



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
—ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837—

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑΣ & ΧΗΜΕΙΑΣ

Χρήση Χρωματογραφίας Κατ' Αντιρροή Για Την Παραλαβή Βιοδραστικών Συστατικών Υψηλής Προστιθέμενης Αξίας Από Εκχυλίσματα Γεντιανής Και Προϊόντων Ελιάς.



Λεμονιά Αντωνιάδη

ΦΑΡΜΑΚΟΠΟΙΟΣ

Μεταπτυχιακό: Απομόνωση, Ανάλυση, Παραγωγή και Έλεγχος Βιοδραστικών
Φυσικών Προϊόντων

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Κ. ΣΚΑΛΤΣΟΥΝΗΣ

ΑΘΗΝΑ, 2019

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Φαρμακευτική Σχολή
Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων

Μεταπτυχιακό πρόγραμμα:

Απομόνωση, Ανάπτυξη, Παραγωγή και Έλεγχος Βιοδραστικών Φυσικών Προϊόντων

Τίτλος εργασίας:

Χρήση Χρωματογραφίας Κατ' Αντιρροή Για Την Παραλαβή Βιοδραστικών
Συστατικών Υψηλής Προστιθέμενης Αξίας Από Εκχυλίσματα Γεντιανής
Και Προϊόντων Ελιάς.

Φοιτήτρια:

ΑΝΤΩΝΙΑΔΗ ΛΕΜΟΝΙΑ

A.M: 170104

Επιβλέπων Καθηγητής:

κ. Σκαλτσούνης Λέανδρος

Τριμελής Επιτροπή:

Καθηγητής κ. Αλέξιος-Λέανδρος Σκαλτσούνης

Καθηγήτρια κα. Σοφία Μητάκου

Επίκουρη Καθηγήτρια κα. Μαρία Χαλαμπαλάκη

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω για την εκπόνηση του μεταπτυχιακού προγράμματος:

- Τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον καθηγητή του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων και επιβλέποντα της διπλωματικής εργασίας κ. Αλέξιο-Λέανδρο Σκαλτσούνη, την καθηγήτρια του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων κα. Σοφία Μητάκου και την επίκουρη καθηγήτρια του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων κ. Μαρία Χαλαμπαλάκη για την κριτική ανάγνωση του κειμένου, τον πολύτιμο χρόνο που διέθεσαν και την τιμή που μου έκαναν να συμμετάσχουν στην τριμελή εξεταστική επιτροπή της διπλωματικής μου εργασίας.
- Τον καθηγητή κ. Αλέξιο-Λέανδρο Σκαλτσούνη για την επιλογή του να μετάσχω στο συγκεκριμένο μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών και την ευκαιρία που μου έδωσε μέσω της ανάθεσης του συγκεκριμένου θέματος.
- Την επίκουρη καθηγήτρια κ. Μαρία Χαλαμπαλάκη για την πολύτιμη συνεργασία, στην λήψη, επεξεργασία και επεξήγηση των φασμάτων μάζας.
- Την καθηγήτρια κ. Σοφία Μητάκου, για το συνεχές ενδιαφέρον, τις καταλυτικές συμβουλές της και την βοήθεια συγγραφής της παρούσας εργασίας.
- Ευχαριστώ μέσα από την καρδιά μου, τον μεταδιδάκτορα Αποστόλη Αγγελή για το γεγονός ότι πίστεψε σε μένα και υπήρξε πάντα δίπλα μου κυρίως σε επιστημονικό αλλά και προσωπικό επίπεδο, με υπομονή σε όλη μου την γκρίνια και αμέριστο ενδιαφέρον. Χωρίς αυτόν, πιθανά να μην είχα κάνει ποτέ αυτό το μάστερ και να μην είχα καταλάβει με τι θέλω να ασχοληθώ.
- Τον υποψήφιο διδάκτορα Δημήτρη Μιχαηλίδη για όλη την συμβολή του στην εξοικείωση μου με το εργαστήριο αλλά και την καταλυτική του βοήθεια του στην εκτέλεση των πειραμάτων ειδικά τις στιγμές που τίποτα δεν πήγαινε όπως έπρεπε.
- Την ερευνήτρια Έφη Θωμά για όλα, τα εργαστηριακά και τα προσωπικά.
- Τον διδάκτορα Παναγιώτη Σταθόπουλο για τις αναλύσεις και τον έλεγχο καθαρότητας των απομονωμένων ουσιών.
- Την υποψήφια διδάκτορα Θεοδώρα Νίκου για την λήψη και τη βοήθεια στην ερμηνεία των φασμάτων μάζας.
- Τον υποψήφιο διδάκτορα Σταύρο Μπειτενάκη για την λήψη των φασμάτων αρχικά και στην συνέχεια την εκμάθηση μου να τα λαμβάνω μόνη
- Την υποψήφια διδάκτορα Μαριλένα Σακαβίτση για την βοήθεια της τις πρώτες στιγμές της επιστροφής μου στο εργαστήριο και τον υποψήφιο διδάκτορα Πέτρο Τζίμα για την ανιδιοτελή συνεργασία.
- Ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλους τους προπτυχιακούς, μεταπτυχιακούς, διδακτορικούς και μεταδιδακτορικούς φοιτητές του εργαστηρίου. Χωρίς την παρουσία τους και τη συμβολή τους η έρευνα θα ήταν σίγουρα λιγότερο ενδιαφέρουσα.

- Τέλος, δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω την οικογένειά μου για όλα αυτά που μου πρόσφεραν και θυσίασαν για μένα, τον Κωνσταντίνο που βίωσε μαζί μου όλη αυτή την διαδικασία και τους φίλους μου, που ήταν πάντα εκεί αληθινά. Σε αυτούς, λοιπόν αφιερώνω αυτό το μεταπτυχιακό και τους υπόσχομαι ακόμα σπουδαιότερα πράγματα.

Πρόλογος

Η εκπόνηση της παρούσας ερευνητικής μελέτης είχε ως αντικείμενο:

- Εφαρμογή της τεχνικής Χρωματογραφίας Κατανομής με Φυγοκέντρηση για την παραλαβή βιοδραστικών συστατικών υψηλής προστιθέμενης αξίας.
- Επεξεργασία μεθανολικού εκχυλίσματος ρίζας Γεντιανής για την παραλαβή καθαρού Γεντιοπικροσίδη με τις τεχνικές C.P.E και prep-HPLC.
- Απομόνωση Ολεανολικού και Μασλινικού Οξέος από προϊόντα ελιάς με την τεχνική pH-Zone C.P.E.
- Ανάλυση Ολικού Πολυφαινολικού Κλάσματος Ελαιολάδου (T.P.F.) και απομόνωση τριών νέων μεταβολιτών: Ολεοκανθαλικό Οξύ, Ολεασεινικό Οξύ και Eda Acid.
- Έλεγχος αντιοξειδωτικής δράσης D.P.P.H. των απομονωμένων φυσικών και ημισυνθετικών παραγώγων του ελαιολάδου.

Κατά την παρούσα διπλωματική εργασία λήφθηκαν τα ακόλουθα αποτελέσματα:

Από την επεξεργασία του μεθανολικού εκχυλίσματος γεντιανής παραλήφθηκε καθαρός μεταβολίτης γεντιοπικροσίδης με την εφαρμογή των τεχνικών C.P.E. και παρασκευαστικής HPLC. Παράλληλα, ταυτοποιήθηκαν ακόμα 6 δευτερογενείς μεταβολίτες του φυτού, Γεντισίνη, Ισογεντισίνη, Πριμεβελοσυλ-3-Ο-ισογεντισίνη, Πριμεβελοσυλ-7-Ο-ισογεντισίνη, Σβερτιαμαρίνη και Λογανικό Οξύ.

Από την επεξεργασία των προϊόντων ελιάς, προέκυψαν τα ακόλουθα αποτελέσματα:

Αρχικά, από την επεξεργασία φύλλων ελιάς με ζωικό άνθρακα παραλήφθηκε το εμπλουτισμένο κλάσμα σε Ολεανολικό Οξύ, όπου με την τεχνική pH-Zone απομονώθηκε καθαρός μεταβολίτης. Η επεξεργασία του Ολικού Πολυφαινολικού Κλάσματος (T.P.F.) με την μέθοδο του dual mode C.P.E. οδήγησε στην παραλαβή εμπλουτισμένου κλάσματος σε Μασλινικό Οξύ, το οποίο περαιτέρω αναλύθηκε με pH-Zone C.P.E. για την παραλαβή καθαρού μεταβολίτη.

Παράλληλα, από την ανάλυση του Ολικού Πολυφαινολικού Κλάσματος με την μέθοδο gradient mode C.P.C. επιτεύχθηκε η παραλαβή εμπλουτισμένων κλασμάτων και η περαιτέρω ανάλυση τους οδήγησε στην απομόνωση τριών νέων μεταβολιτών: Ολεοκανθαλικό Οξύ, Ολεασεινικό Οξύ και Eda Acid ((E)-3-(1-Οξοβουτ-2-εν-2-υλ) γλουταρικό Οξύ).

Τέλος, πραγματοποιήθηκε έλεγχος αντιοξειδωτικής δράσης με την εφαρμογή του πρωτοκόλλου DPPH στους απομονωμένους φυσικούς μεταβολίτες του ελαιολάδου, από όπου εξήχθησαν σημαντικά αποτελέσματα.

Περίληψη

Αντικείμενο μελέτης αποτέλεσε η Χρωματογραφία Κατανομής με Φυγοκέντρηση, η οποία είναι μία σύγχρονη τεχνική για την επεξεργασία και κλασμάτωση πολύπλοκων εκχυλισμάτων και την παραλαβή καθαρών μεταβολιτών, τόσο του πρωτογενή όσο και του δευτερογενή μεταβολισμού των φυτικών οργανισμών. Με την εφαρμογή της τεχνικής αυτής έγινε δυνατή η ανάπτυξη κατάλληλης μεθόδου για την παραλαβή καθαρών μεταβολιτών, ανάλογα τις ιδιότητες του εκχυλίσματος και του μεταβολίτη στόχου.

Επιλέχθηκαν 2 διαφορετικά φυτικά υλικά, η γεντιανή (*Gentiana lutea*) και η ελιά (*Olea europaea*), καθώς είναι πλούσια σε βιοδραστικούς μεταβολίτες με αξιοσημείωτες φαρμακολογικές ιδιότητες.

Πρωταρχικός στόχος της διπλωματικής εργασίας ήταν η επεξεργασία του μεθανολικού εκχυλίσματος ρίζας γεντιανής για την γρήγορη και αποτελεσματική απομόνωση του δραστικού μεταβολίτη γεντιοπικροσίδη με την χρήση όσο το δυνατό πιο εξελιγμένων εργαστηριακών μεθόδων. Έτσι, το εκχύλισμα πλούσιο σε γεντιοπικροσίδη αναλύθηκε αρχικά με την μέθοδο C.P.E., ώστε να μειωθεί ο χρόνος επεξεργασίας και προέκυψαν συνολικά 10 εμπλουτισμένα κλάσματα. Η περαιτέρω ανάλυση των εμπλουτισμένων κλασμάτων με την τεχνική παρασκευαστική HPLC οδήγησε στην παραλαβή γεντιοπικροσίδης σε μεγάλη καθαρότητα. Παράλληλα με την υλοποίηση του πρωταρχικού στόχου, επιτεύχθηκε και μια πιο λεπτομερής φυτοχημική ανάλυση του ολικού εκχυλίσματος από την οποία έγινε δυνατή η παραλαβή και ταυτοποίηση 6 κύριων μεταβολιτών του εκχυλίσματος (Γεντισίνη, Ισογεντισίνη, Ισογεντισίνη-3-O-Πριμεβεροσίδη, Ισογεντισίνη-7-O-Πριμεβεροσίδη, Σβερτιαμαρίνη και Λογανικό Οξύ).

Εξίσου σημαντικός στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η γρήγορη και αποτελεσματική απομόνωση ολεανολικού και μασλινικού οξέος από προϊόντα ελιάς με την χρήση σύγχρονων χρωματογραφικών μεθόδων. Το ολεανολικό και μασλινικό οξύ αποτελούν δύο βιοδραστικά τριτερπενικά οξέα με πληθώρα βιολογικών δράσεων. Οι διαχωριστικές πορείες, που επιλέχθηκαν περιλαμβάνουν σαν κύριο στάδιο τη χρήση της Χρωματογραφίας Κατ' Αντιρροή με την εφαρμογή της μεθόδου pH-zone refining. Η μέθοδος αυτή εκμεταλλεύεται την όξινη φύση των δύο τριτερπενίων και κυρίως την ιδιότητά τους να μεταβάλουν δραματικά τον συντελεστή κατανομής στις δύο φάσεις ενός διφασικού συστήματος ανάλογα του pH του συστήματος. Το δείγμα, που επιλέχθηκε για την απομόνωση του ολεανολικού οξέος είναι το απολιπασμένο κλάσμα του ακετονικού εκχυλίσματος των φύλλων ελιάς. Το κλάσμα αυτό, πέραν των λιπαρών ενώσεων και των χλωροφυλλών που περιέχει, αποτελεί και πλούσια πηγή ολεανολικού οξέος. Η πορεία διαχωρισμού που επιλέχθηκε περιλαμβάνει αρχικά την επεξεργασία του εκχυλίσματος με ζωικό άνθρακα ώστε να απομακρυνθεί ο μεγάλος όγκος χλωροφυλλών και στη συνέχεια, την ανάλυση του κλάσματος με pH-Zone refining C.P.E., που οδήγησε στην απομόνωση καθαρού ολεανολικού οξέος. Το ολικό πολυφαινολικό κλάσμα του ελαιολάδου περιέχει σημαντικές βιοδραστικές ουσίες διαφόρων χημικών κατηγοριών και είναι πλούσια πηγή σε μασλινικό οξύ. Η διαδικασία απομόνωσης του μασλινικού οξέος από το κλάσμα του ελαιολάδου περιλαμβάνει τη χρήση της Χρωματογραφίας Κατ' Αντιρροή με εφαρμογή δύο διαφορετικών μεθόδων. Αρχικά, το εκχύλισμα κλασματώθηκε με dual-mode CPE και στη συνέχεια, το εμπλουτισμένο στον μεταβολίτη, κλάσμα αναλύθηκε με pH-zone refining C.P.E για την παραλαβή καθαρού μεταβολίτη.

Παράλληλα, σημαντικό μέρος διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε η ανάλυση του Ολικού Πολυφαινολικού Κλάσματος με την μέθοδο gradient mode C.P.C., όπου εξασφαλίζεται η

παραλαβή εμπλουτισμένων κλασμάτων με έντονο χημικό ενδιαφέρον. Η επεξεργασία τριών εξ' αυτών των κλασμάτων οδήγησε στην απομόνωση τριών νέων μεταβολιτών. Η ανάλυση του κλάσματος 19 με την μέθοδο παρασκευαστική TLC οδήγησε στην απομόνωση μίας ουσίας με παρόμοια χημική δομή με την ολεοκανθάλη, η οποία ταυτοποιήθηκε ως Ολεοκανθαλικό Οξύ. Με παρασκευαστική HPLC αναλύθηκε το κλάσμα 21, από όπου προέκυψε ουσία με παρόμοια δομή με την Ολεασείνη και χαρακτηρίστηκε ως Ολεασεινικό Οξύ. Τέλος, παρόμοια επεξεργάστηκε το κλάσμα 27, που οδήγησε στην απομόνωση του Eda Acid, το οποίο ενώ έχει απομονωθεί από προϊόντα ελαιοτριβείων, είναι η πρώτη φορά που αναφέρθηκε στο ελαιόλαδο.

Τελευταίο πειραματικό κομμάτι της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι ο έλεγχος της αντιοξειδωτικής δράσης των απομονωμένων μεταβολιτών του ελαιολάδου μέσω της εφαρμογής του πρωτοκόλλου DPPH. Από τα αποτελέσματα λήφθηκαν αξιόλογα συμπεράσματα που συνδέουν την εμφάνιση δράσης μίας ουσίας με την ύπαρξη του χαρακτηριστικού δακτυλίου κατεχόλης στο μόριο της.

Abstract

The subject of this study is the application of the Counter Current Chromatography, which is a modern technique of process and separation complex extracts and isolation pure metabolites of both primary and secondary metabolism of plants. By applying this technique, it has been possible to develop an appropriate method for obtaining pure metabolites depending on the properties of the extract and the metabolite.

Two different plant materials, *Gentiana lutea* and *Olea europaea*, were chosen, as they are rich in bioactive metabolites with remarkable pharmacological properties.

The primary objective of this thesis was the processing of methanol extract of gentian root for the rapid and efficient isolation of the active metabolite gentiopicroside using the most current laboratory methods. Thus, the extract rich in gentiopicroside, was first analyzed by the C.P.E. method to reduce processing time and a total of 10 enriched fractions were obtained. Further analysis of the enriched fractions with preparative HPLC was obtained gentiopicroside in high purity. These two techniques use a different mechanism and their combination in the same separation process can ensure a more efficient purification of the target. Along with the achievement of the primary objective, a more detailed phytochemical analysis of the total extract was happened, from which it was possible to obtain and identify 6 major metabolites of the extract. (Gentisin, Isogentisin, Isogentisin-3-O-Primeveroside, Isogentisin-7-O-Primeveroside, Swertiamarin and Loganic Acid)

Equally important aim of the present work was the rapid and efficient isolation of Oleanolic and Maslinic Acid from olive products using modern chromatographic methods. Oleanolic and maslinic acid are two bioactive triterpenic acids with a variety of biological activities. The separation procedure included the use of Centrifugal Partition Chromatography as the main step by applying the pH-Zone refining method. This method exploited the acidic nature of the two triterpenes and, in particular, their ability to dramatically modification the coefficient partition in the two phases of a two-phase system according to the pH of the system. The acetonic extract of the olive leaves, in addition to the fatty compounds and chlorophylls, is also a rich source of oleanolic acid. The separation involved treating of extract with charcoal to remove the large volume of chlorophylls and then, the fraction was analyzed by pH-Zone refining C.P.E., which led to the isolation of pure oleanolic acid. The total polyphenolic fraction of olive oil contains important bioactive substances of various chemical categories and is a rich source of maslinic acid. The isolation of maslinic acid from the olive oil fraction involved the use of Chromatography Partition Chromatography by applying two different methods. Initially, the extract was fractionated with dual-mode CPE and then the fraction enriched in the metabolite was analyzed by pH-Zone refining C.P.E to obtain pure maslinic acid.

Furthermore, a significant part of this thesis was the analysis of the Total Polyphenol Fraction (T.P.F.) by gradient mode C.P.C., which ensured the intake of enriched fractions with high chemical interest. The treatment of these fractions led to the

isolation of three new metabolites. Analysis of fraction 19 by the preparative TLC method led to the isolation of a compound with similar chemical structure to oleocanthal, which was identified as Oleocanthalic Acid. By applying preparative HPLC, fraction 21 was analyzed to give a compound similar in structure to oleacein and was elucidated as Oleaceinic Acid. Finally, similar procedure in fraction 27 led to the isolation of Eda Acid, which, while had been isolated from olive oil products, is the first time to be mentioned in olive oil.

The last experimental part of this thesis was the control of the antioxidant activity of the isolated metabolites of olive oil through the application of the DPPH protocol. The results obtained remarkable conclusions linking the action of the compound with the presence of the catechol moiety in the molecule.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	v
Πρόλογος.....	vii
Περίληψη.....	ix
Abstract.....	xi
Περιεχόμενα.....	xiii
Εικόνες.....	xvii
Σχήματα.....	xxii
Πίνακες.....	xxiii
Συνοτμήσεις.....	xxiv
1 Θεωρητικό Μέρος	1
1.1 Γεντιάνα-Gentiana lutea Gentianaceae	2
1.1.1 Γενικά Στοιχεία	3
1.1.2 Παραδοσιακές και Σύγχρονες Χρήσεις	5
1.1.3 Γεωγραφική Κατανομή.....	6
1.1.4 Συστηματική Κατάταξη.....	8
1.1.5 Βοτανικά χαρακτηριστικά	10
1.1.6 Φυτοχημική Ανάλυση.....	12
1.1.6.1 Ρίζα και Ριζώματα.....	12
1.1.6.2 Υπέργεια Τμήματα.....	17
1.1.7 Φαρμακολογικές Ιδιότητες	18
1.1.7.1 Επίδραση στον Γαστρικό Βλεννογόνο	19
1.1.7.2 Αντιβακτηριακές και Αντιϊκές Ιδιότητες.....	19
1.1.7.3 Αντιοξειδωτικές Ιδιότητες	20
1.1.7.4 Επίδραση στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα.....	20
1.1.7.5 Αντιφλεγμονώδεις Ιδιότητες και Επούλωση Πληγών	21
1.1.7.6 Άλλες δράσεις.....	21
1.2 Ελιά- Olea europaea, Oleaceae	22
1.2.1 Γεωγραφική Επέκταση	23
1.2.2 Λαογραφικά Στοιχεία	25
1.2.2.1 Ελληνική Μυθολογία.....	25
1.2.2.2 Πολιτισμικά στοιχεία.....	26
1.2.2.3 Παραδοσιακές και Σύγχρονες Ιατρικές χρήσεις.....	28
1.2.3 Οικονομική Ανάλυση.....	29

1.2.4	Συστηματική Κατάταξη.....	32
1.2.5	Βοτανικά Χαρακτηριστικά.....	33
1.2.5.1	Επιμέρους τμήματα της <i>Olea europaea</i>	33
1.2.5.2	Εδαφικές Απαιτήσεις.....	35
1.2.6	Φυτοχημική Σύσταση.....	36
1.2.7	Φαρμακολογικές Ιδιότητες.....	41
1.2.7.1	Αντιδιαβητικές Ιδιότητες.....	41
1.2.7.2	Ανασταλτική Δράση σε Καρκινικά Κύτταρα.....	41
1.2.7.3	Αντιμικροβιακές Ιδιότητες.....	42
1.2.7.4	Αντιοξειδωτικές Ιδιότητες.....	43
1.2.7.5	Αναστολή Ενζύμων.....	44
1.2.7.6	Αντιυπερτασικές και Καρδιοπροστατευτικές Ιδιότητες.....	45
1.2.7.7	Αντιφλεγμονώδεις και Αναλγητικές Ιδιότητες.....	46
1.2.7.8	Γαστροπροστατευτικές Ιδιότητες.....	47
1.2.7.9	Νευροπροστατευτικές Ιδιότητες.....	48
1.2.7.10	Άλλες Φαρμακολογικές Ιδιότητες.....	48
1.3	Χρωματογραφία Κατ' Αντιρροή.....	50
	(Countercurrent Chromatography CCC).....	50
1.3.1	Ιστορικά Στοιχεία- Εξέλιξη Μεθόδου.....	51
1.3.2	Αρχή Μεθόδου.....	51
1.3.3	Βασικοί Τύποι Χρωματογραφίας Κατ' Αντιρροή.....	51
1.3.3.1	Droplet Counter Current Chromatography (DCCC).....	51
1.3.3.2	High – Speed Counter Current Chromatography (HSCCC).....	52
1.3.3.3	Centrifugal Partition Chromatography (CPC).....	52
1.3.3.4	Centrifugal Partition Extraction (CPE).....	53
1.3.4	Οργανολογία.....	54
1.3.5	Επιλογή Και Έλεγχος Διαφασικού Συστήματος.....	56
1.3.5.1	Συντελεστής Κατανομής.....	56
1.3.5.2	Κατακράτηση Στατικής Φάσης.....	60
1.3.6	Παράγοντες Που Επηρεάζουν Τον Διαχωρισμό.....	60
1.3.6.1	Διάλυμα Δείγματος.....	60
1.3.6.2	Επιλογή Κινητής Φάσης.....	61
1.3.6.3	Ροή.....	62
1.3.6.4	Ταχύτητα Περιστροφής.....	62
1.3.6.5	Γέμισμα Στήλης.....	62
1.3.6.6	Ένεση Δείγματος.....	62

1.3.6.7	Υπολογισμός Κατακράτησης Της Στατικής Φάσης.....	63
1.3.7	Πλεονεκτήματα Χρωματογραφίας Κατ' Αντιρροή	63
1.3.8	Μειονεκτήματα Χρωματογραφίας Κατ' Αντιρροή	64
1.3.9	Βασικοί Μέθοδοι Χρωματογραφίας Κατ' Αντιρροή.....	66
1.3.9.1	Normal Mode	66
1.3.9.2	Dual Mode	66
1.3.9.3	Elution-Extrusion	66
1.3.9.4	Gradient Mode	66
1.3.9.5	pH-Zone Refining	67
2	Πειραματικό Μέρος	71
2.1	Αρχές Μεθόδων	72
2.2	Αναλώσιμα-Αντιδραστήρια.....	75
2.3	Πειραματική Επεξεργασία μεθανολικού εκχυλίσματος ρίζας Γεντιανής	77
2.3.1	Εισαγωγή	77
2.3.2	Κλασμάτωση μεθανολικού εκχυλίσματος με Χρωματογραφία κατ' Αντιρροή 78	
2.3.2.1	Επιλογή Διφασικού Συστήματος.....	78
2.3.2.2	Εκτέλεση Διαχωρισμού	81
2.3.3	Καθαρισμός Γεντιοπικροσίδη από εμπλουτισμένα κλάσματα μέσω της παρασκευαστικής HPLC	87
2.3.3.1	Επιλογή Κατάλληλης Μεθόδου.....	87
2.3.3.2	Ανάλυση του απομονωμένου μεταβολίτη και Έλεγχος καθαρότητας	91
2.3.4	Ανάλυση κλασμάτων CPE και ταυτοποίηση των εμπεριεχομένων μεταβολιτών 94	
2.3.5	Συμπεράσματα	107
2.4	Απομόνωση Τριτερπενικών Οξέων από προϊόντα Ελιάς με την χρήση Centrifugal Partition Extraction (C.P.E.)	108
2.4.1	Εισαγωγή	108
2.4.2	Απομόνωση Ολεανολικού Οξέος από Εκχύλισμα Φύλλων Ελιάς.....	110
2.4.2.1	Επεξεργασία εκχυλίσματος με ζωικό άνθρακα.....	110
2.4.2.2	Εκτέλεση διαχωρισμού με την μέθοδο pH-Zone CPE	111
2.4.2.3	Φασματοσκοπική Ανάλυση απομονωμένου Ολεανολικού Οξέος	113
2.4.3	Απομόνωση Μασλινικού Οξέος από Ολικό Πολυφαινολικό Κλάσμα Ελαιολάδου (T.P.F.)	116
2.4.3.1	Κλασμάτωση Ολικού Πολυφαινολικού Κλάσματος Ελαιολάδου με Dual Mode CPE	116

2.4.3.2	Επεξεργασία εμπλουτισμένου κλάσματος Μασλιτικού Οξέος με pH-Zone CPE	118
2.4.3.3	Φασματοσκοπική Ανάλυση απομονωμένου Μασλιτικού Οξέος	121
2.4.4	Συμπεράσματα	124
2.5	Ανάλυση Ολικού Πολυφαινολικού Κλάσματος (T.P.F.)	125
2.5.1	Κλασμάτωση TPF με Step-Gradient CPC	125
2.5.2	Επεξεργασία κλασμάτων CPC και απομόνωση νέων μεταβολιτών.....	128
2.5.2.1	Επεξεργασία του συνενωμένου κλάσματος 19 (Fr19) και παραλαβή Ολεοκανθαλικού Οξέος.....	128
2.5.2.2	Επεξεργασία εμπλουτισμένου κλάσματος 21 (Fr21) και παραλαβή Ολεασεινικού Οξέος.....	135
2.5.2.3	Επεξεργασία του εμπλουτισμένου κλάσματος 27 (Fr27) και παραλαβή του Eda Acid	139
2.5.2.4	Ανάλυση απομονωμένων μεταβολιτών με UHPLC-HRMS.....	141
2.5.3	Ημισυνθετική Παραγωγή Ολεοκανθαλικού και Ολεασεινικού Οξέος.....	145
2.5.3.1	Απομόνωση καθαρής Ολεοκανθάλης και Ολεασείνης από τα εμπλουτισμένα κλάσματα του CPC.....	148
2.5.3.2	Ημισυνθετική παραγωγή Ολεοκανθαλικού Οξέος	151
2.5.3.3	Ημισυνθετική Παραγωγή Ολεασεινικού Οξέος	156
2.5.4	Μελέτες Αντιοξειδωτικής Δράσης.....	168
2.5.5	Συμπεράσματα	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
3	Συμπεράσματα	177
4	Βιβλιογραφία.....	178

Εικόνες

Εικόνα 1 Δημοσιεύσεις ανά χρόνο και ανά ερευνητικό πεδίο.....	3
Εικόνα 2 Νόμισμα με απεικόνιση τον Βασιλιά Γέντη	4
Εικόνα 3 Σκεύασμα "Long-Dan"	5
Εικόνα 4 Σκευάσματα "Moxie".....	5
Εικόνα 5 Παγκόσμια Κατανομή του γένους <i>Gentiana</i>	6
Εικόνα 6 Ευρωπαϊκή Κατανομή του είδους <i>Gentiana lutea</i>	7
Εικόνα 7 Περιοχές Κινδύνου Εξαφάνισης του είδους <i>Gentiana lutea</i>	7
Εικόνα 8 Βοτανικά Τμήματα.....	10
Εικόνα 9 Βοτανικά τμήματα	10
Εικόνα 10 Αποξηραμένες Ρίζες	10
Εικόνα 11 Τμήματα του Άνθους – Βλαστός -Φύλλα	11
Εικόνα 12 Διαφορετικές ποικιλίες <i>G. lutea</i>	11
Εικόνα 13 Βιοσυνθετικό Μονοπάτι.....	13
Εικόνα 14 Καρβοκυκλικά Ιριδοειδή	14
Εικόνα 15 Παράγωγα Σεκολογανικού Οξέος	14
Εικόνα 16 Παράγωγα Κιγκισίδη	14
Εικόνα 17 Παράγωγα Γεντιοπικροσίδη.....	14
Εικόνα 18 Δομή Αμαρογεντίνης	15
Εικόνα 19 Δομή παραγώγων Ξανθόνης	15
Εικόνα 20 Δομή Τριτερπενικών παραγώγων.	15
Εικόνα 21 Δομή παραγώγων C-γλυκοσιδών Φλαβόνης.	16
Εικόνα 22 Δομή α-τοκοφερολοκινόνης.....	16
Εικόνα 23 Δομή Εξακοσανάλης.....	16
Εικόνα 24 Αέριο Χρωματογράφημα αιθέριου ελαίου ριζών.	16
Εικόνα 25 Δομή Μανγκιφερίνης.	17
Εικόνα 26 Δομή Σεπτεμφιδοσίδης.	17
Εικόνα 27 Εμπορικό Σκεύασμα <i>Sinupret</i>	21
Εικόνα 28 Γεωγραφική Εξάπλωση της Ελιάς στην Μεσογειακή Λεκάνη.....	23
Εικόνα 29 Συλλογή ελαιόκαρπου στο Βυζάντιο και Λιομάζωμα, πίνακας του Θεόφιλου.	24
Εικόνα 30 Τετράδραχμο αφιερωμένο στην Αθηνά.....	25
Εικόνα 31 Τετράδραχμο αφιερωμένο στην Αθηνά.....	25
Εικόνα 32 Η Θεϊκή Διεκδίκηση της Αθήνας.....	25
Εικόνα 33 Οι άθλοι του Ηρακλή.....	25
Εικόνα 34 Ελιές-Τοπίο στο Καντακές, Salvador Dalí 1922	26
Εικόνα 35 Ελαιώνας, Vincent Van Gogh.....	27
Εικόνα 36 Παγκόσμια Κατανάλωση Ελαιολάδου.	29
Εικόνα 37 Παγκόσμια Παραγωγή Ελαιολάδου.	30
Εικόνα 38 Παγκόσμια Εξαγωγή Ελαιολάδου στην Παγκόσμια Αγορά	30
Εικόνα 39 Πτωτική Τάση της τιμής πώλησης του Ελαιολάδου από τις 3 Κύριες Χώρες Παραγωγής.....	31
Εικόνα 40 Ευρωπαϊκές Ενδοκοινοτικές Σχέσεις.....	31
Εικόνα 41 Επιμέρους Βοτανικά Τμήματα.....	33
Εικόνα 42 Μηναία Ποσοστά Συλλογής Ελαιόκαρπου.....	34
Εικόνα 43 Δομή Ολεοκανθαλικού Οξέος και Ολεασεινικού Οξέος.	36
Εικόνα 44 Δομές Πολυακόρεστων Λιπαρών Οξέων.....	36
Εικόνα 45 Χημικές Κατηγορίες Μεταβολιτών.....	37

Εικόνα 46 Υποκατηγορίες Φαινολικών Ενώσεων.	38
Εικόνα 47 Δομή Υδροξυτυροσόλης.	39
Εικόνα 48 Δομές ανοιχτών και κλειστών ιριδοειδών.	39
Εικόνα 49 Δομή Λουτεολίνης.	39
Εικόνα 50 Δομή Ακετοξυπινореζινόλης.	40
Εικόνα 51 Δομή Μασλινικού και Ολεανολικού Οξέος.	40
Εικόνα 52 Δομή Μασλινικού και Ολεανολικού Οξέος.	40
Εικόνα 53 Δομή Ολευρωπεΐνης.	41
Εικόνα 54 Droplet Counter Current Chromatography	52
Εικόνα 55 High-Speed Counter Current Chromatography.	52
Εικόνα 56 Centrifugal Partition Chromatography.	52
Εικόνα 57 Οργανολογία C.P.C.	54
Εικόνα 58 Τύποι Υδροδυναμικής Στήλης.	54
Εικόνα 59 Υδροστατική Στήλη.	55
Εικόνα 60 Σχηματική Απεικόνιση Ελέγχου Καταλληλότητας Διφασικού Συστήματος.	57
Εικόνα 61 Διάγραμμα Συστήματος Τύπου 1.	58
Εικόνα 62 Διάγραμμα Συστήματος Τύπου 2.	59
Εικόνα 63 Διάγραμμα Συστήματος Τύπου 3.	59
Εικόνα 64 Άλλοι Τύποι Διαγραμμάτων για την εύρεση διφασικού συστήματος.	60
Εικόνα 65 Κατανόηση Ascending - Descending Mode.	61
Εικόνα 66 Ζώνες μετάπτωσης κατά την αλλαγή του pH.	67
Εικόνα 67 Διάγραμμα μεταβολής pH κατά τον διαχωρισμό.	67
Εικόνα 68 Δομή Γεντιοπικροσίδη.	77
Εικόνα 69 Χρωματογραφήματα για έλεγχο του διφασικού συστήματος σε 254nm, 366nm και στο ορατό.	79
Εικόνα 70 Χρωματογράφημα ολικού εκχυλίσματος <i>Gentiana lutea</i>	79
Εικόνα 71 Χρωματογραφήματα πάνω και κάτω φάσης για τον υπολογισμό του συντελεστή κατανομής K.	80
Εικόνα 72 Χρωματογραφήματα συνενωμένων κλασμάτων CPC στα 254nm, 366nm και στο ορατό.	82
Εικόνα 73 Χρωματογράφημα κατά την εκτέλεση CPE.	83
Εικόνα 74 Χρωματογράφημα συνενωμένων κλασμάτων στα 254nm.	84
Εικόνα 75 Χρωματογράφημα συνενωμένων κλασμάτων στα 366nm.	84
Εικόνα 76 Χρωματογράφημα συνενωμένων κλασμάτων στο ορατό.	85
Εικόνα 77 Χρωματογράφημα Κλασμάτων CPE στα 280nm.	86
Εικόνα 78 Χρωματογράφημα Κλασμάτων CPE στα 254nm.	86
Εικόνα 79 Χρωματογράφημα 1ης Μεθόδου Ανάλυσης.	88
Εικόνα 80 Χρωματογράφημα 2ης Μεθόδου Ανάλυσης.	89
Εικόνα 81 Χρωματογράφημα 3ης Μεθόδου Ανάλυσης.	90
Εικόνα 82 Χρωματογραφήματα καθαρού Γεντιοπικροσίδη στα 280nm.	91
Εικόνα 83 Φάσμα ¹ H Γεντιοπικροσίδη.	92
Εικόνα 84 Χρωματογράφημα Γεντιοπικροσίδη UPHLC.	93
Εικόνα 85 Φάσμα μάζας HRMS-Orbitrap σε αρνητικό ιονισμό του Γεντιοπικροσίδη.	93
Εικόνα 86 Χρωματογράφημα Fr 1 στα 254nm και 280nm.	94
Εικόνα 87 UV της κύριας κορυφής του Fr 1.	94
Εικόνα 88 Δομή Ξανθονών.	95
Εικόνα 89 Χρωματογράφημα Fr1 UPHLC.	96
Εικόνα 90 Φάσμα Μάζας HRMS-Orbitrap σε αρνητικό ιονισμό του Fr1.	96

Εικόνα 91 Δομή Ο-γλυκοζιτών ξανθονών.	97
Εικόνα 92 Δομή Πριμεβεροσίδη.	97
Εικόνα 93 Χρωματογράφημα Fr 3 στα 254nm και 280nm.	98
Εικόνα 94 UV κύριας κορυφής Fr3.....	98
Εικόνα 95 Χρωματογράφημα UPHLC Fr3.....	100
Εικόνα 96 Φάσμα μάζας HRMS-Orbitrap σε αρνητικό ιονισμό του Fr3.	100
Εικόνα 97 Δομή Σβερτιαμαρίνης.....	101
Εικόνα 98 Χρωματογράφημα Fr 8 στα 254nm και 280nm.....	101
Εικόνα 99 Χρωματογράφημα Fr8 UPHLC.....	103
Εικόνα 100 Φάσμα μάζας HRMS-Orbitrap σε αρνητικό ιονισμό του Fr 8.	103
Εικόνα 101 Δομή Λογανικού οξέος.....	104
Εικόνα 102 Χρωματογράφημα UPHLC Fr9.....	106
Εικόνα 103 Φάσμα μάζας HRMS-Orbitrap σε αρνητικό ιονισμό του Fr 9.	106
Εικόνα 104 Δομές Ολεανολικού και Μασλινικού Οξέος	109
Εικόνα 105 Συγκριτικό Χρωματογράφημα μετά την επεξεργασία με Ζωικό Άνθρακα στα 254nm, 366nm και ορατό	110
Εικόνα 106 Συγκριτικό Χρωματογράφημα για τον έλεγχο της καταλληλότητας του διφασικού συστήματος στο ορατό.	111
Εικόνα 107 Χρωματογραφήματα συνενωμένων κλασμάτων CPE στα 254nm, 366nm και στο ορατό.....	113
Εικόνα 108 Φάσμα Ολεανολικού Οξέος.	114
Εικόνα 109 Φάσμα μάζας HRMS-Orbitrap σε αρνητικό ιονισμό του Ολεανολικού Οξέος ..	115
Εικόνα 110 Χρωματογράφημα Κλασμάτων CPE στα 254nm.	117
Εικόνα 111 Χρωματογράφημα Κλασμάτων CPE στα 366nm.	117
Εικόνα 112 Χρωματογράφημα Κλασμάτων CPE στο ορατό.	118
Εικόνα 113 Συγκριτικό Χρωματογράφημα για τον έλεγχο της καταλληλότητας του διφασικού συστήματος στο ορατό.	119
Εικόνα 114 Χρωματογράφημα συνενωμένων κλασμάτων pH-Zone CPE στα 366nm και στο ορατό.....	120
Εικόνα 115 Φάσμα Μασλινικού οξέος.....	121
Εικόνα 116 Φάσμα μάζας HRMS-Orbitrap σε αρνητικό ιονισμό του Μασλινικού Οξέος. ...	123
Εικόνα 117 Χρωματογράφημα κλασμάτων στα 254nm.	126
Εικόνα 118 Χρωματογράφημα κλασμάτων στα 366nm.	127
Εικόνα 119 Χρωματογραφήματα στο ορατό μετά από ψεκασμό με διάλυμα θεικής βανιλίνης και θέρμανση.....	127
Εικόνα 120 Παρασκευαστική TLC και ζώνες ενδιαφέροντος.....	129
Εικόνα 121 Δομή Ολεοκανθαλικού Οξέος.	130
Εικόνα 122 Χρωματογράφημα στα 235nm και το φάσμα UV.	130
Εικόνα 123 Φάσμα ¹ H-NMR Ολεοκανθαλικού Οξέος.	131
Εικόνα 124 Φάσμα COSY Ολεοκανθαλικού Οξέος.....	132
Εικόνα 125 Φάσμα HSQC-DEPT Ολεοκανθαλικού Οξέος.	132
Εικόνα 126 Φάσμα HMBC Ολεοκανθαλικού Οξέος.....	132
Εικόνα 127 Φάσμα μάζας HRMS-Orbitrap σε αρνητικό ιονισμό του Ολεοκανθαλικού Οξέος.	134
Εικόνα 128 Δομή Ολεασεινικού Οξέος.	135
Εικόνα 129 Χρωματογράφημα στα 235nm και το φάσμα UV.	136
Εικόνα 130 Φάσμα ¹ H-NMR Ολεασεινικού Οξέος.....	137
Εικόνα 131 Φάσμα COSY Ολεασεινικού Οξέος.....	137

Εικόνα 132	Φάσμα HSQC-DEPT Ολεασεινικού Οξέος.	138
Εικόνα 133	Φάσμα μάζας HRMS-Orbitrap σε αρνητικό ιονισμό του Ολεασεινικού Οξέος.	139
Εικόνα 134	Δομή Eda Acid.....	140
Εικόνα 135	Φάσμα ¹ H-NMR Eda Acid.....	140
Εικόνα 136	Φάσμα μάζας HRMS-Orbitrap σε αρνητικό ιονισμό του Eda Acid.....	141
Εικόνα 137	Χρωματογραφήματα μάζας Ολικού εκχυλίσματος, καθώς και των απομονωμένων συστατικών. Αρνητικός ιονισμός. Δείγμα 1.	143
Εικόνα 138	Χρωματογραφήματα μάζας Ολικού εκχυλίσματος, καθώς και των απομονωμένων συστατικών. Αρνητικός ιονισμός. Δείγμα 2.	143
Εικόνα 139	Χρωματογραφήματα μάζας Ολικού εκχυλίσματος, καθώς και των απομονωμένων συστατικών. Αρνητικός ιονισμός. Δείγμα 3.	144
Εικόνα 141	Δομή Οξόνης.....	145
Εικόνα 142	Ημισυνθετική Πορεία Ολεασείνης προς Ολεασεινικό Οξύ.....	146
Εικόνα 143	Ημισυνθετική Πορεία Ολεασείνης προς Ολεασεινικό Οξύ.....	146
Εικόνα 144	Ημισυνθετική Πορεία Εμπλουτισμένου κλάσματος προς Ολεασεινικό Οξύ....	147
Εικόνα 145	Ημισυνθετική Πορεία Εμπλουτισμένου κλάσματος προς Ολεοκανθαλικού Οξέος..	147
Εικόνα 146	Χρωματογράφημα από παρασκευαστική HPLC κατά τον καθαρισμό της Ολεοκανθάλης.....	148
Εικόνα 147	Φάσμα ¹ H-NMR Ολεοκανθάλης.....	149
Εικόνα 148	Χρωματογράφημα από παρασκευαστική HPLC κατά τον καθαρισμό της Ολεασείνης.....	150
Εικόνα 149	Φάσμα ¹ H-NMR Ολεασείνης.....	150
Εικόνα 150	Χρωματογράφημα TLC κατά τον έλεγχο της θερμοκρασίας 254nm και στο ορατό.	151
Εικόνα 151	Χρωματογράφημα TLC στα 254nm και στο ορατό.	152
Εικόνα 152	Πορεία Αντίδρασης στα 254ppm και στο ορατό.....	152
Εικόνα 153	Χρωματογραφήματα δύο φάσεων στα 254ppm και στο ορατό.....	153
Εικόνα 154	Πορεία Αντίδρασης στα 254ppm και στο ορατό.....	153
Εικόνα 155	Χρωματογραφήματα δύο φάσεων στα 254ppm και στο ορατό.....	154
Εικόνα 156	Χρωματογραφήματα κλασμάτων στα 254ppm και στο ορατό.....	154
Εικόνα 157	Πορεία Αντίδρασης στα 254ppm και στο ορατό.....	155
Εικόνα 158	Χρωματογραφήματα δύο φάσεων στα 254ppm και στο ορατό.....	155
Εικόνα 159	Σύγκριση Ολεασείνης με το προϊόν αντίδρασης.	156
Εικόνα 160	Πορεία Αντίδρασης στα 254ppm και στο ορατό.....	156
Εικόνα 161	Χρωματογράφημα κλασμάτων στα 254ppm και στο ορατό.	157
Εικόνα 162	Πορεία Αντίδρασης στα 254ppm και στο ορατό.....	158
Εικόνα 163	Χρωματογραφήματα δύο φάσεων στα 254ppm και στο ορατό.....	158
Εικόνα 164	Πορεία αντίδρασης στα 254ppm και στο ορατό.....	159
Εικόνα 165	Χρωματογράφημα στις δύο φάσεις στα 254ppm και στο ορατό.....	159
Εικόνα 166	Πρόοδος αντοδράσεων στα 254ppm και στο ορατό.	161
Εικόνα 167	Χρωματογραφήματα των δύο φάσεων στα 254ppm και στο ορατό.....	161
Εικόνα 168	Χρωματογραφήματα κλασμάτων στα 254ppm και στο ορατό.....	162
Εικόνα 169	Δομή Ολεασεινικού Οξέος.	163
Εικόνα 170	Χρωματογράφημα Ολεασεινικού Οξέος στα 280nm και φάσμα UV.....	163
Εικόνα 171	Φάσμα ¹ H-NMR Ολεασεινικού Οξέος.	164
Εικόνα 172	Φάσμα COSY του Ολεασεινικού Οξέος.....	165
Εικόνα 173	Φάσμα HSQC-DEPT του Ολεασεινικού Οξέος.....	165

Εικόνα 174 Φάσμα ΗΜΒC του Ολεασεινονικού Οξέος.	166
Εικόνα 175 Φάσμα μάζας HRMS-Orbitrap σε αρνητικό ιονισμό του ολεασεινονικού οξέος.	167
Εικόνα 176 Χρωματογράφημα των δύο φάσεων στα 254ppm και στο ορατό.	168
Εικόνα 177 Χρωματογράφημα στα 254ppm και στο ορατό.	168
Εικόνα 178 Πειραματική Διαδικασία.	169
Εικόνα 179 Μηχανισμός Δράσης.	169
Εικόνα 180 96-τρυπες Πλάκες.	171

Σχήματα

Σχήμα 1 % Αναστολή εκχυλίσματος T.P.F.	173
Σχήμα 2 % Αναστολή Ολεοκανθάλης-Ολεασείνης.....	173
Σχήμα 3 % Αναστολή Ολεοκανθαλικού _Ολεασεινονικού Οξέος.....	174
Σχήμα 4 % Αναστολή Τυροσόλης-Υδροξυτυροσόλης	174
Σχήμα 5 % Αναστολή MFLA-MFOA.....	175
Σχήμα 6 % Αναστολή Eda Acid	175
Σχήμα 7 % Αναστολή Αντίδρασης Οξειδωσης-Νέο Ημισυνθετικό Προϊόν	176

Πίνακες

Πίνακας 1 Διάγραμμα Κατάταξης της οικογένειας Gentianaceae.....	8
Πίνακας 2 Συστηματική κατάταξη <i>Gentiana lutea</i>	9
Πίνακας 3 Φαρμακολογικές Ιδιότητες Εκχυλισμάτων <i>G.lutea</i>	18
Πίνακας 4 Παραδοσιακές και Σύγχρονες Ιατρικές Χρήσεις της Ελιάς.	28
Πίνακας 5 Συστηματική Κατάταξη <i>Olea europaea</i>	32
Πίνακας 6 Εδαφικές Απαιτήσεις	35
Πίνακας 7 Ανασταλτικές Ιδιότητες έναντι καρκινικών κυττάρων <i>Olea europaea</i>	42
Πίνακας 8 Αντιμικροβιακές Ιδιότητες <i>Olea europaea</i>	43
Πίνακας 9 Αντιοξειδωτικές Ιδιότητες <i>Olea europaea</i>	44
Πίνακας 10 Αναστολή Ενζύμων από την <i>Olea europaea</i>	45
Πίνακας 11 Αντιυπερτασικές και Καρδιοπροστατευτικές Ιδιότητες <i>Olea europaea</i>	46
Πίνακας 12 Αντιφλεγμονώδεις και Αναλγητικές Ιδιότητες <i>Olea europaea</i>	47
Πίνακας 13 Γαστροπροστατευτικές Ιδιότητες <i>Olea europaea</i>	47
Πίνακας 14 Νευροπροστατευτικές Ιδιότητες <i>Olea europaea</i>	48
Πίνακας 15 Άλλες Ιδιότητες <i>Olea europaea</i>	49
Πίνακας 16 Γενικά Χαρακτηριστικά των 2 τύπων CCC.....	53
Πίνακας 17 Αποτελέσματα δοκιμής διφασικού συστήματος.....	78
Πίνακας 18 Συντελεστές Κατανομής Κ και Διαχωριστότητας α των προς μελέτη ουσιών στο διφασικό σύστημα H ₂ O:EtOH:EtOAc (7,5:3:5 v/v/v).....	80
Πίνακας 19 Συνθήκες πειραματικής διαδικασίας CPC.....	81
Πίνακας 20 Κλάσματα και Βάρη.....	81
Πίνακας 21 Συνθήκες πειραματικής διαδικασίας CPE.....	83
Πίνακας 22 Κλάσματα και Βάρη.....	83
Πίνακας 23 Μέθοδος Ανάλυσης Κλασμάτων σε HPLC.	85
Πίνακας 24 Επεξήγηση χρωμάτων στα Χρωματογραφήματα.	86
Πίνακας 25 1η Μέθοδος Ανάλυσης.	87
Πίνακας 26 2η Μέθοδος Ανάλυσης.	88
Πίνακας 27 3η Μέθοδος Ανάλυσης.	89
Πίνακας 28 Μέθοδος ανάλυσης HPLC Γεντιοπικροσίδη.....	91
Πίνακας 29 Φασματοσκοπικά δεδομένα Γεντιοπικροσίδη.	92
Πίνακας 30 Παράγωγα Ξανθονών.....	95
Πίνακας 31 Φασματοσκοπική Ανάλυση Γεντισίνης - Ισογεντισίνης.....	95
Πίνακας 32 Παράγωγα Ο-γλυκοζιτών ξανθονών.	97
Πίνακας 33 Φασματοσκοπικά δεδομένα των παραγώγων Ο-γλυκοζιτών ξανθόνης.....	99
Πίνακας 34 Φασματοσκοπική ανάλυση Σβερτιαμαρίνης.....	102
Πίνακας 35 Φασματοσκοπική ανάλυση Λογανικού οξέος.	105
Πίνακας 36 Αποτελέσματα δοκιμής διφασικού συστήματος.....	111
Πίνακας 37 Συνθήκες πειραματικής διαδικασίας της τεχνικής pH-Zone CPE.	112
Πίνακας 38 Κλάσματα και Βάρη.....	113
Πίνακας 39 Φασματοσκοπικά Δεδομένα Ολεανολικού Οξέος.....	114
Πίνακας 40 Φασματοσκοπικά Δεδομένα Ολεανολικού Οξέος.....	115
Πίνακας 41 Συνθήκες πειραματικής διαδικασίας CPE.....	117
Πίνακας 42 Κλάσματα και Βάρη.....	118
Πίνακας 43 Αποτελέσματα δοκιμής διφασικού συστήματος.....	119
Πίνακας 44 Συνθήκες πειραματικής διαδικασίας.....	120
Πίνακας 45 Κλάσματα και Βάρη.....	121

Πίνακας 46 Φασματοσκοπικά δεδομένα Μασλινικού Οξέος.....	122
Πίνακας 47 Σειρά Διφασικών Συστημάτων για την επεξεργασία του T.P.F.	125
Πίνακας 48 Υπολογισμός Όγκων Συστημάτων.....	125
Πίνακας 49 Συνθήκες πειραματικής διαδικασίας.....	126
Πίνακας 50 Βάρη συνενωμένων κλασμάτων που προέκυψαν από την κλασμάτωση του TPF με step-gradient CPC σε παρασκευαστική κλίμακα.	127
Πίνακας 51 Οι κύριοι μεταβολίτες του TPF, η δομή τους και τα κλάσματα CPC στα οποία συλλέχθηκαν	128
Πίνακας 52 Κλάσματα και Βάρη.....	129
Πίνακας 53 Μέθοδος ανάλυσης HPLC.	130
Πίνακας 54 Φασματοσκοπική Σύγκριση Ολεοκανθάλης και Ολεοκανθαλικού Οξέος.....	133
Πίνακας 55 Μέθοδος Παρασκευαστικής HPLC.....	135
Πίνακας 56 Μέθοδος Ανάλυσης	135
Πίνακας 57 Φασματοσκοπική Σύγκριση Ολεασείνης και Ολεασεινικού Οξέος,	138
Πίνακας 58 Μέθοδος Ανάλυσης.	139
Πίνακας 59 Φασματοσκοπική Σύγκριση Eda- Eda Acid.	140
Πίνακας 60 Μέθοδος Διαχωρισμού UPHLC.	142
Πίνακας 61 Πειραματικοί Παράμετροι UPHLC.	142
Πίνακας 62 Μέθοδος Καθαρισμού Ολεοκανθάλης,	148
Πίνακας 63 Μέθοδος Καθαρισμού Ολεασείνης.	149
Πίνακας 64 Κλάσματα και Βάρη.....	151
Πίνακας 65 Κλάσματα και Βάρη.....	154
Πίνακας 66 Κλάσματα και Βάρη.....	157
Πίνακας 67 Κλάσματα και Βάρη.....	160
Πίνακας 68 Κλάσματα και Βάρη.....	162
Πίνακας 69 Μέθοδος ανάλυσης.	163
Πίνακας 70 Φασματοσκοπικά Δεδομένα του Ολεασεινικού Οξέος.	166
Πίνακας 71 Συγκεντρώσεις Καθαρών Ουσιών και Κλασμάτων.	170
Πίνακας 72 Φυσικές ουσίες και Ημισυνθετικά Παράγωγα που μελετήθηκαν και IC ₅₀	171

Συντομεύσεις

Συντομεύσεις	Επεξήγηση
1-D	1 dimension 1 διάσταση
2-D	2 dimensions διαστάσεις
δ	Χημική μετατόπιση
λ	Μήκος κύματος
μg	Microgram Μικρογραμμάρια
°C	Βαθμοί Κελσίου
¹³C NMR	Πείραμα NMR πυρήνων άνθρακα 13
¹H NMR	Πείραμα NMR πρωτονίου μίας διάστασης
A.A.	Acetic Acid Οξικό Οξύ
a	Παράγοντας διαχωρισμού
Acetone	Ακετόνη
AcN	Acetonitrile Ακετονιτρίλιο
br	Ευρεία κορυφή
C	Άνθρακας
c	Concentration Συγκέντρωση
C.P.C.	Centrifugal Partition Chromatography Χρωματογραφία Κατανομής με Φυγοκέντρηση
C.P.E.	Centrifugal Partition Extraction
CD₃OD	Deuterated MeOD Δευτεριωμένη μεθανόλη
CDCl₃	Deuterated Chloroform Δευτεριωμένο χλωροφόρμιο
CH₂Cl₂	Dichloromethane Διχλωρομεθάνιο
CHCl₃	Chloroform Χλωροφόρμιο
COSY	Correlation Spectrometry
d	Doublet Διπλή κορυφή σε φάσματα πρωτονίου NMR
DCM	Dichloromethane Διχλωρομεθάνιο
dd	Doublet of Doublet Διπλή διπλή κορυφή σε φάσματα πρωτονίου NMR
ddd	Doublet of Doublet of Doublet Διπλή διπλή διπλή κορυφή σε φάσματα π. NMR
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl 2,2-διφαινυλ-1-πικρυλυδραζύλιο
EI	Electron Ionisation Βομβαρδισμός με ηλεκτρόνια
ESI	Electrospray Ionization Ηλεκτρονιοψεκασμός
EtOAc	Ethyl Acetate Οξικός αιθυλεστέρας
EtOH	Ethanol Αιθανόλη
EVOO	Extra Virgin Olive Oil Έξτρα Παρθένο Ελαιόλαδο
F.A.	Formic Acid Μυρμηκικό Οξύ
Fr	Fraction Κλάσμα
g	Grammar Γραμμάριο
H	Υδρογόνο
H₂O	Water Νερό
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence

HPLC	High Performance Liquid Chromatography Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης
Hz	Hertz
I	Inhibition Αναστολή
IC₅₀	Inhibition Concentration 50%
J	Σταθερά σύζευξης
K	Σταθερά κατανομής
L	Liters Λίτρα
m	Multiple Πολλαπλή κορυφή σε φάσματα πρωτονίου NMR
m-	Meta Μέτα υποκατάσταση σε αρωματικό δακτύλιο
m/z	Αναλογία μάζας προς φορτίο
mg	Milligram
MeOH	Methanol Μεθανόλη
min	Minutes Λεπτά
mL	Milliliters Χιλιοστόλιτρα
mol	Mole
mmol	Milimole
MS	Mass Spectrometry Φασματομετρία Μάζας
n-Hexane	Εξάνιο
NMR	Nuclear Magnetic Resonance Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός
O	Oxygen οξυγόνο
o-	Ortho Όρθρο υποκατάσταση σε αρωματικό δακτύλιο
p-	Para Πάρα υποκατάσταση σε αρωματικό δακτύλιο
ppm	Parts per million
prep HPLC	Preparative High Performance Liquid Chromatography Παρασκευαστική Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης
prep TLC	Preparative Thin Layer Chromatography Παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας
q	Quarter Τετραπλή κορυφή σε φάσματα πρωτονίου NMR
R_f	Retention factor
R_t	Retention time Χρόνος κατακράτησης ή ανάσχεσης
RP	Reverse Phase Αντίστροφης φάσης
r.p.m.	Rounds per minute Περιστροφές ανά λεπτό
s	Single Απλή κορυφή σε φάσματα πρωτονίου NMR
T	Temperature Θερμοκρασία
t	Triplet Τριπλή κορυφή σε φάσματα πρωτονίου NMR
TEA	Triethylamine Τριαιθυλαμίνη
TFA	Trifluoroacetic Acid Τριφθοροοξικό Οξύ
T.P.F.	Total Polyphenolic Fraction Ολικό Πολυφαινολικό Κλάσμα
TLC	Thin Layer Chromatography Χρωματογραφία Λεπτής στιβάδας
UV	Υπεριώδες
V	Volume Όγκος
Vis	Visible Ορατό

1 Θεωρητικό Μέρος

Στη μέρα που απ' τη ζήλεια της στολίζεται μ' εφτά λογιώ φτερά
Ζώνοντας τον αιώνιον ήλιο με χιλιάδες πρίσματα
Εκτυφλωτικά, πέστε μου είναι η τρελή ροδιά
Που αρπάει μια χαίτη μ' εκατό βιτσιές στο τρέξιμό της
Πότε θλιμμένη και πότε γκρινιάρα, πεστε μου είναι η τρελή ροδιά
Που ξεφωνίζει την καινούρια ελπίδα που ανατέλλει;

Η τρελή ροδιά - 2007

Οδυσσέας Ελύτης

1.1 Γεντιάνα-*Gentiana lutea* Gentianaceae



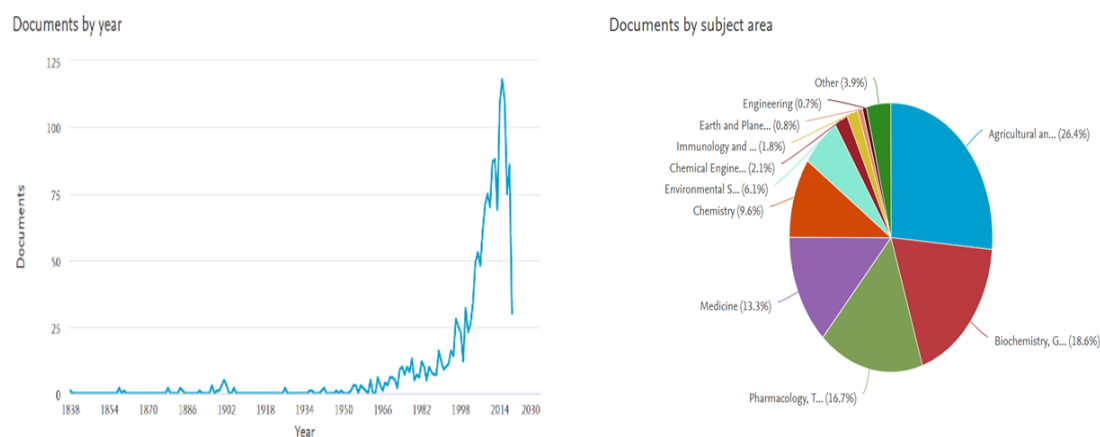
1.1.1 Γενικά Στοιχεία

Η *Gentiana lutea L.*, Gentianaceae είναι ένα πολυετές φαρμακευτικό φυτό που συνήθως αναπτύσσεται στις αλπικές περιοχές της Κεντρικής και Νότιας Ευρώπης και σε χώρες της Δυτικής Ασίας [1]. Η δρόγη αποτελείται από τα ξηρά ριζώματα και ρίζες του (Δρόγη: *Gentianae radix*), και παρατίθεται σε πολλές μονογραφίες φαρμακοποιιών:

- Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία, 2009
- Γαλλική Φαρμακοποιία, 1974
- Ιαπωνική Φαρμακοποιία, 1976
- Βρετανική Φαρμακοποιία, 1996
- Πολωνική Φαρμακοποιία, 2008
- Χιλιανή Φαρμακοποιία, 1941-1951
- Αιγυπτιακή Φαρμακοποιία, 1953
- Βέλγικη Φαρμακοποιία, 1962-1966
- Σκανδιναβική Φαρμακοποιία, 1963-1973
- Σλάβικη Φαρμακοποιία, 1970-1976

Η μονογραφία της δρόγης στην Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία βρίσκεται στην τελική της μορφή από το 2009 ως παραδοσιακής χρήσης. Σε αυτή αναφέρονται όσα είναι απαραίτητα για την χρήση της ρίζας με ασφάλεια και αποτελεσματικότητα. [2]

Παρατηρείται πως ήδη από την δεκαετία του 1960 έχουν εμφανιστεί έρευνες, όμως τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί σε μεγάλο ποσοστό ο αριθμός δημοσιεύσεων (Εικόνα 1) που σχετίζεται με το γένος *Gentiana*, το οποίο οφείλεται στο μεγάλο φαρμακολογικό ενδιαφέρον που παρουσιάζει.[3] Οι κυριότερες κατηγορίες μελετών είναι η φαρμακολογική, η βιοχημική και η γεωπονική με το μεγαλύτερο ποσοστό δημοσιεύσεων (26.4%).



Εικόνα 1 Δημοσιεύσεις ανά χρόνο και ανά ερευνητικό πεδίο.

Ετυμολογική Προέλευση του Ονόματος του Γένους

Ο Γέντης (Γένθιος, "Γένθος") ήταν βασιλιάς του Αρμδιαίου, μιας ισχυρής φυλής στην Ιλλυρία. Βασίλευσε το 181-168 π.Χ. και ήταν ο τελευταίος ηγέτης του Αρμδιαίου. Το όνομά του φαίνεται να προέρχεται από το PIE * g'en- "να γεννιέται", που είναι ομόριζο με την λατινική λέξη «γενιά», "συγγενή, φυλή". Ήταν ο γιος του Πλευράτους (Pleuratus) III, ενός βασιλιά που διατηρούσε σταθερές σχέσεις με τη Ρώμη. Η πρωτεύουσα του βασιλείου του Γένθιου ήταν η Σκόνδρα. Το 180 π.Χ., κατά τη διάρκεια της πρώιμης βασιλείας του, οι Dalmatae και Daorsi δήλωσαν ότι ήταν ανεξάρτητοι από την κυριαρχία του και η πόλη του Rhizon τον εγκατέλειψε πριν την ήττα του, λαμβάνοντας ασυλία από τους Ρωμαίους. Παντρεύτηκε την Έτουτα, την κόρη του βασιλιά της Δαρδανίας Μονουήλ Β. [4]



Εικόνα 2 Νόμισμα με απεικόνιση του Βασιλιά Γέντη

Το 171 π.Χ., ο Γέντης ήταν σύμμαχος με τους Ρωμαίους εναντίον των Μακεδόνων, αλλά το 169 π.Χ. άλλαξε στρατόπεδο και συμάχησε με τον Περσέα της Μακεδονίας. Η νοτιότερη πόλη του κράτους του Αρμδιαίου ήταν η Λισσός (τώρα Lezhë, Αλβανία), μια πόλη που δημιουργήθηκε μετά τον πρώτο πόλεμο των Ιλλυριών. Ο Γέντης κατέστρεψε τις πόλεις της Απολλωνίας και της Επίδαμης (Ρωμαϊκό Δυρράχιο, τώρα Δυρράχιο, Αλβανία), που ήταν σύμμαχοι της Ρώμης. Το 168 π.Χ., νικήθηκε στη Σκόνδρα από ρωμαϊκή δύναμη υπό τον Λ. Ανίκηου Γάλλου, μόνο σε είκοσι ή τριάντα ημέρες και το 167 π.χ. μεταφέρθηκε στη Ρώμη ως αιχμάλωτος θριάμβου του Γάλλου, αφότου αυτός ήταν φυλακισμένος στην Iguvium. Η ημερομηνία του θανάτου του είναι άγνωστη. Μετά την ήττα του, οι Ρωμαίοι χώρισαν την περιοχή σε τρεις διοικητικές διαιρέσεις, που ονομάζονταν Meris. Η έκταση των πρώτων δεν είναι γνωστή, ενώ η δεύτερη ήταν η Labeates, και η τρίτη ήταν η Acrunium, η Rhizon, η Olcinium και τα περίχωρά τους.

Η *Gentiana lutea*, και κατ' επέκταση το γένος *Gentiana*, πήρε το όνομά της από τον βασιλιά Γέντη (Gentius), ως φόρος τιμής, καθώς αναφέρεται ότι είχε ανακαλύψει ότι τα φυτά αυτά είχαν τονωτικές ιδιότητες. Ο Γέντης απεικονίζεται στην οπίσθια όψη του αλβανικού νομίσματος 50 lekë, που εκδόθηκε το 1996 και το 2000 και στην εμπρόσθια όψη του τραπεζογραμματίου 2000 lekë, που εκδόθηκε το 2008. (Εικόνα 2)[4]

1.1.2 Παραδοσιακές και Σύγχρονες Χρήσεις

Στην αρχαιότητα, η «θηριακή» ήταν ένα ξακουστό φάρμακο που παρασκευαζόταν με βάση τη ρίζα της κίτρινης Γεντιανής και τη χρήση πλήθους άλλων βοτάνων και ουσιών. Ο εφευρέτης της «θηριακής» ήταν ο Ανδρόμαχος ο Κρητικός, αρχίατρος του Ρωμαίου αυτοκράτορα Νέρωνα. «Θηριακά» ονομάζονταν όλα τα φάρμακα για τις ασθένειες από δαγκώματα δηλητηριωδών φιδιών.

Τα είδη *Gentiana* έχουν χρησιμοποιηθεί στην παραδοσιακή λαϊκή ιατρική εδώ και πολλά χρόνια. Η *G. lutea*, *G. asclepiadifolia*, *G. olivieri* και *G. cruciata* έχουν χρησιμοποιηθεί ως αντιπυρετικά, στοματικά και διεγερτικά της όρεξης στην Ανατολή [2]. Η *G. kochiana* έχει χρησιμοποιηθεί ως παραδοσιακό φάρμακο στην περιοχή της Τοσκάνης [3]. Τα ριζώματα και οι ρίζες των *G. lutea* και *G. scabra* είναι τα ακατέργαστα φάρμακα που χρησιμοποιούνται ως διεγερτικό όρεξης στη Γαλλία και την Ιαπωνία, αντίστοιχα [4, 5]. Στη κινέζικη Φαρμακοποιία, οι ρίζες τεσσάρων ειδών του γένους *Gentiana* π.χ. *G. scabra*, *G. manshurica*, *G. triflora* και *G. rigescens*, χρησιμοποιούνται ως πρώτες ύλες του "Long-Dan" για την θεραπεία της φλεγμονής, της ηπατίτιδας, των ρευματισμών και της χολοκυστίτιδας [6] (Εικόνα 3). Οι ρίζες άλλων τεσσάρων φυτών, *G. macrophylla*, *G. crassicaulis*, *G. straminea* και *G. duhurica* καταγράφονται ως πρώτες ύλες του "Qin-Jiao" για τη θεραπεία ίκτερου, ηπατίτιδας, φλεγμονής, πόνων και ρευματισμών. [5]



Εικόνα 3 Σκεύασμα "Long-Dan"

Το Moxie (Εικόνα 4) είναι ένα ανθρακούχο ποτό που ήταν μεταξύ των πρώτων αναψυκτικών που παράχθηκαν στις Ηνωμένες Πολιτείες. Συνεχίζει να είναι μέχρι σήμερα δημοφιλής σε περιφερειακό επίπεδο, ιδιαίτερα στη Νέα Αγγλία [2]. Παράγεται από την εταιρία Moxie Beverage Company του Bedford, New Hampshire. Το Moxie αγοράστηκε από την εταιρεία Coca-Cola το 2018 έναντι ενός απροσδιόριστου υψηλού ποσού. [6]

Η γεύση του Moxie είναι μοναδική, ένα γλυκό ποτό με πικρή επίγευση. [3] Το Moxie είναι αρωματισμένο με εκχύλισμα ρίζας γεντιανής. Προέρχεται από το 1876 ως ιατρικό δίπλωμα ευρεσιτεχνίας που ονομάζεται "Moxie Nerve Food". [4] Το Moxie συνδέεται στενά με την πολιτεία του Maine καθώς, ο δημιουργός του, ο Δρ. Augustin Thompson, γεννήθηκε στο Union, Maine, αλλά το δημιούργησε για πρώτη φορά στο Lowell της Μασαχουσέτης [6]. Ο δημιουργός ισχυρίστηκε πως ήταν ιδιαίτερα αποτελεσματικό ενάντια στην «παράλυση, μαλάκυνση του εγκεφάλου, νευρική και αϋπνία». [4] Μετά από λίγα χρόνια, ο Thompson πρόσθεσε σόδα στην φόρμουλα και άλλαξε το όνομα του προϊόντος σε "Beverage Moxie Nerve Food". Το 1885 έλαβε εμπορικό σήμα για το προϊόν του και το διέθεσε ως "ένα υπέροχο μείγμα πικρού και γλυκού, ένα ποτό για να ικανοποιήσει κάθε γούστο" [9].



Εικόνα 4 Σκευάσματα "Moxie"

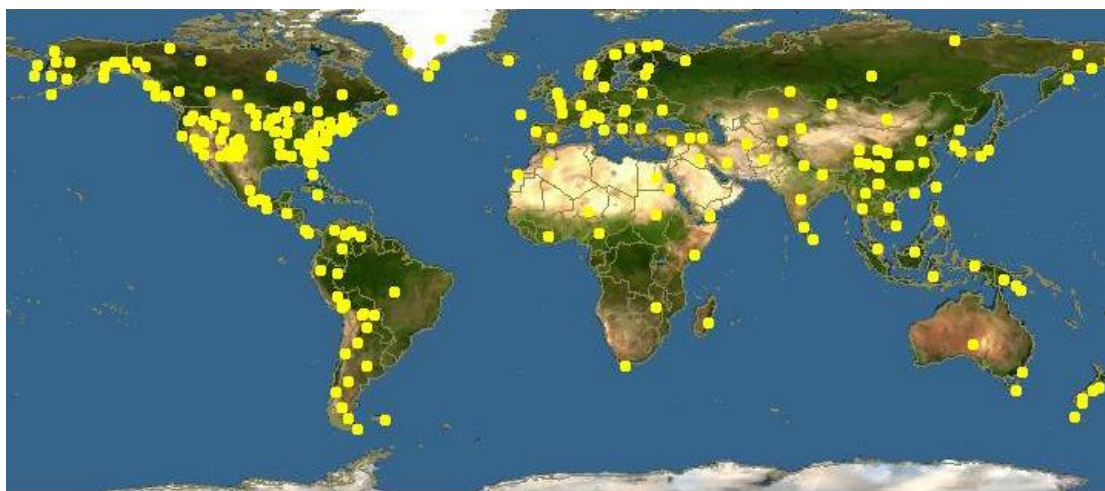
Η λέξη "Moxie" στην αμερικανική αγγλική γλώσσα σημαίνει θάρρος, τόλμη ή αποφασιστικότητα.

Χρησιμοποιείται επίσης στη Γαλλία για την παραγωγή λικέρ και απεριτίφ τύπου «Limousin», με φυτά που συλλέγονται από την περιοχή Auvergne.

1.1.3 Γεωγραφική Κατανομή

Η οικογένεια Gentianaceae, με πάνω από 1600 είδη, είναι η τρίτη μεγαλύτερη οικογένεια της τάξης των Gentianales, μετά τις οικογένειες Rubiaceae and Apocynaceae, που είναι σαφώς μεγαλύτερες. Γι' αυτό τον λόγο και η κατανομή της εντοπίζεται σχεδόν σε όλο τον πλανήτη, με εξαίρεση ίσως τις πολύ ξηρές περιοχές στο κέντρο της Αφρικής. (Εικόνα 5)

Το γένος *Gentiana* είναι ένα από τα πέντε μεγαλύτερα γένη της οικογένειας Gentianaceae και παρουσιάζει μεγάλη ποικιλία στα φυτικά είδη, τη μορφολογία και την ανατομία, καθώς και στη γεωγραφική κατανομή. Τα περισσότερα είδη *Gentiana* αναπτύσσονται σε αλπικούς ή εύκρατους οικοτόπους. (Εικόνα 6) Εκτός από τις υποτροπικές και τροπικές πεδιάδες, το γένος έχει παγκόσμια γεωγραφική κατανομή. [7]

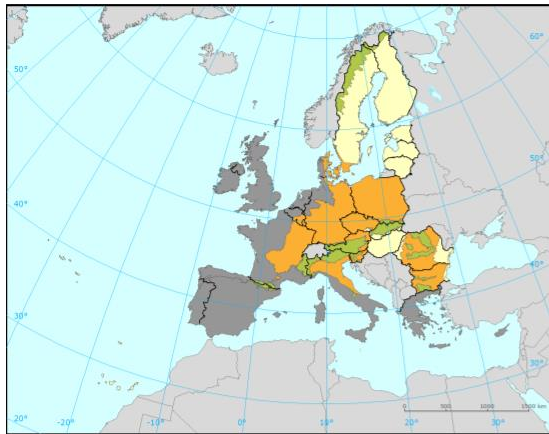


Εικόνα 5 Παγκόσμια Κατανομή του γένους *Gentiana*

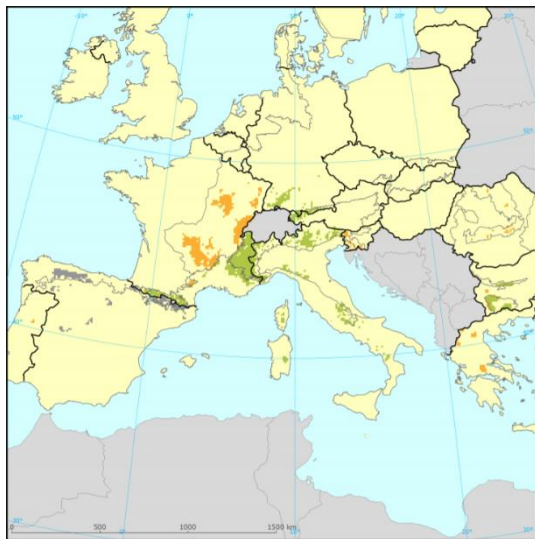
Το πολυετές φυτό *Gentiana lutea* αναπτύσσεται σε ορεινό ή υποαλπικό υψόμετρο στα βουνά της Ευρώπης (Βαλκάνια, μεσαία και νότια Ευρώπη, Πυρηναία Όρη, Άλπεις, Καρπάθια Όρη) αλλά και της Μικράς Ασίας (Τουρκία), σε δάση φυλλοβόλων και κωνοφόρων δέντρων, στις όχθες υγρών πευκοδασών ή σε βραχώδη δάση και σκιασμένα λιβάδια (σε ασβεστολιθικά εδάφη).

Το είδος κατατάσσεται στην λιγότερο επικίνδυνη ζώνη (LC - Annex D) στην ευρωπαϊκή κόκκινη λίστα της IUCN. Η κατάσταση διατήρησης αυτού του είδους είναι "ευνοϊκή" στην περιοχή των Άλπεων και "δυσμενή" με αρνητική τάση στην ηπειρωτική περιοχή **λόγω της Γαλλίας**. (Εικόνα 7) Οι κυριότερες πιέσεις και απειλές οφείλονται κυρίως στην αλόγιστη συλλογή του βοτάνου (τα ριζώματα χρησιμοποιούνται για φαρμακευτικούς και εμπορικούς σκοπούς), στην εντατική βοσκή και στην καλλιέργεια και τροποποίηση των καλλιεργητικών πρακτικών. [8] Επίσης, ακόμα και η κλιματική αλλαγή είναι ένας σημαντικός παράγοντας στην εξαφάνιση του είδους. Εξαιτίας της υπερεκμετάλλευσης των άγριων αποθεμάτων και της βραδείας ανάπτυξής τους, αρκετοί άγριοι πληθυσμοί της *G.lutea* έχουν αποδεκατιστεί και τώρα βρίσκονται κοντά στην εξαφάνιση και / ή είναι δύσκολο να αναγεννηθούν.

Οι παραδοσιακές και βιομηχανικές χρήσεις έχουν δημιουργήσει μεγάλη ζήτηση. [9] η οποία αγγίζει τους 1500 τόνους αποξηραμένων ριζών, που λαμβάνονται από 6000 τόνους φυτικού υλικού κάθε χρόνο σε όλο τον κόσμο και περίπου 150 (ha) εκτάρια που καλλιεργούνται στην Ευρώπη. Οι απαιτήσεις της Ευρώπης κυμαίνονται περίπου στους 450-500 τόνους αποξηραμένης ρίζας.[10]



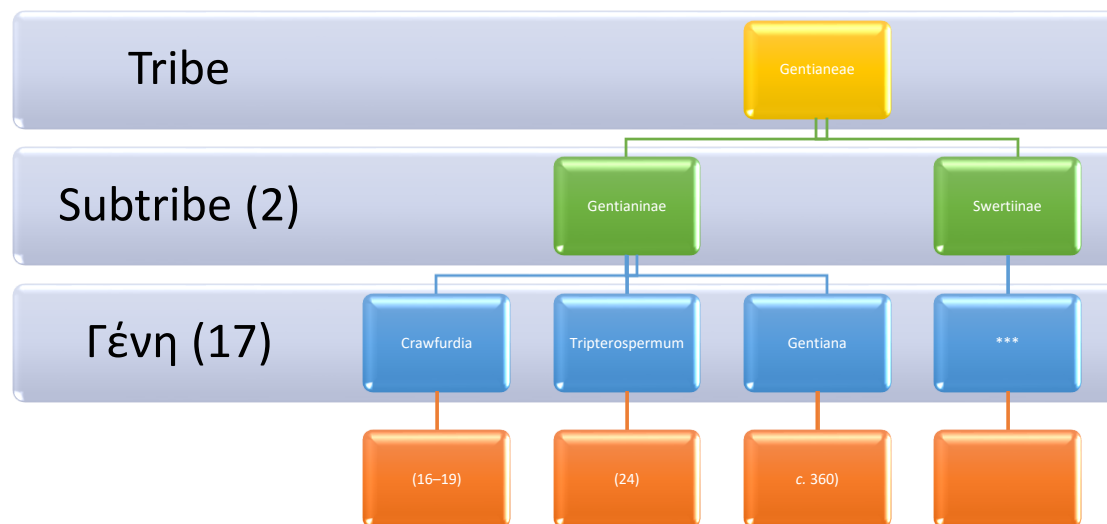
Εικόνα 6 Ευρωπαϊκή Κατανομή του είδους *Gentiana lutea*



Εικόνα 7 Περιοχές Κινδύνου Εξαφάνισης του είδους *Gentiana lutea*

1.1.4 Συστηματική Κατάταξη

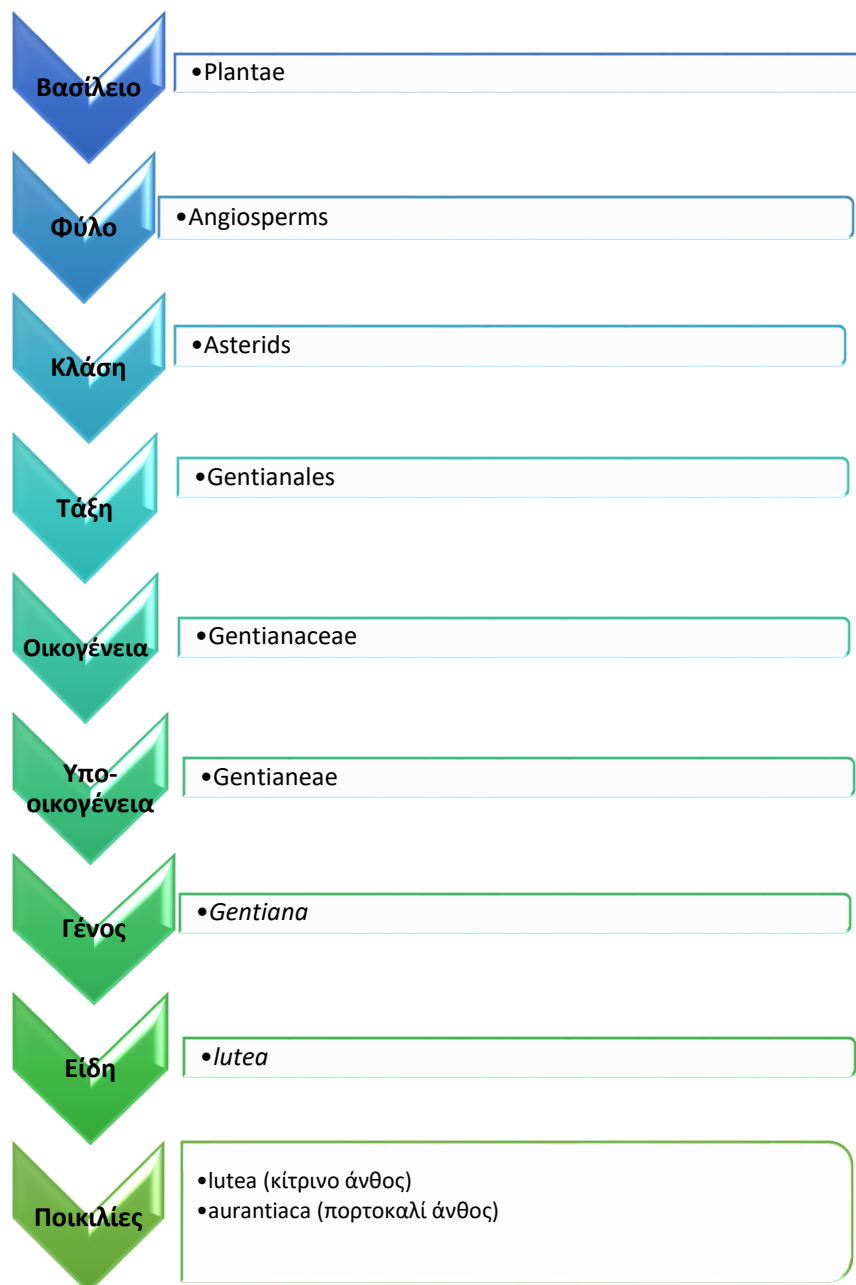
Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η οικογένεια Gentianaceae είναι η τρίτη μεγαλύτερη οικογένεια της τάξης των Gentianales, μετά τις οικογένειες Rubiaceae and Apocynaceae με 87 γένη και περίπου 1615-1688 είδη. (Πίνακας 1) [11]



Πίνακας 1 Διάγραμμα Κατάταξης της οικογένειας Gentianaceae.

Το γένος *Gentiana* είναι ένα από τα πέντε μεγαλύτερα γένη της οικογένειας Gentianaceae και αποτελείται από περίπου 360 είδη. Ανάμεσα σε αυτά ανήκει και η *Gentiana lutea*, το φυτικό είδος που αποτέλεσε το υλικό για την φυτοχημική μελέτη που θα αναλυθεί στο πειραματικό μέρος. Η συστηματική κατάταξη φαίνεται στον Πίνακας 2:

Όσον αφορά τα διάφορα υποείδη του *G. lutea*, η *G. lutea* L. subsp. *lutea* αποτελεί το πιο ευρέως διαδεδομένο. [11] Μόνο τα υποείδη *G. lutea* L. subsp. *symphyandra* (Murbeck) and *G. lutea* L. *vardjanii* (T.Wraber) δεν μπορούν να εντοπιστούν στην Ιβηρική Χερσόνησο, αλλά μεγαλώνουν στην Ανατολική Ευρώπη από τις ανατολικές Άλπεις. Υποείδη της *G. lutea* L. στην Ιβηρική Χερσόνησο είναι: *G. lutea* L. subsp. *lutea*, *G. lutea* L. subsp. *montserratii* (Vivant ex Greuter), η οποία είναι ενδημική μικρές περιοχές των Πυρηναίων και των Κεντρικών Πυρηναίων (Anchisi and Cattaneo, 2010) και η *G. lutea* L. subsp. *aurantiaca*, που περιγράφεται από τον Lainz (1982) περιγράφεται στο Βορειοδυτικό τμήμα της Ιβηρικής Χερσονήσου (Renobales, 2003) και επίσης αναφέρεται από τους Anchisi και Cattaneo (2010) στις όχθες της λίμνης Laurenti. (πηγη: secoiridoids gonzals)



Πίνακας 2 Συστηματική κατάταξη *Gentiana lutea*

1.1.5 Βοτανικά χαρακτηριστικά

Όλα τα είδη του γένους *Gentiana* είναι μονοετείς, διετείς ή πολυετείς πόες. (Εικόνα 9)[11]

Η *Gentiana lutea* L. (*Gentianaceae*) είναι μια πολυετής πόα που αναπτύσσεται στην Κεντρική και Νότιο Ευρώπη σε υψόμετρο μεταξύ 800 έως 2500 m. Η ανθοφορία γίνεται από τον Ιούλιο έως τον Αύγουστο και οι ταξιανθίες του φυτού αναπτύσσονται τόσο που μπορούν να φτάσουν τα 120 cm. Η συγκομιδή γίνεται από τον Σεπτέμβριο έως τον Νοέμβριο.



Εικόνα 8 Βοτανικά Τμήματα

Ρίζες και Ριζώματα

Η ρίζα γεντιανής (*Gentianae radix*) (Εικόνα 10) αποτελεί την δρόγη του φυτικού υλικού και είναι αυτή που συγκεντρώνει το μεγαλύτερο ποσοστό των δραστικών ουσιών. Συλλέγεται το φθινόπωρο και ξηραίνεται απευθείας μετά τη συγκομιδή για να αποφευχθεί η διαδικασία της ζύμωσης που επηρεάζει το περιεχόμενο του εκχυλίσματος και οδηγεί σε αλλαγές του χρώματος. Όταν το υλικό είναι φρέσκο, το χρώμα του είναι κιτρινωπό-λευκό εσωτερικά, αλλά σταδιακά γίνεται πιο σκούρο με την αργή ξήρανση, κατά την οποία αναπτύσσεται μια χαρακτηριστική οσμή. Η ρίζα εμφανίζεται ως ενιαία ή με διακλαδισμένα κυλινδρικά κομμάτια διαφόρων μηκών, συνήθως πάχους 10-40 mm. Τα ριζώματα έχουν συνήθως μεγαλύτερη διάμετρο από τις ρίζες και συχνά φέρουν ένα ή περισσότερα κορυφαία μπουμπούκια. Κατά την ξήρανση, τα ριζώματα εμφανίζουν ρυτίδες εγκάρσια, ενώ οι ρίζες διαμήκη. Η πρώτη ύλη είναι εύθραυστη όταν είναι απολύτως στεγνή, αλλά απορροφά εύκολα την υγρασία από τον αέρα και γίνεται σκληρή.

Η λεία, εγκάρσια επιφάνεια παρουσιάζει φλοιό, καταλαμβάνοντας περίπου το ένα τρίτο της ακτίνας. Ένα εγκάρσιο τμήμα της ρίζας παρουσιάζει μια στενή ζώνη από τέσσερα έως έξι στρώματα λεπτότοιχων φελλοειδών κυττάρων, μια ευρεία ζώνη δευτερογενή φλοιού με καφέ κύτταρα παρεγχύματος, που ουσιαστικά στερούνται αμύλου αλλά περιέχουν σφαιρίδια ελαίου και μικρούς βελονοειδείς κρυστάλλους. Η τελευταία αποτελείται από πολλά στρώματα παρεγχυματικού φλοιού και πολυάριθμες πτυχές ηθμοσωλήνα. Υπάρχει κάμβιο και ένα ευρύ ξήλωμα κιτρινωπό-καστανό έως κίτρινο, με διάσπαρτα μερικά μεγάλα αγγεία. Ένα εγκάρσιο τμήμα του ριζώματος εμφανίζει σχετικά παρόμοια δομή.

Η σκόνη των ριζών είναι κιτρινωπή-καφέ έως κιτρινωπή-πορτοκαλί και ακολουθούν όλους τους διαγνωστικούς χαρακτήρες, αξιοσημείωτα θραύσματα πολυσυμπυκνωμάτων, σπασμένα αγγεία και τραχεία, θραύσματα καστανόχρωμου φελλού, συχνά προσκολλημένα,



Εικόνα 10 Αποξηραμένες Ρίζες

τα οποία είναι κύτταρα με παχύ τοίχωμα, πολυάριθμα κάπως κατεστραμμένα, μεγάλα κύτταρα παρεγχύματος, και περιστασιακές συστάδες λεπτών πρισματικών κρυστάλλων οξαλικού ασβεστίου (μήκους 3- 6 μm) σε γωνίες των κυττάρων του παρεγχύματος. Οι κόκκοι αμύλου είναι λίγοι ή απουσιάζουν. Οι ίνες απουσιάζουν από την πρώτη ύλη. [10]

Βλαστός

Το στέλεχος (βλαστός) είναι συνήθως όρθιο, απλό και ως επί το πλείστον κούφιο. Είναι συνήθως άτριχο-λείο χωρίς αδενώδεις τρίχες ή προστατευτικές.

Φύλλα

Τα φύλλα είναι αντικρυστά και σπάνια εμφανίζονται με την μορφή σπείρας. Τα φύλλα είναι συχνά κατανεμημένα σε μία ξεχωριστή βασική ροζέτα. Τα φύλλα συνήθως είναι άμισχα (επιφυή) με ελλειψοειδές, ωοειδές ή σχεδόν γραμμικό έλασμα έως 30cm. Το ανώτατο ζεύγος φύλλων ενίοτε σχηματίζει ένα περίβλημα γύρω από τα λουλούδια, τα σέπαλα. Μερικές φορές αυτά έχουν αδενώδεις τρίχες στις μασχάλες των φύλλων και σπάνια κοντές νύσσουσες τρίχες.

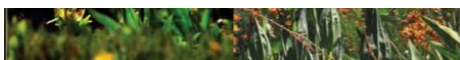
Άνθος

Τα άνθη είναι συνήθως αστερόμορφα κίτρινα (3-4 cm) με 4-7 πέταλα και περιβάλλονται από οβάλ σέπαλα. Σχηματίζουν μπουκέτα στις κορυφές των βλαστών και στις μασχάλες των ανώτερων φύλλων. Οι στήμονες εντοπίζονται σε διάφορα μεγέθη μέσα στην στεφάνη ή σε κόλπους ανάμεσα στα πέταλα της στεφάνης.

Ο πολυμορφισμός στο χρώμα των λουλουδιών έχει συνδεθεί με τις προτιμήσεις των επικονιαστών για ορισμένους χρωματισμούς, κυρίως λόγω της δυνατότητας τους να αντιλαμβάνονται και να διακρίνουν τις διαφορετικές αποχρώσεις [1-3]. Το τελικό χρώμα ενός λουλουδιού προσδιορίζεται από την παρουσία διαφόρων χρωστικών, κυρίως καροτινοειδών, φλαβονοειδών ή βηταϊνών. Το φυτικό είδος *G. lutea* παρουσιάζει δυο διαφορετικές ποικιλίες, οι οποίες οφείλονται στο διαφορετικό χρώμα των ανθέων. Η διαφορετικότητα αυτή είναι γενετική (Zhu et al., 2002, 2003) και οι δύο ποικιλίες είναι γενετικά διαφορετικές. [12] Τα κίτρινα πέταλα του *G. lutea* var. *lutea* οφείλονται στην αποκλειστική συσσώρευση άφθονων ποσοτήτων β-καροτίνης και ξανθοφυλλών, ενώ το πορτοκαλί χρώμα των λουλουδιών του *G. lutea* L. var. *aurantiaca* (M. Lainz) προκαλείται από γλυκοσίδες πελαργονιδίνης, που προσδίδουν μια κοκκινωπή απόχρωση στο κίτρινο χρώμα του άνθους. 21.



Εικόνα 12 Διαφορετικές ποικιλίες *G. lutea*



Εικόνα 11 Τμήματα του Άνθους – Βλαστός -Φύλλα

Καρπός

Ο καρπός είναι συνήθως κάψα με 2 καρπόφυλλα, αλλά είναι σπάνια ράγα. Τα σπέρματα είναι σφαιρικά, ατρακτοειδή—ή πεπλατυσμένα. Το σπερματικό περίβλημα είναι λείο έως ρυτιδωμένο.

Η *Gentiana lutea* αναπαράγεται τόσο από τους σπόρους (Mayogona et αϊ., 2015, Cuena Lombraña et αϊ.) όσο και επικονιαστικά από ένα ευρύ φάσμα εντόμων (Rossi κ.ά., 2014).

1.1.6 Φυτοχημική Ανάλυση

Η συστηματική φυτοχημική έρευνα για το γένος *Gentiana* ξεκίνησε ήδη από τη δεκαετία του 1960. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες της, όχι μόνο οι ελπιδοφόρες βιοδραστικές ουσίες, αλλά και οι άλλες με χημειοταξινομική σημασία έχουν διεγείρει το ενδιαφέρον για το συγκεκριμένο γένος. Μέχρι σήμερα, περισσότερες από 500 διαφορετικές ενώσεις έχουν απομονωθεί από το γένος, οι περισσότερες ανήκουν στα ιριδοειδή, φλαβονοειδή, ξανθόνες και τερπενοειδή, και σε μικρότερο ποσοστό παράγωγα λιγνανίων και φαινολικές ενώσεις [1] [13] [14].

1.1.6.1 Ρίζα και Ριζώματα

Το μεγαλύτερο φυτοχημικό και φαρμακολογικό ενδιαφέρον παρουσιάζει η ρίζα και τα ριζώματα του φυτού.

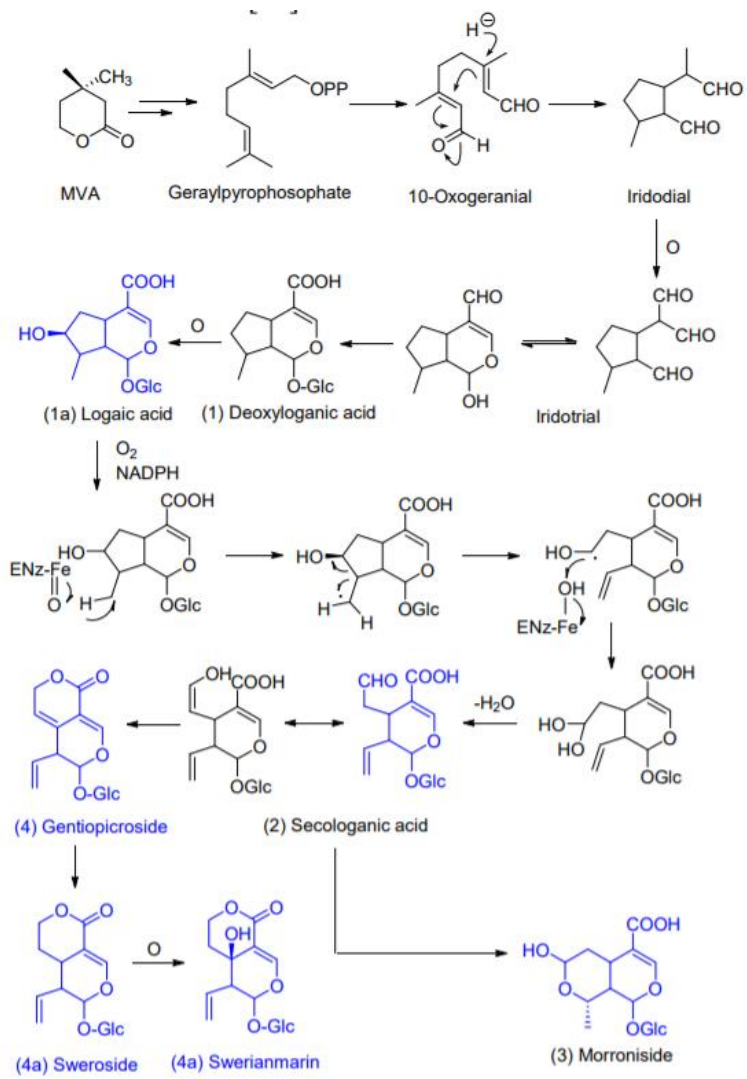
Τα κύρια συστατικά της δρόγης είναι τα πικρά σεκοϊριδοειδή, συμπεριλαμβανομένου του γεντιοπικροσίδη (περιεκτικότητας 2-8%, έως και περίπου 10%), η σβερτιαμαρίνη, ο σβεροσίδης (0,05-0,08%), αμαρογεντίνη (0,01-0,08%), αμαροπανίνη, αμαροσβερίνη, απογλυκοζυλο-τριφθοροσίτης και δεσακετυλοκεπικρίνη, η οποία είναι η πιο πικρή από όλες ενώσεις του φυτικού υλικού. Άλλα συστατικά ανήκουν στις ξανθόνες (έως 0,1%), όπως γεντισίνη, ισογεντισίνη, μεθυλογεντισίνη, γεντισεΐνη και 1υδροξυ-3,7-διμεθυλοξανθόνη. Επίσης, περιέχει 30-55% υδατάνθρακες όπως μονοσακχαρίτες (γλυκόζη και φρουκτόζη), δισακχαρίτες (σακχαρόζη και γεντιβιόζη), τρισακχαρίτες (γεντιανόζη-2,5-8,0%) και πολυσακχαρίτες (πηκτίνες). Σε μικρότερα ποσοστά, εντοπίζονται αλκαλοειδή γεντιανίνης, φλαβονοειδή (λουτεολίνη, απιγενίνη, ισοβιτεξίνη), φυτοστερόλες και αιθέριο έλαιο (0,1-0,2%)[10]).

Η ρίζα της γεντιανής με βάση τη φαρμακοποιία πρέπει να έχει τιμή πικρότητας όχι μικρότερη από 10.000 μονάδες UI και πρέπει επίσης να περιέχει τουλάχιστον 33% υδατοδιαλυτό εκχύλισμα (Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία 2010) [2]

Ιριδοειδή-Γλυκοσίδες Ιριδοειδών

Τα κοινά ιριδοειδή είναι μονοτερπένια με σκελετό ιριδάνης. Συνήθως, βρίσκονται σε μεγάλο αριθμό σε πολλές οικογένειες ως φυσικοί γλυκοσίδες με μεγάλο αριθμό σημαντικών βιολογικών δράσεων, όπως αντιφλεγμονώδη [32], χημειοπροστατευτική [33], και ηπατοπροστατευτική.

Το βιοσυνθετικό μονοπάτι των ιριδοειδών ξεκινά από το μεβανολικό οξύ και η πορεία σχηματισμού είναι η ακόλουθη (Εικόνα 13) [15]:

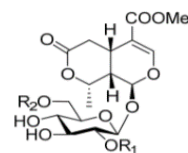


Εικόνα 13 Βιοσυνθετικό Μονοπάτι.

Η κατηγορία αυτή με βάση τον βιοσυνθετικό μονοπάτι χωρίζεται σε έξι κύριες υποκατηγορίες, καρβοκυκλικά ιριδοειδή, παράγωγα σεκολογανικού οξέος, παράγωγα κιγκισίδη, παράγωγα σβεροσίδη, παράγωγα σβερτιαμαρίνης και παράγωγα γεντιοπικροσίδη. [5]

Καρβοκυκλικά Ιριδοειδή

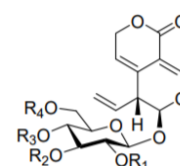
Τα καρβοκυκλικά ιριδοειδή αποτελούν τα ενδιάμεσα μόρια στην οδό βιοσύνθεσης των φυσικών γλυκοσίδων ιριδοειδών. Μέχρι σήμερα, περισσότερα από 40 μόρια έχουν απομονωθεί από φυτά γεντιανής. Οι συνήθεις υποκαταστάσεις και οι δομικές διαφορές εντοπίζονται κυρίως στον C-7 και στον C-11. (Εικόνα 14)



Εικόνα 14 Καρβοκυκλικά Ιριδοειδή

Παράγωγα Σεκολογανικού Οξέος

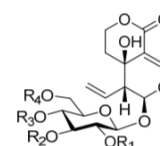
Ο δεσμός C7-C8 των καρβοκυκλικών ιριδοειδών διασπάται από ελεύθερες ρίζες και προκύπτουν τα παράγωγα αυτά. Πρόκειται για τα βασικά ενδιάμεσα, τα οποία κυκλοποιούνται για να παραχθούν τα παράγωγα γεντιοπικροσίδη ή πολυμερίζονται για την παραγωγή γλυκοσίδων δι-ιριδοειδών. (Εικόνα 15)



Εικόνα 15 Παράγωγα Σεκολογανικού Οξέος

Παράγωγα Κιγκισίδη

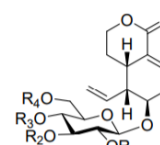
Τα παράγωγα αυτά δεν είναι τα τυπικά ιριδοειδή στο γένος *Gentiana* και μέχρι σήμερα έχουν αναφερθεί 13 από αυτά. Χαρακτηρίζονται από ένα δικυκλικό σύστημα υποκατεστημένων πυρανικών δακτυλίων με την παρουσία κάποιου σακχάρου. (Εικόνα 16)



Εικόνα 16 Παράγωγα Κιγκισίδη

Παράγωγα Γεντιοπικροσίδη

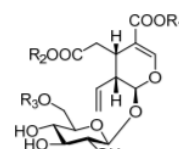
Τα παράγωγα του γεντιοπικροσίδη χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη διπλού δεσμού στους C-5 και C-6. Μέχρι σήμερα έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί 25 τέτοια παράγωγα. (Εικόνα 17)



Εικόνα 17 Παράγωγα Γεντιοπικροσίδη

Παράγωγα Σβεροσίδη

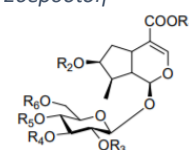
Έχουν απομονωθεί περίπου 102 παράγωγα από το γένος και έχουν υψηλή περιπλοκότητα στις δομές τους. Χαρακτηρίζονται από την απουσία του διπλού δεσμού μεταξύ του C-5 και C-6. (Εικόνα 18)



Εικόνα 18 Παράγωγα Σβεροσίδη

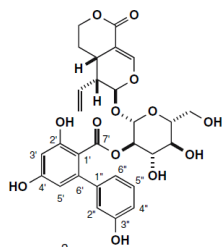
Παράγωγα Σβερτιαμαρίνης

Έχουν απομονωθεί 124 παράγωγα και χαρακτηρίζονται από την παρουσία υδροξυλίου στον C-5. (Εικόνα 19)



Εικόνα 19 Παράγωγα Σβερτιαμαρίνης

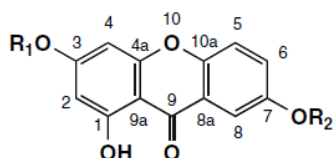
Επιπλέον, οι ρίζες περιέχουν παράγωγα διφαινυλίου όπως είναι η αμαρογεντίνη, η οποία εντοπίζεται στο φλοιό των ριζών, καθώς και η χημικά συγγενής αμαροπανίνη και η αμαροσβερίνη. Η αμαρογεντίνη είναι μία από τις πιο πικρές φυσικές ενώσεις που είναι γνωστές. (Εικόνα 18) [1]



Εικόνα 18 Δομή Αμαρογεντίνης

Ξανθόνες

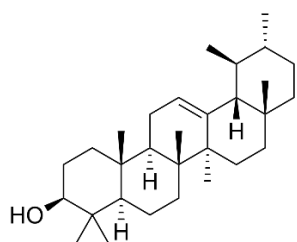
Η γεντισίνη και ο γεντισίδης είναι τα κυρίαρχα συστατικά αυτής της κατηγορίας. Ο βασικός σκελετός είναι ο παρακάτω και μόνο οι C-3 και C-7 είναι δυνατόν να διαφέρουν στα διάφορα παράγωγα. (Εικόνα 19) Τα υπόλοιπα εντοπίζονται σε μικρά ποσοστά, τα οποία μεταβάλλονται ανάλογα την προέλευση, το στάδιο ανάπτυξης και τον χρόνο συλλογής του φυτικού υλικού.



Εικόνα 19 Δομή παραγώγων Ξανθόνης

Τριτερπενικά Παράγωγα

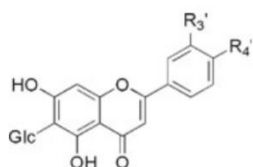
Τα κύρια τριτερπενικά παράγωγα που εντοπίζονται είναι η α-αμυρόνη, α-αμυρίνη, 2,3,-σεκο-3-οξο-ουρσο-12-εν-2λικό οξύ. (Εικόνα 20)



Εικόνα 20 Δομή Τριτερπενικών παραγώγων.

C-γλυκοσίδες Φλαβονών

Συνήθως, πρόκειται για απλές φλαβόνες υποκατεστημένες στον α και β δακτύλιο με σάκχαρα στις R₃ και R₄ των δακτυλίων, αντίστοιχα. Κύρια παράγωγα είναι η ισοσαποναρίνη και 6''-O-β-D-ξυλοπυρανοσυλ-ισοσαποναρίνη. (Εικόνα 21)

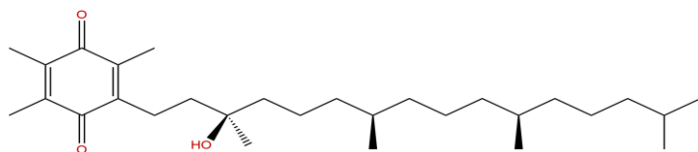


	R _{3'}	R _{4'}
Isoorientin	OH	OH
Isosaponarin	H	OGlc
Isovitexin	H	OH

Εικόνα 21 Δομή παραγώγων C-γλυκοσιδών Φλαβόνης.

Τοκοφερόλες

Κυρίως α-τοκοφερολοκινόνη. (Εικόνα 22)



Εικόνα 22 Δομή α-τοκοφερολοκινόνης.

Μακριάς Αλυσίδας Αλδεΐδες

Εξαντακοσανάλη, τετρακοσανάλη, και τα ισο-παραγώγα τους. (Εικόνα 23)

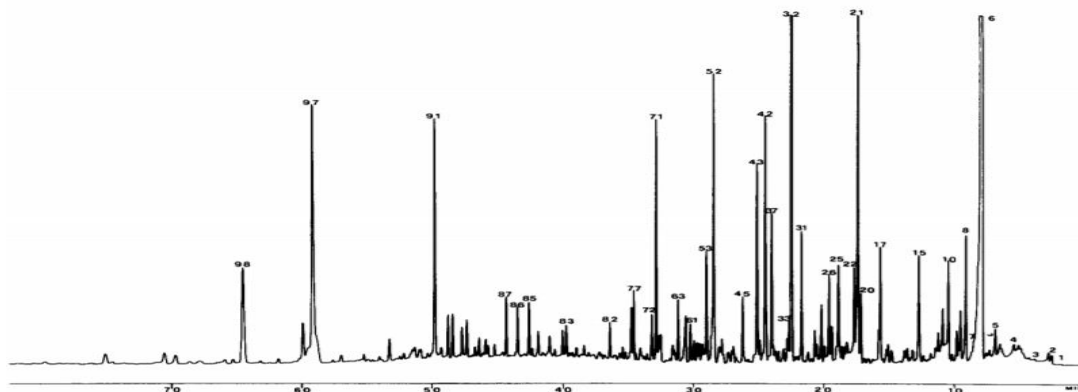


Εικόνα 23 Δομή Εξακοσανάλης.

Αιθέριο Έλαιο

Το αιθέριο έλαιο που προέρχεται μετά από συγκεκριμένη επεξεργασία της ρίζας αποδίδει κυρίως μονοτερπένια, όπως λιμονένιο, λιναλοόλη, *cis*-λιναλυλ οξείδιο και α-τερπινεόλη. [16]

Στο παρακάτω χρωματογράφημα (Εικόνα 24) φαίνονται τα συστατικά ενός αιθέριου ελαίου ρίζας, ο χρόνος κατακράτησης αλλά η σχετική περιεκτικότητά τους μέσα στο δείγμα:



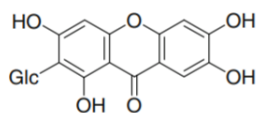
Εικόνα 24 Αέριο Χρωματογράφημα αιθέριου ελαίου ριζών.

1.1.6.2 Υπέργεια Τμήματα

Τα υπέργεια μέρη της κίτρινης γεντιανής παρουσιάζουν και αυτά φυτοχημικό ενδιαφέρον [17] και περιέχουν κυρίως τρεις κατηγορίες δευτερογενών μεταβολιτών [1]:

Ξανθόνες

Η C-γλυκοξανθόνη μανγκιφερίνη (Εικόνα 25) εντοπίζεται μαζί με γεντιοσίδη και ισογεντισίνη.



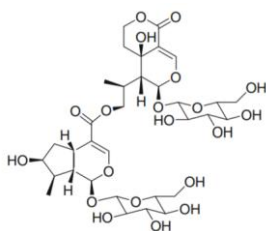
Εικόνα 25 Δομή Μανγκιφερίνης.

Φλαβονοειδή

Κυρίως περιέχουν C-γλυκοφλαβόνες, παρόμοιες με αυτές που εντοπίζονται και στις ρίζες.

Σεκοΐριδοειδή

Εμφανίζονται κυρίως τα παράγωγα που συναντώνται και στις ρίζες και στα ριζώματα και παράγωγα, όπως ο ευστομορουσίδης και ο σεπτεμφιδοσίδης. (Εικόνα 26)



Εικόνα 26 Δομή Σεπτεμφιδοσίδης.

1.1.7 Φαρμακολογικές Ιδιότητες

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3) συνοψίζονται οι κύριες φαρμακολογικές δράσεις των εκχυλισμάτων της ρίζας και των απομονωμένων μεταβολιτών και ο προτεινόμενος μηχανισμός. [1]

ΕΙΔΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ/ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ	ΔΡΑΣΗ	ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ	ΜΕΛΕΤΗ
Εκχύλισμα από ρίζα <i>G. lutea</i>	Πικρό τονωτικό για το γαστρεντερικό σύστημα	Άμεση ρύθμιση της έκκρισης οξέος από το γαστρικό βλεννογόνο	Θηλαστικά, άνθρωπος
Εκχύλισμα από ρίζα <i>G.lutea</i>	Γαστροπροστατευτικό	Αντιελκωτικές δράσεις μέσω του μονοπατιού των προσταγλανδινών στην γαστρική μεμβράνη	Θηλαστικά
Εκχύλισμα από ρίζα <i>G.lutea</i>	Χολαιρετικό	Ομαλοποίηση στην έκκριση χολής	Θηλαστικά
Γεντιοπικροσίδης	Ηπατοπροστατευτικό	Μείωση των ηπατικών αμινο-τρανσφερασών και των TNF στον ορό	Θηλαστικά
Εκχύλισμα από ρίζα <i>G.lutea</i> , Γεντιοπικροσίδης	Αντιβακτηριακό (<i>Helicobacter pylori</i> , <i>Serratia marcescens</i>) Αντιμυκητιασικό (<i>Candida albicans</i>) Αντιικό (HCV, HSV)	Μέσω ελευθέρων ριζών	<i>in vitro</i> , Θηλαστικά
Εκχύλισμα από ρίζα <i>G.lutea</i> , Ολικό Πολυφαινολικό Φορτίο, Ισογεντισίνη	Αντιοξειδωτικό	DPPH, κυτταροπροστατευτικό	<i>in vitro</i> ,
Εκχύλισμα από ρίζα <i>G.lutea</i> ,	Ακτινοπροστατευτικό	Μείωση της κυτοτοξικής επίδρασης της χ-ακτινοβολίας	<i>in vitro</i> , <i>ex vivo</i>
Εκχύλισμα από ρίζα <i>G.lutea</i> , Γεντισίνη, Ισογεντισίνη, Γεντιοπικροσίδης	Αντικαταθλιπτικό	Αναστολή της μονοαμινοοξειδάσης τύπου A (MAO-A)	Θηλαστικά
Γεντιοπικροσίδης	Αναλγητικό	Αποκλεισμός των NMDAN2B υποδοχέων	Θηλαστικά
Εκχύλισμα από ρίζα <i>G.lutea</i> , Γεντιοπικροσίδης, Σβεροσίδης, Σβερτιαμαρίνη	Αντιφλεγμονώδες, Επουλωτικό πληγών	Αναστολή της μυελοπεροξειδάσης	Θηλαστικά
Εκχύλισμα από ρίζα <i>G.lutea</i>	Ανθελμινθικό	Άγνωστος	Θηλαστικά
Sinupret: <i>Gentiana lutea</i> ρίζα, <i>Primula veris</i> άνθος, <i>Rumex Sp.</i> πόα, <i>Sambucus nigra</i> άνθος, <i>Verbena officinalis</i> πόα	Βρογχολυτικό	Άγνωστος	Θηλαστικά, άνθρωπος

Πίνακας 3 Φαρμακολογικές Ιδιότητες Εκχυλισμάτων *G.lutea*

1.1.7.1 Επίδραση στον Γαστρικό Βλεννογόνο

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα παρασκευάσματα της ρίζας *Gentiana* χρησιμοποιούνται παραδοσιακά ως πικρά τονωτικά στο γαστρεντερικό βλεννογόνο (Arino κ.ά., 1997, Blanco et αϊ., 1999, Dorico et αϊ. 2008). Η πίκρα της πρώτης ύλης διεγείρει τις εκκρίσεις στο γαστρεντερικό, κυρίως του γαστρικού υγρού. Υπάρχει μια υπόθεση ότι η γαστρική έκκριση οφείλεται στις επιδράσεις στο στόμα και στο στομάχι (Leslie 1978). Επίσης, έχει αναφερθεί πως η έκκριση είναι δοσοεξαρτώμενη και εκχυλίσματα υψηλής συγκέντρωσης μπορούν να επηρεάσουν και το pH. Ταυτόχρονα, έχει αποδειχθεί η εξαιρετική δράση του εκχυλίσματος σε διάφορα πεπτικά συμπτώματα, όπως καούρα, έμετος, πόνους στο στομάχι, ναυτία, απώλεια της όρεξης, δυσκοιλιότητα, μετεωρισμός. (Gebhardt 1997, Wegner 1997). Πρέπει να τονιστεί ότι ο πλήρης μηχανισμός δράσης δεν έχει κατανοηθεί πλήρως.

Οι άλλες φυσιολογικές δραστηριότητες, οι οποίες σχετίζονται με τις γαστρικές ιδιότητες της ρίζας γεντιανής περιλαμβάνουν

- προώθηση της έκκρισης σάλιου (Blumberger και Glatzel 1968),
- επιτάχυνση και αναστολή έκκρισης γαστρικού χυμού (Yamahara et αϊ., 1978; Okabe et αϊ. 1983),
- έκκρισης χολής (Glatzel και Hackenberg 1967)
- ενίσχυση της κινητικότητας του στομάχου (Niiho et al., 1977).

Ως εκ τούτου, τα εκχυλίσματα, είτε μόνα τους είτε σε συνδυασμό με άλλα βότανα χρησιμοποιούνται για την αύξηση της όρεξης κατά τη διάρκεια της θεραπείας από την οξεία ατονική δυσπεψία και ήπιες διαταραχές της γαστρεντερικής οδού (Jensen και Schripsema 2002; Botion et αϊ. 2005). Για παράδειγμα, η χορήγηση μεθανολικού εκχυλίσματος είχε ως αποτέλεσμα την προστασία έναντι οξέων γαστρικών ελκών που προκαλούνται από ασπιρίνη στην σύνδεση με τον πυλωρό, επαγόμενη από στρες και βλάβη γαστρικού βλεννογόνου που προκαλείται από αιθανόλη. Τα αποτελέσματα ήταν πιθανώς λόγω της δράσης των κύριων ενεργών σεκοϊριδοειδών. Τα αποτελέσματα αυτά συνέδεσαν την χρήση της ρίζας για τις αντιελκωτικές ιδιότητες μέσω του μονοπατιού της προσταγλανδίνης στη γαστρική μεμβράνη (Niiho et al., 2006).

Μερικές φορές, η ρίζα χρησιμοποιείται στη λαϊκή ιατρική ως χολαιρετικό και ηπατοπροστατευτικό αλλά δεν είναι σαφής η φαρμακολογική σύνδεση με αυτή την χρήση. Αντίθετα, υπάρχουν κάποιες ενδείξεις πως ο γεντιοπικροσίδης ίσως έχει προστατευτική δράση ενάντια στην ηπατίτιδα με αναστολή της παραγωγής TNF (παράγοντας νέκρωσης όγκου) σε ποντικούς (Kondo κ.ά., 1994).

1.1.7.2 Αντιβακτηριακές και Αντιϊκές Ιδιότητες

Υπάρχουν αρκετές βιβλιογραφικές αναφορές στις οποίες εκχυλίσματα από την *G. lutea* και/ή απομονωμένοι πικροί παράγοντες εμφανίζουν αντιβακτηριακή δράση [18] [19] [20]. Υπάρχουν επίσης μελέτες στις οποίες ο γεντιοπικροσίδης έδειξε ισχυρή αντιβακτηριακή δράση. [18]

Η αποτελεσματικότητα του εκχυλίσματος ως προς την αντικτική δράση δεν περνάει απαρατήρητη. (Tang et αϊ. 2003; Cheng et αϊ. 2008)

1.1.7.3 Αντιοξειδωτικές Ιδιότητες

Η δραστικότητα της ρίζας ενάντια στις ελεύθερες ρίζες έχει μελετηθεί εκτεταμένα, κυρίως σε δυο διαφορετικά σύστημα: μέσω της δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζυλινής (DPPH) και του υπεροξειδίου που παράγεται από το σύστημα οξειδάσης ξανθίνης.

Επίσης, έχουν διερευνηθεί οι αντιοξειδωτικές δράσεις των εκχυλισμάτων των ριζών σε συσχέτιση με τη συνολική περιεκτικότητά τους σε πολυφαινόλες. Η αυξημένη αντιοξειδωτική δραστικότητα των εκχυλισμάτων μπορεί να αποδοθεί στην αυξημένη περιεκτικότητα σε ολικό πολυφαινολικό φορτίο εκφρασμένη σε mg ισοδυνάμων γαλλικού οξέος. [21]

Σημαντικό πεδίο έρευνας αποτελεί η εφαρμογή των εκχυλισμάτων στο ενδοκυτταρικό οξειδωτικό στρες και την παραγωγή οξειδωμένων πρωτεϊνών που οφείλονται στο κάπνισμα, το οποίο προκαλεί ανεξάρτητο από την κασπάση ενδοθηλιακό κυτταρικό θάνατο. [10]. Μετά από βιοκατευθυνόμενη μελέτη, βρέθηκε ότι η δράση εντοπίζεται στα κλάσματα που περιέχουν ισογεντισίνη (παράγωγο ξανθόνης).

1.1.7.4 Επίδραση στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα

Υπάρχουν μερικές αναφορές ότι τα εκχυλίσματα από *G. lutea* μπορούν να επηρεάσουν και το κεντρικό νευρικό σύστημα. Έχει διαπιστωθεί μία μικρή συσχέτιση με υποδοχείς ντοπαμίνης (D2), σεροτονίνης (5-HT1A) ή της βενζοδιαζεπίνης και του γ-αμινο-η-βουτυρικού οξέος (GABA). Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, μελετήθηκε η πιθανή αντικαταθλιπτική δράση της γεντισίνης και της ισογεντισίνης με *in vitro* αναστολή της μονοαμινο οξειδάσης τύπου A και B. Είναι γνωστό ότι η αναστολή της MAO-A είναι χρήσιμη για τη θεραπεία της κατάθλιψης και του άγχους, ενώ αυτή του MAO-B είναι χρήσιμη στην πρόληψη της νόσου του Parkinson (Brunton et al., 2011). Επομένως, φαίνεται ότι η δράση των εκχυλισμάτων μπορεί να συνδυαστεί με συμπληρωματική αντικαταθλιπτική δράση. (Goetz 2010).

Ο δευτερογενής μεταβολίτης γεντιοπικροσίδης είναι πιθανώς το σημαντικότερο βιοδραστικό συστατικό υπεύθυνο για την αναλγητική δράση της ρίζας (Jiang et al., 2005, Chen et al., 2008). Είναι γενικά αποδεκτό ότι ο πρόσθιος φλοιός εμφανίζει ενεργό ρόλο στη μετάδοση και διαφοροποίηση του πόνου (Wager et al., 2004). Οι υποδοχείς NMDA (N-μεθυλ-ασπαρτικό), συμπεριλαμβανομένων των υποομάδων NR1, NR2A και NR2B, είναι υπερεκφρασμένοι στις περιοχές αυτές. Επώδυνα ερεθίσματα ενισχύουν την προμετωπιαία συναπτική μετάδοση και επάγουν την έκφραση του υποδοχέα του γλουταμινικού οξέος NMDA NR2B στον πρόσθιο φλοιό, καθώς, ο αποκλεισμός του υποδοχέα NR2B με την χορήγηση επιλεκτικών ανταγωνιστών τοπικά στην περιοχή ή συστηματικά, αναστέλλει την αλλοδυνία που σχετίζεται με τη φλεγμονή (Wu κ.ά., 2005). Όπως περιγράφεται από τους Chen et al. (2008), σε δόσεις των 100 και 200 mg / kg (ενδογαστρικά, δύο φορές ημερησίως για 3 ημέρες) μειώθηκε σημαντικά η μηχανική αλλοδυνία με σημαντικά αναλγητικά αποτελέσματα έναντι του επίμονου φλεγμονώδους πόνου σε ποντικούς. Επιπλέον, η συστηματική χορήγηση του γεντιοπικροσίδη ανέτρεψε σημαντικά την υπερέκφραση NR2B.

1.1.7.5 Αντιφλεγμονώδεις Ιδιότητες και Επούλωση Πληγών

Η έρευνα σχετικά με τους παράγοντες επούλωσης πληγών είναι ένας από τους αναπτυσσόμενους τομείς στις σύγχρονες βιοϊατρικές επιστήμες. Υπάρχουν μερικές παρατηρήσεις ότι τα ριζώματα του *G. lutea* μπορεί να έχουν αξία στην θεραπεία πληγών και εγκαυμάτων. (Kumar et al., 2007). Τα αποτελέσματα δείχνουν δράση παρόμοια με αυτή της δικλοφενάκης και της ινδομεθακίνης. Παρόλα αυτά ο ακριβής μηχανισμός που εμπλέκεται στη διαδικασία επούλωσης του τραύματος είναι άγνωστος.

1.1.7.6 Άλλες δράσεις

Η χρόνια ρινοκολπίτιδα μπορεί να οφείλεται σε ευρύ φάσμα αιτιών, συμπεριλαμβανομένης της ρύπανσης και της αλλεργίας. Τα φυτικά φάρμακα γίνονται όλο και πιο δημοφιλή και χρησιμοποιούνται συχνά από τους ενήλικες. (Guo et al., 2006, Antunes et al., 2008, Brown et al., 2009). Η ρίζα γεντιανής είναι συστατικό του Sinupret (Εικόνα 27), ενός εμπορικού παρασκευάσματος βοτάνων που αναπτύχθηκε στη Γερμανία για ρινοκολπίτιδα. Αποτελείται από πέντε φυτικά εκχυλίσματα (*G. lutea* ρίζα, *Primula veris* άνθος, *Rumex sp.* πόα, *Sambucus nigra* άνθος, *Verbena officinalis* πόα) και διατίθεται σε μορφή διαλύματος ή δισκίου (Ciuman 2012). Υπάρχουν κάποια στοιχεία που υποδηλώνουν ότι το Sinupret είναι το αποτελεσματικό συμπλήρωμα για τη θεραπεία της οξείας ρινοκολπίτιδας σε ασθενείς που υποβάλλονται σε αγωγή με αντιβιοτικά (Neubauer and Marz 1994, Melzer et al. 2006). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να έχει αξία κατά τη θεραπεία της χρόνιας και η αποτελεσματικότητά της είναι ανώτερη από την αμπροξόλη και τη Ν-ακετυλοκυστεΐνη (Richstein και Mann 1980. Οι Ernst κ.ά. 1997). Ως εκ τούτου, το Sinupret αντιπροσωπεύει ένα από τα φυτικά φαρμακευτικά προϊόντα (φυτοθεραπευτικά), τα οποία συνδυάζουν βλεννολυτική, αποφρακτική του βλεννογόνου, αντιφλεγμονώδη και αντιμικροβιακή δράση και κλασσικά χρησιμοποιούνται σε προβλήματα του ανώτερου. (Ciuman 2012).



Εικόνα 27 Εμπορικό* Σκεύασμα Sinupret.

1.2 Ελιά- Olea europaea, Oleaceae



1.2.1 Γεωγραφική Επέκταση

Η προέλευση της ελιάς έχει χαθεί με την πάροδο του χρόνου, συμπίπτει και αναμινγύεται με την επέκταση των μεσογειακών πολιτισμών. (Εικόνα 28)



Εικόνα 28 Γεωγραφική Εξάπλωση της Ελιάς στην Μεσογειακή Λεκάνη.

Η πρώτη αναφορά ξύλου ελιάς, που βρέθηκε με την μορφή κάρβουνων, χρονολογείται περίπου 790.000 χρόνια πριν και εντοπίζεται σε περιοχές της σημερινής Συρίας και του Ιράν. Η ύπαρξη τους μπορεί να οφείλεται σε φυσικές πυρκαγιές ή από εστίες σε προϊστορικές τοποθεσίες. [22]

Η παλαιότερη περιοχή, όπου ευημέρησε η *Olea europaea* εντοπίζεται στο σπήλαιο Κλεισούρα (νότια Ελλάδα) και χρονολογείται στα 61.140 - 55.230 π.Χ. Η ελιά είναι παρούσα και στις δύο πλευρές της λεκάνης της Μεσογείου, αλλά προφανώς, τέτοιες τοποθεσίες δεν επιτρέπουν την σχεδίαση ενός ακριβή χάρτη με την κατανομή της. Απολιθώματα φύλλων ελιάς έχουν εντοπιστεί στα τοιχώματα της Καλντέρας ηλικίας περίπου 50.000-60.000 ετών, δείχνοντας πως στην περιοχή επικρατούσαν ευνοϊκές συνθήκες για την ανάπτυξη της (Rhizorouliou S. 2007). Στοιχεία που προέκυψαν από ανάλυση γύρης, μαρτυρούν την παρουσία ελαιόδεντρων στον ελλαδικό χώρο ήδη από τη Νεολιθική εποχή. Συγκεκριμένα, το μέρος από το οποίο πιθανολογείται ότι ξεκίνησε η εξημέρωση του δέντρου, είναι η Κρήτη. Εκεί βρίσκεται μάλιστα μέχρι σήμερα η ελιά του Αζοριά, το αρχαιότερο ελαιόδεντρο στον κόσμο. Υπολογίζεται ότι φυτεύτηκε μεταξύ 1350-1100 π.Χ..

Τοιχογραφία στο ανάκτορο της Κνωσού, του 16ου αιώνα π.Χ., απεικονίζει θαυμάσια έναν ελαιώνα. Οι πινακίδες της Γραμμικής Β' αποτελούν μαρτυρίες για τη μεταχείριση της ελιάς στα ανάκτορα Κνωσού, Πύλου και Μυκηνών μεταξύ 14ου και 13ου αιώνα π.Χ.. Ενδεικτικά, στη Ζάκρο έχουν βρεθεί ολόκληρες ελιές με τη σάρκα τους και χρονολογούνται περί το 1450 π.Χ..

Οι Έλληνες, ιδρύοντας τις πρώτες αποικίες τους στη Σικελία, μετέφεραν μαζί τους την καλλιέργεια της ελιάς. Το ίδιο συνέβη και στις πρώτες αποικίες στη νότια Γαλλία και τη δυτική Ισπανία. Η ελιά και το ελαιόλαδο θα γίνουν γνωστά σε αυτές τις περιοχές του δυτικού κόσμου κάπου στον 7ο αιώνα π.Χ. Η καλλιέργεια όμως θα γίνει συστηματική με τη συμβολή των Ρωμαίων. Οι Ρωμαίοι ήταν επίσης αυτοί που διέδωσαν την καλλιέργεια της ελιάς στις εύφορες κοιλάδες της Τυνησίας, της Αλγερίας και του Μαρόκου.

Με την πτώση της Ρωμαϊκής Αυτοκρατορίας τον 5ο μ.Χ. αιώνα και την εισβολή των βαρβάρων, η καλλιέργεια της ελιάς μειώθηκε. Η δυτική Ευρώπη μπαίνει στο Μεσαίωνα, αλλά η ελαιοπαραγωγή συνεχίζεται στην Ανατολική Ρωμαϊκή Αυτοκρατορία, δηλαδή στο Βυζάντιο. Οι βάρβαροι και οι πρώτες αραβικές επιδρομές όμως, θα σημάνουν το τέλος της «καλής περιόδου» για την ελαιοκαλλιέργεια. Το ελαιόλαδο θα αποκτήσει ξανά την παλιά του αίγλη στην εποχή των Σταυροφοριών.



Εικόνα 29 Συλλογή ελαιόκαρπου στο Βυζάντιο και Λιομάζωμα, πίνακας του Θεόφιλου.

Ήδη από το 16ο αιώνα, οι Ευρωπαίοι φτάνουν στην Αμερική και μεταφέρουν την ελιά στο Νέο Κόσμο. Σήμερα, εντοπίζονται ελαιοκαλλιέργειες στη Βόρεια και Νότια Αμερική (Καλιφόρνια, Μεξικό, Αργεντινή, Χιλή, Περού, Ηνωμένες Πολιτείες), στη Βόρεια Αφρική, στην Αυστραλία ακόμα και σε εξωτικά μέρη όπως Χαβάη. Ο σημερινός παγκόσμιος πληθυσμός ελαιόδεντρων ανέρχεται σε περίπου 800 εκατομμύρια. Σε παγκόσμιο επίπεδο, παραγωγοί ελαιόλαδου δηλώνουν 47 χώρες. Η συντριπτική πλειοψηφία των δέντρων βέβαια βρίσκεται στις χώρες της Μεσογείου (το 95% του συνολικού πληθυσμού).

Στην Ελλάδα, τα ελαιόδεντρα καλλιεργούνται ευρέως και πολύ περισσότερο από οποιοδήποτε άλλο οπωροφόρο δέντρο. Αντιστοιχούν στο 75% της συνολικής μας δενδροκομίας και καλύπτουν το 15% της γεωργικής μας γης. Η βασικότερη ελαιοπαραγωγική περιοχή της χώρας είναι με διαφορά η Πελοπόννησος (Καλαμάτα, Αργολίδα, Λακωνία) και κατ' επέκταση η Κρήτη. Ακολουθούν σε απόσταση η Κεντρική Ελλάδα και η Μακεδονία. Περίπου 35 είδη ελιάς ευδοκούν στην περιοχή της Μεσογείου. Τα σημαντικότερα από αυτά τα συναντάμε στην Ελλάδα με κυριότερους εκπροσώπους στη βρώσιμη ελιά την Κονσερβοελιά, Καλαμών, Μεγαρίτικη και Χαλκιδικής ενώ στις λαδοελιές την Κορωνέικη, Κοθρέικη και Βαλανοελιά.

1.2.2 Λαογραφικά Στοιχεία

1.2.2.1 Ελληνική Μυθολογία

Σύμφωνα με την ελληνική μυθολογία, υπήρξε ιερό δέντρο και λατρευτικό σύμβολο. Ο "Μόρρεος" Δίας ήταν αρχικά ο προστάτης της άγριας ελιάς, της "Μορέας Ελιάς". Αργότερα, η θεά Αθηνά την προσέφερε στην πόλη Αθήνα ως δώρο, φυτεύοντας τη πρώτη ελιά στον ναό του Ερεχθείου στην Ακρόπολη, χτυπώντας με το δόρυ της το σημείο, κατά τον αγώνα μεταξύ των θεών για την ανάδειξη του προστάτη των Αθηνών. Η ίδια δίδαξε στους κατοίκους πώς να την καλλιεργούν και να φροντίζουν τον καρπό, διαφυλάττοντας τον πλούτο και την ευημερία της πόλης. Κλώνοι της ήταν οι 12 ιερές ελιές από τις οποίες δημιουργήθηκε ο περίφημος Ελαιώνας των Αθηνών, ο οποίος δυστυχώς έχει χαθεί στα βάθη των αιώνων. Οι Αθηναίοι για να τιμήσουν την θεά δημιούργησαν ασημένιο τετράδραχμο (Εικόνα 31) με την Αθηνά να φορά την περικεφαλαία και την γλαύκα να κάθεται σ' έναν αμφορέα στεφανωμένο με ελιά. (163-150 π.Χ.)



Εικόνα 31 Τετράδραχμο αφιερωμένο στην Αθηνά



Εικόνα 32 Η Θεϊκή Διεκδίκηση της Αθήνας

Οι Μυκηναίοι προσέφεραν ελαιόλαδο στους Θεούς, ενώ ο Όμηρος ονόμαζε την ελιά «το υγρό χρυσάφι της διατροφής». Οι Μινωίτες είχαν εφεύρει μια πρωτόγνωρη μέθοδο απόσταξης του λαδιού και έχουν διασωθεί ελαιοθήκες, όπου φυλασσόταν το λάδι. Οι Κρήτες τότε, όπως και σήμερα, είχαν ασχοληθεί εκτός από την παραγωγή λαδιού και με το εμπόριο. Ο Αριστοτέλης θεωρούσε την καλλιέργεια της ελιάς επιστήμη, ο Ιπποκράτης χρησιμοποιούσε το λάδι ελιάς ως φάρμακο, ενώ ο Σόλων εισήγαγε την πρώτη νομοθεσία για την προστασία των ελαιοπαραγωγών.

Παρέχοντας δύναμη σε όποιον την κατείχε η ελιά ήταν ένα μέσο επίδειξης της ισχύος και της δύναμης. Είτε κατείχε ελαιώνα, είτε τριήρης από ξύλο ελιάς, η υπεροχή αυτού που την διέθετε ήταν δεδομένη. Το ρόπαλο του Ηρακλή, που ταυτίζεται με την ρώμη και την ανδρεία του, το ξύλο με το οποίο ο Οδυσσεύς τύφλωσε τον γίγαντα Πολύφημο, απέναντι του οποίου βρισκόταν σε μειονεκτική θέση όσο αφορά τη δύναμη αλλά με τη σοφία του και τη δύναμη του μυαλού του κατάφερε να τον νικήσει, ήταν από ελιά. (Εικόνα 33)



Εικόνα 33 Οι άθλοι του Ηρακλή

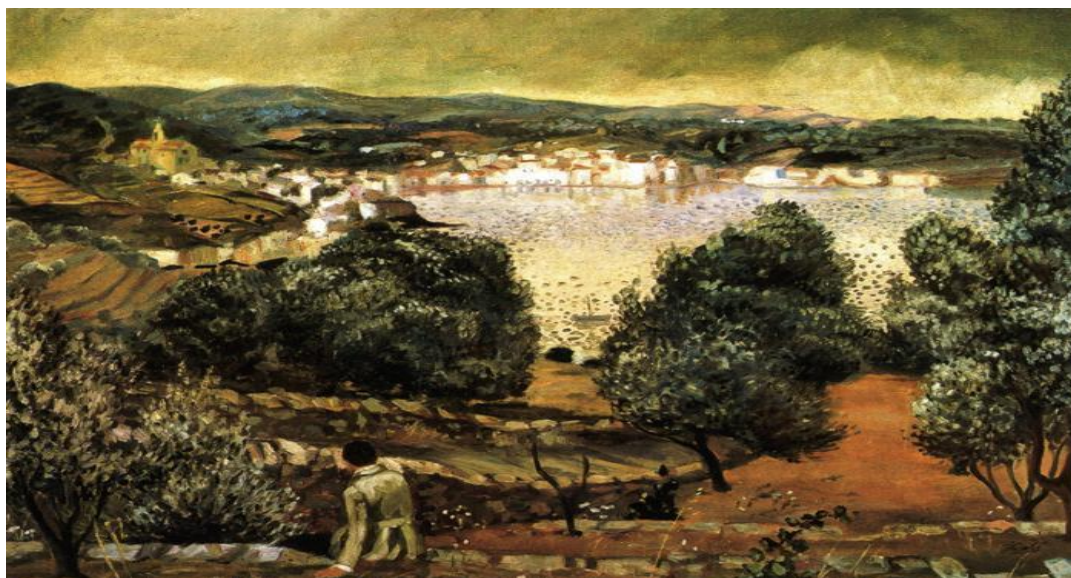
Κατά τη μυθολογία, ο Ηρακλής φύτεψε μια ελιά στο ναό της Ήρας στην αρχαία Ολυμπία, μετά την ολοκλήρωση των 12 άθλων του. Ήταν γνωστή ως η «καλλιστέφανος ελιά», από την

οποία φτιάχνονταν ο «κότινος», ένα στεφάνι αγριελιάς το οποίο έπαιρναν οι αθλητές όταν διέπρεπαν σ' ένα άθλημα. Επίσης, το λάδι της ελιάς μοιράζονταν στους νικητές μέσα σε παναθηναϊκούς αμφορείς. Η ελιά για τους αρχαίους Έλληνες ήταν σύμβολο των ολυμπιακών ιδεωδών, της Ειρήνης, της Σοφίας και της Νίκης και πηγή έμπνευσης ακόμα και στις μέρες μας, καθώς το στεφάνι ελιάς επιλέχθηκε ως σύμβολο της Ολυμπιάδας του 2004.

Το δέντρο της ελιάς είναι αξιοσημείωτα συνδεδεμένο με τον ελληνικό πολιτισμό, αλλά και με τις περισσότερες θρησκείες που αναπτύχθηκαν στην περιοχή της Μεσογείου (Χριστιανισμός, Ιουδαϊσμός, Ισλαμισμός), συμβολίζοντας ειρήνη, μακροζωία, αναζωογόνηση και εξουσία. Το κλαδί ελιάς που κρατούσε ένα περιστέρι ήταν για τον Νώε ο οϊωνός ότι η ανθρώπινη ζωή θα ξανάρχιζε στη γη, μετά τον βιβλικό κατακλυσμό. Στην αρχαία Αίγυπτο πίστευαν ότι η θεά Ίσις, γυναίκα του Όσιρη, κρατούσε το μυστικό για την καλλιέργειά της.

1.2.2.2 Πολιτισμικά στοιχεία

Η ελιά αποτέλεσε πηγή έμπνευσης για μερικούς από τους σημαντικότερους ζωγράφους της Αναγέννησης μέχρι και σημερινούς. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν ο πίνακας του σουρεαλιστικού Salvador Dali το 1922 (Εικόνα 34) και οι μετα-μπρεσιονιστικοί πίνακες που απεικονίζουν ελιές και ελαιώνες του Vincent Van Gogh. (Εικόνα 35)



Εικόνα 34 Ελιές-Τοπίο στο Καντακές, Salvador Dali 1922



Εικόνα 35 Ελαιώνας, Vincent Van Gogh

Σημαντικοί ποιητές της χώρας μας θέλησαν να τιμήσουν και να εξυψώσουν την σημασία της μέσα από δημιουργίες τους. Ο Οδυσσεύς Ελύτης, ένας από τους σημαντικότερους Έλληνες ποιητές αφουγκράστηκε την αξία της και εμπνεύστηκε από την ελιά.

- Εάν αποσυνθέσεις την Ελλάδα, στο τέλος θα δεις να σου απομένουν μια ελιά, ένα αμπέλι κι ένα καράβι. Που σημαίνει με άλλα τόσα την ξαναφτιάχνεις.
- Καταμεσήμερο Ιουλίου... που κι αν ακόμα δεν υπήρχαν ελαιώνες...θα τους είχα επινοήσει.

1.2.2.3 Παραδοσιακές και Σύγχρονες Ιατρικές χρήσεις

Σύμφωνα με την παράδοση αλλά και ιατρικές αναφορές, η θεραπευτική χρήση της ελιάς έγινε κατανοητή πολλά χρόνια πριν. Για τον λόγο αυτό, χρησιμοποιούταν σε διάφορες παθήσεις ανάλογα την επεξεργασία που είχε υποστεί. (Πίνακας 4) Τα θεραπευτικά της αποτελέσματα ήταν πολύ σημαντικά και αυτά αναφέρονται τόσο στον Ιπποκράτη όσο και στον Διοσκουρίδη.

ΕΙΔΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ	ΟΔΟΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ	ΠΑΘΗΣΗ/ΧΡΗΣΗ
Αφέψημα ή Έγχυμα Φύλλων και Καρπών	Από του στόματος	Θεραπεία της Υπογλυκαιμίας, Υπέρτασης, ως Αντιδιαβητικό Αντιπυρετικό, Αντιφλεγμονώδες, Τονωτικό
Ελαιόλαδο με Χυμό λεμονιού	Από του στόματος	Θεραπεία Χολόλιθων
Λάδι από Σύνθλιψη Κουκουτσιών	Από του στόματος	Καθαρτικό
Αφεψήματα Αποξηραμένων Φύλλων και Καρπών	Από του στόματος	Διάρροια, Αναπνευστικές Λοιμώξεις Και Λοιμώξεις Ουροποιητικού Συστήματος
Ελαιόλαδο	Τοπική	Θεραπεία της Τριχόπτωσης
Βραστό Εκχύλισμα από Φρέσκα Φύλλα	Από του στόματος	Θεραπεία του Άσθματος
Βραστό Εκχύλισμα από Ξηρά Φύλλα	Από του στόματος	Θεραπεία της Υπέρτασης
Εκχύλισμα Φύλλων με Ζεστό Νερό	Από του στόματος	Διουρητικό
Ελαιόλαδο	Τοπική	Σε Σκασμένα Άκρα
Καρπός	Τοπική	Καθαριστικό Δέρματος
Παρασκευάσματα Φύλλων	Από του στόματος	Θεραπεία Της Ουρικής Αρθρίτιδας
Φύλλα	Τοπική	Αντιβακτηριακό
Καρποί Και Φύλλα	Τοπική, Από του στόματος	Αιμορροΐδες, Ρευματισμοί και ως Αγγειοδιασταλτικό
Εγχύματα Φύλλων	Τοπική	Θεραπεία Οφθαλμολογικών Λοιμώξεων

Πίνακας 4 Παραδοσιακές και Σύγχρονες Ιατρικές Χρήσεις της Ελιάς.

1.2.3 Οικονομική Ανάλυση

Μεταξύ των καλλιεργούμενων φυτών, η ελιά (*Olea europaea L.*) είναι το έκτο πιο σημαντικό για την παραγωγή ελαιίου στον κόσμο, που σήμερα διαδίδεται από την περιοχή προέλευσης του, την Μεσόγειο σε νέα εδάφη λόγω των ευεργετικών διατροφικών ιδιοτήτων του ελαιόλαδου και της υψηλής οικονομικής αξίας. Το ελαιόλαδο έχει ευνοϊκές θρεπτικές ιδιότητες και, συνεπώς, η κατανάλωση, η οποία παραδοσιακά περιοριζόταν στην περιοχή της Μεσογείου (77% της παγκόσμια περιοχή παραγωγής), αυξάνεται παγκοσμίως (κυρίως Ηνωμένες Πολιτείες, Καναδάς, Αυστραλία και Ιαπωνία). [23]

Η Ευρωπαϊκή Ένωση είναι ο κορυφαίος παραγωγός, καταναλωτής και εξαγωγέας ελαιόλαδου. Κατά τις πέντε τελευταίες περιόδους εμπορίου (2012/13 - 2016/17), η Ε.Ε. παραγωγή άγγιξε το 67%, η κατανάλωση το 55% και η εξαγωγή το 67% του παγκόσμιου ελαιόλαδου. Ανάμεσα σε αυτές τις χώρες την πρωτοκαθεδρία κατέχει η Ελλάδα με μέση κατά κεφαλήν ετήσια κατανάλωση περισσότερη από 13,02 λίτρα, ακολουθούν οι Ισπανοί και Ιταλοί με 10,84 και 9,27 λίτρα αντίστοιχα. (Εικόνα 36)

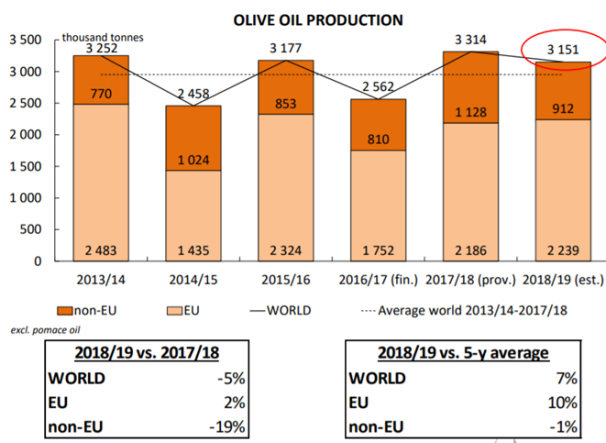


SOURCE: The International Olive Council (IOC), 2011/2012 Forecast Reports

Εικόνα 36 Παγκόσμια Κατανάλωση Ελαιολάδου.

Τα σκήπτρα στην παραγωγή ελαιόλαδου κατέχει η Ε.Ε. και κατ' επέκταση οι χώρες της Μεσογείου, που επικρατούν οι πλέον ευνοϊκές συνθήκες για την καλλιέργειά τους. (Εικόνα 37) [23]

Global production revised up in 2018/19...



Εικόνα 37 Παγκόσμια Παραγωγή Ελαιολάδου.

Η Ελλάδα κατέχει σταθερά εδώ και χρόνια την 3η θέση στις χώρες-παραγωγούς σε όλο τον κόσμο, καθώς οι ελιές της αποδίδουν κατά μέσο όρο 300.000 τόνους λάδι ετησίως. Καλλιεργούνται περίπου 90.000.000 παραγωγικά ελαιόδεντρα, κυρίως σε περιοχές της Κρήτης και της Πελοποννήσου αλλά τα τελευταία χρόνια και άλλες περιοχές αναπτύσσονται δυναμικά.

Η παγκόσμια αγορά ελαιόλαδου αναμένεται να αυξηθεί περίπου 4,4% μέσα στα επόμενα δέκα χρόνια και θα φτάσει τα US \$ 17,205,6 εκατομμύρια το 2028 από 11,188 δολάρια το 2018, σύμφωνα με μια νέα μελέτη Market.us (Prudour Research).

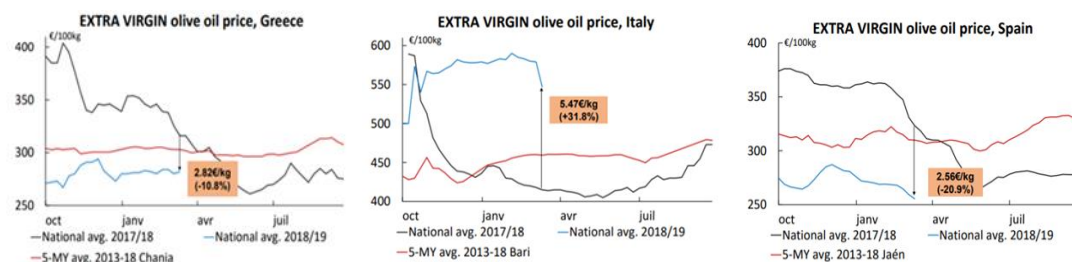
Increasing exports of EU olive oil

EU exports of olive oil to third countries (October - January)									
Trade partner	2013/18 (5-year average)		2016/17		2017/18		2018/19		vs. 2017/18 (%)
	volume (t)	share (%)	volume (t)	share (%)	volume (t)	share (%)	volume (t)	share (%)	
United States	65 302	37	74 048	40	60 319	33	71 451	36	18.5
Brazil	18 829	11	14 841	8	25 584	14	22 845	11	-10.7
Japan	14 991	8	15 262	8	15 377	9	19 039	9	23.8
China	11 572	7	12 043	7	14 830	8	16 328	8	10.1
Canada	8 558	5	9 611	5	8 706	5	9 156	5	5.2
Australia	8 175	5	10 339	6	7 138	4	8 024	4	12.4
Russia	4 694	3	3 655	2	4 097	2	5 006	2	22.2
Others	44 744	25	45 402	25	44 305	25	49 666	24	10.6
Extra EU	176 865		185 200		180 357		200 855		11.4

Source: COMEXT. Period: October - January. CN codes: 1509 (all stat. regimes).

Εικόνα 38 Παγκόσμια Εξαγωγή Ελαιολάδου στην Παγκόσμια Αγορά

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το γεγονός ότι παρά την αύξηση στις εξαγωγές, η τιμή του ελαιόλαδου παρουσιάζει πτωτική τάση στις κύριες εξαγωγικές χώρες. (Εικόνα 39)



Εικόνα 39 Πτωτική Τάση της τιμής πώλησης του Ελαιόλαδου από τις 3 Κύριες Χώρες Παραγωγής.

Στον πίνακα φαίνονται οι ενδοκοινοτικές σχέσεις εμπορίου που αναπτύσσονται μεταξύ των χωρών της ευρωπαϊκής ένωσης. (Εικόνα 40) Όπως παρατηρείται και από τους πίνακες προηγούμενων χρόνων, η Ελλάδα κυρίως εξάγει στην Ιταλία σε ένα σημαντικό ποσοστό της τάξης του 70-80 %. Οι εξαγωγικές σχέσεις με τις άλλες χώρες είναι πολύ μικρότερες.

Increasing intra-EU exports in 2018/19

Intra EU exports of olive oil (CN 1509) (October - December 2018)													
Trade partner	Origin (declared exports)											TOTAL volume	
	Spain		Italy		Greece		Portugal		France		Others		
	volume	share (%)	volume	share (%)	volume	share (%)	volume	share (%)	volume	share (%)	volume	share (%)	
Spain			3.0	11.4	1.7	4.4	20.3	58.0	0.1	5.3	0.0	0.3	25.1
Italy	70.5	49.6			30.6	79.7	12.7	36.2	0.0	0.6	0.3	7.7	114.0
Greece	0.1	0.0	0.2	0.9			0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.9	0.3
Portugal	22.2	15.6	0.0	0.1	0.0	0.0			0.0	0.1	0.0	0.3	22.2
France	22.3	15.7	5.0	19.0	0.4	1.0	0.8	2.3			0.4	11.2	28.9
UK	9.7	6.8	2.9	11.0	0.5	1.4	0.0	0.1	0.1	5.8	0.2	5.4	13.4
Germany	4.3	3.0	8.6	32.8	2.4	6.2	0.1	0.3	0.6	40.4	0.4	9.4	16.3
Netherlands	3.8	2.7	0.9	3.4	0.2	0.6	0.1	0.3	0.0	0.8	0.4	10.6	5.5
Others	9.3	6.5	5.6	21.4	2.6	6.8	1.0	2.7	0.7	47.1	2.1	54.1	21.3
Total	142.1	100	26.2	100	38.3	100	35.0	100	1.5	100	3.9	100	247.1
Total same period previous campaign	129.9		26.1		33.3		32.3		1.6		4.3		227.5
Difference (y-o-y%)	9.4		0.7		15.2		8.4		-4.2		-9.2		8.7

Period: 01/10/2018 - 31/12/2018. Olive oil excl. pomace oil. Source: COMEXT. All stat. regimes.

Εικόνα 40 Ευρωπαϊκές Ενδοκοινοτικές Σχέσεις.

1.2.4 Συστηματική Κατάταξη

Η ελιά είναι το κύριο καλλιεργήσιμο είδος που ανήκει στην μονοφυλετική οικογένεια *Oleaceae*, η οποία περιλαμβάνει 30 γένη και 600 είδη, μέσα στο κλάδο των Asterids. (Bracci et al., 2011). Η οικογένεια περιλαμβάνει τα γένη *Fraxinus* (μελιά, φλαμούρι), *Forsythia* (χρυσή καμπανούλα), *Forestiera* (*F. neomexicana*, καλιφορνέζικη άγρια ελιά), *Ligustrum* (λιγούστρο), and *Syringa* (πασχαλιά), καθώς και *Olea* (ελιά). Το γένος *Olea* περιλαμβάνει 30 είδη και έχει εξαπλωθεί σε Ευρώπη, Ασία, Ωκεανία και Αφρική. Οι κύριες γενετικές πηγές κατατάσσουν ταξινομικά την ελιά στο είδος *Olea europaea*, στο οποίο διαιρούνται σε 6 υποείδη: *cuspidate*, *laperrinei*, *maroccana*, *cerasiformis*, *guanchica*, *europaea*. (Πίνακας 5)



Πίνακας 5 Συστηματική Κατάταξη *Olea europaea*.

1.2.5 Βοτανικά Χαρακτηριστικά

Είναι αείφυλλο δένδρο ή μεγάλος θάμνος. Αυτοφύεται στις εύκρατες και θερμές χώρες της Ευρώπης, Ασίας και Αφρικής. Η μεσογειακή αυτή μορφή είναι δίοικο είδος. ($2n=2x=46$). Η καλλιεργήσιμη ελιά μπορεί να φτάσει σε ύψη που κυμαίνονται από λίγα μέτρα έως 20 μ. Το πάνω τμήμα της ελιάς χαρακτηρίζεται από την πυκνή συνάθροιση των άκρων, κοντά μεσογονάτια διαστήματα και συμπαγές φύλλωμα. Το φως δεν διεισδύει εύκολα στο εσωτερικό, εκτός αν το δέντρο είναι καλά διαχειριζόμενο και κλαδεμένο για να ανοίξει κανάλια φωτός προς το φύλλωμα. Εάν όχι, οι ελιές αναπτύσσουν πολλαπλά κλαδιά με αλληπάλληλα άκρα. Τα κλαδιά είναι ανθεκτικά ώστε να αντέχουν το μεγάλο βάρος των καρπών, τα οποία είναι ευέλικτα, λικνιζόμενα και κρεμασμένα. (Εικόνα 41)[24]



Εικόνα 41 Επιμέρους Βοτανικά Τμήματα.

1.2.5.1 Επιμέρους τμήματα της *Olea europaea*

Κορμός

Ο νεαρός κορμός είναι λείος και πρασινωπός, ο οποίος μετατρέπεται σε παχύ και γκρίζο και εντοπίζονται εξογκώματα, τα οποία είναι υπερπλασίες πλούσιες σε θρεπτικές ουσίες και δεν σχετίζονται με ασθένειες ή καρκινώματα. Το ξύλο αντιστέκεται στην αποσύνθεση και όταν η κορυφή του δέντρου θανατωθεί με μηχανικές βλάβες ή από περιβαλλοντικές επιπτώσεις, τότε από το ριζικό σύστημα μπορεί να προκύψει νέα ανάπτυξη. Ωστόσο, είναι πολύ επιρρεπής σε προσβολές εντόμων και μυκήτων.

Ρίζες

Είτε πολλαπλασιάζεται με σπόρους ή μοσχεύματα, το ριζικό σύστημα είναι γενικά ρηχό, εξαπλώνεται κάθετα σε 0,9 - 1,2 m ακόμα και σε βαθιά εδάφη και γίνεται θυσοανώδης.

Φύλλα

Τα φύλλα της ελιάς είναι παχιά, δερμάτινα και αντίθετα διατεταγμένα, στενά ελλειπτικά έως ελλειπτικά ή ωσειδή-επιμήκη, ή ακόμα και πολύ στενά ελλειπτικά, μήκους 3 - 9 cm, πλάτους 0,3 - 3 cm. Κάθε φύλλο μεγαλώνει σε μία περίοδο 2 χρόνων. Τα φύλλα έχουν στόματα μόνο στην κάτω επιδερμίδα. Τα στόματα περιβάλλονται από ασπιδοειδή τριχώματα που περιορίζουν την απώλεια νερού και καθιστούν την ελιά σχετικά ανθεκτική στην ξηρασία. Μερικές πολυκυτταρικές τρίχες υπάρχουν στις πάνω επιφάνειες των φύλλων. Τα φύλλα ελιάς πέφτουν συνήθως την άνοιξη όταν είναι 2 ή 3 ετών.

Άνθη

Τα μπουμπούκια των λουλουδιών εντοπίζονται στη μασχάλη κάθε φύλλου. Συνήθως ο οφθαλμός σχηματίζεται κατά την εποχή της ανάπτυξης και ξεκινά να είναι ορατή η ανάπτυξη του την επόμενη σεζόν. Μπορεί να παραμείνει αδρανής για περισσότερο από ένα χρόνο και στη συνέχεια να αρχίσει η ανάπτυξη, σχηματίζοντας βιώσιμες ταξιανθίες με λουλούδια. Όταν κάθε φύλλο διατηρεί μια αναπτυσσόμενη ταξιανθία, εκεί σχηματίζονται εκατοντάδες λουλούδια ανά κλαδί. Κάθε ταξιανθία περιέχει 15 - 30 λουλούδια, ανάλογα με την ποικιλία.

Τα λουλούδια γεννιούνται αξονικά κατά μήκος του βλαστού, τοποθετημένα μέσα σε βοτρυώδεις ταξιανθίες. Είναι μικρά, κίτρινα-λευκά και διακριτικά.

Τύποι ανθέων:

- Τα τέλεια λουλούδια, εκείνα με αμφότερα τα παστίλιχα και τα στιβαρά μέρη, συνήθως αποτελούνται από μικρό κάλυκα, 4 πέταλα, 2 στήμονες με ένα νήμα που στηρίζει ένα μεγάλο ανθήρα με γύρη, και ένα πράσινο ύπερο με ένα κοντό παχύ στύλο και ένα μεγάλο στίγμα. Τα τέλεια άνθη δημιουργούνται μασχαλιαία σε μια ταξιανθία όπως και εντός μιας τυπικής τριπλής ταξιανθίας.
- Στα ατελή λουλούδια, συνήθως ο ύπερος είναι ατροφικός ή λείπει και έτσι δεν είναι ικανός να γονιμοποιηθεί και να δώσει καρπό.

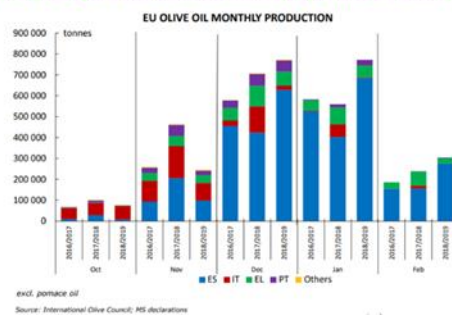
Η έναρξη της ανθοφορίας γίνεται τον Νοέμβριο (Pinney & Polito 1990), και τα λουλούδια παίρνουν μορφή τον Μάρτιο-Απρίλιο. Ο αριθμός ανθέων και η κατανομή τους στην ταξιανθία είναι ένα χαρακτηριστικό κάθε ποικιλίας όμως και στο παρελθόν έχουν παρατηρηθεί διακυμάνσεις από χρονιά σε χρονιά (Lavee, 1996) οπότε επιβεβαιώνεται η σημασία της πραγματοποίησης πολυετών μετρήσεων για την περιγραφή μιας ποικιλίας. Έχουν παρατηρηθεί σημαντικές διαφορές μεταξύ διαφορετικών ετών για την ίδια ποικιλία.

Καρπός

Ο καρπός της ελιάς είναι μία δρύπη και βοτανικά ανήκει στα πυρηνόκαρπα, παρόμοια με αμύγδαλο, βερίκοκο, κεράσι, νεκταρίνι, ροδάκινο και δαμάσκηνο. Αποτελείται από το τοίχωμα των ωοθηκών κι αυτά διαφοροποιούνται σε τρία στρώματα:

- Το εξωκάρπιο, δηλαδή το εξωτερικό περίβλημα που έχει σαρκώδη και ξηρά τμήματα και αποτελείται από επιδερμικά κύτταρα με παχιά εφυμενίδα.
- Το ενδοκάρπιο (λάκκο) διευρύνεται σε πλήρες μέγεθος και σκληραίνει έως και 6 εβδομάδες μετά την πλήρη άνθιση. Αμέσως, το ενδοσπέρμιο αρχίζει να στερεοποιείται και η ανάπτυξη εμβρύου λαμβάνει χώρα, με αποτέλεσμα την ωριμότητα μέχρι τον Σεπτέμβριο.
- Το μεσοκάρπιο (σάρκα) και το εξωκάρπιο (δέρμα) συνεχίζουν τη σταδιακή ανάπτυξή τους.

97% of EU production harvested by end February 2019



Εικόνα 42 Μηνιαία Ποσοστά Συλλογής Ελαιόκαρπου.

Οι καρποί αρχίζουν να αλλάζουν από πράσινο χρώμα σε κίτρινο-λευκό (ωχρό) και να συσσωρεύουν ανθοκυανίνη από το βασικό άκρο. Το σχήμα και το μέγεθος των φρούτων καθώς και το μέγεθος του κοίλου και η μορφολογία της επιφάνειας ποικίλλουν σημαντικά μεταξύ των ποικιλιών.

Ο καρπός είναι καλλιεργητικά ώριμος τον Οκτώβριο ή τον Νοέμβριο. (Εικόνα 42) Εάν γίνει η συγκομιδή εκείνη την εποχή, το λάδι είναι πικρό και ανήκει στη κατηγορία του αγουρελαίου (χαρακτηριστική δριμεία γεύση). Η βασική περίοδος συγκομιδής είναι τον Ιανουάριο-Φεβρουάριο, που οι καρποί ωριμάζουν φυσιολογικά. Ο ελαιοπυρήνας χαρακτηρίζεται από περισσότερες από 2.629 διαφορετικές ποικιλίες.

1.2.5.2 Εδαφικές Απαιτήσεις

Η ελιά ευδοκιμεί σε μεγάλη ποικιλία εδαφών και προσαρμόζεται εύκολα σε ξηροθερμικές συνθήκες, αλλά δεν αντέχει τα κακώς στραγγιζόμενα και ανεπαρκώς αεριζόμενα εδάφη. Αναπτύσσεται σε μεγάλο εύρος εδαφικού pH και χαρακτηρίζεται ως δένδρο μετρίως ανθεκτικό στην αλατότητα. Οι εδαφικές απαιτήσεις της καλλιέργειας ελιάς παρουσιάζονται στον Πίνακα 6:

Εδαφικές Απαιτήσεις

Στράγγιση	Καλή
Αλατότητα	Μέτρια
pH	5.6-8.5
Διαθέσιμος P (mg Kg⁻¹)	15-30
Ανταλλάξιμο K (meq/100g)	0.5-1.0
Ανταλλάξιμο Ca (meq/100g)	6-12
Ανταλλάξιμο Mg (meq/100g)	1-3
Διαθέσιμο B (mg Kg⁻¹)	>0.3

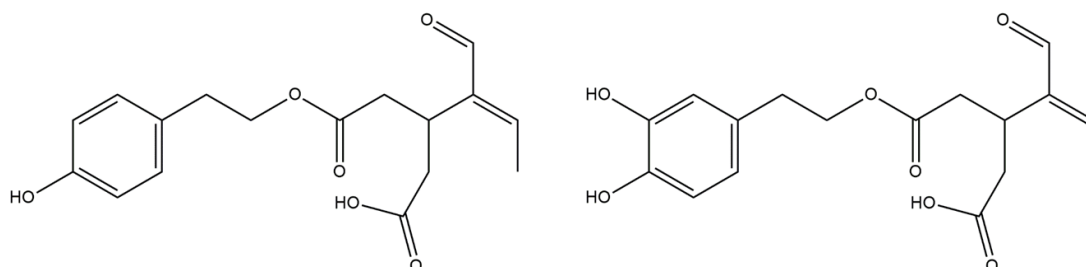
Πίνακας 6 Εδαφικές Απαιτήσεις

1.2.6 Φυτοχημική Σύσταση

Η ελιά χαρακτηρίζεται από την πληθώρα χημικών ουσιών στα επιμέρους τμήματα της. Οι ενώσεις αυτές μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε αυτές που είναι αποτέλεσμα του πρωτογενούς μεταβολισμού του φυτού και σε εκείνες που προέρχονται από τον δευτερογενή μεταβολισμό και τα πολύπλοκα βιοσυνθετικά μονοπάτια που λαμβάνουν χώρα. [24] [25]

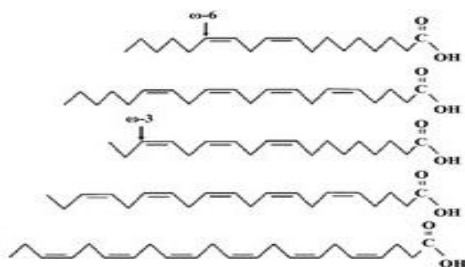
Η περιεκτικότητα του ελαιολάδου ή των άλλων προϊόντων της ελιάς σε συστατικά ποικίλλει και είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την ποικιλία της ελιάς, την χρονική περίοδο συλλογής, αλλά και την επεξεργασία που έχει υποστεί το κάθε δείγμα. Είναι χαρακτηριστικό πως ακόμα και δείγματα από την ίδια καλλιέργεια μπορούν να παρουσιάζουν διαφοροποιήσεις ανάλογα με την θέση τους στην έκταση της καλλιέργειας, αλλά και την χρονιά που έχουν αυτά συλλεχθεί.

Άξιο αναφοράς αποτελεί το γεγονός πως αν και έχει πραγματοποιηθεί ενδελεχής χημική μελέτη και υπάρχει πληθώρα βιογραφικών αναφορών σχετικά με την χημική σύσταση της ελιάς και των προϊόντων της, ακόμα και σήμερα είναι δυνατή η απομόνωση και η ταυτοποίηση δευτερογενών μεταβολιτών, που δεν έχουν εντοπιστεί ξανά. Αυτό οφείλεται σε πολλούς παράγοντες, όπως η εξέλιξη της τεχνολογίας γύρω από τον συγκεκριμένο κλάδο έρευνας, η ορθότερη επεξεργασία των αποτελεσμάτων καθώς και η πιο ολοκληρωμένη κατανόηση των βιοσυνθετικών μονοπατιών και των χημικών συνθήκων που επικρατούν κατά την συγκεκριμένη διαδικασία. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το γεγονός της απομόνωσης δύο νέων σεκοϊριδοειδών παραγώγων, τα όποια είναι προϊόντα οξειδωσης της ολεοκανθαλής και της ολεασεινής, το ολεοκανθαλικό και ολεασεινικό οξύ. (Εικόνα 43)



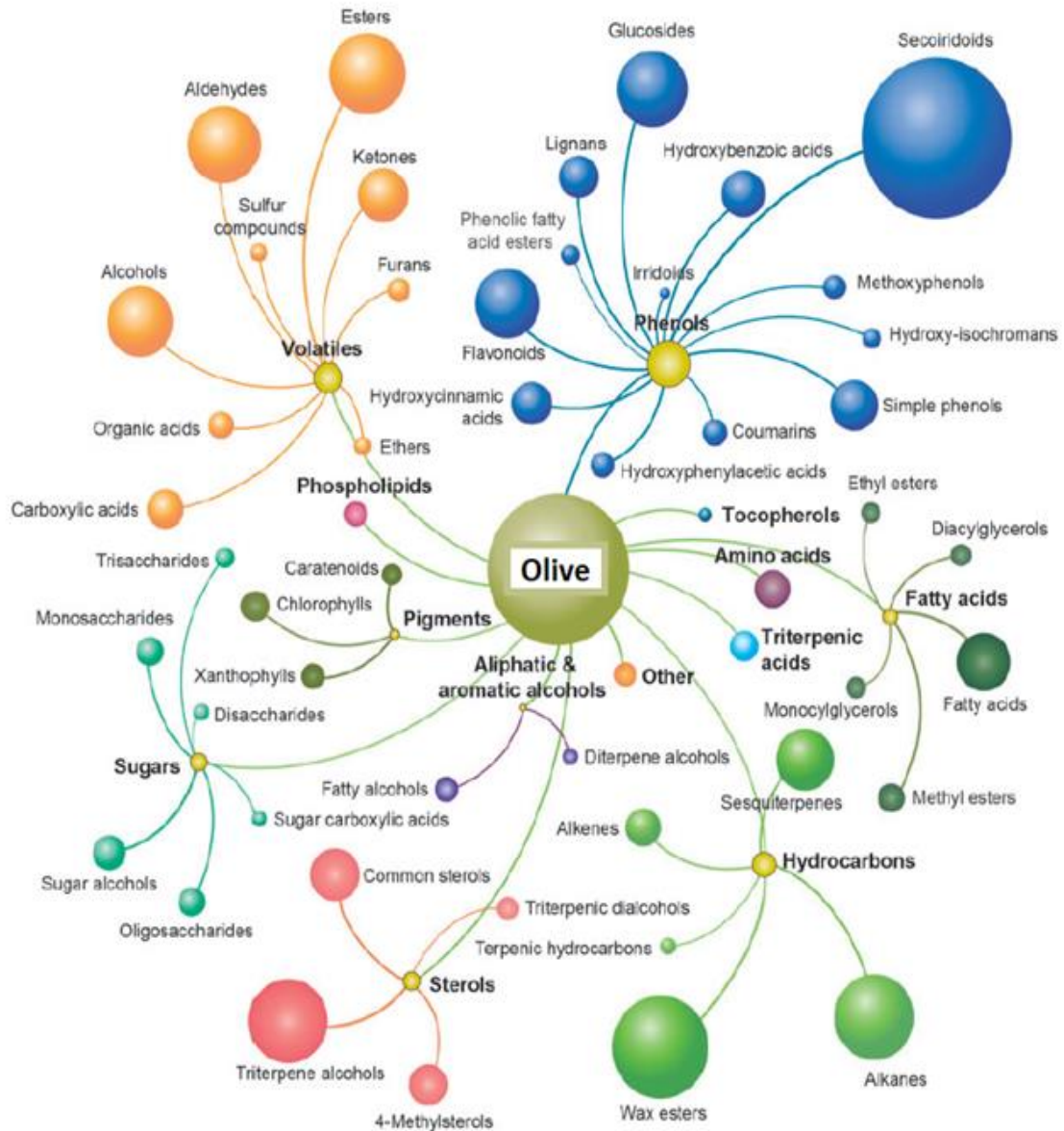
Εικόνα 43 Δομή Ολεοκανθαλικού Οξέος και Ολεασεινικού Οξέος.

Τα κύρια συστατικά του καρπού της ελιάς είναι τα λιπαρά, κυρίως πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) (Εικόνα 44), τα οποία αποτελούν το σαπωνοποιήσιμο κλάσμα (99%). Οι ελιές είναι επίσης πλούσιες σε υδατάνθρακες αλλά φτωχότερες σε πρωτεΐνες. Τα συστατικά που προέρχονται από τον δευτερογενή μεταβολισμό ανήκουν στο ασαπωνοποιήτο κλάσμα (1%).



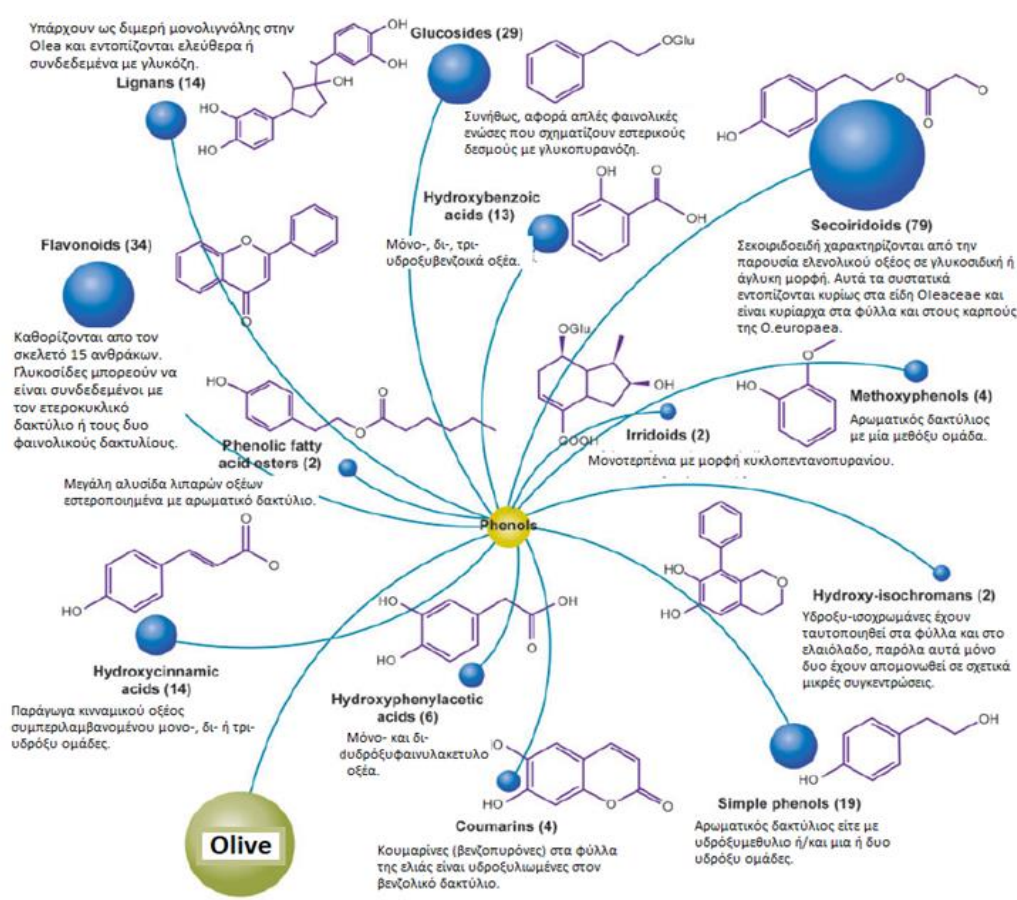
Εικόνα 44 Δομές Πολυακόρεστων Λιπαρών Οξέων.

Συνολικά, μέχρι σήμερα έχουν απομονωθεί περίπου 676 συστατικά διαφόρων κατηγοριών (Εικόνα 45), συμπεριλαμβανομένων 222 φαινολικών συστατικών. Τα συστατικά αυτά ανήκουν σε 13 κύριες κατηγορίες, όπως φαίνονται και στο παρακάτω σχεδιάγραμμα: φαινόλες, λιπαρά οξέα, αλειφατικές και αρωματικές αλκοόλες, στερόλες, φωσφολιπίδια, τριτερπενικά οξέα, πτητικά, υδατάνθρακες, σάκχαρα, χρωστικές ουσίες, τοκοφερόλες, αμινοξέα, βιταμίνες, μέταλλα και ένα μικρό ποσοστό ακατηγοριοποίητων ενώσεων και άλλες 47 υποκατηγορίες. [26]



Εικόνα 45 Χημικές Κατηγορίες Μεταβολιτών.

Μια από τις πιο σημαντικές χημικές κατηγορίες που εντοπίζεται στην ελιά είναι οι φαινολικές ενώσεις, (Εικόνα 46) οι οποίες ευθύνονται και για το μεγαλύτερο ποσοστό της αξιοσημείωτης βιολογικής δράσης, που παρουσιάζει το φυτό. Οι φαινολικές ενώσεις περιλαμβάνουν ένα ποικίλο υποσύνολο χημικών δομών που εντοπίζονται στα φύλλα, στους καρπούς, στο λάδι, στον ελαιοπυρήνα και τα απόβλητα μετά τη παραγωγή του ελαιολάδου. Δομικά, χαρακτηρίζονται από έναν αρωματικό δακτύλιο με μια ή περισσότερες υδροξυλομάδες. Διαιρούνται περαιτέρω σε 13 υποκατηγορίες: απλές φαινόλες, μεθοξυφαινόλες, υδροξυβενζοϊκά οξέα, υδροξυφαινυλοξικά οξέα, υδροξυκιναμωμικά οξέα, ιριδοειδή, σεκοϊριδοειδή, γλυκοσίδες σεκοϊριδοειδών, , φλαβονοειδή, υδροξυϊσοχρωμάνες, κουμαρίνες, ιριδοειδή, Λιγνάνια και φαινολικούς εστέρες λιπαρών οξέων. [26]

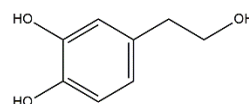


Εικόνα 46 Υποκατηγορίες Φαινολικών Ενώσεων.

Οι κύριες υποκατηγορίες ενώσεων είναι τα φαινολικά οξέα, οι φαινολαλκοόλες, τα φλαβονοειδή και τα ιριδοειδή (Taamalli et al., 2013).

Φαινολαλκοόλες

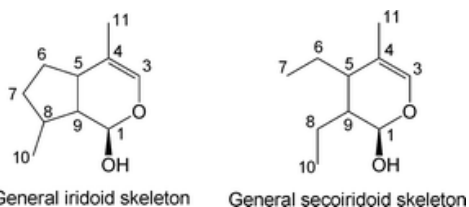
Κύριος εκπρόσωπος αυτής της κατηγορίας είναι η υδροξυτυροσόλη, (Εικόνα 47) η οποία αποτελεί και προϊόν διάσπασης της ολευρωπεΐνης και σχετίζεται άμεσα με την ισχυρή οξειδωτική δράση των προϊόντων της ελιάς εξαιτίας της παρουσίας των φαινολικών υδροξυλίων.



Εικόνα 47 Δομή Υδροξυτυροσόλης.

Ιριδοειδή

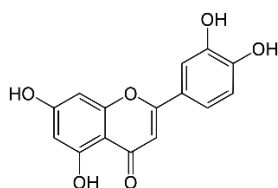
Πρόκειται συνήθως για γλυκοσυλιωμένα παράγωγα ή τα άγλυκά τους και ακολουθούν το βιοχημικό μονοπάτι των τερπενίων. (Εικόνα 48) Η σύνθεση τους ξεκινά από ένα μονοτερπένιο το οποίο καταλήγει στο κυκλοπεντανικό δακτύλιο συνδεδεμένο με ένα ετερογενή εξαμελή δακτύλιο (ιριδοειδές) και στην συνέχεια ο πενταμελής διασπάται για να δώσει το ανοιχτό παράγωγο. (Obied et al., 2008). Εντοπίζονται κυρίως στα φύλλα και στους καρπούς της ελιάς. Η ολευρωπεΐνη είναι ο πλέον ευρέως διαδεδομένος γλυκοσίδης σεκοριδοειδούς στους καρπούς. Η ολεοκανθάλη και η ολεασείνη είναι δυο σεκοΐριδοειδή μη γλυκοζυλιωμένα παράγωγα με μεγάλο βιολογικό ενδιαφέρον.



Εικόνα 48 Δομές ανοιχτών και κλειστών ιριδοειδών.

Φλαβονοειδή

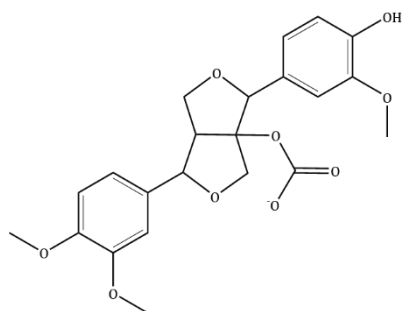
Αποτελούν παράγωγα βενζο-γ-πυρόνης και ανάλογα τις υποκαταστάσεις ανήκουν σε διαφορετική κατηγορία φλαβονοειδών. Βιοσυνθετικά προέρχονται από το σικιμικό μονοπάτι και σε πολλές περιπτώσεις μπορούν να είναι συνδεδεμένα με σάκχαρα. Ένας αριθμός φλαβονοειδών όπως η κερκετίνη (59) [80], η λουτεολίνη, (Εικόνα 49) ο 7-O-ρουτινοσίδης της λουτεολίνης- (61) [56, 80] 62) [80, 81] και η ρουτίνη (63) [57, 80, 81] που έχει αναφερθεί στους καρπούς και τον πολτό τους.



Εικόνα 49 Δομή Λουτεολίνης.

Λιγνάνια

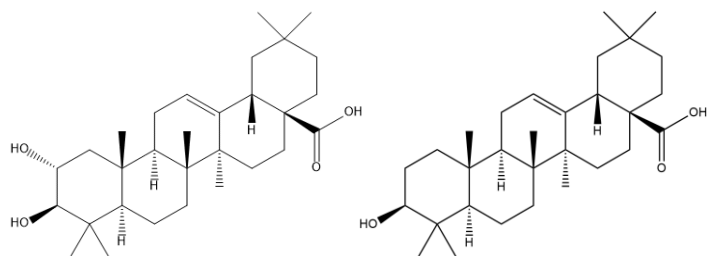
Αποτελούν διμερή φαινυλοπροπανίου που συζευγνούνται με έναν κεντρικό άνθρακα της πλευρικής αλυσού, π.χ. πινορεσινόλη. Βιοσυνθετικά ανήκουν στην κατηγορία C-6 και C-3, ακολουθώντας πολλά βήματα μέχρι την σύνθεσή τους. Εξαιτίας του ενεργειακού κόστους παραγωγής τους, εντοπίζονται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις, [15]κυρίως σε αιθερικό εκχύλισμα φλοιού, όπως (+) - 1-ακετοξυπινορεζινόλη (Εικόνα 50)(45).



Εικόνα 50 Δομή Ακετοξυπινορεζινόλης.

Τριτερπενικά Οξέα

Μεγάλο βιοχημικό και φαρμακολογικό ενδιαφέρον παρουσιάζουν και οι ενώσεις της κατηγορίας των τριτερπενοειδών. Κύριοι εκπρόσωποι είναι το μασλινικό οξύ, που εντοπίζεται στο ελαιόλαδο και το ολεανολικό οξύ, στα φύλλα της ελιάς. Βιοσυνθετικά προέρχονται από το σκουαλένιο και μέσα από μία σειρά αντιδράσεων οδηγείται η σύνθεσή τους. (Εικόνα 51)

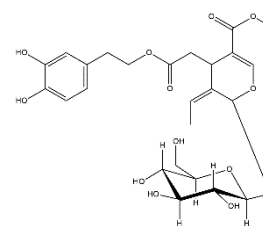


Εικόνα 51 Δομή Μασλινικού και Ολεανολικού Οξέος.

1.2.7 Φαρμακολογικές Ιδιότητες [25]

1.2.7.1 Αντιδιαβητικές Ιδιότητες

Η χρήση της *Olea europaea* στη θεραπεία του διαβήτη έχει επικυρωθεί σε αρκετές πειραματικές μελέτες. Έχει προταθεί η χρήση της ελιάς ως ισχυρό αντιοξειδωτικό, καθώς το οξειδωτικό στρες συνδέεται ευρέως με τις παθολογικές επιπλοκές του διαβήτη και η ανακούφιση από αυτό μειώνει τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα. Έτσι, μετά την διεξαγωγή έρευνας, τα αποτελέσματα παρουσίασαν την ολευρωπεΐνη, (Εικόνα 53) που απαντάται άφθονα στα φύλλα της ελιάς και τους καρπούς ως ισχυρό αντιοξειδωτικό και αντιπεργλυκαιμικό παράγοντα. [143]. Παράλληλα, μελετήθηκαν εκχυλίσματα πλούσια σε ολευρωπεΐνη και υδροξυτυροσόλη και αποδείχθηκε η αντιδιαβητική τους επίδραση που είναι συνυφασμένη με την αντιοξειδωτική τους δράση.



Εικόνα 53 Δομή Ολευρωπεΐνης.

Αν και αρχικά επικρατούσε η αντίληψη πως μόνο η ολευρωπεΐνη είναι αυτή που παρουσιάζει αυτή την δράση, αργότερα, η απομόνωση του ολεανολικού οξέος οδήγησε σε περαιτέρω μελέτες που έδειξαν πως είναι αγωνιστής του υποδοχέα TGR5 (ο πρώτος υποδοχέας κυτταρικής επιφάνειας που ενεργοποιείται από χολικά οξέα), τμήμα του συζευγμένου με πρωτεΐνη G υποδοχέα, μειώνοντας σημαντικά τα επίπεδα γλυκόζης και ινσουλίνης στον ορό ποντικών που έλαβαν τροφή υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά και αυξημένη ανοχή στη γλυκόζη. (1) (105) [144]. Μία νέα ένωση, που απομονώθηκε από το στέλεχος του *Olea europaea*, η οποία είναι ένα ισομερές του ολεανολικού οξέος (105), γνωστή ως διμεθυλολεανολικό οξύ εμφάνισε εξαιρετικές ανασταλτικές δραστηριότητες in vitro έναντι ενζύμων α-αμυλάσης και λιπάσης [117].

1.2.7.2 Ανασταλτική Δράση σε Καρκινικά Κύτταρα

Γενικά, πολλοί από τους δευτερογενείς μεταβολίτες που εντοπίζονται στην *Olea europaea* έχουν παρουσιάσει ενδείξεις δραστηριότητας έναντι διάφορων ειδών καρκίνου. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 7 Ανασταλτικές Ιδιότητες έναντι καρκινικών κυττάρων *Olea europaea*), συνοψίζονται τα κυρία είδη εκχυλισμάτων και δευτερογενών μεταβολιτών και η δράση που εμφανίζουν.

ΕΙΔΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ/ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ	ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ	ΔΡΑΣΗ	ΜΟΡΙΟ ΑΝΑΦΟΡΑΣ
Μασλινικό Οξύ	HT-29: Καρκινικά κύτταρα προερχόμενα από το κόλον	Δοσοεξαρτώμενη	Υδροξυτυροσόλη
Υδροξυτυροσόλη και Λαουρική Υδροξυτυροσόλη	Ανθρώπινη μονοκυτταρική σειρά/Αλλαγές στο DNA και στα αμινοξέα	Ισχυρή	H ₂ O ₂

Ολεανολικό Οξύ	HerG2: Καρκινικά κύτταρα ήπατος Coni et al., 2000	Μέτρια	-
Μεθανολικό Εκχύλισμα Φύλλων	Ανθρώπινα λευχαιμικά κύτταρα	Υψηλή	5-βρωμοδεοξυ ουριδίνη
Ερυθροδιόλη, Ουβαόλη, Ολεανολικό και Μασλιτικό Οξύ	MCF-7: Ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα μαστού	Υψηλή	Trolox
Υδατικό και Μεθανολικό Εκχύλισμα Φύλλων	MCF-7, καρκίνωμα ουροδόχου κύστης (T-24) και ενδοθηλιακό τριχοειδές (BBCE)	Μέτρια	FGF-2
Υδατικό Εκχύλισμα Φύλλων	MKN45: καρκίνος στομάχου, MFC-7, NCI-H460: καρκίνος πνεύμονα, HCT116: καρκίνος κόλον	Μέτρια	MTT
Ερυθροδιόλη	HT-29	Δοσοεξαρτώμενη	Caspase-3
Εκχύλισμα Ελαιόλαδου	HT-115: Ανθρώπινα κύτταρα κόλον	Δοσοεξαρτώμενη	-
Ολευρωπεΐνη	HeLa: καρκίνος τραχήλου	Μέτρια	-
Παράγωγα Λιγνανίου	P-53: καρκίνος παχέος εντέρου	Μέτρια	
Πινορεσινόλη	καρκινικά κύτταρα ανθρώπινου μαστού (López-biedma et al. 2016)	Μέτρια	

Πίνακας 7 Ανασταλτικές Ιδιότητες έναντι καρκινικών κυττάρων *Olea europaea*.

1.2.7.3 Αντιμικροβιακές Ιδιότητες

Η *Olea europaea* έχει χρησιμοποιηθεί ως λαϊκό φάρμακο για τη θεραπεία πολλών μολυσματικών διαταραχών βακτηριακής, μυκητιακής και ιικής προέλευσης.

Μελέτες σε επιτραπέζιες ελιές έδειξαν πως εκτός από το καλό αντιοξειδωτικό του δυναμικό, οι περιεχόμενες φαινόλες έχουν και καλή αντιμικροβιακή δράση υποδηλώνοντας ότι αυτές μπορεί να είναι καλοί υποψήφιοι έναντι βακτηρίων υπεύθυνων για λοιμώξεις του γαστρεντερικού και του αναπνευστικού συστήματος [Pereira et 2002]. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 8 Αντιμικροβιακές Ιδιότητες *Olea europaea*.) συνοψίζονται τα διαφορετικά είδη εκχυλισμάτων και δευτερογενών μεταβολιτών και η αποτελεσματικότητα που παρουσιάζουν έναντι διαφορετικών ελέγχων.

ΕΙΔΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ/ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ	ΜΕΛΕΤΗ	ΔΡΑΣΗ	ΜΕΘΟΔΟΣ
--	---------------	--------------	----------------

Υδατικό Εκχύλισμα Φύλλων	Αντιμικροβιακή	Αξιοσημείωτη	Μέθοδος διάχυσης/ Ερυθρομυκίνη και Στρεπτομυκίνη
Υδατικό Εκχύλισμα Φύλλων	Αντιμυκητιστακή	Αξιοσημείωτη	Ολευρωπεΐνη
Ακετονικό Εκχύλισμα Φύλλων	Αντιβακτηριακή	Καλή	Μέθοδος διάχυσης/ Ολευρωπεΐνη
Alpejujo (Απόβλητο Επεξεργασίας Ελιάς)	Αντιμικροβιακή	Καλή	Συριγγικό Οξύ
Πτητικοί Μεταβολίτες των Καρπών	Αντιβακτηριακή και Αντιμυκητιστακή	Μέτρια	Αμφοτερικίνη, Λεβοφλοξασίνη
Υδατικό Εκχύλισμα Επιτραπέζιων Ελιών	Αντιβακτηριακή και Αντιμυκητιστακή	Καλή	Στρεπτομυκίνη, Οξυτετρακυκλίνη
Μασλιτικό Οξύ	Αντιπαρασιτικό	Εξαρτώμενη από την Δόση	Φαινυλομεθανοσουλφον υλοφθορίδιο
Ακετονικό Εκχύλισμα Φύλλων Εμπλουτισμένο με Ολευρωπεΐνη	Αντιβακτηριακή	Πολύ Καλή	Ολευρωπεΐνη
Αλειφατικές Αλδεΐδες από Καρπό	Αντιμυκητιστακή	Ενεργή εκτός της <i>Candida</i> spp.	Μυκοναζόλη
Μακριάς Αλυσίδας α, β, Ακόρεστες Αλδεΐδες	Αντιμικροβιακή	Δράση σε μεγάλο μικροβιακό εύρος	-
Υδροξυτυροσόλη	Αντιμικροβιακή	Αναστολή πολλών βακτηρίων ¹	
Φλαβονοειδή	Αντιμυκητιστακή	Συνεργιστική δράση σε παθογόνους μύκητες ²	
Φλαβονοειδή	Αντική	Παρεμπόδιση της ενεργοποίησης του HIV-1	Cushnie and Lamb 2005

Πίνακας 8 Αντιμικροβιακές Ιδιότητες *Olea europaea*.

¹ *Helicobacter pylori*, *Listeria monocytogenes* και *Salmonella enteritidis* in vitro υπεύθυνων για μολύνσεις του αναπνευστικού και γαστρεντερικού συστήματος (Ganan et al., 2009)

² *Aspergillus tamarii*, *A. flavus*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Penicillium digitatum* και *Penicillium italicum* (Cushnie et al. 2005)

1.2.7.4 Αντιοξειδωτικές Ιδιότητες

Οι ενεργές ρίζες οξυγόνου και αζώτου είναι απαραίτητες για την παροχή ενέργειας, τη χημική σηματοδότηση, την αποτοξίνωση και την ανοσολογική λειτουργία και παράγονται συνεχώς στο ανθρώπινο σώμα και η ποσότητα τους ελέγχεται προσεκτικά υπό τη δράση των ενδογενών ενζύμων όπως η υπεροξειδική δισμουτάση, η υπεροξειδάση γλουταθειόνης και η καταλάση. Η υπερπαραγωγή αυτών των ριζών, η έκθεση σε εξωτερικές οξειδωτικές ουσίες, η αποτυχία στους αμυντικούς μηχανισμούς, ή βλάβη σε πολύτιμα βιομόρια (DNA, λιπίδια, πρωτεΐνες) είναι δυνατόν να συμβούν. [26]. Αυτές οι βλάβες έχουν συνδεθεί με αυξημένο κίνδυνο καρδιαγγειακών παθήσεων, καρκίνου και άλλων χρόνιων ασθενειών. Ως εκ τούτου, τα αντιοξειδωτικά απαιτούνται για την πρόληψη της οξειδωτικής βλάβης και των χρόνιων ασθενειών [184]. Οι αντιοξειδωτικές δραστηριότητες του *O. europaea* συνοψίζονται στον Πίνακα 9.

ΕΙΔΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ/ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ	ΔΡΑΣΗ	ΜΕΘΟΔΟΣ
Εκχύλισμα Φύλλων	Υψηλή /Καλή	Οξείδωση σόγιας σε μικροκύματα /DPPH
Εκχύλισμα Φύλλων	Εξαρτώμενη από την δόση	Ασκορβικό οξύ
Εκχύλισμα Φύλλων	Μέτρια αναστολή σε οξειδωτικό στρες	MTT/ Ολευρωπεΐνη
Υδατικό Εκχύλισμα Φύλλων	Καλή	Trolox
Αιθανολικό Εκχύλισμα Φύλλων	Εξαιρετική	DPPH
Υδροαλκολικό Εκχύλισμα Φύλλων	Καλή	α-Τοκοφερόλη και Γαλλικό Οξύ
Πολτός Ελιάς Καρπός	Εξαιρετική Καλή	Βιταμίνη C DPPH
Ξηρό Εκχύλισμα Επιτραπέζιων Ελιών	Πολύ Καλή	Trolox
Υδροξυτυροσόλη, Ολευρωπεΐνη και Τυροσόλη	Υψηλή	Βιταμίνη E, BHT
Υδατικά Απόβλητα Ελαιόλαδου	Καλή	2,3,-τεрт-βουτυλ-1,4,υδροξυανισόλη, L-ασκορβικό οξύ
Μασλινικό Οξύ	Καλή	Σιλυμαρίνη
Ελαιόλαδο	Καλή	Λινελαϊκός μεθυλεστέρας
Φαινολικές Ουσίες	Καλή	Ασκορβικό Οξύ
φλαβονοειδή	Καλή	Αναστολή την οξείδωση της LDL μέσω της αναστολής της 15-λιποξυγενάσης (Cushnie and Lamb 2005).

Πίνακας 9 Αντιοξειδωτικές Ιδιότητες *Olea europaea*.

1.2.7.5 Αναστολή Ενζύμων

Στη μεσογειακή λαϊκή ιατρική, η παρασκευή φύλλων ελιάς χρησιμοποιήθηκε ως κοινό τονωτικό για την ουρική αρθρίτιδα [134]. Εξαιτίας αυτής της χρήσης, πραγματοποιήθηκαν πολλές μελέτες ώστε να συνδεθεί αυτή η χρήση με ιατρικά ευρήματα, που θα οδηγήσουν στην ανάπτυξη σκευασμάτων. (Πίνακας 10)

ΕΙΔΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ/ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ	ΣΤΟΧΟΣ	ΔΡΑΣΗ	ΜΕΘΟΔΟΣ/ ΜΟΡΙΟ ΑΝΑΦΟΡΑΣ
Αιθανολικό Εκχύλισμα Φύλλων		Καλή	
Απιγενίνη		Ισχυρότατη	Αλλοπουρίνη
Ολευρωπεΐνη, Καφεϊκό Οξύ, Λουτεολίνη, Γλυκοσίδης 7-O-B-D-Λουτεολίνης	Ανασταλτική δράση κατά της Οξειδάσης της ξανθίνης	Καλή	
Υδατικό Εκχύλισμα Νέων Κλαδιών	Αναστολή ενζύμων πεπτιδάσης και γλυκοσιδάσης των περιοδοντικών βακτηρίων <i>Porphyrromonas gingivalis</i> , <i>Bacteroides intermedius</i> και <i>Treponema denticola</i>	Καλή	
Υδατικό Εκχύλισμα Φύλλων	Αναστολή του ενζύμου μετατροπής αγγειοτενσίνης (ACE)	Σημαντική	in vitro
Ολεασεΐνη		Σημαντική	
α, β-Ακόρεστες Αλδεΐδες	Αναστολή του ενζύμου τυροσινάση που καταλύει την οξείδωση της L-DOPA	Μη Ανταγωνιστικοί Αναστολείς Τυροσινάσης	

Πίνακας 10 Αναστολή Ενζύμων από την *Olea europaea*.

1.2.7.6 Αντιυπερτασικές και Καρδιοπροστατευτικές Ιδιότητες

Η υπέρταση είναι η κύρια αιτία των καρδιακών παθήσεων και οφείλεται για το εγκεφαλικό επεισόδιο των αρτηριών, παθήσεων των περιφερικών αρτηριακών και των χρόνιων νεφρικών νόσων εάν δεν αντιμετωπιστεί. Πολλά φυσικά προϊόντα έχουν βρεθεί αποτελεσματικά κατά της υπέρτασης και μετά από χρόνιες μελέτες, το ελαιόλαδο προτάθηκε ως φυσική και φθηνή πηγή ελέγχου της υπέρτασης [219].

Διαπιστώθηκε ότι το ελαιόλαδο μπορεί να μειώσει σημαντικά τον κίνδυνο εγκεφαλικού επεισοδίου, καρδιακών προσβολών και άλλων καρδιακών παθήσεων [11]. Οι αντιυπερτασικές δραστηριότητες της *O. europaea* συνοψίζονται επίσης στον Πίνακα 11.

ΕΙΔΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ/ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ	ΜΕΛΕΤΗ/ΣΤΟΧΟΣ	ΔΡΑΣΗ
Ουβαόλη, Ουρσολικό και Ολεανολικό Οξύ	Καρδιοτονωτικό	Καλή
Εκχύλισμα Φύλλων	Αντιυπερτασικό	Πολύ καλή
	In vitro μελέτες	Εξαρτώμενη από την δόση
	In vivo μελέτες	Ενεργή σε παρατεταμένη χρήση
Ολεανολικό και Ουρσολικό Οξύ	Μελέτες in vivo σε αρουραίους ανθεκτικούς στην ινσουλίνη	Ενεργή στην δόση 60mg/kg
Εκχύλισμα Φύλλων		Ενεργή στην δόση 100mg/kg
Εκχύλισμα Φύλλων		Ανταγωνιστής ιόντων Ca ²⁺
Υδροξυτυροσόλη	Πρόληψη οξείδωσης της LDL	Έναντι της υπεροξειδωσης των λιπιδίων στις φωσφολιπιδιακές διπλοστιβάδες των κυττάρων (Grignaffini et al., 1994; Visioli et al., 1995)
	Αντιθρομβωτική	Αναστολέας της κυκλοξυγενάσης (Petroni et al., 1995)
	Καρδιοπροστατευτική	Μείωση κατά 42%-50% της ολικής γοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων και Αύξηση 2-3 φορές της HDL χοληστερόλης

Πίνακας 11 Αντιυπερτασικές και Καρδιοπροστατευτικές Ιδιότητες *Olea europaea*

1.2.7.7 Αντιφλεγμονώδεις και Αναλγητικές Ιδιότητες

Το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο εμφανίζει αξιοσημείωτη αντιφλεγμονώδη δράση λόγω κυρίως της ολεοκανθάλης (140), ενός σεκοϊριδοειδούς που παρουσιάζει ανάλογη δράση με το μη στεροειδές αντιφλεγμονώδες με την ιβουπροφαίνη, [229]. Παρόλα αυτά, μελέτες για τον προσδιορισμό της δόσης είτε εκχυλισμάτων είτε της δραστικής έχουν γίνει και συνοψίζονται στον παρακάτω Πίνακα 12:

ΕΙΔΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ /ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗ	ΜΕΛΕΤΗ	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ	ΧΟΡΗΓΟΥΜΕΝ Η ΔΟΣΗ	ΜΟΡΙΟ ΑΝΑΦΟΡΑΣ
Ολεανολικό Οξύ	Αναλγητική	Θηλυκά ποντίκια CD-1	-	Ιβουπροφαίνη, Πρεγκαμπαλίνη, Μπακλοφαίνη
Ελαιόλαδο	Αναλγητική και Αντιφλεγμονώδ ης	Αρσενικά ποντίκια Balb/C	10mg/kg	Δεξαμεθαζόνη
		Αρσενικά Ποντίκια Wistar	100-300mg/kg	Ακετυλοσαλικυλικ ό άλας λυσίνης
Εκχύλισμα Καρπών ν- Εξανίου	Αναλγητική και Αντιφλεγμονώδ ης	Αρσενικά αλπίνο ποντίκια	400mg/kg	Ινδομεθακίνη, Ακετυλοσαλικυλικ ό Οξύ
Αιθανολικό Εκχύλισμα Φύλλων	Αναλγητική	Αρσενικά Ποντίκια Wistar	200mg/kg	Μορφίνη
Ελαιόλαδο	Μελέτη για τον Μηχανισμό δράσης	<i>In vitro</i>	-	Ιβουπροφαίνη
Ολεοκανθάλη				

Πίνακας 12 Αντιφλεγμονώδεις και Αναλγητικές Ιδιότητες Olea europaea.

1.2.7.8 Γαστροπροστατευτικές Ιδιότητες

Παράλληλα, διεξάγονται μελέτες για να ελεγχθεί η επίδραση του ελαιολάδου και των προϊόντων της ελιάς στις διάφορες γαστρικές παθήσεις, καθώς και εδώ σχετίζεται το ισχυρό αντιοξειδωτικό προφίλ της. (Πίνακας 13)

ΕΙΔΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ /ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗ	ΜΕΛΕΤΗ	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙ ΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ	ΔΡΑΣΗ	ΜΟΡΙΟ ΑΝΑΦΟΡΑΣ
Εκχύλισμα Φύλλων	Γαστρικές Αλλοιώσεις	Ποντίκια	Σημαντική/ ταυτόσημη με το θετικό μάρτυρα	Ρανιτιδίνη
Ελαιόλαδο	Γαστρικές αλλοιώσεις βλεννογόνου	Ποντίκια	Καλή/ κοντά στον θετικό μάρτυρα	Κερκετίνη
Υδατικό Εκχύλισμα Φύλλων	Κατά του έλκους /ενδογαστρική χορήγηση	Ποντίκια	Αποτελεσματική στην μείωση του γαστρικού οξέος	-

Πολτός Καρπών	Ηπατοπροστατευτική	Ποντίκια που έχουν υποστεί ηπατική βλάβη	Πολύ Καλή	-
----------------------	--------------------	--	-----------	---

Πίνακας 13 Γαστροπροστατευτικές Ιδιότητες *Olea europaea*

1.2.7.9 Νευροπροστατευτικές Ιδιότητες

Έχει αναφερθεί ότι η μεσογειακή διατροφή έχει υγιείς επιπτώσεις στους ανθρώπους που την εφαρμόζουν και ότι έχουν μειωμένο κίνδυνο νευροεκφυλιστικών παθήσεων [239].

Η νόσος Πάρκινσον είναι η πιο κοινή νευροεκφυλιστική ασθένεια με αποτέλεσμα τον αργό θάνατο των ντοπαμινεργικών νευρώνων του εγκεφάλου. Μία μελέτη (Pasban-Aliabadi et al) σχεδιασμένη για την παρακολούθηση των επιπτώσεων του εκχυλίσματος των φύλλων ελιάς και του κύριου συστατικού ολεωρωπεΐνη στην επαγόμενη από 6-υδροξυδωπαμίνη- (6-OHDA) τοξικότητα σε κύτταρα επινεφριδιακού φαινοχρωμοκυτώματος (PC12), έδειξε την μείωση της βλάβης των κυττάρων και μείωσε τους βιοχημικούς δείκτες του κυτταρικού θανάτου τόσο για το εκχύλισμα όσο και τον καθαρό μεταβολίτη. Ταυτόχρονα όσο αφορά την νόσο Alzheimer, το άγλυκο ολεωρωπεΐνης εμπόδισε τον σχηματισμό τοξικών αμυλοειδών συσσωματωμάτων στον εγκέφαλο, ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα της νόσου. Επίσης, εμφάνισε προστατευτική δράση στη μαρμαρυγή. (Πίνακας 14)

ΕΙΔΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ/ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗ	ΜΕΛΕΤΗ	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ	ΔΡΑΣΗ
Μασλιτικό Οξύ	Νευροπροστασία	Ποντίκια που έχουν υποστεί νευρωνικό θάνατο	Σημαντική/ Δοσοεξαρτώμενη
	Νευρώνες του εγκεφαλικού φλοιού	Νευρώνες που έχουν υποστεί τοξικότητα από γλουταμινικό οξύ	Δοσοεξαρτώμενη
	Βλάβη νευρώνων	Τεχνητή έλλειψη οξυγόνου και γλυκόζης και επανοξυγόνωση	Δοσοεξαρτώμενη
Υδροξυτυροσόλη	Νευροπροστασία	Εγκεφαλικά Κύτταρα με τεχνητά ισχαιμικά επεισόδια	Δοσοεξαρτώμενη
Εκχύλισμα Φύλλων	Διαβητικό νευροπαθή πόνο	In vivo	Καλή

Πίνακας 14 Νευροπροστατευτικές Ιδιότητες *Olea europaea*.

1.2.7.10 Άλλες Φαρμακολογικές Ιδιότητες

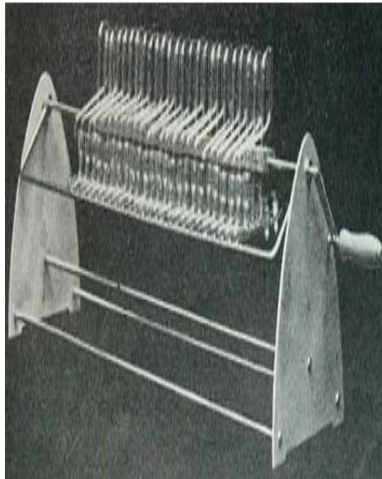
Παρόλα τα θετικά φαρμακολογικά ευρήματα που έχουν ήδη βρεθεί, η έρευνα για την ανακάλυψη νέων δράσεων δεν σταματά. Κάποιες από αυτές τις ενδιαφέρουσες μελέτες παρουσιάζονται στον παρακάτω Πίνακας 15:

ΕΙΔΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ /ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗ	ΜΕΛΕΤΗ	ΣΤΟΧΟΣ	ΔΡΑΣΗ
Υδατικό Εκχύλισμα Μεθανολικό Εκχύλισμα Πετρελαϊκό Εκχύλισμα	Διουρητική	Αναστολή της νατριουρητικής, υαλουρητικής και ανθρακικής ανυδράσης σε πειράματα κάθαρσης λιθίου	Σημαντική
Εκχύλισμα ν-Εξανίου Φύλλων	Επούλωση πληγών	In vivo	Καλή
Υδατικό Εκχύλισμα			Εξαιρετική
Ελαιόλαδο	Υποξία- Επαναοξυγονωτική Βλάβη	Επίδραση κατά την διάρκεια εγκεφαλικού επεισοδίου	Καλή
Υδροξυτυροσόλη Ελενολικο Οξύ	Αντιαλλεργική		Καλή

Πίνακας 15 Άλλες Ιδιότητες Olea europaea.

1.3 Χρωματογραφία Κατ' Αντιρροή

(Countercurrent Chromatography CCC)



1.3.1 Ιστορικά Στοιχεία- Εξέλιξη Μεθόδου

Η Χρωματογραφία Κατ' Αντιρροή είναι μία τεχνική, η οποία αρχικά εφαρμόστηκε από τον Ito το 1964. Ο πρώτος στόχος του ήταν να εξελίξει την υγρή-στερεή χρωματογραφία και να απαλλαγεί από την χρήση της στερεής στατικής φάσης, ώστε να μειωθούν οι απώλειες δείγματος και να βελτιωθεί η απόδοση της. Έτσι, η αρχική συσκευή στήριζε την λειτουργία της στην περιστροφική κίνηση γύρω από δυο άξονες. Όμως για αρκετά χρόνια η χρήση της ήταν περιορισμένη λόγω ποικίλων προβλημάτων όπως, η μη ύπαρξη ορθών μηχανικά συσκευών ή η μη πλήρης κατανόηση των συνθηκών λειτουργίας. Έτσι, στην δεκαετία του 90 μια άλλη ερευνητική ομάδα έρχεται να παρουσιάσει ένα εξελιγμένο μοντέλο πάνω στο οποίο στηρίζεται η τεχνική μέχρι και σήμερα, καθώς αποτελούνταν από κελιά διατεταγμένα γύρω από ρότορα ενός μόνο άξονα που περιστρεφόταν με την δύναμη της φυγοκέντρου. Όλοι όμως είχαν σαν κοινό άξονα τον διαχωρισμό μέσω δυο μη αναμειξιμων φάσεων ενός συστήματος διαλυτών. Με την εξέλιξη της τεχνολογίας των μηχανημάτων που συνεπάγεται και βελτίωση της αποτελεσματικότητας, αυτή η τεχνική καθίσταται πια μία από τις κύριες για την απομόνωση ουσιών, τόσο από φυσικές πηγές όσο και από χημικές και βιομηχανικές. [27] [28] [29]

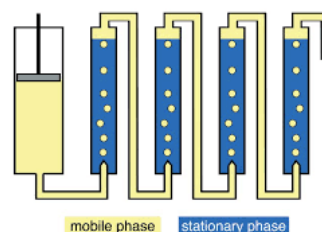
1.3.2 Αρχή Μεθόδου

Η αρχή μεθόδου της τεχνικής βασίζεται στις αρχές της υγρής-υγρής χρωματογραφίας, κατά την οποία δυο μη αναμειξιμες υγρές φάσεις αναμειγνύονται και μετά διαχωρίζονται. Οι αναλυτές απομονώνονται με βάση τους διαφορετικούς συντελεστές κατανομής της κάθε ουσίας στην στατική φάση προς την κινητή φάση και άρα την διαφορετική ταχύτητα με την οποία θα παρασυρθούν από την στατική φάση και θα εξέλθουν από την στήλη. Η συγκεκριμένη χρωματογραφία μπορεί να εφαρμοστεί από άπολους ως πολύ πολικούς αναλυτές, μεταβάλλοντας μόνο την σύσταση του διφασικού συστήματος. [29]

1.3.3 Βασικοί Τύποι Χρωματογραφίας Κατ' Αντιρροή

1.3.3.1 Droplet Counter Current Chromatography (DCCC)

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιεί την βαρύτητα προκειμένου να επέλθει ισορροπία μεταξύ των δύο φάσεων (Υδροστατική ισορροπία). Η κινητή φάση στάγδην εισέρχεται μέσα από την στατική φάση και κατά συνέπεια, είναι μία χρονοβόρος και κοστοβόρος τεχνική για τον διαχωρισμό. Αποτελεί την πρώτη μορφή χρωματογραφίας αντιστρόφου ροής και πια δεν βρίσκει εφαρμογή, παρά μόνο για διδακτική αξιοποίηση. (Εικόνα 54)

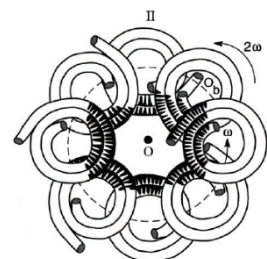


Εικόνα 54 Droplet Counter Current Chromatography

1.3.3.2 High – Speed Counter Current Chromatography

(HSCCC)

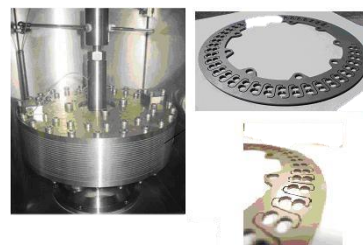
Η τεχνική αυτή χρησιμοποιεί την φυγόκεντρο δύναμη και επιτυγχάνεται γρήγορη ανάμειξη και διαχωρισμός των δυο φάσεων, οδηγώντας έτσι σε καλύτερο και γρηγορότερο διαχωρισμό των ουσιών των δειγμάτων. Η στήλη που χρησιμοποιείται σε αυτή την τεχνική είναι υδροδυναμική μηχανή και αποτελείται από έναν ελικοειδή σωλήνα, ο οποίος περιστρέφεται γύρω από έναν κεντρικό άξονα αλλά και από τον άξονα του (πλανητική κίνηση), σχηματίζοντας πολλαπλές σπειροειδείς στοιβάδες. Η κίνηση αυτή προκαλεί ισχυρή ανάδευση και επιτυγχάνεται διαδοχική ανάμειξη και εξισορρόπηση σε κάθε στοιβάδα. Για το λόγο αυτό η ισορροπία αυτή ονομάζεται υδροδυναμική. (Εικόνα 55)



Εικόνα 55 High-Speed Counter Current Chromatography.

1.3.3.3 Centrifugal Partition Chromatography (CPC)

Και στην περίπτωση αυτή στην στήλη εφαρμόζεται φυγόκεντρος δύναμη, όμως η διαφορά των δύο τεχνικών έγκειται στην διαφορετική μηχανική κατασκευή της στήλης και στις διαφορετικές κινήσεις που συμβαίνουν. Η στήλη αυτή είναι κυλινδρική με κεντρικό άξονα, στον οποίο εφαρμόζεται περιστρεφόμενη κίνηση. Το εσωτερικό της στήλης απαρτίζεται από επιμέρους πλάκες, στις οποίες κυψελίδες οβάλ σχήματος είναι διαδοχικά συνδεδεμένες με σωληνάκια σε διάταξη κεφαλή προς ουρά. Η τεχνική αυτή είναι υδροστατικού τύπου, καθώς η φυγόκεντρος δύναμη εξασφαλίζει την διατήρηση της στατικής φάσης μέσα στην στήλη χωρίς να παρασύρεται από την έκλυση της κινητής φάσης μέσα από την στήλη. (Εικόνα 56)



Εικόνα 56 Centrifugal Partition Chromatography.

1.3.3.3.1 Σύγκριση των δύο τύπων – Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα

Τα γενικά χαρακτηριστικά των δυο τύπων εμφανίζονται στον Πίνακα 16:

	HSCCC	CPC
ΤΥΠΟΣ	Υδροδυναμικός	Υδροστατικός
Εσωτερικό Στήλης	Σπειροειδή Σωληνάκια	Κανάλια από Κελιά
Διατήρηση Στατικής Φάσης	Ποικίλη	Καλή
Αποτελεσματικότητα	Πάνω από 4 πλάκες για κάθε σωληνάκι ή 50 πλάκες ανά mL ή λιγότερο	Πάνω από 1 πλάκα για κάθε κανάλι ή 20 πλάκες ανά mL ή λιγότερο
Μεταβολή Εσωτερικού Όγκου	Αλλαγή πηνίου ή σωληνακίου	Αλλαγή του αριθμού κελιών
Πίεση	Χαμηλή (0.1-10 kg/cm ²)	Μεσαία (2-70 kg/cm ²)
Συντήρηση	Συνδεδετικά σωληνάκια (αλλαγή κάθε 50 ώρες χρήσης)	Rotary seals (συντήρηση κάθε 50 ώρες χρήσης)

Άλλα

Θορυβώδης συναρμολόγηση ,
κανένας έλεγχος της
θερμοκρασίας

Ήσυχη φυγοκέντρηση καλός
έλεγχος της θερμοκρασίας

Πίνακας 16 Γενικά Χαρακτηριστικά των 2 τύπων CCC

Πλεονεκτήματα της CPC έναντι της HSCCC

- Περισσότερος έλεγχος και κατακράτηση της στατικής φάσης.
- Έλεγχος με τις κατάλληλες χρωματογραφικές αναλύσεις όταν χρησιμοποιείται δύσκολο σύστημα διαλυτών και / ή δύσκολο δείγμα.
- Επιτρέπει την χρήση πιο περίπλοκων συστημάτων διαλυτών.
- Επιτρέπει την χρήση πιο περίπλοκων δειγμάτων. Ωστόσο, αν και υπάρχει ο κίνδυνος δημιουργίας γαλακτώματος είναι μικρότερος από ότι στην HSCCC.
- Επιτρέπει τον υπολογισμό του χρόνου κατακράτησης (όγκου κατακράτησης), χρησιμοποιώντας το συντελεστή κατανομής με μεγαλύτερη ακρίβεια λόγω της καλύτερης σταθερότητας της στατικής φάσης.
- Η δυνατότητα μετάβασης από εργαστηριακή κλίμακα σε πιλοτική κλίμακα παρέχει συγκρίσιμες (ή μερικές φορές ακόμη καλύτερες) χρωματογραφικές αναλύσεις στο CPC. Στην HSCCC, υπάρχει απώλεια θεωρητικών πλακών όταν γίνεται αυτή η κλιμάκωση.

Μειονεκτήματα της CPC σε σύγκριση με την HSCCC

- Σήμερα, ίσως μόνο η υψηλότερη τιμή των οργάνων.
- Στα παλαιότερα όργανα, η ποιότητα των rotary seals είναι αμφιλεγόμενη.

1.3.3.4 Centrifugal Partition Extraction (CPE)

Καθώς, η τεχνική CPC αποτελεί ναυαρχίδα στην απομόνωση μεταβολιτών από φυσικά εκχυλίσματα, έγινε μια προσπάθεια εξέλιξης της σε τεχνική εκχύλισης, κυρίως για παρασκευαστική κλίμακα. Έτσι, προέκυψε η μέθοδος CPE, σύμφωνα με την οποία στόχος είναι η εκχύλιση ενός δείγματος και όχι η χρωματογράφιση του. Οι δυο τεχνικές έχουν τον ίδιο μηχανισμό λειτουργίας, δηλαδή η εκχύλιση γίνεται χωρίς την ύπαρξη στερεής στατικής φάσης και βασίζεται στον διαχωρισμό των διαλυμένων ουσιών μεταξύ των δυο μη αναμειξιμων φάσεων. Όπως μια στήλη CPC, και έτσι μια στήλη CPE, αποτελείται από μια σειρά κελιών παράλληλα συνδεδεμένων με σωληνάκια και υποβάλλεται σε φυγόκεντρο δύναμη (Foucault, 1995). Σε μια στήλη CPE, τα κανάλια της είναι μεγαλύτερα αλλά λιγότερα. Οι πρώιμες εφαρμογές της είναι οι διαχωρισμοί με ανταλλαγή ιόντων που χρειάζονται μικρότερο αριθμό θεωρητικών πλακών, αλλά μεγαλύτερη ποσότητα στατικής φάσης που περιέχουν τον συγκρατητή (Hamzaoui et al., 2011). Ένα άλλο πλεονέκτημα των περισσότερων καναλιών είναι η δυνατότητα χρήσης υψηλότερης ροής ενώ διατηρείται σταθερή η κατακράτηση στατικής φάσης. (ungureanu)

1.3.4 Οργανολογία

Τα κύρια και απαραίτητα μέρη ενός συστήματος Χρωματογραφίας Κατ' Αντιρροή είναι τα ακόλουθα: (Εικόνα 57 Οργανολογία C.P.C.)



Εικόνα 57 Οργανολογία C.P.C.

Αντλία

Μέσω της αντλίας καθορίζεται η ροή με την οποία εισάγεται η στατική και η κινητή φάση μέσα στην στήλη. Επίσης, είναι δυνατός ο έλεγχος της πίεσης που αναπτύσσεται μέσα στην στήλη και η διατήρησή της σε σταθερές τιμές, ώστε να εξασφαλίζεται ο ορθός διαχωρισμός του δείγματος.

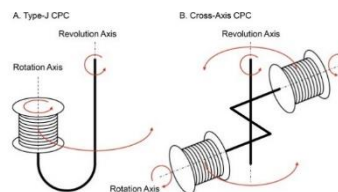
Εισαγωγέας δείγματος

Αποτελεί αναγκαίο εξάρτημα του συνόλου, καθώς μέσα από αυτό γίνεται η έγχυση του δείγματος μέσα στην στήλη. Απαιτείται να είναι πάντα καθαρό και απαλλαγμένο από προηγούμενα δείγματα διότι τυχόν επιμολύνσεις αλλοιώνουν τα αποτελέσματα και την καθαρότητα του διαχωρισμού.

Περιστρεφόμενη στήλη χρωματογραφίας

Ο τύπος της στήλης εξαρτάται από τον τύπο της χρωματογραφίας που θα εφαρμοστεί. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, υπάρχουν υδροστατικές (Εικόνα 58) και υδροδυναμικές στήλες (Εικόνα 59). Και στις δυο περιπτώσεις, το μέγεθος της στήλης καθορίζει και την κλίμακα της ανάλυσης. Υπάρχουν αναλυτικές (χωρητικότητας 10-100mL), ημιπαρασκευαστικές (χωρητικότητας 200-500 mL) και παρασκευαστικές στήλες (χωρητικότητας 1-5 L). Τα τελευταία χρόνια έχουν κυκλοφορήσει υδροστατικές στήλες για βιομηχανική κλίμακα ως και 18 λίτρα, με την όποια μπορούν να επεξεργαστούν κάποια κιλά δείγματος.

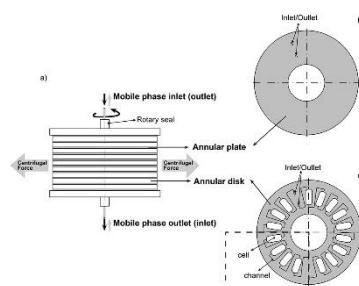
- Η υδροδυναμική στήλη έχει συνήθως ελικοειδή σχήμα και ο σπειροειδής σωλήνας είναι τοποθετημένος γύρω από ένα κεντρικό κύλινδρο, πηνίο. Ανάλογα με τον τρόπο διεύθεσης του πηνίου, διακρίνουμε δυο τύπους στηλών:



Τύπος "J" : Ο άξονας περιστροφής είναι παράλληλα *Εικόνα 58 Τύποι Υδροδυναμικής Στήλης.*
διευθετημένος με τον κεντρικό άξονα περιστροφής.

Τύπος “X” : Ο άξονας περιστροφής αποκλίνει από αυτόν του κεντρικού άξονα περιστροφής.

- Η υδροστατική στήλη αποτελείται από μεταλλικούς δίσκους τοποθετημένους ο ένας πάνω στον άλλο, σχηματίζονται οβάλ κελιά και ενώνονται με σωληνάκια σύνδεσης. Εντοπίζονται διαφορετικοί τύποι στηλών που σχετίζονται κυρίως με την διαφορετική διεύθυνση των κυψελίδων με αποτελέσματα την αύξηση των θεωρητικών πλακών και άρα την βελτίωση της ποιότητας του διαχωρισμού.



Εικόνα 59 Υδροστατική Στήλη.

Ανιχνευτής

Τα εκλούμενα από την στήλη είναι δυνατόν να παρακολουθούνται συνεχώς από ανιχνευτή UV-vis όπως συμβαίνει και στην υγρή χρωματογραφία. Μια σημαντική διαφορά μεταξύ αυτών των δύο μεθόδων είναι ότι στο CPC εξαιτίας της χρήσης υγρής στατικής φάσης, αν αυτή συνεκλούεται με την κινητή φάση τείνει να διαταράσσει την ανίχνευση της καμπύλης έκλουσης. **Κανόνας 12:** Αποφυγή της παγίδευσης στατικής φάσης στην κυψελίδα ανίχνευσης επιτυγχάνεται με έκλυση της κάτω φάσης ως κινητής φάσης από κάτω προς τα πάνω μέσα στον ανιχνευτή και αντίστροφα αν η πάνω φάση του διφασικού συστήματος χρησιμοποιείται ως κινητή φάση. Όταν η πάνω φάση είναι η κινητή φάση, τότε εκλύεται από την κορυφή της κυψελίδας προς τα κάτω και είναι σημαντικό να αποφευχθεί ο σχηματισμός φυσαλίδων. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί είτε με την απαέρωση των δύο φάσεων πριν από τη χρήση, είτε με τη σύνδεση λεπτών σωληνακίων στην είσοδο του ανιχνευτή, έτσι ώστε η πίεση εντός της κυψελίδας να αυξηθεί σημαντικά. Για τους αναλυτές χωρίς χρωμοφόρα, η παρακολούθηση της διαδικασίας μπορεί να πραγματοποιηθεί με διαφορετικούς τρόπους π.χ., χρησιμοποιώντας ELSD [26], φασματομετρία μάζας (CCC-MS) [27] ή IR [28]. Παρόλο που συνιστάται, η παρακολούθηση αυτή δεν είναι απαραίτητη, ειδικά εάν έχει βελτιστοποιηθεί το σύστημα διαλυτών και η ένωση στόχος εκλύεται μετά από συγκεκριμένο όγκο στήλης που εξαρτάται από την τιμή K. Μετά τη συλλογή των κλασμάτων, μπορούν να αναλυθούν με διάφορες μεθόδους π.χ. HPLC ή TLC σε συνδυασμό με πυκνομετρία, έπειτα από μία συγκεκριμένη διαδικασία εξάτμισης και επαναδιάλυσης στους κατάλληλους διαλύτες.

Καταγραφέας

Η καταγραφή του χρωματογραφήματος γίνεται συνήθως μέσω ενός ηλεκτρονικού υπολογιστή.

Αυτόματος συλλέκτης

Με την χρήση του, είναι πιο εύκολη και ξεκούραστη η διαδικασία, καθώς με την ρύθμιση της ροής της διαδικασίας και του όγκου κάθε κλάσματος, είναι εφικτή η συλλογή ισόποσων κλασμάτων.

1.3.5 Επιλογή Και Έλεγχος Διφασικού Συστήματος

Η συμβατική υγρή χρωματογραφία χρησιμοποιεί μία μόνο φάση για την έκλυση των αναλυτών που απελευθερώνονται από το προσροφητικό ή υγρής φάσης επικαλυμμένη στο στερεό υπόστρωμα. Αντίθετα, η τεχνική CCC χρησιμοποιεί ένα σύστημα διαλυτών δύο φάσεων από ένα μη αναμειξιμους διαλύτες, όπου η μία φάση χρησιμοποιείται ως στατική φάση και η άλλη ως κινητή. Η χρήση των διφασικών συστημάτων διαλυτών επιτρέπει την επιλογή διαλυτών από ένα τεράστιο αριθμό πιθανών συνδυασμών. Η επιλογή αυτού του συστήματος διαλυτών για την ένωση ή τις ενώσεις στόχο είναι το πιο σημαντικό βήμα στην CCC, το οποίο αντιστοιχεί στο 90% της συνολικής διαδικασίας. Χωρίς την χρήση της βιβλιογραφίας, η αναζήτηση ενός συστήματος για τον επιτυχή διαχωρισμό των συγκεκριμένων ενώσεων από ένα πολύπλοκο δείγμα μπορεί να είναι πολύ χρονοβόρο. Επομένως, Κανόνας 1: Αρχική και ενδελεχής μελέτη προηγούμενων αναφορών σχετικά με το διαχωρισμό παρόμοιων ενώσεων και την επιτυχή εφαρμογή διαφόρων συστημάτων. Παράλληλα, εντοπισμός βιβλιογραφίας με καταχωρημένα συστήματα διαλυτών που περιέχουν συνήθως αντιπροσωπευτικά παραδείγματα και αντιστοιχούν σε διάφορες κατηγορίες φυσικών προϊόντων. Εάν καμία από αυτές τις μεθόδους δεν κριθεί επιτυχής είτε με την αρχική ή την τροποποιημένη μορφή, τότε είναι αναγκαίο να αντιμετωπιστεί η πρόκληση της εύρεσης νέων πειραματικών συνθηκών. [29]

Όταν η αναζήτηση για ένα σύστημα διαλυτών είναι ανεπιτυχής, η εύρεση του κατάλληλου γίνεται μέσω μίας κουραστικής μεθόδου δοκιμής και λάθους.

Το κατάλληλο σύστημα διαλυτών πρέπει να πληροί τις ακόλουθες απαιτήσεις:

- Οι αναλύτες θα πρέπει να είναι σταθεροί και διαλυτοί στο σύστημα.
- Το σύστημα θα πρέπει να σχηματίζει δύο φάσεις με αποδεκτές αναλογίες όγκου για την αποφυγή σπατάλης διαλυτών.
- Το σύστημα θα πρέπει να εξασφαλίζει έναν αποδεχτό συντελεστή κατανομής στους αναλύτες. Οι τιμές των συντελεστών κατανομής στις δύο φάσεις να κυμαίνονται μεταξύ 0.2 και 5.0 (ιδανική περίπτωση να πλησιάζουν την τιμή 1.0)
- Το σύστημα θα πρέπει να αποφέρει ικανοποιητική κατακράτηση της στατικής φάση στη στήλη.
- Ο χρόνος εξισορρόπησης των δυο φάσεων να είναι μικρός (μικρότερος των 20 sec)

1.3.5.1 Συντελεστής Κατανομής

Ο συντελεστής κατανομής (K) είναι ο λόγος της κατανεμημένης διαλυόμενης ουσίας μεταξύ των δυο φάσεων του διφασικού συστήματος. Συνήθως, εκφράζεται από την ποσότητα της διαλυόμενης ουσίας στη στατική φάση και διαιρείται με αυτή στην κινητή φάση, όπως υπολογίζεται και στην συμβατική υγρή χρωματογραφία. **Κανόνας 2:** Εύρεση συστημάτων με τις τιμές K των ενώσεων στόχων να είναι κατάλληλες. Οι κατάλληλες τιμές K για HSCCC είναι $0,5 \leq K \leq 1,0$.

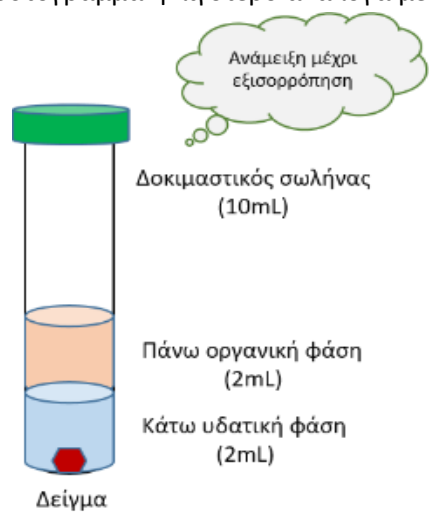
Μια μικρότερη τιμή K εκκλύει τη διαλυμένη ουσία πιο κοντά στο μέτωπο του διαλύτη οδηγώντας σε χαμηλότερη ανάλυση, ενώ μια μεγαλύτερη τιμή K τείνει να δώσει καλύτερες αλλά ευρύτερες, πιο αραιές κορυφές λόγω μεγαλύτερης διάρκειας του χρόνου έκλυσης. Στο CCC, μπορεί κανείς να επιλέξει είτε την άνω είτε την κάτω φάση ως στατική φάση, αυτό μπορεί να αποφασιστεί με τον προσωρινό υπολογισμό του συντελεστή κατανομής ως $K_u / L =$

C_U / C_L , όπου C_U είναι η συγκέντρωση διαλυόμενης ουσίας στην άνω φάση και C_L , εκείνη της κάτω φάσης.

Αν $K_U / L = 2$, τότε η κάτω φάση θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί ως στατική φάση, η οποία δίνει $K = 0,5$. Είναι σημαντικό αυτό το προκαταρκτικό K_U / L να διακρίνεται σαφώς από το K χρησιμοποιώντας τους δείκτες για να αποφευχθεί σύγχυση.

Υπολογισμός των τιμών K_U / L :

Προσθήκη μιας μικρής ποσότητας (συνήθως μερικά χιλιοστόγραμμα ή λιγότερο ανάλογα με το συντελεστή απόσβεσης ή την απορροφητικότητα) της κάθε ένωσης-στόχου ή του δείγματος στο επιλεγμένο διφασικό σύστημα (2 mL της κάθε φάσης) σε δοκιμασμένο σωλήνα με πώμα και καλή ανάμειξη με Vortex για να επιτευχθεί ορθός διαχωρισμός των δύο φάσεων. Μετά τη εξισορρόπηση, ακολουθεί λήψη ίσου όγκου της κάθε φάσης και διαχωρισμός τους σε ξεχωριστό δοκιμαστικό σωλήνα. (Εικόνα 60) Η πορεία της διαδικασίας ποικίλλει ανάλογα τις δυνατότητες του κάθε εργαστηρίου ή τον χρονικό περιορισμό στην λήψη των αποτελεσμάτων. Αρχικά, συνήθως απαιτείται η αραιώση των δειγμάτων των δύο φάσεων με κάποιον κατάλληλο διαλύτη, όπως είναι η μεθανόλη. Είναι δυνατή η μέτρηση της απορρόφησης με φασματοφωτόμετρο στο κατάλληλο μήκος κύματος ή η ανάλυση με HPLC όπου συγκρίνετε το ύψος της κορυφής (ή η περιοχή κάτω από την κορυφή) των αντίστοιχων κορυφών-στόχων. Εάν το δείγμα δεν απορροφά στο UV ή σε ένα ορατό μήκος κύματος, μπορεί να προσδιοριστεί η τιμή K_U/L με διάφορες άλλες τεχνικές, όπως η TLC, ανιχνευτής σκέδασης φωτός (ELSD), δείκτης διάθλασης, MS ή ακόμα και μέσω ελέγχου της βιολογικής δραστηριότητας. Η τεχνική TLC σε συνδυασμό με πυκνομετρία χρησιμοποιείται αποτελεσματικά για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό του K_U/L πολλών συστατικών από ένα μείγμα δειγμάτων.



Εικόνα 60 Σχηματική Απεικόνιση Ελέγχου Καταλληλότητας Διφασικού Συστήματος.

Κανόνας 3: Συστηματική αναζήτηση για ένα κατάλληλο σύστημα διαλυτών σύμφωνα με τους Πίνακες 1 και 2 [14,15,23], όπου είναι διατεταγμένα σύνολα συστημάτων διαλυτών δύο φάσεων από πάνω προς τα κάτω σε φθίνουσα σειρά υδροφοβικότητας στην οργανική φάση. Όταν η πολικότητα των ενώσεων-στόχων είναι άγνωστη, η αναζήτηση μπορεί να ξεκινήσει με το σύστημα αποτελούμενο από εξάνιο-οξικό αιθυλεστέρα-μεθανόλη-νερό σε αναλογία όγκου 3: 5: 3: 5 (Πίνακας 1) που έχει μέτριο βαθμό πολικότητας. Εάν ο συντελεστής κατανομής είναι ελαφρώς εκτός από το επιθυμητό εύρος, μπορεί να ρυθμιστεί με τροποποίηση των όγκων. Για παράδειγμα, αν ο K_U/L είναι ελαφρώς πάνω από 2, η αναλογία μπορεί να τροποποιηθεί ώστε να μετατραπεί σε πιο υδρόφοβη όπως 3.2: 5: 3,2: 5, και εάν ο K_U/L είναι ελαφρώς μικρότερος από 0,5, η πολικότητα μπορεί να τροποποιηθεί προς την αντίθετη κατεύθυνση προς 2.8: 5: 2.8: 5. Εάν η στοχευμένη ένωση κατανέμεται κυρίως στην οργανική φάση, η αναζήτηση κατευθύνεται προς τα επάνω συστήματα του πίνακα, ενώ αντίθετα αν προτιμάει την κάτω φάση, η αναζήτηση πρέπει να κατευθύνεται προς τα κάτω ή να εφαρμόζεται κάποιο σύστημα από τον πίνακα 2. Η αναζήτηση θα πρέπει να συνεχιστεί μέχρις ότου επιτευχθεί το κατάλληλο εύρος τιμών K_U/L για όλες τις ενώσεις που παρουσιάζουν ενδιαφέρον. Όταν οι αναλύτες εξακολουθούν να κατανέμονται περισσότερο στην οργανική άνω φάση πρέπει να δοκιμαστούν εξαιρετικά υδρόφοβα συστήματα όπως

εξάνιο-αιθανόλη-νερό (5: 4: 1) ή εξάνιο-μεθανόλη. Εάν συμβαίνει το αντίθετο και οι αναλύτες είναι πολύ υδρόφιλες ενώσεις, κατανομονται περισσότερο στην υδατική φάση (σε 1-βουτανόλη-νερό), είναι δυνατή η προσθήκη ενός τροποποιητή στα συστήματα: π.χ., 1-βουτανόλη-οξικό οξύ-νερό (4: 1: 5). 1-βουτανόλη-0.1% υδατικό διάλυμα τριφθοροοξικό οξύ (TFA) (1: 1). και 1-βουτανόλη-0.2M NaCl (1: 1).

Εάν το δείγμα προέρχεται από εκχύλισμα φυτικού υλικού, η αναζήτηση μπορεί να ξεκινήσει σε οποιοδήποτε σημείο σύμφωνα με την πολικότητα του διαλύτη που χρησιμοποιείται για την εκχύλιση: εάν το δείγμα είναι εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα (σχετικά υδρόφοβος διαλύτης), η αναζήτηση μπορεί να αρχίσει από (1: 1: 1: 1), ενώ αν το δείγμα είναι ένα εκχύλισμα μεθανόλης (πολικός διαλύτης), η αναζήτηση μπορεί να αρχίσει σε 1-βουτανόλη-νερό.

Κανόνας 4: Τροποποίηση της τιμής K σε αρνητικά φορτισμένους αναλύτες, π.χ., καρβοξυλικά οξέα, με την προσθήκη οξέων, όπως το TFA και το οξικό οξύ στο σύστημα διαλυτών. Εξαιτίας της πρωτονίωσης, αυτά τα μόρια γίνονται πιο υδρόφοβα και ευνοείται η κατανομή τους στην οργανική φάση. Αυτοί οι όξινοι αναλύτες έχουν δύο μοριακές μορφές, την πρωτονιωμένη (COOH) και την μη (COO⁻), όπου η κάθε μια έχει διαφορετική τιμή K, και σχηματίζουν μια ευρύτερη κορυφή όταν εν μέρει ιονίζονται. Ως εκ τούτου, η χρήση ενός οξέος τροποποιητή στο σύστημα συνιστάται. Επίσης, η προσθήκη του οξέος (τυπικά 0,1% TFA) στο σύστημα συχνά μειώνει σημαντικά τον χρόνο εξισορρόπησης, βελτιώνοντας την διατήρηση της στατικής φάσης μέσα στην στήλη. Αυτό ισχύει ιδιαίτερα όταν το διάλυμα του δείγματος περιέχει όξινες προσμίξεις.

Οι τιμές K παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες για την ανάλυση δύο ή και περισσότερων παρόμοιων χημικά ενώσεων. Ο συντελεστής διαχωρισμού α, δηλαδή ο λόγος των συντελεστών κατανομής μεταξύ δύο διαλυμένων ουσιών $\alpha = K_1 / K_2$ είναι μια σημαντική παράμετρος, η οποία δείχνει την διαχωριστικότητα μεταξύ των δύο ουσιών. **Κανόνας 5:** Ο συντελεστής διαχωρισμού $\alpha = K_1 / K_2$, όπου $K_1 > K_2$, θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 1,5. Επίσης, από το συντελεστή διαχωρισμού, μπορεί κανείς να εκτιμήσει τον όγκο κινητής φάσης για την έκλυση της αναλυόμενης ουσίας.

Κανόνας 6: Εάν το K είναι 1, ο αναλύτης θα εκλουστεί σε όγκο κινητής φάσης ίσο με την χωρητικότητα της στήλης ανεξάρτητα από τον όγκο κατακράτησης της στατικής φάσης. Αν $K < 1$ ή $K > 1$, ο αναλύτης θα εκλουστεί πριν ή μετά την έκλυση ενός όγκου στήλης, αντίστοιχα. Ο όγκος συγκράτησης (VR) του αναλύτη μπορεί να προβλεφθεί με μεγαλύτερη ακρίβεια χρησιμοποιώντας τον όγκο έκλυσης του (VSF) και τη συνολική χωρητικότητα της στήλης (VC) από το ακόλουθη εξίσωση:

$$VR = VSF + K (VC - VSF)$$

Εύρεση κατάλληλου διφασικού συστήματος μέσω διαγραμμάτων:

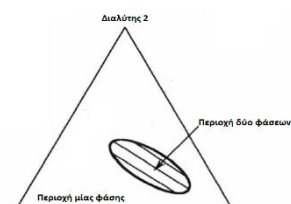
Τις περισσότερες φορές, η βελτιστοποίηση ενός διαχωρισμού συνεπάγεται βελτιστοποίηση στην χρωματογραφική εκλεκτικότητα. Τα διφασικά συστήματα παρασκευάζονται άμεσα, όποτε οι συνθέσεις τους μπορούν να ρυθμιστούν με ακρίβεια για να επιτευχθεί η επιθυμητή ανάλυση. Τα διαγράμματα φάσεων, γνωστά και ως διαγράμματα Ternary των Sgrensen και Arlt [1] μπορούν να αξιοποιηθούν ώστε να κατανοηθούν τα



Εικόνα 61 Διάγραμμα Συστήματος Τύπου 1

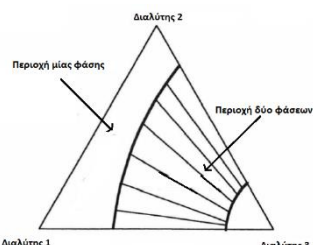
αποτελέσματα της μεταβολής της σύνθεσης της μίας φάσης ως προς την σύνθεση της άλλης. Συνήθως, αποτελούνται από δύο μη αναμειξιμους διαλύτες συν ένα τρίτο διαλύτη, διαλυτό στους δύο πρώτους διαλύτες, π.χ. χλωροφόρμιο-μεθανόλη-νερό. Αυτά τα συστήματα καλούνται συστήματα τύπου 1 και τα τριαδικά τους διαγράμματα είναι παρόμοια με την Εικόνα 61. Το «κρίσιμο σημείο» είναι η γραμμή που χωρίζει τις μονοφασικές και τις διφασικές ζώνες. Οποιοδήποτε σημείο κατά μήκος της γραμμής δίνει την ίδια σύνθεση για την αριστερή και τη δεξιά φάση, αλλά με αντίστοιχες αναλογίες. Ένα σημείο πολύ κοντά στο κρίσιμο σημείο θα οδηγήσει σε μια φάση κορεσμένη με μερικά σταγονίδια της άλλης. Όταν πλησιάζεται το κρίσιμο σημείο, η σύνθεση της αριστερής και της δεξιάς φάσης γίνονται ταυτόσημη και όλοι οι συντελεστές κατανομής συγκλίνουν στο 1. Η θέση του κρίσιμου σημείου είναι ευαίσθητη στη θερμοκρασία και ένα μείγμα που έχει σύνθεση κοντά σε αυτό μπορεί να είναι μονοφασικό ή διφασικό, ανάλογα με τη θερμοκρασία. Συμπερασματικά, η επιλογή των συστημάτων δεν πρέπει να είναι κοντά στο κρίσιμο σημείο.

Μερικά συστήματα αποτελούνται από δύο αναμειξιμους διαλύτες συν ένα τρίτο που είναι αδιάλυτος στους δύο πρώτους διαλύτες, π.χ. οξικός αιθυλεστέρας-βουτανόλη-νερό. Αυτά ονομάζονται συστήματα τύπου 2 και τα τριμερή διαγράμματα τους μοιάζουν με αυτά της Εικόνα 62



Εικόνα 62 Διάγραμμα Συστήματος Τύπου 2.

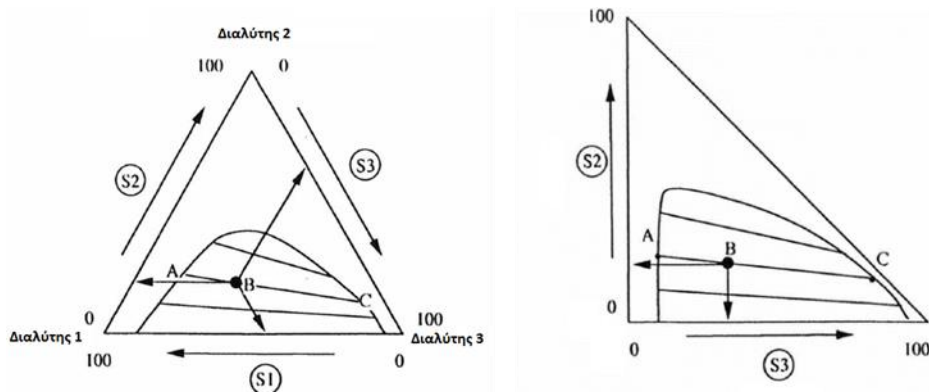
Λίγα συστήματα αποτελούνται από τρεις διαλύτες που είναι πλήρως αναμειξιμοί μεταξύ τους σε ζεύγη και υπάρχει μια ζώνη στο τριμερές διάγραμμα όπου δημιουργείται διφασικό. Αυτά τα συστήματα ονομάζονται τύπου 0 και το τριμερές διάγραμμα μοιάζει με την Εικόνα 63. Το μοναδικό παράδειγμα που χρησιμοποιήθηκε πρόσφατα στο CPC είναι το σύστημα νερού / διμεθυλοσουλφοξείδιο / τετραϋδροφουράνιο.



Εικόνα 63 Διάγραμμα Συστήματος Τύπου 3.

[2]

Η Εικόνα 64 παρουσιάζει δύο τρόπους για να υπολογιστεί η σύνθεση ενός μίγματος τριών διαλυτών 1,2 και 3, αναμειγνύοντας τον όγκο S_1 , S_2 και S_2 αντίστοιχα. Οι άξονες εκφράζονται ως ποσοστό επί τοις εκατό. Η αναπαράσταση στο σχήμα 2α χρησιμοποιείται ευρέως, αλλά δεν είναι άμεσα συμβατή με υπολογιστικά φύλλα, τα οποία προτιμούν να ασχολούνται με ορθολογικές παραστάσεις για ένα δεδομένο σύνολο δεδομένων. Επιπλέον, είναι περιττό ότι $S_1 + S_2 + S_3 = 100$, ανεξάρτητα από το σημείο B, δίνοντας τις δύο φάσεις A και Γ. Είναι ευκολότερο να χρησιμοποιηθεί η αναπαράσταση στο σχήμα 2b, όπου παρουσιάζονται μόνο τα ποσοστά δυο διαλυτών S_1 και S_2 (ή S_1 και S_3 ή S_2 και S_3). Με αυτό τον τρόπο, είναι πολύ εύκολο υπολογιστούν οι γραμμές σύνδεσης και το κρίσιμο σημείο και να σχεδιάσουν το γράφημα ποσοστού όγκου από τα ποσοστά μοριακών ποσοστών ή τα ποσοστά μάζας.



Εικόνα 64 Άλλοι Τύποι Διαγραμμάτων για την εύρεση διφασικού συστήματος.

1.3.5.2 Κατακράτηση Στατικής Φάσης

Το σύστημα CCC δεν χρησιμοποιεί σταθερή μηχανική υποστήριξη για τη συγκράτηση της υγρής στατικής φάσης στη στήλη διαχωρισμού. Ο επιτυχής διαχωρισμός εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ποσότητα της στατικής φάσης που διατηρείται στη στήλη. Γενικά, **Κανόνας 7**: Όσο μεγαλύτερο είναι το ποσοστό κατακράτησης, τόσο καλύτερη είναι η ανάλυση κορυφής και άρα και ο διαχωρισμός. Η ποσότητα της στατικής φάσης που διατηρείται στη στήλη σε μεγάλο βαθμό συσχετίζεται με τον χρόνο εξισορρόπησης των δύο φάσεων σε δοκιμαστικό σωλήνα [24]. **Κανόνας 8**: Μέτρηση του χρόνου εξισορρόπησης του διφασικού συστήματος. Κατά την διαδικασία υπολογισμού του συντελεστή κατανομής, είναι δυνατή η μέτρηση του χρόνου που απαιτείται ώστε οι δυο φάσεις να σχηματίσουν διαυγή στρώματα με μία διακριτή επιφάνεια επαφής. Εάν ο χρόνος καθίζησης είναι μικρότερος από 20 δευτερόλεπτα, το σύστημα θα παρέχει ικανοποιητική διατήρηση της στατικής φάσης, συνήθως πάνω από το 50% της συνολικής χωρητικότητας στήλης με τη βέλτιστη ροή. Αν και η διατήρηση πάνω από 50% είναι ιδανική, μικρότερη ποσότητα, όπως 30%, μπορεί ακόμη να δώσει έναν ικανοποιητικό διαχωρισμό, ειδικά για τους αναλύτες με υψηλές τιμές K.

1.3.6 Παράγοντες Που Επηρεάζουν Τον Διαχωρισμό [29]

1.3.6.1 Διάλυμα Δείγματος

Η προετοιμασία του διαλύματος του δείγματος χρειάζεται κάποιες παραμέτρους. Το δείγμα μπορεί να διαλυθεί απευθείας στην στατική φάση ή σε ένα μείγμα των δύο φάσεων. Ο συνιστώμενος όγκος δείγματος στον τυπικό διαχωρισμό πρέπει να είναι λιγότερο από το 5% της συνολικής χωρητικότητας της στήλης. Η εισαγωγή μεγαλύτερου όγκου δείγματος στην στήλη θα μειώσει την ανάλυση και θα επηρεάσει τον διαχωρισμό των αναλυόμενων ουσιών, ειδικά εκείνων που έχουν μικρές τιμές K. Ιδανικά η αναλυόμενη ουσία εγχέεται στο μικρότερο δυνατό όγκο της στατικής φάσης ώστε να διατηρηθεί η οξύτητα της πρώτης κορυφής έκλουσης. Όταν ένα δείγμα περιέχει διαλυμένες ουσίες μεγάλου εύρους πολικότητας, μπορεί να ελαχιστοποιηθεί ο αναγκαίος όγκος δείγματος, διαλύοντάς το σε ένα μείγμα δυο φάσεων. **Κανόνας 9**: το διάλυμα του δείγματος πρέπει να σχηματίζει δύο φάσεις όταν αναμιγνύεται με οποιαδήποτε από τις φάσεις του διφασικού συστήματος που . Όταν το

δείγμα διαλύεται μόνο στη στατική φάση, όταν προστεθεί μια μικρή ποσότητα κινητής φάσης το διάλυμα θα πρέπει να γίνει θολό, υποδεικνύοντας σχηματισμό δύο φάσεων. Όταν μεγάλη ποσότητα δείγματος διαλύεται στο μίγμα των δύο φάσεων, το διάλυμα δείγματος σχηματίζει συχνά μία μόνο φάση λόγω της τροποποιημένης σύνθεσης. Όταν συμβεί αυτό, περισσότερος διαλύτης θα πρέπει να προστεθεί έως ότου εμφανιστεί το σημείο επαφής μεταξύ των δύο φάσεων. Εάν αυτό δεν συμβεί, η κινητή φάση μπορεί να σπρώξει εξ ολοκλήρου την στατική φάση σχεδόν από τη στήλη. Για να εξασφαλιστεί ικανοποιητική συγκράτηση της στατικής φάσης, το δείγμα διαλύεται σε περίπου ίσους όγκους των δύο φάσεων και μετράται ο χρόνος εξισορρόπησης του δείγματος. Αν ο χρόνος εξισορρόπησης είναι πολύ μεγαλύτερος από 20 δευτερόλεπτα, το διάλυμα θα πρέπει να αραιωθεί περαιτέρω έως ότου ο χρόνος παραμείνει εντός αποδεκτού ορίου ακόμη και αν ο όγκος του δείγματος υπερβαίνει το όριο του 5% του συνολικού όγκου της στήλης.

1.3.6.2 Επιλογή Κινητής Φάσης

Κάθε φάση του διφασικού συστήματος μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως κινητή φάση υπό την προϋπόθεση ότι ο συντελεστής κατανομής K της αναλυόμενης ουσίας είναι στο κατάλληλο εύρος. Προτιμότερο είναι να χρησιμοποιείται η κάτω φάση ως στατική, επειδή το σύστημα καθίσταται πιο σταθερό και η φυγόκεντρος δύναμη που αναπτύσσεται οδηγεί σε σταθερότερη κατακράτηση της (λιγότερη μεταφορά στατικής φάσης και καλύτερη ανίχνευση των κορυφών έκλουσης) και αποφεύγεται η παγίδευση φυσαλίδας αέρα εξαιτίας της εισαγωγής της στατικής φάσης από κάτω προς τα πάνω. Από την άλλη πλευρά, όταν η οργανική φάση (εξαιρουμένων των συστημάτων με χλωροφορμίου) χρησιμοποιείται ως κινητή φάση, αυτό διευκολύνει την εξάτμιση του διαλύτη από τα συλλεχθέντα κλάσματα.

Έτσι, όταν η κινητή φάση είναι η ελαφρύτερη φάση τότε εφαρμόζεται ascending mode (ανεβαίνοντας), ενώ όταν είναι η βαρύτερη descending mode. Εξαιτίας αυτής της δυνατότητας, επιτρέπεται η εφαρμογή είτε κανονικής είτε αντίστροφης φάσης χρωματογραφίας χωρίς την ανάγκη αλλαγής της στήλης. (Εικόνα 65)

Ascending mode: Η ελαφριά πάνω φάση του συστήματος των διαλυτών χρησιμοποιείται ως κινητή και μεταφέρεται μέσα από την στατική κάτω φάση.

Descending mode: Η βαριά κάτω φάση του συστήματος των διαλυτών χρησιμοποιείται ως κινητή και μεταφέρεται μέσα από την στατική πάνω φάση.



Εικόνα 65 Κατανόηση Ascending - Descending Mode.

1.3.6.3 Ροή

Κατά την διεξαγωγή του πειράματος, η ροή της κινητής φάσης προσδιορίζει τον χρόνο του διαχωρισμού, τη ποσότητα στατικής φάσης που διατηρείται στη στήλη, και ως εκ τούτου τη ποιότητα του διαχωρισμού. [25] Έτσι, μειώνοντας την ροή της κινητής φάσης, βελτιώνεται η ανάλυση του δείγματος αλλά αυξάνεται ο χρόνος διαχωρισμού. Το εύρος της ροής εξαρτάται από τον χρόνο εξισορρόπησης του διφασικού συστήματος καθώς και από άλλους παράγοντες. Όταν ο χρόνος αυτός είναι περίπου 20 δευτερόλεπτα και ο συντελεστής K της αναλυόμενης ουσίας είναι μικρός, συνιστάται χρήση χαμηλής ροής.

1.3.6.4 Ταχύτητα Περιστροφής

Η βέλτιστη ταχύτητα περιστροφής για παρασκευαστικές διαδικασίες διαχωρισμού κυμαίνεται μεταξύ 600 και 1200 στροφή ανά λεπτό. Η χρήση χαμηλότερης ταχύτητας θα μειώσει την όγκο της στατικής φάσης που διατηρείται στη στήλη και οδηγήσει σε χαμηλότερη ανάλυση κορυφής.

1.3.6.5 Γέμισμα Στήλης

Σε κάθε διαχωρισμό, η στήλη γεμίζεται πρώτα πλήρως με τη στατική φάση. Συνιστάται πριν την εισαγωγή της στατικής φάσης, η στήλη να ξεπλυθεί με έναν όγκο στήλης τουλάχιστον με έναν διαλύτη αναμείξιμο με τις δύο φάσεις που χρησιμοποιήθηκαν στον προηγούμενο διαχωρισμό (π.χ., αιθανόλη ή μεθανόλη) για να εκπλυθεί τυχόν δείγμα που παραμένει μέσα στη στήλη. Αυτό θα διασφαλίσει επίσης και μια σταθερή καθαρή γραμμή βάσης πριν βγει το μέτωπο του διαλύτη. **Κανόνας 11:** Αποφυγή της παγίδευσης του αέρα στη στήλη ειδικά σε παρασκευαστική στήλη. Αυτό μπορεί να ελεγχθεί ως εξής: Εάν δεν υπάρχει αέρας στη στήλη, η ροή διαλύτη από τη στήλη διακόπτεται αμέσως μετά τη διακοπή της άντλησης. Αν ο διαλύτης συνεχίζει να ρέει από την έξοδο για περισσότερο χρόνο, τότε ο αέρας που παγιδεύεται στη στήλη πρέπει να απομακρυνθεί, επαναλαμβάνοντας την άντληση της στατικής φάσης με χαμηλή ταχύτητα περιστροφής (100-200 στροφές ανά λεπτό) από το κάτω μέρος προς το πάνω (ascending mode) για να επιτυγχάνεται η κίνηση του αέρα προς την έξοδο της στήλης.

1.3.6.6 Ένεση Δείγματος

Υπάρχουν δύο τρόποι για να εκτελεστεί η διαδικασία εισαγωγής του δείγματος. Στην πρώτη μέθοδο, η στήλη αρχικά γεμίζεται εξ ολοκλήρου με τη στατική φάση και αμέσως ακολουθείται η ένεση δείγματος. Η κινητή φάση αντλείται μέσα της στήλης ενώ η στήλη περιστρέφεται με τον μέγιστο ρυθμό. Στη δεύτερη μέθοδο, μετά το γέμισμα της στήλης με στατική φάση, η κινητή φάση εκλούεται μέσα από την στήλη με τον επιθυμητό ρυθμό μέχρι το μέτωπο του διαλύτη να εξέλθει από την στήλη και να δημιουργηθεί υδροδυναμική ισορροπία σε όλη την στήλη, όπως αποδεικνύεται από τη μείωση της εξόδου της στατικής φάσης. Στη συνέχεια, το δείγμα εγχέεται στο στήλη. Κάθε μέθοδος έχει τα δικά της πλεονεκτήματα. Είναι προφανές ότι η δεύτερη μέθοδος θα δώσει μία σαφή παρακολούθηση

της καμπύλης έκκλισης λόγω της ελάχιστης εξόδου της στατικής φάσης από τη στήλη. Ενώ, κατά την πρώτη μέθοδο δημιουργείται ένα ξεχωριστό μέτωπο διαλύτη και μειώνει τον χρόνο του διαχωρισμού λόγω της παράκαμψης του σταδίου επίτευξης της υδροδυναμικής ισορροπίας.

1.3.6.7 Υπολογισμός Κατακράτησης Της Στατικής Φάσης

Το ποσοστό κατακράτησης της στατικής φάσης (Sf) υπολογίζεται από τον λόγο του όγκου της στατικής φάσης (Vs) που παραμένει μέσα στην στήλη κατά την διάρκεια της εξισορρόπησης προς τον συνολικό όγκο της στήλης (V).

$$Sf = V_s/V$$

Επίσης, ο διατηρούμενος όγκος στατικής φάσης (VS) μπορεί να υπολογιστεί από το χρωματογράφημα χρησιμοποιώντας τον όγκο κατακράτησης της κορυφής (R) και της τιμής K σύμφωνα με τα ακόλουθα:

$$VS = (R - V_{SF})/K$$

όπου, το VSF είναι το μέτωπο του διαλύτη,

ή εναλλακτικά

$$VS = (R_2 - R_1)/(K_2 - K_1)$$

όπου, R2 και R1 αντιστοιχούν στον όγκο κατακράτησης των κορυφών 2 και 1 και τα K2 και K1 παρέχουν τις τιμές K των κορυφών 2 και 1, αντίστοιχα.

Η μέτρηση της κατακράτησης της στατικής φάσης είναι χρήσιμη στις προσπάθειες για τη βελτίωση του διαχωρισμού: όταν η ανάλυση των κορυφών δεν είναι ικανοποιητική, η κατακράτηση της στατικής φάσης χρησιμεύει ως οδηγός για την επόμενη δοκιμή. Αν είναι μικρότερη από 30%, ο διαχωρισμός μπορεί να βελτιωθεί με αύξηση της με τη μείωση της ροής της κινητής φάσης, αυξάνοντας την ταχύτητα περιστροφής ή την τροποποίηση του συστήματος διαλυτών ώστε να μειωθεί ο χρόνος εξισορρόπησης. Αν ο Sf είναι πάνω από 50%, είναι επιτακτική η ανάγκη για εύρεση νέου διφασικού συστήματος, το οποίο παρέχει ένα βελτιωμένο παράγοντα διαχωρισμού (α) μεταξύ των αναλυόμενων ουσιών.

1.3.7 Πλεονεκτήματα Χρωματογραφίας Κατ' Αντιρροή

Η τεχνική αυτή χαρακτηρίζεται από πλεονεκτήματα όσο αφορά τον διαχωρισμό, την απομόνωση και τον καθαρισμό ουσιών ενός δείγματος συγκριτικά με άλλες παραδοσιακές τεχνικές υγρής-στερεής χρωματογραφίας, όπως η υγρή χρωματογραφία ανοιχτής στήλης και η χρωματογραφία υψηλής πίεσης. Τα πιο χαρακτηριστικά πλεονεκτήματα είναι τα εξής:

- Δεν απαιτείται η χρήση στερεής στατικής φάσης, εξασφαλίζοντας έτσι την πλήρη ανάκτηση του δείγματος αφού δεν υπάρχει ο κίνδυνος μη αναστρέψιμης προσρόφησης στην επιφάνεια της στατικής φάσης.
- Δεν είναι αναγκαία η αγορά νέας και ακριβής παρασκευαστικής στήλης για την διεξαγωγή του κάθε πειράματος, το μόνο που χρειάζεται είναι οι διαλύτες.

- Δεν είναι αναγκαία η επεξεργασία του δείγματος. Δεν υπάρχει κίνδυνος να καταστραφεί η ακριβή στερεή υποστήριξη. Ωστόσο, η επεξεργασία επιτρέπει πάντοτε να επιτυγχάνονται καλύτερα αποτελέσματα κατά τον διαχωρισμό.
- Υπάρχει μικρότερος κίνδυνος αποδόμησης (διάσπαση ή μετουσίωση κλπ.) για την ένωση-στόχο στο κατάλληλο σύστημα διαλυτών.
- Υπάρχει πολύ μεγαλύτερη χωρητικότητα στήλης που επιτρέπει την έγχυση μεγάλων συγκεντρώσεων του δείγματος με μικρότερο κίνδυνο υπερφόρτωσης της στήλης.
- Συγκριτικά με την Παρασκευαστική HPLC: χρησιμοποιούνται φθηνότεροι διαλύτες - στις περισσότερες περιπτώσεις είναι κατάλληλος ο "αναλυτικός βαθμός" διαλυτών για καλή απόδοση διαχωρισμού και αποδεκτή καθαρότητα της ουσίας στόχου.
- Εξαιτίας της χρήσης υγρών διαλυτών για την επεξεργασία του δείγματος, είναι δυνατή η πλήρης ανάκτηση τους και η επαναχρησιμοποίηση τους.
- Μικρότερη κατανάλωση διαλύτη ανά 1 γραμμάριο καθαρής ένωσης - αυτή η τεχνική θα μπορούσε επίσης να ονομαστεί "πράσινη χρωματογραφία".
- Όλη η διαδικασία λαμβάνει χώρα σε κλειστό σύστημα και η επιρροή από εξωτερικούς παράγοντες είναι ελάχιστη, αυτό εξασφαλίζει την επαναληψιμότητα της κάθε διαδικασίας.
- Υπάρχει μεγάλη ποικιλία στις στήλες, η οποίες επιλέγονται ανάλογα με το είδος των δειγμάτων που πρόκειται να αναλυθούν.
- Διατήρηση της χρωματογραφικής ανάλυσης κατά τη διάρκεια της μεταφοράς της μεθόδου από αναλυτική σε παρασκευαστική κλίμακα. Συγκρίνοντας με την HPLC (και άλλες τεχνικές στερεάς υποστήριξης), η τεχνολογία αυτή είναι πολύ καλύτερα κλιμακούμενη χωρίς απώλεια (σε CPC) ή σχεδόν χωρίς (σε HSCCC) απώλεια θεωρητικών πλακών, αύξηση της κλίμακας σε πιλοτική μειώνει δραματικά την αποτελεσματικότητα του διαχωρισμού σε τεχνικές με στερεό πληρωτικό υλικό.

1.3.8 Μειονεκτήματα Χρωματογραφίας Κατ' Αντιρροή

Παρόλα τα πλεονεκτήματα της τεχνικής αυτής, καθίσταται αδύνατη η μη ύπαρξη κάποιων μειονεκτικών σημείων σε σχέση με τις παραδοσιακές τεχνικές χρωματογραφίας. Κάποια από αυτά παρουσιάζονται παρακάτω:

- Η τεχνική εξακολουθεί να μην είναι ευρέως γνωστή, γι' αυτό και εντοπίζεται μικρότερος αριθμός δημοσιεύσεων και μικρότερη διαθεσιμότητα αναφορών.
- Η διαδικασία καθορισμού των συνθηκών είναι συχνά χρονοβόρα, καθώς υπάρχει η ανάγκη καθορισμού των συστημάτων διαλυτών και η επιλογή των πλέον κατάλληλων σε περίπτωση που δεν υπάρχει βιβλιογραφική αναφορά. Αυτό απαιτεί την καλή ανάπτυξη των αναλυτικών τεχνικών στο εργαστήριο.
- Εξαιρετικά χρονοβόρες βελτιστοποιήσεις - ακόμα και μετά την εξεύρεση κατάλληλου συστήματος διαλύτη, υπάρχει πάντα ανάγκη για βελτιστοποίηση της μεθόδου έκλουσης.
- Ο κίνδυνος αστάθειας του συστήματος διαλυτών (γενικά). Μερικές φορές η απώλεια της στατικής φάσης είναι μεγαλύτερη από ό, τι αναμένεται. Αυτό επηρεάζει πάντοτε την χρωματογραφική ανάλυση. Αυτό είναι πιθανόν να οφείλεται στην κατηγορία ενώσεων που περιέχονται σε ένα δείγμα.
- Ο κίνδυνος δημιουργίας γαλακτώματος. Αυτό το φαινόμενο είναι τυπικό για υπερσυμπυκνωμένα δείγματα και οδηγεί σε απώλεια της στατικής φάσης

- Χαμηλότερη χρωματογραφική ανάλυση με χαμηλότερη κλίμακα καθαρισμού σε σύγκριση με την ημιαυτοματιστική HPLC. Ωστόσο, αυτές οι αναλύσεις είναι συγκρίσιμες μερικές φορές.

1.3.9 Βασικοί Μέθοδοι Χρωματογραφίας Κατ' Αντιρροή [30]

1.3.9.1 Normal Mode

Χαρακτηρίζει την κλασική χρήση της μεθόδου κατά την οποία η μία φάση του διφασικού συστήματος χρησιμοποιείται ως στατική και η άλλη φάση ως κινητή. Ανάλογα με την επιλογή της κινητής και στατικής φάσης έχουμε και τον χαρακτηρισμό ascending και descending mode, η σημασία του οποίου ερμηνεύτηκε στο κεφάλαιο 3.6.2..

1.3.9.2 Dual Mode

Χαρακτηρίζει την μέθοδο σύμφωνα με την οποία είναι δυνατή η εναλλαγή της κινητής ως στατική φάση και το αντίστροφο στην ίδια ανάλυση. Στην πραγματικότητα, αναφέρεται στην δυνατότητα της συσκευής να αλλάζει κινητή και στατική φάση χωρίς να απαιτείται άδειασμα της στήλης. Το πλεονέκτημα αυτής είναι η μείωση του χρόνου ανάλυσης και η αποφυγή του μεγάλου όγκου κινητής φάσης που απαιτείται να εξέλθει από την στήλη, ειδικά για ουσίες που κατανέμονται κυρίως στην στατική φάση.

1.3.9.3 Elution-Extrusion

Η τεχνική αυτή έχει μία διαφορετική προσέγγιση στην μείωση του χρόνου ανάλυσης. Σύμφωνα με αυτή, αφού γίνει η εξισορρόπηση των δύο φάσεων μέσα στην στήλη διοχετεύεται ένας συγκεκριμένος όγκος κινητής φάσης (συνήθως δύο ή τρεις όγκοι στήλης) και στην συνέχεια, εξωθείται όλο το περιεχόμενο της στήλης με ταυτόχρονη συλλογή των κλασμάτων. Η τεχνική στηρίζεται στην εφαρμογή του συντελεστή κατανομής και στην θεωρία ότι με την είσοδο του δείγματος στην στήλη, οι ουσίες κατανέμονται ανάλογα την τιμή του K και με την εξώθηση της στατικής, αυτές εξέρχονται από την στήλη με την σειρά που έχουν κατανεμηθεί. Το πλεονέκτημα που εντοπίζεται είναι η μείωση του χρόνου ανάλυσης και της κατανάλωσης διαλυτών, ωστόσο η ποιότητα του διαχωρισμού ίσως αλλοιώνεται σε σχέση με τις άλλες μεθόδους.

1.3.9.4 Gradient Mode

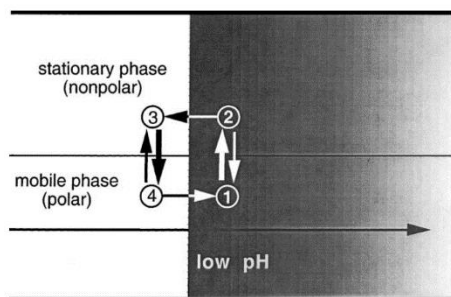
Η μέθοδος αυτή είναι πολύ καινούργια και η εφαρμογή της εντοπίζεται κυρίως στην ανάλυση φυσικών προϊόντων. Με την χρήση της μεθόδου αυτής, η στατική φάση διατηρείται σταθερή αλλά μεταβάλλεται η πολικότητα της κινητής φάσης, συνήθως από άπολη σε πιο πολική ανάλογα με την πολυπλοκότητα και την φύση των ουσιών του δείγματος. Η επιλογή των συστημάτων πρέπει να εξασφαλίζει τον βέλτιστο διαχωρισμό του δείγματος αλλά και την διατήρηση της διφασικότητας εντός της στήλης. Η τελευταία αναγκαιότητα αποτελεί και τον κύριο περιοριστικό παράγοντα στην χρήση της μεθόδου, καθώς οι αλλαγές που συμβαίνουν στο διφασικό σύστημα είναι δυνατό να καταστρέψουν την ισορροπία και να οδηγήσουν σε μία αποτυχημένη ανάλυση. Για τον λόγο αυτό, πάντα παραμένει σταθερή η στατική φάση και με την χρήση ίδιων διαλυτών διαφορετικής αναλογίας καθορίζεται η πολικότητα της κινητής.

1.3.9.5 pH-Zone Refining

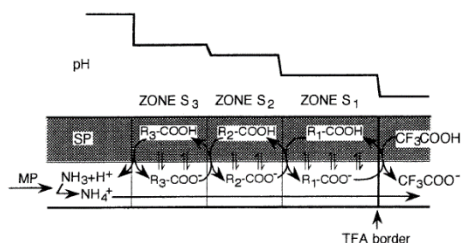
Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται γενικά ως μια παρασκευαστική τεχνική μεγάλης κλίμακας για τον διαχωρισμό των ιονιζόμενων αναλυτών με όξινες ή βασικές ιδιότητες και στηρίζεται στην βαθμιδωτή αλλαγή του pH. Η μέθοδος εκλούει τις ουσίες-στόχους σύμφωνα με το pKa και την υδροφοβικότητα τους. [29]

1.3.9.5.1 Μηχανισμός

Αυτή η παρασκευαστική τεχνική CCC προέκυψε από ένα τυχαίο εύρημα όταν μια όξινη διαλυμένη ουσία (βρωμοακετυλο-T3) σχημάτισε μια εξαιρετικά απότομη κορυφή στον ανιχνευτή καθώς το διάλυμα του δείγματος περιείχε ισχυρό οξύ (βρωμοοξικό οξύ) [34]. Ο μηχανισμός της εν λόγω κορυφής δείχνεται στο σχήμα 4 όπου ένα τμήμα της στήλης περιέχει την οργανική στατική φάση στο άνω ήμισυ και την υδατική κινητή φάση στο κάτω μισό όπως υποδεικνύεται. Λόγω της μη γραμμικής ισοθερμικής κατάστασης, η παρουσία του οξέος στο διάλυμα του δείγματος οδηγεί στον σχηματισμό ενός κρίσιμου σημείου, το οποίο ταξιδεύει μέσω της στήλης με ρυθμό χαμηλότερο από αυτόν της κινητής φάσης. Όπως φαίνεται στο διάγραμμα, η δεξιά πλευρά του κρίσιμου σημείου δίνει πολύ χαμηλότερο pH από την αριστερή πλευρά. Κάτω από αυτή η προϋπόθεση ο όξινος αναλύτης που υπάρχει στη θέση 1



Εικόνα 67 Διάγραμμα μεταβολής pH κατά τον διαχωρισμό



Εικόνα 66 Ζώνες μετάπτωσης κατά την αλλαγή του pH

είναι πρωτονιωμένος και μεταφέρεται γρήγορα στη στατική φάση (θέση 2). Καθώς το κρίσιμο σημείο κινείται προς τα εμπρός, η αναλυόμενη ουσία εκτίθεται σε υψηλό pH, αποπρωτονιώνεται και κινείται μέσα στη κινητή φάση στη θέση 4. Στη συνέχεια, η κινητή φάση γρήγορα μεταφέρει την αναλυόμενη ουσία, η οποία περνάει από το κρίσιμο σημείο για να επαναληφθεί η παραπάνω διαδικασία. Κατά συνέπεια, η ιονιζόμενη ουσία είναι πάντα κοντά στο κρίσιμο σημείο και τελικά εκλούεται ως μια απότομη κορυφή. Αυτό το φαινόμενο είναι πιο αποτελεσματικό με την προσθήκη ενός οξέος (όπως, TFA : συγκρατητής) στη στατική φάση και μια βάση (όπως, NH4OH : εκλουτής) στην κινητή φάση. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι η απότομη κορυφή αλλοιώνεται αρκετά όταν ο όγκος του δείγματος αυξάνεται.

Για παράδειγμα, ένα διφασικό σύστημα διαλυτών αποτελούμενο από αιθέρα και το νερό εξισορροπείται σε μια διαχωριστική χοάνη και διαχωρίζεται. Το TFA (συγκρατητής) προστίθεται στην άνω οργανική φάση, και NH4OH (εκλουτής) στην κάτω υδατική φάση. Η στήλη γεμίζεται πρώτα πλήρως με την οξινομένη οργανική στατική φάση που ακολουθείται από την ένεση διαλύματος δείγματος, που περιέχει τους τρεις όξινους αναλύτες. Μετά η βασική υδατική φάση αντλείται στη στήλη ενώ η στήλη περιστρέφεται με βέλτιστη ταχύτητα. Το οξύ συγκράτησης, το TFA, σχηματίζει ένα απότομο κρίσιμο σημείο, το οποίο κινείται μέσω

της στήλης με ρυθμό χαμηλότερο από αυτόν της κινητής φάσης. Οι τρεις αναλύτες, S1, S2 και S3, σχηματίζουν ανταγωνιστικά ζώνες πίσω από το κρίσιμο σημείο του TFA σύμφωνα με το pK_a και υδροφοβικότητα τους. Μεταξύ αυτών, το S1, με το χαμηλότερο pK_a και υδροφοβικότητα βρίσκεται αμέσως πίσω από το TFA, ενώ S3, με το υψηλότερο pK_a και υδροφοβικότητα βρίσκεται στο τέλος των ζωνών. Όπως δείχνουν τα βέλη, η μεταφορά του πρωτονίου πραγματοποιείται σε κάθε ζώνη εξαιτίας της διαφοράς του pH μεταξύ των γειτονικών ζωνών. Η απώλεια του πρωτονίου από την κινητή φάση στην στατική αντισταθμίζεται από την επιστροφή του στο τέλος κάθε ζώνης, αφού το ιόν αμμωνίου στην υδατική φάση χρησιμεύει ως αντίθετο ιόν. Μετά την επίτευξη ισορροπίας, οι τρεις διαλυμένες ουσίες κινούνται με τον ίδιο, διατηρώντας διαρκώς την απόσταση και το pH τους.

1.3.9.5.2 Επιλογή Συστημάτων

Συστήματα διαλυτών, τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για pH-Zone CPC περιγράφονται σε διάφορες μονογραφίες και άρθρα [30-32]. Για ιοντιζόμενες ουσίες, οι περισσότεροι διαχωρισμοί μπορούν να εκτελεστούν με τη χρήση συστημάτων σχετικά πολικών διαλυτών που περιλαμβάνονται στον Πίνακα 2. Εκτός εάν οι στόχοι είναι υδρόφοβες ενώσεις, όπως λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας, το επιθυμητό σύστημα αποτελείται από μεθυλ-τρι-βουτυλαιθέρα-νερό. Για την εύρεση του κατάλληλου διφασικού συστήματος ακολουθούνται οι παρακάτω οδηγίες βήμα προς βήμα:

Κανόνας 13: Για όξινο αναλύτη:

1. 2 mL από κάθε φάση και 5 mL NH_4OH (περ. 28% NH_3 αποθεματικό διάλυμα) (εκλουτής) φέρεται σε δοκιμαστικό σωλήνα ή έως ότου το pH είναι πάνω από 10.
2. Προσθήκη μιας μικρής ποσότητας της αναλυόμενης ουσίας (έτσι ώστε να μην είναι σημαντική η αλλαγή στο pH), ανάμειξη μέχρι να εξισορροπήσουν τα περιεχόμενα.
3. Μέτρηση της συγκέντρωσης του αναλύτη στην πάνω και κάτω φάση του συστήματος για να υπολογιστεί η τιμή K_U / L ή K_{base} .
4. Αν η $K_{base} \ll 1$, προσθέστε TFA (συγκρατητή) (περίπου 20 mM) στον δοκιμαστικό σωλήνα έως pH περίπου 2, και ανάμειξη με περιδίνηση.
5. Επανάληψη της διαδικασίας του Βήματος (3), υπολογισμός K_{acid} , και εάν Το $K_{acid} \ll 1$, η σύνθεση του συστήματος είναι κατάλληλη για διαχωρισμό.
6. Εάν το K_{base} δεν είναι αρκετά μικρό, επανάληψη ολόκληρης της διαδικασίας χρησιμοποιώντας ένα λιγότερο πολικό σύστημα διαλυτών όπως το εξάνιο-αιθύλιο οξικό-μεθανόλη-νερό, 1: 1: 1: 1 στον Πίνακα 1 ή σε κάτι ακόμα πιο άπολο.
7. Εάν το K_{acid} δεν είναι αρκετά μεγάλο, επανάληψη ολόκληρης της διαδικασίας χρησιμοποιώντας ένα περισσότερο πολικό σύστημα διαλύτη μεθυλο-τριτοβουτυλίου αιθέρας (MBE) -ακετονιτρίλιο (ACN) - νερό (2: 2: 3) στο Πίνακα 2 ή ακόμα πιο πολικό.

Κανόνας 14: Για βασικό αναλύτη, αντικατάσταση με HCl του NH_4OH στο Βήμα (1) για να ελεγχθεί το $K_{acid} \ll 1$, και αντικατάσταση με TEA (τριαιθυλαμίνη) του TFA στο Βήμα (4) για να υπολογιστεί η $K_{base} \ll 1$.

Για επαμφοτερίζουσες ουσίες (ελεύθερα πεπτίδια, κ.λπ.) ή για πολύ πολικές (κατεχολαμίνες), η χρήση ενός υδρόφοβου αντίθετου ιόντος απαιτείται ώστε να διατηρηθεί η ουσία στην οργανική στατική φάση. Ο επιτυχής διαχωρισμός μπορεί να πραγματοποιηθεί

χρησιμοποιώντας δι(2-αιθυλεξυλ)φωσφορικό οξύ (DEHPA) για τα πεπτίδια και τις κατεχολαμίνες [30] και δωδεκυλαμίνη για σουλφονιωμένες χρωστικές. [33]. Για χειρόμορφους διαχωρισμούς [35,36], ένας κατάλληλος παράγοντας, όπως N-δωδεκανοϋλ-L-προλίνη-3,5-διμεθυλανιλίδιο διαλύεται στην στατική φάση: όσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωσή του, τόσο καλύτερη είναι η ανάλυση. Όλοι αυτοί οι παράγοντες διαλύονται στη στατική φάση στην βέλτιστη συγκέντρωση που καθορίζεται από την προκαταρκτικούς ελέγχους. Μια σημαντική προϋπόθεση είναι η πλήρης κατανομή τους στην στατική φάση. Η χρήση ενός παράγοντα, όπως το DEHPA απαιτεί το pH να διατηρείται ουδέτερο ή όξινο στη στήλη με κατάλληλη συγκέντρωση HCl στη κινητή φάση για την αποφυγή γαλακτωματοποίησης των δύο φάσεων.

1.3.9.5.3 Βελτιστοποίηση Συστημάτων

Αφού προσδιοριστεί η σύνθεση του διφασικού συστήματος, ο συγκρατητής (τυπική συγκέντρωση 10-20 mM) προστίθεται στην οργανική φάση και περίπου ισοδύναμη μοριακή συγκέντρωση εκλουτή προστίθεται στην υδατική φάση. Η συγκέντρωση του εκλουτή στην κινητή φάση καθορίζει κυρίως τη συγκέντρωση της ένωσης στόχου στα κλάσματα. Ως εκ τούτου, η αύξηση της συγκέντρωσης του εκλουτή οδηγεί σε υψηλότερη συγκέντρωση και μικρότερο χρόνο κατακράτησης του αναλύτη. Αφ' ετέρου, η συγκέντρωση του συγκρατητή στην στατική φάση καθορίζει τη συγκέντρωση της αναλυόμενης ουσίας στη στατική φάση εντός της στήλης. Κατά συνέπεια, αυξάνοντας τη συγκέντρωση συγκρατητή, αυξάνεται και η συγκέντρωση των αναλυόμενων ουσιών στη στατική φάση, που σχετίζεται με μεγαλύτερο χρόνο κατακράτησης ή αυξημένη τιμή K. Γενικά, μια μεγάλη ποσότητα δείγματος μπορεί να διαχωριστεί αποτελεσματικά με εφαρμογή υψηλών συγκεντρώσεων του συγκρατητή και εκλουτή, π.χ., 40mM για το καθένα. Ωστόσο, η χρήση αυτής της υψηλής συγκέντρωσης συγκρατητή συχνά προκαλεί μεταφορά του στην στατική φάση, προφανώς προκαλούμενη από την καθίζηση του αναλύτη εξαιτίας της υπερβολικής υψηλής συγκέντρωσής του ή στην περιορισμένη διαλυτότητα του στη στατική φάση. Κανόνας 15: Χρήση ίσων μοριακών συγκεντρώσεων του συγκρατητή και του εκλουτή.

Η μέθοδος επιτρέπει τη χρήση μιας οργανικής φάσης ως κινητή φάση (στην περίπτωση αυτή, ο συγκρατητής γίνεται ο εκλουτής και αντιστρόφως) [30]. Σε αυτή τη διαδικασία, ο συγκρατητής στην υδατική στατική φάση χρησιμεύει ως το αντίθετο ιόν για τις αναλυόμενες ουσίες ώστε να προσδιοριστεί η συγκέντρωσή τους στη στατική φάση. Από την άλλη πλευρά, ο εκλουτής στην οργανική φάση τροποποιεί τον συντελεστή κατανομής των αναλυτών, με αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσής τους στην κινητή φάση και τη μείωση του χρόνου κατακράτησης.

1.3.9.5.4 Προετοιμασία Δείγματος

Η προετοιμασία του δείγματος είναι διαφορετική από αυτή που χρησιμοποιείται στον τυπικό διαχωρισμό CCC. Το δείγμα παρασκευάζεται με διάλυση της επιθυμητής ποσότητας δείγματος στη στατική φάση που περιέχει τον συγκρατητή και προσθήκη μικρότερου όγκου της κινητής φάσης χωρίς εκλουτή. Η συγκέντρωση του αναλύτη στην κινητή φάση καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από τη μοριακή συγκέντρωση του εκλουτή (αντίθετα ιόντα).

Συνεπώς, η συγκέντρωση του αναλύτη στα εκλουόμενα κλάσματα δεν έχει σχέση με την αρχική συγκέντρωση στο δείγμα.

Η εφαρμογή πολύ πυκνών διαλυμάτων τείνει να τροποποιεί την ισορροπία του διφασικού συστήματος και την επιφανειακή τάση, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια της στατικής φάσης από τη στήλη. **Κανόνας 16:** Εάν ο χρόνος εξισορρόπησης του διφασικού συστήματος είναι μεγάλος, συνιστάται περαιτέρω αραιώση του δείγματος. Στο διφασικό διάλυμα του δείγματος, ο αναλυτής θα πρέπει να είναι σχεδόν εξ ολοκλήρου κατανεμημένος στη στατική φάση. Αν αυτό δεν συμβαίνει, είναι πολύ πιθανό το δείγμα να περιέχει μεγάλη ποσότητα αλατιού (όπως, άλας νατρίου), που μεταβάλλει το pH του διαλύματος. Εάν αυτή η αλλαγή του pH συμβεί, πρέπει να προστεθεί συγκρατητής ώστε να επανέλθει το pH στο κατάλληλο εύρος. Επομένως, **Κανόνας 17:** Μέτρηση του pH του διαλύματος του δείγματος πριν εφαρμοστεί στη στήλη.

1.3.9.5.5 Διαδικασία

Ο διαχωρισμός ξεκινά με την πλήρωση της στήλης με την στατική φάση, η οποία προηγουμένως είναι είτε οξινισμένη είτε βασική, σύμφωνα με τον αναλύτη-στόχο. Αυτό ακολουθείται από την ένεση του διαλύματος του δείγματος και αρχίζει η άντληση της κινητής φάσης ενώ η συσκευή περιστρέφεται με τη βέλτιστη ταχύτητα (συνήθως 800 στροφές ανά λεπτό). Η εκροή παρακολουθείται συνεχώς χρησιμοποιώντας ανιχνευτή UV [37] και συλλέγονται τα κλάσματα. Εάν δεν υπάρχει διαθέσιμη συσκευή παρακολούθησης pH, μπορεί να γίνει χειροκίνητα. Αν και είναι απαιτητικό, παρέχει το πλεονέκτημα διευκόλυνσης στον ακριβή εντοπισμό του κρίσιμου σημείου μετάπτωσης του pH στα συλλεχθέντα κλάσματα.

Όταν χρησιμοποιείται υδρόφοβο αντισταθμιστικό, όπως το DEHPA, μπορεί να προκύψει μια σταθερή διαρροή μικρής ποσότητας του αντίθετου ιόντος, που μολύνει τα συλλεχθέντα κλάσματα. **Κανόνας 18:** Μια μικρή ποσότητα της στατικής φάσης να παραμένει χωρίς αντισταθμικά στο τέλος της στήλης. Αυτό επιτυγχάνεται με μερική πλήρωση της στήλης με στατική φάση (ελεύθερη του DEHPA αλλά που περιέχει τον συγκρατητή) ακολουθούμενη από άντληση ενός συγκεκριμένου όγκου της στατικής φάσης που περιέχει DEHPA. Με αυτόν τον τρόπο διατηρείται η στατική φάση χωρίς αντίθετο ιόν στο τελικό τμήμα της στήλης και χρησιμεύει ως απορροφητικό για την DEHPA.

2 Πειραματικό Μέρος

2.1 Αρχές Μεθόδων

Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας Thin Layer Chromatography, TLC

Αποτελεί την πιο συχνά χρησιμοποιούμενη τεχνική, καθώς μέσα σε μικρό χρόνο και με μικρό κόστος είναι δυνατή η ανάλυση του περιεχομένου ενός δείγματος, ο πρωταρχικός έλεγχος της καθαρότητας μίας ουσίας, καθώς και η ανίχνευση ουσίας στόχου μέσα σε δείγμα.

Οι προς ανάλυση ουσίες διανύουν μία συγκεκριμένη απόσταση είτε οριζόντια είτε κάθετα, μερικές φορές και κυκλικά πάνω σε στατική στιβάδα υπό την επίδραση μίας κινητής φάσης, η οποία αποτελείται από μίγμα διαλυτών διαφορετικής πολικότητας μέσα σε κλειστό θάλαμο. Η κίνηση διαμέσου της στατικής φάσης επιτυγχάνεται μέσω τριχοειδών δυνάμεων και η απόσταση που διανύει η κάθε ουσία σχετίζεται με την συγγένεια της με την στατική φάση συγκριτικά με την κινητή.

Η ανάπτυξη μπορεί να γίνει είτε σε πλάκες αλουμινίου είτε σε γυάλινες. Συνήθως, η στατική στιβάδα είναι στρωμένη με πήγμα οξειδίου του πυριτίου και σε αυτή την περίπτωση η χρωματογραφία είναι κανονικής φάσης. Για αντίστροφης φάσης χρωματογραφία πρέπει να χρησιμοποιηθούν κατάλληλα επιστρωμένες πλάκες.

Μετά την ανάπτυξη του χρωματογραφήματος, ακολουθεί η παρατήρηση του. Αρχικά, παρατηρείται η απορρόφηση του στο υπεριώδες φως ($\lambda = 254\text{nm}$) και αν υπάρχουν ουσίες που φθορίζουν ($\lambda = 366\text{nm}$). Επιπλέον, υπάρχει μία πληθώρα αντιδραστηρίων εντοπισμού, από πιο γενικά που μπορούν να ανιχνεύσουν πολλές διαφορετικές ουσίες, όπως διάλυμα θειικής βανιλίνης σε MeOH, αλλά και πιο εξειδικευμένα για συγκεκριμένη κατηγορία ουσιών, όπως διάλυμα Νινυδρίνης κατάλληλο για πρωτοταγείς αμίνες, όπου εμφανίζονται ως ροδόχροες κηλίδες και τριτοταγείς αμίνες ως κίτρινες κηλίδες.

Παρασκευαστική TLC

Κατά την μέθοδο αυτή, είναι δυνατή η επεξεργασία ως και 25mg εκχυλίσματος για την παραλαβή καθαρών ουσιών. Οι πλάκες που χρησιμοποιούνται είναι υάλινες, και αφού αναπτυχθεί η πλάκα, ακολουθεί απόξυση των ζωνών, ώστε να παραληφθούν οι ουσίες που αναπτύχθηκαν.

Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης High Performance Liquid Chromatography, HPLC

Η HPLC αποτελεί την συχνότερα χρησιμοποιούμενη τεχνική για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση δειγμάτων.

Η υγρή κινητή φάση προωθείται με την χρήση αντλιών υπό πίεση μέσα στην στήλη, που φέρει συγκεκριμένο πληρωτικό υλικό. Το δείγμα φορτώνεται στην στήλη μέσω βρόγχου έγχυσης και ο διαχωρισμός των συστατικών εξαρτάται από τον συντελεστή κατακράτησης της κάθε ουσίας από την στατική φάση. Η χρονική στιγμή που εξέρχονται από την στήλη χαρακτηρίζεται ως χρόνος έκλουσης και δίνει χρήσιμα συμπεράσματα για το περιεχόμενο του δείγματος. Η παρακολούθηση της ανάλυσης γίνεται με την χρήση ανιχνευτή.

Η φύση του πληρωτικού υλικού της στήλης καθορίζει την φύση της ανάλυσης. Η πιο διαδεδομένη είναι η αντίστροφης φάσης με ODS πηκτή πυριτίας, ενώ με πηκτή πυριτίας είναι κανονικής φάσης. Φυσικά, υπάρχει μία πληθώρα πληρωτικών υλικών που βασίζονται κυρίως στην τροποποίηση της επιφάνειας της πηκτής πυριτίας, αν και υπάρχουν πληρωτικά υλικά που βασίζονται σε οργανικά υλικά.

Οι διαλύτες είναι συγκεκριμένης καθαρότητας και επεξεργασίας με ειδικά φίλτρα, ώστε να μην επηρεάζουν την ανάλυση.

Οργανολογία

- Διαλύτες.
- Αντλία για την προώθηση των διαλυτών μέσα στο σύστημα.
- Βρόγχος έγχυσης όγκου 1μL ως 1mL, ανάλογα τον τύπο της ανάλυσης.
- Στήλη συγκεκριμένων προδιαγραφών, ανάλογα τον τύπο της ανάλυσης.
- Ανιχνευτής, συνήθως υπεριώδους-ορατού (UV-Vis).
- Σύστημα συλλογής και επεξεργασίας χρωματογραφικών δεδομένων.

Φασματοσκοπία Πυρηνικού Συντονισμού Nuclear Magnetic Resonance, NMR

Η φασματοσκοπία NMR είναι μία από τις κύριες τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τη λήψη φυσικών, χημικών, ηλεκτρονικών και δομικών πληροφοριών για τα μόρια που οφείλονται είτε στη χημική μετατόπιση, το φαινόμενο Ζέεμαν (Zeeman effect), ή το φαινόμενο της μετατόπισης Νάιτ (Knight shift), είτε σε συνδυασμό και των δύο, στις συχνότητες συντονισμού των πυρήνων που είναι παρόντες στο δείγμα.

Αποτελεί τεχνική ταυτοποίησης της ακριβούς δομής μορίων ή ακόμα και για τον προσδιορισμό του περιεχομένου ενός δείγματος με βάση χαρακτηριστικές απορροφήσεις.

Χρησιμοποιείται ακτινοβολία για την διέγερση των ατόμων, συνήθως πρωτονίων ^1H ή άνθρακα ^{13}C , ώστε να αλλάζουν τα σπιν τους από παράλληλα σε αντιπαράλληλα.

Η φασματομετρία πρωτονίου είναι ο πιο ευρέως διαδεδομένος τύπος NMR λόγω της ευαισθησίας και του πλήθους των δομικών πληροφοριών που παρέχει. Η ακριβής συχνότητα απορρόφησης ή συντονισμού ενός πρωτονίου εξαρτάται από το χημικό περιβάλλον του και η μονάδα μέτρησης της χημικής μετατόπισης (δ) είναι τα ppm. Καθορίζεται από τον βαθμό στον οποίο ένα πρωτόνιο θωρακίζεται ή αποθωρακίζεται από τις ομάδες με τις οποίες είναι συνδεδεμένο. Από αυτή την γνώση έχουν προκύψει χάρτες με βάση τους οποίους έχουν προκύψει ζώνες στις οποίες εντοπίζονται συγκεκριμένα είδη πρωτονίων, ώστε να είναι πιο εύκολος ο προσδιορισμός τους.

Το δείγμα αναλύεται με δευτεριωμένους διαλύτες, διότι δεν υπάρχει παρεμπόδιση των σημάτων των πρωτονίων του δείγματος από τα πρωτόνια του διαλύτη που βρίσκεται σε σχετικά υψηλή ποσότητα. Η επεξεργασία του γίνεται μέσα σε ειδικό μακρόστενο σωληνάκι.

Όσο πιο σύγχρονο είναι το όργανο, τόσο μεγαλύτερη είναι η ευαισθησία των αποτελεσμάτων και τόσο μικρότερη ποσότητα δείγματος μπορεί να αναλυθεί.

Φασματοσκοπία Μαζών Mass Spectrometry, MS

Αποτελεί μια ιδιαίτερα ειδική τεχνική για τον προσδιορισμό ή την επιβεβαίωση της ταυτότητας μίας ουσίας ή ενός δείγματος.

Λειτουργεί με τον σχηματισμό φορτισμένων μορίων ή μοριακών θραυσμάτων, είτε σε περιοχή υψηλού κενού είτε αμέσως πριν την είσοδο του δείγματος στην περιοχή υψηλού κενού. Τα μοριακά ιόντα πρέπει να δημιουργούνται στην αέρια φάση, διαχειρίζονται με την εφαρμογή ηλεκτρικού ή μαγνητικού πεδίου για να είναι δυνατός ο προσδιορισμός του

μοριακού βάρους του ίδιου άλλα και κάθε θραύσματος που σχηματίζεται από την διάσπαση μορίων.

Ιοντισμός με πρόσκρουση ηλεκτρονίων (EI)

Χρησιμοποιεί ηλεκτρόνια υψηλής ενέργειας, που προκαλούν εκτεταμένη θραύση των δεσμών εντός του αναλύτη.

Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (ESI)

Ιοντισμός σε ατμοσφαιρική πίεση (API)

2.2 Αναλώσιμα-Αντιδραστήρια

Αναλώσιμα

Για την αναλυτική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας χρησιμοποιήθηκαν οι πλάκες κανονικής φάσης *TLC silica gel 60 F₂₅₄ 20*20cm* (Merck) και αντίστροφης φάσης *TLC silica gel 60 RP-18 F₂₅₄ 20*20cm* (Merck). Ενώ, για την παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας χρησιμοποιήθηκαν οι γυάλινες πλάκες *TLC silica gel 60 F₂₅₄ precoated Glass 20*20cm* (Merck).

Οι πλάκες παρατηρήθηκαν με την συσκευή *CAMAG TLC Visualizer* και η εμφάνιση των κηλίδων έγινε με τον ψεκασμό 10% Θεικής Βανιλίνης σε MeOH και θέρμανση.

Για την πλήρωση της στήλης κατά των χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιήθηκε *Silica gel for Chromatography ultrapure 40-60 μm, 60A* και το πορώδες της στήλης ήταν μεγέθους 3. Η άμμος για την σταθεροποίηση της στήλης ήταν *Sea sand extra pure 0.01-0.03mm Merck*.

Όλα τα δείγματα προετοιμάστηκαν με αναλώσιμα της εταιρείας Eppendorf, καθώς και οι πιπέτες προμηθεύτηκαν από την συγκεκριμένη εταιρεία.

Το οξειδωτικό αντιδραστήριο *Oxone* που χρησιμοποιήθηκε για τις ημισυνθετικές αντιδράσεις ήταν της εταιρείας Sigma-Aldrich (Merck).

Στήλες

Για την Χρωματογραφία κατ' Αντιρροής χρησιμοποιήθηκε η αναλυτική στήλη 50mL *FCPC50[®]* και η παρασκευαστική στήλη 1000mL *FCPC1000[®]* (Rousselet-Robatel Kromaton, Annonay, France) και η στήλη εκχύλισης 300mL *FCPE300[®]* (Rousselet-Robatel Kromaton, Annonay, France). Η αντλία που χρησιμοποιήθηκε ήταν *LabAlliance Preparative* (Spectra Lab Scientific Inc., Ontario, Canada) και η συλλογή των κλασμάτων έγινε με τον αυτόματο συλλέκτη *Büchi B-684* (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland).

Η παρασκευαστική στήλη που χρησιμοποιήθηκε για την prep-HPLC ήταν: *SUPERCOSIL[®] LC-18, HPLC Column 25cm, 21.2mm 5μm*. Η ανίχνευση των κορυφών έγινε με τον ανιχνευτή *FLASH 06S DAD 600* (ECOM, Praha-Czech Republic) και η συλλογή τους με τον αυτόματο συλλέκτη *Foxy[®] R2* (Teledyne Isco, Lincoln, USA).

Η αναλυτική στήλη για την ανάλυση των κλασμάτων ήταν: *Discovery HS C-18 (Supelco, Sigma Aldrich) 25cm, 4.6mm, 5μm*.

Η στήλη που έτρεξαν τα δείγματα της μάζας ήταν: *FortisR C-18 (Fortis Technologies) 100mm, 2.1 mm, 1.7 μm*.

Όργανα

NMR: Τα φάσματα λήφθηκαν σε όργανο της *Bruker Avance III-600 spectrometer (Karlsruhe, Germany)*.

LC-MS: Οι αναλύσεις *UPLC-HRMS* και *HRMS/MS analysis* λήφθηκαν σε σύστημα *AQUITY (Waters)* συνδεδεμένο με *LTQOrbitrapR* και *XL hybrid mass spectrometer (Thermo Scientific)* και εγκατεστημένη πηγή «Ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό» (*ESI*) σε αρνητική ρύθμιση.

Διαλύτες

Όλοι οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για τις εκχυλίσεις και τις κλασματώσεις ήταν συγκεκριμένου βαθμού καθαρότητας. Η αιθανόλη (EtOH) και το ακετονιτρίλιο (ACN) έχουν αγοραστεί από την εταιρεία Carlo Erba Reactifs SDS (Val de Reuil, France). Η μεθανόλη (MeOH), το διχλωρομεθάνιο (DCM) και το N,N-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) έχουν αγοραστεί από την εταιρεία from Fisher Scientific UK (Leicestershire, United-Kingdom). Το νερό παραλήφθηκε με την μέθοδο της απόσταξης.

Οι διαλύτες για αναλυτικές μεθόδους έχουν συγκεκριμένες απαιτήσεις. Γι' αυτό, MeOH και ACN κατάλληλα για HPLC gradient grade προμηθεύτηκαν από Carlo-Erba καθώς επίσης και την υψηλής καθαρότητας νερό από την MilliQ device.

Οι δευτερωμένοι διαλύτες για τις φασματοσκοπικές τεχνικές (DMSO, CD₃OH, CDCl₃) ήταν της εταιρείας Sigma-Aldrich (Merck).

Πρότυπα

Πρότυπα βανιλίνης και γεντιοπικροσίδη (98% καθαρότητας) έχουν αγοραστεί από την Sigma-Aldrich (Merck) και την Phytolab, αντίστοιχα. Ενώ, για τα πρότυπα Ολεοκανθάλης, Ολεασείνης, Ολεοκανθαλικό και Ολεασεινικό Οξύ, Μασλινικό και Ολεανολικό Οξύ, MFOA και MFLA απομονώθηκαν στο εργαστήριο μας.

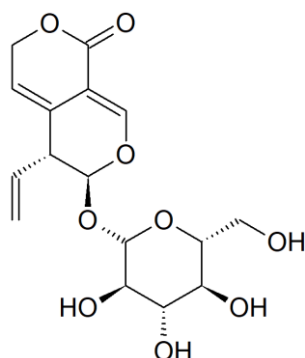
Για την διεξαγωγή των βιολογικών ελέγχων, το DDPH και το Γαλλικό Οξύ προμηθεύτηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich (Merck).

2.3 Πειραματική Επεξεργασία μεθανολικού εκχυλίσματος

ρίζας Γεντιανής

2.3.1 Εισαγωγή

Πρωταρχικός στόχος της παρακάτω πειραματικής διαδικασίας αποτελεί η γρήγορη και αποτελεσματική απομόνωση του δραστικού μεταβολίτη γεντιοπικροσίδη (Εικόνα 68) με την χρήση όσο το δυνατό πιο εξελιγμένων εργαστηριακών μεθόδων. [5]



Εικόνα 68 Δομή Γεντιοπικροσίδη.

Ο γεντιοπικροσίδης ανήκει στην κατηγορία των γλυκοζιτών ιριδοειδών και βιοσυνθετικά προέρχεται από τα μονοτερπένια. Ο σκελετός ιριδάνης που εντοπίζεται στο μόριο του έχει μονοτερπενική προέλευση και περιέχει έναν κυκλοπεντανικό δακτύλιο, ο οποίος συντήκεται με έναν εξαμελή ετεροκυκλικό οξυγονωμένο δακτύλιο. Το σύστημα αυτό προέρχεται από την γερανιόλη μέσω ενός διαφορετικού τύπου δίπλωσης αλλά και έλλειψη των φωσφορυλιωμένων ενδιάμεσων. Η φαρμακολογική του αξία είχε γίνει αντιληπτή ήδη από την αρχαιότητα και παραδοσιακές του χρήσεις αναφέρονται σε πολλές φαρμακοποιίες. Οι κύριες ενδείξεις του είναι ως πικρό τονωτικό και χολαιρετικό, κυρίως δηλαδή για δυσλειτουργίες του γαστρεντερικού συστήματος. Εκχυλίσματα πλούσια σε αυτό το συστατικό αποτελούν πρώτη ύλη για την παρασκευή πολλών φυτικών σκευασμάτων και αφεψημάτων ενώ τελευταίες μελέτες το συνδέουν με ηπατοπροστατευτική και κυτταροτοξική δράση. Όσο οι έρευνες προχωρούν, η παραλαβή του σε μεγάλο βαθμό καθαρότητας αποτελεί κρίσιμο σημείο τόσο για την υλοποίηση φαρμακολογικών μελετών, όσο και την υποστήριξη αναλυτικών και βιοφαρμακευτικών μελετών. Γι' αυτό τον λόγο γίνονται προσπάθειες εύρεσης κατάλληλων τεχνικών και μεθόδων, ώστε η απομόνωση από φυσικές πηγές να είναι αποτελεσματική και συμφέρουσα.

Για την παραλαβή του γεντιοπικροσίδη επιλέχθηκε το μεθανολικό εκχύλισμα από τις ρίζες της *Gentiana lutea*, (Gentianaceae) το οποίο είναι πλούσιο στον συγκεκριμένο μεταβολίτη. Η πορεία που εφαρμόστηκε για την παραλαβή καθαρού γεντιοπικροσίδη περιλαμβάνει την χρήση της Χρωματογραφίας κατ' Αντιρροή συνδυαστικά με την παρασκευαστική HPLC, καθώς οι δυο αυτές τεχνικές δρουν με διαφορετικό μηχανισμό και ο συνδυασμός τους στην ίδια διαχωριστική διαδικασία μπορεί να εξασφαλίσει ένα πιο αποτελεσματικό καθαρισμό του μεταβολίτη στόχου. Παράλληλα με την υλοποίηση του πρωταρχικού στόχου,

επιτεύχθηκε και μια ποιο λεπτομερής φυτοχημική ανάλυση του ολικού εκχυλίσματος από την οποία έγινε δυνατή η παραλαβή και ταυτοποίηση και των υπολοίπων κύριων μεταβολιτών του εκχυλίσματος.

2.3.2 Κλασμάτωση μεθανολικού εκχυλίσματος με Χρωματογραφία κατ' Αντιρροή

2.3.2.1 Επιλογή Διφασικού Συστήματος

Το πρώτο στάδιο της ανάλυσης του μεθανολικού εκχυλίσματος με Χρωματογραφία κατ' Αντιρροή είναι η εύρεση του κατάλληλου διφασικού συστήματος για την επίτευξη ενός αποτελεσματικού διαχωρισμού. Βάση βιβλιογραφικών αναφορών και προγενέστερης εμπειρίας του εργαστηρίου επιλέχθηκε το σύστημα διαλυτών $H_2O:EtOH:EtOAc$ (7,5:3:5 v/v/v) και ελέγχθηκε ως προς την ικανότητα διάλυσης του δείγματος, τον γρήγορο διαχωρισμό των φάσεων καθώς και την κατανομή των συστατικών στις δυο φάσεις του συστήματος. Σε δοκιμαστικό σωλήνα προζυγίστηκαν 10mg ξηρού εκχυλίσματος και αναμείχθηκαν με τους διαλύτες στην αναλογία του συστήματος μέχρι τελικού όγκου 4mL. Στην συνέχεια, ο δοκιμαστικός σωλήνας ανακινήθηκε σε συσκευή Vortex, το μείγμα αφέθηκε σε ηρεμία και καταγράφηκε η διαλυτική ικανότητα του συστήματος, ο χρόνος διαχωρισμού και η αναλογία των δυο φάσεων. [31]

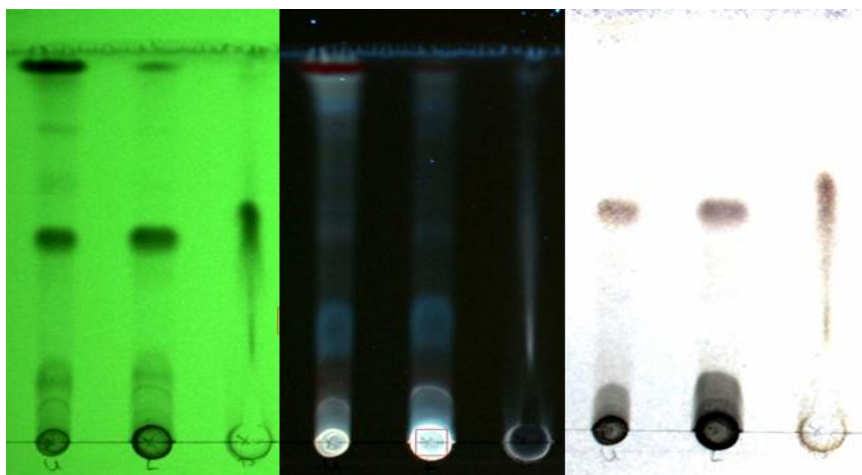
Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 17) φαίνονται τα αποτελέσματα της δοκιμής του διφασικού συστήματος:

Πίνακας 17 Αποτελέσματα δοκιμής διφασικού συστήματος.

Διάλυση Εκχυλίσματος	Χρόνος διαχωρισμού	Αναλογία φάσεων
Καλή	<30sec	40:60 (u:l)

Στην συνέχεια, αφού διαχωρίστηκαν οι δυο φάσεις, το σύστημα ελέγχθηκε τόσο με Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (TLC) όσο και με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC), ώστε να μελετηθούν οι συντελεστές κατανομής των ουσιών, αλλά και ο συντελεστής διαχωριστικότητας.

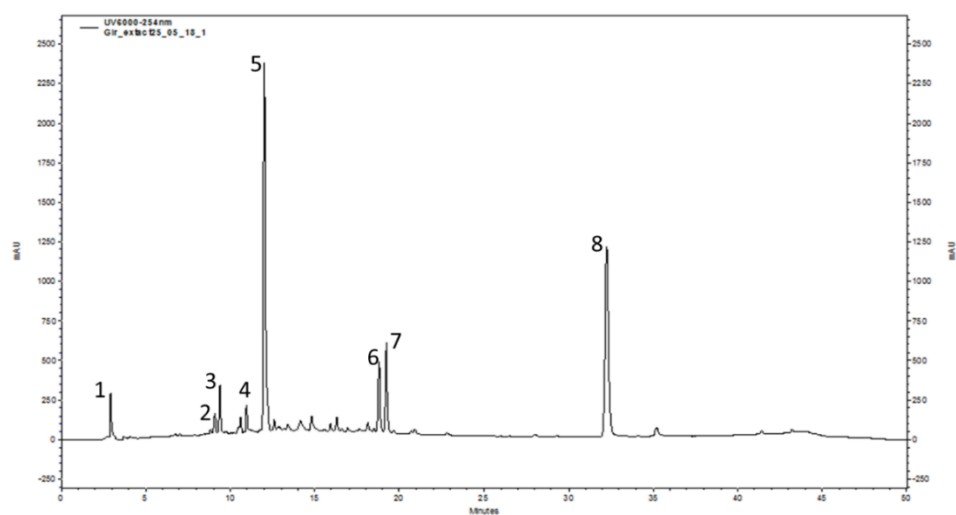
Από το χρωματογράφημα TLC (Εικόνα 69) φαίνεται πως ο μεταβολίτης γεντιοπικροσίδης κατανέμεται και στις 2 φάσεις του συστήματος και ότι είναι αρκετά διαχωρισμένος από τα υπόλοιπα συστατικά του εκχυλίσματος. Επίσης, και τα υπόλοιπα συστατικά του εκχυλίσματος είναι εξίσου καλά διαχωρισμένα με ικανοποιητική κατανομή.



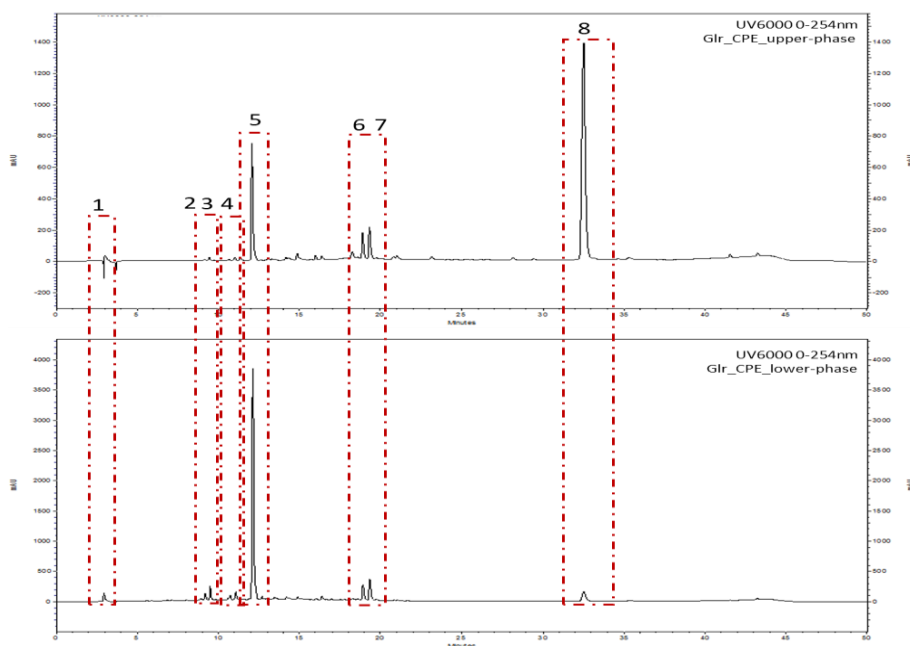
Εικόνα 69 Χρωματογραφήματα για έλεγχο του διφασικού συστήματος σε 254nm, 366nm και στο ορατό.

Τα δείγματα για την ανάλυση με HPLC προετοιμάστηκαν ως εξής: 200μL από την κάθε φάση, εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού και διαλύθηκαν ξανά σε 1mL διαλύτη MeOH (HPLC grade), ενώ παράλληλα προετοιμάστηκε και δείγμα του αρχικού εκχυλίσματος με διάλυση 5 mg σε αντίστοιχη ποσότητα διαλύτη.

Στην Εικόνα χ εμφανίζεται το χρωματογράφημα του μεθανολικού εκχυλίσματος, όπου έχουν επισημανθεί οι κορυφές για τις οποίες υπολογίστηκε ο συντελεστής κατανομής, ενώ στην εικόνα χ φαίνονται τα χρωματογραφήματα της πάνω και κάτω φάσης με βάση τα οποία έγινε ο υπολογισμός των συντελεστών κατανομής των επισημασμένων ουσιών. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο μεταβολίτης γεντιοπικροσίδης αντιστοιχεί στην κορυφή 5 του χρωματογραφήματος: (Εικόνα 70)



Εικόνα 70 Χρωματογράφημα ολικού εκχυλίσματος *Gentiana lutea*.



Εικόνα 71 Χρωματογραφήματα πάνω και κάτω φάσης για τον υπολογισμό του συντελεστή κατανομής K.

Ο υπολογισμός του συντελεστή κατανομής της κάθε ουσίας γίνεται με βάση τον τύπο: $K = C_{x,sp} / C_{x,mr}$ όπου, $C_{x,sp}$ = η συγκέντρωση της ουσίας X στο στατική φάση (stationary phase) και $C_{x,mr}$ = η συγκέντρωση της ίδιας ουσίας στην κινητή φάση (mobile phase) όπου ισοδυναμεί με τον τύπο $K = E_{x,sp} / E_{x,mr}$ (E = εμβαδόν της κορυφής της ουσίας X στο χρωματογράφημα) στην περίπτωση που ο υπολογισμός των συντελεστών κατανομής πραγματοποιείται με χρωματογραφικές μεθόδους (Συντελεστής Κατανομής). Λόγο της πολικής φύσεως του προς ανάλυση εκχυλίσματος (μεθανολικό εκχύλισμα) ως στατική φάση θα χρησιμοποιηθεί η πολική (κάτω) φάση του διφασικού συστήματος και ως εκ τούτου για τον υπολογισμό των K χρησιμοποιήθηκε ο τύπος $K = E_{x,lr} / E_{x,ur}$ όπου, $E_{x,lr}$ = εμβαδόν της κορυφής της ουσίας X στο χρωματογράφημα της κάτω φάσης (lower phase) του διφασικού συστήματος και $E_{x,ur}$ = εμβαδόν της κορυφής της ίδιας ουσίας στο χρωματογράφημα της πάνω φάσης (upper phase). Τα αποτελέσματα της μελέτης παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 18 Συντελεστές Κατανομής K και Διαχωριστότητας α των προς μελέτη ουσιών στο διφασικό σύστημα H₂O:EtOH:EtOAc (7,5:3:5 v/v/v)).

Παράλληλα υπολογίστηκε και ο συντελεστής διαχωριστότητας α της κάθε ουσίας με βάση τον οποίο εκτιμάται η ικανότητα διαχωρισμού της μίας ουσίας από τις υπόλοιπες (ικανοποιητικός διαχωρισμός για $\alpha > 1.5$) (Συντελεστής Κατανομής) Ο τύπος υπολογισμού του α είναι: $\alpha = K_x / K_y$ όπου K_x : συντελεστής κατανομής της ουσίας X και K_y ο πλησιέστερος συντελεστής κατανομής ως προς την ουσία X. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής παρουσιάζονται επίσης στον Πίνακας 18 Συντελεστές Κατανομής K και Διαχωριστότητας α των προς μελέτη ουσιών στο διφασικό σύστημα H₂O:EtOH:EtOAc (7,5:3:5 v/v/v):

Πίνακας 18 Συντελεστές Κατανομής K και Διαχωριστότητας α των προς μελέτη ουσιών στο διφασικό σύστημα H₂O:EtOH:EtOAc (7,5:3:5 v/v/v)

Δευτερογενής μεταβολίτης	Συντελεστής κατανομής, k	Συντελεστής διαχωριστότητας, α
1	11.2	$\alpha_{1,2}=1.14, \alpha_{1,3}=1.04$
2	12.8	$\alpha_{1,2}=1.14$
3	10.8	$\alpha_{1,3}=1.04$

4	16.4	$\alpha_{2,4}=1.28$
5	5.06	$\alpha_{3,5}=2.1$ $\alpha_{5,7}=2.95$
6	1.55	$\alpha_{6,7}=1.11$
7	1.71	$\alpha_{6,7}=1.11$
8	0.11	$\alpha_{6,8}=14.1$

Με βάση τα αποτελέσματα της παραπάνω μελέτης συμπεραίνουμε ότι ο μεταβολίτης γεντιοπικροσίδης μπορεί να διαχωριστεί σε ικανοποιητικό βαθμό με τη χρήση του διφασικού συστήματος H₂O:EtOH:EtOAc (7,5:3:5 v/v/v).

2.3.2.2 Εκτέλεση Διαχωρισμού

2.3.2.2.1 Centrifugal Partition Chromatography (CPC)

Αρχικά η ανάλυση πραγματοποιήθηκε στο μηχάνημα FCPC200[®] και σε ημι-παρασκευαστική στήλη των 200 mL. Η ποσότητα του ξηρού εκχυλίσματος που αναλύθηκε ήταν 200mg, η οποία διαλύθηκε σε 5mL συστήματος (3mL κάτω φάση- 2mL πάνω φάση). Αρχικά, η στήλη πληρώθηκε με την στατική φάση (κάτω φάση) σε ascending mode, περιστροφή 200rpm με ροή 8mL/min. Στη συνέχεια, διαβιβάστηκε η κινητή φάση (ascending mode, 1500rpm και ροή 3,5mL/min) και έγινε εξισορρόπηση του διφασικού συστήματος μέσα στη στήλη (Sf=75%). Ακολούθησε η εισαγωγή του δείγματος και η συλλογή των κλασμάτων όγκου 5mL με τη βοήθεια αυτόματου συλλέκτη. Από την στήλη περάσαν 185ml κινητής φάσης και συλλέχθηκαν τα πρώτα 37 κλάσματα (στάδιο έκλουσης), στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε εξώθηση του περιεχομένου της στήλης χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση την πολική-κάτω φάση του διφασικού συστήματος. Κατά το στάδιο της εξώθησης συλλέχθηκαν 13 επιπλέον κλάσματα. Ο διαχωρισμός διήρκησε 110min και συλλέχθηκαν συνολικά 50 κλάσματα. Τέλος, η στήλη καθαρίστηκε και πληρώθηκε με το σύστημα αποθήκευσης MeOH:H₂O (50:50).

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε φαίνεται συνοπτικά στον παρακάτω Πίνακας 19 Συνθήκες πειραματικής διαδικασίας CPC.:

Πίνακας 19 Συνθήκες πειραματικής διαδικασίας CPC.

Κλάσματα	Στατική φάση	Κινητή φάση	Ρυθμίσεις στήλης			Όγκος κλάσματος
-	Κάτω	-	descending	200rpm	8mL/min	-
-	Κάτω	Άνω	ascending	1500rpm	3,5mL/min	-
1-37	Κάτω	Άνω	ascending	1500rpm	3,5mL/min	5mL
38-50	Άνω	Κάτω	descending	1500rpm	3,5mL/min	5mL

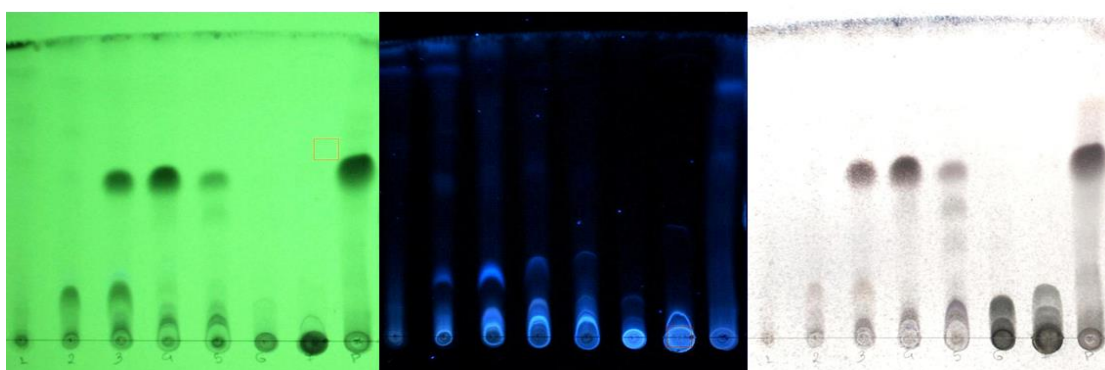
Ο έλεγχος της πορείας του διαχωρισμού αλλά και η περιεκτικότητα των κλασμάτων σε συστατικά πραγματοποιήθηκε με TLC. Με βάση τα χρωματογραφήματα αυτά έγιναν οι συνενώσεις των κλασμάτων από όπου προέκυψαν τελικά 8 κλάσματα τα βάρη των οποίων φαίνονται στον παρακάτω Πίνακας 20 Κλάσματα και Βάρη.:

Πίνακας 20 Κλάσματα και Βάρη.

Fraction	Βάρος (mg)	Fraction	Βάρος (mg)
----------	------------	----------	------------

Fr_1	19.9	Fr_5	44.9
Fr_2	15.8	Fr_6	14.8
Fr_3	37.3	Fr_7	12.2
Fr_4	23.5	Fr_8	30.6

Έτσι, μετά την εκτέλεση του συγκεκριμένου διαχωρισμού και τις συνενώσεις των όμοιων κλασμάτων, αναπτύχθηκε το χρωματογράφημα TLC (Εικόνα 72) σε σύστημα διαλυτών DCM:MeOH (85:15).



Εικόνα 72 Χρωματογραφήματα συνενωμένων κλασμάτων CPC στα 254nm, 366nm και στο ορατό.

Η μελέτη του χρωματογραφήματος TLC των συνενωμένων κλασμάτων έδειξε ότι ο γεντιοπικροσίδης παραλήφθηκε στα κλάσματα 3, 4 και 5 με το κλάσμα 4 να τον περιέχει στην πιο καθαρή του μορφή.

2.3.2.2.2 Centrifugal Partition Extraction (CPE)

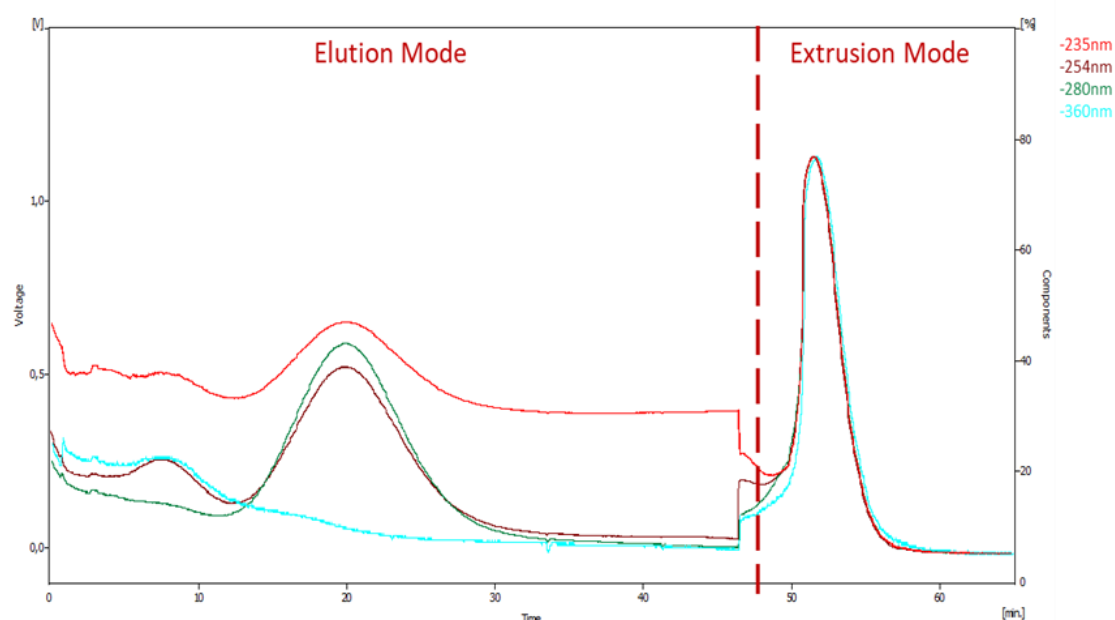
Σε μια προσπάθεια για μείωση του χρόνου της διαδικασίας και γρήγορη και αποτελεσματική παραλαβή των εμπλουτισμένων κλασμάτων του εκχυλίσματος για περαιτέρω ανάλυση τους πραγματοποιήθηκε ο διαχωρισμός στο μηχάνημα FCPE300® με τη χρήση στήλη όγκου 300mL. Η διαδικασία προσαρμόστηκε στο πρωτόκολλο της αναλυτικής κλασμάτωσης. Αρχικά, παρασκευάστηκαν 4L του αρχικού διφασικού συστήματος και ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε η πολική-κάτω φάση του διφασικού συστήματος, ενώ ως κινητή η άπολη-άνω φάση. Η ποσότητα του ξηρού εκχυλίσματος που αναλύθηκε ήταν 6.26g, η οποία διαλύθηκε σε 10mL διφασικού συστήματος. Αρχικά, η στήλη πληρώθηκε με στατική φάση σε ascending mode, περιστροφή 800rpm και ροή διαλυτών 30mL/min. Στη συνέχεια, διαβιβάστηκε η κινητή φάση (ascending mode, 850rpm και με ροή 20mL/min) και έγινε εξισορρόπηση του διφασικού συστήματος μέσα στη στήλη (Sf=80%). Η μείωση των στροφών σε σχέση με την αναλυτική τεχνική οφείλεται στην αύξηση της πίεσης κατά την εκτέλεση του διαχωρισμού. Ακολούθησε η εισαγωγή του δείγματος, όπου η ροή διατηρήθηκε σταθερή και έγινε συλλογή των κλασμάτων όγκου 20mL με τη βοήθεια αυτόματου συλλέκτη. Από την στήλη περάσαν 900mL κινητής και συλλέχθηκαν τα πρώτα 45 κλάσματα (στάδιο έκλουσης), στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε εξώθηση του περιεχομένου της στήλης χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση την πολική-κάτω φάση του διφασικού συστήματος. Κατά το στάδιο της εξώθησης συλλέχθηκαν 22 επιπλέον κλάσματα. Ο διαχωρισμός διήρκεσε 120min και συλλέχθηκαν συνολικά 68 κλάσματα. Τέλος, η στήλη καθαρίστηκε και πληρώθηκε με το

σύστημα αποθήκευσης MeOH:H₂O (50:50). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε φαίνεται συνοπτικά στον Πίνακας 21

Πίνακας 21 Συνθήκες πειραματικής διαδικασίας CPE.

Κλάσματα	Στατική φάση	Κινητή φάση	Ρυθμίσεις στήλης			Όγκος κλασμάτων
-	Κάτω	-	ascending	800rpm	20mL/min	-
-	Κάτω	Άνω	ascending	850rpm	20mL/min	-
1-45	Κάτω	Άνω	ascending	850rpm	20mL/min	20mL
46-64	Άνω	Κάτω	ascending	850rpm	20mL/min	20mL

Καθ' όλη την διάρκεια του διαχωρισμού, η διαδικασία παρακολουθούταν από ανιχνευτή UV σε επιλεγμένα μήκη κύματος: 235nm, 254nm, 280nm και 360nm και το χρωματογράφημα που παραλήφθηκε φαίνεται στην Εικόνα 73.



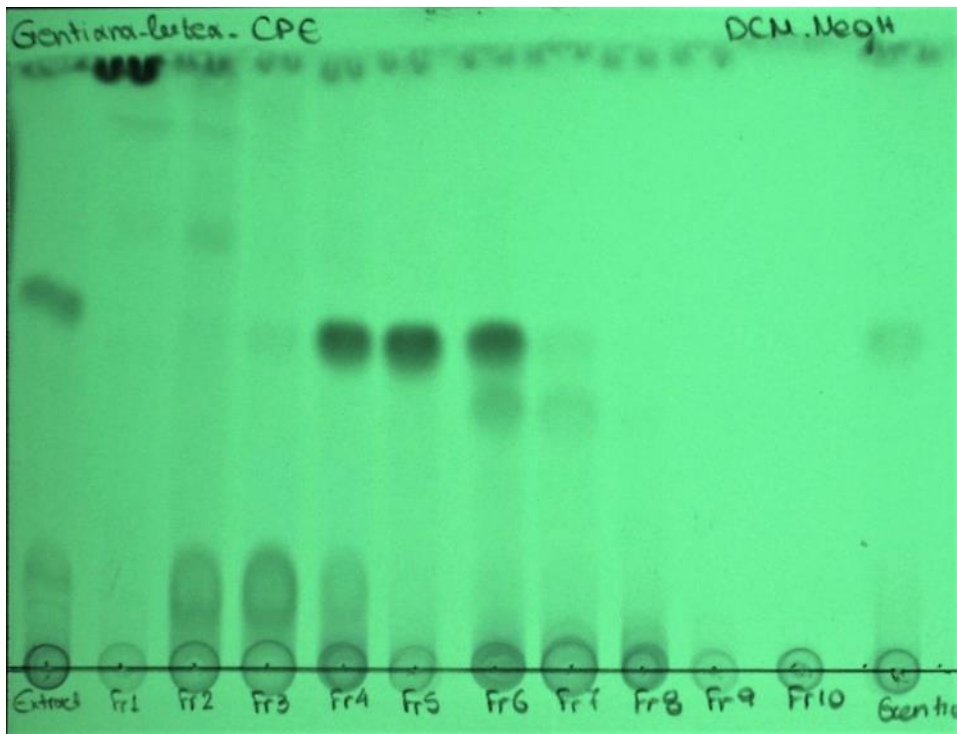
Εικόνα 73 Χρωματογράφημα κατά την εκτέλεση CPE.

Ο έλεγχος της πορείας του διαχωρισμού αλλά και η περιεκτικότητα των κλασμάτων σε συστατικά πραγματοποιήθηκε με TLC. Με βάση τα χρωματογραφήματα αυτά έγιναν οι συνενώσεις των κλασμάτων από όπου προέκυψαν συνολικά 10 κλάσματα, τα βάρη των οποίων φαίνονται στον παρακάτω Πίνακας 22:

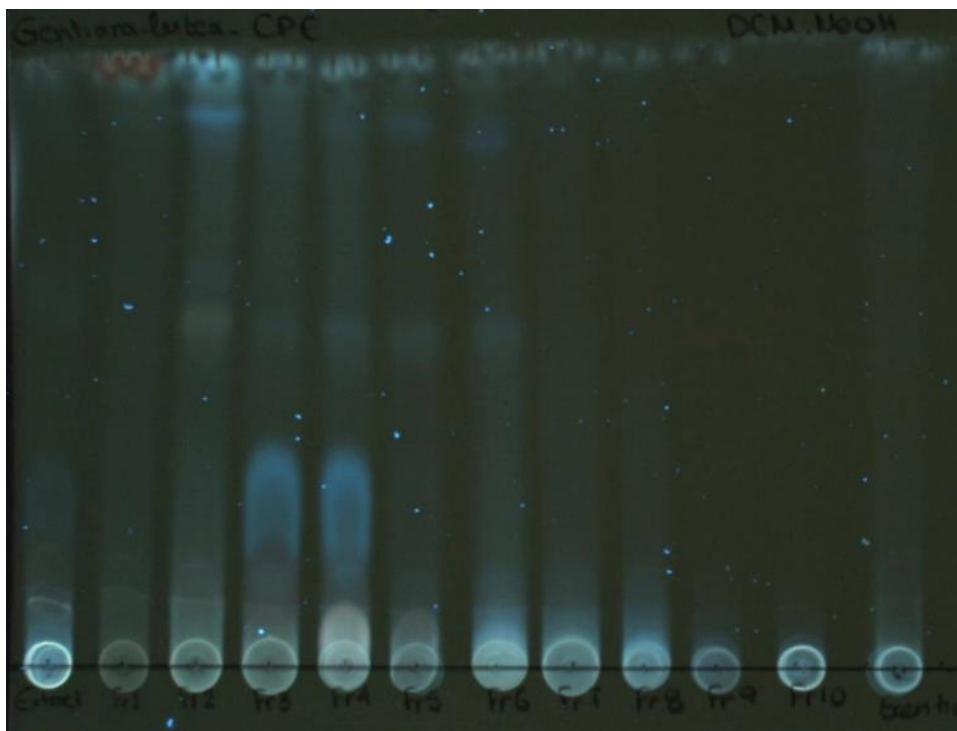
Πίνακας 22 Κλάσματα και Βάρη.

Fraction	Βάρος (mg)	Fraction	Βάρος (mg)
Fr_1	121.5	Fr_6	78.1
Fr_2	125.1	Fr_7	131.7
Fr_3	82.6	Fr_8	151.2
Fr_4	61.3	Fr_9	1140.9
Fr_5	396.8	Fr_10	2975.9

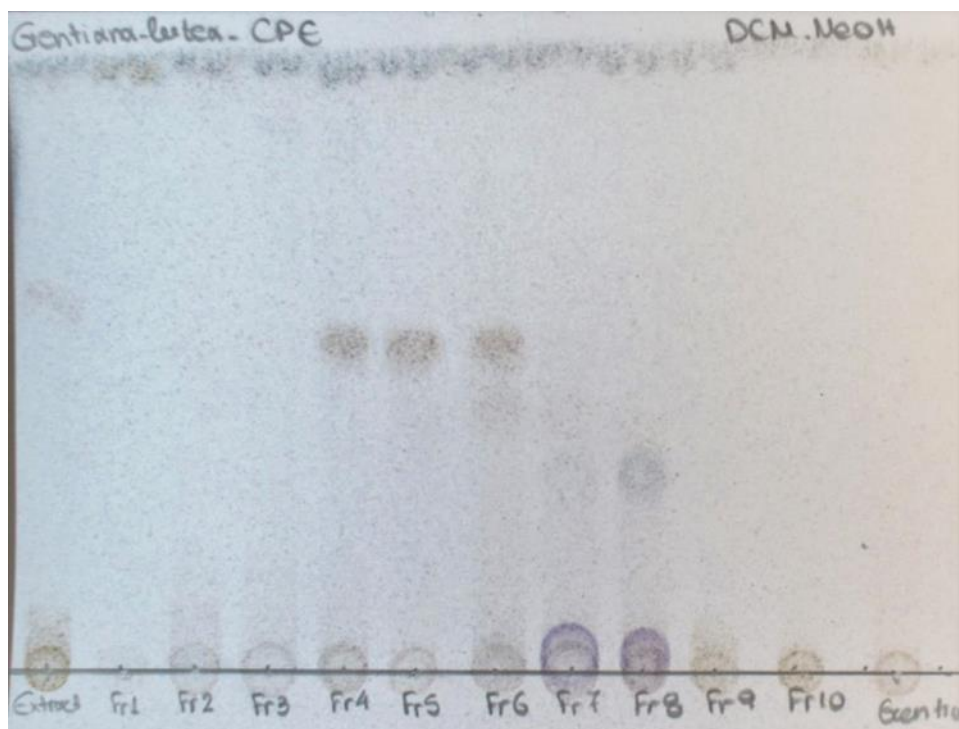
Τα συνενωμένα κλάσματα αναλύθηκαν εκ νέου με TLC και τα χρωματογραφήματα που λήφθηκαν παρουσιάζουν τις παρακάτω Εικόνα 74, Εικόνα 75 και Εικόνα 76:



Εικόνα 74 Χρωματογράφημα συνενωμένων κλασμάτων στα 254nm.



Εικόνα 75 Χρωματογράφημα συνενωμένων κλασμάτων στα 366nm.



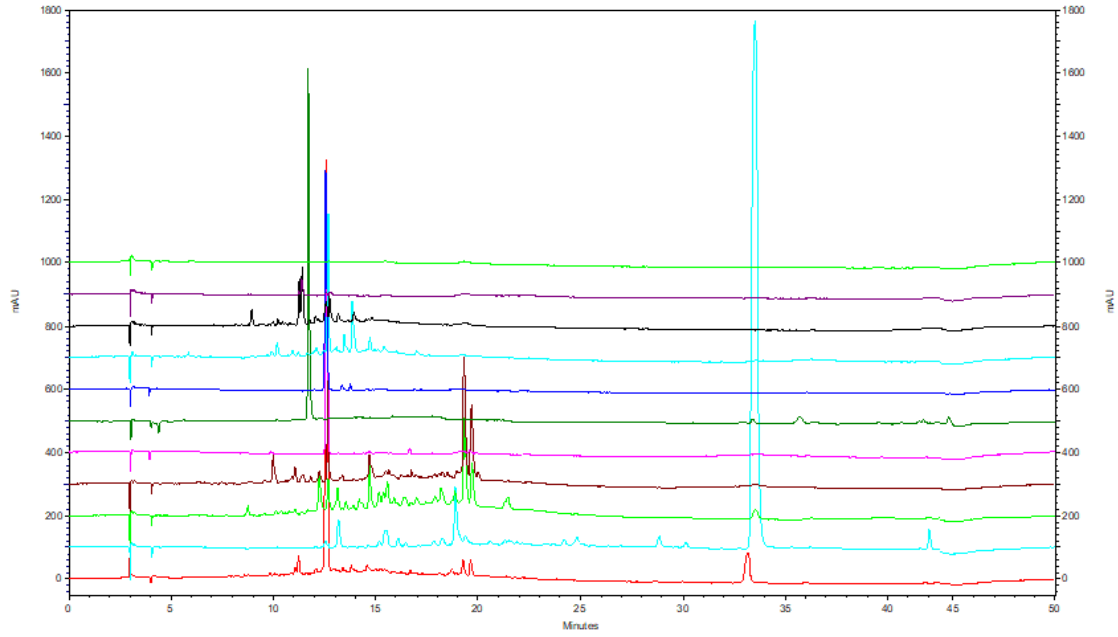
Εικόνα 76 Χρωματογράφημα συνενωμένων κλασμάτων στο ορατό.

Τα συνενωμένα κλάσματα που προέκυψαν από την κλασμάτωση με CPE αναλύθηκαν επίσης με HPLC, ώστε να γίνει δυνατή μια πιο λεπτομερή μελέτη του χημικού τους περιεχομένου. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν διάρκειας 50min και παρουσιάζεται στον Πίνακα 23. Τα δείγματα διαλύθηκαν σε 1 mL MeOH και η συγκέντρωσή τους ήταν 1.5mg/mL. (Inject volume=10μL.)

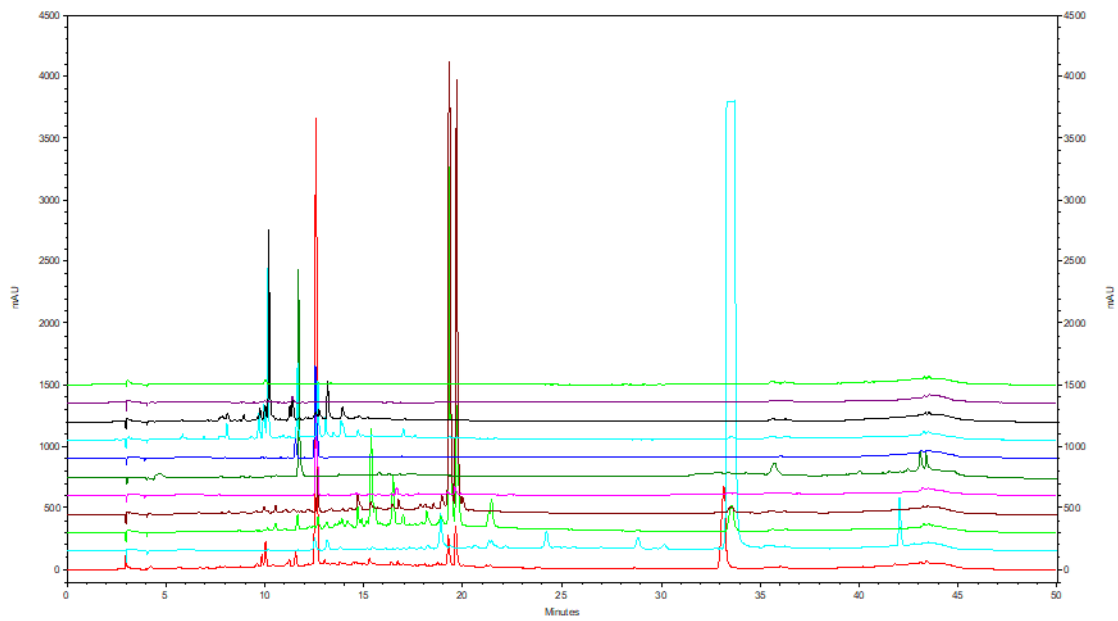
Πίνακας 23 Μέθοδος Ανάλυσης Κλασμάτων σε HPLC.

Time (min)	Solvent A: H ₂ O+ 2%A.A. (%)	Solvent B: AcN+ 5%MeOH + 1%A.A. (%)	Flow (ml/min)
Initial	100	0	10
10	95	5	10
15	95	5	10
20	85	15	10
25	50	50	10
30	5	95	10
35	100	0	10

Τα χρωματογραφήματα που λήφθηκαν από την ανάλυση των κλασμάτων φαίνονται στις Εικόνα 77 και Εικόνα 78 και η επεξήγηση των χρωμάτων ακολουθεί στον Πίνακα 24 Επεξήγηση χρωμάτων στα Χρωματογραφήματα.:



Εικόνα 77 Χρωματογράφημα Κλασμάτων CPE στα 280nm.



Εικόνα 78 Χρωματογράφημα Κλασμάτων CPE στα 254nm.

Πίνακας 24 Επεξήγηση χρωμάτων στα Χρωματογραφήματα.

Trace	Color of Line	Trace	Color of Line
Μεθανολικό Εκχύλισμα	red	Fr 6	blue
Fr 1	aqua	Fr 7	aqua
Fr 2	lime	Fr 8	black
Fr 3	brown	Fr 9	mulberry
Fr 4	purple	Fr 10	lime

Με βάση την παραπάνω ανάλυση των συνενωμένων κλασμάτων συμπερένουμε ότι ο γεντιοπικροσίδης παραλήφθηκε στα κλάσματα 4, 5 και 6 και αντιστοιχεί στην κύρια κορυφή που εμφανίζεται στα 20 min στο χρωματογράφημα UV της κλασμάτωσης CPE (Εικόνα χ). Τα κλάσματα αυτά επεξεργάστηκαν περαιτέρω προκειμένου να παραλάβουμε τον μεταβολίτη γεντιοπικροσίδα σε υψηλή καθαρότητα

2.3.3 Καθαρισμός Γεντιοπικροσίδης από εμπλουτισμένα κλάσματα

μέσω της παρασκευαστικής HPLC

2.3.3.1 Επιλογή Κατάλληλης Μεθόδου

[10]

Αρχικά πραγματοποιήθηκε μελέτη εύρεσης της κατάλληλης μεθόδου για την ανάλυση των εμπλουτισμένων κλασμάτων και την παραλαβή υψηλής καθαρότητας του μεταβολίτη στόχου. Για όλες τις δοκιμές, προετοιμάστηκαν δείγμα των περίπου 60mg από τα εμπλουτισμένα κλάσματα Fr_4, Fr_5 και Fr_6 διαλυμένα σε 1ml H₂O:AcN (50:50 v/v).

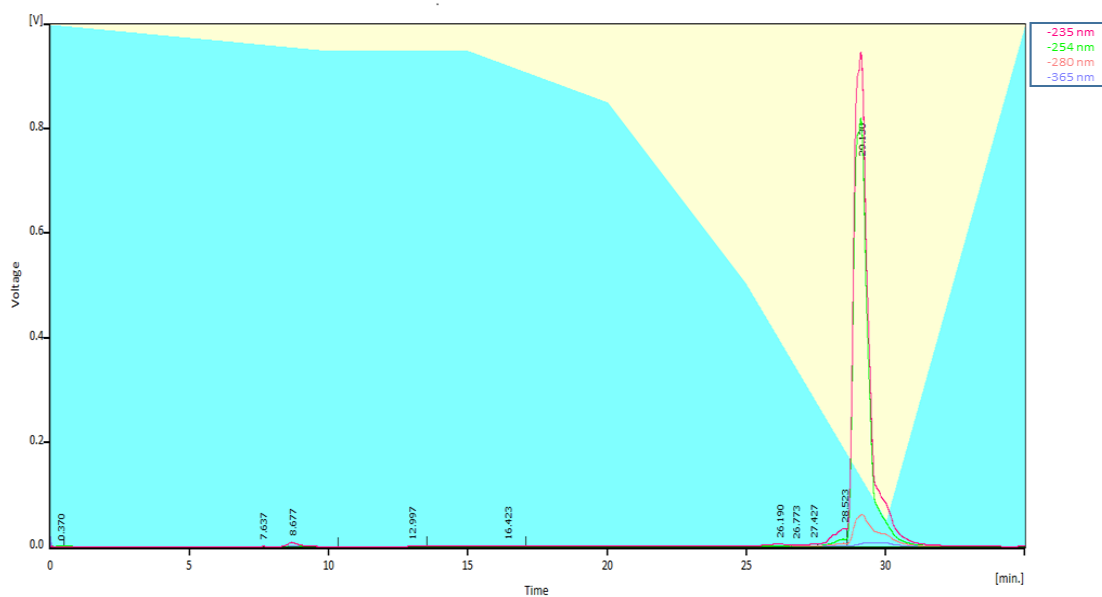
1^η Δοκιμή Μεθόδου

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε φαίνεται στον παρακάτω Πίνακα 25:

Πίνακας 25 1^η Μέθοδος Ανάλυσης.

Time (min)	Solvent A: H ₂ O (%)	Solvent B: AcN (%)	Flow (ml/min)
Initial	100	0	10
10	95	5	10
15	95	5	10
20	85	15	10
25	50	50	10
30	5	95	10
35	100	0	10

Η συλλογή των κλασμάτων έγινε με παρακολούθηση των χρωματογραφημάτων σε μήκη κύματος 235nm, 254nm, 280nm και 365nm. Από το χρωματογράφημα (Εικόνα 79) που λήφθηκε έγινε αντιληπτό πως η μέθοδος δεν είναι κατάλληλη αφού δεν επιτεύχθηκε διαχωρισμός των μεταβολιτών του κλάσματος και όλοι οι μεταβολίτες έχουν πολύ μεγάλο χρόνο έκλουσης.



Εικόνα 79 Χρωματογράφημα 1ης Μεθόδου Ανάλυσης.

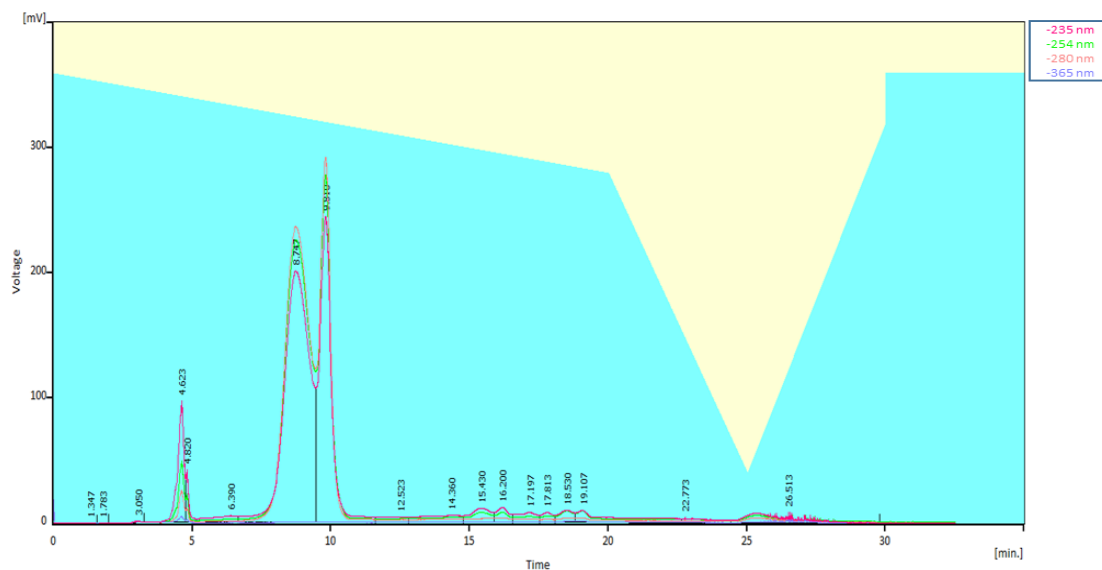
2^η Δοκιμή Μεθόδου

Η διαδικασία επαναλήφθηκε με τροποποίηση την πολικότητας της αρχικής μεθόδου, η οποία φαίνεται στον παρακάτω Πίνακας 26 2η Μέθοδος Ανάλυσης.

Πίνακας 26 2η Μέθοδος Ανάλυσης.

Time (min)	Solvent A: H ₂ O (%)	Solvent B: AcN (%)	Flow (ml/min)
Initial	90	10	15
20	70	30	15
25	10	90	15
30	90	10	15

Το χρωματογράφημα της 2^{ης} μεθόδου (Εικόνα 80) έδειξε ότι η μέθοδος αυτή είναι κατάλληλη αφού επιτεύχθηκε διαχωρισμός των μεταβολιτών του κλάσματος. Κρίθηκε αναγκαία η βελτιστοποίηση των παραμέτρων, ώστε να γίνει εφικτή η μείωση της διάρκειας την μεθόδου, αφού ο στόχος είναι η γρήγορη και αποτελεσματική απομόνωση και παραλαβή του δραστικού μεταβολίτη γεντιοπικροσίδη.



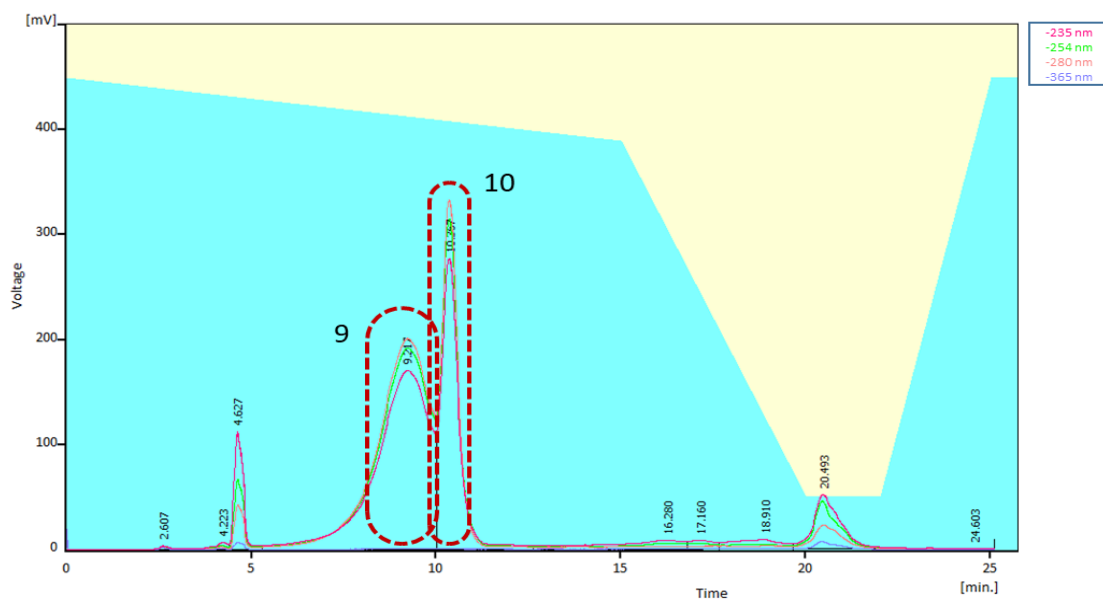
Εικόνα 80 Χρωματογράφημα 2ης Μεθόδου Ανάλυσης.

Για την βελτιστοποίηση της μεθόδου μεταβλήθηκε ο χρόνος και η αναλογία έκλουσης των διαλυτών και η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε φαίνεται στον παρακάτω Πίνακας 27:

Πίνακας 27 3η Μέθοδος Ανάλυσης.

Time (min)	Solvent A: H ₂ O (%)	Solvent B: AcN (%)	Flow (ml/min)
Initial	90	10	15
15	78	22	15
20	10	90	15
22	10	90	15
25	90	10	15

Από το χρωματογράφημα (Εικόνα 81 Χρωματογράφημα 3ης Μεθόδου Ανάλυσης.) που παραλάβαμε μετά τις τροποποιήσεις της 2^{ης} μεθόδου έγινε αντιληπτό πως η νέα μέθοδος (3^η μέθοδος) είναι κατάλληλη αφού επιτεύχθηκε διαχωρισμός του κύριου μεταβολίτη του κλάσματος σε μικρότερο χρόνο και χωρίς να επηρεαστεί η έκλουση των μεταβολιτών.



Εικόνα 81 Χρωματογράφημα 3ης Μεθόδου Ανάλυσης.

Οι δύο κορυφές που εμφανίζονται στα 9,21 min και 10,31 min, συλλέχτηκαν χωριστά και αναλύθηκαν τόσο με HPLC όσο και με φασματοσκοπία NMR προκειμένου να διαπιστωθεί αν πρόκειται για την ίδια ουσία ή για δύο διαφορετικά ισομερή του γεντιοπικροσίδη. Η μελέτη αυτή έδειξε ότι και τα δύο κλάσματα αποτελούν τον ίδιο μεταβολίτη, καθώς έχουν τον ίδιο χρόνο έκλουσης στο χρωματογράφημα HPLC αλλά και ταυτόσημα φάσματα πρωτονίου NMR. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται συχνά στα σεκοΐριδοειδή και πιθανόν να οφείλεται στις ενολικές μορφές που λαμβάνουν τα μόρια αυτά όταν έρχονται σε επαφή με διαλύτες όπως το νερό και οι διάφορες αλκοόλες (αναφορά...).

2.3.3.2 Ανάλυση του απομονωμένου μεταβολίτη και Έλεγχος καθαρότητας

Η ανάλυση και ο έλεγχος καθαρότητας της απομονωμένης ουσίας πραγματοποιήθηκε με τρεις τεχνικές: με HPLC, με NMR και με UHPLC-HRMS

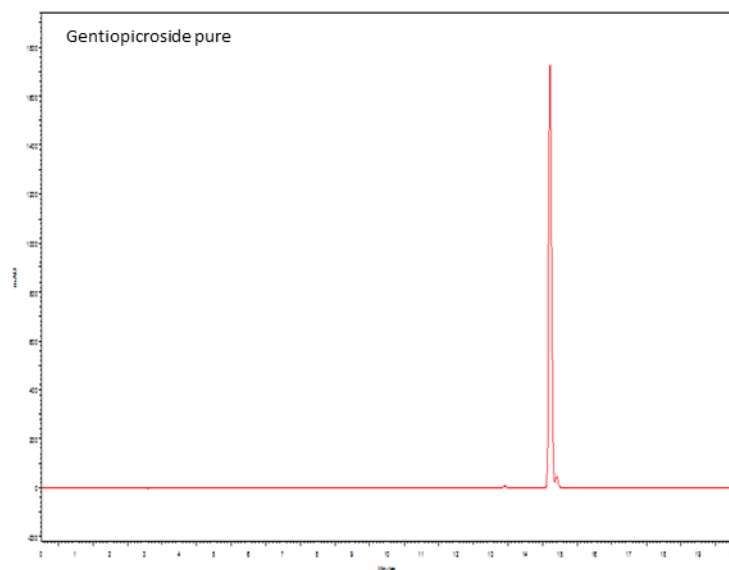
Ανάλυση HPLC

Για την ανάλυση με HPLC εφαρμόστηκε η μέθοδος που φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 28).

Πίνακας 28 Μέθοδος ανάλυσης HPLC Γεντιοπικροσίδη.

Time (min)	Solvent A: H ₂ O +0.2% A.A. (%)	Solvent B: AcN (%)	Flow (ml/min)
Initial	98	2	1
50	2	98	1
53	98	2	1
60	98	2	1

Το δείγμα του απομονωμένου μεταβολίτη (1mg) διαλύθηκε σε 1mL MeOH και ο όγκος της ένεσης ήταν 10μL. Από τα χρωματογραφήματα που λήφθηκαν, είναι εύκολα αντιληπτό το μεγάλο ποσοστό καθαρότητας. (Εικόνα 82)

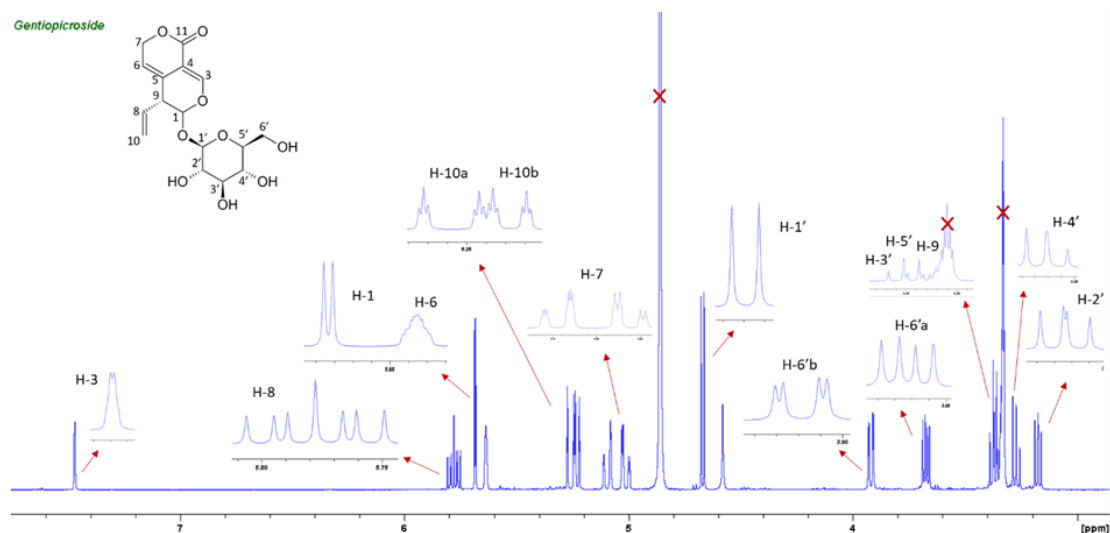


Εικόνα 82 Χρωματογραφήματα καθαρού Γεντιοπικροσίδη στα 280nm.

Ανάλυση NMR

Από την σύγκριση των πειραματικών δεδομένων με αυτά που υπάρχουν στην βιβλιογραφία [9] παρατηρήθηκαν ομοιότητες. Αρχικά από το ¹H φάσμα (Εικόνα 83), εντοπίστηκαν οι χαρακτηριστικές κορυφές που αντιστοιχούν σε γλυκοσίδη ιριδοειδούς. Οι διπλές κορυφές των H-1 και H-3 εντοπίζονται στα 5.68ppm (J=2.91Hz) και 7.46ppm (J=1.21Hz), αντίστοιχα, καθώς επίσης και η χαρακτηριστική κορυφή του H-8 με την μορφή διπλής διπλής διπλής στα 5.77ppm (J=17.14/10.33/6.86Hz). Επίσης, παρατηρούνται οι πολλαπλές κορυφές των

πρωτονίων H-6, H-7 και H-9, αλλά και οι διπλές τριπλές των H-10α και H-10β στα 5.27ppm ($J=17.14\text{Hz}$) και 5.22ppm ($J=10.33/1.46\text{Hz}$). Επίσης, όσο αφορά τα πρωτόνια της γλυκόζης, εύκολα γίνεται αντιληπτό το ανωμερικό πρωτόνιο της θέσης 1' που εμφανίζεται ως μία διπλή κορυφή στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος στα 4.79ppm ($J=7.91\text{Hz}$), καθώς και οι χαρακτηριστικές διπλές διπλές κορυφές των πρωτονίων στην θέση 6, αλλά και οι υπόλοιπες στην περιοχή 3.90 ως 3.17 ppm.



Εικόνα 83 Φάσμα ^1H Γεντιοπικροσίδη.

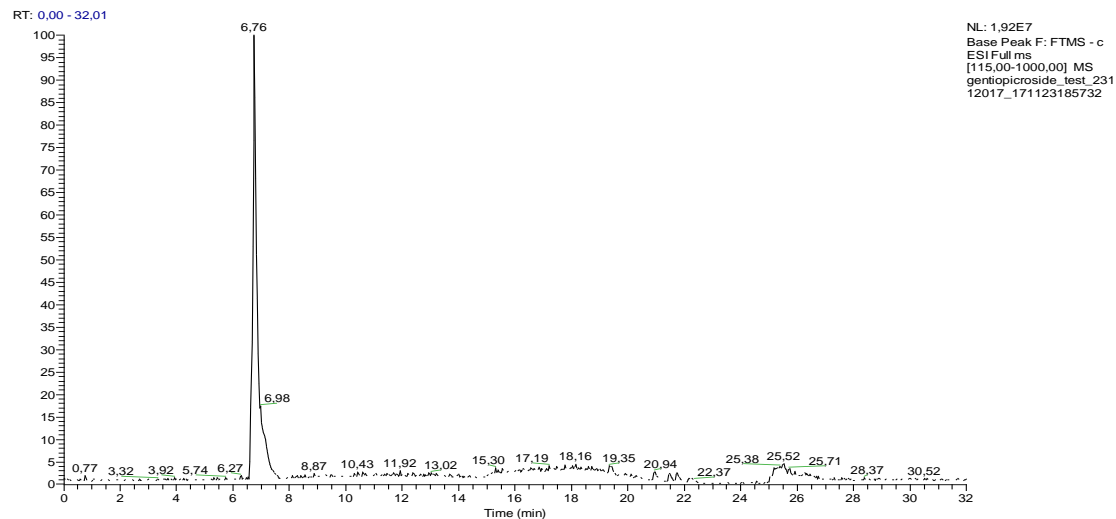
Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα ^1H -NMR και ^{13}C -NMR του μεταβολίτη δίνονται στον παρακάτω Πίνακα 29:

Πίνακας 29 Φασματοσκοπικά δεδομένα Γεντιοπικροσίδη.

Γεντιοπικροσίδη		
H/C	^1H (ppm, m, J σε Hz)	^{13}C (ppm)
1	5.68, d, 2.91	98.67
2	-	-
3	7.46, d, 1.21	150.72
4	-	105.02
5	-	127.18
6	5.63, m	117.26
7	5.09, 5.01, m (2H)	70.94
8	5.77, ddd, 17.14/10.33/6.86	135.08
9	3.31, m,	46.62
10a	5.27, dt, 17.14/1.46 (trans)	118.50
10b	5.22, dt, 10.33/1.46 (cis)	
11	-	166.37
1'	4.66, d, 7.91	74.66
2'	3.17, dd, 8.04/9.09	78.21
3'	3.37, t, 9.17	78.53
4'	3.27, t, 9.17	71.56
5'	3.35, t, 9.17	78.01
6α'	3.67, dd, 11.92/6.30	62.88
6β'	3.91, dd, 11.92/2.26	

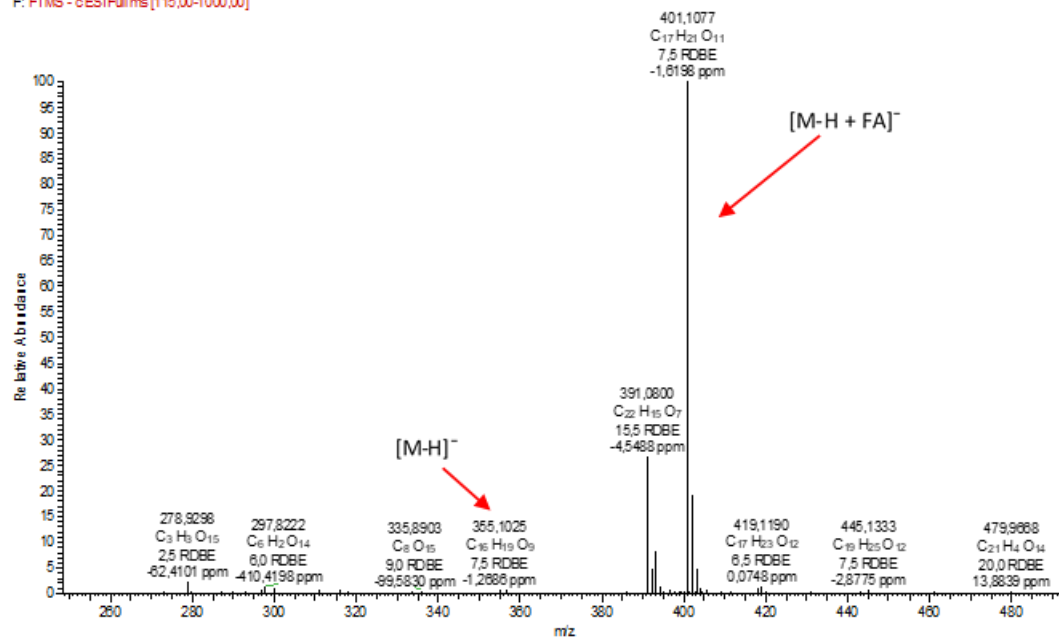
Ανάλυση UHPLC-HRMS

Από το χρωματογράφημα που προέκυψε από την ανάλυση με UHPLC-HRMS παρατηρείται η χαρακτηριστική κορυφή στα 6.76min, η οποία αντιστοιχεί στο ψευδομοριακό ιόν του μεταβολίτη με μάζα 355.1025, στοιχειακή σύσταση C₁₆H₁₉O₉ και βαθμό ακορεστότητας 7.5.



Εικόνα 84 Χρωματογράφημα Γεντιοπικροσίδης UHPLC..

gentiopicroside test 23112017 171123185732: #755-889 RT: 6.27-7.15 AV: 29 NL: 4,47E6
F: FTMS - c ESI Full ms [115,00-1000,00]



Εικόνα 85 Φάσμα μάζας HRMS-Orbitrap σε αρνητικό ιονισμό του Γεντιοπικροσίδης.

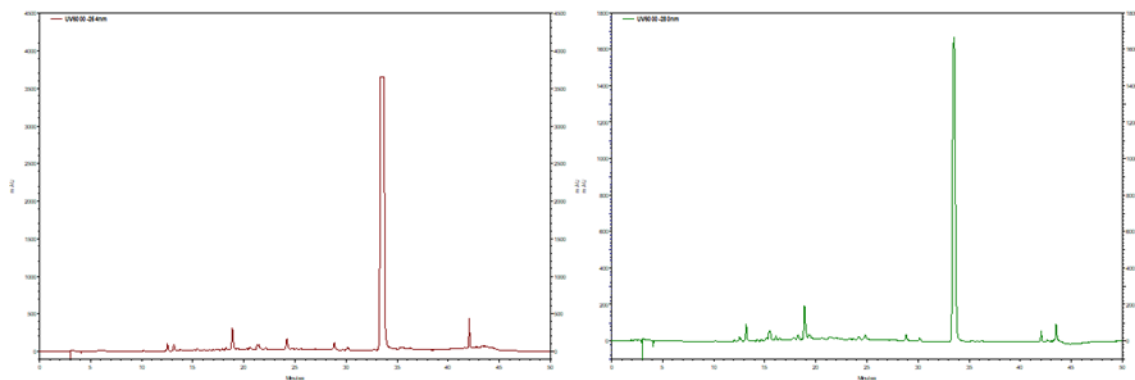
2.3.4 Ανάλυση κλασμάτων CPE και ταυτοποίηση των εμπειροχόμενων μεταβολιτών

➤ Κλάσμα1

Οι κύριοι μεταβολίτες που ταυτοποιήθηκαν από το κλάσμα 1 του μεθανολικού εκχυλίσματος είναι δύο παράγωγα ξανθόνης, γεντισίνη και ισογεντισίνη. Η βιοσύνθεση τους ξεκινά από το βενζοϊκό οξύ και μέσω διαφόρων σταδίων καταλήγει σε αυτά τα παράγωγα. Έχουν χαρακτηριστικό κίτρινο χρώμα και αξιόλογες βιολογικές δράσεις. [9]

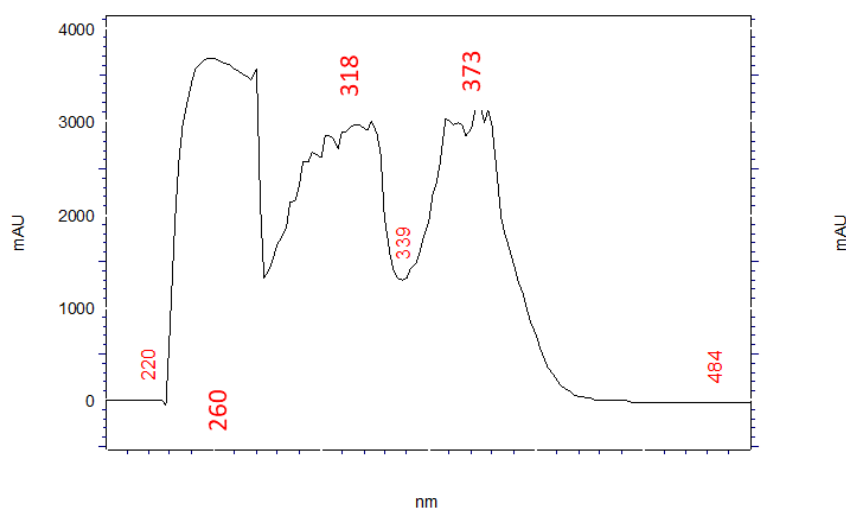
Ανάλυση HPLC

Από τα χρωματογράφημα (Εικόνα 86), έγινε αντιληπτό πως το κλάσμα 1 περιέχει μία ουσία σε μεγάλη ποσότητα και σε ένα αρκετά μεγάλο βαθμό καθαρότητας.



Εικόνα 86 Χρωματογράφημα Fr 1 στα 254nm και 280nm.

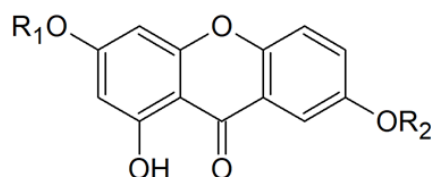
Το UV της κύριας κορυφής του κλάσματος 1 είναι το παρακάτω και η ουσία παρουσιάζει 3 μέγιστα λ_{\max} 260nm, 318nm και 373nm. (Εικόνα 87)



Εικόνα 87 UV της κύριας κορυφής του Fr 1.

Ανάλυση NMR

Στο κλάσμα Fr 1 εντοπίζονται παράγωγα ξανθονών. (Εικόνα 88)



Εικόνα 88 Δομή Ξανθονών.

Πίνακας 30 Παράγωγα Ξανθονών.

	Γεντισίνη	Ισογεντισίνη
R ₁	CH ₃ -	H-
R ₂	H-	CH ₃ -

Από την παρατήρηση του φάσματος ¹H εντοπίστηκαν οι χαρακτηριστικές κορυφές που αντιστοιχούν στα ισομερή μόρια των χρωμονών και χαρακτηριστικό αποτελεί το γεγονός ότι στο κλάσμα βρίσκονται και τα δύο ανάλογα και οι διαφορές στις μετατοπίσεις είναι πολύ μικρές. Αρχικά, οι χαρακτηριστικές απλές κορυφές στα 12ppm περίπου αντιστοιχούν στα πρωτόνια των υδροξυλίων της θέσης 1. Όσο αφορά τον A δακτύλιο εμφανίζονται οι διπλές κορυφές των H-2 και H-4, αλλά και στον C εμφανίζονται οι δύο διπλές και η μία διπλής διπλής των H-5, H-6 και H-8. Επίσης, χαρακτηριστικό στο φάσμα άνθρακα αποτελεί η κορυφή περίπου στα 180ppm, που αντιστοιχεί στον καρβονυλικό άνθρακα. Από τα φάσματα δύο διαστάσεων COZY, HMQC και HMBC αλλά και ¹³C έγινε η τελική απόδοση της δομής των μορίων, συμβουλευτικά με **???**βιβλιογραφία.

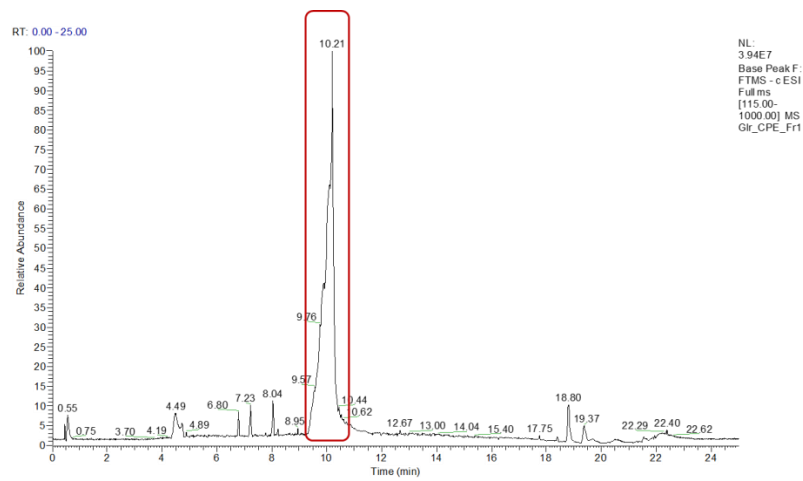
Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα ¹H-NMR και ¹³C-NMR των μεταβολιτών δίνονται στον παρακάτω Πίνακας 31:

Πίνακας 31 Φασματοσκοπική Ανάλυση Γεντισίνης - Ισογεντισίνης.

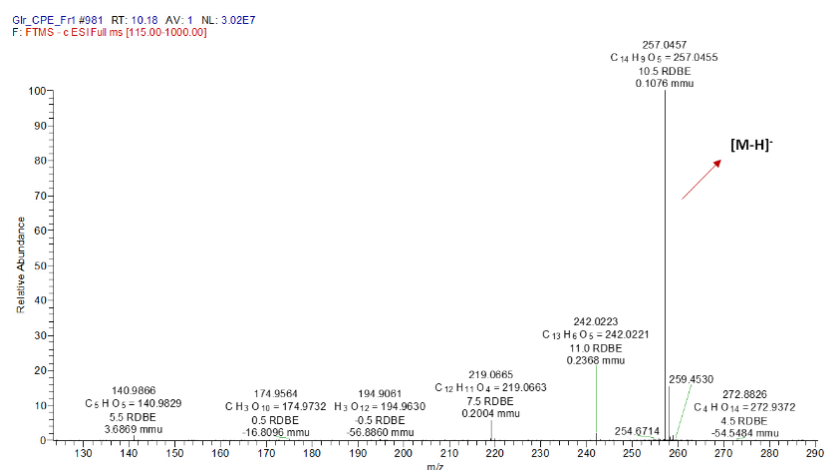
C/H	Γεντισίνη		Ισογεντισίνη	
	¹ H (ppm, m, J σε Hz)	¹³ C (ppm)	¹ H (ppm, m, J σε Hz)	¹³ C (ppm)
1	12.86, s, OH	162.42	12.85, s, OH	162.69
2	6.38, d, 2.03	93.81	6.60, d, 2.19	92.44
3	-	166.38	11.05, s, OH	165.73
4	6.21, d, 2.03	97.99	6.37, d, 2.19	96.82
4α	-	150	-	150
5	7.55, d, 8.98	119.21	7.48, d, 9.04	118.97
6	7.45, dd, 8.98/3.19	124.46	7.31, dd, 9.04/3.01	124.76
7	10.01, s, OH	157	-	158
8	7.49, d, 3.19	105.33	7.42, d, 3.01	107.95
8α	-	120	-	120
9	-	179.51	-	180
9α	-	101	-	102
10α	-	155	-	155
CH ₃ O-	3.88, s	55.71	3.87, s	56

Ανάλυση UPHLC-MS

Από το χρωματογράφημα που προέκυψε από την ανάλυση με UHPLC-HRMS παρατηρείται η χαρακτηριστική κορυφή στα 10.31min, η οποία αντιστοιχεί στο ψευδομοριακό ιόν του μεταβολίτη με μάζα 257.0457, στοιχειακή σύσταση $C_{14}H_{10}O_5$ και βαθμό ακορεστότητας 10.5..



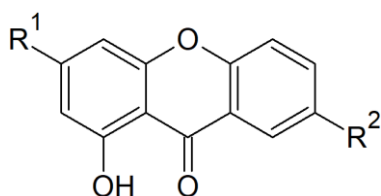
Εικόνα 89 Χρωματογράφημα Fr1 UPHLC.



Εικόνα 90 Φάσμα Μάζας HRMS-Orbitrap σε αρνητικό ιονισμό του Fr1.

➤ Κλάσμα 3

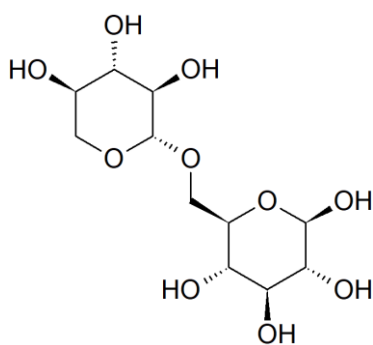
Οι κύριοι μεταβολίτες που ταυτοποιήθηκαν από το κλάσμα 3 του μεθανολικού εκχυλίσματος είναι ο Ισογεντισίνη-3-Ο-πριμεβεροσίδη και ο Ισογεντισίνη-7-Ο-πριμεβεροσίδη. Τα παράγωγα αυτά ανήκουν στην κατηγορία των γλυκοζιτών ξανθόνης, δηλαδή αποτελούνται από τον σκελετό της ξανθόνης και ένα δισακχαρίτη, τον πριμεβεροσίδη (Εικόνα 92), ο οποίος αποτελείται από γλυκόζη και ξυλόζη. Η σύνδεση με τον δισακχαρίτη γίνεται είτε στην θέση 3' είτε στην θέση 7' με την 2' θέση της γλυκόζης. (Εικόνα 91) [32]



Εικόνα 91 Δομή Ο-γλυκοζιτών ξανθονών.

Πίνακας 32 Παράγωγα Ο-γλυκοζιτών ξανθονών.

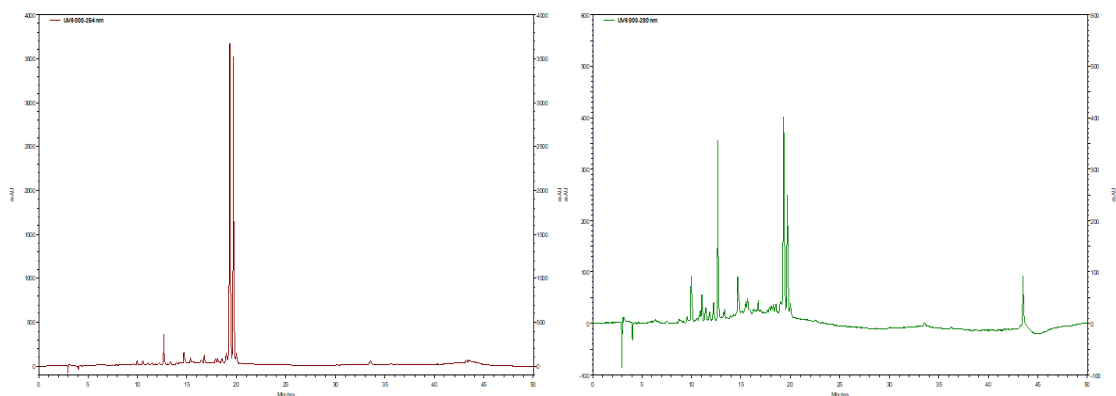
Ισογεντισίνη-3-Ο-πριμεβεροσίδη		Ισογεντισίνη-7-Ο-πριμεβεροσίδη
R ¹	Πριμεβεροδίσης	CH ₃ O-
R ²	CH ₃ O-	Πριμεβεροδίσης



Εικόνα 92 Δομή Πριμεβεροσίδη.

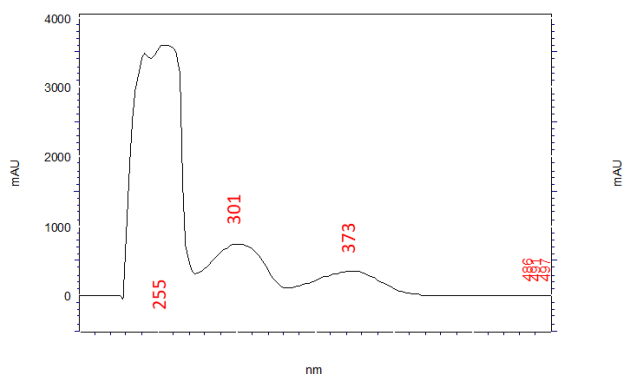
Ανάλυση HPLC

Από τα χρωματογραφήματα (Εικόνα 93), έγινε αντιληπτό πως το κλάσμα 3 περιέχει δύο ουσίες σε μεγάλη ποσότητα με πολύ κοντινό χρόνο έκλουσης. Όμως, γίνεται πιο καθαρό στο 280nm πως το κλάσμα περιέχει αρκετούς διαφορετικούς μεταβολίτες.



Εικόνα 93 Χρωματογράφημα Fr 3 στα 254nm και 280nm.

Το UV και των 2 κορυφών είναι ίδιο και παρουσιάζει 3 μέγιστα λ_{\max} 255nm, 301nm και 373nm. (Εικόνα 94)



Εικόνα 94 UV κύριας κορυφής Fr3.

Ανάλυση NMR

Η ταυτοποίηση του μορίου έγινε τόσο από την επεξεργασία των πειρατικών δεδομένων όσο και από την βιβλιογραφία. Αρχικά, από την παρατήρηση του φάσματος ^1H εντοπίστηκαν οι χαρακτηριστικές κορυφές που αντιστοιχούν στο μόριο της ξανθόνης αλλά και στον διασακχαρίτη και χαρακτηριστικό αποτελεί το γεγονός ότι στο κλάσμα βρίσκονται και τα δύο ανάλογα και οι διαφορές στις μετατοπίσεις είναι πολύ μικρές. Αρχικά, οι χαρακτηριστικές απλές κορυφές στα 12ppm περίπου αντιστοιχούν στα πρωτόνια των υδροξυλίων. Όσο αφορά τον A δακτύλιο εμφανίζονται οι διπλές κορυφές των H-2 και H-4, αλλά και στον C εμφανίζονται οι δύο διπλές και η μία διπλής διπλή των H-5, H-6 και H-8. Επίσης, εντοπίζονται τα πρωτόνια που αντιστοιχούν στα δυο σάκχαρα, όπως το ανωμερικό πρωτόνιο της γλυκόζης που είναι συνδεδεμένη είτε με την θέση 3 είτε με την θέση 7 του μορίου. Επίσης, χαρακτηριστικό στο φάσμα άνθρακα αποτελεί η κορυφή περίπου στα 180ppm, που αντιστοιχεί στον καρβονυλικό άνθρακα. Από τα φάσματα δύο διαστάσεων COZY, HMQC και HMBC αλλά και ^{13}C έγινε η τελική απόδοση της δομής των μορίων, συνδυαστικά με ???.

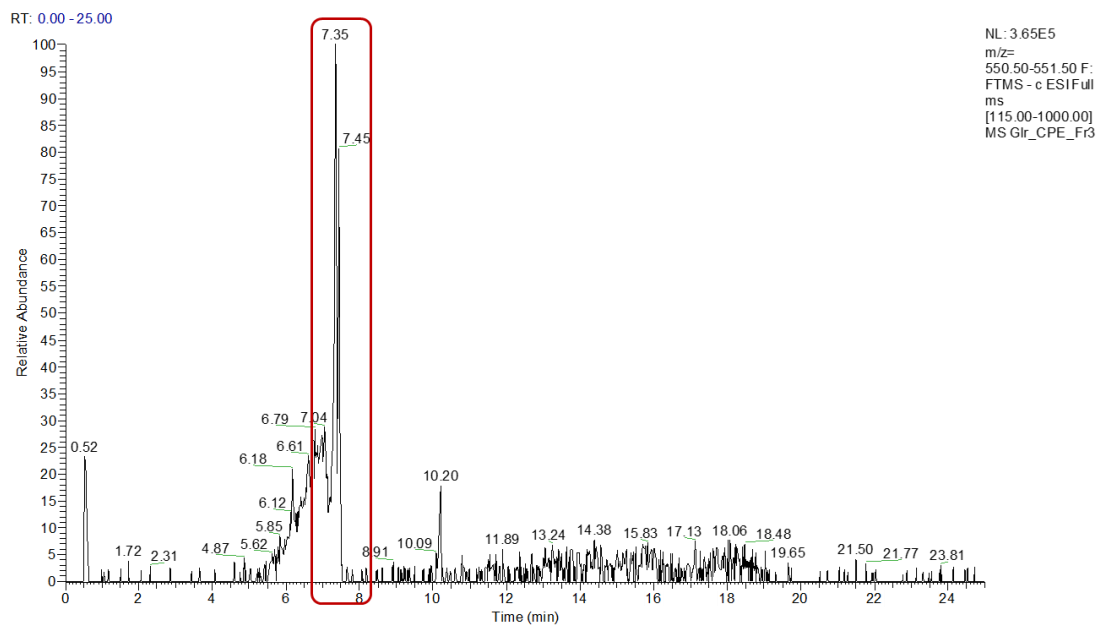
Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα ¹H-NMR και ¹³C-NMR των μεταβολιτών δίνονται στον παρακάτω Πίνακας 33:

Πίνακας 33 Φασματοσκοπικά δεδομένα των παραγώγων Ο-γλυκοζιτών ξανθόνης.

C/H	Ισογεντισίνη-3-Ο-πριμεβεροσίδης		Ισογεντισίνη-7-Ο-πριμεβεροσίδης	
	¹ H (ppm, m, J σε Hz)	¹³ C (ppm)	¹ H (ppm, m, J σε Hz)	¹³ C (ppm)
1	12.80, s, (OH)	153	12.76, s, (OH)	153
2	6.48, d, (2.27)	99	6.41, d, (2.16)	97.7
3	-	163	-	167
4	6.78, d, (2.27)	94.9	6.64, d, (2.16)	93.5
4α	-	158	-	159
5	7.65, d, (9.27)	119.8	7.60, d, (9.25)	120
6	7.67, dd, (9.27/3.25)	126	7.47, dd, (9.25/3)	125
7	-	156	-	151.5
8	7.68, d, (3.25)	111.2	7.53, d, (3)	105
8α	-	121	-	121
9	-	180.5	-	180
9α	-	103.8	-	103
10α	-	156	-	157
CH₃O-	3.90, s	61.1	3.90, s	61.1
1'	5.14, d, 7.5	104.7	5.14, d, 7.5	104.7
2'	3.43, dd, 8.8/7.5	75.9	3.43, dd, 8.8/7.5	75.9
3'	3.41, t, 8.8	78.3	3.41, t, 8.8	78.3
4'	3.25, t, 8.8	71.7	3.25, t, 8.8	71.7
5'	3.23, m	77.3	3.23, m	77.3
6'α	3.81, dd, 11.3/1.4	68.8	3.81, dd, 11.3/1.4	68.8
6'β	3.38, dd, 11.3/6.1		3.38, dd, 11.3/6.1	
1''	4.76, d, 6.6	105.2	4.76, d, 6.6	105.2
2''	3.39, m	74.6	3.39, m	74.6
3''	3.39, m	76.8	3.39, m	76.8
4''	3.50, m	70.8	3.50, m	70.8
5''α	3.95, dd, 11.8/4.9	66.4	3.95, dd, 11.8/4.9	66.4
5''β	3.24, dd, 11.8/9.4		3.24, dd, 11.8/9.4	

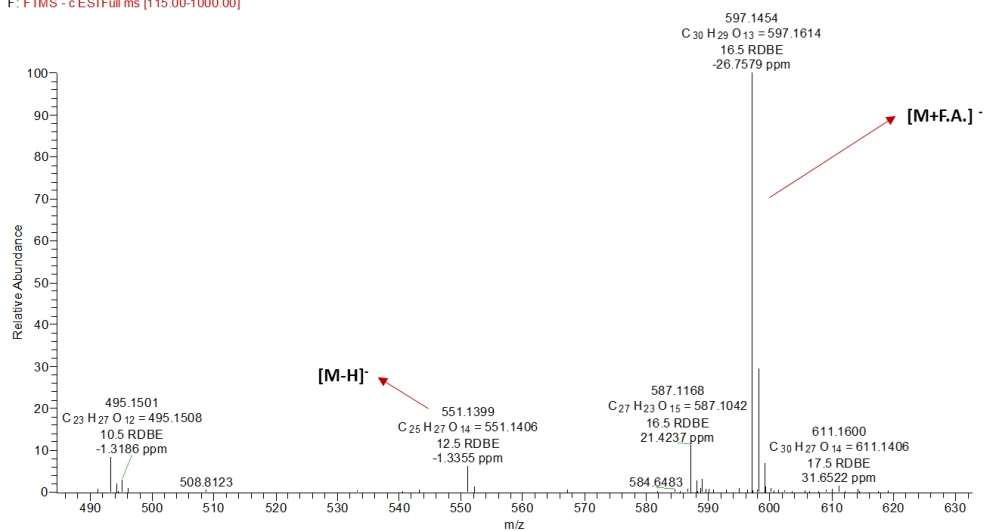
Ανάλυση UPHLC-MS

Από το χρωματογράφημα που προέκυψε από την ανάλυση με UHPLC-HRMS παρατηρείται η χαρακτηριστική κορυφή στα 7.35min και 7.45min, η οποία αντιστοιχεί στο ψευδομοριακό ιόν του μεταβολίτη με μάζα 551.1406, στοιχειακή σύσταση C₂₅H₂₈O₁₄ και βαθμό ακορεστότητας 12.5.



Εικόνα 95 Χρωματογράφημα UPLC Fr3.

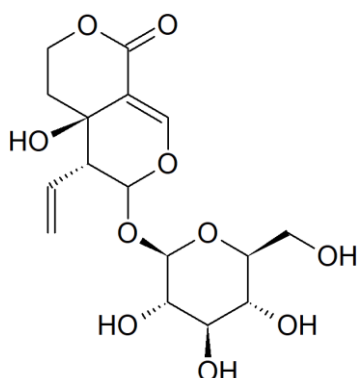
Glr_CPE_Fr3 #700 RT: 7.32 AV: 1 NL: 2.84E6
F: FTMS - c ESI Full ms [115.00-1000.00]



Εικόνα 96 Φάσμα μάζας HRMS-Orbitrap σε αρνητικό ιονισμό του Fr3.

➤ Κλάσμα 8

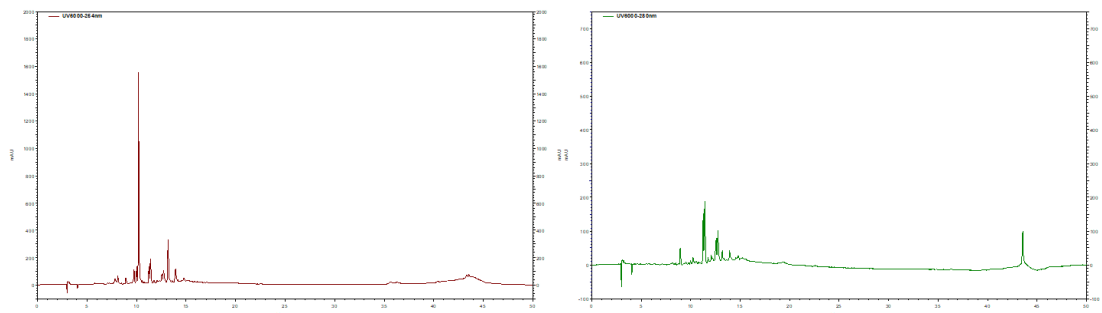
Ο κύριος μεταβολίτης που ταυτοποιήθηκε σε αυτό το κλάσμα είναι η σβερτιαμαρίνη. (Εικόνα 97) Ανήκει στην κατηγορία των ιριδοειδών γλυκοζιτών και είναι μονοτερπένιο με χαρακτηριστικό σκελετό ιριδάνης. Βιοσυνθετικά προέρχεται από το μεβαλονικό οξύ. Αναφέρεται ότι παρουσιάζει ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δραστηριοτήτων όπως αντι-αθηροσκληρωτική, αντιδιαβητική, αντιφλεγμονώδη και αντιοξειδωτική. Αυτές οι δράσεις οφείλονται κυρίως στην επίδρασή της σε διάφορες οδούς σηματοδότησης που σχετίζονται με συμβάντα της καρδιακής διαμόρφωσης όπως η αναστολή έκφρασης NF-κΒ, οξείδωση LDL, απόπτωση, δείκτες φλεγμονής και υπεροξείδωσης λιπιδίων και διέγερση αντιοξειδωτικών ενζύμων. [33]



Εικόνα 97 Δομή Σβερτιαμαρίνης.

Ανάλυση HPLC

Από το χρωματογράφημα στα 254nm γίνεται φανερή η παρουσία ενός κύριου μεταβολίτη. (Εικόνα 98)



Εικόνα 98 Χρωματογράφημα Fr 8 στα 254nm και 280nm.

Ανάλυση NMR

Η ταυτοποίηση του μορίου έγινε τόσο από την επεξεργασία των πειρατικών δεδομένων όσο και από την βιβλιογραφία. Αρχικά από το ^1H φάσμα, εντοπίστηκαν οι χαρακτηριστικές κορυφές που αντιστοιχούν σε γλυκοσίδη ιριδοειδούς. Η διπλή κορυφή του H-1 εντοπίζεται στα 5.72 (J=1.35Hz) και η απλή κορυφή του H-3 στα 7.63ppm, καθώς επίσης και η χαρακτηριστική κορυφή του H-8 με την μορφή διπλής διπλής διπλής στα 5.43ppm (J=17.05/9.92/9.62Hz). Παρατηρούνται οι χαρακτηριστικές κορυφές των πρωτονίων H-6, H-7 και H-9, αλλά και οι διπλές διπλές των H-10α και H-10β στα 5.29ppm (J=9.92/2.09Hz) και

5.37ppm ($J=17.05/2.09\text{Hz}$). Επίσης, όσο αφορά τα πρωτόνια της γλυκόζης, εύκολα γίνεται αντιληπτό το ανωμερικό πρωτόνιο της θέσης 1' που εμφανίζεται ως μία διπλή κορυφή στα 4.68ppm ($J=7.5\text{Hz}$), καθώς και οι χαρακτηριστικές διπλές διπλές κορυφές των πρωτονίων στην θέση 6. Από το ^{13}C φάσμα, εντοπίζεται ο χαρακτηριστικός καρβονυλικός άνθρακας της θέσης 11 στα 167ppm καθώς, και ο μεθυλενικός άνθρακας 10 στα 133.6ppm και ο άνθρακας 8 στα 134.5ppm. Καθοριστική σημασία για την απόδοση της δομής στο μόριο της σβερτιαμαρίνης έπαιξε το γεγονός ότι ο άνθρακας 5 εμφανίζεται στην οξυγονωμένη περιοχή στα 64.3ppm και δεν φέρει κανένα πρωτόνιο. Επίσης, στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος εντοπίζονται οι άνθρακες του σακχάρου, αλλά και ο άνθρακας του ανωμερικού πρωτονίου στα 99.8ppm. Η τελική απόδοση της δομής έγινε την χρήση των δυσδιάστατων πειραμάτων COZY, HMQC και HMBC.

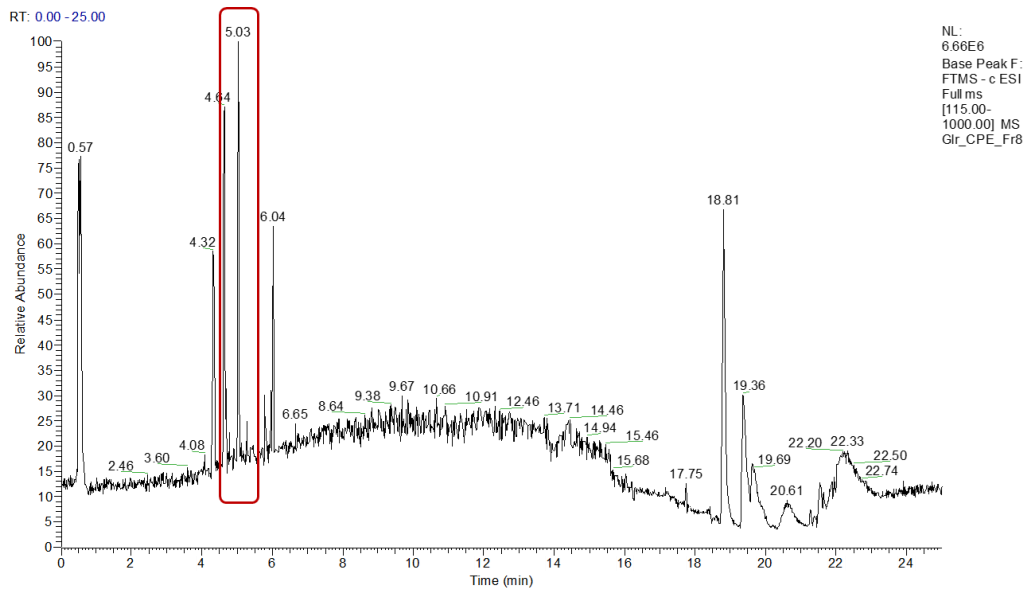
Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα ^1H - και ^{13}C -NMR του μεταβολίτη δίνονται στον παρακάτω Πίνακα 34:

Πίνακας 34 Φασματοσκοπική ανάλυση Σβερτιαμαρίνης.

Σβερτιαμαρίνη		
C/H	^1H (ppm, m, J σε Hz)	^{13}C (ppm)
1	5.72, d, 1.35	99.2
2	-	-
3	7.63, s	155.6
4	-	108.8
5	-	64.3
6a	1.74, ddd, 5.2/2.5/1.5	33.6
6b	1.89, ddd, 13.5/12/5.2	
7a	4.33, ddd, 11/5.2/1.5	74.9
7b	4.74, ddd, 12/11/2.5	
8	5.43, ddd, 17.05/9.92/9.62	134.5
9	2.02, td, 9.0/4.2	46.6
10a	5.29, dd, 9.92/2.09	133.6
10b	5.37, dd, 17.05/2.09	
11	-	167
1'	4.68, d, 7.5	99.8
2'	3.43, dd, 8.8/7.5	75.9
3'	3.41, t, 8.8	78.3
4'	3.25, t, 8.8	71.7
5'	3.23, m	77.3
6'α	3.81, dd, 11.3/1.4	68.8
6'β	3.38, dd, 11.3/6.1	

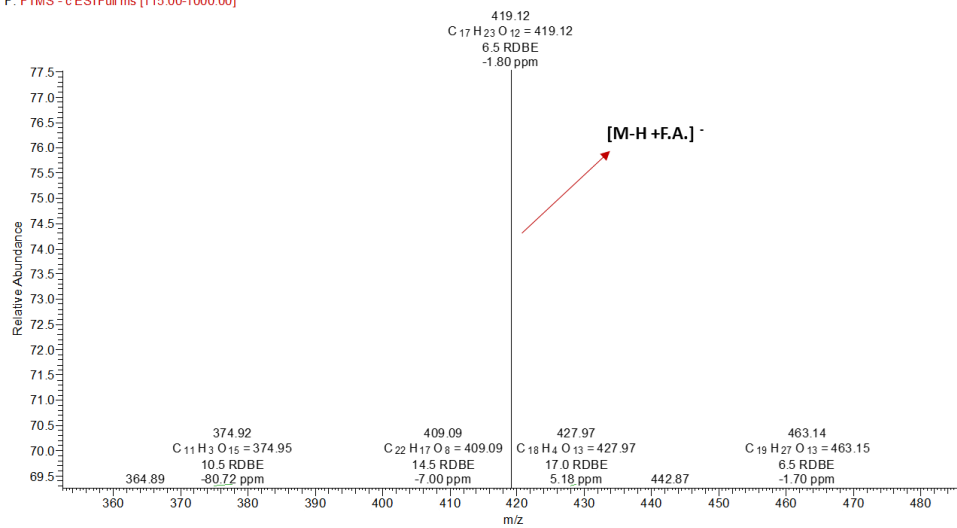
Ανάλυση UPHLC-MS

Από την ανάλυση παρατηρείται η χαρακτηριστική κορυφή στα 5.03min, η οποία αντιστοιχεί στο ψευδομοριακό ιόν του μεταβολίτη συνδεδεμένο με Φορμικό Οξύ και μάζα 419.1205, στοιχειακή σύσταση $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{O}_{10}$ και βαθμό ακορεστότητας 6.5.



Εικόνα 99 Χρωματογράφημα Fr8 UPHLC.

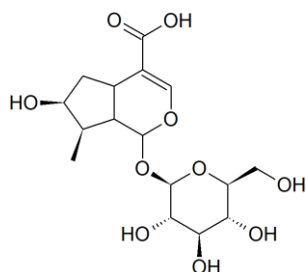
Gr_CPE_Fr8#495 RT: 5.05 AV: 1 NL: 3.08E6
F: FTMS - c ESI Full ms [115.00-1000.00]



Εικόνα 100 Φάσμα μάζας HRMS-Orbitrap σε αρνητικό ιονισμό του Fr 8.

➤ Κλάσμα 9

Το λογανικό οξύ (Εικόνα 101) είναι μονοτερπένιο με σκελετό ιριδάνης και ανήκει στην κατηγορία των καρβοκυκλικών γλυκοζυλιωμένων ιριδοειδών. Βιοσυνθετικά προέρχεται από το μεβαλονικό οξύ και αποτελεί πρόδρομο μόριο πολλών ιριδοειδών παραγώγων που εντοπίζονται στη γεντιανή. [9]



Εικόνα 101 Δομή Λογανικού οξέος

Ανάλυση HPLC

Από το χρωματογράφημα είναι δύσκολη η παρατήρηση κάποιας χαρακτηριστικής κορυφής σε συγκεκριμένο χρόνο έκλυσης.

Ανάλυση NMR

Η ταυτοποίηση του μορίου έγινε τόσο από την επεξεργασία των πειρατικών δεδομένων όσο και από την βιβλιογραφία. Αρχικά από το ^1H φάσμα, εντοπίστηκαν οι χαρακτηριστικές κορυφές που αντιστοιχούν σε γλυκοσίδη ιριδοειδούς. Η διπλή κορυφή του H-1 εντοπίζεται στα 5.27 (J=4.1Hz) και η απλή κορυφή του H-3 στα 7.38ppm, καθώς και η χαρακτηριστική κορυφή του H-9 με την μορφή τριπλής διπλής στα 2.02ppm (J=9.0/4.2Hz). Δεν εντοπίζεται καμία κορυφή στην περιοχή των διπλών δεσμών (εκτός από την κορυφή του πρωτονίου 3) και αυτό αποτελεί πρώτη ένδειξη πως πρόκειται για κάποιο διαφορετικό παράγωγο. Η κορυφή H-5 εμφανίζεται ως τετραπλή κορυφή στα 3.09ppm (J=8.1Hz) και τα δυο πρωτόνια της θέσης 6 ως διπλές διπλές στα 1.65 και 2.23ppm. Επίσης, όσο αφορά τα πρωτόνια της γλυκόζης, εύκολα γίνεται αντιληπτό το ανωμερικό πρωτόνιο της θέσης 1' που εμφανίζεται ως μία διπλή κορυφή στα 5.14ppm (J=7.5Hz), καθώς και οι χαρακτηριστικές διπλές διπλές κορυφές των πρωτονίων στην θέση 6. Από το ^{13}C φάσμα, εντοπίζεται ο χαρακτηριστικός άνθρακας της θέσης 11 στα 169.9ppm που στο συγκεκριμένο μόριο είναι καρβοξυλικός. Καθοριστική σημασία για την απόδοση της δομής στο μόριο του λογανικού οξέος έπαιξε το γεγονός ότι ο άνθρακας 10 εμφανίζεται στα 14.2ppm και τα πρωτόνια του εμφανίζονται ως διπλή κορυφή. Επίσης, στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος εντοπίζονται οι άνθρακες του σακχάρου, αλλά και ο άνθρακας του ανωμερικού πρωτονίου στα 99.8ppm. Η τελική απόδοση της δομής έγινε την χρήση των δυσδιάστατων πειραμάτων COZY, HMQC και HMBC.

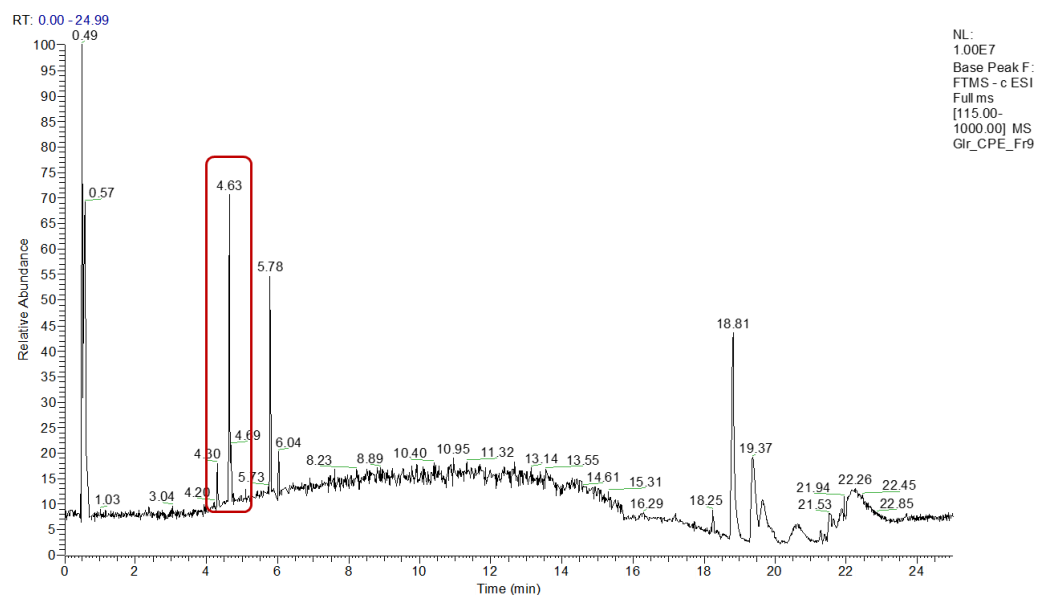
Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα ^1H - και ^{13}C -NMR του μεταβολίτη δίνονται στον παρακάτω Πίνακας 35:

Πίνακας 35 Φασματοσκοπική ανάλυση Λογανικού οξέος.

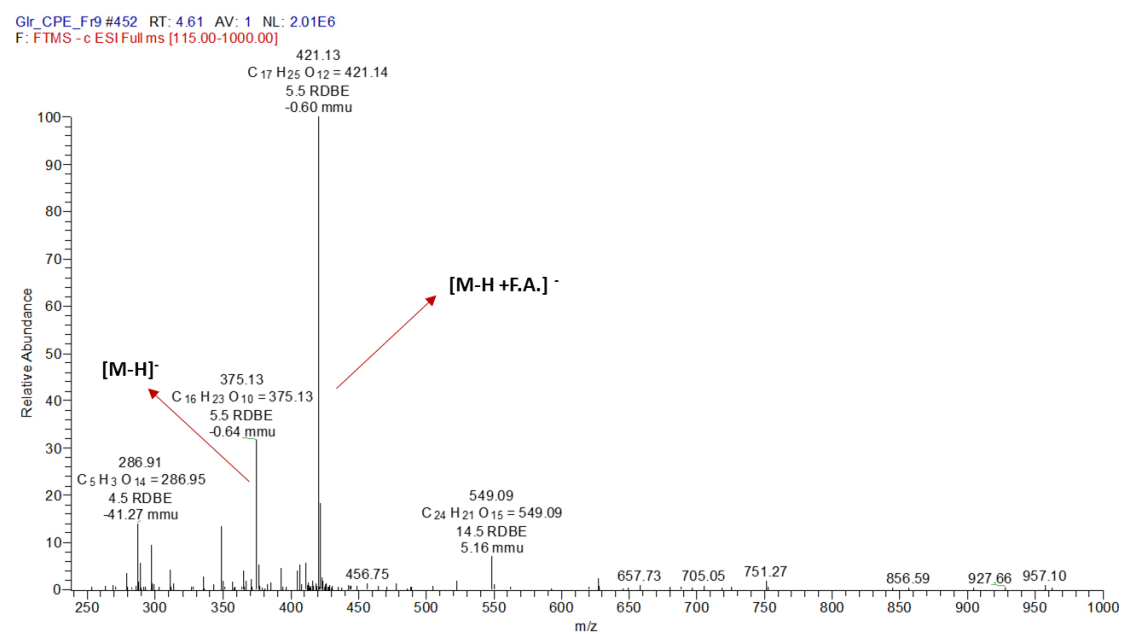
Λογανικό Οξύ		
C/H	^1H (ppm, m, J σε Hz)	^{13}C (ppm)
1	5.27, d, 4.1	96.9
2	-	-
3	7.38, s	152
4	-	113.2
5	3.09, q, 8.1	31.2
6a	1.65, dd, 13.5/7.8	42.6
6b	2.23, dd, 13.5/5.9	
7	4.04, t, 5.9	74.9
8	1.82, m	42.1
9	2.02, td, 9.0/4.2	46.6
10	1.04, d, 6.8	14.2
11	-	169.9
1'	5.14, d, 7.5	104.7
2'	3.43, dd, 8.8/7.5	75.9
3'	3.41, t, 8.8	78.3
4'	3.25, t, 8.8	71.7
5'	3.23, m	77.3
6'α	3.81, dd, 11.3/1.4	68.8
6'β	3.38, dd, 11.3/6.1	

Ανάλυση UPHLC-MS

Από την ανάλυση παρατηρείται η χαρακτηριστική κορυφή στα 4.63min, η οποία στο φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (Εικόνα 103) αντιστοιχεί στο ψευδομοριακό ιόν του μεταβολίτη με μάζα 375.1306, στοιχειακή σύσταση $C_{16}H_{23}O_{10}$ και βαθμό ακορεστότητας 5.5.



Εικόνα 102 Χρωματογράφημα UPHLC Fr9.



Εικόνα 103 Φάσμα μάζας HRMS-Orbitrap σε αρνητικό ιονισμό του Fr 9.

2.3.5 Συμπεράσματα

Οι αξιοσημείωτες φαρμακολογικές ιδιότητες του δευτερογενή μεταβολίτη *γεντιοπικροσίδη* οδήγησαν στην απαίτηση για γρήγορη, οικονομική και αποτελεσματική απομόνωση του από εκχυλίσμα ρίζας Γεντιανής (*Gentiana lutea*, Gentianaceae). Η εμπειρία του εργαστηρίου στην κλασμάτωση και επεξεργασία φυσικών προϊόντων αποτέλεσε καθοριστικό παράγοντα για την εύρεση και την επιλογή της κατάλληλης διαδικασίας για την επίτευξη του τελικού στόχου. Για τον λόγο αυτό έγινε η εφαρμογή δυο τελείως διαφορετικών τεχνικών μεταξύ τους για αξιοποίηση όλων των θετικών στοιχείων που έχουν αυτές να προσφέρουν. Δύο τέτοιες τεχνικές είναι οι CPE και prep-HPLC. Έτσι, αρχικά μέσω της μεθόδου CPE, την εύρεση του κατάλληλου διφασικού συστήματος ($H_2O:EtOH:EtOAc$ 7,5:3:5 (v/v/v)) και την εκτέλεση υπό συγκεκριμένες συνθήκες μπορεί να γίνει κλασμάτωση μεγάλης ποσότητας αρχικού εκχυλίσματος. Επίσης, πλεονέκτημα αποτελεί η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων εξαιτίας της τήρησης των ίδιων συνθηκών σε κάθε έναν από τους κύκλους της κλασμάτωσης. Αυτό γίνεται αντιληπτό από την παρατήρηση των χρωματογραφημάτων κάθε κύκλου κλασμάτωσης. Το επόμενο στάδιο του καθαρισμού είναι η επεξεργασία με prep-HPLC, με την οποία τα εμπλουτισμένα κλάσματα με την ανάπτυξη της ορθής μεθόδου μπορούν να αποδώσουν τον μεταβολίτη σε ένα πολύ μεγάλο ποσοστό καθαρότητας με βάση την περαιτέρω χρωματογραφική και φασματοσκοπική ανάλυση του μέσα σε πολύ μικρό χρόνο ανάλυσης (25min/ένεση).

Ταυτόχρονα, μέσα από την διαδικασία κλασμάτωσης του μεθανολικού εκχυλίσματος λήφθηκαν κλάσματα που φέρουν εξίσου σημαντικούς δευτερογενείς μεταβολίτες, ενδεικτικό είναι πως ταυτοποιήθηκαν ακόμα 6 μόρια (Γεντισίνη, Ισογεντισίνη, Ισογεντισίνη-3-O-Πριμεβεροσίδης, Ισογεντισίνη-7-O-Πριμεβεροσίδης, Σβερτιαμαρίνη και Λογανικό Οξύ).

2.4 Απομόνωση Τριτερπενικών Οξέων από προϊόντα Ελιάς με

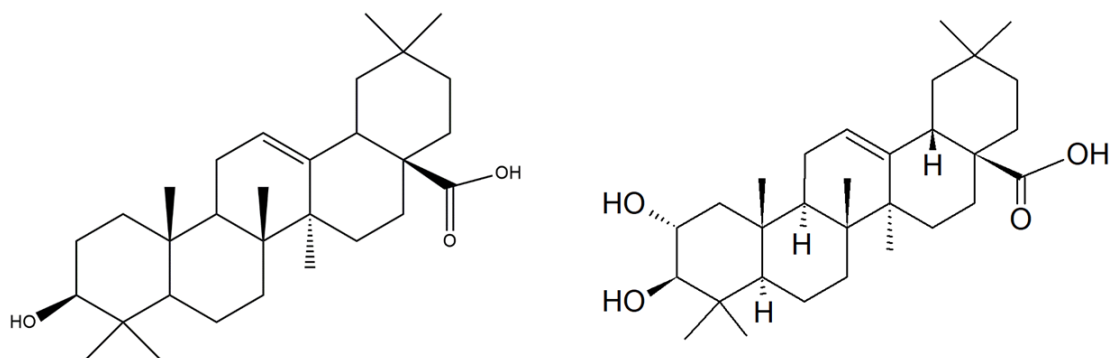
την χρήση *Centrifugal Partition Extraction (C.P.E.)*

2.4.1 Εισαγωγή

Στόχος της παρακάτω πειραματικής διαδικασίας είναι η γρήγορη και αποτελεσματική απομόνωση ολεανολικού και μασλινικού οξέος από προϊόντα ελιάς με την χρήση σύγχρονων χρωματογραφικών μεθόδων. Το ολεανολικό και μασλινικό οξύ (Εικόνα 104) αποτελούν δύο βιοδραστικά τριτερπενικά οξέα με πληθώρα βιολογικών δράσεων.

Πιο, συγκεκριμένα το ολεανολικό οξύ (3β-υδροξυ-ολεα-12-εν-28-ικό οξύ) είναι ένα πεντακυκλικό τριτερπενικό παράγωγο με 30 άτομα άνθρακα και βιοσυνθετικά προέρχεται από την κυκλοποίηση του σκουαλενίου. Είναι παράγωγο α-αμυρίνης και εντοπίζεται σε πολλά φυτικά είδη. Είναι άφθονο σε φυτά της οικογένεια Oleaceae όπως τον ελαιόκαρπο. Στα φυτά αυτά, απαντάται συχνά στους επιφανειακούς κηρούς, οι οποίοι λειτουργούν ως εμπόδιο κατά των παθογόνων μικροοργανισμών και της απώλειας νερού. Δρόγες που περιέχουν ολεανολικό έχουν χρησιμοποιηθεί στην παραδοσιακή ιατρική, αλλά σύγχρονες βιολογικές μελέτες έχουν δείξει πως έχει ισχυρή φαρμακολογική δράση ως ηπατικό φάρμακο, όπως αντιφλεγμονώδης, αντιυπερλιπιδαιμική, ηπατοπροστατευτική, καθώς επίσης αντικρκινική και αντικαρκινική. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν σημαντικά αποτελέσματα σχετικά με την ικανότητα του να βελτιώνει το οξειδωτικό στρες και τη φλεγμονή που προκαλείται από αυτό, καθώς και την πρόληψη του μεταβολικού συνδρόμου. [34] Η αντικαρκινική δραστηριότητα του πιθανολογείται πως συμβαίνει μέσω της αυξημένης ρύθμισης της ενεργοποίησης της μιτοχονδριακής απόπτωσης και της διακοπής του κυτταρικού κύκλου μέσω της αυξημένης ρύθμισης της πρωτεΐνης του όγκου (p53) και της κυκλοξυγενάσης-2. (COX-2) [35]

Το μασλινικό οξύ (2α,3β)-2,3-υδροξυολεαν-12-εν-28-οικό οξύ είναι επίσης ένα πεντακυκλικό τριτερπενικό οξύ που βιοσυνθετικά προέρχεται από την κυκλοποίηση του σκουαλενίου και είναι παράγωγο β-αμυρίνης. Ο μεταβολίτης αυτός εντοπίζεται σε αρκετά φυτικά είδη, όμως ο καρπός της *Olea europaea* είναι από τις πιο πλούσιες πηγές. Το μασλινικό οξύ έχει συνδεθεί με αξιοσημείωτες βιολογικές δράσεις, για αυτό το λόγο είναι τόσο αναγκαία η απομόνωση του σε υψηλή καθαρότητα και σε μεγάλη ποσότητα. Έχει αποτελέσει αντικείμενο πολλών ερευνών λόγω της αντιφλεγμονώδους, αντιδιαβητικής και αντικαρκινικής δράσης που έχει παρουσιάσει. Κλινικές μελέτες απέδειξαν την αντιφλεγμονώδη δράση του μέσω της αναστολής της κυκλοξυγενάσης και του παράγοντα TNFα, ο οποίος εμπλέκεται στην φλεγμονή [36]. Αντιδιαβητική δράση επίσης τεκμηριώνεται μετά από μείωση των επιπέδων της γλυκόζης σε διαβητικά πειραματόζωα στα οποία χορηγήθηκε το μασλινικό [37]. Τέλος, και τα αποτελέσματα που αφορούν την αντικαρκινική του δράση μέσω της απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων ορισμένων τύπων καρκίνου, είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικά [38]. Συμπερασματικά, το μασλινικό οξύ αναδύεται ως ένα νέο φυσικό και ασφαλές μόριο με διαφορετικούς βιολογικούς στόχους, το οποίο μπορεί να θεωρηθεί nutraceutical. (= φαρμακοτρόφιμο) [39]



Εικόνα 104 Δομές Ολεανολικού και Μασλινικού Οξέος

Όπως προαναφέρθηκε, η παραλαβή ενός μεταβολίτη σε μεγάλο βαθμό καθαρότητας αποτελεί κρίσιμο σημείο για την υλοποίηση φαρμακολογικών μελετών. Οι διαχωριστικές πορείες που επιλέχτηκαν περιλαμβάνουν σαν κύριο στάδιο τη χρήση της Χρωματογραφίας Κατ' Αντιρροή με την εφαρμογή της μεθόδου pH-zone refining. Η μέθοδος αυτή εκμεταλλεύεται την όξινη φύση των δύο τριτερπενίων και κυρίως την ιδιότητά τους να μεταβάλλουν δραματικά τον συντελεστή κατανομής στις δύο φάσεις ενός διφασικού συστήματος ανάλογα του pH του συστήματος. Έτσι, αν και πρόκειται για δύο άπολα μόρια, αδιάλυτα σε πολικά συστήματα διαλυτών, εντούτοις, σε αλκαλικό περιβάλλον βρίσκονται κυρίως με τη μορφή ανιόντος και ως εκ τούτου αυξάνεται η συγγενείά τους προς τους πολικούς διαλύτες.

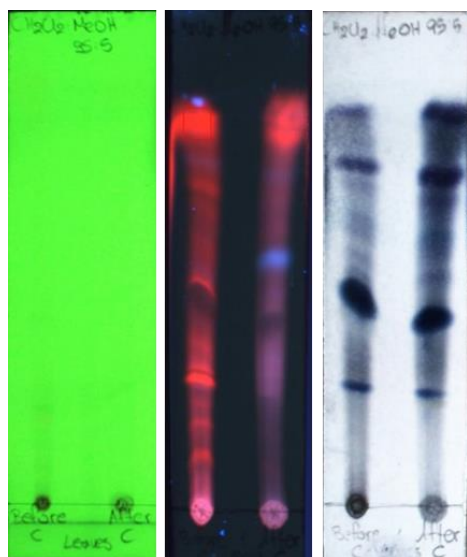
2.4.2 Απομόνωση Ολεανολικού Οξέος από Εκχύλισμα Φύλλων Ελιάς

Το δείγμα, που επιλέχθηκε για την απομόνωση του ολεανολικού οξέος είναι το απολιπασμένο κλάσμα του ακετονικού εκχυλίσματος των φύλλων ελιάς. Το κλάσμα αυτό του εκχυλίσματος, πέραν των λιπαρών ενώσεων και των χλωροφυλλών που περιέχει, αποτελεί και πλούσια πηγή ολεανολικού οξέος. Η πορεία διαχωρισμού που επιλέχτηκε περιλαμβάνει αρχικά την επεξεργασία του εκχυλίσματος με ζωικό άνθρακα ώστε να απομακρυνθεί ο μεγάλος όγκος χλωροφυλλών και στη συνέχεια την ανάλυση του κλάσματος με pH-zone refining CPE.

2.4.2.1 Επεξεργασία εκχυλίσματος με ζωικό άνθρακα

Κατά την διαδικασία αυτή, 10g του επιλεγμένου εκχυλίσματος διαλύθηκαν σε DCM και αναμείχθηκαν με 600g ζωικού άνθρακα. Το μείγμα αυτό διηθήθηκε υπό κενό σε πορώδες 4 (Soxhlet por. 4) , εκπλύθηκε με νέα ποσότητα DCM και το διήθημα εξατμίστηκε μέχρι ξηρού δίνοντας τελικό βάρος 2,5394g. Έτσι, η απόδοση της επεξεργασίας υπολογίστηκε στα 25,39%, η μικρή απόδοση οφείλεται κυρίως στην υψηλή περιεκτικότητα των φύλλων σε χλωροφύλλη όσο και στην πιθανή κατακράτηση των άλλων μεταβολιτών από τον ζωικό άνθρακα.

Η επεξεργασία του εκχυλίσματος φύλλων ελιάς με ζωικό άνθρακα οδήγησε στην απομάκρυνση ενός μεγάλου ποσοστού χλωροφύλλης που εντοπίζεται σε τέτοιας προέλευσης εκχυλίσματα. Αυτό επιβεβαιώθηκε και από το χρωματογράφημα TLC (Εικόνα 105) σε σύστημα διαλυτών DCM:MeOH (95:5 v/v).



Εικόνα 105 Συγκριτικό Χρωματογράφημα μετά την επεξεργασία με Ζωικό Άνθρακα στα 254nm, 366nm και ορατό

2.4.2.2 Εκτέλεση διαχωρισμού με την μέθοδο pH-Zone CPE

Σε μία προσπάθεια για γρήγορη και αποτελεσματική απομόνωση ολεανολικού οξέος εφαρμόστηκε η τεχνική pH-Zone C.P.E. Βασίζεται στην χρήση διφασικού συστήματος με τροποποιημένο το pH και την επιρροή του στην φύση των αναλυτών. (αναλυτική αναφορά ενότητα 1.3.9.5)

Εύρεση Διφασικού Συστήματος

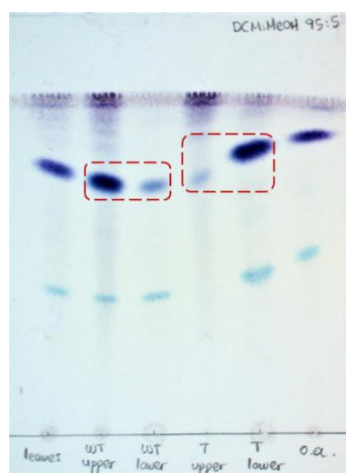
Για τον έλεγχο της συμβατικότητας του συστήματος διαλυτών n-Hexane:EtOAc:EtOH:H₂O (8:2:5:5 v/v/v/v) στην περίπτωση του ολεανολικού οξέος, ζυγίστηκαν 5mg ξηρού επεξεργασμένου εκχυλίσματος σε δοκιμαστικό σωλήνα και παρασκευάστηκαν 5ml του παραπάνω συστήματος (Σ₁) και 5ml του ίδιου συστήματος με την προσθήκη TEA στην υδατική μέχρι το pH να είναι 10 (Σ₂). Ο κάθε δοκιμαστικός αναδεύτηκε σε συσκευή Vortex, τα μείγματα αφέθηκαν σε ηρεμία και καταγράφηκε η διαλυτική ικανότητα τους, ο χρόνος διαχωρισμού και η αναλογία των δυο φάσεων.

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 36) φαίνονται τα αποτελέσματα της δοκιμής των διφασικών συστημάτων:

Πίνακας 36 Αποτελέσματα δοκιμής διφασικού συστήματος.

Σύστημα	Διάλυση Εκχυλίσματος	Χρόνος διαχωρισμού	Αναλογία φάσεων
Σ ₁	Καλή	<30sec	50:50 (u:l)
Σ ₂	Καλή	<30sec	40:60 (u:l)

Ο έλεγχος της καταλληλότητας του διφασικού συστήματος έγινε με TLC (Εικόνα 106) σε σύστημα ανάπτυξης DCM:MeOH (95:5) και από το χρωματογράφημα παρατηρήθηκε η μεταβολή της κατανομής του ολεανολικού οξέος από την πάνω ουδέτερη φάση στην κάτω βασική φάση. Αυτό συμβαίνει εξαιτίας της όξινης φύσης του, όπου στο βασικό περιβάλλον λαμβάνει την μορφή άλατος και ευνοείται η σταθερότητα και η διαλυτότητα του· πάνω σε αυτή την ιδιότητα βασίζεται και η μέθοδος, η οποία εφαρμόζεται.



Εικόνα 106 Συγκριτικό Χρωματογράφημα για τον έλεγχο της καταλληλότητας του διφασικού συστήματος στο ορατό.

Εκτέλεση διαχωρισμού

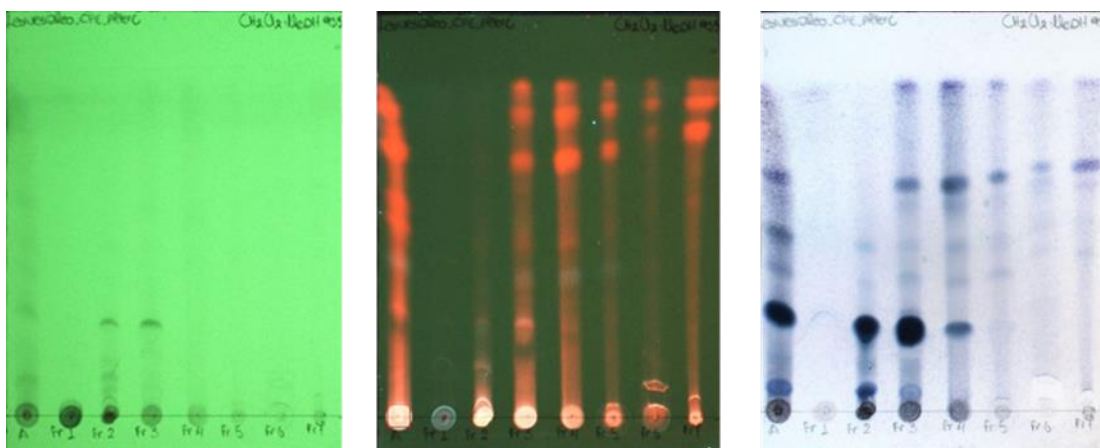
Το σύστημα διαλυτών (1L) παρασκευάστηκε με ανάμειξη n-Hexane:EtOAc:EtOH:H₂O στην επιθυμητή αναλογία 8: 2: 5: 5 (v/v/v v). Οι δύο φάσεις του συστήματος διαχωρίστηκαν μετά από εξισορρόπηση του μείγματος και στην συνέχεια προστέθηκαν 8mL τριφθοροοξικού οξέος (TFA) στην οργανική φάση, ώστε η συγκέντρωση του στο τελικό διάλυμα να αντιστοιχεί σε 100 mM με pH 2 και 11mL τριαιθυλαμίνης (TEA) στην υδατική φάση με σκοπό να ρυθμιστεί το pH 10 και η αντίστοιχη συγκέντρωση να είναι 80 mM. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε descending mode, για τον λόγο αυτό η άπολη φάση αποτέλεσε την στατική φάση και αντίστοιχα η πολική φάση την κινητή φάση. Αρχικά, η στήλη (300mL FCPE300) πληρώθηκε με στατική φάση, η ταχύτητα περιστροφής ρυθμίστηκε και διατηρήθηκε σταθερή καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος στις 750 rpm και η ροή στα 10 mL/min. Στη συνέχεια, 2.5394g του διηθημένου εκχυλίσματος (διαλυμένα σε 10 mL μείγματος 60:40 ουδέτερης κινητής φάσης: όξινης στατικής φάσης), εγχύθηκαν στη στήλη μέσω βρόγχου 10mL και εκλούστηκαν με την αλκαλοποιημένη κινητή φάση σε descending mode στις ίδιες αρχικές συνθήκες. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται χωρίς την εξισορρόπηση των δύο φάσεων και ονομάζεται «μέθοδος sandwich». Αφού συλλέχθηκαν τα πρώτα 20 κλάσματα (στάδιο έκλουσης), στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε εξώθηση του περιεχομένου της στήλης χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση την άπολη φάση του διφασικού συστήματος χωρίς να έχει οξινιστεί σε descending mode. Κατά το στάδιο της εξώθησης συλλέχθηκαν ακόμα 18 κλάσματα. Ο συλλέκτης κλασμάτων ρυθμίστηκε ώστε να συλλέγει κλάσματα των 20 mL. Το πείραμα διήρκεσε 88 λεπτά ενώ όλα τα συλλεχθέντα κλάσματα (38 κλάσματα) αναλύθηκαν με TLC και συνενώθηκαν, με βάση την χημική τους ομοιότητα, προκύπτοντας τελικά 7 συνδυασμένα κλάσματα. Τέλος, η στήλη καθαρίστηκε και πληρώθηκε με το σύστημα αποθήκευσης (MeOH:H₂O 50:50). Κατά την διάρκεια των συνενώσεων έγινε απαραίτητη η ουδετεροποίηση των αλκαλοποιημένων κλασμάτων με την χρήση 0.1N HCL και με υγρή-υγρή εκχύλιση με την προσθήκη DCM, έγινε συλλογή και εξάτμιση της κάτω φάσης.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε φαίνεται συνοπτικά στον παρακάτω Πίνακας 37:

Πίνακας 37 Συνθήκες πειραματικής διαδικασίας της τεχνικής pH-Zone CPE.

Κλάσματα	Στατική φάση	Κινητή φάση	Ρυθμίσεις στήλης			Όγκος κλάσματος
-	Άνω-Όξινη	-	descending	750rpm	10mL/min	-
1-20	Άνω-Όξινη	Κάτω-Βασική	descending	750rpm	10mL/min	20mL
21-38	Άνω	Άνω-Ουδέτερη	descending	750rpm	10mL/min	20mL

Μετά την εκτέλεση του pH-Zone C.P.E. και τις συνενώσεις των κλασμάτων με την ίδια χημική σύσταση, αναπτύχθηκε το χρωματογράφημα TLC (Εικόνα 107) σε σύστημα διαλυτών DCM:MeOH (95:5).



Εικόνα 107 Χρωματογραφήματα συνενωμένων κλασμάτων CPE στα 254nm, 366nm και στο ορατό.

Τα καθαρά βάρη των κλασμάτων φαίνονται στον παρακάτω Πίνακας 38 Κλάσματα και Βάρη. Πίνακας 38:

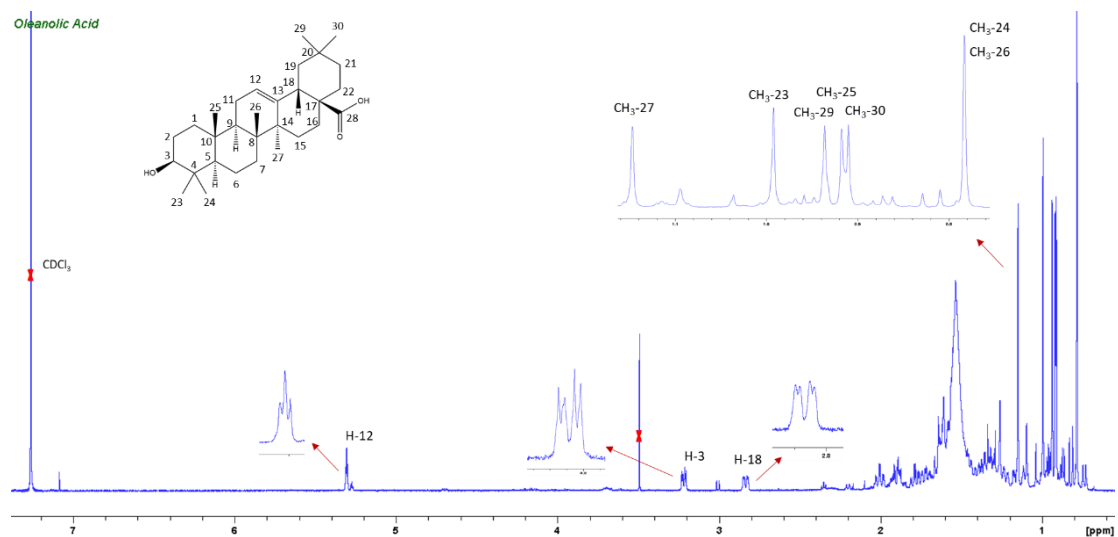
Πίνακας 38 Κλάσματα και Βάρη.

Fraction	Weight (mg)	Fraction	Weight (mg)
Fr 1 (1-6)	24.8	Fr 5 (13-18)	252.4
Fr 2 (7-10)	507.7	Fr 6 (19-29)	241.9
Fr 3 (11)	112.9	Fr 7 (30-38)	347.6
Fr 4 (12)	224.5	-	

2.4.2.3 Φασματοσκοπική Ανάλυση απομονωμένου Ολεανολικού Οξέος

1H NMR

Η ταυτοποίηση του ολεανολικού οξέος έγινε συνδυαστικά με την επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων (Εικόνα 108) αλλά και την χρήση των βιβλιογραφικών αναφορών [35]. Έτσι, η παρουσία της τριπλής κορυφής στα 5.27ppm με $J=4.1\text{Hz}$ υποδεικνύει την παρουσία του διπλού δεσμού στην θέση 1, ενώ η διπλή διπλή κορυφή στα 3,21ppm με $J=11.0/4.2\text{Hz}$ αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 3, η οποία φέρει και υδροξύλιο. Επίσης, παρατηρούνται 7 απλές κορυφές, οι οποίες αντιστοιχούν στα 7 διαφορετικά μεθύλια του μορίου. Η χημική μετατόπιση των κορυφών είναι 0.98, 0.74, 0.91, 0.77, 1.14, 0.93 και 0.91 και υποδεικνύουν τις θέσεις 23, 24, 25, 26, 27, 28 και 29, αντίστοιχα. Επίσης, από την παρατήρηση του φάσματος άνθρακα ^{13}C αναγνωρίζονται 30 άνθρακες: 7 που αντιστοιχούν τα μεθύλια (28.1, 15.5, 15.3, 17.1, 25.9, 33.1 και 23.6ppm), 2 που αντιστοιχούν στους άνθρακες του διπλού δεσμού (122.6 και 143.6ppm), 1 άνθρακας του καρβοξυλίου (183.4ppm) και 1 οξυγονωμένος (79.0ppm).



Εικόνα 108 Φάσμα Ολεανολικού Οξέος.

Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα του ολεανολικού οξέος αναφέρονται στον Πίνακα 39

Πίνακας 39 Φασματοσκοπικά Δεδομένα Ολεανολικού Οξέος.

Ολεανολικό Οξύ

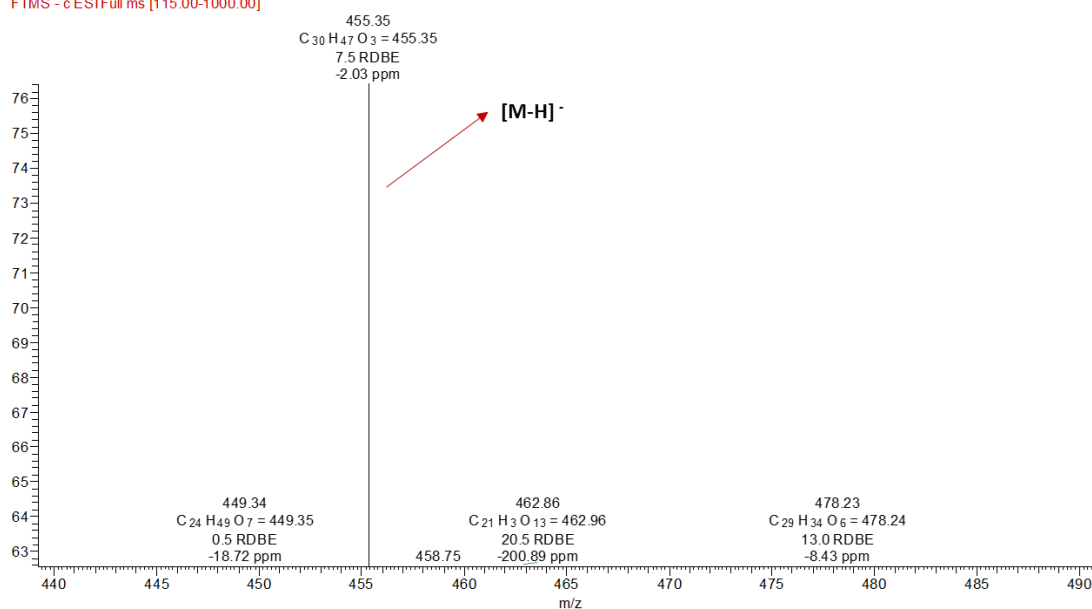
C/H	¹ H (ppm, m, Hz)	¹³ C (ppm)
1	0.82/1.37, m	38.4
2	1.62, m	27.1
3	3.21, dd, 11.0/4.2	79.0
4	-	38.7
5	0.74, m	55.2
6	1.38/1.19, m/m	18.3
7	1.36/1.16, m/m	32.6
8	-	39.2
9	1.51, m	47.6
10	-	37.0
11	1.76	22.9
12	5.27, t, 4.1	122.6
13	-	143.6
14	-	41.6
15	1.02/1.99, m/m	27.6
16	1.92/1.76, m/m	23.4
17	-	46.5
18	2.81, dd, 13.9/3.7	41.0
19	1.63/1.12, m/m	45.8
20	-	30.6

21	1.26/1.03, m/m	33.8
22	1.62/1.84, m/m	32.4
23	0.98, s, 3-H, CH ₃	28.1
24	0.74, s, 3-H, CH ₃	15.5
25	0.91, s, 3-H, CH ₃	15.3
26	0.77, s, 3-H, CH ₃	17.1
27	1.14, s, 3-H, CH ₃	25.9
28	-	183.4
29	0.93, s, 3-H, CH ₃	33.1
30	0.91, s, 3-H, CH ₃	23.6

Πίνακας 40 Φασματοσκοπικά Δεδομένα Ολεανολικού Οξέος.

HRMS/MS

FTMS - c ESI Full ms [115.00-1000.00]



Εικόνα 109 Φάσμα μάζας HRMS-Orbitrap σε αρνητικό ιονισμό του Ολεανολικού Οξέος

2.4.3 Απομόνωση Μασλινικού Οξέος από Ολικό Πολυφαινολικό

Κλάσμα Ελαιολάδου (T.P.F.)

Το ολικό πολυφαινολικό κλάσμα του ελαιολάδου περιέχει σημαντικές βιοδραστικές ουσίες διαφόρων χημικών κατηγοριών. Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή 1.2.6, το Μασλινικό Οξύ είναι εξίσου σημαντικό φαρμακολογικά και γι' αυτό απαιτείται η γρήγορη και αποτελεσματική απομόνωση του. Η διαδικασία απομόνωσης του μασλινικού οξέος από το πολυφαινολικό κλάσμα του ελαιολάδου περιλαμβάνει τη χρήση της Χρωματογραφίας Κατ' Αντιρροή με εφαρμογή δύο μεθόδων. Αρχικά το εκχύλισμα κλασματώθηκε με dual-mode CPE και στη συνέχεια το εμπλουτισμένο στον μεταβολίτη, κλάσμα αναλύθηκε με pH-zone refining CPE. [40]

2.4.3.1 Κλασμάτωση Ολικού Πολυφαινολικού Κλάσματος Ελαιολάδου με Dual Mode

CPE

Η εμπειρία του εργαστηρίου σχετικά με το ελαιόλαδο και τις μεθόδους κλασμάτωσης είναι μεγάλη και πολυετής, ειδικά με την χρήση Χρωματογραφίας κατ' Αντιρροή. Σε μία προσπάθεια για εξέλιξη της τεχνικής και στοχεύοντας στη γρήγορη παραλαβή του εμπλουτισμένου σε μασλινικό οξύ, κλάσματος, έγινε τροποποίηση της καθιερωμένης μεθόδου βαθμιδωτής έκλουσης. Έτσι, επιλέχθηκε μόνο ένα από το σύνολο των τεσσάρων συστημάτων (n-Hex:EtOAc:EtOH:H₂O (3:2:3:2 v/v/v/v)) και εφαρμόστηκε η τεχνική της dual mode CPE σε στήλη 300mL. [40]

Εκτέλεση

Αρχικά, παρασκευάστηκαν 4 λίτρα του αρχικού διφασικού συστήματος. Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε η πολική-κάτω φάση του διφασικού συστήματος, ενώ ως κινητή η άπολη-άνω φάση. Η ποσότητα του ξηρού εκχυλίσματος που αναλύθηκε ήταν 5g, η οποία διαλύθηκε σε 15mL συστήματος (10mL κάτω και 5mL πάνω φάσης). Αρχικά, η στήλη πληρώθηκε με στατική φάση σε ascending mode, περιστροφή 200rpm με ροή 20mL/min. Στη συνέχεια, διαβιβάστηκε η κινητή φάση (ascending mode, 850rpm και ροή 15mL/min) και έγινε εξισορρόπηση του διφασικού συστήματος μέσα στη στήλη (Sf=78%). Ακολούθησε η εισαγωγή του δείγματος, όπου η ροή διατηρήθηκε σταθερή και έγινε συλλογή των κλασμάτων όγκου 20mL με τη βοήθεια αυτόματου συλλέκτη. Από την στήλη περάσαν 900mL κινητής και συλλέχθηκαν τα πρώτα 45 κλάσματα (στάδιο έκλουσης), στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε εξώθηση του περιεχομένου της στήλης χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση την πολική-κάτω φάση του διφασικού. Κατά το στάδιο της εξώθησης συλλέχθηκαν 20 επιπλέον κλάσματα. Τέλος, η στήλη καθαρίστηκε και πληρώθηκε με το σύστημα αποθήκευσης (MeOH:H₂O 50:50). Ο διαχωρισμός διήρκησε 110min και συλλέχθηκαν συνολικά 65 κλάσματα.

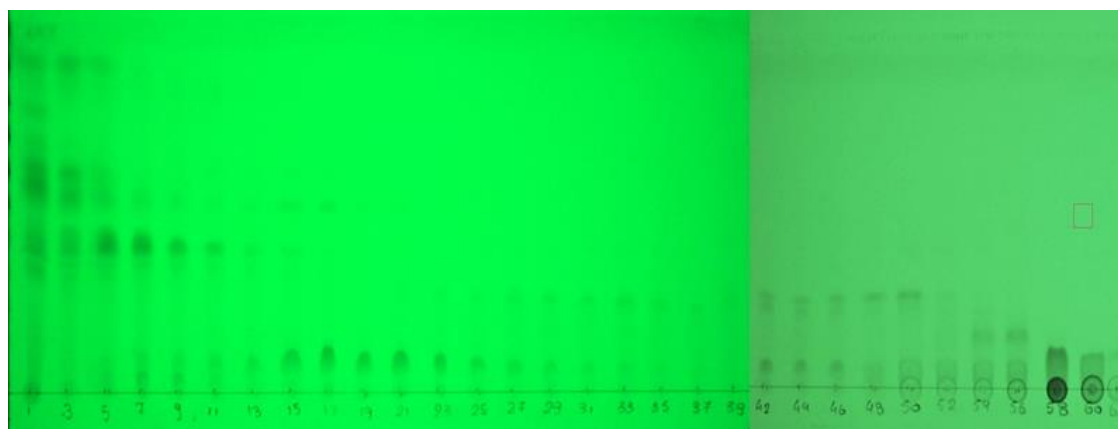
Η διαδικασία που ακολουθήθηκε φαίνεται συνοπτικά στον παρακάτω Πίνακας 41:

Πίνακας 41 Συνθήκες πειραματικής διαδικασίας CPE

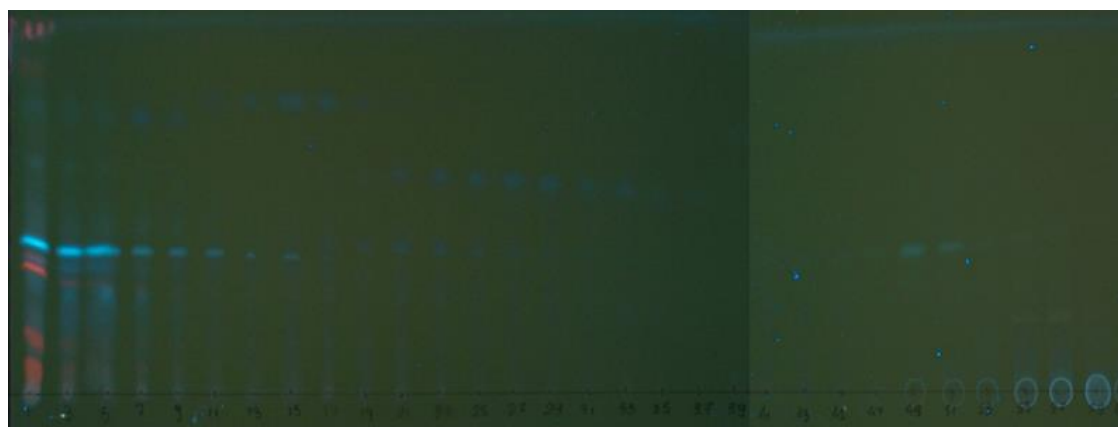
Κλάσματα	Στατική φάση	Κινητή φάση	Ρυθμίσεις στήλης			Όγκος κλάσματος
-	Κάτω	-	ascending	200rpm	20mL/min	-
-	Κάτω	Άνω	ascending	850rpm	15mL/min	-
1-45	Κάτω	Άνω	ascending	850rpm	15mL/min	20mL
46-65	Άνω	Κάτω	ascending	850rpm	15mL/min	20mL

Αποτελέσματα

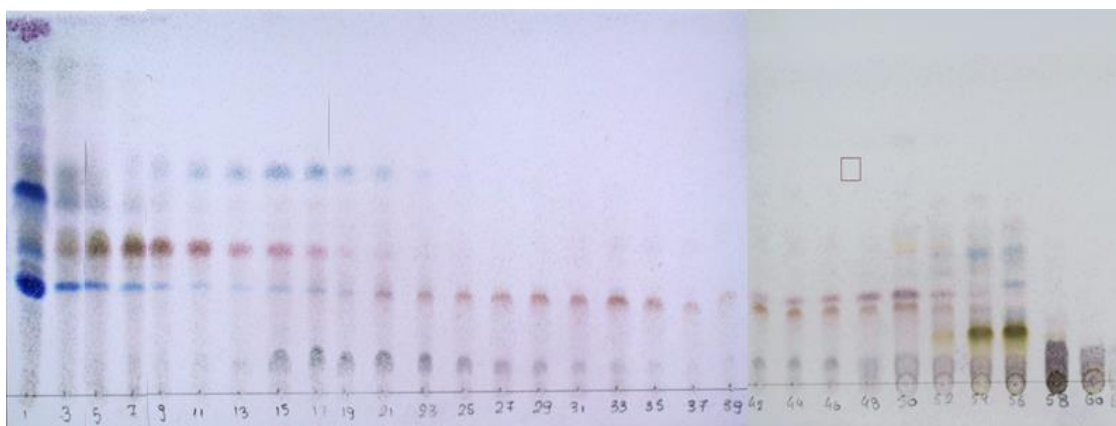
Ο έλεγχος της πορείας του διαχωρισμού αλλά και η περιεκτικότητα των κλασμάτων σε συστατικά πραγματοποιήθηκε με TLC (Εικόνα 110 Εικόνα 111 Εικόνα 112) σε σύστημα ανάπτυξης DCM:MeOH 95:5.



Εικόνα 110 Χρωματογράφημα Κλασμάτων CPE στα 254nm.



Εικόνα 111 Χρωματογράφημα Κλασμάτων CPE στα 366nm.



Εικόνα 112 Χρωματογράφημα Κλασμάτων CPE στο ορατό.

Με βάση τα χρωματογραφήματα αυτά έγιναν οι συνενώσεις των κλασμάτων από όπου προέκυψαν τελικά 8 κλάσματα τα καθαρά βάρη των οποίων φαίνονται στον παρακάτω Πίνακα 42:

Πίνακας 42 Κλάσματα και Βάρη.

Fractions	Βάρος (mg)	Fractions	Βάρος (mg)
Fr 1	718.5	Fr 6	56.8
Fr 2	1144.7	Fr 7	61.1
Fr 3	128.9	Fr 8	208.4
Fr 4	169	Fr 9	77
Fr 5	87		

2.4.3.2 Επεξεργασία εμπλουτισμένου κλάσματος Μασлинικού Οξέος με pH-Zone CPE

Η υψηλή περιεκτικότητα του Ολικού Πολυφαινολικού Κλάσματος του ελαιολάδου (T.P.F.) σε μασлинικό οξύ αποτέλεσε κριτήριο για την προσπάθεια απομόνωσης του. Για γρήγορη και αποτελεσματική απομόνωση μασлинικού οξέος από κλάσμα T.P.F. εφαρμόστηκε η τεχνική pH-Zone C.P.E στο εμπλουτισμένο κλάσμα Fr 1 που λήφθηκε μετά από την επεξεργασία που περιγράφηκε παραπάνω.

Εύρεση Διφασικού Συστήματος

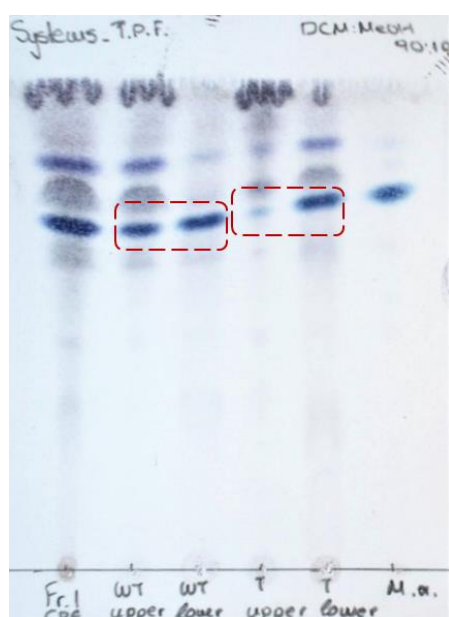
Για τον έλεγχο της συμβατικότητας αυτής της μεθόδου για την επεξεργασία του εμπλουτισμένου κλάσματος αλλά, και την εύρεση του κατάλληλου διφασικού συστήματος επιλέχθηκε το σύστημα n-Hexane:EtOAc:EtOH:H₂O (8: 2: 5: 5 v/v/v/v), το οποίο αναφέρθηκε και στην ενότητα 2.4.2.3 για την απομόνωση του ολεανολικού οξέος, καθώς αποτελούν δομικά ανάλογα και διαφέρουν μόνο στην ύπαρξη ενός υδροξυλίου στην θέση 3 του μασлинικού οξέος. Αρχικά, ζυγίστηκαν 5mg ξηρού κλάσματος σε δοκιμαστικό σωλήνα και παρασκευάστηκαν 5mL του παραπάνω συστήματος (Σ₁) και 5mL του ίδιου συστήματος με την προσθήκη TEA στην υδατική μέχρι το pH να είναι 10 (Σ₂). Ο κάθε δοκιμαστικός σωλήνας αναδεύτηκε σε συσκευή Vortex, τα μείγματα αφήθηκαν σε ηρεμία και καταγράφηκε η διαλυτική ικανότητα τους, ο χρόνος διαχωρισμού και η αναλογία των δυο φάσεων.

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 43) φαίνονται τα αποτελέσματα της δοκιμής των διφασικών συστημάτων:

Πίνακας 43 Αποτελέσματα δοκιμής διφασικού συστήματος.

Σύστημα	Διάλυση Εκχυλίσματος	Χρόνος διαχωρισμού	Αναλογία φάσεων
Σ ₁	Καλή	<30sec	50:50 (u:l)
Σ ₂	Καλή	<30sec	40:60 (u:l)

Ο έλεγχος της καταλληλότητας του διφασικού συστήματος έγινε με TLC (Εικόνα 113) σε σύστημα ανάπτυξης DCM: MeOH (90:10) και από το χρωματογράφημα παρατηρήθηκε η μεταβολή της κατανομής του μασλινικού οξέος και από τις 2 ουδέτερες φάσεις στην κάτω βασική φάση. Αυτό συμβαίνει εξαιτίας της όξινης φύσης του που στο βασικό περιβάλλον λαμβάνει την μορφή άλατος και ευνοείται η σταθερότητα και η διαλυτότητα του· πάνω σε αυτή την ιδιότητα βασίζεται και η μέθοδος, η οποία εφαρμόζεται.



Εικόνα 113 Συγκριτικό Χρωματογράφημα για τον έλεγχο της καταλληλότητας του διφασικού συστήματος στο ορατό.

Διαδικασία

Το σύστημα διαλυτών (1L) παρασκευάστηκε με ανάμειξη n-Hexane:EtOAc:EtOH:H₂O στην επιθυμητή αναλογία 8: 2: 5: 5 (v/v/v/v). Οι δύο φάσεις κάθε συστήματος διαχωρίστηκαν μετά από εξισορρόπηση του μίγματος και στην συνέχεια προστέθηκαν 8mL τριφθοροοξικού οξέος (TFA) στην οργανική φάση, ώστε η συγκέντρωσή του στο τελικό διάλυμα να αντιστοιχεί σε 100mM με pH 2 και 11mL Τριαιθυλαμίνης (TEA) στην υδατική φάση με σκοπό να ρυθμιστεί το pH 10 και η αντίστοιχη συγκέντρωση να είναι 80mM. Το πείραμα θα πραγματοποιηθεί σε descending mode για τον λόγο αυτό η άπολη φάση θα αποτελέσει την στατική φάση και αντίστοιχα η πολική φάση την κινητή φάση. Αρχικά, η στήλη (300mL FCPE300) πληρώθηκε με στατική φάση, η ταχύτητα περιστροφής ρυθμίστηκε και διατηρήθηκε σταθερή καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος στις 800 rpm και ροή στα 20 mL/min. Στη συνέχεια, 1.65g του επιλεγμένου κλάσματος (διαλυμένα σε 10 mL μίγματος 70:30 ουδέτερης κινητής φάσης: όξινης στατικής φάση), εγχύθηκαν στη στήλη μέσω βρόγχου 10mL και εκλούστηκαν με την

αλκαλοποιημένη κινητή φάση σε descending mode στις ίδιες αρχικές συνθήκες. Στην συγκεκριμένη μέθοδο δεν λαμβάνει χώρα η εξισορρόπηση του συστήματος με την κινητή φάση (τεχνική sandwich), διότι με την εξισορρόπηση θα χαθεί η αλληλεπίδραση που δημιουργείται μεταξύ των 2 φάσεων λόγω της διαφοράς pH. Ο συλλέκτης κλασμάτων ρυθμίστηκε ώστε να συλλέγει κλάσματα των 20 mL. Όταν τα κλάσματα αλκαλοποιήθηκαν περίπου στο 20 σωληνάκι, από την στήλη περάστηκε η ουδέτερη στατική φάση. Συνολικά, συλλέχθηκαν 39 κλάσματα και η διαδικασία διήρκεσε 54 λεπτά, ενώ όλα τα συλλεχθέντα κλάσματα αναλύθηκαν με TLC και συνενώθηκαν, με βάση την χημική τους ομοιότητα, προκύπτοντας τελικά 10 συνδυασμένα κλάσματα. Τέλος, η στήλη καθαρίστηκε και πληρώθηκε με το σύστημα αποθήκευσης (MeOH:H₂O 50:50).

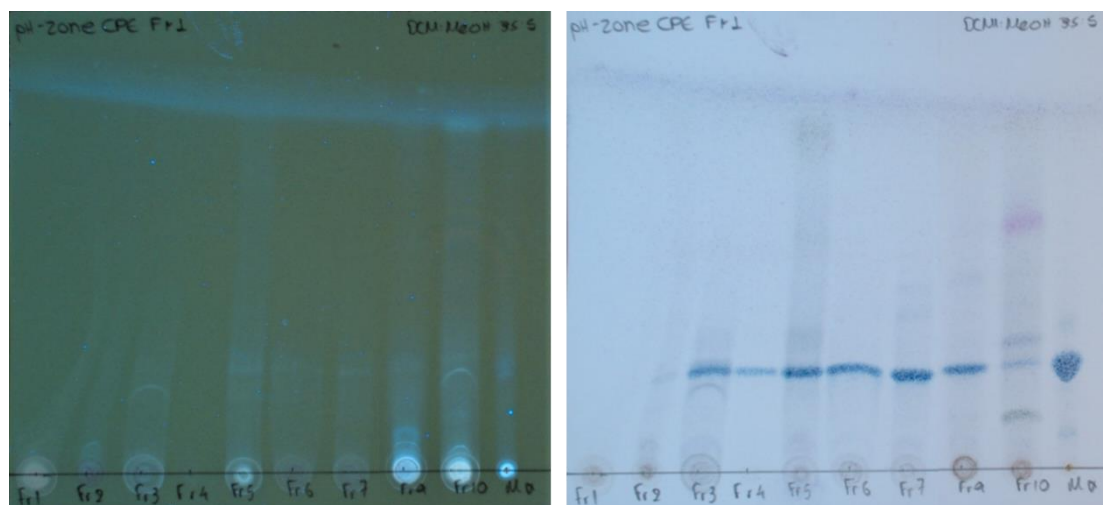
Η διαδικασία που ακολουθήθηκε φαίνεται συνοπτικά στον παρακάτω Πίνακας 44:

Πίνακας 44 Συνθήκες πειραματικής διαδικασίας.

Κλάσματα	Στατική φάση	Κινητή φάση	Ρυθμίσεις στήλης			Όγκος κλάσματος
-	Άνω-Όξινη	-	descending	800rpm	20mL/min	-
1-20	Άνω Όξινη	Κάτω-Βασική	descending	800rpm	20mL/min	20mL
21-39	Άνω Εξουδετερωμένη	Άνω-Ουδέτερη	descending	800rpm	20mL/min	20mL

Όλα τα συλλεχθέντα κλάσματα αναλύθηκαν με TLC στο σύστημα DCM:MeOH (95:5) και έγινε αντιληπτή η καλή διαχωριστική ικανότητα της τεχνικής μέσω την οποίας είναι δυνατή η λήψη καθαρού μασλινικού οξέος. Τα επιλεγμένα κλάσματα διηθήθηκαν σε πορώδες 3 (Soxhlet por. 3) και το ίζημα ήταν αυτό που περιείχε τον καθαρό μεταβολίτη.

Μετά την εκτέλεση του pH-Zone C.P.E. και τις συνενώσεις των κλασμάτων με την ίδια χημική σύσταση, αναπτύχθηκε το χρωματογράφημα TLC (Εικόνα 114) σε σύστημα διαλυτών DCM:MeOH (95:5).



Εικόνα 114 Χρωματογράφημα συνενωμένων κλασμάτων pH-Zone CPE στα 366nm και στο ορατό.

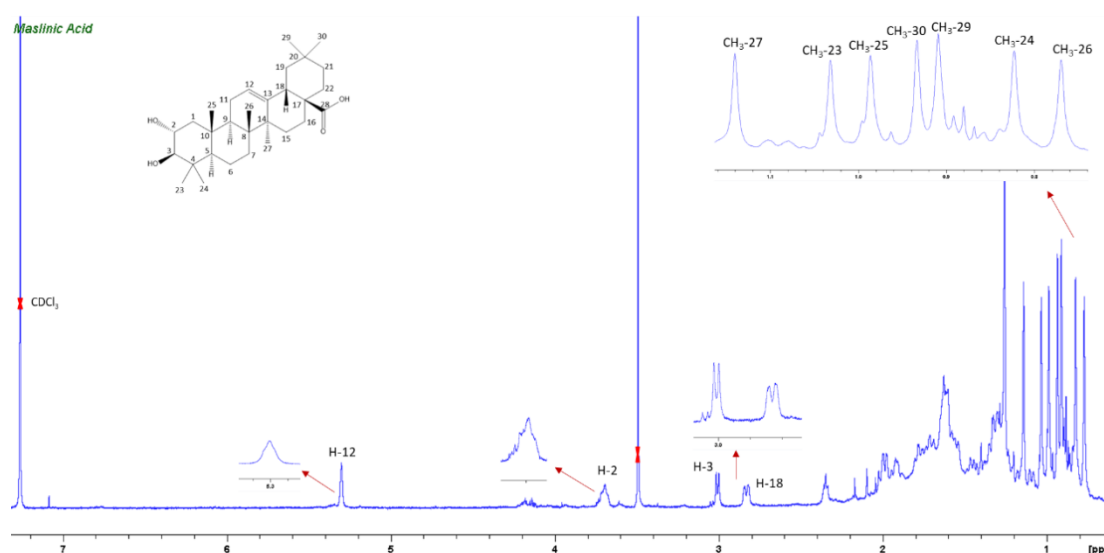
Τα καθαρά βάρη των κλασμάτων φαίνονται στον παρακάτω Πίνακας 45:

Πίνακας 45 Κλάσματα και Βάρη.

Fraction	Weight (mg)	Fraction	Weight (mg)
Fr 1	37.6	Fr 6	142.6
Fr 2	96.7	Fr 7	117.5
Fr 3	203.4	Fr 8	85.6
Fr 4	63.9	Fr 9	84.2
Fr 5	51	Fr 10	83.8

2.4.3.3 Φασματοσκοπική Ανάλυση απομονωμένου Μασλινικού Οξέος

¹H NMR



Εικόνα 115 Φάσμα Μασλινικού οξέος.

Η ταυτοποίηση του μασλινικού οξέος έγινε συνδυαστικά με την επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων (Εικόνα 115 Φάσμα Μασλινικού οξέος.) αλλά και την χρήση των βιβλιογραφικών αναφορών [41]. Στο φάσμα, η παρουσία της πολλαπλής κορυφής στα 5.30ppm υποδεικνύει την παρουσία του διπλού δεσμού στην θέση 1. Από τις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων των θέσεων 2 και 3, που ανήκουν στην οξυγονωμένη περιοχή (3.69 και 3.00 ppm) είναι εύκολη η κατανόηση της παρουσίας 2 υδροξυλίων. Επίσης, παρατηρούνται 7 απλές κορυφές, οι οποίες αντιστοιχούν στα 7 διαφορετικά μεθύλια του μορίου. Η χημική μετατόπιση των κορυφών είναι 1.03, 0.82, 0.98, 0.77, 1.14, 0.90 και 0.93 και υποδεικνύουν τις θέσεις 23, 24, 25, 26, 27, 28 και 29, αντίστοιχα. Επίσης, από την παρατήρηση του φάσματος άνθρακα ¹³C αναγνωρίζονται 30 άνθρακες: 7 που αντιστοιχούν τα μεθύλια (28.6, 16.5, 16.6, 16.8, 25.8, 33.0 και 23.5ppm), 2 που αντιστοιχούν στους άνθρακες του διπλού δεσμού (122.4 και 143.5ppm), 1 άνθρακας του καρβοξυλίου (177.5ppm) και 2 οξυγονωμένοι (68.6 και 84.5ppm).

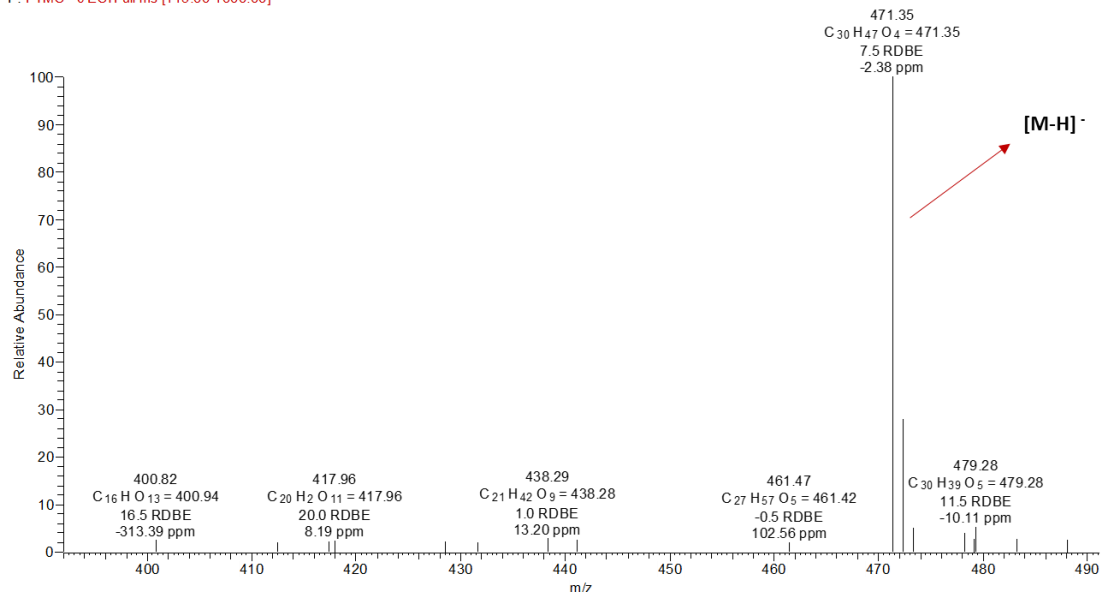
Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα του μασλινικού οξέος αναφέρονται στον Πίνακας 46

Πίνακας 46 Φασματοσκοπικά δεδομένα Μασλινικού Οξέος.

Μασλινικό Οξύ

C/H	¹ H (ppm, m, Hz)	¹³ C (ppm)
1	1.85-1.84, 1.48 (2H), m *	46.6
2	3.69, m, 1-H	68.6
3	3.00, d, 9.32	84.5
4	-	39.2
5	-	55.1
6	1.45, 1.24 (2H), m *	18.2
7	1.60-1.57, 1.17 (2H), m *	32.2
8	-	39.3
9	1.48, m *	47.4
10	-	38
11	1.80, m *	23.3
12	5.30, m, 1-H	122.4
13	-	143.5
14	-	41.1
15	1.45, m *	27.4
16	1.85-1.84, 1.60-1.57 (2H), m *	22.9
17	-	45.7
18	2.83, d, 14.37	41.1
19	1.60-1.57, 1.08 (2H), m *	46.6
20	-	30.6
21	1.30, 1.17, (2H) m *	33.7
22	1.60-1.57, 1.45 (2H), m *	32.4
23	1.03, s, 3-H, CH ₃	28.6
24	0.82, s, 3-H, CH ₃	16.5
25	0.98, s, 3-H, CH ₃	16.6
26	0.77, s, 3-H, CH ₃	16.8
27	1.14, s, 3-H, CH ₃	25.8
28	-	177.5
29	0.90, s, 3-H, CH ₃	33.0
30	0.93, s, 3-H, CH ₃	23.5

F: FTMS - c ESI Full ms [115.00-1000.00]



Εικόνα 116 Φάσμα μάζας HRMS-Orbitrap σε αρνητικό ιονισμό του Μασλικού Οξέος.

2.4.4 Συμπεράσματα

Το Ολεανολικό και Μασλινικό Οξύ είναι τριτερπενικά παράγωγα, που υπάρχουν σε σημαντικές ποσότητες τόσο στο ελαιόλαδο όσο και στα φύλλα της *Olea europaea*, Oleaceae και χαρακτηρίζονται από σημαντικές φαρμακολογικές ιδιότητες. Με έναυσμα την ανάγκη για γρήγορη, αποτελεσματική και μεγάλη σε ποσότητα απομόνωση των δύο μεταβολιτών έγινε η προσπάθεια ανάπτυξης της κατάλληλης μεθόδου. Έτσι, αρχικά για την παραλαβή του εμπλουτισμένου κλάσματος Ολεανολικού Οξέος εκμεταλλεύτηκαν οι ιδιότητες του ζωικού άνθρακα να απορροφά σε μεγάλο βαθμό μεγαλομόρια, όπως χλωροφύλλη και όχι τα υπόλοιπα συστατικά του εκχυλίσματος των φύλλων ελιάς. Από την άλλη μεριά για την παραλαβή του εμπλουτισμένου κλάσματος Μασλινικού Οξέος εφαρμόστηκε η ήδη γνωστή μέθοδος κλασμάτωσης του Πολυφαινολικού Κλάσματος Ελαιολάδου με την διαφορά της επιλογής μόνο ενός διφασικού συστήματος *n*-Hexane:EtOAc:EtOH:H₂O (3: 2: 3: 2 v/v/v/v) και την χρήση της τεχνικής C.P.E.. Μέσω αυτής της τροποποιημένης τεχνικής, έγινε δυνατή η λήψη του επιθυμητού εμπλουτισμένου κλάσματος σε ικανοποιητική απόδοση και σύντομο πειραματικό χρόνο. Στην συνέχεια, τα δύο εμπλουτισμένα κλάσματα επεξεργάστηκαν με την χρήση μίας ιδιαίτερης μεθόδου, pH-zone C.P.E., σύμφωνα με την οποία η όξινη φύση του μεταβολίτη-στόχου παίζει καθοριστικό παράγοντα στην επιλογή των συστημάτων. Αναλυτικότερα, τα συστήματα φέρουν συγκεκριμένο pH, η στατική φάση όξινο ενώ η κινητή βασικό, με αποτέλεσμα το οξύ να λαμβάνει την μορφή άλατος, αυξάνεται η σταθερότητα και η διαλυτότητα του στην κινητή φάση και έτσι, επιτυγχάνεται η απομόνωση του. Συγκεκριμένα, το διφασικό σύστημα που χρησιμοποιείται και για τις δυο απομονώσεις είναι *n*-Hexane:EtOAc:EtOH:H₂O (8: 2: 5: 5 v/v/v/v) και στην στατική φάση προστίθεται TFA, ενώ στην κινητή TEA. Από την εφαρμογή της παραπάνω τεχνικής, η απόδοση αλλά και η καθαρότητα των μορίων ήταν σε ικανοποιητικό βαθμό.

Συμπερασματικά, φαίνεται πως αυτή η μεθοδολογία μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά για τον καθαρισμό σε μεγάλη κλίμακα ολεανολικού και μασλινικού οξέος από προϊόντα της ελιάς, καθώς και για την απομόνωση παρόμοιων όξινων τερπενοειδών από φυσικές πηγές.

2.5 Ανάλυση Ολικού Πολυφαινολικού Κλάσματος (T.P.F.)

2.5.1 Κλασμάτωση TPF με Step-Gradient CPC

Η εξειδίκευση αλλά και η τεχνογνωσία της ερευνητικής ομάδας του εργαστήριου μας στον τομέα του ελαιολάδου κατέχει πρωταρχική θέση, όσο αφορά την επεξεργασία, ανάλυση, απομόνωση και ταυτοποίηση μεταβολιτών καθώς και τον έλεγχο των βιολογικών τους δράσεων. Έτσι, μεταξύ άλλων, είναι δυνατός ο γρήγορος και αποδοτικός διαχωρισμός του ολικού πολυφαινολικού κλάσματος του ελαιολάδου (Total Polyphenolic Fraction, T.P.F.) από το λιπαρό μέρος με τη χρήση σύγχρονων χρωματογραφικών τεχνικών όπως την τεχνική CPE. Στην συνέχεια με τη χρήση της χρωματογραφίας κατ' Αντιρροή και τη μέθοδο της βαθμιδωτής έκλουσης (C.P.C. gradient mode) επιτυγχάνεται η κλασμάτωση του TPF με ικανοποιητικά αποτελέσματα. Τα 4 διφασικά συστήματα που χρησιμοποιούνται στην μέθοδο της βαθμιδωτής έκλουσης διατηρούν σταθερή την αναλογία της κάτω φάσης που αποτελεί και την στατική φάση και μεταβάλλουν την πολικότητα της πάνω φάσης (κινητής), με αποτέλεσμα την βαθμιδωτή έκλουση των ουσιών του πολυφαινολικού κλάσματος. [40]

Η σύνθεση και οι αναλογίες των διαλυτών στη σειρά διφασικών συστημάτων δίνονται στο παρακάτω Πίνακα 47:

Πίνακας 47 Σειρά Διφασικών Συστημάτων για την επεξεργασία του T.P.F.

Σειρά Συστημάτων	n- Hexane	EtOAc	EtOH	H ₂ O
Σ ₁	4	1	2	3
Σ ₂	3	2	2	3
Σ ₃	2	3	2	3
Σ ₄	1	4	2	3

Μέσω αυτής της μεθόδου είναι δυνατή η επεξεργασία μεγάλης ποσότητας πολυφαινολικού κλάσματος (~10g ανά ένεση στην παρασκευαστική στήλη), και η παραλαβή συμπαντικών ποσοτήτων εμπλουτισμένων κλασμάτων με έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον.

Διαδικασία:

Αρχικά, έγινε υπολογισμός του όγκου κάθε συστήματος (Πίνακας 48), ώστε να μην καταναλωθούν μεγάλες ποσότητες διαλυτών και να πραγματοποιηθεί η τεχνική με το λιγότερο δυνατό λειτουργικό κόστος.

Πίνακας 48 Υπολογισμός Όγκων Συστημάτων.

Σύστημα Διαλυτών	n-Hex	EtOAc	EtOH	H ₂ O	Συνολικός όγκος (mL)	Όγκος που περνάει από την στήλη (mL)
Σ ₁	1200	300	600	900	4000	500
Σ ₂	750	500	500	750	2500	1100
Σ ₃	640	900	640	900	3080	1400
Σ ₄	150	600	300	450	1500	1000

Η ποσότητα του ξηρού εκχυλίσματος που αναλύθηκε ήταν 9.70g, η οποία διαλύθηκε σε 30mL Σ₁ (20mL κάτω και 10 mL πάνω φάσης). Αρχικά, η στήλη πληρώθηκε με στατική φάση Σ₁ σε ascending mode, περιστροφή 200 rpm και ροή 20mL/min. Στη συνέχεια, διαβιβάστηκε η κινητή φάση Σ₁ (ascending mode, 750 rpm και με ροή 10mL/min) και έγινε εξισορρόπηση του διφασικού συστήματος μέσα στη στήλη (Sf=77%). Ακολούθησε η εισαγωγή του δείγματος, η ροή αυξήθηκε στα 15mL/min, οι στροφές μειώθηκαν στα 650 rpm και έγινε συλλογή κλασμάτων όγκου 20mL με την χρήση αυτόματου συλλέκτη. Από την στήλη περάσαν 500mL κινητής Σ₁ και συλλέχθηκαν τα πρώτα 25 κλάσματα, στην συνέχεια διαβιβάστηκαν 1100 mL κινητής Σ₂ και συλλέχθηκαν τα επόμενα 55 κλάσματα, διαβιβάστηκαν άλλα 1400 mL κινητής Σ₃ και συλλέχθηκαν ακόμα 70, και τέλος, 1000mL κινητής Σ₄, όπου συλλέχθηκαν 50 κλάσματα. Κατά το στάδιο της εξώθησης αυξήθηκε η ροή στα 20mL/min και διαβιβάστηκε η στατική φάση, ώστε να παρασυρθούν τα πιο πολικά συστατικά που είχαν κατακρατηθεί μέσα στην στήλη (συλλογή περίπου 50 ακόμα κλασμάτων). Το τελικό στάδιο ήταν ο καθαρισμός και η πλήρωση της στήλης με το σύστημα αποθήκευσης (MeOH:H₂O 50:50). Ο διαχωρισμός διήρκεσε 390 min και συλλέχθηκαν συνολικά 250 κλάσματα.

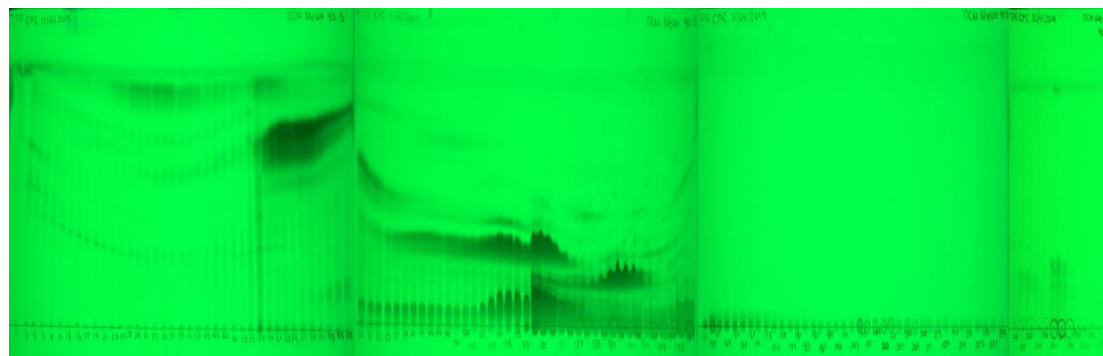
Η διαδικασία που ακολουθήθηκε φαίνεται συνοπτικά στον παρακάτω Πίνακας 49 Συνθήκες πειραματικής διαδικασίας.:

Πίνακας 49 Συνθήκες πειραματικής διαδικασίας.

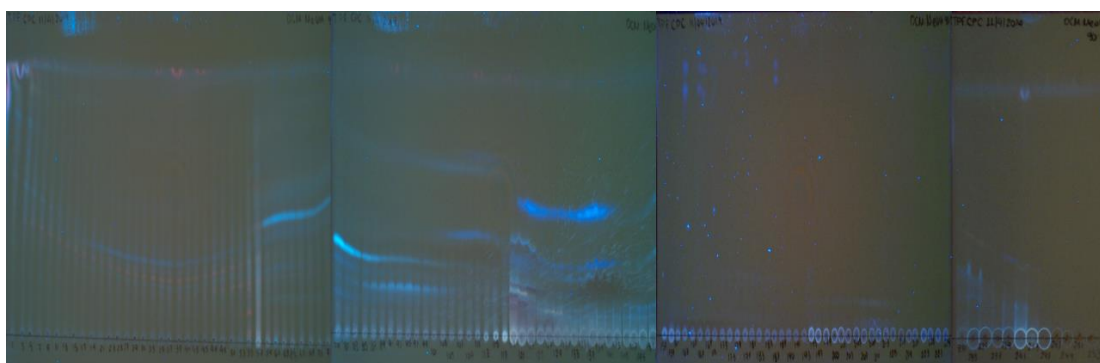
Κλάσματα	Στατική φάση	Κινητή φάση	Ρυθμίσεις στήλης			Όγκος κλάσματος
-	Κάτω	-	ascending	200rpm	20mL/min	-
-	Κάτω	Άνω Σ ₁	ascending	750rpm	10mL/min	-
1-25	Κάτω	Άνω Σ ₁ (500mL)	ascending	650rpm	15mL/min	20mL
26-80	Κάτω	Άνω Σ ₂ (1100mL)	ascending	650rpm	15mL/min	20mL
81-150	Κάτω	Άνω Σ ₃ (1400mL)	ascending	650rpm	15mL/min	20mL
151-200	Κάτω	Άνω Σ ₄ (1000mL)	ascending	650rpm	15mL/min	20mL
200-250	Κάτω	Κάτω (1000mL)	ascending	650rpm	20mL/min	20mL

Αποτελέσματα

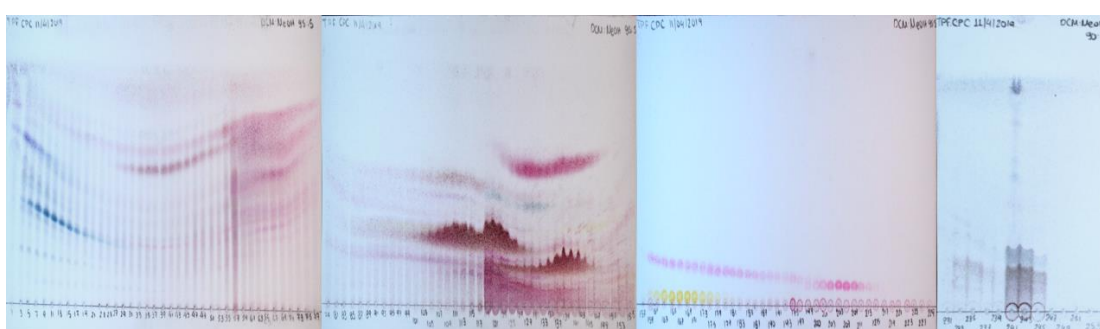
Το σύνολο των κλασμάτων αναλύθηκε με TLC σε σύστημα DCM:MeOH (95:5) και τα χρωματογραφήματα φαίνονται παρακάτω (Εικόνα 117 Εικόνα 118 Εικόνα 119):



Εικόνα 117 Χρωματογράφημα κλασμάτων στα 254rpm.



Εικόνα 118 Χρωματογράφημα κλασμάτων στα 366nm.



Εικόνα 119 Χρωματογραφήματα στο ορατό μετά από ψεκασμό με διάλυμα θεικής βανιλίνης και θέρμανση.

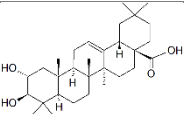
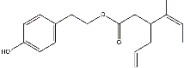
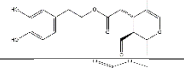
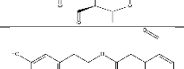
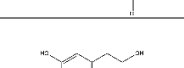

Στη συνέχεια τα κλάσματα με παρόμοιο χημικό προφίλ συνενώθηκαν, συμπυκνώθηκαν μέχρι ξηρού και μετρήθηκε το βάρος τους (Πίνακας 50).

Πίνακας 50 Βάρη συνενωμένων κλασμάτων που προέκυψαν από την κλασμάτωση του TPF με step-gradient CPC σε παρασκευαστική κλίμακα.

Συν. Κλάσμα	Βάρος (mg)	Συν. Κλάσμα	Βάρος (mg)	Συν. Κλάσμα	Βάρος (mg)
Fr 1	172.3	Fr 11	181.9	Fr 21	49.4
Fr 2	141.9	Fr 12	150.4	Fr 22	86.3
Fr 3	113.0	Fr 13	172.9	Fr 23	29.4
Fr 4	110.4	Fr 14	107.9	Fr 24	8.1
Fr 5	80.2	Fr 15	62.9	Fr 25	18.6
Fr 6	27.7	Fr 16	262.0	Fr 26	10.4
Fr 7	64.3	Fr 17	632.1	Fr 27	18.5
Fr 8	59.5	Fr 18	694.5	Fr 28	24.3
Fr 9	54.4	Fr 19	49.1	Fr 29	11.4
Fr 10	169.1	Fr 20	73.3	Fr 30	219.8

Τα συνενωμένα κλάσματα αναλύθηκαν τόσο με χρωματογραφικές τεχνικές όσο και με φασματοσκοπικές και ταυτοποιήθηκαν τα κυριότερα συστατικά του ελαιολάδου. Αναλυτικά, φαίνονται στον παρακάτω Πίνακας 51 Οι κύριοι μεταβολίτες του TPF, η δομή τους και τα κλάσματα CPC στα οποία συλλέχθηκαν:

Πίνακας 51 Οι κύριοι μεταβολίτες του TPF, η δομή τους και τα κλάσματα CPC στα οποία συλλέχθηκαν

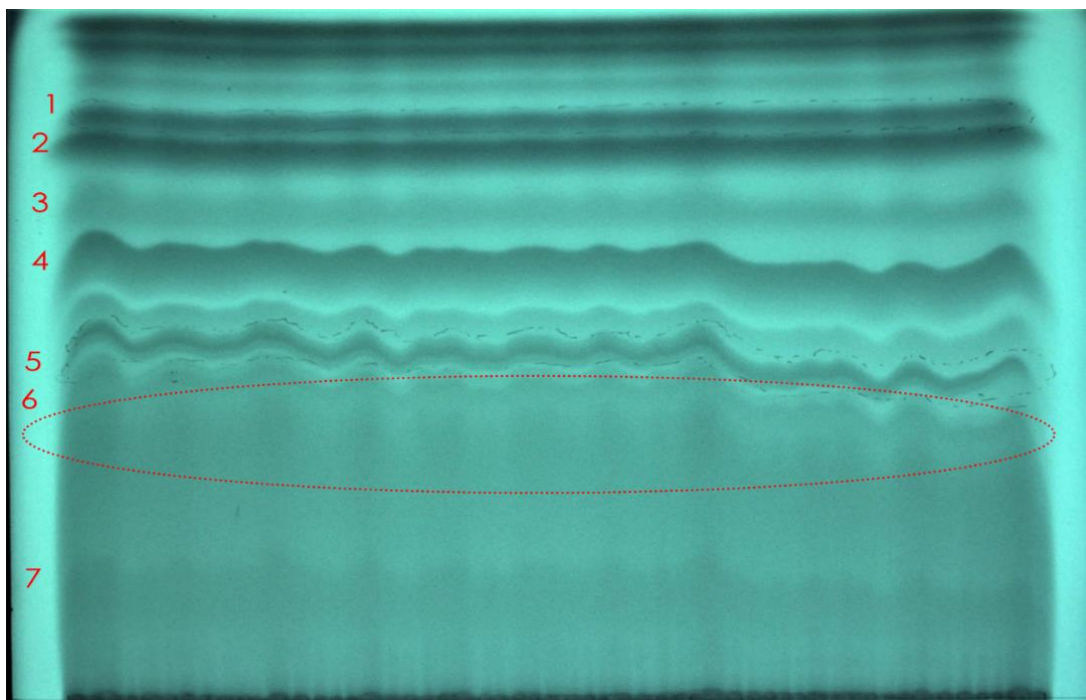
Μεταβολίτης	Δομή	Συνενωμένο Κλάσμα
Μασλιτικό Οξύ		Fr 2
Ολεοκανθάλη		Fr 14
MFOA		Fr 15
Ελενολικό Οξύ		Fr 18
Ολεασείνη		Fr20
Υδροξυτυροσόλη		Fr24

2.5.2 Επεξεργασία κλασμάτων CPC και απομόνωση νέων μεταβολιτών[42]

2.5.2.1 Επεξεργασία του συνενωμένου κλάσματος 19 (Fr19) και παραλαβή

Ολεοκανθαλικού Οξέος

Για την επεξεργασία του συνενωμένου κλάσματος **19** επιλέχθηκε η μέθοδος της παρασκευαστικής TLC. Αρχικά, 23.5mg δείγματος διαλύθηκαν σε 1mL EtOAc και εναποτέθηκαν πάνω στην γυάλινη πλάκα σε προκαθορισμένο σημείο. Η πλάκα αναπτύχθηκε σε κλειστό θάλαμο σε σύστημα διαλυτών n-Heptane EtOAc (30:70 v/v). Η διαδικασία της ανάπτυξης επαναλήφθηκε δύο φορές. Στην συνέχεια, έγινε παρατήρηση της πλάκας με λάμπα UV στα 235nm και επισημάνθηκαν οι σημαντικότερες ζώνες (Εικόνα 120 Παρασκευαστική TLC και ζώνες ενδιαφέροντος).



Εικόνα 120 Παρασκευαστική TLC και ζώνες ενδιαφέροντος

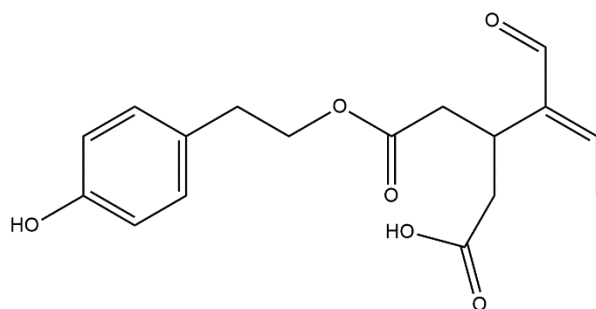
Συνολικά, προέκυψαν 7 ζώνες ενδιαφέροντος. Ακολούθησε απόξυση των επισημασμένων ζωνών, εκχύλιση τους με DCM και ακετόνη και η παραλαβή των ουσιών με διήθηση σε Soxhlet (πορώδες 4).

Μετά την ολοκλήρωση της επεξεργασίας τα βάρη των 7 κλάσμάτων φαίνονται παρακάτω (Πίνακας 52 Κλάσματα και Βάρη.):

Πίνακας 52 Κλάσματα και Βάρη.

Κλάσμα	Βάρος (mg)	Κλάσμα	Βάρος (mg)
1	1.2	5	0.4
2	0.8	6	4.6
3	0.4	7	1.5
4	0.5		

Το κλάσμα 6 παρουσίασε ιδιαίτερο ενδιαφέρον για αυτό αναλύθηκε περαιτέρω με χρωματογραφικές, φασματοσκοπικές και φασματομετρικές μεθόδους. Η ανάλυση αυτή έδειξε ότι πρόκειται για μια ουσία με δομή παρόμοια με την ολεοκανθάλη στην οποία η αλδεΐδη της θέσεως 3 έχει αντικατασταθεί με μια ομάδα οξέος. Η βιβλιογραφική μελέτη που ακολούθησε έδειξε ότι δεν υπάρχουν στοιχεία σχετικά με την απομόνωση και την δομική απόδοση του συγκεκριμένου μεταβολίτη και συνεπώς αποτελεί νέο φυσικό προϊόν και ονομάστηκε ολεοκανθαλικό οξύ, (Εικόνα 121 Δομή Ολεοκανθαλικού Οξέος. (εξαιτίας της στενής δομικής συγγένειας με την ολεοκανθάλη).



Εικόνα 121 Δομή Ολεοκανθαλικού Οξέος.

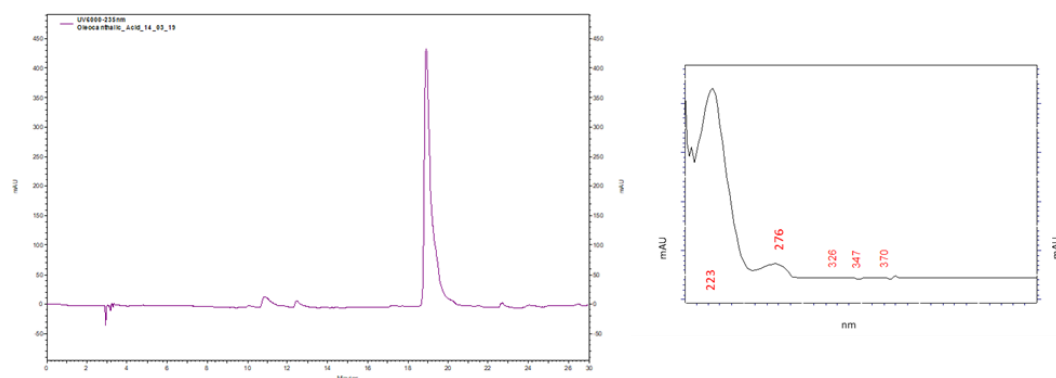
➤ HPLC Ανάλυση

Το δείγμα διαλύθηκε σε 1mL MeOH στην επιθυμητή συγκέντρωση C=0.2mg/mL και αναλύθηκε με την μέθοδο (Πίνακας 53 Μέθοδος ανάλυσης HPLC.):

Πίνακας 53 Μέθοδος ανάλυσης HPLC.

TIME	H ₂ O +0.1% A.A. (%)	AcN + 2%MeOH (%)	Flow (mL / min)
initial	98	2	1.0
10	75	25	1.0
20	37	63	1.0
25	2	98	1.0
27	98	2	1.0
30	98	2	1.0

Το χρωματογράφημα στα 235nm και το φάσμα UV της ουσίας φαίνεται στην Εικόνα 122:



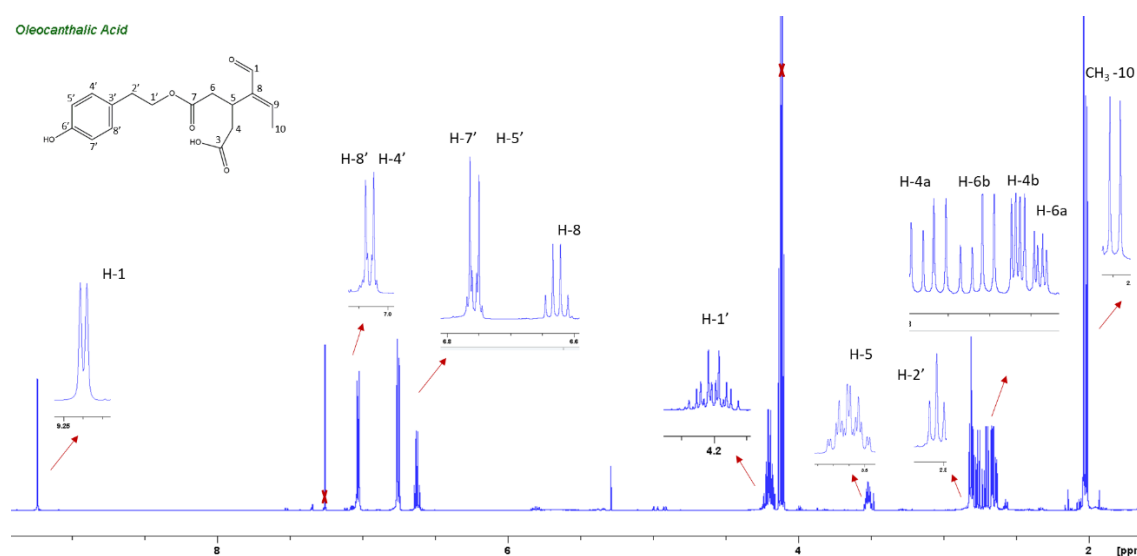
Εικόνα 122 Χρωματογράφημα στα 235nm και το φάσμα UV.

Η δομή της ένωσης διασαφηνίστηκε μέσω των ¹D- και ²D-NMR, καθώς και HRMS και HRMS/MS φασματομετρία.

➤ NMR Ανάλυση

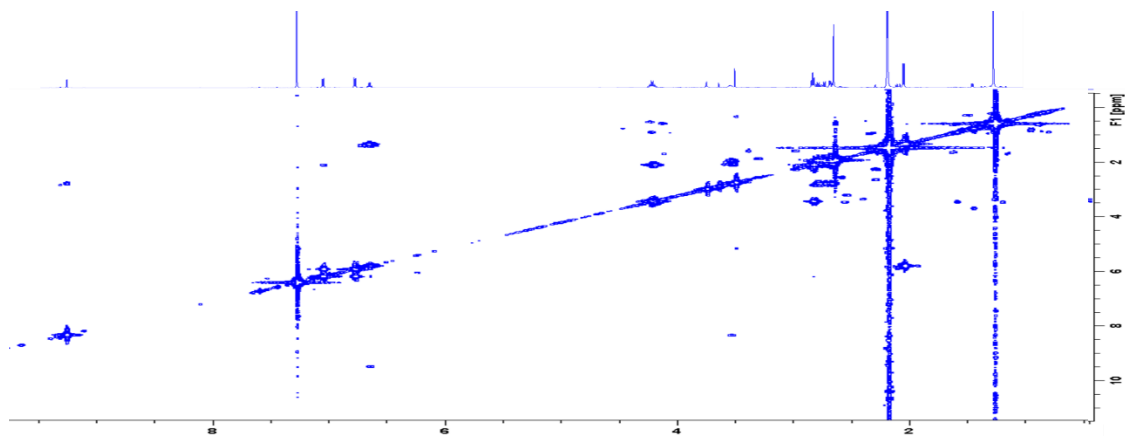
Από την σύγκριση των δεδομένων των φασμάτων της ένωσης και της ολεοκανθάλης παρατηρήθηκαν σημαντικές ομοιότητες. Η παρουσία του συστήματος της τυροσόλης είναι εμφανής από την ύπαρξη δύο διπλών κορυφών στα 7.04 και 6.76ppm (καθεμία αντιστοιχεί σε 2H με J=8.7Hz), που υποδεικνύουν την πάρα- υποκατάσταση αρωματικού δακτυλίου,

καθώς και οι συντονισμοί στα 4.02 ppm (2H, m) και 2.82 ppm (2H, t, J=6.8 Hz), που αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-1' και H-2', αντίστοιχα. Το φάσμα (Εικόνα 123) έδειξε επίσης την παρουσία σεκοϊριδοειδούς σκελετού εξαιτίας των πολυάριθμων κορυφών, μία τετραπλή στα 6,64ppm (J=7,2Hz) (H-8), μία πολλαπλή στα 3,51ppm (H-5), τέσσερις κορυφές στα 2.78-2.64 (H-4a/4b και H-6a/6b) και μία διπλή στα 2.02ppm (3H, J=7.2Hz) (H-10). Οι κύριες διαφορές μεταξύ της προς μελέτη ένωσης και της ολεοκανθάλης είναι η απουσία του αλδεϋδικού πρωτονίου H-3, καθώς και η μετατόπιση των συντονισμών των πρωτονίων H-4α και H-4β (geminal). Αυτό το γεγονός αποδεικνύει την δομική διαφορά μεταξύ των δύο ενώσεων, που σχετίζεται με το δευτερογενές τμήμα του μορίου. Επιπλέον, πολύ χαρακτηριστικός είναι ο συντονισμός του C-3 ο οποίος εμφανίζεται πιο θωρακισμένος σε σύγκριση με τον αντίστοιχο άνθρακα στην ολεοκανθάλη. (Πίνακας 54). Επιπλέον, στο ¹³C φάσμα στην απομονωμένη ένωση ήταν παρόντες δύο καρβοξυλικοί και ένας αλδεϋδικός άνθρακας στα 175,8ppm (C-3), 171,6 ppm (C-7) και 194,8ppm (C-1), αντίστοιχως αντί ενός καρβοξυλικού (171,6 ppm, C-7) και δύο αλδεϋδικών ανθράκων (194,8 ppm, C-1 και 200,2 ppm, C-3), στην ολεοκανθάλη. Η κατανομή της καρβοξυλομάδας στο C-3 προσδιορίστηκε με βάση τις συσχετίσεις στο HMBC και συγκεκριμένα με βάση τις συσχετίσεις των H-4α, H-4b και H-5 στον αντίστοιχο καρβοξυλικό άνθρακα στα 175.8 ppm (C-3). Όλα τα σήματα ¹H και ¹³C επιβεβαιώθηκαν από το COSY, HSQC-DEPT και HMBC και παρουσιάζονται στον Πίνακα.... Η στερεοχημεία της είναι πανομοιότυπη με την 8E διαμόρφωση στην ολεοκανθάλη. Οι εκτός διαγωνίου διασταυρούμενες κορυφές H-1 / H8 και H-5 / H-10 στο 2D φάσμα NOESY προτείνουν την εγγύτητα των ατόμων υδρογόνου, που δείχνουν έτσι τη διαμόρφωση E του C8-C9 διπλού δεσμού.



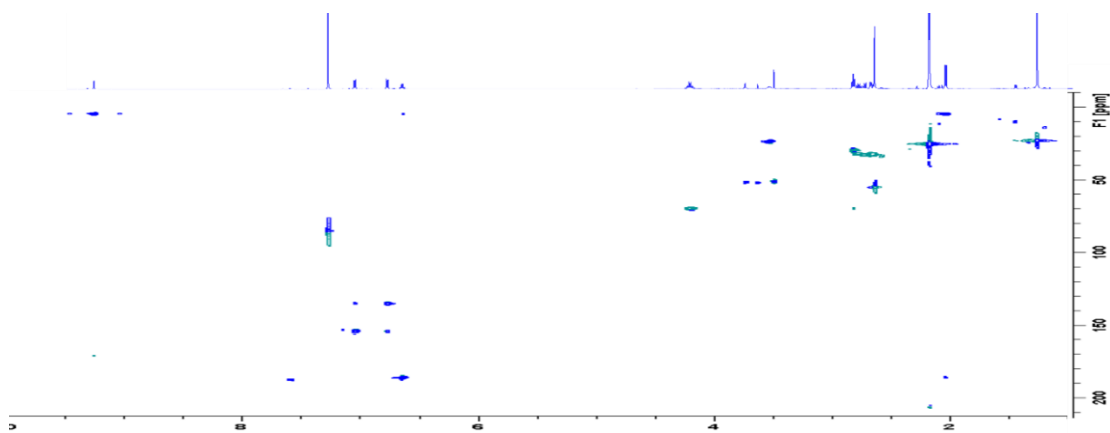
Εικόνα 123 Φάσμα ¹H-NMR Ολεοκανθαλικού Οξέος.

COZY



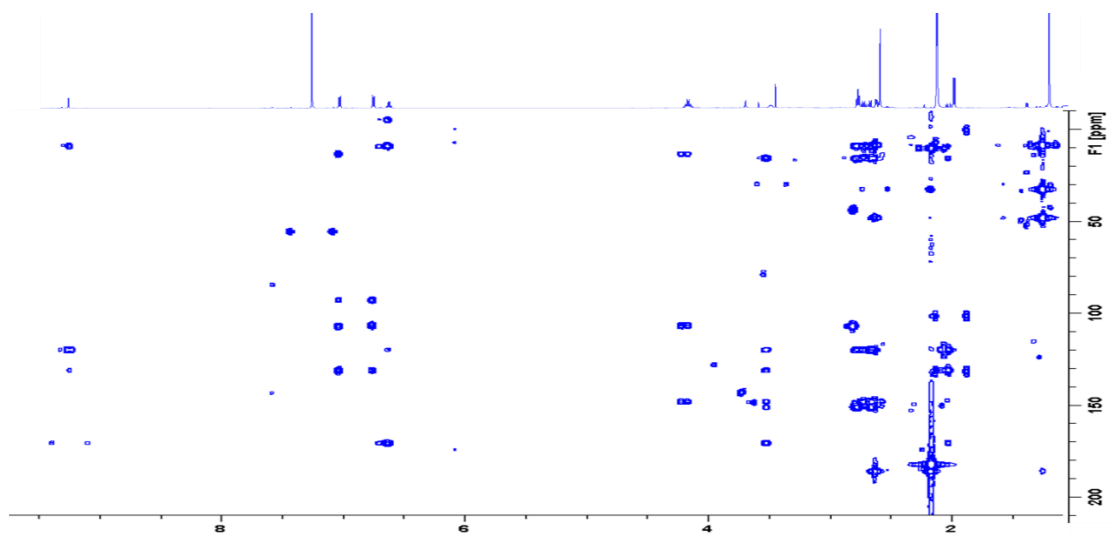
Εικόνα 124 Φάσμα COSY Ολεοκανθαλικού Οξέος.

HSQC-DEPT



Εικόνα 125 Φάσμα HSQC-DEPT Ολεοκανθαλικού Οξέος.

HMBC



Εικόνα 126 Φάσμα HMBC Ολεοκανθαλικού Οξέος.

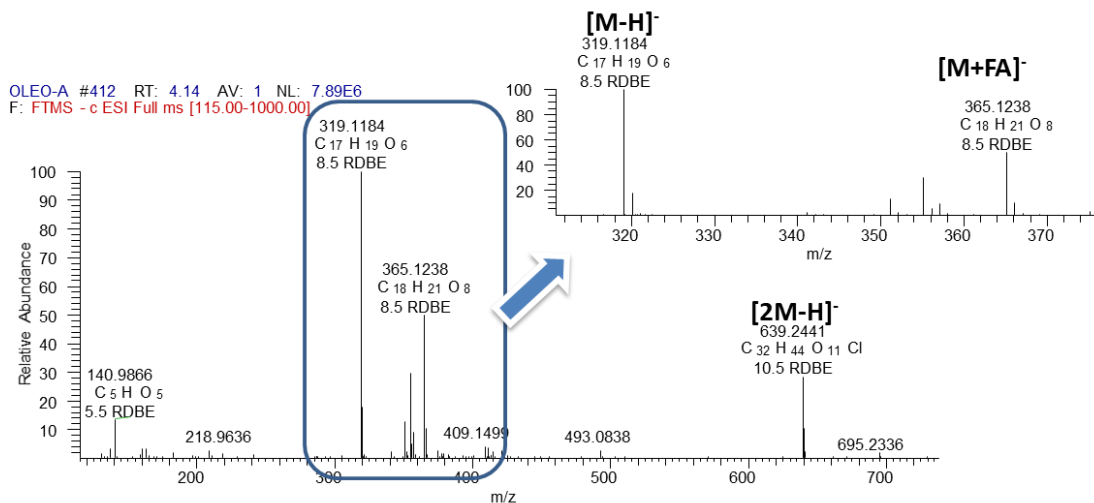
Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα της νέας ουσίας σε σχέση με την ολεοκανθάλη δίδονται στον Πίνακα 54:

Πίνακας 54 Φασματοσκοπική Σύγκριση Ολεοκανθάλης και Ολεοκανθαλικού Οξέος.

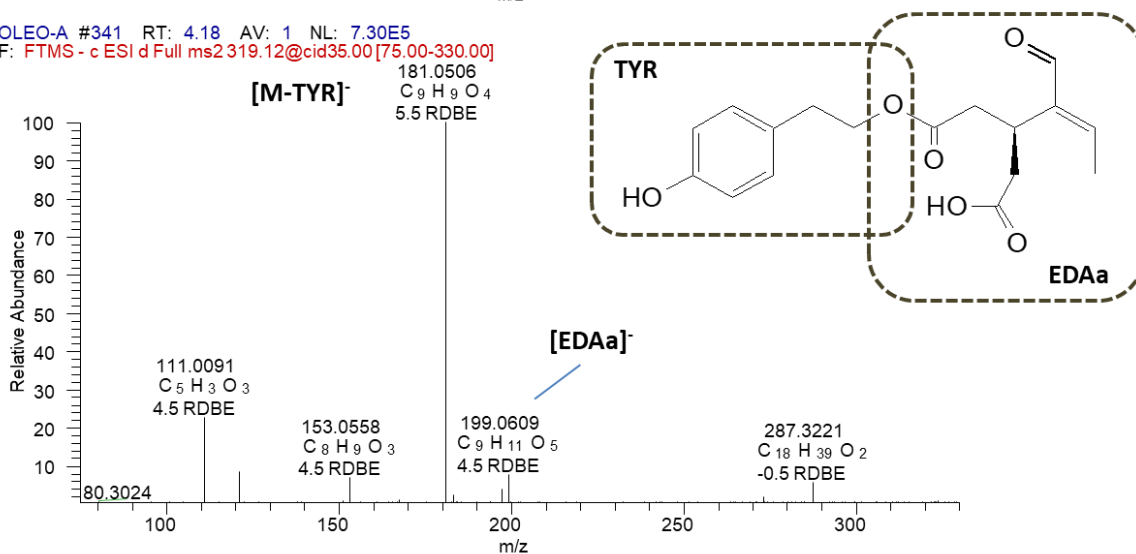
Ολεοκανθάλη			Ολεοκανθαλικό Οξύ	
H / C	¹ H (ppm, m, J σε Hz)	¹³ C (ppm)	¹ H (ppm, m, J σε Hz)	¹³ C (ppm)
1	9.23, d (2.0)	194.8	9.24, d, (2.0)	194.8
3	9.63, brs	202.2	-	175.8
4a	2.97, dd	45.5	2.78, dd, (16.6/8.9)	35.9
4b	2.73, dd		2.64, m	
5	3.60, m	26.4	3.51, m	28.9
6a	2.70, m	36.2	2.71, m	36.5
6b	2.62, m		2.65, m	
7	-	171.6	-	171.6
8	6.63, q	154.2	6.64, q, (7.2)	154.2
9	-	142.9	-	142.9
10	2.07, d	14.5	2.02, d, (7.2) CH ₃	14.5
1'	4.02, m	64.4	4.02, m	64.6
2'	2.82, t	33.5	2.82, t, (6.8)	33.5
3'	-	128.9	-	128.9
4'	7.04, d	129.2	7.04, d, (8.7)	129.2
5'	6.76, d	114.7	6.76, d, (8.7)	114.7
6'	-	154.0	-	154.0
7'	6.76, d	114.7	6.76, d, (8.7)	114.7
8'	7.04, d	129.2	7.04, d, (8.7)	129.2

➤ HRMS/MS Ανάλυση

Το φάσμα μάζας υψηλής ανάλυσης (Εικόνα 127) με ψευδομοριακό ιόν [M-H]⁻ m/z 319.1186 συμφώνησε με την προτεινόμενη στοιχειακή σύνθεση C₁₇H₁₉O₆. Επιπροσθέτως, στο φάσμα HRMS/MS χαρακτηριστικό θραύσμα σε m/z 199.0612 [M-H-TYP]⁻ παρατηρείται και αντιστοιχεί στο ιόν EDA Acid. Επιπλέον, ένα θραύσμα σε m / z 181.0507 παρατηρείται επίσης και αντιστοιχεί σε ιόν θραύσματος [M-H-TYP-H₂O]⁻.



OLEO-A #341 RT: 4.18 AV: 1 NL: 7.30E5
 F: FTMS - c ESI d Full ms 2 319.12@cid35.00 [75.00-330.00]



Εικόνα 127 Φάσμα μάζας HRMS-Orbitrap σε αρνητικό ιονισμό του Ολεοκανθαλικού Οξέος.

2.5.2.2 Επεξεργασία εμπλουτισμένου κλάσματος 21 (Fr21) και παραλαβή

Ολεασεινικού Οξέος

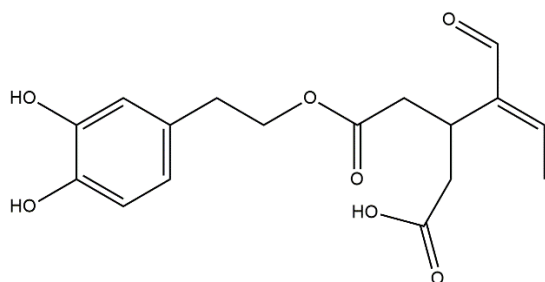
Για την επεξεργασία του κλάσματος **21** επιλέχθηκε η μέθοδος της παρασκευαστικής HPLC. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε φαίνεται στον παρακάτω Πίνακας 55:

Πίνακας 55 Μέθοδος Παρασκευαστικής HPLC.

TIME	H ₂ O (%)	AcN (%)	Flow (mL / min)
initial	80	20	15.0
10	70	30	15.0
12	70	30	15.0
22	50	50	15.0
25	50	50	15.0
30	10	90	15.0
32	80	20	15.0

73.3mg δείγματος διαλύθηκαν σε 1mL AcN και ενέθηκαν στην παρασκευαστική στήλη με τη βοήθεια αυτόματου εισαγωγέα δείγματος. Οι διαφορετικές κορυφές του χρωματογραφήματος συλλέχτηκαν χωριστά και συμπυκνώθηκαν υπό κενό για να μετρηθεί το ξηρό βάρος των κλασμάτων.

Η κορυφή στα ...min (βάρους 3.32mg), παρουσίασε ιδιαίτερο ενδιαφέρον για αυτό αναλύθηκε περαιτέρω με χρωματογραφικές, φασματοσκοπικές και φασματομετρικές μεθόδους. Η ανάλυση αυτή έδειξε ότι πρόκειται για έναν μεταβολίτη με παρόμοια δομή με αυτήν της ολεασείνης με τη μόνη διαφορά να εντοπίζεται στην παρουσία μιας ομάδας οξέος στην θέση 3 αντί της αλδεΐδης. Η βιβλιογραφική μελέτη που ακολούθησε έδειξε ότι δεν υπάρχουν στοιχεία σχετικά με την απομόνωση και την δομική απόδοση του συγκεκριμένου μεταβολίτη και συνεπώς αποτελεί νέο φυσικό προϊόν και ονομάστηκε ολεασεινικό οξύ, (Εικόνα 128) (εξαιτίας της στενής δομικής συγγένειας με την ολεασείνη).



Εικόνα 128 Δομή Ολεασεινικού Οξέος.

➤ HPLC-DAD Ανάλυση

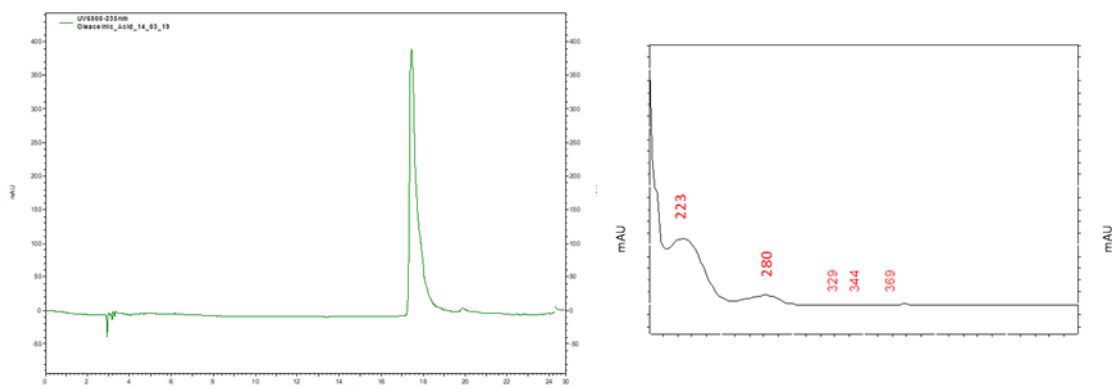
Το δείγμα διαλύθηκε σε 1mL MeOH στην επιθυμητή συγκέντρωση C=0.2mg/mL και αναλύθηκε με την μέθοδο (Πίνακας 56):

Πίνακας 56 Μέθοδος Ανάλυσης

TIME	H ₂ O +0.1% A.A. (%)	AcN + 2%MeOH (%)	Flow (mL / min)
initial	98	2	1.0

10	75	25	1.0
20	37	63	1.0
25	2	98	1.0
27	98	2	1.0
30	98	2	1.0

Το χρωματογράφημα της ουσίας στα 235nm και το φάσμα UV (Εικόνα 129):



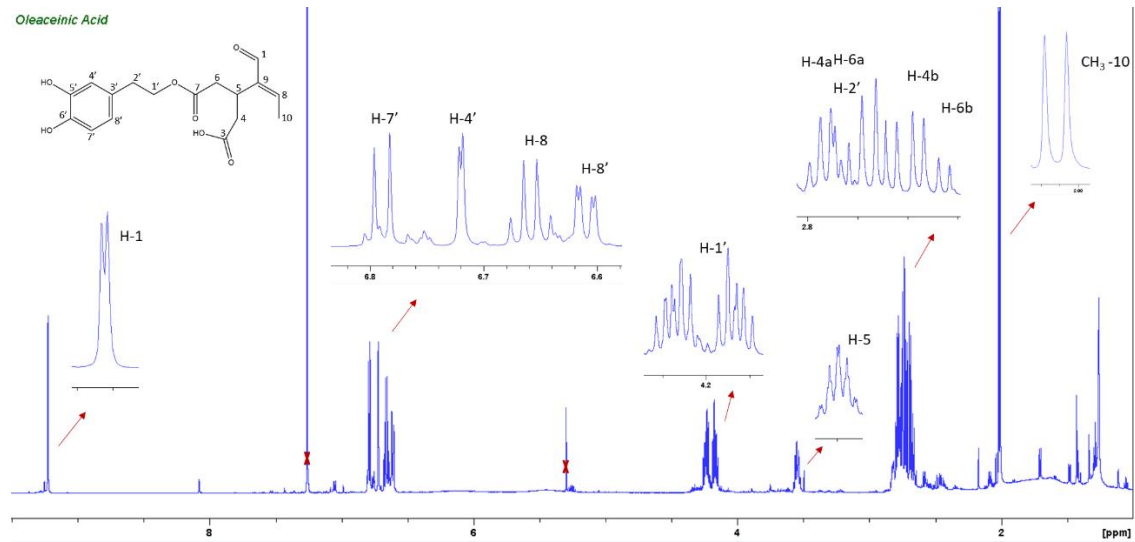
Εικόνα 129 Χρωματογράφημα στα 235nm και το φάσμα UV.

Για την περαιτέρω κατανόηση της ουσίας που απομονώθηκε, αναλύθηκε με φασματοσκοπία NMR 1 D με την χρήση δευτεριωμένου CDCl_3 . Παρουσίασε ιδιαίτερο ενδιαφέρον και αναλύθηκε με NMR 2 D και UPLC-HRMS για καλύτερη απόδοση της δομής του μορίου.

➤ NMR Ανάλυση

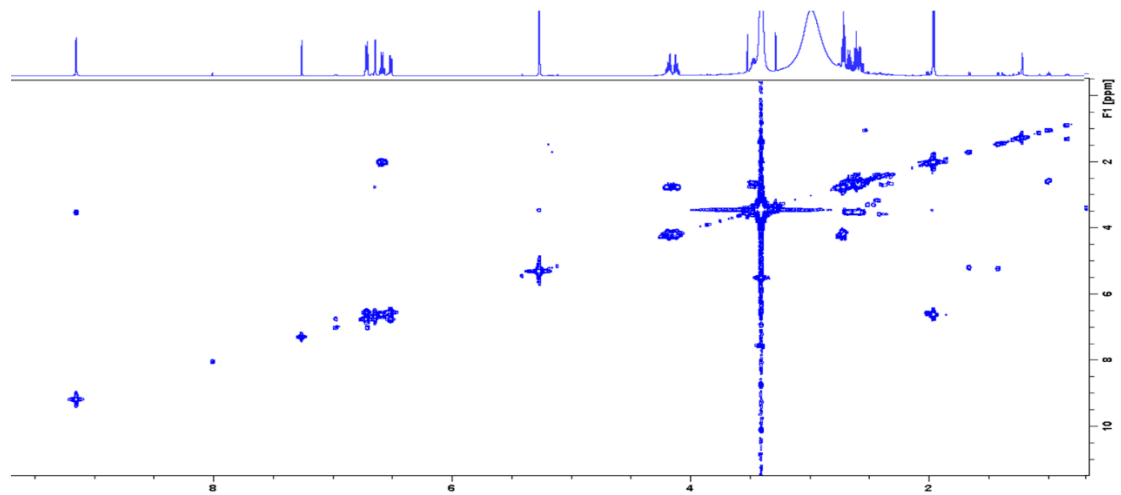
Στο φάσμα ^1H (σε CDCl_3) της ουσίας (Εικόνα 130) παρατηρείται μεγάλη ομοιότητα με το αντίστοιχο φάσμα της ολεασείνης. Η κύρια διαφορά μεταξύ των δύο φασμάτων έγκειται στην απουσία από το φάσμα της υπό μελέτη ουσίας της απλής κορυφής που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της δεύτερης αλδεΐδης του μορίου στην θέση 3 και παράλληλα η μικρή αλλά σημαντική μετατόπιση χαρακτηριστικών κορυφών. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η διαφοροποίηση μεταξύ των δύο μεταβολιτών έχει λάβει χώρα στην θέσης 3 του μορίου.

Η παρουσία τμήματος HT είναι εμφανής από την παρουσία του ABX συστήματος : δύο διπλές κορυφές στα 6.79ppm με $J = 8,2\text{Hz}$ και 6.73ppm με $J = 1,8\text{ Hz}$ και μία διπλή διπλής στα 6,61ppm με $J = 8,2 / 1,8\text{Hz}$, καθώς και δύο πολλαπλές στα 4.23-4.15ppm (H-1') και 2.77ppm (H-2'). Επιπλέον, η σύγκριση των δεδομένων NMR με εκείνα της ολεασείνης αποκάλυψε τις κύριες διαφορές όπως στο προηγούμενο ζεύγος (ολεοκανθάλης και ολεοκανθαλικού οξέος), δηλαδή η απουσία του αλδεϋδικού πρωτονίου H-3, η μετατόπιση των πρωτονίων H-4a και H-4b (geminal), καθώς και την παρουσία καρβοξυλικού άνθρακα αντί ενός αλδεϋδικού άνθρακα C-3 (Πίνακας 57 Φασματοσκοπική Σύγκριση Ολεασείνης και Ολεασεινικού Οξέος.). Περαιτέρω μελέτη των φασμάτων 2D-NMR (COZY, NOESY, HSQC-DEPT, HMBC) επαλήθευσαν τη δομή του μεταβολίτη ως 3-καρβοξυλικό ανάλογο της ολεασείνης.



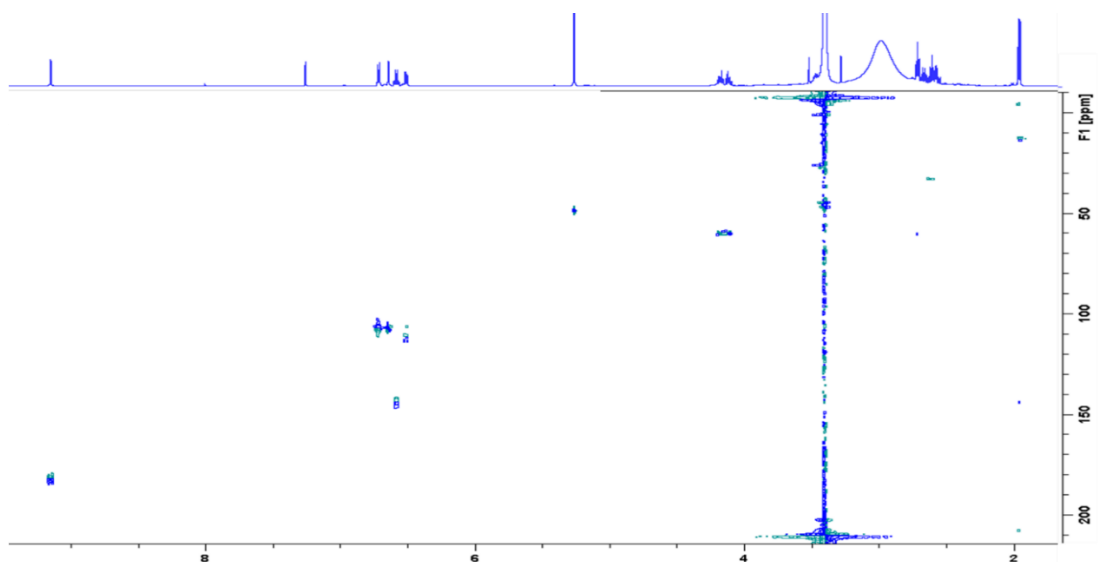
Εικόνα 130 Φάσμα ¹H-NMR Ολεασεινικού Οξέος.

COSY



Εικόνα 131 Φάσμα COSY Ολεασεινικού Οξέος.

HSQC-DEPT



Εικόνα 132 Φάσμα HSQC-DEPT Ολεασεινικού Οξέος.

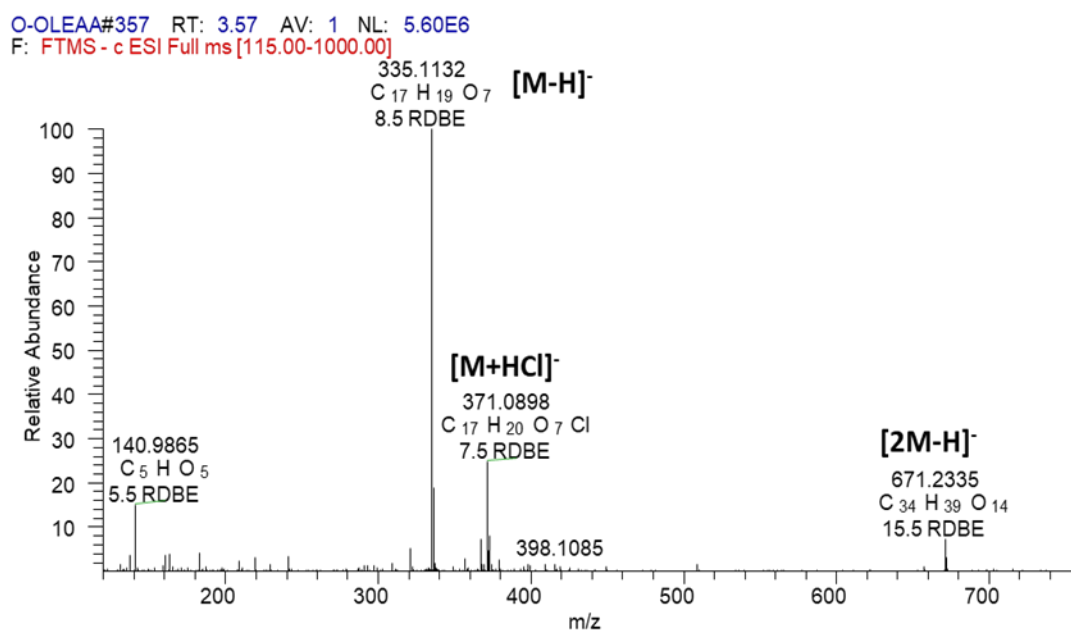
Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα της νέας ουσίας σε σχέση με την ολεασείνη και οι διαφορές που εντοπίζονται ανάμεσα στα δύο μόρια δίδονται στον Πίνακα 57

Πίνακας 57 Φασματοσκοπική Σύγκριση Ολεασεινής και Ολεασεινικού Οξέος.

Ολεασείνη			Ολεασεινικό Οξύ	
C / H	¹ H (ppm, m, J σε Hz)	¹³ C (ppm)	¹ H (ppm, m, J σε Hz)	¹³ C (ppm)
1	9.21, d	195.7	9.23, d (2.0)	195.7
3	9.65, brs	200.7	-	173.9
4a	2.93, dd	46.3	2.75, dd, (16.6/8.9)	36.4
4b	2.79, m		2.68, m	
5	3.64, m	26.7	3.55, m	29.3
6a	2.72, m	36.8	2.71, m	36.8
6b	2.61, m		2.65, m	
7	-	171.5	-	171.5
8	6.65, q	155.0	6.67, q, (7.2)	155.0
9	-	142.9	-	142.9
10	2.06, d	14.9	2.01, d, (7.2)	14.9
1'	4.23/4.15, m	64.8	4.23/4.15, m	64.8
2'	2.77, m	34.1	2.77, m	34.1
3'	-	130.5	-	130.5
4'	6.72, d	116.2	6.73, d, (1.8)	116.2
5'	-	143.0	-	143.0
6'	-	154.0	-	154.0
7'	6.79, d	115.2	6.79, d, (8.2)	115.2
8'	6.61, dd	121.1	6.61, dd, (8.2/1.8)	121.1

➤ HRMS/MS Ανάλυση

Με βάση την ανάλυση του φάσματος μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας HRMS (Εικόνα 133 Φάσμα μάζας HRMS-Orbitrap σε αρνητικό ιονισμό του Ολεασεινικού Οξέος), ο μοριακός τύπος του προσδιορίστηκε ως $C_{17}H_{20}O_7$ (m/z 335.1133) που αντιστοιχεί στο ιόν $[M-H]^-$ και βαθμός ακορεστότητας 8.5.



Εικόνα 133 Φάσμα μάζας HRMS-Orbitrap σε αρνητικό ιονισμό του Ολεασεινικού Οξέος

2.5.2.3 Επεξεργασία του εμπλουτισμένου κλάσματος 27 (Fr27) και παραλαβή του *Eda Acid*

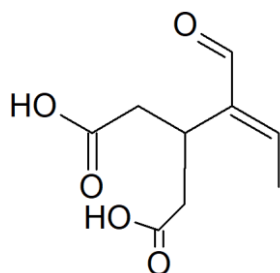
Για την επεξεργασία του κλάσματος **27** επιλέχθηκε η μέθοδος της παρασκευαστικής HPLC (prep HPLC). Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε φαίνεται στον παρακάτω Πίνακας 58 :

Πίνακας 58 Μέθοδος Ανάλυσης.

TIME	H ₂ O (%)	AcN (%)	Flow (mL / min)
initial	90	10	15.0
10	80	20	15.0
20	70	30	15.0
25	10	90	15.0
30	90	10	15.0

18.5mg δείγματος διαλύθηκαν σε 1mL AcN και ενήθηκαν στην παρασκευαστική στήλη και ακολούθησε καθαρισμός του δείγματος με την παραπάνω μέθοδο. Από την διαδικασία, έγινε συλλογή ενός μόνο κλάσματος με βάρος 6.3mg. Το κλάσμα αυτό αναλύθηκε περαιτέρω με φασματοσκοπικές και φασματομετρικές μεθόδους, από όπου διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για τον μεταβολίτη EDA Acid (Εικόνα 134 Δομή Eda Acid.Εικόνα 134). Αξίζει να σημειωθεί ότι ο μεταβολίτης αυτός έχει αναφερθεί προηγουμένως ως συστατικό των αποβλήτων των

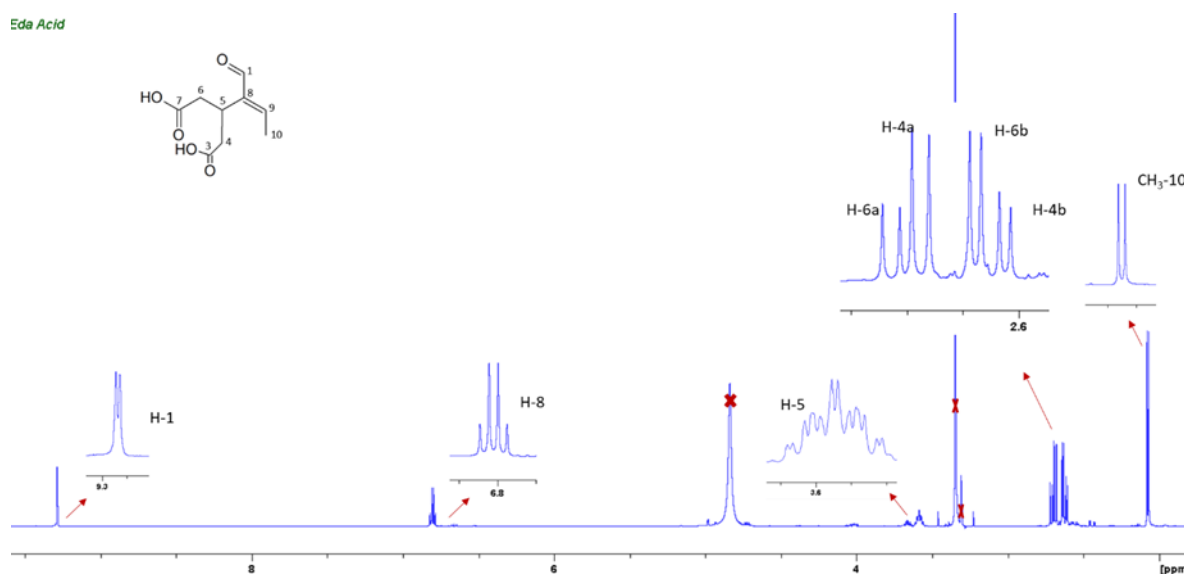
ελαιοτριβείων. [43] Παρ' όλα αυτά, η απομόνωσή του από το ελαιόλαδο αναφέρεται για πρώτη φορά.



Εικόνα 134 Δομή Eda Acid.

➤ NMR Ανάλυση

Η δομή της ένωσης διασαφηνίστηκε μελετώντας τα φάσματα NMR 1D (^1H και ^{13}C) και 2D (COZY, NOESY, HSQC-DEPT, HMBC) και με ανάλυση HRMS και αναγνωρίστηκε ως το 3-καρβοξυλικό ανάλογο του EDA (Eda Acid) ή (E) -3- (1-οξοβουτ-2-εν-2-υλ) γλουταρικό οξύ. Η δομή του επιβεβαιώθηκε με σύγκριση των πειραματικών δεδομένων με τη βιβλιογραφία [44].



Εικόνα 135 Φάσμα ^1H -NMR Eda Acid.

Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα της απομονωμένης ουσίας σε σύγκριση με την πρόδρομη της δίδονται στον Πίνακα 59

Πίνακας 59 Φασματοσκοπική Σύγκριση Eda- Eda Acid.

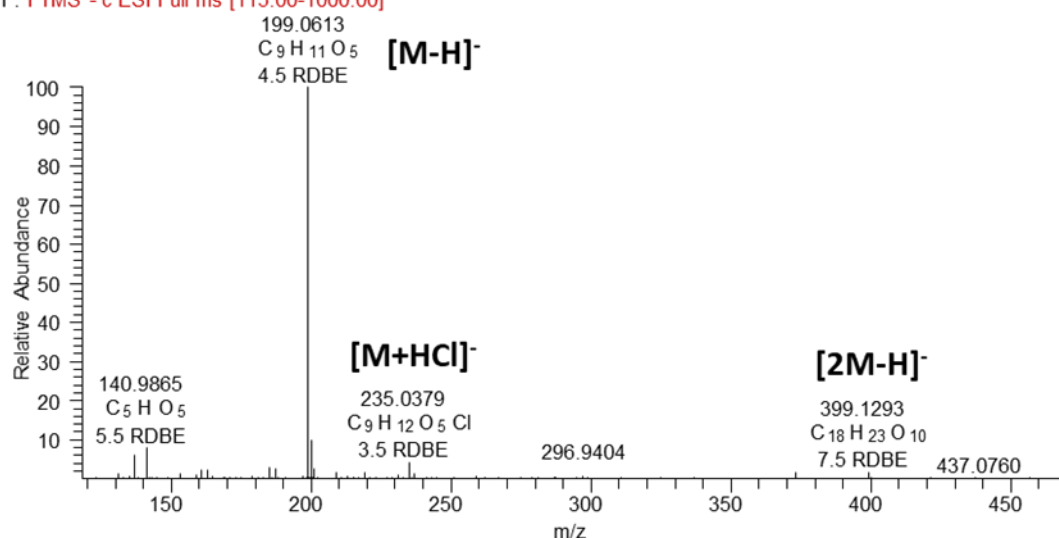
C / H	Eda		Eda Acid	
	1 H (ppm, m, J σε Hz)	13 C (ppm)	1 H ppm, m, J σε Hz	13 C (ppm)
1	9.36, d, (1.4)	195	9.29, d, (2.0)	195.1
3	4.57/4.31, m	68.1	-	176.3
4a	2.14, m	26.1	2.70, dd, (15.9/ 9.3)	36.4

4b	1.88, m		2.63, dd, (15.9/6.1)	
5	3.14, m	28.6	3.59, m	176.3
6a	2.96, dd, (16.5/11.3)	32.9	2.70, dd, (15.9 9.3)	36.8
6b	2.43, dd, (16.5/6.4)		2.63, dd, (15.9/6.1)	
7	-	172	-	171.5
8	-	144.3	-	143.6
9	6.68, q, (7.2)	152.2	6.81, q, (7.1)	142.9
10	2.02, d, (7.2)	14.8	2.08, d, (7.1)	14.9

➤ Φασματομετρική Ανάλυση

Στο φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (Εικόνα 136) παρατηρείται η κορυφή του ψευδομοριακού ιόντος σε m/z 199.0611 $[M-H]^-$ με προτεινόμενο μοριακό τύπο $C_9H_{11}O_5$.

O-EDAA#189-202 RT: 1.90-2.02 AV: 11 NL: 8.31E6
F: FTMS - c ESI Full ms [115.00-1000.00]



Εικόνα 136 Φάσμα μάζας HRMS-Orbitrap σε αρνητικό ιονισμό του Eda Acid.

2.5.2.4 Ανάλυση απομονωμένων μεταβολιτών με UHPLC-HRMS

Με στόχο τη διερεύνηση της παρουσίας των απομονωμένων ενώσεων γενικά στο ελαιόλαδο, αναπτύχθηκε μια μέθοδος UHPLC-HRMS για την ανάλυση του T.P.F.. Οι καθαρές απομονωμένες ενώσεις χρησιμοποιήθηκαν ως πρότυπα αναφοράς. Χρησιμοποιώντας χρωματογραφικά (Rt) και φασματομετρικά χαρακτηριστικά (Δεδομένα HRMS και HRMS / MS, προτεινόμενη στοιχειακή σύνθεση (EC), Βαθμό ακορεστότητας, καθώς και το ιόν εκχύλισης (XIC) εξετάστηκε η παρουσία των ενώσεων. Η παρουσία αυτών συγκρίθηκε με την ύπαρξη των δομικών ανάλογων τους ολεοκανθάλη, ολεασείνη και Eda. [42]

10 δείγματα ελαιολάδου αντιπροσωπευτικά διαφορετικών ποικιλιών παραγωγής και περιοχών ελαιολάδου επιλέχθηκαν τυχαία και αναλύθηκαν για το σκοπό αυτό. Όλα τα δείγματα υποβλήθηκαν στην ίδια διαδικασία εκχύλισης παρέχοντας τα αντίστοιχα TPF. Τα δείγματα TPF παρήχθησαν σύμφωνα με την International Olive Oil Council (IOC) με μερικές τροποποιήσεις (2009). Εν συντομία, διαλύθηκαν 1 g ελαιολάδου σε 1 mL n-Hex και το διάλυμα αναμίχθηκε και ομοιογενοποιήθηκε με σύστημα MeOH:H₂O 80:20 (v/v) σε αναμκτήρα στροβιλισμού για 3 λεπτά (vortex). Για τον διαχωρισμό των δύο φάσεων, χρησιμοποιήθηκε φυγοκέντρηση στα 3.000 rpm για 3 λεπτά. Η ίδια διαδικασία

επαναλήφθηκε δύο φορές για το κάθε δείγμα. Στα εκχυλίσματα έγινε απολίπανση δύο φορές με n-Hex, εξάτμιση υπό κενό, φυγοκέντρωση στους 30 ° C (GeneVac HT-4X). και αποθήκευση στους -20 ° C μέχρι την ανάλυση.

Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός επιτεύχθηκε με βαθμιδωτή έκλουση, χρησιμοποιώντας την μέθοδο που φαίνεται στον Πίνακας 60

Πίνακας 60 Μέθοδος Διαχωρισμού UPLC.

TIME	H ₂ O + 0.1% F.A.	AcN + 0.1% F.A.	Flow (mL / min)
initial	98	2	0.4
9	0	100	0.4
11	0	100	0.4
12	98	2	0.4
15	98	2	0.4

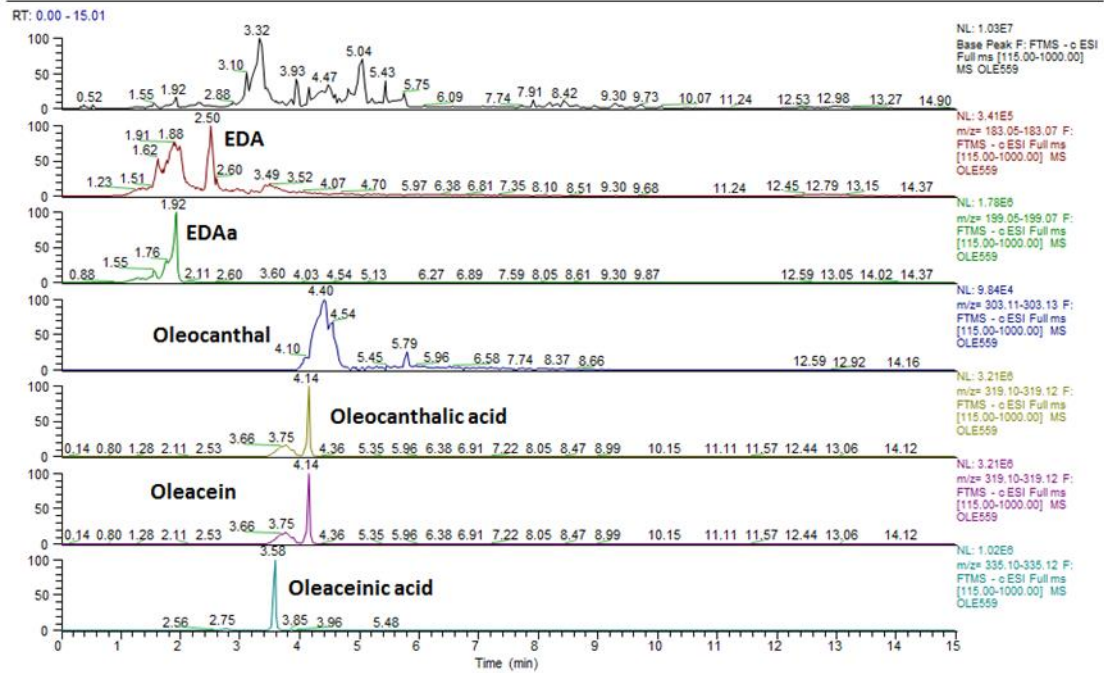
Ο όγκος της κάθε ένεσης ήταν 5 µL και η διάρκεια της μεθόδου ήταν 15 λεπτά. Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων ήταν για τα πρότυπα αναφοράς 50 µg/mL σε MeOH:H₂O 80:20 και για τα δείγματα πολυφαινολικού 300 µg/mL σε MeOH:H₂O 50:50.

Οι πειραματικοί παράμετροι που εφαρμόστηκαν φαίνονται στον Πίνακας 61

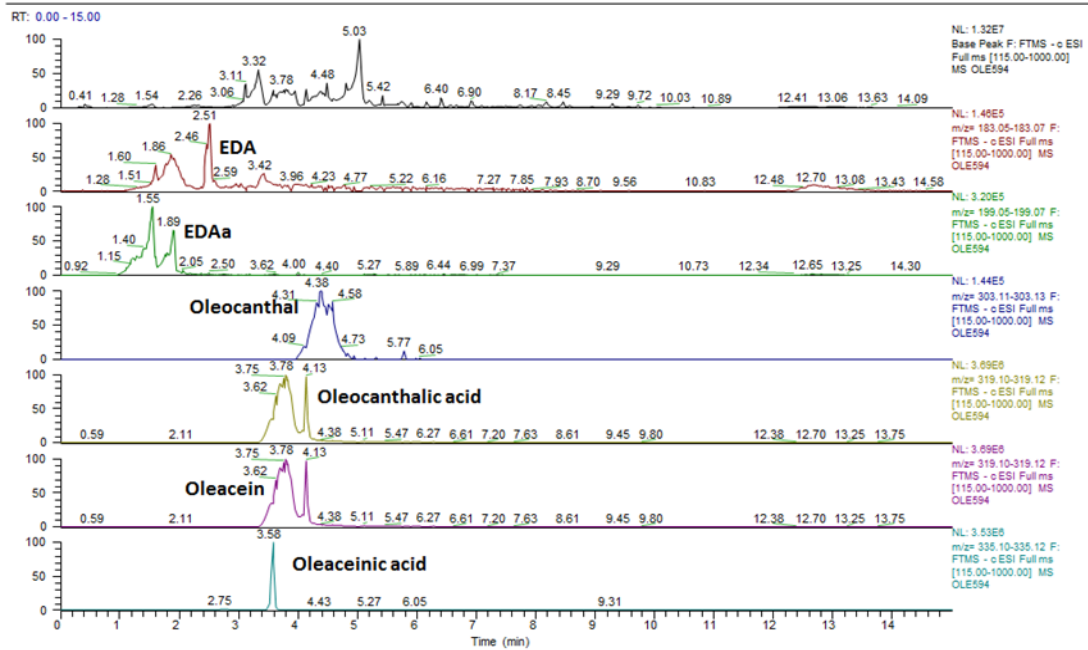
Πίνακας 61 Πειραματικοί Παράμετροι UPLC.

Πειραματικοί Παράμετροι	
Περιοχή ανίχνευσης	115-1000
Ανάλυση	30000
Τιμή CID	35%
Ανάλυση μάζας	7500
Capillary temperature	350 °C
Source voltage	3.0 kV
Tube lens	-40 V
Capillary voltage	-10 V
sheath gas	Nitrogen (40 arb. Units)

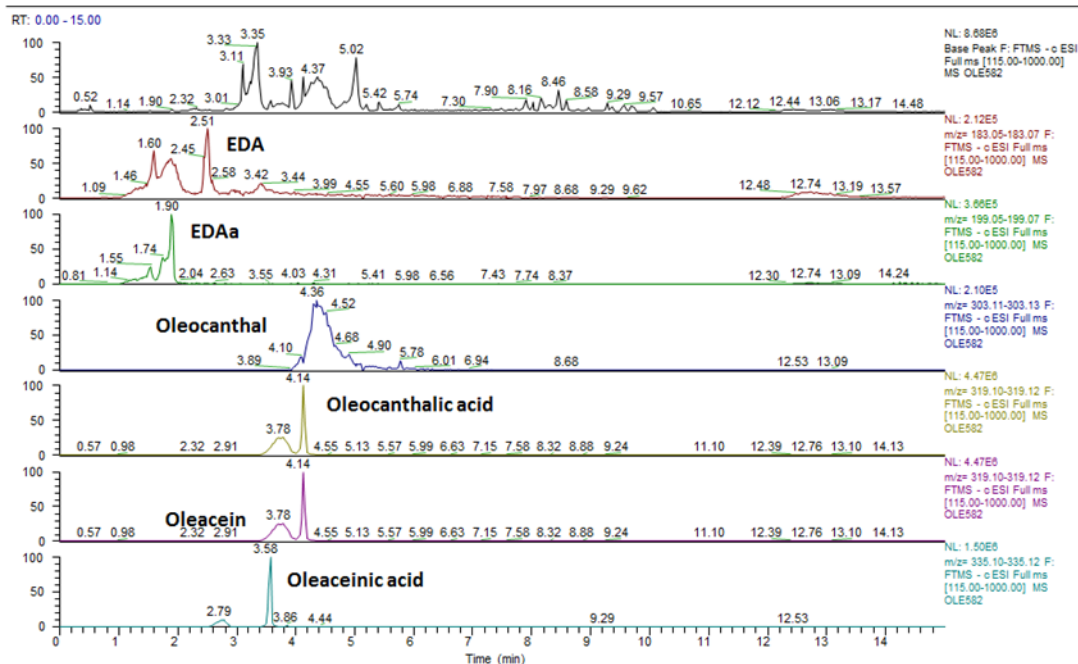
Ενδεικτικά, θα παρουσιαστούν κάποια χρωματογραφήματα (Εικόνα 137 Εικόνα 138 Εικόνα 139):



Εικόνα 137 Χρωματογραφήματα μάζας Ολικού εκχυλίσματος, καθώς και των απομονωμένων συστατικών. Αρνητικός ιονισμός. Δείγμα 1.



Εικόνα 138 Χρωματογραφήματα μάζας Ολικού εκχυλίσματος, καθώς και των απομονωμένων συστατικών. Αρνητικός ιονισμός. Δείγμα 2.



Εικόνα 139 Χρωματογραφήματα μάζας Ολικού εκχυλίσματος, καθώς και των απομονωμένων συστατικών. Αρνητικός ιονισμός. Δείγμα 3.

Με βάση τα δεδομένα οι τρεις απομονωμένες ενώσεις ανιχνεύθηκαν σε όλα τα ελαιόλαδα που μελετήθηκαν και μόνο ποσοτικές διαφορές παρατηρήθηκαν. Αυτό το γεγονός δείχνει ότι τα πρόσφατα απομονωμένα οξέα αντιπροσωπεύουν τυπικές ενώσεις του ελαιολάδου που δεν έχουν περιγραφεί μέχρι τώρα και δεν σχετίζονται με την διάρκεια ζωής του ελαιολάδου. Ωστόσο, τα επίπεδα τους στο ΕΝΟΟ θα μπορούσαν να συνδεθούν με διαφορετικές παραμέτρους όπως η ποικιλία ελιάς, οι τεχνικές εκχύλισης, το στάδιο της ωρίμανσης της ελιάς, την καλλιεργητική πρακτική κλπ.

Μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση που προσφέρει ένα πλεονέκτημα στην ποσοτικοποίησή τους είναι η διαφορά στο χρόνο συγκράτησης όλων των αναλυτών. Με τις μεθόδους UPLC-HRMS ολεοκανθάλη και ολεασεινικό οξύ εκλύονται ξεχωριστά αποφεύγοντας υπερεκτιμήσεις της περιεκτικότητας του δείγματος σε ολεοκανθάλη. (Kanakis et al., 2013). Ακόμη και σε περιπτώσεις δομικών ισομερών (ολεοκανθαλικό οξύ και ολεασεινή), ο διαχωρισμός τους είναι σαφής με αποτέλεσμα περισσότερα ακριβή ποσοτικά δεδομένα. Από την άλλη πλευρά, αν επιχειρείται ποσοτικοποίηση χρησιμοποιώντας NMR τα επικαλυπτόμενα φαινόμενα θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα (Karkoula et al., 2012)

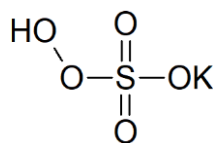
2.5.3 Ημισυνθετική Παραγωγή Ολεοκανθαλικού και Ολεασεινικού

Οξέος

Οι νέοι μεταβολίτες αποτελούν συστατικά του ελαιολάδου σε πολύ μικρή συγκέντρωση, για αυτό τον λόγο είναι δύσκολη η απομόνωση τους σε επαρκείς ποσότητες, που θα επιτρέψουν την διεξαγωγή διαφόρων βιολογικών μελετών για την έρευνα κάποιας ενδιαφέρουσας βιοδραστικής ένδειξης. Εξαιτίας αυτής της αναγκαιότητας για βιολογική αποτίμηση των οξέων, έγινε προσπάθεια ημισύνθεσης τους τόσο από τα αλδεϋδικά ανάλογα τους, όσο και από εμπλουτισμένα κλάσματα.

Στην βιβλιογραφία αναφέρονται διάφορες διαδικασίες για την μετατροπή αλδεϋδών προς τα αντίστοιχα καρβοξυλικά οξέα, ωστόσο επιλέχθηκε να εφαρμοστεί η τεχνική με την χρήση του οξειδωτικού αντιδραστήριου Οξόνη (Oxone), διότι χαρακτηρίζεται από ήπιες συνθήκες αντίδρασης, μικρό κόστος και μεγάλη απόδοση των προϊόντων. [45] [46]

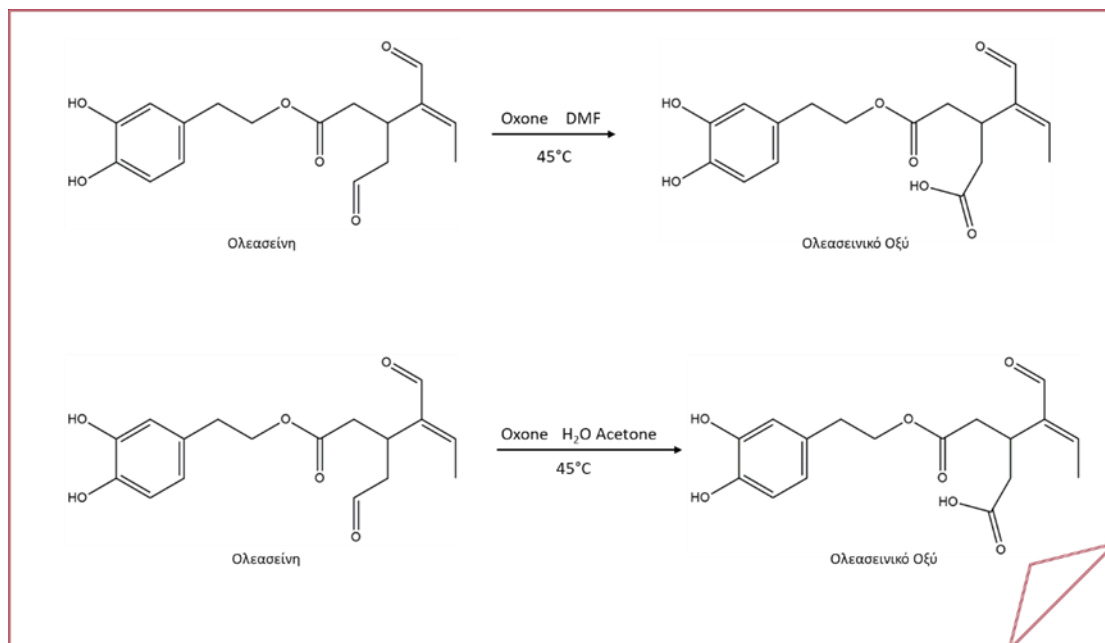
Η Οξόνη (Εικόνα 140) είναι το σύμπλοκο μετα καλίου άλας του υπεροξυμονοθειικού οξέος και χρησιμοποιείται ευρέως ως οξειδωτικό μέσο. Το τριπλό άλας ($2\text{KHSO}_5 \cdot \text{KHSO}_4 \cdot \text{K}_2\text{SO}_4$) είναι η σταθερότερη μορφή του.



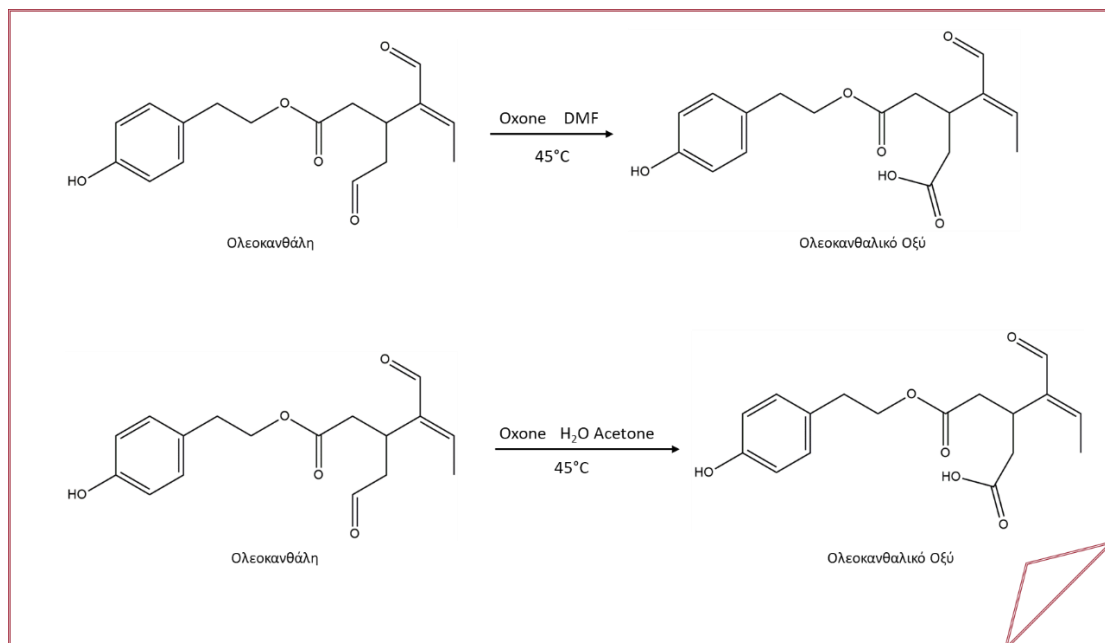
Εικόνα 140 Δομή Οξόνης.

Η πορεία των αντιδράσεων που ακολουθήθηκε για την παραγωγή των οξέων φαίνεται στα παρακάτω σχεδιαγράμματα:

Καθαρή Πρώτη Υλη

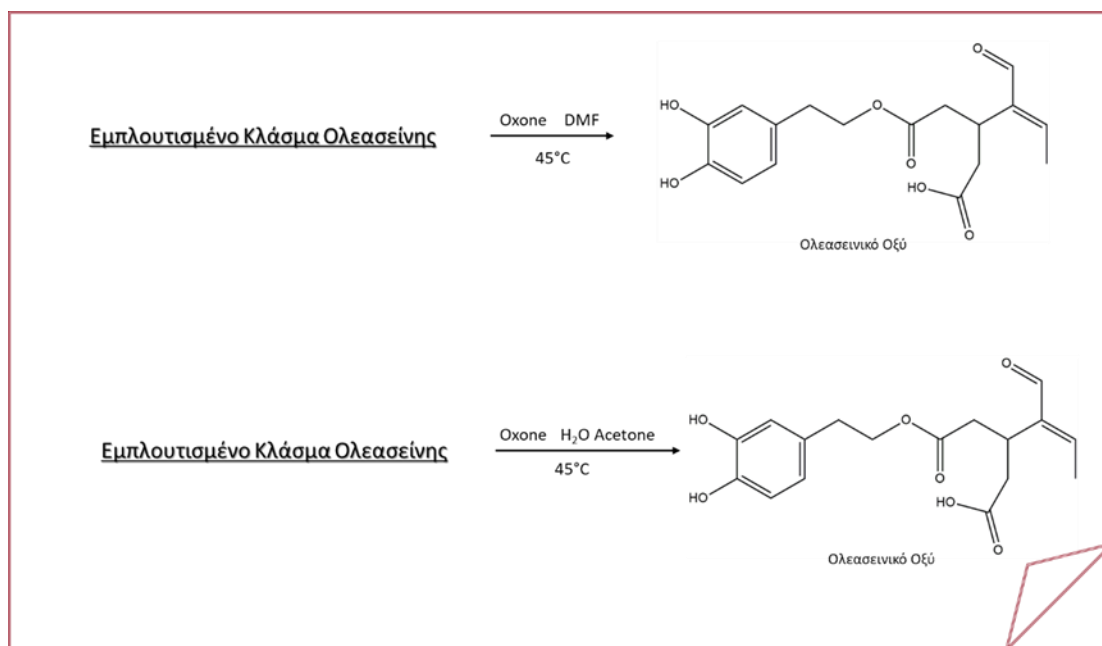


Εικόνα 141 Ημισυνθετική Πορεία Ολεασείνης προς Ολεασεινικό Οξύ.

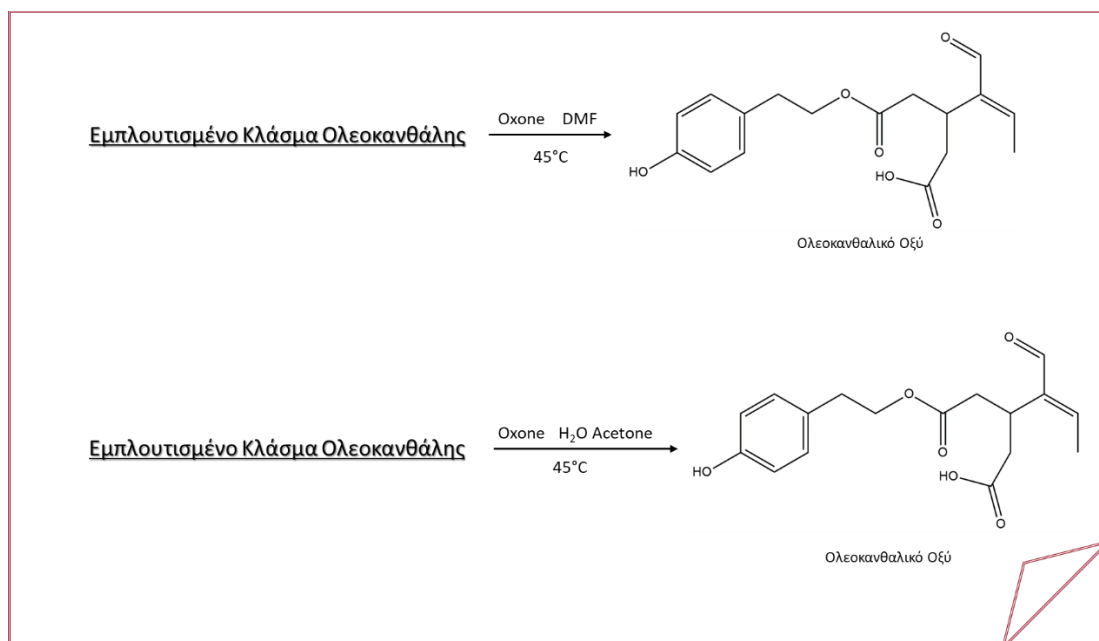


Εικόνα 142 Ημισυνθετική Πορεία Ολεασείνης προς Ολεασεινικό Οξύ.

Εμπλουτισμένα Κλάσματα



Εικόνα 143 Ημισυνθετική Πορεία Εμπλουτισμένου κλάσματος προς Ολεασεινικό Οξύ.



Εικόνα 144 Ημισυνθετική Πορεία Εμπλουτισμένου κλάσματος προς Ολεοκανθαλικού Οξέος..

2.5.3.1 Απομόνωση καθαρής Ολεοκανθάλης και Ολεασείνης από τα εμπλουτισμένα κλάσματα του CPC.

Το πρώτο στάδιο της διαδικασίας ημισυνθετικής παραγωγής ολεοκανθαλικού και ολεασεινικού οξέος αποτελεί η εξασφάλιση καθαρών πρώτων υλών δηλαδή ολεοκανθάλης και ολεασείνης, αντίστοιχα. Έτσι προχωρήσαμε στην επεξεργασία των εμπλουτισμένων κλασμάτων του CPC με παρασκευαστική HPLC με εφαρμογή μιας μεθοδολογίας που αναπτύχθηκε πρόσφατα στο εργαστήριο μας [47]

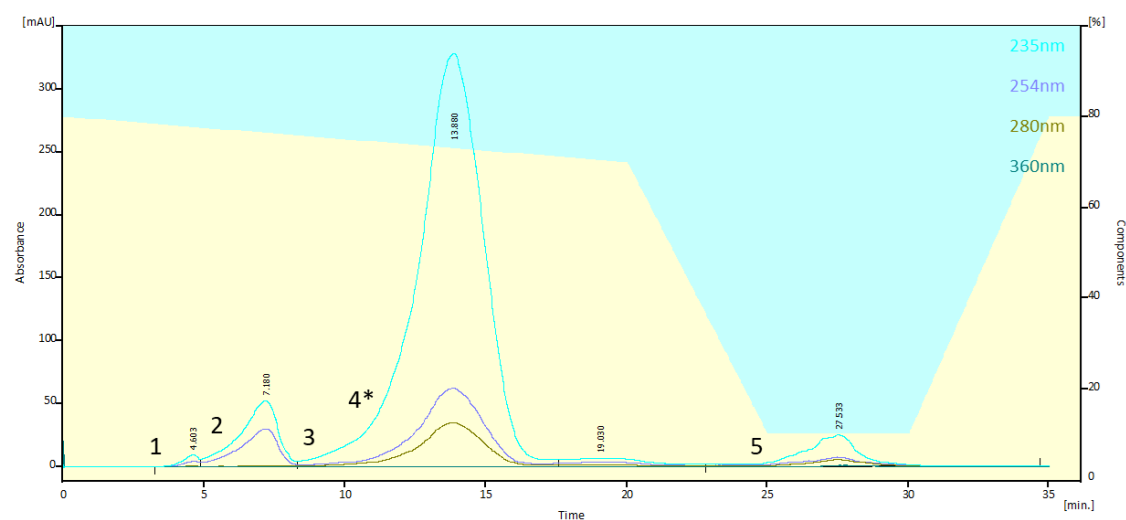
➤ Ολεοκανθάλη

Για την απομόνωση της ολεοκανθάλης επιλέχθηκε το κλάσμα 18 του CPC (Πίνακας 62), πλούσιο στον συγκεκριμένο μεταβολίτη και το οποίο αναλύθηκε με παρασκευαστικής HPLC (prep HPLC) και τη μέθοδο που παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 62 Μέθοδος Καθαρισμού Ολεοκανθάλης.

TIME	H ₂ O (%)	AcN (%)	Flow (mL / min)
initial	70	30	10.0
20	60	40	10.0
25	50	50	10.0
30	10	90	10.0
35	70	30	10.0

Το δείγμα της κάθε ένεσης είναι 70mg και διαλύθηκε σε 1mL AcN(HPLC-grade). Η συλλογή των κλασμάτων έγινε με παρακολούθηση των χρωματογραφημάτων σε μήκη κύματος 235nm, 254nm, 280nm και 365nm. (Εικόνα 145)

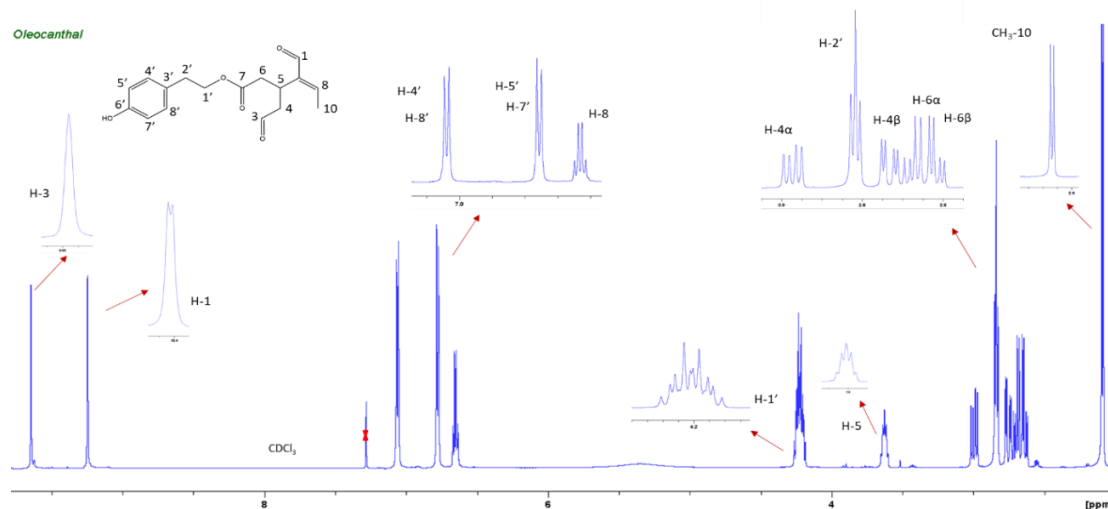


Εικόνα 145 Χρωματογράφημα από παρασκευαστική HPLC κατά τον καθαρισμό της Ολεοκανθάλης.

Από την παρατήρηση του χρωματογραφήματος, συλλέχθηκαν 5 βασικά κλάσματα, όπου η ολεοκανθάλη αντιστοιχεί στο κλάσμα 4 (βασική κορυφή του χρωματογραφήματος).

Ο έλεγχος της καθαρότητας του καθαρού απομονωμένου μορίου έγινε με την λήψη του φάσματος πρωτονίου. (Εικόνα 146)

¹H-NMR.



Εικόνα 146 Φάσμα ¹H-NMR Ολεοκανθάλης.

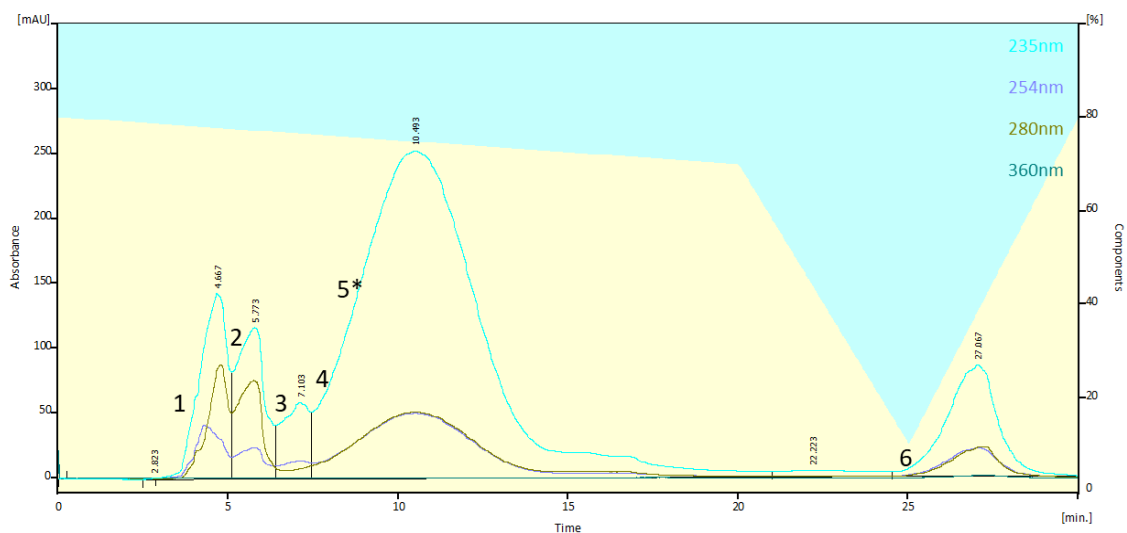
➤ Ολεασείνη

Για την απομόνωση της ολεασείνης επιλέχθηκε το κλάσμα 19, πλούσιο στον συγκεκριμένο μεταβολίτη και εφαρμόστηκε η μέθοδος που αναφέρεται στον παρακάτω Πίνακα 63 Μέθοδος Καθαρισμού Ολεασείνης.:

Πίνακας 63 Μέθοδος Καθαρισμού Ολεασείνης.

TIME	H ₂ O (%)	AcN (%)	Flow (mL / min)
initial	80	20	15.0
20	70	30	15.0
25	10	90	15.0
30	80	20	15.0

Σε κάθε διαχωρισμό ενέθηκαν 70mg εμπλουτισμένου κλάσματος διαλυμένα σε 1mL AcN. Η συλλογή των κλασμάτων έγινε με παρακολούθηση των χρωματογραφημάτων σε μήκη κύματος 235nm, 254nm, 280nm και 365nm. (Εικόνα 156Εικόνα 147)

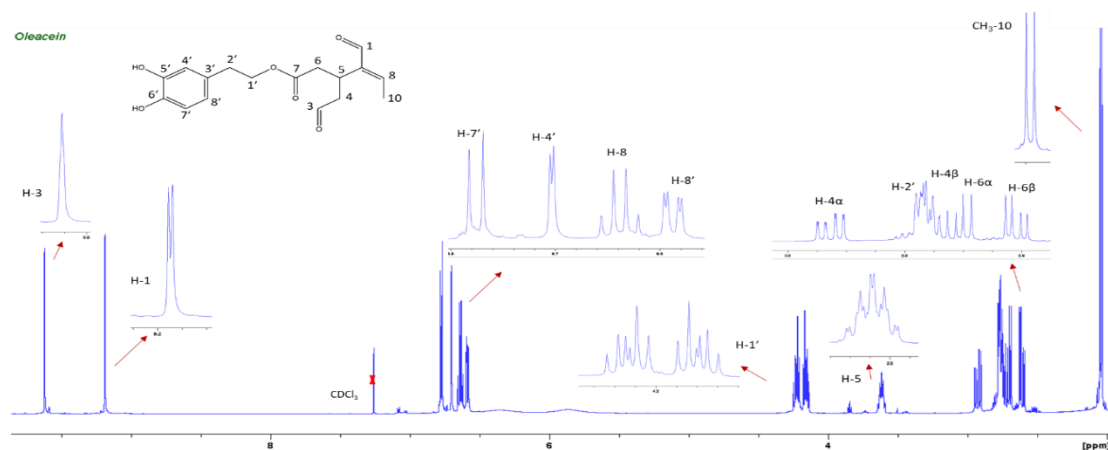


Εικόνα 147 Χρωματογράφημα από παρασκευαστική HPLC κατά τον καθαρισμό της Ολεασείνης.

Από την παρατήρηση του χρωματογραφήματος, (Εικόνα 147 Χρωματογράφημα από παρασκευαστική HPLC κατά τον καθαρισμό της Ολεασείνης.) συλλέχθηκαν 6 βασικά κλάσματα, όπου η ολεασείνη αντιστοιχεί στο κλάσμα 5 (βασική κορυφή του χρωματογραφήματος).

Ο έλεγχος της καθαρότητας του απομονωμένου μορίου έγινε με την χρήση φασματοσκοπικών και χρωματογραφικών τεχνικών.

$^1\text{H-NMR}$

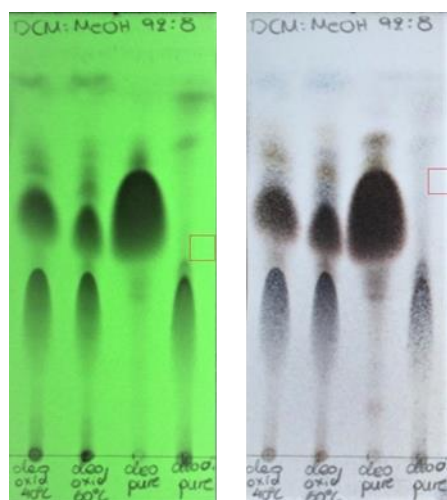


Εικόνα 148 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ Ολεασείνης.

2.5.3.2 Ημισυνθετική παραγωγή Ολεοκανθαλικού Οξέος

2.5.3.2.1 Έλεγχος επίδρασης της θερμοκρασίας στην ημισυνθετική πορεία.

Σε σφαιρική που περιέχει ολεοκανθάλη (33.8 mg, 0.09 mmol) διαλυμένη σε DMF (30mL), προστέθηκε Oxone σε αναλογία 2:1 (60mg, 0.098mmol), και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε με θέρμανση στους 40°C για 7 ώρες. για να γίνει έλεγχος της επίδρασης της θερμοκρασίας στην αντίδραση, προετοιμάστηκε μία δεύτερη σφαιρική που περιείχε ολεοκανθάλη (30.9mg, 0.101mmol) διαλυμένη σε DMF (30mL) και Oxone σε αναλογία 2:1 (60mg, 0.098mmol) και αναδεύτηκε στους 60°C για 7 ώρες. η πρόοδος των αντιδράσεων ελέγχθηκε με TLC (DCM:MeOH 92:8). (Εικόνα 149)



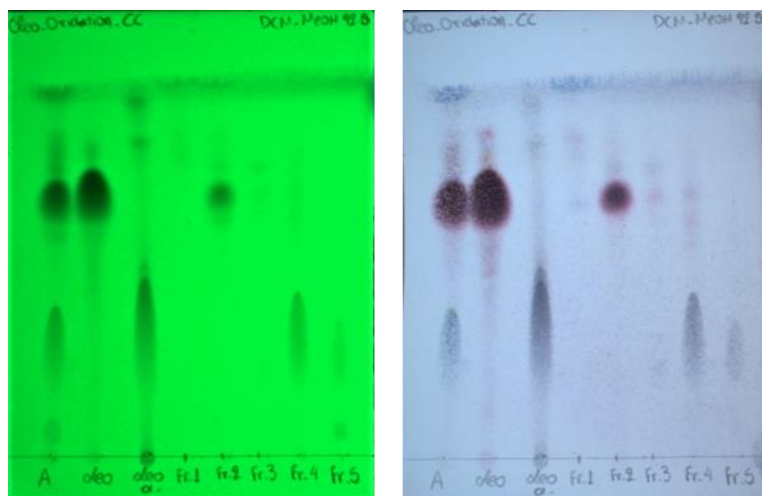
Εικόνα 149 Χρωματογράφημα TLC κατά τον έλεγχο της θερμοκρασίας 254nm και στο ορατό.

Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στα προϊόντα της αντίδρασης εξαιτίας της αύξησης της θερμοκρασίας για αυτό τον λόγο τα μίγματα των αντιδράσεων επεξεργάστηκαν μαζί.

Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, 50 mL H₂O και DCM προστέθηκαν στο μίγμα με σκοπό τον σχηματισμό διφασικού συστήματος. Λήφθηκε η κάτω φάση και εξατμίστηκε μέχρι ξηρού, για την πλήρη απομάκρυνση του DMF σχηματίστηκε αζεοτροπικό μίγμα με την προσθήκη n-Heptane. Η διαδικασία επαναλήφθηκε 3 φορές για την πλήρη έκπλυση του μίγματος. Το υπόλειμμα καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης με σύστημα έκλουσης μεταβαλλόμενης πολικότητας DCM: MeOH : 0–100ml 100%, 100-200ml 99,5-0,5, 200-300ml 99:1, 300-400ml 98:2, 400-500 96:4, 500-600ml 92:8 για την παραλαβή 10,9mg ολεοκανθαλικού οξέος. (Πίνακας 64)

Πίνακας 64 Κλάσματα και Βάρη.

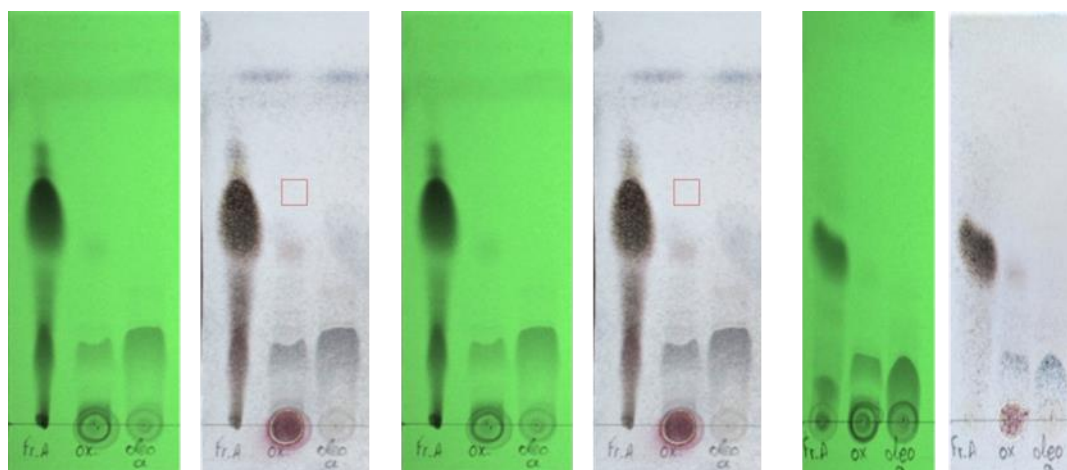
Fraction	Βάρος (mg)
1	6.8
2	14.5
3	4.3
4	10.8



Εικόνα 150 Χρωματογράφημα TLC στα 254nm και στο ορατό.

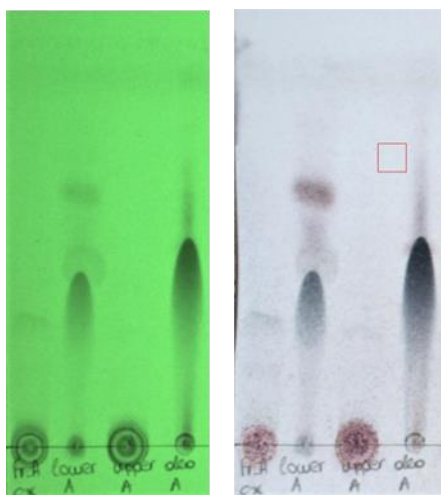
2.5.3.2.2 Έλεγχος ημισυνθετικής πορείας σε εμπλουτισμένο κλάσμα.

Σε σφαιρική που περιέχει κλάσμα πλούσιο σε ολεοκανθάλη (30mg, 0.096 mmol) διαλυμένο σε υδατικό διάλυμα ακετόνης (20%) (30mL), προστέθηκε Οχονε σε αναλογία 4:1 (243mg, 0.396mmol), και το μίγμα της αντίδρασής αναδεύτηκε με θέρμανση στους 45°C για 3 ώρες. η πρόδος της αντίδρασης ελέγχθηκε κάθε μία ώρα με TLC (DCM: MeOH 92:8). (Εικόνα 151)



Εικόνα 151 Πορεία Αντίδρασης στα 254nm και στο ορατό.

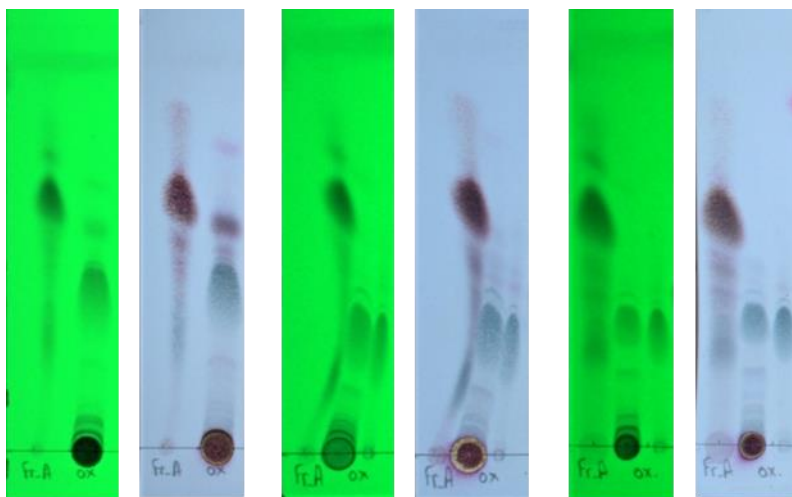
Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, η ακετόνη εξατμίστηκε και 50mL DCM προστέθηκαν στο μίγμα με σκοπό τον σχηματισμό διφασικού συστήματος. Λήφθηκε η κάτω φάση και εξατμίστηκε μέχρι ξηρού. Η διαδικασία επαναλήφθηκε 3 φορές για την πλήρη έκπλυση του μίγματος. (Εικόνα 151)



Εικόνα 152 Χρωματογραφήματα δύο φάσεων στα 254nm και στο ορατό.

2.5.3.2.3 Ημισυνθετική πορεία σε εμπλουτισμένο κλάσμα.

Με σκοπό την ανάπτυξη μεθόδου για την παραλαβή του μεταβολίτη στόχου σε μεγάλη απόδοση και βάρος, επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί μεγαλύτερη ποσότητα της πρώτης ύλης. Έτσι, σε σφαιρική που περιέχει κλάσμα πλούσιο σε ολεοκανθάλη (513g, 1.6 mmol) διαλυμένο σε υδατικό διάλυμα ακετόνης (20%) (100mL), προστέθηκε Oxone σε αναλογία 5:1 (5.03g, 8.2 mmol), και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε με θέρμανση στους 45°C για 3 ώρες. Η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχθηκε κάθε μία ώρα με TLC (DCM: MeOH 92:8). (Εικόνα 153)



Εικόνα 153 Πορεία Αντίδρασης στα 254nm και στο ορατό.

Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, η ακετόνη εξατμίστηκε και 50mL DCM προστέθηκαν στο μίγμα με σκοπό τον σχηματισμό διφασικού συστήματος. (Εικόνα 154)



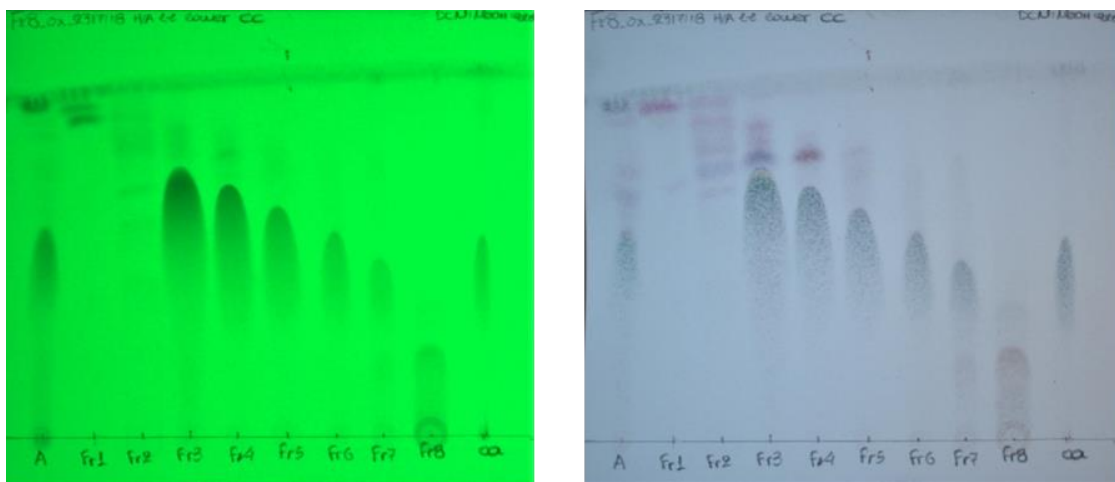
Εικόνα 154 Χρωματογραφήματα δύο φάσεων στα 254nm και στο ορατό.

Το υπόλειμμα καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης με σύστημα έκλουσης μεταβαλλόμενης πολικότητας DCM: MeOH : 0–250ml 100%, 250-500ml 99,5-0,5, 500-750ml 99:1, 750-1000ml 98:2, 1000-1250 96:4, 1250-1600ml 92:8, 1600-1850ml 84:16, 1850-2100ml 68:32 για την παραλαβή 105,5mg ολεοκανθαλικού οξέος. (Πίνακας 65 Κλάσματα και Βάρη.)

Πίνακας 65 Κλάσματα και Βάρη.

Fraction	Βάρος (mg)
1	11.3
2	6.4
3	170.3
4	64.6
5	27.7
6	13.2
7	6.9
8	34.3

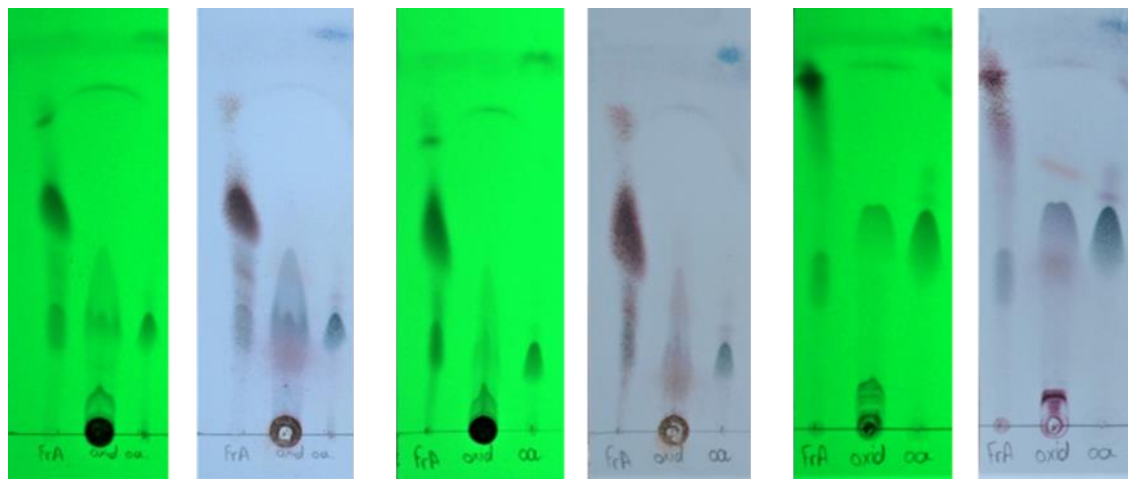
Η συγκεντρωτική TLC των κλασμάτων φαίνεται στην Εικόνα 155:



Εικόνα 155 Χρωματογραφήματα κλασμάτων στα 254nm και στο ορατό.

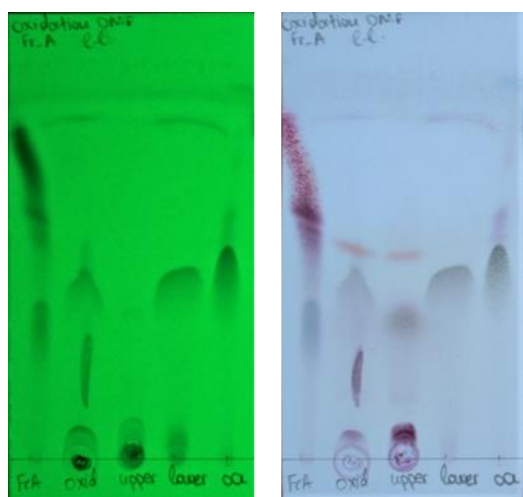
2.5.3.2.4 Έλεγχος ημισυνθετικής πορείας σε εμπλουτισμένο κλάσμα με διαφορετικό διαλύτη αντίδρασης.

Με σκοπό την σύγκριση των παραπροϊόντων της αντίδρασης με την αλλαγή του διαλύτη η αντίδραση μεγάλης κλίμακας πραγματοποιήθηκε με DMF. Έτσι, σε σφαιρική που περιέχει κλάσμα πλούσιο σε ολεοκανθάλη (276.5mg, 0.91mmol) διαλυμένο σε DMF (50mL), προστέθηκε Oxhone σε αναλογία 5:1 (2.79g, 4.55mmol), και το μίγμα της αντίδρασής αναδεύτηκε με θέρμανση στους 45°C για 3 ώρες. Η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχθηκε κάθε μία ώρα με TLC (DCM:MeOH 92:8). (Εικόνα 156)



Εικόνα 156 Πορεία Αντίδρασης στα 254nm και στο ορατό.

Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, 50mL H₂O και DCM προστέθηκαν στο μίγμα με σκοπό τον σχηματισμό διφασικού συστήματος. Λήφθηκε η κάτω φάση και εξατμίστηκε μέχρι ξηρού, για την πλήρη απομάκρυνση του DMF σχηματίστηκε αζεotropικό μίγμα με την προσθήκη n-Heptane. (Εικόνα 157)

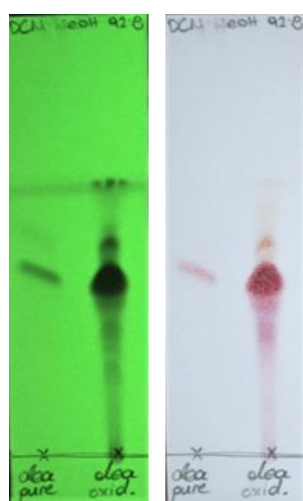


Εικόνα 157 Χρωματογραφήματα δύο φάσεων στα 254nm και στο ορατό.

2.5.3.3 Ημισυνθετική Παραγωγή Ολεασεινικού Οξέος

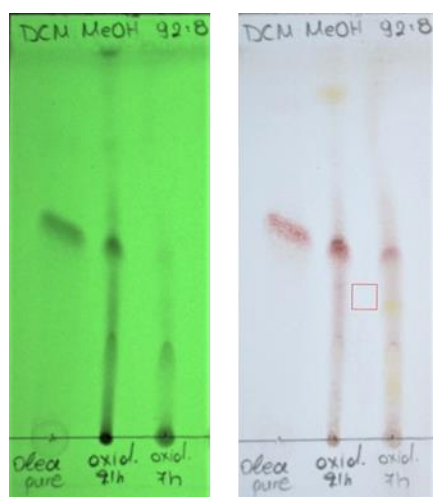
2.5.3.3.1 Έλεγχος επίδρασης της θερμοκρασίας στην ημισυνθετική πορεία.

Σε σφαιρική που περιέχει ολεασείνη (30.8mg, 0.09mmol) διαλυμένη σε DMF (40mL), προστέθηκε Oxone σε αναλογία 1:1 (30.4mg, 0.04mmol), και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 4 ώρες. Η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχθηκε με TLC (DCM: MeOH 95:5). Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, 50 mL H₂O και DCM προστέθηκαν στο μίγμα με σκοπό τον σχηματισμό διφασικού συστήματος. Η διαδικασία επαναλήφθηκε τρεις φορές. Μετά την επεξεργασία και την πλήρη εξάτμιση των διαλυτών της κάθε φάσης χωριστά, έγινε αντιληπτό πως δεν επιτευχθεί η παραγωγή του επιθυμητού προϊόντος. (Εικόνα 158)



Εικόνα 158 Σύγκριση Ολεασείνης με το προϊόν αντίδρασης.

Έτσι, στο υπόλειμμα προστέθηκαν ξανά DMF (30 mL) και Oxone (53.8 mg, 0.09 mmol) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε με θέρμανση στους 40°C για 21 ώρες. Η πρόοδος της αντίδρασης στις 7 και στις 21 ώρες ελέγχθηκε με TLC (DCM:MeOH 92:8). (Εικόνα 159)



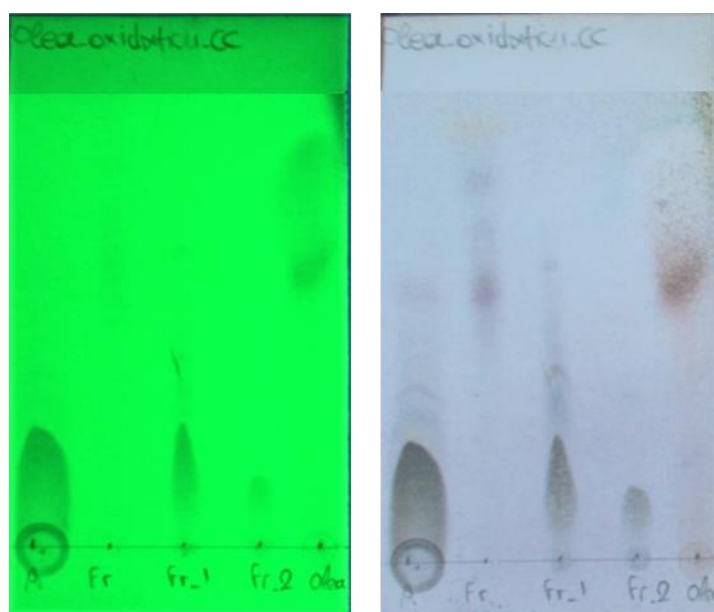
Εικόνα 159 Πορεία Αντίδρασης στα 254nm και στο ορατό.

2.5.3.3.2 Ημισυνθετική πορεία στο αλδεϋδικό ανάλογο.

Σε σφαιρική που περιέχει ολεασεΐνη (35.8mg, 0.09mmol) διαλυμένη σε DMF (30mL), προστέθηκε Oxone σε αναλογία 1:1 (99mg, 0.04mmol) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε με θέρμανση στους 45°C για 7 ώρες. Η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχθηκε με TLC (DCM:MeOH 95:5). Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, 50 mL H₂O και DCM προστέθηκαν στο μίγμα με σκοπό τον σχηματισμό διφασικού συστήματος. Η διαδικασία επαναλήφθηκε τρεις φορές. Λήφθηκε η κάτω φάση και εξατμίστηκε μέχρι ξηρού, για την πλήρη απομάκρυνση του DMF σχηματίστηκε αζεοτροπικό μίγμα με την προσθήκη n-Heptane. Το υπόλειμμα καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης (por.2) με σύστημα έκλουσης μεταβαλλόμενης πολικότητας DCM: MeOH : 0–100ml 100%, 100-200ml 99,5-0,5, 200-300ml 99:1, 300-400ml 98:2, 400-500 96:4, 500-600ml 92:8 για την παραλαβή 6.1mg ολεασεινικού οξέος. (Πίνακας 66)

Πίνακας 66 Κλάσματα και Βάρη.

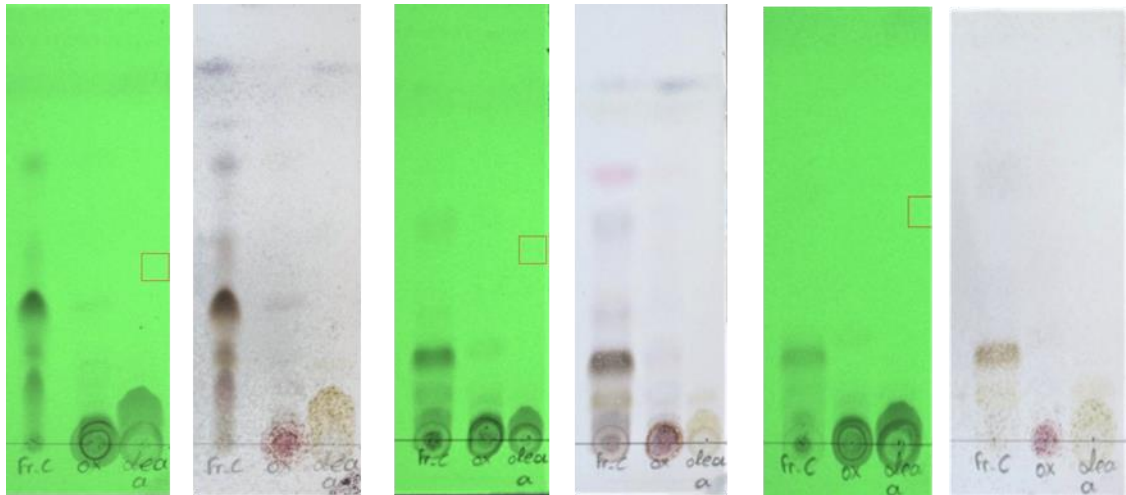
Fraction	Βάρος (mg)
in	0.9
1	6.1
2	0.7



Εικόνα 160 Χρωματογράφημα κλασμάτων στα 254nm και στο ορατό.

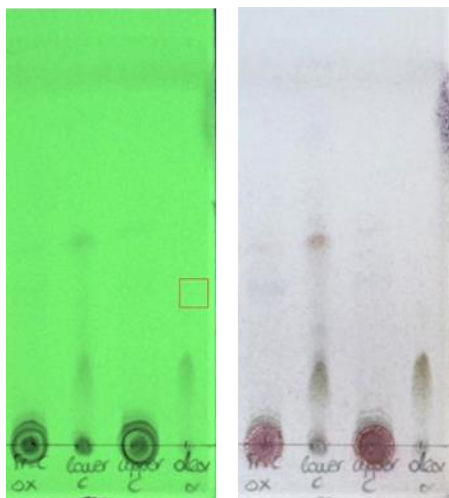
2.5.3.3.3 Έλεγχος ημισυνθετικής πορείας σε εμπλουτισμένο κλάσμα.

Σε σφαιρική που περιέχει κλάσμα πλούσιο σε ολεασεΐνη (31.9mg, 0.1 mmol) διαλυμένο σε υδατικό διάλυμα ακετόνης (20%) (30mL), προστέθηκε Oxone σε αναλογία 4:1 (245.6mg, 0.4 mmol), και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε με θέρμανση στους 45°C για 3 ώρες. Η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχθηκε κάθε μία ώρα με TLC (DCM: MeOH 92:8). (Εικόνα 161)



Εικόνα 161 Πορεία Αντίδρασης στα 254nm και στο ορατό.

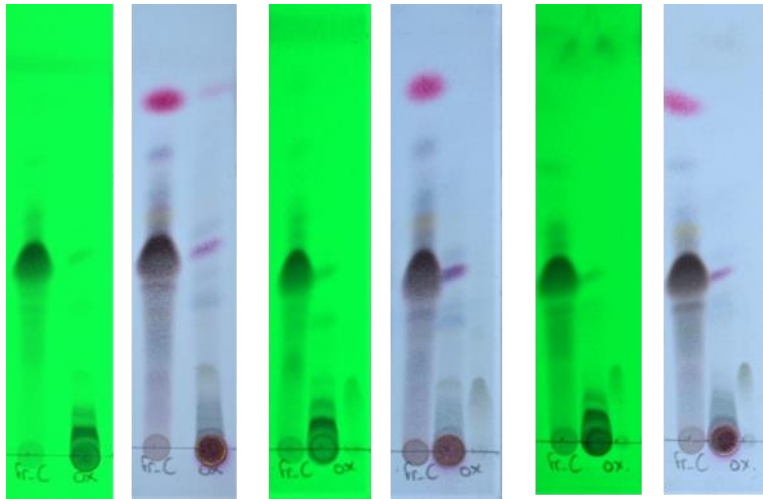
Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, η ακετόνη εξατμίστηκε και 50mL Χλωροφόρμιο προστέθηκαν στο μίγμα με σκοπό τον σχηματισμό διφασικού συστήματος. Λήφθηκε η κάτω φάση και εξατμίστηκε μέχρι ξηρού. Η διαδικασία επαναλήφθηκε 3 φορές για την πλήρη έκπλυση του μίγματος. (Εικόνα 162)



Εικόνα 162 Χρωματογραφήματα δύο φάσεων στα 254nm και στο ορατό.

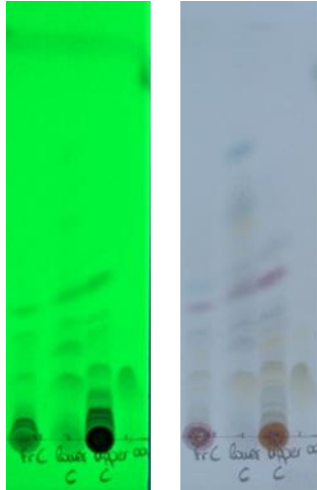
2.5.3.3.4 Ημισυνθετική πορεία σε εμπλουτισμένο κλάσμα.

Σε σφαιρική που περιέχει κλάσμα πλούσιο σε ολεασεΐνη (500mg, 1.56mmol) διαλυμένο σε υδατικό διάλυμα ακετόνης (20%) (100mL), προστέθηκε Οχοπε σε αναλογία 5:1 (4.79g, 0.0078 mmol), και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε με θέρμανση στους 45°C για 3 ώρες. Η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχθηκε κάθε μία ώρα με TLC (DCM:MeOH 92:8). (Εικόνα 163 Πορεία αντίδρασης στα 254nm και στο ορατό.)



Εικόνα 163 Πορεία αντίδρασης στα 254nm και στο ορατό.

Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, η ακετόνη εξατμίστηκε και 50mL Χλωροφόρμιο προστέθηκαν στο μίγμα με σκοπό τον σχηματισμό διφασικού συστήματος. Λήφθηκε η κάτω φάση και εξατμίστηκε μέχρι ξηρού. Η διαδικασία επαναλήφθηκε 3 φορές για την πλήρη έκπλυση του μίγματος.



Εικόνα 164 Χρωματογράφημα στις δύο φάσεις στα 254nm και στο ορατό.

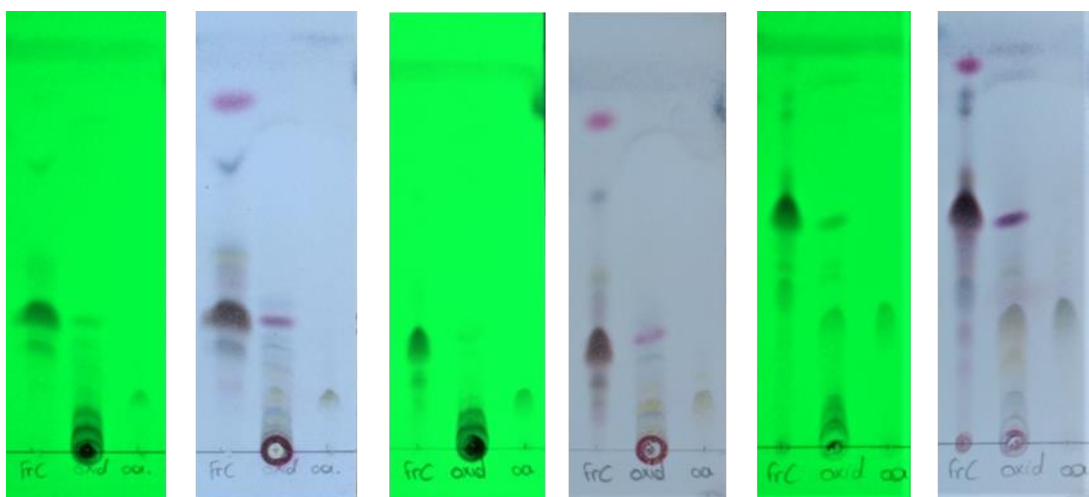
Το υπόλειμμα καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης (por.2) με σύστημα έκλουσης μεταβαλλόμενης πολικότητας DCM: MeOH : 0–250ml 100%, 250-500ml 99,5-0,5, 500-750ml 99:1, 750-1000ml 98:2, 1000-1250 96:4, 1250-1500ml 92:8 και παραλήφθηκαν τα κλάσματα, όπως φαίνονται στον Πίνακα 67 Κλάσματα και Βάρη.:

Πίνακας 67 Κλάσματα και Βάρη.

Fraction	Βάρος (mg)
1	2.6
2	1.4
3	2.8
4	0.6
5	12.8
6	8.2
7	6.3
8	4.8
9	3.5
10	7.3
11	1.6
12	0.6
13	17.8
14	10.9

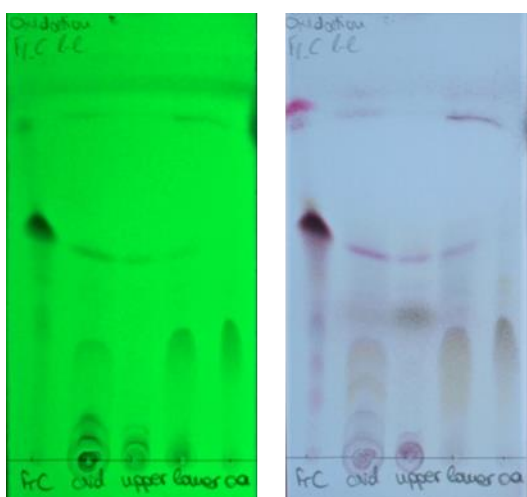
2.5.3.3.5 Έλεγχος ημισυνθετικής πορείας σε εμπλουτισμένο κλάσμα με διαφορετικό διαλύτη αντίδρασης.

Σε σφαιρική που περιέχει κλάσμα πλούσιο σε ολεασεΐνη (257.3mg, 0.804mmol) διαλυμένο σε DMF (50mL), προστέθηκε Oxone σε αναλογία 5:1 (2.46g, 0.004mol), και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε με θέρμανση στους 45°C για 5 ώρες. Η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχθηκε κάθε μία ώρα με TLC (DCM:MeOH 92:8). (Εικόνα 165 Πρόοδος αντιδράσεων στα 254ppm και στο ορατό.)



Εικόνα 165 Πρόοδος αντιδράσεων στα 254nm και στο ορατό.

Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, 50mL H₂O και DCM προστέθηκαν στο μίγμα με σκοπό τον σχηματισμό διφασικού συστήματος. Η διαδικασία επαναλήφθηκε τρεις φορές. Λήφθηκε η κάτω φάση και εξατμίστηκε μέχρι ξηρού, για την πλήρη απομάκρυνση του DMF σχηματίστηκε αζεοτροπικό μίγμα με την προσθήκη n-Hertane. (Εικόνα 166)

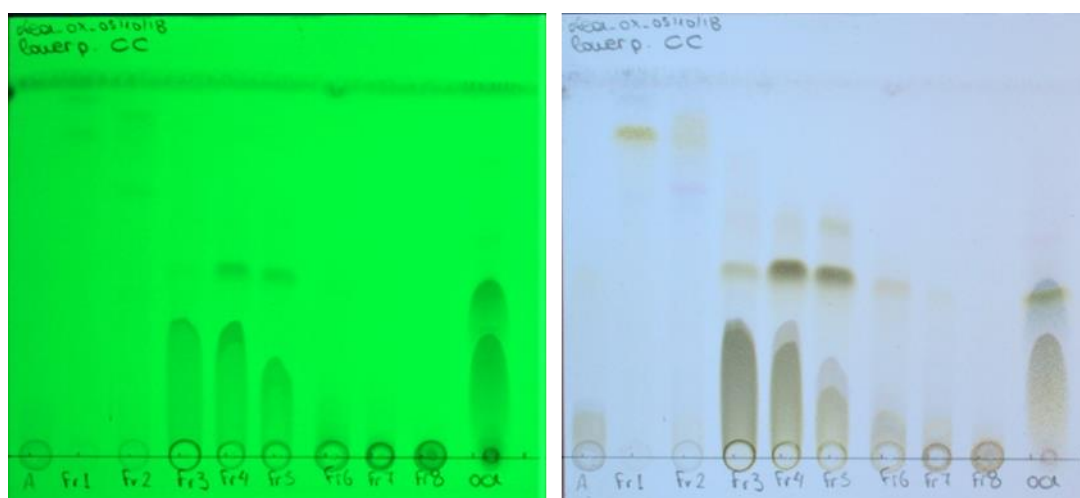


Εικόνα 166 Χρωματογραφήματα των δύο φάσεων στα 254nm και στο ορατό.

2.5.3.3.6 Ημισυνθετική πορεία σε αλδεϋδικού ανάλογο με περίσσεια οξειδωτικού μέσου.

Σε σφαιρική που περιέχει ολεασεΐνη (299.1mg, 0.934mmol) διαλυμένο σε DMF (30mL), προστέθηκε Oxope σε αναλογία 5:1 (2.87g, 4.67mol), και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε με θέρμανση στους 45°C για 7 ώρες. Η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχθηκε κάθε μία ώρα με TLC (DCM:MeOH 95:5). Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, 50mL H₂O και DCM προστέθηκαν στο μίγμα με σκοπό τον σχηματισμό διφασικού συστήματος. Η διαδικασία επαναλήφθηκε τρεις φορές. Λήφθηκε η κάτω φάση και εξατμίστηκε μέχρι ξηρού, για την πλήρη απομάκρυνση του DMF σχηματίστηκε αζεοτροπικό μίγμα με την προσθήκη n-Hertane. Το υπόλειμμα καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης (por.2) με σύστημα έκλουσης μεταβαλλόμενης πολικότητας DCM: MeOH : 0–100ml 100%, 100-200ml 99,5-0,5,

200-300ml 99:1, 300-400ml 98:2, 400-500 96:4, 500-600ml 92:8 και 600-700mL 84:16 για την παραλαβή ολεασεινικού οξέος αλλά και ενός νέου ημισυνθετικού παραγώγου.



Εικόνα 167 Χρωματογραφήματα κλασμάτων στα 254ppm και στο ορατό.

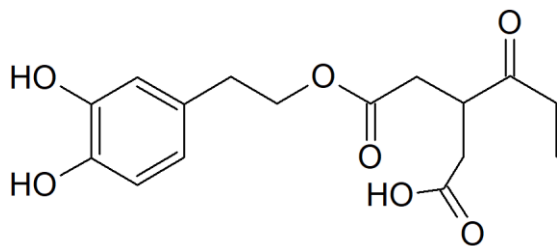
Τα βάρη των συνενωμένων κλασμάτων φαίνονται στον Πίνακα 68:

Πίνακας 68 Κλάσματα και Βάρη.

Fractions	Βάρος (mg)
1	
2	8.8
3	85.1
4	40.8
5	24.8
6	18.4
7	10.6
8	10.9

2.5.3.3.6.1 Ανάλυση και Ταυτοποίηση Νέου Ημισυνθετικού Μεταβολίτη.

Κατά την παρακολούθηση των χρωματογραφημάτων TLC έγινε αντιληπτό πως ο μεταβολίτης στο Fr3 αποτελεί διαφορετικό ημισυνθετικό προϊόν. Έτσι, για περαιτέρω μελέτη της δομής και ταυτοποίηση σου λήφθηκαν όλα τα απαραίτητα χρωματογραφικά και φασματοσκοπικά δεδομένα. Εξαιτίας της χημικής ομοιότητας με το Ολεασεινικό Οξύ και την διαφορά στην θέση 9, στην οποία εντοπίζεται μία καρβόνυλο ομάδα και της έλλειψης βιβλιογραφικών αναφορών, το νέο ημισυνθετικό παράγωγο ονομάστηκε Ολεασεινικό Οξύ. (Εικόνα 168 Δομή Ολεασεινικού Οξέος.)



Εικόνα 168 Δομή Ολεασεινικού Οξέος.

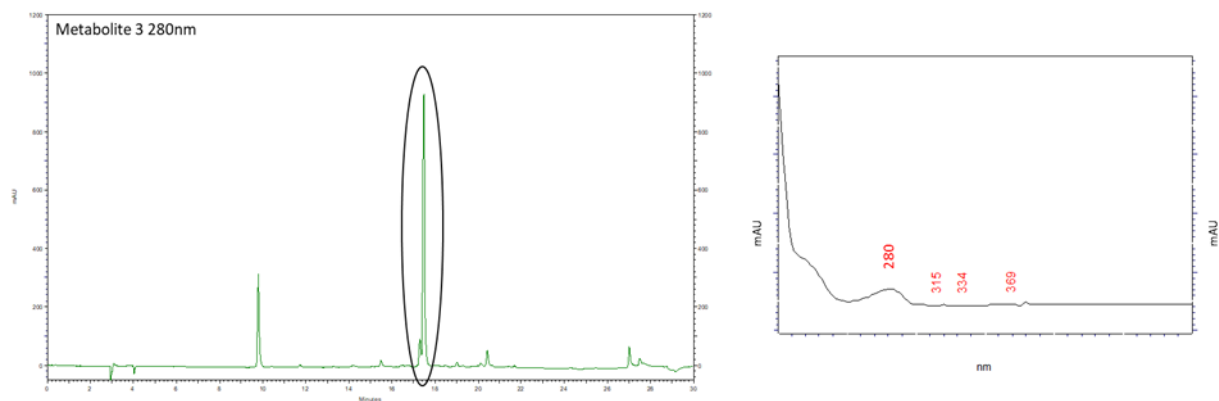
➤ Χρωματογραφική Ανάλυση

Το δείγμα διαλύθηκε σε 1mL MeOH στην επιθυμητή συγκέντρωση C=0.2mg/mL και αναλύθηκε με την μέθοδο (Πίνακας 69 Μέθοδος ανάλυσης.):

Πίνακας 69 Μέθοδος ανάλυσης.

TIME	H ₂ O +0.1% A.A. (%)	AcN + 2%MeOH (%)	Flow (mL / min)
initial	98	2	1.0
10	75	25	1.0
20	37	63	1.0
25	2	98	1.0
27	98	2	1.0
30	98	2	1.0

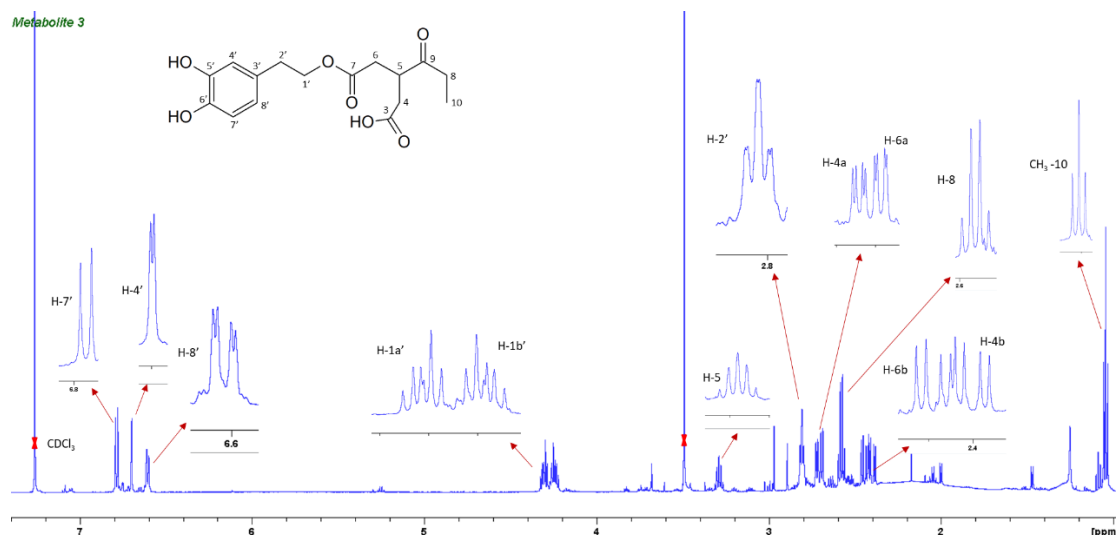
Το χρωματογράφημα του ημισυνθετικού μεταβολίτη στα 280nm και το φάσμα UV (Εικόνα 169):



Εικόνα 169 Χρωματογράφημα Ολεασεινικού Οξέος στα 280nm και φάσμα UV.

➤ Φασματοσκοπική Ανάλυση

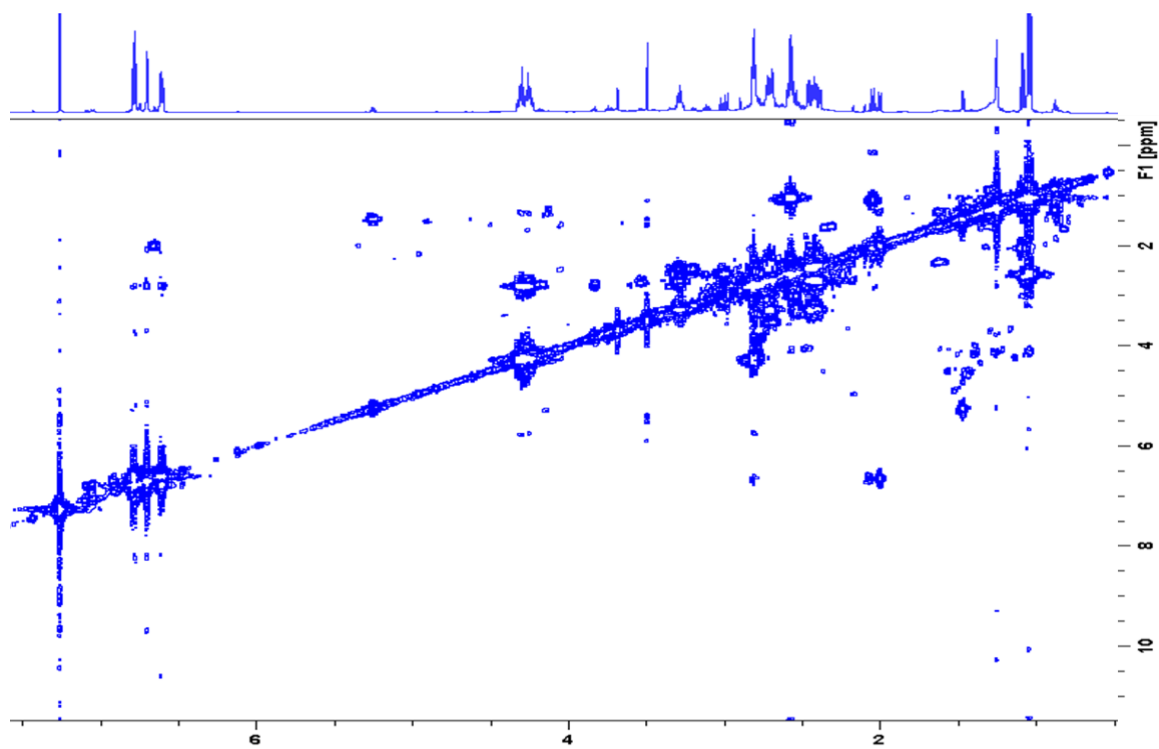
¹H-NMR



Εικόνα 170 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ Ολεασεινονικού Οξέος.

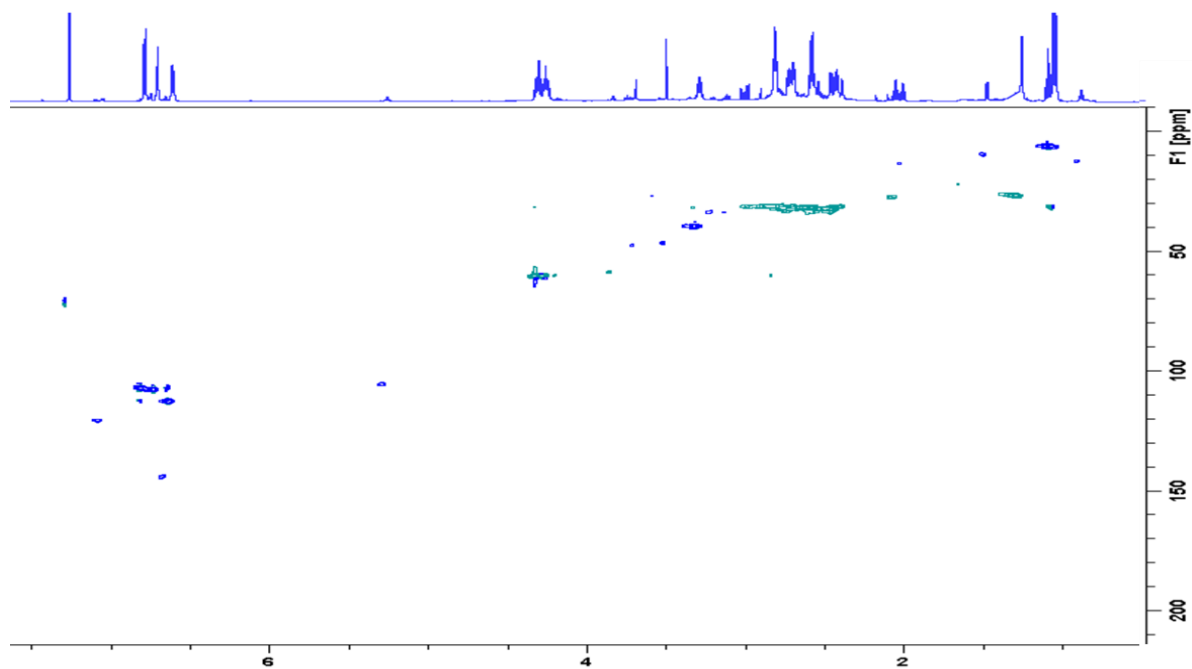
Από την παρατήρηση του φάσματος γίνεται εμφανής η παρουσία του δακτυλίου κατεχόλης από την παρουσία του ABX συστήματος: δύο διπλές κορυφές στα 6.79ppm με $J=8,02\text{Hz}$ και 6,71ppm με $J=1,97\text{ Hz}$ και μία διπλής διπλή στα 6,61ppm με $J = 8,02/1,97\text{Hz}$, καθώς και δύο πολλαπλές στα 4.26-4.30ppm ($\text{H-1}'$) και 2.81ppm ($\text{H-2}'$). Το φάσμα έδειξε επίσης την παρουσία σεκοϊριδοειδούς σκελετού εξαιτίας των πολυάριθμων κορυφών, μία τετραπλή στα 2.57ppm ($J = 7,58\text{Hz}$) (H-8), η οποία όμως εμφανίζεται σε χαμηλότερη χημική μετατόπιση και είναι πιο θωρακισμένη , μία πολλαπλή στα 3,28ppm (H-5), τέσσερις κορυφές στα 2.71-2.44 (H-4a/4b και H-6a/6b). Οι διαφορές με το ολεασεινικό οξύ εντοπίζονται κυρίως στην απουσία της κορυφής στην αλδεϋδική περιοχή και η κορυφή που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-10 εμφανίζεται ως μία τριπλή κορυφή στα 1.04ppm ($J=7.30\text{Hz}$) και όχι ως διπλή. Επιπλέον, στο ^{13}C φάσμα στην απομονωμένη ένωση ήταν παρόντες μόνο ένας καρβοξυλικός άνθρακας (C-3) και ένας καρβονυλικός άνθρακας (C-9) στα 175 και 212.1ppm, αντίστοιχα και κανένας αλδεϋδικός άνθρακας.

COZY



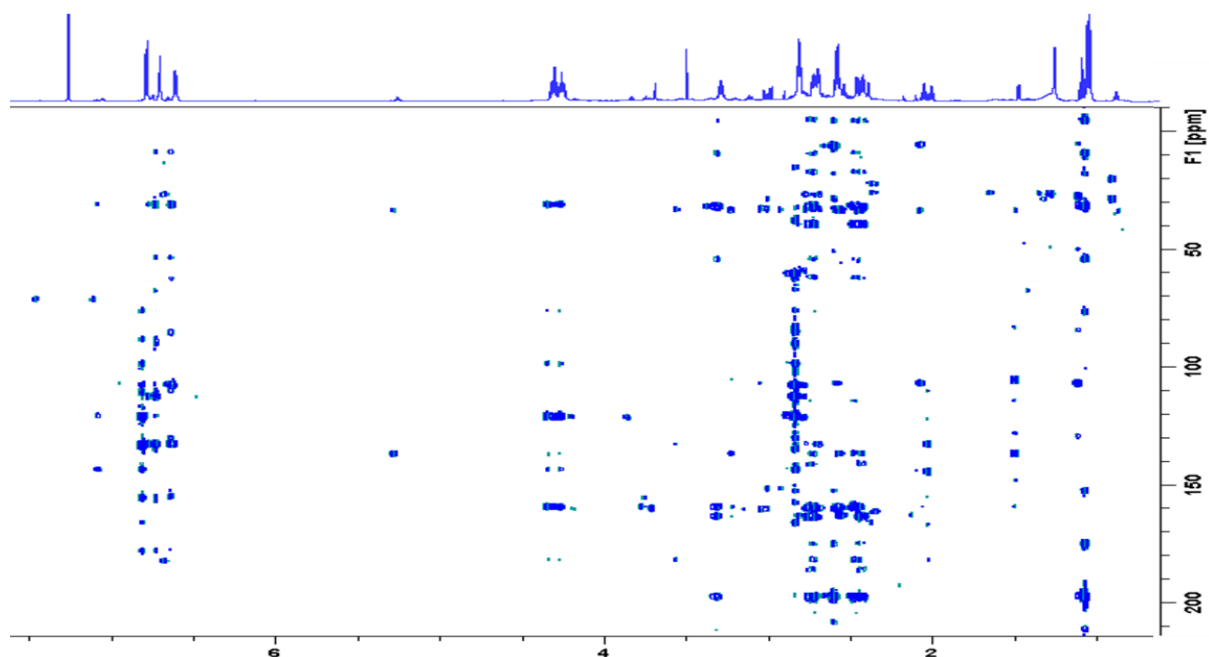
Εικόνα 171 Φάσμα COSY του Ολεασεινικού Οξέος.

HSQC



Εικόνα 172 Φάσμα HSQC-DEPT του Ολεασεινικού Οξέος.

HMBC



Εικόνα 173 Φάσμα HMBC του Ολεασεινονικού Οξέος.

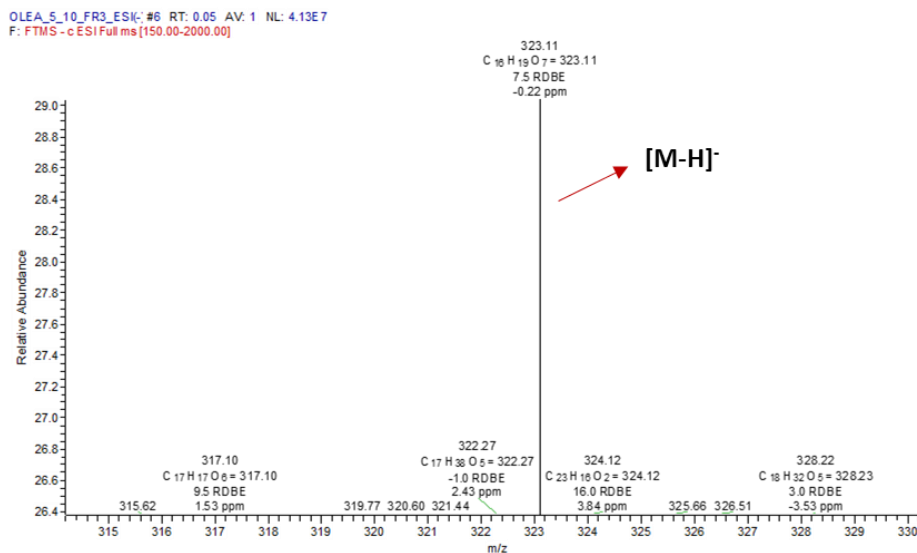
Όλα τα σήματα ^1H και ^{13}C NMR επιβεβαιώθηκαν από το COZY, HSQC και HMBC και παρουσιάζονται στον Πίνακα 70 Φασματοσκοπικά Δεδομένα του Ολεασεινονικού Οξέος.

Πίνακας 70 Φασματοσκοπικά Δεδομένα του Ολεασεινονικού Οξέος.

H/C	^1H (ppm δ J σε Hz)	^{13}C (ppm)
1	-	-
3	-	175
4a	2.71, dd, 7.55/2.69	34.9
4b	2.40, m	
5	3.28, m	43
6a	2.70, m	35.1
6b	2.44, m	
7	-	171.3
8	2.57, q, 7.58	34.8
9	-	212.1
10	1.04, t, 7.30	7.38
1'a	4.26/4.30, m	65.3
1'b		
2'	2.81, m	34.1
3'	-	130
4'	6.71, d, 1.97	116
5'	-	143.4
6'	-	142.7
7'	6.79, d, 8.02	115.3
8'	6.61, dd, 8.02/1.97	121.1

➤ Φασματομετρική Ανάλυση

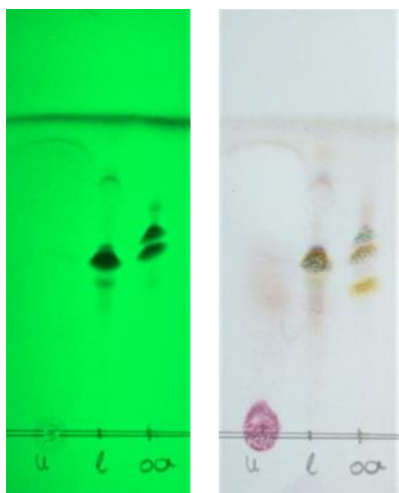
Το φάσμα μάζας υψηλής ανάλυσης με ψευδομοριακό ιόν $[M-H]^-$ m/z 323.1186 συμφώνησε με την προτεινόμενη στοιχειακή σύνθεση $C_{16}H_{19}O_7$ και βαθμό ακορεστότητας 7.5.



Εικόνα 174 Φάσμα μάζας HRMS-Orbitrap σε αρνητικό ιονισμό του ολεασεινικού οξέος.

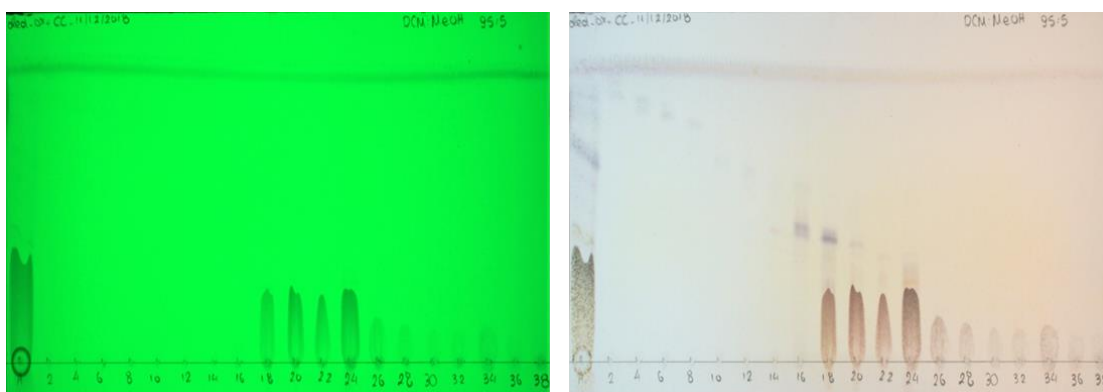
2.5.3.3.7 Ημισυνθετική πορεία σε αλδεϋδικό ανάλογο.

Σε σφαιρική που περιέχει ολεασεΐνη (262.3mg, 0.934mmol) διαλυμένο σε DMF (30mL), προστέθηκε Oxhone σε αναλογία 3:1 (786.9mg, 4.67mol), και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε με θέρμανση στους 45°C για 7 ώρες. Η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχθηκε κάθε μία ώρα με TLC (DCM:MeOH 95:5). Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, 50mL H₂O και DCM προστέθηκαν στο μίγμα με σκοπό τον σχηματισμό διφασικού συστήματος. Η διαδικασία επαναλήφθηκε τρεις φορές. Λήφθηκε η κάτω φάση και εξατμίστηκε μέχρι ξηρού, για την πλήρη απομάκρυνση του DMF σχηματίστηκε αζεοτροπικό μίγμα με την προσθήκη n-Heptane. (Εικόνα 175)



Εικόνα 175 Χρωματογράφημα των δύο φάσεων στα 254nm και στο ορατό.

Το υπόλειμμα καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης (por.2) με σύστημα έκλουσης μεταβαλλόμενης πολικότητας DCM: MeOH : 0–100mL 100%, 100-200mL 99,5-0,5, 200-300mL 99:1, 300-400mL 98:2, 400-500mL 96:4, 500-600mL 92:8, 600-700mL 84:16 για την παραλαβή ολεασεινικού οξέος.



Εικόνα 176 Χρωματογράφημα στα 254nm και στο ορατό.

2.5.4 ΜΕΛΕΤΕΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ

Ως Ελεύθερη Ριζά ορίζεται το χημικό μόριο που έχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στοιβάδα σθένους. Οι πηγές παραγωγής αυτών των ριζών είναι πολλές και συμβαίνουν τόσο εσωκυττάρια όσο και εξωκυττάρια:

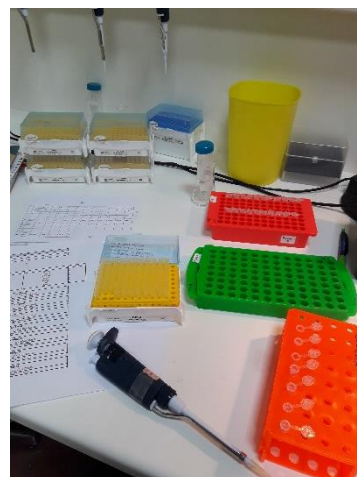
- Ατμοσφαιρική Ρύπανση
- Ιονίζουσα Ακτινοβολία
- Μεταβολισμός
- Φλεγμονή
- Κάπνισμα

Είναι μόνο λίγοι από τους λόγους που οδηγούν σε διαταραχή της οξειδωτικής ισορροπίας και δημιουργούν το γνωστό «οξειδωτικό στρες», που έχει σημαντικές παθολογικές επιπτώσεις.

Για αυτό τον λόγο, τα τελευταία χρόνια γίνεται ολοένα και μεγαλύτερη επένδυση στην εύρεση φυσικών αντιοξειδωτικών, είτε ενζυματικών είτε μη παραγόντων από φυσικές πηγές, ώστε να γίνει αποτελεσματική διαχείριση της κατάστασης. Παράλληλα, έχουν αναπτυχθεί έμπιστες και σοβαρές μελέτες, οι οποίες είναι σε θέση να δώσουν αξιόπιστα αποτελέσματα σχετικά με την αντιοξειδωτική δράση των προς μελέτη δειγμάτων. Έτσι, ο έλεγχος της ικανότητας των εκχυλισμάτων, των κλασμάτων αλλά και των καθαρών ουσιών να εξουδετερώνουν ελεύθερες ρίζες πραγματοποιείται με πληθώρα αντιοξειδωτικών μελετών, όπως:

- Μέθοδος DPPH
- Μέθοδος ABTS
- Εξουδετέρωση OH•
- Εξουδετέρωση της O₂•

Στην παρούσα εργασία έγινε εφαρμογή της μεθόδου δέσμευσης ελευθέρων ριζών DPPH, ή αλλιώς δοκιμασία DPPH. Η ένωση 2,2-διφαινυλ-1-πικρυλυδραζύλιο (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH) αποτελεί μία ρίζα η οποία φέρει ένα μονήρες ηλεκτρόνιο πάνω σε άζωτο και έχει την τάση να ανάγεται προς 2,2-διφαινυλ-1-πικρυλυδραζίνη (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazine). Το DPPH εξαιτίας αυτού του μονήρους ηλεκτρονίου φέρει χαρακτηριστικό ιώδες χρώμα και παρουσιάζει έντονη απορρόφηση στα 517 nm. Η δέσμευση αυτού του ηλεκτρονίου από ουσίες που μπορούν να προσφέρουν ένα άτομο H hydrogen atom transfer, HAT), ή με την προσθήκη ενός ηλεκτρονίου (single electron transfer, SET) έχει σαν αποτέλεσμα τον άμεσο αποχρωματισμό του διαλύματος από ιώδες σε απαλό ροζ, κίτρινο έως άχρωμο και συνεπώς την ελάττωση της απορρόφησης του στα 517 nm, κάνοντας δυνατή την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Επομένως, η ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών μπορεί να προσδιοριστεί φασματοφωτομετρικά λόγω αυτής της χρωματικής αλλαγής και την ελάττωση της απορρόφησης του διαλύματος (Εικόνα 178) (Mishra, Ojha and Chaudhury 2012).



Εικόνα 177 Πειραματική Διαδικασία.



Εικόνα 178 Μηχανισμός Δράσης.

Μεθοδολογία

Ο έλεγχος των παραπάνω εκχυλισμάτων ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση έγινε με τη μέθοδο του DPPH όπως προτείνεται από τους (Lee S.K. et al., 1998) σύμφωνα με την οποία:

Για την παρασκευή του διαλύματος DPPH (Aldrich Chemical company) ζυγίζονται με ακρίβεια 12.4 mg αντιδραστηρίου DPPH και προστίθενται 100 mL απόλυτης EtOH. Το διάλυμα αναδεύεται έντονα καθότι η πλήρης διαλυτοποίηση της ρίζας είναι καθοριστικής σημασίας για την επαναληψιμότητα και την ακρίβεια των μετρήσεων. Το διάλυμα παρασκευάζεται λίγο πριν τη διεξαγωγή του πειράματος και φυλάσσεται μακριά από το φως σκεπασμένο με αλουμινόχαρτο μέχρι τη στιγμή της ανάλυσης. Τα δείγματα προετοιμάζονται με την χρήση DMSO και οι συγκεντρώσεις (Πίνακας 71) που πρέπει να παρασκευαστούν είναι οι εξής:

Πίνακας 71 Συγκεντρώσεις Καθαρών Ουσιών και Κλασμάτων.

Συγκεντρώσεις Καθαρών Ουσιών		Συγκεντρώσεις Κλασμάτων/Εκχυλισμάτων	
C eppendorf	C cell	C eppendorf	C cell
10mM	500μM	10mg/mL	500 μg/mL
5mM	250μM	5 mg/mL	250 μg/mL
2mM	100μM	2 mg/mL	100 μg/mL
1mM	50μM	1 mg/mL	50 μg/mL
400μM	20μM	400 μg/mL	20 μg/mL
200μM	10μM	200 μg/mL	10 μg/mL
100μM	5μM	100 μg/mL	5 μg/mL

Παρασκευάζονται 7 συγκεντρώσεις ώστε να είναι δυνατός ο υπολογισμός του IC₅₀. Κατόπιν, σε 96-τρυπες πλάκες προστίθενται **10μL** από το εκάστοτε δείγμα και **190μL** διαλύματος DPPH. Παρασκευάζεται τυφλό δείγμα με **190μL DPPH και 10μL DMSO**. Επίσης, παρασκευάζονται τυφλά δείγματα τόσο για το control όσο και για το προς κάθε δείγμα μελέτη. Δηλαδή, αυτό αποτελείται **10μL DMSO+190μL EtOH**, όσο αφορά το **control και 10μL δείγματος+190μL EtOH** για τα δείγματα. Ακολουθεί επώαση **για 30 min σε σκοτεινό μέρος και σε θερμοκρασία δωματίου** και στη συνέχεια, μετράται η απορρόφηση στα **517 nm** με Φασματοφωτόμετρο(Tecan). Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το γαλλικό οξύ, το οποίο είναι ένα φυσικό προϊόν με σημαντική αντιοξειδωτική ικανότητα. Προστέθηκαν **10μL διαλύματος γαλλικού οξέος, συγκέντρωσης 100μg/mL σε 190μL DPPH**. Όλες οι αναλύσεις έγιναν εις τριπλούν.

Η μεταβολή της έντασης της απορρόφησης (% μείωση), η οποία είναι αποτέλεσμα της παρουσίας αντιοξειδωτικών ουσιών και αντικατοπτρίζει τη μείωση της ποσότητας της ελεύθερης ρίζας, υπολογίζεται με βάση τον ακόλουθο μαθηματικό τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = \% \text{ δέσμευση ελεύθερης ρίζας} = \frac{[(A-B) - (C-D)]}{(A-B)} \times 100$$

Όπου,

A: η απορρόφηση του control (10μL DMSO+190μL DPPH)

B: το τυφλό (blank) του control (10 μLDMSO+190μL EtOH)

C: η απορρόφηση του δείγματος (10μL δείγματος+190μL DPPH)

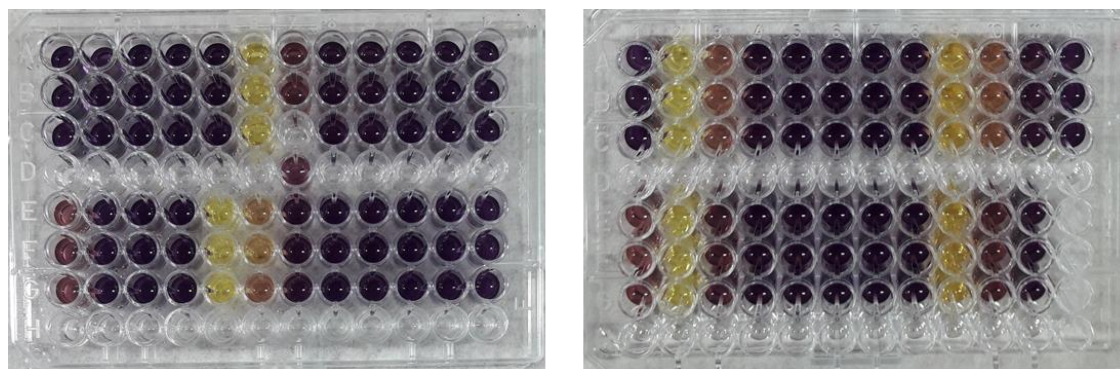
D: το τυφλό (blank) του δείγματος (10μL δείγματος+190μL EtOH)

Με βάση τις τιμές που προκύπτουν από το ποσοστό μείωσης της ρίζας σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις των δειγμάτων στα κελιά της 96-τρυπης πλάκας κατασκευάζονται, για κάθε εκχύλισμα, καμπύλες αναφοράς. Στις καμπύλες αυτές επιλέγονται τα σημεία που αντιστοιχούν στην γραμμική περιοχή και από την καινούργια εξίσωση που προκύπτει υπολογίζεται η τιμή του IC₅₀ που αντιστοιχεί στην τελική συγκέντρωση του δείγματος με την οποία αναστέλλεται το 50% της ρίζας DPPH. Ο υπολογισμός αυτός γίνεται γραφικά.

Μία ακόμα πληροφορία που λαμβάνουμε από τις καμπύλες αφορά τη δραστικότητα των εκχυλισμάτων. Συγκεκριμένα, δραστικά χαρακτηρίζονται τα δείγματα στα οποία σε τελική συγκέντρωση 200 μg/mL αναστέλλουν τη ρίζα σε ποσοστό > 80%, μέτριας δραστικότητας χαρακτηρίζονται αυτά που την αναστέλλουν κατά 50-80% και αδρανή αυτά με αναστολή < 50%.

Αποτελέσματα

Για την μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης επιλέχθηκαν μεταβολίτες που εντοπίζονται κυρίως στο ελαιόλαδο ή είναι προϊόντα ημισύνθεσης και έχουν αξιοσημείωτες βιολογικές δράσεις. (Εικόνα 179 96-τρυπες Πλάκες.)

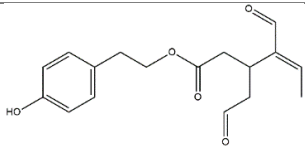
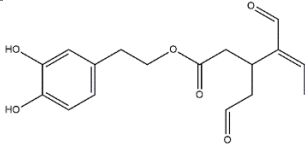
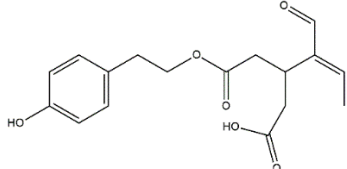
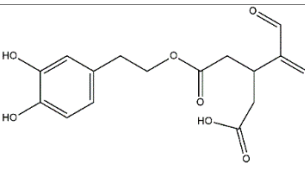
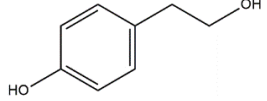
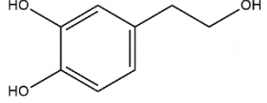
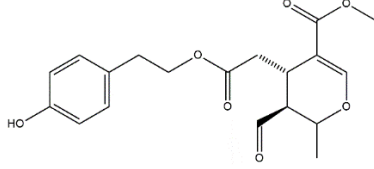
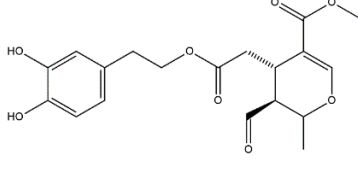
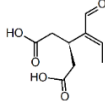
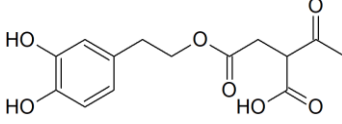


Εικόνα 179 96-τρυπες Πλάκες.

Από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων που λήφθηκαν από το Tecan μέσω της εφαρμογής της εξίσωσης λήφθηκαν τα παρακάτω γραφήματα. Συνοπτικά, στον παρακάτω (Πίνακας 72 Φυσικές ουσίες και Ημισυνθετικά Παράγωγα που μελετήθηκαν και IC₅₀.) φαίνονται οι φυσικές ουσίες ή ημισυνθετικά παράγωγα που μελετήθηκαν, καθώς και IC₅₀:

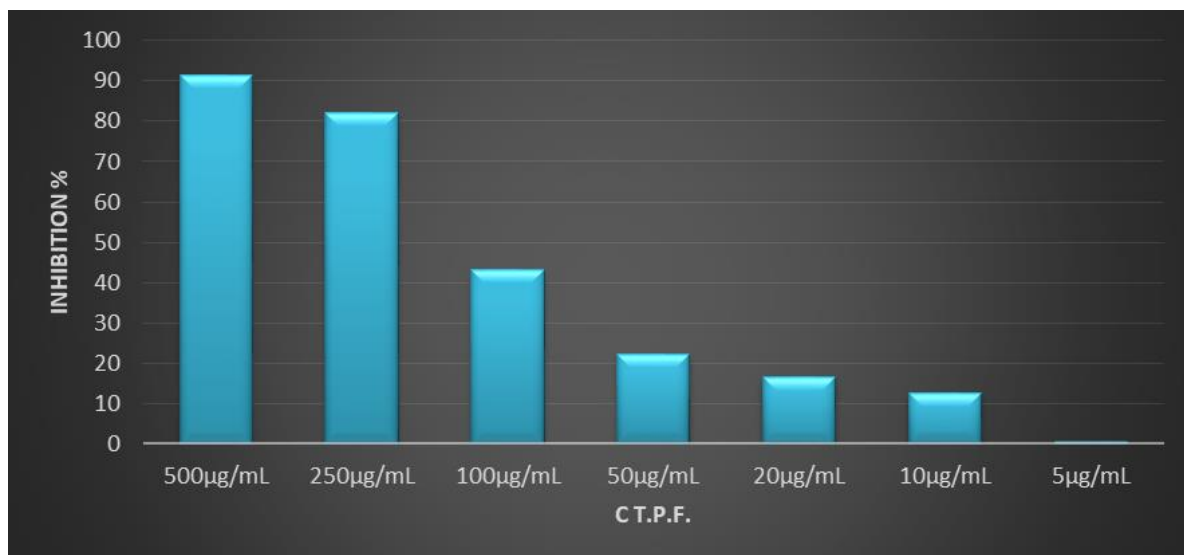
Πίνακας 72 Φυσικές ουσίες και Ημισυνθετικά Παράγωγα που μελετήθηκαν και IC₅₀.

Μεταβολίτης	Χημική Δομή	IC ₅₀	Γραφική Εξίσωση	R ²
T.P.F.		136.09	$y = 0.29x + 10.535$	0.992

Ολεοκανθάλη		-	-	-
Ολεασείνη		72.44	$y = 0.8298x - 10.113$	0.9912
Ολεοκανθαλικό Οξύ		-	-	-
Ολεασεινικό Οξύ		67.27	$y = 0.733x + 0.6939$	0.9991
Τυροσόλη		-	-	-
Υδροξυτυροσόλη		93.09	$y = 0.491x + 4.2903$	0.9958
MFLA		-	-	-
MFOA		217.81	$y = 0.2004x + 6.35$	0.9981
Eda Acid		-	-	-
Κλάσμα Olea_Oxidation		31.99	$y = 1.4943x + 2.197$	0.9999
Μεταβολίτης 3		76.57	$y = 0.8137x - 12.248$	0.9997

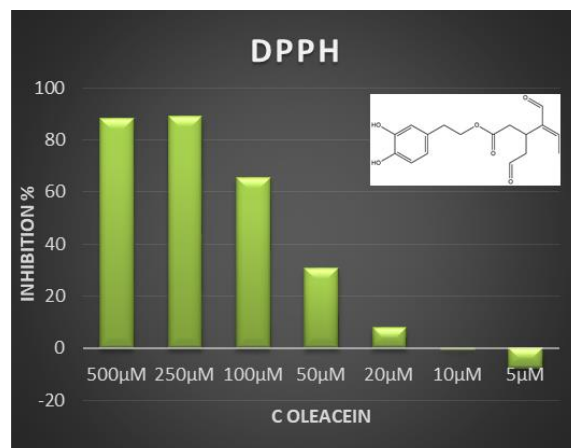
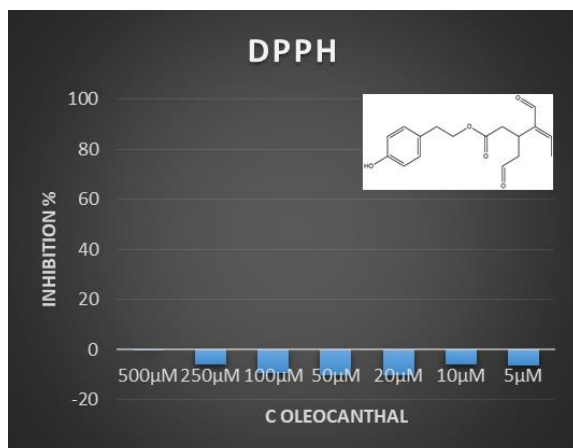
Στα παρακάτω γραφήματα, απεικονίζεται η % Αναστολή ως προς τις συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν:

% Αναστολή εκχυλίσματος T.P.F.



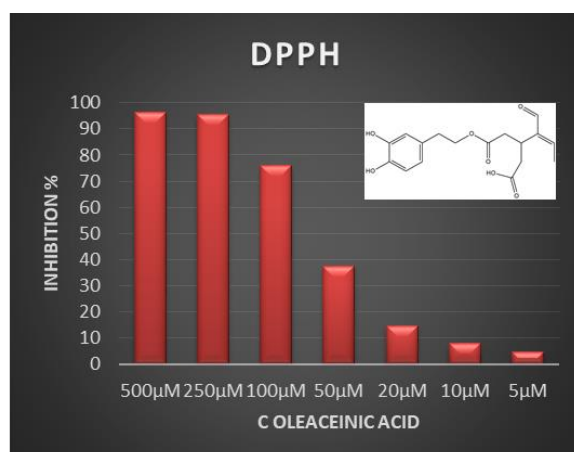
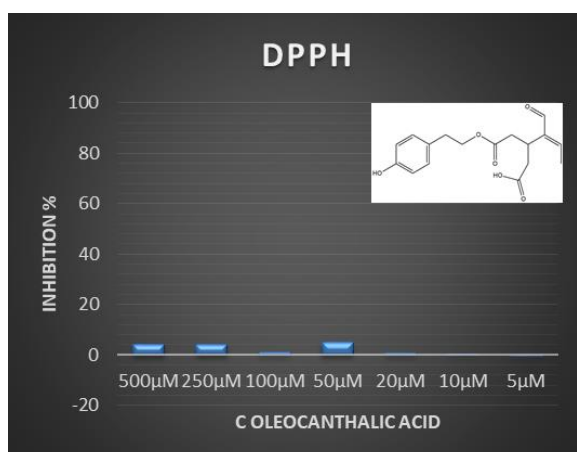
Σχήμα 1 % Αναστολή εκχυλίσματος T.P.F.

% Αναστολή Ολεοκανθάλης-Ολεασείνης



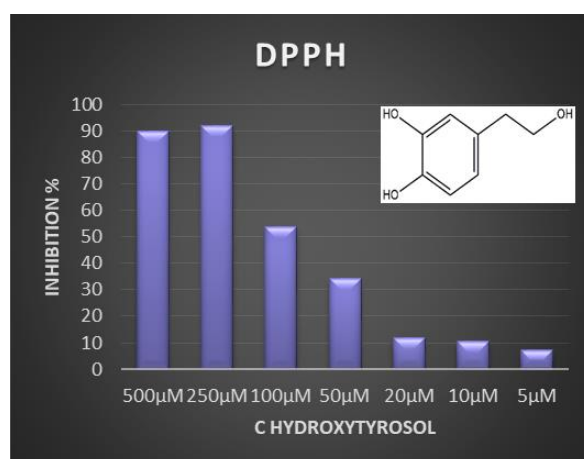
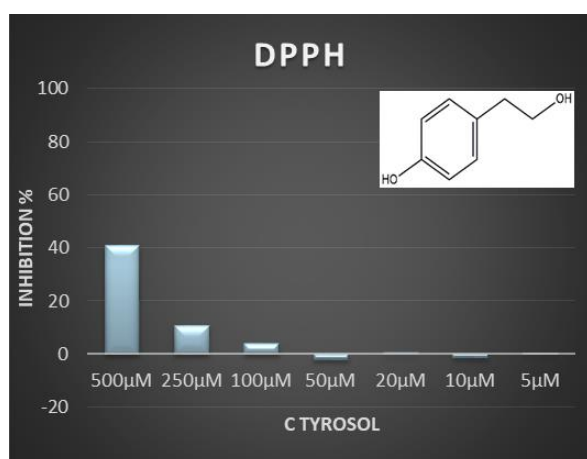
Σχήμα 2 % Αναστολή Ολεοκανθάλης-Ολεασείνης

% Αναστολή Ολεοκανθαλικού _Ολεασεινικού Οξέος



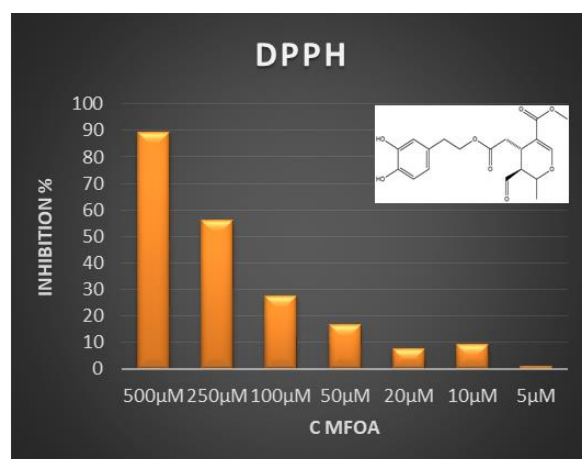
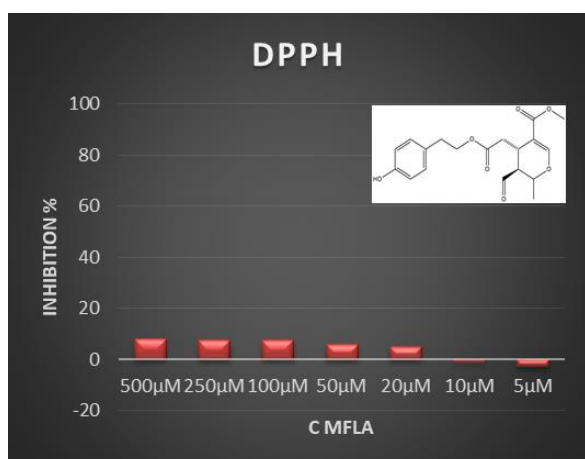
Σχήμα 3 % Αναστολή Ολεοκανθαλικού _Ολεασεινικού Οξέος

% Αναστολή Τυροσόλης-Υδροxyτυροσόλης



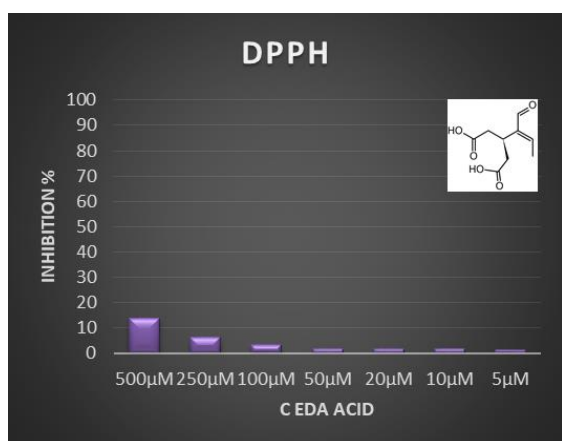
Σχήμα 4 % Αναστολή Τυροσόλης-Υδροxyτυροσόλης

% Αναστολή MFLA-MFOA



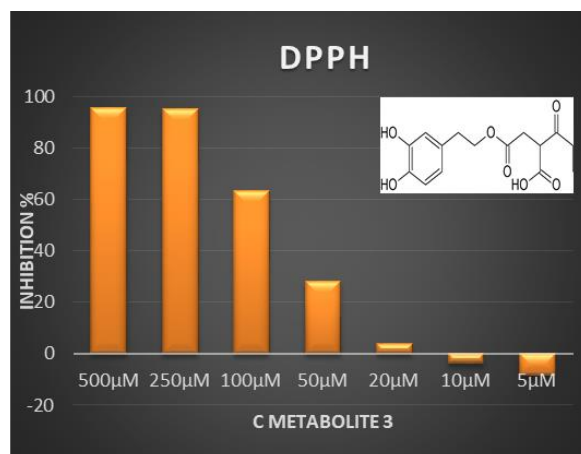
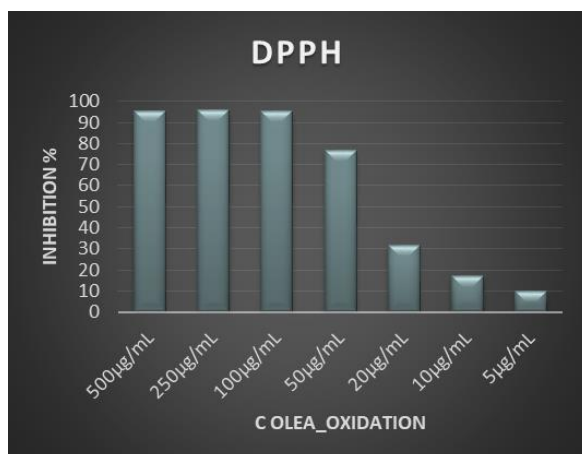
Σχήμα 5 % Αναστολή MFLA-MFOA

% Αναστολή Eda Acid



Σχήμα 6 % Αναστολή Eda Acid

% Αναστολή Αντίδρασης Οξείδωσης-Νέο Ημισυνθετικό Προϊόν



Σχήμα 7 % Αναστολή Αντίδρασης Οξειδωσης-Νέο Ημισυνθετικό Προϊόν

Από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων, παρατηρήθηκε πως τα παράγωγα που φέρουν 2 υδροξύλια στο φαινολικό τμήμα του μορίου (δακτύλιος κατεχόλης) εμφανίζουν σημαντική αντιοξειδωτική δράση μέσω αναστολής της ρίζας DPPH, ενώ αντίθετα αυτά με 1 υδροξύλιο δεν εμφανίζουν καμία δράση. Οι τιμές IC_{50} για αυτά τα δείγματα υποδεικνύουν δράση ακόμα και σε μικρές συγκεντρώσεις. Η διαφορά αυτή οφείλεται στην μεγάλη δραστηριότητα που δημιουργείται εξαιτίας της ηλεκτροχημικότητας αυτού του συστήματος και πιθανώς στην ευκολότερη διάθεση των H^+ που θα αντιδράσουν με τις ελεύθερες ρίζες του διαλύματος. Κρίνεται αναγκαία η περαιτέρω μελέτη για πιο έγκυρα και αξιόπιστα αποτελέσματα που θα οδηγήσουν ακόμα και στην ανάπτυξη σκευασμάτων με ισχυρή αντιοξειδωτική δράση.

3 Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, η εφαρμογή της μεθόδου Χρωματογραφίας Κατ' Αντιρροή παρέχει μοναδικά πλεονεκτήματα στην επεξεργασία ακόμα και των πιο πολύπλοκων μειγμάτων και εξασφαλίζει την παραλαβή καθαρών μεταβολιτών. Η κυριότερη προϋπόθεση για να επιτευχθεί αυτό είναι να βρεθεί ο κατάλληλος τύπος Χρωματογραφίας, αφού ληφθούν σοβαρά υπ' όψιν οι ιδιότητες του εκχυλίσματος και του μεταβολίτη στόχου.

Οι τεχνικές, που δρουν με διαφορετικό μηχανισμό και ο συνδυασμός τους στην ίδια διαχωριστική διαδικασία μπορεί να εξασφαλίσει ένα πιο αποτελεσματικό καθαρισμό του μεταβολίτη στόχου.

Έτσι, από δύο φυτικά είδη με αξιοσημείωτες βιολογικές δράσεις έγινε δυνατή η παραλαβή καθαρών μεταβολιτών, που θα αξιοποιηθούν περαιτέρω τόσο σε *in vitro* όσο ενδεχομένως και σε *in vivo* σε φαρμακολογικού στόχους.

Παράλληλα, απαιτείται η μεταφορά αυτών των διαδικασιών από εργαστηριακή κλίμακα σε πιλοτική για την επεξεργασία μεγάλου όγκου εκχυλισμάτων και την παραλαβή μεγάλης ποσότητας καθαρών ουσιών. Αυτό, σε συνδυασμό με την βιολογική αξιολόγηση, δίνει την δυνατότητα ανάπτυξης φυτικών προϊόντων με κοσμητολογικό, διατροφικό ακόμα και θεραπευτικό ενδιαφέρον.

4 Βιβλιογραφία

- 1 Šavikin K, Aljančić IS, Vajs VE, Milosavljević SM, Jadranin M, Đorđević I, Menković NR. Bioactive secondary metabolites in several genera of gentianaceae species from the central regions of the balkan peninsula. In: The Gentianaceae - Volume 2: Biotechnology and Applications. Institute for Medicinal Plant Research “Dr. Josif Panèiæ”, Tadeuša Koščuška 1, Belgrade, Serbia: Springer Berlin Heidelberg, 2015: 319–347 Im Internet: https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84943259018&doi=10.1007%2F978-3-642-54102-5_14&partnerID=40&md5=e82509d83ca37c9125a3f7462cc9fee5
- 2 European Medicine Agency.
- 3 Scopus.
- 4 <https://en.wikipedia.org/wiki/Gentius>.
- 5 Yuan H-Y, Kwaku OR, Pan H, Han J-X, Yang C-R, Xu M. Iridoid glycosides from the Genus *Gentiana* (Gentianaceae) and their Chemotaxonomic Sense. *Nat Prod Commun* 2017; 12: 1663–1670 Im Internet: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85032387211&partnerID=40&md5=ae9e46f9b73258c7631348c12ec17b4b>
- 6 <https://www.today.com/food/what-s-moxie-why-coca-cola-newest-soda-classic-maine-t136853>).
- 7 <https://www.discoverlife.org/mp/20q?search=Gentiana&flags=glean>:
- 8 European Environment Agency European Topic Centre on Biological Diversity.
- 9 Ando H, Hirai Y, Fujii M, Hori Y, Fukumura M, Niiho Y, Nakajima Y, Shibata T, Torizuka K, Ida Y. The chemical constituents of fresh *Gentiana* root. *J Nat Med* 2007; 61: 269–279 Im Internet: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-34548826524&doi=10.1007%2Fs11418-007-0143-x&partnerID=40&md5=5674b5f0ea3987ea9221aff5fe268eb2>
- 10 Buchwald W, Mikołajczak PŁ. *Gentianae radix*. In: The Gentianaceae - Volume 2: Biotechnology and Applications. Institute of Natural Fibres and Medicinal Plants, Wojska Polskiego Str. 71B, Poznań, 60-630, Poland: Springer Berlin Heidelberg, 2015: 403–419 Im Internet: https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84943270578&doi=10.1007%2F978-3-642-54102-5_17&partnerID=40&md5=2b637bdd01fbb373c3cc5f1f13fb9a1d
- 11 LENA STRUWE VICTOR A. ALBERT. GENTIANACEAE: SYSTEMATICS AND NATURAL HISTORY. 2002
- 12 Veiga T, Guitián J, Guitián P, Guitián J, Munilla I, Sobral M. Flower colour variation in the montane plant *Gentiana lutea* L. (Gentianaceae) is unrelated to abiotic factors. *Plant Ecol Divers* 2016; 9: 105–112 Im Internet: <https://doi.org/10.1080/17550874.2015.1074626>
- 13 Mirzaee F, Hosseini A, Jouybari HB, Davoodi A, Azadbakht M. Medicinal, biological and

- phytochemical properties of *Gentiana* species. *J Tradit Complement Med* 2017; 7: 400–408 Im Internet: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2225411017300044>
- 14 Yan Xu 1, Ying Li 1, Katherine G. Maffucci 2 LH 3 and RZ 1. Analytical Methods of Phytochemicals from the Genus *Gentiana*. *molecules* 2017;
- 15 Dewick PM. Medicinal Natural Products A Biosynthetic Approach.
- 16 Chialva F, Frattini C, Martelli A. Unusual essential oils with aromatic properties III. Volatile components of gentian roots. *Zeitschrift für Leb und Forsch* 1986; 182: 212–214 Im Internet: <https://doi.org/10.1007/BF01042130>
- 17 Nebojša Menković, Katarina Šavikin-Fodulović KS. Chemical Composition and Seasonal Variations in the Amount of Secondary Compounds in *Gentiana lutea* Leaves and Flowers. *Planta Med* 2000; 66: 178–180
- 18 Kumarasamy YDLNPJCMJ. Bioactivity of secoiridoid glycosides from *Centaurium erythraea*. *Phytomedicine* 2003; 10: 344–347
- 19 Mahady GB1, Pendland SL, Stoia A, Hamill FA, Fabricant D, Dietz BM CL. In vitro susceptibility of *Helicobacter pylori* to botanical extracts used traditionally for the treatment of gastrointestinal disorders. *Phytother Res* 2005; 19: 988–991
- 20 Savikin K1, Menković N, Zdunić G, Stević T, Radanović D JT. Antimicrobial activity of *Gentiana lutea* L. extracts. *Z Naturforsch C* 2009; 64: 399–342
- 21 Nastasijević B1, Lazarević-Pašti T, Dimitrijević-Branković S, Pašti I, Vujačić A, Joksić G V V. Inhibition of myeloperoxidase and antioxidative activity of *Gentiana lutea* extracts. *J Pharm Biomed Anal* 2012; 66: 191–196
- 22 Loumou A, Giourga C. Olive groves: “The life and identity of the Mediterranean”. *Agric Human Values* 2003; 20: 87–95 Im Internet: <https://doi.org/10.1023/A:1022444005336>
- 23 https://ec.europa.eu/search/?QueryText=european+olive+oil+sector&op=Search&swlang=en&form_build_id=form-nCrLhzwbCC6bwATMhsq3zZfVh3OBHmwLjNZDKC0QfKk&form_id=nexteuropa_europa_search_search_form.
- 24 Blekas G, Tsimidou M. Olive Oil Composition. *Olive Oil* 2006; 41–72 Im Internet: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781893997882500080>
- 25 Muhammad Ali Hashmi, 1 Afsar Khan, 1 , * Muhammad Hanif, 1 Umar Farooq, 1 * and Shagufta Perveen 2. Traditional Uses, Phytochemistry, and Pharmacology of *Olea europaea* (Olive). *Evid Based Complement Altern Med* 2015;
- 26 Natalie P. Bonvino^{1, 2}, Julia Liang^{1, 2}, Elizabeth D. McCord³ EZ, Natalia Benetti¹, Nancy B. Ray³, Andrew Hung² DB and, Tom C. Karagiannis¹ 5. OliveNet™: a comprehensive library of compounds from *Olea europaea*.
- 27 Molyneux P. JS. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Sci Technol* 2004; 26: 211–219
- 28 Foucault A. Centrifugal Partition Chromatography.
- 29 Ito Y. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions Chromatography, high-

- speed counter-current No Title. *J Chromatogr A* 2004;
- 30 Bojczuk M, Zyzelewicz D, Hodurek P. Centrifugal partition chromatography - A review of recent applications and some classic references. *J Sep Sci* 2017; 40: 1597–1609
- 31 Mandova T, Audo G, Michel S, Grougnet R. Assessment of two centrifugal partition chromatography devices. Application to the purification of *Centaurium erythraea* methanolic extract. *Phytochem Lett* 2017; 20: 401–405 Im Internet: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874390017302811>
- 32 Wang H-M, Liu Q-F, Zhao Y-W, Liu S-Z, Chen Z-H, Zhang R-J, Wang Z-Z, Xiao W, Zhao W-M. Four new triterpenoids isolated from the resin of *Garcinia hanburyi*. *J Asian Nat Prod Res* 2014; 16: 20–28
- 33 Leong XY, Thanikachalam PV, Pandey M, Ramamurthy S. A systematic review of the protective role of swertiamarin in cardiac and metabolic diseases. *Biomed Pharmacother* 2016; 84: 1051–1060 Im Internet: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S075333221631321X>
- 34 Ayeleso TB, Matumba MG, Mukwevho E. Oleanolic Acid and Its Derivatives: Biological Activities and Therapeutic Potential in Chronic Diseases. *Molecules* 2017; 22: 1915 Im Internet: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29137205>
- 35 Hossain MA, Ismail Z. Isolation and characterization of triterpenes from the leaves of *Orthosiphon stamineus*. *Arab J Chem* 2013; 6: 295–298 Im Internet: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878535210002145>
- 36 Huang L, Guan T, Qian Y, Huang M, Tang X, Li Y, Sun H. Anti-inflammatory effects of maslinic acid, a natural triterpene, in cultured cortical astrocytes via suppression of nuclear factor-kappa B. *Eur J Pharmacol* 2011; 672: 169–174
- 37 Liu J, Sun H, Duan W, Mu D, Zhang L. Maslinic acid reduces blood glucose in KK-Ay mice. *Biol Pharm Bull* 2007; 30: 2075–2078
- 38 Reyes-Zurita FJ, Pachon-Pena G, Lizarraga D, Rufino-Palomares EE, Cascante M, Lupianez JA. The natural triterpene maslinic acid induces apoptosis in HT29 colon cancer cells by a JNK-p53-dependent mechanism. *BMC Cancer* 2011; 11: 154
- 39 Lozano-Mena G, Sánchez-González M, Juan ME, Planas JM. Maslinic acid, a natural phytoalexin-type triterpene from olives - A promising nutraceutical? *Molecules* 2014; 19: 11538–11559
- 40 Angelis A, Hamzaoui M, Aligiannis N, Nikou T, Michailidis D, Gerolimos P, Termentzi A, Hubert J, Halabalaki M, Renault J-H, Skaltsounis A-L. An integrated process for the recovery of high added-value compounds from olive oil using solid support free liquid-liquid extraction and chromatography techniques. *J Chromatogr A* 2017; 1491: 126–136 Im Internet: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967317302844>
- 41 Ben Nejma A, Znati M, Daich A, Othman M, Lawson AM, Ben Jannet H. Design and semisynthesis of new herbicide as 1,2,3-triazole derivatives of the natural maslinic acid. *Steroids* 2018; 138: 102–107 Im Internet: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039128X18301272?via%3Dihub>
- 42 Angelis A, Antoniadou L, Stathopoulos P, Halabalaki M, Skaltsounis LA. Oleocanthalic and Oleaceinic acids: New compounds from Extra Virgin Olive Oil (EVOO). *Phytochem Lett* 2018; 26: 190–194 Im Internet:

- <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874390018301757>
- ⁴³ Vougiannopoulou K, Angelopoulou MT, Pratsinis H, Grougnet R, Halabalaki M, Kletsas D, Deguin B, Skaltsounis LA. Chemical and Biological Investigation of Olive Mill Waste Water - OMWW Secoiridoid Lactones. *Planta Med* 2015; 81
- ⁴⁴ Rubio-Senent, F., Martos, S., Garcia, A., Fernandez-Bolanos, J.G., Rodriguez-Gutierrez G, Fernandez-Bolanos J. Isolation and characterization of a secoiridoid derivative from two-phase olive waste (Alperujo). *J Agric Food Chem* 63: 1151–1159
- ⁴⁵ Travis BR, Sivakumar M, Hollist GO, Borhan B. Facile Oxidation of Aldehydes to Acids and Esters with Oxone. *Org Lett* 2003; 5: 1031–1034. Internet: <https://doi.org/10.1021/ol0340078>
- ⁴⁶ Webb KS, Ruskay SJ. Oxidation of aldehydes with Oxone® in aqueous acetone. *Tetrahedron* 1998; 54: 401–410. Internet: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004040209710299X>
- ⁴⁷ Dimitris Michailidis, Apostolis Angelis, Angeliki Skantzari, Nektarios Aligiannis, Panagiotis Stathopoulos, Maria Halabalaki, Jean-Hugues Renault A-LS. Pilot scale extraction of olive oil phenolic fraction and recovery of high purity Oleocanthal and Oleacein. ICNPU 2017, Bansko, 2770 Bulgaria
- Abaza, L., Taamalli, A., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., Zarrouk, M., & Youssef, N. Ben. (2017). Changes in phenolic composition in olive tree parts according to development stage. *Food Research International*.
- Abdullah, Y., Schneider, B., & Petersen, M. (2008). Occurrence of rosmarinic acid, chlorogenic acid and rutin in Marantaceae species. *Phytochemistry Letters*, 1(4), 199–203.
- Adams M. Malaria in the renaissance: Remedies from European herbals from the 16th and 17th century. *J. Ethnopharmacology*, 2011, 133, 278-288
- Benamor, M., Bouariche, Z., Belaid, T., & Draa, M. T. (2008). Kinetic studies on cadmium ions by Amberlite XAD7 impregnated resins containing di(2-ethylhexyl) phosphoric acid as extractant. *Separation and Purification Technology*, 59(1), 74–84.
- Berthod A., Maryutina T., Spivakov B., Shpigun O., Sutherland I.A. (2009). Countercurrent chromatography in analytical chemistry (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 81(2), 355–387.
- Blainski, A., G. C. Lopes & J. C. P. De Mello (2013) Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. *Molecules*, 18, 6852-6865.
- Carda-Broch S. , A. Berthod. (2004). Countercurrent chromatography: a worthy technique for the direct measurement of liquid-liquid partition coefficients. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 45-52.
- Chang, Te-Sheng (2009). "An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors." *International Journal of Molecular Sciences* 10(6): 2440-2475.

- Chemat, F., Vian, M. A., & Cravotto, G. (2012). Green Extraction of Natural Products : Concept and Principles, 8615–8627.
- Duret P., Fakhfakh M.A., Herrenknecht C., Fournet A., Franck X., Figadère B., Hocquemiller R. (2003). Preparative separation of quinolines by centrifugal partition chromatography with gradient elution. *Journal of Chromatography A*, 1011(1-2), 55-65.
- Foucault C. (1998). Counter-current chromatography: instrumentation, solvent selection and some recent applications to natural product purification. *Journal of Chromatography A*, 808, 3–22.
- Ha Y.W., Kim Y.S. (2009). Preparative isolation of six major saponins from Platycodi Radix by high-speed counter-current chromatography. *Phytochem Anal*, 20(3), 207-213.
- Hubert, J., Angelis, A., Aligiannis, N., Rosalia, M., Abedini, A., Bakiri, A., ... Renault, J. H. (2016). In vitro dermo-cosmetic evaluation of bark extracts from common temperate trees. *Planta Medica*, 82(15), 1351–1358.
- Ito Y. (2005). Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1065(2), 145-168.
- Lee, M. S., & Kerns, E. H. (1999). LC/MS applications in drug development. *Mass Spectrometry Reviews*, 18(3–4), 187–279. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2787\(1999\)18:3/4<187::AID-MAS2>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2787(1999)18:3/4<187::AID-MAS2>3.0.CO;2-K)
- Mandal, V., & Mandal, S. C. (2010). Design and performance evaluation of a microwave based low carbon yielding extraction technique for naturally occurring bioactive triterpenoid: Oleanolic acid. *Biochemical Engineering Journal*, 50(1–2), 63–70.
- Margraff R., Intes O., Renault J.H., Garret P. (2005). Partitron 25, a Multi-Purpose Industrial Centrifugal Partition Chromatograph: Rotor Design and Preliminary Results on Efficiency and Stationary Phase Retention. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 28(12-13), 1893-1902.
- Massada Y.(1976) Analysis of essential oils by Gas Chromatography and mass Spectro Spectrometry. John Wiley & Sons, New York
- Michel, T., Khlif, I., Kanakis, P., Termentzi, A., Allouche, N., Halabalaki, M., & Skaltsounis, A. L. (2015). UHPLC-DAD-FLD and UHPLC-HRMS/MS based metabolic profiling and characterization of different *Olea europaea* organs of Koroneiki and Chetoui varieties. *Phytochemistry Letters*, 11, 424–439.
- Mishra, K., H. Ojha & N. K. Chaudhury (2012) Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chemistry*, 130, 10361043.
- Ndlovu, G., Fouche, G., Tselanyane, M., Cordier, W., & Steenkamp, V. (2013). In vitro determination of the anti-aging potential of four southern African medicinal plants.

- Piper, T., Mareck, U., Geyer, H., Flenker, U., Thevis, M., Platen, P., & Schanzer, W. (2008). Determination of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios of endogenous urinary steroids: method validation, reference population and application to doping control purposes. *Rapid Communications in Mass Spectrometry : RCM*, 22, 2161–2175.
- Renault J.H., JM Nuzillard, O Intes, A Maciuk. (2002). Solvent systems. *Elsevier*, 3, 49-83.
- Renault J.H., JM Nuzillard, O Intes, A Maciuk. (2002). Solvent systems. *Elsevier*, 3, 49-83.
- Roberts, C. (2001). Book review. *Journal of Archaeological Science*, 28(5), 566–567.
- Sánchez-González, M., Lozano-Mena, G., Juan, M. E., García-Granados, A., & Planas, J. M. (2013). Assessment of the safety of maslinic acid, a bioactive compound from *Olea europaea* L. *Molecular Nutrition and Food Research*, 57(2), 339–346.
- Schauer, N., Steinhauser, D., Strelkov, S., Schomburg, D., Allison, G., Moritz, T., ... Kopka, J. (2005). GC – MS libraries for the rapid identification of metabolites in complex biological samples, 579, 1332–1337.
- Shingleton, W. D., Hodges, D. J., Brick, P., & Cawston, T. E. (1996). Collagenase: a key enzyme in collagen turnover. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie et Biologie Cellulaire*, 74(6), 759–775.
- Singleton, V. L. & J. A. Rossi (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
- Taamalli, A., Abaza, L., Arráez Román, D., Segura Carretero, A., Fernández Gutiérrez, A., Zarrouk, M., & Ben Youssef, N. (2013). Characterisation of phenolic compounds by HPLC-TOF/IT/MS in buds and open flowers of “chemlali” olive cultivar. *Phytochemical Analysis*.
- Ungureanu C., Marchal L., Chirvase A., & A., Foucault. (2013). Centrifugal partition extraction, a new method for direct metabolites recovery from culture broth: Case study of torularhodin recovery from *Rhodotorula rubra*. *Bioresource Technology*, 132, 406-409.
- Yin, H., & Killeen, K. (2007). The fundamental aspects and applications of Agilent HPLC-Chip. *Journal of Separation Science*, 30(10), 1427–1434.