remDPPH•
0.135	6.644	64.009
0.125	6.069	58.472
0.123	5.954	57.364

X(Csample/CapxDPPH•)	Y(%remDPPH•)
0.048	73.422
0.145	58.472
0.289	46.845

iii) Cc=3.0 µg/ml:

Απορρόφηση (Abs)	µgDPPH•/ml	%remDPPH•
0.1	4.632	44.629
0.104	4.862	46.845
0.102	4.747	45.736

X(Csample/CapxDPPH•)	Y(%remDPPH•)
0.048	76.190
0.145	57.364
0.289	45.736

Στην περίπτωση του κλάσματος του οξικού αιθυλεστέρα, οι εξισώσεις που προέκυψαν για την εξαγωγή του EC<sub>50</sub> είναι οι ακόλουθες:

$$y=92.739e^{-2.536x}, R^2=0.999/ EC_{50}= 0.245$$

$$y=78.722e^{-1.84x}, R^2=0.985/ EC_{50}= 0.247$$

$$y=81.594e^{-2.075x}, R^2=0.968/ EC_{50}= 0.236$$

Μέσος όρος EC<sub>50</sub>= 0.242±0.005 και AE= 4.130.

#### 14.1.3. Εκχύλισμα βουτανόλης (n-BuOH)

Αντίστοιχα με την κατανομή της βουτανόλης, οι απορροφήσεις των μαρτύρων στα 515nm ήταν: **0.188, 0.178, 0.188**. Εισάγοντας τις τιμές αυτές της απορρόφησης στην εξίσωση της παραπάνω καμπύλης αναφοράς (άξονας Y), λαμβάνουμε τη συγκέντρωση (µg DPPH•/ml) του DPPH• που περιέχεται στους μάρτυρες (τιμές άξονα X).

Αναλυτικότερα:



DPPH• Abs Μάρτυρες	μgDPPH•/ml
0.188	9.690
0.178	9.115
0.188	9.690
MO	9.498

Οι αρχικές συγκεντρώσεις του κλάσματος της βουτανόλης ήταν  $C_s = 60\mu\text{g/ml}$  (ή  $0.006\text{ mg/ml}$ ),  $90\mu\text{g/ml}$  και  $120\mu\text{g/ml}$ .

Συνεπώς:

$C_s(\mu\text{g/ml})$	$C_c(\mu\text{g/ml})$
60	1.5
90	2.25
120	3

i)  $C_c = 1.5\ \mu\text{g/ml}$ :

(Απορρόφηση) Abs	μgDPPH•/ml	%remDPPH•
0.155	7.793	82.049
0.148	7.391	77.814
0.152	7.621	80.234

$X(C_{\text{sample}}/C_{\text{apx}}\text{DPPH}\bullet)$	$Y(\%\text{remDPPH}\bullet)$
0.158	82.049
0.237	69.342
0.316	62.081

ii)  $C_c = 2.25\ \mu\text{g/ml}$ :

(Απορρόφηση) Abs	μgDPPH•/ml	%remDPPH•
0.134	6.586	69.342
0.132	6.471	68.132
0.133	6.529	68.737

X(Csample/CapxDPPH•)	Y(%remDPPH•)
0.158	77.815
0.237	68.132
0.316	59.661

ii) Cc=3.00 µg/ml:

(Απορρόφηση) Abs	µgDPPH•/ml	%remDPPH•
0.122	5.896	62.081
0.118	5.667	59.661
0.12	5.782	60.871

X(Csample/CapxDPPH•)	Y(%remDPPH•)
0.158	80.234
0.237	68.737
0.316	60.871

Στην περίπτωση του κλάσματος της βουτανόλης, οι εξισώσεις που προέκυψαν για την εξαγωγή του EC<sub>50</sub> είναι οι ακόλουθες:

$$y=107.4e^{-1.766x}, R^2=0.986/ EC_{50}= 0.433$$

$$y=101.49e^{-1.682x}, R^2=1/ EC_{50}= 0.421$$

$$y=105.17e^{-1.749x}, R^2=0.995/ EC_{50}= 0.425$$

Μέσος όρος EC<sub>50</sub>= 0.426±0.006 και AE= 2.346.

#### 14.1.4.Υδατικό κλάσμα: (H<sub>2</sub>O)

Οι απορροφήσεις των μαρτύρων στα 515nm στην περίπτωση όπου μελετήθηκε η υδατική κατανομή ήταν: **0.206, 0.217, 0.174**. Εισάγοντας τις τιμές αυτές της απορρόφησης στην εξίσωση της παραπάνω καμπύλης αναφοράς (άξονας Y), λαμβάνουμε τη συγκέντρωση (µg DPPH•/ml) του DPPH• που περιέχεται στους μάρτυρες (τιμές άξονα X).

Αναλυτικότερα:

DPPH• Abs Μάρτυρες	μgDPPH•/ml
0.206	10.724
0.217	11.356
0.215	11.241
<b>ΜΟ</b>	11.107

Οι αρχικές συγκεντρώσεις του υδατικού υπολείμματος ήταν  $C_s = 60 \mu\text{g/ml}$  (ή  $0.01 \text{ mg/ml}$ ),  $120 \mu\text{g/ml}$  και  $180 \mu\text{g/ml}$ .

Συνεπώς:

$C_s(\mu\text{g/ml})$	$C_c(\mu\text{g/ml})$
60	1,5
120	3
180	4.5

i)  $C_c = 1.5 \mu\text{g/ml}$ :

(Απορρόφηση) Abs	μgDPPH•/ml	%remDPPH•
0.189	9.747	87.754
0.181	9.287	83.615
0.209	10.897	98.103

$X(C_{\text{sample}}/C_{\text{αρχDPPH}\bullet})$	$Y(\% \text{remDPPH}\bullet)$
0.132	87.754
0.264	86.720
0.396	83.098

ii)  $C_c = 3.0 \mu\text{g/ml}$ :

(Απορρόφηση) Abs	μgDPPH•/ml	%remDPPH•
0.187	9.632	86.720
0.174	8.885	79.993
0.205	10.667	96.033

X(Csample/CαρχDPPH•)	Y(%remDPPH•)
0.132	83.615
0.264	79.993
0.396	74.819

ii) Cc=4.5 µg/ml:

(Απορρόφηση) Abs	µgDPPH•/ml	%remDPPH•
0.180	9.230	83.097
0.164	8.310	74.819
0.204	10.609	95.516

X(Csample/CαρχDPPH•)	Y(%remDPPH•)
0.132	98.103
0.264	96.033
0.396	95.516

Στην περίπτωση του υδατικού υπολείμματος, οι εξισώσεις που προέκυψαν για την εξαγωγή του EC<sub>50</sub> είναι οι ακόλουθες:

$$y=99.57e^{-0.105x}, R^2=0.986/ EC_{50}= 6.560$$

$$y=99.666e^{-0.11x}, R^2=0.978/ EC_{50}= 6.271$$

$$y=99,159e^{-0,101x}, R^2=0,894/ EC_{50}= 6,779$$

Μέσος όρος EC<sub>50</sub>= 6.537±0.250 και AE= 0.147.

Η ικανότητα σάρωσης ριζών, εκφρασμένη σε EC<sub>50</sub>, κυμάνθηκε από 0.685 έως 6.537 mg ξηρού εκχυλίσματος/mg DPPH•. Το κλάσμα του οξικού αιθυλεστέρα παρουσίασε τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δύναμη ανάμεσα σε όλες τις κατανομές, ακολουθούμενο από το κλάσμα της βουτανόλης, το κλάσμα του διαιθυλαιθέρα με τελευταία την κατανομή του υδατικού να εμφανίζει την πιο ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Συνολικά, τα αποτελέσματα της αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο του DPPH• παρουσιάζονται παρακάτω:

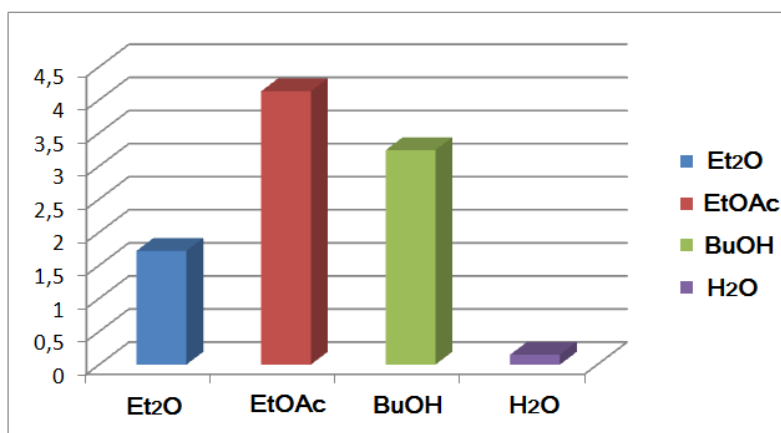
Μέθοδος Σάρωσης Ριζών DPPH•		
Δείγμα	EC50±SD *	AE
Διαιθυλαιθέρα	0.685±0.14	1.460
Οξικού Αιθυλεστέρα	0.242±0.01	4.130
Βουτανόλης	0.426±0.01	2.346
Υδατικό	6.537±0.25	0.148

**EC50±SD:** Αποτελεσματική Συγκέντρωση (Efficient Concentration) σε (mg antioxidant/mg DPPH): η ποσότητα του αντιοξειδωτικού που απαιτείται για να μειωθεί η αρχική συγκέντρωση του DPPH• κατά 50%

\*Ο όρος **EC50** δεν χρησιμοποιείται με την κυριολεκτική του έννοια, καθώς αναφέρεται σε επίπεδο καθαρής ουσίας-ένωσης, αλλά σε επίπεδο μέσης δραστικής συγκέντρωσης εκχυλίσματος.

**AE:** Αντιοξειδωτική Ικανότητα (Antiradical Efficiency):  $1/EC_{50}$

Παρακάτω ακολουθεί ένα συγκεντρωτικό γράφημα σύγκρισης της αντιοξειδωτικής ισχύος μεταξύ των τεσσάρων εκχυλισμάτων της *Indigofera hirsuta*.



AE<sub>κερκετίνης</sub>: 14.71 AE<sub>Τροlox</sub>: 5.59

Αντιοξειδωτική ικανότητα όλων των κατανομών όπως υπολογίστηκε με τη μέθοδο της ρίζας DPPH•

## 15. *IN VITRO* ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΗΣ ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΟΥΣ ΔΡΑΣΗΣ

### 15.1 Ικανότητα αναστολή της λιποξυγονάσης φυτικής προέλευσης

Έχει αποδειχθεί ότι η αναστολή της δράσης της λιποξυγονάσης φυτικής προέλευσης είναι ποιοτικά παρόμοια με την αναστολή που παρατηρείται στη δράση της λιποξυγονάσης κυττάρων συνδετικού ιστού επίμυος και γι' αυτό το λόγο το συγκεκριμένο πρωτόκολλο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένας σωστός ποιοτικός και ημιποσοτικός έλεγχος της δράσης αυτής. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι, παρά τη διαφορά στον αριθμό των αμινοξέων μεταξύ λιποξυγονασών από θηλαστικά και από φυτά (περί τα 600 αμινοξέα έναντι 800, αντίστοιχα), οι πρωτεΐνες εμφανίζουν εκπληκτική ομολογία στην αλληλουχία των αμινοξέων, καθώς και στο ενεργό κέντρο των ενζύμων (Skrzypczak et al., 2003). Οι περισσότεροι αναστολείς των λιποξυγονασών αποτελούν αντιοξειδωτικά, σαρωτές ελευθέρων ριζών και μελέτες που έχουν διενεργηθεί υποδεικνύουν ότι υπάρχει πιθανή σχέση μεταξύ της αναστολής της λιποξυγονάσης και της ικανότητας των αναστολέων να ανάγουν τον  $Fe^{3+}$  στο ανενεργό  $Fe^{2+}$ , στο ενεργό κέντρο του ενζύμου (Muller 1994; Kemal et al., 1987; Van Der Zee et al., 1989).

Όλοι οι διαλύτες και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν προμηθεύτηκαν από το εμπόριο (Sigma-Aldrich Corporation). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο HITACHI U-2001.

Στο πείραμα γίνεται προσπάθεια να μελετηθεί η επίδραση των διαφόρων εκχυλισμάτων (διαιθυλαιθέρα, οξικού αιθυλεστέρα, υπολείμματος οξικού αιθυλεστέρα, βουτανολικού, υδατικού) του μεθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Indigofera hirsuta* στη λιποξυγονάση, ένζυμο που εμπλέκεται στον κύκλο του αραχιδονικού οξέος. Η αναστολή της φυτικής προέλευσης λιποξυγονάσης (σόγιας) ( $1.9 \times 10^4$  w/v σε φυσιολογικό ορό) έγινε σε διάλυμα που περιείχε τελικές συγκεντρώσεις των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων 0.1mM. Τα εκχυλίσματα διαλύονται σε DMSO, ενώ υπόστρωμα αποτέλεσε το άλας με νάτριο του λινελαϊκού οξέος (0.1mM) σε *pH* 9.00 με ρυθμιστικό διάλυμα (Tris-HCl) σε θερμοκρασία δωματίου. Η μετατροπή του λινελαϊκού οξέος σε 13-υδροϋπεροξυ-λινελαϊκό οξύ που καταλύεται από τη LOX καταγράφεται άμεσα στα 234nm με την παρουσία του εκχυλίσματος (Pontiki et al., 2006; Kontogiorgis et al., 2006; Katsori et al., 2011).

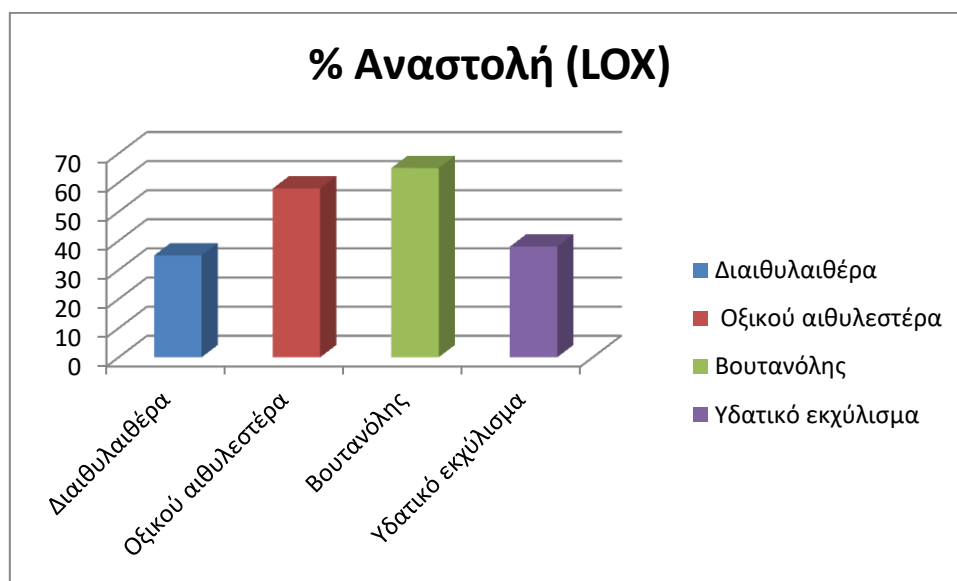
Μέσα σε κυψελίδα χαλαζία τοποθετείται ρυθμιστικό διάλυμα, διμεθυλοσουλφοξειδίο (DMSO), λιποξυγονάση (LOX) και λινελαϊκό οξύ (LLA), με αυτή τη σειρά και μετράται η απορρόφηση ( $Abs_{(LOX+LLA)}$ ) του μείγματος στα 234nm δίχως την προσθήκη του λινελαϊκού οξέος. Οι μετρήσεις γίνονται δυο φορές Από τον μέσο όρο των απορροφήσεων ( $Abs_{(LOX+LLA)}$ ) του

μάρτυρα, αφαιρείται η απορρόφηση ( $Abs_{(LOX)}$ ) του μάρτυρα και το αποτέλεσμα που προκύπτει είναι η απορρόφηση ( $Abs_{(control)}$ ) που οφείλεται στο σχηματισμό του 13-υδροϋπεροξυ-λινελαϊκού οξέος. Η αναστολή του ενζύμου υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\% \text{Αναστολή} = \frac{Abs_{control} - Abs}{Abs_{control}} \times 100$$

Με τον τρόπο αυτό ελέγχεται η ικανότητα των κατανομών του μεθανολικού εκχυλίσματος του φυτού να αναστέλλει αυτήν την ενζυμική αντίδραση και από τις συνολικές μετρήσεις που έγιναν, προκύπτει ο παρακάτω πίνακας. Όπου NDGA % inhibition = 40 in 10μM.

ΚΑΤΑΝΟΜΕΣ	%Αναστολή (LOX)
Διαθυλαιθέρα	34.807
Οξικού αιθυλεστέρα	58.376
Βουτανόλης	65.339
Υδατικό εκχύλισμα	38.730
<b>κουμαρίνη</b>	<b>36%</b>
<b>νορδιυδρογουαϊραεπικό οξύ (NDGA)</b>	<b>83%</b>



Από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι όλα τα εκχυλίσματα πλην του διαθυλαιθέρα ξεπερνούν το ποσοστό αναστολής που προκαλεί η κουμαρίνη και ιδιαίτερα τα εκχυλίσματα του οξικού αιθυλεστέρα και της βουτανόλης προκαλούν μεγαλύτερη αναστολή της δράσης της λιποξυγονάσης φυτικής προέλευσης στο 60% καθώς και η κατανομή της βουτανόλης στο 65%. Η σχετικά αυξημένη αναστολή των δύο εκχυλισμάτων πιθανώς να οφείλεται στην παρουσία φλαβονοειδών ικανά να δράσουν ως σαρωτές ελευθέρων ριζών. Είναι γνωστό ότι

σαρωτές ελευθέρων εμφανίζουν την ικανότητα αναστολής της λιποξυγονάσης (Pontiki *al.*, 2004; Pontiki *al.*, 2008). Η σχετικά αυξημένη ανασταλτική δράση επι του ενζύμου της λιποξυγονάσης φυτικής προέλευσης καταδικνύει ότι τα δύο εκχυλίσματα του οξικού αιθυλεστέρα και της βουτανόλης παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδη δράση μιας και λιποξυγονάση, ένζυμο που εμπλέκεται στον κύκλο του αραχιδονικού οξέος.

## **16. ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΑΝΑΓΩΓΑΣΗΣ ΤΗΣ ΑΛΔΟΖΗΣ(ALR2) ΚΑΙ ΑΛΔΕΥΔΗΣ (ALR1)**

### **16.1 *In vitro* μελέτη της ικανότητας αναστολής της αναγωγάσης της αλδόζης (ALR2)**

Ο προσδιορισμός της ικανότητας αναστολής του ενζύμου αναγωγάσης της αλδόζης πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται από (Νικολαου & Demopoulos 2003) και (Νικολαου *et al.*, 2004). Για τη διεξαγωγή του πειράματος παρασκευάζονται τα εξής διαλύματα:

#### **Διάλυμα φωσφορικών 0.067M pH= 6,2**

Ζυγίστηκαν 0.947g άνυδρο  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (MW=141.980) ή 1.187g ένυδρο  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (MW=177.98), ακολούθησε αραιώση σε 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$  και από αυτά ελήφθησαν 18.5 ml

Ζυγίστηκαν 0.908g άνυδρο  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (MW=136.09), ακολούθησε αραιώση σε 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$  και από αυτά ελήφθησαν 81.5 ml

#### **Διάλυμα NADPH 0.104 mM (τετρανατριούχο άλας, MW=833.4)**

Διαλύθηκαν 6.91 mg NADPH σε 2.5ml buffer. Το διάλυμα έγινε την ημέρα του πειράματος και διατηρήθηκε σε πάγο.

#### **Διάλυμα DL-γλυκεριναλδεύδης 10 mM (MW=90.08)**

Διαλύθηκαν 49.54mg DL-γλυκεριναλδεύδης σε 5ml buffer. Το διάλυμα έγινε την ημέρα του πειράματος και διατηρήθηκε σε πάγο.

#### **Κορεσμένο διάλυμα $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$**

Αναδεύτηκαν 43.5g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  σε 56.5ml  $\text{H}_2\text{O}$  για τουλάχιστον 6h

#### **Διάλυμα $\text{NaHCO}_3$ 0.2M (MW=84.01)**



Διαλύθηκαν 1.68g NaHCO<sub>3</sub> σε 100ml H<sub>2</sub>O

### **Διάλυμα της υπό εξέτασης ουσίας**

Για συγκέντρωση 10<sup>-4</sup> M ζυγίστηκαν σε mg 3.19x10<sup>-3</sup>xMW και διαλύθηκαν σε 1ml 0.2M NaHCO<sub>3</sub> ή 1ml 10% υδατικό διάλυμα DMSO (0.1ml DMSO + 0.9ml H<sub>2</sub>O).

Για μίγματα εκχυλισμάτων φυτών με τελική περιεκτικότητα 50μg/ml ο όγκος που χρειάζεται είναι  $V = x \cdot 10^3 / 1595$  όπου x=βάρος του μίγματος σε mg και V=όγκος του 10% υδατικού διαλύματος DMSO σε ml.

### **Προετοιμασία του ενζύμου της αναγωγής της αλδόζης**

Ομογενοποιήθηκαν 10 φακοί οφθαλμών επίμυων σε 5ml H<sub>2</sub>O και ακολούθησε ψύξη.

Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 10000 rpm/min στους 0°C

Παραλήφθηκε το υπερκείμενο και αναμείχθηκε με το κορεσμένο διάλυμα (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> [αναλογία 4,5ml υπερκείμενο/ 3ml κορεσμένο διάλυμα (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>]

Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 10000 rpm/ min στους 0°C

Ελήφθη το υπερκείμενο και διατηρήθηκε στους -80 °C για 24h.

### **Πείραμα με control**

Έγινε ανάμειξη των εξής διαλυμάτων:

Buffer 2.4 ml

NADPH 100μl

Ένζυμο 300μl

Διάλυμα NaHCO<sub>3</sub> ή 10% DMSO 100μl

Ακολούθησε ανάμειξη 1ml από το παραπάνω μίγμα με 100μl buffer στην κυβελίδα αναφοράς και μηδενίστηκε το φασματοφωτόμετρο. Αμέσως μετά 1ml από το παραπάνω μίγμα αναμείχθηκε με 100μl DL-γλυκεραλδεύδης στην κυβελίδα μέτρησης και καταγράφηκε η έναρξη του χρόνου. Αφέθηκε το σύστημα να ισορροπήσει για 1min στους 30° C και ακολούθησε μέτρηση στα 340nm για 5' ανά 30''. Η ταχύτητα της αντίδρασης πρέπει να είναι περίπου 0.020μον/ λεπτό ή 0.010μον/ λεπτό.

## Πείραμα με αναστολέα

Έγινε ανάμειξη των εξής διαλυμάτων:

Buffer 2.4ml

NADPH 100μl

Ένζυμο 300μl

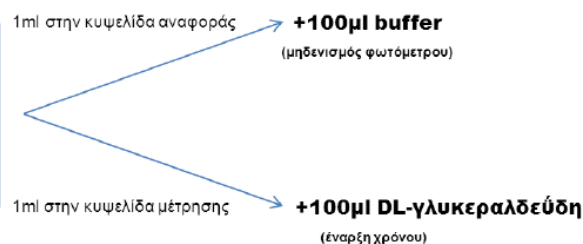
Ουσία 100μl ή 90μl H<sub>2</sub>O + 10μl ουσία σε DMSO

Ακολούθησε ανάμειξη 1ml από το παραπάνω μίγμα με 100μl buffer στην κυβελίδα αναφοράς και μηδενίστηκε το φασματοφωτόμετρο. Αμέσως μετά 1ml από το παραπάνω μίγμα αναμείχθηκε με 100μl DL-γλυκεραλδεύδης στην κυβελίδα μέτρησης και καταγράφηκε η έναρξη του χρόνου. Αφέθηκε το σύστημα να ισορροπήσει για 1min στους 30° C και ακολούθησε μέτρηση στα 340nm για 5' ανά 30''. Η ταχύτητα της αντίδρασης πρέπει να είναι περίπου 0.020μον/ λεπτό ή 0.010μον/ λεπτό.

### Πείραμα μάρτυρα (control):

#### Ανάμειξη:

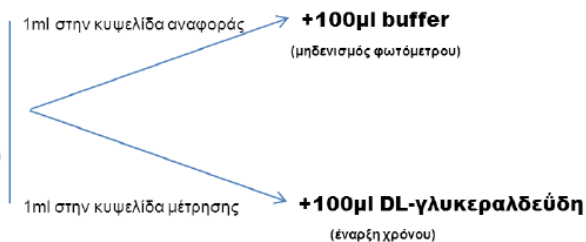
**Buffer : 2.4ml**  
**NADPH : 100μl**  
**Ένζυμο : 300μl**  
**NaHCO<sub>3</sub> ή 10% DMSO: 100μl**



### Πείραμα με αναστολέα (control):

#### Ανάμειξη:

**Buffer : 2.4ml**  
**NADPH : 100μl**  
**Ένζυμο : 300μl**  
**90μl H<sub>2</sub>O+10μl ουσία σε DMSO**



Καταγράφηκε τελικά η % αναστολή του ενζύμου από τη σχέση:

$$\% \text{ αναστολή} = \frac{\text{ταχύτητα με control} - \text{ταχύτητα με αναστολέα}}{\text{ταχύτητα με control}} \times 100$$

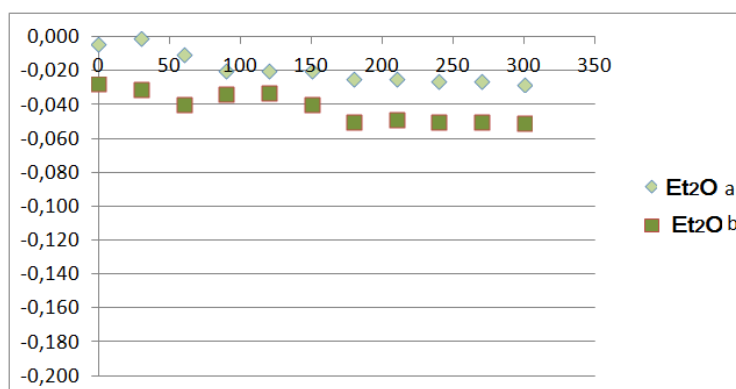
Επειδή πρόκειται για μίγματα ουσιών και όχι για καθαρές ουσίες, τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ανασταλτικές δράσεις και αντιστοιχούν στο μέσο όρο τρεις διαφορετικές

μετρήσεις με τυπική απόκλιση (SD)<10%. Η σορβινίλη θεωρήθηκε ως control με ικανότητα αναστολής του ενζύμου της αναγωγάσης της αλδόζης 45% σε συγκέντρωση 0.25Μμ (59μg/ml). Οι αναφερόμενες στην βιβλιογραφία τιμές για το IC<sub>50</sub> της σορβινίλης κυμαίνονται από 0.07 έως 0.9μM (Zaher et al., 2002).

### 16.1.1. Εκχύλισμα διαιθυλαιθέρα

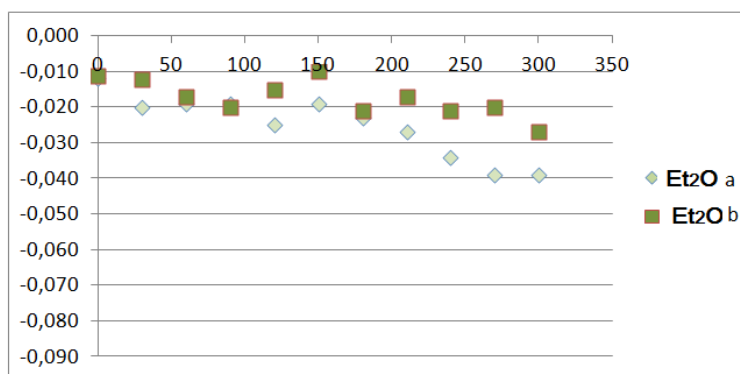
Πίνακας 47 Συγκέντρωση δείγματος 50μg/ml

χρόνος		control		Απορροφήσεις 340nm	
min	sec			Συγκέντρωση 50%	
				Et <sub>2</sub> O	
	0	-0.052	-0.063	-0.004	-0.028
	30	-0.073	-0.083	-0.001	-0.031
1	60	-0.093	-0.102	-0.010	-0.040
	90	-0.118	-0.103	-0.020	-0.034
2	120	-0.134	-0.123	-0.020	-0.033
	150	-0.149	-0.134	-0.020	-0.040
3	180	-0.170	-0.147	-0.023	-0.021
	210	-0.191	-0.170	-0.025	-0.049
4	240	-0.197	-0.184	-0.026	-0.050
	270	-0.209	-0.202	-0.026	-0.050
5	300	-0.213	-0.221	-0.028	-0.051
ταχύτητα αντίδρασης (μον/min)		0.032	0.032	0.005	0.005
MO ταχύτητας αντίδρασης (μον/min)		0.032		0.005	
<i>St.Dev.</i>		0.000424264		0.000141421	
		161	158	24	23
% αναστολή				84.95	85.58
MO % αναστολή				84.27	
				0.4433271376	



Πίνακας 48 Συγκέντρωση δείγματος 25 µg/ml

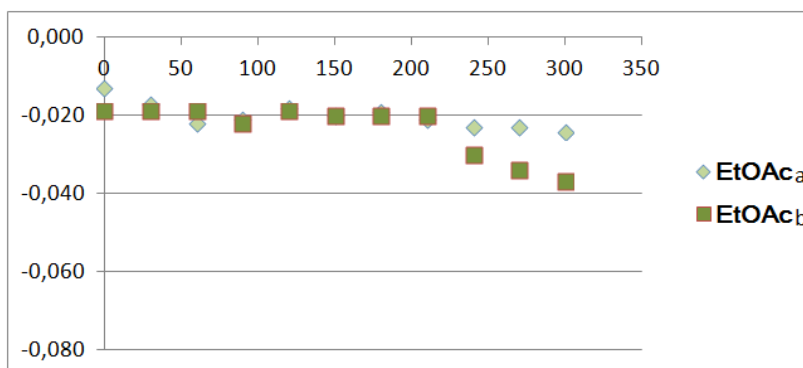
χρόνος		control		Απορροφήσεις 340nm	
min	sec			Συγκέντρωση 25%	
				Et <sub>2</sub> O	
	0	-0.023	-0.033	-0.012	-0.011
	30	-0.043	-0.042	-0.020	-0.012
1	60	-0.067	-0.057	-0.019	-0.017
	90	-0.074	-0.070	-0.019	-0.020
2	120	-0.093	-0.080	-0.025	-0.015
	150	-0.099	-0.091	-0.019	-0.010
3	180	-0.120	-0.111	-0.023	-0.021
	210	-0.131	-0.130	-0.027	-0.017
4	240	-0.143	-0.140	-0.034	-0.021
	270	-0.147	-0.147	-0.039	-0.020
5	300	-0.156	-0.169	-0.039	-0.027
ταχύτητα αντίδρασης (μον/min)		0,027	0,027	0,005	0,003
MO ταχύτητας αντίδρασης (μον/min)		0.027		0.004	
<i>St.Dev.</i>		0.000424264		0.001555635	
		133	136	27	16
% αναστολή				79.93	88.10
MO % αναστολή				84.01	
				5.783029437	



### 16.1.2. Εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα

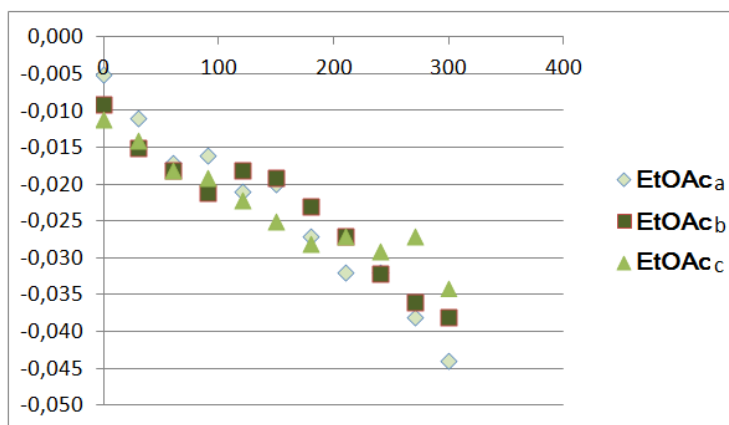
Πίνακας 49 Συγκέντρωση δείγματος 50μg/ml

χρόνος		control		Απορροφήσεις 340nm	
				Συγκέντρωση 50%	
min	sec			EtOAc	
	0	-0.052	-0.063	-0.013	-0.019
	30	-0.073	-0.083	-0.017	-0.019
1	60	-0.093	-0.102	-0.022	-0.019
	90	-0.118	-0.103	-0.021	-0.022
2	120	-0.134	-0.123	-0.018	-0.019
	150	-0.149	-0.134	-0.020	-0.020
3	180	-0.170	-0.147	-0.019	-0.020
	210	-0.191	-0.170	-0.021	-0.020
4	240	-0.197	-0.184	-0.023	-0.030
	270	-0.209	-0.202	-0.023	-0.034
5	300	-0.213	-0.221	-0.024	-0.037
ταχύτητα αντίδρασης (μον/min)		0.032	0.032	0.002	0.004
MO ταχύτητας αντίδρασης (μον/min)		0.032		0.003	
St.Dev.		0.000424264		0.000989949	
		161	158	11	18
% αναστολή				93.10	88.71
MO % αναστολή				90.91	
				3.103289949	



Πίνακας 50 Συγκέντρωση δείγματος 25μg/ml

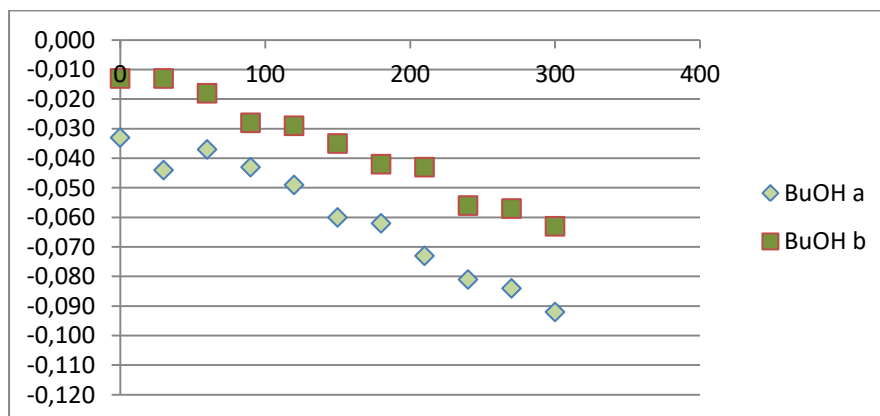
χρόνος		control		Απορροφήσεις 340nm		
min	sec	Συγκέντρωση 25%				
		EtOAc				
	0	-0.023	-0.033	-0.005	-0.009	-0.011
	30	-0.043	-0.042	-0.011	-0.015	-0.014
1	60	-0.067	-0.057	-0.017	-0.018	-0.018
	90	-0.074	-0.070	-0.016	-0.021	-0.019
2	120	-0.093	-0.080	-0.021	-0.018	-0.022
	150	-0.099	-0.091	-0.020	-0.019	-0.025
3	180	-0.120	-0.111	-0.027	-0.023	-0.028
	210	-0.131	-0.130	-0.032	-0.027	-0.027
4	240	-0.143	-0.140	-0.032	-0.032	-0.029
	270	-0.147	-0.147	-0.038	-0.036	-0.027
5	300	-0.156	-0.169	-0.044	-0.038	-0.034
ταχύτητα αντίδρασης (μον/min)		<b>0.027</b>	<b>0.027</b>	<b>0.008</b>	<b>0.006</b>	<b>0.005</b>
MO ταχύτητας αντίδρασης (μον/min)		<b>0.027</b>		<b>0.006</b>		
<i>St.Dev.</i>		<i>0,000424264</i>		<i>0.001616581</i>		
		133	136	39	29	23
% αναστολή				<b>71.00</b>	<b>78.44</b>	<b>82.90</b>
MO % αναστολή				<b>77.45</b>		
				<i>6.00959388</i>		



### 16.1.3. Εκχύλισμα βουτανόλης

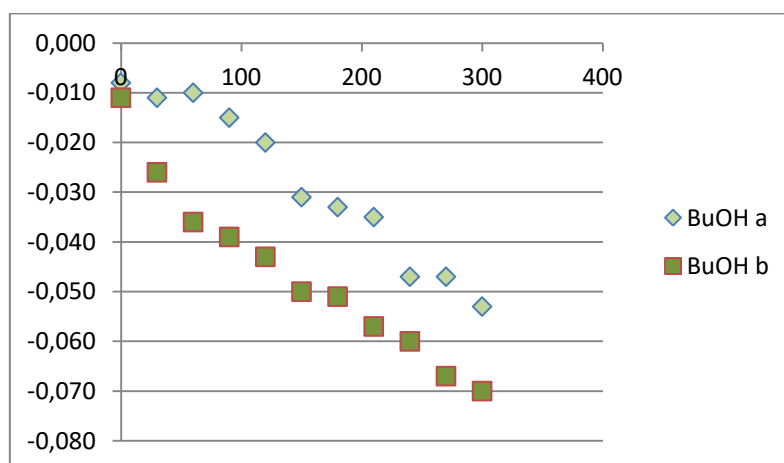
Πίνακας 51 Συγκέντρωση δείγματος 50μg/ml

χρόνος		control		Απορροφήσεις 340nm	
min	sec			Συγκέντρωση 50%	
				BuOH	
	0	-0.052	-0.063	-0.033	-0.013
	30	-0.073	-0.083	-0.044	-0.013
1	60	-0.093	-0.102	-0.037	-0.018
	90	-0.118	-0.103	-0.043	-0.028
2	120	-0.134	-0.123	-0.049	-0.029
	150	-0.149	-0.134	-0.060	-0.035
3	180	-0.170	-0.147	-0.062	-0.042
	210	-0.191	-0.170	-0.073	-0.043
4	240	-0.197	-0.184	-0.081	-0.056
	270	-0.209	-0.202	-0.084	-0.057
5	300	-0.213	-0.221	-0.092	-0.063
ταχύτητα αντίδρασης (μον/min)		0.032	0.032	0.012	0.010
MO ταχύτητας αντίδρασης (μον/min)		0.032		0.011	
St.Dev.		0.000424264		0.001272792	
		161	158	59	50
% αναστολή				63.01	68.65
MO % αναστολή				65.83	
				3,98994422	



Πίνακας 52 Συγκέντρωση δείγματος 25μg/ml

χρόνος		control		Απορροφήσεις 340nm	
min	sec			Συγκέντρωση 25%	
				BuOH	
	0	-0.023	-0.033	-0.008	-0.011
	30	-0.043	-0.042	-0.011	-0.026
1	60	-0.067	-0.057	-0.010	-0.036
	90	-0.074	-0.070	-0.015	-0.039
2	120	-0.093	-0.080	-0.020	-0.043
	150	-0.099	-0.091	-0.031	-0.050
3	180	-0.120	-0.111	-0.033	-0.051
	210	-0.131	-0.130	-0.035	-0.057
4	240	-0.143	-0.140	-0.047	-0.060
	270	-0.147	-0.147	-0.047	-0.067
5	300	-0.156	-0.169	-0.053	-0.070
ταχύτητα αντίδρασης (μον/min)		0.027	0.027	0.009	0.012
MO ταχύτητας αντίδρασης (μον/min)		0.027		0.010	
St.Dev.		0.000424264		0.001979899	
		133	136	45	59
% αναστολή				66.54	56.13
MO % αναστολή				61.34	
				7.360219284	

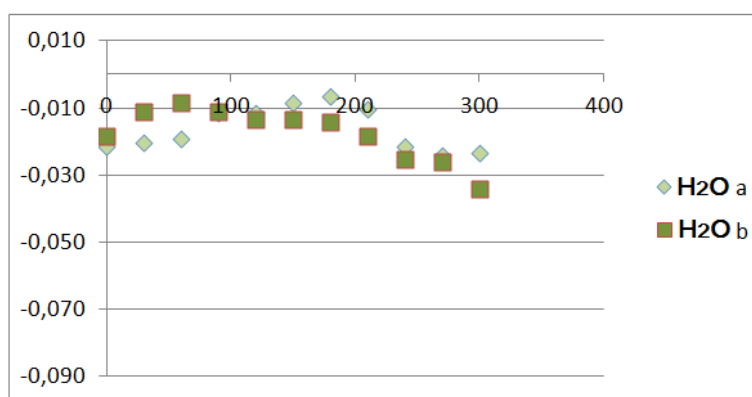




#### 16.1.4. Υδατικό κλάσμα

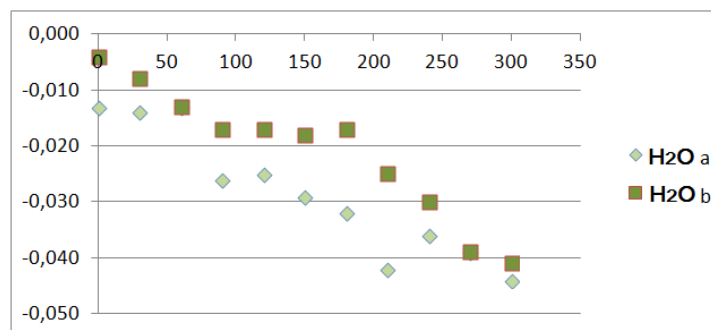
Πίνακας 53 Συγκέντρωση δείγματος 50 µg/ml

χρόνος		control		απορροφήσεις στα 340nm	
min	sec			ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ 50mg/ml	
				H <sub>2</sub> O	
	0	-0.023	-0.033	-0.021	-0.018
	30	-0.043	-0.042	-0.020	-0.011
1	60	-0.067	-0.057	-0.019	-0.008
	90	-0.074	-0.070	-0.011	-0.011
2	120	-0.093	-0.080	-0.011	-0.013
	150	-0.099	-0.091	-0.008	-0.013
3	180	-0.120	-0.111	-0.006	-0.014
	210	-0.131	-0.130	-0.010	-0.018
4	240	-0.143	-0.140	-0.021	-0.025
	270	-0.147	-0.147	-0.024	-0.026
5	300	-0.156	-0.169	-0.023	-0.034
ταχύτητα αντίδρασης (µον/min)		0.027	0.027	0.000	0.003
ΜΟ ταχύτητας αντίδρασης (µον/min)		0.027		0.002	
St.Dev.		0.000424264		0.001979899	
		133	136	2	16
		% αναστολή		98.51	88.10
		ΜΟ % αναστολή		93.31	
				7.360219284	



Πίνακας 54 Συγκέντρωση δείγματος 25 µg/ml

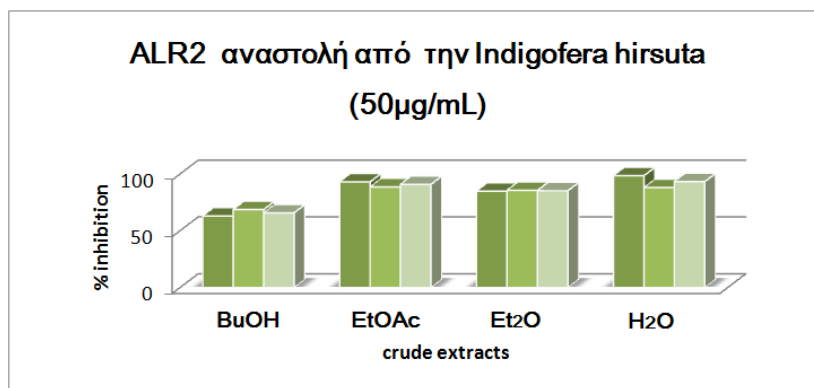
χρόνος		control		Απορροφήσεις 340nm	
min	sec			Συγκέντρωση 25%	
				H <sub>2</sub> O	
	0	-0.023	-0.033	-0.013	-0.004
	30	-0.043	-0.042	-0.014	-0.008
1	60	-0.067	-0.057	-0.013	-0.013
	90	-0.074	-0.070	-0.026	-0.017
2	120	-0.093	-0.080	-0.025	-0.017
	150	-0.099	-0.091	-0.029	-0.018
3	180	-0.120	-0.111	-0.032	-0.017
	210	-0.131	-0.130	-0.042	-0.025
4	240	-0.143	-0.140	-0.036	-0.030
	270	-0.147	-0.147	-0.039	-0.039
5	300	-0.156	-0.169	-0.044	-0.041
ταχύτητα αντίδρασης (μον/min)		0.027	0.027	0.006	0.007
MO ταχύτητας αντίδρασης (μον/min)		0.027		0.007	
St.Dev.		0.000424264		0.000848528	
		133	136	31	37
% αναστολή				76.95	72.49
MO % αναστολή				74.72	
				3.154379693	



Τα κλάσματα που εμφάνισαν την υψηλότερη ικανότητα αναστολής της ALR2 είναι του οξικού αιθυλεστέρα, του διαιθυλιαιθέρα και του υδατικού εκχυλίσματος, η οποία κυμαίνεται από 85% έως 93% σε τελική συγκέντρωση 50µg/ml και από 75% έως 84% σε τελική συγκέντρωση 25 µg/ml. Τη μικρότερη ανασταλτική δράση εμφάνισε το κλάσμα της βουτανόλης με αναστολή 66% σε τελική συγκέντρωση 50µg/ml και 61% σε τελική συγκέντρωση 25µg/ml η οποία και στις δύο περιπτώσεις ήταν πάνω από 50%. Απο τα πειραματικά αποτελέσματα που αναφέρθηκαν προκύπτει ότι η ικανότητα των εκχυλισμάτων να αναστέλλουν το ένζυμο ALR2 παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, δεδομένου ότι εμφανίζουν υψηλή αποτελεσματικότητα αν και πρόκειται για μίγματα ουσιών φυτικών παρασκευασμάτων.

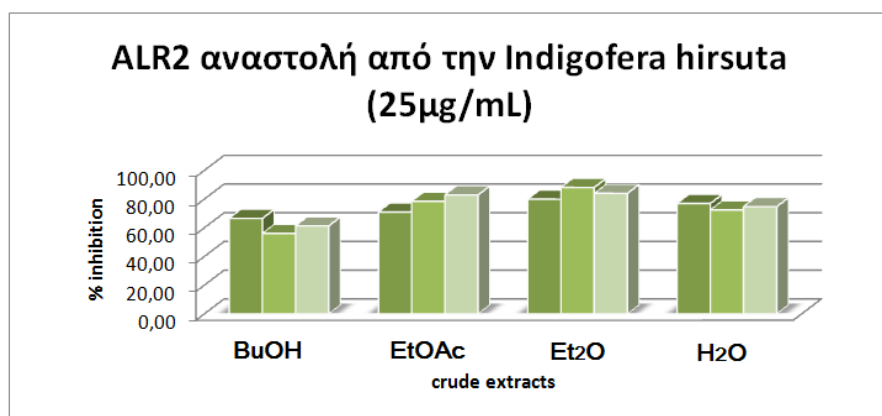
Πίνακας 55: Συγκριτικό ραβδόγραμμα ικανότητας αναστολής της δράσης της αναγωγάσης της αλδόζης (ALR2) των εκχυλισμάτων σε συγκέντρωση 50μg/ml

		50μg/ml				
Εκχυλίσματα		αναστολή a	αναστολή b	αναστολή c	MO	St.Dev.
<i>Indigofera</i>	BuOH	63.01	68.65	65.83	65.83	2.82
<i>hirsuta</i>	EtOAc	93.10	88.71	90.91	90.91	2.20
	Et <sub>2</sub> O	84.95	85.58	85.27	85.27	0.32
	H <sub>2</sub> O	98.51	88.1	93.31	93.31	5.21



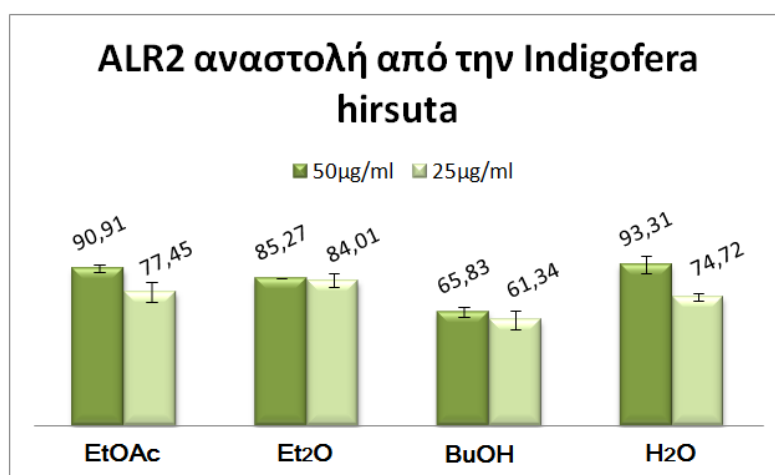
Πίνακας 56: Συγκριτικό ραβδόγραμμα ικανότητας αναστολής της δράσης της αναγωγάσης της αλδόζης (ALR2) των εκχυλισμάτων σε συγκέντρωση 25 μg/ml

		25μg/ml				
Εκχυλίσματα		αναστολή a	αναστολή b	αναστολή c	MO	St.Dev.
<i>Indigofera</i>	BuOH	66.54	56.13	61.34	61.34	5.20
<i>hirsuta</i>	EtOAc	71.00	78.44	82.90	77.45	6.01
	Et <sub>2</sub> O	79.93	88.10	84.01	84.01	4.09
	H <sub>2</sub> O	76.95	72.49	74.72	74.72	2.23



Πίνακας 57: Συνολική αναστολή του ενζύμου της αναγωγής της αλδόζης (ALR2) και στις δύο συγκεντρώσεις

<i>Indigofera hirsuta</i>		ALR2 % inhibition			
		50µg/ml	St.Dev.	25µg/ml	St.Dev.
1	EtOAc	90.91	2.20	77.45	6.01
3	Et <sub>2</sub> O	85.27	0.32	84.01	4.09
4	BuOH	65.83	2.82	61.34	5.20
6	H <sub>2</sub> O	93.31	5.21	74.72	2.23



- Τα κλάσματα που εμφάνισαν την υψηλότερη ικανότητα αναστολής της ALR2 είναι του οξικού αιθυλεστέρα, του διαιθυλαιθέρα και του υδατικού εκχυλίσματος, η οποία κυμαίνεται από 85% έως 93% σε τελική συγκέντρωση 50µg/ml και από 75% έως 84% σε τελική συγκέντρωση 25 µg/ml.
- Τη μικρότερη ανασταλτική δράση εμφάνισε το κλάσμα της βουτανόλης με αναστολή 66% σε τελική συγκέντρωση 50µg/ml και 61% σε τελική συγκέντρωση 25µg/ml η οποία και στις δύο περιπτώσεις ήταν πάνω από 50%.

## 16.2. *In vitro* μελέτη της ικανότητας αναστολής της αναγωγής της αλδεΐδης (ALR1)

Σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται από (Νικολαου & Demopoulos 2003) και (Νικολαου et al., 2004), παρασκευάζονται τα εξής διαλύματα:

### Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0.1 M pH=7.2

Ζυγίστηκαν 3.402g άνυδρο K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (MW=136.4), αραιώθηκαν σε 250 ml H<sub>2</sub>O ml και 1 g NaOH (MW=39.99) τα οποία αραιώθηκαν σε 250ml H<sub>2</sub>O. Τα 250 ml από το διάλυμα K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1M και τα 174.5 ml 0.1M NaOH αραιώθηκαν ως τα 500 ml με νερό.

### **Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10mM pH=7.2**

Σε 50ml από το ρυθμιστικό διάλυμα 0.1M προστέθηκαν 450 ml H<sub>2</sub>O.

### **Ρυθμιστικό διάλυμα S ( 10mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών + 2mM EDTA + 2mM 2-ME)**

Ζυγίστηκαν 202.2mg EDTA (δικάλιο άλας-MW=404.47) και 35.1 μl 2-ME (MW=78.13 , d=1.114 g/ml) και διαλύθηκαν σε 10 MW φωσφορικών pH=7.2.

### **Ρυθμιστικό διάλυμα S + σουκρόζη ( 10mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών + 0,25M σουκρόζη + 2mM EDTA + 2mM 2-ME)**

Ζυγίστηκαν 8.56g σουκρόζη (MW=342.3) και 80.9 mg EDTA (δικάλιο άλας- MW=404.47) και 17.5μl 2-ME (MW=78.13, d=1.114g/ml) και διαλύθηκαν σε 100ml 10mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=7.2.

### **Διάλυμα NADPH 3.6mM**

Διαλύθηκαν 7.5mg τετρανατριούχου άλατος MW=833.4 σε 2.5ml ρυθμιστικού. Το διάλυμα έγινε την ημέρα του πειράματος και διατηρήθηκε σε πάγο.

### **Διάλυμα γλυκουρονικού Na 600mM**

Διαλύθηκαν 140.5mg γλυκουρονικού Na (MW=234.14) 1ml ρυθμιστικό. Το διάλυμα έγινε την ημέρα του πειράματος και διατηρήθηκε σε πάγο.

### **Κορεσμένο διάλυμα (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>**

Αναδεύτηκαν 43.5g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> σε 56.5ml H<sub>2</sub>O για τουλάχιστο 6h.

### **Διάλυμα NHCO<sub>3</sub> 0.2M (MW=84.01)**

Διαλύθηκαν 1.68g NHCO<sub>3</sub> σε 100ml H<sub>2</sub>O

### **Διάλυμα της υπό εξέτασης ουσίας**

Τα μίγματα εκχυλισμάτων φυτών με τελική περιεκτικότητα 50μg/ml

### **Προετοιμασία του ενζύμου της αναγωγής της αλδεΐδης**

Οι νεφροί λαμβάνονται από αρουραίους του ίδιου φύλου και περίπου 250g ώστε να μην είναι πολύ μεγάλοι σε ηλικία.

Ζυγίστηκαν οι νεφροί και προστέθηκαν στο το διάλυμα S-buffer+σουκρόζη.

Ομογενοποιήθηκαν για 1 λεπτό και η διαδικασία πραγματοποιείται με ενδιάμεση ψύξη.

Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 10000rpm/20 min στους 0-4°C.

Το υπερκείμενο παραλήφθηκε και αναμείχθηκε σιγά σιγά με ψυχρό κορεσμένο διάλυμα  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  [αναλογία 4.5 ml υπερκείμενο/3 ml κορεσμένο διάλυμα  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ] για την επίτευξη κορεσμού σε ποσοστό 40% και αφέθηκε σε ηρεμία για 15' και πάντα σε πάγο. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 10000rpm/20 min στους 0-4°C

Το υπερκείμενο και αναμείχθηκε σιγά σιγά με ψυχρό κορεσμένο διάλυμα  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  για την επίτευξη κορεσμού σε ποσοστό 50% και αφέθηκε σε ηρεμία για 15' και σε πάγο.

Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 10000rpm/20 min στους 0-4°C.

Παραλήφθηκε το υπερκείμενο και αναμείχθηκε σιγά σιγά με ψυχρό κορεσμένο διάλυμα  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  για την επίτευξη κορεσμού σε ποσοστό 75 και αφέθηκε σε ηρεμία για 15' και σε πάγο.

Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 10000rpm/20 min στους 0-4°C

Έγινε απόχυση του υπερκείμενου και τα σωληνάκια αφέθηκαν με κλίση 45° ώστε να φύγει η υγρασία. Μετά από λίγο ζυγίστηκε και βρέθηκε το βάρος του pellet μετά από αφαίρεση του αρχικού βάρους τους.

Ακολούθησε επαναδιαλύση το pellet στην κατάλληλη ποσότητα S-buffer ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση του ενζύμου περίπου 20mg/ml.

Προστέθηκε DEAE-52 resin [330mg/10ml] και αναδεύτηκε (σε ποτήρι ζέσης μέχρι να διαλυθούν οι κρύσταλλοι του DEAE-52). Προέκυψε αιώρημα το οποίο αφέθηκε σε ηρεμία για 15' με περιστασιακή ανάδευση .

Ακολούθησε εκ νέου φυγοκέντρηση στις 10000rpm/20 min στους 0-4°C

Παρελήφθη υπερκείμενο και διατηρήθηκε στους -80°C για το πολύ 1 μήνα.

Η καταλυόμενη από το ένζυμο αντίδραση αρχίζει με την προσθήκη του υποστρώματος και παρακολουθείται για χρονικό διάστημα 5 λεπτών, αφού έχει προηγηθεί η ισορροπία της αντίδρασης για 1 λεπτό. Η αναστολή ορίστηκε με παρόμοιο τρόπο όπως και στο πείραμα της αναγωγής της αλδόζης.

Καταγράφηκε τελικά η % αναστολή του ενζύμου από τη σχέση:

$$\% \text{ αναστολή} = \frac{\text{ταχύτητα με control} - \text{ταχύτητα με αναστολέα}}{\text{ταχύτητα με control}} \times 100$$

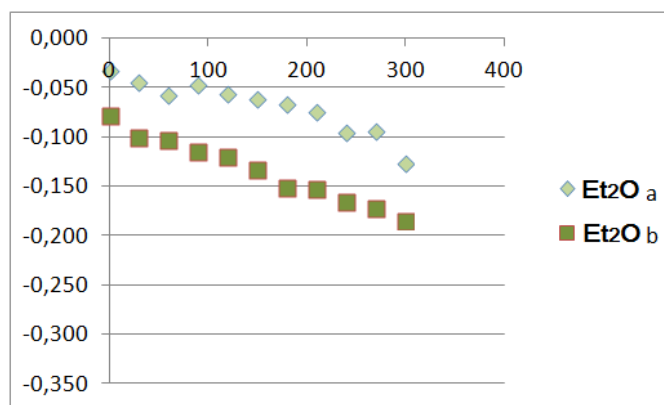
Ως ένωση αναφοράς χρησιμοποιείται η σορβινίλη που υπό τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες προκαλεί αναστολή της ALR2 44.67(±4.37)% σε συγκέντρωση 0.25μM

(δημοσιευμένες τιμές IC50: 0.25μM (Demoroulos and Rekka, 1995)). Για την ALR1 το βαλπροϊκό οξύ αποτελεί καλό αναστολέα της ALR1 (όπως και η φαινοβαρβιτόνη που είναι τυπικός αναστολέας αυτής), ενώ δεν έχει ανάλογη δράση για την ALR2 (μόνο 20% αναστολή σε συγκέντρωση 1mM) και γι' αυτούς τους λόγους μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένωση αναφοράς (Wermuth et al., 1982). Βαλπροϊκό οξύ: 56.1(±2.7)μM, δημοσιευμένες τιμές IC50: 98μM (Poulsom, 1986).

### 16.2.1. Εκχύλισμα διαιθυλαιθέρα

Πίνακας 58 Συγκέντρωση δείγματος 50μg/ml

ALR1	χρόνος		control		Απορροφήσεις 340nm	
	min	sec			Συγκέντρωση 50%	
					EtO	
		0	-0.083	-0.065	-0.032	-0.077
		30	-0.095	-0.089	-0.045	-0.100
1	60		-0.119	-0.094	-0.057	-0.102
	90		-0.141	-0.113	-0.047	-0.114
2	120		-0.162	-0.132	-0.056	-0.119
	150		-0.187	-0.152	-0.062	-0.133
3	180		-0.207	-0.172	-0.066	-0.151
	210		-0.231	-0.190	-0.074	-0.152
4	240		-0.251	-0.208	-0.095	-0.165
	270		-0.271	-0.224	-0.094	-0.171
5	300		-0.287	-0.243	-0.127	-0.184
ταχύτητα αντίδρασης (μον/min)			<b>0.041</b>	<b>0.036</b>	<b>0.019</b>	<b>0.021</b>
MO ταχύτητας αντίδρασης (μον/min)			<b>0.038</b>		<b>0.020</b>	
<i>St.Dev.</i>			<i>0.003676955</i>		<i>0.001697056</i>	
			204	178	95	107
% αναστολή					<b>50.26</b>	<b>43.98</b>
MO % αναστολή					<b>47.12</b>	
					<i>4.442555693</i>	

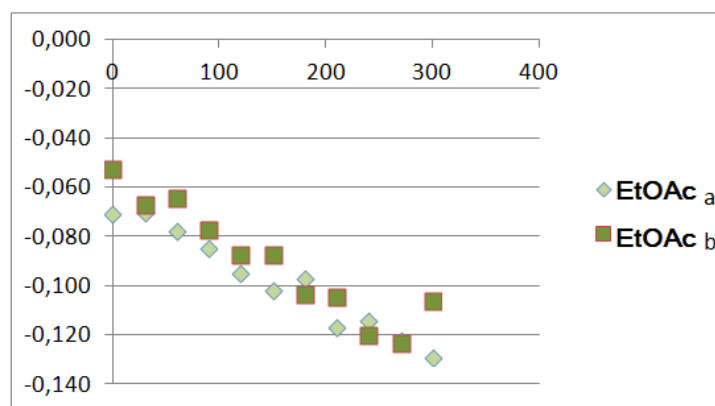


## 16.2.2. Εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα

Πίνακας 59: Συγκέντρωση δείγματος 50μg/ml

ALR1	χρόνος		control	Απορροφήσεις 340nm		
	min	sec		Συγκέντρωση 50%		
				AcOEt		
		0	-0.083	-0.065	-0.071	-0.052
		30	-0.095	-0.089	-0.070	-0.067
1		60	-0.119	-0.094	-0.078	-0.064
		90	-0.141	-0.113	-0.085	-0.077
2		120	-0.162	-0.132	-0.095	-0.087
		150	-0.187	-0.152	-0.102	-0.087
3		180	-0.207	-0.172	-0.097	-0.103
		210	-0.231	-0.190	-0.117	-0.104
4		240	-0.251	-0.208	-0.114	-0.120
		270	-0.271	-0.224	-0.122	-0.123
5		300	-0.287	-0.243	-0.129	-0.106
	ταχύτητα αντίδρασης (μον/min)		0.041	0.036	0.012	0.011
	MO ταχύτητας αντίδρασης (μον/min)		0.038		0.011	
	St.Dev.		0.003676955		0.000565685	
			204	178	58	54
	% αναστολή				69.63	71.73
	MO % αναστολή				70.68	1.480851898

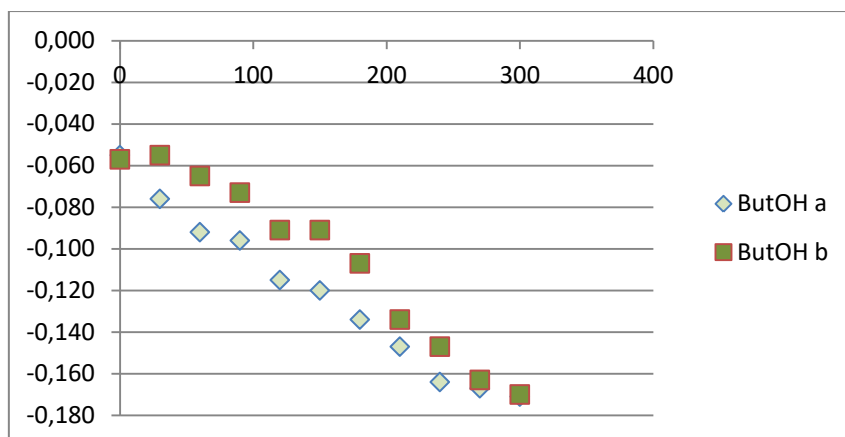




### 16.2.3. Εκχύλισμα βουτανόλης

Πίνακας 60: Συγκέντρωση δείγματος 50μg/ml

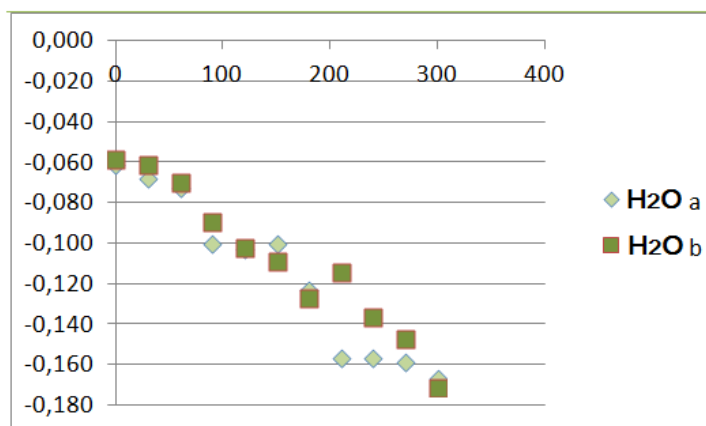
ALR1	χρόνος		control		Απορροφήσεις 340nm	
					Συγκέντρωση 50%	
	min	sec			ΒυOH	
		0	-0.083	-0.065	-0.055	-0.057
		30	-0.095	-0.089	-0.076	-0.055
1		60	-0.119	-0.094	-0.092	-0.065
		90	-0.141	-0.113	-0.096	-0.073
2		120	-0.162	-0.132	-0.115	-0.091
		150	-0.187	-0.152	-0.120	-0.091
3		180	-0.207	-0.172	-0.134	-0.107
		210	-0.231	-0.190	-0.147	-0.134
4		240	-0.251	-0.208	-0.164	-0.147
		270	-0.271	-0.224	-0.167	-0.163
5		300	-0.287	-0.243	-0.171	-0.170
	ταχύτητα αντίδρασης (μον/min)		0.041	0.036	0.023	0.023
	MO ταχύτητας αντίδρασης (μον/min)		0.038		0.023	
	St.Dev.		0.003676955		0.000424264	
			204	178	116	113
	% αναστολή				39.27	40.84
	MO % αναστολή				40.05	
					1.110638923	



### 12.3.4. Υδατικό κλάσμα

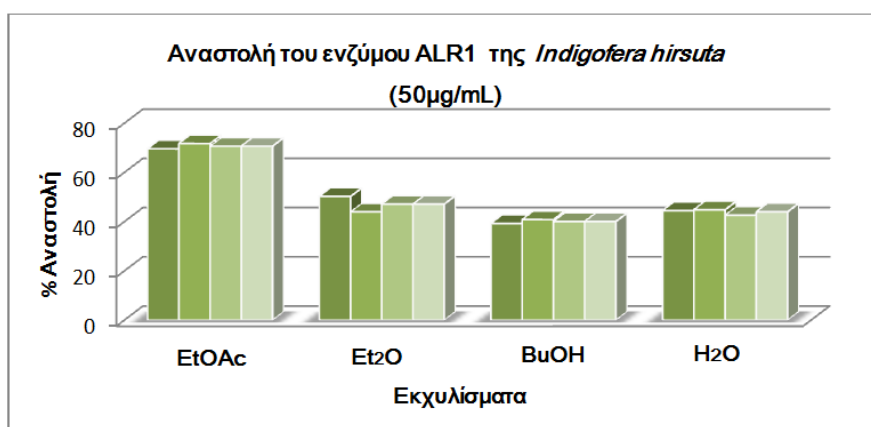
Πίνακας 61: Συγκέντρωση δείγματος 50μg/ml

ALR1	χρόνος		control		Απορροφήσεις 340nm	
	min	sec			Συγκέντρωση 50%	
					H2O	
		0	-0.083	-0.065	-0.061	-0,058
		30	-0.095	-0.089	-0.068	-0,061
1		60	-0.119	-0.094	-0.073	-0,070
		90	-0.141	-0.113	-0.100	-0,089
2		120	-0.162	-0.132	-0.103	-0,102
		150	-0.187	-0.152	-0.100	-0,109
3		180	-0.207	-0.172	-0.123	-0,127
		210	-0.231	-0.190	-0.157	-0,114
4		240	-0.251	-0.208	-0.157	-0,136
		270	-0.271	-0.224	-0.159	-0,147
5		300	-0.287	-0.243	-0.167	-0,171
	ταχύτητα αντίδρασης (μον/min)		<b>0.041</b>	<b>0,037</b>	<b>0.021</b>	<b>0,023</b>
	MO ταχύτητας αντίδρασης (μον/min)		<b>0,0382</b>		<b>0,0219</b>	
	St.Dev.		<i>0.003676955</i>		<i>0.000989949</i>	
			204	178	106	113
	% αναστολή				<b>44.50</b>	<b>40.84</b>
	MO % αναστολή				<b>42.67</b>	
					<i>2.591490821</i>	



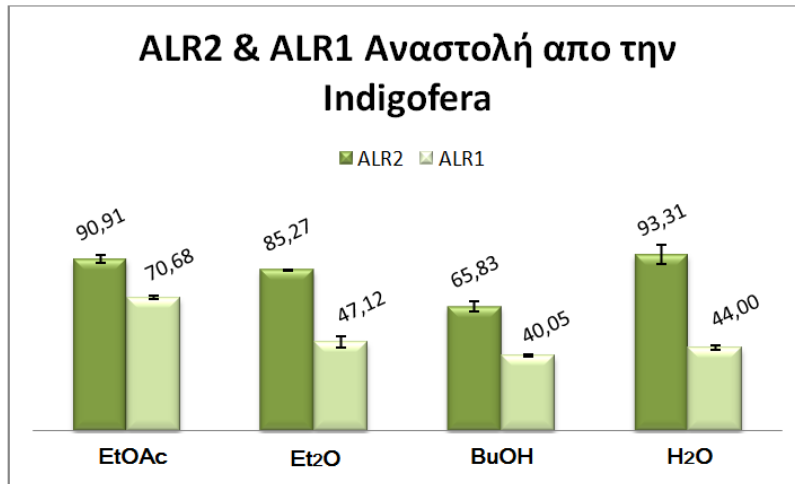
Πίνακας 62: Συγκριτικό ραβδόγραμμα ικανότητας αναστολής της δράσης της αναγωγάσης της αλδεϋδης (ALR1) των εκχυλισμάτων σε συγκέντρωση 50µg/ml

		50µg/ml				
Εκχυλίσματα		Αναστολή a	Αναστολή b	Αναστολή c	MO	St.Dev.
<i>Indigofera</i>	AcOEt	69.63	71.73	70.68	70.68	1.05
<i>hirsuta</i>	Et <sub>2</sub> O	50.26	43.98	47.12	47.12	3.14
	BuOH	39.27	40.84	40.05	40.05	0.79
	H <sub>2</sub> O	44.5	44.84	42.67	44.00	1.17



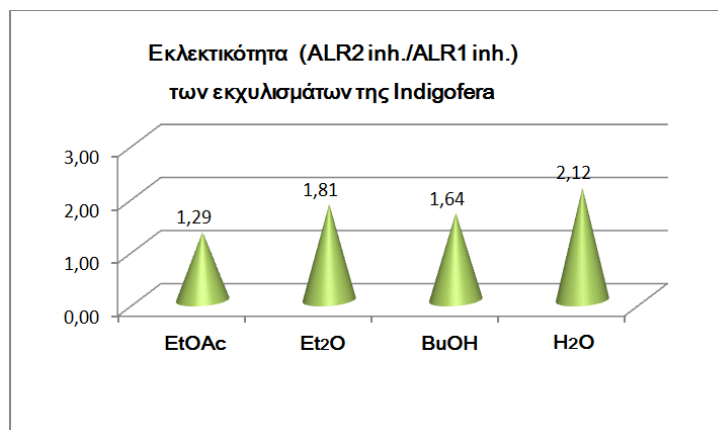
Πίνακας 63: Σύγκριση ικανότητας αναστολής της δράσης της αναγωγάσης της αλδόζης (ALR2) και της δράσης της αναγωγάσης της αλδεϋδης (ALR1)

<i>Indigofera</i>		Αναστολή σε 50µg/ml				Εκλεκτικότητα (ALR2 inh./ALR1 inh.)
		ALR2	St.Dev.	ALR1	St.Dev.	
1	Ethyl acetate	90.91	2.20	70.68	1.05	1.29
3	Et <sub>2</sub> O	85.27	0.32	47.12	3.14	1.81
4	Butanol	65.83	2.82	40.05	0.79	1.64
6	H <sub>2</sub> O	93.31	5.21	44.00	1.17	2.12



- Όσο πιο μεγάλος είναι ο λόγος αναστολής ALR2/αναστολή ALR1 τόσο μεγαλύτερη είναι και η εκλεκτικότητα αφού αναστέλλεται περισσότερο το ένζυμο της ALR2 και λιγότερο το ένζυμο της ALR1.
- Τα εκχυλίσματα που εμφάνισαν την μεγαλύτερη εκλεκτικότητα ήταν το υδατικό, το βουτανολικό και του διαιθυλαιθέρα ενώ το κλάσμα του οξικού αιθυλεστέρα εμφάνισε τη μικρότερη εκλεκτικότητα δεδομένου ότι ο λόγος ήταν πολύ κοντά στο 1.

**Εκλεκτικότητα αναστολής της δράσης της αναγωγή της αλδόζης (ALR2) και της δράσης της αναγωγή της της αλδεΐδης (ALR1)**



## Εκχυλισμα του οξικού αιθυλεστέρα

Το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα μελετήθηκε στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών και βρέθηκε η παρουσία πινιτόλης καθώς και παραγώγων ναριγγενίνης και απιγενίνης. Αποτελέσματα αυτής της μελέτης παρουσιάστηκαν στο 21 Πανελλήνιο Συνέδριο Χημείας 2011 (Karakousi et al., 2011) καθώς και στο 16 Πανελλήνιο Φαρμακευτικό Συνέδριο 2013 (Karakousi et al., 2013). Ενώ αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι προς δημοσίευση (Karakousi et al., 2017).

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η φυτοχημική ανάλυση των υπέργειων τμημάτων του φυτού *Indigofera hirsuta* πραγματοποιήθηκε με συνδυασμό των τεχνικών LC-DAD-MS( ESI<sup>+</sup>) ανάλυσης, φασμάτων υπεριώδους-ορατού, πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (<sup>1</sup>HNMR,<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-COSY,HSQC, HMBC,<sup>13</sup>CNMR) και φασμάτων μάζης. Η ποιοτική ανάλυση των αρχικών εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε σε σύστημα LC-DAD-MS( ESI<sup>+</sup>) και έδειξε την παρουσία παραγώγων φλαβονών, φλαβανονών, φλαβονολών εστεροποιημένων με φαινυλοπροπανοϊκά οξέα, παραγώγων του κινικού οξέος, εστέρων φαινυλοπροπανοϊκών οξέων, παραγώγων υδροξυ βενζοϊκών οξέων, και προκυνιδινών. Οι ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν με την μέθοδο του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (φάσματα NMR) σε συνδυασμό με φάσματα μάζης (MS) ανήκουν στην κατηγορία των φλαβονοειδών (φλαβανόνες, φλαβόνες, φλαβονόλες), δύο στην κατηγορία των υδροξυβενζοϊκών οξέων, 2 στην κατηγορία των φαινυλοπροπανοϊκών οξέων, μία στην κατηγορία των ινδολικών παραγώγων, 2 στην κατηγορία των εστέρων της γλυκερόλης, μια που αντιστοιχεί στην ένωση της στιγμαστερόλης, μια κυκλιτόλη η πινιτόλη, η ουρακίλη και μια μεθυλο γλυκόζη. Είναι η πρώτη φορά που μελετώνται τα εκχυλίσματα του διαιθυλαιθέρα, οξικού αιθυλεστέρα της βουτανόλης και υδατικού εκχυλίσματος του συγκεκριμένου είδους του γένους *indigofera* με ταυτόχρονη απομόνωση ουσιών, έλεγχο οξειδωτικής δράσης, έλεγχο αναστολής της ALR2/ALR1 και έλεγχο αναστολής της λιποξυγονάσης. Ιδιαίτερης σημασίας κρίνεται το γεγονός ότι οι φλαβανόνες που απομονώθηκαν ως καθαρές ουσίες, εμφανίστηκαν ταυτόχρονα ως S- και R- ισομερή και για δεύτερη φορά σε αναλογία 1:1, ενώ για πρώτη φορά απομονώθηκαν με αυτή την αναλογία στο φυτό *Tephrosia humilis*.

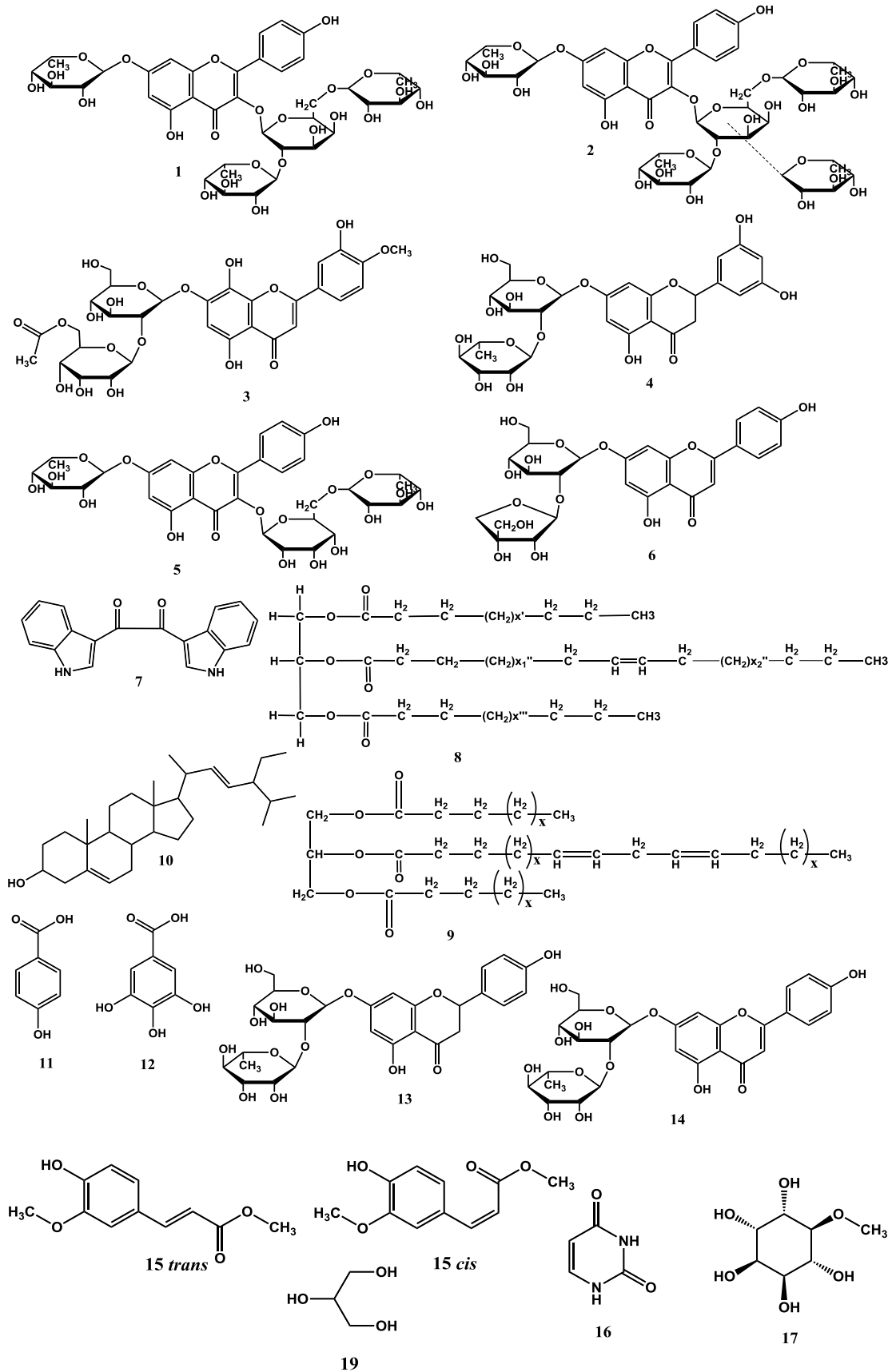
Η αντιοξειδωτική ικανότητα των κατανομών που προέκυψαν από το φυτικό υλικό μελετήθηκε με την δοκιμασία αναγωγής της ελεύθερης ρίζας του DPPH•. Από τη μέθοδο αυτή προκύπτει

ότι τα κλάσματα του οξικού αιθυλεστέρα παρουσίασαν τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δύναμη ανάμεσα σε όλες τις κατανομές, ακολουθούμενα από τα αντίστοιχα κλάσματα της βουτανόλης, του διαιθυλαιθέρα με την κατανομή του υδατικού εκχυλίσματος να εμφανίζει την μικρότερη αντιοξειδωτική δράση. Από τα πειραματικά αποτελέσματα για την ανασταλτική δράση επί της λιποξυγονάσης φυτικής προέλευσης προκύπτει ότι όλα τα εκχυλίσματα πλην του διαθυλαιθέρα εμφανίζουν αναστολή της δράσης της λιποξυγονάσης φυτικής προέλευσης  $\geq 60\%$ . Το ποσοστό αναστολής της δράσης της λιποξυγονάσης φυτικής προέλευσης δεν προσεγγίζει τιμή του ποσοστού αναστολής του NDGA. Η σχετικά αυξημένη αναστολή των δύο εκχυλισμάτων πιθανά να οφείλεται στην παρουσία φλαβονοειδών ικανά να δράσουν ως σαρωτές ελευθέρων ριζών. Επομένως τα εκχυλίσματα του οξικού αιθυλεστέρα και της βουτανόλης με την σχετικά αυξημένη τους ικανότητα να αναστείλουν το ένζυμο της λιποξυγονάσης φυτικής προέλευσης  $\geq 60\%$  χαρακτηρίζονται από αντιφλεγμονώδη δράση.

Επιπροσθέτως, τα πειραματικά αποτελέσματα που προκύπτουν από την αναστολή του ενζύμου της αναγωγής της αλδόζης (ALR2) εμφανίζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, δεδομένου ότι τα εκχυλίσματα τα εκχυλίσματα εμφανίζουν υψηλή αποτελεσματικότητα αναστολής του ενζύμου, αν και πρόκειται για μίγματα ουσιών φυτικών εκχυλισμάτων. Τα κλάσματα που εμφάνισαν την υψηλότερη ικανότητα αναστολής της ALR2 είναι του οξικού αιθυλεστέρα, του διαιθυλαιθέρα και του υδατικού εκχυλίσματος, η οποία κυμαίνεται από 85% έως 93% σε τελική συγκέντρωση 50μg/ml και από 61% έως 84% σε τελική συγκέντρωση 25 μg/ml. Τη μικρότερη ανασταλτική δράση εμφάνισε το κλάσμα της βουτανόλης με αναστολή 66% σε τελική συγκέντρωση 50μg/ml και 61% σε τελική συγκέντρωση 25μg/ml η οποία και στις δύο περιπτώσεις ήταν πάνω από 50%. Όσον αφορά την αναστολή του ενζύμου αναγωγής της αλδεΐδης (ALR1), σε όλες τις περιπτώσεις των κλασμάτων που μελετήθηκαν, προκαλείται μεγαλύτερη αναστολή της ALR2 σε σχέση με την ALR1. Παρατηρήθηκε ότι τα εκχυλίσματα που εμφάνισαν την μεγαλύτερη εκλεκτικότητα ήταν το υδατικό, το βουτανολικό και του διαιθυλαιθέρα ενώ το κλάσμα του οξικού αιθυλεστέρα εμφάνισε τη μικρότερη εκλεκτικότητα δεδομένου ότι ο λόγος ήταν πολύ κοντά στο 1. Το γεγονός ότι το υδατικό εκχύλισμα εμφάνισε υψηλή ανασταλτική δράση έναντι της αναγωγής της αλδόζης (ALR2) μπορεί να οφείλεται στα υψηλά ποσοστά πινιτόλης η οποία δρα ως υπογλυκαιμικός παράγοντας μολονότι δεν έχει βρεθεί κάποια συσχέτιση με το ένζυμο της αναγωγής της αλδόζης.

Τέλος αξίζει να σημειωθεί ότι ορισμένες ουσίες απομονώθηκαν για πρώτη φορά από το γένος *Indigofera* συγκεκριμένα: **1)** ο 3-O-α-L- ραμνοπυρανοζυλο (1<sup>'''</sup>→2<sup>''</sup>) [α-L-ραμνοπυρανοζυλο(1<sup>'''</sup>→6<sup>''</sup>) ]- β-D-γαλακτοπυρανοζυλο-7-O-α-L-ραμνοπυρανοζίτης της

καιμφερόλης, **2**) ο 3-O-α-L- ραμνοπυρανοζυλο (1->2)[α-L-ραμνοπυρανοζυλο(1->6)[α-L- β-D-γαλακτοπυρανοζυλο-7-O-α-L-ραμνοπυρανοζυλο-ραμνοπυρανοζίτης της καιμφερόλης, **3**) 7-O-D-[6'''-O-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοζυλο-(1'''->2'')]-β-D-γλυκοπυρανοζίτης της 4'-O-μεθυλο υποαλετίνης, **4**) 7-O-β-D-Νεοεσπεριδοζίτης της 5,7,3',5' τετραϋδροξυ φλαβανόνης, **5**) η ρομπινίνη, **6**) η απιίνη και **7**) 1,2-Δις(1 Η-ινδολ-3-υλ)αιθαν-1,2-διόνη. Επίσης απομονώθηκε ένα **8**) τριγλυκερίδιο που φέρει έναν ακόρεστο δεσμό ενώ ταυτοποιήθηκε ένα μίγμα **9**) τριγλυκεριδίου με δύο διπλούς δεσμούς και **10**) στιγμαστερόλης. Η δομή των δύο τριγλυκεριδίων δεν ήταν δυνατόν να προσδιοριστεί με ακρίβεια λόγω έλλειψης φασμάτων μάζας. Απομονώθηκαν επίσης το **11**) 4-OH-βενζοϊκό οξύ, **12**) το γαλλικό οξύ, **13**) ναριγγίνη, η **14**) ροϊφολίνη. Ταυτοποιήθηκε επίσης ένα μίγμα **15**) *cis, trans* ισομερών του φερούλικού μεθυλεστέρα, καθώς και ένα μίγμα **16**) πινιτόλης **17**) ουρακίλης **18**) 1-μέθυλο-β-D-γλυκοπιρανόζης και **19**) γλυκερόλης. Από αυτές τις ενώσεις οι **11**), **12**), **13**), **14**), **15**), **5**), **6**) εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση (Manuja et al., 2013), (Asnaashari et al., 2014), (Karamac et al., 2005, 2017), (Tripoli et al., 2007), (Refaat et al., 2015), (Lau et al., 2005), Papay and Antal 2014). Οι ενώσεις **10**), **11**), **12**), **15**) εμφανίζουν αντιφλεγμονώδη δράση (Gabay et al., 2008), (Manuja et al., 2013), (Adefegha et al., 2015). Οι ενώσεις **10**), **11**), **12**), **13**), **14**), **5**), **6**), **16**) είναι γνωστές για την υπογλυκαιμική δράση (Nualkaew et al., 2015), (Peungvicha et al. 1998), (Adefegha et al., 2015), (Jung et al., 2004), (Rao et al., 2011), (Varma and Kinoshita 1976), (Tang et al., 2008), (Gao et al., 2005). Όσον αφορά τα δύο διαστερεοϊσομερή S και R της ναριγγίνης έχει βρεθεί ότι παρουσιάζουν στερεοεκλεκτικότητα σε *in vitro* μελέτες αντιφλεγμονώδους δράσης (Haizhen et al., 2014), (Gaggeri et al., 2013). Γεγονός που υποδηλώνει ότι τα δύο εναντιομερή των φλαβανονών δίνονται να παρουσιάζουν διαφορετική φαρμακολογική δράση και να υφίστανται διαφορετικό μεταβολικό μετασχηματισμό (Yanez et al., 2008).



Πίνακας ταυτοποιημένων ενώσεων του φυτού *Indigofera hirsuta*





## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abraham P., Arul, V., Philip S., Padmakeerthiga B., Madhavan N.R., Sethupathy S., (2010). Effect of *Indigofera aspalathoides* leaf extract on Hepatic Xenobiotic enzymes activity in hamster with DMBA induced oral cancer International Journal of Drug Development and Research 2(3), 476-481
- Adefegha Adeniyi Stephen, Oboh Ganiyu, Ejakpovi Idowu Isaac, Oyeleye Idowu Sunday (2015). Antioxidant and antidiabetic effects of gallic and protocatechuic acids: a structure–function perspective Comparative Clinical Pathology 24, 6, 1579–1585
- Addy M.E., Addo P., Nyarko A.K. (1992). *Indigofera arrecta* prevents the development of hyperglycaemia in the db/db mouse . Phytotherapy Res 6, 1, 25-28
- Addy M.E., Nyarko A.K. (1988). Diabetic patients' response to oral administration of aqueous extract of *Indigofera arrecta*. Phytotherapy Res 2, 4, 192-195
- Afolayan AJ, Meyer JJ. (1997). The antimicrobial activity of 3,5,7-trihydroxyflavone isolated from the shoots of *Helichrysum aureonitens*. J Ethnopharmacol 57:177-81.
- Agnese, A.M.; Perez, C.; Cabrera, J.L. (2001). *Adesmia aegiceras*: antimicrobial activity and chemical study. Phytomedicine 8, 5, 389-394
- Ahmadu, A.A., Onanuga, A., BUEbeshi (2011). Isolation of antibacterial flavonoids from the aerial parts of *Indigofera secundiflora* Pharmacognosy Journal 3(19), 25-28
- Al –Lin. Lin, Bo Liu, Hai-Lin Qin, Simon Mingknen Lee, Yi-Tao Wang, Guan-Huq Du. (2008). Anti-influenza Virus Activities of flavonoids From the Medicinal Plant *Elsholtzia rugulosa* Planta Med. 74 (8): 847-851
- Alexiou Polyxeni, Nicolaou Ioannis Stefek Milan Kristic Albin and Demopoulos Vassilis J. (2008). Design and synthesis of N-(3,5-difluoro-4-hydroxyphenyl) benzenesulfonamides as aldose reductase inhibitors. Bioorganic & Medicinal Chemistry 16, 3926–3932
- Ali, N.A.A., Jülich, W.-D., Kusnick, C., Lindequist, U. (2001). Screening of Yemeni medicinal plants for antibacterial and cytotoxic activities J. Ethnopharmacology 74, 2, 173-179
- Aliou M. Balde, M. Claeys, L. A. Pieters, V. Wray and A.J. Vlietinck (1991). Ferulic Acid Esters from stem bark of *Pavetta Owariensis*. Phytochemistry, Vol.30, No.3 1024-1026, 1991
- Alston T.A., Mela L., Bright H.J. (1977). 3-Nitropropionate, the toxic substance of *Indigofera*, is a suicide inactivator of succinate dehydrogenase Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 74, 9, 3767-3771
- Amala B.E., Ganga, N., Arivudainambi, R. and Santhanam, G. (1982). Indian J. Med. Res 76 115–118
- Amoras, M., Sauvager, F., Girre, L., & Cormier, M. (1992a). In vitro antiviral activity of propolis. Apologie 23, 231-240
- Amoras, M., Simoes, C. M., Girre, L., Sauvager, F., & Cormier, M. (1992b). Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. J Nat Prod 55, 1732-1740
- Anand K.K., Chand D., Ghatak B.J.R. (1979). Protective effect of alcoholic extract of *Indigofera tinctoria* Linn. in experimental liver injury Indian Journal of Experimental Biology 17, 7, 685-687

- Anand K.K. Chand, D., Ghatak B.J.R., Arya R.K. (1981). Histological evidence of protection by *Indigofera tinctoria* Linn. against carbontetrachloride induced hepatotoxicity - An experimental study Indian Journal of Experimental Biology 19, 3, 298-300
- Andreou A.-Z., Brodhun F., Feussner I., (2009b). Biosynthesis of oxylipins in nonmammals. Prog. Lipid Res.. doi:10.1016/j.plipres.2009.1002.1002
- Arora A., Nair M. G., and Strasburg G. M. (1998). Free Radical Biol. Med. 24, 1355–1363
- Arriaga Angela M. C., Lemos Telma L. G., Santiago Gilvandete M. P., Andrade-Neto Manoel, Braga Milena A. de Almeida Macia C. S., Gomes Tathilene B. M., Rodrigues Francisco E. A., Nunes Jackson, Vasconcelos, Alves Pericles B. (2013) Chemical composition and antioxidant activity of *Indigofera suffruticosa* Chemistry of Natural Compounds, 49, 1
- Arriaga A.M.C., Andrade-Neto M., Malcher G.T., Gomes T.B.M., Vasconcelos J.N. Rodrigues A.C.P., De Oliveira, M.C.F., Santiago G.M.P. (2008). Composition of the essential oil of *Indigofera microcarpa* from the Northeast of Brazil Chemistry of Natural Compounds 44, 2,245-246
- Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine Volume 2 Issue 12 December (2012). Pages 966-974
- Asnaashari M, Farhoosh R, Sharif A (2014), Antioxidant activity of gallic acid and methyl gallate in triacylglycerols of Kilka fish oil and its oil-in-water emulsion. Food Chem. 15;159:439-44
- Asuntha G., Prasannaraju Y., Prasad K.V.S.R.G. (2010). Effect of ethanol extract of *Indigofera tinctoria* Linn (Fabaceae) on lithium/pilocarpine-induced status epilepticus and oxidative stress in wistar rats Tropical J. Pharm. Res 2, 149-156
- Athar M., An K. P., Morel K. D., Kim A. L., Aszterbaum M., Longley J., et al. (2001). Ultraviolet B(UVB)-induced cox-2 expression in murine skin: An immunohistochemical study. Biochemical and Biophysical Research Communications, 280, 1042–1047
- Atiku I, Musa A.M and Sule M.I (2013). Isolation of stigmasterol from methanolic extract of *Cissus cornifolia baker* (Planch) Nigerian Journal of Pharmaceutical Sciences 12, 1
- Awad H.M., Boersma M.G., Vervoort J., Rietjens I.M.C.M. (2000). Peroxidase-catalysed formation of quercetin-quinone methide glutathione adducts. Arch. Biochem. Biophys. 378, 224
- Awadh N.A. Ali W.-D Jülich C Kusnick, U Lindequist (2001). Screening of Yemeni medicinal plants for antibacterial and cytotoxic activities Journal of Ethnopharmacology 74, 2,173-179
- Back M. Inhibitors of the 5-lipoxygenase pathway in atherosclerosis (2009). Curr. Pharm. Des., 15, 3116–3132
- Bae EA, Han MJ, Kim DH. (1999). In vitro anti-Helicobacter pylori activity of some flavonoids and their metabolites. Planta Med 65:442-3
- Balamurugan G., Muralidharan P. (2010). Effect of *indigofera tinctoria* on  $\beta$ -amyloid (25-35) mediated Alzheimer's disease in mice: Relationship to antioxidant activity Bangladesh J. Pharmacol 5,1, 51-56
- Balasubramanian R., Narayanan, M., Kedalgovindaram L., Rama K.D. (2007). Cytotoxic activity of flavone glycoside from the stem of *Indigofera aspalathoides* Vahl Journal of Natural Medicines , 61, 1, 80-83
- Balde M. Aliu, Claeys M., Pieters L.A., Wray V. and Vlietinck A.J. Ferulic Acid Esters from stem bark of *Pavetta Owariensis*. (1991). Phytochemistry, 30,3 1024-1026

- Bangar A.V., Saralaya M.G. (2011). Anti-hyperglycaemic activity of ethanol extract and chloroform extract of *Indigofera tinctoria* leaves in streptozotocin induced diabetic mice (Family-Papilionaceae) Res. J. Pharmaceutical, Biol. and Chem. Sci 2, 1, 445-455
- Bashir AK, Abdalla AA, Wasfi IA, Hassan ES, Amiri MH, Crabb TA. (1994). Flavonoids of *Limonium axillare*. Int J Pharmacogn 22:366-72
- Bates S.H.; Jones R.B.; Baily C.J. (2000). Insulin-like effect of pinitol. Br.J.Pharmacol., 130, 1944-1948
- Batt D.G.; Maynard G.D.; Petraitis J.J.; Shaw J.E.; Galbraith W.; Harris R.R. (1990). 2-Substituted-1-Naphthols as Potent 5-Lipoxygenase Inhibitors with Topical Antiinflammatory Activity. J. Med. Chem., 33, 360–370
- Bertorello A. M., Aperia A., Walaas S. I., Nairn A. C., & Greengard P. (1991). Phosphorylation of the catalytic subunit of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase inhibits the activity of the enzyme. Proc Natl Acad Sci USA 88, 11359-11362
- Bird T.G.C.; Bruneau P.; Crawley G.C.; Edwards M.P.; Foster S.J.; Girodeau J.M.; Kingston J.F.; McMillan R.M. (1991). (Methoxyalkyl)thiazoles: A new series of potent, selective, and orally active 5-lipoxygenase inhibitors displaying high enantioselectivity. J. Med. Chem, 34, 2176–2186
- Bobe G., Albert P. S., Sansbury L. B., Lanza E., Schatzkin A., Colburn N. H., et al. (2010). Interleukin-6 as a potential indicator for prevention of high risk adenoma recurrence by dietary flavonols in the polyp prevention trial. Cancer Prevention Research (Phila), 3(6), 764–775
- Boersma M.G., Vervoort J., Szymusiak H., Lemanska K., Tyrakowska B., Cenas N., Segura-Aguilar J., Rietjens I.M.C.M., (2000). Regioselectivity and reversibility of the glutathione conjugation of quercetin quinone methide. Chem. Res. Toxicol. 13, 185
- Bohlmann F., Zdero C., King R.M., Robinson H., (1981). Thirteen kolavane derivatives from *Symphyopappus* species. Phytochemistry 20, 7, 1657-1663
- Bonni. A., Brunet. A., West. A. E., Datta. S. R., Takasu. M. A., & Greenberg. M. E. (1999). Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcriptiondependent and -independent mechanisms. Science, 286, 1358–1362
- Boopala Bhagavan, N., Arunachalam S., Dhasarathan P., Kannan N.D. (2013). Evaluation of anti inflammatory activity of *indigofera aspalathoides* vahl in swiss albino mice Journal of Pharmacy Research 6, 3, 350-354
- Borhani D.W., Harter T.M., Petrash J.M. (1992). The crystal structure of the aldose reductase. NADPH binary complex. J.Biol.Chem 267, 24841-7
- Bors W., Heller W., Michel C., Saran M. (1990). Flavonoids as antioxidants, determination of radical-scavenging efficiencies. Methods Enzymol 186, 343-355
- Brown J.P., (1980). A review of the genetic effects of naturally occurring flavonoids, anthraquinones and related compounds. Mut. Res. 75, 243
- Bosio K, Avanzini C, D'Avolio A, Ozino O, Savoia D. (2000). In vitro activity of própolis against *Streptococcus pyogenes*. Lett Appl Microbiol 31,174-7
- Brand-Williams W.; Cuvelier M. E.; Berset C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensm. Wiss. Technol 28, 25-30

- Brinkworth RI, Stoermer MJ, Fairlie DP. (1992). Flavones are inhibitors of HIV-1 proteinase. *Biochem Biophys Res Commun* 188:631-7
- Brock TG, McNish RW, Coffey MJ, Ojo TC, Phare SM, Peters-Golden M. (1996). Effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on eicosanoid production by mononuclear phagocytes. *J Immunol.*;156 (7):2522-2527
- Bueno Pérez L., Li, J., Lantvit, D.D., (...), Lucas, D.M., Kinghorn, A.D.(2013) Bioactive constituents of *indigofera spicata* *Journal of Natural Products* 76(8), 1498-1504
- Bruneton J., *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Medicinales* (2<sup>nd</sup> edition) *Technique et Documentation*, Lavoisier (1993)
- Caccamese S., Chillemi R., (2010). Racemization at C-2 of naringin in pummel (*Citrus grandis*) with increasing maturity determined by chiral high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr A* 1217 (7), 1089-1093
- Cafarchia C, De Laurentis N, Milillo MA, Losacco V, Puccini V. (1999). Antifungal activity of Apulia region própolis. *Parassitologia* 41:587-90
- Cagliani Augusta, Coisson Jean Daniel, Travaglia Fabiano, Acquotti Domenico, Palla Geraldo, Palla Luigi, Arlorio Marco.(2014). Application of 1h NMR for the characterization and authentication of Tonda Gentile Trilobata hazelnuts from Piedmont (Italy).*Food Chem.* 148, 77-85
- Cao G., Sofic E., and Prior R. L. (1997). *Free Radical Biol. Med.*, 22,749-760
- Carpeneo F., Bortignon C., Bruni A., & Santi R. (1969). Effect of quercetin on membrane-linked activities. *Biochem Pharmacol* 18, 1495-1500
- Carper D., Nishimura C., Graham C., Wistow G., Shinohara T., Watanabe K., Hayaishi O., (1988). The primary structure of rat lens aldose reductases. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 29, 319
- Carper D.A.; Wistow G.; Nishimura C.; Graham C.; Watanabe K.; Fujii Y.; Hayashi H.; Hayaishi O. (1989). A superfamily of NADPH-dependent reductases in eucaryotes and prokaryotes. *Exp. Eye Res*, 49, 377-388
- Charleson S.; Evans J.F.; Leger S.; Perrier H.; Prasit P.; Wang Z.; Vickers P.J. (1994). Structural requirements for the binding of fatty acids to 5-lipoxygenase-activating protein. *Eur. J. Pharmacol.*, 267, 275-280
- Chen Z. Y., Chan P. T., Ho K. Y., Fung K. P. and Wang J. (1996) *Chem. Phys. Lipids* 79 157-163
- Chen L. W., Egan L., Li Z. W., Greten F. R., Kagnoff M. F., & Karin M. (2003). The two faces of IKK and NF-kappaB inhibition: Prevention of systemic inflammation but increased local injury following intestinal ischemiareperfusion. *Nature Medicine*, 9(5), 575-581
- Chensue SW, Kunkel SL. (1983). Arachidonic acid metabolism and macrophage activation. *Clin Lab Med.*; 3(4):677-694
- Choi E. J., & Ahn W. S. (2009). Kaempferol induced the apoptosis via cell cycle arrest in human breast cancer MDA-MB-453 cells. *Nutr Res Pract*, 2(4), 322-325
- Choi S. U., Kim K. H., Choi E. J., Park S. H., Lee C. O., Jung N. P., Yoon S.K., & Ryu S. Y. (1999). P-glycoprotein (Pgp) does not affect the cytotoxicity of flavonoids from *Sophora flavescens*, which also have no effects on Pgp action. *Anticancer Res* 19, 2035-2040

- Christina A.J.M., Jose M.A., Heison Robert S.J., Kothai R., Chidambaranathan N., Muthumani, P. (2003). Effect of *Indigofera aspalathoides* against Dalton's ascitic lymphoma Fitoterapia 74, 3, 280-283
- Claimer, C.S., Mahesh, A., Sinilal, B., Rao, D.M., Thangadurai, D. (2012) Protective effect of *Indigofera aspalathoides* roots on N-nitrosodiethylamine-induced hepatocarcinogenesis in mice Ind. J. Pharm. Sci. 74, 2, 157-160
- Clifford H. Pokorny J., Yanishlieva N., Gordon M. (Eds), Woodhead Pbs. Ltd. Cambridge, (2001). Sources of natural antioxidants, Oilseeds, nuts, cereals, legumes, animal products and microbial sources. In Antioxidants in food. UK, 3, 160-166
- Clifford M. N., Knight S., Surucu B., & Kuhnert N. (2006a). Characterization by LC-MS of four new classes of chlorogenic acids in green coffee beans: Dimethoxycinnamoylquinic acids, diferuloylquinic acids and feruloyl-dimethoxycinnamoylquinic acids. J. Agric Food Chem. 54, 1957-1969
- Clifford M. N., Zheng W. & Kuhnert N. Profiling the chlorogenic acids of aster by HPLC-MS<sup>n</sup>. Phytochem. Anal. (2006b), 17:384
- Clifford Michael. N., Knight Susan and Kuhnert Nikolai (2005). Discriminating between the Six Isomers of Dicafeoylquinic Acid by LC-MS<sup>n</sup> J. Agric. Food Chem. 53, 3821-3832
- Colgan SP, Serhan CN, Parkos CA, DelpArcher C & Madara JL (1993). Lipoxin A4 modulates transmigration of human neutrophils across intestinal epithelial monolayers. J. Clin. Invest., 92: 75-82
- Connolly P.J.; Wetter S.K.; Beers K.N.; Hamel S.C.; Chen R.H.K.; Wachter M.P.; Ansell J.; Singer M.M.; Steber M.; Ritchie D.M. (1999). N-Hydroxyurea and hydroxamic acid inhibitors of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. Bioorg. Med. Chem. Lett., 9, 979-984
- Constantino L.; Rastelli G.; Vianello P.; Cignarella G.; Barlocco D. (1999). Diabetes complications and their potential prevention: Aldose reductases inhibition and other approaches. Med. Res. Rev 19, 3-23
- Costantino L, Rastelli G, Gamberini MC, Barlocco D (2000) Pharmacological approaches to the treatment of diabetic complications. Expert Opin Ther Pat 10: 1245-1262
- Cooke A.R., (1955). The toxic constituent of *Indigofera endecaphylla*. Arch. Biochem. Biophys. 55, 1, 114-120.
- Corey E.J.; Wright S.W.; Matsuda S.P.T. (1989). Stereochemistry and mechanism of the biosynthesis of leukotriene A4 from 5(S)-hydroperoxy-6(E),8,11,14(Z)-eicosatetraenoic acid. Evidence for an organoiron intermediate. J. Am. Chem. Soc., 111, 1452-1455
- Cortes J. R., Perez-G M., Rivas M. D., & Zamorano J. (2007). Kaempferol inhibits IL-4-induced STAT6 activation by specifically targeting JAK3. J. Immunol. 179, 3881-3887
- Crawley G.C.; Dowell R.I.; Edwards P.N.; Foster S.J.; McMillan R.M.; Walker E.R.H.; Waterson D.; Bird T.G.; Bruneau P.; Girodeau J.M. (1992). Methoxytetrahydropyrans. A new series of selective and orally potent 5-lipoxygenase inhibitors. J. Med. Chem., 35, 2600-2609
- Critchfield JW, Butera ST, Folks TM. (1996). Inhibition of HIV activation in latently infected cells by flavonoid compounds. AIDS Res Hum Retroviruses 12:39-46
- Cushnie TPT, Hamilton VES, Lamb AJ. (2003). Assessment of the antibacterial activity of selected flavonoids and consideration of discrepancies between previous reports. Microbiol Res 158:281-9

- Cuvelier, M.E; Richard, H.; Berset, C. **(1992)**. Comparison of activity of some acid phenols, Structure-activity relationship. *Biosci. Biotech. Biochem* 56, 324-325
- Dahot. M.Umar **(1999)**. Antibacterial and antifungal activity of small protein of *Indigofera oblongifolia* leaves J. Ethnopharmacol, 64, 3, 277-282
- Dall' Agnol R, Ferraz A, Bernardi AP. **(2003)**. Antimicrobial activity of some *Hypericum* species. *Phytomedicine* 10:511-6
- Daniels D. G. H., King H. G. C. and Martin H. F. **(1963)**. Antioxidants in oats: esters of phenolic acids. *J.Sci.Fd. Agric.*, 14, 385, 387, 388
- De Lima A.K., Cavalcanti De Amorim, E.L., Mendonça De Aquino, T., Sampaio De Andrade Lima, C., Magalhães De Mendonça Pimentel, R., Higino, J.S., De Albuquerque, U.P. **(2003)**. Pharmacognostical study of *Indigofera microcarpa* Desv. (Fabaceae) *Braz. J. Pharm. Sci.* 39, 4
- De Moraes M.A., Souza E., Bieber L.W., De Mello J.F., Cavalcanti M.S.B., Da Silva Filho A.A., Do Nascimento S.C. **(1991)**. Antimicrobial activity of *Indigofera microcarpa* benzofurans *Fitoterapia* 62, 6, 514-516
- De Vriese, A.S.; Verbeuren, T.J.; Van de Voorde, J.; Lameire, N.H.; Vanhoutte, P.M. **(2000)**. Endothelial dysfunction in diabetes. *Br. J. Pharmacol* 130, 963-974
- Del Corso A., Cappiello M., Mura U., **(2008)**. From a dull enzyme to something else: facts and perspectives regarding aldose reductase. *Curr.Med.Chem* 15, 1452-61
- Del Rio D., Stewart A., Mullen W., Burns J., Lean M., Brighenti F., et al. **(2004)**. HPLC-MS analysis of phenolic compounds and purine alkaloids in green and black tea. *Journal of Agricultural and Food Chem.* 52, 2807-2815
- Dhakal Ram Chandra, Rajbhandari Meena, Kalauni Surya K., Awale Suresh, Gewali Mohan. B. **(2008)**. *J.Nepal Chem.Soc.*, 23, 89-92
- Demopoulos V.J.; Zaher N.; Zika Ch.; Anagnostou K., Mamadou E.; Alexiou P.; Nicolaou I. **(2005)**. Compounds that combine aldose reductases inhibitory activity and ability to prevent the glycation (glycation and/or fructation) of proteins as putative pharmacotherapeutic agents. *Drug Design Reviews Online* 2, 293-304
- Dewick .M. *Paul Medicinal Products: A Biosynthetic Approach* . Third Edition. Wiley
- de Sa A., Fernando R., Barreiro E. J., Fraga M., and Alberto C. **(2009)**. From nature to drug discovery: the indole scaffold as a 'privileged structure'. *Mini Rev. Med. Chem.* 9, 782-793
- Dini I., Tenore G.C, Dini A. **(2004)**. Phenolic constituents of *Kancolla* seeds *Food Chem.* 84 163-168
- Dkhil M.A., Al-Khalifa M.S., Al-Quraishy S., Zrieq R., Moneim A.E.A. **(2016)**. *Indigofera oblongifolia* mitigates lead-acetate induced kidney damage and apoptosis in a rat model *Drug Des Devel and Ther* 10, 2 ,1847-1856
- Dkhil M.A., Moneim A.E.A., Al-Quraishy S. **(2016)**. *Indigofera oblongifolia* Ameliorates Lead Acetate-Induced Testicular Oxidative Damage and Apoptosis in a Rat Model *Biol Trace Elem Res* 173, 2, 1, 354-361
- Dkhil M.A., Lubbad M.Y., Al-Shaebi E.M., Delic D., Al-Quraishy S. **(2015)**. The antiplasmodial and spleen protective role of crude *indigofera oblongifolia* leaf extract traditionally used in the treatment of malaria in Saudi Arabia *Drug Des Devel Ther* 9, 6235-6246

- Dominguez X.A., Martinez C., Calero A., Dominguez Jr., X.A., Hinojosa M., Zamudio A., Zabel V., Smith W.B., Watson W.H. (1978). Louisfieserone, an unusual flavanone derivative from *Indigofera suffruticosa*, Mill. Tetrahedron Letters Volume 19, 5, 429-432
- Dorland's Pocket Medical Dictionary 24<sup>th</sup> edition
- Du G-H, Qiu Y, Tian Y-E, Zhang J-T (1995). Prevention of galactose –induced cataractogenesis in rats by salvianolic acid A. Acta. Pharm.Sin 30:561-566
- Dufourc Erick J. (2008). The role of phytosterols in plant adaptation to temperature Plant Signal Behav 3:2, 133-134
- El- Kabbani O., Podjiarny. (2007). Selectivity determinants of the aldose and aldehyde reductases inhibitor-binding sites. Cell. Mol, Life Sci. 64 1970-1978
- El-Abyad MS, Morsi NM, Zaki DA, Shaaban MT. (1990). Preliminary screening of some Egyptian weeds for antimicrobial activity. Microbios; 62:47-57
- El-Kabbani O., Narayana S.V.L., Babu Y.S., Moore.K.M., Flynn T.G., Petrash J.M., Westbrook E.M., De Lucas L.J., Bugg C.E., (1991). Purification crystallization and preliminary chrystallographic analysis of porcine aldose reductases. J. Mol.Biol. 218, 695-698
- El-Kabbani O., Wilson D.K., Petrash M., Quioccho F.A (1998). Structural features of the aldose reductases inhibitor-binding sites. Mol. Vis. 4,19-26
- El-Sayed M., and Verpoorte R. (2007). *Catharanthus* terpenoid indole alkaloids: biosynthesis and regulation. Phytochem. Rev. 6, 277–305
- Evans J.F.; Ferguson A.D.; Mosley R.T.; Hutchinson J.H. (2008) What's all the FLAP about? 5-lipoxygenase-activating protein inhibitors for inflammatory diseases. Trends Pharmacol. Sci., 29, 72–78
- Evans P., Halliwell B. (2001). Micronutrients, oxidant/antioxidant status Brit.J Nutr 85, S67-S74
- Farzana Panhwar. (2005). Chemistry and biochemistry of Legume, with cultural activities in Sindh
- Fearnley J. (2001). Bee propolis. London, UK: Souvenir Press Ltd
- Ferreira E.S.B., Hulme A.N., McNab H., Quye A., (2004). The natural constituents of historical textile dyes. Chem. Soc. Rev. 33, 329-336
- Fesen MR, Pommier Y, Leteurtre F, Hiroguchi S, Yung J, Kohn KW. (1994). Inhibition of HIV-1 integrase by flavones, caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and related compounds. Biochem Pharmacol 48:595-608
- Fierro IM, Serhan CN. (2001). Mechanisms in anti-inflammation and resolution: the role of lipoxins and aspirin-triggered lipoxins. Braz J Med Biol Res.; 34(5):555-66
- Finnegan R. A. and W. H. Muller (1965). Chemical examination of a toxic extract of *Indigofera endecaphylla*. The endecaphyllins J.Pharm.Sci, 54, 1136-1144
- Finnegan A., Grusby M. J., Kaplan C. D., O'Neill S. K., Eibel H., Koreny T., et al. (2002). IL-4 and IL-12 regulate proteoglycan-induced arthritis through statdependent mechanisms. J. Immunol., 169(6), 3345–3352
- Fletcher H. G., Anderson L., and Lardy H. (1951). J. Org. Chem. 16, 1238
- Folco G.; Murphy R. C. (2006). Pharmacol. Rev., 58, 375



- Friedman B.S.; Bel E.H.; Buntinx A.; Tanaka W.; Han Y.R.; Shingo S.; Spector R.; Sterk P. **(1993)**. Oral Leukotriene Inhibitor (MK-886) Blocks Allergen-induced Airway Responses. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 147, 839–844
- Fruchtmann R.; Mohrs K.H.; Hatzelmann A.; Raddatz S.; Fugmann B.; Junge B.; Horstmann H.; Muller-Peddinghaus R. **(1993)**. In vitro pharmacology of BAY X1005, a new inhibitor of leukotriene synthesis. *Agents Actions*, 38, 188–195
- Fukai Toshio, Marumo Ai, Kaitou Kiyoshi, Kanda Toshihisa, Terada Sumio, Nomura Taro. **(2002)**. Anti-Helicobacter pylori flavonoids from licorice extract. *Life Sciences* 71 1449-1463
- Fukui H, Goto K, Tabata M. **(1988)**. Two antimicrobial flavanones from the leaves of *Glycyrrhiza glabra*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 36:4174-6
- Funari C.S., Passalacqua T.G., Rinaldo D., Napolitano A., Festa M., Capasso A., Piacente S., (...), Silva D.H.S., **(2011)**. Interconverting flavanone glucosides and other phenolic compounds in *Lippia salviaefolia* Cham. Ethanol extracts, *Phytochemistry* 72 (16), 2052-2061
- Gabay O.H., Sanchez C., Chevy F., Breton M., Nourissat G., Wolf C., Berenbaum F. **(2008)**. Anti-inflammatory properties of stigmaterol in cartilage: New insights. *Osteoarthritis and Cartilage* 16,4,S79
- Galati G., Chan T., Wu B., O'Brien P.J., **(1999)**. Glutathione-dependent generation of reactive oxygen species by the peroxidase-catalyzed redox cycling of flavonoids. *Chem. Res. Toxicol.* 12, 521
- Galati G., Moridani M.Y., Chan T.S., O'Brien P.J., **(2001)**. Peroxidative metabolism of apigenin and naringenin versus luteolin and quercetin: glutathione oxidation and conjugation. *Free Rad. Biol. Med.* 30, 370
- Gaggeri R, Rossi D, Daglia M, Leoni F, Avanzini MA, Manellic M, Juza M, Collina S. **(2013)**. An eco-friendly enantioselective access to (R)-naringenin as inhibitor of proinflammatory cytokine release. *Chem. Biodivers.*; 10:1531-1538
- Gao Z., Huang K., Yang X., Xu H., **(1999)**. Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of *Scutellaria baicalensis* Georgi, *Biochim Biophys Acta* 472 643-650
- Gao Yunfeng, Zhang Mengna, Wu Tianchen, Xu Mengying, Cai Haonan, and Zhang Zesheng **(2005)**. Effects of D-Pinitol on Insulin Resistance through the PI3K/Akt Signaling Pathway in Type 2 Diabetes Mellitus Rats *J. Agric. Food Chem.*, 63 (26), 6019–6026
- Garbhapu A., Yalavarthi P., Koganti P. **(2011)**. Effect of ethanolic extract of *Indigofera tinctoria* on chemically-induced seizures and brain GABA levels in albino rats *Iran J. Basic Med. Sci* 14 (4),318-326
- Garcez W. S.; Garcez F. R.; Honda N. K.; DaSilva A. J. R. **(1989)**. A nitropropanoyl-glucopyranoside from *Indigofera suffruticosa*, *Phytochemistry*, 28 1251-1252
- Garcez W.S., Garcez F.R., Barison, A. **(2003)**. Additional 3-nitropropanoyl esters of glucose from *Indigofera suffruticosa* (Leguminosae) *Biochem. Syst. Ecol.* 31(2), pp. 207-209
- German B.J., Dillard C.J. **(1998)**. Phytochemicals and targets of chronic disease. In *Phytochemicals. A new paradigm*. Bidlack W.R., Omaye S.T., Meskin M.S., Jahner D. (Eds). Technomic Publishing Company, Inc. Pennsylvania, USA, , Ch.2. 13-14
- Ghiasuddin, Rehman T.U., Arfan M., Liaqat W., Waliullah Rauf A., Khan I., Mohammad G., Choudhary M.I. **(2011)**. In-vitro pharmacological investigations of aerial parts of *Indigofera heterantha* *J. Med. Plant Res.* 5, 24, 30 , 5750-5753

- Gillard J.; Ford-Hutchinson A.W.; Chan C.; Charleson S.; Denis D.; Foster A.; Fortin R.; Leger S.; McFarlane C.S.; Morton H. **(1989)**. L-663,536 (MK-886) (3-[1-(4-chlorobenzyl)-3-t-butylthio-5-isopropylindol-2-yl]-2,2-dimethylpropanoic acid), a novel, orally active leukotriene biosynthesis inhibitor. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 67, 456–464.
- Gillmor S.A.; Villasenor A.; Fletterick R.; Sigal E.; Browner M.F. **(1997)**. The structure of mammalian 15-lipoxygenase reveals similarity to the lipases and the determinants of substrate specificity. *Nat. Struct. Biol.*, 4, 1003–1009
- Gonzalez David Raya, Pamatz-Bolanos Teresa, del Rio-Torres Rosa E., Martinez- Munoz Rosa E., Echeverria-Oscar Ron, and Martinez-Pacheco Mauro M. **(2008)**. D-(+)-Pinitol, a Component of the Heartwood of *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. *Z. Naturforsch.* 63c, 922D924
- Gupta R.K., Chatterjee P.C. **(1982)**. The fibrinolytic effect of leguminosae plant seeds extracts on human fibrinogen *Indian J Pathol Microbiol* 25, 4, 237-241
- Awad H.M., Boursma S., van Bladeren P.J., Vervoort J., Rietjens I.M.C.M., **(2001)**. Structure–activity study on the quinone/quinone methide chemistry of flavonoids. *Chem. Res. Toxicol.*, 14 pp. 398–408
- Halfon Belkis, Ciftci Ece, Topcu Gulacti **(2013)**. Flavonoid constituents of *Sideritis caesarea*. *Turk J Chem* 37: 464-472
- Hagen S. E., Prasad J. V., Boyer F. E., Domagala J.M., Ellsworth E. L., Gajda C., Hamilton H. W., Markoski L. J., Steinbaugh, B.A., Tait, B. D., Lunney, E. A., Tummino, P. J., Ferguson, D., Nouhan, C., Gracheck, S. J., Saunders, J. M., & VanderRoest, S. **(1997)**. Synthesis of 5,6-dihydro-4-hydroxy-2-pyrones as HIV-1 protease inhibitors: the profound effect of polarity on antiviral activity. *J Med Chem* 40, 3707-3711
- Haldar P.K., Bhattacharya S., Bala A., Kar B., Mazumder U.K., Dewanjee S. **(2010)**. Chemopreventive role of *Indigofera aspalathoides* against 20-methylcholanthrene-induced carcinogenesis in mouse. *Toxicol Environ Chem.* 92, 9, 1749-1763
- Harborne J.B Dey P.M. **(1989)**. *Methods in plant biochemistry/ series editors P.M. Dey and J.B Harborne*
- Harizi H, Gualde N. **(2002)**. Dendritic cells produce eicosanoids, which modulate generation and functions of antigen-presenting cells. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.*; 66(5-6):459–466
- Harizi H, Juzan M, Moreau JF, Gualde N. **(2003)**. Prostaglandins inhibit 5-lipoxygenase-activating protein expression and leukotriene B4 production from dendritic cells via an IL-10-dependent mechanism. *J Immunol.*;170(1):139–146
- Harizi Hedi and Gualde Norbert **(2004)**. 5-Lipoxygenase Pathway, Dendritic Cells, and Adaptive Immunity. *J. Biomed. Biotechnol.* :2, 99–105
- Hasan A., Ahmad I., Khan, M.A., Chudhary M.I. **(1996)**. Two flavonol triglycosides from flowers of *Indigofera hebeptala*. *Phytochemistry* 43, 5, 1115-1118
- Haizhen Li, Chao Li, Tao Shen, Lijuan Zhao, Dongmei Ren **(2014)**. *R*-eriodictyol and *S*-eriodictyol exhibited comparable effect against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in EA.hy926 cells *Drug Discoveries & Therapeutics.* 2014; 8(5):218-224
- Hasan, A., Farman, M. **(1993)**. Constituents of *Indigofera hebeptala* leaves *Fitoterapia* 64, 5, 479

- Hashmi Muhammad Ali, Khan Afsar, Ayub Khurshid, Farooq Umar. (2014). Spectroscopic and density functional theory studies of 5,7,3',5'-tetrahydroxyflavanone from the leaves of *Olea ferruginea*. *Spectrochim Acta Mol. Biomol. Spectrosc.* 128, 225-230
- Hegarty M.P., Pound, A.W. (1968). Indospicine, a new hepatotoxic amino-acid from *Indigofera spicata* *Nature*, 217, 5126, 354-355
- Heijnen C. G. M., Haenen G. R. M. M, van Acker F. A. A. van der Vijgh W. J. F. and Bast A. (2001). Flavonoids as peroxynitrite scavengers: the role of the hydroxyl groups. *Toxicol. in Vitro* 15, 3–6
- Heijnen C. G. M., Haenen G. R. M. M., Vekemans J. A. J. M. and Bast A. (2001). Peroxynitrite scavenging of flavonoids: structure activity relationship. 10, 199–206
- Hennig, R.; Grippo, P.; Ding, X.; Rao, S.M.; Buchler, M.W.; Friess, H.; Talamonti, M.S.; Bell, R.H.; Adrian, T.E. (2005). 5-Lipoxygenase, a Marker for Early Pancreatic Intraepithelial Neoplastic Lesions. *Cancer Res.*, 65, 6011–6016
- Hisaeda, Aya Matsunami, Katsuyoshi Otsuka, Hideaki Takeda, Yoshio (2011). Flavonol glycosides from the leaves of *Indigofera zollingeriana* *J Nat Med* 65:360-363
- Hong, J. T., Yen, J. H., Wang, L., Lo, Y. H., Chen, Z. T., & Wu, M. J. (2009). Regulation of heme oxygenase-1 expression and MAPK pathways in response to kaempferol and rhamnocitrin in PC12 cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 237, 59–68
- Horisberger J.-D., Jannin P., Reuben M.A., Lasater L. S., Chow D. C., Forte J. G., Sachs G., Rossier B. C., & Geering K. (1991). The H<sup>+</sup>-ATPase  $\beta$ -subunit can act as a surrogate for the  $\beta$ -subunit of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-pumps. *J Biol Chem* 266, 19131-19134
- Huang D., Boxin, O. U., & Prior, R.L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J.Agric.Food Chem.*, 53(6), 1841-1856
- Hu CQ, Chen K, Shi Q, Kilkuskie RE, Cheng YC, Lee KH, (1994). Anti-AIDS agents, 10, Acacetin-7-O-beta-D-galactopyranoside, an anti-HIV principle from *Chrysanthemum morifolium* and a structure-activity correlation with some related flavonoids. *J Nat Prod*; 57:42-51
- Hufford CD, Lasswell WL. (1978). Antimicrobial activities of constituents of *Uvaria chamae*. *Lloydia*; 41:156-60
- Hussain S. P., Hofseth L. J., & Harris C. C. (2003). Radical causes of cancer. *Nat Rev Cancer*, 3(4), 276–285
- Hutton, E.M., Windrum, G.M., Kratzing, C.C. (2014). Studies on the toxicity of *Indigofera endecaphylla*. I. Toxicity for rabbits. *Int. J. Res. Pharm. Sci.* 5, 1, 73-78 17
- Hyuk-Hwan Song, Piseth Khiev, Hee-Sung Chai, Hyeong-Kyu Lee, Sei-Ryang Oh, Young Hee Choir and Young-Won Chin (2012). Flavonoids from *Thyrsanthera suborbicularis* and Their NO Inhibitory Activity. *Nat. Prod. Sci.* 18(4):273-278
- Ito, K., Nakazato, T., Yamato, K., Miyakawa, Y., Yamada, T., Hozumi, N., et al. (2004). Induction of apoptosis in leukemic cells by homovanillic acid derivative, capsaicin, through oxidative stress: Implication of phosphorylation of p53 at Ser-15 residue by reactive oxygen species. *Cancer Research*, 64(3), 1071–1078
- Jonathan L. T.; Gbeassor M.; Che C. T.; Fong H. H.; Farnsworth N. R.; Le Breton G.C.; Venton D. L. (1990). Pseudoemiglabrin, a Platelet Aggregation Inhibitor from *Tephrosia semiglabra* *J. Nat. Prod* 53, 1572

- Jovanovic S. V., Steenken S., Hara Y., and Simic M. G. (1996). Reduction potentials of flavonoid and model phenoxy radicals. Which ring in flavonoids is responsible for antioxidant activity? J.Chem. Soc., Perkin Trans.2, 2497–2504
- Jung P., Menssen A., Mayr D., & Hermeking H. (2008). AP4 encodes a c-MYC inducible repressor of p21. Proc Natl Acad Sci U. S. A., 105(39), 15046–15051
- Jung Un Ju, Lee Mi-Kyung, Jeong Kyu-Shik and Choi Myung-Sook (2004). The Hypoglycemic Effects of Hesperidin and Naringin Are Partly Mediated by Hepatic Glucose-Regulating Enzymes in C57BL/KsJ-db/db Mice. Journal of nutrition 134(10):2499-503
- Karakousi Christina, Konstantinidou Markella Gabrieli Chrysi, Kokkalou Eugenios (2013). Phytochemical Analysis of *Indigofera hirsuta* (Leguminosae) and evaluation of the anti-inflammatory activity 16 Πανελλήνιο Φαρμακευτικό Συνέδριο
- Karakousi Vasiliki Christina, Gabrieli Chrysi, Kokkalou Eugenios\* (2011), LC-DAD-MS (ESI+) Analysis of *Indigofera hirsuta* (Leguminosae), Evaluation Of Antioxidant And Inhibitional Activity Of Aldose Reductase. 21 HELLENIC CONFERENCE OF CHEMISTRY
- Karakousi Vasiliki Christina, Gabrieli Chrysi, Kokkalou Eugenios\* Phytochemical analysis with antioxidant and aldose reductase inhibitory activity of the aerial parts of *Indigofera hirsuta* (2017), Natural Product Research . Προς δημοσίευση
- Kamal R., Mangla M. (1993). In vivo and in vitro investigations on rotenoids from *Indigofera tinctoria* and their bioefficacy against the larvae of *Anopheles stephensi* and adults of *Callosobruchus chinensis* J. Biosci. 18 1, 93-101
- Kamal. R., Mangla M. (1987). Rotenoids from *Indigofera tinctoria* and their bio-efficacy against cyclops, the carrier of dracunculiasis *Pharmazie* 42, 5, 356
- Kameswaran T.R, Ramanibai R. (2008). Antiproliferative activity in flavonoids fraction or *Indigofera tinctoria* Linn. Biological science 5, 1-7
- Karamac Magdalena, Bucinski Adam, Pegg.Ronald B and Amarowicz Ryszard (2005), Antioxidant and Antiradical Activity of Ferulates Czech J. Food Sci. 23, 2: 64–68
- Karamac Magdalena, Koleva Lidiya, Kancheva Vessela D., Amarowicz Ryszard (2017), The Structure–Antioxidant Activity Relationship of Ferulates Molecules 22, 527
- Kasimu R, Tanaka K, Tezuka Y, Gong Z-N, Li J-X, Basnet P, Namba, T, Kadota S (1998). Coparative study of seventeen *Salvia* Plants: aldose reductases inhibitory activity of water and MeOH extracts and LC-MS analysis of water extracts. Chem Pharm. Bull, 46: 500-504
- Katewa S.S., Arora A. (2001). Hepato protective effect of certain ethanomedicinal plants from Aravalli hills of Rajasthan indian Drugs 38, 6, 332-335
- Kato K, Murakami N, Hasegawa Y, Nakayama K, Ohta M, Mizota M, Yamaguchi K, Ishiguro I, Miwa I, Okuda (1991). *J.Diabetes* ; 40 (Suppl1):A 346
- Katsori A.-M., Chatzopoulou M., Dimas K., Kontogiorgis C., Patsilnakos Trangas, T., Hadjipavlou-Litina, D., (2011)., Curcumin analogues as possible anti-proliferative & anti-inflammatory agents, European Journal of Medicinal Chemistry 46 (7), 2722-2735

- Kayani S., Ahmad M., Sultana S., Khan Shinwari Z., Zafar M., Yaseen G., Hussain M., Bibi T. (2015). Ethnobotany of medicinal plants among the communities of Alpine and Sub-alpine regions of Pakistan J. Ethnopharmacol 164, 22, 186-202
- Kemal C., Louis-Flamberg P., Krupinski-Olsen R., Shorter, A.L., (1987). Reductive inactivation of soybean lipoxygenase 1 by catechols: A possible mechanism for regulation of lipoxygenase activity, Biochemistry 26 (22), 7064-7072
- Kerjaschki D.; Bago-Horvath Z.; Rudas M.; Sexl V.; Schneckenleithner C.; Wolbank S.; Bartel G.; Krieger S.; Kalt R.; Hantusch B.; et al. (2011). Lipoxygenase mediates invasion of intrametastatic lymphatic vessels and propagates lymph node metastasis of human mammary carcinoma xenografts in mouse. J. Clin. Investig., 121, 2000–2012
- Khalifah R.G.; Baynes J.W.; Hudson E.G. (1999). Amadorins: Novel post-Amadori inhibitors of advanced glycation reactions. Bioche.Biophys.Res.Comm., 257,251-258
- Kim DH, Bae EA, Han MJ. (1999). Anti-Helicobacter pylori activity of the metabolites of poncirin from *Poncirus trifoliata* by human intestinal bacteria. Biol Pharm Bull; 22:422-44
- Kim HJ, Woo ER, Shin CG, Park H. (1998). A new flavonol glycoside gallate ester from *Acer okamotoanum* and its inhibitory activity against human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) integrase. J Nat Prod. 61:145-8
- Kim J. M.; Yoo K.; Kim J.; Seo Y.; Ha B.; Kho J.; Shin Y.; Chung C. (2007). Effect of pinitol on glucose metabolism and adipocytokines in uncontrolled type 2 diabetes. Diabetes Res Clin.Pract., S247-S251
- Kinoshita, J.H., Kador, P., Catiles, M., (1981), Aldose reductase in diabetic cataracts, Journal of the American Medicinal Association 246 (3), 257-261
- KiteGeoffreyC. Stoneham,CharlotteA. Veitch,NigelC. (2007) Flavonol Tetraglycosides and Other Constitutents From Leaves of *Styphnolobium Japonicum* (Leguminosae) and Related Taxa. Phytochemistry, 68, 10, 1407 – 1416
- Kochanowska-Karamyan A. J., and Hamann M. T. (2010). Marine indole alkaloids: potential new drug leads for the control of depression and anxiety. Chem. Rev. 110, 4489–4497
- Kontogiorgis C., Hadjipavlou-Litina D., (2006)., Biological evaluation of several coumarin derivatives designed as possible anti-inflammatory/antioxidant agents, J Enzyme Inhib Med Chem 18 (1), 63-69
- Koukoulitsa Catherine, Zika Chariklia, Geromichalos, Vassilis J. Demopulos and Skaltsa (2006). Evaluation of aldose reductases inhibition and docking studies of some secondary metabolites, isolated from *Origanum vulgare* L. ssp.hirtum Bioorganic & Med. Chem. 14 ,1653-1659
- Kowalski J., Samojedny A., Paul, M., Pietsz G., & Wilczok T. (2005). Effect of apigenin, kaempferol and resveratrol on the expression of interleukin-1b and tumor necrosis factor-a genes in J774.2 macrophages. Pharmacol Rep, 57, 390–394
- Kumar Raju Senthil, Balasubramanian Raj Kapoor, Perumal Perumal (2011). Antitumor and Cytotoxic activities of methanol extract of *Indigofera linnaei* Ali. Asian Pacific J Cancer Prev,12, 613-618
- Kumar R.S., Raj Kapoor B., Perumal P., Kumar S.V., Geetha A.S.(2016). Beneficial effects of methanolic extract of *indigofera linnaei* Ali. On the inflammatory and nociceptive responses in rodent models Braz. J. Pharm. Sci. 52, 1, 113-123
- Kumar S. A., Gandhimathi R., Mohana Lakshmi S., Rahul N., Ashok Kumar C.K. (2009). Evaluation of the antinociceptive properties from *Indigofera tinctoria* leaves extracts J. Pharma. Sci. Res. 1, 2, 31-37

- Kumar S.S., Karrunakaran, C.M., Rao M.R.K., Balasubramanian M.P. (2010). *Indigofera aspalathoides* protection against 20-methylcholanthrene-induced experimental fibrosarcoma growth after transplantation in rats - Role of xenobiotic drug metabolizing enzymes Asian Pac J Cancer Prev, 11, 6, 1833-1838
- Kumar S.S., Rao M.R.K., Balasubramanian M.P. Antiproliferative role of *Indigofera aspalathoides* on 20 methylcholanthrene induced fibrosarcoma in rats
- Kumar Senthil R., Rajkapoor B., Perumal, P. (2011). Antitumor and cytotoxic activities of methanol extract of *Indigofera linnaei* Ali Asian Pacific Journal of Cancer Prevention 12 (3), 613-618
- Kumar Vinay, Abbas Abul K., Fausto Nelson, (2007). Robbins Basic Pathology 8<sup>th</sup> edition
- Kuroyanagi M, Arakawa T, Hirayama Y, Hayashi T. (1999). Antibacterial and antiandrogen flavonoids from *Sophora flavescens*, J Nat Prod; 62:1595-9
- Lau Ching S., Carrier Danielle J., Beitle Robert R., Howard Luke R., LayJr Jackson O., Liyanage Rohana, Clausen Edgar C.(2005), A Glycoside Flavonoid in Kudzu (*Pueraria lobata*) Identification, Quantification, and Determination of Antioxidant Activity Applied Bioch. and Biotech. 121-124(1-3):783-94
- Lee TH, Horton CE, Kyan-Aung U, Haskard D, Crea AE & Spur BW (1989). Lipoxin A4 and lipoxin B4 inhibit chemotactic responses of human neutrophils stimulated 565 Braz J Med Biol Res 34(5) 2001
- Lee I.-C., Bae J.-S., Kim T., Kwon O.J., Kim T.H., (2011). Polyphenolic constituents from the aerial parts of *Thymus quinquecostatus* var. japonica collected on Ulleung Island. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 54, 811–816
- Lee J.S., Lee C.M., Jeong Y.I.; Jung I. D., Kim B.H., Seong E.Y., Kim J.I., Choi I. W., Chung H. Y., Park Y.M. (2007a). D-Pinitol regulates Th1/Th2 balance via suppressing Th2 immune response in ovalbumin-induced asthma. FEBS Lett., 581, 1, 57-64
- Lee J.S.; Jung I. D.; Jeong Y. I.; Lee C. M.; Shin Y. K.; Lee S.Y.; Suh D.S.; Yoon M.S.; Lee K. S.; Choi Y. H.; Chung H. Y.; Park Y.M. (2007b). D- Pinitol inhibits Th1 polarization via suppression of dendritic cells. Int. Immunopharmacol 7, 6, 791-804
- Lee K. M., Lee K. W., Jung S. K., Lee E. J., Heo Y. S., Bode A. M., et al. (2010b). Kaempferol inhibits UVB-induced COX-2 expression by suppressing Src kinase activity. Biochem. Pharmacol., 80(12), 2042–2049
- Lee S., Kim Y. J., Kwon S., Lee Y., Choi S. Y., Park J., et al. (2009). Inhibitory effects of flavonoids on TNF- $\alpha$ -induced IL-8 gene expression in HEK 293 cells. BMB Reports, 42(5), 265–270.
- Li BQ, Fu T, Dongyan Y, Mikovits JA, Ruscetti FW, Wang JM. (2000). Flavonoid baicalin inhibits HIV-1 infection at the level of viral entry. Biochem Biophys Res Commun 276:534-8
- Li BQ, Fu T, Yan YD, Baylor NW, Ruscetti FW, Wang JM. (1993). Inhibition of HIV infection by baicalin a flavonoid compound purified from Chinese herbal medicine. Cell Mol Biol Res 39:119-24
- Li W, Asada Y, Yoshikawa T. (1998). Antimicrobial flavonoids from *Glycyrrhiza gabra* hairy Root cultures, Planta Med 64:746-7
- Li J.; Rao J.; Liu Y.; Cao Y.; Zhang Y.; Zhang Q.; Zhu D. (2013). 15-Lipoxygenase promotes chronic hypoxia-induced pulmonary artery inflammation via positive interaction with nuclear factor- $\kappa$ B. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 33, 971–979

- Liavonchanka, A., Feussner, I., (2006). Lipoxygenases: occurrence, functions and catalysis. *J. Plant Physiol.* 163, 348–357
- Lien E. J., Ren S., Bui H.-H., and Wang R. (1999). Quantitative structure-activity relationship of phenolic antioxidant. *Free Radic Biol Med.* 26 285–294
- Lin YM, Anderson H, Flavin MT. (1997). In vitro anti-HIV activity of biflavonoids isolated from *Rhus succedanea* and *Garcinia multiflora*. *J Nat Prod*; 60:884-8
- Lindhorst Essentials of carbohydrate chemistry and biochemistry, 2<sup>nd</sup> edition, Wiley (2004)
- Liu Ai-Lin, Liu Bo, Qin Hai-Lin, Lee Simon MingYuen, Wang Yi-Tao, Du Guan-Hua (2008). Anti-Influenza Virus Activities of Flavonoids from the Medicinal Plant *Elsholtzia rugulosa*. *Planta Med.* 74(8): 847-851
- Du Guan-Hua (2008) Anti-Influenza Virus Activities of Flavonoids from the Medicinal Plant *Elsholtzia rugulosa* *Planta Med*; 74: 648–651
- Liu C.; Xu D.; Liu L.; Schain F.; Brunnström A.; Björkholm M.; Claesson H.E.; Sjöberg J. (2009). 15-Lipoxygenase-1 induces expression and release of chemokines in cultured human lung epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 297, L196–L203
- Liu S., Yang F., Zhang, C., Ji H., Hong P., & Deng C. (2009b). Optimization of process parameters for supercritical carbon dioxide extraction of *Passiflora* seed oil by response surface methodology. *J. Supercritical Fluids*, 48, 9–14
- Liu W., Fu Y. J., Zu Y. G., Tong M. H., Wu N., Liu X. L., et al. (2009a). Supercritical carbon dioxide extraction of seed oil from *Opuntia dillenii* Haw. and its antioxidant activity. *Food Chemistry*, 114, 334–339
- Loewus Frank A., Murthy Pushpalatha P.N. (2000). myo-Inositol metabolism in plants *Plant Science* 150 1–19
- Logendra Sithes, Ribnicky David M., Yang Hui., Poulev Alexander, Ma Jun, Kennelly J. Edward Raskin Ilya (2006). Bioassay-guided isolation of aldose reductases inhibitors from *Artemisia dracunculus* *Phytochem* 67 1539-1546
- Lu Yu, Chu Chen, Liang-Fen Wang, Xi Kuang, Ke Liu, Hao Zhang, and Jun-Rong Du (2013). Neuroprotective Effect of Kaempferol Glycosides against Brain Injury and Neuroinflammation by Inhibiting the Activation of NF- $\kappa$ B and STAT3 in Transient Focal Stroke *PLoS One.*; 8(2): e55839
- Lü M., Su Y.-F., Gao Y., Song D.-B., Gao X.-M., Zhang B.-L. (2009). Chemical constituents in two species of *Indigofera* Linn *Chinese Traditional and Herbal Drugs* 40, 3, 356-373
- Lubbad M.Y., Al-Quraishy S., Dkhil, M.A. (2015). Antimalarial and antioxidant activities of *Indigofera oblongifolia* on Plasmodium chabaudi-induced spleen tissue injury in mice *Parasitol. Res* 114, 9, 18, 3431-3438
- Lukata Lokadi Pierre, Munkombwe Namboole Moses (2015). Isolation and characterization of Stigmasterol and b-Sitosterol from *Odontonema Strictum* (Acanthaceae) *JIPBS* 2 (1),88-95
- Lung SC, Weselake RJ. (2006). Diacylglycerol acyltransferase: a key mediator of plant triacylglycerol synthesis. *Lipids*;41:1073-88
- Luo H., Rankin G. O., Liu L., Daddysman M. K., Jiang B. H., & Chen Y. C. (2009). Kaempferol inhibits angiogenesis and VEGF expression through both HIF dependent and independent pathways in human ovarian cancer cells. *Nutr. and Cancer*, 61(4), 554–563

- Luo H., Rankin G.O., Juliano N., Jiang B.-H., Chen Y.C. (2012). Kaempferol inhibits VEGF expression and in vitro angiogenesis through a novel ERK-NFκB-cMyc-p21 pathway Food Chem. 130, 2, 15, 321-328
- Mabry T. J., Markham K. R. and Thomas M. B. (1970). The Systematic Identification of Flavonoids. Springer, Berlin
- Mabry T. J., Markham K. R., & Thomas M. B. (1970). The ultraviolet spectra of flavones and flavonols. The UV spectra of isoflavones, flavanones and dihydroflavonols. The systematic identification of flavonoids. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, Chapter V:pp. 91, 121, 127, 131, 139. Chapter VI: p.165
- Madikizela, B., Ndhlala, A.R. , Finnie, J.F., Staden, J.V. (2013). In vitro antimicrobial activity of extracts from plants used traditionally in South Africa to treat tuberculosis and related symptoms. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, Article no 840719
- Maffei Facino, R., Carini, M., Aldini G., & De Angelis L. (1997). A rapid screening by liquid chromatography/mass spectrometry and fast-atom bombardment tandem mass spectrometry of phenolic constituents with radical scavenging activity, from *Krameria trianta* roots. Rapid Commun. Mass Spectrom. 11, 1303-1308
- Mahmood A., Mahmood A., Malik R.N., Shinwari Z.K. (2013). Indigenous knowledge of medicinal plants from Gujranwala district, Pakistan J. Ethnopharmacol 148, 2, 9, 714-723
- Majak W., Benn M. (1994). Additional esters of 3-nitropropanoic acid and glucose from fruit of the New Zealand karaka tree, *Corynocarpus laevigatus* Phytochemistry 35, 4,901-903
- Malamas MS, Hohman TC, Millen J. (1994). Novel spirosuccinimide aldose reductase inhibitors derived from isoquinoline-1,3-dione: 2-[(4-bromo-2-fluorophenyl)-methyl]-6-fluorospiro-[isoquinoline-4(1H),3' pyrrolidine]-1,2',3,5' (2H)-tetrone and congeners. J.Med.Chem. 37:2043-2058
- Malarvannan, L., Devaki, T. (2003). Protective effect of *Indigofera tinctoria* on tissue antioxidant defence system against D-galactosamine and endotoxin-induced hepatopathy in rats. J.Nutr. Rem., 3/1(2003) 49-53
- Maltese F, C Er Kelens F.V.D Kooy Y.H.Choi, R.Verporte (2007). Citrus limonoids Analysis, bioactivity and biomedical prospects. J. of Agric Food Chem., 55, 21, 8285-8285
- MacGregor, J.T., Jurd, L., (1978). Mutagenicity of plant flavonoids: structural requirements for mutagenic activity in *Salmonella typhimurium*. Mut. Res. 54, 297
- Manuja Rohini, Sachdeva Shikha, Jain Akash, Chaudhary Jasmine (2013), A Comprehensive Review on Biological Activities of P-Hydroxy Benzoic Acid and Its Derivatives Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res., 22(2), 20, 109-115
- McMillan, R.M.; Walker, E.R.H. (1992) Designing therapeutically effective 5-lipoxygenase inhibitors. Trends Pharmacol. Sci., 13, 323-330
- Maltese F., Cornelis E., Frank van der Kooy, Young H. C., Verpoorte R. (2009). Analytical Methods Identification of natural epimeric flavanone glycosides by NMR spectroscopy Food Chemistry 116 575-579
- Mancini, J.A.; Prasit, P.; Coppolino, M.G.; Charleson, P.; Leger, S.; Evans, J.F.; Gillard, J.W.; Vickers, P.J. (1992). 5-Lipoxygenase-activating protein is the target of a novel hybrid of two classes of leukotriene biosynthesis inhibitors. Mol. Pharmacol., 41, 267-272
- Manorenjitha M. S., Zair J., Ling S.K., Mailina J. and Nuziah H., (2016). Constituents of the fruit peel from white *Citrus Grandis* (L.) Osbeck, International Journal of Pharma and Bio Sciences, 7(1): 267-278



- Mariani C., Braca A., Vitalini S., De Tommasi N., Visioli F., Fico G. (2008). Flavonoid characterization and *in vitro* antioxidant activity of *Aconitum anthora* L. (Ranunculaceae) Phytochemistry 69, 5, 1220–1226
- Margis Rogério, Zolet Andreia Carina Turchetto, Maraschin Felipe dos Santos, Loss Guilherme. (2011) Biosynthesis of Triacylglycerols (TAGs) in plants and alga International Journal of Plant Biology;2:10
- Masayuki Yoshikawa, Toshiaki Uemura, Hiroshi Shimoda, Akinobu Kishi, Yuzo Kawahara and Hisashi Matsuda (2000). Phytoestrogens from the Aerial Part of *Petroselinum crispum* Mill. (Parsley) and Structures of 6''-Acetylapiin and a New Monoterpene Glycoside, Petroside Chem. Pharm.Bull. 48 (7) 1039-1044
- Matsuda Hisashi, Toshio Morikawa, Iwano Toguchida, and Masayuki Yoshikawa. (2002). Structural requirements of flavonoids and Related Compounds for aldose Reductase Inhibitory Activity Chem.Pharm.Bull. 50, 6, 788-795
- Matławska I., Sikorska M., and Bylka W. (1999). Flavonoid compounds in *Lavatera thuringiaca* L. (Malvaceae) flowers. Acta Polon. Pharm. 56, 453-458
- McKay Matthew J, Carroll Anthony R, Quinn Ronald J, Hooper John N A (2002). 1,2-Bis(1H-Indol-3-Yl)ethane-1,2-Dione, an Indole Alkaloid From the Marine Sponge *Smenospongia* Sp J Nat Prod 65 (4), 595-597. 4
- Mealy N & Castaner J, (1996). Drugs of the future, 21 (1) ,37
- Mendes Monica, Cristiane Soares, de Oliveira Guilherme Antonio Lopes, Lacerda Jselma Sousa, Junior Luis Mario Rezende, da Silva Mirna Luciano de Gois, Coelho Mayara Ladeira, Tomé Adriana da Rocha, da Costa Junior Joaquim Soares, Ferraz Alexandre de Barros Falcao, David Jorge Mauricio and de Freitas Rivellison Mendes (2015). Evaluation of the cicatrizant activity of a semisolid pharmaceutical formulation obtained from *Platonia insignis* Mart. Afr J of Pharm. Pharmacol 9(6), 154-164
- Metodiowa, D., Jaiswal, A.K., Cenas, N., Dickançaitė, E., Segura- Aguilar, J., (1999). Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. Free Rad. Biol. Med. 26, 107
- McMillan, R.M.; Walker, E.R.H. (1992). Designing therapeutically effective 5-lipoxygenase inhibitors. Trends Pharmacol. Sci., 13, 323–330
- Mealy N, Castaner J. (1996). SNK-860: symptomatic antidiabetic, aldose reductases inhibitor. Drugs of the future 21:261-265
- Merati, G., Pasquali, P., Vergani, C., & Landi, L. (1992). Antioxidant activity of ubiquinone-3 in human low density lipoprotein. 16,1, 11-17
- Meshram Gangadhar, Patil Bhavana, Yadav Sunil, Shinde Datta (2011). Isolation And Characterisation Of Gallic Acid From *Terminalia Bellerica* And Its Effect On Carbohydrate Regulatory System In Vitro. IJRAP 2, (2) 559-562
- Micheel F., (1932). Liebigs Ann. Chem. 406, 77
- Middleton, E., Kandaswami, C., (1994). The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. In: Harborne, J.B. (Ed.), The Flavonoids. Chapman and Hall, London, 619–652
- Miller, R.W., Smith Jr., C.R., (1973). Seeds of *Indigofera species*: Their content of amino acids that may be deleterious J. Agric and Food Chem, 21, 5, 909-912

- Miski M, Ulubelen A, Johansson C, Mabry T.J. (1983). Antibacterial activity studies of flavonoids from *Salvia palaestina*. J Nat Prod ; 46:874-5
- Morris, M.P., Pagán, C., Warmke, H.E. (1954). Hiptagenic acid, a toxic component of *Indigofera endecaphylla* Science 119, 3088, 322-323
- Mosblech, A., Feussner, I., Heilmann, I., (2009). Oxylipins: structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation. Plant Physiol. Biochem. 47, 6, 511-517
- Μπαρπαλώνας Δ. Κοκκινη. (2004) Συστηματική Βοτανική Θεσσαλονίκη.
- Muller, K., (1994). 5-Lipoxygenase and 12-lipoxygenase: Attractive targets for the development of novel antipsoriatic drugs, Archiv der Pharmazie 327 ,1, 3-19
- Musa, A. M., Aliyu, A., Abdullahi, M., Yaro, A., Magaji, M., Hassan, H. and Iliya, Bioactive chalcone from *Indigofera pulchra* 2011. Journal of Medicinal Plants Research. 5(22), 5444-5449
- Muthee, J.K., Gakuya, D.W., Mbaria, J.M., Kareru, P.G., Mulei, C.M., Njonge, F.K. (2011). Ethnobotanical study of anthelmintic and other medicinal plants traditionally used in Loitokitok district of Kenya J. Ethnopharmacol 135, 1,26, 15-21
- Mylari BL, Zembrowski WJ, Beyer TA, Bordner J, Burdi DF, Bussolotti DL, Inskeep PB, Siegel TW. (1992). J.Med Chem ; 35:2169
- Nagai T., Suzuki Y., Tomimori T., & Yamada H. (1995b). Antiviral activity of plant flavonoid, 5,7,4'-trihydroxy-8-methoxyflavone, from the roots of *Scutellaria baicalensis* against influenza A (H3N2) and B viruses. Biol Pharm Bull 18,295-299
- Narender T, Khaliq T Puri A, Chander R (2006). Antidyslipidemic activity of furano-flavonoids isolated from *Indigofera tinctoria* Bioorg Med. Chem. Lett.16,13, 3411-3414
- Nawwar M. A. M., Buddrus J. and Bauert H., (1982), Dimeric phenolic constituents from the roots of *Tamarix Nilotila*, Phytochemistry 21(7), 1755-1758
- Nelms K., Keegan A. D., Zamorano J., Ryan J. J., & Paul W. E. (1999). The IL-4 receptor: Signaling mechanisms and biologic functions. Annual Rev of Immunol, 17, 701-738
- Nelson H.; Kemp J.; Berger W.; Corren J.; Casale T.; Dube L.; Walton-Bowen K.; LaVallee N.; Stepanians M. (2007). Efficacy of zileuton controlled-release tablets administered twice daily in the treatment of moderate persistent asthma: A 3-month randomized controlled study. Ann. Allergy Asthma Immunol., 99, 178-184
- Ng TB, Ling JM, Wang ZT, Cai JN, Xu GJ, (1996). Examination of coumarins, flavonoids and polysaccharopeptide for antibacterial activity. Gen Pharmacol, 27:1237-40
- Ngule, M.C. (2014). Phytochemical screening and in vitro antibacterial assessment of different *Indigofera Arrecta* solvent extracts against selected pathogenic microorganisms. Int. J. Pharm. Pharm Sci 3,2
- Nicolaou I.; Demopoulos V.J. (2003). Substituted Pyrrol-1-ylacetic Acids that Combine Aldose Reductase Enzyme Inhibitory Activity and Ability To Prevent the Nonenzymatic Irreversible Modification of Proteins from Monosaccharides. J. Med. Chem., 46:417
- Nicolaou I.; Zika, C.; Demopoulos V.J. (2004). [1-(3,5-Difluoro-4-hydroxyphenyl)-1H-pyrrol-3-yl]phenylmethanone as a Bioisostere of a Carboxylic Acid Aldose Reductase Inhibitor. J. Med. Chem 47: 2706

- Niraikulam A., Natarajan V., Hyungdon Y. (2010). Effect of *Indigofera tinctoria* against carbon tetrachloride induced hepatic damage in albino rats Res J Biotechnol 5, 1, 5-8
- Niraikulam, A., Hyungdon, Y., Natarajan, V. (2009). Effect of *Indigofera tinctoria* against carbon tetrachloride induced hepatic damage in albino rats Res. J. Biotech 4, 49-52
- Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumara T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M (2000). Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. Nature 404:787-790
- Nishikawa T.; Kukidome Sonoda K.; Fujisawa K.; Matsuhisa T.; Motoshima Araki, E. (2007). Impact of mitochondrial ROS production on diabetic vascular complications Diabetes Res. Clin. Pract 77S, S41-S45
- Nishimura C., Wistow G., Carper D. (1989). Rat lens aldose reductases: characterization of its primary structure, mRNA, and gene complexity. Prog Clin Biol Res 290, 211-20
- Nittaya Chanayath, Sorasak Lhieochaiphant and Suree Phutrakul (2002). Pigment Extraction Techniques from the Leaves of *Indigofera tinctoria* Linn. and *Baphicacanthus cusia* Brem. and Chemical Structure Analysis of Their Major Components CMU. Journal Vol. 1(2) 149
- Nualkaew Somsak , Padee Peerawit, and Talubmook Chusri (2015). Hypoglycemic activity in diabetic rats of stigmasterol and sitosterol-3-O-β-D-glucopyranoside isolated from *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk. leaf extract 9(20), 629-635
- Oliw E.H., (2002). Plant and fungal lipoxygenases. Prostag. Oth. Lipid Mediators 68– 69, 313–323
- Ono K, Nakane H, Fukushima M, Chermann JC, Barre-Sinoussi F. (1990). Differential inhibitory effects of various flavonoids on the activities of reverse transcriptase and cellular DNA and RNA polymerases. Eur J Biochem;190:469-76
- Ono, K., Nakane, H., Fukushima, M., Chermann, J. C., & Barre-Sinoussi, F. (1990). Differential inhibitory effects of various flavonoids on the activities of reverse transcriptase and cellular DNA and RNA polymerases. Eur J Biochem 190, 469-476. Eur J Biochem 199, 769
- Osawa K, Yasuda H, Maruyama T, Morita H, Takeya K, Itokawa H, (1992). Isoflavones from the heartwood of *Swartzia polyphylla* and their antibacterial activity against cariogenic bacteria. Chem Pharm Bull (Tokyo) 40:2970-4
- Osman Ustun, Berrin Ozcelik, Yakut Akyon, Ufuk Abbasoglu, Erdem Yesilada. (2006). Flavonoids with anti-*Helicobacter pylori* activity from *Cistus laurifolius* leaves. Journal of Ethnopharmacology 108 457-461
- Owen R.W, Haubner R, Mier W, Giacosa A, Hull W.E, Spiegelhalder B, Bartsch H (2005) Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes Food and Chemical Toxicology 41, 5, 2003, 703–717
- Palacios P, Gutkind G, Rondina RV, de Torres R, Coussio JD. (1983). Genus Baccharis. II. Antimicrobial activity of *B. crispa* and *B. notoserigila*. Planta Med 49:128
- Papay Zsofia Edit, Antal Istvan (2014). Study on the antioxidant activity during the formulation of biological active ingredient European Scientific Journal 3 1857–7881
- Papayianni A, Serhan CN & Brady HR (1996). Lipoxin A4 and B4 inhibit leukotriene-stimulated interactions of human neutrophils and endothelial cells. Journal of Immunology, 156: 2264-2272

- Parejo I., Codina C., Petrakis C., Kefalas P., (2000). Evaluation of scavenging activity assessed by Co(II)/EDTA-induced luminal chemiluminescence and DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical assay, J. Pharmacol Toxicol Methods 44 (3), pp. 507-512
- Park YK, Ikegaki M. (1998). Preparation of water and ethanolic extracts of própolis and evaluation of the preparations. Biosci Biotechnol Biochem 62:2230-2
- Pepeljnjak S, Jalsenjak I, Maysinger D. (1982). Growth inhibition of *Bacillus subtilis* and composition of various propolis extracts. Pharmazie 37:864-5
- Perkins, J.M. Radical chemistry. Ellis Horworth, UK, (1994), Ch.1. p.1, ch.3.pp.21-28
- Peters Marc-Golden and Henderson William R. (2007). Leukotrienes N.Engl J.Med. 357:1841-1854
- Peungvicha Penchom, Temsiririrkkul Rungravi, Prasain Jeevan Kurmar, Tezuka Yasuhiro, Kadota Shigetoshi, Thirawarapan Suwan S,Watanabe Hiroshi (1998). 4-Hydroxybenzoic acid: a hypoglycemic constituent of aqueous extract of *Pandanus odoratus* root 62 1, 79–84
- Pidgeon, G.P.; Tang, K.; Cai, Y.L.; Piasentin, E.; Honn, K.V. (2003). Overexpression of Platelet-type 12-Lipoxygenase Promotes Tumor Cell Survival by Enhancing  $\alpha\beta 3$  and  $\alpha\beta 5$  Integrin Expression. Cancer Res., 63, 4258–4267
- Plioukas Michael, Gabrieli Chrysi, Lazari Diamanto & Kokkalou Eugene (2015). Phytochemical analysis with the antioxidant and aldose reductase inhibitory capacities of *Tephrosia humilis* aerial parts extracts. Natural Product Research, 30, 12, 1366-1372
- Posternak T. (1962) : Les cyclitols. Hermann, Paris
- Pontiki E., Hadjipavlou-Litina D., (2006). Antioxidant and anti-inflammatory activity of aryl-acetic and hydroxamic acids as novel lipoxygenase inhibitors, Med Chem 2 (3), 251-264
- Pontiki, E., Hadjipavlou-Litina, D., (2004). Quantitative structure activity relationships (QSARs) on lipoxygenase inhibitors, Curr. Med. Chem.: Anti-Inflammatory and Anti-Allergy Agents 3 (2), 139-156
- Pontiki, E., Hadjipavlou-Litina, D., (2008). Lipoxygenase inhibitors: A comparative QSAR study review and evaluation of new QSARs, Med Res Rev 28 (1), 39-117
- Poulsom, R., (1986). Inhibition of hexonate dehydrogenase and aldose reductase from bovine retina by sorbinil, statil, M79175 and valproate. Biochem Pharmacol; 35, 2955-9
- Prasad Y.R.,Chakradhar V. (2004). A new isoflavone from *Indigofera linnaei* Indian Journal of Chemistry - Section B Organic and Medicinal Chemistry 43(8), 1807-1808
- Premalatha D., Kamaraj R., Tangavelou, A.C. (2014). Phytochemistry and antimicrobial efficacy of *Indigofera longiracemosa* (Fabaceae) International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 6, 1, 158-160
- Prescott LM, Harley JP, Klein DA. (1999). Microbiology. London. UK:WCB/McGraw-Hill
- Qazi B. S., Tang K., & Qazi A. (2011). Recent advances in underlying pathologies provide insight into interleukin-8 expression-mediated inflammation and angiogenesis. Int J. Inflam, 908468
- Qin Liu, Ming Liu, Mabry J Tom and Dixon A. Richard, (1994). Flavonol Glycosides from *Cephalocereus senzilis*. Phymchmistry, 36. 1, 229-231

- Rahman Taj Ur, Arfan Mohammad, Liaqat Wajiha, Uddin Ghias, Choudhary M. Iqbal **(2014)**. Isolation of a Novel Indigoferamide-A from Seeds of *Indigofera Heterantha* Wall and its Antibacterial Activity Rec. Nat. Prod. 4:2 412-416
- Rajendra Prasad Y and Chakradhar V **(2004)**. A new isoflavone from *Indigofera linnaei*. Indian J. Chem, , 43B, 1807-08
- Rajendran K., Shirwaikar, A., Srinivasan, K.K. **(2013)**. Preliminary antidiabetic studies on aqueous extract of *Indigofera aspalathoides* Vahl ex DC Indian J of Nat Prod Resour 4, 2,146-150
- Raj Kapoor Balasubramanian, Murugesh Narayanan, Lalitha Kedalgovindaram and Krishna Devarakonda Rama **(2007)**. Cytotoxic activity of flavone glycoside from the stem of *Indigofera aspalathoides* Vahl J. Nat. Med 61, 80-83
- Raj Kapoor, B., Jayakar, B., Kavimani, S., Murugesh, N., **(2006)**. Protective effect of *Indigofera aspalathoides* against CCl<sub>4</sub> -induced hepatic damage in rats J Herb Pharmacother 6, 1, 49-54
- Raj Kapoor, B., Murugesh, N., Chodon, D., Sakthisekaran, D. **(2005)** .Chemoprevention of N-nitrosodiethylamine induced phenobarbitol promoted liver tumors in rat by extract of *Indigofera aspalathoides*. Biol. Pharm. Bull. 28, 2, 364-366
- Raj Kapoor, B., Kavimani, S., Ravichandiran, V., Sekhar, K., Kumar, R.S., Kumar, M.R., Pradeepkumar, M., Einstein, J.W., Kumar, E.P. **(2009)**. Effect of *Indigofera aspalathoides* on complete Freund's adjuvant-induced arthritis in rats Pharm Biol 47, 6, 553-557
- Raj Kapoor, B., Anandan, R., Jayakar, **(2003)**. B Anti-inflammatory activity of *Indigofera aspalathoides* in rats. Biomedicine. 23, 1-2, 118-121
- Raj Kapoor, B., Jayakar, B., Murugesh, N. **(2004)**. Antitumor activity of *Indigofera aspalathoides* on Ehrlich ascites carcinoma in mice Indian J. Pharmacol 36, 1, 38-40
- Rajput A.P. and Rajput T.A. **(2012)**. Isolation of Stigmasterol and  $\beta$ -Sitosterol from Chloroform Extract of Leaves of *Corchorus fascicularis* Lam. Int J. of Biol Chem 6 (4): 130-135
- Ramana K.V.; Friedrich B.; Tammali R.; West M.B.; Bhatnagar A.; Srivastava S.K. **(2006)**. Requirements of aldose reductases for the hyperglycaemic activation of protein kinase C and formation of diacylglycerol in vascular smooth muscle cells. Diabetes, 54, 818-829
- Ramana K.V.; Friedrich B.; Srivastava S.; Bhatnagar A.; Srivastava S.K. **(2004)**. Activation of nuclear factor-K $\beta$  by hyperglycemia in vascular smooth muscle cells is regulated by aldose reductases. Diabetes, 53, 2910-2920
- Rahman T.U., Arfan, M., Liaqat, W., Uddin, G., Iqbal Choudhary, M. **(2014)** Isolation of a novel indigoferamide-a from seeds of *Indigofera heterantha* wall and its antibacterial activity Isolation of a novel indigoferamide-a from seeds of *Indigofera heterantha* wall and its antibacterial activity Nat Prod. 8(4):412-416
- Rahman T.U., Uddin, G., Nisa, R.U., (...), Choudhary, M.I., Ayub, K. **(2015)** Spectroscopic and density functional theory studies of 7-hydroxy-3'-methoxyisoflavone: A new isoflavone from the seeds of *Indigofera heterantha* (Wall) Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 148, 375-381
- Ramaswamy AS, Jayaraman S, Sirsi M, Rao KH. **(1972)**. Antibacterial action of some naturally occurring citrus bioflavonoids. Indian J Exp Biol ;10:72-3
- Ramires R.; Caiaffa M.F.; Tursi A.; Haeggström J.Z.; Macchia L. **(2004)**. Novel inhibitory effect on 5-lipoxygenase activity by the anti-asthma drug montelukast. Biochem. Biophys. Res. Commun., 324, 815–821

- Ramos BF, Zhang Y, Qureshi R, Jakschik BA. (1991). Mast cells are critical for the production of leukotrienes responsible for neutrophil recruitment in immune complex-induced peritonitis in mice. *J Immunol.*;147(5):1636–1641
- Rao Koteswara Yerra, Lee Meng-Jen, Chen Keru, Lee Yi-Ching, Wu Wen-Shi and Tzeng Yew-Min (2011). Insulin-Mimetic Action of Rhoifolin and Cosmoisin Isolated from *Citrus grandis* (L.) Osbeck Leaves: Enhanced Adiponectin Secretion and Insulin Receptor Phosphorylation in 3T3-L1 Cells. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine
- Rastelli G.; Ferrari AM;. Costantino L; Gamberini MC (2002) Discovery of new inhibitors of aldose reductase from molecular docking and database screening- *Bioorg Med Chem* 10 ,1437 -1450
- Ratty A. K., Das N.P., (1989). Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: structure-activity relationship, *Biochem Med Metab Biol*, 39 , 69-79
- Rauha JP, Remes S, Heinonen M, et al. (2000). Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *Int J Food Microbiol* :56:3-12
- Ravn H, Nishibe S, Sasahara M, Xuebo L (1990). Phenolic compounds from *Plantago asiatica*. *Phytochem* 29:3627-3631
- Renuka Jain, Sheweta Jain, Archana Sharma, Hideyuki Ito, Tsutomu Hatano (2007) Isolation of (+)-pinitol and other constituents from the root bark of *Tamarindus indica* Linn. *J.Nat Med* 61:355-356
- Rehman Aziz-Ur, Malik A, Riaz N., (...), Nawaz S.A., Choudhary M.I. (2004). Lipoxygenase inhibiting flavonoids from *Indigofera heterantha*. *Heterocycles* 63(2), 359-366
- Rehman Aziz-Ur, Malik, A., Riaz, N., (...), Nawaz, S.A., Choudhary, M.I. (2005). Lipoxygenase inhibiting constituents from *Indigofera heterantha* *Chem. Pharm. Bull.* 53(3), 263-266
- Rahman T.U., Arfan M., Liaqat W., Uddin G., Iqbal Choudhary M. (2014). Isolation of a novel indigoferamide-a from seeds of *Indigofera heterantha* wall and its antibacterial activity *Records of Natural Products* 8(4), 412-416
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26, 1231-1237
- Refaat John, Desoukey Samar Y., Ramadan Mahmoud A. and Kamel Mohamed S. Rhoifolin (2015), A Review Of Sources and Biological Activities. *Int.Journ.of Pharm* 2(3): 102-109
- Renuka Jain, Sheweta Jain, Archana Sharma, Hideyuki Ito, Tsutomu Hatano (2007). Isolation of (+)-pinitol and other constituents from the root bark of *Tamarindus indica* Linn. *J.Nat Med* 61:355-356
- Renukadevi K.P., Suhani Sultana S. (2011). Determination of antibacterial, antioxidant and cytotoxicity effect of *Indigofera tinctoria* on lung cancer cell line NCI-H69 *Int. J. Pharmacol.* 7 (3), 356-362
- Renzi P.M. (1999). Antileukotriene agents in asthma: The dart that kills the elephant? *CMAJ*, 160, 217–223
- Ribeiro N, Streiff S, Heissler D, Elhabiri M, Albrecht-Gary AM, Atsumi M, Gotoh M, Desaubry L, Nakatani Y, Ourisson G. (2007). Reinforcing effect of bi- and tri-cyclopolyprenols on 'primitive' membranes made of polyprenyl phosphates. *Tetrahedron*; 63:3395-407
- Rice-Evans CA, Miller NJ. (1996). Structure–antioxidant activity of flavonoids and isoflavonoids. In: Rice-Evans CA, Packer L, editors. *Flavonoids in health and disease*. New York: Marcel Dekker;. 199–219

- Rodríguez-Lyon, M.L., Díaz-Lanza, A.M., Bernabé, M., Villaescusa-Castillo, L., (2000). Flavone glycosides containing acetylated sugars from *Sideritis hyssopifolia*. Magn. Reson. Chem. 38, 684–687
- Rolo AP, Palmeira CM. (2006). Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol. Apr 15;212(2):167-78.* 20
- Rondeau J.M., Tete-Favier F., Podjarny A., Reymann J.M., P., Biellmann J.F., Moras D., (1992). Novel NADPH-binding domain revealed by the crystal structure of aldose reductases. *Nature* 355, 469-72
- Sahu P.M., Singh, B., Sharma R.A. Singh, D. (2010). Insecticidal compounds from *Indigofera tinctoria* (L.) R. Br. Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences 80, 4, 336-344
- Sajid Mehmood, Aziz-Ur-Rahman, Zaheer Ahmad, Nighat Afza, Abdul Malik, Habib Ahmad and Muhammad Iqbal Choudhary (2008). Monoterpene glycosides from *Indigofera hetrantha* Nat. Prod. Re, 22, (13), 1189-1195
- Sagi S., Avula B., Wang Y.-H., and Khan I. A. (2016). Quantification and characterization of alkaloids from roots of *Rauwolfia serpentina* using ultra-high performance liquid chromatography-photo diode array-mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 408, 177–190
- Samuelsson B. Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science.* (1983); 220 (4597) : 568–575
- Samuelsson B., Dahlen S.-E., Lindgren J.A., Rouzer C.A., Serhan C.N., (1987). Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science* 237, 1171–1176
- Sanchez-Rabaneda F., Jauregui O., Casals I., Andres-Lacueva C., Izquierdo-Pulido M., & Lamuela-Raventos R. M. (2003). Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). *J. Mass Spectrom.* 38, 35–42
- Sanchez-Rabaneda F., Jauregui O., Lamuela-Raventos R. M., Viladomat F., Bastida J., & Codina C. (2004). Qualitative analysis of phenolic compounds in apple pomace using liquid chromatography coupled to mass spectrometry in tandem mode. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18, 553–563
- Saravana Kumar A., Gandhimathi R., Mohana Lakshmi S., Rahul N., Ashok Kumar C.K. (2009). Evaluation of the antinociceptive properties from *Indigofera tinctoria* leaves extracts *J. Pharm. Sci. Res.* 2, 31-37
- Saravana Kumar A., Madhan Mohan, E., Gandhimathi R., Amudha, P. (2009). Study on the anti-seizure activity of methanolic extracts of *Indigofera Tinctoria* (L.) *Pharmacologyonline* 1, 1341-1351
- Sato M, Tsuchiya H, Takase I, Kureshiro H, Tanigaki S, Inuma M. (1995). Antibacterial activity of flavanone isolated from *Sophora exigua* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its combination with antibiotics. *Phytother Res* ;9:509-12
- Sato S., (1992). Rat kidney aldose reductases and aldehyde reductases and polyol production in rat kidney, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 263, F799-F805
- Schaeffer A, Bronner R, Benveniste P, Schaller H. (2001). The ratio of campesterol to sitosterol that modulates growth in *Arabidopsis* is controlled by STEROL METHYLTRANSFERASE 2;1. *Plant J*; 25:605-15
- Schaller H. (2004). New aspects of sterol biosynthesis in growth and development of higher plants. *Plant Physiol*; 42:465-76
- Schindler R., & Mentlein R. (2006). Flavonoids and vitamin E reduce the release of the angiogenic peptide vascular endothelial growth factor from human tumor cells. *J Nutr* 136, 1477–1482

- Schrack K, Mayer U, Martin G, Bellini C, Kuhnt C, Schmidt J, Jürgens G. (2002). Interactions between sterol biosynthesis genes in embryonic development of *Arabidopsis*. *Plant J*; 31:61-73
- Seckin Özden, Nedime Dürüst, Kenjiro Toki, Norio Saito, Toshio Honda (1998). Acylated kaempferol glycosides from the flowers of *delphinium formosum* *Phytochemistry*, 49, (1), 241-245
- Kumar S., Rao M., Balasubramanian, M.P. (2011). Chemopreventive effects of *Indigofera aspalathoides* on 20-methylcholanthrene induced fibrosarcoma in rats *International Journal of Cancer Research* 7, 2, 144-151
- Selvam C., Sanjay M., Jachak R., Gnana Oli, Ramasamy Thilagavathi, Asit.K., Chakraborti and K.K. Bhutani (2004). A new cyclooxygenase (COX) inhibitory pterocarpan from *Indigofera aspalathoides*: structure elucidation and determination of binding orientations in the active sites of the enzyme by molecular docking *Tetrahedron Letters* 45, (22), 4311-4314
- Selway JWT. Antiviral activity of flavones and flavans. In: Cody V, Middleton E, Harborne JB, editors. (1986). *Plant flavonoids in biology and medicine: biochemical, pharmacological, and structure-activity relationships*. New York, NY: Alan R. Liss, Inc
- Serhan CN (1997). Lipoxins and novel aspirin-triggered 15-epi-lipoxins (ATL): a jungle of cell-cell interactions or a therapeutic opportunity? *Prostaglandins*, 53: 107- 137
- Shahidi F., Wanasundara J.P.D. (1992). Phenolic Antioxidants. *Crit. Rev. Food. Sci. Nut.*, 32,67-103
- Shahjahan M., Vani G., Devi C.S.S. (2005). Protective effect of *Indigofera oblongifolia* in CCl<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity *J. Med. Food* 8 2, 261-265
- Sharif A., Ahmed E., Malik A., Riaz N., Afza N., Nawaz S.A., Arshad M., Choudhary, M.I. (2005). Lipoxigenase inhibitory constituents from *Indigofera oblongifolia* *Arch. Pharm. Res* 28, 7, 761-764
- Sharma V., Joseph C., Ghosh S., Agarwal A., Mishra M. K., & Sen E. (2007). Kaempferol induces apoptosis in glioblastoma cells through oxidative stress. *Mol. Cancer Ther*, 6, 2544–2553
- Shimazaki Y., Yajima T., Takani M., and Yamauchi O. (2009). Metal complexes involving indole rings: structures and effects of metal–indole interactions. *Coord. Chem. Rev.* 253, 479–492
- Sichel G., Corsaro C, Scalia M., Di Bilio A. J., and Bonomo R. P., (1991). In vitro scavenger activity of some flavonoids and melanins against O<sub>2</sub><sup>-</sup> Free Radical *Biol. Med.* 11 1–8
- Francisco A. M., Borges Fernanda, Guimarães Carla, Lima José L. F. C., Matos Carla, and Reis Salette (2000). Phenolic Acids and Derivatives: Studies on the Relationship among Structure, Radical Scavenging Activity, and Physicochemical Parameters *J. Agric. Food Chem.*,48 (6), 2122–212
- Simin K, Ali Z, Khaliq-Uz-Zaman SM, Ahmad VU. (2002). Structure and biological activity of a New rotenoid from *Pongamia pinnata*. *Nat Prod Lett*; 16:351-7
- Simons K, Ehehalt R. (2002). Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J Clin Invest*; 110:597-603
- Simons K, Ikonen E. (2000). How cells handle cholesterol. *Science*; 290:1721-6
- Singh B, Chandan BK, Sharma N, Bhardwaj V, Satti NK, Gupta VN, Gupta BD, Suri KA, Suri OP. (2006). Isolation, structure elucidation and in vivo hepatoprotective potential of trans-tetracos-15-enoic acid from *Indigofera tinctoria* Linn *Phytother Res.* Oct; 20 (10):831-9



- Singh B., A. K. Saxena, B. K. Chandan, V. Bhardwaj, V. N. Gupta, O. P. Suri and S. S. Handa (2001). Hepatoprotective activity of indigtone—a bioactive fraction from *Indigofera tinctoria* Linn. *Phytother. Res.* 15, 294-297
- Singh R.K.; Pandey B.L.; Tripathi M.; Pandey V.B. (2001). Anti-inflammatory effect of (+)-pinitol. *Fitoterapia*, 72, 2.168-170
- Sittie A.A., Nyarko A.K. (1998). *Indigofera arrecta*. Safety evaluation of an antidiabetic plant extract in non-diabetic human volunteers 12,1, 52-54
- Skrypczak-Jankun, E., Zhou, K., Jankun, J., (2003), Inhibition of lipoxygenase by (-)-epigallocatechin gallate: X-ray analysis at 2.1 Å reveals degradation of EGCG and shows soybean LOX-3 complex with EGC instead., *International of molecular medicine* 12 (4), 415-420
- Sorkness C.A. (1997). The use of 5-lipoxygenase inhibitors and leukotriene receptor antagonists in the treatment of chronic asthma. *Pharmacotherapy*, 17, 50S–54S
- Spanbroek R, Hildner M, Steinhilber D, et al. (2000). 5- lipoxygenase expression in dendritic cells generated from CD34+ hematopoietic progenitors and in lymphoid organs. *Blood.*; 96(12):3857–3865
- Spanbroek R, Stark HJ, Janssen-Timmen U, et al. (1998). 5-Lipoxygenase expression in Langerhans cells of normal human epidermis. *Proc Natl Acad Sci USA.*;95(2):663–668
- Spector M., O'Neal S., & Racker E. (1980a). Reconstitution of the Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> pump of Ehrlich ascites tumor and enhancement of efficiency by quercetin. *J Biol Chem* , 255, 5504-5507
- Spector M., O'Neal S., & Racker E. (1980b). Phosphorylation of the beta subunit of Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup>- ATPase in Ehrlich ascites tumor by a membrane-bound protein kinase. *J Biol Chem* 255, 8370-8373
- Sreepriya M., Devaki T., Nayeem, M. (2001). Protective effects of *Indigofera tinctoria* L. Against D-Galactosamine and carbon tetrachloride challenge on 'in situ' perfused rat liver *Indian J. Physiol. Pharmacol.*, 45, 4, , 428-434
- Srivastava S.K.; Ramana K.V.; Bhatnagar A. (2005). Role of aldose reductases and oxidative damage in diabetes and the consequent potential for therapeutic options. *Endocr. Rev.*, 26, 380-392
- Stangeland T., Alele P.E., Katuura E., Lye K.A. (2011). Plants used to treat malaria in Nyakayojo sub-county, western Uganda *J Ethnopharmacol* 137, 1, 1, 154-166
- Steiner D.R.S.; Gonzalez N.C.; Wood J.G. (2001). Leukotriene B4 promotes reactive oxidant generation and leukocyte adherence during acute hypoxia. *J. Appl. Physiol.*, 91, 1160–1167
- Steuber H., Heine A., Podjarny A., Klebe G. (2008). Merging the binding sites of aldose and aldehyde reductases for detection of inhibitor selectivity-determining features. *J. Mol. Biol.* 379, 991-1016
- Sudhar P.S., Armstrong D.A., (1990). Redox potential of some sulfur containing radicals. *J. Phys. Chem.* 94, 5915.
- Sundberg R. J., "The Chemistry of Indoles", Academic Press, New York (1970), p. 1
- Su Y., Lü M., Yang F., Li C., Di L., Wu D., Guo Z., Lü J., Guo D. (2008). Six new glucose esters of 3-nitropropanoic acid from *Indigofera kirilowii* *Fitoterapia* 79, 6, 451-455
- Su Y., Li C., Gao Y., Di L., Zhang X., Guo D. (2005). Acryloylated glucose 3-nitropropanoates from *Indigofera kirilowii* *J. Nat Prod* 68 (12), 1785-1786

- Swarnalatha S., Puratchikody A. (2014). Cytokine mediated immunomodulatory properties of Kaempferol-5-O- $\beta$ -D-glucopyranoside from methanol extract of aerial parts of *Indigofera aspalathoides* Vahl ex DC Int.J.Res.Pharm.Sci., 5(1), 1-6
- Swaroop Anand, Sinha Arun Kumar, Chawla Raman, Arora Rajesh, Sharma Rakesh Kumar and Kumar Jonala Kotes (2005). Isolation and Characterization of 1,3-Dicapryloyl-2-linoleoylglycerol A Novel Triglyceride from Berries of *Hippophae rhamnoides* Chem. Pharm. Bull. 53 (8) 1021—1024
- T Schewe. (2002). 15-Lipoxygenase-1: a prooxidant enzyme. Biol. Chem., 383 365–374
- Tahan F. (2008). Montelukast inhibits tumour necrosis factor- $\alpha$ -mediated interleukin-8 expression through inhibition of nuclear factor- $\kappa$ B p65-associated histone acetyltransferase activity. Clin. Exp. Allergy, 38, 805–811
- Tait B. D., Hagen S., Domagala J., Ellsworth E. L., Gajda C., Hamilton H, W., Prasad J. V., Ferguson D., Graham N., Hupe D., Nouhan C., Tummino P. J., Humblet C., Lunney E.A., Pavlovsky A., Rubin J., Gracheck S. J., Baldwin E. T., Bhat T.N., Erickson J. W., Gulnik S. V., & Liu B. (1997). 4-Hydroxy-5,6-dihydropyrones. 2. Potent non-peptide inhibitors of HIV protease. J Med Chem 40, 3781-3792
- Takeda S.; Jiang R.; Aramaki H.; Imoto M.; Toda A.; Eyanagi R.; Amamoto T.; Yamamoto I.; Watanabe K. (2011). 9-tetrahydrocannabinol and its major metabolite 9-tetrahydrocannabinol-11-oic acid as 15-lipoxygenase inhibitors. J. Pharm. Sci., 100, 1206–1211
- Tang Guang-Yan, Li Xue-Juan and Zhang Hong-Yu (2008). Antidiabetic Components Contained in Vegetables and Legumes Molecules, 13, 1189-1194
- Terashima S, Shimizu M, Nkayama H, Ishikura M, Ueda Y., Imai K, Suzui A, Morita N (1990). Studies on aldose reductases inhibitors from medicinal plants of Sinfito. *Potentilla candidans*, and further synthesis of their related compounds. Chem.Pharm.Bull. 38:2733-2736
- Tete-Favier A., F., Mitschler A., Barbanton J., Barth P., Urzhumtseva L., Biellmann J F., Podjarny A., Moras D. (1997). A “specificity” pocket inferred from the crystal structures of the complexes of aldose reductases with the pharmaceutically important inhibitors tolrestat and sorbinil. Structure 5, 601-12
- Thaisrovongs S., Romero D. L., Tommasi R. A., Janakiraman M. N., Strohbach J. W., Turner S. R., Biles C., Morge R. R., Johnson P. D., Aristoff P.A., Tomich P. K., Lynn J. C., Morge R. R., Johnson P. D., Aristoff P. A., Tomich P. K., Lynn J, C., Horng M., Chong K. T., Hinshaw R. R., Howe W. J., Finzel B. C., & Watenpaugh K. D. (1996). Structure-based design of HIV protease inhibitors: 5,6-dihydro-4-hydroxy-2-pyrones as effective, nonpeptidic inhibitors. J Med Chem 39, 4630-4642
- Thangadurai D., Viswanathan M.B. (2000). Antitumorogenic Activity of *Indigofera longeracemosa* Indian J. Pharm. Sci. 62 (4), 287-290
- Thangadurai, D., Viswanathan, M.B., Ramesh, N. (2002). Indigoferabietone, a novel abietane diterpenoid from *Indigofera longeracemosa* with potential antituberculous and antibacterial activity, Pharmazie 57, 10, 714-715
- Thangadurai N. Ramesh M. B. Viswanathan D. Xavier Prasad (2001). A novel xanthene from *Indigofera longeracemosa* stem Fitoterapia, 72, 1, 92-94
- The Bible, Jeremiah 8, verse 22; Jeremiah 46, verse 11; Jeremiah 51, verse 8
- Thiruvanmiyoor Ravichandran Kameswaran and Ravichandran Ramanibai (2008). The Antiproliferative Activity of Flavanoid Fraction of *Indigofera tinctoria* is Through Cell Cycle Arrest and Apoptotic Pathway in A-549 Cells J. Biol. Sci. 8, 3, 577-583

- Tintinger, G.R.; Feldman, C.; Theron, A.J; Anderson, R. **(2010)**. Montelukast: More than a cysteinyl leukotriene receptor antagonist? *Scientific World Journal* 10, 2403–2413
- Torreñegra RD, Ricardo AA, Pedrozo JP, Fuentes OC. **(1989)**. Flavonoids from *Gnaphalium gracile* H.B.K. *Int J Crude Drug Res* ; 27:22-4
- Tripathi BK, Srivastava AK. **(2006)**. Diabetes mellitus: complications and therapeutics *Med Sci Monit.* 12,7, RA130-47.
- Tripoli E, Guardia ML, Giammanco S, Majo DD, Giammanco M **(2007)**, Citrus flavonoids: molecular structure, biological activity and nutritional properties: a review *Food Chem* 104:466–79
- Tsao TF, Newman MG, Kwok YY, Horikoshi AK. **(1982)**. Effect of Chinese and western antimicrobial agents on selected oral bacteria. *J Dent Res* 61: 1103-6
- Tsitsigiannis D.I., Keller N.P., **(2007)**. Oxylipins as developmental and host-fungal communication signals. *Trends Microbiol.* 15, 109–118
- Tsuchiya H, Sato M, Iinuma M, **(1994)**. Inhibition of growth of cariogenic bacteria in vitro by plant flavanones. *Experienta* ; 50:846-9
- Tsuchiya H, Sato M, Miyazaki T, Fujiara S, Tanigaki S, Ohyama M, Tanaka T Iinuma M. **(1996)**. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Ethnopharmacol* ; 50:27-34
- Uda Y., Price K. R., Williamson G., & Rhodes M, J. **(1997)**. Induction of the anticarcinogenic marker enzyme, quinone reductases, in murine hepatoma cells in vitro by flavonoids. *Cancer Lett* 120, 213-216
- Uffe Anthoni, Encarnacion Rosalba D., Nielsen Per H. and Carsten Christophersen **(1998)**. Huazhongilexone is not 3',5,5',7-Tetrahydroxyflavanone. Preparation of 3',5'-Dimethoxy-5,7-dihydroxyflavanone. *Acta Chimica Scandinavica* 52, 1243-1246
- Uma Devi P., Ganasoundari A., Rao B.S., & Srinivasan K. K. **(1999)**. In vivo radioprotection by ocimum flavonoids: survival of mice. *Radiat Res* 151, 74-78
- Upwar N., Patel, R., Waseem, N., Mahobia, N.K. **(2011)**, Anti-inflammatory potential of alcoholic extract of *Indigofera oblongifolia* Forsk *Int. J. Res Pharm Sci* 2, 23-25
- Urzumtsev A, Tete-Faver F, Mitschler A, Barbanton J, Barth P, Urzumtseva L, Biellmann J-F, Podjarny AD, Moras D **(1997)**. A specificity pocket inferred from the crystal structures of the complexes of aldose reductases with pharmaceutically important inhibitors tolrestat and sorbinil *Structure* , 5, 601-612
- Valsaraj R, Pushpangadan P, Smitt UW, Adersen A, Christensen B S, Sittie Archibald, Nyman U, Nielsen Claus, Olsenn C.E **(1997)**. New anti-HIV-1, antimalarial, and antifungal compounds from *Terminalia bellerica*. *J Nat Prod* 60:739-42
- van Acker SABE, Bast A, van der Vijgh WJF. **(1997)**. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. In: Rice-Evans CA, Packer L, editors. *Flavonoids in health and disease*. New York: Marcel Dekker; 221–51
- Van Acker S.; Den Berg D.; Tromp M.; Griffioen D.; Bennekom W.& Bast A. **(1996)**. Structural aspects of the antioxidant activity of flavonoids. *Free Rad. Biol. Med* 20: 331
- Van Der Zee J., Eling T.E., Mason R.P., **(1989)**. Formation of free radical metabolites in the reaction between soybean lipoxygenase and its Inhibitors. An ESR study, *Biochemistry* 28 (21), 8363-8367

- Van Heyningen, R., (1959), Formation of polyols by the lens of the rat with 'sugar' cataract, *Nature* 184 (4681), 194-195
- Varma D. Shambhu and Kinoshita Jin H. (1976). Inhibition of lens aldose reductase by flavonoids-their possible role in the prevention of diabetic cataracts *Biochem. Pharmacol.* 25, 2505-2513
- Veckenstedt A., & Puszai R. (1981). Mecchanism of antiviral action of quercetin against cardiovirus infection in mice. *Antiviral Res* 1, 249-261
- Veckenstedt A., Guttner J., & Beladi I. (1987). Synergistic action of quercetin and murine alpha/beta interferon in the treatment of Mengo virus infection in mice. *Antiviral res* 7, 169-178
- Venkata Sai Prakash Chaturvedula, Indra Psakash (2012). Isolation of Stigmasterol and  $\beta$ -Sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavisissimus*. *Int. Curr. Pharm. J.* 1(9):239-242
- Vieira Mariana N., Winterhalter Peter and Jerz Gerold (2015). Flavonoids from the flowers of *Impatiens glandulifera* Royle isolated by high performance countercurrent chromatography. *Phytochem Anal*, 27, 116-125
- Vijisara Elizabeth D. and Arumugam S. (2014). GC-MS analysis of bioactive constituents of *Indigofera suffruticosa* leaves *J Chem Pharm Res*, 6 (8):294-300
- Vincent A.M.; Russell J.W.; Low P.; Feldman E.L. (2004). Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocr.Rev*, 25, 612-628
- Vinson J.A.; Howard III T.B. (1996). Inhibitor of protein glycation and advanced glycation end products by ascorbic acid and other vitamins and nutrients. *J. Nutr. Biochem* 7, 659-663
- Voelker T, Kinney AJ. (2001). Variations in the Biosynthesis of Seed-Storage Lipids. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*; 52:335-61
- Waage SK, Hedin PA. (1985). Quercetin 3-O-galactosyl-(1-6)-glucoside, a compound from narrowleaf vetch with antibacterial activity. *Phytochemistry* 24:243-5
- Wacher A., & Eilmes H.G. (1978). Antiviral activity of plant components. 1<sup>st</sup> communication: Flavonoids. (German). *Arzneimittelforschung* 28, 347-350
- Wachter GA, Hoffmann JJ, Furbacher T, Blake ME, Timmermann BN. (1999). Antibacterial and antifungal flavanone from *Eysenhardtia texana*. *Phytochemistry* 52:1469-71
- Walmir S. Garcez, Fernanda R. Garcez, Neli K. Honda, Antonio J.R. da Silva (1989). A nitropropanoyl-glucopyranoside from *Indigofera suffruticosa* *Phytochem* 28,4, 1251-1252
- Walter Majak and Michael Benn (1994). Additional esters of 3-nitropropanoic acid and glucose from fruit of the New Zealand Karaka tree, *Corynocarpus laevigatus* *Phytochem* 35, 4, 901-903
- Wang Xin-Luan, Wang Nai-Li, Zhang Yan, Gao Hao, Pang Wai-Yin, Wong Man-Sau, Zhang Ge, Qin Ling and Yao Xin-Sheng (2008). Effects of Eleven Flavonoids from the Osteoprotective Fraction of *Drynaria fortunei* (KUNZE) J. SM. on Osteoblastic Proliferation Using an Osteoblast-Like Cell Line, *Chem. Pharm. Bull.* 56(1) 46—51, 56,1
- Wang D.; Dubois R.N. (2010). Eicosanoids and cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 10, 181–193
- Wang P. F., & Zheng R. L. (1992). Inhibitors of autoxidation of linoleic acid by flavonoids in micelles. *Chem Phys Lipids* 63,37-40

- Warjeet S. Laitonjam and Sujata D. Wangkheirakpam Comparative study of the major components of the indigo dye obtained from *Strobilanthes flaccidifolius* Nees. and *Indigofera tinctoria* Linn. (2011). IJ P P B 3 (7), 108-116
- Wen E., Liang H. Chemical constituents of *Indigofera pseudotinctoria* Zhongguo Zhongyao Zazhi (2010). Zhongguo Zhong Yao Za Zhi 35(20),2708-2711
- Wermuth B., H. Burgisser K. Bohren J.P. von Wartburg (1982). Purification and characterization of human-brain aldose reductase. Eur J Biochem; 127, 279-84
- Whitman S. (2002). Structure-activity relationship studies of nordihydroguaiaretic acid inhibitors toward soybean, 12-human, and 15-human lipoxygenase. J. Med. Chem., 45, 2659-2661
- Wild S., Roglic G. Green A., Sicree R., King H. (2004). Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. Diabetes Care 27, 1047-53
- Williams- Brand W., Cuvelier M. E., Berset C (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Technology, 28, 25-30
- Wilson D.K., Bohren K.M., Gabbay K.H., Quijcho F.A. (1992). An Unlikely Sugar Substrate Site in the 1.65 Angstrom Structure of the Human Aldose Reductase Holoenzyme Implicated in Diabetic Complications. Science 257, 81-84
- Wilson DK, Tarle I, Petrash JM, Quijcho FA. (1993). Refined 1.8 Å structure of human aldose reductase complexed with the potent inhibitor zopolrestat. Proc Natl Acad Sci USA;90(21):9847-51
- Winkel-Shirley B. (2002). Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology Plant Physiology 126, 2 485-493
- Wisastra R, Dekker F.J. (2014). Inflammation, Cancer and Oxidative Lipoxygenase Activity are Intimately Linked. Cancers (Basel). 17;6(3):1500-21
- Wleklik M., Zahorscha R., & Luczak M. (1987). Interferon-inducing activity of flavonoids. Acta Microbiol Pol 36, 151-154
- Wu M.; Lin T.; Chiu Y.; Liou H.; Yang R.; Fu W. (2012). Involvement of 15-lipoxygenase in the inflammatory arthritis. J. Cell. Biochem., 113, 2279-2289
- Xiao PG. (2002). Modern Chinese materia medica [M]. Beijing: Chemical Industry Press
- Xorge A. Dominguez, Carolina Martinez, Alvaro Calero, Xorge A. Dominguez Jr., Marianela Hinojosa, Angeles Zamudio, William H Watson and Volker Zabel. (1978). Mexican Medicinal Plants XXXI Chemical Components from Jinquelite *Indigofera suffruticosa* J. Med. Plant. Res 34, 172-175
- Xu S.; Mueser T.; Marnett L.; Funk M., (2012). Crystal structure of 12-lipoxygenase catalytic-domain-inhibitor complex identifies a substrate-binding channel for catalysis. Structure, 20, 1490-1497
- Yahya M.A.A., Yaacob W.A. and. Nazlina I (2011). Isolation of chemical constituents from rhizomes of *ettlingera sphaerocephala* var. *grandiflora* The Malaysian Journal of Analytical Sciences, 15 1 22 - 26
- Yan fang Su, Chunzheng Li, Yuan Gao, Lizhi Di, Xinxin Zhang, Dean Guo.(2005). Acryloylated glucose 3-nitropropanoates from *Indigofera kirilowii* Journal of Natural Products 68, 12, 1785-1786

- Yan S. F.; Ramasamy R.; Naka Y.; Schmidt A. M. (2003). Glycation, inflammation, and RAGE- A scaffold for the macrovascular complications of diabetes and beyond. *Circ. Res* 93, 1159-1169
- Yanez JA, Remsberg CM, Miranda ND, Vega-Villa KR, Andrews PK, Davies NM. (2008). Pharmacokinetics of selected chiral flavonoids: hesperetin, naringenin and eriodictyol in rats and their content in fruit juices. *Biopharm. Drug Dispos.*; 29:63-82.
- Yasufumi Katagiri, Yasuyuki Hashidoko and Satoshi Tahara. (2002). Localization of Flavonoids in the Yellow Lupin Seedlings and Their UV-B-absorbing Potential. *Z. Naturforsch* 57c, 811-816.
- Yawadio Robert, Tanimori Shinji, Morita Naofumi (2007). Identification of phenolic compounds isolated from pigmented rices and their aldose reductases inhibitory activities *Food Chem.* 101, 1616-1625
- Ylä-Herttuala, S.; Rosenfeld, M.E.; Parthasarathy, S.; Sigal, E.; Särkioja, T.; Witztum, J.L.; Steinberg, D. (1991). Gene expression in macrophage-rich human atherosclerotic lesions. 15-lipoxygenase and acetyl low density lipoprotein receptor messenger RNA colocalize with oxidation specific lipid-protein adducts. *J. Clin. Investig.*, 87, 1146–1152
- Yokozawa T., Chen C.P., Dong E., Tanaka T., Nonaka G-I., and Nishioka (1998). *Pharmacol.* 56, 213–222
- Young R.N. (1999). Inhibitors of 5-lipoxygenase: A therapeutic potential yet to be fully realized? *Eur. J. Med. Chem.*, 34, 671–685
- Yoshikawa Masayuki, Uemura Toshiaki, Shimoda Hiroshi, Kishi Akinobu, Kawahara Yuzo, and Matsuda Hisashi (2000). Medicinal Foodstuffs. XVIII.1) Phytoestrogens from the Aerial Part of *Petroselinum crispum* MILL. (PARSLEY) and Structures of 6-O-Acetylapiin and a New Monoterpene Glycoside, Petroside *Chem. Pharm. Bull.* 48(7) 1039—1044
- Yuldashev M.P., Batirov E.Kh., Malikov V.M., Yuldashev P.Kh., 1993, Acylated flavanone glycosides from *Ricinus communis*, *Chem. Nat. Compd* 29 (3), 303-305
- Zaher N, Nicolaou I, Dimopoulos VJ (2002). Pyrrolylbenzothiazole derivatives as aldose reductases inhibitors. *J Enzym Inhib Med Chem* 17:131-135
- Zhan T; Lou H. (2007). Synthesis ofazole nucleoside analogues of D-pinitol as potential antitumor agents. *Carbohydr Res.*, 342, 6, 865-869
- Zhang X.-X., Zhang Z.-X., Chen L., Su Y.-F. (2006). New aliphatic nitro-compounds from *Indigofera carlesii* *Fitoterapia* 77, 1, 15-18
- Zhang Hua, Conte Melissa M., Huang Xiao-Cong, Khalil Zeinab and Capon Robert J (2012). A search for BACE inhibitors reveals new biosynthetically related pyrrolidones, furanones and pyrroles from a southern Australian marine sponge, *lanthella* sp. *The Royal Society of Chemistry Org. Biomol. Chem.* 10, 2656
- Zhao Y.; Wang W.; Wang Q.; Zhang X.; Ye L. (2012). Lipid metabolism enzyme 5-LOX and its metabolite LTB4 are capable of activating transcription factor NF-κB in hepatoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 418, 647–651
- Zheng WF, Tan RX, Yang L, Liu ZL. (1996). Two flavones from *Artemisia giraldii* and their antimicrobial activity. *Planta Med*: 62:160-2
- Zhong-Jun Ma, Isao Fujii, Yutaka Ebizuka, Xian Li (2004). A new lignan from the seeds of *Sphaerophysa salsula* J *Asian Nat Prod Res*, 6 (4), 265–269

