



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΑΘΗΝΩΝ**

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

**ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑΣ & ΧΗΜΕΙΑΣ
ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ**

ΦΥΤΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ:

Hypericum trichocaulon Boiss. & Heldr. – Hypericaceae



**ΔΑΣΚΑΛΑΚΗ ΑΡΤΕΜΙΣ
ΦΑΡΜΑΚΟΠΟΙΟΣ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΓΙΑ ΤΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ: ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ, ΑΝΑΠΤΥΞΗ, ΠΑΡΑΓΩΓΗ &
ΕΛΕΓΧΟΣ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ**

ΑΘΗΝΑ 2016

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα –ξεκινώντας- να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που με βοήθησαν να φέρω εις πέρας τη διπλωματική αυτή εργασία.

Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές μου και κυρίως την Καθηγήτρια κ. Ελένη Σκαλτσά για την επιλογή του θέματος και για τη συνεχή επιμέλεια και καθοδήγηση που μου παρείχε ως επιβλέπουσα, τόσο κατά τη διάρκεια εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου εργασίας εδώ στην Αθήνα, όσο και καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας μου στο εξωτερικό.

Εν συνεχεία, ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή Dr. Jörg Heilmann, του Τμήματος Pharmazeutische Biologie, Universität Regensburg, Γερμανία, για την πολύτιμη βοήθειά του στην εκπόνηση της μεταπτυχιακής μου εργασίας και για την πάντα ευχάριστη και φιλική υποδοχή στο εργαστήριό του.

Ευχαριστώ την τριμελή εξεταστική επιτροπή του Τομέα Φαρμακογνωσίας & Χημείας Φυσικών Προϊόντων Καθηγήτρια κ. Ελένη Σκαλτσά, την Καθηγήτρια κ. Ιωάννα Χήνου και την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Αναστασία Καριώτη.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ζαχαρία Κυπριωτάκη, Εργαστήριο Συστηματικής Βοτανικής, ΤΕΙ Κρήτης, για τη βοήθειά του στον εντοπισμό και τη συλλογή της δρόγης. Χωρίς αυτόν ο εντοπισμός του *Hypericum trichocaulon* θα ήταν πραγματικά αδύνατος!

Ευχαριστώ το Τμήμα Κεντρικής Ανάλυσης, Τμήμα Χημείας και Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου του Regensburg, και ειδικά τον κ. Fritz Kastner και τον κ. Josef Kiermaier για τη μέτρηση των φασμάτων NMR και μάζας.

Ευχαριστώ πολύ τους συναδέλφους μου τόσο στην Ελλάδα, όσο και στη Γερμανία για τη βοήθεια και την υποστήριξή τους όποτε αυτή ήταν αναγκαία και για τις όμορφες «εργαστηριακές αναμνήσεις» που ποτέ δε θα ξεχάσουμε!

Τέλος ευχαριστώ τους γονείς μου και τα αδέρφια μου για τη συνεχή ψυχολογική, ηθική και υλική υποστήριξή τους σε κάθε επιλογή μου όλα αυτά τα χρόνια.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A. Εισαγωγή

A.1 Σκοπός της εργασίας	1
A.2 Το γένος <i>Hypericum</i> L.....	3
A.2.1 Βοτανική περιγραφή-Ταξινόμηση.....	3
A.2.2 Δρογοετυμολογία.....	9
A.2.3 Δρογοϊστορία-Λαϊκή Θεραπευτική.....	9
A.2.4 Δρογοφαρμακολογία	
A.2.4.1α. Παραδοσιακή Χρήση	11
A.2.4.1β. Καλώς καθιερωμένη Χρήση	11
A.2.4.2. Αντικαταθλιπτική δράση.....	13
A.2.4.3 Αντενδείξεις-Αλληλεπιδράσεις.....	18
A.2.4.4 Άλλες Φαρμακολογικές Δράσεις.....	19
A.2.5 Δρογοχημεία	
A.2.5.1 Δρογοχημεία του γένους.....	23
A.2.5.2 Δρογοχημεία του section <i>Drosocarpium</i>	44

B. Πειραματικό Μέρος

B.1. Τεχνικές και οργανολογία που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση και ταυτοποίηση των δευτερογενών μεταβολιτών.....	53
B.1.1. Φασματοσκοπικές και Φασματομετρικές μέθοδοι.....	57
B.1.2. Διαλύτες.....	58
B.2. Εκχύλιση της δρόγης.....	59
B.3. Χρωματογραφικός διαχωρισμός εκχυλισμάτων	
B.3.1. Χρωματογραφικός διαχωρισμός του κυκλοεξανικού εκχυλίσματος: TRIC.....	60
B.3.2. Χρωματογραφικός διαχωρισμός του μεθανολικού εκχυλίσματος: TRIM.....	70

Γ. Αποτελέσματα

I. ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΠΑΡΑΓΩΓΑ

Γ.1 Ξανθόνες

Γ.1.1. Ουσία 1: Υπεριξανθόνη Α (Hyperixanthone A).....78

Γ.2. Φλαβονοειδή

Γ.2.1. Ουσία 2: I3,II-8 Διαπιγενίνη..... 85

Γ.2.2. Ουσία 3: Κερκιτρίνη 89

Γ.2.3. Ουσία 4: Υπεροσίδης.....94

Γ.2.4. Ουσία 5: Ρουτίνη.....99

Γ.2.5. Ουσία 6: Μυρικιτρίνη..... 104

Γ.3. Προανθοκυανιδίνες

Γ.3.1. Ουσία 7: Προκυανιδίνη A2.....110

Γ.4. Φαινολοξέα

Γ.4.1. Ουσία 8: Ε-Χλωρογενικό οξύ.....117

II. Φλορογλυκινόλες

Γ.5 Παράγωγο Υπερφορίνης

Γ.5.1. Ουσία 9: Αντιυπερφολιατίνη (Adhyperfoliatin)123

III. Τερπένια

Γ.6. Διτερπένια

Γ.6.1. Ουσία 10: *trans*-φυτόλη.....133

IV. Λιπαρά οξέα

Γ.7.1. Ουσία 11: α-λινολενικό οξύ.....139

Δ. Συμπεράσματα-Συζήτηση.....141

Ε. Βιβλιογραφία.....149

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A.1 Σκοπός της εργασίας

Το γένος *Hypericum* L. περιλαμβάνει πάνω από 469 είδη με παγκόσμια εξάπλωση και ένα πλούσιο φάσμα φαρμακολογικών δράσεων. Δημοφιλές κυρίως για την αντικαταθλιπτική του δράση, έχει κινήσει έντονα το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας εδώ και δεκαετίες με μεγάλο αριθμό επιστημονικών μελετών να συγκεντρώνονται γύρω από αυτό.

Το φυτό είναι ευρέως γνωστό ως υπερικό ή βαλσαμόχορτο και χρησιμοποιείται εκτενώς σε φαρμακευτικά φυτικά προϊόντα, καθώς και σε ομοιοπαθητικά παρασκευάσματα. Από το Νοέμβριο του 2009 έχει αναρτηθεί από τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων (EMA) η μονογραφία της καλώς καθιερωμένης χρήσης και της παραδοσιακής χρήσης του είδους *Hypericum perforatum* L. (www.ema.eu). Είναι ιδιαίτερος δημοφιλές για τη θεραπεία ήπιας έως μετρίως σοβαρής καταθλιπτικής διαταραχής, καθώς τα φυτικά σκευάσματα του *Hypericum perforatum* L. αποτελούν την μοναδική εναλλακτική αντικαταθλιπτική θεραπεία (καλώς καθιερωμένη χρήση) έναντι των κλασσικών συνθετικών αντικαταθλιπτικών σκευασμάτων. Ως φάρμακο παραδοσιακής χρήσης ενδείκνυται σε: περιστασιακή νοητική εξάντληση, ήπια γαστρεντερική δυσφορία (*per os*) και σε τοπική χρήση για ήπιες δερματικές φλεγμονές (όπως ηλιακό έγκαυμα) και ως βοήθημα στην επούλωση ήπιων πληγών.

Χρησιμοποιείται επίσης σε τρόφιμα, έπειτα από έλεγχο ορίων περιεκτικότητας σε υπερικίνη και ξανθόνες, καθώς είναι κατηγοριοποιημένο ως φυσική πηγή τροφίμων (κατηγορία 5) (Council of Europe, 2000).

Αποτελεί ένα από τα κορυφαία σε πωλήσεις φυτικά προϊόντα, ενώ χαρακτηριστική είναι η ανάλυση, η οποία αναφέρει ότι οι πωλήσεις στο υπερικό αυξήθηκαν κατά 2800% μέσα σε ένα έτος (Brevoort, 1998).

Ωστόσο, παρά τις εκτενείς μελέτες που έχουν γίνει πάνω στο υπερικό, τα περισσότερα είδη του γένους δεν έχουν ακόμα μελετηθεί. Σύμφωνα με το τρίτο ετήσιο συνέδριο για το υπερικό που διεξήχθη στην Πάντοβα τον Οκτώβριο του 2010, το 60% των ειδών του γένους *Hypericum* L. παραμένει ακόμα ανεξερεύνητο (Crockett, 2010).

Στην παρούσα εργασία γίνεται μια προσπάθεια συμβολής στην περαιτέρω μελέτη του

γένους παρουσιάζοντας την πρώτη φυτοχημική μελέτη στο είδος *Hypericum trichocaulon* Boiss. & Heldr.. Πρόκειται για ένα ενδημικό είδος το οποίο φύεται στη Δυτική και Κεντρική Κρήτη. Κύριος στόχος είναι η απομόνωση και ταυτοποίηση δευτερογενών μεταβολιτών του είδους με σκοπό τη συμβολή στην πληρέστερη χημειοταξινόμηση του γένους. Επιπλέον, με τη συγκεκριμένη εργασία επιχειρείται η συμβολή στην εκτενέστερη φυτοχημική μελέτη της χλωρίδας της Κρήτης, ένα νησί το οποίο παρουσιάζει εξαιρετικά υψηλά ποσοστά ενδημισμού, έχοντας 1825 διαφορετικά είδη φυτών από τα οποία το 19.3% είναι ενδημικά (Trigas et al., 2013).

A.2. ΤΟ ΓΕΝΟΣ *HYPERICUM* L.

A.2.1 Βοτανική Περιγραφή-Ταξινόμηση

Το γένος *Hypericum* L. περιλαμβάνει πάνω από 469 ανθοφόρα είδη, τα οποία συναντώνται σε όλες τις ηπείρους εκτός από την Ανταρκτική. Πρόκειται για πόες, θάμνους και σπάνια για δέντρα, τα οποία μπορούν να ευδοκιμήσουν σε μεγάλη ποικιλία περιβαλλοντικών συνθηκών και κυρίως στις εύκρατες περιοχές του Βορείου Ημισφαιρίου. Αντίθετα, η εξάπλωση των ειδών αυτών σε περιοχές ακραίων συνθηκών ξηρασίας, θερμοκρασίας και αλατότητας είναι περιορισμένη (Crockett & Robson, 2011). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα 2/3 των ειδών του γένους *Hypericum* L. εντοπίζονται στη λεκάνη της Μεσογείου (Nürk & Crockett, 2011) και πολλά από αυτά είναι ενδημικά.

Το γένος *Hypericum* L. είναι ένα από τα 9 γένη (*Cratoxylum* Blume, *Eliea* Cambess., *Harungana* Lamarck, *Hypericum* L., *Lianthus* N.Robson, *Santomasia* N.Robson, *Thornea* Breedlove & McClintock, *Triadenum* Rafinesque, και *Vismia* Vand), που ανήκουν στην οικογένεια Hypericaceae Juss. και αποτελεί το 80% της οικογένειας αυτής. Ανήκει στον κλάδο Hypericaceae Choisy, ο οποίος είναι ένας από του τρεις κλάδους (Vismieae, Cratoxyleae), που εντάσσονται στην οικογένεια Hypericaceae Juss. (Nürk & Blattner, 2010), ενώ η οικογένεια Hypericaceae Juss. είναι μία από τις πέντε οικογένειες (Bonnetiaceae, Clusiaceae s.s., Hypericaceae, Calophyllaceae, Podostemaceae), που ανήκουν στην τάξη Malpighiales (Ruhfel et al., 2011).

Kingdom: Plantae

Subkingdom: Tracheobionta

Division: Spermatophyta

Subdivision: Magnoliophyta

Classis: Magnoliophyta

Subclassis: Dileniidae

Order: Malpighiales/ Theales

Family: Clusiaceae/ Hypericaceae/ Guttiferae

Subfamily: Hypericoideae

Tribe: Hypericeae

Genus: *Hypericum* L.

Πίνακας A.1: Ταξινόμηση του γένους *Hypericum* L. (Strasburger, 2012)

Καθώς το γένος *Hypericum* L. είναι τεράστιο, η διαίρεσή του σε υποκατηγορίες είναι αναγκαία. Έτσι, μετά από εκτενείς μελέτες από το 1997 έως και σήμερα, οι οποίες βασίστηκαν στα μορφολογικά και φυλογενετικά χαρακτηριστικά, στη σύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών και στον αριθμό χρωμοσωμάτων, το γένος *Hypericum* L. διαιρέθηκε από τον Norman K. B. Robson σε 36 διαφορετικά sections, όπου και ενσωματώθηκαν τα περισσότερα είδη του γένους.

Sections/Subsections/Series	Αρ. Ειδών	Εξάπλωση
1. <i>Campyloporus</i> (Spach) R. Keller	10	Τροπική, νοτιοανατολική Αφρική και γειτονικά νησιά, ΝΔ Ιράν
2. <i>Psorophytum</i> (Spach) Nyman	1	Ισπανία (Βαλεριάδες νήσοι)
3. <i>Ascyreia</i> Choisy	43	ΝΑ Ευρώπη, δυτική έως νοτιοανατολική Ασία, νότια Κίνα
4. <i>Takasagoya</i> (Y. Kimura) N Robson	5	Ιαπωνία (νησί Ryuku), Ταϊβάν, Φιλιππίνες
5. <i>Androsaemum</i> (Duhamel) Gordon	4	Μακαρονησία, δυτική και νότια Ευρώπη έως Ιράν, Σαουδική Αραβία, Υεμένη
6. <i>Inodora</i> Stef.	1	ΒΑ Τουρκία, Γεωργία
6a. <i>Umbraculoides</i> N. Robson	1	Μεξικό (Oaxaca)
7. <i>Roscyna</i> (Spach) R. Keller	2	Κεντρική έως ανατολική Ασία, ΒΑ Αμερική
8. <i>Bupleuroides</i> Stef.	1	ΒΑ Τουρκία, Γεωργία
9. <i>Hypericum</i> L.	42	Ευρώπη, ΒΔ Αφρική, Ασία, ΒΔ
I. <i>Hypericum</i>	19	Αμερική, ως <i>Hypericum perforatum</i>
i). <i>Hypericum</i>	12	συναντάται σε πολλά άλλα μέρη του
ii). <i>Senanensia</i> N. Robson	7	κόσμου
II. <i>Erecta</i> N. Robson	23	
9a. <i>Concinna</i> N. Robson	1	ΗΠΑ (Β. Καλιφόρνια)
9b. <i>Graveolentia</i> N. Robson	9	ΝΑ Καναδάς, ανατολικές ΗΠΑ έως Γουατεμάλα
9c. <i>Sampsonia</i> N. Robson	2	ΒΑ Ινδία έως Ν Ιαπωνία
9d. <i>Elodeoida</i> N. Robson	5	Α και ΝΑ Ασία (Κίνα έως Kashmir)
9e. <i>Monanthea</i> N. Robson	7	Α και ΝΑ Ασία (Κίνα έως Σρι Λάνκα)
10. <i>Olympia</i> (Spach) Nyman	4	Ν. Βαλκανική χερσόνησο, Δ Τουρκία, νησιά Αιγαίου
11. <i>Campylopus</i> Boiss	1	Ν. Βουλγαρία, ΒΑ Ελλάδα, ΒΔ Τουρκία
12. <i>Origanifolia</i> Stef.	13	Τουρκία, Γεωργία, Συρία
13. <i>Drosocarpium</i> Spach.	11	Μαδέρα, Μεσόγειος έως Δ Καύκασος
14. <i>Oligostema</i>	7	Ευρώπη, Μακαρονησία, Μεσόγειος

15. Thasia Boiss ^B	1	Ελλάδα, Βουλγαρία, Τουρκία
16. Crossophyllum Spach ^B	3	Β Αιγαίο, Τουρκία, Καύκασος
17. Hirtella Stef.	30	Δ. Μεσόγειος και Ν. Ευρώπη έως Αλτάι
I. Stenadenum N. Robson	12	
II. Platyadenum N. Robson	18	
i). Lydia Sennikov	5	
ii). Scabra N. Robson	3	
iii). Abbreviata Semikov	10	
18. Taeniocarpium Jaub & Spach.	28	Ευρώπη, Μεσόγειος έως Ιράν και Μογγολία
19. Coridium Spach	6	Μεσόγειος, Άλπεις, Καύκασος
20. Myriandra (Spach) R. Keller	29	Ανατολική και κεντρική Β. Αμερική
I. Centrosperma R. Keller	14	έως Ονδούρα, Βερμούδες και νησιά της Καραϊβικής
II. Pseudobrathydium R. Keller	1	
III. Suturosperma R. Keller	7	
IV. Brathydium (Spach) R. Keller	2	
V. Ascyrum (L.) N. Robson	5	
21. Webbia (Spach) R. Keller	1	Κανάρια νησιά, Μαδέρα
22. Arthrophyllum Jaub & Spach.	5	Ν. Τουρκία, Συρία, Λίβανος
23. Triadenioides Jaub & Spach.	5	Ν. Τουρκία, Συρία, Λίβανος, Σοκότρα
24. Heterophylla N. Robson	1	Τουρκία (ΒΔ και δυτικο- κεντρική Ανατολία)
25. Adenotrias (Jaub & Spach.) R. Keller	3	Ν. Μαρόκο έως Μεσόγειο
26. Humifusoideum R. Keller	12	Τροπική και νότια Αφρική, Μαδαγασκάρη, ΝΑ έως Α. Ασία
27. Adenosepalum Spach.	25	Κανάριες νήσοι, Μαδέρα, Ευρώπη, Αφρική, ΝΔ Ασία
I. Aethiopica N. Robson	7	
II. Pubescentes N. Robson	6	
III. Caprifolia N. Robson	3	
IV. Adenosepatum	9	
28. Elodes (Adans) W. Koch	1	Αζόρες και Δ Ευρώπη
29. Brathys (Mutis ex L. F. Choisy)	87	Κεντρική και νότια Αμερική, νησιά της Καραϊβικής, ΝΑ Καναδάς και ανατολικές ΗΠΑ
I. Styphelioides N. Robson	2	
II. Phellotes N. Robson	32	
III. Brathys	39	
IV. Spahcium R. Keller	14	
30. Trigynobrathys (Y. Kimura) N. Robson	52	Ν. Αμερική έως Ν. Καναδάς, έως ΝΑ Ασία, Χαβάη, Αυστραλία, Νέα Ζηλανδία, Αφρική
I. Connatum (R. Keller) N. Robson	27	
II. Knifa (Adans.) N. Robson	25	

Πίνακας Α.2.: Επισκόπηση των sections του γένους *Hypericum* L. (Crockett & Robson, 2011)

Όσον αφορά τη βοτανική περιγραφή, τα γενικά μορφολογικά χαρακτηριστικά συνοψίζονται παρακάτω (Crockett & Robson, 2011):

Στο γένος *Hypericum* L. απαντώνται κυρίως θάμνοι και μικρά ποώδη φυτά, μονοετή ή πολυετή. Σπάνια συναντάμε δέντρα ύψους περίπου 10m, με ξύλινο κορμό. Τα φυτά του γένους έχουν αδένες ανοιχτού ή βαθέως χρώματος. Ο δεύτερος τύπος αδένα μπορεί να έχει βαθύ κόκκινο ή σκοτεινό χρώμα, το οποίο είναι χαρακτηριστικό της παρουσίας ναφθοδιανθρονών. Οι ανοιχτού τύπου αδένες εκκρίνουν συστατικά αιθερίων ελαίων και φλορογλυκινόλες.

Τα φύλλα είναι είτε λεία, είτε φέρουν μία απλή σειρά τριχών. Έχουν αδένες ή «κενά», που περιέχουν ρητίνη ή αιθέριο έλαιο (αυτά είναι διάφανα ή θολά) και συχνά περιέχουν υπερίκίνη και ψευδοϋπερίκίνη, οπότε έχουν βαθύ κόκκινο ή σκοτεινό χρώμα. Τα στελέχη των φυτών έχουν πράσινο έως καστανο-κίτρινο ή κόκκινο χρώμα. Έχουν αδένες ανοικτού έως βαθέως χρώματος (κάποιες φορές μη εμφανείς), οι οποίοι είναι κυρίως απλοί. Ο φλοιός είναι κόκκινος έως καστανός/ιώδης-καστανός ή αργυροειδής ή σπάνια φελλώδης. Τα φύλλα είναι αντίθετα, σταυρωτά ή μερικές φορές σε εναλλασσόμενες σπείρες των 3-4, έχουν παράφυλλα, άμισχα αρχικά και σταδιακά με μίσχο, μερικές φορές με βασική άρθρωση, ελεύθερα ή εκφύονται ενωμένα, αιθαλή ή φυλλοβόλα επί της άρθρωσης ή πάνω από αυτή. Το έλασμα είναι ακέραιο με βάση ή περιστασιακά με ωτία, τα οποία είναι πλαισιωμένα με αδένες, σπάνια εξ ολοκλήρου αδενώδες-οδοντωτό. Η ταξιανθία είναι τελική, έχει 1-∞ άνθη και είναι κυματώδης, με τη μορφή θύρσου [σύνθετη, κυματώδης ταξιανθία] ή βοτρυοειδής. Η μετάβαση από τα φύλλα στα σέπαλα γίνεται είτε σταδιακά, είτε απότομα. Συχνά παρατηρούνται στα φυτά, που ανήκουν στα sections 3, 4, βράκτια φύλλα, συνήθως παρόμοια με σέπαλα, που παραμένουν πάνω στο φυτό, όσο και τα φύλλα ή κάποιες φορές απομακρύνονται νωρίτερα από αυτά. Τα άνθη είναι διγενή, ακτινόμορφα, αστεροειδή έως κωδωνοειδή ή ψευδο-σωληνοειδή, ομόστηλα ή σπανιότερα διμορφικά ετερόστηλα. Τα σέπαλα είναι 4-5 (σπανίως 6 ή 3), ρομβοειδή ή σταυρωτά και αντίθετα, ίσα ή ± άνισα, μερικές φορές φυλλοειδή, ελεύθερα ή εν μέρει ενωμένα, σταθερά επάνω στο φυτό ή περιστασιακά απομακρύνονται από αυτό, έχουν νεύρα 1-11 περίπου, τα οποία είναι παράλληλα ή αποκλίνοντα, διχοτομούνται ή διακλαδίζονται, ενώ συχνά έχουν και αδένες ωχρούς ή σκοτεινούς. Τα πέταλα έχουν χρώμα κίτρινο του λεμονιού έως και χρυσοκίτρινα ή σπανιότερα κρεμεζί ή λευκά. Συχνά χρωματίζονται κόκκινα ραχιαία και αυτό είναι ορατό στους ανθικούς οφθαλμούς. Πολύ σπάνια είναι εξ ολοκλήρου κόκκινα. Είναι 4-5 (σπανίως 6 ή 3), ίσα,

ελεύθερα, σταθερά πάνω στο φυτό ή πέφτουν από αυτό, ασύμμετρα, συχνά με επιφανειακούς αδένες οι οποίοι εντοπίζονται σε σημεία ή σε γραμμική στοίχιση και είναι ωχροί ή σκούροι. Οι στήμονες εντοπίζονται σε δέσμες 4-5, ελεύθεροι ή με ποικίλους τρόπους σύνδεσης (2+ 1+ 1+ 1, 2+ 2+1, (5), (4)), λείοι, σταθεροί πάνω στο φυτό ή απομακρύνονται από αυτό. Κάθε άνθος έχει περίπου 1-60 στήμονες. Τα νήματά τους είναι κίτρινα έως πορτοκαλί ή κόκκινα, επιμήκη έως ελλειπτικά και σχεδόν ισοδιαμετρικά.

***Hypericum trichocaulon* Boiss. & Heldr.**

Sectio Drosocarpium

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε το είδος *H. trichocaulon*, το οποίο ανήκει στο section Drosocarpium Spach (Rosbson, 2010a).

Στο section αυτό περιλαμβάνονται συνολικά 11 είδη:

H. perfoliatum L., *H. trichocaulon* Boiss. & Heldr, *H. vesiculosum* Griseb., *H. bithynicum* Boiss., *H. montrbretti* Spach, *H. rumeliacum* Boiss., *H. barbatum* Jacq., *H. rochelii* Griseb. et Schenk, *H. spruneri*, *H. richerii* Vill, *H. umbellatum* A. Kern.

Τα είδη αυτά εξαπλώνονται από τα νησιά της Βορειοδυτικής Αφρικής έως τις περιοχές γύρω από τη Μαύρη θάλασσα: Μαδέιρα, Κανάρια νησιά, Μαρόκο, Αλγερία, Τυνησία, Σαρδηνία, Κορσική, Βαlearίδες νήσοι, Πορτογαλία, Ισπανία, Ελλάδα, Ελβετία, Νότιο Γαλλία, Ιταλία, Λίβανο, Συρία, Κύπρος, Βοσνία-Ερζεγοβίνη, Μοντενέγκρο, Σερβία, Ουκρανία, Ρουμανία, Κροατία, Σλοβενία, Αυστρία.



Χάρτης εξάπλωσης των ειδών που ανήκουν στο section Drosocarpium

(<http://hypericum.myspecies.info/taxonomy/term/497>)

Το *H. trichocaulon* είναι ένα από τα 7 ενδημικά είδη υπερικού της Κρήτης και οι αναφορές σε αυτό είναι ελάχιστες. Όπως αναφέρεται στο ψηφιακό Βοτανικό μουσείο της Κρήτης το *H. trichocaulon* εντοπίζεται στη Δυτική και Κεντρική Κρήτη και συγκεκριμένα στα Λευκά Όρη, στον Κέδρο (νότια περιοχή του νομού Χανίων) και στις κορυφές του Ψηλορείτη, σε υψόμετρο 350-1950 m. Ο οικοτόπος του είναι τα φρύγανα σε ασβεστολιθικές βραχώδεις θέσεις και επίπεδες αργιλώδεις εκτάσεις. Πρόκειται για πολυετές φυτό με βλαστούς μήκους 5-25(-45) cm έρποντες ή ανερχόμενους, λεπτούς, μερικές φορές ριζοβολούντες στη βάση. Έχει φύλλα μήκους 5-11(-14) mm, ωοειδή-προμήκη προς γραμμοειδή, επιφυή ή με μικρό μίσχο, ακέραια. Οι ταξιανθίες έχουν λίγα άνθη, αρκετά μεγάλα. Τα σέπαλα είναι στρογγυλεμένα στο άκρο, οδοντωτά με μαύρα στίγματα, ή ακέραια. Τα σέπαλα και τα πέταλα μερικές φορές έχουν μαύρες κηλίδες ή λωρίδες σε όλη την επιφάνειά τους. Τα πέταλα έχουν μήκος 6-12 mm. Τέλος, η περίοδος ανθοφορίας είναι από τον Μάιο έως τον Ιούλιο.



Χάρτης εξάπλωσης του *H. trichocaulon*

(http://www.cretanflora.com/hypericum_trichocaulon.html)

<i>Hypericum</i> sp. ενδημικά της Κρήτης	Εξάπλωση	Υψόμετρο (m)
<i>Hypericum aciferum</i> (Greuter) N. K. B. Robson (= <i>Elodes acifera</i> Greuter)	Δυτική Κρήτη (νότια Ν. Χανίων)	5 – 50
<i>Hypericum amblycalyx</i> Coust. & Gand.	Ανατολική Κρήτη	0 – 1000
<i>Hypericum empetrifolium</i> Willd. ssp. <i>oliganthum</i> (Rech. Fil.) Hagemann	Σε όλη την Κρήτη	0 – 1450
<i>Hypericum empetrifolium</i> Willd. ssp. <i>tortuosum</i> (Rech. Fil.) Hagemann	Δυτική & Κεντρική Κρήτη	1400 - 2.300
<i>Hypericum jovis</i> Greuter	Κεντρική Κρήτη	550 – 1500
<i>Hypericum kelleri</i> Bald.	Δυτική Κρήτη (Λευκά όρη)	(300-) 1050 – 2000
<i>Hypericum trichocaulon</i> Boiss. & Heldr.	Δ. & Κεντρική Κρήτη	(0-) 350 – 1950

Πίνακας Α.3: Ενδημικά είδη *Hypericum* L. στο νησί της Κρήτης

A.2.2 ΔΡΟΓΟΕΤΥΜΟΛΟΓΙΑ

Η ονομασία που επικράτησε κατά τους αρχαίους χρόνους ήταν η «υπερεικόν» η οποία με τη σειρά της παραλήφθηκε από τους Λατίνους ως *Hypericum*. Η ονομασία προέρχεται από την ένωση των λέξεων «υπέρ» και «εικόνα» και έχει θρησκευτική προέλευση, διότι οι αρχαίοι Έλληνες διακοσμούσαν με αυτό τα θρησκευτικά τους είδωλα. Με τον τρόπο αυτό πίστευαν ότι θα προστατευτούν από τα δαιμονικά πνεύματα διότι ήταν πολύ μισητό από αυτά. Η ανάγκη του ανθρώπου να ξορκίσει τα πνεύματα ήταν εντονότερη κατά το θερινό ηλιοστάσιο (21 Ιουνίου), όταν πίστευαν ότι η δύναμη του «κακού» ήταν ισχυρότερη. Η παγανιστική εορτή που δημιουργήθηκε από αυτή την ανάγκη λάμβανε χώρα την παραμονή της εαρινής ισημερίας και θεωρείται ότι αργότερα εκχριστιανίστηκε. Στην χριστιανική πλέον εκδοχή η εορτή αυτή είναι αφιερωμένη στη μνήμη του μάρτυρα του χριστιανισμού Αγίου Ιωάννη του Προδρόμου, ο οποίος τιμάται στις 24 Ιουνίου, περίοδος που το φυτό βρίσκεται σε πλήρη ανθοφορία. Από τότε τα περισσότερα είδη του γένους *Hypericum* L. είναι γνωστά ως «χόρτο του Άη- Γιαννιού» (St. John wort/ Johanniskraut) (Bilia et al., 2002). Μια άλλη ενδιαφέρουσα αλλά λιγότερο δημοφιλής εκδοχή είναι ότι η ετοιμολογία της λέξης «υπερικό» προκύπτει ενώνοντας τις λέξεις «υπό» και «Έρικα», καθώς το φυτό έχει την τάση να φύεται κάτω από τα φυτά του γένους *Erica* L. (Carnoy, 1959).

A.2.3 ΔΡΟΓΟΪΣΤΟΡΙΑ-ΛΑΪΚΗ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ

Η δρόγη του υπερικού, *Hyperici herba*, είναι γνωστή από αρχαιοτάτων χρόνων για τις θεραπευτικές της ιδιότητες.

Αξίζει να αναφερθούμε λίγο στις δράσεις που έχουν αποδοθεί στη δρόγη του υπερικού κατά το πέρασμα των χρόνων και μετέπειτα να φτάσουμε στις πιο πρόσφατες μελέτες που κατατάσσουν το υπερικό στα σύγχρονα φάρμακα φυτικής προέλευσης.

Ξεκινώντας από την Αρχαία Ελλάδα, ο Ιπποκράτης (5^{ος} αιώνας π.Χ.) στο *Περί Νούσων*, αναφέρεται στη δράση του Υπερικού ως αναλγητικό σε περιπτώσεις ρήξης της πνευμονικής βαλβίδας, καθώς και σε περιπτώσεις λυγγώδους πυρετού, ενώ στο έργο *Περί Διαίτης* αναφέρεται στη δράση του χυμού του ως ψυκτικό (Μιτάκης, 2007).

Ο Διοσκουρίδης (1^{ος} αιώνας μ.Χ.) στο *Περί Υλης Ιατρικής* προσδίδει την ιδιότητα του εμμηναγωγού και διουρητικού, ενώ αναφέρει ότι τα σπέρματα και τα φύλλα του φυτού μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως καταπλάσματα για τη θεραπεία εγκαυμάτων. Επίσης αναφέρεται και ως αντίδοτο σε δηλητηριώδη δαγκώματα, ενώ διαλυμένο σε οίνο χαρακτηρίζεται ως αντίδοτο κατά του τεταρταίου πυρετού. Ακόμη το συγκαταλλάγει και ως αντιπυρετικό και ως θεραπευτικό για την ισχυαλγία (Berendes, 1970; Wellmann, 1958).

Ο Γαληνός (2^{ος} αιώνας μ.Χ.) στο *Περί Κράσεως και Δυνάμεως* των απλών φαρμάκων επίσης το αναφέρει ως διουρητικό, εμμηναγωγό, κατά των εγκαυμάτων, καθώς και για την αντιμετώπιση της ισχυαλγίας. Στο *Περί Ευπορίστων* αναφέρει την εσωτερική του χρήση για τη θεραπεία του ίκτερου (Μιτάκης, 2007). Ο Ορειβάσιος (4^{ος} αιώνας μ.Χ.) επαναλαμβάνει στο έργο του τις ενδείξεις του Γαληνού.

Τέλος, ο Πλίνιος ο πρεσβύτερος (1^{ος} αιώνας μ.Χ.) στο *Histariae Naturalis* το καταγράφει ως αντιδιαρροϊκό, βελτιωτικό της ροής των ούρων και ως δρόγη για την αντιμετώπιση των προβλημάτων της κύστης (Μιτάκης, 2007).

Κατά τον Μεσαίωνα, η έντονη σύνδεση του υπερικού με τη θρησκεία, καθώς και οι θρησκευτικές ονομασίες που του αποδίδονταν, ενίσχυσαν τη χρήση του φυτού έναντι ψυχικών παθήσεων. Από την εποχή του Παράλκεσου (1493-1541) χρησιμοποιείται σε ψυχικές διαταραχές και χαρακτηρίζεται ως «άρνικα των νεύρων». Ο Παράλκεσος δε συνιστούσε τη χορήγησή του στην κατάθλιψη και σε παρόμοιες διαταραχές, καθώς και ως επουλωτικό (Laswon et al., 1998). Από το Μεσαίωνα και μετά η δρόγη χρησιμοποιείται στην παραδοσιακή ευρωπαϊκή θεραπευτική για την νευραλγία, το άγχος, τη νέυρωση και την κατάθλιψη (Rasmussen, 1998). Τόσο στον ευρωπαϊκό χώρο, όσο και στις χώρες του Νέου Κόσμου η εσωτερική χρήση της δρόγης αφορούσε την αντιμετώπιση ψυχικών διαταραχών, ενώ η εξωτερική χρήση την επουλωτική και αντισηπτική δράση. Οι γραπτές αναφορές συνεχίζονται και γίνονται όλο και περισσότερες. Να αναφέρουμε χαρακτηριστικά ότι στην 1η Pharmacopoeia Londinensis συμπεριλαμβάνεται το έλαιο που παρασκευάζεται από τα άνθη του υπερικού (Culpeper, 1653).

Σήμερα στις λαϊκές χρήσεις της δρόγης αναφέρονται η εσωτερική της χρήση για τη θεραπεία της γαστρίτιδας, της μελαγχολίας και των ασθενειών της χοληδόχου κύστης και η εξωτερική της χρήση για την επούλωση πληγών (Wichtl, 1997).

Τη σημερινή εποχή και ιδιαίτερα τα τελευταία 20 χρόνια η δρόγη του υπερικού είναι ιδιαίτερα δημοφιλής για την επουλωτική, αντιμικροβιακή-αντισηπτική και αντικαταθλιπτική της δράση. Ευρέως διαδεδομένη είναι και η χρήση του ελαίου που παρασκευάζεται από το υπερικό, γνωστού ως βαλσαμέλαιο. Το βαλσαμέλαιο μπορεί να χρησιμοποιηθεί εξωτερικά για τη θεραπεία και τη μετέπειτα φροντίδα σε οξείες και ήπιους τραυματισμούς, σε μυαλγίες και εγκαύματα πρώτου βαθμού, ενώ η εσωτερική του χρήση γίνεται για την αντιμετώπιση της δυσπεψίας. Εκτός από το βαλσαμέλαιο, καταναλώνεται αρκετά και αφέψημα υπερικού (Isacchi et al. 2007).

A.2.4 ΔΡΟΓΟΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑ

Με βάση την Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία, δρόγη αποτελούν τα υπέργεια αποξηραμένα τμήματα του φυτού, τα οποία έχουν συλλεχθεί λίγο πριν ή κατά την περίοδο της ανθοφορίας. Η περιεκτικότητα αυτών σε ναφθοδιανθρόνες πρέπει να είναι τουλάχιστον 0.08% υπολογισμένη ως υπερικίνη ($C_{30}H_{16}O_8$, MB 504.4) και συλλεγμένη από αποξηραμένη δρόγη. Οι ποσότητες υπερφορίνης και φλαβονοειδών πρέπει να αναφέρονται.

A.2.4.1α Παραδοσιακή Χρήση

Οι ενδείξεις του Ευρωπαϊκού Οργανισμού Φαρμάκων για την παραδοσιακή χρήση του ως φυτικό φάρμακο, είναι:

- I. Από του στόματος, για την ανακούφιση από περιστασιακή νοητική εξάντληση και για συμπτωματική αγωγή σε ήπια γαστρεντερική δυσφορία
- II. Τοπικά, για τη συμπτωματική αγωγή σε ήπιες δερματικές φλεγμονές (όπως ηλιακό έγκαυμα) και ως βοήθημα στην επούλωση ήπιων πληγών.

A.2.4.1β Καλώς Καθιερωμένη Χρήση

Η μονογραφία της καλώς καθιερωμένης χρήσης του *Hypericum perforatum* L. (EMA/HMPC/101304/2008) αναρτήθηκε το Νοέμβριο του 2009 και αφορά στερεές φαρμακοτεχνικές μορφές φυτικών παρασκευασμάτων για από του στόματος χορήγηση. Η καλώς καθιερωμένη χρήση της δρόγης όπως αυτή προσδιορίζεται από τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας Α.4):

Παρασκευάσματα	Ενδείξεις	Δοσολογία	Ιδιαίτερες προειδοποιήσεις και προφυλάξεις
Ξηρό εκχύλισμα (DER 3- 7:1), διαλύτης εκχύλισης μεθανόλη (80% v/v)	Θεραπεία ήπιας έως μέτριας έντασης καταθλιπτικών επεισοδίων	Εφάπαξ δόση: 300- 600mg 1- 3 φορές ημερησίως	
Ξηρό εκχύλισμα (DER 3- 6:1), διαλύτης εκχύλισης αιθανόλη (80% v/v)	Αποτελέσματα αναμένονται μέσα στις πρώτες 4 εβδομάδες της θεραπείας.	Ημερήσια δόση: 600- 1800mg Εφάπαξ δόση: 900mg 1 φορά ημερησίως	Κατά τη διάρκεια της θεραπείας η έκθεση στη UV ακτινοβολία πρέπει να αποφεύγεται.
Ξηρό εκχύλισμα (DER 2.5-8:1), διαλύτης εκχύλισης αιθανόλη (50- 68% v/v)	Βραχυπρόθεσμη θεραπεία συμπτωμάτων μέτριας έντασης καταθλιπτικών επεισοδίων. Θεραπεία έως 6 εβδομάδες. Αποτελέσματα αναμένονται μέσα στις πρώτες 4 εβδομάδες της θεραπείας.	Ημερήσια δόση: 612mg, 1 φορά ημερησίως ή Εφάπαξ δόση: 250- 650mg 2- 3 φορές ημερησίως	Δε συνίσταται χρήση από παιδιά και ανηλίκους κάτω των 18 ετών.
		Ημερήσια δόση: 500- 1200mg	

A.2.4.2 Αντικαταθλιπτική Δραση

Η αντικαταθλιπτική δράση του υπερικού, που έχει καθιερώσει τη χρήση του για εκατοντάδες χρόνια στη λαϊκή θεραπευτική, επιβεβαιώνεται και απο τις σύγχρονες φαρμακολογικές μελέτες. Σύμφωνα με αυτές, θετικές ενδείξεις για τη δράση αυτή έχουν επιδείξει τόσο ολικά εκχυλίσματα της δρόγης, όσο και μεμονωμένα συστατικά. Από όλες τις κατηγορίες ενώσεων που περιλαμβάνονται στο υπερικό, σημαντικότερες για τη δράση θεωρούνται οι ναφθοδιανθρόνες (υπερικίνη και ψευδοϋπερικίνη) και οι φλορογλυκινόλες (υπερφορίνη). Αρχικά, μετά από *in vitro* πειράματα προτάθηκε ότι η αντικαταθλιπτική δράση οφείλεται στην αναστολή-MAO από την υπερικίνη

(Suzuki et al. 1984). Όμως η δράση αυτή δεν επιβεβαιώθηκε ποτέ σε πειράματα *in vivo* (Bladt et al., 1994). Από τότε, έχουν γίνει πολλές μελέτες στην προσπάθεια να αποδοθεί η αντικαταθλιπτική δράση σ' ένα συστατικό, καθώς και να βρεθεί ο ακριβής μηχανισμός δράσης. Υπεύθυνη ουσία φαίνεται να είναι κυρίως η υπερφορίνη. Ωστόσο αυτό που σήμερα ισχύει είναι ότι παράλληλα με την υπερφορίνη τόσο η υπερικίνη όσο και τα φλαβονοειδή δρουν συνεργικά (Schmidt et al., 2015).

Παρακάτω παρατίθενται κάποιοι μηχανισμοί δράσης που σχετίζονται με τις αντικαταθλιπτικές ιδιότητες και έχουν προταθεί για μεμονωμένα συστατικά:

Υπερικίνη/ Ψευδοϋπερικίνη:

- Η υπερικίνη μπορεί να δράσει ως αναστολέας MAO τύπου A και B *in vitro* σε μιτοχόνδρια εγκεφαλικών κυττάρων ποντικών (Suzuki et al. 1984)
- Η υπερικίνη μπορεί να προσδεθεί σε GABA_A και 5-HT₁ υποδοχείς (Curle, 1988)
- Η υπερικίνη δρα ως αναστολέας της β-υδροξυλάσης της ντοπαμίνης *in vitro* με IC₅₀ 3.8 μmol/ L (Denke et al., 1999) Η ψευδοϋπερικίνη αναστέλλει επίσης τη β-υδροξυλάση της ντοπαμίνης (με IC₅₀=3Mμ) (Denke et al. 1999).
- Παρουσιάζουν συγγένεια με NMDA υποδοχείς [N-methyl-D-aspartate receptor] (Cott, 1997)
- Τόσο η υπερικίνη όσο και η ψευδοϋπερικίνη αναστέλλουν την πρόσδεση στους D3 και D4 υποδοχείς σε ποντίκια, ωστόσο καμία από τις δύο δεν επηρεάζει τους μεταφορείς σεροτονίνης και νορ-αδρεναλίνης ή τον 5-HT υποδοχέα (Butterweck et al. 2002).
- Έπειτα από θεραπεία 8 εβδομάδων η υπερικίνη αύξησε τις συγκεντρώσεις 5-HT στον υποθάλαμο και παρουσίασε νευροενδοκρινικά αποτελέσματα σε ποντίκια έπειτα από 14 ημέρες *per os* χορήγησης μειώνοντας τα επίπεδα αδρενοκορτικοτροπικών ορμονών και κορτικοστερόνης στο πλάσμα (Butterweck et al., 2001, Butterweck et al., 2002)
- Επηρεάζουν την μεταγραφή των γονιδίων, που εμπλέκονται στο σύστημα υποθάλαμος- υπόφυση- επινεφρίδια μειώνοντας τα επίπεδα του m-RNA, τόσο του παράγοντα έκκρισης κορτικοτροπίνης, όσο και του υποδοχέα σεροτονίνης 5- HT1A στον υποθάλαμο και τον ιππόκαμπο αντίστοιχα (Butterweck et al., 2001).

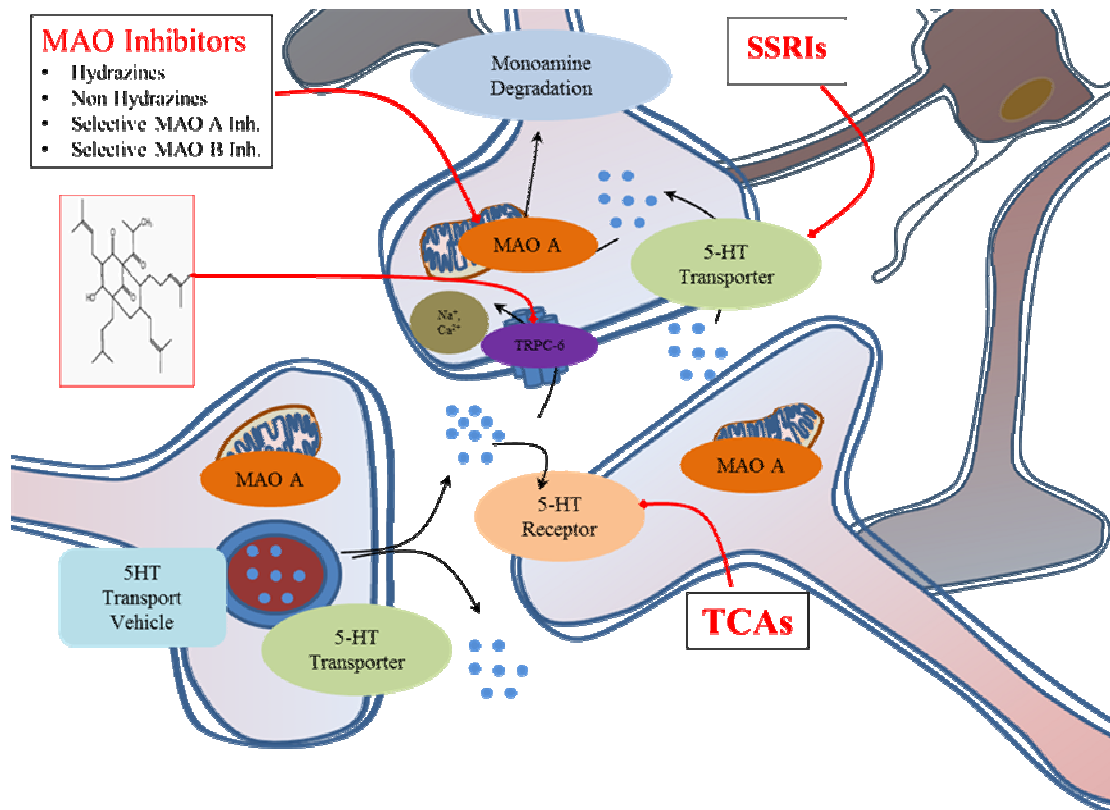
Φλορογλυκινολές:

- Αναστολή της επαναπρόσληψης σεροτονίνης (5- HT), ντοπαμίνης, νορ-επινεφρίνης, αδρεναλίνης, L-γλουταμινικού οξέος και γ-αμινοβουτυρικού οξέος από την

υπερφορίνη και το δομικό ανάλογο της αντιυπερφορίνη (μεθυλιωμένη υπερφορίνη) (Chatterjee et al., 1998a, Jensen, 2001, Russo et al., 2014).

Η αναστολή της επαναπρόσληψης της σεροτονίνης, ντοπαμίνης και *νορ*-αδρεναλίνης είναι παρόμοια με την αναστολή, που προκαλούν τα αντικαταθλιπτικά ιμιπραμίνη, νομιφεσίνη και φλουοξετίνη. Μάλιστα, σε αντίθεση με τα φάρμακα αυτά, η υπερφορίνη και η αντιυπερφορίνη αναστέλλουν ισχυρά και τα τρία αυτά συστήματα μεταφοράς (Jensen, 2001).

Αντίθετα με τα συνθετικά αντικαταθλιπτικά, τα οποία αναστέλλουν τον υποδοχέα της σεροτονίνης 5-HT, η υπερφορίνη αναστέλλει την επαναπρόσληψη σεροτονίνης μέσω αύξησης της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης Ca^{2+} και Na^{+} (Singer et al., 1999, Müller, et al., 2001, Müller, 2003). Ο Treiber και η επιστημονική του ομάδα, το 2005 έδειξαν ότι η εισροή Na^{+} μεσολαβείται μέσω μη εκλεκτικών διαύλων κατιόντων (non selective cation channels -NSCCs). Η παραπάνω μελέτη υπέδειξε ότι η υπερφορίνη δρα σε μια υποκατηγορία των NSCC, αυξάνοντας την ενδοκυττάρια συγκέντρωση ιόντων Ca^{2+} και Na^{+} (Treiber et al., 2005). Ο Leuner και η ερευνητική του ομάδα το 2007, ως συνέχεια της παραπάνω μελέτης, αναγνώρισαν τον παραπάνω διάυλο ως τον διάυλο-υποδοχέα παροδικού δυναμικού 6 (transient receptor potential channel protein 6 - TRPC6). Η μελέτη αποκάλυψε ότι η ενεργοποίηση του TRPC6 από την υπερφορίνη, αυξάνει την εισροή νατρίου στους νευρώνες, οδηγώντας σε μείωση του πρηνούς νατρίου μεταξύ του νευρώνα και μετασυναπτικού χάσματος. Η έλλειψη αυτή πρηνούς νατρίου μειώνει την επαναπρόσληψη των μονοαμινικών νευροδιαβιβαστών (εικ.1). Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, ο μηχανισμός μέσω του οποίου η υπερφορίνη δρα, διαφέρει από το μηχανισμό δράσης των συμβατικών αντικαταθλιπτικών, πιθανώς ανοίγοντας το δρόμο για την ανακάλυψη μιας νέας κατηγορίας αντικαταθλιπτικών φαρμάκων (Leuner et al., 2007). Επιπρόσθετα, η υπερφορίνη αυξάνει τον αριθμό των 5-HT υποδοχέων, όπως φαίνεται σε *in vivo* πειράματα σε εγκεφάλους επίμυων (Teufel-Meyer and Gleitz, 1997), παρέχοντας πιθανόν ένα μακράς διάρκειας ευεργετικό αποτέλεσμα από τη χρήση του υπερικού. Τέλος, κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι η αποτελεσματικότητα της θεραπείας με εκχύλισμα υπερικού, εξαρτάται άμεσα από τη συγκέντρωση της υπερφορίνης (Laakmann et al., 1998).



Εικόνα 1: Πιθανός μηχανισμός δράσης της υπερφορίνης. Η υπερφορίνη ενεργοποιεί τον TRPC6 (*transient receptor potential channel protein 6* - διάυλος-υποδοχέα παροδικού δυναμικού - 6) αυξάνοντας την εισροή νατρίου στους νευρώνες, οδηγώντας σε μείωση του πλανούς νατρίου μεταξύ του νευρώνα και μετασυναπτικού χάσματος. Αντίθετα, τα συνθετικά αντικαταθλιπτικά αναστέλλουν τον υποδοχέα της σεροτονίνης 5-HT.

Φλαβονοειδή:

- Παράγωγα φλαβονοειδών πιθανόν να είναι υπεύθυνα για την αναστολή MAO (Wurglics & Zsilavecz, 2006).
- Η κερκετίνη έχει παρουσιάσει εκλεκτική ανασταλτική δράση έναντι MAO- A με τιμή IC_{50} 0.010 μ M (Chimenti et al., 2006).
- Ο υπεροξείδης μειώνει *in vitro* την ευαισθησία των β_2 - αδρενεργικών υποδοχέων σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος σε αρουραίους, όπως και το αντικαταθλιπτικό δεσμεθυλιμπραμίνη (Prenner et al., 2007).
- Κλάσματα που περιέχουν φλαβονοειδή εμποδίζουν τη δράση της κατεχολο-O-τρανσφεράσης (COMT) (Kleber et al., 1999)

- Η αμεντοφλαβόνη, που απαντάται συχνά στο γένος *Hypericum* L., έχει συνδυαστικές ικανότητες με τους υποδοχείς των βενζοδιαζεπινών σε πειράματα *in vitro* (Nielsen et al., 1988).

Εκχυλίσματα της δρόγης:

Όσον αφορά τη δράση διαφόρων εκχυλισμάτων της δρόγης πολυάριθμες *in vitro* μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί. Σύμφωνα με κάποιες από αυτές:

- Τα υδατοαιθανολικά εκχυλίσματα υπερίκου έχουν δείξει εκλεκτική αλλά ασθενή αναστολή της οξειδάσης των μονοαμινών τύπου A (MAO-A) καθώς και μέτρια αλληλεπίδραση με το σύμπλεγμα του GABA A υποδοχέα των βενζοδιαζεπινών και του μεταφορέα ιόντων χλωρίου (Müller et al., 1997).
- Το αιθανολικό εκχύλισμα μπορεί να αναστείλλει την β-υδροξυλάση της ντοπαμίνης (Kleber et al., 1999), ενώ ασκεί ανταγωνιστική δράση για τους NMDA υποδοχείς αναστέλλοντας πιθανότατα τους διαύλους ιόντων (Chatterjee et al., 1999).
- Το μεθανολικό εκχύλισμα αναστέλλει την επαναπρόσληψη σεροτονίνης, νορ-αδρεναλίνης και ντοπαμίνης (Müller et al., 1997).
- Βιοχημικές μελέτες πάνω στο ολικό εκχύλισμα της δρόγης έδειξαν ασθενή αναστολή MAO-A και MAO-B, αλλά εντονότερη αναστολή επαναπρόσληψης σεροτονίνης (5-HT), ντοπαμίνης και νορ-επινεφρίνης σε ίσο βαθμό (Müller et al., 1997).
- Ξηρό εκχύλισμα της δρόγης, το οποίο έχει περιεκτικότητα 0.3% σε υπερίκίνη και 3.8% σε υπερφορίνη επιδρά στους σ-υποδοχείς και αυξάνει την μετάδοση των σεροτονεργικών σημάτων (Panocka et al., 2000).
- Έχει καταγραφεί αναστολή του ενζύμου κατεχολο-Ο-μεθυλοτρανσφεράση από το ολικό εκχύλισμα της δρόγης (Russo et al., 2014).
- Έχει παρατηρηθεί αναστολή της απελευθέρωσης της ιντερλευκίνης 6, ουσία που σχετίζεται με την κατάθλιψη, καθώς επηρεάζει την απελευθέρωση της κορτιζόλης (Russo et al., 2014).
- Επηρεάζει τη διαμόρφωση της έκφρασης των υποδοχέων σεροτονίνης (Jie Zhao, 2015).

Όπως προείπαμε, ο ακριβής μηχανισμός δράσης της δρόγης του υπερίκου δεν είναι ακόμη πλήρως εξακριβωμένος. Παρόλα αυτά, είναι αποδεκτό ότι ασκεί ανασταλτική δράση στην επαναπρόσληψη της σεροτονίνης, νορ-αδρεναλίνης, ντοπαμίνης, γ-

αμινοβουτυρικού οξέος (GABA) και L-γλουταμινικού οξέος από τα νευρικά κύτταρα. Κανένα άλλο αντικαταθλιπτικό φάρμακο δεν έχει τόσο ευρύ φάσμα δράσης (Müller 2003).

Οι κλινικές μελέτες έχουν αποδείξει την αποτελεσματικότητα της δρόγης, που είναι συγκρίσιμη με την αποτελεσματικότητα πολλών συμβατικών αντικαταθλιπτικών και μάλιστα χωρίς να υπάρχουν σημαντικές ανεπιθύμητες ενέργειες. Η μέση ημερήσια δόση, που απαιτείται για την θεραπεία ήπιας έως μέτριας κατάθλιψης είναι περίπου 900mg ξηρού εκχυλίσματος διαιρεμένου σε 3 ημερήσιες δόσεις (www.ema.eu, Russo et al., 2014). Οι ανεπιθύμητες ενέργειες περιορίζονται σε ήπιες γαστρεντερικές και δερματικές διαταραχές και είναι μικρότερης βαρύτητας από τις διαταραχές, που παρουσιάζονται από τη χρήση τρικυκλικών αντικαταθλιπτικών (Kim et al. 1999) και από τη χρήση εκλεκτικών αναστολέων επαναπρόσληψης σεροτονίνης (SSRIs) (Schrader, 2000, Woelk, 2000, Lecrubier et al., 2002, Szegedi et al., 2005, Gastpar et al., 2006).

Τα αποτελέσματα της πρώτης κλινικής μελέτης έγιναν γνωστά ήδη από το 1979 (Hoffmann and Kuhl, 1979) και από τότε πολλές είναι οι κλινικές μελέτες, που εξετάζουν την αποτελεσματικότητα του υπερικού όχι μόνο σε σύγκριση με συμβατικά αντικαταθλιπτικά, αλλά και με placebo (Klemow et al., 2011). Όσον αφορά την αντιμετώπιση ήπιων έως μέτριων καταθλιπτικών διαταραχών η δράση του υπερικού είναι καλύτερη σε σύγκριση με placebo και έχει παρόμοια αποτελεσματικότητα σε σύγκριση με τους SSRIs και τα τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά.

Ωστόσο, είναι δύσκολο να καθοριστεί η καταλληλότερη θεραπευτική δόση. Στις περισσότερες κλινικές μελέτες οι ημερήσιες δόσεις που χρησιμοποιούνται κυμαίνονται από 400-900mg, και η περιεκτικότητα του εκχυλίσματος σε υπερικίνη είναι 0.2-0.3%.

Όσον αφορά τη θεραπεία μείζονας κατάθλιψης, τα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα. Αυτό που γενικά φαίνεται να ισχύει είναι ότι η δρόγη του υπερικού έχει λίγο καλύτερα αποτελέσματα έναντι των placebo, αλλά καμία δράση σε μακροχρόνια-μείζονα κατάθλιψη σε σύγκριση με τα συμβατικά αντικαταθλιπτικά (Linde et al., 2005).

A.2.4.3 Αντεδείξεις-Αλληλεπιδράσεις:

Η επίδραση του ξηρού εκχυλίματος της δρόγης *Hypericum* στα κυτοχρώματα CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19 και της Ρ-γλυκοπρωτεΐνης έχει αποδειχθεί τόσο με *in vitro* (Perloff et al., 2001) και *in vivo* πειράματα (Imai et al., 2008), όσο και με κλινικές μελέτες (Xie et al., 2005). Επομένως η χρήση της δρόγης πρέπει να γίνεται με μεγάλη προσοχή σε περιπτώσεις συγχορηγήσεων με φάρμακα αναστολείς πρωτεασών.

Σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό φαρμάκων, οι αντεδείξεις που συνοδεύουν τη χρήση του υπερικού είναι οι ακόλουθες:

- Το ξηρό εκχύλισμα της δρόγης *Hypericum* επηρεάζει την ομαλή λειτουργία των κυτοχρωμάτων CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19 και της Ρ-γλυκοπρωτεΐνης. Η συγχορήγηση με κυκλοσπορίνη, με ανοσοκατασταλτικά που περνούν στη συστηματική κυκλοφορία, όπως η μακρολίδη τρακόλιμους, με αναστολείς πρωτεάσης όπως η αμπρεναβίρη και ινδιναβίρη, με βαρφαρίνη και με ιρινοτεκάνη αντενδείκνυται.
- Ιδιαίτερη προσοχή απαιτείται κατά τη συγχορήγηση φαρμάκων των οποίων ο μεταβολισμός επηρεάζεται από τα κυτοχρώματα CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19 και την Ρ-γλυκοπρωτεΐνη, καθώς υπάρχει σοβαρό ενδεχόμενο μείωσης της συγκέντρωσής τους στο πλάσμα. Τέτοια παραδείγματα αποτελούν η αμιτρυπτιλίνη, η δεξοφενανδίνη, οι βενζοδιαζεπίνες, η μεθαδόνη, η σιμβαστατίνη, η διγοξίνη και η φιναστερίδη.
- Υπάρχει ο κίνδυνος ελάττωσης της συγκέντρωσης στο αίμα αντισυλληπτικών, τα οποία χορηγούνται *per os*. Αυτό μπορεί να προκαλέσει αυξημένη εμμηνορρυσία. Επίσης είναι αυξημένος ο κίνδυνος ανεπιθύμητης εγκυμοσύνης, γι αυτό απαιτείται λήψη επιπλέον αντισυλληπτικών μέτρων.
- Προεγχειρητικά θα πρέπει να εξετάζεται η πιθανή αλληλεπίδραση με ουσίες, που χρησιμοποιούνται για την πρόκληση τοπικής ή γενικής αναισθησίας και αν θεωρείται αναγκαίο να διακόπτεται η χρήση των φυτικών παρασκευασμάτων.
- Η αυξημένη ενζυμική δραστηριότητα, που προκαλείται από τη χρήση σκευασμάτων υπερικού επανέρχεται στα φυσιολογικά της επίπεδα μία εβδομάδα έπειτα από τη διακοπή της λήψης τους.
- Η χρήση σκευασμάτων υπερικού συμβάλλει στα σεροτονεργικά αποτελέσματα όταν συνδυάζεται με αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης, βουσπιρόνη ή τριπτάνες.

- Δε συνίσταται η λήψη τους κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και του θηλασμού λόγω έλλειψης επαρκών κλινικών δεδομένων.
- Άλλες πιθανές ανεπιθύμητες ενέργειες κατά τη λήψη τους είναι οι γαστρεντερικές διαταραχές, οι αλλεργικές δερματικές αντιδράσεις, η πιθανή εμφάνιση κόπωσης ή ανησυχίας.
- Υπάρχει αυξημένη πιθανότητα πρόκλησης ηλιακών εγκαυμάτων όταν η λήψη σκευασμάτων υπερικού γίνεται από ανοιχτόχρωμα άτομα.

A.2.4.4 Άλλες Φαρμακολογικές Δράσεις

Εκτός από την αντικαταθλιπτική δράση στη δρόγη του υπερικού αποδίδονται επιπλέον φαρμακολογικές δράσεις όπως κυτταροτοξική, αντιμικροβιακή, αντική και αντιοξειδωτική δράση.

Αντιμικροβιακή δράση

Εδώ και πολλά χρόνια το υπερίκο χρησιμοποιείται παραδοσιακά ως επούλωτικό πληγών. Σήμερα έχουν πλέον προσδιοριστεί οι δευτερογενείς μεταβολίτες που προσδίδουν αντιμικροβιακή, αντιβακτηριακή και αντιμυκητιακή δράση στη δρόγη (συστατικά του αιθερίου ελαίου, φλορογλυκινόλες, φλαβονοειδή, ταννίνες κ.α.) (Saddiqe et al., 2010).

Αντική δράση

Οι Russo et al. (2013) στην ανασκόπηση τους για το υπερίκο προτάσουν μεταξύ άλλων και τα εξής:

- Η υπερίκίνη για να δράσει αποτελεσματικά ως αντικό απαιτεί μια άθικτη μεμβράνη ή επιφάνεια κυττάρου (viral envelope).
- Ο μηχανισμός δράσης περιλαμβάνει τη φωτοενεργοποίηση της υπερίκινης.
- Η δέσμευση της υπερίκινης στη λιπιδική μεμβράνη του ιού αναστέλλει την ιική σύντηξη και το σχηματισμό συγκυτίου.
- Άμεση δράση κατά του καψιδίου του ιού αναστέλλει την κινητικότητα.
- Αναστολή της κίνησης της τυροσίνης.

Ακόμη υπάρχουν πολλές επιπλέον αναφορές για την αντική δράση της δρόγης χωρίς ωστόσο να συνοδεύονται από κλινικά δεδομένα. Έχουν γίνει δοκιμές για την *in vitro*

αντι-ική δραστικότητα της δρόγης έναντι ρετροϊών, συμπεριλαμβανομένου και του ιού HIV (Couldwell et al., 1994), έναντι του συμπλέγματος του ιού του έρπητα τύπου 1 και τύπου 2 και έναντι των ιών Sindhis, παρα-ινφλουένσα 3, φουσαλιδώδους στοματίτιδας και του ιού λοιμώδους αναιμίας (American Herbal Pharmacopoeia, 1997). Οι μελέτες όπου εξετάζονταν η δράση της δρόγης του υπερικού ενάντια στον ιό HIV έχουν φτάσει σε επίπεδο κλινικών μελετών φάσης I. Όμως, στις κλινικές αυτές μελέτες φάσης I, που έχουν διεξαχθεί, η υπερικίνη προκάλεσε φωτοτοξικότητα στους περισσότερους ασθενείς και έτσι δεν κατάφεραν να δώσουν κάποιο αποτέλεσμα (Gulik et al., 1999).

Αντικαρκινικές ιδιότητες

Υπάρχουν πολλές διαφορετικές μελέτες που υποστηρίζουν ότι πολλοί από τους δευτερογενείς μεταβολίτες του γένους *Hypericum* L. (κυρίως φλορογλυκινόλες, ξανθόνες και χρωμόνες) έχουν κυτταροτοξική δράση έναντι συγκεκριμένων καρκινικών σειρών (Jie Zhao et al., 2015). Οι μελέτες αφορούν κυρίως τη δράση της υπερφορίνης και της υπερικίνης. Στα πλαίσια αυτά, οι Schempp et al. (2002) υποστηρίζουν ότι η **υπερφορίνη** αναστέλλει την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων *in vitro* με ένα μηχανισμό που περιλαμβάνει την επαγωγή της απόπτωσης μέσω ενεργοποίησης των κασπασών. Οι κασπάσες είναι πρωτεάσες κυστεΐνης που ενεργοποιούν έναν καταρράκτη ενδοκυττάρων πρωτεολυτικών διεργασιών. Η υπερφορίνη προκαλεί επίσης την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από απομονωμένα μιτοχόνδρια. Η μιτοχονδριακή ενεργοποίηση αποτελεί ένα πρώιμο στάδιο στην επαγόμενη απόπτωση οδηγώντας σε αναστολή της ανάπτυξης του όγκου, όπως έχει αποδειχθεί σε *in vivo* μοντέλα καρκίνου (Schempp et al. 2002). Επομένως, καθώς η υπερφορίνη κατέχει σημαντική αντινεοπλασματική δράση, είναι άμεσα διαθέσιμη σε μεγάλες ποσότητες (δεδομένου ότι είναι εκ φύσεως σε αφθονία), και εμφανίζει χαμηλή τοξικότητα *in vivo*, αποτελεί ελπιδοφόρο νέο αντικαρκινικό παράγοντα. Άλλες μελέτες *in vitro* απέδειξαν ότι η υπερφορίνη σε συνδυασμό με πολυφαινολικές προκυανιδίνες B2 ανέστειλαν αποτελεσματικά την ανάπτυξη των K562 και U937 κύτταρων, που αποτελούν *in vitro* μοντέλο λευχαιμίας, καθώς και των κυττάρων του εγκεφαλικού γλοιοβλαστώματος LN229 (Hostanska et al. 2003). Όσον αφορά την **υπερικίνη**, η δράση της ως αντικαρκινικό αποδίδεται στη δυνατότητα φωτοδυναμικής θεραπείας που μπορεί να προσφέρει (Agostinis et al. 2002). Η φωτοδυναμική θεραπεία προϋποθέτει τη χορήγηση ενός μη τοξικού

φαρμάκου με δυνατότητα συσσώρευσής του στην περιοχή του όγκου το οποίο ονομάζεται φωτοευαισθητοποιητής. Έπειτα από τη χορήγησή του και αφού περάσει κάποια περίοδος επώασης όπου ο πάσχων ιστός εκτίθεται στο ορατό φως (συνήθως μεγάλου μήκους κύματος κόκκινο φως) παρουσία οξυγόνου, ο φωτοευαισθητοποιητής ενεργοποιείται παράγοντας ρίζες και άλλα προϊόντα οξυγόνου τα οποία είναι τοξικά για τα κύτταρα του όγκου. Με αυτόν τον τρόπο τα καρκινικά κύτταρα καταστρέφονται κάνοντας τη φωτοδυναμική θεραπεία μια ιδιαίτερα ελκυστική μέθοδο κυρίως λόγω της υψηλής εκλεκτικότητας που αυτή εμφανίζει. Οι ναφθοδιανθρόνες έχουν έντονη την τάση να παράγουν ρίζες και άλλα δραστικά προϊόντα οξυγόνου όταν εκτίθενται σε έντονη ακτινοβολία. Ιδιαίτερα η υπερικίνη αποτελεί έναν από τους ισχυρότερους φωτοευαισθητοποιητές της φύσης (Karioti & Bilia, 2010).

Ο Fox και οι συνεργάτες του (1998) διαπίστωσαν ότι η υπερικίνη κατά την ακτινοβολία με λευκή ή υπεριώδη ακτινοβολία ή και με τις δύο προκάλεσε σχεδόν πλήρη απόπτωση (94%) σε κακοήγη δερματική κυτταρική σειρά λεμφώματος. Ομοίως, οι Olivo et al. (2006) πρότειναν την εφαρμογή της στη θεραπεία του καρκίνου της ρινοφαρυγγικής κοιλότητας. In vitro μελέτες έχουν δείξει ότι η υπερικίνη λειτουργεί συνεργικά με τον αντικαρκινικό παράγοντα 5-αμινολεβουλινικό οξύ (5-ALA) προς αναστολή της αναπτυξιακής κυτταρικής σειράς καρκίνου του οισοφάγου, καθώς και των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων του ενδομητρίου (HEC-1A) (Schneider- Yin et al. 2009), όταν εκτίθεται σε λευκό φως. Η υπερικίνη και το 5-ALA λειτουργούν συνεργικά προς σχηματισμό πρωτοπορφυρίνης IX (PpIX), η οποία, μετά τη μετατροπή της σε πορφυρίνη, μετατρέπει το οξυγόνο σε ελεύθερες ρίζες, οι οποίες προκαλούν απόπτωση των καρκινικών κυττάρων (Schneider-Yin et al. 2009).

Πρόληψη της νόσου Alzheimer:

Η υπερικίνη μπορεί να παρεμβαίνει στις διεργασίες του πολυμερισμού του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου, το οποίο είναι υπεύθυνο για την έναρξη της νόσου Alzheimer (Griffith et al., 2010). Η επίδρασή της στα β-αμυλοειδή πεπτίδια παρουσιάζεται και στην μελέτη των Sgarbossa et al. (2008). Πρόκειται για in vitro μελέτη όπου η υπερικίνη σε συγκεντρώσεις $10^{-5}M$ προλαμβάνει τη διαδικασία συσσωμάτωσης 1-40 β-αμυλοειδών πεπτιδίων. Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης το ότι η υπερικίνη

χρησιμοποιήθηκε για την παρακολούθηση in vitro της εμφάνισης πρόωρων καταστάσεων συσσωμάτωσης των β-αμυλοειδών πεπτιδίων κατά τη διάρκεια διεργασίας πολυμερισμού.

Γαστρεντερικές διαταραχές και γαστρικό έλκος:

Εκχυλίσματα της δρόγης παρουσίασαν δράση έναντι γαστρεντερικών διαταραχών εμφανίζοντας καταπραϊντικές και επουλωτικές ιδιότητες (Zdunić et al., 2009).

Αντιφλεγμονώδης δράση:

Έχει αναφερθεί ότι η φωτοενεργοποιημένη ψευδοϋπερκίνη αναστέλλει την παραγωγή της προσταγλανδίνης E2 (PGE2) (Hammer et al., 2007).

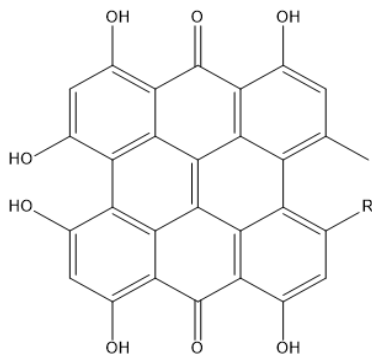
A.2.5 ΔΡΟΓΟΧΗΜΕΙΑ

A.2.5.1 Δρογοχημεία του γένους

Μετά από μελέτες πολλών δεκαετιών, μπορούμε να καταλήξουμε ότι οι παρακάτω χημικές ομάδες διακρίνουν το πλούσιο μεταβολικό προφίλ του γένους *Hypericum* L., με κυριώτερες τις 4 πρώτες:

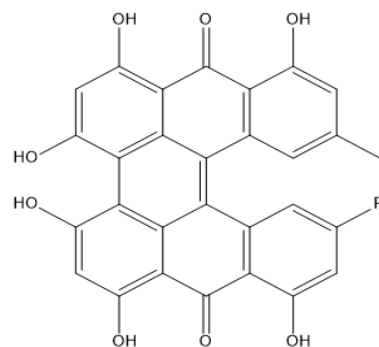
1. Ναφθοδιανθρόνες
2. Φλορογλυκινόλες
3. Ξανθόνες
4. Φλαβονοειδή
5. Ταννίνες
6. Άλλα φαινολικά
7. Πτητικά συστατικά

Ναφθοδιανθρόνες: Οι σημαντικότεροι εκπρόσωποι της κατηγορίας αυτής είναι η υπερικίνη και η ψευδοϋπερικίνη, καθώς και οι βιοσυνθετικοί πρόδρομοί τους πρωτοϋπερικίνη και πρωτοψευδοϋπερικίνη. Η υπερικίνη και η ψευδοϋπερικίνη απομονώθηκαν πρώτη φορά από το *H. perforatum* L. το 1939 (Brockmann et al., 1939, Karioti and Bilia, 2010).



R= -CH₃: υπερικίνη

R= -CH₂OH: ψευδοϋπερικίνη



R= -CH₃: πρωτοϋπερικίνη

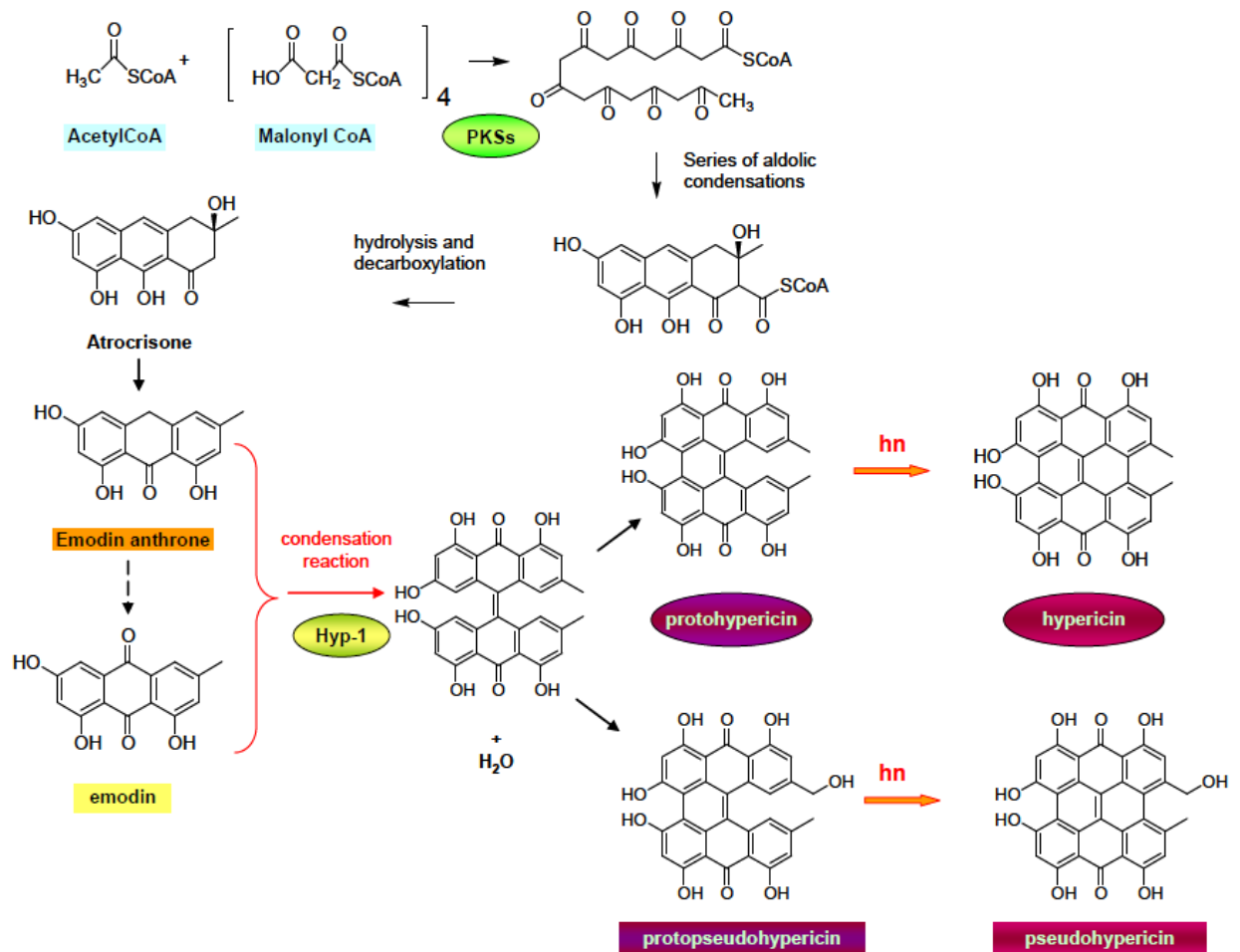
R= -CH₂OH: πρωτοψευδοϋπερικίνη

Η παρουσία τους φαίνεται να περιορίζεται στα φυλογενετικά ανεπτυγμένα είδη του γένους. Υπάρχουν ολόκληρα sections, όπου δεν έχουν βρεθεί έως σήμερα υπερικίνη ή ψευδοϋπερικίνη και αυτά είναι τα ακόλουθα: *Ascyreia*, *Takasagoia*, *Androsaemum*, *Inodora*, *Roscyna*, *Concinna*, *Sampsonia*, *Elodeoida*, *Campylopus*, *Hirtella*, *Myriandra*, *Webbia*, *Arthrophyllum*, *Heterophylla*, *Adenotrias*, *Brathys* και

Trigynobrathys (Crockett & Robson, 2011). Στο *H. perforatum* η περιεκτικότητα σε ναφθοδιανθρόνες κυμαίνεται από 0.05 έως 0.30% και εξαρτάται από την καλλιέργεια, το υψόμετρο, την ηλιοφάνεια και την εποχή (Bruni and Sacchetti, 2009). Τα παράγωγα αυτά συναντώνται κυρίως στα άνθη του φυτού και ιδιαίτερα στους σκοτεινούς αδένες (Zobayed et al., 2006). Όταν τα άνθη θρυμματίζονται τα δάκτυλα βιάφονται κόκκινα εξαιτίας των ναφθοδιανθρονών (Karioti & Bilia, 2010).

Οι ναφθοδιανθρόνες έχουν γίνει αντικείμενο μελέτης τόσο για τις αντικαταθλιπτικές, όσο και για τις αντικές και αντικαρκινικές ιδιότητές τους. Η υπερικίνη είναι ένας από τους πιο ισχυρούς φωτοδυναμικούς παράγοντες (Karioti & Bilia 2010) και γι'αυτό της αποδίδονται αντικαρκινικές ιδιότητες.

Βιοσυνθετικά προέρχονται από το μονοπάτι του οξικού οξέος. Για την βιοσύνθεση της υπερικίνης, ένα μόριο ακετυλο-CoA συμπυκνώνεται με 7 μόρια μηλονυλο-CoA και σχηματίζεται μία οκτακετιδική αλυσίδα. Μετά από διαδοχικές κυκλοποιήσεις και αποκαρβοξυλιώσεις σχηματίζεται η ανθρόνη της εμοδίνης, η οποία θεωρείται το πρόδρομο μόριο της υπερικίνης. Η ανθρόνη της εμοδίνης οξειδώνεται σε εμοδίνη και έπειτα από μία αντίδραση συμπύκνωσης σχηματίζεται η διανθρόνη. Μετά από διαδοχικές οξειδώσεις σχηματίζεται η πρωτοϋπερικίνη η οποία μετατρέπεται σε υπερικίνη στο ορατό φως (Karioti & Bilia 2010).



Βιοσύνθεση υπερικίνης (Karioti & Bilia, 2010).

Πρόκειται για εξαιρετικά ασταθή μόρια ειδικά παρουσία φωτός. Οι Wirz et al., (2001) μελέτησαν τη σταθερότητα πρότυπων διαλυμάτων υπερικίνης και ψευδοϋπερικίνης. Όλα τα διαλύματα ήταν σταθερά σε θερμοκρασία -20° C, απουσία φωτός. Οι υψηλές θερμοκρασίες, η παρουσία πυριδινών και κυρίως η έκθεση στο φως επιταχύνουν την αποδόμηση της ψευδοϋπερικίνης. Η υπερικίνη είναι σταθερότερη στο φως από ό,τι η ψευδοϋπερικίνη. Το pH είναι ένας ακόμη παράγοντας που επηρεάζει την σταθερότητα των ναφθοδιανθρονών. Όξινες συνθήκες, παρουσία και απουσία φωτός προκάλεσαν την αποσύνθεση και των δύο μορίων (Liu et al., 2005). Σε συνθήκες δωματίου (θερμοκρασία, φως) οι απώλειες σε υπερικίνη και ψευδοϋπερικίνη σε διάστημα 4 ημερών είναι 20%, γι' αυτό το λόγο όλες οι διαδικασίες απομόνωσης για τα συστατικά αυτά πρέπει να γίνονται το ταχύτερο δυνατόν (Karioti et al., 2009).

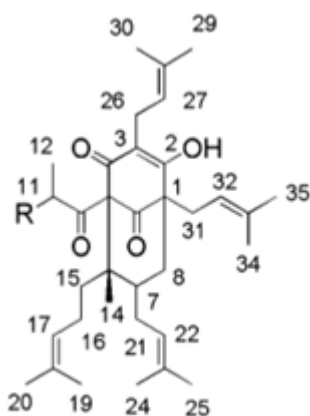
Τέλος, οι ναφθοδιανθρόνες είναι ελάχιστα διαλυτές στο νερό (Wirz et al., 2002). Πιθανώς οι προκυανιδίνες να είναι υπεύθυνες για τη διάλυση των ναφθοδιανθρονών

στα υδατικά διαλύματα υπερικού μέσω του σχηματισμού συμπλόκων (Butterweck et al., 1998).

Παράγωγα Φλορογλυκινολών

Πρόκειται για λιπόφιλα μόρια. Όπως συμβαίνει και με τα παράγωγα ναθοδιανθρονών έτσι και οι φλορογλυκινόλες δεν βιοσυντίθενται από όλα τα είδη του γένους *Hypericum*. Ο πιο σημαντικός εκπρόσωπος των φλορογλυκινολών είναι η υπερφορίνη η οποία θεωρείται το κυρίως υπεύθυνο συστατικό της δρόγης του Υπεरिकού για την αντικαταθλιπτική δράση. Έως σήμερα έχει εντοπιστεί στα sections *Androsaemum*, *Bupleuroides*, *Hypericum*, *Organifolia*, *Drosocarpium*, *Hirtella*, *Myriandra*, *Adnosepalum* και *Elodes* (Crockett & Robson, 2011).

Η βιοσύνθεση των μορίων αυτών ξεκινάει με τη συμπύκνωση ενός μορίου ισοβουτυρυλο-συνενζύμου-A και τριών μορίων μηλονυλο-συνενζύμου-A. Στη συνέχεια έπειτα από ενδομοριακές συμπυκνώσεις, πρενυλιώσεις και γερανυλιώσεις προκύπτουν τα γνωστά έως σήμερα μόρια φλορογλυκινολών (Dakanali et al., 2011).



R=CH₃ : υπερφορίνη

R=CH₂CH₃ : αντι-υπερφορίνη

Η υπερφορίνη, μαζί με την αντιυπερφορίνη, εντοπίζονται κυρίως στους ανώριμους καρπούς, συνεπώς οι απομονωθείσες φλορογλυκινόλες θα είναι σε μεγαλύτερη ποσότητα όταν το φυτό συλλέγεται κατά την καρποφορία, παρά κατά την ανθοφορία (Butterweck and Schmidt, 2007).

Η υπερφορίνη είναι ιδιαίτερα ασταθής στο φως και στο οξυγόνο και αποδομείται στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες.

Οι πολύ καλές της όμως βιολογικές δράσεις έχουν τραβήξει το ενδιαφέρον των επιστημόνων. Εκτός από την αντικαταθλιπτική δράση, η υπερφορίνη έχει επιδείξει καλή αντιβακτηριακή, αντιφλεγμονώδη, αντικαρκινική και αντι-αγγειογόνο δράση. Ως εκ τούτου τα τελευταία χρόνια αναζητώνται παράγωγα με παρόμοια δομή και μεγαλύτερη σταθερότητα, που να έχουν παρόμοιες αξιολογες δράσεις (Medina et al., 2006). Στην προσπάθεια αυτή πάρα πολλά παράγωγα φλορογλυκινολών έχουν

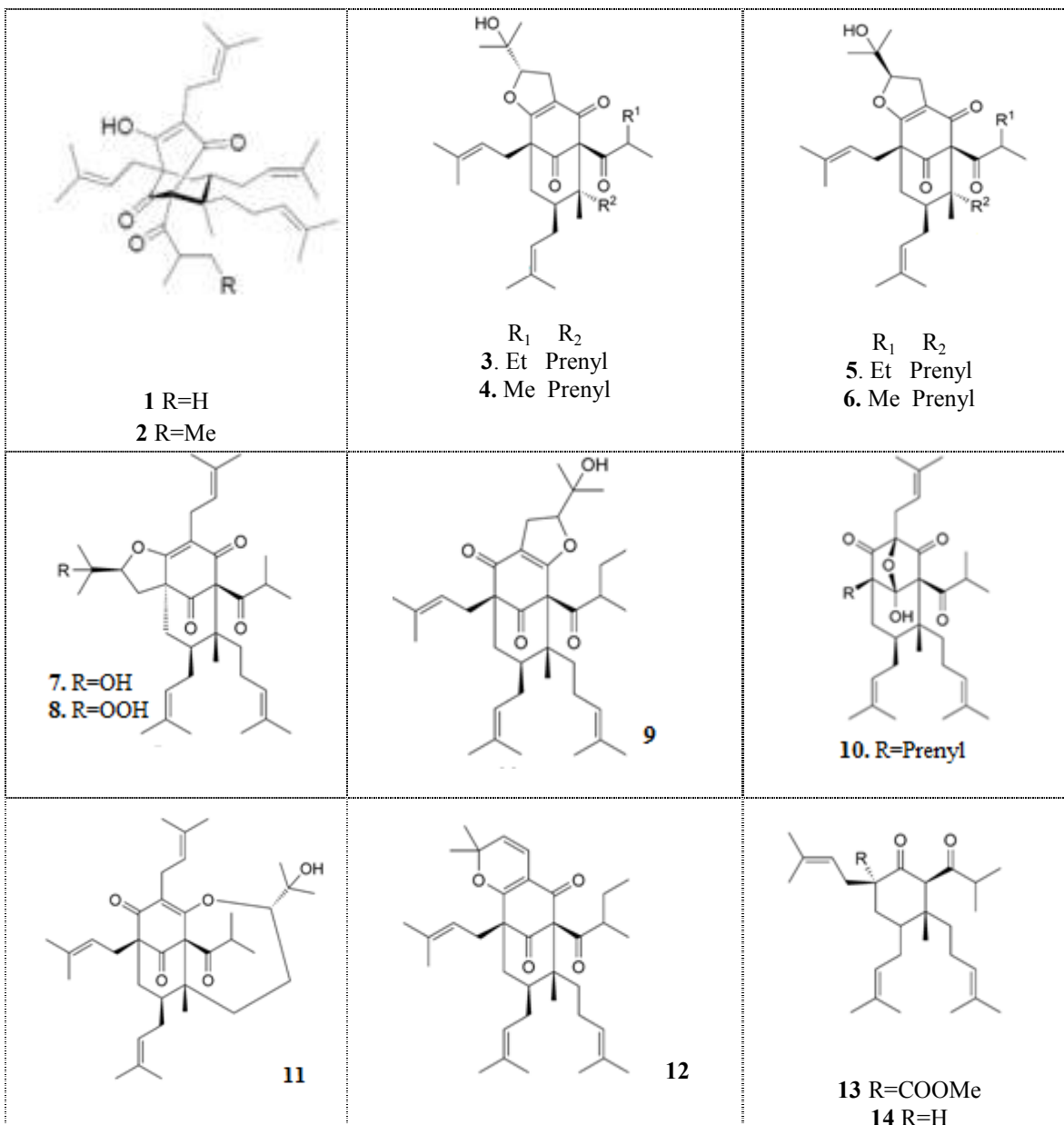
απομονωθεί. Στην πολύ πρόσφατη δημοσίευσή τους, οι Zhao et al. (2015) κατηγοριοποιούν 170 ανάλογα των φλορογλυκινολών, που έχουν ως τώρα απομονωθεί και ταυτοποιηθεί από το γένος *Hypericum* L., σε 5 κατηγορίες:

1. Παράγωγα υπερφορίνης
2. Σαμπσονιονίνες
3. Σπειροκυκλικές ακυλο-φλορογλυκινόλες
4. Ροττερνικού τύπου φλορογλυκινόλες
5. Απλά φλορογλυκινολικά παράγωγα

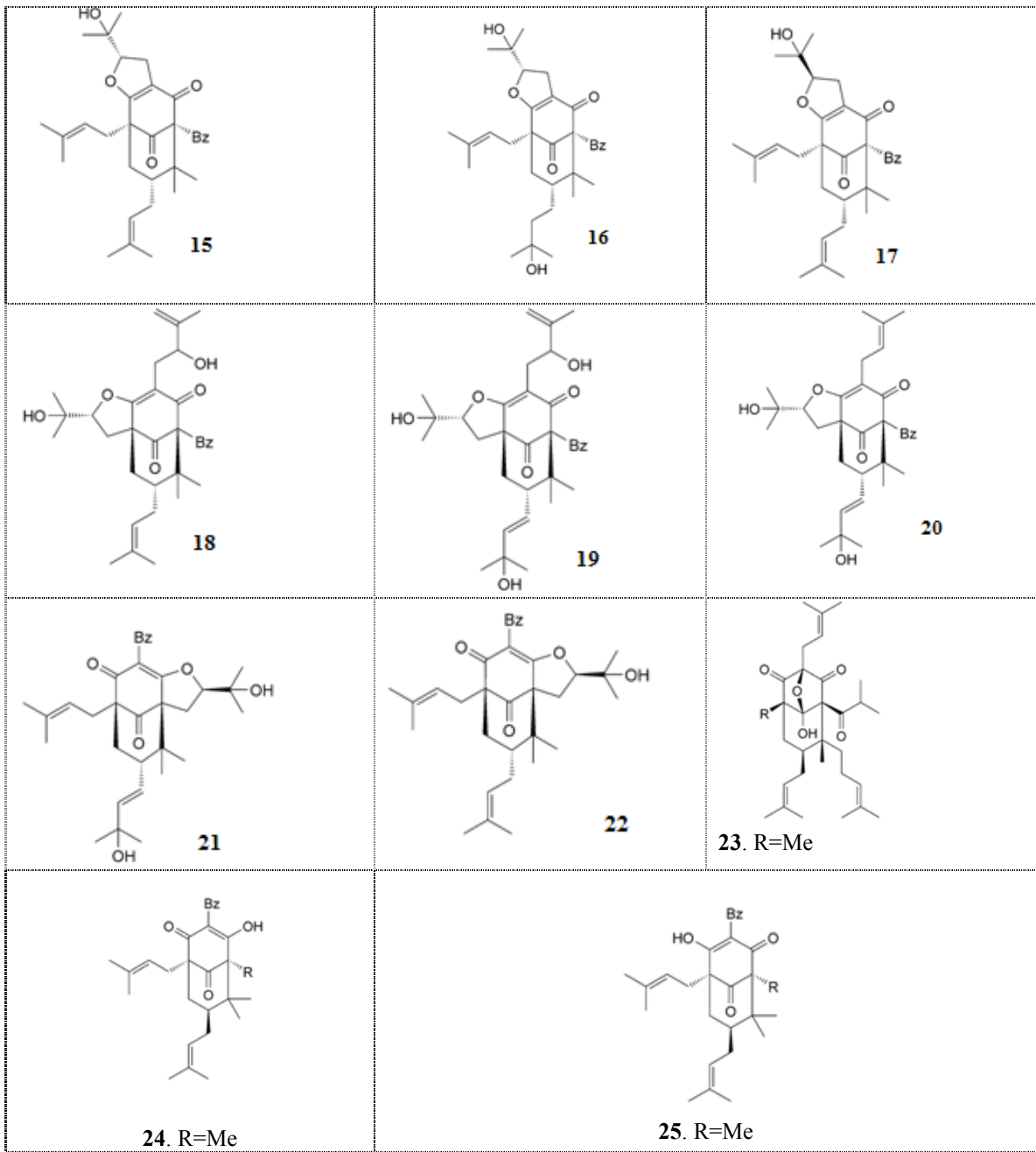
Παράγωγα υπερφορίνης:

Στην κατηγορία αυτή συγκαταλέγονται μέχρι στιγμής 46 παράγωγα από τα οποία τα 14 έχουν απομονωθεί από το *H. perforatum* L. Ακολουθούν πίνακες με τα παράγωγα υπερφορίνης, που έχουν απομονωθεί από διάφορα είδη *Hypericum* L.

<i>H. perforatum</i> L.	1. Hyperforin 2. Adhyperforin	Singer et al., 1999 Jensen et al., 2001
	3. Furoadhyperforin isomer A 4. Furohyperforin isomer 1 5. Furoadhyperforin isomer B 6. 27-Epifurohyperforin isomer 1 7. Furohyperforin 8. 33-Deoxy-33-hydroperoxyfurohyperforin 9. Furohyperforin isomer 2 10. 8-Hydroxyhyperforin-8,1-hemiacetal	Hashida et al., 2008
	11. Oxepahyperforin	Matsuhisa et al., 2002
	12. Pyrano[7,28-b]hyperforin	Hashida et al., 2008
	13. Methyl (1S,3R,4R)-4-methyl-1,5-bis(3-methylbut-2-en-1-yl)-4-(4-methylpent-3-en-1-yl)-3-(2methylpropanoyl)-2-oxocyclohexanecarboxylate 14. (2R,3R,6R)-3-Methyl-4,6-bis(3-methylbut-2-en-1-yl)-3-(4-methylpent-3-en-1-yl)-2-(2-methylpropanoyl)cyclohexanone	Shan et al., 2001

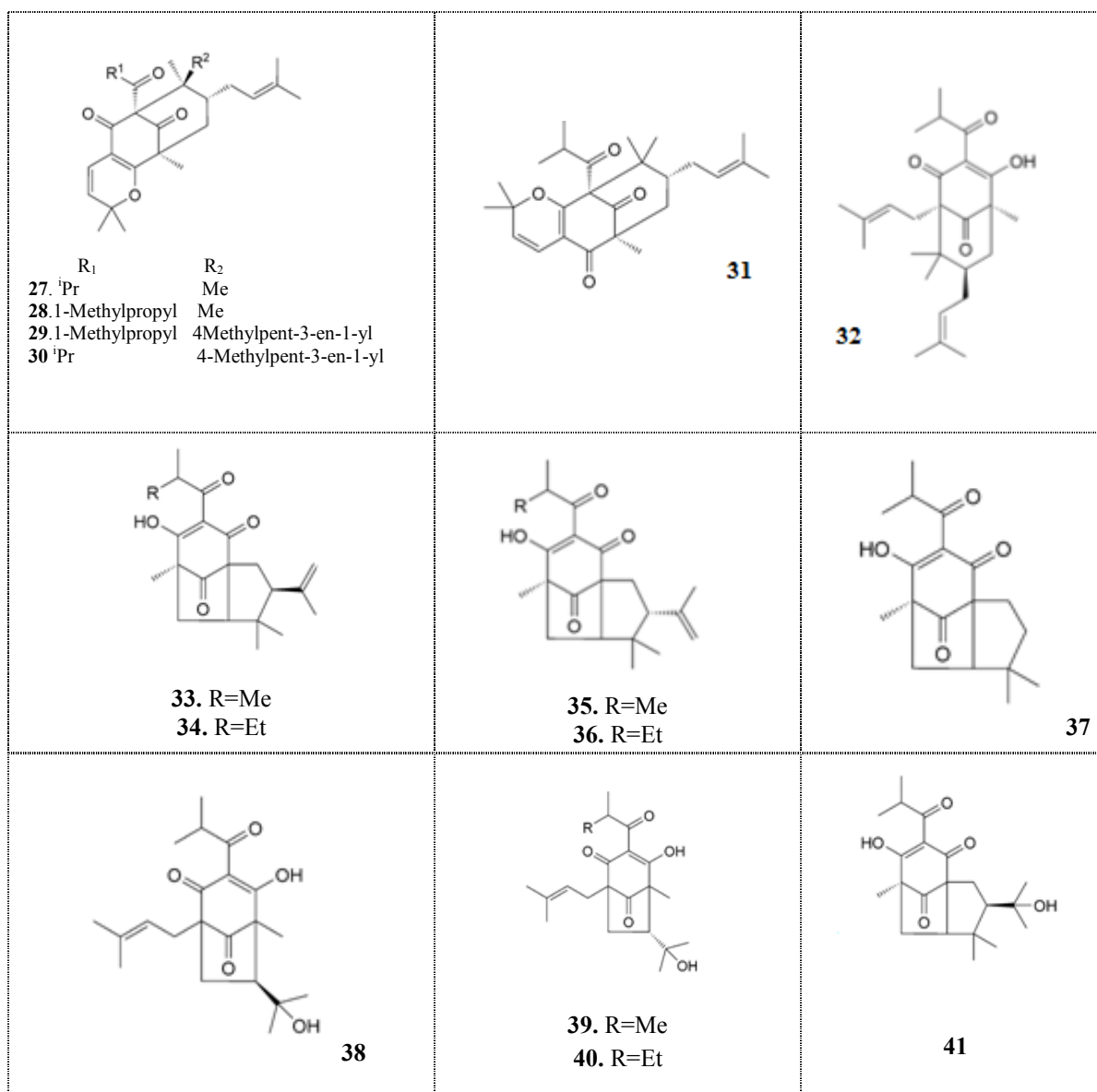


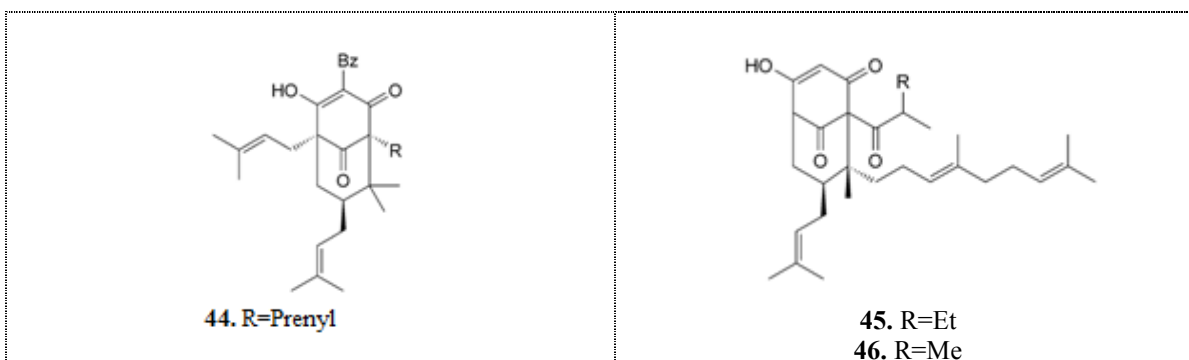
<p><i>H. scabrum</i> L.</p>	<p>15.Hyperibone A 16.Hyperibone C 17.Hyperibone B 18.Hyperibone D 19.Hyperibone E 20.Hyperibone F 21.Hyperibone H 22.Hyperibone I</p>	<p>Matsuhisa et al., 2002</p>
	<p>23.Hyperibone J 24.Hyperibone L-a 25.Hyperibone L-b</p>	<p>Tanaka, et al., 2004</p>



<i>H. papuanum</i> Ridl.	27. Papuaforin A 28. Papuaforin C 29. Papuaforin D 30. Papuaforin E 31. Papuaforin B 32. Hyperpapuanone	Winkelman et al., 2000
	33. Ialibinone A 34. Ialibinone B 35. Ialibinone C 36. Ialibinone D	Winkelmann et al., 2001

	37. Ialibinone E 38. Enaimeone A 39. Enaimeone B 40. Enaimeone C	
	41. 1'-Hydroxyialibinone A 42. 1'-Hydroxyialibinone B 43. 1'-Hydroxyialibinone D	Winkelmann et al., 2001
<i>H. sampsonii</i> Hance	44. 7-Epiclusianone	Xiao et al., 2007
<i>H. prolificum</i> L.	45. Prolifenone A 46. Prolifenone B	Henry et al., 2006



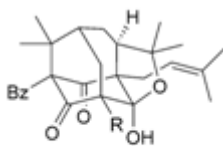
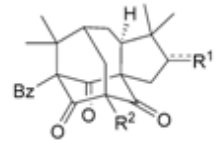
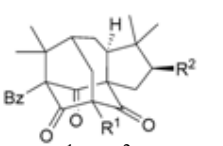
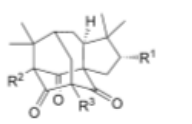
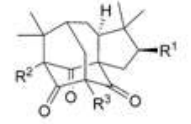
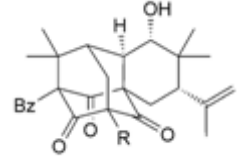
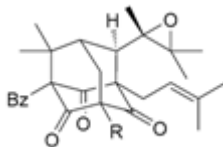
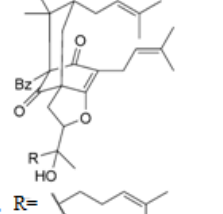
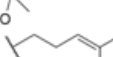
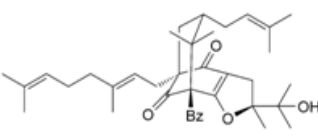
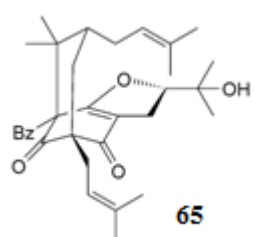
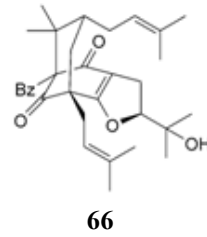
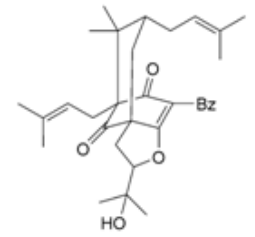
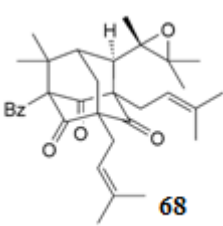
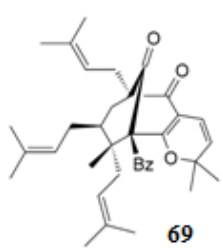
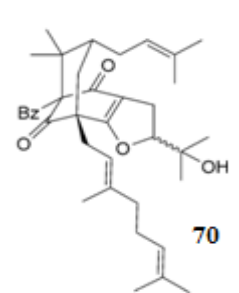


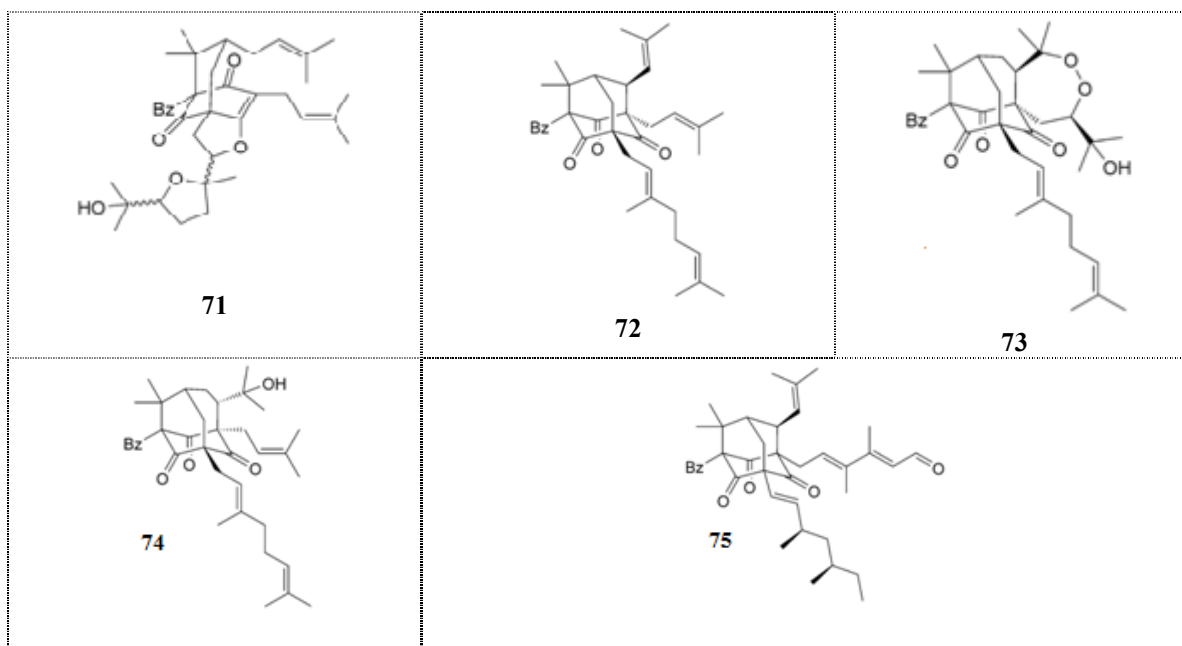
Παράγωγα Σαμπσιονίνης:

Τα πολυπρενυλιωμένα παράγωγα βενζυλοφλορογλυκινολών σχηματίζονται από πολύπλοκες κυκλοποιήσεις των πρενυλικών ομάδων. Οι δομές αυτών των κυκλοποιημένων ενώσεων έχουν διευκρινιστεί μετά από εκτεταμένες φασματοσκοπικές μελέτες. Οι περισσότεροι μεταβολίτες, μερικοί από τους οποίους είναι βιοδραστικοί, πιθανώς βιοσυντίθενται από ένα απλό κοινό πρόδρομο βενζυλοφλορογλυκινόλης (Hu and Sim, 2000).

<i>H. sampsonii</i> Hance	47. Sampsonione A	Hu and Sim, 1998
	48. Sampsonione B	
	49. Sampsonione C	
	50. Sampsonione D	Hu and Sim, 1999
	51. Sampsonione E	
	52. Hypersampsonone A	
	53. Hypersampsonone D	Xiao et al., 2007
	54. Hypersampsonone B	
	55. Hypersampsonone C	
	56. Hypersampsonone E	
	57. Sampsonione F	Hu and Sim, 1999
	58. Sampsonione G	
	59. Sampsonione H	
	60. Sampsonione I	Hu and Sim, 1999
	61. Sampsonione J	
	62. Sampsonione K	
	63. Sampsonione L	Hu and Sim, 2000
	64. Sampsonione M	
	65. Sampsonione N	
66. Sampsonione O	Lin and Wu, 2003	
67. Sampsonione P		
68. Sampsonione Q		
<i>H. erectum</i> Thunb.	69. Hypersampsonone F	Xiao et al., 2007
	70. Otogirinin D	Ishida et al., 2010
	71. Otogirinin E	

	72. Otogirinin A 73. Otogirinin B 74. Otogirinin C	
<i>H. sinaicum</i> Hochst. ex Boiss.	75. Sinaicicone	Rezanka et al., 2007

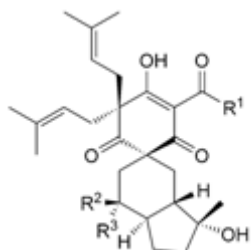
 <p>47. R=Geranyl 48. R=Prenyl</p>	 <p>R₁ R₂ 49. a-1-hydroxy-1-methylethyl Geranyl 50. a-1-methylvinyl Geranyl 51. O Geranyl</p>	 <p>R¹ R² 52. Geranyl 1-Hydroxy-1-methylethyl 53. Prenyl 1-Hydroxy-1-methylethyl 54. Geranyl H</p>
 <p>R₁ R₂ R₃ 55. 1-Methylvinyl 2-Methylpropanoyl Geranyl 56. Pr Bz Geranyl</p>	 <p>R₁ R₂ R₃ 57. Pr 2-Methylpropanoyl Geranyl 58. H 2-Methylpropanoyl Geranyl 59. Pr Bz Geranyl</p>	 <p>60. R=Geranyl</p>
 <p>61. R=Geranyl</p>	 <p>62. R=  63. R= Me</p>	 <p>64</p>
 <p>65</p>	 <p>66</p>	 <p>67</p>
 <p>68</p>	 <p>69</p>	 <p>70</p>



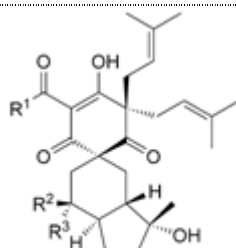
Σπειροκυκλικές φλορογλυκινόλες:

Πρόκειται για πολυκυκλικές ακυλο-φλορογλυκινόλες.

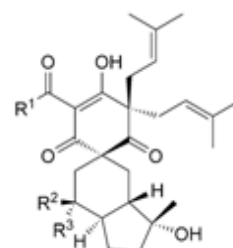
<i>H. ascyron</i> L.	76. Tomoeone A 77. Tomoeone C 78. Tomoeone E 79. Tomoeone G 80. Tomoeone B 81. Tomoeone D 82. Tomoeone F 83. Tomoeone H	Hashida et al., 2008
<i>H. beanii</i> N. Robson	84. Hyperbeanol A 85. Hyperbeanol B 86. Hyperbeanol C 87. Hyperbeanol D 88. Hypercalin B	Chen et al., 2011
<i>H. chinense</i> L.	89. Chipericumun C 90. Chipericumun D 91. Chipericumun A 92. Chipericumun B	Abe et al., 2012
<i>H. geminiflorum</i> Hemsl.	93. Hyperieliptone HA 94. Hyperieliptone HB	Wu et al., 2008



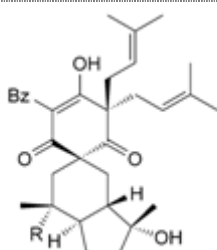
- | | R ¹ | R ² | R ³ |
|-----|-----------------|----------------|----------------|
| 76. | ⁱ Pr | Me | OH |
| 77. | ⁱ Pr | OH | Me |
| 78. | ⁱ Bu | Me | OH |
| 79. | ⁱ Bu | OH | Me |



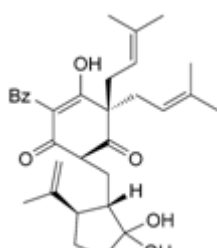
- | | R ¹ | R ² | R ³ |
|-----|-----------------|----------------|----------------|
| 80. | ⁱ Pr | Me | OH |
| 81. | ⁱ Pr | OH | Me |
| 82. | ⁱ Bu | Me | OH |
| 83. | ⁱ Bu | OH | Me |



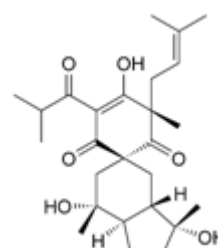
- | | R ¹ | R ² | R ³ |
|-----|----------------|----------------|----------------|
| 84. | Ph | Me | OH |
| 85. | Ph | OH | Me |



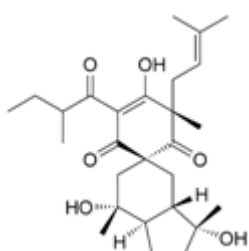
86. R=OH
87. R=OOH



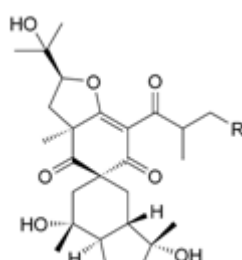
88



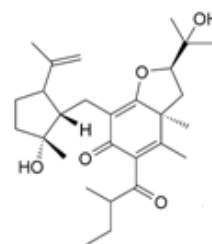
89



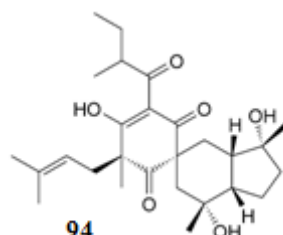
90



91. R=H
92. R=Me



93

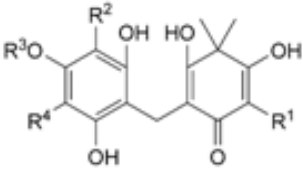
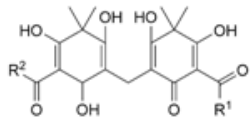
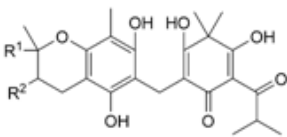
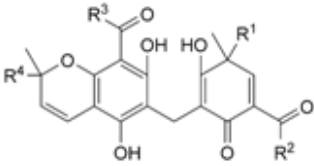
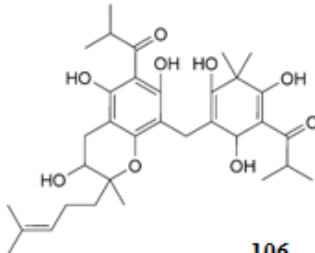
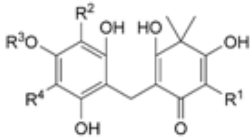
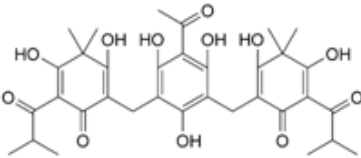
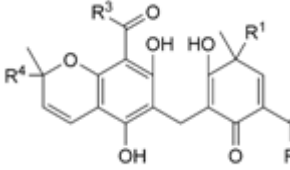
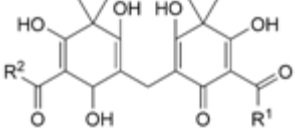
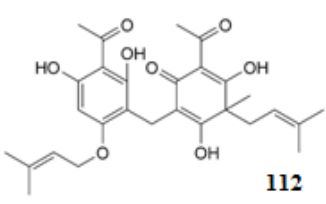
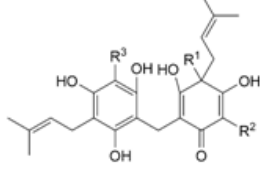
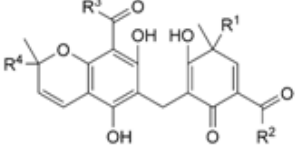
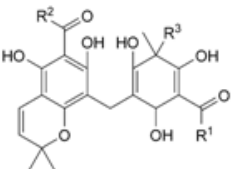
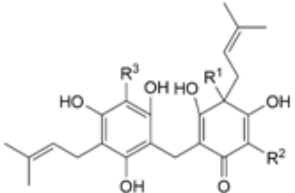


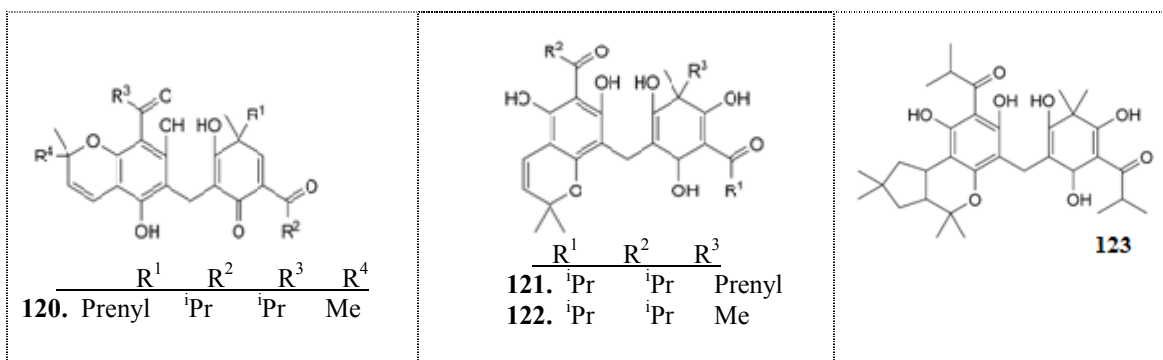
94

Ροττλερινικά παράγωγα:

Τα παράγωγα αυτά αποτελούνται από δύο δακτυλίους, μία χαρακτηριστική ομάδα φιλισινικού οξέος (Α δακτύλιος) και ένα μόριο φλορογλυκινόλης (Β δακτύλιος). Οι δύο δακτύλιοι συνδέονται μεταξύ τους με μία ομάδα μεθυλενίου. Κάποια από αυτά τα παράγωγα διαθέτουν αντιμικροβιακές ιδιότητες (Zhao et al., 2015).

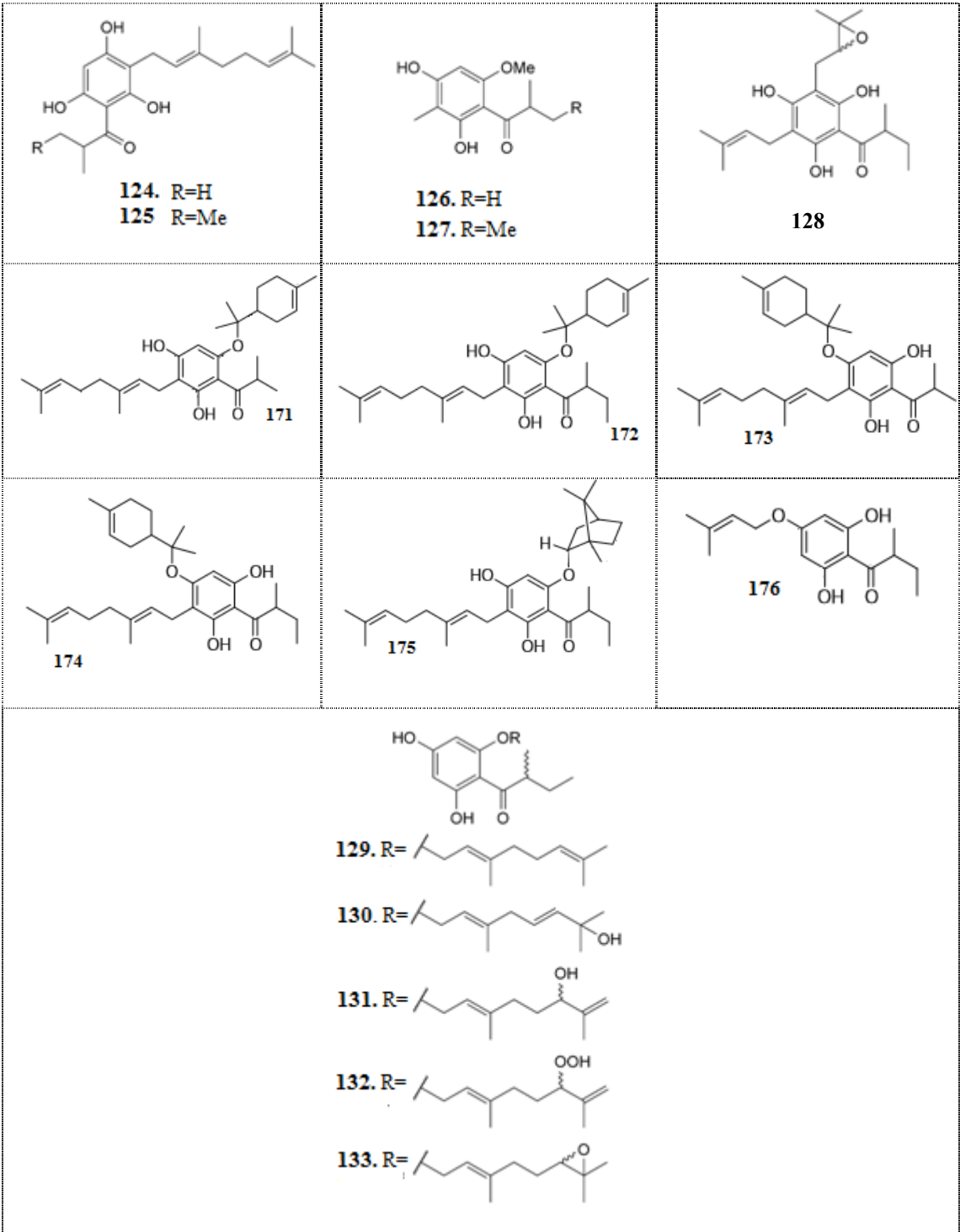
<i>H. japonicum</i> Thunb.	95. Sarothralin 103. Sarothralen B	Ishiguro et al., 1986
<i>H. japonicum</i> Thunb.	96. Sarothralen A	Ishiguro et al., 1987
	101. Japonicine C 102. Japonicine A 105. Japonicine B	Gu, 1988
	97. Saroaspidin A 98. Saroaspidin B 99. Saroaspidin C 104. Sarothralen C 106. Sarothralen D	Ishiguro et al., 1994
	100. Sarothralin G 107. Japonicine D	Ishiguro et al., 1990
<i>H. uliginosum</i> Kunth.	108. Uliginosin A 109. Uliginosin B	Parker and Johnson, 1968
<i>H. drummondii</i> Grev. & Hook. Torr. & A. Gray	110. Albaspidin P-P 111. Albaspidin A-A	Jayasuriya and McChesney, 1988
	117. Drummondin D 112. Drummondin E 113. Drummondin F 118. Isodrummondin D	Jayasuriya et al., 1991
	114. Drummondin A 115. Drummondin B 116. Drummondin C	Jayasuriya and McChesney, 1988
	<i>H. brasiliense</i> Choisy	119. Hyperbrasilol C 120. Hyperbrasilol B 121. Isohyperbrasilol B
122. Isouliginosin B 123. Hyperbrasilol A		Rocha et al., 1995

 $\begin{array}{cccc} R^1 & R^2 & R^3 & R^4 \\ \hline 95. & ^i\text{Bu} & \text{H} & \text{Prenyl} & \text{Bz} \\ 96. & ^i\text{Bu} & ^i\text{Bu} & \text{H} & \text{Geranyl} \\ 97. & ^i\text{Bu} & ^i\text{Bu} & \text{H} & \text{Me} \\ 98. & ^i\text{Bu} & 2\text{-methylbutanoyl} & \text{H} & \text{Me} \\ 99. & 2\text{-methylbutanoyl} & << & \text{H} & \text{Me} \\ 100. & ^i\text{Bu} & \text{Bz} & \text{H} & \text{Geranyl} \\ 101. & ^i\text{Bu} & \text{Bz} & \text{Prenyl} & \text{H} \end{array}$	 $\begin{array}{cc} R^1 & R^2 \\ \hline 102. & ^i\text{Pr} \quad ^i\text{Pr} \end{array}$	
 $\begin{array}{cc} R^1 & R^2 \\ \hline 104. & 4\text{-Methylpent-3-en-1-yl} & \text{OH} \\ 105. & \text{Me} & \text{H} \end{array}$	 $\begin{array}{cccc} R^1 & R^2 & R^3 & R^4 \\ \hline 103. & \text{Me} & ^i\text{Pr} & ^i\text{Pr} & 4\text{-Methylpent-3-en-1-yl} \end{array}$	 106
 $\begin{array}{cccc} R^1 & R^2 & R^3 & R^4 \\ \hline 108. & \text{Bu} & \text{Prenyl} & \text{H} & \text{Bu} \end{array}$	 107	 $\begin{array}{cccc} R^1 & R^2 & R^3 & R^4 \\ \hline 109. & \text{Me} & ^i\text{Pr} & ^i\text{Pr} & \text{Me} \end{array}$
 $\begin{array}{cc} R^1 & R^2 \\ \hline 110. & \text{Et} & \text{Et} \\ 111. & \text{Me} & \text{Me} \end{array}$	 112	 $\begin{array}{ccc} R^1 & R^2 & R^3 \\ \hline 113. & \text{Me} & \text{Ac} & \text{Ac} \end{array}$
 $\begin{array}{cccc} R^1 & R^2 & R^3 & R^4 \\ \hline 114. & \text{Me} & \text{Et} & \text{Et} & \text{Me} \\ 115. & \text{Me} & \text{Et} & \text{Me} & \text{Me} \\ 116. & \text{Me} & \text{Et} & \text{Me} & \text{Me} \\ 117. & \text{Prenyl} & \text{Me} & \text{Me} & \text{Me} \end{array}$	 $\begin{array}{ccc} R^1 & R^2 & R^3 \\ \hline 118. & \text{Me} & \text{Me} & \text{Prenyl} \end{array}$	 $\begin{array}{ccc} R^1 & R^2 & R^3 \\ \hline 119. & ^i\text{Bu} & \text{Me} & \text{Bu} \end{array}$

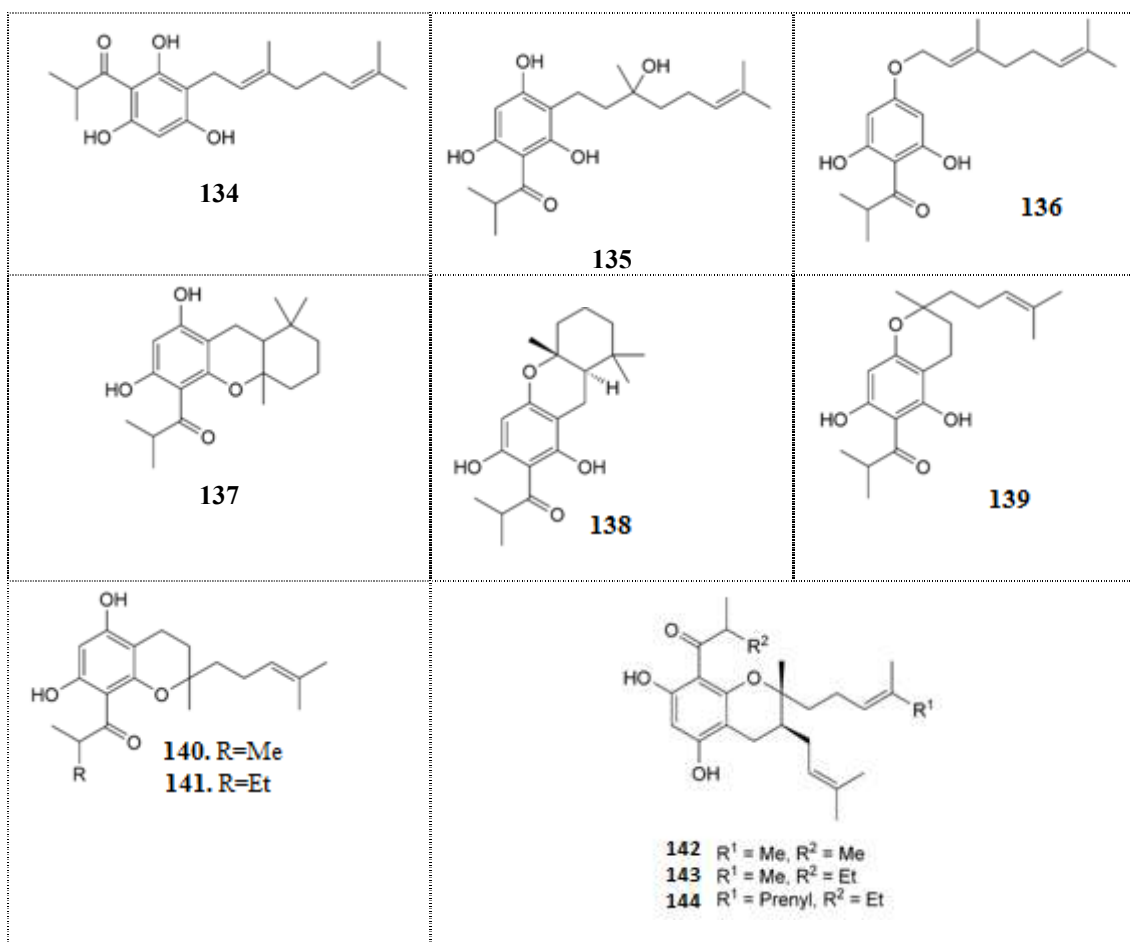


Απλά φλορογλυκινολικά παράγωγα :

<p><i>H. empetrifolium</i> Willd.</p>	<p>124. 3-Geranyl-1-2-methylpropanoyl-phloroglucinol 125. 3-Geranyl-1-2-methylbutanoyl-phloroglucinol 171. Empetrifelixin A 172. Empetrifelixin B 173. Empetrifelixin C 174. Empetrifelixin D 175. Empetrikajaforin 176. Empetrikathiforin</p>	<p>Crockett et al., 2008 Schmidt et al., 2012</p>
<p><i>H. beanie</i> N. Robson</p>	<p>126. 1-2,4-Dihydroxy-6-methoxy-3-methylphenyl-2-methylpropan-1-one 127. 1-2,4-Dihydroxy-6-methoxy-3-methylphenyl-2-methylbutan-1-one</p>	<p>Po Shiu and Gibbons, 2006</p>
<p><i>H. foliosum</i> Aiton</p>	<p>128. 1-{3-[3,3-Dimethyloxiran-2-ylmethyl]-2,4,6-trihydroxy-5-3-methylbut-2-en-1-ylphenyl} 2-methylbutan-1-one</p>	<p>Gibbons et al., 2005</p>
<p><i>H. olympicum</i> L.</p>	<p>129. Olympicin A 130. Olympicin B 131. Olympicin C 132. Olympicin D 133. Olympicin E</p>	<p>Shiu et al., 2012</p>

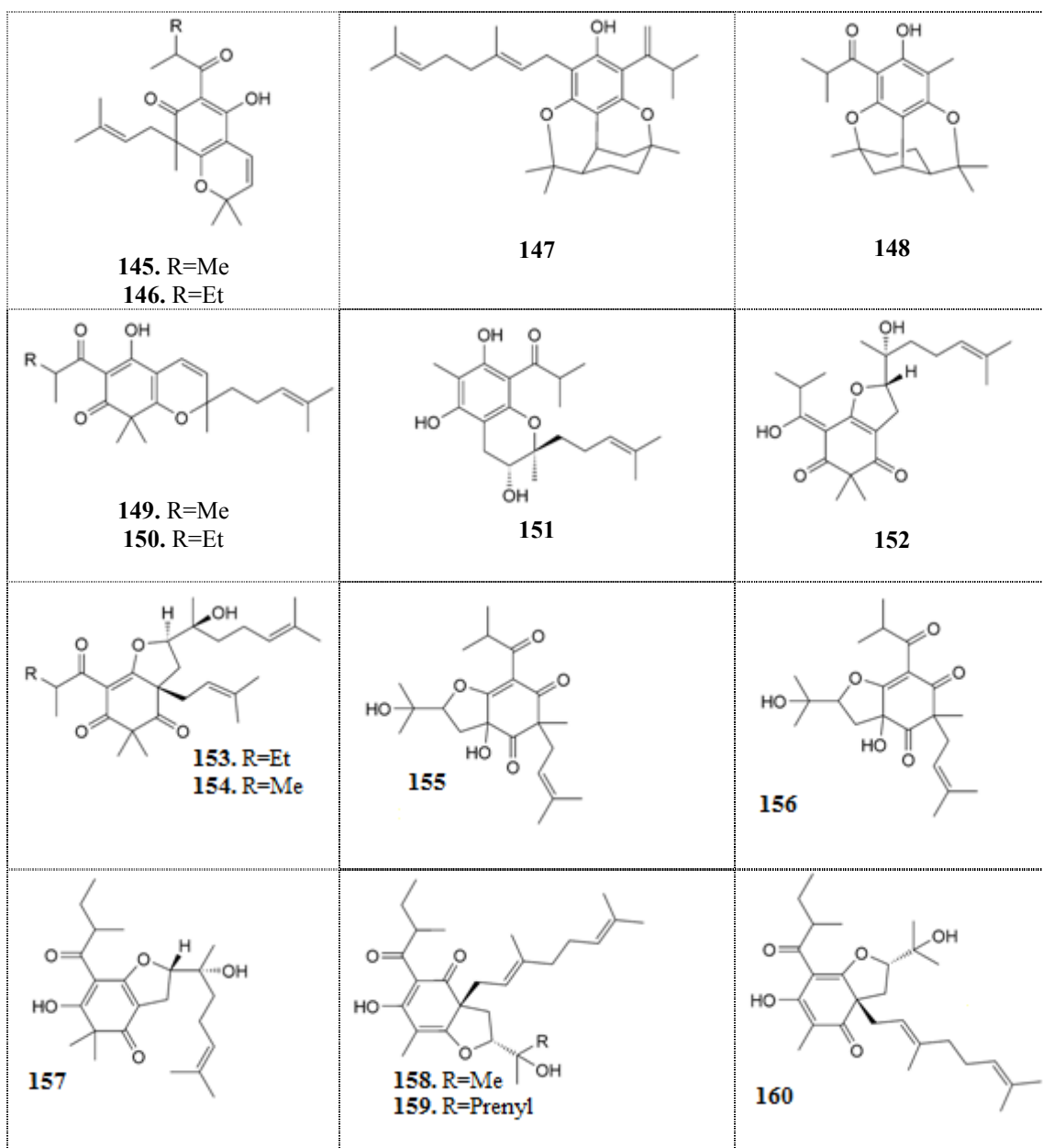


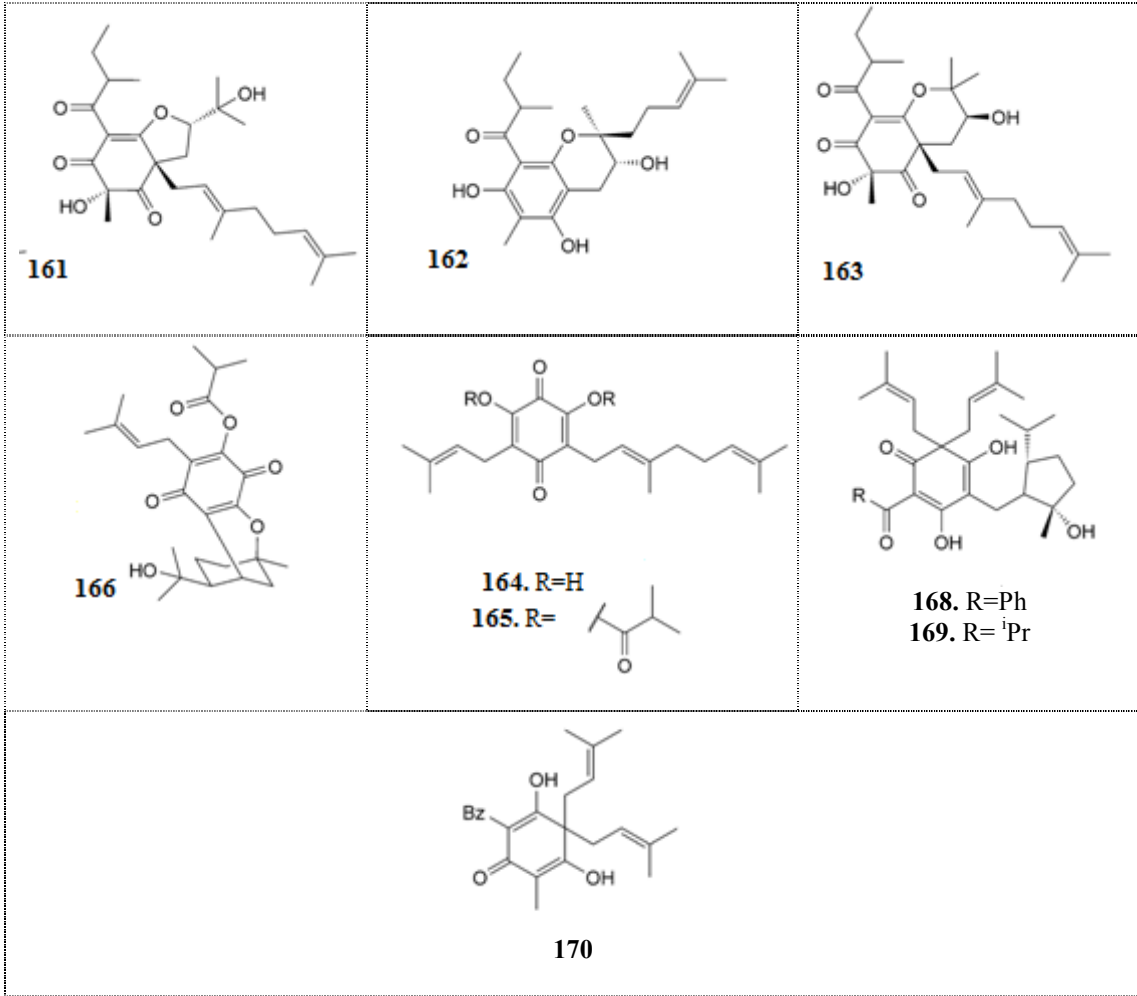
<i>H. styphelioides</i> A.Rich.	134. 3-Geranyl-1-3-methylbutanoylphloroglucinol	Gamiotea-Turro et al., 2004
<i>H. jovis</i> Greuter	135. Hyperjovinol A 136. 1-4- {[2E-3,7-Dimethylocta-2,6-dien-1-yl]oxy}-2,6-dihydroxyphenyl-2-methylpropan-1-one 137. 4-Geranyloxy-1-2-methylbutanoylphloroglucinol 138. Hyperjovinol B 139. 1-[3,4-Dihydro-5,7-dihydroxy-2-methyl-24-methylpent-3-en-1-yl-2H-1-benzopyran-6-yl]2-methylpropan-1-on	Athanasas et al., 2004
<i>H. amblyocalyx</i> Coustur. & Gand.	140. 1-[3,4-Dihydro-5,7-dihydroxy-2-methyl-2-4-methyl-pent-3-en-1-yl-2H-1-benzopyran-8-yl]2-methylpropan-1-one 141. 1-[3,4-Dihydro-5,7-dihydroxy-2-methyl-24-methylpent-3-en-1-yl-2H-1-benzopyran-8-yl]2-methylbutan-1-one 142. Hypercalyxone A 143. Hypercalyxone B	Winkelmann et al., 2003
<i>H. prolificum</i> L.	144. Prolificin A	Henry et al., 2006



<i>H. papuanum</i> Ridl.	145. Hyperguinone A 146. Hyperguinone B	Winkelmann et al., 2000	
	147. Furonewguinone A 148. Furonewguinone B	Winkelmann et al., 2001	
<i>H. pseudopetiolum</i> R. Keller	149. Petiolin A 150. Petiolin B 152. Petiolin C	Tanaka et al., 2008	
	151. Petiolin J 153. Petiolin L 154. Petiolin M 156. Petiolin K	Tanaka et al., 2010	
	155. Petiolin D	Tanaka et al., 2010	
	<i>H. yojiroanum</i> Tatew. & Koji Ito	157. Yojironin C	Mamemura et al., 2011
		158. Yojironin E	Tanaka et al., 2011

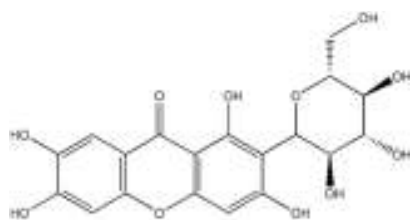
	159. Yojironin F 160. Yojironin G 161. Yojironin H 162. Yojironin D 163. Yojironin I	
<i>H. erectum</i> Thunb.	164. Erectquione A 165. Erectquione B 166. Erectquione C	An et al., 2002
<i>H. calycinum</i> L.	167. Hypercalin A 168. Hypercalin A 169. Hypercalin A	Decosterd et al., 1989
<i>H. ellipticum</i> Hook.	170. Elliptophenone A	Manning et al., 2011



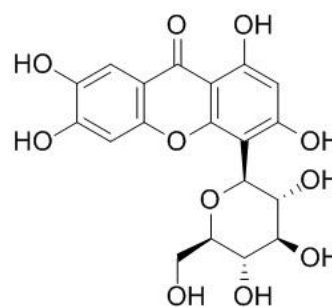


Ξανθόνες

Οι ξανθόνες, μαζί με τις φλορογλυκινόλες, αποτελούν τις δύο μεγαλύτερες κατηγορίες δευτερογενών μεταβολιτών, που βιοσυντίθεται από το γένος. Ακολουθούν το βιοσυνθετικό μονοπάτι του σικιμικού οξέος και έως ένα σημείο η βιοσύνθεσή τους είναι κοινή με εκείνη των φλορογλυκινολών (Dakanali and Theodorakis, 2011). Στο γένος *Hypericum* L. έχουν απομονωθεί πάνω από 100 παράγωγα ξανθονών στα οποία ποικίλει ο αριθμός υδροξυλίων, μεθοξυλίων και η πρενυλική, βουτυλική και γλυκοσιδική υποκατάσταση στο βασικό σκελετό των ξανθονών. Οι δύο ξανθόνες που συναντώνται συχνότερα στο γένος είναι η μαγκιφερίνη και η ισομαγκιφερίνη οι οποίες χαρακτηρίζονται ως 1,3,6,7-τετραϋδροξυ-ξανθόνες. Η μεταβλητότητα του βαθμού οξείδωσης και του αριθμού των πρενυλίων στις ξανθόνες έχει χημειοταξονομική αξία για το γένος (Crockett and Robson, 2011).

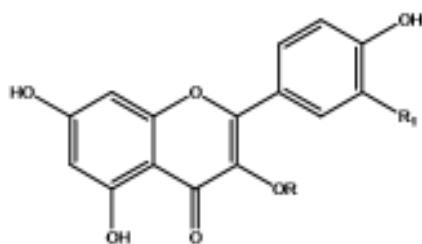


Μαγκιφερίνη



Ισομαγκιφερίνη

Φλαβονοειδή και γλυκοσίδες των φλαβονοειδών



- R=H, R₁=OH κερκετίνη
- R=β-rut, R₁=OH ρουτίνη
- R=β-gal, R₁=OH υπεροσίδης
- R=α-Glc, R₁=OH κερκετρίνη
- R=β-Glc, R₁=OH ισοκερκετρίνη
- R=H, R₁=H καιμπερόλη

Τα παράγωγα φλαβονοειδών είναι ευρέως διαδεδομένα στο γένος *Hypericum* L. (2-4%) και πιθανότατα συμβάλλουν στην αντικαταθλιπτική δράση της δρόγης του Υπερικού (Butterweck and Schmidt, 2007). Έχουν απομονωθεί φλαβονόλες (π.χ. καιμπερόλη, κερκετίνη), φλαβόνες (π.χ. λουτεολίνη), γλυκοσίδες φλαβονοειδών (π.χ.

υπεροσίδης, ισοκερκετίνη, κερκιτρίνη, ρουτίνη), διφλαβονοειδή (διαπιγενίνη, αμεντοφλαβόνη) και κατεχίνες (Barnes et al., 2001). Όλα τα φλαβονοειδή έχουν κοινό βιοσυνθετικό δρόμο, ο οποίος προκύπτει από τη συσσωμάτωση δύο άλλων βιοσυνθετικών οδών, του σικιμικού οξέος και του μηλονικού οξέος.

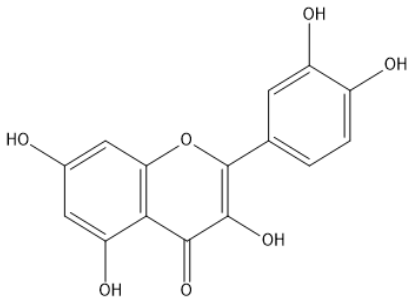
Άλλα συστατικά

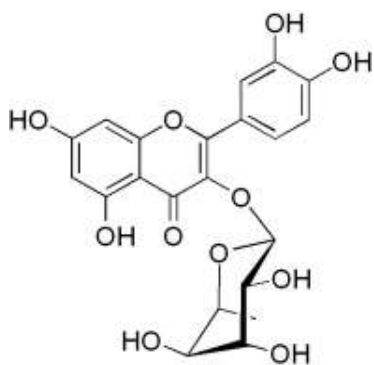
Εκτός από τις παραπάνω κατηγορίες στο γένος *Hypericum* L. έχουν βρεθεί βενζοφαινόνες, χρωμόνες, μεροτερπενοειδή, λακτόνες, παράγωγα φαινολοξέων και αιθέρια έλαια (Jie Zhao et al., 2015)

A.2.5.2 Δρογοχημεία του Sectio Drosocarpium

Το sectio Drosocarpium περιλαμβάνει 11 είδη. Όσον αφορά το *H. trichocaulon* Boiss. & Heldr. δεν υπάρχει καμία φυτοχημική μελέτη έως σήμερα. Υπάρχουν όμως αρκετές μελέτες για άλλα είδη του sectio Drosocarpium. Έχουν απομονωθεί αρκετοί μεταβολίτες εκ των οποίων κατεχίνες, φλαβονοειδή, γλυκοσίδες φλαβονοειδών, διφλαβονοειδή, φαινολοξέα, δύο ξανθόνες, φλορογλυκινόλες, ναφθοδιανθρόνες, καθώς και αιθέρια έλαια.

Παράγωγα φλαβονοειδών-βιοδείκτες για το γένος σύμφωνα με τους Crockett & Robson (2011)

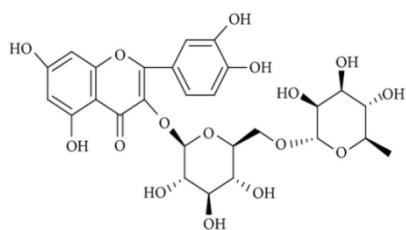
Χημική Δομή	Είδος <i>Hypericum</i> (sectio Drosocarpium)	Εντοπισμός των δευτερογενών μεταβολιτών στο γένος <i>Hypericum</i> L.
 <p style="text-align: center;">κερκετίνη</p>	<p><i>H. perforatum</i> L. <i>H. montbretii</i> Spach <i>H. bithynicum</i> Boiss. <i>H. umbellatum</i> A. Kern (Çırak et al., 2007, Nedialkov et al., 2007, Çırak et al., 2014)</p>	<p>Η κερκετίνη εντοπίζεται σε όλα τα sections εκτός από τα: Concinna, Sampsonia, Elodeoidea, Campylopus, Organifolia, Thasia και Adenotrias (Crockett and Robson, 2011)</p>



κερκιτρίνη

H. perfoliatum L.
H. montbretii Spach
H. bithynicum Boiss.
 (Çırak et al., 2007,
 Çırak et al., 2014)
H. barbatum Jacq.
H. richerii Vill
H. rumeliacum Boiss.
 (Smelcerovic and
 Spiteller, 2006)

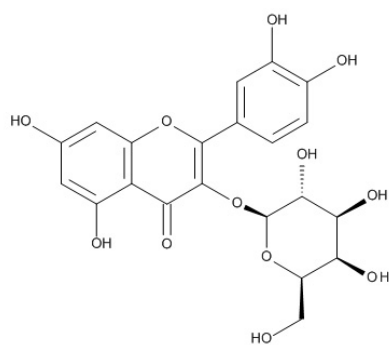
Η κερκιτρίνη εντοπίζεται σε όλα τα sections εκτός από τα: Campyloporus, Concinna, Sampsonia, Elodeoidea, Olympia, Organifolia, Thasia, Triadenioides και Adenotrias (Crockett and Robson, 2011)



ρουτίνη

H. perfoliatum L.
H. montbretii Spach
H. bithynicum Boiss.
 (Çırak et al., 2007,
 Çırak et al., 2014)

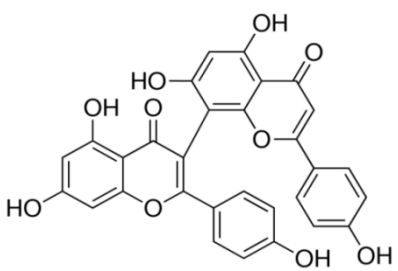
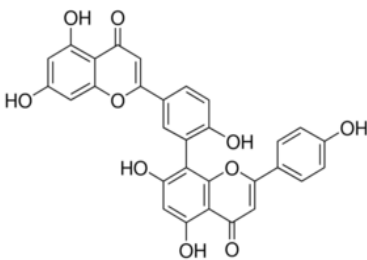
Η ρουτίνη εντοπίζεται σε όλα τα sections εκτός από τα: Campyloporus, Takasagoya, Androsaemum, Concinna, Sampsonia, Elodeoidea, Organifolia, Thasia, Coridium, Webbia και Arthrophyllum (Crockett & Robson, 2011)



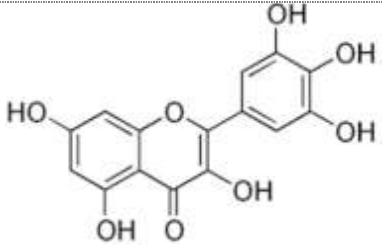
υπεροσίδης

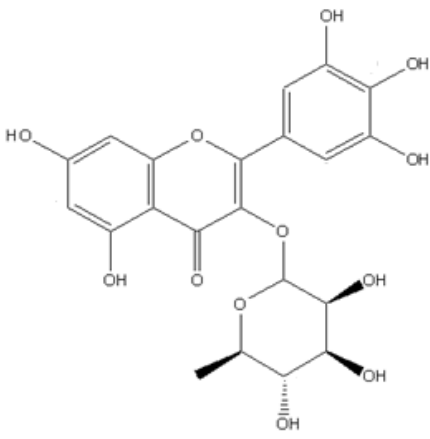
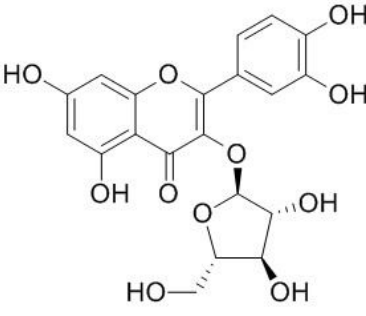
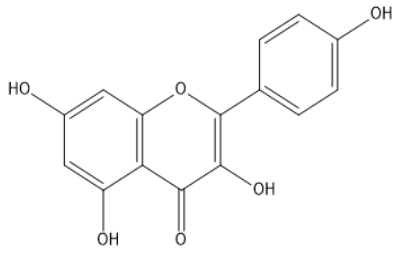
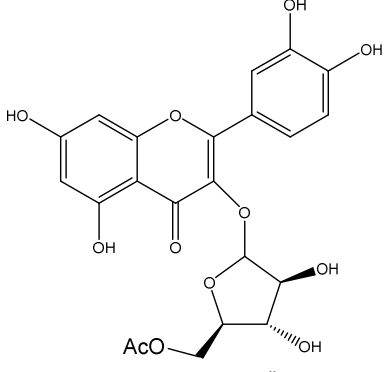
H. perfoliatum L.
H. montbretii Spach
H. bithynicum Boiss.
H. umbellatum A.
 Kern
 (Çırak et al., 2007,
 Nedialkov et al.,
 2007, Çırak et al.,
 2014)
H. barbatum Jacq.
H. richerii Vill
H. rumeliacum Boiss.
 (Smelcerovic and
 Spiteller, 2006)

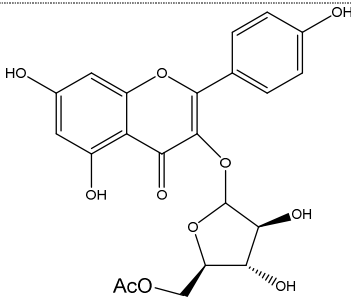
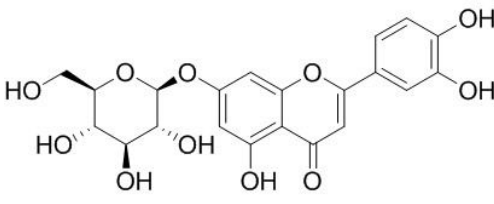
Ο υπεροσίδης εντοπίζεται σε όλα τα sections εκτός από τα: Takasagoya, Concinna, Sampsonia, Elodeoidea, Campylopus, Organifolia, Thasia και Adenotria (Crockett and Robson, 2011)

 <p>I3, Π8-διαπιγενίνη</p>	<p><i>H. umbellatum</i> A. Kern (Nedialkov et al., 2007)</p>	<p>Η I3, Π8-διαπιγενίνη εντοπίζεται στα ακόλουθα sections: Ascyreia, Androsaemum, Hypericum, Drosocarpium, Oligostema, Taeniocarpium, Webbia και Adenosepalum (Crockett and Robson, 2011)</p>
 <p>αμεντοφλαβόνη</p>	<p><i>H. montbretii</i> Spach (Çirak et al., 2014)</p>	<p>Η αμεντοφλαβόνη εντοπίζεται στα ακόλουθα sections: Hypericum, Graveolentia, Olympia, Drosocarpium, Crossophyllum, Taeniocarpium, Myriandra και Adenosepalum</p>

Άλλα παράγωγα φλαβονοειδών που εντοπίζονται στο sectio *Drosocarpium*

Χημική δομή	Είδος	Βιβλιογραφική αναφορά
 <p>μυρικετίνη</p>	<p><i>H. rumeliacum</i> Boiss. <i>H. rochelii</i> Griseb. et Schenk <i>H. montbretii</i> Spach <i>H. barbatum</i> Jacq. <i>H. perfoliatum</i> L. <i>H. umbellatum</i> A. Kern</p>	<p>Nediakov et al., 2007</p>

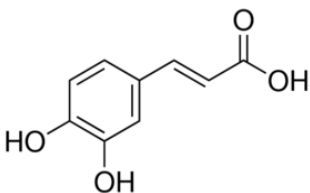
 <p>μυρικιτρίνη</p>	<p><i>H. rumeliacum</i> Boiss. <i>H. rochellii</i> Griseb. et Schenk <i>H. montbretii</i> Spach <i>H. barbatum</i> Jacq. <i>H. perfoliatum</i> L.</p>	<p>Nediakov et al., 2007</p>
 <p>αβικουλαρίνη</p>	<p><i>H. umbellatum</i> A. Kern <i>H. montbretii</i> Spach</p>	<p>Nediakov et al., 2007 Çırak et al., 2014</p>
 <p>καμπφερόλη</p>	<p><i>H. umbellatum</i> A. Kern</p>	<p>Nediakov et al., 2007 Çırak et al., 2011 Kulevanova et al., 2002</p>
 <p>κερκετινο-3-O-α-L-(5''-ακετυλο)-αραβινοφουρανοσίδης</p>	<p><i>H. umbellatum</i> A. Kern</p>	<p>Nediakov et al., 2007</p>

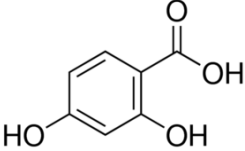
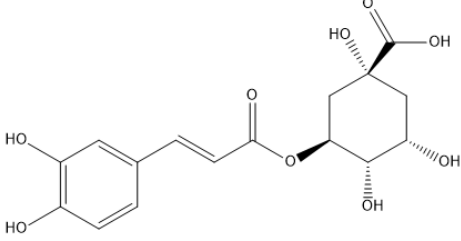
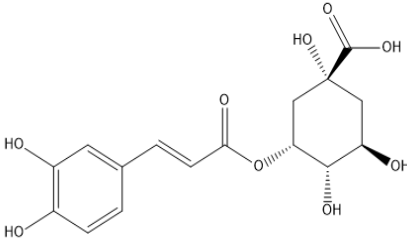
 <p>καμπφερολο-3-O-α-L-(5''-ακετυλο)-αραβινοφουρανοσίδης</p>	<p><i>H. umbellatum</i> A. Kern</p>	<p>Nediakov et al., 2007</p>
 <p>απιγενινο-7-O-γλυκοσίδης</p>	<p><i>H. perfoliatum</i> L.</p>	<p>Çırak et al., 2007</p>

Όπως φαίνεται και στον παραπάνω πίνακα, η **μυρικετίνη** και το γλυκοσιδικό παράγωγό της **μυρικιτρίνη** εντοπίζονται στα περισσότερα είδη του section, που έχουν μελετηθεί έως τώρα, ενώ γενικότερα στο γένος *Hypericum* L. οι μεταβολίτες αυτοί συναντώνται σπάνια. Έχει προταθεί μάλιστα από τους Nediakov et al. (2007) ότι οι φλαβονόλες αυτές μπορούν να αποτελούν χημειοταξινομικούς δείκτες για αυτό το section.

Φαινολοξέα

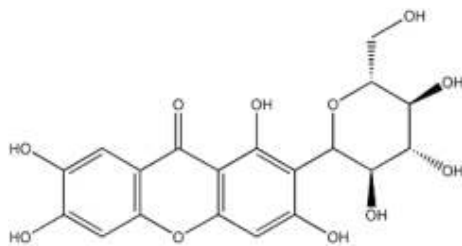
Σύμφωνα με τις έως τώρα μελέτες στο section *Drosocarpium* έχουν εντοπιστεί τα εξής τέσσερα παράγωγα φαινολοξέων: καφεϊκό οξύ, 2,4-διυδροξυ-βενζοϊκό οξύ, χλωρογενικό οξύ και νεοχλωρογενικό οξύ.

 <p>καφεϊκό οξύ</p>	<p><i>H. montbretii</i> Spach</p>	<p>Çırak et al., 2014</p>
---	-----------------------------------	---------------------------

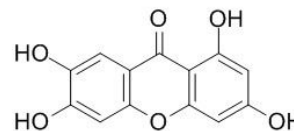
 <p>2,4-διυδροξυ-βενζοϊκό οξύ</p>	<p><i>H. montbretii</i> Spach</p>	<p>Çırak et al., 2014</p>
 <p>Χλωρογενικό οξύ</p>	<p><i>H. perfoliatum</i> L. <i>H. montbretii</i> Spach <i>H. bithynicum</i> Boiss.</p>	<p>Çırak et al., 2007 Çırak et al., 2014</p>
 <p>νεοχλωρογενικό οξύ</p>	<p><i>H. montbretii</i> Spach</p>	<p>Çırak et al., 2014</p>

Ξανθόνες

Στο sectio Drosocarpium έχουν μέχρι στιγμής εντοπιστεί δύο παράγωγα ξανθονών, η μαγκιφερίνη, μία γλυκοσιδική ξανθόνη, που είναι ευρέως διαδεδομένη στο γένος *Hypericum* L. και η νοραθυριόλη που είναι το άγλυκο της μαγκιφερίνης. Η μαγκιφερίνη έχει εντοπιστεί στο *H. rochelii* και στο *H. perfoliatum* (Kitanov and Nedialkov, 1998), ενώ η νοραθυριόλη στο *H. umbellatum* (Nedialkov et al., 2007).



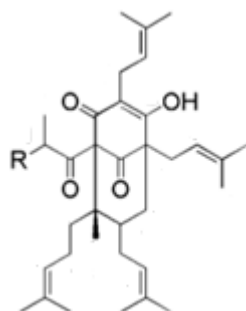
Μαγκιφερίνη



Νοραθυριόλη

Φλορογλυκινόλες

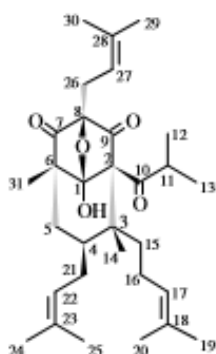
Στο sectio *Drosocarpium* έχουν εντοπιστεί τόσο η υπερφορίνη, όσο και η αντιυπερφορίνη. Η υπερφορίνη έχει εντοπιστεί στα είδη *H. perfoliatum*, *H. montbretii*, *H. bithenicum* (Çırak et al., 2007, id. 2014). Η αντιυπερφορίνη έχει εντοπιστεί με μεθόδους αναλυτικής χρωματογραφίας στο *H. montbretii* (Çırak et al., 2014).



R=CH₃ υπερφορίνη

R=CH₂CH₃ αντιυπερφορίνη

Από το *H. perfoliatum* απομονώθηκε ένα πολυ-ισοπρενυλιωμένο παράγωγο υπερφορίνης, το οποίο ονομάστηκε υπερφολιατίνη [hyperfoliatin] (Benkiki et al., 2003). Το παράγωγο αυτό έχει απομονωθεί και στο *H. scabrum* (Tanaka et al., 2004), όπου έχει ονομαστεί υπεριμπόνη J [hyperibone J].



Η υπερφολιατίνη έχει επιδείξει *in vivo* αντικαταθλιπτική δράση, σε δοκιμασίες εξαναγκασμένης κολύμβησης σε ποντίκια. Ο μηχανισμός δράσης σχετίζεται με την μείωση της επαναπρόσληψης των μονοαμινικών νευροδιαβιβαστών (Rego et al., 2007).

Ναφθοδιανθρόνες

Η υπερικίνη και η ψευδοϋπερικίνη έχουν εντοπιστεί και μάλιστα σε υψηλή περιεκτικότητα στα είδη του sectio *Drosocarpium*. Συγκεκριμένα αναφορές υπάρχουν για τα είδη *H. perfoliatum*, *H. bithenicum*, *H. montbetti* (Çırak et al., 2007, id. 2014). Η παρουσία των υπερικινών είναι μείζονος σημασίας για την ταξινόμηση των ειδών

στο γένος *Hypericum* L. και υποδεικνύει τα φυλογενετικά πιο προηγμένα sections (Kitanov, 2001, Crockett and Robson, 2011). Έτσι, ο εντοπισμός τους στο section *Drosocarpium* επιβεβαιώνει τη θέση του στο γένος.

Αιθέρια έλαια - πτητικά συστατικά

Οι μονοτερπενικοί υδρογονάνθρακες φαίνεται να είναι η κυριότερη κατηγορία ενώσεων στο αιθέριο έλαιο των ειδών, που ανήκουν στο section *Drosocarpium* (Saroglou et al., 2007).

Η ανάλυση αιθερίου ελαίου από το *H. barbatum* έδωσε σαν κυριότερα συστατικά τα ακόλουθα:

(-)- α -pinene, (-)- β -pinene, (-)-limonene, (-)-(E)-caryophyllene, (-)-caryophyllene oxide, ενώ στο *H. rumeliacum* τα κυριότερα συστατικά ήταν τα α -pinene και β -pinene (Couladis et al. 2003, Saroglou et al. 2007).

Από το *H. umbellatum* ανιχνεύθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 126 συστατικά με κυριότερα τα: germacrene D και (E)-nerodilol, ενώ στην ίδια μελέτη στο αιθέριο έλαιο του *H. rochelii* τα κυριότερα συστατικά ήταν: n-nonane και β -pinene (Đorđević et al., 2013).

Τέλος η σύσταση του αιθερίου ελαίου στο *H. perforiatum* διαφέρει αρκετά ανάλογα με τη γεωγραφική προέλευση. Για παράδειγμα, δείγματα αιθερίου ελαίου από τον ελλαδικό χώρο παρουσίασαν υψηλή περιεκτικότητα σε α -pinene και β -pinene (Couladis et al., 2001), ενώ σε ανάλυση αιθερίου ελαίου από την Αλγερία τα κύρια συστατικά ήταν: thymol, T-cadinol και 2,5-dimethyl-2-ethylphenol (Touafek et al., 2005). Στο αιθέριο έλαιο με προέλευση την Τυνησία τα κύρια συστατικά ήταν: α -pinene, allo-aromadendrene και germacrene-D (Hosni et al., 2008). Τα αποτελέσματα αυτά είναι ενδεικτικά της μεταβλητότητας της σύστασης του αιθερίου ελαίου ανάλογα με την προέλευση και τις περιβαλλοντικές συνθήκες.

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

B.1 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ

α. Χρωματογραφία επί λεπτής στιβάδας

Πλάκες λεπτής στιβάδας:

- Γέλη οξειδίου του πυριτίου με δείκτη φθορισμού σε φύλλα αλουμινίου 20 x 20 cm. Πάχος στιβάδας 0.1 mm (Kieselgel F₂₅₄, Merck, Art. 5554) (αναλυτική χρωματογραφία).
- Γέλη οξειδίου του πυριτίου αντιστρόφου φάσεως με δείκτη φθορισμού σε γυάλινες πλάκες 5 x 10cm. Πάχος στιβάδας 0.25mm (Kieselgel F₂₅₄, Merck, Art. 15685) (αναλυτική χρωματογραφία).
- Μικροκρυσταλλική κυτταρίνη (cellulose) χωρίς δείκτη φθορισμού σε φύλλα αλουμινίου 20 x 20 cm. Πάχος στιβάδος 0.1 mm (Merck, Art. 5552) (αναλυτική χρωματογραφία).

Μικροπιπέτες:

Για την τοποθέτηση του δείγματος πάνω στις πλάκες λεπτής στιβάδας χρησιμοποιήθηκαν γυάλινες μικροπιπέτες: Hirschmann Laborgeräte όγκου 5μl, Blaubrand intraMARK όγκου 5, 10 και 20μl

Απεικόνιση, επεξεργασία και αποθήκευση αποτελεσμάτων:

Πριν και έπειτα από τον ψεκασμό έγινε απεικόνιση, επεξεργασία και αποθήκευση της εκάστοτε ανεπτυγμένης πλάκας λεπτής στιβάδας με την εφαρμογή του προγράμματος Linomat 5, σε θάλαμο φωτογράφισης Reprostar 3 (με λάμπα ορατού, λάμπα 254nm και λάμπα 366nm) και τη χρήση του λογισμικού WinCats 1.4.2 (Camag, Muttenz, CH).

β. Χρωματογραφία στήλης

- Γέλη οξειδίου του πυριτίου 60, 111567 Geduran, για χρωματογραφία στήλης (0.040-0.063 mm).
- Γέλη οξειδίου του πυριτίου 60, (SDS 2050044), για χρωματογραφία στήλης (0.040-0.063 mm).

- Sephadex LH-20, γέλη υδροξυπροπυλιωμένης δεξτράνης (Pharmacia Fine Chemicals). Μέγεθος κόκκων: 25-100 μ. Πριν από τη χρήση αφήνεται να διογκωθεί με το διαλύτη έκλουσης επί 24 ώρες. Ακολούθως, φέρεται στη στήλη και εκπλύνεται με τον ίδιο διαλύτη πέντε φορές (αντενδείκνυται η μηχανική και κυρίως η μαγνητική ανάδευση, διότι καταστρέφονται οι κόκκοι).

γ. Flash chromatography χαμηλής πίεσης:

Όργανο: Spot Flash Liquid Chromatography, SPOT-System Ser.-No. 08-01-108, με φασματοφωτόμετρο μονής δέσμης.

Λογισμικό: Armen Glider Flash V2.3

Κατασκευαστής: Interchim, 03103 Montlucon, France

δ. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

- Αναλυτική HPLC: για την επιλογή των καταλληλότερων προς μελέτη κλασμάτων και την ανάπτυξη μεθόδου απομόνωσης προϊόντων χρησιμοποιήθηκε αναλυτική υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (Analytical HPLC, Analytical High Performance Liquid Chromatography):

Όργανο: Elite LaChrom L-2200 (τμήμα συλλογής κλασμάτων), L-2130 (αντλία), L-2455 (ανιχνευτής συστοιχίας διοδίων (DAD- Diode Array Detector)), L-2350 (θάλαμος στήλης) και λογισμικό EZChromElite 3.1.7.

Στήλη αντιστρόφου φάσης (reversed phase): Hibar 250-4, Purosphare RP-18e (5μm) (Hibar, Aalen).

Συγκέντρωση των προς μελέτη δειγμάτων 1mg/ml.

- Παρασκευαστική HPLC: για την παραλαβή τελικών καθαρών προϊόντων
 - Όργανο: ProStar, 410 (τμήμα αυτόματου δειγματολήπτη), 210 (τμήμα των δύο αντλιών), 335 (κομμάτι του ανιχνευτή συστοιχίας διοδίων (DAD-Diode Array Detector) και 701 (τμήμα συλλογής κλασμάτων) (Varian, Darmstadt).

Στήλες αντιστρόφου φάσης (reversed phase):

- Eclipse XDB-C18, 5 μm, 9.4 x 250 mm (Agilent, USA)
- Eurosphere-100 C18, 16mm

Συγκέντρωση των προς μελέτη δειγμάτων 10mg/ml και ενιόμενος όγκος δείγματος 250 µl.

➤ Όργανο: χρωματογράφος με ανιχνευτή διαθλασιμέτρου: RID Shimadzu 10A & αντλία Jasco PU-2080 Plus Isocratic.

Στήλη αντιστρόφου φάσης (reversed phase):

- Kromasil C18 Semi-prep (250 x10 mm).

Ταχύτητα ροής: 1.0 ml/min. Συγκέντρωση των προς μελέτη κλασμάτων: 3.5-7.0 mg/ml και ενιόμενος όγκος δείγματος 460 µl.

Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκαν τα ενδεικνυόμενα μίγματα διαλυτών ανάλογα με την πολυπλοκότητα και την πολικότητα εκάστου δείγματος, όπως περιγράφονται κατωτέρω στην πορεία απομόνωσης.

ε. Αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματογραφία μάζας (GC-MS):

Χρησιμοποιήθηκε σύστημα Hewlett Packard 5973-6890 και η μέθοδος παραγωγής ιόντων ήταν ιονισμός με ηλεκτρόνια (70 eV). Τα δείγματα αναλύθηκαν σε άπολη στήλη HP-5MS (30 m x 0.25 mm (i.d.), film thickness: 0.25 µm). Θερμικό πρόγραμμα: από τους 60°C (5 min) μέχρι τους 280°C, με ρυθμό αύξησης της θερμοκρασίας 4°C/min. Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε το αδρανές αέριο ήλιο (1.0 ml/min).

Χρωματογραφικά αντιδραστήρια

Τα χρωματογραφήματα παρατηρούνται κατ' αρχήν στο ορατό και το υπεριώδες φως (254nm, 366nm). Για την εμφάνισή τους χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αντιδραστήρια:

- Για τα φλαβονοειδή:
β-αμινοαιθυλεστερας του διφαινυλοβορικού οξέος, διάλυμα 1% σε μεθανόλη (αντιδραστήριο Neu) (Neu, 1957). Τα παράγωγα της απιγενίνης εμφανίζουν κιτρινοπράσινο φθορισμό και μετά 24 ώρες χρωματίζονται κόκκινα στο φως της ημέρας, τα παράγωγα της λουτεολίνης εμφανίζουν κίτρινο φθορισμό, τα παράγωγα

της καιμπερόλης εμφανίζουν κιτρινοπράσινο φθορισμό και της κερκετίνης έντονο πορτοκαλοκίτρινο.

- για τις ξανθόνες και τις φλορογλυκινόλες:
 - αντιδραστήριο NP/Macroglol: 1% β-αμινοαιθυλεστέρας του διφαινυλοβορικού οξέος (=διφαινυλοβορανυλοξυαιθυλαμίνη) σε MeOH (NP, αντιδραστήριο Neu) και 5% πολυαιθυλενογλυκόλη-4000 (Macroglol, PEG) σε EtOH (Europäisches Arzneibuch, 2011)
 - αντιδραστήριο ανισαλδεΰδης (Wagner et al., 1983): 0.5ml ανισαλδεΰδης, 10ml AcOH 99%, 85ml μεθανόλης και 5ml π. H₂SO₄.

Και για τα δύο αντιδραστήρια, αμέσως μετά τον ψεκασμό το χρωματογράφημα θερμαίνεται για 10 min στους 120° C. Έπειτα από τον ψεκασμό με τα συγκεκριμένα αντιδραστήρια τα πρενυλιωμένα παράγωγα ξανθών και φλορογλυκινολών αποκτούν χαρακτηριστικούς χρωματισμούς: στο ορατό εμφανίζουν έντονο καστανό-κίτρινο χρώμα, στο υπεριώδες φως σε λ 254 nm εμφανίζουν γαλάζιο φθορισμό και σε λ 366 nm χαρακτηριστικό έντονο turquoise φθορισμό.

- για τις υπόλοιπες κατηγορίες συστατικών χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο βανιλίνης:

Διάλυμα A: βανιλίνη (Merck, Art. No. S26047 841) 5% σε μεθανόλη

Διάλυμα B: π. H₂SO₄ 5% σε μεθανόλη (Stahl, 1969)

Ίσοι όγκοι αναμιγνύονται αμέσως πριν τον ψεκασμό και το χρωματογράφημα θερμαίνεται για 5 min στους 105° C.

B.1.2 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΕΣ ΚΑΙ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

α. Φασματοσκοπία Υπεριώδους-ορατού (UV-Vis) (Mabry *et al.*, 1970; Markham *et al.*, 1981).

Τα φάσματα υπεριώδους-ορατού ελήφθησαν σε φασματοφωτόμετρο Shimadzu UV-160 A.

β. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

Για την λήψη των φασμάτων Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού NMR (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy) χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθοι φασματογράφοι:

- Φασματογράφος Bruker AC 200 (200.13 MHz για ^1H -NMR και 50.3 MHz για ^{13}C -NMR) της Φαρμακευτικής σχολής του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.
- Φασματογράφος Bruker DRX 400 (399.95 MHz για ^1H -NMR) της Φαρμακευτικής σχολής του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.
- Φασματογράφος Bruker Avance III HD 400 (400.13 MHz για ^1H -NMR και 100.61 MHz για ^{13}C -NMR) του τμήματος φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού της Κεντρικής Ανάλυσης, Τμήμα Χημείας και Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου του Ρέγκενσμπουργκ.
- Φασματογράφος Bruker Avance III 600 kryo (600.25 MHz για ^1H -NMR και 150.93 MHz για ^{13}C -NMR), του τμήματος φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού της Κεντρικής Ανάλυσης, Τμήμα Χημείας και Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου του Ρέγκενσμπουργκ. Η χρήση του συγκεκριμένου φασματογράφου έγινε μόνο για τα δείγματα των οποίων η ποσότητα ήταν μικρότερη από 1mg και η λήψη αυτών των φασμάτων έγινε από τον κύριο Fritz Kastner, συνεργάτη του τμήματος Κεντρικής Ανάλυσης του Πανεπιστημίου του Ρέγκενσμπουργκ.

Τα φάσματα ελήφθησαν με τους ακόλουθους διαλύτες: CDCl_3 δίχως εσωτερικό πρότυπο, λαμβάνοντας το σήμα του διαλύτη ως αναφορά (7.24 ppm για ^1H -NMR και 77.0 ppm για ^{13}C -NMR) και CD_3OD (3.31 ppm για ^1H -NMR και 49.5 ppm για ^{13}C -NMR).

Για τη λήψη των φασμάτων χρησιμοποιήθηκαν 0.5 ml του εκάστοτε δευτεριωμένου διαλύτη σε σωλήνα NMR (507-HP-8). Για τα δείγματα των οποίων η ποσότητα ήταν

μικρότερη από 1mg χρησιμοποιήθηκαν 0.3 ml του εκάστοτε δευτεριωμένου διαλύτη σε ειδικούς σωλήνες NMR (Shigemi).

Οι χημικές μετατοπίσεις εκφράζονται σε δ (ppm) και οι σταθερές σύζευξης (J) σε Hertz (Hz).

Χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες τεχνικές:

DEPT (**D**istorsionless **E**nhancement by **P**olaritation **T**ransfer) για τον προσδιορισμό της πολυπλοκότητας των σημάτων στα φάσματα ^{13}C -NMR.

COSY (**C**ORrelation **S**pectroscop**Y**).

HSQC (**H**eteronuclear **S**ingle **Q**uantum **C**orrelation).

HMBC (**H**eteronuclear **M**ultiple **B**ond **C**orrelation).

NOESY (**N**uclear **O**verhauser **E**ffect **S**pectroscop**Y**).

ROESY (**R**otating-frame **O**verhauser **E**ffect **S**pectroscop**Y**).

γ. Φασματομετρία Μάζης

Για την επαλήθευση της δομής των απομονωμένων ενώσεων διεξήχθη ανάλυση φασματομετρίας μάζης με HRESI-MS: Q-TOF 6540 UHD (Aligent Technologies) στο τμήμα της κεντρικής ανάλυσης, Τμήμα Χημείας και Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου του Ρέγκενσμπουργκ από τον κ. Josef Kiermaier.

B.1.3 ΔΙΑΛΥΤΕΣ

Σε όλες τις τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν, εκτός από την HPLC, η χρήση των διαλυτών έγινε κατόπιν αποστάξεως με εξαίρεση τη μεθανόλη (Lab-Scan, ref. A3509E) και ο βαθμός καθαρότητάς τους ήταν “pro analysis”.

Για την HPLC χρησιμοποιήθηκαν διαλύτες υψηλού βαθμού καθαρότητας “Gradient grade for liquid chromatography (HPLC)” και συγκεκριμένα ACN (Gradient grade for liquid chromatography, Merck, Darmstadt), MeOH (Gradient grade for liquid chromatography LiChrosolv[®], Merck, Darmstadt) και H₂O (milipore, <0.05 μS), παραγόμενο από τη συσκευή Ultra Pure Water Purification System (Astacus LS, MembraPure, Bodenheim). Πριν χρησιμοποιηθούν οι διαλύτες στην HPLC διηθήθηκαν υπό κενό και απαερώθηκαν σε λουτρό υπερήχων Ultrasonic cleaner US1700TH (VWR International GmbH, Darmstadt).

B.2. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΤΗΣ ΔΡΟΓΗΣ

Το φυτό συλλέχθηκε 25 Μαΐου του 2014 στην περιοχή Ιδαίων Άντρον στο όρος Ψηλορείτη με τη βοήθεια του Δρ. Ζαχαρία Κυπριωτάκη (Καθηγητής Συστηματικής Βοτανικής, Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας, ΤΕΙ Κρήτης). Δείγμα φυτικής συλλογής φυλάσσεται στη προσωπική Φυτική Συλλογή (herbarium) του Δρα Κυπριωτάκη με κωδικό: 15484 / 25-5-2014. Συλλέχθηκαν τα υπέργεια ανθισμένα τμήματα του φυτού. Η δρόγη τοποθετήθηκε σε σκοτεινό και δροσερό μέρος για δύο εβδομάδες έως ότου να ξηραθεί πλήρως, οπότε προέκυψαν 174.0 g υπεργείων τμημάτων ξηρού φυτού, αδρομερώς τετμημένων.

Η δρόγη εκχυλίσθηκε χρησιμοποιώντας την μέθοδο της εμβροχής σε θερμοκρασία δωματίου με διαλύτες αυξανόμενης πολικότητας: **κυκλοεξάνιο**, διχλωρομεθάνιο, **μεθανόλη** και μίγμα μεθανόλης: νερού 5:1.

εκχύλισμα	κωδικός	Βάρος (g)	Απόδοση (%)	
			β/β σε ξηρή δρόγη)	χρώμα
c-Hexane	TRIC	2.8532	1.64	κίτρινο
DCM	TRID	1.8160	1.04	πράσινο
MeOH	TRIM	28.9808	16.66	κόκκινο
MeOH/H ₂ O (5:1)	TRIW	22.7323	13.06	κόκκινο

Η παρούσα φυτοχημική μελέτη αφορά το άπολο εκχύλισμα **TRIC** και το πολικό εκχύλισμα **TRIM**.

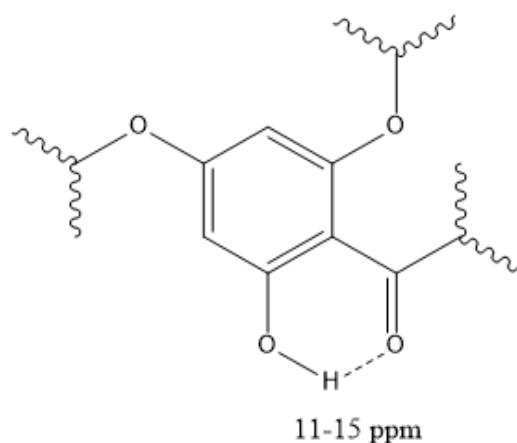
B.3 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ

B.3.1. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΚΥΚΛΟΕΞΑΝΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ: TRIC

Η αναζήτηση παραγώγων ξανθών και φλορογλυκινολών επικεντρώθηκε στα άπολα εκχυλίσματα: TRIC (κυκλοεξανίου) και TRID (διχλωρομεθανίου).

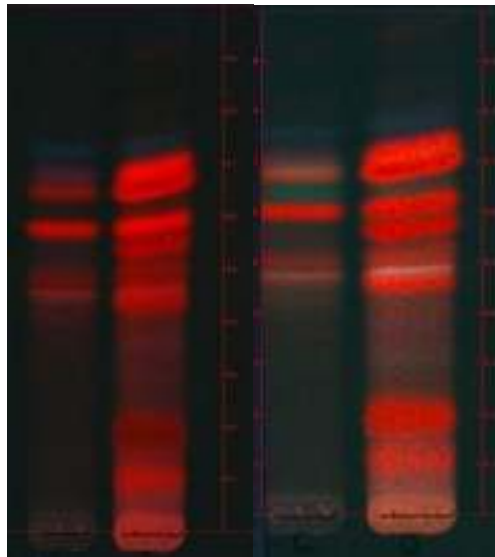
Ο εντοπισμός αυτών των δύο φυτοχημικών ομάδων γίνεται:

- Μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας, όπου εμφανίζονται χαρακτηριστικές ζώνες στη λιπόφιλη περιοχή του χρωματογραφήματος, οι οποίες στο ορατό εμφανίζουν καστανο-κίτρινο χρώμα και σε λ 366nm εμφανίζουν χαρακτηριστικό έντονο κυανό φθορισμό έπειτα από ψεκασμό με ανισαλδεΐδη ή με το αντιδραστήριο Neu/Macroglol.
- Μέσω αναλυτικής υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με την εμφάνιση κορυφών στο χρωματογράφημα, που απορροφούν σε λ 290 nm.
- Μέσω φασματοσκοπικού ελέγχου $^1\text{H-NMR}$ όπου εμφανίζονται απλές κορυφές, που εμφανίζουν χαρακτηριστική χημική μετατόπιση περίπου σε δ 11-15 ppm εξ αιτίας του δεσμού υδρογόνου, που σχηματίζεται μεταξύ του υδρογόνου της υδροξυλομάδας του φλορογλυκινολικού σκελετού και γειτονικού καρβονυλίου.



Ο χρωματογραφικός έλεγχος των δύο εκχυλισμάτων έγινε με σύστημα διαλυτών ανάπτυξης:

Hexane: EtOAc: CH_3COOH : 1) 65: 33: 2, 2) 60:38:2 και 3) 68:30:2.



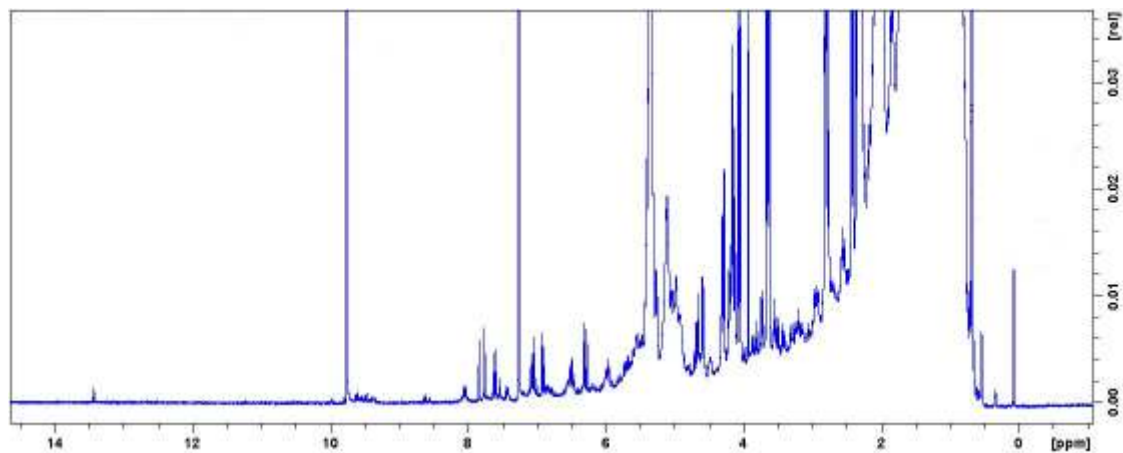
i

ii

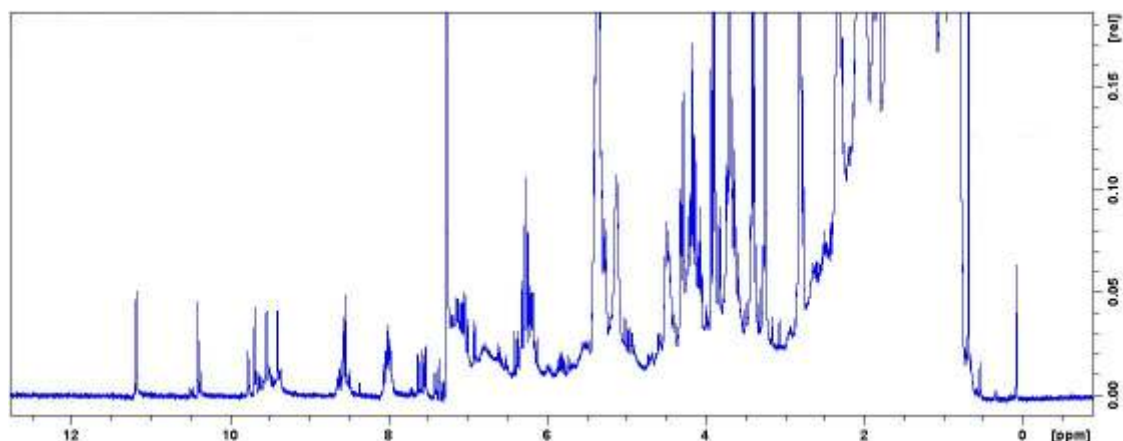
Χρωματογραφία επί λεπτής στιβάδας γέλης οξειδίου του πυριτίου σε σύστημα διαλυτών ανάπτυξης Hexane: EtOAc: CH₃COOH (68: 30: 2). Η πρώτη στήλη κάθε χρωματογραφήματος αντιστοιχεί στο TRIC και η δεύτερη στο TRID.

- i. λ 366nm, χωρίς ψεκασμό αντιδραστηρίου,*
- ii. λ 366nm έπειτα από ψεκασμό με NP/Macrolog*

¹H-NMR για το TRIC



$^1\text{H-NMR}$ για το TRID



Με βάση τα αποτελέσματα από το συγκριτικό χρωματογραφικό και φασματοσκοπικό έλεγχο επιλέχθηκε το κυκλοεξανικό εκχύλισμα **TRIC** για περαιτέρω μελέτη. Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ και τα δύο εκχυλίσματα παρουσιάζουν απλές κορυφές με χημική μετατόπιση σε δ 11-15. Ωστόσο όπως προκύπτει από τον χρωματογραφικό έλεγχο, στο **TRIC** δεν είναι τόσο έντονη η παρουσία γλωροφυλλών, σε αντίθεση με το **TRID**, το οποίο αφενός είχε πράσινο χρώμα και αφετέρου στην χρωματογραφία λεπτής στιβάδας εμφάνιζε πολλές χαρακτηριστικές ζώνες έντονου κόκκινου φθορισμού σε λ 366 nm.

Απομάκρυνση των κηρών

Το κυκλοεξανικό εκχύλισμα (**TRIC**) διαλύθηκε σε MeOH και αφέθηκε σε ηρεμία στους 0°C έως διαχωρισμού δύο φάσεων: κάτω λευκή ημιστερεή φάση (κηροί) και άνω υγρή κίτρινη φάση. Η άνω φάση συλλέχθηκε και η διαδικασία επαναλήφθηκε μέχρι αποχρωματισμού της άνω φάσης. Μετά την απομάκρυνση των κηρών, το τελικό βάρος του κυκλοεξανικού εκχυλίσματος ήταν 1.6207 g.

ΠΡΩΤΗ ΚΛΑΣΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΤΗΛΗΣ (FLASH CHROMATOGRAPHY) ΧΑΜΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ

Το απολιπανθέν κυκλοεξανικό εκχύλισμα βάρους 1.6207g χωρίστηκε σε δύο μέρη καθένα από τα οποία υποβλήθηκε σε πρώτο διαχωρισμό μέσω χρωματογραφίας χαμηλής πίεσης σε στήλη γέλης πυριτίου αντιστρόφου φάσεως, C18-SiGel. Ως υγρό έκλουσης χρησιμοποιήθηκε μίγμα διαλυτών H₂O:MeOH μειούμενης πολικότητας και ροή 10mL/min. Συγκεκριμένα η μέθοδος που αναπτύχθηκε παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα:

Χρόνος (min)	H ₂ O	MeOH
0	30	70
20	30	70
25	10	90
40	10	90
45	0	100
90	0	100

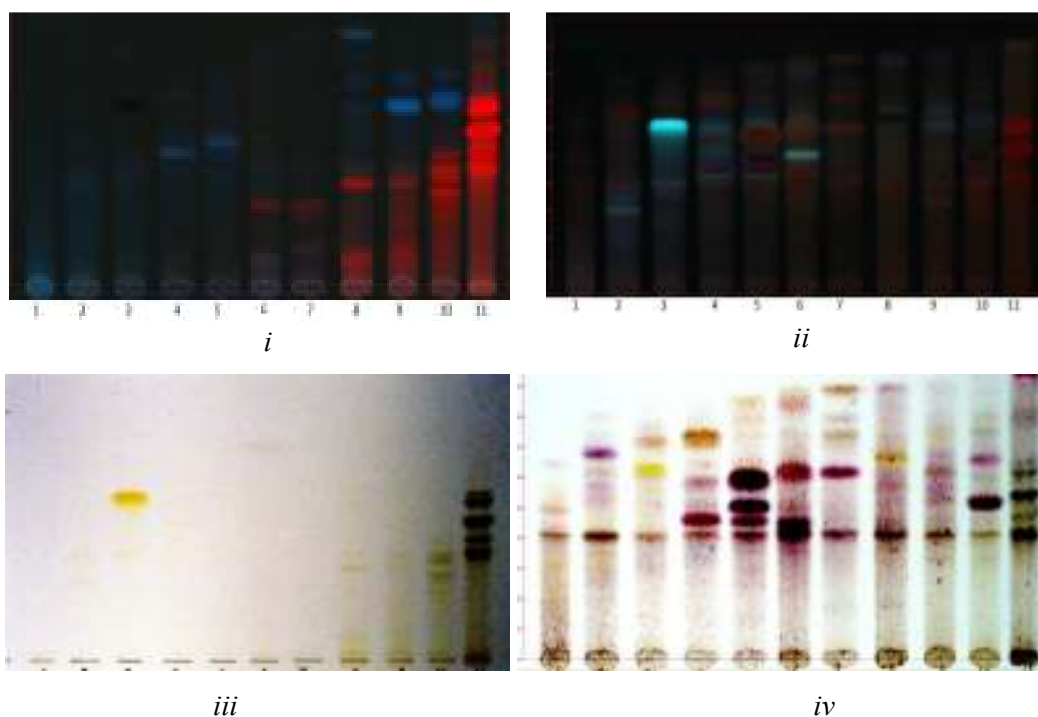
Συλλέχθηκαν 165 κλάσματα όγκου 7.5mL από κάθε χρωματογραφία, δηλαδή συνολικά 230 κλάσματα, τα οποία κατόπιν ελέγχου με αναλυτική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, με σύστημα διαλυτών ανάπτυξης Hexane: EtOAc: CH₃COOH (65:33:2) συνενώθηκαν δίνοντας τα ακόλουθα 10 κλάσματα:

Κλάσμα		Κωδικός	Βάρος (mg)
1-61	1-45	TRIC.1	184.43
62-65	46-50	TRIC.2	67.56
66-70	51-53	TRIC.3	56.62
71-76	54-58	TRIC.4	56.22
77-101	59-66	TRIC.5	58.63
102-105	71-74	TRIC.6	94.78
106-111	75-79	TRIC.7	63.35
112-119	80-102	TRIC.8	131.65
120-151	103-140	TRIC.9	156.43
152-165	141-165	TRIC.10	446.86

Τα κλάσματα 67-70 από τη 2^η χρωματογραφία δεν συνενώθηκαν, αλλά αποθηκεύτηκαν ως ένα κλάσμα με κωδικό TRIC_2_8 και βάρος 43.58mg.

Για την επιλογή των κλασμάτων, που υποβλήθηκαν σε περαιτέρω χρωματογραφικό διαχωρισμό με σκοπό την απομόνωση παραγώγων ξανθονών και φλορογλυκινολών έγιναν τρεις διαφορετικοί έλεγχοι:

- έλεγχος με αναλυτική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας χρησιμοποιώντας σύστημα διαλυτών ανάπτυξης Cyclohexane: EtOAc: CH₃COOH (5.8: 4.0: 0.2)
- φασματοσκοπικός έλεγχος ¹H-NMR
- αναλυτική υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης



Χρωματογραφία επί λεπτής στιβάδας γέλης οξειδίου του πυριτίου για τα κλάσματα που προέκυψαν από τη χρωματογραφία χαμηλής πίεσης. Απεικονίζονται 11 κλάσματα από τα οποία τα 2 πρώτα συνενώθηκαν στην πορεία της απομόνωσης για να δώσουν το κλάσμα TRIC.1. Το σύστημα διαλυτών ανάπτυξης που χρησιμοποιήθηκε ήταν Hexane: EtOAc: CH₃COOH (65:33:2).

- i) λ 366nm, χωρίς ψεκασμό*
- ii) λ 366nm, με ψεκασμό με ανισαλδεΰδη*
- iii) ορατό, χωρίς ψεκασμό*
- iv) ορατό, με ψεκασμό με ανισαλδεΰδη*

Επιλέγησαν για παραπάνω μελέτη τα κλάσματα **TRIC.2** (67.56mg), **TRIC.3** (56.62mg), **TRIC.4** (56.22mg), **TRIC.5** (58.63) και **TRIC.6** (94.78mg).

Χρωματογραφικός διαχωρισμός των κλασμάτων TRIC.2, TRIC.3 και TRIC.4 με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντιστρόφου φάσεως (RP₁₈-HPLC).

Τα κλάσματα **TRIC.2**, **TRIC.3** και **TRIC.4** υποβλήθηκαν σε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντιστρόφου φάσεως (RP₁₈-HPLC) με ανιχνευτή συστοιχίας διοδίων (DAD - Diode Array Detector). Για το **TRIC.2** και **TRIC.4** χρησιμοποιήθηκε η στήλη αντιστρόφου φάσεως Eurosphere-100 C18, 16mm, και η ροή ήταν 7mL/min. Πριν από κάθε ένεση τα δείγματα διαλύθηκαν σε 100% ACN και κάθε ενιόμενη ποσότητα ήταν όγκου 500-800 μl και συγκέντρωσης 10 mg/ml. Σε κάθε περίπτωση χρησιμοποιήθηκε διαβαθμισμένο σύστημα διαλυτών ACN: H₂O. Για το **TRIC. 3** χρησιμοποιήθηκε η στήλη αντιστρόφου φάσεως Eclipse XDB-C18, [5 μm, 9.4 x 250 mm] και η ροή ήταν 3 ml/min. Κάθε ενιόμενη ποσότητα ήταν όγκου 250μL και συγκέντρωσης 10mg/mL.

- **Κλάσμα TRIC.2**

Συνολικά 16 mg του κλάσματος υποβλήθηκαν σε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντιστρόφου φάσεως (RP₁₈-HPLC) και διαβαθμισμένο σύστημα διαλυτών ACN: H₂O, όπως αυτό φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Χρόνος (min)	H ₂ O	ACN
0	20	80
45	0	100

Από την χρωματογραφία αυτή απομονώθηκε και ταυτοποιήθηκε η ουσία: **1,2-διυδρο-3,6,8-τριυδροξυ-1,1-δισ(3-μεθυλοβουτ-2-ενυλο)-5-(1,1διμεθυλοπροπ-2-ενυλο)-ξανθεν-2,9-διόνη**, γνωστή ως **υπεριξανθόνη A** (R_t=12.60 min, 2.19mg) (ουσία 1).



Χρωματογράφημα του κλάσματος TRIC.2

- Κλάσμα **TRIC.3**

Όλη η ποσότητα του κλάσματος αυτού (56.62 mg) υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντιστρόφου φάσεως (RP₁₈-HPLC) και διαβαθμισμένο σύστημα διαλυτών ACN: H₂O, όπως αυτό φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Χρόνος (min)	H ₂ O%	ACN%
0	40	60
2	20	80
30	5	95
32	2	98
34	40	60
38	40	60

Από τη χρωματογραφία αυτή συλλέχθηκε ένα υποκλάσμα με κωδικό **TRIC.3.2** (2.15mg), το οποίο όμως ήταν μίγμα ουσιών, μεταξύ των οποίων και μία φλορογλυκινόλη, την οποία δεν καταφέραμε να ταυτοποιήσουμε καθώς η ποσότητα του κλάσματος ήταν ελάχιστη.

- Κλάσμα **TRIC.4**

Όλη η ποσότητα του κλάσματος υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντιστρόφου φάσεως (RP₁₈-HPLC) και διαβαθμισμένο σύστημα διαλυτών ACN: H₂O, όπως αυτό φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Χρόνος (min)	H ₂ O%	ACN
0	15	85
2	15	85
30	10	90
32	0	100

Από την χρωματογραφία αυτή απομονώθηκε και ταυτοποιήθηκε η ουσία: **α-λινολενικό οξύ** (Rt=14.61min, 6.8mg) (ουσία **11**)

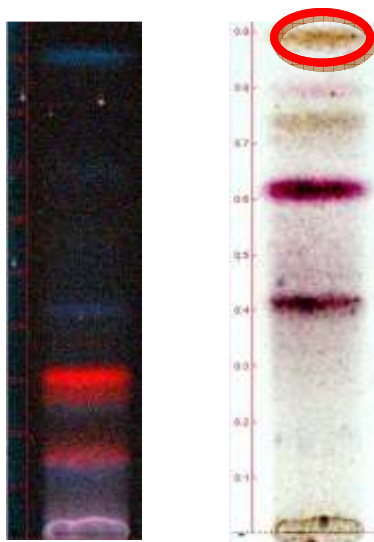
Χρωματογραφικός διαχωρισμός του κλάσματος TRIC.6 (94.78mg)

Το κλάσμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης (31 x 1.5 cm) επί γέλης πυριτίου (SDS 2050044) με υγρό έκλουσης μίγμα διαλυτών Hex: EtOAc αυξανόμενης πολικότητας. Η ροή ήταν 2 ml/ min και ελήφθησαν συνολικά 458 κλάσματα όγκου 2 ml. Τα πρώτα 300 κλάσματα παραλήφθηκαν με αναλογία διαλυτών Hex: EtOAc (93: 7) και τα υπόλοιπα με αναλογία Hex: EtOAc (90: 10).

Κατόπιν ελέγχου με αναλυτική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, με σύστημα διαλυτών ανάπτυξης Hexane: EtOAc: CH₃COOH (80:20:2) ακολούθησαν οι ακόλουθες 6 συνενώσεις: TRIC.6.1 (1→17, 5.9mg), TRIC.6.2 (18→29, 11.21mg), TRIC.6.3 (30→54, 1.64mg) TRIC.6.4 (55→83, 1.45mg) TRIC.6.5 (84-199, 8.40mg) TRIC.6.6 (200-458, 36.41mg)

Ακολούθησε έλεγχος με αναλυτική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, με σύστημα διαλυτών ανάπτυξης Hexane: EtOAc: CH₃COOH (65:33:2), καθώς και φασματοσκοπικός έλεγχος.

Τα κλάσματα **TRIC.6.2** και **TRIC.6.5** επιλέγησαν για περαιτέρω ανάλυση.



Αρχικό κλάσμα **TRIC.6**

Αριστερά: 366nm χωρίς ψεκασμό

Δεξιά.: ορατό, ψεκασμός με AA/H₂SO₄

Έχει επισημανθεί με κόκκινο η ζώνη που θα επιχειρηθεί να διαχωρισθεί.

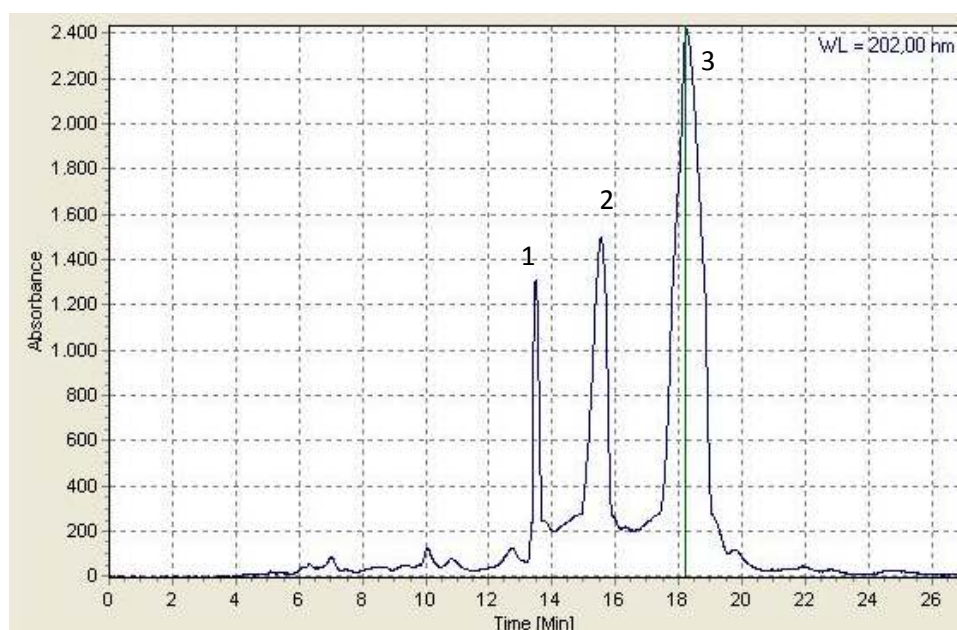
Χρωματογραφικός διαχωρισμός των ομάδων:

TRIC.6.2 (18→29, 11.21mg) και **TRIC.6.5** (84-199, 8.40mg).

- Ομάδα **TRIC.6.2** (11.21mg)

Συνολικά 11.00 mg υποβλήθηκαν σε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντιστρόφου φάσεως (RP₁₈-HPLC) με 100% ACN. Η πρώτη έκλουση πραγματοποιήθηκε για 45 min, αλλά καθώς όλα τα συστατικά εκλούστηκαν τα πρώτα 20 min ο χρόνος της χρωματογραφικής ανάλυσης μειώθηκε στα 27 min. Ως στήλη χρησιμοποιήθηκε η στήλη αντιστρόφου φάσεως Eclipse XDB-C18 [5 μm, 9.4 x 250 mm] και η ροή ήταν 3 ml/min. Κάθε ενιόμενη ποσότητα ήταν όγκου 250μL και συγκέντρωσης 10mg/mL.

Χρόνος (min)	ACN%
0	100
27	100

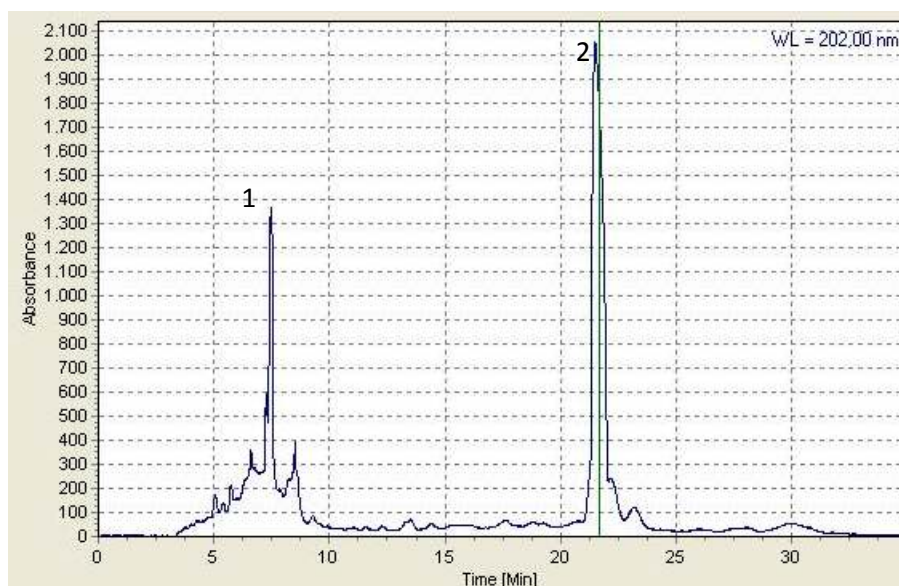


Από το παραπάνω χρωματογράφημα η ουσία με κωδικό TRIC.6.3 απομονώθηκε και ταυτοποιήθηκε ως **1-υδροξυ-(6-αποπρενυλο-6,13-μεθυλο-υπερφορίνη) 8,1-ημιακετάλη** ((1.95mg, t_R 18.55) (ουσία 9)

- Ομάδα **TRIC.6.5** (8.40 mg)

Όλη η ποσότητα υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντιστρόφου φάσεως (RP₁₈-HPLC) με 100% ACN. Η πρώτη έκλουση πραγματοποιήθηκε για 45 min, αλλά καθώς όλα τα συστατικά εκλούστηκαν τα πρώτα 25 min ο χρόνος της χρωματογραφικής ανάλυσης μειώθηκε στα 35 min. Ως στήλη χρησιμοποιήθηκε η στήλη αντιστρόφου φάσεως Eclipse XDB-C18 [5 μm, 9.4 x 250 mm] και η ροή ήταν 3 ml/min. Κάθε ενιόμενη ποσότητα ήταν όγκου 250μL και συγκέντρωσης 10mg/mL.

Χρόνος (min)	ACN%
0	100
35	100



Το κύριο συστατικό της χρωματογραφίας αυτής (κορυφή 2) απομονώθηκε και ταυτοποιήθηκε ως **trans-φυτόλη** (ουσία **10**) (1.65 mg, t_R 21.44).

B.3.2. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΜΕΘΑΝΟΛΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ: TRIM

Το μεθανολικό εκχύλισμα (28.9808g) αρχικά υποβλήθηκε σε διαχωρισμό με υγρή-υγρή εκχύλιση. Το σύνολο του μεθανολικού εκχυλίσματος διαλύθηκε σε H₂O (300 ml). Με τη βοήθεια διαχωριστικής χοάνης η υδατική φάση εκχυλίστηκε διαδοχικά με οργανικούς διαλύτες αυξανόμενης πολικότητας: EtOAc και BuOH (η διαδικασία επαναλήφθηκε τρεις φορές για κάθε διαλύτη και κάθε φορά χρησιμοποιήθηκαν 300 ml από κάθε διαλύτη). Όλοι οι διαλύτες είχαν προηγουμένως κορεστεί με νερό. Τα τρία κλάσματα που προέκυψαν από αυτή τη διαδικασία συμπυκνώθηκαν σε χαμηλή θερμοκρασία (40° C) σε περιστροφική συσκευή αποστάξεως υπό κενό και παρουσιάζονται με σειρά αυξανόμενης πολικότητας στον παρακάτω πίνακα:

Διαλύτης εκχύλισης	Κωδικός	Βάρος (g)	Απόδοση (% β/β σε ξηρή δρόγη)
EtOAc	TRIM-A	7.3475	25.35
BuOH	TRIM-B	6.1148g	21.10
H ₂ O	TRIM-C	11.1g	38.30

Επιλέχθηκε για περαιτέρω μελέτη το κλάσμα **TRIM-A**.

Κλάσμα **TRIM-A** (7.3475 g)

Μέρος του κλάσματος υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης επί Sephadex LH-20 (30 x 4 cm) με ισοκρατική έκλουση με σύστημα διαλυτών MeOH:H₂O 70:30 % και ροή 0.5 ml/ min.

Ελήφθησαν 416 κλάσματα μέσου όγκου 10.0 ml. Συνενώθηκαν στις ομάδες που εμφανίζονται στον παρακάτω πίνακα κατόπιν ελέγχου με αναλυτική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας επί:

- γελής πυριτίου (Merck, Art. 5554) με μίγμα διαλυτών ανάπτυξης EtOAc: MeOH (30:70)
- μικροκρυσταλλικής κυτταρίνης (cellulose) με διαλύτη ανάπτυξης AcOH 30%

Κλάσμα	Κωδικός	Βάρος (mg)
1-9	tri-a	45
11-17	tri-b	324.8
18-27	tri-c	534.6
28-36	tri-d	238.4
37-53	tri-e	417.7
54-58	tri-f	77.0
59-63	tri-g	189.7
74-98	tri-h	94.2
99-128	tri-i	77.6
129-138	tri-j	67.0
139-172	tri-k	53.3
173-213	tri-l	58.8
214-279	tri-m	69.9
280-286	tri-n	5.5
287-416	tri-o	5.8

Ακολούθησε χρωματογραφικός έλεγχος επί λεπτής στιβάδας:

- γέλης οξειδίου του πυριτίου και μίγμα διαλυτών ανάπτυξης EtOAc: AcOH: H₂O (6.5:1.5:2)
- μικροκρυσταλλικής κυτταρίνης (cellulose) με διαλύτη ανάπτυξης AcOH 30%
Επιλέγησαν για περαιτέρω μελέτη τα κλάσματα **tri-c**, **tri-f**, **tri-j**, **tri-m**.

- Κλάσμα **tri-f** (77.0 mg)

Το κλάσμα tri-f σε διάλυμα συγκέντρωσης 7.0 mg/ml, υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντιστρόφου φάσεως (RP₁₈-HPLC) με ανιχνευτή διαθλασίμετρο, με ροή 1 ml/min και ως διαλύτη έκλουσης το ισοκρατικό μίγμα μεθανόλης-οξικού οξέος 5% (MeOH:AcOH 5%) σε αναλογία 40:60. Από την χρωματογραφία αυτή απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν οι ουσίες: **μυρικιτρίνη** (R_t= 22 min, 23.8 mg) (ουσία **6**), **υπεροσίδης** (R_t= 27.2 min, 1.2 mg) (ουσία **4**) και **κερκιτρίνη** (R_t=39.7 min, 8.1 mg) (ουσία **3**).

- Κλάσμα **tri-j** (67.0 mg)

Το κλάσμα **tri-j** σε διάλυμα συγκέντρωσης 7.0 mg/ml, υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντιστρόφου φάσεως (RP₁₈-HPLC) με ανιχνευτή διαθλασίμετρο, με ροή 1 ml/min και ως διαλύτη έκλουσης το ισοκρατικό μίγμα μεθανόλης-οξικού οξέος 5% (MeOH:AcOH 5%) σε αναλογία 60:40. Από την χρωματογραφία αυτή απομονώθηκε και ταυτοποιήθηκε η ουσία: **προκουανιδίνη A2** (Rt=20.0 min, 4.0mg) (ουσία 7).

- Κλάσμα **tri-m** (69.9 mg)

Υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης (15 cm x 1.25cm) επί Sephadex LH-20 με υγρό έκλουσης μεθανόλη (MeOH 100%). Συνολικά ελήφθησαν 37 κλάσματα μέσου όγκου 10.0 mL. Ακολούθησε αναλυτική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας επί μικροκρυσταλλικής κυτταρίνης (cellulose) με διαλύτη ανάπτυξης AcOH 30%, καθώς και επί γέλης οξειδίου του πυριτίου, με σύστημα διαλυτών ανάπτυξης EtOAc:AcOH:H₂O (6.5:1.5:2.0). Προέκυψαν οι ακόλουθες συνενώσεις: tri-m-A (1→8, 22.4mg), tri-m-B (9→11, 3.9 mg) tri-m-C (12→13, 14.6mg) **tri-m-D (14, 6.5mg)** tri-m-E (15→18, 10.3mg) tri-m-F (19→28, 2.6 mg), tri-m-G (29→34, 1.0mg) tri-m-H (35→37, 0.7mg)

Το κλάσμα **tri-m-D** μετά από φασματοσκοπικό έλεγχο ταυτοποιήθηκε ως **I3, Π8-διαπιγενίνη (6.5 mg)** (ουσία 2)

- Κλάσμα **tri-c** (534.6 mg)

Υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης (28.0cm x 2cm) επί Sephadex LH-20 με υγρό έκλουσης μεθανόλη (MeOH 100%). Συνολικά ελήφθησαν 37 κλάσματα μέσου όγκου 10.0 mL. Κατόπιν ελέγχου με αναλυτική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας επί μικροκρυσταλλικής κυτταρίνης (cellulose) με διαλύτη ανάπτυξης AcOH 30% πραγματοποιήθηκαν οι ακόλουθες συνενώσεις: tri-c-A (1→15, 70.8mg) tri-c-B (16→20, 228.9mg) **tri-c-C (21→24, 53.0mg)**, tri-c-D (25→26, 5.4mg) tri-c-E (27→28, 2.7mg) tri-c-F (29-31, 2.9mg) tri-c-G (32→37, 2.8mg)

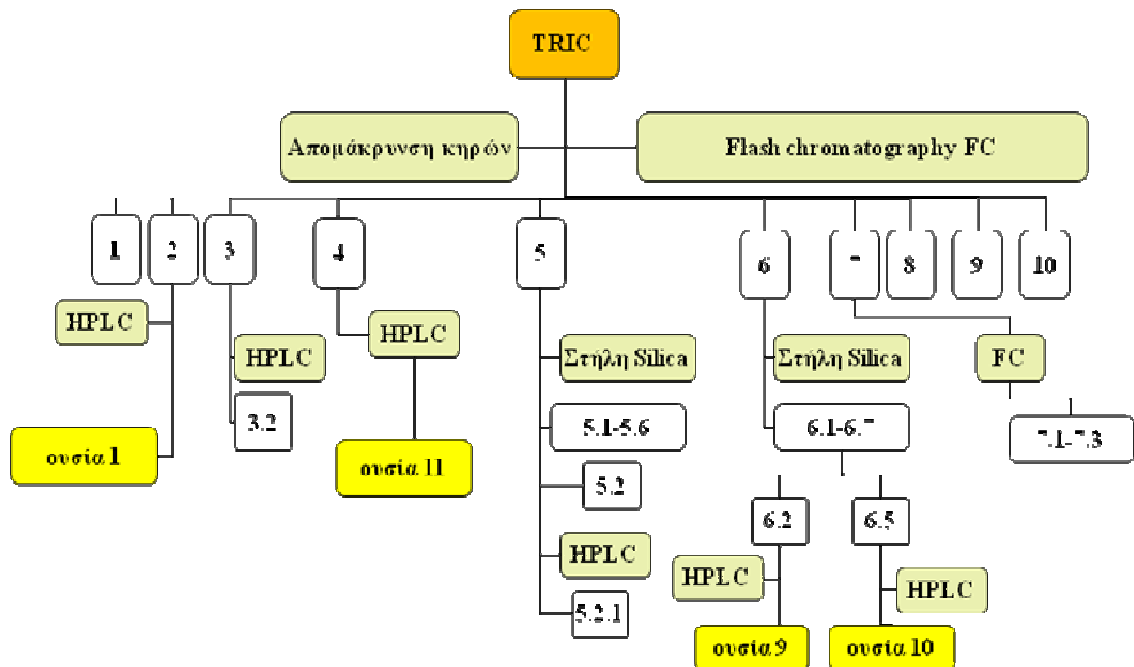
Από τα παραπάνω κλάσματα, το κλάσμα **tri-c-C** (53.0 mg) υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης (5.5 cm x 1.5 cm) επί γέλης πυριτίου (SDS 2050044) με υγρό έκλουσης μίγμα διαλυτών Cyhex: DM: MeOH: H₂O αυξανόμενης πολικότητας. Ελήφθησαν συνολικά 47 κλάσματα. Για το πρώτο κλάσμα συλλέχθηκαν 40.0 mL, ενώ για το δεύτερο 30.0 mL. Τα υπόλοιπα κλάσματα ήταν μέσου όγκου 10.0 mL. Το σύστημα διαλυτών είχε την διαβάθμιση, που περιγράφεται στον παρακάτω πίνακα:

Κλάσματα	Cyhex	DM	MeOH	H ₂ O
1	100	-	-	-
2-3	-	100	-	-
3 -20	-	90	10	1
21-25	-	85	15	1,5
26-27	-	75	25	2,5
28-34	-	70	30	3
35-38	-	60	40	4
39-44	-	50	50	5
45-47	-	-	100	-

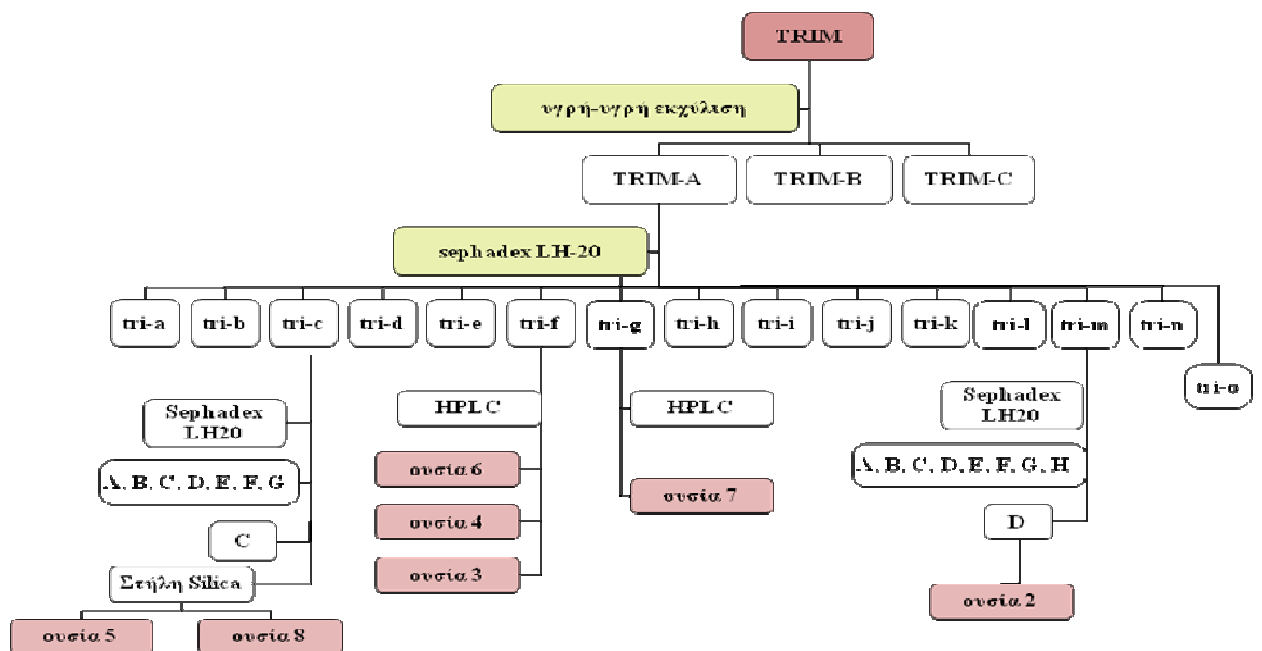
Μετά από χρωματογραφικό έλεγχο λεπτής στιβάδας επί γέλης οξειδίου του πυριτίου, με σύστημα διαλυτών ανάπτυξης DM:MeOH:H₂O (65:33:2) και επί μικροκρυσταλλικής κυτταρίνης (cellulose) με διαλύτη ανάπτυξης AcOH 30% πραγματοποιήθηκαν οι ακόλουθες συνενώσεις: **tri-c-CA** (1→17, 1.6mg), **tri-c-CB** (18→25, 1.9 mg), **tri-c-CC** (26→29, 4.1mg) **tri-c-CD** (30→35, 6.9 mg), **tri-c-CE** (37→39, 2.0 mg), **tri-c-CF** (40→47, 4.5 mg).

Ακολούθησε φασματοσκοπικός έλεγχος για τα κλάσματα **tri-c-CB** και **tri-c-CE** τα οποία ταυτοποιήθηκαν ως **ρουτίνη** (ουσία **5**) (1.9 mg) και **χλωρογενικό οξύ** (ουσία **8**) (2.0 mg).

Σχηματική παράσταση του χρωματογραφικού διαχωρισμού του
κυκλοεξανικού εκχυλίσματος TRIC



Σχηματική παράσταση του χρωματογραφικού διαχωρισμού του
μεθανολικού εκχυλίσματος TRIM



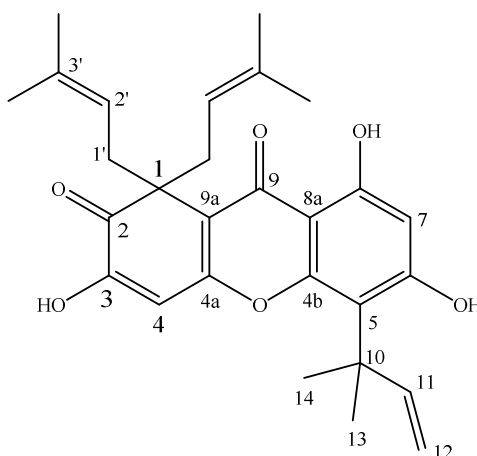
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

I. ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΠΑΡΑΓΩΓΑ

Γ. 1. ΞΑΝΘΟΝΕΣ

Γ.1.1. Ουσία 1: Υπεριξανθόνη Α

1,2-διυδρο-3,6,8-τριυδροξυ-1,1-δισ(3-μεθυλοβουτ-2-ενυλο)-5-(1,1διμεθυλοπροπ-2-ενυλο)-ξανθεν-2,9διονη



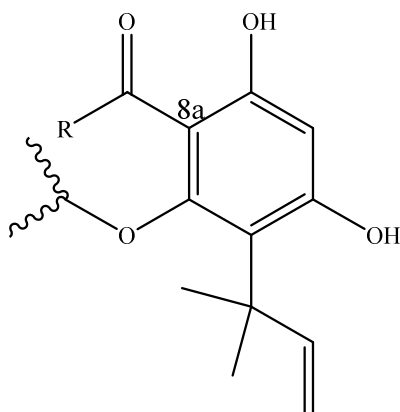
Η ουσία **1** απομονώθηκε ως κίτρινο ελαιώδες υπόλειμμα και ταυτοποιήθηκε μετά από φασματοσκοπική μελέτη και φασματομετρία μάζας. Ανήκει στη χημική κατηγορία των ξανθονών, έχει μάζα $[M-H]^-$ m/z 464.2149, η οποία αντιστοιχεί στο μοριακό τύπο $C_{28}H_{32}O_6$.

Κατά την πρώτη ανάγνωση των φασμάτων υπήρξε η εντύπωση ότι πρόκειται για παράγωγο φλορογλυκινόλης, καθότι αφενός η εικόνα της χρωματογραφίας επί λεπτής στιβάδας των δύο αυτών ομάδων είναι παρόμοια και αφετέρου αρχικά εντοπίστηκαν και συνδυάστηκαν μέσω φασματοσκοπίας HMBC τα σήματα ενός αρωματικού πυρήνα, ο οποίος είναι δομικό συστατικό του φλορογλυκινολικού σκελετού (C4b-C8a).

Η προσεκτική μελέτη των φασμάτων έδειξε ότι η υποκατάσταση του αρωματικού δακτυλίου έχει ως εξής:

- Υπάρχει ένα αρωματικό πρωτόνιο, το οποίο εμφανίζει απλή κορυφή σε δ_H 6.29 (1H, s, H-7) και βρίσκεται πάνω στον πλέον θωρακισμένο άνθρακα του αρωματικού αυτού πυρήνα, στον C-7 (δ_C 101.6).
- Πάνω σε αυτόν τον αρωματικό πυρήνα εντοπίστηκαν τρεις οξυγονωμένοι άνθρακες: C-6 (δ_C 161.3), C-4b (δ_C 154.8) και C-8 (δ_C 161.1). Μάλιστα, όπως προκύπτει και από το φάσμα HSQC οι άνθρακες C-6 και C-8 φέρουν υδροξύλια, τα οποία εμφανίζονται σε δ_H 7.09 (s, 6-OH) και δ_H (s, 13.42, 8-OH). Στο φάσμα HMBC, το 6-OH δίνει σήμα διασταύρωσης με τους άνθρακες C-5 και C-6, ενώ το 8-OH με τους άνθρακες C-7, C-8 και C-8a.

- Οι δύο εναπομείναντες μη οξυγονωμένοι άνθρακες του σκελετού είναι περισσότερο αποθωρακισμένοι συγκριτικά με τον C-7: C-5 (δ_C 109.2) και C-8a (δ_C 105.7). Αυτό υποδηλώνει ότι είναι υποκατεστημένοι. Συγκεκριμένα ο C-5 στο φάσμα HMBC δίνει σήμα διασταύρωσης με τα μεθυλικά πρωτόνια της θέσης 13 και 14, τα οποία αποτελούν μέρος μίας 1,1-διμεθυλο-προπ-2-ενυλο-ομάδας, η οποία ταυτοποιείται από το σύνολο των σημάτων σε δ_H : 6.44 (1H, dd ($J=17.8/10.6$ Hz, H-11), 5.40 (1H, d, $J=10.5$ Hz, H-12a), 5.48 (1H, d, $J=17.7$, H-12b), 1.68 (6H, s, H-13 και H-14). Επίσης, ο C-8a φέρει καρβονυλομάδα (C-9, δ_C 179.7) και αυτό αποδεικνύεται από την έντονη αποθωράκιση του πρωτονίου του γειτονικού υδροξυλίου στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (8-OH, s, δ_H 13.42), η οποία δικαιολογείται μόνο από τη δημιουργία δεσμού υδρογόνου μεταξύ του υδροξυλίου και του καρβονυλίου της θέσης 9. Από τα παραπάνω δεδομένα προκύπτει ο παρακάτω σκελετός:



Με βάση την αρχική υπόθεση ότι πρόκειται για παράγωγο φλορογλυκινόλης, ο υποκαταστάτης R θα έπρεπε να είναι τέτοιος, ώστε η υποκατάσταση της θέσης 8a να είναι μια αλειφατική ακυλομάδα. Κάτι τέτοιο όμως δεν επαληθεύεται, καθώς στην περιοχή δ_H 2-4 του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ απουσιάζει η χαρακτηριστική πολλαπλή κορυφή πρωτονίου αλειφατικής ακυλομάδας.

Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με το δεδομένο ότι ένα υδρογόνο διπλού δεσμού (H-4, s, δ_H 6.48) δίνει σήματα στο φάσμα HMBC με μια εντελώς διαφορετική ομάδα αποθωρακισμένων ανθράκων σε δ_C : 116.2 (C-9a), 151.6 (C-3), 151.2 (C-4a) και 201.2 (C-2) μας οδήγησε στο συμπέρασμα ότι το μόριο διαθέτει τρεις δακτυλίους και δεν είναι παράγωγο φλορογλυκινόλης, αλλά ξανθόνης.

Το μόριο αυτό της ξανθόνης, εκτός από την 1,1-διμεθυλο-προπ-2-ενυλο-ομάδα της θέσης 5 που περιγράφηκε παραπάνω, έχει τους εξής επιπλέον υποκαταστάτες:

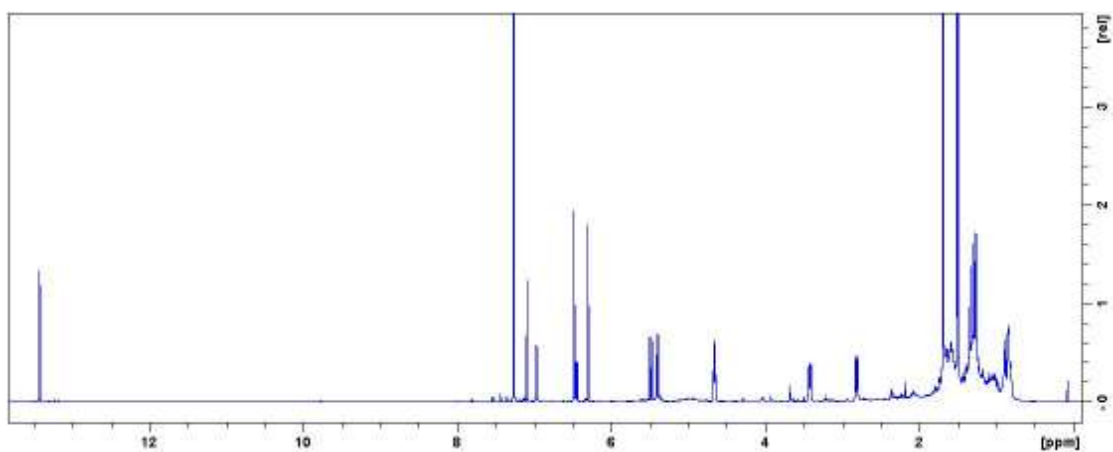
- Το σύνολο των σημάτων σε δ_H : 4.66 (2H, t, $J=7.7\text{Hz}$, H-2'), 3.40 (2H, dd, $J=13.8/7.1\text{Hz}$, H1'), 2.81 (2H, dd, $J=13.8/7.9\text{Hz}$, H1'), 1.51 (6H, s) και 1.49 (6H, s) είναι χαρακτηριστικό της παρουσίας gem δι (3-μεθυλοβουτ-2-ενυλο)-ομάδας, η οποία είναι συνδεδεμένη, σύμφωνα με το φάσμα HMBC, πάνω σε ένα sp^3 άτομο άνθρακα (C-1, δ_C 55.9) (Azebaze et al., 2006).
- Το πρωτόνιο, που στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$, δίνει απλή κορυφή σε δ_H 6.97, στο φάσμα HSQC δεν συνδέεται με άτομο άνθρακα, άρα είναι υδροξύλιο, το οποίο βάσει του φάσματος HMBC φαίνεται να είναι γειτονικό της θέσης 4 (J_3) και αντιστοιχεί στο 3-OH.

Ο συνδυασμός των παραπάνω πληροφοριών οδήγησε στην ταυτοποίηση του μορίου ως 1,2-διυδρο-3,6,8-τριυδροξυ-1,1-δισ (3-μεθυλοβουτ-2-ενυλο)-5-(1,1-διμεθυλοπροπ-2-ενυλο)-ξανθεν-2,9-διόνη.

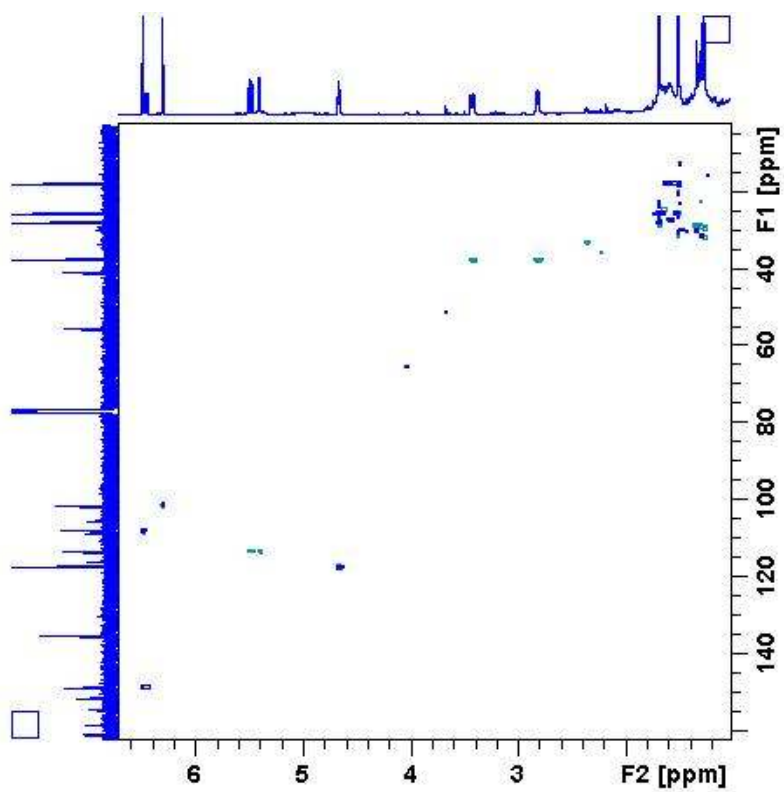
Το μόριο αυτό έχει απομονωθεί άλλες δύο φορές από το γένος *Hypericum* L., από το *H. erectum* Thunb. (An et al., 2002) και το *H. sampsonii* Hance (Xiao et al., 2008). Έχει επιδείξει αντιβακτηριακή δράση έναντι του ανθεκτικού στη νορφλοξασίνη στελέχους του *S. aureus* (SA- 1199B) με ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Xiao et al., 2008).

Πίνακας Γ.1.1.: Φασματοσκοπικά δεδομένα της ουσίας 1 (CDCl₃, 600 MHz)

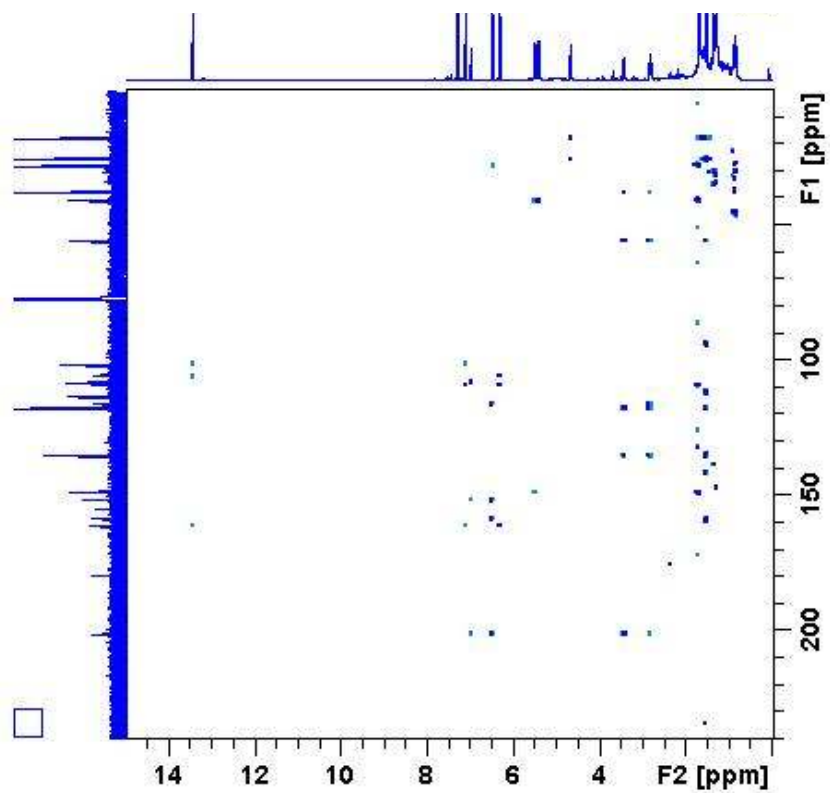
Θέση	Τύπος C	δ _C	δ _H	Αρ. H	Πολλαπλότητα J (Hz)	HMBC
1	C	55.8	-	-	-	-
2	C	201.2	-	-	-	-
3	C	158.6	-	-	-	-
4	CH	108.1	6.48	1	s	2, 3, 4a, 9a
4a	C	151.8	-	-	-	-
4b	C	154.8	-	-	-	-
5	C	109.2	-	-	-	-
6	C	161.3	-	-	-	-
7	CH	101.6	6.29	1	s	5, 8
8	C	161.1	-	-	-	-
8a	C	105.7	-	-	-	-
9	C	179.7	-	-	-	-
9a	C	116.2	-	-	-	-
10	C	40.9	-	-	-	-
11	CH	149.0	6.44	1	dd (J=17.8/10.6)	13, 14
12	CH ₂	113.6	5.40	2	d (J=10.5)	10, 11
			5.48		d (J=17.7)	
13	CH ₃	28.1	1.68	3	s	5, 10, 11, 12, 13
14	CH ₃	28.1	1.68	3	s	5, 10, 11, 12, 13
1'	CH ₂	37.8	3.42	2	dd (J=13.8/7.1)	2, 2', 3'
			2.81	2	dd (J=13.8/7.9)	2, 9a, 2', 3'
2'	CH	117.7	4.66	2	t (J=7.7)	1', 4', 5'
3'	C	135.3	-	-	-	-
4'	CH ₃	25.7	1.49	6	s	1, 2', 3', 5'
5'	CH ₃	17.9	1.51	6	s	2', 3', 4'
3-OH	-	-	6.97	1	s	2, 4, 4a, 7
6-OH	-	-	7.09	1	s	5, 6
8-OH	-	-	13.42	1	s	7, 8, 8a



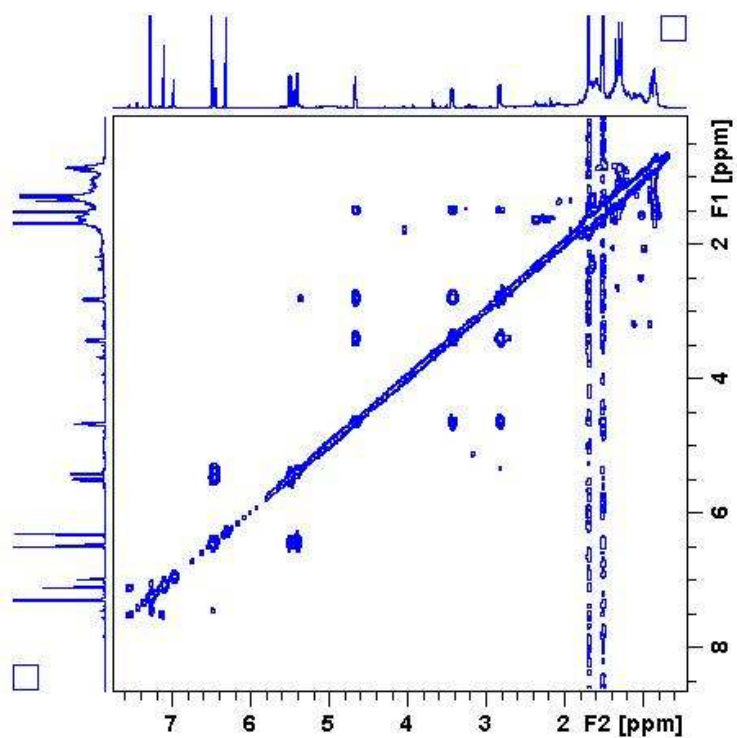
Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ουσίας **1**



Φάσμα HSQC της ουσίας **1**



Φάσμα HMBC της ουσίας 1

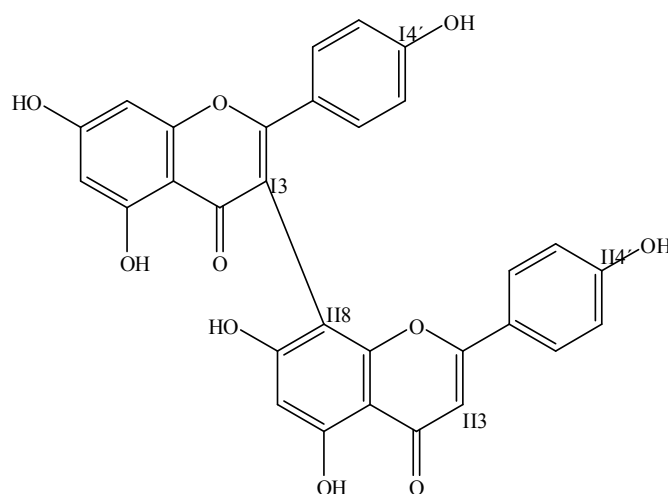


Φάσμα COSY της ουσίας 1

Γ. 2 ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ

Γ.2.1. Ουσία 2: Ι3-Π8-Διαπιγενίνη

Ι5,Π5,Ι7,Π7-τετραϋδροξυ-Ι2,Π2-δι(4-υδροξυφαινυλο)-[Ι3,Π8-δι-4Η-1-βενζοπυρανο]-Ι4,Π4-διδόνη



Πρόκειται για διφλαβονοειδές με μοριακό τύπο $C_{30}H_{18}O_{10}$, που απομονώθηκε ως καστανοκίτρινο υπόλειμμα και ταυτοποιήθηκε μετά από φασματοσκοπική μελέτη και σύγκριση με τα βιβλιογραφικά δεδομένα (Tatsis et al. 2007).

Η Ι3, Π8-διαπιγενίνη, όπως και η αμεντοφλαβόνη, είναι χαρακτηριστικές ενώσεις στο υπερίκο, εμφανίζονται αποκλειστικά στα άνθη και σε αυτές προσδίδονται ιδιότητες αντι-φλογιστικές και κατασταλτικές (Butterweck & Schmidt, 2007).

Όλες οι κορυφές, που εμφανίζονται στο φάσμα ^1H-NMR – συνολικά οκτώ - εντοπίζονται στην αρωματική περιοχή. Τέσσερις από αυτές ολοκληρώνουν για δύο πρωτόνια και οι υπόλοιπες για ένα πρωτόνιο. Αναλυτικότερα:

- Τα πρωτόνια σε δ_H 7.35 (2H, d, $J=8.8$ Hz) ανήκουν σε κοινό αρωματικό σύστημα με τα πρωτόνια σε δ_H 6.61 (2H, d, $J=8.9$ Hz), όπως προκύπτει από το φάσμα COSY και βρίσκονται σε θέση ορθο-μεταξύ τους.
- Αντίστοιχα, τα πρωτόνια σε δ_H 7.52 (2H, d, $J=8.9$ Hz) και δ_H 6.75 (2H, d, $J=8.9$ Hz) ανήκουν στο ίδιο αρωματικό σύστημα και βρίσκονται επίσης σε ορθο-σύζευξη μεταξύ τους.

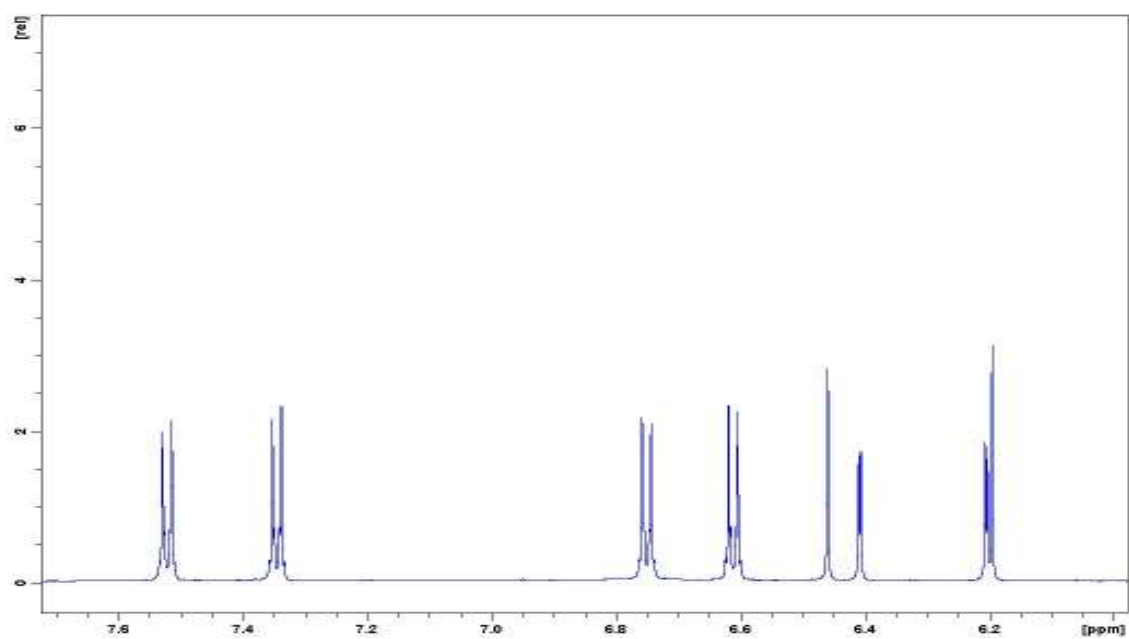
Τα παραπάνω δεδομένα υποδηλώνουν την ύπαρξη δύο π-υποκατεστημένων δακτυλίων, γεγονός που παραπέμπει στη δομή απιγενίνης και στη συγκεκριμένη περίπτωση διαπιγενίνης. Από τις υπόλοιπες κορυφές:

- Τα πρωτόνια σε δ_H 6.21 και 6.41 εμφανίζουν μετα-σύζευξη μεταξύ τους ($J=2.1$ Hz)
- Τα πρωτόνια σε δ_H 6.46 και 6.20 δεν φαίνεται να ανήκουν σε κοινό αρωματικό σύστημα, καθώς εμφανίζονται ως απλές κορυφές και δεν δίνουν σήματα διασταύρωσης στο φάσμα COSY.

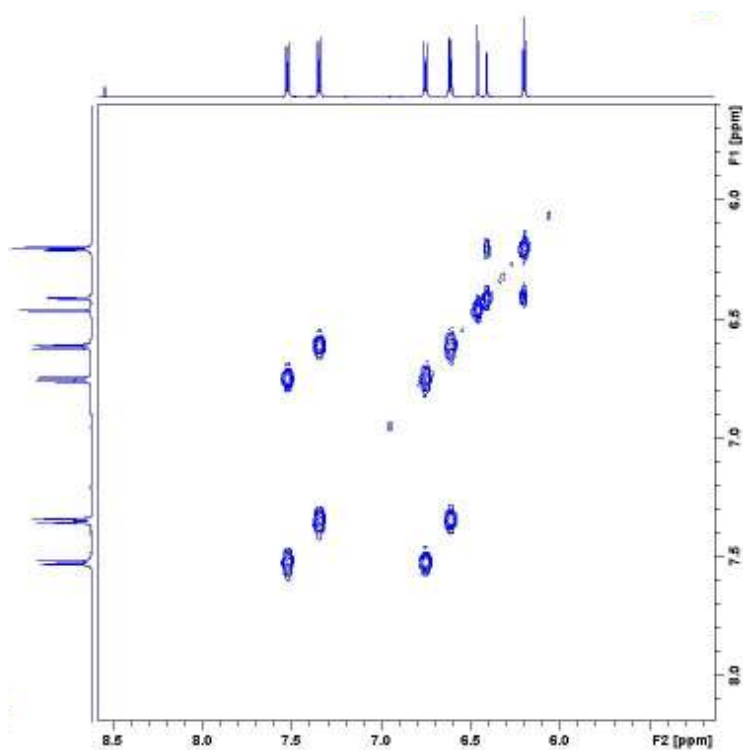
Κάνοντας την υπόθεση ότι πρόκειται για διφλαβονοειδές και σε συνδυασμό με τα παραπάνω δεδομένα θεωρήθηκε ότι η θέση σύνδεσης των δύο φλαβονοειδών είναι η θέση 3 του ενός μορίου και η θέση 8 του δεύτερου, καθώς απουσιάζει μια δεύτερη μετα-σύζευξη. Ο συνδυασμός των ανωτέρω δεδομένων οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το μόριο της Ι3, Π8-διαπιγενίνης, γεγονός, που επιβεβαιώθηκε έπειτα από τη σύγκριση με τα βιβλιογραφικά δεδομένα (Tatsis et al., 2007).

Πίνακας: Φασματοσκοπικά δεδομένα της ουσίας 2 (CD₃OD, 600 Hz)

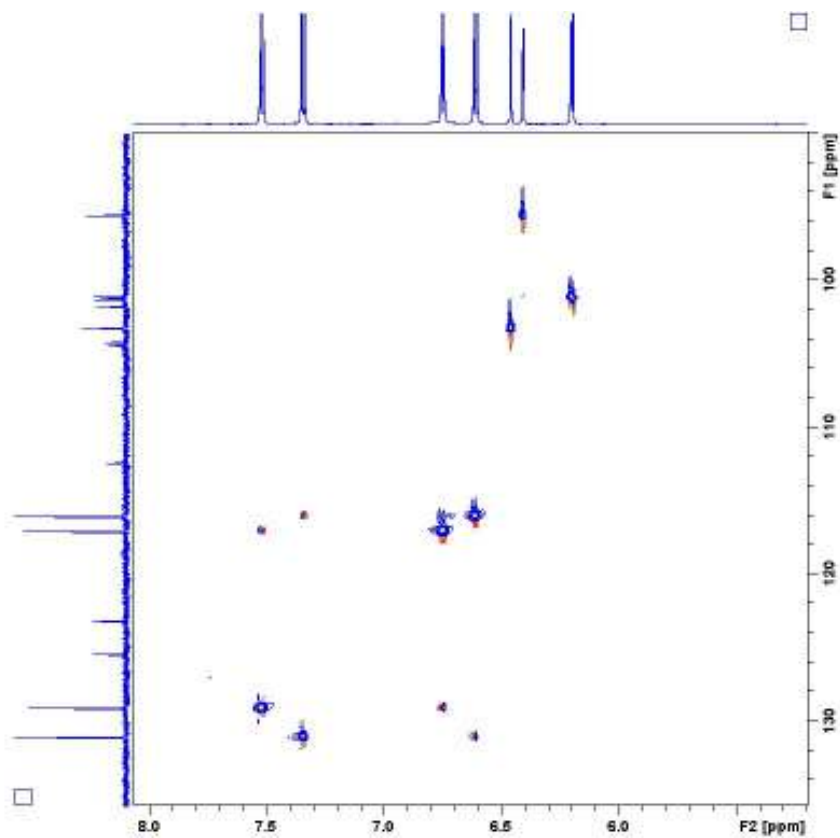
Θέση	Τύπος C	δ_C	δ_H	Αρ. H	Πολλαπλότητα J (Hz)	HMBC
I2	C	165.5	-	-	-	-
I3	C	112.4	-	-	-	-
I4	C	182.8	-	-	-	-
I5	C	163,3	-	-	-	-
I6	CH	101.1	6.21	1	d (J=2.1)	I3,I5,I7,I8,I10
I7	C	169.1	-	-	-	-
I8	CH	95.5	6.41	1	d (J=2.1)	I6,I7,I10
I9	C	159.8	-	-	-	-
I10	C	104.2	-	-	-	-
II'	C	152.4	-	-	-	-
I2'/I6'	CH	131.0	7.35	2	d (J=8.8)	I2, I4'
I3'/I5'	CH	116.0	6.61	2	d (J=8.9)	II', I3'/I5'
I4'	C	161.2	-	-	-	-
II2	C	165.5	-	-	-	-
II3	C	103.2	6.46	1	s	II2,II4,II10,II1'
II4	C	183.6	-	-	-	-
II5	C	162.9	-	-	-	-
II6	CH	101.2	6.20	1	s	II7,II8,II10
II7	C	168.2	-	-	-	-
II8	C	101.7	-	-	-	-
II9	C	157.0	-	-	-	-
II10	C	104.3	-	-	-	-
II1'	C	123.1	-	-	-	-
II2'/II6'	CH	129.0	7.52	2	d (J=8,9)	II2,II3'/II5',II4'
II3'/II5'	CH	117.0	6.75	2	d (J=8.8)	II1', II4'
II4'	C	162.9	-	-	-	-



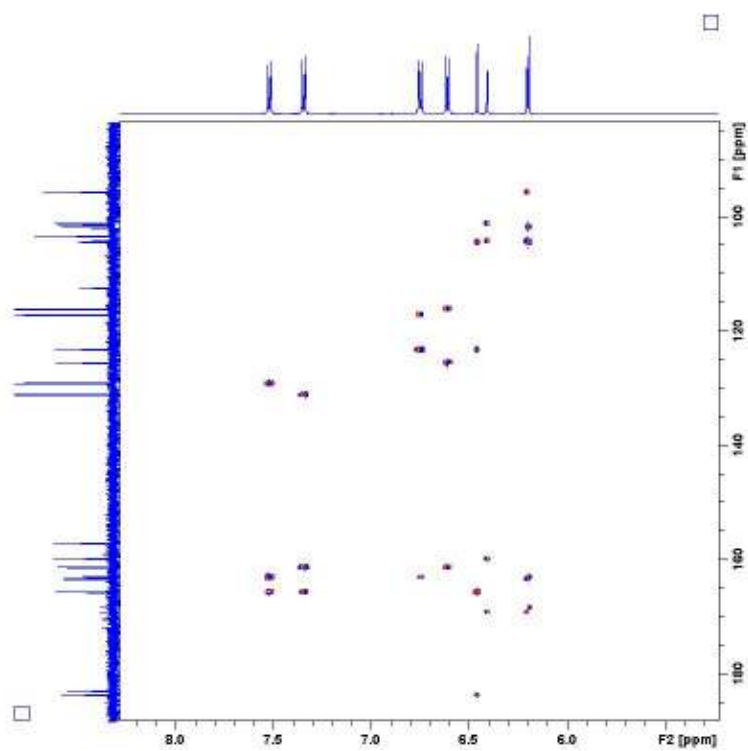
Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ ουσίας **2**



Φάσμα COSY της ουσίας **2**

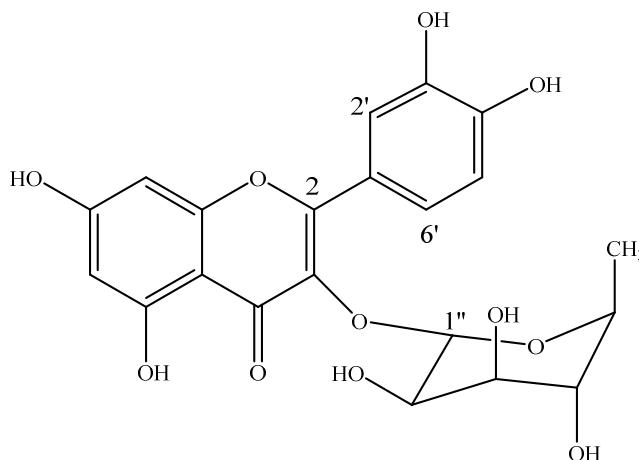


Φάσμα HSQC της ουσίας 2



Φάσμα HMBC της ουσίας 2

Γ.2.2. Ουσία 3: Κερκιτρίνη
Κερκετινο-3-O-α- L-ραμνοσίδης



Η ουσία **3** απομονώθηκε ως υποκίτρινο υπόλειμμα και ταυτοποιήθηκε μετά από φασματοσκοπική ανάλυση και σύγκριση με τα βιβλιογραφικά δεδομένα. Έχει μοριακό τύπο $C_{21}H_{20}O_{11}$ και προκειται για ένα γλυκοσίδη φλαβονοειδούς.

Κατά τη φασματοφωτομετρική εξέταση της ουσίας (φάσματα υπεριώδους-ορατού) ελήφθησαν χαρακτηριστικές καμπύλες με τα ακόλουθα μέγιστα (nm):

	Κορυφή II		Κορυφή I		Δλ I
			Ib	Ia	
MeOH	254	297sh		347	
MeONa	272	326		395 ↑	+48
AlCl ₃	270	303 sh		422	+75
AlCl ₃ / HCl	267	299 sh	350	399	+52
NaOAc	262 (Δλ=+8)	299 sh		391	
NaOAc / H ₃ BO ₃	262	301 sh		367	+20

Από την τιμή απορρόφησης της πρώτης κορυφής του μεθανολικού διαλύματος (347 nm) συμπεραίνεται ότι η ουσία ανήκει στις φλαβονόλες. Με την προσθήκη MeONa παρατηρείται βαθυχρωμική μετατόπιση κατά +48 nm της κορυφής I και ταυτόχρονα

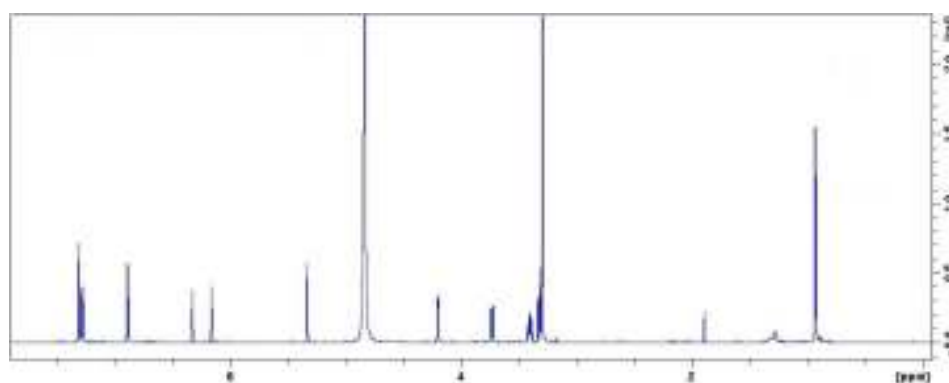
αύξηση της εντάσεώς της, οπότε συμπεραίνουμε ότι το 4'-OH είναι ελεύθερο. Η βαθυχρωμική μετατόπιση κατά +75 nm της I κορυφής μετά την προσθήκη AlCl_3 , οφείλεται στο σχηματισμό συμπλόκου μεταξύ της κετονομάδας και του υδροξυλίου της θέσεως 5, το οποίο μετά την προσθήκη $\pi.\text{HCl}$ διασπάται, γεγονός που υποδηλώνει την παρουσία συστήματος o-OH στο B δακτύλιο. Αυτό επιβεβαιώνεται και μετά την προσθήκη $\text{NaOAc}/\text{H}_3\text{BO}_3$ ($\Delta\lambda=+20$ nm). Το -OH της θέσης 7 είναι ελεύθερο, διότι στο φάσμα με NaOAc παρατηρείται βαθυχρωμική μετατόπιση της κορυφής II κατά +8 nm.

Με την πρώτη ανάγνωση του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ έγινε φανερό ότι πρόκειται για παράγωγο κερκετίνης. Συγκεκριμένα, εντοπίζονται δύο διαφορετικά αρωματικά συστήματα: ένα σύστημα με δύο πρωτόνια, που εμφανίζουν μετα-σύζευξη και ένα σύστημα ABX, όπου παρατηρείται μια ορθο-/ και μια μετα-σύζευξη. Το σύστημα υποκατάστασης ABX, που συναντάται στον B δακτύλιο παρουσιάζει τα ακόλουθα σήματα: το πιο αποθωρακισμένο σήμα του φάσματος είναι μια διπλή κορυφή, που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και εμφανίζεται σε δ_{H} 7.32, η οποία αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-2' ($J= 2.1$ Hz)/ το σήμα σε δ_{H} 7.29, το οποίο έχει τη μορφή μιας διπλώς διπλής κορυφής με σταθερά σύζευξης $J=8.3/2.1$ Hz, που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο H-6' / η διπλή κορυφή σε δ_{H} 6.89, με $J= 8.2$ Hz, που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-5' (Ozgen *et al.*, 2010, Benayache *et al.*, 2014). Στον δακτύλιο A του φλαβονοειδούς εντοπίζονται άλλες δύο κορυφές σε δ_{H} 6.17 ($J=1.8$ Hz) και 6.33 ($J=1.5$ Hz), οι οποίες αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-6 και H-8 αντίστοιχα.

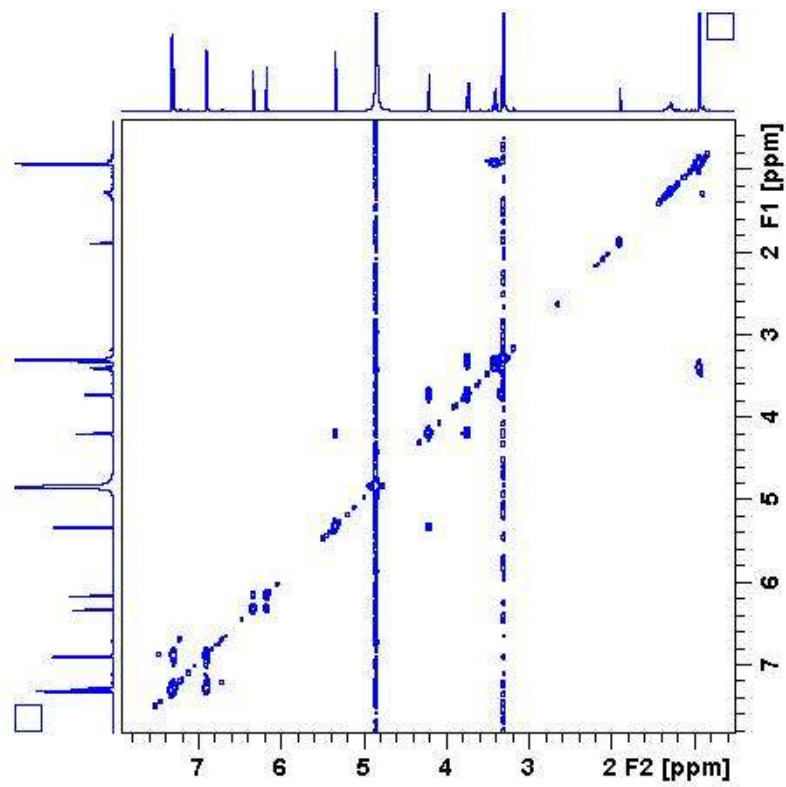
Επίσης, η διπλή κορυφή μεθυλίου σε δ_{H} 0.93, οι πολλαπλές κορυφές στην περιοχή με δ_{H} 3.33 έως 4.21 και η διπλή κορυφή σε δ_{H} 5.34 με μικρή σταθερά σύζευξης, $J=1.4$ Hz, δηλώνουν την παρουσία ραμνόσης σε α -διαμόρφωση (Markham in Dey & Harborne, 1993). Τα δεδομένα αυτά για τη ραμνόση συνάδουν με τα δεδομένα της ουσίας **6**. Αυτό επιβεβαιώνεται και από το φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$, όπου εντοπίζεται ο $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ σε δ_{C} 17.7 και τέσσερις άνθρακες μεταξύ δ_{C} 71.9 και 73.3. Το ανωμερικό πρωτόνιο του σακχάρου με βάση το φάσμα HSQC συνδέεται σε άνθρακα με δ_{C} 103.6, όπως ακριβώς και στην ουσία **6**.

Πίνακας: Φασματοσκοπικά δεδομένα της ουσίας 3 (CD₃OD, 600Hz)

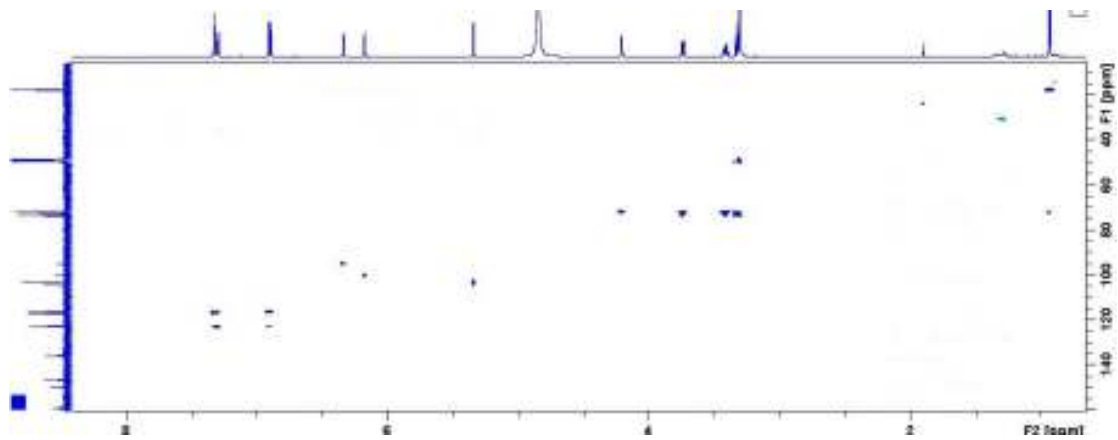
Θέση	Τύπος C	δ_c	δ_H	Αρ. H	Πολλαπλότητα J	HMBC
2	C	159.2	-	-	-	-
3	C	136.2	-	-	-	-
4	C	179.5	-	-	-	-
5	C	163.4	-	-	-	-
6	CH	100.2	6.17	1	d (J=1.8)	5,7,8,10
7	C	167.2	-	-	-	-
8	CH	95.0	6.33	1	d (J=1.5)	6,7,9,10
9	C	158.6	-	-	-	-
10	C	105.6	-	-	-	-
1'	C	123.0	-	-	-	-
2'	CH	116.9	7.32	1	d (J=2.1 Hz)	2,1',3',4',6'
3'	C	146.5	-	-	-	-
4'	C	149.9	-	-	-	-
5'	CH	116.4	6.89	1	d (J=8.2 Hz)	1',3',4'
6'	CH	122.8	7.29	1	dd (J=8.3/2.1)	2, 2',4'
1''	CH	103.6	5.34	1	d (J=1.4)	3,3''
2''	CH	71.9	4.21	1	m	3'',4''
3''	CH	72.1	3.74	1	dd (J=9.4/3.2)	2'',4''
4''	CH	73.3	3.33	1	m	3'',5'',6''
5''	CH	72.0	3.38-3.43	1	m	4'',6''
6''	CH ₃	17.7	0.93	3	d (J=6.2)	4'',5''



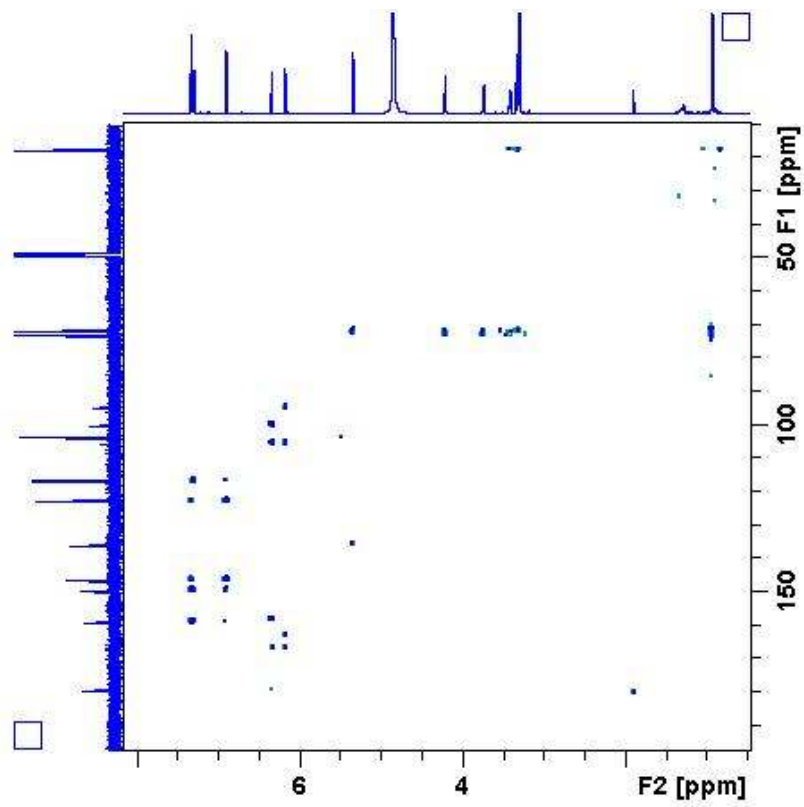
Φάσμα ¹H-NMR της ουσίας 3



Φάσμα COSY της ουσίας 3

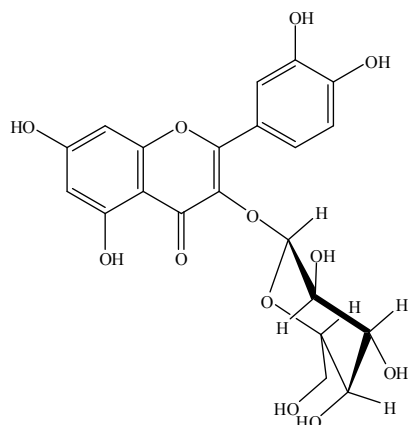


Φάσμα HSQC της ουσίας 3



Φάσμα HMBC της ουσίας 3

Γ.2.3. Ουσία 4: Υπεροσίδης
κερκετινο-3-O-β-D-γαλακτοπυρανοσίδης



Η ουσία **4** με μοριακό τύπο $C_{21}H_{20}O_{12}$ απομονώθηκε ως υποκίτρινο υπόλειμμα και ταυτοποιήθηκε μετά από φασματοσκοπική μελέτη και σύγκριση με τα βιβλιογραφικά δεδομένα (Güvenalp et al., 2005, Cota et al., 2012), ως κερκετινο-3-O-β-D-γαλακτοπυρανοσίδης, γνωστός ως υπεροσίδης (Güvenalp et al., 2005, Cota et al., 2012).

Ο υπεροσίδης εντοπίζεται σε όλα τα sections του γένους *Hypericum* L. εκτός από τα: Takasagoya, Concinna, Sampsonia, Elodeoida, Campylopus, Organifolia, Thasia και Adenotria (Crockett and Robson, 2011), ενώ γενικότερα τα περισσότερα φλαβονοειδή, που εντοπίζονται στο *H. perforatum* είναι γλυκοσιδικά παράγωγα κερκετίνης (Tatsis et al., 2007).

Κατά τη φασματοφωτομετρική εξέταση της ουσίας (φάσματα υπεριώδους-ορατού) ελήφθησαν χαρακτηριστικές καμπύλες με τα ακόλουθα μέγιστα (nm):

	Κορυφή II		Κορυφή I		Δλ I
			Ib	Ia	
MeOH	260	269 sh		369	
MeONa	272		326	405 ↑	+36
AlCl ₃	273		304sh	435	+66
AlCl ₃ / HCl	271		299sh	367 402	+33
NaOAc	272 (Δλ=+12)		324	378	
NaOAc / H ₃ BO ₃	260		294sh	377	+8

Από την τιμή απορρόφησης της πρώτης κορυφής του μεθανολικού διαλύματος (348.5 nm) συμπεραίνεται ότι η ουσία ανήκει στις φλαβονόλες. Με την προσθήκη MeONa παρατηρείται βαθυχρωμική μετατόπιση κατά +36 nm της κορυφής I και ταυτόχρονα αύξηση της εντάσεώς της, οπότε συμπεραίνουμε ότι το 4'-OH είναι ελεύθερο. Η βαθυχρωμική μετατόπιση κατά +66 nm της I κορυφής μετά την προσθήκη AlCl₃, οφείλεται στο σχηματισμό συμπλόκου μεταξύ της κετονομάδας και του υδροξυλίου της θέσεως 5, το οποίο μετά την προσθήκη π.HCl διασπάται, γεγονός που υποδηλώνει την παρουσία συστήματος ο-OH στο B δακτύλιο. Αυτό επιβεβαιώνεται και μετά την προσθήκη NaOAc/H₃BO₃ (Δλ=+8 nm). Το -OH της θέσης 7 είναι ελεύθερο, διότι στο φάσμα με NaOAc παρατηρείται βαθυχρωμική μετατόπιση της κορυφής II κατά +12 nm.

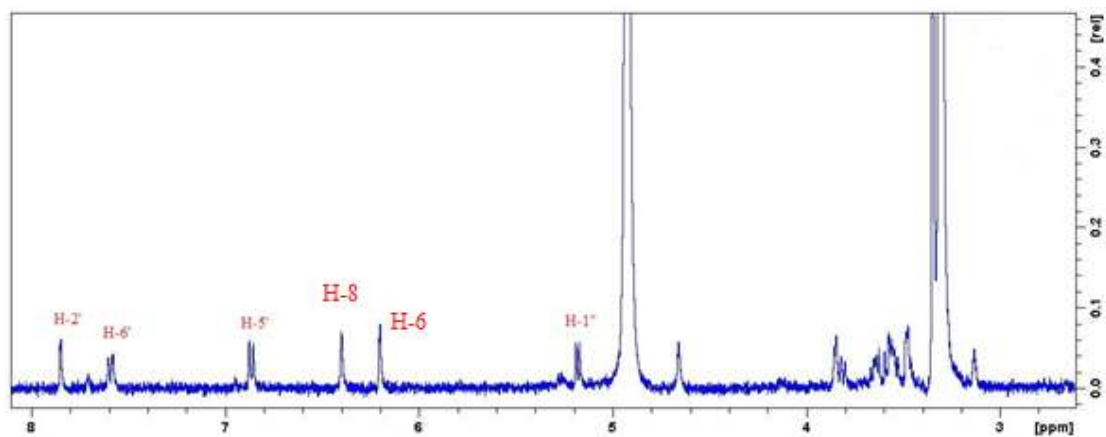
Κατά την πρώτη ανάγνωση του φάσματος ¹H-NMR έγινε φανερό ότι πρόκειται για παράγωγο κερκετίνης, καθώς εντοπίζονται δύο διαφορετικά αρωματικά συστήματα: ένα σύστημα με δύο πρωτόνια που εμφανίζουν μετα-σύζευξη, και ένα σύστημα ABX, όπου παρατηρείται μια ορθο- και μια μετα-σύζευξη. Συγκεκριμένα:

- Το σύστημα υποκατάστασης ABX, που συναντάται στον B δακτύλιο παρουσιάζει τα ακόλουθα σήματα:
 - το πιο αποθωρακισμένο σήμα του φάσματος είναι μια διπλή κορυφή, που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και εμφανίζεται σε δ_H 7.85, η οποία αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-2' (J= 1.3 Hz)
 - το σήμα σε δ_H 7.59, το οποίο έχει τη μορφή μιας διπλώς διπλής κορυφής με σταθερές σύζευξης J=8.0/2.0Hz, που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο H-6'
 - η διπλή κορυφή σε δ_H 6.86, με J= 8.0 Hz, που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-5'.
- Στον δακτύλιο A του φλαβονοειδούς εντοπίζονται άλλες δύο κορυφές σε δ_H 6.20 (J=2.0 Hz) και 6.40 (J=2.0 Hz), οι οποίες αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-6 και H-8.
- Παράλληλα παρατηρούνται σήματα και στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος, υποδηλώνοντας την παρουσία σακχάρου. Σε δ_H 5.18 μια διπλή κορυφή με μεγάλη σταθερά σύζευξης, J=7.9 Hz, που δίνει ολοκλήρωση για ένα πρωτόνιο, αντιστοιχεί στο ανωμερικό πρωτόνιο του σακχάρου, ενώ το σύνολο των σημάτων που εντοπίζονται σε δ_H 3.45 έως 3.82 αντιστοιχούν στα υπόλοιπα πρωτόνια του σακχάρου.
- Με βάση το φάσμα COSY και το HSQC καταλήξαμε ότι πρόκειται για γαλακτόση καθώς:

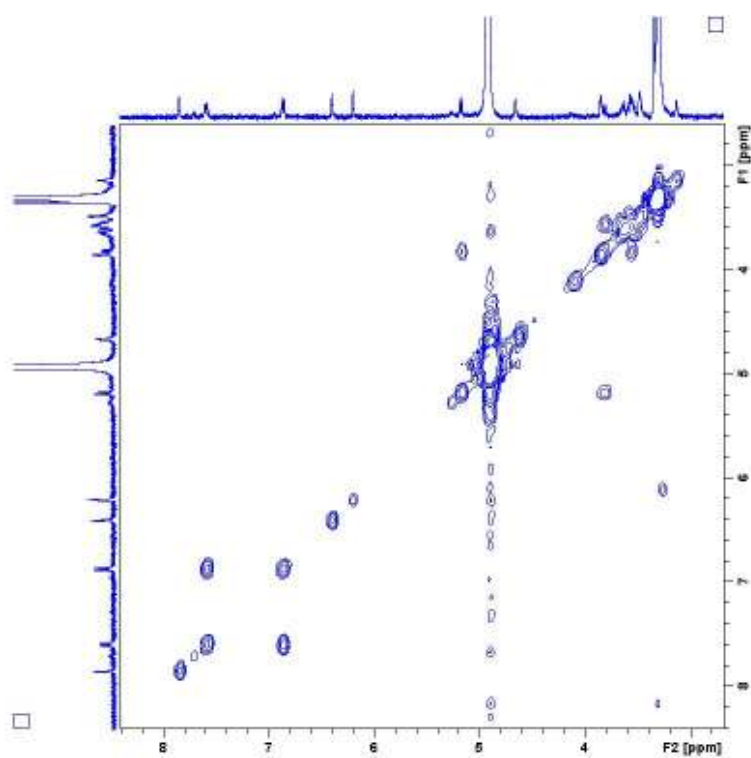
Το H-1" του σακχάρου σε δ_H 5.18 (δ_C 104.9) δίνει σήμα διασταύρωσης με το πρωτόνιο σε δ_H 3.82 (δ_C 72.6) (H-2"), το οποίο συζεύγνυται με το πρωτόνιο σε δ_H 3.53 (δ_C 74.6) (H-3"). Εν συνεχεία, το πρωτόνιο αυτό (H-3") δίνει 2 σήματα διασταύρωσης με το H-2" και με το πρωτόνιο σε δ_H 3.85 ($J=3.0\text{Hz}$) (δ_C 70.0), που πρόκειται για το H-4". Το πρωτόνιο σε δ_H 3.45 συνδέεται με άνθρακα σε δ_C 77.1, που αντιστοιχεί στον άνθρακα C-5" και ταιριάζει πλήρως με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας (Güvenalp et al., 2005). Τέλος, τα πρωτόνια σε δ_H 3.55 & 3.64 συνδέονται στον άνθρακα δ_C 61.5, ο οποίος αντιστοιχεί στον C-6" πράγμα που επιβεβαιώνεται και από την βιβλιογραφία. Οπότε η ουσία 4 ταυτοποιήθηκε ως κερκετινο-3-Ο-β-D-γαλακτοπυρανοσίδης.

Πίνακας: Φασματοσκοπικά δεδομένα $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$ της ουσίας 4 (CD_3OD , 400 MHz)

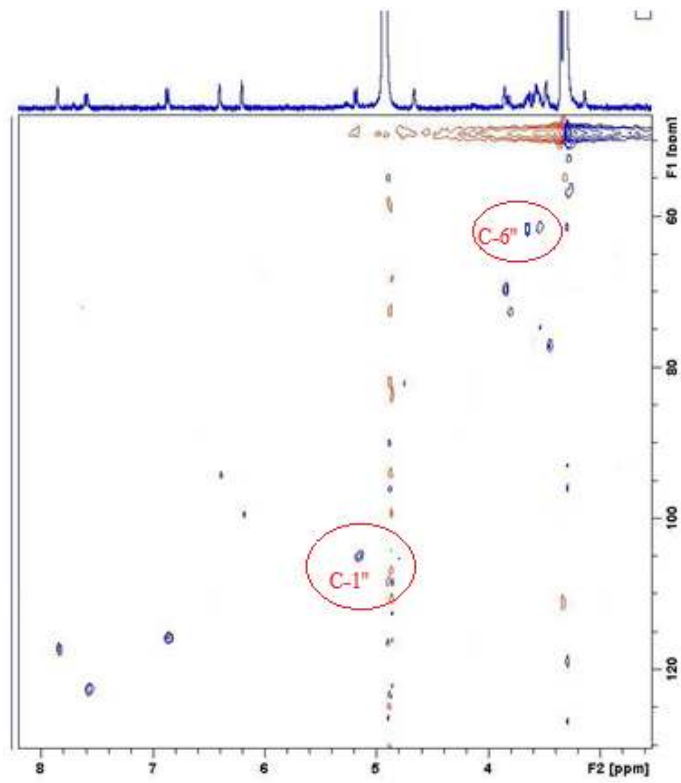
Θέση	δ_C	δ_H	Αρ. H	Πολλαπλότητα J (Hz)
άγλυκο				
2'	116.2	7.85	1	d ($J=2.0$)
6'	122.4	7.59	1	dd ($J=8.0/2.0$)
5'	115.4	6.86	1	d ($J=8.0$)
8	93.9	6.40	1	d ($J=2.0$)
6	99.9	6.20	1	d ($J=2.0$)
γαλακτόση				
1"	104.9	5.18	1	d ($J=7.9$)
2"	72.6	3.82	1	m
3"	74.6	3.53	1	m
4"	70.0	3.85	1	d ($J=3.0$)
5"	77.1	3.45	1	m
6"	61.5	3.55 & 3.64	2	m



Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ουσίας 4

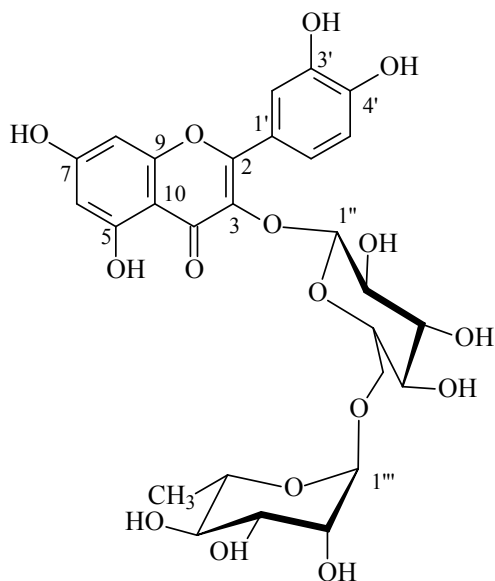


Φάσμα COSY της ουσίας 4



Φάσμα HSQC της ουσίας 4

**Γ.2.4. Ουσία 5: κερκετινο-3-O-(6''-α-L-ραμνοπυρανοσυλο)-β-D-γλυκοκυρα-
νοσίδης [= κερκετινο-3-O-β-D-ρουτινοσίδης, ρουτίνη]**



Η ουσία **5** απομονώθηκε ως υποκίτρινο υπόλειμμα και ταυτοποιήθηκε μετά απο φασματοσκοπική μελέτη και σύγκριση με τα βιβλιογραφικά δεδομένα. Έχει μοριακό τύπο $C_{27}H_{30}O_{16}$.

Πρόκειται για τον πλέον διαδεδομένο γλυκοσίδη φλαβονοειδούς στο φυτικό βασίλειο. Η ρουτίνη είναι γνωστή ήδη από το 1842. Απομονώθηκε για πρώτη φορά από το φυτό *Ruta graveolens* - Rutaceae, από όπου και πήρε το όνομά της (Weiss in Harborne and Mabry, 1975). Ο γλυκοσίδης αυτός κυριαρχεί στα Rutaceae και είναι συστατικό της “κιτρίνης” που ανακαλύφθηκε από τον Sent Gyorgi. Του έχει αποδοθεί η ονομασία βιταμίνη P λόγω της ευεργετικής δράσης που εμφανίζει στα αγγεία, καθώς επίσης και ο όρος βιοφλαβονοειδές.

Η ρουτίνη εντοπίζεται σε όλα τα sections του γένους *Hypericum* L. εκτός από τα: *Campylosporus*, *Takasagoya*, *Androsaemum*, *Concinna*, *Sampsonia*, *Elodeoida*, *Organifolia*, *Thasia*, *Coridium*, *Webbia* και *Arthrophyllum*.

Κατά τη φασματοφωτομετρική εξέταση της ουσίας (φάσματα υπεριώδους-ορατού) ελήφθησαν χαρακτηριστικές καμπύλες με τα ακόλουθα μέγιστα (nm):

	Κορυφή II			Κορυφή I		Δλ I
				Ib	Ia	
MeOH	256	265sh	292sh		350	
MeONa	272		326		403 ↑	+53
AlCl ₃	273.5		301.5		420	+70
AlCl ₃ / HCl	268		300	348	400	+50
NaOAc	269(Δλ=+12)		324		385	
NaOAc / H ₃ BO ₃	260		294		367	+17

Από την τιμή απορρόφησης της πρώτης κορυφής του μεθανολικού διαλύματος (350 nm) συμπεραίνεται ότι η ουσία ανήκει στις φλαβονόλες. Με την προσθήκη MeONa παρατηρείται βαθυχρωμική μετατόπιση κατά +53 nm της κορυφής I και ταυτόχρονα αύξηση της εντάσεώς της, οπότε συμπεραίνουμε ότι το 4'-OH είναι ελεύθερο. Η βαθυχρωμική μετατόπιση κατά +70 nm της I κορυφής μετά την προσθήκη AlCl₃, οφείλεται στο σχηματισμό συμπλόκου αφενός μεταξύ της κετονομάδας και του υδροξυλίου της θέσεως 5 σταθερού στην παρουσία π.HCl και αφετέρου σε σύστημα ο-OH στο B δακτύλιο, το οποίο μετά την προσθήκη π.HCl διασπάται. Η παρουσία συστήματος ο-OH στο B δακτύλιο επιβεβαιώνεται και μετά την προσθήκη NaOAc/H₃BO₃ (Δλ=+17 nm). Το -OH της θέσης 7 είναι ελεύθερο, διότι στο φάσμα με NaOAc παρατηρείται βαθυχρωμική μετατόπιση της κορυφής II κατά +12 nm.

Με την πρώτη ανάγνωση του φάσματος ¹H-NMR έγινε φανερό ότι πρόκειται για παράγωγο κερκετίνης. Αναλυτικότερα, στο σύστημα ABX το πιο αποθωρακισμένο πρωτόνιο σε δ_H 7.67 (H-2') εμφανίζει μετα-σύζευξη με το πρωτόνιο σε δ_H 7.64 (H-6') το οποίο εμφανίζει μία διπλώς διπλή κορυφή και έχει άλλη μία σύζευξη με το πρωτόνιο σε δ_H 6.85 (H-5').

Οι πολλαπλές κορυφές σε δ_H 3.35-3.80 υποδηλώνουν την παρουσία σακχάρου. Μάλιστα, οι δύο κορυφές σε δ_H 5.10 (1H, d, J=7.5 Hz) και 4.51 (1H, brs)

παραπέμπουν στην ύπαρξη δύο ανωμερικών πρωτονίων και επομένως σε κάποιο δισακχαρίτη. Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώνεται και από το φάσμα HSQC όπου εμφανίζονται δέκα σήματα διασταύρωσης στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος σε δ_C 68.2 - 78.2.

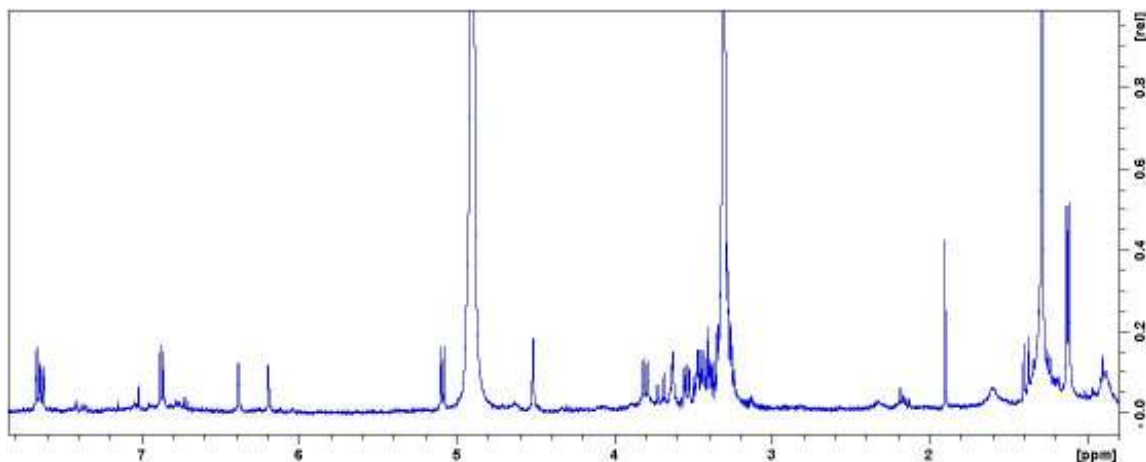
Με βάση τα παρακάτω δεδομένα το γλυκοσιδικό τμήμα ταυτοποιήθηκε ως 6''- α -L-ραμνοπυρανοσυλο- β -D-γλυκοπυρανοσίδης:

- Από το φάσμα HSQC το ανωμερικό πρωτόνιο σε δ_H 4.51 (d, $J=1.5$ Hz) συνδέεται σε άνθρακα δ_C 102.3 και συζεύγνυται με το πρωτόνιο σε δ_H 3.62 (dd, $J=3.3/1.5$ Hz) (φάσμα COSY). Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την εμφάνιση μίας διπλής κορυφής, που αντιστοιχεί σε μεθυλομάδα στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ σε δ_H 1.12 ($J=6.2$ Hz) υποδεικνύει την παρουσία α -ραμνόςης. Όσον αφορά την ραμνόςη, στο φάσμα COSY διακρίνονται τα σήματα διασταύρωσης του πρωτονίου σε δ_H 3.54 (dd, $J=9.5/3.3$) με το πρωτόνιο σε δ_H 3.28 (δ_C 74.0), καθώς και η σύζευξη του πρωτονίου σε δ_H 3.45 (δ_C 70.0) με το μεθύλιό της σε δ_H 1.12 (δ_C 17.7).
- Το ανωμερικό πρωτόνιο δ_H 5.10 (1H, d, $J=7.5$ Hz) συνδέεται με άνθρακα σε δ_C 104.4 (φάσμα HSQC) και δίνει σήμα διασταύρωσης με το πρωτόνιο δ_H 3.45 (δ_C 75.8). Τα δεδομένα αυτά παραπέμπουν στο σάκχαρο της γλυκόσης, το οποίο συνδέεται απευθείας στην θέση 3 της κερκετίνης (Cota et al., 2012, Fernandez et al., 2005). Η αποθωράκιση του άνθρακα 6 της γλυκόσης σε δ_C 68.2 (φάσμα HSQC) υποδεικνύει τη θέση 6 της γλυκόσης ως θέση σύνδεσης μεταξύ των δύο σακχάρων γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τη βιβλιογραφία (Güvenalp et al., 2005).
- Επιπλέον για τη γλυκόση, στο φάσμα COSY διακρίνεται η σύζευξη του πρωτονίου της θέσης 6a'' σε δ_H 3.80, το οποίο εμφανίζεται στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ ως μία ευρεία διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης 10.1 Hz με το γειτονικό του πρωτόνιο (H-5'') σε δ_H 3.43 (δ_C 78.2), που συμφωνεί με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας (Güvenalp et al., 2006), καθώς και με το διδυμό του (H-6b'') σε δ_H 3.39.

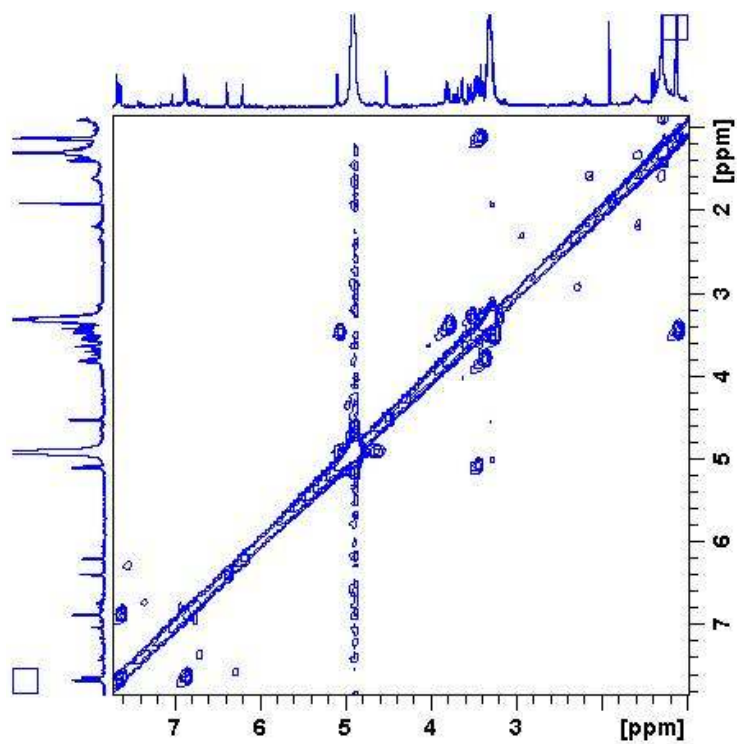
Επομένως, με βάση τα παραπάνω δεδομένα η ουσία **5** ταυτοποιήθηκε ως κερκετινο-3-*O*-(6''- α -L-ραμνοπυρανοσυλο)- β -D-γλυκοπυρανοσίδης.

Πίνακας: Φασμαροσκοπικά δεδομένα της ουσίας 5 (CD₃OD, 400Hz)

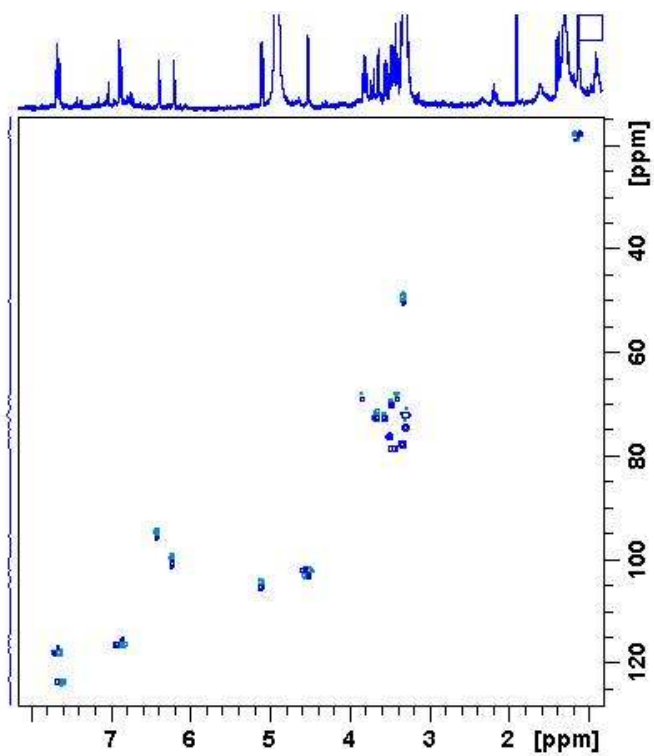
Θέση	δ_C	δ_H	Αρ. H	Πολλαπλότητα J (Hz)
άγλυκο				
2'	117.6	7.67	1	d (2.1)
5'	116.1	6.87	1	d (8.4)
6'	123.4	7.64	1	dd (8.4/2.1)
6	99.9	6.20	1	d (2.1)
8	94.8	6.39	1	d (2.1)
γλυκόση				
1''	104.4	5.10	1	d (7.5)
2''	75.8	3.43	1	m
3''	77.2	3.32	1	m
4''	71.7	3.27	1	m
5''	78.2	3.43	1	m
6a''	68.2	3.80	1	brd (10.1)
6b''		3.39	1	m
ραμνόση				
1'''	102.3	4.51	1	d (1.5)
2'''	71.8	3.62	1	dd(3.5/1.5)
3'''	72.4	3.54	1	dd(9.5/3.3)
4'''	74.0	3.28	1	m
5'''	70.0	3.45	1	m
6'''	17.7	1.12	3	d (6.2)



Φάσμα ¹H-NMR της ουσίας 5

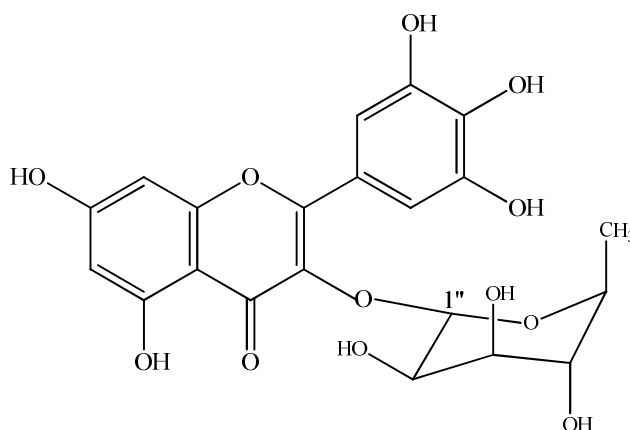


Φάσμα COSY της ουσίας 5



Φάσμα HSQC της ουσίας 5

Γ.2.5. Ουσία 6: Μυρικιτρίνη
Μυρικετινο-3-O-α-L-ραμνοσίδης



Πρόκειται για ετεροσίδη φλαβονοειδών με γενικό μοριακό τύπο $C_{21}H_{20}O_{12}$. Η ουσία απομονώθηκε ως υποκίτρινο υπόλειμμα και ταυτοποιήθηκε μετά από φασματοσκοπική μελέτη και σύγκριση με τα βιβλιογραφικά δεδομένα (David et al., 1996).

Η μυρικιτρίνη δεν εντοπίζεται τόσο συχνά στο γένος *Hypericum* L., αλλά κυρίως στα είδη που ανήκουν στο section *Drosocarpium* (Nedialkov et al., 2007).

Κατά τη φασματοφωτομετρική εξέταση της ουσίας (φάσματα υπεριώδους-ορατού) ελήφθησαν χαρακτηριστικές καμπύλες με τα ακόλουθα μέγιστα (nm):

	Κορυφή II		Κορυφή I		Δλ I	
			Ib	Ia		
MeOH	258	265sh	299sh	348		
MeONa	272		326	403 ↑	+55	
AlCl ₃	268		314 sh	425	+77	
AlCl ₃ / HCl	271		308 sh	356 sh	402	+48.5
NaOAc	269 (Δλ=+12.5)			349		
NaOAc / H ₃ BO ₃	258		299 sh	377	+29	

Από την τιμή απορρόφησης της πρώτης κορυφής του μεθανολικού διαλύματος (348.5 nm) συμπεραίνεται ότι η ουσία ανήκει στις φλαβονόλες. Με την προσθήκη MeONa παρατηρείται βαθυχρωμική μετατόπιση κατά +54.5 nm της κορυφής I και ταυτόχρονα αύξηση της εντάσεώς της, οπότε συμπεραίνουμε ότι το 4'-OH είναι ελεύθερο. Η βαθυχρωμική μετατόπιση κατά +71.5 nm της I κορυφής μετά την προσθήκη AlCl₃, οφείλεται στο σχηματισμό συμπλόκου αφενός μεταξύ της κετονομάδας και του υδροξυλίου της θέσεως 5 σταθερού στην παρουσία π.HCl και αφετέρου σε σύστημα ο-OH στο Β δακτύλιο, το οποίο μετά την προσθήκη π.HCl διασπάται. Αυτό επιβεβαιώνεται και μετά την προσθήκη NaOAc/H₃BO₃ (Δλ=+17 nm). Το -OH της θέσης 7 είναι ελεύθερο, διότι στο φάσμα με NaOAc παρατηρείται βαθυχρωμική μετατόπιση της κορυφής II κατά +12.5 nm.

Κατά την πρώτη ανάγνωση του φάσματος ¹H-NMR στην αρωματική περιοχή σε δ_H 6.94 παρατηρείται μία απλή κορυφή που ολοκληρώνει για 2 πρωτόνια, ενώ εντοπίζονται άλλες δύο κορυφές σε δ_H 6.19 και 6.35, οι οποίες ολοκληρώνουν για 1 πρωτόνιο η κάθεμία και έχουν μετα-σύζευξη μεταξύ τους (J=2.2Hz). Οι πολλαπλές κορυφές στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος σε δ_H 3.31 έως 4.20 υποδηλώνουν την παρουσία σακχάρου, ενώ σε δ_H 5.30 υπάρχει μία διπλή κορυφή που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο ανωμερικό πρωτόνιο του σακχάρου.

Στο φάσμα ¹³C-NMR παρατηρείται άνθρακας με δ_C 179.7, ο οποίος αντιστοιχεί σε άνθρακα καρβονυλίου και έξι ακόμα αρκετά αποθωρακισμένοι άνθρακες με τιμές δ_C, οι οποίες παραπέμπουν σε υδροξυλιωμένους άνθρακες (δ_C 136.3, 137.9, 146.9 (2C), 163.1, 166.1), των οποίων ωστόσο τα υδροξύλια δεν είναι ορατά στο φάσμα ¹H-NMR, καθώς η λήψη του έγινε σε δευτεριωμένη μεθανόλη.

Τα δεδομένα αυτά σε συνδυασμό με τη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για γλυκοσίδη φλαβονοειδούς και μάλιστα το σάκχαρο βρίσκεται στη θέση 3 του σκελετού του φλαβονοειδούς καθώς από το φάσμα ¹H-NMR απουσιάζει το βινυλικό υδρογόνο της θέσης 3 των φλαβονοειδών. Ακόμη το γεγονός ότι σε δ_H 6.94 εμφανίζεται μία κορυφή που ολοκληρώνει για 2 πρωτόνια μας οδήγησε στο συμπέρασμα ότι ο Β-δακτύλιος είναι υποκατεστημένος στις θέσεις 3', 4', 5' και έτσι πρόκειται για μυρικετινο-παράγωγο και συγκεκριμένα για 3, 5, 7, 3', 4', 5'-υδροξυ-υποκατεστημένη φλαβονόλη.

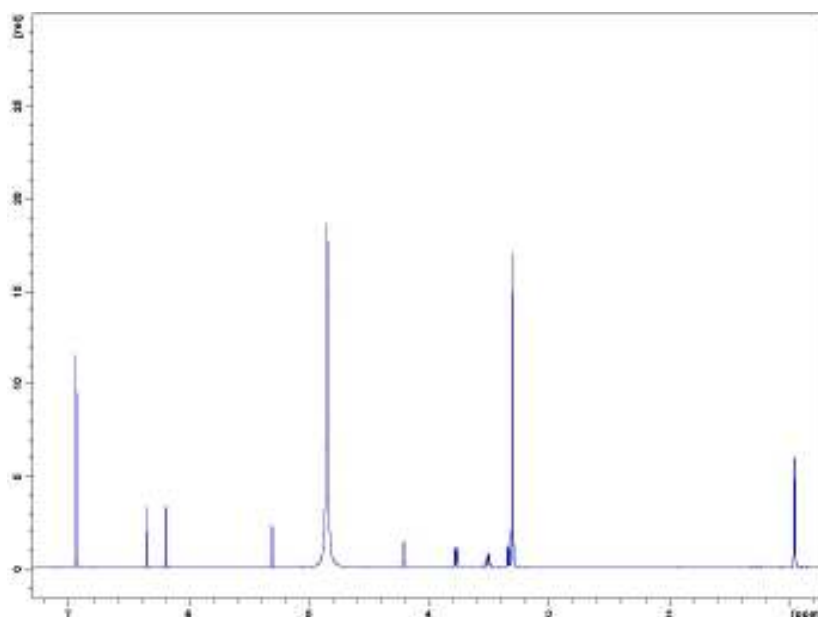
Λεπτομερέστερη ανάλυση στο φάσμα ¹³C-NMR έδειξε την παρουσία ενός μεθυλίου

δ_C 17.7, τεσσάρων οξυγονωμένων μεθινικών ανθράκων με δ_C μεταξύ 71.9 και 73.3 και ενός άνθρακα στα 103.6, που αντιστοιχεί στον ανωμερικό άνθρακα του σακχάρου. Με σημείο αναφοράς το ανωμερικό αυτό πρωτόνιο και βάσει των φασμάτων COSY και HSQC της ουσίας ταυτοποιήθηκε πλήρως και το οσιδικό της τμήμα: το ανωμερικό πρωτόνιο συζεύγνυται με το πρωτόνιο, το οποίο εμφανίζεται σε δ_H 4.20 (H-2"), το οποίο ακολούθως συζεύγνυται με το υδρογόνο που εμφανίζεται σε δ_H 3.78 (H-3"). Το πρωτόνιο σε δ_H 3.78 δίνει σήμα διασταύρωσης με το πρωτόνιο σε δ_H 3.33 (H-4"), το οποίο με τη σειρά του συζεύγνυται με το πρωτόνιο σε δ_H 3.51 (H-5"). Τέλος, το πρωτόνιο σε δ_H 3.51 δίνει σήμα διασταύρωσης με το μεθύλιο σε δ_H 0.95 (H-6").

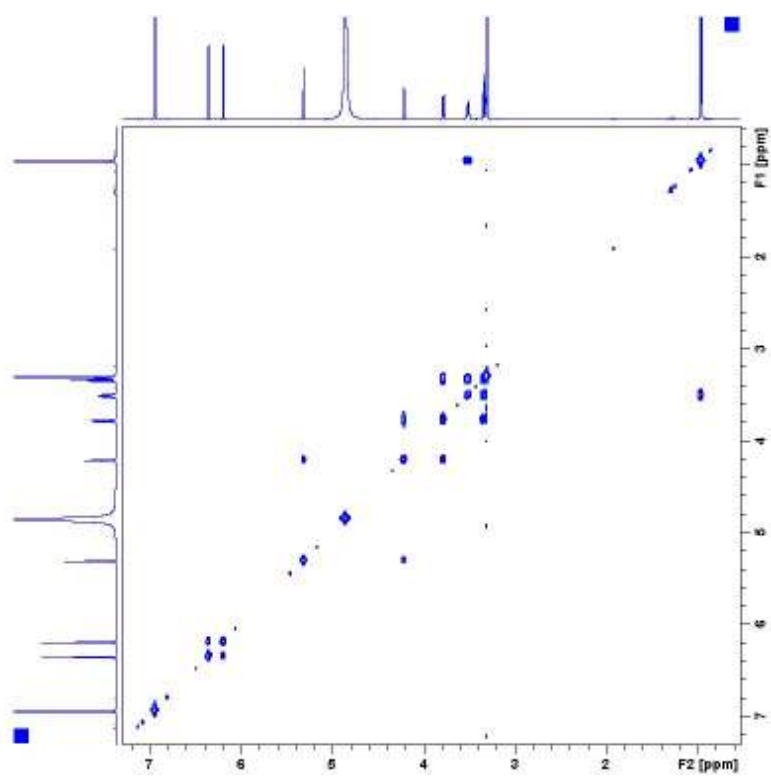
Τα στοιχεία αυτά δείχνουν ότι πρόκειται για ραμνόση και καθώς η σταθερά σύζευξης του ανωμερικού πρωτονίου H-1" (δ_H 5.30) είναι 1.22 Hz πρόκειται συγκεκριμένα για α-ραμνόση. Έτσι η ουσία **6** ταυτοποιήθηκε ως μυρικετινο-3-Ο-ραμνοσίδης.

Πίνακας: Φασματοσκοπικά δεδομένα της ουσίας 6 (CD₃OD, 600Hz)

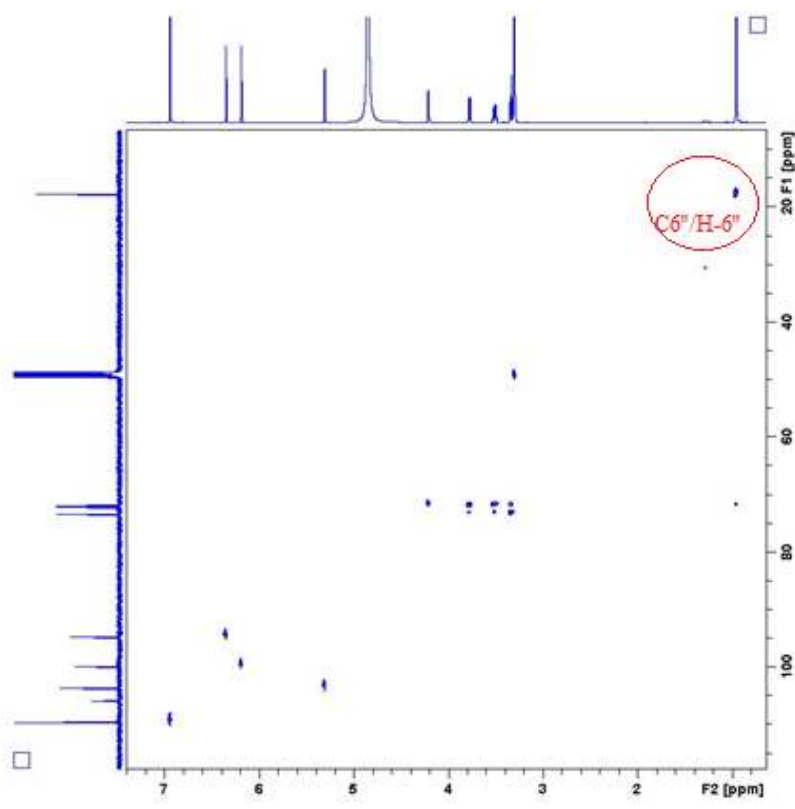
Θέση	Τύπος C	δc	δH	Αρ. H	Πολλαπλότητα J (Hz)	HMBC σήματα
2	C	159.4	-	-	-	-
3	C	136.3	-	-	-	-
4	C	179.7	-	-	-	-
5	C	163.1	-	-	-	-
6	CH	99.9	6.19	1	d (J=2.2 Hz)	5, 7, 8, 10
7	C	166.1	-	-	-	-
8	CH	94.7	6.35	1	d (J=2.2Hz)	6, 7, 9, 10
9	C	158.5	-	-	-	-
10	C	105.8	-	-	-	-
1'	C	121.9	-	-	-	-
2'	CH	109.6	6.94	1	s	2, 3', 4', 5', 6'
3'	C	146.9	-	-	-	-
4'	C	137.9	-	-	-	-
5'	C	146.9	-	-	-	-
6'	CH	109.6	6.94	1	s	2, 1', 2', 3', 4', 5'
1''	CH	103.6	5.30	1	d (J=1.2)	3, 2'', (5'')
2''	CH	71.9	4.20	1	m	1'', 3'', 4''
3''	CH	72.1	3.78	1	dd (J=9.4/3.2)	2'', 4''
4''	CH	73.3	3.33	1	m	3'', 5'', 6''
5''	CH	72.0	3.51	1	m	3'', 4'', 6''
6''	CH ₃	17.7	0.95	3	d (J=6.2)	4'', 5''



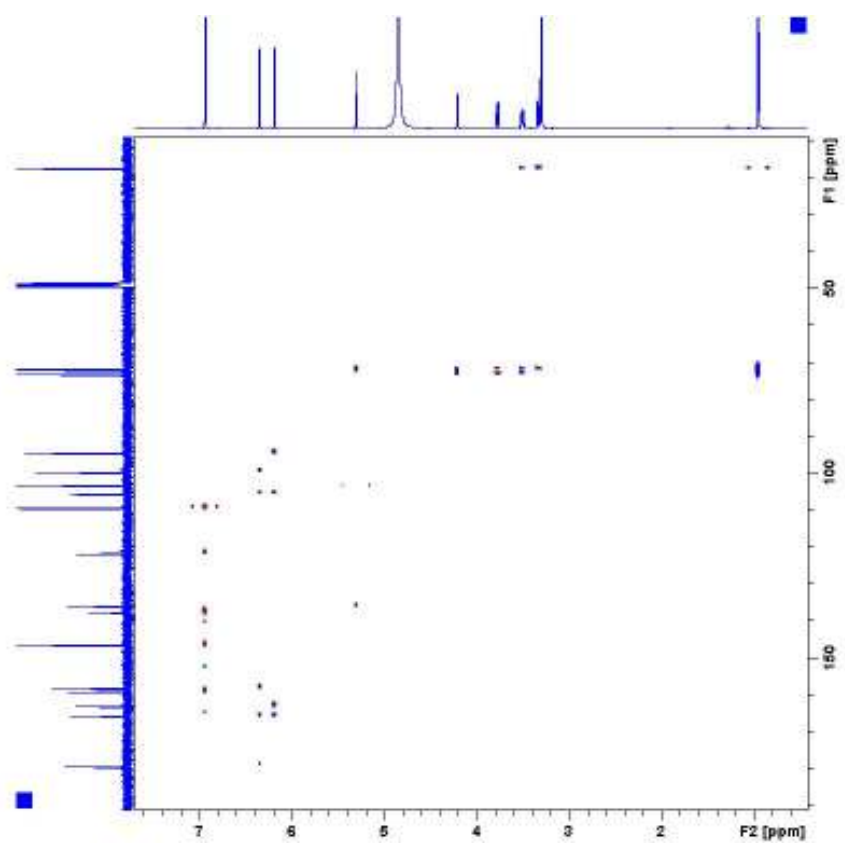
Φάσμα ¹H-NMR της ουσίας 6



Φάσμα COSY της ουσίας 6



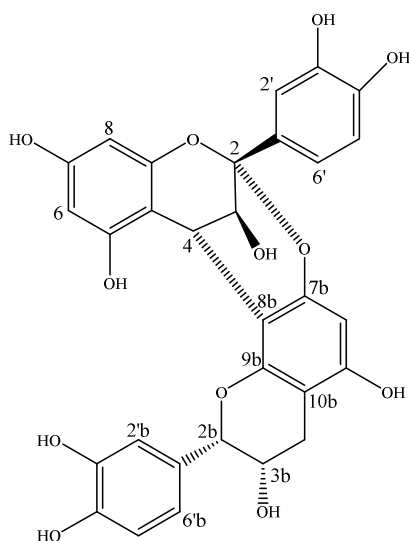
Φάσμα HSQC της ουσίας 6



Φάσμα HMBC της ουσίας 6

Γ.3 ΠΡΟΑΝΘΟΚΥΑΝΙΔΙΝΕΣ

Γ.3.1. Ουσία 7: προκυανιδίνη Α2 [επικατεχίνο-(4b→8; 2b-O-7)-επικατεχίνη]



Η ουσία 7 απομονώθηκε ως λευκό υπόλειμμα. Πρόκειται για μία συμπυκνωμένη ταννίνη γνωστή ως προκυανιδίνη Α2. Έχει μοριακό τύπο $C_{30}H_{24}O_{12}$ και η δομή της αποδόθηκε μετά από φασματοσκοπική ανάλυση και φασματομετρία μάζας. Στη χρωματογραφία TLC εμφανίστηκε ως κόκκινη κηλίδα σε γέλη οξειδίου του πυριτίου και σύστημα ανάπτυξης EtOAc:AcOH:H₂O (6.5:1.5:2) μετά από ψεκασμό με το αντιδραστήριο βανιλίνης.

Οι προκυανιδίνες πιστεύεται ότι δημιουργούν σύμπλοκα με τις ναφθοδιανθρόνες και έτσι συμβάλλουν στη διαλυτότητά τους σε υδατικά διαλύματα. (Butterweck et al. 1998). Η παρουσία τους στο *H. perforatum* είναι γνωστή από το 1925 (Porodko, 1925), ενώ σχετικά πρόσφατα αναφέρεται η απομόνωση των προκυανιδινών Α2, Β1, Β2, Β3, Β5, Β7 και C1 από το υδατικό εκχύλισμα υπερικού (Ploss et al., 2001).

Ακολουθεί η ανάλυση του φάσματος η οποία οδήγησε στην δομή της προκυανιδίνης Α2:

- Στην **αρωματική περιοχή** του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ παρουσιάζονται 8 σήματα, που όλα ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο εκτός από την κορυφή σε δ_{H} 6.80, που ολοκληρώνει για δύο. Τα πρωτόνια αυτά ανήκουν σε διαφορετικούς άνθρακες, όπως προκύπτει από το φάσμα HSQC. Παρουσιάζουν μία εικόνα διπλώς-διπλής κορυφής, αλλά μετά από εκτενέστερη μελέτη αποτελούν δύο ξεχωριστές διπλές κορυφές με $J=8.2$ Hz. Τα πρωτόνια αυτά δεν δίνουν σήματα σύζευξης μεταξύ τους και όπως

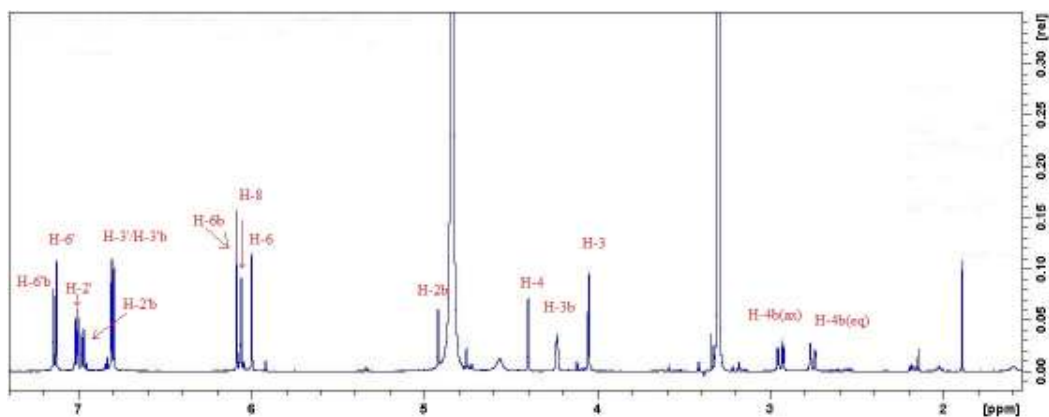
προκύπτει και από τα δεδομένα που παρατίθενται στη συνέχεια, ανήκουν σε διαφορετικά αρωματικά συστήματα.

- Ακόμη, στην αρωματική περιοχή διακρίνονται δύο συστήματα ABX. Στο ένα σύστημα ABX, ξεκινώντας από το πίο αποθωρακισμένο πρωτόνιο σε δ_H 7.14 ($J=2.0$ Hz) βλέπουμε ότι παρουσιάζει σύζευξη στο φάσμα COSY με το πρωτόνιο σε δ_H 6.97 ($J=8.0/2.0$ Hz). Τα πρωτόνια αυτά βρίσκονται σε μετα-θέση μεταξύ τους. Το πρωτόνιο σε δ_H 6.97 παρουσιάζει και μία ορθο-σύζευξη με ένα από τα δύο πρωτόνια στη θέση δ_H 6.80.
- Στο δεύτερο σύστημα ABX, στο φάσμα COSY το πρωτόνιο σε δ_H 7.13 (d, $J=2.2$ Hz) εμφανίζει μία μετα-σύζευξη με το πρωτόνιο σε δ_H 7.01 (dd, $J=8.3/2.2$ Hz), το οποίο με τη σειρά του εμφανίζει μία ορθο-σύζευξη με το πρωτόνιο σε δ_H 6.80.
- Αφαιρώντας τις παραπάνω κορυφές, μας μένουν τρία ακόμα σήματα στην αρωματική περιοχή: Τα πρωτόνια σε δ_H 6.06 και 5.99 δίνουν σήμα διασταύρωσης στο COSY και παρουσιάζουν μετα-σύζευξη μεταξύ τους. Το πρωτόνιο σε δ_H 6.08 εμφανίζει μία απλή κορυφή και δεν παρουσιάζει καμία σύζευξη στο φάσμα COSY.
- Στην **αλειφατική περιοχή** του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ παρατηρούμε δύο δίδυμα πρωτόνια σε δ_H 2.95 (dd, $J=17.0/4.9$ Hz) και δ_H 2.75 (dd, $J=17.0/2.0$ Hz), τα οποία δίνουν σήμα διασταύρωσης με το πρωτόνιο σε δ_H 4.23. Από τις σταθερές σύζευξης προκύπτει ότι τα πρωτόνια σε δ_H 2.95 και δ_H 4.23 βρίσκονται σε θέση ax-eq μεταξύ τους. Ακόμη το πρωτόνιο στα 4.23 ppm εμφανίζει μία πολλαπλή κορυφή, καθώς, όπως προκύπτει από το φάσμα COSY, συζεύγνυται με το πρωτόνιο σε δ_H 4.92. Οι χημικές αυτές μετατοπίσεις είναι χαρακτηριστικές για τις **φλαβαν-3-όλες** και για το μόριο της επικατεχίνης (Davis et al., 1996) και αυτό επιβεβαιώνεται και από το φάσμα HSQC, καθώς και από τις χημικές μετατοπίσεις των ανθράκων που συνδέονται με τα πρωτόνια αυτά.
- Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι από το φάσμα άνθρακα προκύπτει ότι το μόριο διαθέτει 30 άνθρακες, μας οδήγησε στο ότι μπορεί να πρόκειται για συμπύκνωση δύο μορίων φλαβαν-3-ολών. Πράγματι, στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ εμφανίζονται άλλες δύο κορυφές σε δ_H 4.05 d ($J=3.4$ Hz) και 4.40 d ($J=3.3$ Hz), που ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η καθεμία και τα πρωτόνια τους δίνουν σήμα διασταύρωσης στο φάσμα COSY. Ακόμη όπως προκύπτει από τις σταθερές σύζευξης τα πρωτόνια αυτά βρίσκονται σε θέση *cis* μεταξύ τους, πράγμα που επιβεβαιώνεται και από το φάσμα NOE.

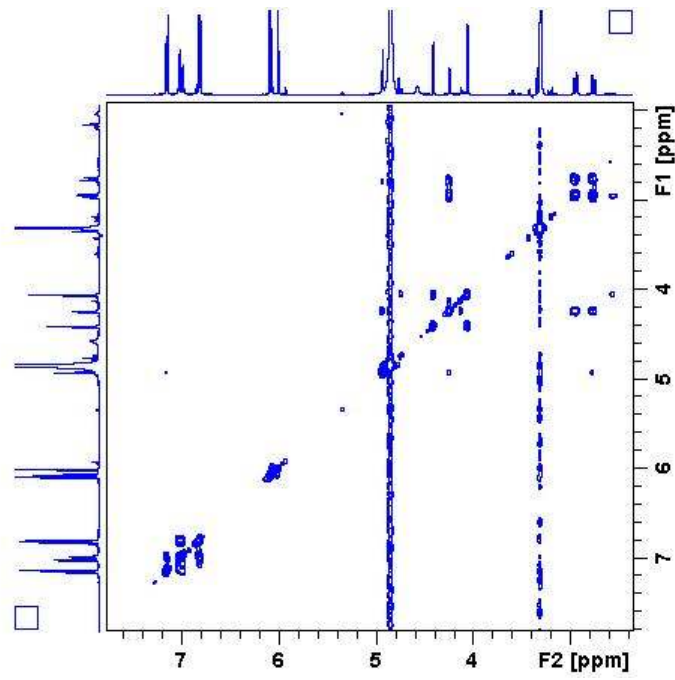
- Οι θέσεις σύνδεσης των δύο μορίων φαίνεται να είναι δύο, καθώς: 1) ο άνθρακας της θέσης 2 του ενός μορίου φλαβαν-3-όλης είναι τεταρτοϋποκατεστημένος, όπως προκύπτει από το HSQC και το φάσμα HMBC και 2) στη θέση 4 του ίδιου μορίου υπάρχει μόνο ένα πρωτόνιο. Επίσης, το πρωτόνιο της θέσης 4 δίνει σήμα διασταύρωσης στο HMBC με τους άνθρακες 8b και 9b του δεύτερου μορίου φλαβαν-3-όλης. Άρα η μία θέση σύνδεσης είναι **4 με 8b**, που επιβεβαιώνεται και από το ότι στη θέση 6 του δεύτερου μορίου φλαβαν-3-όλης (θέση 6b) υπάρχει το πρωτόνιο στα 6.08 ppm (s), που δεν παρουσιάζει καμία μετα-σύζευξη. Η άλλη θέση σύνδεσης κάναμε την υπόθεση ότι είναι η θέση 2 του ενός μορίου, με το υδροξύλιο της θέσης 7 (**2 με 7b**) του δεύτερου μορίου.
- Τέλος από τη φασματομετρία μάζης, όπου προέκυψε ότι (M+H⁺) 577.1343 με βάση τις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων και των ανθράκων και κυρίως του C-2b, ο οποίος συντονίζεται σε $\delta < 84$ ppm, και συγκρίνοντας με τη βιβλιογραφία (Lou et al., 1999, Wang et al., 2015) προκύπτει η δομή της προκυανιδίνης A2.

Πίνακας : Φασματοσκοπικά δεδομένα της ουσίας 7 (CD₃OD, 400Hz)

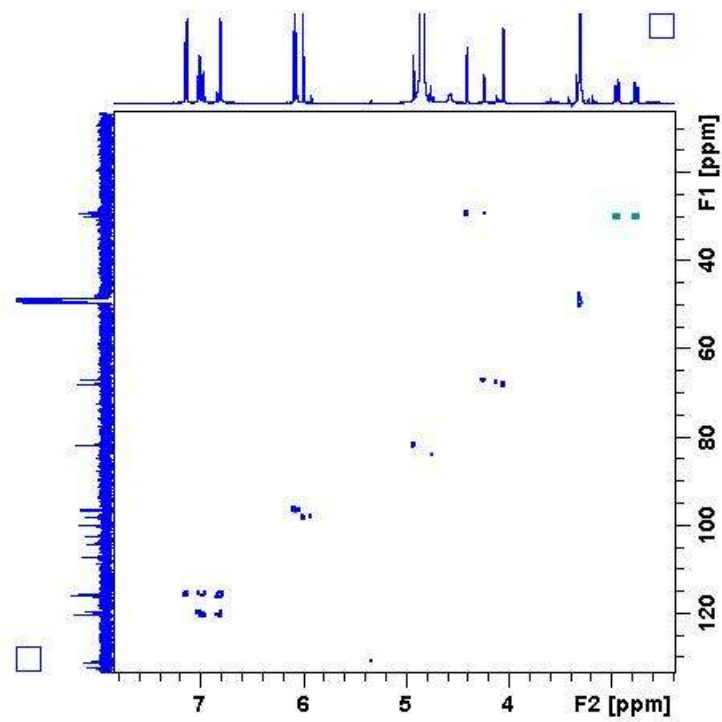
Θέση	Τύπος C	δ _C	δ _H	Αρ. H	Πολλαπλότητα	HMBC
2	C	100,2	-	-	-	-
3	CH	68.1	4.05	1	d (J=3.4)	10
4	CH	29.3	4.40	1	d (J=3.3)	3,5,9,10,8b,9b
5	C	157.0	-	-	-	-
6	CH	98.3	5.99	1	d (J=2.3)	5,8,10
7	C	158.2	-	-	-	-
8	CH	96.2	6.06	1	d (J=2.3)	6,10
9	C	154.3	-	-	-	-
10	C	104.3	-	-	-	-
1'	C	132.5	-	-	-	-
2'	CH	119.8	7.01	1	dd (J=8.3/2.2)	2',3',4',6'
3'	CH	115.6	6.80	1	d (J=8.2)	1',5'
4'	C	146.8	-	-	-	-
5'	C	146.0	-	-	-	-
6'	CH	115.7	7.13	1	d (J=2.2)	2',3',4',5'
2b	CH	81.8	4.92	1	s	1'b,2'b,6'b
3b	CH	67.0	4.23	1	m	10b
4bax	CH ₂	29.9	2.95	2	dd (J=17/4.9)	3b,5b,9b,10b
4beq			2.75		dd (J=17/2.0)	2b,3b,9b,10b
5b	C	156,6	-	-	-	-
6b	CH	96.5	6.08	1	s	5b,8b,10b
7b	C	152.3	-	-	-	-
8b	C	107.2	-	-	-	-
9b	C	152.2	-	-	-	-
10b	C	102.4	-	-	-	-
1'b	C	131.2	-	-	-	-
2'b	CH	120.4	6.97	1	dd (J=8.4/2.0)	2b,3'b,4'b,6'b
3'b	CH	116.0	6.80	1	d (J=8.3)	5'b
4'b	C	146.3	-	-	-	-
5'b	C	145.6	-	-	-	-
6'b	CH	115.9	7.14	1	d (J=2.0)	2b,1'b,4'b



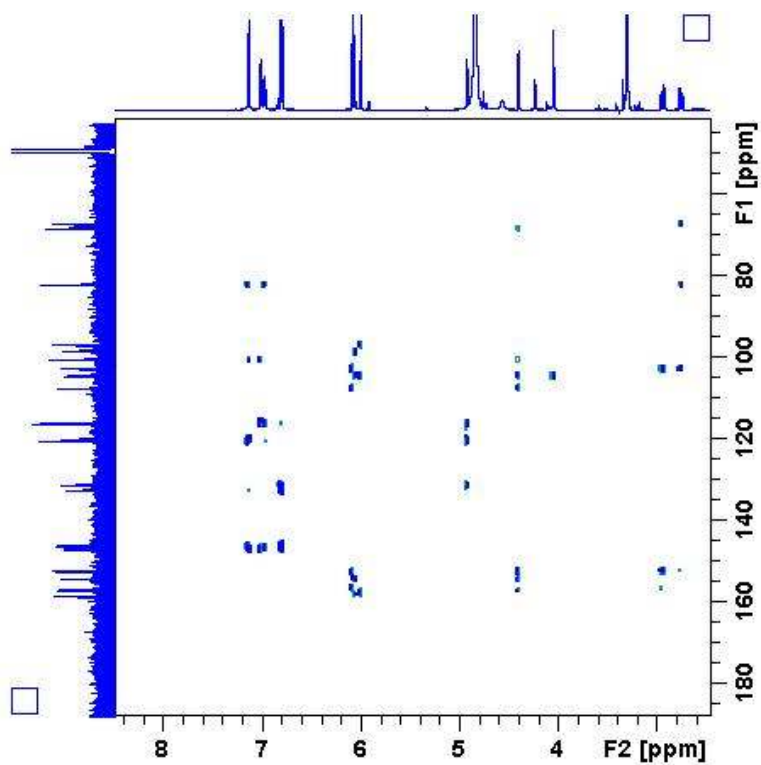
Φάσμα ¹H-NMR της ουσίας 7



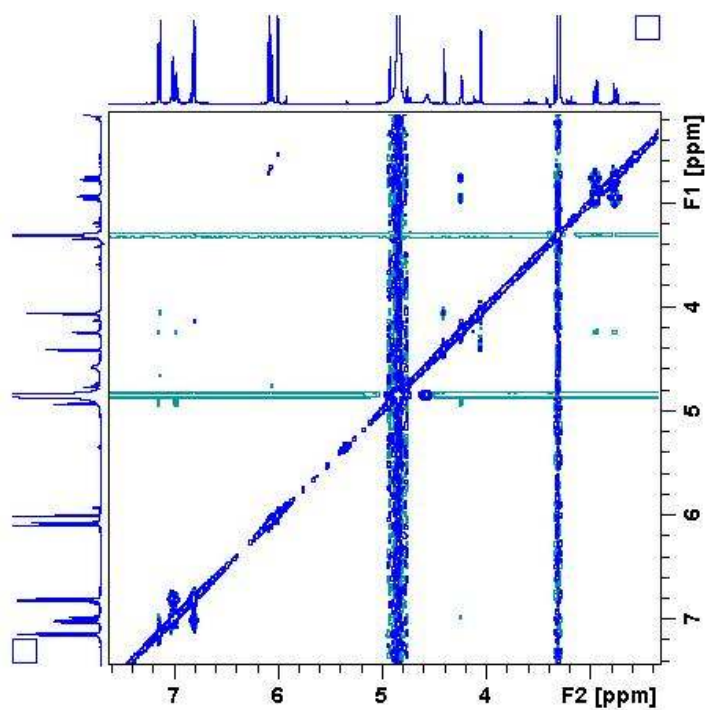
Φάσμα COSY της ουσίας 7



Φάσμα HSQC της ουσίας 7



Φάσμα HMBC της ουσίας 7

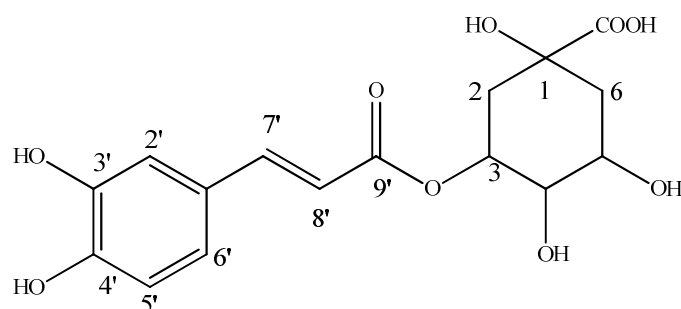


Φάσμα NOESY της ουσίας 7

Γ.4 ΦΑΙΝΟΛΟΞΕΑ

Γ.4.1. Ουσία 8: Χλωρογενικό οξύ

3-*O-E*-καφεϋλοκινικό οξύ



Η ουσία ανήκει στα παράγωγα των φαινολοξέων και αντιστοιχεί στο μοριακό τύπο $C_{16}H_{18}O_9$. Ταυτοποιήθηκε μετά από σύγκριση με τα βιβλιογραφικά δεδομένα (Pauli *et al.*, 1999).

Πρόκειται για έναν από τους πιο κοινούς εστέρες κινικού οξέος ανάμεσα στα δικοτυλήδωνα φυτά (Mølgaard and Ravn, 1988). Έχει απομονωθεί από πληθώρα φυτών που ανήκουν σε διάφορες οικογένειες, όπως Brassicaceae, Saxifragaceae, Rosaceae, Malaceae, Apiaceae, Asteraceae, Solanaceae, Hydrangeaceae, Valerianaceae, Ericaceae, Loganiaceae, Rubiaceae, Lamiaceae. Επίσης, έχει απομονωθεί και από κατώτερα φυτά, π.χ. φτέρες (Veit *et al.*, 1992). Μαζί με τα ισομερή, τους 4' και 5' εστέρες του κινικού οξέος αποτελεί χημειοταξινομικό δείκτη. Το χλωρογενικό οξύ έχει ιδιαίτερα μελετηθεί, καθώς αποτελεί συστατικό της καθημερινής μας διατροφής. Έχει βρεθεί στα μήλα (Mayr *et al.*, 1995), στη μύρα (Montanari *et al.*, 1999), κυρίως όμως σε ροφήματα όπως ο καφές (Rogers *et al.*, 1999) και το τσάι Maté (Mazzafera *et al.*, 1997). Πολλές μελέτες έχουν γίνει σε διάφορες ποικιλίες του καφέ (*Coffea* sp.) και αφορούν στην περιεκτικότητά τους σε χλωρογενικό οξύ (Morishita *et al.*, 1986, Rogers *et al.*, 1999), καθώς και άλλα παράγωγα του κινικού ή του καφεϊκού οξέος.

Αρχικά, υποθέσαμε ότι πρόκειται για παράγωγο φαινολοξέος λόγω του κυανού φθορισμού σε υπεριώδες φως στη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας. Μετά από τη φασματοσκοπική ανάλυση και με σύγκριση με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, η υπόθεση αυτή επιβεβαιώθηκε.

Κατά την πρώτη ανάγνωση του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ της ουσίας **8** εντοπίζεται η παρουσία αφενός ενός αρωματικού συστήματος, το οποίο εμφανίζει υποκατάσταση τύπου ABX [δ_{H} 7.06, d ($J=1.9\text{Hz}$)/ δ_{H} 6.95 dd ($J=8.2/1.9\text{Hz}$)/ δ_{H} 6.79 d ($J=8.2\text{ Hz}$)] και αφετέρου δύο πρωτονίων, τα οποία ανήκουν σε *trans*-διπλό δεσμό, καθώς δίνουν δύο διπλές κορυφές σε δ_{H} 7.58 και 6.31 με μεγάλη σταθερά σύζευξης ($J=15.5\text{ Hz}$). Σύμφωνα με το φάσμα NOESY της ουσίας τα πρωτόνια του διπλού δεσμού βρίσκονται πλησίον των πρωτονίων δ_{H} 7.06 και δ_{H} 6.95 του αρωματικού πυρήνα.

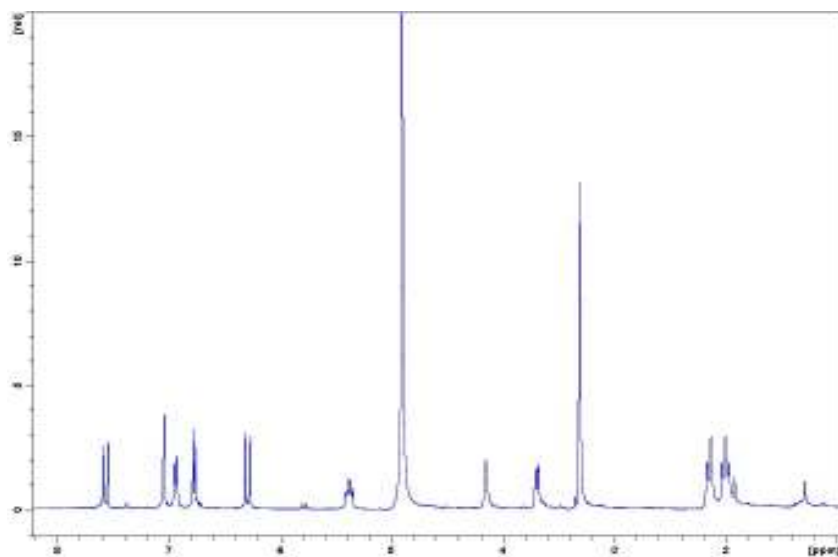
Παράλληλα στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ εντοπίζεται η πολλαπλή κορυφή σε δ_{H} 5.40, καθώς ένα σύνολο κορυφών, οι οποίες εμφανίζονται την περιοχή δ_{H} 2.13-4.16. Σύμφωνα με το φάσμα COSY, όσον αφορά το τμήμα αυτό, το πρωτόνιο με δ_{H} 4.16 συζεύγνυται με το πρωτόνιο σε δ_{H} 3.71 και αυτό με το πρωτόνιο σε δ_{H} 5.40. Από τη χημική μετατόπιση των πρωτονίων αυτών συμπεραίνεται ότι πιθανώς να ανήκουν σε οξυγονωμένους άνθρακες. Επίσης υπάρχουν και δύο ακόμα αλειφατικά μεθυλένια (φάσμα COSY), τα οποία ανήκουν στους άνθρακες σε δ_{C} 38.5 και 40.2 (φάσμα HSQC) και παρουσιάζουν και τα δύο στο φάσμα COSY σύζευξη με τα πρωτόνια σε δ_{H} 5.40 (H-3) και 4.16 (H-5). Από το φάσμα HSQC προκύπτει, ότι ο C-3, 72.1 φέρει οξυγονούχο ομάδα, ενώ από τη χημική μετατόπιση του πρωτονίου αντιλαμβανόμαστε ότι η θέση αυτή αποτελεί θέση ακυλίωσης. Με τη βοήθεια των φασμάτων COSY και HSQC προκύπτει η εξής αλληλουχία σημάτων:



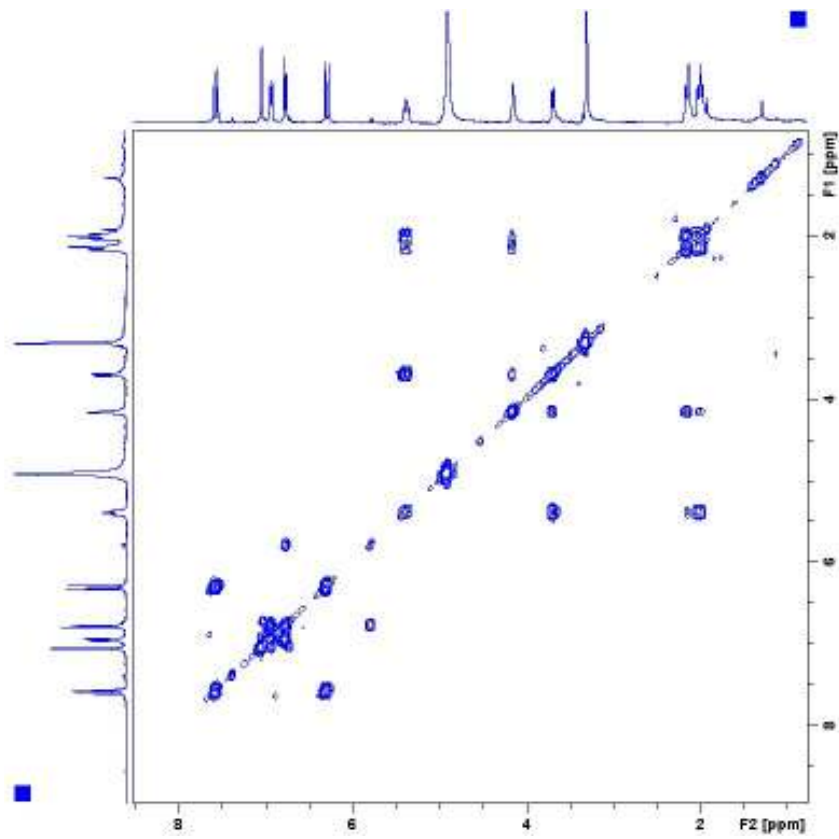
Δεδομένου ότι τα φάσματα έχουν ληφθεί σε δευτεριωμένη μεθανόλη, το καρβοξυλικό πρωτόνιο δεν είναι ορατό. Τα παραπάνω δεδομένα παραπέμπουν στη δομή του κινικού οξέος.

Πίνακας: Φασματοσκοπικά δεδομένα της ουσίας 8 (CD₃OD, 400Hz)

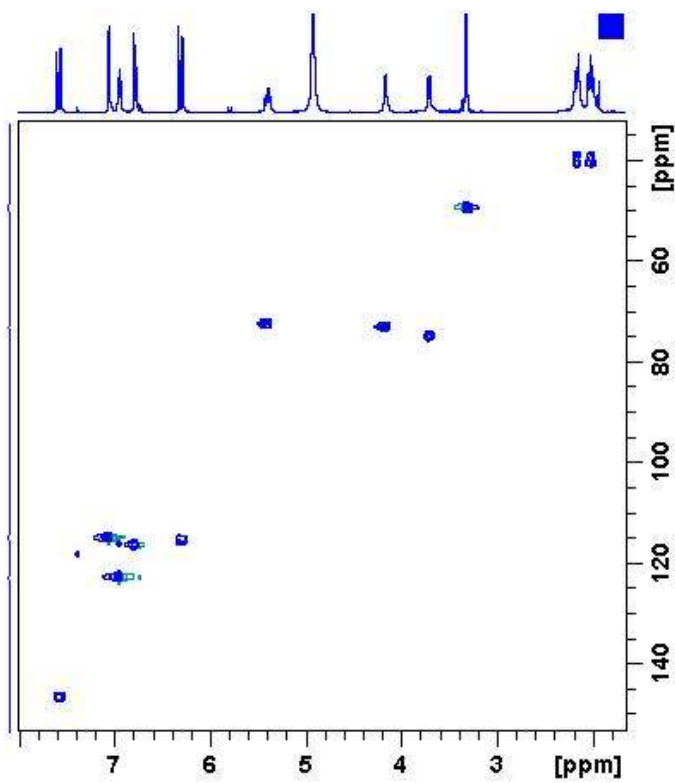
Θέση	Τύπος C	δ _C	δ _H	Αρ. H	Πολλαπλότητα J (Hz)
καφεοϋλο-ομάδα					
2'	CH	114.6	7.06	1	d (1.9)
5'	CH	116.1	6.79	1	d (8.2)
6'	CH	122.6	6.95	1	dd (8.2/1.9)
7'	CH	146.6	7.58	1	d (15.5)
8'	CH	115.2	6.31	1	d (15.5)
κινούλο-ομάδα					
2a	CH ₂	38.5	2.13	1	m
2b			2.00	1	m
3	CH	72.1	5.40	1	m
4	CH	74.5	3.71	1	dd (9.9/3.1)
5	CH	72.7	4.16	1	brs
6a	CH ₂	40.2	2.13	1	m
6b			2.00	1	m



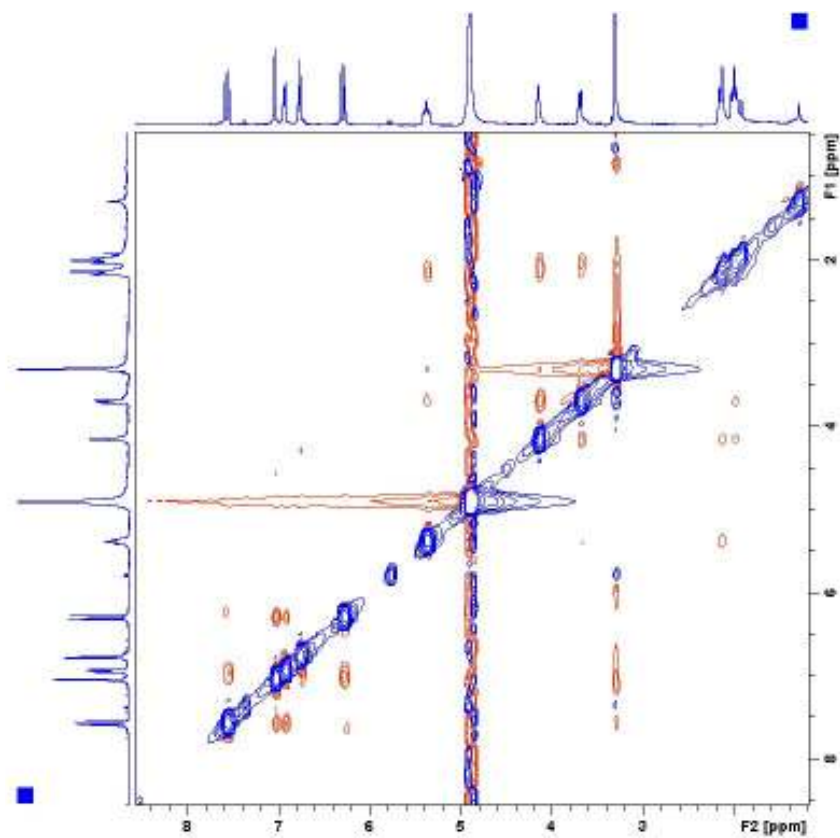
Φάσμα ¹H-NMR της ουσίας 8



Φάσμα COSY της ουσίας 8



Φάσμα HSQC της ουσίας 8



Φάσμα NOESY της ουσίας **8**

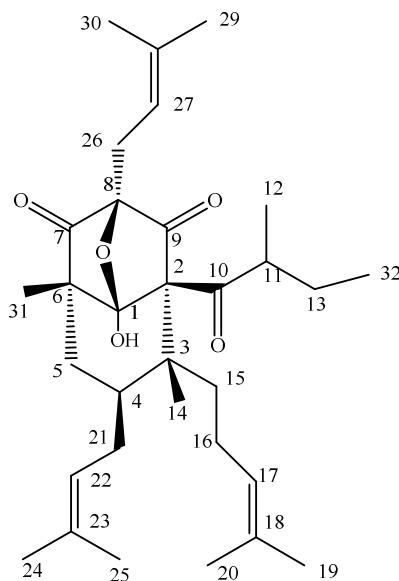
II. ΦΛΟΡΟΓΛΥΚΙΝΟΛΕΣ

Γ.5. Παράγωγο Υπερφορίνης

Γ.5.1. Ουσία 9: Αντι-υπερφολιατίνη

8-υδροξυ-(6-αποπρενυλο-6,13-μεθυλο-υπερφορίνη) 8,1-ημιακετάλη

Η ουσία **9** απομονώθηκε ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα και ταυτοποιήθηκε μετά από φασματοσκοπική μελέτη και φασματομετρία μάζας.



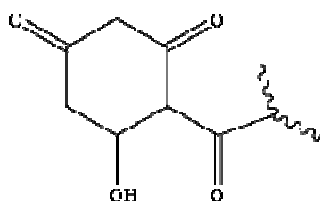
Πρόκειται για ένα πολυ-ισοπρενυλιωμένο παράγωγο υπερφορίνης, που σύμφωνα με τα μέχρι έως τώρα δεδομένα είναι νέο φυσικό προϊόν. Έχει μάζα $[M-H]^-$ m/z 511.21 που αντιστοιχεί σε μορικό τύπο $C_{32}H_{47}O_5$.

Τα ακόλουθα δεδομένα από την μελέτη των φασμάτων 1H -NMR, ^{13}C -NMR και HSQC μας οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για παράγωγο υπερφορίνης:

- Η παρουσία τριών πρωτονίων, που συμμετέχουν σε διπλό δεσμό σε δ_H 5.03, 4.96, 4.91, υποδεικνύει την παρουσία τριών πρενυλικών αλυσίδων (3-μεθυλο-βουτεν-2-ενυλο- ομάδα). Τα σήματα αυτά, που εμφανίζονται ως τριπλές κορυφές σε δ_H περίπου 5.0, είναι χαρακτηριστικές για τα πρενυλικά παράγωγα φλορογλυκινολών. Ταυτόχρονα, η παρουσία 6 αρκετά αποθωρακισμένων μεθυλίων σε δ_H 1.68, 1.53, 1.58, 1.66, 1.63 και 1.64 (μεθύλια που συνδέονται σε διπλό δεσμό) επιβεβαιώνει την υπόθεση αυτή. Το μόριο της υπερφορίνης αποτελείται από 4 πρενυλικές αλυσίδες γι'

αυτό και παρουσιάζει 8 σήματα πρενυλικών μεθυλίων στην περιοχή αυτή (Mitsopoulou et al., 2015).

- Η πολλαπλή κορυφή σε δ_H 2.96 είναι χαρακτηριστική για την αλειφατική αλκυλομάδα των φλορογλυκινολών.
- Η απλή κορυφή σε δ_H 7.87 αντιστοιχεί σε υδροξύλιο καθώς στο φάσμα HSQC δεν εμφανίζει σύζευξη με άτομο άνθρακα.
- Επιπλέον, στο φάσμα ^{13}C -NMR, διακρίνονται 3 καρβονυλικοί άνθρακες σε δ_C 217.7, 209.9, 206.7. Ο άνθρακας σε 217.7 πιθανότατα αντιστοιχεί στο καρβονύλιο της πλευρικής αλυσίδας του σκελετού των φλορογλυκινολών, ενώ οι άλλοι δύο συμπεραίνουμε ότι προέρχονται από την οξείδωση των υδροξυλίων του φλορογλυκινολικού σκελετού. Άρα ο βασικός σκελετός πιθανότατα διαμορφώνεται ως εξής:

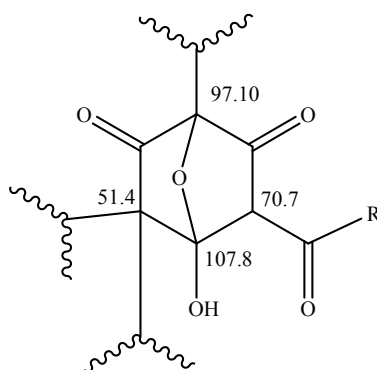


Αναλύοντας εκτενέστερα τα φασματοσκοπικά δεδομένα και κυρίως το φάσμα ^{13}C -NMR η παρουσία ενός δακτυλίου ημιακετάλης αποτέλεσε βασικό κλειδί για την απόδοση της δομής. Συγκεκριμένα:

- το σήμα του υδροξυλίου σε χαμηλότερα πεδία σε δ_H 7.83
- η εμφάνιση δύο οξυγονωμένων τεταρτοταγών ανθράκων σε δ_C 107.9 και 97.1
- η παρουσία δύο τεταρτοταγών ανθράκων σε δ_C 51.4 και 70.7
- οι δύο καρβονυλικοί άνθρακες, που αναφέρονται παραπάνω
- η απουσία πρωτονίων στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος

μας οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για πενταϋποκατέστημένο φλορογλυκινολικό σκελετό, που περιλαμβάνει δύο κετόνες και μία ακετάλη καρβονυλίου.

Άρα πρόκειται για οξυγονωμένο παράγωγο υπερφορίνης (Verota et al., 2000, Benkiki et al., 2003) που διαμορφώνεται ως εξής:



Συνεχίζοντας, από το φάσμα HMBC, τα δύο δίδυμα πρωτόνια σε δ_H 2.53 (dd, $J=15.6/7.6$ Hz) και δ_H 2.76 (dd, $J=15.6/7.2$ Hz), που ανήκουν στον άνθρακα σε δ_C 23.7 (φάσμα HSQC) δίνουν σήμα διασταύρωσης με τα δύο καρβονύλια σε δ_C 209.9 και 206.7, καθώς και με τον άνθρακα σε δ_C 97.1, άρα αποτελούν μέρος της πρενυλικής αλυσίδας που τοποθετείται μεταξύ των καρβονυλικών αυτών ανθράκων και συνδέονται στον άνθρακα σε δ_C 97.1. Με τη βοήθεια του φάσματος HMBC και COSY και με βάση την αριθμηση που δόθηκε μετά τον καθορισμό της δομής, η πρενυλική αυτή αλυσίδα καθορίστηκε πλήρως: δ_H 2.53 (dd, $J=15.6/7.6$ Hz) (**H-26a**) και δ_H 2.76 (dd, $J=15.6/7.2$ Hz) (**H-26b**), δ_H 5.03 (t, $J=7.3$ Hz) (**H-27**), δ_H 1.63 (3H, s) (**CH₃-30**) και δ_H 1.64 (3H, s) (**CH₃-29**).

Εκτός από τα πρενυλικά μεθύλια διακρίνονται επιπλέον τέσσερα σήματα μεθυλίων σε δ_H 1.14 (s), δ_H 1.02 (s), δ_H 0.90 (d, $J=$) και δ_H 0.88 (t).

Για το μεθύλιο σε δ_H 1.14 (**CH₃-31**) από το φάσμα HMBC προκύπτει ότι συζεύγνυται με τον άνθρακα καρβονυλίου σε δ_C 209.9 (**C-7**), με τον άνθρακα, που φέρει το υδροξύλιο της ημιακετάλης σε δ_C 107.9 (**C-1**) και με τους άνθρακες σε δ_C 51.4 (**C-6**) και δ_C 33.9 (**C-5**). Αυτό υποδεικνύει ότι το μεθύλιο αυτό τοποθετείται στον άνθρακα σε δ_C 51.4. Στον άνθρακα αυτό στη δομή της υπερφορίνης τοποθετείται πρενυλική ομάδα (Tanaka et al., 2004).

Για την πλήρη απόδοση της δομής έγινε επισταμένη μελέτη όλων των διαδοχικών σημάτων HMBC και COSY απ'όπου προέκυψαν τα ακόλουθα δεδομένα:

- Τα δίδυμα πρωτόνια του άνθρακα **C-5** δίνουν σήμα διασταύρωσης στο φάσμα COSY με το πρωτόνιο σε δ_H 1.05 (δ_C 42.0) (**H-4/C-4**), το οποίο με τη σειρά του συζεύγνυται με τα δίδυμα πρωτόνια δ_H 1.65 και 2.08, τα οποία ανήκουν σε πρενυλική αλυσίδα, η οποία με βάση το φάσμα HMBC καθορίζεται ως εξής: δ_H 1.65 (**H-21a**) και

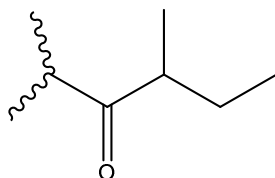
δ_{H} 2.08 (**H-21b**), δ_{H} 4.91 (t, $J=6.8$ Hz) (**H-22**), δ_{H} 1.68 (3H, s) (**CH₃-24**), δ_{H} 1.55 (3H, s) (**CH₃-25**).

- Το πρωτόνιο της θέσης **4** δίνει σήμα διασταύρωσης στο HMBC με τον άνθρακα δ_{C} 47.0 (**C-3**) ο οποίος είναι τετραϋποκατεστημένος.

- Υπάρχει ακόμα μία πρενυλική ομάδα, η οποία αποτελείται από τα ακόλουθα σήματα: δ_{H} 1.82 (δεν διακρίνονται οι σταθερές σύζευξης λόγω αλληλεπικάλυψης κορυφών) (**H-16a**) και δ_{H} 2.25 (m) (**H-16b**), δ_{H} 4.96 (t, $J=7.0$ Hz) (**H-17**) και τα σήματα των μεθυλίων δ_{H} 1.58 (3H, s) (**CH₃-20**), δ_{H} 1.66 (3H, s) (**CH₃-19**). Τα δίδυμα πρωτόνια της θέσης **16**, που ανήκουν στην παραπάνω πρενυλική αλυσίδα, συζεύγγονται στο φάσμα COSY με τα πρωτόνια μεθυλενίου σε δ_{H} 1.60 και 1.74 (**H-15**), τα οποία δίνουν σήμα διασταύρωσης στο φάσμα HMBC με τον άνθρακα δ_{C} 47.0 (**C-3**) και τον άνθρακα δ_{C} 70.7 (**C-2**). Επιπλέον, το μεθύλιο σε δ_{H} 1.02 δίνει σήμα διασταύρωσης στο HMBC με τα μεθυλένια των θέσεων **4** και **16** και με τον άνθρακα σε δ_{C} 70.7 (**C-2**). Άρα το μεθύλιο αυτό τοποθετείται στον άνθρακα C-3, ο οποίος συνδέεται με τον δ_{C} 70.7 (**C-2**) δημιουργώντας έναν εξακυκλικό δακτύλιο.

Απομένει πλέον ο καθορισμός της αλειφατικής αλκυλομάδας της φλορογλυκινόλης:

- το πρωτόνιο σε δ_{H} 2.96 (**H-11**), που βρίσκεται δίπλα στο καρβονύλιο της πλευρικής αλυσίδας, παρουσιάζει στο φάσμα HMBC δύο ισχυρές συζεύξεις (J_3): με τον άνθρακα σε δ_{C} 16.2 (**C-12**) (δ_{H} 0.90, d, $J=6.8$ Hz) και με έναν μεθυλενικό άνθρακα σε δ_{C} 25.08 (**C-13**) (δ_{H} 1.48 και 1.62), ενώ στο φάσμα COSY είναι ευδιάκριτες και οι συζεύξεις αυτού του πρωτονίου σε δ_{H} 2.96 με τα πρωτόνια των ανθράκων αυτών. Επιπλέον, τα μεθυλενικά πρωτόνια σε δ_{H} 1.48 και 1.62 (**H-13a** και **H-13b**) παρουσιάζουν στο φάσμα COSY σύζευξη με τα μεθυλικά πρωτόνια δ_{H} 0.88 (**H-32**) του άνθρακα δ_{C} 11.5 (**C-32**). Επομένως, η πλευρική αλυσίδα παρουσιάζει την ακόλουθη δομή, η οποία ταυτίζεται με την πλευρική αλυσίδα της αντι-υπερφορίνης (2-μεθυλο-βουτανούλο-ομάδα):



Τέλος, η μεγάλη διαξονική σύζευξη ($J=13.9$ Hz) μεταξύ του υδρογόνου της θέσης 5 (**H-5ax**) και του υδρογόνου της θέσης 4 (**H-4**) υποδεικνύει την ισημερινή θέση της πρενυλικής αλυσίδας, που εφάπτεται στον άνθρακα C-4. Ακόμη, το ισχυρό σήμα

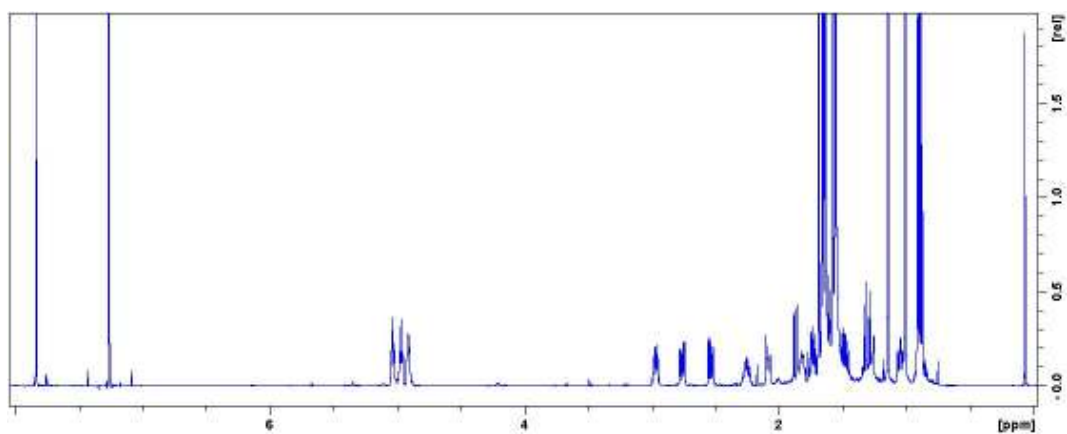
διασταύρωσης μεταξύ του H-5αx με τα μεθύλια CH₃-31 και CH₃-14 μας επιτρέπει να συμπεράνουμε την διαμόρφωση ανάκλιντρου του κυκλοεξανικού δακτυλίου και τη στεreoχημική διαμόρφωση των κέντρων C-3 και C-4, που συμφωνεί και με τη βιβλιογραφία (Tanaka et al., 2004).

Έτσι με βάση τα παραπάνω δεδομένα, το μόριο αυτό ταυτοποιήθηκε ως **8,1-ημιακετάλη της 8-υδροξυ-6-αποπρενυλο-6,13-μεθυλο-υπερφορίνης**. Ένα παρόμοιο οξυγονωμένο παράγωγο έχει προηγουμένως εντοπιστεί στο *H. perforatum* (Verotta et al., 2000) και άλλο ένα στο *H. scarbum* (Tanaka et al., 2004) και στο *H. perfoliatum* (Benkiki et al., 2003).

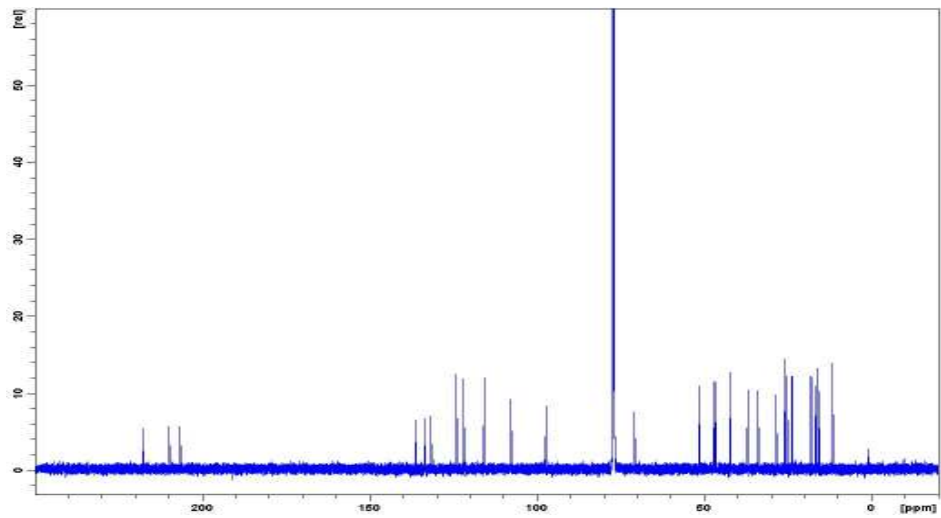
Πίνακας: Φασματοσκοπικά δεδομένα της ουσίας 9 (CDCl₃, 600 Hz)

Θέση	Τύπος C	δ _c	δ _H	Αρ. H	Πολλαπλότητα	HMBC
1	C	107.8	-	-	-	-
2	C	70.7	-	-	-	-
3	C	47.0	-	-	-	-
4	CH	42.0	1.05	1	m	3
5	CH ₂	33.9	1.31(ax)	2	dd (13.4/13.9)	4,6,7,21,31
			1.87(eq)		dd (J=14.3/3.6)	6,21
6	C	51.4	-	-	-	-
7	C	209.9	-	-	-	-
8	C	97.10	-	-	-	-
9	C	206.7	-	-	-	-
10	C	217.7	-	-	-	-
11	CH	46.4	2.96	1	m	10,12,32
12	CH ₃	16.2	0.90	3	d (J=7.0)	10,11,13
13a	CH ₂	25.1	1.48	2	m	10,11,12,32
13b			1.62		m	
14	CH ₃	15.4	1.01	3	s	2,3,4,15
15a	CH ₂	36.9	1.60	2	m	14,16
15b			1.74		m	2,3,14,16,17
16a	CH ₂	23.9	1.82	2	m	15,17
16b			2.25		m	-
17	CH	124.0	4.96	1	t (J=7.0)	15,19,20
18	C	131.7	-	-	-	-
19	CH ₃	25.7	1.66	3	s	17,18,19,20
20	CH ₃	17.8	1.58	3	s	17,18
21a	CH ₂	28.3	1.65	2		-
21b			2.08			22
22	CH	122.0	4.91	1	t (J=6.8)	21,24,25

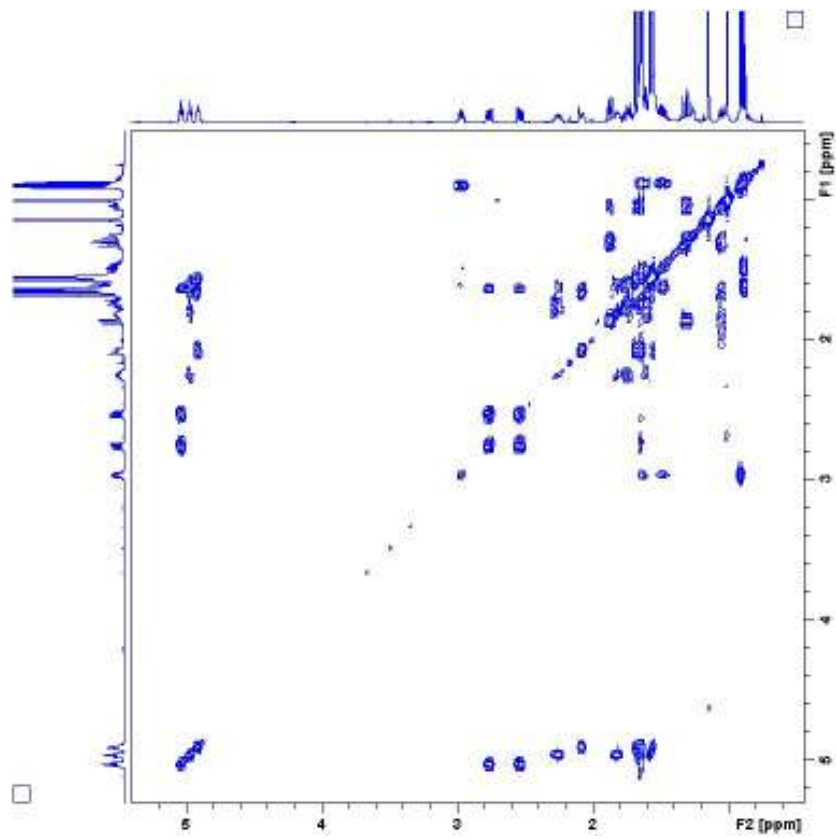
23	C	133.5	-	-	-	-
24	CH ₃	25.8	1.68	3	s	22,23
25	CH ₃	18.0	1.55	3	s	23,24
26a	CH ₂	23.7	2.53	2	dd (J=15.6/7.6)	7,8,9
26b			2.76		dd (J=15.6/7.2)	7,8,9
27	CH	115.7	5.03	1	t (J=7.3)	26,29,30
28	C	136.0	-	-	-	-
29	CH ₃	25.8	1.64	3	s	27,28
30	CH ₃	17.9	1.63	3	s	27, 28
31	CH	16.7	1.14	3	s	1,5,6,7
32	CH ₃	11.5	0.88	3	t (J= 7.3)	11,13
1-OH	-	-	7.83	1	s	1,2,6



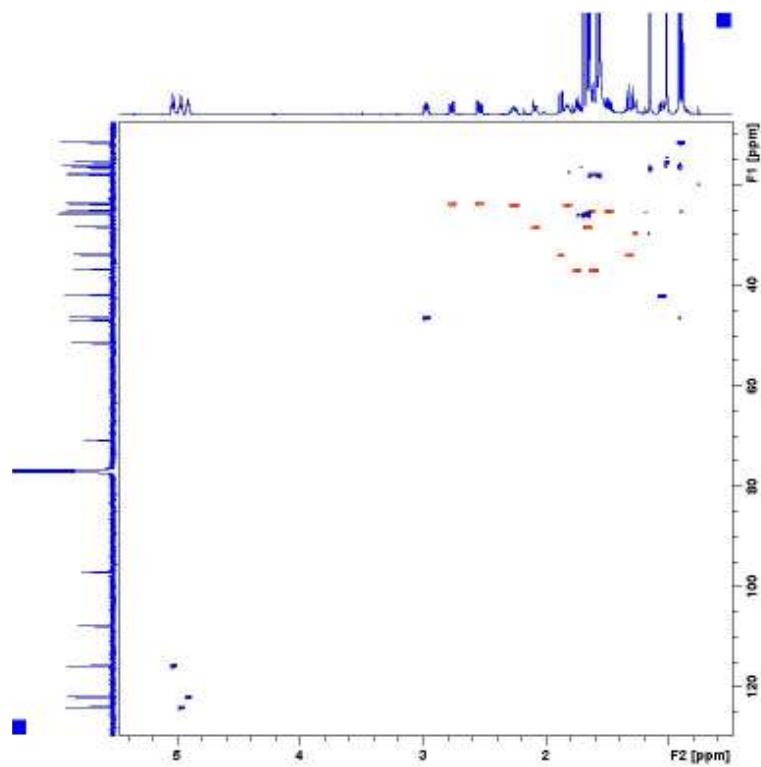
Φάσμα ¹H-NMR της ουσίας **9**



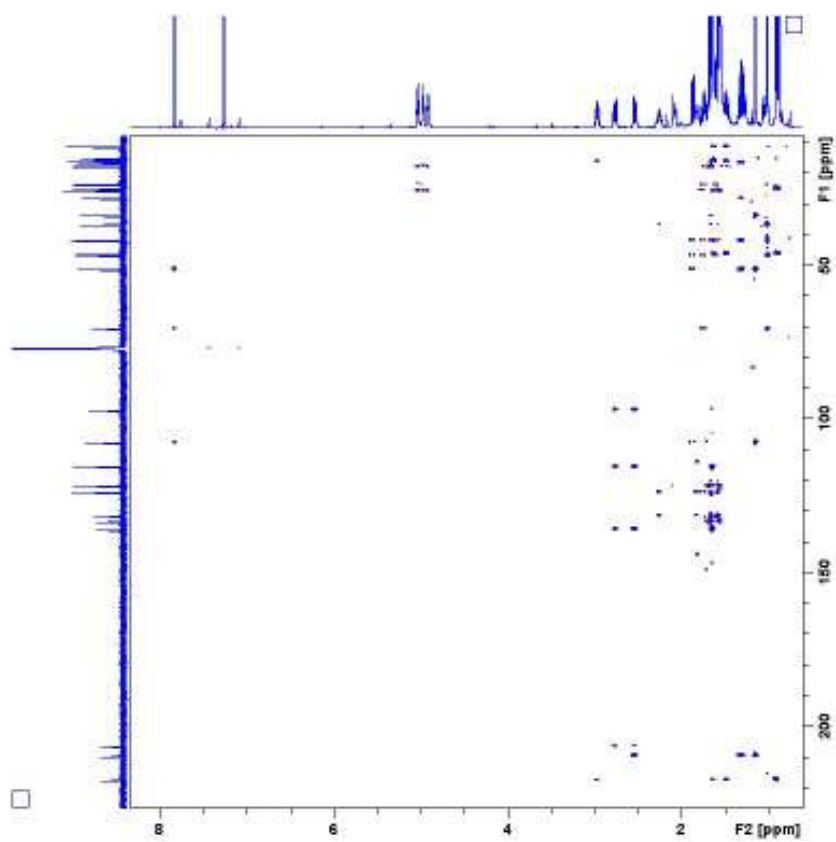
Φάσμα ^{13}C -NMR της ουσίας **9**



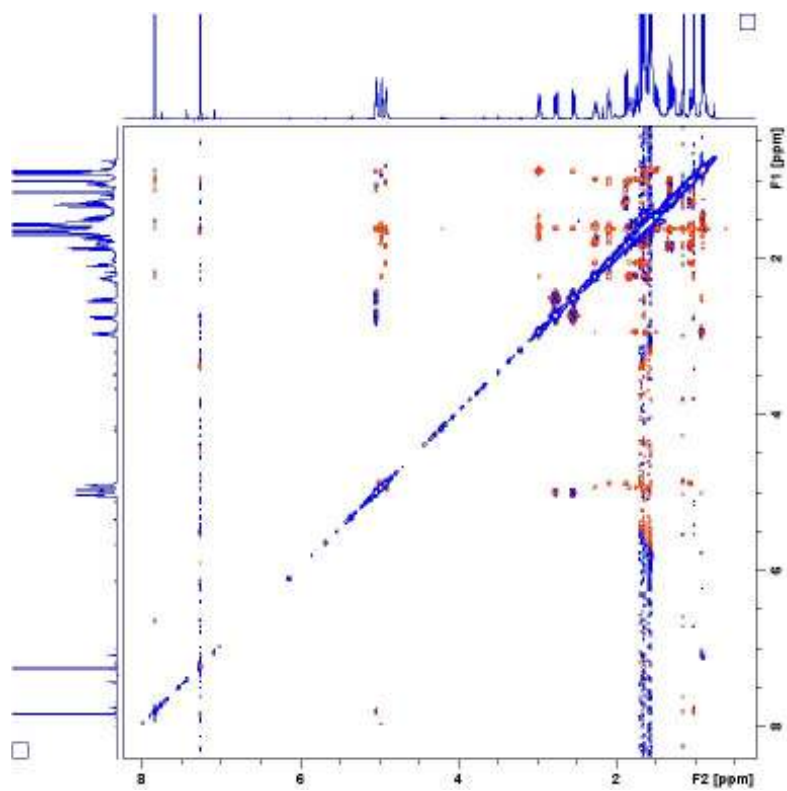
Φάσμα COSY της ουσίας **9**



Φάσμα HSQC της ουσίας **9**



Φάσμα HMBC της ουσίας **9**

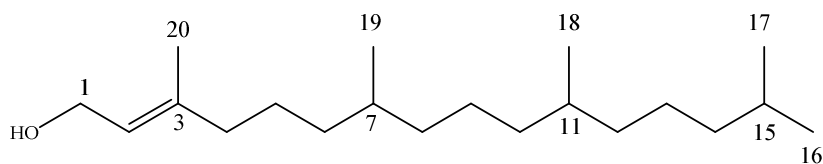


Φάσμα NOESY της ουσίας 9

III. ТЕРИЕНІА

Γ.6. ΔΙΤΕΡΠΕΝΙΑ

Γ.6.1. Ουσία 10: *trans*-φυτόλη



Η ουσία **10** απομονώθηκε ως υπόλευκο υπόλειμμα και ταυτοποιήθηκε μετά από φασματοσκοπική μελέτη και σύγκριση με τα βιβλιογραφικά δεδομένα. Αντιστοιχεί σε μοριακό τύπο C₂₀H₄₀O.

Με την πρώτη ανάγνωση του φάσματος ¹H-NMR υποθέσαμε ότι ίσως πρόκειται για κάποιο τερπένιο, καθώς:

- Στην περιοχή των διπλών δεσμών, σε δ_H 5.41 εμφανίζεται μία τριπλώς διπλή κορυφή, που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο, οπότε και αντιστοιχεί σε πρωτόνιο διπλού δεσμού. Ο δεύτερος άνθρακας που συμμετέχει στο διπλό δεσμό είναι πλήρως υποκατεστημένος καθώς δεν εμφανίζεται άλλο σήμα στην περιοχή αυτή.
- Σε δ_H 4.15, πιθανότατα σε οξυγονωμένο άνθρακα, εμφανίζεται μία διπλή κορυφή που ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια.
- Στην περιοχή δ_H 0.87-2.00 εμφανίζονται πολλά σήματα που αντιστοιχούν σε αλειφατικά πρωτόνια.

Η εικόνα αυτή του φάσματος ¹H-NMR είναι χαρακτηριστική των τερπενίων. Από το φάσμα άνθρακα προκύπτει ότι το μόριο διαθέτει είκοσι άνθρακες, άρα πρόκειται για διτερπένιο. Από το φάσμα HSQC βλέπουμε ότι πλην του τεταρτοταγούς άνθρακα σε δ_C 140.3, που συμμετέχει στο διπλό δεσμό, όλοι οι υπόλοιποι άνθρακες είναι πρωτονιωμένοι. Άρα λόγω της απουσίας τεταρτοταγών ανθράκων, καταλήξαμε ότι πιθανότατα πρόκειται για αλειφατικό διτερπένιο.

Ανατρέχοντας στη βιβλιογραφία και μελετώντας κυρίως το φάσμα ¹³C-NMR της ουσίας **10** σε σύγκριση με τα χαρακτηριστικά σήματα ανθράκων για τα διτερπένια, καταλήξαμε ότι πρόκειται για την *trans*-φυτόλη, καθώς οι χημικές μετατοπίσεις των ανθράκων ταυτίζονται πλήρως με τη βιβλιογραφία (Arigoni et al., 1997). Αυτό επιβεβαιώθηκε και μετά από την ανάλυση του φάσματος μάζας μέσω GC-MS, όπου

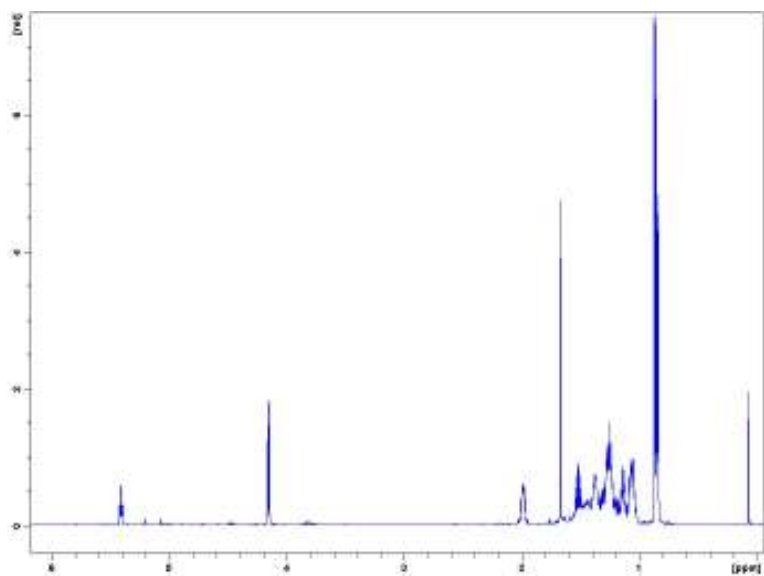
διακρίνεται η βασική κορυφή σε m/z 71 και από την σύγκριση του φάσματος μάζας με τα αντίστοιχα της βιβλιογραφίας:

<http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C150867&Mask=200#Mass-Spec>

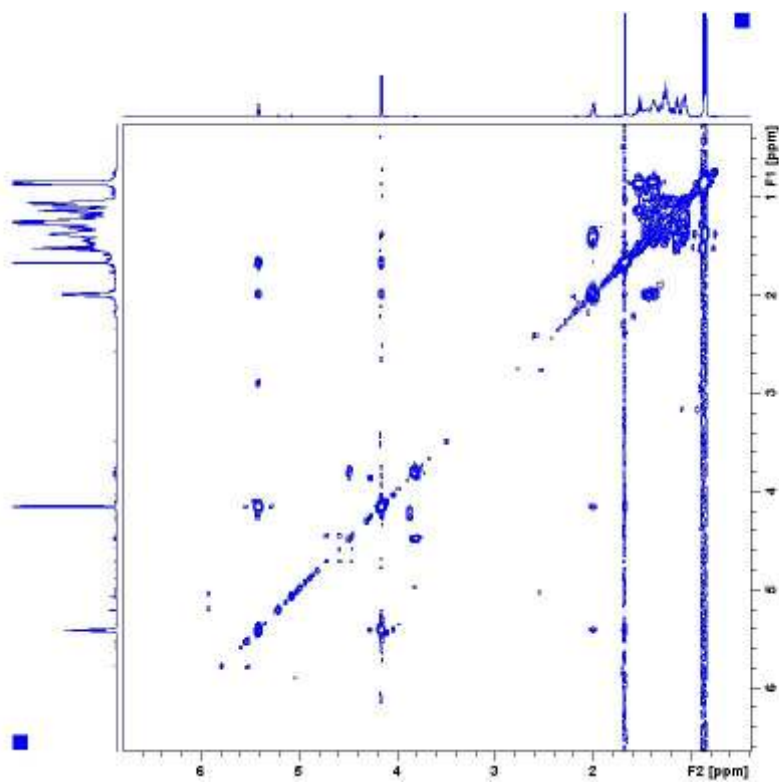
Πίνακας: Φασματοσκοπικά δεδομένα της ουσίας 10, (CDCl₃, 600Hz)

Θέση	Τύπος C	δ _C	δ _H	Πολλαπλότητα J (Hz)
3	C	140.33	-	-
2	CH	123.07	5.41	td (7.0/1.1)
1	CH ₂	59.43	4.15	d (7.0)
4	CH ₂	39.87	1.99	m*
14	CH ₂	39.36	1.14	m*
10	CH ₂	37.42	1.06 & 1.26	m*
8	CH ₂	37.35	1.06 & 1.26	m*
12	CH ₂	37.28	1.06 & 1.26	m*
6	CH ₂	36.65	1.08 & 1.27	m*
11	CH	32.79	1.38	m*
7	CH	32.69	1.38	m*
15	CH	27.97	1.52	m*
5	CH ₂	25.13	1.38 & 1.44	m*
13	CH ₂	24.79	1.24 & 1.28	m*
9	CH ₂	24.47	1.18 & 1.19	m*
17	CH ₃	22.71	0.87	d*
16	CH ₃	22.62	0.87	d*
19	CH ₃	19.75	0.85	d*
18	CH ₃	19.71	0.85	d*
20	CH ₃	16.17	1.67	s

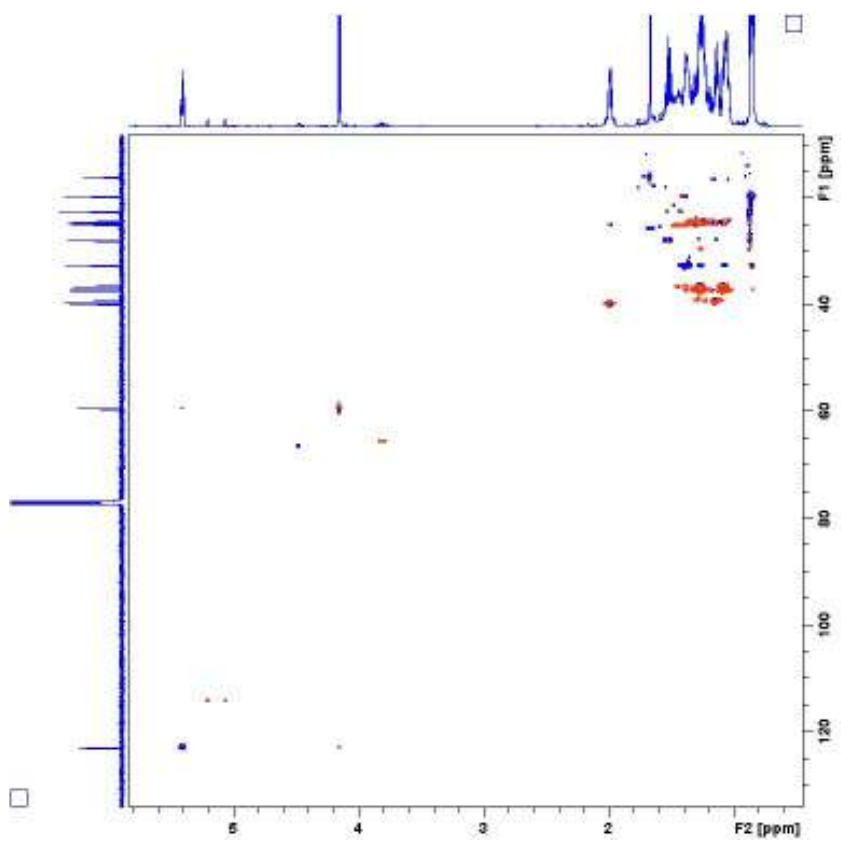
*Οι πολλαπλότητες και οι σταθερές σύζευξης δεν είναι δυνατον να καθοριστούν λόγω αλληλεπικάλυψης των σημάτων.



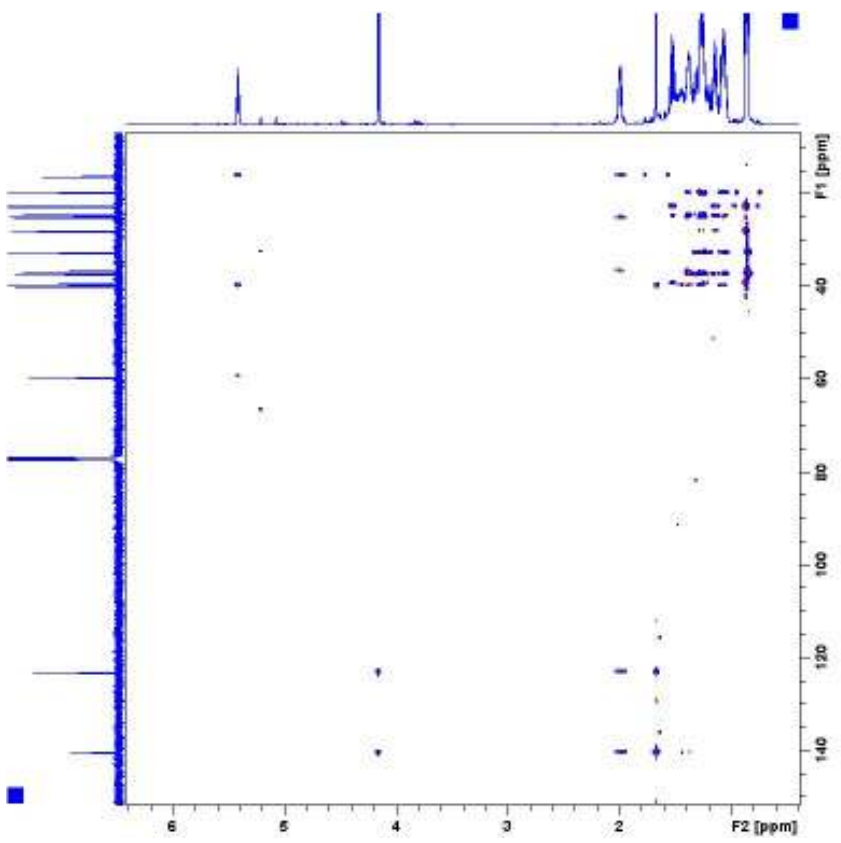
Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ουσίας **10**



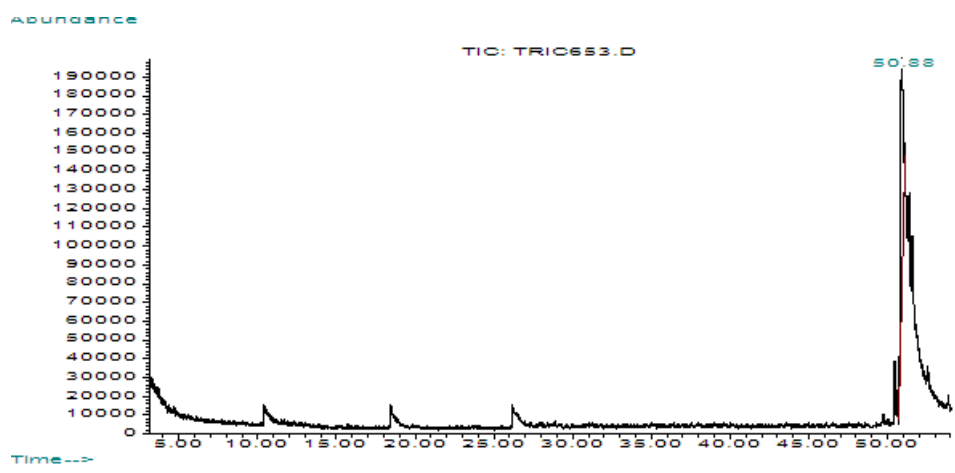
Φάσμα COSY της ουσίας **10**



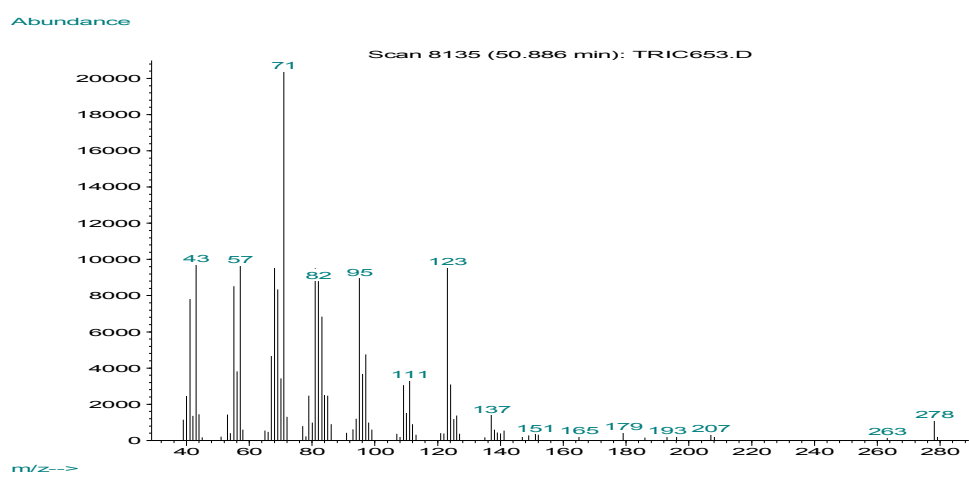
Φάσμα HSQC της ουσίας **10**



Φάσμα HMBC της ουσίας **10**



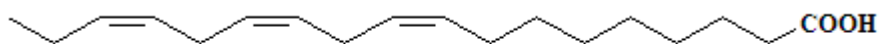
Αέριο Χρωματογράφημα της ουσίας **10**



Φάσμα μάζης ουσίας **10**

IV. ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ

Γ.7.1. Ουσία 11: α-λινολενικό οξύ



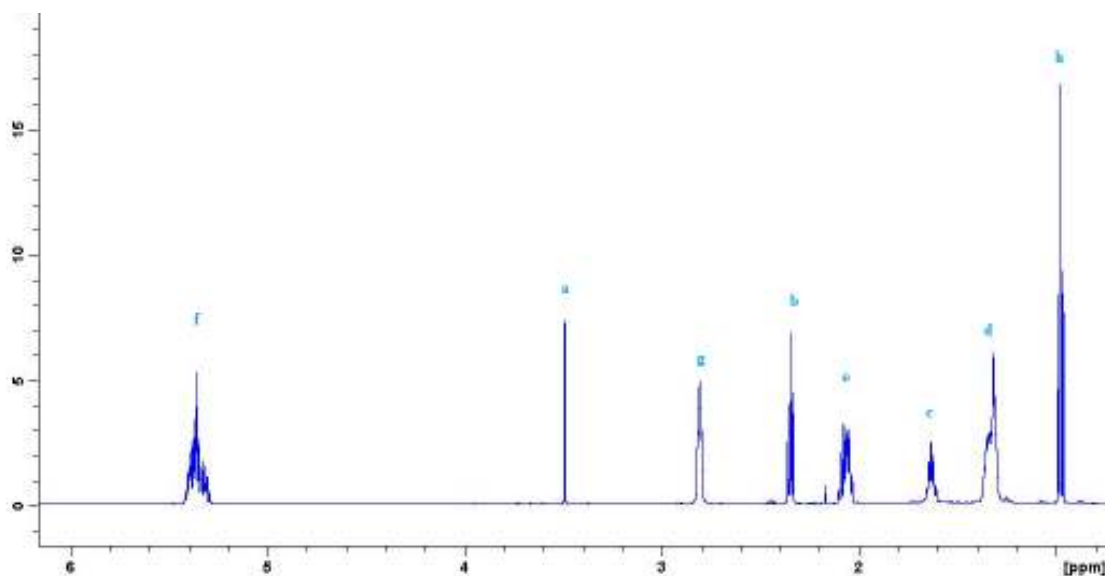
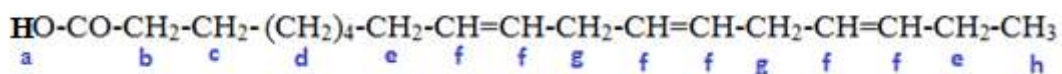
Η ουσία **11** απομονώθηκε ως υπόλευκο άμορφο υπόλειμμα και ταυτοποιήθηκε ως α-λινολενικό οξύ μέσω φασματοσκοπίας.

Από το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ουσίας, προέκυψαν τα παρακάτω δεδομένα:

- Το πρωτόνιο της υδροξυλομάδας του οξέος (**a**), εμφανίζει μια απλή κορυφή σε δ_{H} 3.49.
- Το αποθωρακισμένο μεθυλένιο **b**, που βρίσκεται ενωμένο με το καρβονύλιο του οξέος, αντιστοιχεί σε μια τριπλή κορυφή (καθώς έχει δίπλα του ένα άλλο μεθυλένιο) σε δ_{H} 2.34, η οποία ολοκληρώνει για 2 πρωτόνια.
- Τα δύο πρωτόνια του γειτονικού μεθυλενίου **c**, εμφανίζουν μια πολλαπλή κορυφή σε δ_{H} 1.63, δηλαδή στην αλειφατική περιοχή του φάσματος.
- Τα επομενα τέσσερα μεθυλένια **d** της ένωσης, εμφανίζουν ένα κοινό σήμα στο φάσμα με τη μορφή μιας ευρείας κορυφής, που ολοκληρώνει για 8 πρωτόνια και είναι στην αλειφατική περιοχή του φάσματος (δ_{H} 1.31).
- Τα δύο βινυλικά μεθυλένια **e** της ένωσης, αντιστοιχούν σε μια κοινή πολλαπλή κορυφή σε δ_{H} 2.05, η οποία ολοκληρώνει για τέσσερα πρωτόνια.
- Τα έξι ολεφινικά μεθίνια **f**, που σχηματίζουν τους 3 διπλούς δεσμούς του πολυακόρεστου αυτού λιπαρού οξέος, έχουν κοινό σήμα στην ολεφινική περιοχή με δ_{H} 5.34, και είναι το πιο αποθωρακισμένο του φάσματος. Πρόκειται για μια πολλαπλή κορυφή που ολοκληρώνει για 6 πρωτόνια.
- Τα δύο διβινυλικά μεθυλένια **g** της ένωσης, τα οποία βρίσκονται ανάμεσα σε δύο ολεφινικά μεθίνια, αποθωρακίζονται περισσότερο από τα υπόλοιπα μεθυλένια της ένωσης, και αντιστοιχούν σε μια τριπλή κορυφή σε δ_{H} 2.81 που ολοκληρώνει για τέσσερα πρωτόνια.
- Τέλος, το μεθύλιο **h** κατέχει την πιο θωρακισμένη κορυφή του φάσματος, η οποία είναι τριπλή (επειδή βρίσκεται δίπλα σε μεθυλένιο) και σε δ_{H} 0.97.
- Η μελέτη του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ της ουσίας, έγινε με σύγκριση των βιβλιογραφικών δεδομένων (Hatzakis *et al.*, 2011)

Φασματοσκοπικά δεδομένα της ουσίας 10 (CD3OD, 400Hz)

Θέση	Τύπος C	δ_H	Αρ. H	Πολλαπλότητα J (Hz)
a	OH	3.49	1	s
b	CH ₂	2.34	2	t (J= 7.5)
c	CH ₂	1.63	2	m
d	(CH ₂) ₄	1.31	8	brs
e	CH ₂	2.05	4	m
f	CH	5.34	6	m
g	CH ₂	2.81	4	t (J= 5.9)
h	CH ₃	0.97	3	t (J= 7.5)

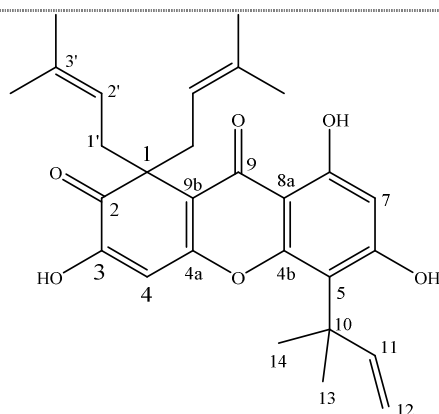


Φάσμα ¹H-NMR της ουσίας 11

Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα μελέτη αφορά την πρώτη φυτοχημική μελέτη του *H. trichocaulon* Boiss. & Heldr. Συνολικά απομονώθηκαν 11 δευτερογενείς μεταβολίτες. Από το κυκλοεξανικό απομονώθηκαν οι ουσίες **1**, **9**, **10**, **11** και από το μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού οι ουσίες **2-8**. Η ουσία 9 αποτελεί ένα νέο φυσικό προϊόν. Στους 11 αυτούς δευτερογενείς μεταβολίτες συμπεριλαμβάνονται 1 ξανθόνη, 1 παράγωγο φλορογλυκινόλης, 1 παράγωγο λιπαρού οξέος, 1 διτερπένιο, 5 παράγωγα φλαβονοειδών, μία προανθοκυανιδίνη και ένα παράγωγο φαινολοξέος (πίνακας Δ.1):

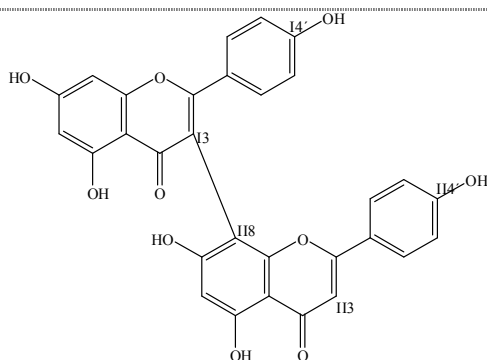
Ξανθόνη



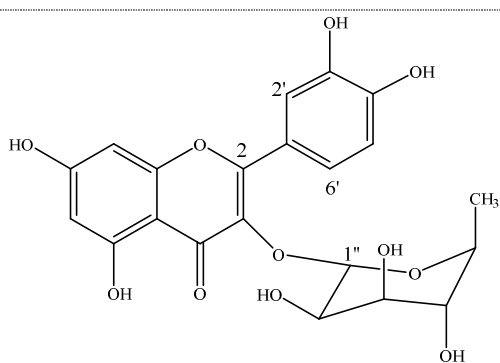
Υπεριξανθόνη Α

1,2-διδρο-3,6,8-τριδροξυ-1,1-δισ(3-μεθυλοβουτ-2-ενυλο)-5-(1,1διμεθυλοπροπ-2-ενυλο)-ξανθεν-2,9διονη
(ουσία 1)

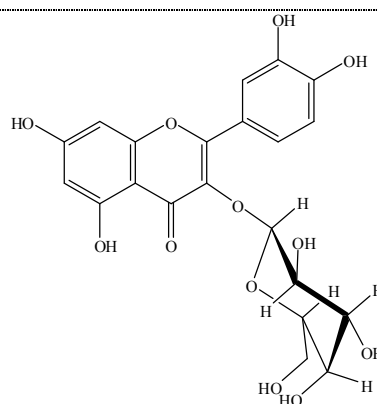
Φλαβονοειδή



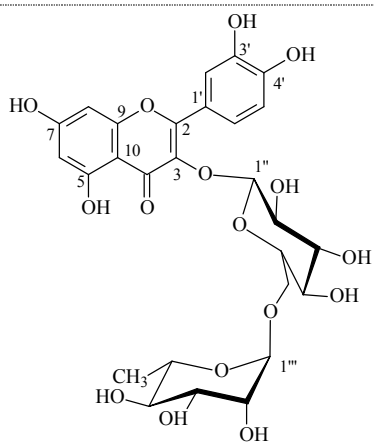
13, 18-διαπιγενίνη
(ουσία 2)



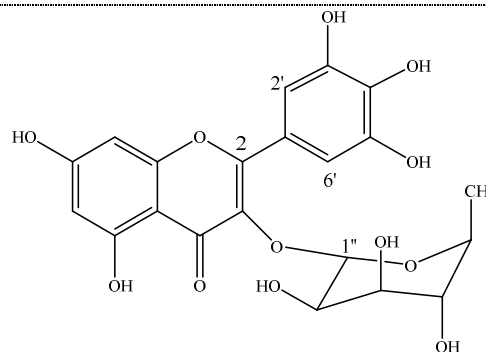
Κερκιτρίνη (ουσία 3)



Υπεροσιδής (ουσία 4)

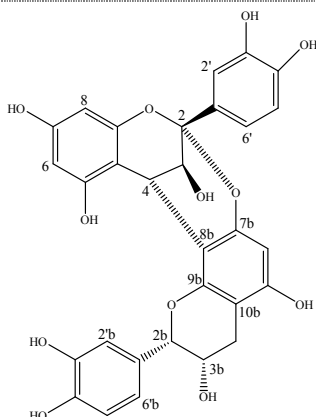


Ρουτίνη (ουσία 5)



Μυρικιτρίνη (ουσία 6)

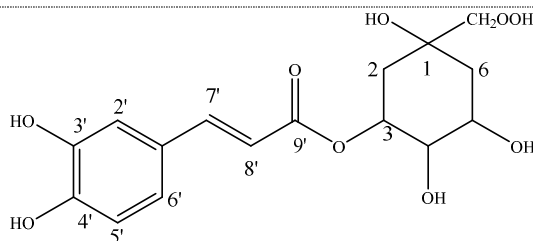
Συμπυκνωμένη ταννίνη



Προκυανιδίνη A₂

Επικατεχιν-(4β-8, 2β-O-7)-επικατεχίνη
(ουσία 7)

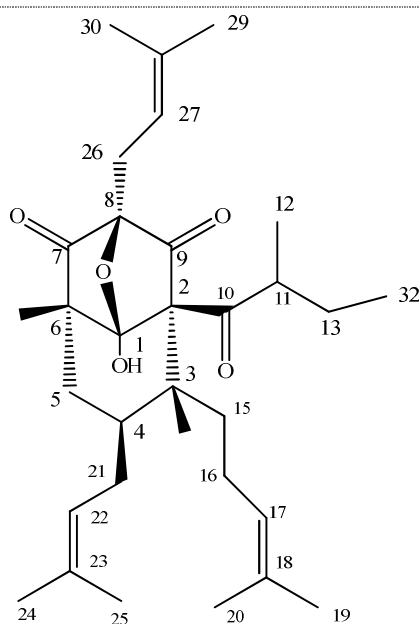
Παράγωγο φαινολοξέος



Χλωρογενικό οξύ

3-*O-E*-καφεϋλοκινικό οξύ (ουσία 8)

Φλορογλυκινόλη

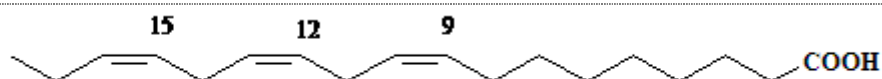


Αντιπερφολιατίνη:

8-υδροξυ-(6-αποπρενυλ-6,13-μεθυλο-υπερφορίνη) 8,1-ημιακετάλη

(ουσία 9)

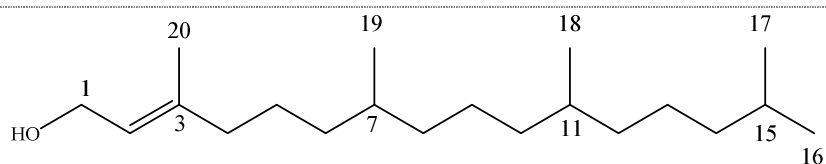
Λιπαρό οξύ



α-λινολενικό οξύ

(ουσία 11)

Διτερπένιο



trans-φυτόλη

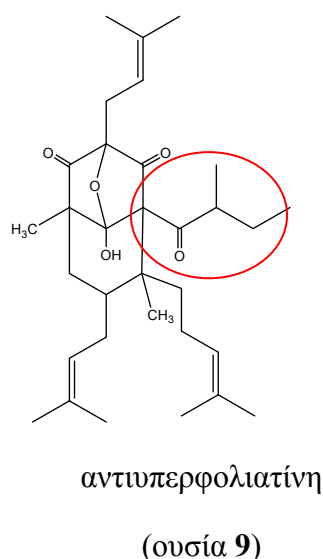
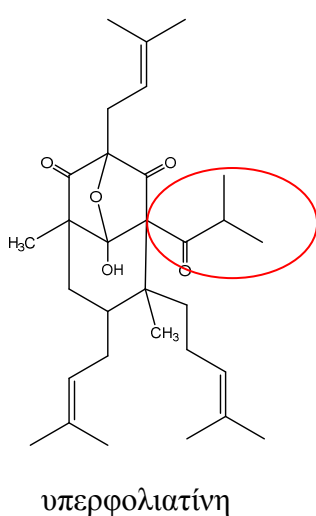
3,7,11,15-τετραμεθυλο-2-εξαδεκεν-1-ολη

(ουσία 10)

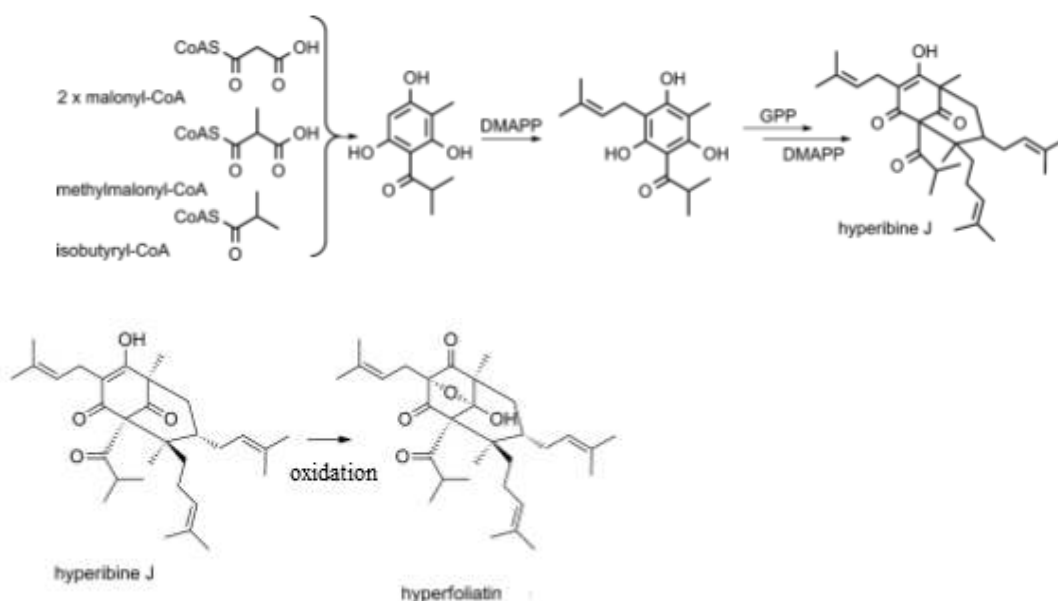
Σύμφωνα με τη δρογοχημεία του section *Drosocarpium* στο οποίο ανήκει και το *H. trichocaulon*, τέσσερα από τα φυσικά προϊόντα που απομονώθηκαν εντοπίζονται πρώτη φορά στο section αυτό και συγκεκριμένα πρόκειται για τις ουσίες **1, 9, 10**.

Στο κυκλοεξανικό εκχύλισμα, η μελέτη επικεντρώθηκε στην απομόνωση ξανθονών και φλορογλυκινολών για τις οποίες το γένος *Hypericum* L. αποτελεί πλούσια πηγή. Οι ξανθόνες προέρχονται από το μονοπάτι του σικιμικού οξέος και ως ένα σημείο η βιοσύνθεσή τους είναι παρόμοια με αυτή των φλορογλυκινολών (Dakanali and Theodorakis, 2011). Η ουσία **1** που απομονώθηκε στη μελέτη αυτή έχει απομονωθεί άλλες δύο φορές στο γένος *Hypericum* L. και συγκεκριμένα από το *H. erectum* Thunb. (An et al., 2002) και το *H. sampsonii* Hance (Xia et al., 2008). Είναι ένα πολυ-ισοπρενυλιωμένο παράγωγο ξανθόνης που έχει επιδείξει αντιβακτηριακή δράση έναντι του ανθεκτικού στη νορφλοξασίνη στελέχους του *S. aureus* (SA- 1199B) με ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση 2 μg /mL (Xiao et al., 2008). Μέχρι στιγμής στο section *Drosocarpium* έχουν εντοπιστεί δύο παράγωγα ξανθονών, η μαγκιφερίνη (γλυκοσιδική ξανθόνη) και το άγλυκό της ναραθυριόλη (βλ. Δρογοχημεία section).

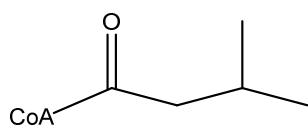
Η ουσία **9** που είναι ένα παράγωγο υπερφορίνης, απομονώνεται για πρώτη φορά και αποτελεί μόλις τη δεύτερη απομόνωση παραγώγου φλορογλυκινόλης στο section *Drosocarpium*. Έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον ότι η ουσία **9** παρουσιάζει τεράστια ομοιότητα με την φλορογλυκινόλη που έχει απομονωθεί στο *H. perforiatum* L., που επίσης ανήκει στο section *Drosocarpium*. Η μόνη τους διαφορά στη δομή έγκειται στην πλευρική αλειφατική αλκυλομάδα που έχει επισημανθεί παρακάτω:



Όσον αφορά τη βιοσύνθεση της υπερφολιατίνης (hyperfoliatin), οι Benkiki et al. προτείνουν ότι πιθανότατα ακολουθεί παρόμοιο βιοσυνθετικό μονοπάτι με την υπερφορίνη όπου ένα μόριο ισοβουτυρυλο-συνένζυμου Α συνδέεται με τρία μόρια μηλονυλο-συνένζυμου Α. Η πλευρική αλυσίδα της ουσίας **9**, 2-μεθυλο-βουτανουόλο-ομάδα, είναι η ίδια όπως και στο μόριο της αντιυπερφορίνης. Για την παραγωγή της αντιυπερφορίνης πρόδρομο μόριο αποτελεί η L-ισολευκίνη, ενώ για την υπερφορίνη η L-βανιλίνη. Έτσι υποθέτουμε ότι η ουσία **9** ακολουθεί το βιοσυνθετικό μονοπάτι της αντιυπερφορίνης. Στο *H. triquetrifolium* έχει βρεθεί σε μεγάλες ποσότητες ένα δομικό ανάλογο της υπερφορίνης, η υπεριμπίνη J (hyperibine J), το οποίο παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ομοιότητα με την ουσία **9** και την υπερφολιατίνη. Μάλιστα, οι Mitsopoulou et al., προτείνουν ότι η υπερφολιατίνη αποτελεί προϊόν οξείδωσης της υπεριμπίνης J. Παρακάτω παρουσιάζεται το βιοσυνθετικό μονοπάτι που προτείνει η ερευνητική τους ομάδα:



Αντίστοιχα, έχοντας ως πρόδρομο μόριο το isovaleryl-CoA από το παραπάνω μονοπάτι προκύπτει η ουσία **9**.



isovaleryl-CoA

Τόσο η υπερφολιατίνη, όσο και η ουσία **9**, η οποία στη παρούσα μελέτη χαρακτηρίζεται ως αντιυπερφολιατίνη, αποτελούν οξυγονωμένα παράγωγα φλορογλυκινολών και έτσι δεν είναι ξεκάθαρο αν αποτελούν φυσικά προϊόντα του φυτού ή αν προέρχονται από την αποδόμηση των φλορογλυκινολών κατά τη διαδικασία της κατεργασίας του φυτικού υλικού και της έκθεσής του στον ατμοσφαιρικό αέρα όπου τα μόρια αυτά είναι ασταθή (Verotta et al., 2000). Παρόλα αυτά, η υπερφολιατίνη έχει επιδείξει *in vivo* αντικαταθλιπτική δράση, σε δοκιμασίες εξαναγκασμένης κολύμβησης σε ποντίκια και έχει προταθεί ότι ο μηχανισμός δράσης σχετίζεται με την μείωση της επαναπρόσληψης των μονοαμινικών νευροδιαβιβαστών (Rego et al., 2007).

Συνεχίζοντας, κατά τη μελέτη του μεθανολικού εκχυλίσματος, απομονώθηκαν 4 γλυκοσίδες φλαβονοειδών από τους οποίους οι 3 είναι ευρέως διαδεδομένοι στο γένος *Hypericum* L. και αποτελούν χημειοταξινομικούς δείκτες για αυτό. Πρόκειται για την κερκιτρίνη (ουσία **3**), τον υπεροσίδη (ουσία **4**) και την ρουτίνη (ουσία **5**). Αυτό που είναι σημαντικό, είναι ο εντοπισμός του ραμνοσίδη της μυρικετίνης (μυρικιτρίνη, ουσία **6**) και μάλιστα σε αρκετά μεγάλη ποσότητα. Ο γλυκοσίδης αυτός δεν εντοπίζεται συχνά στο γένος, παρά μόνο στα είδη που ανήκουν στο section *Drosocarpium* και έχει προταθεί από τους Nediakov et al. (2007) ως χημειοταξινομικός δείκτης για το section. Μέχρι στιγμής το *H. trichocaulon* έχει τοποθετηθεί στο section αυτό με βάση τα μορφολογικά του χαρακτηριστικά. Ο εντοπισμός της μυρικιτρίνης σε αυτό, επιβεβαιώνει και χημειοταξινομικά ότι ανήκει στο section *Drosocarpium*.

Ακόμη, από το μεθανολικό εκχύλισμα απομονώθηκαν το διφλαβονοειδές I3, Π8-διαπιγενίνη (ουσία **2**), μία προανθοκυανιδίνη, η προκυανιδίνη A2 (ουσία **7**) και ένα παράγωγο φαινολοξέος, το χλωρογενικό οξύ (ουσία **8**). Η I3, Π8- διαπιγενίνη (ουσία **2**) είναι ευρέως διαδεδομένη στο γένος και έχει εντοπιστεί και σε ένα ακόμη είδος του section *Drosocarpium*, στο *H. umbellatum*. Το χλωρογενικό οξύ και τα ισομερή του αποτελούν τα πιο κοινά φαινολοξέα στο γένος. Τέλος, η παρουσία προανθοκυανιδών στο *H. perforatum* είναι γνωστή από το 1925 (Porodko, 1925) ενώ η απομόνωσή τους δεν είναι τόσο συχνή. Πιστεύεται ότι δημιουργούν σύμπλοκα με τις ναφθοδιανθρόνες και έτσι συμβάλλουν στη διαλυτότητά τους σε υδατικά διαλύματα. (Butterweck et al., 1998), ενώ μελέτες δείχνουν ότι βελτιώνουν τη βιοδιαθεσιμότητα των υπερικινών σε *in vivo* πειράματα στο πλάσμα αρουραίων (Butterweck et al., 2003).

Μέσα από αυτήν την πρώτη φυτοχημική ανάλυση του *H. trichocaulon* φαίνεται η αναγκαιότητα της περαιτέρω μελέτης του γένους *Hypericum* L. καθώς μεγάλο τμήμα είναι ακόμα ανεξερευνήτο και συνεχώς εντοπίζονται νέα δεδομένα. Το γένος *Hypericum* L. αποτελεί ένα ιδανικό παράδειγμα, το οποίο αποδεικνύει την αξία της συνέχισης της έρευνας στον τομέα της Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων δεδομένου ότι συμβάλλει σημαντικά στην ανάδειξη του ρόλου των παραδοσιακών φυτικών φαρμάκων στην πρόληψη και τη θεραπεία των ασθενειών του σύγχρονου πολιτισμού.

E. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abe, S., Tanaka, N., Kobayashi, J. I. (2012). Prenylated Acylphloroglucinols, Chipericumins A–D, from *Hypericum chinense*. J. Nat. Prod. 75(3): 484-488.
- Agostinis, P., Vantieghem, A., Merlevede, W., de Witte, P.A. (2002) Hypericin in cancer treatment: more light on the way. Int. J. Biochem. Cell. Biol., 34: 221–241.
- An, T.-Y., M.-D. Shan, L.-H. Hu, S.-J. Liu and Z.-L. Chen (2002). Polyprenylated phloroglucinol derivatives from *Hypericum erectum*. Phytochemistry 59(4): 395-398.
- Arigoni, D., Sagner, S., Latzel, C., Eisenreich, W., Bacher, A., Zenk, M. H. (1997), Terpenoid biosynthesis from 1-deoxy-D-xylulose in higher plants by intramolecular skeletal rearrangement. Biochemistry Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 94, pp. 10600–10605
- Athanasas, K., P. Magiatis, N. Fokialakis, A.-L. Skaltsounis, H. Pratsinis and D. Kletsas (2004). Hyperjovinols A and B: Two New Phloroglucinol Derivatives from *Hypericum jovis* with Antioxidant Activity in Cell Cultures. J. Nat. Prod. 67(6): 973-977.
- Azebaze A. G. B., Meyer M., Valentin A., Nguemfo E. L., Fomum Z. T. and Nkengfack A. E. (2006). Prenylated Xanthone Derivatives with Antiplasmodial Activity from *Allanblackia monticola* Staner L.C., Chem. Pharm. Bull. 54(1): 111-113.
- Barnes, J., L. A. Anderson and J. D. Phillipson (2001). St John's wort (*Hypericum perforatum* L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. J Pharm Pharmacol 53(5): 583-600.
- Benayache F., Bouregghda A., Ameddah S., Marchioni E., Benayache F., Benayache S., (2014). Flavonoids from *Thymus numidicus* Poiret. Der Pharmacia Lettre 6(2): 50-54.

- Benkiki, N., Z. Kabouche, F. Tillequin, P. Verite, E. Chosson and E. Seguin (2003). A new polyisoprenylated phloroglucinol derivative from *Hypericum perforatum* (Clusiaceae). *Z Naturforsch C* 58(9-10): 655-658.
- Berendes J. (1970). *Des Pedianos Dioskurides aus Anazarbos Arzneimittellehre*. Stuttgart 1902, Verlag Von Ferdinand Elke; 2nd Edition Dr. Martin Sandig, Wiesbaden. pp. 361-362.
- Bilia, A. R., Gallori, S., Vincieri, F. F. (2002). St. John's wort and depression. *Life Sci.* 70 (26): 3077–3096.
- Bladt, S. and H. Wagner (1994). Inhibition of MAO by fractions and constituents of hypericum extract. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 7 Suppl 1: S57-59.
- Brevoort, P., (1998). The booming US botanical market. A new overview. *Herbalgram* 44, 33-46.
- Bruni, R., Sacchetti, G. (2009). Factors affecting polyphenol biosynthesis in wild and field grown St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L. Hypericaceae/Guttiferae). *Molecules* 14(2): 682-725.
- Budzianowski, J., Skrzypczak Lutoslaw (1995), Phenylpropanoid esters from *Lamium album* flowers, *Phytochemistry*, 38(4): 997-1001
- Butterweck, V., Bockers, T., Korte B., Wittkowski, W., Winterhoff, H. (2002). Long-term effects of St. John's wort and hypericin on monoamine levels in rat hypothalamus and hippocampus. *Brain Res* 930(1-2): 21-29.
- Butterweck, V., Schmidt, M. (2007). St. John's wort: role of active compounds for its mechanism of action and efficacy. *Wien Med Wochenschr* 157(13-14): 356-361.
- Butterweck, V., Korte, B., Winterhoff, H. (2001). Pharmacological and endocrine effects of *Hypericum perforatum* and hypericin after repeated treatment. *Pharmacopsychiatry* 34 Suppl 1: S2-7.
- Butterweck, V., Liefländer-Wulf, U., Winterhoff, H., Nahrstedt, A., (2003). Plasma levels of hypericin in presence of procyanidin B2 and hyperoside: a pharmacokinetic study in rats. *Planta Med.* 69(3): 189-92

Carnoy, A. (1959). Dictionnaire étymologique des noms grecs de plantes, Bibliothèque du Muséon, Louvain, p.150.

Chatterjee, S., V. Filippov, P. Lishko, O. Maximyuk, M. Nöldner and O. Krishtal (1999). Hyperforin attenuates various ionic conductance mechanisms in the isolated hippocampal neurons of rat. *Life Sciences* 65(22): 2395-2405.

Chatterjee, S. S., S. K. Bhattacharya, M. Wonnemann, A. Singer and W. E. Müller (1998a). Hyperforin as a possible antidepressant component of hypericum extracts. *Life Sciences* 63(6): 499-510.

Chen, X.-Q., Y. Li, K.-Z. Li, L.-Y. Peng, J. He, K. Wang, Z.-H. Pan, X. Cheng, M.-M. Li, Q.-S. Zhao and G. Xu (2011). Spirocyclic Acylphloroglucinol Derivatives from *Hypericum beanii*. *Chem. Pharm. Bull.* 59(10): 1250-1253.

Chimenti, F., Cottiglia, F., Bonsignore, L., Casu, L., Casu, M., Floris, C., Secci, D., Bolasco, A., Chimenti, D., Granese, A., Befani, O., Turini, P., Alcaro, S., Ortuso, F., Trombetta, G., Loizzo, A., Guarino, I. (2006). Quercetin as the Active Principle of *Hypericum hircinum* Exerts a Selective Inhibitory Activity against MAO-A: Extraction, Biological Analysis and Computational Study. *J. Nat. Prod.*, 69, 945.

Cota, B. B., Siqueira E. P., d. Oliveira D. M., Alves T. M. A., Sobral M. E. G., Rabello A. and C. L. Zani (2012). Chemical constituents and leishmanicidal activity from leaves of *Kielmeyera variabilis*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 22: 1253-1258.

Cott, J. M. (1997). In vitro receptor binding and enzyme inhibition by *Hypericum perforatum* extract. *Pharmacopsychiatry* 30 Suppl 2: 108-112.

Couladis, M., Baziou, P., Petrakis, P. V., Harvala, C., (2001) Essential oil composition of *Hypericum perforatum* L. Growing in different locations in Greece *Flav. Frag. J.* 16(3): 204 - 206

Couladis, M., Chinou, I. B., Tzakou, O., Petrakis, P. V (2003). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Hypericum rumeliacum* subsp. *apollinis* (Boiss. & Heldr.). *Phytother Res* 17(2): 152-154.

Council of Europe, (2000). Natural sources of Flavourings. Report No. 1 Strasbourg; Council of Europe.

Couldwell, W.T., Gopalakrishna, R, Hinton, D.R., He, S., Weiss, M.H., Law, R.E., Apuzzo, M.L., Law, R.E. (1994). Hypericin- a potential antiglioma therapy Neurosurgery 35 (5), 993.

Crockett, S. L., Wenzig, E. M., Kunert, O., Bauer, R. (2008). Anti-inflammatory phloroglucinol derivatives from *Hypericum empetrifolium*. Phytochem Lett 1(1): 37-43.

Crockett, S. L., Robson, N. K. (2011). Taxonomy and Chemotaxonomy of the Genus *Hypericum*. Med Aromat Plant Sci Biotechnol 5(Special Issue 1): 1-13.

Çurak, C., Radušienė, J., Janulis, V., Ivanauskas, L. (2007). Secondary metabolites in *Hypericum perforatum*: variation among plant parts and phenological stages. Bot. Helv. 117(1): 29-36.

Çurak, C., Radusiene, J., Ivanauskas, L., Jakstas, V., Çamaş, N. (2014). Changes in the content of bioactive substances among *Hypericum montbretii* populations from Turkey. Rev.Brasil. Farmacogn. 24(1): 20-24.

Culpeper, N. (1653). Pharmacopoeia Londinensis. *London Dispensatory*. Gent. p.220.

Curle, P. K., G; Hiller, K.O. (1988). Neurochemical Studies on *Valeriana* and *Hypericum* Germany.

Dakanali, M., Theodorakis, E. A. (2011). Polyprenylated Phloroglucinols and Xanthones. In: Erwan Poupon und Bastien Nay (Hg.): Biomimetic organic synthesis. Weinheim: Wiley-VCH, S. 433–467.

Decosterd, L. A., Stoeckli-Evans, H., Chapuis, J.-C., Sordat, B., Hostettmann, K., (1989). New Cell Growth-Inhibitory Cyclohexadienone Derivatives from *Hypericum calycinum* L. Helvetica Chimica Acta 72(8): 1833-1845.

David, JM, Cruz, C. F., Guedes, MLS, Chavez JP. (1996). Flavonol Glycosides from *Davilla flexuosa*. J. Braz. Chem. Soc. 7(2): 115-118.

Denke, A., H. Schempp, E. Mann, W. Schneider and E. F. Elstner (1999). Biochemical activities of extracts from *Hypericum perforatum* L. 4th Communication: influence of different cultivation methods. *Arzneimittelforschung* 49(2): 120-125.

Dordević, A., J. Lazarević, A. Šmelcerović and G. Stojanović (2013). The case of *Hypericum rochelii* Griseb. & Schenk and *Hypericum umbellatum* A. Kern. essential oils: Chemical composition and antimicrobial activity. *J.Pharm. Biomed. Anal.* 77: 145-148.

Europäisches Arzneibuch (2011). 7. Bd. 1. Ausg., Grundwerk. Stuttgart, Eschborn: Dt. Apotheker-Verl., Govi-Verlag.

Escarpa, A. and González, M. C., (1998). High-performance liquid chromatography with diode-array detection for the determination of phenolic compounds in peel and pulp from different apple varieties. *J.Chrom.A*, 823(1-2): 331-337.

Franchi, G. G., Nencini, C., Collavoli, E., Massarelli, P. (2011). Composition and antioxidant activity in vitro of different St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) extracts. *J. Med. Plants Res*, 5(17): 4349-4353.

Gamiotea-Turro, D., Cuesta-Rubio, O., Prieto-González S., De Simone, F., Passi, S. Rastrelli, L., (2004). Antioxidative Constituents from the Leaves of *Hypericum styphelioides*. *Journal of Natural Products* 67(5): 869-871.

Gastpar, M., Singer, A., Zeller, K., (2006). Comparative efficacy and safety of a once-daily dosage of hypericum extract STW3-VI and citalopram in patients with moderate depression: a double-blind, randomised, multicentre, placebo-controlled study. *Pharmacopsychiatry* 39(2): 66-75.

Gibbons, S., Moser, E., Hausmann, S., Stavri, M., Smith, E., Clennett, C. (2005). An anti-staphylococcal acylphloroglucinol from *Hypericum foliosum*. *Phytochemistry* 66(12): 1472-1475.

Griffith, T.N., Varela-Nallar, L., Dinamarca, M.C., Inestrosa, N.C., (2010). Neurobiological effects of Hyperforin and its potential in Alzheimer's disease therapy. *Curr. Med. Chem.* 17, 391-406.

Gu, G.M., Feng, S. Z., Wang, X.Y., (1988). Antimalarial constituents of *Hypericum japonicum* Thunb. Isolation and structure of japonicins A, B, C and D. Acta Chim. Sin. 46: 246–225.

Gulick, R. M., MD, MPH, Vincent McAuliffe, MD, Jeanne Holden-Wiltse, MPH, Clyde Crumpacker, MD, Leonard Liebes, PhD, Daniel S. Stein, MD, Patricia Meehan, PhD, Sheila Hussey, RN, Janet Forcht, RN and Fred T. Valentine, MD, (1999) for the AIDS Clinical Trials Group 150 and 258 Protocol Teams. Phase I Studies of Hypericin, the Active Compound in St. John's Wort, as an Antiretroviral Agent in HIV-Infected Adults AIDS Clinical Trials Group Protocols 150 and 258, Ann Intern Med., 130, 510-514.

Güvenalp, Z., Demirezer, Ö. (2005). Flavonol glycosides from *Asperula arvensis* L. Turkish Journal of Chemistry 29: 163-169.

Güvenalp, Z., Kilic N., Kazaz C., Yusuf K.L., Demirezer Ö. (2006). Chemical constituents of *Galium tortumense*, Turkish Journal of Chemistry 30(4):515-523

Hammer K.D.P., Hillwig M.L., Solco A.K.S., Dixon P.M., Delate K., Murphy P.A., Wurtele E.S., Birt D.F. (2007). Inhibition of Prostaglandin E2 production by anti-inflammatory *Hypericum perforatum* extracts and constituents in RAW264.7 mouse macrophage cells. J. Agric. Food. Chem. 55, 7323–7331.

Hashida, W., N. Tanaka, Y. Kashiwada, M. Sekiya, Y. Ikeshiro and Y. Takaishi (2008). Tomoeones A-H, cytotoxic phloroglucinol derivatives from *Hypericum ascyron*. Phytochemistry 69(11): 2225-2230.

Hatzakis, E., Agiomyrgianaki, A., Kostidis, S., Dais, P., (2011). High-resolution NMR spectroscopy, An alternative fast tool for Qualitative and Quantitative Analysis of Diacylglycerol (DAG) oil. J. Am Oil Chem Soc 88, 1695-1708.

Henry, G. E., S. Raithore, Y. Zhang, B. Jayaprakasam, M. G. Nair, D. Heber and N. P. Seeram (2006). Acylphloroglucinol Derivatives from *Hypericum prolificum*. J. Nat. Prod. 69(11): 1645-1648.

Hosni, K., K. Msaâda, M. Ben Taârit, O. Ouchikh, M. Kallel and B. Marzouk (2008). Essential oil composition of *Hypericum perforatum* L. and *Hypericum tomentosum* L. growing wild in Tunisia. *Ind. Crops Prod.* 27(3): 308-314.

Hu, L.-H. and K.-Y. Sim (1998). Complex caged polyisoprenylated benzophenone derivatives, sampsoniones A and B, from *Hypericum sampsonii*. *Tetrahedron Lett.* 39(43): 7999-8002.

Hu, L.-H. and K.-Y. Sim (1999). Sampsoniones C-H, a unique family of polyprenylated benzophenone derivatives with the novel tetracyclo[7.3.1.13,11.03,7]tetradecane-2,12,14-trione skeleton, from *Hypericum sampsonii* (Guttiferae). *Tetrahedron Lett.* 40(4): 759-762.

Hu, L.-H. and K.-Y. Sim (2000). Sampsoniones A–M, a Unique Family of Caged Polyprenylated Benzoylphloroglucinol Derivatives, from *Hypericum sampsonii*. *Tetrahedron* 56(10): 1379-1386.

Hoffmann, J. and E. D. Kuhl (1979). Therapy of depressive states with hypericin. *ZFA (Stuttgart)* 55(12): 776-782.

Hosni, K., K. Msaâda, M. Ben Taârit, O. Ouchikh, M. Kallel and B. Marzouk (2008). Essential oil composition of *Hypericum perforatum* L. and *Hypericum tomentosum* L. growing wild in Tunisia. *Ind. Crops Prod.* 27(3): 308-314.

Hostanska, K, Bommer, S, Weber, M, Krasniqi ,B, Saller, R., (2003). Comparison of the growth-inhibitory effect of *Hypericum perforatum* L. extracts, differing in the concentration of phloroglucinols and flavonoids, on leukaemia cells, *J Pharm Pharmacol.*, 55(7): 973-80.

Imai, H., T. Kotegawa, K. Tsutsumi, T. Morimoto, N. Eshima, S. Nakano and K. Ohashi (2008). The recovery time-course of CYP3A after induction by St John's wort administration. *Br J Clin Pharmacol* 65(5): 701-707.

Isacchi, B., Bergonzi, M. C., Carnevali, F., van der Esch, S. A, Vincieri F. F. and Bilia, A. R. (2007). Analysis and stability of the constituents of St. John's wort oils prepared with different methods. *J Pharm Biomed Anal* 45(5): 756-761.

- Ishida, Y., Shirota, O., Sekita, S., Someya, K, Tokita, F., Nakane, T. , Kuroyanagi M., (2010). Polyprenylated Benzoylphloroglucinol-Type Derivatives Including Novel Cage Compounds from *Hypericum erectum*. Chem. Pharm. Bull. 58(3): 336-343.
- Ishiguro, K., Yamaki, M., Kashihara, M., Takagi, S. (1986). Sarothralen A and B, new antibiotic compounds from *Hypericum japonicum*. Planta Med. (4): 288-290.
- Ishiguro, K., Yamaki, M., Kashihara, M., Takagi, S. (1987). Saroaspidin A, B, and C: Additional Antibiotic Compounds from *Hypericum japonicum*. Planta Med 53(05): 415-417.
- Ishiguro, K., Yamaki, M., Kashihara, M., Takagi, S., Isoi, K. (1990). Sarothralin G: a new antimicrobial compound from *Hypericum japonicum*. Planta medica 56(3): 274-276.
- Ishiguro, K., Nagata, S., Fukumoto, H., Yamaki, M., Isoi, K. (1994). Phloroglucinol derivatives from *Hypericum japonicum*. Phytochemistry 35(2): 469-471.
- Jayasuriya, H., Clark, A. M., McChesney, J. D. (1991). New Antimicrobial Filicinic Acid Derivatives from *Hypericum drummondii*. J. Nat. Prod. 54(5): 1314-1320.
- Jayasuriya, H., McChesney, J. D. (1988). Drummondins A-C: three novel rottlerin-type antibiotics from *Hypericum drummondii*. Journal of the Chemical Society, Chemical Communications(24): 1592-1593.
- Jensen, A.G., Hance, S. H., Nielsen, E.O. (2001). Adhyperforin as a contributor to the effect of *Hypericum perforatum* L. in biochemical models of antidepressant activity. Life Sci 14: 1593–1605.
- Jie Zhao, Wei Liua, Jin-Cai Wang (2015). Recent Advances Regarding Constituents and Bioactivities of Plants from the Genus *Hypericum*, Chem. & Biodivers. 12, 309-349.
- Karioti A., Bilia, A.R. (2010). Hypericins as Potential Leads for New Therapeutics. Int. J. Mol. Sci., 11, 562-594.

- Karioti, A., Vincieri, F. F., Bilia, A. R., (2009). Rapid and efficient purification of naphthodianthrones from St. John's wort extract by using liquid-liquid extraction and SEC. *J Sep Sci* 32(9): 1374-1382.
- Kim, H. L., Streltzer, J., Goebert, D. (1999). St. John's wort for depression: a meta-analysis of well-defined clinical trials. *J Nerv Ment Dis* 187(9): 532-538.
- Kitanov, G. M., Nedialkov, P. T. (1998). Mangiferin and isomangiferin in some *Hypericum* species. *Biochemical Systematics and Ecology* 26(6): 647-653.
- Kitanov, G. M. (2001). Hypericin and pseudohypericin in some *Hypericum* species. *Biochem Syst Ecol* 29(2): 171-178.
- Kleber, E., Obry, T., Hippeli, S., Schneider, W., Elstner, E. F. (1999). Biochemical activities of extracts from *Hypericum perforatum* L. 1st Communication: inhibition of dopamine-beta-hydroxylase. *Arzneimittelforschung* 49(2): 106-109.
- Klemow, K. M., Bartlow, A., Crawford, J., Kocher, N., Shah, J., Ritsick, M. (2011). Medical Attributes of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*). *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*. I. F. F. Benzie and S. Wachtel-Galor. Boca Raton (FL).
- Kommission E Monographs (1989). 01104 Hyperici herba / Johanniskraut - Berichtigung - BAnz. Nr. 43 vom 02.03.1989.
- Laakmann, G., Schüle, C., Baghai, T., Kieser, M., (1998). St. John's wort in mild to moderate depression: the relevance of hyperforin for the clinical efficacy, *Pharmacopsychiatry*. 31:54-59.
- Lawson, LD, Bauer, R. (1998) *Phytomedicines of Europe-Chemistry and Biological Activity*. Washington, D.C.: American Chemical Society, pp. 287–98.
- Lecrubier, Y., Clerc, G., Didi, R., Kieser, M. (2002). Efficacy of St. John's wort extract WS 5570 in major depression: a double-blind, placebo-controlled trial. *Am J Psychiatry* 159(8): 1361-1366.

- Leuner K, Kazanski, V., Müller, M., Essin, K., Henke, B., Gollasch, M., Harteneck, C., Müller, WE., (2007). Hyperforin-a key constituent of St. John's wort specifically activates TRPC6 channels, *FASEB J*, 21: 4101-4111.
- Lin, Y.-L., Wu, Y.-S. (2003). Polyprenylated Phloroglucinol Derivatives from *Hypericum sampsonii*. *Helv. Chim. Acta* 86(6): 2156-2163.
- Liu, F., Pan, C., Drumm, P., Ang, C. Y., (2005). Liquid chromatography-mass spectrometry studies of St. John's wort methanol extraction: active constituents and their transformation. *J Pharm Biomed Anal* 37(2): 303-312.
- Linde, K., Berner, M., Egger, M., Mulrow, C., (2005). St John's wort for depression: meta-analysis of randomised controlled trials. *Br J Psychiatry* 186: 99-107.
- Lou, Hongxiang, Yamazaki, Yoshimitsu, Sasaki, Tsutomu, Uchida, Masaru, Tanaka, Hideoki, Oka, Syuichi (1999). A-type proanthocyanidins from peanut skins. *Phytochemistry*, 51, 297-308.
- Mamemura, T., Tanaka, N., Shibazaki, A., Gono, T., Kobayashi J. (2011). Yojironins A–D, meroterpenoids and prenylated acylphloroglucinols from *Hypericum yojiroanum*. *Tetrahedron Letters* 52(28): 3575-3578.
- Manning, K., Petrunak, E., Lebo, M., González-Sarrías, A., Seeram, N. P., Henry G. E (2011). Acylphloroglucinol and xanthenes from *Hypericum ellipticum*. *Phytochemistry* 72(7): 662-667.
- Markham K. R., (1993). in Dey P.M & Harborne J.B (eds). *Methods in Plant Biochemistry, Techniques of flavonoid identification*, Academic Press. p.216.
- Matsuhisa, M., Shikishima, Y., Takaishi, Y., Honda, G., Ito, M., Takeda, Y., Shibata, H., Higuti, T., Kodzhimatov, O. K., Ashurmetov, O. (2002). Benzoylphloroglucinol Derivatives from *Hypericum scabrum*. *J. Nat. Prod.* 65(3): 290-294.
- Maisenbacher, P., Kovar, K. A., (1992). Analysis and stability of Hyperici oleum. *Planta Med* 58(4): 351-354.

Mayr, U., Treutter, D., Santos-Buelga, C., Bauer, H., Feucht, W., (1995), Developmental changes in the phenol concentrations of 'Golden delicious' apple fruits and leaves, *Phytochemistry*, 38, 1151-1155.

Mazzafera, P., (1997), Maté drinking: caffeine and phenolic acid intake, *Food Chemistry*, 60, 67-71.

Medina, M. A., Martinez-Poveda, B., Amores-Sanchez, M. I., Quesada, A. R. (2006). Hyperforin: more than an antidepressant bioactive compound? *Life Sci* 79(2): 105-111.

Mitakis E. 2007. Ethnopharmacology of *Hypericum*.

http://www.ethnopharmacology.gr/images/stories/ekdiloseis/2007_06/mitakis.pdf

Mitsopoulou, K., Vidali, V., Maranti, A., Couladouros, E., (2015). Isolation and Structure Elucidation of Hyperibine J [Revised Structure of Adhyperfirin (7-Deprenyl-13-methylhyperforin)]: Synthesis of Hyperibone J, *Eur. J. Org. Chem.*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 287–290

Muller, W. E. (2003). Current St John's wort research from mode of action to clinical efficacy. *Pharmacol Res* 47(2): 101-109.

Muller, W. E., Rolli, M., Schafer, C., Hafner, U. (1997). Effects of hypericum extract (LI 160) in biochemical models of antidepressant activity. *Pharmacopsychiatry* 30 Suppl 2: 102-107.

Müller, W. E., Singer, A., Wonnemann, M. (2001). Hyperforin- antidepressant activity by a novel mechanism of action. *Pharmacopsychiatry* 34 (Suppl I), 98–102

Montanari, L., Perretti, G., Natella, F., Guidi, A., Fantozzi, P., (1999), Organic and Phenolic Acids in Beer, *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 32, 535-539.

Nedialkov, P. T., Kitanov, G. M., Zheleva-Dimitrova, D. Z., Girreser, U. (2007). Flavonoids and a xanthone from *Hypericum umbellatum* (Guttiferae). *Biochemical Systematics and Ecology* 2(35): 118-120.

- Nielsen, M., Frokjaer, S., Braestrup, C. (1988). High affinity of the naturally-occurring biflavonoid, amentoflavon, to brain benzodiazepine receptors in vitro. *Biochem Pharmacol* 37(17): 3285-3287.
- Nürk, N. M., Crockett, S. L. (2011). Morphological and phytochemical diversity among *Hypericum* species of the Mediterranean Basin. *Med. Aromat. Plant. Sci. Biotechnol.* 5 (Special Issue 1), S. 14–28.
- Obry T. (1991). Einfluß eines ethanolischen Auszuges aus *Hypericum perforatum* auf die Enzyme der Noradrenalin synthese und auf die Diaphorase [diploma work]. Maximilians-Universität, München, Germany.
- Olivo M, Du, H.Y, Bay, B.H., (2006). Hypericin lights up the way for the potential treatment of nasopharyngeal cancer by photodynamic therapy, *Curr Clin Pharmacol.* (3): 217-22.
- Ossipov, V., Nurmi, K., Loponen, J., Haukioja, E., Pihlaja, K., (1996) High-performance liquid chromatographic separation and identification of phenolic compounds from leaves of *Betula pubescens* and *Betula pendula*, *J. Chromatogr. A*, 721(1): 59-66.
- Özgen, U., Sevindik, H., Kazaz, C., Yigit, D., Kandemir, A., Secen, H., Calis I., (2010). A new sulfated a-Ionone glycoside from *Sonchus erzincanicus* Matthews. *Molecules* 15, 2593-2599.
- Panocka, I., Perfumi, M., Angeletti, S., Ciccocioppo, R., Massi, M. (2000). Effects of *Hypericum perforatum* on ethanol intake, and on behavioural despair- a search for the neurochemical systems involved. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 66, 105-111.
- Parker, W. L., Johnson, F. (1968). The structure determination of antibiotic compounds from *Hypericum uliginosum*. *J Am Chem Soc* 90(17): 4716-4723.
- Shiu, W. K., Gibbons, S. (2006). Anti-staphylococcal acylphloroglucinols from *Hypericum beanii*. *Phytochemistry* 67(23): 2568-2572.
- Pauli, G. F., Kuczkowiak, U., Nahrstedt, A. (1999) Solvent effects in the structure dereplication of caffeoyl quinic acids. *Magn. Reson. Chem.*, 37, 827-836.

- Perloff, M. D., Moltke, L. L., Stormer, E., Shader, R. I., Greenblatt, D. J. (2001). Saint John's wort: an in vitro analysis of P-glycoprotein induction due to extended exposure. *Br J Pharmacol* 134(8): 1601-1608.
- Ploss, O., Petereit, F., Nahrstedt, A. (2001). Procyanidins from the herb of *Hypericum perforatum*, *Die Pharmazie*, 56(6): 509-511.
- Prenner, L., Sieben, A., Zeller, K., Weiser, D., Haberlein, H. (2007). Reduction of high-affinity beta2-adrenergic receptor binding by hyperforin and hyperoside on rat C6 glioblastoma cells measured by fluorescence correlation spectroscopy. *Biochemistry* 46(17): 5106-5113.
- Rasmussen, P., (1998). St John's wort-A review of its use in depression. *Australian J Med Herbalism*; 10(1): 8-13
- Rego, J. C., Benkiki, N., Chosson, E., Kabouche, Z., Seguin, E., Costentin, J. (2007). Antidepressant-like effect of hyperfoliatin, a polyisoprenylated phloroglucinol derivative from *Hypericum perforatum* (Clusiaceae) is associated with an inhibition of neuronal monoamines uptake. *Eur J Pharmacol* 569(3): 197-203.
- Robson N. K. B., (1977). Studies in the genus *Hypericum* L. (Guttiferae). 1. Infrageneric classification. In *Bull. Brit. Mus. Nat. Hist. (Bot.)* 5 (6), pp. 294–355.
- Robson N. K. B., (1981). Studies in the genus *Hypericum* L. (Guttiferae). 2. Characters of the genus. In: *Bull. Brit. Mus. Nat. Hist. (Bot.)* (8), pp. 55–236.
- Robson N. K. B. (2010). Studies in the genus *Hypericum* L. (Hypericaceae) 5(1). Sections 10. Olympia to 15/16. *Crossophyllum*. - *Phytotaxa* 4, 5-126.
- Řezanka, T., Sigler, K. (2007). Sinaicinone, a complex adamantanyl derivative from *Hypericum sinaicum*. *Phytochemistry* 68(9): 1272-1276.
- Rocha, L., Marston, A., Potterat, O., Kaplan, M. A. C., Hostettmann, K. (1996). More phloroglucinols from *Hypericum brasiliense*. *Phytochemistry* 42(1): 185-188.
- Rocha, L., Marston, A., Potterat, O., Kaplan, M. A. C., Stoeckli-Evans, H., Hostettmann, K. (1995). Antibacterial phloroglucinols and flavonoids from *Hypericum brasiliense*. *Phytochemistry* 40(5): 1447-1452.

Rogers, W. J., Michaux, S., Bastin, M., Bucheli, P., (1999). Changes to the content of sugars, sugar alcohols, myo-inositol, carboxylic acids and inorganic anions in developing grains from different varieties of Robusta (*Coffea canephora*) and Arabica (*C. arabica*) coffees, *Plant Science*, 149, 115-123

Ruhfel, B. R., Bittrich, V., Bove, C. P., Gustafsson, Mats, H. G., Philbrick, C. T., Rutishauser, R. (2011). Phylogeny of the clusioid clade (Malpighiales); evidence from the plastid and mitochondrial genomes. In *Am. J. Bot.* 98 (2), 306–325.

Russo, E., Scicchitano, F., Whalley, B. J., Mazzitello C., Ciriaco, M., Esposito, S., Patanè, M., Upton, R., Pugliese, M., Chimirri, S., Mammì, M., Palleria, C., De Sarro G. (2014). *Hypericum perforatum*: Pharmacokinetic, Mechanism of Action, Tolerability, and Clinical Drug–Drug Interactions. *Phytotherapy Research* 28(5): 643-655.

Saddiqe, Z., Naeem, I., Maimoona, A. (2010). A review of the antibacterial activity of *Hypericum perforatum* L. *J Ethnopharmacol* 131, 511–521.

Saroglou, V., Marin, P. D., Rancic, A., Veljic, M., Skaltsa, H. (2007). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of six *Hypericum* species from Serbia. *Biochem. Syst. Ecol.* 35(3): 146-152.

Schrader, E. (2000). Equivalence of St John's wort extract (Ze 117) and fluoxetine: a randomized, controlled study in mild-moderate depression. *Int Clin Psychopharmacol* 15(2): 61-68.

Schempp, C.M, Kirkin, V., Simon-Haarhaus, B., Kersten, A, Kiss, J., Termeer, C.C, Gilb, B., Kaufmann, T., Borner, C., Sleeman, J.P., Simon J.C. (2002). Inhibition of tumour cell growth by hyperforin, a novel anticancer drug from St. John's wort that acts by induction of apoptosis, *Oncogene*, 21(8):1242-50

Schmidt, M., Butterweck, V. (2015). The mechanisms of action of St. John's wort: an update. *Wien Med Wochenschr* 165(11-12): 229-235.

Shiu, W. K., Rahman, M. M., Curry, J., Stapleton, P., Zloh, M., Malkinson, J. P., Gibbons, S. (2012). Antibacterial Acylphloroglucinols from *Hypericum olympicum*. *J. Nat. Prod.* 75(3): 336-343.

- Singer, A., Wonnemann, M., Müller, W. E. (1999). Hyperforin, a major antidepressant constituent of St. John's wort, inhibits serotonin uptake by elevating free intracellular Na⁺. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 290, 1363-1368.
- Singer, A., Wonnemann, M., Müller, W. E. (2000). Hyperforin alters free intracellular H⁺ and Na⁺ concentration in human platelets [abstract]. Biocenter Symposium on Drug Therapy. Pharmacology of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) and its constituents. Frankfurt, Germany.
- Silvana, D., Petrovic, Ralf Löscher, Momcilo, S., Gorunovic, Irmgard Merfort (1999) Flavonoid and phenolic acid patterns in seven *Hieracium* species, *Biochem. System. Ecol.* 27(6): 651-656
- Smelcerovic, A., Spitteller, M. (2006). Phytochemical analysis of nine *Hypericum* L. species from Serbia and the F.Y.R. Macedonia. *Pharmazie* 61(3): 251-252.
- Schmidt, S., Jürgenliemk, G., Skaltsa, H., Heilmann, J., (2012). Phloroglucinol derivatives from *Hypericum empetrifolium* with antiproliferative activity on endothelial cells, *Phytochemistry*, 77: 218–225.
- Schneider-Yin, X., Kurmanaviciene, A., Roth, M., Roos, M., Fedier, A., Minder, EI., Walt, H., (2009). Hypericin and 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX induce enhanced phototoxicity in human endometrial cancer cells with non-coherent white light. *Photodiagnosis Photodyn Ther.*, 6(1):12-8
- Stahl, E., (1969). *Thin-Layer Chromatography, A Laboratory Handbook*, 2nd. Edit.
- Strasburger, E., (2012). *Lehrbuch der Botanik*. 36. Aufl., neu bearb.; Nachdr. Heidelberg; Spektrum, Akad. Verl.
- Suzuki, O., Y. Katsumata, M. Oya, S. Bladt and H. Wagner (1984). Inhibition of monoamine oxidase by hypericin. *Planta Med* 50(3): 272-274.
- Szegedi, A., Kohnen, R., Dienel, A., Kieser, M. (2005). Acute treatment of moderate to severe depression with hypericum extract WS 5570 (St John's wort): randomised controlled double blind non-inferiority trial versus paroxetine. *BMJ* 330(7490): 503.

Tanaka, N., Kubota, T., Ishiyama, H., Araki, A., Kashiwada, Y., Takaishi, Y., Mikami Y., Kobayashi, J. (2008). Petiolins A-C, phloroglucinol derivatives from *Hypericum pseudopetiolum* var. *kiusianum*. *Bioorganic & medicinal chemistry* 16(10): 5619-5623.

Tanaka, N., Mamemura, T., Shibazaki, A., Gono, T., Kobayashi, J. (2011). Yojironins E-I, prenylated acylphloroglucinols from *Hypericum yojiroanum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 21(18): 5393-5397.

Tanaka, N., Otani, M., Kashiwada Y., Takaishi, Y., Shibazaki A., Gono, T., Shiro, M., Kobayashi J. (2010). Petiolins J-M, prenylated acylphloroglucinols from *Hypericum pseudopetiolum* var. *kiusianum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 20(15): 4451-4455.

Tanaka, N., Takaishi, Y., Shikishima, Y., Nakanishi, Y., Bastow, K., Lee K.-H., Honda G., Ito M., Takeda Y., Kodzhimatov O. K., Ashurmetov, O. (2004). Prenylated Benzophenones and Xanthenes from *Hypericum scabrum*. *J. Nat. Prod.* 67(11): 1870-1875.

Tatsis, E. C., Boeren, S., Exarchou, V., Troganis, A. N., Vervoort, J., Gerothanassis I. P. (2007). Identification of the major constituents of *Hypericum perforatum* by LC/SPE/NMR and/or LC/MS. *Phytochemistry* 68(3): 383-393.

Teufel-Mayer, R., Gleitz, J., (1997). Effects of long-term administration of hypericum extracts on the affinity and density of the central serotonergic 5-HT1 A and 5-HT2 A receptors. *Pharmacopsychiatry*, 30:113-116.

Touafek, O., Nacer, A., Kabouche, A., Kabouche, Z. (2005). Analysis of the essential oil of algerian *Hypericum perforatum* (L). *Flavour and Fragrance Journal* 20(6): 669-670.

Treiber, K., Singer, A., Henke, B., Müller, W.E. (2005). Hyperforin activates nonselective cation channels (NSCCs), *Br J Pharmacol.*; 145(1): 75-83.

Trigas, P., Panitsa, M., Tsiftsis, S., (2013). Elevational Gradient of Vascular Plant Species Richness and Endemism in Crete – The Effect of Post-Isolation Mountain Uplift on a Continental Island System. *PLoS ONE* 8(3), e59425.

Veit, M., Weidner, C., Strack, D., Wray, V., Witte, L., Czygan, F.-C., (1992) The distribution of caffeic acid conjugates in the equisetaceae and some ferns, *Phytochemistry*, 31, 3483-3485.

Verotta, L., Appendino, G., Jakupovic, J., Bombardelli, E. (2000). Hyperforin analogues from St. John's wort (*Hypericum perforatum*). *J. Nat. Prod.* 63, 412-415.

Wagner H., Blatt S., Zgainski E. M. 1983. Drogenanalyse. Dünnschichtchromatographische Analyse von Arzneidrogen. Berlin, New York: Springer.

Wang, C. M., Hsu, Y. M., Jhan, Y. L., Tsai, S. J., Lin, S. X., Su, C. H., Chou C. H. (2015). Structure Elucidation of Procyanidins Isolated from *Rhododendron formosanum* and Their Anti-Oxidative and Anti-Bacterial Activities. *Molecules* 20(7): 12787-12803.

Wellmann, M. (1958). Dioscurides Die Arzneimittellehre des Dioskurides; Berlin-Neuköln, By August Raabe; III: 161 – 162.

Wichtl, M. (1997). Teedrogen und Phytopharmaka, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, pp. 357 – 361.

Williams, C. A., Goldstone F., Greenham, J. (1996), Flavonoids, cinnamic acids and coumarins from the different tissues and medicinal preparations of *Taraxacum officinale*, *Phytochemistry*, 42(1): 121-127

Winkelmann, K., Heilmann, J., Zerbe, O., Rali, T., Sticher, O. (2000). New Phloroglucinol Derivatives from *Hypericum papuanum*. *J. Nat. Prod.* 63(1): 104-108.

Winkelmann, K., Heilmann, J., Zerbe, O., Rali, T., Sticher, O. (2001). Further Prenylated Bi- and Tricyclic Phloroglucinol Derivatives from *Hypericum papuanum*. *Helvetica Chimica Acta* 84(11): 3380-3392.

Winkelmann, K., Heilmann, J., Zerbe, O., Rali, T., Sticher, O. (2001). New Prenylated Bi- and Tricyclic Phloroglucinol Derivatives from *Hypericum papuanum*. *J. Nat. Prod.* 64(6): 701-706.

Winkelmann, K., San, M., Kypriotakis, Z., Skaltsa, H., Bosilij, B., Heilmann J., (2003). Antibacterial and cytotoxic activity of prenylated bicyclic acylphloroglucinol derivatives from *Hypericum amblycalyx*. *Z Naturforsch C* 58(7-8): 527-532.

Woelk, H. (2000). Comparison of St John's wort and imipramine for treating depression: randomised controlled trial. *BMJ* 321(7260): 536-539.

Wu, C.-C., Yen, M.-H., Yang, S.-C., Lin, C.-N. (2008). Phloroglucinols with Antioxidant Activity and Xanthonolignoids from the Heartwood of *Hypericum geminiflorum*. *J. Nat. Prod.* 71(6): 1027-1031.

Wurglics, M., Schubert-Zsilavecz, M. (2006). *Hypericum perforatum*: a 'modern' herbal antidepressant: pharmacokinetics of active ingredients. *Clin. Pharmacokinet.* 45(5), 449-68.

Xiao, Z. Y., Mu, Q., Shiu, W. K. P., Zeng, Y. H., Gibbons, S. (2007). Polyisoprenylated Benzoylphloroglucinol Derivatives from *Hypericum sampsonii*. *J. Nat. Prod.* 70(11): 1779-1782.

Xie, R., Tan, L. H., Polasek, E. C., Hong, C., Teillol-Foo, M., Gordi, T., Sharma, A., Nickens, D. J., Arakawa, T., Knuth, D. W., Antal, E. J. (2005). CYP3A and P-glycoprotein activity induction with St. John's Wort in healthy volunteers from 6 ethnic populations. *J Clin Pharmacol* 45(3): 352-356.

Zdunić, G., Godevac, D., Milenković, M. (2009). Evaluation of *Hypericum perforatum* oil extracts for an anti-inflammatory and gastroprotective activity in rats. *Phytother Res.* 23, 1559–1564.

Zobayed, S. M., Afreen, F., Goto, E., Kozai, T. (2006). Plant-environment interactions: Accumulation of hypericin in dark glands of *Hypericum perforatum*. *Ann Bot* 98(4): 793-804.

<http://hypericum.myspecies.info/taxonomy/term/497>

http://www.cretanflora.com/hypericum_trichocaulon.html

